DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251028003
引用格式: 姬贺龙, 李凯航, 高琦, 等. 间接竞争酶联免疫吸附法快速测定黄曲霉毒素 B_1、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(7): 295–304.
JI HL, LI KH, GAO Q, *et al*. Rapid determination of aflatoxin B_1, T-2 toxin and zearalenone by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(7): 295–304. (in Chinese with English abstract).

间接竞争酶联免疫吸附法快速测定黄曲霉毒素 B_1、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮

姬贺龙[1#], 李凯航[2#], 高　琦[1], 岳振峰[3], 史西志[4], 罗　燕[5], SHEILA Okoth[6], 宋素泉[1*]

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京　210095; 2. 上海市动物疫病预防控制中心, 上海　201103; 3. 深圳职业技术大学食品药品学院, 深圳　518000; 4. 宁波大学海洋学院, 宁波　315000; 5. 深圳市农产品质量安全检验检测中心, 深圳　518000; 6. 内罗毕大学生物科学学院, 内罗毕　00100)

摘　要: 目的　建立间接竞争酶联免疫吸附测定(indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA)法快速检测农产品中常见且毒性较强的黄曲霉毒素 B_1 (aflatoxin B_1, AFB_1)、T-2 毒素和玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA)的方法。**方法**　本研究以高亲和力单克隆抗体为识别元件, 基于 ic-ELISA 原理, 系统优化了包被抗原类型与浓度、抗体稀释倍数、抗原稀释液组成及竞争孵育时间等关键参数。分别建立 AFB_1、T-2 毒素与 ZEA 的检测体系, 并通过加标回收实验验证方法学性能。**结果**　3 种毒素完全抗原偶联成功。单克隆抗体效价分别为 AFB_1: 2.56×10^4; T-2 毒素: 8.19×10^5; ZEA: 2.56×10^4, 且与其他真菌毒素无交叉反应。最优检测条件为: AFB_1[包被抗原 AFB_1-牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), 质量浓度 8 μg/mL, 一抗稀释 1:6400, 抗原稀释液为含 10%甲醇+0.010%吐温-20 的 0.010 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS), pH 9.0, 竞争孵育 45 min]、T-2 毒素(包被抗原 T-2-BSA, 质量浓度 8 μg/mL, 一抗稀释 1:25600, 抗原稀释液为含 10%甲醇+0.005 mol/L PBS, pH 7.4, 竞争孵育 30 min)、ZEA[包被抗原 ZEA-鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA), 质量浓度 0.50 μg/mL, 一抗稀释 1:1600, 抗原稀释液为含 10%甲醇+0.010 mol/L PBS, pH 6.0, 竞争孵育 60 min]。方法性能: AFB_1 检出限 0.0273 ng/mL, 线性范围 0.047~0.588 ng/mL, 加标回收率 104.0%~110.0%; T-2 毒素检出限 0.183 ng/mL, 线性范围 0.288~7.493 ng/mL, 加标回收率 107.3%~108.3%; ZEA 检出限 1.090 ng/mL, 线性范围 2.319~69.533 ng/mL, 加标回收率 97.9%~112.3%, 所有指标变异系数均小于 15%。**结论**　本研究建立的 ic-ELISA 方法灵敏度高、重复性好、特异性强, 可实现对谷物样品中 AFB_1、T-2 毒素和 ZEA 的快速筛查, 为农产品真菌毒素污染监测与风险评估提供技术支撑。

关键词: 黄曲霉毒素 B_1; T-2 毒素; 玉米赤霉烯酮; 间接竞争酶联免疫吸附法

收稿日期: 2025-10-28
基金项目: 江苏省科技计划“一带一路”创新合作项目(SBZ2024080008); 深圳市科技计划科技重大专项(KCXFZ20240903092405007); 宁波市科技计划国际科技合作项目(2024H003)

#姬贺龙和李凯航为共同第一作者

第一作者: 姬贺龙(1999—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为兽医公共卫生。E-mail: jihelong@stu.njau.edu.cn
李凯航(1977—), 男, 高级兽医师, 主要研究方向为预防兽医。E-mail: 691126830@qq.com
***通信作者:** 宋素泉(1977—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为动物源性食品安全。E-mail: suquan.song@njau.edu.cn

Rapid determination of aflatoxin B_1, T-2 toxin and zearalenone by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay

JI He-Long[1#], LI Kai-Hang[2#], GAO Qi[1], YUE Zhen-Feng[3], SHI Xi-Zhi[4], LUO Yan[5], SHEILA Okoth[6], SONG Su-Quan[1*]

(1. *College of Veterinary Medicine*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*; 2. *Shanghai Animal Disease Control Center*, *Shanghai* 201103, *China*; 3. *School of Food and Drug*, *Shenzhen Polytechnic University*, *Shenzhen* 518000, *China*; 4. *School of Marine Sciences*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315000, *China*; 5. *Shenzhen Inspection and Testing Center of Agricultural Product Quality and Safety*, *Shenzhen* 518000, *China*; 6. *School of Biological Sciences*, *University of Nairobi*, *Nairobi* 00100, *Kenya*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid detection of 3 kinds of common and highly toxic mycotoxins in agricultural products—aflatoxin B_1 (AFB_1), T-2 toxin and zearalenone (ZEA) by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA). **Methods** High-affinity monoclonal antibodies were used as recognition elements, based on the ic-ELISA principle, and key ic-ELISA parameters—including coating antigen type and concentration, antibody dilution ratio, antigen diluent composition and competition incubation time—were systematically optimized. Independent detection systems for AFB_1, T-2 toxin and ZEA were established and their performance was validated through spiked recovery experiments. **Results** The complete antigens for the 3 kinds of mycotoxins were successfully conjugated. The titers of the corresponding monoclonal antibodies were 2.56×10^4 for AFB_1, 8.19×10^5 for T-2 toxin and 2.56×10^4 for ZEA, with no cross-reactivity observed with other mycotoxins. The optimal detection conditions were as follows: For AFB_1—coating antigen AFB_1-bovine serum albumin (BSA) at 8 μg/mL, primary antibody dilution of 1:6400, antigen diluent comprising 0.010 mol/L phosphate-buffered saline (PBS) (pH 9.0) containing 10% methanol and 0.010% Tween-20 and a competition incubation time of 45 min; for T-2 toxin—coating antigen T-2-BSA at 8 μg/mL, primary antibody dilution of 1:25600, antigen diluent comprising 0.005 mol/L PBS (pH 7.4) containing 10% methanol and a competition incubation time of 30 min; for ZEA—coating antigen ZEA-ovalbumin (OVA) at 0.5 μg/mL, primary antibody dilution of 1:1600, antigen diluent comprising 0.010 mol/L PBS (pH 6.0) containing 10% methanol and a competition incubation time of 60 min. The method performance parameters were as follows: Limits of detection of 0.0273 ng/mL (AFB_1), 0.183 ng/mL (T-2 toxin) and 1.09 ng/mL (ZEA), with corresponding linear ranges of 0.047–0.588, 0.288–7.493 and 2.319–69.533 ng/mL. Spiked recoveries were 104.0%–110.0%, 107.3%–108.3% and 97.9%–112.3%, respectively and all coefficient of variations were below 15%. **Conclusion** The established ic-ELISA method demonstrates high sensitivity, good reproducibility and strong specificity, enabling the rapid screening of AFB_1, T-2 toxin and ZEA in grain samples. It provides reliable technical support for the monitoring and risk assessment of mycotoxin contamination in agricultural products.

