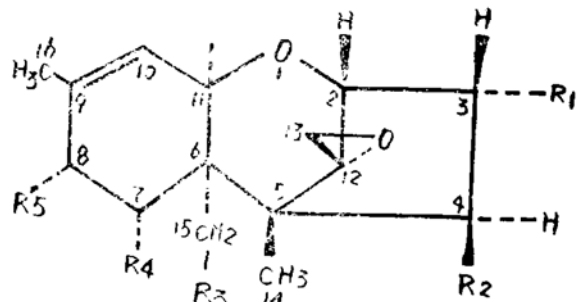


某些单端孢霉烯族化合物的免疫化学研究进展 (文献综述)

阳传和综述 罗雪云审校
(卫生部食品卫生监督检验所)

单端孢霉烯化合物(Trichothecenes)是某些农作物致病真菌的代谢产物,其化学结构主要是一类倍半萜烯类物质,目前已发现有5大类45种(图1)。主要产毒真菌有镰刀菌(*Fusarium*)、木霉(*Trichoderma*)、漆斑菌(*Myrothecium*)、单端孢霉(*Trichothecium*)、头孢霉(*Cephalosporium*)、葡萄状穗霉(*Stachbotrys*)和柱孢霉(*Cylindrocarpum*)等。由镰刀菌属所引起的麦类、玉米等的赤霉病,污染大量该类毒素。人畜误食带毒的谷物后,可引起呕吐、腹泻等急性中毒症状,有时可使心肌受损,胃肠出血,严重地影响造血功能,造成人畜死亡。典型的病例有食物中毒性白细胞缺乏病(ATA)

黑葡萄穗霉毒素中毒病等^[2]。这类毒素中,最常见且危害性最大的有T-2毒素,脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、二醋酸蔗草镰刀菌烯醇(DAS)及玉米赤霉烯酮(F-2)等^{[4][3]}。



参 考 文 献

- (2) 夏宏器,等,肉毒中毒,第1版,乌鲁木齐:新疆人民出版社,1982,195—204
- (3) Hall JD.et al.Isolation of an organism resembling *clostridium barati* which produces type F botulina toxin from an infant with botulism.J Clin Microbiol 1985, 21, 654.
- (4) McCroskey LM.et al.Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. J Clin Microbiol 1986, 23, 201.
- (6) Midura TF.Laboratory aspects of infant botulism in California.Rev Infect Dis 1979, 1, 652.
- (7) Paton JC.et al.Quantities of *clostridium botulinum* organisms and toxin in feces and presence of *clostridium botulinum* toxin in the serum of an infant with botulism.J Clin Microbiol 1983, 17, 13
- (8) Mills DC.et al.The large intestine as the site of *clostridium botulinum* colonization in human infant J Infect Dis 1987, 156, 997.
- (9) Sugiyama H.et al.Intraintestinal toxin in infant mice challenged intragastrically with *clostridium botulinum* spores.Infect Immunity 1978, 21, 59.
- (10) Moberg LJ.et al.Microbial ecologic basis of infant botulism as studied with germfree mice.Infect Immunity 1979, 25, 653.
- (11) Aron SS.Infant botulism:Anticipating the second decade.J Infect Dis 1986, 154, 201.
- (12) Aureli P.et al.Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *clostridium butyricum* in Italy.J Infect Dis 1986, 154, 207.
- (13) Sonnabend OAR.et al.Continuous microbiological and pathological study of 70 sudden and unexpected infant deaths:Toxigenic intestinal *clostridium botulinum* infection in 9 cases of sudden infant death syndrome.Lancet i Feb 1985, 21, 237.
- (14) Johnson RO.et al.Diagnosis and management of infant botulism.Am J Dis Child 1979, 133, 586, n

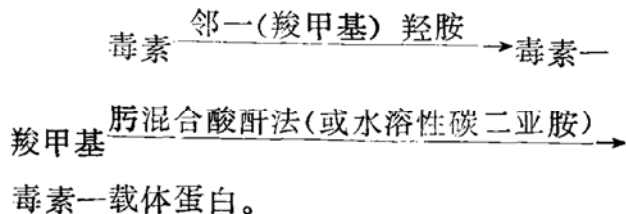
毒素名称	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
T-2	OH	OCOH ₃	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH (CH ₃) ₂
HT-2	OH	OH	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH CH(CH ₃) ₂
DAS	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	H
DON	OH	H	OH	OH	=O
DOVE	H	H	OH	H	H

