

研 究 生： 张 勋

专 业： 食品营养与安全

研 究 方 向： 食品安全

导 师： 胥 传 来 教 授

指导小组成员： 王 利 兵 研究员

学位授予日期： 二零一四年六月

答辩委员会主席：夏文水 教授

江南大学

地址：无锡市蠡湖大道 1800 号

二〇一四年六月

独创性声明

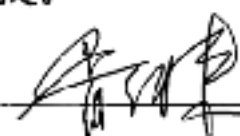
本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得江南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

签 名： 张勳 日 期： 2014.06.17

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解江南大学有关保留、使用学位论文的规定：江南大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签 名： 张勳 导师签名： 
日 期： 2014.06.17

摘要

真菌毒素是一些真菌在生长过程中产生的致病性、致死性的次级代谢产物，在粮食生产、贮存、加工和流通环节都有可能因为保存条件不当污染真菌造成污染。由于大多数真菌毒素的毒性剧烈，并具有致癌、致畸和致突变的“三致”作用，因此各种检测方法被开发用于检测粮食谷物中的各种真菌毒素。免疫分析法具有高灵敏、快速、高通量、多残留和现场检测的优势，现已发展成为真菌毒素检测快速筛查和检测的重要手段之一。本课题采用免疫学原理，将真菌毒素半抗原偶联到蛋白载体，通过免疫和细胞筛选，制备了特异性单克隆抗体的基础上，建立起黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 M₁、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 T-2 毒素六种物质的快速检测方法，主要研究内容如下：

(1) 将真菌毒素分子衍生后制备的半抗原，通过紫外、质谱等进行鉴定后，通过活性酯法或者 CDI 法与载体蛋白（血蓝蛋白、牛血清白蛋白和卵清蛋白）偶联，制备了六种真菌毒素半抗原的完全抗原；通过免疫 BALB/c 小鼠、细胞融合和亚克隆，总共获得 8 株针对六种真菌毒素特异性或群选型单克隆抗体。

(2) 对筛选得到的 8 株单克隆抗体的性质进行了鉴定，其亲和常数分别为黄曲霉毒素 B₁ 4.2×10^9 L/mol(11A9)和 2.29×10^9 L/mol(5C3)；黄曲霉毒素 M₁ 1.28×10^9 L/mol(G3D9)和 2.29×10^9 L/mol(H1)；赭曲霉毒素 A 1.09×10^9 L/mol；玉米赤霉烯酮 2.26×10^9 L/mol；脱氧雪腐镰刀菌烯醇 1.6×10^8 L/mol；T-2 毒素 1.35×10^8 L/mol。并测定了其抗体亚型和交叉反应率。

(3) 试验优化了包被抗原和一抗使用浓度，标准品稀释液的缓冲液的 pH、离子强度、甲醇含量、一抗和二抗的反应时间、显色时间等 ELISA 条件。在最适 ELISA 条件下，测得抗体的 IC₅₀ 分别为：黄曲霉毒素 B₁ 0.043 ± 0.003 ng/mL(11A9)和 0.025 ± 0.005 ng/mL(5C3)；黄曲霉毒素 M₁ 0.032 ± 0.006 ng/mL(G3D9)和 0.035 ± 0.005 ng/mL(H1)；赭曲霉毒素 A 0.092 ± 0.005 ng/mL；玉米赤霉烯酮 0.054 ± 0.004 ng/mL；脱氧雪腐镰刀菌烯醇 31.60 ± 2.89 ng/mL；T-2 毒素 0.431 ± 0.019 ng/mL。

(4) 在建立的 8 株单克隆抗体细胞株基础上，建立了六种真菌毒素的 ELISA，并通过添加回收对方法进行了验证，其回收率均在 80%~120%之间，批内批间差异均小于 20%。

(5) 通过优化酶解条件，制备了 AFB₁ 单抗的 F(ab')₂ 片段，通过免疫兔子，制备得到 AFB₁ 的抗独特型抗体，并对其进行了鉴定。用来开发黄曲霉毒素无毒试剂盒；通过实际样品添加回收试验，其回收率在 110%~130%之间，批内批间变异系数均小于 10%。

(6) 制备了可用于快速现场检测的 AFB₁、AFM₁、OTA、ZEN、DON 和 T-2 生物毒素胶体金快速检测试纸条，其检测限 LOD 分别为 0.2、0.1、0.2、1、50 和 5 ng/mL，cut-off 值分别为 0.5、0.2、1.0、2.0、100 和 10 ng/mL。

(7) 制备了可以同时检测 4 种真菌毒素 (ZEN、T-2、AFB₁ 和 OTA) 的试纸条, 其 LOD 分别为 2、16、1 和 2 ng/mL, cut-off 值分别为为 4、32、2 和 4 ng/mL。

关键词: 真菌毒素; 单克隆抗体; ELISA; 胶体金试纸条

Abstract

Mycotoxins are pathogenic and fatal secondary metabolites which are produced by some fungi during growing. Mycotoxins could be fabricated during the production, storage, processing and circulation of cereal in case of improper conditions. Because of the acute toxicity as well as the ability of carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity, all kinds of detection methods were developed. With advantages in high sensitivity, rapid, high throughput and more residues and field test, immunoassay has been one of the important means of rapid screening and detection mycotoxin detection. In this research complete antigens were prepared by conjugating the haptens of mycotoxins to the proteins carrier, and then were used to immunize mice. The cell lines of monoclonal antibodies (mAbs) that against AFB₁, AFM₁, OTA, ZEN, DON and T-2 toxin were obtained through cell-screening. Rapid assay methods for the six mycotoxins were developed based on the mAbs. The main contents are as follows.

(1) The haptens were obtained by deriving the mycotoxins, and confirmed by UV-spectroscopy and mass. Subsequently complete antigens were obtained by conjugating the haptens with protein carriers. Finally eight cell lines were obtained through immunization, cell fusion and subclone.

(2) Characteristics of mAbs were identified, the affinity constant was AFB₁ 4.2×10^9 L/mol(11A9) and 2.29×10^9 L/mol (5C3) ;AFM₁ 1.28×10^9 L/mol (G3D9) and 2.29×10^9 L/mol(H1) ;OTA 1.09×10^9 L/mol;ZEN 2.26×10^9 L/mol; DON 1.6×10^8 L/mol; T-2 toxin 1.35×10^8 L/mol, respectively. Antibody subtypes and cross reaction were also measured.

(3) Some conditions were optimized, such as the concentrations of coating antigens and antibodies, the pH, ion strength and methanol concentration of the standard solutions, reaction time of primary antibodies, Secondary antibodies and colour developing. Under the best conditions, the IC₅₀ were 0.043 ± 0.003 ng/mL(AFB₁, 11A9)and 0.025 ± 0.005 ng/mL(AFB₁, 5C3), 0.032 ± 0.006 ng/mL(AFM₁, G3D9) and 0.035 ± 0.005 ng/mL(AFM₁, H1), 0.092 ± 0.006 ng/ mL (OTA), 0.054 ± 0.004 (ZEN) ng/mL, 31.60 ± 2.89 ng/mL(DON), 0.431 ± 0.019 ng/mL(T-2 toxin), respectively.

(4) The ELISA methods for six mycotoxins were developed on the base of obtained eight mAbs. The ELISA methods were confirmed by spiked assay. The recoveries were between 80%~120%, and the differences between group and within group were less than 20%.

(5) F(ab')₂ fragment of AFB₁ mAbs were prepared by optimizing the enzymatic hydrolysis conditions of antibodies. Anti-idiotypic antibody was obtained by immunizing rabbits, and was used to develop nontoxic ELISA kit. The kit was confirmed by spiked assay. The recoveries were between 110%~130%, and the differences between group and within group were less than 10%.

(6) The rapid field-test strips for detecting AFB₁, AFM₁, OTA, ZEN, DON and T-2 toxin were developed. The LOD is 0.2, 0.1, 0.2, 1, 50, 5 ng/mL and cut-off level were 0.5, 0.2, 1.0, 2.0, 100, 10 ng/mL, respectively.

(7) The multiple rapid field-test strips for simultaneously detecting ZEN、T-2、AFB₁ and OTA was developed. The LOD is 2, 16, 1, 2 ng/mL and cut-off level were 4, 32, 2, 4 ng/mL, respectively.

Key words: mycotoxins; monoclonal antibody; ELISA; colloidal gold test strip

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
AF	Aflatoxin	黄曲霉毒素
OTA	Ochracin A	赭曲霉毒素 A
ZEN	Zearalenone	玉米赤霉烯酮
DON	Deoxynivalenol	脱氧雪腐镰刀菌烯醇
3-AcDON	3-Acetyldeoxynivalenol	3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇
15-AcDON	15-Acetyldeoxynivalenol	15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇
NIV	Nivalenol	雪腐镰刀菌烯醇
TLC	Thin-Layer Chromatography	薄层层析
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrum	气质联用技术
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱法
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrum	液质联用技术
Ic-ELISA	Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay	间接竞争酶联免疫吸附法
IC ₅₀	Fifty percent inhibition concentration	半数抑制浓度
EDC	1-Ethyl-carbodiimide hydrochloride	1-乙基-碳二亚胺盐酸盐
NHS	N-hydroxy succinimide	N-羟基琥珀酸亚胺
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲溶液
CB	Carbonate buffer solution	碳酸盐缓冲溶液
BB	Borate buffer solution	硼酸盐缓冲溶液
CDI	Carboxyl diimidazole	羧基二咪唑
TMB	Tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺
CR	Cross-reactivity	交叉反应
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
DMF	N, N-dimethylformamide	N,N-二甲基甲酰胺
LOD	Limit of detection	检测限
OD	Optical density	光密度
OVA	Ovalbumin	鸡卵清蛋白
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
PVP	Polyvinylpyrrolidone P	聚乙烯吡咯烷酮 P
KLH	Keyhole limpet hemocyanin	血蓝蛋白
HT	Hypoxanthine-thymidine monophosphate	次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧苷
HAT	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine Monophosphate	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶脱氧苷
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略语表.....	V
目录.....	VI
第一章 绪论	1
1.1 立题背景.....	1
1.2 真菌生物毒素概述.....	1
1.2.1 黄曲霉毒素.....	1
1.2.2 赭曲霉毒素.....	4
1.2.3 玉米赤霉烯酮.....	6
1.2.4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇.....	8
1.2.5 T-2 毒素.....	11
1.3 真菌生物毒素检测技术的研究进展.....	12
1.3.1 仪器分析法.....	12
1.3.2 免疫化学分析法.....	15
1.4 本论文的主要研究工作.....	20
第二章 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测方法的建立	21
2.1 引言.....	21
2.2 材料与仪器.....	21
2.2.1 药品与试剂.....	21
2.2.2 主要仪器与设备.....	21
2.2.3 主要溶液.....	22
2.2.4 实验动物和细胞.....	22
2.3 实验方法.....	22
2.3.1 AFB ₁ 半抗原的设计与合成.....	22
2.3.2 AFB ₁ 完全抗原制备.....	23
2.3.3 小鼠免疫.....	23
2.3.4 小鼠血清检测.....	24
2.3.5 单克隆抗体的制备.....	24
2.3.6 单克隆抗体的性质鉴定.....	26
2.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化.....	26
2.3.8 实际样品添加回收试验.....	27
2.4 结果与分析.....	28
2.4.1 半抗原的合成与结构鉴定.....	28

2.4.2 完全抗原的鉴定	28
2.4.3 动物免疫与检测	29
2.4.4 单克隆抗体的性质	29
2.4.5 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化	31
2.4.6 实际样品添加回收试验	36
2.5 讨论	37
2.6 本章小结	38
第三章 黄曲霉毒素 M₁ 单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测方法的建立	39
3.1 引言	39
3.2 材料与仪器	39
3.2.1 药品与试剂	39
3.2.2 主要仪器与设备	39
3.2.3 主要溶液	39
3.2.4 实验动物和细胞	39
3.3 实验方法	40
3.3.1 AFM ₁ 半抗原的衍生	40
3.3.2 AFM ₁ 完全抗原的制备	40
3.3.3 小鼠免疫	40
3.3.4 小鼠血清检测	40
3.3.5 单克隆抗体的制备	40
3.3.6 单克隆抗体性质鉴定	41
3.3.7 AFM ₁ 间接竞争 ELISA 的建立与优化	41
3.3.8 实际样品添加回收试验	41
3.4 结果与分析	41
3.4.1 AFM ₁ 半抗原的合成鉴定	41
3.4.2 AFM ₁ 完全抗原的合成鉴定	42
3.4.3 小鼠免疫与检测	43
3.4.4 单克隆抗体的性质	43
3.4.5 AFM ₁ 间接竞争 ELISA 的优化	45
3.4.6 实际样品添加回收试验	52
3.5 讨论	52
3.6 本章小结	52
第四章 赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测方法的建立	54
4.1 引言	54
4.2 材料与仪器	54
4.2.1 药品与试剂	54
4.2.2 主要仪器与设备	54

4.2.3 主要溶液.....	54
4.2.4 实验动物和细胞.....	54
4.3 实验方法.....	54
4.3.1 赭曲霉毒素 A 免疫抗原合成.....	54
4.3.2 赭曲霉毒素 A 包被抗原制备.....	55
4.3.3 小鼠免疫.....	55
4.3.4 小鼠血清检测.....	55
4.3.5 单克隆抗体的制备.....	55
4.3.6 单克隆抗体的性质鉴定.....	55
4.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化.....	56
4.3.8 实际样品添加回收试验.....	56
4.4 结果与分析.....	56
4.4.1 OTA 免疫抗原的鉴定.....	56
4.4.2 OTA 包被抗原的鉴定.....	57
4.4.3 小鼠的免疫与检测.....	57
4.4.4 单克隆抗体的性质.....	57
5.3.8 实际样品添加回收试验.....	66
5.4 结果与分析.....	66
5.4.1 ZEN 半抗原的合成鉴定.....	66

5.4.2 ZEN 完全抗原的合成鉴定	66
5.4.3 小鼠的免疫与检测	67
5.4.4 单克隆抗体的性质鉴定	68
5.4.5 ZEN 间接竞争 ELISA 的优化	69
5.4.6 实际样品添加实验	73
5.5 本章小结	73
第六章 脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测方法的建立	74
6.1 引言	74
6.2 材料与仪器	74
6.2.1 药品与试剂	74
6.2.2 主要仪器与设备	74
6.2.3 主要溶液	74
6.2.4 实验动物和细胞	74
6.3 实验方法	74
6.3.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 DON 半抗原的设计与合成 ^[145, 191, 192]	74
6.3.2 脱氧雪腐镰刀菌烯醇完全抗原的合成	75
6.3.3 小鼠免疫	75
6.3.4 小鼠血清检测	75
6.3.5 单克隆抗体的制备	76
6.3.6 单克隆抗体的性质鉴定	76
6.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化	76
6.3.8 实际样品添加回收试验 ^[147, 194]	76
6.4 结果与分析	76
6.4.1 DON 半抗原的合成鉴定	76
6.4.2 DON 完全抗原的合成鉴定	77
6.4.3 小鼠的免疫与检测	77
6.4.4 单克隆抗体的性质鉴定	78
6.4.5 DON 间接竞争 ELISA 的优化	80
6.4.6 实际样品添加实验	83
6.5 讨论	83
6.6 本章小结	84
第七章 T-2 毒素单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测方法的建立	85
7.1 引言	85
7.2 材料与仪器	85
7.2.1 药品与试剂	85
7.2.2 主要仪器与设备	85
7.2.3 主要溶液	85

7.2.4 实验动物和细胞.....	85
7.3 实验方法.....	85
7.3.1 T-2 毒素半抗原的合成.....	85
7.3.2 T-2 毒素完全抗原的合成.....	86
7.3.3 小鼠免疫.....	86
7.3.4 小鼠血清检测.....	86
7.3.5 单克隆抗体的制备.....	86
7.3.6 单克隆抗体的性质鉴定.....	86
7.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化.....	86
7.3.8 实际样品添加回收试验.....	87
7.4 结果与分析.....	87
7.4.1 T-2 半抗原的合成鉴定.....	87
7.4.2 T-2 完全抗原的合成鉴定.....	88
7.4.3 小鼠的免疫与检测.....	88
7.4.4 单克隆抗体的性质鉴定.....	88
7.4.5 T-2 毒素间接竞争 ELISA 的优化.....	89
8.4.1 抗体纯化方法.....	97
8.4.2 F(ab') ₂ 片段的制备.....	97
8.4.3 F(ab') ₂ 片段的纯化.....	98

9.3.6 试纸条的组装.....	104
9.3.7 实际样品的检测.....	104
9.4 结论与分析.....	105
9.4.1 金纳米粒子的表征.....	105
9.4.2 标记抗体反应 pH 的优化.....	105
9.4.3 标记抗体用量的优化.....	106
9.4.4 T 线包被浓度的优化.....	106
9.4.5 多重试纸条金标抗体用量优化.....	107
9.4.6 实际样品的检测.....	107
9.5 讨论.....	110
9.6 本章小结.....	111
主要结论.....	112
论文创新点.....	114
致 谢.....	115
参考文献.....	116
附 录: 作者在攻读博士学位期间发表的论文与专利.....	124

第一章 绪论

1.1 立题背景

真菌毒素 (Mycotoxins) 是某些丝状真菌在适宜温度、适宜湿度条件下产生的二级代谢产物。目前已知的真菌毒素有 300 多种^[1], 主要污染粮油食品和饲料^[2, 3]。有研究表明, 一年中全世界粮食总产量的 25% 受到真菌毒素的污染^[4]。所有的农作物在生长、采后贮藏以及加工时期, 都可能会被污染产毒真菌进而含有生物毒素。真菌毒素不仅污染粮食, 造成食物中毒, 大多真菌毒素还具有致癌、致畸、致突变作用, 对人类的生存和健康造成巨大威胁。虽然可以控制粮食在生长和贮存的条件以减少污染的发生, 以及粮食加工过程中可以去除部分真菌毒素^[5, 6], 但不能完全去除, 因此检测粮食生产工程中的真菌毒素含量非常有必要的。

真菌毒素常用的检测方法主要分为仪器检测方法和免疫学检测法。仪器方法主要包括高效液相^[7, 8]、气相色谱^[9]、以及其质谱联用色谱方法^[10]。免疫学检测方法主要包括酶联免疫 ELISA^[11, 12]、胶体金试纸条^[13]以及免疫亲和柱^[14-16]等。仪器检测方法虽然准确但由于设备昂贵、样品前处理复杂、检测成本高等缺点, 无法满足廉价、快速现场检测的要求。而免疫学方法, 基于抗原抗体的特异性反应, 具有快速、廉价、低成本和特异性好的特点, 十分适合大量样品的初筛和现场检测。基于以上原因, 本课题利用免疫学原理, 研究开发一系列生物毒素的高灵敏高特异的单克隆抗体, 并在此基础上, 开发出可用于实际样品检测的生物毒素免疫学快速检测方法。

1.2 真菌生物毒素概述

真菌毒素是一些真菌在生长过程中产生的致病性、致死性的二级代谢产物。到目前为止, 已经查明的真菌毒素大概有 300 多种, 其中危害较大, 污染普遍的主要有: 黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AF)、赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN)、T-2 毒素 (T-2 toxin, T-2) 以及伏马毒素 (Fumonisin, FB) 等等。其主要的产毒真菌主要集中在于曲霉菌 (*Aspergillus*)、青霉菌属 (*Penicillium*) 以及镰刀菌属 (*Fusarium*) 等等。

1.2.1 黄曲霉毒素

1.2.1.1 理化性质

在众多真菌毒素中, 黄曲霉毒素是公认的毒性最强、危害最大的一类。主要是由黄曲霉和寄生曲霉产生^[17]。目前分离出来的黄曲霉有 20 多种, 其中结构明确的有 18 种。在食品污染中比较常见主要有 B₁、B₂、G₁、G₂^[18-20] 和 M₁^[21]。其中 M₁ 是 B₁ 在生物体内的经过羟化作用的代谢产物, 主要存在于动物体内和体液 (血液、乳汁和尿液) 中^[22]。

常见的黄曲霉毒素的结构见图 1-1, 其分子量在 312 到 346 之间。不同黄曲霉毒素结构非常类似, 都含有一个氧杂萜邻酮和双呋喃环, 其中双呋喃环为基本的毒性结构, 氧杂萜邻酮与致癌性有关。黄曲霉毒素性质非常稳定, 分解温度在 200℃ 以上, 易溶于

甲醇、氯仿、DMF 等有机溶剂，在水中的溶解度在 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 左右。所有的黄曲霉毒素在紫外灯下都能发出荧光，其中 B_1 和 B_2 发出的是蓝色荧光，而 G_1 和 G_2 发出的是黄绿色荧光^[23]。

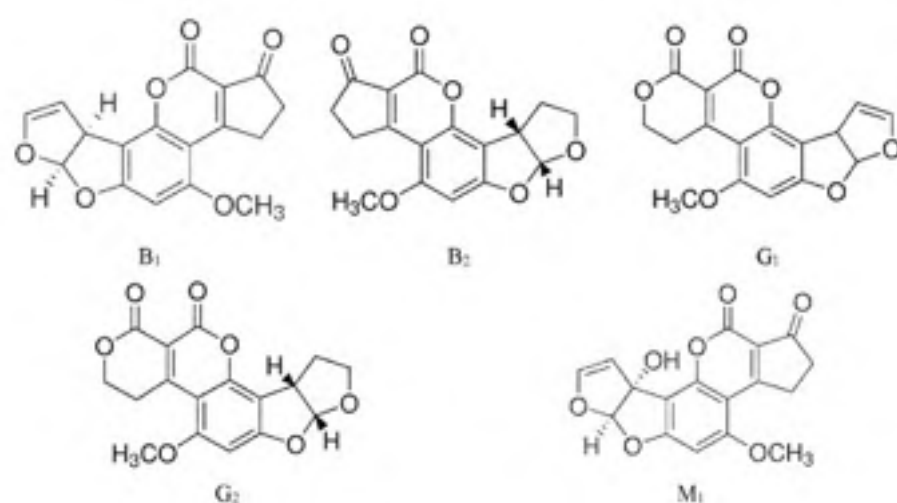


图 1-1 黄曲霉毒素结构
Fig.1-1 Structure of aflatoxins

1.2.1.2 毒性危害与限量

黄曲霉毒素是迄今为止已知的毒性最强的有毒物质之一，在几种黄曲霉毒素中，毒性最强的是黄曲霉毒素 B_1 (AFB_1)，其毒性 10 倍于氰化钾，属于特剧毒物质范畴。黄曲霉毒素 B_1 可导致肝损伤和诱发肝癌，也能诱发胃癌、肾癌、直肠癌以及其他等部位的癌症，具有很强的致癌性、致畸和致突变作用。因此黄曲霉毒素 B_1 在 1988 被联合国世界卫生组织下的癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 归为第一类致癌物质^[24]。

黄曲霉毒素 M_1 (AFM_1) 主要是由黄曲霉毒素 B_1 经哺乳动物摄入后，经过体内的细胞色素 CYP450 1A2 作用后，在呋喃环 C10 位置羟化后的产物。 AFM_1 主要存在动物的内脏、肌肉组织、内脏、蛋和尿液中，其中乳汁中最为常见。与 AFB_1 相比， AFM_1 的毒性相对低一些，但致癌性相当，因此也被癌症组织 IRAC 在 2002 年列为第一类致癌物^[25]。

由于黄曲霉毒素在食物中的广泛存在以及特剧毒性，因此世界各国均制定了严格的限量标准。我国政府在 2011 年发布最新的 GB2761-2011 中对其食物中黄曲霉毒素的含量做了严格的规定^[26]，见表 1.1。

1.2.1.3 污染情况

黄曲霉毒素 B_1 的污染普遍存在于世界范围内的各种粮食谷物中，其中污染最重的主要有玉米、花生和棉籽等。Castillo-Urueta 等 2006 和 2007 年在墨西哥城采集并检测

表 1-1 GB2761-2011 食品中黄曲霉毒素限量指标

Table 1-1 The maximum residue limit of AF by GB2761-2011

黄曲霉毒素	食物类别	限量 $\mu\text{g}/\text{kg}$
AFB ₁	谷物及其制品	5~20
	豆类及其制品	5
	坚果及籽类	5~20
	油脂及其制品	10~20
	调味品	5
	特殊膳食食品（婴幼儿食品）	0.5
AFM ₁	乳及乳制品	0.5
	特殊膳食食品（婴幼儿食品）	0.5

表 1-2 欧盟食品中黄曲霉毒素的限量标准

Table 1-2 The maximum residue limit of AF by the European Union

食品	最大残留限量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
落花生(花生)和其他油籽及其加工产品	2.0	4.0	—
巴旦木、开心果和杏仁	8.0	10.0	—
食用榛子和巴西坚果,	5.0	10.0	—
坚果及其制品、果脯、谷物食品和谷物加工制品	2.0	4.0	—
生牛奶, 杀菌牛乳以及用于生产奶制品的牛奶。	—	—	0.050
供婴儿和幼儿食用的谷类加工食品以及婴儿食品	0.10	—	—
婴儿配方食品和后续配方食品	—	—	0.025
专供婴儿食用的具有特殊医疗目的的疗效食品	0.10	—	0.025
无花果干	6.0	10.0	—

了 396 份市场上的玉米样品, 发现约有 13% 的样品超过了当地的限量标准 ($12 \mu\text{g}/\text{kg}$), 在受到污染的 56 份样品中, AFB₁ 的平均含量为 $12.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 黄曲霉毒素总量的平均含量在 $20.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[27]; Abbas, M. 对巴基斯坦地区 72 份花生样品进行检测, 发现 82% 的检测样品中含有黄曲霉毒素, 含量在 $14.3 \sim 98.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ 之间^[28]。在 2004 年的上半年, 有 317 名肯尼亚人因为出现肝衰竭症状被送往医院, 最终死亡 125 人, 当地卫生官员排除了急性肝炎, 怀疑是由黄曲霉毒素急性中毒。经检测发现食用的玉米样品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量竟高达 $4400 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[29]; 高秀芬在 2011 年对从吉林、河南、湖北、四川、广东、广西采集到 276 份玉米样品进行检测, 发现 75.36% 的样品含有黄曲霉毒素 (总量), 平均水平为 $44.04 \mu\text{g}/\text{kg}$, 其中 AFB₁ 的阳性检出率最高, 为 74.55%, 平均含量为 $39.64 \mu\text{g}/\text{kg}$, 说明黄曲霉毒素的污染在我国较为广泛, 南方省份的检出率高于北方^[30]。李凤琴在 2007~2008 年抽检了在中国河南、河北、广西、安徽、四川、重庆和江苏等 7 个

由于黄曲霉毒素 B₁ 在粮食谷物中的污染非常普遍, 由此加工成的饲料也会经常受到污染。AFB₁ 经过哺乳动物的体内代谢和转化, 会通过乳汁中排出 AFM₁, 造成普遍的乳制品安全问题。Aygun 在 2009 年检测了 120 份土耳其当地传统奶酪食品, 发现在 72 份 (60%) 样品中 AFM₁ 的含量在 16 ~ 1043 ng/kg, 其中 16 份 (13.3%) 的样品中 AFM₁ 的含量超过了当地最大允许值 (250 ng/kg), 可能会对当地人群造成健康风险^[32]; Iqbal 在 2010 年 11 月到 2012 年 4 月期间, 抽取巴基斯坦市场上的 107 份牛奶样品、96 份酸奶、116 份白奶酪、150 份奶油芝士和 74 份奶油, 对检测其 AFM₁ 含量, 结果表明在 71% 的牛奶样品、61% 酸奶样品、78% 白奶酪、59% 奶油芝士和 45% 奶油样品中检出 AFM₁, 其中 58% 的牛奶样品、47% 酸奶样品、15% 白奶酪、11% 奶油芝士和 52% 奶油样品中的 AFM₁ 含量高于欧盟标准^[33]; Fallah 在 2007 年十月到 2008 年五月随机抽取了 210 份奶酪样品 (116 份白奶酪和 94 份奶油芝士) 检测, AFM₁ 的检出率为 76.6%, 含量在 52.1~785.4 ng/kg, 其中 24.2 的样品中 AFM₁ 的含量超过欧盟标准^[34]; Oliveira 在 2009 年抽查了巴西 75 份超高温奶, 发现 23 份 (30.7%) 的样品中含有 AFM₁, 含量在 1000~4100 ng/L, 超过了巴西的最大限量规定^[35]。2011 年 12 月我国质检总局发布的乳制品检测报告结果显示, 国内某公司牛奶产品被检测出 AFM₁ 超标 140%, 在社会上造成巨大影响^[36]。Zheng 在 2010 年抽取了中国北京、河北、山西、上海和广东五省 360 份生牛奶, 测定其 AFM₁ 含量, 结果表明 78.1% 的牛奶中还有 AFM₁, 含量在 5~123 ng/L 之间, 低于中国限量规定含量, 但是有 10% 的样品超过了欧盟的限量规定^[37]。

1.2.2 赭曲霉毒素

1.2.2.1 理化性质

赭曲霉毒素 (Ochratoxin) 主要是由赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*)、纯绿青霉 (*Penicillium verrucosum*) 和碳黑曲霉 (*Aspergillus carbonarius*) 产生的有毒次级代谢产物, 主要有 9 种结构类似物^[38]。其中对人类健康危害最大的主要是赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)。

赭曲霉毒素 A 为无色针状晶体, 其分子量为 403.81, CAS 号: 303-47-9, 分子式为 C₂₀H₁₈ClNO₆, 分子结构式见图 1-2。OTA 的熔点为 169℃, 易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂, 溶于碱性盐溶液, 微溶于水, 在紫外灯下发出绿色荧光, 紫外最大吸收峰在 330 nm, 另有一个弱吸收峰在 380 nm^[39]。OTA 对热稳定, 普通烹饪蒸煮只能降解部分毒性。

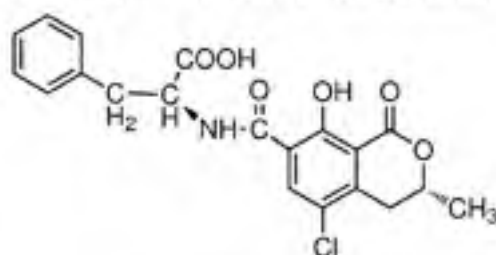


图 1-2 赭曲霉毒素 A 结构

Fig.1-2 Structure of ochratoxin A

1.2.2.2 毒性危害与限量

许多研究证明 OTA 不仅具有肝脏和肾脏毒性,而且具有致癌、致畸、致突变和免疫抑制作用。联合国癌症研究组织也将其列为 CLASS 2B 类致癌物质^[40]。OTA 进入动物组织后,主要的靶器官是肝脏和肾脏。不同动物对 OTA 的敏感性不同,其经口 LD₅₀ 见表 1-2^[41]。从表中可以看出,狗和猪对 OTA 比较敏感,而小鼠和大鼠最不敏感。有研究表明 OTA 可能是人类巴尔干地方性肾病和北非慢性间质性肾病的主要致病因素,并有可能导致多种泌尿系统上皮组织肿瘤^[42-43]。OTA 在人体内的清除速度比其他实验动物慢,因此会增加接触暴露时间,导致更严重的危害^[44]。

表 1-3 OTA 对不同动物经口 LD₅₀Table 1-3 Oral LD₅₀ values of OTA

动物种类	经口 LD ₅₀ (mg/kg)
大鼠	20~30
小鼠	48~58
猪	1.0
狗	0.2
鸡	3.6

由于 OTA 具有的致癌和致病性,世界各国和组织均对 OTA 在食品中的限量做了非

1.2.2.3 污染情况

欧洲的葡萄酒产量占到世界总产量的 70%左右,有大量研究调查了欧洲葡萄酒中 OTA 的含量。有研究表明欧洲葡萄、葡萄酒和果脯中 OTA 主要是碳黑曲霉 (*Aspergillus*

carbonarius) 造成的^[47]。Valero 调查了欧洲不同地区 121 种不同酿造方法的葡萄酒, 发现总共有 19.8% 的葡萄酒 OTA 的含量超过了欧盟的最高限量 ($2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)^[48]。李增宁对河北食管癌、胃癌高发区的粮食中 OTA 的含量进行调查, 发现赞皇县粮食中 OTA 的检出率为 45.16%, 平均含量为 $2.41 \mu\text{g}/\text{kg}$, 最高达 $14.25 \mu\text{g}/\text{kg}$, 已经超过我国限量规定^[49]。付鹏程调查了 31 份取自部分国家粮食储备库的稻米样品, 对其真菌毒素进行测定, 发现 OTA 的阳性率为 87.10%, 超标率为 3.22%^[50]。Vecchio 在 2011 年调查了意大利市场上的 44 分咖啡产品, 发现 96% 的样品中含有 OTA, 其中有 12% 的样品中 OTA 的含量高于欧盟的最高限量 ($2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)^[51]。de Magalhães 测定了 2006 年 56 分可可豆中 OTA 的含量, 其中有 4 份 (7.4%) 样品中 OTA 的含量超过了欧盟最高限量^[52]。

1.2.3 玉米赤霉烯酮

1.2.3.1 理化性质

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 又称 F-2 毒素, 是一类具有较强雌激素作用的非甾醇类真菌毒素, 主要由禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*)、黄色镰刀菌 (*F. culmorum*)、木贼镰刀菌 (*F. equiseti*) 半裸镰刀菌 (*F. semitectum*) 等镰刀菌通过聚酮途径合成的次级代谢产物^[53]。ZEN 纯品为白色结晶物质, 其分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$, 分子量为 318.4, 熔点约 161°C , 难溶于水, 易溶于甲醇、乙腈、乙酸乙酯、氯仿的有机溶剂和碱性水溶液。ZEN 的甲醇溶液在紫外灯下呈现蓝绿色^[54]。ZEN 虽然溶于碱性溶液中, 但其酯键被打开, 内酯结构被破坏, pH 下降后可以恢复。ZEN 属于雷索酸内酯类物质, 其结构类似物有五种: 玉米赤霉醇 (α -Zearalanol), β -玉米赤霉醇 (β -Zearalanol), α -玉米赤霉烯醇 (α -Zearalenol), β -玉米赤霉烯醇 (β -Zearalenol), 玉米赤霉酮 (Zearalanone), 分子结构式见图 1-3。

1.2.3.2 毒性危害与限量

ZEN 的急性毒性非常低, 其经口 LD_{50} 一般在 $20\sim 20000 \text{mg kg b.w.}$, 腹腔注射的毒性比经口要高一些, 具体见表 1-4^[55]。ZEN 及其类似物的毒性主要表现在其类雌激素活性和影响合成代谢上。由于具有雌激素作用, 因此可以通过雌激素受体刺激细胞增殖, 作为动物生长促进剂使用, 但由于其有严重的副作用, 已被各国禁止使用。ZEN 的雌激素作用也可对动物的生殖造成影响, 包括生殖力下降, 减少同胎生仔数, 改变甲状腺、肾上腺和脑垂体质量, 并引起血液中孕酮和雌激素的含量变化。在所有的实验动物中, 猪和羊对 ZEN 较为敏感^[56]。对于雄性动物, ZEN 可导致血清中睾酮含量下降、减少睾丸质量, 导致精子质量降低、雄性动物雌性化和性欲降低。最近的研究表明, ZEN 可以通过雌激素受体作用刺激动物或者人类的乳腺癌细胞增殖^[57], 并可以抑制细胞培养在无血清培养时的凋亡^[58]。另有报道 ZEN 同样具有细胞和遗传毒性, 并对免疫系统有一定的影响。高浓度的 ZEN 作用下, 有丝分裂原诱导的淋巴细胞增殖会受到抑制, 同时 IL-2 和 IL-5 的水平会升高。ZEN 对人类的致癌性证据不充分, 因此国际癌症研究组织 IARC 将其列为 CLASS 3。

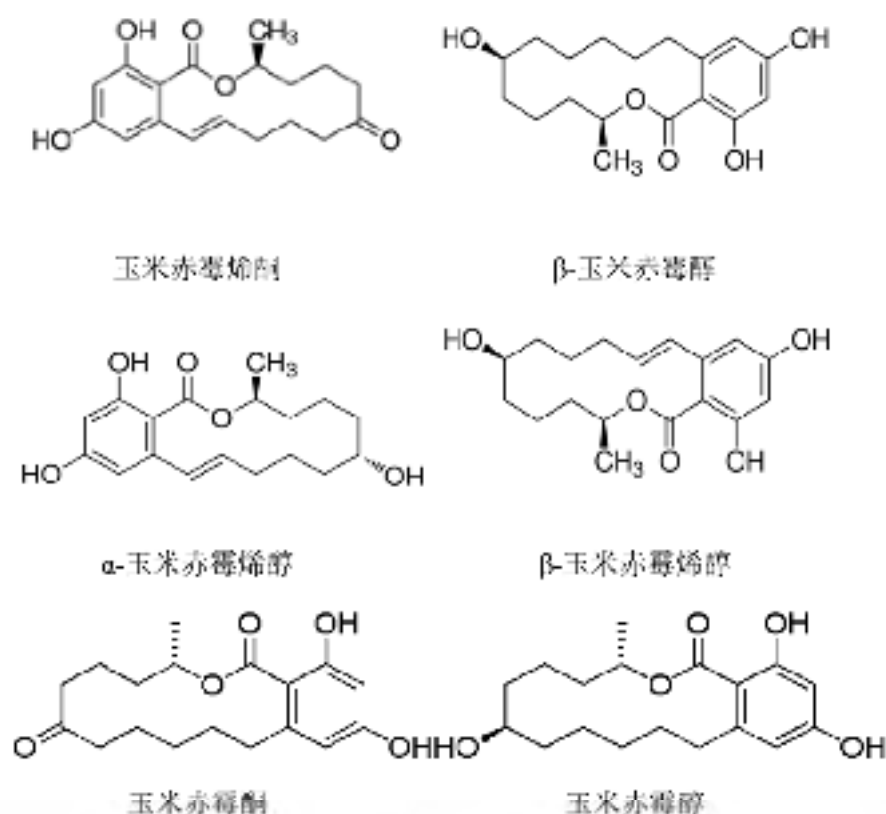


图 1-3 玉米赤霉烯酮及其类似物结构

Fig.1-3 Structure of zearalenone and analogues

为了控制 ZEN 的危害，我国政府在 2011 年公布了 ZEN 在食品中的最大限量，规定了谷物及其制品，主要包括小麦、小麦粉、玉米、玉米面（渣、片）中 ZEN 的限量为 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[26]。欧盟对食物中 ZEN 的含量做了更加详尽的规定，根据食物种类的不同限量从 20 到 $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，见表 1-6。

表 1-5 ZEN 对不同动物的急性毒性

Table 1-5 Acute toxicity (LD50) of ZEN in different animal

物种	性别	给药途径	LD50(mg/kg b.w.)
小鼠	M/F	口服	>2000
小鼠	F	口服	>20000
小鼠	F	腹腔注射	>500
大鼠	M/F	口服	>4000
大鼠	M/F	口服	>10000
大鼠	M/F	腹腔注射	5500
豚鼠	F	腹腔注射	2500
豚鼠	F	口服	>5000

1.2.3.3 污染情况

对世界各国和各地区粮食谷物中的 ZEN 及类似物的含量有大量文献进行了调查，表明其在粮食作物中有检出率很高，超过限量规定的有很大的比例。Zaied 检测了 2010 年收获的 205 份小麦样品中 ZEN 含量，结果表明 75% 的样品中含有 ZEN，其中的含量

表 1-6 欧盟对食品中 ZEN 最大限量

Table 1-6 The maximum residue limit of zearalenone by the European Union

食品	最大残留限量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
未加工谷物, 不包括玉米	100
未加工玉米, 拟用于通过湿磨处理的未加工玉米	350
直接供人类消费的谷物	75
精制玉米油	400
面包、糕饼、饼干、谷类小吃和早餐谷类	50
直接供人类食用的玉米、玉米点和玉米早餐谷类	100
加工谷类食品 (不包括加工玉米食品) 和婴幼儿食品	20
婴幼儿加工谷类食品	20
实际粒径 > 500 微米的玉米碎和玉米研磨产品	200
实际粒径 \leq 500 微米的玉米碎和玉米研磨产品	300

在 3~560 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均含量为 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[59]。Pleadin 对克罗地亚收获的 40 份玉米样品进行了 ZEN 含量的测定, 发现 87.5% 的样品中含有 ZEN, 其中含量最高的为 5.11 mg/kg ^[60]。Li 在 2010 年 4 月调查了中国长三角地区 76 份粮油样品, 发现 ZEN 的检出率最高, 为 27.6%, 含量在 10.0~440.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其中 9.2% 的样品中 ZEN 的含量超过中国规定的限量 (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[61]。Ji 抽取了 2010-2012 三年中国江苏省的 180 份小麦样品, 对其中的 ZEN 含量进行了测定, 结果表明 12.8% 的样品为阳性样品, 含量在 10.13~3048.88 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均含量为 73.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 超过了中国限量规定的 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[62]。李凤琴在 2007~2008 年抽检了在中国河南、河北、广西、安徽、四川、重庆和江苏等 7 个省 446 份玉米和小麦样品, 发现 192 份小麦样品中 ZEN 的阳性率为 22.9%, 其中有 6 份 (3.13%) 超过中国规定限量; 204 份玉米样品中, 有 85 份的阳性率, 其中 37 份超过中国限量规定, 超标率 13.14%^[11]。

1.2.4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇

1.2.4.1 理化性质

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON) 又名呕吐毒素 (Vomitoxin, VT), 主要是有镰刀菌中的禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*)、黄色镰刀菌 (*F. culmorum*) 产生的一种可以引起动物呕吐反应的单端孢霉烯族毒素。单端孢霉烯是一种具有四环类倍半萜烯醇, 其 12 位和 13 位上有环氧基团, 9 位和 10 位之间为双键结构。单端孢霉烯按照结构不同可以分为 A、B、C、D 四类。DON 按照结构属于 B 族类单端孢霉烯 (特征为 C8 位为酮基), 同属 B 族单端孢霉烯毒素的还有其在 C3 和 C15 位置上的乙酰基团衍生产物: 3-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-acetyldeoxynivalenol, 3-AcDON)、15-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-acetyldeoxynivalenol, 15-AcDON)、雪腐镰刀菌烯醇 (Nivalenol, NIV) 以及镰刀菌烯酮 X (fusarenon X (FX))。

DON 的分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$, 化学名称为 3a,7a,15-三羟基-12,13-环氧单端孢霉-9-烯-8-酮, 其分子量为 296.3, 结构式见图 1-4。纯品为无色结晶体, 熔点在 151 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 易溶

于水、甲醇、乙腈、乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷等极性溶剂，不溶于石油醚和正己烷^[63]。有文献报道 DON 在甲醇中不稳定，在室温中放置 22 天的 DON 其 TLC 发生明显变化，而乙腈和乙酸乙酯为其合适的长期保存溶剂^[64]。DON 在 210 nm 处的短紫外区有吸收峰，但在此紫外区大多数有机物均有吸收，因此无法作为特征吸收峰。DON 性质稳定，一般食物加工中的热，酸处理均等加工方式均不能有效破坏其结构，对碱处理比较敏感^[65, 66]。

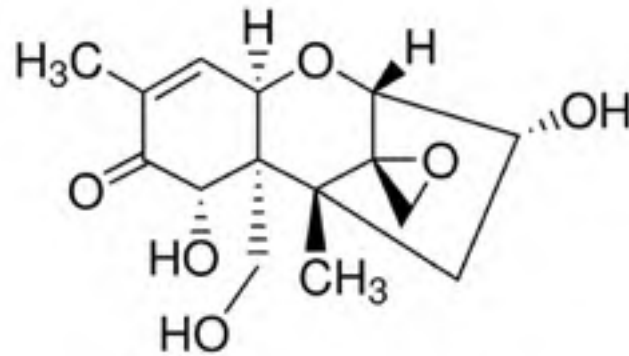


图 1-4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇结构

Fig.1-4 Structure of DON

1.2.4.2 毒性危害与限量

DON 主要的毒性机理是通过与 S60 核糖体结合或抑制肽基转移酶的活性抑制真核细胞的蛋白合成。DON 的毒性是常见的单端孢霉烯毒素中毒性最小的，但是其能导致最严重呕吐反应，因此又被称为呕吐毒素。不同种属的动物对 DON 的敏感性不同。马、狗、猪、猴子等较为敏感，猪对 DON 是最敏感的，是其他动物的 100 倍。DON 的吸收分厂迅速，摄入 0.1 mg/kg 的饲料后，10 min 内就会发生呕吐反应，20~30 min 后血液中的 DON 含量达到峰值，半衰期为 2~4 小时；超过 20 mg/kg 的含量时，会导致完全拒食。禽类、反刍动物对 DON 非常不敏感^[67]。B6C3F1 雌性小鼠的 DON 腹腔注射 LD50 为 49 mg/kg bw 经口 LD50 为 78 mg/kg bw^[68]，DDS 系雄性和雌性小鼠的经口 LD50 为 70 和 70.6 mg/kg bw；大鼠的经口 LD50 为 7.3 mg/kg bw^[66]。

除了呕吐、拒食、腹泻、头晕、头痛等急性反应外，DON 具有细胞毒性、干扰蛋白合成以及丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases, MAPKs）信号通路的作用。DON 对生长较快的细胞如淋巴细胞、脾脏细胞和造血细胞等细胞的具有明显的抑制^[69, 70]。Pestka J J 的研究表明 DON 和其他 B 族单端孢霉烯毒素（3-AcDON, 15-AcDON, NIV 和 FX）导致 50%细胞凋亡的浓度分别为 0.6, 0.5, 0.5 和 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 。DON 在 250~1000 ng/mL 的浓度时，可诱导半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶和 Jukat T 细胞发生凋亡；在用十四烷酸乙酸大戟二萜醇酯和离子霉素预处理后，DON 在 62.5~500 ng/mL 时明显的上调 IL-2 和 IL-8 的表达。但在同样浓度下的 FX 抑制 IL-2 表达，3-AcDON, 15-AcDON 和 NIV 没有明显的作用；3-AcDON, 15-AcDON 分别在 62.5~500 和 625~5000 ng/ml 浓度下上调 IL-8 的表达，而 FX 和 NIV 则没有明显作用。在细胞因子表

达差异说明了几种 B 族单端孢霉烯毒素在 MAPKs 通路上的作用是不同的^[71]。Kadota T 在 Caco-2 细胞上研究也说明了 DON 可以干扰细胞的基因表达和转运^[72]。

由于 DON 的具有严重的毒性和污染的广泛性，各个国家和地区都制定了食物中的最大限量。欧盟对食物中 DON 的最大限量见表 1-7，最严格的为婴幼儿食品中 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国仅对谷物及其制品（包括玉米、玉米面、大麦、小麦、麦片和小麦粉）做出了限量规定，为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[26]。

表 1-7 欧盟对食品中 DON 最大限量

Table1-7 The maximum residue limit of deoxynivalenol by the European Union

食品	最大残留限量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
未加工谷物，不包括硬粒小麦、燕麦和玉米	1250
未加工硬粒小麦和燕麦	1750
未加工玉米，拟用于通过湿磨处理的未加工玉米	1750
供人类直接食用的谷类食品，作为最终产品销售的	750
供人类直接食用的谷物面粉、麸皮和胚芽	
面食（干制）	750
面包、糕饼、饼干、谷类小吃和早餐谷类	500
供婴幼儿食用的谷物类加工食品	200
实际粒径> 500 微米的玉米碎和玉米研磨产品	750
实际粒径 \leq 500 微米的玉米碎和玉米研磨产品	1250

