

分类号:

单位代码: 10433

密 级:

学 号: 20503020355

# 山东理工大学

## 生物与医药硕士学位论文

农产品中真菌毒素单克隆抗体高效筛选  
及免疫分析技术研究

**Highly efficient screening and immunoassay technology for  
monoclonal antibodies against mycotoxins in agricultural  
products**

研 究 生: 韦琳

指 导 教 师: 杨青青 副教授

协 助 指 导 教 师: \_\_\_\_\_

学 位 类 别: 生物与医药硕士专业学位

专 业 领 域: 生物与医药(食品工程)

研 究 方 向: 食品安全技术

论 文 完 成 日 期: 2023年3月27日

## 摘要

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFs) 中危害最大的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (Aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 和单端孢霉烯族毒素中毒性最大的 T-2 毒素都会损害人体免疫系统, 低剂量的毒素可引起炎症反应、长期接触会对人体的免疫系统具有抑制作用。及时准确测出农产品中的真菌毒素污染是保障农产品安全的有效途径。免疫分析技术因其灵敏度高、操作简单等特点被广泛应用于真菌毒素快速检测中。免疫层析技术 (Immunochromatographic assay, ICA) 和酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒等快速检测产品常用作农产品现场快速检测, 市场监管总局发布的食品检验方法中采用的均为比色和试纸条检测方法。免疫分析技术的核心试剂为抗体, 获得分泌高质量单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞株是单克隆抗体制备的前提。目前市场上快速检测产品灵敏度不高、容易出现假阳性、操作步骤繁琐、耗时耗财, 其关键核心试剂-单克隆抗体质量亟待提高。针对污染农产品严重的 AFB<sub>1</sub> 和 T-2 毒素和目前常用的快速免疫分析检测技术的缺点, 本课题的主要研究内容成果如下:

(1) 采用类分布函数顶点亚克隆法结合三步样本放大和多浓度标准品检测筛选得到 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体。

研究过程中发现, 随着亚克隆的进行细胞上清检测数据的分布类似于分布函数, 选择分布函数顶端附近灵敏度和特异性较高的细胞孔进行亚克隆。随着亚克隆的进行逐渐降低标准品的浓度对细胞进行驯化以提高单克隆抗体的灵敏度。但是单一标准品浓度对细胞上清的检测有一定的局限性, 上清中抗体较多时会忽略一些好的细胞。对 96 孔细胞板单一标准品下筛选出来的细胞在 24 孔、6 孔细胞板和培养瓶中进行样本放大, 并采用多浓度标准品进行上清检测, 对比数据一致的细胞即为单克隆培养获得的稳定的细胞株, 最终获得稳定分泌抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的最佳杂交瘤细胞株 AFB<sub>1</sub>-B56-A2-2, 所分泌的单克隆抗体 MAbA2-2 的半抑制浓度为 0.13522 ng/mL, 检测范围为 0.08518-0.21464 ng/mL。

(2) 基于动态、伪均质的免疫磁珠 (Immunomagnetic beads, MBs)-间接竞争 ELISA (MBs-icELISA) 的建立。

针对目前 ELISA 耗时长、过程繁琐等问题, 以单克隆抗体 MAbA2-2 为识别元件、MBs 为抗原载体构建 MBs-icELISA。作为固定相的 MBs 比平板具有更大的表面积固定更多的抗原, 并将反应体系从固相转移到液相使反应体系更加均匀。增加外力条件可以使 MBs-icELISA 处于一种动态中, 不仅提高结合率而且极大缩短了检测时间。与现有的

ELISA 相比, MBs-icELISA 缩短了 2/3 检测时间, 提高了灵敏度。在最优的反应条件下, 甲醇溶液 (10%, z/o) 中线性拟合方程为  $Y=-0.57lgX+2.64$  ( $R^2=0.99396$ ), 线性检测范围为 0.004-10 ng/mL, 检测限 (Limit of detection, LOD) 为 0.0013 ng/mL。

(3) 基于生物活性保护和信号放大荧光免疫层析检测技术 (Fluorescence immunochromatography assay, FIA) 的构建。

目前大多数免疫层析检测技术是采用靶标抗体直接标记法, 标记过程易损害抗体活性, 且信号采集效率低, 因此本研究建立了一种 FIA 用于检测 T-2 毒素。荧光探针 (IgG@Eu) 由聚苯乙烯荧光微球与绵羊抗小鼠 IgG 结合制备, 不仅能保护单克隆抗体活性, 提高了荧光微球与单克隆抗体的结合率进而扩增荧光信号。T-2 毒素在甲醇溶液 (70%, z/o) 中的标准工作方程式为  $Y=-0.43022X+0.7308$  ( $R^2=0.98593$ )。T-2 毒素在甲醇溶液 (70%, z/o) 中的 LOD 为 0.01 ng/mL, 线性范围为 0.0625-50 ng/mL。在玉米底物、饲料底物中的 LOD 为 0.052 ng/mL、0.071 ng/mL, T-2 毒素的回收率在 95.31%-119.03%、95.7%-110.33% 之间, 相对标准偏差小于 11.38%、16.02%。采用 LC-MS/MS 法对该方法进行了验证, 结果表明该方法具有较好的准确性。

本研究为杂交瘤细胞筛选技术的创新提供了理论基础, 所建立的 MBs-icELISA 和 FIA 在后续有望转化为产品售于市场, 实现农产品现场高通量快速检测, 为免疫分析方法的构建提供了理论基础和实践技术支持。

**关键词:** 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>; T-2 毒素; 免疫磁珠; ELISA; 荧光免疫层析检测技

## Abstract

Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), the most harmful of the aflatoxins (AFs), and T-2, the most toxic of the trichothecene toxins, both damage the human immune system. Low doses of the toxin can cause an inflammatory response, and long-term exposure can have a suppressive effect on the human immune system. Timely and accurate detection of fungal toxin contamination in agricultural products is an effective way to ensure the safety of agricultural products. Immunoassay techniques are widely used for rapid mycotoxin detection because of their high sensitivity and simple operation. Immunochromatographic assay (ICA) and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits are commonly used for rapid on-site testing of agricultural products. Food inspection methods issued by the General Administration of Market Regulation are used in the colorimetric and test strip detection methods. The core reagents of immunoassay technology are antibodies, and obtaining positive hybridoma cell lines that secrete high-quality monoclonal antibodies is a prerequisite for monoclonal antibody preparation. At present, the sensitivity of rapid detection products on the market is not high, prone to false positives, cumbersome operation steps, time-consuming and costly, and the quality of the key core reagents - monoclonal antibodies need to be improved. In response to the serious contamination of agricultural products with AFB<sub>1</sub> and T-2 toxins and the shortcomings of the current commonly used rapid immunoassay detection techniques, the main research results of this topic are as follows:

(1) The AFB<sub>1</sub> monoclonal antibody was obtained by a distribution function-like vertex subcloning method combined with a three-step amplification sample assay and a multi-concentration standard assay.

During the study, it was found that the distribution of the cell supernatant assay data with subcloning resembled a distribution function. Cell wells with high sensitivity and specificity near the top of the distribution function were selected for subcloning. As the subcloning proceeded, the concentration of the standard was gradually reduced to domesticate the cells to improve the sensitivity of the monoclonal antibody. However, the single standard concentration has some limitations for the detection of cell supernatants, and some good cells are overlooked when there are more antibodies in the supernatant. The cells screened under a single standard in a 96-well cell plate were amplified in a 24-well, 6-well cell plate and culture flask, and the supernatant was detected by using multiple concentrations of standards, and the cells with consistent comparison data were the stable cell lines obtained by monoclonal culture

best hybridoma cell line AFB<sub>1</sub>-B56-0591A2-2, which stably secreted anti-AFB<sub>1</sub> monoclonal antibody, was eventually obtained. The semi-inhibitory concentration of the secreted monoclonal antibody MAbA2-2 was 0.13522 ng/mL, and the detection range was 0.08518-0.21464 ng/mL.

(2) Establishment of a dynamic, pseudo-homogeneous immunomagnetic bead-based indirect competition ELISA (MBs-icELISA).

The MBs-icELISA was constructed using the monoclonal antibody MAbA2-2 as the recognition element and MBs as the antigen carrier, which has a larger surface area than the plate to fix more antigen and transfer the reaction system from solid phase to liquid phase to make the reaction system more homogeneous. The addition of external conditions allows the MBs-icELISA to be dynamic, not only increasing the binding rate but also greatly reducing the detection time. Compared with existing ELISA, MBs-icELISA reduces the detection time by 2/3 and increases the sensitivity. Under the optimal reaction conditions, the linear fitting equation in methanol solution (10%, z/o) was  $Y=-0.571gX+2.64$  ( $R^2=0.99396$ ), the linear detection range was 0.004-10 ng/mL, and the limit of detection (LOD) was 0.0013 ng/mL.

(3) Construction of a fluorescence immunochromatographic assay (FIA) based on bioactivity protection and signal amplification.

Most current immunochromatographic detection techniques are based on direct labeling with target antibodies, and the labeling process is prone to damage antibody activity and low signal acquisition efficiency, so in this study, an FIA was established for the detection of T-2 toxin. The fluorescent probe (IgG@Eu) was prepared by combining polystyrene fluorescent microspheres with sheep anti-mouse IgG, which not only protected the monoclonal antibody activity, but also improved the binding rate of the fluorescent microspheres to the monoclonal antibody and thus amplified the fluorescent signal. the standard working equation for T-2 toxin in methanol solution (70%, z/o) is  $Y=-0.43022X+0.7308$  ( $R^2=0.98593$ ). the LOD of T-2 toxin in methanol solution (70%, z/o) was 0.01 ng/mL with a linear range of 0.0625-50 ng/mL. the LOD in corn substrate and feed substrate was 0.052 ng/mL, 0.071 ng/mL, and the recoveries of T-2 toxin ranged from 95.31%-119.03%, 95.7%-110.33% with the relative standard deviations less than 11.38% and 16.02%. The method was validated by LC-MS/MS, and the results showed that the method has good accuracy.

This study provides a theoretical basis for the innovation of hybridoma cell screening technology, and the established MBs-icELISA and ICA are expected to be transformed into products to be sold in the market, realizing on-site high-throughput rapid detection of

agricultural products, and providing a theoretical basis and practical technical support for the construction of immunoassay methods.

**Keywords: Aflatoxin B<sub>1</sub>; T-2 toxin; Immunomagnetic beads; Enzyme-linked immunosorbent assay; Fluorescent immunochromatographic assay**

# 目 录

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 T-2 毒素理化性质与危害.....	2
1.2 真菌毒素抗体识别原件.....	3
1.2.1 抗体分类.....	3
1.2.2 单克隆抗体制备方法.....	4
1.3 真菌毒素污染免疫分析检测技术.....	7
1.3.1 表面等离子体共振(SPR)免疫传感器.....	7
1.3.2 电化学免疫传感器.....	9
1.3.3 电化学发光免疫传感器.....	11
1.3.4 荧光免疫传感器.....	11
1.3.5 酶联免疫吸附法.....	13
1.3.6 免疫层析分析法.....	14
1.4 研究目的意义与研究内容.....	17
1.4.1 研究目的及意义.....	17
1.4.2 研究主要内容.....	17
第二章 采用分布函数顶点亚克隆筛选 AFB <sub>1</sub> 抗体.....	19
2.1 材料与方法.....	19
2.1.1 实验动物与细胞.....	19
2.1.2 主要试剂与仪器.....	19
2.1.3 主要试剂配制.....	21
2.1.4 动物免疫.....	23
2.1.5 抗血清 ELISA 检测.....	23
2.1.6 杂交瘤细胞的制备.....	24
2.1.7 杂交瘤细胞培养与筛选.....	25
2.1.8 阳性株的单克隆化.....	26
2.1.9 细胞三步样本放大.....	26
2.1.10 单克隆抗体的制备.....	26
2.1.11 阳性株冻存.....	27
2.2 结果与讨论.....	27
2.2.1 小鼠免疫效果.....	27
2.2.2 杂交瘤细胞亚克隆.....	28
2.2.3 阳性细胞株的选择与抗体的纯化.....	32

2.3 本章小结.....	34
第三章 基于动态、伪均质 MBs-ic ELISA 的构建 .....	36
3.1 材料与方法.....	36
3.1.1 主要试剂与仪器.....	36
3.1.2 主要试剂配制.....	37
3.1.3 AFB <sub>1</sub> -BSA 偶联磁珠(MBs-AFB <sub>1</sub> -BSA).....	37
3.1.4 MBs-AFB <sub>1</sub> -BSA 偶联过程的优化 .....	37
3.1.5 MBs-icELISA 的构建.....	38
3.1.6 MBs-icELISA 捕获过程的优化 .....	38
3.1.7 标准曲线的建立.....	39
3.2 结果与讨论.....	39
3.2.1 MBs-icELISA 的构建.....	39
3.2.2 MBs-AFB <sub>1</sub> -BSA 的优化.....	40
3.2.3 MBs-ic ELISA 捕获过程的优化 .....	41
3.2.4 MBs-icELISA 标准曲线.....	42
3.3 本章小结.....	43
第四章 基于生物活性保护和信号放大策略的荧光免疫层析法检测 T-2 毒素 .....	44
4.1 材料与方法.....	44
4.1.1 主要试剂与仪器.....	44
4.1.2 荧光探针的制备(IgG@Eu).....	46
4.1.3 FIA 纸基传感器的制备 .....	46
4.1.4 标准曲线的建立.....	47
4.1.5 FIA 的评价 .....	48
4.1.6 样品制备.....	48
4.1.7 对实际样品的检测.....	48
4.2 结果和讨论.....	48
4.2.1 FIA 纸基传感器的条件优化 .....	48
4.2.2 T-2 毒素的标准曲线的建立 .....	51
4.2.3 纸基传感器的性能测试.....	52
4.2.4 样品中 T-2 毒素的检测 .....	53
4.3 本章总结.....	53
第五章 结论和展望 .....	55
5.1 结论.....	55
5.2 展望.....	56
参考文献.....	57



## 第一章 绪论

### 1.1 真菌毒素

真菌毒素是由真菌或霉菌感染产生的次级代谢产物, 又被称为霉菌毒素<sup>[1-3]</sup>。目前全世界范围已经发现近 600 种真菌毒素<sup>[4]</sup>, 常见的真菌毒素有黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFs)、呕吐毒素(Deoxynivalenol, DON)、T-2 毒素、赭曲霉毒素(Ochratoxin, OT)等<sup>[5]</sup>。真菌或霉菌感染出现于农产品生产的各个阶段, 从播种、生长、收获、储存、运输到销售过程中任何适宜其生长的环境都容易造成感染<sup>[6-7]</sup>。每年被真菌毒素污染的农产品上千万吨, 并且因毒素污染造成的经济损失也非常严重<sup>[8-9]</sup>。农产品一旦造成毒素污染, 经过生物链的聚集最终将进入人或动物的体内以及土地中。人体一旦摄入或者接触真菌毒素将引发致癌、致突变及致畸等慢性毒性, 且毒素在人体内是无法分解的, 会严重影响身体健康<sup>[10]</sup>。除此之外, 真菌毒素稳定性非常好, 传统的食品加工技术很难将其降解, 所以防止其进入人或动物体内造成危害最根本的方式就是监测其发生与存在<sup>[11]</sup>。

#### 1.1.1 黄曲霉毒素的理化性质与危害

在所有霉菌毒素中, AFs 是造成食品污染的主要原因之一<sup>[12]</sup>, AFs 各结构如图 1.1 所示。黄曲霉、寄生曲霉、Nomius 曲霉和假烟曲霉在 25-30°C 和 15% 以上湿度条件下产生不同的黄曲霉毒素<sup>[13-14]</sup>。黄曲霉毒素可以溶于不同类型的有机溶剂, 包括甲醇、氯仿和苯<sup>[15]</sup>。这类毒素在紫外光下的稳定性很差, 在温度 >100°C 时很稳定。1974 年, 印度古吉拉特邦和拉贾斯坦邦报告了由 AFs 感染引起的肝炎疫情<sup>[16]</sup>, 在这次爆发中, 有 100 多人因食用受黄曲霉菌污染的玉米而死亡, 1981 年在肯尼亚也爆发了黄曲霉毒素事件<sup>[17]</sup>。在世界范围内, 多起黄曲霉病导致了大约 500 起急性感染和 200 起死亡<sup>[18,19]</sup>。常有因食用 AFs 污染的牛奶而爆发疫情的报道<sup>[20]</sup>。AFB<sub>1</sub> 是所有 AFs 中毒性最强的, 对人类威胁最严重的毒素之一<sup>[21,22]</sup>。

AFB<sub>1</sub> 是强有力的致癌物、致畸物、致突变物、免疫毒物、肝毒物和生殖毒物。除此以外, 食用 AFB<sub>1</sub> 污染的食物也会通过增加营养不良的风险来抑制生长<sup>[23]</sup>。国际癌症研究机构将 AFB<sub>1</sub> 列为一类致癌物<sup>[24]</sup>。持续接触 AFB<sub>1</sub> 会造成肝脏损伤, 从而增加肝硬化的发病率和肝脏中肿瘤的形成几率。根据全世界的统计, 大约 28% 的肝癌是由 AFB<sub>1</sub> 引起的<sup>[25]</sup>。此外, AFB<sub>1</sub> 的毒性增强了乙肝病毒的感染率, 从而增加了肝癌和相关异常的风险。在包括人类在内的动物中, AFB<sub>1</sub> 的毒性会导致黄曲霉毒素中毒和肝癌, 涉及 DNA 和蛋白质之间的相互作用, 刺激细胞增殖。暴露于 AFB<sub>1</sub> 会抑制免疫力, 从而增加免疫缺陷病毒攻击的敏感性<sup>[26-28]</sup>。AFB<sub>1</sub> 暴露还增加了其他几种传染病感染和腹泻的可

能性<sup>[29]</sup>。

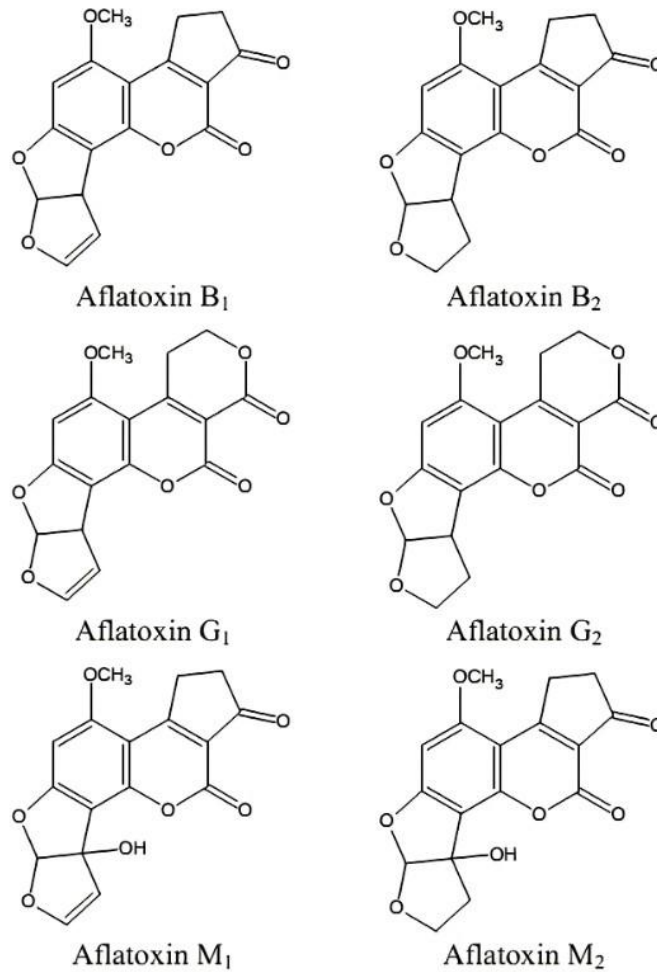


图 1.1 常见 AFs 的化学结构<sup>[13]</sup>

Fig. 1.1 Chemical structure of common AFs<sup>[13]</sup>

### 1.1.2 T-2 毒素理化性质与危害

T-2 毒素是一种毛霉菌毒素，由镰刀菌产生，属于 A 型毛霉菌毒素中危害最大的一种毒素<sup>[30]</sup>。Bamwrg 等人<sup>[31]</sup>在 1967 年首次发现了 T-2 毒素的化学结构，如图 1.2 所示。T-2 毒素分布广泛、难以处理，在寒冷的气候或潮湿的储存条件下，T-2 毒素会在动物饲料、玉米、小麦、大麦和燕麦中产生，对人类健康和畜牧业有害<sup>[32-33]</sup>。一旦动物或人接触到 T-2 毒素，就会引起一系列的毒性反应，如呕吐、腹泻、厌食等<sup>[34]</sup>。T-2 毒素对人类和动物的免疫系统<sup>[35]</sup>、神经系统<sup>[36]</sup>和消化系统<sup>[37]</sup>具有毒性。此外，该毒素还能抑制蛋白质、DNA 和 RNA 的合成<sup>[38]</sup>，诱发肝中毒和肾衰竭<sup>[39]</sup>，以及导致软骨细胞凋亡<sup>[40]</sup>。更重要的是，T-2 毒素一旦进入人类或动物的消化系统，其代谢物的毒性大于或等于其原

生毒性。由于 T-2 毒素的高毒性，人们对其给予了相当大的关注<sup>[41-43]</sup>。

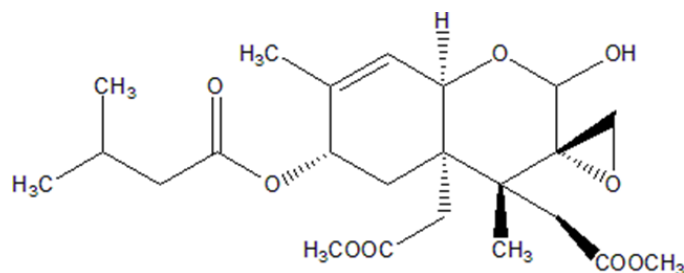


图 1.2 T-2 毒素的化学结构<sup>[31]</sup>

Fig. 1.2 Chemical structure of T-2 toxin<sup>[31]</sup>

## 1.2 真菌毒素抗体识别原件

生物识别元件能够特异性识别目标物，真菌毒素检测中所用到的识别元件有核酸适配体<sup>[44,45]</sup>（RNA、ssDNA 或自组装 DNA）、抗体、分子生物探针<sup>[46,47]</sup>、酶类<sup>[48-50]</sup>（DNA 酶、RNA 酶、分裂荧光素酶）、分子印聚物<sup>[51,52]</sup>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，使其广泛应用于真菌毒素检测中<sup>[53]</sup>。二者相比较，抗体的特异性以及亲和力性能远优于适配体，因此建立的检测方法灵敏度远优于适配体建立的检测方法。

### 1.2.1 抗体分类

目前用于真菌毒素检测的抗体种类较多：多克隆抗体<sup>[54]</sup>、单克隆抗体<sup>[55,56]</sup>、双特异性抗体<sup>[57,58]</sup>、基因工程抗体<sup>[59-61]</sup>等，每种抗体都有各自的优点和局限性，例如多克隆抗体，不需要严格的特异性所以比较容易制备，但亲和力和灵敏度远不如单克隆抗体；双特异性抗体能够同时识别两种目标物，实现同步检测，目前双特异性抗体的制备技术比较复杂繁琐且周期长；基因工程抗体可以根据需要对现有的抗体进行设计定性改造、会更符合需求，但其制备过程涉及基因文库筛选、基因克隆与表达载体构建等基因工程程序，操作过程技术含量高且耗时复杂。近年来，多克隆抗体、双特异性抗体、基因工程抗体等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，单克隆抗体通常由杂交瘤细胞株分泌所得，一般通过几次的亚克隆就可获得阳性杂交瘤细胞株。科勒和米尔斯坦在 1975 年发明的杂交瘤技术<sup>[62]</sup>为大规模生产单克隆抗体打开了大门。单克隆抗体可以高特异性和亲和力地与靶标分子结合，被认为是一种高灵敏度的检测探针。许多单克隆抗体已经被开发出来，这促进了以后基因组时代的基础生命科学的进步。单克隆抗体作为生物制药产品也吸引了很多关注，它们作为药物的市场正在扩大。因此，单克隆抗体成为了基础生物科学和工业中的高性能生物材料<sup>[63,64]</sup>。抗体的质

量直接决定了传感器的灵敏度，获得单克隆抗体的前提是筛得优质的阳性杂交瘤细胞。

### 1.2.2 单克隆抗体制备方法

目前，单克隆抗体制备的主要方式是由阳性杂交瘤细胞分泌所得，阳性杂交瘤细胞的质量直接影响单克隆抗体的质量。因此，简单快速、高效地筛选出能高质量阳性杂交瘤细胞株仍然是个亟待突破的瓶颈。流式细胞术（Flow cytometry, FCM）是应用流式细胞仪对处于流动的液体中悬浮的细胞及亚细胞结构等生物颗粒和非生物颗粒进行多参数、快速准确分析定量及分选的技术<sup>[65]</sup>。流式细胞仪的工作原理如下：流体系统将荧光染色的悬浮细胞或微粒在压力下从试管或多孔板中抽取细胞样品，并将其注入流动液体（称为鞘液）层流中间的流室中，鞘液可帮助缩窄细胞流，从而将细胞组织成一行大致单行的单细胞颗粒流并输送至流式检测室<sup>[66]</sup>。Sachi Akagi 等人和 Atsumi Sakaguchi 等人<sup>[67,68]</sup>根据杂交瘤细胞表面的膜型免疫球蛋白及其分泌形式抗体，与抗原具有相同的结合特性，选择膜型免疫球蛋白结合的荧光标记抗原作为筛选标记建立了膜免疫球蛋白定向杂交瘤筛选与克隆（Screening and cloning of membrane immunoglobulin directed hybridoma, MIHS）方法。MIHS 使用流式细胞仪将其单独分类到 96 孔板中。模型实验表明，该方法能高效地获得适用于免疫印迹和免疫荧光的良好单克隆抗体，通过该方法建立的大多数单克隆抗体都属于 IgG 同型，它比 IgM 型更受青睐。使用高通量流式细胞仪，该方法避免了繁琐的重复筛选和克隆过程。对于难以表达的疏水膜抗原或多链蛋白复合物，传统的 ELISA 筛选也是不现实的。Haohai Zhang 等人<sup>[69]</sup>使用 Celigo 图像细胞仪的新的高通量筛选方法，该方法通过直接对比活细胞上的抗体结合信号，无论有无重组抗原表达，以避免非特异性信号。有限稀释法亚克隆通过检测杂交瘤上清液与中国仓鼠卵巢细胞上表达的重组抗原 CD39 的结合，优化了基于图像细胞术的高通量筛选方法。接下来，通过连续稀释纯化的 CD39 抗体来验证图像细胞仪的敏感性。Celigo 被用于测量商业和内部的膜结合 CD39 抗体的抗体亲和力。这种基于细胞的筛选程序可以在一天内完全完成，显著提高了杂交瘤筛选的吞吐量和效率。此外，测量抗体与活细胞的直接结合，消除了假阳性和假阴性命中。该图像细胞术方法灵敏度高，可在浓度低至 5 ng/mL 的上清液中检测阳性抗体，同时测定 Kd 结合亲和系数。Krista Evans 等人<sup>[70]</sup>将贝顿迪金森冲击细胞分选器的单细胞沉积能力与同步细胞的显微成像能力相结合，创建了一个生产克隆生产细胞系的系统。用荧光标记细胞测定的单细胞沉积效率为 98%。将沉积的细胞固定在微孔板孔底部所需的离心力为 1126 g，所有细胞在细胞成像系统焦平面的概率为 98.1%。细胞分选器沉积单个细胞的概率，结合每个细胞沉降到成像仪焦平面的概率，产生记录的 99% 的联合单克隆概率。虽然流式细胞术仍然是最准确和可靠的细胞筛选方法之一，但往往需要大量的时间来进行适当的数据采集，这一直是速率限制因素，每

