

# 绿色无毒黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫检测方法

张勋, 匡华\*, 徐丽广, 马伟, 刘丽强, 胥传来

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 建立了一种基于抗独特型抗体的绿色无毒的 ELISA 方法, 并用于检测面粉中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>。通过酶解 2 种抗黄曲霉毒素小鼠单克隆抗体 (11A9 和 1G3) 制备 F(ab')<sub>2</sub> 片段, 并将其免疫新西兰大白兔制备抗独特型抗体。最终得到两种抗独特型抗体, 并对抗独特型抗体和 AFB<sub>1</sub> 进行相关性分析。通过实际样品添加回收, 其批内回收率为 115.60%~121.88%, 变异系数在 5% 以内; 而批间回收率为 111.89%~126.98%, 变异系数低于 8%。分析结果准确可靠, 表明此无毒绿色 ELISA 是一种安全可靠的 AFB<sub>1</sub> 分析方法。

**关键词:** 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>; F(ab')<sub>2</sub> 片段; 抗独特型抗体; 无毒 ELISA

**中图分类号:** TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)12—1293—05

## Green and Nontoxic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Aflatoxin B<sub>1</sub> Detection

ZHANG Xun, KUANG Hua\*, XU Li-guang, MA Wei, LIU Li-qiang, XU Chuan-lai

(School of Food Science and Technology, JiangNan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** A environmental-friendly and nontoxic enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) in wheat flour sample was developed. In this method, the standard substance was substituted by the anti-idiotypic antibody (anti-id antibody). The anti-id antibodies were prepared by immunizing the rabbits with the F(ab')<sub>2</sub> fragments that were obtained by digesting the monoclonal antibodies (11A9 and 1G3) against AFB<sub>1</sub>. Two kinds of anti-id antibodies was prepared and both could mimic the three-dimensional structural of AFB<sub>1</sub> and caused specific inhibition to the 11A9 mAb. The correlation of the AFB<sub>1</sub> and anti-id antibodies were analyzed by regression. The green ELISA based on anti-id antibody was applied in the analysis of spiked wheat flour sample. The recovery intra- and inter-assay was between 111.89% and 126.98%, respectively, while the CV less than 10%. The results indicated that the environmental-friendly and nontoxic ELISA could be used for actual samples.

**Keywords:** Aflatoxin, F(ab')<sub>2</sub> fragments, Anti-Id antibody, Green ELISA

收稿日期: 2013-07-30

基金项目: 国家十二五科技支撑计划项目(2012BACD1807, 2012BAD29B04); 国家十二五 863 计划项目(2012AA06A303)。

\* 通信作者: 匡华(1981—), 女, 河南长垣人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全与分析研究。

E-mail: khecho@163.com

黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFs)是一类由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等产生的一类结构类似的化合物<sup>[1]</sup>。黄曲霉毒素毒性极强,并具有致畸、致癌和致突变毒性。在已发现的数10种类的黄曲霉毒素中,黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)毒性最强,已被国际癌症组织列为第一类致癌物<sup>[2]</sup>。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AFB<sub>1</sub>分析方法,不论仪器检测还是免疫检测,均需要有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<sup>[3-7]</sup>。抗独特型抗体(Anti-idiotypic, Anti-Id 或 Ab<sub>2</sub>)在空间构象上与抗原存在内影象关系<sup>[8]</sup>,因此可以替代原始抗原作为标准物质,用于AFB<sub>1</sub>的无毒免疫学检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

新西兰大白兔,由江南大学动物中心提供;明胶、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、胃蛋白酶和弗氏佐剂,购自Sigma公司;蛋白质A,购于GE公司;HRP-山羊抗小鼠IgG,购自Jackson公司;其他试剂均为国产分析纯,购于上海国药集团。

### 1.2 仪器

Thermo MK3 酶标仪,伯乐电泳槽及电泳仪,HH-S 数显恒温水浴锅,江苏金坛医疗仪器厂制造;PH050A 型培养箱,上海一恒科学仪器有限公司制造;96孔可拆卸酶标板,Corning公司制造。

