

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241028010

引用格式: 谭建林, 彭珍华, 孙皓, 等. 鹅膏毒素胶体金酶联免疫层析试纸条的研制及其应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 69–75.

TAN JL, PENG ZH, SUN H, *et al.* Development and application of colloidal gold enzyme-linked immunochromatographic test strip for amanitin detection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 69–75. (in Chinese with English abstract).

鹅膏毒素胶体金酶联免疫层析试纸条的 研制及其应用

谭建林¹, 彭珍华¹, 孙皓¹, 杨黎¹, 王亚琴¹, 方淑兵², 辛燕斌¹,
马雪涛¹, 牛之瑞^{1*}

(1. 云南省产品质量监督检验研究院/国家热带农副产品质量检验检测中心, 昆明 650223;

2. 青岛普瑞邦生物工程有限公司, 青岛 266001)

摘 要: **目的** 基于免疫层析技术, 研制检测蘑菇中鹅膏毒素的酶联免疫试纸条。**方法** 采用 N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基卡巴朴胺[N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]作为活化剂, 引入 6-氨基己酸得到鹅膏毒素半抗原, 并进一步与钥孔帽贝血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)和牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)偶联制备免疫原和包被原, 然后利用免疫原免疫 Balb/c 小鼠来制备单克隆抗体。通过制备胶体金和金标抗体, 优化包被抗原、二抗浓度及提取液, 成功研制鹅膏毒素胶体金免疫层析试纸条, 并对其进行交叉反应、稳定性、重复性、正确性进行了评价。**结果** 试纸条对 α -鹅膏毒素、 β -鹅膏毒素和 γ -鹅膏毒素的检出限分别为 100、20 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。灵敏度为 100%, 假阳性率和假阴性率为 0%, 且与现有仪器方法检测结果一致, 同其他蘑菇毒素无交叉反应。**结论** 该试纸条具有操作简便, 重复性高、稳定性好的特点, 适用于蘑菇中鹅膏毒素的现场筛查和快速检测。**关键词:** 鹅膏毒素; 胶体金; 免疫层析试纸条; 蘑菇

Development and application of colloidal gold enzyme-linked immunochromatographic test strip for amanitin detection

TAN Jian-Lin¹, PENG Zhen-Hua¹, SUN Hao¹, YANG Li¹, WANG Ya-Qin¹,
FANG Shu-Bing², XIN Yan-Bin¹, MA Xue-Tao¹, NIU Zhi-Rui^{1*}

(1. Yunnan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, National Tropical Agricultural By-products Quality Inspection and Testing Center, Kunming 650223, China; 2. Qingdao Pribolab Bioengineering Co., Ltd., Qingdao 266001, China)

ABSTRACT: Objective To develop an enzyme-linked immunochromatographic test strip for the determination of amanita toxin in mushroom based on immunochromatography. **Methods** N-hydroxysuccinimide (NHS) and

收稿日期: 2024-10-28

基金项目: 国家市场监督管理总局技术保障专项(2022YJ25); 云南省市场监督管理局科技计划项目(2023YSJK03)

第一作者: 谭建林(1985—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全与生物毒素研究。E-mail: ynzjtg@126.com

*通信作者: 牛之瑞(1982—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与检验。E-mail: bullnzh@163.com

N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) were used as activators, 6-aminoheptanoic acid was introduced to obtain amanitin peptide hapten, and further conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA) to prepare immunogen and coating antigen. Then, the immunogen was used to immunize Balb/c mice to prepare monoclonal antibodies. The colloidal gold immunochromatographic test strip for amanitin was successfully developed by preparing colloidal gold and gold labeled antibody, optimizing the concentration of coating antigen, secondary antibody and extracting solution, and then its cross reactivity, stability, repeatability, and accuracy were evaluated. **Results** The limits of detection of α -amanitin, β -amanitin, and γ -amanitin peptide were 100, 20 and 50 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The sensitivity was 100%, the false positive rate and false negative rate were 0%, and the results were consistent with the existing instrumental methods without cross reaction with other mushroom toxins. **Conclusion** The test strip has the characteristics of simple operation, high repeatability and good stability, and is suitable for on-sites screening and rapid detection of amanitin in mushrooms.

