

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250218005

引用格式: 张浩然, 程传民, 王晨, 等. 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测小麦中禾谷镰孢菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(11): 17–25.

ZHANG HR, CHENG CM, WANG C, *et al.* Detection of *Fusarium graminearum* in *Triticum aestivum* by double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(11): 17–25. (in Chinese with English abstract).

双抗体夹心酶联免疫吸附法检测小麦中 禾谷镰孢菌

张浩然^{1,2#}, 程传民^{3#}, 王晨², 李培武^{2,4,5}, 张奇^{1,2,4,5*}, 唐晓倩^{2,5*}

- [1. 山西农业大学食品科学与工程学院, 晋中 030801; 2. 中国农业科学院油料作物研究所, 农业农村部油料及制品质量监督检验测试中心, 农业农村部油料产品质量安全风险评估实验室(武汉), 农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 武汉 430062; 3. 四川省饲料工作总站, 成都 610000; 4. 湖北洪山实验室, 武汉 430070; 5. 湖北大学食品安全研究院, 武汉 430062]

摘要: **目的** 研制禾谷镰孢菌的特异性抗体, 开发小麦禾谷镰孢菌污染情况的双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)。**方法** 采用物理研磨法制备禾谷镰孢菌真菌裂解液抗原, 通过杂交瘤技术研制禾谷镰孢菌单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 对 mAb 的特异性、亲和力等抗体性能参数进行测定。采用棋盘法探究制备的 mAb 与多克隆抗体(polyclonal antibody, pAb)最佳组合条件, 进而建立 DAS-ELISA 方法。对方法的灵敏度、重复性进行评价, 并应用于自然发病小麦样品的检测。**结果** 成功制备了禾谷镰孢菌 mAb 1C4F3 和 pAb FG2801。mAb 与其他真菌无交叉反应, 特异性强。亲和力常数为 1.26×10^7 L/mol, 具有较高的亲和力。建立了禾谷镰孢菌 DAS-ELISA 方法, 检出限达 1.223 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 标准曲线范围 1.56~100.00 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。通过对从中国主要小麦产区采集的 96 份自然发病样本进行检测, 验证了该方法的可靠性。发现样品中禾谷镰孢菌的含量与脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)的含量存在显著的正相关关系($r^2=0.8897$), 因此 DAS-ELISA 不仅可用于禾谷镰孢菌的快速检测, 还可评估样本中 DON 的污染情况。**结论** 本研究开发的 DAS-ELISA 能够对小麦中的禾谷镰孢菌进行快速定量测定, 同时可快速评估样本中 DON 的污染水平, 具有较高的准确性和可靠性, 在田间及收获后小麦作物禾谷镰孢菌污染监测方面具有良好的应用潜力。

关键词: 禾谷镰孢菌; 单克隆抗体; 免疫测定; 小麦; 霉菌毒素

收稿日期: 2025-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(32102089, 32422072, U22A20551)

#张浩然和程传民为共同第一作者

第一作者: 张浩然(1999—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为农产品真菌毒素检测与预警研究。E-mail: 1826236882@qq.com

程传民(1980—), 男, 高级畜牧师, 主要研究方向为畜产品及饲料质量与安全。E-mail: 1374485029@qq.com

*通信作者: 张奇(1975—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品真菌毒素检测与预警研究。E-mail: zhangqi01@caas.cn

唐晓倩(1984—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为粮油典型污染物免疫快检研究。E-mail: wtxqtutu@163.com

Detection of *Fusarium graminearum* in *Triticum aestivum* by double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay

ZHANG Hao-Ran^{1,2#}, CHENG Chuan-Min^{3#}, WANG Chen², LI Pei-Wu^{2,4,5},
ZHANG Qi^{1,2,4,5*}, TANG Xiao-Qian^{2,5*}

[1. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China; 2. Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Quality Inspection and Test Center for Oilseeds Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory of Risk Assessment for Oilseeds Products (Wuhan), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430062, China; 3. Sichuan Provincial Feed Industry Administration Station, Chengdu 610000, China; 4. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China; 5. Food Safety Research Institute, Hubei University, Wuhan 430062, China]

ABSTRACT: Objective To develop specific antibodies against *Fusarium graminearum* and establish a double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) for detecting the contamination of *Fusarium graminearum* in *Triticum aestivum*. **Methods** The fungal lysate antigen of *Fusarium graminearum* was prepared by physical grinding. Monoclonal antibody (mAb) against *Fusarium graminearum* were developed using hybridoma technology. The performance parameters of mAbs, such as specificity and affinity, were measured. The optimal combination conditions of the prepared mAbs and polyclonal antibody (pAb) were explored using the checkerboard method, and then the DAS-ELISA method was established. The sensitivity and repeatability of the method were evaluated, and the method was applied to the detection of naturally infected *Triticum aestivum* samples. **Results** The mAb 1C4F3 and pAb FG2801 against *Fusarium graminearum* were successfully prepared. The mAb showed no cross-reaction with other fungi, indicating strong specificity. The affinity constant was 1.26×10^7 L/mol, suggesting high affinity. A DAS-ELISA method for *Fusarium graminearum* was established, with a limit of detection of 1.223 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and a standard curve range of 1.56–100.00 $\mu\text{g}/\text{mg}$. The reliability of the method was verified by detecting 96 naturally infected samples collected from major *Triticum aestivum*-producing areas in China. A significant positive correlation was found between the content of *Fusarium graminearum* and the content of deoxynivalenol (DON) in the samples ($r^2=0.8897$). Therefore, the DAS-ELISA could not only be used for the rapid detection of *Fusarium graminearum* but also for evaluating the DON contamination in the samples. **Conclusion** The DAS-ELISA developed in this study enables rapid and quantitative determination of *Fusarium graminearum* in *Triticum aestivum*. Simultaneously, it allows for a swift assessment of the DON contamination level in samples. Characterized by high accuracy and reliability, this method holds considerable application potential in monitoring *Fusarium graminearum* contamination in *Triticum aestivum* crops both in the field and post-harvest.

