

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240919004

引用格式: 蔡如凤, 项乾, 冯雅婷, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 检测试剂盒的制备及应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 51–57.

CAI RF, XIANG Q, FENG YT, *et al.* Preparation and application of aflatoxin B₁ detection kit [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 51–57. (in Chinese with English abstract).

黄曲霉毒素 B₁ 检测试剂盒的制备及应用

蔡如凤¹, 项乾², 冯雅婷¹, 李佳楠^{1*}

(1. 江汉大学生命科学学院, 武汉 430056; 2. 武汉云克隆科技股份有限公司, 武汉 430056)

摘要: **目的** 制备高效价黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 单克隆抗体检测试剂盒, 快速准确检测食品中的 AFB₁。 **方法** 通过碳二亚胺法, 将 AFB₁ 分别与牛血清白蛋白 (bovine albumin, BSA) 偶联合成免疫抗原、与鸡卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) 偶联制备检测抗原; 通过免疫小鼠、细胞融合、杂交瘤细胞筛选, 体内诱生腹水、分离纯化等过程制备 AFB₁ 单克隆抗体, 并开发可用于快速检测 AFB₁ 含量的试剂盒。 **结果** 制备的单克隆抗体效价高达 1:27 w, 对柄曲霉素有弱交叉反应, 反应率为 13%, 与其他 2 种化合物未见交叉反应; 对加标样品的批内、批间试验相对标准偏差分别为 2.6%~3.6% 和 5.0%~8.0%; 检测回收率达到 89.82%~103.64%; 该试剂盒检测灵敏度半数抑制浓度值为 650 pg/mL, 检测范围为 156~5000 pg/mL, 检出限为 100 pg/mL; 以不同产地的玉米面粉为检测样品进行 AFB₁ 含量检测, 各地检测结果分别为 9.756、2.483、3.995、39.080 和 7.831 μg/kg。 **结论** 该研究制备出高效价 AFB₁ 单克隆抗体, 该抗体不仅可以用于试剂盒检测实验方法的开发, 同时为开发基于 AFB₁ 单克隆抗体和胶体金法的快速检测试纸条奠定基础。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 单克隆抗体; 检测试剂盒; 酶联免疫吸附法

Preparation and application of aflatoxin B₁ detection kit

CAI Ru-Feng¹, XIANG Qian², FENG Ya-Ting¹, LI Jia-Nan^{1*}

(1. Life Science College, Jiangnan University, Wuhan 430056, China;
2. Wuhan Cloud-Clone CORP, Wuhan 430056, China)

ABSTRACT: Objective To prepare a high-titer monoclonal antibody detection kit for aflatoxin B₁ (AFB₁) and rapidly and accurately detect AFB₁ in food. **Methods** By carbodiimide method, AFB₁ was conjugated with bovine albumin (BSA) to form immune antigen, and with chicken ovalbumin (OVA) to prepare detection antigen. AFB₁ monoclonal antibody was prepared by immunizing mice, cell fusion, screening of hybridoma cells, inducing ascites *in vivo*, isolation and purification, and a kit for rapid detection of AFB₁ was developed. **Results** The prepared monoclonal antibody had a titer of up to 1:27 w and showed weak cross-reactivity to Shentquumycin, with a reaction rate of 13%. No cross-reactivity was observed with the other 2 compounds. The relative standard deviation of the intra- and inter-batch tests for the spiked samples was 2.6%~3.6% and 5.0%~8.0%, respectively. The recoveries were

收稿日期: 2024-09-19

第一作者: 蔡如凤(2002—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为生物学。E-mail: 231112010001@stu.jhun.edu.cn

*通信作者: 李佳楠(1978—), 女, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: lydian_l@163.com

89.82%–103.64%。The detection sensitivity (median inhibitory concentration value) was 650 pg/mL, with a detection range of 156–5000 pg/mL with the limit of detection of 100 pg/mL. When AFB₁ content was detected in corn flour from different origins, the detection results were 9.756, 2.483, 3.995, 39.080 and 7.831 µg/kg. **Conclusion** This research has prepared high-titer monoclonal antibodies against AFB₁. These antibodies can not only be utilized for the development of test kit detection experimental methods but also lay the foundation for the development of rapid test strips based on AFB₁ monoclonal antibodies and the colloidal gold method.

