



农产品中黄曲霉毒素产毒菌标识性分子大容量反应体系 提高 ELISA 灵敏度

魏晓^{1,2,4}, 张奇^{1,2,3}, 张文^{1,3,5}, 李慧^{1,2,4}, 李培武^{1,2,3,4,5}

(¹中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; ²农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 武汉 430062; ³农业部生物毒素检测重点实验室, 武汉 430062; ⁴农业部油料产品质量安全风险评估实验室, 武汉 430062; ⁵农业部油料及制品质量监督检验测试中心, 武汉 430062)

摘要:【目的】为预防和降低黄曲霉毒素污染, 在前期探明黄曲霉毒素产毒菌株鉴别标识性分子 P08 蛋白的基础上, 欲研究建立高灵敏、大容量反应体系的双抗夹心 ELISA 检测技术, 为污染源头监控提供技术支撑。【方法】用干菌丝作标识性分子 P08 蛋白的参考物, 以高压均质制得的黄曲霉菌裂解液为检测抗原, 纯化后的 P08-VHH 作包被抗体, 产毒菌株多抗作检测抗体, 抗原、抗体分别以 200 μL /孔加入到 96 孔酶标板, 进行大容量反应体系夹心 ELISA 法的试验。优化相关理化因素, 以阳性孔 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 1.0$, 阳性孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ /阴性孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 较高为原则, 确定最佳试验条件, 建立标准曲线。并通过样品添加回收试验、重复性试验、特异性试验, 对建立的夹心 ELISA 方法进行性能评估。【结果】通过棋盘格试验确定了最佳包被抗体浓度为 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最佳多抗的工作浓度为 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。优化反应条件确定: 最佳抗体包被条件为 4℃ 过夜, 最佳封闭液为 3% 的 BSA, 最佳封闭条件为 37℃ 封闭 2 h, 最佳多抗作用条件为 37℃ 反应 50 min。在优化后的条件下建立了夹心 ELISA 方法的标准曲线, 对黄曲霉菌检测限可达到 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 比前期报道的常规容量反应体系灵敏度提高了约 10 倍。该方法特异性强, 与青霉菌、尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、赭曲霉均无交叉反应, 且检测非产毒黄曲霉菌株信号值较低, 接近于阴性值。重复性试验显示, 板间变异系数为 1.5%—5.8%, 板内变异系数为 0.4%—3.2%, 均小于 7%, 说明该方法稳定性好。采用该方法对花生、玉米等农产品进行添加回收试验, 平均回收率在 81.9%—109.0%。【结论】本研究建立的大容量反应体系夹心 ELISA 方法可快速、高灵敏地检测黄曲霉毒素产毒菌, 为从源头上控制黄曲霉毒素污染提供了新的快速、方便的检测技术支撑。

关键词: 农产品; 黄曲霉菌; 纳米抗体; ELISA; 标识性分子

Improving the Sensitivity of ELISA by Large-Capacity Reaction System of Aflatoxigenic Fungi-Biomarker in Agro-products

WEI Xiao^{1,2,4}, ZHANG Qi^{1,2,3}, ZHANG Wen^{1,3,5}, LI Hui^{1,2,4}, LI PeiWu^{1,2,3,4,5}

(¹Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062; ²Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062; ³Key Laboratory of Detection for Mycotoxins, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062; ⁴Laboratory of Risk Assessment for Oilseeds Products (Wuhan), Ministry of Agriculture, Wuhan 430062; ⁵Quality Inspection and Test Center for Oilseeds Products, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062)

Abstract: 【Objective】In order to prevent and reduce the contamination by *Aspergillus* species from the source, a highly

收稿日期: 2019-08-09; 接受日期: 2019-11-05

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602505)、国家自然科学基金(31801665)、湖北省技术创新专项重大项目(2018ABA081)、湖北省自然科学基金(2017CFB333)

联系方式: 魏晓, Tel: 13163292893; E-mail: 15621567212@163.com. 通信作者张奇, E-mail: zhangqi01@caas.cn

sensitive large-capacity reaction system DAS-ELISA was established, based on the biomarker PO8 protein of aflatoxigenic fungi. This study aimed to provide key technical support for pollution source monitoring. 【Method】In this study, the dry mycelium was used as a reference for the biomarker PO8 protein, the mycelia lysate made by high pressure homogenization was used as envelope antigen, the purified PO8-VHH was used as capture antibody, and rabbit polyclonal antibody against *Aspergillus* was used as detection antibody. The antigen and antibody were added to the 96-well microtiter plate at 200 $\mu\text{L}/\text{well}$, and the sandwich ELISA for the large-capacity reaction system was carried out. Based on the principle that the positive hole $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 1.0$, the positive hole $\text{OD}_{450\text{nm}}/\text{negative hole } \text{OD}_{450\text{nm}}$ was higher to determine the optimal experimental conditions and to establish a standard curve. The performance of the established sandwich ELISA method was evaluated by spike-and-recovery test, repeatability test and specific test.

【Result】Assays were performed in the PO8-VHH ($3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) coated ELISA format, in which the detection antibody was $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ diluted. The optimized physicochemical factors in the performance were obtained: the antibody coating condition was 4°C overnight, the blocking reagent was 3% BSA, the blocking condition was 37°C 2 h, and the polyclonal antibody working time was 50 min. The standard curve was established under the optimal conditions, the minimum detectable limit was $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. This method was specific, with no cross reaction with HBHA, FO, FV, and AO. Meanwhile, the inter-assay repetition rate was 1.5%-5.8% and intra-assay repetition rate was 0.4%-3.2%, both lower than 10%, indicating it was good repeatability. Non-aflatoxigenic fungi had lower values, close to negative value. 【Conclusion】The large-capacity reaction system sandwich ELISA method established in this study could quickly and accurately detect aflatoxigenic fungi, which laid a foundation for further control of aflatoxin contamination from the source.

