

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2016.12.2016041401

孙清, 李馥雪, 贾玉军, 等. 黄曲霉毒素 M₁ 和黄曲霉毒素 B₁ 总量酶联免疫试剂盒的研制及应用[J]. 环境化学, 2016, 35(12): 2501-2510.
SUN Qing, LI Fuxue, JIA Yujun, et al. Development and application of an ELISA kit for simultaneous determination of aflatoxin M₁ and aflatoxin B₁[J]. Environmental Chemistry, 2016, 35(12): 2501-2510.

黄曲霉毒素 M₁ 和黄曲霉毒素 B₁ 总量酶联免疫 试剂盒的研制及应用 *

孙 清^{1,2} 李馥雪² 贾玉军² 邓乾民³ 刘杰民^{1,2} 时国庆^{2**}

(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 通过合成黄曲霉毒素 M₁(AFM₁) 完全抗原 AFM₁-BSA 并免疫小鼠, 成功制备了 AFM₁ 单克隆抗体 2F12. 通过以辣根过氧化物酶(HRP) 标记的 AFB₁ 作为竞争抗原, 成功研制了能同时检测液态奶、酸奶和奶粉中 AFM₁ 和 AFB₁ 的 ELISA 试剂盒, 该试剂盒的最低检测限(IC₁₀) 为 37 pg·mL⁻¹, IC₅₀ 为 211 pg·mL⁻¹, 线性范围为 50—1500 pg·mL⁻¹, 对 AFM₁ 和 AFB₁ 的交叉反应率分别为 100% 和 102%, 对其它黄曲霉毒素的交叉反应率小于 20%. 利用建立的试剂盒对多种样品进行了加标回收实验, 回收率在 87.9%—109.1% 之间, 批内相对标准偏差在 3.9%—10.8% 之间, 批间相对标准偏差 ≤ 11.1%. 多次对比试验表明, 试剂盒的检测结果与进口试剂盒相当.

关键词 酶联免疫吸附测定, 黄曲霉毒素 M₁, 黄曲霉毒素 B₁, 牛奶, 试剂盒.

Development and application of an ELISA kit for simultaneous determination of aflatoxin M₁ and aflatoxin B₁

SUN Qing^{1,2} LI Fuxue² JIA Yujun² DENG Qianmin³ LIU Jiemin^{1,2} SHI Guoqing^{2**}

(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 Primebiotech Company Limited, Beijing, 100085, China)

Abstract: A monoclonal antibody 2F12 against AFM₁ was developed by immunizing mice with AFM₁-BSA antigen. With the HRP-labeled AFB₁ as the competitive antigen, an ELISA kit for simultaneous detection of AFM₁ and AFB₁ in milk and milk products was successfully developed. The limit of detection and the IC₅₀ for AFM₁ was 37 pg·mL⁻¹ and 211 pg·mL⁻¹, respectively. The linear range was between 50 pg·mL⁻¹ and 1500 pg·mL⁻¹ for AFM₁, Cross reactivities for AFM₁ and AFB₁ were 100% and 102%, and less than 20% for the other aflatoxin analogues. Spike recoveries for milk and milk products ranged from 87.9% to 109.1%, and the intra- and inter-assay relative standard deviations were lower than 10.8% and 11.1%. The results of this kit were consistent with that of imported commercial ELISA kits in several tests.

2016 年 4 月 14 日投稿 (Received: April 14, 2016).

* 国家高技术研究发展计划(2012AA101609-5), 国家自然科学基金(21576023), 中央高校基本科研业务费专项资金(FRF-AS-15-005) 资助.

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2012AA101609-5), National Natural Science Foundation of China(21576023) and Fundamental Research Funds for the Central Universities(FRF-AS-15-005).

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

Corresponding author, Tel: 010-62334497, E-mail: shiguqing@ustb.edu.cn

Keywords: ELISA, aflatoxin M₁, aflatoxin B₁, milk, ELISA kit.

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFT)是迄今发现污染农产品毒性最强的一类生物毒素^[1].黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂(Aflatoxin B₂, AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁(Aflatoxin G₁, AFG₁)和黄曲霉毒素 G₂(Aflatoxin G₂, AFG₂)是粮油食品及饲料中黄曲霉毒素的主要存在形式,黄曲霉毒素 M₁(Aflatoxin M₁, AFM₁)及黄曲霉毒素 M₂(Aflatoxin M₂, AFM₂)是哺乳动物吸收 AFB₁和 AFB₂后的代谢产物,主要存在于奶、蛋、肉等组织中^[2].1993年,AFB₁被世界卫生组织国际癌症研究机构列为一类致癌物,2002年,AFM₁被列为一类致癌物,二者均可引起人类和动物的肝脏病变和致癌^[3-4].为了控制黄曲霉毒素对人类的危害,世界上大多数国家都对食品中黄曲霉毒素的含量进行严格的限制.美国FDA规定 AFB₁的限量为 20 μg·kg⁻¹,AFM₁的限量为 0.5 μg·kg⁻¹^[5].欧盟对 AFB₁的限量在 0.1—8 μg·kg⁻¹之间,对 AFM₁的限量在 0.025—0.05 μg·kg⁻¹^[6].我国目前对食品中 AFB₁的限量在 0.5—20 μg·kg⁻¹之间,对食品中 AFM₁的限量在 0.5 μg·kg⁻¹^[7].

黄曲霉毒素的常见检测方式主要有薄层色谱法(TLC)、液相色谱法(HPLC)、液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)和酶联免疫分析法(ELISA)等^[8].TLC和HPLC、HPLC-MS/MS等方法都需要复杂的样品前处理过程,不适合大量样品的筛选.ELISA方法是上世纪70年代发展起来的免疫检测技术,它把抗原抗体免疫反应与酶的高效催化作用原理结合起来,因此ELISA方法具有选择性强、灵敏度高、时间短、检测限低等特点.