KEY WORDS: aflatoxin B₁; monoclonal antibodies; detection kit; enzyme-linked immunosorbent assay

0 引言

黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)最早被发现于 1960 年, 是黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)的次级代谢产物, 也是自然界毒性最强的一类真菌毒素, 污染广, 危害大, 对食品安全和人民健康造成巨大威胁, 黄曲霉毒素家族中主要成员包括黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、B₂、G₁、G₂、M₁ 和 M₂, 基本结构中都含有二呋喃环和氧杂萜邻酮(香豆素)^[1-2]。其中以 AFB₁ 分布最广、毒性最强、危害最大; 并且广泛存在于土壤、动植物和各种坚果, 在大豆、稻谷、玉米、通心粉、调味品、牛奶、奶制品、食用油等制品中经常被检出^[3], 是国际癌症研究组织(International Organization for Research on Cancer, IARC)认定的 I 类致癌物^[4]。

国内外常用的 AFB₁ 检测方法主要包括薄层色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用技术, 还有近年来新兴的纳米技术等, 这些方法样本前处理过程过于复杂, 且检测过程对仪器的精密度以及操作人员的专业性都有较高要求, 不够便捷高效, 不适用于 AFB₁ 的快速检测^[5-9]。所以目前更多的是采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)进行检测^[10], 这种方法依赖于抗原抗体反应, 对单克隆抗体的制备要求较高, 但目前的 ELISA 中抗体价效普遍较低, 影响了检测的灵敏度与准确性^[11]。

AFB₁ 分子量为 312.274 Mr, 只有反应原性而无免疫原性, 属半抗原^[12], 只有和牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)、鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)、多聚氨基酸(通常为多聚赖氨酸)等载体蛋白连接后才能转化为既具有反应原性又具有免疫原性的完全抗原, 刺激动物产生分泌抗体。AFB₁ 理化性质稳定, 缺乏和蛋白质偶联的活性基团, 因此需要将其他活性基团引入 AFB₁ 后才能与载体蛋白偶联^[13]。而采用甾族化合物活性基团的引入方法, 以吡啶为催化物, 可以将羧甲基甲酰胺引入到 AFB₁ 中^[14]。基于此, 本研究拟制备高效价且具有高亲和力的 AFB₁ 单克隆抗体, 并将其用于开发高灵敏度的 AFB₁ 快速检测试剂盒, 适用于在食品安全监管中进行大量样品的初检。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛奶、面粉、豆腐乳: 超市购买; 玉米面粉: 网购。

8 周龄, 体重 20~25 g 的雌性纯种白变种实验室小鼠(BALB/C) 8 只: 武汉云克隆科技股份有限公司。

1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC]、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、甲醇(色谱级, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)(纯度≥99.5%, 国药集团化学试剂有限公司); 羧甲基羟胺半盐酸盐(carboxymethoxylamine hemihydrochloride, CMO)(纯度>98.0%, 东京化成工业株式会社); N-羧基琥珀酰亚胺(N-hydroxy succinimide, NHS)(纯度 98.0%, 北京百灵威科技有限公司); 4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP)(纯度 99.0%, 上海迈瑞尔生化科技公司); 聚乙二醇 PEG2000、DMEM 培养基、HAT 培养基(美国赛默飞世尔科技有限公司); 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(湖南韵邦生物科技股份有限公司); BSA(纯度≥98%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 吡啶溶液[质量浓度为 2000 µg/mL, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]。

1.2 仪器与设备

SMR16.1 全自动酶标仪(武汉优尔生生命科学装备有限公司); BSD-150 恒温培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); TGL16 高速离心机(长沙英泰仪器有限公司); UV-2600i 紫外分光光度计(日本岛津公司); JA5003B 千分之一电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); 79-1 磁力搅拌器(常州博远实验分析仪器厂); DYY-15D 电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 人工抗原合成与鉴定

称取 5 mg AFB₁ 溶于 1 mL 吡啶溶液, 随后加入 CMO 和 DMAP, 70 °C 下回流搅拌 2 h, 去吡啶, 旋干, 萃取得到中间产物; 将中间产物溶于 0.5 mL DMF, 加入 2.5 mg EDC

和 1.5 mg NHS, 避光活化 1 h, 把活化的半抗原逐滴加入到提前配置的 BSA 溶液中, 避光反应 2 h^[15-16]。反应产物用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)透析, 得到 AFB₁ 免疫抗原 AFB₁-BSA, 以同样的方法合成检测抗原 (AFB₁-OVA)低温冻存, 备用。

利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和紫外光谱扫描法进行鉴定。

1.3.2 动物免疫及血清效价测定

挑选 4 只 8 周龄, 体重 20~25 g 的雌性纯种 BALB/C 小鼠; 以 AFB₁-BSA 为免疫原进行皮下注射。免疫接种方案为: 初次免疫后 3 周进行加强免疫, 然后每 2 周进行一次加强免疫。加强免疫 3 次后, 测量血清效价, 10 d 后进行冲击免疫。

