

· 研究论文 ·

黄曲霉毒素 B1 液相芯片定量检测方法的探索

宋慧君^{1,2}, 马惠蕊², 裴轶君², 刘淑艳², 曹远银^{*3}

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 沈阳 110161; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001;

3. 沈阳农业大学 植物免疫研究所, 沈阳 110161)

摘要:采用间接竞争法的原理和液相芯片技术平台, 选用黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 多克隆抗体对 AFB1 的定量检测方法进行了探索。通过优化偶联抗原浓度, 确定 AFB1 多抗临界饱和浓度和抗原抗体最佳孵育时间, 建立了 AFB1 液相芯片定量检测方法。以通用的 IC₅₀ 值作为灵敏度衡量标准, 其灵敏度为 1.33 ng/mL, 以 IC₁₀ 作为最低检测限衡量标准, 其最低检测限为 0.15 ng/mL, 线性方程为 $y = 0.0006x + 0.0008$ 。应用该方法对脱脂牛奶和全脂牛奶中的 AFB1 进行添加回收率检测, 在 2.0 ~ 16.0 ng/mL 添加水平下, 平均回收率均大于 75%, 相对标准偏差介于 2.80% ~ 4.69% ($n = 7$) 之间。经过实际样品的检测, 证明该方法灵敏、稳定、快速、简便, 适用于大量样本的检测。

关键词:黄曲霉毒素 B1; 液相芯片技术; AFB1 多克隆抗体; 定量分析

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2011.04.11

中图分类号: Q657; Q785

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2011)04-0394-08

Quantitative analysis of Aflatoxin B1 using the microsphere array technology

SONG Hui-jun^{1,2}, MA Hui-rui², PEI Yi-jun², LIU Shu-yan², CAO Yuan-yin^{*3}

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, Liaoning Province, China;

3. Institute of Plant Immunology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The quantitative detection of Aflatoxin B1 (AFB1) was investigated on the microsphere array platform and indirect competition by using the Anti-Aflatoxin B1. Through optimizing the concentration and saturated concentration of AFB1-BSA and Anti-Aflatoxin B1 as well as incubation time of antigen and antibody, the method of quantitative detection of AFB1 was established. As referring to the detection sensitivity standard IC₅₀, results showed that the detection sensitivity was 1.33 ng/mL. Meanwhile, as referring to the limit of detection standard IC₁₀, the detection limitation was 0.15 ng/mL. The linear equation was $y = 0.0006x + 0.0008$. By applying this original research to test the imitating contaminated skim and full milk, the recovery rate of the two kinds of milk was all greater than 75% under the AFB1 added level of 2.0 - 16.0 ng/mL, and the relative standard deviation was between 2.80% - 4.69% ($n = 7$). Overall, the quantitative analysis of AFB1 using the microsphere array

收稿日期: 2011-02-12; 修回日期: 2011-05-18.

作者简介: 宋慧君 (1974-), 女, 硕士, 高级工程师, 电话: 0411-82583933, E-mail: selen369@163.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 曹远银 (1955-), 男, 博士, 研究员, 从事有害化学物质残留检测、生物安全和小麦病害研究, 电话: 024-888487149, E-mail: caoyy66@yahoo.com.cn.

基金项目: 中国质检总局资助项目 (2009IK152).

technology was sensitive, stable, rapid and simple. The method was applicable to mass sample testing.

Key words: Aflatoxin B1; microsphere array technology; Anti-Aflatoxin B1; quantitative analysis

食品在生产、加工、储存、运输和销售的过程中会受到多方面的污染,主要包括生物性污染、化学性污染、放射性污染等。其中,化学性污染来源复杂,种类繁多,主要有农药污染、重金属污染等。据报道,在全世界投入使用的 1 350 种农药中,最多只有 600 种能够被检测出来^[1]。因此亟待寻找一种高通量和高灵敏性的农药检测方法。

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFT)是一类主要由黄曲霉 *Asperillus flavus* 和寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* 产生的具有强毒性和强致癌性的次生代谢产物的总称。与许多小分子农药相似,AFT 是一种小分子毒素,其定量检测一直是检验检疫的难点之一。本研究拟探讨 AFT 的定量检测方法,希望对小分子农药的检测有一定的借鉴和参考意义。