AFB₁完全抗原的合成及抗体制备等研究工作最早由Chu等开始^[9-10].不久之后Chu等对AFB₁的ELISA方法进行了改进,花生样品中的AFB₁提取后直接稀释便可进行检测,定量分析时间缩短到1h之内,检测回收率在80.1%—103.6%之间,因而该方法被AOAC采用^[11].牛奶中AFM₁的ELISA检测方法最早由Pestka等提出,样品中AFM₁的检测灵敏度达到0.25 ng·mL⁻¹^[12].2002年,Thirumala-devi等建立了针对牛奶中AFM₁的间接竞争ELISA方法,牛奶离心后用甲醇进行提取,过滤并稀释后进行测定,灵敏度同样达到0.25 ng·mL⁻¹,该方法与AFB₁的交叉率在5%^[13].截止到目前为止,针对AFM₁的ELISA检测方法都不能同时检测AFB₁^[14-15],但有文献报道,在土耳其的母乳中发现了比AFM₁含量更高的AFB₁存在^[16],说明乳或乳制品存在同时含有AFM₁和AFB₁的可能性.由于AFB₁的毒性要比AFM₁强,因此开发一种既能检测AFM₁,又能同时检测AFB₁的快速ELISA检测产品对于乳和乳制品的安全监管十分必要.

在本文中,本课题组研制出一种可同时检测乳和乳制品中AFM₁和AFB₁的ELISA检测试剂盒,通过优化试剂盒的各组分,标准曲线的检测限达到了37 pg·mL⁻¹,对AFM₁和AFB₁的交叉反应率分别为100%和102%,对其它黄曲霉毒素的交叉反应率小于20%.由于试剂盒反应时间短,样品前处理简单,可以利用此试剂盒快速准确地检测乳和乳制品中黄曲霉毒素M₁和B₁的含量.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 试剂

AFM₁、AFB₁以及类似物(AFB₂、AFG₁、AFG₂)标准品、牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、Proclin 300购于Sigma Aldrich公司.Tween 20购于北京百灵威科技有限公司.胎牛血清、DMEM购自Hyclone公司.酶标板封闭保护液、HRP酶稀释液及底物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 mmol·L⁻¹, pH=7.4,含0.05% Tween-20),其他试剂均为国产分析纯.羊抗鼠IgG、抗体亚型试剂盒购自Southernbiotech公司.

1.2 仪器

Enspire 多模式读板机(PE公司,美国),恒温培养箱及鼓风干燥箱(上海一恒,中国).

1.3 AFM₁完全抗原及单克隆抗体的制备

AFM₁-BSA、AFM₁-OVA完全抗原的合成方法以及单克隆抗体的制备参考实验室AFB₁完全抗原及

抗体的制备方法进行^[17],单克隆抗体细胞株筛选时同时用 AFM₁ 和 AFB₁ 标准品进行竞争性实验,制备与 AFB₁ 交叉率高的 AFM₁ 的单克隆抗体.酶标抗原的合成采用高碘酸钠法,合成方法参考实验室 AFB₁ 酶标抗原的合成^[17].

1.4 试剂盒酶标板的制备

用碳酸缓冲液(50 mmol·L⁻¹, pH 9.6)将羊抗鼠 IgG 稀释至适当浓度,用 8 道移液器将稀释后的抗体加入到 96 孔酶标板中,每孔 100 μL,放入 2—8 ℃ 冰箱过夜.第二天取出,用 PBST 溶液洗涤 2 次,每次 30 s.最后一次甩掉孔中液体,在吸水纸上拍干后,每孔加入酶标板封闭液 200 μL,37 ℃ 恒温箱中封闭 1 h,然后洗涤 1 次.酶标板 37 ℃ 干燥箱干燥 1 h 后用铝箔袋真空密封,4 ℃ 保存备用.

1.5 酶联免疫检测步骤

实验前取出适量酶标板,恢复到室温后,先用酶稀液稀释抗 AFM₁ 抗体至适当浓度,每孔 100 μL,室温反应 10 min,然后每孔用 250 μL 洗涤液(PBST)洗 5 次,每次 30 s,吸水纸拍干.依次在微孔中加入 AFM₁ 标准品或样品溶液 50 μL,随后加入酶标抗原溶液(用 HRP 酶稀液稀释至一定浓度)50 μL,室温孵育 10 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,室温孵育 10 min.每孔加终止液(2 mol·L⁻¹ H₂SO₄)50 μL,振荡酶标板,用酶标仪(Enspire 多模式读板机)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.

1.6 羊抗鼠 IgG、抗 AFM₁ 抗体和酶标抗原用量的优化

在上述反应条件下,分别测定不同羊抗鼠 IgG 包被量、抗 AFM₁ 抗体用量及酶标抗原用量对试剂盒检测灵敏度的影响,在 B₀ 值(空白溶液孔对应的吸光度值)大于 1.5 的前提下,选择 IC₅₀ 值低的组合.

1.7 标准品稀释液的优化

选取不同稀释比(1:8、1:10、1:12、1:14)的脱脂奶粉溶液,配成一系列浓度的样品稀释液,用样品稀释液将 AFM₁ 标准储备液稀释为 0、50、100、200、500、1500 pg·mL⁻¹ 的标品溶液.为了保证标准品的有效期,溶液中需添加 0.1% 的 Proclin 300 作防腐剂.按上述方法进行检测,观察空白样品的检测值及加标值的变化.以加标回收率较好的溶液为最佳标品稀释液.

