

分类号：
密 级：

单位代码：10433
学 号：19403020076

山东理工大学

硕士学位论文

农产品中黄曲霉毒素和伏马毒素免疫
快速检测方法研究

Study on rapid immunoassay for aflatoxin and fumonisins
in agricultural products

研 究 生： 查传云

指 导 教 师： 杨青青（副教授）

申请学位门类级别： 工学硕士

学 科 专 业 名 称： 食品科学与工程

研 究 方 向： 食品质量与安全

论 文 完 成 日 期： 2022年3月17号

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得山东理工大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 

时间： 2022年 6月7日


关于论文使用授权的说明

本人完全了解山东理工大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅；学校可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名： 

时间： 2022年 6月7日

导师签名： 

时间： 2022年 6月7日

摘要

由于黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 和伏马毒素 B₁ (Fumonisin B₁, FB₁) 毒性大, 广泛污染玉米, 难以防控, 因此, 快速灵敏的检测方法是防止已经污染的农产品进入食物链的重要手段。近年来, 市售的 ELISA 试剂盒和试纸条产品由于高特异性强和高灵敏度, 广泛用于高通量检测。然而 ELISA 的准确性和稳定性受许多因素影响; 试纸条通常基于单抗标记, 其信号放大作用有限, 易造成假阴性从而影响检测结果准确性。目前, 单抗 (monoclonal antibody, mAb) 是成功构建上述方法的关键试剂, 其主要通过筛选阳性杂交瘤细胞分泌而得, 因而, 杂交瘤细胞的筛选过程主要影响到制备的单抗质量, 进而影响到所构建的免疫分析方法的性能。因此, 针对严重污染玉米的 AFB₁ 和 FB₁, 以及目前市售免疫检测产品的局限性, 本课题的主要研究成果如下:

(1) 有限稀释亚克隆次数对 AFB₁ 单抗制备的影响: 经 PEG 法进行细胞融合制备杂交瘤细胞, 采用 ELISA 结合不同浓度的标准品筛选阳性株, 并采用有限稀释法对其进行 10 次亚克隆。结果表明, 高浓度的 AFB₁ 标准品筛选可能有利于富集保留阳性细胞株, 随着亚克隆次数的增加, 细胞阳性率和单抗抑制率逐渐增加, 然而当亚克隆次数超过 7 次时, 阳性细胞株生长繁殖缓慢, 检测周期变长, 且单抗的抑制率几乎不变甚至降低。此外, 对最终得到的杂交瘤细胞株 ZFG8 分泌的单抗进行评价和可变区基因和氨基酸序列分析, 其半抑制浓度 (IC₅₀) 为 1.1539 ng/mL, 检测范围 (IC₂₀-IC₈₀) 为 0.2829-4.7073 ng/mL, 对其他黄曲霉毒素的最大交叉反应率为 0.73%。

(2) 构建 ELISA 以高通量检测玉米粉中的 AFB₁: 为提高 ELISA 的准确性和稳定性, 收集市售和实验室抗原抗体, 研究了来自不同厂家的抗原抗体组合对 ELISA 的效价和灵敏度的影响。在最优的工作条件下, 建立了 ELISA 以高通量检测玉米粉中的 AFB₁。结果表明, 在玉米粉基质中, 该方法的 IC₅₀ 为 0.1625 ng/mL, 线性检测范围为 0.0195-2.5 ng/mL (相当于玉米样品的 0.2343-30 μg/kg), 玉米粉基质的线性拟合方程为 $Y = -0.4051X + 0.2978$ ($R_{adj}^2 = 0.9821$)。此外, 该方法可以特异性识别 AFB₁, 加标回收率为 81.13%-96.94%, 相对标准偏差均 ≤ 9.14%, 在 1 份玉米粉标准物质 (GBW

(E) 100386) 和 3 份市售玉米粉实际样品的检测结果中, 所建立的 ELISA 与 HPLC 具有高度的一致性。这些表明该方法灵敏度、特异性和准确性较高, 可以满足玉米粉中 AFB₁ 的高通量检测。

(3) 基于间接信号放大策略的 LFI 快速定量检测 FB₁: 为放大检测信号, 保护单抗活性, 提高检测结果准确性, 以镧荧光纳米颗粒标记羊抗鼠 IgG 以制备通用检测探针 (羊抗鼠 IgG@Eu), 在最优条件下, 构建了基于间接信号放大策略的免疫层析试纸条检测玉米中的 FB₁。该方法可以特异性地识别 FB₁, 在玉米中的检测限为 0.025 ng/mL (基于样品重量为 0.50 ng/g), 检测范围约为 1-50 ng/mL (根据样品重量为 20-1000 ng/g); 加标回收率为 82.50-115.08%, 相对标准偏差 ≤ 6.06%。将其应用于玉米样品的实际检测中, 所建立的方法与 HPLC-MS/MS 具有高度的一致性。这些表明该方法具有极高的灵敏度、良好的特异性、精确性和准确性, 可以用于玉米中 FB₁ 的现场快速筛查。

综上所述, 以上研究为杂交瘤细胞筛选、单抗制备和抗原抗体的选择提供了一定的参考价值, 所建立的 ELISA 和 LFI 在一定程度上可以克服市售产品的局限性, 并满足玉米样品的现场高通量检测需求, 这为构建其他免疫分析方法提供了一定的理论和实践支持。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 伏马毒素 B₁; 亚克隆次数; 单抗制备; ELISA; 侧流免疫分析

Abstract

Aflatoxin B₁ (AFB₁) and Fumonisin B₁ (FB₁) widely contaminating corn are highly toxic and difficult to control, thus, rapid and sensitive detection methods are important to prevent contaminated agricultural products from entering the food chain. In recent years, commercial ELISA kits and test strips have been widely used for high-throughput detection due to their high specificity and sensitivity. However, the accuracy and stability of ELISA are affected by many factors; the test strip is usually based on monoclonal antibody (mAb) labeling, and its signal amplification effect is limited and is easy to cause false negative, which affects the accuracy of detection results. At present, mAb is the key reagent for the successful construction of immunoassay, which is mainly obtained by screened positive hybridoma cell line. Therefore, the screening process of hybridoma cell mainly affects the quality of the prepared mAb, which in turn affects the performance of the constructed immunoassay. So, aimed at the AFB₁ and FB₁ seriously contaminating corn, as well as the limitations of current commercially immunoassay products available, the main research results of this project were as follows:

(1) Effects of different times of limiting dilution subcloning on the preparation of mAb against AFB₁: Hybridoma cells were fused and prepared by PEG method. The positive cell line was screened by ELISA combined with different concentrations of standards, and then was subcloned up to 10 times by limiting dilution analysis. The results showed that the screening process with high concentration standard may be conducive to the enrichment and retention of positive cell lines, with the increase of subclonal times, the cell positive rate and the inhibition rate gradually increased. However, when the subclonal times exceeded 7 times, the growth and reproduction of positive cell lines became slower, the detection cycle became longer, and also the inhibition rate of mAb almost remained unchanged or even decreased. In addition, the final obtained mAb secreted by the hybridoma cell line ZFG8 was evaluated by ELISA, and the variable region gene and amino acid sequence of mAb were analyzed. The half inhibitory concentration (IC₅₀) was 1.1539 ng/mL, the detection range (IC₂₀-IC₈₀) was 0.2829-4.7073 ng/mL, and the maximum cross reaction rate to other aflatoxins was 0.73%.

(2) Construction of ELISA for high-throughput detection of AFB₁ in corn flour: In order to improve the accuracy and stability of ELISA, commercial and laboratory antigen and antibody were collected, the effects of combinations of antigen and antibody from different manufacturers on the titer and sensitivity of ELISA were studied. In addition, an ELISA for the high-throughput detection of AFB₁ in corn flour was established by optimizing the conditions. The results showed that the IC₅₀ of this method was 0.1625 ng/mL and the linear detection range was 0.0195-2.5 ng/mL (equivalent to 0.2343-30 µg/kg based on corn flour sample), the linear fitting equation of corn flour matrix was $Y=-0.4051X+0.2978$ ($R_{adj}^2=0.9821$). Furthermore, the method could specifically identify AFB₁, the recovery rate was 81.13%-96.94%, and the relative standard deviation (RSD) was lower than 9.14%. In the detection results of one corn flour reference material (GBW (E) 100386) and three actual samples of commercial corn flour, the established ELISA was highly consistent with HPLC. These results showed that the method had high sensitivity, specificity and accuracy, which could meet the high-throughput detection of AFB₁ in corn flour.

(3) Rapid quantitative detection of FB₁ by LFI based on indirect signal amplification strategy: In order to amplify the detection signal, protect the activity of mAb and improve the accuracy of detection results, goat anti-mouse IgG was labeled with europium fluorescent nanoparticles to prepare a universal detection probe (Goat anti-mouse IgG@Eu), under the optimal conditions, an immunochromatographic test strip based on indirect signal amplification strategy was constructed to detect FB₁ in corn. This method could specifically identify FB₁, the detection limit in corn was 0.025 ng/mL (0.50 ng/g based on the sample weight), and the detection range was 1-50 ng/mL (20-1000 ng/g based on the sample weight), the recovery rate was 82.50-115.08% and the relative standard deviation (RSD) was lower than 6.06%. This method was applied to detect the actual corn samples, the result was highly consistent with that of HPLC-MS/MS. These results showed that the method had high sensitivity, good specificity, accuracy and accuracy, and could be used for rapid screening of FB₁ in corn on site.

In conclusion, the above research provided a certain reference value for hybridoma cell screening, monoclonal antibody preparation and the selection of antigen and antibody. The established ELISA and LFI could, to some extent, overcome the limitations of commercial products, and meet the needs of on-site and high-throughput detection of corn

samples, thus providing certain theoretical and practical support for the construction of other immunoassay.

Keywords: Aflatoxin B₁; Fumonisin B₁; Times of subcloning; Monoclonal antibody preparation; Enzyme-linked immunosorbent assay; Lateral flow immunoassay

目录

摘要.....	III
ABSTRACT.....	V
目录.....	VIII
第一章 绪论.....	1
1.1 真菌毒素.....	1
1.1.1 黄曲霉毒素的理化性质与危害.....	1
1.1.2 伏马毒素的理化性质与危害.....	2
1.1.3 真菌毒素的污染范围与限量标准.....	3
1.2 真菌毒素生物识别元件研究.....	4
1.2.1 抗体分类.....	5
1.2.2 单抗制备方法研究.....	5
1.3 真菌毒素免疫分析方法研究.....	6
1.3.1 表面增强拉曼散射免疫分析.....	6
1.3.2 表面等离子共振免疫分析.....	7
1.3.3 化学发光免疫分析.....	7
1.3.4 电化学发光免疫分析.....	8
1.3.5 电化学免疫分析.....	8
1.3.6 酶联免疫吸附法.....	9
1.3.7 侧流免疫分析法.....	10
1.4 研究目的及意义.....	11
1.5 研究内容及技术路线.....	12
第二章 有限稀释亚克隆次数对 AFB ₁ 单抗制备的影响.....	14
2.1 引言.....	14
2.2 材料与方法.....	14
2.2.1 实验动物与细胞.....	14
2.2.2 主要试剂与仪器.....	15
2.2.3 主要试剂配制.....	16
2.2.4 动物免疫.....	17
2.2.5 抗血清 ELISA 检测.....	18
2.2.6 杂交瘤细胞的制备.....	19
2.2.7 杂交瘤细胞培养与筛选.....	19
2.2.8 阳性株的单克隆化.....	20
2.2.9 腹水制备与细胞冻存.....	20
2.2.10 单抗纯化与制备.....	21
2.2.11 单抗的效价、灵敏度和特异性.....	21
2.2.12 可变区序列分析.....	21
2.3 结果与讨论.....	21
2.3.1 抗血清 ELISA 检测.....	21

2.3.2	杂交瘤细胞培养与筛选	23
2.3.3	单抗的效价、灵敏度和特异性	27
2.3.4	与同类型单抗的比较	28
2.3.5	可变区序列分析	29
2.4	本章小结	29
第三章 构建 ELISA 以高通量检测黄曲霉毒素 B₁		31
3.1	引言	31
3.2	材料与方法	31
3.2.1	主要试剂与仪器	31
3.2.2	主要试剂配制	32
3.2.3	ELISA 具体步骤	33
3.2.4	不同抗原抗体组合对 ELISA 结果影响	33
3.2.5	ELISA 条件优化	33
3.2.6	样品预处理	34
3.2.7	ELISA 工作标曲的建立	34
3.2.8	方法评价	34
3.2.9	实际应用性	34
3.3	结果与讨论	35
3.3.1	不同抗原抗体组合对 ELISA 影响	35
3.3.2	ELISA 条件优化	36
3.3.3	ELISA 工作标曲的建立	40
3.3.4	方法评价	41
3.3.5	实际应用性	42
3.4	本章小结	42
第四章 基于间接信号放大策略的 LFI 快速定量检测伏马毒素 B₁		44
4.1	引言	44
4.2	材料与方法	44
4.2.1	主要试剂与仪器	44
4.2.2	主要试剂配制	46
4.2.3	通用探针(羊抗鼠-IgG@Eu)的制备	46
4.2.4	试纸条的制备	46
4.2.5	单抗用量优化	46
4.2.6	样品预处理	47
4.2.7	侧流免疫分析方法的构建	47
4.2.8	侧流免疫分析方法的评价	47
4.3	结果与讨论	47
4.3.1	侧流免疫分析方法原理	47
4.3.2	单抗用量优化	49
4.3.3	侧流免疫分析方法的构建	50
4.3.4	侧流免疫分析方法的评价	52
4.3.5	实际应用性	54
4.4	本章小结	54

第五章 结论与展望	56
5.1 结论	56
5.2 展望	57
参考文献	58
附录	70
在读期间成果	72
致谢	73

第一章 绪论

1.1 真菌毒素

真菌毒素是由真菌在收获、作物储存、加工、运输等期间产生的有毒次生代谢物，广泛存在于谷物、饲料及其制品中。单一真菌可能同时产生一种以上的真菌毒素，不同的真菌可在同一植物中增殖，在这两种情况下都容易导致两种或两种以上的真菌毒素污染^[1]。目前，已发现近 400 种真菌毒素和代谢产物^[2]，其中易污染农产品且危害严重的是黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFs)、伏马菌素(Fumonisin, FBs)、赭曲霉毒素(Ochratoxin, OTA)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)^[3]，食用真菌毒素污染的食物可导致不同的毒性作用和不良影响，对人体与动物的健康造成严重威胁^[4-7]。

1.1.1 黄曲霉毒素的理化性质与危害

黄曲霉毒素(AFs)主要是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)产生的次级代谢物，这种霉菌毒素大多是在较温暖的气候中产生，在炎热干燥或潮湿的条件下易于污染农产品^[8,9]。黄曲霉毒素是以二氢呋喃环和香豆素为基本结构的一组结构类似的化合物，其二氢呋喃末端的双键有较强的毒性并具有致癌性，目前已经鉴定出 12 种黄曲霉毒素，主要的黄曲霉毒素如图 1.1 所示^[10]，分子量为 312-346 Dal，其耐高温，难溶于水，易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂中；同时，黄曲霉毒素在紫外光照射下可以发出强烈的不同颜色的荧光。考虑到对人体的毒性作用，黄曲霉毒素在真菌毒素中具有代表性并备受关注，国际癌症研究机构(IARC)将有毒物质划分为五类(I、2A、2B、3、4 类)，而黄曲霉毒素中最主要的四种化合物，即黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)和黄曲霉毒素 M₁(AFM₁)均列为人类致癌物第 I 类^[11]。据报道，全球有近 45 亿人面临过度接触黄曲霉毒素的风险，这导致由黄曲霉毒素诱发的肝癌病例占有所有肝癌病例的 4.6-28.2%^[12]。

黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)的分子式为 C₁₇H₁₂O₆，分子量 312 Dal，在 365 nm 紫外光下，发出蓝紫荧光，其具有极高的理化性质稳定性，如耐高温、易溶于有机溶剂等，这就意味着通过常规的手段难以破坏其分子结构，从而降低其毒性^[13]；

而且,研究表明,黄曲霉毒素 B₁ 是已知的最有效的天然致癌物,具有极高的毒性^[14],其中位致死剂量 (LD₅₀) 为 0.36 mg/kg (体重),属于剧毒范围^[15]。毒理学研究表明,AFB₁ 被细胞色素 P450 微粒体酶代谢为黄曲霉毒素-8,9-环氧化物 (AFBO),这一化合物与 DNA 结合并形成加合物,从而导致 DNA 损伤^[16]。此外,已经有足够的人类流行病学和动物实验证明 AFB₁ 具有高度致癌性^[17,18]、诱变性和致畸性^[19,20];而且 AFB₁ 作为一种实验性肝癌原,被认为是人肝癌 (HCC) 的主要诱导因素^[21],这表明其具备极高的潜在的肝致癌风险,从而严重危害人类健康。

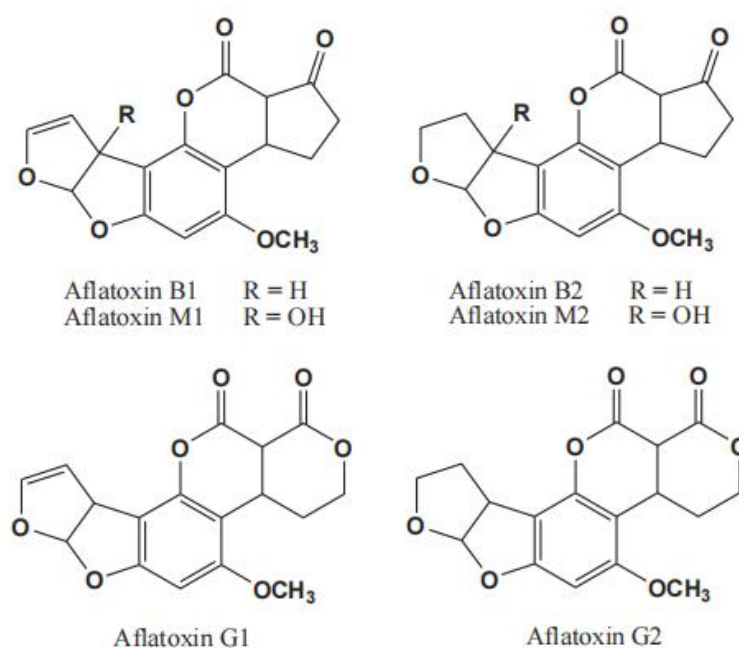


图 1.1 常见的黄曲霉毒素化学结构式

Fig. 1.1 The chemical structure of aflatoxins B₁,B₂,M₁,M₂,G₁,G₂^[11]

1.1.2 伏马毒素的理化性质与危害

伏马毒素 (Fumonisin) 主要是由串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 产生的有毒次级代谢产物^[22],是一组由不同的多氢醇和丙三羧酸组成的结构类似的双酯类化合物,目前已发现 28 种伏马毒素类似物^[23],其中,伏马毒素 B₁ (Fumonisin B₁, FB₁) 约占总伏马毒素的 75%,是伏马毒素的主要成分和常见污染物,并且毒性最强^[24,25]。伏马毒素 B₁ 被国际癌症研究机构 (IARC) 归为人类致癌物 2B 组^[26]。

伏马毒素 B₁ (Fumonisin B₁, FB₁) 的分子式为 C₃₄H₅₉NO₁₅,分子量为 721 Dal,纯品为白色粉末,易溶于水、甲醇及乙腈水,在常温甲醇溶液中易分解为单甲酯或二甲酯,常温水溶液下稳定,耐酸碱,且具有热稳定性^[27,28],这些表明其具有极高的理

化稳定性。目前,伏马毒素的毒性机理尚不明确,但毒理学研究表明,伏马毒素的结构与鞘氨醇类似,会造成的鞘脂类代谢紊乱以及脂类合成失控,这可能影响相关的调控功能,进而影响其他代谢^[29,30]。另有研究表明,当长期暴露于 FB₁ 时,许多物种涉及肝毒性、生殖毒性、免疫系统的毒性和其他疾病,如生长障碍,先天缺陷等^[31-34],这些进一步证明高水平的 FB₁ 暴露量会引起各种潜在的风险从而严重危害生物体的健康。

1.1.3 真菌毒素的污染范围与限量标准

真菌毒素污染农产品是全世界普遍存在的问题。据统计,全世界每年超过 25% 的农作物会被真菌毒素污染,这些污染会导致农作物营养价值下降,生产成本升高,感染疾病的概率和死亡率的增加,从而导致巨大的农业损失以及饲料产业经济损失,并且真菌毒素产生的大量有毒次级代谢产物会通过食物链的积累进入人体,从而严重危害人类生命健康安全^[35]。从 20 世纪 70 年代开始,人们已经意识到真菌毒素污染饲料甚至威胁人类食品安全。然而,迄今为止,农产品中真菌毒素污染依然是一个亟待解决的问题。由于真菌种类繁多,在自然界分布广泛,其对环境适应能力强,因此,真菌毒素广泛存在于并易污染玉米、小麦、大米、玉米、大豆等粮农产品,还会污染饲料、牛奶、茶叶、食用油等农副产品^[36-39]。其中,黄曲霉毒素 B₁ 和伏马毒素 B₁ 同时污染玉米、饲料等农副产品现象普遍。例如,在 2013-2014 年,一份对山东省 520 份玉米或储藏玉米的真菌毒素检测报告显示, AFB₁、AFB₂、FB₁、FB₂、DON、ZEN 均有检出,且 AFB₁ 检测超标^[40];另外,在 2013-2016 年陕西省 382 份市售小麦粉样品中同时检出黄曲霉毒素和伏马毒素^[41];2018 年,一份对 2017 年 1-12 月来自我国不同省份的 876 份饲料样品的研究结果显示 AFB₁ 的阳性检出率高达 93.75%,FB₁ 的阳性检出率为 88.75%,且 98.97% 的饲料及原料受到 2 种及以上霉菌毒素污染^[42]。

随着社会经济的发展和人们健康意识的增强,针对真菌毒素引起的农副产品质量安全问题,世界各国和不同地区制定了关于食品中真菌毒素的限量标准或详细指南(表 1.1),以保护消费者健康。与此同时,随着社会的发展,许多真菌毒素标准已经增加了新的产品类别,限量值也在逐渐降低,样品抽样、处理方法和分析方法逐渐增多,标准更趋于严格、详细、多样化^[43-45]。我国国标(GB2761-2017, GB5009.240-2016, GB13078-2017)中明确规定了黄曲霉毒素、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、脱氧雪

腐镰刀菌烯醇、伏马毒素等真菌毒素的限量标准，以保护消费者健康。

表 1.1 不同国家和地区真菌毒素的限量标准

Tab. 1.1 The limit standards of mycotoxin in different countries and regions

霉菌毒素	地区	产品种类	限量要求 (µg/kg)
AFB ₁	China	玉米、玉米及其制品	20
		大米	10
		小麦	5
	FDA	成人食品	20
		婴幼儿配方食品	0.5
AFTs	EU	谷物及其制品	4
		玉米及大米	10
AFM ₁	China	乳及其乳制品、婴幼儿配方食品	20
	EU	牛奶	0.5
		婴幼儿食品	0.1
	FDA	牛奶	0.5
赭曲霉毒素 A	China	谷物及豆类	5
	EU	谷物及其制品	3
玉米赤霉烯酮	China	玉米及小麦	60
	EU	谷物及其制品	75
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	China	玉米、小麦等	1000
	FDA	小麦及其制品	1000
	EU	谷物及其制品	750
展青霉素	China	水果（苹果、山楂）制品	50
	EU	固体苹果制品	50
伏马毒素 (FB ₁ +FB ₂)	China	玉米及其制品	6×10 ⁴
	FDA	玉米及其产品	2000
	EU	成人玉米食品	400
		婴儿玉米食品	200

1.2 真菌毒素生物识别元件研究

生物识别元件能识别待检测的目标物，影响所构建方法的灵敏度和特异性。目前，真菌毒素生物识别元件通常有抗体、核酸适配体^[46,47]（RNA、ssDNA 或自组装 DNA）、分子生物探针^[48,49]、酶类^[50-52]（DNA 酶、RNA 酶、分裂荧光素酶）、分子印聚物^[53,54]等，相较于其他识别元件，由于抗体和适配体对生物分子识别的柔性作用，其广泛应用于真菌毒素检测中^[55]。