KEY WORDS: aflatoxin B_1; T-2 toxin; zearalenone; indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay

0 引 言

黄曲霉毒素 B_1 (aflatoxin B_1, AFB_1)、T-2 毒素和玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA)是谷物中最为常见的真菌毒素, 分别具有强致癌性、神经毒性及生殖毒性, 严重威胁人类健康及畜牧业发展[1–2], 为世界卫生组织公认的I类致癌物, 其中 AFB_1 毒性最强, 除致癌、致畸、致突变作用外, 还具有肝脏毒性, 可引发肝细胞坏死与纤维化[3–6]。T-2 毒素是拟枝孢镰刀菌产生的倍半萜烯类毒素, 广泛污染玉米、小麦等粮油作物, 具有强神经毒性(如引起共济失调、神经细胞凋亡)和生殖毒性(如抑制精子发生、干扰胚胎发育)[7–10]。ZEA 由镰刀菌属真菌产生, 具有类雌激素活性, 可导致生殖发育障碍(如母猪外阴红肿、胎儿畸形), 同时兼具细胞毒性、免疫抑制及潜在致癌性[11–13]。

据联合国粮食及农业组织统计, 全球每年约25%的谷物受真菌毒素污染, 不仅造成巨大经济损失, 还通过食物链危害人畜健康[14–18]。因此, 做好对农产品的检测工作是至关重要的。目前针对真菌毒素的检测方法主要有高效液相色谱法、液相色谱-质谱法[19–21]等仪器分析法, 这些方法有较高的准确度和灵敏度, 但因仪器昂贵, 操作相对复杂,

样品前处理烦琐, 检测耗时等问题, 不适合大量样品筛查和现场快速检测[2,22–23]。基于抗原-抗体反应的免疫分析技术[如酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金免疫层析、免疫传感器]可弥补上述不足, 其中胶体金免疫层析适合现场定性筛查, 免疫传感器需特殊传感元件, 而 ELISA 因兼顾定量能力与操作简便性, 成为批量快速检测的优选技术[24–27]。相较于直接 ELISA(需标记一抗, 成本高)、夹心 ELISA(不适用于小分子毒素), 间接竞争 ELISA (indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA)通过抗原与抗体的竞争结合, 更适合 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 等小分子毒素检测, ic-ELISA 因其操作简便、成本低和适于批量样品分析, 被广泛应用于霉菌毒素的快速检测。然而, 已有 ic-ELISA 方法仍存在一些共性不足: (1)检测性能对包被抗原类型、抗体用量及反应体系条件高度敏感, 部分研究参数优化不充分, 导致方法重复性和稳定性受限; (2)复杂粮食基质中共提取物易对抗原-抗体结合产生干扰, 影响检测灵敏度。针对上述不足, 本研究拟通过系统的参数优化策略, 对包被抗原类型与浓度、一抗稀释倍数、抗原稀释液组成及竞争孵育时间等关键因素进行全面优化, 提高检测体系的稳定性和灵敏度; 同时, 结合不同霉菌毒素的分子结构特征, 差异化选择最优载体蛋白, 有效改善抗体识别效率。这是由于此类毒素分子量小(<1000 Da), 属于半抗原, 需与载体蛋白偶联形成完全抗原才能激发免疫反应, 因此完全抗原的合成质量及载体蛋白的性质直接决定了抗体的特异性与检测方法的灵敏度[25]。

鉴于此, 本研究以 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 为对象, 通过化学偶联制备完全抗原, 筛选特异性单克隆抗体, 系统优化 ic-ELISA 关键参数, 建立适用于实际样品的快速检测方法, 为谷物及饲料中真菌毒素防控提供技术支持[24]。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

玉米粉(市售)。

AFB_1 标准品(纯度≥99%)、鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)(纯度≥95%)(美国 Sigma-Aldrich 公司); T-2 毒素标准品(纯度≥99%)、ZEA 标准品(纯度≥99%)(以色列 Fermentek 公司); 分泌 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 单克隆抗体的杂交瘤细胞(本实验室自制); 羧甲基羟胺半盐酸盐(carboxymethoxylamine hemihydrochloride, CMO)、N,N'-羰基二咪唑(N,N'-carbonyldiimidazole, CDI)(纯度≥99%, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC] (纯度≥99%)、N-羟基硫代琥珀酰亚胺(N-hydroxysulfosuccinimide, NHS)(纯度≥99%)(上海源叶生物科技有限公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(纯度≥97%)、二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)(分析纯)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)(纯度≥99%)(北京索莱宝科技有限公司); 吡啶、苯(分析纯, 南京化学试剂股份有限公司); 甲醇、四氢呋喃(分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司); 乙酸乙酯(分析纯, 广东光华科技股份有限公司); 四氢呋喃(分析纯, 广东光华科技股份有限公司); 吐温-20(化学纯, 赛国生物科技有限公司); 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的亲和纯化山羊抗小鼠 IgG (H+L)二抗(稀释比例 1:5000, 美国 Jackson Immuno Research 公司)。

1.2　仪器与设备

ELX800 酶标仪(美国 Biotek 公司); NanoDrop 2000C 超微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司); TS-100C56 恒温摇床(上海天呈实验仪器制造有限公司); FA1004 电子天平(精度 0.1 mg, 上海精密科学仪器有限公司); MX-S 涡旋仪[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]; HGC-24A 氮吹仪(上海济成分析仪器有限公司); SZCL-2 磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司); DM0412S 离心机(美国 SCILOGEX 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　完全抗原的制备

(1) AFB_1 完全抗原的制备

参照文献[28–29]的方法并稍作改进。利用 CMO 将 AFB_1 转化为肟化物(AFB_1O), 再通过 EDC/NHS 活化法将 AFB_1O 与 BSA 偶联。反应产物经 PBS 透析后, 制得完全抗原(AFB_1-BSA), –20 ℃保存备用。AFB_1-OVA 用同样方法制备。

(2) T-2 毒素完全抗原的制备

T-2 毒素完全抗原的制备参照文献[30]的方法, 采用 CDI 法制备。将 T-2 毒素与 CDI 活化后, 逐滴加入 BSA 溶液中偶联。反应产物经透析、离心后收集上清, 制得完全抗原(T-2-BSA), –20 ℃冻存。T-2-OVA 用同样方法制备。

