|  |  |
| --- | --- |
| 分类号： S945.1 | 密 级 ： |
| U D C ：591.2 | 学 号 ：2111104332 |

广 东 海 洋 大 学

硕 士 学 位 论 文

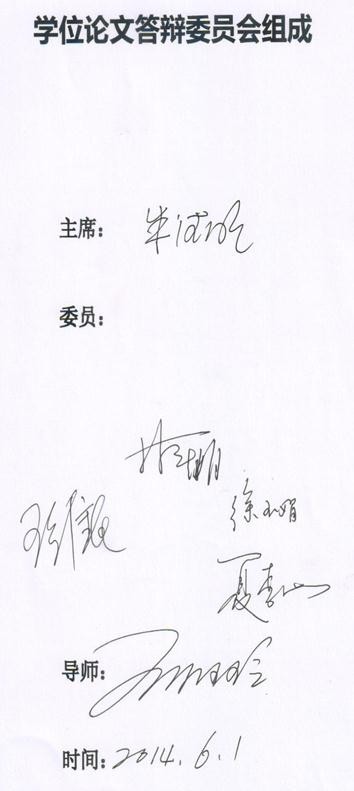
凡纳滨对虾体内隐蔽态 T-2 毒素的共性表征与危害识别

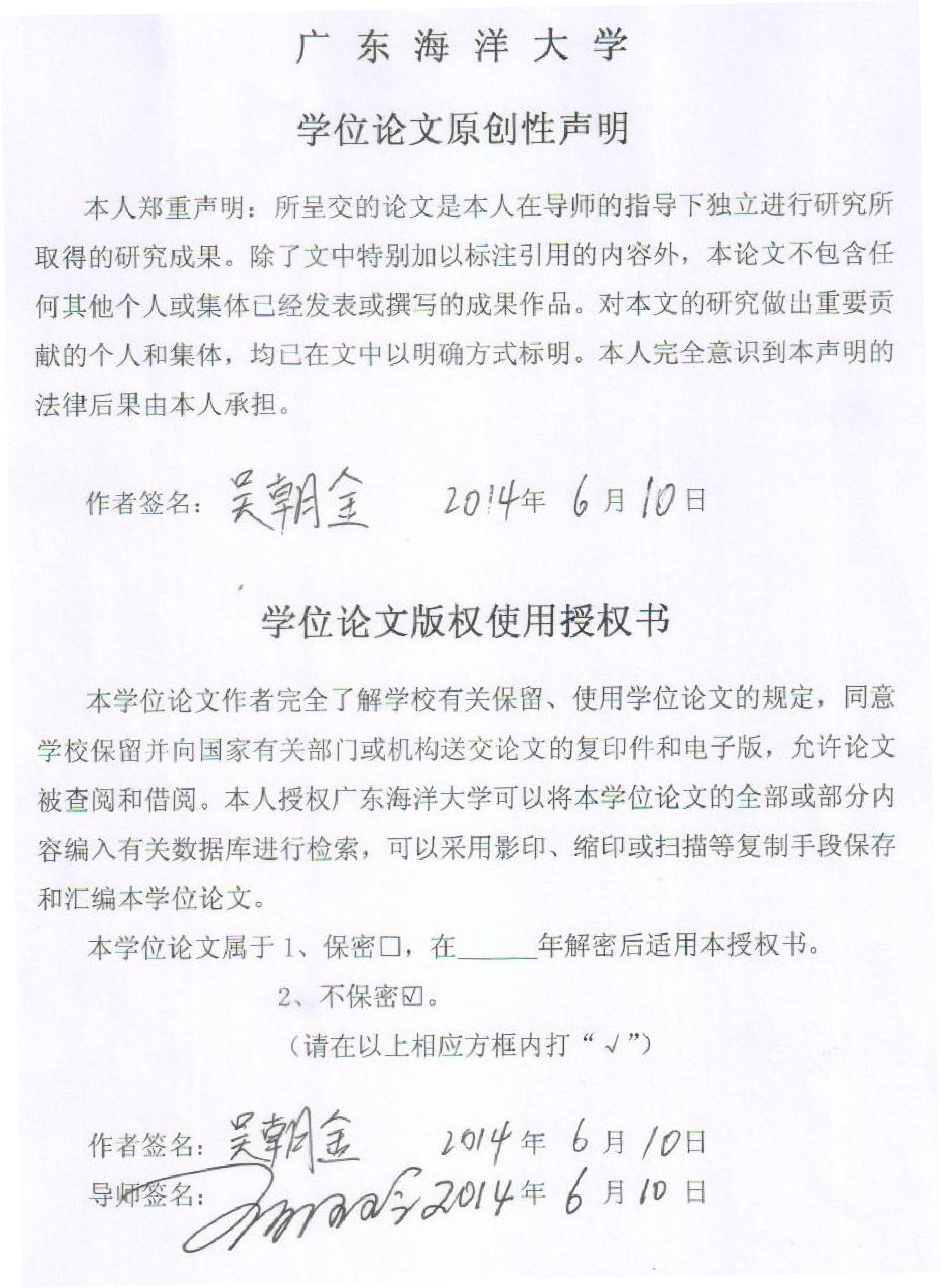
吴朝金

指 导 教 师 ： 王 雅 玲 教授 申 请 学 位 类 别： 工学硕士 专 业 名 称： 水产品加工及贮藏工程 研 究 方 向： 海洋生物活性物质研究与开发学 院 名 称： 食品科技学院

中国·湛江

2014 年 6 月





凡纳滨对虾体内隐蔽态T-2毒素的共性表征与危害识别

摘 要

以T-2毒素暴露未出现物质蓄积的染毒对虾各组织匀浆液进行小鼠灌胃。分析小鼠的免疫功能指标、血清生化指标和遗传毒性指标的变化，根据总体概率学分析识别染毒对虾对小鼠的损伤效应。结果显示，染毒对虾对小鼠的免疫功能和遗传特性产生明显损害效应（出现P<0. 05的概率高），而小鼠的血清生化指标未出现明显变化（出现P <0. 05的概率低），表明染毒对虾具有免疫毒性和遗传毒性，对小鼠造成的肝毒和肾毒损伤效应较小。染毒对虾自身没有T-2毒素的物质蓄积却表现出对小鼠免疫和遗传上的功能蓄积毒性，说明了染毒对虾中可能存在隐蔽态T-2毒素，可通过对虾食物链，对小鼠产生损害效应。

不同暴露剂量T-2毒素口服20d蓄积染毒对虾经有机溶剂提取，再采用三氟乙酸水解法处理，通过LC-MS/MS检测处理前后样品中T-2毒素含量，结果证实了对虾体内隐蔽态T-2毒素的存在；明确了对虾中隐蔽态T-2毒素主要集中在对虾的肝胰腺、血液、肌肉、虾头中，且隐蔽态T-2毒素解离率与对虾的暴露剂量呈正相关。肝胰腺为最主要的隐蔽态存在部位，在肝胰腺的上清样中T-2毒素的增量为约为23.6 ng/尾，肝胰腺残渣样中解离出的T-2毒素增量约为为11.0 ng/尾。残渣样中隐蔽态T-2毒素被解离出，表明有机溶剂分离提取对虾体内的隐蔽态T-2毒素存在一定量的损失。

核磁共振和质谱表征，证明了目标T-2毒素母核半抗原3-Ac-NEOS的合成，利用红细胞酶解法制备半抗原3-Ac-NEOS的方法可行且纯度较高，半抗原的制备得到优化，经柱色谱分离纯化后，得到半抗原合成率为60%左右。在蒸气浴条件下，3-Ac-NEOS与琥珀酸酐（HS）反应合成了在C8位具有连接臂的3-Ac-NEOS-HS，后通过碳二亚胺法将半抗原与载体蛋白偶联制备T-2毒素母核完全抗原，采用紫外扫描及SDS-PAGE凝胶电泳，最终确定了半抗原3-Ac-NEOS与蛋白的成功偶联，其中免疫原3-Ac-NEOS-HS-BSA内3-Ac-NEOS与BSA的偶联比为8.76: 1，包被原3-Ac-NEOS-HS-OVA内3-Ac-NEOS与OVA的偶联比为7.24: 1，两个都在范围(3~45)：

1之间，都具有免疫原性，且其中免疫原的偶联比为8.76: 1在范围(8~25)：1之间，表明能够进行免疫产生具有较高效价的抗血清。

利用制备的T-2毒素母核完全抗原免疫新西兰种兔子，经间接ELISA法检测，在第五次加强免疫后的抗血清，效价达到1: 64000，可用于纯化制备抗体。利用纯化后的抗体建立间接竞争ELISA法分析抗体的灵敏度和特异性，结果显示T-2毒素母核抗体相对于具有母核结构的A型单端孢霉烯族毒素特异性差，但相对于不具有母核结构的B族毒素DON的特异性强，表明T-2毒素母核抗体可识别隐蔽态T-2毒素。间接竞争ELISA对T-2毒素的检测限为49 ng/mL, IC50为0.228µg/mL。

同时利用包被抗原3-Ac-NEOS-HS-OVA偶联羧基磁珠，制备了可识别T-2毒素母核抗体的3-Ac-NEOS-HS-OVA-免疫磁珠（T2-IMB），并以此磁珠建立间接竞争

ELISA，即免疫磁珠间接竞争ELISA(T2-IMB-ELISA)。T2-IMB-ELISA对T-2毒素母核的检测限为0.023µmol/L，相当于10.7 ng/mL的T-2毒素，检测限明显低于建立的常规间接竞争ELISA法49 ng/mL的检测限；对T-2毒素加标检测的平均回收率为

92.37%，且变异系数均在变异系数在3.26~6.43之间，说明T2-IMB-ELISA具有较高的回收率和检测准确性。T2-IMB-ELISA被成功应用于检测对虾体内的隐蔽态T-2毒素，结果显示，以最高剂量组肝胰腺为例，检测到的隐蔽态T-2毒素为0.057 nmol/尾。若全部解离为T-2毒素的，可得到T-2毒素的增量为26.7 ng/尾。结果高于用解离法检测到的23.6 ng/尾增量。表明了解离法处理隐蔽态T-2毒素不完全，有部分损失。T2-IMB-ELISA适合于检测对虾体内的隐蔽态T-2毒素。

**关键字**：隐蔽态； T-2 毒素； 3-乙酰基-新茄病镰刀菌烯醇； T-2 毒素母核抗体； 免疫磁珠酶联免疫法

**The Common Representation and Hazard Identification of Masked T-2 Toxin in *Litopenaeus vannamei***

**Abstract**

The experiment was performed with the infected shrimp, but there is no T-2 toxin accumulation phenomenon was observed. The mice were treated different tissue homogenate of the infected shrimp by intragastric administration. Detect the immune function indexes, serum biochemical parameters and genotoxicity indicators of mice. According to general probabilistic to analysis and identify the damage effect on the mice that was cause by shrimp. The results showed that T-2 toxin infected shrimp has significant harms on immune functions and genetic characteristics of mice (high probability P<0.05), but not significant impact on serum biochemical indexes of mice (low probability P<0.05). These indicated that T-2 toxin infected shrimp has immune toxicity and genetic toxicity, but it caused no significant damages to the liver and kidneys of mice. Although no T-2 toxin accumulation phenomenon of the infected shrimp was observed, mice appear immune and genetic function accumulation toxicity phenomenon after gavage the infected shrimp. It showed that the infected shrimp may contain masked T-2 toxin, and it can do harms on mice through the food chain of shrimp.

Organic solvent extracted the shrimp of 20 d different T-2 oral dose accumulation infected then treated the extracted residua and organic solvent by Trifluoroacetic acid, LC-MS/MS detective T-2 toxin of the dissociation sample, the dissociation of T-2 toxin from sample confirmed masked T-2 toxin exist in shrimp. determined masked T-2 toxin is concentrated in the hepatopancreas, blood, muscles and head of shrimp. Dissociation rate of masked T-2 toxin was positively correlated with shrimp infected dosage. Hepatopancreas as the major part that masked T-2 toxin exists. T-2 toxin increment in the supernatant of one shrimp hepatopancreas dissociation sample is about 23.6ng and the residual increment is about 11.0 ng. T-2 toxin increase in the residue samples indicate that organic solvent extract masked toxin is incomplete.

Base on NMR and mass spectrometry the synthesis of target T-2 toxin nucleus hapten 3-Ac-NEOS was demonstrated and using erythrocyte enzymatic hydrolysis method to acquire Hapten 3-Ac-NEOS is feasible and high purity. After we optimized its preparation and purified by column chromatography, the yield of hapten was 60% or so. In the steam bath conditions, 3-Ac-NEOS and HS synthesized to be 3-Ac-NEOS-HS with

Connecting arm, then we prepared T-2 toxin nucleus complete antigen by carbodiimide method with conjugating the hapten with carrier protein, and used UV scanning and SDS-PAGE gel electrophoresis, finally we determined the conjugated success of the hapten 3-Ac-NEOS with bovine serum albumin and ovalbumin. The coupling ratio between 3-Ac-NEO and BSA was 8.76: 1 and the coupling ratio between 3-Ac-NEOS and OVA was 7.24: 1, both were in the range of (3~45):1 and had immunogenic. The coupling rate of immunogenic was 8.76: 1 that was in the range of (8~25): 1, which indicated to produce efficient antiserum.

Using the T-2 toxin completely the parent nucleus antigen which was prepared immune the New Zealand rabbits, Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) to detection. After the fifth booster immunization, the antiserum titer was 1: 64000 and it can be used for antibody purification. The indirect competitive ELISA was established based on antibodies purification for analysis the sensitivity and specificity of antibodies, Results show that parent nucleus antibody of T-2 toxin relative to the Single-family trichothecene A with mother nucleus structure specificity is poor, but relative to the Single-family trichothecene B toxins DON without mother nuclear structure specificity is strong. Indicating T-2 toxin nucleus antibodies specifically recognize the structure of the nucleus of A single-family trichothecene toxins. Using indirect competitive ELISA the detection limit for T-2 toxin was 49 ng/mL and IC50 was 0.228µg/mL.

Using the coating antigen 3-Ac-NEOS-HS-OVA that conjugate with carboxyl beads to prepared identifiable T-2 toxin mother nucleus antibody immunized beads (T2-IMB), that is the immune beads indirect competitive ELISA (T2-IMB-ELISA). T2-IMB-ELISA for T-2 toxin mother nucleus detection limit was equivalent 10.7 ng/mL of T-2 toxin, and significantly lower than the detection limits 49 ng/mL. of conventional indirect competitive ELISA method. Labeling of T-2 toxin detection of the average recovery was 92.37% and the variation coefficient are between 3.26~6.43, shows that T2-IMB-ELISA has high recovery rate and detection accuracy. T2-IMB-ELISA has been successfully applied to the detection of masked T-2 toxin in the shrimp, the results showed that detective the masked T-2 toxin in the one hepatopancreas of the highest dose group is about 0.057nmol, if all masked toxin was dissociation increments of the T-2 toxin is 26.7 ng, higher than the group which under condition of acid hydrolysis increment is 23.6 ng. Indicating that acid hydrolysis is not complete, there is partial loss. T2-IMB-ELISA is suitable for detection of masked T-2 toxin in vivo of shrimp.

**Key Words**: masked T-2 toxin; 3-Ac-NEOS; Mother nucleus antibody; IMB-ELISA

目 录

[摘 要](#_Toc686518648) 2

**[Abstract](#_Toc686518649)** 2

[1 绪论](#_Toc686518651) 7

[1.1 T-2毒素在对虾食物链蓄积中的危害](#_Toc686518652) 7

[1.2 对虾体内隐蔽态T-2毒素的发现](#_Toc686518653) 7

[1.3 隐蔽态真菌毒素的概述](#_Toc686518654) 8

[1.3.1 隐蔽态真菌毒素的发现](#_Toc686518655) 8

[1.3.2 隐蔽态真菌毒素的母核结构特性及潜在危害](#_Toc686518656) 8

[1.4 隐蔽态真菌毒素的的识别方法](#_Toc686518657) 8

[1.4.1 隐蔽态真菌毒素的解离检测法](#_Toc686518658) 8

[1.4.2 隐蔽态真菌毒素的纯化检测法](#_Toc686518659) 8

[1.4.3 免疫磁珠酶联免疫检测技术](#_Toc686518660) 8

[1.5 本课题研究内容与创新意义](#_Toc686518661) 9

[1.5.1 研究内容](#_Toc686518662) 9

[1.5.2 创新意义](#_Toc686518663) 9

[2 T-2毒素染毒对虾对小鼠的危害识别](#_Toc686518664) 9

[2.1 材料与仪器](#_Toc686518665) 9

[2.1.1 材料和试剂](#_Toc686518666) 9

[2.1.2 仪器与设备](#_Toc686518667) 10

[2.2 实验方法](#_Toc686518668) 10

[2.2.1 给药方式](#_Toc686518669) 10

[2.2.2 免疫功能指标的测定](#_Toc686518670) 11

[2.2.3 遗传毒性试验方法](#_Toc686518671) 11

[2.2.4 小鼠血清Th化指标的测定](#_Toc686518672) 12

[2.2.5 统计学分析](#_Toc686518673) 12

[2.3 结果](#_Toc686518674) 12

[2.3.1 小鼠免疫功能指标的测定](#_Toc686518675) 12

[2.3.2 血清肝脏Th化指标的测定](#_Toc686518676) 12

[2.3.3 血清肾脏Th化指标的测定](#_Toc686518677) 14

[2.3.4 小鼠精子畸形试验](#_Toc686518678) 17

[2.3.5 小鼠骨髓微核试验](#_Toc686518679) 21

[2.3.6 小鼠检测指标显著性变化的概率统计](#_Toc686518680) 22

[2.3.7 各染毒对虾免疫毒性的多维尺度分析](#_Toc686518681) 22

[2.4 讨论](#_Toc686518682) 23

[2.4.1 染毒对虾对小鼠免疫功能的影响](#_Toc686518683) 23

[2.4.2 染毒对虾对小鼠血清肝脏Th化指标的影响](#_Toc686518684) 23

[2.4.3 染毒对虾对小鼠血脂和血清肾脏Th化指标的影响](#_Toc686518685) 23

[2.4.4 染毒对虾对小鼠的遗传毒性](#_Toc686518686) 23

[2.5 小结](#_Toc686518687) 23

[3 三氟乙酸水解处理测定对虾体内隐蔽态T-2毒素](#_Toc686518688) 23

[3.1 材料与仪器](#_Toc686518689) 23

[3.1.1 试剂与药品](#_Toc686518690) 23

[3.1.2 实验仪器](#_Toc686518691) 24

[3.2 实验方法](#_Toc686518692) 24

[3.2.1 凡纳滨对虾的染毒](#_Toc686518693) 25

[3.2.2 对虾样品前处理](#_Toc686518694) 25

[3.2.3 三氟乙酸水解处理虾样提取液与残渣的方法](#_Toc686518695) 25

[3.2.4 三氟乙酸水解处理条件的优化](#_Toc686518696) 25

[3.2.5 LC-MS/MS检测](#_Toc686518697) 25

[3.3 结果](#_Toc686518698) 25

[3.3.1 T-2毒素的LC-MS/MS检测质谱条件](#_Toc686518699) 25

[3.3.2 三氟乙酸水解处理对虾体内mT-2s的条件选择](#_Toc686518700) 25

[3.3.3 染毒对虾体内可解离mT-2s含量的测定](#_Toc686518701) 26

[3.4 讨论](#_Toc686518702) 26

[3.5 小结](#_Toc686518703) 26

[4 T-2毒素母核完全抗原的合成与鉴定](#_Toc686518704) 26

[4.1 材料与仪器](#_Toc686518705) 26

[4.1.1 材料与试剂](#_Toc686518706) 27

[4.1.2 仪器和设备](#_Toc686518707) 27

[4.2 实验方法](#_Toc686518708) 28

[4.2.1 T-2毒素乙酰化](#_Toc686518709) 28

[4.2.2 半抗原3-Ac-NEOS的合成](#_Toc686518710) 28

[4.2.3 T-2毒素母核抗原的合成](#_Toc686518711) 28

[4.3 结果](#_Toc686518712) 28

[4.3.1 3-乙酰基-T-2毒素的质谱鉴定](#_Toc686518713) 28

[4.3.2 母核半抗原3-Ac-NEOS的结构鉴定](#_Toc686518714) 28

[4.3.3 3-Ac-NEOS-HS与蛋白的偶联](#_Toc686518715) 29

[4.4 讨论](#_Toc686518716) 30

[4.5 小结](#_Toc686518717) 30

[5 T-2毒素母核多克隆抗体的制备与检测](#_Toc686518718) 30

[5.1 材料与仪器](#_Toc686518719) 30

[5.1.1 材料和试剂](#_Toc686518720) 30

[5.1.2 仪器设备](#_Toc686518721) 30

[5.2 实验方法](#_Toc686518722) 31

[5.2.1 免疫兔子](#_Toc686518723) 31

[5.2.2 抗血清的分离与保存](#_Toc686518724) 32

[5.2.3 抗血清效价的测定](#_Toc686518725) 32

[5.2.4 抗血清的纯化](#_Toc686518726) 32

[5.2.5 最佳抗体稀释度和抗原包被浓度的检测](#_Toc686518727) 32

[5.2.6 测定抗体检测限与特异性](#_Toc686518728) 32

[5.3 结果](#_Toc686518729) 33

[5.3.1 抗血清效价的测定](#_Toc686518730) 33

[5.3.2 最佳的抗体与包被原工作浓度](#_Toc686518731) 35

[5.3.3 抑制率IC50以及交又反应率](#_Toc686518732) 36

[5.4 讨论](#_Toc686518733) 36

[5.5 小结](#_Toc686518734) 37

[6 免疫磁珠间接竞争ELISA的建立及在对虾中隐蔽态T-2毒素检测上的应用](#_Toc686518735) 37

[6.1 材料与仪器](#_Toc686518736) 37

[6.1.1 材料和试剂](#_Toc686518737) 37

[6.1.2 仪器设备](#_Toc686518738) 38

[6.2 实验方法](#_Toc686518739) 38

[6.2.1 抗原与羧基磁珠的偶联](#_Toc686518740) 38

[6.2.2 磁珠上的包被原偶联率分析](#_Toc686518741) 38

[6.2.3 免疫磁珠的制备优化](#_Toc686518742) 38

[6.2.4 免疫磁珠间接竞争ELISA检测条件的优化](#_Toc686518743) 39

[6.2.5 免疫磁珠间接竞争ELISA检测T-2毒素母核含量标准抑制曲线的测定](#_Toc686518744) 39

[6.2.6 加标回收率测定](#_Toc686518745) 39

[6.2.7 免疫磁珠酶联免疫法在对虾中mT-2s检测上的应用](#_Toc686518746) 39

[6.3 结果](#_Toc686518747) 39

[6.3.1 羧基磁珠偶联包被原的条件优化](#_Toc686518748) 40

[6.3.2 免疫磁珠间接竞争酶联免疫法检测条件的优化](#_Toc686518749) 40

[6.3.3 标准竞争抑制曲线的测定](#_Toc686518750) 40

[6.3.4 回收率检测结果](#_Toc686518751) 41

[6.3.5 口服蓄积染毒对虾的检测结果](#_Toc686518752) 41

[6.4 讨论](#_Toc686518753) 42

[6.5 小结](#_Toc686518754) 42

[7 总结与展望](#_Toc686518755) 42

[7.1 总结](#_Toc686518756) 42

[7.2 不足之处与展望](#_Toc686518757) 42

[参考文献](#_Toc686518758) 42

**作者简介**................................................................................................ **错误！未定义书签。**

**导师简介**................................................................................................ **错误！未定义书签。**

**英文缩写及对照**

**Abbreviations and controls**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩略语 | 英文全称 | 中文全称 |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance | 核磁共振 |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography | 高效液相色谱 |
| DON | Deoxynivalenol | 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 |
| ZON | zearalenone | 玉米赤霉烯酮 |
| FB1 | Fumonisin B1 | 伏马毒素 B1 |
| FB2 | Fumonisin B2 | 伏马毒素 B2 |
| HFB1 | Hidden Fumonisin B1 | 隐蔽态伏马毒素 B1 |
| ESI | Electron Spray Ionization | 电喷雾离子源 |
| ZON-14-G | zearalenone-14-β-d-glucoside | 玉米赤霉烯酮-14-β-D-糖苷 |
| BW | Body Weight | 体重 |
| ZON-4-G | zearalenone-4-β-d-glucoside | 玉米赤霉烯酮-4-β-D-糖苷 |
| ZON-4-S | zearalenone-4-sulfate | 玉米赤霉烯酮-4-硫酸盐 |
| DON-3-G | deoxynivalenol-3-glucoside | 脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-糖苷 |
| DON-4-S | deoxynivalenol-3-glucoside | 脱氧雪腐镰刀菌烯醇-4-硫酸盐 |
| DON-15-G | deoxynivalenol-3-glucoside | 脱氧雪腐镰刀菌烯醇-15-糖苷 |
| GC | Gas Chromatography | 气相色谱 |
| HT2-3-G | HT2-3-glucoside | HT-2 毒素-3-糖苷 |
| HT2-4-G | HT2-4-glucoside | HT-2 毒素-4-糖苷 |
| LC | Liquid Chromatography | 液相色谱 |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay | 酶联免疫吸附试验 |
| IMB | Immunoglobulin Magnetic Beads | 免疫磁珠 |
| LC-MS/MS | Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry | 液相色谱与多级质谱联用 |
| IC50 | Half maximal inhibitory concentration | 半抑制浓度 |
| NHS | N-Hydroxysuccinimide | N-羟基琥珀酰亚胺 |
| EDC | carbodiimide | 碳二亚胺 |
| HRP | Horse Radish Peroxidase | 辣根过氧化酶 |
| ConA | Concanavalin | 刀豆蛋白 A |
| OD | Optical Density | 光密度 |
| DMSO | dimethylsulfoxide | 二甲基亚砜 |
| MTT | Methyl thiazolyl tetrazolium | 甲基噻唑基四唑 |