Key words: agro-products; *Aspergillus flavus*; nanobody; ELISA; biomarker

0 引言

【研究意义】部分黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*A. parasiticus*) 能够产生黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AFT), 它具有强致癌^[1]、致畸、免疫抑制性, 并且毒性强、污染广、危害重, 是人类迄今发现的污染农产品和食品毒性最大、致癌力最强的一类真菌毒素^[2]。黄曲霉菌可侵染大多数农产品, 不仅造成巨大的经济损失, 还严重危害人类和动物的健康^[3]。其中我国的主要油料作物花生受到黄曲霉毒素污染尤为严重, 近年来, 我国出口的花生及其制品常因黄曲霉毒素含量超标, 在国际贸易市场上遭受重大经济损失, 严重影响了我国农产品进出口贸易的健康发展^[4-5]。目前, 黄曲霉毒素检测技术已发展比较成熟^[6], 但是针对的是已经被 AFT 污染的农产品和食品。若能在 AFT 产生之前, 检测到具有潜在产毒能力的黄曲霉菌, 即黄曲霉毒素产毒菌, 从而可以从源头来监控食品安全^[7]。因此, 建立对黄曲霉毒素产毒菌的高灵敏检测方法, 对农产品黄曲霉毒素污染源控制与现代农业产业高质量发展具有重要意义。【前人研究进展】传统的黄曲霉菌检测主要依赖于形态学特征观察和培养基鉴定, 但由于黄曲霉菌种类繁多、形态复杂, 误判率高^[8-9], 现在逐渐用 PCR 方法^[10-12]和免疫学检测方法^[13-16]来取代传统的生化鉴定方法。由于 PCR 检测方法所需仪器、试剂价格较高, 且需要专业的技术人员进行操作, 因此 PCR 检测方法实用性不高^[17]。黄曲霉菌免疫学检测方法是基于

抗体与抗原的特异性相互作用的 ELISA 检测方法, 目前文献报道的真菌 ELISA 检测方法多为双抗体夹心 ELISA 法。包被抗体、抗原和检测抗体形成“夹心式”复合物^[13-14]。双抗夹心 ELISA 方法要求被检测的抗原至少有至少两个以上的结合位点, 这样才可以同时被包被抗体和检测抗体识别。ELISA 检测方法具有灵敏度高、特异性好、筛选通量高、成本低和不依赖昂贵仪器等优点^[18-19]。现有研究用黄曲霉菌的菌丝、细胞分泌物等做抗原免疫兔子制得黄曲霉产毒菌多抗, 并建立 ELISA 方法检测黄曲霉菌, 灵敏度达 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[20-22]。VILLAMIZAR 等^[23]对大米中的黄曲霉菌进行检测, 灵敏度达 $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。也有研究者制备黄曲霉菌单克隆抗体, 利用 ELISA 方法检测黄曲霉菌^[24-26]。XUE 等^[27]对花生中黄曲霉菌的最低检测限可达 $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。【本研究切入点】WANG 等^[7]利用黄曲霉菌表面蛋白、分泌蛋白和胞内蛋白作为抗原免疫羊驼和大耳兔, 成功获得黄曲霉菌的纳米抗体和多抗。经试验证明研制出的 PO8 纳米抗体能够识别黄曲霉和寄生曲霉中的单一条带 (45 kD), 对非曲霉属真菌和细菌没有交叉反应, 并且该蛋白可较为容易地分泌到细胞外, 这使得利用 PO8-VHH 检测黄曲霉毒素产毒菌更加有望成为可能。然而 WANG 等^[7]建立的黄曲霉菌检测方法灵敏度较低 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。【拟解决的关键问题】建立大容量反应体系的夹心 ELISA 检测方法, 富集 PO8 蛋白以提高检测灵敏度, 并优化相关反应条件, 以实现黄曲霉毒素产毒菌的高灵敏和快速精准测定。

1 材料与方法

试验于 2018 年在中国农业科学院油料作物研究所进行。

1.1 材料和试剂

黄曲霉菌株 *A. flavus* 3.4408、黄曲霉菌 PO8 纳米抗体、菌多抗均为本实验室保存, 花生、玉米购于武汉中百超市, DNA marker 购于宝生物工程有限公司, BSA 购于美国 Sigma 公司, HRP 标记羊抗兔 IgG 购于武汉博士德生物公司, X-Tractor 细胞裂解液、HisPur 镍柱 NTA 树脂购于美国 Clontech 公司, HRP 标记抗 HA 标签鼠单抗购于北京康为世纪有限公司, 氨基青霉素钠盐 (Amp) 购于美国 Amresco 公司。

1.2 仪器与设备

恒温培养箱、恒温摇床购于美国 Thermo Fisher 公司, 高压均质机 ATS1500 购于加拿大 ATS 公司, 水平凝胶电泳仪、凝胶成像分析系统购于北京六一仪器厂, 酶标仪购于美国分子仪器公司, 全自动洗板机、96 孔酶标板购于美国 Costar 公司。