## 2 材料与方法

### 2.1 F(ab')<sub>2</sub>片段的制备

将抗黄曲霉毒素小鼠单克隆抗体11A9和1G3用蛋白质A柱纯化,并在pH 3.8的醋酸盐缓冲液中磁力搅拌透析6h,调整抗体质量浓度到2 mg/mL。同样用pH 3.8的醋酸盐缓冲液配置0.1 mg/mL的胃蛋白酶溶液。将抗体溶液和胃蛋白酶溶液按照1:1的体积比例混合后,37℃水浴进行酶解反应。反应结束后,加入1 mol/L Tris溶液将反应溶液调至中性。酶解产物经蛋白质A纯化后,收集穿流液,用SDS-PAGE鉴定,-20℃分装保存。

### 2.2 黄曲霉毒素抗独特型抗体的制备

将纯化的F(ab')<sub>2</sub>片段免疫新西兰大白兔。首次免疫采用弗氏完全佐剂乳化抗原,免疫剂量为2 mg/只,背部皮下多点注射。加强免疫时采用弗氏不完全佐剂乳化,免疫剂量减半。从第3次开始,免疫后第7天耳缘静脉采血,分离血清后检测效价。当效价不再增加时,用0.5 mg耳缘静脉冲免后采集血清。得到的血清经蛋白质A纯化后,分装保存于-20℃。

### 2.3 ELISA方法的建立

将包被抗原AFB<sub>1</sub>-BSA按照0.15 μg/mL的质量浓度进行包被,100 μL/孔,37℃孵育2h,弃去孔中液体,用质量分数0.05% PBST洗液洗板3次后,用含质量分数0.2%明胶的碳酸盐缓冲液CBS进行封闭,200 μL/孔,4℃过夜,同样方法洗板3次拍干。每孔先加入50 μL不同质量浓度的AFB<sub>1</sub>标准品溶液(0~1 ng/mL)或者抗独特型抗体(0~100 μg/mL),再加入合适倍数的抗黄曲霉毒素单抗溶液,37℃孵育30 min后,洗板3次;加入体积比1:3 000稀释的HRP标记羊抗鼠二抗,100 μL/孔,37℃孵育30 min后,洗板3次;每孔加入100 μL TMB底物液,于37℃显色反应15 min,用50 μL 2 mol/L硫酸终止液终止后,用酶标仪测450 nm波长的吸光值。

### 2.4 抗独特型抗体的性质

为了验证抗独特型抗体和AFB<sub>1</sub>之间具有相关性,将相同抑制率对应的AFB<sub>1</sub>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%<sup>[9]</sup>。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。抗独特型抗体特异性检验,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:

$$CR = (IC_{50AFB_1} / IC_{50其他}) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中IC<sub>50AFB<sub>1</sub></sub>为抗独特型抗体对抗黄曲霉毒素单抗11A9的IC<sub>50</sub>,而IC<sub>50其他</sub>为抗独特型抗体针对其他毒素单克隆抗体的IC<sub>50</sub>。

### 2.5 添加回收试验

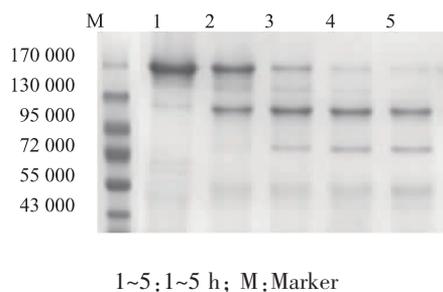
面粉样品经江苏省进出口检验检疫局HPLC-MS/MS检测,不含有黄曲霉毒素。称取5 g面粉样品于三角烧瓶中,分别添加10、25、50 ng的AFB<sub>1</sub>。室温干燥后,加入50 mL甲醇-水(体积比70:30),振荡均匀后,超声提取30 min。提取液经滤纸过滤后,

