

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/02

C12P 21/08 C12N 15/12

G01N 33/53 G01N 33/577

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00810985.0

[43]公开日 2002年8月21日

[11]公开号 CN 1365387A

[22]申请日 2000.9.7 [21]申请号 00810985.0

[30]优先权

[32]1999.9.7 [33]JP [31]253443/99

[32]1999.10.29 [33]JP [31]310185/99

[86]国际申请 PCT/JP00/06100 2000.9.7

[87]国际公布 WO01/18196 日 2001.3.15

[85]进入国家阶段日期 2002.1.29

[71]申请人 协和梅迪克斯株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 河野弘明 桥本百合子

芳泽宅实

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 8 页 说明书 34 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 用于单端孢菌毒素真菌毒素检测的方法和试剂

[57]摘要

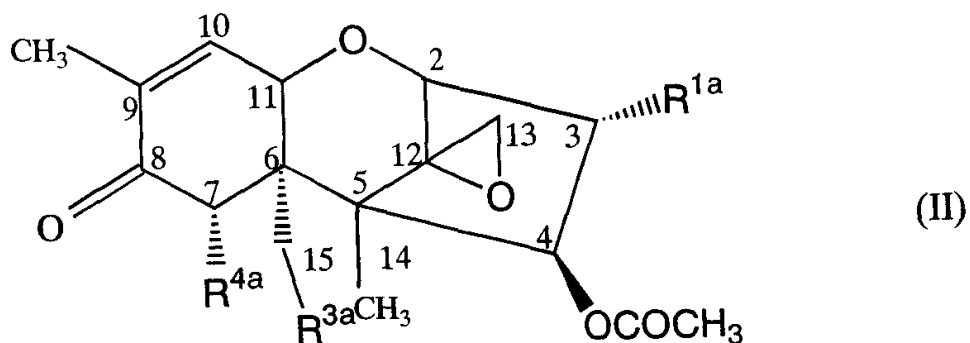
产生了对单端孢菌毒素真菌毒素 DON、NIV 和 T-2 具有高亲和性的单克隆抗体,并且采用所说的单克隆抗体集中检测了单端孢菌毒素真菌毒素。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

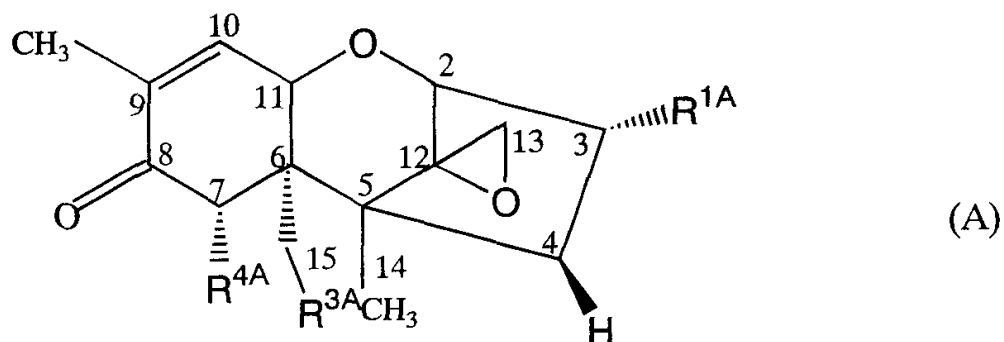
知识产权出版社出版

# 权 利 要 求 书

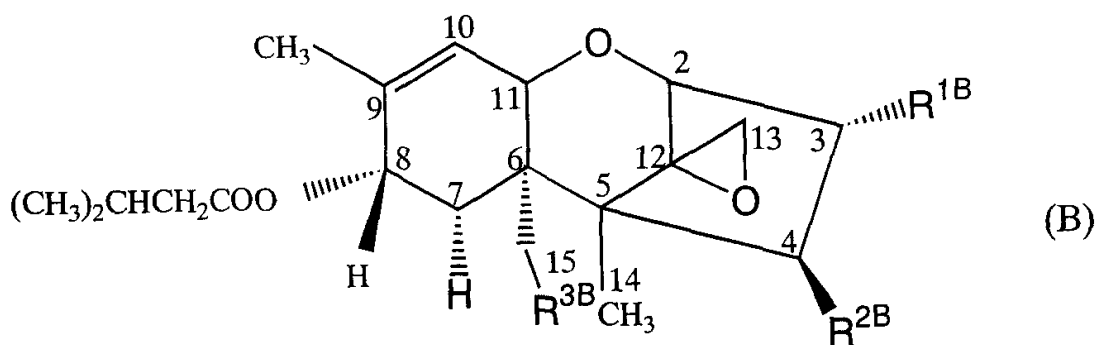
1. 一种单克隆抗体或其片段，其对式 (II) 代表的化合物具有亲和性。



其中  $R^{1a}$ ,  $R^{3a}$  和  $R^{4a}$  可以相同或者不同，每个代表羟基或酰氧基，并且其实质上不与以式 (A) 代表的化合物



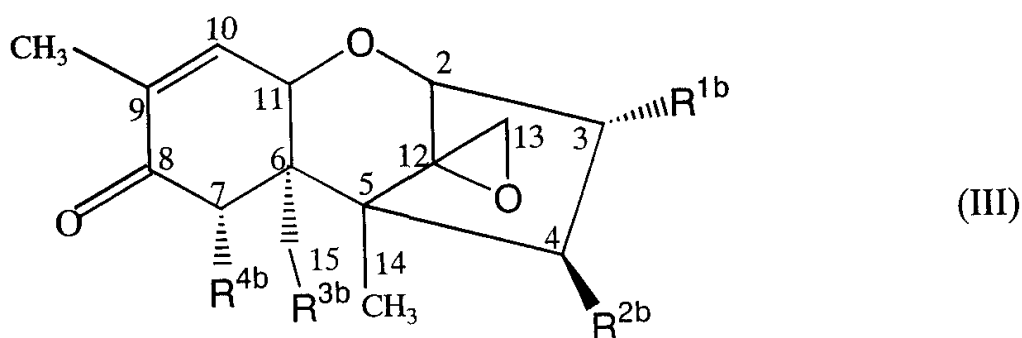
其中  $R^{1A}$ ,  $R^{3A}$  和  $R^{4A}$  可以相同或者不同，每个代表羟基或酰氧基或式 (B) 代表的化合物进行反应



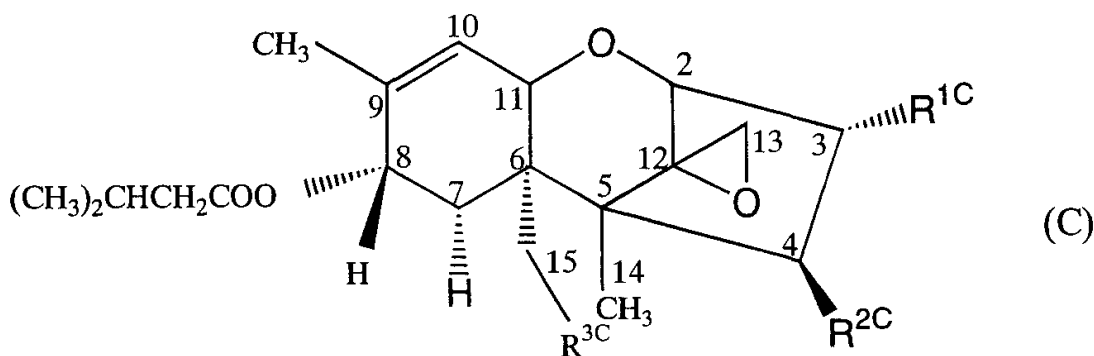
其中  $R^{1B}$ ,  $R^{2B}$  和  $R^{3B}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基, 所说的对式 (II) 代表的化合物的亲和性以下列顺序递减: 化合物 1-1 > 化合物 1-2 > 化合物 1-3, 其中化合物 1-1 是式 (II) 代表的化合物, 其中  $R^{1a}$  和  $R^{3a}$  是  $OCOCH_3$ ,  $R^{4a}$  是  $OH$ , 化合物 1-2 是式 (II) 代表的化合物, 其中  $R^{1a}$  和  $R^{4a}$  是  $OH$ ,  $R^{3a}$  是  $OCOCH_3$ , 以及化合物 1-3 是式 (II) 代表的化合物, 其中  $R^{1a}$ ,  $R^{3a}$  和  $R^{4a}$  是  $OCOCH_3$ .

2. 根据权利要求 1 的单克隆抗体或其片段, 其中所说的单克隆抗体是由杂交瘤 KTM-205 产生的单克隆抗体 KTM-205.

3. 一种单克隆抗体或其片段, 其对以式 (III) 代表的化合物具有亲和性



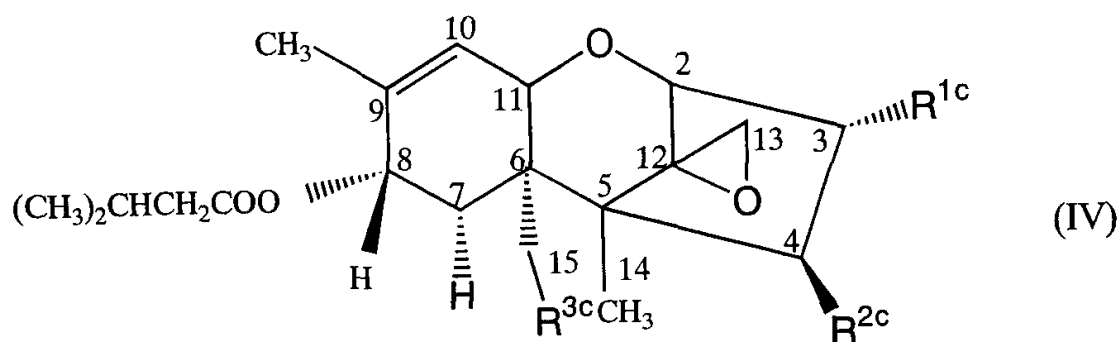
其中  $R^{1b}$ ,  $R^{3b}$  和  $R^{4b}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基;  $R^{2b}$  代表  $H$ ,  $OH$ , 或酰氧基, 前提是  $R^{2b}$  是  $H$  或  $OH$ , 至少  $R^{1b}$ ,  $R^{3b}$  和  $R^{4b}$  其中一种是酰氧基, 并且其实质上不与以式 (C) 代表的化合物进行反应:



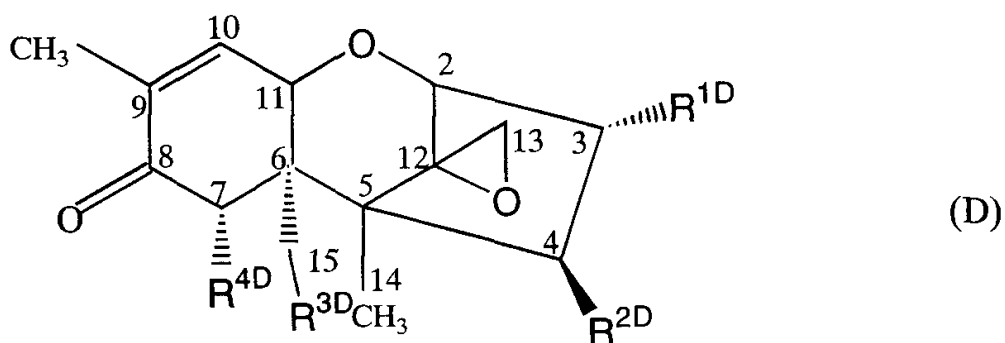
其中  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基, 所说的对以式 (III) 代表的化合物的亲和性以下列顺序递减: 化合物 2-1 > 化合物 2-2 > 化合物 2-3, 其中化合物 2-1 是以式 (III) 代表的化合物, 其中  $R^{1b}$  和  $R^{3b}$  是  $OCOCH_3$ ,  $R^{2b}$  是 H, 和  $R^{4b}$  是 OH, 化合物 2-2 是以式 (III) 代表的化合物, 其中  $R^{1b}$ ,  $R^{3b}$  和  $R^{4b}$  是  $OCOCH_3$ ,  $R^{2b}$  是 H, 以及化合物 2-3 是以式 (III) 代表的化合物, 其中  $R^{1b}$  和  $R^{4b}$  是 OH,  $R^{2b}$  和  $R^{3b}$  是  $OCOCH_3$ 。

4. 根据权利要求 3 的单克隆抗体或其片段, 其中所说的单克隆抗体是由杂交瘤 KTM-240 产生的单克隆抗体 KTM-240。

5. 一种单克隆抗体或其片段, 其对以式 (IV) 代表的化合物具有亲和性



其中  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基; 前提是  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  至少其中一种是酰氧基, 并且其实质上不与以式 (D) 代表的化合物进行反应:



其中  $R^{1D}$ ,  $R^{3D}$  和  $R^{4D}$  可以相同或不同, 每个代表 H 或 OH, 以及 H, OH 或酰氧基, 所说的对以式 (IV) 代表的化合物的亲和性以下列顺序递减: 化合物 3-1 > 化合物 3-2, 其中化合物 3-1 是以式 (IV) 代表的化合物, 其中  $R^{1c}$  是 OH,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  是  $OCOCH_3$ , 化合物 3-2 是以式 (IV) 代表的化合物, 其中  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  是  $OCOCH_3$ 。

6. 根据权利要求 5 的单克隆抗体或其片段, 其中单克隆抗体是由杂交瘤 KTM-249 产生的单克隆抗体 KTM-249。

7. 一种能够产生根据权利要求 1 或 2 的单克隆抗体的杂交瘤。

8. 一种能够产生根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体的杂交瘤。

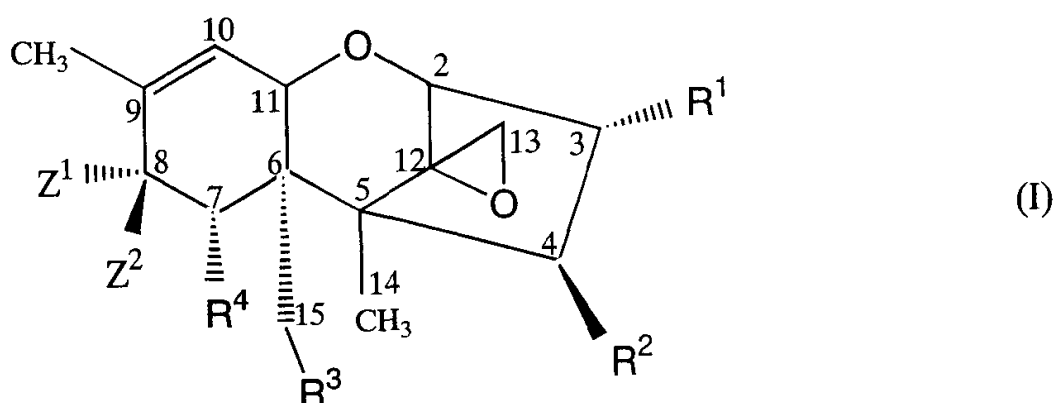
9. 一种能够产生根据权利要求 5 或 6 的单克隆抗体的杂交瘤。

10. 根据权利要求 7 的杂交瘤, 其以保藏号 FERM BP-6835 保藏于国立生物科学和人类技术研究所工业科学和技术机构。

11. 根据权利要求 8 的杂交瘤, 其以保藏号 FERM BP-6836 保藏于国立生物科学和人类技术研究所工业科学和技术机构。

12. 根据权利要求 9 的杂交瘤, 其以保藏号 FERM BP-6837 保藏于国立生物科学和人类技术研究所工业科学和技术机构。

13. 一种用于产生杂交瘤的方法, 该杂交瘤产生根据权利要求 1-6 任一的单克隆抗体, 该方法包括通过给动物施用一种从以式 (I) 代表的化合物



其中  $R^1$  代表 H 或酰氧基;  $R^2$ ,  $R^3$  和  $R^4$  可以相同或者不同, 每个代表 H, 羟基或酰氧基; 以及  $Z^1$  代表  $OCOCH_2CH(CH_3)_2$ , 和  $Z^2$  代表 H, 或  $Z^1$  和  $Z^2$  一起代表  $=O$ , 前提是  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , 和  $R^4$  中的至少其中一种是 OH, 通过把其

中的至少一个羟基基团转变为酰氧基，并通过把一种载体物质结合到其 3-位碳原子上制备的物质免疫动物，并通过把一种永久生长细胞与一种从免疫动物中获得的产生抗体的细胞相融合，以获得杂交瘤。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中式 (I) 中的  $R^2$  是酰氧基。

15. 根据权利要求 13 的方法，其中，通过把至少其中一个羟基基团转变为酰氧基，通过在 3-位使用一个取代基作为接头，把载体物质结合到从一种以式 (I) 代表的化合物制备的化合物的 3-位碳原子上。

