

网络出版日期:2018-05-09

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180509.1603.006.html

# G族黄曲霉毒素半抗原分子设计、抗原合成及抗体特性

王亚楠<sup>1</sup>, 王晓斐<sup>2</sup>, 牛琳琳<sup>1</sup>, 雷 壮<sup>1</sup>, 张海棠<sup>1</sup>, 王自良<sup>1</sup>

(1. 河南科技学院 动物科技学院, 河南新乡 453003; 2. 河南科技学院 新科学院, 河南新乡 453003)

**摘 要** 根据黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> (Aflatoxin G<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>) 的分子结构和活性位点, 采用半缩醛法(SA)、环氧化物法(EP)和烯醇醚衍生物法(EED)制备 G 族 AF 人工抗原 AFG<sub>1</sub>-BSA, 通过 UV 和 SDS-PAGE 进行鉴定。用 AFG<sub>1</sub>-BSA 免疫 Balb/C 小鼠制备多克隆抗体(AFG<sub>1</sub> pAb), 间接 ELISA 检测 AFG<sub>1</sub> pAb 效价, 阻断 ELISA 分析其敏感性, 交叉反应试验分析其特异性。结果显示, AFG<sub>1</sub>-BSA 合成成功, 3 种合成方法中, SA 法效果最好, AFG<sub>1</sub> 与 BSA 的分子结合比为 4.32 : 1, 间接 ELISA 效价为 1 : (6.4 × 10<sup>3</sup>), 阻断 ELISA 检测其 IC<sub>50</sub> 为 13.6 μg · kg<sup>-1</sup>, 与 AFG<sub>2</sub> 的交叉反应率(CR)为 82.19%, 与 AFB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 无 CR。表明获得高效价、敏感、特异、广谱的 AFG pAb, 为 G 族 AF 和 AF 总量免疫检测方法的建立奠定基础。

**关键词** G 族黄曲霉毒素; 半抗原; 人工抗原; 多克隆抗体; 特性分析

**中图分类号** TS207.3.S859.84

**文献标志码** A

**文章编号** 1004-1389(2018)05-0626-08

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AF)对机体具有急性、慢性、致癌和免疫抑制等毒性作用, 其中以 AFB<sub>1</sub> 毒性最强, 污染广泛, 比例最高(占 50% 以上)。世界上大多数国家对食品中 AFB<sub>1</sub> 最大残留限量(Maximum residue limit, MRL)都做出明确规定<sup>[1-2]</sup>。自然条件下产生的 AF 主要包括 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 4 种, 其污染食品的特点是多种毒素几乎同时存在, 且具有毒性加性效应, 制订 AF 总量(Total aflatoxins, TAFs)(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)的 MRL 及相应检测方法已成为发展趋势<sup>[3]</sup>。至 2013 年, 世界上已有 91 个国家采用 TAFs 限量标准, 如国际食品法典委员会(CAC)、美国食品药品监督管理局(FDA)等规定食品中 TAFs 限量标准为 15 μg · kg<sup>-1</sup>, 日本为 10 μg · kg<sup>-1</sup>, 欧盟为 4 μg · kg<sup>-1</sup>, 中国现有标准尚未涉及 TAFs 限量要求, 但在《GB/T 5009.23-2006 食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的测定》标准中规定了 TAFs 限量的检测方法<sup>[4]</sup>。

食品中 TAFs 分析方法主要有理化分析和免疫分析两类, 其中免疫分析方法由于具有选择性强、灵敏度高、快速简便、样品筛检量大、可现场操

作等优势, 已成为 TAFs 检测研究的热点课题, 并在 TAFs 快速检测中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。高质量的抗体是建立免疫分析的核心试剂, 就目前的研究进展而言, 实现 TAFs 免疫分析的主要途径之一是分别制备针对 B 族 AF 和 G 族 AF 的灵敏度高、特异性强的单一抗体, 之后形成混合通用抗体, 而高质量抗体的制备依赖于半抗原分子设计与抗原合成<sup>[6]</sup>。关于 G 族 AF 抗原合成方法的研究国内外已有相关报道, 但对不同半抗原分子设计、抗原合成及抗体特性比较分析方面的研究尚未见报道。本研究以 AFG<sub>1</sub> 为反应起始原料, 旨在通过不同 AFG<sub>1</sub> 半抗原分子设计与抗原合成方法合成人工抗原, 制备多克隆抗体(pAb), 并对其特性进行分析, 筛选出最佳半抗原分子设计与抗原合成方法, 为特异性强、亲和力高、识别谱广的 G 族 AF 高质量抗体的制备和 TAFs 免疫分析方法的建立奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 试剂 AFB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 标准品, 德国

收稿日期:2017-07-14 修回日期:2017-09-27

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划(2014BAD13B05)。

第一作者:王亚楠,女,硕士研究生,从事动物性食品安全生物技术研究。E-mail:792176339@qq.com

通信作者:王自良,男,教授,博士,主要从事食品安全生物技术研究。E-mail:wangziliang66@126.com

Prio-Lab 公司产品,购自郑州市盈科试剂耗材经营部;牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA),Pierce 公司产品,购自郑州市中原区云科试剂耗材站;辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 抗体(GaRIgG-HRP),华美生物工程有限公司产品。其他试剂市售所得,均为分析纯或色谱纯。试验用水均为三蒸水。

