

赭曲霉毒素 A 模拟表位的筛选及免疫学鉴定

王 耀^{1,2} 胡晓飞¹ 裴亚峰¹ 赵 东¹ 刘运超¹ 张改平¹ 李志西² 邓瑞广¹

(1. 河南省农业科学院/农业部动物免疫学重点实验室,河南省动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002;

2. 西北农林科技大学食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

摘要:从噬菌体随机七肽库中筛选得到赭曲霉毒素 A 的模拟表位,并以其替代毒素标品建立赭曲霉毒素 A 免疫学快速检测方法。以纯化的抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体(OTA mAb)为配基,亲和筛选融合表达在丝状 M13 噬菌体次要衣壳蛋白(PⅢ)上的随机七肽库,以 ELISA 方法鉴定阳性克隆,并以筛选的模拟表位建立赭曲霉毒素 A 的 ELISA 检测方法。经过 4 轮亲和筛选,共得到 22 株与 OTA mAb 特异结合的阳性噬菌体克隆,且该结合都能够被 OTA 标品阻断,DNA 测序及多肽核心序列分析后,得到赭曲霉毒素 A 的模拟表位的主要序列为:MPLWXDL,X 为任意氨基酸,以阳性噬菌体克隆建立的竞争 ELISA 检测方法,线性范围为 250~8000pg/ml。基于制备的 OTA mAb,利用噬菌体随机七肽库可成功筛选到赭曲霉毒素 A 的模拟表位,并能够替代 OTA 标品建立直接竞争模式的免疫学快速检测方法。

关键词:噬菌体随机七肽库;赭曲霉毒素 A;模拟表位;单克隆抗体

SCREENING AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE MIMICKING EPITOPE OF OCHRATOXIN A

WANG Yao^{1,2} HU Xiao-fei¹ PEI Ya-feng¹ ZHAO Dong¹ LIU Yun-chao¹ ZHANG Gai-ping¹
LI Zhi-xi² DENG Rui-guang¹

(1. Key Laboratory for Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Key Laboratory of Animal Immunology/Henan

Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002;

2. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: To screen the mimicking epitope of Ochratoxin A from Ph. D. -7TM and establish the immunoassay for detecting OTA with it. An anti-Ochratoxin A monoclonal antibody was used as ligand, biopanning was done to screen the mimicking epitope from a Ph. D. -7TM, which was displayed as a fusion protein with the coat protein Ⅲ of filamentous phage M13, the positive clones was identified by ELISA, and established a immunoassay for detecting OTA with the positive phages. After four rounds of panning, 22 positive clones could bind to the OTA mAb and the binding could be blocked by the free ochratoxin A. With the DNA sequencing and peptide core sequence analysis, the amino sequence of the mimicking epitope is MPLWXDL(X is any amino acid residues). A competitive ELISA immunoassay was established with the positive clones, the linear range of the inhibition curves is between 250pg/ml and 8000pg/ml. Based on the OTA mAb, the phage display technique can be successfully applied to screen the mimicking epitope of Ochratoxin A, the obtain phage can replaced Ochratoxin A to establish the immunoassay.

Key words: Phage random 7 peptide library; Ochratoxin A; mimicking epitope; monoclonal antibody

收稿日期:2012-03-06 接受日期:2012-06-07

基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项(201203040),河南省扶持企业自主创新资金项目,河南省农业科学院科技发展及示范推广专项基金