KEY WORDS: *Fusarium graminearum*; monoclonal antibody; immunoassay; *Triticum aestivum*; mycotoxin

0 引言

禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)是一种在农业领域具有重大危害的病原菌, 它可侵染多种重要的谷类作物, 如小麦、玉米等, 引发诸如小麦赤霉病、玉米穗腐病等严重病害^[1]。有报道指出, 由禾谷镰孢菌引起的小麦赤霉病在流行期间会导致 10%~70%的产量损失, 对全球小麦生产构成重大威胁^[2]。禾谷镰孢菌不仅导致农作物产量大幅降低, 其产生的次级代谢产物如玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)等真菌

毒素还会污染粮食, 对食品安全构成严重威胁, 危害人类和牲畜的健康^[3]。ZEN 作为一种雌激素物质, 会与雌激素受体结合, 提高体内雌激素水平, 导致内分泌紊乱, 进而影响生殖系统^[4]。此外, ZEN 还具有免疫毒性^[5]、细胞毒性^[6]、基因毒性^[7]和肝毒性^[8]。DON 会改变肠道菌群结构, 破坏肠道屏障功能, 引起胃肠道黏膜出现充血、水肿等病理变化^[9]。此外, DON 还会损伤免疫系统, 诱发内分泌系统和神经系统的病变^[10]。另外, DON 及其衍生物还可以和 ZEN 产生协同效应, 加剧动物肝、肾细胞损伤和氧化损伤^[11]。因此, 快速、准确地检测禾谷镰孢菌对于及时防控病害、减少毒

素产生、保障粮食安全起到至关重要的作用。

传统的针对禾谷镰孢菌的检测方法存在一定局限性, 例如, 基于形态学的检测往往需要专业的人员且耗时较长, 而且形态学特征可能会受到培养条件等因素的影响, 导致检测结果不准确^[12]。为了提高检测结果的准确性, 分子生物学方法也被广泛应用。例如, ATOUI 等^[13]基于靶向参与 ZEN 生物合成的 *PKS13* 基因的引物, 成功开发了一种实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测方法, 用于禾谷镰孢菌 DNA 的检测及定量分析, 方法的检出限为 0.005 pg DNA。NIESSEN 等^[14]基于禾谷镰孢菌半乳糖氧化酶基因建立的环介导等温扩增技术能够在 30 min 内检测到少于 2 pg 的纯化靶标 DNA。HOREVAJ 等^[15]将真菌基因组 DNA 的量化与生物量联系起来, 以 Tri6_10F/Tri6_4R 引物对建立的 qPCR 方法, 可从磨碎的小麦籽粒中检测出禾谷镰孢菌菌丝体。相较于传统的形态学检测方法, 分子生物学方法准确性得到了很大的提高, 但操作复杂, 对样本质量和设备要求较高。免疫学检测方法以其特异性强、灵敏度高、操作相对简便等优点, 在病原菌检测领域中展现出巨大潜力。在免疫学检测技术中, 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 是一种经典且广泛应用的方法, 能够实现对大分子物质的特异性高效定量检测^[16]。

目前, 采用 ELISA 法检测禾谷镰孢菌生物量的相关研究较少。本研究旨在研制禾谷镰孢菌抗体, 采用单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 和多克隆抗体 (polyclonal antibody, pAb) 相结合, 建立双抗体夹心酶联免疫吸附测定 (double-antibody sandwich-enzyme inked immunosorbent assay, DAS-ELISA) 方法, 用于小麦中禾谷镰孢菌生物量的定性和定量分析。为小麦中禾谷镰孢菌的快速检测和田间病害的早期防控提供技术支持, 从而有效减少禾谷镰孢菌为农作物生产和粮食安全带来的负面影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

日本大耳兔、健康雌性的 6~8 周左右的 BALB/c 小鼠 [免疫动物购自武汉生物制品研究有限责任公司, 动物生产许可证号: SCXK(鄂)2021-0026]; 健康的小麦籽粒 (山东丰之坊农业科技有限公司)。

禾谷镰孢菌、亚洲镰孢菌 (*Fusarium asiaticum*)、拟轮枝镰孢菌 (*Fusarium verticillioides*) 由江苏省农业科学院徐剑宏研究员团队馈赠; 实验中所用的塔宾曲霉 (*Aspergillus tubingensis*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*)、桔

青霉 (*Penicillium citrinum*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*) 均来源于本实验室菌株保藏库; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar medium, PDA)、马铃薯葡萄糖水培养基 (potato dextrose water medium, PDW) (青岛海博生物技术有限公司); ZEN、DON 免疫亲和柱和 ZEN、DON 酶联免疫快速检测试剂盒 (青岛普瑞邦生物工程有限公司); Protein G 亲和层析柱 (金斯瑞生物科技股份有限公司); 正辛酸、硫酸铵 (纯度 $\geq 99.0\%$, 国药集团化学试剂有限公司); 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、聚乙二醇 (美国 Sigma 公司); 抗体亚型鉴定试剂盒 (美国 Thermo 公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗 (美国 Jackson ImmunoResearch 公司); 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

MAXQ4000 恒温摇床、SNL216V 冷冻干燥机 (美国 Therm Fisher Scientific 公司); Tissuelyser-48 全自动样品快速研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); Spectra Maxi3x 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); SX-500 全自动灭菌锅 (日本 Tomy 公司); ME204TE02 电子天平 (精度 0.0001 g, 瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 禾谷镰孢菌生长特性及产毒能力研究

制备抗体的第一步是为待检测的分析物设计合适的免疫抗原, 选择的抗原质量直接关系到能否成功得到需要的具有一定特异性和实用性的抗体^[17]。因此, 对拟作为抗原的禾谷镰孢菌的产毒能力及生长状态进行研究, 旨在测定禾谷镰孢菌菌株是否为产毒菌株, 并确定制备抗原的最佳生长时期。将禾谷镰孢菌菌丝接种到 PDA 培养基上, 28 °C 高湿阴暗条件下培养 5 d, 活化菌株^[18]。采用直径为 9 mm 的打孔器沿菌体边缘打取 1 块活化后的新嫩菌丝饼至 150 mL PDW 培养基中, 28 °C 190 r/min 恒温振荡培养 1~10 d。将培养物离心以分离培养液和菌丝体, 收集菌丝体置于真空冷冻干燥机中冻干, 称重。记录冻干菌体质量以测定菌体生长速率和生长状态。采用 ZEN 和 DON 免疫亲和柱富集和纯化培养液中的真菌毒素。利用真菌毒素酶联免疫快速检测试剂盒对禾谷镰孢菌的产毒量及产毒速率进行测定。

1.3.2 抗原制备及鉴定

参考黄曲霉裂解液抗原制备方法^[19], 将活化的禾谷镰孢菌新嫩菌丝接种至 PDW 培养基中 28 °C 190 r/min 振荡培养 2 d, 离心分离培养液和菌丝体, 将菌丝体重悬于 10% 福尔马林-磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中, 4 °C 放置 24 h 将其灭活, 以减少免疫过程中对免

