



张浩楠, 高建伟. 玉米赤霉烯酮完全抗原的制备及鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 2021(6):87-92.

玉米赤霉烯酮完全抗原的制备及鉴定

张浩楠, 高建伟

(齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要:为了降低基层检测部门检测谷物中玉米赤霉烯酮(ZEN)的成本, 研制国产化检测试剂盒非常必要, 而试剂盒的研制离不开完全抗原的支持。本试验的主要内容是将 ZEN 脲化, 生成玉米赤霉烯酮脲(ZENO), 再用 DCC-NHS 活性酯法将 ZENO 与牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵白蛋白(OVA)偶联合成 ZEN 完全抗原, 最后透析将未偶联的小分子 ZEN 除去, 得到的即为完全抗原。包被原 ZEN-BSA 浓度为 $1.62 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 免疫原 ZEN-OVA 浓度为 $1.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。采用 UV 法、SDS-PAGE 法对完全抗原进行鉴定, 同时建立间接 ELISA 方法验证包被原 ZEN-BSA。结果表明:采用活性酯法合成的 ZEN 完全抗原在 319 nm 处出现新的吸收峰, 且 SDS-PAGE 图表明 ZEN-BSA 分子量集中在 $60 \sim 70 \text{ kDa}$, ZEN-OVA 分子量集中在 $40 \sim 50 \text{ kDa}$, 不同于 BSA 和 OVA 分子量, 但相差不大。根据紫外扫描图计算得到 ZEN-BSA 结合比为 $7.0:1$, ZEN-OVA 结合比为 $6.1:1$ 。根据免疫学方法可知, $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值随着毒素浓度的增加而减小。本试验利用 3 种方法对 ZEN 完全抗原进行鉴定, 证明 ZEN 完全抗原偶联成功。

关键词:玉米赤霉烯酮; 抗原合成; 酶联免疫吸附试验; 毒素检测

玉米赤霉烯酮(ZEN, 也称为 F-2 霉菌毒素)是由某些镰刀菌产生的次级代谢产物, 是饲料和谷物中最常见的污染物之一^[1]。ZEN 是具有生殖毒性、肝毒性、遗传和免疫毒性的化合物^[2]。为了减少 ZEN 对人类和家畜健康造成的严重危害, 目前至少有 100 个国家制定了有关食品中 ZEN 上限的明确规则。欧盟修订(EC)466/2001 法规(G/SPS/N/EEC/253)对一些食品内的 ZEN 规定了欧盟统一的最大限量, 主要内容如下:未加工谷物(除玉米外)最大残留限量 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 谷粉(除玉米粉外)限量为 $75 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 在面包、蛋糕、饼干中, 限量为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。我国 2017 年实行的《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量(GB 2761-2017)》^[3]中规定:供人食用的小麦及玉米中, ZEN 最大限量为 $60 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

目前 ZEN 的检测方法主要有仪器分析方法和免疫学方法。仪器分析方法主要有薄层色

谱(TLC)^[4]、高效液相色谱(HPLC)^[5]和液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)^[6]等。由于 TLC 方法样品制备繁琐、检测时间过长、检测限高、零敏度差、特异性差等缺点, 近些年在安全检测中基本不再使用该法; HPLC 和 LC-MS/MS 样品制备过程过于复杂、仪器采购和后期维护成本较高、检测时间过长等缺点导致了该方法只适用于实验室中的痕量检测及验证性检测, 不适用于现场快检和大批量的样品检测。免疫测定方法因其具有较好的灵敏性、可靠性、快速性、实用性和便携性而被广泛用于食品安全监测^[7-10]。在我国国标《饲料中玉米赤霉烯酮的测定(GB/T 19540-2004)》^[11]中, 采用了 ELISA 方法来检测饲料用谷物原料中的玉米赤霉烯酮, 该方法的检测限为 $0.00025 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

建立免疫测定方法的第一步和关键步骤是获得具有高特异性和亲和力的抗体, 而具有高特异性和亲和力的抗体的产生依赖于半抗原分子设计和抗原合成^[12]。本研究结合相关文献报道, 将 ZEN 与羧甲氧基胺半盐酸盐反应, 合成半抗原 ZEN-6-羧甲氧基胺(ZEN-oxime)。然后通过碳二亚胺法将半抗原与载体蛋白偶联制备 ZEN 全抗原, 本研究中主要采用的载体蛋白是 BSA 和 OVA。并采用了多种鉴定方法对所合成的偶联抗原进行鉴定, 为后续免疫动物、制备单克隆抗体和开发试剂盒等提供技术支持。

