



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103760353 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201410045470. X

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 02. 08

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8774 2014. 01. 16

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 王保民 周立刚 傅小香 单体江

王晓晗 赖道万

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页 附图6页

(54) 发明名称

检测稻曲菌素 A 的方法及其专用酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测稻曲菌素 A 的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的方法及其专用试剂盒所使用的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体是由小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5 分泌产生的, 该小鼠杂交瘤细胞株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为 CGMCC No. 8774。本发明所提供的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体是以稻曲菌素 A-OVA (稻曲菌素 A 和卵清白蛋白的偶联物) 为包被抗原, 通过间接竞争 ELISA 方法对杂交瘤细胞进行筛选得到的; 利用该单克隆抗体制备得到的间接竞争酶联免疫试剂盒, 用于定性或定量检测植物样品中的稻曲菌素 A, 线性检测范围在 2. 8-72. 0ng/mL, 具有快速、特异性强、灵敏度高的优点。

1. 小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5, 在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为 CGMCC No. 8774。

2. 抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体, 其特征在于: 所述单克隆抗体是由权利要求 1 所述的小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌产生的。

3. 权利要求 2 所述的单克隆抗体在检测或辅助检测稻曲菌素 A 中的应用。

4. 权利要求 1 所述的小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 或权利要求 2 所述的单克隆抗体在制备检测或辅助检测稻曲菌素 A 的试剂或试剂盒中的应用。

5. 一种检测或辅助检测稻曲菌素 A 的试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒中含有独立包装的权利要求 2 所述的稻曲菌素 A 的单克隆抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒中还含有独立包装的稻曲菌素 A 标准品。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒中还含有独立包装的如下 1) -5) 试剂中的至少一种:

1) 包被缓冲液: 溶剂为水, 溶质为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和  $\text{NaHCO}_3$ ; 所述  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和所述  $\text{NaHCO}_3$  在所述包被缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.04M。

2) 样品稀释液: 溶剂为水, 溶质为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{NaCl}$ 、吐温 -20 和明胶; 所述  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、所述  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和所述  $\text{NaCl}$  在所述样品稀释液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M; 所述吐温 -20 在所述样品稀释液中的体积百分含量为 0.1%; 所述明胶在所述样品稀释液中的含量为 5g/L。

3) 洗涤液: 溶剂为水, 溶质为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaCl}$  和吐温 -20; 所述  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、所述  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和所述  $\text{NaCl}$  在所述洗涤液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M; 所述吐温 -20 在所述洗涤液中的体积百分含量为 0.1%。

4) 底物缓冲液: 溶剂为水, 溶质为柠檬酸三钠和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 所述柠檬酸三钠和所述  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  在所述底物缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.03M。

5) 终止液: 2M 的硫酸水溶液。

8. 一种检测或辅助检测稻曲菌素 A 的方法, 包括使用权利要求 5-7 中任一所述的试剂盒对待测样品进行检测的步骤。

9. 权利要求 5-7 中任一所述的试剂盒在定性或定量检测稻曲菌素 A 中的应用。

10. 将权利要求 2 所述抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体和固相载体相偶联得到的免疫亲和吸附剂; 或

以所述免疫亲和吸附剂为填料的免疫亲和色谱柱; 或

含有所述免疫亲和吸附剂或所述免疫亲和色谱柱的试剂盒; 或

所述免疫亲和吸附剂、所述免疫亲和色谱柱或所述试剂盒在分离纯化稻曲菌素 A 中的应用。

## 检测稻曲菌素 A 的方法及其专用酶联免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测稻曲菌素 A 的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] 稻曲病(False smut of rice)是由稻绿核菌(*Villosiclava virens* (Nakata) Tanaka&Tanaka) (无性态为: *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi) 侵染形成的一种世界性水稻真菌病害,也叫伪黑穗病、绿黑穗病等。自 20 世纪 80 年代以来,由于水稻品种的变化、耕作制度的改变和化学肥料的大量使用以及杂交水稻的问世等因素,稻曲病的发生及危害呈加重趋势,已成为中国及世界上多稻区的主要病害之一。稻曲病会严重影响水稻产量和品质,更为严重的是稻曲病菌能产生毒素,为害人畜,直接影响水稻的食用安全性。迄今,稻曲病菌中已阐明的毒素有两类,第一类为黑粉菌素(*Ustilaginoidins*),属于二萜并- $\gamma$ -吡喃酮类(*Bis(naphtho- $\gamma$ -pyrone)s*),为脂溶性有色物质;另一类为稻曲菌素(*Ustiloxins*),属于环肽类,为水溶性无色物质。稻曲菌素具有广泛的毒性,对水稻种子萌发、幼苗生长及愈伤组织生长都具有毒害作用;可造成畜禽生长和生殖能力的下降和内脏器官病变;对微管蛋白组装和细胞骨架形成具有抑制作用。

[0003] 基于稻曲菌素广泛的毒性,快速、准确了解稻曲球、稻曲病菌、以及稻草和稻谷及其制品中稻曲菌素的种类和含量就显得尤为重要。稻曲菌素 A (*Ustiloxin A*)是主要的稻曲菌毒素成分,因此稻曲菌素的检测分析主要针对稻曲菌素 A。目前可采用薄层层析(TLC)检测法、高效液相色谱(HPLC)法、液-质联用(LC-MS)法进行分析。由于免疫测定技术具有高通量、快速及灵敏度高等特点,在真菌毒素的检测方面已经获得了广泛的应用。虽然文献已有报道关于稻曲菌素 A 的抗血清,但只是定性地定位稻曲菌素 A 在稻曲病菌中的分布情况,基于稻曲菌素 A 的单克隆抗体的酶联免疫检测方法及其专用酶联免疫试剂盒还未见报道,所以开发一种基于稻曲菌素 A 的单克隆抗体的酶联免疫检测方法及其专用酶联免疫试剂盒具有非常重要的意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种检测稻曲菌素 A 的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

[0005] 该方法及其专用试剂盒所使用的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体是由小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5 分泌产生的,该小鼠杂交瘤细胞株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为 CGMCC No. 8774。

[0006] 上述小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌产生的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体,也是本发明保护的范围。

[0007] 上述抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体可用于检测或辅助检测稻曲菌素 A,尤其适合于检测或辅助检测植物样品中的稻曲菌素 A。

[0008] 本发明所提供的小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8744 或抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体可用于制备检测或辅助检测稻曲菌素 A 的试剂或试剂盒,特别是用于制备检测或辅

助检测植物样品中的稻曲菌素 A 的试剂或试剂盒。

[0009] 本发明的另一个目的是提供一种检测或辅助检测稻曲菌素 A 的试剂盒。

[0010] 本发明所提供的试剂盒中含有独立包装的所述抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体。

[0011] 在本发明所提供的试剂盒中,还可含有独立包装的稻曲菌素 A 标准品。

[0012] 所述抗稻曲菌素 A 标准品可为稻曲菌素 A 或由所述稻曲菌素 A 配制成的一系列不同浓度的稻曲菌素 A 溶液;所述一系列不同浓度的稻曲菌素 A 溶液的浓度具体可为: 200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL 和 3.125ng/mL,所述稻曲菌素 A 溶液的溶剂具体可为水,稀释可用样品稀释液;所述样品稀释液的溶剂为水,溶质为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{NaCl}$ 、吐温-20 和明胶;所述  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、所述  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和所述  $\text{NaCl}$  在所述样品稀释液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M;所述吐温-20 在所述样品稀释液中的体积百分含量为 0.1%;所述明胶在所述样品稀释液中的含量为 5g/L。

[0013] 在本发明所提供的试剂盒中,还可含有独立包装的标记酶;所述标记酶可为辣根过氧化酶或碱性磷酸酶。在本发明的一个实施例中,所述标记酶具体为羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP (购自 Jackson 公司,商品目录号为 79556)。

[0014] 在本发明所提供的试剂盒中,还可含有独立包装的如下 1)-5) 试剂中的至少一种:

[0015] 1) 包被缓冲液:溶剂为水,溶质为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和  $\text{NaHCO}_3$ ;所述  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和所述  $\text{NaHCO}_3$  在所述包被缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.04M;pH9.6。

[0016] 2) 样品稀释液:溶剂为水,溶质为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{NaCl}$ 、吐温-20 和明胶;所述  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、所述  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和所述  $\text{NaCl}$  在所述样品稀释液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M;所述吐温-20 在所述样品稀释液中的体积百分含量为 0.1%;所述明胶在所述样品稀释液中的含量为 5g/L;pH7.5。

[0017] 3) 洗涤液:溶剂为水,溶质为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaCl}$  和吐温-20;所述  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、所述  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和所述  $\text{NaCl}$  在所述洗涤液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M;所述吐温-20 在所述洗涤液中的体积百分含量为 0.1%;pH7.5。

[0018] 4) 底物缓冲液:溶剂为水,溶质为柠檬酸三钠和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;所述柠檬酸三钠和所述  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  在所述底物缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.03M;pH5.5。