图1主要单端孢霉烯族化合物的化学结构测定单端孢霉烯族化合物常用的化学方法是薄层层析法、气相、液相色谱法以及气-质联用等。这些方法,有的因方法本身的限制,精确度低,敏感性差;有的因需要价格昂贵的精密仪器、费时及复杂的提取过程,因而限制了它们的使用,很难在基层食品卫生检验部门推广。因此,探求一种经济、可靠、敏感、特异的测定方法实属必要。目前,国内外不少学者已开展了对此类毒素的免疫化学方法的研究,制备出对毒素特异性强的抗血清^[5•6•7]和单克隆抗体^[8•9•10],再通过简单而又快速的测定方法,如放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA),定量分析食品、饲料及体液中的毒素含量^[11•12•13•14•15]也有人运用这种特异性抗体,作为一种免疫组织化学试剂,探测动物组织中的毒素的位置^[16]。这种借助于免疫学原理和方法而研制出来的免疫检测方法,简单、快速、可靠、特异性强,易于推广,在食品卫生、环境卫生及临床医学等领域中,有广泛的应用前景。

抗体的制备

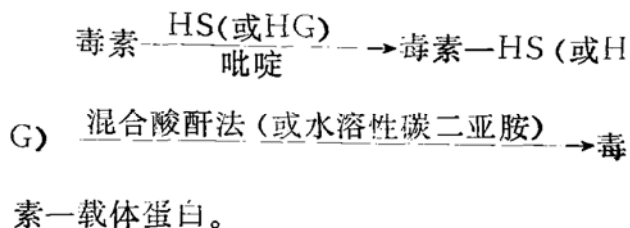
单端孢霉烯族化合物是一类低分子量化合物,缺少免疫原性,因此不能直接免疫动物,但当它们与蛋白质(或多肽)载体共价结合后,则具有抗原性,能诱发动植物产生抗体。由于大多数毒素分子结构上缺少与蛋白质结合的羧基,因此,在联接载体蛋白之前,必须将毒素转变成酸酐类衍生物,然后再与载体蛋白分子上的氨基进行共价结合。主要制备方法有下述两种。

结构上含有羧基(或酮基)的毒素首先将毒素与邻-(羧甲基)羟胺反应,生成毒素的羧甲基肟衍生物,然后再通过混合酸酐法(或水溶性碳二亚胺法),使其与载体蛋白结合,即:



结构上含有羟基的毒素

首先将毒素与琥珀酸酐(HS)或戊二酸酐(HG)反应,生成毒素的HS(或HG)衍生物,再通过混合酸酐(或水溶性碳二亚胺法)与载体蛋白结合,即



单端孢霉烯族化合物抗原的制备主要通过第二种方法,见表1。

载体蛋白的选择,常用的有动物血清白蛋白、γ-球蛋白、聚L-赖氨酸等。通常选用

表1 常见单端孢霉烯族化合物与载体蛋白联接方法

衍生物	毒素	联接方法
羧甲基肟(CMO)	DAS T-2 F-2 HT-2	WSC MA
HG	DAS T-2	WSC MA
HS	DOVE T-2	WSC MA

注:WSC:水溶性碳二亚胺法,MA:混合酸酐法,DOVE:脱氧疣孢菌素烯醇。

牛血清白蛋白(BSA)。因为BSA价廉易得,免疫活性强,溶解度大,在半抗原结合过程中对所使用的有机溶剂的剧烈化学条件引起的变性作用抵抗力较强,但在具体情况下可根据实际情况需要,选用不同的载体蛋白。

在单端孢霉烯族化合物中,T-2毒素

免疫检测技术的研究报道最多。T-2毒素与载体蛋白的联接方法一般是首先在C-3位置上将T-2转变成T-2-HS,再通过水溶性碳二亚胺法,与牛血清白蛋白结合,生成T-2-HS-BSA复合物^[17]。据报道,由于在C-8位置上存在的支链基团具有免疫抑制作用,因此用上述方法制备出来的抗原免疫动物,与其他半抗原物质(如类固醇等)相比,动物所产生的抗体效价较低。因此Wei等^[18]通过一系列的化学过程,将T-2转变成乙酰新茄病镰刀菌烯醇(3-Ac-NEOS)以实现在C-8位置上与蛋白联接。用这种新的抗原免疫动物,可以大大提高疫体的效价获得快速的免疫应答Zhang等^[5]还发现,当T-2毒素通过琥珀酸酐(或戊二酸酐)与蛋白结合,制成的抗原,经合动物体后,易于水解成游离毒素,影响了蛋白质合成,具有免疫抑制作用。为了克服这个问题,他们首先将T-2氧化成脱氢衍生物,然后将其转变成T-2-CMO(T-2-羧甲基肟),再与载体蛋白结合,以提高动物的抗体效价。