个板上的每一个孔都必须单独采集和处理。并且基于流式细胞仪建立的细胞筛选方法在小型实验室中难以实现，需要专业人员熟练掌握流式细胞仪的使用方式以及数据分析。

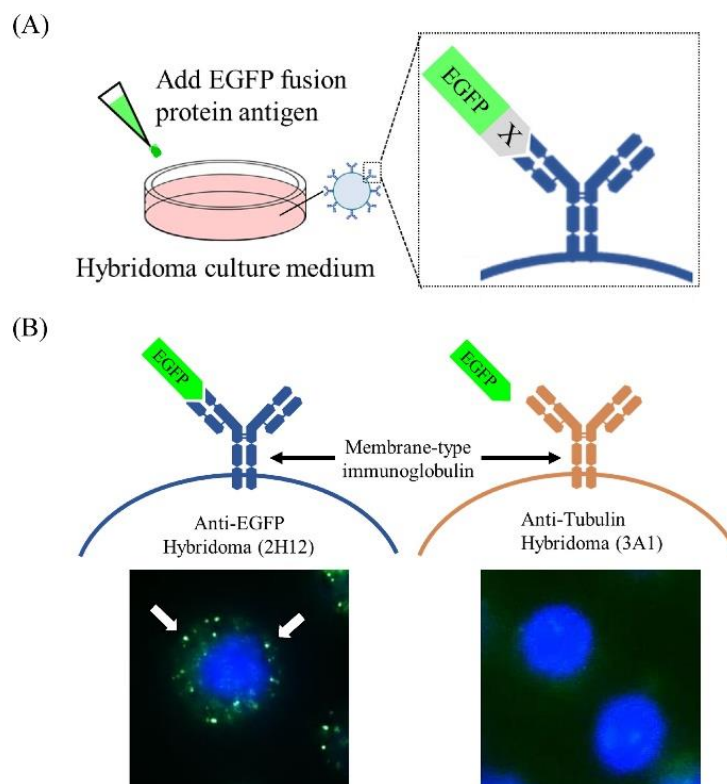


图 1.3 膜免疫球蛋白定向杂交瘤筛选与克隆方法示意图<sup>[68]</sup>

Fig. 1.3 Schematic diagram of the membrane immunoglobulin-directed hybridoma screening and cloning method<sup>[68]</sup>

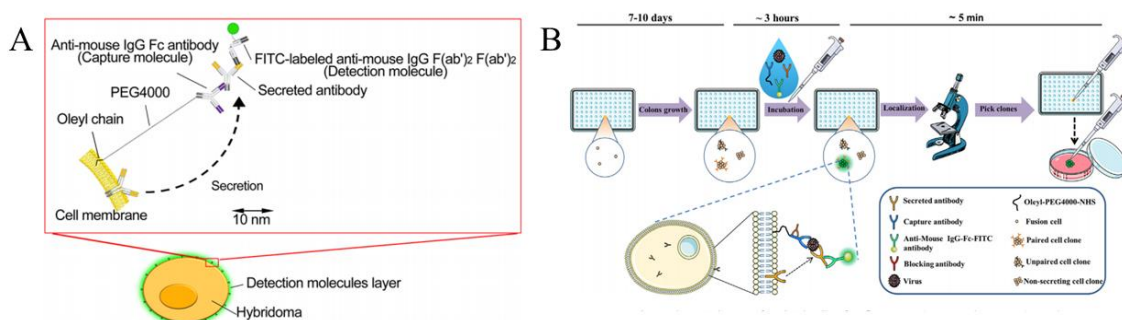


图 1.4 A:细胞表面荧光免疫吸附试验示意图<sup>[71]</sup>; B:基于三明治细胞表面荧光免疫吸附试验<sup>[72]</sup>

Fig.1.4 A:Schematic diagram of cell surface fluorescence immunosorbent assay <sup>[71]</sup>;

B:Sandwich-based cell surface fluorescence immunosorbent assay<sup>[72]</sup>

Akiko Kida<sup>[71]</sup>等人制备了脂质标记的抗鼠 IgG Fc 抗体（捕获分子），并均匀地显示

在目标细胞的表面，分泌的新生抗体被夹在捕获分子和荧光标记的抗鼠 IgGF (ab')<sub>2</sub> (ab')<sub>2</sub> (检测分子) 之间。这种新开发的方法称为细胞表面荧光免疫吸附试验 (Cell surface-fluorescence immunosorbent assay, CS-FIA)。每个细胞的荧光强度与夹持抗体的数量具有很好地相关性 (从 6.25 fg/细胞到 6.40 pg/细胞)。当对小鼠杂交瘤约  $4 \times 10^3$  细胞进行 CS-FIA 处理后，分离出 28 个在一天内荧光强度最高的杂交瘤细胞株。此外，在单细胞繁殖到约 10 个细胞后 (2 周后)，20 个杂交瘤细胞株仍然能够分泌比亲本杂交瘤分泌的更高数量的抗体 (高达 7 倍)。Zhiyuan Jin 等人<sup>[72]</sup>开发了一种基于三明治 (CSFIA) 的快速筛选配对抗体的新方法，捕获抗体通过脂质衍生物 Oleyl-PEG4000-NHS 锚定在杂交瘤细胞膜上，加入山羊抗小鼠抗体 (阻断剂) 来阻断捕获抗体的 Fc 片段。捕获抗体的 Fab 片段可以特异性地结合添加的抗原，形成捕获的抗体抗原复合物 (免疫复合物)。如果杂交瘤细胞分泌的抗体能够识别免疫复合物。根据抗原和抗体的特异性结合，在细胞表面形成双抗体夹心结构。杂交瘤细胞将用抗小鼠 IgGFc-异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 抗体染色。

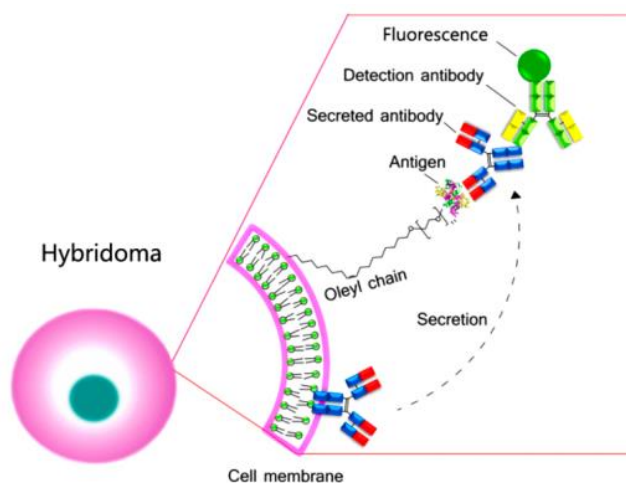


图 1.5 基于细胞膜表面抗原锚定的细胞表面荧光免疫吸附试验示意图<sup>[73]</sup>

Fig. 1.5 Schematic diagram of cell surface fluorescence immunosorbent assay based on cell membrane surface antigen anchoring<sup>[73]</sup>

Xiuqing Li 等人<sup>[73]</sup>抗原首先通过双功能分子 Oleyl-PEG4000-NHS 锚定在杂交瘤细胞表面。从杂交瘤细胞分泌的特异性抗体随后被细胞表面的抗原捕获。阳性杂交瘤细胞用荧光标记的抗小鼠 IgG-Fc 抗体进行染色。在加入甲基纤维素半固体培养基后，使用移液管很容易选择阳性克隆。这些阳性细胞克隆可用于直接扩增后产生单克隆抗体。利用该方法，高效快速地筛选了猪流行性腹泻病毒和抗孔雀石绿的阳性杂交瘤克隆。Junjie Yan 等人<sup>[74]</sup>利用同等方式从杂交瘤中制备了一种单克隆抗体，利用 CSFIA 可以区分 HP-PRRSV (包括 TP、QJ、LQ、JN-HS 和 TY 菌株) 和 C-PRRSV (CH-1A) 菌株。Hongfen



Bian 等人<sup>[75]</sup>采用 CS-FIA 筛选的 PEDV 阳性杂交瘤细胞制备单克隆抗体, 制备了 14 株抗南方 PEDV 的单克隆抗体。

Daohong Zhang 等人<sup>[76]</sup>采用了常规半固体培养基法、干细胞培养基法以及液体培养基法三种方法选育杂交瘤细胞株, 在前人研究基础上建立了新型两步筛选法, 并通过此筛选法得到了灵敏度最高的黄曲霉毒素通用抗体。Qingqing Yang 等人<sup>[77]</sup>结合 Daohong Zhang 等人报道的“新型两步筛选法”采用液体培养基-半固体培养基交替使用对杂交瘤细胞进行选育筛选获得了辣椒素类物质的通用单克隆抗体。

制备单克隆抗体的过程中最为重要的是筛选高亲和力、高灵敏度的阳性杂交瘤细胞株。将流式细胞仪应用于阳性杂交瘤细胞的筛选, 加速的细胞筛选过程往往需要大量的时间来进行适当的数据采集, 这一直是速率限制因素。每个板上的每一个孔都必须单独采集和处理。并且基于流式细胞仪建立的细胞筛选方法在小型实验室中难以实现, 需要专业人员熟练掌握流式细胞仪的使用方式以及数据分析。细胞表面荧光免疫吸附试验是将阳性细胞孵育不同的荧光信号利用荧光显微镜捕获信号进而将目标细胞进行分离筛选得到, 荧光材料的使用需要严格控制, 荧光剂具有变异性倾向, 存在一定的潜在危害。目前广泛采用的阳性杂交瘤细胞株筛选方法为先通过 HAT 培养去除未融合的骨髓瘤细胞来选择杂交瘤细胞, 结合 ELISA 法测出阳性孔后, 再通过有限稀释亚克隆法如此反复进行 2-4 轮筛选, 直至筛出稳定表达靶标抗体阳性杂交瘤细胞系。整个筛选过程周期长、筛选量大, 耗费人力物力, 且容易丢失优质阳性克隆, 导致新抗体开发成本高、难度大, 急需研究抗体高效筛选技术, 提高单克隆抗体研发效率和成功率。

### 1.3 真菌毒素污染免疫分析检测技术

对真菌毒素的定量检测传统的方法是采用色谱分析, 例如薄层色谱法<sup>[78]</sup>、高效液相色谱法<sup>[79,80]</sup>和液相色谱-质谱联用法<sup>[81]</sup>。以上方法检测结果准确性非常高, 但是在检测过程中需要昂贵且专业的仪器以及专业的技术人员、样品的前处理繁琐, 难以实现快速高通量检测。基于以上方法的局限性, 以抗原抗体高特异性识别为基础的新的免疫分析方法(免疫传感器)蓬勃发展<sup>[82]</sup>。

#### 1.3.1 表面等离子体共振(SPR)免疫传感器

表面等离子体共振(Surface plasmon resonance, SPR)首次出现是由 Wood 在 19 世纪提出的<sup>[83]</sup>。表面等离子体共振是一种简单而直接的传感技术, 它的原理依赖于光在全反射条件下通过棱镜并照射在棱镜上侧的金属表面时产生光波的一种光学方法, 即在一个特定的入射角度即共振角下, 金属表面自由振荡的电子吸收光子能量, 导致电子共振

[84-88]。固定在薄膜表面的物质与被分析物之间的特异性结合反应导致响应信号的变化[89]。SPR 能够高效而敏感的识别分子间相互作用，可以同时满足高灵敏度、实时、连续检测、样本量小的要求，这对食品中毒素、重金属、农药以及其他有害物质的检测和疾病早期诊断的高精度检测具有重要意义[90,91]。

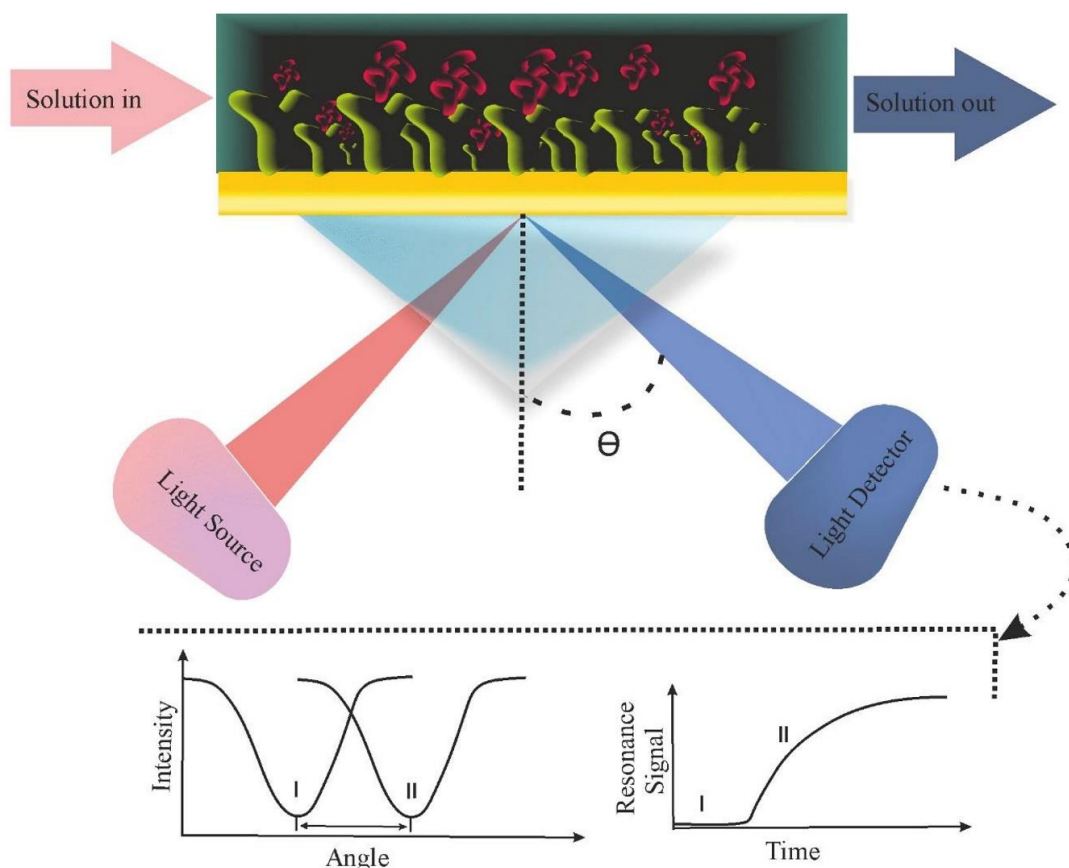


图 1.6 用于 SPR 生物传感的传统克雷奇曼光学结构示意图<sup>[91]</sup>

Fig. 1.6 Schematic diagram of the conventional Kretschmann optical structure for SPR biosensing<sup>[91]</sup>

基于 SPR 的小目标分子无标记检测是一个巨大的挑战，在没有信号放大时小目标物的识别信号会微弱一些，需要将信号放大才能进行准确和精确的定量检测。Hema Bhardwaj、Hong Lei 等人<sup>[92,93]</sup>都利用纳米金（AuNPs）在锚定信号放大和等离子体共振耦合产生方面都表现出了显著的影响。Hema Bhardwaj 等人人<sup>[92]</sup>使用自组装单分子层（SAM）Au 芯片通过 EDC-NHS 交联剂进行顺序修饰，嫁接蛋白 a，最终与抗 AFB<sub>1</sub> 抗体相互作用，如图 1.7 所示。利用在 SAM Au 芯片上沉积的功能化硫辛酸 AuNPs，然后使用 EDC-NHS 交联剂原位激活功能基团，嫁接蛋白 a 和固定抗 AFB<sub>1</sub> 抗体，制备了类似的多层芯片表面。该多层功能化 AuNPs 修饰的 Au 芯片成功用于 0.01~50nM 的 AFB<sub>1</sub> 检测，检测限为 0.003 nM。与裸自组装 Au 芯片相比，AuNPs 的检测极限为 0.19 nM，



线性检测范围为 1-50 nM。

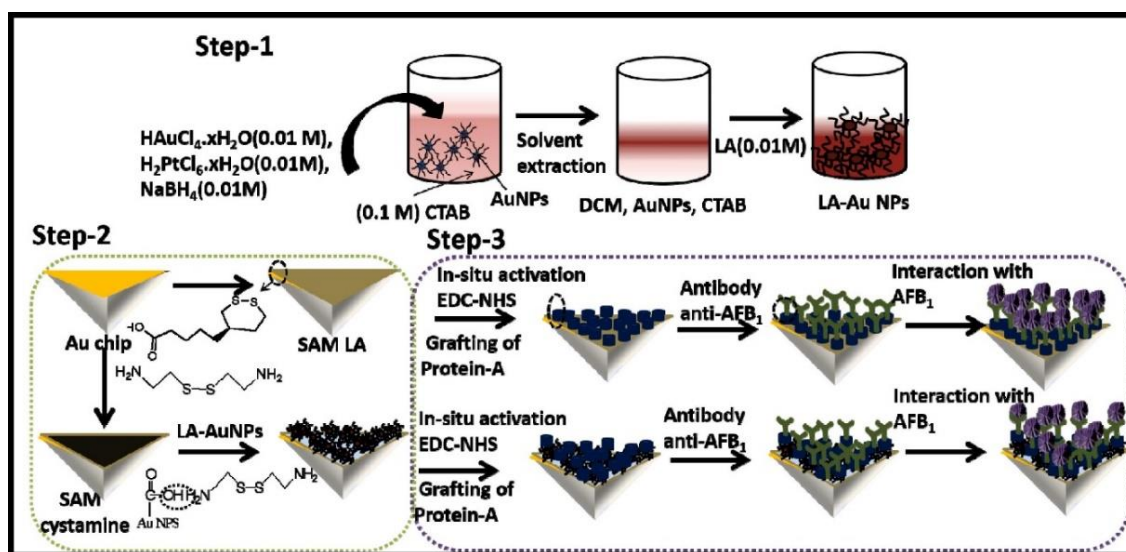


图 1.7 SPR 生物传感器活性表面修饰中所涉及的不同步骤的示意图<sup>[92]</sup>

Fig. 1.7 Schematic representation of the different steps involved in the active surface modification of SPR biosensors<sup>[92]</sup>

### 1.3.2 电化学免疫传感器

电化学 (Electrochemistry, EC) 免疫传感器是基于固态器件上的亲和配体的生物传感器，其中免疫化学反应耦合到传感器表面以产生输出的 EC 响应，如电流、电位、离子浓度、电导、电容或阻抗变化<sup>[94]</sup>。EC 免疫传感器将特异性抗原抗体免疫识别与操作简单响应快速的 EC 检测相结合，使得其在各种检测方面取得了重大进展。EC 免疫传感器因其固有的小型化和潜在的自动化在食品快检方面得到了极大的应用<sup>[95]</sup>。然而，在裸电极上，小分子物质的电化学反应并不明显。因此，有必要引入一些电极改性剂来提高其比表面积，提高 GCE 的电催化活性和灵敏度。Na Wang 等人<sup>[96]</sup>采用石墨烯、双金属有机框架材料 (Zn/Ni-ZIF-8-800)、壳聚糖 (Chitosan, CS) 和 AuNPs 对裸玻璃状碳电极进行了改性，将金属有机框架 (Metal-organic framework, MOF) 材料更大的表面积、更高的电导率和更好的稳定性、AuNPs 优异的导电性和生物相容性、CS 优异的成膜能力和良好的附着力集于一体构建了基于 AuNPs/Zn/Ni-ZIF-8-800@石墨烯的电化学免疫传感器，用于快速检测花生油中的 AFB<sub>1</sub>，如图 1.8。在最佳条件下，电化学免疫传感器的线性范围为 0.18~100 ng/mL，检测限为 0.18 ng/mL。此外，所制备的电化学传感器具有长期稳定性和较高的选择性，其为小分子物质的检测奠定了基础。Zhenhong Yuan 等人<sup>[97]</sup>利用普鲁士蓝 (Prussian blue, PB) 纳米颗粒、沸石咪唑酸盐框架-8 (ZIF-8) 和聚多巴胺 (Dopamine, PDA) 合成 PB@ZIF-8/PDA 作为信号探针，集结了 ZIF-8 的高孔隙

率、PB 独特的电化学活性和 PDA 优异的电导率提高了该传感器的灵敏度（图 1.9）。将兔抗小鼠免疫球蛋白 G 功能化 PB@ZIF-8/PDA，制备电化学探针构建了基于间接竞争模式的简易电化学免疫传感器，它对 DON 的检测灵敏度高，检测限低。

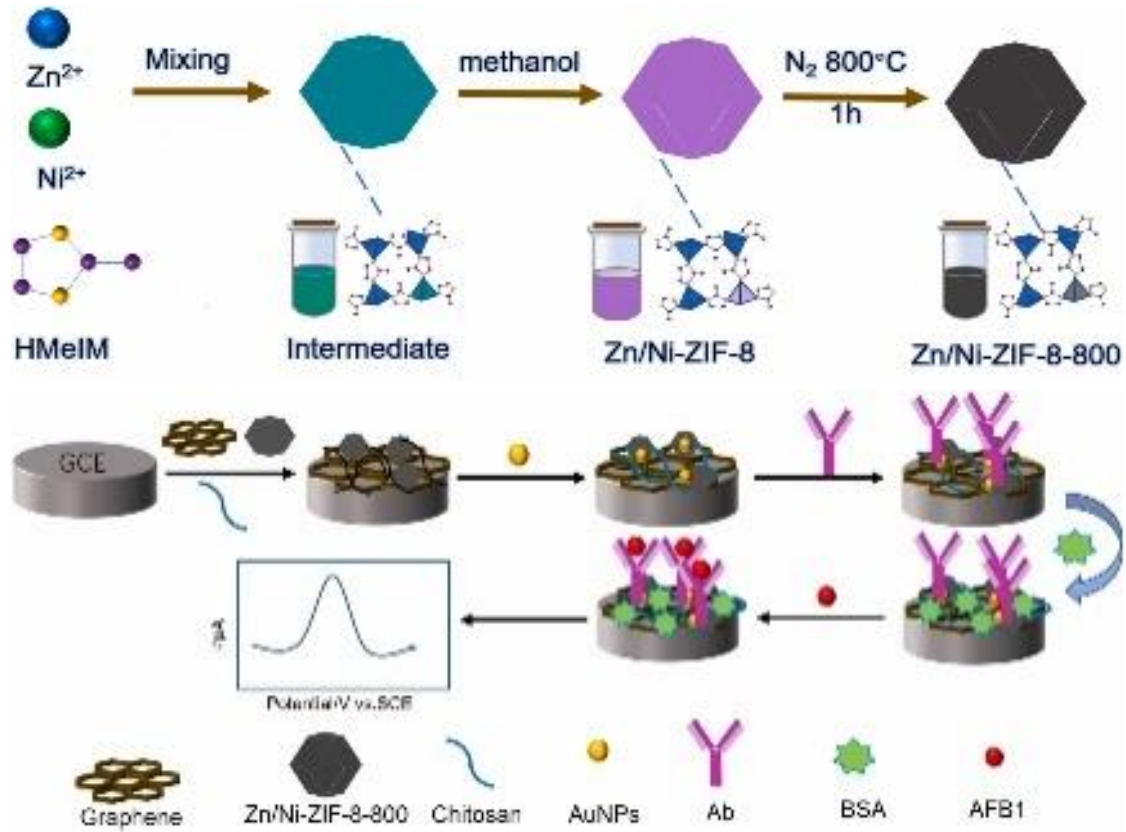


图 1.8 Zn/Ni-ZIF-8-800 的合成工艺和 AFB<sub>1</sub> 电化学免疫传感器示意图<sup>[96]</sup>

Fig.1.8 Schematic diagram of the synthesis process and aflatoxin B<sub>1</sub> electrochemical immunosensor of Zn/Ni-ZIF-8-800<sup>[96]</sup>

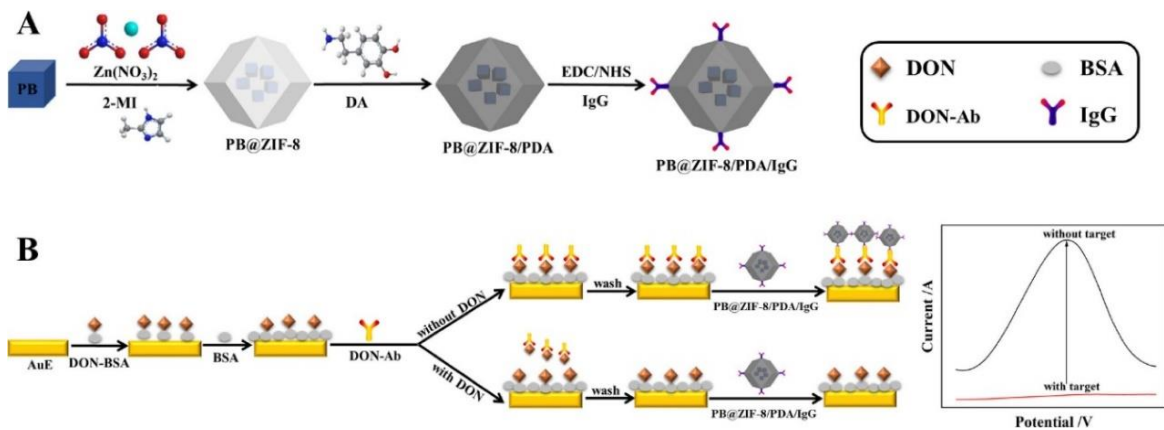


图 1.9 以 PB@ZIF-8/PDA/IgG 作为信号探针进行 DON 检测的传感策略示意图<sup>[97]</sup>

Fig. 1.9 Schematic diagram of the sensing strategy using PB@ZIF-8/PDA/IgG as a signal probe for DON detection<sup>[97]</sup>