KEY WORDS: amanitin; colloidal gold; immunochromatographic test strip; mushroom

0 引言

蘑菇引起的食物中毒是世界上许多国家食品安全的重点关注问题^[1-4]。我国每年都有食用毒蘑菇引起的食物中毒事件,以夏季最为常见,死亡率高,其中含鹅膏毒素蘑菇中毒死亡人数超过蘑菇中毒总死亡人数的 90%^[3-5]。2023 年,中国疾病预防控制中心在对 24 个省级行政区的 505 起蘑菇中毒事件进行了调查,1303 名患者中 16 人死亡,病死率为 1.23%^[6]。鹅膏毒素(amanitin, AMA)主要包括有 α -AMA、 β -AMA 和 γ -AMA,对人的口服半致死量(lethal dose, 50%, LD_{50})为 0.2~0.5 mg/kg ^[7-8]。AMA 毒性强、致死率高,人体摄入 AMA 后,6~12 h 无明显症状,12~24 h 会出现恶心、呕吐腹泻和腹痛等常见中毒症状,72~96 h 进入肝毒性阶段,抑制细胞 RNA 聚合酶的活性,阻碍蛋白质的合成,引起肝细胞的坏死,是引起肝损害型中毒主要毒素^[8-12]。

目前,AMA 的检测方法主要有:免疫学检测方法^[13-14]、纳米生物传感器检测方法^[15]、毛细管电泳质谱法^[16]、高效液相色谱法^[17]、液相色谱-离子阱质谱法^[18]、液相色谱-串联质谱法^[19-22]、液相色谱-四极杆飞行时间质谱法^[23-24]、液相色谱-高分辨质谱法^[25-26]、基因扩增法^[27-28]等。我国目前没有检测 AMA 的国家标准或行业标准,国家市场监督管理总局于 2020 年 11 月 19 日发布了食品补充检验方法 BJS 202008《蘑菇中 α -鹅膏毒素等 6 种蘑菇毒素的测定》,规定了蘑菇中 α -AMA 等 6 种蘑菇毒素的液相色谱-串联质谱测定方法,其具有灵敏度高、检出限低、重复性好等优点。但是上述方法存在检测时间长、操作烦琐以及仪器昂贵等问题,限制其应用。免疫学检测法主要是基于抗原抗体之间的特异性反应原理而建立,其具有快速、操作简单、直观等特点适合现场的初步检测。对于 AMA 来说,国内外报道主要在酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法^[13-14],ELISA 方法需要酶标仪以及专业人员进行操作,不适用现场快速检测和普通消费者的使

用。同时,国内对于 AMA 免疫层析试纸条的报道极少。

因此,基于 AMA 蘑菇中毒具有发作紧急的特点,亟需对 AMA 进行现场快速检测。本研究针对野生菌中主要引发中毒的 AMA,开发一种基于胶体金免疫层析试纸条,促进我国市场监管机构对于蘑菇及其制品的监管。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蘑菇样品(24 份):云南省昆明市、玉溪市、楚雄市野外采集。

α -AMA、 β -AMA、 γ -AMA、羧基二羟基鬼笔毒素、羧基三羟基鬼笔毒素、二羟基鬼笔毒素标准品(纯度 $\geq 90\%$,上海安谱瑞世标准技术服务有限公司);钥孔帽贝血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)(美国 Amresco 公司);弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)、弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant, FICA)(美国 Sigma 公司);Balb/c 小鼠[北京实验动物研究中心,实验动物许可证号 SYXK(京)2020-0038];SP20 骨髓瘤细胞、DMEM 培养基、胎牛血清(上海酶联生物科技有限公司);HAT 培养基、HT 培养基、细胞培养板、细胞培养皿、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS, 浓度 10 mmol/L)、Tris 缓冲液(上海普飞生物技术有限公司);氯金酸、碳酸钾、柠檬酸三钠、二甲基甲酰胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基卡巴朴胺、N-羧基琥珀酰亚胺(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、protein G 纯化柱[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline with Tween-20, PBST, 浓度 10 mmol/L)、三乙醇胺缓冲盐水溶液(Tris-buffered saline, TBS, 浓度 50 mmol/L)、PBST 和 TBS 混合溶液(TBST, 浓度 50 mmol/L)、甘氨酸盐酸缓冲液(浓度 0.1 mmol/L)、Tirs 缓冲液(浓度 1 mmol/L)(青岛普瑞邦生物工程有限公司)。

1.2 仪器与设备

1290-6460QQQ 液相色谱-串联质谱仪(美国 Agilent 公司); HX-80HX-160 二氧化碳培养箱(上海航佩仪器有限公司); BSA224S 电子天平[感量 0.1 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 β -AMA 抗原制备

AMA 是小分子, 不具备免疫原性, 需要偶连蛋白后才具备免疫原性。称取 2 mg β -AMA 标准品, 用 0.3 mL 的二甲基甲酰胺(dimethyl formamide, DMF)溶解, 然后立即加入 1 mg 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基卡巴朴胺[N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]以及 1 mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS), 25 °C 搅拌活化反应 2 h。称取 10 mg 的 KLH 蛋白用 2 mL 的 0.01 mol/L PBS (pH 8.0)溶解, 然后将活化的 β -AMA 加入 KLH 溶液中, 室温搅拌反应 6 h。用 10 kD 超滤管离心超滤, 纯化得到 β -AMA-KLH 免疫原; 采用相同方法将 AMA 半抗原偶连到 BSA 蛋白上制备出包被原 β -AMA-BSA。