用T-2-HS-BSA免疫BALB/C小鼠,在制备单克隆抗体的过程中,遇到的一个困难是,由于毒素的免疫毒性作用,杂交瘤的形成率非常低,以致于通过常规的免疫方式,很难产生单克隆抗体^[8]。pauely等^[4]在制备抗原的过程中,用乙二胺(EDA)对载体蛋白(BSA)进行处理可以大大提高细胞融合率,产生高亲和力的抗体。其原因是经过EDA处理后,可以封闭载体蛋白上的羧基使得毒素-酸酐衍生物上的羧基与蛋白分子上的氨基专一结合,从而使得一个蛋白分子能结合更多的半抗原,增加了抗原决定簇的数量。提高融合率的另一个方法是根据Finkelman的免疫调节理论^[19],用羊免疫球蛋白(Glg G)作为载体,与毒素联结。Hunter等^[8]用这种方法制备出特异性强的单克隆抗体。

此外, Gendloff^[14]等用大剂量的T-2-BSA免疫,也产生了高亲和力的单克隆抗体, Goodbrand^[20]用钥孔蠍血蓝素(KLH)作为载体,研制抗T-2的单克隆抗体,亦获得成功。

毒素的免疫分析研究中所产生的抗体,其实用性如何,主要取决于它的特异性和效价的高低。特异性是用来区分该毒素与同类物质的定性指标,主要通过相似结构的不同种毒素与抗体进行竞争性结合而确定;而效价则表明该抗体能检测出多大浓度的毒素含量,是定量指标。80年代中期以前,单端孢霉烯族化合物的免疫测定多采用常规的血清学方法,虽然此法具有灵敏度高、检测快速等优点,但在制备抗血清的过程中,需要高纯度的抗原,而且所产生的抗血清数量有限,也无法获得对某一毒素的特异性抗体。因此,近年来,制备特异性强、效价高、容易大量生产的单克隆抗体技术越来越普及^[14, 20]。

检测方法

特异性抗体(或抗血清)制备的目的是用于毒素的检测。目前,单端孢霉烯族化合物的免疫检测方法,最常用的是放射免疫测定(RIA)和酶标免疫吸附测定法(ELISA)。

RIA法

RIA法是将抗体(或抗血清)与待测样品同时孵育,加入已知量的氚标记的毒素,再通过一定的方法将结合的和游离的毒素分开,用液闪仪测定放射活性,根据标准曲线得出待测样品中的毒素含量。RIA测定的灵敏度见表2。

一般来说,RIA在纯毒素的标准溶液中检测范围为0.1~0.5ng,而在食品、饲料及体液等样品中,灵敏度为2~5ppb。测定时,样品的预处理比较简单。如wei^[18]所用的方法是,1g样品(玉米粉)置于16×100mm

表2 RIA检测单端孢霉烯族化合物的灵敏度

毒 素	抗 体 类 型	标准液检测 范围 (ng)	最小检 出 量 (ppb)	回 收 率 (%)				文 献 号
				五 米	小 麦	血 浆	尿	
T-2	抗血清	0.2—2.5	1.0		86	103		[21]
T-2	抗血清	0.2—2.5	2.5	103	100			[21]
T-2	抗血清	0.2—2.5	5.0	102			102	[21]
T-2	抗血清	0.1—0.5	1.0			87—112		[12]
T-2	抗血清	0.25—10.0	5.0			101		[21]
T-2	单 抗	0.1—2						[18]

的试管内,加5ml丙酮,旋转搅拌5min后离心,3ml上清转移到另一小瓶中,加12ml蒸馏水稀释,经过层析柱处理,用60%的水丙酮洗脱,洗液再用pBS稀释10倍,即可用于RIA测定。Lee等^[22]认为,样品在粗提取过程中,经过柱层析处理,可以提高RIA的测灵敏度达1倍以上

ELISA法

通常有两种ELISA法用于单端孢霉烯族化合物的检测,即直接ELISA和间接ELISA法。直接法由于要制备毒素与酶(辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶)的结合物,在这个过程中,较难克服酶的变性问题,因此使用范围不太广,间接法的应用范围比较广。

间接ELISA法检测过程中,首先用抗

原包被载体表面(通常用微孔板),然后加入特异性抗体(或抗血清),同时加入纯毒素溶液(制作标准曲线)或待测样品提取液检测样品中毒素含量,再加入酶标记的羊抗兔(抗血清)或羊抗鼠(单克隆抗体)免疫球蛋白,最后加入底物显色,根据测定的光密度值确定毒素含量

ELISA检测的灵敏度见表3。

一般说来,测定纯毒素标准溶液时,ELISA法的灵敏度比RIA法高10~100倍,检测样品时,两者差异较小。ELISA法最大的优点在于不需要使用放射性同位素,并且分析过程中所需时间较短,易于推广。

