

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2015.10.2015031001

孙清, 李谷丰, 邓乾民, 等. 高灵敏黄曲霉毒素 B1 酶联免疫试剂盒的研制及应用[J]. 环境化学, 2015, 34(10): 1845-1853

SUN Qing, LI Gufeng, DENG Qianmin, et al. Development and application of a highly sensitive ELISA kit for aflatoxin B1 [J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(10): 1845-1853

## 高灵敏黄曲霉毒素 B1 酶联免疫试剂盒的研制及应用\*

孙 清<sup>1,2</sup> 李谷丰<sup>3</sup> 邓乾民<sup>3</sup> 刘杰民<sup>1,2</sup> 时国庆<sup>2\*\*</sup>

(1. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京, 100083; 2. 北京科技大学化学与生物工程学院, 北京, 100083;  
3. 北京普赞生物技术有限公司, 北京, 100085)

**摘 要** 为实现对环境及食品样品中黄曲霉毒素 B1 的高灵敏检测, 通过优化一系列试剂盒参数, 研制了一步间接竞争 ELISA 检测试剂盒. 优化后的包被缓冲液为 90 mmol·L<sup>-1</sup>、pH 4.6 的柠檬酸缓冲液, 最佳反应 pH 值为 7.4, 抗体包被浓度为 0.2 μg·mL<sup>-1</sup>, HRP-BSA-AFB1 稀释比为 1/4000, 标品稀释液为含 7% 甲醇的 PBST 溶液. 优化后试剂盒 IC<sub>50</sub> 值为 66 pg·mL<sup>-1</sup>, 检测限为 7.6 pg·mL<sup>-1</sup>, 检测线性范围为 10—810 pg·mL<sup>-1</sup>. 试剂盒对不同 AFB1 添加水平 (0.5 μg·kg<sup>-1</sup>, 1 μg·kg<sup>-1</sup>) 的玉米、豆粕和鱼粉样品平均回收率为 108.4%—134.8%. 对玉米、豆粕和鱼粉样品各 20 份盲样测试结果表明, 试剂盒检测结果与 HPLC-MS/MS 检测结果吻合.

**关键词** ELISA, 黄曲霉毒素 B1, 残留, 试剂盒.

## Development and application of a highly sensitive ELISA kit for aflatoxin B1

SUN Qing<sup>1,2</sup> LI Gufeng<sup>3</sup> DENG Qianmin<sup>3</sup> LIU Jiemin<sup>1,2</sup> SHI Guoqing<sup>2\*\*</sup>

(1. School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing, 100083, China;  
2. School of Chemistry and Biological Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing, 100083, China;  
3. Beijing Primebiotek Company Limited, Beijing, 100085, China)

**Abstract:** A one-step indirect competitive ELISA kit for AFB1 was successfully developed, for the detection of trace AFB1 in environment and foodstuffs. Optimization was performed for coating buffer, pH of assay buffer, concentrations of anti-AFB1 monoclonal antibody and HRP labeled AFB1-BSA, and sample dilution reagent. The limit of detection and the IC<sub>50</sub> for AFB1 was 7.6 pg·mL<sup>-1</sup> and 66 pg·mL<sup>-1</sup> respectively, with good linearity between 10—810 pg·mL<sup>-1</sup> for AFB1. Spike recoveries for maize, soybean meal and fishmeal samples ranged from 108.4% to 134.8%. Aflatoxin B1 residues in sixty samples were determined by the ELISA kit and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) respectively, and the result of ELISA kit was consistent with that of HPLC-MS/MS.

**Keywords:** ELISA, aflatoxin B1, residue, ELISA kit.

黄曲霉毒素是一类主要由黄曲霉和寄生曲霉产生的真菌毒素<sup>[1]</sup>. 它可污染许多种环境及食物, 自二十世纪六十年代发现黄曲霉毒素以来, 黄曲霉毒素的污染问题已被公认为全球性的污染问题<sup>[2]</sup>. 自然界中黄曲霉毒素主要有 4 种: B1、B2、G1 和 G2, 其中黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1) 污染最严重, 毒性最大<sup>[3]</sup>. 1993 年, 世界卫生组织国际癌症研究机构将其列为一类致癌物, 其作用的靶器官主要为肝脏, 可

2015 年 3 月 10 日投稿.

\* 国家高技术研究发展计划 (2012AA101609-5), 新世纪优秀人才支持计划 (NCET-11-0581), 中央高校基本科研业务费专项资金 (FRF-TP-12-007B) 资助.

\*\* 通讯联系人, Tel: 010-62334497; E-mail: shiguqing@ustb.edu.cn

引起人类和动物的肝脏病变和致癌<sup>[4]</sup>.由于黄曲霉的毒性极大且稳定,并且一般的加工方式无法去除食品中的 AFB1,因此,世界上大多数国家都对食品中的黄曲霉毒素的含量进行了严格的限制.欧盟对 AFB1 的限量在 0.1—8  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  之间<sup>[5]</sup>.美国 FDA 规定 AFB1 的限量为 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[6]</sup>.我国目前对 AFB1 的限量为特殊性膳食食品中为 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,其他谷物及制品中 AFB1 的限量依据不同来源而有所不同,但都在 5.0—20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  之间<sup>[7]</sup>.