1.3 抗原的制备

将黄曲霉菌的干菌丝作为标识性分子 PO8 蛋白的参考物质。将黄曲霉菌 3.4408 的孢子液加至 Czapek 培养基中, 使终浓度为 5×10^5 cfu/mL, 于 28℃ 摇床培养 5 d 后, 用灭菌滤纸过滤收集菌丝, 并用液氮充分研磨至粉末溶解在 PBS 中, 随后用高压均质仪充分裂解黄曲霉菌菌丝, 制得黄曲霉菌裂解液作为抗原, 抗原浓度以菌丝量计。

1.4 PO8 纳米抗体的纯化与验证

将 pComb3x-PO8/Top10F 在 LB-Amp 固体培养基上进行活化。从平板上挑单克隆接种到 SB-Amp 液体培养基中扩大培养, 37℃ 恒温摇床振荡培养至菌液 OD_{600nm} 为 0.6—0.8, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ IPTG 溶液。次日, $3000 \times g$ 离心 30 min, 弃上清液收集菌体, 将菌体用细胞裂解液裂解, 收集上清用 PBS ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 缓冲液透析过夜。将透析后的溶液离心以去除细胞碎片, 取上清液通过镍柱纯化。用 SDS-PAGE 电泳对各流出液进行分析, 混合纯的纳米抗体流出液, 用 PBS 缓冲液透析过夜, 超滤浓缩透析液, 最后用考马斯亮蓝法测其浓度, 分装储存于 -20℃^[28]。将黄曲霉菌裂解液梯度稀释至 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10、 10^2 、 10^3 和 $10^4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 包被酶标板, 用间接 ELISA 方法测定纯化后的纳米抗体亲和力。

1.5 包被抗体和检测抗体工作浓度设置

将纯化后的 PO8-VHH 分别以 3、2、1 和 0.5

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 96 孔酶标板, 并设置 5 个重复孔, 包被量为每孔 200 μL , 4℃ 包被过夜。次日, 用 PBST 洗板 3 次。随后加入 3% BSA 作为封闭液, 每孔 300 μL , 37℃ 条件下封闭 2 h。取出后, 用 PBST 洗板 3 次。将黄曲霉菌裂解液稀释至 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以 200 μL 每孔加入酶标板, 37℃ 反应 1 h。取出后用 PBST 洗板 3 次。用兔多抗做检测抗体, 将菌多抗用 PBS 分别稀释至 4、3、2.5、2、1.5、1 和 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分别以 200 μL 每孔加入酶标板, 37℃ 反应 50 min。取出后, 用 PBST 洗板 3 次。每孔加入 200 μL HRP 标记的羊抗兔抗体 (1:5000), 37℃ 反应 1 h。取出后用 PBST 洗板 6 次。最后每孔加入 100 μL 的 TMB 显色液, 37℃ 避光反应 15 min 后加入终止液终止反应, 立即于酶标仪上读取 OD_{450nm} 值。

1.6 抗体包被条件设置

采用确定的抗体包被浓度和多抗稀释度, 分别以 37℃ 2 h, 37℃ 1 h, 4℃ 12 h 共 3 种不同的条件包被 PO8 纳米抗体, 用夹心 ELISA 方法测定 OD_{450nm}, 并分析 P/N 值, 确定最佳抗体包被条件。

1.7 封闭液设置

分别在 37℃ 以 5% 脱脂奶粉、3% 脱脂奶粉、3% BSA 共 3 种封闭液进行封闭, 其他条件不变, 进行夹心 ELISA 方法测定 OD_{450nm}, 分析 P/N 值, 确定最佳封闭液。

1.8 封闭时间处理

分别以 37℃ 3 h、37℃ 2 h、37℃ 1 h 三种不同条件进行封闭, 其他条件不变, 夹心 ELISA 方法测定 OD_{450nm}, 并分析 P/N 值, 确定最佳封闭时间。

1.9 多抗工作时间的确定

将多抗分别在 37℃ 条件下分别作用 30、50 和 60 min, 夹心 ELISA 方法测定 OD_{450nm}, 分析 P/N 值, 确定最佳多抗工作时间。

1.10 夹心 ELISA 方法标准曲线的绘制

按照已确定的条件, 将黄曲霉菌裂解液梯度稀释至 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10、 10^2 、 10^3 和 $10^4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以 200 μL /孔加入酶标板, 用夹心 ELISA 法测定 OD_{450nm} 值。以黄曲霉菌裂解液浓度为横坐标, 以 OD_{450nm} 值为纵坐标, 绘制标准曲线。ELISA 检测的标准曲线可通过下面的公式进行拟合:

$$OD_{450nm} = B = B_{min} + \frac{B_{max} - B_{min}}{1 + (C / EC_{50})^k}$$

式中, B 为实际测定的结合反应吸光度值, B_{min} 为最小吸光度值, B_{max} 为最大吸光度值, C 为测定浓度,

EC_{50} 为半最大效应浓度, k 为斜率。

1.11 夹心 ELISA 方法特异性的建立

用 1.3 的方法制备青霉菌 (HBHA)、尖孢镰刀菌 (FO)、串珠镰刀菌 (FV)、赭曲霉 (AO) 细胞裂解液。用优化的反应条件建立的夹心 ELISA 方法, 检测青霉菌、尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、赭曲霉细胞裂解液, PBS 作为阴性对照, 每组设置 5 个重复, 检验该方法的特异性。

用从江西、湖北等地采集的黄曲霉菌株 (5 种产毒菌株和 5 种不产毒菌株) 分别接种健康、无霉变的花生, 15 d 后将被菌侵染后的花生粉碎, 称取适量花生粉末悬浮于 PBS 缓冲液中。将样品稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 包被 ELISA 板, 用建立的 ELISA 方法进行测定, 以检测该方法与不产毒的黄曲霉菌是否有交叉反应。