[0019] 5) 终止液:2M 的硫酸水溶液。

[0020] 在本发明所提供的试剂盒中,还可含有独立包装的包被原。

[0021] 所述包被原为稻曲菌素 A 与载体蛋白的偶联物。在所述包被原中,所述稻曲菌素 A 与所述载体蛋白的质量配比为 1.15:7.50。

[0022] 在本发明中,所述载体蛋白具体为卵白蛋白(OVA),将相应的包被原命名为稻曲菌素 A-OVA 包被原。

[0023] 具体的,所述稻曲菌素 A-OVA 包被原是按照如下步骤的方法制备得到的:

[0024] (a1) 将稻曲菌素 A 溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,得到溶液 A;

[0025] 所述稻曲菌素 A 和所述二甲基甲酰胺(DMF)的比例为 2.3mg:1.0mL;

[0026] (a2) 将卵白蛋白(OVA)溶解于 PBS 溶液中,得到溶液 B;

[0027] 所述卵白蛋白(OVA)和所述 PBS 溶液的配比为 7.5mg:1.0mL;

[0028] (a3) 将所述溶液 A 和所述溶液 B 混合,使混合液中所述稻曲菌素 A 和所述卵白蛋

白(OVA)的质量配比为 1.15:7.50,得到溶液 C;

[0029] (a4)向所述溶液 C 中加入体积分数 5% 的戊二醛水溶液,4℃过夜偶联,PBS 中透析 3 天,得到所述稻曲菌素 A-OVA 包被原;

[0030] 所述体积分数 5% 的戊二醛水溶液和所述溶液 C 的体积比为 6.8 μL:1.5mL。

[0031] 本发明的还一个目的是提供一种检测或辅助检测稻曲菌素 A 的方法。

[0032] 本发明所提供的检测或辅助检测稻曲菌素 A 的方法,包括使用所述试剂盒对待测样品(如植物样品)进行检测的步骤。

[0033] 所述试剂盒在定性或定量检测稻曲菌素 A 中的应用也属于本发明的保护范围。

[0034] 本发明还保护如下:将所述抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体和固相载体相偶联得到的免疫亲和吸附剂;或以所述免疫亲和吸附剂为填料的免疫亲和色谱柱;或含有所述免疫亲和吸附剂或所述免疫亲和色谱柱的试剂盒。

[0035] 所述免疫亲和吸附剂、所述免疫亲和色谱柱或所述试剂盒在分离纯化稻曲菌素 A 中的应用也属于本发明的保护范围。

[0036] 本发明所提供的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体是以稻曲菌素 A-OVA(稻曲菌素 A 和卵清白蛋白的偶联物)为包被抗原,通过间接竞争 ELISA 方法对杂交瘤细胞进行筛选得到的;利用该单克隆抗体制备得到的间接竞争酶联免疫试剂盒,用于定性或定量检测植物样品中的稻曲菌素 A,线性检测范围在 2.8-72.0ng/mL,具有快速、特异性强、灵敏度高的优点。

[0037] 保藏说明

[0038] 参据的生物材料(株):2D3G5

[0039] 科学描述:小鼠杂交瘤细胞株

[0040] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0041] 保藏机构简称:CGMCC

[0042] 地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号

[0043] 保藏日期:2014 年 1 月 16 日

[0044] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No. 8774

## 附图说明

[0045] 图 1 为间接竞争 ELISA 中稻曲菌素 A 的标准曲线。以不同浓度的稻曲菌素 A 溶液的浓度(ng/mL)为横坐标,B/B<sub>0</sub> (B 表示含有稻曲菌素 A 时的 OD 值,B<sub>0</sub> 表示不含有稻曲菌素 A 时的 OD 值)为纵坐标,运用 OriginPro8 软件绘制得到的标准曲线。

[0046] 图 2 为稻曲菌素 A 的 HR-ESI-MS 谱图。

[0047] 图 3 为稻曲菌素 A 的 <sup>1</sup>H NMR 谱图(D<sub>2</sub>O, 400MHz)。

[0048] 图 4 为稻曲菌素 A 的 <sup>13</sup>C NMR 谱图(D<sub>2</sub>O, 400MHz)。

[0049] 图 5 为稻曲菌素 B 的 HR-ESI-MS 谱图。

[0050] 图 6 为稻曲菌素 B 的 <sup>1</sup>H NMR 谱图(D<sub>2</sub>O, 400MHz)。

[0051] 图 7 为稻曲菌素 B 的 <sup>13</sup>C NMR 谱图(D<sub>2</sub>O, 400MHz)。

## 具体实施方式

[0052] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

- [0053] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0054] 弗氏完全佐剂:Sigma 公司,产品目录编号为 F5881。
- [0055] 弗氏不完全佐剂:Sigma 公司,产品目录编号为 F5506。
- [0056] 稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B (标准品):由发明人所在实验室分离并纯化得到。可具体参考发明人所发表的如下论文:
- [0057] Shan T, Sun W, Liu H, Gao S, Lu S, Wang M, Chen Z, Wang S, Zhou L. Determination and analysis of ustiloxins A and B by LC-ESI-MS and HPLC in false smut balls of rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(9):11275-11287.
- [0058] Shan T, Sun W, Wang X, Fu X, Sun W, Zhou L. Purification of ustiloxins A and B from rice false smut balls by macroporous resins. *Molecules*, 2013, 18(7):8181-8199.
- [0059] 包被缓冲液:溶剂为水,溶质为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和  $\text{NaHCO}_3$ , pH 值为 9.6;溶质  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和  $\text{NaHCO}_3$  在包被缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.04M。
- [0060] 洗涤液:溶剂为水,溶质为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、NaCl 和吐温-20, pH 值为 7.5;溶质  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 NaCl 在洗涤液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M;吐温-20 在洗涤液中的体积百分含量为 0.1%。
- [0061] 样品稀释液:溶剂为水,溶质为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 NaCl、吐温-20 和明胶;溶质  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 NaCl 在所述样品稀释液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M;所述吐温-20 和明胶在所述样品稀释液中的百分含量为 0.1%(v/v) 和 0.5%(w/v)。
- [0062] 底物缓冲液:溶剂为水,溶质为柠檬酸三钠和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 值为 5.5;溶质柠檬酸三钠和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  在底物缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.03M。
- [0063] 终止液:浓度为 2M 的硫酸水溶液。
- [0064] 实施例 1、稻曲菌素 A 抗原的合成
- [0065] 按照如下方法合成稻曲菌素 A-BSA 免疫原和稻曲菌素 A-OVA 包被原:
- [0066] 取 2.3mg 稻曲菌素 A 溶解在 1mL 二甲基甲酰胺(DMF)中,称取 11mg 牛血清白蛋白(BSA)和 7.5mg 卵白蛋白(OVA)分别用 1mL PBS 溶解,然后将如上稻曲菌素 A 溶液分成两份(500  $\mu\text{L}$ /份)分别加入到 BSA 溶液和 OVA 溶液中,搅拌均匀,分别加入 6.8  $\mu\text{L}$  体积分数 5% 的戊二醛水溶液,4℃过夜偶联,PBS 中透析 3 天,得到稻曲菌素 A-BSA 免疫原和稻曲菌素 A-OVA 包被原。
- [0067] 实施例 2、小鼠杂交瘤细胞株的获得及抗稻曲菌素 A 单克隆抗体的制备
- [0068] Balb/c 小白鼠:8-10 周龄雌性小鼠,购自军事医学科学院实验动物中心。
- [0069] SP2/0 骨髓瘤细胞:购自中国兽医药品监察所。
- [0070] 一、动物免疫
- [0071] 1、以 8-10 周龄的雌性 Balb/c 小白鼠作为实验动物。
- [0072] 2、基础免疫:取 1mL 实施例 1 制备的的稻曲菌素 A-BSA 免疫原溶液(浓度为 1mg/mL,溶剂为 PBS)加入等体积弗氏完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。用乳化好的免疫原采用腹腔及背部皮下多点注射 Balb/c 小白鼠,注射剂量为每只小鼠注射 0.1mg 稻曲菌素 A-BSA 免疫原,其中腹腔注射 0.05mg,背部皮下注射两点,0.025mg/点。

[0073] 3、加强免疫：基础免疫 2 周后，取 1mL 实施例 1 制备的的稻曲菌素 A-BSA 免疫原溶液（浓度为 1mg/mL，溶剂为 PBS），加入 1mL 弗氏不完全佐剂，用磁力搅拌器充分搅拌乳化，直到滴入水中不扩散。将乳化好的免疫原采用腹腔及背部皮下多点注射 Ba1 b/C 小白鼠，注射剂量为每只小鼠注射 0.1mg 稻曲菌素 A-BSA 免疫原，其中腹腔注射 0.05mg，背部皮下注射两点，0.025mg/点。

## [0074] 二、细胞融合和克隆化

[0075] 加强免疫每隔 2 周一次，从第三次加强免疫开始，每次免疫后第 3 天，从小鼠眼眶采血，测定抗体效价，效价的定义为 OD 值为 1 时的血清稀释倍数。待效价大于 1:8000（即 OD 值为 1，稀释倍数为 8000）后，选择血清效价最佳的小鼠，取脾细胞，按 9:1（数量配比）比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合；采用有限稀释法筛选分泌单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株；采用间接非竞争 ELISA 的方法以实施例 1 制备得到的稻曲菌素 A-OVA 为包被抗原筛选分泌抗体效价高和特异性好的单克隆细胞株。

