

免疫标记分析技术及其在粮食霉菌毒素检测中的应用研究进展

青文哲¹, 杨伊磊¹, 陈力力^{2,3*}

(1. 湖南农业大学食品科技学院, 长沙 410128; 2. 食品科技和生物技术湖南省重点实验室, 长沙 410128;
3. 湖南省发酵食品工程技术研究中心, 长沙 410128)

摘要: 霉菌毒素是由丝状真菌产生的次生代谢产物, 严重污染粮食如大米、玉米、小麦、大麦等, 给人类健康带来威胁。为了保护消费者健康和减少经济损失, 监管和控制粮食中的霉菌毒素成为生产者、管理部门和研究人员的主要目标。为此大量快速、适用及精确的检测方法被研究开发并应用, 以特异性抗体为基础的免疫分析技术具有广阔的开发应用前景。本文就免疫标记分析技术以及在粮食霉菌毒素检测中的应用进行综述, 包括粮食的霉菌毒素的种类和对人类的危害; 免疫标记分析技术的分类; 放射免疫分析、酶标记免疫分析、免疫荧光标记技术、时间分辨荧光免疫分析技术、免疫胶体金标记技术等粮食霉菌毒素检测中的应用。

关键词: 霉菌毒素; 粮食; 免疫标记技术

A review on applications of labeling immunoassay techniques for mycotoxin detection in grain

QING Wen-Zhe¹, YANG Yi-Lei¹, CHEN Li-Li^{2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China;
3. Hunan Provincial Research Center of Engineering and Biotechnology for Fermentative Food, Changsha 410128, China)

ABSTRACT: Mycotoxins are natural contaminants produced by a range of fungal species. They usually presents in grain such as rice, corn, wheat, and barley, which posses a threat to the health of humans. To protect consumer health and reduce economic losses, surveillance and control of mycotoxins in grain has become a major objective for producers, regulatory authorities and researchers worldwide. In this paper, labeling immunoassay techniques, such as radio immunoassay, enzyme immunoassay, fluorescence immunoassay, time resolved fluoroimmunoassay and colloidal gold immunoassay, and its applications in mycotoxin detection of grain were discussed.

KEY WORDS: mycotoxin; grain; immunolabelling technique

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2013AA102107)

Fund: Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(2013AA102107)

*通讯作者: 陈力力, 教授, 主要研究方向为食品微生物及生物技术。E-mail: chenlili001@tom.com

*Corresponding author: CHEN Li-Li, Professor, College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, No.1, Nongda Road, Furong District, Changsha 410128, China. E-mail: chenlili001@tom.com

1 引言

自古以来, 人类利用真菌(霉菌、酵母菌)生产出多种美味食品, 如豆豉、酱油、食醋、奶酪、面包、意大利腊肠、啤酒、黄酒、葡萄酒等, 然而食品消费伴随着一些食源性疾病的发生, 其中造成较大社会影响的有 1913 年俄罗斯东西伯利亚发生的白细胞缺乏病, 1952 年美国佐治亚州发生的动物急性致死性肝炎和 1960 年英国发生的火鸡 X 病^[1]。这些疾病的发生都与霉菌毒素有关, 尽管早在 11 世纪欧洲圣像画中就有关于霉菌毒素引起中毒的描述, 但直到 1960 年英国 10 万多只火鸡因饲用黄曲霉毒素污染的饲料而死亡的事件发生后, 霉菌毒素才被人们确定为潜在的健康危害^[2,3]。迄今发现粮食中主要霉菌毒素有黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素、单端孢霉烯族毒素, 这些霉菌毒素表现出巨大的结构多样性, 从而产生不同的理化性质, 具有各自的特点及造成对人及动物的危害^[4,5](见表 1)。

根据中国农科院农产品加工研究所统计, 2001~2011 年, 受霉菌毒素污染的影响, 我国出口欧盟食品违例事件达 2559 起, 其中霉菌毒素超标占 28.6%, 高于公众熟知的重金属、食品添加剂、农药残留等因素, 在单一事件中比例最高^[6]。霉菌毒素污染不仅给食品企业、粮油加工企业、畜禽养殖场以及饲料的加工企业造成了巨大的经济损失, 而且已成为我国农产品出口欧盟的最大阻碍, 给我国粮油加工和出口企业造成了巨大经济损失。因此, 食品中霉菌毒素的监控对于保障食品质量安全具有十分重要的意义。粮食中检测霉菌毒素的方法众多, 一般可分为三类, 理化检测方法, 包括层析、气相色谱、液相色谱等; 生物学检

测法, 包括皮肤毒性试验、致呕吐实验、种子发芽实验等; 免疫学检测法, 即利用抗原抗体反应的原理进行霉菌毒素检测。

免疫学检测方法具有灵敏度高、特异性强、快速方便等优点, 特别适合于各种霉菌毒素污染监控中大批量粮食样本的筛检工作^[7,8]。然而, 虽然基于抗体和毒素间特异性结合反应的免疫检测有诸多优点, 但是抗原抗体反应要形成明显可见的絮凝或沉淀, 必须满足一定的条件, 在大多数情况下, 抗原抗体的反应量不足, 或者抗原为半抗原、抗体为单效价抗体时, 其结果很难观察判断, 另外传统的完整抗体有其特定的限制。基于上述原因, 人们建立的免疫标记技术, 即采用特殊标记物标记抗原或抗体, 通过测定抗原抗体复合物中的标记物, 使不可见的反应放大, 使其在检测中的敏感性、特异性、精确性及应用范围等方面大大超过了传统免疫检测方法。

