

米酵菌酸单克隆抗体的制备与鉴定

谭 攀¹, 吴 鑫¹, 唐 霏¹, 黄建飞², 张贵虹², 陈 晶^{2*}

(1. 深圳市三方圆生物科技股份有限公司, 深圳 518000; 2. 深圳市质量计量检测研究院, 深圳 518000)

摘 要: **目的** 建立鲜湿米粉中米酵菌酸(bongkrelic acid, BA)的免疫学快速检测方法, 制备特异性识别 BA 的单克隆抗体并进行评价。**方法** 利用碳二亚胺[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]法将 BA 半抗原与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和卵清蛋白(ovalbumin, OVA)载体偶联, 分别合成 BA 免疫原(BA-BSA)和包被原(BA-OVA), 用 BA-BSA 免疫 Balb/C 小鼠, 取免疫效果好的小鼠脾脏与小鼠 NS-1 骨髓瘤细胞进行融合。采用间接竞争酶联免疫吸附法(indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, icELISA)进行筛选, 筛选出能分泌所需特异性抗体的杂交瘤细胞, 利用有限稀释法进行亚克隆得到单株能稳定分泌所需抗体的细胞; 采用体内诱生法制备腹水型单克隆抗体。利用正辛酸-饱和硫酸铵法纯化腹水型抗体, 通过酶联免疫吸附法测定纯化后的抗体效价。**结果** 成功合成了 BA 免疫原 BA-BSA 和 BA 包被原 BA-OVA, 筛选获得 BA 杂交瘤细胞株 BA-3F1E9, 单克隆抗体的效价为 1×10^5 。**结论** 本研究建立了制备高特异性 BA 单克隆抗体的方法, 为开发鲜湿米粉中 BA 快速检测试剂盒提供了理论依据。

关键词: 米酵菌酸; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附法

Preparation and identification of monoclonal antibodies of bongkrelic acid

TAN Pan¹, WU Xin¹, TANG Fei¹, HUANG Jian-Fei², ZHANG Gui-Hong², CHEN Jing^{2*}

(1. Shenzhen Sanfangyuan Biological Technology Co., Ltd., Shenzhen 518000, China;
2. Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT: Objective To establish an immunological rapid detection method for bongkrelic acid (BA) in fresh wet rice noodles, and prepare and evaluate monoclonal antibodies that specifically recognize BA. **Methods** BA semi-antigen was coupled with bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) carriers using the carbodiimide 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) method to synthesize BA immunogen (BA-BSA) and encapsulant (BA-OVA), respectively. Balb/C mice were immunized with BA-BSA, and the spleens of mice with good immunization results were taken and fused with NS-1 myeloma cells of mice. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) was used to screen the hybridoma cells that could secrete the desired specific antibody, and subcloning was performed using limited dilution to obtain a single cell that could stably secrete the desired antibody; *in vivo* ascites-type monoclonal antibody was prepared by *in vivo* induction method. The ascites-type antibody was purified by *n*-octanoic acid-ammonium saturated sulfate method, and the potency of the purified antibody was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Immunogen BA-BSA and coating antigen BA-OVA were

基金项目: 2022 年深圳市可持续发展专项、创新创业专项(KCXFZ20211020165404007)

Fund: Supported by the 2022 Sustainable Development Special Project of Shenzhen and Special Project on Innovation and Entrepreneurship (KCXFZ20211020165404007)

*通信作者: 陈晶, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检测方向。E-mail: 59420435@qq.com

*Corresponding author: CHEN Jing, Master, Senior Engineer, Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, No.4, Xili Tongfa Road, Nanshan District, Shenzhen 518000, China. E-mail: 59420435@qq.com

successfully synthesized and the hybridoma cell line BA-3F1E9 was obtained by screen. The titer of this monoclonal antibody was 1×10^5 . **Conclusion** A method for preparing highly specific monoclonal antibody against BA has been established, which will provide a theoretical basis for developing a rapid detection kit for BA in fresh wet rice noodles.