疫动物的毒害^[20]。用生理盐水洗涤多次以去除福尔马林,收集菌丝体。将灭活后的菌丝体置于真空冷冻干燥机中冻干。称取适量冻干菌丝,加入 PBS,用全自动样品快速研磨仪充分研磨,释放菌体蛋白,制备禾谷镰孢菌真菌裂解液抗原。抗原浓度以菌丝量浓度计。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)对所制备的抗原进行鉴定。

1.3.3 抗体制备及纯化

将禾谷镰孢菌抗原稀释到合适浓度,采用背部皮下多点注射方式分别免疫 2 只健康雌性日本大耳兔和 3 只健康雌性的 6~8 周左右的 BALB/c 小鼠。每只日本大耳兔免疫剂量为 1 mg/次,每只 BALB/c 小鼠免疫剂量为 0.7 mg/次(免疫剂量均以菌丝量浓度计)。免疫前取血作为阴性血清对照。首次免疫采用等体积弗氏完全佐剂与抗原混合乳化,此后每隔两周以相同剂量抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合乳化后免疫^[21]。自第三次免疫起,每次免疫后第 7 d 分别从小鼠耳缘静脉采血和小鼠尾部静脉取血,离心后收集血清,采用间接酶联免疫吸附测定(indirect enzyme linked immunosorbent assay, iELISA)方法检测大耳兔和小鼠的血清滴度^[22]。直至多次免疫后,血清滴度不再提高,将分离出的兔血清经 Protein G 亲和层析柱纯化^[23],制备禾谷镰孢菌 pAb。选取血清滴度最高的小鼠进行细胞融合,在细胞融合的前 3 d 对小鼠进行冲击免疫,即用含吐温-20 的 PBS 稀释的抗原对小鼠进行腹腔注射,剂量为 0.3 mg。

参考已报道的方案进行细胞融合^[24]。无菌条件下摘取血清滴度最高的小鼠的脾脏,将骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞按照 1:5~1:10 的数量比进行混合,在聚乙二醇的作用下诱导细胞融合。利用拟轮枝镰孢菌、黄曲霉、赭曲霉真菌裂解液作为反筛抗原,在包被浓度相同的情况下,筛选出目标抗原 OD₄₅₀ 值较大且目标抗原与反筛抗原 OD₄₅₀ 值的差值最大的融合细胞孔位做亚克隆。经多次亚克隆后,将能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株注入 BALB/c 小鼠腹腔中,10 d 后收集腹水,再用辛酸-硫酸铵法纯化^[25],获得纯化后的 mAb 用于后续研究。

1.3.4 抗体鉴定

采用 SDS-PAGE 对所制备的 mAb 和 pAb 的纯度进行测定^[26]。利用 iELISA 测定所制备抗体的滴度。使用抗体分型试剂盒对所制备的 mAb 的亚型进行测定。采用 iELISA 测定 mAb 的亲合力常数(affinity constant, Kaff)^[27],使用 4 种不同质量浓度的抗原(4.0、2.0、1.0、0.5 μg/mL)作为包被抗原,不同稀释度的抗体作为检测试剂。以抗体浓度的对数值为横坐标,OD₄₅₀ 值为纵坐标,绘制 4 条不同浓度的 S 型曲线。曲线上部趋于平坦段的值为最大值 OD_{max},找出曲线中 50% OD_{max} 对应的抗体浓度。将 4 个浓度任意两两

组合,根据以下公式(1)计算抗体的 Kaff 值:

$$Kaff = \frac{n-1}{2[n(Ab')t - (Ab)t]} \quad (1)$$

式中: n 为每个组合中两个包被浓度的倍数, $(Ab')t$ 和 $(Ab)t$ 分别为每个组合中两个 50% OD_{max} 对应的抗体浓度, mol/L。共得到 6 个 Kaff 值,将 6 个 Kaff 值取平均值,即为 mAb 的 Kaff 值。采用蛋白免疫印记法分析 mAb 特异性识别禾谷镰孢菌真菌裂解液抗原中特定蛋白的能力^[28]。按照 1.3.2 中所述的禾谷镰孢菌抗原制备方法,制备相同菌丝量浓度的塔宾曲霉、绿色木霉、土曲霉、寄生曲霉、桔青霉、亚洲镰孢菌、拟轮枝镰孢菌、黄曲霉、赭曲霉等 9 种真菌裂解液抗原,利用 iELISA 检测禾谷镰孢菌 mAb 的特异性。

1.3.5 DAS-ELISA 方法建立

DAS-ELISA 的原理图如图 1 所示,在 96 孔酶标板上包被针对禾谷镰孢菌的捕获抗体,加入样本后,禾谷镰孢菌与捕获抗体结合,然后加入检测抗体和酶标二抗,最后加入底物,此时,酶催化底物产生与分析物浓度成比例的颜色变化,加入终止液后置于酶标仪下读取吸光度值,最终实现禾谷镰孢菌的定量检测。为比较 mAb 和 pAb 分别作为捕获抗体或检测抗体时检测禾谷镰孢菌的能力,采用棋盘法对捕获抗体及检测抗体的选择及浓度进行优化。具体步骤如下:分别将 mAb 和 pAb 作为捕获抗体,以不同质量浓度(50.000、25.000、12.500、6.250、3.125、1.563、0.781、0.391、0.195 μg/mL)包被在 96 孔酶标板上,空白孔加 0.01 mol/L PBS 记为 BL₁,在 4 °C 下孵育过夜;采用 4% (m/V)脱脂牛奶在 37 °C 孵育 1 h,以封闭非特异性结合位点;在孔中加入相同浓度抗原,37 °C 孵育 45 min;然后分别加入不同质量浓度(25.000、12.500、6.250、3.125、1.563、0.781、0.391 μg/mL)的 pAb 和 mAb 作为检测抗体,空白孔加 0.01 mol/L PBS 记为 BL₂,37 °C 孵育 45 min;随后,加入 1:5000 稀释的酶标二抗,37 °C 孵育 45 min;孵育结束后将酶标板用含吐温-20 的 PBS 彻底洗净,加入底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色,37 °C 孵育 10 min;加入 2 mol/L 硫酸终止反应;然后立即用酶标仪读取波长在 450 nm 处的吸光度值。值得注意的是,在涉及使用酶标二抗的步骤中,根据检测抗体的类型选择适当的酶标二抗。当捕获抗体为 mAb,检测抗体为 pAb 时,采用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔作为二抗。当捕获抗体为 pAb,检测抗体为 mAb 时,使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠作为二抗。为排除 mAb 或 pAb 作为捕获抗体或检测抗体时对检测结果的干扰,依据空白值 BL₁、BL₂ 均在 1.0 以下且 OD 值-BL₁、OD 值-BL₂ 均大于 0.7 作为初筛依据,筛选出几组抗体组合建立 DAS-ELISA 标准曲线。以标准曲线的检出限及检测范围作为评判依据,确定最终的捕获抗体及检测抗体的选择及浓度。