1.3.2 抗原鉴定

采用液相色谱-串联质谱法检测超滤管滤液中 β -AMA 的含量, 从而计算 β -AMA 在蛋白上的偶联量^[29]。

1.3.3 β -AMA 单克隆抗体的制备

通过制备的 β -AMA 抗原 β -AMA-KLH 对小鼠进行注射, 获得免疫小鼠。经过免疫方法确认、免疫及血清检测、融合、筛选、单克隆制备、筛选、注射, 获得腹水提纯, 筛选出满足要求的原料抗体, 为持续产出建立基础。

(1) 免疫程序

将 β -AMA-KLH 抗原免疫 BALB/c 小鼠, 首次免疫采用抗原与 FCA 进行乳化免疫小鼠, 之后免疫抗原与 FICA 进行乳化免疫小鼠; 细胞融合前冲击免疫抗原用生理盐水稀释免疫小鼠。首次免疫采用 100 μ g 抗原对小鼠进行皮下多点注射, 二次免疫与首次免疫间隔 28 d, 免疫剂量减半为 50 μ g, 之后加强免疫之间间隔 14~21 d, 进行大腿肌肉注射, 免疫剂量减为 25 μ g。免疫期间定时采血进行效价测定^[30]。冲击免疫前检测小鼠血清效价, 并用 5 ng/mL 的 β -AMA 进行抑制率检测。冲击免疫与最后一次加强免疫间隔大于 14 d, 冲击免疫后 3 d 进行融合。

(2) 细胞融合

脾细胞制备: 选取效价不低于 10 万的小鼠, 冲击免疫后 3 d, 无菌条件下取脾脏, 研磨过 70 μ m 筛网, 用红细胞裂解液裂解红细胞, 制成单细胞悬液, 进行细胞计数。将 SP2/0 和脾细胞按照 1:4 比例混合, 用电融合缓冲液洗涤 2 遍, 最后用电融合缓冲液重悬细胞混合液, 调整细胞密度 1×10^7 加入融合池内, 设置好电融合仪参数进行电融合。

融合完成后用含有 20% FBS 的 HAT 完全培养基重悬细胞, 进行铺板。融合 3 d 后用 20% FBS 的 HT 培养基换液, 换液后 7 d 进行 ELISA 初筛检测。

(3) 细胞融合后的筛选

采用 β -AMA-BSA 检测抗原包被, 检测细胞上清。将阳性克隆转入 24 孔内培养 3 d 后进行复检。分别用 α -AMA、 β -AMA 和 γ -AMA 标准品进行细胞上清抑制实验检测, 筛选出目的阳性细胞株进行亚克隆。

(4) 亚克隆及细胞定株

连续亚克隆 2 次, 采用 1 ng/mL 的 β -AMA 进行抑制率检测。最终选择抑制率最高的阳性克隆细胞株, 进行细胞扩大培养并冻存。

(5) 单克隆抗体的生产

将阳性细胞株按照接种密度 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 接种 200 mL 培养基, 进行无血清滚瓶培养驯化, 设置滚瓶培养箱转速 12 r/min, CO₂ 浓度 5%, 培养 7~10 d 收集细胞上清进行亲和纯化。

(6) 抗体纯化

将纯化样品、protein G 纯化柱、10 mmol/L PBS、0.1 mmol/L 甘氨酸盐酸缓冲液及 1 mmol/L Tris 缓冲液从冰箱内取出恢复室温。加入 5 mL 平衡缓冲液至纯化柱中, 按约 1 mL/min 的流速流出平衡缓冲液。将样品按照约 1 mL/min 的流速上样至层析柱中。用 30 mL 的平衡缓冲液洗涤纯化柱, 流速维持约 2 mL/min, 洗至流出液的 A280 吸光度达到稳定。用 10~15 mL 洗脱缓冲液洗脱抗体, 流速维持约 1 mL/min, 收集含有目的免疫球蛋白的洗脱液, 并立刻加入中和缓冲液, 调节 pH 至 7.4。用 pH 7.4 的 PBS 透析抗体, 最后抗体于 -20 °C 保存。

1.3.4 免疫层析试纸条的检测原理

基于胶体金为显色标签的试纸条目视判定结果如图 1 所示。试纸条反应区内包被有质控线(C 线)和检测线(T 线), T 线为 AMA 与 BSA 的结合物(AMA-BSA), 结合垫上为抗 AMA 单克隆抗体与胶体金的结合物(Ab-CG), 当样品中不