目前, 根据标记物种类、反应机制等特点建立了多种免疫标记分析方法^[9](图 1), 免疫标记技术具有快速、定性或定量甚至定位的特点, 已发展成为一类检测微量和超微量生物活性物质的免疫生物化学分析技术, 在粮食霉菌毒素检测中也得到了广泛使用^[10-12]。在我国由中国农业科学院油料作物研究所、农业部生物毒素检测重点实验室报道的黄曲霉毒素高灵敏检测技术等研究成果, 已经被广泛应用在农产品(花生、玉米、稻米等)、食用油(花生油、玉米油、菜籽油等)、调味品(花生酱、酱油、醋等)、乳制品(鲜牛奶、奶粉等)和饲料(饼粕等)等 5 大类 60 多种农产品及食品产品质量安全检测。并在生产、流通、检测、普查、风险监测与政府监管以及国内外科研相关机构推广应用^[13]。

表 1 粮食中含有的主要霉菌毒素及危害
Table 1 Major mycotoxins in grain and their major health effects for human

毒素名称	病原名称	粮食来源	危害及疾病名称
黄曲霉毒素 (aflatoxin, AFT)	金黄色曲霉、寄生曲霉	高粱、大豆、玉米、 小麦、大麦、落花生	肝癌 HCC(急性黄曲霉毒素中毒)、雷氏症 候群、恶性营养不良
赭曲霉毒素 (ochratoxin, OA)	青霉	大麦、小麦、燕麦、 黑麦	慢性间歇性肾病、巴尔干半岛肾病 睾丸癌
玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN)	镰刀菌	玉米、小麦、大米、 大麦、小米和燕麦	肝癌、睾丸癌、食道癌、青春期早熟
伏马毒素 (fumonisin FB)	镰刀菌、链格孢菌	玉米、小麦	食道癌
黄绿青霉素 (citreoviridin, CIT)	曲霉、青霉	大米	心脏毒、脚气病
橘青霉素 (citrinin)	曲霉、青霉	大米、大麦、小麦、 燕麦、玉米	肾脏毒
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)	镰刀菌、头孢菌、漆斑菌、 链格孢菌	大麦、燕麦、高粱、 大豆、玉米、小麦	呕吐、造血系统损害

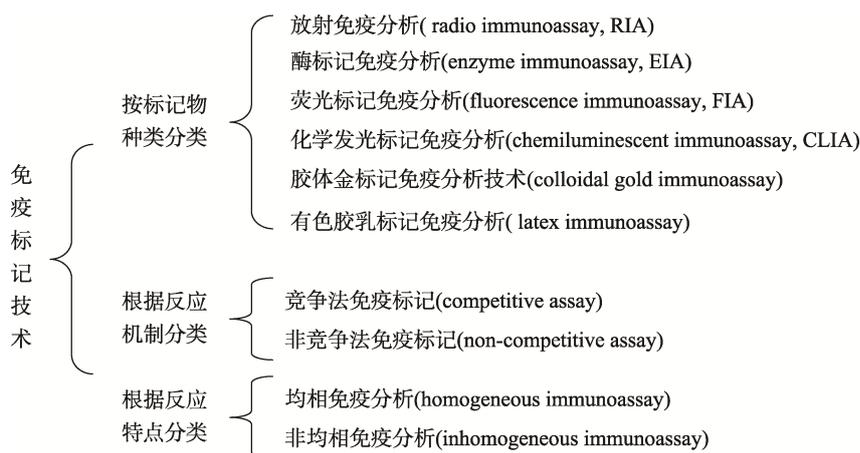


图 1 免疫标记技术的分类

Fig. 1 Classification of labeling immunoassay techniques

2 放射免疫标记技术及应用

放射免疫标记技术(immunoradiometric assay, IRMA)是将同位素分析的高灵敏度与抗原抗体反应的特异性相结合,以放射性同位素作为示踪物的标记免疫测定方法,测定中先以放射性同位素为标记物标记标准品,然后与样品混合,加入定量特异性抗体。由于样品中的抗原浓度与抗原抗体复合物中放射性强度成反比,根据对抗原抗体复合物的放射性计数,即可计算样品中的抗原浓度。此项技术灵敏度高,可检测出纳克(ng)、皮克(pg),甚至飞克(fg)的超微量物质,特异性强即可分辨结构类似的抗原,另外重复性好,样品及试剂用量少,测定方法易规范化和自动化等,因此建立的放射免疫测定法(radio immunoassay, RIA)已被广泛应用,目前国外已成功应用 RIA 检测的物质多达 300 余种,国内研究的被测物质也达百余种,RIA 试剂盒已有 60 余种,RIA 成为测定各种微量物质不可缺少的手段^[14]。在霉菌毒素检测方面,Chu^[15]首先用 ³H 标记抗体试验了棕曲霉毒素的放射免疫分析,随后,建立了关于黄曲霉毒素 B₁、镰孢霉毒素等多种霉菌毒素的放射免疫分析。人们采用 RIA 检测牛奶中的黄曲霉毒素 M₁,可测浓度为 5~50 ng/mL,另外测定玉米赤霉烯酮及 T-2 毒素都有很高的灵敏度^[16,17],但放射性元素易造成污染,标准品难以保存,且该法必须与液体闪烁计数器等仪器连用,价格昂贵,成本较高,技术推广上具有一定难度,因此该法的应用受到一定限制。

3 免疫荧光标记技术及应用

免疫荧光标记技术(immunofluorescence techniques)以荧光物质标记抗原(抗体),利用特殊仪器测定荧光强度而推算被测物浓度,特异性强、敏感性高、速度快,与放射免