1.1.2 溶液 ELISA 所用稀释液为  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS);洗液为含  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Tween-20(PBST)的 PBS;封闭液为含  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  猪血清的 PBST;包被液为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)。

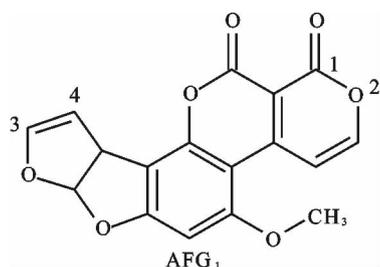
1.1.3 主要仪器 Pharmacia 蛋白质核酸分析仪,Amersham 公司;WD-9403D 型紫外仪,北京六一仪器厂;RF-5301 PC 荧光光谱仪,日本岛津公司;JY-3000 电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;F-4500 型荧光分光光度计,日本日立公司;多功能全自动酶标仪(MK3 型),美国热电公司。

1.1.4 试验动物 SPF 级 4 周龄雌性 Balb/C 小鼠,新乡医学院实验动物中心提供,动物许可号:

SCXK(豫)2010-0002。

## 1.2 方法

1.2.1 G 族 AF 半抗原分子设计与人工抗原合成 以  $\text{AFG}_1$  为起始原料,根据其分子结构上存在的活性基团和活性位点(图 1),参照文献[7-11],采用半缩醛法(semi acetal,SA)、环氧化物法(Epoxyde,EP)、烯醇醚衍生物法(Enol ether derivative,EED)合成  $\text{AFG}_1$ -BSA。



1,2,3,4 表示活性位点 1,2,3 and 4 indicates active sites

图 1  $\text{AFG}_1$  分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of  $\text{AFG}_1$

SA 法:  $\text{AFG}_1$  在  $\text{H}_2\text{SO}_4$  作用下转化为  $\text{AFG}_{2,a}$ ,  $\text{AFG}_{2,a}$  的醛基与 BSA 的氨基生成不稳定的希夫氏碱,在  $\text{NaBH}_4$  的还原作用下,生成稳定的  $\text{AFG}_{2,a}$ -BSA<sup>[7-8]</sup>,合成路线见图 2。

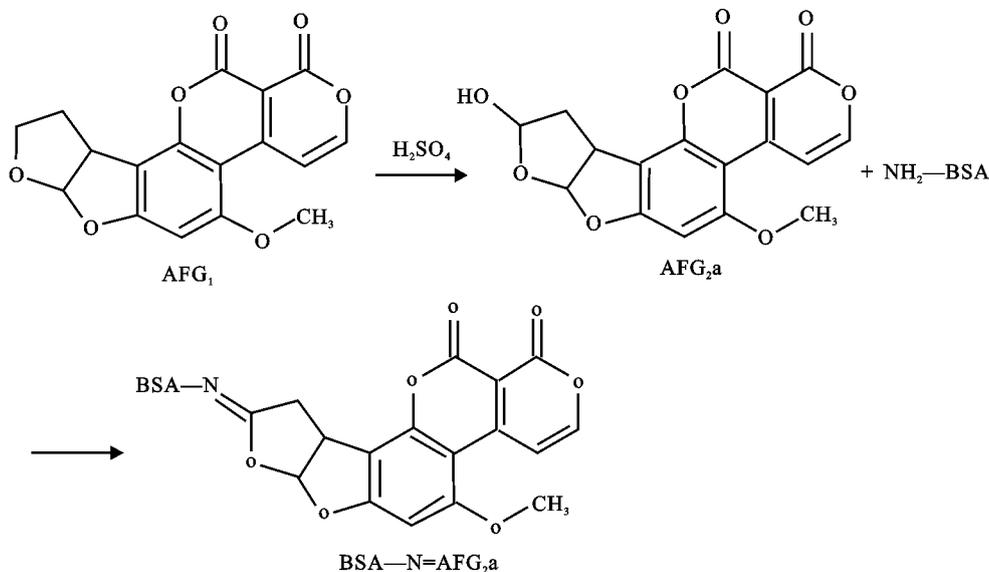


图 2  $\text{AFG}_1$ -BSA SA 法合成路线

Fig. 2 Synthetic route of  $\text{AFG}_1$ -BSA by SA method

EP 法:利用  $\text{AFG}_1$  双呋喃环双键,在氧化作用下,  $\text{AFG}_1$  的 3 位、4 位形成环氧化物,与 BSA 的  $-\text{NH}_2$  反应形成二级胺,以  $-\text{CONH}-$  形式与 BSA 偶联合成  $\text{AFG}_1$ -BSA<sup>[9-10]</sup>,合成路线见图 3。

EED 法:利用  $\text{AFG}_1$  4 位的活性位点,通过添

加乙醇酸连接臂,得到  $\text{AFG}_1$  烯醇醚衍生物 ( $\text{AFG}_1$ -GA),利用  $\text{AFG}_1$ -GA 的羧基与 BSA 偶联合成  $\text{AFG}_1$ -BSA<sup>[11]</sup>,合成路线见图 4。