(3) ZEA 完全抗原的制备

同 AFB_1 完全抗原的制备。

1.3.2　完全抗原鉴定

(1)间接 ELISA 鉴定

偶联后的完全抗原作为包被原做间接 ELISA, 阴性对照为 BSA 和 OVA, 空白对照为 PBS。根据前期实验, 完全抗原均以 4 μg/mL 的质量浓度包被最佳。以 AFB_1-BSA 为例, 间接 ELISA 具体步骤为: 将 AFB_1-BSA 以 4 μg/mL 包被于 ELISA 孔中, 每孔 100 μL, 4 ℃过夜; 洗涤后, 用 5%脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h; 洗涤后, 加入抗 AFB_1 单克隆抗体, 37 ℃孵育 1 h; 洗涤后加入 HRP 标记的亲和纯化山羊抗小鼠 IgG (H+L)二抗, 37 ℃孵育 1 h 后洗涤, 显色 10 min, 终

止显色后测定 OD_{450}, 记录结果。

(2)紫外扫描鉴定

用超微量分光光度计测定 BSA、OVA 及对应完全抗原在 220~400 nm 的吸光度, 根据特征吸收峰的变化来鉴定完全抗原是否偶联成功。

1.3.3 单克隆抗体生产及特性鉴定

(1)单克隆抗体生产

将分泌 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 单克隆抗体的杂交瘤细胞(1×10^6 个/只)注入 BALB/c 小鼠腹腔, 7~10 d 后收集腹水; 获得含相应单克隆抗体的腹水, 使用 IgG 蛋白纯化柱进行单抗纯化。

(2)单克隆抗体效价和特异性测定

采用间接 ELISA 法测定纯化后腹水中抗体的效价, 具体步骤为: 完全抗原以 4 μg/mL, 每孔 100 μL 包被, 加入梯度稀释的腹水。判断标准为: 腹水 OD_{450} 大于或等于 2 倍阴性对照 OD_{450} 时, 对应的最高稀释倍数即为腹水效价[31]。

采用 ic-ELISA 法测定纯化后腹水的特异性, 具体步骤为: 完全抗原以 4 μg/mL, 每孔 100 μL 包被, 分别以 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 各自的结构类似物作为竞争物, 计算交叉反应率(cross-reactivity, CR)。CR 的计算见公式(1)。

$$CR/\%=IC_{50}(\text{结构类似物})/IC_{50}(\text{目标毒素})\times100\% \quad (1)$$

式中: IC_{50} 为半抑制浓度(half maximum inhibitory concentration), 使反应信号抑制 50%的毒素浓度。

1.3.4 ic-ELISA 方法条件优化

为获得灵敏度高、重复性好且基质效应较低的检测体系, 本研究对包被抗原种类、包被抗原浓度、单克隆抗体工作浓度、抗原稀释液组成以及竞争孵育时间等关键参数进行了系统优化。所有优化实验均在相同的竞争物浓度梯度下进行, 并通过绘制抑制曲线计算 IC_{50}, 以 IC_{50} 最低作为判断灵敏度高的标准。

(1)包被抗原种类的选择

比较同一毒素以 BSA 与 OVA 偶联的完全抗原作为包被物时的检测灵敏度。均以 4 μg/mL 的初始质量浓度包被酶标板, 100 μL/孔, 4 ℃过夜包被; 抗 AFB_1 单克隆抗体 1:1000 稀释作为一抗, 12.5 ng/mL 的 AFB_1 标准溶液 2 倍梯度稀释至 0.195 ng/mL 作为竞争抗原、抗 T-2 毒素单克隆抗体 1:1000 稀释作为一抗, 1000 ng/mL 的 T-2 毒素标准溶液 3 倍梯度稀释至 0.15 ng/mL 作为竞争抗原、抗 ZEA 单克隆抗体 1:1000 稀释作为一抗, 100 ng/mL 的 ZEA 标准溶液 2 倍梯度稀释至 0.195 ng/mL 作为竞争抗原, 未加任何毒素的抗原稀释液作为阴性对照, 比较两种完全抗原的 IC_{50}, 较低组为最佳包被原。最终以该包被条件进入下一步优化。

(2)包被抗原浓度与一抗稀释倍数优化

通过棋盘法来确定抗原最佳包被浓度和一抗最佳工作浓度, 包被抗原和一抗均倍比稀释, 测定间接 ELISA, 当所测定的 OD_{450} 最接近 1.0, 为最佳包被浓度。

(3)抗原稀释液的优化

本研究对抗原稀释液的组成成分, 包括甲醇、离子强度、pH 和吐温-20 进行优化。AFB_1 采用甲醇浓度为 0%、10%、20%和 30%, pH 为 5.0~9.0, 吐温-20 浓度为 0.000%、0.001%、0.010%、0.100%和 1.000%和离子强度为 0.005、0.010、0.020、0.040 和 0.080 mol/L 的抗原稀释液进行间接竞争 ELISA 测定。

(4)竞争孵育时间的优化

确定最佳竞争孵育时间, 使抗体与竞争抗原充分结合, 分别采用 37 ℃孵育竞争抗原和一抗 15、30、45、60、75 min, 计算抑制率的变化。抑制率的计算见公式(2)。

$$抑制率/\%=[(B_0-B)/B_0]\times100\% \quad (2)$$

式中: B_0 为不含毒素(0 ng/mL 标准品)的反应孔在 450 nm 处的吸光度值; B 为含有待测毒素(或标准品)的反应孔吸光度值。

1.3.5 标准曲线绘制

依据上述优化后的 ic-ELISA 方法条件, 使用不同浓度的竞争抗原与单抗竞争反应, 拟合间接竞争标准曲线: 以竞争抗原浓度的对数值为横坐标[X, lg(ng/mL)], 以竞争抗原浓度为 0 的 OD_{450} 为 B_0, 各相应竞争抗原浓度的 OD_{450} 为 B, 以 B/B_0 为纵坐标(Y, %), 绘制竞争标准曲线, 计算回归曲线的方程和相关参数, 进而计算出各曲线的 IC_{50}、检测区间和检出限(limit of detection, LOD)。将抑制率为 50%时的 B/B_0 (即 Y=50)代入标准曲线的线性回归方程 $Y=a+b\lg(C)$, 反解出对应的竞争抗原浓度 C, 即为 IC_{50}。IC_{50} 的计算见公式(3)。

$$IC_{50}=10^{[(50-a)/b]} \quad (3)$$

式中: a 为回归方程的截距; b 为回归方程的斜率。

1.3.6 样品加标回收测定

样品前处理: 称取 3 g 粉碎玉米样品(过 80 目筛)于 50 mL 离心管, 分别添加 AFB_1 (0.25、1.25、2.50 μg/kg)、T-2 毒素(15、30、60 μg/kg)、ZEA (25、50、150 μg/kg)标准品; 加 15 mL 80%甲醇, 涡旋振荡 10 min, 4500 r/min 离心 10 min; 上清经 0.45 μm 有机相滤膜过滤, 取 500 μL 滤液氮气吹干, 500 μL 最优抗原稀释液复溶。回收率计算见公式(4)。