16. 根据权利要求 13 的方法，其中，将从以式 (I) 代表的化合物通过把至少其中一个羟基基团转变为以 OR 所代表的基团，其中 R 代表取代的或未取代的低级酰基或取代的或未取代的芳香酰基，制备的化合物溶解于溶剂中，该溶剂不是有机溶剂或不包含有机溶剂，然后结合到载体物质上。

17. 根据权利要求 16 的方法，其中不是有机溶剂或不包含有机溶剂的该溶剂是水。

18. 用于测定样品中单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定方法，包括使至少一种根据权利要求 1-6 的单克隆抗体和其片段作用于包含单端孢菌毒素真菌毒素的样品。

19. 用于测定样品中单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定方法，包括把具有至少一个羟基基团的、以式 (I) 所代表的化合物中的至少一个羟基基团转变成以 OR 所代表的基团，其中 R 代表一个取代的或未取代的低级酰基或一个取代的或未取代的芳香酰基，并且使至少一种根据权利要求 1-6 的单克隆抗体和其片段作用于包含单端孢菌毒素真菌毒素的样品。

20. 根据权利要求 18 或 19 的免疫测定方法，其中单端孢菌毒素真菌毒素选自下组：脱氧瓜萎镰菌醇 (DON)，瓜萎镰菌醇 (NIV)，T-2 毒素 (T-2) 及其衍生物。

21. 一种测定样品中 DON, NIV, T-2 及其衍生物的总量的方法，该方法包括使用根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体或者片段、从根据权利要求 18 或 19 的免疫测定方法获得的值或使用根据权利要求 5 或 6 的单克隆抗体或者片段、从根据权利要求 18 或 19 的免疫测定方法获得的值计

算总量。

22. 一种测定样品中 NIV 及其衍生物的方法，该方法包括使用根据权利要求 1 或 2 的单克隆抗体或者片段、根据权利要求 18 或 19 实施免疫测定。

23. 一种测定样品中 DON, NIV 及其衍生物的方法，该方法包括使用根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体或者片段、根据权利要求 18 或 19 实施免疫测定。

24. 一种测定样品中 DON 及其衍生物的方法，该方法包括使用根据权利要求 3 或 4 的单克隆抗体或者片段、从根据权利要求 18 或 19 的免疫测定获得的值或使用根据权利要求 1 或 2 的单克隆抗体或者片段、从根据权利要求 18 或 19 的免疫测定获得的值计算 DON 及其衍生物的量。

25. 一种测定样品中 T-2 及其衍生物的方法，该方法包括使用根据权利要求 5 或 6 的单克隆抗体或者片段、根据权利要求 18 或 19 实施免疫测定。

26. 根据权利要求 18 或 19 的免疫测定方法，其中免疫测定方法选自下组：放射免疫测定，酶免疫测定，荧光免疫测定和发光免疫测定。

27. 根据权利要求 18 或 19 的免疫测定方法，其中免疫测定方法选自下组：竞争免疫测定和夹心免疫测定。

28. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂，包含至少一种根据权利要求 1 至 6 的单克隆抗体及其片段作为活性成分。

29. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据权利要求 28 的试剂和一个固定抗原的固相平板。

30. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据权利要求 28 的试剂和一个固定抗原的固相平板，一种与根据权利要求 1 至 6 任一的单克隆抗体及其片段起反应的标记的抗体或抗体片段，以及一种用于检测所说抗体或抗体片段标记的试剂。

31. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据权利要求 28 的试剂和一个固定抗原的固相平板，一种被标记的根据权利要求 1 至 6 任一的单克隆抗体及其片段，以及一种用于检测所说抗

体或抗体片段标记的试剂。

32. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据权利要求 28 的试剂和一种预处理样品使以式 (I) 代表的化合物中的羟基转变成为以 OR 代表的基团的溶液，其中 R 具有与如上限定相同的含义。

33. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据权利要求 28 的试剂，一个固定抗原的固相平板，和一种预处理样品使以式 (I) 代表的化合物中的羟基转变成为以 OR 代表的基团的溶液，其中 R 具有如以上限定相同的含义。

34. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据权利要求 28 的试剂，一个固定抗原的固相平板，一种与根据权利要求 1 至 6 中的任何单克隆抗体及其片段起反应的标记的抗体或抗体片段，一种用于检测所说抗体或抗体片段标记的试剂，以及一种预处理样品使以式 (I) 代表的化合物中的羟基转变成为以 OR 代表的基团的溶液，其中 R 具有如权利要求限定的相同的含义。

35. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含一个固定抗原的固相平板，一种根据权利要求 1 至 6 中被标记的任何单克隆抗体及其片段，一种用于检测所说抗体或抗体片段标记的试剂，以及一种预处理样品使以式 (I) 代表的化合物中的羟基转变成为以 OR 代表的基团的溶液，其中 R 具有如权利要求限定的相同的含义。

36. 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的方法，该方法包括用包含有机溶剂的溶液处理包含单端孢菌毒素真菌毒素的样品，以从样品中提取单端孢菌毒素真菌毒素，以及通过根据权利要求 18 或 19 的免疫测定方法测定提取的单端孢菌毒素真菌毒素。

37. 根据权利要求 36 的方法，其中有机溶剂是一种水溶性的有机溶剂。

38. 根据权利要求 36 或 37 的方法，其中水溶性的有机溶剂至少是选自下组的一个成员：甲醇，乙醇，丙醇，乙腈，二甲基亚砜，二甲基甲酰胺。

39. 一种通过免疫测定检测样品中产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的方法，该方法包括向培养基中接种包含产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的样品，在培养基中培养该微生物，以及使根据权利要求1至6的至少一种单克隆抗体及其片段作用于培养过程中产生的单端孢菌毒素真菌毒素。

40. 一种通过免疫测定鉴定样品中产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的方法，该方法包括向培养基中接种包含产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的样品，在培养基中培养该微生物，以及使根据权利要求1至6的至少一种单克隆抗体及其片段作用于培养过程中产生的单端孢菌毒素真菌毒素。

# 说 明 书

---

## 用于单端孢菌毒素真菌毒素检测的方法和试剂

### 技术领域

本发明涉及农作物，食物，饲料等中的单端孢菌毒素（trichothecene）真菌毒素的免疫测定，涉及用于免疫测定的试剂和试剂盒，以及其中使用的单克隆抗体。

### 背景领域

真菌毒素被定义为真菌（经由食物或饲料对人类或动物有一些有害效应的）产生的次生代谢物，并区别于细菌毒素及其诸如此类的毒素。真菌毒素，不同于细菌毒素，是低分子量物质，包括各种已知物质。在其化学结构和对生活的有机体有害效应方面有相当的变化。不只是一些真菌毒素对人类有害；某些在人体中表现高的急性毒性，其它的被认为在肾和肝脏具有致癌性或致瘤性。由于其低分子量，真菌毒素在食品加工或烹调的一般条件下很难分解或除去。而且，当通过饲料摄取进入食用动物体内时，真菌毒素的高稳定性使其保留在这些动物的肉与牛奶产品中，当摄入人体之后最终表现出毒性。

真菌毒素污染能通过各种途径发生，但广义上被分为作物的初级污染（在作物的栽培，收获，储藏和加工过程中通过真菌的侵染发生）和家畜和海产品（例如，肉，奶，蛋）的次级污染。根据诸如作物种类（真菌的底物），存在于栽培环境中的真菌种类以及环境条件（例如，温度，湿度和降雨量）的因素，初级污染表现出局部特征。

单端孢菌毒素真菌毒素是污染主要的禾谷类作物（如大麦，小麦，黑麦，燕麦和玉米）的代表性真菌毒素。脱氧瓜萎镰菌醇（DON），瓜萎镰菌醇（NIV），T-2 毒素（T-2）是代表性的单端孢菌毒素真菌毒素。主要产生它们的真菌，禾谷镰孢、黄色镰孢、拟枝孢镰孢，一般存在于土壤中，如果自然条件如温度，湿度以及降雨满足的话，容易侵染农作物，导致传播农作物的真菌毒素污染。为了防止食品和饲料的污染，许多国家正式

通过了关于食品和饲料中的单端孢菌毒素真菌毒素残余浓度的法规。因此，迅速和准确地测定食品和饲料中的单端孢菌毒素真菌毒素是很重要的。

以前用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的方法包括层析，高效液相色谱，气相色谱，质谱和使用动物的生物测定，这些方法以单独地或结合的方式进行测定。而且，最近提出的免疫测定开始使用。免疫测定(是迅速和简单地执行分析的方法，具有非常好的特异性和灵敏度)被广泛地应用于各个领域，包括测定激素和生物物质。尤其，用于制备单克隆抗体的技术促进了免疫测定方法的较大进展。

也存在一些单端孢菌毒素真菌毒素的衍生物，它们也具有毒性。因此，为了了解单端孢菌毒素真菌毒素污染的程度，优选地是以某些共同地而不是个别地测定这些衍生物。测定的实验材料包括非常广泛范围的物质，例如，如受单端孢菌毒素真菌毒素侵染的大麦，小麦，黑麦，燕麦以及玉米的禾谷类，用感染的禾谷类饲喂的家畜的肉和奶，从感染的肉和奶产生的加工的食物。而且，由于在加工过程中真菌毒素的浓度被稀释，有必要测定低浓度的单端孢菌毒素真菌毒素。因此，需要一种具有较高灵敏度的测定方法。

另一方面，为了了解污染的地点和情况，单独地测定 3 种主要的单端孢菌毒素真菌毒素 DON, NIV 和 T-2 是重要的。为了建立能够测定这些单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定，将有利地使用对欲测定的单端孢菌毒素真菌毒素具有高亲和性和高特异性的抗体，尤其是单克隆抗体。

在各种出版物中公开了单端孢菌毒素真菌毒素的单克隆抗体。日本出版检查的专利申请 43358/93 公开了对 T-2 具有特异性的单克隆抗体和用抗体对 T-2 类型测定的方法，该单克隆抗体是通过用一种免疫原(通过把 T-2 结合到一种载体蛋白上制备的)免疫老鼠而获得的。Dietrich 等获得了 T-2 的单克隆抗体和 3-乙酰 DON 的单克隆抗体(天然毒素, 3:288-293, 1995)。美国专利 4879248 公开了在第 8 个位置上使用取代基作为接头，通过结合一种载体蛋白产生抗体。然而，这些出版物都没有公开适合于本发明的对象的具有高亲和性和特异性的单克隆抗体。

应用和环境的微生物学, 1993年5月, 59:1264-1268 公开了 4,15-二乙酰 NIV 的多克隆抗体(通过使用一种免疫原制备, 其中载体蛋白质结合在第 3-位置的碳原子上), 但没有公开利用类似的免疫原产生单克隆抗体。此外, T-2 和 DON 的单克隆抗体在食品添加剂污染(5: 629, (1988)) 和农业食品化学杂志(36:663(1988)) 中予以公开。

根据本发明的单克隆抗体具有下列特征, 并且优于以上提及的已知的单克隆抗体。

与 Dietrich 等的抗体(3E2)(天然毒素, 3:288, 1995)相比较, 249-KTM 有相当高的亲和性, 和高度的灵敏性(T-2 的检测限: ca. 0.0001 ng/ml)。KTM-249 表现出与乙酰 T-2, HT-2 和 T-2 相同程度的反应性, 因此适合于本发明的对象。

KTM-2 与 HT-2 和 T-2 的反应性在同一水平(T-2=HT-2=100%), 与乙酰 T-2 的反应为 78%。另一方面, 美国专利 4772551 中公开的抗 T-2 单克隆抗体 IVI-10092 对 T-2 的 0.023 显示出 50%的抑制值, 乙酰 T-2 的 0.094 显示出 50%的抑制值, (反应性:0.023/0.094=25%, 根据对 T-2 的 50%抑制值, 为 100%), 对 HT-2 的 1 显示出 50%的抑制值(反应性: 0.023/1=2.3%)。这表明 KTM-249 能够检测广泛范围的 T-2 衍生物, 即, 对 T-2 具有高度的选择性但与 DON 或 NIV 衍生物没有反应性, 而 IVI-10092 仅仅对 T-2 有选择性。

KTM-240 表现出明显不同于 Dietrich 的抗体(天然毒素, 3:288, 1995)的反应性。例如, 5B2 与二乙酰-DON 的反应性是与三乙酰-DON 的反应性约 6 倍, 它与三乙酰-DON 的反应性小于与 3-乙酰-DON 的反应性的, 而 KTM-240 与二乙酰-DON 的反应性是其与 15-乙酰-DON 的反应性的约 50 倍, 它与三乙酰-DON 的反应性是与 15-乙酰-DON 的反应性的约两倍。此外, KTM-240 与乙酰化的 NIV 具有强烈的反应性, 而 5B2 与这样的化合物不能反应, 因此不能用于 DON 和 NIV 的同时检测。

日本出版的审查过的专利申请 43358/93 中描述的抗-T-2 毒素单克隆抗体表现出与 HT-2 的交互反应性为 3%。另一方面, KTM-249 表现出与所有的 HT-2, T-2, 和乙酰 T-2 相同水平的反应性, 因此适合于测定总的 T-2

相关的毒素，KTM-249是本发明的一个对象。

Chiba 等的抗体(食品添加剂污染 5: 629 , (1988))与 HT-2 的反应性不到与 T-2 反应性的 0.5%，而本发明的 KTM-249 也与 HT-2 强烈地进行反应。

Casale 等的抗体 DON-1(农业食品化学杂志 36:663(1988))和本发明的 KTM-240 在反应性方面有明显的不同。DON-1 强烈地与 3-乙酰-DON 起反应，与 DON 有很好的反应性，与 NIV 具较弱的反应性，但不与 15-乙酰-DON 起反应。KTM-240 不与 DON 或 NIV 起反应，但与二乙酰-DON 和三乙酰-DON 强烈反应。KTM-240 也与 15-乙酰-DON 起反应，且它与 15-乙酰-DON 的反应性比它与 3-乙酰-DON 的反应性更强。

## 本发明的内容

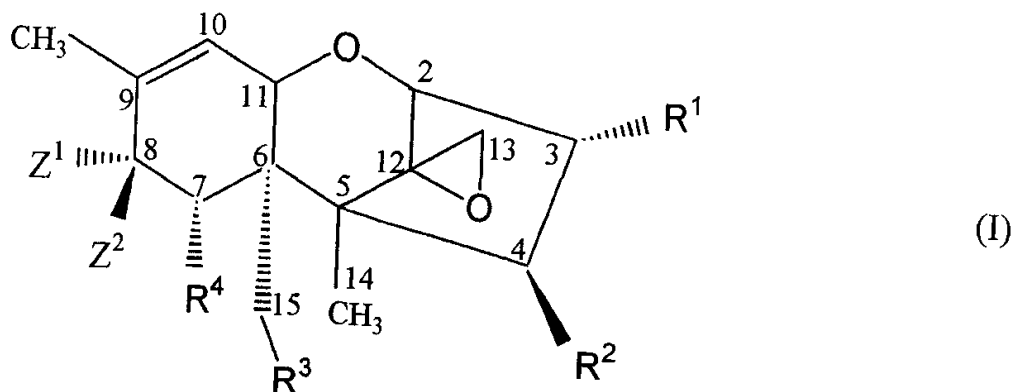
在单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定中使用的抗体要求能够共同地测定单端孢菌毒素真菌毒素及其许多衍生物，要求具有足够的特异性用于单独地测定 3 种主要的类型(即，DON 类型，NIV 类型和 T-2 类型)，也要求有高的亲和性，能够测定低浓度的抗原。而且，考虑到产率和重复性以及为本发明的目的所要求的恒定的特异性，本发明的抗体优选地是单克隆抗体或其片段。

抗体片段包括 Fab, Fab' 和 F(ab)<sub>2</sub>。

通过把杂交瘤产生的抗体用胰蛋白酶或其类似物经酶处理，或经还原可获得本发明的抗体片段。通过从杂交瘤提取 mRNA，把从 mRNA 制备的 cDNA 插入到原核或真核表达载体中，把载体导入原核或真核细胞中，然后在其中表达所需的产物也可获得抗体片段。

单端孢菌毒素真菌毒素低分子量物质，它们是所谓的半抗原，只具有较低的免疫原性。因此，为了产生单端孢菌毒素真菌毒素的抗体，有必要把真菌毒素改变成为生物可识别的一种抗原形式，例如，在免疫接种之前，通过把它结合到载体物质上。本发明发明人注意到这样的事实：在制备载体物质和单端孢菌毒素真菌毒素的缀合物中，结合位点的差异影响产生的抗体的亲和性和特异性。因为单端孢菌毒素真菌毒素很少可