收稿日期:2021-02-06

基金项目:黑龙江省教育厅高教强省优势特色学科-玉米重点专项(LTSW201729); 黑龙江省教育厅植物性食品加工技术特色学科专项(YSTSXK201826); 齐齐哈尔市科技计划市校合作项目(SXSP-2019003); 黑龙江省教育厅基本业务专项(135509321); 黑龙江省自然科学基金留学归国人员科学基金(LC2017014); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSC-2017157)。

第一作者:张浩楠(1995-), 女, 在读硕士, 从事食品营养与安全管理。E-mail:237686729@qq.com。

通信作者:高建伟(1982-), 男, 博士, 讲师, 从事食品营养与安全管理。E-mail:16900279@qq.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 玉米赤霉烯酮(ZEN,美国 Sigma 公司),牛血清蛋白(BSA,美国 Sigma 公司),鸡卵白蛋白(OVA,美国 Sigma 公司),羧甲氧基胺半盐酸盐(上海麦克林生化科技有限公司),吡啶(阿拉丁试剂有限公司),N-羟基琥珀酸亚胺(NHS,美国 Sigma 公司),N,N'-二环己碳二亚胺(DCC,美国 Sigma 公司),二甲基甲酰胺(DMF,上海麦克林生化科技有限公司),丙烯酰胺(美国 Amresco 公司),TEMED(美国 Sigma 公司),Tween-20(美国 Sigma 公司),3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,美国 Amresco 公司),无水四氢呋喃(阿拉丁试剂有限公司),三羟甲基氨基甲烷(TRIS,美国 Amresco 公司),甘油(德国 BioRFOX 公司)。

1.1.2 仪器与设备 HZQ-Q 全温振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),WD-9413A 凝胶成像分析仪(北京市六一仪器厂),Victor 酶标仪(美国 GE),Lambda 750 紫外-可见-近红外分光光度计(PerkinElmer),DY-24DN 型电泳仪(北京市六一仪器厂),96 孔酶标板(美国康宁公司)。

1.2 方法

1.2.1 ZEN 半抗原合成 参考王元凯等^[13]的方法并稍作修改,具体方法如下:取 1 mg ZEN 溶于 1.2 mL 吡啶中,加入 2 mg O-羧甲基羟胺,室温搅拌反应 24 h。氮气吹干后,溶于 4 mL 蒸馏水,调节 pH 至 8.0,分 3 次分别加入 1 mL 苯,未反应的玉米赤霉烯酮通过苯除去,保留水相。水相调 pH 至 3.0,溶液变浑浊,用 10 mL 乙酸乙酯分 4 次抽提,保留脂相,用无水硫酸钠滤过后吹干,得到淡黄色油状物质即为玉米赤霉烯酮-6-羧甲氧肟。

1.2.2 包被原 ZEN-BSA 合成 采用 DCC-NHS 活性酯法^[14]合成 ZEN 完全抗原:将上述得到的黄色油状物溶于 0.4 mL 无水四氢呋喃中,再加入 6 mg DCC 和 3 mg NHS,30 ℃ 振摇 60 min,2 500 g 离心 20 min,保留上清液,氮气吹干后用二甲基甲酰胺溶解残留物。将上述溶液缓慢加入含 15 mg BSA 的 3 mL 碳酸氢钠($0.13 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)缓冲液中,4 ℃ 摇动过夜,取上清液在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液中透析 3 d,所得即为 ZEN 完全抗原,

4 ℃ 储藏备用,若长期储藏则需放在 -20 ℃ 冰箱中。

1.2.3 免疫原 ZEN-OVA 合成 同包被原 ZEN-BSA 合成方法。

1.2.4 全抗原鉴定 蛋白质浓度测定。选用紫外吸收法测定蛋白质浓度^[15]。绘制标准曲线,以吸光度为纵坐标,标准蛋白含量为横坐标建立标准曲线,具体步骤如下:配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BSA 标准溶液,用 pH7.4 的 PBS 将蛋白溶液稀释成 0,0.1,0.2,0.3,0.4 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,测定 $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ 值并以此为纵坐标,牛血清蛋白浓度为横坐标,绘制标准曲线。将待测溶液用 PBS 稀释 50 倍测定 $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ 值。根据标准曲线测定 ZEN-BSA 蛋白含量。同理测定 ZEN-OVA 蛋白含量,绘制标准曲线。