1.12 重复性试验

用同批次包被的 ELISA 板分别检测 4 份阳性样品和 1 份阴性样品, 并设置 5 个重复计算批内变异系数。用不同批次包被的 ELISA 板同时检测 4 份阳性样品和 1 份阴性样品, 计算批间变异系数, 评价该方法的重复性。变异系数 $CV (\%) = \text{标准偏差} / \text{平均值} \times 100$ 。

1.13 添加回收率测定

将健康 (表皮完整、无霉菌) 的花生、玉米粉碎, 称取 0.1 g 加入到 10 mL PBST 缓冲液中悬浮, 添加不同浓度的黄曲霉菌裂解液 (100 、 10 和 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 取 $200 \mu\text{L}$ 加入酶标板, 通过 ELISA 方法计算回收率。

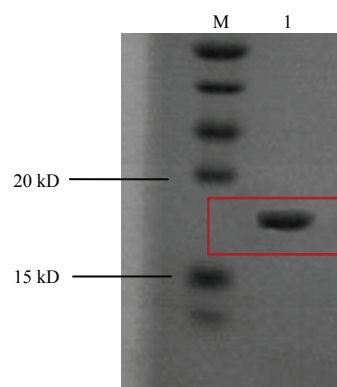
2 结果

2.1 黄曲霉菌 PO8-VHH 的纯化鉴定

将纯化后的 PO8-VHH 进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 1 所示, PO8-VHH 分子量约为 17 kD , 与预期大小相符, 且条带单一。用考马斯亮蓝法测蛋白浓度为 $550 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明纯化效果良好。用间接 ELISA 方法鉴定纯化的 PO8-VHH 与制得的黄曲霉菌裂解液的结合力如图 2 所示, PO8-VHH ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 可最低识别到 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄曲霉菌丝。

2.2 包被抗体和检测抗体最佳工作浓度

棋盘法确定最佳 VHH 包被浓度和菌多抗工作浓度 (表 1)。抗体工作浓度的选择应遵循以下两个原则: ① $OD_{450\text{nm}}$ 值接近于 1.0 ; ② 抗体用量少为佳; 根据表 1 中结果可确定最佳 VHH 包被量为 $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最佳多抗工作浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



M: 蛋白分子量标准 Protein Marker; 1: PO8-VHH

图 1 纯化后纳米抗体 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis analysis of purified Nanobodies

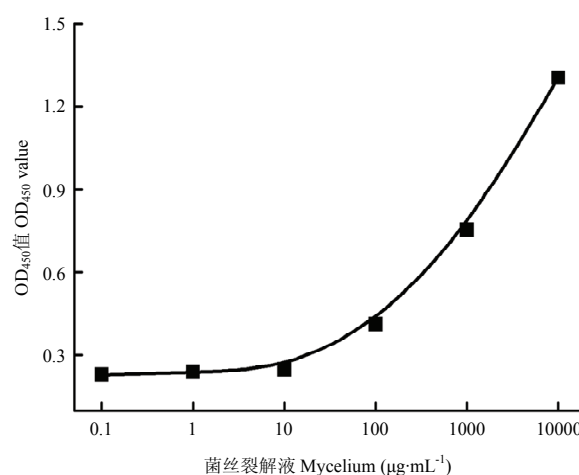


图 2 纳米抗体与黄曲霉菌的亲合力分析

Fig. 2 Sensitivity of PO8-VHH determined with different concentrations of *A. flavus*

2.3 抗体包被条件的确定

抗体包被条件的不同会对 ELISA 反应产生影响, 测定结果见图 3, 4°C 包被过夜条件下 P (阳性值) / N (阴性值) 值平均数最大且 P 值大于 1.0 , 因此, 4°C 过夜为最佳抗体包被条件。

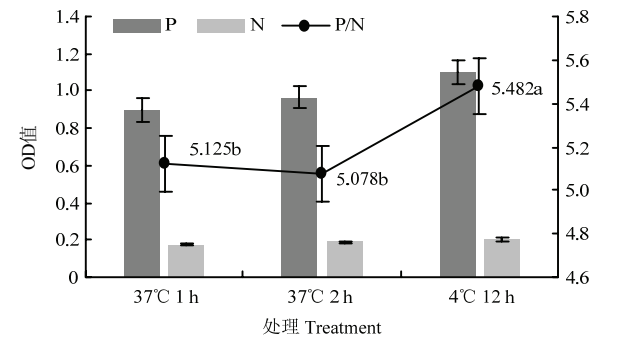
2.4 最佳封闭液的确定

封闭试剂的选择能够影响 ELISA 的非特异性吸附, 从而影响 ELISA 的灵敏度。因为用纳米抗体作包被抗体易出现假阳性, 因此本试验加大了封闭液的浓度。由图 4 可知, 3% BSA 封闭液的 P/N 值最高, 为最佳封闭液。

表 1 不同浓度包被抗体和多抗 ELISA 结果

Table 1 The optimum antibody coating concentration and the best dilution of the polyclonal antibody

| 包被抗体稀释度 Antibody coating dilution (μg·mL ⁻¹) | 多抗稀释度 Polyclonal antibody concentration (μg·mL ⁻¹) | | | | | | |
|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 4 | 3 | 2.5 | 2 | 1.5 | 1 | 0.5 |
| 0.5 | 1.4758 | 0.8651 | 0.5182 | 0.3603 | 0.3344 | 0.227 | 0.2148 |
| 1 | 1.5511 | 0.8667 | 0.5633 | 0.4631 | 0.3676 | 0.3353 | 0.2937 |
| 2 | 1.5714 | 0.9132 | 0.6063 | 0.4855 | 0.3974 | 0.3598 | 0.2949 |
| 3 | 1.8485 | 1.3707 | 1.0641 | 0.7815 | 0.5402 | 0.3655 | 0.3570 |