目前黄曲霉毒素的检测方式主要有薄层色谱法(TLC)、色谱分析法和免疫分析法等<sup>[8]</sup>.TLC法是根据黄曲霉毒素能在紫外区域发出特殊荧光的特点来检测黄曲霉毒素的.TLC法检测成本低,操作简单,是最早用于检测黄曲霉毒素的方法.Klaric等<sup>[9]</sup>利用TLC法检测AFB1的灵敏度为2  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,但由于TLC法与其他方法相比,灵敏度不高,定量不准,无法满足日益严格的检测要求,现在已越来越少使用<sup>[10-11]</sup>.色谱分析方法主要有高相液相色谱法(HPLC)和液相-质谱联用法(HPLC-MS/MS)等,具有高分辨率、快速、准确性好、灵敏度高、检测限低等优点.Cavaliere等<sup>[12]</sup>建立的LC/ESI-MS/MS方法检测限达40  $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ .Huang等<sup>[13]</sup>建立的UHPLC-MS/MS对AFB1的检测灵敏度更是高达9  $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ .不过色谱法需要专门的仪器设备及专业的操作人员,样品提取后还需要复杂的净化过程,不适合短期内大批量样品的检测<sup>[14-15]</sup>.

免疫方法是利用抗原与抗体特异性识别为基础设计的检测方法.通常包括放射免疫分析方法(RIA)、酶联免疫法(ELISA)和免疫层析法等,其中ELISA法最常用.ELISA法的灵敏度可与仪器方法相比,有时检测限还要比仪器方法更低,并且前处理比仪器方法的更简单,可进行高通量筛选.在过去二十年里,ELISA法由于其简单、可靠、灵敏、选择性高、适用范围广而在农作物中黄曲霉毒素的检测中得到了快速的发展<sup>[16]</sup>.Rossi等<sup>[15]</sup>、Kolossova等<sup>[17]</sup>、万宇平等<sup>[18]</sup>利用AFB1的单克隆抗体建立的ELISA方法检测限可达36—50  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .但上述方法有的反应时间长,有的前处理方法复杂.

本课题组研制出一种高灵敏黄曲霉毒素B1检测试剂盒,通过优化试剂盒的各种组分的参数,标准曲线的检测限达到了7.6  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,并且反应时间短,前处理简单.利用此试剂盒可快速灵敏地检测粮食及饲料中黄曲霉毒素B1含量.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2、M1标准品、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、羧甲基羟氨半盐酸盐(CMO)、PEG4000购于Sigma Aldrich公司.Tween 20、3,3',5',5-四甲基联苯氨(TMB)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、吡啶、过氧化氢脲购于北京百灵威科技有限公司.胎牛血清、DMEM购自Hyclone公司.辣根过氧化物酶(HRP)购于上海雪满生物科技有限公司,酶标板封闭保护液及HRP酶稀释液均购自湖州英创生物科技有限公司,PBST溶液为磷酸盐缓冲液(10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH=7.4,含0.05% Tween-20),其他试剂均为国产分析纯.抗体亚型试剂盒购自Southernbiotech公司.

MK3型酶联免疫检测仪(Thermo,美国).

### 1.2 AFB1完全抗原的合成

将1.5 mg的AFB1与3 mg的CMO溶解于2 mL的甲醇-吡啶(体积比1:1)溶液中,70  $^{\circ}\text{C}$ 反应5 h.反应后将反应液挥干,用双蒸水溶解残留物.调整溶液的pH值至3.0,用3 mL乙酸乙酯提取产物3次.合并乙酸乙酯层,挥干,用0.5 mL DMF重溶.取0.45 mL产物溶液,加入30 mg EDC和8.64 mg NHS,再加入1.5 mL DMF,30  $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜.反应液与3 mL 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS溶解的12.5 mg BSA室温下反应2 h.反应完成后,3000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,上清液用2 L PBS透析3 d,每天换液1次.最后将透析袋中的液体收集,即为AFB1-BSA,-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存.按同样的方法合成AFB1-OVA,-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存.

### 1.3 免疫动物及抗体制备

用上述合成的AFB1完全抗原免疫BALB/c小鼠.采用小剂量长周期的免疫方案,12周后取小鼠脾细胞进行细胞融合.用50%聚乙二醇(PEG4000)作融合剂,将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,细胞悬于

含 16% 胎牛血清的选择培养基内,培养于 96 孔细胞培养板中,置 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 孵箱中培养 7 d 左右,镜检杂交瘤克隆生长良好时,取上清液,利用 AFB1-OVA 包被的酶标板进行间接 ELISA 实验,对于阳性孔采用有限稀释法进行多次克隆及亚克隆,筛选可稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株,及时冻存并放大培养.采用动物体内诱生腹水法制备单克隆抗体.于 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.2 mL 降植烷,24 h 后注射 0.5 mL 含杂交瘤细胞的不完全培养液.10 d 后收集腹水,采用 Protein A 亲和纯化柱对腹水进行抗体纯化,利用亚型试剂盒对其进行亚型分析,纯化的抗体加入甘油(终浓度 50%), -20 °C 保存.