### 1.3.3 电化学发光免疫传感器

电化学发光 (Electrochemical luminescence, ECL) 是基于电极表面发生高能电子转移, 形成激发态而发光的一种特殊的化学发光 (Chemiluminescence, CL) 现象, 将光谱方法和 EC 联系在了一起<sup>[98,99]</sup>。与荧光分析方法相比, ECL 不需要光源可以避免样品中发光物质的影响。与基于光谱的检测方法以及电化学检测相比, ECL 具有明显的优势, 如信号背景噪声低、灵敏度高和重现性好, 因此可以大规模实际应用<sup>[100,101]</sup>。将高特异性和高选择性的抗体与 ECL 相结合构建基于 ECL 免疫传感器在具有非常大的应用前景, 且特异性好、灵敏度高、背景低、可控性强、分析速度快、耗时短。构建 ECL 传感器前提需要发光体, 如 Ru(bpy)<sub>3</sub>2p、鲁米诺、半导体量子点金属纳米材料等。Xiaohui Lv 等人<sup>[102]</sup>在温和碱性溶液中反应得到了具有三维网络纳米结构的纳米孔钴 (NPCo), 三氧化二钴 (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) 在 NPCo 表面进一步生长, 然后得到 NPCo/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>。通过金纳米颗粒功能化 NPCo/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (NPCo/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au) 固定抗体制备 ECL 修饰电极, 用于检测霉菌毒素 DON。此外, AuNPs 的引入提高了电导率, NPCo/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au 对 RuSi@Ru(bpy)<sub>3</sub>2p 的发光具有良好的催化性能且其纳米多孔结构可以促进大量生物分子和发光材料的固定化。电位分辨电化学发光 (Potential-resolved electrochemical luminescence, PRECL) 是在循环伏安扫描过程中通过不同电位产生多通道 ECL 发射的过程, 近年来, 具有电位分辨的电化学发光团体系在生物测定法方面表现出了巨大的应用潜力。Xiaoyi Lv 等人<sup>[103]</sup>合成了具有 PRECL 发光特性的有机硼复合荧光染料 IBPHF, 该染料在中性 PBS 溶液中分别在阳极区和阴极区发出两个独立的 ECL 信号。用于捕获更多的抗体的三维多孔淀粉碳纳米材料 (Three-dimensional porous starch carbon nanomaterials, 3D-PSC NPs) 具有良好的电导率和生物相容性。因此, 利用信号探针 IBPHF 的优异性能和其与衬底 3D-PSC NPs 之间的协同作用可以实现对 AFB<sub>1</sub> 进行准确检测。这为食品安全监测和生物分析提供了更多的可能性。

### 1.3.4 荧光免疫传感器

异质和均质免疫分析是两种常见的免疫分析技术<sup>[104]</sup>。均质免疫分析包括将生物分子固定在纳米材料上, 都是在溶液中进行的。均质免疫分析法可用于比较复杂的样品的检测, 不需要较多的样品消耗, 样品预处理目标物的分离比较简单、相对廉价并且传感器性能优异<sup>[105]</sup>。荧光免疫分析法是一种常用的光学生物传感器, 结合了荧光技术 (高灵敏度) 和免疫分析法 (高选择性) 的优点, 近年来得到了医学和纳米技术的特别关注。荧光共振能量转移 (FRET) 是一种非辐射物理现象, 能量转移过程的效率依赖于供体和受体之间的接近和合适的对齐以及偶极-偶极相互作用<sup>[96]</sup>。“开启”是 FRET 最重要和最普遍的应用方法之一, 它是基于通过用特定化合物取代猝灭剂或通过化合物将猝灭剂从

猝灭荧光中“开启”<sup>[107,108]</sup>。Liang Zhang 等人开发了一种“开启”荧光传感器，用于对玉米样品中伏马菌素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 和 B<sub>3</sub> (Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>, FB<sub>1</sub>、FB<sub>2</sub> 和 FB<sub>3</sub>) 的总检测，如图 1.10 所示。采用罗丹明 B 异硫氰酸酯(Rhodamine B isothiocyanate, RBITC)和 AuNPs 作为能量供体-受体对，恢复的荧光强度与 FB 的浓度成反比，检测结果结果表明，荧光“开启”传感器在玉米样品的 FBs 分析中具有巨大的应用潜力。

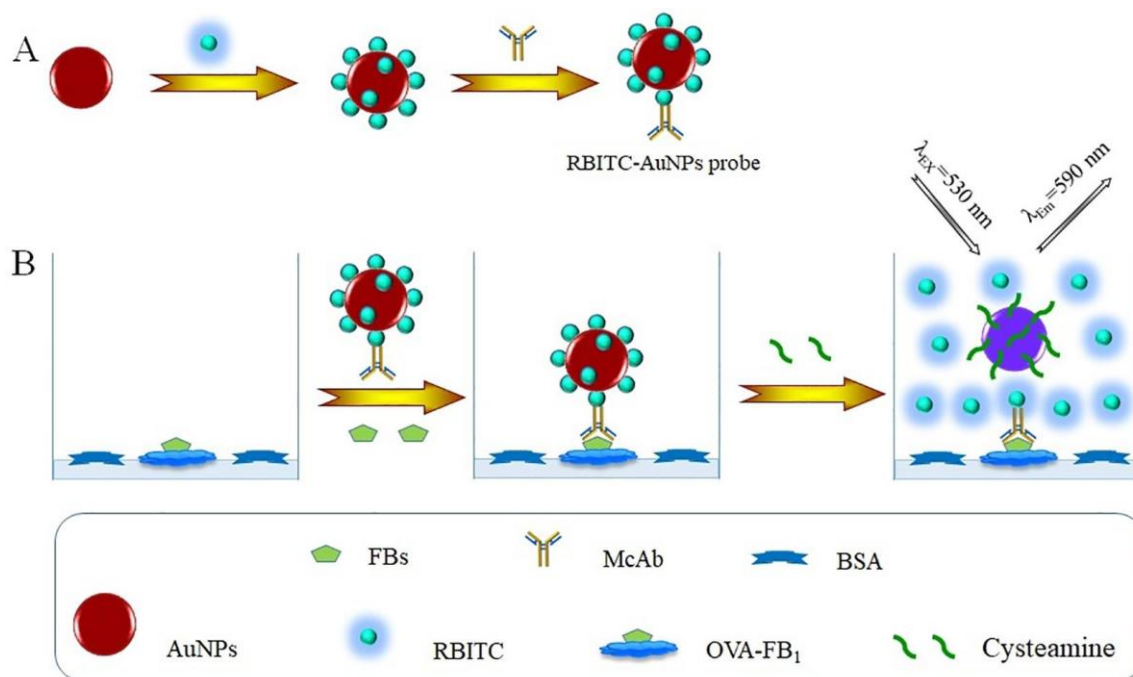


图 1.10 荧光“开启”传感器检测 FB1 示意图<sup>[108]</sup>

Fig. 1.10 Schematic diagram of the fluorescent "on" sensor detecting FB1<sup>[108]</sup>

量子点的高灵敏度使其常用于荧光免疫传感器中。核心/壳量子点具有独特的光谱特性，可调发光颜色，高荧光强度，高光稳定性，高荧光量子产量和长荧光寿命，在单一激发波长下，可以同时使用具有多种颜色，用在荧光免疫同步检测传感器中<sup>[110-113]</sup>。Jingming Zhou 等人<sup>[114]</sup>首次开发了一种基于多色量子点 (Quantum dots, QDs) 标记的单元同时定量玉米赤霉烯酮 (Zetilenone, ZEN) 和赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 的多重荧光免疫分析方法，如图 1.11 所示。选择两种最大发射波长为 520nm (绿色) 的 ZnCdSe/核/壳量子点作为标记材料，设计了抗 ZEN-mAb-QDs 和抗 OTA-mAb-QDs 作为免疫荧光探针。在相同的激发波长和两个不同的发射波长下测量荧光，以确定每个目标。

荧光偏振 (FP) 是一种强大而灵敏的技术，通过监测荧光标记分子或固有荧光分子的表观大小的变化来研究分子相互作用<sup>[115,116]</sup>。荧光偏振免疫分析检测 (FPIA) 是一种同质技术，具有不用分离和洗涤步骤的独特优势。检测过程简单、快速、廉价和可靠，主要应用于制药和医学研究，可以短检测时间、增加吞吐量、简化检测程序<sup>[117,118]</sup>。



Vincenzo Lippolis 等人<sup>[119]</sup>建立了一种灵敏、准确的 FPIA 用于测定自然污染小麦样品中的 OTA。首先合成了一种荧光素标记的 OTA 示踪剂，并检测了其三种单克隆抗体的结合反应，竞争性 FP 免疫分析显示半抑制浓度值为 0.48 ng/mL。小麦样品用乙腈/水（60:40, v/v）提取，在 FP 免疫分析之前，使用氨基丙基柱通过快速固相萃取程序进行纯化，总分析时间小于 20 min。小麦样品（3-10 μg/kg）的平均回收率为 87%，相对标准差一般低于 6%，检测限和定量限分别为 0.8 μg/kg 和 2.0 μg/kg。Chenglong Li 等人<sup>[120]</sup>提出了一种同源、高通量、多波长荧光团基 FPIA（MWFPIA），用于玉米中 DON、T-2 毒素和 FB<sub>1</sub> 的同步检测。使用不同染料合成的多色示踪剂和特异性单克隆抗体（mab）进行 MWFPIA。在自然污染的玉米样品中进行了验证，并与 HPLC-MS/MS 的结果进行了比较。

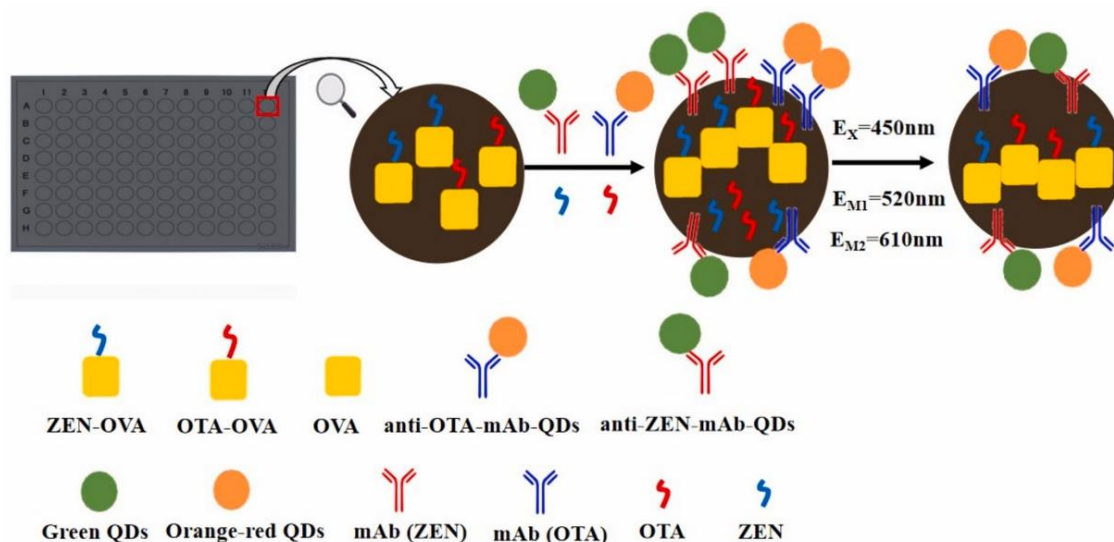


图 1.11 基于多色量子点同时定量测定 ZEN 和 OTA 的方法示意图<sup>[114]</sup>

Fig. 1.11 Schematic diagram of the method for simultaneous quantitative determination of ZEN and OTA based on multicolor quantum dots<sup>[114]</sup>

### 1.3.5 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附试验（Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA）首次发布是 Engvall 和 Perlmann 在 1971 年发表的 IgG 定量测定的文章<sup>[121]</sup>，使其在后续的发展中成为微量检测物质的一种方法。ELISA 常用到的有双抗体夹心法、直接法、间接非竞争法和间接竞争法这四种模式。ELISA 的应用非常广泛，无论是在大分子还是小分子的检测中都得到了应用。Tingting Yan 等人<sup>[122]</sup>开发了一种生物素-链霉亲和素扩增酶 ELISA（BA-ELISA），利用生物素化的纳米体 Nb26 和链霉亲和素（Streptavidin, SA）偶联聚合辣根过氧化物酶（Horse radish peroxidase, HRP）（SA-PolyHRP）来快速地检测谷

物中的 AFB<sub>1</sub>。在最优条件下, AFB<sub>1</sub> 的 BA-ELISA 的半抑制浓度值提高到 0.21 ng/mL, 满足了实际应用中检测限的要求, 检测时间控制在 1 h 内并且节省了多达 98% 的抗体。Huang Dai 等人<sup>[123]</sup>以姜黄素为比色指标, 建立了一种可检测 AFB<sub>1</sub> 的新型比色 ELISA。以脲酶和兔抗小鼠免疫球蛋白 G 标记的金纳米颗粒为信号标记, 建立了一种间接竞争性酶标记免疫分析方法。脲酶催化尿素水解生成氨, 提高了溶液的 pH 值, 姜黄素的酚羟基在碱性条件下电离成酚氧阴离子, 增强了协同效应。结果, 姜黄素的颜色从黄色变成了红褐色, 产生了可见的颜色变化。在最佳条件下, AFB<sub>1</sub> 可以用肉眼进行定性测定, 在 0.01-5 ng/mL 范围内呈线性关系, 检测限为 67 pg/mL。Kunlu Bao 等人<sup>[124]</sup>将 OTA 特异性纳米体 (Nb28) 与 c4 结合蛋白 (C4bp) c 端片段融合, 形成自组装的七聚体融合蛋白 (Nb28-C4bp $\alpha$ )。此外, 利用较高亲和力的七聚体开发了一种超灵敏的竞争的检测咖啡样品中 OTA 的 ELISA。该灵敏度增强策略的半抑制浓度为 0.13 ng/mL, LOD 为 0.009 ng/mL。所提出的纳米体多聚化可以是一种特别有吸引力的策略, 以提高各种免疫分析的灵敏度或分析信号。Shengnan Zhan 等人<sup>[125]</sup>开发了一种动态光散射 (Dynamic light scattering, DLS) 增强的直接竞争 ELISA (DLS-dcELISA), 用于超灵敏地检测玉米中的 AFB<sub>1</sub>。利用羟基自由基诱导的 AuNP 聚集来放大 AuNP 散射信号, 所开发的 DLS-dcELISA 对 AFB<sub>1</sub> 具有超高的灵敏度, 检测限为 0.12 pg/mL, DLS-dcELISA 具有良好的选择性、高精度和较强的实用性。该技术可以取代基于吸收的等离子体或彩色信号作为免疫分析信号输出, 以增强霉菌毒素的竞争性检测。ELISA 是免疫分析方法中最为成熟且最有前景的一个检测方法, 在传统 ELISA 基础与原理上进行创新提高检测方法的灵敏度与实用性。

### 1.3.6 免疫层析分析法

免疫层析分析法 (Immunochromatographic assay, ICA) 是一种结合了色谱和免疫技术的分析方法, 利用抗原抗体的特异性识别为基础, 通过液体在试纸条上的毛细管作用力实现对不同物质的分析能力。ICA 检测时间短、成本低、易于推广、操作简单, 使其广泛用于霉菌毒素的监测<sup>[126-128]</sup>。Yiyi Chen 等人<sup>[129]</sup>开发了一种改进的基于上转化纳米颗粒的免疫层析分析法 (IUCNPs-ICA) 用于检测 ZEN, 如图 1.12 所示。采用溶剂热法合成了掺杂 Lu<sup>3+</sup> 的 UCNPs, 掺杂 30% Lu<sup>3+</sup> 的 UCNPs 表现出最佳的光学性能。随后开发了 IUCNPs-ICA, 用于在优化条件下检测谷物中的 ZEN。Shuai Zheng 等人<sup>[130]</sup>报道了一种使用功能化磁 QDs 作为捕获/检测双功能免疫探针的多路 IC), 该探针可以同时敏感地检测食物中的 AFB<sub>1</sub>、OTA 和 FB<sub>1</sub>, 如图 1.13 所示。抗体修饰的多层磁性量子点纳米珠 (Magnetic quantum dot nanobeads, MagQBD) 可以从复杂溶液中有效捕获三种目标霉菌毒素, 并通过荧光信号读取在一个 ICA 条带上同时检测它们。

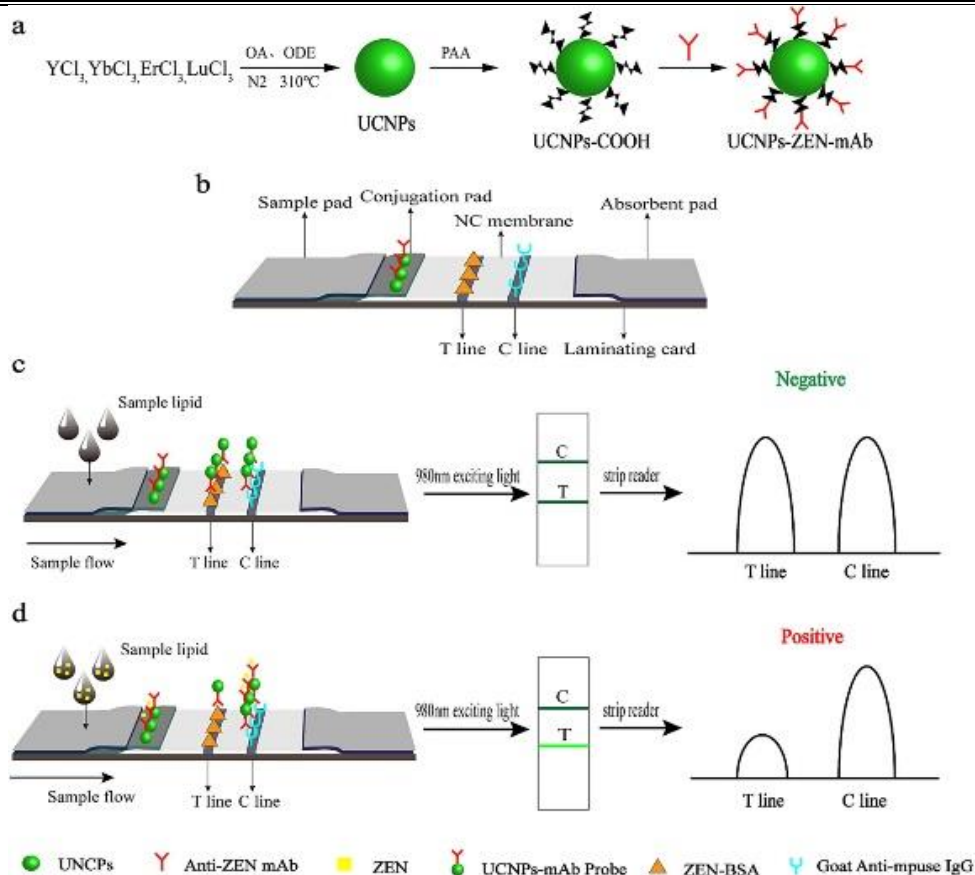


图 1.12 快速检测 ZEN 的 IUCNPs-ICA 示意图<sup>[129]</sup>

Fig. 1.12 Schematic diagram of IUCNPs-ICA for rapid detection of ZEN<sup>[129]</sup>

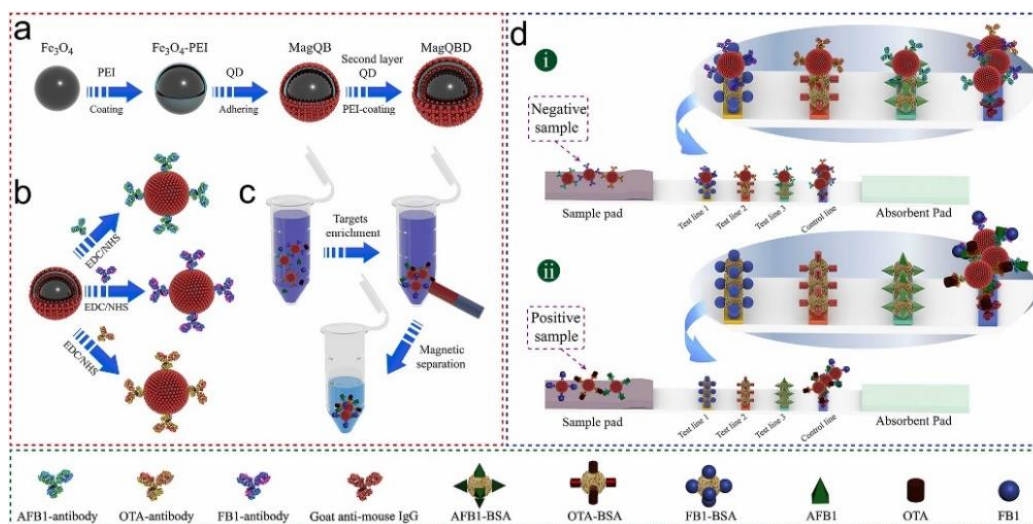


图 1.13 (a)双功能 MagQBD 的制备原理图, (b)不同特异性抗体修饰的免疫 MagQBD 的制备, (c)通过免疫 MagQBD 磁富集靶霉菌毒素, 以及(d)基于 MagQBD 的 ICA 同时检测三种霉菌毒素<sup>[130]</sup>  
Fig. 1.13 Schematic diagram of (a) preparation of bifunctional MagQBD, (b) preparation of immune MagQBD modified with different specific antibodies, (c) magnetic enrichment of target mycotoxins by immune MagQBD, and (d) simultaneous detection of three mycotoxins by MagQBD-based ICA<sup>[130]</sup>

除基于视觉以及荧光信号的 ICA 以外，近年基于光热的免疫传感器逐渐出现。Qing Wang 等人<sup>[131]</sup>使用 CSA 纳米颗粒和  $\text{HAuCl}_4$  的自发氧化还原反应制备花状 CSA 纳米复合材料，与  $\text{AFB}_1$  抗体结合形成光热探针，研制了一种用于  $\text{AFB}_1$  的光热免疫传感器，如图 1.14 所示。因此，该热传感器可作为一种检测霉菌毒素定量检测的新方法，以满足食品工业的检测需求，进一步保证食品的安全。CSA 不仅抗体结合率高而且具有良好光热转化。与视觉 ICA 相比，光热传感器的灵敏度和检测范围更有显著的优势，光热传感器有望应用于其他食品污染物的快速检测。此外，它还还为其他热效应材料在光热免疫分析中的应用提供了思路。

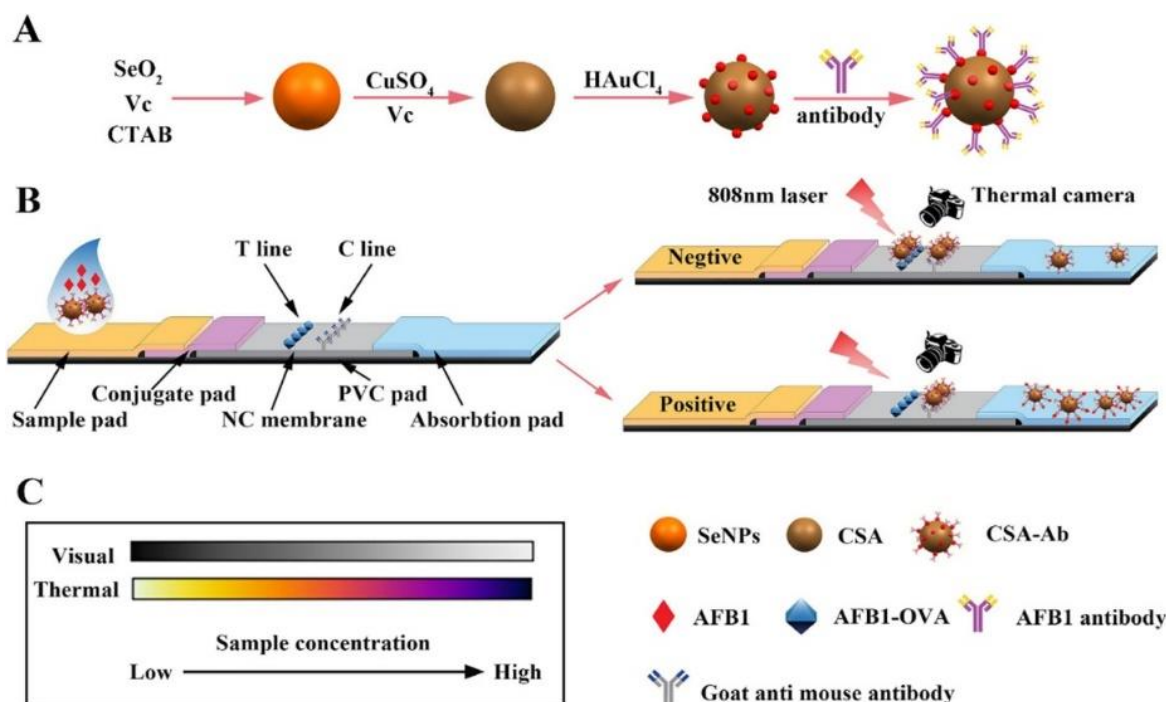


图 1.14 PT-ICSs 的示意图。(A) CSA 和 CSA-Ab 的合成过程。(B) PT-ICSs 的构建和检测程序，T 线：测试线[ $\text{AFB}_1$ -OVA]，C 线：对照线[抗小鼠抗体]。(C) 比色法和光热法结果的比较<sup>[131]</sup>  
 Fig. 1.14 Schematic diagram of PT-ICSs. (A) The synthesis process of CSA and CSA-Ab. (B) Construction and detection procedure of PT-ICSs, line T: test line [ $\text{AFB}_1$ -OVA], line C: control line [anti-mouse antibody]. (C) Comparison of colorimetric and photothermal results<sup>[131]</sup>

综上所述，ICA 和 ELISA 是最易于携带用于快速现场高通量检查，与便携式阅读器或移动电话相结合，快速读取检测结果。免疫层析法的灵敏度取决于所用抗体的质量和信号材料的使用和标记。试纸条最常用的标记方式是单克隆抗体直接标记，标记过程会直接损害抗体的活性，影响信号放大作用，极易影响检测结果的准确性。传统的 ELISA 检测时间长、成本高且步骤繁琐，造成检测过程的浪费，伪均质的反应过程使反应体系在均相中进行提高结合率，既减少了实验时间又可以节约试剂提高检测效率。



## 1.4 研究目的意义与研究内容

### 1.4.1 研究目的及意义

农产品每年在全球的需求量非常大且逐年升高,与之相关的农产品质量安全的问题也变得越来越突出。除人为造成的农产品损失之外最重要的原因就是霉菌感染造成的真菌毒素的污染。农产品真菌毒素污染不仅会造成环境污染以及经济损失,而且会危害消费者的身体健康和生命安全,因此,快速检测到农产品中的真菌毒素污染是预防其进入食物链的最重要手段之一。目前真菌毒素的检测方法中免疫分析技术最为灵敏度,且 ELISA 试剂盒以及 ICA 对于农产品的高通量现场检测最为方便快捷。传统的 ELISA 步骤繁琐,反应面仅限于一个平面,相对于一个均质的反应溶液来说限制了反应的结合过程。目前市面上的 ICA 常用单克隆抗体直接进行标记,这容易对单克隆抗体的活性造成损失,容易造成假阳性且灵敏度不够高。免疫分析技术中最为重要的元件是单克隆抗体,单克隆抗体是由阳性杂交瘤细胞分泌得到的。阳性杂交瘤细胞的筛选直接影响到单克隆抗体的质量,进而影响检测方法的灵敏度。所以,针对同时严重污染农产品的 AFB<sub>1</sub> 和 T-2 毒素,以及最为常用免疫检测产品的局限性,本论文首先以 AFB<sub>1</sub> 为目标物,采用类分布函数顶点亚克隆法结合三步样本放大和多浓度标准品检测筛选能够识别 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体 MAba2-2;其次针对现有 ELISA 检测时间长、步骤繁琐、结合率低等缺点,以 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体为识别元件构建了基于动态伪均质的磁珠 ELISA;最后,为保护试纸条中的关键元件-单克隆抗体并且放大荧光信号,构建了 FIA 纸质传感器。以上研究为阳性杂交瘤细胞的高效筛选、单克隆抗体的制备提供了一定的理论基础和技术支持,ELISA 和 ICA 能够克服目前检测技术的局限性,有望转化为真菌毒素现场高通量检测手段,为其他免疫分析技术的创新提供了新的思路与支持。