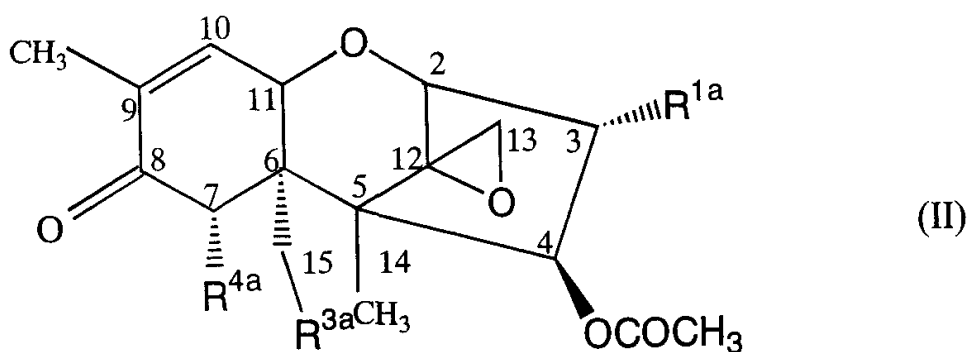
溶于水，其溶液一般用有机溶剂制备。本发明发明人已发现，通过将以式(I)所代表的单端孢菌毒素真菌毒素



(其中  $R^1$  代表 OH 或酰氧基;  $R^2$ ,  $R^3$  和  $R^4$  可以相同或者不同, 每个代表 H, 羟基或酰氧基; 以及  $Z^1$  代表  $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  和  $Z^2$  代表 H, 或  $Z^1$  和  $Z^2$  一起代表  $=\text{O}$ , [在下文以式(I)为代表的化合物称为化合物(I)]溶解在不含有有机溶剂的水溶液中, 通过在该化合物的 3-位使用取代基作为接头把化合物(I)结合在一种载体物质上, 以及使用获得的缀合物作为免疫原, 可以获得高亲和性的抗体。

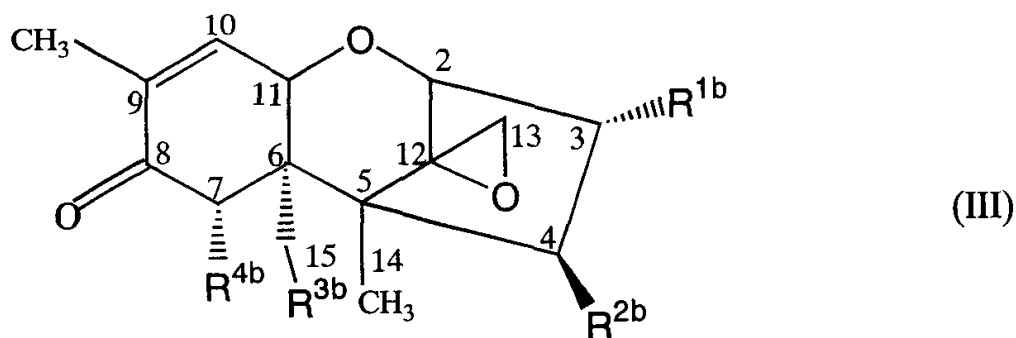
本发明发明人已发现: 通过利用乙酰化的单端孢菌毒素真菌毒素作为免疫原可以获得具有高特异性和亲和性的单克隆抗体。

而且, 本发明发明人还发现: 当把样品中的单端孢菌毒素真菌毒素转化成为以式(II)所代表的化合物后, 通过利用本发明的抗体可以测定 DON, NIV, 和 T-2 的总量, 或 DON, NIV, 和 T-2 中的 3 种主要的类型。

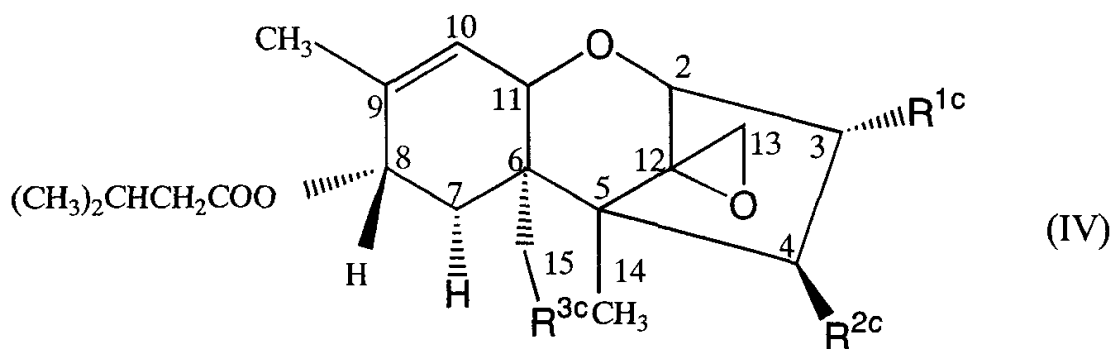


(其中  $R^{1a}$ ,  $R^{3a}$  和  $R^{4a}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基) [在下文

以式(II)所代表的化合物称为化合物(II)], 以式(III)所代表的化合物:



(其中  $R^{1B}$ ,  $R^{3B}$  和  $R^{4B}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基;  $R^{2B}$  代表 H, OH, 或酰氧基, 前提是  $R^{2B}$  是 H 或 OH, 至少  $R^{1B}$ ,  $R^{3B}$  和  $R^{4B}$  其中一种是酰氧基), [在下文以式(III)所代表的化合物称为化合物(III)], 以式(IV)所代表的化合物:



(其中  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基, 前提是  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  至少其中一种是酰氧基), 在这些发现的基础上完成了本发明。

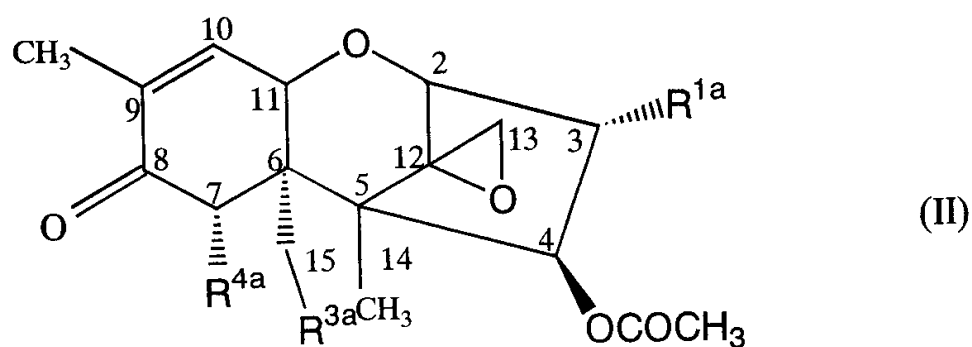
在上述式中的基团定义中, 酰氧基中的酰基是指一个取代的或非取代的低级酰基基团, 或是一个取代的或非取代的芳香酰基基团。低级酰基基团是指具有 1 至 12 个碳原子的直链或支链的烷酰基团, 如甲酰基, 乙酰基, 丙酰基, 丁酰基, 异丁酰基, 缬草酰基, 异缬草酰基, 新戊酰, 己酰基, 庚酰基, 辛酰基, 癸酰基和十二烷基。芳香酰基包括苯甲酰基, 萘甲酰基。在被取代的低级酰基基团中的取代基的例子是羟基和羧基。

在被取代的低级芳香酰基基团中的取代基的例子是低级烷基，羟基，低级烷氧基，卤素和羧基。低级烷基和低级烷氧基是指的低级烷基部分是指具有 1-6 个碳原子烷基直链或支链的低级酰基，如甲基，乙基，丙基，异丙基，丁基，异丁基，仲-丁基，叔丁基，戊基，己基。卤素是指氟，氯，溴或碘。

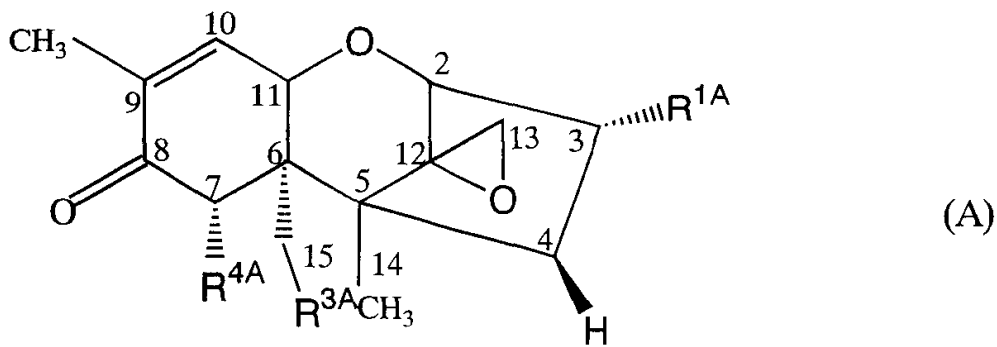
NIV 类型的真菌毒素包括瓜萎镰菌醇 (NIV)，4-乙酰瓜萎镰菌醇，3，4-二乙酰瓜萎镰菌醇，4，15-二乙酰瓜萎镰菌醇，3，4，15-三乙酰瓜萎镰菌醇，4，7，15-三乙酰瓜萎镰菌醇，和 3，4，7，15-四乙酰瓜萎镰菌醇；DON 类型的真菌毒素包括脱氧瓜萎镰菌醇 (DON)，3-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇，3-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇，15-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇，3，15-二乙酰脱氧瓜萎镰菌醇和 3，7，15-三乙酰脱氧瓜萎镰菌醇；T-2 类型的真菌毒素包括 HT-2，T-2 和乙酰 T-2。

本发明涉及下列 (1)-(40):

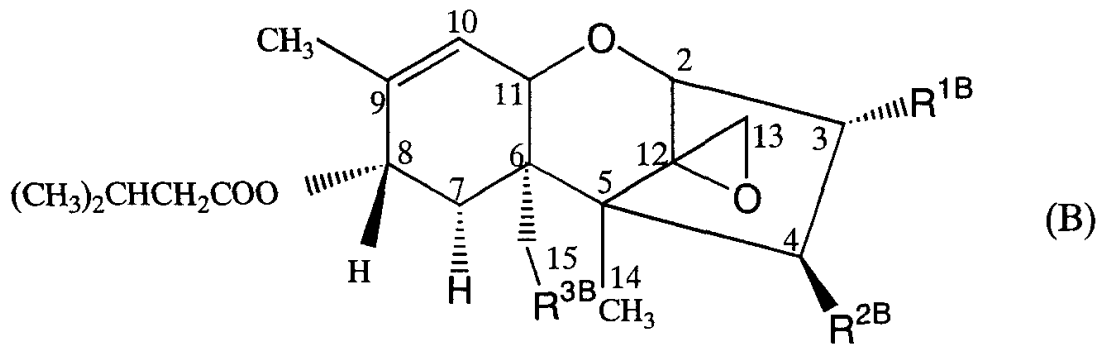
(1) 一种单克隆抗体或其片段，其对式 (II) 代表的化合物具有亲和性



(其中  $R^{1a}$ ,  $R^{3a}$  和  $R^{4a}$  可以相同或者不同，每个代表羟基或酰氧基)，并且其实质上不与以式 (A) 代表的化合物



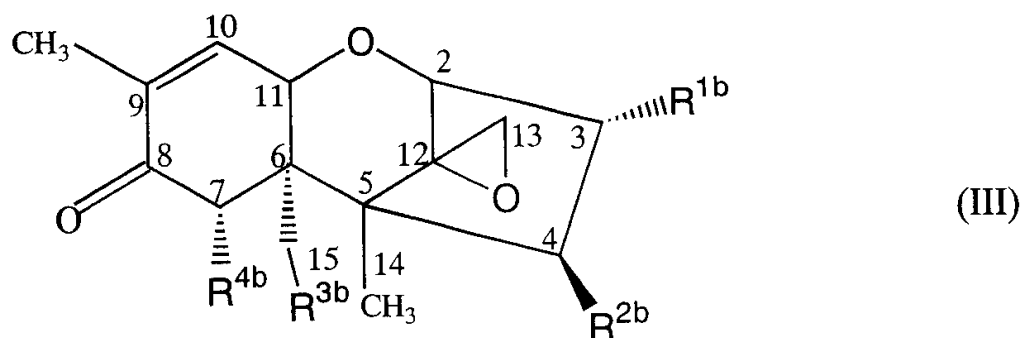
(其中  $R^{1A}$ ,  $R^{3A}$  和  $R^{4A}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基) 或式 (B) 代表的化合物进行反应:



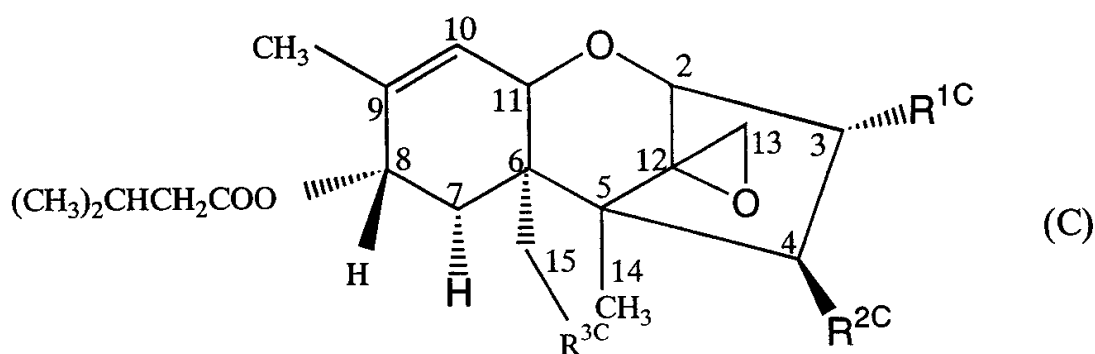
(其中  $R^{1B}$ ,  $R^{2B}$  和  $R^{3B}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基), 所说的亲和性(对式(II)代表的化合物)以下列顺序递减: 化合物 1-1>化合物 1-2>化合物 1-3, 其中化合物 1-1 是式(II)代表的化合物, 其中  $R^{1a}$  和  $R^{3a}$  是  $OCOCH_3$ ,  $R^{4a}$  是  $OH$ , 化合物 1-2 是式(II)代表的化合物, 其中  $R^{1a}$  和  $R^{4a}$  是  $OH$ ,  $R^{3a}$  是  $OCOCH_3$ , 以及化合物 1-3 是式(II)代表的化合物, 其中  $R^{1a}$ ,  $R^{3a}$  和  $R^{4a}$  是  $OCOCH_3$ 。

(2) 根据上述(1)的单克隆抗体或其片段, 其中所说的单克隆抗体是由杂交瘤 KTM-205 产生的单克隆抗体 KTM-205。

(3) 一种单克隆抗体或其片段, 其对以式(III)代表的化合物具有亲和性



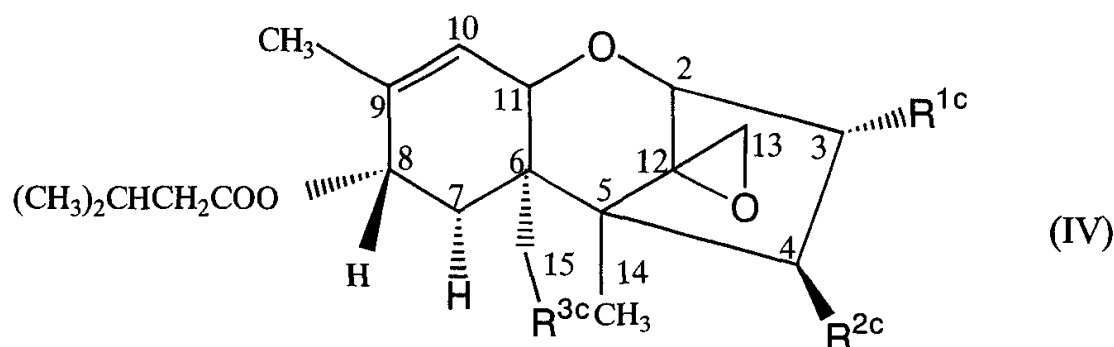
(其中  $R^{1b}$ ,  $R^{3b}$  和  $R^{4b}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基;  $R^{2b}$  代表 H, OH, 或酰氧基, 前提是  $R^{2b}$  是 H 或 OH, 至少  $R^{1b}$ ,  $R^{3b}$  和  $R^{4b}$  其中一种是酰氧基), 并且其实质上不与以式 (C) 代表的化合物进行反应:



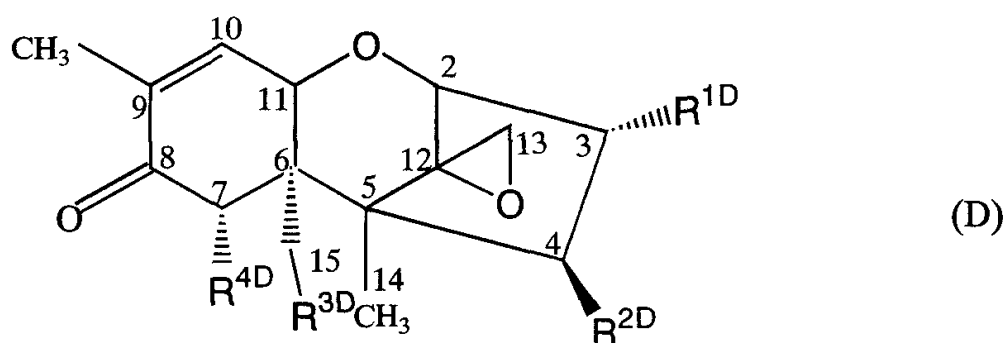
(其中  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基), 所说的亲和性(对以式 (III) 代表的化合物)以下列顺序递减: 化合物 2-1 > 化合物 2-2 > 化合物 2-3, 其中化合物 2-1 是以式 (III) 代表的化合物, 其中  $R^{1b}$  和  $R^{3b}$  是  $\text{OCOCH}_3$ ,  $R^{2b}$  是 H, 和  $R^{4b}$  是 OH, 化合物 2-2 是以式 (III) 代表的化合物, 其中  $R^{1b}$ ,  $R^{3b}$  和  $R^{4b}$  是  $\text{OCOCH}_3$ ,  $R^{2b}$  是 H, 以及化合物 2-3 是以式 (III) 代表的化合物, 其中  $R^{1b}$  和  $R^{4b}$  是 OH,  $R^{2b}$  和  $R^{3b}$  是  $\text{OCOCH}_3$ 。

(4) 根据上述 (3) 的单克隆抗体或其片段, 其中所说的单克隆抗体是由杂交瘤 KTM-240 产生的单克隆抗体 KTM-240。

(5) 一种单克隆抗体或其片段, 其对以式 (IV) 代表的化合物具有亲和性



(其中  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基; 前提是  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  至少其中一种是酰氧基), 并且其实质上不与以式 (D) 代表的化合物进行反应:



(其中  $R^{1D}$ ,  $R^{3D}$  和  $R^{4D}$  可以相同或者不同, 每个代表羟基或酰氧基, 以及  $R^{2D}$  是 H, OH 或酰氧基), 所说的亲和性(对以式 (IV) 代表的化合物)以下列顺序递减: 化合物 3-1 > 化合物 3-2, 其中化合物 3-1 是以式 (IV) 代表的化合物, 其中  $R^{1c}$  是 OH,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  是  $\text{OCOCH}_3$ , 化合物 3-2 是以式 (IV) 代表的化合物, 其中  $R^{1c}$ ,  $R^{2c}$  和  $R^{3c}$  是  $\text{OCOCH}_3$ 。

(6) 根据上述 (5) 的单克隆抗体或其片段, 其中单克隆抗体是由杂交瘤 KTM-249 产生的单克隆抗体 KTM-249。

(7) 一种能够产生根据上述 (1) 或 (2) 的单克隆抗体的杂交瘤。

(8) 一种能够产生根据上述 (3) 或 (4) 的单克隆抗体的杂交瘤。

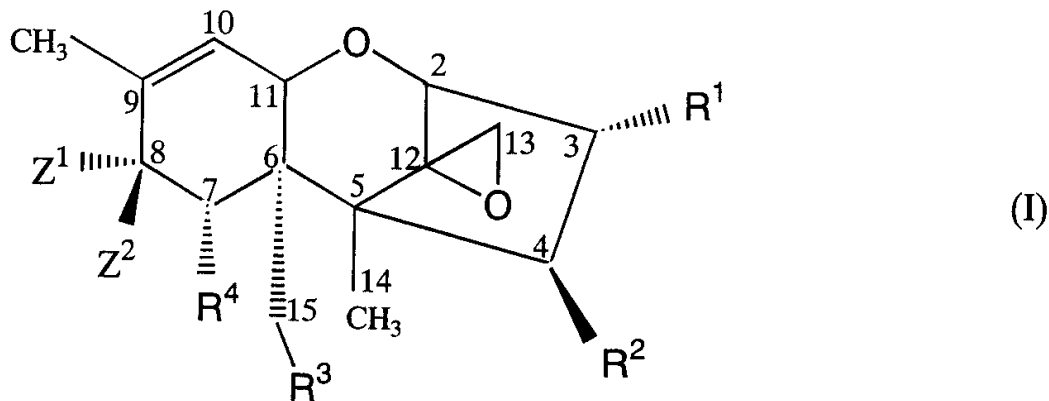
(9) 一种能够产生根据上述 (5) 或 (6) 的单克隆抗体的杂交瘤。

(10) 根据上述 (7) 的杂交瘤, 以保藏号 FERM BP-6835 保藏于国立生物科学和人类技术研究所工业科学和技术机构。

(11) 根据上述(8)的杂交瘤, 以保藏号 FERM BP-6836 保藏于国立生物科学和人类技术研究所工业科学和技术机构。

(12) 根据上述(9)的杂交瘤, 以保藏号 FERM BP-6837 保藏于国立生物科学和人类技术研究所工业科学和技术机构。

(13) 一种用于产生杂交瘤的方法, 该杂交瘤产生根据上述 1-6 任一的单克隆抗体, 该方法包括通过给动物施用一种从以式(I)代表的化合物



(其中  $R^1$  代表 H 或酰氧基;  $R^2$ ,  $R^3$  和  $R^4$  可以相同或者不同, 每个代表 H, 羟基或酰氧基; 以及  $Z^1$  代表  $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 和  $Z^2$  代表 H, 或  $Z^1$  和  $Z^2$  一起代表  $=\text{O}$ , 假如  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , 和  $R^4$  中的至少其中一种是 OH) 通过把其中的至少一个羟基基团转变为酰氧基, 并通过把一种载体物质结合到其 3-位碳原子上制备的物质免疫动物, 并通过把一种永久生长细胞与一种从免疫动物中获得的产生抗体的细胞相融合, 以获得杂交瘤。

(14) 根据上述 13 的方法, 其中式(I)中的  $R^2$  是酰氧基。

(15) 根据上述 13 的方法, 其中, 通过把至少其中一个羟基基团转变为酰氧基, 通过在 3-位使用一个取代基作为接头, 把载体物质结合到从一种以式(I)代表的化合物制备的化合物的 3-位碳原子上。

(16) 根据上述 13 的方法, 其中, 将从以式(I)代表的化合物通过把至少其中一个羟基基团转变为以 OR 所代表的基团(其中 R 代表一个取代的或未取代的低级酰基或取代的或未取代的芳香酰基)制备的化合物溶解于溶剂(该溶剂不是有机溶剂或不包含有机溶剂)中, 然后结合到载体物质上。

(17) 根据上述 16 的方法，其中不是有机溶剂或不包含有机溶剂的该溶剂是水。

(18) 用于测定样品中单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定方法，包括使至少一种根据上述 (1)-(6) 的单克隆抗体和其片段作用于包含单端孢菌毒素真菌毒素的样品。

(19) 用于测定样品中单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定方法，包括把化合物(具有至少一个羟基基团的、以式(I)所代表的)中的至少一个羟基基团转变成以 OR 所代表的基团(其中 R 代表一个取代的或未取代的低级酰基或一个取代的或未取代的芳香酰基)，并且使至少一种根据上述 (1)-(6) 的单克隆抗体和其片段作用于包含单端孢菌毒素真菌毒素的样品。

(20) 根据上述 (18) 或 (19) 的免疫测定方法，其中单端孢菌毒素真菌毒素选自下组：脱氧瓜萎镰菌醇(DON)，瓜萎镰菌醇(NIV)，T-2 毒素(T-2) 及其衍生物。

(21) 一种测定样品中 DON, NIV, T-2 及其衍生物的总量的方法，该方法包括使用根据上述 (3) 或 (4) 的单克隆抗体或者片段、从根据上述 (18) 或 (19) 的免疫测定方法获得的值或使用根据上述 (5) 或 (6) 的单克隆抗体或者片段、从根据上述 (18) 或 (19) 的免疫测定方法获得的值计算总量。

(22) 一种测定样品中 NIV 及其衍生物的方法，该方法包括使用根据上述 (1) 或 (2) 的单克隆抗体或者片段、根据上述 (18) 或 (19) 实施免疫测定。

(23) 一种测定样品中 DON, NIV 及其衍生物的方法，该方法包括使用根据上述 (3) 或 (4) 的单克隆抗体或者片段、根据上述 (18) 或 (19) 实施免疫测定。

(24) 一种测定样品中 DON 及其衍生物的方法，该方法包括使用根据上述 (3) 或 (4) 的单克隆抗体或者片段、从根据上述 (18) 或 (19) 的免疫测定获得的值或使用根据上述 (1) 或 (2) 的单克隆抗体或者片段、从根据上述 (18) 或 (19) 的免疫测定获得的值计算 DON 及其衍生物的量。

(25) 一种测定样品中 T-2 及其衍生物的方法，该方法包括使用根据上述 (5) 或 (6) 的单克隆抗体或者片段、根据上述 (18) 或 (19) 实施免疫测定。

(26) 根据上述 (18) 或 (19) 的免疫测定方法，其中免疫测定方法选自下组：放射免疫测定，酶免疫测定，荧光免疫测定和发光免疫测定。

(27) 根据上述 (18) 或 (19) 的免疫测定方法，其中免疫测定方法选自下组：竞争免疫测定和夹心免疫测定。

(28) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂，包含至少一种根据上述 (1) 至 (6) 的单克隆抗体及其片段作为活性成分。

(29) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据上述 (28) 的试剂和一个固定抗原的固相平板。

(30) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据上述 (28) 的试剂和一个固定抗原的固相平板，一种与根据上述 (1) 至 (6) 任一的单克隆抗体及其片段起反应的标记的抗体或抗体片段，以及一种用于检测所说抗体或抗体片段标记的试剂。

(31) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据上述 (28) 的试剂和一个固定抗原的固相平板，一种被标记的根据上述 (1) 至 (6) 任一的单克隆抗体及其片段，以及一种用于检测所说抗体或抗体片段标记的试剂。

(32) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据上述 (28) 的试剂和一种预处理样品(使以式 (I) 代表的化合物中的羟基转变成为以 OR(其中 R 具有如上述限定的相同的含义)代表的基团)的溶液。

(33) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据上述 (28) 的试剂，一个固定抗原的固相平板，和一种预处理样品(使以式 (I) 代表的化合物中的一个羟基转变成为以 OR(其中 R 具有如上述限定的相同的含义)代表的基团)的溶液。

(34) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含根据上述 (28) 的试剂，一个固定抗原的固相平板，一种与根据上述 (1)

至(6)中的任何单克隆抗体及其片段起反应的标记的抗体或抗体片段，一种用于检测所说抗体或抗体片段标记的试剂，以及一种预处理样品(使以式(I)代表的化合物中的羟基转变成为以OR(其中R具有如上述限定的相同的含义)代表的基团)的溶液。

(35) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定的试剂盒，包含一个固定抗原的固相平板，一种根据上述(1)至(6)中被标记的任何单克隆抗体及其片段，一种用于检测所说抗体或抗体片段标记的试剂，以及一种预处理样品(使以式(I)代表的化合物中的一个羟基转变成为以OR(其中R具有如上述限定的相同的含义)代表的基团)的溶液。

(36) 一种用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的方法，该方法包括用包含有机溶剂的溶液处理包含单端孢菌毒素真菌毒素的样品，以从样品中提取单端孢菌毒素真菌毒素，以及通过根据上述(18)或(19)的免疫测定方法测定提取的单端孢菌毒素真菌毒素。

(37) 根据上述(36)的方法，其中有机溶剂是一种水溶性的有机溶剂。

(38) 根据上述(36)或(37)的方法，其中水溶性的有机溶剂至少是选自下组的一个成员：甲醇，乙醇，丙醇，乙腈，二甲基亚砜，二甲基甲酰胺。

(39) 一种通过免疫测定检测样品中产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的方法，该方法包括向培养基中接种包含产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的样品，在培养基中培养该微生物，以及使根据上述(1)至(6)的至少一种单克隆抗体及其片段作用于培养过程中产生的单端孢菌毒素真菌毒素。

(40) 一种通过免疫测定鉴定样品中产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的方法，该方法包括向培养基中接种包含产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的样品，在培养基中培养该微生物，以及使根据上述(1)至(6)的至少一种单克隆抗体及其片段作用于培养过程中产生的单端孢菌毒素真菌毒素。

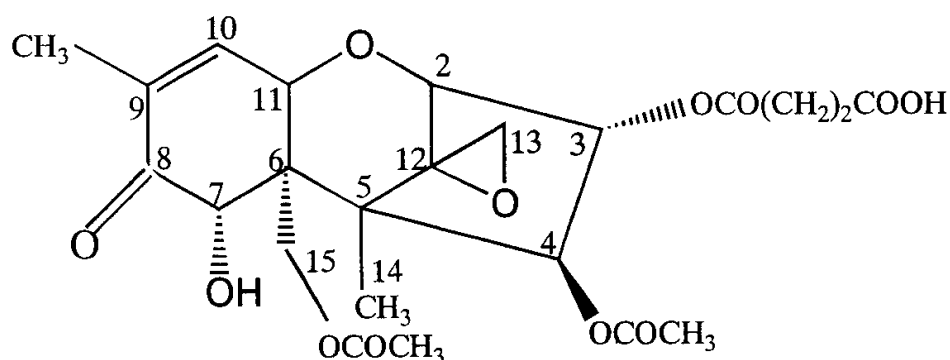
## 1、产生单端孢菌毒素真菌毒素的单克隆抗体的方法

产生本发明的单端孢菌毒素真菌毒素的单克隆抗体的方法描述如下。

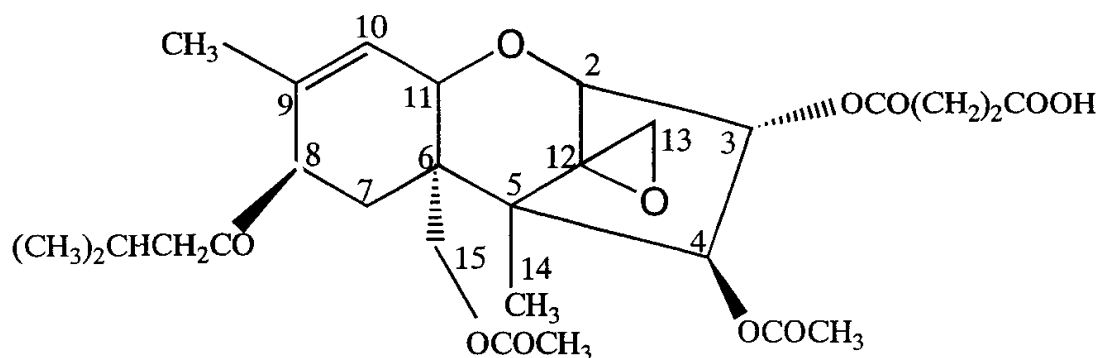
单克隆抗体可由下列方法制备，该方法包括把一种产生抗体的细胞(从通过施用免疫原免疫的动物中获得)与永久生长细胞如骨髓瘤细胞相融合，培养杂交瘤或把杂交瘤施用给动物以便造成腹水肿瘤，和从产生的培养物或腹水中分离和纯化单克隆抗体。

为了获得本发明的单端孢菌毒素真菌毒素的单克隆抗体，有必要使用供免疫接种的一种抗原的缀合物作为免疫原以及高分子量的载体(也称载体物质)。用于免疫接种的抗原可通过从样品中纯化或通过化学合成获得。在此过程中，使用乙酰化的单端孢菌毒素真菌毒素。通过使用缀合物(在真菌毒素的 3-位利用取代基作为接头，通过把高分子量载体结合到乙酰化的单端孢菌毒素真菌毒素上制备的)作为免疫原能有效获得根据本发明的所需的单克隆抗体。

作为用于免疫的抗原，使用通过把以式(I)所代表的化合物中的一个羟基转变为以 OR 所代表的基团(其中 R 具有如上述定义的相同的含义)制备的化合物。优选地，使用以式(b-1)所代表的化合物：