作者简介:王 耀(1986-),男,河南三门峡人,博士研究生,研究方向为食品安全检测。E-mail:tiger861215@163.com

通讯作者:邓瑞广(1960-),男,河南平顶山人,研究员,硕士生导师,主要从事动物疫病和食品安全快速检测技术研究。E-mail:rgd999@163.com

赭曲霉毒素(Ochratoxin)是曲霉属和青霉属的某些菌株产生的次级代谢产物,它包含7种结构类似的化合物,其中毒性最大、分布最广、产毒量最高、对农作物污染最重、与人类健康关系最为密切的是赭曲霉毒素A(Ochratoxin A, OTA)^[1]。其作用的靶器官主要是肾脏和肝脏,是一种强烈的肾、肝毒素,并具有较强的致癌、致畸和致突变作用^[2]。由于OTA广泛存在于农产品及畜产品,且能经食物链进入人体,对人类生命健康造成危害,因此实现对OTA的快速、准确检测意义重大。目前,对OTA检测方法有化学分析法、仪器分析法和免疫学分析法等。其中免疫学分析法以敏感度高,检出限低的优势在OTA定性、定量检测中广泛应用,实现了OTA快速、简便、高灵敏检测,对保障我国农产品安全有着积极意义^[3]。但是,当前免疫学检测方法是建立在以标记毒素或偶联毒素为竞争抗原基础上的有毒检测体系,存在毒素标品昂贵、对生产及操作人员健康有害以及偶联反应重复性差等缺陷,制约了它的应用和推广^[4]。近年来,利用噬菌体随机肽库技术得到的模拟表位肽替代毒素作为竞争抗原,建立的无毒检测体系,推动了OTA免疫学检测的快速发展^[5]。噬菌体随机肽库技术是以大量随机编码的多肽序列插入噬菌体展示载体,形成噬菌体展示文库。每个噬菌体粒子或者噬菌体只展示一种序列的外源肽链,不同的噬菌体粒子或者噬菌体展示不同序列的外源肽链^[6]。本研究的目的是以抗OTA的单克隆抗体为配基,从噬菌体随机七肽库中亲和筛选OTA的模拟表位,并利用OTA的抗原模拟表位替代人工合成抗原,建立无需OTA标品的ELISA快速检测方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

噬菌体随机七肽库(Ph. D. -7TM Phage Display Peptide Library Kit)购自New England Biolabs公司;抗OTA单克隆抗体由河南省动物免疫学重点实验室制备;辣根过氧化物酶标记的抗M13抗体购自Parnacia公司;牛血清白蛋白(BSA)、赭曲霉毒素A(OTA)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、伏马菌素B1(FB1)、黄曲霉毒素B1(AFB1)、氨苄西林(AMP)、诺氟沙星(NF)、磺胺二甲嘧啶(SM2)、氯霉素(CAP)、泰乐菌素(TL)标准品均购自美国Sigma公司;96孔酶标板购自Coster;试验用超纯水由本实验室制备;其他试剂均为市售分析纯级。

1.2 试验方法

1.2.1 抗OTA单克隆抗体的纯化 用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,参考Lambert^[7]所述方法,稍加改进。腹水6000/min离心15min,取上清,用6mol/L的乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH=4.0)稀释5倍,用5mol/L NaOH调pH至4.5。逐滴加入辛酸至终浓度为25 μ l/ml,室温搅拌30min,6000r/min离心30min,收集上清。上清经中速滤纸过滤2次后与10 \times PBS按1:10比例混合,用5mol/L NaOH调pH至7.4,放入冰箱冷却至4 $^{\circ}$ C。每毫升上述混合液加0.2778g固体硫酸铵,4 $^{\circ}$ C搅拌30min,以6000r/min离心20min,弃上清,沉淀用少量1 \times PBS溶液溶解,1 \times PBS溶液透析除去硫酸铵,经SDS-PAGE鉴定,DU2600核酸蛋白分析仪测定单克隆抗体的含量,-20 $^{\circ}$ C分装冻存。