#### 1.4 AFB1-BSA 的 HRP 标记

利用高碘酸钠法合成 HRP 标记的 AFB1-BSA (简称 HRP-BSA-AFB1).将 0.4 mL 高碘酸钠 (21.4 mg·mL<sup>-1</sup>) 缓慢加入到 1.6 mL HRP 溶液 (5 mg·mL<sup>-1</sup>) 中,4 °C 搅拌 1 h.反应完毕后,将反应物置于醋酸缓冲液 (1 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 4.4) 中,4 °C 透析过夜.取 550 μL 高碘酸活化的 HRP,用 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 碳酸盐缓冲液调节 pH 值至 9.0,再加入 2 mg 的 AFB1-BSA,4 °C 搅拌过夜.取 55 μL 硼氢化钠溶液 (4 mg·mL<sup>-1</sup>) 加入反应液中,4 °C 静置 2 h.用硫酸铵沉淀法纯化 HRP-BSA-AFB1,纯化的 HRP-BSA-AFB1 加入甘油(终浓度 50%), -20 °C 长期保存.

#### 1.5 试剂盒酶标板的制备

用适当缓冲液将 AFB1 抗体稀释至适当浓度,每孔 100 μL 包被酶标板,4 °C 过夜.用 PBST 溶液洗涤 3 次,每次 30 s.甩掉孔中液体,在吸水纸上拍干后,每孔加入酶标板封闭保护液 200 μL,37 °C 温育 1 h,洗涤同上.酶标板干燥后用铝箔袋真空密封,4 °C 保存备用.

#### 1.6 酶联免疫检测步骤

取出酶标板恢复到室温后,依次在微孔中加入 AFB1 标准品或样品溶液 50 μL,随后加入 HRP-BSA-AFB1 溶液(用 HRP 酶稀释液稀释至一定浓度) 50 μL,37 °C 孵育 40 min,每孔用 250 μL 洗涤液(PBST) 洗 5 次,每次 30 s,吸水纸拍干.每孔加底物溶液 100 μL,37 °C 孵育 10 min.每孔加终止液 (2 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50 μL,振荡酶标板,用酶标仪于 450 nm 波长处进行 OD 值检测(以 630 nm 波长为参比波长),测定每孔的 OD 值.

#### 1.7 包被缓冲液的优化

采用棋盘实验方法,分别以不同 pH 值、不同离子强度的碳酸盐缓冲液 (pH 9.0、pH 9.3、pH 9.6 及 20、50、100 mmol·L<sup>-1</sup>)、磷酸盐缓冲液 (pH 7.0、pH 7.4、pH 7.8 及 20、50、100 mmol·L<sup>-1</sup>)、柠檬酸缓冲液 (pH 4.3、pH 4.6、pH 4.8 及 45、90、135 mmol·L<sup>-1</sup>) 稀释抗体,使抗体浓度为 0.2 μg·mL<sup>-1</sup>,制备酶标板,考察不同包被缓冲液对 B<sub>0</sub> 值(标准品浓度为零的空白溶液孔对应的吸光度值)的影响.以 B<sub>0</sub> 值最高的包被缓冲液条件为最佳包被缓冲液条件.

#### 1.8 最佳反应 pH 值的优化

分别配制 pH 值为 6.0、6.8、7.4、8.0 的 PBST 缓冲液,用 PBST 缓冲液将 AFB1 标准储备液稀释为一系列浓度的 AFB1 标准溶液.按 1.6 节方法进行检测,观察 B<sub>0</sub> 值及使 B<sub>0</sub> 值下降 50% 所对应的浓度 (IC<sub>50</sub>) 值的变化.以 B<sub>0</sub> 值高且稳定、IC<sub>50</sub> 值小为最佳反应 pH 值.

#### 1.9 抗体包被量、HRP-BSA-AFB1 用量的优化

在优化的包被条件下,分别优化不同抗体包被量及 HRP-BSA-AFB1 用量对试剂盒相对标准偏差及检测灵敏度的影响,在 B<sub>0</sub> 值大于 1.5,且平均板内相对标准偏差小于 10% 条件下,选择 IC<sub>50</sub> 值低的组合.

#### 1.10 标准品稀释液的优化

选取不同类型的有机溶剂(甲醇、乙醇、乙腈、DMF、DMSO),与 PBST 混合,分别配成 10%、20% 浓度的样品稀释溶液,将 AFB1 标准储备液稀释为一系列浓度的 AFB1 标准溶液.按上述方法进行检测,观察 B<sub>0</sub> 值及 IC<sub>50</sub> 值的变化.以 B<sub>0</sub> 值高且稳定、IC<sub>50</sub> 值小为最佳标准品稀释液.

#### 1.11 标准曲线的建立

用标准品稀释液将 AFB1 标准品稀释为 0、10、30、90、270、810 pg·mL<sup>-1</sup> 等 6 个浓度,按上述 ELISA 方法测定其 OD 值.重复测定 5 次取平均值,计算其百分结合率 (B/B<sub>0</sub>).