图中不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$)。下同
Different lowercase letters in the figure indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$). The same as below

图 3 不同抗体包被时间的 P/N 值

Fig. 3 The specific value in different coating time

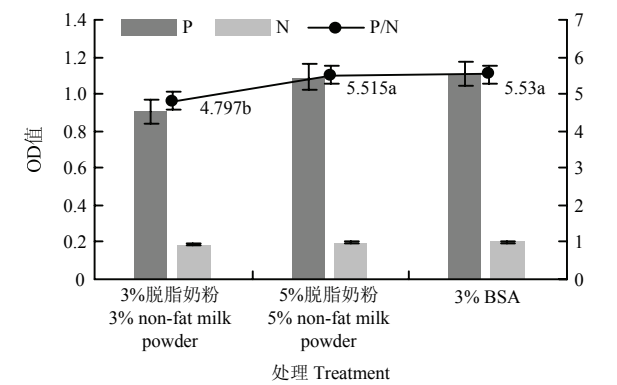


图 4 不同封闭液的 P/N 值

Fig. 4 The specific value in different blocking solution

2.5 最佳封闭时间的确定

如图 5 所示,在 37°C 封闭 2 h 条件下 P/N 值最高,且 $\text{OD}_{450\text{nm}}>1.0$, 所以 2 h 为最佳封闭时间。

2.6 最佳多抗作用时间的确定

由图 6 可知,在 37°C 反应 50 min 条件下 P/N 值

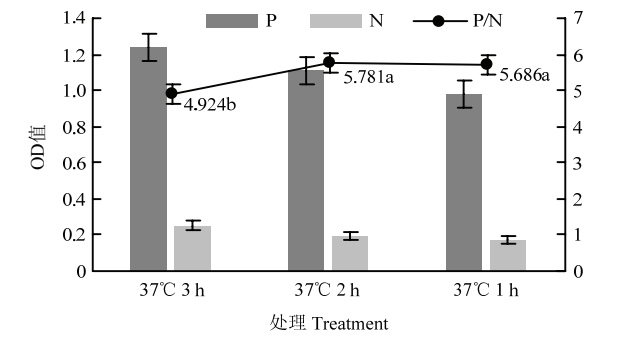


图 5 不同封闭时间的 P/N 值

Fig. 5 The specific value in different blocking time

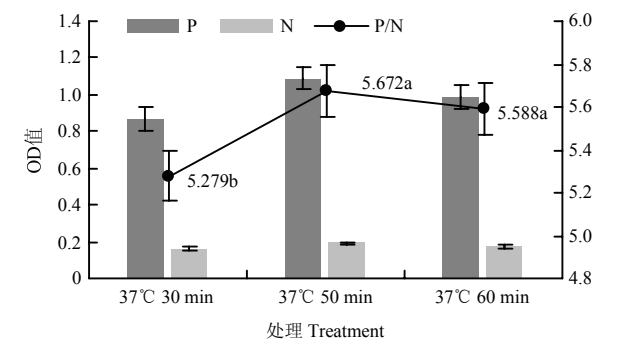


图 6 不同多抗工作时间的 P/N 值

Fig. 6 The specific value in different polyclonal antibody working time

最高,且 $\text{OD}_{450\text{nm}}>1.0$, 为最佳多抗作用时间。

2.7 夹心 ELISA 方法标准曲线的绘制

建立的该大容量反应体系夹心 ELISA 方法对黄曲霉菌检测限可达到 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。黄曲霉菌干菌丝浓度的对数值与 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值之间进行非线性拟合,相关系数较高 ($R^2>0.99$) (图 7), 表明建立的标准曲线准确度较高。

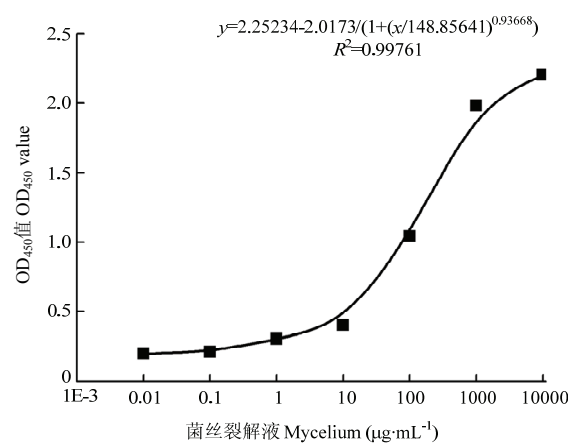


图 7 大容量反应体系夹心 ELISA 方法标准曲线

Fig. 7 Standard curve of sandwich ELISA method for large-capacity reaction system

2.8 夹心 ELISA 方法特异性的确定

用优化后的双抗体夹心 ELISA 方法检测青霉菌（HBHA）、尖孢镰刀菌（FO）、串珠镰刀菌（FV）、赭曲霉菌（AO），结果均无交叉反应，阴、阳性均成立（表 2）。用建立的 ELISA 方法分别检测被产毒菌株和非产毒菌株侵染的花生材料，结果显示，非产毒黄曲霉菌株的信号值较低，接近于阴性值（表 3）。表明建立的大容量夹心 ELISA 方法具有良好的特异性。