目前,已被成功分离鉴定的 AFT 主要包括 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、AFM1、AFM2 等 20 余种毒素^[2]。AFB1 是其中最稳定、毒性最大的毒素之一,世界上许多国家对 AFT 的含量尤其是 AFB1 的含量均设定了严格的限量标准。其中,世界卫生组织推荐食品和饲料中 AFT 的最高允许限量(MRL)标准为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3];美国联邦政府有关法律规定,人类消费食品和奶牛饲料中的 AFT 的含量(B1 + B2 + G1 + G2)不能超过 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4];欧盟相关法规规定,直接提供给人类食用的食物及组成食品的组份中 AFB1 的含量不能超过 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3];日本则规定,食品中 AFB1 的含量不能超过 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5];我国在《食品中真菌毒素限量》中规定,AFT 在玉米、花生仁、花生油及制品中不得超过 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在大米和其他食用油中不得超过 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在其他粮食、豆类及发酵食品中不得超过 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,婴儿代乳食品中为不得检出^[6]。

目前,AFT 的检测方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法、薄层层析法、生物鉴定法和免疫检测法等^[7-11]。液相芯片技术是近几年刚刚兴起的一种高通量检测技术,集中了分子生物学、免疫学、高分子化学、激光检测、微流体以及计算机等方面的先进技术,可实现分子遗传学和免疫学的多指标自动化高通量检测,也被称为“液态生物芯片”^[12-13]。利

用液相芯片技术定量检测 AFB1 的原理是:在一种荧光微球表面交联上 AFB1 蛋白纯品,同时加入待检的游离的 AFB1 小分子和其标记有生物素的相应抗体,使游离的 AFB1 小分子蛋白与交联在微球表面的 AFB1 小分子蛋白纯品竞争结合抗体,经过洗脱后加入链霉亲和素-藻红蛋白(Streptavidin, R-phycoerythrin conjugate, SA-PE)。SA-PE 是一种新型的荧光标记试剂,可与标记有生物素的 AFB1 多克隆抗体结合,在波长 532 nm 的激光激发下发射出强烈的荧光,其荧光强度与待检的小分子蛋白的量成反比,因此可对待检小分子蛋白进行定量检测^[14]。液相芯片是继平面芯片之后的一种新型芯片技术,是一种非常灵活的多元分析平台,具有巨大的应用潜力,可用于免疫分析、核酸研究、酶学分析、受体-配体识别分析等众多领域^[15]。目前应用较多的是细胞因子的检测、病原体的检测和分型以及单核苷酸多态性(SNP)的检测等^[16-18]。AFB1 属于小分子毒素中的一种,采用液相芯片技术定量检测小分子毒素还鲜有报道。本研究中笔者首次采用液相芯片技术平台,应用 AFB1 多克隆抗体对 AFB1 液相芯片检测方法进行探索,以期建立 AFB1 液相芯片定量测试方法。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 仪器与设备 Luminex 100 型液相芯片系统(美国 Luminex 公司);TDX-1 型旋涡混合器(北京方通达科技有限公司);HB-032 型金属恒温加热器(上海申能博彩生物科技有限公司);JA2003 型电子天平(上海衡平仪器仪表厂);2.5 ~ 1 000 μL 微量移液器(德国 Eppdorf 公司)。

1.1.2 试剂 AFB1 多克隆抗体(Anti-Aflatoxin B1,免疫抗原 AFB1-OVA,兔源,抗体类型 IgG,质量浓度 6.90 mg/mL,由辽宁出入境检验检疫局生物实验室提供);黄曲霉毒素 B1 标准品(AFB1,1 mg,纯度 $\geq 99\%$)、黄曲霉毒素 B1-BSA(AFB1-BSA,5 mg,纯度 $\geq 99\%$)、黄曲霉毒素 B2 标准品(AFB2,1 mg,纯度 $\geq 99\%$)、黄曲霉毒素 G1 标准品(AFG1,

1 mg, 纯度 $\geq 98\%$)和玉米赤霉烯酮标准品(ZEN, 10 mg, 纯度 $\geq 99\%$), 均为 Sigma 公司产品; 链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE, Invitrogen 公司, 1 mg/mL, 1 mL); 14 号和 28 号羧基化荧光编码微球(Luminex 公司, 1.25×10^7 个); 微球活化缓冲液: 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , pH 6.2; 微球偶联缓冲液: PBS, pH 7.4; 微球清洗缓冲液: PBS, pH 7.4, 0.05% Tween-20; 微球储存液: PBS, 0.1% BSA, 0.02% Tween-20, 0.05% Azide, pH 7.4; 50 mg/mL *N*-羟基琥珀酰亚胺工作液; 50 mg/mL 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)氯化二亚胺工作液; 蛋白生物素标记试剂盒(EZ-LINK, Pierce 公司, 10 次); 1 mg/mL 生物素标记兔抗羊 IgG; 全脂牛奶和脱脂牛奶(市售)。