疫法相比,无放射性污染,并且操作简便,便于推广。

目前,在粮食霉菌毒素检测中较为普遍的免疫荧光法为荧光光度计法与免疫亲和柱净化结合使用,这种结合使用方法的优点是直接接触毒素,不用毒素标样,极少使用有机试剂,并且免疫亲和柱(IAC)已经商业化,操作简便,耗时少。免疫亲和柱-荧光光度计法已为美国 AOAC 的标准检测方法,以黄曲霉毒素检测为例,它可以检测黄曲霉毒素总量达到 2×10^{-3} mg/kg 以下,这种方法也是我国玉米、大米、小麦、花生及其制品(花生酱、花生仁、花生米)等食品中黄曲霉毒素检测推荐使用的国家标准方法。已经报道的通过免疫亲和柱-荧光法检测的粮食霉菌毒素有黄曲霉毒素、赭曲霉毒素及玉米赤霉烯酮等^[18-20],但是免疫亲和柱-荧光光度计法并非十全十美,它对水和试剂的要求较高,所测毒素必须具有较强的荧光,而且此方法不太适合检测含有复杂基体成分的样品,因此免疫亲和柱层析净化荧光光度法多用于进行批量样品的快速筛选,随后,需采用化学方法进行方法验证,其结果才更加准确可靠。

荧光偏振免疫技术(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)是另一种应用于大批量粮食样本霉菌毒素快速筛选的新型的定量荧光免疫检测方法,目前在欧洲、美国、日本和中国等国家和地区可查询到数量众多的发明专利,并且,推出了检测 DON 和 FB₁ 等霉菌毒素的 FPIA 试剂盒产品,具高通量、高速度、高灵敏和易于实现自动化等优点^[21]。研究表明 FPIA 已经成功地应用于小麦中 DON、玉米中 ZON 以及食品中 OTA 的测定^[22-25],在小麦麸及面粉 DON 的检测中,检出限量为 120 μg/kg^[26],并且人们开展了采用 FAB₁ 单克隆抗体制备新型荧光素标记的 AFB₁-EDF 示踪物,建立 FPIA 检测 AFT 的研究,试验结果显示检测微孔板中的 96 个样品仅需 5 min 的时间, FAB₁ 最低检出浓度为 13.12 ng/mL^[27]。尽管 FPIA 精密度

高、速度快、样品用量少、仪器不需要每次校准, 操作简便, 但仪器设备昂贵, 药品试剂盒专属性强, 限制其实际应用。

4 时间分辨荧光免疫分析技术及应用

20 世纪 80 年代迅速发展起来的时间分辨荧光免疫分析(time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)以具有特殊荧光的镧系离子与螯合剂结合作为示踪物标记, 在一定的反应体系发生反应后, 用时间分辨荧光仪测定产物中的特异荧光强度, 推测反应体系中待测物的浓度, 从而达到对待测物质进行定量分析的目的, 具有排除其他荧光干扰、灵敏度高、一次可以测多个样品的优势, 是目前被公认最有发展前途的非放射标记技术, 此项技术在粮食霉菌毒素检测中已得到应用。

采用时间分辨荧光技术建立的黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)间接竞争免疫分析法(AFB-TRFIA)灵敏度为 0.01 μg/kg, 检测线性范围为 0.01~100 μg/kg, 批内和批间的变异率为 4.1%和 6.8%, 平均回收率为 97.2%^[28]。建立的黄曲霉毒素 B₁ 和赭曲霉毒素 A 的高灵敏的 TRFIA 检测方法, 检测黄曲霉毒素 B₁ 的灵敏度为 0.02 μg/L, 检测线性范围为 0.02~100 μg/L; 检测赭曲霉毒素 A 的灵敏度为 0.05 μg/L, 检测线性范围为 0.05~50 μg/L, 不仅灵敏度高, 稳定性好, 可测范围宽, 而且一次操作同时可以得到 AFB₁、OTA 的两个结果, 并且研制出具有我国自主知识产权的快速、灵敏的 AFB₁-TRFIA、OTA-TRFIA 检测试剂盒^[29,30]。另外人们采用此项技术建立了粮食中多种霉菌毒素的测定方法, 如制备了伏马毒素 B₁(fumonisin B₁, FB₁)单克隆抗体并利用该抗体研制了基于时间分辨免疫荧光分析方法的检测试剂盒, 使 FB₁ 最低检出浓度为 2 ng/mL, 检测线性范围为 2~5122 ng/mL^[31]; 建立了快速灵敏的 T-2 毒素的全自动检测方法, 即采用 T-2-BSA 包被 96 孔板作为固相抗原, 与游离的 T-2 竞争有限的抗 T-2 单克隆抗体, 以 Eu³⁺ 标记的羊抗鼠抗体示踪, 采用间接竞争免疫分析方法在解离增强荧光免疫分析体系中建立 T-2-TRFIA^[32]。利用抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)多克隆抗体, 采用纳米均相时间分辨荧光免疫法测定技术建立间接竞争 DON-TRFIA 定量检测方法, 灵敏度为 0.007 ng/mL, 检测线性范围为 0.007~100 ng/mL, 批内批间变异系数均<5%; 玉米、小麦样品添加回收实验的回收率分别为 84%~110%、67%~100%^[33], 因此认为纳米均相时间分辨荧光免疫法测 DON 是目前 DON 检测中最灵敏的方法之一。该分析方法稳定性好, 可测范围宽, 具有很好的应用前景。

人们采用 TRFIA 技术建立了测定粮食中黄曲霉毒素、T-2 毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮等毒素的方法, 此技术集合了酶标记技术、放射标记技术和同位素标记技术的优点, 具有灵敏度高、特异性很强、稳定性好、

测定范围宽、非放射性等特点, 随着时间分辨荧光免疫层析试剂盒和试纸条的研发和应用^[34,35]TRFIA 操作更加简单、更适用于真菌毒素的超微量分析, 成为一项很有前途的、值得推广使用的技术。