2.9 重复性试验

用优化后的双抗体夹心 ELISA 方法对板内、板间重复性进行验证。分别检测 5 份不同样品的 OD 值，并计算其变异系数。结果如表 3、表 4 所示，板间变异系数为 1.5%—5.8%，板内变异系数为 0.4%—3.2%，均小于 7%，说明建立的大容量夹心 ELISA 检测方法具有一定的稳定性。

2.10 添加回收率试验

为评估新建立的黄曲霉毒素产毒菌标识性分子的大容量反应体系 ELISA 检测方法在样品分析中的有效性，对易染黄曲霉的花生、玉米进行黄曲霉菌丝加

表 2 特异性试验结果

Table 2 Results of specificity test

| 项目 Project | 检测样品 Test sample | | | | | |
|---------------------|------------------|----------|-------|-------|-------|-------|
| | 阳性 | 阴性 | HBHA | FO | FV | AO |
| | Positive | Negative | | | | |
| OD _{450nm} | 1.043 | 0.179 | 0.172 | 0.221 | 0.176 | 0.169 |

表 3 ELISA 检测被黄曲霉菌污染的花生

Table 3 ELISA for detecting *Aspergillus*-contaminated peanut samples

| 组别 Sample number | OD _{450nm} 值 OD _{450nm} value | AFB ₁ 的含量 Concentration of AFB ₁ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) |
|---------------------|--|--|
| 1 | 0.201 | 0.000 |
| 2 | 0.202 | 0.000 |
| 3 | 0.209 | 0.000 |
| 4 | 0.199 | 0.000 |
| 5 | 0.193 | 0.000 |
| 6 | 0.389 | 1237.053 |
| 7 | 0.417 | 2294.187 |
| 8 | 0.388 | 3135.416 |
| 9 | 0.470 | 4212.220 |
| 10 | 0.466 | 5434.766 |

表 3 板间重复性

Table 3 Inter-assay repeatability

| 组别 Sample number | 平均值 Average value | 标准差 Standard deviation | 变异系数 Variation coefficient (%) |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 阳性 1 Positive1 | 1.975 | 0.033 | 1.6 |
| 阳性 2 Positive2 | 1.043 | 0.047 | 4.5 |
| 阳性 3 Positive3 | 0.581 | 0.015 | 2.6 |
| 阳性 4 Positive4 | 0.523 | 0.008 | 1.5 |
| 阴性 5 Negative5 | 0.188 | 0.011 | 5.8 |

表 4 板内重复性

Table 4 Intra-assay repeatability

| 组别 Sample number | 平均值 Average value | 标准差 Standard deviation | 变异系数 Variation coefficient (%) |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 阳性 1 Positive1 | 1.725 | 0.006 | 0.4 |
| 阳性 2 Positive2 | 1.069 | 0.012 | 1.2 |
| 阳性 3 Positive3 | 0.585 | 0.019 | 3.2 |
| 阳性 4 Positive4 | 0.532 | 0.014 | 2.6 |
| 阴性 5 Negative5 | 0.184 | 0.004 | 2.0 |

标和回收研究试验。本试验的模拟样本中，菌丝的添加浓度分别为 100、10 和 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，用已建立并优化的方法检测，结果如表 5 所示，样品中黄曲霉菌丝的平均回收率在 81.9%—109.0%，符合一般情况。

3 讨论

黄曲霉菌侵染花生、玉米等经济作物，造成重大

表 5 添加样品回收率

Table 5 The detection results of analog samples

| 样品 Sample | 添加量 Dosage ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 检出浓度 Detection concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 回收率 Rate of recovery (%) |
|--------------|---|---|--------------------------------|
| 花生 Peanut | 100 | 107.32±3.20 | 107.32 |
| | 10 | 8.19±1.08 | 81.90 |
| | 1 | 0.97±0.12 | 97.00 |
| 玉米 Corn | 100 | 105.55±3.80 | 105.55 |
| | 10 | 9.6±0.98 | 96.00 |
| | 1 | 1.09±0.13 | 109.00 |

结果为 3 d 间测定结果的平均值 The result is the average value of 3 days

的经济损失，其产生的黄曲霉毒素属于 I 类致癌物，严重危害人和动物的健康^[29-30]，因此针对黄曲霉毒素以及产毒菌的检测已成为近年来的发展热点。目前，针对黄曲霉毒素的检测方法已比较成熟，如黄曲霉毒素免疫亲和检测技术，灵敏度可达 0.003—0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[31-34]，我国自主研发的黄曲霉毒素单光谱成像检测仪，灵敏度最高可达 0.03 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。但是目前针对黄曲霉毒素产毒菌的检测发展比较缓慢，黄曲霉菌免疫学检测方法主要是基于多抗、单抗等传统抗体建立的 ELISA 检测方法，传统抗体存在均一性差、特异性差、生产周期较长等缺点。笔者实验室用黄曲霉菌表面蛋白、分泌蛋白和胞内蛋白作为抗原免疫羊驼率先制备了针对黄曲霉菌的纳米抗体，具有特异性强、亲和力和溶解度高、稳定性好等优点^[35-39]，为黄曲霉毒素产毒菌的检测提供了关键技术支持。WANG 等^[7]建立的夹心 ELISA 检测方法灵敏度较低，且未对其建立的方法进行性能评估。本研究针对其不足，研究建立了大容量反应体系的纳米抗体-多抗夹心 ELISA 检测方法，加大抗原的用量富集黄曲霉菌标识性分子 PO8 蛋白以提高检测灵敏度，并优化相关理化条件，使该方法能够以低至 $10^{-1} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度检测到黄曲霉菌，与王婷的检测限（1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）相比，灵敏度提高了 10 倍。并对易感染黄曲霉菌的花生、玉米进行加标回收试验，证明该方法可应用于实际农产品中黄曲霉菌的检测与分析。