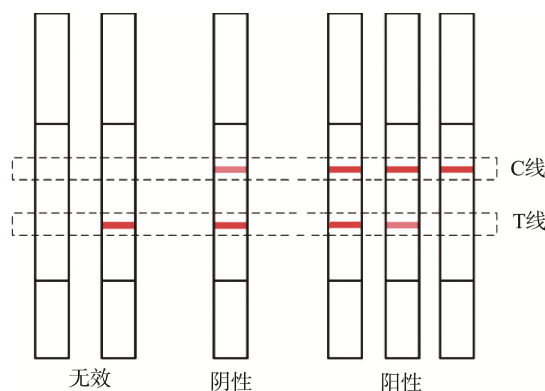


图 1 目视判定示意图

Fig.1 Visual judgment diagram

含 AMA 时, Ab-CG 随液体层析伸展至 T 线位置, 与 T 线上的 AMA-BSA 特异性结合, 形成一条很深的红线(T 线), 多余的 Ab-CG 继续向上涌动至 C 线位置, 形成一条很浅的红线(C 线), 当样本中含 AMA 时, 样本中的 AMA 会与 T 线上的 AMA-BSA 竞争结合 Ab-CG, 使 T 线的颜色变浅或者不显色, 而 C 线颜色变深。

1.3.5 胶体金标记抗体制备

(1) 胶体金的制备

量取 200 mL 超纯水, 加入到 250 mL 洁净锥形瓶中, 将锥形瓶置于磁力加热搅拌器的加热板上, 放入搅拌子, 打开搅拌旋钮, 开始搅拌。用移液器吸取 2 mL 质量分数为 1% 的氯金酸溶液, 加入上述 100 mL 超纯水中。打开加热旋钮, 加热至沸腾, 快速加入质量分数为 2% 的柠檬酸三钠水溶液 1~3 mL, 溶液在 2 min 内由灰色变黑色, 最后变成红色, 加热搅拌 10 min, 关掉加热旋钮, 搅拌至室温, 加超纯水定容至 200 mL, 避光保存。

(2) 金标抗体制备

取 3 只洁净的 1.5 mL 离心管, 每只加入 1 mL 胶体金。分别加入 0.2 mol/L 碳酸钾 5 μ L, 混合均匀, 然后分别加入 6 μ g 的 β -AMA 抗体, 室温反应 30 min。然后分别加入 10 μ L 的 20% BSA, 混匀, 室温反应 30 min。13000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用 1/10 体积复溶液复溶, 备用。

1.3.6 包被抗原及二抗浓度的优化

β -AMA 抗原分别作 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 ($V:V$, 下同) 稀释, 二抗分别作 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 稀释, 分别包被于膜上, 包被宽度均为 1 μ L/cm²。对不同组合进行标号。选择 C、T 线颜色满足要求, 且灵敏度满足要求的组合, 最终选择 β -AMA 抗原 1:20 稀释, 二抗 1:80 稀释。

1.3.7 β -AMA 试纸条组装

硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)下段距聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)背板下边缘 20 mm, 金标垫压膜下端 2 mm, 样品垫压金垫一半, 下端与 PVC 背板下边缘对齐, MAX 线压 NC 膜 2 mm, 吸水纸压膜上端 3 mm, 即时贴压 NC 膜 3 mm, 在 PVC 背板上依次粘贴样品垫, 结合释放垫, 硝酸纤维素膜, 吸收垫, 并在样品垫外面黏贴保护膜。

1.3.8 样本提取液的优化

取 AMA 阴性的 4 种新鲜蘑菇样本各 1 g, 每种样品 8 份, 分别不添加以及添加 20 μ g/kg 的 β -AMA 标准品, 然后加入 5 mL 的 PBS、PBST、TBS 以及 TBST 4 种提取液进行检测, 振荡混匀 5 min, 静置 1 min, 取上清液进行检测。选择提取率最高的稀释液作为最终的样品稀释液。

1.3.9 试纸条检出限验证

取 4 份新鲜阴性蘑菇样本, 分别添加 0、20、40、80 μ g/kg 的 β -AMA 标准品, 用提取液 5 倍提取后, 采用试纸条进行检测, 结果如图 2 所示, 未添加标品的试纸条, T 线颜色明显

比 C 线深, 显示为阴性; 随着添加浓度的上升, T 线越来越浅, C 线越来越深, 当添加 20 μ g/kg 的 β -AMA 标准品时, T 线与 C 线颜色一致, 定义此时浓度为样品的检出限。

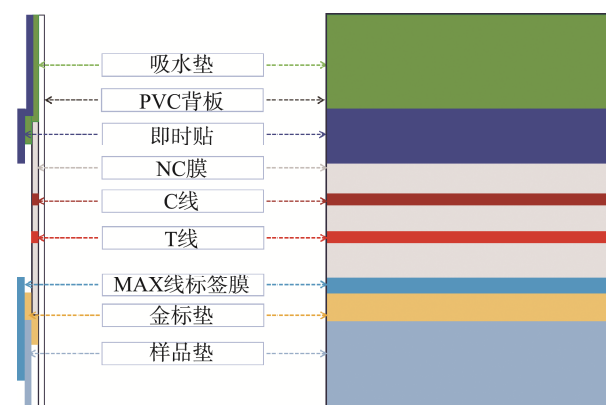


图 2 β -AMA 试纸条的结构

Fig.2 Structure of β -AMA toxin test strip

1.3.10 试纸条性能评估及验证

(1) 重复性验证

取同一种 AMA 阴性的蘑菇样本 40 份, 其中 20 份添加 20 μ g/kg 的 β -AMA, 1~20 号样本为不添加 AMA 样本, 21~40 号样本为添加 AMA 样本, 然后用制备的试纸条进行检测。