1.2.2 G 族 AF 人工抗原鉴定 UV 鉴定:称取一定量的  $\text{AFG}_1$ 、BSA 和  $\text{AFG}_1$ -BSA,  $\text{AFG}_1$  用甲

醇溶解,以甲醇作空白对照;BSA 和 AFG<sub>1</sub>-BSA 用甲醇 PBS 溶液[V(甲醇):V(PBS)=4:6]溶解,为空白对照,在波长 200~450 nm 进行紫外扫描,分析扫描图谱,参照文献[12-13]所述方法计算 AFG<sub>1</sub> 与 BSA 的分子结合比。

SDS-PAGE 鉴定:浓缩胶质量浓度为 50 g·L<sup>-1</sup>,电压 90 V;分离胶质量浓度为 120 g·L<sup>-1</sup>,电压 45 V;上样量每孔 10 μL,蛋白

每孔 10 μg;考马斯亮蓝染色,用紫外凝胶成像系统分析软件计算 AFB<sub>1</sub> 与 BSA 的分子结合比。

荧光强度鉴定:称取一定量的 BSA 和 AFG<sub>1</sub>-BSA 溶解于甲醇 PBS 溶液[V(甲醇):V(PBS)=4:6],质量浓度均为 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>,在激发波长 365 nm、发射波长 440 nm 的条件下测定荧光强度。

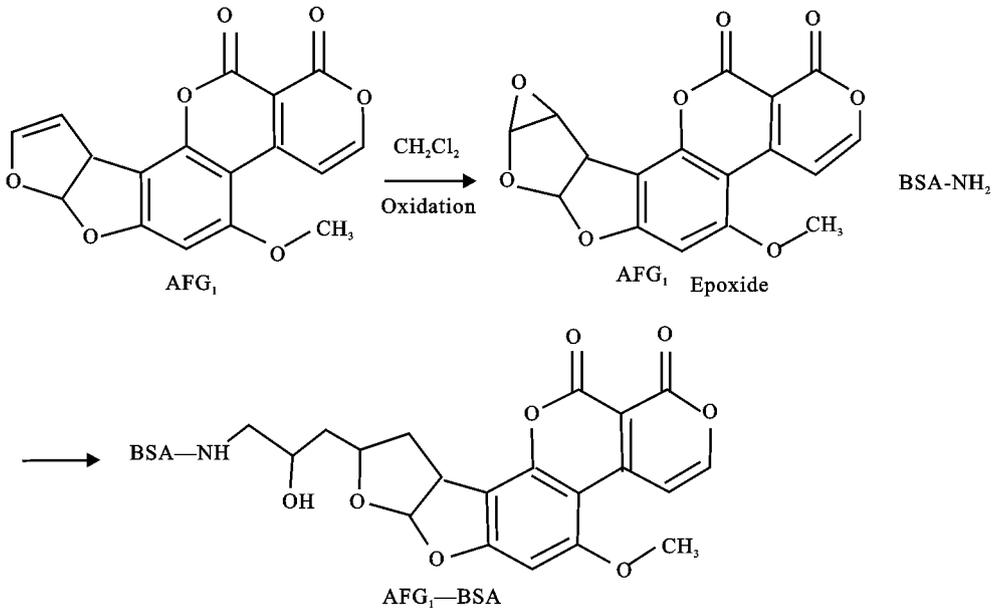


图 3 AFG<sub>1</sub>-BSA EX 法合成路线

Fig. 3 Synthetic route of AFG<sub>1</sub>-BSA by EX method

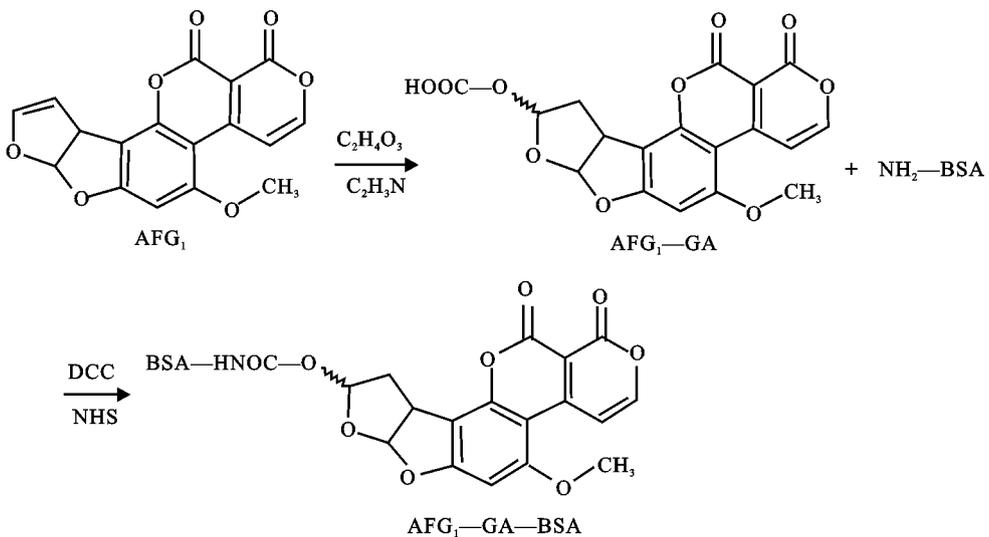


图 4 AFG<sub>1</sub>-BSA EED 法合成路线

Fig. 4 Synthetic route of AFG<sub>1</sub>-BSA by EED method

1. 2. 3 AFG<sub>1</sub> pAb 制备与免疫学特性分析  
 AFG<sub>1</sub> pAb 制备:用 3 种不同方法合成的抗原 AFG<sub>1</sub>-BSA 分别免疫 Balb/C 小鼠,每种抗原免