不同的黄曲霉菌株产毒力有差别，现有的检测方法大多需要培养黄曲霉菌若干天才能检测毒素，这样一方面浪费时间，另一方面容易产生误差，所以需要研究一种快速鉴别菌株产毒力的方法。本研究用纳米抗体作捕获抗体的灵敏度未及 XUE 等^[27]用

单链抗体作捕获抗体的灵敏度。但纳米抗体分子量（15 kD）明显小于单链抗体（25 kD），不易聚集且更加稳定^[40-41]，这对于利用纳米抗体建立黄曲霉分子预警技术具有重要意义。

4 结论

本研究采用黄曲霉菌干菌丝作为抗原，黄曲霉毒素产毒菌标识性分子 PO8 蛋白的纳米抗体作为捕获抗体，菌多抗作为检测抗体，通过增大免疫反应体系容量和优化系列反应条件，研究建立了一种大容量反应体系的夹心 ELISA 检测方法，对黄曲霉菌的检测限可达 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，灵敏度比前期报道的常规反应容量方法提高了约 10 倍。因此，本研究建立的检测方法具有灵敏度高、特异性强、重复性好的特点，为从源头上控制农产品黄曲霉毒素污染提供了关键方法。

References

[1] CAVALIERE C, FOGLIA P, GUARINO C, NAZZARI M, SAMPERI R, LAGANA A. A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2007, 21: 550-556.

[2] ELLIS W O, SMITH J P, SIMPSON B K, OLDHAM J H. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1991, 30: 403-439.

[3] CANDISH A A G, WIBOWO M S, SMITH J E. Immunoassay identification of *Aspergillus flavus* using monoclonal antibodies raised to the whole cell extracts. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(1): 21-24.

[4] ARDIC M, KARAKAYA Y, ATASEVER M, DURMAZ H. Determination of aflatoxin B₁ levels in deep-red ground pepper using immunoaffinity column combined with ELISA. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(5): 1596-1599.

[5] DING X X, LI P W, BAI Y Z, ZHOU H Y. Aflatoxin B₁ in post-harvest peanuts and dietary risk in China. *Food Control*, 2012, 23(1): 143-148.

[6] 张奇, 李培武, 陈小媚, 周海燕, 印南日, 甘冬生. 黄曲霉毒素免疫检测技术研究进展. *农产品质量与安全*, 2013, 63(3): 42-46.

ZANG Q, LI P W, CHEN X M, ZHOU H Y, YIN N R, GAN D S. Advances in research on aflatoxin immunoassay. *Quality and Safety of Agro-Products*, 2013, 63(3): 42-46. (in Chinese)

[7] WANG T, LI P W, ZHANG Q, ZHANG W, ZHANG Z W, WANG T,

- HE T. Determination of *Aspergillus* pathogens in agricultural products by a specific nanobody-polyclonal antibody sandwich ELISA. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4348.
- [8] 于淑玲. 真菌的分子生物学鉴定方法. 邢台师范高专学报, 2002, 17(4): 64-65.
- YU S L. How to discern fungi in molecule biology. *Journal of Xingtai University*, 2002, 17(4): 64-65. (in Chinese)
- [9] 王琢, 闫培生. 真菌毒素产生菌的分子鉴定研究进展. 中国农业科技导报, 2010, 12(5): 42-50.
- WANG Z, YAN P S. Research progress on molecular identification of mycotoxin-producing fungi. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(5): 42-50. (in Chinese)
- [10] GEISEN R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and stigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology*, 1996, 19(3): 388-392.
- [11] CRISEO G, BAGNARA A, BISIGNANO G. Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(4): 291-295.
- [12] SOMASHEKAR D, RATI E R, ANAND S, CHANDRASHEKAR A. Isolation, enumeration and PCR characterization of aflatoxigenic fungi from food and feed samples in India. *Food Microbiology*, 2004, 21(6): 809-813.
- [13] DE RUITER G A, HOOPMAN T, AFWANDER L, NOTERMANS S H W, NOUT M J R. Immunochemical detection of Mucorales species in foods. *Monthly Weather Review*, 1992, 84(9): 229-234.
- [14] YONG R K, COUSIN M A. Nonspecific enzyme-linked immunosorbent assay for molds in foods. *Journal of Food Science*, 1995, 60(6): 1357-1363.
- [15] TSAI G J, COUSIN M A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in cheese and yogurt. *Journal of Dairy Science*, 1990, 73(12): 3366-3378.
- [16] VAN DER HORST M, SAMSON R A, KARMAN H. Comparison of two commercial kits to detect moulds by latex agglutination. *Developments in Food Science*, 1992, 31: 241-245.
- [17] PASSONE M A, ROSSO L C, CIANCIO A, ETCHEVERRY M. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 138(3): 276-281.
- [18] NOTERMANS S, HEUVELMAN C J, VAN EGMOND H P, PAULSCH W E, BESLING J R. Detection of mold in food by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Food Protection*, 1986, 49(10): 786-791.
- [19] CROWTHER J R. *The ELISA Guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2009.
- [20] YONG R K, COUSIN M A. Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 65(1/2): 27-38.
- [21] TSAI G J, YU S C. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, 1997, 60(8): 978-984.
- [22] TSAI G J, YU S C. Detecting *Aspergillus parasiticus* in cereals by an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 50(3): 181-189.
- [23] VILLAMIZAR R A, MAROTO A, RIUS F X. Rapid detection of *Aspergillus flavus* in rice using biofunctionalized carbon nanotube field effect transistors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(1): 119-126.
- [24] PARK J W, SHON D H, KIM Y B. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting mould contamination in agricultural commodities and comparison with conventional assays. *Food and Agricultural Immunology*, 2003, 15(3/4): 159-166.
- [25] CANDLISH A A G, WIBOWO M S, SMITH J E. Immunoassay identification of *Aspergillus flavus* using monoclonal antibodies raised to the whole cell extracts. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(1): 21-24.
- [26] KWARK B Y, SHON D H, KWON B J, KWEON C H, LEE K H. Detection of *Aspergillus* and *Penicillium* genera by enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001, 11(1): 21-28.
- [27] XUE S, LI H P, ZHANG J B, LIU J L, HU Z Q, HUANG T, LIAO Y C. Chicken single-chain antibody fused to alkaline phosphatase detects *Aspergillus* pathogens and their presence in natural samples by direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(22): 10992-10999.
- [28] ZHANG C X, ZHANG Q, TANG X Q, ZHANG W. Development of an anti-Idiotypic VHH antibody and toxin-free enzyme immunoassay for ochratoxin A in cereals. *Toxins*, 2019, 11(5): 280.
- [29] RUSHING B R, SELIM M I. Aflatoxin B₁: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupation exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 124: 81-100.
- [30] 解伟, 郭冉, 夏辉, 王小瑞, 李赵嘉, 李垚垚, 王美雪, 沈庆洲. 黄曲霉毒素 B₁ 对凡纳滨对虾幼虾肝胰腺抗氧化酶的损伤机制. 水产学报, 2017, 41(3): 448-455.
- XIE W, GUO R, XIA H, WANG X R, LI Z J, L G G, WANG M X, SHEN Q Z. Damage mechanism of aflatoxin B₁ on antioxidant