1.2.2 亲和筛选噬菌体随机七肽库 纯化抗OTA单克隆抗体每孔100 μ l(100 μ g/ml,0.1mol/L NaHCO₃溶液稀释),4 $^{\circ}$ C包被过夜,4 $^{\circ}$ C封闭2h(5mg/ml BSA,0.1mol/L NaHCO₃溶液),用TBST(50mmol/L Tris-HCl,pH7.5,150mmol/L NaCl,0.1% Tween-20)洗涤6次,每孔加入稀释后的噬菌体肽库100 μ l(约含噬菌体 2×10^{11} pfu),室温下轻摇震荡1h,弃去液体,用TBST洗涤10次,洗去未结合的噬菌体后,每孔加入洗脱液(Gly-HCl,pH2.2)100 μ l,室温下轻摇震荡8min(切勿超过8min),吸出洗脱液,加入15 μ l中和缓冲液至中性。中和后的洗脱液除留一部分作滴度测定外,其余的洗脱液加到20ml LB培养液(接种有处于对数生长前期的*E. coli* ER2738)中进行扩增培养,37 $^{\circ}$ C震荡培养4~5h后,4 $^{\circ}$ C 12000r/min离心10min,上清液加入1/6体积的PEG/NaCl溶液(20% PEG-8000,2.5mol/L NaCl),4 $^{\circ}$ C沉淀过夜。沉淀后,4 $^{\circ}$ C 12000r/min离心15min,弃上清,再用1ml TBST悬浮噬菌体,加入1/6体积的PEG/NaCl冰上孵育60min。再4 $^{\circ}$ C离心15min,去上清,沉淀用200 μ l TBST溶液悬浮。测定滴度后,进行第2次、第3次和第4次亲和筛选。每次加入的噬菌体量都为 2×10^{11} pfu,包被的抗体量分别为75、50和25 μ g/ml。TBST中Tween-20的含量从第二轮筛选起增至0.5%。其余步骤与第一轮筛选相同。第4轮筛选后的洗脱产物经滴度测定后,从总量不到100个噬菌斑的平板上挑选若干蓝色噬菌斑,分别置于1ml接种处于对数生长期前期的*E. coli* ER2738的LB培养液中进行扩增培养、纯化并测定滴度。所有的亲和筛选操作过程均在超净工作台中完成,所用溶液都经过高压灭菌,以避免受到野生型M13噬菌体污染^[8]。

1.2.3 Phage-ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆 用10 μ g/

ml 纯化后的抗 OTA 单克隆抗体包被 ELISA 板, 5mg/ml BSA 溶液封闭。每孔 100 μ l TBST 铺底, 每个要鉴定的噬菌体克隆从 1:2000 开始倍比稀释^[9], 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 用 PBST 洗涤 6 次, 加入 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的抗 M13 单抗 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, PBST 洗涤 6 次。加 TMB 显色液 100 μ l/孔, 显色 4min, 2mol/L H₂SO₄ 100 μ l/孔终止反应, 测定 450nm 波长吸光度值 (A)。用原始肽库包板作为阳性对照, 抗 ZEN 单抗包板作阴性对照 (NC), 抗 OTA 单抗包板加 PBST 作空白对照 (BC)。以待测孔 OD₄₅₀ 值 \geq NC OD₄₅₀ 值的 2.1 倍 (P/N \geq 2.1), 判为阳性^[10]。

1.2.4 最佳包被浓度和噬菌体工作浓度的选择 选用纯化后的抗 OTA 单克隆抗体为包被原, 抗体的浓度分别为 20、15、10、5、3 和 1 μ g/ml, 包被在 96 孔酶标板中, 并封闭, 分别测定效价, 得到每个稀释倍数所对应的噬菌体稀释倍数, 然后再分别测定敏感性, 计算 IC₅₀, 选出 IC₅₀ 最好的一组, 其所对应的包被浓度即为最佳包被浓度, 对应的噬菌体浓度即为噬菌体最佳工作浓度。

1.2.5 阳性噬菌体克隆敏感性鉴定 采取直接竞争 ELISA 法鉴定阳性噬菌体克隆的敏感性, 纯化后的抗 OTA 单克隆抗体以最佳包被浓度包被好的 ELISA 板, 5mg/ml BSA 溶液封闭。加入不同浓度的 OTA (用乙醇溶解, PBS 为稀释液配制) 50 μ l 和阳性噬菌体 50 μ l (工作浓度为优化后的噬菌体最佳工作浓度), 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 用 PBST 洗涤 6 次, 加入 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的抗 M13 单克隆抗体 (100 μ l/孔), 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 洗涤 6 次。加 TMB 显色液 (100 μ l/孔) 显色 4min, 2mol/L H₂SO₄ 100 μ l/孔终止反应, 测定 450nm 波长吸光度 (A) 值。计算各浓度的结合率, 并作标准曲线。结合率 (%) = B/B₀ \times 100% (B₀ 为不加 OTA 的 A 值, B 为加 OTA 的 A 值)。