### 1.4.2 研究主要内容

(1) 采用类分布函数顶点亚克隆法结合三步放大样本和多浓度标准品检测法筛选 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体。

研究过程中发现,随着亚克隆的进行,细胞上清检测数据的分布类似于分布函数,选择分布函数顶端附近的细胞孔进行下一步亚克隆以提高单克隆抗体的特异性。随着亚克隆的进行逐渐降低标准品的浓度对细胞进行驯化以提高单克隆抗体的灵敏度性,但是单一标准品浓度对细胞上清的检测有一定的局限性,上清中抗体较多时会忽略一些好的细胞。因此对单一标准品下筛选出来的 96 孔细胞板中细胞在 24 孔和 6 孔细胞板中进行上清样本放大,并采用多梯度浓度标准品进行检测,对比两次扩培后细胞上清检测数据,

数据一致的细胞即为单克隆培养获得的稳定的细胞株，选择数据好的可满足需要的杂交瘤细胞进行抗体的制备。最终获得稳定分泌抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 AFB<sub>1</sub>-B56-A2-2，所分泌的单克隆抗体 MAAbA2-2 的半抑制浓度为 0.13522 ng/mL，检测范围为 0.08518-0.21464 ng/mL。

### (2) 基于动态、伪均质的 MBs-icELISA 的建立。

以单克隆抗体 MAAbA2-2 为识别元件、MBs 为抗原载体构建基于动态、伪均质的 MBs-icELISA，作为固定相的 MBs 比平板具有更大的表面积固定更多的抗原，并将反应体系从固相转移到溶液使反应试剂更加均匀，加上外力条件可以使 MBs-icELISA 处于一种动态中，不仅提高结合率而且极大缩短了检测时间。与现有的检测方法相比，MBs-icELISA 缩短了 2/3 检测时间，提高了灵敏度。在最优的反应条件下，甲醇溶液(10%, z/o)中线性拟合方程为  $Y = -0.571gX + 2.64$  ( $R^2 = 0.99396$ )，线性检测范围为 0.004-10 ng/mL，线性范围覆盖 5 个数量级，LOD 为 0.0013 ng/mL。

### (3) 基于生物活性保护和信号放大 FIA 的建立。

目将聚苯乙烯荧光微球与绵羊抗小鼠 IgG 结合制备了荧光探针 (IgG@Eu)。羊抗鼠 IgG 既能保护单克隆抗体，又可以扩增荧光信号。这种标记方法提高了荧光微球与单克隆抗体的结合率。T-2 毒素在甲醇溶液 (70%, z/o) 中的标准工作方程式为  $Y = -0.43022X + 0.7308$  ( $R^2 = 0.98593$ )。T-2 毒素在甲醇溶液 (70%, z/o) 中的 LOD 为 0.01 ng/mL，线性范围良好 (0.0625-50 ng/mL)。在玉米底物中的检测限为 0.052 ng/mL，在饲料底物中为 0.071 ng/mL。玉米样品中 T-2 毒素的回收率在 95.31%-119.03% 之间，相对标准偏差小于 11.38%。在饲料样品回收率为 95.7%-110.33%，相对标准偏差低于 16.02%。采用 LC-MS/MS 法对该方法进行了验证，结果表明，该方法具有较好的准确性。

## 第二章 采用分布函数顶点亚克隆筛选 AFB<sub>1</sub> 抗体

随着生物技术的发展,以抗体、适配体为识别元件的生物传感器也发展迅速,抗体与适配体相比有着优越的特异性和亲和力,抗体的质量直接决定了传感器的灵敏度,获得单克隆抗体的前提是筛得优质的阳性杂交瘤细胞。研究抗体高效筛选技术,提高单克隆抗体研发效率和成功率,研制出灵敏度高且能持续供应的优质单克隆抗体生物原料试剂是提升现场快速检测技术的关键环节。目前实验室阶段阳性杂交瘤细胞筛选方法主要包括膜免疫球蛋白定向杂交瘤筛选与克隆、细胞表面荧光免疫吸附试验和限制性稀释克隆。膜免疫球蛋白定向杂交瘤筛选方法的建立需要使用流式细胞仪进行细胞分选,需要大量的时间来进行适当的数据采集,细胞表面荧光免疫吸附试验需要在细胞膜表面进行荧光染色、荧光材料具有变异性倾向,存在一定的潜在危害。传统的抗体制备方法是根据细胞培养液上清中的抗体数量对细胞培养板孔内细胞进行选择,选择抗体质量好的培养孔的细胞进行限制稀释法克隆完成阳性杂交瘤细胞的纯化与筛选。但是传统的有限稀释法筛选周期长、成本高、优质阳性杂交瘤细胞细胞易被覆盖而损失掉。

基于以上分析和思考,本文以 AFB<sub>1</sub> 为目标物筛选能够快速识别 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体。本研究采用类分布函数顶点亚克隆法结合三步样本放大和多浓度标准品检测筛选得到 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体。研究过程中发现亚克隆的细胞上清检测数据的分布类似于分布函数,因此选择顶端附近的细胞进行亚克隆。首先,采用降低标准品浓度的方法对细胞进行驯化;其次,在多次亚克隆后对单一标准品筛选出来的细胞进行抗体样本放大,采用多梯度浓度标准品依次检测;最后,选择分泌抗体特异性、亲和力以及稳定性好的细胞用于抗体的制备。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 实验动物与细胞

(1) 用于实验的小鼠使用 SPF 级 4-6 周龄雌性 Balb/c 小鼠,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证号: SCXK(鲁)20190003。

(2) 用于细胞融合的小鼠骨髓瘤细胞株 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。

#### 2.1.2 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;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
氯化钠	NaCl	500 g (分析纯)	国药
十二水合磷酸氢二钠	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	500 g (分析纯)	国药
氯化钾	KCl	500 g (分析纯)	国药
磷酸二氢钾	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500 g (分析纯)	国药
碳酸钠	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	500 g (分析纯)	国药
碳酸氢钠	NaHCO <sub>3</sub>	500 g (分析纯)	国药
柠檬酸	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	500 g (分析纯)	国药
一水合柠檬酸	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O	500 g (分析纯)	国药
3,3',5,5'-四甲基联苯胺	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub>	5 g	上海阿拉丁
过氧化氢脲	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O·H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25 g	上海阿拉丁
甲醇	CH <sub>3</sub> OH	500 mL	国药
无水乙醇	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	500 mL	国药
浓硫酸	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 mL	国药
AFB <sub>1</sub> -BSA	/	1 mg	美国 Sigma
弗氏完全/不完全佐剂	/	10 mL/瓶	美国 Sigma
HEPES	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	100 g	美国 Sigma
L-谷氨酰胺	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	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	四季青
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 <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> OH	500 g	美国 Sigma
二甲基亚砜	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	50 mL (生物无菌级)	美国 Sigma
羊抗鼠 IgG-HRP	/	2 mg/mL	山东绿都
AFB <sub>1</sub> 标准品	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFB <sub>2</sub> 标准品	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	1 mg/mL	天津阿尔塔

AFM <sub>1</sub> 标准品	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFM <sub>2</sub> 标准品	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFG <sub>1</sub> 标准品	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	1 mg/mL	天津阿尔塔
AFG <sub>2</sub> 标准品	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	1 mg/mL	天津阿尔塔
T-2	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>	1 mg	天津阿尔塔
DON	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	1 mg	天津阿尔塔
ZEN	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	1 mg	天津阿尔塔
OTA	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>	1 mg	天津阿尔塔
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 <sub>2</sub> 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

### 2.1.3 主要试剂配制

#### (1) ELISA 主要溶液配制

- ① 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液, 0.01 mol/L, pH 7.4): 用电子天平准确称取 24.0 g NaCl、

8.7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、0.6 g KCl 和 0.6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 用超纯水溶解后定容至 3 L。

② PBST 溶液 (0.01 mol/L PBS 溶液+0.05%吐温-20)：用 1 mL 移液枪分 2 次吸取 1.5 mL 吐温-20 加到 3 L 0.01 mol/L 的 PBS 溶液中，室温下磁力搅拌混匀 1 h。

③ 碳酸盐缓冲液 (CBS 溶液, 0.05 mol/L, pH 9.6)：用电子天平准确称取 0.795 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 1.465 g NaHCO<sub>3</sub> 用超纯水溶解后定容至 500 mL。

④ 10% 甲醇-PBS 溶液 (v/v)：量取 10 mL CH<sub>3</sub>OH 加入到 90 mL PBS 溶液中，混匀备用。

⑤ 0.5% BSA-PBST 溶液 (m/v)：用电子天平称取 0.5 g BSA 加入到 100 mL PBST 溶液中。

⑥ 封闭液 (5% 脱脂奶粉)：用电子天平称取 1 g 脱脂奶粉加入到 20 mL PBST 溶液中。

⑦ 柠檬酸缓冲溶液：用电子天平准确称取 4.665 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 和 9.205 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 溶于超纯水中并定容至 500 mL，存于 4°C 备用。

⑧ TMB 溶液：用电子天平称取 100 mg TMB 溶于 50 mL C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH，避光保存于 -20°C 冰箱备用。

⑨ 过氧化氢脲溶液 (3%)：用电子天平称取 0.3 g CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶解于 10 mL 超纯水中，避光存于 4°C 冰箱备用。

⑩ ELISA 终止液 (2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)：用量筒量取浓硫酸 54.5 mL，边加边轻轻摇晃混匀缓慢加入到 400 mL 超纯水中，溶液冷却至室温后，用超纯水定容至 500 mL，室温放置备用。

## (2) 动物与细胞实验主要试剂配制

① 0.9% 的生理盐水：用电子天平称取 0.9 g NaCl 溶解于 100 mL 超纯水中，搅拌至完全溶解，将 0.9% 的生理盐水用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，分装后置于 -20°C 冰箱冻存。

② NaOH 溶液 (2 mol/L)：用电子天平准确称取 8 g NaOH 固体粉末，用超纯水溶解并定容至 100 mL。

③ HEPES 贮存液 (1 mol/L, 100 x)：用电子天平称取 23.8 g C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 溶于 50 mL 超纯水中，用 NaOH 溶液 (2 mol/L) 调 pH 至 7.5-8.0，然后用超纯水定容至 100 mL，在无菌操作台中过滤除菌，分装至提前灭好菌的容器中置于 -20°C 保存，使用时提前放至 4°C 中解冻。

④ L-谷氨酰胺溶液：用电子天平准确称取 1.46 g L-谷氨酰胺，加 50 mL 超纯水使其溶解充分在无菌操作台中过滤除菌，分装至提前灭好菌的容器中置于 -20°C 冰箱冻存，使用时提前放至 4°C 中解冻。

⑤ HAT/HT 贮存液 (50 x) : 取瓶装的 HAT (HT) 粉末于无菌操作台上, 用注射器吸取 10 mL 的 RPMI-1640 基础培养基注射至 HAT (HT) 瓶中, 混匀后分装到提前灭菌容器中, 置于 -20°C 冰箱冻存, 使用时提前放至 4°C 中解冻。

⑥ PEG 溶液: 用电子天平称取 10 g PEG 溶于 10 mL PBS 溶液 (0.01 mol/L, pH 7.4) 中, 置于 121°C 湿热灭菌 30 min 后与无菌操作台中按 1 mL/管用灭菌容器分装, 保存在 4°C 冰箱。

⑦ RPMI-1640 完全培养液: 无菌环境下取 400 mL RPMI-1640 基础培养液依次加入 100 mL 胎牛血清、5 mL 双抗和 5 mL HEPES 贮存液, 混匀后 4°C 保存。

⑧ HAT (HT) 培养液: 无菌环境下取 90 mL RPMI-1640 完全培养液加入 10 mL 的 Clone Easy 培养基、2 mL HAT (HT) 贮存液 (50x)、1 mL 非必需氨基酸和 1 mL L-谷氨酰胺溶液, 混匀后 4°C 保存。

⑨ 细胞冻存液: 量取 9 mL RPMI-1640 完全培养液, 加入 1 mL 二甲基亚砷 (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS), 混匀后 4°C 保存。

#### 2.1.4 动物免疫

进行动物实验的小鼠为 Balb/c 雌性小鼠。每只老鼠免疫 200 μL 的免疫试剂, 其中包含 50% 体积的弗式完全佐剂或弗式不完全佐剂和 40 μg AFB<sub>1</sub>-BSA。以四只小鼠为一组进行动物免疫, 取 200 μg AFB<sub>1</sub>-BSA (1 mg/mL) 加入 300 μL 0.9% 的生理盐水进行稀释, 随后加入 500 μL 弗氏佐剂用调合银汞机进行乳化。将免疫试剂乳化完全后采用背部皮下多点注射进行免疫。首次免疫使用的弗氏佐剂为弗氏完全佐剂, 间隔 21 天后采用弗式不完全佐剂进行二次免疫, 随后第 42、63、84、105 天采用与第二次免疫相同的免疫方式和剂量进行免疫。

#### 2.1.5 抗血清 ELISA 检测

在第二次至第六次免疫后的第 7 天采用断尾方式收集小鼠血清, 将收集的血清用低温冷冻离心机 8000 rpm 离心 5 min, 取含有抗体的上清液加入同等体积的甘油混匀置于 -20°C 冰箱保存, 随后采用间接非竞争和竞争 ELISA 对小鼠血清进行检测。

间接非竞争 ELISA 步骤:

(1) 包被: 取 10 μL AFB<sub>1</sub>-BSA (0.5 mg/mL, 含有 50% 甘油) 用 10 mL CBS 溶液稀释至 0.5 μg/mL, 按照 100 μL/孔加入 96 孔酶标板微孔中, 置于 4°C 冰箱反应过夜 (或 37°C 烘箱反应 2 h), 弃去包被液后置于洗板机上用 PBST 溶液洗涤 3 次, 将酶标板在吸水纸上扣干孔中剩余液体。

(2) 封闭: 用电子天平准确称取 1 g 脱脂奶粉加入 20 mL PBST 溶液中作为封闭液,

按照 200  $\mu\text{L}$ /孔加入 96 孔酶标板微孔中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱反应 1 h，弃去封闭液后置于洗板机上用 PBST 溶液洗涤 3 次，将酶标板在吸水纸上扣干孔中剩余液体。

(3) 一抗：将血清在适宜离心管中用 0.5% BSA-PBST 溶液进行 11 个浓度的梯度稀释，按照 200  $\mu\text{L}$ /孔依次加入 96 孔酶标板微孔中，设置一组空白对照孔（只添加 0.5% BSA-PBST 溶液），置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱反应 1 h，弃去血清稀释液后置于洗板机上用 PBST 溶液洗涤 3 次，将酶标板在吸水纸上扣干孔中剩余液体。

(4) 二抗：用移液枪准确量取 1  $\mu\text{L}$  羊抗鼠酶标二抗溶液加入 10 mL PBST 溶液稀释，按照 100  $\mu\text{L}$ /孔加入 96 孔酶标板微孔中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱反应 1 h，弃去二抗溶液后置于洗板机上用 PBST 溶液洗涤 6 次，将酶标板在吸水纸上扣干孔中剩余液体。

(5) 显色：按照 9.5 mL 柠檬酸缓冲溶液、0.5 mL TMB 溶液、32  $\mu\text{L}$  过氧化氢脲溶液的量配置显色液（现用现配），按照 100  $\mu\text{L}$ /孔加入 96 孔酶标板微孔中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱避光孵育 15 min。

(6) 终止显色：将 2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  按 50  $\mu\text{L}$ /孔的量 96 孔酶标板微孔中使显色反应终止，然后立即用酶标仪测定反应溶液在 450 nm 处吸光值即 OD 值。

(7) 效价选择：选择 OD 值在 1 附近时对应的血清的稀释比为该血清的效价。

间接竞争 ELISA 步骤：

(1) 包被：同间接非竞争 ELISA 包被步骤。

(2) 封闭：同间接非竞争 ELISA 封闭步骤。

(3) 一抗：将 AFB<sub>1</sub> 溶液在离心管中用 10% 甲醇-PBS 溶液进行 10 个浓度的梯度稀释，血清稀释至间接非竞争 ELISA 选择的效价的 2 倍。将不同浓度梯度稀释 AFB<sub>1</sub> 溶液按照 50  $\mu\text{L}$ /孔依次加入酶标板中，设置两组空白对照孔（只添加 10% 甲醇-PBS 溶液），然后 0.5% BSA-PBST 溶液稀释好的血清按照 50  $\mu\text{L}$ /孔依次加入酶标板中，设置一组空白对照孔（只添加 0.5% BSA-PBST 溶液 PBST 溶液），置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱反应 1 h，弃去液体后置于洗板机上用 PBST 溶液洗涤 3 次，将酶标板在吸水纸上扣干孔中剩余液体。

(4) 二抗：同间接非竞争 ELISA 二抗步骤。

(5) 显色：同间接非竞争 ELISA 显色步骤。

(6) 终止显色：同间接非竞争 ELISA 终止显色步骤。B 为含有不同浓度 AFB<sub>1</sub> 溶液的酶标孔在 450 nm 处吸光值，B<sub>0</sub> 为仅有血清溶液的酶标孔在 450 nm 处吸光值。

(7) 数据处理：以 AFB<sub>1</sub> 浓度为横坐标，B/B<sub>0</sub> 为纵坐标，绘制标准曲线，计算小鼠血清 50% 抑制浓度（即 IC<sub>50</sub>）。

### 2.1.6 杂交瘤细胞的制备

(1) 冲击免疫：根据小鼠血清 ELISA 检测选择免疫效果好的小鼠用于杂交瘤细胞



株的制备, 在细胞融合前三天用小鼠免疫等量的 AFB<sub>1</sub>-BSA 进行冲击免疫, 冲击免疫采用 0.9% 的生理盐水直接稀释至 150  $\mu$ L 后注射至小鼠腹腔

(2) 骨髓瘤细胞 SP2/0 复苏与培养: 将液氮中冻存的细胞从液氮罐中取出后快速放入 37 $^{\circ}$ C 温水中摇晃解冻, 待细胞化冻后用 RPMI-1640 基础培养液洗涤细胞后用 RPMI-1640 完全培养液重悬培养, 进行多次传代培养后 RPMI-1640 基础培养基对细胞进行富集用血球计数板计数, 使细胞总量在  $1-2 \times 10^7$  个。

(3) 小鼠免疫脾细胞的制备: 将小鼠脱臼处死, 在 75% 的酒精浸泡 5 min 后移入超净工作台, 用剪刀和镊子将小鼠腹部打开取出完整的脾脏。用注射器针头均匀在脾脏扎孔和注射器内芯轻轻研磨脾脏, 使脾细胞从脾脏外膜中释放出来。随后用 200 目细胞筛网过滤去除肝脏中脂肪及缔结组织, RPMI-1640 基础培养液洗去细胞中的红细胞及小的缔结组织, 最后用 RPMI-1640 基础培养基对脾细胞进行富集用血球计数板计数。

(4) 细胞融合: 根据脾细胞数量按照骨髓瘤细胞: 脾细胞=1:3 的比例向脾细胞中加入适量的骨髓瘤细胞在 PEG 下进行细胞融合, 最后将融合的细胞轻轻重悬至 100 mL 的 HAT 培养液转移至 96 孔细胞板中培养。

### 2.1.7 杂交瘤细胞培养与筛选

细胞融合后的第 7 天, 向细胞孔中添加 80  $\mu$ L/孔 HAT 培养液以补给细胞生长繁殖所需要的营养。待细胞上清颜色有些许变化时结合镜检下细胞生长数量和形态状况, 对细胞上清进行检测, 检测时采用间接非竞争和单个标准品浓度的竞争 ELISA 对上清进行检测, 检测时各对应一个检测孔。首次检测细胞上清吸取之后补加 100  $\mu$ L/孔 HT 培养液。随后进行 2.1.8 的细胞株的单克隆化。亚克隆第 5 天左右, 在电子显微镜下可以看见细胞集落, 在第七天的时候按 80  $\mu$ L/孔补加 HT 培养液, 随后按照细胞生长状况对细胞进行检测以及亚克隆, 检测之后补加含有 50%HT 培养基+50%含 10%生长因子的完全培养液。细胞原版一直补加的是 HAT 培养液, 第一次亚克隆以及亚克隆的板在检测前后补加的是 HT 培养液, 第二次亚克隆以及亚克隆的板在检测前后补加的是含有 50%HT 培养基+50%含 10%生长因子的完全培养液, 自第三次及以后的亚克隆以及亚克隆以后的板在检测前后补加的是含 10%生长因子的完全培养液

ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株步骤:

(1) 包被: 同间接非竞争 ELISA 包被步骤。

(2) 封闭: 同间接非竞争 ELISA 封闭步骤。

(3) 一抗: 将 AFB<sub>1</sub> 溶液用 10% 甲醇-PBS 溶液稀释到所需浓度, 向已包被封闭好的 96 孔酶标板的奇数列中按照 50  $\mu$ L/孔的量加入 10% 甲醇-PBS 溶液, 偶数列中按照 50  $\mu$ L/孔的量加入稀释到所需浓度的 AFB<sub>1</sub> 溶液, 然后用移液枪取细胞板中一列的细胞上清

按照 50  $\mu\text{L}$ /孔加入酶标板微孔的一个奇数列和一个偶数列，置于 37°C 烘箱反应 1 h，弃去血清稀释液后置于洗板机上用 PBST 溶液洗涤 3 次，将酶标板在吸水纸上扣干孔中剩余液体。

(4) 二抗：同间接非竞争 ELISA 二抗步骤。

(5) 显色：同间接非竞争 ELISA 显色步骤。

(6) 终止显色：同间接非竞争 ELISA 终止显色步骤。

(7) 数据处理：在第三步中加入 10% 甲醇-PBS 溶液的细胞孔为记作  $B_0$ ，在第三步中加入 AFB<sub>1</sub> 溶液的细胞孔为记作 B， $(1-B/B_0) \times 100\%$  则为抑制率。

### 2.1.8 阳性株的单克隆化

在 ELISA 检测完成后，以所得到的  $B_0$  和抑制率为筛选标准结合细胞生长状况选择好的细胞进行亚克隆。如果选择的细胞孔内细胞数量少于 200 时，直接将细胞孔内细胞吹打用 10 mL 培养基进行稀释，滴加到新的细胞板中。若细胞板中细胞数量较多时，首先对细胞孔内细胞进行吹打使细胞全部重悬，使用血球计数板进行计数后稀释到两种不同浓度，在 96 孔细胞板前 8 列按 100  $\mu\text{L}$ /孔的量滴加细胞浓度为 5 个/mL 的细胞悬液，后 4 列按 100  $\mu\text{L}$ /孔的量滴加细胞浓度为 50 个/mL 的细胞悬液。

首次亚克隆采用 HT 培养液、第二次亚克隆使用 50% HT 培养基+50% 含 10% 生长因子的完全培养基，此后使用含 10% 生长因子的完全培养基。

### 2.1.9 细胞三步样本放大

三步样本放大指从将亚克隆至 96 孔细胞板内的细胞采用 2.1.7 中的单浓度标准品检测后选择  $B_0$  值  $>1.5$  并且状态不错的细胞株扩大至 24 孔细胞板中进行培养待细胞呈指数增长后进行竞争和非竞争 ELISA 检测，根据检测结果选择细胞扩大至 6 孔细胞板中进行培养待细胞呈指数增长后进行第三次检测竞争和非竞争 ELISA 检测，根据检测结果选择细胞扩大至细胞培养瓶中进行培养待细胞呈指数增长后进行第三次检测竞争和非竞争 ELISA 检测，对比三次检测数据选择细胞株扩大培养进行冻存以及抗体制备对比细胞株的三次检测数据，选择  $IC_{50}$  值稳定且低细胞进行扩大培养用于抗体的制备。

### 2.1.10 单克隆抗体的制备

(1) 致敏：在腹腔注射阳性杂交瘤细胞株前 3-10 天按照 0.5 mL/只的量将弗式不完全佐剂注射至 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠的腹腔中，使小鼠腹腔处于高敏感状态。

(2) 腹水制备：使用基础培养基将培养好的阳性杂交瘤细胞稀释至  $1-2 \times 10^6$  个/mL，将细胞悬液注射到已经提前致敏的小鼠腹腔内，大约 1 mL/只。注射阳性杂交瘤细胞株

7 天后随时观察小鼠状态，待小鼠腹部明显膨大、毛发杂乱、行动缓慢且不活泼时使用针头取出小鼠腹腔内的腹水。好的腹水一般呈乳白色，不成熟的腹水会因带有红细胞而呈红色，将不同颜色的腹水分别保存。

(3) 腹水的纯化：将收集的腹水在冷冻离心机中采用 4°C，8000 rpm，10 min 离心取上清采用辛酸硫酸铵法对腹水上清进行纯化，纯化后的抗体溶液用冷冻干燥机干燥至粉末存于 -20°C 冰箱。

(4) 抗体的评价：将纯化的单克隆抗体采用间接非竞争和竞争 ELISA 的结果进行评价，并用 AFs 里其余的黄曲霉毒和其他毒素对纯化的抗体进行特异性评价。将数据用 origin 软件进行处理获得各数据的竞争曲线图和 IC<sub>20</sub> 值、IC<sub>50</sub> 值、IC<sub>80</sub> 值。

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

其中，a 指 AFB<sub>1</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值，b 指其他黄曲霉毒素结构类似物的 IC<sub>50</sub> 值。

### 2.1.11 阳性株冻存

将杂交瘤细胞用完全培养基扩大培养，待其培养至足够的数量且处于对数期的细胞用基础培养基进行富集，使用离心机离心后加入适量的细胞冻存液重悬进行重悬，用血球计数板计数后用冻存液再次稀释使细胞浓度在  $1-5 \times 10^6$  个/mL，将细胞悬液按照 1 mL/管的量分装于提前灭菌好的 2 mL 冻存管内。将冻存管置于 4°C 冰箱静置 10 min 后放于 -20°C 冰箱冻存 30 min，转移至液氮上方过夜，最后转移至液氮罐冻存盒中长期储存。

## 2.2 结果与讨论

### 2.2.1 小鼠免疫效果

本方案采取免疫策略在参考张道宏的基础上增加了一次免疫。随着免疫次数的增加，小鼠脾细胞成熟度越高。在免疫初期小鼠免疫系统产生的是 IgM、IgD 型抗体，其中膜结合型单体 IgM(mIgM) 抗体是未成熟 B 细胞的标志，未成熟 B 细胞仅表达 mIgM，成熟 B 细胞可同时表达 mIgM、mIgD。随着多次周期性免疫的刺激，我们想要的 IgG 型抗体逐渐形成。所以在免疫初期，IgM、IgD 型抗体泛滥，但随着免疫次数的增加，小鼠血清中此类型的抗体数量减少导致小鼠血清的效价略有下降，但随着免疫继续进行 B 细胞逐渐成熟，我们想要的 IgG 抗体出现小鼠血清的效价出现了回升。在最后一次免疫取血后小鼠的效价均在 16000 以上，B56 和 B57 号效价为 32000，B59 号和 B57 号为 16000 均达到了我们想要的效果。此时 B59 号小鼠的 IC<sub>50</sub> 值最低，首先选了 B59 号小鼠进行细胞融合。B56 和 B57 号小鼠在第六次免疫时已经达到了 32000，但是结合前几次血清效价变化趋势，B56 号小鼠比较符合抗体效价的变化趋势，同时其竞争检测时的 IC<sub>50</sub> 也