1.2.1 抗体分类

目前, 抗体分为多抗^[56]、单抗^[57,58]、双抗^[59,60]、基因工程抗体^[61-63]等, 每种抗体都具备各自的优点和局限性, 比如, 多抗易制备, 只是由于免疫过后抗血清的成分过于复杂, 因此所获得的抗体亲和力较低, 灵敏度也较差; 双抗可以同时识别两种目标物, 能够实现同步检测, 提高了检测效率, 只是目前的制备过程周期长且较复杂; 基因工程抗体可以合理设计并定性改造现有的抗体, 可以得到理想的单抗 (scFv、Fab)、重组双抗、纳米抗体, 但涉及基因文库筛选、基因克隆与表达载体构建等基因工程, 操作过程耗时复杂。近年来, 双抗、纳米抗体、基因工程抗体由于其潜在的优势受到了越来越多的关注、研究和应用, 而相较于以上抗体, 单抗通常由杂交瘤细胞株分泌所得, 一般通过 ELISA 筛选结合 4 次的亚克隆就可以得到质量较好的阳性杂交瘤细胞株, 其制备体系比较完善成熟、操作简单、经济成本较低, 且得到的抗体质量较高, 作为一种生物识别元件广泛应用于免疫分析方法的构建。

1.2.2 单抗制备方法研究

目前, 单抗主要是由杂交瘤细胞分泌所得, 因此, 如何简单快速、高效地筛选出能够稳定分泌高质量单抗的阳性杂交瘤细胞株仍然是个亟待解决的瓶颈。一些新型的技术已经用于杂交瘤细胞的筛选, 如 Jin Zhiyuan 等人设计了一种基于夹心细胞表面荧光免疫吸附法 (SCSFIA) 以快速筛选杂交瘤细胞^[64]; 此外, 一些研究学者采用基于噬菌体展示库^[65]、流式细胞仪^[66,67]等技术制备抗体, 这种方法筛选效率高, 只是涉及文库筛选、基因工程等, 操作较为复杂或者仪器昂贵, 限制了其应用范围。比较常规的操作是 ELISA 筛选出杂交瘤阳性株, 有限稀释法亚克隆阳性株, 反复 4 次左右可得分泌单抗的阳性杂交瘤细胞株, 如张媛媛通过细胞筛选和 3 次亚克隆, 获得的杂交瘤细胞 4D9 能够稳定分泌抗 AFB₁ 的单抗, 结果表明, 所制备的单抗对 AFB₁ 具有较强的亲和性和特异性, 灵敏度符合国家限量标准^[68]; 管笛利用体细胞融合成功制备出抗 AFM₁ 单抗并在此基础上获得了抗独特性抗体以代替 AFM₁ 标准品进行绿色免疫分析^[69]; 张道宏设计了 ELISA 结合梯度筛选法筛选阳性株, 经过 2-4 次亚克隆, 最终成功筛选出一株超灵敏的黄曲霉毒素通用单抗 1C11 (对 AFB₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的灵敏度 (以 IC₅₀ 表示) 依次为 1.2、1.3、2.2 和 18.0 pg/mL) 以及 2 株抗黄曲霉毒素 B₁ 和 M₁ 的特异性单抗, 并用所得的单抗构建了免疫层析方法检测黄曲霉毒素^[70], 这种

筛选方法提高了阳性率,有效避免了阳性细胞株的丢失。只是通过几次亚克隆制备获得单抗,若增加亚克隆次数,其对阳性细胞株的生长繁殖、单抗灵敏度和特异性的影响还有待研究。

1.3 真菌毒素免疫分析方法研究

在过去,普遍采用色谱分析如薄层色谱法^[71]、高效液相色谱法^[72,73]和液相色谱-质谱法^[74]等实现对真菌毒素的定量检测,虽然应用上述方法检测结果灵敏、准确,但需要复杂的样品预处理、昂贵的仪器和专业的操作人员,这可能使其难以实现快速、高通量筛选。为克服以上方法的局限性,以抗体-抗原高特异性识别的免疫传感器(免疫分析方法),再结合不同种类的材料(染料、荧光素、纳米颗粒)以起到修饰、放大信号或者作为探针的作用,由于其优异的性能,已经被开发应用于各个领域^[68]。

1.3.1 表面增强拉曼散射免疫分析

拉曼散射是光与物质相互作用的一种形式,其实质是光子和散射物质中的分子之间发生了非弹性碰撞,产生了光的非弹性散射效应。而表面增强拉曼散射(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)是指当一些分子被吸附到某些粗糙的金属(如银、铜、金等)表面上时,它们的拉曼散射强度会增加 10^4 - 10^6 倍。目前,其理论模型还未确定,但人们较普遍的看法是基于物理增强(电磁增强)和化学增强(分子增强)这两种机制导致拉曼散射强度的大大增加。由于该效应发生于金属-吸附分子体系,而且SERS可以获得待测物的SERS光谱的定性和定量信息,因此其广泛应用于生物医学、环境监测和食品工业^[76]。如Li Yu等人将AFB₁-BSA、ZEA-BSA和OTA-BSA包被在微阵列金表面,用5,5-二硫代双(琥珀酰亚胺基-2-硝基苯甲酸)(DSNB)标记金纳米颗粒(GNPs)作为拉曼报告分子,与霉菌毒素单抗偶联后形成SERS探针,开发了一种基于SERS的免疫分析方法以检测AFB₁、ZEA、OTA,这种设计允许三种独立的免疫反应进行多重分析,结果表明,AFB₁、ZEA、OTA的检测限分别为0.061-0.066, 0.53-0.57, 0.26-0.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[77]; Zhang Wanjun等人整合了双拉曼标记和三线分析格式,用5,5-二硫代双-2-硝基苯甲酸(DTNB)和4-巯基苯甲酸(MBA)标记Au@Ag纳米颗粒作为拉曼报告分子,然后偶联相应抗体后,形成SERS探针,构建基于SERS的侧流免疫层析试纸条同时检测玉米中的六种霉菌毒素^[78]。基于SERS的免疫分析方法具有制样简单、峰形窄、灵敏度高、选择性好等优点,但是目前对霉

菌毒素检测的报道很少,研究仍处于起步阶段,而且拉曼光谱仪器昂贵,在研究新型的 SERS 探针、信号放大等方面还有待深入研究。

1.3.2 表面等离子共振免疫分析

表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 是一种光学现象,用于检测全本反射条件下金属薄膜 (Au 或 Ag) 表面亲和作用下引起的折射率变化,其对表面分子的结合提供及时敏感的反应。以 SPR 技术为基础的表面等离子共振免疫传感器具有所需样品量小、金属芯片可重复利用、抗原抗体反应动态实时检测、高通量筛选等突出优点,在环境监测、食品安全、临床诊断等多个领域得到广泛应用^[79],然而,表面等离子共振分析通常用于大分子量分析,导致其在金属膜表面折射率的可测量变化,霉菌毒素通常是一类小分子化合物,因此通常用间接竞争法分析,再辅以不同种类的纳米材料修饰到金属膜表面,以提高方法的响应性能。如 Aleksandra Karczmarczykac 等人构建了一种基于金纳米颗粒增强的 SPR 间接竞争免疫分析法,灵敏地检测红酒样品中的 OTA, LOD 为 0.068 ng/mL^[80];采用 SPR 免疫分析方法进行实时监测中,信号放大以及生物识别元件固定是一项挑战,但是可以通过使用合适的包覆剂或配体进行纳米颗粒的表面修饰来克服这一局限性。因此,有研究学者将半胱氨酸沉积在金膜上,再沉积脂酸-金纳米颗粒,形成自组装单层膜 (SAM),再通过沉积蛋白质 A 固定单抗,以检测 AFB₁,实验结果表明,与直接修饰 AuNPs 的 SPR 免疫分析方法相比,基于上述修饰模式的 SPR 免疫分析方法可使灵敏度提高 6 倍^[81]。虽然 SPR 免疫分析展现出了小分子检测方面的优势和潜力,同时,在应用 SPR 时,降低与非靶标分子的非特异性吸附,开发新型的 SPR 芯片、仪器的小型便携化等仍有待研究。

1.3.3 化学发光免疫分析

化学发光 (Chemiluminescence, CL) 是由化学反应中能量的释放引起的现象,产物从激发态跃迁回到基态,触发光的产生,光强在 1-2 min 内达到最大值,从而缩短了整体分析时间,同时避免了背景干扰和放射免疫分析中的污染风险,其在不同领域应用广泛^[82]。其中,最普遍的化学发光免疫分析是利用过氧化物酶可以催化鲁米诺和 H₂O₂ 体系的氧化,而目标化合物的含量与鲁米诺或其衍生物的 CL 强度有关^[83]。此外,为了满足检测多种毒素的需求以及降低背景值, Xu Jie 等人以单抗、过氧化物

酶催化鲁米诺和 H_2O_2 体系, 利用硅水胶光子晶体微球 (SHPCM) 悬浮阵列建立了一种超灵敏、低背景的化学发光免疫传感器同时检测 AFB_1 、 FB_1 和 OTA ^[84]; 为避免基质中的复杂成分干扰, Xie Gang 等人利用磁性颗粒将反应后的成分分离, 在碱性磷酸酶存在下, 催化 Lumigen APS-5 溶液产生荧光, 结果表明其对 AFB_1 的 LOD 较低, 为 0.05 ng/mL , 这为复杂样本中其他霉菌毒素的定量提供了可行性^[85]。为进一步实现信号放大, 降低背景干扰, 提高其精确性, 未来可以从引入新型纳米材料和纳米酶、开发无标签的化学发光方法及小型便携式化学发光仪等方面加强研究。

1.3.4 电化学发光免疫分析

电化学发光 (Electrochemiluminescence, ECL) 是电化学与化学发光结合的产物, 它是通过电化学反应直接或间接引发的发光现象^[86]。根据 ECL 反应的机理, ECL 体系主要分为湮灭型 ECL 体系、共反应物 ECL 体系、阴极 ECL 体系, 不论哪种体系, 都是在施加一定强度的电压后, 反应体系中生成激发态的产物, 激发态的产物跃迁后回到基态, 在此过程中产生发光现象, 由于加入待测物后, 光强信号改变, 故可进行目标物的定量检测。如 Zheng HongLi 等人利用 TRM 的双重功能 (固定功能和探针功能) 形成双放大信号, 联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 为电化学发光剂, 设计了一种双抗体夹心法的电化学发光免疫分析法检测 ZEN, 这显著提高了免疫传感器的性能^[87]; 为了进一步提高 ECL 免疫传感器的检测性能, Zheng HongLi 等人在原来研究的基础上发现, 二茂铁羧酸 (FCA) 可以有效地猝灭 $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_3^{2+}]$ 的 ECL 信号, 同时提高鲁米诺的 ECL 强度, 以这两个为新的 ECL 发射单元, 通过计算两个 ECL 信号的比值, 开发了一种微妙的双功能试剂调节的三明治模型的 ECL 免疫传感器用于 DON 检测, 结果表明其 LOD 为 0.0167 pg/mL ^[88]。电化学发光与化学发光类似, 都是基于光强信号实现定量, 灵敏度高且可以线性输出, 只是其仪器寿命短、选择性差, 无法实现高通量检测, 在这些方面还有待提高。

1.3.5 电化学免疫分析

电化学免疫分析 (Electrochemical Immunoassay) 主要以抗体为识别元件, 电极 (固体电极、离子选择性电极、气敏电极、丝网印刷电极等) 作为转换元件, 通过其与目标物、修饰材料等物化相互作用, 引起电化学性质改变, 经化学工作站转变成电信号 (电流、阻抗、电压等), 以实现目标物的定量检测。由于其具有灵敏度高、

响应快速、样品消耗低等优点^[89]，已成为检测湿度、气体、重金属、农残、毒素的强力工具。电化学免疫分析的物化相互作用通常是在电解质溶液中的电极微界面上发生的，在构建此方法时，通常需要将纳米材料修饰到电极表面以改变电化学性能，放大信号。一般采用直接抗体抗原识别或者间接竞争模式构建电化学免疫分析方法。例如，Yugender Goud 等人基于间接竞争模式，直接将 ZEN-BSA 包被在丝网印刷电极上，后期包被单抗、目标物和碱性磷酸酶标记的二抗，加入底物反应后，进行 DPV 扫描，以构建电化学免疫分析法检测 ZEN^[90]；Ajay Kumar Yagati 等人通过不同的材料修饰电极后，直接将单抗固定在电极表面，建立了基于 AFB₁ 检测的无标记电化学阻抗传感器，由于其具有较大的表面积、良好的导电性和生物相容性，该方法具有良好的检测性能^[91]。电化学免疫分析法具备很多优势，如不用氧化还原试剂、灵敏度高、绿色经济等，但要提高电化学免疫分析法的性能，可能要提高电极表面固定物的稳定性、改善纳米材料的电化学性能、开发便携小型仪器以及纳米电极等。

1.3.6 酶联免疫吸附法

自 1971 年 Engvall 和 Perlmann 发表了酶联免疫吸附测定 (Enzyme Linked Immunosorbent assay, ELISA) 用于 IgG 定量测定的文章^[92]，使得这一方法发展成为检测微量物质的方法。ELISA 通常有双抗体夹心法、直接法、间接非竞争法和间接竞争法这四种模式，利用上述方法，结合各种各样的材料和策略，提高方法性能，开发的商业 ELISA 试剂盒可以检测小分子、抗原、病毒、大分子蛋白等^[93-98]。在 AFB₁ 检测方面，Lai Wenqiang 等人利用抗坏血酸氧化酶和抗 AFB₁ 抗体标记金纳米粒子，利用 AFB₁-BSA 偶联磁珠，以及 MnO₂ 催化体系开发了一种新的竞争型免疫分析法，用于检测花生中的 AFB₁，其检测限低至 6.5 pg/mL^[99]；Zhan Shengnan 等人利用羟基自由基诱导的金纳米颗粒(AuNP)聚集来放大 AuNP 散射信号，所开发的基于动态光散射的直接竞争 ELISA 对 AFB₁ 具有超高的灵敏度，检测限为 0.12 pg/mL^[100]。虽然上述方法开发了新的检测体系，放大了检测信号，提高了检测的灵敏度，但考虑到经济效益，并未在商业 ELISA 试剂盒中广泛应用。目前，一般采用直接竞争或间接竞争模式的 ELISA 试剂盒检测 AFB₁，如孙清将酶标抗原包被在板上，成功研制出直接竞争 ELISA 试剂盒检测 AFB₁，IC₅₀ 为 66 pg/mL，线性范围为 10-810 pg/mL^[101]；鲁希研制出抗 AFB₁ 单抗，在此基础上，构建了间接竞争模式的 ELISA 试剂盒检测玉米

和饲料中的 AFB₁, 灵敏度为 IC₅₀ 为 1.502 ng/mL, 线性范围 (IC₂₀-IC₈₀) 为 0.342-6.597 ng/mL, 饲料样品的检测限为 0.836 μg/kg, 检测范围为 1.368-26.388 μg/kg^[102]。而且, 我国已经将 ELISA 试剂盒定量检测农产品中的霉菌毒素列为国标方法 (GB5009.22-2016), 该方法在玉米中 AFB₁ 的检出限为 1 μg/kg, 定量限为 3 μg/kg。然而, 不用品牌的 ELISA 试剂盒的质量不同, 虽然吕秋威等人采用不同品牌的 ELISA 试剂盒对 AFB₁ 检测进行了质量评价, 以保证检测结果的准确性^[103], 但是其准确性很大程度上与所用的抗体和抗原的性能有关, 来自不同厂家的抗原抗体对于 ELISA 的效价和灵敏度的影响不同, 此外, 方法的模式、样品前处理、仪器和实验人员的操作都会对最终检测结果产生影响。

1.3.7 侧流免疫分析法

侧流免疫层析法 (Lateral Flow Immunochromatography, LFI) 主要是基于免疫识别以及抗体标记技术, 通过毛细管作用力的移动速度差异或分子间的识别作用, 从而在反应基质上实现分离并检测的色谱系统, 由于其简便快速, 其广泛用于食品安全、临床诊断和环境污染物的检测。其中, 基于时间分辨发光技术的侧流免疫分析法是一种经济高效、简单快速的方法, 无需专业技术人员或昂贵的设备, 适用于现场样品检测, 近年来其受到越来越多的关注^[104,105]。时间分辨荧光免疫试纸条通常采用更大的斯托克斯位移、更长荧光寿命的镧系元素, 尤其是铕, 作为荧光探针^[106]。在传统的 LFI 中, 通常将铕纳米颗粒直接标记在单抗上, 这种荧光探针具有制备简单、稳定性好、储存时间长的优点^[107]。然而, 这种标记方法的缺点可能是在制备探针的过程中降低了单抗的生物活性, 干扰了抗体与抗原之间的识别, 从而降低了灵敏度, 增加了昂贵单克隆抗体的消耗。此外, 基于直接单抗标记的检测探针只能识别一种特定的目标物, 当待测目标物发生变化时, 需要重新制备检测探针, 这不仅延长了实验周期, 增加了成本, 而且仅仅使用一种探针也无法同时检测多种毒素。因此, 针对上述问题, 许多研究者提出了间接标记的侧流免疫层析法, 例如, Urusov 等人^[108]提出使用抗鼠的抗体-金纳米颗粒复合物作为探针来检测玉米样品中的 FB₁, LOD 为 0.6 ng/mL, 这为同时检测多种毒素提供了通用探针; 然而, 在这种模式下, 单抗同时结合探针和 C 线上的羊抗鼠 IgG, 这可能会阻碍单抗和抗原的特异性识别, 使竞争模式复杂化, 降低了灵敏度。在此基础上, 一些研究人员提出了用荧光分子标记羊抗鼠 IgG 作为探针,

检测其他小分子物质的新模式的侧流免疫分析法, 例如, Urusov 等人^[109]同时检测玉米赤霉烯酮和黄曲霉毒素 B₁, LOD 分别为 6 和 0.6 ng/mL; Majdinasa 等人^[110]检测赭曲霉毒素 A, 其 LOD 低至 0.4 pg/mL; Li 等人^[111]同时检测牛奶中的黄曲霉毒素 M₁ 和三聚氰胺, LOD 分别为 0.009 和 0.024 ng/mL; Dong 等人^[112]检测脱氧雪腐镰刀烯醇, 其 LOD 为 0.121 ng/mL, 这都证明了基于间接模式的侧流免疫分析法可以克服以上所述 LFI 的局限性, 并展示了优异的性能。然而, 据我们所知, 很少有研究学者采用上述方法定量检测 FB₁。

综上所述, 基于 SERS、SPR、CL、ECL、EC 的免疫分析方法, 目前通常采用昂贵的仪器, 无法实现快速高通量检测, 而 ELISA 和 LFI 能克服上述方法的局限性, 尤其是市售的 ELISA 试剂盒和试纸条, 以其简单便携、高灵敏度和高通量的优点, 实现对目标物的现场筛查, 但 ELISA 试剂盒的准确性很大程度与所用的抗体抗原的性能有关, 来自不同厂家的抗原抗体对于 ELISA 的效价和灵敏度的影响不同, 此外, 方法的模式、样品前处理、仪器和实验人员的操作都会对最终检测结果产生影响, 因此其工作的稳定性和准确性有待提高; 而试纸条通常基于单抗标记, 其信号放大作用有限, 因此易造成弱阳性漏检, 从而影响检测结果准确性。因此, 有必要对上述两种方法进一步研究以提高 ELISA 和试纸条的性能。

1.4 研究目的及意义

当前, 农产品需求量逐年升高与农产品质量安全问题的矛盾越来越突出。据报道, 导致农产品损失的首要原因是真菌毒素污染, 这不仅导致农产品资源的浪费和全球经济损失, 而且关系到消费者的身体健康和生命安全。针对严重污染玉米的 AFB₁ 和 FB₁, 市售的 ELISA 试剂盒和试纸条产品具有特异性强、灵敏度高、适合高通量检测等优点, 是预防其进入食物链的重要手段之一。然而 ELISA 的准确性和稳定性受许多因素影响; 试纸条通常基于单抗标记, 其信号放大作用有限, 因此易造成弱阳性漏检, 从而影响检测结果准确性。目前, 单抗是成功构建上述方法的关键试剂, 其主要通过筛选阳性杂交瘤细胞分泌而得, 因而, 杂交瘤细胞的筛选过程主要影响到制备的单抗质量, 进而影响到所构建的免疫分析方法的特异性和灵敏度。所以, 针对严重污染玉米的 AFB₁ 和 FB₁, 以及目前市售免疫检测产品的局限性, 本论文首先研究了有限稀释亚克隆次数对 AFB₁ 单抗制备的影响; 其次, 在此基础上, 搜集市售抗原抗体,

研究了不同组合下的抗原抗体对 ELISA 的影响, 而且, 为提高 ELISA 工作的稳定性和准确性, 通过条件优化, 在最佳抗原抗体组合下, 构建了 ELISA 以高通量检测玉米粉中的 AFB₁; 最后, 为放大试纸条检测信号和提高检测结果准确性, 建立了基于信号放大策略的侧流免疫分析法以快速定量检测 FB₁, 上述 ELISA 和层析试纸条分别实现了玉米及其产品中 AFB₁ 和 FB₁ 的高通量现场筛查。以上研究为杂交瘤细胞筛选、单抗制备和抗原抗体的选择提供了一定的参考价值, 所建立的 ELISA 和侧流免疫层析法可以克服市售产品的局限性, 并满足玉米样品的现场高通量检测需求, 这为构建其他免疫分析方法提供了一定的理论和实践支持。

1.5 研究内容及技术路线

本论文的具体研究内容如下:

(1) 有限稀释亚克隆的次数对 AFB₁ 单抗制备的影响: 经动物免疫、抗血清 ELISA 检测, 取免疫效果好的 Blab/c 小鼠的脾细胞经 PEG 融合法与骨髓瘤细胞 SP2/0 制备杂交瘤细胞株, 采用 ELISA 结合不同浓度的标准品筛选阳性杂交瘤细胞株, 采用有限稀释法对阳性细胞株进行高达 10 次亚克隆, 观察阳性细胞株生长状态, 并结合筛选结果(细胞阳性率、细胞抑制率)进行分析, 提出可能影响单抗质量的原因; 对阳性细胞株分泌的单抗进行效价、灵敏度、特异性检测以评价单抗的质量, 并与其他研究者所制备的 AFB₁ 单抗进行了对比分析, 最后对单抗可变区基因和氨基酸序列分析, 以研究亚克隆次数对 AFB₁ 杂交瘤阳性细胞株生长繁殖、单抗制备的影响, 以期杂交瘤细胞筛选、单抗制备提供一定的参考, 为免疫检测方法的构建奠定基础。

(2) 构建 ELISA 以高通量检测黄曲霉毒素 B₁: 为提高 ELISA 的准确性, 收集市售和实验室抗原抗体, 研究了来自不同厂家的抗原抗体组合对于 ELISA 的效价和灵敏度的影响; 此外, 为提高 ELISA 工作的稳定性和灵敏度, 通过对封闭液种类、甲醇浓度、盐离子浓度、pH 值、酶标二抗稀释倍数的优化, 在最佳的抗原抗体组合下, 构建 ELISA 以高通量检测玉米粉中的 AFB₁。并且, 对该方法的特异性、精确性和应用性进行评价, 以期构建 ELISA 试剂盒检测玉米及其他农产品中的 AFB₁ 提供参数, 扩大其应用范围, 为抗原抗体的选择提供一定的参考。

(3) 基于间接信号放大策略的免疫层析试纸条快速定量检测伏马毒素 B₁: 为放大检测信号, 提高检测准确性, 保护单抗生物活性, 以镧系元素铈纳米材料标记羊抗

鼠-IgG 制备通用荧光探针（羊抗鼠 IgG-Eu），通过优化 T 线包被原、C 线兔抗羊 IgG 的用量、单抗浓度、荧光探针稀释倍数等条件，构建基于间接信号放大策略的免疫层析试纸条用于检测玉米中的伏马毒素 B₁，并评估其灵敏度、特异性、精确性和准确性、应用性，以期为简单快速、高通量的现场检测玉米中的 FB₁ 提供方法支持。