1.8 标准曲线的建立

用标准品稀释液将 AFM₁ 标准品稀释为 0、50、100、200、500、1500 pg·mL⁻¹ 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($B/B_0 \times 100\%$).其中, B 为标准品或样品溶液孔对应的 OD 值, B₀ 为标准品浓度为零的空白溶液孔对应的吸光度值.以标准品浓度对数为横坐标,其对应的 B/B₀ 值为纵坐标,绘制标准曲线.用同样的方法计算样品的 B/B₀, 相应的 AFM₁ 浓度可通过标准曲线计算得出.标准曲线的检测限为 $B/B_0 = 90\%$ (使 OD 值下降 10%, IC₁₀) 时的标品浓度^[18].

1.9 离心脱脂对液态奶检测的影响

对于鲜奶、纯奶等未发酵的液态奶,同一样品分成数份,分别添加终浓度为 0.5、1 μg·kg⁻¹ 的 AFM₁, 将所有样品分成两份,一份不离心直接检测,一份在 4 ℃ 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 去掉上层脂肪后恢复至室温再进行检测.比较离心脱脂对检测值及加标回收率的影响.

1.10 实际样品检测

对于鲜奶、纯奶等未发酵的液态奶,根据 1.9 节的结果选择合适的方法进行检测.对于奶粉,称取奶粉 1 g 后,用 10 mL 50 ℃ 去离子水溶解后恢复至室温,然后按液态奶的前处理进行检测.

对于酸奶、奶酪等固体或含乳酸菌的酸奶饮料等,称取 5 g,加入 10 mL 乙腈进行提取,振荡 5 min 后 4000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取 1 mL 上清液于氮气下吹干,加入 1 mL 标准品稀释液复溶,然后进行检测.

分别测定空白牛奶、奶粉和酸奶各 20 个样品,计算出其吸光度值的标准偏差,利用 4 参数拟合作出标准曲线,将 $[1 - 3 \times (\text{标准偏差}/B_0)] \times 100\%$ 作为 B/B₀ 代入曲线,计算得出样品中 AFM₁ 的测定值,即为样品最低检测限^[19].

对液态奶、奶粉和酸奶样品选择 2 个添加浓度(0.5、1 μg·kg⁻¹),分别对 3 批试剂盒开展样本添加回收实验,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性.

1.11 与进口商用试剂盒的检测方法比对

抽取液态奶和奶粉盲样样本数份,利用自制试剂盒和德国拜发公司、奥地利 ROMER 公司的 AFM_I 试剂盒同时进行对比检测,确定试剂盒与进口试剂盒检测方法的符合度.另外选择在某奶制品企业使用自制试剂盒与拜发试剂盒进行现场对比测试,比较在实际使用过程中自制试剂盒与进口试剂盒的符合度.

1.12 稳定性实验

将足量的试剂盒分别保存于 37 ℃ 培养箱和 2—8 ℃ 冰箱.37 ℃ 条件下保存的试剂盒每隔 1 d 取适量、2—8 ℃ 条件下的试剂盒每隔 1 月取适量,分别测定其 B₀ 值和 IC₅₀ 值.根据实验结果判定试剂盒的储存稳定性.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 AFM_I 完全抗原和抗体鉴定

AFM_I-BSA 抗原合成后通过 MALDI-TOF-MS 质谱确认,合成的完全抗原分子量明显大于 BSA 标准品(图 1),通过计算可得到 AFM_I-BSA 完全抗原中 AFM_I 分子数:BSA 分子数=11.1:1.

利用 AFM_I-BSA 抗原免疫小鼠后,进行了单克隆抗体的制备,最终获得一株与 AFB₁ 交叉率高、可稳定分泌抗 AFM_I 抗体的细胞株 2F12.经过亚型鉴定,2F12 分泌的抗 AFM_I 单克隆抗体为 IgG_{2b},轻链为 λ 型.利用间接非竞争法对抗体的亲和常数进行测定^[20],计算得到抗体的亲和常数为 1.8×10⁹ L·mol⁻¹,属于高亲和力的抗体^[21].

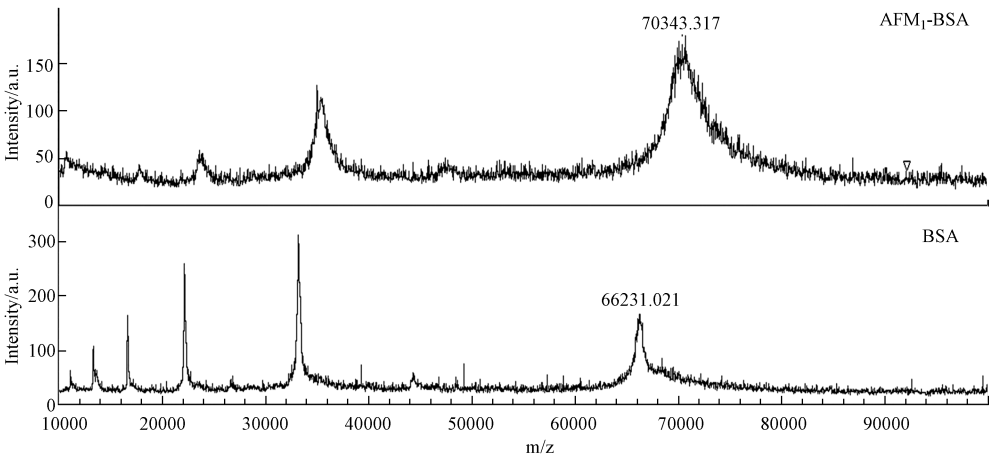


图 1 AFM_I-BSA 和 BSA 质谱图

Fig.1 MOLDI-TOF-MS spectra of AFM_I-BSA and BSA

利用间接竞争法对 2F12 抗体的灵敏度及交叉率进行了测定,结果如表 1 所示.抗体对 AFM_I 的灵敏度最高,与 AFB₁ 的交叉率为 37.8%,与 AFG₁ 的交叉率为 20.2%.抗体与 AFB₁ 交叉率较高,但仍未达到可检测 AFM_I 和 AFB₁ 总量的目的.