1.2.4.3 污染情况

有大量文献对世界各国和各地区粮食谷物中的 DON 及类似物的含量进行了调查，表明其在粮食作物中有很广泛的分布，超过限量规定的有很大的比例。李凤琴在 2007~2008 年抽检了在中国河南、河北、广西、安徽、四川、重庆和江苏等 7 个省 446 份玉米和小麦样品，发现 192 份小麦样品中 DON 的阳性率为 88%，但均未超过中国规定限量；玉米样品中，有 50.5% 的阳性率，其中 7 份超过中国限量规定，平均超标 2.1 倍。除了 DON，其类似物和衍生物，如 3-AcDON，15-AcDON 和 NIV 等也有较高的检出率，不容忽视^[31]。Ji 抽取了 2010-2012 三年中国江苏省的 180 份小麦样品，对其中的 DON 含量进行了测定，结果表明 74.4% 的样品为阳性样品，含量在 14.52-41157.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平均含量为 488.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[62]。Bensassi, F. 于 2007 年抽检了 65 份玉米样品，发现 83% 的样品中含有 DON，含量在 $12.8 \pm 5\% \sim 30.5 \pm 13.3\% \text{ mg}/\text{kg}$ 之间，超过了欧盟 1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 限量标准^[73]。Sifuentes 调查了 2008 和 2009 两年巴西种植的 113 份小麦样品，发现 66.4% 的样品检出了 DON，其含量在 206.3 to 4732.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，DON 的平均含量为高达 1894.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，估计摄入量为 1.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. 超出了粮农组织/世界卫生组织专家委员会 (FAO/WHO) 最大可容忍的日摄入量 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.^[74]。Mishra 测定了印度 50 份小麦、25 份玉米和 25 份大麦样品中的 DON 含量，发现 30% 的样品中含有 DON，其中 7% 的样品 DON 的含量超过了印度食品安全和标准规定 (1 mg/kg)，估计摄入量为 7.72 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. 超出了粮农组织/世界卫生组织专家委员会 (FAO/WHO) 最大可容忍的日摄入量 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.^[75]。Larsen 报道了 ILSI Europe Natural Toxin Task Force 组织的研讨会上对欧洲谷

物中 DON 的含量调查做了整体总结, 总共 11000 份 (57%) 的样品中被检出含有 DON, 其中 7% 的谷物和面粉中 DON 的含量超过了 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的欧盟限量^[76]。

1.2.5 T-2 毒素

1.2.5.1 理化性质

T-2 毒素也属于镰刀菌产生的单端孢霉烯族毒素, 主要有 *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae*, and *Fusarium acuminatum* 等镰刀菌分泌产生。由于其 C8 位置没有羰基基团, 因此 T-2 毒素和其类似物 HT-2 属于 A 类单端孢霉烯族毒素。T-2 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_9$, 分子量为 466.52, 其结构式见图 1-5。T-2 毒素在水中溶解度不大, 几乎不溶解, 易溶于甲醇、乙醇、DMF、乙酸乙酯、乙腈和氯仿的有机溶剂。T-2 毒素不容易挥发, 对光和温度不敏感, 但强酸和碱性条件下其活性大部分会被破坏。

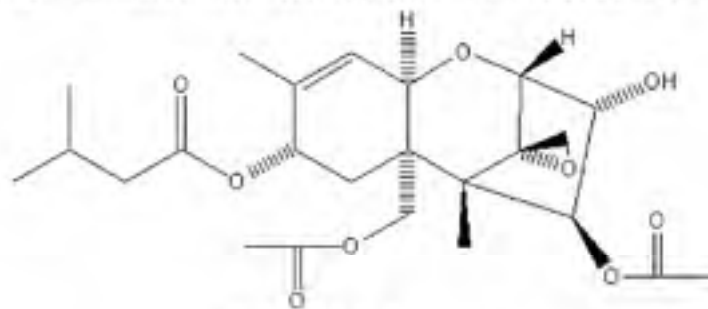


图 1-5 T-2 毒素的结构

Fig.1-5 Structure of T-2 Toxin

1.2.5.2 毒性危害与限量

尽管 T-2 毒素在食物中的检出率相比 DON 等其他单端孢霉烯族毒素要低, 但是其毒性在所有单端孢霉烯族毒素中是最高的^[77]。T-2 毒素的急性中毒主要表现为呕吐、拒食和体重下降等。其毒性因物种不同而有差异, T-2 毒素对各种动物的 LD_{50} 见表 1-8。一般认为猪和家禽对 T-2 毒素比较敏感, 而反刍动物因为瘤胃中微生物作用, 有一定的耐受。在 LD_{50} 的 1/5 剂量时, T-2 毒素可导致鸽子发生呕吐。大鼠暴露在 3 和 5 mg/kg 的剂量时, 可发生网状细胞过多症和淋巴球减少症, 最明显的病变器官是胸腺、淋巴结和集合淋巴小结。在对大鼠喂食 T-2 毒素后可以发现大鼠大脑中色氨酸、血清素、吲哚胺和多巴胺水平浓度发生变化。当鸡摄入含有 T-2 毒素的饲料后, 会明显导致产蛋率和孵化率的下降^[78], 同时观察到血清中总蛋白和胆固醇水平的下降和尿酸和乳酸脱氢酶水平的上升。低剂量的 T-2 毒素对动物的免疫系统有刺激作用, 可以提高 IgA 和 IgE 的水平, 但是在高剂量时会对免疫系统造成抑制^[79]。另外有研究表明 T-2 毒素可能与人类食物中毒性白细胞缺乏病症 (alimentary toxic aleukia, ATA)、大骨节病 (Kaschin-Beck disease) 和克山病 (Kersan disease) 有着密切的关系^[80]。

由于 T-2 毒素的危害, 粮农组织/世界卫生组织专家食品添加剂委员会 (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) 和欧盟食品安全管理局 (European Food Safety Authority, EFSA) 已经发表了食物中 T-2 毒素和 HT-2 毒素带来的风险^[81]。欧盟食品科学委员会在 2002 年制定了临时的每日耐受摄入量, T-2 和 HT-2 总量不超过 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw; 随后在 2011 年欧洲食品安全局制定了 T-2 和 HT-2 每日耐受

摄入量, 总量不超过 100 ng/kg bw^[82]。我国规定配合饲料中 T2 毒素的允许量最高为 1 mg/kg^[83]。

表 1-8 T-2 毒素对不同动物经口 LD₅₀Table 1-8 The LD₅₀ values of T-2 toxin

物种	给药途径	LD ₅₀ (mg/kg b.w.)
小鼠	口服	10
大鼠	腹腔注射	1.5
豚鼠	腹腔注射	1.2
鸡	口服	1.84~6.3
猪	静脉注射	1.21

1.2.5.3 污染情况

T-2 毒素在各种谷物中污染非常普遍, 尤其是在玉米、小麦和燕麦中^[84]。冯杰调查了黑龙江省具有代表性的 13 个县总共 390 份粮食样品, 通过 ELISA 测定其 T-2 含量, 发现 130 份玉米中有 43 份阳性, 但含量均小于 100 ng/g, 而 130 份面粉中, 有 80 份阳性, 其中超过 100 ng/g 的有 8 份, 说明当时黑龙江省面粉中 T-2 毒素污染较重^[85]。付莹在 2009 年调查了青海省大骨节病高发区兴海县家庭中主粮 T-2 含量进行了调查, 发现小麦中平均含量为(78.91±46.17) μg/kg, 而面粉平均含量为(47.47±46.47) μg/kg, 与当地大骨节病发病分布一致^[86]。

1.3 真菌生物毒素检测技术的研究进展

由于在世界范围内真菌毒素的污染非常普遍, 再加上各种真菌毒素的在很低剂量就产生的各种毒性, 因此世界各国的研究人员在几十年时间一直都在开发更加灵敏、更加快速、更加低成本和准确的检测方法。归纳下来可以分为: 薄层层析法 (TLC)、仪器检测方法 (主要是 HPLC、GC 及质谱联用)、免疫学检测方法 (包括 ELISA、IAC 等)、电化学检测方法、表面增强拉曼 (SERS) 以及各种融合后的检测方法, 但目前实际应用最为广泛主要还是仪器检测方法 (准确、适用于确证分析) 和免疫学检测方法 (快速、简便、适用于快速筛查和现场检测)。因此主要以应用最为广泛的检测方法进行综述。

1.3.1 仪器分析法

1.3.1.1 黄曲霉毒素仪器检测方法

黄曲霉毒素仪器检测方法主要是液相法, 检测器一般使用荧光检测器 (需要进行柱后衍生, 包括化学衍生、电化学衍生和光化学衍生) 或者质谱检测器, 样品前处理一般都会用到固相萃取或者免疫亲和柱。Zhu Z 建立了利用亲和柱纯化有色大米中的黄曲霉毒素检测方法, 经过柱后电化学衍生和荧光检测器后, AFB₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的最低检测限和最低定量限分别为 0.025、0.015、0.05、0.05 和 0.08、0.05、0.15、0.15 μg/kg, 回收率在 75.2~94.7%^[87]。Afsah-Hejri 优化了 HPLC 检测黄曲霉毒素的条件, 在流动相为 乙腈:水:甲醇=8:54:38, 柱温 24℃, 流速在 0.4 mL/min 时, 为最佳定量条件, AFB₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的最低检测限分别为 0.03、0.01、0.09 和 0.06 ng/mL^[88]。Fu 利用 UHPLC 建立

的黄曲霉毒素检测方法, 样品经过乙腈:水(86:16)提取和固相柱净化后, 没有经过化学衍生, 而是利用紫外检测器在 360 nm 处检测, AFB₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的最低检测限分别为 0.32、0.19、0.32 和 0.19 μg/kg, 定量限为 1.07、0.63、1.07 和 0.63 μg/kg^[89]。

考虑到 AFM₁ 危害, 世界各国都制定了针对 AFM₁ 的非常严格的限量, 比如欧盟规定的婴儿乳品中 AFM₁ 的最高限量为 0.025 μg/kg, 对仪器的检测方法提出了非常高的要求。世界各国的研究人员一直在努力优化提高 AFM₁ 的仪器检测方法, Wang 利用 OASIS HLB SPE 柱对液体奶和奶粉样品进行纯化后, 利用 HPLC 和荧光检测器检测器中的 AFM₁ 含量, 方法的最低检测限分别可以达到 0.006 和 0.026 μg/kg, 回收率在 85.4~96.9% 之间, RSDs 在 0.8~3.6%^[90]。Cavaliere 建立了利用 HPLC/MS 检测牛奶中 AFM₁ 的方法, 并对比了电喷雾 ESI 和大气压 APPI 两种电离方式时, 除了 AFM₁ 的检测限分别为 12 ng/kg 和 6 ng/kg 的区别外, 其他性能没有区别, 均符合欧盟的最大限量检测要求^[91]。

1.3.1.2 赭曲霉毒素 A 仪器检测方法

很多仪器检测方法已经开发出来用于检测各种食物中的 OTA 含量。最主要的分离方法是基于 HPLC, 由于 OTA 具有紫外吸收峰和激发后能发出荧光, 因此可以选用紫外、荧光和质谱检测器。Yang 建立了中草药中 OTA 含量的 HPLC 检测方法, 样品经过甲醇:水(80:20, v/v)提取后, 经过亲和柱纯化后上样检测, 检测器为荧光检测器, 其 LOD 和 LOQ 分别为 0.3 和 0.8 μg/kg^[92]。Afsah-Hejri 通过优化 HPLC 的各项条件, 得到的最佳的检测条件为 5mM pH 2.36 的醋酸盐缓冲液:乙腈:甲醇(40:30:30, v/v), 激发和发射波长分别为 333 和 467 nm, 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 24℃, 在优化后的条件下, OTA 的回收率和 LOD 分别为 95.4% 0.05 ng/g^[93]。Arroyo-Manzanares 建立了一种基于反相毛细管高效液相色谱(capillary HPLC)串联激光诱导荧光检测器(LIF)的检测红酒中的 OTA 检测方法, 通过分散液-液微萃取作为简单有效的前处理方法, 其检测限为 5.5 ng/L, 回收率在 91.7~98.1%, 由于方法使用较少的有机溶剂, 更加环保; 同时 LIF 的使用也提高了检测方法的灵敏度^[94]。Arroyo-Manzanares 通过适配体作为亲和配体的 SPE 柱作为前处理方法, 建立了 OTA 的 HPLC-FLD 检测方法, 其回收率在 74%~88%, 其 LOD 和 LOQ 分别为 23 和 77 pg/g^[95]。

1.3.1.3 玉米赤霉烯酮仪器检测方法

单纯利用仪器方法检测 ZEN 的研究已不多见, 大部分研究集中在上个世界 80 年代及以前, 目前更多的研究集中在 ZEN 和其他毒素同时检测的研究上^[96, 97]。Zhang 建立了利用 HPLC 及 FLD 检测器检测中国药用植物中的 ZEN 含量的方法, 样品经过甲醇:水(80:20, v/v)提取和 IAC 纯化后, 方法的回收率在 80.8~98.3% 之间, 检测限为 9.5 μg/kg, 并对阳性样本进一步用 LC-ESI-MS/MS 进行确证^[98]。孟娟建立了粮食中玉米赤霉烯酮及其 5 种类似物的 UPLC-MS/MS 检测方法, 样品经过乙腈:水(84:16, v/v)溶液提取后, 利用石墨化炭黑(GCB)SPE 柱进行纯化后用 UPLC-(ESI)MS/MS 进行测定, 六种物质的检出限为 0.1~0.2 μg/kg, 回收率在 79.9%~104.0% 之间^[99]。Antep 利用一种新的液相微萃取方法-分散液-液微萃取(DLLME)作为前处理方法, 前处理浓缩倍数可以达到 43.3 倍, 配合 HPLC-FLD 检测啤酒中的 ZEN, 其检测限和定量限可以达到 0.12 和 0.40 μg/L, 回

收哦率在 71%~108% 之间^[100]。Rahmani 开发建立了一种同时检测包括 ZEN, AF 和 OTA 在内的多种毒素 HPLC-FLD 检测方法, 样品经过甲醇: 水(80:20, v/v)提取后, 利用多功能 IAC 纯化并用于仪器检测, ZEN 的检测限和定量限分别为 0.5 和 2 ng/g, 回收率在 77-104% 之间^[101]。

1.3.1.4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇仪器检测方法

DON 的仪器检测方法主要有 TLC、HPLC 和 GC, 其中最常用的是 HPLC, 检测器一般使用质谱或者紫外 UV 检测器(检测波长一般在 220nm 处), 也有见报道通过 2, 6-二甲基二氢吡啶衍生后, 利用荧光检测器进行检测。Cunha 利用 GC-MS 检测人类尿液中的 DON 及其代谢物, 其检测限和定量限分别在 0.06~0.30 ng/mL 和 0.2~1.0 ng/mL 回收率高于 73%^[102]。Brenn-Struckhofova 开发了一种利用 sol-gel 亲和柱纯化样品, 并用 HPLC-UV 检测食物中的 DON 含量, 相比传统的免疫亲和柱, sol-gel 亲和柱具有同样的选择性, 但制造成本、保存稳定性和重复使用都更有优势。利用这种方法, 检测玉米、小麦和意大利面条样品, 检测限分别可以达到 240、200 和 207 ng/g, 回收率分别为 83%、99% 和 97%^[103]。

Klötzel 分别对比了不同的样品纯化方法(两种亲和柱和一种活性炭氧化铝柱)和检测器(二级阵列管 DAD 和荧光检测器 FLD)在样品处理和检测时的差异, 发现 PEG 会干扰亲和柱的回收率, 因此不建议使用。使用 DAD 检测活性炭氧化铝柱纯化的样品, 基质效应严重干扰方法准确度, 而通过衍生后利用 FLD 检测或者使用亲和柱时, 效果较好。同时也发现 DAD 检测器的方法灵敏度要优于 FLD 检测方法(LOD 分别为 1.4 和 7.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[104]。

1.3.1.5 T-2 毒素仪器检测方法

作为单端孢霉烯毒素中毒性最强的毒素, T-2 毒素及其代谢产物对动物和人体都会有毒性作用, 而且目前并没有有效的治疗方案针对 T-2 毒素中毒, 因此避免摄入 T-2 毒素就显得非常重要。为了达到这个目的, 分析化学研究人员建立很多方法来检测食物中的 T-2 毒素含量。一般常用的方法有 HPLC。对于 HPLC 来说, T-2 毒素和代谢产物没有强的紫外吸收, 为了达到好的检测灵敏度, 需要对其进行衍生后, 利用衍生物的荧光特性配合 FLD 检测器检测。Visconti A 利用 IAC 亲和柱纯化提取液后, 采用 1-氰酸萘(1-anthrolynitrile, 1-AN)对 T-2 进行衍生后, 建立了 T-2 毒素和 HT-2 毒素的 HPLC-FLD 方法, 其激发波长为 381 nm, 发射波长为 470 nm, 方法的最低检测限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (T-2) 和 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (HT-2), 回收率在 70%~100%^[105]。Lippolis V 对比和优化了芘-1-碳酰氯(Pyrene-1-carbonyl Cyanide, PCC)、2-萘甲酰氯(2-naphthoyl chloride, 2-NC) 和 1-萘甲酰氯(1-naphthoyl chloride, 1-NC) 三种 T-2 衍生试剂的检测效果, 发现 PCC 和 2-NC 两种衍生试剂要好于之前应用广泛的 1-AN, 对 T-2 毒素和 HT-2 毒素检测限最低可以达到 2.0 和 2.8 ng^[106]。

除了 FLD 检测器, 通用性和定性更好的 MS 检测器以及气相色谱 GC 也可以用来检测 T-2 毒素^[107, 108]。

1.3.1.6 多种毒素多重仪器检测方法

目前已知的真菌毒素大概有 300~400 种。由于这些毒素的物理化学性质有很大的不同,因此在不同食物基质中针对一种或者一类真菌毒素有很多的检测方法。在粮食生产过程中,粮食作物可能受到多种产毒真菌污染的污染,或者感染的真菌能同时产生多种毒素,因此会含有不止一种或者一类真菌毒素^[109]。有报道称如果使用单一的检测方法,需要多次测定才能知道各种真菌毒素的含量,不仅浪费时间,消耗大量人力物力,还降低了工作效率。因此急需能同时检测多种类真菌毒素的检测方法。目前已经有很多针对真菌毒素的检测方法的报道。Tanaka 利用 HPLC/APCI-TOF-MS 建立了同时检测谷物中镰刀菌和曲霉产生的 13 种生物毒素的方法,在实际样品中各种真菌毒素的 LOD 在 0.1~6.1 ng/g 之间,回收率在 71%~133%之间,说明 TOFMS 的高分辨率和高选择性可以用来建立食物中快速实时的多重真菌毒素的检测方法^[110]。郑翠梅利用固相 SPE 结合 LC/TOF-MS,建立了小麦和玉米中 13 种真菌毒素(单端孢霉烯族毒素、AF、FB、OTA 和 ZEN)的检测方法,其定量限在 1~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,回收率在 70.2%~109.7%之间^[111]。葛宝坤等采用多重免疫亲和柱纯化样品提取液后,利用 HPLC/MSMS 检测中药材中的 AF、FB、T-2、HT-2、OTA 和 ZEN 等 14 种真菌毒素的含量,在优化的条件下,各种毒素的 LOQ 在 1~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率在 71.9~99.7%之间^[112]。

1.3.2 免疫化学分析法

仪器方法虽然检测准确,但是需要价格昂贵的仪器、专业的实验室和操作人员、检测成本高,这些缺点限制了仪器检测方法的普及和大面积应用。免疫化学分析方法,是利用抗原和抗体的特异性反应为基础建立起来的特异性高、灵敏度高、成本低、对操作人员要求低的一类快速分析方法,其对环境和仪器要求低,样品检测通量高、速度快。因此适合大量样品的快速筛查和现场检测^[113, 114]。常见的免疫化学分析方法可以分为酶联免疫吸附分析(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、免疫层析试纸条(immunochromatographic strip, ICA, 也称 Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay, 俗称胶体金试纸条)、免疫亲和柱(Immunoaffinity chromatography, IAC)、化学发光免疫分析(chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay, CL-ELISA)以及时间分辨荧光免疫分析(timed-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)等等。其中最常用、最成熟、应用最广的主要是 ELISA、胶体金试纸条和 IAC。ELISA 除了肉眼定性判断和半定量判断结果,还可通过酶标仪测定吸光值进行定量分析;胶体金试纸条 ICA,只需将试纸条插入待测液体,即可在几分钟内读取结果,是最适合现场检测的免疫分析方法;IAC 主要是在样品前处理方面,通过高度特异性的吸附和洗脱目标物质,可以排除各种基质效应的干扰,一般和仪器分析方法联用^[113, 115, 116]。免疫分析的核心是抗体,其特异性和亲和力直接影响到方法的特异性、准确性和灵敏度,因此制备出性能优良的抗体(主要是单抗),是整个免疫化学分析方法的基础。本章节主要对 ELISA 和 ICA 方法进行综述。

1.3.2.1 黄曲霉毒素免疫分析方法

针对黄曲霉毒素的限量主要分为 AFB₁、AF 总量 (B₁+B₂+G₁+G₂) 和 AFM₁ 的限量, 因此黄曲霉毒素免疫分析的主要检测目标也分为以上三种。Li 利用设计策略, 使用 AFG₂ 作为竞争分子筛选到了 3 个群选型单克隆抗体。其中 10C9 对 G₂ 的交叉高达 65%, 对 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的 IC₅₀ 分别为 2.09、2.23、2.19、3.21 和 2.95 ng/mL。建立了花生样品中黄曲霉总量的检测方法, LOD 在 0.06~0.09 ng/mL (样品稀释 10 倍检测), 回收率在 87.5%~102.0%^[117]。同一个课题组 Zhang 利用两步筛选方法得到了一株超灵敏抗体, 对 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的 IC₅₀ 分别为 1.2、1.3、2.2 和 18.0 pg/mL, 是报道过的最灵敏的抗体^[118]。Jiang 制备了一株 AF 群选型单克隆抗体细胞株, 其产生的单抗对 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的 IC₅₀ 分别为 0.13、0.22、0.081、0.42 和 0.16 μg/kg, 在此基础上建立了可以检测 B₁ 和 M₁ 的间接竞争 ELISA, LOD 分别为 0.52 和 0.031 μg/kg, 回收率在 73%~121%^[119]。Acharya 利用一种对 AFB₁ 特异性较高的抗体, 设计了一种可以检测 AF 总量的一种非竞争 ELISA, 同样的抗体在非竞争和传统的竞争 ELISA, 对 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的交叉分别为 100%、150%、125%、35% 和 100%、16.5%、14.5%、0.9%^[120]。

相比 ELISA 分析, 一般 ICA 的灵敏度要差一些, 再加上样品前处理中的稀释倍数的影响, 因此检测试剂样品中仍然具有很高的挑战性, 对抗体的灵敏度和亲和力有更高的要求。Zhang 利用 AFB_{2a}-BSA 作为免疫原免疫小鼠, 得到了一株对黄曲霉 B1 高度特异性的单抗细胞株 3G1, 利用此细胞株单抗制备的胶体金试纸条, 肉眼识别的最低检测限为 1 ng/mL。通过分析天然存在 AFB₁ 的样品, 并和 HPLC 验证对比, 具有良好的相关性, 说明开发的 ICA 是可以满足农产品中对 AFB₁ 选择性检测需求^[121]。Moon 采用一种不同的策略, 利用金纳米粒子和 AFB₁-BSA 偶联作为检测试剂, 单抗作为 T 线固定在硝酸纤维素膜上, 在 10 ppb B₁ 浓度时可看到 T 线不显色^[122]。Anfossi 建立了一种检测玉米中四种 AF 的定量 ICA 方法, 其 LOD 为 1 μg/kg, 检测范围为 2~40 μg/kg, 通过分析 25 份实际样品, 并与官方验证方法对比, 发现有很好的符合度^[123]。

1.3.2.2 AFM₁ 免疫分析方法

AFM₁ 在奶制品和婴幼儿食品中的含量均有严格的限量, 我国的限量为 0.5 μg/kg, 而欧盟的限量标准最低是 0.025 μg/kg。如此严格的限量, 对所有的分析方法都是一种挑战。无论是液态的牛奶还是需要溶解稀释的奶粉, 前处理要求非常苛刻, 为适应快速和现场检测的目的, 一般不提倡进行提取等耗时繁琐前处理, 需要尽量减少或者不稀释样品进行测试。Wang 利用免疫兔子得到的抗体, 建立了 AFM₁ 直接竞争 ELISA, 方法的 IC₅₀ 为 0.014 ng/ml (间接竞争 ELISA 为 0.06 ng/ml), 对 B₁ 的交叉为 70%; 同时建立的 ICA 方法, 其 LOD 为 1ng/mL^[124]。Pei S C 在筛选到的单克隆抗体细胞株基础上, 建立了 AFM₁ 的间接竞争 ELISA 方法, 抗体对 B₁ 和 G₁ 的交叉分别为 13.9% 和 6.7%, LOD 为 0.04 ng/ml, 在 0.1~3.2ng/mL 的加标样品分析时, 平均回收率为 98%^[125]。Guan 利用半固体培养基筛选得到一株 AFM₂ 单抗细胞株 2C9, 对 AFM₁ 的亲合力为 1.74×10^9 L/mol, 对其他黄曲霉毒素没有交叉, 通过优化 ELISA 过程中的一些物理化学影响因素 (pH、离子强度和封闭剂), 最终在牛奶和含奶谷物食品样品的 LOD 分别为 3 ng/L 和 6ng/L, 批内和批间差异小于 10%, 回收率 91%~110%^[126]。Vdovenko 建立的化学发光

ELISA, LOD 为 0.001 ng/mL, 检测区间为 0.002~0.0075 ng/mL, 批内和批间回收率分别为 81.5~117.6%和 86~110.6%^[127]。

Zhang 建立了一种不需要提取, 简单用水稀释后直接测试 AFM₁ 的 ICA, 其 LOD 和消线浓度分别为 0.3 和 4.0 ng/mL, 其肉眼判断结果和定量的 ELISA 有很好的相关性^[128]。Anfossi 建立了一种半定量 ICA 的 AFM₁ 检测方法, 样品通过离心脱脂后加入到样品孔后, 经过 37℃ 孵育 15min 后, 通过移动扫描仪进行光密度扫描, LOD 和 IC₅₀ 分别为 20 ng/L 和 99 ng/L^[129]。Zhang 利用双免疫原策略免疫小鼠得到一株对 M₁ 特异性的单抗, IC₅₀ 在 0.034 μg/L, 亲和力为 1.28×10⁹ mol/L, 在此基础上建立了对牛奶和奶粉中 AFM₁ 的 ICA 检测方法, 不需要任何前处理直接测试, 肉眼可判定的 LOD 分别为 0.1 和 0.8 μg/L, 完全消线浓度为 0.2 和 1.6 μg/L^[130]。

1.3.2.3 OTA 免疫分析方法

法定的 OTA 分析方法一般为仪器分析, 包括有机溶剂提取、SPE 或 IAC 净化以及上机测试。虽然准确, 但是成本高、耗时且需要专业人员。相比之下, 免疫学检测方法成本低、快速高通量, 但具有一定的假阳性, 因此可以作为仪器检测前大量样本的筛查。筛查到的阳性样本再进一步使用仪器方法确认。目前已经有很多 OTA 免疫检测方法的研究。

Yu 利用单抗建立了一种直接竞争化学发光 ELISA, 通过优化捕获抗体和酶标记 OTA 浓度的浓度、封闭液以及实验条件, 并和传统的显色 ELISA 比较, 其工作范围 (IC₂₀~IC₈₀) 分别为 0.02-0.3 ng/mL 和 0.17-2.2 ng/mL。在添加样本测试中, CL-ELISA 的回收率在 72%~125%之间^[131]。Zhang 制备了一株 OTA 单抗被开发了一种简单快速的间接竞争 ELISA, 抗体 IC₅₀ 为 1.70 ng/mL, 与 OTB 的交叉为 17%, 检测范围在 0.55~6.75 ng/mL 之间, LOD 为 0.15 ng/mL, 通过测试添加样本, 回收率在 89.7%~101.4%, 批内和批间偏差分别小于 4%和 8%^[132]。Liu 筛选得到 OTA 的细胞株, 并在单抗基础上建立直接竞争 ELISA 和 ICA 方法, ELISA 中抗体对 OTA、OTB 和 OTC 的 IC₅₀ 分别为 0.32、0.17 和 0.28 ng/mL, ICA 方法的 LOD 为 5.0 ng/mL^[132]。

Cho 制备了一株 OTA 单抗, 其 IC₅₀ 在直接竞争模式下为 1.20 ng/mL, LOD 为 0.12 ng/mL, 与 OTB 的交叉为 31.7%, 利用此单抗建立的 ICA 方法, 其 LOD 为 500 ng/mL, 灵敏度较差, 其原因可能是胶体金在膜上的不可逆固定化或者抗体的非特异性结合造成的^[133]。Lai 利用抗原模拟肽来取代 OTA-蛋白偶联物, 进而建立 ICA 分析方法, 其 LOD 为 10 ng/mL^[134]。Urusov 筛选到一株可耐受高浓度甲醇的 OTA 单抗细胞株, 最高可以耐受提取基质中 35%甲醇含量, 在此基础上建立的 ICA 方法, 消线浓度为 50 ng/mL, 通过光密度分析半定量, 其 LOD 可以达到 5 ng/mL^[135]。

1.3.2.4 ZEN 免疫分析方法

He 利用单克隆抗体来筛选丝状噬菌体展示的抗原模拟肽库, 筛选得到了可以模拟 ZEN 抗原决定簇的抗原模拟肽, 并将其用于 ELISA, 其检测范围在 100~10,000 pg/ml, LOD 为 100 pg/ml。通过和商业化的 ELISA 对比, 回收率相差不大^[136]。Pei 利用高通量 ELISA 筛选得到的单抗, 其对 β-玉米赤霉烯醇、α 和 β-玉米赤霉醇的交叉分别为 24.1%,

189.1%, 43.9%, 抗体 IC_{50} 为 1.79 ng/g。建立的间接竞争 ELISA 的 LOD 为 0.1 ng/g, 检测范围为 0.5~10 ng/g, 添加回收率在 80%~128%^[137]。Gao Y 为了避免非特异性的产生, 采用 Mannich 反应偶联 ZEN 到氨基化 BSA (cBSA) 制备免疫原, 产生的多抗和单抗对其他 5 种类似物的交叉小于 7% 和 2%。在单抗基础上建立了 ZEN 的 ELISA, LOD 为 1.56 $\mu\text{g/L}$, 回收率在 80%~120%, 变异系数 <15%, 批内批间差异均 <5%^[138]。

Liu 利用一株高灵敏的单抗建立了 ZEN 的 ICA 检测方法, 通过测定颜色密度, 可以在 1~50 ng/mL 范围内进行定量, IC_{50} 为 15 ng/mL^[139]。Wang 建立了一种可以同时检测 ZEN 和伏马毒素 (FB) 的试纸条, 通过优化金纳米粒子大小、喷墨浓度和缓冲液成分, 其检测限分别为 6 和 50 ng/mL, 通过与 ELISA 和 LC-MS 方法同时检测实际样品并对比数据, 结果具有很高的一致性^[140]。Shim 利用单克隆抗体建立的 ICA 方法, 通过优化 T 线包被和金标抗体的使用浓度, 在标准溶液和添加样本中的 LOD 分别为 2.5 ng/mL 和 30 $\mu\text{g/kg}$, 通过测试添加玉米样品和阳性玉米样本, 结果证明和 ELISA 和 HPLC 有很好的一致性^[137, 141]。

1.3.2.5 DON 免疫分析方法

免疫分析方法的核心在于抗体。抗体的特异性和亲和力决定了免疫分析方法的特异性和灵敏度。在文献报道的制备的 DON 抗体中, 大多对 DON 的衍生物 3-AcDON 或者 15-AcDON 有很强的交叉。其主要原因是由于抗原合成是位点的选择。不经过衍生的直接使用 C3 或者 C15 羟基或者同时衍生两个羟基, 以及选择性的利用其中一个羟基衍生后偶联蛋白, 产生的抗体都会有交叉性的问题。如果在 C3 位置的羟基进行琥珀酸酐的衍生, 那么产生的抗体一般会对 3-AcDON 有很强的交叉; 同样的道理适用于 C15 位置的羟基^[142, 145]。Schneider 利用 15-AcDON 多步衍生制备的 15-HS-DON 偶联蛋白制备的鸡蛋蛋黄抗体, 对 3-AcDON 和 15-AcDON 的交叉只有 15% 和 4%。在此抗体基础上建立的 ELISA 检测限为 2 $\mu\text{g/kg}$, 回收率在 104%~120%^[146]。何庆华在 DON 单抗的基础上, 建立了间接竞争 ELISA, 方法的 LOD 为 20 ng/mL, IC_{50} 为 103 ng/mL, 检测范围在 50~400 ng/mL 之间, 样品加标回收率在 83.3%~110.0% 之间, 批内和批间差异分别小于 10% 和 15%, 结果其其他商业 ELISA 和仪器方法对比没有明显差异^[147]。Ji 建立了一种基于小鼠多抗的间接竞争 ELISA 检测小麦中的 DON 含量, 其检测范围在 0.01~100 $\mu\text{g/mL}$, 回收率在 82%~93% 之间, 与 3-acDON 和 T-2 的交叉分别为 55.2% 和 6.3%^[148]。Li 建立了一种间接竞争 ELISA 来检测玉米中的 DON, 并通过 UPLC-MS/MS 进行了验证。方法的 IC_{50} 和检测限 (按 IC_{10} 计) 分别为 61.10 ng/mL 和 6.12 ng/mL, 在玉米和小麦样品中的添加回收率分别在 79.3%~115.2% 和 74.3%~118.3%, 与仪器方法的线性相关系数为 0.9884, 说明建立的 ELISA 可以用于实际样品的检测^[149]。

Kolosova 在单抗基础上建立了 DON 的 ICA 检测方法。通过优化硝酸膜种类、样品垫、包被原和金标抗体的浓度、封闭剂的种类等, 发现可以在高浓度和低浓度两个浓度

ICA 检测方法, 通过添加离子型表面活性剂 SDS 来抑制金标抗体和 T 线包被之间的非特异性结合, 其 LOD 在 50 ng/mL。Liu J 建立一种定量检测食物中 DON 的 ICA 方法, 整个试剂盒包括读卡器、扫描仪和试纸条, 标准溶液的检测曲线可以使用四参数方程进行拟合, LOD 为 0.30 mg/kg, 检测结果与仪器方法对比具有一致性^[151]。

1.3.2.6 T-2 毒素免疫分析方法

利用免疫方法检测 T-2 毒素的报道主要有柱形式、试纸条以及 SPR 的形式, 有关 T-2 毒素 ELISA 检测主要是商业化试剂盒的比对。

Pal 建立了一种膜过滤免疫分析和 ELISA 的 T-2 毒素检测方法, 并对两种方法进行了对比。在膜过滤免疫分析抗体固定在附有滤纸和聚乙烯卡的膜上, 使用 T-2-HRP 作为显色标记物, 氯萘酚 (4CN) 作为显色剂, 通过光密度定量。两种方法的 LOD 分别为 0.5 和 0.25 pg/孔 (点), 标准曲线范围分别是 1~20 和 0.5~20 pg/孔 (点), 两种方法的回收率都在 80~108%^[152]。Li 对比了 3 种形式的 ELISA, 包括传统的 ELISA、一步 ELISA 和 reverse ELISA (re-ELISA), 结果表明 re-ELISA 的 LOD 最低, 分别为 3.04 (T-2) 和 2.79 (HT-2) ng/mL, 在特异性、基质效应、准确度和精确度没有差异。在 50、200 和 500 ng/mL 的水平上添加回收率分别为 67.9~112.9%、60.8~108.8% 和 62.7~88.1%, RSD 分别小于 10.3%、14.0% 和 11.5%^[153]。Molinelli 在单抗基础上建立 T-2 毒素的定性和半定量方法, 其 cut-off 值在阳性小麦和燕麦中为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 通过光密度进行半定量分析, 在燕麦中线性检测范围为 250~350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[154]。

1.3.1.7 多种毒素多重免疫分析方法

粮食作物可能受到多种产毒真菌污染的污染, 或者感染的真菌能同时产生多种毒素, 因此会含有不止一种或者一类真菌毒素, 因此利用免疫分析快速检测多种真菌毒素可以提高检测效率。目前免疫分析在检测真菌毒素方面主要分为两个方向, 一种是需要借助仪器来区分不同毒素对应的信号变化, 如不同颜色荧光或者电信号等。Wu 利用适配体标记的多色上转化荧光纳米粒子和氧化石墨烯之间的荧光共振能量传递, 建立了 OTA 和 FB 毒素的同时检测方法, LOD 分别为 0.02 ng/mL 和 0.1 ng/mL^[155]。Saha 建立了一种基于膜形式的多重免疫分析, 原理同 ELISA, 不同之处在于将抗体固定在膜的不同区域, 利用此方法检测辣椒添加样本中的 AFB₁ 和 OTA, 检测限分别为 2 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[156]。Wang 建立了利用免疫芯片检测饮用水中六种真菌毒素 (AFB₁、AFM₁、DON、OTA、T-2 和 ZEN) 的方法, 其检测范围 0.04~1.69, 0.45~3.90, 20.20~69.23, 35.68~363.18, 0.11~1.81, 和 0.08~7.47 ng/mL, 回收率 80%~120%^[157]。

另外一种是利用不同位置的显色来区分不同的毒素种类, 如试纸条和显色柱等。Goryacheva 建立了一种净化偶联免疫分析的柱形式的检测方法, 方法基于含有净化层和不同检测层的 1 mL 小柱, 不同检测柱层固定有不同的抗体, 检测原理类似于竞争 ELISA, 同时检测香料中 AFB₁ 和 OTA 的 cut-off 值分别为 5 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 20 min 可以检测 6 个样品^[158]。Lattanzio 建立了一种可以同时检测玉米中 ZEN、T-2 毒素、HT-2 毒素、DON 和 FB 毒素的胶体金试纸条, 检测限分别为 280、400、1400、3200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 假阳性率不高于 13%^[159]。

1.4 本论文的主要研究工作

本论文的主要工作主要分为以下 7 个方面：

(1) 设计合成黄曲霉毒素 B₁ 和 M₁ 人工完全抗原，筛选制备特异性和群选性高灵敏单抗细胞株，并建立了 ELISA 检测方法；

(2) 设计合成 OTA 人工完全抗原，筛选制备特异性高灵敏单抗细胞株，并建立了 ELISA 检测方法；

(3) 设计合成 ZEN 人工完全抗原，筛选制备特异性高灵敏单抗细胞株，并建立了 ELISA 检测方法

(4) 设计合成 DON 人工完全抗原，筛选制备特异性高灵敏单抗细胞株，并建立了 ELISA 检测方法；

(5) 设计合成 T-2 人工完全抗原，筛选制备特异性高灵敏单抗细胞株，并建立了 ELISA 检测方法；

(6) 制备了 AFB₁ 的抗独特型抗体，并建立了绿色无毒 AFB₁ 快速检测方法；

(7) 建立基于胶体金技术的，适用于现场检测的真菌毒素的高灵敏快速检测方法。

第二章 黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的制备及其ELISA检测方法的建立

2.1 引言

黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AF) 在众多真菌毒素中被公认为是毒性最强、危害最大的一类毒素。世界各国制订的针对黄曲霉毒素的限量标准也最为严格。我国最新制订的 GB2761-2011 中对黄曲霉毒素 B₁ 的含量限量在 0.5~20 μg/kg 之间。因此需要高灵敏、高亲和力的抗体来建立免疫学分析方法, 才能达到限量要求, 并能应用于实际生产生活。

黄曲霉毒素 B₁ 的分子量为 312.27, 属于半抗原, 无免疫原性, 不能刺激动物体产生抗体, 需要将其和蛋白载体偶联制备完全抗原, 才能刺激动物产生免疫应答。黄曲霉毒素 B₁ 本身没有用于偶联蛋白的活性基团, 需要对半抗原进行衍生引入羧基。本章研究利用羧甲基羟胺衍生黄曲霉毒素 B₁ 引入羧酸基团, 使用活性酯法将活化好的半抗原偶联到 KLH 和 BSA 蛋白载体上。通过使用新型免疫佐剂, 在较短时间内, 仅需少量免疫原得到免疫效果较好的小鼠。通过细胞融合, 将小鼠脾脏细胞和小鼠骨髓瘤 SP2/O 细胞融合, 并通过不同的筛选方案, 最终得到具有不同交叉反应的高亲和力、高灵敏的抗黄曲霉毒素 B₁ 的单克隆抗体细胞株。在此基础上开发了用于快速检测黄曲霉毒素 B₁ 的免疫学快速检测方法。

2.2 材料与仪器

2.2.1 药品与试剂

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁、O-(羧甲基)羟胺半盐酸盐 (O-(Carboxymethyl) hydroxylamine hemihydrochloride, CMO)、水溶性碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl)、N-羟琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS)、明胶、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, TMB)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、聚乙二醇 PEG1500、DMSO (生化纯)、钥孔血蓝蛋白 Hemocyanin from *Megathura crenulata* (KLH) 和牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 均购自 Sigma 公司; 澳洲胎牛血清、RPMI 1640 细胞培养基、HAT 培养基 (50×)、HT 培养基 (100×)、L-谷氨酰胺均购买自 Gibco 公司; IsoQuick™ 小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购于一龙公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG 购自艾美捷科技有限公司; QuickAntibody™ 快免佐剂购于北京康碧泉生物科技有限公司; 黄曲霉毒素 B₁ 阴性面粉样本由江苏省进駐口检验检疫局提供, 经液质检测; 氯化钠、N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide, DMF)、硫酸铵、正辛酸、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、无水甲醇、无水乙醇、Tween-20 均购买自上海国药集团; 实验用水无特殊说明均为 Milli-Q 纯水; 其他均为国产分析纯。

2.2.2 主要仪器与设备

单道可调试移液器、Multiskan Mk3 型酶标仪、零下 80℃ 超低温冰箱、3111 型 CO₂ 培养箱 (Thermo Fisher LabSystems 公司); AB135-S 型电子分析天平 (METLER TOLEDO

梅特勒-托利多公司); AB104-N 型电子天平 (METLER TOLEDO 梅特勒-托利多公司); 八道可调移液器 (Eppendorf 公司); W201 型恒温水浴锅 (上海申顺生物科技有限公司); QT-2A 旋涡混合器 (上海琪特分析仪器有限公司); TDL-40B 低速台式大容量离心机 (上海安亭科学仪器厂); LDZX-50KB 不锈钢立式灭菌器 (上海天呈科技有限公司); SW-CJ-IPO 超净工作台 (苏净安泰); Milli-Q Integral Cabinet 3 超纯水制备仪 (美国的 Millipore 公司); 倒置显微镜 TS100 (Nikon 公司); 6 孔、24 孔、96 孔细胞培养板 (Corning 公司); DELTA320 型 pH 计 (METLER TOLEDO 梅特勒-托利多公司); KQ-32C0DV 型超声波清洗器 (昆山市舒美超声仪器有限公司); DHG-9143BS-III 型电热干燥箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司)。

2.2.3 主要溶液

pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (0.01M, PBS): 称取 3.62 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KH_2PO_4 , 8.0 g 的 NaCl 和 0.2 g 的 KCl, 全部溶于超纯水中并定容至 1000 mL。

包被缓冲液: pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 (CBS): 称取 Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 溶于少量蒸馏水, 加水至约 800mL 混匀, 调 pH 值至 9.6, 加水定容至 1000mL, 4℃ 贮存备用。

洗涤缓冲液 (PBST): 含量为 0.05% (V/V) 吐温 Tween 20 的 PBS 溶液;

抗体稀释液: 含量为 0.1% (W/V) 明胶的 PBST;

封闭液: 含量为 0.2% (W/V) 明胶的 CBS;

显色 A 液: 柠檬酸 9.33 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 36.8 g, 超声溶解后加入 H_2O_2 0.18 mL, 加水定容至 1000 mL, 4℃ 贮存备用。

显色 B 液 (TMB 溶液): TMB 600 mg 加乙二醇低温超声至溶解后定容至 500mL, 4℃ 贮存备用。

终止液: 2 mol/L 硫酸 (98% 浓硫酸 11.1 mL + 88.9 mL 蒸馏水)

2.2.4 实验动物和细胞

小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞购于中科院上海细胞所; Ballb/C 小鼠, 6-8 周龄, 雌性, 购于扬州大学医学比较中心。

2.3 实验方法

2.3.1 AFB₁ 半抗原的设计与合成

由于 AFB₁ 分子上没有可用的活性基团, 因此需要肟化反应 (图 2-1) 引入羧基以便偶联蛋白载体^[160-162]。4 mg AFB₁ (0.012 mmol) 和 8 mg 羧甲基羟胺盐酸盐 (0.073 mmol) 溶解于 3 mL 甲醇:水:吡啶 (4:1:1, V/V/V) 中, 至于 75℃ 水浴中震荡反应 3 h 后冷却至室温后, 避光过夜。反应溶液经旋转蒸发去除后, 所得沉淀物用少量氯仿溶解, 通过薄层鉴定并分离纯化 (GF254, 展开剂: 三氯甲烷:甲醇=9:1, V/V), 得到 AFB₁ 的肟化产物 AFB₁-CMO。

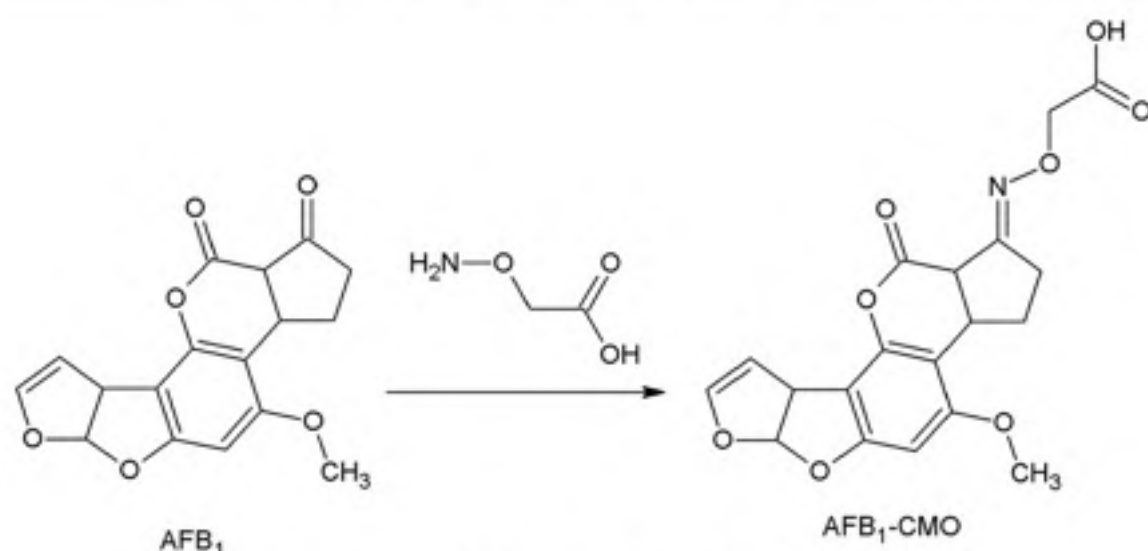


图 2-1 黄曲霉毒素 B₁ 的肟化
Fig.2-1 Oximation of aflatoxin B₁

2.3.2 AFB₁ 完全抗原制备

衍生后的 AFB₁ 半抗原通过活性酯法偶联到蛋白分子上^[120, 163, 164] (图 2-2)。将上一步得到的 AFB₁-CMO 2 mg (0.005 mmol), 1.08 mg EDC (0.005 mM) 和 0.6 mg NHS (0.005 mM) 溶解于 2 mL 无水 N,N 二甲基甲酰胺 DMF 中, 室温下磁力搅拌过夜。将反应溶液 4000 rpm 离心 15 min 后取上清。蛋白载体 BSA 和 KLH 各取 5 mg, 分别加入到含有 10% DMF 的 0.1 M 的 NaHCO₃ 溶液中, 磁力搅拌溶解后, 至于冰上冷却。将活化好的 AFB₁-CMO 溶液分成 2 份, 分别加入到两种蛋白载体溶液中, 室温磁力搅拌过夜后, PBS 透析三天, 每 6 h 更换一次透析液。透析结束后, 分装后 -20℃ 保存。

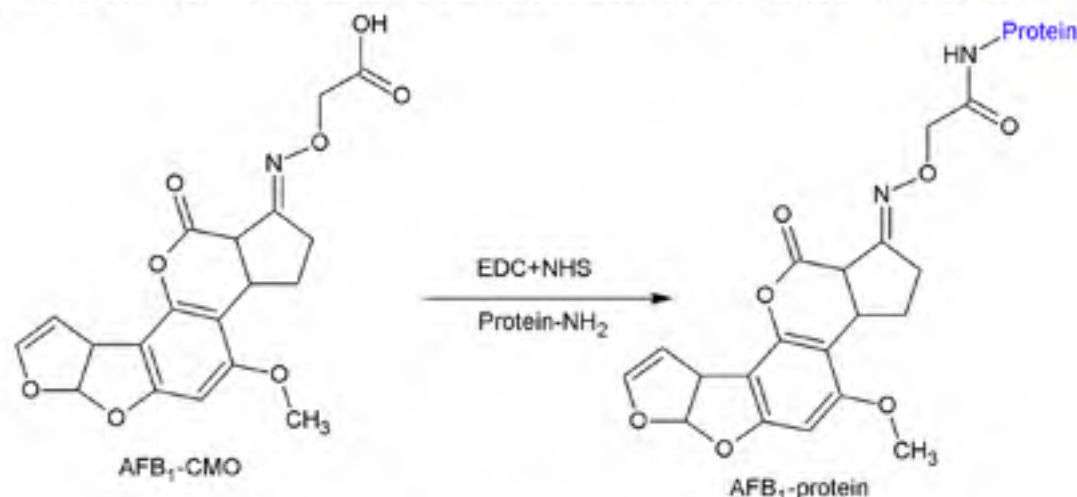


图 2-2 黄曲霉毒素 B₁ 完全抗原的合成
Fig.2-2 The synthesis of aflatoxin B₁ complete antigen

2.3.3 小鼠免疫

将 AFB₁-KLH 完全抗原作为免疫原免疫 4 只 Balb/C 小鼠。将 AFB₁-KLH 稀释到 1 mg/mL, 取适量与等体积的快免佐剂混合, 震荡均匀后, 按每只小鼠 20 μg 的剂量, 腿