以标准品浓度对数为横坐标,其对应的 B/B<sub>0</sub> 值为纵坐标,绘制标准曲线.用同样的方法计算样品的 B/B<sub>0</sub>,相应的 AFB1 浓度可通过标准曲线计算得出.标准曲线的检测限为 B/B<sub>0</sub> = 90% (使 OD 值下降

10%, IC<sub>10</sub>)时的标品浓度<sup>[19]</sup>.

### 1.12 实际样品检测

样品充分研磨后过 20 目筛,取 5 g 过筛样品,加入 25 mL 样品提取液(70%甲醇,含 4% NaCl),剧烈振荡 5 min,静置后,取 50 μL 上清液,加入 450 μL 样品稀释液(PBST),混合均匀后用建立的 ELISA 方法对其中 AFB1 含量进行测定.分别测定空白玉米、豆粕和鱼粉各 20 个样品,根据标准曲线求出测定值,计算出其平均值,再加上 3 倍标准差,即为样品最低检测限<sup>[18]</sup>.对玉米、豆粕和鱼粉样品选择 2 个添加浓度,分别对 3 批试剂盒开展样本添加回收试验,每个添加浓度做 5 个平行,根据各添加浓度的实际测定值计算添加回收率和批内批间相对标准偏差,从而判定试剂盒准确度和精密度.

### 1.13 特异性测定

分别取与 AFB1 结构类似的黄曲霉毒素 AFB2、AFG1、AFG2、AFM1 配制成不同浓度溶液,测量其类似物的 IC<sub>50</sub>值,按下式计算交叉反应率:

$$\text{交叉反应率}(\%) = (\text{AFB1 IC}_{50}) / (\text{类似物 IC}_{50}) \times 100\%$$

### 1.14 与 HPLC-MS/MS 检测方法的比对

抽取玉米、豆粕和鱼粉盲样样本各 20 份,利用试剂盒和 HPLC-MS/MS 方法分别进行检测,确定试剂盒与仪器检测方法的符合率.仪器检测方法参考“NY/T 2071—2011 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法”<sup>[20]</sup>,检测限为 1 μg·kg<sup>-1</sup>.

### 1.15 稳定性实验

将足量的试剂盒保存于 37 °C 培养箱.每隔 1 d 取适量,测定其 B<sub>0</sub>值和 IC<sub>50</sub>值.同时,将足量的试剂盒保存于 2—8 °C 冰箱.每隔 1 月取适量,测定其 B<sub>0</sub>值和 IC<sub>50</sub>值.根据实验结果判定试剂盒的储存稳定性.

## 2 结果与讨论

### 2.1 AFB1 抗体鉴定

用 AFB1-BSA 完全抗原免疫小鼠后,得到了分泌抗 AFB1 的单克隆细胞株 AFB1-2A4.抗体纯化后利用抗体亚型鉴定试剂盒鉴定 AFB1 单克隆抗体为 IgG1 亚型,轻链亚型为 λ 亚型.利用 SDS-PAGE 测抗体蛋白分子量为 150 kD.

### 2.2 包被缓冲液的优化

首先考察了 3 种不同包被缓冲体系(柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液)下抗体在酶标板上的包被效果.根据 B<sub>0</sub>值评价抗体包被效果.B<sub>0</sub>值越高,说明此时抗体的吸附量或抗体的抗原结合位点暴露量越大.由图 1 可见,不同类型的缓冲液、不同的缓冲液浓度对抗体包被的效果影响非常大.推测不同种类的缓冲液对抗体的构象及抗体表面电荷的影响可能不同,由此对抗体与抗原的结合造成的影响存在差异.相比较而言,柠檬酸缓冲液条件下,B<sub>0</sub>值最高.柠檬酸缓冲液下 3 个不同的 pH 对包被效果影响很小,而缓冲液浓度则有较大影响(图 1).当浓度较低时(45 mmol·L<sup>-1</sup>),B<sub>0</sub>值较低,但当浓度达到 90 mmol·L<sup>-1</sup>时,再升高浓度至 135 mmol·L<sup>-1</sup>,B<sub>0</sub>值也并没有明显升高,因此最终选用 pH 4.6 的 90 mmol·L<sup>-1</sup>柠檬酸缓冲液作包被缓冲液.

### 2.3 最佳反应 pH 值的优化

通过图 2 可以看出,抗原抗体的反应受 pH 影响较大,低 pH(pH=6)时 B<sub>0</sub>值明显高于高 pH(pH=8)下的 B<sub>0</sub>值.但在低 pH 时,IC<sub>50</sub>值较大,说明此时灵敏度受影响.由于商用试剂盒需要有较好的保质期,因此,初始 B<sub>0</sub>值不能太低,否则保存一段时间后 B<sub>0</sub>会低至无法正常使用.综合考虑,最终选择了 B<sub>0</sub>值 > 1.5、IC<sub>50</sub>值较低(灵敏度较好)的 pH=7.4 的条件作为最佳反应 pH.