KEY WORDS: bongkreikic acid; monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

0 引言

米酵菌酸(bongkreikic acid, BA, $C_{28}H_{38}O_7$)是由椰毒假单胞菌属酵米面亚种产生的一种可以引起食物中毒的毒素,最早于 20 世纪 30 年代被荷兰学者 Mertens 和 Vanveen 在研究爪哇居民椰子发酵食物中毒时发现^[1]。BA 是一种强呼吸毒素,可引起人和多种动物的急性中毒^[2-3],导致神经系统、消化系统及泌尿系统损伤,主要靶器官是肝、脑、肾等脏器^[4],一旦中毒会因呼吸衰竭而死亡^[5-9],是发酵玉米面制品、变质鲜银耳及其他变质淀粉类制品引起食物中毒的主要原因。其次,由于 BA 的耐热性强,100℃开水煮沸和高压蒸煮(120℃)均不能破坏其毒性。有研究表明人体摄入 1~1.5 mg 的 BA 可能引起生命垂危,而另一项研究则认为口服 BA 对人体的半数致死量为 3.16 mg/kg^[10]。据不完全统计,自 2014 年以来,我国由 BA 引起的食物中毒事件高达几十余起,病死率高达 50%以上^[11-12]。为了预防中毒事件的发生和应对中毒后的快速治疗处理,建立 BA 的快速灵敏检测方法十分必要。

目前针对 BA 的检测方法主要为仪器分析法,包括高效液相色谱法^[13-15]、高效液相色谱-串联质谱法^[16-20]、超高效液相色谱法^[21-22]、超高效液相色谱-串联质谱法^[23-28]等。这些方法虽然准确可靠,但是其检测时间长,耗费成本高,且操作复杂,常作为确证方法。而基于抗原抗体特异性结合的免疫分析方法因其快速、灵敏、准确和高通量等优点能够满足现场快速筛查的需求而深受青睐,特别是胶体金免疫层析法易操作和低成本的优势,而被广泛应用于食品安全快速筛查^[29-32]。基于抗体的 BA 检测方法特异性强,灵敏度高,且操作简便、成本低。因此,研究抗 BA 单克隆抗体的制备对于 BA 的快速检测具有十分重要的经济和社会意义。

为了建立一种快速、特异性高的 BA 免疫检测方法。本研究通过 BA 半抗原与载体蛋白偶联制备免疫原^[33-34],进而免疫 BALB/c 小鼠,再取小鼠脾细胞与小鼠 NS-1 骨髓瘤细胞融合,经筛选和克隆^[35],制备并进行初步评价 BA 单克隆抗体,为下一步研制鲜湿米粉中 BA 快速检测免疫试剂盒提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

SPF 级的 Balb/C 雌性小鼠(6~8 周龄,体重约 20 g/只,购于广东省医学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK-(粤)2018-0002)。

BA[分析纯,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];毒黄素、T-2 毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素、呕吐毒素、河豚毒素、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉酮(分析纯,坛墨质检标准物质中心);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC·HCl]、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、丁二胺、蔗糖、碳酸氢钠、一水葡萄糖、碳酸钠、氯化钠、硼酸钠,十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、浓硫酸、柠檬酸、正辛酸(分析纯)、弗式完全佐剂、弗式不完全佐剂、聚乙二醇 1500 (Macrogol 1500, PEG 1500)、50×HAT 培养基添加剂、50×HT 培养基(生物技术级)(上海麦克林生化科技股份有限公司);PRMI 1640 培养基(生物技术级,美国赛默飞世尔科技有限公司);胎牛血清[生物技术级,翌圣生物科技(上海)股份有限公司];青链霉素溶液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, HEPES)、谷氨酰胺(生物技术级)、BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司);巯基乙醇(分析纯,上海海曲化工有限公司);N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、乙酸乙酯(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);NS-1 细胞(生物技术级,江苏宝莱生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

TD5 多管架自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);Multiskan-FC 酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);SDLA-B-1101 超纯水机(重庆澳凯龙医疗科技股份有限公司);PW-960 全自动酶标洗板机(深圳汇松科技发展有限公司);XW-80A 旋涡混合器(深圳市白鳍豚生物科技有限公司);BPX-52 电热恒温培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);CLM-170B-8-CN 二氧化碳培养箱(太仓艺斯高医疗器械有限公司);S100F+XSZ-D 倒置显微镜[尼康仪器(上海)有限公司];SW-CJ-LFD 超净工作台(苏州净化设备有限公司);Cary 60 UV-Vis 分光光度计[安捷伦科技(中国)有限公司];H2T-A2000 电子天平(精度 0.01 g,福州华志科学仪器有限公司);BSA224S-CW 分析天平[精度 0.0001 g,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 抗原的合成

(1)米酵菌酸免疫原的制备

称取 1.0 mg BA 溶于 0.2 mL DMF 中,称取 3 mg EDC·HCl、

2 mg NHS 溶于 0.5 mL pH 8.5 的硼酸盐缓冲液(borate buffer, BB), 将前者滴加入后者中, 室温避光活化 6 h, 得到 BA 活化液。称取 8 mg BSA 溶于 1 mL pH 8.5 的 BB 中, 将上述 BA 活化液滴加入蛋白溶液, 室温避光反应 8 h。4℃下用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)透析 9 次, 每次间隔 8 h, 离心取上清即为 BA 免疫原。