部肌肉单位点注射。三周后按照同样的剂量和方式进行第二次免疫，并与免疫后七天小鼠尾部采血检测效价。具体免疫方案见表 2-1。

表 2-1 小鼠免疫程序

Table 2-1 Immunization program of mice

免疫次数	间隔时间 (天)	免疫抗原剂 量 ($\mu\text{g}/\text{只}$)	免疫注射方式	采血方式
1 st	—	20	腿部肌肉注射	—
2 nd	21	20	腿部肌肉注射	尾部采血
3 rd	14	20	腿部肌肉注射	尾部采血
4 th	14	20	腿部肌肉注射	尾部采血
5 th	18	20	腹腔注射	眼球采血

2.3.4 小鼠血清检测

将采集的小鼠血清在 37℃ 放置 1 h 后，4000 rpm 离心 10min，吸取上层澄清部分血清，采用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 测定血清的效价和抑制包被抗原为 AFB₁-BSA。采用棋盘法确定最佳的包被浓度，基本步骤如下：

包板：用包被缓冲液将 AFB₁-BSA (1 mg/mL) 从 1000 倍开始倍比稀释，

以 100 μL /孔包被酶标板，37℃ 反应 2 h；取出，甩去孔中溶液，每孔加入 250 μL PBST 洗板 3 次，1 min/次，拍干；

封闭：加入封闭液，200 μL /孔封闭，4℃ 过夜，PBST 洗板 3 次，1 min/次，拍干；

加一抗：测定血清效价时，将血清从 1000 开始倍比稀释，每行加入一个稀释浓度的血清稀释液，每孔 100 μL ；测血清抑制时，每孔加入 50 μL 不同浓度的标准品溶液后，再加入 50 μL 合适稀释倍数的血清稀释液，37℃ 反应 30 min 后洗板三次，拍干；另设 PBS 孔作为空白对照；

加二抗：加入 3000 倍稀释的 HRP 酶标山羊抗小鼠 IgG (稀释)，100 μL /孔，37℃ 反应 30 min 后，洗板 4 次，拍干；

显色反应：将显色 A 液和 B 液 5:1 混合后，每孔加入 100 μL ，37℃ 显色 15min；

终止反应：加入终止液 2 M H₂SO₄，50 μL /孔，终止反应后，在酶标仪下测定 450 nm 波长下的吸光值。

2.3.5 单克隆抗体的制备

2.3.5.1 细胞融合

小鼠血清测定后一周，从液氮取出冻存的 SP2/0 细胞，置于 -80℃ 冰箱 2 小时使液氮挥发后，放入 37℃ 的水浴锅内进行解冻，期间不停地温和摇动，直到冻存管内看不到结冰。继续摇动孵育 30 s 后，在超净工作台内打开冻存管，将解冻的细胞转移到含有 1.5 mL 1640 完全培养基无菌的 15 mL 离心管中，静置 2 min 后，缓慢加入预热的培养基至 10 mL 后，再静置 5 min，800 rpm 离心 10 min，弃上清，加入少量完全培养基，将细胞轻轻吹打均匀后转至培养瓶中，放入 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。细胞状态稳定后，用含

有 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8-A 的完全培养基培养 15~20 h 后换液。在细胞对数生长期以 1:2 比例传代扩大培养至需要数量。

小鼠血清测定后第 18 天, 采用腹腔注射进行冲免。冲免 3 天后将小鼠眼球采血后, 放入到含有 100 mL 75% 乙醇中浸泡消毒 10 min 后, 在超净工作台中无菌操作取出脾脏, 去除表面脂肪等组织, 用 10 mL 1640 培养液冲洗后, 将脾脏置于 200 目不锈钢筛网上, 用一次性 5 mL 注射器内芯研磨挤压过筛。用 10 mL 1640 冲洗筛网后, 收集脾细胞至 15 mL 离心管, 1 000 rpm 离心 10 min, 弃去上清, 并重复一次。用 10 mL 1640 培养液悬浮, 加台盼兰染液后进行细胞计数。同时将 SP2/0 细胞收集到 50 mL 离心管中, 离心后用 20 mL 1640 培养液悬浮后, 加台盼兰染液后进行细胞计数。

将脾细胞和 SP2/0 细胞按照 10:1 的比例混合均匀后, 1 000 rpm 离心 10 min, 完全去除上清。用手用力敲打离心管底部, 使细胞沉淀混成均匀糊状后, 按照表 2-2 中程序进行细胞融合。

表 2-2 细胞融合的程序
Table 2-2 Program of cell fusion

时间	步骤
0~1 min	缓慢加入预热的 PEG 1500 溶液 1 mL, 先慢后快, 边加边摇,
1~2 min	轻轻摇动离心管
2~3 min	缓慢加入 0.5 mL RPMI 1640 不完全培养液, 并轻轻摇动, 使溶液混合均匀
3~4 min	缓慢加入 1 mL RPMI 1640 不完全培养液, 并轻轻摇动
4~5 min	缓慢加入 2 mL RPMI 1640 不完全培养液, 并轻轻摇动
5~6 min	缓慢加入 2 mL RPMI 1640 不完全培养液, 并轻轻摇动
6~7 min	加入 4 mL RPMI 1640 不完全培养液, 并轻轻摇动
7~8 min	加入 RPMI 1640 不完全培养液至 20 mL 刻度

融合结束后, 将离心管在室温静置 10 min 后, 800 rpm 离心 10 min, 用 HAT 完全培养基轻轻悬浮细胞, 并吹打均匀后, 按照 1×10^5 cell/mL 的密度, 200 μL /孔加到 96 孔培养板中, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。在融合后的第三天进行 HAT 培养基半换液, 第七天 HAT 培养基全换液。从第 10 天开始全换液为 HT 培养基。

2.3.5.2 细胞筛选

在细胞融合后第八天, 每孔取细胞上清 120 μL , 加入 360 μL 抗体稀释液进行稀释后, 采用间接非竞争 ELISA 进行阳性筛选, 同时用四种标准品黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 采用间接竞争 ELISA 进行抑制筛选^[118]。选取阳性值高、抑制较好、细胞状态好的孔, 采用有限稀释法, 按照 10 cell/mL, 200 μL /孔进行亚克隆。每次亚克隆后第 7 天取细胞上清稀释后检测阳性和抑制。如果细胞阳性显色值太高, 需要将细胞上清进一步稀释后测抑制。选择阳性细胞孔中抑制最好、细胞为单团的孔进行下一步亚克隆。经过三次亚克隆和筛选后, 经过显微镜观察与 ELISA 结果对比, 有细胞的孔均为阳性, 说明细胞纯度为 100%, 选单团细胞孔进行扩大培养, 冻存, 液氮保存。

2.3.6 单克隆抗体的性质鉴定

将筛选得到的杂交瘤细胞株通过体内腹水法制备单克隆抗体。按照 1ml/只 Balb/C 小鼠腹腔注射无菌石蜡油，七天后收集培养的杂交瘤细胞，按照 1×10^6 cell/只将杂交瘤细胞腹腔注射到小鼠体内。待小鼠腹部鼓起时，使用 5 ml 注射器抽取腹水。将采集到的腹水 10000 rpm 高速离心，弃去沉淀和上层的石蜡油。采用辛酸-硫酸铵法对小鼠血清进行纯化。

2.3.6.1 单克隆抗体亚型的鉴定

采用美国恩沃劳格 (EnviroLogix) 公司的小鼠单抗亚型鉴定试剂盒，对筛选到的细胞株抗体亚型进行鉴定，并对照标准图进行亚型分类。将第二次亚克隆结束后，扩大培养的杂交瘤培养液上清，取 0.5 mL 置于 1.5mL 离心管中，分别将重链和轻链鉴定试纸条置于离心管中，于 5 min 后取出，对照标准图进行亚型分类判定。

2.3.6.2 抗体交叉反应的测定

采用本章 2.3.4 中间竞争 ELISA 测定单抗与黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的 IC₅₀ 值。交叉反应率 (cross-reactivity, %) = (黄曲霉毒素 B₁ 的 IC₅₀ / 其他黄曲霉毒素的 IC₅₀) × 100%。

2.3.6.3 抗体亲和力的测定

按照文献中的方法^[165-167]，采用非竞争 ELISA 测定单克隆抗体的亲和常数 (K_a)。将包被原 AFB₁-BSA 从 1μg/mL 开始两倍倍比稀释四个浓度进行包板，纯化好的 AFB₁ 抗体则从 1000 倍开始倍比稀释，按照 2.3.4 中效价测定的方法进行非竞争 ELISA 测定。将得到 OD_{450nm} 值为纵坐标，抗体浓度(mmol/mL)的对数值为横坐标，绘制出相应的 4 条曲线，找出每条曲线上最大吸光值和 50%吸光值时对应的抗体摩尔浓度，并将每两个抗体浓度，按照公式 $Ka = (n-1) / 2 (n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算出一个亲和常数，公式中 n 表示两条曲线中包被抗原浓度的倍数比值，[Ab']_t 和 [Ab]_t 分别为每条曲线中两个最大吸光值 50% 时分别对应的抗体浓度。

2.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化

利用棋盘法确定最佳的包被抗原和单克隆抗体使用浓度。选择 OD 在 1.0~1.5 之间的点对应的包被抗原和抗体使用浓度作为工作点。不同药物的 ELISA 法不尽相同，由于影响 ELISA 反应的条件很多，改变任何一个参数都会使结果变得不尽相同，所以对于 ELISA 重要的参数是需要经过试验优化确定的，才能保证整个 ELISA 操作工作在一个相对稳定的状态下进行。

2.3.7.1 标准品稀释液 pH 的优化

标准品稀释液的 pH 会影响蛋白分子带电荷的多少，对抗体的活性有一定的影响。因此对不同的 pH 标准品稀释液 (5.8、6.4、7.4、8.0) 对 ELISA 的影响进行考察。

2.3.7.2 标准品稀释液甲醇含量的优化

实际样品检测的前处理都离不开有机溶剂的使用，尤其是甲醇最为常见。有机溶剂含量过高，会使蛋白分子变性，并失去活性。不同的单抗分子，其耐受甲醇的浓度也会

有所不同,并最终影响到前处理方法。本实验对不同的甲醇浓度(0、10%、20%、30%、40%、50%)的标准品稀释液对ELISA的影响进行考察。

2.3.7.3 标准品稀释液离子强度的优化

实际样品中或多或少都会含有一定的盐离子。不同的盐离子浓度也会对抗体的活性有一定的影响。本实验对不同的离子强度的PBS(2 mM、5 mM、10 mM、20 mM、50 mM)作为标准品稀释液进行考察。

2.3.7.4 一抗反应时间的优化

抗原抗体反应会随着时间的增加而发生变化,但到达一定时间后,反应即达到一定平衡,本实验取一抗反应时间为15min、30 min、45 min、60 min 4个点来确定最佳反应时间。

2.3.7.5 二抗反应时间的优化

二抗的反应时间也会影响显色的高低和方法的灵敏度。本实验取二抗反应时间为15min、30 min、45 min、60 min 4个点来确定最佳反应时间。

2.3.7.6 显色反应时间的优化

显色时间的长短将影响反应颜色的深浅,即吸光值的大小。实验采取的反应时间分别为10 min、15 min、20 min、25 min,来确定最佳显色时间。

2.3.7.7 间接竞争ELISA的标准抑制曲线

按照以上优化后的参数,建立对AFB₁的间接竞争ELISA方法,并建立标准曲线。以AFB₁标准品浓度的对数值为横坐标,以B/B₀为纵坐标(B为AFB₁浓度为零的孔的吸光值,B₀为不同AFB₁浓度对应的孔的吸光值),在origin中做散点图,并利用非线性Logistic四参数函数进行拟合。根据拟合结果,计算得出标准曲线的IC₅₀以及检测曲线IC₁₅和IC₈₅。

2.3.8 实际样品添加回收试验

阴性小麦面粉样品,分别按照0.5 μg/kg, 1 μg/kg, 2 μg/kg三个水平进行黄曲霉毒素B₁添加回收试验,所用抗体为11A9和5C3。每份样品各称取5.0 g,加入25 mL含有4% NaCl的50%的甲醇:水(V/V),漩涡震荡均匀后,超声提取30min。提取液经5000 rpm离心后,上清用PBST稀释5倍混匀,每孔加50μL进行间接ELISA检测。重复三次,三批不同批次测定。

阴性红茶和绿茶经粉碎后,过40目筛,分别按照10 μg/kg, 20 μg/kg, 50 μg/kg三个水平进行黄曲霉毒素B₁添加回收试验,所用抗体为11A9。每份样品称取1.0g,加入5mL80%甲醇水溶液后震荡混匀,超声10min进行提取,提取液经4000g离心后,上清用水稀释100倍后混匀,每孔加50μL进行间接ELISA检测。重复五次,三批不同批次测定。

2.4 结果与分析

2.4.1 半抗原的合成与结构鉴定

AFB₁ 及其脲化产物 AFB₁-CMO 的薄层层析分析结果分别见图 2-3。AFB₁ 经过脲化反应引入羧基基团后, 会使分子的极性增加。从图 2-3 中可以看出, AFB₁-CMO 的 R_f 值与 AFB₁ 相比较变小。这是因为硅胶薄层层析为正向层析, 点样物质的极性越大, 分子与硅胶之间的相互作用力越强, 延展开剂方向移动越缓慢, 导致其 R_f 值越低。说明 AFB₁ 脲化成功, 可以进行下一步反应。



图 2-3 AFB₁ 和 AFB₁-CMO 的薄层分析结果(左 AFB₁, 右 AFB₁-CMO)

Fig.2-3 The TLC result of AFB₁ and AFB₁-CMO(left AFB₁, right AFB₁-CMO)

2.4.2 完全抗原的鉴定

将 AFB₁、BSA、KLH 及其对应的完全抗原用 PBS 稀释合适的倍数后, 在 200~600nm 范围进行扫描。得到的紫外可见光吸收图谱如图 2-4 和图 2-5 所示:

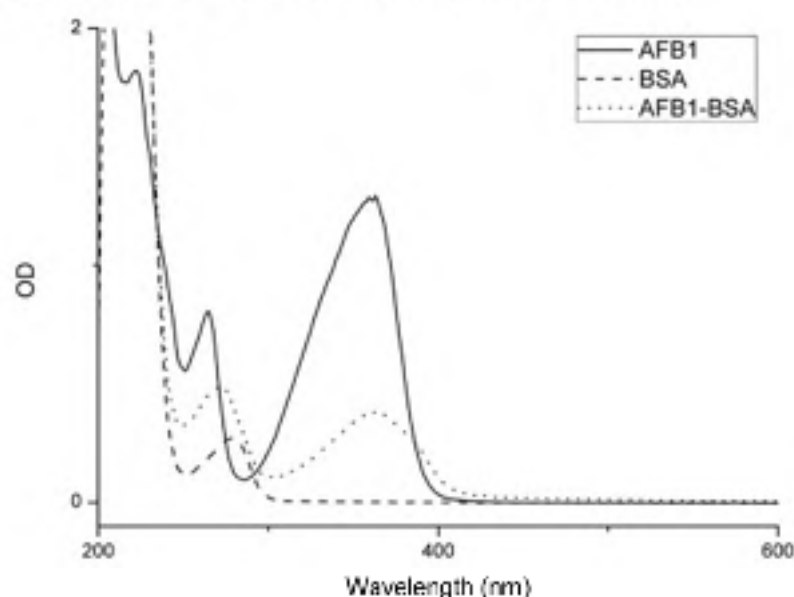
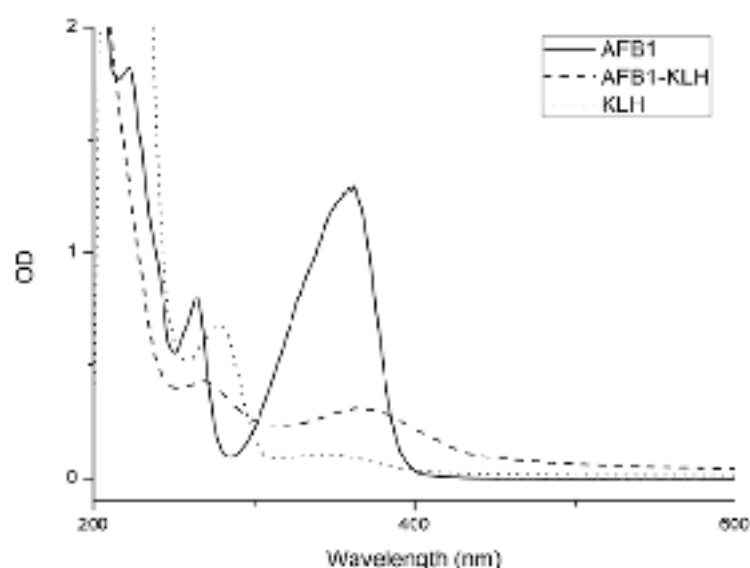


图 2-4 AFB₁-BSA 的紫外-可见光吸收扫描图谱

Fig. 2-4 Ultraviolet-visible spectrum of AFB₁-BSA

图 2-5 AFB₁-KLH 的紫外-可见光吸收扫描图谱Fig. 2-5 Ultraviolet-visible spectrum of AFB₁-KLH

从图 2-4 和图 2-5 中可以看出：AFB₁ 有两个吸收峰，分别在 265 nm 和 360 nm 处，而 BSA 的最大吸收峰在 278 nm，KLH 的吸收峰在 278 nm，340 nm 吸收峰不明显。偶联后的 AFB₁-BSA 和 AFB₁-KLH 第一个吸收峰在 269 nm 处，介于 AFB₁ 的第一个吸收峰和蛋白 278 nm 的吸收峰之间；完全抗原第二个吸收峰在 360 nm 处，说明 AFB₁ 成功偶联到蛋白载体上。

2.4.3 动物免疫与检测

本章研究采用了新型的快免佐剂对小鼠进行了免疫。与传统的佐剂相比，快免佐剂每次的免疫剂量仅为 20 μ g，而常规的弗氏佐剂用量一般在 50~200 μ g 之间；快免佐剂一般第二次免疫既可采血检测，而弗氏佐剂一般要第三次免疫才采血检测。考虑到 AFB₁ 完全抗原合成成本较高，因此快免佐剂更适合。采用快免佐剂小鼠在四免后血清的效价和抑制结果如表 2-3 所示：

表 2-3 四免后小鼠血清的检测结果

Table 2-3 The test result of surum of mice after 4th immunization

小鼠	1	2	3	4
包被浓度	8000	8000	16000	16000
血清稀释	8000	16000	16000	8000
IC ₅₀	4.23	6.81	2.56	3.84

从表中可以看出，#2 和 #3 号小鼠血清效价较高，而 #3 号和 #4 号血清（多克隆抗体）的 IC₅₀ 较低，综合考虑选择小鼠 #3 号和 #4 进行细胞融合。

2.4.4 单克隆抗体的性质

通过两次细胞融合和亚克隆筛选，最终得到了两个杂交瘤细胞株 11A9 和 5C3。

2.4.4.1 抗体亚型的鉴定

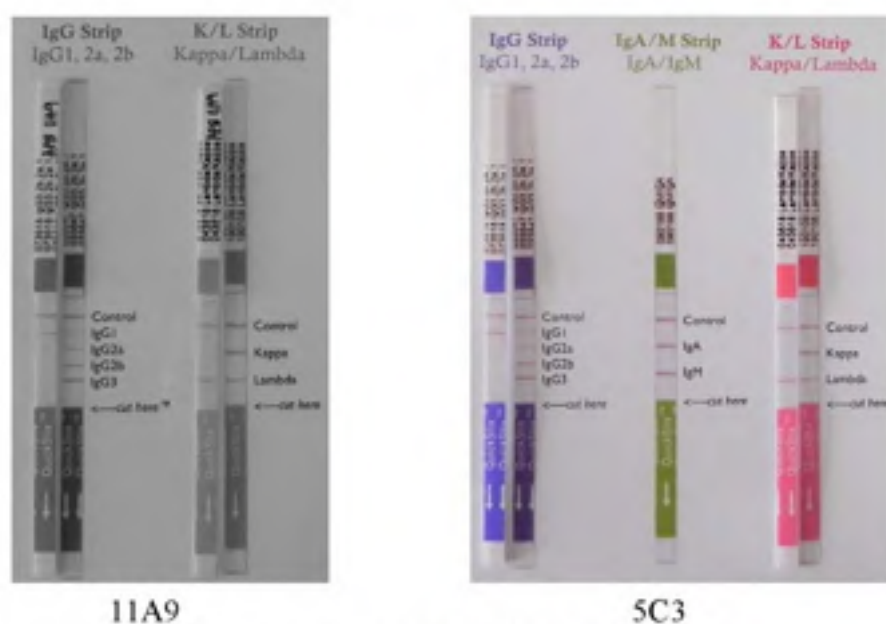


图 2-6 单克隆抗体 IgG 的亚型鉴定

Fig.2-6 The IgG subclass of monoclonal antibody

通过单抗亚型鉴定试剂盒对单抗的免疫球蛋白类别、亚型及其轻链类型进行鉴定，结果见图 2-6:

表 2-4 AFB1 单克隆抗体 11A9 和 5C3 的交叉反应率的测定

Tab.2-4 The cross-reactivity of mAb 11A9 and 5C3

名称	结构式	分子式	11A9 IC ₅₀ (ng/mL)	11A9 CR(%)	5C3 IC ₅₀ (ng/mL)	5C3 CR(%)
AFB ₁		C ₁₇ H ₁₂ O ₆	0.057	100.00	0.029	100.00
AFB ₂		C ₁₇ H ₁₄ O ₆	0.077	74.15	0.082	35.36
AFG ₁		C ₁₇ H ₁₂ O ₇	0.135	42.16	0.114	25.44
AFG ₂		C ₁₇ H ₁₄ O ₇	0.240	23.64	0.796	3.64
AFM ₁		C ₁₇ H ₁₂ O ₇	0.772	7.37	0.159	18.24

从图中实验结果和标准图对照可以看出,单克隆抗体 11A9 和 5C3 的 IgG 亚型均为 IgG 1 型,轻链类型均为 λ 类型,两次试验 control 线明显,说明试剂有效,结果可信。

2.4.4.2 抗体交叉反应的测定

通过间接竞争 ELISA 测得的单克隆抗体 11A9 的 IC₅₀ 及交叉反应率见表 2-4。从表中可以看出,11A9 单抗对黄曲霉毒素 B₂、G₁ 和 G₂ 的交叉要高于 5C3,因此更适合做黄曲霉毒素总量的检测,而 5C3 相对更适合做黄曲霉毒素 B₁ 特异性的检测。两种单克隆单体均具有很低的 IC₅₀,因此可以以此为基础建立高灵敏的黄曲霉毒素检测方法。

2.4.4.3 抗体亲和力的测定

按照 2.3.6.3 中的公式计算得出,11A9 单抗的亲合力为 $3.8 \times 10^9 \text{L/mol}$,5C3 单抗的亲合力为 $4.2 \times 10^9 \text{L/mol}$ 。

2.4.5 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化

利用棋盘法确定最佳的包被抗原和单克隆抗体使用浓度的结果见表 2-5a 和 2-5b:

表 2-5a 单抗 11A9 的工作点
Table 2-5a The workpoint of 11A9

	包被抗原稀释倍数								
	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	
1000	2.758	2.687	2.842	2.758	2.687	2.307	1.980	1.196	
2000	2.676	2.633	2.493	2.493	2.399	2.156	1.898	1.166	
4000	2.763	2.791	2.505	2.520	2.333	2.235	1.824	1.030	
8000	2.602	2.535	2.491	2.477	2.426	2.096	1.576	0.927	
16000	2.284	2.439	2.311	2.284	2.132	1.796	1.289	0.689	
32000	1.794	2.110	2.059	2.098	1.831	1.447	0.972	0.491	
64000	1.095	1.369	1.503	1.579	1.338	1.05	0.638	0.350	
128000	0.605	0.869	0.969	1.022	0.944	0.734	0.476	0.255	
AFB ₁ (ng/mL)	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	
0	0.855	1.192	1.443	1.48	1.238	1.385	1.172	1.056	
0.01	0.843	1.044	1.369	1.327	1.138	1.266	1.111	0.910	
0.02	0.815	1.043	1.233	1.300	1.037	1.155	1.101	0.916	
0.05	0.699	0.845	0.994	0.936	0.757	1.143	1.006	0.880	
0.1	0.566	0.604	0.609	0.481	0.324	0.868	0.936	0.831	
0.2	0.485	0.452	0.381	0.292	0.195	0.264	0.746	0.847	
0.5	0.316	0.267	0.217	0.151	0.089	0.123	0.134	0.746	
1	0.287	0.239	0.173	0.117	0.088	0.103	0.094	0.562	
IC ₅₀	0.120	0.085	0.072	0.063	0.057	0.120	0.248	>1.000	
R ²	0.991	0.990	0.997	0.993	0.992	0.974	0.973	0.88436	

表 2-5b 单抗 5C3 的工作点
Table 2-5b The workpoint of 5C3

	包被抗原稀释倍数							
	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000
2000	3.271	3.015	3.066	3.015	2.669	2.856	2.163	1.686
4000	2.748	2.652	2.674	2.776	2.591	2.408	1.845	1.257
8000	2.625	2.869	2.567	2.647	2.266	1.994	1.324	0.886
16000	2.292	2.432	2.472	2.216	1.797	1.427	0.927	0.624
32000	1.456	1.654	1.613	1.488	1.153	0.869	0.525	0.341
64000	0.869	1.064	1.036	0.923	0.714	0.563	0.334	0.245
128000	0.513	0.658	0.624	0.572	0.414	0.356	0.209	0.175
256000	0.321	0.453	0.395	0.347	0.266	0.239	0.153	0.142
AFB ₁ (ng/mL)								
0	1.270	1.667	1.663	1.505	1.278	1.502	1.469	1.394
0.01	1.149	1.458	1.454	1.249	1.065	1.385	1.393	1.389
0.02	1.116	1.293	1.273	1.058	0.85	1.203	1.312	1.353
0.05	0.972	1.065	0.924	0.691	0.448	0.690	1.021	1.228
0.1	0.699	0.769	0.584	0.343	0.230	0.264	0.500	0.931
0.2	0.604	0.611	0.420	0.248	0.149	0.186	0.208	0.482
0.5	0.366	0.433	0.235	0.173	0.095	0.103	0.110	0.118
1	0.283	0.362	0.187	0.145	0.087	0.099	0.113	0.116
IC ₅₀	0.116	0.059	0.051	0.035	0.029	0.041	0.070	0.135
R ²	0.988	0.997	0.999	0.995	1.000	0.997	0.997	0.998

从表中可以看出，两种单抗的最佳包被浓度均为 32000 倍稀释，在此包被浓度下，11A9 的使用浓度为 64000 倍稀释，IC₅₀ 为 0.057 ng/mL；5C3 的使用浓度为 32000 倍稀释，IC₅₀ 为 0.029 ng/mL。对其他的参数优化均在此工作点（即抗原抗体使用浓度）下进行。

2.4.5.1 标准品稀释液 pH 的优化

不同 pH 标准品稀释液（pH 5.8、6.4、7.4、8.0）对单克隆抗体 11A9 和 5C3 的影响分别见表 2-6a 和 2-6b：

表 2-6a pH 对单抗 11A9 的影响
Table 2-6a Effects of pH on 11A9

pH	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
5.8	1.181±0.057	0.088±0.008	13.5
7.0	1.372±0.055	0.091±0.002	15.1
7.4	1.217±0.042	0.075±0.006	16.2
8.0	1.312±0.035	0.096±0.003	13.7

表 2-6b pH 对单抗 5C3 的影响

Table2-6b Effects of pH on 5C3

pH	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
5.8	1.172 ±0.055	0.039±0.002	30.1
6.5	1.123 ±0.049	0.041±0.003	27.4
7.4	1.115 ±0.054	0.037±0.003	30.1
8.0	1.177 ±0.036	0.038±0.003	31.0

从表中可以看出,不同的 pH 的标准品稀释液对两种抗体的 IC₅₀ 和零孔吸光值 Amax 影响不大,因此选择最常用的 pH7.4 的 PBS 作为标准品的稀释液。

2.4.5.2 标准品稀释液甲醇含量的优化

不同甲醇浓度标准品稀释液对单克隆抗体 11A9 和 5C3 的影响分别见表 2-7a 和 2-7b:

表 2-7 a 甲醇浓度对 11A9 的影响

Table2-6 a Effects of methanol concentration on 11A9

甲醇浓度 (v/v)	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
0%	1.217±0.033	0.069±0.005	17.6
10%	1.155±0.033	0.077±0.001	15.0
20%	1.176±0.037	0.085±0.000	13.8
30%	1.096±0.044	0.081±0.004	13.5
40%	1.065±0.030	0.092±0.001	11.6
50%	0.974±0.001	0.097±0.002	10.0

表 2-7 b 甲醇浓度对 5C3 的影响

Table2-6 b Effects of methanol concentration on 5C3

甲醇浓度 (v/v)	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
0%	1.164±0.045	0.038±0.001	30.6
10%	1.183±0.048	0.047±0.001	25.2
20%	1.224±0.051	0.055±0.001	22.3
30%	1.248±0.063	0.088±0.001	14.2
40%	1.242±0.041	0.110±0.001	11.3
50%	1.324±0.070	0.137±0.001	9.7

从表中可以看出甲醇浓度对抗体的 IC₅₀ 和零孔吸光值 Amax 都有影响。随着甲醇浓度的升高, 11A9 的 Amax 值会有所降低, 而 IC₅₀ 逐渐上升, 在 20% 以内的甲醇浓度影响不显著; 而 5C3 的 Amax 随着甲醇浓度的升高而略有上升, IC₅₀ 逐渐上升, 在 10% 甲

醇浓度时影响不大。因此,选择 10%的甲醇浓度作为标准品稀释液。以后样品前处理时,最终检测的样品,甲醇含量也应限制在 10%以内。

2.4.5.3 标准品稀释液离子强度的优化

不同离子强度标准品稀释液对单克隆抗体 11A9 和 5C3 的影响分别见表 2-8a 和 2-8b:

表 2-8 a 离子强度对 11A9 的影响

Table 2-8 a Effects of the ionic strength on 11A9

离子强度	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
0	1.650±0.061	0.079±0.001	20.9
2 mM	1.370±0.090	0.094±0.001	14.5
5 mM	1.376±0.002	0.080±0.002	17.1
10 mM	1.286±0.091	0.077±0.002	16.6
20 mM	1.147±0.035	0.063±0.001	18.1
50 mM	0.965±0.061	0.059±0.002	16.3

表 2-8 b 离子强度对 5C3 的影响

Table 2-8 b Effects of the ionic strength on 5C3

离子强度	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
0	1.959±0.063	0.031±0.002	63.2
2 mM	1.580±0.056	0.024±0.003	65.9
5 mM	1.576±0.043	0.027±0.002	58.4
10 mM	1.575±0.048	0.023±0.002	68.5
20 mM	1.260±0.036	0.020±0.001	63.0
50 mM	1.238±0.032	0.021±0.001	59.0

从表中可以看出离子强度对抗体的零孔吸光值 Amax 有较大影响,两种单抗的 Amax 都随着离子强度的增大而下降;同时 IC₅₀ 也略有下降。离子强度在 2~10 mM 范围时, Amax 和 IC₅₀ 较为稳定,变化不大。综合考虑,选择较为常用的 10 Mm PBS 作为标准品稀释液。

2.4.5.4 一抗反应时间的优化

不同一抗反应时间对单克隆抗体 11A9 和 5C3 的影响分别见表 2-9a 和 2-9b。

表 2-9a 一抗温育时间对抗 11A9 的影响

Table 2-9a Effects of incubate time primary antibody on mAb 11A9

反应时间	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
60 min	1.736±0.034	0.042±0.002	41.3
45 min	1.554±0.032	0.040±0.002	38.9
30 min	1.269±0.027	0.040±0.002	31.7
15 min	0.964±0.015	0.045±0.002	21.4

表 2-9b 一抗温育时间对 5C3 的影响

Table 2-9b Effects of incubate time of primary antibody on 5C3

反应时间	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
60 min	1.607±0.019	0.027±0.001	59.5
45 min	1.537±0.018	0.028±0.001	54.9
30 min	1.344±0.021	0.030±0.002	44.8
15 min	1.052±0.015	0.035±0.002	30.1

从表中可以看出,随着一抗反应时间的延长, A_{max} 逐渐升高, 而 IC₅₀ 随着时间的延长, 变化不大。说明反应时间只是影响显色的高低, 对 ELISA 的灵敏度影响较小。从实际检测要求出发, 时间越短越好, 而 A_{max} 一般要求在 1.0~1.5 之间。综合考虑, 选择 30 min 的一抗反应时间。

2.4.5.5 二抗反应时间的优化

不同二抗反应时间对单克隆抗体 11A9 和 5C3 的影响分别见表 2-9a 和 2-9b:

表 2-10a 二抗温育时间对 11A9 的影响

Table 2-10a Effects of the incubate time of secondary antibody on 11A9

中可以看出,随着显色反应时间的延长, 两种单抗 A_{max} 升高明显, IC₅₀ 随着时间的延长变化不大。说明显色反应时间只是影响显色的高低, 对 ELISA 的灵敏度影响较小。

考虑到显色时间过长,有可能会使本底值升高,综合考虑,选择 15 min 的显色反应时间。

表 2-11a 显色反应时间对 11A9 的影响

Table 2-11a Effects of the colouring reaction time of second antibody on 11A9

显色时间	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
10 min	0.796±0.021	0.056±0.004	14.2
15 min	1.063±0.023	0.057±0.003	18.6
20 min	1.335±0.023	0.055±0.002	24.3
25 min	1.522±0.022	0.054±0.002	28.2

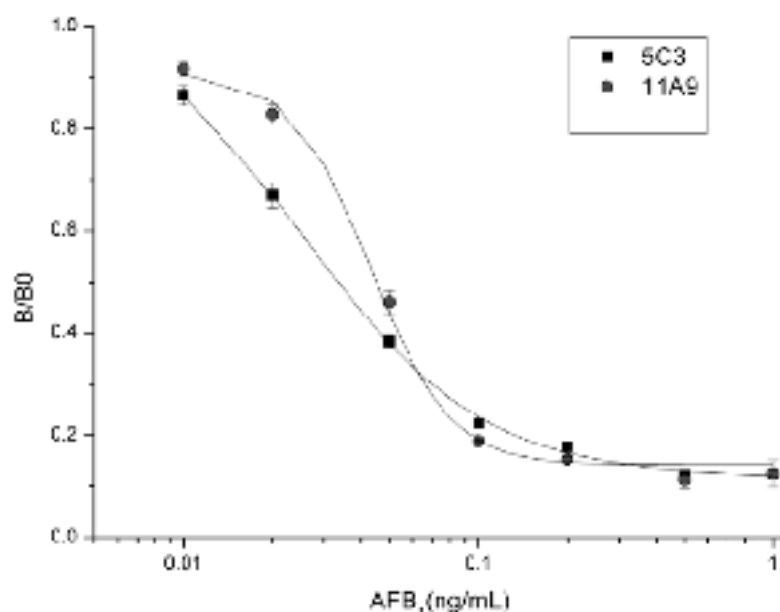
表 2-11b 显色反应时间对 5C3 的影响

Table 2-11b Effects of the colouring reaction time of second antibody on 5C3

显色时间	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
25 min	1.638±0.027	0.023±0.001	71.2
20 min	1.380±0.029	0.025±0.002	55.2
15 min	1.057±0.032	0.028±0.003	37.8
10 min	0.839±0.024	0.029±0.003	28.9

2.4.5.7 间接竞争 ELISA 的标准抑制曲线

按照以上优化后的参数,对单克隆抗体 11A9 和 5C3 建立标准曲线,见图 2-7:

图 2-7 AFB₁ 单克隆抗体抑制标准曲线Fig.2-7 The standard inhibitive curve of AFB₁ monoclonal antibody

根据标准曲线的拟合结果,5C3 的 IC₅₀ 为 0.025±0.005 ng/mL,检测区间为 (IC₁₅₋₈₅) 0.011~0.264 ng/mL; 11A9 的 IC₅₀ 为 0.043±0.003 ng/mL,检测区间为 (IC₁₅₋₈₅) 0.018~0.153 ng/mL; 相关系数 R² 分别为 0.996 和 0.995。

2.4.6 实际样品添加回收试验

阴性面粉添加回收实验的结果由图 2-7 中的标准曲线方程和样品前处理稀释倍数计算得出,结果见表 2-11。从表中可以看出,11A9 单抗建立的 ELISA 其添加回收率在 91.4~116.7% 之间,批内变异系数 3.4%~8.5% 之间,批间变异系数 5.5%~10.1% 之间; 5C3

单抗奖励的 ELISA, 其添加回收率在 84.7~115.6%之间, 批内变异系数 4.5%~8.1%之间, 批间变异系数 6.1%~8.9%之间。而基于阴性茶叶添加回收的结果见表 2-13。由于茶叶中含有较多的生物碱类物质, 因此有很强的基质效应, 因此需要对前处理进行优化, 以消除其带来的干扰。本研究得到的单抗 11A9, 由于其灵敏度高, 因此可以通过方法稀释倍数以消除基质干扰。从表中可以看出, 11A9 单抗建立的 ELISA 对茶叶样品的添加回收测定, 其回收率在 70.4%~116.3%之间, 批内变异系数在 1.7%~7.7%之间, 批间变异系数在 3.5%~12.0%之间。

表 2-12 ELISA 方法测定面粉样品中 AFB₁ 的添加回收率Table 2-12 Recovery analysis of AFB₁ from spiked flour samples by ELISA

单克隆抗体	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	变异系数(%)	
			批内(n=3)	批间(n=3)
11A9	0.5	116.7 \pm 9.1	7.8	10.1
	1.0	105.3 \pm 5.1	3.4	5.5
	2.0	91.4 \pm 3.9	8.6	9.6
5C3	0.5	115.6 \pm 11.6	8.1	8.9
	1.0	106.8 \pm 7.5	5.6	8.5
	2.0	84.7 \pm 3.6	4.5	6.1

表 2-13 ELISA 方法测定茶叶样品中 AFB₁ 的添加回收率Table 2-13 Recovery analysis of AFB₁ from spiked tea samples by ELISA

样品类型	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	变异系数(%)	
			批内(n=5)	批间(n=3)
红茶	10	116.3 \pm 9.1	1.8	3.5
	20	85.5 \pm 5.1	3.4	4.5
	50	70.4 \pm 3.9	7.5	8.7
绿茶	10	111.8 \pm 11.6	1.7	5.5
	20	83.2 \pm 4.7	3.4	5.4
	50	76.8 \pm 4.6	7.7	12.0

2.5 讨论

黄曲霉毒素 AFB₁ 经过衍生引入了羧酸基团后, 可以利用经典的碳二亚胺法或者混合酸酐法将其偶联到蛋白载体上。由于 AFB₁ 毒性较大, 且价格较贵, 因此在进行化学衍生的时候一般都是在 1 毫克左右的量进行, 对操作的要求比较高。衍生后的溶液, 颜色会变为黄褐色, 通过薄层分析, 可以判断其偶联是成功的。对于反应过程中过量的 CMO, 本论文未作纯化处理, 经过多次合成, 只要 CMO 过量不是太多, 对 AFB₁ 和蛋白载体的偶联影响就不会太明显, 因此可以简化这一繁琐步骤, 也可以避免造成衍生物质更大的损失。在小鼠免疫过程中, 本研究尝试了一种新的免疫佐剂, 不需要乳化, 与弗氏佐剂相比, 每只小鼠免疫剂量也可以减少一半以上, 因此对于价格较贵的抗原, 可

以考虑使用。需要注意的是，每一种半抗原由于性质不同，因此效果也可能相差很大。本节研究结果表明，至少对于 AFB₁ 的免疫原是适用的。

2.6 本章小结

1. 通过酰化反应，对 AFB₁ 分子进行衍生引入羧基团，并通过活性酯法成功将衍生后的 AFB₁-CMO 连接到 BSA 和 KLH 两种蛋白载体上，制备了两种 AFB₁ 完全抗原并对其衍生产物和完全抗原进行了鉴定。

2. 将 AFB₁-KLH 作为免疫原免疫小鼠，通过使用快免佐剂，在四免后得到了较好的免疫效果。通过两次细胞融合，最终筛选得到了 2 种不同的 AFB₁ 单克隆抗体细胞株 11A9 和 5C3。

3. 对单克隆抗体 11A9 和 5C3 进行了鉴定。5C3 的 IC₅₀ 为 0.025±0.005 ng/mL，检测区间为 0.011~0.264 ng/mL；11A9 的 IC₅₀ 为 0.043±0.003 ng/mL，检测区间为 0.018~0.153 ng/mL；两种单抗 IgG 亚型均为 IgG 1 型，轻链类型均为 λ 类型；11A9 单抗的亲合力为 3.8×10⁹ L/mol，5C3 单抗的亲合力为 4.2×10⁹ L/mol；11A9 对 B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的交叉分别为 74.15%、42.16%、23.64% 和 7.37%，5C3 对 B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的交叉分别为 35.36%、25.44%、3.64% 和 18.24%。

4. 评价了不同 pH、甲醇浓度、离子强度、一抗二抗反应时间及显色时间对单克隆抗体 11A9 和 5C3 的影响，确立了最佳工作条件为：pH 为 7.4，甲醇浓度 10%，离子强度为 10 mM，一抗二抗反应时间均为 30 min，显色时间 15min。

5. 利用单抗 11A9 和 5C3 建立的 ELISA 方法分别对样品进行了添加回收实验。对于面粉样品，两种单抗的 ELISA 方法回收率在 84.7~116.7% 之间，批内批间差异均小于 11%；对于茶叶样品，11A9 的 ELISA 方法，回收率在 70.4%~116.3% 之间，批内变异系数在 1.7%~7.7% 之间，批间变异系数在 3.5%~12.0% 之间。

第三章 黄曲霉毒素M₁单克隆抗体的制备及其ELISA检测方法的建立

3.1 引言

黄曲霉毒素素 M₁ (Aflatoxin M₁, AFM₁) 是 AFB₁ 在肝微粒体单氧化酶系催化下的单羟基化的产物^[168-170], 主要存在于动物体内脏以及分泌的乳汁和尿液中。目前最主要污染牛奶和奶制品。奶牛等动物摄入含有 AFB₁ 的饲料后, 经体内代谢产生, 一般在摄入 12~24 h 就能检测到^[171]。AFM₁ 的致癌性虽然只有 AFB₁ 的 10% 左右, 但奶制品作为婴幼儿的日常主要食品, 危害更大, 因此限量非常严格。我国在最新颁布的 GB2761-2011 中对婴幼儿含乳食品中的限量为 0.5 μg/kg^[172]。

目前 AFM₁ 的常用的检测方法主要有仪器检测方法, 包括 HPLC、HPLC-MS/MS^[173-175], 以及免疫学检测方法^[124, 125]。虽然目前已经有很多免疫学快速检测方法的研究, 但由于其限量要求低, 而快速检测为方便大多还采用稀释的前处理方法, 因此对其核心试剂单克隆抗体的要求其高。本章研究在前人研究基础上, 采用两种不同的免疫程序和新型快免佐剂, 开发出了可用于高灵敏、高亲和力的 AFM₁ 单克隆抗体, 为 AFM₁ 的快速检测提供了技术支持。

3.2 材料与仪器

3.2.1 药品与试剂

O-(羧甲基)羟胺半盐酸盐 (O-(Carboxymethyl) hydroxylamine hemihydrochloride, CMO)、碳二亚胺 N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS)、黄曲霉毒素 M₁ 购于 sigma 公司; QuickAntibody™ 快免佐剂购于北京康碧泉生物科技有限公司; 黄曲霉毒素 M₁ 标准品溶液 (10 μg/mL, 乙腈)、牛奶阴性样本由江苏省进出口检验检疫局提供, 其他试剂同 2.2.1 章节。

3.2.2 主要仪器与设备

同 2.2.2 章节。

3.2.3 主要溶液

黄曲霉毒素 M₁ 标准溶液: 将 10 μg/mL 的 AFM₁ 乙腈溶液, 用乙腈分别稀释到 1 μg/mL 和 100 ng/mL, -20℃ 避光保存。

其他同第二章 2.2.3。

3.2.4 实验动物和细胞

同第二章 2.2.4。

3.3 实验方法

3.3.1 AFM₁ 半抗原的衍生

AFM₁ 的结构与 AFB₁ 的结构只相差一个羧基, 因此采取与 2.3.1 章节相同的衍生策略和方法, 并略作修改。1 mg AFM₁ 和 2mg 的 CMO 溶解于 1 mL 甲醇:水:吡啶=4:1:1 (V/V/V) 的反应溶液中, 置于棕色密闭玻璃小瓶中, 并用铝箔包裹以避光。小瓶用棉绳悬挂于 85℃ 水浴水面处, 反应 3h。期间注意水面高度并及时添加。水浴结束后, 将反应小瓶置于室温过夜。用氮气吹干反应溶液后, 用少量甲醇溶解, 用于薄层分析, 展开剂为氯仿:甲醇=9:1 (V/V)。

3.3.2 AFM₁ 完全抗原的制备

将活化好的 AFM₁ CMO(按 1mg AFM₁ 计) 2.34 mg EDC.HCl 和 0.88 mg NHS 溶解于 0.5 mL DMF 中, 室温磁力搅拌 4h。蛋白载体 KLH 和 OVA 各 2.5 mg, 分别溶解于 2 mL 0.05 M NaHCO₃ 缓冲液中, 磁力搅拌溶解。将活化好的 AFM₁-CMO 溶液分成两份, 分别滴加到两种载体蛋白溶液中。偶联反应在室温下过夜后, 用 PBS 透析三天, 每 8h 更换一次透析液。收集透析好的完全抗原, 分装后-20℃ 保存。

3.3.3 小鼠免疫

小鼠免疫采用两种策略: 策略一, 将合成的 AFM₁-KLH 作为免疫原免疫 2 只八周龄雌性 Balb/C 小鼠 (#1 和 #2), 具体方案同 2.2.3 章节; 策略二, 采用双免疫抗原免疫小鼠: 将 2.3.2 章节合成的 AFB₁-KLH 作为免疫原免疫 2 只小鼠 (#3 和 #4) 两次, 再用合成的 AFM₁-KLH 免疫小鼠 2 次, 免疫时间和剂量同 2.2.3 章节。

3.3.4 小鼠血清检测

采用一步法快速测定。将 AFM₁-OVA 作为包被抗原, 按照 1000、3000、9000 和 27000 的倍数包被 96 孔板的不同列。洗板封闭同 2.3.4 章节。小鼠尾部采血 2 μL, 将采集到的全血加入到含有 2 mL 抗体稀释液的 1.5 mL 离心管中, 震荡均匀, 在此基础上进行 3 个 3 倍梯度稀释, 共 4 个浓度。将封闭好的酶标板每一列的上部 4 个孔加入 50 μL PBS, 下部 4 个孔加入 50 μL 一定浓度 (5~100 ng/mL) 的 AFM₁ 标准溶液。标准溶液每次只用一个浓度。2 免后采血采用 20 ng/mL, 3 免后 5 ng/mL, 四免后 1 ng/mL。将 4 个浓度的全血稀释液, 按照顺序分别加入到不同包被浓度的酶标板的每一列上, 37℃ 反应半小时后, 洗板、加二抗及显色步骤同 2.3.4 章节。