$$回收率/\%=(检测浓度/添加浓度)\times100\% \quad (4)$$

平行测定 3 次, 计算变异系数(coefficient of variation, CV)。

1.4 数据处理

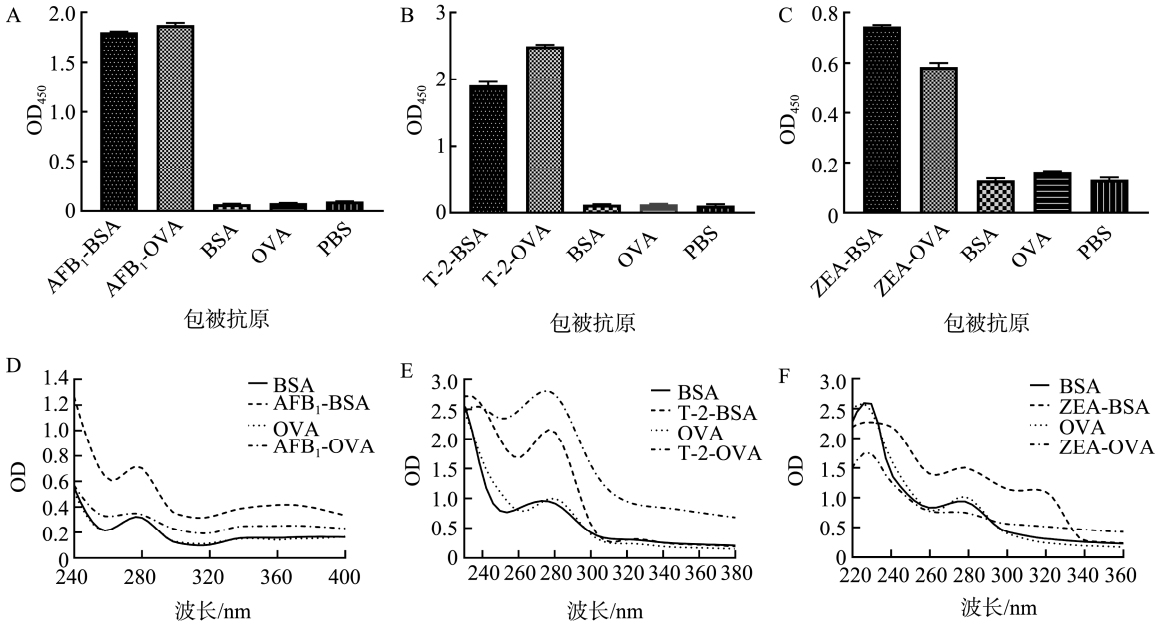
用 Microsoft Excel 2019 进行数据统计, GraphPad Prism 9 软件拟合标准曲线; 数据以平均值±标准偏差表示, 所有实验均至少独立重复 3 次($n\geq3$), 采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)进行显著性检验, $P<0.05$ 为差异显著。

2　结果与分析

2.1　完全抗原的鉴定结果

间接 ELISA 结果: AFB_1-BSA、AFB_1-OVA 的 OD_{450} 分别为 1.80±0.01、1.87±0.02, 高于载体蛋白 BSA (0.07±0.01)、OVA (0.10±0.01)(图 1A); T-2-BSA、T-2-OVA 的 OD_{450} 分别为 1.91±0.05、2.50±0.02, 高于载体蛋白 BSA (0.12±0.01)、OVA (0.13±0.01)(图 1B); ZEA-BSA、ZEA-OVA 的 OD_{450} 分别为 0.75±0.01、0.58±0.02, 高于载体蛋白 BSA (0.13±0.01)、OVA (0.16±0.01)(图 1C)。即偶联后的完全抗原检测得到的吸光值均高出载体蛋白 BSA 和 OVA 包被的孔数倍, 表明抗体可特异性识别偶联产物。

紫外扫描结果(图 1D~F): 偶联前后载体蛋白和完全抗原的波形和吸收峰均出现了较为明显的改变, 这是因为载体蛋白与完全抗原偶联, 吸光值出现了叠加, 据此可以判断完全抗原偶联成功。



注: A、B、C. 间接 ELISA 鉴定 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 完全抗原; D、E、F. AFB_1、T-2 毒素、ZEA 完全抗原与载体蛋白的紫外吸收光谱图。

图 1　完全抗原鉴定(n=3)

Fig.1　Identification of complete antigen (n=3)

2.2　单克隆抗体特性鉴定结果

单克隆细胞株产生的腹水抗体经纯化后, 间接ELISA法测定抗体效价。结果显示, AFB_1 的抗体效价为 2.56×10^4; T-2 毒素的抗体效价为 8.19×10^5; ZEA 的抗体效价为 2.56×10^4。抗体特异性如表 1 所示, 3 种单克隆抗体与其对应的结构类似物 CR 均较低, 说明 AFB_1、T-2、ZEA 3 种单克隆抗体的特异性均较高。

表 1　单克隆抗体抗特异性

Table 1　Specificity of monoclonal antibody

类型	标准品	CR/%
AFB_1 类似物	黄曲霉毒素 B_2	25.0
	黄曲霉毒素 G_1	12.5
	黄曲霉毒素 G_2	8.3
T-2 类似物	HT-2 毒素	9.8
ZEA 类似物	α-玉米赤霉烯醇	16.7
	β-玉米赤霉烯醇	8.3
	α-玉米赤霉醇	10.0
	β-玉米赤霉醇	6.3

