

以赭曲霉毒素 A 多克隆抗体建立直接竞争酶联免疫吸附分析方法研究

Development of Direct Competitive ELISA for Ochratoxin A Assay

刘运龙

LIU Yun-long

(广西粮油科学研究所,广西南宁 530001)

(Guangxi Grain and Oil Scientific Institute, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要:将赭曲霉毒素 A(OA)抗原免疫大白兔制备多克隆抗体,建立直接竞争酶联免疫吸附分析方法(ELISA)。结果多克隆抗体的效价高达 1:21 万。建立的直接竞争 ELISA 检测方法的下限为 0.05ng/ml,线性范围 0.05~51.2ng/ml,OA 添加到玉米粉中的样品回收率达到 94.8%。

关键词:酶联免疫吸附法 赭曲霉毒素 A 多克隆抗体

中图分类号:Q5-33,R446.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2010)03-0244-03

Abstract: Ochratoxin A(OA)-KLH conjugates were mixed with adjuvant and injected into rabbit hypoderm to produce anti-serum. The anti-OA polyclonal antibodies were purified with affinity chromatographic column and used to establish direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that the line arrangement of the assay was between 0.05 and 51.2ng/ml. The lowest detectable amount of OA was 0.05ng/ml. OA recovery from corn flour with OA reached to 94.8%.

Key words: ELISA, ochratoxin A, polyclonal antibody

赭曲霉毒素是曲霉属和青霉属的某些菌种产生的次级代谢有毒产物,属烈性的肝脏和肾脏毒素。这类毒素包括 7 种结构类似的化合物,其中毒性最大,对农作物污染最严重,分布最广泛的是赭曲霉毒素 A(OA),OA 被证实有致癌、致畸、致突变的作用,还具有免疫抑制性^[1],国际癌症研究机构 IARC 将 OA 定位为 2B 类致癌物(即可能引起人类癌症的物质)^[2]。OA 的产毒菌株广泛地存在于自然界中,在谷类和人血清等样品中都检出过 OA 残留^[2,3],严重危害人类的健康。由于 OA 的危害性,各国都立法对食品中 OA 的残留进行限定。至今已有多个国家制定了食品(1~50 μ g/kg)和动物饲料(100~1000 μ g/kg)的 OA 限量标准。及时进行检测和分析是预防和控制 OA 危害的有效手段。

酶联免疫吸附法(ELISA)是近年兴起的一种简便、快速、灵敏度高的检测方法,该检测方法无需贵重仪器设备,对样品纯度要求不高,而且可以定性定量检测样品,适用于大批量样品的检测,在食品残毒和有害物质的快速检测领域有着极高的应用价值。ELISA 检测方法因其简便快速、灵敏度高等特点,已经在 OA 的检测中开始应用。Kawamura^[4]等建立的 ELISA 分析的方法,OA 检测下限可达 50pg/ml。阳传和等^[5]建立的 ELISA 方法,OA 检测下限为 2~2.5ng/ml。刘仁荣^[6]用 OA 单克隆抗体建立的间接竞争 ELISA 检测方法的检测下限为 0.15 μ g/ml,线性范围为 200~6000pg/ml,提高了 OA 的检测下限。ELISA 方法的基本原理是抗原抗体的反应,需要有灵敏度高、特异性强的抗体为基础。OA 是小分子半抗原,作为半抗原只有反应原性而无免疫原性,必须与分子量大的免疫原性强的载体蛋白,如钥孔戚血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)等耦联,借助大分子的 T 细胞表位刺激动物

收稿日期:2009-08-20

修回日期:2010-04-12

作者简介:刘运龙(1962-),男,工程师,主要从事粮油饲料产品开发及其快速检测技术的研究。

机体才能产生抗体特异性免疫应答,产生针对小分子抗原的抗体。本文通过制备高效价的 OA 多克隆抗体,并在此基础上建立 OA 直接竞争酶联免疫吸附分析方法。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

OA 标准品为澳大利亚 Fermentek 公司产品,OA-BSA 耦联物、OA-KLH 耦联物以及辣根过氧化物酶标记的 OA(OA-HRP)均为加拿大 Immunechem 公司产品。牛血清白蛋白(BSA)、福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂为中国兽药监察所产品。TMB 显色液为加拿大 MOSS 公司产品;TGL-16G 离心机为上海安亭科学仪器公司产品;微量移液器为上海大龙公司产品;酶标仪为南京华东为公司产品;酶标板为美国 Corning 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 OA 多克隆抗体的制备与效价测定