1.2.6 阳性噬菌体克隆特异性鉴定 抗 OTA 单克隆抗体的特异性鉴定是以 OTA 及常见的真菌产物等作为抑制剂, 用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC₅₀, 以单克隆抗体对 OTA 的 IC₅₀ 与各抑制物的 IC₅₀ 之比的百分数

为其交叉反应率 (CR%)^[11], 参照此方法, 以 OTA 和 OTA 结构类似的小分子化合物的单克隆抗体为包被原, 包被量都为 10 μ g/ml。用 Phage ELISA 测定阳性噬菌体克隆对抗 OTA 单克隆抗体和其他单克隆抗体的 OD₄₅₀ 值, 待测孔 OD₄₅₀ 值 \leq NC OD₄₅₀ 值的 2.1 倍 (P/N \leq 2.1), 判为阴性, 待测孔 OD₄₅₀ 值 \geq NC OD₄₅₀ 值的 2.1 倍 (P/N \geq 2.1), 判为阳性。若阳性噬菌体克隆与其他小分子化合物单克隆抗体 ELISA 结果都为阴性, 说明该噬菌体克隆特异性好。

1.2.7 阳性克隆的 DNA 测序及多肽序列分析 取扩增和纯化后的噬菌体 50 μ l, 进行噬菌体全菌测序。根据插入的 DNA 序列翻译出氨基酸序列, -96 g III 测序引物 5'-^HO CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3'。

2 结果与分析

2.1 抗 OTA 单克隆抗体纯化结果

OTA 腹水纯化后通过 SDS-PAGE 鉴定可知 (图 1), 经分离纯化后的抗体在泳道中呈现 2 条带, 分子量约为 55 和 26kD, 分别与抗体的重、轻链分子量大小一致, 且无其他杂带, 说明抗体纯化达到很好的效果。

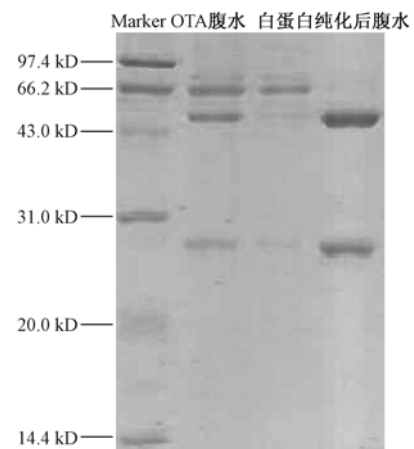


图 1 腹水纯化后 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of purified ascites

表 1 亲和筛选中噬菌体的富集

Table 1 Enrichment of phage in biopanning

筛选轮次 round of panning	抗体包被量 antibody (μ g/ml)	噬菌体投入量 phage input (pfu/ml)	噬菌体洗脱量 phage output (pfu/ml)	回收率 recovery rate (%)
1	100	1×10^{11}	7.3×10^5	7.3×10^{-4}
2	75	1×10^{11}	4.4×10^6	4.4×10^{-3}
3	50	1×10^{11}	3.25×10^9	3.25 \times
4	25	1×10^{11}	7.8×10^9	7.8

2.2 亲和筛选结果

经过4轮亲和筛选,每一轮投入的噬菌体量相同,但随着抗体包被量的减少、洗涤液 Tween-20 含量的增加,每轮选择性吸附于抗体的噬菌体量均有所增加,噬菌体的洗脱量从 7.3×10^5 pfu/ml 增加到 7.8×10^9 pfu/ml,回收率从 $7.3 \times 10^{-4}\%$ 增加到 7.8%,说明包被的抗 OTA 单克隆抗体对噬菌体随机肽库中的噬菌体展示多肽进行了有效的选择性富集,即含有赭曲霉毒素 A 模拟表位的噬菌体粒子得到富集。结果见表 1。