(2) 稳定性验证

将制备好的试纸条分别放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱、室温以及 37 $^{\circ}$ C 烘箱, 分别放置 7、14、21 和 28 d, 然后检测阴性样品以及添加 20 μ g/kg 的 β -AMA。

(3) 交叉反应性验证

在 AMA 阴性样本中分别添加 100 μ g/kg 的 α -AMA、 β -AMA、 γ -AMA、羧基二羟基鬼笔毒肽、羧基三羟基鬼笔毒肽和二羟基鬼笔毒肽等 AMA 类似物, 用于检测试纸条交叉反应性。

(4) 其他性能指标验证

参照《食品快速检测产品符合性评价技术要求》检测各项性能指标, 包括灵敏度、假阳性率和假阴性率。

1.3.11 实际样品准确性测试

新鲜采集的蘑菇样本 24 份, 分别用试纸条和 BJS 202008 中的仪器方法(液相色谱-串联质谱方法)进行检测, 对比两种检测方法的结果, 判断本项目试纸条的准确性。

1.4 数据处理

实验重复 3 次, 实验结果以平均值表示。原理图和结构图采用 PowerPoint 2016 绘制, 表格采用 Word 2016 进行绘制。

2 结果与分析

2.1 AMA 抗原鉴定

采用液相色谱-串联质谱法检测超滤管滤液中

β -AMA 的含量, 通过检测 β -AMA-KLH 抗原滤液中, β -AMA 为 0.22 mg, 因此 10 mg 的 KLH 蛋白与 1.78 mg 的 β -AMA 偶联。同样检测 β -AMA-BSA 抗原滤液中, β -AMA 为 0.08 mg, 因此 10 mg 的 BSA 蛋白与 1.92 mg 的 β -AMA 偶联。

2.2 单克隆抗体制备

2.2.1 免疫小鼠血清效价以及抑制率检测

小鼠血清用 PBS 稀释一定比例, 采用 ELISA 方法检测效价以及抑制率, 结果如表 1 所示。结果表明, 3 号小鼠效价为 160000, 且 5 ng/mL 的 β -AMA 抑制率达到 66.2%, 是所有小鼠中最适合进行融合的小鼠。

表 1 小鼠血清效价及抑制率检测结果

Table 1 Test results of mouse serum potency and inhibition rate				
小鼠编号	血清稀释倍数	PBS OD ₄₅₀	标准品 OD ₄₅₀	抑制率/%
1	80000	1.821	1.362	25.2
2	80000	1.776	1.117	37.1
3	160000	1.653	0.559	66.2
4	160000	1.766	0.871	50.7
5	40000	1.552	1.131	27.1

2.2.2 定株细胞检测

定株细胞上清用 PBS 稀释一定比例, 采用 ELISA 方法检测抑制率, 结果如表 2 所示。结果表面, 克隆号 3D9 抑制率最高, 因此选择这株细胞进行抗体制备。

表 2 定株细胞抑制率检测结果

Table 2 Detection results of inhibition rate of fixed strain cells				
序号	细胞克隆号	PBS OD ₄₅₀	标准品 OD ₄₅₀	抑制率/%
1	1H2	1.665	0.721	56.7
2	3D6	1.368	0.646	52.8
3	3D9	1.886	0.568	69.9
4	5A7	1.469	0.652	55.6
5	5A12	1.666	0.818	50.9
6	8G2	1.721	0.762	55.7
7	8G6	1.833	0.933	49.1
8	10A1	1.556	0.824	47.0

2.3 AMA 胶体金试纸条研制

2.3.1 试纸条样本提取液的优化

不同提取液的检测结果详见表 3。采用不同提取液分别提取干蘑菇样本, 对于干蘑菇样本使用 TBS 作为提取液 20 倍提取可以消除基质影响。结果表明, 采用 TBS 作为提取液, 可以满足检测要求。

2.3.2 AMA 试纸条检出限测定

本项目试纸条检出限如图 3 所示。从检测结果可知试纸条对于样本中 β -AMA 的检出限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。采用相同方法, 测试 α -AMA 和 γ -AMA 标准品, 测得本项目试纸条对

于样本中 α -AMA 的检出限为 100 $\mu\text{g/kg}$, 对于样本中 γ -AMA 的检出限为 50 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 3 不同样本提取液对检测结果的影响