(2)米酵菌酸包被原的制备

称取 1.0 mg BA 溶于 0.2 mL DMF 中, 称取 3 mg EDC·HCl、2 mg NHS 溶于 0.5 mL pH 8.5 的 BB 中, 将前者滴加入后者中, 室温避光活化 6 h, 得到 BA 活化液。称取 5 mg OVA 溶于 1 mL pH 8.5 的 BB 中, 将上述 BA 活化液滴加入蛋白溶液, 室温避光反应 8 h。4℃下用 0.01 mol/L PBS 透析 9 次, 每次间隔 8 h, 离心取上清即为 BA 包被原。

本研究采用 EDC 法^[36]制备 BA 完全抗原, 将 BA 半抗原分别与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联, 得完全抗原 BA-BSA 和 BA-OVA。用紫外分光光度计于 230~360 nm 波长处扫描吸收曲线。

1.3.2 小鼠免疫及效价测定

将 BA 免疫原 BA-BSA 与弗氏完全佐剂等量混合, 完全乳化后, 通过腹腔注射 0.1 mL 免疫 6~8 周龄 Balb/C 雌性小鼠, 每只注射剂量为含 BA-BSA 100 μg, 之后每隔 2 周以相同剂量 BA-BSA 免疫原与弗氏不完全佐剂混合乳化后进行腹腔注射免疫小鼠, 共免疫 3 次, 三免后通过小鼠尾静脉进行采血, 分离血清, 以 BA 包被原 BA-OVA 包被酶标板, 用间接竞争酶联免疫吸附法(indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, icELISA)检测分析血清抗体效价及对 BA 的抑制效果。选取免疫效价检测值最高、BA 抑制效果最好的小鼠, 于细胞融合前 3 d 进行一次冲击免疫, 3 d 后取冲击免疫过的小鼠脾脏细胞与小鼠 NS-1 骨髓瘤细胞进行细胞融合。

1.3.3 细胞融合及筛选

按小鼠脾脏细胞:小鼠 NS-1 骨髓瘤细胞=5~10:1 的比例混合于 50 mL 离心管中, 经 1500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 尽可能去除干净, 用手指轻弹离心管底部使沉淀混匀, 将离心管置于 37℃水浴中。将预热在 37℃水浴中的 PEG 1 mL 缓慢滴入离心管中, 边加边轻轻搅拌, 在 1 min 内滴完, 37℃水浴中静置 1 min。之后先慢后快在 5 min 内加入 10 mL 37℃预热的 RPMI-1640 培养基, 再经 1000 r/min 离心 7 min, 弃去上清液, 加入适量 HAT 培养基中重悬细胞, 将细胞重悬液加入装有足量 HAT 培养基的玻璃瓶中, 混合均匀, 将混悬液以每孔 100 μL 加入已有饲养细胞 100 μL 的 96 孔细胞培养板中, 将培养板于培养箱中 37℃培养, CO₂ 含量为 5%。

融合后第 7 d 观察细胞的生长状况, 用 HAT 培养基半换液一次, 10 d 后再用 HT 培养基全换液, 待细胞长满孔底 1/3~1/2 时, 吸取上清液用 icELISA 进行检测, 间接检

测(OD_{450 nm}), 包被抗原为 BA-OVA, 以 $P/N \geq 2.1$ (P 为阳性 OD 值, N 为阴性对照 OD 值)作为阳性判断标准。对检测结果为阳性、对 BA 抑制率高的细胞孔进行细胞亚克隆。采用有限稀释法进行亚克隆, 选择阳性值、对 BA 抑制率高的阳性孔再次克隆。连续克隆 3 次或以上, 待所有细胞孔阳性率检测为 100%时, 扩大培养并冻存。

1.3.4 单克隆抗体腹水的制备与纯化

腹水的制备: 选取 10 只 6~8 周龄的 Balb/C 小鼠, 腹部注射液体石蜡 0.5 mL。一周后, 再经腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞, 1~2 周后小鼠腹腔杂交瘤细胞生长并产生大量腹水, 待小鼠腹部膨大到一定程度时收集腹水。将腹水用低速离心机 1000 r/min 离心 5 min, 取中间层上清。再用高速冷冻离心机 10000 r/min 离心 5 min, 取上清用 icELISA 法进行检测。