表 1 2F12 抗体的灵敏度及交叉率

Table 1 The sensitivity and cross reactivity of 2F12 antibody

化合物 Compounds	IC ₅₀ /(ng·mL ⁻¹)	交叉率 Cross reactivity/%
AFM _I	0.068	100
AFB ₁	0.18	37.8
AFB ₂	0.80	8.5
AFG ₁	0.337	20.2
AFG ₂	1.3	5.2

2.2 抗原抗体用量的优化

2.1 节中的间接竞争法需要一抗和标准品反应 60 min,洗板后 HRP 标记的二抗反应 30 min,时间较长,不适合作为试剂盒的反应条件.经过预实验,比较了缩短时间后包被抗原的间接竞争法、包被二抗的直接竞争法以及包被抗体的直接竞争法等 3 种模式的区别,结果显示包被二抗的直接竞争法板内及板间相对标准偏差最小,并且加标回收率最好(数据未给出).因此,最终选择包被二抗的直接竞争法作为试剂盒的反应模式.

由于 AFM₁ 抗体对 AFB₁ 的交叉率只有 38%,为了提高试剂盒与 AFB₁ 的交叉率,尝试通过使用与 AFM₁ 抗体的结合力较弱的 HRP-BSA-AFB₁ 来提高与 AFB₁ 的交叉率,使得试剂盒能同时检测 AFM₁ 和 AFB₁.

经过预实验,在试剂盒包被羊抗鼠 IgG 的条件下改用 HPR-BSA-AFB₁ 后重新测得 AFM₁ 单克隆抗体对不同标准品的灵敏度和交叉率,结果如表 2 所示.改用 AFB₁ 的酶标抗原(HRP-BSA-AFB₁)后,ELISA 方法对 AFB₁ 的交叉率提高,并且使 AFM₁ 和 AFB₁ 的交叉率分别为 100%和 102%,而对其他 3 种类似物的交叉率都在 20%以下.因此,可以使用改进后的 ELISA 方法来同时检测样品中的 AFM₁ 和 AFB₁.

表 2 更换酶标抗原后 2F12 抗体的灵敏度及交叉率

Table 2 The sensitivity and cross reactivity of 2F12 antibody with HRP-antigen

化合物 Compounds	IC ₅₀ /(ng·mL ⁻¹)	交叉率 Cross reactivity/%
AFM ₁	0.26	100
AFB ₁	0.25	102.0
AFB ₂	1.36	18.8
AFG ₁	1.70	15.0
AFG ₂	4.80	5.3

表 2 中抗体对各标准品的灵敏度与表 1 相比,有明显下降.这是因为表 1 和表 2 采用的 ELISA 模式不同:表 1 采用的是间接竞争法,反应时分为两步,并且反应时间要显著长于表 2 采用的直接竞争法,进一步加大了两个条件下抗体灵敏度的差异.

确认 ELISA 方法的各种试剂种类后,首先利用棋盘法对羊抗鼠 IgG、AFM₁ 抗体及酶标抗原的用量进行了优化.羊抗鼠 IgG 包被过夜后,洗板后再加入 AFM₁ 抗体,室温反应 10 min,洗板后再加入酶标抗原和空白奶样,反应 10 min,洗板后显色 10 min.棋盘结果如表 3 所示.

表 3 棋盘法筛选羊抗鼠 IgG、AFM₁ 抗体及酶标抗原用量

Table 3 Optimization of concentrations of coating goat anti-mouse IgG, antibody and HRP-BSA-AFB₁

羊抗鼠 IgG 包被量								
Coating concentrations of goat anti-mouse IgG/(μg·mL ⁻¹)	1	0.5	0.25	0.125	1	0.5	0.25	0.125
AFM ₁ 抗体浓度								
Concentrations of antibody/(μg·mL ⁻¹)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
酶标抗原稀释比	1/1000	2.780	2.536	2.149	1.209	2.724	2.227	1.413
Dilution ratio of	1/2000	2.478	1.973	1.303	0.693	2.046	1.440	0.860
HRP-BSA-AFB ₁	1/4000	1.521	0.968	0.638	0.346	1.045	0.712	0.458
	1/8000	0.890	0.578	0.354	0.196	0.597	0.446	0.272
							0.272	0.156

由表 3 可见,当羊抗鼠 IgG 浓度在 1 μg·mL⁻¹ 时,对于后续加入的 AFM₁ 抗体来说,羊抗鼠 IgG 已经接近饱和.因此,选择了羊抗鼠 IgG 包被浓度为 1 μg·mL⁻¹ 的两个条件进行标准曲线的测定,测定后的标线结果如表 4 所示.很明显,AFM₁ 抗体浓度为 0.1 μg·mL⁻¹、酶标抗原用量为 1/2000 时标准曲线的灵敏度最好,最终选择此条件作为试剂盒的抗原抗体最佳用量条件.