# 1 绪论

## 1.1 T-2毒素在对虾食物链蓄积中的危害

湛江是位于中国广东的一座南部港口城市，其特殊的地理环境，形成了发达的海洋生物产业。其中对虾产业尤为发达，湛江每年的产虾量占全国总虾量的15%[1]。然而，常见于霉变饲料中的镰孢菌所产生的T-2毒素污染却给湛江对虾产业的发展带来了很大障碍[2]。2009年的一份检测报告显示广东省饲料中T-2毒素的含量为全国最高

[3]. 作为广东省的沿海城市，湛江特殊的地理气候更容易导致对虾饲料霉变产T-2毒素。研究发现，T-2 毒素危害对虾健康，低剂量的T-2 毒素能够对黑虎虾（*Alpheus*

*bellulus*）形成危害，黑虎虾在连续喂食8至10周1.0 - 2.0 mg/kg·*mb*剂量T-2毒素后，出现明显的病变症状，其中主要有造血和淋巴组织出现分离，肝胰腺组织出现萎缩、红肿及退化[4]。饲喂T-2毒素污染饲料的对虾免疫系统功能下降，对抗疾病的能力显著下降[5]。目前，研究人员发现作为T-2毒素主要毒性部位的母核（如图4-1）不易被破坏[6]，极易通过食物链的传递，进入人类或其它动物体内，并产生二次毒性危害。

## 1.2 对虾体内隐蔽态T-2毒素的发现

目前就有关对虾暴露T-2毒素的危害研究虽然还很少，但是其可能造成的危害，已经开始被许多研究者们所重视。

有关T-2毒素对凡纳滨对虾肌肉品质性状影响的相关研究发现，暴露于不同剂量T-2毒素饲料的凡纳滨对虾，经行20天蓄积染毒试验后，凡纳滨对虾体重的变化显著；并且通过对试验组和对照组的感官指标、化学指标和肌肉品质典型性状进行综合分析，发现T-2毒素导致凡纳滨对虾的肌肉品质下降，相关的对虾生物酶活性也发生了变化。然而通过对蓄积染毒的凡纳滨对虾进行T-2含量检测时，却并未发现T-2毒素发生物质蓄积的直接证据[7]。按定期递增剂量法饲喂凡纳滨对虾T-2毒素时，也发现在T-2毒素的作用下，对虾体性状发生明显变化，肌肉组织、肠道组织和肝胰腺组织都出现了不同程度的病变，然而对凡纳滨对虾体内T-2毒素含量进行LC-MS/MS检测，却也未发现T-2毒素在对虾体内物质蓄积[8]。同时，代喆和施琦在检测蓄积试验组对虾体内的T-2毒素含量时，同步检测了T-2主要代谢产物HT-2毒素的含量，发现HT-2毒素含量处于检测限水平以下，大部分残留含量接近于零[7-8]。说明了T-2毒素在对虾体内并没有被代谢转化为其它游离态的强毒产物。染毒对虾产生毒性效应的谜团亟待揭示。根据目前日益兴起的有关隐蔽态真菌毒素的学说，推测对虾体内存在有隐蔽态T-2毒素（mT-2s），部分T-2毒素在对虾体内通过转变为mT-2s而逃避常规方法的分离纯化与检测。

## 1.3 隐蔽态真菌毒素的概述

近几十年，随着人们对真菌毒素（*mycotoxin*）研究的深入，真菌毒素的危害及作用机理逐渐为人们所认识。真菌毒素是由真菌在一定条件下产生的有毒次级代谢产物，其包括单端孢霉烯族毒素、玉米赤霉烯酮和黄曲霉毒素等。真菌毒素易于污染人类和动物所需的植物源性食物[9]，真菌毒素存在下的食品，常出现营养缺失、品质下降和败坏等现象。真菌毒素可经食物链，进入动物和人类机体中，破坏细胞结构和细胞内各种DNA和RNA，进而抑制机体内各种蛋白和酶类的合成[10]。在2002年，世界卫生组已确定了真菌毒素为食源性疾病形成的重要根源之一[11]。世界各地许多国家地区也分别针对食品中各类真菌毒素制定限量检测标准[12-13]。然而，隐蔽态真菌毒素的出现，却为真菌毒素的研究检测带来了许多瓶颈。

### 1.3.1 隐蔽态真菌毒素的发现

隐蔽态真菌毒素由真菌毒素转变而来，目前所知的隐蔽态真菌毒素主要包括隐蔽态DON、隐蔽态ZON、隐蔽态FB及隐蔽态A型单端孢霉烯族毒素等[14]。部分学者认为，隐蔽态真菌毒素的形成是机体内产生的一种应激模式作用下的结果，是机体针对真菌毒素产生的一种解毒方式。自从1984年，Young等提出小麦中可能含有隐蔽态DON以来[15]，隐蔽态真菌毒素已逐渐为人们所认识，并引起了广大学者的重视。

Young等对小麦面粉中真菌毒素，进行间隔一年检测，发现真菌毒素中只有DON含量升高了一倍，推测小麦面粉的原始样本中可能存在另一种形式的DON，可躲避常规检测方法的检测[15]，称为隐蔽态DON。随后，Chakrabarti等就也在香蕉中发现了与脂肪酸相结合的隐蔽态真菌毒素[16]。Miller 等则认为抗性小麦之所以对镰孢菌

（*Fusarium sp.*）带来的赤霉病具有一定抵抗作用，可能部分原因就是抗性小麦具有将部分DON转化为隐蔽态DON的能力[17]。目前，研究者发现，隐蔽态真菌毒素不仅天然存在的，还可通过人工合成方法获得，隐蔽态真菌毒素可分为自然形成的和人工合成两大类。

#### 1.3.1.1 自然形成的隐蔽态真菌毒素的研究现状

除了前面所述Young等在小麦面粉中发现的隐蔽态DON和Chakrabarti等在香蕉中发现的脂肪酸结合类隐蔽态真菌毒素外，研究还发现了许多自然形成的隐蔽态真菌毒素。

Kamimura等（1986）提出，玉米赤霉烯酮在微生物转化的过程，有部分C-4位结合糖苷形成玉米赤霉烯酮-4-β-D-糖苷[18]。Engelhardt等（1988）也报道了在玉米培养基中，玉米赤霉烯酮的C-4位可结合糖苷，形成隐蔽态玉米赤霉烯酮[19]。El-Sharkawy等在1987年和1991年分别报道了玉米赤霉烯酮可在雅致枝霉中转化为玉米赤霉烯酮

-4-糖苷和玉米赤霉烯酮-2, 4-二糖苷[20-21]。并且El-Sharkaway等还于1991年报道了玉米赤霉烯酮可在根霉菌属内被转化为ZON-4-S这一硫酸盐类隐蔽态ZON[22]. Plasencia

等也报道了有硫酸盐类隐蔽态玉米赤霉烯酮（ZON-4-S）在禾谷镰刀菌中的形成[23]。

Schneweis等（2002）则指出小麦中天然存在玉米赤霉烯酮-4-β-D-糖苷[24]。Berthiller 等

（2006）经研究得出ZON可在南芥菜体内被转化为多种隐蔽态ZON，如不同构型的二己糖苷结合物、丙二酰基己糖苷结合物和戊糖基己糖苷结合物等[25]。

Eun-Kyung等从玉米片中分离纯化得到101 ng/g的隐蔽态伏马毒素（HFB1），该隐蔽态伏马毒素为FB1蛋白结合形成，101 ng/g的HFB1等同于180 ng/g的FB1[26]. Mattia等也从玉米和麸皮的样中检测到了与蛋白相结合的隐蔽态伏马毒素，其结合蛋白主要为玉米胚乳蛋白[27]。

1992年，Sewald等从玉米细胞悬液中分离出了隐蔽态DON（DON-3-G），并对它进行了结构分析[28]。2005年和2009年，Berthiller等分别从玉米和小麦中分离纯化出了DON-3-G，并通过LC-MS/MS检测分析，确定了小麦体内的隐蔽态DON含量高达1000μg/kg，该含量可使小麦体内的DON含量升高70%[29-30]. Lancova等（2008）则在麦芽啤酒中发现了隐蔽态DON-3-G[31]。随后，Kostelanska等（2009）也在啤酒和啤酒制备的中间产物中发现了DON-3-G，经LC-MS/MS对176份啤酒样品中的

DON和DON-3-G进行定量检测，发现部分样品中DON-3-G含量高于DON含量，其中最高的可达到37mg/L[32]。除已报道的糖苷类隐蔽态DON外，还存在其它隐态DON，Prelusky等就发现，泌乳期的羊可将DON在机体内转化为DON-4-S这一硫酸盐类隐蔽态DON，并经尿液排出体外，其转化率可达2%[33]。

除了为人们所熟知的隐蔽态B型单端孢霉烯族毒素外，隐蔽态A型单端孢霉烯族毒素也开始逐渐为人们所认识。Nakagawa等利用LC-Orbitrap质谱仪鉴定了商业用玉米粉中糖苷类隐蔽态DAS和糖苷类隐蔽态NES的存在，虽未明确它们的具体结构，但是已经推测，与糖苷结合位点很大可能性是在C-3位上[34]。McCormick等发现，部分酵母菌可以使受污染谷物中的T-2毒素转化代谢，糖苷类隐蔽态T2-3-G便是其中的代谢产物之一[35]。Lattanzio等则从受污染的小麦和燕麦中分离得到T2-3-G、HT2-3-G和HT2-4-G，并通过LC-MS/MS进行检测分析[36]。Busman等在拟分枝孢镰刀菌固态和液态发酵过程中，通过LC-MS/MS检测到T2-3-G和HT2-3-G的存在[37]。

#### 1.3.1.2 人工合成的隐蔽态真菌毒素

虽然自然界中广泛存在着自然形成的隐蔽态真菌毒素，但为了进一步研究隐蔽态真菌毒素的形成作用机制，人工合成隐蔽态真菌毒素便为人们所要求。目前人工合成的隐蔽态真菌毒素主要包括真菌毒素结合糖苷、蛋白、脂肪酸及硫酸盐等。1991年，

E. Savard等人工合成了8种DON-脂肪酸酯共轭物和2种DON-糖苷共轭物。脂肪酸酯共轭物中脂肪酸与DON的主要结合位点集中在C3和C15位上，而DON-糖苷结合物，则是在乙酰溴葡糖存在的条件下，通过加入酰氯和吡啶来带动反应而形成[38]。

Stevenson等利用牛的葡糖醛酸基转移酶作为催化剂，以尿苷二磷酸葡萄糖醛酸作为

辅因子，合成多种隐蔽态ZON，其中ZON-4-G和ZON-6-G糖苷结合物含量高，而ZON-2-G含量较少[39]。Wu等通过提取大鼠的肝微粒体作用于DON和糖苷类物质，反应生成DON-3-G这一糖苷类隐蔽态DON[40]. Berthiller等也成功利用人工合成方法合成了2种糖苷类隐蔽态DON, DON-3-G和DON-15-G[29]. Mikula等则利用一种快速且可再生的化学合成方法合成了ZON-14-G[41]。

Welsch等通过分别提取大鼠、小鼠、猪和人类体内的肝微粒体，利用不同肝微粒体上的酶体系催化T-2毒素与UDPGA发生反应，生成T-2糖苷结合物和HT-2糖苷结合物，并通过LC-MS/MS进行检测分析，比较不同肝微粒体作用下糖苷结合生成情况，发现生成的HT-2糖苷结合物含量高于T-2糖苷结合物，T2-3-G只在小鼠肝微粒体作用下形成，而HT-2糖苷结合物中，人肝微粒体作用下，生成的HT2-3-G含量最高，其次是大鼠、小鼠。而HT2-4-G只在猪肝微粒体作用下形成，且含量不高[42]。

免疫学检测过程中真菌毒素与蛋白结合形成隐蔽态。大部分真菌毒素为小分子物质，要对动物产生免疫效果，需要偶联大分子物质[43]。小分子真菌毒素与蛋白偶联形成的抗原属于蛋白类的隐蔽态真菌毒素。陈飞和李岩松等，利用伏马毒素与蛋白偶联分别制备得到伏马菌素B1蛋白结合物和伏马菌素B2蛋白结合物[44-45]；徐娟等在2011年成功获得了T-2毒素的蛋白结合物T-2-HS-BSA和T-2-HS-OVA[46]；马冬月和王俊双两人同时在2010年制备得到了脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素的蛋白结合物[47-48]；高璟瑜等也在赭曲霉毒素A上获得了其与蛋白的结合物[49]。

### 1.3.2 隐蔽态真菌毒素的母核结构特性及潜在危害

隐蔽态真菌毒素是真菌毒素在一定的外界环境条件下，通过与糖苷、蛋白、脂肪、硫酸盐等物质相结合而形成，通常作用位点为真菌毒素的羟基部位。如T-2 毒素的

C3位和HT-2毒素的C3和C4位都能偶联糖苷或蛋白，形成隐蔽态。部分学者认为，食源性植物体内的隐蔽态真菌毒素，是在机体针对真菌毒素产生的一种解毒模式的作用下形成的[50]。极性较低的单端孢霉烯族毒素和玉米赤霉烯酮通过与部分糖类、氨基酸及硫酸盐等极性较高的物质相结合，性质发生改变，极性升高，并暂时性的降低了真菌毒素的毒性[50]。然而，虽然真菌毒素在机体内转变为隐蔽态真菌毒素，可以暂时性的降低危害作用，但是隐蔽态真菌毒素的母核结构并未被破坏，仍然可能在机体内再次解离为前体毒素形成造成危害。Berthiller等就报道了DON-3-G在纤维素酶和纤维二糖酶以及一些乳酸菌如历久肠球菌、蒙氏肠球菌和植物乳酸杆菌的作用下，大部被水解为前体DON[51]. Berthiller等还报道指出，三氟乙酸处理能较好地将DON-3-G水解为前体DON[29]. Liu等则通过添加三氯乙酸处理含有隐蔽态DON的受污染小麦，经GC/MS检测后，发现DON含量升高了13~63%[52]. Nagl等也指出DON-3-G进入大鼠的消化道后，部分被水解为前体DON[53]。周兵则在2008年系统地阐述了解离具有赤霉病的大麦中的隐蔽态DON的方法，结果显示在酶解处理中，木瓜蛋白酶解离

效果最好，使DON含量提高了16~28%；而在酸水解处理中，以三氟乙酸的处理效果最好，DON含量升高了40%[54]。另一方面，由于隐蔽态真菌毒素性质跟真菌毒素比较变化较大，如极性发生改变等，隐蔽态真菌毒素可逃避常规检测方法的检测[55]，从而形成潜在的食品的安全问题。特别是在某些食品的加工过程中，真菌毒素很容易在外部加工环境的作用下被转化为隐蔽态真菌毒素，从而逃离检测[56-58]。这些便对隐蔽态真菌毒素的检测技术提出了更高的要求。

## 1.4 隐蔽态真菌毒素的的识别方法

目前，针对隐蔽态真菌毒素的检测方法以解离检测前体真菌毒素和分离纯化检测单一隐蔽态真菌毒素为主。

### 1.4.1 隐蔽态真菌毒素的解离检测法

目前隐蔽态真菌毒素检测，主要思路，是将隐蔽态真菌毒素解离为前体真菌毒素，降低其检测的难度，然后利用常规检测方法分析前体毒素含量的变化，从而判断可解离隐蔽态真菌毒素的含量。Liu等就是利用TCA酸水解法解离小麦中的隐蔽态DON，并用GC/MS检测了前体DON含量的变化[52]。周兵和Berthiller等则都是利用三氟乙酸和酶进行水解隐蔽态DON，并分别利用GC-ECD法和LC-MS/MS方法检测了DON含量的变化，从而确定被解离的隐蔽态DON含量[29, 51, 54]。

### 1.4.2 隐蔽态真菌毒素的纯化检测法

隐蔽态真菌毒素的检测除了通过解离检测前体真菌毒素的方法外，大多数研究思路，是通过对自然形成和人工合成的隐蔽态真菌毒素进行提取纯化，并结合目前的一些先进的检测技术进行结构分析和鉴定。

Prelusky等利用同位素标记法结合色谱分析，识别出DON在羊泌乳中部分转化为了DON硫酸盐结合物[33]。Nakagawa等利用高效液相分离和质谱法鉴定联用，确定了玉米粉中隐蔽态DAS和隐蔽态NEO的存在。Lattanzio等则利用乙腈水（86: 14）提取小麦和燕麦中的T-2糖苷结合物和HT-2糖苷结合物，并利用多功能净化柱Mycosep@ #227进行纯化，经LC-MS/MS进行检测分析得到3种糖苷结合物。

### 1.4.3 免疫磁珠酶联免疫检测技术

解离法和纯化检测法，虽然是目前检测隐蔽态真菌毒素的主流方法，但都存在着局限性。解离检测法破坏了隐蔽态真菌毒素的结构，不利于进一步的研究的进行；单一提取纯化检测只能用于识别部分隐蔽态毒素的存在，而并不能用于隐蔽态毒素的定量检测。所以，需要寻求更适合于检测隐蔽态真菌毒素的方法。免疫磁珠酶联免疫检测的提出为解决这一难题带来了新的思路。

#### 1.4.3.1 免疫磁珠

作为一种新型的纳米材料——免疫磁珠主要由磁性微球和免疫配基组成，其中磁

性微球是由具有稳定高磁性的小颗粒外围包裹一层高分子材料，并在微球最外层表面为许多活化基团覆盖（如-COOH、-OH、-NH2等基团）而形成[59]。磁性微球表面的活化基团被活化后，可与免疫配基发生共价偶联，从而形成可识别特定抗原或抗体的免疫磁性微球，该免疫磁性微球即为免疫磁珠。目前的免疫配基主要为各类抗原、多克隆抗体和单克隆抗体。

#### 1.4.3.2 免疫磁珠广泛应用于食品中外源化合物的富集和分离

免疫磁珠通过表面的抗体作用于特定目标抗原，将目标抗原连接于磁珠上，并利用流体力学的作用，实现对目标抗原的富集。富集完目标抗原的磁珠在外加磁场的作用下，发生定向移动，使得目标原与其余杂志分离，从而实现免疫磁珠对目标抗原的富集分离。根据目前的研究，免疫磁珠能够利用其表面共价连接的抗体实现在短时间内对小分子毒素、微生物、细胞和特异蛋白等物质的富集分离。免疫磁珠的富集分离功能为研究者们所衷意，王延利用免疫磁珠对葡萄球菌和沙门氏菌进行了富集分离

[60]. 牛瑞江利用免疫磁珠富集分离了沙门氏菌，并证实拥有较好的灵敏性和特异性

[61]. 而免疫磁珠在小分子毒素检测上的应用为近几年兴起，谢芳在2013年利用免疫磁珠快速富集分离酱油中的黄曲霉毒素B1[62]。免疫磁珠的应用，简化了样品的前处理过程，并提高了检测的灵敏性和特异性[63]。但是，免疫磁珠在T-2毒素及其衍生物的应用还未见报道。

#### 1.4.3.3 免疫磁珠酶联免疫检测

免疫磁珠具有强大的富集分离功能，研究者经常将免疫磁珠与其它检测方法相结合应用于检测目标物。在检测小分子毒素过程中，免疫磁珠经常与串联质谱、酶联免疫检测法等相结合。如谢芳同时用串联质谱和酶联免疫法检测了利用免疫磁珠富集的黄曲霉毒素B1[62]。然而，不管是串联质谱检测，还是酶联免疫检测，前提都是需要将目标检测物从免疫磁珠上分离下来，再进行另外的检测操作，这一定程度上增加了实验操作的复杂性，同时还会导致部分的损失。而免疫磁珠酶联免疫检测技术的存在，则解决了这些难题。

免疫磁珠酶联免疫法（*Immunomagnetic* bead ELISA, IMB-ELISA）是近年来发展起来的一种新型的分离检测技术，其起源于20世纪80代末[38]。与传统的ELISA

想比较，磁性微粒作为载体对抗体的吸附能力是酶标板的1000倍以上[64]。在传统的

ELISA中，抗体分子因被固定于酶标板表面，与抗原特异结合只能发生于酶标板表面。而在IMB-ELISA中，一方面，磁性微粒表面积大、粒径小的特点，增大了抗体与抗原的接触面积；另一方面，由于免疫磁珠是悬浮于样液之内，其抗体与目标抗原的可及性得到提高。IMB-ELISA的检测灵敏度远高于传统ELISA，加上其简便快速的操作过程，IMB-ELISA的研究越来越为人们所重视。目前，IMB-ELISA在许多领域中被应用。雷家慧在2009年建立了用基于IgY的IMB-ELISA检测日本血吸虫循环抗原

的方法[64]。邱广亮等则通过IMB-ELISA富集检测了肝癌血清的甲胎蛋白[65]。同时免疫磁珠结合ELISA方法也已被证实适合应用于检测小分子真菌毒素。刘伟伟和谢芳等就分别利用免疫磁珠结合ELISA方法富集检测了酱油和植物中的黄曲霉毒素[66-67]。可考虑将IMB-ELISA应用于检测隐蔽态的真菌毒素。