1.2 试验方法

1.2.1 微球的活化与偶联 参照 Luminex 说明书进行。设计偶联抗原 AFB1-BSA 的用量分别为 15、30、50、100 μg ; 随机选择 14 号和 28 号两种微球各 500 μL , 分别放入 2 个 1.5 mL 的离心管中, 14 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液; 加入微球活化缓冲液, 80 μL /管, 旋涡振荡 30 s, 14 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液; 分别于上述 2 个离心管中加入微球活化缓冲液, 80 μL /管, 旋涡振荡 30 s, 将微球重新悬浮; 加入新鲜配制的 50 mg/mL 的 Sulfo-NHS 工作液, 10 μL /管, 轻微振荡, 立即进行下一步; 分别于上述离心管中加入新鲜配制的 50 mg/mL 的 EDC 工作液, 10 μL /管, 轻微振荡, 避光, 室温振荡孵育 20 min; 14 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液; 分别于上述离心管中加入偶联缓冲液, 500 μL /管, 旋涡振荡 30 s, 14 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液; 重复上述操作一次; 将上述活化微球平均分装至 10 个离心管中, 100 μL /管; 以 AFB1-BSA 为溶质, 以 PBS 为溶剂, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的溶液; 在装有 14 号活化微球的 5 个离心管中, 分别加入 15、30、50、100 μL 1 mg/mL 的 AFB1-BSA 溶液及 10 μL 生物素标记兔抗羊 IgG(偶联质控), 分别用偶联缓冲液将体积补足至 500 μL , 避光, 室温旋涡振荡 2 h; 在装有 28 号活化微球的 5 个离心管中, 分别加入 15、30、50 和 100 μL 1 mg/mL 的 AFB1-BSA 溶液及 10 μL 生物素标记兔抗羊 IgG(偶联质控), 分别用偶联缓冲液将体积补足至

500 μL , 避光, 室温旋涡振荡 2 h; 将上述 10 个离心管在 14 000 r/min 下离心 2 min, 弃去上清液; 分别向上述 10 个离心管中加入清洗缓冲液, 1 mL/管, 旋涡振荡 30 s, 14 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液; 重复上述操作 1 次; 分别向上述 10 个离心管中加入微球储存液, 100 μL /管, 悬浮微球, 4 $^\circ\text{C}$ 避光保存(使用时根据仪器读球数目, 可适当进行稀释)。活化微球与上述抗原偶联后, 标识为: 14#-15、14#-30、14#-50、14#-100、28#-15、28#-30、28#-50、28#-100。

1.2.2 抗体的生物素标记 参照 EZ-LINK 试剂盒操作说明书进行。将存储在冰箱中的生物素标记试剂盒取出后平衡至室温; 用 PBS (pH 7.2) 将 0.5 mL AFB1 多克隆抗体稀释至 1 mL; 新鲜配制 10 mmol/L 的 *N*-羟基琥珀酰亚胺溶液; 于上述 1 mL AFB1 多克隆抗体中加入 10 mmol/L 的生物素 46.31 μL , 4 $^\circ\text{C}$ 下反应 16 h; 打开一个脱盐柱, 置于 15 mL 离心管中, 在 1 000 r/min 下离心 2 min, 去除贮存液后将脱盐柱再放回该离心管中; 在脱盐柱的树脂床顶部加入 2.5 mL PBS (pH 7.2), 1 000 r/min 下离心 2 min, 去除液体, 重复此步骤 2~3 次; 将脱盐柱放于新的 15 mL 离心管中, 在脱盐柱中的树脂床中间加入 AFB1 多克隆抗体, 使样品被树脂吸附; 将上述脱盐柱在 1 000 r/min 下离心 2 min, 收集离心后的滤液, 该液体即为纯化后的蛋白样品, 分装后于 -20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

1.2.3 AFB1 液相芯片检测方法的建立 主要包括反应体系的优化(偶联抗原浓度、抗体浓度及孵育时间的优化)、抗体饱和和临界浓度的确定和竞争法检测标准曲线的建立 3 个方面。

1.2.3.1 反应体系优化 AFB1 多克隆抗体浓度组: 2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 抗原抗体孵育时间: 分别选择 1、3、6、15、24 和 48 h 6 个不同时间段。反应体系由偶联 AFB1-BSA 微球、多克隆抗体和 PBS 组成。在 1.5 mL 的离心管中按表 1 依次加入偶联 AFB1-BSA 微球, AFB1 多克隆抗体, 最后用 PBS 补足体积至 100 μL ; 每个反应体系重复配制 18 个; 混匀, 37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育; 分别于孵育时间为 1、3、6、15、24 h 和 48 h 时, 各取出 3 个反应体系, 分别加入 25 μL 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SA-PE, 混匀, 37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min。孵育结束后, 每个反应体系取