3.3.5 单克隆抗体的制备

细胞筛选时同时用两种标准品黄曲霉毒素 B₁ 和 M₁ 进行抑制筛选。其他步骤同 2.3.5 章节。

3.3.6 单克隆抗体性质鉴定

单克隆抗体的生产与纯化，同 2.3.6 章节。

3.3.6.1 单克隆抗体亚型的鉴定

同 2.3.6.1 章节。

3.3.6.2 单克隆抗体交叉反应的测定

同 2.3.6.2 章节。

3.3.6.3 单克隆抗体亲和力的测定

同 2.3.6.3 章节。

3.3.7 AFM₁ 间接竞争 ELISA 的建立与优化

AFM₁ 的标准品价格昂贵，如果使用 AFM₁-OVA 作为包被抗原，成本巨大。考虑到 AFM₁ 单抗与 AFB₁ 存在一定的交叉反应，所以分别以 AFB₁-BSA 和 AFM₁-OVA 为包被原，尝试建立异源的 ELISA，以及节约检测成本。利用棋盘法确定最佳的包被抗原和单克隆抗体使用浓度。

其他步骤同 2.3.7 章节

3.3.8 实际样品添加回收试验

牛奶样品经 HPLC-MS/MS 检测，不含有 AFM₁。分别按照 0.050 μg/L，0.100 μg/L，0.200 μg/L 三个水平进行 AFM₁ 添加回收试验。取三个水平添加的牛奶样品各 5.0 mL，5000 rpm 离心 10 min 后，弃去上清脂肪层。用 PBS 稀释 3 倍后，用建立好的间接竞争 ELISA 方法进行检测。得到的结果经回归方程计算后，乘以 3 倍的稀释因子，即为测得的牛奶中 AFM₁ 含量。每次实验重复三次，连续三天测定。

3.4 结果与分析

3.4.1 AFM₁ 半抗原的合成鉴定

AFM₁ 及其肟化产物 AFM₁-CMO 的薄层层析分析结果分别见图 3-1:

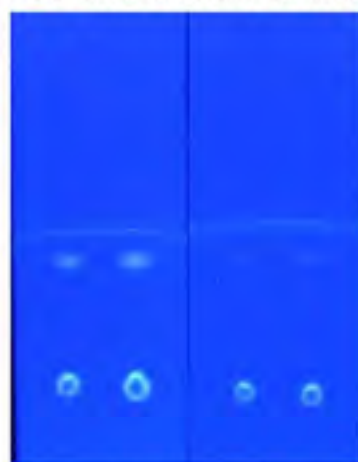


图 3-1 AFM₁ 和 AFM₁-CMO 的薄层分析结果(左 1.5 h, 右 3 h)

Fig.3-1 The TLC result of AFM₁ and AFM₁-CMO (left 1.5 h, right 3h)

其结果的分析类似于 2.4.1 章节。AFM₁ 分子由于在羧基位点引入了羧酸基团，反应产物比 AFM1 具有更大的极性，因此 Rf 值变小。从图中可以看出，反应 1.5 h 时，仍有少量的 AFM₁ 没有反应，到 3 h 时，没有反应的 AFM₁ 含量已经很少。说明脲化反应较为彻底，可以用来进行下一步的偶联。

3.4.2 AFM₁ 完全抗原的合成鉴定

将 AFM₁、OVA、KLH 及其对应的完全抗原用 PBS 稀释合适的倍数后，在 200~600nm 范围进行扫描。得到的紫外可见光吸收图谱如图 3-2 和图 3-3 所示：

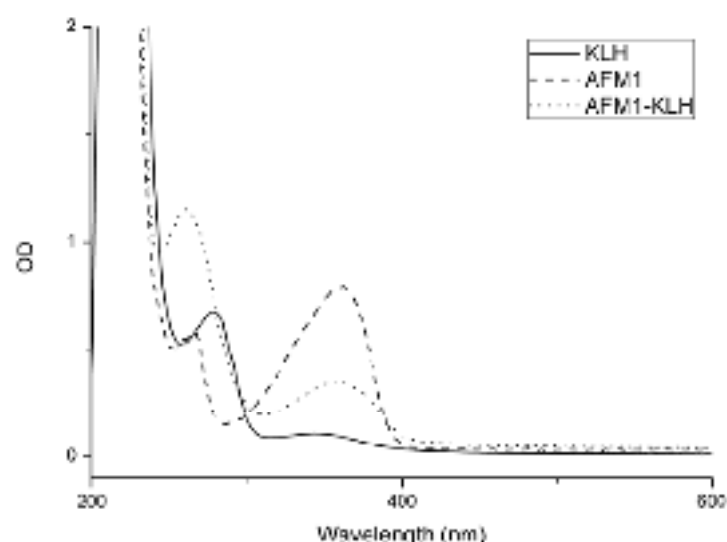


图 3-2 AFM₁-KLH 的紫外扫描图

Fig. 3-2 Ultraviolet spectrum of immunogen AFM₁-KLH

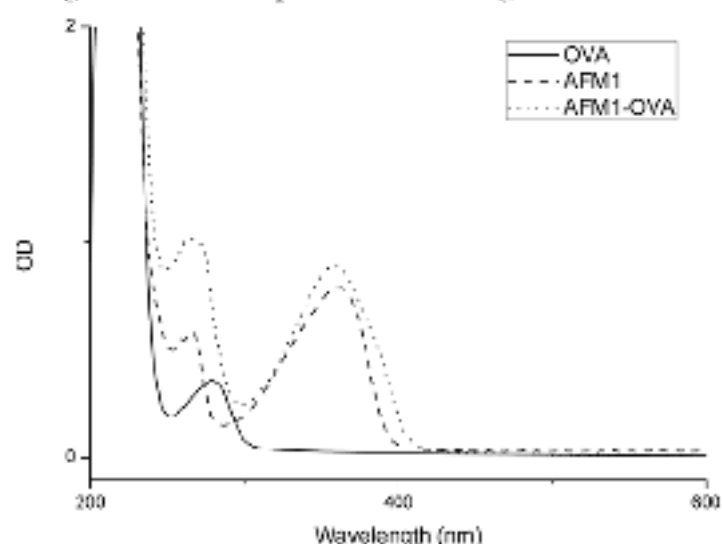


图 3-3 AFM₁-OVA 的紫外扫描图

Fig. 3-3 Ultraviolet spectrum of immunogen AFM₁-OVA

从图中可以看出，AFM₁ 在 265 nm 和 360nm 处共有两个吸收峰，蛋白载体的吸收峰均在 278nm，KLH 在 340 nm 处有微弱的吸收。偶联了 AFM₁ 的完全抗原，不仅在 360nm 左右有明显的吸收峰，而且相对于蛋白载体纯蛋白，其 278nm 处的吸收峰已明显偏向 265nm 处。说明完全抗原的偶联是成功的，可以进行动物免疫。

3.4.3 小鼠免疫与检测

小鼠 4 免后采血后，用一步法快速测定其效价和抑制的结果见表 3-1，从表中可以看出，#2 和#4 号小鼠免疫效果较好。在包被抗原为 3000 和 9000 倍稀释、全血 1000 和 3000 倍稀释的时候，加 PBS 和 1 ng/mL AFM₁ 的孔的 OD 值相差一倍以上，说明两种免疫策略均有效，#2 和#4 两只小鼠的多克隆抗体对 AFM₁ 抑制已经在 1 ng/mL，可以用来进行细胞融合。

表 3-1 四免后小鼠血清的检测结果
Table 3-1 The test result of surum of mice after 4th immunization

		包被稀释倍数							
全血稀释倍数	1000 3000 9000 27000				1000 3000 9000 27000				
	#1 小鼠				#2 小鼠				
1000	2.229	2.059	1.448	0.523	1.832	1.262	0.715	0.237	
3000	1.404	1.226	0.777	0.299	1.015	0.671	0.340	0.214	
9000	0.615	0.500	0.321	0.144	0.390	0.265	0.165	0.138	
27000	0.243	0.214	0.154	0.104	0.217	0.148	0.117	0.135	
上边四行为 PBS，下边四行为 AFM ₁ 1 ng/mL									
1000	2.097	1.914	1.383	0.556	1.297	0.696	0.264	0.109	
3000	1.343	1.081	0.649	0.290	0.564	0.299	0.139	0.104	
9000	0.584	0.406	0.251	0.127	0.237	0.134	0.082	0.081	
27000	0.264	0.203	0.134	0.093	0.135	0.095	0.086	0.106	
		包被稀释倍数							
全血稀释倍数	1000 3000 9000 27000				1000 3000 9000 27000				
	#3 小鼠				#4 小鼠				
1000	1.369	0.938	0.475	0.176	1.395	1.196	0.743	0.288	
3000	0.637	0.440	0.312	0.114	0.656	0.465	0.311	0.159	
9000	0.253	0.179	0.146	0.079	0.244	0.202	0.164	0.116	
27000	0.161	0.109	0.162	0.085	0.140	0.126	0.155	0.172	
上边四行为 PBS，下边四行为 AFM ₁ 1 ng/mL									
1000	1.042	0.653	0.254	0.117	0.950	0.551	0.278	0.120	
3000	0.461	0.282	0.135	0.082	0.397	0.229	0.131	0.093	
9000	0.192	0.129	0.079	0.061	0.170	0.115	0.075	0.067	
27000	0.115	0.094	0.079	0.083	0.111	0.093	0.088	0.096	

3.4.4 单克隆抗体的性质

通过两次细胞融合和亚克隆筛选，最终得到了两个杂交瘤细胞株 G3D9（小鼠#4）和 H1（小鼠#2）。其中 G3D9 由通过双免疫原策略免疫的#2 小鼠，经融合筛选得到；H1 是通过单免疫原策略免疫的#4 小鼠，经融合筛选得到。

3.4.4.1 抗体亚型的鉴定

通过单抗亚型鉴定试剂盒对单抗的免疫球蛋白类别、亚型及其轻链类型进行鉴定，结果见图 3-4：

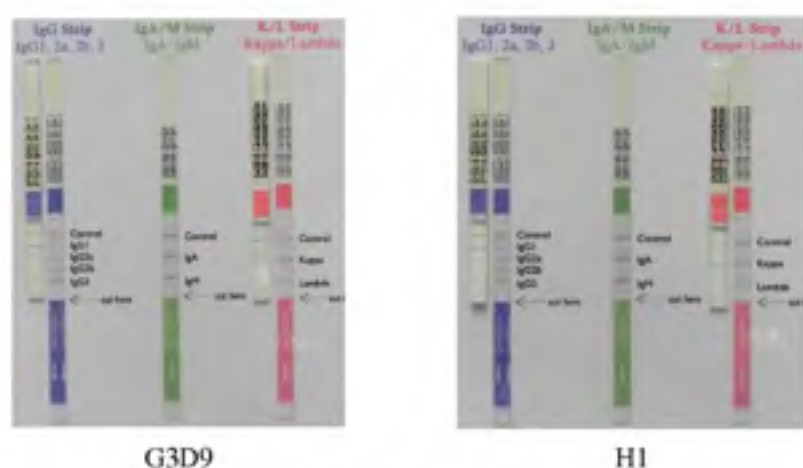


图 3-4 单克隆抗体 IgG 的亚型鉴定

Fig.3-4 The IgG subclass of monoclonal antibody

从图中实验结果和标准图对照可以看出，单克隆抗体 G3D9 的 IgG 亚型为 IgG1 型，轻链为 κ 链；单克隆抗体 H1 的 IgG 亚型同样为 IgG1 型，轻链为 κ 链。试纸条 control 线明显，说明结果有效。

3.4.4.2 抗体交叉反应的测定

通过间接竞争 ELISA 测得的单克隆抗体 G3D9 和 H1 的 IC_{50} 及其与其他黄曲霉毒素的交叉反应率见表 3-2:

表 3-2 AFM1 单克隆抗体 G3D9 和 H1 的交叉反应率的测定

Tab.3-2 The cross-reactivity of mAb 11A9 and 5C3

名称	结构式	分子式	G3D9 IC_{50} (ng/mL)	G3D9 CR(%)	H1 IC_{50} (ng/mL)	H1 CR(%)
AFM ₁		C ₁₇ H ₁₂ O ₇	0.054	100.00	0.042	100.00
AFB ₁		C ₁₇ H ₁₂ O ₆	0.090	60.14	0.598	7.08
AFB ₂		C ₁₇ H ₁₄ O ₆	1.004	5.38	>10.00	<0.50
AFG ₁		C ₁₇ H ₁₂ O ₇	0.192	28.12	2.700	1.57
AFG ₂		C ₁₇ H ₁₄ O ₇	>5.00	<1.00	>10.00	<0.50

从表中可以看出, G3D9 单抗对 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的交叉反应分别为 60.14%、5.38%、28.12% 和 1% 以下, G3D9 不仅对 AFM₁ 有较好的灵敏度, 同时对 AFB₁ 同样具有较好的灵敏度, 因此可以用来设计用来检测可能同时含有 AFB₁ 和 AFM₁ 的食物中黄曲霉毒素的含量, 例如婴幼儿食品、各种添加谷物成分的牛奶等。而单抗 H1 对 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的交叉反应均小于 10%。两种单抗在 1000 ng/mL 的浓度下, 均为看出对其他真菌毒素有明显的交叉, 因此可以特异性的检测食品中的 AFM₁ 含量。

3.4.4.3 抗体亲和力的测定

按照 2.3.6.3 中的公式计算得出, 在 AFB₁-BSA 为包被抗原的时候, G3D9 单抗的亲合力为 1.28×10^9 L/mol, H1 单抗的亲合力为 2.29×10^9 L/mol。

3.4.5 AFM₁ 间接竞争 ELISA 的优化

分别使用 AFM₁-OVA 和 AFB₁-BSA 作为同源和异源包被抗原, 利用棋盘法确定单抗 G3D9 和 H1 的合适的包被抗原和抗体使用浓度, 见表 3-3a、b 和 3-4a、b。选择 OD 在 1.0~1.5 之间的点对应的包被抗原和抗体使用浓度作为工作点。

表 3-3a G3D9 在同源包被时的工作点

Table 3-3a The workpoint of G3D9 with homologous coating antigen

G3D9 稀释倍 数	包被抗原 AFM ₁ -OVA 稀释倍数							
	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000
1000	2.293	2.321	2.267	2.117	1.790	1.290	0.728	0.450
2000	1.854	1.958	1.872	1.735	1.409	0.986	0.567	0.352
4000	1.265	1.373	1.265	1.155	0.957	0.709	0.383	0.244
8000	0.838	0.877	0.855	0.739	0.620	0.449	0.281	0.192
16000	0.504	0.515	0.484	0.441	0.364	0.276	0.159	0.108
32000	0.318	0.310	0.305	0.267	0.221	0.196	0.115	0.105
64000	0.185	0.189	0.182	0.153	0.143	0.124	0.081	0.076
128000	0.231	0.210	0.155	0.121	0.108	0.109	0.080	0.084

表 3-3b G3D9 在异源包被时的工作点

Table 3-3b The workpoint of G3D9 with heterogenous coating antigen

抗体稀 释倍数	包被抗原 AFB ₁ -BSA 稀释倍数							
	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000
1000	2.344	2.334	2.297	1.888	1.610	1.112	0.584	0.358
2000	1.759	1.808	1.834	1.620	1.143	0.785	0.508	0.298
4000	1.068	1.208	1.202	1.061	0.842	0.674	0.405	0.217
8000	0.605	0.748	0.728	0.619	0.525	0.439	0.258	0.161
16000	0.329	0.467	0.416	0.387	0.289	0.242	0.172	0.111
32000	0.199	0.309	0.282	0.272	0.220	0.176	0.130	0.105
64000	0.128	0.231	0.172	0.181	0.126	0.129	0.089	0.082
128000	0.110	0.183	0.142	0.116	0.109	0.083	0.086	0.070

从表中可以看出, G3D9 单抗在同源包被和异源包被的情况下, 均能选出 OD 在 1.0~1.5 之间的工作点, 说明 G3D9 单抗能以 AFB₁-BSA 作为包被抗原。

表 3-4a HI 在同源包被时的工作点

Table 3-4a The workpoint of HI with homologous coating antigen

HI 稀释倍数	包被抗原 AFM1-OVA 稀释倍数							
	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000
1000	2.777	2.867	2.658	2.583	2.117	1.508	0.973	0.536
2000	2.429	2.485	2.379	2.128	1.789	1.247	0.711	0.437
4000	2.146	2.132	1.972	1.703	1.324	0.876	0.528	0.310
8000	1.571	1.505	1.377	1.199	0.878	0.609	0.360	0.235
16000	0.956	0.952	0.833	0.716	0.505	0.362	0.200	0.139
32000	0.539	0.579	0.509	0.43	0.318	0.247	0.140	0.107
64000	0.300	0.315	0.288	0.254	0.178	0.162	0.095	0.083
128000	0.201	0.202	0.189	0.165	0.136	0.113	0.084	0.085

表 3-4b HI 在异源包被时的工作点

Table 3-4b The workpoint of HI with heterogenous coating antigen

HI 稀释倍数	包被抗原 AFB1-BSA 稀释倍数							
	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000
1000	2.368	2.539	2.479	2.222	1.78	1.121	0.686	0.310
2000	2.114	2.128	2.102	1.833	1.341	0.860	0.492	0.249
4000	1.547	1.589	1.598	1.331	0.879	0.567	0.299	0.177
8000	1.009	1.028	0.987	0.847	0.558	0.359	0.194	0.124
16000	0.587	0.621	0.601	0.511	0.338	0.226	0.140	0.091
32000	0.353	0.387	0.379	0.317	0.228	0.163	0.101	0.091
64000	0.248	0.238	0.243	0.188	0.135	0.116	0.079	0.077
128000	0.191	0.193	0.171	0.135	0.104	0.086	0.063	0.057

从表中可以看出, HI 单抗在同源包被和异源包被的情况下, 均能选出 OD 值在 1.0~1.5 之间的工作点。说明 HI 单抗同样也能以 AFB₁-BSA 作为包被抗原。

为进一步对比两种包被抗原对两种单抗的灵敏度的影响, 选择了两种包被下两种单抗的工作点, 在各个工作点包被抗原和一抗浓度下, 通过间接竞争法对比不同包被抗原下的抗体最佳 IC₅₀, 结果见表 3-5a、b 和 3-6a、b:

表 3-5a G3D9 在同源包被工作点的抑制

Table 3-5a The inhibition of G3D9 with homologous coating antigen

包被倍数	2000	4000	8000	16000	32000	64000
一抗倍数	4000	4000	4000	4000	2000	1000
AFM1 0 ppb	1.216	1.225	1.259	1.177	1.403	1.466
0.01 ppb	1.106	1.119	1.108	0.995	1.307	1.394
0.02 ppb	1.086	1.066	1.050	0.873	1.247	1.353
0.05 ppb	0.841	0.794	0.690	0.531	0.920	1.201
0.1 ppb	0.637	0.535	0.457	0.295	0.440	0.921
0.2 ppb	0.434	0.359	0.291	0.176	0.240	0.397
0.5 ppb	0.300	0.219	0.162	0.106	0.114	0.143
1 ppb	0.214	0.167	0.134	0.093	0.092	0.107
IC ₅₀	0.083	0.068	0.053	0.038	0.065	0.121
R ²	0.996	0.998	0.996	0.998	0.996	0.994

表 3-5b G3D9 在异源包被工作点的抑制

Table 3-5b The inhibition of G3D9 with heterogenous coating antigen

包被倍数	2000	4000	8000	16000	32000	64000
一抗倍数	4000	4000	4000	4000	2000	1000
AFM ₁ 0 ppb	1.276	1.382	1.320	1.129	1.291	0.986
0.01 ppb	1.263	1.332	1.242	1.031	1.285	0.964
0.02 ppb	1.130	1.177	1.146	0.878	1.201	0.943
0.05 ppb	0.895	0.865	0.745	0.553	0.928	0.723
0.1 ppb	0.580	0.563	0.439	0.257	0.374	0.298
0.2 ppb	0.404	0.447	0.353	0.221	0.257	0.267
0.5 ppb	0.277	0.309	0.241	0.160	0.168	0.221
1 ppb	0.276	0.311	0.261	0.183	0.182	0.233
IC ₅₀	0.064	0.051	0.046	0.038	0.063	0.058
R ²	0.997	0.997	0.997	0.994	0.995	0.997

从表中 3-5a 和 b 中可以看出, 单抗 G3D9 在同源包被不同的工作点下都有较好的抑制, 其中抑制最好的工作点是: 包被 16000 倍稀释, 一抗 4000 倍稀释, 在此工作点下的 IC₅₀ 最低, 为 0.038 ng/mL, 回归拟合的相关系数 R² 为 0.998; 而在异源包被的工作点下, 单抗 G3D9 同样具有很好的抑制, 最好的工作点同样为包被 16000 倍稀释, 一抗 4000 倍稀释, 在此工作点下的 IC₅₀ 最低, 为 0.038 ng/mL, 回归拟合的相关系数 R² 为 0.994。说明单抗 G3D9 可以以 AFB₁-BSA 作为异源包被抗原进行免疫分析, 不需要再使用 AFM₁-OVA 作为包被抗原, 可以极大的降低分析成本。

从表中 3-6a 和 b 中可以看出, 单抗 H1 在同源包被不同的工作点下都有较好的抑制, 其中抑制最好的工作点是: 包被 16000 倍稀释, 一抗 8000 倍稀释, 在此工作点下的 IC₅₀ 最低, 为 0.048 ng/mL, 回归拟合的相关系数 R² 为 0.998; 而在异源包被的工作点下, 单抗 H1 同样具有很好的抑制, 最好的工作点同样为包被 16000 倍稀释, 一抗 8000 倍稀释, 在此工作点下的 IC₅₀ 最低, 为 0.034 ng/mL, 回归拟合的相关系数 R² 为 0.996。说明单抗 H1 同样可以以 AFB₁-BSA 作为异源包被抗原进行免疫分析, 不需要再使用 AFM₁-OVA 作为包被抗原, 可以极大的降低分析成本。

表 3-6a H1 在同源包被工作点的抑制

Table 3-6a The inhibition of H1 with homologous coating antigen

包被倍数	2000	4000	8000	16000	32000	64000
一抗倍数	8000	8000	8000	8000	4000	2000
AFM ₁ 0 ppb	1.326	1.448	1.311	1.094	1.223	1.105
0.01 ppb	1.256	1.235	1.199	0.956	1.071	1.033
0.02 ppb	1.180	1.231	1.082	0.881	1.004	0.991
0.05 ppb	1.032	0.996	0.797	0.561	0.864	0.973
0.1 ppb	0.817	0.684	0.489	0.327	0.513	0.775
0.2 ppb	0.612	0.472	0.305	0.191	0.260	0.504
0.5 ppb	0.380	0.264	0.161	0.108	0.112	0.143
1 ppb	0.281	0.187	0.104	0.083	0.087	0.094
IC ₅₀	0.129	0.088	0.062	0.048	0.083	0.177
R ²	1.000	0.990	0.999	0.998	0.986	0.991

表 3-6b HI 在异源包被工作点的抑制

Table 3-4b The inhibition of HI with heterogenous coating antigen

包被倍数	2000	4000	8000	16000	32000	64000
一抗倍数	8000	8000	8000	8000	4000	2000
AFM1 0 ppb	1.191	1.336	1.305	1.125	1.043	1.068
0.01 ppb	1.182	1.122	1.110	0.933	0.973	1.020
0.02 ppb	0.952	1.053	0.949	0.777	0.892	0.919
0.05 ppb	0.816	0.808	0.632	0.486	0.655	0.813
0.1 ppb	0.558	0.478	0.353	0.229	0.295	0.599
0.2 ppb	0.405	0.306	0.193	0.141	0.145	0.253
0.5 ppb	0.247	0.184	0.109	0.097	0.065	0.081
1.0ppb	0.185	0.132	0.076	0.078	0.063	0.064
IC ₅₀	0.072	0.059	0.043	0.034	0.061	0.108
R ²	0.984	0.991	0.999	0.996	0.996	0.989

因此在异源包被的基础上, 进一步评价了不同 pH、甲醇浓度、离子强度、一抗反应时间、二抗反应时间和显色时间对单抗 G3D9 和 HI 的影响。

3.4.5.1 标准品稀释液 pH 的优化

选择了 4 中不同 pH 标准品稀释液 (pH 5.8、6.4、7.4、8.0), 考察其对单克隆抗体 G3D9 和 HI 的影响, 结果分别见表 3-7a 和 3-7b:

表 3-7a 不同 pH 对抗 G3D9 的影响

Table 3-7a Effects of different pH on G3D9

pH	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
5.8	1.186±0.033	0.043±0.003	27.6
6.4	1.146±0.028	0.039±0.002	29.4
7.4	1.181±0.026	0.042±0.003	28.1
8.0	1.228±0.019	0.045±0.004	27.3

表 3-7b 不同 pH 对抗 HI 的影响

Table 3-7b Effects of different pH on HI

pH	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
5.8	1.187 ±0.033	0.036 ±0.001	33.0
6.4	1.292 ±0.033	0.039 ±0.003	33.1
7.4	1.236 ±0.033	0.035 ±0.003	35.3
8.0	1.178 ±0.033	0.041 ±0.002	28.7

从表中可以看出, pH 对两种单抗 G3D9 和 HI 的 IC₅₀ 和最大吸光值 A_{max} 基本没有影响。为方便考虑, 使用最为常用的 pH7.4 的 PBS 作为标准品稀释液

3.4.5.2 标准品稀释液甲醇含量的优化

标准品稀释液中的甲醇含量对两种单抗 G3D9 和 HI 的影响见表 3-8a 和 3-8b。从表中可以看出, 甲醇含量的升高 (从 0 到 50%) 对两种单抗 G3D9 和 HI 的最大吸光值没有明显影响, 但是两种单抗的 IC₅₀ 均随着甲醇浓度的升高而降低。因此在分析实际样品的时候, 需要考虑到甲醇含量的影响, 为保证检测灵敏度, 最好的 10% 以内。本研究选择不含甲醇的 PBS 最为标准品的稀释液。

表 3-8a 不同甲醇浓度对单抗 G3D9 的影响

Table 3-7a Effects of different methanol concentration on G3D9

甲醇浓度 (v/v)	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
0%	1.309 ±0.032	0.032 ±0.003	40.9
10%	1.238 ±0.023	0.051 ±0.004	24.3
20%	1.302 ±0.021	0.067 ±0.004	19.4
30%	1.293 ±0.031	0.100 ±0.006	12.9
40%	1.252 ±0.040	0.135 ±0.010	9.27
50%	1.349 ±0.025	0.165 ±0.009	8.18

表 3-8b 不同甲醇浓度对单抗 H1 的影响

Table 3-7b Effects of different methanol concentration on H1

甲醇浓度 (v/v)	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
0%	1.319 ±0.024	0.026 ±0.001	50.7
10%	1.412 ±0.043	0.045 ±0.005	31.4
20%	1.404 ±0.045	0.064 ±0.007	21.9
30%	1.376 ±0.028	0.079 ±0.002	17.4
40%	1.423 ±0.020	0.104 ±0.007	13.7
50%	1.375 ±0.019	0.153 ±0.014	8.99

3.4.5.3 标准品稀释液离子强度的优化

不同离子强度标准品稀释液对单克隆抗体 G3D9 和 H1 的影响分别见表 3-9a 和 3-9b:

表 3-9 a 不同离子强度对 G3D9 的影响

Table 3-9 a Effects of the ionic strength on G3D9

离子强度	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
0	1.236 ±0.016	0.050 ±0.003	24.9
2 mM	1.269 ±0.028	0.045 ±0.005	28.1
5 mM	1.169 ±0.037	0.042 ±0.004	27.5
10 mM	1.134 ±0.026	0.041 ±0.003	28.0
20 mM	1.002 ±0.030	0.033 ±0.005	30.2
50 mM	0.759 ±0.036	0.032 ±0.008	23.4

表 3-9 b 离子强度对 H1 的影响

Table 3-9 b Effects of the ionic strength on H1

离子强度	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
0	1.297 ±0.036	0.052 ±0.003	25.1
2 mM	1.281 ±0.040	0.052 ±0.002	24.8
5 mM	1.322 ±0.027	0.048 ±0.003	27.6
10 mM	1.304 ±0.028	0.042 ±0.001	31.2
20 mM	1.235 ±0.021	0.030 ±0.004	41.1
50 mM	0.930 ±0.034	0.034 ±0.002	32.8

从表中可以看出, 随着标准品稀释液中离子强度的增强, G3D9 和 H1 两种单抗的 A_{max} 逐渐降低, 同时 IC_{50} 也在逐渐降低。在实际分析过程中, 虽然需要尽可能低的 IC_{50} 来保证灵敏度, 但 A_{max} 太低, 显色值低, 误差会加大。综合考虑, 选择常用的 10 mM 的 PBS 作为标准品稀释液。

3.4.5.4 一抗反应时间的优化

不同一抗反应时间对单克隆抗体 G3D9 和 H1 的影响分别见表 3-10a 和 3-10b:

表 3-10a 一抗反应时间对 G3D9 的影响

Table 3-10a Effects of the incubate time of primary antibody on G3D9

反应时间	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
60 min	1.264 ± 0.016	0.035 ± 0.001	36.1
45 min	1.162 ± 0.021	0.038 ± 0.004	30.6
30 min	0.978 ± 0.034	0.036 ± 0.004	27.2
15 min	0.689 ± 0.052	0.026 ± 0.008	26.5

表 3-10b 一抗反应时间对 H1 的影响

Table 3-10b Effects of the incubate time of primary antibody on H1

30 min	1.251 ± 0.023	0.038 ± 0.003	32.9
15 min	0.839 ± 0.013	0.036 ± 0.003	23.3

表 3-11b 二抗反应时间对 H1 的影响

Table 3-10b Effects of the incubate time of secondary antibody on H1

反应时间	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
60 min	1.903 ±0.040	0.037 ±0.002	51.4
45 min	1.542 ±0.046	0.034 ±0.003	45.4
30 min	1.235 ±0.020	0.034 ±0.002	36.3
15 min	0.889 ±0.015	0.031 ±0.002	28.7

3.4.5.6 显色反应时间的优化

不同显色反应时间对单克隆抗体 G3D9 和 H1 的影响分别见表 3-12a 和 3-12b:

表 3-12a 显色反应时间对 G3D9 的影响

Table 3-10a Effects of the colouring time on mAb G3D9

显色时间	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
25 min	1.992 ±0.019	0.049 ±0.001	40.6
20 min	1.627 ±0.020	0.049 ±0.002	33.2
15 min	1.359 ±0.035	0.047 ±0.004	28.9
10 min	1.016 ±0.037	0.050 ±0.005	20.3

表 2-10b 显色反应时间对 H1 的影响

Table 3-12b Effects of the colouring time on mAb H1

显色时间	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
25 min	1.820 ±0.041	0.040 ±0.002	45.5
20 min	1.535 ±0.036	0.041 ±0.003	37.4
15 min	1.280 ±0.029	0.039 ±0.002	32.8
10 min	0.898 ±0.013	0.041 ±0.001	21.9

从表中可以看出,随着显色反应时间的增加,G3D9 和 H1 两种单抗 A_{max} 升高明显,IC₅₀ 随着时间的延长变化不大。说明显色反应时间只是影响显色的高低,对 ELISA 的灵敏度影响较小。在保证一定 A_{max} 的前提下,为保证分析的快速性和降低本底值,综合考虑,选择 15 min 的显色反应时间。

3.4.5.7 间接竞争 ELISA 的标准抑制曲线

按照以上优化后的参数,建立了两种单抗的标准抑制曲线,如图 3-4 所示:

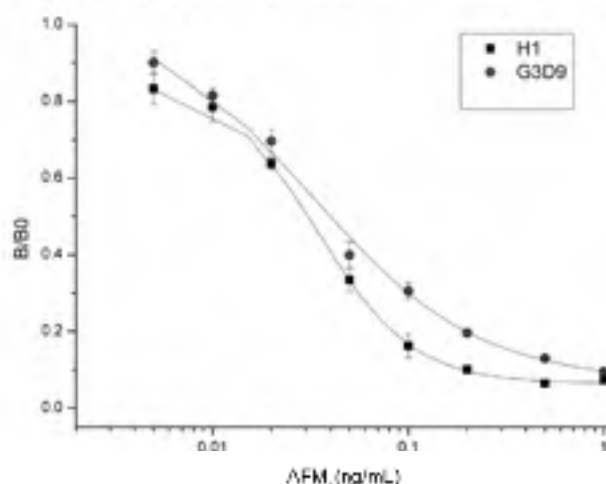


图 3-4 AFM1 单克隆抗体抑制标准曲线

Fig.3-4 The standard inhibitive curve of AFM1 monoclonal antibody

根据标准曲线的拟合结果, 单抗 G3D9 的 IC_{50} 为 0.032 ± 0.006 ng/mL, 检测区间为 (IC_{15-85}) $0.008 \sim 0.376$ ng/mL; 单抗的 IC_{50} 为 0.035 ± 0.005 ng/mL, 检测区间为 (IC_{15-85}) $0.005 \sim 0.110$ ng/mL; 相关系数 R^2 分别为 0.997 和 0.993。

3.4.6 实际样品添加回收试验

阴性牛奶添加回收的结果见表 3-13。从表中可以看出, G3D9 单抗建立的 ELISA 其添加回收率在 94.9~115.4% 之间, 批内变异系数 3.07%~10.26% 之间, 批间变异系数 9.76%~13.4% 之间; H1 单抗建立的 ELISA, 其添加回收率在 82.0~93.8% 之间, 批内变异系数 9.29%~11.33% 之间, 批间变异系数 11.04%~19.83% 之间。

表 3-13 ELISA 方法测定样品中 AFM_1 的添加回收率
Table 3-13 Recovery analysis of AFM_1 from spiked samples by ELISA

单克隆抗体	添加水平 ($\mu\text{g/L}$)	平均回收率 (%)	变异系数(%)	
			批内(n=3)	批间(n=3)
G3D9	0.05	115.4 ± 11.2	10.2%	12.9%
	0.10	95.2 ± 10.7	9.4%	13.4%
	0.20	94.9 ± 6.7	3.0%	9.8%
H1	0.05	93.8 ± 15.7	11.3%	19.9%
	0.10	93.4 ± 8.9	9.9%	11.5%
	0.20	82.0 ± 7.0	9.3%	11.0%

3.5 讨论

AFM_1 的价格是非常贵的, 因此合成抗原的成本也是非常高的, 这一点会直接影响到实际应用和检测时的成本。因此, 如果可以用 AFB_1 的包被抗原来代替 AFM_1 包被抗原, 就可以极大程度上降低以后的检测成本。通过查阅文献, 发现 AFM_1 的抗体很少会对 AFB_1 有较好的交叉, 因此可能不能使用 AFB_1 的包被抗原。因此本论文设计了一种新的双抗原免疫策略, 即先用 AFB_1 的免疫抗原免疫小鼠, 间隔一段时间后, 再用 AFM_1 的免疫抗原免疫小鼠。通过利用抗体的亲和力成熟理论, 在对 AFB_1 有特异性的 B 细胞基础上, 进一步诱导进化出同时识别 M_1 的特异性 B 细胞。通过对得到的 G3D9 单抗交叉反应的测定, 说明此策略是成功的。同时我们也发现, 即使只使用 AFM_1 免疫原得到的对 AFB_1 没有明显交叉的单抗 H1, 也可以使用 AFB_1 的包被抗原。其原因可能是由于在引入羧基基团的时候, 引入的间隔臂与 AFB_1 相同引起的。

3.6 本章小结

1. 通过酰化反应, 在 AFM_1 上衍生引入羧基基团, 并通过活性酯法成功将衍生后的 AFM_1 -CMO 连接到 OVA 和 KLH 两种蛋白载体上, 制备了两种 AFM_1 完全抗原, 并对其衍生产物和完全抗原进行了鉴定。

2. 通过双免疫原和单免疫原两种免疫策略, 将 AFM_1 -KLH (以及 AFB_1 -KLH) 作为免疫原免疫小鼠, 通过使用**快免佐剂**, 在四免后得到了较好的免疫效果。通过两次细胞

融合，最终筛选得到了2种不同的AFM₁单克隆抗体细胞株G3D9和H1，其中G3D9为双免疫原免疫小鼠融合后筛选得到的单克隆抗体。

3.对单克隆抗体G3D9和H1进行了鉴定。G3D9的 IC_{50} 为 0.032 ± 0.006 ng/mL，检测区间为 $0.008\sim 0.376$ ng/mL；H1的 IC_{50} 为 0.035 ± 0.005 ng/mL，检测区间为 $0.005\sim 0.110$ ng/mL；两种单抗IgG亚型均为IgG1型，轻链类型均为 κ 链类型；G3D9单抗的亲合力为 1.28×10^9 L/mol，H1单抗的亲合力为 2.29×10^9 L/mol；G3D9对B₁、B₂、G₁和G₂的交叉分别为60.14%、5.38%、28.12%和1%以下，H1对B₁、B₂、G₁和G₂的交叉均小于10%。

4.评价了不同pH、甲醇浓度、离子强度、一抗二抗反应时间及显色时间对单克隆抗体G3D9和H1的影响，确立了最佳工作条件为：pH为7.4，甲醇浓度0，离子强度为10 mM，一抗反应时间均为45 min，二抗反应时间均为30 min，显色时间15 min。

5.利用单抗G3D9和H1建立的ELISA方法分别对阴性牛奶样品进行了添加回收实验。两种单抗的ELISA方法回收率在82.0%~115.4%之间，批内差异均小于12%，批间差异均小于20%。

第四章 赭曲霉毒素A单克隆抗体的制备及其ELISA检测方法的建立

4.1 引言

赭曲霉毒素(Ochratoxin)主要是由要产生菌是赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*)和纯绿青霉(*Penicillium verrucosum*)产生的有毒次级代谢产物,主要有9种结构类似物,其中对人类健康危害最大的主要是赭曲霉毒素A(Ochratoxin A, OTA),主要危害人和动物的肾脏^[176, 177]。OTA对农作物的污染范围比较广,包括谷物、豆类、葡萄、等等^[147, 178, 179]。国际癌症组织(IARC)在1993年将OTA列为Class2B,即对人类的可能致癌物质。

目前OTA的检测方法主要分为仪器检测方法和快速检测方法。由于欧盟和我国均对OTA制定了严格的限量,因此对免疫学快速检测提出了很高的要求。本章研究在前人研究基础上,采用新型快免佐剂,开发出了可用于高灵敏、高亲和力的OTA单克隆抗体,并在此基础上建立ELISA快速检测方法。

4.2 材料与仪器

4.2.1 药品与试剂

赭曲霉毒素A(Ochratoxin A, OTA)、1,1'-羰基二咪唑(1,1'-Carbonyldiimidazole, CDI)购于sigma公司; QuickAntibody™快免佐剂购于北京康碧泉生物科技有限公司; 赭曲霉毒素A和赭曲霉毒素B标准品溶液(10 μg/mL, 乙腈)、面粉阴性样本由江苏省进出口检验检疫局提供,其他试剂同2.2.1章节。

4.2.2 主要仪器与设备

同2.2.2章节

4.2.3 主要溶液

赭曲霉毒素A标准溶液:将10 μg/mL的OTA乙腈溶液,用乙腈分别稀释到1 μg/mL和100 ng/mL, -20℃避光保存。其他同第二章2.2.3。

4.2.4 实验动物和细胞

同第二章2.2.4。

4.3 实验方法

4.3.1 赭曲霉毒素A免疫抗原合成

OTA免疫抗原的合成采用活性酯法^[180-184],如图4-1所示。1mg OTA、0.78mg NHS和1.75 mg EDC溶解于0.5 mL DMF中,磁力搅拌,室温下活化1 h。5 mg KLH溶解于2 mL 0.05 mol/L的NaHCO₃溶液中,磁力搅拌均匀。将活化好的OTA溶液,逐滴加入

到 KLH 溶液中。利用 pH 试纸监控反应溶液的 pH，用 1 M 的 NaOH 溶液调节反应溶液的 pH，使之保持在 8.5 附近。偶联反应室温下反应 3 h 后，将反应溶液装入透析袋中，于 0.05 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液中透析 3 天，每 8 h 更换一次透析液。最后一次透析液换成 PBS。合成的包被抗原抗原分装后，置于 -20℃ 分装保存。

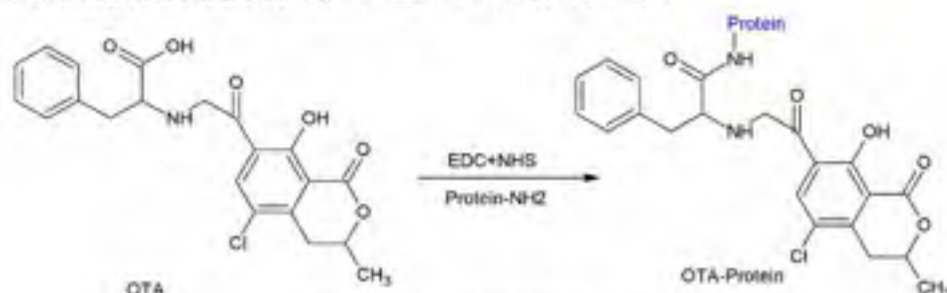


图 4-1 OTA 完全抗原的合成

Fig.4-1 The synthesis of OTA complete antigen

4.3.2 赭曲霉毒素 A 包被抗原制备

OTA 包被抗原合成采用 CDI 法^[185, 186]。OTA 分子上的羧基，可以通过 CDI 活化后，偶联到蛋白分子上的赖氨酸氨基上。合成的主要步骤：1 mg 的 OTA 溶解于 0.2 mL 无水 DMSO 中，加入 2 mg CDI，在室温下，磁力搅拌溶解后，避光继续反应 10 min；5 mg 的 OVA，溶解到 1 mL pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 CBS 中，磁力搅拌溶解。将活化好的 OTA 溶液，逐滴加入到 OVA 溶液中。加完后，继续磁力搅拌，避光室温反应 4 h。反应结束后，反应溶液在 CBS 溶液中透析 3 次，以除去未反应的 OTA 及其他小分子；最后一次透析液换成 PBS。合成的包被抗原抗原分装后，置于 -20℃ 分装保存。

4.3.3 小鼠免疫

利用快速免疫佐剂，免疫 4 只 Balb/C 雌性小鼠，其他同 2.2.3 章节。

4.3.4 小鼠血清检测

小鼠免疫的检测采用一步法快速检测，所用标准品溶液换为 OTA，具体方法同 3.3.4 章节。

4.3.5 单克隆抗体的制备

细胞筛选时使用 OTA-OVA 作为包被抗原筛选阳性孔，OTA 作为标准品其抑制。其他步骤同 2.3.5 章节。

4.3.6 单克隆抗体的性质鉴定

单克隆抗体的生产与纯化，同 2.3.6 章节。

4.3.6.1 单克隆抗体亚型的鉴定

同 2.3.6.1 章节。

4.3.6.2 单克隆抗体交叉反应的测定

同 2.3.6.2 章节。

4.3.6.3 单克隆抗体亲和力的测定

同 2.3.6.3 章节。

4.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化

利用棋盘法确定包被抗原和一抗的最佳使用浓度后，参照 2.3.7 章节，对不同 pH、不同甲醇浓度和不同离子强度的标准品稀释液，以及一抗、二抗和显色反应时间对间接竞争 ELISA 的影响进行评价。

4.3.8 实际样品添加回收试验

阴性小麦面粉样品，分别按照 1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平进行 OTA 添加回收试验。每份样品各称取 5.0 g，加入 25 mL 含有 4% NaCl 的 40% 的甲醇:水(V/V)，漩涡震荡均匀后，超声提取 30min。提取液经 5000 rpm 离心后，上清用 PBST 稀释 5 倍后用于间接 ELISA 检测。每次实验重复三次，连续三天测定。

4.4 结果与分析

4.4.1 OTA 免疫抗原的鉴定

将 OTA、KLH 及其 OTA-KLH 用 PBS 稀释合适的倍数后，在 200~600nm 范围进行扫描。得到的紫外可见光吸收图谱如图 4-2 所示。从图中可以看出 KLH 在 350nm 处的微弱吸收峰，偶联 OTA 小分子后，OTA-KLH 在 380nm 处，有一个较高的紫外吸收，而其吸收峰是 OTA 分子的一个吸收峰；而 OTA 原来在 340nm 左右的吸收峰，可能由于与 KLH 350nm 处的峰叠加，并和 OTA 380 nm 的峰合并发生偏移。因此说明抗原偶联是成功的。

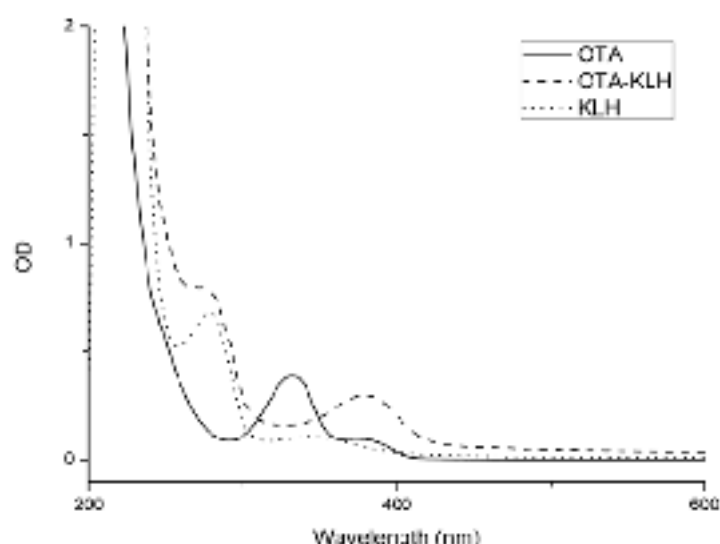


图 4-2 OTA-KLH 的紫外扫描图

Fig. 4-2 Ultraviolet spectrum of immunogen OTA-KLH

4.4.2 OTA 包被抗原的鉴定

将 OTA、OVA 及其 OTA-OVA 用 PBS 稀释合适的倍数后，在 200~600nm 范围进行扫描。得到的紫外可见光吸收图谱如图 4-3 所示：

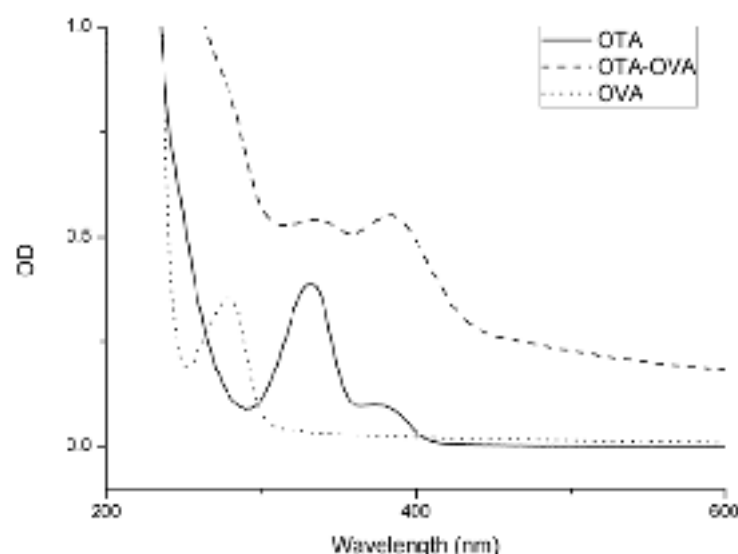


图 4-3 OTA-OVA 的紫外扫描图

Fig. 4-3 Ultraviolet spectrum of immunogen OTA-OVA

从图中可以看出，OTA-OVA 同样具有 OTA 在 340 和 380nm 处的吸收峰，并且原来比较微弱的 380nm 处的吸收峰，在偶联 OVA 分子后，有了较大的提高。这个现象与 OTA-KLH 有些相似。而 340nm 处吸收峰的不同可能是因为采用了不同的偶联剂造成的。

4.4.3 小鼠的免疫与检测

小鼠 4 免后采血后，用一步法快速测定其效价和抑制的结果见表 4-1，从表中可以看出，除#4 小鼠效价较低，没有明显的抑制外，#1、#2 和#3 号小鼠免疫效果较好。在包被抗原为 9000 和 27000 倍稀释、全血 1000 和 3000 倍稀释的时候，加 PBS 和 1 ng/mL OTA 的孔的 OD 值相差一倍以上，说明#1、#2 和#3 三只小鼠的多克隆抗体对 OTA 抑制已经在 1 ng/mL 一下，都可以用来进行细胞融合。