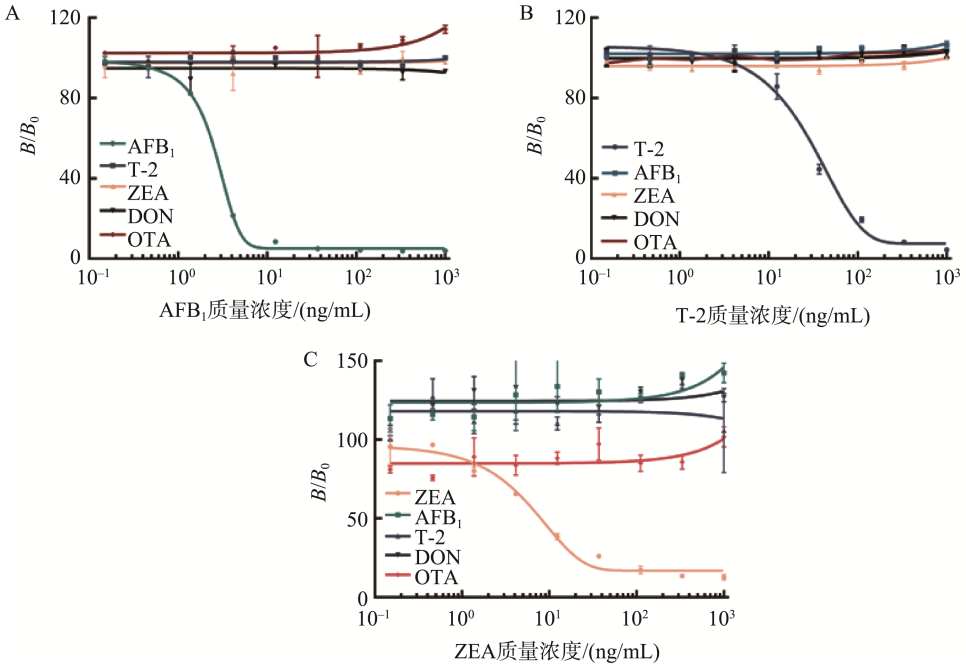
2.3　ic-ELISA 方法工作条件的确定

2.3.1　包被抗原种类的选择结果

结果如图 2 所示, 用 AFB_1-BSA 包被的 IC_{50} 约为 0.49 ng/mL, 而 AFB_1-OVA 包被的 IC_{50} 约为 0.8 ng/mL(图 2A), 说明使用 AFB_1-BSA 包被的灵敏度更高, 因此之后选用 AFB_1-BSA 包被; 同理, T-2-BSA 包被的 IC_{50} 约为 1.3 ng/mL, T-2-OVA 包被的 IC_{50} 约为 14.7 ng/mL(图 2B), 选用 T-2-BSA 包被; 用 ZEA-OVA 包被的 IC_{50} 约为 10.8 ng/mL, ZEA-BSA 包被的 IC_{50} 约为 22.08 ng/mL(图 2C), 选用 ZEA-OVA 包被。即最佳包被抗原种类分别为: AFB_1-BSA、T-2-BSA、ZEA-OVA。

2.3.2　包被抗原浓度与一抗稀释倍数优化结果

如表 2~4 所示, 包被抗原与抗体均倍比稀释, 测定间接 ELISA。测定的 OD_{450} 最接近 1.0 所对应的抗原浓度即为最佳包被浓度。结果表明: AFB_1-BSA 最佳包被质量浓度为 8 μg/mL, 一抗最佳稀释倍数为 1:6400; T-2-BSA 最佳包被质量浓度为 8 μg/mL, 一抗最佳稀释倍数为 1:25600; ZEA-OVA 最佳包被质量浓度为 0.50 μg/mL, 一抗最佳稀释倍数为 1:1600。



注: 赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)。

图 2 ic-ELISA 中包被原的选择(n=3)

Fig.2 Selection of coating antigen of ic-ELISA (n=3)

表 2 棋盘法优化 AFB_1 包被抗原质量浓度与一抗稀释倍数(OD_{450}, n=3)

Table 2 Optimization of AFB_1 coating antigen mass concentration and primary antibody dilution by checkerboard titration (OD_{450}, n=3)

包被抗原质量浓度/(μg/mL)	一抗稀释倍数		
	3200	6400	12800
16	1.513	0.953	0.574
8	1.427	0.993	0.575
4	1.484	0.923	0.553

表 3 棋盘法优化 T-2 包被抗原质量浓度与一抗稀释倍数(OD_{450}, n=3)

Table 3 Optimization of T-2 coating antigen mass concentration and primary antibody dilution by checkerboard titration (OD_{450}, n=3)

包被抗原质量浓度/(μg/mL)	一抗稀释倍数		
	12800	25600	51200
16	1.564	1.070	0.710
8	1.427	1.006	0.682
4	1.442	0.982	0.619

表 4 棋盘法优化 ZEA 包被抗原质量浓度与一抗稀释倍数(OD_{450}, n=3)

Table 4 Optimization of ZEA coating antigen mass concentration and primary antibody dilution by checkerboard titration (OD_{450}, n=3)

包被抗原质量浓度/(μg/mL)	一抗稀释倍数		
	800	1600	3200
2.00	1.970	1.706	1.477
1.00	1.542	1.394	0.919
0.50	1.219	0.991	0.702
0.25	0.850	0.642	0.398

2.3.3 抗原稀释液的优化结果

分别从甲醇浓度、离子强度、pH 和吐温-20 浓度 4 个方面对抗原稀释液进行优化。进行 ic-ELISA, 选择 IC_{50} 较低的组合作为最适抗原稀释液。结果见图 3 所示, 10%甲醇+0.010%吐温-20 的 0.010 mol/L PBS (pH 9.0)时, AFB_1 的 IC_{50} 最低; 10%甲醇+0.005 mol/L PBS (pH 7.4)时, T-2 毒素的 IC_{50} 最低; 10%甲醇+0.010 mol/L PBS (pH 6.0)时, ZEA 的 IC_{50} 最低, 以此条件用作后续检测。

2.3.4 竞争孵育时间的优化结果

分别选取 0、15、30、45、60 和 75 min 作为竞争孵育时间, 计算抑制率。抑制率反映了样品中游离毒素对包被抗原与抗体结合的竞争能力, 抑制率越高, 说明样品中毒素浓度越高。AFB_1 孵育时间为 45 min 时, 抑制率达 83.3%(图 4A); T-2 毒素孵育时间为 30 min 时, 抑制率达 95.2%(图 4B); ZEA 孵育时间为 60 min 时, 抑制率达 68.9%(图 4C)。即后续试验 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 分别选择 45、30、60 min 作为竞争孵化时间。