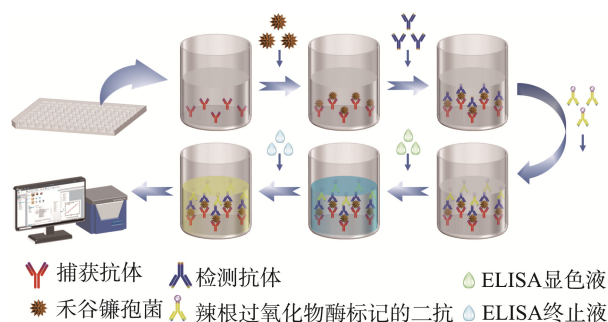


图 1 基于 DAS-ELISA 检测禾谷镰孢菌的原理图

Fig.1 Schematic illustration of detecting *Fusarium graminearum* based on DAS-ELISA

1.3.6 DAS-ELISA 方法的评价与应用

将健康的小麦籽粒粉碎, 准确称取 80.0 mg 小麦粉和 20.0 mg 禾谷镰孢菌冻干菌丝, 将二者混合均匀, 制成 100.0 mg 人工污染的小麦样品。加入 10 mL PBS 涡旋混匀, 置于全自动样品研磨仪中充分研磨, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤, 得到人工污染的小麦粉样品的提取液, 将提取液稀释 10 倍, 然后 2 倍梯度稀释, 按照 1.3.5 中确定的捕获抗体及检测抗体的选择及浓度建立小麦基质中 DAS-ELISA 标准曲线, 以评价样品基质对检测方法灵敏度的影响。

在健康的小麦样品中加入不同质量的禾谷镰孢菌冻干菌丝, 按照相同的前处理方法, 得到 3 组浓度分别 10、50 和 100 μg/mg 的提取液, 采用 DAS-ELISA 法测定 3 组提取液的吸光度值, 计算该方法的回收率和变异系数, 以评价该方法在实际样品检测中的准确性和重复性。

为进一步评价所建立的 DAS-ELISA 方法的可行性, 在中国的河南、江苏、湖北 3 省的不同小麦生产区收集了 96 份自然发病的小麦籽粒样品, 同时, 用人工接种禾谷镰孢菌孢子液的培养 10 d 的小麦籽粒作为阳性对照, 按照相同的前处理方法处理受污染样品, 采用 DAS-ELISA 方法对禾谷镰孢菌的污染水平进行测定。另外, 称取适量受污染样品, 用 70% 甲醇-PBS 溶液提取真菌毒素^[29], 将其稀释

后, 采用 ZEN 和 DON 酶联免疫快速检测试剂盒对样品中禾谷镰孢菌产生的主要真菌毒素的含量进行测定。

1.4 数据处理

所有检测实验都进行了 3 次生物学重复。所有数据均以平均值±标准偏差的形式表示。图表使用 GraphPad Prism 9.5.1 绘制。统计分析借助 SPSS 23.0 软件进行。组间比较采用 Fisher 精确检验。P<0.05 视为具有统计学意义。

2 结果与分析

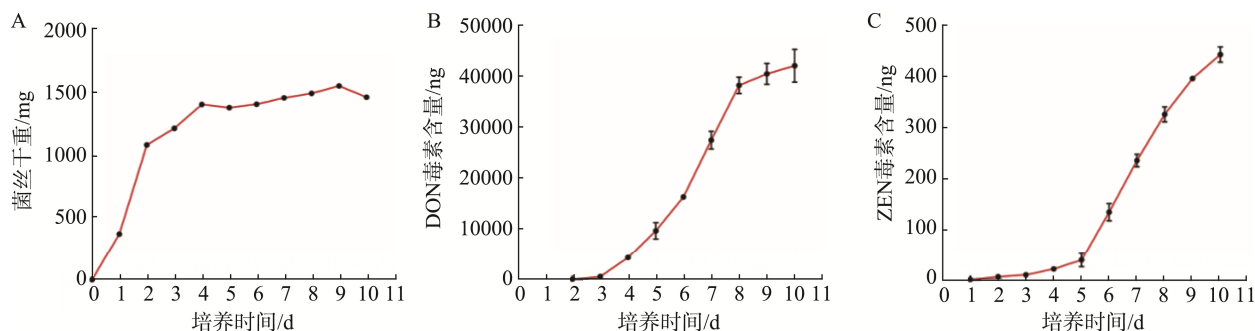
2.1 禾谷镰孢菌的生长特性及产毒能力分析

禾谷镰孢菌培养过程中菌丝干重变化情况如图 2A 所示。其中禾谷镰孢菌在 1~2 d 内生长迅速, 生长速率最大。培养 2 d 时菌丝体干重即达到 1078.9 mg。在培养第 9 d 时达到干重最大值为 1548.8 mg。后逐渐萎缩凋零, 菌丝体干重下降。

本研究主要对禾谷镰孢菌产生的 DON 和 ZEN 两种真菌毒素的含量进行测定。禾谷镰孢菌产 DON 含量的变化趋势如图 2B 所示, 其中禾谷镰孢菌在培养第 2~3 d 时产生 DON 毒素, 产毒速率逐渐增加, 直至培养至第 8 d 后产毒速率减缓, 培养第 10 d 时产毒量达到 42067 ng。禾谷镰孢菌产 ZEN 含量的变化趋势如图 2C 所示, 其中禾谷镰孢菌在培养第 1~2 d 时即可产生 ZEN 毒素, 但培养 2 d 时产毒量仅为 5.6 ng。产毒速率逐渐增加直至培养至第 9 d 后产毒速率减缓。培养第 10 d 时产毒量达到 443.165 ng。综合禾谷镰孢菌的生长速率、菌丝干重以及产毒能力等因素, 选择培养 2 d 的禾谷镰孢菌菌丝体制备真菌裂解液抗原。