2.3 Phage-ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆结果

从第4轮亲和筛选洗脱液的 10^6 滴度板上挑取 22 株噬菌体单克隆,分别编号 4L1~4L22。图 2 为 4L1~4L22 Phage-ELISA 结果,由图可看出,22 株噬菌体克隆都能够与抗 OTA 单克隆抗体很好的结合,P/N 值都远远大于 2.1。因此,初步鉴定该 22 株噬菌体克隆均为阳性克隆。

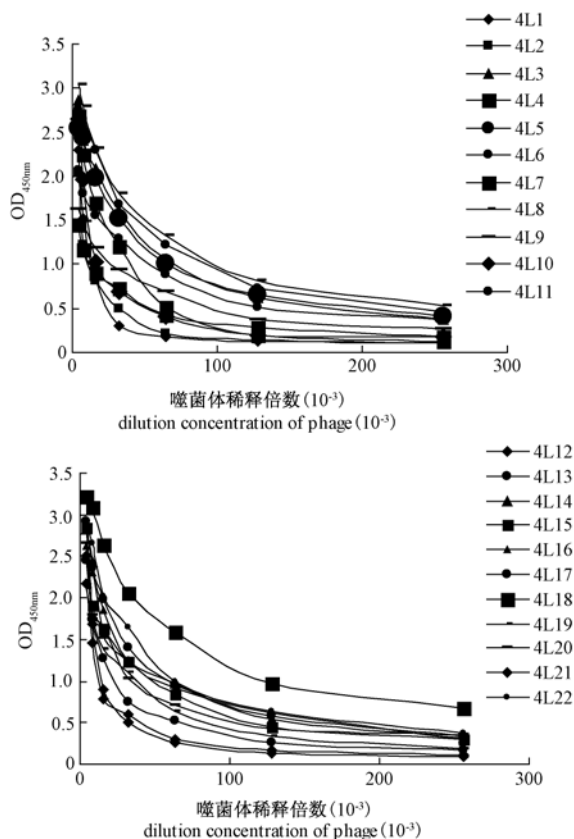


图 2 4L1~4L22 噬菌体克隆 Phage-ELISA 结果

Fig. 2 The results of Phage-ELISA

2.4 最佳包被浓度和噬菌体工作浓度测定结果

表 2 是在不同的包被抗体浓度下,Phage-ELISA 检测的试验结果,根据该结果得到噬菌体的最佳工作浓度 (OD_{450} 值为 1.0~1.5 之间所对应噬菌体工作浓

度的 2 倍),再测定噬菌体的敏感性,结果如图 3。由图 3 可知,包被的抗体浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$,噬菌体稀释倍数为 1:5000 时, IC_{50} 最低。因此选取最佳抗体包被浓度是 $10 \mu\text{g/ml}$,最佳噬菌体工作浓度为 1:5000。

表 2 间接 Phage-ELISA 结果

Table 2 The results of indirect Phage-ELISA

噬菌体稀释倍数 dilution of phage	抗体包被量 antibody ($\mu\text{g/ml}$)					
	20	15	10	5	3	1
1:2000	3.418	3.404	3.188	2.555	1.956	0.398
1:4000	2.563	2.372	2.347	1.711	1.274	0.237
1:8000	1.777	1.712	1.532	1.151	0.747	0.233
1:16000	1.085	1.056	0.902	0.653	0.458	0.213
1:32000	0.639	0.560	0.501	0.358	0.236	0.193
1:64000	0.341	0.339	0.300	0.206	0.188	0.189
1:128000	0.286	0.179	0.261	0.186	0.127	0.162
NC	0.090	0.112	0.160	0.096	0.084	0.068
BC	0.066	0.079	0.074	0.088	0.048	0.026