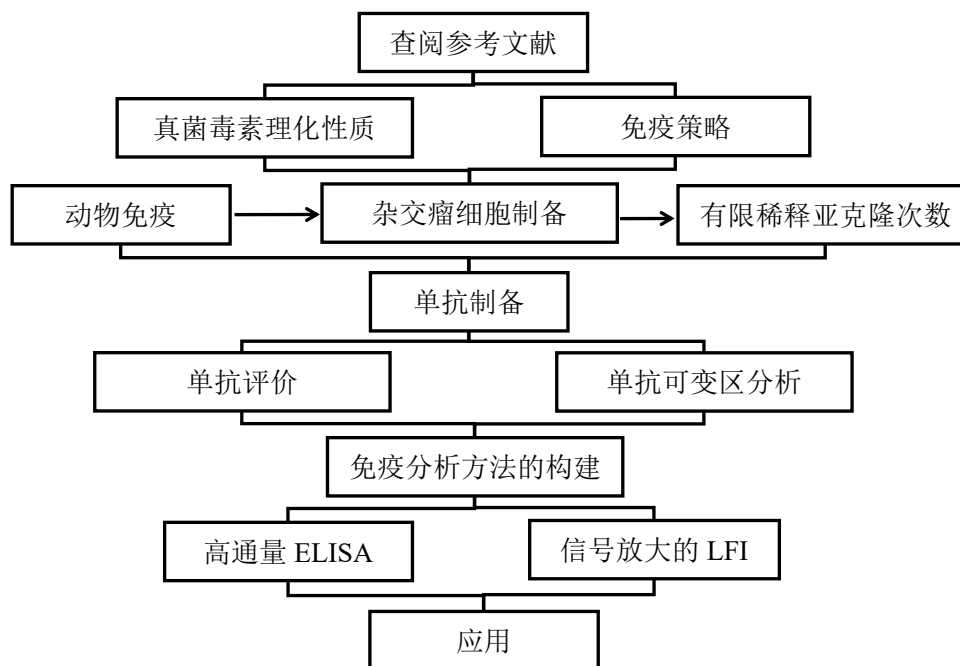


图 1.2 研究技术路线

Fig. 1.2 The technical route of this project

第二章 有限稀释亚克隆次数对 AFB₁ 单抗制备的影响

2.1 引言

为保障农产品质量安全,灵敏快速、高通量的检测方法是其中关键的环节之一。近年来,随着分子生物学,免疫学和材料科学的发展,免疫分析方法在真菌毒素检测方面得到了越来越多的关注^[75]。但为实现良好的检测效果,关键之处在于获得高亲和力、高特异性和高灵敏度的抗体。其中,单抗的制备体系比较完善成熟、操作简单、经济成本较低,且得到的抗体质量较高,作为一种生物识别元件广泛应用于免疫分析方法的构建。目前,如何高效地筛选杂交瘤细胞株进而得到高质量的单抗仍然是个亟待解决的问题,普遍成熟的做法是通过 ELISA 筛选结合 4 次的亚克隆就可以得到质量较好的阳性杂交瘤细胞株,但次数过多(超过 7 次)的有限稀释亚克隆法对阳性细胞株的生长状态、单抗效价、灵敏度、特异性的影响目前还没有研究者进行探究。

基于以上分析和思考,在实验室现有条件下,为研究亚克隆次数对 AFB₁ 杂交瘤阳性细胞株生长繁殖、单抗制备的影响。本章经动物免疫、抗血清 ELISA 检测,取免疫效果好的 Balb/c 小鼠的脾细胞经 PEG 融合法与骨髓瘤细胞 SP2/0 制备杂交瘤细胞株,采用 ELISA 结合不同浓度的标准品筛选阳性杂交瘤细胞株,采用有限稀释法对阳性细胞株进行高达 10 次亚克隆,观察阳性细胞株生长状态,并结合筛选结果(细胞阳性率、细胞抑制率)进行分析,提出可能影响单抗质量的原因;对阳性细胞株分泌的单抗进行效价、灵敏度、特异性检测以评价单抗的质量,并与其他研究者所制备的 AFB₁ 单抗进行了对比分析,最后对单抗可变区基因和氨基酸序列分析,以期对杂交瘤细胞筛选及单抗制备提供一定的参考,为免疫方法的构建提供生物识别元件。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验动物与细胞

(1) SPF 级 4-6 周龄雌性 Balb/c 小鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证号: SCXK(鲁)20190003。

(2) 小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 由山东绿都生物科技有限公司(中国,山东省滨州市)提供。

2.2.2 主要试剂与仪器

本实验所用的主要试剂与耗材如表 2.1 所示，其他试剂均为分析纯；本实验所用的主要仪器如表 2.2 所示。

表 2.1 本实验的主要试剂与耗材

Tab. 2.1 Main reagents and material of this experiment

试剂	化学式	规格	厂家
脱脂奶粉	/	450 g (18 小袋)	内蒙古伊利
牛血清白蛋白	/	500 g	美国 Sigma
一水合柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	500 g (分析纯)	上海国药
3,3',5,5'-四甲基联苯胺	C ₁₆ H ₂₀ N ₂	5 g	上海阿拉丁
过氧化氢脲	CH ₄ N ₂ O·H ₂ O ₂	25 g	上海阿拉丁
AFB ₁ -BSA	/	1 mg	美国 Sigma
弗氏完全/不完全佐剂	/	10 mL/瓶	美国 Sigma
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	100 g	美国 Sigma
L-谷氨酰胺	C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	100 g	美国 Sigma
RPMI-1640 基础培养基	/	500 mL	美国 Cytiva
双抗(青链霉素)(100×)	/	100 mL	美国 Thermofisher
胎牛血清	/	100 mL	浙江天航生物科技
非必需氨基酸(100×)	/	100 mL	美国 Thermofisher
生长因子	/	100 mL	北京博奥龙免疫技术
HAT/HT(50×)	/	10 瓶	美国 Sigma
PEG1450	H(CH ₂ CH ₂ O) _n OH	500 g	美国 Sigma
二甲基亚砜	C ₂ H ₆ OS	50 mL (生物无菌级)	美国 Sigma
羊抗鼠 IgG-HRP	/	2 mg/mL	山东绿都
AFB ₁ 标准品	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFB ₂ 标准品	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFM ₁ 标准品	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFM ₂ 标准品	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFG ₁ 标准品	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFG ₂ 标准品	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFB ₁ -BSA	/	2.5 mg/mL	中国农业科学院
96 孔聚苯乙烯酶标板	/	3590	美国 Costar 公司

表 2.2 本实验的主要仪器
Tab. 2.2 Main instruments of this experiment

仪器	型号	厂家
调合银汞机	HL-AH	杭州中润医疗器械
磁力搅拌器	MYP11-2	上海梅颖浦仪器仪表制造
快速混匀器	SZ-1	常州普天仪器制造
酶标仪	Varioskan LUX	美国 Thermofisher
洗板机	888	美国 Thermofisher
高速冷冻离心机	Sorvall ST 16R	美国 Thermofisher
立式高压蒸汽灭菌锅	LDZX-50KBS	上海申安医疗器械厂
移液枪	ependof	德国 ependof
超纯水仪	LS MK2	美国 PALL 公司
紫外超净工作台	SW-CJ-2FD	苏州安泰空气技术
台式低速离心机	TDZ4-WS	湘仪离心机仪器
倒置显微镜	BDS400	重庆奥特光学仪器
CO ₂ 细胞培养箱	1N/PE	美国 Thermofisher
分析天平	AL 104	德国梅特勒托利多仪器
pH 计	FE20-K	上海智光仪器仪表
超声波清洗器	KQ3200E	昆山市超声仪器
电热鼓风干燥箱	Dhg-9240A	上海一恒科学仪器

2.2.3 主要试剂配制

2.2.3.1 ELISA 主要溶液配制

ELISA 主要试剂配制依据董浩玮硕士学位论文 2.2.2^[113], 在此基础上, 补充 0.05 mol/L, pH9.6 碳酸盐缓冲液: 称取 0.795 g 碳酸钠 (Na₂CO₃) 和 1.465 g 碳酸氢钠 (NaHCO₃) 用超纯水溶解后定容至 500 mL。

2.2.3.2 动物细胞实验主要试剂配制

(1) 免疫试剂 (用于免疫小鼠, 现配现用): 取 300 μL, 0.9% 的生理盐水于 1.5 mL 离心管中, 一次将 200 μL, 1 mg/mL AFB₁-BSA, 500 μL 弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂加入上述离心管中, 震荡混匀后, 设置调合银汞机的转速为 440 r/min, 时间为 20 s, 每振荡混匀 20 s, 立即取下离心管, 放置 4°C 冰箱中冷却 2 min, 重复上述过程至少 8 次。乳化完成后, 取一滴乳化液滴到清水中, 乳化液稳定的悬浮在清水液面上, 且不扩散, 表明试剂已经完全混匀, 短时间内放置 4°C 冰箱保存备用。

(2) 1 mol/L HEPES (100×): 称量 23.80 g HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S) 溶于 50 mL 无菌水中, 用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.5, 用无菌水定容至 100 mL, 在超净工作台上, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后, 分装, 封口膜封口后, 置于-20°C冻存。

(3) L-谷氨酰胺: 称取 1.460 g L-谷氨酰胺, 加 50 mL 无菌水使其充分溶解, 在超净工作台内用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后, 分装, 封口膜封口后, 置于-20°C冰箱冻存。

(4) RPMI-1640 完全培养基: 在超净工作台上量取 80 mL RPMI-1640 基础培养液, 依次加入 20 mL 胎牛血清、1 mL 双抗和 1 mL HEPES, 混匀后备用。

(5) 2% HAT/HT 培养基 (v/v): 量取 86 mL RPMI-1640 完全培养基, 加入 10 mL 的 Clone Easy 培养基、2 mL HAT/HT (50x)、1 mL 非必需氨基酸和 1 mL L-谷氨酰胺, 混匀后备用。

(6) 1 g/mL PEG1450 (m/v): 称取 10 g PEG1450 (H(CH₂CH₂O)_nOH) 溶于 10 mL, PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 中, 超声处理使其溶解, 得到类似于胶水无色粘稠状液体, 121°C高压蒸汽灭菌 30 min, 冷却至室温后, 在紫外超净工作台上分装到已经灭菌的冻存管中, 1 mL/管, 置于-20°C冰箱冻存, 融合前取出先放 4°C冰箱解冻, 再置于 37°C烘箱温育备用。

(7) 细胞冻存液: 量取 9 mL RPMI-1640 完全培养液, 加入 1 mL 二甲基亚砜 (C₂H₆OS), 混匀后置于 4°C冰箱备用。

2.2.4 动物免疫

用 1 mL 无菌注射器多次缓慢地吸取乳化好的免疫试剂, 排出空气后, 将免疫试剂注射到小鼠颈背部, 每只注射 4-5 个点, 免疫剂量为 40 μg/只。首次免疫采用弗氏完全佐剂, 间隔 28 天进行二次免疫, 二次及其以后的免疫都采用弗氏不完全佐剂, 时间间隔为 21 天, 免疫方式和剂量相同, 具体的小鼠免疫策略见表 2.3。

表 2.3 不同阶段下的免疫策略
Tab. 2.3 Immune strategies of mice at different stages

免疫次序	间隔 (天)	免疫剂量 ($\mu\text{g}/\text{只}$)	部位/方法	佐剂类型
一	0	40	颈背部皮下多点注射	弗氏完全
二	28	40	同上	弗氏不完全
三	49	40	同上	弗氏不完全
四	70	40	同上	弗氏不完全
五	91	40	同上	弗氏不完全
冲击免疫	细胞融合前 3 天	30	腹腔注射	无

2.2.5 抗血清 ELISA 检测

二次免疫后,第 7 天将小鼠尾部取血,抗血清于 37°C 烘箱中放置 2 h 后,再于 4°C 冰箱中过夜,次日将抗血清离心 ($7084 \times g$, 5 min),取出上清液,加入同等体积的甘油,混匀后置于 -20°C 备用。采用间接 ELISA 检测抗血清的亲合力和灵敏度,以筛选免疫效果良好(抗血清效价和灵敏度高)的小鼠进行细胞融合。

间接非竞争 ELISA 步骤如下:

(1) 包被:取 10 μL , 0.5 mg/mL 的 AFB₁-BSA,加入到 10 mL, 0.05 mol/L, pH 9.6 碳酸盐缓冲液中,混匀,按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入微孔中,4°C 反应过夜或 37°C 温育 2 h,弃去包被液,用 0.05%PBST 洗涤酶标板 3 次,扣干;

(2) 封闭:取 5%脱脂奶粉-PBST (m/v),按照 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入微孔中,37°C 温育 1 h,弃去封闭液,用 0.05%PBST 洗涤酶标板 3 次,扣干;

(3) 加入抗体或抗血清稀释液:抗血清用 0.5%BSA-PBST 从第 1 列 1:1000 开始倍比稀释至第 11 列,第 12 列是空白对照,即加同等体积的 0.5%BSA-PBST。按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入微孔中,37°C 温育 1 h,弃去液体,用 0.05%PBST 洗涤酶标板 3 次,扣干;

(4) 羊抗鼠 IgG-HRP:取 1 μL , 1 mg/mL 的酶标二抗,加入 10 mL, 0.05%PBST,混匀后,按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入微孔中,37°C 温育 1 h 后,弃去酶标二抗液,用 0.05%PBST 洗涤酶标板 9 次,扣干;

(5) 显色:按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入显色液,37°C 避光下温育 10 min;

(6) 终止:按照 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入终止液,立即用酶标仪测定反应溶液在 450 nm 处的吸光值,即 OD 值。

(7) 结果判读: 以 OD₄₅₀ 值大于或等于 1 时所对应的抗血清最高稀释倍数为 ELISA 效价值 (抗血清滴度)。

间接竞争 ELISA 步骤如下: 除第 (3) 步骤和第 (7) 步骤外, 其他步骤与间接非竞争步骤一致。第 (3) 步骤为加入 AFB₁ 标准品和抗血清稀释液: 用 10% 甲醇-PBS 将 AFB₁ 倍比稀释一系列梯度浓度, 将上述 AFB₁ 标准品稀释液先按照 50 μL/孔加到微孔中, 用 0.5% BSA-PBST 稀释抗血清, 再按照 50 μL/孔加入到微孔中, 第 11 列作非竞争, 第 12 列作空白对照, 即每孔只加 50 μL 的 0.5% BSA-PBST 和 50 μL 的 10% 甲醇-PBS。37°C 温育 1 h, 弃去液体后, 用 0.05% PBST 洗涤酶标板 3 次, 扣干; 第 (7) 步骤为数据处理: 第 11 列的 OD₄₅₀ 值 (阴性值) 记作 B₀, 第 1-10 列 OD₄₅₀ 值记作 B, 第 12 列空白值记作 B*。

2.2.6 杂交瘤细胞的制备

(1) 冲击免疫: 根据抗血清 ELISA 检测结果, 选出效价高、灵敏度高的小鼠, 在细胞融合的前三天对该小鼠进行冲击免疫。具体操作为: 将 30 μg 的 AFB₁-BSA 直接用 0.9% 的生理盐水稀释至 150 μL 后, 混合均匀, 直接注射至小鼠的腹腔内即可。

(2) 骨髓瘤细胞 SP2/0 的制备: 将小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 用 RPMI-1640 完全培养基进行传代培养至生长对数期 (肉眼可见培养瓶底部呈白茫茫的片状, 镜检时细胞成片状分布, 细胞空隙较小, 圆润明亮), 将骨髓瘤细胞刮下, 加入 RPMI-1640 基础培养基重悬后, 离心 (1062 × g, 5 min), 弃上清, 留沉淀, 再加入一定体积的 RPMI-1640 基础培养基重悬, 倒置显微镜下用血球计数板镜检细胞数量, 使得细胞总量在 1-2 × 10⁷ 个。

(3) 细胞融合前耗材和试剂的准备、小鼠免疫脾细胞的制备、PEG 诱导骨髓瘤细胞与脾细胞融合的具体步骤参考杨青青论文 2.3.5.4^[14]。

2.2.7 杂交瘤细胞培养与筛选

细胞融合后的第 7 天左右, 用一次性灭菌玻璃管补加 2% HT 培养基, 1 滴/孔, 以促进杂交瘤细胞的生长繁殖, 第 14 天左右, 肉眼可见培养基底部有模糊的点状, 且培养基由紫红色变为黄色, 镜检观察细胞长至培养孔的 1/4-1/3, 这时可采用间接 ELISA 并结合不同浓度的 AFB₁ 标准品检测细胞上清液, 以提高筛选效率。首次检测完成后要及时补加 2% HT 培养基, 2 滴/孔。ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株的具体步

骤与 2.2.5 一致, 只不过第 (3) 步骤和第 (7) 步骤不同, 第 (3) 步骤为加入一定浓度的 AFB₁ 标准品和细胞上清液: 用 10% 甲醇-PBS 将 AFB₁ 稀释到一定浓度, 96 孔酶标板的奇数列按照 50 μ L/孔加入 10% 甲醇-PBS, 偶数列按照 50 μ L/孔加入一定浓度的 AFB₁ 标准溶液, 对应一个奇数列, 一个偶数列, 各按照 50 μ L/孔向酶标板微孔中加入细胞上清液, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 弃去液体后, 用 0.05% PBST 洗涤酶标板 3 次, 扣干; 第 (7) 步骤为结果判读: 96 孔酶标板奇数列的 OD₄₅₀ 值记作 B₀, 偶数列的 OD₄₅₀ 值记作 B, 抑制率为 $(1-B/B_0) \times 100\%$ 。

2.2.8 阳性株的单克隆化

采用有限稀释亚克隆法对阳性杂交瘤细胞株进行 10 次单克隆, ELISA 检测完成后, 阳性细胞数量达到或超过培养孔面积 1/4 时, 参考张道宏 2.3.3.6^[70]的方法进行单克隆, 当细胞数量在 200-300 个左右时, 吹取全部的细胞, 加入到 20 mL 的培养基, 按照 2 滴/孔铺满 96 孔。首次、第二次、第三次亚克隆分别使用 2、1、0.5% HT 培养基, 此后使用 RPMI-1640 完全培养基。亚克隆第 4 天左右, 镜检可见细胞集落, 亚克隆第 7 天左右按照 1 滴/孔补加 RPMI-1640 完全培养基, 第 14 天左右, 细胞长至细胞孔的 1/4 左右, 此时培养液微微发黄, 即可重复 2.2.7 步骤进行细胞上清液检测。

2.2.9 腹水制备与细胞冻存

2.2.9.1 腹水制备

(1) 小鼠致敏(腹腔注射): 使用弗氏不完全佐剂, 注射空白的 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 0.5 mL/只, 第 9 天后, 腹腔注射阳性杂交瘤细胞。

(2) 腹水制备: 培养阳性杂交瘤细胞浓度至 $1-2 \times 10^6$ 个/mL, 将其注射到致敏小鼠腹腔内, 大约 1 mL/只。大约 8 天左右, 可观察到小鼠皮毛杂乱, 腹部明显膨大, 行动缓慢且不活泼, 此时, 可制取腹水(正常为接近乳白色的液体), 每只一次大约能取腹水 5 mL, 间隔 2 天左右, 每只小鼠通常可再取一次腹水。

2.2.9.2 阳性株冻存

细胞冻存步骤与 2.2.6 步骤 (2) 相似, 只不过, 将培养至对数期的细胞离心, 弃上清, 留沉淀后, 加入 1-2 mL 的细胞冻存液重悬, 血球计数板计数后, 使细胞浓度约 $1-5 \times 10^6$ 个/mL, 将细胞分装于 2 mL 冻存管内。先将装有细胞的冻存管置于 4 $^{\circ}$ C,

10 min 后, -20°C 冻存 30 min, 转移至液氮罐上方过夜, 最后转移至液氮罐冻存盒中长期储存。

2.2.10 单抗纯化与制备

将收集的腹水离心 (4°C, 4427.5 × g, 10 min), 后续纯化所用试剂和依据杨青青学位论文 2.2.2.2^[114]。

2.2.11 单抗的效价、灵敏度和特异性

分别采用间接非竞争和竞争 ELISA 检测后得出效价和 IC₅₀ 值评价单抗亲和力和灵敏度。采用间接竞争 ELISA 检测黄曲霉毒素结构类似物, 数据经 Origin Pro 9.0 处理得出 IC₅₀ 值, 带入交叉反应率公式以评价单抗的特异性。

$$\text{交叉反应率 (CR, \%)} = (a/b) \times 100\%$$

其中, a 指 AFB₁ 的 IC₅₀ 值, b 指其他黄曲霉毒素结构类似物的 IC₅₀ 值。

2.2.12 可变区序列分析

利用总 RNA 提取试剂盒并按照说明书提取杂交瘤细胞总 RNA, 5'RACE 反转录得到 cDNA 序列, 根据 IMGT 网页公布的小鼠抗体序列信息设计各类亚型的通用引物, 经 PCR 扩增得到抗体可变区序列, 转化到大肠杆菌质粒中并抽提测序, 使用 seqman 软件比对获得的抗体序列, 比对分析测序结果, 初步得到抗体可变区序列, 导入 IMGT 分析抗体序列, 最后得到抗体可变区测序报告。

2.3 结果与讨论

2.3.1 抗血清 ELISA 检测

2.3.1.1 抗血清效价

在相同的实验条件下, 抗血清效价越高, 表明抗体稀释倍数越高, 即小鼠对免疫原更敏感, 产生抗体的数量或质量都比较好。

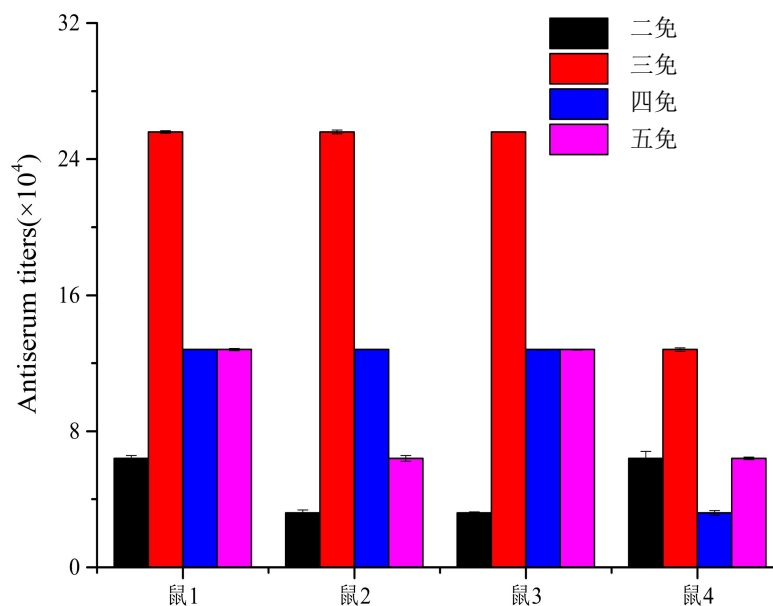


图 2.1 不同免疫次数下小鼠的抗血清效价

Fig. 2.1 Antiserum titers of mice under different immunization times

由图 2.1 可以发现,随着免疫次数的增加,1、2、3 号小鼠的抗血清效价先升高,后降低,这可能是因为早期 IgM 是首次免疫应答产生的抗体,随着不断的免疫应答,B 细胞在抗原刺激和细胞因子的作用下被激活,产生记忆细胞和效应 B 细胞,后者在再次免疫抗原的条件下,IgG 分泌增多,此时 IgG 是再次免疫应答的主要免疫球蛋白,效价达到最高值;当免疫次数再增加时,在相同剂量的免疫原下,小鼠受到的免疫刺激小,或已经产生了免疫耐受。4 号小鼠的抗血清效价先升高后降低,五免完成后,又升高,这可能是由于小鼠之间的体质差异,在相同的免疫条件下,免疫原的吸收效果、免疫系统的应答水平等的不同所引起的。此外,根据常规免疫原则,即少剂量、多次数、长时间的免疫生物体,使机体可以持续产生针对特异性抗原的抗体,一般认为,效价达到 1:16000 及以上可进行细胞融合。五免小鼠后,4 只小鼠的效价都高于 1:64000,表明小鼠可以用于细胞融合。

2.3.1.2 抗血清灵敏度

为获得大量能够特异性识别 AFB₁ 的 B 细胞,以用于细胞融合,产生特异性较好的杂交瘤细胞,在相应的效价下,采用竞争 ELISA 检测不同免疫次数下的抗血清以评价抗体的灵敏度。