腹水的纯化: 取 1 mL 腹水, 用 0.06 mol/L pH 4.8 的乙酸盐缓冲液稀释 2~4 倍, 逐滴加入 33 μL 正辛酸, 并搅拌 30 min, 4℃静置 2 h, 4℃, 12000 r/min 离心 30 min, 取上清, 加入体积为上清 1/10 的 0.1 mol/L pH 7.4 的 PBS 溶液, 并用 1 mol/L NaOH 调 pH 为 7.4, 搅拌下滴加等体积 pH 7.4 的饱和硫酸铵溶液, 静置 2 h 或 4℃过夜, 4℃, 12000 r/min 离心 30 min, 弃上清。将沉淀溶于适量体积的 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 中, 4℃条件下用 0.01 mol/L 的 PBS 透析除盐。

1.3.5 单克隆抗体的浓度与效价

BCA 法检测抗体浓度: 按 BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒说明, 将标准品或样品加入到酶标板中, 再将 BCA 工作液加入到酶标板中, 37℃孵育 30 min, 冷却至室温后, 在酶标仪上测各孔在 562 nm 处的吸光度值, 计算待测蛋白的浓度。

抗体的效价: 将 BA 包被原 BA-OVA 分别稀释至质量浓度为 0.25、0.50、1.00、2.00 μg/mL, 100 μL/孔包被在酶标板上, 将抗体进行梯度稀释, 采用 icELISA 测定效价。

1.3.6 单克隆抗体亚型鉴定

本研究采用抗体亚型鉴定试剂盒进行鉴定, 按试剂盒说明书, 将抗体亚型 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM 加入酶标板中, 4℃包被过夜或 37℃包被 2 h。洗板、拍干, 加入封闭液室温孵育 1 h。洗板、拍干, 加入一定待测抗体, 室温孵育 1 h。洗板、拍干, 加入相应浓度的辣根过氧化物酶标记过的羊抗鼠, 室温孵育 1 h。洗板、拍干, 加入底物液后避光室温孵育 10 min, 加入 2 mol/L 硫酸终止反应, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值, 通过吸光度值可判断出待测抗体亚型。

1.3.7 单克隆抗体灵敏度测定

一般用半数抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC₅₀)值来评价抗体的灵敏度, 通过测定 BA 的 icELISA 标准抑制曲线, 标准品质量浓度梯度 0、3、6、12、24、48 ng/mL。以 BA 标准品浓度的对数值为横坐标, 450 nm 吸光度值

为纵坐标, 通过线性函数进行拟合, 计算得出标准曲线的 IC_{50} 。

1.3.8 单克隆抗体特异性测试

本研究选取毒黄毒素、T-2 毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素、呕吐毒素、河豚毒素、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉酮 8 种标准品进行交叉反应的测定, 通过 icELISA 得到 BA 单克隆抗体对 10 ppm 浓度的 8 种标准品的抑制情况, 以此判断制备的 BA 单克隆抗体的特异性。以单抗对 BA 的 IC_{50} 与各结构类似物的 IC_{50} 的百分比作为其交叉反应率。其中交叉反应率越小, 则说明 BA 单克隆抗体对该 BA 的特异性越高。

2 结果与分析

2.1 完全抗原的合成

本研究用 BA 半抗原和 BSA、OVA 载体蛋白制备了完全抗原 BA-BSA 和 BA-OVA, 通过紫外分光光度计扫描检测, 结果如图 1 所示, BA 半抗原吸收峰位置相较于完全抗原 BA-BSA、BA-OVA 都发生偏移, 强度也有一定变化。因此可以推测 BA 半抗原与 BSA、OVA 两种载体蛋白均偶联成功。

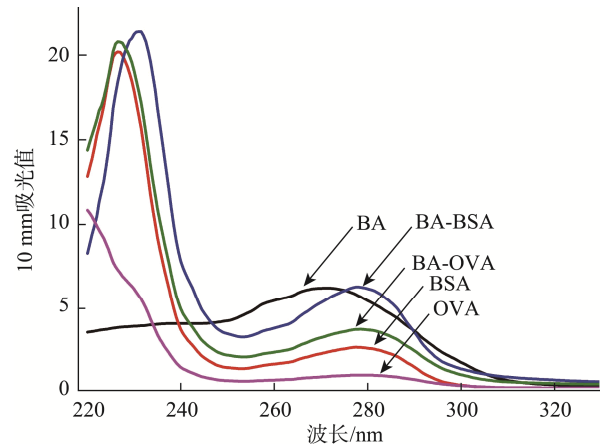


图 1 BA 免疫抗原和包被抗原的紫外扫描光谱
Fig.1 Ultraviolet scanning spectra of BA immune antigens and coated antigens