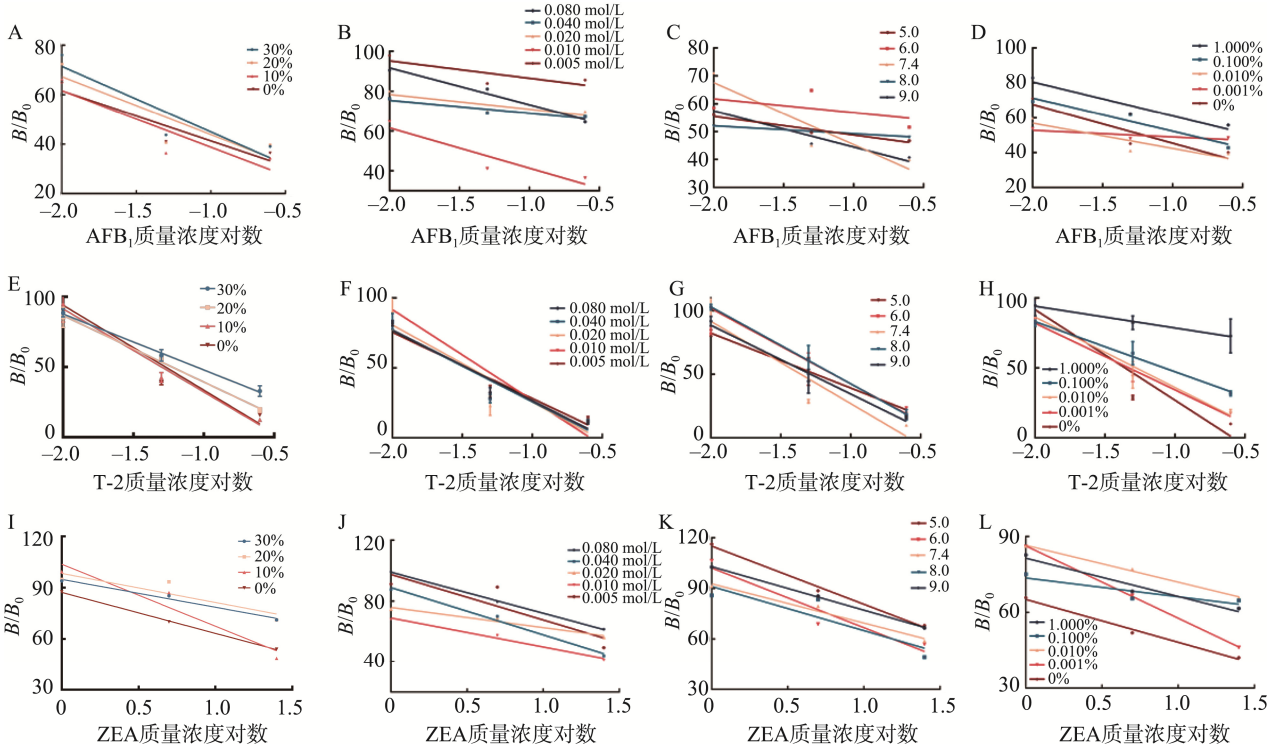
2.3.5 ic-ELISA 检测方法的建立

根据上述优化结果, 本研究确定了 AFB_1、T-2 毒素、ZEA ic-ELISA 方法的最优条件。根据此条件建立了 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 的标准曲线, 如图 5 所示。

本研究建立的 AFB_1 的 ELISA 检测方法, 其线性方程为 Y=19.547–45.372×lg(X) (r^2=0.9858), 线性范围 IC_{20}~IC_{70} 为 0.047~0.588 ng/mL, IC_{50} 为 0.178 ng/mL, 其 LOD 为 0.0273 ng/mL(图 5A)。

本研究建立的 T-2 毒素的 ELISA 检测方法，其线性方程为 Y=57.08–42.395×lg(X) (r^2=0.9866)，线性范围 IC_{20}~IC_{80} 为 0.288~7.493 ng/mL，IC_{50} 为 1.51 ng/mL，其 LOD 为 0.183 ng/mL(图 5B)。

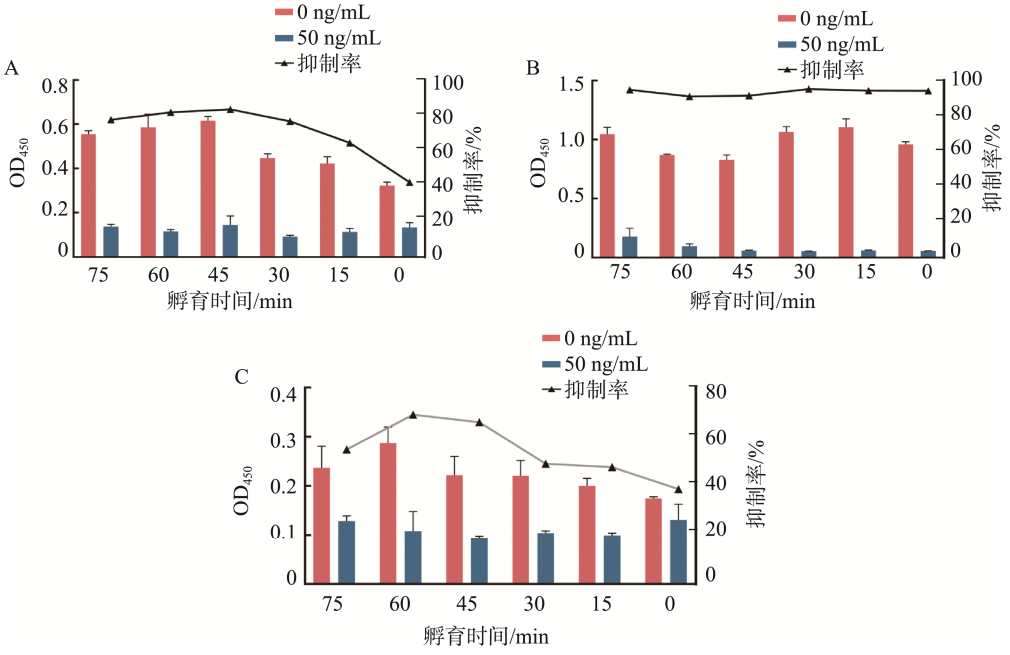
本研究建立的 ZEA 的 ELISA 检测方法，其线性方程为 Y=92.371–33.857×lg(X) (r^2=0.9858)，线性范围 IC_{20}~IC_{70} 为 2.319~69.533 ng/mL，IC_{50} 为 15.6 ng/mL，其 LOD 为 1.090 ng/mL(图 5C)。



注: A、E、I. 甲醇浓度; B、F、J. 离子强度; C、G、K. pH; D、H、L. 吐温-20 浓度。

图 3　抗原稀释液成分对 ic-ELISA 的影响(n=3)

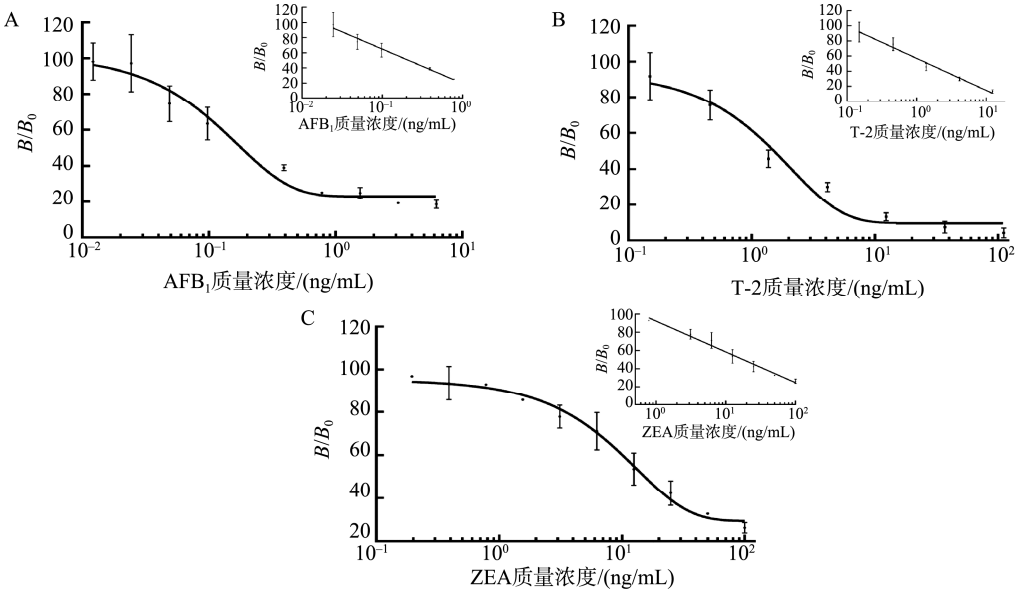
Fig.3　Effects of antigen diluent components on ic-ELISA (n=3)