将福氏不完全佐剂与 OA-KLH 耦联物充分乳化 成免疫原,按常规方法免疫 2~4kg 体重的兔子。首免剂量为每只兔子 0.5mg。加强免疫剂量为每只兔子 0.25mg,经 3 次加强免疫后,采集兔子血液制备血清。将血清过 OA 亲和色谱提纯柱,洗脱后用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)透析脱盐。按 5 μ g/ml 包被 OA-BSA 耦联物,4 $^{\circ}$ C 过夜,次日用含有 0.1% Tween20 的 PBS 溶液(PBS_t)漂洗,拍干。再用含有 1% BSA 的 PBS 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h。PBS_t 漂洗,拍干。用含 0.01% BSA 的 PBS 按 1:1000 稀释,然后按 1:2 稀释到下一孔,依次类推,最后一孔设为空白对照。37 $^{\circ}$ C 反应 1h 后,PBS_t 漂洗 3 次,拍干。按每孔 100 μ l 加入用含 0.01% BSA 的 PBS 按 1:5000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP,37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后,PBS_t 漂洗 3 次,拍干。按每孔 100 μ l 加入 TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 反应 15min 后,加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪测定 450nm 波长光密度值(OD 值)。

1.2.2 OA 直接竞争 ELISA 方法的建立

用外加法测定玉米粉 OA 含量建立直接竞争 ELISA 标准曲线。使用方阵滴定法确定最佳的抗体包被浓度(1.5 μ g/ml)、抗原、酶标抗原工作液以及反应时间,并根据确定的最佳的体系建立 OA 直接竞争 ELISA 的标准曲线。OA 抗体用 PBS 包被,37 $^{\circ}$ C 放置 30min,再置 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日拍干,用 PBS_t 洗涤 2 次,按每孔 100 μ l 加 1%BSA-PBS_t 37 $^{\circ}$ C 30min 封闭后拍干,室温风干后用锡珀纸真空包装,4 $^{\circ}$ C 保存备用。测定由冰箱取出放置至室温,用 PBS_t 洗涤 2 次,按每

孔 50 μ l 加入不同浓度的 OA 标准液,混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 10min。再按每孔 50 μ l 加入 OA-HRP 工作液。混匀后 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min,拍干,PBS_t 洗涤 4 次,按每孔 100 μ l 加入 TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 反应 15min 后,加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪测定 450nm 波长光密度值(OD 值)。根据 450nmOD 值作出标准曲线。

1.2.3 样品提取实验

在不含 OA 的 0.1g 玉米粉中加入不同量的 OA 标准品(0ng/ml,0.01ng/ml,0.05ng/ml,0.2ng/ml,0.8ng/ml,3.2ng/ml,51.2ng/ml),密封,室温过夜。次日按每管 180 μ l 加入甲醇(含 0.01%乙酸)溶液萃取 1h,10000g 离心 10min 后取上清液,加入等体积的 PBS 稀释,取 50 μ l 进行直接竞争 ELISA 测定,记录 OD 值并建立标准曲线,推导出公式,计算回收率。

2 结果与分析

2.1 OA 多克隆抗体的效价测定

由图 1 的结果可以看出,OA 的滴度最高可达到 1:21 万,表明获得了效价极高的特异性抗体。

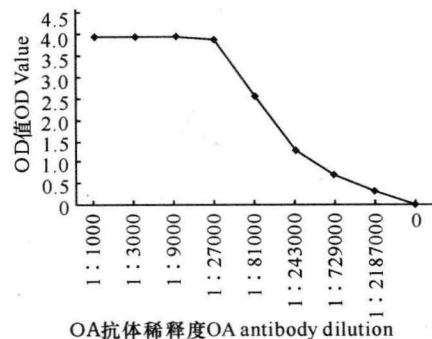


图 1 OA 多克隆抗体效价

Fig. 1 Titre of ochratoxin A polyclonal antibody

2.2 直接竞争 ELISA 标准曲线的建立

以不同浓度 OA 竞争后的 OD 值为纵坐标,OA 浓度(ng/ml)为横坐标,用外加法测定玉米粉 OA 含量,建立的直接竞争 ELISA 标准曲线见图 2。从图 2 中可以看出,直接竞争 ELISA 检测 OA 的下限为 0.05ng/ml,线性范围为 0.05~51.2ng/ml,50%的 OA 抑制浓度达到 3ng/ml。