75 μL , 加入液相芯片中进行测试。

1.2.3.2 AFB1 多克隆抗体饱和临界浓度确定

采用 14#-100 和 28#-100 两种偶联微球进行试验, 孵育时间为 24 h; AFB1 多克隆抗体浓度组为: 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0、15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.3.3 标准曲线的建立 采用 14#-100 和 28#-100 两种偶联微球进行试验, 孵育时间为 24 h, 多克隆抗体的质量浓度为 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; AFB1 标准品质

量浓度组为: 0、0.03、0.06、0.31、0.63、1.25、2.50、3.75、5.00、6.25、7.50、9.38、11.25 ng/mL 。本研究中, 设反应体系中的偶联抗原浓度为 c , 加入的荧光标记的多克隆抗体质量浓度为 A , 反应体系中偶联抗原捕获 A 浓度的特异性多克隆抗体后的荧光信号值 (median fluorescence intensity, MFI) 为 m ; 待检样品对应的 MFI 为 Y , 其倒数 $y = 1/Y$, 样品质量浓度为 x , 可得出 $y = c \times m / (x + c)$, $x = c \times m \times y - c$, 即样品的质量浓度与 MFI 值的倒数成正比^[19]。

表 1 偶联抗原浓度、多克隆抗体浓度优化反应体系组成

Table 1 The reaction system about the concentration of coupling antigen and Anti-Aflatoxin B1

黄曲霉毒素 B1 多抗浓度 Anti-Aflatoxin B1/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	黄曲霉毒素 B1 多抗体积 Anti-Aflatoxin B1/ μL	偶联微球 (10 $\mu\text{L}/\text{反应}$) Coupling microsphere (10 $\mu\text{L}/\text{reaction}$)							
0.00	5.00	14#-15	14#-30	14#-50	14#-100	28#-15	28#-30	28#-50	28#-100
2.00	5.00	14#-15	14#-30	14#-50	14#-100	28#-15	28#-30	28#-50	28#-100
4.00	5.00	14#-15	14#-30	14#-50	14#-100	28#-15	28#-30	28#-50	28#-100
8.00	5.00	14#-15	14#-30	14#-50	14#-100	28#-15	28#-30	28#-50	28#-100
16.00	5.00	14#-15	14#-30	14#-50	14#-100	28#-15	28#-30	28#-50	28#-100
32.00	5.00	14#-15	14#-30	14#-50	14#-100	28#-15	28#-30	28#-50	28#-100
64.00	5.00	14#-15	14#-30	14#-50	14#-100	28#-15	28#-30	28#-50	28#-100
终体积 Total volume/ μL		100	100	100	100	100	100	100	100

1.2.4 AFB1 多克隆抗体特异性检测 选择 28#-100 偶联微球进行试验, 孵育时间为 24 h; 多克隆抗体的质量浓度为 6.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$; 分别选择 AFB2、AFG1 以及 ZEN 进行交叉反应试验。

1.2.5 AFB1 牛奶样品加标回收率测定 选择 28#-100 偶联微球进行试验, 孵育时间为 24 h; 分别选择脱脂牛奶和全脂牛奶进行测试, AFB1 添加回收水平分别设置低 (2.0 ng/mL)、中 (8.0 ng/mL)、高 (16.0 ng/mL) 3 个水平。参照 MaxSignal™ Aflatoxin B1 elisa test kit (BIOO Scientific Corp) 说明书, 将添加 AFB1 的牛奶于 4℃ 冰箱中放置过夜, 提取前将样品于摇床中振荡 30 min, 充分混匀; 对于脱脂牛奶, 用质量分数为 35% 的甲醇稀释 10 倍, 于摇床中振荡 30 min, 取 50 μL 稀释后的样品进行检测; 对于含脂牛奶, 取适量的牛奶样品在 4 000 r/min 下离心 5 min, 除去上层脂肪层, 用 35% 的甲醇稀释 10 倍, 取 50 μL 稀释后的样品进行检测。

1.2.6 数据分析 试验结果用 Excel 和 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 AFB1 液相芯片检测反应体系优化结果

由图 1、图 2 中数据得出: 1) 随着偶联抗原用量的增加, 同一抗体浓度和同一孵育时间下检测得到的荧光信号值 (MFI) 呈现升高的趋势, 当偶联抗原用量在 100 μg 时, MFI 最大; 2) 随着 AFB1 多克隆抗体浓度的增加, 同一用量偶联抗原在同一孵育时间下检测得到的 MFI 呈现先升高后降低的趋势, 当多克隆抗体质量浓度在 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, MFI 最大, 之后随着抗体浓度的继续增加, MFI 下降; 3) 随着孵育时间的增加, 同一浓度偶联抗原和同一浓度多克隆抗体反应检测得到的 MFI 呈现逐步升高的趋势, 当孵育时间为 48 h 时, MFI 最大。