小鼠第 3 针加强免疫后第 7~10 d, 眼球采血 20 μL, 稀释于 1 mL PBS 中, 离心取上清进行 ELISA 检测(抗原包被质量浓度为 2 μg/mL), 记录每只小鼠的血清效价。利用酶标仪读取 OD_{450 nm} 吸光值, 当免疫小鼠血清孔 OD₄₅₀ 值(P)/阴性小鼠血清孔 OD₄₅₀ 值(N)≥2.1 时, 判定所检测物质为阳性^[17]。

1.3.3 细胞融合

复苏 SP2/0 骨髓瘤细胞, 扩大培养。将免疫过的小鼠脱颈处死解剖取出脾脏, 分离脾细胞, 用含 10%胎牛血清和双抗的 DMEM 培养基悬浮细胞沉淀, 计数并备用。收集骨髓瘤细胞与脾细胞在加入 PEG2000 的作用下融合。加入 DMEM 终止融合反应, 用 HAT 培养基重悬后筛选培养。

1.3.4 单克隆抗体的制备

采取间接 ELISA 法筛选单克隆杂交瘤细胞株并用体内诱生腹水法大量制备单克隆抗体。

96 孔板换液, 每孔加 160 μL HT 培养液。将检测抗原 AFB₁-OVA 包被在酶标板上, 4 °C 过夜; 1% BSA 于 37 °C 封闭 2 h; 加入待检测细胞上清每孔 90 μL, 37 °C 孵育 1 h。洗板 3 次; 每孔加入 100 μL 8000 倍稀释二抗, 37 °C 孵育 1 h。洗板 5 次; 每孔加入 100 μL 显色剂, 37 °C 显色 5 min; 每孔加入 50 μL 终止液, 酶标仪 450 nm/630 nm 双波长读数。

ELISA 筛选出阳性细胞后, 采取有限稀释法进行克隆化。经过多次有限稀释克隆, 筛选出能持续稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 扩大培养并冻存。

最后, 采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体。另取两只 8 周小鼠, 提前 3~7 d 以 500 μL/只的用量腹腔注射石蜡油; 将筛选出的阳性杂交瘤细胞以 1×10⁶/只的细胞数量注射到小鼠的腹腔中, 待小鼠腹部鼓胀后收集腹水。

1.3.5 单克隆抗体的纯化、鉴定及效价分析

采用 Protein G 法纯化腹水中的抗体, SDS-PAGE 电泳检测抗体纯度; 使用抗体亚型鉴定试剂盒检测 AFB₁ 单克隆抗体, 并采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体效价。纯化后的抗体加入防腐剂和甘油冻存。

1.3.6 交叉反应分析

选取部分食品中常用到的食品添加剂进行抗体交叉反应测定, 包括槐角苷、柄曲霉素和胭脂红, 分析制备的抗体在使用时是否会受来自此类物质的交叉作用影响。在该检测中 AFB₁ 作为免疫原, 其他 3 种为交叉免疫原, 根据公式(1)计算交叉反应率。

$$C/\% = \frac{IC_{50}(AFB_1)}{IC_{50}(cAg)} \times 100\%$$

(1)

式中: C 为交叉反应率, %; IC₅₀ 为样品与检测抗原偶联时的半数抑制浓度(median inhibitory concentration); cAg 为交叉免疫原。

1.3.7 试剂盒的制备

将检测抗原用包被液稀释至质量浓度为 2 μg/mL, 并以每孔 100 μL 包被酶标板, 保鲜膜包裹后放入 4 °C 过夜。弃掉酶标板孔内液体, 每孔加 200 μL 封闭液, 放置 37 °C 温箱 1.5 h。弃去孔内液体, 三乙醇胺缓冲盐溶液(Tris buffer saline, TBS)溶液洗涤后控干, 加入酶标板保护液, 每孔 140 μL, 0.5 h 后控干, 制成预包被板, -20 °C 保存。试剂盒组成见表 1。

表 1 AFB₁ 检测试剂盒组成

Table 1 Composition of AFB₁ detection kit

试剂名称	数量	试剂名称	数量
预包被的 96 孔板	1	96 孔板覆膜	4
AFB ₁ 标准品	2	标准品稀释液	1×20 mL
检测液 A	1×120 μL	检测稀释液 A	1×12 mL
检测液 B	1×120 μL	检测稀释液 B	1×12 mL
TMB 底物	1×9 mL	终止液	1×6 mL
浓洗涤液(30×)	1×20 mL	使用说明书	1

1.3.8 试剂盒间接竞争 ELISA 标准曲线的建立

以 B/B₀ 值(B 是不同浓度 AFB₁ 标准品 450 nm 处的吸光值; B₀ 为未添加标准品时 450 nm 处的吸光值)为纵坐标, AFB₁ 标准品质量浓度(156.25、312.50、625.00、1250.00、2500.00、5000.00、10000.00 pg/mL)的对数值(log10)为横坐标, 绘制间接竞争 ELISA 标准曲线, 并进行相关性分析。灵敏度用 IC₅₀ 值, 即标准品与检测抗原偶联时的半数抑制浓度表示; 线性范围代表最大信号值 20%~80%的抑制率(IC₂₀~IC₈₀); 检出限由 IC₁₀ 值计算得出^[18-19]。