疫 1 组,共 3 组,每组 5 只。免疫剂量按 AFG<sub>1</sub>-BSA 中 BSA 的量计算,每只 50 μg,体积为 0.2 mL,背部皮下 4~6 点注射,共免疫 5 次,时间间

隔 4 d。最后 1 次免疫后 21 d 摘除眼球眶下窦采血,分离血清,得到 AFG<sub>1</sub> pAb。

AFB<sub>1</sub> pAb 免疫学特性分析:采用间接 ELISA 进行效价检测<sup>[14]</sup>。敏感性鉴定,间接竞争 ELISA (icELISA) 测定 AFG<sub>1</sub> pAb 对 AFG<sub>1</sub> 的 50% 抑制质量浓度 ( $IC_{50}$ ),以  $IC_{50}$  衡量敏感性<sup>[15]</sup>。特异性鉴定,采用交叉反应试验,选择 AFG<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 作为抑制物,icELISA 测定各抑制物的  $IC_{50}$ ,以 AFG<sub>1</sub> pAb 对 AFG<sub>1</sub> 的  $IC_{50}$  与 AFG<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 的  $IC_{50}$  百分比为其交叉反应率 (CR)。

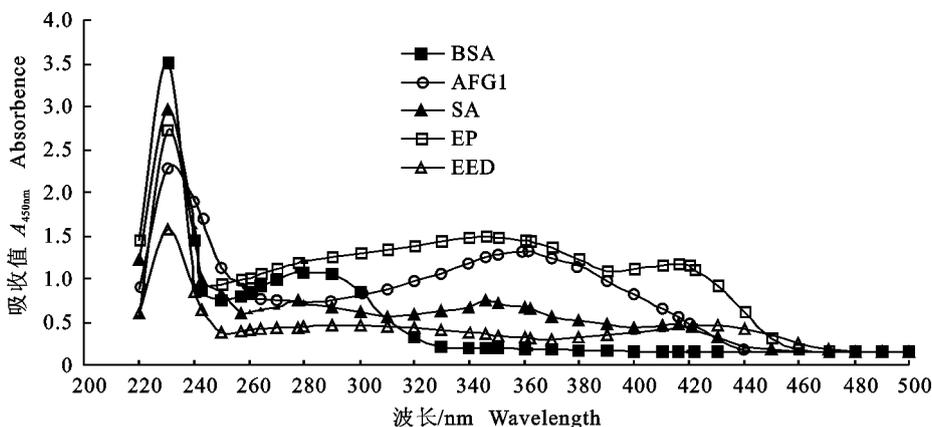


图 5 合成人工抗原 AFG<sub>1</sub>-BSA 的紫外光谱图

Fig. 5 UV spectra of artificial antigen AFG<sub>1</sub>-BSA

表 1 不同偶联方法合成 AFG<sub>1</sub>-BSA 的分子结合比

Table 1 Molecular binding ratio of AFG<sub>1</sub>-BSA by different coupling methods

偶联方法 Coupling method	起始摩尔比 Initial molar ratio	产物分子结合比 Products molar ratio	AFG <sub>1</sub> 利用率/% Usage ratio of AFG <sub>1</sub>
SA	50 : 1	4.32 : 1	8.64
EP	50 : 1	6.24 : 1	12.48
EED	50 : 1	2.56 : 1	5.12

注:由于 BSA 的相对分子质量为 66 200, AFG<sub>1</sub> 为 328, BSA 远大于 AFG<sub>1</sub>,因而在计算利用率时,设定 BSA 被 100% 利用。

Note: Due to relative molecular mass of BSA is 66 200, AFG<sub>1</sub> is 328, the relative molecular mass of BSA is much larger than that of AFG<sub>1</sub>, so in the calculation of usage ratio of BSA, set BSA to be used by 100%.

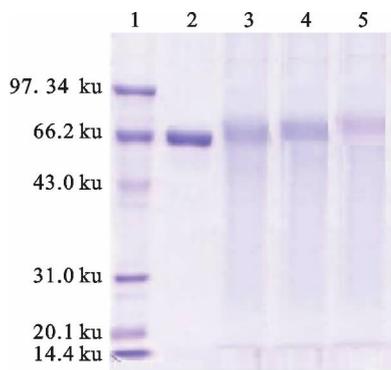
2.1.2 SDS-PAGE 鉴定 由图 6 可知,3 种方法合成的免疫原 AFG<sub>1</sub>-BSA 在凝胶板上的迁移速率小于 BSA,表明 AFG<sub>1</sub>-BSA 的 MW 大于 BSA,说明 AFG<sub>1</sub>-BSA 合成成功。

2.1.3 荧光强度鉴定 由图 7 可知,在相同激发光源、相同蛋白质质量浓度 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 条件下,3 种方法合成的抗原与 BSA 相比,荧光强

## 2 结果与分析

### 2.1 G 族 AF 人工抗原鉴定

2.1.1 UV 鉴定 由图 5 可知,BSA 的最大吸收峰在 278 nm, AFG<sub>1</sub> 在 200~500 nm 有 243、257、264 和 362 nm 4 个吸收峰,最大吸收峰在 362 nm。SA 和 EP 均在 346 nm 和 413 nm 出现特征吸收峰, EED 在 423 nm 出现特征吸收峰,与 BSA 和 AFG<sub>1</sub> 有不同的紫外吸收特征,表明采用 3 种方法均成功合成人工抗原 AFG<sub>1</sub>-BSA。AFG<sub>1</sub> 与 BSA 的分子结合比见表 1。