## 1.5 本课题研究内容与创新意义

### 1.5.1 研究内容

（1）T-2毒素染毒对虾对小鼠的危害识别

以T-2毒素暴露未出现物质蓄积的染毒对虾各组织匀浆液进行小鼠灌胃。检测小鼠的免疫功能指标、血清生化指标和遗传毒性指标的变化，并根据总体概率学和多维尺度分析识别染毒对虾对小鼠的损伤效应。

（2）三氟乙酸水解处理测定对虾体内的mT-2s

不同暴露剂量T-2毒素口服20d蓄积染毒对虾经有机溶剂提取，再采用三氟乙酸水解法处理，通过LC-MS/MS检测游离态T-2毒素含量变化，分析对虾不同组织内可解离的mT-2s含量，识别对虾中出现mT-2s蓄积的主要靶器官。

（3）T-2毒素母核抗原的优化制备与检测

通过化学法乙酰化T-2毒素C3位，并利用红细胞酶解液酶解乙酰化后的T-2毒素，通过多种柱色谱分离方法对乙酰化产物和酶解后的族半抗原3-Ac-NEOS进行分离纯化，并利用核磁共振和LC-MS/MS进行检测分析，确定乙酰化产物和族半抗原3-Ac-NEOS的合成。利用碳二亚胺法将牛血清白蛋白和鸡蛋清蛋白偶联在族半抗原的C8位上，得免疫原和包被原两种T-2毒素母核抗原，并用凝胶电泳和紫外扫描分析制备的两种T-2毒素母核抗原是否符合要求，为下一步的抗体制备提供可靠抗原。

（4）T-2毒素母核族抗体的制备与检测

利用前期制备的免疫原免疫新西兰种兔子，免疫一段时间后对兔子进行耳静脉取血，棋盘滴定法检测抗血清效价。当免疫效果达到要求后，对兔子进行心脏取血，并对抗血清进行纯化冻干保存。建立间接竞争酶联免疫检测法检测抗体的特异性和灵敏度，确定制备的目标抗体是否符合要求，为建立免疫检测技术提供支持。

（5）免疫磁珠间接竞争ELISA的建立及在对虾中mT-2s检测上的应用

将T-2毒素母核抗原中的包被原与磁珠相偶联，制备可识别T-2毒素母核抗体的母核抗原-免疫磁珠（T2-IMB），在此抗原-免疫磁珠和制备的多克隆抗体基础上建立可用于检测对虾体内mT-2s的免疫磁珠间接竞争酶联免疫检测方法，利用免疫磁珠间接竞争酶联免疫法可识别富集T-2毒素母核抗体的特性，通过检测mT-2s（可与T-2毒素母核抗体结合）对抗体结合T2-IMB的抑制率，间接检测mT-2s含量。将T2-IMB-ELISA应用于检测对虾体内的含有母核的毒素含量，即mT-2s的含量。

### 1.5.2 创新意义

（1）首次识别了T-2毒素经对虾食物链产生的二次危害；酸水解法证实了对虾体内

mT-2s的存在，并检测了可解离的mT-2s的含量。

（2）优化了T-2毒素母核抗体的制备，并将其应用于免疫检测技术。

（3）首次建立了可用于检测对虾体中mT-2s的免疫磁珠间接竞争ELISA。

# 2 T-2毒素染毒对虾对小鼠的危害识别

T-2毒素（C24H34O5）是分子量为466.22的倍半萜烯类化合物，全名为4, 15-二乙酰氧基-8-(异戊酰氧基) -12, 13-环氧单端孢霉-9-烯-3-醇，属于A型单端孢霉烯族毒素

[68]. 纯T-2毒素为白色针状结晶，性质稳定，不易消除，具有强毒性[69]。

可在多种农作物上生长的镰孢菌能够在一定条件下产生T-2毒素[2]。T-2毒素在谷物饲料中广泛存在[70]，其结构稳定不易被分解代谢，可通过食物链在生物间进行传递并产生危害。作为占全国产虾量15%的湛江[1]，其对虾产业就正面临着霉变饲料中T-2毒素的危害。2009年，张自强报道了广东省的饲料中T-2毒素含量在全国各省检测样中含量最高[3]。而广东的粤西港口城市湛江，因其特殊的地理气候环境，对虾饲料更容易受潮霉变，这也为虾饲料中T-2毒素的产生制造了条件[71]。T-2毒素危害对虾健康，低剂量的T-2毒素能使对虾造血和淋巴组织出现分离，肝胰腺组织出现萎缩、红肿及退化[4]，还能造成对虾免疫系统功能下降，对抗疾病的能力受抑制[5]。T-2毒素的母核结构不易被破坏[72]，在机体内容易转化为mT-2s逃避检测，并能通过食物链继续产生作用。由此可见，T-2毒素不仅危害对虾的健康，还可能通过对虾进入食物链，对其它动物产生危害。然而，目前有关T-2毒素或mT-2s通过对虾食物链进入其它动物造成危害的研究还未见报道。本章节就T-2毒素染毒对虾对小鼠的危害进行了识别。

以小鼠为对象进行危害识别试验，主要是通过小鼠的一些常规指标的变化，如免疫功能指标[73-75]、血清生化指标[76-77]、遗传毒性指标[78-81]等来判断某一物质对小鼠造成的危害。本章节试验，以T-2毒素暴露未出现物质蓄积的染毒对虾各组织匀浆液进行小鼠灌胃。分别检测小鼠的免疫功能指标、血清生化指标和遗传毒性指标的变化，根据总体概率学和多维尺度分析识别染毒对虾对小鼠的损伤效应。

## 2.1 材料与仪器

### 2.1.1 材料和试剂

**表2-1** **主要试剂与材料**

**Table** **2-1** **The main reagents and materials**

| 试剂名称 | 采购公司 |
| --- | --- |
| T-2毒素标准品（纯度＞98%）； | 美国 ENZO 公司 |
| 二甲基亚砜（DMSO）；2,4-二硝基氟苯（DNFB）； | 湛江海博生物科技 |
| 吉姆萨工作液；噻唑兰（MTT）； | 广州齐云生物公司 |
| 刀豆蛋白（ConA）；DMEM 培养基；初胎牛血清； | 广州齐云生物公司 |

### 2.1.2 仪器与设备

**表2-2** **主要仪器**

Table 2-2 The main instrument

| 仪器名称 | 仪器厂家 |
| --- | --- |
| 722 可见光分光光度计 | 上海佑科仪器仪表有限公司 |
| 冷冻离心机 | 日本日立公司 |
| CO2培养箱 | 美国 Thermo 公司 |
| 超净工作台 | 苏州净化设备厂 |
| E-330 酶标仪 | 美国 Thermo 公司 |
| 恒温水浴锅 | 上海博讯实业有限公司 |
| 电子天平 | 北京赛多利斯天平有限公司 |
| 电子显微镜 | 日本 Olympus 公司 |

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 给药方式

将对虾随机分组，每组20尾，低、中、高剂量（3、6和9 mg/kg·*m*b）T-2毒素肌肉注射染毒对虾，分别取对虾不同组织（肌肉，肠道，肝胰腺，血液）制备匀浆液。

将SPF级昆明种小鼠随机分为对照、低剂量毒虾、中剂量毒虾和高剂量毒虾灌胃4大组，在将4大组分别分为灌胃肌肉、虾肠、肝胰腺和虾血4小组。利用染毒对虾不同组织匀浆液灌胃小鼠，以5 g/kg体重剂量两次经口灌胃，对照组为健康虾匀浆液；试验期内小鼠健康饮食；饲养温度20~30℃，相对湿度40%~50%；连续灌胃7 d。

### 2.2.2 免疫功能指标的测定

#### 2.2.2.1 免疫器官指数的测定

精子致畸及微核试验所用小鼠取完精子后，迅速剪取胸腺和脾脏，用滤纸去除周围脂肪及其它组织，称重。计算免疫器官的指数，公式如下：

脾脏指数脾脏质量（mg）100% ；

小鼠体重（g）

#### 2.2.2.2 腹腔巨噬细胞的吞噬功能的检测[74]

胸腺指数胸腺质量（mg）100%

小鼠体重（g）

1）小鼠眼球采血后颈椎脱臼处死，75%乙醇浸泡1 min，无菌操作台下，用4 mL

预冷RPMI1640培养液（含肝素）灌洗腹腔。

2）洗出液离心（1500 r/min）10 min弃上清。0. 5 mL的RPMI 1640培养液（含

10%的新生胎牛血清）重悬沉淀。

3）悬液用台盼兰染色，计数活细胞数，调整细胞浓度为3\*106个/mL。

4）以每组3个重复的方式往96孔细胞板中加入100µL悬液。置CO2培养箱内，

37℃下孵育2 h。

5）去除培养液，将0.072%中性红溶液加入，每孔100µL，继续孵育1 h。

6）生理盐水洗涤2次，每孔加入200µL细胞溶解液，在20℃下摇晃混匀30 min，测定OD570nm值。

#### 2.2.2.3 淋巴细胞转化能力在ConA诱导下的变化[82-83]

1）无菌操作台上洗完腹腔后，迅速剪取脾脏，置于无菌小平皿中。

2）加入适量PBS，镊子轻撕至碎过200目筛网，过滤完后加入DMEM培养液 2

mL制备成细胞悬液。

3）显微镜下观察，并调整细胞浓度为1\*107个/mL。

4）细胞增殖：使用24孔培养板进行培养，每个处理占两孔，每孔加入1 mL细胞悬液后，将50µL ConA和双蒸水分别各加入一孔中，置CO2培养箱内（5% CO2），37℃下培养48 h，并在第44 h每孔各加入50µL MTT。

5）结束后，各加入DMSO 1 mL，吹打至完全溶解结晶紫，后转移至96孔板中，分装3孔，设为平行对照。检测OD570nm值，以ConA孔和双蒸水孔各自OD570nm值的差值表示淋巴细胞的转化能力。

#### 2.2.2.4 小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力试验[82]

灌胃7 d结束后，取高剂量对虾灌胃组进行碳廓清试验。小鼠尾静脉注射0.20

g/mL的墨汁，根据小鼠体重进行注射，剂量为0.01 mL/g。间隔2、15 min后毗静脉丛取血，取血量为20µL。用0.1 % Na2CO3溶液稀释成2 mL。分别测定OD600nm值，以0.1 % Na2CO3溶液作对照。后处死小鼠，取出肝脏和脾脏，并清除血污称量。代入公式，算出吞噬指数。

*K* lg *OD*1lg *OD*2 ,

15 2

吞噬指数 

小鼠质量

脾脏质量肝脏质量

3 K

式中：K是修止系数；*OD*1、*OD*2分别为2、15 min对应条件下的OD600nm值。

### 2.2.3 遗传毒性试验方法

#### 2.2.3.1 小鼠精子畸形试验

连续一周灌胃后，在第8天，用颈椎脱臼法处死小鼠[84]，取两侧附睾至烧杯中，

加入约1 mL的生理盐水，对附睾纵向剪2刀，精致5 min。吸取一滴于载玻片上，按照杨建英等的方法[78]进行抹片自然风干后，甲醇固定5 min风干，用1 %~2 %伊红染色1 h，蒸馏水轻轻冲洗，风干后镜检[85]。

将抹片置于100~400倍显微镜下观察。计数结构完整的500个精子[78]，按照无钩、香蕉形、胖头、无定形、尾折叠、双头、双尾几类进行分类计数，计算畸形率。

#### 2.2.3.2 小鼠骨髓微核试验

小鼠经处死取完附睾后，进行解剖，迅速剪取胸骨或股骨，按照国家标准GB

15193.5-2003骨髓细胞微核试验方法进行制片[86]，骨髓液与小牛血清混匀后抹片并自然晾干，后于甲醇中固定5 min, Giemsa应用液中染色。12 min后用配好的磷酸盐缓冲液轻冲。晾干标记后，阴凉干燥处保存。

油镜下观察。选取适宜观察位置，用双盲法阅片。嗜多染红细胞，计数1000个/只[79-80]，以千分率表示微核率含量。

### 2.2.4 小鼠血清Th化指标的测定

血清测定以下九个指标：谷丙转氨酶（ALT）、碱性磷酸酶（ALP）、总蛋白（TP）、白蛋白（ALB）、钙（Ca2+）、总胆固醇（TCHO）、甘油三酯（TG）、血尿素氮（BUN）、血肌酐（Cr）；以上指标均按试剂盒上操作方法进行处理测定。

### 2.2.5 统计学分析

用SPSS 19.0进行单因素方差分析，确定各试验组指标相对于对照组是否发生显著性变化（p<0.05），并进行显著性变化概率统计分析和多维尺度分析。

## 2.3 结果

### 2.3.1 小鼠免疫功能指标的测定

**表2-3 小鼠免疫功能指标测定结果（±s, n=6）**

**Table 2-3 The determination results of mouse immune function indexe ( ±s,n=6)**



|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 巨噬细胞 |  |  | 淋巴细胞 |  |  |
| 灌胃 |  | 碳廓清实验 | |  | 免疫器官指数 | |
| 组别 | 吞噬能力 |  |  | 转化能力 |  |  |
| 样本 | OD 值 | 碳廓清指数 | 吞噬系数 | OD 差值 | 脾脏指数 | 胸腺指数 |
| 对照 | 0.363±0.030 a | 0.017±0.001 a | 4.579±0.151 a | 0.121±0.015 a | 3.488±0.261 a | 2.442±0.383 |
| 低剂量 | 0.361±0.016 a | - | - | 0.127±0.016 a | 3.310±0.155 ab | 2.473±0.681 |
|  | 0.165±0.037 b |  |  | 0.041±0.033 b | 3.270±0.157 ab |  |
|  | - | - | 2.190±0.350 |
| 高剂量 | 0.139±0.027 b | 0.011±0.003 b | 3.342±0.340 b | 0.119±0.018 a | 3.043±0.206 b | 2.133±0.396 |
| 对照 | 0.308±0.034 a | 0.015±0.001 | 4.354±0.228 | 0.184±0.013 a | 3.578±0.566 | 2.380±0.383 |
| 低剂量 | 0.322±0.047 a | - | - | 0.199±0.053 a | 3.333±0.413 | 2.148±0.333 |
|  | 0.165±0.067 b |  |  | 0.059±0.049 b |  |  |
|  | - | - | 3.290±0.320 | 2.052±0.479 |
| 高剂量 | 0.174±0.066 b | 0.013±0.002 | 3.914±0.352 | 0.131±0.045 a | 3.213±0.265 | 1.918±0.345 |
| 对照 | 0.337±0.024 a | 0.016±0.002 | 4.449±0.050 | 0.155±0.011 a | 3.555±0.549 | 2.303±0.422 a |
| 低剂量 | 0.317±0.045 a | - | - | 0.113±0.016 b | 3.383±0.151 | 2.210±0.284 ab |
|  | 0.183±0.053 b |  |  | 0.142±0.009 ab |  | 2.108±0 .283ab |
|  | - | - | 3.310±0.426 |
| 高剂量 | 0.229±0.012 b | 0.014±0.002 | 4.234±0.175 | 0.049±0.014 c | 3.363±0.480 | 1.893±0.311 b |
| 对照 | 0.263±0.049 a | 0.016±0.001 | 4.494±0.228 | 0.274±0.052 a | 3.372±0.333 a | 2.260±0.210 a |
| 低剂量 | 0.246±0.042 ab | - | - | 0.242±0.037 a | 3.113±0.125 ab | 2.152±0.301 ab |
|  | 0.175±0.057 b |  |  | 0.224±0.011 a | 3.010±0.174 ab | 1.898±0.173 b |
|  | - | - |
| 高剂量 | 0.191±0.046 ab | 0.017±0.007 | 4.490±0.502 | 0.063±0.019 b | 2.943±0.142 b | 1.960±0.282 b |

肌肉

中剂量

肝胰腺

中剂量

肠道

中剂量

血液

中剂量

注：（1）*P*> 0. 05：差异不显著，用同肩标字母表示；p<0. 05：差异显著，用不同肩标字母表示；-：未测；

（2）n：试验动物数。下同

由表2-3可知，与对照组相比，低剂量的对虾对小鼠的巨噬细胞吞噬能力并未产生显著性影响（p> 0.05）；而中、高剂量的对虾四组织对小鼠巨噬细胞的吞噬能力都能产生显著性影响（p<0.05），吞噬能力明显减弱。

小鼠碳粒廓清指数和吞噬系数在高剂量组的对虾肌肉作用下产生显著性变化

（p<0.05）；肝胰腺组和肠道组有所下降但并不显著（p> 0.05），血液组无明显变化。淋巴细胞在刀豆蛋白诱导下形成的转化能力指标见表2-3。由表2-3可知，肌肉

和肝胰腺组中，只有中剂量的虾样与对照组相比有显著性变化（p<0.05），低、高剂量的与对照相比不存在显著性变化（p> 0.05）。肠道与血液组中，高剂量的虾样对小鼠淋巴细胞转化能力影响与对照组相比具有显著性差异（p<0.05），明显弱于对照组。

表2-3里的免疫器官指数显示，与对照组相比，大部分试验组，小鼠的脾脏指数和胸腺指数随着灌胃对虾T-2毒素暴露剂量的增加而呈下降的趋势，但下降的趋势大部分不显著（p> 0.05），其中脾脏指数只有高剂量的对虾肌肉和血液组才与对照组有显著性差异（p<0.05），而胸腺指数只有高剂量的肠道组、血液组与对照组有显著性差异（p<0.05）。

### 2.3.2 血清肝脏Th化指标的测定

**表2-4 小鼠血肝指标（±s, n=6）**



**Table 2-4 The blood routine indexes of mice ( ±s, n=6)**

灌胃样本组别

血清肝脏指标

ALP(U/L) ALT(U/L) TP(g/L) ALB(g/L)

肌肉

肝胰腺

肠道

血液

对照 110.43±13.97 54.88±7.31 56.97±4.45 31.08±1.50

低剂量 105.65±16.94 56.68±10.60 54.69±11.56 31.94±1.45

中剂量 101.24±18.70 57.87±6.25 52.54±6.27 30.60±2.63

高剂量 106.81±20.98 61.96±9.34 53.70±2.05 31.01±1.39

对照 103.08±13.77 60.81±17.38 59.55±4.44 30.85±2.29

低剂量 105.42±15.25 63.36±21.48 61.63±6.23 31.91±2.25

中剂量 99.43±15.92 65.00±14.38 60.11±4.87 31.99±3.06

高剂量 94.97±13.32 65.90±14.01 57.87±10.12 27.82±3.36

对照 108.40±17.48 61.76±16.56 57.94±3.50 30.34±3.31

低剂量 98.81±14.39 60.52±23.18 55.10±9.64 31.58±3.53

中剂量 107.75±20.76 61.60±18.63 58.85±1.91 30.94±1.55

高剂量 104.91±18.08 65.40±9.89 54.81±6.40 30.30±2. 33

对照 115.28±13.71 66.65±27.70 60.19±2.08 31.03±3.98

低剂量 107.94±19.31 69.51±21.93 57.79±8.51 33.50±3.24

中剂量 112.37±9.60 64.13±3.80 54.23±8.43 30.54±2.55

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  | 高剂量 | 106.41±12.11 | 74.71±19.78 | 55.43±6.42 | 29.53±1.88 |  |

血肝指标见表2-4。由表2-4可知，与对照组相比，不同注射剂量的对虾四个组织肌肉、肝胰腺、肠道、血液对小鼠血清肝脏生化指标虽有影响但并显著（p> 0.05）。并且各个组织之间，随着暴露剂量的增加，对小鼠的血清肝脏生化指标也并未产生显著性影响（p> 0.05）。

### 2.3.3 血清肾脏Th化指标的测定

小鼠血清肾脏生化指标及血脂指标的测定结果见表2-5。由表2-5可知，与对照组相比，血尿素氮指标发生显著性变化最为明显：在肌肉组中，高剂量虾样作用比对照组明显增强（p<0.05）；肝胰腺组中，中剂量的虾样明显强于对照组（p<0.05）；肠道组中，中、高剂量虾样的作用与对照组相比明显增强（p<0.05）；血液组中，高剂量组虾样作用明显强于对照组（p<0.05）。此外，与对照组相比，低剂量的对虾肠道使小鼠的Ca离子浓度显著增大（p<0.05）；高剂量的对虾肌肉使小鼠的总胆固醇指标显著增大（p<0.05）。

**表2-5 小鼠血肾及血脂指标（±s, n=6）**





**Table 2-5 The blood routine and serum lipid indexes of mice ( ±s, n=6)**

灌胃样本组别

血清肾脏生化指标血脂指标

Cr BUN Ca2+ TCHO TG

|  | (µmol/L) | (mmol/L) | (mmol/L) | (mmol/L) | (mmol/L) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 对照 | 54.20±5.57 | 8.21±1.10 b | 1.98±0.15 | 3.14±0.37 a | 1.08±0.23 |
| 低剂量 | 52.39±13.06 | 8.44±1.61 ab | 2.16±0.26 | 2.57±0.30 ab | 1.15±0.35 |
| 肌肉  中剂量 | 58.68±5.67 | 10.04±1.60 ab | 2.06±0.24 | 2.61±0.19 ab | 0.98±0.23 |
| 高剂量 | 60.68±15.16 | 11.60±2.33 a | 1.94±0.39 | 2.51±0.40 b | 0.89±0.13 |
| 对照 | 53.73±6.38 ab | 8.31±0.28 b | 1.81±0.22 ab | 3.21±0.18 | 1.16±0.31 |
| 低剂量 | 54.91±4.55 b | 9.86±1.40 b | 1.85±0.30 b | 2.82±0.37 | 1.11±0.20 |
| 肝胰腺  中剂量 | 63.68±6.96 ab | 12.84±1.39 a | 2.32±0.38 a | 3.01±0.26 | 1.05±0.21 |
| 高剂量 | 65.33±10.8 a | 9.35±1.24 b | 1.72±0.32 b | 2.95±0.54 | 0.95±0.18 |
| 对照 | 59.23±10.29 | 8.15±0.44 b | 1.97±0.13 b | 3.14±0.16 | 1.07±0.21 |
| 低剂量 | 60.64±7.37 | 8.80±1.56 b | 2.36±0.17 a | 2.87±0.22 | 1.05±0.16 |
| 肠道  中剂量 | 56.44±8.69 | 11.37±1.09 a | 2.09±0.11 b | 3.04±0.23 | 1.12±0.28 |
| 高剂量 | 59.21±4.31 | 11.19±1.70 a | 2.01±0.23 b | 2.96±0.28 | 0.96±0.24 |
| 对照 | 55.30±7.73 | 8.47±0.41 b | 1.74±0.20 | 3.07±0.21 | 1.21±0.23 |
| 低剂量 | 57.40±11.52 | 8.20±1.56 b | 1.82±0.20 | 2.92±0.28 | 1.09±0.20 |
| 血液  中剂量 | 54.26±8.62 | 10.19±1.48 ab | 2.04±0.27 | 3.13±0.41 | 0.98±0.16 |
| 高剂量 | 54.55±9.12 | 11.37±1. 36a | 1.85±0.20 | 3.24±0.23 | 0.97±0.25 |

### 2.3.4 小鼠精子畸形试验

小鼠经连续的一周灌胃染毒对虾后，出现畸形精子。由表2-6可知，经灌胃染毒后，总体上看，精子畸形以尾折叠和无定型畸形为最常见，其次为胖头畸形，无钩和双尾畸形比较少，香蕉型和双头最少。试验组精子畸形率均高于对照组，部分具有统计学意义，即存在显著性差异（P<0. 05）。随着对虾染毒剂量的上升，与对照组相比，低剂量灌胃组产生的精子畸形率不存在显著性差异（P> 0. 05），中剂量组中只有肝胰腺组存在显著性差异（P<0. 05）；而高剂量组中，除血组织外，其他灌胃组产生畸形率与对照组相比存在显著性差异（P<0. 05）。同剂量不同灌胃组织之间畸形率比较，发现只有高剂量的肌肉组和血液组之间存在显著性差异（P<0. 05）。同组织不同剂量试验组间畸形率比较，发现只有高剂量组肌肉与低剂量组肌肉之间存在显著性差异