1.3.9 试剂盒精密度分析

试剂盒的精密度包括批内精密度以及批间精密度, 即取同批次试剂盒和不同批次试剂盒分别对低、中、高定值样品进行定量检测; 批内每份样品连续测定 20 次, 批间每份样品用同一试剂盒重复测定 10 次; 分别计算样品的平均值和标准偏差。最后按照公式(2)计算出样品测定值变异系数(coefficient of variation, CV), 用 CV 来表示该试剂盒测定时的精密度。

$$CV/\%=\frac{SD}{Mean}\times100\%$$

(2)

式中: SD 为样品标准偏差, pg/mL; Mean 为不同浓度样品的平均值, pg/mL。

1.3.10 加标样品回收率测定

从超市购买符合食品质量安全的牛奶、面粉和豆腐乳, 液体样品直接取样, 固体及半固体样品进行匀浆, 将 AFB₁ 标准品分别加入到以上的样品中, 使终质量浓度分别为 1000、500 和 200 pg/mL, 将混合物混匀, 用 5 mL PBS 浸提 3 min, 4 °C 10000 r/min 下离心 10 min, 取上清液^[20]。使用间接竞争 ELISA 法, 用 AFB₁ 检测试剂盒进行检测, 并根据公式(3)计算回收率(R), 以此还可用于分析该试剂盒在对不同质地样品(液体、块状固体及粉状固体)进行检测时的效果和精确度。

$$R/\%=\frac{MV}{SV}\times100\%$$

(3)

式中: MV 为实际测得 AFB₁ 含量, pg/mL; SV 为理论添加 AFB₁ 标准品含量, pg/mL。

1.4 黄曲霉毒素 B₁ 检测试剂盒对不同产地玉米面粉的实际检测

网购分别产于广东清远、贵州安顺、山西太原、山东菏泽和湖北恩施的玉米面粉为材料。

称取 2.00 g±0.05 g 玉米面粉于 50 mL 离心管中, 加 10 mL 70%甲醇, 振荡 5 min, 室温 4000 r/min 离心 10 min; 取 0.5 mL 上清, 加入 0.5 mL 去离子水, 混匀制成待测样品。用 AFB₁ 检测试剂盒进行检测。

1.5 数据处理

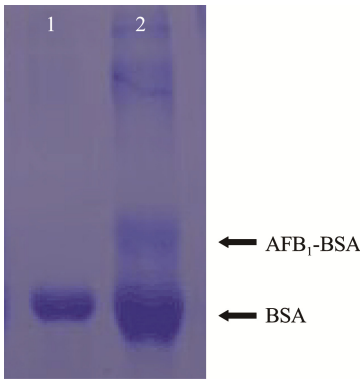
紫外吸收图谱由 LabSolutions UV-Vis (Version1.12)软件分析绘制; 所有实验均进行平行实验, 数据汇合后, 利用 Office 2013 软件进行数据处理并采用 Origin 2024b 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 AFB₁ 完全抗原鉴定

对完全合成抗原 AFB₁-BSA 与 BSA 进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示(图 1)完全抗原原有 2 条带, BSA 只有 1 条带。AFB₁-BSA 的分子量较 BSA 略大, 推测 AFB₁ 与载体蛋白偶联成功。

紫外光谱扫描 AFB₁-BSA、BSA 和 AFB₁, 结果显示(图 2), BSA 在 280 nm 处有特征吸收峰, AFB₁ 在 360 nm 处有特征吸收峰, AFB₁-BSA 在 280 nm 和 360 nm 附近都有特征吸收峰, 由于叠加效应, AFB₁-BSA 完全抗原吸收峰发生蓝移, 说明 AFB₁-BSA 抗原合成成功。



注: 条带 1 为 BSA; 条带 2 为 AFB₁-BSA。

图 1 完全抗体 SDS-PAGE 检测

Fig.1 Detection of complete antibodies by SDS-PAGE

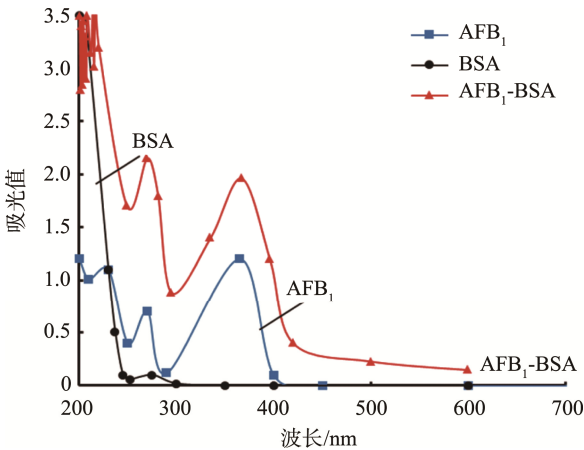


图 2 BSA、AFB₁ 和 AFB₁-BSA 的紫外可见吸收光谱
Fig.2 Ultraviolet-visible absorption spectrum of BSA, AFB₁ and AFB₁-BSA