2.2 SDS-PAGE 鉴定禾谷镰孢菌真菌裂解液抗原

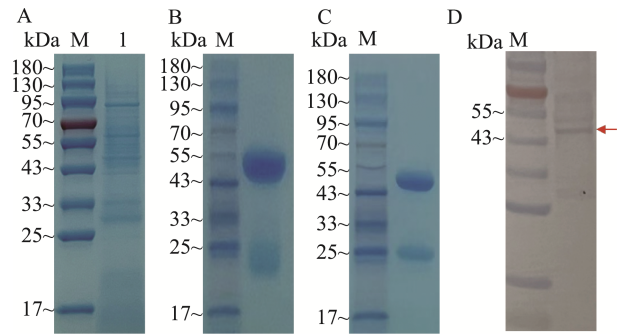
采用 SDS-PAGE 鉴定禾谷镰孢菌真菌裂解液抗原。结果如图 3A 所示, 禾谷镰孢菌真菌裂解液抗原[3A-1]在蛋白 Marker [3A-M]条带范围内有多个明显条带, 证明采用物理研磨的方法可以使禾谷镰孢菌内的蛋白释放。抗原可用于后续动物免疫试验。



注: A. 禾谷镰孢菌菌丝体干重变化趋势图; B. 禾谷镰孢菌产 DON 毒素趋势图; C. 禾谷镰孢菌产 ZEN 毒素趋势图。

图 2 禾谷镰孢菌生长特性及产毒能力

Fig.2 Growth characteristics and toxin-producing ability of *Fusarium graminearum*



注: A. 禾谷镰孢菌抗原 SDS-PAGE 鉴定图; B. 多克隆抗体 SDS-PAGE 鉴定图; C. 单克隆抗体 SDS-PAGE 鉴定图; D. 单克隆抗体蛋白免疫印记鉴定图。

图 3 抗原、抗体纯度验证及单克隆抗体蛋白免疫印记鉴定图
Fig.3 Antigen and antibody purity validation and western blot identification of monoclonal antibodies

2.3 抗体制备及纯化分析

采用 iELISA 测定免疫的日本大耳兔和 BALB/c 小鼠血清滴度, 其中日本大耳兔在第 6 次免疫后血清滴度在 1:32000 以上, BALB/c 小鼠在第 5 次免疫后血清滴度为 116000 以上。说明采用物理研磨方法制备的抗原可诱导免

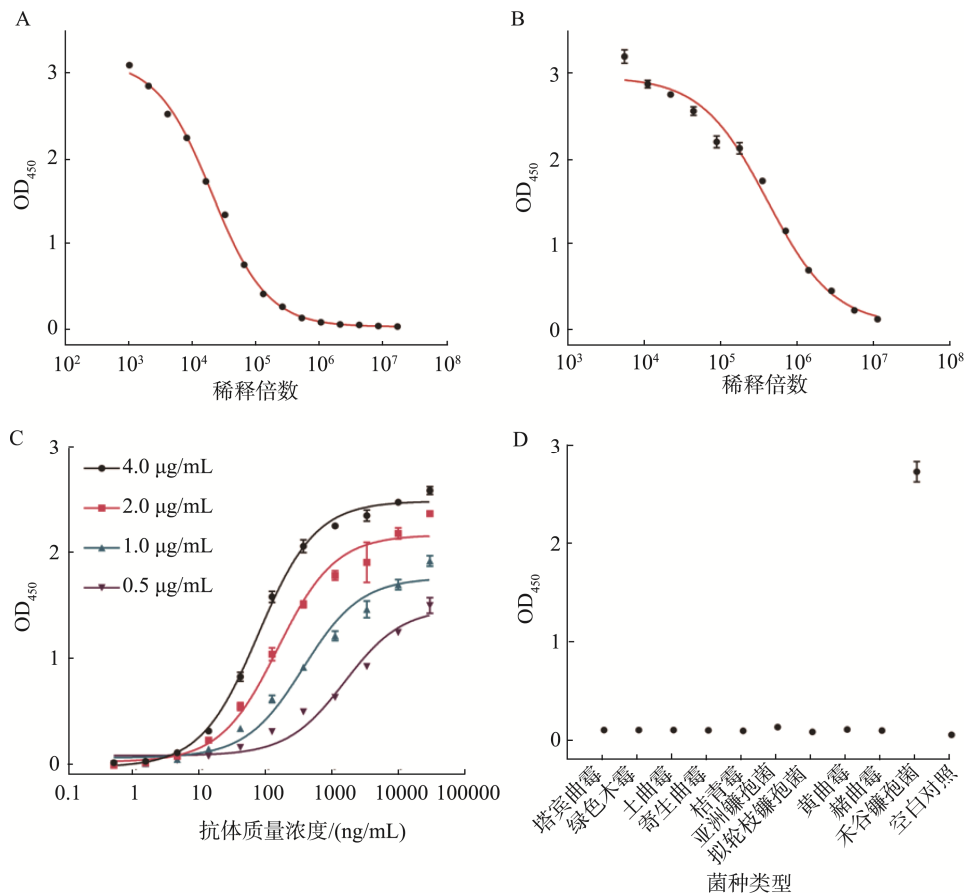
疫动物产生较高的免疫应答反应。兔血清经 Protein G 亲和层析柱纯化, 制备禾谷镰孢菌 pAb, 命名 FG2801。将小鼠进行冲击免疫, 然后采用聚乙二醇诱导细胞融合, 最终得到禾谷镰孢菌 mAb, 命名 1C4F3。

2.4 抗体纯度及 Western Blotting 鉴定分析

采用 SDS-PAGE 验证纯化后的 pAb 和 mAb, 如图 3B 和 3C 所示, 其中图 3B 为 pAb 蛋白条带, 图 3C 为 mAb 蛋白条带。纯化后的两种抗体均有重链轻链两条清晰明显条带, 表明抗体纯化成功。蛋白免疫印记法鉴定结果如图 3D 所示, 所制备的 mAb 主要识别禾谷镰孢菌真菌裂解液抗原中分子量在 48 kDa 左右的蛋白。