用 PBST(含体积分数 0.05% Tween20 的 PBS)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 d ELISA 结果得出。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 F(ab')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub> 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。经过优化,发现 pH 3.8 的条件较为合适。考察了不同时间对单克隆抗体 11A9 酶解效果的影响。结果(见图 1)表明,在 pH 3.8 条件下,经过 5 h 的反应,抗体基本上全部水解。在此条件下的酶解产物,经过蛋白质 A 纯化,收集穿流液,即得到 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

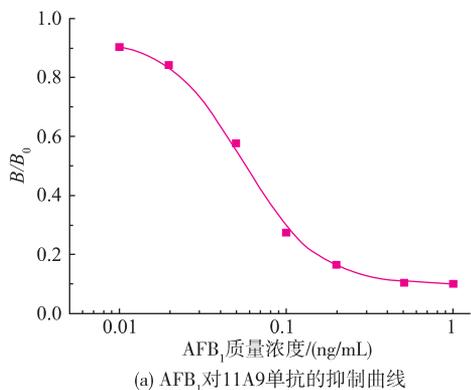


1~5:1~5 h; M:Marker  
图 1 不同时间下的 11A9 抗体酶解效果

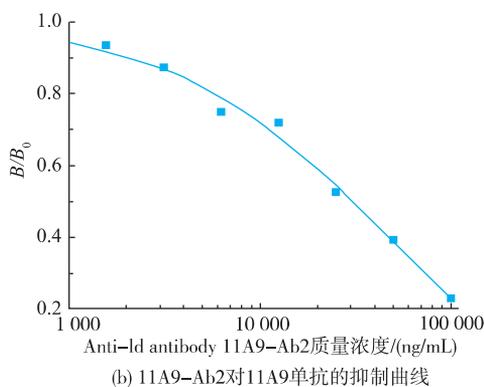
Fig. 1 Digestion of mAb 11A9 at pH3.8 for different times; 1~5 h; M:marker

#### 3.2 ELISA 方法

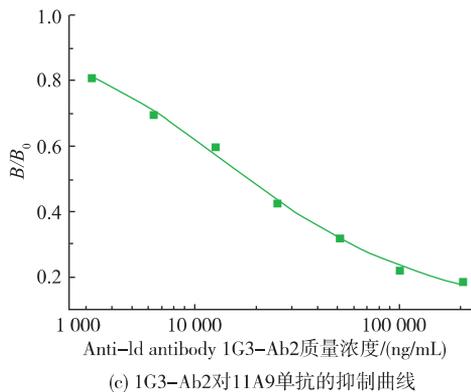
采用 AFB<sub>1</sub>、抗独特型抗体 11A9-Ab2 和 1G3-Ab2 作为 ELISA 标准品时,结果表明都能对抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体 11A9 产生抑制,其抑制曲线分别见图 2 (a)(b)(c)。经过四参数方程拟合计算,其 IC<sub>50</sub> 分别为 0.057 ng/mL、30 145 ng/mL 和 18 458 ng/mL。从结果中也可以看出,采用 1G3 单抗制备的抗独特型抗体 1G3-Ab2,对 11A9 单抗同样具有抑制,甚至效果要好于 11A9-Ab2。说明由于抗独特型抗体模拟 AFB<sub>1</sub> 的空间结构,因此对针对 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体都会有抑制作用。