2.2 免疫小鼠血清效价检测

采集加强免疫后的小鼠眼眶血, 稀释后进行间接 ELISA 检测, 根据 P/N 值, 即各组所测得的 OD_{450 nm} 值与对应阴性对照 OD_{450 nm} 值之比是否大于 2.1 来判定抗体效价。结果显示(表 2), 1、3、4 号小鼠效价均为 1:81K, 2 号小鼠血清效价最高为 1:243K, 因此选择 2 号小鼠进行细胞融合。

表 2 小鼠血清效价测定
Table 2 Determination of serum titers in mice

小鼠 编号	相对应稀释度下 OD _{450 nm} 值							阴性对照 OD _{450 nm} 值	效价
	1:1000	1:3000	1:9000	1:27000	1:81000	1:243000	1:729000		
1	3.423	2.433	1.564	0.960	0.484	0.277	0.187	0.171	1:81K
2	4.538	3.238	3.094	1.843	1.057	0.493	0.303	0.174	1:243K
3	3.795	3.280	2.320	1.403	0.701	0.346	0.260	0.167	1:81K
4	4.537	3.586	2.837	1.362	0.629	0.339	0.206	0.166	1:81K

2.3 单克隆抗体的鉴定、纯化与效价分析

细胞融合后, 采用间接 ELISA 检测培养细胞上清, 对阳性细胞进行 3 次以上有限稀释筛选出能稳定分泌抗 AFB₁ 抗体的杂交瘤细胞株 S419-C5 和 S419-C8^[21]。将单克隆细胞注射到小鼠腹腔, 收集腹水后用 protein G 柱进行抗体纯化, 纯化后的抗体经 SDS-PAGE 电泳分析结果显示 (图 3), 仅有重链和轻链两条带, 说明制备的单克隆抗体具有较高纯度。用抗体亚型鉴定试剂盒检测后发现, 制备的单克隆抗体亚型重链为 IgG1, 轻链为 λ。纯化后的抗体质量浓度为 4.4 mg/mL, 且 S419-C8 细胞株产生抗体效价更高为 1:27w(表 3)。

2.4 交叉反应分析结果

交叉反应分析结果显示(表 4), AFB₁ 单克隆抗体与 AFB₁ 的反应率为 100%; 对柄曲霉素有弱交叉反应, 其交叉反应率为 13%, 对槐角苷和胭脂红无交叉反应; 推测是因为柄曲霉素是 AFB₁ 的前体, 两者的分子结构较相似所

致^[22]; 说明制备的单克隆抗体具有较高的特异性, 不易受其他潜在食品添加剂的影响。



注: 条带 1 为 S419-C5 细胞株抗体; 条带 2 为 S419-C8 细胞株抗体。

图 3 纯化抗体 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of purified antibody

表 3 纯化后抗体效价分析
Table 3 Analysis of purified antibody titers

细胞株	对应稀释度下 OD _{450 nm} 值							空白对照 OD _{450 nm} 值	效价
	1w	3w	9w	27w	81w	243w	729w		
S419-C8	3.545	2.764	1.786	0.903	0.266	0.093	0.025	0.23	1:27w
S419-C5	2.469	1.521	0.594	0.201	0.052	0.029	0.018	0.19	1:9w

表 4 抗 AFB₁ 抗体与 AFB₁ 及其他化合物的交叉反应
Table 4 Cross-reactivity of anti-AFB₁ antibodies with AFB₁ and other compounds

小分子	分子结构	IC ₅₀ /(pg/mL)	交叉反应/%
AFB ₁		650	100.00
槐角苷		NR	<0.01
柄曲霉素		5000	13.00
胭脂红		NR	<0.01

注: NR. 无反应。

2.5 标准曲线的建立

间接竞争 ELISA 抑制曲线线性关系良好, 回归方程式

为 $Y=-0.4307X+1.795$ ($r^2=0.9965$); IC₅₀ 值为 650 pg/mL, 经计算得出标准曲线的线性检测范围为 156~5000 pg/mL, 检出限为 100 pg/mL。说明本研究制备的 AFB₁ 检测试剂盒灵敏度较好。