是挺好的，而 B57 号小鼠再前几次免疫中其抑制曲线从视觉上看并没有较好的抑制趋势。对此次小鼠免疫效果的最终排序为 B59-B56-B58-B57。

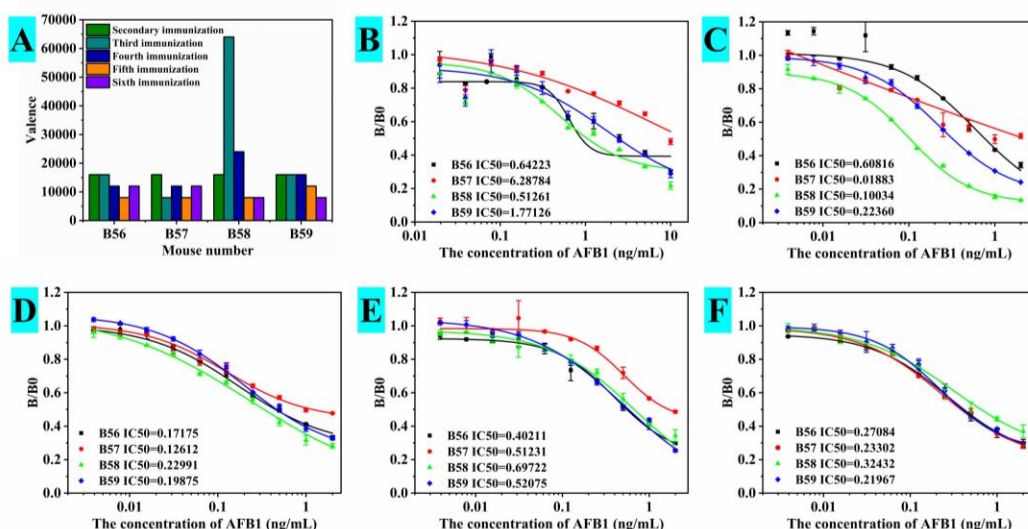


图 2.1 小鼠免疫结果图。A: 不同免疫次数小鼠血清效价图；B-F: 第二次到第六次免疫小鼠血清竞争图

Fig. 2.1 Immunization results of mice. A: Serum potency of mice immunized at different times; B-F: Serum competition of mice immunized for the second time to the sixth time

## 2.2.2 杂交瘤细胞亚克隆

本实验共做了三次细胞融合，选取了本实验室之前免疫的一只小鼠将其命名为 AFB<sub>1</sub>-0519 以及 B59 和 B56 号小鼠进行了细胞融合。在三次筛选中分别采用了三个不同的筛选策略，选取了不同状态下细胞数量进行检测。AFB<sub>1</sub>-0519 待细胞孔内细胞长至细胞孔的 1/6 左右时进行上清检测，如果细胞孔内存在多个细胞株时，往往不好的细胞会比好的的细胞长得更快一些，就会导致不好的细胞长得较好将好的细胞覆盖掉。因此 B59 和 B56 号细胞筛选过程中待细胞生长至 500 个细胞左右时进行了上清检测。但是随着细胞的生长以及其周围细胞数量以及细胞培养液中环境的不同会导致细胞生长的前期与后期的的不同，因此在 B56 号细胞筛选过程增加了一次细胞换液，在细胞长至 500 个细胞左右对细胞进行换液培养两天后进行上清检测。

观察三次融合的细胞检测图从 AFB<sub>1</sub>-0519 到 B59 再到 B56 从整体上看 B<sub>0</sub> 值大于 0.6 且 1-B/B<sub>0</sub> 大于 0.3 的细胞孔在整体上看数量是逐渐增加的。但是随着亚克隆次数的增加，阳性孔的数量占比增加后又出现了减低的趋势，并且经过长期的亚克隆纯化一直未得到数据较好的单细胞株，因此在 B56 第十次亚克隆检测完毕后收集了 96 孔细胞上清进行非竞争和竞争 ELISA 检测，其中 1 和 2 是在 96 孔上清检测时 0.6 < B<sub>0</sub> 且 0.3 < 1-B/B<sub>0</sub> 的上

清, 3 和 4 是在 96 孔上清检测时  $1 < B_0$  且  $B/B_0 < 0.3$  的上清。上清检测结果如图 2.6 所示, 1-4 号上清中均存在与 AFB<sub>1</sub> 较高的特异性和亲和力的抗体。单一标准品浓度且对上清不进行稀释时的检测, 可能是由于其上清中抗体数量过多。有数据表明在亚克隆检测时对上清不进行稀释且只选取一个标准品浓度的检测方式会遗漏一些较好的细胞。

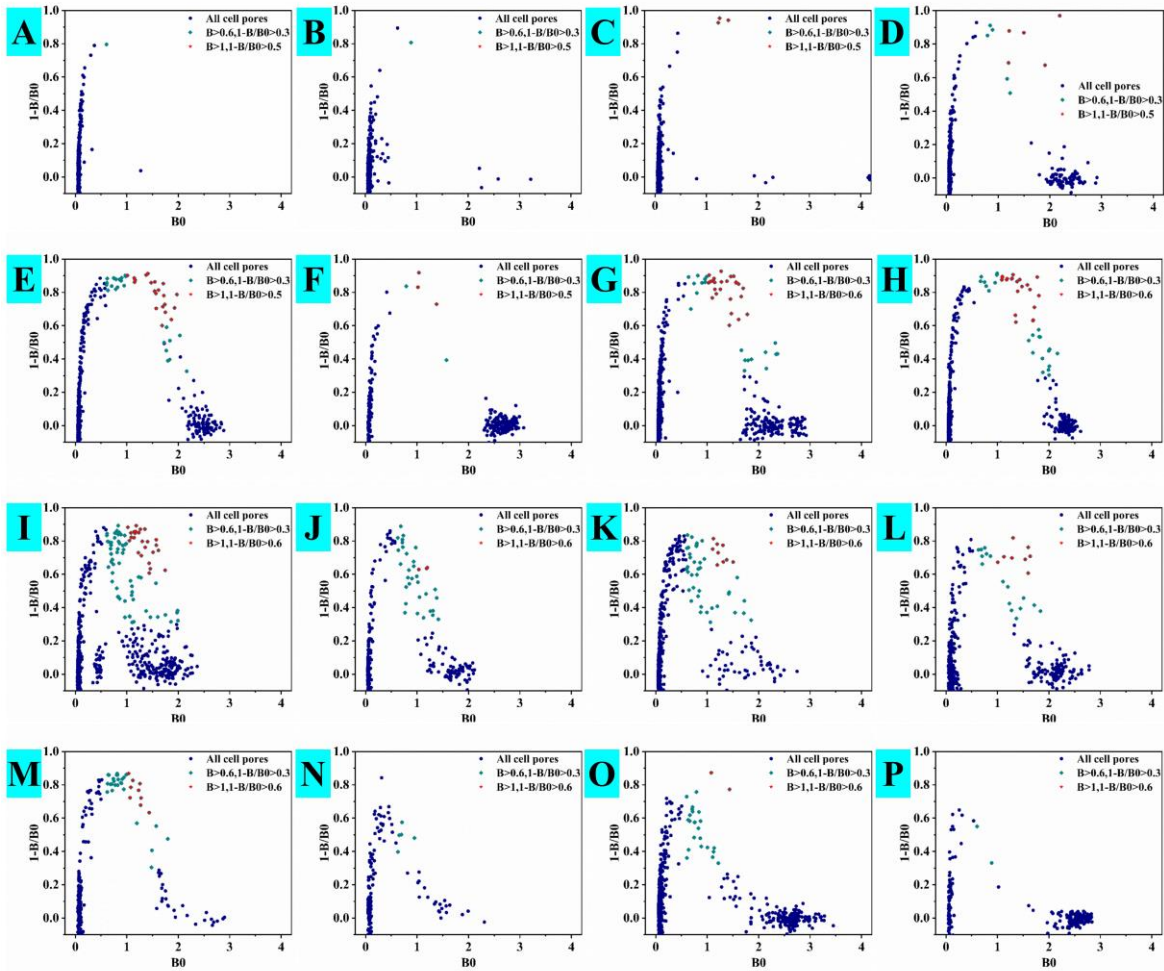


图 2.2 第 1 只小鼠上清检测数据图。A-C: 原代细胞板第一至第三上清检测数据; D-P: 第一次至第十三次亚克隆细胞上清试验的数据

Fig. 2.2 Graph of supernatant assay data of the first mouse. A-C: Primary cell plate first to third supernatant test data; D-P: Data from the first to thirteenth subclonal cell supernatant tests



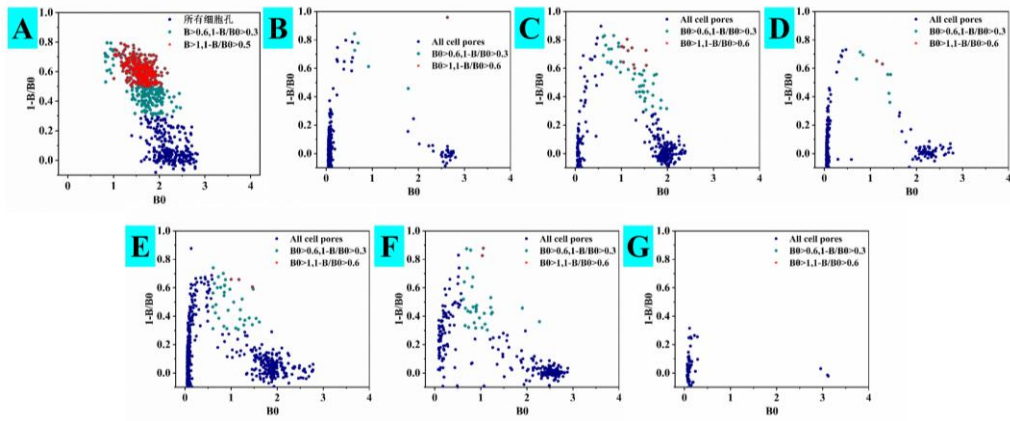


图 2.3 B59 小鼠细胞上清检测数据图。A: 原代细胞板上清检测数据; B-G: 第一至第六次亚克隆细胞上清试验数据

Fig. 2.3 Graph of supernatant assay data of B59 mouse cells. A: Primary cell plate supernatant test data; B-G: Data from the first to sixth subclonal cell supernatant tests

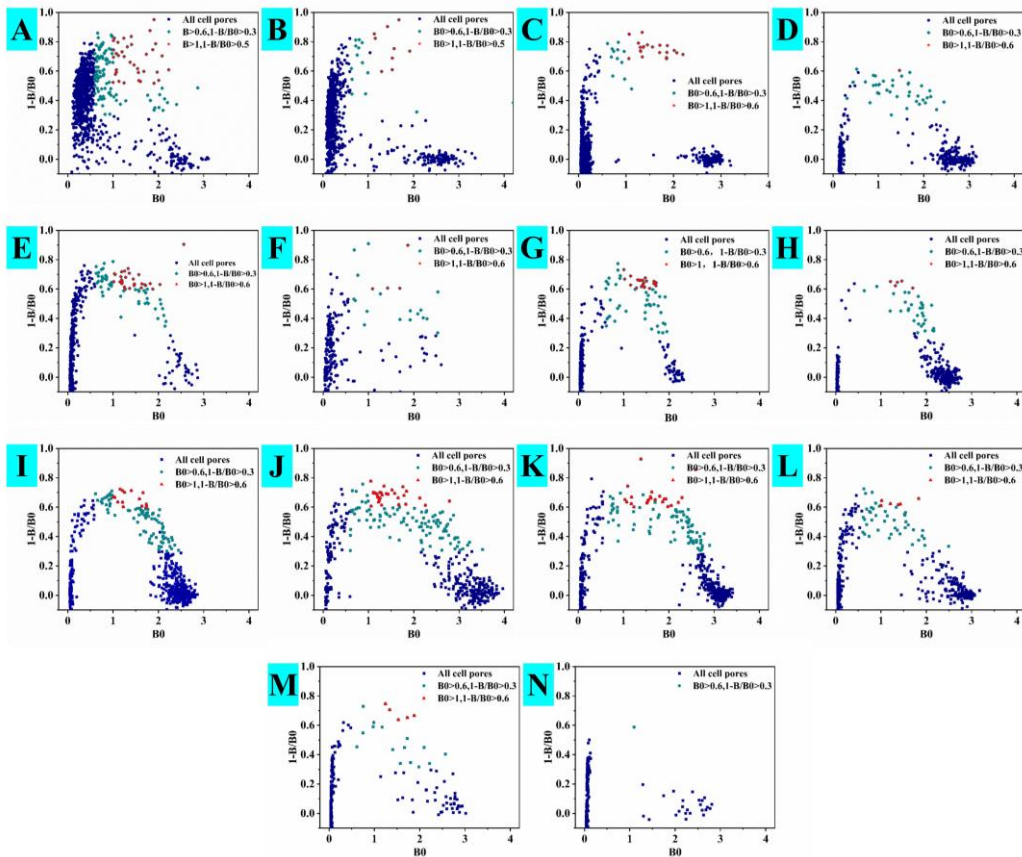


图 2.4 B56 小鼠细胞上清检测数据图。A-B: 原代细胞板第一至第二上清检测数据; C-N: 第一次至第十二次亚克隆细胞上清试验数据

Fig. 2.4 Graph of supernatant assay data of B56 mouse cells. A-B: Primary cell plate first to second supernatant test data; C-N: Data from the first to twelfth subclonal cell supernatant tests

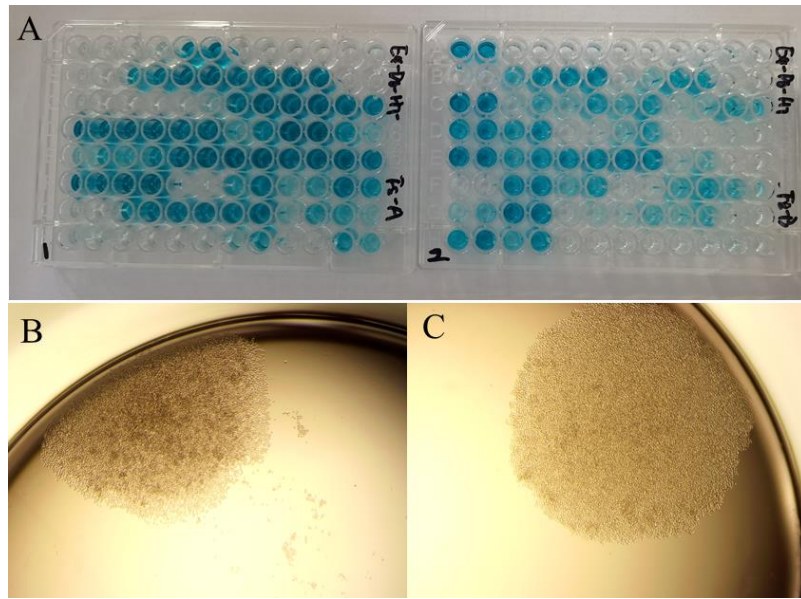


图 2.5 A: 96 孔细胞板上清检测显色图; B-C: 亚克隆十天四倍显微镜下杂交瘤细胞生长图  
 Fig. 2.5 A: Color rendering of 96-well cell plate supernatant detection; B-C: hybridoma cell growth at subclonal 10 days under four - fold microscope

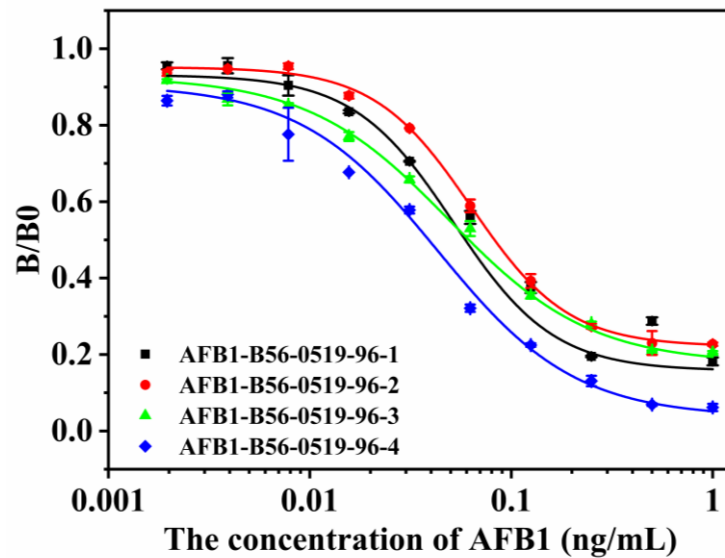


图 2.6 96 孔细胞上清竞争 ELISA 检测图  
 Fig. 2.6 96-well cell supernatant competition ELISA assay chart

观察数据图可知，上清法中细胞孔的分布与分布函数有些相似。通过对原试验和亚克隆板试验数据的比较，可以看出亚克隆细胞板与原试验板之间存在一些明显的差异。在亚克隆细胞板检测中， $B_0$  值大于 0.6 且  $1-B/B_0$  大于 0.4 细胞孔很少，而在原始版本中，

这些孔隙的比例仍然相当大。亚克隆板细胞孔的分布大致可分为三个区域，部分为  $B_0$  值小于 0.6 的细胞孔，这部分细胞对 AFB<sub>1</sub> 没有亲和力或细胞较少，说明没有阳性细胞或阳性细胞较少。第二部分是  $B_0$  值大于 0.6 且  $1-B/B_0$  大于 0.3 的细胞孔，说明细胞孔中的细胞对 AFB<sub>1</sub> 具有更好的亲和力和特异性。 $B_0$  值的第三部分大于 0.5 且  $1-B/B_0$  小于 0.3。这部分细胞有两种可能，一种是它们对 AFB<sub>1</sub>-BSA 有亲和力，但对 AFB<sub>1</sub> 没有亲和力。二是它们对 AFB<sub>1</sub> 具有良好的亲和力和特异性，在未稀释的情况下，由于孔内细胞分泌的抗体较多，对测定的抑制率不高。从亚克隆检测数据中发现，选择单一浓度标准检测细胞上清液存在很大的缺陷。不经上清液滴定直接测定细胞的选择会忽略一些数据良好的细胞。

### 2.2.3 阳性细胞株的选择与抗体的纯化

表 2.3 扩瓶后各细胞上清检测各指标汇总

Tab. 2.3 Summary of each index of each cell supernatant assay after flask expansion

细胞株	效价	B <sub>0</sub> (竞争)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)
AFB <sub>1</sub> -B56-0519A2(25T0612)	1/16	1.35930	0.14082
AFB <sub>1</sub> -B56-0519A3(25T0612)	1/32	1.28840	0.19655
AFB <sub>1</sub> -B56-0519A4(25T0612)	1/32	1.26475	0.49911
AFB <sub>1</sub> -B56-0519B1(25T0612)	1/24	1.20910	0.14153
AFB <sub>1</sub> -B56-0519B6(25T0612)	1/32	1.37770	0.29642
AFB <sub>1</sub> -B56-0519D3(25T0612)	1/32	1.39465	0.38429
AFB <sub>1</sub> -B56-0519D5(25T0612)	1/32	1.60165	47895.84380
AFB <sub>1</sub> -B56-0602C1(25T0627)	1/128	0.72990	0.15767
AFB <sub>1</sub> -B56-0602C6(25T0627)	1/192	1.26010	0.50066
AFB <sub>1</sub> -B56-0602D6(25T0627)	1/64	1.37515	0.35058
AFB <sub>1</sub> -B56-0602A6(25T0627)	1/512	1.03005	0.23179
AFB <sub>1</sub> -B56-0618A4(070425T)	1/96	1.22790	0.16639
AFB <sub>1</sub> -B56-0618B1(070425T)	1/512	1.08835	0.18250
AFB <sub>1</sub> -B56-0618B5(070425T)	1/64	1.02876	0.24678

在 B56 小鼠融合细胞筛选过程中，第十次上清检测后对  $B_0$  值较好的细胞进行上清搜集采用非竞争和竞争 EILSA 进行检测。一些检测结果较好的细胞株采用单一标准品检测会造成遗漏，因此在第十次亚克隆检测后选择性合适的细胞进行三步样本放大和多浓度标准品检测。将检测结果中顶点附近以及  $B_0$  值较好并且状态不错的细胞扩大至 24 孔



细胞孔进行培养。检测 24 孔培养板中细胞后选择合适的细胞转移至 6 孔细胞孔中进行再次扩大培养。对比三次检测数据，IC<sub>50</sub> 值一致的细胞株即为单细胞克隆所得细胞株，进行培养瓶扩大培养。经过三次亚克隆检测后扩大培养一共扩至培养瓶 14 株细胞，将其扩大培养后的细胞上清检测数据进行对比，对比数据如表一所示。对比 14 株细胞竞争 ELISA 检测数据所得的 IC<sub>50</sub> 值，有六株细胞 IC<sub>50</sub> 值低于 0.2。通过对比四株细胞的 IC<sub>50</sub> 值和 B<sub>0</sub> 值大小最终选择 AFB<sub>1</sub>-B56-0519A2-2 进行腹水制备。

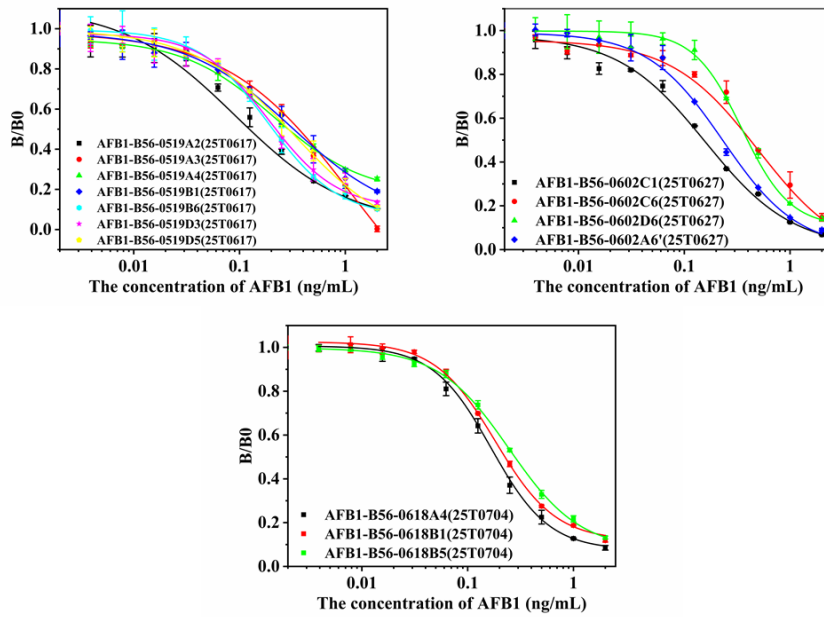


图 2.7 扩瓶后各细胞株上清检测数据图

Fig. 2.7 Data of supernatant detection of each cell line after flask expansion

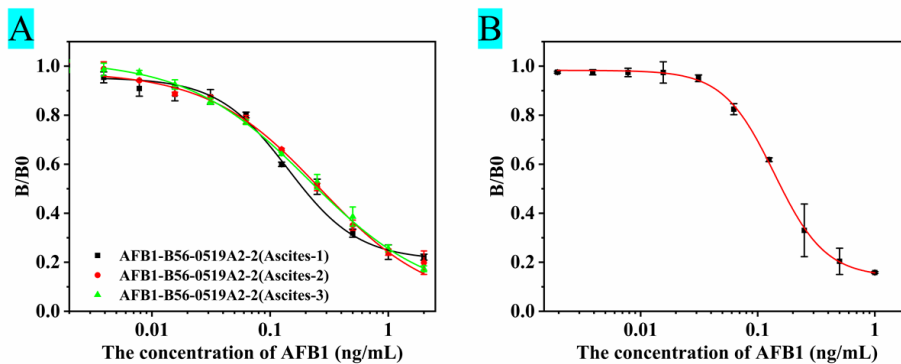


图 2.8 A: 腹水竞争检测数据图; B: MAbA2-2 竞争检测数据图

Fig. 2.8 A: Plot of ascites competition assay data; B: Plot of MAbA2-2 competition assay data

经过对细胞上清 ELISA 检测，选择 AFB<sub>1</sub>-B56-0519A2-2 细胞扩大培养对细胞进行

冻存备份, 继续培养细胞至所需浓度后, 对提前使用弗式不完全佐剂注射过的小鼠进行腹腔注射制备腹水, 腹水鉴定如图 2.8A 所示, 随后采用采用辛酸硫酸铵法对抗体进行纯化, 纯化后的抗体命名为 MAbA2-2, 用 ELISA 检测纯化后的抗体数据如图 2.8B 所示, 纯化后抗体 MAbA2-2 的 IC<sub>50</sub> 为 0.13522 ng/mL, 检测范围 (IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>) 为 0.08518-0.21464 ng/mL。随后对纯化的抗体进行特异性检测, MAbA2-2 对各毒素的特异性数据如表 2.4 所示。利用抗体分型试剂盒检测纯化抗体, 抗体主要是 IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b, 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对抗体进行分析最终能看出明显的两个条带。

表 2.4 MAbA2-2 对不同毒素的特异性数据

Tab. 2.4 Data on the specificity of MAbA2-2 for different toxins

Toxin	IC <sub>50</sub>	CR%
AFB1	0.1352	100
AFB2	>2	<6.8
AFM1	>2	<6.8
AFM2	0.4752	28.5
AFG1	>2	<6.8
AFG2	1.0609	12.7
T-2	>2	<6.8
ZEN	>2	<6.8
DON	1.1746	11.5
OTA	>2	<6.8

## 2.3 本章小结

本章以 AFB<sub>1</sub> 为目标物, 经过 Balb/c 小鼠动物免疫和抗血清 ELISA 检测, 取免疫效果好的小鼠脾脏的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 经过 PEG 融合法制备杂交瘤细胞株, 通过 HAT 和 HT 选择培养基筛选出融合成功的杂交瘤细胞株, 采用 ELISA 法结合不断降低的 AFB<sub>1</sub> 标准品浓度筛选分泌高质量抗体的阳性杂交瘤细胞株。主要结论如下:

(1) 亚克隆的细胞上清检测数据的分布类似于分布函数, 选择分布函数顶端附近的细胞进行亚克隆。

(2) 随着亚克隆的进行, 逐渐降低标准品的浓度对细胞进行驯化, 但是单一标准品浓度对细胞上清的检测有一定的局限性, 上清中抗体较多时会忽略一些好的细胞。因此对单一标准品筛选出来的 96 孔细胞板中细胞在 24 孔和 6 孔细胞板中进行上清样本放大, 并采用多梯度浓度标准品进行检测, 对比两次扩培后细胞上清检测数据, 数据一致