2.5 抗体滴度、亚型、亲和力及特异性测定

采用 iELISA 测定两种抗体的滴度, 将 OD₄₅₀ 值在 1.0 左右的抗体稀释倍数作为抗体滴度, pAb 滴度达 1:43000(图 4A)。mAb 滴度达 1:940000(图 4B)。采用抗体分型试剂盒对所制备 mAb 的亚型进行测定, 经检测, mAb 亚型为 IgG1。K_{aff} 被视为衡量抗体性能的一个关键指标, 它是指抗体与抗原相互作用的强度和结合的稳定程度^[30]。K_{aff} 在 1×10⁷~1×10¹² L/mol 范围内的抗体被认为具有高亲



注: A. 多克隆抗体滴度图; B. 单克隆抗体滴度图; C. 单克隆抗体亲和力鉴定图; D. 单克隆抗体特异性鉴定图。

图 4 抗体性能鉴定图

Fig.4 Identification diagram of antibody performance

和力^[31]。按照 1.3.4 中所述的方法绘制如图 4C 所示的 S 型曲线, 经计算, mAb 的亲力和常数为 1.26×10^7 L/mol, 属于高亲和力抗体。mAb 特异性鉴定结果如图 4D 所示, mAb 与塔宾曲霉、绿色木霉、土曲霉、寄生曲霉、桔青霉、亚洲镰孢菌、拟轮枝镰孢菌、黄曲霉、赭曲霉等 9 种真菌均无交叉反应, 特异性良好。

2.6 禾谷镰孢菌 DAS-ELISA 标准曲线建立

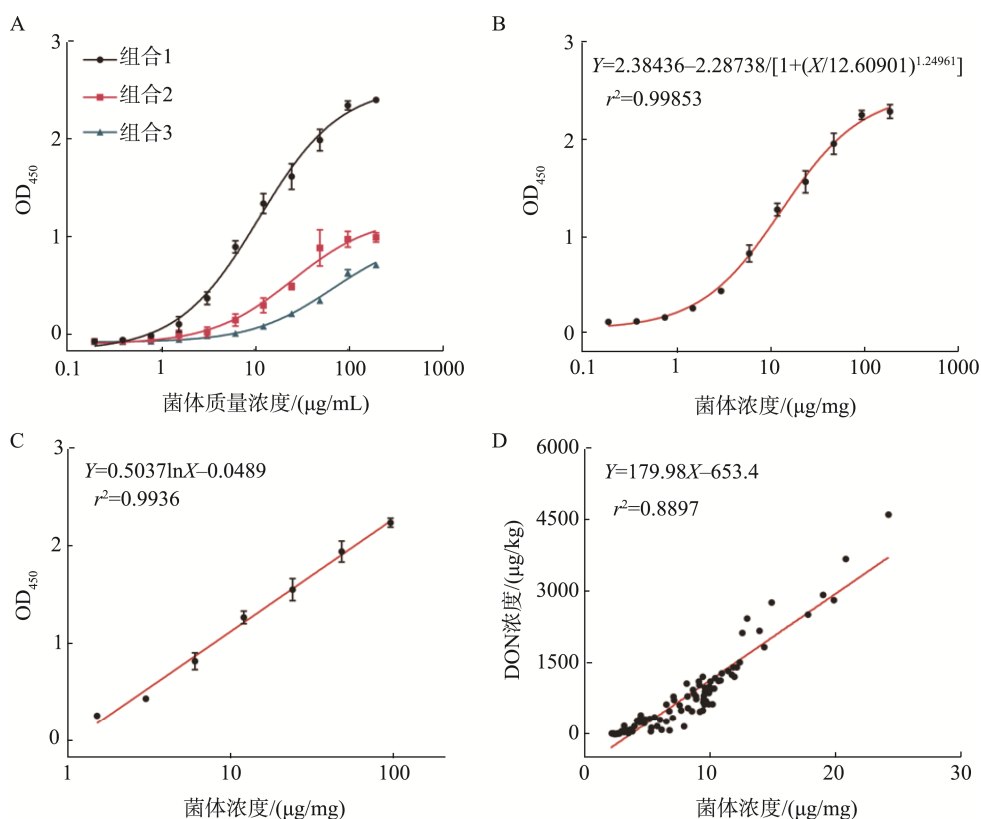
采用 1.3.5 中所描述的方法筛选了 3 组捕获抗体与检测抗体的组合, 分别是组合 1: 捕获抗体为 mAb, 质量浓度为 0.391 $\mu\text{g/mL}$, 检测抗体为 pAb, 质量浓度为 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 。组合 2 和组合 3: 捕获抗体为 pAb, 质量浓度为 1.563 $\mu\text{g/mL}$, 检测抗体为 mAb, 质量浓度分别为 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.563 $\mu\text{g/mL}$ 。准确称取 20.0 mg 禾谷镰孢菌冻干菌丝, 加入 1 mL PBS 置于全自动研磨仪中充分研磨, 制备已知质量的禾谷镰孢菌抗原。将所制备抗原梯度稀释, 采用上述筛选组合分别建立禾谷镰孢菌 DAS-ELISA 标准曲线。如图 5A 所示, 以 pAb 作为捕获抗体的检出限分别为 3.61 $\mu\text{g/mL}$ 和 6.56 $\mu\text{g/mL}$, 且随着菌体浓度的增加, 检测信号值变化较小, 而以 mAb 作为捕获抗体, pAb 作为检测抗体时, 检测方法的检出限为 1.04 $\mu\text{g/mL}$, 检测信号值随着菌体浓度的增加变化明显。故选择 0.391 $\mu\text{g/mL}$ mAb 作为捕获抗体,

3.125 $\mu\text{g/mL}$ pAb 作为检测抗体建立 DAS-ELISA 标准曲线。

2.7 DAS-ELISA 实际应用效果分析

在实际样品检测过程中, 基质效应是影响实验准确性的重要因素。待检生物样本中除了目标抗原外, 还含有各种蛋白质、脂质、盐类等成分, 他们可能与抗体或抗原发生非特异性结合, 从而影响抗体对抗原的特异性识别, 进而干扰检测结果^[32]。为了评价样品基质对检测方法灵敏度的影响, 以禾谷镰孢菌的主要侵染对象小麦为基质, 按照 1.3.6 中所描述的前处理方法, 建立基质中 DAS-ELISA 标准曲线。如图 5B 所示, DAS-ELISA 对小麦基质中的禾谷镰孢菌的检出限为 1.223 $\mu\text{g/mg}$, 在 1.56~100.00 $\mu\text{g/mg}$ 的浓度范围内, 检测信号与菌体浓度的对数之间呈现良好的线性关系($r^2=0.9936$)[图 5C]。这个结果与 2.6 中所建立的以 PBS 为基质的标准曲线的检测限基本相近, 因此, 证明小麦样品对所建立的 DAS-ELISA 法的影响较小。