2.3 标准曲线的建立

由于奶样中基质成分复杂,直接选择用 PBST 或水配制标线时,标准曲线与奶样中标准曲线差别较大,无法用来对样品中的 AFM₁ 进行准确定量(数据未给出).因此,选择用脱脂奶粉稀释至不同比例(1:8、1:10、1:12、1:14)的溶液作为标准品稀释液.

4 个不同稀释比下的标准曲线图如图 2 所示,不同条件下的加标回收率数据如图 3 所示.结果显示,

除了 1:14 的溶液标线与其他 3 组差别较大以外,1:8、1:10 和 1:12 的脱脂奶粉溶液在标准曲线和回收率上差别都不大.考虑到一般奶粉复溶时均采用 1:10 的稀释方法,因此,最终选择 1:10 的脱脂奶粉作为标准品稀释液.

表 4 各组合参数及灵敏度
Table 4 Parameters and sensitivities of two conditions

	羊抗鼠 IgG 包被量 Coating concentrations of goat anti-mouse IgG/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	AFM ₁ 抗体浓度 Concentrations of antibody/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	酶标抗原稀释比 Dilution ratio of HRP-BSA-AFB ₁	IC ₅₀ / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
条件一 Condition 1	1	0.2	1/4000	249
条件二 Condition 2	1	0.1	1/2000	191

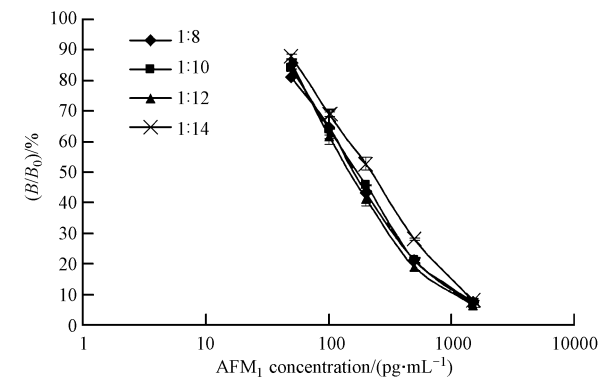


图 2 脱脂奶粉不同稀释比溶液下标准曲线($n=3$)
Fig.2 Standard curves of AFM₁ in a series of
diluted skimmed milk ($n=3$)

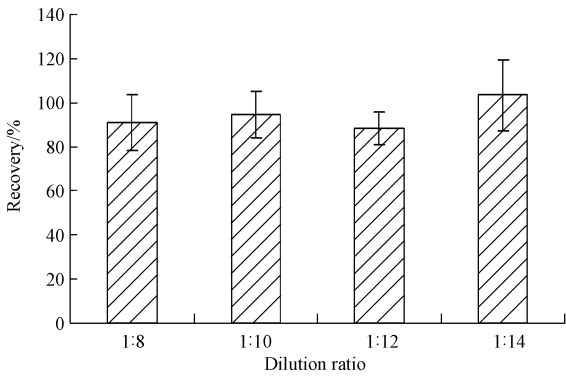


图 3 不同标准曲线下样品加标回收率($n=5$)
Fig.3 Recoveries of AFM₁ in samples analyzed by
different standard curves ($n=5$)

以 1:10 稀释的脱脂奶粉作为标准品稀释液,配制不同浓度的 AFM₁ 标准品,经过 ELISA 检测,以 B/B_0 值为纵坐标,AFM₁ 浓度对数为横坐标,绘制标准曲线,最终得到如图 4 所示的标准曲线图($n=5$). 曲线回归方程为 $y=-22.971\ln x+172.9$,线性相关系数 $R^2=0.989$,检测限 $\text{IC}_{10}=37\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{IC}_{50}=211\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,线性范围为 $50\text{--}1500\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.4 离心脱脂对液态奶检测的影响测定

通常试剂盒在检测牛奶时,需要将牛奶离心脱脂后进行检测.为了考察离心脱脂对检测是否有影响,在牛奶中添加了不同浓度的 AFM₁,比较了离心和不离心对检测结果的影响,结果如图 5 所示.从图 5 可以看出,离心不离心对检测值影响很小,两个条件下的检测值基本相当,并且两组数据经 T 检验后 P 值大于 0.1,说明两组数据无明显差别.因此,牛奶无需脱脂即可进行检测.

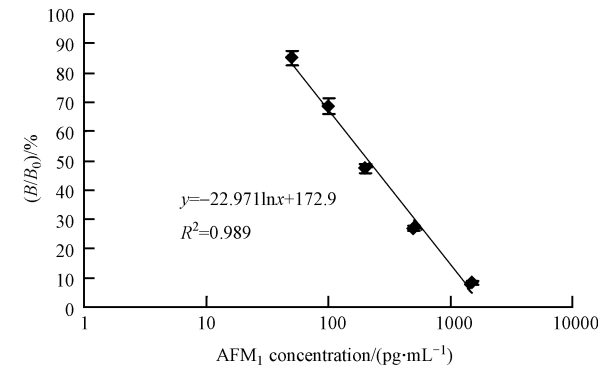


图 4 AFM₁ 标准曲线($n=5$)
Fig.4 The standard curve of AFM₁($n=5$)

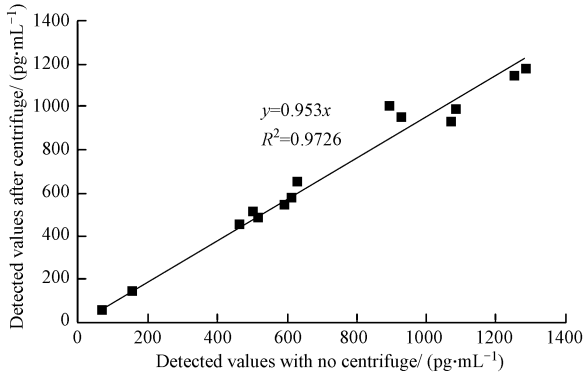


图 5 离心脱脂对检测值的影响
Fig.5 The influence of skimming by centrifuge
on the detection values

2.5 样品检测限、准确度和精密度

对于鲜奶、纯奶等未发酵的液态奶,根据 2.4 节的结果可直接进行检测.对于奶粉,1:10 复溶后也可直接检测.而对于酸奶、奶酪等固体或含乳酸菌的酸奶饮料等,若不处理直接进行检测,则样品会对试剂盒的检测结果有很大干扰,因此,需要用乙腈进行提取,挥干后复溶,然后进行检测.