（P<0. 05）。染毒对虾四个组织中，以血液组对小鼠畸形率的影响最小，没有统计学意义；肌肉、肝胰腺、肠道都存在一定的毒性作用，尤其是高剂量组作用最为显著。**表2-6小鼠精子畸形率变化（±s ）**



**Table 2-6 The rate of teratosperm of mice ( ±s)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 灌胃部位 | 组别 | 动物数  （只） | 检测 精子数  （个） | 胖头 | 折尾 | 无定型 | 无钩 | 香蕉型 | 双头 | 双尾 | 畸形 精子数  （个） | 畸形率（%） |
|  | 对照 | 6 | 3000 | 14 | 26 | 21 | 3 | 1 | 2 | 3 | 70 | 2.33±0.48 abc |
| 肌肉 | 低剂量 | 6 | 3000 | 23 | 30 | 26 | 2 | 0 | 1 | 1 | 83 | 2.77±0.66 abcd |
| 中剂量 | 6 | 3000 | 19 | 31 | 30 | 4 | 3 | 1 | 4 | 92 | 3.07±0.62bcde |
|  | 高剂量 | 6 | 3000 | 24 | 38 | 35 | 4 | 3 | 2 | 3 | 109 | 3.63±0.61 e |
|  | 对照 | 6 | 3000 | 8 | 22 | 28 | 3 | 0 | 1 | 2 | 64 | 2.13±0.52 a |
| 肝  胰腺 | 低剂量 | 6 | 3000 | 15 | 27 | 29 | 5 | 1 | 0 | 5 | 82 | 2.73±0.83 abcd |
| 中剂量 | 6 | 3000 | 16 | 33 | 30 | 5 | 2 | 3 | 5 | 94 | 3.13±0.59 cde |
|  | 高剂量 | 6 | 3000 | 20 | 34 | 31 | 4 | 1 | 1 | 4 | 95 | 3.17±0.87 de |
|  | 对照 | 6 | 3000 | 11 | 26 | 24 | 2 | 0 | 0 | 2 | 65 | 2.17±0.39 a |
| 肠道 | 低剂量 | 6 | 3000 | 19 | 27 | 27 | 4 | 1 | 1 | 1 | 80 | 2.67±0.73 abcd |
| 中剂量 | 6 | 3000 | 14 | 24 | 28 | 4 | 3 | 2 | 3 | 78 | 2.60±0.55 abcd |
|  | 高剂量 | 6 | 3000 | 22 | 35 | 29 | 5 | 2 | 2 | 2 | 97 | 3.23±0.43 de |
|  | 对照 | 6 | 3000 | 11 | 23 | 24 | 2 | 2 | 3 | 2 | 67 | 2.23±0.48 a |
| 血液 | 低剂量 | 6 | 3000 | 13 | 27 | 23 | 3 | 0 | 1 | 2 | 69 | 2.30±0.45 ab |
| 中剂量 | 6 | 3000 | 19 | 29 | 21 | 3 | 0 | 1 | 1 | 74 | 2.47±0.55 abcd |
|  | 高剂量 | 6 | 3000 | 19 | 31 | 27 | 2 | 0 | 0 | 2 | 81 | 2.70±0.60 abcd |

### 2.3.5 小鼠骨髓微核试验

由表2-7可知，与对照组相比，高剂量试验组微核出现率均显著增大（P<0. 05）；

低、中剂量肝胰腺灌胃组与中剂量肌肉灌胃组微核出现率显著性增大（P<0. 05）。同组织不同剂量试验组间微核出现率相比较，除了血液组外，其余灌胃组织中，均有高剂量组微核出现率显著高于低剂量组（P<0. 05）。同剂量不同灌胃组织之间微核出现率比较，发现高剂量不同灌胃组间均有显著性差异（P<0. 05）；中剂量组中，肝胰腺组与其它灌胃组的差异显著（P<0. 05）；低剂量组中，肝胰腺组与肠道、血液灌胃组的差异显著（P<0. 05），肌肉组与血液组的差异显著（P<0. 05）。从总体角度分析，则可发现，随着对虾染毒剂量的增大，小鼠骨髓微核出现率逐渐增大，部分存在显著性增大，其中以染毒对虾的肝胰腺和肌肉组织对小鼠骨髓微核的出现率影响最大，其次为肠道，而血液影响最小。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 灌胃部位 | 组别 | 动物数  （只） | 观察的  PCE 数（个） | 含微核  PCE 数（个） | 微核率  （‰） |
|  | 对照 | 6 | 6000 | 13 | 2.17±0.75 ab |
| 肌肉 | 低剂量 | 6 | 6000 | 22 | 3.67±0.52 bc |
| 中剂量 | 6 | 6000 | 30 | 5.00±1.41 cd |
|  | 高剂量 | 6 | 6000 | 58 | 9.67±2.34 f |
|  | 对照 | 6 | 6000 | 10 | 1.67±1.03 a |
| 肝  胰腺 | 低剂量 | 6 | 6000 | 34 | 5.67±1.37 d |
| 中剂量 | 6 | 6000 | 39 | 6.50±1.38 de |
|  | 高剂量 | 6 | 6000 | 45 | 7.50±1.05 e |
|  | 对照 | 6 | 6000 | 12 | 2.00±1.41 ab |
| 肠道 | 低剂量 | 6 | 6000 | 19 | 3.17±1.72 ab |
| 中剂量 | 6 | 6000 | 22 | 3.67±1.03 bc |
|  | 高剂量 | 6 | 6000 | 35 | 5.83±1.72 d |
|  | 对照 | 6 | 6000 | 9 | 1.50±1.22 a |
| 血液 | 低剂量 | 6 | 6000 | 12 | 2.00±1.26 ab |
| 中剂量 | 6 | 6000 | 17 | 2.83±0.98 ab |
|  | 高剂量 | 6 | 6000 | 21 | 3.50±1.64 bc |

**表2-7** **小鼠骨髓嗜多染红细胞的微核率变化（±s）Table 2-7 The changes of bone marrowcells micronucleus of mice (±s)**





### 2.3.6 小鼠检测指标显著性变化的概率统计

由图2-1可知，从总体角度统计分析，随着T-2毒素暴露剂量的升高，染毒对虾对小鼠的免疫功能指标、遗传毒性指标和血清生化指标产生显著性影响（P<0. 05）的概率增大。表明染毒对虾能对小鼠产生毒性，且毒性随着T-2毒素暴露剂量的增大而增大。图2-1显示，小鼠指标出现显著性变化（P<0. 05）以免疫功能指标和遗传毒性指标为主。其中，高剂量组的染毒对虾对小鼠的遗传毒性指标的影响最大，且四个

组织都能对小鼠产生遗传毒性作用。



**图2-1 小鼠检测指标相对于对照组发生显著性变化（P<0.05）的概率**

**Fig.** **2-1** **The probability of significant differences(P<0.05) about experimental group compared with control group**

同时，统计高剂量组染毒对虾作用下小鼠免疫功能指标和血清生化指标相对于对照组出现显著性变化（P<0.05）的概率，可得图2-2，由图我们可以了解到，染毒对虾中以肌肉组织具有的免疫毒性和血清生化毒性最强，其次为血液和肠道，肝胰腺产生的毒性较弱。



**图2-2高剂量组染毒对虾作用下小鼠免疫功能和血清生化指标出现显著性变化（P<0.05）的概率Fig. 2-2 The probability of significant differences (P<0.05) about the effect of high dose infected shrimp on immune and serum biochemical indexe of mice**

### 2.3.7 各染毒对虾免疫毒性的多维尺度分析

根据表2-3，计算各试验组与对照组之间的相对差异值（相对差异值=（试验组-对照组）/对照组），以各个相对差异值之间的绝对差值为基础，对各个试验组间在免疫功能各指标上的变化进行多维尺度分析（MDS），得到综合指标分析的二维标度分析图2-3，指标的Stress值分别为0.10，RSQ为0.97，Stress值在0.05与0.15之间，

RSQ值大于0.80，这表明MDS图能够较为准确的解释各个试验组在免疫功能指标上的关系。

从图2-3可以看出，在免疫功能指标的变化上，各试验组被分为三个组，灌胃低剂量染毒对虾四个组织的点为一个聚类组；灌胃中剂量染毒对虾的肠道、血液和高剂量肌肉、肝胰腺四个点为一个聚类组；灌胃中剂量染毒对虾肌肉、肝胰腺和高剂量肠道、血液的四个点为一个聚类组；各聚类组内点相似度较大，聚类组间相似距离较远。表明聚类组内产生的免疫毒性相近，聚类组间产生的免疫毒性相差较大。由图2-3显示，低剂量暴露染毒的对虾，不同组织内产生的毒性相近；而中高剂量暴露的染毒对虾不同组织间的毒性存在差异。结合上述对虾体内存在mT-2s的结果，表明染毒对虾不同组织内的mT-2s总类和含量存在差异。



**图2-3** **染毒对虾四组织在免疫功能方向上的多维尺度分析**

**Fig.** **2-3** **MDS on the toxic effect of different homogenate tissue of*Litopenaeus vannamei* on immune function indexes of mice**

## 2.4 讨论

### 2.4.1 染毒对虾对小鼠免疫功能的影响

非特异性免疫、细胞和体液免疫三类共同组成了机体的免疫功能。其中，非特异性免疫功能包括巨噬细胞吞噬功能和免疫器官的比值等。研究选择了细胞免疫和非特异性免疫两类免疫功能的代表性试验，其中有巨噬细胞吞噬功能试验、小鼠碳廓清试验、反映细胞免疫功能的ConA诱导的淋巴细胞转化能力试验和反映免疫器官比值的脾脏指数和胸腺指数。作为一类重要的免疫调节细胞，腹腔巨噬细胞参与机体的非特异性免疫，具有调节免疫应答的功能[88]，而衡量机体免疫功能的重要标志之一就是其的吞噬能力[87]。胸腺和脾脏作为免疫器官，其重量指数与免疫的产生密切相关，也可反映机体免疫力[74]。淋巴细胞转化现象是在淋巴细胞受外界刺激物的刺激后形成，表现出细胞代谢旺盛、蛋白质及核酸合成增加，以及细胞增大等特点。多个免疫功能指标的综合比较分析，可以更加全面的识别小鼠免疫功能所受到的影响。

试验研究表明，高剂量暴露染毒的对虾对小鼠的巨噬细胞吞噬能力产生显著影响

（P<0.05）。ConA诱导的淋巴细胞转化能力和巨噬细胞吞噬功能指标显示，中剂量暴露染毒的虾对小鼠的免疫功能产生了显著性影响。说明小鼠体淋巴细胞转化能力指标和巨噬细胞吞噬能力指标，较为敏感，产生的应答效果好。

从整体概率上分析，免疫毒性是染毒对虾的主要毒性之一，随着T-2毒素的暴露剂量越高，染毒对虾对小鼠的免疫功能造成的危害越大，其中以高剂量组对虾肌肉的毒性最大。然而染毒对虾体内却未有游离态T-2毒素被检测出，说明对虾体内可能存在mT-2s，并可经对虾食物链对小鼠产生免疫毒性作用。其次，通过对所有免疫指标的MDS分析发现，低剂量暴露的染毒对虾各组织免疫毒性相近，中剂量和高剂量暴露下染毒对虾各组织的免疫毒性却存在很大差异，可能原因是对虾不同组织内可被吸收转化的mT-2s含量和种类存在差异。

### 2.4.2 染毒对虾对小鼠血清肝脏Th化指标的影响

肝脏是动物最大的解毒器官，肝脏正常与否，对动物来说是非常重要的[76-77]。世界卫生组织推荐ALT作为分析肝功能损害的最敏感指标。一般只要有1%的肝细胞死亡，ALT浓度就可以升高一倍。同时，肝脏还是存储碱性磷酸酶的主要器官，肝脏受损伤后，碱性磷酸酶含量升高，因此碱性磷酸酶是肝脏功能检查指标之一。血清蛋白主要是在肝脏中合成，血清TP和ALB浓度也成为了肝脏功能检测指标之一[89]，当机体肝脏受损时，蛋白合成功能减弱，血清TP和ALB浓度下降。本试验中，通过利用T-2毒素注射染毒对虾不同组织的匀浆液灌胃小鼠，后经检测发现，四个血清肝脏生化指标ALT、ALP、TP、ALB，试验组相对于对照组并没有发生显著变化，各试验小组之间指标也未发生显著性变化，由此说明，小鼠的肝脏并未出现明显损伤。染毒对虾并未使小鼠的血清肝脏生化指标发生显著性变化，对小鼠的肝脏的损伤作用不显著。

### 2.4.3 染毒对虾对小鼠血脂和血清肾脏Th化指标的影响

作为机体内蛋白质代谢的主要终产物BUN和肌肉的主要代谢产物肌酐。二者主要经肾小球滤过排出体外[90]。肾功能损伤早期，血尿素氮和血肌酐一样，浓度变化不大，但当肾小球滤过率下降至正常的50%以下时，二者的浓度才迅速升高。肾功能的损伤会导致血清中尿素氮和肌酐浓度上升。血中有生理活性Ca2+属胞外钙，约一半主要与清蛋白结合，经肾排出，当肾功能受损时，血中Ca2+会受到影响[91]。本试验中，中高剂量暴露下，染毒对虾使小鼠的血肾指标发生了变化，其中以血尿素氮的变化最为明显，而血肌酐虽然变化并不显著，但在肌肉和肝胰腺组中出现上升趋势；而钙离子浓度随注射剂量的增加虽出现了先升后降的趋势，但是变化不显著，说明染毒的对虾对小鼠的肾脏功能产生一定毒性效应，降低了小鼠肾脏功能，但不能判断是否出现损伤。

血脂是研究机体内脂类代谢的一个重要窗口，其主要包括甘油三酯、胆固醇、磷

脂等[92]。其中总胆固醇（TC）和甘油三酯（TG）主要以脂蛋白的形式存在并运输，TC和TG的浓度可作为机体脂类代谢的标志[92-93]。本试验中，总胆固醇和甘油三酯检测指标除了T-2毒素高剂量暴露组对虾肌肉使小鼠总胆固醇含量出现显著性下降外，其他染毒试验组都未出现指标显著性变化，间接说明了肝脏和肾脏功能虽有下降但未出现显著性损伤。

### 2.4.4 染毒对虾对小鼠的遗传毒性

精子畸形指的是精子形状出现异常及异常数量的增多[81, 94]。正常在人类或哺乳动物的精液中只存在少量的畸形精子[94-95]。然而，由于生殖系统对某些外源物质（如化学和真菌毒素）的敏感性，生殖系统容易受外源物质的影响，使得雄性动物精液内精子的畸形率发生改变[95]。因此，哺乳动物精子畸形率高低的检测指标，可以反映外源化合物的生殖毒性及其可能具有的致突作用。在我国，小鼠精子畸形试验已经作为评价食品、药品对雄性动物遗传毒性的重要指标[86]。本试验结果显示了染毒对虾的不同组织的精子致畸作用不同，其中肌肉、肝胰腺和肠道产生的影响显著，尤以高剂量组作用明显，为产生精子致畸毒性的主要部位，同时精子致畸率与染毒对虾的暴露剂量呈正相关，表明了对虾体内的T-2毒素具有一定的遗传毒性。

微核（Micronucleus MCN），是位于真核细胞中独立于主细胞核的一类核小体，是真核细胞中的一种异常结构，当真核细胞中染色体发生部分丢失或断裂时，染色体在细胞有丝分裂后期时，无法进入子代细胞的细胞核，而在间期子代细胞浆中形成不规则核小体[95-97]。骨髓嗜多染红细胞的微核率间接体现染色体畸变发生率的高低，体现染色体的受损伤情况，是目前检测受试物是否具有遗传毒性的常用遗传学方法之一

[86, 95]. 本试验中，高剂量染毒对虾对小鼠的微核的影响显著，染毒对虾的暴露剂量与

微核出现率也呈现一定的剂量反应关系，表明染毒对虾对小鼠染色体的畸变产生作用，具有一定的遗传毒性。而染毒对虾各组织中以肌肉和肝胰腺的产生的影响最为明显，其次为肠道。

从总体概率学角度分析结果也表明了染毒对虾体内可能存在有可被小鼠吸收转化为T-2毒素的mT-2s，并能够对小鼠的遗传特性产生危害，染毒对虾的遗传毒性随着T-2毒素暴露剂量的增大而增强。

## 2.5 小结

T-2毒素暴露未出现物质蓄积的染毒对虾对小鼠具有免疫毒性和遗传毒性，而对小鼠肝毒和肾毒损伤效应较弱。

未出现物质蓄积的染毒对虾具有的遗传毒性和免疫毒性随着T-2毒素暴露剂量的增大而增强，表明了对虾体内含有mT-2s，并且可通过对虾食物链，对小鼠产生危害。

染毒对虾不同组织对小鼠产生的危害不同，表明对虾不同组织中存在的mT-2s

的总类和含量存在差异。

# 3 三氟乙酸水解处理测定对虾体内隐蔽态T-2毒素

在现有的隐蔽态真菌毒素的研究中，隐蔽态真菌毒素被定义为了一类不易被提取，可逃避常规方法检测，在动物机体或食品加工过程中，可被解离为前体真菌毒素的一类真菌毒素转化物[14]。隐蔽态真菌毒素通常是由极性较低的真菌毒素与较高极性的物质，如糖类、氨基酸、脂肪酸和硫酸盐等相结合，自身性质发生改变，从而逃避提取与检测[30]。作为隐蔽态真菌毒素中的一类，mT-2s也具备这些性质。前面的研究背景中已经提到，隐蔽态真菌毒素在一定的外界条件作用下，可被解离为前体真菌毒素。其中酸水解解离隐蔽态真菌毒素，就是一类主要的解离方法。目前，酸水解法解离隐蔽态真菌毒素的研究主要集中在解离隐蔽态DON的研究上，如Liu等利用TCA水解小麦种的隐蔽DON，释放了13-63%的DON[45]；周兵也利用TCA水解处理了小麦种的隐蔽态DON，释放了28%左右的DON，并在此基础上，优化了用三氟乙酸水解处理小麦中的隐蔽态DON[47]。而针对mT-2s的酸解离研究却未见报道。

在酸解离方法中，三氟乙酸沸点低，酸性强于三氯乙酸，且易溶于有机溶剂[47]。三氟乙酸具有比三氯乙酸更适合用于解离隐蔽态真菌毒素的优势，周兵的优化试验中已经证实三氟乙酸对隐蔽态DON的解离效果比三氯乙酸效果好[47]。不同暴露剂量T-2毒素口服20d蓄积染毒对虾，用LC-MS/MS未检测到T-2毒素和T-2毒素的主要代谢产物HT-2毒素，表明了T-2毒素在对虾体内并未被转化为其他同族毒素[8]。考虑到mT-2s的存在，推测T-2毒素在对虾体内被转化为mT-2s逃避检测。本章节试验对不同暴露剂量T-2毒素口服20d蓄积染毒对虾进行有机溶剂提取，再采用三氟乙酸水解法处理不同组织部位的匀浆提取液和残渣，LC-MS/MS分别检测解离出的前体T-2毒素的含量。间接得出对虾中可解离mT-2s的量。

## 3.1 材料与仪器

### 3.1.1 试剂与药品

**表3-1** **主要试剂与材料**

**Table** **3-1** **The main reagents and materials**

| 试剂名称 | 采购公司 |
| --- | --- |
| T-2毒素标准品（纯度 ≥98%） | 美国 ENZO 公司 |
| 2,4-二硝基氟苯（DNFB）；二甲基亚砜（DMSO） | 湛江海博生物科技 |
| 乙腈，甲醇（一级色谱纯）；乙酸铵 | 广州齐云生物公司 |
| 三氟乙酸 | 广州齐云生物公司 |

### 3.1.2 实验仪器

**表3-2** **主要仪器**

**Table** **3-2** **The main instrument**

| 仪器名称 | 仪器厂家 |
| --- | --- |
| TSQ Quantum Access 液相色谱-质谱联用仪 | 美国 Thermo Scientific 公司 |
| 冷冻离心机 | 日本日立公司 |
| 涡旋震荡仪 | 美国 Heidolph 公司 |
| 超声波仪 | 美国 utoscience 公司 |
| Jnc 氮吹仪 | 德国 Organomation Assiciates 公司 |
| 恒温水浴锅 | 上海博讯实业有限公司 |
| 电子天平 | 北京赛多利斯天平有限公司 |
| T25均质机 | 德国 IKA 公司 |

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 凡纳滨对虾的染毒

20 d口服蓄积染毒，参考代喆（2013）对虾染毒方式进行染毒凡纳滨对虾[7]，饲料中T-2毒素的含量分别设为0、1.2、2.4、4.8、12.2 mg/kg，染毒20 d后，用冰麻醉对虾，抽血，解剖，称重，－80℃保存。

### 3.2.2 对虾样品前处理

取出已解剖的各剂量组染毒虾样，以三尾为一平行，各设三个平行。对每个平行进行样品前处理，处理方法参考施琦（2013）对凡纳滨对虾不同组织部位内T-2毒素的提取[8]。

血样品处理每个平行血样，用6 mL乙酸乙酯进行溶解，涡旋振荡10 min，离心5 min（4000 r/min），分离并保存上清液和残渣，三次重复，合并上清提取液。

虾头、虾壳和肌肉样品前处理分别取染毒虾样的虾头、虾壳和肌肉，各加入10 mL乙酸乙酯，剪碎，10 000 r/min均质1 min, 10 mL乙酸乙酯清洗刀头，合并于匀浆液中，分别超声并振荡10 min，后离心（4 000 r/min, 10 min）取上清。残渣再

加入15 mL乙酸乙酯超声振荡离心取上清，重复2次，合并乙酸乙酯上清提取液，并保留残渣管。

肝胰腺样品处理分别取染毒虾样的肠道和肝胰腺，加入10 mL乙酸乙酯剪碎，分别超声振荡10 min，后离心（4 000 r/min, 10 min）取上清，重复三次，合并上清，并保留残渣管。

分别从上述的提取液中各取出1/10，氮吹浓缩，保存于－20 ℃，待与三氟乙酸

处理样一起进行LC-MS/MS方法检测T-2毒素含量。

### 3.2.3 三氟乙酸水解处理虾样提取液与残渣的方法

分别将各提取液氮吹浓缩至近干（呈现油状），后用1 mL乙酸乙酯复溶。将复溶后的提取液与残渣分别转入对应标记的可耐高温高压的反应瓶中，分别往反应瓶中加入一定浓度的三氟乙酸溶液（乙酸乙酯：水=9: 1作为溶剂）10 mL，在选定的温度和时间条件下反应，反应完成后放置室温冷却2h，分别加入10 mL乙酸乙酯转入50 mL离心管中，超声并振荡10 min，后离心（4 000 r/min, 10 min）取上清，并重复三次操作，合并上清，氮吹浓缩－20℃保存，后用LC-MS/MS方法检测保存样中T-2毒素含量。

### 3.2.4 三氟乙酸水解处理条件的优化

三氟乙酸的优化试验参考周兵的三氟乙酸处理条件进行选择[47]。并以最高染毒剂量组的对虾肝胰腺的提取液和残渣作为样本，进行优化试验。每个处理样各设三个平行，并以含水10%的乙酸乙酯代替三氟乙酸溶液处理样品作为空白对照。