紫外光谱鉴定。在 200~400 nm 范围内进行紫外扫描。浓度为蛋白标准液 BSA $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,OVA $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 待测两种抗原溶液 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,得到紫外吸收光谱图,根据吸收峰位置判断抗原是否成功合成。

电泳鉴定。使用 SDS-PAGE 电泳对 BSA、ZEN-BSA、OVA、ZEN-OVA 进行鉴定,根据分子量差距大小来判断抗原是否成功合成。

免疫学方法鉴定。采用本实验室已建立的 ELISA 方法进行操作,将 ZEN-BSA 稀释为一定浓度包被 96 孔酶标板,4 ℃ 过夜。第 2 天取出恢复至室温洗板 3 次,每孔加 $100 \mu\text{L}$ 5% 脱脂乳粉封闭液,37 ℃ 温育 1 h。洗板拍干,将 ZEN 毒素标准品梯度稀释,每孔 $100 \mu\text{L}$,每孔再加入 $100 \mu\text{L}$ 单抗,37 ℃ 温育 1 h。洗板拍干,加酶标二抗,37 ℃ 温育 1 h。洗板拍干,加显色液,15 min 后加终止液,用酶标仪测 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值。

1.2.5 检测样品中的 ZEN 含量 样品中 ZEN 含量以国家食品安全规定的粮食中毒素含量最大残留限量 $60 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为基准,设定小于 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为阴性样品,大于 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为阳性样品,其中大于 $60 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为超标样品。2020 年采集黑龙江省部分地区高粱样品 32 个,小米样品 64 个,小麦粉样品 24 个,用已合成的玉米赤霉烯酮完全抗原根据 1.2.4 中的方法建立 ELISA 方法,把以上各种样品进行前处理后进行检测,不仅可以检验出所检样品中是否含有玉米赤霉烯酮,也可以进一步验证所偶联的完全抗原是否成功。

样品的前处理过程如下所示:

- ①取一定量的样品(一般为 2~5 g),粉碎后加入 8 mL 的甲醇(甲醇浓度可适当调节);
- ②使用旋涡机将其充分混合(约 5 min);
- ③使用离心机在离心 5 min(4 000 r·min⁻¹);
- ④取少量上清液,加入一定量的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释(一般为 10 倍稀释,可根据具体样品不同而适当调整),制得样品稀释液备用。

根据 1.2.4 中的 ELISA 方法进行测定,将其中 ZEN 毒素标品更换为上述所制得的样品稀释液,然后将其所测得的 OD 值,根据标准方程计算玉米样品中的玉米赤霉烯酮含量。

1.2.6 数据分析 本试验所有数据采用 Origin 8.0 软件将实验数据进行作图及计算。

2 结果与分析

2.1 偶联物蛋白含量测定

选择紫外分光光度计对两种抗原在 280 nm 波长下进行检测,分别用 OVA 和 BSA 作为标准蛋白,得到 OD 值分别为 0.233 和 0.098,代入方程,将结果扩大 50 倍,得到的浓度即全抗原蛋白浓度。通过紫外吸收法测定包被原 ZEN-BSA 的蛋白浓度为 1.62 mg·mL⁻¹,免疫原为 1.33 mg·mL⁻¹。