[0076] 上述间接非竞争 ELISA 方法的步骤具体如下：

[0077] 1) 包被：在 96 孔酶标板中加入 100  $\mu$ L 浓度为 250ng/mL 的稻曲菌素 A-OVA 溶液（溶剂为包被缓冲液），37℃ 包被 3 小时，用洗涤液洗涤 4 次。

[0078] 2) 加样品：抑制孔加入预先配置好的稻曲菌素 A 标准品（浓度为 100ng/mL，溶剂为样品稀释液）50  $\mu$ L，空白孔加入 50  $\mu$ L 样品稀释液。

[0079] 3) 加抗体：将 50  $\mu$ L 杂交瘤细胞培养液加至酶标板中，置湿盒中 37℃ 条件下 30min，洗板 4 次。

[0080] 4) 加酶标二抗：将羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP（购自 Jackson 公司，商品目录号为 79556）（浓度为 0.1mg/mL）用样品稀释液稀释 1000 倍，每孔加 100  $\mu$ L，置湿盒中 37℃ 条件下 30min，洗板 4 次。

[0081] 5) 显色：取 20mg 邻苯二胺（OPD）溶于 10mL 底物缓冲液中，再向其中加 4  $\mu$ L 30%（质量分数） $H_2O_2$ ，得到底物溶液。将底物溶液加入酶标板中，每孔 100  $\mu$ L。显色 10min。

[0082] 6) 终止：每孔加入 50  $\mu$ L 终止液，用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值，部分结果见表 1。表 1 中，2D3、3G9、4F7 和 4B11 分别代表筛选过程中加入的细胞培养板不同孔中的杂交瘤细胞，抑制率（%）=[（空白孔 OD 值 - 抑制孔 OD 值）/ 空白孔 OD 值]  $\times$  100%。

[0083] 表 1 间接非竞争 ELISA 法筛选杂交瘤细胞的结果

[0084]

| 项目<br>位置编号 | 空白孔的 OD 值 | 抑制孔（25 ng/mL）的 OD 值 | 抑制率（%） |
|------------|-----------|---------------------|--------|
| 2D3        | 1.312     | 0.254               | 80.6   |
| 3G9        | 0.338     | 0.110               | 67.5   |
| 4F7        | 0.643     | 0.159               | 75.3   |
| 4B11       | 0.266     | 0.080               | 69.9   |

[0085] 吸光值越大,说明抗体对抗原的亲合力越高;抑制率越高,说明抗体的特异性越好。从表 1 的数据可以看出,2D3 的抑制率最高,达 80.6%,同时与包被抗原的亲合力也比较高,因此选取 2D3 杂交瘤细胞继续进行筛选,最后得到分泌抗体特异性好、亲合力高的小鼠杂交瘤细胞株,命名为 2D3G5。该小鼠杂交瘤细胞株已于 2014 年 1 月 16 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏号为 CGMCC No. 8774。

### [0086] 三、细胞冻存和复苏

[0087] 用冻存液将小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 制成  $1 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时,取出冻存管,立即放入 37℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后移入培养瓶内培养。

### [0088] 四、单克隆抗体的制备与纯化

#### [0089] 1、增量培养

[0090] 细胞培养基的制备方法:向 DMEM 培养基中添加小牛血清(购自 GIBCOBRL,产品目录号为 26170-043)和碳酸氢钠,小牛血清的终浓度为 20% (体积分数),碳酸氢钠的终浓度为 0.2% (质量百分含量),pH 为 7.4。

[0091] 将小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 置于上述细胞培养基中,37℃ 培养,期间每天观察,并及时扩增培养。

#### [0092] 2、腹水制备

[0093] Balb/c 小鼠腹腔注射灭菌石蜡油(0.3mL/只)。7 天后腹腔注射小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 (约  $10^6$  个/只)。7 天后采集腹水,用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,纯化后的腹水(即小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌的单克隆抗体溶液)-20℃ 保存。

### [0094] 五、单克隆抗体的鉴定

[0095] 1、将步骤四 2 得到小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌的单克隆抗体溶液采用单克隆抗体类型检测试剂盒(购自 Sigma,产品编号为 IS02-1KT)检测单克隆抗体的亚型,具体操作参见试剂盒说明书。

[0096] 结果显示,小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌的单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为 IgG1 型。

#### [0097] 2、利用间接非竞争性 ELISA 法测定单克隆抗体的交叉反应

[0098] 1) 包被:取 96 孔酶标板,采用稻曲菌素 A-OVA 溶液进行包被,100  $\mu$ L/孔;稻曲菌素 A-OVA 溶液的浓度为 1000ng/mL,溶剂为包被缓冲液;37℃ 包被 3 小时,用洗涤液洗涤 4 次。

[0099] 2) 加样品:实验孔每孔加入 50  $\mu$ L 待测化合物溶液,对照孔为 50  $\mu$ L 的样品稀释液。

[0100] 其中,待测化合物溶液为稻曲菌素 A 溶液或稻曲菌素 B 溶液(溶剂均为样品稀释液);稻曲菌素 A 溶液的浓度可为:200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5 ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL 和 1.5625ng/mL;稻曲菌素 B 溶液的浓度可为:5000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL、78.125ng/mL 和 39.0625ng/mL。

[0101] 3) 加抗体:每孔加入 50  $\mu$ L 步骤四 2 得到的单克隆抗体溶液的稀释液(用样品稀释

液稀释成 250ng/mL);每种稀释液设置三个复孔;置湿盒中 37℃条件下 30min,洗板 4 次。

[0102] 4) 加酶标二抗:将羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP (浓度为 0.1mg/mL,购自 Jackson 公司,商品目录号为 79556)用样品稀释液稀释 1000 倍,每孔加 100 μL,置湿盒中 37℃条件下 30min,洗板 4 次。

[0103] 5) 显色:取 20mg 邻苯二胺(OPD)溶于 10mL 底物缓冲液中,再向其中加 4 μL 30% (质量分数) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,得到底物溶液。将底物溶液加入酶标板中,每孔 100 μL。显色 10min。

[0104] 6) 终止:每孔加入 50 μL 终止液,用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值。

[0105] 以待测化合物溶液浓度为横坐标,OD/OD<sub>0</sub> (OD 值表示实验孔的吸光值,OD<sub>0</sub> 表示对照孔的吸光值)为纵坐标,运用 OriginPro8 软件分别计算稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B 的 IC<sub>50</sub> 值(标准曲线纵坐标数值等于 50% 对应的待测化合物浓度 (ng/mL),即 IC<sub>50</sub> 值),按下列公式计算交叉反应率:

[0106] 交叉反应率 (%)=[IC<sub>50</sub>(稻曲菌素 A)/IC<sub>50</sub>(稻曲菌素 B)]×100%

[0107] 结果显示,得到的单克隆抗体对稻曲菌素 B 的交叉反应率为 4.12%,说明小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌的单克隆抗体特异性很强。

[0108] 表 2 单克隆抗体与稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B 的交叉反应

[0109]

| 化合物    | IC <sub>50</sub> (ng/mL) | 交叉反应率 (%)   |
|--------|--------------------------|-------------|
| 稻曲菌素 A | 12.05 ± 0.43             | 100 ± 3.32  |
| 稻曲菌素 B | 292.13 ± 8.51            | 4.12 ± 0.11 |

[0110] 实施例 3、检测稻曲菌素 A 的酶联免疫试剂盒的制备及其应用

[0111] 一、试剂盒的制备

[0112] 本发明的检测稻曲菌素 A 的酶联免疫试剂盒由稻曲菌素 A-OVA (包被原)、小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体、羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP、包被缓冲液、样品稀释液、洗涤液、稻曲菌素 A 标准品溶液、底物缓冲液和终止液组成。

[0113] 稻曲菌素 A-OVA:由实施例 1 制备得到。

[0114] 小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体:由实施例 2 步骤四 2 制备得到。

[0115] 羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP:购自 Jackson 公司,商品目录号为 79556。

[0116] 包被缓冲液:溶剂为水,溶质为 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 NaHCO<sub>3</sub>,pH 值为 9.6;溶质 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 NaHCO<sub>3</sub> 在包被缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.04M。

[0117] 洗涤液:溶剂为水,溶质为 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaCl 和吐温-20,pH 值为 7.5;溶质 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 NaCl 在洗涤液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M;吐温-20 在洗涤液中的体积百分含量为 0.1%。

[0118] 样品稀释液:溶剂为水,溶质为 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 NaCl、吐温-20 和明胶;溶质 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 NaCl 在所述样品稀释液中的浓度分别为 0.02M、0.0015M 和 0.14M;所述吐温-20 和明胶在所述样品稀释液中的百分含量为 0.1%(v/v) 和 0.5%(w/v)。

[0119] 底物缓冲液:溶剂为水,溶质为柠檬酸三钠和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH 值为 5.5;溶质柠檬酸三