4.4.4 单克隆抗体的性质

小鼠#3 经过细胞融合和三次亚克隆后，成功筛选到一株抗 OTA 单克隆抗体细胞株，编号#6。

4.4.4.1 抗体亚型的鉴定

通过单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对单抗的免疫球蛋白类别、亚型及其轻链类型进行鉴定，结果见图 4-4。从图中可以看出，OTA 单克隆抗体#6 的 IgG 亚型为 IgG 1 型，其轻链为 κ 类型。两条试纸条的 control 线明显，说明测试有效。

表 4-1 四免后小鼠血清的检测结果

Table 4-1 The test result of surum of mice after 4th immunization

		包被稀释倍数							
全血稀释倍数	1000 3000 9000 27000				1000 3000 9000 27000				
	#1 小鼠				#2 小鼠				
1000	2.558	2.260	1.639	0.709	2.362	2.406	1.842	0.869	
3000	1.577	1.236	0.876	0.291	1.646	1.579	1.067	0.403	
9000	0.719	0.518	0.325	0.132	0.791	0.64	0.386	0.174	
27000	0.219	0.223	0.145	0.094	0.318	0.262	0.177	0.105	
上边四行为 PBS, 下边四行为 OTA 1 ng/mL									
1000	2.507	2.121	1.337	0.451	2.371	1.949	1.187	0.418	
3000	1.499	1.105	0.553	0.186	1.382	0.957	0.495	0.180	
9000	0.659	0.418	0.207	0.090	0.566	0.368	0.186	0.089	
27000	0.284	0.191	0.115	0.074	0.248	0.171	0.110	0.082	
		包被稀释倍数							
全血稀释倍数	1000 3000 9000 27000				1000 3000 9000 27000				
	#3 小鼠				#4 小鼠				
1000	2.834	2.662	2.572	1.622	1.074	0.817	0.509	0.210	
3000	2.657	2.422	1.854	0.921	0.426	0.348	0.226	0.098	
9000	1.673	1.366	0.947	0.396	0.162	0.145	0.100	0.067	
27000	0.741	0.586	0.361	0.15	0.083	0.075	0.065	0.050	
上边四行为 PBS, 下边四行为 OTA 1 ng/mL									
1000	2.785	2.557	2.041	0.811	0.858	0.655	0.350	0.133	
3000	2.369	1.853	1.054	0.361	0.349	0.265	0.152	0.082	
9000	1.355	0.913	0.416	0.150	0.144	0.117	0.080	0.059	
27000	0.630	0.386	0.199	0.091	0.093	0.080	0.073	0.064	



图 4-4 单克隆抗体 IgG 的亚型鉴定

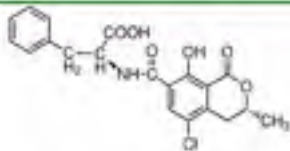
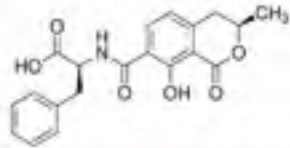
Fig.4-4 The IgG subclass of monoclonal antibody

4.4.4.2 抗体交叉反应的测定

通过间接竞争 ELISA 测得的 OTA 单克隆抗体#6 的 IC_{50} 及与其类似物 OTB 的交叉反应率见表 4-2。从表中可以看出, 单克隆抗体#6 对 OTA 有很好的特异性, 对其类似物 OTB 的交叉仅为 0.94%。同时#6 单抗在 1000 ng/mL 的浓度下, 均为看出对其他真菌毒素有明显的交叉, 因此可以用来建立 OTA 的免疫学分析方法。

表 4-2 OTA 单克隆抗体#6 的交叉反应率的测定

Tab.4-2 The determination of the cross-reactivity of mAb #6 against OTA

名称	结构式	分子式	CAS 号	IC_{50} (ng/mL)	CR(%)
赭曲霉毒素 A Ochratoxin A		$C_{20}H_{18}ClNO_6$	303-47-9	0.075	100.00
赭曲霉毒素 B Ochratoxin B		$C_{20}H_{19}NO_6$	4825-86-9	7.92	0.94

4.4.4.3 抗体亲和力的测定

按照 2.3.6.3 中的公式计算得出, #6 单抗的亲和力为 $1.09 \times 10^9 L/mol$ 。

4.4.5 OTA 间接竞争 ELISA 的优化

利用棋盘法确定最佳的包被抗原和单克隆抗体使用浓度的结果见表 4-3:

表 4-3 OTA 单抗#6 的工作点

Table 4-3 The workpoint of OTA mAb #6

	包被抗原稀释倍数						
	1000	2000	4000	8000	16000	32000	
1000	2.898	2.655	2.698	2.107	1.542	0.939	
2000	2.767	2.352	2.399	1.890	1.205	0.693	
4000	2.676	2.364	2.116	1.595	0.941	0.564	
8000	2.509	2.263	1.851	1.187	0.669	0.373	
16000	1.985	1.734	1.318	0.757	0.450	0.230	
32000	1.350	1.196	0.843	0.523	0.289	0.164	
64000	0.725	0.632	0.417	0.316	0.151	0.111	
128000	0.411	0.376	0.299	0.190	0.102	0.087	
OTA (ng/mL)	1000	2000	4000	8000	16000	32000	
0	1.178	0.945	1.067	0.965	1.042	1.178	
0.01	0.964	0.818	1.002	0.989	1.045	0.964	
0.02	0.961	0.737	0.943	0.945	1.007	0.961	
0.05	0.670	0.498	0.737	0.867	1.022	0.670	
0.1	0.385	0.284	0.547	0.754	1.064	0.385	
0.2	0.262	0.156	0.211	0.527	1.031	0.262	
0.5	0.134	0.084	0.093	0.134	0.709	0.134	
1	0.120	0.082	0.085	0.100	0.397	0.120	
IC_{50}	0.054	0.048	0.089	0.201	0.499	0.054	
R^2	0.985	0.997	0.990	0.991	0.991	0.985	

从表中可以看出, OTA 单抗#6 的最佳包被浓度为 2000 倍稀释, 在此包被你浓度下抗体的稀释倍数为 32000, 此时的 IC_{50} 为 0.048 ng/mL。

4.4.5.1 标准品稀释液 pH 的优化

选择了 4 中不同 pH 标准品稀释液 (pH 5.8、6.4、7.3、8.0), 考察其对单克隆抗体 #6 的影响, 结果分别见表 4-4:

表 4-4 不同 pH 对 OTA 单抗#6 的影响

Table 4-4 Effects of different pH on OTA mAb #6

pH	Amax	IC_{50} (ng/mL)	Amax/ IC_{50}
5.8	1.744 ±0.059	0.200±0.017	8.7
6.4	1.754 ±0.048	0.161±0.013	10.9
7.4	1.486 ±0.068	0.105±0.015	14.1
8.0	1.774 ±0.051	0.146±0.012	12.1

从表中可以看出, 不同 pH 的标准品稀释液对 OTA 单抗#6 的 Amax 和 IC_{50} 均有一定的影响。在 pH7.4 时, 虽然 Amax 最低, 但同时 IC_{50} 也是最低的, 其比值 Amax/ IC_{50} 最高。因此选择 pH7.4 的 PBS 作为标准品稀释液。

4.4.5.2 标准品稀释液甲醇含量的优化

不同甲醇含量的标准品稀释液对 OTA 单抗#6 的影响见表 4-6:

表 4-5 不同甲醇浓度对 OTA 单抗#6 的影响

Table 4-5 Effects of different methanol concentration on OTA mAb #6

甲醇浓度 (v/v)	Amax	IC_{50} (ng/mL)	Amax/ IC_{50}
0%	1.197 ±0.031	0.123 ±0.009	9.7
10%	1.295 ±0.026	0.251 ±0.012	5.2
20%	1.296 ±0.019	0.392 ±0.009	3.3
30%	1.228 ±0.023	1.421 ±0.021	0.9
40%	1.166 ±0.032	2.500 ±0.023	0.5
50%	1.128 ±0.040	4.094 ±0.017	0.3

从表中可以看出, 不同浓度的甲醇, 对 OTA 单抗#6 的 Amax 基本没有影响; 但其 IC_{50} 随着甲醇浓度的增加而增加, 尤其是在甲醇浓度超过 20% 的时候, 更明显。 IC_{50} 在甲醇含量为 0 时最低, 因此选择不含甲醇的 PBS 作为标准品稀释液。同时考虑到甲醇含量对抗体的影响, 实际样品检测的时候, 甲醇含量不应该超过 10%。

4.4.5.3 标准品稀释液离子强度的优化

不同离子强度标准品稀释液对 OTA 单抗#6 的影响见表 4-6:

表 4-6 离子强度对 OTA 单抗#6 的影响

Table 4-6 Effects of the ionic strength on OTA mAb #6

离子强度	Amax	IC_{50} (ng/mL)	Amax/ IC_{50}
0	1.066 ±0.025	0.120 ±0.010	8.9
2 mM	1.315 ±0.036	0.146 ±0.019	9.0
5 mM	1.286 ±0.040	0.148 ±0.017	8.9
10 mM	1.248 ±0.041	0.140 ±0.012	8.9
20 mM	0.914 ±0.024	0.097 ±0.020	9.4
50 mM	0.673 ±0.025	0.102 ±0.022	6.6

从表中可以看出,随着标准品稀释液中离子强度的增强,对 OTA 单抗#6 的 A_{max} 和 IC_{50} 先升高后在逐渐降低。在 20 mM 和 50 mM 时,虽然 IC_{50} 较低,但其 A_{max} 对应的值较低;而在 0 mM (纯水) 时, A_{max} 在合适范围内, IC_{50} 也较低,但考虑到纯水的 pH 容易受到干扰,容易发生较大的变化,因此选择常用的 10 mM 的 PBS 作为标准品稀释液。

4.4.5.4 一抗反应时间的优化

不同一抗反应时间对 OTA 单抗#6 的影响分别见表 4-7:

表 4-7 一抗反应时间对 OTA 单抗#6 的影响

Table 4-7 Effects of the incubate time of primary antibody on OTA mAb #6

反应时间	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
60 min	1.928 ± 0.075	0.155 ± 0.033	12.4
45 min	1.706 ± 0.042	0.152 ± 0.016	11.2
30 min	1.413 ± 0.028	0.150 ± 0.013	9.4
15 min	1.039 ± 0.021	0.129 ± 0.010	8.1

从表中可以看出,随着一抗反应时间的延长,最大吸光值 A_{max} 升高明显,而 IC_{50} 也有升高。15min 时, IC_{50} 最低,同时 A_{max} 也在合适范围,综合考虑,选择一抗时间为 15 min。

4.4.5.5 二抗反应时间的优化

不同二抗反应时间对 OTA 单抗#6 的影响分别见表 4-8:

表 4-8 二抗反应时间对 OTA 单抗#6 的影响的影响

Table 4-8 Effects of the incubate time of secondary antibody on OTA mAb #6

反应时间	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
60 min	1.870 ± 0.057	0.174 ± 0.026	10.7
45 min	1.679 ± 0.041	0.160 ± 0.015	10.5
30 min	1.375 ± 0.031	0.148 ± 0.013	9.3
15 min	0.945 ± 0.019	0.128 ± 0.011	7.4

从表中可以看出,随着二抗反应时间的延长,最大吸光值 A_{max} 升高明显, IC_{50} 也有轻微的上升趋势。在 30 min 时, A_{max} 值较为合适,同时 IC_{50} 相对较低,因此,选择二抗反应的时间为 30 min。

4.4.5.6 显色反应时间的优化

不同显色反应时间对 OTA 单抗#6 的影响分别见表 4-9:

表 4-9 显色反应时间对 OTA 单抗#6 的影响

Table4-9 Effects of the colouring incubate time of second antibody on OTA mAb #6

显色时间	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
10 min	1.052 ± 0.024	0.136 ± 0.012	7.7
15 min	1.395 ± 0.017	0.135 ± 0.006	10.3
20 min	1.712 ± 0.034	0.138 ± 0.012	12.4
25 min	1.950 ± 0.030	0.126 ± 0.004	15.5

从表中可以看出,随着显色时间的延长, A_{max} 的增加非常明显, IC_{50} 变化不大。因此主要参考 A_{max} 。在 15min 时, A_{max} 的显色值较为合适,因此选择 15 min 作为显色时间。

4.4.5.7 间接竞争 ELISA 的标准抑制曲线

按照以上优化后的参数,建立了 OTA 单克隆抗体#6 的标准抑制曲线,如图 4-5 所示:

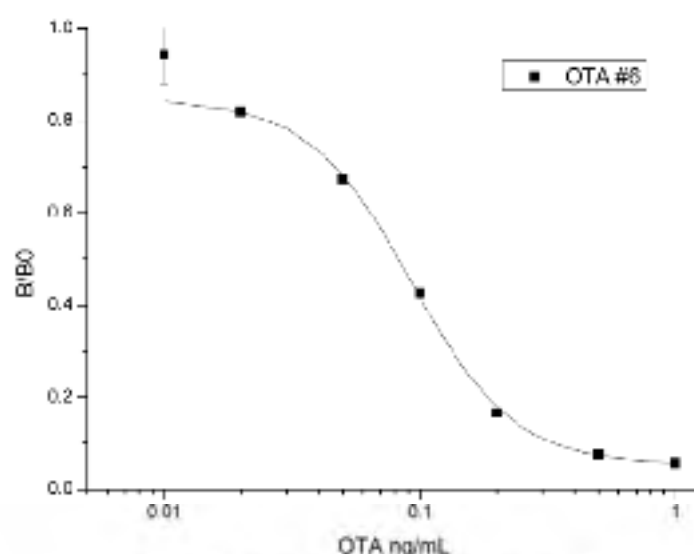


图 4-5 OTA 单克隆抗体#6 抑制标准曲线

Fig.4-5 The standard inhibitive curve of OTA mAb #6

将实验数据在 origin 软件中使用 4 参数方程进行拟合。根据曲线的拟合结果,OTA 单克隆抗体#6 的 IC_{50} 为 0.092 ± 0.006 ng/mL,检测区间为 (IC_{15-85}) $0.026 \sim 0.263$ ng/mL; 相关系数 R^2 分别为 0.9998。

4.4.6 实际样品添加试验

阴性小麦面粉样品,分别按照 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg}$, $2.00 \mu\text{g}/\text{kg}$, $5.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平进行 OTA 添加回收试验的结果见表 4-10。从表中可以看出,建立的 OTA 的 ELISA 检测方法,其平均回收率在 $88.5\% \sim 118.8\%$ 之间,批内差异小于 11%,批间差异小于 14%,说明方法具有可靠的稳定性,可进一步用于 OTA 的快速检测应用。

表 4-10 ELISA 方法测定样品中 OTA 的添加回收率

Table 4-10 Recovery analysis of OTA from spiked samples by ELISA

单克隆抗体	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收 率 (%)	变异系数(%)	
			批内(n=3)	批间(n=3)
OTA#3	1.25	88.5 ± 9.2	10.1	13.7
	2.50	98.9 ± 6.9	8.1	10.7
	5.00	118.8 ± 2.5	5.4	7.8

4.5 本章小结

1. 通过活性酯法和 CDI 法成功制备了两种 OTA 完全抗原并对进行了鉴定；

2. 将 OTA-KLH 作为免疫原免疫小鼠，通过使用快免佐剂，在四免后得到了较好的免疫效果。通过细胞融合，最终筛选得到 OTA 单克隆抗体细胞株#6；

3. 对 OTA 单克隆抗体#6 进行了鉴定。其 IC_{50} 为 0.092 ± 0.006 ng/mL，检测区间为 $0.026 \sim 0.263$ ng/mL；单抗 IgG 亚型为 IgG 1 型，轻链类型为 κ 类型；单抗的亲合力为 1.09×10^8 L/mol；对 OTB 的交叉分别 0.94%。

4. 评价了不同 pH、甲醇浓度、离子强度、一抗二抗反应时间及显色时间对 OTA 单克隆抗体#6，确立了最佳工作条件为：pH 为 7.4，甲醇浓度 0，离子强度为 10 mM，一抗二抗反应时间为 15min 和 30 min，显色时间 15min。

5. 利用 OTA 单抗#6 建立的 ELISA 方法分别对阴性面粉样品进行了添加回收实验。其 ELISA 方法回收率在 88.5%--118.8% 之间，批内批间差异均小于 14%。

第五章 玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及其ELISA检测方法的建立

5.1 引言

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 主要由禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*)、黄色镰刀菌 (*F. culmorum*)、木贼镰刀菌 (*F. equiseti*) 半裸镰刀菌 (*F. semitectum*) 等镰刀菌通过聚酮途径合成的次级代谢产物^[33], 属于雷索酸内酯类物质, 其结构类似物有五种: 玉米赤霉醇 (α -Zearalanol), β -玉米赤霉醇 (β -Zearalanol), α -玉米赤霉烯醇 (α -Zearalenol), β -玉米赤霉烯醇 (β -Zearalenol), 玉米赤霉酮 (Zearalanone)。ZEN 及其类似物的毒性主要表现在其类雌激素活性和影响合成代谢上, 并具有细胞和遗传毒性。因此世界各国制定了严格的限量标准来控制食品中 ZEN 的含量。ZEN 的仪器检测方法耗时、成本高、对人员和设备要求高, 相比而言, 免疫学快速检测技术具有高灵敏、高通量、快速和低成本等优点, 在 ZEN 快速和现场检测中可以发挥更大的作用。

本章研究在前人研究基础上, 采用新型快免佐剂, 开发出了可用于高灵敏、高亲和力的 ZEN 筛选型单克隆抗体, 并在此基础上建立 ELISA 快速检测方法, 为 ZEN 的快速检测提供了技术支持。

5.2 材料与仪器

5.2.1 药品与试剂

玉米赤霉烯酮、玉米赤霉酮、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇和 β -玉米赤霉醇及其标准溶液购于 Sigma 公司。阴性小麦面粉样品由江苏省进出口检验检疫局提供。其他同 2.2.1 章节。

5.2.2 主要仪器与设备

同 2.2.2 章节。

5.2.3 主要溶液

玉米赤霉烯酮、玉米赤霉酮、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇和 β -玉米赤霉醇的标准溶液, 用乙醇稀释到 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 ng/mL , -20°C 避光保存。其他同第二章 2.2.3。

5.2.4 实验动物和细胞

同 2.2.4 章节

5.3 实验方法

5.3.1 玉米赤霉烯酮半抗原的设计与合成

玉米赤霉烯酮的分子上没有可以直接用于偶联的基团，因此需要进行衍生反应，一边引入可用的基团，以便偶联到蛋白载体上^[187]。衍生反应见图 5-1。5 mg 的 ZEN 和 10 mg 的 CMO 溶解于 1 mL 无水吡啶中，于 70℃ 反应 3h。反应结束后，用氮气吹干反应溶液后，用少量甲醇溶解，用于薄层分析，展开剂为氯仿:甲醇=9:1 (V/V)。

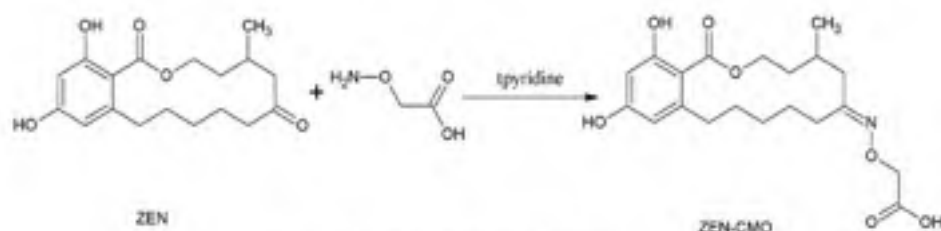


图 5-1 玉米赤霉烯酮的肟化

Fig5-1 Oximation of Zearalenone

5.3.2 玉米赤霉烯酮完全抗原制备

ZEN 分子肟化后，引入了一个羧酸基团，因此可以采用活性酯法将其偶联到蛋白载体上^[188-190]。1 mg 的 ZEN-CMO，2.4 mg 的 EDC 和 1.1 mg 的 NHS 溶解于 0.5 mL DMF 中，磁力搅拌溶解，并在室温下活化 2 h。5 mg 载体蛋白 (KLH 或 BSA) 溶解在 2 mL 0.05 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液中，冰浴下磁力搅拌溶解。将活化好的 ZEN-CMO 溶液，逐滴加入到蛋白溶液中，冰浴下反应过夜后，装入透析袋，用 0.01 M 的 PBS 透析三天后，分装保存于 -20℃。

5.3.3 小鼠免疫

将 ZEN-KLH 作为免疫原免疫小鼠，具体步骤同 2.3.3 章节。

5.3.4 小鼠血清检测

小鼠免疫的检测采用一步法快速检测，所用标准品溶液换为 ZEN，具体方法同 3.3.4 章节。

5.3.5 单克隆抗体的制备

细胞筛选时用 ZEN 进行抑制筛选，其他步骤同 2.3.5 章节。

5.3.6 单克隆抗体的性质鉴定

5.3.6.1 抗体亚型的鉴定

同 2.3.6.1 章节。

5.3.6.2 抗体交叉反应的测定

同 2.3.6.2 章节。

5.3.6.3 抗体亲和力的测定

同 2.3.6.3 章节。

5.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化

参照 2.3.7 章节，利用棋盘法确定包被抗原和一抗的最佳使用浓度后，对不同 pH、不同甲醇浓度和不同离子强度的标准品稀释液，以及一抗、二抗和显色反应时间对间接竞争 ELISA 的影响进行评价。

5.3.8 实际样品添加回收试验

阴性小麦面粉样品，分别按照 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ， 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ， 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平进行 ZEN 添加回收试验。每份样品各称取 5.0 g，加入 25 mL 含有的 50% 的甲醇:水(V/V)，漩涡震荡均匀后，超声提取 30min。提取液经 5000 rpm 离心后，上清用 PBST 稀释 5 倍后用于间接 ELISA 检测。每次实验重复三次，连续三天测定。

5.4 结果与分析

5.4.1 ZEN 半抗原的合成鉴定

ZEN 半抗原衍生的脎化反应结果如图 5-2。由于在 ZEN 的羰基位置引入了羧基，导致整个分子的急性变大，因此其 Rf 值变小。从图中可以看出，经过 3 个小时的脎化反应，ZEN 分子大部分已经转化为 ZEN-CMO。通过薄层分离出需要的 ZEN-CMO，可以用于下一步偶联反应。



图 5-2 ZEN 和 ZEN-CMO 的薄层分析结果(左:ZEN, 右:ZEN-CMO)

Fig.5-2 The TLC result of ZEN and ZEN-CMO (left :ZEN, right: ZEN-CMO)

5.4.2 ZEN 完全抗原的合成鉴定

将 ZEN、KLH 和 BSA 及其对应的完全抗原用 PBS 稀释合适的倍数后，在 200~600nm 范围进行扫描。得到的紫外可见光吸收图谱如图 5-3 和图 5-4 所示：

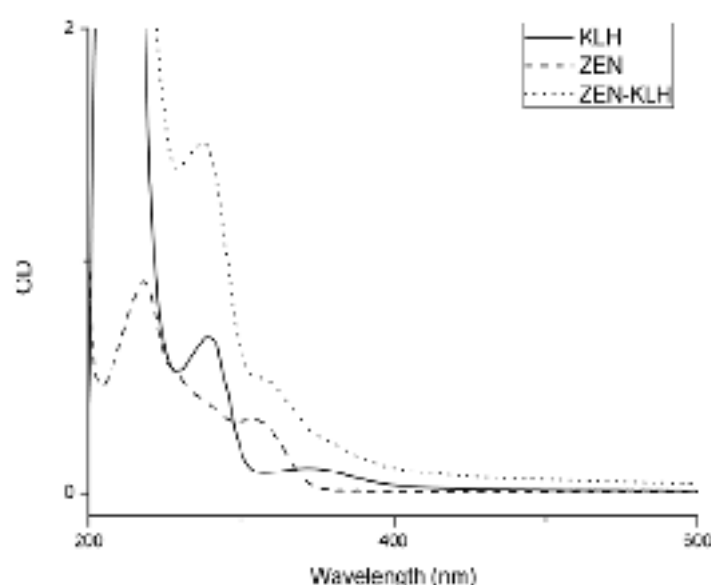


图 5-3 ZEN-KLH 的紫外扫描图

Fig. 5-3 Ultraviolet spectrum of immunogen ZEN-KLH

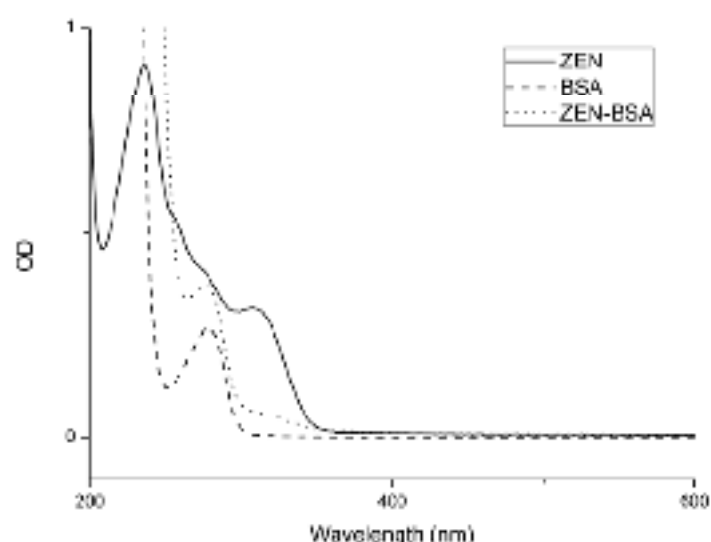


图 5-4 ZEN-BSA 的紫外扫描图

Fig. 5-4 Ultraviolet spectrum of immunogen ZEN-BSA

从图中可以看出,ZEN 分子在 240 nm 和 310 nm 处有两个吸收峰,蛋白 BSA 和 KLH 的吸收峰都在 278 nm 处。偶联后的 ZEN-BSA 和 ZEN-KLH 很明显具有 ZEN 和蛋白两者的吸收峰的叠加。因此认为完全抗原的合成是成功的。

5.4.3 小鼠的免疫与检测

4 只小鼠通过**快免佐剂**进行免疫。在小鼠 4 免后通过鼠尾采血后,用一步法快速测定其效价和抑制的结果见表 5-1。从表中可以看出,#2 号小鼠免疫效果较好。在包被抗原为 3000 和 9000 倍稀释、全血 1000 稀释的时候,加 PBS 的阴性孔的 OD 值和加入 1 ng/mL ZEN 的孔的 OD 值相差一倍以上,说明#2 小鼠的多克隆抗体对 ZEN 抑制已经在 1 ng/mL 一下,可以用来进行细胞融合。

表 5-1 四免后小鼠血清的检测结果

Table 5-1 The test result of surum of mice after 4th immunization

全血稀释倍数	包被稀释倍数							
	1000	3000	9000	27000	1000	3000	9000	27000
	#1 小鼠				#2 小鼠			
1000	2.277	2.101	1.107	0.421	1.724	1.393	0.809	0.317
3000	1.458	1.161	0.519	0.24	0.807	0.599	0.363	0.204
9000	0.642	0.498	0.252	0.131	0.311	0.237	0.167	0.112
27000	0.287	0.244	0.143	0.092	0.171	0.133	0.125	0.133
	上边四行为 PBS, 下边四行为 ZEN 1 ng/mL							
1000	2.145	1.701	0.725	0.258	0.932	0.474	0.196	0.092
3000	1.375	0.93	0.342	0.153	0.386	0.202	0.103	0.087
9000	0.57	0.367	0.18	0.086	0.165	0.093	0.07	0.068
27000	0.267	0.186	0.135	0.082	0.108	0.083	0.075	0.09
	包被稀释倍数							
全血稀释倍数	1000	3000	9000	27000	1000	3000	9000	27000
	#3 小鼠				#4 小鼠			
1000	1.308	0.913	0.495	0.199	2.229	2.059	1.448	0.523
3000	0.711	0.401	0.242	0.14	1.404	1.226	0.777	0.299
9000	0.27	0.182	0.121	0.081	0.615	0.5	0.321	0.144
27000	0.136	0.098	0.084	0.069	0.243	0.214	0.154	0.104
	上边四行为 PBS, 下边四行为 ZEN 1 ng/mL							
1000	1.064	0.68	0.247	0.108	2.097	1.914	1.383	0.556
3000	0.497	0.288	0.128	0.081	1.343	1.081	0.649	0.29
9000	0.212	0.124	0.075	0.06	0.584	0.406	0.251	0.127
27000	0.127	0.091	0.072	0.067	0.264	0.203	0.134	0.093

5.4.4 单克隆抗体的性质鉴定

经过细胞融合后, 筛选到一株单克隆抗体细胞株, 编号#3。

5.4.4.1 抗体亚型的鉴定

通过单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对单抗的免疫球蛋白类别、亚型及其轻链类型进行鉴定, 结果见图 5-5:

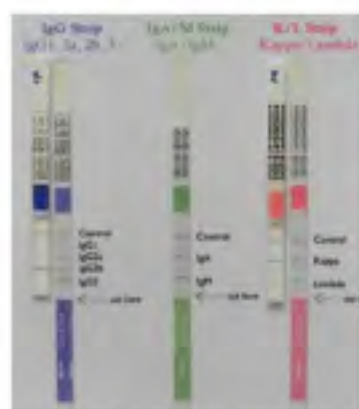


图 5-5 ZEN 单克隆抗体#3 IgG 的亚型鉴定

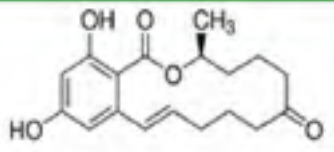
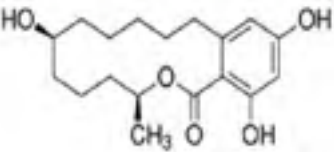
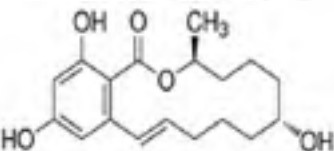
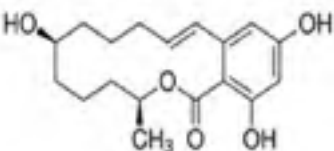
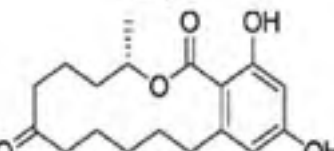
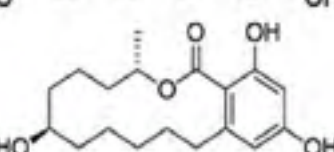
Fig.5-5 The IgG subclass of monoclonal antibody ZEN#3

从图中可以看出, ZEN 单克隆抗体#3 的 IgG 亚型为 IgG 2b 型, 其轻链为 κ 类型。两条试纸条的 control 线明显, 说明测试有效。

5.4.4.2 抗体交叉反应的测定

通过间接竞争 ELISA 测得的 ZEN 单克隆抗体#3 的 IC_{50} 及与其类似物的交叉反应率见表 5-2:

表 5-2 ZEN 单克隆抗体#6 的交叉反应率的测定
Tab.5-2 The determination of the cross-reactivity of mAb #3 against ZEN

名称	结构式	分子式	CAS 号	IC_{50} (ng/mL)	CR(%)
玉米赤霉烯酮 Zearalenone		$C_{18}H_{22}O_5$	17924-92-4	0.045	100.00
β -玉米赤霉醇 β -Zearalanol		$C_{18}H_{26}O_5$	42422-68-4	0.080	56.25
α -玉米赤霉烯醇 α -Zearalenol		$C_{18}H_{26}O_5$	36455-72-8	0.058	77.59
β -玉米赤霉烯醇, β -Zearalenol		$C_{18}H_{24}O_5$	71030-11-0	0.073	61.64
玉米赤霉酮 Zearalanone		$C_{18}H_{26}O_5$	5975-78-0	0.033	136.36
玉米赤霉醇 α -Zearalanol		$C_{18}H_{26}O_5$	26538-44-3	0.040	112.50

从表中可以看出, ZEN 单抗#6 对于 6 种 ZEN 的类似物具有很好的交叉反应, 因此可以用来建立 ZEN 总量快速检测方法。

5.4.4.3 抗体亲和力的测定

按照 2.3.6.3 中的公式计算得出, #6 单抗的亲和力为 2.26×10^9 L/mol。

5.4.5 ZEN 间接竞争 ELISA 的优化

利用棋盘法确定最佳的包被抗原和单克隆抗体使用浓度的结果见表 5-3。从上表中可以看出, ZEN #3 单抗的最佳包被浓度是 8000 倍稀释, 在此浓度下, 一抗的使用浓度为 16000 倍稀释, 在此工作点浓度下, ZEN #3 单抗的 IC_{50} 为 0.075 ng/mL。

表 5-3 ZEN 单抗#3 的工作点
Table 5-3 The workpoint of ZEN mAb #3

	包被抗原稀释倍数					
	1000	2000	4000	8000	16000	32000
2000	2.761	2.779	2.617	2.382	1.964	1.347
4000	2.715	2.620	2.532	2.262	1.762	1.046
8000	2.363	2.152	2.159	1.883	1.287	0.808
16000	1.924	1.793	1.525	1.224	0.794	0.518
32000	1.110	1.113	0.965	0.799	0.453	0.271
64000	0.638	0.685	0.595	0.519	0.354	0.230
128000	0.305	0.285	0.302	0.278	0.213	0.141
256000	0.184	0.184	0.152	0.153	0.181	0.127
ZEN (ng/mL)	1000	2000	4000	8000	16000	32000
0	1.088	1.128	1.313	1.137	1.163	1.311
0.01	0.978	1.005	1.198	1.027	1.053	1.199
0.02	0.972	0.946	1.187	0.959	1.073	1.230
0.05	0.872	0.754	1.017	0.744	0.892	1.139
0.1	0.592	0.466	0.624	0.435	0.675	1.076
0.2	0.454	0.354	0.376	0.250	0.485	1.085
0.5	0.217	0.166	0.150	0.110	0.110	0.778
1	0.165	0.107	0.099	0.080	0.084	0.321
IC ₅₀	0.135	0.085	0.102	0.075	0.138	0.639
R ²	0.984	0.992	0.992	0.996	0.986	0.966

5.4.5.1 标准品稀释液 pH 的优化

不同的 pH 对 ZEN #3 单抗的影响见表 5-4:

表 5-4 pH 对 ZEN 单抗#3 的影响
Table 5-4 Effects of pH on ZEN mAb #3

pH	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
5.8	1.280 ±0.043	0.097 ±0.004	13.2
7.0	1.270 ±0.029	0.080 ±0.006	15.9
7.4	1.380 ±0.037	0.065 ±0.004	21.2
8.0	1.200 ±0.021	0.066 ±0.003	17.9

从表中可以看出, 不同 pH 下最大吸光值 A_{max} 变化不大, IC₅₀ 随着 pH 的增加, 略有降低, 在 pH7.4 和 8.0 的时候相差不大; 但 pH 7.4 的时候 A_{max} 略高, A_{max}/IC₅₀ 比值最大, 因此选择 pH 7.4 的 PBS 作为标准品稀释液。

5.4.5.2 标准品稀释液甲醇含量的优化

标准品稀释液中不同甲醇含量的影响见表 5-5: 从表中可以看出, 甲醇含量在 30% 以内时, 对最大吸光值 A_{max} 的变化不大, 超过 30% 后, 下降明显; IC₅₀ 随着甲醇浓度

的增加,先升高,再降低。两种参数综合考虑,选择不含甲醇的 PBS 作为标准品稀释液,此时 A_{max}/IC_{50} 值也是最大。

表 5-5 甲醇浓度对 ZEN 单抗#3 的影响

Table 5-5 Effects of methanol concentration on ZEN mAb #3

甲醇浓度 (v/v)	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
0%	1.310 ± 0.045	0.064 ± 0.004	20.3
10%	1.310 ± 0.051	0.111 ± 0.009	11.8
20%	1.320 ± 0.046	0.140 ± 0.015	9.4
30%	1.340 ± 0.019	0.130 ± 0.013	10.4
40%	0.910 ± 0.028	0.082 ± 0.010	11.2
50%	0.920 ± 0.030	0.067 ± 0.005	13.8

5.4.5.3 标准品稀释液离子强度的优化

不同离子强度标准品稀释液对 ZEN 单抗#3 的影响见表 5-6:

表 5-6 离子强度对 ZEN 单抗#3 的影响

Table 5-6 Effects of the ionic strength on ZEN mAb #3

离子强度	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
0	1.305 ± 0.051	0.068 ± 0.008	19.2
2 mM	1.390 ± 0.036	0.066 ± 0.004	21.1
5 mM	1.270 ± 0.041	0.067 ± 0.002	19.0
10 mM	1.250 ± 0.029	0.068 ± 0.005	18.4
20 mM	1.090 ± 0.039	0.064 ± 0.004	17.0
50 mM	0.963 ± 0.0443	0.058 ± 0.003	16.6

从表中可以看出,随着标准品稀释液中离子强度的增强,ZEN 单抗#3 的 A_{max} 逐渐降低, IC_{50} 变化不大。在 A_{max} 和 IC_{50} 相差不大的情况下,选择常用的 10 mM 的 PBS 作为标准品稀释液。

5.4.5.4 一抗反应时间的优化

不同一抗反应时间对 ZEN 单抗#3 的影响分别见表 5-7:

表 5-7 一抗反应时间对 ZEN 单抗#3 的影响

Table 5-7 Effects of the incubate time of primary antibody on ZEN mAb #3

反应时间	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
15 min	1.080 ± 0.060	0.057 ± 0.009	18.7
30 min	1.380 ± 0.059	0.065 ± 0.006	21.3
45 min	2.010 ± 0.035	0.069 ± 0.005	28.9
60 min	2.140 ± 0.043	0.072 ± 0.004	29.6

从表中可以看出,随着一抗反应时间的延长,最大吸光值 A_{max} 升高明显,而 IC_{50} 略有升高,在保证 IC_{50} 较低和 A_{max} 较高的要求下,综合考虑,选择一抗时间为 30 min。

5.4.5.5 二抗反应时间的优化

不同二抗反应时间对 ZEN 单抗#3 的影响分别见表 5-8。从表中可以看出,随着二抗反应时间的延长,最大吸光值 A_{max} 升高明显,同时 IC_{50} 也有轻微的上升趋势。在 30 min 时, A_{max} 值较为合适,同时 IC_{50} 最低, A_{max}/IC_{50} 比值也最大,因此,选择二抗反应的时间为 30 min。

表 5-8 二抗反应时间对 ZEN 单抗#3 的影响

Table 5-8 Effects of the incubate time ZEN mAb #3

反应时间	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
15 min	1.000 ±0.016	0.092 ±0.005	10.9
30 min	1.320 ±0.043	0.088 ±0.009	15.0
45 min	2.220 ±0.058	0.149 ±0.016	14.9
60 min	2.250 ±0.052	0.167 ±0.012	13.5

5.4.5.6 显色反应时间的优化

不同显色反应时间对 ZEN 单抗#3 的影响分别见表 5-9:

表 5-9 显色反应时间对 ZEN 单抗#3 的影响

Table 5-9 Effects of the colouring incubate time of secondary antibody on ZEN mAb #3

显色时间	Amax	IC ₅₀ (ng/mL)	Amax/IC ₅₀
10 min	0.960 ±0.014	0.086 ±0.005	11.1
15 min	1.100 ±0.026	0.078 ±0.004	14.2
20 min	1.630 ±0.052	0.086 ±0.011	19.0
25 min	2.320 ±0.047	0.075 ±0.006	30.7

从表中可以看出,随着显色时间按的延长, Amax 的增加非常明显, IC₅₀ 变化不大。因此主要参考 Amax。在 15min 时, Amax 的显色值较为合适,因此选择 15 min 作为显色时间。

5.4.5.7 间接竞争 ELISA 的标准抑制曲线

按照上边优化选择好的各项参数,建立的 ZEN 单抗#3 的标准抑制曲线见图 5-6:

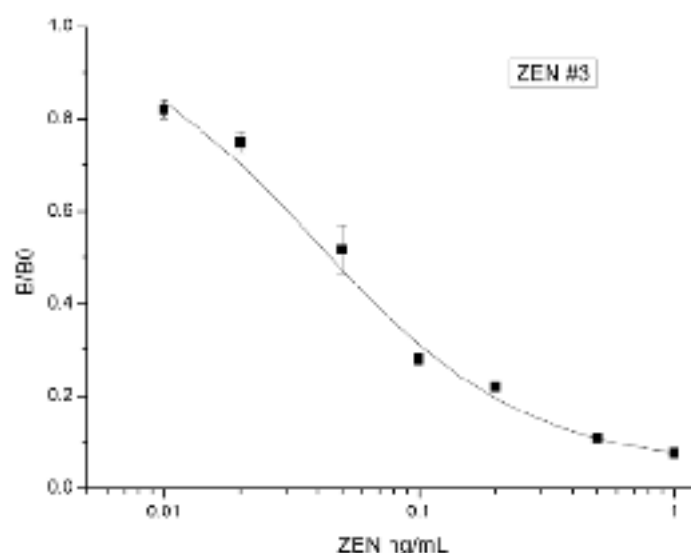


图 5-6 ZEN 单克隆抗体#6 抑制标准曲线

Fig.5-6 The standard inhibitive curve of ZEN mAb #6

将实验数据在 origin 软件中使用 4 参数方程进行拟合。根据曲线的拟合结果, ZEN 单克隆抗体#3 的 IC₅₀ 为 0.054±0.004 ng/mL, 检测区间为 (IC₁₅₋₈₅) 0.010~0.266 ng/mL; 相关系数 R² 分别为 0.999。

5.4.6 实际样品添加实验

ZEN 阴性面粉样本，分别按照 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平进行 ZEN 添加回收试验，结果见表 5-10。从表中可以看出，在 ZEN#3 单抗基础上建立的 ELISA 对添加回收样本的平均回收率在 81.0%~100.4%之间，批内差异小于 10%，批间差异小于 15%，说明建立的方法具有可靠的准确度和精确度，可以进一步用于实际样品中 ZEN 的检测。

表 5-10 ELISA 方法测定样品中 ZEN 的添加回收率
Table 5-10 Recovery analysis of ZEN from spiked samples by ELISA

单克隆抗体	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	变异系数(%)	
			批内(n=3)	批间(n=3)
ZEN#3	0.5	81.0 \pm 5.5	9.9	11.1
	1.0	100.4 \pm 6.4	3.6	8.9
	2.0	95.3 \pm 13.4	9.6	14.6

5.5 本章小结

1. 通过酯化反应，在 ZEN 上衍生引入羧基基团，并通过活性酯法成功将衍生后的 ZEN-CMO 连接到 BSA 和 KLH 两种蛋白载体上，制备了 ZEN 完全抗原，并对其衍生产物和完全抗原进行了鉴定。

2. 将 ZEN-KLH 作为免疫原免疫小鼠，通过使用快免佐剂，在四免后得到了较好的免疫效果。通过细胞融合，最终筛选得到 ZEN 单克隆抗体细胞株#3；

3. 对 ZEN 单克隆抗体#3 进行了鉴定。其 IC_{50} 为 0.054 \pm 0.004 ng/mL，检测区间为 0.010~0.266 ng/mL；单抗 IgG 亚型为 IgG 2b 型，轻链类型为 κ 类型；单抗的亲合力为 2.26 $\times 10^9$ L/mol；对 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉醇的交叉分别为 56.25%、77.59%、61.64%、136.36%和 112.5%。

4. 评价了不同 pH、甲醇浓度、离子强度、一抗二抗反应时间及显色时间对 ZEN 单克隆抗体#3，确立了最佳工作条件为：pH 为 7.4，甲醇浓度 0，离子强度为 10 mM，一抗二抗反应时间均为 30 min，显色时间 15min。

5. 利用 ZEN 单抗#3 建立的 ELISA 方法分别对阴性面粉样品进行了添加回收实验。ELISA 的平均回收率在 81.0%~100.4%之间，批内差异小于 10%，批间差异小于 15%。

第六章 脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备及其ELISA检测方法 方法的建立

6.1 引言

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON) 又名呕吐毒素 (Vomitoxin, VT), 主要是有镰刀菌中的禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*)、黄色镰刀菌 (*F. culmorum*) 产生的一种可以引起动物呕吐反应的 B 族单端孢霉烯族毒素。其主要类似物有 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-acetyldeoxynivalenol, 3-AcDON)、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-acetyldeoxynivalenol, 15-AcDON)、雪腐镰刀菌烯醇 (Nivalenol, NIV) 以及镰刀菌烯酮 X (fusarenon X (FX))。由于 DON 的具有严重的毒性和污染的广泛性, 各个国家和地区都制定了食物中的最大限量。

本章研究在前人研究基础上, 采用新型快免佐剂, 开发出了可用于高灵敏、高亲和力的 DON 单克隆抗体, 为 DON 的快速检测提供了技术支持。

6.2 材料与仪器

6.2.1 药品与试剂

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON)、雪腐镰刀菌烯醇 (Nivalenol, NIV)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-Acetyldeoxynivalenol, 3-AcDON) 和 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-Acetyldeoxynivalenol, 15-AcDON)、三氯化铝、4-二甲氨基吡啶 (4-dimethylamino pyridine, DMAP)、丁二酸酐和丁基硼酸 (Butylboronic acid, BBA) 购于 Sigma 公司; 阴性小麦面粉样品由江苏省进出口检验检疫局提供。其他同 2.2.1 章节。

6.2.2 主要仪器与设备

同 2.2.2 章节。

6.2.3 主要溶液

DON、NIV、3-AcDON 和 15-AcDON 标准溶液用乙腈稀释到 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 ng/mL , -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。其他同第二章 2.2.3。

6.2.4 实验动物和细胞

同 2.2.4 章节

6.3 实验方法

6.3.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 DON 半抗原的设计与合成^[145, 191, 192]

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 DON 的衍生步骤见图 6-1。1 mg DON 溶解于 0.5 mL 吡啶中, 加入 BBA 5 mg, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中避光反应过夜, 封闭。薄层监测反应过程, 展开剂为: 三氯

甲烷:丙酮:异丙醇(8:1:1, V/V/V)。将 3.2 mg DMAP 和 7 mg 丁二酸酐溶解于 0.5 mL 吡啶中, 加入到上述反应溶液中, 于 50℃ 反应 4 h 后, 加入 100 μ L 水以中止反应。氮气吹干反应溶液, 残留物用 5 mL 水溶解后, 用三氯甲烷萃取 4 次, 每次 3 mL。合并三氯甲烷溶液, 氮气吹干后, 加入 1 mL 甲醇溶解, 37℃ 中震荡反应过夜解封闭, 即得到丁二酸酐衍生后的 3-HS-DON。所得产物用薄层和质谱进行鉴定。展开剂为:三氯甲烷:甲醇(9:1,V/V)。

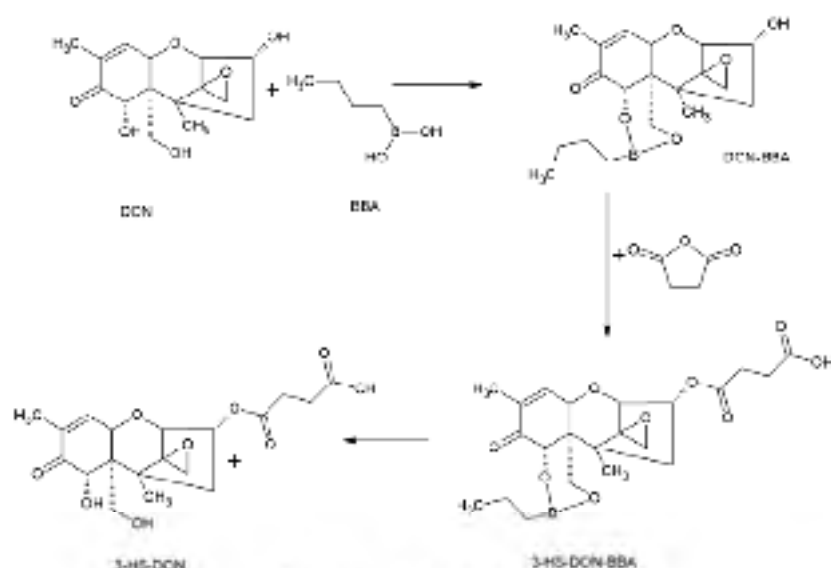


图 6-1 DON 半抗原的合成

Fig6-1 Synthesis steps for hapten of DON

6.3.2 脱氧雪腐镰刀菌烯醇完全抗原的合成

DON 免疫原的合成采用活性酯法。1 mg 的 3-HS-DON, 1.2 mg NHS 和 2.5 mg 的 EDC, 溶解于 DMF 中, 室温活化 4 h。将 5 mg 的 KLH 溶解于 3 mL PBS 中。将活化好的 3-HS-DON, 逐滴加入到 KLH 溶液中, 调节反应 pH 在 8.0 附近, 室温反应过夜。反应结束后, 用 PBS 透析三天, 每 8 h 更换一次透析液。