1. Marker; 2. BSA; 3. SA; 4. EP; 5. EED

图 6 合成人工抗原 AFG<sub>1</sub>-BSA 的蛋白凝胶电泳图

Fig. 6 Photo of artificial antigen AFG<sub>1</sub>-BSA by SDS-PAGE 度均有不同程度增强,表明完全抗原合成成功。

### 2.2 AFG<sub>1</sub> pAb 免疫学特性分析

2.2.1 效价测定 由图 8 可知,经 5 次免疫后,每组挑选出 1 只效价最高的小鼠,共挑选出 3 只,间接 ELISA 测定其效价,并进行比较,3 只小鼠的 AFG<sub>1</sub> pAb 效价均达到  $1 : (1.6 \times 10^3)$  以上,说明合成的 3 种完全抗原 AFG<sub>1</sub>-BSA 均具有很

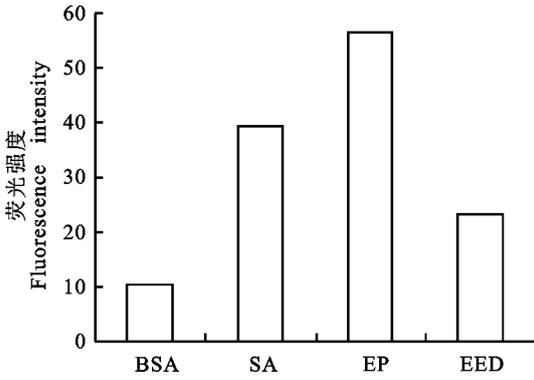


图7 合成人工抗原 AFG<sub>1</sub>-BSA 的荧光强度

Fig. 7 Fluorescence intensity of artificial antigen AFG<sub>1</sub>-BSA

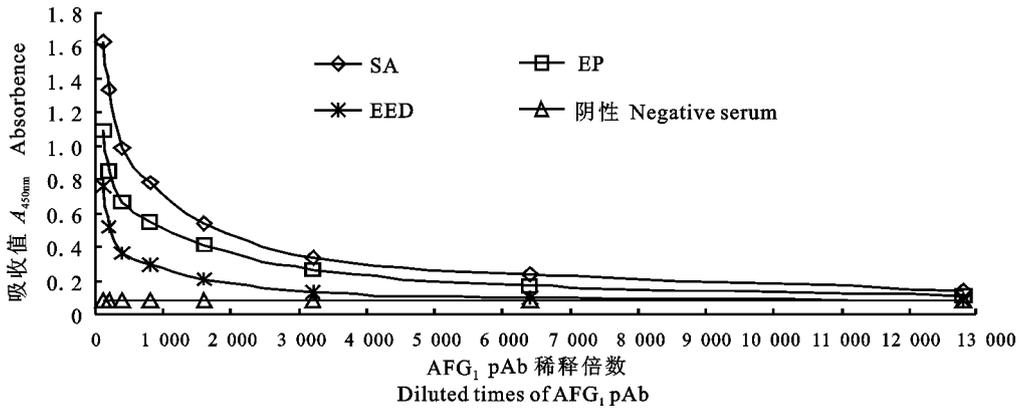


图8 AFG<sub>1</sub> pAb 效价测定曲线

Fig. 8 Curves of AFG<sub>1</sub> pAb titration

合成抗原免疫动物后获得的 AFG<sub>1</sub> pAb 均能 100% 识别 AFG<sub>1</sub>, 其中 AFG<sub>1</sub> pAb(SA) 敏感性最好, IC<sub>50</sub> 为 13.6 μg · kg<sup>-1</sup>, 广谱性也最好, 与 AFG<sub>2</sub> 的 CR 为 82.19%, 与 AFB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 的 CR 均小于 10%。AFG<sub>1</sub> pAb(EP) 具有较好的敏感性, IC<sub>50</sub> 为 20.28 μg · kg<sup>-1</sup>, 但广谱性较差, 与其他 AF 的 CR 均小于 10%。AFG<sub>1</sub> pAb(EED) 对 AFG<sub>1</sub> 的敏感性较差, IC<sub>50</sub> 为 65.32 μg · kg<sup>-1</sup>。结果表明, 半缩醛法制备的 AFG<sub>1</sub>-BSA 敏感性高、特异性强、广谱性最好。

### 3 讨论

#### 3.1 AF 人工抗原合成路径

高质量的抗体是建立免疫分析方法的核心试剂, 就目前的研究进展而言, 实现 TAFs 总量免疫分析的途径有两条, 一是分别制备 B 族 AFs 和 G 族 AFs 灵敏度高、特异性强的单一抗体, 之后混