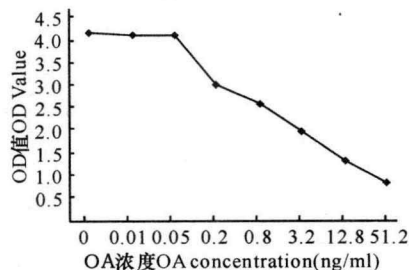


图 2 OA 直接竞争 ELISA 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of direct competitive ELISA

2.3 样品回收率

由直接竞争 ELISA 标准曲线推导出的线性回归方程为 $Y = -0.6299x + 4.6027$, 相关系数 $R^2 = 0.995$ (图 3), 依据方程计算得到样品回收率为 94.8%。

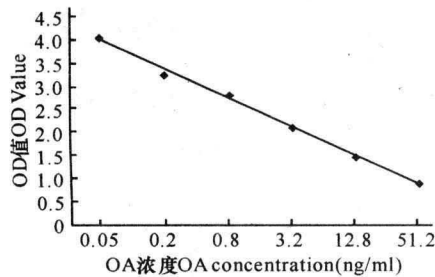


图 3 线性回归方程

Fig. 3 Linear regression equation

3 结束语

本实验利用 OA-KLH 免疫兔子后, 产生了良好的免疫效果, 获得了高效价的血清抗体。经亲和色谱提纯多克隆抗体后建立的 OA 直接竞争酶联免疫吸附分析方法, 其检测下限为 0.05ng/ml, 线性范围为 0.05~51.2ng/ml, 具有较高的敏感度和良好的线性范围。将 OA 添加到玉米粉样品中, 用直接竞争酶联

免疫吸附分析方法检测经萃取后的上清液, 样品 OA 的回收率高达 94.8%。这些实验结果为下一步试剂盒的研发奠定了基础。

参考文献:

- [1] Krogh P, Hald B, Pedersen E J. Causal association of mycotoxic nephropathy[J]. Acta path microbiol scand, 1978, 269(Suppl):1-28.
- [2] 高翔, 李梅, 张立实. 赭曲霉毒素 A 的毒性研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2005, 32(1): 51-55.
- [3] GB/T5009.96-2003. 谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [4] Kawamura O, Sato S, Kajii H, et al. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies[J]. Toxicon, 1989, 27: 887-97.
- [5] 阳传和, 罗雪云, 李业鹏, 等. 抗赭曲霉毒素 A 单克隆杂交瘤细胞系的建立及特性[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1992, 8(2): 17-21.
- [6] 刘仁荣, 余宙, 何庆华, 等. 以赭曲霉毒素 A 单克隆抗体建立竞争酶联免疫吸附分析方法的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 174-177.

(责任编辑: 韦廷宗)

(上接第 241 页 Continue on page 241)

- [3] Utsumi Y. Variational analysis of ridged waveguide modes[J]. IEEE trans microwave theory tech, 1985, 33(2): 111-120.
- [4] Sun W, Balanis C A. Analysis and design of quadruple ridged waveguides[J]. IEEE Trans Microwave Theory Tech, 1994, 42(12): 2201-2207.
- [5] Balaji, Vahldieck U. Radial mode matching analysis of ridged circular waveguides[J]. IEEE Trans Microwave Theory Tech, 1996, 44(7): 1183-1186.
- [6] Hellszajn J, McKay M. Voltage-current definition of impedance of double ridge waveguide using the finite

element method[J]. IEEE Proc Microwaves, antennas and propagation, 1998, 145(1): 39-44.

- [7] 金永兴, 徐江峰, 王剑锋. 脊形波导有限差分法分析[J]. 中国计量学院学报, 2003, 14(2): 114-116.
- [8] 牛家晓, 张祺, 周希朗, 等. 梯形脊形金属波导传输特性的二维频域有限差分法分析[J]. 应用科学学报, 2006, 24(6): 569-572.
- [9] 何红雨. 电磁场数值计算与 MATLAB 实现[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2005: 18-20.

(责任编辑: 韦廷宗)