的细胞即为单克隆培养获得的细胞株，选择数据好的可满足需要进行抗体的制备。

(3)通过间接非竞争和竞争 ELISA 对抗体 MAbA2-2 进行评价，其半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.13522 ng/mL，检测范围为 0.08518-0.21464 ng/mL (IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>)。

### 第三章 基于动态、伪均质 MBs-icELISA 的构建

AFB<sub>1</sub> 是毒性危害最大的一种真菌毒素，预防其进入人体最根本的方法就是提前检测其存在。目前已有多种检测黄曲霉毒素的检测方法，最有权威的就是质谱-液相色谱法、薄层层析法以及生化法。随着生物技术的发展，以抗体、适配体为识别原件的生物传感器也发展迅速，例如 ELISA、ICA、荧光偏振、比色法、电化学发光在内的检测方法也迅猛发展。抗体和适配体相比有着优越的特异性和亲和力。以抗体为识别原件最常用的免疫分析方法是 ELISA，但是 ELISA 消耗时间长且消耗耗材多，一次测试至少需要 5 h，且成本较高，作为信号分子主要原件的催化酶的信号放大系统有限导致其检测限和检测范围有一定的局限性。出于 ELISA 的局限性，借助电化学、电化学发光、荧光等技术利用 ELISA 的原理建立真菌毒素检测方法层出不穷。基于磁珠作为基底而建立的 ELISA 中进行提高结合率，既减少了实验时间又可以节约试剂提高检测效率。

基于上述分析和思考，在本实验中，以单克隆抗体 MAbA2-2 为识别元件、免疫磁珠 (MBs) 为抗原载体构建 MBs-icELISA，作为固定相的 MBs 比平板具有更大的表面积固定更多的抗原，并将反应体系从固相转移到溶液使反应试剂更加均匀，加上外力条件可以使 MBs-icELISA 处于一种动态中，不仅提高结合率而且极大缩短了检测时间。与现有的检测方法相比，MBs-icELISA 缩短了 2/3 检测时间，提高了灵敏度。

#### 3.1 材料与方法

##### 3.1.1 主要试剂与仪器

本实验所用的主要试剂与耗材如表 3.1 所示，其他试剂均为分析纯；本实验所用的主要仪器如表 3.2 所示。

表 3.1 本实验的主要试剂与耗材  
Tab. 3.1 Main reagents and material of this experiment

试剂	化学式	规格	厂家
MES	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S	100 g	荷兰 Duchefa
羧基磁珠		500 nm	百迈格生物
EDC	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	1 g	美国 Sigma

表 3.2 本实验的主要仪器  
Tab. 3.2 Main instruments of this experiment

仪器	型号	厂家
磁力搅拌器 混匀器	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
移液枪	eppendof	德国 eppendof
超纯水仪	LS MK2	美国 PALL 公司
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
电热鼓风干燥箱	Dhg-9240A	上海一恒科学仪器

### 3.1.2 主要试剂配制

(1) MES buffer (0.05 M, pH 5.0-6.0) 溶液: 用电子天平准确称取 0.976 g MES 粉末, 用超纯水溶解定容至 100 mL, 用 NaOH 调节 pH 至 5.0-6.0。

(2) 磁珠活化剂 (10 mg/ml EDC 现用现配): 准确称取 10 mg EDC 粉末, 用 1 mL MES buffer 溶解。

其余常规缓冲试剂同 ELISA 主要溶液。

### 3.1.3 AFB<sub>1</sub>-BSA 偶联磁珠 (MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA)

AFB<sub>1</sub>-BSA 偶联的磁珠采用的是在百迈格生物购买的 500 nm 的羧基磁珠, 利用磁珠上的羧基与 AFB<sub>1</sub>-BSA 的氨基进行生物偶联。首先将含 10 mg 有羧基的磁珠用 MES 缓冲液 (0.05 M, pH5.2) 进行清洗三次, 用 EDC 溶液在室温下保持混匀状态活化 40 min。然后, 加入 100 μg AFB<sub>1</sub>-BAS 单克隆抗体 (用 0.05 M MES 缓冲液透析), 缓慢摇晃反应 12 h, 随后加入专用封闭剂 0.5 ml 保持混匀状态反应室温反应 4 h。用保存缓冲液 2 ml 清洗磁珠三次于 4°C 保存。

### 3.1.4 MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 偶联过程的优化

(1) AFB<sub>1</sub>-BSA 的用量优化

按照 AFB<sub>1</sub>-BSA 偶联磁珠步骤, 磁珠活化时添加中按照 1 mg 磁珠分别添加 5、10、

20、40  $\mu\text{g}$  的 AFB<sub>1</sub>-BSA 进行磁珠的偶联, 其余步骤一致, 将偶联好的磁珠进行采用 0、0.2、1 ng/mL 的 AFB<sub>1</sub> 采用 MBs-icELISA 进行检测, 对比空白值以及抑制率选择最优添加量。

#### (2) EDC 的用量优化

按照 AFB<sub>1</sub>-BSA 偶联磁珠步骤, 在 AFB<sub>1</sub>-BSA 添加中按照 1 mg 磁珠分别添加 0.2、0.5、1、1.5  $\mu\text{g}$  的 EDC 进行磁珠的偶联, 其余步骤一致, 将偶联好的磁珠进行采用 0、0.2、1 ng/mL 的 AFB<sub>1</sub> 采用 MBs-icELISA 进行检测, 对比空白值以及抑制率选择最优添加量。

#### (3) 偶联缓冲溶液的 pH 优化

按照 AFB<sub>1</sub>-BSA 偶联磁珠步骤, 偶联缓冲溶液分别采用 pH=9.6 的 CBS 溶液、pH=7.4 的 PBS 溶液、pH=5.2 的 MES 溶液磁珠的偶联, 其余步骤一致, 将偶联好的磁珠进行采用 0、0.2、1 ng/mL 的 AFB<sub>1</sub> 采用 MBs-icELISA 进行检测, 对比空白值以及抑制率选择最优 pH。

#### (4) 抗原抗体的捕获过程优化

设计了两种不同的捕获过程, 将分阶段加入抗体与酶标二抗孵育和将抗体与酶标二抗一块加入进行孵育, 将磁珠不加抗体只加酶标二抗的情况作为对照组。

### 3.1.5 MBs-icELISA 的构建

取 1  $\mu\text{L}$  3.1.3 制备的 MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 溶液用 PBST 清洗 3 遍, 加入 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的 AFB<sub>1</sub> 和 100  $\mu\text{L}$  稀释度为 1: 400 的 MAbs 混合在 0.5 mL EP 管在混匀器中 37°C 孵育 30 min。然后将试管置于磁铁上 5 s, 丢弃上清液。向 EP 管加入羊抗鼠酶标二抗(Ab2-HRP) 在混匀器中 37°C 孵育 30 min。免疫复合物 (MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA-MAbs-Ab2-HRP) 在磁铁的作用下, 用 PBST 通过分离洗涤 3 次。加入 200  $\mu\text{L}$  TMB 溶液, 在 37°C 下黑暗孵育 15 min。取 100  $\mu\text{L}$  显色液于 96 微标板中加入 50  $\mu\text{L}$  的 2 M 硫酸终止反应, 使用 Varioskan LUX 多功能酶标仪测量光密度 (OD<sub>450</sub>)。

### 3.1.6 MBs-icELISA 捕获过程的优化

#### (1) 对 MabA2-2 的孵育时间的优化

按照 MBs-icELISA 步骤, 加入 MabA2-2 后依次孵育 10、20、30、40、50、60 min, 且不添加 AFB<sub>1</sub> 溶液, 后续步骤一致, 经数据处理后, 选择吸光度最大时对应的孵育时间为最佳反应条件。

### (2) MabA2-2 的使用量的优化

按照 MBs-icELISA 步骤, 依次加入 100  $\mu\text{L}$  稀释度为 1/50、1/100、1/200、1/400、1/800、1/1600 的 MabA2-2 且不添加 AFB<sub>1</sub> 溶液, 后续步骤一致, 选择吸光度最大时对应的孵育时间为最佳反应条件。

### (3) HRP-Ab2 的使用量的优化

按照 MBs-icELISA 步骤, 不添加 AFB<sub>1</sub> 溶液 MabA2-2 孵育后依次加入 100  $\mu\text{L}$  稀释度为 60、80、100、120、140、160  $\mu\text{g/mL}$  的酶标二抗溶液, 经数据处理后, 选择吸光度最大时对应的孵育时间为最佳反应条件。

#### 3.1.7 标准曲线的建立

用 10% 甲醇-PBS 加入不同浓度的 AFB<sub>1</sub>, 进行 MBs-icELISA 检测。为了进行统计处理, 对每个标记浓度重复测量 3 次, 用酶标仪读取 450 nm 处的吸光度。对结果进行了统计分析。以毒素浓度的对数值为 X 值, 以不同反应液的吸光度为 Y 值, 得到线性方程。对阴性样品进行 20 次测量, 得到阴性样品的平均值  $B_0$  和标准偏差 SD, 将  $(B_0-3*SD)$  代入标准曲线方程, 得到最低检测限 (LOD)。

## 3.2 结果与讨论

### 3.2.1 MBs-icELISA 的构建

传统的 ELISA 是在酶标板中实现, 而 MBs-icELISA 将载体改为免疫磁珠。如图所示, MBs-icELISA 是以 MBs 作为载体实现的, 结合 AFB<sub>1</sub>-BSA 进行后续捕获。在 MBs-ELISA 中分散良好的 MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 作为搅拌器, 无论是在磁场存在还是混匀状态下都能使溶液处于均匀状态。MBs-ELISA 的构建主要分为 4 部分: 第一, 是免疫磁珠表面的 AFB<sub>1</sub>-BSA 与目标物 AFB<sub>1</sub> 对 Ab 进行竞争性的靶点反应; 第二, 在磁分离后, Ab2-HRP 进一步与免疫磁珠表面的 AFB<sub>1</sub>-BSA 的靶点反应, 形成三明治免疫复合物; 第三, 将免疫复合物分离并洗涤 3 次后, 加入 TMB 显色底物, 显色完成后用硫酸进行终止生成一种由酶标仪可测定的黄色反应产物。最终用酶标仪测定反应物在 450 nm 处的吸光度。

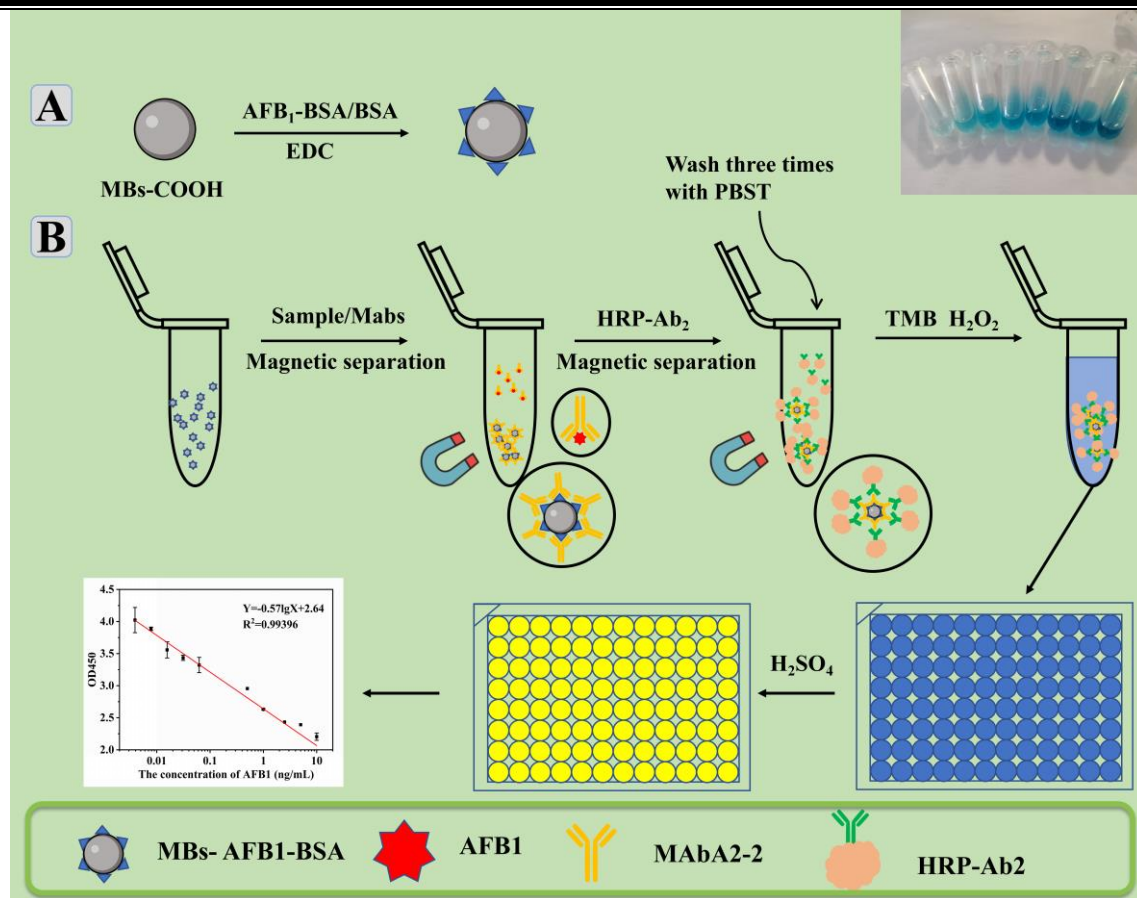


图 3.1 MBs-icELISA 原理图。A: MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 合成示意图; B: MBs-icELISA 检测过程示意图

Fig.3.1 Schematic diagram of MBs-icELISA. A: Schematic diagram of MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA synthesis; B: Schematic diagram of MBs-icELISA detection process

### 3.2.2 MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 的优化

MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 作为一个基底，从开始就影响了检测方法的灵敏度，选择了 AFB<sub>1</sub>-BSA 的用量、EDC 以及偶联缓冲溶液的 pH 这三个因素进行了优化。通过测定 OD 值 450 和抑制率来评估偶联条件对 MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 活性的影响。首先，AFB<sub>1</sub>-BSA 在 5-10 μg 随着浓度的上升 OD 值也处于上升阶段，从 10-40 μg 随着浓度的上升 OD 值处于差不多的，考虑物料损耗选取 10 μg 作为每毫克磁珠的抗原偶联量（图 3.2A）。其次，0.2 μg 的 EDC 适用于 MBs 和 AFB<sub>1</sub>-BSA 的偶联（图 3.2B），过量使用 EDC 容易使 AFB<sub>1</sub>-BSA 的活性丧失。第三，选择了 pH 为 9.6、7.4、5.2 的三个缓冲溶液研究了偶联缓冲液的 pH 对 OD450 值的影响（图 3.2C），在 pH 值为 5.2 的 MES 缓冲溶液时，OD450 值最高，抑制率最高。最后对抗原抗体的捕获过程进行了优化，如图 3.2D，A 为只有磁性不加抗体与二抗的情况，B 为分阶段加入抗体与酶标二抗孵育的情况，C 为将抗体与



酶标二抗一块加入进行孵育的情况。结果显示分阶段加入的结合效果比一次性加入的结合效果好。

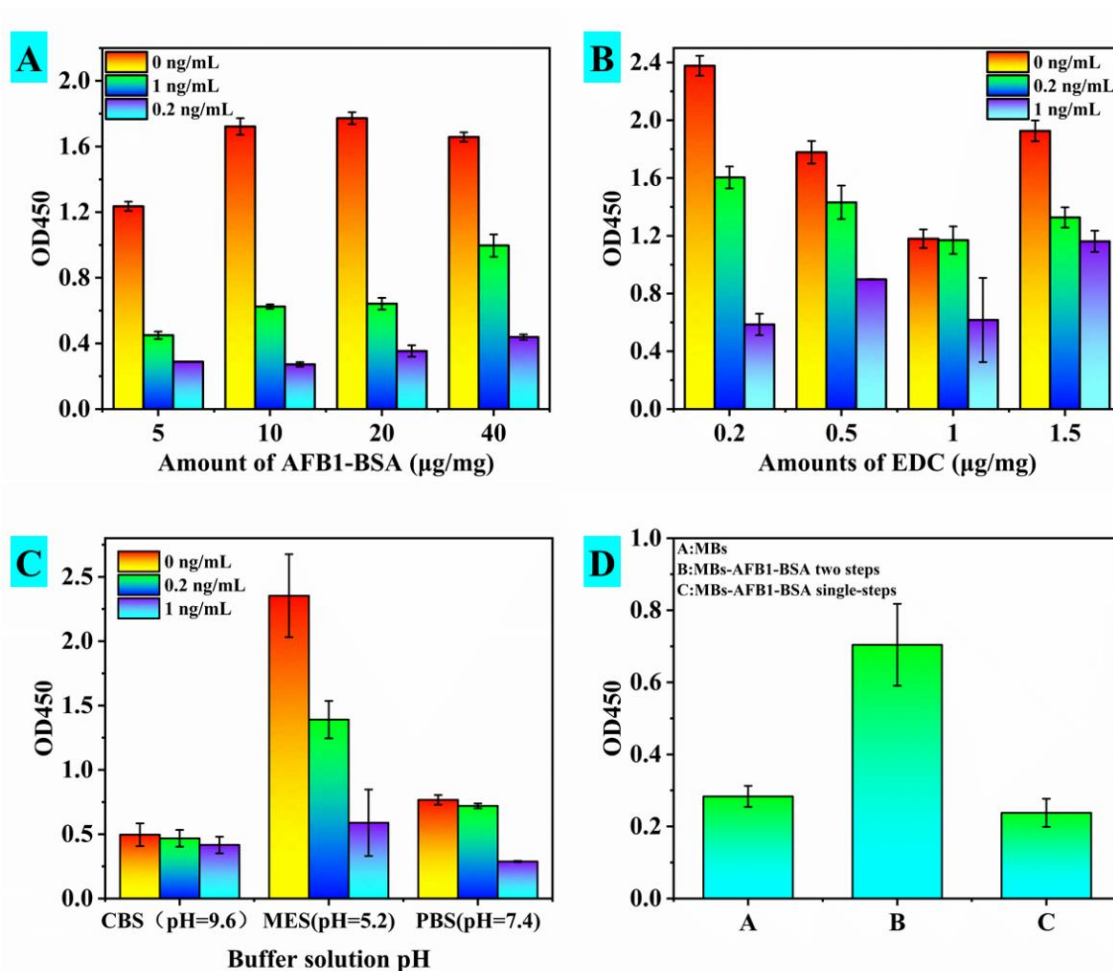


图 3.2 MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 合成过程的优化数据图

Fig. 3.2 Optimized data plot of MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA synthesis process

### 3.2.3 MBs-icELISA 捕获过程的优化

除了 MBs-AFB<sub>1</sub>-BSA 偶联过程中投料量的影响,反应过程中各种试剂的添加量及时间会影响 MBs-icELISA 的灵敏度。因此对 MabA2-2 的孵育时间、MabA2-2 和 HRP-Ab2 的使用量进行了优化,各优化结果如图 3.4 所示。首先, MabA2-2 的孵育时间在 5-30 min 中随着时间的增加 OD 值逐渐上升,30 min 之后 OD 值逐渐平稳,选取 30 min MabA2-2 的孵育时间。其次, MAb 作为 MBs-icELISA 最主要识别原件决定了传感器的灵敏度,选择不同稀释比的 Mab,随着 Mab 的上升 OD450 逐渐增大,到达 1:400 后呈平稳趋势;最后, HRP-Ab2 的用量影响了 MBs-icELISA 的显色反应,过少的 HRP-Ab2 会影响

传感器检测上限, 过多的 HRP-Ab2 对传感器不会有太大影响, 但是本着节约宗旨对 HRP-Ab2 的用量进行了优化。优化结果如图 3.4C 所示, HRP-Ab2 的最优用量为 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

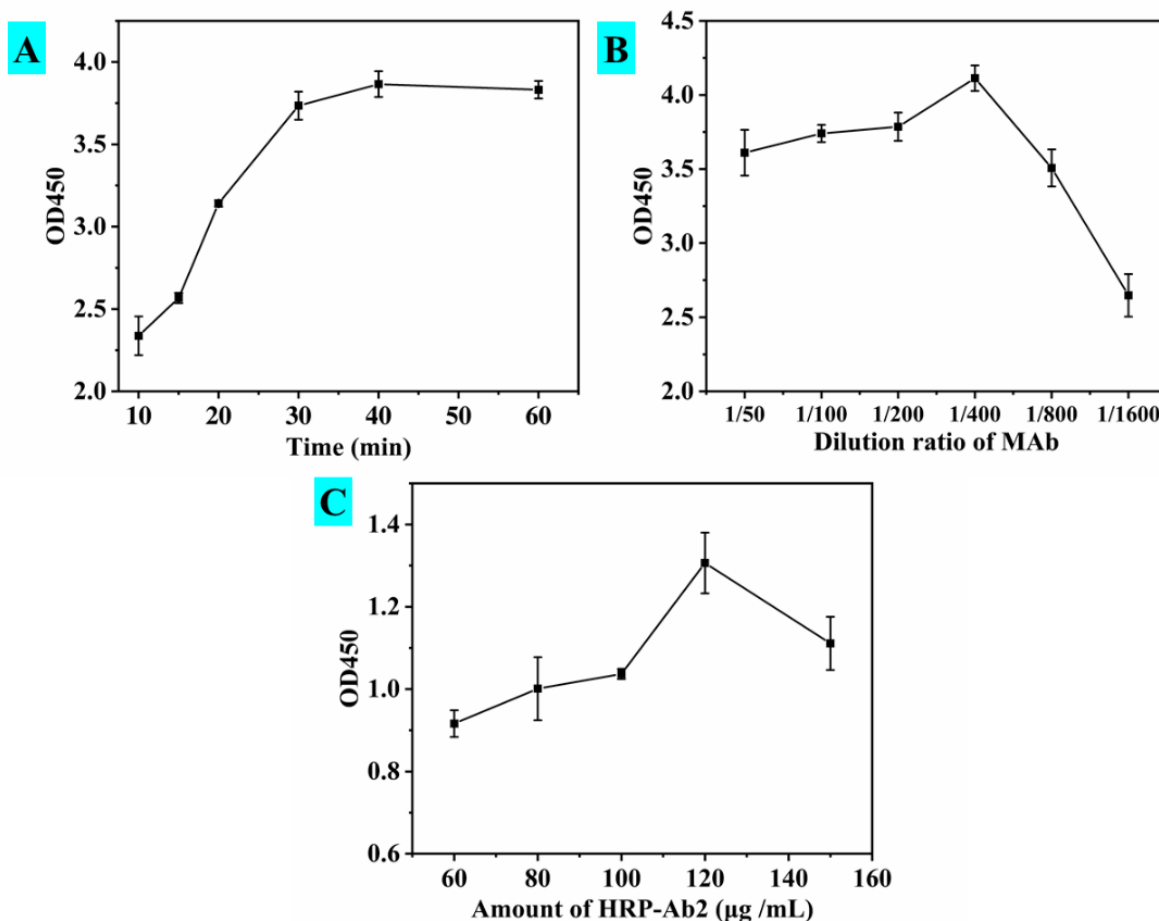


图 3.4 MBs-icELISA 捕获过程的优化数据图

Fig. 3.4 Optimized data plot for MBs-icELISA capture process

### 3.2.4 MBs-icELISA 标准曲线

在最佳条件下研究了 MBs-icELISA 对 AFB<sub>1</sub> 的灵敏度。随着 AFB<sub>1</sub> 浓度的增加, 传感器的吸光度值逐渐降低, 在 0.004–10  $\text{ng}/\text{mL}$  的浓度范围内显示出令人满意的线性关系, 线性范围覆盖 5 个数量级。AFB<sub>1</sub> 的检测限 (LOD) 为 0.0013  $\text{ng}/\text{mL}$ 。用制备的单克隆抗体建立的传感器具有较宽的识别范围。

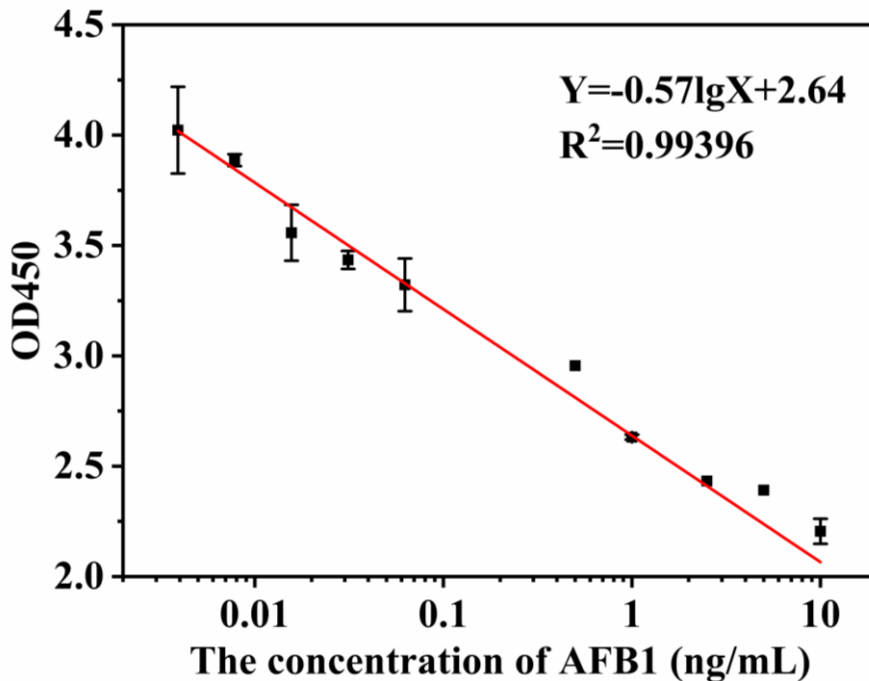


图 3.5 MBs-icELISA 标准曲线图

Fig. 3.5 Standard curve of MBs-icELISA

### 3.3 本章小结

在本章中，以第二章制备的识别 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体 MAbA2-2 为识别原件构建基于均相、伪均质的 MBs-icELISA，优化了免疫磁珠与抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 的偶联过程中 AFB<sub>1</sub>-BSA 的用量、EDC 以及偶联缓冲溶液的 pH 这三个因素，进而优化了 MBs-icELISA 中 MabA2-2 的孵育时间、MabA2-2 和 HRP-Ab2 的使用量这三因素。

(1) 免疫磁珠与抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 的偶联过程中每毫克磁珠加入 0.2 μg 的 EDC 进行活化加入 10 μg AFB<sub>1</sub>-BSA 在 pH 值为 5.2 的 MES 缓冲溶液进行偶联；MabA2-2 的最有孵育时间为 30 min、最佳稀释比为 1: 400，HRP-Ab2 的最优用量为 120 μg/mL。

(2) 在最优的反应条件下，甲醇基质的线性拟合方程为  $Y = -0.57\lg X + 2.64$  ( $R^2 = 0.99396$ ) 线性检测范围为 0.004–10 ng/mL，线性范围覆盖 5 个数量级。AFB<sub>1</sub> 的检测限 (LOD) 为 0.0013 ng/mL。