2.6 试剂盒精密度分析

对试剂盒进行样品批内差和批间差的分析结果显示 (表 5), 批内 CV 为 2.6%~3.6%, 批间 CV 为 5.0%~8.0%。批内、批间实验的 CV 均小于 10%, 说明制备的试剂盒具有高稳定性和高精密度。

表 5 批内与批间试剂盒变异率分析
Table 5 Analysis of the variation rates of kits within and between batches

	样本	n	均值 /(pg/mL)	标准差 /(pg/mL)	CV/%
批内差	1	20	217	5.7	2.6
	2	20	512	18.5	3.6
	3	20	1231	33.1	2.6
批间差	1	10	213	17.1	8.0
	2	10	521	32.1	6.1
	3	10	1331	67.7	5.0

2.7 加标样品 AFB₁ 回收率测定

使用制备的试剂盒检测添加了 AFB₁ 标准品的牛奶、

面粉和豆腐乳,结果显示(表 6),加标回收率分别为 89.82%~100.57%、93.20%~103.64%、90.51%~98.41%,相较于魏功等^[23]报道的利用高相液相色谱法检测,本研究的加标回收率优于其回收率 85%~95%,表明该研究制备的 AFB₁ 检测试剂盒准确性高,可用于精确分析样品中的 AFB₁ 含量。且相同条件与检测方法下,在不同质地样品(液体、粉状固体和块状固体)的检测中,在粉末状样品的检测效果更佳。

表 6 加标样品中 AFB₁ 回收率分析
Table 6 Analysis of recovery rates of AFB₁ content in food samples

样品	加标量/(pg/g)	测定值/(pg/g)	回收率/%
牛奶	200	201.13±0.95	100.57
	500	464.54±62.63	92.91
	1000	898.22±75.82	89.82
面粉	200	207.29±16.73	103.64
	500	466.01±51.15	93.20
	1000	953.08±86.72	95.31
豆腐乳	200	196.81±13.56	98.41
	500	452.54±47.73	90.51
	1000	936.21±96.35	93.62

2.8 检测试剂盒对不同产地玉米面粉的实测结果

使用制备的试剂盒检测网购于不同产地的玉米面粉中 AFB₁ 的含量,结果显示(表 7)。

表 7 市售玉米面粉中 AFB₁ 的含量检测结果
Table 7 Test results of AFB₁ content in commercially available corn flour

样品编号	OD _{450 nm} 值	AFB ₁ 质量浓度/(ng/mL)	原样品中 AFB ₁ 含量/(μg/kg)
1	0.625	1.951	9.756
2	1.109	0.497	2.483
3	0.996	0.799	3.995
4	0.388	7.816	39.080
5	0.653	1.566	7.831

注:样品 1 产于广东清远;样品 2 产于贵州安顺;样品 3 产于山西太原;样品 4 产于山东菏泽;样品 5 产地为湖北恩施。

来自于广东清远的样品中 AFB₁ 含量为 9.756 μg/kg,贵州安顺的样品中 AFB₁ 含量为 2.483 μg/kg,山西太原的样品中 AFB₁ 含量为 3.995 μg/kg,山东菏泽的样品中 AFB₁ 含量为 39.080 μg/kg,湖北恩施的样品中 AFB₁ 含量为 7.831 μg/kg。除来自于山东菏泽的样品外,其余 4 种玉米面粉中 AFB₁ 含量均不超过 20 μg/kg,符合 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》要求,但 5 个样品均不符合欧盟对食品中 AFB₁ 的含量不能超过 2 μg/kg 的标准(EC 1881/2006)。

我国玉米中 AFB₁ 污染情况与地域的水分含量有关,总体上,南方玉米中 AFB₁ 的污染情况要高于北方,如四

川、河南、山东等地区玉米黄曲霉毒素(B₁、B₂、G₁、G₂)含量显著高于其他省份^[24-25]。本研究测得的 AFB₁ 含量显示:山东>广东>湖北>山西>贵州,符合我国玉米中 AFB₁ 污染总体情况^[26],玉米破损粒的 AFB₁ 含量常常是完整玉米粒的几十倍,推测山东菏泽来源的样品使用的破损粒较多。此结果也证明该研究制备的试剂盒在实际应用中的可实施性。

3 讨论与结论

AFB₁ 具有高毒性和强致癌性,给食品安全带来了巨大风险^[27],因此,高效精准检测食品中的 AFB₁ 至关重要。随着生活水平逐渐改善,人们对食品安全的关注度也日益升高,对于食品中有毒物质的灵敏、准确、便捷检测需求增速显著。