5 酶免疫分析技术及应用

酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是目前应用最多的免疫酶技术, 其反应在微孔板上进行, 使用酶标仪测定读数, 具有高特异性、高敏感度、操作方便、分析速度快、适合对大量样本筛选等优点。采用 ELISA 测定粮食中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素、黄曲霉毒素、伏马菌素的方法已经得到应用^[36]。在玉米及其副产物玉米赤霉烯酮的检测中, 优化了样品前处理后, ELISA 方法灵敏度为 1.0 ng/mL, 线性范围为 0~20 ng/mL, 回收率达 70.3%~90.9%, 并用此法测定了 24 份玉米副产物样品, 检出率为 100%, 阳性率为 37.5%, 其结果表明此方法快速灵敏准确, 有较好的实用性^[37]。采用酶联免疫吸附法测定东北地区玉米等粮食及副产物饲料原料中 6 种霉菌毒素(黄曲霉毒素 B、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、伏马毒素、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素)含量^[38]。

由于收获粮食和库存粮食的真菌毒素检测往往批量大、时间紧, 为此, 一般使用酶联免疫试剂盒进行检测。目前, 常见的黄曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素和伏马毒素等六种霉菌毒素的商品化 ELISA 试剂盒都可以获得, 根据 ELISA 技术开发的毒素检测试剂盒减少了毒素检测的许多中间过程, 大大缩短了检测时间, 为毒素的快速检测奠定了坚实基础。然而通过对目前国内市场上供应的常见粮食真菌毒素检测试剂盒进行测试发现, 不同品牌酶联免疫试剂盒的批次间、同一批次的孔板间存在差异, 给检测结果带来影响, 导致试剂盒检测对按照 GB 2715-2005《粮食卫生标准》中各种真菌毒素限量要求的标准限量值的判定会出现偏差^[39], 因此认为试剂盒用于量大时粮食样品的真菌毒素筛选, 具有很好的适用性和一定的准确性; 在用酶联免疫试剂盒时检测样品时, 应该用质控样品对整个检测过程进行质量控制或用高压液相法进行核验, 特别是对检测的临界值样品要用其他方法进行比对、确认, 以防检测结果的假阳性和假阴性。

为了提高检测灵敏度, 在常规检测方法的基础上, 建立了小分子夹心 ELISA、双抗原夹心 ELISA、同步 ELISA 测定抗体, 组合单克隆抗体夹心 Dot-ELISA 测抗原等等^[40-42], 与传统的比色 ELISA 法相比, 建立的直接竞争性 ELISA 法在进行玉米及大米的玉米赤霉烯酮、T-2 毒素检测中都具有很好的检测特异性^[43-47], 另外, 将特异性抗体添加显色物质应用于 ELISA 方法上检测食品中的玉米烯酮可提高灵敏度^[48]; 在噬菌体表面筛选到抗赭曲霉毒素 A

的模拟表位, 将其与载体 BSA 偶联, 建立了无毒素竞争 ELISA^[49], 噬菌体展示纳米抗体 Phage2-5 具备良好的模拟黄曲霉毒素抗原的生物活性, 用作替代抗原建立的免疫分析方法灵敏度高、甲醇耐受能力强, 并且样品基质效应不明显, 具有进一步研制黄曲霉毒素模拟抗原的前景^[50]。以匙孔血蓝蛋白(KLH)为载体, 采用碳化亚二胺法人工合成伏马菌素 B₁(FB₁)抗原 FB₁-KLH, 免疫大白兔获得特异性良好的抗 FB₁ 多克隆抗体; 在多克隆抗体的基础上建立了伏马菌素 B₁ 的间接竞争酶联免疫吸附分析方法^[51], 该方法的最低检出限为 1.1 μg/L, 平均批内和批间变异系数分别为 5.8%、10.2%; 在玉米、小麦、大米、高粱谷物样本中添加 50~500 μg/kg 的 FB₁ 标准品, 平均回收率在 70.5%~105.6%之间。另外, 人们将 ELISA 与其他技术相结合, 建立了新的 ELISA 方法, 如生物素-链亲和素酶免分析 (biotinavidin system, BSA-ELISA) 以生物素亲和素能发生特异性结合为基础建立高特异性、非免疫反应系统, 将其与酶免疫标记体系相结合, 极大地提高了测定的灵敏度, 它比普通 ELISA 试剂盒的灵敏度提高 4~16 倍^[52]。斑点酶联免疫吸附试验用对蛋白质有极强吸附力的硝酸纤维素膜代替 ELISA 中的塑料制品 96 孔板作为固相载体, 酶作用底物后在硝酸纤维素膜上形成有色沉淀而使膜着色, 它的灵敏度较一般 ELISA 高 6~8 倍、可达纳克水平, 试剂用量小, 不需其他设备条件。聚合酶链式反应酶联免疫吸附分析法(PCR-ELISA)分析使用 PCR 在生物体外放大特定的 DNA 片段, 能从 100 万个细胞中检测出一个靶细胞, 因此在 PCR 扩增以后, 利用 ELISA 的原理和方法, 使用酶标抗体, 通过免疫吸附、酶促反应产物的分析实现了精确定量。制备高特异性的抗 T-2 毒素单克隆抗体(mAb), 建立的快速敏感的间接竞争 ELISA 免疫分析方法检测大米中的 T-2 毒素, 对 T-2 毒素 IC₁₀ 为 5.80 μg/kg, 加标样品的回收率为 72.0%~108.5%, 并且试验证明与 UPLC-MS/MS 方法有明显的相关性^[53]。另外磁珠颗粒 ELISA、直接竞争性化学发光 ELISA 等都大大地提高了检测灵敏度和检测特异性。

6 免疫胶体金标记技术及应用

免疫胶体金标记技术 (immunogenic colloidal gold signature, ICS) 是利用金颗粒具有高电子密度的特性, 以胶体金作为示踪标记物, 应用于抗原抗体反应的继三大标记技术 (荧光素、放射性同位素和酶) 后发展起来的固相标记免疫测定技术。这一反应也可以通过银颗粒的沉积被放大, 称之为免疫金银染色。