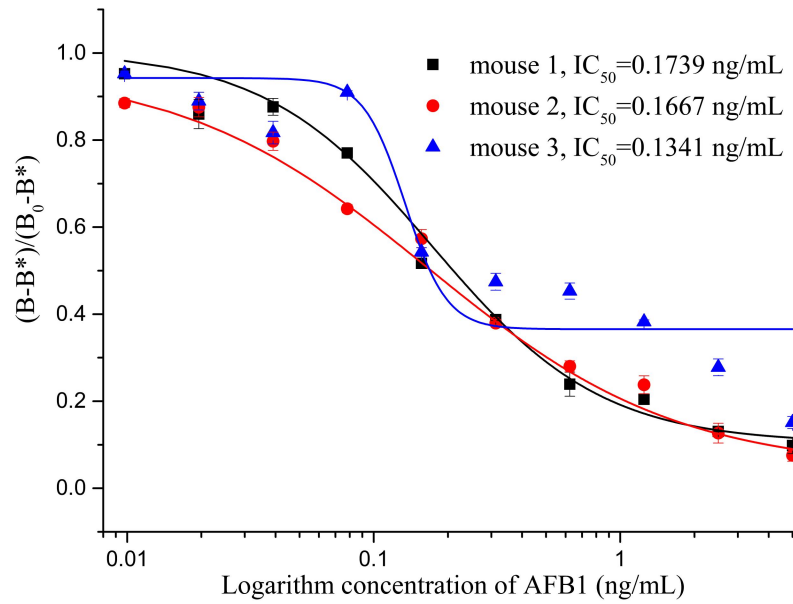


图 2.2 免疫小鼠抗血清的竞争曲线

Fig. 2.2 Competition curve of antiserum obtained

图 2.2 结果显示，在第五次免疫完成后，1、2 和 3 号小鼠的 IC₅₀ 值差距不大，其中 3 号鼠的 IC₅₀ 值最低，但考虑到 1、2 和 3 号小鼠的检测范围（IC₂₀-IC₈₀ 值分别为 0.0582-0.5190，0.0332-0.8354，0.1025-0.1756 ng/mL），在 IC₅₀ 值差距不大的情况下，2 号小鼠的检测范围更广且拟合曲线更好，因此选择 2 号小鼠进行细胞融合。

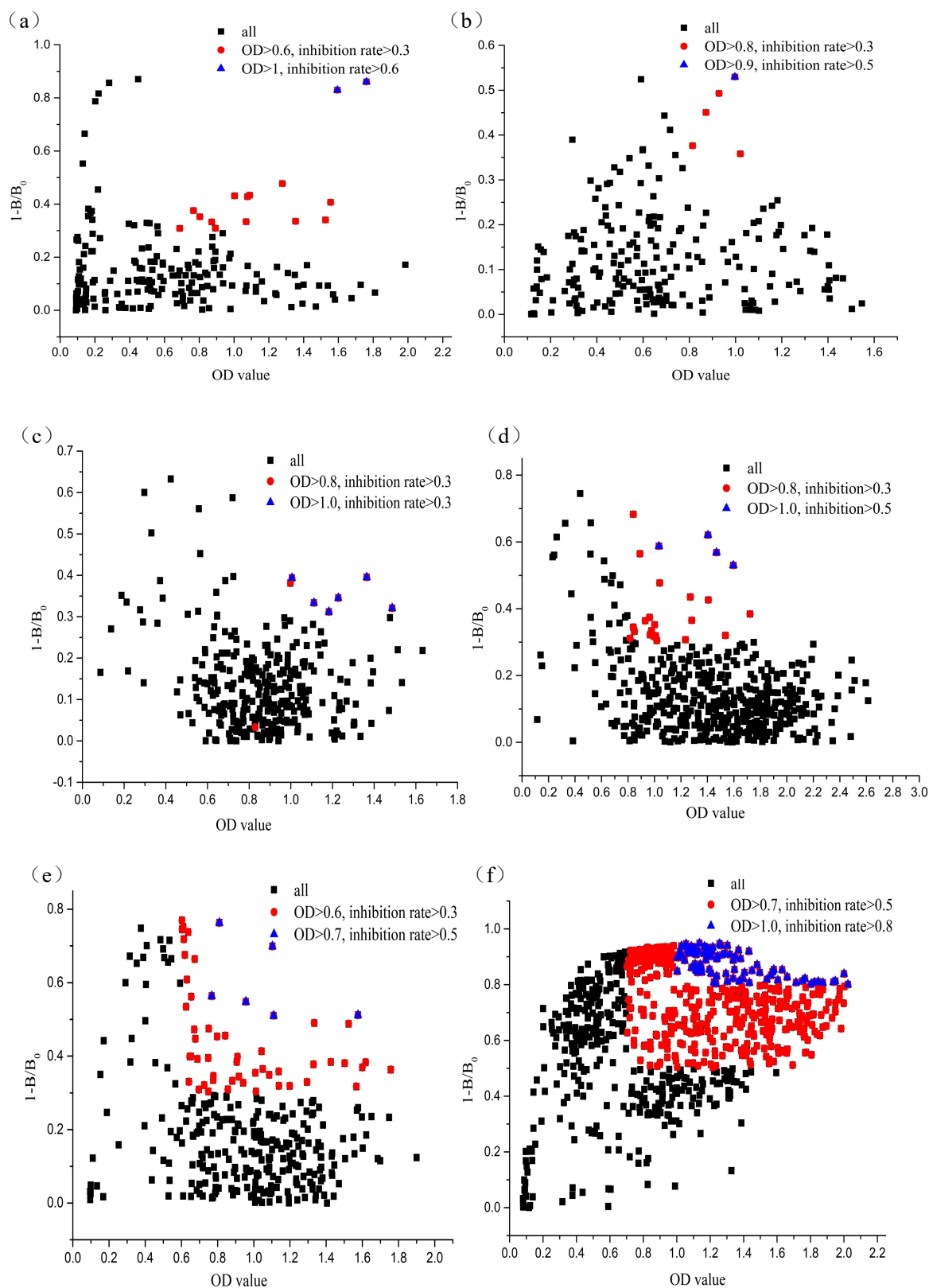
2.3.2 杂交瘤细胞培养与筛选

首先采用 2% 的 HAT 培养基有选择性地培养融合成功的杂交瘤细胞，第 7 天左右，补加 2% 的 HT 培养基富集杂交瘤细胞，以使其快速适应环境，促进其生长繁殖。第 14 天左右进行细胞上清液检测。此后逐渐降低 HT 培养基浓度，直至完全换成 RPMI-1640 完全培养基，以降低杂交瘤细胞对生长环境的依赖性，节约经济成本。对融合后的细胞进行 10 次有限稀释法亚克隆。



图 2.3 杂交瘤细胞生长图 (左: 第 7 天, 右: 第 14 天)

Fig. 2.3 The growth state of hybridoma cell (left: the 7th day, right: the 14th day)



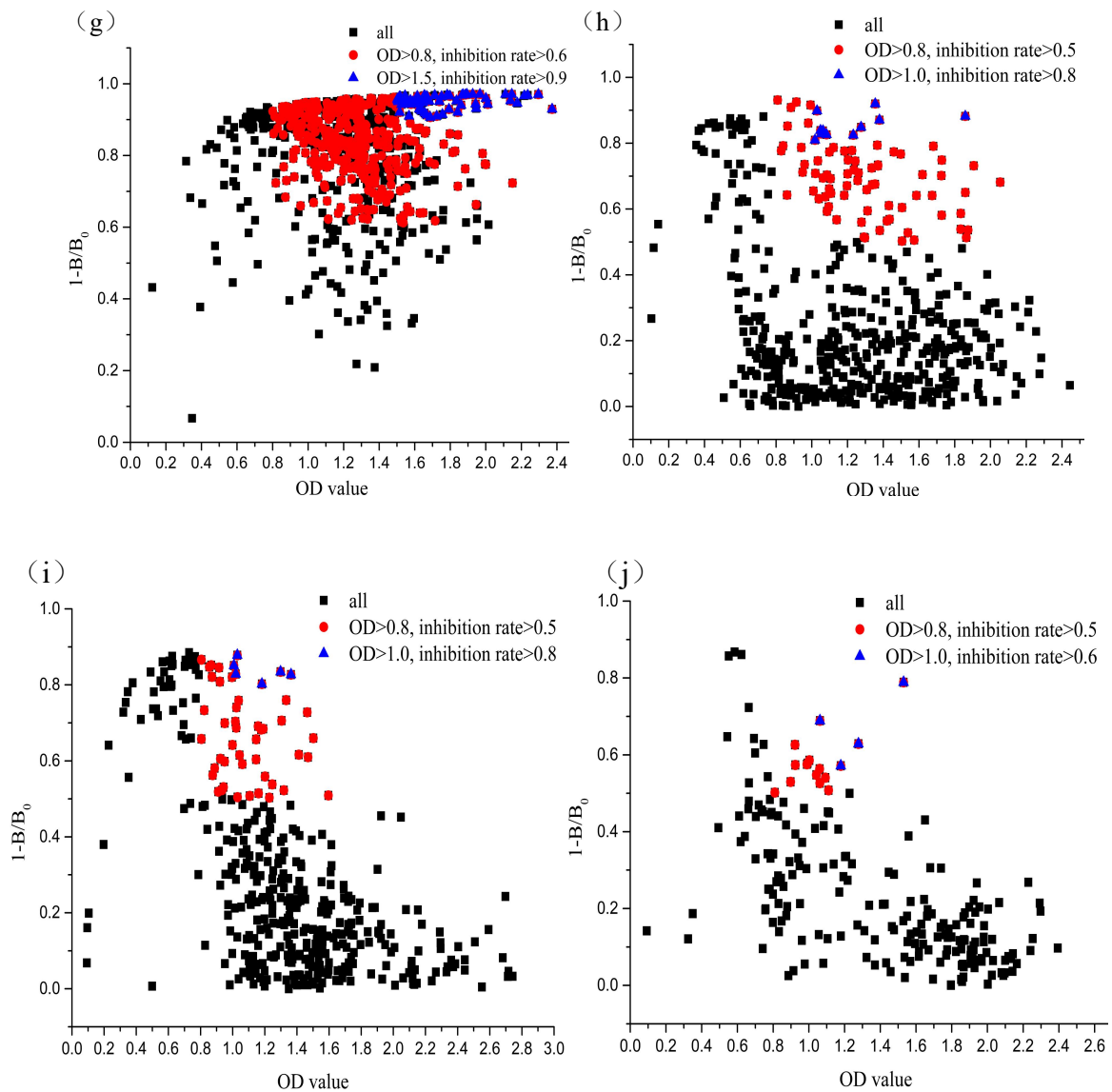


图 2.4 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株 (图 a-j 分别对应 1-10 次亚克隆筛选)
 Fig. 2.4 Positive hybridoma cell screened by ELISA (Fig. a-j corresponding to the 1st-10th subclone screening respectively)

由图 2.4 可以看出，随着亚克隆次数的增加（图 a-j），红色点和蓝色点的数量逐渐增加，且逐渐分布于二维平面的右上角，这表明细胞株分泌的抗体效价越来越好，对 AFB₁ 的竞争作用越来越强，阳性杂交瘤细胞株的数量密集且质量较好，这可能是由于经过多次单克隆化，阳性细胞株得以分选和富集，导致分泌的单抗效价和抑制率逐渐升高。当筛选所用的标准品浓度不变，亚克隆次数继续增加时（图 h-j），细胞生长繁殖缓慢，检测周期明显变长，且高质量的阳性细胞株的数量减少，其分泌的单抗的效价和灵敏度下降，如第 8 次亚克隆筛选的 D10 孔的效价为 2.2959，抑制率为

0.9703，其亚克隆孔 G8 的效价为 0.7757，抑制率为 0.7133，这可能是由于 AFB₁ 标准品浓度太低，阳性杂交瘤细胞的筛选和亚克隆达到自身的极限，且细胞相对脆弱，生长繁殖状态不好，从而影响到单抗的分泌，导致竞争作用减弱。

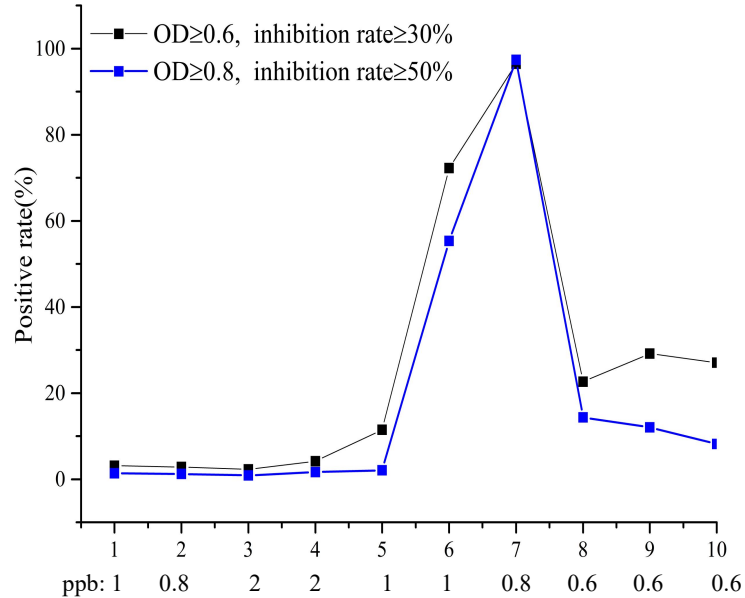


图 2.5 不同筛选次数下阳性杂交瘤细胞所占细胞总量的百分比

Fig. 2.5 The percentage of positive hybridoma cells under different screening time

由图 2.5 可知，随着细胞筛选次数的增加，阳性杂交瘤细胞所占每次筛选细胞总量的比率先增加，后减少。在第二次筛选时，降低标准品浓度至 0.8 ppb 时，阳性细胞比率都降低，这可能是因为一开始阳性杂交瘤细胞的生长缓慢，分泌抗体量少，不占优势或融合后杂交瘤细胞株本身的质量就不好，故降低标准品，可能导致阳性杂交瘤细胞的丢失。因此，第三次和第四次筛选，提高了标准品浓度，发现阳性细胞比率提高。第五、六、七次筛选开始降低标准品浓度，发现阳性细胞比率上升，且有些亚克隆阳性株分泌的单抗效价和抑制率也提高，比如第 5 次亚克隆阳性孔 H12 分泌的单抗效价为 0.8399，抑制率为 0.6829，其第 7 次亚克隆阳性孔 A7 分泌的单抗效价为 1.5388，抑制率为 0.8186；这可能是因为经过上几次阳性细胞株的富集和亚克隆，单抗质量越来越好，因此降低标准品浓度，反而能筛选到竞争效果更好的阳性株。尤其是从第 7 次标准品为 0.8 ppb 降低至第 8 次的 0.6 ppb，虽然阳性细胞孔比率下降，但个别阳性细胞株分泌的单抗抑制率却明显提高，这可能是因为进一步降低标准品浓度，大多数阳性株到达自身的极限，抑制率不再增加，而个别阳性株可能因此被单克隆纯化，因此筛到的细胞株质量更好。在第八、九、十次筛选中，标准品浓度不变，

细胞阳性率反而下降,这可能是由于过多的亚克隆和筛选对制备的单抗产生不良的影响,在此标准品浓度下,竞争作用达到饱和。最终筛选出了一株最好的抗 AFB₁ 杂交瘤细胞株,命名为 ZFG8。

综上所述,高浓度的 AFB₁ 标准品筛选可能有利于富集保留阳性细胞株,随着亚克隆次数的增加,细胞阳性率和上清液中单抗的抑制率逐渐增加,这可能是因为经过几次亚克隆,高质量的阳性细胞株得以分离和富集,使得在低浓度的标准品筛选下,其分泌单抗的抑制率依然提高,然而当亚克隆次数过多时(超过 7 次时),阳性细胞株生长繁殖缓慢,检测周期变长,且细胞上清液中单抗的抑制率几乎不变甚至降低,这可能是由于多次亚克隆可能对细胞造成了损伤,且筛选已经达到了细胞本身的限制,因此抑制率难以提高,其分泌的单抗质量可能下降。

2.3.3 单抗的效价、灵敏度和特异性

将纯化后的单抗粉末用 0.01 mol/L, pH 7.4 的磷酸缓冲溶液(已用 0.22 μm 微孔滤膜过滤)稀释至 2.5 mg/mL, ELISA 所用的包被原 AFB₁-BSA 由中国武汉农业科学研究院提供,将单抗溶液从 1:1000 倍比稀释,检测单抗的效价。在效价下,作竞争 ELISA, AFB₁ 标准品从第 1 列 2.5 ppb 倍比稀释,其他条件不变。实验结果表明,单抗的效价为 1:1000,这可能是由于在细胞冻存、细胞复苏时,质量高的阳性细胞株丢失、腹水制备时,部分阳性细胞株转阴、腹水纯化时,单抗损失较多,沉淀的杂蛋白较多,导致单抗效价值低。

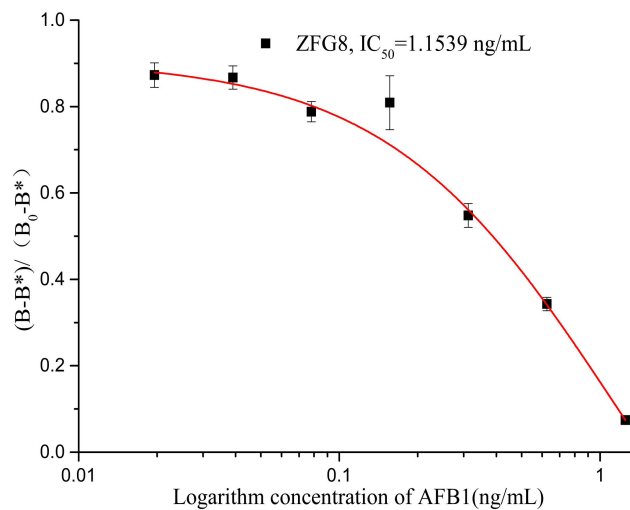


图 2.6 ZFG8 单抗的竞争曲线

Fig. 2.6 The competition curve of ZFG8 mAb

如图 2.6 所示, 单抗的竞争结果表明, 其 IC₅₀ 值为 1.1539 ng/mL, 检测范围为 0.2829-4.7073 ng/mL (IC₂₀-IC₈₀)。

将 AFB₁、AFB₂、AFM₁、AFM₂、AFG₁ 和 AFG₂ 标准品从第 1 列 2.5 ppb 倍比稀释, 在单抗效价下, 作间接竞争 ELISA 以评价单抗的特异性, 根据结果可知, 单抗对 AFB₁ 的 IC₅₀ 值为 1.3339 ng/mL, 对 AFB₂ 的 IC₅₀ 值为 182.60 ng/mL, 对其他霉菌毒素的 IC₅₀ 值大于 182.60 ng/mL, 根据交叉反应率公式计算知, 单抗对 AFB₂ 的交叉反应率为 0.73%, 对 AFM₁、AFM₂、AFG₁ 和 AFG₂ 的交叉反应率小于 0.73%, 证明所得的单抗能够高特异性地识别 AFB₁。

2.3.4 与同类型单抗的比较

目前, 国内外有很多针对 AFB₁ 单抗制备的报道 (见表 2.4), 与其他研究者制备 AFB₁ 单抗相比, 本课题制备的单抗对 AFB₁ 识别的灵敏度较低, 这可能是由于从小鼠免疫完成后到细胞融合间隔时间过长从而影响了脾细胞的活性; 前期采用传统有限稀释法亚克隆及后期亚克隆次数过多, 再加上人为选择生长慢但抑制率高的细胞株, 经多次传代后, 导致了高质量阳性细胞株的丢失; 杂交瘤细胞本身的限制, 灵敏度难以提高。然而, 虽然 1C11 单抗对 AFB₁ 的灵敏度最高, 但是其是一株黄曲霉毒素通用单抗, 对 AFB₂ 的交叉反应率也最高 (交叉反应率为 92.3%); 与孙秀兰制备的 5D3 单抗相比, 本研究所制备的 AFB₁ 单抗的灵敏度略高, 两者对 AFB₂ 的交叉反应率相差不大, 但其对其他黄曲霉毒素 (AFG₁、AFG₂、AFM₁) 的交叉反应率均小于 0.73%, 因此, 综合灵敏度和特异性, 这优于 5D3 单抗。仅就特异性而言, ZFG8 的特异性最高, 这可能是由于良好的免疫效果和增多的亚克隆次数, 提高了单抗对 AFB₁ 的特异选择性。

表 2.4 现有 AFB₁ 单抗及黄曲霉毒素通用抗体的灵敏度与交叉反应率
 Tab. 2.4 The sensitivity and cross reaction rate of existing anti-AFB₁ mAb and anti-aflatoxin universal antibody

阳性株	方法	单抗类型	灵敏度 (IC ₅₀ , ng/mL)					交叉反应率 (%)					年份	文献
			AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁		
7A1	icELISA	特异性	0.04	0.15	0.40	0.45	0.40	100	26.7	10	8.9	10	2017	[115]
4D12		通用性	0.02	0.10	0.10	0.09	0.10	100	20	20	22.2	20		
2B6	icELISA	特异性	0.95	1.8	1.6	6.1	9.3	100	52.8	59.4	15.6	10.2	2007	[116]
3G1	icELISA	特异性	1.6	25	>100	>100	/ ^a	100	6.4	<1	<1	/	2010	[117]
357	icELISA	特异性	0.003	0.007	0.0034	0.016	/	100	42	88	19	/	2008	[118]
9c7c11cd	cdELISA	特异性	0.045	0.057	2.530	2.120	/	100	78.9	1.78	21.2	/	2016	[119]
34	cdELISA	特异性	0.62	12.4	2	25.8	/	100	5	31	2.4	/	2006	[120]
1NP-Dcd	cdELISA	特异性	0.037	0.123	0.063	0.463	0.925	100	30	59	8	4	2016	[121]
2A4	icELISA	特异性	0.12	1.3	0.8	10.3	3.1	100	9.2	15	1.2	3.9	2016	[101]
5D3	icELISA	特异性	2	280	300	1050	86	100	0.71	0.67	0.19	2.33	2005	[122]
1C11	icELISA	通用性	0.0012	0.0013	0.0022	0.018	0.013	100	92.3	54.5	6.7	9.0	2011	[70]
4F12		特异性	0.086	0.095	0.101	0.416	0.201	100	90	84	20.7	42.8		
ZFG8	icELISA	特异性	1.33	182.6	>182.6	>182	>182	100	0.73	<0.73	<0.73	<0.73	2022	b

^a表示并未检测该毒素的 IC₅₀, ^b表示本课题所制备的单抗

2.3.5 可变区序列分析

由单抗的基因序列和氨基酸序列结果(附录)可知,重链可变区编码基因序列(SQ VH NO.1)长 355 bp,其编码 118 个氨基酸(SQ VH NO.2);轻链可变区编码基因序列(SQ VL NO.3)长 328 bp,其编码 109 个氨基酸(SQ VL NO.4)。这为抗体的同源建模、抗原抗体的识别机制研究、基因工程抗体的改造提供了数据和理论支持。

2.4 本章小结

本章研究了有限稀释亚克隆的次数对 AFB₁ 单抗制备的影响,通过 HAT 选择培养基筛选出融合成功的杂交瘤细胞株,浓度不断降低的 HT 培养基富集阳性细胞株,采用 ELISA 法结合不同浓度的 AFB₁ 标准品筛选阳性细胞株,采用有限稀释对阳性细胞株进行多达 10 次单克隆化。主要结论如下:

- (1) 随着亚克隆次数的增加,细胞阳性率和上清液中单抗的抑制率逐渐增加,

这可能是因为多次亚克隆，使高质量的阳性细胞株得以分离和富集，然而当亚克隆超过 7 次时，阳性细胞株生长繁殖缓慢，检测周期变长，且细胞上清液中单抗的抑制率几乎不变甚至降低，这可能是因为多次亚克隆可能对细胞造成了损伤，且筛选已经达到了细胞本身的限制，因此抑制率难以提高。

(2) 对杂交瘤细胞株 ZFG8 所分泌的单抗进行评价，其半抑制浓度 (IC₅₀) 为 1.1539 ng/mL，检测范围为 0.2829-4.7073 ng/mL (IC₂₀-IC₈₀)；单抗对其他黄曲霉毒素 (AFB₂、AFM₁、AFM₂、AFG₁、AFG₂) 的最大交叉反应率为 0.73%。此外，还对单抗可变区基因和氨基酸序列进行分析。

(3) 与其他研究者制备抗 AFB₁ 单抗相比，本课题制备的单抗能高特异性识别 AFB₁，这很大程度上可能是由于增多的亚克隆次数，提高了单抗对 AFB₁ 的特异选择性。