本研究将 AFB₁ 与载体蛋白 BSA 偶联制备了免疫原;通过免疫小鼠、细胞融合、抗体纯化等过程获得了效价高达 1:27w 的 AFB₁ 单克隆抗体;建立了检测 AFB₁ 的间接竞争 ELISA 方法,其中 IC₅₀ 为 650 pg/mL,线性范围为 156~5000 pg/mL,检出限为 100 pg/mL;在已有文献陈文星等^[28]基于纳米抗体-荧光素酶检测 AFB₁、董高丽等^[29]利用胶体金免疫层析试纸和 ZHANG 等^[30]利用磁性捕获荧光分离器检测 AFB₁ 的研究中,最低检出限分别为 0.205、20、0.1146 ng/mL 均高于本研究的检出限 0.1 ng/mL。本研究制备的试剂盒具有良好的特异性、灵敏性和重复性,能快速准确检测市售玉米面粉中 AFB₁ 含量,为食品安全监管中进行大量样品的初检提供了实验方法和检测产品。同时本研究制备的高效价 AFB₁ 单克隆抗体,可用于进一步开发基于胶体金法的 AFB₁ 快速检测试纸条,从而实现无需仪器设备的 AFB₁ 现场检测,为餐饮业原材料检测和食品监管部门抽检提供便利。

参考文献

[1] YANLI M, YU M, DI H, *et al.* Portable visual quantitative detection of aflatoxin B₁ using a target-responsive hydrogel and a distance-readout microfluidic chip [J]. Lab On A Chip, 2016, 16(16): 3097-3104.

[2] WEIYA C, PAN Y, KEPENG Y, *et al.* Aflatoxin B₁: Metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development [J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2021, 32(6): 41-42.

[3] 李康, 应美蓉, 盛慧萍, 等. 胶体金免疫层析技术在真菌毒素快速检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 201-206.

LI K, YING MR, SHENG HP, *et al.* Application of colloidal gold immunochromatographic assay in rapid detection of mycotoxins [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2013, 4(1): 201-206.

[4] IARC. International Agency for Research on Cancer, WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene aflatoxins [C]. Lyon: IARC, 2002.

[5] HUSSAIN A, RAHMAN Z, KHAN M. Detection of aflatoxins in peanut oils marketed in peshawar, pakistan using thin layer chromatography [J]. Journal of Food Quality and Hazards Control, 2021, 8(2): 87-91.