Table 3 Influences of different sample extraction solutions on detection results					
样品	添加量	PBS	PBST	TBS	TBST
1	0	-	-	-	-
	20 $\mu\text{g/kg}$	-	+	+	+
2	0	-	-	-	-
	20 $\mu\text{g/kg}$	-	-	+	-
3	0	-	-	-	-
	20 $\mu\text{g/kg}$	-	-	+	+
4	0	-	-	-	-
	20 $\mu\text{g/kg}$	+	-	+	-

注: +代表阳性; -代表阴性。表 4~6 同。



图 3 β -AMA 的检出限测定结果
Fig.3 Limits of determination results for β -amanita

2.3.3 试纸条性能评估及验证

(1) 试纸条重复性验证

试纸条重复性结果如表 4 所示。检测结果显示阴性样品检测均为阴性, 阳性样品检测结果均为阳性, 且显色程度基本相同, 试纸条重复性良好。

表 4 试纸条重复性验证

Table 4 Repeatability verification of test strip							
阴性样本	结果	阴性样本	结果	阳性样本	结果	阳性样本	结果
1	-	11	-	21	+	31	+
2	-	12	-	22	+	32	+
3	-	13	-	23	+	33	+
4	-	14	-	24	+	34	+
5	-	15	-	25	+	35	+
6	-	16	-	26	+	36	+
7	-	17	-	27	+	37	+
8	-	18	-	28	+	38	+
9	-	19	-	29	+	39	+
10	-	20	-	30	+	40	+

(2)试纸条稳定性验证

试纸条稳定性结果如表 5 所示。结果显示, 试纸条在 4℃、室温及 37℃分别放置 7、14、21 和 28 d, 对特定加标样品进行检测结果无明显差异, 试纸条具有很好的热稳定性。

表 5 试纸条稳定性验证
Table 5 Stability verification of test strips

时间/d	样品	4℃	室温	37℃
7	阴性	-	-	-
	添加 20 μg/kg	+	+	+
14	阴性	-	-	-
	添加 20 μg/kg	+	+	+
21	阴性	-	-	-
	添加 20 μg/kg	+	+	+
28	阴性	-	-	-
	添加 20 μg/kg	+	+	+

(3)试纸条交叉反应验证

试纸条交叉反应性结果如表 6 所示。结果显示, 添加 α-AMA、β-AMA、γ-AMA 的样本检测结果为阳性, 添加羧基二羟基鬼笔毒肽、羧基三羟基鬼笔毒肽和二羟基鬼笔毒肽的样本检测结果为阴性, 表明试纸条和鬼笔毒素类蘑菇毒素无交叉反应。

表 6 试纸条交叉反应验证
Table 6 Cross reaction verification of test strips

蘑菇毒素	检测结果
α-AMA	+
β-AMA	+
γ-AMA	+
羧基二羟基鬼笔毒肽	-
羧基三羟基鬼笔毒肽	-
二羟基鬼笔毒肽	-

(4)试纸条其他性能指标验证

参照《食品快速检测产品符合性评价技术要求》计算各项性能指标。结果如表 7 所示, 灵敏度为 100%、假阳性率和假阴性率为 0%。

表 7 性能指标评价结果
Table 7 Results of performance index evaluation

样品	阳性	阴性
阳性	50	0
阴性	0	50
样本总数	50	50
灵敏度 $p+$	$p+ = (50/50) \times 100\% = 100\%$	
假阳性率 $pf+$	$pf+ = [(50-p-)/50] \times 100\% = 0\%$	
假阴性率 $pf-$	$pf- = [(50-p+)/50] \times 100\% = 0\%$	

注: 灵敏度是指方法在实验条件下达到的实际检出限时, 检出阳性结果的阳性样品数占总阳性样品数的百分比; 假阳性率是指方法在实验条件下达到的检出限时, 阴性样品中检出阳性结果的最大概率(以百分比计); 假阴性率是指方法在实验条件下达到的检出限时, 阳性样品中检出阴性结果的最大概率(以百分比计)。

(5)实际样品准确性检测

新鲜采集的蘑菇样本 24 份, 分别用本项目试纸条和 BJS 202008《蘑菇中 α-鹅膏毒肽等 6 种蘑菇毒素的测定》中的仪器方法(液相色谱-串联质谱方法)进行检测。液相色谱-串联质谱方法检测原理是试样经甲醇提取, 提取液经氮吹后以水复溶, 正己烷脱脂, 水溶液经 HLB 固相萃取柱净化后, 采用液相色谱-串联质谱仪检测, 外标法定量。24 份样品中 21 份样品仪器检测结果为未检出, 胶体金试纸条检测结果为阴性。3 份样品仪器法检出 α-AMA 的结果分别为 1387.6、331.2 和 652.5 μg/kg, 胶体金试纸条检测结果为阳性。实验结果表明, 试纸条检测方法 with 仪器检测方法一致性较好, 检测结果准确可靠。