免疫组织化学技术的研究

应用免疫酶技术,对人体及动、植物组

表3 ELISA法检测单端孢霉烯族化合物的灵敏度

测 定 方 法	毒 素	抗 体 类 型	标准液检 测范围 (pg)	最 小 检 出 量 (ppb)	回 收 率 (%)				文 献
					五 米	小 麦	血 浆	尿	
直 接 法	T-2	抗血清	2.5—200	1.0	124	86			[21]
	T-2	抗血清	2.5—200	2.5	146	96			[15]
	T-2	抗血清	2.5—200	5.0	109	83			[21]
间 接 法	T-2	抗血清	2.0—200	0.2			51	79	[21]
	T-2	抗血清		1.0			55	77	[21]
	T-2	抗血清		5.0			95	82	[21]
	T-2	单 抗	50—1000						[3]
	T-2	单 抗		10					[9]

织内的有关抗原定位,已引起了学者们的充分注意。近年来,运用特异性抗体作为免疫组织化学试剂探测真菌毒素在动植物体内以及菌丝中的位置的研究也已开展起来。其方法主要有两种,即间接免疫组织化学技术和

过氧化物酶—抗过氧化物酶(Peroxidase—antiperoxidase,简称PAP)法。

间接免疫组织化学技术,首先将含有毒素的动植物组织或器官固定于多聚甲醛—赖氨酸—高碘酸盐中,然后包埋在乙二醇甲基

丙烯酸盐内,充分水洗后,将材料制成切片,加入抗该毒素的抗体,洗干,再加入酶标二标。底物(二氨基联苯胺)显色后,含有毒素的材料切片在光学显微镜下便可观察到褐色区域,指示出毒素的位置。

PAP法与上述方法基本相似,其不同点在于加入抗体后,先添加羊抗兔免疫球蛋白G,最后加入过氧化物酶—抗过氧化物酶结合物,待与底物反应完毕,置光学显微镜下观察。Lee等^[10]用该法成功地进行组织中T-2毒素的定位分析。

结束语

综上所述,近年来,单端孢霉烯族化合物免疫测定方法的研究已取得了很大的进展。免疫测定不但能检测食品中的微量毒素,而且为诊断毒素中毒提供手段。由于该方法简单、敏感、特异,应用前景非常广泛。但是,同其他任何新技术一样,免疫测定方法还有一些问题需要解决,如不同的研究者制备出来的抗体或同一研究者不同时间制备出来的抗体,在检测同一批样品时,会有一定的误差。如何降低这些误差,使测定程序规范化,还有大量的工作要做。另外,就单端孢霉烯族化合物而言,目前只有对个别毒素进行了免疫测定技术方面的研究,还有相当数量的、危害性比较大的毒素,还未进行研究。近几年开展起来的单克隆抗体技术,很好地克服了抗血清异性差、抗体不能大量制备的缺点,但它的检测灵敏度比抗血清低^[10、21]。因此,制备敏感性强的单克隆抗体,还有待攻克。

参考文献

1. William FB, et al. Trichothecenes in mycotoxins and N-nitrosocompounds. In: Rondld CS, ed. *Environmental Risks Vol. II*. Boca Raton, Florida. CRC press, Inc., 1981:29—40
2. 孟昭赫, 等编. 真菌毒素研究进展, 北京: 人民卫生出版社, 1979:1—341
3. Fan TSL, et al. Production and characterization

of a monoclonal antibody cross-reactive with most group A trichothecenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988;54:2959

4. Pally JU, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody to the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1988;369:487

5. Zhang GS, et al. Improved method for production of antibodies against T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in rabbits. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986;51:132

6. Chu FS, et al. Production and characterization of antibody against diacetoxyscirpenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984;48:777

7. Chu FS, et al. Production and characterization of antibody against deoxyverrucarol. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984;48:781

8. Hunter, KW, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin T-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985;49:168

9. Gendloff EH, et al. 198 Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites. *Phytopathology* 77 1987;77:57

10. Hack R, et al. A monoclonal antibody to the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol. *Lett. Appl. Microbiol.* 1989;8:71

11. Fontelo PA, et al. Detection of T-2 toxin by an improved radioimmunoassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983;45:640

12. 荣康泰, 等. T-2毒素的放射免疫测定, *中国药理与毒理学杂志* 1987, 1(3):195

13. Fan TSL et al. Simultaneous analysis of T-2 toxin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987;54:37

14. Gendloff EH, et al. Detection of T-2 toxin in *Fusarium sporotrichioides* infected corn by enzyme-linked immuno-sorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984;4:71161

15. Pestka JJ, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1982;59:940A

16. Lee SC, et al. Immunoperoxidase localization of T-2 toxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984;72:228

17. Chu FS, et al. Production of antibody against T-2 toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979;37:104

18. Wei RD, Chu FS. Production and characterization of a generic antibody against group A trichothecenes