以上研究为杂交瘤细胞的筛选、单抗制备提供一定的参考，为免疫分析方法的构建提供了可选择的识别元件。

第三章 构建 ELISA 以高通量检测黄曲霉毒素 B₁

3.1 引言

由于黄曲霉毒素种类繁多、污染广泛、毒性大且难以预防。其中，就毒性而言，AFB₁是已知天然最有效的致癌物，居于黄曲霉毒素的首位。因此，为预防其带来的严重危害，简单快速、可靠灵敏、经济有效的分析方法成为研究的热点。而 ELISA 的样品前处理简单，其灵敏度可以与大型仪器检测相媲美，检测限甚至更低，可实现高通量筛选，目前，以此为基础的市售 ELISA 试剂盒在黄曲霉毒素的检测中得到了广泛应用，其灵敏度基本满足国家限量标准要求，但与欧盟的限量要求仍有差距。此外，ELISA 试剂盒的准确性很大程度与所用的抗体和抗原的性能有关，不同厂家来源的抗体和抗原对于所构建的 ELISA 性能的影响不同，除此之外，方法模式、样品前处理以及仪器和实验人员的操作都会对最终结果的准确度产生影响。因此，随着时代发展，提高 ELISA 检测的准确性和稳定性，以实现农产品中 AFB₁ 的监测和预警有重要意义。

基于上述分析和思考，为提高 ELISA 检测的准确性和稳定性，首先，搜集市售和实验室的 AFB₁ 抗原抗体，研究了不同来源的抗原抗体组合对 ELISA 性能的影响；其次，在最佳的抗原抗体组合下，通过优化封闭液种类、甲醇浓度、pH、盐离子浓度、酶标二抗浓度，在最优条件下，建立甲醇和玉米粉基质标准曲线；最后，对该方法的灵敏度、特异性、精确性和准确性进行评估，将构建的 ELISA 应用于玉米粉中黄曲霉毒素 B₁ 的高通量检测，并与 HPLC 的检测结果相比较，以评价其应用性。

3.2 材料与方法

3.2.1 主要试剂与仪器

本章所用到的试剂与仪器包含在 2.2.2 的试剂与仪器中，除此之外，还用到的其他试剂如表 3.1 所示。

表 3.1 本实验所用的主要试剂
Tab. 3.1 Main reagents of this experiment

试剂	化学式	规格	厂家
AFB ₁ -BSA	/	1 mg/mL	山东绿都
AFB ₁ -BSA	/	1 mg/mL	北京博奥龙
抗 AFB ₁ 单抗	/	1 mg/mL	山东绿都
抗 AFB ₁ 单抗 1C11	/	固体粉末	中国农业科学研究院 (武汉)
卵清白蛋白 (OVA)	/	10 g	美国 Sigma

3.2.2 主要试剂配制

本章试剂配制与 2.2.3.1 的 ELISA 试剂配制相同, 除此之外, 补充以下所用到的试剂。

(1) 1%BSA/OVA-PBST (m/v): 称取 50 mg BSA/OVA 溶解于 5 mL PBST 中, 混匀, 现配现用, 短时间可置于 4°C 备用。

(2) 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (用于配制不同盐离子浓度和不同 pH 的磷酸盐缓冲液): A 液, 称取 3.580 g 十二水合磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄ · 12H₂O), 溶解于烧杯中, 用超纯水定容至 50 mL, 置于 4°C 备用; B 液, 称取 1.560 g 二水合磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄ · 2H₂O), 溶解于烧杯中, 用超纯水定容至 50 mL, 置于 4°C 备用。

(3) 不同盐离子浓度的 0.01 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液: 取 (2) 中 A 液和 B 液各 4.75, 20.25 mL, 用超纯水定容至 500 mL。量取 4 份上述溶液, 每份 100 mL, 分别加入 0、0.2、0.8、3.2 g 氯化钠 (NaCl), 配制成 0%、0.2%、0.8%、3.2% 的磷酸盐缓冲液。

(4) 不同 pH 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液: 取 (2) 中的 A 液和 B 液, 按照表 3.2 所示配制, 定容至 100 mL。

表 3.2 不同 pH 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液
Tab.3.2 0.01 mol/L phosphate buffer solution of different pH

pH	A 液 (mL)	B 液 (mL)	超纯水 (mL)
5.7	4.675	0.325	95
6.5	3.425	1.575	95
7.4	0.950	4.050	95
8.0	0.265	4.735	95

3.2.3 ELISA 具体步骤

间接非竞争和间接竞争 ELISA 步骤参考 2.2.5。

3.2.4 不同抗原抗体组合对 ELISA 结果影响

不同组合下的 AFB₁-BSA (A、B、C) 和抗 AFB₁ 单抗 (1、2、3 单抗的初始浓度分别是 0.5、0.5 和 2.5 mg/mL)，按照间接 ELISA 得出数据，处理后，分析不同抗原抗体组合对 ELISA 效价和灵敏度的影响，为提高 ELISA 的灵敏度，选取效价值高、灵敏度高的抗原抗体组合构建 ELISA。

3.2.5 ELISA 条件优化

3.2.5.1 封闭液的优化

加入不同种类的封闭液 (1%OVA-PBST、1%BSA-PBST、5%脱脂奶粉-PBST、5%脱脂奶粉-PBS)，作竞争 ELISA，经数据处理后，选择对应 IC₅₀ 值最低的封闭液为最佳反应条件。

3.2.5.2 甲醇浓度的优化

按照间接竞争 ELISA 步骤，即第三步加入用不同浓度的甲醇-PBS (5%、10%、20%、40%，v/v) 稀释的一系列 AFB₁ 标准品，后续步骤一致，经数据处理后，选择对应 IC₅₀ 值最低的甲醇-PBS 浓度为最佳反应条件。

3.2.5.3 盐离子浓度的优化

按照间接竞争 ELISA 步骤，即第三步中，先用 0.01 mol/L，pH7.4 磷酸盐缓冲液 (含 0%、0.2%、0.8%、3.2%的氯化钠，m/v) 配制不同盐浓度的甲醇-PBS 和 0.05%BSA-PBST，再用上述溶液分别稀释相应的 AFB₁ 标准品和单抗，后续步骤一致，经数据处理后，选择对应 IC₅₀ 值最低的盐离子浓度为最佳反应条件。

3.2.5.4 pH 值的优化

按照间接竞争 ELISA 步骤，即第三步中，先用 0.01 mol/L，一定盐离子浓度的不同 pH 值的磷酸盐缓冲液 (pH 5.7、6.5、7.4、8.0) 配制甲醇-PBS 和 0.05%BSA-PBST，再用上述溶液分别稀释相应的 AFB₁ 标准品和单抗，后续步骤一致，经数据处理后，

选择对应 IC₅₀ 值最低的 pH 值为最佳反应条件。

3.2.5.5 酶标二抗稀释倍数的优化

取不同体积的酶标二抗 (1 mg/mL) 配制成不同稀释倍数的酶标二抗-PBST 溶液 (1:5000、1:10000、3:20000、1:20000, v/v)。作间接竞争 ELISA 步骤, 经数据处理后, 选择对应 IC₅₀ 值最低的酶标二抗稀释倍数为最佳反应条件。

3.2.6 样品预处理

参考国标方法 (GB5009.22-2016): 称取 5.00 g 玉米样品粉末于 50 mL 离心管中, 加入 20.00 mL, 70% 甲醇-水溶液 (v/v), 涡旋混匀后, 置于超声波中振荡 20 min, 在 6000 r/min 下离心 10 min, 用 0.45 μm 有机滤膜过滤 2 次得上清液, 再用 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液稀释 5 倍后备用。

3.2.7 ELISA 工作标曲的建立

取经大型仪器鉴定为阴性的玉米粉样品, 经过样品预处理后得到 12 mL 上清液, 将其稀释 5 倍后, 再用其稀释 AFB₁ 标准品至一系列的浓度梯度, 在最佳的反应条件下, 根据间接竞争 ELISA, 经 Origin Pro 9.0 数据处理, 建立甲醇-PBS 基质和玉米粉基质工作标准曲线。

3.2.8 方法评价

3.2.8.1 ELISA 特异性评价

在最佳反应条件下, 研究所建立方法在玉米粉基质中对不同种类的黄曲霉毒素 (AFB₂、AFM₁、AFM₂、AFG₂) 的特异性。

3.2.8.2 ELISA 精确性与准确性评价

取经大型仪器鉴定为阴性的玉米样品, 对其添加低、中、高浓度的 AFB₁, 日内每个加标浓度重复 3 次, 日间每个加标浓度重复 3 次, 重复 3 天, 计算加标回收率和变异系数, 以评价方法的精确性与准确性。

3.2.9 实际应用性

购买 1 份玉米粉标准物质 (GBW (E) 100386) 和 3 份市售的玉米粉, 按照样品

预处理提取上清液，稀释 5 倍后，在最优条件下进行竞争 ELISA 检测，将 $Y=(B-B^*)/(B_0-B^*)$ 带入线性拟合方程，反求 X，则样品中 AFB₁ 的浓度 $C(\text{ng/mL})=10^X$ ，同样的玉米粉经 HPLC 检测，对比检测结果以验证 ELISA 结果的准确性和可靠性。

3.3 结果与讨论

3.3.1 不同抗原抗体组合对 ELISA 影响

作为免疫分析方法的核心试剂，抗原抗体的质量是提高免疫分析方法灵敏度和准确度的关键。已知，效价越高，表明单抗用量越少，单抗对 AFB₁ 的亲合力越高。

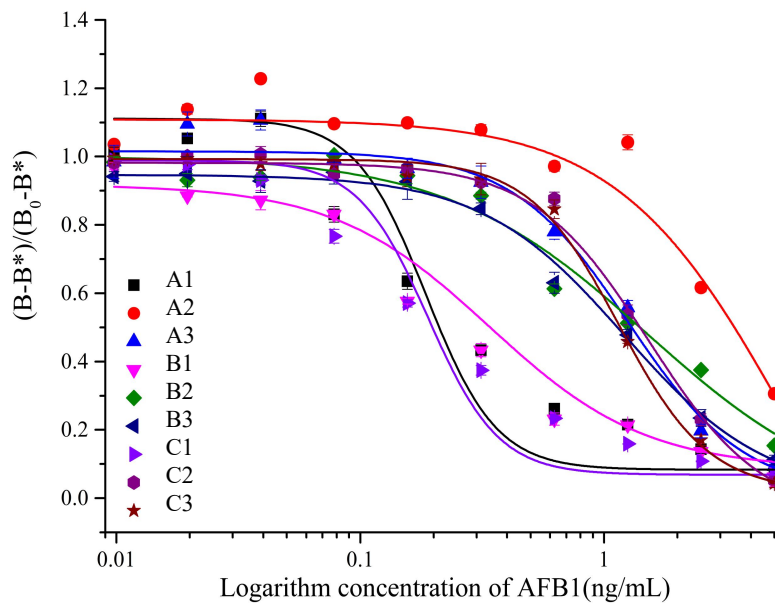


图 3.1 不同抗原抗体组合下的竞争曲线

Fig. 3.1 Competition curves under different combinations of antigen and antibody

在其他检测条件不变的情况下，由表 3.3 可以看出，不同来源的抗原抗体组合，ELISA 的效价相差不大且较低，这可能是由于单抗本身的限制，因此对不同来源的抗原的亲合力不高，2 号单抗的效价优于 1 号和 3 号，表明 2 号单抗的亲合力更高。在相同的抗原，不同的单抗组合下（如 A1、A2、A3），ELISA 的效价相差不大，但灵敏度相差很大，这是由于单抗质量不同引起的，如单抗的来源、制备方法、纯化方法、储存条件等都能影响到单抗的质量。在相同的单抗，不用抗原组合下灵敏度不同，如 B2 和 C2 几乎相同，但与 A2 相差巨大，这可能主要由于抗原的质量差距引起的。完全抗原 AFB₁-BSA 是由 AFB₁ 和 BSA 偶联而成，半抗原 AFB₁ 的结构（连接臂长短、引入基团结构与位置等）、与 BSA 的偶联方法、偶联率以及产率纯度，都影响到完

全抗原的理化性质，进而影响到完全抗原的质量和单抗的识别作用。此外，相比于 1 号和 2 号单抗，A3、B3 和 C3 的灵敏度几乎一致，这表明单抗对不同来源的抗原的识别效果相似，进一步表明 3 号单抗的结构或识别作用最稳定。虽然，2 号单抗的亲合力高，但是灵敏度最低，即对 AFB₁ 的特异性识别弱；而 A1 和 C1 组合，其灵敏度最高。考虑到经济成本，产品的批次，再综合效价和 IC₅₀ 值，选择 C1 这一组合建立 ELISA。

表 3.3 不同抗原抗体组合下的效价和 IC₅₀

Tab. 3.3 Titers and IC₅₀ under different combinations of antigen and antibody

	A	B	C
1	1:1000 ^a , 0.1856 ^b	1:1000, 0.3383	1:1000, 0.1894
2	1:2000, 5.6755	1:4000, 1.5024	1:4000, 1.5173
3	1:1000, 1.2563	1:1000, 1.2081	1:1000, 1.1535

^a 指的是抗原抗体组合下的效价，^b 指的是抗原抗体组合下的 IC₅₀ 值

3.3.2 ELISA 条件优化

3.3.2.1 封闭液的优化

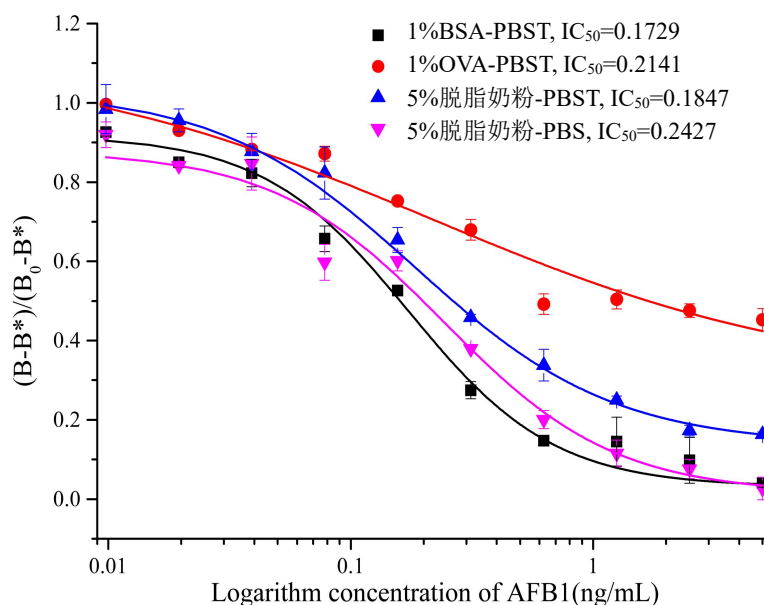


图 3.2 不同种类的封闭液的竞争曲线

Fig. 3.2 Competition curves of different sealing liquids

封闭剂应封闭所有微孔的未结合位点而不结合靶蛋白表位、也不与抗体或检测试剂有交叉反应，因此其目的是降低非特异性吸附，从而降低背景值。通常，一般用

0.05-0.1%PBST 溶解 BSA、OVA、脱脂奶粉、明胶等配成封闭液，因为其含有大量蛋白质，可以与微孔中表面上的空洞位置结合，从而降低背景值；另外，吐温-20 作为一种表面活性剂，可以保护抗原抗体，并且能减少抗体对抗原的非特异性作用，从而也能降低背景值。因此，在相同的抗原抗体的组合下，我们研究了不同种类封闭液下的 IC₅₀。由图 3.2 可以得知，在 1%BSA-PBST 封闭下，IC₅₀ 为 0.1729 ng/mL，封闭效果最好；5%脱脂奶粉-PBST 的 IC₅₀ 为 0.1847 ng/mL，效果次之；5%脱脂奶粉-PBS 封闭效果最差，这可能是由于封闭液中未加表面活性剂吐温-20。由于 1%BSA-PBST 和 5%脱脂奶粉-PBST 的封闭效果相差不大，且考虑到 BSA 比较昂贵，为节约经济成本，故选择 5%脱脂奶粉-PBST 作为最佳的封闭液条件。

3.3.2.2 甲醇浓度的优化

由于 AFB₁ 难溶于水，易溶于甲醇、氯仿等有机溶剂，但考虑到抗体对目标物的识别处于溶液环境，且甲醇对抗体的活性有一定影响，从而影响抗原抗体识别反应。

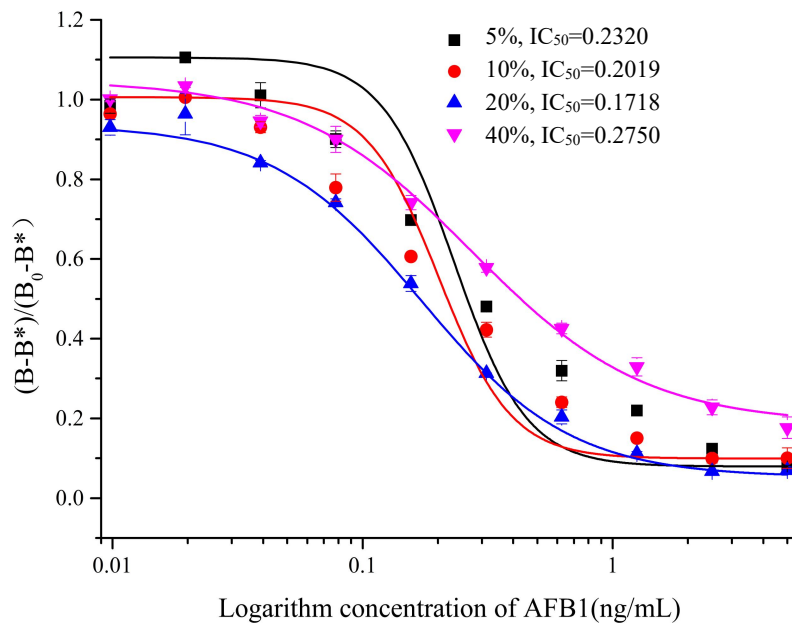


图 3.3 不同甲醇浓度下的竞争曲线

Fig. 3.3 Competition curve under different methanol concentrations

由图 3.3 可知，随着甲醇浓度的增加，IC₅₀ 值先降低再升高，且在 20%甲醇-PBS 下达到最小值，这可能是由于在此甲醇浓度下，AFB₁ 良好地溶解于溶液中，且甲醇浓度对抗体的活性影响降到最低，抗原抗体反应体系达到最优水平。因此，当甲醇-PBS (v/v) 的浓度为 20%时，作为最佳的反应条件。

3.3.2.3 盐离子浓度的优化

盐离子能改变蛋白质的表面电荷分布,从而影响静电势能、溶解度、疏水作用力、氢键、离子键等。抗体作为一种蛋白质,其理化特性也受盐离子浓度影响,特别是在高浓度盐离子时,抗体的水化层、疏水作用等被破坏,导致抗体构象改变甚至沉淀,影响抗体活性。

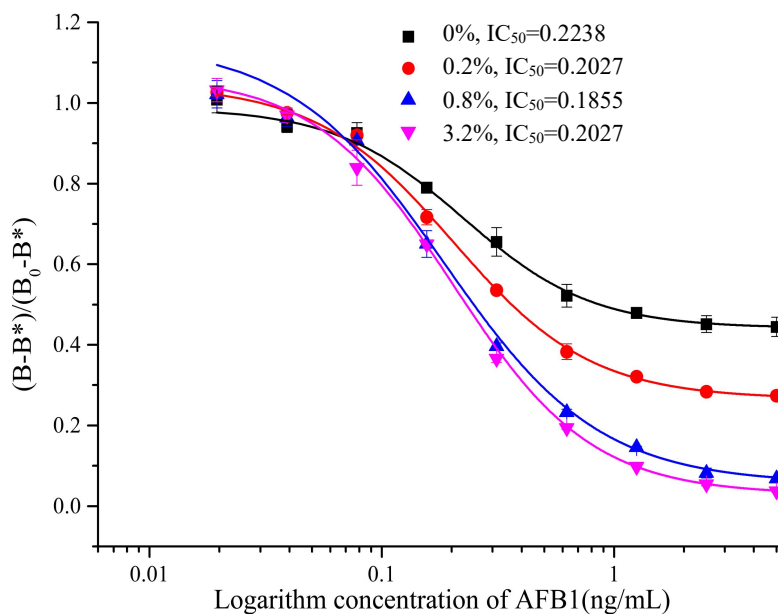


图 3.4 不同盐离子浓度的竞争曲线

Fig 3.4 Competition curve of different salt ion concentrations

由图 3.4 可知,随着盐离子浓度的增加,灵敏度也提高,0.8%盐离子浓度(以 NaCl 计)时,灵敏度最高(IC₅₀为 0.1855 ng/mL),此后盐离子浓度增加,灵敏度反而降低,这可能是因为在低浓度的盐离子时,抗体的溶解度增加;当盐离子浓度再升高时,抗体的理化性质朝着不利于抗原抗体识别反应的方向发展,导致灵敏度降低。因此,选择 0.8%氯化钠浓度作为最佳的盐离子浓度。

3.3.2.4 pH 值的优化

由于组成抗体的氨基酸有游离的羧基、氨基还有 R 侧链,在溶液中解离为两性离子,在解离基团的数目和种类一定的情况下,溶液 pH 值决定抗体电荷性质和数量,这会进一步影响抗体的理化性质(盐键、等电点等)。

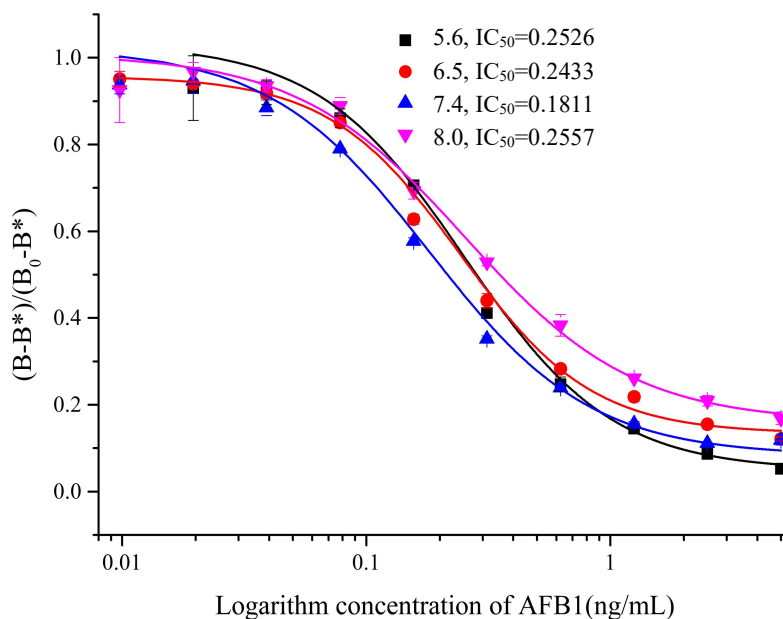


图 3.5 不同 pH 条件下的竞争曲线

Fig. 3.5 Competition curve under different pH conditions

由图 3.5 可知，随着 pH 的增大，灵敏度先升高，再降低，在中性 pH7.4 的条件下，灵敏度最高（IC₅₀ 为 0.1811 ng/mL），这可能是因为 pH 过酸或过碱，抗体中的氨基酸分别形成氨基化阳离子和羧基阴离子，这在一定的盐浓度中，会形成不同的复杂体系，影响抗原抗体识别。因此，选择 7.4 作为最佳 pH 条件。

3.3.2.5 酶标二抗稀释倍数的优化

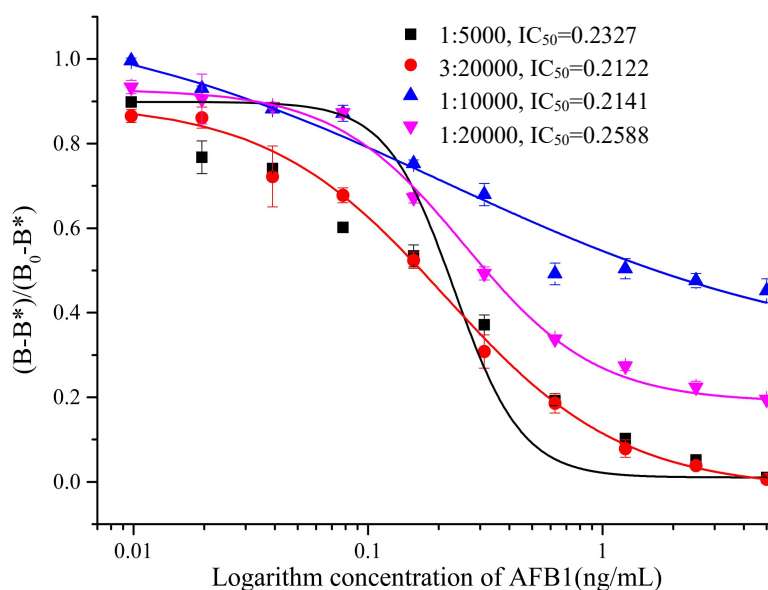


图 3.6 不同酶标二抗稀释倍数下的竞争曲线

Fig. 3.6 Competition curve under different dilution ratio of enzyme labeled secondary antibody