DON 包被抗原的合成采用 CDI 法^[142, 193]。1mg 的 DON 和 8 mg 的 CDI 溶解于 0.5 mL DMSO 中, 室温反应 30 min。将 5 mg BSA 溶解于 2 mL PBS 中, 搅拌溶解。在 CDI 活化反应溶液中加入 20 μ L 水后, 迅速将 BSA 溶液加入, 调节 pH 在 8.0 附近。室温下反应 4 h 后, 将反应溶液用 PBS 透析三天每 8 h 更换一次透析液。

6.3.3 小鼠免疫

将 DON-3-HS-KLH 作为免疫原免疫小鼠, 具体步骤同 2.3.3 章节。

6.3.4 小鼠血清检测

小鼠免疫的检测采用一步法快速检测, 所用标准品溶液换为 DON, 具体方法同 3.3.4 章节。

6.3.5 单克隆抗体的制备

细胞筛选时用 DON 进行抑制筛选,其他步骤同 2.3.5 章节。

6.3.6 单克隆抗体的性质鉴定

6.3.6.1 抗体亚型的鉴定

同 2.3.6.1 章节。

6.3.6.2 抗体交叉反应的测定

同 2.3.6.2 章节。

6.3.6.3 抗体亲和力的测定

同 2.3.6.3 章节。

6.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化

参照 2.3.7 章节,利用棋盘法确定包被抗原和一抗的最佳使用浓度后,对不同 pH、不同甲醇浓度和不同离子强度的标准品稀释液,以及一抗、二抗和显色反应时间对间接竞争 ELISA 的影响进行评价。

6.3.8 实际样品添加回收试验^[147, 194]

阴性面粉样品分别按照 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平进行 DON 添加回收试验。每份样品各称取 5.0 g, 加入 25 mL 水漩涡震荡均匀后,超声提取 30min。提取液经 5000 rpm 离心后,上清用 PBS 稀释 1 倍后用于间接 ELISA 检测。每次实验重复三次,连续三天测定。

6.4 结果与分析

6.4.1 DON 半抗原的合成鉴定

DON 分子进行衍生的 TLC 的检测结果见图 6-2:

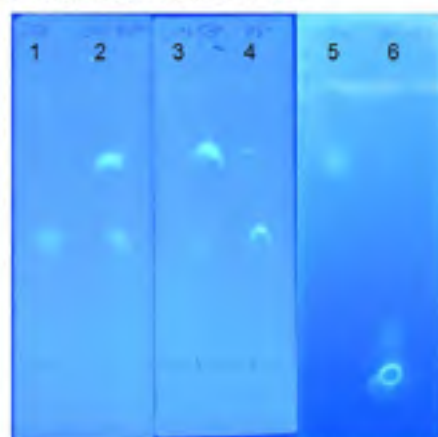


图 6-2 DON 半抗原合成的薄层分析结果

(1, 5: DON; 2, 3: DON-BBA;4:3-HS-DON-BBA;6:3-HS-DON)

Fig.6-2 The TLC result of DON hapten

从图中可以看出 DON 分子上引入 BBA 封闭后, 极性减弱, R_f 值增加 (第 1 点和 2 点)。随着反应时间的延长, DON 大部分转化为 DON-BBA (第 2 和 3 点)。在此基础上再引入丁二酸基团, 3-HS-DON-BBA 的分子极性增加, R_f 值减小 (第 3 和 4 点)。将 3-HS-DON-BBA 解封闭, 得到 3-HS-DON, 分子极性进一步增加, R_f 值减小 (第 5 点和 6 点)。TLC 的结果说明了 3-HS-DON 的合成是成功的。

同时利用质谱对合成的 3-HS-DON 进行了鉴定, 结果见图 6-3。DON 的分子量为 296.3, 引入丁二酸基团后, 脱去一分子水, 其分子量为 396。其质谱图中显示, 3-HS-DON 的液相出峰时间为 5.1 min, 其一级二级质谱显示, 3-HS-DON 的负离子分子量为 395。说明 3-HS-DON 的合成是成功的, 可以用于完全抗原的制备。

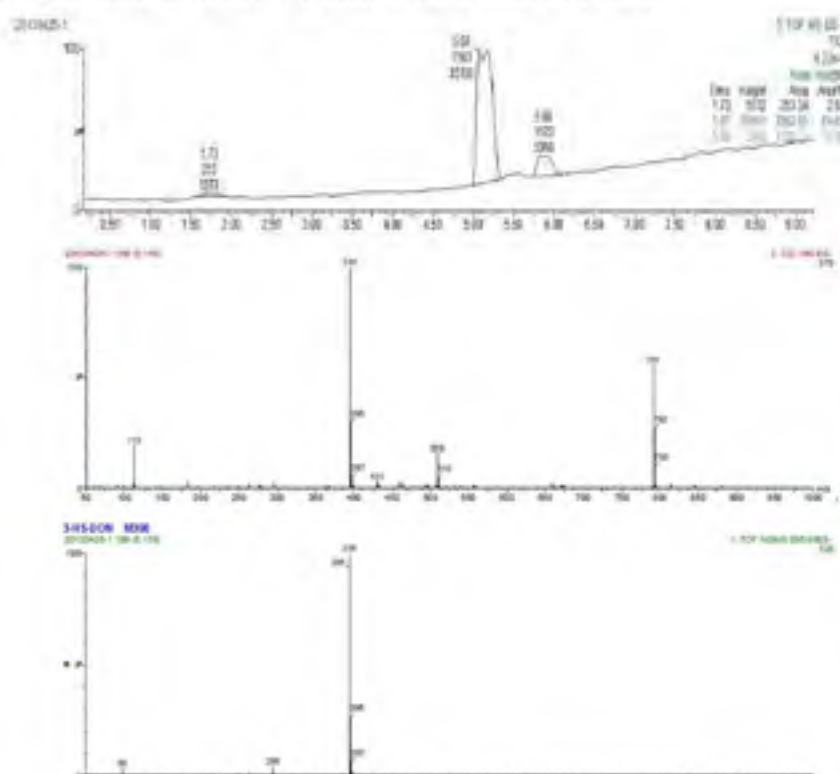


图 6-3 DON 半抗原合成的质谱分析结果

Fig.6-2 The LC-MS/MS result of DON hapten

6.4.2 DON 完全抗原的合成鉴定

由于 DON 在紫外可见光区没有特征吸收, 因此没有较好的办法对合成的 DON 完全抗原进行鉴定。因此我们选择直接免疫小鼠, 利用小鼠多抗进行 ELISA 分析, 观察是否有效价及 DON 分子能对多抗产生抑制来评价完全抗原的合成是否成功。

6.4.3 小鼠的免疫与检测

小鼠 4 免后采血后, 用一步法快速测定其效价和抑制的结果见表 6-1。从表中可以

表 6-1 四免后小鼠血清的检测结果

Table 6-1 The test result of surum of mice after 4th immunization

全血稀释倍数	包被稀释倍数							
	1000	3000	9000	27000	1000	3000	9000	27000
	#1 小鼠				#2 小鼠			
1000	2.451	1.613	0.652	0.252	2.272	1.778	0.880	0.347
3000	1.647	1.252	0.449	0.215	1.931	1.294	0.556	0.235
9000	0.823	0.805	0.273	0.168	1.338	0.699	0.307	0.144
27000	0.362	0.446	0.177	0.152	0.733	0.361	0.187	0.127
	上边四行为 PBS, 下边四行为 DON 100 ng/mL							
1000	2.188	1.423	0.520	0.223	2.166	1.677	0.872	0.352
3000	1.482	1.005	0.247	0.179	1.828	1.203	0.490	0.216
9000	0.578	0.620	0.191	0.124	1.196	0.646	0.263	0.129
27000	0.260	0.293	0.119	0.102	0.590	0.311	0.145	0.098
	包被稀释倍数							
全血稀释倍数	1000	3000	9000	27000	1000	3000	9000	27000
	#3 小鼠				#4 小鼠			
1000	2.905	2.438	2.289	1.560	2.408	1.710	0.755	0.282
3000	2.792	2.299	2.034	1.380	1.792	1.029	0.443	0.194
9000	2.540	2.200	1.799	1.132	0.920	0.471	0.239	0.123
27000	2.148	1.844	1.297	0.765	0.389	0.231	0.151	0.133
	上边四行为 PBS, 下边四行为 DON 100 ng/mL							
1000	2.849	2.293	1.948	1.234	1.689	1.148	0.456	0.185
3000	2.653	2.195	1.684	0.908	1.258	0.579	0.261	0.130
9000	2.372	1.958	1.241	0.498	0.408	0.249	0.134	0.084
27000	1.967	1.512	0.736	0.327	0.231	0.129	0.097	0.078

6.4.4 单克隆抗体的性质鉴定

经过细胞融合后, 筛选到一株单克隆抗体细胞株, 编号 8G2。

6.4.4.1 抗体亚型的鉴定

通过单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对单抗的免疫球蛋白类别、亚型及其轻链类型进行鉴定, 结果见图 6-4:

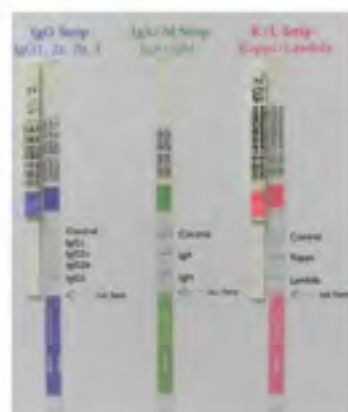


图 6-4 DON 单克隆抗体 8G2 IgG 的亚型鉴定

Fig.6-4 The IgG subclass of DON mAb 8G2

从图中可以看出, DON 单克隆抗体 8G2 的 IgG 亚型为 IgG 1 型, 其轻链为 λ 类型。两条试纸条的 control 线明显, 说明测试有效。

5.4.4.2 抗体交叉反应的测定

通过间接竞争 ELISA 测得的 DON 单克隆抗体 8G2 的 IC_{50} 及与其类似物的交叉反应率见表 6-2:

表 6-2 DON 单抗 8G2 的交叉反应率的测定

Table 6-2 The determination of the cross-reactivity of mAb 8G2 against DON

名称	结构式	分子式	CAS 号	IC_{50} (ng/mL)	CR(%)
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol		$C_{15}H_{20}O$ 6	51481-10-8	34.129	100.00
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 3-Acetyldeoxynivalenol		$C_{17}H_{22}O$ 7	50722-38-8	2.730	1250.38
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 15-Acetyldeoxynivalenol		$C_{17}H_{22}O$ 7	88337-96-6	81.063	42.10
雪腐镰刀菌烯醇 Nivalenol		$C_{15}H_{20}O$ 7	23282-20-4	>1000	<3.41
T-2 toxin		$C_{24}H_{34}O$ 9	21259-20-1	>1000	<3.41
HT-2 toxin		$C_{22}H_{32}O$ 8	26934-87-2	>1000	<3.41

从表中可以看出, DON 单抗 8G2 对 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇的交叉比较高, 为 1250.38%, 对 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇的交叉为 42.10%, 对雪腐镰刀菌烯醇、T-2

毒素和 HT-2 毒素没有交叉。一般对于 DON 的单抗, 按照免疫抗原不同的偶联位点 (3 位和 15 位), 均会对偶联位点处乙酰化的类似物有较高的交叉^[143, 145, 195]。

6.4.4.3 抗体亲和力的测定

按照 2.3.6.3 中的公式计算得出, DON 单抗 8G2 单抗的亲和力为 1.60×10^8 L/mol。

6.4.5 DON 间接竞争 ELISA 的优化

利用棋盘法确定最佳的 DON 包被抗原和单克隆抗体使用浓度的结果见表 6-3。从表中可以看出, DON 单抗 8G2 的最佳包被浓度为 128000 倍稀释, 在此包被浓度下一抗的使用浓度为 2000 倍稀释。在此工作点浓度下的 IC_{50} 为 33.070 ng/mL。

表 6-3 DON 单抗 8G2 的工作点
Table 6-3 The workpoint of DON mAb8G2

	包被抗原稀释倍数					
	4000	8000	16000	32000	64000	128000
1000	2.729	2.672	2.625	2.445	1.971	1.415
2000	2.255	2.272	2.215	2.047	1.586	1.116
4000	1.646	1.717	1.681	1.591	1.219	0.837
8000	1.098	1.127	1.097	1.031	0.809	0.565
16000	0.667	0.691	0.684	0.627	0.499	0.373
32000	0.364	0.393	0.388	0.362	0.297	0.227
64000	0.218	0.219	0.228	0.212	0.177	0.146
128000	0.149	0.153	0.151	0.142	0.119	0.104
DON (ng/mL)	1000	2000	4000	8000	16000	32000
0	1.230	1.290	1.358	1.318	1.604	1.536
2	1.212	1.273	1.321	1.241	1.518	1.452
5	1.237	1.256	1.266	1.214	1.468	1.386
10	1.271	1.211	1.256	1.166	1.373	1.303
20	1.277	1.238	1.219	1.075	1.276	1.213
50	1.277	1.214	1.102	0.936	1.032	0.955
100	1.225	1.155	0.995	0.747	0.806	0.746
200	1.199	1.062	0.862	0.582	0.593	0.563
IC_{50}	N	N	N	78.825	42.146	33.070
R^2	N	N	N	0.997	0.999	0.998

N: 无拟合结果返回。

6.4.5.1 标准品稀释液 pH 的优化

不同的 pH(5.8,7.0,7.4,8.0)标准品稀释液对 DON 单抗 8G2 的影响见表 6-4。从表中可以看出, 在 pH7.4 时, 最大吸光值 A_{max} 最小, 其他 pH 条件下 A_{max} 相差不大; 同

样, IC_{50} 在 pH7.4 时, 明显低于其他 pH 条件, 说明在 pH7.4 条件下, 抗体最灵敏。因此选择 pH7.4 作为抗体稀释液最佳的 pH。

表 6-4 pH 对 DON 单抗 8G2 的影响
Table 6-4 Effects of pH on DON mAb 8G2

pH	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
5.8	1.441 ± 0.012	63.690 ± 5.096	0.023
7.0	1.438 ± 0.009	56.440 ± 4.352	0.025
7.4	1.030 ± 0.016	31.550 ± 2.986	0.033
8.0	1.412 ± 0.009	57.530 ± 3.835	0.025

6.4.5.2 标准品稀释液甲醇含量的优化

不同的标准品稀释液甲醇浓度 (0, 10%, 20%, 30%, 40% 和 50%) 对 DON 单抗 8G2 的影响见表 6-5。从表中可以看出, 在甲醇浓度不超过 30% 时, 对最大吸光值 A_{max} 的影响不大; 但是 IC_{50} 随着甲醇浓度的上升而上升, 说明甲醇浓度影响 EEISA 的灵敏度, 因此应尽量降低甲醇含量, 最好不使用甲醇, 以达到最灵敏的检测效果。

表 6-5 甲醇浓度对 DON 单抗 8G2 的影响
Table 6-5 Effects of methanol concentration on DON mAb 8G2

甲醇浓度(v/v)	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
0%	1.033 ± 0.006	31.705 ± 1.252	0.03
10%	1.084 ± 0.015	49.060 ± 5.854	0.02
20%	1.055 ± 0.027	80.162 ± 4.798	0.01
30%	1.006 ± 0.014	108.151 ± 9.578	0.01
40%	0.914 ± 0.012	250.418 ± 18.642	0.00
50%	0.880 ± 0.009	395.162 ± 23.931	0.00

6.4.5.3 标准品稀释液离子强度的优化

不同的标准品稀释液离子强度 (0, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM 和 50 mM) 对 DON 单抗 8G2 的影响见表 6-6。从表中可以看出, 随着离子强度的增加, 最大吸光值和 IC_{50} 均呈现就爱那个趋势, 免疫分析中, 一般需要高的 A_{max} 和低的 IC_{50} , 因此需要在两者之间做出平衡。考虑到 10 mM 的 PBS 最为常用, 因此选择 10 mMPBS 作为标准品稀释液。

表 6-6 离子强度对 DON 单抗 8G2 的影响
Table 6-6 Effects of the ionic strength on DON mAb 8G2

离子强度	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
0	1.390 ± 0.018	66.800 ± 4.737	0.020
2 mM	1.230 ± 0.017	56.969 ± 3.426	0.022
5 mM	1.181 ± 0.013	43.433 ± 2.742	0.027
10 mM	0.975 ± 0.013	33.078 ± 2.535	0.028
20 mM	0.777 ± 0.008	26.558 ± 2.048	0.029
50 mM	0.506 ± 0.006	24.997 ± 1.739	0.020

6.4.5.4 一抗反应时间的优化

不同的一抗反应时间 (15 min, 30 min, 45 min 和 60 min) 对 DON 单抗 8G2 的影响见表 6-7。从表中可以看出, 随着一抗时间的增加, 最大吸光值最大非常明显; IC_{50}

在 30min 以内随着时间的增加而增加, 30min 后变化不大。15min 虽然有较低的 IC_{50} , 但是 A_{max} 较低, 因此选择 30min 作为一抗反应时间。

表 6-7 一抗反应时间对 DON 单抗 8G2 的影响

Table 6-7 Effects of the incubate time of primary antibody on DON mAb 8G2

反应时间	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
15 min	0.940 ± 0.008	32.965 ± 1.952	0.029
30 min	1.283 ± 0.019	38.331 ± 2.508	0.033
45 min	1.517 ± 0.042	38.842 ± 1.565	0.039
60 min	1.702 ± 0.038	39.609 ± 2.339	0.043

6.4.5.5 二抗反应时间的优化

不同的二抗反应时间 (15 min, 30 min, 45 min 和 60 min) 对 DON 单抗 8G2 的影响见表 6-8:

表 6-8 二抗反应时间对 DON 单抗 8G2 的影响

Table 6-8 Effects of the incubate time of secondary antibody on DON mAb 8G2

反应时间	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
15 min	0.983 ± 0.025	31.951 ± 2.687	0.031
30 min	1.465 ± 0.031	37.640 ± 1.925	0.039
45 min	1.642 ± 0.022	39.185 ± 2.403	0.042
60 min	1.855 ± 0.016	43.433 ± 2.924	0.043

从表中可以看出, 随着二抗反应时间的增加, 最大吸光值 A_{max} 和 IC_{50} 均增大, 15min 虽然 IC_{50} 最低, 但是 A_{max} 太低, 只有 0.983; 在 30min 时虽然 IC_{50} 略高, 但是 A_{max} 合适, 因此综合考虑选择 30min 作为二抗反应时间。

6.4.5.6 显色反应时间的优化

不同的显色反应时间 (10 min, 15 min, 20 min 和 25 min) 对 DON 单抗 8G2 的影响见表 6-9:

表 6-9 显色反应时间对 DON 单抗 8G2 的影响

Table 6-9 Effects of the colouring reaction time on DON mAb 8G2

显色时间	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
10 min	0.937 ± 0.006	30.937 ± 2.229	0.030
15 min	1.206 ± 0.013	32.165 ± 1.786	0.037
20 min	1.372 ± 0.019	38.645 ± 2.143	0.035
25 min	1.473 ± 0.025	40.683 ± 2.402	0.036

从表中可以看出, 随着显色时间的增加, A_{max} 逐渐增大, 但是在 15min 后幅度不大, 而 IC_{50} 同样随着时间的增加而增加, 但是 10min 和 15min 相差不大, 因此选择 15min 作为最佳显色时间。

6.4.5.7 间接竞争 ELISA 的标准抑制曲线

按照以上优化后的参数, 对 DON 单抗 8G2 建立标准曲线, 见图 6-5:

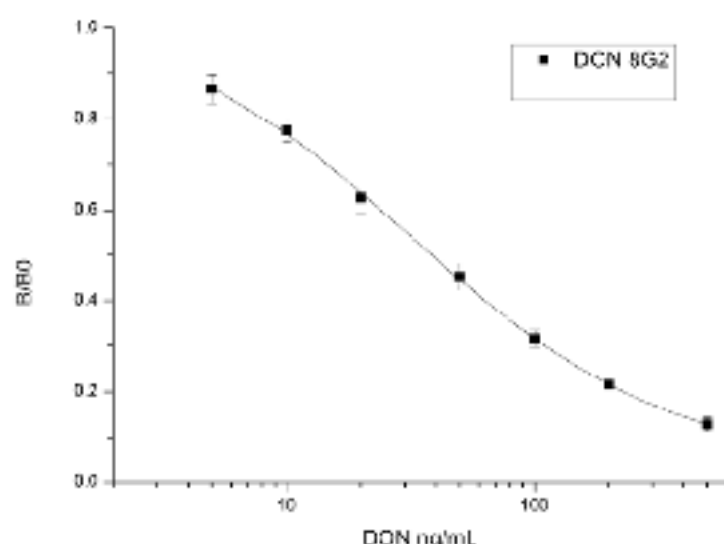


图 6-5 DON 单抗 8G2 抑制标准曲线

Fig.6 5 The standard inhibitive curve of DON mAb 8G2

将实验数据在 origin 软件中使用 4 参数方程进行拟合。根据曲线的拟合结果, DON 单抗 8G2 的 IC_{50} 为 31.60 ± 2.89 ng/mL, 检测区间为 (IC_{15-85}) $5.83 \sim 376.71$ ng/mL; 相关系数 R^2 分别为 0.999。

6.4.6 实际样品添加实验

阴性面粉样品分别按照 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, $500 \mu\text{g}/\text{kg}$, $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平进行 DON 添加回收试验结果见表 6-10。从表中可以看出, 其平均回收率在 $80.8\% \sim 105.2\%$ 之间, 批内偏差和批间偏差分别小于 11% 和 15% 。说明建立的 ELISA 方法, 具有很好的准确度和精确度。

表 6-10 ELISA 方法测定样品中 DON 的添加回收率
Table 6-10 Recovery analysis of DON from spiked samples by ELISA

单克隆抗体	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	变异系数(%)	
			批内(n=3)	批间(n=3)
DON8G2	100	86.1 ± 12.4	10.3	14.5
	500	80.8 ± 7.3	5.6	8.7
	1000	105.2 ± 7.9	6.3	8.4

6.5 讨论

DON 分子上有三个羟基, 分别在 3 位、7 位和 15 位。在进行丁二酸酐衍生的时候, 需要对 7 位和 3 位的羟基进行封闭, 以保证酸酐衍生产物的纯度。本论文选用 BBA 对 7 位和 15 位的羟基封闭(DON-BBA), 并在 3 位引入了丁二酸基团, 得到 3-HS-DON-BBA。将其解封闭后, 得到需要的半抗原 3-HS-DON。对整个反应利用 TLC 进行了监测, 由于 DON 在荧光板上无紫外吸收, 因此采用三氯化铝作为显色剂。同时我们也利用 CDI 方法合成了包被抗原, 此方法合成的包被抗原与用之前的保护和衍生合成的包被抗原没有明显的差异, 但步骤简单, 因此可以降低以后的应用成本。本研究也曾尝试过使用比较简单的 CDI 方法合成免疫抗原, 但没有得到好的结果, 可能是因为此方法选择性较差,

DON 分子上的三个羟基可能都会发生反应，造成免疫抗原过于复杂。同时由于 DON 分子对碱处理相对敏感，在偶联蛋白的时候，选择了接近中性的 PBS 作为缓冲溶液。

6.6 本章小结

1. 通过封闭保护和琥珀酸酐衍生制备了 DON 半抗原并对进行了鉴定，通过活性酯法和 CDI 法制备了两种 DON 完全抗原；

2. 将 DON-KLH 作为免疫原免疫小鼠，通过使用快免佐剂，在四免后得到了较好的免疫效果。通过细胞融合，最终筛选得到 DON 单克隆抗体细胞株 8G2；

3. 对 DON 单克隆抗体 8G2 进行了鉴定。其 IC_{50} 为 31.60 ± 2.89 ng/mL，检测区间为 (IC_{15-85}) 5.83~376.71 ng/mL；IgG 亚型为 IgG1 型，其轻链为 λ 类型；单抗的亲合力为 1.6×10^8 L/mol；对 3-acDON 交叉为 1250.38%，对 15-acDON 的交叉为 42.10%，对 NIV、T-2 毒素和 HT-2 毒素没有交叉。

4. 评价了不同 pH、甲醇浓度、离子强度、一抗二抗反应时间及显色时间对 DON 单克隆抗体 8G2，确立了最佳工作条件为：pH 为 7.4，甲醇浓度 0，离子强度为 10 mM，一抗二抗反应时间为 15min 和 30 min，显色时间 15min。

5. 利用 DON 单抗 8G2 建立的 ELISA 方法对阴性面粉样品进行了添加回收实验。其 ELISA 方法回收率在 80.8%~105.2%之间，批内批间差异均小于 15%。

第七章 T-2毒素单克隆抗体的制备及其ELISA检测方法的建立

7.1 引言

T-2 毒素也属于镰刀菌产生的单端孢霉烯族毒素,主要有 *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae*, 和 *Fusarium acuminatum* 等镰刀菌分泌产生 A 类单端孢霉烯族毒素。。T-2 毒素的其毒性在所有单端孢霉烯族毒素中是最高的^[77]急性中毒主要表现为呕吐、拒食和体重下降等。另外有研究表明 T-2 毒素可能与人类食物中毒性白细胞缺乏病症 (alimentary toxic aleukia, ATA)、大骨节病 (Kaschin-Beck disease) 和克山病 (Kersan disease) 有着密切的关系^[80]。T-2 毒素在各种谷物中污染非常普遍,尤其是在玉米、小麦和燕麦中。因此有必要建立快速、简便的快速检测技术,为样品筛查和现场检测提供检测技术。

本章研究在前人研究基础上,采用新型快免佐剂,开发出了可用于高灵敏、高亲和力的 T-2 毒素单克隆抗体,为 T-2 毒素的快速检测提供了技术支持。

7.2 材料与仪器

7.2.1 药品与试剂

T-2 毒素、HT-2 毒素、4-二甲氨基吡啶(4-dimethylamino pyridine, DMAP)、丁二酸酐和丁基硼酸 (Butylboronic acid, BBA) 购于 Sigma 公司;阴性小麦面粉样品由江苏省进出口检验检疫局提供。其他同 2.2.1 章节。

7.2.2 主要仪器与设备

同 2.2.2 章节。

7.2.3 主要溶液

T-2、HT-2 标准溶液用乙腈稀释到 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 ng/mL , -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。其他同第二章 2.2.3。

7.2.4 实验动物和细胞

同 2.2.4 章节

7.3 实验方法

7.3.1 T-2 毒素半抗原的合成

从结构式上可以看出, T-2 毒素只有一个羟基,因此可以通过琥珀酸酐衍生法,引入羧酸基团。将 1 mg T-2 毒素、3.2 mg DMAP 和 7 mg 丁二酸酐溶解于 0.5 mL 吡啶中,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 h。氮气吹干反应溶液,残留物用 5 mL 水溶解后,用三氯甲烷萃取 4 次,每次 3 mL。合并三氯甲烷溶液,氮气吹干。所得产物用薄层和质谱进行鉴定。展开剂为:三氯甲烷:甲醇(9:1,V/V)。

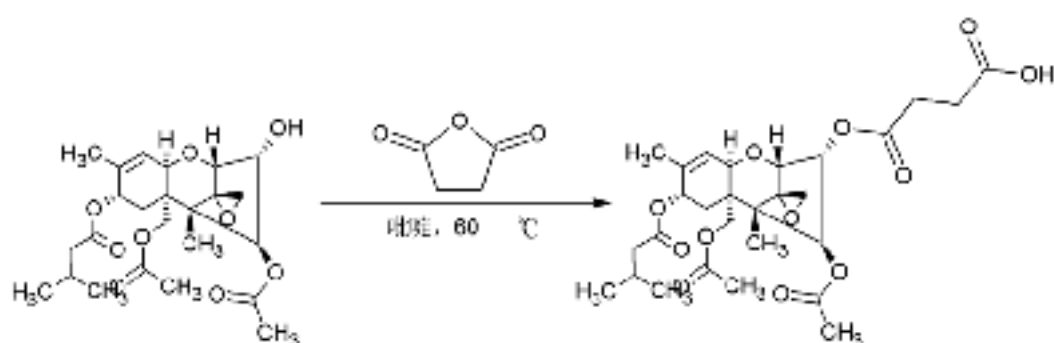


图 7-1 T-2 毒素半抗原的合成

Fig7-1 Synthesis steps for hapten of T-2 toxin

7.3.2 T-2 毒素完全抗原的合成

T-2 毒素免疫原的合成采用活性酯法。将 1 mg T-2 毒素衍生得到的 3-HS-T-2、0.49 mg NHS 和 1.64 mg 的 EDC，溶解于 DMF 中，室温活化 4 h。5 mg KLH 溶解于 3 mL PBS 中。将活化好的 3-HS-T-2，逐滴加入到 KLH 溶液中，调节反应 pH 在 8.5 附近，室温反应过夜。反应结束后，用 PBS 透析三天，每 8 h 更换一次透析液。

T-2 毒素包被抗原的合成同免疫抗原，载体蛋白为 OVA。

7.3.3 小鼠免疫

将 T-2-HS-KLH 作为免疫原免疫小鼠，具体步骤同 2.3.3 章节。

7.3.4 小鼠血清检测

小鼠免疫的检测采用一步法快速检测，所用标准品溶液换为 T-2，具体方法同 3.3.4 章节。

7.3.5 单克隆抗体的制备

细胞筛选时用 T-2 进行抑制筛选，其他步骤同 2.3.5 章节。

7.3.6 单克隆抗体的性质鉴定

7.3.6.1 抗体亚型的鉴定

同 2.3.6.1 章节。

7.3.6.2 抗体交叉反应的测定

同 2.3.6.2 章节。

7.3.6.3 抗体亲和力的测定

同 2.3.6.3 章节。

7.3.7 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化

参照 2.3.7 章节，利用棋盘法确定包被抗原和一抗的最佳使用浓度后，对不同 pH、不同甲醇浓度和不同离子强度的标准品稀释液，以及一抗、二抗和显色反应时间对间接竞争 ELISA 的影响进行评价。

7.3.8 实际样品添加回收试验

阴性面粉样品分别按照 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平进行 T-2 添加回收试验。每份样品各称取 5.0 g，加入 25 mL 40% 甲醇-水(V/V)漩涡震荡均匀后，超声提取 30min。提取液经 5000 rpm 离心后，上清用 PBS 稀释 5 倍后用于间接 ELISA 检测。每次实验重复三次，连续三天测定。

7.4 结果与分析

7.4.1 T-2 半抗原的合成鉴定

T-2 毒素具有一个自由羟基，因此可以将此羟基通过琥珀酸酐衍生，进而引入羧基。因为衍生前后的 T-2 毒素没有紫外吸收，因此使用硫酸作为显色剂。T-2 毒素衍生后的 TLC 结果见图 7-2。从图中可以看出由于引入了羧基，导致 T-2 分子极性增强，因此 Rf 值变低，同时由于羧基的存在，衍生物出现了拖尾现象。



图 7-2 T-2 半抗原合成的薄层分析结果
(1: T-2; 2: 3-HS-T-2)

Fig.7-2 The TLC result of T-2 hapten

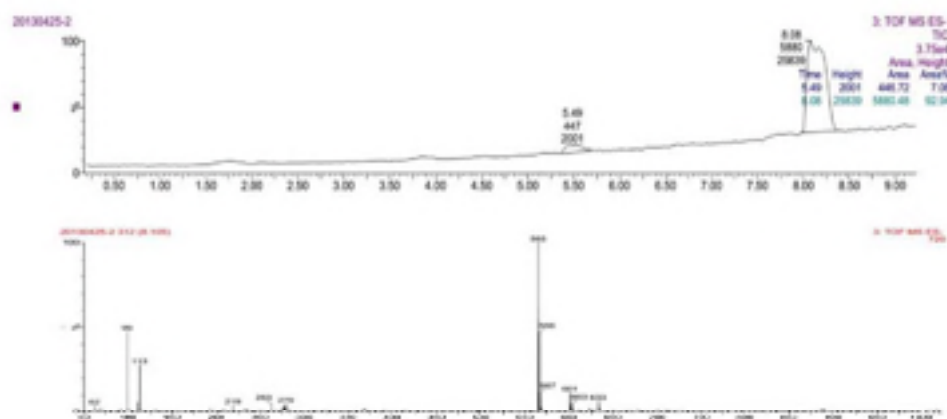


图 7-3 T-2 毒素半抗原合成的质谱分析结果

Fig.7-3 The LC-MS/MS result of T-2 toxin hapten

7.4.2 T-2 完全抗原的合成鉴定

T-2 毒素在紫外可见光区没有特征吸收, 没有较好的办法对合成的 T-2 毒素完全抗原进行鉴定。因此我们选择直接免疫小鼠, 利用 ELISA 方法对小鼠多抗血清进行分析, 观察是否有效价及 T-2 分子能对多抗产生抑制来评价完全抗原的合成是否成功。

7.4.3 小鼠的免疫与检测

小鼠在四次免疫后的血清的效价和抑制检测, 我们采取一步法检测的结果见表 7-1。从表中可以看出 2 号和 4 号小鼠的抑制较好, 50 ng/mL 的 T-2 毒素可以产生 50% 以上的抑制, 因此选择其中一只效价稍高的 2 号小鼠进行细胞融合。

表 7-1 四免后小鼠血清的检测结果

		包被稀释倍数					
		3000	9000	27000	3000	27000	3000
		#1 小鼠			#2 小鼠		
全血稀释倍数	1000	1.385	0.808	0.360	1.488	0.601	0.270
	3000	0.758	0.378	0.179	0.817	0.32	0.145
	9000	0.340	0.183	0.097	0.393	0.168	0.091
	27000	0.156	0.098	0.067	0.179	0.100	0.062
上边四行为 PBS, 下边四行为 T-2 50 ng/mL							
全血稀释倍数	1000	0.879	0.502	0.249	0.660	0.295	0.121
	3000	0.379	0.229	0.126	0.294	0.137	0.078
	9000	0.165	0.107	0.078	0.139	0.086	0.060
	27000	0.090	0.069	0.068	0.085	0.063	0.056
包被稀释倍数							
		3000	9000	27000	3000	9000	27000
		#3 小鼠			#4 小鼠		
全血稀释倍数	1000	1.627	0.698	0.358	1.141	0.646	0.397
	3000	0.969	0.411	0.208	0.598	0.361	0.195
	9000	0.522	0.216	0.122	0.319	0.194	0.118
	27000	0.228	0.119	0.078	0.143	0.105	0.074
上边四行为 PBS, 下边四行为 T-2 50 ng/mL							
全血稀释倍数	1000	0.677	0.303	0.153	0.457	0.357	0.238
	3000	0.319	0.156	0.091	0.207	0.166	0.117
	9000	0.147	0.083	0.063	0.110	0.091	0.069
	27000	0.086	0.063	0.055	0.072	0.061	0.068

7.4.4 单克隆抗体的性质鉴定

经过细胞融合后, 筛选到一株单克隆抗体细胞株, 编号 8E6 (简称, 全部标号为 4H3-3B3-8E6)。

7.4.4.1 抗体亚型的鉴定

通过单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对单抗的免疫球蛋白类别、亚型及其轻链类型进行鉴定,结果见图 7-5。从图中可以看出 T-2 单克隆抗体 8E6 的亚型为 IgG2a, 轻链为 kappa 型, control 线明显, 说明结果有效。

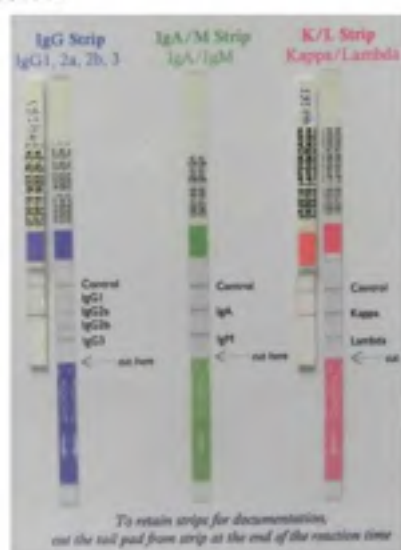


图 7-5 T-2 单克隆抗体 8E6 IgG 的亚型鉴定

Fig.7-5 The IgG subclass of T-2 mAb 8E6

7.4.4.2 抗体交叉反应的测定

通过间接竞争 ELISA 测得的 T-2 单克隆抗体 8E6 的 IC_{50} 及与其类似物的交叉反应率见表 7-1。从表中可以看出, 单抗 8E6 对 T-2 毒素类似物 HT-2 的 IC_{50} 为 1.503 ng/mL, 交叉反应率为 28.6%。

表 7-2 T-2 毒素单抗 8E6 的交叉反应率的测定

Table 7-2 The determination of the cross-reactivity of mAb 8E6 against T-2 toxin

名称	结构式	分子式	CAS 号	IC_{50} (ng/mL)	CR(%)
T-2 toxin		$C_{24}H_{34}O_9$	21259-20-1	0.430	100
HT-2 toxin		$C_{22}H_{32}O_8$	26934-87-2	1.503	28.6

7.4.4.3 抗体亲和力的测定

按照 2.3.6.3 中的公式计算得出, 8E6 单抗的亲和力为 1.35×10^8 L/mol。

7.4.5 T-2 毒素间接竞争 ELISA 的优化

利用棋盘法确定最佳的 T-2 毒素包被抗原和单克隆抗体使用浓度的结果见表 7-3。从表中可以看出, 在包被抗原在 16000 和 32000 倍稀释的时候, OD 值最高不超过 1.0, 因此在此包被浓度下, 没有合适的工作点。T-2 单抗 8E6 的最佳包被浓度为 1000 倍稀释, 在此包被浓度下一抗的使用浓度为 16000 倍稀释。在此工作点浓度下的 IC_{50} 为 0.536 ng/mL, 相关系数 R^2 为 0.998。

表 7-3 T-2 毒素单抗 8E6 的工作点
Table 7-3 The workpoint of T-2 mAb 8E6

	包被抗原稀释倍数					
	1000	2000	4000	8000	16000	32000
1000	2.421	2.136	1.809	1.310	0.735	0.436
2000	2.131	1.830	1.469	0.970	0.540	0.103
4000	2.033	1.586	1.165	0.782	0.431	0.234
8000	1.900	1.289	0.931	0.546	0.296	0.181
16000	1.341	0.912	0.623	0.336	0.184	0.122
32000	0.814	0.532	0.361	0.209	0.123	0.092
64000	0.580	0.376	0.235	0.143	0.095	0.077
128000	0.299	0.200	0.143	0.097	0.073	0.064
T-2 (ng/mL)	1000	2000	4000	8000	16000	32000
0	1.306	1.351	1.524	1.370		
0.05	1.303	1.358	1.514	1.493		
0.1	1.264	1.296	1.49	1.375		
0.2	1.193	1.283	1.486	1.504		
0.5	0.748	1.148	1.486	1.354		
1	0.368	0.664	1.435	1.159		
2	0.223	0.287	1.369	1.146		
5	0.107	0.121	0.340	0.826		
IC ₅₀	0.536	0.947	2.300	N		
R ²	0.998	0.996	0.992	0.844		

N: 无拟合结果返回。

7.4.5.1 标准品稀释液 pH 的优化

不同的 pH(5.8,7.0,7.4,8.0)标准品稀释液对 T-2 单抗 8E6 的影响见表 7-4。从表中可以看出不同 pH 的标准品稀释液,对最大吸光值 A_{max} 的影响不大,而 IC₅₀ 随着 pH 的上升而增加,从两者的比值作为参考,可以得到, pH5.8 为最合适的标准品稀释液 pH。

表 7-4 pH 对 T-2 毒素单抗 8E6 的影响
Table 7-4 Effects of pH on mAb 8E6 against T-2 toxin

pH	A _{max}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
5.8	1.188 ±0.025	0.559 ±0.017	2.1
7.0	1.138 ±0.013	0.649 ±0.023	1.8
7.4	1.129 ±0.066	0.661 ±0.017	1.7
8.0	1.175 ±0.022	0.662 ±0.010	1.8

N: 无拟合结果返回。

7.4.5.2 标准品稀释液甲醇含量的优化

不同的标准品稀释液甲醇浓度(0, 10%, 20%, 30%, 40%和50%)对T-2单抗8E6的影响见表7-5。从表中可以看出,随着甲醇浓度的增加,最大吸光值 A_{max} 和 IC_{50} 均升高,当甲醇浓度超过40%, IC_{50} 已经超出了曲线中最大的浓度。因此,应该尽量减少标准品稀释液中的甲醇含量,选择不含甲醇的PBS作为标准品稀释液。

表7-5 甲醇浓度对T-2毒素单抗8E6的影响

Table 7-5 Effects of methanol concentration on mAb 8E6 against T-2 toxin

甲醇浓度 (v/v)	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
0%	1.314 ±0.055	0.491 ±0.056	1.3
10%	1.693 ±0.107	0.954 ±0.079	1.7
20%	1.688 ±0.065	1.756 ±0.076	1.7
30%	1.738 ±0.011	3.715 ±0.089	1.7
40%	1.761 ±0.096	N	N
50%	1.808 ±0.054	N	N

N: 无拟合结果返回。

7.4.5.3 标准品稀释液离子强度的优化

不同的标准品稀释液离子强度(0, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM和50 mM)对T-2单抗8E6的影响见表7-6。从表中可以看出,随着离子强度的增加,最大吸光值 A_{max} 和 IC_{50} 均呈下降趋势,因此需要在两个参数之间选出平衡点。参考两者的比值,选择比值最大的20mM作为标准品稀释液的离子强度。

表7-6 离子强度对T-2毒素单抗8E6的影响

Table 7-6 Effects of the ionic strength on mAb 8E6 against T-2 toxin

离子强度	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
0	1.709 ±0.013	0.823 ±0.039	2.1
2 mM	1.640 ±0.051	0.627 ±0.020	2.6
5 mM	1.675 ±0.087	0.676 ±0.020	2.5
10 mM	1.428 ±0.019	0.481 ±0.017	2.9
20 mM	1.191 ±0.005	0.400 ±0.009	4.0
50 mM	0.988 ±0.108	0.382 ±0.025	2.6

7.4.5.4 一抗反应时间的优化

不同的一抗反应时间(15 min, 30 min, 45 min和60 min)对T-2单抗8E6的影响见表7-7。从标准可以看出,随着一抗反应时间的增加,最吸光值 A_{max} 增加,而 IC_{50} 逐渐降低并在30min后达到平衡。从时间和灵敏度角度考虑,选择30min作为一抗的反应时间。

表7-7 一抗反应时间对T-2毒素单抗8E6的影响

Table 7-7 Effects of the incubate time of primary antibody on mAb 8E6 against T-2 toxin

反应时间	A_{max}	$IC_{50}(ng/mL)$	A_{max}/IC_{50}
15 min	0.694 ±0.013	2.312 ±0.054	0.3
30 min	1.147 ±0.017	0.500 ±0.050	2.3
45 min	1.429 ±0.028	0.494 ±0.046	2.9
60 min	1.651 ±0.051	0.491 ±0.066	3.4

7.4.5.5 二抗反应时间的优化

不同的二抗反应时间 (15 min, 30 min, 45 min 和 60 min) 对 T-2 单抗 8E6 的影响见表 7-8。从表中可以看出, 随着二抗反应时间的增加, 光值大 A_{max} 明显增加, 同时 IC_{50} 也有缓慢的增加。在 IC_{50} 相差不大的情况下, 在保证 A_{max} 不太低的前提下, 应该尽量选择较短的时间保 ELISA 的快速。因次选择 30min 作为二抗反应时间。

表 7-8 二抗反应时间对 T-2 毒素单抗 8E6 的影响

Table 7-8 Effects of the incubate time of secondary antibody on mAb 8E6 against T-2 toxin

反应时间	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
15 min	0.943 ± 0.018	0.390 ± 0.024	2.4
30 min	1.425 ± 0.035	0.448 ± 0.011	3.2
45 min	1.734 ± 0.023	0.489 ± 0.012	3.5
60 min	1.987 ± 0.041	0.510 ± 0.091	3.9

7.4.5.6 显色反应时间的优化

不同的显色反应时间 (10 min, 15 min, 20 min 和 25 min) 对 T-2 单抗 8E6 的影响见表 7-9。从表中可以看出, 随着显色时间的延长, 最大吸光值 A_{max} 逐渐增大, 而 IC_{50} 变化不大。在保证显色强度 (A_{max}) 的前提下, 选择尽量短的显色时间。因此选择 20min 作为显色时间。

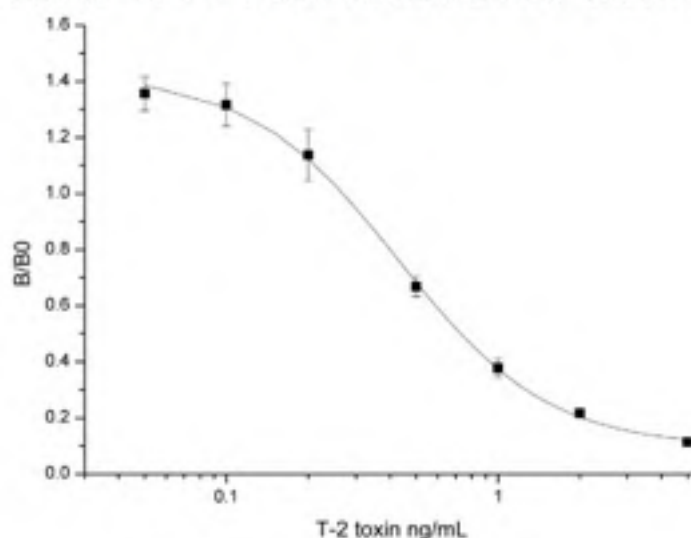
表 7-9 显色反应时间对 T-2 毒素单抗 8E6 的影响

Table 7-9 Effects of the colouring reaction time on mAb 8E6 against T-2 toxin

显色时间	A_{max}	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50}
10 min	0.714 ± 0.035	0.598 ± 0.020	1.2
15 min	1.040 ± 0.053	0.554 ± 0.011	1.9
20 min	1.325 ± 0.019	0.582 ± 0.014	2.3
25 min	1.622 ± 0.012	0.573 ± 0.023	2.8

7.4.5.7 间接竞争 ELISA 的标准抑制曲线

按照以上优化后的参数, 对 T-2 单抗 8E6 建立标准曲线, 见图 7-5。



将实验数据在 origin 软件中使用 4 参数方程进行拟合。根据曲线的拟合结果, T-2 单抗 8E6 的 IC_{50} 为 0.431 ± 0.019 ng/mL, 检测区间为 (IC_{15-85}) $0.036 \sim 3.172$ ng/mL; 相关系数 R^2 分别为 0.998。

7.4.6 实际样品添加实验

阴性面粉添加回收实验的结果见表 7-10。从表中可以看出, T-2 单抗 8E6 建立的 ELISA 其添加回收率在 80.2%~117.9%之间, 批内变异系数 2.8%~6.7%之间, 批间变异系数 5.1%~12.9%之间, 说明建立的 ELISA 方法有很好的准确度和精确度, 可以进一步用于实际样品的检测。

表 7-10 ELISA 方法测定样品中 T-2 的添加回收率
Table 7-10 Recovery analysis of T-2 from spiked samples by ELISA

单克隆抗体	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	变异系数(%)	
			批内(n=3)	批间(n=3)
T-2 8E6	5.0	80.2 ± 8.9	6.7	12.9
	12.5	93.9 ± 4.2	2.8	5.1
	25.0	107.9 ± 4.2	6.3	5.7

7.5 本章小结

1. 通过琥珀酸酐衍生制备了 T-2 毒素半抗原并对进行了鉴定, 通过活性酯法制备了 T-2 完全抗原;

2. 将 T-2-KLH 作为免疫原免疫小鼠, 通过红细胞融合, 最终筛选得到 T-2 单克隆抗体细胞株 8E6;

3. 对 T-2 单克隆抗体细胞株 8E6 进行了鉴定。其 IC_{50} 为 0.431 ± 0.019 ng/mL, 检测区间为 (IC_{15-85}) $0.036 \sim 3.172$ ng/mL; IgG 亚型为 IgG 2a 型, 其轻链为 kappa 类型; 单抗的亲和力为 1.35×10^8 L/mol; 对 HT-2 交叉为 28.6%。