2.2 小鼠免疫及效价

将 BA-BSA 免疫的小鼠阳性血清及空白小鼠阴性血清进行梯度稀释, 采用方阵法^[37]确定包被原 BA-OVA 最佳包被浓度和阳性血清最佳稀释浓度, 选取 450 nm 下吸光度值为 2.0 左右时所对应的包被原浓度以及阳性血清稀释倍数为二者的最佳工作浓度。经过 4 次免疫(表 1), 检测结果得出血清在 1:8000, 抗原包板质量浓度为 1 μg/mL 时效价最佳。

表 1 免疫小鼠多抗血清的效价
Table 1 Titer of polyclonal antiserum in immunized mice

小鼠	空白对照	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
1 号	0.065	3.262	3.020	2.744	1.803
2 号	0.058	2.454	1.853	1.378	0.813
3 号	0.062	2.624	2.358	1.796	1.389

2.3 单克隆细胞株的融合与筛选

细胞融合一周后, 用 HAT 培养基进行半换液, 融合 10 d 后, 用 HT 培养基进行全换液, 待融合细胞集落长到孔底 1/3~1/2 左右时, 吸取培养液使用 ELISA 方法进行特异性抗体检测, 确定哪个孔有分泌特异性抗体的杂交瘤细胞。选择检测结果为阳性、对 BA 抑制率高的细胞孔进行细胞亚克隆, 采用有限稀释法进行亚克隆, 选择阳性值大、对 BA 抑制率高的阳性孔再次克隆。连续克隆 3 次或以上, 待所有细胞孔阳性率检测为 100%时, 扩大培养并冻存。得到能稳定分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞, 如表 2 所示, 命名为 BA-3F1E9, 抑制率为 86.6%。

表 2 单克隆杂交瘤细胞上清的抑制率(%)
Table 2 Inhibitory rates of supernatant of monoclonal hybridoma cells (%)

标准品/ (mg/kg)	一次亚克隆	二次亚克隆	三次亚克隆	四次亚克隆
15	53.3	68.2	72.4	86.6

2.4 单克隆腹水的制备与纯化及效价测定

通过体内培养法制备 3 批腹水, 每批 10 只 Balb/C 小鼠, 将腹水用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化后, 用 ELISA 测定纯化的腹水抗体效价。由表 3 可知, 腹水的效价达到 1×10^5 , 且 3 批腹水的批间差异小, 相对标准偏差值为 1.7%, 证明得到的杂交瘤细胞能稳定分泌所需的特异性单克隆抗体, 并且抗体的稳定性良好。

表 3 单克隆抗体腹水的效价
Table 3 Titer of monoclonal antibody ascities

腹水批次	效价			
	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6
BA-BSA 腹水 20231012	3.747	2.969	1.592	0.584
BA-BSA 腹水 20230915	3.710	2.818	1.616	0.613
BA-BSA 腹水 20231021	3.805	2.795	1.562	0.724

2.5 ELISA 测定结果

由 BCA 方法检测得到纯化的腹水抗体蛋白质质量浓度为 6 mg/mL。通过 ELISA 测定其抗体效价, 如表 4 可知, 抗体的效价为 1×10^5 , 初步达到了单克隆抗体的制备要求。

表 4 单克隆抗体的效价
Table 4 Titer of monoclonal antibody

抗体	抗体效价			
	1×10 ³	1×10 ⁴	1×10 ⁵	1×10 ⁶
BA 抗体	3.747	2.969	1.592	0.584
空白对照	0.112	0.073	0.070	0.065

2.6 单克隆抗体亚型

用抗体亚型鉴定试剂盒鉴定腹水抗体的类型, 通过吸光度值可判断出待测抗体亚型, 吸光度值最大的孔对应的亚型即为腹水抗体亚型, 实验结果显示, IgG1 亚型的孔吸光度值最大, 可判断单克隆抗体亚型为 IgG1。

2.7 单克隆抗体灵敏度

通过测定 BA 的 icELISA 标准抑制曲线, 计算得出标准曲线的 IC₅₀。如表 5 可知, 标准曲线相关系数(r^2)为 0.9988, 线性良好; 标准曲线的 IC₅₀ 为 6.9 ng/mL, 以此来评价单抗灵敏度。