通过测定 20 份空白牛奶、奶粉和酸奶样品的吸光度值,计算标准偏差,并利用 1.10 节中的方法计算得到对三者中 AFM₁ 的方法检测限分别为 37、34、42 pg·mL⁻¹(表 5).

表 5 AFM₁ 在 3 种样品中的检测限
Table 5 The detection limits for AFM₁ in three types of samples

样品 Sample	平行数 Numbers	(标准偏差/B ₀) (Standard deviation/B ₀)/%	最低检测限 Limit of detection/(pg·mL ⁻¹)
牛奶	20	3.3	37
奶粉	20	2.8	34
酸奶	20	4.3	42

对液态奶、奶粉和酸奶样品选择 2 个添加浓度(0.5、1.0 μg·kg⁻¹),分别对 3 批试剂盒开展样本添加回收实验,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.由表 6 可知,各样品添加 0.5、1.0 μg·kg⁻¹ 的 AFM₁ 回收率在 87.9%—109.1%之间,批内相对标准偏差在 3.9%—10.8%之间,批间相对标准偏差≤11.1%.

表 6 试剂盒的回收率及相对标准偏差
Table 6 The recovery and RSD% of ELISA kit

		液态奶 Liquid milk/(μg·kg ⁻¹)		酸奶 Yoghourt/(μg·kg ⁻¹)		奶粉 Milk powder/(μg·kg ⁻¹)	
		0.5	1	0.5	1	0.5	1
第一批次 First batch	平均值 Average/(μg·kg ⁻¹)	0.53	1.09	0.47	1.00	0.47	0.97
	回收率 Recovery/%	105.4	109.1	94.4	100.2	94.6	96.9
	批内相对标准偏差 Inter-assay RSD/%	7.8	5.3	9.1	8.1	10.0	8.5
第二批次 Second batch	平均值 Average/(μg·kg ⁻¹)	0.47	0.96	0.49	0.97	0.46	0.96
	回收率 Recovery/%	93.1	95.7	98.0	97.5	92.3	95.7
	批内相对标准偏差 Inter-assay RSD/%	5.9	9.7	10.7	9.5	9.5	8.1
第三批次 Third batch	平均值 Average/(μg·kg ⁻¹)	0.46	0.88	0.49	0.88	0.50	1.02
	回收率 Recovery/%	92.9	88.3	98.2	87.9	100.3	102.2
	批内相对标准偏差 Inter-assay RSD/%	4.8	3.9	7.9	10.8	6.6	9.6
批间相对标准偏差 Intra-assay RSD/%		8.6	11.1	8.8	10.5	8.9	8.7

为了验证该试剂盒确实可以同时检测样品中的 AFM₁ 和 AFB₁,在 20 份样品中分别添加终浓度为 0.5 μg·kg⁻¹ 的 AFM₁、0.5 μg·kg⁻¹ 的 AFB₁ 和浓度分别为 0.5 μg·kg⁻¹ 的 AFM₁ 和 AFB₁ 混合样品,利用试剂盒对加标回收率进行了测定,结果如表 7 所示.可以看出,不管是添加 AFM₁ 还是 AFB₁,或者两者同时添加,试剂盒都能准确地检测出来.

表 7 AFM₁ 或 AFB₁ 的加标回收率

Table 7 Recoveries of AFM₁ or AFB₁

加标物 Compound spiked	样品数量 Sample numbers	添加浓度 Spiked concentration/(μg·kg ⁻¹)	检测浓度 Detected concentration/(μg·kg ⁻¹)	回收率 Recovery/%
AFM ₁	20	0.5	0.47±0.06	94±11
AFB ₁	20	0.5	0.51±0.07	102±14
AFM ₁ 和 AFB ₁	20	1.0	0.99±0.11	99±11

2.6 与进口试剂盒的检测方法的比对

由于目前市面上没有可以同时检测 AFM₁ 和 AFB₁ 的总量试剂盒,为了进行对比,只能以检测乳和乳制品的 AFM₁ 来衡量试剂盒的准确性.目前市售牛奶中 AFM₁ 较低,为了扩大对比范围,抽取液态奶和奶粉盲样样本数份,各样品添加 0.5、1.0 μg·kg⁻¹ 的 AFM₁,利用自制试剂盒和德国拜发公司、奥地利 ROMER 公司的 AFM₁ 试剂盒同时进行对比,确定试剂盒与进口试剂盒检测方法的符合度,最终检测结果比较如图 6 所示(样品中 AFM₁ 含量低于检测限的未在图中显示).从图 6 可以看出,本研究所建立的试剂盒检测方法结果与进口 ROMER 或拜发公司的试剂盒检测结果相当,三者检测结果非常接近.另外,ROMER 试剂盒前处理较复杂,需要 4 ℃ 下静置 30 min,并且需要添加甲醇,同时其检测灵敏度(100 pg·mL⁻¹)要略低于本研究方法;而拜发公司的试剂盒检测灵敏度非常高,但操作复杂,检测时间需要 75 min,时间长,且线性范围(5—80 ng·mL⁻¹)并不适合中国的限量标准(表 8).综合以上分析,本研究所建立的试剂盒更适合目前的中国市场使用.