制备的胶体金颗粒在碱性环境条件下带负电荷, 可与蛋白质分子的正电荷基团静电吸附而形成牢固结合即免疫胶体金, 也可与许多其他生物大分子如葡萄球菌 A 蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酶等发生非共价结合。

胶体金颗粒本身呈红色, 所以当免疫胶体金颗粒遇到相应的抗原或抗体形成抗原抗体复合物, 在适宜条件下达到一定的密度时, 便于光镜、透射电镜或扫描电镜观察检测, 也可直接肉眼观察判断, 具有快速、简便、特异、敏感等优点。因此胶体金免疫技术已应用到生物学的各个领域, 并成为不同样品定性定量的快速免疫检测方法^[54-56]。

在粮食霉菌毒素检测中, 利用胶体金免疫层析技术建立了一种快速检测食品中黄曲霉毒素 B₁ 的方法, 即采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒标记抗黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体并喷于玻璃纤维上, 黄曲霉毒素 B₁ 偶联抗原和二抗鼠抗驴分别结合于硝酸纤维膜上依次将样本垫、胶金垫、硝酸纤维膜和吸水纸组装切割成胶体金试纸条并装入检测卡中, 测试结果表明, 这种黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试纸条的灵敏度为 5 ng/mL, 检测时间为 10 min, 批内和批间重复性为 100%, 假阳性率和假阴性率均为 0, 使用简单方便非常适合现场快速检测黄曲霉毒素 B₁。同时赖卫华等^[57]利用抗原抗体特异性结合的原理研制了免疫胶体金技术检测棕曲霉毒素的试纸条等其他霉菌毒素的快速检测方法。另外, 研究了纳米金标记免疫检测体系建立过程中的影响因素, 包括检测带的信号强度、封闭试剂、纳米金探针的浓度、包被试剂 A 和 B 的浓度、纳米金溶胶的颗粒尺寸及检测过程中的化学体系等。通过参数优化, 确立了建立快速、简易的金标试剂条检测方法的最佳条件^[58,59]。

国家粮食局标准质量中心于 2010 年启动粮食收购现场黄曲霉毒素 B₁ 快速检测方法的应用研究, 建立了胶体金免疫标记快速检测主要原粮黄曲霉毒素 B₁ 的方法, 并就在收购现场检测的可行性进行了研究。结果显示, 该方法可检测黄曲霉毒素 B₁ 在 5 μg/kg 以上的原粮样品, 并可按粮食卫生标准的需要, 分别设定 5、10、20 μg/kg 的检出限, 方便实际样品的检测。同时, 组织开展了脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮等真菌毒素胶体金试纸快速检测方法的应用研究, 并采用国家标准方法对上述两种真菌毒素的胶体金快速测试卡从检测的准确性、重复性、稳定性方面进行验证, 如北京国家粮油质检中心、湖北、广西、辽宁、四川和重庆等省级粮油检测中心受国家粮食局标准质量中心委托, 于 2010 年 5 月至 2011 年 2 月分别对几家公司生产的呕吐毒素与玉米赤霉烯酮毒素快速检测试纸条进行验证, 结果表明, 真菌毒素胶体金快速检测方法简便快捷, 尤其前处理简单, 适用于现场快速筛选分析, 适合粮食收购环节现场快速筛选检测工作^[60]。

但是, 胶体金免疫技术在实际研究及应用过程中仍存在一些不足之处: 首先, 该方法在检测过程中常出现假阳性和假阴性问题; 其次, 检测的灵敏度及可重复性程度不高, 检测线性范围需要进一步扩展; 最后, 因免疫胶体金技术是以胶体金纳米颗粒作为标记物, 颗粒本身的一些特性也导致免疫胶体金技术的应用受到一定限制, 如在操

作过程中要求清洁程度高, 胶体金溶液的稳定性较差, 存放时间短等。

7 展 望

免疫标记技术利用放射性同位素、荧光素、酶、胶体金等作为标记物, 使标记的抗体或抗原和与之对应的抗原或抗体进行特异性的抗原抗体反应, 通过物理化学手段, 使不可见的反应放大, 转化为可见的、可测知的光、电、脉冲等信号, 最终借助于各种精密的检测仪器结果进行观察和测定, 大大提高了免疫反应的敏感性, 因此人们依此已创建了不少快速、简便、特异、敏感、低耗的检测霉菌毒素的方法应用于粮食霉菌毒素的检测。从上所述, 粮食霉菌毒素快速检测常用方法为 ELISA 试剂盒检测和胶体金标记快速检测, 操作简便快速, 非常适合粮食收购环节现场快速筛选检测工作。同时, 我们也可以看到多重检测和分析手段的联合应用^[61-65], 根据霉菌毒素理化性质的特点, 选择适当的检测方法在进行样品的简单快速、适合多组分残留分析的前处理基础上, 再借助准确灵敏检测仪器, 将能更加有效地提高检测粮食霉菌毒素的灵敏度和精确度。粮食霉菌毒素是一类对人体危害比较大的化合物, 种类繁多, 化学性质各不相同, 密切关注新技术和引入新方法, 不断完善创新, 才能推出适用于我国粮食霉菌毒素的检测技术。