表 5 BA 的 icELISA 标准抑制曲线
Table 5 icELISA standard inhibition curves for BA

BA 标准品质量浓度/ (ng/mL)	吸光度值	相关系数(r^2)	IC ₅₀ / (ng/mL)
0	2.284	0.9988	6.9
3	1.649		
6	1.201		
12	0.784		
24	0.474		
48	0.245		

2.8 单克隆抗体特异性

选取毒黄毒素、T-2 毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素、呕吐毒素、河豚毒素、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉酮 8 种标准品进行交叉反应的测定。其 IC₅₀ 和交叉反应率如表 6 所示, BA 与 8 种标准品的交叉反应率均小于 0.1%, 说明与这 8 中毒素没有交叉反应, 进一步说明 BA 单抗特异性良好。

表 6 单克隆抗体的交叉反应率
Table 6 Cross-reactivity rates of monoclonal antibody

交叉物	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应率/%
BA	10	100
毒黄毒素	>10000	<0.1
T-2 毒素	>10000	<0.1
赭曲霉毒素	>10000	<0.1
伏马毒素	>10000	<0.1
呕吐毒素	>10000	<0.1
河豚毒素	>10000	<0.1
黄曲霉毒素 B ₁	>10000	<0.1
玉米赤霉酮	>10000	<0.1

3 结 论

本研究采用碳二亚胺法将 BA 半抗原分别与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联制备 BA 完全抗原, 免疫原 BA-BSA 和包被原 BA-OVA。通过杂交瘤技术将免疫成功的小鼠脾脏细胞与小鼠 NS-1 骨髓瘤细胞融合, 对细胞株经过筛选和亚克隆, 获得 1 株 BA 杂交瘤细胞株 BA-3F1E9。通过体内培养法制备的腹水抗体并纯化, 腹水效价达到 1×10⁵, 3 批腹水抗体的效价批间差异小, 说明制备的单克隆抗体特异性和稳定性良好。为下一步研制鲜湿米粉中 BA 快速检测免疫试剂盒或检测卡提供了实验依据。

参考文献

[1] FALCONER TM, KERN SE, BRZEZINSKI JL, *et al.* Identification of the potent toxin bongkrekeic acid in a traditional African beverage linked to a fatal outbreak [J]. *Forensic Sci Int*, 2017, 270: E5–E11.

[2] JIAO ZQ, KAWAMURA Y, MISHIMA N, *et al.* Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: Description of *B. gladioli* pathovar co-covenenans and an emended description of *B. gladioli* [J]. *Microbiol Immunol*, 2003, 47(12): 915–925.

[3] KAZUTO T, TAKESHI I, ATSUSHI Y, *et al.* KH-17, a simplified derivative of bongkrekeic acid, weakly inhibits the mitochondrial ADP/ATP carrier from both sides of the inner mitochondrial membrane [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2022, 101(4): 865–872.

[4] MOEBIUS N, ROSS C, SCHERLACH K, *et al.* Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekeic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli* [J]. *Chem Biol*, 2012, 19(9): 1164–1174.

[5] HAN D, CHEN J, CHEN W. Bongkrekeic acid and *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans*: Formidable foe and ascending threat to food safety [J]. *Foods*, 2023, 12(21): 3926.

[6] CAO XM, LI LH, LIANG HZ, *et al.* Dual-modular immunosensor for bongkrekeic acid detection using specific monoclonal antibody [J]. *J Hazard Mater*, 2023. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.131634

[7] LI H, LIANG Z, LI Y, *et al.* Molecular docking and molecular dynamics simulation study on the toxicity mechanism of bongkrekeic acid [J]. *Toxicon*, 2023. DOI: 10.1016/j.toxicon.2023.107021

[8] GUDO ES, COOK K, KASPRE AM, *et al.* De-scription of a mass poisoning in a rural district in Mozambique: The first documented bongkrekeic acid poisoning in Africa [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(9): 1400–1406.

[9] SHI RJ, LONG CY, DAI Y, *et al.* Bongkrekeic acid poisoning: Severe liver function damage combined with multiple organ failure caused by eating spoiled food [J]. *Legal Med*, 2019, 41(10): 16–22.

[10] ANWAR M, KASPER A, STECKA RA, *et al.* Bongkrekeic acid: A review of a lesser-known mitochondrial toxin [J]. *J Med Toxicol*, 2017, 13(2): 173–179.