(a) AFB<sub>1</sub>对11A9单抗的抑制曲线



(b) 11A9-Ab2对11A9单抗的抑制曲线



(c) 1G3-Ab2对11A9单抗的抑制曲线

图 2 对单克隆抗体 11A9 的抑制曲线  
Fig. 2 Standard curve of 11A9 mAb

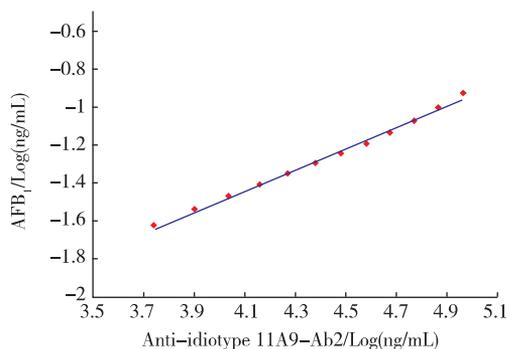
#### 3.3 两种标准物质相关性分析

两种标准物质的抑制曲线(图 2)说明,抗独特型抗体和 AFB<sub>1</sub> 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% 之间抑制率的质量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 3。从图 3 可以看出,抗独特型抗体和 AFB<sub>1</sub> 之间具有质量浓度对数的线性关系,其回归方程为:

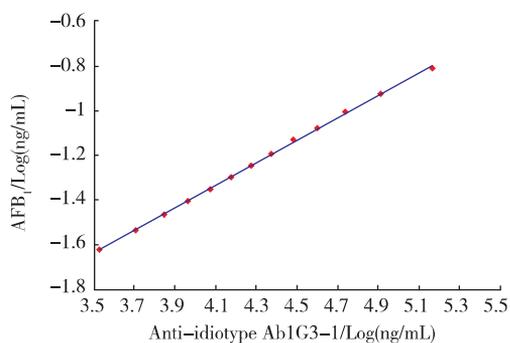
$$y=0.554 4x-3.711 3 \quad (11A9-Ab2) \quad (2)$$

$$y=0.501 2x-3.389 6 \quad (AG3-Ab2) \quad (3)$$

其中  $x$  为抗独特型抗体浓度,  $y$  为 AFB<sub>1</sub> 浓度, 相关系数  $R^2$  分别为 0.994 9 和 0.998 7。说明抗独特型抗体和 AFB<sub>1</sub> 具有高度的一致性, 可以作为无毒的标准品替代物。



(a) 11A9-Ab2和AFB<sub>1</sub>的相关性



(b) 1G3-Ab2和AFB<sub>1</sub>的相关性

图3 回归分析结果

Fig. 3 Regression analysis

### 3.4 抗独特型抗体的特异性

将抗独特型抗体分别替换其他的生物毒素及其对应的单克隆抗体, 并观察其对单抗的抑制效

果。结果显示, 其交叉反应均低于 1%。说明抗独特型抗体对其他生物毒素单抗交叉反应低, 具有很好的特异性, 可以作为特异性的标准品替代物开发绿色无毒的免疫检测方法。

### 3.5 添加回收试验

空白面粉样品添加回收实验的结果见表 1。从表 1 可以看出, 通过抗独特型抗体作为标准品的无毒 ELISA 方法, 其批内回收率为 115.60%~121.88%, 变异系数在 5% 以内; 而批间回收率为 111.89%~126.98%, 变异系数低于 8%。

表 1 面粉样品添加回收分析

Table 1 Analysis of wheat flour samples spiked with AFB<sub>1</sub>

样品	添加量/(ng/g)	批内(n=3)			批间(n=3)		
		测量值	CV/%	回收率/%	测量值	CV/%	回收率/%
wheat flour	2	0.024	4.65	119.01	0.025	6.88	126.98
	5	0.058	4.25	115.60	0.056	1.50	111.89
	10	0.122	3.05	121.88	0.113	7.95	112.59

## 4 结语

采用抗体 F(ab')<sub>2</sub> 片段作为免疫原制备了抗黄曲霉毒素 AFB<sub>1</sub> 的抗独特型抗体, 对抗独特型抗体的性质进行了鉴定, 并分析了抗独特型抗体和 AFB<sub>1</sub> 之间的相关性。建立了以抗独特型抗体为基础的无毒绿色 AFB<sub>1</sub> 的 ELISA 分析方法, 通过样品添加实验, 其批内和批间回收率在 111.89%~126.98% 之间, 变异系数低于 8%。该方法安全准确, 为无毒绿色的 AFB<sub>1</sub> 分析方法。

## 参考文献:

- [1] Reddy K R N, Raghavender C R, Salleh B, et al. Potential of aflatoxin B<sub>1</sub> production by *Aspergillus flavus* strains on commercially important food grains[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2011, 46(1): 161-165.
- [2] 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.
- [3] 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]. *Food and Agricultural Immunology*, 2012 (ahead-of-print): 1-10.
- [4] Khayoon W S, Saad B, Yan C B, et al. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(3): 882-886.
- [5] Nonaka Y, Saito K, Hanioka N, et al. Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(20): 4416-4422.
- [6] 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.