### 2.4 抗体包被量及 HRP-BSA-AFB1 用量优化

通过棋盘实验,在优化的封闭液和酶稀液条件下优化了抗体包被量和 HRP-BSA-AFB1 稀释比例,结果如表 1 所示.



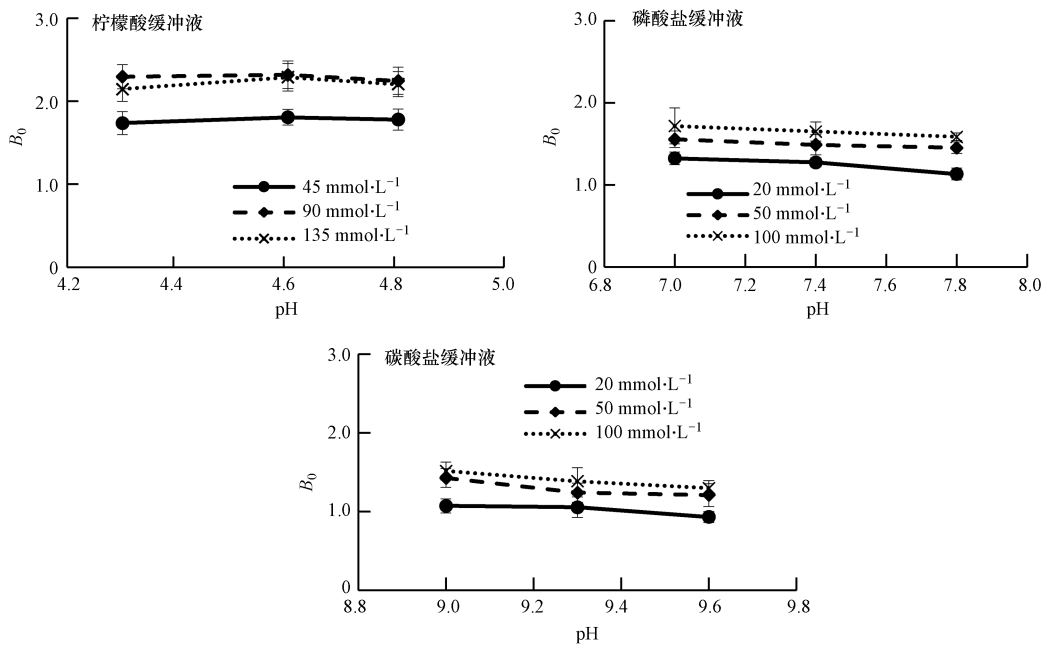


图 1 包被缓冲液 pH 及浓度对  $B_0$  值的影响 ( $n=3$ )

Fig.1 Effect of pH and ionic strength of coating buffer on  $B_0$  value ( $n=3$ )

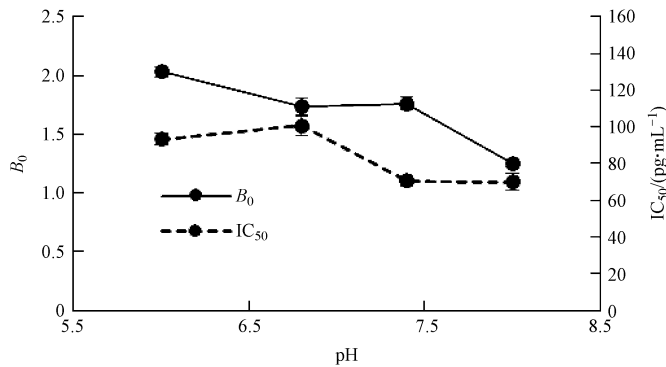


图 2 缓冲液 pH 值对  $B_0$  及  $IC_{50}$  值的影响 ( $n=3$ )

Fig.2 Effect of buffer pH on  $B_0$  value and  $IC_{50}$  value ( $n=3$ )

表 1 抗体包被量、HRP-BSA-AFB1 用量的优化

Table 1 Optimization of concentrations of coating antibody and HRP-BSA-AFB1

抗体包被量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	HRP-BSA- AFB1 稀释比	阴性吸光度值	平均相对标 准偏差/%	线性范围/ ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$IC_{50}$ / ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
0.2	1/2000	2.706	8.3	30—810	176
	1/4000	2.330	7.6	10—810	67
	1/8000	1.965	13.1	3.3—270	41
0.1	1/2000	1.443	9.6	3.3—270	38
	1/4000	1.277	7.7	3.3—270	30
	1/8000	1.041	20.2	3.3—270	26
0.05	1/2000	0.615	—	—	—
	1/4000	0.497	—	—	—
	1/8000	0.357	—	—	—

由表 1 可见,抗体包被量及 HRP-BSA-AFB1 的用量,都对标线的  $IC_{50}$  值有影响,不同抗体及 HRP-BSA-AFB1 用量下的  $IC_{50}$  值相差倍数能达到 5 倍.同一抗体包被量下,HRP-BSA-AFB1 浓度越低, $IC_{50}$  值越小,同一 HRP-BSA-AFB1 浓度下,包被浓度越小, $IC_{50}$  值越小.当抗体包被量在  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,HRP-BSA-AFB1 稀释比为 1/8000 时, $IC_{50}$  值最小,但此时阴性吸光度值只有 1.0 左右,并且平均相对标准偏差达到 20.2%,并不适合作为试剂盒的参数.在满足阴性 OD 值大于 1.5,平均相对标准偏差小于 10% 条件下,灵敏度最高的条件为抗体包被量  $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,HRP-BSA-AFB1 稀释比为 1/4000 时.因此,选择此条件作为最优抗体包被量及 HRP-BSA-AFB1 用量.