钠和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  在底物缓冲液中的浓度分别为 0.01M 和 0.03M。

[0120] 终止液 : 浓度为 2M 的硫酸水溶液。

[0121] 稻曲菌素 A 标准品溶液 : 为系列不同浓度的稻曲菌素 A 溶液, 浓度具体为 200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL 和 3.125ng/mL, 溶于样品稀释液中。

[0122] 二、试剂盒的应用

[0123] 1、制作标准曲线

[0124] (1) 包被 : 取 96 孔酶标板, 采用稻曲菌素 A-OVA 溶液进行包被,  $100\ \mu\text{L}$ /孔; 稻曲菌素 A-OVA 溶液的浓度为 1000ng/mL, 溶剂为包被缓冲液;  $37^\circ\text{C}$  包被 3 小时, 用洗涤液洗涤 4 次。

[0125] (2) 加标准品溶液 : 将作为标准品的系列不同浓度的稻曲菌素 A 溶液分别加入到不同的实验孔, 每孔加入  $50\ \mu\text{L}$ ; 每个浓度设置三个复孔。对照孔为  $50\ \mu\text{L}$  的样品稀释液。

[0126] (3) 加抗体 : 每孔加入  $50\ \mu\text{L}$  小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体的稀释液(用样品稀释液稀释成 250ng/mL); 置湿盒中  $37^\circ\text{C}$  条件下 30min, 洗板 4 次。

[0127] (4) 加酶标二抗 : 将羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP (浓度为 0.1mg/mL, 购自 Jackson 公司, 商品目录号为 79556) 用样品稀释液稀释 1000 倍, 每孔加  $100\ \mu\text{L}$ , 置湿盒中  $37^\circ\text{C}$  条件下 30min, 洗板 4 次。

[0128] (5) 显色 : 取 20mg 邻苯二胺(OPD)溶于 10mL 底物缓冲液中, 再向其中加  $4\ \mu\text{L}$  30% (质量分数)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 得到底物溶液。将底物溶液加入酶标板中, 每孔  $100\ \mu\text{L}$ 。显色 10min。

[0129] (6) 终止 : 每孔加入  $50\ \mu\text{L}$  终止液, 用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值。

[0130] (7) 绘制标准曲线 : 以不同浓度的稻曲菌素 A 溶液为横坐标,  $B/B_0$  ( $B$  表示实验孔的 OD 值,  $B_0$  表示对照孔的 OD 值) 为纵坐标, 运用 OriginPro8 软件绘制标准曲线。

[0131] 实验设 3 次重复, 取三次实验结果的平均值, 得到的标准曲线如图 1 所示。标准曲线方程为  $Y=0.02239+0.97837/[1+(x/13.04376)^{0.88151}]$  ( $R^2=0.99318$ )。  $B/B_0$  为 20%–80% 时稻曲菌素 A 的浓度范围即为检测范围。线性检测范围在 2.8–72.0ng/mL。

[0132] 2、步骤一中试剂盒的使用方法

[0133] (1) 待测样品经水提取, 提取液直接检测或加适量样品稀释液稀释成样品液。

[0134] (2) 包被 : 取 96 孔酶标板, 采用稻曲菌素 A-OVA 溶液进行包被,  $100\ \mu\text{L}$ /孔; 稻曲菌素 A-OVA 溶液的浓度为 1000ng/mL, 溶剂为包被缓冲液;  $37^\circ\text{C}$  包被 3 小时, 用洗涤液洗涤 4 次。

[0135] (3) 加样品 : 每孔加入  $50\ \mu\text{L}$  样品液。

[0136] (4) 加抗体 : 每孔加入  $50\ \mu\text{L}$  小鼠杂交瘤细胞株 2D3G5CGMCC No. 8774 分泌的抗稻曲菌素 A 的单克隆抗体的稀释液(用样品稀释液稀释成 250ng/mL); 置湿盒中  $37^\circ\text{C}$  条件下 30min, 洗板 4 次。

[0137] (5) 加酶标二抗 : 将羊抗鼠酶标二抗 IgG-HRP (浓度为 0.1mg/mL, 购自 Jackson 公司, 商品目录号为 79556) 用样品稀释液稀释 1000 倍, 每孔加  $100\ \mu\text{L}$ , 置湿盒中  $37^\circ\text{C}$  条件下 30min, 洗板 4 次。

[0138] (6) 显色 : 取 20mg 邻苯二胺(OPD)溶于 10mL 底物缓冲液中, 再向其中加  $4\ \mu\text{L}$  30%

(质量分数)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 得到底物溶液。将底物溶液加入酶标板中, 每孔  $100\ \mu\text{L}$ 。显色 10min。

[0139] (7) 终止: 每孔加入  $50\ \mu\text{L}$  终止液, 用酶标仪 492nm 处测定各孔的 OD 值。

[0140] 在同一块板上同时做标准曲线(参见步骤 1), 根据标准曲线计算得到待测样品中稻曲菌素 A 的含量。

[0141] 3、抗稻曲菌素 A 单克隆抗体在检测不同地区稻曲球样品中稻曲菌素 A 含量上的应用实例

[0142] (1) 从不同地区(见表 3) 随机取适量稻曲球样品研磨成粉末(可加少量石英砂辅助), 称取 0.2g 的稻曲球样品, 加 6mL 蒸馏水超声提取 30min, 提取三次, 合并三次提取液, 提取液直接检测或加适量样品稀释液稀释成样品液。

[0143] (2) 按照上述步骤 2 中的步骤(2)–(7) 进行。

[0144] 在同一块板上同时做标准曲线(参见步骤 1), 根据标准曲线计算得到待测样品中稻曲菌素 A 的含量。

[0145] 结果如表 3 所示。可见不同地区的稻曲球中稻曲菌素 A 的含量有差异。

[0146] 表 3 间接竞争 ELISA 方法检测不同地区稻曲球样品中稻曲菌素 A 含量

[0147]

| 样品 <sup>a</sup> | 稻曲菌素 A 含量 (mg/g)  |
|-----------------|-------------------|
| 山东临沂            | $0.95 \pm 0.03^b$ |
| 湖南汉寿            | $0.64 \pm 0.03$   |
| 四川邛峡            | $0.36 \pm 0.09$   |
| 辽宁东港            | $0.34 \pm 0.09$   |
| 福建建瓯            | $0.71 \pm 0.01$   |
| 福建建阳            | $0.68 \pm 0.05$   |

[0148] 注: a 每个样品三次重复; b 三次检测平均值  $\pm$  SD。

[0149] 4、稻曲球样品添加回收实验

[0150] (1) 取适量稻曲球样品, 按照上述步骤 3 中步骤(1) 进行操作, 得到稻曲球样品提取稀释液。按照上述步骤 2 进行操作, 检测到其中稻曲菌素 A 的浓度为 12.88ng/mL。

[0151] (2) 取 6 份(1mL/ 份) 步骤(1) 所得的稻曲球样品提取稀释液, 分别编号为 1–6。将稻曲菌素 A 标准品添加到其中, 对应编号为 1–6 的 6 份稻曲球样品提取稀释液, 稻曲菌素 A 标准品的添加浓度(以稻曲球样品提取稀释液为溶液, 配成相应浓度的标准品溶液) 分别为: 100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL 和 0ng/mL。共得到 6 份待测样品。各待测样品分别取  $50\ \mu\text{L}$  进行间接竞争 ELISA 分析, 按照上述步骤 2 中的步骤(2)–(7) 进行。

[0152] (3) 用样品稀释液配制的稻曲菌素 A 标准品溶液做标准曲线(参见步骤 1)。根据标准曲线计算得到各待测样品中稻曲菌素 A 的含量。

[0153] (4) 计算回收率。

[0154] 回收率计算公式为: 回收率(%) = (添加后稻曲菌素 A 的浓度 – 添加前稻曲菌素 A

的浓度)/ 稻曲菌素 A 的添加浓度  $\times 100\%$ 。其中,“添加后稻曲菌素 A 的浓度”为编号为 1-5 的 5 份待测样品中测得的稻曲菌素 A 的浓度,“添加前稻曲菌素 A 的浓度”为编号为 6 的待测样品中测得的稻曲菌素 A 的浓度。

[0155] 结果如表 4 所示,回收率范围在 95.86%-113.28%。

[0156] 表 4 稻曲球样品的稻曲菌素 A 添加回收实验

[0157]

| 添加前稻曲菌素 A 浓度<br>(ng/mL) | 稻曲菌素 A 的<br>添加浓度<br>(ng/mL) | 添加后稻曲菌素 A 浓度<br>(ng/mL) | 稻曲菌素 A<br>平均回收率<br>(%, n=3) $\pm$ SD |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
|                         | 100                         | 108.74                  | 95.86 $\pm$ 3.84                     |
|                         | 50                          | 68.47                   | 111.18 $\pm$ 5.03                    |
| 12.88                   | 25                          | 38.89                   | 104.04 $\pm$ 8.86                    |
|                         | 12.5                        | 26.43                   | 108.40 $\pm$ 7.49                    |
|                         | 6.25                        | 19.96                   | 113.28 $\pm$ 6.95                    |

[0158] 上述实施例中所涉及的稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B 是本发明的发明人自己制备得到的,具体可参考发明人所发表的如下论文:

[0159] Shan T, Sun W, Liu H, Gao S, Lu S, Wang M, Chen Z, Wang S, Zhou L. Determination and analysis of ustiloxins A and B by LC-ESI-MS and HPLC in false smut balls of rice. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(9):11275-11287.