[11] ZHANG H, GUO Y, CHEN L, *et al.* Epidemiology of foodborne

- bongkrekeic acid poisoning outbreaks in China, 2010 to 2020 [J]. *PLoS One*, 2023, 18(1): e0279957.
- [12] 苏嘉妮, 杨丹婷, 李婉珊, 等. 2018 年广东省米面制品、淀粉及其制品中椰毒假单胞菌酵米面亚种的调查分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(13): 4112–4118.
- SU JN, YANG DT, LI WS, *et al.* Investigation and analysis of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* from rice flour products and starch and its products in Guangdong Province in 2018 [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(13): 4112–4118.
- [13] 康翠欣, 毛燕妮, 何艳, 等. 高效液相色谱法快速测定淀粉及其制品中米酵菌酸的含量[J]. *食品科技*, 2021, 46(3): 308–312.
- KANG CX, MAO YN, HE Y, *et al.* Fast determination of bongkrekeic acid in starch and its products by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci Technol*, 2021, 46(3): 308–312.
- [14] 李红艳, 金燕飞, 黄海智, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器结合固相萃取法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 247–251.
- LI HY, JIN YF, HUANG HZ, *et al.* Fast determination of bongkrekeic acid in foods using mixed-mode weak anion exchange solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) [J]. *Food Sci*, 2016, 37(24): 247–251.
- [15] 侯佰立. 固相萃取-高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. *现代食品*, 2019, (9): 169–172.
- HOU BL. Fast determination of bongkrekeic acid in foods using solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *Mod Food*, 2019, (9): 169–172.
- [16] 方兰云, 江艳华, 李继革, 等. 基于硝基修饰的锆基金属有机框架材料的分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的米酵菌酸[J]. *分析化学*, 2023, 51(6): 1024–1032.
- FANG LY, JIANG YH, LI JG, *et al.* Determination of rice fermented acid in food by dispersive solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry of nitro-modified zirconium-based metal-organic framework materials [J]. *Chin J Anal Chem*, 2023, 51(6): 1024–1032.
- [17] ZHOU B, LI HL, MA J, *et al.* Fast determination of bongkrekeic acid in plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2022, 40(3): 219–221.
- [18] 温海滨. 高效液相色谱-串联质谱法测定黑木耳中的米酵菌酸[J]. *现代食品*, 2020, (12): 166–169.
- WEN HB. Determination of bongkrekeic acid in *Auricularia auricula* by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food*, 2020, (12): 166–169.
- [19] 曾令浩, 李思颖, 李文倩, 等. 高效液相色谱-串联质谱法快速检测银耳中的米酵菌酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(19): 6538–6541.
- ZENG LH, LI SY, LI WQ, *et al.* Rapid determination of bongkrekeic acid in tremella by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(19): 6538–6541.
- [20] 张洁, 王谢, 马青青, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定木耳中米酵菌酸[J]. *河南预防医学杂志*, 2021, 32(7): 496–499.
- ZHANG J, WANG X, MA QQ, *et al.* Determination of bongkrekeic acid in agaric by HPLC-MS/MS [J]. *Henan J Prev Med*, 2021, 32(7): 496–499.
- [21] HU J, LIANG M, XIAN Y, *et al.* Development and validation of a multianalyte method for quantification of aflatoxins and bongkrekeic acid in rice and noodle products using PRiME-UHPLC-MS/MS method [J]. *Food Chem*, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133598.
- [22] 周霞, 陈万勤, 傅红雪, 等. 全自动固相萃取-超高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸含量[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(8): 159–160.
- ZHOU X, CHEN WQ, FU HX, *et al.* Fast determination of bongkrekeic acid in food by auto solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2018, 46(8): 159–160.
- [23] 于浩洋, 冯静, 李颜岩. 超高效液相色谱-串联质谱测定米粉中米酵菌酸[J]. *化学分析计量*, 2022, 31(9): 12–15.
- YU HY, FENG J, LI YY. Determination of bongkrekeic residue in rice flour by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chem Anal Meter*, 2022, 31(9): 12–15.
- [24] 罗兰, 秦威振, 王甫, 等. 超声辅助液液萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定米粉、河粉中的米酵菌酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(15): 6062–6067.
- LUO L, QIN WZ, WANG P, *et al.* Determination of bongkrekeic acid in rice noodles and chow fun by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasonic assisted liquid-liquid extraction [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(15): 6062–6067.
- [25] 张宏峰, 周思, 何荣, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定食源性中毒患者生物样品中的米酵菌酸[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(15): 2815–2818, 2824.
- ZHANG HF, ZHOU S, HE R, *et al.* Determination of bongkrekeic acid in biological samples of poisoned patients with foodborne poisoning by UPLC-MS/MS [J]. *Mod Prev Med*, 2021, 48(15): 2815–2818, 2824.
- [26] 王缘, 白春林, 刘继恒. 直接提取法-超高效液相色谱串联质谱法测定玉米面粉中米酵菌酸含量[J]. *公共卫生与预防医学*, 2023, 34(6): 76–79.
- WANG Y, BAI CL, LIU JH. Determination of bongkrekeic acid in corn flour by direct extraction-ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Public Health Prev Med*, 2023, 34(6): 76–79.
- [27] 覃冬杰, 陈荣珍, 卢艺, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定柳州螺蛳粉中米酵菌酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(13): 4273–4278.
- QIN DJ, CHEN RZ, LU Y, *et al.* Determination of bongkrekeic acid in Liuzhou river snails rice noodle by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(13): 4273–4278.
- [28] 李晨华, 李海霞, 王宾, 等. 超高压液相色谱-高分辨质谱联用仪检验血液中的米酵菌酸[J]. *化学研究与应用*, 2023, 35(3): 708–712.
- LI CH, LI HX, WANG B, *et al.* Simultaneous determination of bongkrekeic acid in blood by LC-QTOF-MS [J]. *Chem Res Appl*, 2023, 35(3): 708–712.