由于酶标二抗能识别单抗，因而洗脱后被固定在微孔中，进而显色。酶标二抗的稀释度可以影响显色进而影响 OD 值。由图 3.6 可知，随着酶标二抗的稀释倍数增加，灵敏度先升高，再降低，这可能是因为酶标二抗稀释倍数过高或过低会造成非特异性吸附，进一步影响显色及背景值。由于酶标二抗在 3:20000 和 1:10000 的 IC₅₀ 值相差不大，为节约成本，选择 1:10000 作为酶标二抗稀释倍数。

3.3.3 ELISA 工作标曲的建立

在上述最优的条件下，AFB₁ 标准品浓度从第 1 列 5 ppb 倍比稀释至第 10 列 0.0097 ppb，作甲醇基质和玉米粉基质的工作标准曲线。

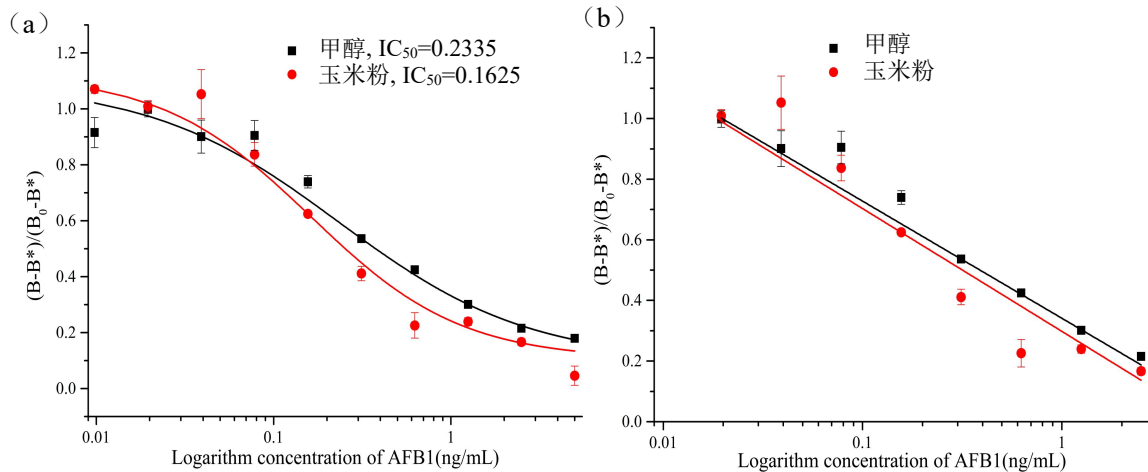


图 3.7 甲醇和玉米基质下的拟合曲线 (a: 非线性; b: 线性)

Fig. 3.7 Fitting curve under methanol and corn matrix (a: nonlinear; b: linear)

如图 3.7 所示，在甲醇基质中，IC₅₀ 为 0.2355 ng/mL，检测范围为 0.0422-1.2926 ng/mL (IC₂₀-IC₈₀)；在玉米粉基质中，IC₅₀ 为 0.1625 ng/mL，线性检测范围为 0.0195-2.5 ng/mL (相当于玉米样品的 0.2343-30 μg/kg)，玉米粉基质的线性拟合方程为 $Y=-0.4051X+0.2978$ ($R_{adj}^2=0.9821$)，我国国标 (GB5009.22-2016) 规定玉米样品中的 AFB₁ ≤ 20 μg/kg，且规定采用 ELISA 试剂盒检测玉米中 AFB₁ 的检出限为 1 μg/kg，定量限为 3 μg/kg，根据所建立的 ELISA 的线性检测范围可知，该方法可以满足玉米粉中 AFB₁ 的高通量检测。

3.3.4 方法评价

3.3.4.1 ELISA 特异性

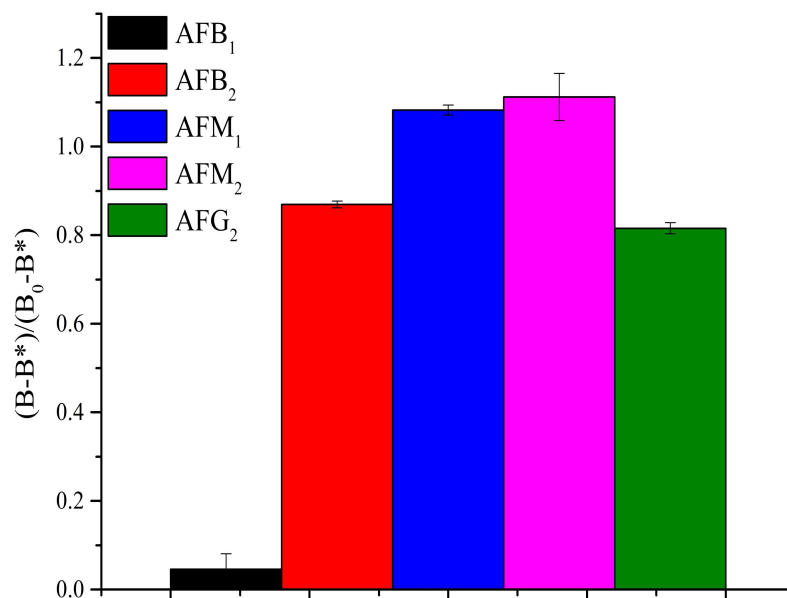


图 3.8 ELISA 的特异性评价

Fig. 3.8 Specificity evaluation of ELISA

如图 3.8 所示，在 5 ppb 浓度下，玉米基质中的 AFB₂、AFM₁、AFM₂、AFG₂ 的 $(B-B^*)/(B_0-B^*)$ 高于 0.8，显著高于 AFB₁ 的值 (0.046)，基于间接竞争 ELISA 原理，当样品中的黄曲霉毒素低于 5 ppb， $(B-B^*)/(B_0-B^*)$ 值更高，这意味着当样品中的黄曲霉毒素低于在 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，所建立的方法能特异性识别玉米中的 AFB₁，表明所建立的方法具有良好的特异性。

3.3.4.2 ELISA 精确性和准确性

对阴性玉米粉样品进行低、中、高浓度的加标 (0.46、15、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，在最优条件下进行竞争 ELISA 检测，其中日内实验每组浓度重复 3 次，日间实验每组浓度重复 3 次，连续 3 天。计算加标回收率和相对标准偏差 (RSD)，实验结果如表 3.4 所示，玉米粉样品的加标回收率为 81.13%-96.94%，相对标准偏差均 $\leq 9.14\%$ ，表明所建方法的准确性良好。

表 3.4 ELISA 加标回收

Tab. 3.4 Recovery experiments of ELISA

实验	添加值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测值 \pm S.D ^a ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
批内 (n=3)	0.46	0.43 \pm 0.04	91.50	9.14
	15	14.08 \pm 1.17	93.86	8.34
	30	25.15 \pm 1.50	83.83	5.95
批间 (n=9)	0.46	0.39 \pm 0.03	83.52	6.76
	15	14.54 \pm 0.41	96.94	2.85
	30	24.34 \pm 0.67	81.13	2.77

^a指的是标准偏差

3.3.5 实际应用性

购买 4 份玉米粉（1 份为标准物质，3 份为市售玉米粉），将所建立的方法应用于玉米实际样品检测，并根据玉米粉基质的线性标准曲线计算 AFB₁ 的浓度。此外，通过 HPLC 检测相同的样品，从而形成对照组，以证明其应用性和有效性。结果如表 3.5 所示，玉米样本 1（标准物质，GBW（E）100386）检测到含有 AFB₁，其余三份均未检测到 AFB₁，且 HPLC 的检测结果与 ELISA 检测结果具有一致性，表明 ELISA 可作为玉米粉中 AFB₁ 定量测定的筛选方法，具有较高的经济效益。而且，基于上述 ELISA 的优化参数，可以构建 ELISA 试剂盒检测玉米粉及其他农产品中的 AFB₁，以扩大其应用范围。

表 3.5 HPLC 和 ELISA 实际样品检测结果比较

Tab. 3.5 The detection results of actual samples by HPLC and ELISA

样品	NO.	HPLC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ELISA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
玉米粉	1	27.00 \pm 3.00	27.25 \pm 1.11
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	ND

ND 是指应用该方法并未检测到 AFB₁

3.4 本章小结

针对严重污染玉米产品、毒性大的 AFB₁ 以及市售 ELISA 试剂盒的局限性，首先搜集市售和实验室的 AFB₁ 抗原抗体，研究不同来源的抗原抗体对 ELISA 效价和灵敏度的影响；其次，为提高 ELISA 的准确性和稳定性，实现玉米粉中 AFB₁ 高通量检测，在最优组合的抗原抗体基础上，通过优化封闭液种类、甲醇浓度、盐离子浓度、pH 和酶标二抗稀释倍数，建立了 ELISA 以高通量检测玉米粉中的 AFB₁。主要结论如下：

(1) 不同的抗原抗体组合（包括相同的抗原/抗体，不同的抗体/抗原），其效价和灵敏度（IC₅₀）不同，表明抗体抗原的质量是影响所构建 ELISA 的效价和灵敏度的关键因素。为构建高灵敏的 ELISA 以满足玉米粉中 AFB₁ 检测的需求，最终选择 C1 这一组合构建 ELISA。

(2) 在最优的反应条件下，玉米粉基质的线性拟合方程为 $Y=-0.4051X+0.2978$ ($R_{adj}^2=0.9821$)，线性检测范围为 0.0195-2.5 ng/mL（相当于玉米样品的 0.2343-30 μg/kg），此外，该方法具有良好的特异性和准确性，在玉米粉样品的实际检测结果中，所建立的 ELISA 与 HPLC 具有高度的一致性，表明该方法可以满足玉米粉中 AFB₁ 的高通量筛查。

上述研究，可以为免疫分析方法中抗原抗体的选择提供一定的参考，基于 ELISA 优化的条件参数，可建立 ELISA 试剂盒以高通量检测玉米粉及其他农产品中的 AFB₁，扩大其应用性，这对于控制农产品质量安全具有很大的意义。

第四章 基于间接信号放大策略的 LFI 快速定量检测伏马毒素 B₁

4.1 引言

伏马毒素 B₁ (Fumonisin B₁, FB₁) 是伏马毒素的主要成分和常见污染物, 并且毒性最强, 广泛污染玉米。目前, 市售的免疫层析试纸条能够简单快速检测目标物以实现定性或定量, 适合大样本筛查, 但在该方法中, 荧光信号可能容易受到背景荧光和被测样品的复杂基质成分的干扰, 容易造成假阴性, 因此为克服上述局限性, 许多研究学者提出了间接标记法的试纸条检测其他小分子物质以提高检测准确性, 只是目前还未应用 FB₁ 检测。

基于以上分析和思考, 针对严重污染玉米产品且毒性较大的 FB₁, 为放大检测信号, 保护单抗的生物活性, 提高检测准确性, 在本章节中, 采用钕纳米颗粒标记羊抗鼠 IgG 制备通用荧光探针 (羊抗鼠-IgG@Eu), 由于羊抗鼠-IgG 是用小鼠单抗的 Fc 片段免疫羊获得的, 因此通用荧光探针 (羊抗鼠-IgG@Eu) 可与任何其他毒素的小鼠单克隆抗体结合, 从而进一步节省检测探针的制备时间, 并为同时检测其他有毒物质提供通用生物材料。具体来说, 当样品含有 FB₁ 时, 它们与 T 线上的包被原竞争荧光探针, 从而导致荧光信号的随着样品中 FB₁ 浓度的增高而降低。由于间接竞争和放大策略, 在反应 10 分钟后, 测试条的 C 线和 T 线区域将形成清晰的不同深浅红色, 用便携式荧光测试仪收集荧光信号得以量化。同时, 本章从原理上比较了单抗直接标记法和羊抗鼠-IgG 间接标记法的差异; 将该方法的性能与现有的侧流免疫分析方法进行了比较, 以验证其有效性; 在实际玉米样品中检测 FB₁ 时, 所建立方法的检测结果与 LC-MS/MS 检测方法的结果进行了比较。

4.2 材料与方法

4.2.1 主要试剂与仪器

本章所用到的试剂与仪器包含于 2.2.2 试剂与仪器中, 除此之外, 还用到的其他试剂和耗材如表 4.1 所示, 其他仪器如表 4.2 所示。

表 4.1 实验所用的试剂和耗材

Tab. 4.1 Main reagents and material of the experiment

试剂/耗材	化学式	规格/型号	厂家
聚苯乙烯钨荧光纳米颗粒	/	200 nm, 1% (m/v)	国药集团
EDC·HCl	C ₈ H ₁₈ ClN ₃	100 mg	美国 Sigma
PVP-30	(C ₆ H ₉ NO) _n	500 g	上海优你生物科技
蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	500 g	国药集团
FB ₁ -BSA	/	1 mg	美国 Sigma
T-2	C ₂₄ H ₃₆ O ₉	1 mg	美国 Sigma
FB ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	1 mg	美国 Sigma
FB ₂	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	1 mg	美国 Sigma
FB ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	1 mg	美国 Sigma
DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	1 mg	美国 Sigma
羊抗鼠-IgG	/	2 mg	武汉博士德生物工程
兔抗羊-IgG	/	2 mg	北京博奥龙生物技术
抗 FB ₁ 单抗	/	2 mg	中国农业科学院 (武汉)
吸水垫	/	CFSP223000	美国 Millipore
玻璃纤维素膜	/	/	上海捷宁生物科技
NC 膜	/	/	美国 Millipore
可拆卸微孔板	/	/	上海拜力生物科技
0.22 μm 微孔滤膜	/	/	美国 Millipore
0.45 μm 微孔滤膜	/	/	美国 Millipore

表 4.2 实验所用的主要仪器
Tab. 4.2 Main instrument of the experiment

仪器	型号	厂家
喷金仪	XYZ3050	美国 Biodot
切条机	CM4000	美国 Biodot
高速冷冻离心机	CF16RX	日本 Hitachi
便携荧光速测仪	SS-230	上海优你生物科技
电子分析天平	CAP224S	德国 Sartorius
LC-MS/MS	LCMS-8060	日本岛津
Milli-Q 超纯水系统 (18.2 MΩ·cm)	/	美国 Millipore
365 nm 紫外灯	/	上海拜力生物科技
喷金仪	XYZ3050	美国 Biodot

4.2.2 主要试剂配制

主要试剂配制参考安兴爽学位论文 3.2.2^[123]。

4.2.3 通用探针（羊抗鼠-IgG@Eu）的制备

通用检测探针的制备参考 Dong 等人^[112]。

4.2.4 试纸条的制备

试纸条由 20 mm 玻璃纤维膜（样品垫）、25 mm 硝化纤维膜（NC 膜）、45 mm 吸收垫和背衬板组成（图 4.1（a））。将最佳浓度的 FB₁-BSA（0.25 mg/mL）和兔抗羊-IgG（0.1 mg/mL）都以最佳速度 0.7 μL/cm 在硝酸纤维素膜上划线分别生成检测线（T 线）和质控线（C 线），立即将包被完成的 NC 膜在 37°C 的烘箱中干燥 2 h 备用；用封闭溶液处理样品垫 15 min，并在 37°C 下干燥 2 h；吸水垫无需任何处理。将样品垫、NC 膜和吸水垫层依次层压并粘贴在背衬板上，交叠处均重叠 1-2 mm，最后，使用切条机将试纸条板切割成 3.8 mm 宽的条状，并将切好的试纸条密封并储存在 4°C 下备用。

4.2.5 单抗用量优化

将 2 μL 制备好的荧光探针添加到反应微孔中，加入 133 μL 样品缓释液稀释荧光

探针, 然后将 5 μL , 0.5、1、2、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 FB₁ 单抗添加到微孔中。加入 20 μL 用 70% 甲醇-PBS (v/v) 稀释至一系列不同浓度的 FB₁ 标准品, 同时设置阴性对照, 将试纸条插入微孔中, 反应 10 min 后, 用便携式荧光速测仪读取 T 线荧光值, 比较在不同单抗用量下, T 线荧光强度的变化。

4.2.6 样品预处理

玉米样品预处理依据安兴爽 3.3.6^[123]步骤进行。

4.2.7 侧流免疫分析方法的构建

向微孔中加入适量的荧光探针、抗 FB₁ 单抗、样品提取物或 FB₁ 标准溶液, 使总反应体积达到 160 μL , 将试纸条垂直插入反应微孔并反应 10 分钟后, 溶液通过毛细管作用沿着试纸条流动, 实现间接竞争免疫分析。用便携式荧光速测仪 (激发波长: 365 nm; 发射波长: 613 nm) 记录 T 线和 C 线的荧光信号, 将 FB₁ 浓度的对数设置为 X 轴, 将 T 线与 C 线的面积比值设置为 Y 轴, 通过 Origin Pro 9.0 进行数据的非线性和线性拟合, 以获得不同基质下的标准曲线。

4.2.8 侧流免疫分析方法的评价

在最优条件下, 采用试纸条检测不同类型的真菌毒素以评价方法的特异性, 每个测试重复三次; 通过对阴性样品添加低、中、高浓度的 FB₁ 标准品, 进行加标回收实验以评估方法精确性和准确度, 日内实验每个浓度重复三次, 而日间实验在不同的 5 天内每个浓度重复三次; 将该方法和 LC-MS/MS 分别用于玉米的实际样品检测, 并对结果进行比较, 以评价其应用性。

4.3 结果与讨论

4.3.1 侧流免疫分析方法原理

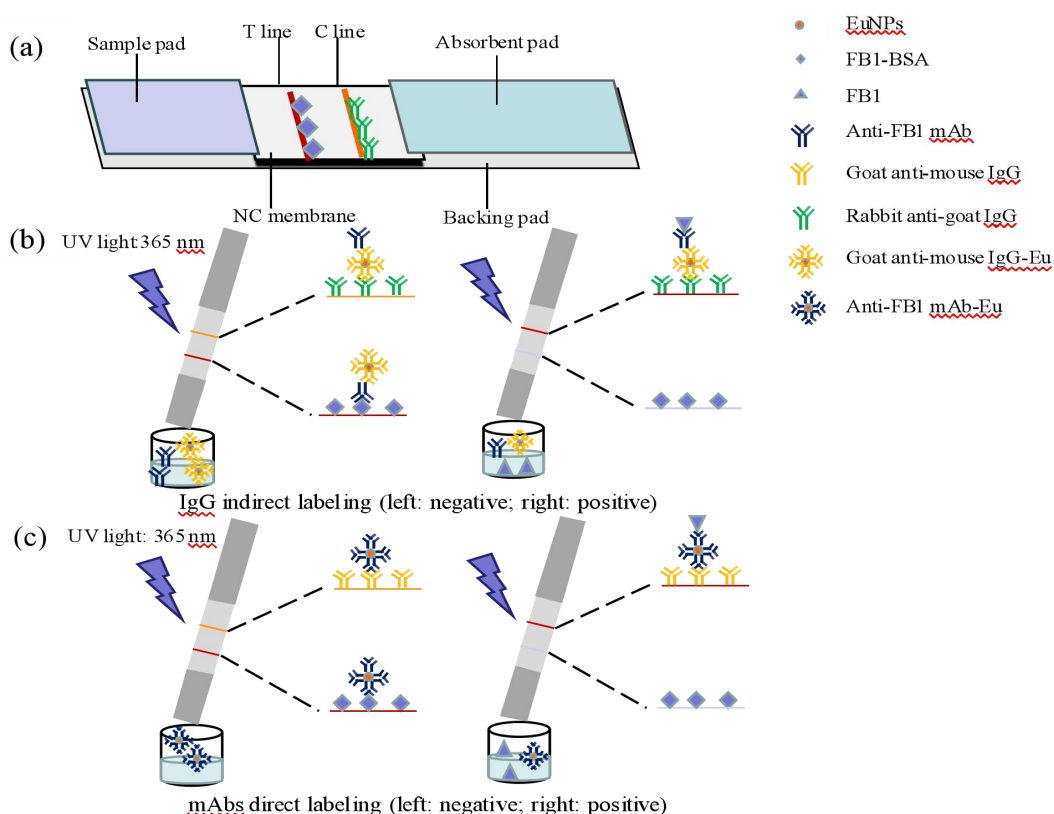


图 4.1 免疫试纸条组成及侧流免疫分析方法模式 (a) 基于羊抗鼠-IgG 间接标记的试纸条组装, (b) 基于羊抗鼠-IgG 间接标记的侧流层析方法的原理, (c) 基于单抗直接标记的传统侧流层析方法的原理

Fig. 4.1 The configuration of test strip and the mode of LFI (a) The configuration of test strip based on goat anti-mouse IgG indirect labeling, (b) the principle of LFI based on goat anti-mouse IgG indirect labeling, (c) the principle of traditional LFI based on mAb direct labeling.

在原理上, 比较了基于羊抗鼠-IgG 间接标记 (图 4.1 (b)) 的侧流免疫层析法与基于抗 FB₁ 单克隆抗体直接标记 (图 4.1 (c)) 的侧流免疫层析法, 两者的差异主要表现在三个方面, 首先, 微孔中反应液的成分不同, 前者由样品溶液、通用荧光探针和抗 FB₁ 单抗组成, 后者由样品溶液和荧光探针组成。通用荧光探针 (羊抗鼠-IgG@Eu) 所用的羊抗鼠-IgG 是经鼠源单抗的 Fc 片段免疫羊得到的, 这意味着通用荧光探针可以结合其他任何小鼠单克隆抗体, 这为同时检测其他有毒物质提供了途径。然而, 基于一级单抗直接标记的检测探针只能识别一种特定的目标物, 当目标物发生变化时, 检测探针需要重新制备, 因此不具有良好的通用性。其次, 试纸条 C 线包被的试剂不同, 前者的 C 线包被兔抗羊-IgG, 后者包被羊抗鼠-IgG。最后, 信号放大效果不同, 前者采用间接信号放大策略, 以抗 FB₁ 单抗为媒介, 使通用荧光探针与单位单抗的结合率大大提高, 具有良好的信号放大作用, 后者的信号放大效果有限,

导致前者的灵敏度优于后者。

基于羊抗鼠-IgG 间接标记的 LFI 的具体原理如图 4.1 (b) 所示：当样品溶液中没有 FB₁ 目标物时，加入 FB₁ 单抗后，其与荧光探针结合形成游离的复合物（单抗-羊抗鼠-IgG@Eu），由于毛细管现象，复合物沿着条带移动，然后被包被在 T 线上的 FB₁-BSA 竞争原截留，剩余的游离复合物继续向上移动，并与 C 线上的兔抗羊-IgG 结合，此时 T 线和 C 线分别形成最深和最浅的红色，同时，T 值最大，C 值最小，T/C 值最大，结果为阴性。当样品提取物中含有低浓度的 FB₁ 目标物时，一部分游离的抗 FB₁ 单抗识别 FB₁ 并与其结合，再与荧光探针结合形成复合物（FB₁-单抗-羊抗鼠-IgG@Eu），该复合物沿着条带流动，直接与 C 线上的兔抗羊-IgG 结合，从而形成一个颜色比较深的 C 线条带，其 C 值更大，由于样品溶液中含有少量的 FB₁ 目标物，游离的抗 FB₁ 单抗不能完全被饱和，因此，由剩余的单抗与荧光探针结合形成的复合物（单抗-羊抗鼠-IgG@Eu），继续向上泳动，被包被在 T 线上的 FB₁-BSA 竞争原截留，从而形成一个颜色比较浅的 T 线条带，其 T 值比较小，T/C 值变小，结果为阳性。当样品溶液中含有高浓度的 FB₁ 目标物时，游离的抗 FB₁ 单抗被 FB₁ 完全饱和，形成抗原-抗体复合物（FB₁-单抗），其与荧光探针结合所形成的复合物（FB₁-单抗-羊抗鼠-IgG@Eu）迁移到 T 线，因为没有多余的游离单抗来识别 T 线上包被的 FB₁-BSA 竞争原，所以 T 线的颜色色带消失，荧光值几乎为零，然后复合物全部移动到 C 线，导致 C 线的颜色最深，值最大，T/C 值最小，结果是阳性。

4.3.2 单抗用量优化

在不同的单抗用量下，研究 T 线的荧光值随着不同浓度标准品（用 70% 甲醇-PBS 稀释 FB₁ 标准品至 0.625、1.25、2.5、6.25、12.5、25、50 ng/mL）的变化，并设置阴性对照组。