[0160] Shan T, Sun W, Wang X, Fu X, Sun W, Zhou L. Purification of ustiloxins A and B from rice false smut balls by macroporous resins. Molecules, 2013, 18(7):8181-8199.

[0161] 上述实施例中所涉及的稻曲菌素 A 和稻曲菌素 B 的制备方法大致如下:

[0162] 1、稻曲菌素 A 的制备

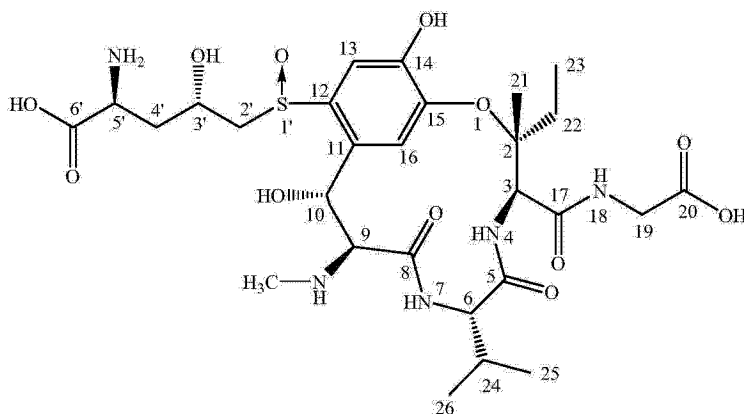
[0163] 将一定量的稻曲球用水冷浸提取得水提取物,然后分别用离子交换树脂 PA308、大孔吸附树脂 HP-20、透析袋透析以及各种柱层析方法对粗提物进行处理,通过 TLC 和 HPLC 分析后合并相同的组分,对得到的单体化合物进行波谱学鉴定,最终得到稻曲菌素 A 的单体化合物。具体操作如下:

[0164] 取稻曲球(1000g),晾干,粉碎,按干重(g)和水体积(mL)的配比的 1:30 (g/mL) 冷浸提取 7 次,每次 12 小时,将 7 次提取液合并,减压浓缩得到稻曲球水提取物。将提取物用水混悬,用滤纸过滤,滤液过大孔吸附树脂 HP-20,用水洗脱后,再用 30% 乙醇洗脱,合并 30% 乙醇洗脱液,过透析袋(3500Da),收集透析液,浓缩后依次过 ODS-AQ、Sephadex LH-20 和 Sephadex G-15,可获得 80mg 纯的稻曲菌 A。

[0165] 取上述分离纯化的稻曲菌素 A 单体化合物,对其进行波谱鉴定。其高分辨质谱(HR-ESI-MS)谱图如图 2 所示;核磁共振氢谱( $^1\text{H}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz)谱图如图 3 所示;核磁共振碳谱( $^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz)谱图如图 4 所示。由此,确定上述所得稻曲菌素 A 单体化合物的结构式如式 I 所示,与已知的稻曲菌素 A 结构式相同。

[0166] 制备出的稻曲菌素 A 的理化性质和波谱数据如下：纯品为白色粉末(MeOH)。通过高分辨质谱(HR-ESI-MS,  $m/z$  674.26859  $[M+H]^+$ ) 确定分子式为： $C_{28}H_{43}N_5O_{12}S$ 。核磁共振氢谱( $D_2O$ , 400MHz) 化学位移( $\delta$ , ppm): 7.60 (1H, s, H-13), 7.08 (1H, s, H-16), 4.93 (1H, d,  $J_{10,9}=10.0$ Hz, H-10), 4.84 (1H, s, H-3), 4.35-4.40 (1H, m, H-3'), 4.28 (1H, d,  $J_{9,10}=10.0$ Hz, H-9), 4.14 (1H, d,  $J_{6,24}=10.2$ Hz, H-6), 3.99 (1H, dd,  $J_{5',4'}=4.0$ Hz, 7.6Hz, H-5'), 3.77 (2H, s, H-19), 3.33 (1H, dd,  $J_{2',2'}=13.2$ Hz,  $J_{2',3'}=9.6$ Hz, H-2'), 3.04 (1H, dd,  $J_{2',2'}=13.2$ Hz,  $J_{2',3'}=2.8$ Hz, H-2'), 2.77 (3H, s,  $NCH_3$ -9), 2.17-2.25 (2H, m, H-22, H-4'), 2.12 (1H, ddd,  $J_{4',3'}=2.8$ Hz,  $J_{4',4'}=14.2$ Hz,  $J_{4',5'}=7.6$ Hz, H-4'), 1.86-1.92 (1H, m, H-24), 1.76 (1H, s, H-21), 1.68-1.73 (1H, m, H-22), 1.09 (3H, t,  $J=7.2$ Hz, H-23), 0.88 (3H, d,  $J_{26,24}=7.0$ Hz, H-26), 0.78 (3H, d,  $J_{25,24}=7.0$ Hz, H-25)。核磁共振碳谱( $D_2O$ , 100MHz) 化学位移( $\delta$ , ppm): 176.0 (C-20), 174.1 (6'-C), 170.7 (C-5), 170.0 (C-17), 166.0 (C-8), 151.9 (C-14), 145.7 (C-15), 136.1 (C-12), 127.7 (C-11), 123.9 (C-16), 113.7 (C-13), 86.9 (C-2), 73.7 (C-10), 66.4 (C-9), 64.5 (2'-C), 63.5 (3'-C), 59.8 (6-C), 59.3 (3-C), 52.5 (5'-C), 43.5 (19-C), 36.4 (4'-C), 32.0 ( $NCH_3$ -C), 31.8 (22-C), 28.4 (24-C), 20.9 (21-C), 18.0 (26-C), 17.7 (25-C), 7.5 (23-C)。上述制备出的稻曲菌素 A 的理化性质和波谱数据与文献(Koiso Y, Li Y, Iwasaki S, Hanaoka K, Kobayashi T, Sonoda R, Fujita Y, Yaegashi H, Sato Z. Ustiloxins, antimitotic cyclic peptides from false smut balls on rice panicles caused by *Ustilaginoidea virens*. The Journal of Antibiotics 1994, 47(7):765-773.) 报道的相一致。

[0167]



式 I

[0168] 2、稻曲菌素 B 的制备

[0169] 将一定量的稻曲球用水冷浸提取得水提取物,然后分别用离子交换树脂 PA308、大孔吸附树脂 HP-20、透析袋透析以及各种柱层析方法对粗提物进行处理,通过 TLC 和 HPLC 分析后合并相同的组分,对得到的单体化合物进行波谱学鉴定,最终得到稻曲菌素 B 的单体化合物。具体操作如下:

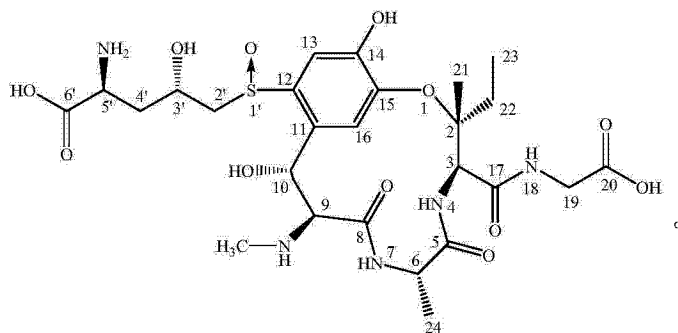
[0170] 取稻曲球(1000g),晾干,粉碎,按干重(g)和水体积(mL)的配比的 1:30 (g/mL) 冷浸提取 7 次,每次 12 小时,将 7 次提取液合并,减压浓缩得到稻曲球水提取物。将提取物用水混悬,用滤纸过滤,滤液过大孔吸附树脂 HP-20,用水洗脱,合并水洗脱液,过透析袋(3500Da),收集透析液,浓缩后依次过 Sephadex LH-20 和 Sephadex G-15,可获得 20mg 纯的

稻曲菌 B。

[0171] 取上述稻曲菌素 B 单体化合物, 对其进行波谱鉴定。其高分辨质谱(HR-ESI-MS)谱图如图 5 所示; 核磁共振氢谱( $^1\text{H}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz)谱图如图 6 所示; 核磁共振碳谱( $^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz)谱图如图 7 所示。由此, 确定上述所得稻曲菌素 B 单体化合物的结构式如式 II 所示, 与已知的稻曲菌素 B 结构式相同。