方差分析结果 (见表 2) 表明: 1) 偶联抗原浓度、多克隆抗体浓度以及孵育时间对 MFI 的影响均达到了极显著水平; 2) 三种因素对 MFI 值的影响大小顺序分别为多克隆抗体浓度 > 孵育时间 > 偶联抗原浓度。

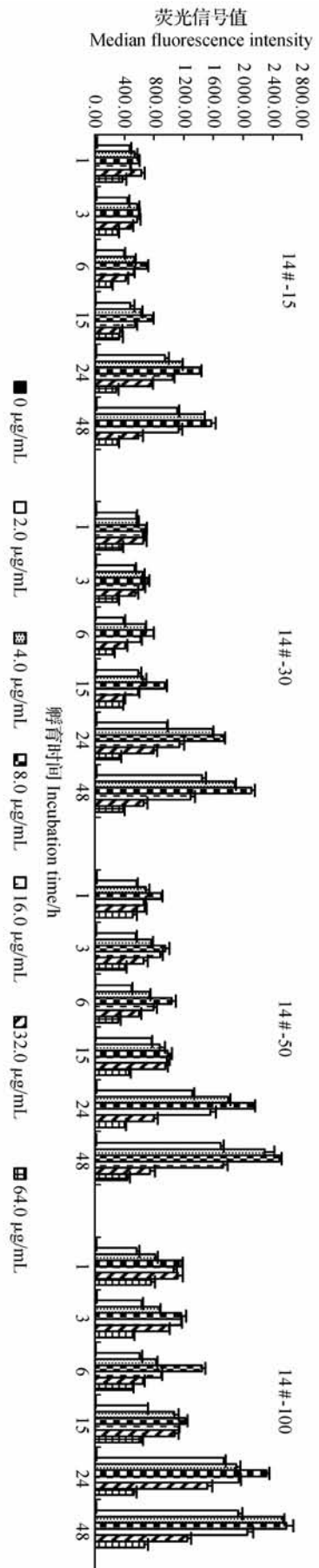


图1 14号微球反应体系偶联抗原浓度、多克隆抗体浓度及孵育时间优化结果

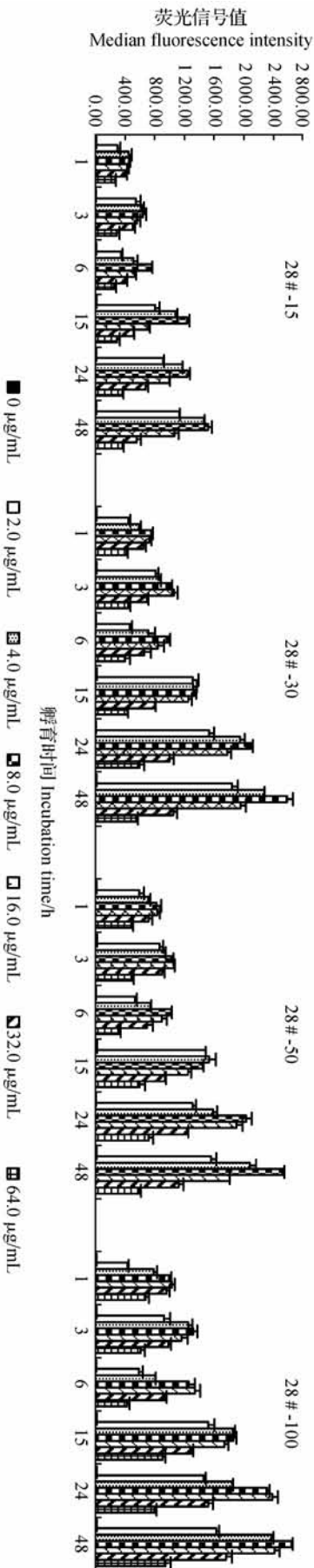


图2 28号微球反应体系偶联抗原浓度、多克隆抗体浓度及孵育时间优化结果

表 2 偶联抗原浓度、多抗浓度及孵育时间方差分析结果

Table 2 Result of ANOVA about the concentration of coupling antigen and Anti-Aflatoxin B1 and incubation time

微球 Microsphere	F 检验 F test	黄曲霉毒素 B1 多抗浓度 Anti-Aflatoxin B1 concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	偶联抗原浓度 Coupling antigen concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	孵育时间 Incubation time/h
14#	F	2 038.96	707.93	1 167.00
	P	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$
28#	F	1 924.80	744.74	1 086.55
	P	$P < 0.01$	$P < 0.01$	