注: A. AFB_1 孵育时间; B. T-2 毒素孵育时间; C. ZEA 孵育时间。

图 4　竞争孵育时间的选择(n=3)

Fig.4　Selection of competition incubation time (n=3)



注: 插图为对应毒素在线性范围内的线性回归曲线。

图 5 ic-ELISA 检测 AFB_1、T-2 毒素、ZEA 的标准曲线(n=3)

Fig.5 Calibration curve for ic-ELISA against AFB_1, T-2 toxin, ZEA (n=3)

2.3.6 玉米样品加标回收试验结果

在玉米样品中添加不同浓度的相应毒素标准品, ic-ELISA 检测结果如表 5 所示。AFB_1 加标回收率为 104.0%~110.0%, T-2 毒素加标回收率为 107.3%~108.3%, ZEA 加标回收率为 97.9%~112.3%, CVs 均小于 15%。结果表明, 本研究建立的方法在玉米基质中具有良好的准确度和稳定性, 满足实际检测要求。

表 5 玉米中霉菌毒素加标回收率(n=3)

Table 5 Recovery rates of mycotoxins in corn samples (n=3)

毒素	加入浓度 /(μg/kg)	检测浓度 /(μg/kg)	回收率 /%	CVs/%
AFB_1	0.25	0.27	108.0	6.7
	1.25	1.30	104.0	1.5
	2.50	2.75	110.0	7.5
T-2 毒素	15.00	16.10	107.3	1.3
	30.00	32.50	108.3	8.2
	60.00	64.90	108.2	1.9
ZEA	25.00	28.10	112.3	1.3
	50.00	52.10	104.2	5.9
	150.00	146.80	97.9	11.5

3 结论与讨论

本研究以 AFB_1、T-2 毒素和 ZEA 为研究对象, 成功制备了 3 种毒素的完全抗原和对应的单克隆抗体, 并在此基础上建立了灵敏度高、特异性强的 ic-ELISA 检测方法。通过系统优化包被抗原种类与浓度、抗体稀释倍数、抗原稀释液成分及竞争孵育时间等关键参数, 获得了在玉米样品中灵敏、稳定、可重复的检测体系。在玉米基质中 AFB_1 标准曲线的线性范围 IC_{20}~IC_{70} 为 0.047~0.588 ng/mL, IC_{50} 为 0.178 ng/mL, 其 LOD 为 0.0273 ng/mL。在玉米基质中 T-2 毒素标准曲线的线性范围 IC_{20}~IC_{80} 为 0.288~7.493 ng/mL, IC_{50} 为 1.51 ng/mL, 其 LOD 为 0.183 ng/mL。在玉米基质中 ZEA 标准曲线的线性范围 IC_{20}~IC_{70} 为 2.319~69.533 ng/mL, IC_{50} 为 15.6 ng/mL, 其 LOD 为 1.09 ng/mL。

从实验结果看, 3 种 ic-ELISA 方法的 LOD 均明显低于国家食品安全标准限量, 且线性范围宽、加标回收率在 97.9%~112.3%之间、CVs 均小于 15%, 表明方法的灵敏度、准确度与稳定性均满足农产品中真菌毒素检测要求[14,24]。该结果验证了免疫学检测技术在小分子毒素快速定量分析中的可行性与优越性[2,25], 体现了抗原抗体特异性识别反应的普遍原理。

已有研究报道了多种基于 ELISA 或胶体金免疫分析的霉菌毒素快速检测方法[32–33], AFB_1、T-2 毒素和 ZEA 的多处于 0.016~0.250、0.5~20.0、0.001~6.250 ng/mL[34–37], 能够满足粮食中真菌毒素的快速筛查需求与上述方法相比, 本研究建立的 ic-ELISA 方法在保持操作简便和检测效率较高的基础上, 在检测灵敏度和定量性能方面进一步得到提升, 尤其在玉米基质中表现出较低的 LOD 和较宽的线性范围, 可作为现有免疫学快速检测技术的有益补充。

此外, 本研究针对不同毒素的结构特点, 对包被抗原类型及抗原稀释体系进行了针对性优化。实验结果表明, AFB_1和T-2毒素采用BSA作为载体蛋白时, 可获得较好的竞争抑制效果; 而对于结构柔性较高的ZEA, 采用OVA作为异源包被抗原(ZEA-OVA)更有利于降低非特异性结合, 在一定程度上减弱基质效应, 进一步提高检测灵敏度和重复性。同时, 本研究制备的单克隆抗体与其结构相似物交叉反应均较低, 表明了方法的特异性, 也进一步证明了本实验抗体筛选与优化策略的有效性。

综上所述, 本研究建立的 ic-ELISA 方法可为饲料中AFB_1、T-2 毒素和 ZEA 的快速筛查提供一种可靠、经济、简便的检测手段, 具有良好的实际应用前景。

参考文献

[1] MIN L, FINK-GREMMELS J, LI D, *et al.* An overview of aflatoxin B_1 biotransformation and aflatoxin M_1 secretion in lactating dairy cows [J]. Animal Nutrition , 2021, 7(1): 42–48.

[2] DAI H, HUANG Z, LIU X, *et al.* Colorimetric ELISA based on urease catalysis curcumin as a ratiometric indicator for the sensitive determination of aflatoxin B_1 in grain products [J]. Talanta, 2022, 246: 123495.

[3] ENGIN AB, ENGIN A. DNA damage checkpoint response to aflatoxin B_1 [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2019, 65: 90–96.

[4] AMARE MG, KELLER NP. Molecular mechanisms of aspergillus flavus secondary metabolism and development [J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 66: 11–18.

[5] LIN L, FU P, CHEN N, *et al.* Total flavonoids of rhizoma drynariae protect hepatocytes against aflatoxin B_1-induced oxidative stress and apoptosis in broiler chickens [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 230: 113148.

[6] ZHENG M, LIU H, YE J, *et al.* Target-responsive aptamer-cross-linked hydrogel sensors for the visual quantitative detection of aflatoxin B_1 using exonuclease I-triggered target cyclic amplification [J]. Food Chemistry: X, 2022, 15: 100395.

[7] LI Y, CHEN A, MAO X, *et al.* Multiple antibodied based immunoaffinity columns preparation for the simultaneous analysis of deoxynivalenol and T-2 toxin in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127802.

[8] MAHATO DK, LEE KE, KAMLE M, *et al.* Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2266.

[9] 肖杰文, 冉俊祥, 杨占臣, 等. 美国大豆中镰刀菌的分离鉴定[J]. 植物检疫, 2011, 25(1): 29–32.
XIAO JW, RAN JX, YANG ZC, *et al.* Identification of fusarium isolates from America soybean [J]. Plant Quarantine, 2011, 25(1): 29–32.