和以式(b-2)所代表的化合物：



通过把禾谷镰孢、黄色镰孢、拟枝孢镰孢等的菌株接种到合适的培养基中，并在大致为室温下培养约 20 天，再通过合适的方法纯化来制备样品。合适的培养基包括市售的培养基如马铃薯-葡萄糖培养基，以及例如通过把磨光的大米与蒸馏水弄湿，然后在灭菌锅中灭菌配置的培养基。通过用丙酮腈/水 (3:1 v/v) 提取获得的培养物并把提取物通过一个用几层 Florisil 和无水硫酸钠包装或几层硅胶和无水硫酸钠填装的柱子，或借助于再结晶的方式进行纯化。样品也可通过从污染霉菌的谷物中提纯获得。通过任何能够纯化所需物质的方法，例如，通过使用 TCL 板或通过 HPLC 进行纯化。市售的样品也是有用的。

作为高分子量的载体，可使用任何高分子量的物质，只要该物质具有与免疫接种的抗原中的羧基，氨基，或类似基团缩合的反应基团，并且能够赋予免疫接种的抗原以免疫原性或当与抗原结合时提高抗原的免疫原性。

合适的高分子量物质包括蛋白质如牛血清白蛋白 (BSA)，球蛋白，匙孔血蓝蛋白 (KLH)，甲状腺球蛋白，多糖如葡萄糖和琼脂糖，包含聚苯乙烯和丙烯酸胶的胶乳微粒，多核苷酸如多尿苷酸和多腺苷酸，以及合成的高分子量物质如 MAP (多抗原肽)。高分子量物质可通过各种方法结合到单端孢菌毒素真菌毒素上，如使用 Nobuo Sakato, Meneki Jikken Sosaho (免疫实验操作书册)，第 151 页 (Shunsuke Migita 等编, Nankodo, 1995) 所描述的方法 (碳二酰亚胺法，戊二醛法以及二异氰酸盐法)，使用羧基的方法 (活性酯法，酸酐混合物法以及酰叠氮法)，使用巯基的方法

(MBS 法和 SPDP 法)以及使用羟基的方法(溴化氰法和过碘酸氧化法)。在这些方法中,重要的是在含水的培养基中,而不是在有机溶剂中或包含有机溶剂的溶液中溶解单端孢菌毒素真菌毒素,以便使其在动物中产生充分的免疫原性。

免疫原施用到动物如小鼠,大鼠,仓鼠,野兔,豚鼠,山羊,绵羊,马或家禽,优选施用到小鼠,大鼠或仓鼠体内。

根据在 Saido 和 Toyoshima, Shin Seikagaku Jikken Koza(生化实验新讲义, 1: 389(1990), Tokyo Kagaku Dojin 等)中所描述的方法可以实行免疫接种。例如,免疫原用完全或者不完全的 Freund 氏佐剂乳化,产生的乳化液通过腹腔,皮下或肌肉注射到动物体内。施用 1.0 至 300  $\mu\text{g}$  的免疫原 2 次或多次,优选地定期间隔 7 至 30 天施用 2 至 4 次,优选地 12-16 天完成免疫接种。

产生抗体的细胞可从免疫接种动物的脾,淋巴结,外周血液等等获得。产生抗体的细胞也可通过所谓的“体外免疫接种”获得,即,通过直接免疫接种负责产生抗体的细胞(从免疫接种动物的脾,淋巴结,外周血液等收集)[Arai 与 Ohta 等等, 实验医药, 6: 43(1988)]。

至于用于与产生抗体的细胞融合的骨髓瘤细胞没有特定的限制,但优选地是使用来源于与产生抗体的细胞相同的动物的细胞系。

优选地还使用具有特定的药物标记的骨髓瘤细胞,以便有效地选择合适地进行融合的细胞。例如,优选地抗-8-氮鸟嘌呤的骨髓瘤细胞,因为它们不能在含次黄嘌呤,氨基蝶呤和胸苷培养基(HAT 培养基)上生长,由这些骨髓瘤细胞与正常细胞融合产生的融合细胞能在 HAT 培养基中生长,因而从未融合的骨髓瘤细胞区别开来。特定的例子是 P3 x 63-Ag, P3 x -Ag8- U1 和 SP2/O-Ag14。这些骨髓瘤细胞从物理化学研究所的细胞库中可以获得。

通过应用 Kohler 和 Milstein 开发的方法[*Nature* 256:495 (1975)]及其快捷和各种各样的修正方法可以实行细胞融合。在一通常使用的方法中,产生抗体的细胞和骨髓瘤细胞以 10 至 3: 1 的比例相混合,并用 30 至 50%的聚乙二醇(平均分子量: 1500 至 6000)作为融合因子处理。也可

通过电穿孔实施融合[Ohkouchi 等, 实验医药, 6: 50(1988)]。

经细胞融合处理的细胞悬浮于选择培养基中并在有利于选择所需细胞的培养器皿中如 96 孔的培养皿培养, 选择性地使融合的细胞生长。

术语“选择性培养基”是指允许具有特定的药物标记或类似物的细胞选择性生长的培养基。例如, 通过使用 HAT 选择性培养基(补充有 10%FCS 和含有  $1 \times 10^{-4}$  mol/l 次黄嘌呤,  $4 \times 10^{-7}$  mol/l 氨基蝶呤和  $2 \times 10^{-5}$  mol/l 胸苷培养基)或类似的培养基, 在骨髓瘤细胞的 8-氮鸟嘌呤的抗性基础上有效地选择从产生抗体的细胞与 P3 x 63-Ag 骨髓瘤细胞相融合产生的融合细胞。

通过一种如酶免疫测定或放射免疫测定的方法, 在融合细胞的上清培养基中检测所需抗体的存在, 可从选择性生长的融合细胞中选择对目标物质产生抗体的细胞。从所选择的细胞中获得的单细胞克隆通过有限稀释的方法, 软琼脂培养法或类似的方法以获得产生单克隆抗体的杂交瘤。

杂交瘤在合适的培养基中培养, 或通过腹膜移植到动物上, 并使其在腹水中生长。从收集的培养物或腹水可以获得单克隆抗体。如果必要的话, 提纯之后可使用培养物或腹水中的抗体。可通过各种方法进行纯化, 例如, 单独地或结合用硫酸胺盐析分离, 使用离子交换层析, 凝胶过滤柱层析, 利用蛋白质 A 或蛋白质 C 的亲合柱层析, 利用固定抗原的凝胶柱层析。

通过以上描述的方法可获得抗-单端孢菌毒素真菌毒素的单克隆抗体。由此获得的单克隆抗体分别包括指定为 KTM-205, KTM-240 和 KTM-249 的单克隆抗体。

单克隆抗体 KTM-205 对以式(II)所代表的化合物具有亲和性, 实质上并不与以式(A)或(B)所代表的化合物起反应。其对化合物 1-1, 化合物 1-2, 化合物 1-3 的亲和性具有以下递减的顺序: 化合物 1-1 > 化合物 1-2 > 化合物 1-3。

单克隆抗体 KTM-240 对以式(III)所代表的化合物具有亲和性, 实质上并不与以式(C)所代表的化合物起反应。其对化合物 2-1, 化合物 2-2, 化合物 2-3 的亲和性具有以下递减的顺序: 化合物 2-1 > 化合物 2-2 > 化

合物 2-3。

单克隆抗体 KTM-249 对以式 (IV) 所代表的化合物具有亲和性，实质上并不与以式 (D) 所代表的化合物起反应。其对化合物 3-1，化合物 3-2 的亲和性具有以下递减的顺序：化合物 3-1 > 化合物 3-2 >。

## 2、测定单端孢菌毒素真菌毒素的方法

包含在样品中的单端孢菌毒素真菌毒素可通过任何一种能够测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定方法测定，但优选地是使用本发明的单克隆抗体或单克隆抗体片段测定。

包含真菌毒素的样品包括所有可能包含真菌毒素的物质，例如，农作物，通过加工农作物获得的产品，以及栽培农作物的环境因子。

农作物可以是任何农作物，例如，水稻，大麦，小麦，黑麦，燕麦，大豆，玉米和土豆。农作物包括生长在栽培田间如农场和市场的那些作物。

通过加工农作物所获得的产品包括所有通过加工农作物所获得的食物与饮料。

包含真菌毒素的样品也包括饲料，即，家畜的饲料，家禽如猪，牛的肉，奶，蛋，和家禽的饲料，以及通过加工如肉，奶，蛋所获得的产品。

农作物栽培的环境因子包括构成农作物环境的各种因子，例如无机因子如湿度和土壤，粘附在无机因子上生活的微生物，飘浮在空中的微生物孢子，以及有机残余物如植物的残桩或者残茬。

包含真菌毒素的大多数上述提到的样品是固体。因此，样品可以经过预处理从样品中收集真菌毒素，并且制成适合于一般免疫测定的液态样品，除非不必要提取真菌毒素。以下列方式实行预处理。

通过处理包含真菌毒素的样品可以收集真菌毒素，照这种方法或被破碎以后，用有机溶剂提取真菌毒素和收集提取物。

样品可用任何方法破碎，只要真菌毒素通过破碎处理不分解或不消失。合适的方法包括用研钵和研杵，通过超声波捣碎或通过碾磨机和杵锤，或用刀切碎。

样品照此或由上述方法处理之后，用有机溶剂处理，例如，通过直接把样品浸没在有机溶剂中。通过操作如搅拌和超声处理可以提高提取效率。

尽管可以使用任何有机溶剂，优选的有机溶剂是水溶性的，如甲醇，乙醇，丙醇，丙酮腈，二甲亚砜和二甲基甲酰胺。整个提取物中的有机溶剂的含量为 25%或更多，优选地为 50%或更多，更优选地为 75%或更多。

通过蒸发溶剂或把提取物通过柱子可收集有机溶剂提取的单端孢菌毒素真菌毒素。

根据本发明的预处理过程可进一步包括把单端孢菌毒素真菌毒素的一部分转化成为它们的衍生物的步骤，例如，部分的酰化作用步骤，优选地部分的乙酰化作用。乙酰化作用的步骤描述如下。

通过把试验化合物溶解在一种合适的溶剂中，并加入乙酸酐和碱使其反应进行乙酰化作用。合适的溶剂包括含卤素有机溶剂如二氯甲烷和三氯甲烷，以及不与乙酸酐进行反应的一般溶剂如二乙基酯，DMF，DMSO 和二氯甲烷。

在反应中有用的碱包括有机碱如咪啉和三乙基胺，以及无机碱，如碳酸氢钠和碳酸钾盐。优选的为咪啉，既可作为碱，也可作为溶剂。

在部分的乙酰化作用中为了只使所需的部分乙酰化，有必要控制乙酸酐的浓度，反应温度和反应时间。优选的是样品在乙酰化作用之前充分干燥，反应温度不应太高，且在反应期间保持恒定，反应时间保持恒定。

此外，有必要使反应在合适的时间终止，以避免过度进行反应。

乙酸酐的浓度是干燥样品重量的 0.1 至 10000 倍，优选地为 0.5 至 10 倍，并且根据增加的有机溶剂的量必须加以调整。

在使用的溶剂的冰点和沸点之间的任何温度可进行反应，但优选地在 30℃ 至 50℃ 进行，更优选地在 45℃ 进行。只要能达到目的，这些乙酰化作用条件不需要特别地加以限制。典型地，当使用 20mg 的干燥样品时，用 50  $\mu$ l 的咪啉和 25  $\mu$ l 的乙酸酐在 45℃ 下进行反应约 45 分钟。

反应开始之后可立即终止反应，或进行一周的时间，但从实际的观点

看，优选地在一小时之内终止反应。

通过去除碱基和乙酸酐或加入碱可以终止反应。碱基和乙酸酐可通过蒸发去除。作为碱，优选地使用碳酸氢钠的水溶液。

只要能达到目的，以上这些乙酰化作用条件不需要特别地加以限制。

在上述提到的包含单端孢菌毒素真菌毒素的样品中，那些有可能包含产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物，例如，无需用有机溶剂抽提步骤和部分乙酰化作用步骤中的一个或两个步骤即可分析栽培作物的环境因子。即，当这些样品直接地接种到培养基使微生物生长之后，通过免疫测定可测定培养基中产生的式(II)，(III)，(IV)的化合物。也可把这些样品接种到选择性培养基上如 Komada 培养基(1g 的  $K_2HPO_4$ ，0.5g 的 KCl，0.5g 的  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.01g 的 Fe-EDTA，2g 的 L-天冬酰胺，20g 的 D-半乳糖，1g 的五氯硝基苯 75%水合物，0.5g 的胆酸钠，1g 的  $NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$ ，0.3 的硫酸链霉素，15g 的琼脂和 1000ml 的蒸馏水，pH 3.8-4.0)，把在选择性培养基上生长的微生物接种到培养基中，然后通过免疫测定可测定培养基中产生的式(II)，(III)，(IV)的化合物。

此外，通过把含有 Komada 培养基的培养皿放置在高于地面约 90 cm 之上，并敞开在空气中一定的时间，可以捕获飘浮在空中的微生物的孢子。把捕获孢子的培养皿在室温(20℃-25℃)下培养约一周，出现的菌落可用作样品。

只要微生物能在其中生长，可以使用任何培养基。优选的是通过把精白米与一定量的蒸馏水置于一个能灭菌一段时间使其湿润的器皿中制备的培养基，然后在灭菌锅中灭菌。蒸馏水的量优选地为精白米的 1 至 10 倍。稻米与水优选地在灭菌锅中灭菌 15 分钟至半天。

本发明的免疫测定可以通过任何已知的免疫测定方法实施。

合适的方法包括各种敏感的免疫测定如利用放射性同位素标记的免疫测定，利用酶的酶免疫测定，利用荧光物质的荧光免疫测定，和利用发光物质的发光免疫测定。

在免疫测定中，抗体或者抗原的量利用上述描述的标记的抗原或抗体测定。在本发明中，任何检测或测定抗原的方法可以用于免疫测定，但

竞争性免疫测定和夹心免疫测定最合适的。

此外，上述方法的各种的修饰是已知的。例如，竞争性免疫测定的修饰包括(1)一种使用标记的抗原和样品中的抗原或用于与抗体或抗体片段结合的标准物质之间的竞争的方法，(2)一种使用液相样品中的抗原或标准物质与标记的抗体或抗体片段结合的固定的抗原之间的竞争的方法，(3)一种使用标记的抗原和样品中的抗原或用于与固定的抗体或抗体片段结合的标准物质之间的竞争的方法。

夹心免疫测定一般地包括使固定在固相支持物的一级抗体(即，固定在合适的固相支持物如珠子，试管或平板)与标准物质或样品中的抗原起反应，使结合在固定抗体(或抗体片段)上的抗原与二级抗体(或抗体片段)起反应，以及通过某些适当的方法检测所形成的固定抗体-抗原-二级抗体(或抗体片段)的三分体复合物。一般地，通过用各种标记的用于检测的物质标记二级抗体(或抗体片段)，例如，放射性同位素，酶，荧光物质，发光物质和金属。这些测定主要用于测定溶液中的抗原，但在单端孢菌毒素真菌毒素(存在于组织和细胞，以及用于检测的滤膜上如硝酸纤维素滤膜或尼龙膜)的定性或定量的分析中也有用。

本发明提供用于测定单端孢菌毒素真菌毒素的免疫测定试剂或试剂盒。试剂盒由仪器和/或试剂的组合物组成，在组成或形式上可能有变化，至于其包含的物质实质上与以下描述的构成成分或其部分相同。

根据本发明的免疫测定的试剂包含本发明的单克隆抗体或其作为活性成分的片段。根据本发明的用于样品分析(需要酰化步骤)的试剂盒包括把以式(I)所代表的化合物转变成以式 OR(其中 R 具有如以上所定义的相同的含义)所代表的化合物的预处理样品的溶液和本发明的单克隆抗体或其片段。

根据本发明的免疫测定的上述试剂盒还可包含(当需要时)样品的稀释剂，测定的平板，标记的二级抗-鼠抗体，用于检测标记物质的试剂，标准物质等等。

样品合适的稀释剂包括包含表面活性剂的溶液，缓冲液和蛋白质如 BSA 或者酪蛋白。作为测定的平板，可以使用一种抗原-固定的 96-孔的

聚苯乙烯微量滴定板或相似物。合适的标记的二级抗-鼠抗体包括对本发明的抗-单端孢菌毒素真菌毒素的单克隆抗体或抗体片段具有亲和性的抗体，例如，兔抗-鼠免疫球蛋白抗体，该抗体用标记的酶如辣根过氧化物酶(HRP)，牛小肠碱性磷酸酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶，并且与缓冲液，蛋白质如BSA或者酪蛋白，防腐剂等相混合。用于检测标记物质的试剂可包含按照上述提到的标记酶的各种成分；例如，当使用辣根过氧化物酶时，试剂主要包含四甲基联苯胺，邻苯二胺，等等。在根据本发明的试剂中，也可使用直接用辣根过氧化物酶标记的本发明的抗-单端孢菌毒素真菌毒素的单克隆抗体或抗体片段。此外，根据本发明的免疫测定试剂盒不必包含所有上述提到的组分，并且可以包括附加的组分。