#### 3.2.4.1 三氟乙酸使用浓度的优化

以90%的乙酸乙酯作为溶剂，分别配制1.0、1.5和2.0 mol/L的三氟乙酸溶液，各取10 mL加入到已加入提取样和残渣样的反应瓶中，130℃下反应1 h，反应完成后放置室温冷却2 h，分别加入10 mL乙酸乙酯转入50 mL离心中，超声并振荡10 min，后离心（4 000 r/min, 10 min）取上清，并重复三次操作，合并上清，氮吹浓缩-20℃保存，后用LC-MS/MS方法检测保存样中T-2毒素含量。

#### 3.2.4.2 三氟乙酸水解反应时间的优化

配制优化好浓度后的三氟乙酸溶液，取10 mL加入到放置完样品的反应瓶，分别在110、120、130、140和150 ℃下反应1 h，并经上述一样的后续处理后，LC-MS/MS方法检测保存样中T-2毒素含量。

#### 3.2.4.3 三氟乙酸水解反应温度的优化

将10 mL优化浓度下的三氟乙酸溶液加入到已放置完样品的反应瓶中，置于优化温度下，分别反应30、50、70、90 和110 min，取出并进行同上的后续处理后，检测样品中T-2毒素含量。

### 3.2.5 LC-MS/MS检测

LC-MS/MS检测三氟乙酸处理前后样品中T-2毒素的含量。上机前将浓缩的样品用1mL的甲醇-水（3: 7）复溶，并过0.22µm的滤膜。LC-MS/MS检测的试验条件和方法参考施琦（2013）建立的检测对虾体内T-2毒素的方法[8]。

## 3.3 结果

### 3.3.1 T-2毒素的LC-MS/MS检测质谱条件

以全扫描模式（full scan）对检测样品和标准品进行检测。而如图3-1所示的是T-2毒素的总离子流图（total ion current），通过对处于的某一质量范围的离子强度进行相加而得到，比如图中所示T-2毒素的保留时间为5.37min，这一结果与施琦（2013）报道的结果相近[8]。



**图3-1** **检测T-2毒素的总离子流图**

**Fig.** **3-1** **Total ion chromatogram of T-2 toxin**

### 3.3.2 三氟乙酸水解处理对虾体内mT-2s的条件选择

由下三个图可知（图3-2、图3-3、图3-4）可知，对虾上清样的处理条件为1.5 mol/L

的三氟乙酸在130 ℃下反应50 min，残渣样的处理条件为2.0 mol/L的三氟乙酸在

130℃下反应70 min。

#### 3.3.2.1 三氟乙酸水解浓度选择

由图3-2可知，1.5 mol/L三氟乙酸作用下，对虾上清样中T-2毒素的增量最大；

2.0 mol/L三氟乙酸作用下，对虾残渣样中T-2毒素的增量最大。



**图3-2 不同浓度三氟乙酸处理下每尾虾内T-2毒素的增加量**

**Fig.** **3-2** **Increment of T-2 toxin in shrimp under different concentrations of TFA**

#### 3.3.2.2 三氟乙酸水解时间选择

用1.5 mol/L乙酸三氟处理上清样和2.0 mol/L乙酸三氟处理残渣样，130℃下反应不同时间，得T-2毒素增量如图3-3所示，上清样的T-2毒素增量在50 min达最大，残渣样的T-2毒素增量在70 min达到最大。



**图3-3 三氟乙酸不同处理时间下每尾虾内T-2毒素的增加量**

**Fig.** **3-3** **Increment of T-2 toxin in shrimp under different action time of TFA**

#### 3.3.2.3 水解温度选择

确定上清样和残渣样各自的三氟乙酸处理浓度和时间后，在此基础上优化反应温度，得结果如图3-4所示，上清样和残渣样都在130℃处，T-2毒素增量达到最大。



**图3-4 不同温度处理条件下每尾虾内T-2毒素的增加量**

**Fig.** **3-4** **Increment of T-2 toxin in shrimp under different action temperature of TFA**

### 3.3.3 染毒对虾体内可解离mT-2s含量的测定

上清处理样检测结果，如图3-5所示，通过对图3-5上的柱形进行比较，我们可得出，经三氟乙酸水解处理之后，染毒对虾的上清提取样中，虾头、肌肉、肝胰腺和血液中有mT-2s被解离出来，且被解离的mT-2s的量与对虾的染毒剂量呈正相关，其

中以12.2 mg/kg剂量组中T-2毒素的增量最大，肝胰腺内所解离出来的T-2毒素含量最高。虾壳中则并未有被解离的mT-2s，肌肉也只在最高剂量组中检出。

残渣处理样中。肝胰腺、肌肉和虾头残渣中解离出了T-2毒素。图3-6，同样也显示在虾壳残渣内未检测到有mT-2s被解离。其中以12.2 mg/kg剂量组肝胰腺中解离的mT-2s含量最高。



**图3-5 三氟乙酸水解处理下染毒对虾不同组织部位上清样中T-2毒素的增量**

**Fig.** **3-5** **Increment of T-2 toxin in extract for different shrimp tissues with the acton of TFA**



**图3-6 三氟乙酸水解处理下染毒对虾不同组织残渣样中T-2毒素的增量**

**Fig.** **3-6** **Increment of T-2 toxin in residue for different shrimp tissues with the acton of TFA**

## 3.4 讨论

利用三氟乙酸水解处理对虾体内的mT-2s的过程中，针对上清样和残渣样有不同的水解条件。残渣样中，具有许多杂质，如蛋白质，糖类和脂类物质等，它们可能在

一定程度上阻碍着三氟乙酸水解mT-2s，所以才得出水解残渣样的三氟乙酸浓度要高于水解上清样的三氟乙酸浓度。

经三氟乙酸水解处理后，根据不同处理样中T-2增量大小的变化，我们可以确定染毒对虾体内存在mT-2s。不同暴露剂量下，不同组织内的mT-2s含量也具有明显的差异。肝胰腺作为对虾体内主要的解毒组织，可通过部分T-2毒素转化为mT-2s来达到暂时降低T-2毒性的目的[30]，因此染毒对虾肝胰腺内出现大量可被解离的mT-2s。并且这种解毒模式下形成的mT-2s还可经对虾的血液循环系统进入对虾血液和肌肉组织，这也同时解释了在血液和肌肉样中有mT-2s被解离的原因。

在虾头和肝胰腺的上清处理样和残渣处理样中，都有mT-2s被解离检测到，说明了虾头和肝胰腺中的mT-2s部分可被有机溶剂提取；而在肌肉、肝胰腺和虾头的残渣中有T-2毒素被检出，说明，残渣组织内存在有不易被有机溶剂提取的mT-2s，有机溶剂提取法的对mT-2s的提取不完全。

## 3.5 小结

受不同暴露剂量T-2毒素口服20 d蓄积染毒的对虾体内存在mT-2s; mT-2s主要集中在对虾的肝胰腺、血液、肌肉、虾头中，高剂量组的虾头也有部分mT-2s被解离出，且对虾体内的mT-2s的量与对虾的染毒剂量呈正相关。肝胰腺为可解离mT-2s含量最高的部位。

# 4 T-2毒素母核完全抗原的合成与鉴定

上一章节我们通过三氟乙酸解离检测到了对虾体内的mT-2s，证实了对虾体内mT-2s的存在。三氟乙酸水解检测mT-2s的方法虽然证明了mT-2s的存在，但是酸水解过程破坏了mT-2s的结构，不利于后续研究的进行；同时，用三氟乙酸水解对虾体内的mT-2s，解离程度不明，结果的准确性未得到很好的确定。因此为了进一步对mT-2s进行检测和研究，便需要我们去寻找一种可以在不破坏mT-2s结构的前提下分离纯化并检测mT-2s的方法。

研究背景已指出mT-2s具有特殊的“隐蔽”性，可逃避常规方法的分离检测[30]。在不破坏和解离mT-2s结构的前提下，想要对mT-2s进行检测，考虑可以将免疫磁珠酶联免疫法应用于检测对虾体内的mT-2s。

免疫磁珠酶联免疫法同时具备有富集分离和检测目标物的功能，且检测准确性和灵敏度高（具体见第六章节），适合运用于检测mT-2s。而将免疫磁珠酶联免疫法运用于检测对虾体内mT-2s的前提就是制备一种可以识别mT-2s的抗体。mT-2s是T-2毒素与其它物质的共轭结合物，母核未被破坏，mT-2s与T-2毒素一样具有T-2毒素母核结构（图4-1），可考虑制备一种可特异性识别这一母核结构的抗体来对mT-2s产生识别。制备一种可识别某一类具有共性结构的小分子毒素的多克隆抗体，基本思路是针对这类毒素的共性母核结构设计一种可暴露母核结构特性的族半抗原，由该半抗原偶联载体蛋白制备免疫原，通过免疫兔子等常规实验动物，制备得目标多克隆抗体[98-100]。本章节内容，便是制备这种暴露了T-2毒素母核结构特性，并能使动物产生免疫的T-2毒素母核完全抗原，为后期T-2毒素母核多克隆抗体的制备提供支持。



**图4-1** **T-2毒素及其母核结构**

**Fig.** **4-1** **The mother nucleus structure of T-2 toxin**

T-2毒素作为A型单端孢霉烯族中最常见且毒性最大的毒素[101]，具有严格的特征母核结构（图4-1），性质稳定，通过对T-2毒素C8位侧链基团进行羟基化修饰，

可以降低T-2毒素的特异性，凸显出T-2毒素母核结构，进一步与蛋白偶联，即可形成具有母核免疫原性的T-2毒素母核完全抗原。目前，Wei R D等已经通过肝脏S9溶液酶解法成功制备了3-Ac-NEOS，并确认其可作为暴露T-2毒素母核的半抗原，与牛血清白蛋白偶联所得的免疫原具有很好的免疫效果[102-103].3-Ac-NEOS的形成就是通过修饰T-2毒素C8位基团，来暴露T-2毒素母核特性。然而该方法和制备过程复杂且产物种类较多，增大了半抗原的分离纯化难度。本章节试验中，对该族半抗原3-Ac-NEOS的制备过程进行了优化，利用同样可作用于毒素母核C8位基团的大鼠红细胞酶解液[104]代替猪的肝脏S9溶液进行酶解反应，多种柱色谱共同分离纯化得到半抗原，并以核磁共振和LC-MS/MS方法进行检测。半抗原偶联蛋白，紫外扫描法法和凝胶电泳分析确定完全抗原的合成，并计算抗原的偶联比，为下一步多克隆抗体的制备提供可靠的免疫原和包被原。

## 4.1 材料与仪器

### 4.1.1 材料与试剂

**表4-1** **主要试剂与材料**

**Table** **4-1** **The main reagents and materials**

| 试剂名称 | 采购公司 |
| --- | --- |
| T-2毒素标准品（纯度 ≥98%） | 美国 ENZO 公司 |
| 醋酸酐；吡啶；二甲基亚砜（DMSO） | 广州齐云生物公司 |
| 乙腈；甲醇；丙酮；氯仿；乙酸乙酯 | 湛江海博生物科技 |
| 大孔树脂；硅镁吸附剂；柱层析硅胶 | 广州齐云生物公司 |

### 4.1.2 仪器和设备

**表4-2** **主要仪器**

**Table** **4-2** **The main instrument**

| 仪器名称 | 仪器厂家 |
| --- | --- |
| Z 系列层析柱 | 上海沪西分析仪器厂有限公司 |
| 核磁共振仪 | 美国 Varian 公司 |
| 涡旋震荡仪 | 美国 Heidolph 公司 |
| 旋转蒸发仪 | 日本岛津有限公司 |
| Jnc 氮吹仪 | 德国 Organomation Assiciates 公司 |
| 恒温水浴锅 | 上海博讯实业有限公司 |
| 电子天平 | 北京赛多利斯天平有限公司 |

## 4.2 实验方法



**图4-2** **T-2毒素母核完全抗原的合成路线**

**Fig.** **4-2** **Synthetic route of antigen on the mother nucleus structure of T-2 toxin**

### 4.2.1 T-2毒素乙酰化

在具塞试管中加入10 mg T-2毒素、1 mL嘧啶和2 mL醋酸酐，室温下振荡反应2 h，反应完成后，取出氮吹浓缩，后加入3 mL乙醇，混匀并进行70℃加热氮吹浓缩，浓缩液进行硅胶过柱。以100 mL正己烷洗柱，以正己烷：乙酸乙酯（50: 50）作为洗脱剂进行洗脱。洗脱液浓缩结晶，－20℃保存，部分进行质谱检测。

### 4.2.2 半抗原3-Ac-NEOS的合成

根据Johnsen H等的红细胞酶解法[101]制备小鼠红细胞酶解液，取制备的3-Ac-T-2毒素加入到1 mL二甲基亚砜和1 mL乙醇混匀得A液，后往A液里加入3 mL红细胞酶解液，调节pH至7.4-7.5之间，放置37℃培养箱中乳化2 h。乳化完成后，进行适当氮吹浓缩。浓缩液先进行离子交换柱层析，以大孔树脂作为吸附剂，以丙酮作为洗脱剂，用150 mL丙酮进行洗脱，对洗脱液进行旋转蒸发浓缩，浓缩到一定体积后，移入试管中，进行氮吹浓缩，浓缩完成后用蒸馏水复溶，并用20 mL三氯甲烷进行四次萃取，萃取液进行浓缩后再次用硅镁吸附剂进行过柱，分别用30 mL CHCl3，25 mL CHCl3（含甲醇1%），25 mL CHCl3（含甲醇2%），25 mL CHCl3（含甲醇3%）进行逐步洗脱。对洗脱液氮吹浓缩结晶，核磁共振进行结构检测，并同时进行质谱检测，以此确定3-Ac-NEOS结构。

### 4.2.3 T-2毒素母核抗原的合成

#### 4.2.3.1 3-Ac-NEOS-HS的制备

通过琥珀酸酐法在制备的族半抗原C8位引入连接臂。将4 mg 3-Ac-NEOS与80

mg琥珀酸酐混合溶于2 mL吡啶中，参考徐娟等的琥珀酸酐法进行构建连接臂[46]。

#### 4.2.3.2 偶联蛋白制备完全抗原

制备免疫原3-Ac-NEOS-HS-BSA.0. 2 mL的DMF中溶解3 mg 3-Ac-NEOS-HS，制得A液；25 mL蒸馏水中溶解6 mg牛血清白蛋白、4 mg EDC，制得B液。将A液加入B液，边滴边搅拌；AB液混匀后，加0.8 mg EDC，调pH至5.5。室温下连续搅拌24 h，后用0. 01 mol/L, pH7. 4的PBS溶液透析5 d，每天换液一次，4℃下透析。透析完成后，分装冷冻干燥。包被原3-Ac-NEOS-HS-OVA制备同上。

#### 4.2.3.3 完全抗原的检测与偶联比计算

适当稀释3-Ac-NEOS，3-Ac-NEOS-HS，BSA，OVA和T-2毒素母核完全抗原，进行紫外扫描和凝胶电泳，通过紫外扫描特征峰值和电泳条带的差异来进行偶联成功与否的判定，并计算偶联比。取同一波长时各自的吸光度和浓度，根据公式（1）计算摩尔吸光系数。

ε= A / (C \* L) (1)

式中：c-样品浓度(mol/L)；A为吸光度；ε为摩尔吸光系数(L/(mol**.** cm))；L为石英皿厚度(1cm)。利用式（2）估算3-Ac-NEOS与BSA、OVA的分子数之比，即偶联比[46]。

偶联比= (ε 偶联物-ε 载体蛋白) / ε 半抗原 (2)

## 4.3 结果

### 4.3.1 3-乙酰基-T-2毒素的质谱鉴定

质谱扫描模：ESI（+）；其余检测条件参考施琦（2013）检测T-2毒素的条件进行设定[8]。检测结果如下图所示。

由图4-4可知，检测所得的最强离子峰的m/z为526.66 [M+18] +，与目标产物3-Ac-T-2毒素的理论分子量（MW=508）相符，为目标检测物3-Ac-T-2，该物质的保留时间由图4-3可知为5.21 min。



**图 4-3** **乙酰化T-2毒素的总离子流图**

**Fig.** **4-3** **Total ion chromatogram of 3-Ac-T-2 toxin**



**图 4-4** **乙酰化T-2毒素的的质谱图**

**Fig.** **4-4** mass spectrum of **3-Ac-T-2 toxin**

### 4.3.2 母核半抗原3-Ac-NEOS的结构鉴定

由图4-5可得3-Ac-NEOS的保留时间为3.36 min，图4-6则显示一级质谱检测最

强峰442.45 [M+18] +符合已知3-Ac-NEOS的理论分子量（MW=424），并且从图4-6的二级质谱图，可以看到有明显区别于m/z同为442的HT-2的子离子峰305.03[8]。另一方面，由图4-8这一H-NMR图也显示了目标检测物3-Ac-NEOS所特有三个

乙酰基特征峰（分别位于C3，C4和C1上），图4-8显示的在2.024, 2.182和2.246分别具有较强的峰，即为目标产物3-Ac-NEOS三个乙酰基特征峰，并且在4.122出现峰，为C8位羟基所产生，与文献相符合[102]。

因此综上证实目标半抗原3-Ac-NEOS合成。且通过质谱和核磁谱图可知，谱图杂质峰很少，纯度较高。



**图 4-5** 3-Ac-NEOS**的总离子流图**

**Fig.** **4-5** **Total ion chromatogram of 3-Ac-NEOS**



**图 4-6** 3-Ac-NEOS**的一级质谱图**

**Fig.** **4-6** The primary mass spectrogram of **3-Ac-NEOS**



**图 4-7** 3-Ac-NEOS**的二级质谱图**

**Fig.** **4-7** The secondary mass spectrogram of **3-Ac-NEOS**



**图 4-8** 3-Ac-NEOS**的1H-NMR 图**

**Fig.** **4-8** The **1H-NMR of 3-Ac-NEOS**

### 4.3.3 3-Ac-NEOS-HS与蛋白的偶联

由图4-9可以看出，3-Ac-NEOS的紫外吸收峰在194 nm左右，3-Ac-NEOS-HS的紫外吸收峰在196 nm 左右，BSA 的紫外吸收峰在273 nm，偶联 物

3-Ac-NEOS-HS-BSA 的紫外吸收峰在277 nm 左右，发生偏移，BSA 上偶联了

3-Ac-NEOS，表明半抗原3-Ac-NEOS 连接到了载体蛋白上，全抗原合成成功。

3-Ac-NEOS-HS-BSA和BSA的最大吸收峰分别在波长277 nm和273 nm处。并且经偶联比计算得3-Ac-NEOS与BSA的偶联比是8.76: 1.



A.3-Ac-NEOS b. 3-Ac-NEOS-HS c. BSA d. 3-Ac-NEOS-HS-BSA

**图 4-9** 3-Ac-NEOS**、3-Ac-NEOS-HS、BSA和3-Ac-NEOS-HS-BSA的紫外扫描图谱**

**Fig.** **4-9** UV **Spectra of 3-Ac-NEOS, 3-Ac-NEOS-HS, BSA and 3-Ac-NEOS-HS-BSA**

由图4-10可以看出，3-Ac-NEOS的紫外吸收峰在194 nm左右，3-Ac-NEOS-HS的紫外吸收峰在196 nm左右，OVA的紫外吸收峰在274 nm，偶联物3-Ac-NEOS-HS-OVA 的紫外吸收峰在282nm 左右，向右发生了偏移，表明半抗原

3-Ac-NEOS连接到了载体蛋白上，全抗原合成成功。3-Ac-NEOS-HS-OVA和OVA的最大吸收峰分别在波长282 nm和274 nm处。计算得3-Ac-NEOS与OVA的偶联比是

7.24: 1.

A.3-Ac-NEOS b. 3-Ac-NEOS-HS e. OVA f. 3-Ac-NEOS-HS-OVA



**图 4-10** 3-Ac-NEOS**、3-Ac-NEOS-HS、OVA和3-Ac-NEOS-HS-OVA的紫外扫描图谱**

**Fig.** **4-10** UV Spectra of 3-Ac-NEOS, **3-Ac-NEOS-HS, OVA and 3-Ac-NEOS-HS-OVA**

对3-Ac-NEOS-HS与蛋白的偶联物进行电泳分析，结果见图4-11. 由图4-11可以看出，3-Ac-NEOS-HS-BSA位略高于BSA，偶联物3-Ac-NEOS-HS-BSA分子量略大于BSA分子量66.446KDa，说明3-Ac-NEOS-HS-BSA偶联成功。同样的，3-Ac-NEOS-HS-OVA位略高于OVA，偶联物3-Ac-NEOS-HS-OVA分子量大于OVA

分子量45KDa，进一步说明了3-Ac-NEOS-HS-OVA偶联成功。



**图 4-11** **聚丙烯酰胺电泳图谱**

**Fig.** **4-11** **SDS-PAGE of BSA, 3-Ac-NEOS-HS-BSA, OVA and 3-Ac-NEOS-HS-OVA**

## 4.4 讨论

T-2毒素属于倍半萜烯类化合物，具有A型单端孢霉烯族毒素特征母核结构，若将其特征部位C8位基团进行修饰，并对C3位羟基进行乙酰化修饰保护，就可所得暴露出T-2毒素母核结构的族半抗原3-Ac-NEOS。作为小分子物质3-Ac-NEOS，本身不具有免疫原性，不能像细菌等天然抗原一样可单独用于动物免疫，刺激其产生特异性抗体[105]。因此，获得族完全抗体的还需是将3-Ac-NEOS族半抗原与蛋白质大分子偶联，转变成T-2毒素母核完全抗原。本试验采用琥珀酸酐法和碳二亚胺法制备族完全抗原，即免疫原3-Ac-NEOS-HS-BSA和包被原3-Ac-NEOS-HS-OVA，以备进一步免疫家兔制备族完全抗体。

抗体对半抗原产生的特异性不仅取决于半抗原整个分子或部分结构的性质，还与完全抗原中蛋白载体上连接的半抗原数目有关，因此，需要计算蛋白载体上半抗原的偶联数目，即通过检测半抗原与载体蛋白的偶联比。一般情况下，抗原要具备有免疫原性，并可用于免疫，偶联比需要达到（3~45）：1 ，达到（8~25）：1 时能得到效价较高的抗体[106]。本试验合成的人工抗原3-Ac-NEOS-HS-BSA和3-Ac-NEOS-HS-OVA的偶联比为8.76: 1和7.24: 1，免疫原达到要求，且能产生效价较高的抗体，包被原偶联比也接近8，达到了使用要求，可用于免疫学试验。

## 4.5 小结

经核磁共振和质谱表征，证明目标半抗原3-Ac-NEOS的合成，利用红细胞酶解法制备半抗原3-Ac-NEOS的方法可行且纯度较高，半抗原的制备得到优化。在蒸气浴条件下，3-Ac-NEOS与琥珀酸酐（HS）反应合成了3-Ac-NEOS-HS，后通过碳二亚胺法将半抗原与载体蛋白偶联制备完全抗原，采用紫外扫描及SDS-PAGE确定了半抗原3-Ac-NEOS成功构建连接臂并与牛血清白蛋白和卵清蛋白结合生成T-2毒素母核完全抗原。经计算得3-Ac-NEOS与牛血清白蛋白的偶联比为8.76: 1，与卵清蛋白的偶联比为7.24: 1，表明此完全抗原能够用于免疫动物。T-2毒素母核半抗原的优化制备及完全抗原的合成为进一步制备抗T-2毒素母核多克隆抗体奠定了基础。