[10] YANG X, LIU P, CUI Y, *et al.* Review of the reproductive toxicity of T-2 toxin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(3): 727–734.

[11] CAGLAYAN MO, ŞAHIN S, ÜSTÜNDAĞ Z. Detection strategies of zearalenone for food safety: A review [J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2022, 52(2): 294–313.

[12] ALASSANE-KPEMBI I, SCHATZMAYR G, TARANU I, *et al.* Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(16): 3489–3507.

[13] MAHATO DK, DEVI S, PANDHI S, *et al.* Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review [J]. Toxins, 2021, 13(2): 92.

[14] 谢体波, 刘红, 陆苇, 等. 间接竞争 ELISA 检测试剂盒测定粮油食品中的黄曲霉毒素 B_1[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2834–2839.
XIE TB, LIU H, LU W, *et al.* Determination of aflatoxin B_1 in cooking oil, peanut, and grain by using direct competitive ELISA kit [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(7): 2834–2839.

[15] SOARES-MATEUS AR, BARROS S, PENA A, *et al.* Mycotoxins in pistachios (*Pistacia vera* L.): Methods for determination, occurrence, decontamination [J]. Toxins, 2021, 13(10): 682.

[16] MATEUS ARS, BARROS S, PENA A, *et al.* Development and validation of QuEChERS followed by UHPLC-ToF-MS method for determination of multi-mycotoxins in pistachio nuts [J]. Molecules, 2021, 26(19): 5754.

[17] AKINMUSIRE OO, EL-YUGUDA AD, MUSA JA, *et al.* Mycotoxins in poultry feed and feed ingredients in Nigeria [J]. Mycotoxin Research, 2019, 35(2): 149–155.

[18] BISCOTO GL, SALVATO LA, ALVARENGA ÉR, *et al.* Mycotoxins in cattle feed and feed ingredients in brazil: A five-year survey [J]. Toxins, 2022, 14(8): 552.

[19] 马妍, 孙长坡, 王峻, 等. T-2 毒素降解菌株的筛选、鉴定与降解机制分析[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 173–182.
MA Y, SUN CP, WANG J, *et al.* Screening, identification and action mechanism of T-2 toxin-degrading strains [J]. Food Science, 2023, 44(22): 173–182.

[20] ALSHANNAQ A, YU JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(6): 632.

[21] PEREIRA SC, CUNHA CS, FERNANDES OJ. Prevalent mycotoxins in animal feed: Occurrence and analytical methods [J]. Toxins, 2019, 11(5): 290.

[22] ZHANG X, HE K, FANG Y, *et al.* Dual flow immunochromatographic assay for rapid and simultaneous quantitative detection of ochratoxin A and zearalenone in corn, wheat, and feed samples [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2018, 19(11): 871–883.

[23] SELVARAJ JN, WANG Y, ZHOU L, *et al.* Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: A review [J]. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2015, 32(4): 440–452.

[24] 潘明飞, 李诗洁, 郭丹丹, 等. 间接竞争酶联免疫分析方法检测花生中黄曲霉毒素 B_1[J]. 中国食品学报, 2019, 19(9): 255–261.
PAN MF, LI SJ, GUO DD, *et al.* Determination of aflatoxin B_1 in peanut by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(9):

255–261.

[25] 李敏, 马飞, 李培武, 等. 基于异源策略的黄曲霉毒素 B_1 酶联免疫(ELISA)分析方法的建立[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(6): 802–807.
LI M, MA F, LI PW, *et al.* Heterology strategy-based competive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B_1 [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2014, 36(6): 802–807.

[26] YIN S, NIU L, LIU Y. Recent progress on techniques in the detection of aflatoxin B_1 in edible oil: A mini review [J]. Molecules, 2022, 27(19): 6141.

[27] LIAO X, LI Y, LONG N, *et al.* Multi-mycotoxin detection and human exposure risk assessment in medicinal foods [J]. Food Research International, 2023, 164: 112456.

[28] 蒋佳伊, 张磊, 秦露, 等. 高灵敏度黄曲霉毒素 B_1 单克隆抗体的制备及其在中药材酸枣仁污染快速检测中的应用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3900–3907.
JIANG JY, ZHANG L, QIN L, *et al.* Preparation of highly sensitive monoclonal antibody against aflatoxin B_1 and its application in rapid detection of contamination in *Ziziphi spinosae* semen [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(16): 3900–3907.

[29] 张浩楠, 高建伟. 玉米赤霉烯酮完全抗原的制备及鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 2021(6): 87–92.
ZHANG HN, GAO JW. Preparation and identification of zearalenone complete antigen [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2021(6): 87–92.

[30] 邢云瑞, 孙亚宁, 姚静静, 等. T-2 毒素完全抗原制备及免疫学检测方法的建立[J]. 河南农业科学, 2018, 47(4): 124–129.
XING YR, SUN YN, YAO JJ, *et al.* Preparation of T-2 toxin complete antigen and establishment of immunological detection method [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2018, 47(4): 124–129.

[31] ERTEKIN Ö, PIRINÇCI Ş, ÖZTÜRK S. Monoclonal IgA antibodies for aflatoxin immunoassays [J]. Toxins, 2016, 8(5): 148.

[32] PENG D, CHANG F, WANG Y, *et al.* Development of a sensitive monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring T-2 toxin in food and feed [J]. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2016, 33(4): 683–692.

[33] VENKATARAMANA M, RASHMI R, UPPALAPATI SR, *et al.* Development of sandwich dot-ELISA for specific detection of ochratoxin A and its application on to contaminated cereal grains originating from India [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 511.

[34] 张磊, 林煜伦. 间接竞争酶联免疫分析法快速检测决明子中黄曲霉毒素 B_1 的研究[J]. 广东化工, 2023, 50(21): 20–22, 29.
ZHANG L, LIN YL. Rapid detection of aflatoxin B_1 in semen cassiae by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Guangdong Chemical Industry, 2023, 50(21): 20–22, 29.

[35] 谢婷婷. 胶体金检测卡测定小麦和玉米中伏马毒素和 T-2/HT-2 毒素的方法学联合验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(4): 36–43.
XIE TT. Interlaboratory validation of colloidal gold detection card for detecting fumonisin and T-2/HT-2 toxin in *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(4): 36–43.

[36] 王雄, 齐红莉, 吴继宗, 等. 抗 T-2 毒素单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2): 301–304.
WANG X, QI HL, WU JZ, *et al.* Preparation and characterization of a monoclonal antibody against T-2 toxin [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(2): 301–304.

[37] 董国良. 玉米赤霉烯酮类和伏马菌素类广谱单克隆抗体的制备及 ELISA 方法的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
DONG GL. Preparation of broad spectrum monoclonal antibodiesagainst zearalenone and fumonisin and establishment of enzyme-linked immunosorbent assay [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)