上述研究，可以为自制单克隆抗体的应用提供一定的参考，基于 MBs-icELISA 的建立步骤可以转化成 ELISA 试剂盒实现现场高通量检测农产品中的 AFB<sub>1</sub>，扩大生产提高应用面，对于农产品质量安全监测具有重要的意义。

## 第四章 基于生物活性保护和信号放大策略的荧光免疫层析法检测 T-2 毒素

T-2 毒素是由镰刀菌产生的一种毛霉菌毒素，在寒冷的气候或潮湿的储存条件下易产生，对人类健康和畜牧业有严重的危害。随着 ICA 的发展，免疫层析检测法纸基传感器已逐渐应用于 T-2 毒素的检测。纸基传感器易于携带，可用于快速现场检测。纸基传感器可以与便携式读条器或手机结合，快速读取结果。在研究中，AuNPs 经常被用作免疫层析检测纸基传感器的标记材料，因为它们具有良好的稳定性和容易辨别的颜色，并且容易合成。然而，AuNPs 仍有许多问题。例如，检测结果容易受到有色样品的干扰，其灵敏度有待提高。为了提高免疫层析检测纸基传感器的灵敏度，新的标记材料如量子点、量子点纳米珠已被使用，它们可以消除珍珠色颗粒的干扰，但被认为对身体有害的元素。使用镧系元素取代传统的 AuNPs 和量子点作为时间分辨免疫层析法的标记材料，是近年来一个热点。镧系螯合物表现出非常理想的标签特性：强大的胶体稳定性使其易于表面功能化，基于其光学特性的更高灵敏度和准确性。镧系荧光珠 (Fluorescent beads, FBS) 具有非常好的荧光特性：荧光寿命长，激发光谱宽，发射光谱窄而尖。这些优点使其成为嵌入微珠的 15 种镧系元素中最适合作为标记材料的元素。在传统的 ICA 耦合策略中，标记材料直接与 T-2 毒素抗体耦合。在偶联过程中，抗体和标记材料需要经历一定的条件和一些化学反应，以使它们结合在一起。然而，偶联过程会破坏其生物活性和结构，降低其识别抗原的能力，这使得它很难满足我们的要求。

因此，基于以上思考为了进一步提高检测的灵敏度，保护靶标抗体，我们建立了基于二级抗体标记法的 FIA 纸基传感器，利用 FBS 检测 T-2 毒素。在这项工作中，羊抗鼠 IgG 与聚苯乙烯荧光微球偶联作为荧光探针，与 T-2 毒素抗体结合。以 T-2 毒素为靶标，以 T-2 毒素抗体为核心识别元件，建立了基于特异性抗体活性保护的 FIA 纸基传感器。我们探讨了该方法的灵敏度、稳定性、准确性、特异性等特性，将其应用于玉米和饲料样品中 T-2 毒素的检测，并与 LC-MS/MS 的分析结果进行了比较。

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 主要试剂与仪器

本章所用到的部分试剂耗材和仪器在 2.1.1 中已展示，除此之外用到的试剂和耗材如表 4.1 所示、仪器如表 4.2 所示。

表 4.1 试剂和耗材

Tab. 4.1 Main reagents and material

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	$C_8H_{18}ClN_3$	100 mg	美国 Sigma
PVP-30	$(C_6H_9NO)_n$	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 <sub>1</sub> -BSA	/	1 mg	美国 Sigma
T-2	$C_{24}H_{36}O_9$	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 T-2 毒素单克隆抗体	/	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

表 4.2 主要仪器

Tab. 4.2 Main instrument

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

### 4.1.2 荧光探针的制备 (IgG@Eu)

100  $\mu\text{L}$  的氧化铈乳胶加入 400  $\mu\text{L}$  的 0.2 M 硼酸缓冲溶液 (pH8.18) 中, 并使用涡旋振荡器进行混合。超声处理 10 min 后, 氧化铈乳胶被均匀地分散在硼酸缓冲液中。为了激活氧化铈乳胶表面的羧基以方便羊抗鼠 IgG 偶联, 在上述溶液中加入一定量的新鲜制备的 EDC 溶液 (15 mg/mL), 并通过高速搅拌激活 15 min。然后将溶液高速离心 10 min (13300 rpm, 10 $^{\circ}\text{C}$ ), 弃去上清液, 将沉淀物重新重悬在 500  $\mu\text{L}$  硼酸缓冲液中。将上述溶液用超声波充分混合 10 min, 使其重新溶解。在高速离心 10 min (13300 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ ) 后, 弃去上清液, 加入 1mL 含 0.5% BSA 的硼酸缓冲液, 并在低温下振荡 3 小时。通过上述程序制备的探针 (IgG@Eu) 在 4 $^{\circ}\text{C}$  下保存以备进一步使用<sup>[132]</sup>。

### 4.1.3 FIA 纸基传感器的制备

FIA 纸基传感器由四个部分组成: NC 膜、样品垫、吸收垫和背板。如图 4.1 (A) 所示, NC 膜是反应场所, 它被喷上测试线 (T 线) 和质量控制线 (C 线)。用 XYZ 3050 点膜仪将 T-2-BSA 结合物和山羊抗鼠 IgG 点在硝酸纤维素膜上, 生成测试线和对照线, 最佳用量为 0.7  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。标记后, 底板在 37 $^{\circ}\text{C}$  下干燥 2 h, 用 CM 4000 型条形切割器切割成条形 (4 mm 宽)。然后, 将样品垫、NC 膜和吸收垫依次叠加粘贴在底板上, 重叠 1 mm。条状物被转移到一个含有干燥剂的小塑料盒中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$  下保存。

该传感器的工作原理如图 4.1B 所示。第一步是准备样品溶液, 其中包括适量的反应缓释液、荧光探针、单克隆抗体和样品提取物。将总体积为 160  $\mu\text{L}$  的样品溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$  下加热 10 min 后, 将纸基传感器插入样品杯中, 将样品溶液沿试纸条层析至反应区。反应结束后, 用读条器读取纸基传感器。当样品中没有毒素时, 样品溶液中的单克隆抗体结合的荧光探针被 T 线上的包被抗原固定, 游离的荧光探针和多余的复合物被结合到 C 线上的兔抗羊 IgG。这时, T 线的荧光强度最大, C 线的荧光强度最小, T/C 值最大。当样品中含有检测目标时, 目标特异性单克隆抗体与荧光探针 (IgG@Eu) 结合, 形成复合物 (MAb-IgG@Eu)。这时, 复合物 (MAb-IgG@Eu) 将首先与检测目标反应, 并被兔抗羊 IgG 固定在 C 线上。剩余的复合物被原始涂层 (T-2-BSA) 固定在 T 线上。最后, 游离的荧光探针和多余的复合物与 C 线上的兔抗羊 IgG 结合。由于靶标消耗了单克隆抗体, T 线荧光信号减弱, 然后 C 线荧光信号增强, T/C 值相应下降。毒素越多, T 线越弱, T 线荧光信号越强, T/C 值越小。

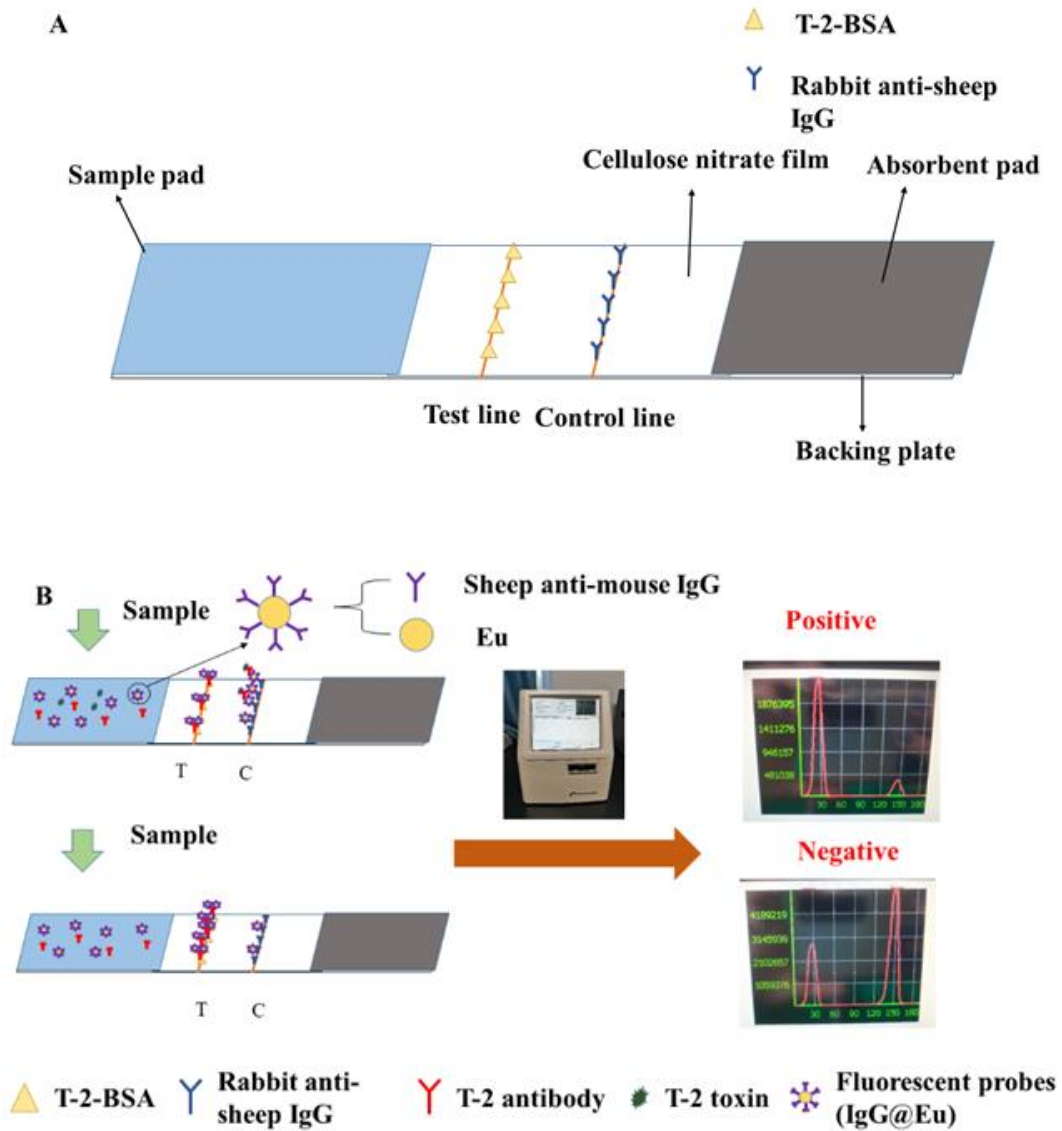


图 4.1 A: FIA 纸基传感器的结构图; B: FIA 纸基传感器的工作原理

Fig. 4.1 A: Structure diagram of FIA paper-based sensor; B: Operating principle of FIA paper-based sensor

#### 4.1.4 标准曲线的建立

在检测用的阴性样品基质中加入标准物质，用 70% 甲醇水、玉米基质和饲料基质分别加入 T-2 毒素，进行条形检测。为了进行统计处理，对每个标记浓度重复测量 5 次，用荧光检测器读取荧光条。对结果进行了统计分析。以毒素浓度的对数值为 X 值，以 T 线荧光信号值与 C 线荧光信号值的比值 (T/C) 为 Y 值，得到线性方程。对阴性样品进行 20 次测量，得到阴性样品的平均值  $B_0$  和标准偏差 SD，将  $(B_0 + 3 * SD)$  代入标准曲线

方程，得到最低检测限（LOD）。

#### 4.1.5 FIA 的评价

##### （1）FIA 的特异性

特异性是传感器的重要特性之一。特异性是通过开发的 FIA 与其他霉菌毒素的交叉反应来评估的。将 AFM<sub>1</sub>、DON、T-2、ZEN、FB<sub>1</sub> 标准品加入到缓释液中，使其最终浓度为 20 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、5 ng/mL、50 ng/mL。另设一组空白样品作为非目标物质检测的对照。通过比较 T 线的荧光强度来评价检测方法的特异性。

##### （2）FIA 的精确性和准确性

收集用 LC-MS/MS 检测的阴性玉米和饲料样品，并加入低、中、高浓度的目标物质毒素，每个浓度做 3 个计算。对同一批纸条进行标记，通过测量毒素的回收率和标准偏差来确定目标物质的精确度和准确性。对每种浓度进行三次计算，并计算变异系数以考察方法的精密度。

#### 4.1.6 样品制备

5.0 g 的玉米和饲料样品被研磨和粉碎，用 20 mL 甲醇/水（70:30 v/v）提取 30 分钟。用 0.45 μm 的膜过滤器过滤提取液，用 4 mL 的缓冲液稀释 1 mL，进行 5 倍稀释。稀释液用 0.45 μm 的膜膜过滤稀释，作为检测用的提取液。

#### 4.1.7 对实际样品的检测

为了验证荧光免疫层析检测技术在实际样品中的可行性，采用试纸条和 LC-MS / MS 检测不同批次的玉米和饲料样品，并对测量结果进行了比较。

## 4.2 结果和讨论

### 4.2.1 FIA 纸基传感器的条件优化

#### （1）EDC 用量的优化

本实验采用 EDC 激活荧光微球的羧基，荧光微球的激活程度随着 EDC 用量的不同而不同。羧基的数量决定了荧光微球和二级抗体之间的偶联比例。将 10 μL、20 μL、30 μL、40 μL 15 mg/mL 的 EDC 溶液加入到乳化液中，重复实验，观察乳化状态结果。表 4.3 显示了不同 EDC 用量对氧化锆乳剂活化效果的影响。当 EDC 溶液大于或等于 30 μL 时，乳液的状态良好。本着节约的原则，选择 30 μL 15 mg/mL 的 EDC 水溶液来激活氧



化铈乳胶。

表 4.3 EDC 用量的优化

Tab. 4.3 Optimization of EDC dosage

EDC 用量	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
乳胶状态	凝固	微量凝固	不凝固	不凝固

### (2) 羊抗鼠 IgG 偶联量的优化

羊抗鼠 IgG 的偶联量可间接影响纸基传感器的灵敏度和检测范围。二抗用量的优化参考了董浩玮实验中二抗的用量<sup>[132]</sup>。我们选择 100  $\mu\text{L}$  作为最佳的山羊抗鼠 IgG 偶联量。

### (3) T-2 抗体含量的优化

T-2 抗体的含量是本实验中的一个重要参数，它直接决定了该方法的灵敏度和检测范围。为了减少出现假阳性或假阴性的可能性，我们对 T-2 抗体的用量进行了优化。我们将 5  $\mu\text{g}$ 、1  $\mu\text{g}$ 、0.5  $\mu\text{g}$  和 0.1  $\mu\text{g}$  的单克隆抗体与上述优化条件下得到的荧光探针混合，并将其加入不同浓度的 T-2 毒素样品杯中，制备检测溶液。同一批次的相应条带被用于检测。反应一段时间后，用荧光仪读取条上 T 线的荧光强度。以标准浓度为横轴，以 T 线的荧光强度为纵轴。如图 3 所示，当抗体剂量为 0.5  $\mu\text{g}$  和 0.1  $\mu\text{g}$  时，荧光强度在 12.5 和 25 时消失，这使得条带的检测极限变窄。当抗体用量为 5  $\mu\text{g}$  时，当 T-2 毒素的用量达到 50 时，荧光强度仍为 700 左右，且变化非常微弱，这将导致试纸条的灵敏度下降。当抗体用量为 1  $\mu\text{g}$  时，T 线的荧光强度随着 T-2 毒素的减少而降低，直到 50 ng/mL 时荧光信号消失。因此，选择 1  $\mu\text{g}$  作为 T-2 抗体的添加量。

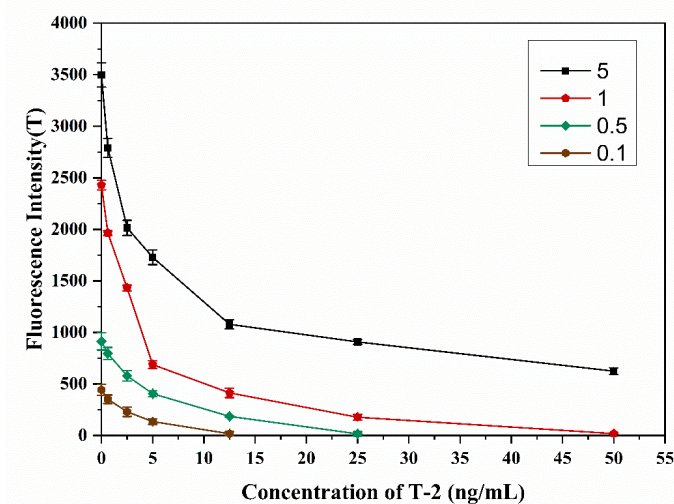


图 4.2 T-2-mAb 的优化

Fig. 4.2 Optimization of T-2-mAb

#### (4) 试纸条喷洒量的优化

将 C 线的兔抗羊 IgG 浓度设定为 0.1、0.2 和 0.25 mg/mL，喷洒速度设定为 0.5、0.7 和 1.0  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ，T 线的 T-2 抗原浓度设定为 0.1、0.25 和 0.4 mg/ml。荧光探针分别用反应液稀释 50、100、160 和 200 倍。三种因素通过 ELISA 棋盘法进行组合。经过反复试验，将 T-2-BSA 的喷洒量定为 0.25 mg/mL，兔抗羊 IgG 的喷洒量定为 0.1 mg/mL，喷洒速度为 0.7  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ，荧光探针的稀释比例确定为 160 倍。通过这种组合，试纸条检测技术可以获得较低的灵敏度和合适的检测范围。

#### (5) 样品垫的选择

样品垫会影响样品液的色谱。如果样品液的色谱受到影响，反应区的反应就会受到影响。在试纸色谱中使用了三种不同材料的样品垫：玻璃纤维、Fusion 5 和血液过滤膜。当使用 Fusion 5 时，荧光探针在样品垫和 NC 膜的交界处被阻挡，荧光带不明显。当使用滤膜时，荧光探针被严重堵塞。在样品垫上，且探针到 C 线的数量较少，荧光带不明显。用玻璃纤维做的荧光探针层析效果较好，荧光带明显，有利于间接免疫竞争反应的进行。因此，本实验选择玻璃纤维制成的样品垫。

#### (6) 缓冲溶液的优化

反应缓冲液会间接影响试纸上的特异性反应，影响测试结果。我们选择了表中所示的五种不同的缓冲溶液，用试纸进行测试，观察不同缓冲溶液下的条纹亮度和背景颜色。结果如表 4.4 所示，当选择缓冲溶液 5 时，条纹的亮度是最亮的，没有背景色。蔗糖可以提高疏水性和色谱速度。BSA 可以阻断非特异性结合点，减少非特异性结合。Tween-20 可以提高反应的稳定性和免疫试剂的特异性识别能力。PVPK 30 具有良好的分散性，可消除 NC 膜的背景色。以水+1%蔗糖+0.5%BSA+2%Tween-20+1%PVPK 30 作为反应缓释液。

表 4.4 反应缓释液的优化

Tab. 4.4 Reaction slow-release solution optimization

序号	反应缓释液	亮度	背景颜色
1	Water	黑暗的	是
2	Water+1% Sucrose	黑暗的	是
3	Water +1% Sucrose +0.5% BSA	弱亮	是
4	Water +1% Sucrose +0.5% BSA+2% Tween-20	亮	是
5	Water +1% Sucrose +0.5% BSA+2% Tween-20+1% PVPK 30	非常亮	无

### 4.2.2 T-2 毒素的标准曲线的建立

将不同浓度的标准物质加入到空白基质和玉米饲料机制中，制备检测用标准样品溶液。以 T-2 浓度为 X 轴，以 T 线和 C 线的荧光值比为 Y 轴建立标准曲线。结果如图 4.3 所示。T-2 在甲醇溶液（70%，z/o）中的标准工作方程式为  $Y=-0.43022X+0.7308$ ， $R^2$  为 0.98593。阴性样品测定 20 次，得到阴性样品的平均值  $B_0$  和标准偏差 SD，将  $(B_0-3*SD)$  代入标准曲线方程，得到最低检测限（LOD）。T-2 在甲醇溶液（70%，z/o）中的 LOD 为 0.01 ng/mL，线性范围良好(0.0625-50 ng/mL)。在玉米底物中的检测限为 0.052 ng/mL，在饲料底物中为 0.071 ng/mL。

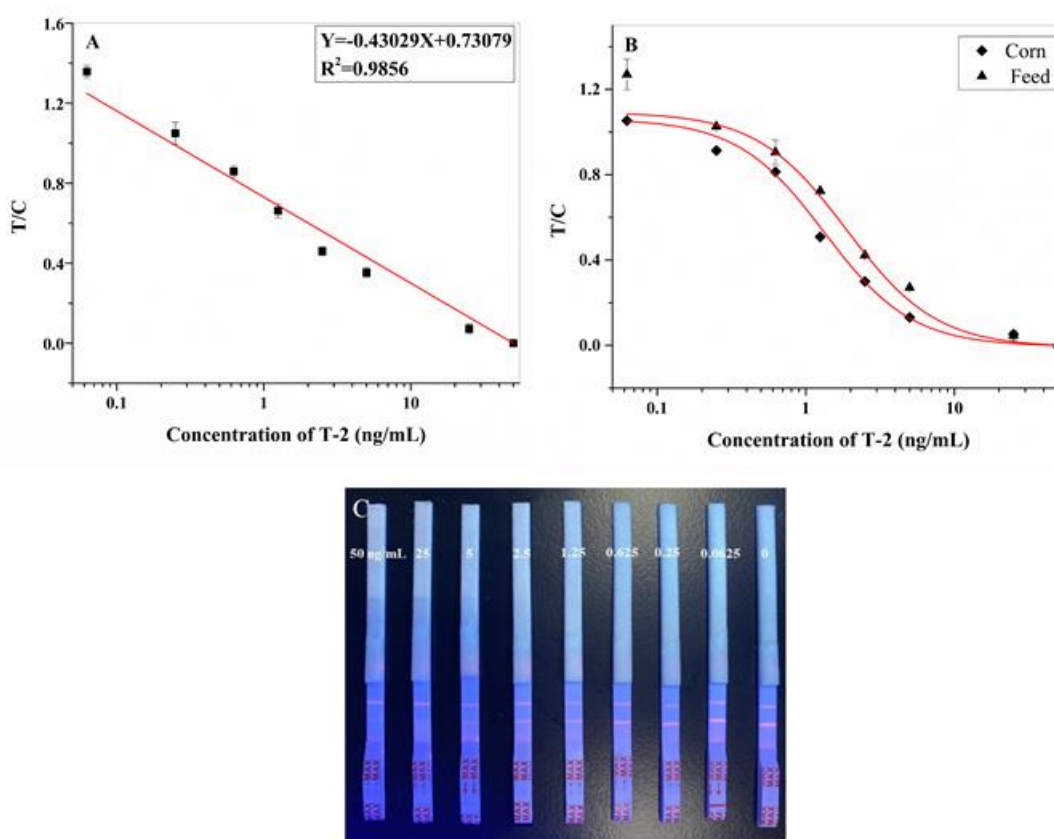


图 4.3 A: 70% 甲醇中定量检测的标准曲线; B: 玉米和饲料样品中定量检测的标准曲线; C: 70% 甲醇中的定量检测的真实图片

Fig.4.3 A:Standard curve of quantitative detection in 70% methanol; B:Standard curve of quantitative detection in corn and feed samples;C:Real picture of quantitative detection in 70% methanol

如表 4.5 所示，基于特异性抗体活性保护的荧光免疫层析纸基传感器的检测线比其他方法低。与其他方法相比，该方法在检测过程中不需要庞大的仪器，操作简单。该方法可用于多个样品的快速检测。

表 4.5. 本研究与现有检测技术的比较

Table 4.5. Comparison of the present study with existing detection technologies

检测方法	检测线	参考
DNA zyme-assisted triple-amplified electrochemical aptasensor for ultra-sensitive	0.107 fg /mL	[133]
Imaging surface plasmon resonance biosensor assay	1.2 ng/mL	[134]
Ovalbumin antibody-based fluorometric immunochromatographic	10 fg /mL	[135]
Multicolor immunochromatographic assay	30 ng/mL	[136]
Fluorescent immunochromatographic paper sensor based on specific antibody activity protection	0.01 ng/mL	This work

### 4.2.3 纸基传感器的性能测试

#### (1) FIA 的特异性

为了测试纸带的特异性,用纸带测试了空白样品、AFM<sub>1</sub>、DON、T-2、ZEN 和 FB<sub>1</sub>。通过荧光检测器读取 T 线的荧光强度。如图 4.4 所示,当加入目标标准时,T 线几乎完全消失。非目标标准品的 T 线强度与空白的相似。这表明基于二抗法的荧光免疫层析条在检测中具有良好的特异性。

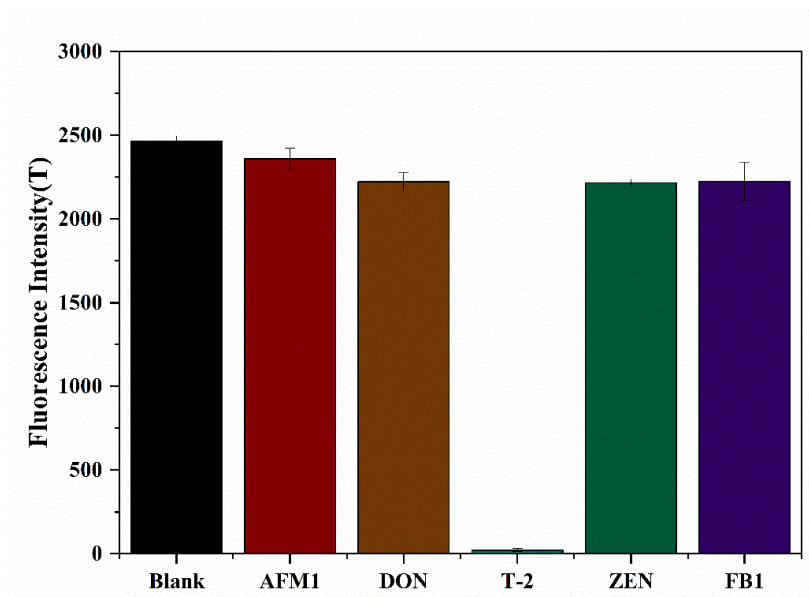


图 4.4 基于纸张传感器特异性评价

Fig. 4.4 Paper-based sensor specificity evaluation

### (2) FIA 的精确性和准确性

如表 4.6 所示, 玉米样品的回收率在 95.31%-119.03% 之间, 相对标准偏差低于 11.38%。在饲料样品中, 回收率为 95.7%-110.33%, 相对标准偏差低于 16.02%。本研究中, 基于二级抗体标记的 T-2 的 FIA 纸基传感器具有较高的回收率和较好的精密度, 可以满足实际检测的要求。