加标回收率和变异系数是衡量检测方法准确性和重复性的关键指标, 按照 1.3.6 中操作步骤计算 DAS-ELISA 方法的加标回收率和变异系数如表 1 所示, 日内实验的加标回收率在 107.52%~116.50%, 日间实验的加标回收率在 106.74%~113.20%, 变异系数均小于 10%。由此证明, 所建立的 DAS-ELISA 法准确性高, 具有良好的重复性。



注: A. 不同抗体组合的 DAS-ELISA 标准曲线图; B. 小麦基质中 DAS-ELISA 标准曲线图; C. 小麦基质中 DAS-ELISA 的线性检测范围; D. 禾谷镰孢菌生物量与 DON 含量的关系图。

图 5 DAS-ELISA 方法建立及实际应用效果图

Fig.5 Establishment of DAS-ELISA method and effect diagram of its practical application

表 1 小麦样品中 DAS-ELISA 的准确性与重复性测试
Table 1 Accuracy and repeatability tests of DAS-ELISA in *Triticum aestivum* samples

加标量/($\mu\text{g}/\text{mg}$)	日内($n=6$)			日间($n=6$)		
	测定值/($\mu\text{g}/\text{mg}$)	回收率/%	变异系数/%	测定值/($\mu\text{g}/\text{mg}$)	回收率/%	变异系数/%
10	11.65	116.50	5.63	11.32	113.20	6.25
50	53.76	107.52	4.76	53.37	106.74	4.92
100	109.23	109.23	4.84	108.54	108.54	5.13

为进一步评价所建立的 DAS-ELISA 方法在实际样品检测中的可行性,从中国小麦主产区(河南、江苏、湖北)选取了 3200 份样品,剔除健康小麦样品后,最终选取了 96 份患病小麦样品作为验证样品。同时采用真菌毒素酶联免疫快速检测试剂盒对样品中禾谷镰孢菌产生的主要真菌毒素 DON 和 ZEN 的含量进行测定。具体测定数据见补充材料。DAS-ELISA 结果显示,所有自然发病样品的检测结果均呈阳性,因此,证明所建立的 DAS-ELISA 方法具有良好的可行性,可从自然的小麦样品中检测到微量的禾谷镰孢菌。结合真菌毒素的检测数据发现,自然发病的小麦样品中 DON 含量与利用 DAS-ELISA 方法所检测的禾谷镰孢菌的生物量之间呈正相关关系($r^2=0.8897$)[图 5D]。这表明 DAS-ELISA 方法不仅可用于禾谷镰孢菌的快速检测,还可用于评估样本中 DON 的污染状况。

3 结论

本研究成功制备了原创的禾谷镰孢菌 mAb 1C4F3 和 pAb FG2801,抗体特异性强,与其他真菌无交叉反应。所制备抗体具有较高的亲和力,能够准确识别禾谷镰孢菌。以两种抗体为免疫核心试剂建立了针对禾谷镰孢菌的 DAS-ELISA 方法,所建立的方法具有较高的灵敏度和准确性,对小麦样品中禾谷镰孢菌的检出限达 $1.223 \mu\text{g}/\text{mg}$,在 $1.56\sim 100.00 \mu\text{g}/\text{mg}$ 的浓度范围内,检测信号值与菌体浓度的对数之间呈现良好的线性关系($r^2=0.9936$)。利用 DAS-ELISA 对 96 份自然发病样品进行检测,结果显示,所有自然发病样品均呈阳性。结合自然发病样品中真菌毒素的污染水平,发现样品中 DON 毒素的含量和利用 DAS-ELISA 方法检测到的禾谷镰孢菌的生物量之间呈正相关($r^2=0.8897$)。综上所述,DAS-ELISA 方法在禾谷镰孢菌的快速检测和定量分析方面展现出良好的应用潜力,可为田间小麦及仓储小麦中禾谷镰孢菌的监测、防控的相关研究提供有力的技术支撑。

参考文献

- [1] HAN SL, WANG MM, MA ZY, *et al.* Fusarium diversity associated with diseased cereals in China, with an updated phylogenomic assessment of the genus [J]. *Studies In Mycology*, 2023, 104(1): 87–148.
- [2] KHAN MK, PANDEY A, ATHAR T, *et al.* Fusarium head blight in wheat: Contemporary status and molecular approaches [J]. *3 Biotech*, 2020, 10:

1–17.

- [3] 牛宏晓, 杨薇, 王兴毓. 禾谷镰刀菌对仓储小麦品质劣变影响的研究[J]. *中国粮油学报*, 2024, 39(10): 20–27.
NIU HX, YANG W, WANG XY. Effects of *Fusarium graminearum* on quality deterioration of stored wheat [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2024, 39(10): 20–27.
- [4] 李凯龙, 刘昆仑, 辛颖, 等. 玉米赤霉烯酮生物降解及其脱毒机制研究进展[J]. *食品科学*, 2025, 46(1): 246–254.
LI KL, LIU KL, XIN Y, *et al.* Research progress on zearalenone biodegradation and its detoxification mechanism [J]. *Food Science*, 2025, 46(1): 246–254.
- [5] BULGARU CV, MARIN DE, PISTOL GC, *et al.* Zearalenone and the immune response [J]. *Toxins*, 2021, 13(4): 248.
- [6] 荀以仁, 周兴华, 史建荣, 等. 玉米赤霉烯酮毒素生物降解酶研究进展[J]. *核农学报*, 2024, 38(6): 1137–1145.
XUN YR, ZHOU XH, SHI JR, *et al.* Research progress on the zearalenone-biodegrading enzymes [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2024, 38(6): 1137–1145.
- [7] 马梓峰, 李巧, 徐红梅, 等. 玉米赤霉烯酮对奶牛乳腺上皮细胞生长和乳脂合成相关基因表达的影响[J]. *华北农学报*, 2024, 39(1): 201–210.
MA ZF, LI Q, XU HM, *et al.* The effect of zearalenone on the growth of bovine mammary epithelial cells and the expression of genes related to milk fat synthesis [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2024, 39(1): 201–210.
- [8] 任亚林, 李耘, 吴静. AFB₁ 和 ZEN 对 HepG2 细胞体外联合毒性效应及机制研究[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(11): 160–167.
REN YL, LI Y, WU J. Combined hepatotoxicity assessment of mycotoxins AFB₁ and zearalenone on hepatocellular carcinoma cells HepG2 *in vitro* and its mechanisms [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(11): 160–167.
- [9] JIA BX, LIN HK, YU S, *et al.* Mycotoxin deoxynivalenol-induced intestinal flora disorders, dysfunction and organ damage in broilers and pigs [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 451: 131172.
- [10] ZHANG JJ, YOU L, WU WD, *et al.* The neurotoxicity of trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON): Current status and future perspectives [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 145: 111676.
- [11] DOMIJAN AM, HERCOG K, ŠTAMPAR M, *et al.* Impact of deoxynivalenol and zearalenone as single and combined treatment on DNA, cell cycle and cell proliferation in HepG2 cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4082.
- [12] CAMBAZA E, KOSEKI S, KAWAMURA S. *Fusarium graminearum* colors and deoxynivalenol synthesis at different water activity [J]. *Foods*, 2018, 8(1): 7.
- [13] ATOUI A, KHOURY AE, KALLASSY M, *et al.* Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize [J]. *International Journal of Food*