3 结 论

本研究成果成功合成了 β-AMA 半抗原, 并制备 β-AMA 单克隆抗体。用免疫层析方法开发出 AMA 试纸条, 可快速方便的检测出蘑菇中的 AMA, 样本中 α-AMA、β-AMA 和 γ-AMA 的检出限分别为 100、20 和 50 μg/kg。经验证, 该试纸条重复性好, 且具有较好的稳定性。通过与食品补充检验方法(BJS 202008)进行比较, 验证了方法的准确性。综上所述, 本研究研制的 AMA 胶体金试纸条具有较高的灵敏度、正确度、精密度, 可用于蘑菇中 α-AMA、β-AMA、γ-AMA 的快速检测分析, 以防范误食 AMA 类蘑菇中毒, 并辅助毒素调查工作, 为政府部门对蘑菇及其制品的安全监管提供更快捷、可靠的技术支撑。

参考文献

[1] SCHMUTZ M, CARRON PN, YERSIN B, *et al.* Mushroom poisoning: A retrospective study concerning 11-years of admissions in a swiss emergency department [J]. Internal and Emergency Medicine, 2018, 13(1): 59-67.

[2] BEHZAD KM, MOHAMMAD AS, SATAR R, *et al.* Epidemiology and economic burden of an outbreak of cyclopeptide-containing mushroom poisoning in the west of Iran [J]. Frontiers in Public Health, 2022, 10: 910024.1-910024.8.

[3] LI WW, PIRES SM, LIU ZT, *et al.* Mushroom poisoning outbreaks-China, 2010-2020 [J]. China CDC Weekly, 2021, 3(24): 518-522.

[4] LI HJ, ZHANG HS, ZHANG YZ, *et al.* Preplanned studies: Mushroom poisoning outbreaks-China, 2019 [J]. China CDC Weekly, 2020, 2(2): 19-27.

[5] 牛姬飞, 涂文校, 倪大新. 2004—2009 年全国毒蕈中毒突发公共卫生事件分析[J]. 疾病监测, 2011, 26(3): 231-233.

NIU JF, TU WX, NI DX. Public health emergencies of mushroom poisoning in China, 2004—2009 [J]. Disease Surveillance, 2011, 26(3): 231-233.

[6] LI HJ, ZHANG YZ, ZHANG HS, *et al.* Mushroom poisoning outbreaks-China, 2023 [J]. China CDC Weekly, 2023, 6(4): 64-68.

[7] 谭建林, 曾明梅, 赵秀琳, 等. 野生菌中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽检验方法及样品处理技术研究进展[J]. 化学分析计量, 2023, 32(8): 115-210.

TAN JL, ZENG MM, ZHAO XL, *et al.* Research progress in the detection method and pretreatment technology of amanita and phallotoxins [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2023, 32(8): 115-210.