- [ 7 ] Bircan C. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC[J]. **International journal of Food Science & Technology**, 2005, 40(9): 929-934.
- [ 8 ] Jerne N K. Towards the network theory of the immune system[J]. **Ann Immunol: Inst Pasteur**, 1974, 125: 373-389.
- [ 9 ] Guan D, Li P, Cui Y, et al. A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M<sub>1</sub> in milk [J]. **Analytica Chimica Acta**, 2011, 703(1): 64-69.

## 科 技 信 息

欧盟拟修订多种作物中多杀菌素的最大残留限量

2013 年 11 月 4 日, 欧盟食品安全局(EFSA)就修订多种作物中多杀菌素( spinosad)的最大残留限量发布了意见。

据了解, 依据欧盟委员会(EC)No396/2005 法规第 6 章的规定, 比利时收到一家公司要求修订多种作物中多杀菌素最大残留限量的申请。为协调多杀菌素胺的最大残留限量(MRL), 比利时建议对其残留限量进行修订。

依据欧盟委员会(EC)No396/2005 法规第 8 章的规定, 比利时起草了一份评估报告, 并提交至欧委会, 之后转至欧盟食品安全局。

欧盟食品安全局对评估报告进行评审后, 做出如下修改建议:

产品代码	产品种类	现行限量/(mg/kg)	推荐限量/(mg/kg)
0154010	蓝莓	0.4/-	1.5
0154020	蔓越橘/红覆盆子	0.02*/-	1.5
0154030	黑加仑(红色、黑色和白色)	0.3 /-	1.5
0154040	醋栗(包括杂交出的其他醋栗物种)	0.3 /-	1.5
0154050	蔷薇果	0.3 /-	1.5
0154060	桑葚(野生浆果)	0.02*/-	1.5
0154070	氮双吡咯 Azarole(地中海枸杞子)(软枣猕猴桃)	0.3 /-	1.5
0154080	接骨木浆果(黑野樱桃/苹果莓, 鼠李, 沙棘, 山楂, 花椒果和其他树浆果)	0.3 /-	1.5
0154990	其他小水果和浆果类	0.02*/-	1.5
0243020	羽衣甘蓝	2/2	2
1011010	猪 肌肉	0.05 /2	0.1
1011020	猪 脂肪	1/2	2
1011030	猪 肝脏	0.5/0.5	0.7
1011040	猪 肾脏	0.3 /0.5	0.5
1012010	牛 肌肉	0.3/3	0.3
1012020	牛 脂肪	3/3	3
1012030	牛 肝脏	2/2	2
1012040	牛 肾脏	1/1	1
1013010 1014010	绵羊、山羊, 肌肉	0.05/2	0.3
1013020 1014020	绵羊、山羊, 脂肪	2/2	3
1013030 1014030	绵羊、山羊 肝脏	0.5/0.6	1.5
1013040 1014040	绵羊、山羊 肾脏	0.5/0.5	0.5
101610	禽类, 肌肉	0.2/1	0.2(临时)
1016020	禽类, 脂肪	1/1	1(临时)
1016030	禽类, 肝脏	0.2/0.2	0.2(临时)
1016040	禽类, 肾脏	0.2/0.2	0.2(临时)
1020000	牛奶	0.5/0.2	0.2
1030000	鸟蛋	0.2/0.2	0.2(临时)

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 欧盟拟修订多种作物中多杀菌素的最大残留限量 [EB/OL]. (2013-11-6). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=43711>.