# 5 T-2毒素母核多克隆抗体的制备与检测

目前，抗体的制备主要有多克隆抗体制备和单克隆抗体制备，其中单克隆抗体具有较为准确的高特异性和单一生物功能，[但是因为其固定的亲和性](http://wenwen.soso.com/z/Search.e?sp=S%E6%B5%9C%E6%8F%92%E6%8B%B0%E9%8E%AC%3Fch%3Dw.search.yjjlink&amp;cid=w.search.yjjlink)和局限的生物活性

[48]，以及复杂的制备技术，费时费工，目前有关单克隆抗体在A型单端孢霉烯族毒素检测上的应用报道较少，实验室用于检测A型单端孢霉烯族毒素的免疫学分析方法所用抗体普遍还是使用多克隆抗体，多克隆抗体的制备在免疫学研究中被广泛接受

[49]. 多克隆抗体可以识别同一抗原的多个表位，在免疫检测中，可以识别更多的抗原，

受到抗原构象变化的影响较小。mT-2s并不是以单一形式存在，虽然具备T-2毒素母核结构，但毒素彼此之间的母核结构仍具有一定的差异，因此要求制备的抗体需要有较好的亲和性，受抗原构象变化的影响较小，而多克隆抗体的特点刚好符合这一要求。

抗体的制备是免疫检测方法建立的前提，免疫动物的选择也关系着抗体制备效果的好坏。其中，家兔被作为重要的免疫动物之一。家兔易饲养，抗病能力强，已有许多研究报道指出，使用兔子进行免疫，制备所得抗血清效价高、特异性强[47]。兔子体液免疫应答反应强烈，适合于多克隆抗体制备[48]。本章节通过制备的T-2毒素母核免疫原3-Ac-NEOS-HS-BSA免疫家兔，制备抗血清；分离纯化所获得的抗血清，检测效价；用制备的T-2毒素母核抗体建立间接竞争ELISA，检测抗体灵敏度和特异性。

## 5.1 材料与仪器

### 5.1.1 材料和试剂

**表5-1** **主要试剂与材料**

**Table** **5-1** **The main reagents and materials**

| 试剂名称 | 采购公司 |
| --- | --- |
| 新西兰长耳白兔（雌性，2-2.5kg）； | 广东医学院 |
| 完全弗氏佐剂；不完全弗氏佐剂； | 北京博奥森生物技术有限公司 |
| 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG（HRP-IgG）； | 广州齐云生物公司 |

### 5.1.2 仪器设备

**表5-2** **主要仪器**

**Table** **5-2** **The main instrument**

| 仪器名称 | 仪器厂家 |
| --- | --- |
| 酶标仪 | 美国 Thermo Scientific 公司 |
| 冷冻离心机 | 日本日立公司 |
| 生化培养箱 | 上海博讯实业有限公司 |

## 5.2 实验方法

### 5.2.1 免疫兔子

取400µg制备好的免疫原3-Ac-NEOS-HS-BSA溶于1 mL 0.9%氯化钠溶液，与弗氏完全佐剂等体积混合，以连接器进行来回抽打，充分乳化致使形成油包水状，后进行皮下注射。

此后每隔2周用200µg 3-Ac-NEOS-HS-BSA溶于1 mL 0.9%氯化钠溶液，与等量弗氏不完全佐剂混匀，皮下注射。

**表5-3** **兔子的免疫过程**

**Table** **5-3** **Immunologic process of rabbit**

| 免疫次序 | 动物数（只） | 间隔时间（d） | 佐剂类型 | 剂量（µg /只） | 免疫途径 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 3 | 14 | 完全佐剂 | 400 | 皮下 |
| 2 | 3 | 14 | 不完全佐剂 | 200 | 皮下 |
| 3 | 3 | 14 | 不完全佐剂 | 200 | 皮下 |
| 4 | 3 | 14 | 不完全佐剂 | 200 | 皮下 |
| 5 | 3 | 14 | 不完全佐剂 | 200 | 皮下 |

### 5.2.2 抗血清的分离与保存

抗血清效价检测采用耳静脉取血，最后的取血采用兔子心脏取血。兔血存于50

mL离心管中，至于4 ℃冰箱中，倾斜45度过夜保存。过夜后，血清析出，用一次

性吸管吸出保存于50 mL离心管中，残渣4℃环境下3 000 r/min、离心15 min，吸取

上清，合并于先前血清离心管中，接着以4000 r/min、4℃离心10 min，加入叠氮钠

（0.02%）和甘油（50%）混合分装，保存于－20℃[49]。

### 5.2.3 抗血清效价的测定

抗血清效价的检测参考采间接ELISA法[107-108].

1）96孔酶标板内每孔加入100µL 10µg/mL的包被原，冰箱内4℃过夜；

2）移去，PBST洗涤3次，每次3 min；

3）拍干，加入150µL封闭液，37℃封闭2 h；

4）PBST重复洗涤3次，拍干，加入不同稀释度阴性和阳性血清（1: 1 000，1：

2 000, 1: 4 000, 1: 8 000, 1: 16 000, 1: 32 000, 1: 64 000, 1: 128 000），每孔

100µL，各设三个平行37℃下孵育1 h；

5）同上洗涤拍干，加入HRP-羊抗兔IgG(1: 3000)，100µL/孔，37 ℃孵育1 h；

6）同上洗涤三次拍干后，加入TMB显色液，每孔100µL，37 ℃下反应15 min；

7）加入终止液，每孔50µL，置于酶标仪下检测OD450nm值。以阳性血清的OD450nm与对应阴性血清的OD450nm的比值大于2.1为判断标准，抗血清效价即为大于2.1的抗血清最大稀释倍数。

### 5.2.4 抗血清的纯化

利用饱和硫酸铵对抗血清进行纯化[48]。

1）配制饱和硫酸铵及PBS（pH 7.0, 0.02 mol/L），分别至于冰箱4℃预冷，取出20 mL血清，与等体积PBS混合，边搅拌边逐滴加入到预冷的40mL饱和硫酸铵溶液中，得A液，将A液并放置冰箱中过夜保存。

2）取出A液放置冷冻离心机中，4℃、12000 r/min条件下离心10 min，弃上清，加入20 mL预冷PBS（pH 7.0, 0.02 mol/L）复溶，加入40/3 mL预冷的饱和硫酸铵（逐滴加入），4℃静置1 h。

3）步骤同2），改饱和硫酸铵用量为20/3 mL。

4）步骤同2），离心完成后，弃上清，取20 mL PBS（pH 7.0, 0.02 mol/L）复溶沉淀，装入透析袋中。

5）在4℃冰箱中进行透析，透析液用PBS（pH 7.0, 0.02 mol/L），每天换液两次，于第三天用蔡氏试剂检测透析液，无黄色则终止透析。

6）透析完成后，将溶液分装，冷冻干燥，保存于-20℃冰箱。

### 5.2.5 最佳抗体稀释度和抗原包被浓度的检测

根据朱立平等在2000年报道的方阵滴定法进行测定[109]。以最后一次效价检测后纯化得到的抗体进行试验。

1）将包被原3-Ac-NEOS-HS-OVA，配成目标稀释度，2.5 、5.0、10.0 、20.0µg/mL。将包被原以一列一种浓度的模式加入到96孔酶标板中，4℃包被过夜，每孔各200µL。

2）过夜后，用PBST洗涤3次，每次3 min。每孔加入200µL封闭液，37℃孵育1h。

3）PBST同上洗涤3次，加入不同稀释度抗体（1: 1 000, 1: 2 000, 1: 4 000，

1: 8 000, 1: 16 000, 1: 32 000, 1: 64 000），每列从上到下，一次加入不同稀释度的抗体100µL，37℃孵育1 h。

4）同上酶标二抗（1: 3000）100µL，孵育1 h，洗涤。

5）加入100µL TMB显色15 min。后同上终止反应，测定各孔的OD450nm值。以

OD450nm值接近1时对应的抗原浓度和抗体稀释度为最佳包被抗原浓度和抗体最佳工作稀释度。

### 5.2.6 测定抗体检测限与特异性

#### 5.2.6.1 间接竞争ELISA法的建立及间接竞争标准曲线的绘制

根据间接ELISA绘制针对T-2毒素的间接竞争抑制标准曲线，并计算出IC50，和检测限。间接竞争ELISA法步骤如下：

1）96孔酶标板中加入200µL最佳包被浓度包被原，4℃包被过夜。

2）过夜后，PBST洗涤3次，3 min/次。每孔加入200µL封闭液，37℃孵育1 h。

3）PBST同上洗涤3次，依次加入100µL浓度分别为0、0.010、0.025、0.050、

0.100、0.250、0.500、1.000、2.000µg/mL的T-2毒素。

4）后各加入100µL两倍最佳抗体工作浓度的抗体，37℃下孵育1 h。

5）PBST洗3次，加HRP标记的羊抗兔IgG (1: 3 000) 100µL，孵育1 h。

6）洗涤三次，加入100µL TMB显色15 min。终止反应，测定各孔的OD450nm值。以OD450nm值接近1时对应的抗原浓度和抗体稀释度为最佳包被抗原浓度和抗体最佳工作稀释度。

计算抑制率，以抑制率值为纵坐标，以T-2毒素浓度的100倍的对数值为横坐标，绘制间接竞争标准曲线。抑制率=1-(*B*-b) /(*Bo*-b) \* 100%: *B*是加入竞争毒素的反应孔的OD值；*Bo*是未加入竞争毒素的反应孔的OD值；b是加入PBS的空白孔。

抑制率为0.5对应的T-2毒素浓度即为半数竞争抑制浓度IC50，抑制率为0.1对应的T-2毒素浓度即为，T-2毒素的检测限。

#### 5.2.6.2 交叉反应率

选择3-Ac-NEOS、3-Ac-NEOS-HS、HT-2毒素和呕吐毒素作为竞争抗原，浓度设为0.025、0.050、0.100、0.250、0.500µg/mL，与纯化后的抗体进行间接竞争ELISA检测，方法同上，测定抗体针对A族毒素、B族毒素的特异性。

## 5.3 结果

### 5.3.1 抗血清效价的测定

从第一次加强免疫后一周，开始进行耳静脉取血检测抗血清效价，间隔两周取一次，前三次检测的抗血清效价均未能达到要求。第四次检测抗血清效价时，2号兔子和3号兔子达到要求，并且又进行了一次加强免疫后，第五次检测效价，如表5-4显示，按照P/N大于2.1为基准，1号兔抗体效价为1: 8 000, 2号兔抗体效价为1: 64

000, 3号兔抗体效价在1: 16 000以上，接近1: 32 000.2号兔可进行心脏取血。

**表5-4** **兔子第5次检测抗体血清效价**

**Table** **5-4** **The fifth time detection of rabbit antiserum titer**

| 血清稀释度 |  | OD450 | |  |  | P/N |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1号（P） | 2号（P） | 3号（P） | 阴性对照（N） | 1号 | 2号 | 3号 |
| 1:2 000 | 2.263 | 2.472 | 2.214 | 0.232 | 9.754 | 10.655 | 9.543 |
| 1:4 000 | 1.607 | 2.365 | 2.025 | 0.229 | 7.017 | 10.328 | 8.843 |
| 1:8 000 | 0.973 | 1.783 | 1.257 | 0.223 | 4.363 | 7.996 | 5.637 |
| 1:16 000 | 0.436 | 1.166 | 0.614 | 0.214 | 2.037 | 5.449 | 2.869 |
| 1:32 000 | 0.207 | 0.524 | 0.283 | 0.138 | 1.533 | 3.797 | 2.051 |
| 1:64 000 | 0.172 | 0.287 | 0.191 | 0.132 | 1.303 | 2.174 | 1.447 |
| 1:128 000 | 0.133 | 0.139 | 0.136 | 0.125 | 1.064 | 1.112 | 1.088 |

### 5.3.2 最佳的抗体与包被原工作浓度

取最后一次效价检测的2号兔血清，进行棋盘滴定检测。在棋盘滴定法检测中，所使用的包被原为第三章节中偶联比符合要求的3-Ac-NEOS-HS-OVA。检测结果如表5-5所示，在3-Ac-NEOS-HS-OVA浓度为5µg/mL以及抗体稀释度为1: 4 000时，所检测得到的OD450值分别为1.026，最接近1，因此5µg/mL即为3-Ac-NEOS-HS-OVA的最佳包被浓度。抗体的最佳工作稀释倍数为1: 4 000。

**表5-5 包被杭原的最佳工作浓度的测定**

**Table** **5-5** **Detection of the best working concentration of envelope antigen**

| 血清稀释倍数 |  | 包被抗原浓度（µg/mL）的 OD450 | | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 50 | 20 | 10 | 5 | 2.5 |
| 1:1 000 | 2.442 | 2.378 | 2.328 | 1.946 | 1.635 |
| 1:2 000 | 2.363 | 2.325 | 2.072 | 1.634 | 1.232 |
| 1:4 000 | 2.195 | 2.092 | 1.874 | 1.026 | 0.874 |
| 1:8 000 | 1.876 | 1.624 | 1.556 | 0.872 | 0.502 |
| 1:16 000 | 1.404 | 1.341 | 1.182 | 0.533 | 0.316 |
| 1:32 000 | 1.298 | 0.853 | 0.695 | 0.274 | 0.173 |
| 1:64 000 | 0.623 | 0.534 | 1.464 | 0.213 | 0.122 |

### 5.3.3 抑制率IC50以及交又反应率

由图5-1可知，T-2毒素的浓度在0.050µg/mL到0.500 ng/mL之间的吸光度比值之间有良好的线性关系。拟合该区间的四个点，可得线性回归方程：y=0.5993x-0.3130，其中R2=0.9919。计算得，抑制率达到50%所对应的T-2毒素的浓度IC50为0.228µg/mL。当抑制率为10%时对应的T-2毒素的浓度，即为检测限，经计算得为0.049µg/mL左右。



**图5-1 标准间接竞争抑制率曲线**

**Fig.** **5-1** **Standard curve of inhibition rate about indirect competition**

3-Ac-NEOS、3-Ac-NEOS-HS、HT-2毒素和呕吐毒素作为竞争抗原代替T-2毒素，检测计算得表5-6.3-Ac-NEOS、3-Ac-NEOS-HS、HT-2毒素、呕吐毒素与T-2毒素的交叉反应率分别为116%、97%、84%和0.3% 。

## 5.4 讨论

**表5-6** **交叉反应率的检测**

**Table** **5-6** **Detection of cross reactivity**

| 竞争抗原 | IC50 （µg/mL） | 交叉反应率（%） |
| --- | --- | --- |
| 3-Ac-NEOS | 0.197 | 116 |
| 3-Ac-NEOS-HS | 0.235 | 97 |
| HT-2毒素 | 0.272 | 84 |
| DON | 76.4 | 0.3 |

在多克隆抗体制备的过程中，可添加一定量的弗氏佐剂。当乳化成油包水状后，该状态下免疫原的释放速度减缓，从而延长免疫原的保留时间，增强免疫效果。从抗血清效价检测的变化结果中，就可判断使用的免疫原产生了免疫效果，随着免疫时间增加，免疫效果增强，当经过多次免疫加强后，可得效价较高的抗血清。2号兔便在第5次加强免疫反应后得到了较好的抗血清效价，效价高于1: 64 000。

同时，由于个体差异的存在，同一物种对免疫原的应答能力同样存在差异，比如

1号兔，在第五次加强免疫后，抗血清效价才为1: 8 000，效价偏低，而3号兔在第四次效价检测达到1: 16 000，第五次检测，效价还是在1: 16 000以上接近于1: 32

000. 可知兔子间也存在着明显的个体差异，2号兔的免疫应答明显强于1号和3号兔，制备的抗体最适合用于进一步的试验。免疫的一个关键，便是对免疫动物的选择，兔子作为现今实验室一种重要的试验动物，经常被用于制备抗体，特别是对蛋白类免疫原，兔子的使用更频繁。兔子的挑选应该严格按照实验室动物的挑选标准进行挑选

[110]。

抗体效价符合要求后，又分别对抑制率IC50和交叉反应率进行了检测计算。从结果中显示，制备得到的抗T-2毒素母核多克隆抗体对A型单端孢霉烯族毒素的有较高交叉反应率，对B型毒素DON的交叉反应率低。抗T-2毒素母核多克隆抗体可特异性识别具有T-2毒素母核结构的毒素，比如具有母核的蛋白类隐蔽态3-Ac-NEOS-HS-OVA，符合族抗体要求。目标抗体制备成功，可进一步应用于免疫检测。

## 5.5 小结

成功制备了抗T-2毒素母核的多克隆抗体；抗血清效价1: 64000，符合要求；用纯化后抗体建立的间接竞争ELISA法的对T-2毒素的检测限为0.049µg/mL，IC50为0.228µg /mL；抗体相对于具有母核结构的毒素特异性差，相对于不具备母核结构的B族毒素特异性强。

# 6 免疫磁珠间接竞争ELISA的建立及在对虾中隐蔽态T-2毒素检测上的应用

目前，从食品中提取分离隐蔽态真菌毒素，主要是通过有机溶剂萃取，再经柱色谱进行净化。Veronica等[111]利用乙腈水（84: 16）提取，Mycosep@ #227柱净化得T-2毒素和HT-2毒素的糖苷结合物T2-3-G，HT2-3-G，HT2-4-G；于钏钏等[112]以乙腈水（84: 16）从小麦中提取分离出隐蔽态脱氧雪腐镰刀菌烯醇，并通过Myeosep226净化柱纯化得到DON-3-G. Berthille等[113]也通过多功能净化柱从小麦中纯化得到了DON和DON-3-G。然而，有机溶剂提取过程容易带入其他干扰物，如色素、蛋白、荧光物和结构类似物等。干扰物的带入容易对隐蔽态毒素的检测产生干扰[114-115]，因此利用有机溶剂提取隐蔽态真菌毒素后，常需要伴随着进行柱色谱分离纯化。柱色谱分离纯化虽然提高了净化效果，但其昂贵的价格、复杂的操作过程和洗脱损失特性却限制了它的使用和发展。免疫磁珠酶联免疫检测技术的提出则解决了这一问题。

免疫磁珠酶联免疫技术在检测T-2毒素和mT-2s上的应用还未见报道，免疫磁珠具有可分离和富集目标提取物的功能特性，其上抗体或抗原可与待测物特异性结合，在经外界磁场的加持作用下，磁性小球可定向移动富集，从而达到分离富集的效果。免疫磁珠分离技术操作简便，耗时短，且分离富集效果好[59]。将免疫磁珠技术与酶联免疫法相结合，建立的免疫磁珠酶联免疫检测技术与传统的酶联免疫检测相比较，灵敏度得到了很大的提升，磁性微粒作为载体对抗原抗体的吸附能力是酶标板的1000倍以上[64]。免疫磁珠酶联免疫检测技术的应用已在许多方面被研究报道，谢芳等就通过免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油中黄曲霉毒素B1[114]。

本章内容主要是制备可识别具有T-2毒素母核抗体的3-Ac-NEOS-HS-OVA -免疫

磁珠（T2-IMB），并通过T2-IMB与酶联免疫法相结合，建立可检测的mT-2s的免疫磁珠间接竞争酶联免疫检测法（T2-IMB-ELISA），并运用于检测染毒对虾中的mT-2s。

## 6.1 材料与仪器

### 6.1.1 材料和试剂

**表6-1** **主要试剂与材料**

**Table** **6-1** **The main reagents and materials**

| 试剂名称 | 采购公司 |
| --- | --- |
| 羧基磁珠（180nm） | 海狸生物公司 |
| DEC；NHS | 北京博奥森生物技术有限公司 |
| 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG（HRP-IgG） | 广州齐云生物公司 |

### 6.1.2 仪器设备

**表6-2** **主要仪器**

**Table** **6-2** **The main instrument**

| 仪器名称 | 仪器厂家 |
| --- | --- |
| 酶标仪 | 美国 Thermo Scientific 公司 |
| Jnc 氮吹仪 | 德国 Organomation Assiciates 公司 |
| 生化培养箱 | 上海博讯实业有限公司 |
| 电子天平 | 北京赛多利斯天平有限公司 |

## 6.2 实验方法

### 6.2.1 抗原与羧基磁珠的偶联

1）清洗：分别取0.2 mg羧基磁珠于2 mL离心管中，500µL PB(0.02 mo1/L, pH

7.4）洗2次，洗涤后用250µL PB缓冲液（0.02 mo1/L, pH 7.4）超声分散重悬；

2）活化：分别加入250µL用PB缓冲液配制的EDC和NHS，37℃活化2 h；

3）偶联：磁分离，吸去上清液，同上PB缓冲液洗涤三次，超声重悬。再分别将200g的包被抗原加入到已活化磁珠中，37℃偶联3 h；

4）封闭：磁分离，取出上清液（上清液中的蛋白含量待检），加入100 µL的乙醇胺溶液和OVA封闭液，37℃封闭2h，保持悬浮状态；

5）保存：PB（0.02 mo1/L, pH 7.4）洗涤磁珠3次，磁分离，弃上清液，用250µL

pH7.4的PB（0.02 mo1/L, 含0.02% NaN3和0.5% OVA）重悬，存于4℃。

### 6.2.2 磁珠上的包被原偶联率分析

用BCA法测定偶联后上清液中包被原的的含量（562 nm处OD值），间接计算出磁珠表面偶联的包被原量，并计算包被原偶联率。

### 6.2.3 免疫磁珠的制备优化

#### 6.2.3.1 偶联液选择

1）分别用蒸馏水、PB缓冲液（0.02 mol/L, pH 7.4）、PBS缓冲液（0.02 mol/L, pH

7.4）、CBS缓冲液（0.02 mol/L, pH 7.4）配制200µg/mL的包被原；

2）各取0.2 mg已活化磁珠，磁分离，弃上清，分别加入配制好的包被抗原250µL，重悬，37℃偶联3 h，悬浮状态；

3）磁分离，取出上清液A1，用各自包被原对应的缓冲液和蒸馏水250µL，洗涤

3次，磁分离，合并洗涤液于上清液A1中，得B1液；

4）用微量蛋白检测法，检测B1液中蛋白含量，推算磁珠上偶联的包被原的量。

#### 6.2.3.2 偶联液pH值优化

1）用上述优化的溶液配制200µg/mL的包被原，并分别调成pH 6.5、pH 7.4、

PH 8.0、pH 9.6;

2）各取0.2 mg已活化磁珠，磁分离，弃上清，分别加入配制好的不同pH的包被原250µL，重悬，37℃分别偶联3 h，以悬浮状态保持；

3）磁分离，取出上清液A2，用各自包被原对应pH值的溶液250µL，洗涤3次，磁分离，合并洗涤液于上清液A2中，得B2液；

4）用微量蛋白检测法，检测B2液中蛋白含量，推算磁珠上偶联的包被原的量。

#### 6.2.3.3 偶联时间的优化

1）用上述优化的溶液配制200µg/mL的包被原；

2）各取0.2 mg已活化磁珠，磁分离，弃上清，加入配制的包被原250µL，重悬，

37℃下分别偶联1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 h，以悬浮状态保持；

3）磁分离，取出上清液A3，用各自包被原对应pH值的溶液250µL，洗涤3次，磁分离，合并洗涤液于上清液A3中，得B3液；

4）用微量蛋白检测法，检测B3液中蛋白含量，推算磁珠上偶联的包被原的量。

#### 6.2.3.4 包被原浓度优化

1）用上述优化的溶液配制24、48、72、96、120、144、168、192、216、240µg/mL

的包被原；

2）各取0.2 mg已活化磁珠，磁分离，弃上清，各加入配制的包被原250µL，重悬，37℃下分别偶联已优化的时间，以悬浮状态保持；

3）磁分离，取出上清液A4，用各自包被原对应pH值的溶液250µL，洗涤3次，磁分离，合并洗涤液于上清液A4中，得B4液；

4）用微量蛋白检测法，检测B4液中蛋白含量，计算磁珠上偶联的包被原的量。

### 6.2.4 免疫磁珠间接竞争ELISA检测条件的优化

#### 6.2.4.1 抗体的最适稀释度选择

利用含10%甲醇的PBS缓冲液（0.01 mol/L, pH 7.4）对制备的T-2毒素母核抗体进行稀释，稀释度分别为1: 1 000, 1: 2 000, 1: 3 000, 1: 4 000, 1: 5 000, 1: 6 000, 1: 7 000, 1: 8 000, 1: 10 000.