2.2 AFB1 抗体饱和临界浓度

以 AFB1 多克隆抗体质量浓度为横坐标,以不同浓度多克隆抗体与两种偶联微球 14#-100 和 28#-100 反应得到的 MFI 为纵坐标,绘制散点图,见图 3。

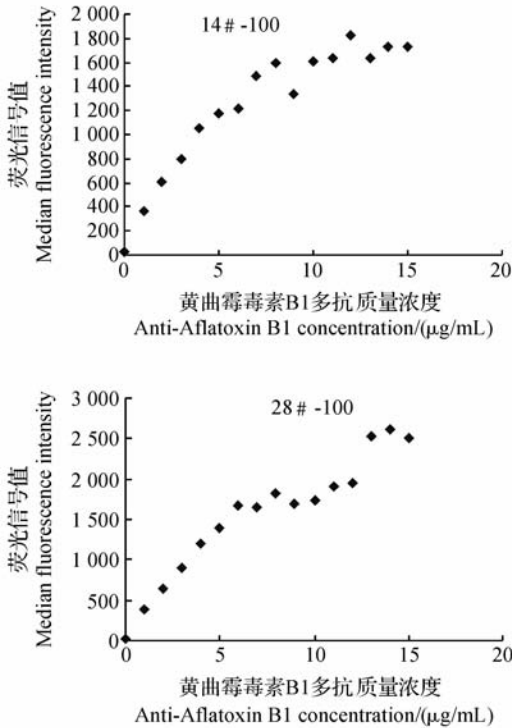


图 3 抗体临界饱和浓度散点图

Fig. 3 The scatter diagram of the critical saturated concentration of Anti-Aflatoxin B1

根据散点图,分别选定 0~6.0、0~7.0 和 0~8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个抗体区间浓度与 MFI 值进行线性拟合,得到 3 个 R^2 值,分别命名为 R_1^2 、 R_2^2 和 R_3^2 。根据线性关系,最大 R^2 即为 AFB1 抗体饱和和临界浓度。测试结果排序依次是 $R_1^2 > R_2^2 > R_3^2$,表明多克隆抗体质量浓度在 0~6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性关系较好。两种微球规律基本一致,见表 3。

表 3 多克隆抗体不同浓度区间试验数据线性拟合结果

Table 3 The linear extraction result of the experimental data about Anti-Aflatoxin B1 in different concentration

偶联微球 Coupling microsphere	R_1^2 (0 ~ 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	R_2^2 (0 ~ 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	R_3^2 (0 ~ 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
14#-100	0.988 8	0.979 9	0.975 4
28#-100	0.995 2	0.982 6	0.970 8

2.3 AFB1 液相芯片定量检测方法的建立

根据 1.2.3.3 节中检测原理所述,检测样品质量浓度与 MFI 倒数成正比。因此,对 AFB1 多克隆抗体与 14 号和 28 号微球偶联 AFB1-BSA 反应得到的 MFI 值求倒数,并与样品浓度进行线性拟合,得到的 R^2 介于 0.984 2~0.990 6 之间,符合定量实验的标准,表明竞争法标准曲线建立成功。以抑制率达 50% 时的 AFB1 质量浓度作为灵敏度 (IC_{50}),14 号微球和 28 号微球的 IC_{50} 值分别为 1.33 和 1.43 ng/mL 。以抑制率达到 10% 时的 AFB1 质量浓度作为最低检测限 (IC_{10}),14 号微球和 28 号微球的 IC_{10} 值分别为 0.15 和 0.16 ng/mL 。14 号微球及 28 号微球线性拟合方程分别为 $y = 0.000 6x + 0.000 8$ 和 $y = 0.000 7x + 0.001$ 。对所建立的标准曲线进行方差分析的结果表明,两种微球对荧光信号的影响无显著性差异,表明液相芯片检测体系均匀稳定。

2.4 AFB1 多克隆抗体特异性测定

对各毒素检测得到的 MFI 值求倒数,并与毒素样品浓度进行线性拟合,计算各毒素 IC_{50} 值及 AFB1 与各种毒素的交叉反应率。结果(表 4)表明:本研究中使用的多克隆抗体对 AFB1 有特异的识别能力;同时,抗体对 AFB2 和 AFG1 也有一定的识别能力,交叉反应率分别为 14.68% 和 5.45%;抗体与

ZEN 的交叉反应率 < 0.10% , 表明 AFB1 多克隆抗体对 ZEN 无识别能力。

表 4 抗体交叉反应测定结果

Table 4 The detection result of the cross reaction about Anti-Aflatoxin B1

毒素类型 Toxin type	黄曲霉毒素 B1 多克隆抗体 IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应率 Cross reactivity rate/%
AFB1	1.40	100.00
AFB2	9.50	14.68
AFG1	25.58	5.45
ZEN	>837.45	<0.10