- 708–712.
- [29] 董宪兵, 赵博, 周纯洁, 等. 食品中米酵菌酸测定方法研究进展[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(12): 167–171.
- DONG XB, ZHAO B, ZHOU CJ, *et al.* Research progress on determination method of bongkreic acid in food [J]. J Chin Cereal Oil Ass, 2021, 36(12): 167–171.
- [30] 曹雪铭, 徐振林, 苏燕瑜, 等. 胶体金免疫层析法快速检测食品中的米酵菌酸[J]. 中国食品学报, 2023, 23(2): 309–318.
- CAO XM, XU ZL, SU YY, *et al.* The Rapid detection of bongkreic acid in foods using colloidal gold immunochromatographic assay [J]. J Chin Cereal Oil Ass, 2023, 23(2): 309–318.
- [31] 卢宇剑, 刘华良. 米酵菌酸的相关检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3273–3280.
- LU YJ, LIU HL. Research progress on related detection methods of bongkreic acid [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(8): 3273–3280.
- [32] 杜连启, 朱凤妹, 李楠. 胶体金免疫层析法检测猪肉中3种磺胺类药物残留[J]. 中国食品学报, 2014, 14(3): 151–160.
- DU LQ, ZHU FM, LI N. Colloidal gold immunochromatography assay for simultaneous detection of sulphonamides residue in pork [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2014, 14(3): 151–160.
- [33] 刘秀梅, 余东敏, 文卫华, 等. 米酵菌酸多克隆抗体的制备[J]. 卫生研究, 1995, 24(2): 93–95.
- LIU XM, YU DM, WEN WH, *et al.* Production of polyclonal antibody against bongkreic acid [J]. J Hyg Res, 1995, 24(2): 93–95.
- [34] 金光香, 赵乃听, 吴国庆. 米酵菌酸毒素抗体的制备[J]. 潍坊医学院学报, 1991, (3): 168–169.
- JIN GX, ZHAO NX, WU GQ. Production of antibody of bongkreic acid [J]. Acta Acad Med Weifang, 1991, (3): 168–169.
- [35] 刘秀梅, 文卫华. 米酵菌酸单克隆抗体细胞株的建立[J]. 卫生研究, 1996, 25(4): 48–50.
- LIU XM, WEN WH. Development of a monoclonal antibody cell line against bongkreic acid [J]. J Hyg Res, 1996, 25(4): 48–50.
- [36] 别玮, 姚佳, 冯鑫, 等. 美洛昔康单克隆抗体制备及其免疫层析试纸条的研制[J]. 质量安全与检验检测, 2023, 33(5): 89–96.
- BIE W, YAO J, FENG X, *et al.* Preparation of monoclonal antibody in meloxicam and development of immunochromatographic strips for meloxicam test [J]. Qual Saf Inspect Test, 2023, 33(5): 89–96.
- [37] 谭攀, 吴鑫, 蔡杜曼, 等. 酚酞单克隆抗体的制备[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(24): 8479–8483.
- TAN P, WU X, CAI DM, *et al.* Preparation of monoclonal antibody of phenolphthalein illegally added in health products [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(24): 8479–8483.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



谭攀, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全快速检测技术。

E-mail: 445831146@qq.com



陈晶, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检测方向。

E-mail: 59420435@qq.com