各取200µL不同稀释度的抗体加入到含有0.2 mg免疫磁珠的2 mL离心管中，37℃下旋转孵育2 h, PBST洗涤三次，磁分离，每次洗涤各2 min；加入200µL的酶标二抗（1: 3000），重悬，37 ℃旋转孵育2 h, PBST洗涤三次，磁分离，弃上清；加入200µL的TMB，室温反应15 min，加入100µL 2 mol/L的H2SO4，终止反应；磁分离，吸出200µL上清液，至96孔酶标板中，450 nm下检测OD值。

#### 6.2.4.2 酶标二抗的稀释度选择

在含有0.2 mg免疫磁珠的2 mL离心管中加入200µL最适稀释度抗体，37℃下旋转孵育2 h, PBST洗涤三次，磁分离；加入稀释度为1: 1 000, 1: 2 000, 1: 3 000，

1: 4 000, 1: 5 000的酶标二抗200µL，37℃旋转孵育2 h, PBST洗涤三次，磁分离，弃上清；加入200µL的TMB，室温反应15 min，加入100µL 2 mol/L的H2SO4，终止反应；磁分离，吸出200µL上清液，至96孔酶标板中，450 nm下检测OD值。

### 6.2.5 免疫磁珠间接竞争ELISA检测T-2毒素母核含量标准抑制曲线的测定

以族半抗原T-2毒素作为提供母核标品，配制T-2毒素的梯度浓度，用甲醇水将T-2毒素分别配成0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28µmol/L。依次取不同浓度的T-2毒素溶液200µL与0.2 mg免疫磁珠相混合重悬。

加入两倍最佳抗体工作浓度的抗体200µL，与上述磁珠混合，37 ℃旋转孵育2.5

h, PBS缓冲液（0.01 mol/L, pH 7.4）洗涤三次，磁分离。

加入200µL的酶标抗体（1: 3000），37 ℃旋转孵育2 h, PBS洗三次，磁分离。加入200µL的TMB，室温反应15min后，加入100µL 2 mol/L的H2SO4，终止

反应；磁分离，吸出200µL上清液，至96孔酶标板中，450 nm下检测OD值。

### 6.2.6 加标回收率测定

选取10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL作为T-2毒素的加标浓度，与匀浆完全的健康虾的虾样混合，进行加标检测回收试验。回收率计算公式如下：

回收率(%) 加标后测定值-原样品测定值100

已知加标量

### 6.2.7 免疫磁珠酶联免疫法在对虾中mT-2s检测上的应用

#### 6.2.7.1 染毒虾样的前处理

参考施琦（2013）虾样内T-2毒素乙酸乙酯提取法，对虾样进行前处理。每个部位设置三个平行，并以健康虾为空白对照。1.2和2.4剂量组，以8尾虾为一个平行

进行处理；4.8与12.2剂量组以4尾虾为一个平行进行处理。处理方法同第三章。血样品处理每个平行血样，用6 mL乙酸乙酯进行溶解，涡旋振荡10 min，离

心5 min（4 000 r/min），重复三次取上清合并。保留残渣管。

虾头、虾壳和肌肉样品前处理 分别取染毒虾样的虾头、虾壳和肌肉，各加入10 mL乙酸乙酯，剪碎，10 000 r/min均质1 min, 10 mL乙酸乙酯清洗刀头，合并于匀浆液中，分别超声并振荡10 min，离心（4 000 r/min, 10 min）取上清。残渣再加

入15 mL乙酸乙酯超声振荡离心取上清，重复2次，合并上清提取液，保留残渣管。肝胰腺样品处理分别取染毒虾样的肠道和肝胰腺，加入10 mL乙酸乙酯剪碎，

分别超声振荡10 min，离心（4 000 r/min, 10 min）取上清，重复三次，合并上清，并保留残渣管。

#### 6.2.7.2 虾样中T-2毒素与mT-2s含量的测定

1）虾样处理完复溶于1 mL的含10%甲醇PBS缓冲液中作为检测样。

2）分别吸取0.2 mg制备好的免疫磁珠，置于2 mL的尖头离心管中，清洗，磁分离去上清，各加入对应的检测样200 µL，重悬后，加入两倍最适工作浓度的抗体

200µL，37℃旋转孵育2 h，磁分离，弃上清，PBS缓冲液洗涤三次。

3）加入200µL配制好的羊抗兔酶标二抗，37℃旋转孵育2 h。孵育后清洗三次。

4）加入200µL TMB，室温旋转反应15min，后加入100µL的2 mol/L的H2SO4，终止反应，磁分离，各吸取200µL上清液到96孔酶标板中，450nm下，检测OD450nm。

5）检测所得的OD450nm，通过竞争抑制曲线换算出检测到的T-2毒素母核浓度，假定该母核毒素可完全解离为前体毒素，则可将此浓度换算成T-2毒素的浓度，并以T-2毒素的增量表示mT-2s的含量。

## 6.3 结果

### 6.3.1 羧基磁珠偶联包被原的条件优化

通过BCA微量蛋白检测法检测上清液中剩余的抗体量，间接计算偶联率。

#### 6.3.1.1 偶联液

在蒸馏水、PB缓冲液（0.02 mol/L, pH 7.4）、PBS缓冲液（0.02 mol/L, pH 7.4）、

CBS缓冲液（0.02 mol/L, pH 7.4）作用下，得到的偶联率如图6-1所示。图中显示，在PB缓冲液中得到的包被抗原偶联率最高，为23.28%。



**图6-1 不同缓冲液条件下磁珠的包被抗原偶联率**

**Fig.** **6-1** **Coupling rate of the magnetic beads and antigen on the action of different buffer solution**

#### 6.3.1.2 缓冲液pH

在0.02 mol/L的PB缓冲液中，不同的pH值环境下，得到的偶联率效果不同，图6-2显示，在pH 7.4的PB缓冲液中，包被抗原的偶联率最高，达到了25.33%。



**图 6-2** **不同pH值的PB缓冲液作用下磁珠的包被抗原偶联率**

**Fig.** **6-2** Coupling rate of the magnetic beads and antigen on the action of different pH about **PB**

#### 6.3.1.3 偶联时间

如图6-3所示，随着偶联时间的增加，磁珠上所偶联的包被抗原量也逐渐增加，其中在2.5 h前，增加的速度最快，而2.5 h后，增加速度减慢，并且趋于平缓，所以最佳的偶联时间为2.5 h，偶联率为26.62%。



**图 6-3** **不同的偶联时间下磁珠的包被抗原偶联率**

**Fig.** **6-3** Coupling rate of the magnetic beads and antigen on the action of different **time**

#### 6.3.1.4 抗体磁珠的偶联反应比例

由图6-4可知，随着加入的包被抗原浓度逐渐增大，磁珠上偶联的包被抗原量也逐渐增大，当包被抗原加入的量与磁珠比例在30-210µg/mg之间时，磁珠上抗原的偶联量与抗原磁珠的偶联反应比例有良好的线性关系，之后，随着偶联反应比例的升高，磁珠上偶联的包被抗原量升高趋势变缓，到270µg/mg之时逐渐趋于平行。因此，抗原磁珠的最佳偶联比例可选为240-270µg/mg之间的任意值，根据抗原的储备量而定。本次试验选取270µg/mg作为最佳的抗原磁珠偶联反应比例。



**图 6-4** **磁珠上抗原偶联量随偶联比例的变化**

**Fig.** **6-4** Coupling quantity of antigen on the magnetic beads at different reaction rate **of antigen and magnetic beads**

### 6.3.2 免疫磁珠间接竞争酶联免疫法检测条件的优化

#### 6.3.2.1 抗体最佳工作稀释度

由图6-5可知，当抗体稀释度为1: 6000时，OD450nm值为1.094，最接近于1。选取该点是的抗体浓度为抗体的最佳工作浓度。



**图 6-5** **不同稀释度T-2毒素母核抗体作用下的吸光度值变化**

**Fig.** **6-5** The change of opticaldelnsity at the action of different antibody **concentration**

#### 6.3.2.2 酶标二抗的最佳工作浓度

同检测抗体最佳工作浓度一样，酶标二抗在1: 2500时的OD450nm值最接近于1，可选为酶标二抗的最佳工作浓度。



**图 6-6** **不同稀释度酶标二抗影响下吸光度值的变化**

**Fig.** **6-6** The change of opticaldelnsity at the action of different IgG-HRP **concentration**

### 6.3.3 标准竞争抑制曲线的测定

从图6-7，我们可得到T-2毒素母核的浓度在0.01µmol/L到0.16µmol/L之间的吸光度比值之间有良好的线性关系。拟合该区间的五个点，可得线性回归方：y=-3.6829x+0.9985，其中R2=0.9956。以吸光度比值接近50%的对应的母核的浓度为

IC50。计算得，吸光度比值接近0.5时，母核浓度为0.135µmol/L，即T-2毒素浓度为63 ng/mL。该值位于线性区间内。当吸光度比值接近0.9时，对应的浓度为检出限，为0.023µmol/L左右，即T-2毒素的检出限为10.7 ng/mL。



**图 6-7** **标准间接竞争抑制曲线**

**Fig.** **6-7** Standard curve of inhibition rate about indirect **competition**

### 6.3.4 回收率检测结果

选取10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL三个加标浓度下，虾头内T-2毒素的加标回收率为86.14%-98.57%，肌肉中T-2毒素的加标回收率为90.36%-98.42%，平均值为92.37%；变异系数在3.26-6.43之间。如表6-3所示。

**表6-3** **对虾样本中T-2毒素的回收率**

**Table** **6-3** **Recovery ofT-2 toxin in shrimp**

| 部位 | T-2加标量（ng/g） | T-2样本平均回收率（%） | 标准偏差 s(%) | 变异系数 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 10 | 86.14 | 2.81 | 3.26 |
| 虾头 | 25 | 98.57 | 3.96 | 4.02 |
|  | 50 | 90.64 | 4.74 | 5.23 |
|  | 10 | 90.36 | 3.05 | 3.38 |
| 肌肉 | 20 | 98.42 | 4.20 | 4.28 |
|  | 50 | 90.09 | 5.79 | 6.43 |

### 6.3.5 口服蓄积染毒对虾的检测结果

利用免疫磁珠间接竞争ELISA法检测不同虾样提取液中的T-2毒素和mT-2s含量，将显示的母核含量结果转化为T-2毒素，即假设mT-2s完全转化前体T-2毒素，则可得图6-8所示结果



**图 6-8** T2-IMB-ELISA**可检出对虾不同组织中T-2毒素的量（隐蔽态T-2毒素完全解离情况下）**

**Fig.** **6-8** Content of **T-2 in different parts of shrimp by T2-IMB-ELISA(under the circumstance of masked T-2 fully disintegrated)**

由图6-8可知，除了虾壳体内未检测出mT-2s外，在对虾的虾头、肌肉、肝胰腺、血液中都检测出了mT-2s，且可知，mT-2s的量随着染毒剂量的增加而增加。以肝胰腺中的mT-2s含量最高，其次为血液、虾头和肌肉。平均12.2剂量组中每尾虾的肝

胰腺中平均含有0.057 nmol的mT-2s，若完全解离，可增加26.7 ng的T-2毒素。



**图 6-9** T2-IMB-ELISA**可检出对虾不同组织中T-2毒素的增量（相对于三氟乙酸解离出的量）Fig. 6-9** Increment content of **T-2 in different parts in shrimp by T2-IMB-ELISA** (**comparison to the disintegrated content by TFA)**

由图6-9，可了解到，随着染毒剂量的上升，用免疫磁珠间接竞争ELISA法检测得到的mT-2s含量明显高于解离方法所检测到的隐蔽T-2毒素含量。且在肝胰腺和血液中，得到的增量还逐渐上升。与解离前体毒素的检测方法相比较，试验组中增量最为明显的是最高剂量血液组，而在较低剂量组中，增量较大的为染毒虾头组。

## 6.4 讨论

免疫磁珠的形成，是通过磁珠表层所连接的基团被活化后，与具有免疫特性的抗体或抗原相偶联而形成。偶联后的免疫磁珠可特异性的识别某一种或某一类目标抗原抗体。免疫磁珠产生的富集吸附效果，除了受自身所偶联的抗原或抗体的特性所决定外，还受磁珠的抗原抗体偶联量和免疫磁珠的富集检测环境影响，本章节通过对磁珠偶联条件的优化，制备了包被抗原偶联量为270µg/mg的3-Ac-NEOS-HS-OVA-免疫磁珠（T2-IMB）。这一含量，通过后续的试验证实，完全满足应用于建立免疫磁珠间接竞争ELISA法。

而在免疫磁珠的富集检测环境的选择上，考虑到T-2毒素难溶于水，但在甲醇等有机溶剂中有很好的溶解性，而mT-2s因与高级性物质相结合，极性增大，因此配置一定比例的可溶解T-2毒素和mT-2s的甲醇水作为反应体系。甲醇比例太高容易影响免疫磁珠表面的抗原活性，根据谢芳等报道的甲醇含量15%以下的甲醇水对免疫磁珠上偶联的蛋白影响小[114]，因此本章节试验采用含甲醇10%的甲醇水作为免疫磁珠的反应体系。

免疫磁珠间接争ELISA法的建立，为检测对虾体内的mT-2s提供了可能，因其不会破坏mT-2s 的结构，为后期进一步的研究提供了良好基础。免疫磁珠间接竞争

ELISA法中使用的免疫磁珠偶联的是包被抗原，可以特异识别经免疫原3-Ac-NEOS-HS-BSA免疫制备得到的族抗体。通过免疫磁珠上的包被抗原与族抗体之间的反应，达到免疫磁珠可达到富集族抗体的目的，在经外力磁场作用下进行分离。而免疫磁珠间接竞争ELISA法就是通过利用目标毒素来与免疫磁珠竞争族抗体，抑制抗体与免疫磁珠的反应，从而通过检测族抗体的受抑制率间接检测目标毒素的含量。

以磁珠作为载体进行的酶联免疫反应，具有比传统使用酶标板进行的酶联免疫反应高得多的灵敏度和准确度。本章节利用偶联了包被抗原的免疫磁珠建立的免疫磁珠间接竞争ELISA法（T2-IMB-ELISA），对T-2毒素母核的检测限为0.023 µmol/L ，换算为T-2毒素，即为10.7 ng/mL，明显低于用常规间接竞争ELISA法的0.049µg/mL的检出限（第五章节）。利用建立的免疫磁珠间接竞争ELISA法对虾体内的T-2毒素的加标检测，回收率可达92.37%，变异系数在3.26-6.43之间，表明新建立的T2-IMB-ELISA比常规的ELISA更加适合于检测对虾体内的mT-2s。

应用T2-IMB-ELISA在染毒对虾肝胰腺、血液、肌肉、虾头中检测得到的mT-2s含量高于解离方法检测到的隐蔽态T-2毒素。而在虾壳中未检测到隐蔽态T-2毒素。说明三氟乙酸水解方法解离的隐蔽态T-2毒素存在部分损失，复杂的解离过程和萃取纯化过程造成了检测的准确性降低。同时三氟乙酸并不能使所有的隐蔽态T-2毒素都被解离。而T2-IMB-ELISA操作过程简便快捷，且无需进行多余的纯化过程，增加了检测的准确性。

## 6.5 小结

成功制备了抗原偶联量可达270µg/m g的免疫磁珠；以10%的甲醇水作为T2-IMB-ELISA的反应体系，并且优化了族抗体和酶标二抗的最佳稀释度；建立T2-IMB-ELISA并成功应用于染毒对虾内mT-2s的检测，检测的准确度和灵敏度较高；T2-IMB-ELISA检测得到的mT-2s量高于解离检测前体法检测到的量，说明解离法解离不够彻底，且有损失。

# 7 总结与展望

## 7.1 总结

日益严峻的T-2毒素污染问题已经给水产品行业带来严重影响，T-2毒素影响对虾的养殖与健康。T-2毒素结构稳定，在对虾体内其母核结构不易被破坏，可通过与极性物质相结合，转化为mT-2s，逃避检测。mT-2s不仅影响了对虾体内T-2毒素检测的准确性，而且还可经食物链进入其它动物机体继续产生危害。本试验识别了染毒对虾对小鼠的毒性危害，并通过解离方法证实了对虾体内隐蔽态T-2毒素的存在；通过共性表征mT-2s的母核结构，制备了可识别这一母核结构的T-2毒素母核抗体，利用这一抗体与包被了T-2毒素母核抗原的免疫磁珠建立了可检测mT-2s的免疫磁珠间接竞争ELISA，并应用于检测对虾体内的mT-2s。

（1）通过对免疫毒性、血清生化毒性和遗传毒性指标的综合分析，识别T-2毒素暴露染毒对虾对小鼠产生的危害。从整体概率上分析，随着对虾染毒剂量的上升，小鼠的遗传特性和免疫功能受影响的程度增大，并呈一定的正相关，表明了染毒对虾具有免疫毒性和遗传毒性，毒性随着T-2毒素暴露剂量的升高而增强，对虾体内可能有mT-2s的存在；同时，同一剂量下的染毒对虾不同组织表现出的毒性大小存在差异，表明了可能是mT-2s在对虾不同组织内的含量与组成不同。

（2）用三氟乙酸水解处理未检测到T-2毒素的20 d口服蓄积染毒虾样，处理前后T-2毒素含量发生了变化，有mT-2s被解离为T-2毒素被检测出；且解离出T-2毒素的量与暴露剂量呈正相关，表明对虾体内的mT-2s的量随着暴露剂量的升高而升高，并在对虾体内发生蓄积。其中以肝胰腺的有机提取样和残渣样中被解离出的mT-2s含量最高，表明了肝胰腺是对虾将T-2毒素转化为mT-2s的主要部位。

（3）本文制备暴露了T-2毒素母核特性的T-2毒素母核半抗原3-Ac-NEOS，并对其制备条件进行了优化，以大鼠的红细胞酶解液代替猪的肝脏S9溶液，可更有效的对乙酰化后的T-2毒素的C8位基团进行羟基化修饰，3-Ac-NEOS结构经核磁共振和LC-MS/MS方法得以确认；以琥珀酸酐法在T-2毒素C8位上构建了连接臂，在碳二亚胺法作用下，与蛋白BSA和OVA分别偶联，得到免疫原和包被原，通过紫外扫描和凝胶电泳确定了偶联的成功，并计算得到各自的偶联比，免疫原的偶联比为8.76：

1，包被原的偶联比为7.24: 1，免疫原达到免疫要求，可用于免疫制备较高效价的抗体。

（4）利用制备的免疫原与弗氏佐剂混合，免疫新西兰种兔子。间隔两周进行一次加强免疫，制备得到了效价较高的抗血清。利用间接ELISA法检测抗血清效价，检测结果显示第五次加强免疫反应后一周所取抗血清效价最好，效价达到1: 64 000。建立间接竞争ELISA法检测得到可致使抗体的抑制率达到50%的T-2毒素浓度IC50

和交叉反应率，得到T-2毒素对T-2毒素母核抗体的半数竞争抑制率浓度（IC50）为

0.228µg/mL，检测限为0.049µg/mL. T-2毒素与3-Ac-NEOS、3-Ac-NEOS-HS、HT-2毒素和呕吐毒素的交叉反应率显示T-2毒素母核抗体相对于A型单端孢霉烯族毒素的特异性低，相对于没有A型母核的B族毒素特异性高。抗体符合检测T-2毒素母核的要求。

（5）利用T-2毒素母核包被原与羧基磁珠相偶联，制备可被T-2毒素母核抗体识别的包被抗原免疫磁珠（T2-IMB），并将磁珠T2-IMB与ELISA法相结合，建立了可识别mT-2s的免疫磁珠间接竞争酶联免疫法（T2-IMB-ELISA）。T-2毒素母核抗体在T2-IMB-ELISA中的最佳工作稀释度为1: 6 000，说明T2-IMB对T-2毒素母核抗体具有较好的吸附富集效果。T2-IMB-ELISA检测T-2毒素时，建立的间接竞争抑制曲线显示，T-2毒素母核对抗体的半数抑制率浓度为0.135µmol/L，检测限为0.023

µmol/L左右，换算为T-2毒素浓度，即为10.7 ng/mL。检测限低于普通的间接竞争

ELISA检测限0.049µg/mL，表明T2-IMB-ELISA比常规间接竞争ELISA更适合于检测mT-2s。将T2-IMB-ELISA应用于检测对虾中的T-2毒素，平均回收率在92.37%，变异系数在3.26-6.43之间，表明用T2-IMB-ELISA检测准确率高。检测得出对虾各组织内mT-2s的含量高于用三氟乙酸水解处理法检测得到的mT-2s，表明了三氟乙酸水解处理法不能完全解离对虾中mT-2s，有部分损失。

## 7.2 不足之处与展望

有关对虾体内mT-2s的研究是一项全新的课题，在国内外还未见有过相关研究报道，本研究属初步探讨，有许多内容有待进行更深入的研究。

本试验未对肌肉注射染毒对虾体内的隐蔽态进行检测，使得染毒对虾对小鼠的危害识别缺乏有力的支撑证据。同时本试验只是对染毒对虾在整体指标上的危害进行了探讨，未能深入的去解析其具体的功能变规律和作用原因，这一方面可继续进行深入研究。

本试验制备的T-2毒素母核抗体，不仅能识别T-2毒素母核，还能识别其它A型毒素的母核，属于A型单端孢霉烯族毒素的族抗体。因此在有其它A型毒素存在的情况下，检测mT-2s受一定影响。限制了该抗体在mT-2s上的应用范围。因此，在接下去的研究可考虑通过制备可专一识别T-2毒素母核的特异性抗体上着手进行，同时也可考虑在单克隆抗体制备方法上的研究。

本试验是通过包被抗原偶联免疫磁珠制备抗原免疫磁珠去识别抗体，建立免疫磁珠间接竞争ELISA，过程较为繁琐，进一步研究可考虑建立免疫磁珠直接竞争ELISA。

参考文献

[1] Wu X Y, Yang Y F. Heavy metal (Pb, Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn and Zn) concentrations in harvest-size white shrimp *Litopenaeus vannamei* tissues from aquaculture and wild source[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(1): 62~65.

[2]杨青，朱建国. 镰孢菌和镰孢菌感染[J]. 浙江检验医学, 2010, 8(2): 16~18.

[3]张自强. 我国饲料中黄曲霉毒素B1、T-2毒素和赭曲霉毒素A分布规律的研究[D]. 雅安： 四川农业大学, 2009。

[4] Supamattaya K, Bundit O, Boonyarapatlin M, *et al*. Effects of mycotoxins T-2 and ZONralenone on growth performance immuno-ohysiological parameters and histological changes in Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. XII International Symposium of Fish Nutrition & Feeding, 2006, 41: 218~221.

[5] Encarnação, P. Mycotoxins: an overlooked threat in shrimp[ EB/OL]. (2008-04-09) [2014-05-22][. http: //allaboutfeed. test. blueskies. nl/news/mycotoxins-an-overlooked-th reat-in-shrimps-11428. html](http://allaboutfeed.test.blueskies.nl/news/mycotoxins-an-overlooked-threat-in-shrimps-11428.html).