### 3、用于鉴定产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的方法

包含产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的样品包括栽培农作物的环境因子，例如，湿度，土壤，空气，飘浮在空中的孢子，以及有机残余物如植物残桩或残茬。

产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物在栽培田间的残余植物上形成子囊壳，例如，如水稻残茬的有机残余植物上。当满足如降水和高湿度的环境条件时，微生物的子囊孢子在空中散落以侵染开花或成熟期的作物。

因此，非常重要的是了解被产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物污染栽培田间的状况以及它们产生真菌毒素的能力，以便预见真菌毒素损害的发生和采取对策。

产生单端孢菌毒素真菌毒素的菌株，当在培养基中培养时，特异性地在培养基中产生包括以式(II)，(III)和(IV)所代表的化合物的单端孢菌毒素真菌毒素。产生的单端孢菌毒素真菌毒素的种类和数量随着产生单端孢菌毒素真菌毒素的菌株而变化。

因此，通过根据在上述2中描述的免疫测定，检测在样品培养基中的上述化合物的存在可确认在样品中产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物。此外，根据在上述2中描述的免疫测定，通过定性和定量地分析菌

株产生的单端孢菌毒素真菌毒素可鉴定菌株。

根据在上述 2 中描述的免疫测定，通过鉴定存在于田间的产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物，还可能了解栽培田间的环境污染状况。

上述样品直接接种到培养基中使微生物生长，测定培养基中以式 (II)，(III) 和 (IV) 所代表的化合物以检测由产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的污染。也可以把样品接种到在选择性培养基如 Komada 培养基上 (1g 的  $K_2HPO_4$ ，0.5g 的 KCl，0.5g 的  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.01g 的 Fe-EDTA，2g 的 L-天冬酰胺，20g 的 D-半乳糖，1g 的五氯硝基苯 75% 水合物，0.5g 的胆酸钠，1g 的  $NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$ ，0.3 的硫酸链霉素，15g 的琼脂和 1000ml 的蒸馏水，pH 3.8-4.0)。接种通过在选择性培养基上生长的微生物至培养基中，然后测定在培养基中产生的 (II)，(III) 和 (IV) 的化合物以检测微生物的污染。此外，通过把含有 Komada 培养基的培养皿放置在高于地面约 90cm 之上，并敞开在空气中一定的时间，可以捕获飘浮在空中的微生物的孢子。把捕获孢子的培养皿在室温 (20℃-25℃) 下培养约一周，可以有利地使用出现的菌落。

作为培养基，可以使用各种培养基。优选的是通过把精白米与一定量的蒸馏水置于一个能灭菌一段时间使其湿润的器皿中制备的培养基，然后在灭菌锅中灭菌。

#### 附图简要描述

附图 1 表示利用 KTM-205 测定单端孢菌毒素真菌毒素的校准曲线。

附图 2 表示利用 KTM-240 测定单端孢菌毒素真菌毒素的校准曲线。

附图 3 表示利用 KTM-249 测定单端孢菌毒素真菌毒素的校准曲线。

附图 4 表示利用 KTM-240 和 KTM-249 测定单端孢菌毒素真菌毒素的校准曲线。

附图 5 表示由 ELISA 测定的样品中的根据本发明的单端孢菌毒素真菌毒素的量与由 GC-MS 所测定的相同的样品中的单端孢菌毒素真菌毒素的量的相关性。

附图 6 表示用 KTM-240 在禾谷镰孢培养物 (通过在稻米培养基中培养所获得的) 中的单端孢菌毒素真菌毒素的测定结果。

附图 7 表示从不同的栽培田间的水稻主茎上分离的菌株的培养物中的单端孢菌毒素真菌毒素的测定结果。

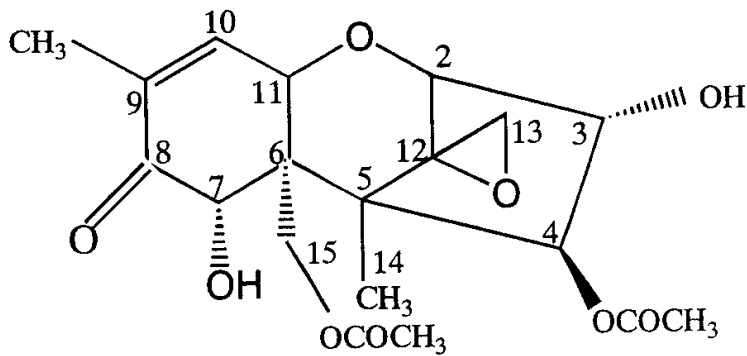
### 实施本发明的最佳方式

本发明通过参考实施例描述如下。

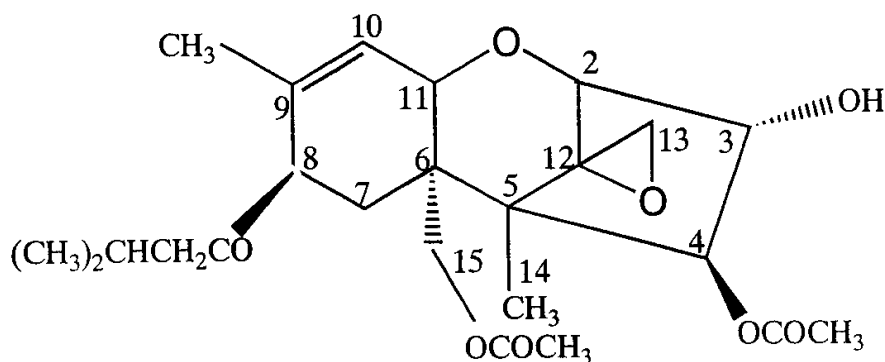
#### 实施例 1(单克隆抗体的产生)

##### a) 化合物

N7769(Sigma 化学公司)被用作式(a-1)的化合物:



以及 T4887 式(Sigma 化学公司)被用作式(a-2)的化合物:



##### b) 用于免疫接种的抗原的制备:

式(a-1)的化合物(4, 15-二乙酰瓜萎镰菌醇)和式(a-2)的化合物(T-2)(各 50 毫克)分别置于带有螺盖的 7 毫升试管中。当 1 毫升的干嘧啶和 35 毫克的酸酐加入到每个试管后,混合物在金属水浴锅中(YH-121, Yamato

Kagaku)于 100℃下反应 3 小时。每个反应混合物浓缩至干以除去嘧啶，再加 4 毫升的氯仿和用 4 份 1 毫升的水洗涤。氯仿层在无水硫酸钠上脱水。产生的溶液进行硅胶薄层层析，气相层析和气相色谱-质谱 (GS-MS) 以确认各自溶液中式 (b-1) 化合物 (4, 15-二乙酰瓜萎镰菌醇 3-半琥珀酸) 和式 (b-2) 的化合物 (T-2 3-半琥珀酸) 的存在，然后在减压下浓缩至干。

获得的含有式 (b-1) 和式 (b-1) 的化合物 (各 0.5 克) 的浓缩物，在加入 0.01% Triton X-100 和探针类型的超声发生器的帮助下 (Model UR-200P, Tommy Seiko), 分别溶于 50  $\mu$  l 的 10 mM 的包含 140 mM 氯化钠 (下文简称为 PBS) 的磷酸缓冲液中。每种溶液用 0.5 ml 的无水匙孔血蓝蛋白 (下文简称为 KLH) (20 mg/ml)。当每种混合物调整至 pH 7.5 后，向其中加入 20 mg 的 EDC [1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺]，再在室温下反应 6 小时。当反应完成之后，在 PBS 中进行透析以获得作为透析液的单端孢菌毒素真菌毒素衍生物 [式 (b-1)]-KLH 和单端孢菌毒素真菌毒素衍生物 [式 (b-2)]-KLH 的水溶液。通过 Lowry 蛋白质分析试剂盒 (Bio-Rad) 用牛血清白蛋白 (下文简称为 BSA) 作为对照测定水溶液中的蛋白质浓度。用 BSA 代替 KLH 重复上述过程，依靠它获得单端孢菌毒素真菌毒素衍生物 [式 (b-1)]-BSA 缀合物和单端孢菌毒素真菌毒素衍生物 [式 (b-2)]-BSA 缀合物。

### c) 单克隆抗体的制备:

6 周龄的 Balb/c 雄鼠以 1:1 的完全 Freund 佐剂和单端孢菌毒素真菌毒素衍生物 [式 (b-1) 或式 (b-2)]-KLH 的混合物以每只动物 0.1 mg 的量在背部皮下注射。以 3 周的间隔在鼠的背部进一步把上述 1:1 的混合物 (0.1 mg/每只动物) 皮下注射 2 次。3 周之后，溶解于 PBS 的单端孢菌毒素真菌毒素衍生物 [式 (b-1) 或式 (b-2)]-KLH (0.1 mg/每只动物) 通过尾部静脉施药到该老鼠中，3 天之后，以下列方式从脾获得产生抗体的细胞。

从免疫接种的动物中无菌地切下脾，在无血清的 RPMI-1640 培养基 (Nissui Pharmaceutical 有限公司) 中解开，并通过 100-筛孔的网释放脾细胞。脾细胞悬浮于低渗溶液中以溶解其中的红细胞，并用无血清的 RPMI-1640 培养基用离心方式洗涤 3 次以获得产生抗体的细胞。

另一方面，P3X-Ag8-U1 骨髓瘤细胞在包含 10% 的小牛胎儿血清 (FCS)

的RPMI-1640培养基中培养。在对数生长期时收集细胞并用无血清的RPMI-1640培养基用离心方式洗涤3次。

获得的产生抗体的细胞悬浮液和P3X-Ag8-U1骨髓瘤细胞以10:1的比例相混合，并在1200rpm离心5分钟，以除去培养液。向获得的细胞中慢慢加入1ml的50%的聚乙二醇1500(Boehringer Mannheim GmbH)溶液，然后逐渐加入50ml的无血清的RPMI-1640培养基，再在1200rpm下离心5分钟，以除去培养基。获得的细胞悬浮于HAT培养基中(补充有10% FCS和含有 $1 \times 10^{-4}$  M次黄嘌呤， $4 \times 10^{-7}$  M氨基蝶呤和 $2 \times 10^{-5}$  M胸苷的RPMI-1640培养基)，密度为 $1 \times 10^4$  细胞/ ml，把细胞悬浮液置于一个96-孔的微量滴定板中，每个孔200  $\mu$  l。细胞在37℃于5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养，培养10天之后，在所有的孔中观察到杂交瘤菌落。

以下列方式通过ELISA筛选培养上清的抗体滴度，为了选择包含产生所需抗体的细胞的孔。向96-孔的微量滴定板中的每个孔中加入50  $\mu$  l的单端孢菌毒素真菌毒素衍生物[式(b-1)或式(b-2)]-BSA的缀合物(20  $\mu$  g/ml, 0.1M碳酸缓冲液, pH 9.5)，让平板于4℃下过夜，然后用PBS洗涤3次。把250  $\mu$  l的1% BSA/PBS加入到每个孔之后，让平板在室温下放置1小时，然后用PBS洗涤3次以准备反应的平板。向该平板的每个孔中加入50  $\mu$  l的用含有0.1%BSA的PBS稀释11倍的培养上清液，让该平板在室温下放置3小时使之进行反应。反应完成之后，平板用含有0.05%吐温20的PBS洗涤5次。然后，向每个孔中加入50  $\mu$  l的过氧化物酶(POD)-标记的抗-鼠免疫球蛋白兔IgG (Dako)，紧接着在室温下反应1小时。平板用含有0.05%吐温20的PBS洗涤5次之后，向每个孔中加入50  $\mu$  l的TMB显色试剂(Intergen)，紧接着在室温下反应30分钟。最后，向每个孔中加入50  $\mu$  l的1mol/l的硫酸水溶液，用一个微量板计数器(MTP-120, Corona 电器有限公司)测定450nm的吸光值，选择吸光值为1或大于1的孔中的细胞。

通过有限稀释进行克隆。上述选自孔中的细胞悬浮于包含10%的FCS和 $1 \times 10^7$  细胞/ 毫升的胸腺细胞的RPMI-1640培养基中(细胞密度为0.5个细胞/毫升)，把细胞悬浮液以200  $\mu$  l的量置于一个96-孔的微量滴定板的每个孔中。细胞在37℃于5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。在开始培养后，观察10

至14天，以选择一些其中可观察到一个菌落生长的孔。通过上述的ELISA在选择的细胞中筛选培养上清的抗体滴度，以选择包含产生所需抗体的菌株的孔。用单克隆抗体分类试剂盒(Zymet实验室公司)测定由此获得菌株的培养上清中的抗体的免疫球蛋白类型。选择产生IgG1亚类抗体的菌株，不包括那些产生IgG3或IgM亚类的抗体。

8周龄或更长周龄的雄性老鼠用降植烷(2, 6, 10, 14-四甲基戊十碳烷)(0.5ml/每头动物)腹腔内注射，并保留2个星期。

然后向该鼠腹腔内注射产生单克隆抗体的细胞( $1 \times 10^6$  细胞/每头动物)。

7至14天之后，当每个鼠的腹腔内积累大量的腹水时，通过一个18G的注射器从腹腔中收集腹水，再通过3000 rpm下离心10分钟收集上清。获得的上清用结合缓冲液(3M NaCl, 1.5 M甘氨酸, pH 8.9)稀释3倍，并通过一个用结合缓冲液平衡的蛋白质A柱子。当柱子用PBS洗涤之后，用50mM甘氨酸/盐酸缓冲液(pH 2.5)洗脱抗体，洗脱液立即用1 M的磷酸缓冲液(pH 7.5)中和。由此收集的抗体溶液在PBS中充分透析，借此获得包含纯化的单克隆抗体。

#### 实施例2: 单克隆抗体特异性的检查

向96-孔的微量滴定板中的每个孔中加入实施例1中制备的 $50 \mu\text{l}$ 的单端孢菌毒素真菌毒素衍生物[式(b-1)或式(b-2)]-BSA的缀合物( $20 \mu\text{g/ml}$ , 0.1M碳酸缓冲液, pH 9.5)溶液，让平板于 $4^\circ\text{C}$ 下过夜，然后用PBS洗涤3次。把 $250 \mu\text{l}$ 的1%BSA/PBS加入到每个孔之后，让平板在室温下放置1小时，然后用PBS洗涤3次以准备反应的平板。向该平板的每个孔中加入 $50 \mu\text{l}$ 的含有0.1%BSA的0.1mol/l的磷酸缓冲液(pH 7.4)和各种浓度的各种单端孢菌毒素真菌毒素衍生物以及含有0.1% BSA(对照: 0%抑制)的0.1mol/l的磷酸缓冲液(pH 7.4)，另外，实施例1中获得的抗体用含有0.1% BSA的0.1mol/l的磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释至 $100\text{ng/ml}$ 的浓度，以每个孔中 $50 \mu\text{l}$ 的量搅拌加入至平板的每个孔中。使该平板在 $4^\circ\text{C}$ 下过夜使孔中的混合物反应。反应完成之后，平板用含有0.05%吐温20的PBS洗涤5次。然后，向每个孔中加入 $50 \mu\text{l}$  POD-标记的抗-鼠免疫球蛋白兔IgG，紧接

着在室温下反应1小时。平板用含有0.05%吐温20的PBS洗涤5次之后，向每个孔中加入50 μ l的TMB显色试剂(Intergen)，紧接着在室温下反应30分钟。最后，向每个孔中加入50 μ l的反应终止液，用一个微量板计数器测定450nm的吸光值。对反应中使用的单端孢菌毒素真菌毒素，制备其单端孢菌毒素真菌毒素浓度/吸光度曲线。从每种单端孢菌毒素真菌毒素衍生物相对于表示为100%的对照吸光度的反应抑制率，测定每种抗体与每种单端孢菌毒素真菌毒素的反应性。在所获得的结果的基础上，从实施例1确定的菌株中选择适合于本目的的产生单克隆抗体的菌株。所选择的菌株和由它们产生的单克隆抗体分别指定为KTM-205, KTM-240 和 KTM-249。根据下面各自的特征选择实施例1中的菌株：KTM-205，最低浓度的式(II)的化合物的抑制和式(A)或式(B)没有实质的抑制；KTM-240，最低浓度的式(III)的化合物的抑制和式(C)没有实质的抑制；以及KTM-249，最低浓度的式(IV)的化合物的抑制和式(D)没有实质的抑制。抗体的特异性表示于表1。