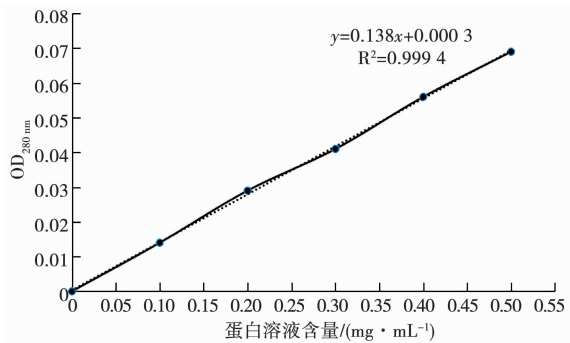


图 1 蛋白质浓度测定 ZEN-BSA 标准曲线图

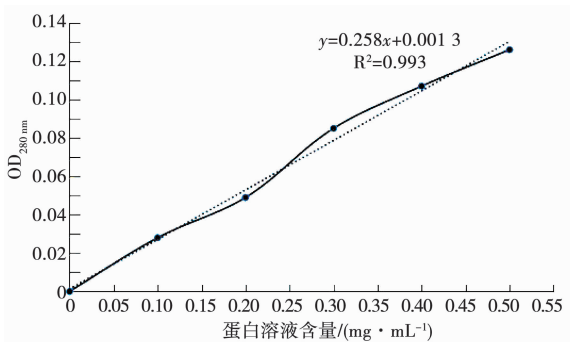


图 2 蛋白质浓度测定 ZEN-OVA 标准曲线图

2.2 紫外吸收光谱法验证人工抗原

将合成的偶联抗原首先进行紫外(200~

400 nm)扫描,其结果如图 3 所示,BSA 和 OVA 在 278 nm 出现了吸收峰,偶联后的 ZEN-BSA 和 ZEN-OVA 在 319 nm 处出现了新的吸收峰,从波形上来看,最大吸收峰位置出现偏移,说明新的吸收峰是由于载体蛋白分子上连接上了其它吸收基团(ZEN),且该结果与曹欢^[16]等人的结果基本符合,可以初步判断完全抗原偶联成功。并根据公式计算结合比^[17-18]:

$$\text{结合比} = \frac{(\epsilon_{\text{结合物}} - \epsilon_{\text{载体}})}{\epsilon_{\text{半抗原}}} (\epsilon: \text{摩尔消光系数})$$

配制一定浓度的 ZEN 溶液,在 319 nm 下进行紫外扫描,根据朗伯比尔定律 $A = \epsilon bc$ 计算得到 ZEN 的平均摩尔消光系数。通过紫外吸收法测定包被原 ZEN-BSA 的蛋白浓度为 1.62 mg·mL⁻¹,免疫原 ZEN-OVA 为 1.33 mg·mL⁻¹。而根据人工抗原在 319 nm 的吸光度值计算人工抗原的摩尔消光系数,根据载体蛋白在 278 nm 的吸光度计算载体蛋白的摩尔消光系数。遂计算出 ZEN-BSA 结合比为 7.0:1,ZEN-OVA 结合比为 6.1:1。

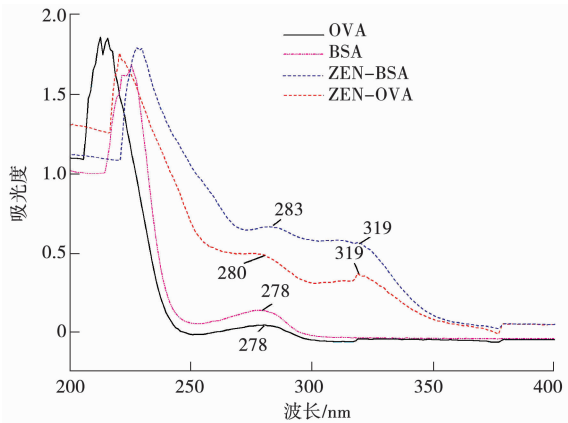


图 3 完全抗原紫外全波长扫描图

2.3 SDS-PAGE 鉴定抗原

由于玉米赤霉烯酮(ZEN)的分子量较小,约为 318,故采用分子量较大的牛血清蛋白(BSA,分子量约 67 000)和鸡卵白蛋白(OVA,分子量约 45 000)进行偶联,由于 ZEN 与蛋白之间的分子量差距太大,故两种蛋白与偶联后的完全抗原相比并无明显的变化,其结果如图 4 所示,ZEN-BSA 与 BSA 之间的分子量差距并不大且都集中在 60~70 kDa,ZEN-OVA 与 OVA 之间的分子量差距并不大且都集中在 40~50 kDa,与孙亚宁等^[19]结果相符,故可初步判断完全抗原偶联成功。