参考文献

- [1] 史明贤. 食品安全与卫生学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
Shi MX. Food safety and hygiene[M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2003.
- [2] Bryden WL. 霉菌毒素研究现状及未来挑战[J]. 中国家禽, 2014, 36(2): 35-39.
Bryden WL. Bryden. Research status and future challenges of Mycotoxin[J]. China Poultry, 2014, 36(2): 35-39.
- [3] Duade SC, Pena A, Lino CM. A review on Ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products[J]. Food Microbiol, 2010, 27(2): 187-198.
- [4] Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of Mycotoxins: a review [J]. Anal Chim Acta, 2009, 632(21): 168-180.
- [5] Gonzalez Pereyra ML, Rosa CA, Dalcero AM, et al. Mycobiota and Mycotoxins in malted barley and brewer spent grain from argentinean breweries[J]. Lett Appl Microbio, 2011, 53(6): 649-655.
- [6] 刘阳. 霉菌毒素对食品安全的影响[C]. 中国畜牧兽医学会 2013 年学术年会 “霉菌毒素风险管理国际高峰论坛”, 2013.
Liu Y. Effect of mycotoxin on food safety [C]. Chinese pastorage veterinary medicine International Summit Forum of Mycotoxin Risk Management, 2013.
- [7] 何庆华, 许杨. ZEN 毒性研究及检测方法进展[J]. 卫生研究, 2005, 34(4): 502-506.
He QH, Xu Y. Advance in study on zearalenone's toxicity and determination[J]. J Hyg Res, 2005, 34(4): 502-506.
- [8] 宫小明, 郝莹, 董静, 等. 真菌毒素检测技术的研究进展[J]. 检验检疫学刊, 2010, 20(2): 67-69.
Gong XM, Hao Y, Dong J, et al. Review of research progress for the detection of Mycotoxins[J]. J Inspection and Quarantine, 2010, 20(2): 67-69.
- [9] 刘瑶, 田亚平. 免疫标记技术的现状和发展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(8): 3536-3539.
Liu Y, Tian YP. Situation and progress in labeling immunoassay techniques [J]. Chin J Clinic (Electron Edit), 2013, 7(8): 3536-3539.
- [10] 庞凌云, 祝美云, 李瑜. ZEN 检测方法研究进展[J]. 粮食与油脂, 2009, 21(007): 3941-3945.
Pang LY, Zhu MY, Li Y. Research advance on determination methods for zearalenone[J]. Cereals & Oils, 2009, 21(007): 3941-3945.
- [11] De Girolamo A, Pascale M, Visconti A. Comparison of methods and optimization of the analysis of fumonisins B₁ and B₂ in masa flour, an alkaline cooked CO1TI product[J]. Food Addit Contam, 2011, 28(5): 667-675.
- [12] 杨世亚, 邱景富. 食品中真菌毒素的污染状况与检测方法研究进展[J]. 现代预防医学, 2012, 39(22): 5897-8900.
Yang SY, Qiu JF. Research progress of pollution condition and detecting method in mycotoxins in the food[J]. Mod Prev Med, 2012, 39(22): 5897-8900.
- [13] 张奇, 李培武, 陈小媚, 等. 黄曲霉毒素免疫检测技术研究进展[J]. 农产品质量与安全, 2013, 63(3): 42-46.
Zhang Q, Li PW, Chen XM, et al. Research progress in immunoassay techniques for Aflatoxins[J]. Agric Prod Qual Safe, 2013, 63(3): 42-46.
- [14] 胡晓飞, 李艳梅, 王方雨, 等. 免疫学技术在霉菌毒素检测中的应用[J]. 河南农业科学, 2013, 42(4): 157-160.
Hu XF, Li YM, Wang FY, et al. Application of immunological techniques in Mycotoxin detection[J]. J Henan Agric Sci, 2013, 42(4): 157-160.
- [15] Chu FS. Immunochemical methods for mycotoxin analysis: from radioimmunoassay to biosensors [J]. Mycotoxins, 2004, 54(1):1-4
- [16] 任亚妮, 车振明. 免疫标记技术在食品安全检测中的应用[J]. 中国调味品, 2010, (3): 34-36.
Ren YN, Che ZM. The application of immunolabelling technique in food safety detection [J]. China Condiment, 2010, (3): 34-36.
- [17] 张德安. 霉菌毒素的检测方法概述[J]. 新疆畜牧业杂志, 2013, (1): 21-22.
Zhang DA. Determination methods for Mycotoxin [J]. J Xinjiang Anim Husbandry, 2013, (1): 21-22.
- [18] Zhang DH, Li PW, Zhang Q, et al. Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure[J]. Anal Chim Acta, 2009, 636: 63-69.
- [19] Shim WB, Kolosova AY, Kim Y, et al. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin[J]. A Int J Food Sci Technol, 2004, 39: 829-837.
- [20] 王伟. 小麦中真菌毒素的快速检测方法的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2013, (9): 60-63.
Wang W. Rapid determination for mycotoxins in wheat[J]. Cereal Feed Ind, 2013, (9): 60-63.
- [21] 王战辉, 米铁军, 沈建忠. 荧光偏振免疫分析检测粮食及其制品中的真菌毒素研究进展[J]. 中国农业科学, 2012, 45(23): 4862-4872.