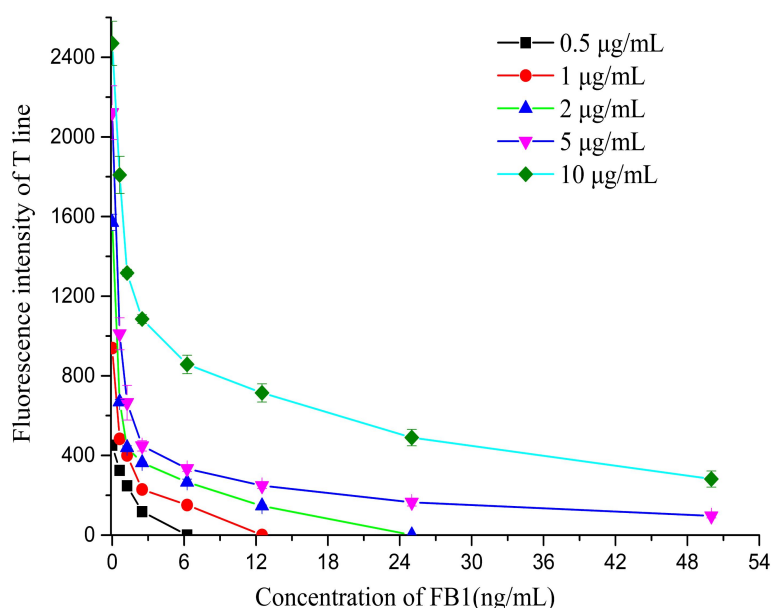


图 4.2 单抗用量优化

Fig. 4.2 Optimization of mAb dosage

结果如图 4.2 所示，在阴性条件下，随着单抗用量的增加，T 线的荧光强度迅速增加，这可能是由于在一定水平的荧光探针下，单位单抗携带的荧光探针数量增加所致；同时，在阳性条件下，随着 FB₁ 浓度的增加，无论使用多少单抗，T 线的荧光强度逐渐降至零，这也符合试纸条的原理。随着单抗用量的增加，当 T 线颜色消失时，相应的 FB₁ 浓度也变大，这可能是因为此时单抗消耗了更高浓度的 FB₁，降低了 T 线的荧光强度，拓宽了检测范围。如果单抗用量太小，T 线荧光值弱，容易出现假阳性和假阴性结果，导致检测结果不准确，检测范围狭窄；如果单抗的用量过大，在相同的 T/C 值下，虽然检测范围扩大了，但灵敏度可能会降低。综上所述，单抗的最佳为 5 μL, 5 μg/mL。

4.3.3 侧流免疫分析方法的构建

根据样品预处理阴性的玉米，所得的提取液经 5 倍稀释后，用其稀释 FB₁ 标准品至 0.125、0.25、0.625、2.5、5、20 和 50 ng/mL，同时设置 70% 甲醇基质组，即用 70% 甲醇-PBS 溶液稀释 FB₁ 标准品至上述相同的浓度，并设置空白组，即不加任何 FB₁ 标准品，只检测不同的阴性基质稀释液。不同基质下的阴性样品重复 20 次，以获得平均 B₀ 和标准偏差 (SD)，通过将 Y 值 (Y=B₀-3×SD) 带入线性拟合方程并反向计算 X，获得检测限 (LOD=10^X)。在 70% 甲醇溶液中，LOD 为 0.026 ng/mL，在玉米

基质中，LOD 为 0.025 ng/mL（根据样品重量，相当于 0.50 ng/g）。

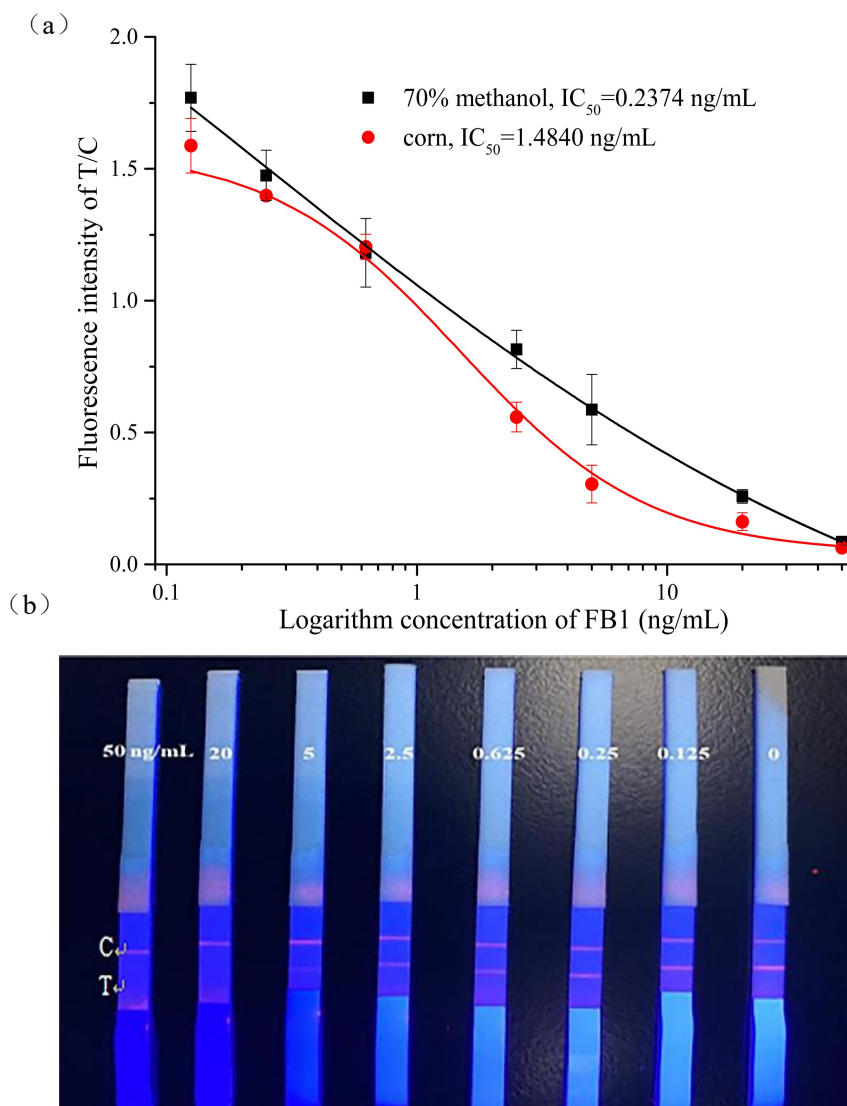


图 4.3 侧流免疫分析方法的构建 (a) 不同基质下的非线性拟合曲线；
(b) 70%甲醇溶液下试纸条检测 FB₁ 的实物图

Fig. 4.3 The establishment of LFI (a) Nonlinear fitting standard curves for FB₁ detection in different matrix; (b) The physical image for FB₁ detection in 70% methanol solution.

不同基质下非线性拟合的标准曲线如图 4.3 (a) 所示，在 70%甲醇、玉米中，非线性拟合方程分别为 $Y = -0.59263 + 4.23028 / (1 + (X/0.23745)^{10.30981})$ ($R_{adj}^2 = 0.9983$), $Y = 0.04227 + 1.5538 / (1 + (X/1.48405)^{11.14981})$ ($R_{adj}^2 = 0.9985$), 检测范围为 1-50 ng/mL, IC₅₀ 分别为 0.2374 和 1.4840 ng/mL。由图 4.3 (b) 可知，随着 FB₁ 的增加，T 线的颜色逐渐变浅直至消失，C 线的颜色逐渐加深，这与实验原理一致。

此外，与已报道的免疫分析法，尤其是用于快速检测伏马毒素 B₁ 的免疫层析试纸^[124,129]（如表 4.3 所示）相比，该方法不仅具有试纸条的共同优点，如操作简单，

成本低，适合现场高通量快速检测，而且其检测灵敏度更高，检测时间更短，甚至优于另一种模式的间接标记的侧流免疫层析试纸条^[108]，因此本章建立的 LFI 可用于玉米中 FB₁ 的快速定性和定量检测。

表 4.3 现有的免疫分析法与所建的 LFI 检测 FB₁ 比较
Tab. 4.3 Comparison of this study with existing immunoassay for FB₁ detection

检测方法	检测范围 ^a (ng/mL)	LOD ^a (ng/mL)	检测时间 (min)	样品	参考文献
High-sensitivity immunochromatographic assay	/	0.6	15	Corn	[108]
Ic-ELISA	1-800	1.0	>30	Corn	[124]
Homogeneous immunoassay	0.533-6.81	0.079	/	Maize	[125]
chemiluminescence immunoassay	0.05-25	0.027	>90	Corn and wheat	[126]
Gray-imaging-based immunochromatographic	0.24-15	0.24	10	Rice, maize, wheat and peanut	[127]
QDs based -immunochromatographic assay	2.295-69.867	/	25	Corn and wheat	[128]
Colloidal gold immunoassay strip	/	2.5	5	Corn	[129]
Lateral flow dual immunoassay	9.34-100.45	5.23	30	Corn and wheat	[130]
Lateral flow immunoassay	1.56-6.25	/	15	Maize flour	[131]
Quantitative fluorescence-based immunochromatographic assay	0.25-2.0	0.12	20	Maize flour	[132]
Gold nanoparticles-based lateral flow immunoassay	/	2.0	>10	Maize flour	[133]
Multiplex mycotoxin immunochromatographic assay	/	0.25	10	Corn, wheat and rice	[134]
ScFv-based immunochromatographic strip	/	2.5	10	Maize	[135]
Second antibody labeling based-LFI	1-50	0.025	10	Corn	本研究

^a表示检测范围和 LOD 并不是根据样本重量衡量的

4.3.4 侧流免疫分析方法的评价

4.3.4.1 LFI 的特异性

为了验证侧流免疫分析方法能够特异性识别 FB₁，在上述最佳检测条件下，向反应微孔中加入 20 μL 用 70% 甲醇-PBS (v/v) 溶液稀释的 AFM₁、T-2、FB₁、FB₂、FB₃ 和 DON 标准品，使最终浓度分别为 20、50、50、50、50、50 ng/mL；同时设置空白对照，即只加相同体积的 70% 甲醇-PBS (v/v) 溶液，由便携式荧光速测仪采集试纸条 T 线的荧光信号。

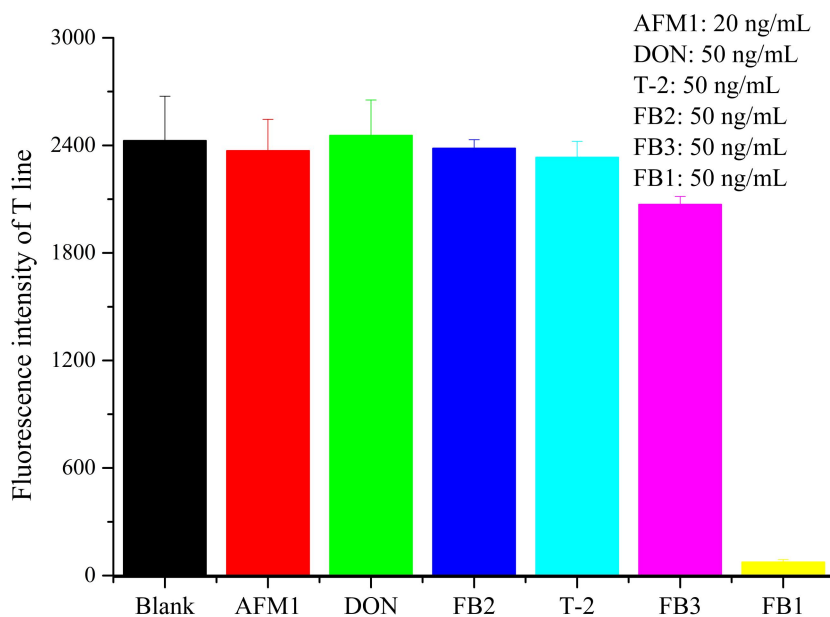


图 4.4 LFI 特异性评价

Fig. 4.4 Specificity evaluation of LFI

结果如图 4.4 所示，当物质为非目标物时，T 线的荧光值较高，与空白对照组无显著差异；当有 FB₁ 目标物时，T 线的荧光带几乎消失，荧光值与空白对照组和非目标物组（AFM₁、DON、FB₂、T-2、FB₃）有显著差异，尤其是与 FB₁ 结构相似的 FB₂ 和 FB₃ 的荧光值。从原理上讲，这与理论结果一致，表明单抗几乎不能识别除 FB₁ 以外的其他真菌毒素。总之，侧流免疫分析具有良好的特异性。

4.3.4.2 LFI 的精确性和准确性

将低、中、高浓度（2、20 和 40 ng/mL，对应于样品 40、400 和 800 ng/g）的 FB₁ 标准品添加到经 LC-MS/MS 测定为阴性的玉米样品的提取液中，进行日内和日间加标回收，计算回收率和相对标准偏差，以进一步评估所建立方法的准确性和精密度。LC-MS/MS 的技术参数如下：对于液相色谱，色谱柱（C18，100 mm×2.1 mm，3 μm），柱温：20°C，流速：0.2 mL/min，进样量：10 μL，流动相为甲醇（A）和 0.1%甲酸水溶液（B）（v/v，含有 5 mmol/L CH₃COONH₄），设置并使用线性梯度洗脱程序；对于质谱，离子源：ESI，源温度：330°C，毛细管压力：4.0 kV（ESI⁺），脱溶气体温度：300°C，脱溶气体流速：10 mL/min；质谱扫描模式：多反应监测（MRM），母离子/子离子（722/334.4，722/352.3），碰撞能量分别为 26 和 20 eV。结果如表 4.4 所示。在玉米样品中，回收率为 82.50-115.08%，RSD 低于 6.06%，证明所建立的方

法回收率高, 表明该方法具有良好的准确度和精密度, 可用于实际样品的检测。

表 4.4 玉米样品中加标回收实验

Tab. 4.4 Recovery analysis of FB₁ in spiked corn samples

	添加值 (ng/g)	检测值±S.D ^a (ng/g)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
日内 (n=3)	40	33.0±1.80	82.50	5.45
	400	445.2±2.30	111.32	0.51
	800	733.3±15.10	91.66	2.05
日间 (n=3)	40	34.6±2.69	86.50	4.34
	400	460.2±21.34	115.08	5.15
	800	758.8±38.29	94.86	6.06

^a表示标准偏差

4.3.5 实际应用性

将所建立的方法应用于六份玉米实际样品检测中, 实际样品的 LC-MS/MS 技术参数如 4.3.4.2 所述。结果如表 4.5 所示。在六份玉米样品中, 玉米样品 1、2、3 都检测出 FB₁, 玉米样品 4、5、6 未检测到 FB₁, 该方法所得结果与 LC-MS/MS 法一致, 表明该方法可作为玉米和饲料中 FB₁ 定量测定的筛选方法, 具有较高的经济效益。

表 4.5 LFI 与 LC-MS/MS 检测实际样品结果

Tab. 4.5 The results of natural samples by LFI and LC-MS/MS

Sample	NO.	LC-MS/MS (ng/g)	试纸条(ng/g)
玉米	1	328.4	285.6
	2	233.6	271.2
	3	519.4	461.2
	4	ND	ND
	5	ND	ND
	6	ND	ND

ND 表示应用该方法并未检测到 FB₁

4.4 本章小结

针对严重污染玉米产品、毒性大的 FB₁ 以及市售试纸条的局限性, 为放大检测信号, 提高检测准确性, 本章以镧荧光纳米颗粒标记羊抗鼠 IgG, 制备通用检测探针(羊抗鼠 IgG@Eu), 通过优化试纸条包被原的浓度、划线速度、单抗浓度、荧光探针稀释倍数构建了基于间接信号放大策略的免疫层析试纸条用于检测玉米的 FB₁。主要结

论如下：

(1) 在最优的条件下，该方法在玉米中的检测限为 0.025 ng/mL（基于样品重量为 0.50 ng/g），检测范围约为 1-50 ng/mL（根据样品重量为 20-1000 ng/g），该方法能特异性识别 FB₁，在玉米样品中加标回收率为 82.50-115.08%，相对标准偏差（RSD）低于 6.06%；将其应用于玉米样品的实际检测中，所建立的方法与 HPLC-MS/MS 具有高度的一致性。这些表明该方法具有良好的特异性、精确性和准确性，可以用于玉米中 FB₁ 的现场快速筛查。

(2) 与其他研究团队之前发表的间接标记的侧流免疫层析法^[108]相比，该方法的检测限降低了至少 20 倍，且具有较宽的线性范围和较高的灵敏度。

本章建立的侧流免疫分析法保护了单抗活性，放大了检测信号，并为多目标免疫分析提供了通用检测探针，可广泛用于玉米中 FB₁ 的现场快速定性和定量检测，这也为其他毒素的检测提供了一定的方法参考。

第五章 结论与展望

5.1 结论

针对严重污染玉米的 AFB₁ 和 FB₁，以及现有市售 ELISA 试剂盒和试纸条的局限性，本文首先研究了有限稀释亚克隆次数对 AFB₁ 单抗制备的影响，制备了黄曲霉毒素单抗；其次，以单抗为生物识别元件，构建的 ELISA 和 LFI 分别实现了对玉米及其产品中 AFB₁ 和 FB₁ 的高通量现场筛查。本课题的主要研究成果如下：

(1) 有限稀释亚克隆次数对 AFB₁ 单抗制备的影响：随着亚克隆次数的增加，细胞阳性率和上清液中单抗的抑制率逐渐增加，亚克隆次数过多，阳性细胞株生长繁殖缓慢，检测周期变长，且细胞上清液中单抗的抑制率几乎不变甚至降低。在此基础上，最终获得能够稳定分泌抗 AFB₁ 单抗的杂交瘤细胞株 ZFG8。经 ELISA 检测，该单抗的半抑制浓度 (IC₅₀) 为 1.1539 ng/mL，检测范围为 0.2829-4.7073 ng/mL (IC₂₀-IC₈₀)，对其他黄曲霉毒素 (AFB₂、AFM₁、AFM₂、AFG₁、AFG₂) 的最大交叉反应率为 0.73%。此外还对单抗的可变区基因和氨基酸序列分析。与其他研究者制备的抗 AFB₁ 单抗相比，本课题制备的单抗的特异性高，这很大程度上可能是由于增多的亚克隆次数提高了单抗对 AFB₁ 的特异选择性。

(2) 构建 ELISA 以高通量检测玉米粉中的 AFB₁：来自不同厂家的抗原抗体组合对于 ELISA 的效价和灵敏度的影响不同，表明抗体抗原的质量是影响所构建 ELISA 的效价和灵敏度的关键因素。在 C1 这一组合下，通过反应条件优化，建立了 ELISA 以高通量检测玉米粉中的 AFB₁。结果表明，在玉米粉基质中，该方法的 IC₅₀ 为 0.1625 ng/mL，线性检测范围为 0.0195-2.5 ng/mL (相当于玉米样品的 0.2343-30 μg/kg)，此外，该方法可以特异性识别 AFB₁，在玉米粉样品的加标回收率为 81.13%-96.94%，相对标准偏差均 ≤9.14%，在 1 份玉米粉标准物质 (GBW (E) 100386) 和 3 份市售玉米粉实际样品的检测结果中，所建立的 ELISA 与 HPLC 具有高度的一致性。这些表明该方法可以满足玉米粉中 AFB₁ 的高通量检测。

(3) 基于间接信号放大策略的侧流层析法快速定量检测 FB₁：以镧荧光纳米颗粒标记羊抗鼠 IgG，制备通用检测探针 (羊抗鼠 IgG@Eu)，在最优的条件下，构建了基于间接信号放大策略的免疫层析试纸条用于检测玉米中的 FB₁。该方法可以特异

性地识别 FB₁，在玉米中的检测限为 0.025 ng/mL（基于样品重量为 0.50 ng/g），检测范围约为 1-50 ng/mL（根据样品重量为 20-1000 ng/g）；在玉米样品中加标回收率为 82.50-115.08%，相对标准偏差（RSD）低于 6.06%。将其应用于玉米样品的实际检测中，所建立的方法与 HPLC-MS/MS 具有高度的一致性。这些表明该方法具有极高的灵敏度、良好的特异性、精确性和准确性，可以用于玉米中 FB₁ 的现场快速筛查。

综上所述，以上研究为杂交瘤细胞筛选和单抗制备提供了一定的参考价值，以单抗为识别元件分别构建了 ELISA 检测黄曲霉毒素 B₁ 和 LFI 检测伏马毒素 B₁，上述两种免疫分析方法在一定程度上可以克服市售产品的局限性，实现大通量样品的筛查，这为保障农产品质量安全提供了一定的检测技术支持，并为构建其他快速免疫分析方法提供了一定的理论和实践支持。

5.2 展望

本研究仍存在一些不足之处，希望在后续研究中得以完善：

（1）ELISA 可开发成试剂盒进行大通量筛选，不过需要酶标仪，且该方法易受加样、洗涤彻底性、反应温度和时间等因素影响，这可能限制了其快速检测；本课题所建立的是湿法试纸条，为提高其用户友好度和扩大应用范围，干法试纸条的还有待进一步开发。

（2）在杂交瘤细胞筛选的基础上，可以制备其他识别元件，比如双抗、纳米抗体、基因工程抗体等，结合各种纳米材料，构建多种混合毒素的免疫分析方法。

参考文献

- [1] Feijó Corrêa J, Orso P, Bordin K, et al. Toxicological effects of fumonisin B₁ in combination with other Fusarium toxins[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 121: 483-494.
- [2] Lger T, Uar A, Akrolu F, et al. Genotoxic effects of mycotoxins[J]. Toxicon, 2020, 185: 104-113.
- [3] Twaru zek M, Skrzydlewski P, Kosicki R, et al. Mycotoxins survey in feed materials and feeding stuffs in years 2015–2020[J]. Toxicon, 2021, 202: 27-39.
- [4] Cimbalo A, Alonso-Garrido M, Font G, et al. Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 137: 111161.
- [5] Souza C, Khaneghah A, Oliveira C. The occurrence of aflatoxin M₁ in industrial and traditional fermented milk: a systematic review study[J]. Italian Journal of Food Science, 2021, 33: 12-23.
- [6] Alshannaq A, Yu J. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(6): 632.
- [7] Goud K, Reddy K, Satyanarayana M, et al. A review on recent developments in optical and electrochemical aptamer-based assays for mycotoxins using advanced nanomaterials[J]. Microchimica Acta, 2020, 187(29): 1-32.
- [8] Kurtzman C, Horn B, Hesseltine C. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1987, 53(3): 147-158.
- [9] Richard J. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(12): 3-10.
- [10] Wang X, Reinhard Niessner, Tang D, et al. Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins[J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 912: 10-23.
- [11] IARC. Chemical agents and related occupations. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans[M]. IARC, 2012, 100, 249–294.
- [12] Muhammad A, Faqir M, Masood S, et al. Aflatoxins: biosynthesis, occurrence, toxicity, and remedies[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(8): 862-874.

- [13] Keller N, Turner G, Bennett J. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(12): 937-947.
- [14] Squire R. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach[J]. *Science*, 1981, 214(4523): 877-880.
- [15] Nonaka Y, Saito K, Hanioka N, et al. Determination of aflatoxins in food samples by automated online intube solidphase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(20): 4416-4422.
- [16] Wild C, Montesano R. A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention[J]. *Cancer Letters*, 2009, 286(1): 22-28.
- [17] Yang X, Lv Y, Huang K, et al. Zinc inhibits aflatoxin B₁-induced cytotoxicity and genotoxicity in human hepatocytes (HepG₂ cells)[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 92: 17-25.
- [18] Baynes R, Riviere J. Establishing Maximum Residue Limits in Europe[M]. John Wiley & Sons Inc, 2014.
- [19] Bhattacharya R, Francis A, Shetty T. Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B₁: In vitro effect of vitamins[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1987, 188(2): 121-128.
- [20] Macholz R. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 32(2): 150-150.
- [21] Kew M. Synergistic interaction between aflatoxin B₁ and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis[J]. *Liver International*, 2003, 23(6): 405-409.
- [22] JECFA. Evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives[M]. World Health Organization, 2001.
- [23] Alberts J, Schatzmayr G, Moll W, et al. Detoxification of the fumonisin mycotoxins in maize: an enzymatic approach[J]. *Toxins*, 2019, 11(9): 523-538.
- [24] Galeana E, Sánchez D, Torre-Hernández M, et al. Fumonisin B₁ produced in planta by *Fusarium verticillioides* is associated with inhibition of maize β -1,3-glucanase activity and increased aggressiveness[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2017, 100: 75-83.