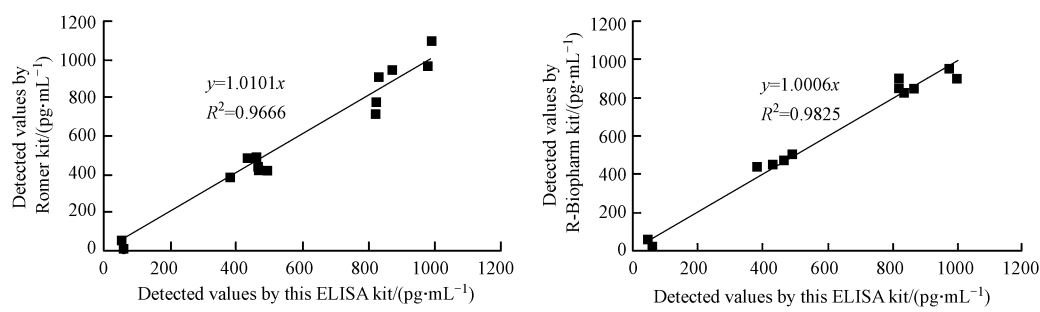


图 6 不同试剂盒检测结果比较图

Fig.6 Comparison of data analyzed by this ELISA kit and other kits

表 8 不同试剂盒参数比较

Table 8 Comparison of this ELISA kit and other kits			
	本研究 This ELISA kit	ROMER 公司试剂盒 ROMER kit	拜发试剂盒 R-Biopharm kit
原奶前处理 Preparation of raw milk	不处理直接检测	4 ℃ 下静置 30 min,3000 g 离心 10 min,取下层奶样 0.4 mL 加 0.1 mL 纯甲醇,混匀,待测	10 ℃ 下 3500 g 离心 10 min,用样品稀释液稀释至合适浓度后检测
奶粉前处理方法 Preparation of milk powder	1 g 样品加 10 mL 50 ℃ 去离子水,溶解后按原奶前处理	1 g 样品加 10 mL 50 ℃ 去离子水,溶解后按原奶前处理	1 g 样品加 10 mL 去离子水,50 ℃ 水浴 30 min,溶解后按原奶前处理
检测时间 Detection time	一抗反应 10 min,加酶标抗原反应 10 min,显色 10 min	反应 20 min,显色 10 min	一抗反应 15 min,加样品后反应 30 min,加酶标抗原反应 15 min,显色 15 min
检测时间总计 Total time	30 min	30 min	75 min
检测范围 Detection range	50—1500 pg·mL ⁻¹	100—2000 pg·mL ⁻¹	5—80 pg·mL ⁻¹
反应条件 Detection temperature	室温	室温	室温

除了在实验室利用加标样品进行试剂盒的对比外,还在某省某奶企进行了试剂盒的现场对比.对方使用德国拜发公司的 AFM₁ 试剂盒,本实验室使用自制的 AFM₁ 试剂盒,连续对比测试 2 d,总共对 51 份原奶、成品奶进行了对比测试.对于拜发试剂盒,奶样按说明书进行离心脱脂后检测,对于自制 AFM₁ 试剂盒,仅需取部分样品恢复至室温后加样,无需离心脱脂(表 8).两个试剂盒的对比结果如图 7 所示,现场测试结果与实验室对比结果类似,两个试剂盒的检测结果基本相同,再次验证本研究中的试剂盒检测结果的准确性.检测结果同时也表明该地区奶中 AFM₁ 污染较为普遍,所有样品全部检出 AFM₁(含量大于 0.05 μg·kg⁻¹),甚至有部分样品检测值已接近 1.0 μg·kg⁻¹,检测结果表明需要继续对该地区奶样中

的 AFM₁ 进行监测,并且需要对奶牛的饲料进行 AFB₁ 的监测及预防.

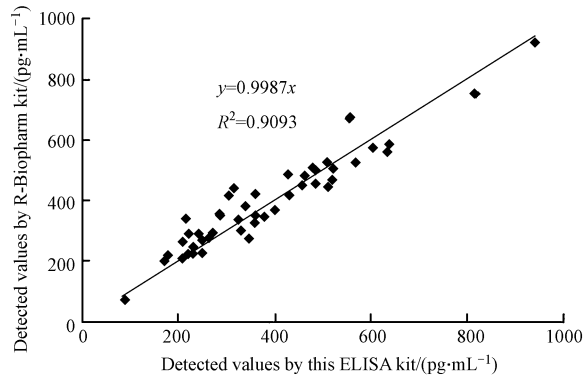


图 7 现场对比测试结果

Fig.7 Comparison of data analyzed by different kits in field test

2.7 储存稳定性

试剂盒在 37 ℃ 环境保存 13 d 后, B_0 值下降至 1.710,相比初始 B_0 值下降 19.4%,但 IC_{50} 值未见明显变化(表 9).按照 37 ℃ 保存 1 d 相当于 4 ℃ 保存 1 个半月的模型计算^[22],理论上试剂盒在 4 ℃ 可以保存 19 个月左右.实际实验中,试剂盒在 2—8 ℃ 保存 13 个月后, B_0 值下降至 1.752,相比初始 OD 值下降 17.5%, IC_{50} 值没有明显变化.因此,试剂盒在 2—8 ℃ 可以至少稳定保存 12 个月.