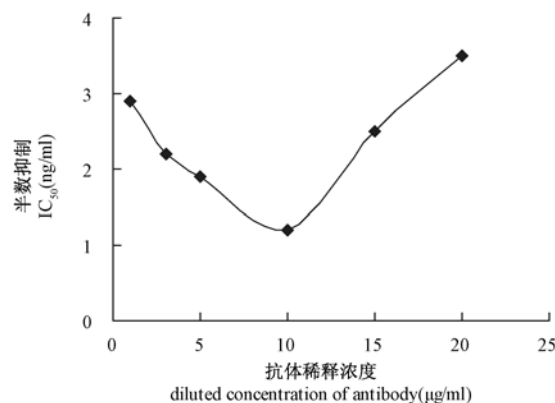


图 3 不同包被浓度对应的 IC_{50} 趋势图

Fig. 3 IC_{50} run chart of different package concentration

2.5 阳性噬菌体克隆敏感性鉴定结果

以直接竞争法鉴定噬菌体的敏感性,经鉴定,22 株噬菌体克隆敏感性较好,都能被赭曲霉毒素 A 标品抑制。根据图 4 所示结果,全部的数据能够呈现出的曲线趋势均是典型的 S 型曲线,所得到的线性范围是选取快速下降区间部分,因此可以得出线性范围为 250~8000pg/ml。

2.6 阳性噬菌体克隆特异性鉴定结果

以抗 TL、ZEN、NF、AMP、FB1、SM2、CAP、AFB1 的单克隆抗体(由河南省动物免疫学重点实验室制备)为阴性对照,分别进行 Phage-ELISA 测定,数据结果表明,22 株噬菌体仅能够与抗 OTA 单克隆抗体结合,即 P/N 值大于 2.1,与其他 8 种无关单克隆抗体不能结

表 3 4L19 噬菌体克隆特异性鉴定结果

Table 3 The result of the special identification of phage 4L19clone

单抗 mAb	稀释倍数 dilution concentration							空白 black
	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	
OTA	1.045	0.681	0.426	0.308	0.161	0.115	0.080	0.054
TL	0.088	0.068	0.085	0.068	0.095	0.073	0.073	0.069
ZEN	0.092	0.061	0.075	0.064	0.068	0.064	0.056	0.053
NF	0.060	0.051	0.088	0.058	0.070	0.058	0.053	0.051
AMP	0.071	0.054	0.094	0.063	0.063	0.061	0.061	0.061
FB1	0.065	0.056	0.114	0.059	0.078	0.062	0.081	0.076
SM2	0.062	0.056	0.086	0.058	0.069	0.061	0.056	0.053
CAP	0.059	0.049	0.097	0.057	0.076	0.062	0.067	0.058
AFB1	0.141	0.114	0.087	0.071	0.091	0.079	0.102	0.086

合,即 P/N 值小于 2.1。因此可以说明 22 株噬菌体特异性很好,本文以 4L19 株噬菌体数据为例,结果见表 3、图 5。

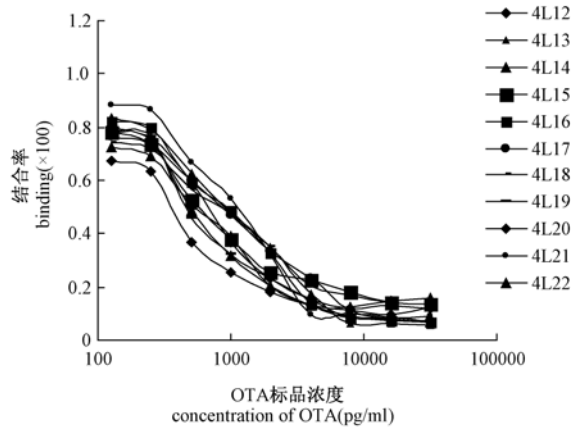
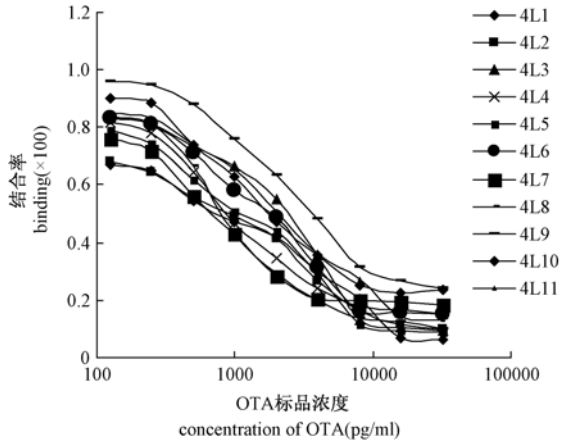