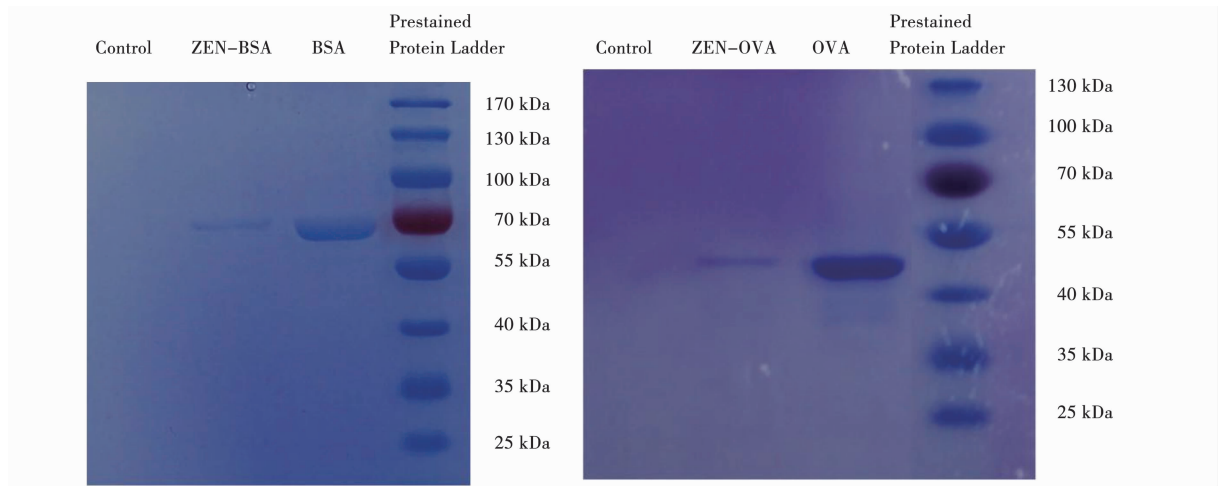


图 4 BSA 和 ZEN-BSA 的 SDS-PAGE 电泳图(左)及 OVA 和 ZEN-OVA 的 SDS-PAGE 电泳图(右)

2.4 间接竞争 ELISA 法验证人工抗原

将 ZEN-BSA 包被酶标板,实验室保存的 ZEN 单抗作为一抗,然后根据加入不同浓度的 ZEN 毒素产生竞争作用,显色后通过酶标仪能够读取不同的吸光值。使用 Origin 8.0 软件选择参数 Logistic 作为拟合曲线绘制不同浓度的 ZEN 作为横坐标,以 B/B₀ 为纵坐标的标准曲线,得到如图 5 所示标准曲线,其标准方程为: $y = 0.398\ 87 + 0.679\ 81/[1 + (x/0.311\ 99)^{0.490\ 03}]$, $R^2 = 0.996\ 8$,通过该方程计算 ZEN 的 IC₅₀ 为 32.23 ng·mL⁻¹。故可以进一步确认毒素能与偶联抗原产生竞争性,故完全抗原偶联成功。与其他文献如陈晓飞^[20]计算的 IC₅₀ 为 74.69 ng·mL⁻¹,唐宁^[21]得到的 IC₅₀ 为 57.88 ng·mL⁻¹相比,检测灵敏度更好。

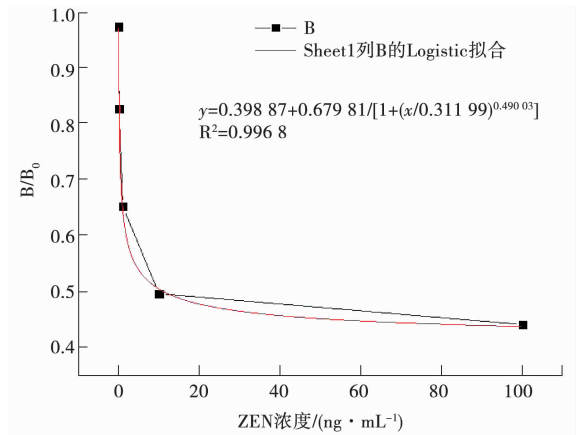


图 5 免疫学法鉴定人工抗原

2.5 检测粮食样品中的 ZEN

由表 1 结果显示,2020 年黑龙江省小麦粉样品的玉米赤霉烯酮含量偏高,高粱样品次之,小米样品未见超标,考虑到黑龙江省大部分地区的气

候条件较为接近,故产生这种现象的原因可能是在采收、贮藏过程中,小麦样品所处环境更潮湿,更容易产生和累积玉米赤霉烯酮。

表 1 样品中 ZEN 检出率

| 样品 | 样品数 | 阳性均值/(μg·kg ⁻¹) | 阳性率/% | 超标率/% |
|-----|-----|-----------------------------|-------|-------|
| 高粱 | 32 | 46.04 | 18.75 | 6.25 |
| 小米 | 64 | 25.71 | 9.37 | 0 |
| 小麦粉 | 24 | 53.74 | 25.00 | 8.33 |