好的免疫原性, 按效价评价 3 组的免疫效果, 顺序依次为 SA、EP 和 EED。

2.2.2 敏感性分析 由图 9 可知, 免疫后挑选出效价最高的 3 只小鼠的阻断 ELISA 曲线呈良好的线性关系, 将 A<sub>450nm</sub> 值转化为 B/B<sub>0</sub>%, 再对 lg[AFG<sub>1</sub>/100] 进行回归分析, 均符合线性关系的判定标准。该 3 只小鼠血清 AFG<sub>1</sub> pAb 抑制曲线的回归方程、R<sup>2</sup> 值和 IC<sub>50</sub> 值见表 2, 其中抑制效果最好的是 SA 组小鼠的血清, IC<sub>50</sub> 为 13.6 μg · kg<sup>-1</sup>, 其次是 EP 组 (20.28 μg · kg<sup>-1</sup>), EED 组小鼠的敏感性较差。

2.2.3 特异性分析 由表 3 可知, 3 种偶联方法

合为混合通用抗体, 该方法目前较为常用, 并取得很好的应用效果; 二是制备能够同时识别 AF B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 且灵敏度高、识别谱广的单一通用抗

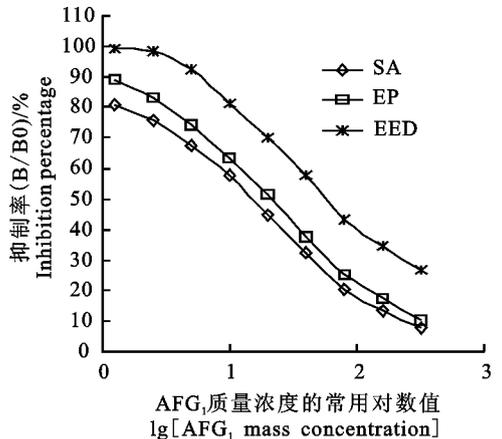


图9 AFG<sub>1</sub> pAb 对 AFG<sub>1</sub> 的抑制曲线

Fig. 9 Inhibition curves of AFG<sub>1</sub> pAb against AFG<sub>1</sub>

表 2 AFB<sub>1</sub> pAb 对 AFB<sub>1</sub> 抑制曲线的回归方程、R<sup>2</sup> 值和 IC<sub>50</sub> 值  
Table 2 Regression equation, R<sup>2</sup> and IC<sub>50</sub> of AFB<sub>1</sub> pAb against AFB<sub>1</sub>

序号 Serial number	回归方程 Regression equation	R <sup>2</sup> 值 R <sup>2</sup> value	IC <sub>50</sub> / (μg · L <sup>-1</sup> )
1	y = -33.184x + 87.671	0.988 3	13.60
2	y = -35.178x + 95.975	0.992 2	20.28
3	y = -33.329x + 110.48	0.977 9	65.32

注:“y”表示抑制率,即不同质量浓度 AFG<sub>1</sub> 标准品溶液 A<sub>450</sub> 值与空白溶液 A<sub>450</sub> 值的百分率;“x”表示不同质量浓度 AFG<sub>1</sub> 标准品溶液的常用对数值。

Note: “y” indicates the inhibition percentage, that is the percentage of A<sub>450</sub> value of AFG<sub>1</sub> standard solution with different mass concentration and A<sub>450</sub> value of blank solution; “x” indicates the common logarithm value of AFG<sub>1</sub> standard solution with different mass concentration.

表 3 AFG<sub>1</sub> pAb 与 AFB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的交叉反应  
Table 3 Percent cross-reactivity of AFG<sub>1</sub> pAb with AFB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>

AF	SA		EP		EED	
	IC <sub>50</sub> / (μg · L <sup>-1</sup> )	交叉反应率/% Cross-reactivity	IC <sub>50</sub> / (μg · L <sup>-1</sup> )	交叉反应率/% Cross-reactivity	IC <sub>50</sub> / (μg · L <sup>-1</sup> )	交叉反应率/% Cross-reactivity
B <sub>1</sub>	>1×10 <sup>3</sup>	<10	>1×10 <sup>3</sup>	<10	>1×10 <sup>3</sup>	<10
B <sub>2</sub>	>1×10 <sup>3</sup>	<10	>1×10 <sup>3</sup>	<10	>1×10 <sup>3</sup>	<10
G <sub>1</sub>	13.6	100	20.28	100	65.32	100
G <sub>2</sub>	16.55	82.19	>1×10 <sup>3</sup>	<10	>1×10 <sup>3</sup>	<10

体,这是最为理想的技术方法,但制备这种高质量的单抗较为困难。由于 AF 是小分子半抗原,必须合成人工免疫原,借助活化的 T 细胞辅助 B 细胞增殖及分化,从而获得合格的抗体。

### 3.2 G 族 AF 人工免疫原合成方法及免疫效果

由于对 G 族 AF 半抗原分子设计、抗原合成方法及所产生抗体特性的研究起步较晚,综合分析上述 3 种方法,笔者认为,半缩醛法效果最优,将 AFG<sub>1</sub> 酸化形成 AFG<sub>2</sub>a,利用 AFG<sub>2</sub>a 的 3 位羟基活性基团,以希夫氏碱为间隔臂合成抗原,所产生抗体具有效价高、敏感性好、特异性强和识别谱广的特性。环氧化物法可以诱导机体快速产生抗体,但其敏感性方面不及半缩醛法。烯醇醚衍生物法存在明显的缺陷,诱导机体产生抗体的能力较差,且产生的抗体对 AFG<sub>1</sub> 的敏感性较差,因此,该方法在科学研究中具有较好的应用价值,但实际生产中应用很少。