图 4 4L12 ~4L22 的直接竞争 ELISA 结果

Fig. 4 The standard curves of direct competitive ELISA

2.7 阳性噬菌体 DNA 序列分析

22 株阳性克隆经 DNA 测序后,翻译得到插入七肽的氨基酸序列(表 4)。由表 4 可知,赭曲霉毒素 A

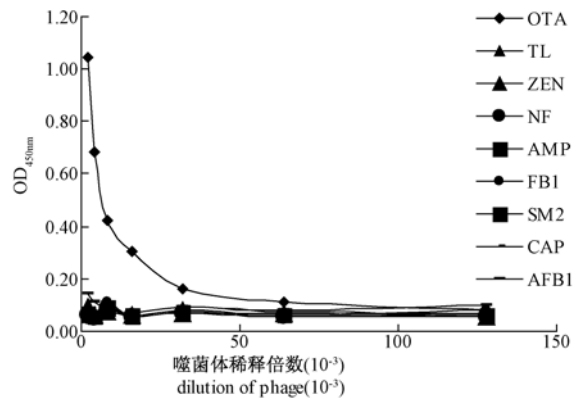


图 5 4L19 噬菌体克隆特异性鉴定结果

Fig. 5 The result of the special identification of phage clone

模拟表位的主要多肽序列为:MPLWXDL, X 为任意氨基酸。

3 讨论

3.1 Phage-ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆

在鉴定阳性噬菌体克隆时,噬菌体加入量很关键。常用的方法是通过双层琼脂平板法测定噬菌体的滴度,算出噬菌体的浓度,一般加入量是 1×10^{12} pfu,按照每株噬菌体的滴度结果,算出相对应的噬菌体加入量,再进行 4 倍系列稀释。此方法的弊端是工作量巨大,滴度结果有偏差等。在总结常规 ELISA 方法基础上,本试验得到新的方法,即按照每株噬菌体克隆的稀释倍数测定 ELISA 结果,每株噬菌体都从相应的稀释倍数进行倍比稀释,且通过蓝白斑筛选试验和噬菌体全菌测序可以判断出噬菌体在进行扩增时是否被野生型的噬菌体污染。该方法的引入大大减少了试验的

表4 阳性噬菌体插入DNA和多肽序列结果

Table 4 The DNA and peptide sequences of positive clones

阳性噬菌体克隆编号 number of positive phage	DNA 序列 DNA sequences	多肽序列 peptide sequences
4L6	CTTCCTTGAAGCTGCTTGTT	LPWKLLV
4L14	TTGCCTTGAAGCTTTGGCG	LPWKLLA
4L20	TTGCCGTGGCGCTGCTTGCT	LPWRLLA
4L13, 4L18, 4L3, 4L8, 4L22	ATGCCGCTTTGGGAGGATCTG	MPLWEDL
4L5, 4L11, 4L19, 4L17	ATGCCGCTTTGGTCTGATCTG	MPLWSDL
4L15	ATGCCTATTGGTCCGATCTG	MPIWSDL
4L16	ATGCCTATTGGGCTGATATT	MPIWADI
4L9	TATCATTTCGGATGTTTTT	YHFPDVF
4L2	TATCATTTTGTTGATGTTTTT	YHFVDVF
4L1	TATCATTTCGGTGAGTTGTAT	YHFGELY
4L7	TATCATTAGGTTGATCTGTAT	YHQVDLY
4L12, 4L10	CATCATTTCGGGATCTTTAT	HHFRDLY
4L21	CATCATTTAATGATTTGTAT	HHFNLDLY
4L4	CATCCGATGCCGCCGCCGAG	HPMPPQ

工作量,同时也使整个试验系统更稳定、重复性更高。

3.2 阳性噬菌体克隆特异性鉴定

筛选噬菌体随机七肽库得到的噬菌体单克隆是否具有特异性与 OTA mAb 结合,需要进行特异性鉴定。由于缺少此方面试验,所以参考单克隆抗体的特异性鉴定方法,它是以靶标抗原以外的其他抗原作为抑制剂,再测定交叉反应率,因此设计以 OTA mAb 外的 8 种无关单抗为对照,测定筛选到的噬菌体单克隆与无关单抗反应的 OD₄₅₀ 值,若 OD₄₅₀ 值都处于阴性水平,说明该噬菌体克隆的特异性很好。本试验结果证明了此方法的可行性和准确性。