3 讨论

本研究采用目前比较成熟的半抗原合成方法,将 ZEN 与羧甲基羟胺半盐酸盐进行反应,引出游离的羰基,与载体蛋白进行偶联^[22],采用此方法制备的抗体的灵敏度比较高^[14]。Thongrusamee 等^[23]在设计 ZEN 半抗原时,以 ZEN 分子中的酮基、羟基等具有活性的基团为基础,采用脲化法进行改造,王景琳等^[24]用这种方法将 ZEN 毒素 C₆ 位置(酮基)交联羧基(-COOH),经质谱分析,采用此法可有效地将 ZEN 毒素转化为带羧基的 ZEN 脲。此外,也有用丁二醇缩水甘油醚方法将 ZEN 与载体蛋白偶联制备单克隆抗体,获得的抗体对 ZEN 和 ZAN 识别较好,对其他结构类似物识别能力较差。常用的完全抗原合成方法有碳化二亚胺法(EDC)、活性酯法(NHS 酯法)、羧基化法[N,N'-羰基二咪唑(CDI)],混合酸酐法。胥传来等^[25]利用碳二亚胺法成功制备了磺胺二甲基嘧啶人工抗原。刘琦等^[26]利用碳二亚胺 EDC 将 ZEN 与钥孔血蓝蛋白(KLH)偶联制备出免疫原。杨振东等^[27]则先以氯甲基异丁酯与含有羧基的 ZEN 反应形成混合酸酐,然后先后与 BSA 和 OVA 上的氨基反应得到较高质量的

ZEN 人工抗原。本试验采用的 DCC 和 sulfo-NHS 结合使用也是一种有效的抗原合成方法^[28]。

目前,对于完全抗原的鉴定主要有较为简单的紫外光谱法、电泳法,较为复杂的色谱法、TNBS 法等。本研究采用的紫外光谱法是将其在 200~400 nm 波长下进行全波长扫描,然后根据在不同波长下的吸光度和峰面积的区别来初步判断偶联是否成功。唐宁^[21]通过紫外扫描图,确定偶联物在 273 nm 特征波长,计算得到 ZEN-BSA 结合比为 12:1,ZEN-OVA 结合比为 21:1。电泳法较多的是采用 SDS-PAGE 法,它是根据不同分子量蛋白质在凝胶中迁移速率不同,在电流的作用下将不同的蛋白质在分离胶中分离开来,进而鉴定蛋白质。但是这种方法对于蛋白质分子量相差较大的两种蛋白的比较有更好的效果,而 BSA 分子量为 67 000 kDa,ZEN 分子量为 318 kDa,这两种物质偶联成功后其分子量并无明显的差别,两个条带间的区别并不大,故使用该方法鉴定完全抗原并不完全合适。当半抗原或全抗原在紫外区无吸收或不明显时,可采用 TNBS 法^[29]。曹欢等^[16]利用 TNBS 法计算得到 ZEN-BSA 和 ZEN-OVA 结合比分别为 20:1 和 13:1。陈晓飞^[20]利用 TNBS 法测得偶联结合比 $n\text{ZONO}:n\text{BSA}=12.7:1$ 、 $n\text{ZONO}:n\text{OVA}=6.6:1$ 。虽然结果更为精确,但其操作难度更大,对实验仪器要求更高。本试验主要根据紫外吸收光谱图来计算结合比,得到 ZEN-BSA 的偶联比为 7.0:1。同理可求得 ZEN-OVA 的偶联比为 6.1:1。此方法可在验证人工抗原合成成功的同时计算结合比,且操作简便。杨振东等^[27]用此方法得到 ZEN 人工免疫抗原的偶联比为 12.04:1,人工检测原的偶联比为 8.28:1。