[0172] 制备出的稻曲菌素 B 的理化性质和波谱数据如下: 纯品为白色粉末(MeOH)。通过高分辨质谱(HR-ESI-MS,  $m/z$  646. 23751  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 确定分子式为:  $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{S}$ 。核磁共振氢谱( $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz) 化学位移( $\delta$ , ppm): 7. 57 (1H, s, H-13), 7. 39 (1H, s, H-16), 4. 98 (1H, d,  $J_{10,9}=10.0\text{Hz}$ , H-10), 4. 71 (1H, s, H-3), 4. 46 (1H, q,  $J_{6,24}=7.0\text{Hz}$ , H-6), 4. 33-4. 38 (1H, m, H-3'), 4. 21 (1H, d,  $J_{9,10}=10.0\text{Hz}$ , H-9), 3. 97 (1H, dd,  $J_{5',4'}=4.0\text{Hz}$ , 8. 0Hz, H-5'), 3. 81 (1H, d,  $J_{19,19}=17.0\text{Hz}$ , H-19), 3. 75 (1H, d,  $J_{19,19}=17.0$ ), 3. 37 (1H, dd,  $J_{2',2'}=13.4\text{Hz}$ ,  $J_{2',3'}=10.0\text{Hz}$ , H-2'), 3. 03 (1H, dd,  $J_{2',2'}=13.4\text{Hz}$ ,  $J_{2',3'}=2.4\text{Hz}$ , H-2'), 2. 76 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ -9), 2. 04-2. 19 (3H, m,  $\text{H}_2$ -4', H-22), 1. 74 (3H, s, H-21), 1. 65-1. 70 (1H, m, H-22), 1. 19 (3H, d,  $J_{24,6}=7.0\text{Hz}$ , H-24), 0. 97 (-3H, t,  $J_{23,22}=7.2\text{Hz}$ , 7. 2Hz, H-23)。核磁共振碳谱( $\text{D}_2\text{O}$ , 100MHz) 化学位移( $\delta$ , ppm): 176. 2 (C-20), 174. 1 (6'-C), 171. 8 (C-5), 169. 8 (C-17), 165. 6 (C-8), 152. 0 (C-14), 145. 6 (C-15), 136. 5 (C-12), 127. 8 (C-11), 123. 9 (C-16), 113. 7 (C-13), 87. 0 (C-2), 73. 3 (C-10), 66. 1 (C-9), 64. 5 (2'-C), 63. 5 (3'-C), 59. 6 (3-C), 52. 4 (5'-C), 49. 4 (6-C), 43. 5 (19-C), 36. 4 (4'-C), 31. 7 ( $\text{NCH}_3$ -C), 30. 9 (22-C), 21. 6 (21-C), 15. 2 (24-C), 7. 7 (23-C)。上述制备出的稻曲菌素 B 的理化性质和波谱数据与文献(Koiso Y, Li Y, Iwasaki S, Hanaoka K, Kobayashi T, Sonoda R, Fujita Y, Yaegashi H, Sato Z. Ustiloxins, antimitotic cyclic peptides from false smut balls on rice panicles caused by Ustilaginoidea virens. The Journal of Antibiotics 1994, 47 (7): 765-773.) 报道的相一致。

[0173]