3.3 阳性噬菌体 DNA 序列分析

本研究得到赭曲霉毒素 A 的模拟表位的主要序列为:MPLWXDL, X 为任意氨基酸。与之前报道的赭曲霉毒素 A 的模拟表位的氨基酸序列(IRPMVXX, X 为任意氨基酸)不一致^[5, 12],这是由于模拟表位肽与单克隆抗体之间的结合是一一对应关系,抗体不同株,模拟表位肽也差别很大,同时分析本研究得到的氨基酸序列收敛情况,可以发现特殊的氨基酸序列占主导地位,比如 MPLWXDL,其他序列的密码子在一个或者更多的位置上有差异,这样的结果表明:筛选所采用的文库具有合适的多样性;筛选的进行基于氨基酸序列结合特性的倾向性,而这种结合特性往往与多肽的空间结构相关,它们的一级结构并不一定高度同源^[13]。纯度高、特异性强、敏感性高的单克隆抗体是获得优质抗原模拟表位的首要条件,本课题采用的抗 OTA 单克隆抗体具有高纯度、强特异性、高敏感性等特性,单克隆抗体间接 ELISA 效价达 1 : 7.68 × 10⁵, IC₅₀ 为

112.8pg/ml,亲和常数为 9.74 × 10¹¹ L/mol,与赭曲霉毒素 B 交叉反应率为 17%,为试验开展奠定了良好的基础。

4 结论

本试验利用噬菌体随机七肽库可成功筛选到赭曲霉毒素 A 的模拟表位。经过 4 轮亲和筛选,共得到 22 株与 OTA mAb 特异结合的阳性噬菌体克隆,且该结合都能够被 OTA 标品阻断。DNA 测序及多肽核心序列分析后,得到赭曲霉毒素 A 的模拟表位的主要序列为:MPLWXDL, X 为任意氨基酸。以阳性噬菌体克隆建立的竞争 ELISA 检测方法,线性范围为 250 ~ 8000pg/ml,检测下限 100pg/ml。为制备 OTA 无毒 ELISA 检测试剂盒和试纸条奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Höhler D. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action [J]. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft, 1998, 37(1): 2-12
- [2] Creppy E E, Baudrimont I, Betbeder A M. Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant [J]. Toxicology letters, 1995, 82: 869-877
- [3] Leitner A, Zöllner P, Paolillo A, et al. Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 453(1): 33-41
- [4] Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library [J]. Science, 1990, 249(4967): 386
- [5] Liu R R, Yu Z, He Q H, et al. An immunoassay for ochratoxin A without the mycotoxin [J]. Food control, 2007, 18(7): 872-877
- [6] Pande J, Szewczyk M M, Grover A K. Phage display: concept,

- innovations, applications and future[J]. *Biotechnology advances.*, 2010, 28(6): 849-858
- [7] Lambert L A, Warner W G, Wei R R, et al. The protective but nonsynergistic effect of dietary β -carotene and vitamin E on skin tumorigenesis in Skh mice [J]. *Nutrition and Cancer*, 1994, 1(21): 1-12
- [8] Bratkovi T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(5): 749-767
- [9] Zhao Y L, Zhang G P, Liu Q T, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(24): 12138-12142
- [10] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays [M]. Elsevier Science Ltd, 1985
- [11] Shelver W L, Smith D J. Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine [J]. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2000, 21(1): 1-23
- [12] 刘仁荣, 余宙, 何庆华, 王希, 许杨. 噬菌体展示肽库筛选赭曲霉毒素A模拟表位的研究[J]. *卫生研究*, 2005, 34(4): 448-450
- [13] Clackson T, Lowman H B. Phage display: a practical approach [M]. Oxford University Press, 2004

(责任编辑 邱爱枝)