- [8] DE OJ, WANG JJ, VILLENEUVE E, *et al.* Current fatality rate of suspected cyclopeptide mushroom poisoning in the united states [J]. *Clinical Toxicology*, 2021, 59(1): 24–27.
- [9] 余成敏, 李海蛟. 中国含鹅膏毒肽蘑菇中毒临床诊断治疗专家共识[J]. *中华危重症医学杂志(电子版)*, 2020, 1: 20–28.
- YU CM, LI HJ. Chinese consensus on clinical diagnosis and treatment of amanita mushroom poisoning [J]. *Chinese Journal of Critical Care Medicine (Electronic Edition)*, 2020, 1: 20–28.
- [10] GARCIA J, COSTA VM, CARVALHO A, *et al.* Amanita phalloides poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 86(12): 41–55.
- [11] 卢中秋, 孙承业, 于学忠, 等. 中国蘑菇中毒诊治临床专家共识[J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(8): 935–943.
- LU ZQ, SUN CY, YU XZ, *et al.* Consensus of clinical experts in the diagnosis and treatment of mushroom poisoning in China [J]. *Chinese Journal of Emergency Medicine*, 2019, 28(8): 935–943.
- [12] 易思嘉, 罗林, 陈子健, 等. 毒蕈中 α -鹅膏毒肽的中毒机制及检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(20): 129–139.
- YI SJ, LUO L, CEHN ZJ, *et al.* Research progress on poisoning mechanism and detection technology of α -amanitin in toadstool [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(20): 129–139.
- [13] BEVER CS, HNASKO RM, CHENG LW, *et al.* A rapid extraction method combined with a monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of amatoxins [J]. *Toxins*, 2019, 11(12): 724–734.
- [14] 刘河冰, 秦誉, 邢维维, 等. 蘑菇中鹅膏毒肽间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(5): 294–301.
- LIU HB, QIN Y, XING WW, *et al.* Establishment of indirect competitive ELISA method for detecting amanitin in mushroom [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(5): 294–301.
- [15] 杨人香, 王巍, 马怡, 等. 正电性金纳米-核酸适配体纳米生物传感器快速检测野生菌中的 α -鹅膏毒肽[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(10): 76–83.
- YANG RX, WANG W, MA Y, *et al.* Rapid detection of α -amanitin in wild mushroom based on electropositive gold nanoparticles-aptamer nanobiosensor [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(10): 76–83.
- [16] RITTGEN J, PÜTZ M, PYELL U. Identification of toxic oligopeptides in amanita fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(10): 2094–2100.
- [17] 任荆蕾, 图力古尔, 包海鹰. 东北地区非鹅膏属真菌中鹅膏肽类毒素的分布[J]. *菌物学报*, 2016, 35(9): 1080–1098.
- REN JL, TULI GER, BAO HY. Distribution characteristics of amatoxins in fungi excluding amanita [J]. *Mycosystema*, 2016, 35(9): 1080–1098.
- [18] ABBOTT NL, HILL KL, ALAINE G, *et al.* Detection of α -, β -, and γ -amanitin in urine by LC-MS/MS using 15N10- α -amanitin as the internal standard [J]. *Toxicon*, 2018, 152(15): 71–77.
- [19] 赵丽, 张瑞雨, 林佳, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定蘑菇中 5 种毒肽[J]. *理化检验-化学分册*, 2019, 55(2): 201–206.
- ZHAO L, ZHANG RY, LIN J, *et al.* UPLC-MS determination of 5 poisonous peptides in mushrooms [J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2019, 55(2): 201–206.
- [20] 薛康, 胡江涛, 陈佳玥, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定野生菌中 6 种鹅膏毒肽和鬼笔毒肽毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(22): 8695–8702.
- XUE K, HU JT, CHEN JY, *et al.* Simultaneous determination of 6 kinds of amatoxins and phallotoxins in wild mushrooms by dispersive solid-phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(22): 8695–8702.
- [21] 方力, 邱凤梅, 余新威, 等. TurboFlow 在线净化-液相色谱-串联质谱法快速检测人尿中鹅膏肽类毒素[J]. *色谱*, 2021, 39(3): 338–345.
- FANG L, QIU FM, YU XW, *et al.* Determination of amanita peptide toxins in human urine by TurboFlow online clean-up-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(3): 338–345.
- [22] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-三重四级杆质谱法高灵敏测定尿液和血浆中 3 种鹅膏毒肽[J]. *色谱*, 2022, 40(5): 443–451.
- ZHANG XY, CAI XX, ZHANG XY, *et al.* Highly sensitive determination of three kinds of amanitins in urine and plasma by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry coupled with immunoaffinity column clean-up [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2022, 40(5): 443–451.
- [23] 柳洁, 曾灼祥, 肖嘉慧. 血清和尿液中 4 种鹅膏肽类毒素的 UPLC-ESI-Q-TOF 分析[J]. *现代预防医学*, 2017, 44(23): 4344–4348, 4353.
- LIU J, ZENG ZX, XIAO JH. Determination of four amatoxins and phallotoxins in serum and urine by ultra performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2017, 44(23): 4344–4348, 4353.
- [24] XU XM, CAI ZX, ZHANG JS, *et al.* Screening of polypeptide toxins as adulteration markers in the food containing wild edible mushroom by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Food Control*, 2017, 71: 393–402.
- [25] 贺丽迎, 唐晓琴, 赵舰, 等. 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定毒蘑菇中 5 种鹅膏肽类毒素[J]. *色谱*, 2023, 41(1): 94–103.
- HE LY, TANG XQ, ZHAO J, *et al.* Determination of five amanita peptide toxins in poisonous mushrooms by ultra performance liquid chromatography-quadrupole electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2023, 41(1): 94–103.
- [26] 蒋云露, 吴文林, 黄弋耘, 等. 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速检测菌类中鹅膏毒肽毒素[J]. *粮食储藏*, 2024, 53(4): 40–45, 61.
- JIANG YL, WU WL, HUANG YY, *et al.* Rapid determination of amanita peptide toxins in mushrooms by ultra performance liquid chromatography-Q exactive orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. *Grain Storage*, 2024, 53(4): 40–45, 61.
- [27] WOŁOSZYN A, KOTŁOWSKI R. A universal method for the identification of genes encoding amatoxins and phallotoxins in poisonous mushrooms [J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2017, b68(3): 247–251.
- [28] HE ZM, LUO T, FAN FX, *et al.* Universal identification of lethal amanitas by using hyperbranched rolling circle amplification based on α -amanitin gene sequences [J]. *Food Chemistry*, 2019, 298(15): 125031.1–125031.8.
- [29] 赵静, 赵其阳, 张耀海, 等. 螺虫乙酯单克隆抗体的制备及酶联免疫分析方法的建立[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(10): 247–254.
- ZHAO J, ZHAO QY, ZHANG YH, *et al.* Preparation of monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of spirotetramat [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(10): 247–254.
- [30] KOHL TO, ASCOLI CA. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017, 65(7): 193–199.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)