- Wang ZH, Mi TJ, Shen JZ. Advance in fluorescence polarization immunoassay for the determination of Mycotoxins in cereals and related products[J]. *Scientia Agric Sinic*, 2012, 45(23): 4862–4872.
- [22] Smith DS, Eremin SA. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391(5): 1499–1507.
- [23] Maragos CM. Fluorescence polarization immunoassay of mycotoxins: A review [J]. *Toxins*, 2009, 1: 196–207.
- [24] Maragos CM. Fluorescence polarization for mycotoxin determination [J]. *Mycotoxin Res*, 2006, 22(2): 96–99.
- [25] Choi EH, Kim DM, Choi SW, *et al.* Optimisation and validation of a fluorescence polarisation immunoassay for rapid detection of zearalenone in corn[J]. *Inter J Food Sci Technol*, 2011, 46(10): 2173–2181.
- [26] Valenzano S, Lippolis V, Pascale M, *et al.* Determination of Deoxynivalenol in wheat bran and whole-wheat flour by Fluorescence Polarization Immunoassay[J]. *Food Anal Methods*, 2014, 7: 806–813.
- [27] Sheng YJ, Eremin S, Wang ZH, *et al.* The Development of a fluorescence polarization immunoassay for Aflatoxin detection[J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27(2): 126–129.
- [28] 黄飏, 陶文沂, 张莲芬, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 的高灵敏时间分辨荧光免疫分析[J]. *核技术*, 2006, 29(4): 295–300.
Huang B, Tao WY, Zhang LF, *et al.* High sensitive time-resolved fluorescence immunoassay analysis of aflatoxin B₁[J]. *Nuclear Tech*, 2006, 29(4): 295–300.
- [29] 黄飏, 张珏, 马智鸿, 等. 用双标记时间分辨荧光免疫法同时检测黄曲霉毒素 B₁ 和赭曲霉毒素 A[J]. *卫生研究*, 2009, 38(4): 385–388.
Huang B, Zhang J, Ma ZH, *et al.* Simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A by the dual-label time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *J Hyg Res*, 2009, 38(4): 385–388.
- [30] Hagan AK, Zuchner T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(9): 2847–2864.
- [31] 解肖鹏, 张雷. 时间分辨荧光免疫分析技术的研究进展[J]. *食品与药品*, 2012, 14: 203–206.
Xie XP, Zhang L. Research development of time-resolve fluorimmunoassay [J]. *Food Med*, 2012, 14: 203–206.
- [32] 杨润琳, 计融, 江涛, 等. T-2 毒素的高灵敏时间分辨荧光免疫分析[J]. *食品与机械*, 2010, 26(1): 74–76.
Yang RL, Ji R, Jiang T, *et al.* High sensitive time-resolved fluorescence immunoassay of T-2 toxin[J]. *Food Mach*, 2010, 26(1): 74–76.
- [33] 周彬, 高雷, 金坚, 等. 纳米均相时间分辨荧光免疫法检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(8): 338–342.
Zhou B, Gao L, Jin J, *et al.* Quantitative determination of deoxynivalenol using light initiated chemiluminescence assay[J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, 31(8): 338–342.
- [34] 陈建玲, 李文学, 朱伟, 等. 伏马毒素 B₁ 时间分辨免疫荧光检测试剂盒的研制[J]. *癌变·畸变·突变*, 2013, 25(1): 48–52.
Chen JL, Li WX, Zhu W, *et al.* Development of TRFIA kit quantitative analysis fumonisin [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*, 2013, 25(1): 48–52.
- [35] 李静, 李培武, 张奇, 等. 时间分辨荧光免疫层析试纸条在油料饼粕黄曲霉毒素 B₁ 检测中的应用[J]. *中国油料作物学报*, 2014, 36(2): 256–262.
Li J, Li PW, Zhang Q, *et al.* Investigation of TRFIA strip for quantitative determination of aflatoxin B₁ in oilseed meals[J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2014, 36(2): 256–262.
- [36] 周晓, 谢体三, 刘运龙. ELISA 技术在食品真菌毒素检测中的应用[J]. *粮食与食品工业*, 2007, 14(5): 49–52.
Zhou X, Xie TS, Liu YL. The application of ELISA technique in food mycotoxins detection[J]. *Cereal Food Ind*, 2007, 14(5): 49–52.
- [37] 张东升, 王虎, 蔡建荣, 等. 玉米副产物中 ZEN 的 ELISA 测定[J]. *饲料工业*, 2008, 29(1): 38–40.
Zhang DS, Wang H, Cai JR, *et al.* ELISA detection of ZEN in corn by-products[J]. *Feeding Ind*, 2008, 29(1): 38–40.
- [38] 单安山, 周长路, 张圆圆, 等. 东北地区不同饲料原料中霉菌毒素含量的测定[J]. *东北农业大学学报*, 2013, 44(6): 9–100.
Shan AS, Zhou CL, Zhang YY, *et al.* Detection of contents of mycotoxins in different feed ingredients in Northeastern China[J]. *J North Agric Univ*, 2013, 44(6): 96–100.
- [39] 熊宁, 刘坚, 杨卫民, 等. 粮食真菌毒素酶联免疫试剂盒应用测试情况[J]. *粮食科技与经济*, 2011, 36(11): 57–59.
Xing N, Liu J, Yang WM, *et al.* Investigation of ELISA kit quantitative analysis in grain mycotoxins [J]. *Grain Sci Technol Economy*, 2011, 36(11): 57–59.
- [40] Hiraoka H, Yamamoto K, Mori Y, *et al.* Modified use of a commercial ELISA kit for deoxynivalenol determination in rice and corn silage [J]. *Mycotoxin Res*, 2013, 29(2): 79–88.
- [41] 杨丹妮, 汪海峰. 小麦中呕吐毒素的 ELISA 和 HPLC 法检测[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(3): 1269–1270.
Yang DN, Wang HF. ELISA and HPLC for detection of DON in wheat [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41(3): 1269–1270.
- [42] Du HW, Liu J, Xun YP, *et al.* Determination of Deoxynivalenol, Zearalenone, Aflatoxin B₁, and Ochratoxin by an Enzyme-Linked Immunosorbent[J]. *Assay Anal Lett*, 2014, 47(11): 1912–1920.
- [43] Yu FY, Vdovenko MM, Wang JJ, *et al.* Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays with chemiluminescent and colorimetric detection for the determination of Ochratoxin A in food[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(3): 809–813.
- [44] Aamot HU, Hofgaard IS, Brodal G, *et al.* Evaluation of rapid test kits for quantification of HT-2 and T-2 toxins in naturally contaminated oats [J]. *World Mycotoxin J*, 2013, 6 (1): 31–41.
- [45] 裴世春, 孙丽敏. 利用 dc-ELISA 筛选玉米赤霉烯酮产毒菌的研究[J]. *食品科技*, 2009, (7): 45–49.
Pei SC, Sun LM. Screening of zearalenone producing strains by dc-ELISA[J]. *Food Sci Technol*, 2009, (7): 45–49.
- [46] 介明沙, 张卫民, 于斐, 等. 谷物中伏马菌素 B₁ 残留的直接竞争 ELISA 检测方法研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2013, 34(3): 35–38.
Jie MS, Zhang WM, Yu P, *et al.* Research on direct competitive ELISA for determination of Fumonisin B₁ residues in grains[J]. *Journal of Henan Univ Technol (Nat Sci Edit)*, 2013, 34(3): 35–38.
- [47] 黄婉君, 骆敏儿, 钟娜, 等. 基于独特型-抗独特型玉米赤霉烯酮间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(3): 419–422.
Huang WJ, Luo MR, Zhong N, *et al.* Development of indirect competitive inhibition ELISA method for zearalenone based on idio-type-anti-idio-type reaction[J]. *Chin J Biolog*, 2014, 27(3): 419–422.
- [48] Burmistrova NA, Goryacheva IY, Basova EY, *et al.* Application of a new