表 9 储存不同时间后试剂盒 B_0 值及 IC_{50} 值的变化

Table 9 The B_0 and IC_{50} value of the ELISA kit after the storage

4 ℃			37 ℃		
保存时间 Time /month	B_0	$IC_{50}/$ (pg·mL ⁻¹)	保存时间 Time /day	B_0	$IC_{50}/$ (pg·mL ⁻¹)
1	2.122	211	1	2.122	211
3	1.962	200	3	1.933	201
5	1.985	205	5	1.915	200
7	1.862	197	7	1.883	209
9	1.871	201	9	1.862	215
11	1.796	188	11	1.789	203
13	1.752	186	13	1.710	224

3 结论(Conclusion)

通过合成黄曲霉毒素 M₁(AFM₁) 完全抗原并免疫小鼠,获得一株可分泌抗 AFM₁ 抗体的细胞株 2F12.以辣根过氧化物酶(HRP) 标记的 AFB₁ 做为酶标抗原,通过优化抗体包被浓度、酶标抗原浓度、标准品稀释液等试剂盒参数,研制成功了同时能检测液态奶、酸奶和奶粉中 AFM₁ 和 AFB₁ 的 ELISA 试剂盒.该试剂盒的最低检测限(IC_{10}) 为 37 pg·mL⁻¹, IC_{50} 为 211 pg·mL⁻¹,线性范围为 50—1500 pg·mL⁻¹.利用建立的试剂盒对多种样品进行了加标回收实验,样品添加 0.5、1.0 μg·kg⁻¹ 的 AFM₁ 回收率在 87.9%—109.1%之间,批内相对标准偏差在 3.9%—10.8%之间,批间相对标准偏差≤11.1%.对 AFM₁ 和 AFB₁ 标准品的混合加标实验证明,试剂盒可同时检测两种污染物.多次对比试验表明,试剂盒的检测结果与进口商用试剂盒的检测结果相当.因此,本试剂盒可以用于对乳和乳制中黄曲霉毒素 M₁ 和 B₁ 残留的检测.

参考文献(References)

[1] 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) : 28-48.

- [2] 李秉鸿,李筠. 畜禽黄曲霉中毒及去毒研究的概述[J]. 畜牧与兽医, 2001, 33(2): 40-42.
LI B H, LI Y. An overview of the research on the toxicity and detoxification of livestock and poultry[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2001, 33(2): 40-42 (in Chinese).
- [3] International Agency For Research Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins[J]. *IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans*, 1993, 56: 451-489.
- [4] International Agency For Research Cancer. Some mycotoxins, naphthalene and styrene[J]. *IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans*, 2002, 82: 171-300.
- [5] Council for Agricultural Science Technology. Mycotoxins-risks in plant, animal and human systems, Task Force Report, No. 139[R]. Ames, Iowa: 2003.
- [6] European Economic Community Council. Commission regulation (EU) No 165/2010[J]. *Official Journal of European Communities*, 2010, L50: 8-12.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 食品中真菌毒素限量: GB 2761—2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
MINISTRY of HEALTH P R O C. National food safety standards maximum levels of mycotoxins in food: GB 2761—2011 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2011 (in Chinese).
- [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.
LI P W, MA L, YANG J E, et al. A review on analytical methods for aflatoxin B1 in grains and oilseeds products[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2005, 27(2): 77-81 (in Chinese).
- [9] CHU F S, UENO I. Production of antibody against aflatoxin B1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33(5): 1125-1128.
- [10] CHU F S, HSIA M T, SUN P S. Preparation and characterization of aflatoxin B1-1-(O-carboxymethyl) oxime[J]. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1977, 60(4): 791-794.
- [11] CHU F S, FAN T S, ZHANG G S, et al. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B1 in agricultural commodities[J]. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1987, 70(5): 854-857.
- [12] PESTKA J J, LI Y, HARDER W O, et al. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M1 in milk[J]. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1981, 64(2): 294-301.
- [13] THIRUMALA-DEVI K, MAYO M A, HALL A J, et al. Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunoassay for aflatoxin M(1) in milk and milk-based confectionery[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(4): 933-937.
- [14] GUAN D, LI P, ZHANG Q, et al. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk and infant milk products[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(4): 1359-1364.
- [15] 江涛, 俞琼, 李敏, 等. 抗黄曲霉毒素 M1 抗体制备及检测方法建立[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(1): 43-45.
JIANG T, YU Q, LI M, et al. Development of monoclonal antibody against aflatoxin M1 and immunoassay for aflatoxin M1[J]. *Chinese Journal of Public Health*. 2007, 23(1): 43-45 (in Chinese).
- [16] GURBAY A, SABUNCUOGLU S A, GIRGIN G, et al. Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(1): 314-319.
- [17] 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 Q, LI G F, DENG Q M, et al. Development and application of a highly sensitive ELISA kit for aflatoxin B1[J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 34(10): 1845-1853 (in Chinese).
- [18] LI M, LI P, WU H, et al. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for sterigmatocystin in cereal and oil products[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e106415.
- [19] OTIENO P O, OWUOR P O, LALAH J O, et al. Comparative evaluation of ELISA kit and HPLC DAD for the determination of chlorpyrifos ethyl residues in water and sediments[J]. *Talanta*, 2013, 117: 250-257.
- [20] BEATTY J D, BEATTY B G, VLAHOS W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1987, 100(1-2): 173-179.
- [21] GODING J W. *Monoclonal antibodies: Principles and practice: Production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology*[M]. 2 ed. London: Academic Press, 1986.
- [22] DESHPANDE S S. *Enzyme immunoassays: from concept to product development*[M]. Springer Science & Business Media, 1996.