表1 抗体的反应性

|                      | KTM-205 | KTM-240 | KTM-249 |
|----------------------|---------|---------|---------|
| 瓜萎镰菌醇(NIV)           | —*      | —       | —       |
| 4-乙酰瓜萎镰菌醇            | <0.01   | —       | —       |
| 3, 4-二乙酰瓜萎镰菌醇        | 0.01    | <0.01   | —       |
| 4, 15-二乙酰瓜萎镰菌醇       | 0.02    | 0.02    | —       |
| 3, 4, 15-三乙酰瓜萎镰菌醇    | 1.00    | 1.00    | —       |
| 4, 7, 15-三乙酰瓜萎镰菌醇    | <0.01   | —       | —       |
| 3, 4, 7, 15-四乙酰瓜萎镰菌醇 | <0.01   | <0.01   | —       |
| 脱氧瓜萎镰菌醇(DON)         | —       | —       | —       |
| 3-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇          | —       | —       | —       |
| 15-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇         | —       | 0.02    | —       |
| 3, 15-二乙酰脱氧瓜萎镰菌醇     | —       | 1.00    | —       |
| 3, 7, 15-乙酰脱氧瓜萎镰菌醇   | —       | 0.04    | —       |
| HT-2                 | —       | —       | 1.00    |
| T-2                  | —       | —       | 1.00    |
| 乙酰 T-2               | —       | —       | 0.78    |

注)相对反应性(基于与表示为1的最大活性物质的反应性)。

## \*: 实质上未确认的反应性

产生这些抗体的杂交瘤以KTM-205 (FERM BP- 6835) KTM-240 (FERM BP-6836) 和KTM-249 (FERM BP-6837), 于1999年8月11日保藏于国立生物科学和人类-技术研究所工业科学和技术机构, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, 日本。

### 实施例3: 样品中单端孢菌毒素真菌毒素的测定

#### a) 用于反应的平板

向96-孔的微量滴定板的每个孔中加入实施例1中制备的50  $\mu$  l的单端孢菌毒素真菌毒素衍生物[式(b-1)或式(b-2)]-BSA的缀合物(20  $\mu$  g/ml, 0.1M碳酸缓冲液, pH 9.5)溶液。让该平板于4 $^{\circ}$ C下过夜, 然后用PBS洗涤3次。把300  $\mu$  l的1%BSA/PBS或脱脂乳/PBS加入到每个孔之后, 让平板在室温下放置1小时, 然后用PBS洗涤3次以准备反应的平板。

#### b) 用于分析的样品制备

向不同产地的小麦粉(每个10克)中加入40 ml的甲醇/水(3:1), 产生的悬浮液在室温下偶尔搅拌放置90分钟以用于提取。获得的提取物通过滤纸过滤, 收集过滤液。向2 ml的过滤液中加入等量的甲醇, 使混合物在4 $^{\circ}$ C下放置4小时, 然后于4 $^{\circ}$ C下以3000 rpm离心15分钟。收集上清液并于4 $^{\circ}$ C下保存。

保存的溶液(160  $\mu$  l)置于1ml的带盖子的试管中, 在气流中浓缩至干燥, 然后把其置于一个真空器中一天一夜让其完全干燥。向试管中加入50  $\mu$  l的干嘧啶, 干燥的物质完全地溶解于其中, 再加入25  $\mu$  l的乙酸酐。拧紧试管的盖子, 使其在45 $^{\circ}$ C下放置45分钟。当嘧啶和乙酸酐在气流中完全蒸发后, 加入100  $\mu$  l的乙醇和900  $\mu$  l的吐温-PBS(含0.05%吐温-20和140mM NaCl的10mM的磷酸缓冲液, pH 7.4)制成待测定的样品。NIV, DON和T-2的制备物单独地用如以上相同的方式进行处理, 并用吐温-PBS稀释至适当的浓度以制备用作标准溶液的系列稀释液。

#### c) 测定流程

向每个用于反应的平板的孔中加入50 μ l的待测样品，一个标准溶液，或作为对照的吐温-PBS(含0.05% 吐温-20 和 140mM NaCl的10mM的磷酸缓冲液，pH 7.4)。向每个孔中再加入50 μ l的(1)KTM-205溶液(300ng/ml，包含0.1% BSA的吐温-PBS)，(2)KTM-240溶液(300ng/ml，包含0.1% BSA的吐温-PBS)，(3)KTM-249溶液((300ng/ml，包含0.1% BSA的吐温-PBS)，或(2)和(3)的1:1的混合物。当充分搅拌后，孔中的混合物在室温下震荡和搅拌反应45分钟。平板用吐温-PBS洗涤5次，并向每个孔中加入100 μ l的HRP-标记的抗-鼠免疫球蛋白兔抗体溶液(300ng/ml，包含0.1% BSA的吐温-PBS)，再在室温下震荡和搅拌反应30分钟。当平板用吐温-PBS洗涤5次后，向每个孔中加入100 μ l的TMB 溶液(Intergen)，再在黑暗处于室温下震荡和搅拌反应30分钟。然后，通过向每个孔中以50 μ l/每孔的量加入1mol/l的硫酸水溶液终止反应，并用一个平板计数器(MTP-120, Corona电器有限公司)测定450nm波长的吸光值。

#### d) 浓度计算

按照下列方程从每个孔的测定结果计算抑制率。对照的吸光度指孔中的反应混合物(其中加入有吐温-PBS(含0.05% 吐温-20和 140mM 的NaCl的10mM的磷酸缓冲液，pH 7.4)，而不是样品溶液或标准溶液)中的吸光度。

$$\text{抑制率 (\%)} = \{(\text{对照的吸光度}) - (\text{样品的吸光度})\} / (\text{对照的吸光度}) \times 100$$

标准溶液的浓度用 X 轴上的对数刻度和 Y 轴上的抑制率作图以准备校准曲线。校准曲线表示于附图 1, 2, 3, 4。通过参照这些校准曲线，以下列方式从每个样品的抑制率测定每个样品中的单端孢菌毒素真菌毒素的浓度。

从这些孔与 KTM-205 反应的结果计算 NIV 及其衍生物的浓度，并从这些孔与 KTM-240 反应的结果计算 NIV, DON 及其衍生物的浓度。通过从这些孔与 KTM-240 反应的结果减去与 KTM-205 反应的结果计算 DON 及其衍生物的浓度。从这些孔与 KTM-249 反应的结果计算 T-2 及其衍生物的浓度。通过把这些孔与 KTM-240 反应的结果与 KTM-249 反应的结果相加计

算 NIV, DON, T-2 及其衍生物浓度。

实施例4: 比较实施例: 通过GC-MS测定

通过GS-GS测定如同实施例3中相同的样品(小麦粉)的单端孢菌毒素真菌毒素。

a) 样品制备

把实施例3中制备的小麦粉样品的每种保存溶液(160  $\mu$  l)置于一个1ml的有盖试管中, 在气流中浓缩至干燥, 然后把其置于一个真空器中一天一夜让其完全干燥。加入25  $\mu$  l的三甲基硅烷基化剂(N-三甲基硅烷基咪唑:N, O-双三甲基硅烷基乙酰胺:三甲基氯硅酮, 3:3:2, v/v/v)后, 拧紧试管的盖子, 使其在50 $^{\circ}$ C下放置20分钟。产生的混合物用500  $\mu$  l的n-己烷稀释和用200  $\mu$  l的水洗涤。n-己烷层(400  $\mu$  l)用等量的n-己烷稀释。

b) 用GC-MS测定

获得的每种稀释液通过气相色谱-质谱仪(GC-MS, Shimadzu GCMS-QP2000)测定单端孢菌毒素真菌毒素。测定条件如下: 毛细管柱(Shimadzu HiCap-CBP1); 柱温度, 保持在120 $^{\circ}$ C下持续5分钟, 以每分钟8 $^{\circ}$ C提高到280 $^{\circ}$ C; 进口和界面温度, 280 $^{\circ}$ C; 离子源温度, 270 $^{\circ}$ C; 电离势, 70eV; 扫描率(35-700m/z), 1.5次扫描/秒; 上样率, 5点/秒。

c) 与实施例3比较

如附图5所示, 测定结果与根据本发明的方法的实施例3所获得的结果非常一致。图5表示通过使用KTM-240同时测定DON和NIV的结果与通过GC-MS单独测定DON和NIV结果的总和之间的相关性。

实施例5: 确认产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物的生长

a) 用于分析的样品准备

精大米(50g)置于一个500ml的烧瓶中, 并加入150 ml的蒸馏水。烧瓶在室温下放置1小时以使大米浸湿, 然后在120 $^{\circ}$ C灭菌25分钟以制备培养基(大米培养基)。禾谷镰孢(ATCC 15624)接种到该培养基中, 并在室温(20-25 $^{\circ}$ C)下培养。每5天以每份500  $\mu$  l收集培养的上清液。单独地, 没有接种任何菌株的培养基保存在室温(20-25 $^{\circ}$ C)下, 每5天以每份500  $\mu$  l收集培养的上清液作为对照。向每个收集的样品中加入2.5ml的丙酮腈/

水(3:1, v/v)再用匀浆机(Histcon NS-50, Nichi-on-i Rikakiki)磨碎,并以3000 rpm离心10分钟。获得的上清立即在-80℃冷冻并作为待测样品保存。

#### b)微生物生长的确认

向96-孔的微量滴定板的每个孔中加入实施例1中制备的50 μ l的单端孢菌毒素真菌毒素衍生物[式(b-1)]-BSA的缀合物(20 μ g/ml, 0.1 M 碳酸缓冲液, pH 9.5)溶液。让该平板于4℃下过夜,然后用PBS洗涤3次。把300 μ l的1% BSA/PBS或脱脂乳/PBS加入到每个孔之后,让平板在室温下放置1小时,然后用PBS洗涤3次以准备反应的平板。

冷冻保存的每种样品于室温下融化并充分搅拌。融化的样品(160 μ l)置于一个1ml的有盖试管中并在气流中浓缩至干燥。向试管中加入100 μ l的乙醇和900 μ l的吐温-PBS(含0.05%的吐温-20 和 140mM 的NaCl的10mM的磷酸缓冲液, pH 7.4)制成以下描述的待测样品。

向反应平板的每个孔中加入50 μ l的待测样品,或作为对照的吐温-PBS(含0.05%的吐温-20 和 140mM 的NaCl的10mM的磷酸缓冲液, pH 7.4)。向每个孔中再加入50 μ l的KTM-240溶液(300ng/ml, 包含0.1% BSA的吐温-PBS)。当充分搅拌后,孔中的混合物在室温下震荡和搅拌反应45分钟。平板用吐温-PBS洗涤5次,并向每个孔中加入100 μ l的HRP-标记的抗-鼠免疫球蛋白兔抗体溶液(300ng/ml, 包含0.1% BSA的吐温-PBS),再在室温下震荡和搅拌反应30分钟。当平板用吐温-PBS洗涤5次后,向每个孔中加入100 μ l的TMB 溶液(Intergen),再在黑暗处于室温下震荡和搅拌反应30分钟。然后,通过向每个孔中以50 μ l/每孔的量加入1mol/l的硫酸水溶液终止反应,并用平板计数器(MTP-120, Corona电器有限公司)测定450nm波长的吸光值。

结果表示于附图6。吸光度随着微生物的生长而减少,并且确认微生物在生长和生长的微生物是产生单端孢菌毒素真菌毒素的微生物。

#### 实施例6: 检测产生单端孢菌毒素真菌毒素菌株的存在

向96-孔的微量滴定板的每个孔中加入实施例1中制备的50 μ l的单端孢菌毒素真菌毒素衍生物[式(b-1)]-BSA的缀合物(20 μ g/ml, 0.1 M 碳

酸缓冲液, pH 9.5) 溶液。让该平板于4℃下过夜, 然后用PBS洗涤3次。把300 μ l的1% BSA/PBS或脱脂乳/PBS加入到每个孔之后, 让平板在室温下放置1小时, 然后用PBS洗涤3次以准备反应的平板。

充分搅拌以上获得的每种样品。把500 μ l的每种样品置于一个1ml的有盖试管中并在气流中浓缩至干。向试管中加入50 μ l的乙醇和450 μ l的吐温-PBS(含0.05%的吐温-20和140mM的NaCl的10mM的磷酸缓冲液, pH 7.4) 制成以下描述的待测样品。

向反应平板的每个孔中加入50 μ l的待测样品, 或作为对照的吐温-PBS(含0.05%的吐温-20和140mM的NaCl的10mM的磷酸缓冲液, pH 7.4)。向每个孔中再加入50 μ l的(1)KTM-205溶液(300ng/ml, 包含0.1% BSA的吐温-PBS)或(2)KTM-240溶液(300ng/ml, 包含0.1% BSA的吐温-PBS)。当充分搅拌后, 孔中的混合物在室温下震荡和搅拌反应45分钟。平板用吐温-PBS洗涤5次, 并向每个孔中加入100 μ l的HRP-标记的抗-鼠免疫球蛋白兔抗体溶液(300ng/ml, 包含0.1% BSA的吐温-PBS), 再在室温下震荡和搅拌反应30分钟。当平板用吐温-PBS洗涤5次后, 向每个孔中加入100 μ l的TMB溶液(Intergen), 再在黑暗处于室温下震荡和搅拌反应30分钟。然后, 通过向每个孔中以50 μ l/每孔的量加入1mol/l的硫酸水溶液终止反应, 并用平板计数器(MTP-120, Corona电器有限公司)测定450nm波长的吸光值。

结果表示于附图7。在从栽培田块A, B, D的水稻秸秆分离的菌株培养物中被检测到单端孢菌毒素真菌毒素, 而从栽培田块C的水稻秸秆分离的菌株培养物中没有检测到单端孢菌毒素真菌毒素。这些结果表明栽培田块A, B, D也被产生单端孢菌毒素真菌毒素的菌株污染的可能性, 但否定栽培田间C被污染的可能性。从A, B, D的结果也证明田块A主要是由产生DON的菌株污染, 田块B, D是由产生NIV的菌株污染。