## 2.5 标准曲线的建立

根据不同溶剂下  $B_0$  值及  $IC_{50}$  值的变化(表 2),20% 及 10% 甲醇组  $B_0$  值及  $IC_{50}$  值与 PBST 体系最接近,并且  $IC_{50}$  值也几乎是最小的,说明添加不超过 20% 的甲醇不仅不会影响酶标抗原与包被抗体的结合,也不影响标准品与包被抗体的结合.因此,可以选用不超过 20% 的甲醇的溶液作为标准曲线的溶液.考虑到样品提取液为 70% 甲醇溶液,检测时将样品提取液稀释 10 倍,即此时稀释液中甲醇含量为 7%,因此,最终标线所用的溶液为含 7% 甲醇的 PBST 溶液.

用标品稀释液配制不同浓度的 AFB1 溶液,经过 ELISA 检测,以  $B/B_0$  值为纵坐标,AFB1 浓度对数为横坐标,绘制标准曲线,最终得到如图 3 所示的标准曲线图( $n=5$ ).曲线回归方程为  $y = -18.58 \ln(x) + 127.73$ ,线性相关系数  $R^2 = 0.994$ ,检测限  $IC_{10} = 7.6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , $IC_{50} = 66 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,线性范围为 10—810  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

表 2 不同有机溶剂对  $B_0$  值及  $IC_{50}$  值的影响

Table 2 Effect of organic solvents on the  $B_0$  value and  $IC_{50}$  value

	20% 体系			10% 体系		
	$B_0$	$IC_{50}/$ ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$B_0/IC_{50}$	$B_0$	$IC_{50}/$ ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$B_0/IC_{50}$
PBST	1.734	70	0.025	1.788	65	0.028
甲醇	1.778	66	0.027	2.060	69	0.030
乙醇	1.689	93	0.018	2.016	84	0.024
乙腈	1.202	89	0.014	2.051	68	0.030
DMSO	1.024	361	0.003	1.538	127	0.012
DMF	0.893	531	0.002	1.484	329	0.005

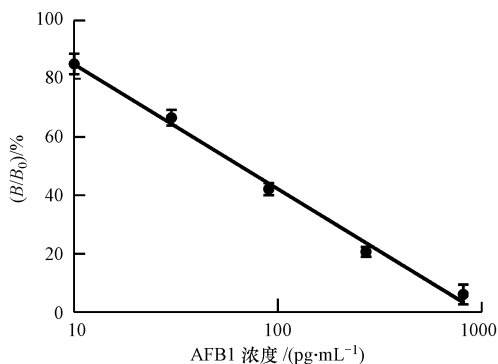


图 3 AFB1 标准曲线图( $n=5$ )

Fig.3 Standard curve for detection of AFB1 ( $n=5$ )

## 2.6 样品检测限

通过测定 20 份空白玉米、豆粕和鱼粉样品中 AFB1 的含量,得到对三者中 AFB1 的方法检测限分别为 15、16、13  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (表 3).

表 3 AFB1 在 3 种样品中的检测限

Table 3 Detection limits for AFB1 in three different samples

样品	平行数	平均值/(pg·mL <sup>-1</sup> )	标准差/(pg·mL <sup>-1</sup> )	最低检测限/(pg·mL <sup>-1</sup> )
玉米	20	6	3	15
豆粕	20	7	3	16
鱼粉	20	7	2	13

## 2.7 准确度和精密度

准确度和精密度分别以回收率和相对标准偏差(RSD)表示.分别在空白玉米、豆粕和鱼粉中添加终浓度为 0.5、1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的 AFB1,每个浓度做 5 个平行,用 3 批不同的试剂盒进行试验,测定回收率和批内、批间相对标准偏差,结果见表 4.由表 4 可知,玉米添加 0.5、1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的 AFB1 回收率在 109.2%—126.0%之间,批内相对标准偏差 $\leq 10.3\%$ ,批间相对标准偏差 $\leq 10.4\%$ .豆粕添加 0.5、1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的 AFB1 回收率在 110.4%—134.8%之间,批内相对标准偏差 $\leq 12.8\%$ ,批间相对标准偏差 $\leq 11.6\%$ .鱼粉添加 0.5、1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的 AFB1 回收率在 108.4%—129.8%之间,批内相对标准偏差 $\leq 10.2\%$ ,批间相对标准偏差 $\leq 10.9\%$ .