2.5 牛奶样品中的添加回收率

以脱脂牛奶和全脂牛奶为试验样本,进行 AFB1 添加回收率试验。结果(表 5)表明,在添加水平为 2.0 ~ 16.0 ng/mL 下,其回收率均大于 75%,相对标准偏差(RSD)介于 2.80% ~ 4.69% ($n=7$) 之间,检测水平符合毒素残留分析的要求。

表 5 AFB1 在脱脂牛奶和全脂牛奶中的添加回收率 ($n=7$)

Table 5 Recovery of AFB1 fortified in skim milk and full milk ($n=7$)

样品类型 Sample type	添加水平 Spiked level/ (ng/mL)	平均回收率 Average recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
脱脂牛奶 Skim milk	2.0	83.45	4.28
	8.0	78.56	3.53
	16.0	79.57	4.69
全脂牛奶 Full milk	2.0	76.40	4.38
	8.0	75.59	4.34
	16.0	78.19	2.80

3 小结与讨论

免疫学检测中,通常以 IC₅₀ 值作为评价一种检测方法灵敏度的指标,以 IC₁₀ 值则作为检测限(LOD)。本研究建立了 AFB1 液相芯片定量检测方法,以通用的 IC₅₀ 作为灵敏度衡量标准,其灵敏度为 1.33 ng/mL,以 IC₁₀ 作为检测限衡量标准,其检测限为 0.15 ng/mL,线性方程为 $y = 0.0006x + 0.0008$ 。应用该方法对脱脂牛奶和全脂牛奶进行添加回收率检测,在添加水平为 2.0 ~ 16.0 ng/mL

下的平均回收率均大于 75%,RSD 介于 2.80% ~ 4.69% ($n=7$) 之间,其中低 AFB1 添加水平(2.0 ng/mL)为欧盟食品中 FB1 的限量标准(MRL),应用该方法检测回收率和检测误差均满足要求。中国于 1981 年制定了 AFB1 限量标准,并于 2005 年进行了修订,将大米等粮食中 AFB1 的 MRL 值降至 10 ng/kg^[20]。本方法建立的 AFB1 检测灵敏度完全可满足我国食品中 AFB1 的检测要求,同时也完全满足欧盟对人类食物中 AFB1 的相关限量要求。该方法简化了样品的纯化和分离步骤,经过实际样品的检测,证明具有比传统检测法更简便、经济、灵敏的特点,适用于大批量样品的快速检测。

利用液相芯片技术平台进行 AFB1 检测有如下几点优势:首先,液相芯片技术相对于酶联免疫吸附法(ELISA)来说,整个反应在液相体系中进行,大大提高了反应的灵敏度,减少了假阳性的概率;其次,ELESA 反应过程中需要酶的参与,反应结果易受酶活性的影响,试剂寿命较短,而液相芯片技术不存在以上条件的限制;再者,液相芯片技术采用化学法将抗原与微球进行偶联,在液相反应条件下偶联微球与抗体结合的比表面积远远大于固相反应中抗原与酶标板底部抗体结合的比表面积,因此,相对于 ELESA 的物理性非特异吸附法,液相反应体系使得整个反应更加充分,更加稳定。另外,目前 AFB1 检测常用的薄层层析法存在样品提取过程较复杂,不适宜大量样本的检测等缺点,本研究建立的 AFB1 液相芯片定量检测技术弥补了上述不足,不失为一种稳定、快速、灵敏、高通量的检测方法。本研究同时采用两种微球进行试验,试验结果充分表明了该方法的灵敏性和稳定性。

参考文献:

- [1] YI Mei(亦梅). 食品中潜藏农药问题普遍存在[J]. *Shandong Pestic News*(山东农药信息),2008(2):22.
- [2] LIU Zuo-xin(刘作新),GAO Jun-xia(高军侠). 黄曲霉毒素的检测方法研究进展[J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报),2004,31(2):223-226.
- [3] SU Fu-rong(苏福荣),WANG Song-xue(王松雪),SUN Hui(孙辉),*et al.* 国内外粮食中真菌毒素限量标准制定的现状与分析[J]. *Sci Technol Cereals, Oils Foods*(粮油食品科技),2007,15(6):57-59.
- [4] FENG Liang(冯靓),CAI Zeng-xuan(蔡增轩),TAN Ying(谭莹),*et al.* HPLC 同时测定食品中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2