[6] Wannemacher R W, Wiener S L. Trichothecene mycotoxins[J]. Washington D C: Walter Reed Army Medical Center, 1997: 655~676.

[7]代喆. T-2毒素诱导凡纳滨对虾肌肉品质典型性状的变化规律[D]. 湛江： 广东海

洋大学, 2013.

[8]施琦. T-2毒素的自然发生与降解及其在对虾中的蓄积规律[D]. 湛江：广东海洋大学, 2013。

[9]鲍蕾，梁成珠，刘学惠. 出入境农产品中真菌毒素的污染、检测及控制[J]. 食品安全与检测, 2005，(1)：60~61.

[10]王希春，何成华，刘海明，等. 真菌毒素的污染、危害及其检测技术[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(8)：104~107.

[[11] Anonymous.](http://apps.webofknowledge.com/OneClickSearch.do?product=UA&amp;search_mode=OneClickSearch&amp;excludeEventConfig=ExcludeIfFromFullRecPage&amp;SID=3CmYkW9nO5L2KD6daYT&amp;field=AU&amp;value=%5bAnonymous%5d&amp;cacheurlFromRightClick=no) Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives[R]. World Health Organization technical report series, 2002, 906: 1-62.

[12] Commission Regulation (EC). No 1126/2007[S]. 2007.

[13] GB 2761-2005. 食品中真菌毒素限量[S]. 北京： 中国标准出版社, 2005.

[14] Swamy H V L N. Masked Mycotoxins: The Hidden Killers in Feed[EB/OL]. (2009-01-11)[2014-05-24][. http: //www. porknetwork. com/pork-exec/health-zone/mas ked-mycotoxins-the-hidden-killers-in-feed-114019509. html](http://www.porknetwork.com/pork-exec/health-zone/masked-mycotoxins-the-hidden-killers-in-feed-114019509.html).

[15] Young J C, Fulcher R G, Hayhoe J H, *et al*. Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of Eastern Canadian wheats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32(3): 659~664.

[16] Chakrabarti D K, Ghosal S. Occurrence of free and conjugated 12,13-epoxytrichothecenes and ZONralenone in banana fruits injected with Fusarium moniliforme[J]. [Applied and](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=ISSN) Environmental Microbiology, 1986, 51(1): 217~219.

[17] Miller J D, Greenhalgh R. Metabolites of fungal pathogens and plant resistance[J]. American Chemical Society, 1988, 379(9): 117~129.

[18] Kamimura H. Conversion of ZONralenone to ZONralenone glycoside by *Rhizopus sp.* [J][. Applied and](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=ISSN) Environmental Microbiology, 1986, 52(3), 515~519.

[19] Engelhardt G, Zill G, Wohner B, *et al*. Transformation of the Fusarium mycotoxin ZONralenone in maize cell suspension cultures[J]. Naturwissenschaften, 1988,75(6): 309~310.

[20] El-Sharkawy S, Abul-Hajj Y. [Microbial transformation of ZONralenone, I. Formation of ZONralenone-4-O-β-glucoside](http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023250882&amp;partnerID=7tDmEqzL&amp;rel=3.0.0&amp;md5=db8e338c22ad586d1c6cfbed81d6c290)[J]. Journal of Natural Products, 1987, 50(3): 520~521.

[21] El-Sharkawy S. Microbial transformation of ZONralenone III. Formation of 2,4-O-beta-diglucoside[J]. Acta Pharmaceutica Jugoslavica, 1989, 39(4): 303~310.

[22] El-Sharkaway S H, Selim M I, Afifi M S, *et al*. Microbial transformation of ZONralenone to a ZONralenone sulfate[J]. [Applied and](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=ISSN) Environmental Microbiology, 1991, 57(2): 549~552.

[23] Plasencia J, Mirocha C J. Isolation and characterization of ZONralenone sulfate produced by *Fusarium spp.* [J]. [Applied and](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=ISSN) Environmental Microbiology, 1991, 57(1): 146~50.

[24] Schneweis I, Meyer K, Engelhardt G, *et al*. Occurrence of ZONralenone-4-β-D-glucopyranoside in wheat[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(6): 1736~1738.

[[25] Berthiller F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Berthiller%20F%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17071522) [Werner U,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Werner%20U%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17071522) [Sulyok M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sulyok%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17071522) *et al*. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin ZONralenone in the model plant Arabidopsis thaliana[J]. [Food Additives and Contaminants,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071522) 2006, 23(11): 1194~1200.

[26] Kim E K, Scott P M, Lau B P. Hidden fumonisin in corn flakes[J]. Food Additives and Contaminants, 2003, 20(2): 161~169.

[27] Mangia M. Free and Hidden Fumonisins in Maize and gluten-free products[D].

Parma: Universitàdegli Studi di Parma, 2009.

[28] Sewald N, von Gleissenthall J L, Schuster M, *et al*. Structure elucidation of a plant metabolite of 4-desoxynivalenol[J]. Tetrahedron Asymmetry, 1992, 3(7): 953~960.

[29] Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, *et al*. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(9): 3421~3425.

[30] Berthiller F, Dall'Asta C, Corradini R, *et al*. Occurrence of deoxynivalenol and its 3-β-D-glucoside in wheat and maize[J]. Food Additives and Contaminants, 2009, 26(4): 507~511.

[31] Lancova K, Hajslova J, Poustka J, *et al*. Transfer of Fusarium mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer[J]. Food Additives and Contaminants, 2008, 25(6): 732~744.

[32] Kostelanska M, Hajslova J, Zachariasova M, *et al*. Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glucoside, in beer and some brewing intermediates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(8): 3187~3194.

[33] Prelusky D B, Veira D M, Trenholm H L, *et al*. Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep[J]. Journal of Environmental Science and Health Part B-pesticides Food Contaminants and Agricultural, 1987, 22(2): 125~148.

[34] Nakagawa H, Sakamoto S, Sago Y, *et al*. Detection of masked mycotoxins derived from type A trichothecenes in corn by high-resolution LC-Orbitrap mass spectrometer[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013, 30(8): 1407~1414.

[35] McCormick S P, Price N P, Kurtzman C P. Glucosylation and other biotransformations of T-2 toxin by yeasts of the trichomonascus clade[J]. [Applied and](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=ISSN) Environmental Microbiology, 2012,78(24): 8694~8702.

[36] Lattanzio V M, Visconti A, Haidukowski M, *et al*. Identification and characterization of new Fusarium masked mycotoxins, T2 and HT2 glycosyl derivatives, in naturally contaminated wheat and oats by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2012, 47(4): 466~475.

[37] Busman M, Poling S M, Maragos C M. Observation of T-2 Toxin and HT-2 Toxin Glucosides from Fusarium sporotrichioides by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)[J]. Toxins, 2011, 3(12): 1554~1568.

[38] Savard M E. Deoxynivalenol Fatty Acid and Glucoside Conjugates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(3): 570~574.

[39] Stevenson D E, Hansen R P, Loader J I, *et al*. Preparative Enzymatic Synthesis of Glucuronides of ZONralenone and Five of Its Metabolites[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(1): 4032~4038

[40] Wu X, Murphy P, Cunnick J, *et al*. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(10): 1846~1855.

[41] Mikula [H](http://www.researchgate.net/researcher/2006667499_H_Mikula/), [Hametner](http://www.researchgate.net/researcher/38854556_C_Hametner/) C, [Berthiller](http://www.researchgate.net/researcher/38761467_F_Berthiller/) F, *et al*. Fast and reproducible chemical synthesis of ZONralenone-14-β, D-glucuronide[J]. World Mycotoxin Journal, 2012, 5 (3): 289~296.

[42] Welsch T, Humpf H U. HT-2 toxin 4-glucuronide as new T-2 toxin metabolite: enzymatic synthesis, analysis, and species specific formation of T-2 and HT-2 toxin glucuronides by rat, mouse, pig, and human liver microsomes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(40): 10170~10178.

[43]晁博， 薛飞群. 小分子半抗原抗体制备技术的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2006，

36(09): 757~762.

[44]陈飞，邵景东. 伏马菌素B1间接竞争ELISA检测方法的建立和应用[J]. 江苏农业科学, 2007, (6): 278~281.

[45]李岩松，柳增善，周玉，等. 伏马菌素FB2间接竞争ELISA检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(9): 1204~1207.

[46]徐娟，洪淑娟，付建英，等. T-2毒素人工抗原的制备[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(9): 66~69.

[47]马冬月. 农产品中呕吐毒素的酶联免疫检测方法的研究[D]. 天津： 天津科技大

学, 2010.

[48]王俊双. 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇胶体金免疫快速检测技术研究[D]. 无锡：江南大学, 2010。

[49]高璟瑜，杨扬，张红星，等. 抗赭曲霉毒素A多克隆抗体的制备[J]. 现代食品科技, 2011, 27(3): 324~327, 336.

[50] Galaverna G, Dall'Asta C, Mangia M, *et al*. Masked Mycotoxins: an Emerging Issue for Food Safety[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2009, 27: S89~S92.

[51] Berthiller F, Krska R, Doming K J, *et al*. Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion[J]. Toxicology Lletters, 2011, 206(3): 264~267.

[52] Liu Y, Walker F, Hoeglinger B, *et al*. Solvolysis procedures for the determination of bound residues of the myxotoxin deoxynivalenle in Fusarium species infected grain of two winter wheat cultivars preinfected with barley yellow dwarf virus[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(17): 6864~6869.

[53] Nagl V, Schwartz H, Krska R, *et al*. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats[J]. Toxicology Lletters, 2012, 213(3): 367~373.

[54]周兵. 赤霉病污染大麦作物中结合态脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测体系构建研究[D].

杭州： 浙江大学, 2008.

[55] Berthiller F, Sulyok M, Krska R, *et al*. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(1-2): 33~37.

[56] Humpf H U, Voss K A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2004, 48(4): 255~269.

[57] Dall'Asta C, Galaverna G, Aureli G, *et al*. A LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products[J]. World Mycotoxin Journal. 2008, 1(3): 237~246.

[58] Lancova k, Hajslova J, Poustka J, *et al*. Transfer of Fusarium mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer[J]. Food Additives and Contaminants Part A. 2008, 25(6): 732~744.

[59]喻伟. 免疫磁珠的制备及其初步应用[D]. 武汉： 华中农业大学, 2010。

[60]王延昭. 利用免疫磁珠技术富集肠炎沙门氏菌和金黄色葡萄球菌[D]. 武汉：华中农业大学, 2010。

[61]牛瑞江. [沙门氏菌富集及ELISA检测方法的研究](http://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-11902-1012428539.htm)[D]. 南昌： 南昌大学, 2012。

[62]谢芳. 基于免疫磁珠的痕量黄曲霉毒素B1快速富集及ELISA检测的研究[D]. 南昌： 南昌大学, 2013。

[63]闻一鸣，徐金婷，向军俭. 免疫磁珠富集技术进展[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29: 88~92.

[64]雷家慧. 基于IgY的免疫磁珠夹心ELISA法检测日本血吸虫循环抗原的研究[D].

无锡： 华中科技大学, 2009。

[65]邱广亮，赵康， 李咏兰， 等. 肝癌血清甲胎蛋白免疫磁珠酶联免疫法的建立[J]. 精细加工, 2006, 23(10)：950~953.

[66]刘伟伟. 免疫磁珠的制备及对植物油中黄曲霉毒素B1的检测[D]. 无锡：江南大学, 2012。

[67]谢芳，赖卫华，史爱武，等. 免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油中黄曲霉毒素B1[J]. 食品科学, 2013, 34(18)：165~169.

[68] Mateo J J, Mateo R, Hinojo M J, *et al*. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by Fusarium strains[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 955(2): 245~256.

[69]王敏辉， 李吕木， 丁晓琳. T-2 毒素研究进展[J]. 动物营养学报, 2011, 23(1):

20~24.

[70]付鹏程，李荣涛，谢刚，等. 稻谷真菌毒素污染调查与分析[J]. 粮食储藏, 2004, 32(4): 49~51.

[71]李群伟， 李德安， 孟宪清， 等. 影响镰刀菌生长与产毒的基本条件的实验研究[J].

中国地方病学杂志, 1998, 17(6): 355~358.

[72]邹永迅，张红霞，花日茂. T-2 毒素的毒性效应及致毒机制研究进展[J]. [生态毒理学报](http://c.g.wanfangdata.com.cn/Periodical-cyyhj.aspx), 2011, 06(2)：121~128.

[73]易中华，彭莉. 饲料中霉菌毒素对动物免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2010, 31(5)：43~46.

[74]张自广， 石念进， 王希春， 等. 中药复方多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 畜牧与

兽医, 2012, 44(2): 81~85.

[75]黄生权，潘华新，周联. 两种灵芝多糖对小鼠免疫功能增强作用研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(03)：355~357.

[76]袁莉芸，袁慧，陈铁桥. 低剂量T-2毒素对雏鸡免疫器官及血清生化指标的影响

[J]. 中国家禽, 2007, 29(17): 14~16.

[77]姜昕，刘密凤，林林，等. 低剂量T-2毒素对大鼠血清生化指标的影响[J]. 中国地力病学杂志, 2004, 23(2)：116~118.

[78]杨建英，张勇法. T-2毒素对雄性小鼠精液质量的影响[J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(9): 1125~1127.

[79]卿佰春， 崔亚飞， 李晓林， 等. 抗真菌药安特芬的小鼠微核试验与精子畸形试验

研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 141~143.

[80]李洪龙，胡闯，王智航，等. 中药肠宁II 对小鼠的精子畸形试验和微核试验[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(8)：8~9.

[81]王丽丽，郭营，周彦生，等. 氧化型染发剂对小鼠精子畸形和骨髓细胞微核的影响[J]. 新乡医学院学报, 2010, 27(6)：564~566.

[82]张艳，叶克难. 虫草灵芝抱子粉复合物对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(17)：269~273.

[83]李文娟，聂少平，余强，等. 黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 食品科学, 2009, 30(19)：297~299.

[84]苏敬水，刘炳琪. 科学实验中动物致死方式的选择[J]. 畜牧兽医杂志, 2012, 31(2)：51~56.

[85] GB 15193.7-2003, 小鼠精子畸形试验. ICS 07.100.30[S]. 北京：中国标准出版社,

2004.

[86] GB 15193.5-2003, 骨髓细胞微核试验. ICS 07.100.53[S]. 北京：中国标准出版社, 2003.

[87]马得莹， 单安ft. 中草药对动物生长内分泌和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧兽

医, 2004, 31(1): 16~19.

[88] Arjona A, Boyadjieva N, Sarkar D K. Circadian rhythms of granzyme B, perforin, IFN-γ, and NK cell cytolytic activity in the spleen effects of cheonic ethanol[J]. Journal of lmmunology, 2004, 172(5): 2811~2817.

[89]孙淑洁， 王宝维， 葛文华， 等. 维生素A对鹅生长性能及血清生化指标的影响[J].

动物营养学报, 2012, 24(1): 78~84.

[90]何成华. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒性和生物转化的研究[D]. 南京：南京农业大学, 2007。

[91]杜建梅. 肾损害患者的血清中离子钙浓度值变化[J]. 现代预防医学, 2012, 39（4）：

960~964.

[92]郑国华，陈锦秀，葛莉，等. 白黎芦醇对不同饲料喂养小鼠血脂水平的影响[J]. 中国自然医学杂志, 2008, 10(5)：385~387.

[93]孙建凤，赵军，祁茹，等. 日粮中浒苔添加水平对肉鸡免疫功能和血清生化指标的影响[J]. 动物营养报, 2010, 22(3)：682~688.

[94]欧仁福，魏星华，姜斌，等. 磺胺氯吡嗪钠染毒小鼠精子畸形率及骨髓细胞微核的变化[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(4)：294~296.

[95]张桥. 卫生毒理学基础[M]. 北京：人民卫生出版社, 2000: 154~172.

[96]杜峰涛，李林. 细胞微核形成机理探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(4): 19~22.

[97]王爽， 诸葛坚， 余应年. 微核与微核试验在遗传毒理学中的应用[J]. 癌变・畸

变・突变, 2000, 12(4): 253~256.

[98] Bruun L, Koch C, Jakobsen M H, *et al*. Characterization of monoclonal antibodies raised against different structures belonging to the striazine group of herbicides[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 436(1): 87~101.

[99] Beier R C, Ripley L H, Young C R, *et al*. Production, characterization, and cross-reactivity studies of monoclonal antibodies against the coccidiostat nicarbazin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(10): 4542~4552.

[100] Basta P V, Adcock A F, Tallent C R, *et al*. Preparation of monoclonal antibodiesreactive to the endogenous small molecule, anandamide[J]. Journal of Immunological Methods, 2004, 285(2): 181~195.

[101] Ueno Y. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes[J]. Fundamental and applied toxicology, 1984, 4(2): 124~132.

[102] Wei R D, Chen M Y, Zhao Y J. Production and characterization of a generic antibody against group A trichothecenes[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(2): 399~408.

[[103] Fan T S,](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=AUTH) [Schubring S L,](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=AUTH) [Wei R D](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=AUTH), *et al*. Production and Characterization of a Monoclonal Antibody Cross-Reactive with Most Group A Trichothecenes[J]. [Applied and](http://europepmc.org/search?page=1&amp;query=ISSN) Environmental Microbiology, 1988, 54(12): 2959~2963.

[104] Johnsen H, Odden E, Johnsen B A, *et al*. Metabolism of T-2 toxin by blood cell carboxylesterases[J]. Biochemical Pharmacology, 1988, 37(16): 3193~3197.

[105]宋娟， 王榕妹， 王悦秋， 等. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备[J]. 分析化

学, 2010, 38(8): 1211~1218.

[106] Erlanger B F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey[J]. Methods in Enzymology, 1980, 70(A): 70~74.

[107] 洪淑娟. 抗T-2 毒素和脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素的抗体制备和T-2 毒素酶联免疫

分析检测方法的建立[D]. 武汉： 华中农业大学, 2011。

[108] 杨利国， 胡少昶. 酶免疫测定技术[M]. 南京： 南京大学出版社, 1998: 124。

[109] 朱立平， 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京： 人民军医出版社, 2000: 74。

[110] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京： 人民卫生出版社, 2001: 232~241.

[111] Lattanzio V M, Visconti A, Haidukowski M, *et al*. Identification and characterization of new Fusarium masked mycotoxins, T2 and HT2 glycosyl derivatives, in naturally contaminated wheat and oats by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Mass Spectrometry. 2012, 47(4): 466~475.

[112]于钏钏， 邵兵， 李风琴， 等. 粮食中隐蔽型脱氧雪腐镰刀菌烯醇等多组分真菌毒

素协同检测技术[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(8): 736~740.

[113] Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, *et al*. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 3421~3425.

[114]谢芳， 赖卫华， 史爱武， 等. 免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油中黄曲

霉毒素B1[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 165~169.

[115]孙秀兰，赵晓联，汤坚. 大米中黄曲霉毒素B1的提取方法优化[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 128~131.

致谢

首先，非常感谢王雅玲导师和孙力军教授的悉心指导与栽培。从试验的设计、进行到完成都凝聚着导师的心血。导师传授给的思维与处事方式，我都铭记于心。

在试验过程中，感谢CAMT团队所有老师在学术上给予我的指引，感谢课题组的同学在试验中给予我的帮助。

在这里，也要感谢我的家人和朋友对我的关心、照顾与鼓励，没有他们，我的硕士生活将失去色彩。

最后，感谢曾经与我一起进行试验的邱妹、夏阳、谢加璇、李敏红、张翠榕、周鹏飞等师弟师妹们，有了你们，我才能够顺利完成本次硕士论文。

作者简介

吴朝金（1987-），男，福建省龙海市人，广东海洋大学硕士研究生，主要研究方向：水产品加工及贮藏工程。

承担科研项目：对虾隐蔽态T-2毒素的多维表征及其依赖JAK/STAT通路的免疫毒性分子标记识别（31371777），参与。

在读期间发表论文：

[1]吴朝金,王雅玲\*,孙力军等.对虾中T-2毒素对小鼠免疫功能和血清生化指标的影响

[J].中国食品学报（EI，已收录）

[2] 黄展锐, 吴朝金, 王雅玲\*, 孙力军\*, 等. 对虾中T-2毒素对小鼠精子致畸率及微核的影响[J]. 广东农业科学(CSCD, 已收录)

[3] Chaojin Wu, Yaling Wang\*, Lijun Sun, Defeng Xu, Huanming Liu, Qi Shi, Jianmeng Liao, Yang Liu. Change Rule of immune and serum biochemical index in mice induced by T-2 toxin in Litopenaeus vannamei. CIGR Section VI-Guangzhou-November 2013.

在读期间撰写审稿中的论文：

[1] Chaojin Wu, Qi Shi, Yaling Wang\*, Lijun Sun, *et al*. Determination of T-2 and HT-2 toxins in Litopenaeus vannamei by LC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study[J]. World Mycotoxin Journal

[2] Chaojin Wu, Qi Shi, Yaling Wang\*, Lijun Sun, *et al*. Study on the distribution rule of T-2 toxin in Litopenaeus vannamei by using grey relational analysis.

[3] Chaojin Wu, Qi Shi, Yaling Wang\*, Lijun Sun, *et al*. Study on the accumulation rule of T-2 toxin in Litopenaeus vannamei.

在读期间申请审稿中的专利：

[1] 王雅玲, 吴朝金, 孙力军, 徐德峰. 一种A型单端孢霉烯族毒素多克隆抗体及其制备方法与应用.

[2] 王雅玲, 吴朝金, 孙力军, 徐德峰. 一种用于隐蔽态T-2毒素富集的T-2毒素母核抗体免疫磁珠的制备及应用方法.

[3] 王雅玲, 吴朝金, 孙力军, 徐德峰. 一种用于检测隐蔽态T-2毒素的免疫磁珠间接竞争ELISA试剂盒的制备.

导师简介

王雅玲（1965-），女，博士，教授，研究方向：水产品中真菌毒素的危害与控制。教育背景：

2001年-2006年ft东农业大学动物科技学院预防兽医学专业，硕博连读研究生/农学博士。

1984年-1988年浙江工商大学杭州商学院食品系食品卫生专业，本科/理学学士。工作经历：

2009年- 2012年广东海洋大学食品科技学院食品质量与安全系，教师，食品质量与安全教授。

2006年-2009年大连民族学院生命科学学院食品系，教师，食品工程副教授。

1988 年-2001 年吉林省辽源市疾病控制中心（原卫生防疫站），食品卫生科，食品卫生副主任医师。

长期从事水产食品链中微生物毒素的研究，主要针对镰孢菌产生的T-2毒素和细菌产生的溶血毒素等自然发生的微生物毒素，建立其快速灵敏的痕量检测技术，探明其在养殖源头到餐桌的水产食物链上的发生规律、毒性识别、绿色安全控制技术等。特别是在真菌毒素T-2/HT-2以及AF、OTA和ZEN和金葡菌溶血毒素的色谱、质谱的仪器分析技术和免疫检测技术，包括免疫磁珠净化技术；T-2/HT-2毒素蓄积对对虾肌肉品质的影响；残留毒素的毒性特征，以及微生物毒素的产生菌的产毒特性、绿色控制研究等方面均取得突破性进展。发表高水平学术论文50余篇，其中SCI收录 6

篇，承担国家自然科学基金3项，其中结题1项、在研2项，“十一五”国家科技支

撑计划项目子课题1项（已结题），“十二五”国家科技支撑计划项目子课题1项（在

研），校级项目2项，湛江市科学计划项目1项（在研），参加广东省教育部产学研结

合项目1项。获省级科研奖励3项，主编食品毒理学教材1部，申请专利2项等。