### 3.3 AF 人工免疫原合成方法的发展趋势

由于 AFB<sub>1</sub> 与其他 AF 污染密切相关,AFB<sub>2</sub> 污染伴随 AFB<sub>1</sub>,高浓度 AFB<sub>1</sub> 对 AFG<sub>1</sub> 和 AFG<sub>2</sub> 有抑制作用,因此,对于食品 AF 污染免疫检测评价方法有两种,包括中国在内部分国家采用 AFB<sub>1</sub> 限量标准,但为解决多种毒素污染同时存在且具有毒性叠加效应及在检测标准方面的相应

缺失,部分国家采用 AF 总量(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)限量标准。鉴于此,AF 免疫分析技术的研究重点在于通过 AF 半抗原分子设计与抗原合成,一方面提高抗体对 AFB<sub>1</sub> 识别的敏感性和特异性,满足对 AFB<sub>1</sub> 限量标准的要求;另一方面,提高抗体对 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 识别的敏感性和广谱性,满足对 AF 总量限量标准的要求。目前,AF 半抗原分子设计与抗原合成仍停留在经验设计与预测设计层面,多采用试错法(Trial-and-error assays)进行,尽管对合成的人工抗原已建立红外(IR)、紫外(UV)、质谱(MS)、凝胶电泳(SDS-PAGE)和核磁共振(NMR)等多种鉴定方法,但最终是需通过动物试验验证其科学性和合理性,一定程度上存在盲目性和偶然性<sup>[16]</sup>。随着分子免疫学、量子化学、分子力学等新型学科的兴起,分子信息技术、分子模拟技术、计算机辅助技术的推广应用,这些为提高半抗原分子设计与抗原合成的合理性、时效性和预见性提供可供借鉴的理论与方法<sup>[17-19]</sup>。Kim 等<sup>[20]</sup>通过计算机辅助技术,制备出特异性强、识别谱广的 TAFs mAb,对 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 的 IC<sub>50</sub> 分别为 4.36、7.22、6.61、29.41 μg · kg<sup>-1</sup>,以 ELISA 技术模式实现 TAFs 检测。周茜等<sup>[21]</sup>借助分子模拟技术,成功制备 G 族 AF mAb,对 AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>

的  $IC_{50}$  分别为 17.18、19.75  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 并建立 AF G 族 ELISA 检测方法。

## 4 结论

根据 AFG<sub>1</sub> 的分子结构和活性位点, 采用 SA 法、EP 法和 EED 法 3 种方法制备 G 族 AF 人工免疫原 AFG<sub>1</sub>-BSA, 通过 UV、SDS-PAGE 和荧光强度测定对合成的人工抗原进行鉴定。结果表明, 在 G 族 AF 人工免疫原合成的 3 种方法中, SA 法效果最好, AFG<sub>1</sub> 与 BSA 的分子结合比为 4.32 : 1, 动物免疫所产生的 AFG<sub>1</sub> pAb 具有效价高、敏感、特异、广谱等特性。研究结果为 G 族 AF 和 AF 总量免疫检测方法的建立奠定基础。

## 参考文献 Reference:

- [1] HABIBIPOUR R, TAMANDEGANI P R, FARMANY A. Monitoring of aflatoxin G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, and B<sub>2</sub> occurrence in some samples of walnut[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2016, 188(12): 669.
- [2] 王亚楠, 王晓斐, 牛琳琳, 等. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 半抗原分子设计与抗原合成及抗体特性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(23): 367-376.  
WANG Y N, WANG X F, NIU L L, *et al.* Research progress in hapten molecule design and immunogen synthesis and antibody characteristics of aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(23): 367-376.
- [3] AIKO V, MEHTA A. Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins [J]. *Journal of Biosciences*, 2015, 40(5): 943-954.
- [4] 马海华, 孙榭舟, 甄 彤, 等. 我国国家标准和行业标准中黄曲霉毒素测定方法综述[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(6): 360-366.  
MA H H, SUN J ZH, ZHENG T, *et al.* A review on aflatoxins determination methods in China's national and industry standards[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(6): 360-366.
- [5] SIAHI SHABAD M R, ANSARIN M, TAHAVORI A, *et al.* Determination of aflatoxins in nuts of Tabriz confectionaries by ELISA and HPLC methods [J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 2(1): 123-126.
- [6] GEFEN T, VAYA J, KHATIB S, *et al.* The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity [J]. *Immunology*, 2015, 144(1): 116-126.
- [7] CHU F S, STEINERT B W, GAUR P K. Production and characterization of antibody against aflatoxin G<sub>1</sub> [J]. *Journal of Food Safety*, 1985, 7(3): 161-170.
- [8] LI P W, ZHOU Q, WANG T, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay method specific for the detection of G-group aflatoxins [J]. *Toxins*, 2016, 8(1): 5-15.
- [9] MARYIN C N, GARNER R C. Aflatoxin B<sub>1</sub>-oxide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B<sub>1</sub> causes guanine substitution in nucleic acids [J]. *Nature*, 1977, 267(5614): 863-865.
- [10] ZHANG J Y, LI P W, ZHANG W, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin g(1) [J]. *Hybridoma*, 2009, 28(1): 60-70.
- [11] LYER R S, HARRIS T M. Preparation of aflatoxin B<sub>1</sub> 8, 9-epoxide using m-chloroperbenzoic acid [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1993, 6(3): 313-316.
- [12] 王亚楠, 王淑云, 张海棠, 等. 抗重金属 Cd<sup>2+</sup> 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及其免疫学特性鉴定 [J]. *西北农业学报*, 2014, 23(11): 24-29.  
WANG Y N, WANG SH Y, ZHANG H T, *et al.* Establishment of hybridoma cell lines secreting anti-cadmium ion monoclonal antibody and identification of their immunological properties [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2014, 23(11): 24-29.
- [13] 王亚楠, 丁 蕊, 王晓斐, 等. 抗重金属 Cr<sup>3+</sup> 单克隆抗体的研制及其免疫学特性分析 [J]. *西北农业学报*, 2016, 25(11): 1597-1602.  
WANG Y N, DING H, WANG X F, *et al.* Preparation of anti-chromium ion monoclonal antibodies and analysis of their immunological properties [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2016, 25(11): 1597-1602.
- [14] 张金阳, 李培武, 张 文, 等. 黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 人工抗原的合成 [J]. *食品科学*, 2008, 29(6): 194-197.  
ZHANG J Y, LI P W, ZHANG W, *et al.* Synthesis of aflatoxin G<sub>1</sub> artificial antigen [J]. *Food Science*, 2008, 29(6): 194-197.
- [15] LI P W, ZHOU Q, WANG T, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay method specific for the detection of G-group aflatoxins [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 8(1): 1-11.
- [16] 管 露, 张银志, 杨婷婷, 等. 百草枯半抗原分子设计合成及表征 [J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(5): 524-528.  
GUAN L, ZHANG Y ZH, YANG T T, *et al.* Synthesis and characterization of the hapten for paraquat [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(5): 524-528.
- [17] XU Z L, SHEN Y D, BEIER R S, *et al.* Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants: a review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 647(2): 125-136.
- [18] SEVY A M, MEILER J. Antibodies: computer-aided prediction of structure and design of function [J]. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2(6): 1-14.
- [19] KORTKHONJIA E, BRANDMAN R, ZHPU J Z, *et al.* Probing antibody internal dynamics with fluorescence anisotropy and molecular dynamics simulations [J]. *Mabs*, 2013, 5(2): 306-322.