- Microbiology, 2012, 154(1-2): 59–65.
- [14] NIESSEN L, VOGEL RF. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 140(2-3): 183–191.
- [15] HOREVAJ P, MILUS EA, BLUHM BH. A real-time qPCR assay to quantify *Fusarium graminearum* biomass in wheat kernels [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(2): 396–406.
- [16] 张欣, 王福成, 韩先干, 等. 阪崎克罗诺杆菌双抗体夹心酶联免疫吸附检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2024, 56(4): 66–71.
ZHANG X, WANG FC, HAN XG, *et al.* Establishment of a double - antibody sangwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Cronobacter sakazakii* detection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56(4): 66–71.
- [17] YANG Y, CHEN YZ, XIA T. Optimizing antigen selection for the development of tuberculosis vaccines [J]. Cell Insight, 2024, 3(3): 100163.
- [18] 赵秀英, 黄晴雯, 曹浩杰, 等. 响应面法优化禾谷镰刀菌产脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的液体培养条件[J]. 中国农业科技导报, 2023, 25(7): 222–233.
ZHAO XY, HUANG QW, CAO HJ, *et al.* Optimization of liquid culture conditions for the production of deoxynivalenol and its derivatives by *Fusarium graminearum* using response surface methodology [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2023, 25(7): 222–233.
- [19] WANG T, LI PW, ZHANG Q, *et al.* Determination of *Aspergillus* pathogens in agricultural products by a specific nanobody-polyclonal antibody sandwich ELISA [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4348.
- [20] 吴登艳, 杜茂涛, 谭燃景. 幽门螺杆菌通过其优势蛋白组分活化肥大细胞的致病机制研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(9): 726–734, 739.
WU DY, DU MT, TAN RJ. Study on the pathological mechanism of *Helicobacter pylori* via its dominant protein components activating mast cells [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2020, 36(9): 726–734, 739.
- [21] 薛菲, 杨梓纯, 许炎辉, 等. 禽致病性大肠杆菌 cOmpT 单克隆抗体的研制及其识别抗原表位的鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(12): 3122–3132.
XUE F, YANG ZC, XU YH, *et al.* Development of monoclonal antibodies against the cOmpT protein of avian pathogenic *Escherichia coli* and identification of epitopes recognized by monoclonal antibodies [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2020, 51(12): 3122–3132.
- [22] 洪凌云, 吴峰, 毛茅, 等. 抗 NTX 多克隆抗体制备及快速检测方法建立[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2020, 42(S2): 97–100.
HONG LY, WU F, MAO M, *et al.* Preparation of anti-NTX polyclonal antibody and establishment of a rapid detection method [J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2020, 42(S2): 97–100.
- [23] 张颖, 王化磊, 曹增国, 等. 埃博拉病毒病抗原反间间接血凝检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(7): 1310–1314.
ZHANG Y, WANG HL, CAO ZG, *et al.* Development of a method for reverse indirect hemagglutination detection of Ebola virus disease antigen [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2019, 39(7): 1310–1314.
- [24] FU JY, GU M, TANG XQ, *et al.* Early evaluation of aflatoxin occurrence risk using an ultra-sensitive immunoassay for pre-aflatoxin protein biomarker detection [J]. Food Control, 2024, 160: 110317.
- [25] 夏诗琪, 徐超莲, 刘道峰, 等. 胶体金免疫层析法联检食品中 5 种典型沙门氏菌模型的建立和优化[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 154–158.
XIA SQ, XU CL, LIU DF, *et al.* Preparation and optimization of colloidal gold strip for simultaneously detecting five typical *Salmonella* in foods [J]. Food Science, 2014, 35(22): 154–158.
- [26] 李旭, 魏德强. 以烟草花叶病毒为载体的 μ E3 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(20): 2509–2512.
LI X, WEI DQ. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against μ E3 using TMV as a carrier [J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(20): 2509–2512.
- [27] 左家思. 黄曲霉毒素多功能荧光纳米抗体构建及免疫检测技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2023.
ZUO JS. Research on aflatoxin multifunctional fluorescent nanobody construction and immunoassay technology [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023.
- [28] 张婵, 张瑞凯, 刘雁霞, 等. 小 G 蛋白 ARL3 多克隆抗体制备及其突变体鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(9): 65–71.
ZHANG C, ZHANG RK, LIU YX, *et al.* Preparation of polyclonal antibodies against the small G protein ARL3 and identification of its mutants [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(9): 65–71.
- [29] ZHANG J, GAO L, ZHOU B, *et al.* Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay [J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2011, 91(2): 193–197.
- [30] RANAWAKAGE DC, TAKADA T, KAMACHI Y. HiBiT-qIP, HiBiT-based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 6895.
- [31] ZHANG CX, ZHANG WQ, TANG XQ, *et al.* Change of amino acid residues in idiotypic nanobodies enhanced the sensitivity of competitive enzyme immunoassay for mycotoxin ochratoxin A in cereals [J]. Toxins, 2020, 12(4): 273.
- [32] 刘兆宏, 王晶, 孙瑞卿. 纳米材料结合快速滤过型净化法测定出口水果和蔬菜中 3 种农药残留[J]. 食品科技, 2024, 49(7): 322–329.
LIU ZH, WANG J, SUN RQ. Determination of three pesticide residues in exported fruits and vegetables using a combination of nanomaterials and rapid filtration purification method [J]. Food Science and Technology, 2024, 49(7): 322–329.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)