### 工业实用性

通过使用本发明的单克隆抗体或其片段可简单、准确地检测或测定作物, 食品, 饲料等等中的单端孢菌毒素真菌毒素。

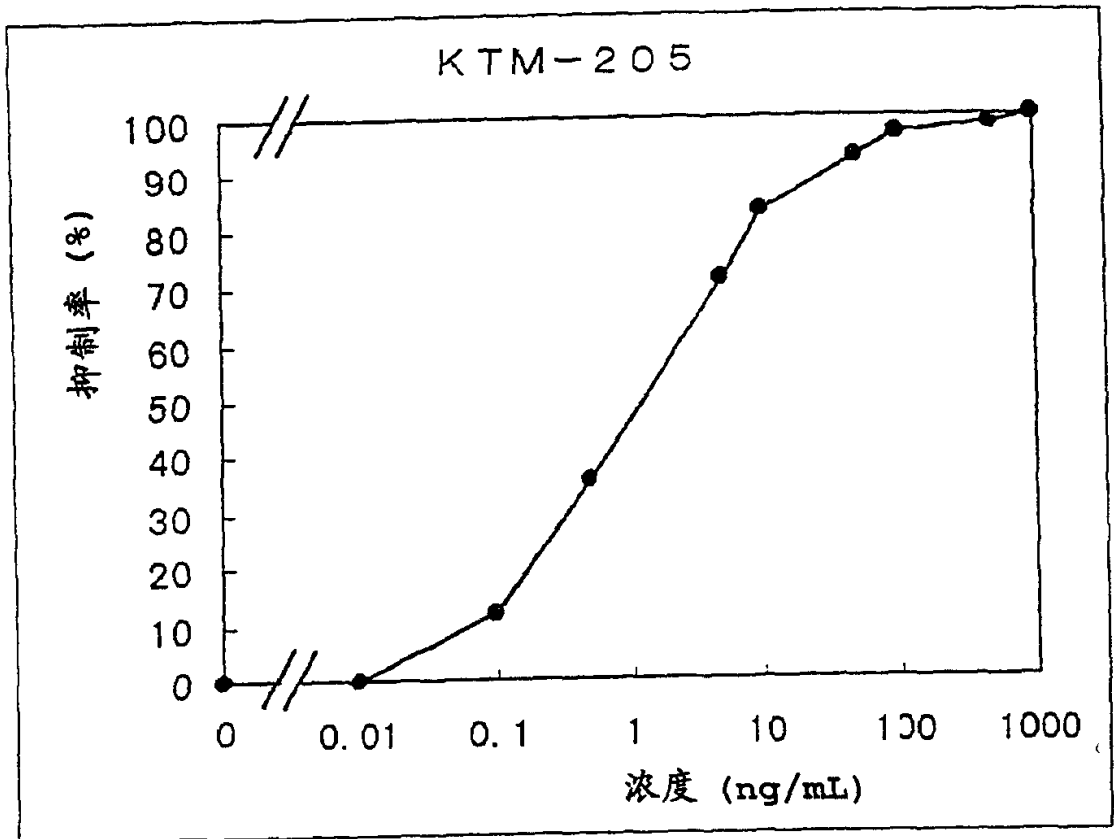


图1

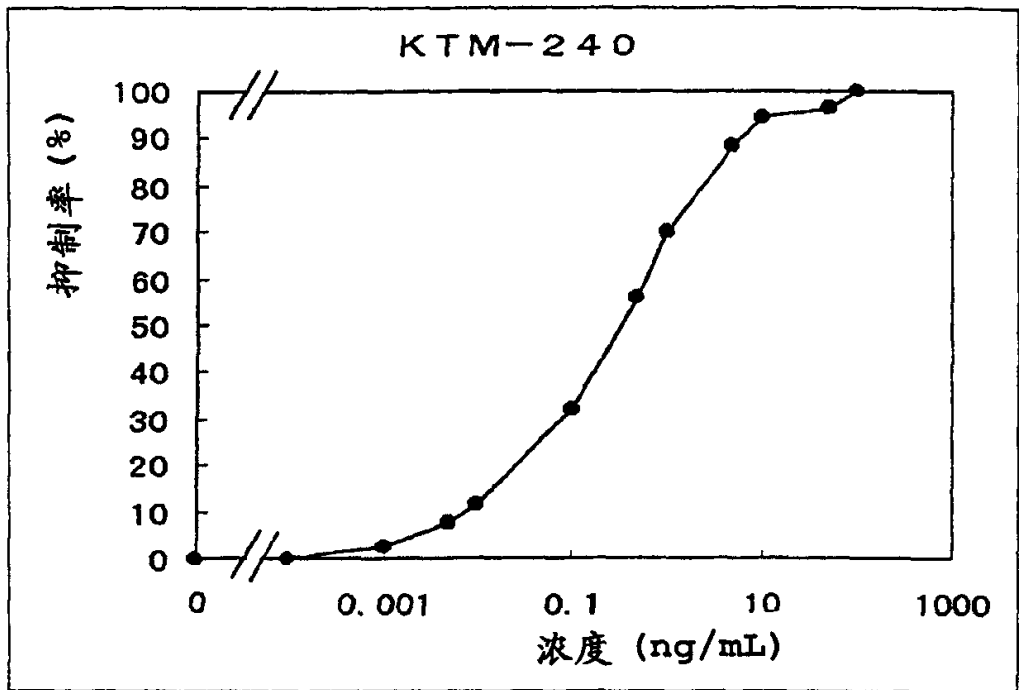


图 2

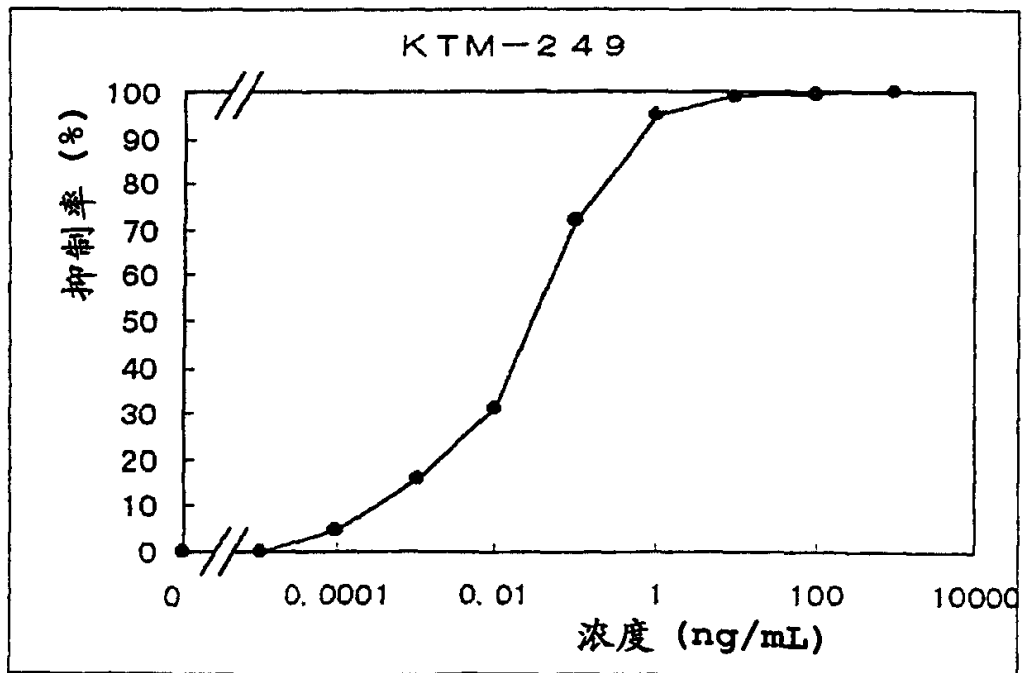


图 3

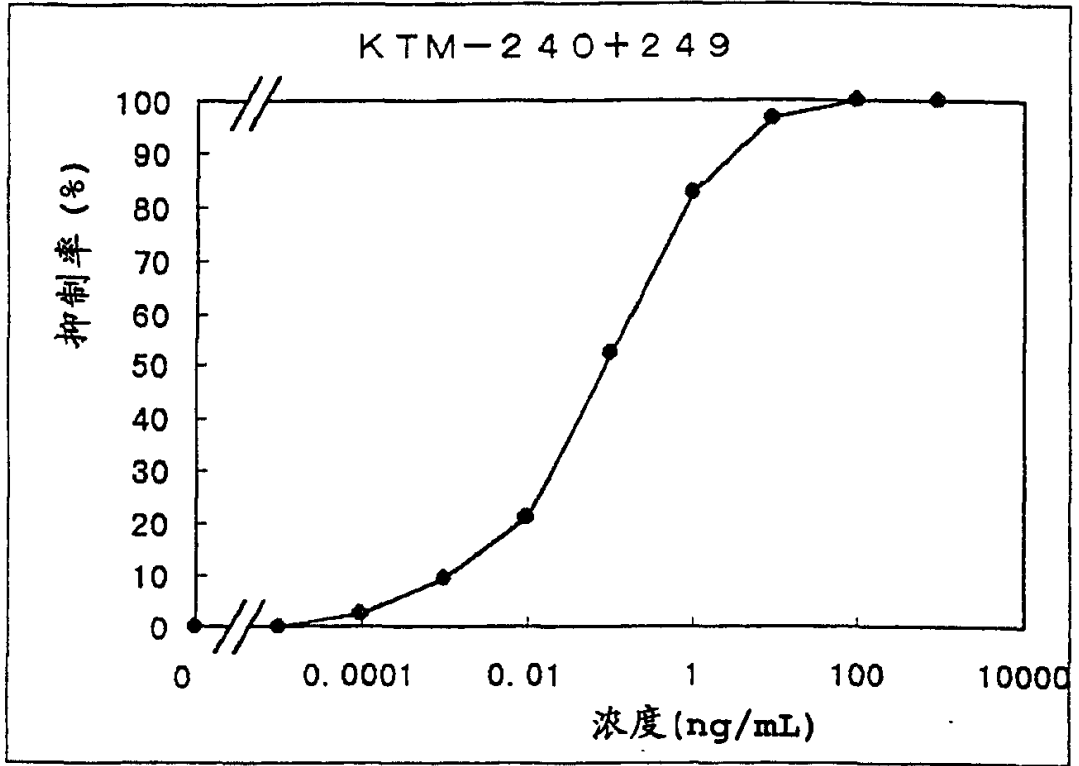


图 4

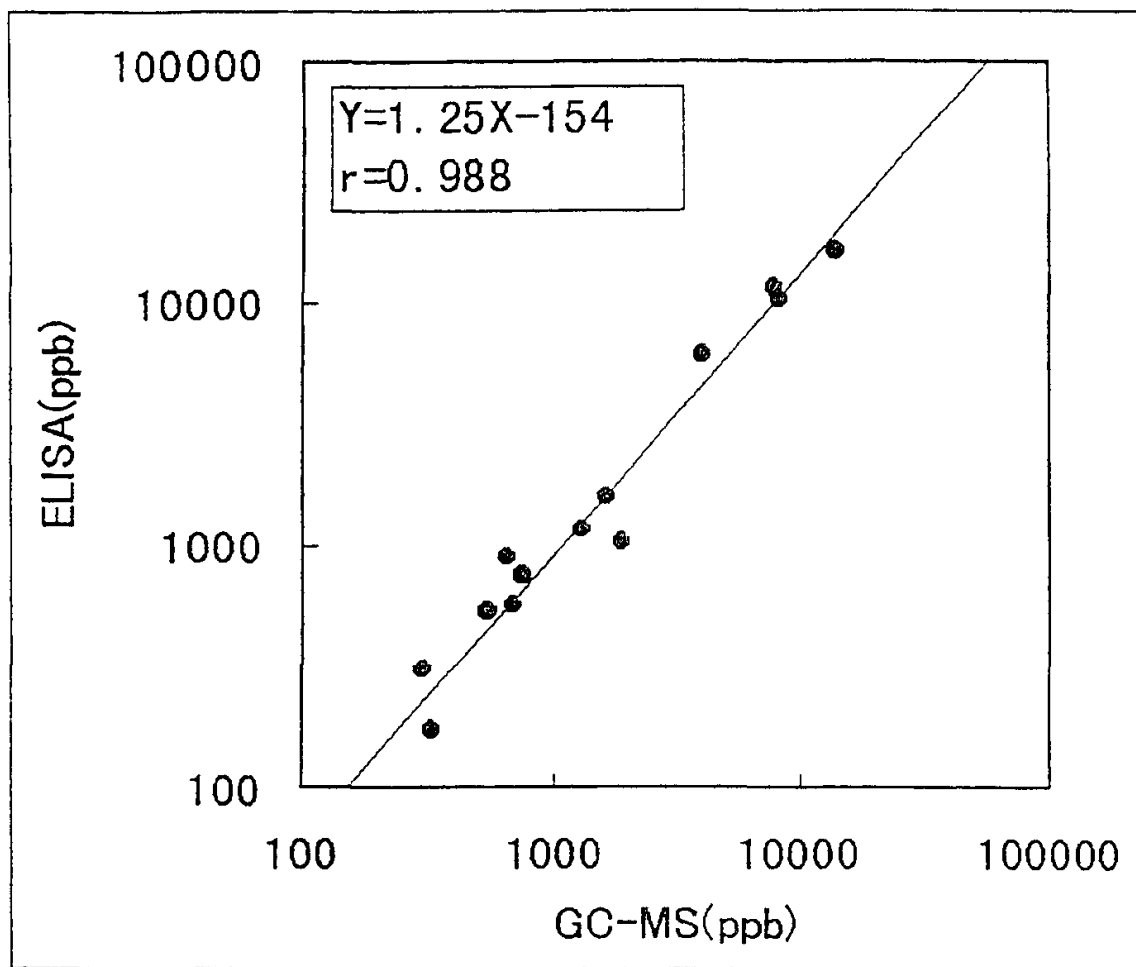


图5

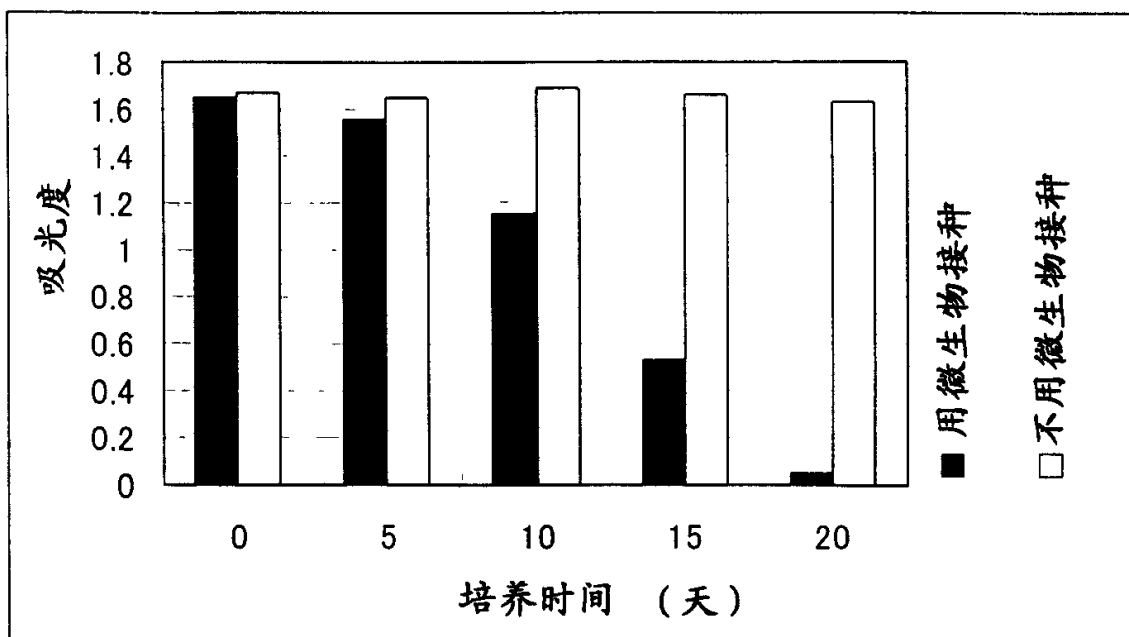


图6

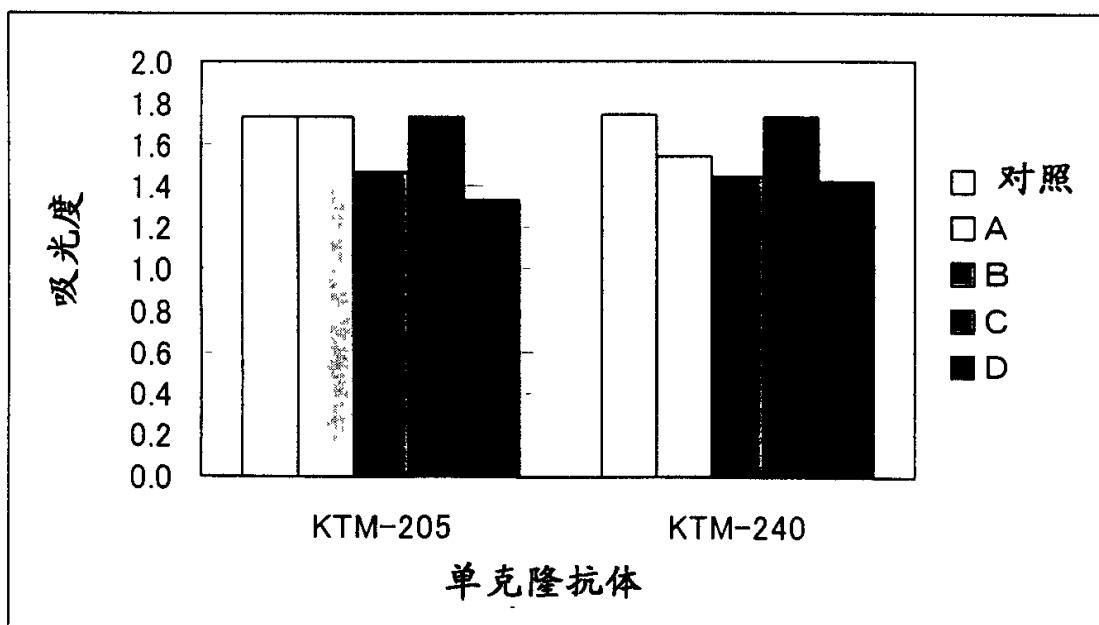


图7

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于单端孢菌毒素真菌毒素检测的方法和试剂   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1365387A</a>                                   | 公开(公告)日 | 2002-08-21 |
| 申请号            | CN00810985.0   | 申请日     | 2000-09-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 协和梅迪克斯株式会社   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 协和梅迪克斯株式会社   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 协和梅迪克斯株式会社   |         |            |
| [标]发明人         | 河野弘明<br>桥本百合子<br>芳泽宅实  |         |            |
| 发明人            | 河野弘明<br>桥本百合子<br>芳泽宅实  |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/14 C12N15/12 C12P21/08 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/577 |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/14  |         |            |
| 代理人(译)         | 李瑛   |         |            |
| 优先权            | 1999253443 1999-09-07 JP<br>1999310185 1999-10-29 JP         |         |            |
| 其他公开文献         | CN100480383C   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>               |         |            |

摘要(译)

产生了对单端孢菌毒素真菌毒素DON、NIV和T-2具有高亲和性的单克隆抗体,并且采用所说的单克隆抗体集中检测了单端孢菌毒素真菌毒素。