- [20] KIM S H, CHA S H, KARYN B, *et al.* Production of group specific monoclonal antibody to aflatoxins and its application to enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Toxicol Research*, 2011, 27(2):125-131.
- [21] 周 茜, 张 文, 张 奇, 等. 黄曲霉毒素 G 族人工抗原的

合成与免疫效果研究[J]. 化学试剂, 2010, 32(10): 869-872, 876.

ZHOU Q, ZHANG W, ZHANG Q, *et al.* Synthesis of aflatoxin G class artificial antigen [J]. *Chemical Reagents*, 2010, 32(10): 869-872, 876.

## Hapten Molecular Design and Antigen Synthesis and Antibody Characterization of G-group Aflatoxins

WANG Yanan<sup>1</sup>, WANG Xiaofei<sup>2</sup>, NIU Linlin<sup>1</sup>, LEI Zhuang<sup>1</sup>,  
ZHANG Haitang<sup>1</sup> and WANG Ziliang<sup>1</sup>

(1. Animal Science and Technology College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang Henan 453003, China;

2. School of Xinke, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang Henan 453003, China)

**Abstract** According to molecular structure and active site of aflatoxin G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), the G-group AF artificial antigen AFG<sub>1</sub>-BSA was prepared by using three methods SA, EP and EED and identified by UV and SDS-PAGE. Polyclonal antibodies against AFG<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub> pAb) were prepared by immunizing Balb/C mice with AFG<sub>1</sub>-BSA, and the titers of AFG<sub>1</sub> pAb was detected by indirect ELISA, the sensitivity of AFG<sub>1</sub> pAb was analyzed by blocking ELISA and the specificity of AFG<sub>1</sub> pAb was analyzed by cross reactivity (CR) test. The results showed that AFG<sub>1</sub>-BSA was synthesized successfully and the best one was SA method among three synthesis methods of G-group AF artificial antigen and its conjugation ratio of AFG<sub>1</sub> to BSA was about 4.32 : 1. The immune efficacy of SA method was the best, its AFG<sub>1</sub> pAb had high titers of 1 : (6.4 × 10<sup>3</sup>) by indirect ELISA, a good sensitivity with the 50% inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) of 13.6 μg · kg<sup>-1</sup> to AFG<sub>1</sub> by blocking ELISA and a high CR to AFG<sub>2</sub> of 82.19%, little or no CR to AFB<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. The high-titer, sensitive, specific and broad G-group pAb were produced in sera of immunized Balb/C mice, which it was possible to establish immunoassay of G-group AF and total AF residues in food and agricultural products.

**Key words** G-group aflatoxins; Hapten; Artificial antigen; Polyclonal antibody; Specificity analysis

**Received** 2017-07-14

**Returned** 2017-09-27

**Foundation item** Special Project of the National Science & Technology Pillar Program during the 12th Five-Year Plan (No. 2014BAD13B05).

**First author** WANG Yanan, female, master student. Research area: biotechnology of food safety. E-mail: 792176339@qq.com

**Corresponding author** WANG Ziliang, male, professor, Ph. D. Research area: biotechnology of food safety. E-mail: wangziliang1966@126.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)