表 4 试剂盒的回收率及相对标准偏差

Table 4 Recovery rates and RSD of ELISA kit

		玉米/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )		豆粕/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )		鱼粉/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	
		0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
第一批次	平均值/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	0.63	1.11	0.55	1.33	0.58	1.30
	回收率/%	126.0	110.6	110.4	132.8	116.4	129.8
	批内相对标准偏差/%	5.8	7.4	12.8	4.3	10.2	5.7
第二批次	平均值/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	0.55	1.13	0.62	1.35	0.64	1.30
	回收率/%	109.2	112.8	123.2	134.8	127.6	129.6
	批内相对标准偏差/%	10.2	5.6	9.6	4.4	7.0	4.6
第三批次	平均值/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	0.57	1.12	0.63	1.32	0.54	1.26
	回收率/%	113.2	112.4	125.2	132.4	108.4	125.8
	批内相对标准偏差/%	10.3	7.3	10.4	7.3	10.0	8.7
	批间相对标准偏差/%	10.4	6.4	11.6	5.1	10.9	6.2

## 2.8 交叉反应率

利用已确定的 ELISA 条件对 AFB1 的类似物 AFB2、AFG1、AFG2 及 AFM1 进行标准曲线测定,求出各自的  $\text{IC}_{50}$  值,再根据各自的  $\text{IC}_{50}$  值得到交叉率结果(表 5).结果表明,试剂盒与 AFG1 的交叉率最高,为 13.8%,而与其他类似物的交叉率非常低.

表 5 试剂盒对 AFB1 类似物的交叉反应率

Table 5 Cross reactivity of ELISA kit for aflatoxins

化合物	$\text{IC}_{50}/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	交叉率/%
AFB1	66	100
AFB2	1250	5.3
AFG1	480	13.8
AFG2	13400	0.5
AFM1	5150	1.3

## 2.9 HPLC-MS/MS 与 ELISA 结果比对

选取玉米、豆粕和鱼粉盲样样本各 20 份,利用试剂盒和 HPLC-MS/MS 分别进行检测,确定试剂盒与 HPLC-MS/MS 检测方法的符合率.检测结果如表 6 所示.

表6 HPLC-MS/MS与ELISA对天然样品中AFB1的检测结果

Table 6 Natural AFB1 occurrence in samples evaluated by HPLC-MS/MS and ELISA

玉米/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )			豆粕/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )			鱼粉/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )		
样品号	HPLC-MS/MS	ELISA	样品号	HPLC-MS/MS	ELISA	样品号	HPLC-MS/MS	ELISA
1	ND	—	1	ND	—	1	ND	—
2	ND	—	2	ND	—	2	ND	—
3	ND	—	3	ND	—	3	ND	—
4	ND	—	4	96.17	88.18	4	2.01	1.89
5	ND	—	5	ND	—	5	ND	—
6	ND	—	6	ND	—	6	ND	—
7	ND	—	7	ND	—	7	ND	—
8	18.71	20.1	8	ND	—	8	ND	—
9	ND	—	9	ND	—	9	ND	—
10	ND	—	10	ND	—	10	ND	—
11	ND	—	11	ND	—	11	ND	—
12	ND	—	12	ND	—	12	ND	—
13	ND	—	13	ND	—	13	ND	—
14	3.03	4.88	14	ND	—	14	ND	—
15	ND	—	15	22.03	19.71	15	2.39	1.36
16	ND	—	16	ND	—	16	ND	—
17	82.11	64.36	17	ND	—	17	ND	—
18	ND	—	18	5.02	3.27	18	ND	—
19	ND	—	19	ND	—	19	ND	—
20	ND	—	20	ND	—	20	ND	—

注:ND表示低于该仪器方法检测限,试剂盒检测结果低于检测限用“—”表示。

结果表明,AFB1 ELISA 试剂盒检测方法检出结果与仪器检测方法吻合.60个样品中,阳性样品8个,阴性样品52个,试剂盒检测结果与HPLC-MS/MS检测结果相比,阴性、阳性符合率均为100%,并且,阳性样品的检测值相近.样品中有1份玉米及1份豆粕 AFB1 含量严重超标,含量都大于 $50\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,超过了国家限量标准<sup>[21]</sup>(饲料中限量分别为 $50\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $30\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).鱼粉中 AFB1 含量较低,仅2份(总共20份)检出 AFB1,并且含量都在 $5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以下。

## 2.10 储存稳定性

试剂盒在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境保存2周后, $B_0$ 值下降至1.419,相比初始 $B_0$ 值下降27.0%,但 $\text{IC}_{50}$ 值未见明显变化(表7).按照 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境保存1d相当于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存1个半月的模型计算<sup>[22]</sup>,理论上试剂盒在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可能保存21个月左右.实际实验中,试剂盒在 $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存12个月后, $B_0$ 值下降至1.601,相比初始OD值下降17.7%, $\text{IC}_{50}$ 值也没有明显变化.因此,试剂盒在 $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可以至少稳定保存12个月。

表7 储存不同时间后试剂盒 $B_0$ 值及 $\text{IC}_{50}$ 值的变化Table 7 The  $B_0$  and  $\text{IC}_{50}$  value of the ELISA kit after storage