为了减少上述两种方法鉴定完全抗原带来的不确定因素,本研究使用竞争 ELISA 方法对 ZEN-BSA 进行鉴定,在不同浓度毒素的作用下,能够产生竞争性,且能够得到标准曲线。从而从另一个角度来佐证完全抗原偶联成功。赵红艳^[30]采用间接 ELISA 方法验证人工抗原 ZEN-OVA,当抗体从 100 倍稀释至 800 倍时, $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值逐渐减小,说明人工抗原与 ZEN 答抗发生特异性结合,进而证明人工抗原合成成功。将制得的 ZEN-BSA 按照 ELISA 法检测黑龙江省内高粱、小米和小麦粉中的 ZEN 含量,结果显示,该完全抗原能检测出天然样品中的 ZEN,并且从阳性率和超标率可以看出,针对不同浓度的 ZEN 产生的

竞争性不同,说明本试验制备的完全抗原对 ZEN 灵敏度较高,能够应用到实际的检测中。

4 结论

合成完全抗原是构建免疫分析方法的第一步。由于 ZEN 是小分子物质,仅有反应原性没有免疫原性。必须将 ZEN 与大分子蛋白偶联才能刺激机体产生特异性抗体。本试验通过对 ZEN C₆ 位的酮基与 O-羧甲基羟氨反应,形成玉米赤霉烯酮肟化物,再通过活性酯法获得具有免疫原性的 ZEN-BSA 和 ZEN-OVA。两种完全抗原的蛋白浓度分别为 1.62 和 1.33 mg·mL⁻¹,结合比分别为 7.0:1 和 6.1:1。经 SDS-PAGE 电泳和紫外扫描鉴定两种抗原合成成功。用间接竞争 ELISA 方法鉴定 ZEN-BSA,得到标准曲线 $y=0.398\ 87+0.679\ 81/[1+(x/0.311\ 99)^{0.490\ 03}]$, $R^2=0.996\ 8$ 。天然样品检测结果表明,用此完全抗原检出的高粱样品超标率为 6.25%,小麦粉超标率为 8.33%。在此基础上,本实验室将继续开展动物免疫、单抗合成等后续试验,为开发稳定性高、检测限低的国产试剂盒提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 甄玉萍.玉米赤霉烯酮的提取纯化及其产生菌的产毒性研究[D].齐齐哈尔:齐齐哈尔大学,2016.
- [2] ABDELLAH Z,MIGUEL S J,CARLOS M J,et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(1): 1-18.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品中真菌毒素限量:GB 2761—2017[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [4] KLARIĆ M S,CVETNIĆ Z,PEPELJNJAK S,et al. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography[J]. Archives of Industrial Hygiene & Toxicology, 2009, 60(4): 427-434.
- [5] OK H E,CHOI S,KIM M,et al. HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula[J]. Food Chemistry, 2014, 163: 252-257.
- [6] CHEN D,CAO X,TAO Y,et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasound-assisted extraction and auto solid-phase clean-up method for the determination of *Fusarium* toxins in animal derived foods[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1311: 21-29.
- [7] KONG D,LIU L,SONG S,et al. A gold nanoparticle-based semi-quantitative and quantitative ultrasensitive paper sensor for the detection of twenty mycotoxins[J]. Nanoscale, 2016, 8: 5245-5253.