4. 评价了不同 pH、甲醇浓度、离子强度、一抗二抗反应时间及显色时间对 DON 单克隆抗体 8G2, 确立了最佳工作条件为: pH 为 5.8, 甲醇浓度 0, 离子强度为 20 mM, 一抗二抗反应时间为 30min 和 30 min, 显色时间 20min。

5. 利用 DON 单抗 8G2 建立的 ELISA 方法对阴性面粉样品进行了添加回收实验。其 ELISA 方法回收率在 80.2%~117.9%之间, 批内差异均小于 7%, 批间差异小于 13%。

第八章 绿色无毒黄曲霉毒素B₁免疫检测方法的建立

8.1 引言

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFs) 是一类由黄曲霉等真菌产生的一类结构类似的化合物。黄曲霉毒素毒性极强, 并具有致畸、致癌和致突变毒性。在已发现的几十种类的黄曲霉毒素中, 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 毒性最强, 已被国际癌症组织列为第一类致癌物。黄曲霉毒素在农作物中广泛存在, 因此大量分析方法被开发用于检测黄曲霉毒素。

目前的 AFB₁ 分析方法, 不论仪器检测还是免疫检测, 均需要待分析物质的标准溶液, 不仅费用高, 还会对分析人员和环境造成伤害和污染^[196, 197]。抗独特型抗体 (Anti-idiotypic, Anti-Id 或 Ab₂) 在空间构象上与抗原存在内影像关系^[198], 因此可以替代原始抗原作为标准物质, 用于 AFB₁ 的无毒免疫学检测。

8.2 材料与仪器

8.2.1 药品与试剂

胃蛋白酶、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)购自 Sigma; 蛋白 A 购于 GE 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (HRP-IgG)、辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG (HRP-IgG 购于康成生物工程公司; 氯乙酸、丙烯酰胺、N, N-亚甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、十二烷基硫酸钠 (SDS) 甘氨酸购于百灵威公司; SN123-20T 预染蛋白分子量标准, 购于南京生兴公司; 阴性小麦面粉样品由江苏省进出口检验检疫局提供; AFB₁ 单抗 11A9, 1G3 本实验室制备; 其他同 2.2.1 章节。

8.2.2 主要仪器与设备

Biorad Mini-PROTEAN Tetra MP4 电泳槽, 美国伯乐公司; JY3000 电泳仪, 北京六一公司; 其他同 2.2.2 章节。

8.2.3 主要溶液

饱和硫酸铵: 105g 硫酸铵加入 100 mL 去离子水中, 加热搅拌至溶解, 冷却到室温后, 氨水调 pH 到 7.0, 即得到饱和硫酸铵溶液。

0.06mol/L 乙酸盐缓冲液: pH5.0, 0.58 g 醋酸钠, 0.282 mL HAc, 加纯水至 200 mL。

30% 丙烯酰胺溶液: 称取 58.4 g 丙烯酰胺、1.6 g N, N-亚甲叉双丙烯酰胺, 加入 50 mL 水加热溶解, 冷却后加水定容至 200 mL, 过滤后避光保存, 一个月内使用。

浓缩胶缓冲液: 称取 13.1 g Tris 碱, 100 mL 水溶解后, 用 6 M 浓盐酸调 pH 至 6.8 后定容至 200 mL。

分离胶缓冲液: 称取 36.34 g Tris 碱, 用 100 mL 水溶解后, 用 6 M 的浓盐酸调 pH 至 8.8 后定容至 200 mL。

10×电极缓冲液: 称取 144.1 g 甘氨酸, 30.3 g Tris 碱, 加水溶解后定容至 1 L。

2×上样缓冲液：4 mL 0.5M Tris-HCl(pH6.8)、2 mL 甘油、0.5 μL 0.1%溴酚蓝(w/v)、2.5mL 纯水混合均匀。

固定液：25 g 三氯乙酸溶于水中并定容至 100mL。

染色液：50 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50mL 固定液中。

脱色液：甲醇 3mL，乙酸 3mL，纯水 294 mL。

其他同第二章 2.2.3。

8.2.4 实验动物和细胞

新西兰大白兔由江南大学动物中心提供；其他同 2.2.4 章节

8.3 实验方法

8.3.1 抗体的纯化

小鼠单克隆抗体 11A9 腹水，采集后 10000rpm 离心 10 min 后收集中间透明部分，分别用硫酸铵盐析法、辛酸-硫酸铵盐析法和 protein A 法进行纯化。主要操作方法如下：

硫酸铵法：吸取 1mL 腹水，用纯水稀释一倍后，加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混合均匀后放 4 ℃ 静置 2 h，使蛋白质充分沉淀。4000 rpm 离心 15 min，弃上清保留沉淀。将沉淀溶于 1 mL 0.01 M PBS 中，用 0.01M PBS 透析 24 h 每隔 8 h 换透析缓冲液一次，以彻底去除硫酸铵。

辛酸硫酸铵法：取 1 mL 腹水与 2 mL pH4.5 醋酸盐缓冲液混合，室温搅拌按照下 33 μL/mL 腹水，逐滴加入正辛酸，室温混合振荡 30 min。5000 rpm 离心 10 min，弃沉淀，上清经 125 μm 的尼龙网过滤后，加入过滤液 10%体积的 0.1M pH 8.0 PBS，用 1 M 氢氧化钠溶液调 pH 值至中性后，加入等体积饱和硫酸铵充分混匀，4 ℃静置 2h 以上。5000 rpm 离心 10 min，弃上清沉淀用 1 mL 0.01M PBS 溶解，4 ℃下用 0.01 M PBS 透析 48 h。

Protein A 法：将 0.5 mL 小鼠腹水离心后上清，用 pH7.4 的 0.01 M PBS 溶液稀释 2 倍后，经 0.22 μm 针头滤器过滤后上 Protein A 柱。流速为 1mL/min；用 20 mL 0.01M PBS 溶液冲洗柱子，流速为 2 mL/min；用 pH 4.0 柠檬酸缓冲液洗脱，流速为 1mL/min，收集洗脱液，调节 pH 至 7.4；柱子用 10 mL 0.01M PBS 溶液冲洗再生后，用 5 mL 含 20% 乙醇 PBS 溶液冲洗，置于 4 ℃中保存。洗脱液装入透析袋，0.01 M PBS 溶液透析 48h，每 8h 换液。

将上述三种方法纯化的单克隆抗体，经非变性电泳鉴定纯度。

8.3.2 抗 AFB₁ 单克隆抗体 F(ab')₂ 片段的制备

单克隆抗体 F(ab')₂ 片段的制备采用胃蛋白酶酶解的方法。分别用 pH 3.8 和 pH4.5 的 0.1M 乙酸盐溶液配置酶溶液，浓度为 0.1 mg/mL。将纯化好的抗 AFB₁ 抗体分别置于 200 倍体积 pH 3.8 和 pH4.5 的 0.1 M 乙酸盐溶液中透析 12h，每 6 小时换一次透析液。通过紫外 280nm 吸光值测定透析后的蛋白溶度，并调整到 2 mg/mL，200 ul/管分装。将

溶解在相同 pH 值的酶和抗体等体积混合，放于 37℃ 水浴中，每隔 60 min 取出 50 μ l，用 2 M Tris 碱溶液调 pH 至中性来终止反应。最后将每个时间点取出的水解样品采用非变性凝胶电泳法鉴定。根据电泳图选择最有效的 pH 和时间。

8.3.3 F(ab')₂ 片段的纯化

利用上一步确定的最有效的酶解时间和 pH 来制备 AFB₁ 单抗的 F(ab')₂ 片段，将得到的酶解产物通过 Protein A 柱进行纯化：将终止后的反应液体用 PBS 溶液稀释 4 倍后，上样到 Protein A 柱，以流速 0.5 滴/s 过柱，收集穿流液。用 pH 3.7 磷酸缓冲液洗脱结合上的 Fc 片段，流速 1 滴/s，洗脱液不收集。Protein A 柱用 10 mL 0.01M PBS 溶液冲洗再生后，用 5 mL 含 20% 乙醇 PBS 溶液冲洗，置于 4℃ 中保存。收集的穿流液液装入透析袋中，在 0.01M PBS 溶液中透析 24 h，每 8h 换一次透析液透，透析后冷冻 -20℃ 保存备用。

8.3.4 动物免疫

取 1 mg/mL F(ab')₂ 片段 1 mL 与等量的弗氏佐剂混合，用注射器反复挤推至阻力变大，第一次免疫采用完全弗氏佐剂，以后均采用不完全弗氏佐剂。将推好的乳化抗原免疫大白兔，采用背部皮下多点免疫，每 22 天免疫一次。每次免疫后一周后，用 1mL 注射器在耳缘静脉取血，按 2.3.4 章节中血清效价的测定方法测定抗血清的效价。血清效价不再升高时，耳缘静脉冲击免疫，剂量为 0.2 mg，三天后心脏采血。将收集到的血放入 37℃ 烘箱中静置 1 h，6000 r/min 离心 15 min 分离血清，辛酸硫酸铵法纯化后分装保存备用。

8.3.5 间接 ELISA 方法建立

按照 2.3.4 章节的方法建立间接 ELISA，其中 AFB₁ 标准品用制备的抗独特性抗体代替。

8.3.6 抗独特型抗体的性质

为了验证抗独特型抗体和 AFB₁ 之间的具有相关性，将相同抑制率对应的 AFB₁ 标准品浓度和抗独特型抗体浓度分别为横纵坐标做图。抑制率区间为 20%~80%，间隔为 5%^[199]。通过对得到的散点图进行回归分析，得到两种标准物质之间的对应关系。抗独特型抗体的特异性的检验，将其作为标准品检测对其他生物毒素单克隆抗体的抑制。交叉反应率 CR 按照如下公式计算：

$$CR\% = (IC_{50}AFB_1 / IC_{50} \text{其他}) \times 100\%$$

其中 IC₅₀AFB₁ 为抗独特型抗体对抗黄曲霉毒素单抗 11A9 的 IC₅₀，而 IC₅₀ 其他为抗独特型抗体针对其他毒素单克隆抗体的 IC₅₀。

8.3.7 添加回收试验

面粉样品经江苏省进出口检验检疫局 HPLC-MS/MS 检测, 不含有黄曲霉毒素。称取 5.0 g 面粉样品于三角烧瓶中, 分别添加 10、25 和 50 ng 的 AFB₁。室温干燥后, 加入 50 mL 甲醇:水(70:30)振荡均匀后, 超声提取 30 min。提取液经滤纸过滤后, 用 PBST (含 0.05% Tween20 的 PBS, v/v) 稀释 10 倍后, 用无毒 ELISA 检测。批内和批间实验回收率和变异系数基于不连续的 3 天 ELISA 结果得出。

8.4 结论与分析

8.4.1 抗体纯化方法

小鼠腹水含有大量之类和杂蛋白等杂质, 为了避免对实验产生影响, 一般需要对腹水进行纯化。本研究通过非变性凝胶电泳法对比了辛酸-硫酸铵盐析沉淀法和饱和硫酸铵沉淀法、Protein A 法、硫酸铵二步沉淀法等纯化效果, 结果见图 8-1:

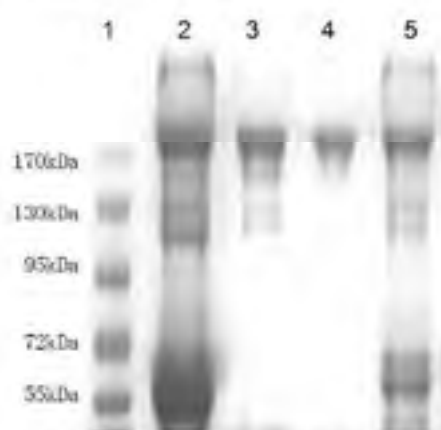


图 8-1 单克隆抗体的不同纯化方法对比

Fig.8-1 The comparison of different purification methods for mAb

注: 1: Marker 蛋白; 2: 腹水; 3: 辛酸-硫酸铵法纯化的抗体; 4: protein A 法纯化的抗体; 5: 硫酸铵一次沉淀产物;

从图中可以看出, Protein A 的纯化效果最好, 辛酸硫酸铵法稍差, 而硫酸铵法交叉, 含有较多的杂质。考虑到纯化的抗体的最终目的是作为免疫原, 因此选择了效果最好的 Protein A 方法作为抗体的纯化方法。

8.4.2 F(ab')₂ 片段的制备

一般小鼠 IgG 抗体分子包含有不变区和可变区。如果用整个分子免疫兔子, 得到的多克隆抗体, 会有部分针对其不变区的, 而抗独特型抗体主要是针对抗体可变区内的独特性表位。因此将不变区去除, 有利于抗独特型抗体的制备。本研究中使用胃蛋白酶对抗体分子进行酶解, 得到 F(ab')₂ 片段。由于胃蛋白酶在酸性条件下才有较高的活性, 因此需要在酸性的醋酸盐缓冲溶液中进行。本研究考察了不同 pH 和不同时间对单克隆抗体 11A9 酶解效果的影响。结果见图 8-2a 和 b:

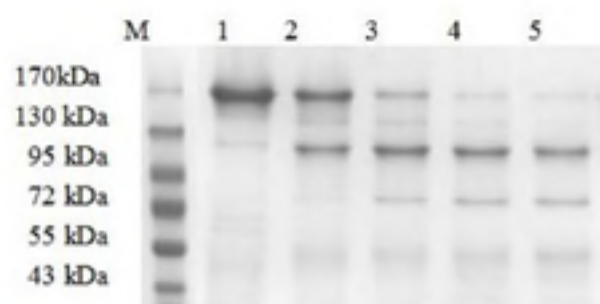


图 8-2a. pH3.8 不同时间下的 11A9 抗体酶解效果 1~5: 1~5 h; M: Marker
Fig. 8-2a Digestion of mAb 11A9 at pH3.8 for different times: 1~5 h; M: maker

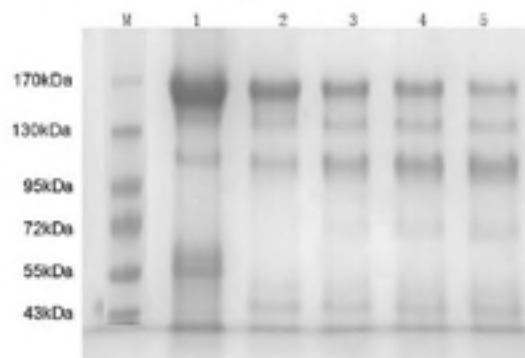


图 8-2b. pH4.5 不同时间下的 11A9 抗体酶解效果 1~5: 1~5 h; M: Marker
Fig. 8-2b Digestion of mAb 11A9 at pH4.5 for different times: 1~5 h; M: maker

从图中可以看出, 在 pH 4.5 条件下, 即使经过 5 h 的反应, 抗体依然没有完全水解; 而在 pH 3.8 条件下, 经过 5 h 的反应, 抗体基本上全部水解。因此选择 pH3.8 酶解 5 h 的条件来制备 F(ab')₂ 片段。

8.4.3 F(ab')₂ 片段的纯化

采用 Protein A 亲和层析柱法纯化酶解后的产物, 得到的 F(ab')₂ 片段电泳图件图 8-3 所示。从图中可以看出, Protein A 纯化的效果非常好, 杂带很少, 可以用于免疫动物。

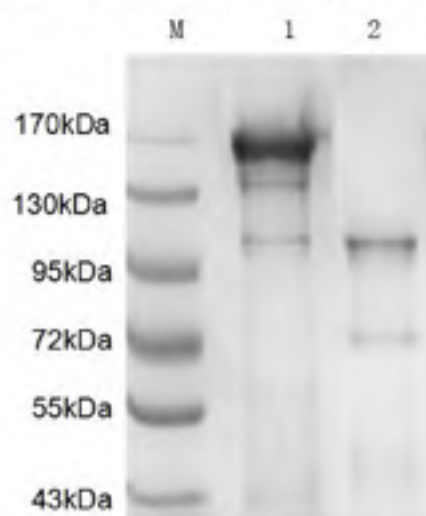


图 8-3. 纯化后的 F(ab')₂ 纯度: 1: mAb; 2: F(ab')₂; M: Marker
Fig. 8-3 Purity of F(ab')₂ after purification; 1: mAb; 2: F(ab')₂; M: Marker

8.4.4 ELISA 方法的建立

采用 AFB₁、抗独特型抗体 11A9-Ab2 和 1G3-Ab2 作为 ELISA 标准品时, 结果表明都能对抗 AFB₁ 单克隆抗体 11A9 产生抑制, 其抑制曲线分别见图 8-4、8-5 和 7-6。经过四参数方程拟合计算, 其 IC₅₀ 分别为 0.057 ng/mL、30 145 ng/mL 和 18 458 ng/mL。从结果中也可以看出, 采用 1G3 单抗制备的抗独特型抗体 1G3-Ab2, 对 11A9 单抗同样具有抑制, 甚至效果要好于 11A9-Ab2。说明由于抗独特型抗体模拟 AFB₁ 的空间结构, 因此对针对 AFB₁ 的单克隆抗体都会有抑制作用。

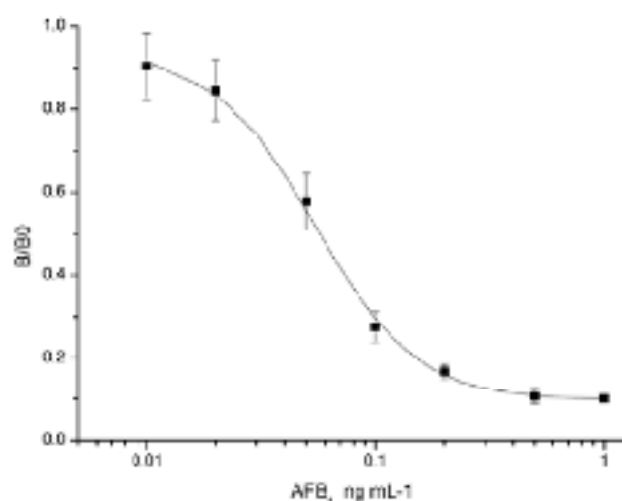
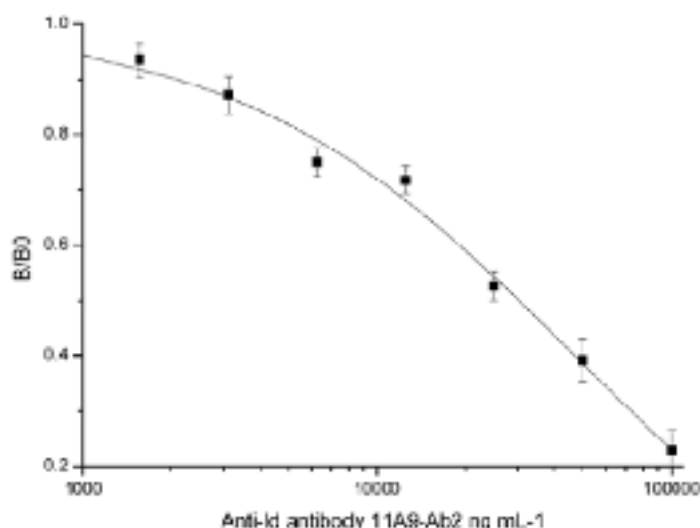
图 8-4 AFB₁ 对 11A9 单抗的抑制曲线Fig. 8-4 The standard curve of 11A9 mAb by AFB₁

图 8-5 11A9-Ab2 对 11A9 单抗的抑制曲线

Fig.8-5 The standard curve of 11A9 mAb by 11A9-Ab2

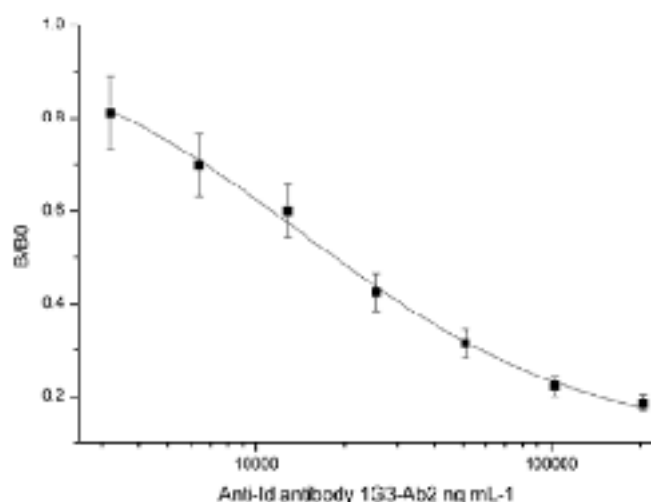


图 8-6 1G3-Ab2 对 11A9 单抗的抑制曲线

Fig.8-6 The standard curve of 11A9 mAb by 1G3-Ab2

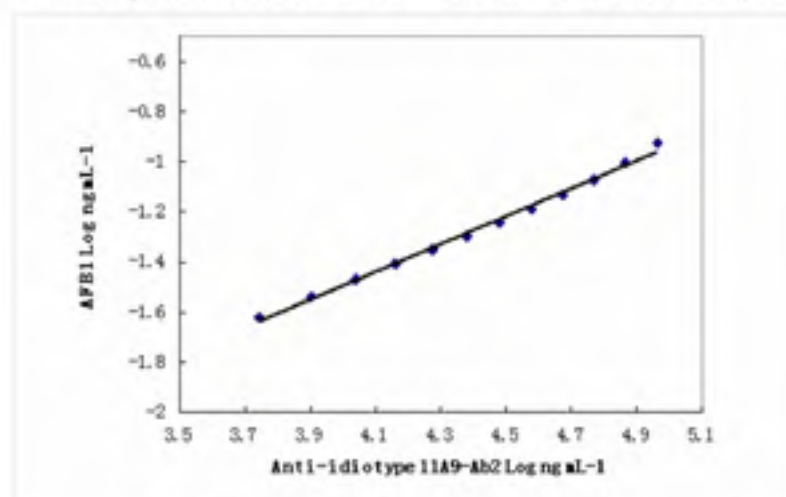
8.4.5 抗独特性抗体的鉴定

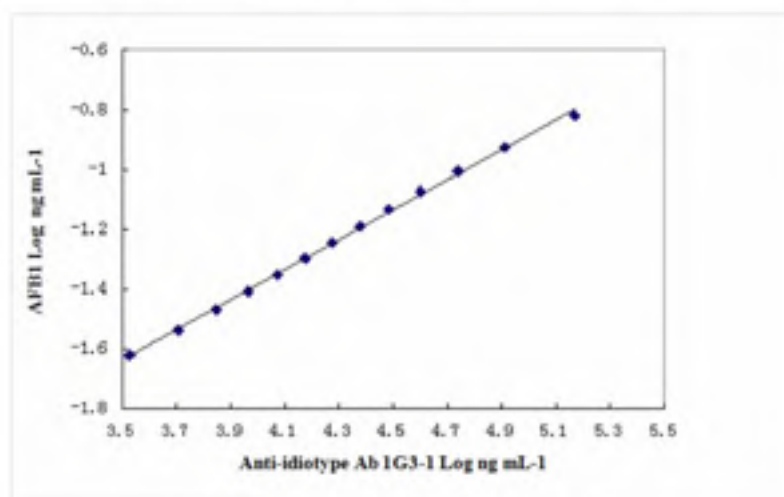
两种标准物质的抑制曲线（图 8-4、8-5 和 8-6）说明，抗独特型抗体和 AFB₁ 都可以对 11A9 单抗产生抑制。为了研究两种物质之间的相关性，对导致 20%~80%之间抑制率的浓度分别为横纵坐标，取对数后进行回归分析，间隔为 5%。其结果见图 8-7 和 8-8。从图中可以看出抗独特型抗体和 AFB₁ 之间具有浓度对数的线性关系，其回归方程为：

$$y=0.5544x-3.7113 \quad (11A9-Ab2)$$

$$y=0.5012x-3.3896 \quad (AG3-Ab2)$$

其中 x 为抗独特型抗体浓度， y 为 AFB₁ 浓度，相关系数 R^2 分别为 0.9949 和 0.9987。说明抗独特型抗体和 AFB₁ 具有高度的一致性，可以作为无毒的标准品替代物。

图 8-7 11A9-Ab2 和 AFB₁ 的相关性Fig.8-7 Correlation of results between 11A9-Ab2 and AFB₁

图 8-8 1G3-Ab2 和 AFB₁ 的相关性Fig.8-8 Correlation of results between 1G3-Ab2 and AFB₁

8.4.6 实际样品添加回收试验

空白面粉样品添加回收实验的结果见表 8-1。从表中可以看出通过抗独特型抗体作为标准品的无毒 ELISA 方法，其平均回收率为 113.75%~122.99，变异系数在 10%以内，批间变异系数低于 15%。

表 8-1. 面粉样品添加回收分析

Table 8-1 Analysis of wheat flour samples spiked with AFB₁

样品	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	变异系数(%)	
			批内(n=3)	批间(n=3)
小麦粉	2.0	122.99 \pm 12.8	9.3	13.9
	5.0	113.75 \pm 6.4	4.3	6.5
	10.0	117.24 \pm 4.7	3.5	8.0

8.5 小结

1. 通过优化胃蛋白的最佳酶解条件，制备了 AFB₁ 单克隆抗体 11A9 和 1G3 的 F(ab')₂ 片段，并通过 Protein A 柱进行了纯化，对得到的 F(ab')₂ 片段进行非变性凝胶电泳鉴定；

2. 利用制备的 F(ab')₂ 片段免疫大白兔，通过血清纯化，得到黄曲霉毒素 B₁ 的抗独特型抗体，并对其基本性质进行了鉴定。两种抗独特型抗体同 AFB₁ 对 AFB₁ 单抗的抑制具有很高的相关性，可以用来开发黄曲霉毒素无毒试剂盒；

3. 利用 AFB₁ 抗独特型抗体替代常规试剂盒中的 AFB₁ 标准品，通过实际样品添加回收试验，其回收率在 110%~130%之间，批内批间变异系数均小于 10%，批间变异系数均小于 15%。

第九章 适用于现场检测的真菌毒素胶体金试纸条的研制

9.1 引言

胶体金快速检测试纸条在医学快速筛查中已经应用很长时间,其中应用最早、应用范围最广的商业化试纸条是早孕试纸^[200]。在过去的十年内,快速检测试纸条在食品和饲料领域的应用越来越广,检测的指标包括了病原体、药物残留、抗生素、真菌毒素以及过敏原等^[201-204]。相对于较为准确的仪器检测方法和 ELISA 快速检测方法,试纸条的检测时间更短,只需要 5~10 min;更加简便,不需要任何仪器,肉眼即可判断;容易保存,不需要低温能保存半年以上;成本低、检测一次的成本只有几元。由于以上原因,试纸条是进行现场快速检测的最佳选择。

本章研究在已有的真菌毒素单克隆抗体基础上,建立了多种真菌毒素高灵敏、适用于现场检测的快速检测试纸条,

9.2 材料与仪器

9.2.1 药品与试剂

氯金酸、柠檬酸三钠、BSA、海藻糖、叠氮化钠购于 Sigma 公司, Tween 20、硼酸、硼砂购于上海国药集团;真菌毒素单克隆抗体(AFB₁ mAb 5C3、AFM1 mAb III、OTA mAb #6、ZEN mAb#3、DON mAb 8G2、T-2 mAb 8E6)及包被抗原,本实验室自制;羊抗鼠 IgG,康成生物工程公司;其他同 2.2.1。

9.2.2 主要仪器与设备

101A-2 电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂);超纯水制备仪 Cabinet 3(美国的 Millipore 公司);Cary100 型紫外分光光度计(安捷伦公司);XYZ 3000 金标点样仪、CM4000 切条机(美国的 Bio-dot 公司);CN140 硝酸纤维素膜、吸水垫、金标垫和样品垫购于上海杰一生物;其他同 2.2.2 章节。

9.2.3 主要溶液

10% NaCl 溶液: 10g NaCl, 溶解于 70 毫升纯水中,定容到 100 mL;

2 mM pH8.0 硼酸盐缓冲溶液(BB): 0.05 mol/L 硼砂 3 mL, 0.2 mol/L 硼酸 7 mL, 用纯水稀释 100 倍。

0.1 M K₂CO₃: 13.82 g K₂CO₃ 溶解于 700 毫升纯水中,定容到 1000 mL;

10% BSA 溶液: 1g BSA 溶解到 7mL 纯水中,定容到 10 mL。

金标抗体洗涤液: 含有 2% BSA、2% Tween20 和 5% 蔗糖的 BB 缓冲液;

金标抗体悬浮液: 含有 5% 海藻糖、1% BSA、2% Tween20 和 0.05% 叠氮化钠的 BB 缓冲溶液。

9.3 实验方法

9.3.1 金纳米粒子的制备

金纳米粒子的制备按照文献中的方法制备^[205, 206]。所用试剂全部用超纯水配制,三角瓶等容器用王水处理过夜。向三角瓶内加入 200 mL 超纯水,剧烈搅拌下,加入 20 mL 1 g/L 的新鲜配制的氯金酸溶液,磁力加热搅拌至溶液沸腾 10 min 后,立即加入 0.7 mL 新鲜配置的 2% 柠檬酸三钠溶液,大约 1 min 后溶液变为无色,再变为蓝色,最终变为深红色,保持溶液沸腾继续 10 min 左右,停止加热,室温搅拌冷却,4℃ 保存备用。将制备的胶体金溶液通过可见光区吸收扫描和电镜进行评价。

9.3.2 标记抗体反应 pH 的优化^[207-209]

取六个 1.5 mL 离心管,各加入 1 mL 金溶液,分别向每个离心管加入 0 μL、2 μL、4 μL、6 μL、8 μL 和 10 μL 0.1 M 的 0.1 M K₂CO₃ 溶液。纯化好的单克隆抗体,用 2 mM 的 BB 缓冲液稀释到 0.2 mg/mL,取 50 μL 抗体溶液(10 μg)加入到各个离心管中,室温震荡 30 min。向各离心管中加入 50 μL 10% 的 NaCl 溶液,震荡均匀后,室温静置 1 h。肉眼观察金溶液的颜色变化。选择没有变蓝的、添加 K₂CO₃ 最少的一管金溶液的 pH 体系。

9.3.3 标记抗体用量的优化

在优化好的 pH 的条件下,比较了不同抗体用量对金标抗体的影响。取 5 个 1.5 mL 离心管,各加入 1 mL 胶体金溶液。添加合适的体积的 0.1 M K₂CO₃ 溶液后,分别加入 50 μL 不同浓度的单克隆抗体(0.05 mg/mL, 0.10 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.40 mg/mL, 0.80 mg/mL),室温震荡 30 min 后,加入 50 μL 10% BSA 封闭 1 h。封闭结束后,8000 rpm 离心,小心去除上清,加入 1 mL 金标抗体洗涤液,震荡均匀后,再次离心并去除上清。沉淀用 500 μL 金标抗体悬浮液溶解并震荡均匀。取 5 μL 不同抗体量标记的金溶液,滴加到空白试纸条金标垫上,烘干。加入 100 μL PBS 后于 10 min 后观察各试纸条的颜色。选择颜色明显、抗体用量最少的一组对应的抗体量作为纳米金的标记量。

9.3.4 T (test) 线包被浓度的优化

将各包被原分别按照 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL 和 2 mg/mL 的浓度喷到硝酸纤维膜上,其中 AFM₁ 试纸条上的包被原为 AFB₁-BSA。干燥后,用标记好的抗体溶液滴加到空白试纸条金标垫上,烘干。加入 100 μL PBS 后于 10 min 后观察各试纸条的颜色。选择颜色明显、包被抗原浓度最低的浓度作为最佳 T 线浓度。

9.3.5 多重试纸条金标抗体用量的优化

分别将 ZEN、T-2、AFB₁ 和 OTA 的包被原,按照上一步优化好的 T 线浓度,喷到纤维膜上,从上到下依次分别为 C 线、ZEN、T-2、AFB₁ 和 OTA,每条线间隔距离控制在 3 mm 左右,将金标垫由原来的 3mm×5mm 加大到 3mm×8mm。将四种 T 线对应的

金标抗体分别按照 5、10、15 μ L 的量加到同一金标垫上，烘干，组装后，插入到含有 150 μ L 的 PBS 微孔中，10min 后观察显色。

9.3.6 试纸条的组装

将上述优化好的 T 线浓度，将包被抗原和羊抗鼠 IgG (0.5 mg/mL) 按照图 9-1A 所示进行喷膜；将优化好的金标抗体溶液加到金标垫上，烘干；按照图 9-1A 所示，将样品垫、金标垫、硝酸纤维膜和吸水纸进行组装。多重试纸条从上到下依次分别为 C 线、ZEN、T-2、AFB₁ 和 OTA，每条线间隔距离控制在 3 mm 左右。试纸条的结果判定见图 9-1 B。如果 Control 线和 T 线都显线，说明检测样品为阴性；如果 Control 线显线，T 线不显线，说明样品中的待测物含量已经超过检测限，为阳性样品；Control 线不显线，说明试纸条失效，检测结果无效。

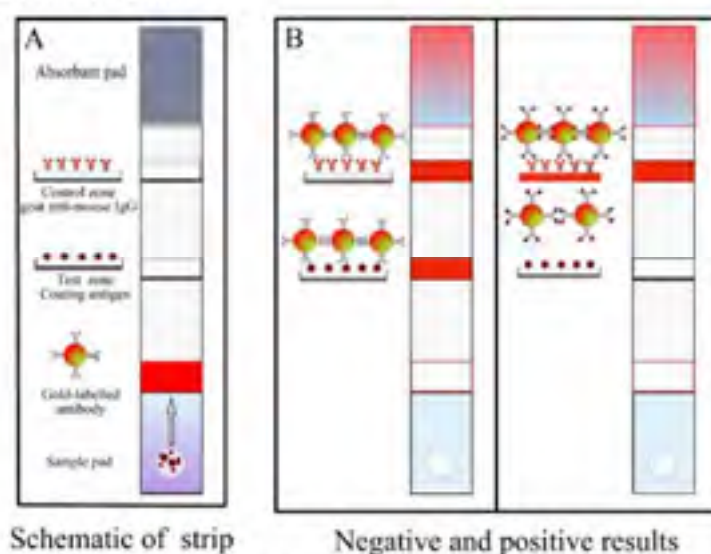


图 9-1 金标试纸条的示意图

Fig.9-1 Schematic diagram of gold-labeled strip

9.3.7 实际样品的检测

9.3.7.1 AFB₁、OTA、ZEN、DON 和 T-2 样品

阴性小麦面粉样品，分别按照表 9-1 进行 AFB₁、OTA、ZEN、DON 和 T-2 添加。每份样品各称取 5 g，依次用 15 mL 含有 50% 的甲醇：水 (V/V) 和 12.5mL 的水进行提取，漩涡震荡均匀后，超声提取 30min。提取液经 5000 rpm 离心后，并合上清，后用于试纸条检测。

表 9-1 面粉中真菌毒素添加水平

Table 9-1 Spiked levels of mycotoxins in flour

真菌毒素	添加水平 μ g/kg
AFB ₁	0、0.75、1.5、3.8、7.5、15.0
OTA	0、0.75、1.5、3.8、7.5、15.0
ZEN	0、0.75、1.5、3.8、7.5、15.0、37.5
DON	0、75.0、150.0、375.0、750.0、1500.0
T-2	0、7.5、15.0、35.0、70.0、140.0

9.3.7.2 AFM₁ 样品

牛奶样品经 HPLC-MS/MS 检测, 不含有 AFM₁。分别按照 0.01 μg/L、0.02 μg/L、0.05 μg/L、0.1 μg/L、0.2 μg/L 和 0.05 μg/L 水平添加 AFM₁。奶粉样品按 8 mL 水/g 样品溶解后, 同牛奶样品处理。样品直接用于试纸条检测。

9.3.7.3 红酒样品

阴性红酒样品经仪器检测确认, 按照表 9-2 进行添加后, 取 5 mL 红酒样品, 超声脱气 10min, 用 PBS 稀释 5 倍混匀后, 直接用于试纸条检测。

表 9-2 红酒中真菌毒素添加水平

Table 9-2 Spiked levels of mycotoxins in red wine

真菌毒素	添加水平 μg/L
ZEN	0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0
T-2	0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0
AFB ₁	0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0
OTA	0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0

9.4 结论与分析

9.4.1 金纳米粒子的表征

一般认为 20~40 nm 粒径的金纳米粒子比较适合标记抗体。小于 10 nm 时, 抗体很难标记到金纳米粒子上, 而 40 nm 以上的金不够稳定^[207]。本实验所合成的金纳米粒子的可见光谱和电镜结果见图 9-2。从图 a 中可以看出, 金纳米粒子溶液的最大吸收峰在 528nm, 结合电镜结果分析, 其直径在 25 nm 左右。

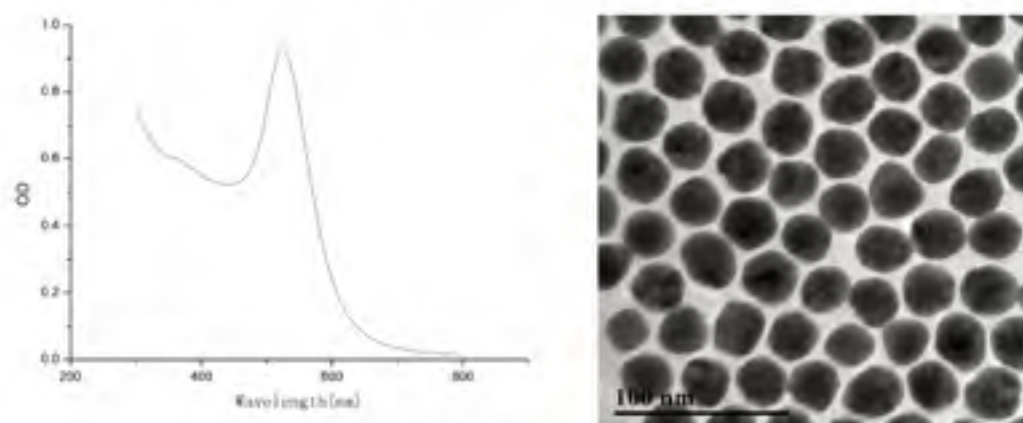


图 9-2 金纳米粒子的可见光扫描图 (a) 和透射电镜图 (b)

Fig. 9-2 Visible spectrum (a) and TEM image (b) of Au NP solution

9.4.2 标记抗体反应 pH 的优化

不同 pH 下的金标记抗体的稳定性如表 9-3 所示。通过观察胶体金聚集后产生的蓝色, 可以得出其最佳的标记 pH。AFB₁ 抗体的最佳标记 pH 为每毫升金溶液加入 0.1 M 的 K₂CO₃ 溶液 6 μL; 其他的抗体 (AFM₁、OTA、ZEN、DON 和 T-2) 的用量分别为每毫升金 8 μL、6 μL、8 μL、4 μL 和 2 μL。

表 9-3 不同 pH 下的金标抗体的稳定性

Table 9-3 Stability of gold labeled antibody under different pH

	0	2	4	6	8	10 μ L
AFB ₁ 5C3	+++	++	+	-	-	-
AFM ₁ H1	+++	++	+	+	-	-
OTA #6	++	++	+	-	-	-
ZEN #3	+++	+++	++	+	-	-
DON 8G2	++	+	-	-	-	-
T-2 8E6	+	-	-	-	-	-

+:表示蓝色强弱

9.4.3 标记抗体用量的优化

不同抗体标记量的稳定性如表 9-4 所示。从图中可以看出，随着抗体浓度的增加，T 线的颜色逐渐加深。颜色过深，会影响试纸条的林敏度；过浅，不利于结果的判别。通过肉眼观察对比，AFB₁、AFM₁、OTA、ZEN、DON 和 T-2 最佳抗体的浓度分别为：0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.2 mg/mL、0.05 mg/mL 和 0.1 mg/mL。

表 9-4 不同抗体用量 T 线强弱

Table 9-4 Intensity of T line at different antibody account

	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8 mg/mL
AFB ₁ 5C3	++	+++	+++	++++	++++
AFM ₁ H1	+	++	+++	+++	++++
OTA #6	+	+	++	+++	+++
ZEN #3	+	++	+++	+++	+++
DON 8G2	++	+++	+++	+++	++++
T-2 8E6	++	+++	+++	+++	++++

+:表示 T 线强弱

9.4.4 T 线包被浓度的优化

不同抗体标记量的稳定性如表 9-4 所示。从图中可以看出，随着包被抗原浓度的增加，T 线的颜色逐渐加深。包被浓度过高，其蛋白载体上的小分子含量升高，不利于待检测样品中自由小分子和抗体的竞争性结合。因此在颜色合适的范围内，选择较低的包被浓度。通过肉眼观察对比，AFB₁、AFM₁、OTA、ZEN、DON 和 T-2 最佳抗体的浓度分别为：0.2 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、0.5 mg/mL、0.1 mg/mL 和 0.1 mg/mL。

表 9-5 不同包被用量 T 线强弱

Table 9-5 Intensity of T line at different coating antigen concentration

	0.1	0.2	0.5	1	2 mg/mL
AFB ₁ 5C3	++	+++	+++	++++	++++
AFM ₁ H1	++	+++	+++	+++	++++
OTA #6	+	+	+++	+++	++++
ZEN #3	++	++	+++	+++	+++
T-2 8E6	+++	+++	+++	++++	++++
DON 8G2	+++	+++	++++	++++	++++

+:表示 T 线强弱

9.4.5 多重试纸条金标抗体用量优化

多重试纸条除了多条 T 线外, 金标抗体也需要几种同时加到金标垫上, 为保证金释放效果, 防止出现金标垫过载, 因此金标垫面积增加一倍。考虑到大量金标抗体可能对抗体释放造成影响, 进而影响 T 线显色, 因此对各金标抗体用量进行了优化。结果见表 9-6。从表中可以看出, 在金表抗体用量均为为 10 μL /条, 阴性显色值较为合适。

表 9-6 不同金标抗体的用量的 T 线显色强度

Table 9-6 Intensity of T line at different gold-labelled antibody account

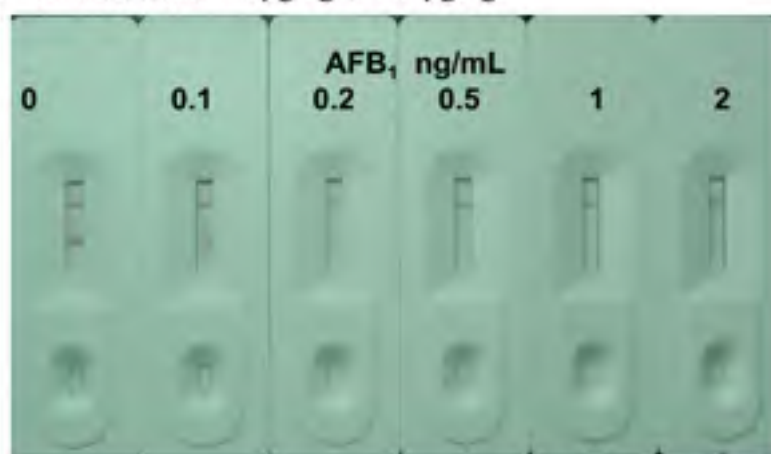
	5	10	15	μL
ZEN	+	+++	++++	
T-2	+	+++	++++	
AFB ₁	++	+++	+++	
OTA	+	+++	+++	

9.4.6 实际样品的检测

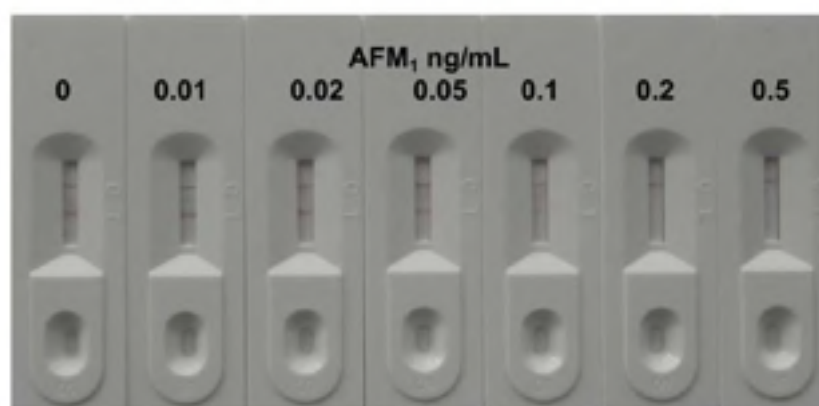
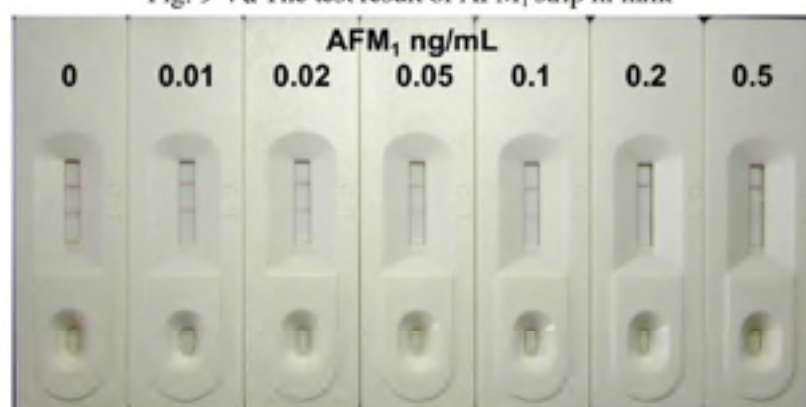
试纸条的最低检测限 LOD 定义为使 T 线颜色明显比空白时变弱的最低的检测物的浓度, 而 cut-off 值定义为 T 线完全消失时的最低检测物浓度^[210]。

9.4.5.1 AFB₁ 试纸条实际样品检测

面粉样品添加 AFB₁ 的试纸条检测结果如图 9-3 所示。从图中可以看出, AFB₁ 试纸条的 LOD 为 0.2 ng/mL, 而 cut-off 值为 0.5 ng/mL。考虑到前处理中的稀释倍数, 实际样品的 LOD 和 cut-off 值分别为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 3.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

图 8-3 AFB₁ 试纸条测定结果Fig. 8-3 The test result of AFB₁ strip9.4.5.2 AFM₁ 试纸条实际样品检测

牛奶和奶粉样品添加 AFM₁ 的试纸条检测结果如图 9-4a 和 b 所示。从图中可以看出, AFM₁ 试纸条的 LOD 为 0.1 ng/mL, 而 cut-off 值为 0.2 ng/mL。考虑到奶粉溶解的稀释倍数, 奶粉实际样品的 LOD 和 cut-off 值分别为 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

图 9-4 a AFM₁ 试纸条测定结果(牛奶)Fig. 9-4 a The test result of AFM₁ strip in milk图 9-4 b AFM₁ 试纸条测定结果(奶粉)Fig. 9-4 b The test result of AFM₁ strip in milk powder

9.4.5.3 OTA 试纸条实际样品检测

面粉样品添加 OTA 的试纸条检测结果如图 9-5 所示。从图中可以看出, OTA 试纸条的 LOD 为 0.2 ng/mL, 而 cut-off 值为 1.0 ng/mL。考虑到前处理中的稀释倍数, 实际样品的 LOD 和 cut-off 值分别为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

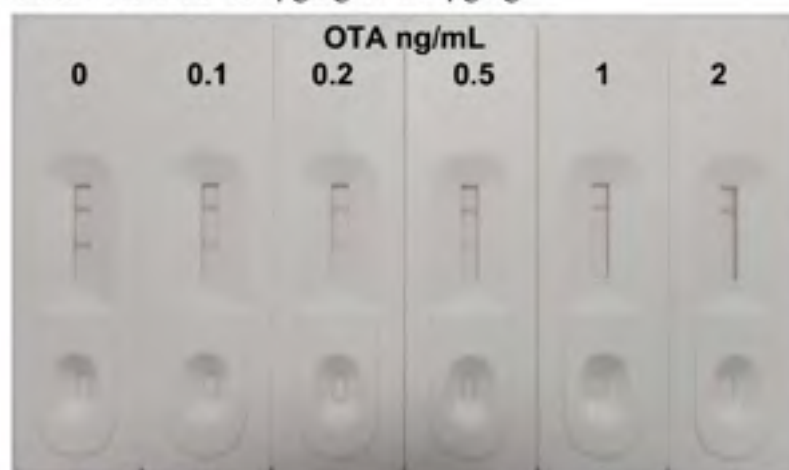


图 9-5 OTA 试纸条测定结果

Fig. 9-5 The test result of OTA strip

9.4.5.4 ZEN 试纸条实际样品检测

面粉样品添加 ZEN 的试纸条检测结果如图 9-6 所示。从图中可以看出, ZEN 试纸条的 LOD 为 1.0 ng/mL, 而 cut-off 值为 2.0 ng/mL。考虑到前处理中的稀释倍数, 实际样品的 LOD 和 cut-off 值分别为 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