表 4.6 FIA 的精确性和准确性  
Tab. 4.6 Precision and accuracy of FIA

样品	标准品(ng/mL)	检测(ng/mL)	回收率 (%)	相对标准偏差(%)
玉米	1.00	1.14	114.33	3.06
	10.00	11.90	119.03	11.38
	30.00	28.59	95.31	3.33
饲料	1.00	1.10	110.33	8.60
	10.00	10.61	106.13	16.02
	30.00	28.71	95.7	10.22

#### 4.2.4 样品中 T-2 毒素的检测

将该方法应用于玉米和饲料样品的检测, 并与 LC-MS/MS 进行了比较, 结果见表 4.7, 所建立的方法与与 LC-MS/MS 相比差距较小。

表 4.7 样品中 T-2 毒素的检测  
Tab. 4.7 Detection of T-2 toxin in Samples

样品	LC-MS/MS (ng/mL)	FIA (ng/mL)
玉米 1	11.30	12.86
玉米 2	15.84	14.33
饲料 1	15.57	16.08
饲料 2	8.92	9.31

### 4.3 本章总结

以污染农产品、毒性较大的 T-2 毒素为目标物, 针对目前市售试纸条的缺点, 羊抗鼠 IgG 与聚苯乙烯荧光微球偶联作为荧光探针, 与 T-2 毒素抗体结合。以 T-2 毒素为靶标, 以 T-2 毒素抗体为核心识别元件, 建立了基于特异性抗体活性保护的 FIA 纸基传感

器。优化了工作条件，如 EDC 试剂、抗体偶联量、T-2 抗体用量、免疫试剂喷洒量等。对试纸条层析条件，如样品垫和稀释液进行了选择。在最优条件下构建了荧光免疫层析试纸条，

主要结论如下：

(1) T-2 毒素在甲醇溶液 (70%, v/v) 中的标准工作方程式为  $Y = -0.43022X + 0.7308$  ( $R^2 = 0.98593$ )。T-2 毒素在甲醇溶液 (70%, v/v) 中的 LOD 为 0.01 ng/mL，线性范围良好 (0.0625-50 ng/mL)。在玉米底物中的检测限为 0.052 ng/mL，在饲料底物中为 0.071 ng/mL。

(2) 玉米样品的回收率在 95.31%-119.03% 之间，相对标准偏差小于 11.38%。在饲料样品回收率为 95.7%-110.33%，相对标准偏差低于 16.02%。该方法通过 LC-MS/MS 进行了验证，结果显示该方法具有良好的准确性。

(3) 实验结果表明，该方法灵敏度高，特异性好，检测结果准确，能在短时间内实现目标的检测，可用于农产品中 T-2 毒素的现场快速筛查。

本章建立的 FIA 中单克隆抗体可以通过与 FBS 间接结合来保护其活性且提高了荧光微球和单克隆抗体之间的结合率，可广泛用于农产品中 T-2 毒素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 结论和展望

### 5.1 结论

黄曲霉毒素 (AFs) 中危害最大的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 和单端孢霉烯族毒素中毒性最大的 T-2 毒素都会损害人体免疫系统, 低剂量的毒素可引起炎症反应、长期接触会对人体的免疫系统具有抑制作用。常用的快速免疫分析检测产品的弊端: ELISA 试剂盒检测过程繁琐、结合效率低等, 常用来现场快速检测的试纸条使用的单克隆抗体标记方式严重影响单克隆抗体的活性进而影响试纸条的灵敏度。本文首先以 AFB<sub>1</sub> 为目标物采用类分布函数顶点亚克隆结合三步放大样本和多浓度标准品检测法筛选得到 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体 MAbA2-2; 其次, 以 MAbA2-2 为识别元件构建了基于动态均相的 MBs-icELISA; 最后构建了基于生物活性保护和信号放大 EIA。本课题的主要研究内容成果如下:

(1) 亚克隆的细胞上清检测数据的分布类似于分布函数, 选择顶端附近灵敏度高的细胞进行亚克隆。随着亚克隆的进行逐渐降低标准品的浓度对细胞进行驯化, 但是单一标准品浓度对细胞上清的检测有一定的局限性, 上清中抗体较多时会忽略一些好的细胞。因此对单一标准品筛选出来的 96 孔细胞板中细胞在 24 孔和 6 孔细胞板中进行上清样本放大, 并采用多梯度浓度标准品进行检测, 对比两次扩培后细胞上清检测数据, 数据一致的细胞即为单克隆培养获得的细胞株, 选择数据好的可满足需要进行抗体的制备。通过间接非竞争和竞争 ELISA 对抗体 MAbA2-2 进行评价, 其半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 0.13522 ng/mL, 检测范围 (IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>) 为 0.08518-0.21464 ng/mL。

(2) 免疫磁珠与抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 的偶联过程中, 每毫克磁珠加入 0.2 μg 的 EDC 进行活化加入 10 μg AFB<sub>1</sub>-BSA 在 pH 值为 5.2 的 MES 缓冲溶液进行偶联; MabA2-2 的最有孵育时间为 30 min、最佳稀释比为 1: 400, HRP-Ab2 的最优用量为 120 μg/mL。在最优的反应条件下, 甲醇基质的线性拟合方程为  $Y = -0.571gX + 2.64$  ( $R^2 = 0.99396$ ) 线性检测范围为 0.004-10 ng/mL, 线性范围覆盖 5 个数量级。AFB<sub>1</sub> 的检测限 (LOD) 为 0.0013 ng/mL。

(3) T-2 毒素在甲醇溶液 (70%, z/o) 中的标准工作方程式为  $Y = -0.43022X + 0.7308$  ( $R^2 = 0.98593$ )。T-2 毒素在甲醇溶液 (70%, z/o) 中的 LOD 为 0.01 ng/mL, 线性范围良好 (0.0625-50 ng/mL)。在玉米底物中的检测限为 0.052 ng/mL, 在饲料底物中为 0.071 ng/mL。玉米样品的回收率在 95.31%-119.03% 之间, 相对标准偏差小于 11.38%。在饲料样品回收率为 95.7%-110.33%, 相对标准偏差低于 16.02%。该方法通过 LC-MS/MS 进行了验证, 结果显示该方法具有良好的准确性。实验结果表明, 该方法灵敏度高, 特异性好, 检测结果准确, 能在短时间内实现目标的检测, 可用于农产品中 T-2 毒素的现场快



速筛查。

## 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) 本文所制备的单克隆抗体 MabA2-2 的特异性有待提升，可以通过基因工程进行改造制备纳米抗体，提高抗体的各方面特性

(2) Mb-icELISA 开发成试剂盒进行现场高通量检测，结合 Mb-icELISA 开发掌上酶标仪或者结合手机拍照开发一个能够快速分析结果的软件；本课题构建的试纸条是湿法试纸条，转化成干法试纸条后会更加便捷，且应用为更加广泛。



## 参考文献

- [1] 李育松. 当代中国食品药品安全问题伦理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [2] Karlovsky P, Suman M, Berthiller F, et al. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination[J]. *Mycotoxin Research*, 2016, 132(4):179-205.
- [3] 杨世亚, 邱景富. 食品中真菌毒素的污染状况与检测方法研究进展[J]. *现代预防医学*, 2012, 39(22):5897-5900.
- [4] 李双青, 李晓敏, 张庆合. 植物油中真菌毒素检测技术的研究进展[J]. *色谱*, 2019, 37(6):569-580.
- [5] 裴鹏钢, 熊科, 叶宏, 等. 粮油食品中微生物和真菌毒素污染预测模型研究进展[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(2):179-182.
- [6] 王刚, 王玉龙, 张海永等. 真菌毒素形成的影响因素[J]. *菌物学报*, 2020, 39(3):477-491.
- [7] 杨静, 吴芳. 国外粮食安全储藏期评估研究进展[J]. *粮食储藏*, 2016, 45(4):1-8.
- [8] Schaarschmidt S, Fauhl-Hassek C. The fate of mycotoxins during the primary food processing of maize[J]. *Food Control*, 2021, 121(5):107651.
- [9] Mukanga M, Derera J, Tongoona P, et al. A survey of pre-harvest ear rot diseases of maize and associated mycotoxins in south and central Zambia[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141(3):213-221.
- [10] 廖子龙, 于英威, 唐坤等. 农作物中真菌毒素研究进展[J]. *粮油仓储科技通讯*, 2019, 35(2):47-49+56.
- [11] 王少敏, 季申, 杜春晓, 等. Qu ECh ERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定三七中 26 种真菌毒素[J]. *世界中医药*, 2019, 14(4):798-804.
- [12] Mahato D, Lee K, Kamle M, et al. Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and Control strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019
- [13] Nodoushan S, Nasirizadeh N, Kachuei R, et al. Electrochemical detection of aflatoxin B1: an aptasensor prepared using graphene oxide and gold nanowires[J]. *Analytical Methods*. 2019, 11, 6033–6042.
- [14] Wang X, Wu X, Lu Z, et al. Comparative study of time-resolved fluorescent nanobeads, quantum dot nanobeads and quantum dots as labels in fluorescence immunochromatography for detection of aflatoxin B1 in grains[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4):575
- [15] Campagnollo F, Ganey K, Khaneghah A, et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: a review[J]. *Food Control*, 2016
- [16] Krishnamachari K, Nagarajan V, Bhat R, et al. An outbreak in western India[J]. *Hepatitis due to aflatoxicosis*, *Lancet*, 1975.
- [17] Ngindu A, Kenya P, Ocheng D, et al. 1982. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in

- Kenya[J]. Lancet, 1982
- [18] Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Gieseke K, et al., 2005. Case-control Study of an Acute Aflatoxicosis Outbreak[J]. Environ. Health Perspect, Kenya, p. 2004.
- [19] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2004. Outbreak of aflatoxin poisoning—eastern and central provinces, Kenya, January–July 2004. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.
- [20] Kumar P, Mahato D, Kamle M, et al. Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. Frontiers in Microbiology, 2017.
- [21] Zhou Q, Tang D, Recent advances in photoelectrochemical biosensors for analysis of mycotoxins in food[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2020,124: 115814.
- [22] Tang Y, Tang D, Zhang J, et al. Novel quartz crystal microbalance immunodetection of aflatoxin B1 coupling cargo-encapsulated liposome with indicator-triggered displacement assay[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1031:161–168.
- [23] Dohnal V, Wu Q, Kuřca K. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences[J]. Archives of Toxicology, 2014, 88 (9):1635–1644.
- [24] Taghdisi S, Danesh N, Ramezani M, et al. A new amplified fluorescent aptasensor based on hairpin structure of G-quadruplex oligonucleotideAptamer chimera and silica nanoparticles for sensitive detection of aflatoxin B1 in the grape juice[J]. Food Chemistry, 2018, 268:342–346.
- [25] Bhardwaj H, Sumana G, Marquette C. A label-free ultrasensitive microfluidic surface Plasmon resonance biosensor for Aflatoxin B1 detection using nanoparticles integrated gold chip[J]. Food Chemistry, 2020, 307:1–7.
- [26] Sun C, Liao X, Jia B, et al. Development of a ZnCdS@ZnS quantum dots–based label-free electrochemiluminescence immunosensor for sensitive determination of aflatoxin B1 in lotus seed. Microchim. Acta. 2020, 187.
- [27] Tang L, Huang Y, Lin C, et al. Highly sensitive and selective aflatoxin B1 biosensor based on Exonuclease I-catalyzed target recycling amplification and targeted response aptamer-crosslinked hydrogel using electronic balances as a readout[J]. Talanta, 2020, 214:1–6.
- [29] Eivazzadeh-Keihan, R., Pashazadeh, P., Hejazi, M., et al. Recent advances in Nanomaterial-mediated Bio and immune sensors for detection of aflatoxin in food products[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2017, 87:112–128.
- [30] Ji F, He D, Olaniran AO, et al. Occurrence, toxicity, production and detection of Fusarium mycotoxin: a review[J]. Food Production, Processing and Nutrition, 2019, 6:1-14.
- [31] Bamwrg JR, RImst NV, Strong FM. The structures of toxins from two strains of Fusarium Tricinctum[J]. Pergamon, 1968, 24: 3329-3336.

- [32] Elham A, Tina J. Occurrence and fate of mycotoxins in cereals and cereal-based products: A narrative review of systematic reviews and meta-analyses studies[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2020, 41:68–75.
- [33] Janik E, Ceremuga M, Saluk-Bijak J et al. Biological Toxins as the Potential Tools for Bioterrorism. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20:1181-1199.
- [34] Escrivá L, Font G, Manyes L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: a review. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Biological Research Association*, 2015, 78:185–206.
- [35] You L, Zhao Y, Kuca K et al. Hypoxia, oxidative stress, and immune evasion: a trinity of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON) [J]. *Archives of Toxicology*, 2021, 51: 1379–1394.
- [36] Jiajia Z, Li Y, Wenda W et al. The neurotoxicity of trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON): Current status and future perspectives[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 145:111676.
- [37] Wang C, Wang X, Xiao S et al. T-2 toxin in the diet suppresses growth and induces immunotoxicity in juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 97:593-601.
- [38] Lirui H, Shuo L, Chong Z, et al. The combination of T-2 toxin and acrylamide synergistically induces hepatotoxicity and nephrotoxicity via the activation of oxidative stress and the mitochondrial pathway[J]. *Toxicology*, 2021, 189: 65-72.
- [39] Zhong H, Yu C, Gao R et al. A novel sandwich aptasensor for detecting T-2 toxin based on rGO-TEPA-Au@Pt nanorods with a dual signal amplification strategy[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 144: 111635.
- [40] Liu J, Wang L, Guo X, et al. The role of mitochondria in T-2 toxin-induced human chondrocytes apoptosis[J]. *PLoS ONE*, 2017, 9:10839.
- [41] Fatima Z, Guo P, Huang D, et al. The critical role of p16/Rb pathway in the inhibition of GH3 cell cycle induced by T-2 toxin[J]. *Toxicology*, 2018, 400–401:28–39.
- [42] EFSA. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms[J]. *EFSA J*, 2017, 15:4655.
- [43] EFSA. Panel on contaminants in the food chain (CONTAM); scientific report on human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin[J]. *EFSA Journal*, 2017, 15, 4972.
- [44] 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.
- [45] 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.

- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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 B<sub>1</sub>[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 177:112939.
- [51] Aksa B, GbvsI A, Manuel F, et al. A simple detection platform based on molecularly imprinted polymer for AFB<sub>1</sub> and FB<sub>1</sub> mycotoxins[J]. *Microchemical Journal*, 2021, 171:106730.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] Liu J. The history of monoclonal antibody development-Progress, remaining challenges and future innovations[J]. *Annals of Medicine and Surgery*, 2014, 3:113-116.
- [56] 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.
- [57] Sompunga P, Pruksametan 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.
- [58] 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.
- [59] Markus V, Janne L, Urpo L. Directed antibody-engineering techniques and their applications in food immunoassays[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(2):219-226.
- [60] 任文洁. 抗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 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.

- [61] Chabrol E, Stojko J, Nicolas A, et al. Recombinant VHHs: Production, characterization and affinity[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 589:113491.
- [62] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975,256(5517):495–497.
- [63] Payne W. Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies[J]. *Clinical Microbiology LINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 1988,1(3):313–329.
- [64] Long F, Zhu A, Shi H. Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning[J]. *Sensors*, 2013, 13 (10):3928–13948.
- [65] Adan A, Akizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(2): 163-176
- [66] 陈林, 宋丽. 流式细胞术的发展及在植物研究中的应用[J/OL]. *生物工程学报*.
- [67] Sachi A, Chika Na, Yoichiro T, 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.
- [68] Atsumi S, Chika N, Ayuko S, et al. Rapid and reliable hybridoma screening method that is suitable for production of functional structure-recognizing monoclonal antibody[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021,131(6):696-702.
- [69] Zhang H, Leo L, William R, et al. Novel high-throughput cell-based hybridoma screening methodology using the Celigo Image Cytometer[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2017,447:23–30
- [70] Evans K, Albanetti T, Venkat R, et al. Assurance of monoclonality in one round of cloning through cell sorting for single cell deposition coupled with high resolution cell imaging[J]. *Biotechnology Progress*, 2015, 31(5):1172–1178.
- [71] Akiko K, Masumi I, Tomoaki N, et al. Cell Surface-Fluorescence Immunosorbent Assay for Real-Time Detection of Hybridomas with Efficient Antibody Secretion at the Single-Cell Level[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85:1753–1759
- [72] 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*, 2021,1163:338493
- [73] Li X, Bian H, Yu S, et al. A Rapid Method for Antigen-Specific Hybridoma Clone Isolation[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90:2224–2229
- [74] Yan J, Bin P, Che H, et al. On-site differential diagnostic detection of HP-PRRSV and C-PRRSV using EuNPs-mAb fluorescent probe-based immunoassay[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413:5799–5810.

- [75] Bian H, Xu F, Jia Y, et al. A new immunochromatographic assay for on-site detection of porcine epidemic diarrhea virus based on monoclonal antibodies prepared by using cell surface fluorescence immunosorbent assay[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15:32
- [76] Zhang D, Li P, Zhang Q, et al. Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 636(1):63-69
- [77] 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
- [78] 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.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] Wiley P, Ma B, Zhang K, et al. Rapid communications in mass spectrometry[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2004, 8:603-606.
- [82] 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.
- [83] Englebienne, P., Van Hoonacker, A., Verhas, M.. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences[J]. Spectroscopy-an International Journal, 2003.17:255-273.
- [84] Nguyen HH, Park J, Kang S, et al. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications [J]. Sensors, 2015, 15(5):10481-10510.
- [85] Huang Y, Zhang L, Zhang H, et al. Development of a portable SPR sensor for nucleic acid detection [J]. Micromachines, 2020, 11(5):526.
- [86] Bdcikova M, Slaby J, Špringer T, et al. Advances in surface plasmon resonance imaging and microscopy and their biological applications [J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2019, 12(1): 151-176.
- [87] Wang DS, Fan SK. Microfluidic surface plasmon resonance sensors: From principles to point-of-care applications [J]. Sensors, 2016, 16(8):1175.
- [88] Liu C, Zeng X, An Z, et al. Sensitive detection of exosomal proteins via a compact surface plasmon resonance biosensor for cancer diagnosis [J]. ACS Sensors, 2018, 3(8):1471-1479.
- [88] Paliwal A, Sharma A, Tomar M, et al. Room temperature detection of NO<sub>2</sub> gas using optical sensor based on surface plasmon resonance technique[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2015, 216:497-503.
- [90] Wei X, Yin M, Zhang L, et al. Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor for detection of mycotoxins:

- A review[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2022, 510:113349
- [91] Mahmoudpour M, Dolatabadi J.E.N, Torbati M, et al. Nanomaterials and new biorecognition molecules based surface plasmon resonance biosensors for mycotoxin detection[J]. *Bioscience and Bioengineering*, 2019,143:111603.
- [92] Hema B, Gajjala S, Christophe A.M. A label-free ultrasensitive microfluidic surface Plasmon resonance biosensor for Aflatoxin B1 detection using nanoparticles integrated gold chip[J]. *Food Chemistry*, 2020, 307:125530
- [93] Lei H, Zhu S, Liu C, et al. Constructing the Au nanoparticle multimer on optical fiber end face to enhance the signal of localized surface plasmon resonance biosensors: A case study for deoxynivalenol detection.
- [94] Felix F, Angnes L, Electrochemical immunosensors-A powerful tool for analytical applications[J]. *Bioscience and Bioengineering*, 2018,102:470-478.
- [95] Wen W, Yan X, Zhu C, et al. Recent advances in electrochemical immunosensors[J]. *Analytical Chemistry*, 2017,89:138-156
- [96] Wang N, Liu Q, Hu X, et al. Electrochemical immunosensor based on AuNPs/Zn/Ni-ZIF-8-800@graphene for rapid detection of aflatoxin B1 in peanut oil[J]. *Analytical Biochemistry*, 2022,650:114710
- [97] Yuan Z, Dai H, Liu X, et al. An electrochemical immunosensor based on prussian blue@zeolitic imidazolate framework-8 nanocomposites probe for the detection of deoxynivalenol in grain products[J]. *Food Chemistry*, 2023, 405:134842
- [98] Jiang H, Wang X. Progress of metal nanoclusters-based electro-chemiluminescent analysis[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017,45:1776-1785.
- [99] Miao W. Electrogenated chemiluminescence and its biorelated applications[J]. *Chemical Reviews*, 2008,108:2506-2553.
- [100] Han Y, Fang Y, Ding X, et al. A simple and effective flexible electrochemiluminescence sensor for lidocaine detection[J]. *Electrochemistry Communications*, 2020,116:106760.
- [101] Xue J, Yang L, Du Y, et al. Electrochemiluminescence sensing platform based on functionalized poly-(styrene-co-maleicanhydride) nanocrystals and iron doped hydroxyapatite for CYFRA 21-1 immunoassay[J]. *Sensors and Actuators: B Chemical*, 2020, 321:128454.
- [102] Lv X, Li Y, Yan T, et al. Electrochemiluminescence modified electrodes based on RuSi@Ru(bpy)<sub>3</sub>2p loaded with gold functioned nanoporous CO/CO<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for detection of mycotoxin deoxynivalenol[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 70:8-33
- [103] Lv X, Tan F, Miao T, et al. Potential-resolved differential electrochemiluminescence immunosensor



- based on novel designed IBPHF for self-correctable detection of AFB<sub>1</sub>[J]. *Microchemical Journal*, 2022, 181:107845
- [104] Cruz H, Rosa C, Oliva A, Immunosensors for diagnostic applications[J]. *Parasitology Research*, 2002, 88:S4–S7.
- [105] Pei X, Zhang B, Tang J, et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: a review[J]. *Analytical Chemical Acta*, 2013, 758:1–18.
- [106] Syed A. Hussain, An introduction to fluorescence resonance energy transfer (FRET),
- [107] Anfossi, L., Calderara, M., Baggiani, C., et al. Development and application of a quantitative lateral flow immunoassay for fumonisin in maize[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 682(1–2):104–109
- [108] Liu, D, Huang, X, Wang, Z, et al. Goldnanoparticle-based activatable probe for sensing ultralow levels of prostate-specific antigen[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(6):5568–5576.
- [109] Mak A.C, Osterfeld S.J, Yu H, et al. Sensitive giant magnetoresistive-based immunoassay for multiplex mycotoxin detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25 (7):1635–1639.
- [110] Zhan S, Huang X, Chen R, et al. Novel fluorescent ELISA for the sensitive detection of zearalenone based on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive quantum dots for signal transduction[J]. *Talanta*, 2016, 158:51–56.
- [111] Liu L, Huang Q, Tanveer Z.I, et al. “Turn off-on” fluorescent sensor based on quantum dots and self-assembled porphyrin for rapid detection of ochratoxin A[J]. *Sensors and Actuators: B Chemical*, 2020, 302.
- [112] Bi X, Luo L, Li L, et al. A FRET-based aptasensor for ochratoxin A detection using graphitic carbon nitride quantum dots and CoOOH nanosheets as donor-acceptor pair[J]. *Talanta*, 2020, 218:121159.
- [113] Hu J, Liu M.H, Zhang C.Y. Integration of isothermal amplification with quantum dot-based fluorescence resonance energy transfer for simultaneous detection of multiple microRNAs[J]. *Chemical Science*, 2018, 9 (18):4258–4267.
- [114] Zhou J, Liu Z, Yang Q, et al. Multiple fluorescence immunoassay for the simultaneous detection of Zearalenone and Ochratoxin A[J]. *Analytical Biochemistry*, 2021, 628:114288.
- [115] Checovich WJ, Bolger RE, Burke T. Fluorescence polarization a new tool for cell and molecular biology[J]. *Nature*, 1995, 375:254–256.
- [116] Jameson DM, Ross JA. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110:2685–2708.
- [117] Nasir M, Jolley M, Comb C. High[J]. *Throughput Screen*. 1999, 2:177–190
- [118] Smith D, Eremin S. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391:1499–1507.
- [119] Vincenzo L, Michelangelo P, Stefania V, et al. Fluorescence Polarization Immunoassay for Rapid,

- Accurate and Sensitive Determination of Ochratoxin A in Wheat[J]. *Food Analytical Methods*, 2014, 7:298–307.
- [120] Li C, Wen K, Mi T, et al. A universal multi-wavelength fluorescence polarization immunoassay for multiplexed detection of mycotoxins in maize[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 79:258–265.
- [121] Engvall E, Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin[J]. *Immunochemistry*, 1971, 9(9):871–874.
- [122] Yan T, Zhu J, Li Y, et al. Development of a biotinylated nanobody for sensitive detection of aflatoxin B1 in cereal via ELISA[J]. *Talanta*, 2022, 239:123125
- [123] Dai H, Huang Z, Liu X, et al. Colorimetric ELISA based on urease catalysis curcumin as a ratiometric indicator for the sensitive determination of aflatoxin B1 in grain products[J]. *Talanta*, 2022, 246:123495
- [124] Bao K, Liu X, Xu Q, et al. Nanobody multimerization strategy to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of ochratoxin A in coffee samples[J]. *Food Control*, 2021, 127:108167
- [125] Zha S, Hua Ji, 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*, 2021, 342:128327
- [126] Charernchai S, Chikae M, Phan T.T, et al. Automated paper-based femtogram sensing device for competitive enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B1 using submicroliter samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94 (12):099–5105.
- [127] Hu S, Dou X, Zhang L, et al. Rapid detection of aflatoxin B1 in medicinal materials of radix and rhizome by gold immunochromatographic assay[J]. *Toxicon*, 2018, 150:144–150.
- [128] Nardo F, Anfossi L, Giovannoli C, et al. A fluorescent immunochromatographic strip test using quantum dots for fumonisins detection[J]. *Talanta*, 2016, 150:463–468.
- [129] Chen Y, Lu H, Shi H, et al. An improved up-conversion nanoparticles-based immunochromatographic assay for rapid detection of zearalenone in cereals[J]. *Food Chemistry*, 2023, 412:135555.
- [130] Zheng S, Wu T, Li J, et al. Difunctional immunochromatographic assay based on magnetic quantum dot for ultrasensitive and simultaneous detection of multiple mycotoxins in foods[J]. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2022, 359:131528
- [131] Wang Q, Li S, Zhang Y, et al. A highly sensitive photothermal immunochromatographic sensor for detection of aflatoxin B1 based on Cu<sub>2</sub>-xSe-Au nanoparticles[J]. *Food Chemistry*, 2023, 401:134065.
- [132] 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.
- [133] Wang L, Jin H, Wei M, et al. A DNAzyme-assisted triple-amplified electrochemical aptasensor for ultra-sensitive detection of T-2 toxin[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 328:129063.
- [134] Hossain M, McCormick S, Maragos C. An Imaging Surface Plasmon Resonance Biosensor Assay for the Detection of T-2 Toxin and Masked T-2 Toxin-3-Glucoside in Wheat[J]. *Toxins*, 2018, 10:119.

- [135] Qie Z, Yan W, Gao Z et al. Ovalbumin antibody-based fluorometric immunochromatographic lateral flow assay using CdSe/ZnS quantum dot beads as label for determination of T-2 toxin[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186:816.
- [136] Urusov A, Gubaidullina M, Petrakova A, et al. A new kind of highly sensitive competitive lateral flow immunoassay displaying direct analyte-signal dependence. Application to the determination of the mycotoxin deoxynivalenol[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185:29.