式 II

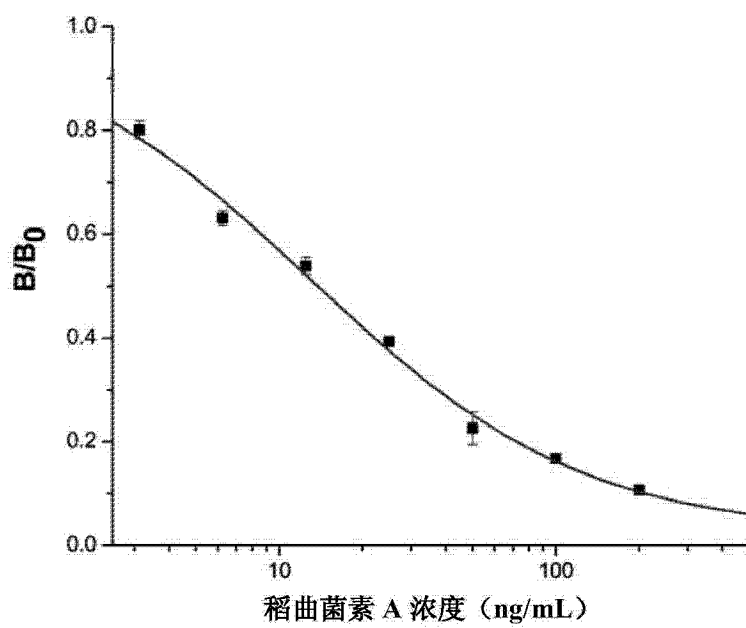


图 1

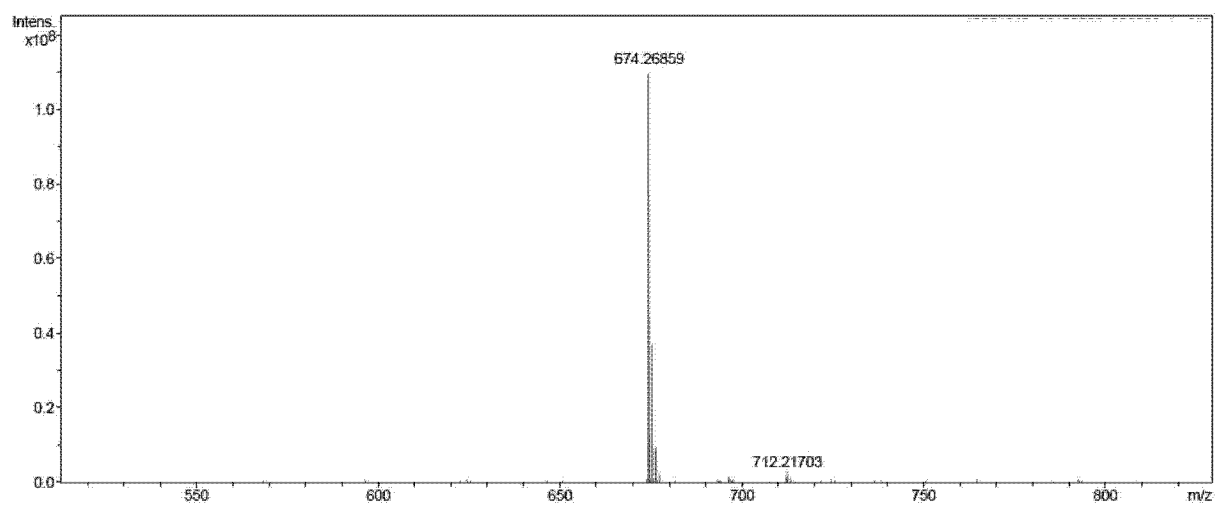


图 2

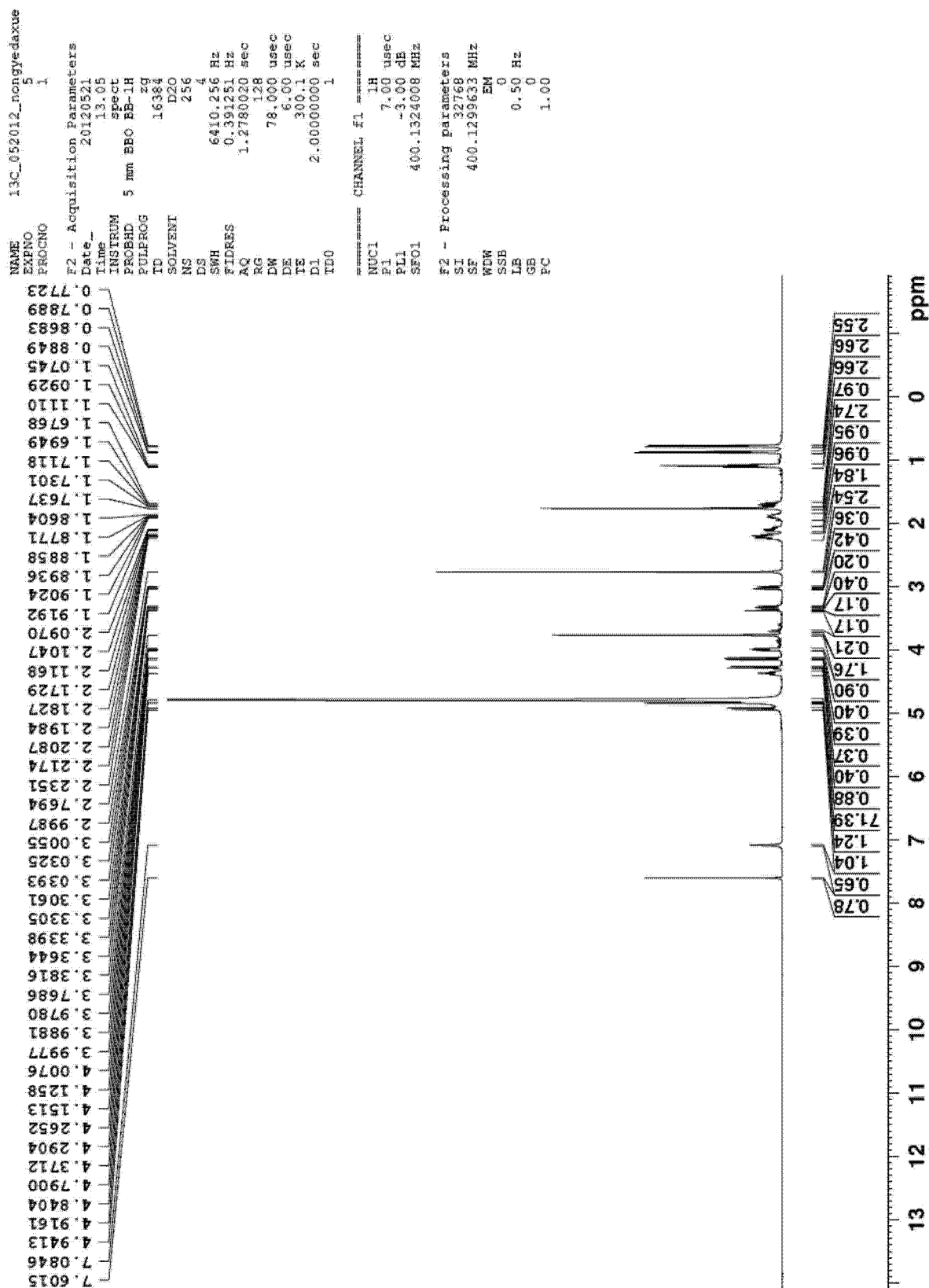


图 3

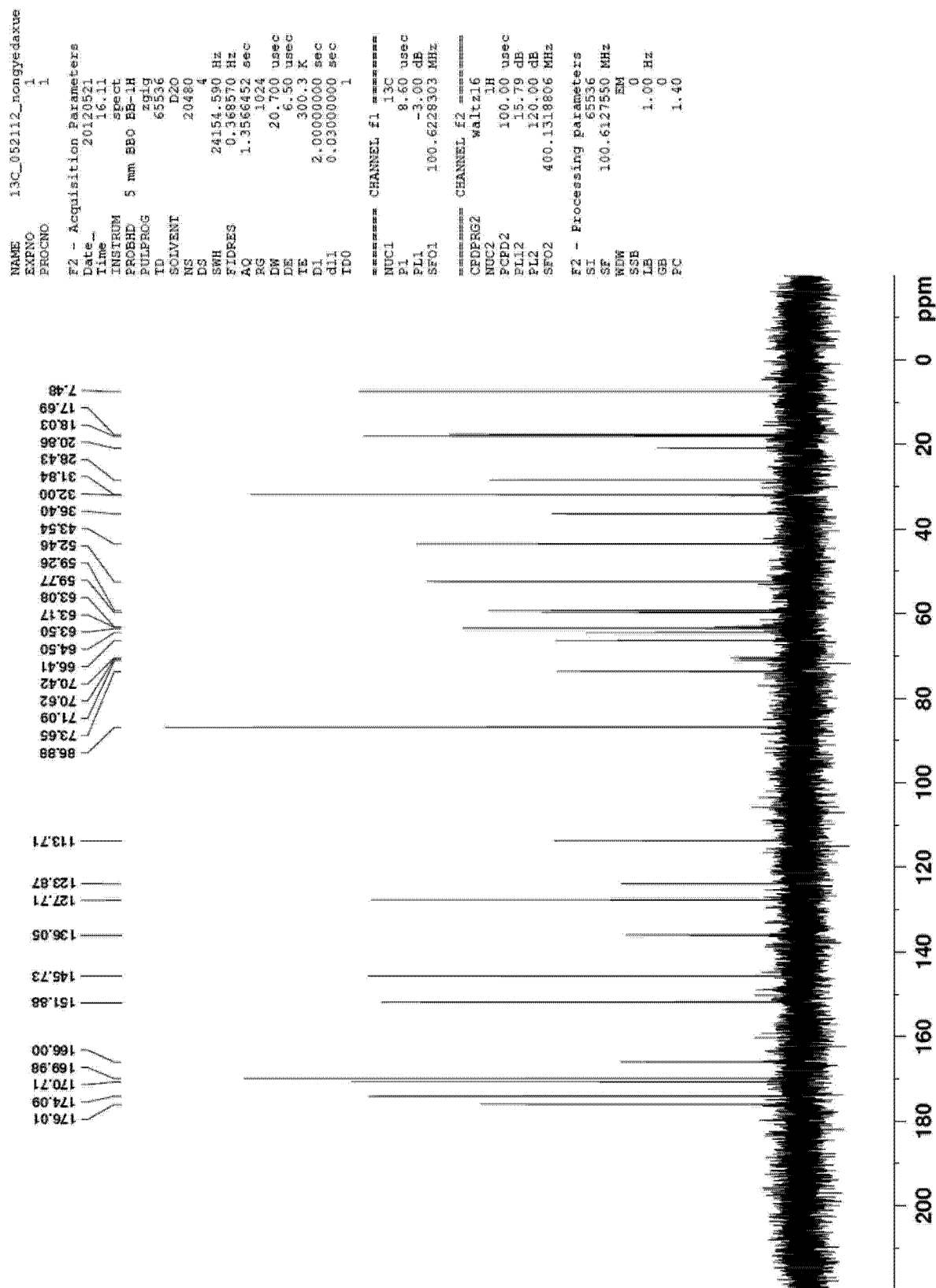


图 4

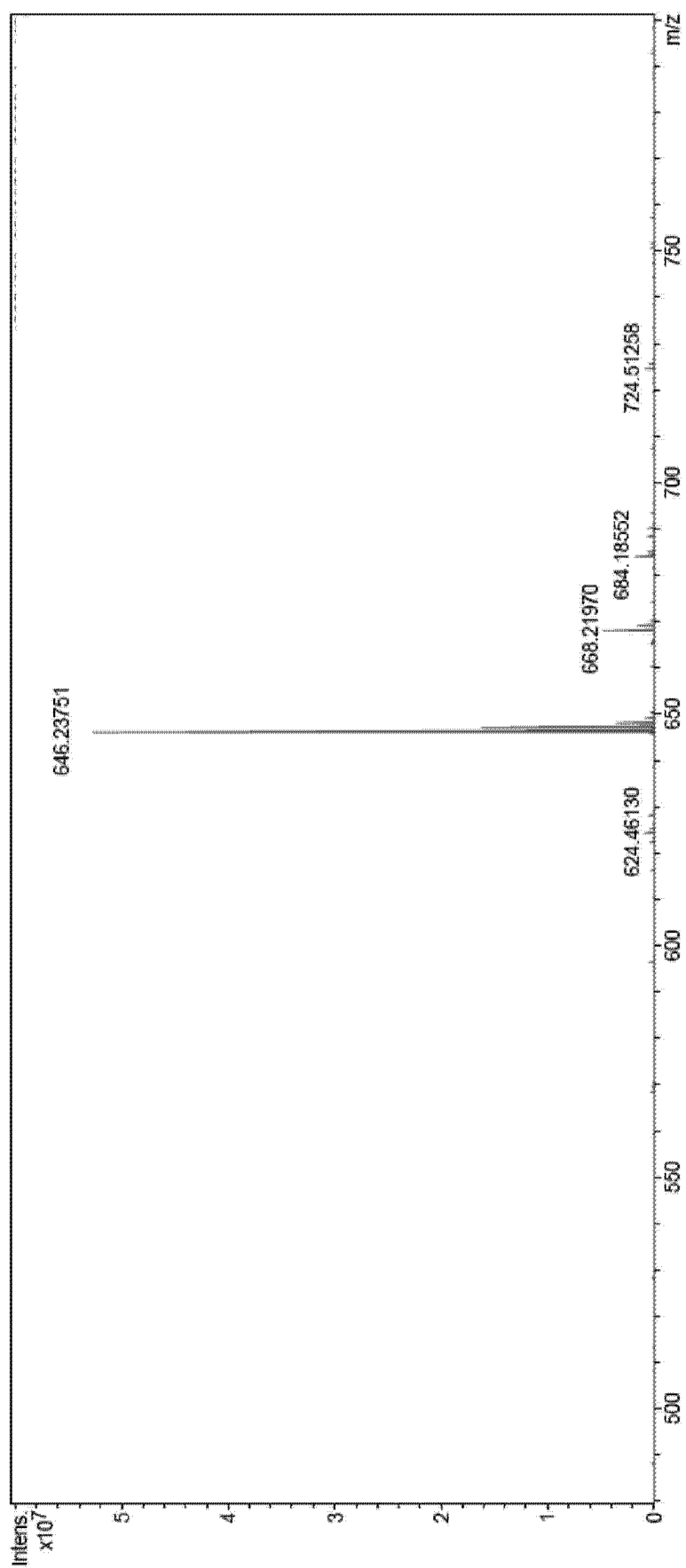


图 5

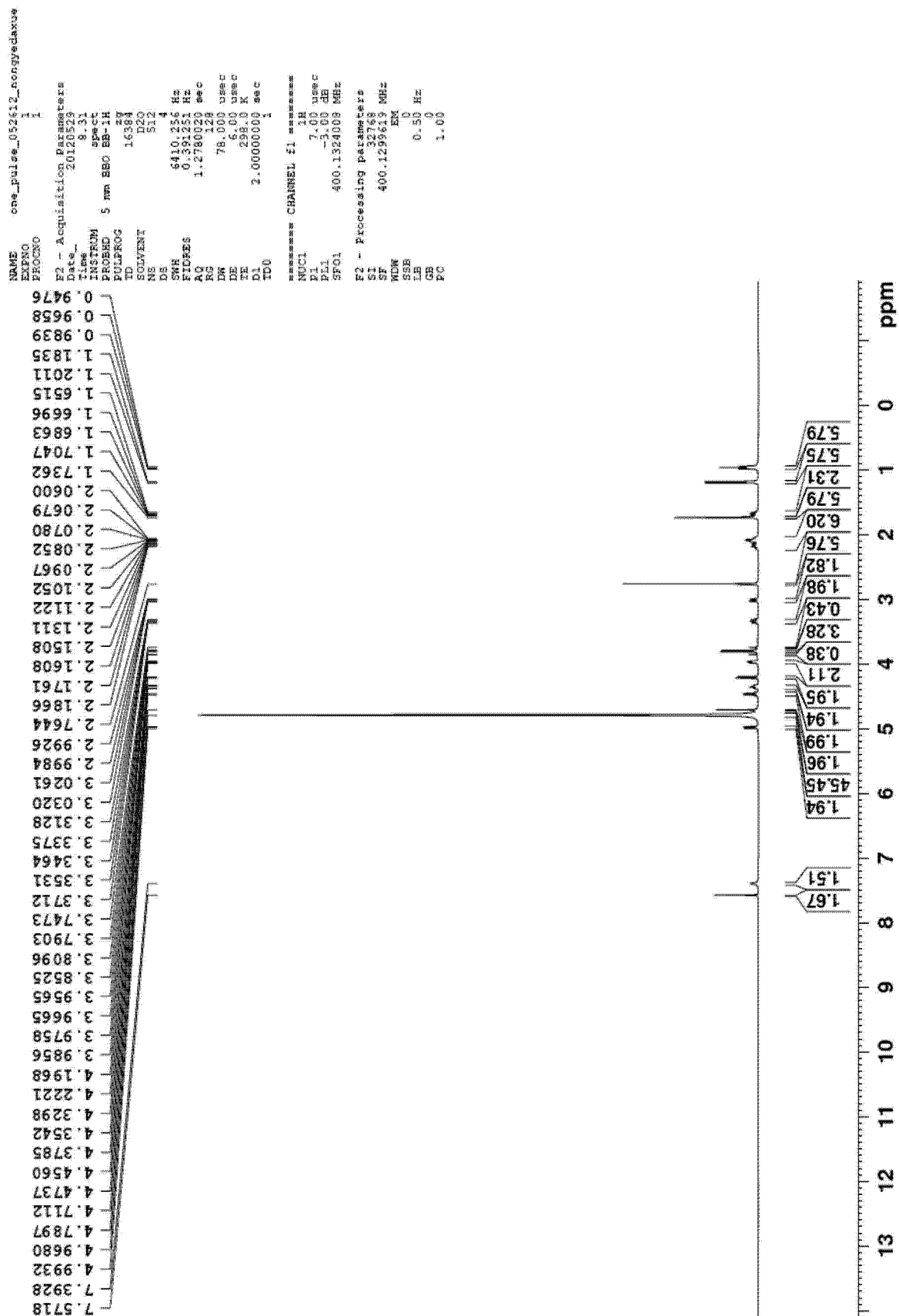


图 6

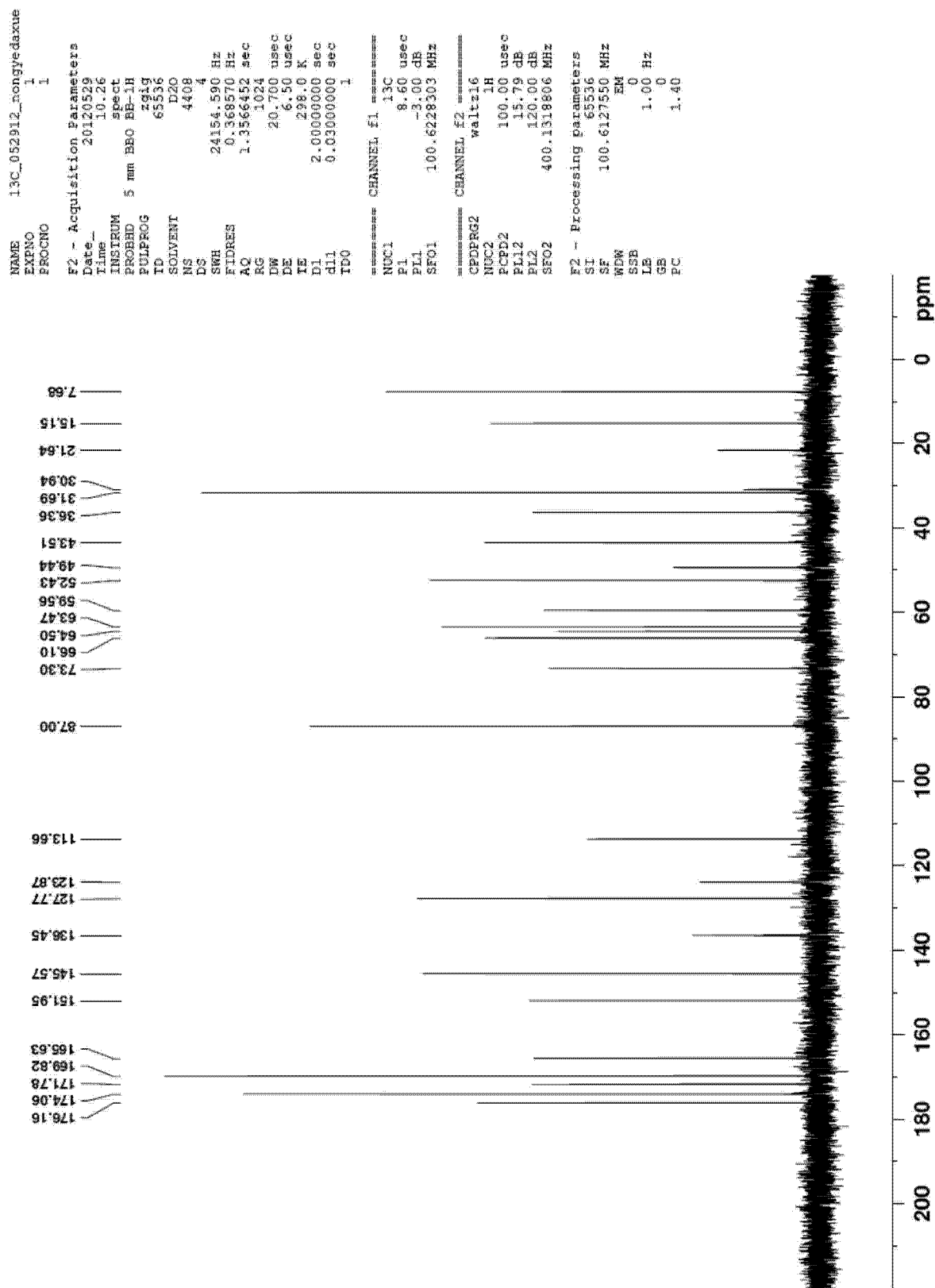


图 7

|                |                                                            |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 检测稻曲菌素A的方法及其专用酶联免疫试剂盒                                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN103760353A</a>                               | 公开(公告)日 | 2014-04-30 |
| 申请号            | CN201410045470.X                                           | 申请日     | 2014-02-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国农业大学                                                     |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国农业大学                                                     |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国农业大学                                                     |         |            |
| [标]发明人         | 王保民<br>周立刚<br>傅小香<br>单体江<br>王晓晗<br>赖道万                     |         |            |
| 发明人            | 王保民<br>周立刚<br>傅小香<br>单体江<br>王晓晗<br>赖道万                     |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N33/531                                      |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/14 G01N33/56961 G01N33/577 G01N2333/38 G01N2333/473 |         |            |
| 代理人(译)         | 关畅                                                         |         |            |
| 其他公开文献         | CN103760353B                                               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>             |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测稻曲菌素A的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的方法及其专用试剂盒所使用的抗稻曲菌素A的单克隆抗体是由小鼠杂交瘤细胞株2D3G5分泌产生的，该小鼠杂交瘤细胞株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No. 8774。本发明所提供的抗稻曲菌素A的单克隆抗体是以稻曲菌素A-OVA（稻曲菌素A和卵清白蛋白的偶联物）为包被抗原，通过间接竞争ELISA方法对杂交瘤细胞进行筛选得到的；利用该单克隆抗体制备得到的间接竞争酶联免疫试剂盒，用于定性或定量检测植物样品中的稻曲菌素A，线性检测范围在2.8-72.0ng/mL，具有快速、特异性强、灵敏度高的优点。