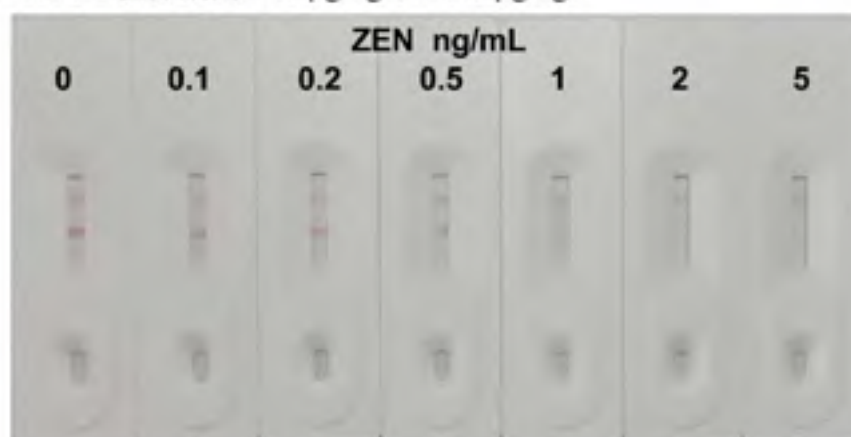


图 9-6 ZEN 试纸条测定结果

Fig. 9-6 The test result of ZEN strip

9.4.5.5 DON 试纸条实际样品检测

面粉样品添加 DON 的试纸条检测结果如图 9-7 所示。从图中可以看出, DON 试纸条的 LOD 为 50.0 ng/mL, 而 cut-off 值为 100.0 ng/mL。考虑到前处理中的稀释倍数, 实际样品的 LOD 和 cut-off 值分别为 375.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 750.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

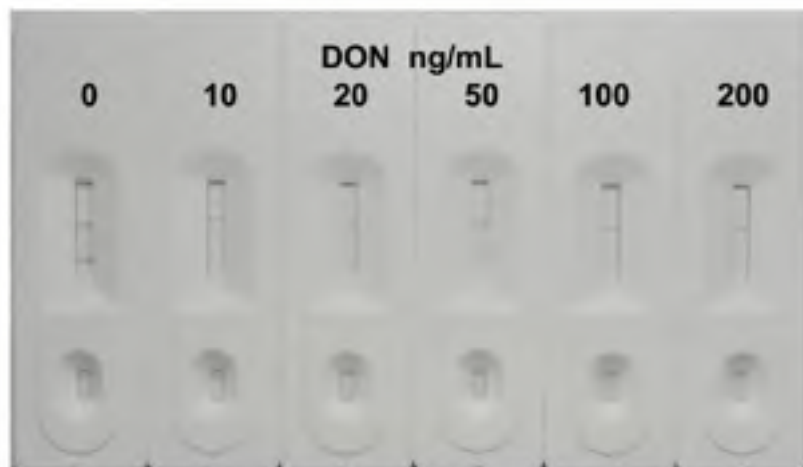


图 9-7 DON 试纸条测定结果

Fig. 9-7 The test result of DON strip

9.4.5.6 T-2 试纸条实际样品检测

面粉样品添加 T-2 的试纸条检测结果如图 9-8 所示。从图中可以看出, T-2 试纸条的 LOD 为 5.0 ng/mL, 而 cut-off 值为 10.0 ng/mL。考虑到前处理中的稀释倍数, 实际样品的 LOD 和 cut-off 值分别为 35.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 70.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

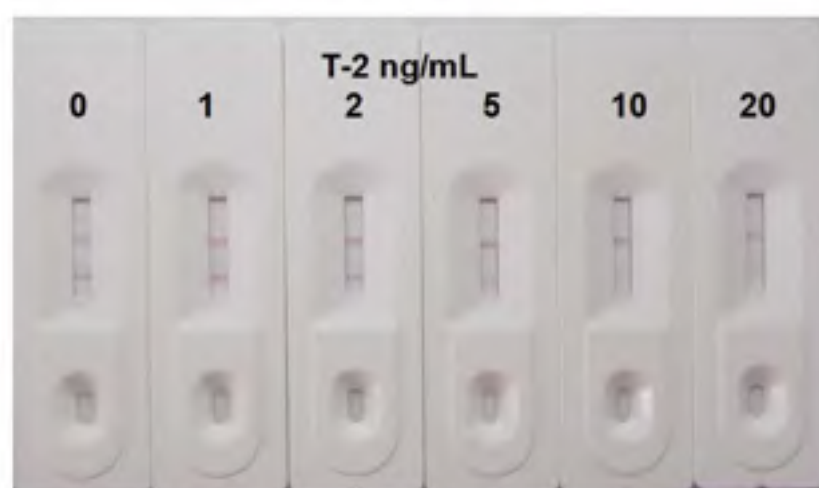


图 9-8 T-2 毒素试纸条测定结果

Fig. 9-8 The test result of T-2 toxin strip

9.4.5.7 多重试纸条实际样品检测

面粉样品添加 T-2 的试纸条检测结果如图 9-9 所示。从图中可以看出，多重试纸条对 ZEN、T-2、AFB₁ 和 OTA 的 LOD 分别为 2.0、16.0、1.0 和 2.0 ng/mL，cut-off 值分别为 4.0、32.0、2.0 和 4.0 ng/mL。考虑到前处理中的稀释倍数 5，实际样品的 LOD 和 cut-off 值分别为 10.0、80.0、5.0 和 10.0 μg/L，cut-off 值分别为 20、160、10 和 20 μg/L。与单目标检测试纸条相比，多重试纸条在灵敏度方面有所降低，主要是因为金标垫上同时加入四种金标抗体，造成浓度过高，干燥后释放不完全引起。因此需要进一步改善金释放情况。

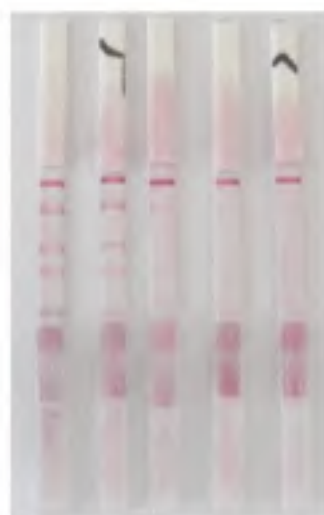


图 9-9 多重毒素试纸条测定结果

Fig. 9-9 The test result of multiplexed toxin strip

9.5 讨论

在制备胶体金溶液以及后边的抗体标记过程，应该特别注意所用容器的洁净，玻璃容器和磁力搅拌子最好用王水浸泡过夜后用纯水和超纯水冲洗干净使用，所用的水均为超纯水以免杂质引起金纳米粒子的聚集。在多重试纸条的制备过程中，由于同一金标垫上加入了四种不同的金标抗体，因此会造成浓度过高而因此释放效果不好，因此我们加大了金标垫的尺寸，同时对金标抗体的用量进行了优化，但抗体用量的增加会导致灵敏

度的下降,也是以后需要进一步优化和克服的地方。由于T线较多,因此需要调整各条线之间的距离,以便在硝酸纤维膜上进行多重T线的划膜;同时由于多条T线之间的距离已经超出了塑料卡壳的观察口范围,因此不适合使用塑料外壳,因此需要在微孔加样检测。

9.6 本章小结

1. 通过优化金纳米粒子标记抗体的最佳pH、最佳抗体浓度和T线包被浓度,组装了AFB₁、AFM₁、OTA、ZEN、DON和T-2的胶体金试纸条;
2. 通过样品添加和样品前处理,AFB₁试纸条的LOD为0.2 ng/mL,而cut-off值为0.5 ng/mL;AFM₁试纸条的LOD为0.1 ng/mL,而cut-off值为0.2 ng/mL;OTA试纸条的LOD为0.2 ng/mL,而cut-off值为1.0 ng/mL;ZEN试纸条的LOD为1.0 ng/mL,而cut-off值为2.0 ng/mL;DON试纸条的LOD为50.0 ng/mL,而cut-off值为100.0 ng/mL;T-2试纸条的LOD为5.0 ng/mL,而cut-off值为10.0 ng/mL;
3. 制备了4种真菌毒素(ZEN、T-2、AFB₁和OTA)多重试纸条,对ZEN、T-2、AFB₁和OTA的LOD分别为2.0、16.0、1.0和2.0 ng/mL,cut-off值分别为为4.0、32.0、2.0和4.0 ng/mL。

主要结论

1. 抗 AFB₁ 单克隆抗体的制备、鉴定与 ELISA 方法

制备的两株抗 AFB₁ 单抗 5C3 和 11A9 的 IC₅₀ 为 0.025 ng/mL 和 0.043 ng/mL, 亲和力分别为 4.2×10^9 L/mol 和 3.8×10^9 L/mol, B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的交叉分别为 35.36%、25.44%、3.64%、18.24% 和 74.15%、42.16%、23.64%、7.37%。对 ELISA 中抗原抗体使用浓度、标准品稀释液和反应时间做了优化。对阴性面粉样品进行了添加回收实验, 两种单抗的 ELISA 方法回收率在 84.7~116.7% 之间, 批内批间差异均小于 11%。

2. 抗 AFM₁ 单克隆抗体的制备、鉴定与 ELISA 方法

利用双抗原免疫策略制备的两株抗 AFM₁ 单抗 G3D9 和 H1 的 IC₅₀ 分别为 0.032 ng/mL 和 0.035 ng/mL, 亲和力分别为 1.28×10^9 L/mol 和 2.29×10^9 L/mol; G3D9 对 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的交叉分别为 60.14%、5.38%、28.12% 和 1% 以下, H1 对 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的交叉均小于 10%。对 ELISA 中抗原抗体使用浓度、标准品稀释液和反应时间做了优化。对阴性牛奶样品进行了添加回收实验, 两种单抗的 ELISA 方法回收率在 82.0%~115.4% 之间, 批内差异均小于 12%, 批间差异均小于 20%。

交叉为 28.6%。对 ELISA 中抗原抗体使用浓度、标准品稀释液和反应时间做了优化。对阴性面粉样品进行了添加回收实验。其 ELISA 方法回收率在 80.2~117.9% 之间, 批内差异均小于 7%, 批间差异小于 13%。

7. 绿色无毒黄曲霉毒素 B₁ 免疫检测方法的建立

通过酶解制备并纯化了 AFB₁ 抗体 F(ab')₂ 片段, 并进行非变性凝胶电泳鉴定; 通过免疫大白兔得到抗独特型抗体, 对其基本性质进行鉴定。抗独特型抗体同 AFB₁ 对 AFB₁ 单抗的抑制具有很高的相关性; 利用抗独特型抗体替代常规试剂盒中的 AFB₁ 标准品, 通过实际样品添加回收试验, 其回收率在 110%~130% 之间, 批内批间变异系数均小于 10%, 批间变异系数均小于 15%。

8. 适用于现场检测的真菌毒素胶体金试纸条的研制

通过优化条件, 制备了 AFB₁、AFM₁、OTA、ZEN、DON 和 T-2 的单目标检测的胶体金试纸条和 ZEN、T-2、AFB₁、OTA 的多重试纸条; AFB₁ 试纸条的 LOD 为 0.2 ng/mL, 而 cut-off 值为 0.5 ng/mL; AFM₁ 试纸条的 LOD 为 0.1 ng/mL, 而 cut-off 值为 0.2 ng/mL; OTA 试纸条的 LOD 为 0.2 ng/mL, 而 cut-off 值为 1 ng/mL; ZEN 试纸条的 LOD 为 1 ng/mL, 而 cut-off 值为 2 ng/mL; DON 试纸条的 LOD 为 50 ng/mL, 而 cut-off 值为 100 ng/mL; T-2 试纸条的 LOD 为 5 ng/mL, 而 cut-off 值为 10 ng/mL; 多重试纸条, 对 ZEN、T-2、AFB₁ 和 OTA 的 LOD 分别为 2、16、1 和 2 ng/mL, cut-off 值分别为 4、32、2 和 4 ng/mL。

论文创新点

1. 采用了双抗原免疫新策略，制备了针对 6 种真菌毒素的 8 株特异性强、灵敏度高的单克隆抗体细胞株，建立了无需使用真菌毒素标准品的无酶 ELISA 的免疫检测方法。

2. 制备了针对 6 种真菌毒素的高灵敏的胶体金试纸条，灵敏度均达到了 ppb 级，实现了真菌毒素的现场快速肉眼可视检测。

3. 采用了多重 T 线标记技术，制备了可以用于同时检测赭曲霉毒素、T-2、黄曲霉毒素和呕吐毒素的多重检测试纸条，实现真菌毒素的高灵敏高通量的现场快速筛查。

致 谢

岁月如梭，不知不觉已到而立之年。读书近二十四年，最辛苦、最多收获的莫过于在江南大学四年生涯。

本论文是在我的导师胥传来教授的精心指导下完成的，论文从选题、研究方案的设计、研究工作的开展到最后论文的撰写与审阅无不凝聚了导师胥传来教授的智慧与心血。在四年的博士学习和研究中，胥老师除了传授科学知识，还教会了我如何做人做事的学问，更培养和锻炼了我独立思考、独立工作的能力，以及实事求是的科学态度。导师严谨的治学态度、宽厚的胸怀以及真诚的人格魅力深深地感染着我，是我学习的榜样和楷模，必将对我今后的工作和生活产生深远的影响。在此，谨向导师致以最诚挚的感谢和崇高的敬意！

感谢实验室匡华、彭池方、徐丽广、马伟和宋珊珊老师在学习和生活上给予的指导与关照。感谢华安麦科生物技术公司柳家鹏董事长和尹丽梅给予的热情无私的帮助与支持！感谢江苏省进出口检验检疫局沈崇钰处长在实际样品方面给予的帮助和支持。

衷心地感谢实验室的刘丽强、邢常瑞、陈秀金和徐乃丰博士在实验上的指导和帮助。

真诚地感谢曾在实验室一起奋斗的师兄师姐们，他们是：陈伟、朱颖越、许宙等，感谢他们在日常生活和实验工作中对我的指导、鼓励和帮助。感谢实验室的严文静、吴晓玲、郝昌龙、林菲、刘薇波、赵媛、屈昌龙、马文蔚、勇倩倩、王文斌、尹玉云、郭端男、尹红红、彭娟、郭玲玲、管丹丹、孔娜、孔德昭、曹珊珊、陈燕妮、严会娟、彭双、余丽、赵森等师弟师妹们在实验和生活上带来的帮助和欢乐，给我的艰苦枯燥郁闷的实验生活带来了一抹灿烂的阳光。

感谢与我同级一起共同艰辛奋斗多年的食品 10 级博士班的所有的同学，还有相处了四年的室友程新峰博士，与你们一起走过了最艰难和最难忘的岁月！

特别感谢妻子张萍给予的关心、支持和鼓励，是你在我身后默默付出，支持陪伴了我走过诸多风风雨雨！

最后特别感谢我的父母亲对我三十年来的养育和教导之恩，是你们始终如一的关爱和理解激励着我顺利完成学业！

张勋

2014 年 5 月 25 日

参考文献

- [1] Binder E M, Tan L M, Chin L J, et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007,137(3-4):265-282.
- [2] Bryden W L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2012,173(1):134-158.
- [3] Park J W, Kim E K, Shon D H, et al. Natural co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2002,19(11):1073-1080.
- [4] Škrbić B, Živančev J, Đurišić-Mladenović N, et al. Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products[J]. *Food Control*, 2012,25(1):389-396.
- [5] Joanny J P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007,137(3-4):342-362.
- [6] Bullerman L B, Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007,119(1):140-146.
- [7] Khayoon W S, Saad B, Yan C B, et al. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up[J]. 2010,118(3):882-886.
- [8] 李为喜, 郑庆木, 武力, 等. 测定玉米中伏马毒素的免疫亲和层析净化高效液相色谱法[J]. *作物学报*, 2012,38(3):556-562.
- [9] 林纓, 冯建林, 陈佳, 等. GC-MSMS方法检测玉米中的T-2与HT-2毒素[J]. *分析化学*, 2009,37(1):555.
- [10] 彭康年, 王运兴. 液相色谱-串联质谱法测定动物肝脏中黄曲霉毒素[J]. *分析科学学报*, 2012,28(3):303-307.
- [11] Rossi C N, Takabayashi C R, Ono M A, et al. Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed[J]. 2012,132(4):2211-2216.
- [12] Barna-Vetró I, Solti L, Téren J, et al. Sensitive ELISA Test for Determination of Ochratoxin A[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996,44(12):4071-4074.
- [13] Kolosova A Y, De Saeger S, Sibanda L, et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007,389(7):2103-2107.
- [14] Uchigashima M, Saigusa M, Yamashita H, et al. Development of a Novel Immunoaffinity Column for Aflatoxin Analysis Using an Organic Solvent-Tolerant Monoclonal Antibody[J]. 2009,57(19):8728-8734.
- [15] 李军, 十一茫, 田苗, 等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素A[J]. *色谱*, 2006,24(6):581-584.
- [16] 葛宝坤, 赵孔祥, 王伟, 等. 免疫亲和柱净化-液相色谱-串联质谱法测定中药材中的14种真菌毒素[J]. *色谱*, 2011,29(6):495-500.
- [17] Reddy K R N, Raghavender C R, Salleh B, et al. Potential of aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* strains on commercially important food grains[J]. *International journal of food science & technology*, 2011,46(1):161-165.
- [18] 任鹏程, 李荣涛, 谢刚, 等. 稻谷真菌毒素污染调查与分析[J]. *粮食储藏*, 2004,33(4):49-51.
- [19] 杨琳. 粮谷中的黄曲霉毒素(B1、B2、G1、G2)和赭曲霉毒素A联合检测研究[D]. 西南大学食品科学, 2011.
- [20] 曹魁, 孙利, 土明林, 等. 粮谷中8种痕量真菌毒素的定量分析方法[J]. *分析测试学报*, 2013,32(2):150-155.
- [21] Santini A, Raiola A, Ferrantelli V, et al. Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy)[J]. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2013,6(3):181-186.
- [22] Prandini A, Tansini G, Sigolo S, et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009,47(5):984-991.
- [23] 马良. 黄曲霉毒素B₁的高灵敏度检测技术研究[D]. 中国农业科学院农产品质量与食品安全, 2007.
- [24] Ghali R, Hmaissia-Khlifa K, Ghorbel H, et al. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods[J]. *Food Control*, 2008,19(9):921-924.
- [25] Humans I W G O, Organization W H, Cancer I A F R. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene[M]. World Health Organization, 2002.

- [26] 中华人民共和国卫生部. 食品中真菌毒素限量. 食品安全国家标准GB 2761-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [27] Castillo-Urueta P, Carvajal M, Méndez I, et al. Survey of aflatoxins in maize tortillas from Mexico City[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2011,4(1):42-51.
- [28] Abbas M, Asi M R, Anwar F, et al. Assessment of aflatoxins in peanuts grown in the Pothohar area of Pakistan[J]. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2013:1-5.
- [29] Barrett J R. Liver cancer and aflatoxin: New information from the Kenyan outbreak[J]. *Environmental health perspectives*, 2005,113(12):A837.
- [30] 高秀芬, 尚士安, 张宏元, 等. 中国部分地区玉米中4种黄曲霉毒素污染调查[J]. 卫生研究: JOURNAL OF HYGIENE RESEARCH, 2011,40(1):46-49.
- [31] 李凤琴, 于制制, 邵兵, 等. 2007-2008年中国谷物中隐藻类脱氧雪腐镰刀菌烯醇及多组分真菌毒素污染状况[J]. 中华预防医学杂志, 2011,45(1):57-63.
- [32] Aygun O, Essiz D, Durmaz H, et al. Aflatoxin M1 Levels in Surk Samples, a Traditional Turkish Cheese from Southern Turkey[J]. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2009,83(2):164-167.
- [33] Iqbal S Z, Asi M R. Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan[J]. *Food Control*, 2012.
- [34] Fallah A A, Jafari T, Fallah A, et al. Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese[J]. *Food and chemical toxicology*, 2009,47(8):1872-1875.
- [35] Oliveira C P D, Soares N D F F, Oliveira T V D, et al. Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil[J]. *Food Control*, 2013,30(1):90-92.
- [36] 蒙牛被检出黄曲霉毒素M1超标[J]. 中国防伪报道, 2012(2):8.
- [37] Zheng N, Wang J, Han R, et al. Survey of aflatoxin M1 in raw milk in the five provinces of China[J]. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2013,6(2):110-115.
- [38] Ma W, Yin H, Xu L, et al. Femtomole ultrasensitive aptasensor for the detection of Ochratoxin A[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012.
- [39] 张新国. 高效液相色谱法检测小麦和啤酒样品中赭曲霉毒素A的方法研究[D]. 河北医科大学, 2007.
- [40] Ariño A, Herrera M, Estopañan G, et al. High levels of ochratoxin A in licorice and derived products[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007,114(3):366-369.
- [41] Pitt J I. Toxicogenic fungi: which are important?[J]. *Medical mycology*, 2000,38(s1):17-22.
- [42] Castegnare M, Canadas D, Vrabcheva T, et al. Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers[J]. *Molecular nutrition & food research*, 2006,50(6):519-529.
- [43] Pfohl-Leszkowicz A, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky I N, et al. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins[J]. *Food additives & contaminants*, 2002,19(3):282-302.
- [44] Bayman P, Baker J L. Ochratoxins: a global perspective[J]. *Mycopathologia*, 2006,162(3):215-223.
- [45] Cao J, Zhou S, Korg W, et al. Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in ginger and LC-MS/MS confirmation[J]. *Food Control*, 2013,35(2):337-343.
- [46] Commission E. Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1831/2003 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A[J]. *Off. J. Eur. Union*, 2010,35:7-8.
- [47] Battilani P, Magan N, Logrieco A. European research on ochratoxin A in grapes and wine[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006,111, Supplement 1(0):S2-S4.
- [48] Valero A, Marín S, Ramos A J, et al. Survey: Ochratoxin A in European special wines[J]. *Food Chemistry*, 2008,108(2):593-599.
- [49] 李培宁. 河北省不同地区粮食赭曲霉毒素A污染情况及OA致细胞损伤作用的研究[D]. 河北医科大学病理学与病理生理学, 2007.
- [50] 仝鹏程, 李荣涛, 谢刚, 等. 稻谷真菌毒素污染调查与分析[J]. 粮食储藏, 2004,33(4):49-51.
- [51] Vecchio A, Mineo V, Planeta D. Ochratoxin A in instant coffee in Italy[J]. *Food Control*, 2012,28(2):220-223.
- [52] de Magalhães J T, Sodrè G A, Viscogliosi H, et al. Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans[J]. *Food Control*, 2011,22(5):744-748.
- [53] Reverberi M, Ricelli A, Zjalic S, et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010,87(3):899-911.
- [54] 罗小虎. 高效液相色谱法测定玉米赤霉烯酮的方法研究[D]. 西华大学, 2009.
- [55] Zinedine A, Soriano J M, Molto J C, et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin[J]. *Food and chemical*

toxicology, 2007,45(1):1-18.

[56] 姜淑贞, 杨维仁, 杨在宾. 玉米赤霉烯酮的代谢、毒性及其预防措施[J]. 动物营养学报, 2011,23(2):196-202.

[57] Yu Z, Zhang L, Wu D, et al. Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2005,62(3):441-446.

[58] Ahamed S, Foster J S, Bukovsky A, et al. Signal transduction through the ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone - induced cell - cycle progression in MCF - 7 cells[J]. Molecular carcinogenesis, 2001,30(2):88-98.

[59] Zaied C, Zouaoui N, Bacha H, et al. Natural occurrence of zearalenone in Tunisian wheat grains[J]. Food Control, 2012,25(2):773-777.

[60] Pleadin J, Sokolović M, Peršić N, et al. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia[J]. Food Control, 2012,28(1):94-98.

[61] Li R, Wang X, Zhou T, et al. Occurrence of four mycotoxins in cereal and oil products in Yangtze Delta region of China and their food safety risks[J]. Food Control, 2014,35(1):117-122.

[62] Ji F, Xu J, Liu X, et al. Natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in wheat from Jiangsu province, China[J]. Food Chemistry, 2014,157(0):393-397.

[63] Pestka J J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks[J]. Animal Feed Science and Technology, 2007,137(3-4):283-298.

[64] Wei R D, Chu F S. Instability of some trichothecenes in methanol.[J]. Journal - Association of Official Analytical Chemists, 1985,69(5):902-903.

[65] Bretz M, Beyer M, Cramer B, et al. Thermal degradation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2006,54(17):6445-6451.

[66] Kushiro M. Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat[J]. International journal of molecular sciences, 2008,9(11):2127-2145.

[67] Pestka J J, Smolinski A T. Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2005,8(1):39-69.

[68] Forsell J H, Jensen R, Tai J, et al. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse[J]. Food and chemical toxicology, 1987,25(2):155-162.

[69] Uzarski R L, Islam Z, Pestka J J. Potentiation of trichothecene-induced leukocyte cytotoxicity and apoptosis by TNF- α and Fas activation[J]. Chemico-biological interactions, 2003,146(2):105-119.

[70] Zhou H, Islam Z, Pestka J J. Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol[J]. Toxicological Sciences, 2005,87(1):113-122.

[71] Pestka J J, Uzarski R L, Islam Z. Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes[J]. Toxicology, 2005,206(2):207-219.

[72] Kadota T, Furusawa H, Hirano S, et al. Comparative study of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol on intestinal transport and IL-8 secretion in the human cell line Caco-2[J]. Toxicology in Vitro, 2013,27(6):1888-1895.

[73] Bensassi F, Zaied C, Abid S, et al. Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia[J]. Food Control, 2010,21(3):281-285.

[74] Silveiras Dos Santos J, Souza T M, Ono E Y S, et al. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products[J]. Food Chemistry, 2013,138(1):90-95.

[75] Mishra S, Ansari K M, Dwivedi P D, et al. Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population[J]. Food Control, 2013,30(2):549-555.

[76] Larsen J C, Hunt J, Perrin I, et al. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report[J]. Toxicology Letters, 2004,153(1):1-22.

[77] Sudaćin D L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health[J]. Toxicology letters, 2003,143(2):97-107.

[78] 杨凌宸, 赵志勇, 周振雷, 等. T-2毒素的理化特性及其对家禽的毒害作用[J]. 畜牧与兽医, 2013,45(4):101-104.

[79] Pestka J J, Zhou H, Moon Y, et al. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox[J]. Toxicology letters, 2004,153(1):61-73.

[80] 张薇. 抗 T-2 毒素单链抗体的制备及该毒素对细胞毒性影响的初步研究 [D][D]. 福建农林大学, 2010.

[81] Canada R A, Coker R D, Egan S K, et al. T-2 and HT-2 toxins[J]. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO Food Additives Series, 2001,17:557-652.

[82] Weidner M, Welsch T, Hübner F, et al. Identification and Apoptotic Potential of T-2 Toxin

- Metabolites in Human Cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012,60(22):5676-5684.
- [83] 中华人民共和国农业部. 配合饲料中T-2毒素 的允许量. 中华人民共和国国家标准.GB21693-2008 [Z]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [84] Schothorst R C, van Egmond H P. Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states": Subtask: trichothecenes[J]. *Toxicology Letters*, 2004,153(1):133-143.
- [85] 冯杰, 曹艳红, 王绍举, 等. 黑龙江省市售粮食T-2毒素检测与分析[J]. 中国地方病学杂志; CHINESE JOURNAL OF ENDEMIOLOGY, 2004,23(6):560-561.
- [86] 付莹, 孟凡刚, 邓佳云, 等. 2008年四川省阿坝州大骨节病相对活跃病区链及T-2毒素水平调查[J]. 中国地方病学杂志; CHINESE JOURNAL OF ENDEMIOLOGY, 2010,29(3):325-329.
- [87] Zhu Z, Liu G, Chen Y, et al. Assessment of aflatoxins in pigmented rice using a validated immunoaffinity column method with fluorescence HPLC[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013,31(2):252-258.
- [88] Afsah-Ejri L, Jinap S, Arzandeh S, et al. Optimization of HPLC conditions for quantitative analysis of aflatoxins in contaminated peanut[J]. *Food Control*, 2011,22(3-4):381-388.
- [89] Fu Z, Huang X, Min S. Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008,1209(1-2):271-274.
- [90] Wang Y, Liu X, Xiao C, et al. HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB[J]. *Food Control*, 2012,28(1):131-134.
- [91] Cavaliere C, Foglia P, Pastorini E, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk: Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006,1101(1-2):69-78.
- [92] Yang L, Wang L, Fan J, et al. Determination of ochratoxin A in traditional Chinese medicinal plants by HPLC-FLD[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2010,27(7):989-997.
- [93] Afsah-Ejri L, Jinap S, Mirhosseini H. Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions[J]. *Food Control*, 2012,23(1):113-119.
- [94] Arroyo-Manzanares N, Gámiz-Gracia L, García-Campaña A M. Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction[J]. *Food Chemistry*, 2012,135(2):358-372.
- [95] De Girolamo A, McKeague M, Miller J D, et al. Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column[J]. *Food Chemistry*, 2011,127(3):1378-1384.
- [96] Rahmani A, Jinap S, Khatib A, et al. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in cereals using a validated RP-HPLC method and PHRED derivatization system[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2013,36(5):600-617.
- [97] Soleimany F, Jinap S, Rahmani A, et al. Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC- β DA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system[J]. *Food Additives and Contaminants*. 2011,28(4):494-501.
- [98] Zhang X, Liu W, Logrieco A F, et al. Determination of zearalenone in traditional Chinese medicinal plants and related products by HPLC-FLD[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2011,28(7):885-893.
- [99] 孟娟, 朱晶, 张楠, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测粮食及其制品中的玉米赤霉烯酮类真菌毒素[J]. 色谱, 2010,28(6):601-607.
- [100] Antep H M, Merdivan M. Development of new dispersive liquid-liquid microextraction technique for the identification of zearalenone in beer[J]. *Analytical Methods*, 2012,4(12):4129-4134.
- [101] Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2010,27(12):1683-1693.
- [102] Cunha S C, Fernandes J O. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for determination of deoxynivalenol and its metabolites in human urine[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012,50(3-4):1019-1025.
- [103] Brenn-Struckhoffova Z, Cichna-Markl M, Böhm C, et al. Selective Sample Cleanup by Reusable Sol-Gel Immunoaffinity Columns for Determination of Deoxynivalenol in Food and Feed Samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2006,79(2):710-717.
- [104] Klötzel M, Schmidt S, Lauber U, et al. Comparison of Different Clean-Up Procedures for the Analysis of Deoxynivalenol in Cereal-Based Food and Validation of a Reliable HPLC Method[J]. *Chromatographia*, 2005,62(1-2):41-48.
- [105] Visconti A, Lattanzio V M T, Pascale M, et al. Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Journal of*

- chromatography A, 2005,1075(1):151-158.
- [106] Lippolis V, Pascale M, Maragos C M, et al. Improvement of detection sensitivity of T-2 and HT-2 toxins using different fluorescent labeling reagents by high-performance liquid chromatography[J]. *Talanta*, 2008,74(5):1476-1483.
- [107] 林纛, 陈佳, 吴弼东, 等. 固相萃取-气相色谱-串联质谱法检测粮食作物中的 T-2 与 HT-2 毒素[J]. *军事医学 ISTIC*, 2013,37(5).
- [108] 林纛, 冯建林, 陈佳, 等. GC-MSMS方法检测玉米中的T-2与HT-2毒素[J]. *分析化学*, 2009,37(z1):555.
- [109] Bennett J W, Klich M. Mycotoxins[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003,16(3):497-516.
- [110] Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, et al. Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006,20(9):1422-1428.
- [111] 郑翠梅. 高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法同时测定粮食中13种真菌毒素[D]. 山东农业大学植物病理学, 2012.
- [112] 葛宝坤, 赵孔祥, 王伟, 等. 免疫亲和柱净化-液相色谱-串联质谱法测定中药材中的14种真菌毒素[J]. *色谱*, 2011,29(6):495-500.
- [113] Turner N W, Subrahmanyam S, Piletsky S A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009,632(2):168-180.
- [114] Köppen R, Koch M, Siegel D, et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010,86(6):1595-1612.
- [115] Berthaller 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.
- [116] Şenyuva H Z, Gilbert J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review[J]. *Journal of Chromatography B*, 2010,878(2):115-132.
- [117] Li P, Zhang Q, Zhang W, et al. Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut[J]. 2009,115(1):313-317.
- [118] Zhang D, Li P, Zhang Q, et al. Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure[J]. 2009,636(1):63-69.
- [119] Jiang W, Wang Z, Nöke G, et al. Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in Food Matrices by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay[J]. 2012:1-8.
- [120] Acharya D, Dhar T K. A novel broad-specific noncompetitive immunoassay and its application in the determination of total aflatoxins[J]. *Analytica chimica acta*, 2008,630(1):82-90.
- [121] Zhang D, Li P, Yang Y, et al. A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B1[J]. 2011,85(1):736-742.
- [122] Moon J, Kim G, Lee S. A gold nanoparticle and aflatoxin B1-BSA conjugates based lateral flow assay method for the analysis of aflatoxin B1[J]. *Materials*, 2012,5(4):634-643.
- [123] Anfossi L, D'Areo G, Calderara M, et al. Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2011,28(2):226-234.
- [124] Wang J J, Liu B H, Hsu Y T, et al. Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M1 in milk[J]. *Food Control*, 2011,22(6):964-969.
- [125] Pei S C, Zhang Y Y, Eremin S A, et al. Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies[J]. *Food Control*, 2009,20(12):1080-1085.
- [126] Guan D, Li P, Zhang Q, et al. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk and infant milk products[J]. *Food Chemistry*, 2011,125(4):1359-1364.
- [127] Vdovenko M M, Lu C, Yu F, et al. Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin M1 in milk[J]. *Food Chemistry*, 2014,158:310-314.
- [128] Zhang D H, Li P W, Zhang Q, et al. Extract-free immunochromatographic assay for on-site tests of aflatoxin M1 in milk[J]. *Analytical Methods*, 2012,4(10):3307-3313.
- [129] Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, et al. Optimization of a lateral flow immunoassay for the ultrasensitive detection of aflatoxin M1 in milk[J]. *Analytica chimica acta*, 2013,772:75-80.
- [130] Zhang X, Liu L, Chen X, et al. Immunochromatographic strip development for ultrasensitive analysis of aflatoxin M1[J]. *Analytical Methods*, 2013.
- [131] Yu F, Vdovenko M M, Wang J, et al. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays with Chemiluminescent and Colorimetric Detection for the Determination of Ochratoxin A in Food[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011,59(3):809-813.

- [132] Zhang A, Ma Y, Feng L, et al. Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China[J]. Food Control, 2011,22(11):1723-1728.
- [133] Cho Y, Lee D, Kim D, et al. Production of a Monoclonal Antibody against Ochratoxin A and Its Application to Immunochromatographic Assay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005,53(22):8447-8451.
- [134] Lai W, Fung D Y, Yang X, et al. Development of a colloidal gold strip for rapid detection of ochratoxin A with mimotope peptide[J]. Food Control, 2009,20(9):791-795.
- [135] Urusov A E, Kostenko S N, Sveshnikov P G, et al. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2011,66(8):770-776.
- [136] He Q, Xu Y, Huang Y, et al. Phage-displayed peptides that mimic zearalenone and its application in immunoassay[J]. Food chemistry, 2011,126(3):1312-1315.
- [137] Pei S, Lee W, Zhang G, et al. Development of anti-zearalenone monoclonal antibody and detection of zearalenone in corn products from China by ELISA[J]. Food Control, 2013,31(1):65-70.
- [138] Gao Y, Yang M, Peng C, et al. Preparation of highly specific anti-zearalenone antibodies by using the cationic protein conjugate and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Analyst, 2012,137(1):229-236.
- [139] Liu G, Han Z, Nie D, et al. Rapid and sensitive quantitation of zearalenone in food and feed by lateral flow immunoassay[J]. Food Control, 2012,27(1):200-205.
- [140] Wang Y K, Shi Y B, Zou Q, et al. Development of a Rapid and Simultaneous Immunochromatographic Assay for the Determination of Zearalenone and Fumonisin B1 in Corn, Wheat and Feedstuff Samples[J]. Food Control, 2012.
- [141] Thongrussamee T, Kuzmina N S, Shim W, et al. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in cereals[J]. Food Additives and Contaminants, 2008,25(8) 997-1006.
- [142] Maragos C M, McCormick S P. Monoclonal Antibodies for the Mycotoxins Deoxynivalenol and 3-Acetyl-Deoxynivalenol[J]. Food and Agricultural Immunology, 2000,12(3):181-192.
- [143] Sinha R C, Savard M E, Lau R. Production of monoclonal antibodies for the specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995,43(6) 1740-1744.
- [144] Grove J F, McAlees A J, Taylor A. Preparation of 10-g quantities of 15-O-acetyl-4-deoxynivalenol.[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1988,53(16):3860-3862.
- [145] Casale W L, Pesika J J, Hart L P. Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogs[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988,36(3):663-668.
- [146] Schneider L, Pichler H, Krska R. An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies[J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2000,367(1):98-100.
- [147] 何庆华, 许杨, 刘仁荣, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇ELISA定量检测试剂盒的研制[J]. 食品与发酵工业, 2008,34(12):160-162.
- [148] Ji F, Li H, Xu J, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol (DON)[J]. Toxins, 2011,3(8):968-978.
- [149] Li Y, Shi W, Shen J, et al. Development of a rapid competitive indirect ELISA procedure for the determination of deoxynivalenol in cereals[J]. Food and Agricultural Immunology, 2012,23(1):41-49.
- [150] Kolosova A Y, Sibanda L, Dumoulin F, et al. Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges[J]. Analytica chimica acta, 2008,616(2):235-244.
- [151] Liu J, Zanardi S, Powers S, et al. Development and practical application in the cereal food industry of a rapid and quantitative lateral flow immunoassay for deoxynivalenol[J]. Food Control, 2012,26(1):88-91.
- [152] Pal A, Acharya D, Saha D, et al. Development of a Membrane-Based Immunofiltration Assay for the Detection of T-2 Toxin[J]. Analytical Chemistry, 2004,76(14):4237-4240.
- [153] Li Y, Zhang Y, Shi W, et al. Determination of T-2 Toxin and HT-2 Toxin in Milk: A Comparison of Three Formats of Immunoassays[J]. Analytical Letters, 2012,45(16):2425-2435.
- [154] Molinelli A, Grussalber K, Führer M, et al. Development of Qualitative and Semiquantitative Immunoassay-Based Rapid Strip Tests for the Detection of T-2 Toxin in Wheat and Oat[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008,56(8):2589-2594.
- [155] Wu S, Duan N, Ma X, et al. Multiplexed fluorescence resonance energy transfer aptase/sor between upconversion nanoparticles and graphene oxide for the simultaneous determination of mycotoxins[J]. Analytical chemistry, 2012,84(14):6263-6270.
- [156] Saha D, Acharya D, Roy D, et al. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin

- B1 and ochratoxin A in chili samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007,584(2):343-349.
- [157] Wang Y, Liu N, Ning B, et al. Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012,34(1):44-50.
- [158] Goryacheva I Y, De Saeger S, Delmulle B, et al. Simultaneous non-instrumental detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using a clean-up tandem immunoassay column[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007,590(1):118-124.
- [159] Lattanzio V M T, Nivarlet N, Lippolis V, et al. Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of *Fusarium* mycotoxins in cereals[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012,718(0):99-108.
- [160] Zhang X, Feng M, Liu L, et al. Detection of aflatoxins in tea samples based on a class-specific monoclonal antibody[J]. 2013,48(6):1269-1274.
- [161] Devi K T, Mayo M A, Reddy K L N, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B1[J]. 1999,29(5):284-288.
- [162] Chu F S, Ueno I. Production of antibody against aflatoxin B1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977,33(5):1125-1128.
- [163] 江斌, 熊勇华, 许杨, 等. EDC 法制备黄曲霉毒素 B1 人工抗原的研究[J]. *食品科学*, 2005,26(7):125-128.
- [164] 陈耀生, 李根久. 黄曲霉毒素 B1 抗原的构建[J]. *卫生研究*, 1998,27:133-137.
- [165] Liu F, Lou Y, Shi X, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody specific for copper-chelate complex[J]. *Journal of Immunological Methods*. 2013,387(1-2):228-236.
- [166] Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. *Journal of immunological methods*, 1987,100(1):173-179.
- [167] 孙凤霞. 三聚氰胺单克隆抗体制备及其高灵敏快速检测技术研究[D]. 江南大学, 2011.
- [168] Tekinçca K K, Uçar G. Aflatoxin M1 levels in butter and cream cheese consumed in Turkey[J]. *Food Control*, 2008,19(1):27-30.
- [169] Kav K, Col R, Kaan Tekinsen K. Detection of aflatoxin M1 levels by ELISA in white-brined Urfa cheese consumed in Turkey[J]. *Food Control*. 2011,22(12):1883-1886.
- [170] Prado G, Oliveira M S, Lima A S, et al. Occurrence of aflatoxin M1 in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil[J]. *Ciência e Agrotecnologia*. 2008,32(6):1906-1911.
- [171] 熊江林, 王艳明, 刘建新. 牛奶中黄曲霉毒素M1的来源和控制途径[J]. *中国畜牧杂志*, 2012,48(23):82-87.
- [172] GB. 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量 [S][D]., 2011.
- [173] 吕飞, 钟伟龙, 朱惠康, 等. LC-MS/MS测定猪尿中的黄曲霉毒素M1[J]. *中国兽医杂志*, 2012,48(1):60-62.
- [174] 柳洁, 柯培英. 高效液相色谱法测定食品中黄曲霉毒素的方法研究[J]. *现代预防医学*, 2002,29(2):137-140.
- [175] Kim E K, Shen D H, Ryu D, et al. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2000,17(1):59-64.
- [176] Amézqueta S, González-Peñas E, Murillo-Arbizu M, et al. Ochratoxin A decontamination: A review[J]. *Food Control*, 2009,20(4):326-333.
- [177] 李凤琴, 计融. 赭曲霉毒素A与人类健康关系研究进展[J]. *卫生研究*, 2003,32(2):172-175.
- [178] Mateo R, Medina Á, Mateo E M, et al. An overview of ochratoxin A in beer and wine[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007,119(1-2):79-83.
- [179] 李增宁, 杨惠霞, 张祥宏, 等. 河北省食管癌、胃癌高发区居民食用小麦赭曲霉毒素A污染情况分析[J]. *卫生研究*, 2006,35(6):754-755.
- [180] 陈雪岚, 许杨, 吴成钢. 赭曲霉毒素A的酶联免疫检测——I. 抗原的制备[J]. *卫生研究*, 2002,31(1):53-54, 封4.
- [181] Zlu H P, Liu T T, Liu B, et al. Antigens synthesis and antibodies preparation for furazolidone and its metabolite 3-amino-2-oxazolidinone[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2010,21(9):1049-1052.
- [182] Sheng W, Yang L, Wang J, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of gentamycin residues in animal-derived foods[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013,50(1):204-209.
- [183] Chu F S, Chang F C, Hinsdill R D. Production of antibody against ochratoxin A[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976,31(5):831.
- [184] Thirumala-Devi K, Mayo M A, Gopal R, et al. Production of Polyclonal Antibodies against Ochratoxin A and Its Detection in Chilies by ELISA[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000,48(10):5079-5082.
- [185] Liu B, Tsao Z, Wang J, et al. Development of a Monoclonal Antibody against Ochratoxin A and Its Application in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Gold Nanoparticle Immunochromatographic

- Strip[J]. *Analytical Chemistry*, 2008,80(18):7029-7035.
- [186] Xiao H, Clarke J R, Marquardt R R, et al. Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1995,43(8):2092-2097.
- [187] D Thouvenot R M. Radioimmunoassay for zearalenone and zearalanol in human serum: production, properties, and use of porcine antibodies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983,45 (1):16-23.
- [188] Li Z, Song S, Xu L, et al. Development of an Ultrasensitive Immunoassay for Detecting Tartrazine[J]. *Sensors*, 2013,13(7):8155-8169.
- [189] Lu Y, Peterson J R, Gooding J J, et al. Development of sensitive direct and indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for monitoring bisphenol-A in canned foods and beverages[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012,403(6):1607-1618.
- [190] 唐宁. 玉米赤霉烯酮单抗的制备及初步应用[D]. 扬州大学临床兽医学, 2009.
- [191] 蔡芳, 李华, 陈怀谷, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 人工抗原及多克隆抗体的研制[J]. *江苏农业学报*, 2008,24(4):419-424.
- [192] 邓舜洲, 游淑珠, 许扬. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇人工抗原的研制[J]. *食品科学*, 2007,28(2):149-152.
- [193] 王海彬, 李培武, 张奇, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫分析核心试剂特异性单克隆抗体的研制与特性研究[J]. *化学试剂*, 2012,34(9):771-776.
- [194] 邓舜洲, 何庆华, 章英, 等. 竞争间接ELISA检测饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮[J]. *江西农业大学学报*, 2006,28(2):289-292.
- [195] Xu Y, Huang Z, He Q, et al. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of deoxynivalenol in wheat and maize[J]. *Food Chemistry*, 2010,119(2):834-839.
- [196] Bircan C. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC[J]. 2005,40(9):929-934.
- [197] Rodríguez-Cervantes C H, Ramos A J, Robledo-Marengo M L, et al. Determination of aflatoxin and fumonisin levels through ELISA and HPLC, on tilapia feed in Nayarit, Mexico[J]. 2012(ahead-of-print):1-10.
- [198] Jerne N K. Towards the network theory of the immune system[J]. *Ann. Immunol.(Inst. Pasteur)*. 1974,125:373-389.
- [199] Guan D, Li P, Cui Y, et al. A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M1 in milk[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011,703(1):64-69.
- [200] Ngori B, Guc Y, Wang X, et al. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010,397(3):1113-1135.
- [201] Schubert-Ullrich P, Rudolf J, Ansari P, et al. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2009,395(1):69-81.
- [202] Gui W, Wang S, Guo Y, et al. Development of a one-step strip for the detection of triazopiridines residues in environmental samples[J]. *Analytical biochemistry*, 2008,377(2):202-208.
- [203] Zhang G P, Wang X N, Yang J F, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist clenbuterol residues[J]. *Journal of immunological methods*, 2006,312(1):27-33.
- [204] Verheijen R, Osswald I K, Dietrich R, et al. Development of a one step strip test for the detection of (dihydro) streptomycin residues in raw milk[J]. *Food and agricultural immunology*, 2000,12(1):31-40.
- [205] Cvak B, Pum D, Molinelli A, et al. Synthesis and characterization of colloidal gold particles as labels for antibodies as used in lateral flow devices[J]. *Analyst*, 2012,137(8):1882-1887.
- [206] Kuang H, Chen W, Yan W, et al. Crown ether assembly of gold nanoparticles: melamine sensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011,26(5):2032-2037.
- [207] Christopher P, Robinson N, Shaw M K. Antibody-label conjugates in lateral-flow assays[M]//*Drugs of Abuse*. Springer, 2005:87-98.
- [208] Xing C, Feng M, Hao C, et al. Visual Sensor for the Detection of Trace Cu (II) Ions using an Immunochromatographic Strip[J]. *Immunological investigations*, 2013,42(3):221-234.
- [209] Xing C, Hao C, Liu L, et al. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for copper (II) determination in drinking water[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2013(ahead-of-print):1-11.
- [210] Li X, Li P, Zhang Q, et al. Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in agro-food[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013,49(0):426-432.

附 录: 作者在攻读博士学位期间发表的论文与专利

发表文章:

1. Xun Zhang, Min Feng, Liqiang Liu, Changrui Xing, Hua Kuang, Chianfang Peng, Libing Wang and Chuanlai Xu. Detection of aflatoxins in tea samples based on a class - specific monoclonal antibody[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 48(6): 1269-1274. (与第 2 章有关, IF 1.24)

2. Xun Zhang, Liqiang Liu, Xiujin Chen, Hua Kuang, Shanshan Song and Chuanlai Xu. Immunochromatographic strip development for ultrasensitive analysis of aflatoxin M₁[J]. Analytical Methods, 2013, 5(23): 6567-6571. (与第 3、9 章有关, IF 1.855)

3. 张勋, 匡华, 徐丽广, 马伟, 刘丽强, 胥传来. 绿色无毒黄曲霉毒素 B₁ 免疫检测方法[J]. 食品与生物技术学报, 2013,32(12):1293-1297. (CSCD, 与第 8 章有关)