- [8] KONG D, XIE Z, LIU L, et al. Development of indirect competitive ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of sterigmatocystin in cereal products[J]. Food and Agricultural Immunology, 2017, 28(2): 260-273.
- [9] LI A, TANG L, SONG D, et al. A SERS-active sensor based on heterogeneous gold nanostar core-silver nanoparticle satellite assemblies for ultrasensitive detection of aflatoxin B₁ [J]. Nanoscale, 2016, 8: 1873-1878.
- [10] PENG D, FENG L, PAN Y, et al. Development and validation of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring organoarsenic compounds in edible chicken, pork and feed[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 821-828.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中玉米赤霉烯酮的测定: GB/T 19540—2004[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [12] GEFEN T, VAYA J, KHATIB S, et al. The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity[J]. Immunology, 2015, 144(1): 116-126.
- [13] 王元凯. 玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及高通量定性、定量检测技术的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [14] GENDLOFF E H, CASALE W L, RAM B P, et al. Hapten-protein conjugates prepared by the mixed anhydride method[J]. Journal of Immunological Methods, 1986, 92: 15-20.
- [15] 曹红翠. 紫外分光光度法测定蛋白质的含量[J]. 广东化工, 2007(8): 93-94.
- [16] 曹欢, 祭芳, 王秀宇, 等. 玉米赤霉烯酮半抗原及全抗原的合成与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(9): 975-978.
- [17] 李俊锁. 兽药残留分析研究进展[J]. 中国农业科学, 1997, 30(5): 81-87.
- [18] 陈新建, 陈梅英, 赵会杰. 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998.
- [19] 孙亚宁. 玉米赤霉烯酮免疫学快速检测技术研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [20] 陈晓飞. 抗玉米赤霉烯酮和黄曲霉毒素 B₁ 抗体的制备和评价[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [21] 唐宁. 玉米赤霉烯酮单抗的制备及初步应用[M]. 扬州: 扬州大学, 2009.
- [22] TANG X, LI X, LI P, et al. Development and application of an immunoaffinity column enzyme immunoassay for mycotoxin zearalenone in complicated samples[J]. Plos One, 2014, 9(1): 85606.
- [23] THONGRUSSAMEE T, KUZMINA N S, SHIM W B, et al. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in cereals[J]. Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2008, 25(8): 997-1006.
- [24] 王景琳, 张志东, 尹世兴, 等. 玉米赤霉烯酮免疫检测技术研究-兔抗玉米赤霉烯酮抗体研制[J]. 中国兽医科技, 1991, 21(1): 13-14.
- [25] 胥传来, 彭池方, 郝凯, 等. 动物源食品中磺胺二甲嘧啶人工抗原的合成研究[J]. 食品科学, 2005(7): 118-121.
- [26] 刘琦, 生威, 李志, 等. 基于单克隆抗体的玉米赤霉烯酮检测方法研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(21): 111-115.
- [27] 杨振东, 宁炜, 徐丹, 等. 玉米赤霉烯酮人工抗原的合成以及抗体的制备[J]. 分析科学学报, 2011, 27(2): 158-161.
- [28] HERMANSON G T. Bioconjugate techniques[M]. 2nd ed. Rockford, Illinois(USA): Elsevier, 2008.
- [29] 吕俊美. 玉米赤霉烯酮及其衍生物单克隆抗体的制备及免疫试纸检测方法的建立[D]. 新乡: 河南科技学院, 2020.
- [30] 赵红艳. 玉米赤霉烯酮胶体金免疫层析试纸条的研制[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.

Preparation and Identification of Zearalenone Complete Antigen

ZHANG Hao-nan, GAO Jian-wei

(College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161000, China)

Abstract: In order to reduce the cost of detecting zearalenone (ZEN) in grains by the basic-level testing department, it is necessary to develop a domestically produced testing kit, and the development of the kit need the support of complete antigen. The main content of this experiment is to oximize ZEN to produce zearalenone oxime (ZENO), and then combine ZENO with bovine serum albumin (BSA) and chicken ovalbumin (OVA) by the DCC-NHS active ester method. ZEN complete antigen. Finally, dialysis removes the unconjugated small molecule ZEN, and the result is complete antigen. The original coating ZEN-BSA concentration was $1.62 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the immunogen ZEN-OVA concentration was $1.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The UV method and SDS-PAGE method were used to identify the complete antigen. At the same time, an indirect ELISA method was established to verify the original coating ZEN-BSA. The results showed that the ZEN complete antigen synthesized by the active ester method had a new absorption peak at 319 nm, and the SDS-PAGE chart showed that the molecular weight of ZEN-BSA was concentrated at 60-70 kDa, and the molecular weight of ZEN-OVA was concentrated at 40-50 kDa. Different from the molecular weight of BSA and OVA but not much different. The ZEN-BSA binding ratio was 7.0:1 and the ZEN-OVA binding ratio was 6.1:1 calculated according to the UV scan. According to the immunological method chart, the $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ value decreased with the increase of the toxin concentration. This test uses three methods to identify the ZEN complete antigen, which proves that the ZEN complete antigen coupling is successful.

Keywords: zearalenone; antigen synthesis; enzyme-linked immunosorbent assay; toxin detection