- [25] Gallo A, Masoero R, Bertuzzi R, et al. Effect of the inclusion of adsorbents on aflatoxin B₁ quantification in animal feedstuffs[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2010, 27(1): 54-63.
- [26] Ostry V, Malir F, Toman J, et al. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification[J]. *Mycotoxin Research*, 2017, 33: 65-73.
- [27] Yuan Q, Clarke J, Zhou H, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin zearalenone[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(1): 263-269.
- [28] Choi G, Lee D H, Min W K, et al. Cloning, expression, and characterization of single chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2004, 35(1): 84-92.
- [29] Qin X, Zhang R, Ge S, et al. Sphingosine kinase AtSPHK1 functions in fumonisin B₁-triggered cell death in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 119, 70-80.
- [30] Chen J, Wei Z, Wang Y, et al. Fumonisin B₁: Mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 149, 111977.
- [31] Singh M, Kang S. Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy activation attenuates fumonisin B₁ induced hepatotoxicity in vitro and in vivo[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 110, 371-382.
- [32] Nemer A, Azab A, Rimon G, et al. Different roles of cAMP/PKA and PKC signaling in regulating progesterone and PGE₂ levels in immortalized rat granulosa cell cultures[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 269, 88-95.
- [33] Lee H, Ryu D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: public health perspectives of their co-occurrence[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65, 7034-7051.
- [34] Gbore F. Reproductive organ weights and semen quality of pubertal boars fed dietary fumonisin B₁[J]. *Animal*, 2009, 3(8): 1133-1137.
- [35] Magnoli A, Poloni V, Cavaglieri L. Impact of myco-toxin contamination in the animal feed industry[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2019: 1-22.
- [36] Lai X, Liu R, Ruan C, et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China[J]. *Food Control*. 2015, 50, 401-404.
- [37] 李雅静, 秦曙, 杨艳梅, 等. 中国谷物真菌毒素污染研究现状[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(3): 9.

- [38] Tolosa J, Rodríguez Y, Ruiz M, et al. Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 158, 112661.
- [39] Abdolmaleki K, Khedri S, Alizadeh L, et al. The mycotoxins in edible oils: An overview of prevalence, concentration, toxicity, detection and decontamination techniques[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021: 500-511.
- [40] 王燕, 董燕婕, 岳晖, 等. 山东省玉米真菌毒素污染状况调查及分析[J]. *粮油食品科技*, 2016, 24(3): 69-73.
- [41] 胡佳薇, 乔海鸥, 田丽, 等. 2013-2016年陕西省谷物及其制品中真菌毒素的污染状况[J]. *卫生研究*, 2017, 46(6): 1013-1015.
- [42] 杜妮. 2017年我国部分地区饲料及饲用原料霉菌毒素污染调查报告[J]. *猪业科学*, 2018, 35(2): 58-60.
- [43] Vanegmond H, Schothorstr C, Jonker M. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context[J]. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389(1): 147-157.
- [44] European C. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding[M]. *Official Journal of the European Union*, 2007.
- [45] Food and drug administration. Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds[M]. U. S. 2001.
- [46] Zhang N, Liu B, Cui X, et al. Recent advances in aptasensors for mycotoxin detection: On the surface and in the colloid[J]. *Talanta*, 2021, 223, 121729.
- [47] Wang C, Qian J, An K, et al. Fabrication of magnetically assembled aptasensing device for label-free determination of aflatoxin B₁ based on EIS[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 108, 69.
- [48] Deepa N, Sreenivasa M Y. Molecular methods and key genes targeted for the detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides*-An updated review[J]. *Food Bioscience*, 2019, 32(8): 100473.
- [49] 兰飞飞. 基于氧化锌和杂交链式反应的纸基光电化学生物传感器的研究[D]. 济南大学, 2018.

- [50] Muller S, Strohbach D, Wolf J. Sensors made of RNA: tailored ribozymes for detection of small organic molecules, metals, nucleic acids and proteins[J]. IEE Proceedings-Nanobiotechnology, 2006, 153(2): 31-40.
- [51] Hyoyoung, Mun, Eun-Jung, et al. Homogeneous assay of target molecules based on chemiluminescence resonance energy transfer (CRET) using DNAzyme-linked aptamers[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 58, 308-313.
- [52] Alsulami T, Nath N, Flemming R, et al. Development of a novel homogeneous immunoassay using the engineered luminescent enzyme NanoLuc for the quantification of the mycotoxin fumonisin B₁[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2020, 177, 112939.
- [53] Aksa B, Gbvsl A, Manuel F, et al. A simple detection platform based on molecularly imprinted polymer for AFB₁ and FB₁ mycotoxins[J]. Microchemical Journal, 2021, 171, 106730.
- [54] Li W, Diao K, Qiu D, et al. A highly-sensitive and selective antibody-like sensor based on molecularly imprinted poly(L-arginine) on COOH-MWCNTs for electrochemical recognition and detection of deoxynivalenol[J]. Food chemistry, 2021, 350, 129229.
- [55] 唐晓倩. 农产品典型真菌毒素生物识别材料与快速检测方法研究[D]. 中国农业科学院, 2020.
- [56] Xing W, He L, Yang H, et al. Development of a sensitive and group-specific polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of malachite green and leucomalachite green in water and fish samples[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 89(13): 2165-2173.
- [57] Liu J. The history of monoclonal antibody development-Progress, remaining challenges and future innovations[J]. Annals of Medicine and Surgery, 2014, 3, 113-116.
- [58] Chen L, Hu X, Sun Y, et al. An ultrasensitive monoclonal antibody-based lateral flow immunoassay for the rapid detection of xylazine in milk[J]. Food Chemistry, 2022, 383, 132293.
- [59] Sompunga P, Pruksametanan N, Rangnoi K, et al. Generation of human and rabbit recombinant antibodies for the detection of Zearalenone by phage display antibody technology[J]. Talanta, 2019, 201, 397-405.
- [60] Shu Q, Wang L, Ouyang H, et al. Multiplexed immunochromatographic test strip for time-resolved chemiluminescent detection of pesticide residues using a bifunctional antibody[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 87, 908-914.

- [61] Markus V, Janne L, Urpo L. Directed antibody-engineering techniques and their applications in food immunoassays[J]. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(2): 219-226.
- [62] 任文洁. 抗黄曲霉毒素 B₁ 纳米抗体免疫学性能分析及其随机突变库的研究[D]. 南昌大学, 2019.
- [63] Chabrol E, Stojko J, Nicolas A, et al. Recombinant VHHs: Production, characterization and affinity[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 589, 113491.
- [64] Jin Z, Wang L, Cao D, et al. A new method for rapid screening of hybridoma cell clones secreting paired antibodies using sandwich cell surface fluorescence immunosorbent assay[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1163(8): 338493.
- [65] 赵岩岩, 赵圣明, 梁颖, 等. 噬菌体展示技术在食品安全分析中的应用[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(14): 342-345.
- [66] Akagi S, Nakajima C, Tanaka Y, et al. Flow cytometry-based method for rapid and high-throughput screening of hybridoma cells secreting monoclonal antibody[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 125(4): 464-469.
- [67] Lu M, Chan B, Schow P, et al. High-throughput screening of hybridoma supernatants using multiplexed fluorescent cell barcoding on live cells[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2017, 451, 20-27.
- [68] 张媛媛. 黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体制备及免疫分析方法研究[D]. 江苏大学, 2018.
- [69] 管笛. 黄曲霉毒素 M₁ 单克隆抗体及检测技术研究[D]. 中国农业科学院, 2011.
- [70] 张道宏. 黄曲霉毒素杂交瘤细胞株的选育及免疫层析检测技术研究[D]. 中国农业科学院, 2011.
- [71] Rottinghaus G, Coatney C, Minor H. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1992, 4, 326-329.
- [72] Shephard G, Sydenham E, Thiel P, et al. Quantitative determination of fumonisins b₁ and b₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Journal of Liquid Chromatography*. 1990, 13, 2077-2087.
- [73] Jaimez J, Fente C, Vazquez B, et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 882, 1-10.

- [74] Wiley P, Ma B, Zhang K, et al. Rapid communications in mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2004, 8, 603-606.
- [75] Jia M, Liao X, Fang L, et al. Recent advances on immunosensors for mycotoxins in foods and other commodities[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 136, 116193.
- [76] Feng J, Xu Y, Huang W, et al. A magnetic SERS immunosensor for highly sensitive and selective detection of human carboxylesterase 1 in human serum samples[J]. *Analytica Chimica ACTA*, 2020, 1097, 176-185.
- [77] Li Y, Chen Q, Xu X, et al. Microarray surface enhanced raman scattering based immunosensor for multiplexing detection of mycotoxin in foodstuff[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 266, 115-123.
- [78] Zhang W, Tang S, Jin Y, et al. Multiplex SERS-based lateral flow immunosensor for the detection of major mycotoxins in maize utilizing dual Raman labels and triple test lines[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 393, 122348.
- [79] Mahmoudpour M, Dolatabadi J, Torbati M, et al. Nanomaterials based surface plasmon resonance signal enhancement for detection of environmental pollution[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 127, 72-84.
- [80] Karczmarczyk A, Reiner-Rozman C, Hageneder S, et al. Fast and sensitive detection of ochratoxin A in red wine by nanoparticle-enhanced SPR[J]. *Analytica Chimica ACTA*, 2016, 937 143-150.
- [81] Bhardwaj H, Sumana G, Marquette C. A label-free ultrasensitive micro-fluidic surface plasmon resonance biosensor for aflatoxin B₁ detection using nanoparticles integrated gold chip[J]. *Food Chemistry*, 2020, 307, 125530.
- [82] Chen G, Jin M, Du P, et al. A review of enhancers for chemiluminescence enzyme immunoassay[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28, 315-327.
- [83] Yu S, Yu F, Liu L, et al. Which one of the two common reporter systems is more suitable for chemiluminescent enzyme immunoassay: alkaline phosphatase or horseradish peroxidase[J]. *Luminescence*, 2016, 31, 888-892.
- [84] Xu J, Li W, Liu R, et al. Ultrasensitive low-background multiplex mycotoxin chemiluminescence immunoassay by silica-hydrogel photonic crystal microsphere suspension arrays in cereal samples[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 232, 577-584.
- [85] Xie G, Zhu M, Liu Z, et al. Development and evaluation of the magneticparticle-based chemiluminescence immunoassay for rapid and quantitative

- detection of aflatoxin B₁ in foodstuff[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29, 564-576.
- [86] Richter M. Electrochemiluminescence[J]. *Chemical Reviews*, 2004, 104(6): 3003-3036.
- [87] Zheng H, Yi H, Lin W, et al. A dual-amplified electrochemiluminescence immunosensor constructed on dual-roles of rutile TiO₂ mesocrystals for ultrasensitive zearalenone detection[J]. *Electrochimica ACTA*, 2018, 260, 847-854.
- [88] Zheng Y, Ke H, Yi H, et al. A bifunctional reagent regulated ratiometric electrochemiluminescence biosensor constructed on surfactant-assisted synthesis of TiO₂ mesocrystals for the sensing of deoxynivalenol[J]. *Talanta*, 2019, 196, 600-607.
- [89] Kimmel D, LeBlanc G, Meschievitz M, et al. Electrochemical sensors and biosensors[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(2): 685-707.
- [90] Goud K, Kumar V, Hayat A, et al. A highly sensitive electrochemical immunosensor for zearalenone using screen-printed disposable electrodes[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, 832, 336-342.
- [91] Yagati A, Chavan S, Baek C, et al. Label-free impedance sensing of aflatoxin B₁ with polyaniline nanofibers/Au nanoparticle electrode array[J]. *Sensors*, 2018, 18, 1320.
- [92] Engvall E, Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin[J]. *Immunochemistry*. 1971, 9(9): 871-874.
- [93] Wu L, Li G, Xu X, et al. Application of Nano-ELISA in food analysis: recent advances and challenges[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 113, 140-156.
- [94] Xiong Y, Leng Y, Li X, et al. Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 126, 115861.
- [95] Correa V, Rodrigues T, Portilho A, et al. Modified ELISA for antibody avidity evaluation: the need for standardization[J]. *Biomedical Journal*, 2021, 44, 433-438.
- [96] Hendrickson O, Chertovich J, Zherdev A, et al. Ultrasensitive magnetic ELISA of zearalenone with pre-concentration and chemiluminescent detection[J]. *Food Control*, 2017, 84, 330-338.
- [97] Ling S, Pang J, Yu J, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against fumonisin B₁ and development of detection by ic-ELISA[J]. *Toxicon*, 2014, 80, 64-72.

- [98] Shu M, Xu Y, Liu X, et al. Anti-idiotypic nanobody-alkaline phosphatase fusion proteins: Development of a one-step competitive enzyme immunoassay for fumonisin B₁ detection in cereal[J]. *Analytica Chimica ACTA*, 2016, 924, 53-59.
- [99] Lai W, Wei Q, Xu M, et al. Enzyme-controlled dissolution of MnO₂ nanoflakes with enzyme cascade amplification for colorimetric immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 89, 645-651.
- [100] Zhan S, Hu J, Li Y, et al. Direct competitive ELISA enhanced by dynamic light scattering for the ultrasensitive detection of aflatoxin B₁ in corn samples[J]. *Food Chemistry*, 2020, 342(39):128327.
- [101] 孙清. 食品及饲料中黄曲霉毒素的快速免疫检测试剂盒研究[D]. 北京科技大学, 2017.
- [102] 鲁希. AFB₁, T-2 毒素, DON 间接竞争 ELISA 试剂盒的研制[D]. 南京农业大学, 2019.
- [103] 吕秋威, 郁恒, 刘旭龙, 等. 不同品牌霉菌毒素检测试剂盒的质量评价[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(19): 6850-6856.
- [104] Zhang M, Yan L, Huang Q, et al. Highly sensitive simultaneous detection of major ochratoxins by an immunochromatographic assay[J]. *Food Control*, 2018, 84, 215-220.
- [105] Majdinasab M, Sheikh-Zeinoddin S, Soleimani-Zad P, et al. A reliable and sensitive time-resolved fluorescent immunochromatographic assay (TRFICA) for ochratoxin A in agro-products[J]. *Food Control*, 2015, 47, 126-134.
- [106] Yang Q, Zhu J, Ma F, et al. Quantitative determination of major capsaicinoids in serum by ELISA and time-resolved fluorescent immunoassay based on monoclonal antibodies[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 81, 229-235.
- [107] Wang J, Liu B, Hsu Y, et al. Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M₁ in milk[J]. *Food Control*, 2011, 22, 964-969.
- [108] Urusov A, Petrakova A, Gubaydullina M, et al. High-sensitivity immunochromatographic assay for fumonisin B₁ based on indirect antibody labeling[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39, 751-758.
- [109] Urusov A, Petrakova A, Zherdev A, et al. "Multistage in one touch" design with a universal labelling conjugate for high-sensitive lateral flow immunoassays[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86, 575-579.

- [110] Majdinasab M, Zareian M, Zhang Q, et al. Development of a new format of competitive immunochromatographic assay using secondary antibody-europium nanoparticle conjugates for ultrasensitive and quantitative determination of ochratoxin A[J]. Food Chemistry, 2019, 275, 721-729.
- [111] Li G, Xu L, Wu W, et al. On-site ultrasensitive detection paper for multiclass chemical contaminants via universal bridge-antibody labeling: mycotoxin and illegal additives in milk as an example[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91, 1968-1973.
- [112] Dong H, An X, Xiang Y, et al. Novel time-resolved fluorescence immunochromatography paper-based sensor with signal amplification strategy for detection of Deoxynivalenol[J]. Sensors, 2020, 20(22), 6577.
- [113] 董浩玮. 基于广谱性抗体识别的有机磷农药残留快速检测方法研究[D]. 山东理工大学, 2021.
- [114] 杨青青. 食用植物油外源污染物辣椒素及黄曲霉毒素免疫检测技术研究[D]. 中国农业科学院, 2016.
- [115] 孔德昭. 食品中真菌毒素抗体制备及其快速检测方法研究[D]. 江南大学, 2017.
- [116] 蒋广明. 黄曲霉毒素 B₁ 单抗的制备及初步应用[D]. 扬州大学, 2007.
- [117] 肖智. 高特异性黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的研制[D]. 中国农业科学院, 2010.
- [118] Christian C, Ekkehard W, Dietmar K, et al. Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies[J]. Journal of Immunological Methods, 2008, 329(1-2): 184-193.
- [119] Liu-Wei J, Lu C, Liu L, et al. Development of novel monoclonal antibodies-based ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for aflatoxin B₁ detection[J]. Food Control, 2016, 59, 700-707.
- [120] Kolosova A, Shim W, Yang Z, et al. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 384(1): 286-294.
- [121] Michalina Oplatońska S, Nermin S, Xu Y, et al. Fast and sensitive aflatoxin B₁ and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts, maize and feed ingredients[J]. Food Control, 2016, 63: 239-245.
- [122] 孙秀兰. 食品中黄曲霉毒素 B₁ 金标免疫层析检测方法研究[D]. 江南大学, 2005.

- [123] 安兴爽. 基于免疫分析的黄曲霉毒素 M₁ 和呕吐毒素高灵敏快速检测方法研究[D]. 山东理工大学, 2020.
- [124] Ling S, Pang J, Yu J, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against fumonisin B₁ and development of detection by Ic-ELISA[J]. *Toxicon*, 2014, 80, 64-72.
- [125] Alsulami T, Nath N, Flemming R, et al. Development of a novel homogeneous immunoassay using the engineered luminescent enzyme NanoLuc for the quantification of the mycotoxin fumonisin B₁[J]. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021, 177, 112939.
- [126] Jie M, Yu S, Yu F, et al. An ultrasensitive chemiluminescence immunoassay for fumonisin B₁ detection in cereals based on gold-coated magnetic nanoparticles[J]. *Journal of the science of food and agriculture*, 2018, 98, 3384-3390.
- [127] Tang X, Li P, Zhang Z, et al. An ultrasensitive gray-imaging-based quantitative immunochromatographic detection method for fumonisin B₁ in agricultural products[J]. *Food Control*, 2017, 80, 333-340.
- [128] Hou S, Ma J, Cheng Y, et al. Quantum dot nanobead-based fluorescent immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of fumonisin B₁, deoxynivalenol, and zearalenone in grains[J]. *Food Control*. 2020, 117, 107331.
- [129] Ling S, Wang R, Gu X, et al. Rapid detection of fumonisin b₁ using a colloidal gold immunoassay strip test in corn samples[J]. *Toxicon*, 2015, 108, 210-215.
- [130] Wang Y, Yan Y, Ji W, et al. Rapid simultaneous quantification of zearalenone and fumonisin B₁ in corn and wheat by lateral flow dual immunoassay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 5031-5036.
- [131] Anfossi L, Di Nardo F, Cavallera S, et al. A lateral flow immunoassay for straightforward determination of fumonisin mycotoxins based on the quenching of the fluorescence of CdSe/ZnS quantum dots by gold and silver nanoparticles[J]. *Microchimica ACTA*, 2018, 185, 94.
- [132] Wang Z, Li H, Li C, et al. Development and application of a quantitative fluorescence-based immunochromatographic assay for fumonisin b₁ in maize[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62, 6294-6298.
- [133] Yu Q, Li H, Li C, et al. Gold nanoparticles-based lateral flow immunoassay with silver staining for simultaneous detection of fumonisin B₁ and deoxynivalenol[J]. *Food Control*, 2015, 54, 347-352.

- [134] Yan J, Hu W, You K, et al. Biosynthetic mycotoxin-conjugates mimetics mediated green strategy for multiplex mycotoxin immunochromatographic assay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68, 2193-2200.
- [135] Ren W, Xu Y, Huang Z, et al. Single-chain variable fragment antibody-based immunochromatographic strip for rapid detection of fumonisin b₁ in maize samples[J]. *Food Chemistry*, 2020, 319, 126546.

附录

ZFG8 分泌的单抗可变区基因序列和氨基酸序列分析:

SQ VH NO.1 (重链可变区 DNA 序列) **FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**

GAAGTGATCCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTC
CCTAAACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATGCCATGTC
TTGGGTTCCGCCAGACTCCGGTGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGGA
GTGGTGATGATTCACCTACTCTCCTGACACTATGAAGGGACGATTCACCATCT
CCAGAGACAATGCCAAGAACCCTATACCTCAAATGAGCGGTCTGAGGTCT
GAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAGACATAACTGGGACTGGTACTTCGA
TGTCTGGGGCGCAGGGGCCACGGTCACCGTCTCCTCAG

SQ VH NO.2 (重链可变区氨基酸序列) **FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSNYAMSWVRQTPVKRLEWVATIRS
GDDFTYSPDTMKGRFTISRDNKNTLYLQMSGLRSEDTAIYYCARHNWDWYFDV
WGAGATVTVSS

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu
Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Val
Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Arg Ser Gly Asp Asp Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr
Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser
Gly Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg His Asn Trp Asp Trp Tyr Phe
Asp Val Trp Gly Ala Gly Ala Thr Val Thr Val Ser Ser

SQ VL NO.3 (轻链可变区 DNA 序列) **FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCATCACCTGGTGAAACA
GTCACACTCACTTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTACAAAGTATGTC
AATTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACC
AACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGAC
AAGGCTGCCCTACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCC
TGTGCTCTATGGAACAACAACCATTTGGTGTTCCGGTGGAGGAACCAAACCTGACT
GTCCTAG

SQ VL NO.4 (轻链可变区氨基酸序列) **FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTTKYVNWVQEKPDHLFTGLIGGT
NNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWNNNHLVFGGGTKLTVL

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu
Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Thr Lys Tyr Val Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro
Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp
Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Asn Asn Asn His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
Leu Thr Val Leu

在读期间成果

- [1] Zha Chuanyun, An Xingshuang, Zhang Jiali, Wei Lin, Zhang Qi, Yang Qingqing*, Li Falan, Sun Xia, Guo Yemin. Indirect signal amplification strategy with a universal probe-based lateral flow immunoassay for the rapid quantitative detection of fumonisin B₁ [J]. *Analytical Methods*, 2022, 14: 708-716.
- [2] Sun Xia, Zhao Qingxue, Zha Chuanyun, Zhang Jiali, Zhou Zhongrui, Dong Haowei, Yang Qingqing*, Guo Yemin, Zhao Shancang. Competitive electrochemical immunosensor for detection of capsaicinoids in edible vegetable oil based on computer aided molecular modeling[J]. *Journal of The Electrochemical Society*, 2022, 169, 057502.
- [3] Wei Lin, Zhang Jiali, Zha Chuanyun, Yang Qingqing*, Li Falan, Sun Xia, Guo Yemin, Liu Zhanli. A strategy to protect biological activity and amplify signal applied on time-resolved fluorescence immunochromatography for detecting T-2 toxin[J]. *European Food Research and Technology*, 2021, 248: 457-466.

致谢

稷下湖水汤汤，如箭如梭时光。转眼间，三年的硕士研究生生活已至尾声。值此论文完稿之际，我谨向所有帮助、陪伴我走过这段日子的人表示最诚挚的感谢。

首先，向我的导师—杨青青副教授致以最深的感激和最高的敬意。三年来，在杨老师的悉心指导和着力栽培下，我得以逐渐成熟、顺利成长。老师为人宽厚谦和，处事体贴周到，工作务实忘我，治学严谨不苟，是我在今后的科研以及人生道路上学习的榜样。本论文从最初选题、实验到小论文发表以及后期的写作，无不倾注了老师大量的心血。求学期间，我曾因课题进行不顺而沮丧萎靡，曾因身体原因感到焦虑不安，老师及时了解到我的困境并为我指明方向，在学术上给予指导支持，在生活上给予理解与关照，对此，我感到非常幸运，非常感激老师的深切关心和无私帮助。

同样要感谢孙霞教授和郭业民教授，在研究生期间对我的理解、关心与帮助；感谢本课题组所有老师在我求学期间给予的帮助。感谢董浩玮、赵庆雪、安兴爽、岳凤玲、王广现等师哥师姐在实验上的指导和生活中的照顾；感谢项耀东、尹佳琪、黄靖程、李建森、孔倩倩、刘俊杰、张梅等同学一直以来的帮助、陪伴和鼓励；感谢刘强、张佳丽、韦琳等师弟师妹给予我的关心和帮助。

由衷地感谢我的家人，求学多年，感谢你们义无反顾的支持和无条件的理解信任。

最后，感谢我自己。从来不曾优秀过，也不曾放弃过。

感谢三年来所有的相遇、相知和相伴。在你们的支持和陪伴下，我才得以在科研和人生的道路上且行且砥砺，渐行渐坚定，愈行愈欢欣！

查传云
2022年3月