- anti-zearalenone monoclonal antibody in different immunoassay formats[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395: 1301–1307.
- [49] Hill NS, Schwarz P, Dahleen LS, *et al.* ELISA analysis for Fusarium in barley: development of methodology and field assessment[J]. *Crop Sci*, 2006, 46: 2636–2642.
- [50] 王妍入, 李培武, 张奇, 等. 噬菌体展示纳米抗体模拟黄曲霉毒素抗原的活性表征[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(4): 685–692.
Wang YR, Li PW, Zhang Q, *et al.* Characterization of a phage-displayed nanobody imitating Aflatoxin antigen[J]. *Sci Agric Sinica*, 2014, 47(4): 685–692.
- [51] Thongrussamee T, Kuzmina NS, Shim WB, *et al.* Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in cereals[J]. *Food Addit Contam*, 2008, 25: 997–1006.
- [52] 刘师文, 何庆华, 邹龙, 等. 谷物中伏马菌素 B₁ 酶联免疫分析法的建立[J]. *食品科学*, 2010, 31(18): 350–354.
Liu SW, He QH, Zou L, *et al.* Development of an ELISA method for determining fumonisin B₁ in cereals [J]. *Food Sci*, 2010, 31(18): 350–354.
- [53] Li YS, Luo XS, Yang SP, *et al.* High specific monoclonal antibody production and development of an ELISA method for monitoring T-2 Toxin in rice [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(7): 1492–1497.
- [54] 张道宏, 李培武, 张奇, 等. 污染粮油食品的主要真菌毒素及胶体金免疫层析技术在快速检测中的应用[J]. *中国油料作物学报*, 2010, 32(4): 577–582.
Zhang DH, Li PW, Zhang Q, *et al.* Major mycotoxins contaminating the cereal and oil foods and application of colloidal-gold immunochromatography assay in mycotoxins detection[J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2010, 32(4): 577–582.
- [55] 骆敏儿, 唐勇, 向军俭. 玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析法的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(7): 729–733.
Luo MR, Tang Y, Xiang JJ. Preparation of anti-zearalenone monoclonal antibody and preliminary establishment of colloidal gold immunochromatographic assay for zearalenone[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2013, 29(7): 729–733.
- [56] Chun HS, Choi EH, Chang HJ, *et al.* A fluorescence polarization immunoassay for the detection of zearalenone in corn[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 639: 83–89.
- [57] 邓省亮, 赖卫华, 许杨. 胶体金免疫层析法快速检测黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 232–235.
Deng SL, Lai WH, Xu Y. Study on Gold Immunochromatography assay for rapid detection of Aflatoxin B₁[J]. *Food Sci*, 2007, 28(2): 232–235.
- [58] 晏丽, 孙秀兰, 张银志, 等. 荧光定量 PCR 检测发酵豆酱中黄曲霉毒素相关基因[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 37(11): 177–182.
Yan L, Sun SL, Zhang YZ, *et al.* Research of quantification of the copy number of nor-1, a gene of the Aflatoxin biosynthetic pathway in fermented bean sauce by real-time PCR[J]. *Food Ferment Ind*, 2012, 37(11): 177–182.
- [59] Shim WB, Yang ZY, Kim JS, *et al.* Development of immunochromatography strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the rapid detection of aflatoxin B₁ in grain and feed samples[J]. *Microbiol Biotechnol*, 2007, 17: 1629–1637.
- [60] Li P, Zhang Q, Zhang W, *et al.* Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut[J]. *Food Chem*, 2009, 115(1): 313–317.
- [61] 宫小明, 任一平, 董静, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定花生、粮油中 18 种真菌毒素[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(1): 6–12.
Gong XM, Ren YP, Dong J, *et al.* Determination of 18 Mycotoxin Contaminants in Peanuts and Oils by Gel Permeation Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *J Instrum Anal*, 2011, 30(1): 6–12.
- [62] Soleimany F, Jinap S, Rahmani A, *et al.* Simultaneous Detection of 12 Mycotoxins in Cereals Using Rp-Hplc-Pda-Fld with Phred and A Post-Column Derivatization System[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2011, 28(4): 494–501.
- [63] 张宁, 李培武, 张奇, 等. 抗单端孢霉烯族 T-2 毒素单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *化学试剂*, 2014, 36(1): 4–8.
Zhang N, Li PW, Zhang Q, *et al.* Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody Against T-2 Toxin[J]. *Chem Reagents*, 2014, 36(1): 4–8.
- [64] Mankevičienė A, Jablonskytė-Raščė D, Maikštėnienė S. Occurrence of mycotoxins in spelt and common wheat grain and their products[J]. *Food Addit Contam: Part A*, 2014, 31(1): 132–138.
- [65] Krska R, Malachova A, Berthiller F, *et al.* Determination of T-2 and HT-2 toxins in food and feed: an update[J]. *World Mycotoxin J*, 2014, 7(2): 131–142.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



青文哲, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物及生物技术。
E-mail: 1035640691@qq.com



陈力力, 教授, 主要研究方向为食品微生物及生物技术。
E-mail: chenlili001@tom.com