- [J]. *Chinese J Health Lab Tech*(中国卫生检验杂志),2007,17(3):511-513.
- [5] LI Shu-guo(李书国), CHEN Hui(陈辉), LI Xue-mei(李雪梅), *et al.* 粮油食品中黄曲霉毒素检测方法综述[J]. *Sci Technol Cereals, Oils Foods*(粮油食品科技),2009,17(2):62-65.
- [6] GB2761-2005. Maximum levels mycotoxins in foods(食品中真菌毒素限量)[S]. Beijing(北京):China Standard Press(中国标准出版社),2005:1-25.
- [7] WANG Hong-liang(王宏亮). 薄层层析法测定饲料中黄曲霉毒素 B1 方法的改进[J]. *Cereal & Feed Ind*(粮食与饲料工业),1998(1):40-42.
- [9] WANG Feng-ying(王凤英). 高效液相色谱法测定花生中的黄曲霉毒素[J]. *Mod Instrum*(现代仪器),2002(3):16,22-23.
- [9] PAN Zhong-hua(潘中华), XU Yan-fang(徐燕芳), CHENG Heng-hao(成恒蒿). 黄曲霉毒素分析方法进展[J]. *Agro-Environ & Devel*(农业环境与发展),1995,44(2):30-33.
- [10] LIU Qi-fang(柳其芳), LI Xue-hui(黎雪慧). 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B1[J]. *Hainan Med J*(海南医学),2004,15(7):57-58.
- [11] MA Liang(马良), LI Pei-wu(李培武), ZHANG Wen(张文). 高效液相色谱法对农产品中黄曲霉毒素的测定研究[J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报),2007,26(6):774-778.
- [12] EARLEY M C, VOGT R F Jr, SHAPIRO H M, *et al.* Report from a workshop on multianalyte microsphere assays[J]. *Cytometry*, 2002,50(5):239-242.
- [13] SMITH P L, WALKERPEACH C R, FULTON R J, *et al.* A rapid, sensitive, multiplexed assay for detection of viral nucleic acids using the flow matrix system[J]. *Clin Chem*,1998,44(9):2054-2056.
- [14] YANG Yang(杨洋), TANG Hua(汤华). 液相芯片技术在检验医学和生物医学中的应用[J]. *Chinese J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报),2007,23(4):256-261.
- [15] CHEN Wei(陈玮). 液相芯片技术的原理与应用进展[J]. *J Chengdu Med College*(成都医学院学报),2008,3(29):225-231.
- [16] FUNDING M, HANSEN T K, GJEDSTED J, *et al.* Simultaneous quantification of 17 immune mediators in aqueous humour from patients with corneal rejection[J]. *Acta Ophthalmol Scand*,2006,84(6):759-765.
- [17] WALLACE J, WODA B A, PIHAN G F, *et al.* Facile, comprehensive, high throughput genotyping of human genital papillomaviruses using spectrally addressable liquid bead microarrays[J]. *J Mol Diagn*,2005,7(1):72-80.
- [18] KULLER L, WATANABE R, ANDERSON D, *et al.* Development of a whole virus, multiplex flow cytometric assay for antibody screening of a specific pathogen free primate colony[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*,2005,53(3):185-193.
- [19] Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau(深圳出入境检验检疫局), Huazhong Agricultural University(华中农业大学), Beijing LabX Co. Ltd(北京盈九思科技发展有限公司). 几种兽药残留的流式液相芯片检测方法及其关键技术的研究[R/OL]. (2006-07-04). <http://www.cqn.com.cn/news/zggmsb/2007/156348.html>
- [20] LIN Lei(林磊). Study on countermeasures in broccoli of Zhejiang Province cope with Japanese Positive List(浙江省西兰花应对日本“肯定列表”研究)[D]. Tianjin(天津):Hebei University of Technology(河北工业大学),2007:14.

(责任编辑:金淑惠)

欢迎订阅《植物病理学报》

《植物病理学报》是中国植物病理学会主办的全国性学术刊物,“中国科技核心期刊”。主要刊登植物病理学各分支未经发表的专题评述、研究论文和研究简报等,以反映中国植物病理学的研究水平和发展方向,推动学术交流,促进研究成果的推广和应用。

本刊现已被英国农业与生物技术文摘(CAB)、联合国粮农组织 AGRIS 等收录。据《中国科技期刊引证报告》(2010年版)统计结果,《植物病理学报》的影响因子达 0.721。2003 年荣获首届《中国学术期刊检索与评价数据规范》(CAJ-CD)执行优秀期刊奖。

本刊为双月刊,每期定价 30 元,全年 6 期共 180 元。

邮发代号:82-214。欢迎投稿,欢迎订阅。

编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路 2 号 中国农业大学植保楼 406 室

邮编:100193

电话:(010)6273 2364

传真:(010)6281 3785

E-mail:journal@cspp.org.cn。