保存时间/月	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$		保存时间/d	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	
	$B_0$	$\text{IC}_{50}/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$		$B_0$	$\text{IC}_{50}/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	1.945	66.0	1	1.945	66.0
2	1.841	73.2	2	1.770	61.3
3	1.784	68.9	3	1.704	66.2
4	1.791	55.7	4	1.815	66.8
5	1.712	65.7	5	1.698	65.9
6	1.706	65.7	6	1.654	69.8
7	1.742	62.5	7	1.691	74.8
8	1.677	61.1	8	1.586	70.6
9	1.649	71.0	9	1.639	69.7
10	1.620	63.9	10	1.534	67.0
11	1.591	53.5	11	1.412	78.4
12	1.601	48.8	12	1.446	69.4
			13	1.402	75.4
			14	1.419	76.8



### 3 结论

本文通过优化包被缓冲体系、反应 pH 值、AFB1 单克隆抗体包被浓度、HRP-BSA-AFB1 反应浓度、样品稀释液等试剂盒参数,研制成功了出高灵敏度 AFB1 ELISA 检测试剂盒,该试剂盒的最低检测限( $IC_{10}$ )为  $7.6 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $IC_{50}$  为  $66 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,线性范围为  $10\text{—}810 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,灵敏度与文献报导相比,具有显著提升.利用建立的 ELISA 方法对多种样品进行了加标回收实验,玉米、豆粕及鱼粉添加  $0.5$ 、 $1.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 AFB1 回收率在  $108.4\%\text{—}134.8\%$  之间,批内相对标准偏差  $\leq 12.8\%$ ,批间相对标准偏差  $\leq 11.6\%$ .试剂盒检测结果与 HPLC-MS/MS 结果相比,阴性、阳性符合率均为  $100\%$ ,并且,对阳性样品的检测值相近.本试剂盒可以用于对环境、粮食或饲料样品中黄曲霉毒素残留的检测.

**致谢:**本试剂盒的第三方验证测试(实验结果 2.6、2.7、2.9 节)委托国家饲料质量监督检验中心(北京)完成,在此谨致谢意.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Nesbitt B F, O'Kelly J, Sargeant K, et al. *Aspergillus flavus* and turkey X disease: Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*[J]. Nature, 1962, 195(4846): 1062-1063
- [ 2 ] Kensler T W, Roebuck B D, Wogan G N, et al. Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology[J]. Toxicological Sciences, 2011, 120(1): S28-S48
- [ 3 ] Wild C P, Gong Y Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(1): 71-82
- [ 4 ] International Agency For Research Cancer. IARC monograph on the evaluation of the carcinogenic risk to humans[M]. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1993. 56
- [ 5 ] European Economic Community Council. Commission regulation (EU) No 165/2010[M]. Official Journal of European Communities, 2010, L50:8-12
- [ 6 ] Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins-risks in plant, animal and human systems, Task Force Report, No. 139[R]. Ames, Iowa, 2003: 1-191
- [ 7 ] GB 2761—2011, 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].北京:中国标准出版社,2011
- [ 8 ] 李培武,马良,杨金娥,等.粮油产品黄曲霉毒素 B1 检测技术研究进展[J].中国油料作物学报,2005,27(2):77-81
- [ 9 ] Klaric M S, Cvetnic Z, Pepeljnjak S, et al. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography[J]. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 2009, 60(4): 427-434
- [ 10 ] Younis Y M H, Malik K M. TLC and HPLC assay of aflatoxin contamination in Sudanese peanuts and peanut products[J]. Kuwait Journal of Science and Engineering, 2003, 30(1): 79-93
- [ 11 ] Bao L, Bao Z, Zhang Y, et al. Aflatoxin testing in peanuts: A proficiency assessment scheme for Chinese analytic laboratories[J]. Journal of AOAC International, 2009, 92(2): 481-486
- [ 12 ] Cavaliere C, Foglia P, Guarino C, et al. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 596(1): 141-148
- [ 13 ] Huang B, Han Z, Cai Z, et al. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 662(1): 62-68
- [ 14 ] Jaimez J, Fente C A, Vazquez B I, et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 882(1-2): 1-10
- [ 15 ] Rossi C N, Takabayashi C R, Ono M A, et al. Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed[J]. Food Chemistry, 2012, 132(4): 2211-2216
- [ 16 ] Lee N A, Wang S, Allan R D, et al. A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and Soybeans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(10): 2746-2755
- [ 17 ] Kolosova A Y, Shim W B, Yang Z Y, et al. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 384(1): 286-294
- [ 18 ] 万宇平,李勇,王凤红,等.黄曲霉毒素 B1 残留 ELISA 试剂盒的研制及应用[J].中国畜牧兽医,2013,40(1):57-61
- [ 19 ] 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
- [ 20 ] NY/T 2071-2011, 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法[S].北京:中国农业出版社,2011
- [ 21 ] GB 1378-2001, 中华人民共和国国家标准 饲料卫生标准[S].北京:中国标准出版社,2001
- [ 22 ] 江涛,宫慧之,李凤琴,等.抗伏马菌素 B1 单克隆抗体的制备及试剂盒的研制[J].卫生研究,2006,35(2):209-212