- enzyme in hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 448-455. (in Chinese)
- [31] 马良, 李培武, 张文. 高效液相色谱法对农产品中黄曲霉毒素的测定研究. *分析测试学报*, 2007, 26(6): 774-778.
- MA L, LI P W, ZHANG W. Determination of aflatoxins in agricultural products by high performance liquid chromatography. *Journal of Instrumental Analysis*, 2007, 26(6): 774-778. (in Chinese)
- [32] 马良, 张宇昊, 李培武. LIF-HPCE 法检测食品中的黄曲霉毒素 B1. *食品科学*, 2009, 30(10): 135-139.
- MA L, ZHANG Y H, LI P W. Determination of aflatoxin B1 in food by laser induced Fluorescence-High performance capillary electrophoresis. *Food Science*, 2009, 30(10): 135-139. (in Chinese)
- [33] 王秀媛, 李培武, 杨扬, 张文, 张奇, 范素芳, 喻理, 王琳, 陈小媚, 李英, 姜俊. 液相色谱-三重串联四极杆质谱测定粮油中的黄曲霉毒素. *色谱*, 2011, 29(6): 517-522.
- WANG X P, LI P W, YANG Y, ZHANG W, ZHANG Q, FAN S F, YU L, WANG L, CHEN X M, LI Y, JIANG J. Determination of aflatoxins in cereals and oils by liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 2011, 29(6): 517-522. (in Chinese)
- [34] 范素芳, 李培武, 王秀媛, 丁晓霞, 张文, 张奇. 高效液相色谱和高效液相色谱-离子阱质谱测定花生、玉米和大米中黄曲霉毒素方法比较. *食品科学*, 2011, 32(12): 254-258.
- FAN S F, LI P W, WANG X P, DING X X, ZHANG W, ZHANG Q. Comparison on determination of aflatoxins in peanut, corn and rice by liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Science*, 2011, 32(12): 254-258. (in Chinese)
- [35] MUYLDERMANS S, BARAL T N, RETAMOZZO V C, DE BAETSELIER P, DE GENST E, KINNE J, LEONHARDT H, MAGEZ S, NGUYEN V K, REVETS H. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 128(1-3): 178-183.
- [36] NGUYEN V K, DESMYTER A, MUYLDERMANS S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Advances in Immunology*, 2001, 79(1): 261-296.
- [37] MAASS D R, SEPULVEDA J, PERNTNER A, SHOEMAKER C B. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *Journal of Immunological Methods*, 2007, 324(1/2): 13-25.
- [38] 潘欣, 蔡家麟, 王颖. 单域重链抗体的分子特征. *生物技术通讯*, 2012(5): 741-745.
- PAN X, CAI J L, WANG Y. Molecular characterization of single domain heavy chain antibody. *Letters in Biotechnology*, 2012(5): 741-745. (in Chinese)
- [39] BROISAT A, HERNOT S, TOCZEK J, DE VOS J, RIOU L M, MARTIN S, AHMADI M, THIELENS N, WERNERY U, CAVELIERS V, MUYLDERMANS S, LAHOUTTE T, FAGRET D, GHEZZI C, DEVOOGDT N. Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circulation Research*, 2012, 110(7): 927-937.
- [40] WÖRN A, PLÜCKTHUN A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(5): 989-1010.
- [41] ABULROB A, SPRONG H, VAN BERGEN EN HENEGOUWEN P, STANIMIROVIC D. The blood-brain barrier transmutating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 95(4): 1201-1214.

(责任编辑 赵伶俐)