[6] SOMSUBSIN S, SEEBUNRUENG K, BOONCHIANGMA S, *et al.* A

- simple solvent based microextraction for high performance liquid chromatographic analysis of aflatoxins in rice samples [J]. *Talanta*, 2018, 176: 172–177.
- [7] FATHALLAH N, DEEB EM, RABE AA, *et al.* Ultra-performance liquid chromatography coupled with mass metabolic profiling of *Ammi majus* roots as waste product with isolation and assessment of oral mucosal toxicity of its psoralen component xanthotoxin [J]. *Metabolites*, 2023, 13(10): 1044.
- [8] 王亚芳, 任文洁, 何保山. 基于胶体金-适配体的层析试纸条检测玉米中黄曲霉毒素 B₁ [J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2024, 45(2): 106–113.
- WANG YF, REN WJ, HE BS. Detection of aflatoxin B₁ in corn by chromatography strip based on colloidal gold aptamer [J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2024, 45(2): 106–113.
- [9] HONGXIA G, QINGSONG C. Development of rapid dispersive pipette extraction method for analysis of aflatoxins and major metabolite using high performance liquid chromatography (HPLC) [Z]. 2018.
- [10] WANG CJ, ZHANG L, LUO JY, *et al.* Development of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for high-throughput detection and risk assessment of aflatoxin B₁ in animal-derived medicines [J]. *Toxicon*, 2021, 197: 99–105.
- [11] HAN S, YANG Y, CHEN T, *et al.* Quantitative determination of aflatoxin b₁ in maize and feed by ELISA and time-resolved fluorescent immunoassay based on monoclonal antibodies [J]. *Foods*, 2024, 13(2): 319.
- [12] 张宁, 赵志琴, 范志华, 等. 酶联免疫吸附法快速检测黄曲霉毒素 [J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(3): 146–150.
- ZHANG N, ZHANG ZQ, FAN ZH, *et al.* Rapid detection of aflatoxin by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(3): 146–150.
- [13] 张勋. 真菌毒素类高灵敏高通量快速检测方法研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- ZHANG X. High-sensitivity, high-throughput and rapid detection immunoassay for mycotoxins [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [14] 王磊. 黄曲霉毒素 B₁ 免疫学快速检测技术研究 [D]. 郑州: 河南科技大学, 2011.
- WANG L. Preparation of monoclonal antibody and establishment of immunological rapid test method of AFB₁ [D]. Zhengzhou: Henan University of Science and Technology, 2011.
- [15] 姚静静, 胡晓飞, 韩俊岭, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的制备及基于该抗体的黄曲霉毒素 B₁ 免疫学检测方法的建立 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31(3): 1405–1414.
- YAO JJ, HU XF, HAN JL, *et al.* Establishment of immunologic detection method for aflatoxin B₁ based on preparation of aflatoxin B₁ monoclonal antibody [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(3): 1405–1414.
- [16] KEMP HA, MORGAN MRA. Studies on the detrimental effects of bivalent binding in a microtitration plate ELISA and possible remedies [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1986, 94(1/2): 65–72.
- [17] 谢林梅, 唐子木, 钱新杰, 等. 非洲猪瘟病毒 p72 重组蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(13): 5–11.
- XIE LM, TANG ZM, QIAN XJ, *et al.* Preparation of monoclonal antibody against recombinant protein of African swine fever virus p72 and establishment of double antibody sandwich ELISA method [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2023(13): 5–11.
- [18] 姜金庆, 李新朋, 李艺. 雌二醇人工抗原的合成及间接竞争 ELISA 标准曲线的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(5): 772–775, 780.
- JIANG JQ, LI XP, LI Y. Synthesis of estradiol artificial antigen and establishment of an indirect competitive ELISA standard curve [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(5): 772–775, 780.
- [19] HUO JQ, BOGDAN B, LI ZF, *et al.* Hapten synthesis, Antibody development, and a highly sensitive indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of dicamba [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(20): 5711–5719.
- [20] 谢倩, 李庆, 李佳楠. 日落黄酶联免疫试剂盒的制备及应用 [J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6): 326–332.
- XIE Q, LI Q, LI JN. Preparation and application of ELISA kit for detection of sunset yellow [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(6): 326–332.
- [21] 张怡聪, 张杰, 房健, 等. 鼠伤寒沙门菌延伸因子 EF-Tu 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(2): 137–141.
- ZHANG YC, ZHANG J, FANG J, *et al.* Preparation and identification of the monoclonal antibody against elongation factor Tu of *Salmonella typhimurium* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(2): 137–141.
- [22] NIETO DHC, GRANERO MA, ZON AM, *et al.* Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 118: 460–470.
- [23] 魏功, 王乐, 王慧, 等. 大曲中黄曲霉毒素 B₁ 的高效液相色谱检测方法 [J]. *酿酒*, 2024, 51(1): 105–108.
- WEI G, WANG L, WANG H, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in Daqu by high performance liquid chromatography [J]. *Liquor Making*, 2024, 51(1): 105–108.
- [24] PRAKASH O, SIRADHANA B S. Factors affecting formation of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus* on Ganga-5maize hybrid [J]. *Current Science*, 1978, 47: 695–696.
- [25] 兰静, 金海涛, 赵琳, 等. 玉米真菌毒素污染与控制技术研究进展 [J]. *农产品质量与安全*, 2020(5): 15–21.
- LAN J, JIN HT, ZHAO L, *et al.* Research advance in mycotoxin contamination in maize and its control technology [J]. *Quality and Safety of Agro-products*, 2020(5): 15–21.
- [26] 邱立忠, 王德印, 刘鹏飞, 等. 玉米(玉米油)中黄曲霉毒素的检测与控制 [J]. *齐鲁工业大学学报*, 2021, 35(5): 23–30.
- QIU LZ, WANG DY, LIU PF, *et al.* Detection and control of aflatoxin in corn and corn oil [J]. *Journal of Qilu University of Technology*, 2021, 35(5): 23–30.
- [27] LU YY, CHEN R, DONG YZ, *et al.* Magnetic relaxation switching immunoassay based on “limited-magnitude” particles for sensitive quantification of aflatoxin B₁ [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1266: 341329.
- [28] 陈文星, 王凤华, 谭晓亮, 等. 基于纳米抗体-荧光素酶的黄曲霉毒素 B₁ 检测方法构建 [J]. *中国食品学报*, 2024, 24(4): 349–360.
- CHEN WH, WANG FH, TAN XL, *et al.* Development of the detection method for aflatoxin B₁ based on nanobody-nano luciferase fusion proteins [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2024, 24(4): 349–360.
- [29] 董高丽, 江迎春, 胡鹏, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析试纸条的制备及性能研究 [J]. *山东化工*, 2024, 53(8): 29–31, 38.
- DONG GL, WANG YC, HU P, *et al.* Studies on the preparation and properties of aflatoxin B₁ colloidal gold immunochromatography strip [J]. *Shandong Chemical Industry*, 2024, 53(8): 29–31, 38.
- [30] ZHANG NT, BAI JW, ZHAO K. Detection of aflatoxin B₁ by a magnetic capture separator with time-resolved fluorescent microspheres [J]. *Microchemical Journal*, 2024, 199: 110040.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)