

## 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 检测技术研究

谢琿 章先 王歆 凡鹏程 时玉菲 方维焕\*

(浙江大学动物科学学院 浙江省动物预防医学重点实验室 浙江 杭州 310058)

**摘要:**【目的】制备黄曲霉毒素 B1 单克隆(AFB<sub>1</sub>)抗体, 建立间接竞争 ELISA 检测方法用于污染样品中 AFB<sub>1</sub> 的检测。【方法】用碳二亚胺法制备黄曲霉毒素 B1 的完全抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 后免疫 Balb/c 小鼠, 经过细胞融合和克隆化筛选获得抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。采用体内诱生腹水法制备抗体, 通过间接 ELISA 方法分别测定抗体亚类和效价。经优化实验条件, 建立稳定的间接竞争 ELISA 检测方法, 并用于检测饲料样品中的黄曲霉毒素 B1。【结果】获得 4 株稳定分泌抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 选择 3B9 细胞株制备抗体, 测定抗体亚类为 IgG1, 效价为 1:204 800, 与黄曲霉毒素 B2、G1、G2 和 M1 的交叉反应率分别为 2.2%、33.9%、1.8% 和 4.1%, 与赭曲霉毒素 A、伏马毒素和玉米赤霉烯酮几乎不存在交叉反应。以此单抗构建了 AFB<sub>1</sub> 间接竞争 ELISA 检测方法, 在 AFB<sub>1</sub> 浓度为 1.04–25.00 μg/L 范围内呈线性( $R^2=0.993$ ), 检测限为 1.04 μg/L, 半数抑制率( $IC_{50}$ )为 6.03 μg/L, 平均加标回收率在线性范围内可达 85%–120%, 变异系数均小于 10%。【结论】通过饲料样品检测证实, 该方法与进口 ELISA 试剂盒检测一致性良好, 可用于实际样品中黄曲霉毒素 B1 的快速筛检。

**关键词:** 黄曲霉毒素 B1, 单克隆抗体, 间接竞争 ELISA

## Preparation of anti-aflatoxin B1 monoclonal antibodies and its use in an indirect competitive ELISA for aflatoxin B1

XIE Hui ZHANG Xian WANG Xin FAN Peng-Cheng SHI Yu-Fei FANG Wei-Huan\*

(Zhejiang Province Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

**Abstract:** [Objective] Prepare anti-aflatoxin B1 monoclonal antibodies to develop an indirect competitive ELISA (ic-ELISA) applied to detect AFB<sub>1</sub> in samples. [Methods] The aflatoxin B1 (AFB<sub>1</sub>) was conjugated with bovine serum albumin by the carbodiimide method and used to immunize Balb/c mice. Hybridoma cell strains could be obtained by clonal screening and monoclonal antibodies (mAb) could be obtained by inducing ascites *in vivo*. The subclass and titer of mAb were identified by indirect ELISA. After optimizing experimental conditions, a stable ic-ELISA would be developed and applied to detect AFB<sub>1</sub> in feed samples. [Results] Four hybridoma cell strains stably secreting specific

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA101602)

\*通讯作者: Tel: 86-571-88982242; 信箱: whfang@zju.edu.cn

收稿日期: 2014-12-24; 接受日期: 2015-02-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-11

antibodies to AFB<sub>1</sub> were obtained. One of the cell strains 3B9 was chosen to prepare mAb, The mAb belongs to IgG1 with a titer of 1: 204 800. Its cross-reactivity with aflatoxins B2, G1, G2 and M1 was 2.2%, 33.9%, 1.8% and 4.1% respectively. It did not react with ochratoxin A, fumonisin and zearalenone. An indirect-competitive ELISA (ic-ELISA) coated with the mAb had a detection range of 1.04–25.00 µg/L with the detection limit at 1.04 µg/L and the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) at 6.03 µg/L. The average recovery rate ranged from 85% to 120% with the variation coefficient less than 10%. **[Conclusion]** The ic-ELISA has good consistency compared with a commercial kit. We suppose that the ic-ELISA could be used to detect AFB<sub>1</sub> from food or feed samples.

**Keywords:** Aflatoxin B1, Monoclonal antibody, Indirect competitive ELISA

黄曲霉毒素是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、特曲霉(*Aspergillus nomius*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等产生的次生代谢产物, 主要分为 B1、B2、G1 和 G2, 其中以黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB<sub>1</sub>)污染最为严重, 其具有极强的毒性、致癌性以及自然界存在的普遍性, 可污染多种粮食作物, 严重威胁着食品安全和消费者的健康<sup>[1-3]</sup>。许多国家规定了 AFB<sub>1</sub> 在各类粮食、食品和饲料中的限量标准, 研究准确、快速、灵敏的 AFB<sub>1</sub> 检测方法具有重要意义<sup>[4]</sup>。传统的高效液相色谱法(HPLC)虽具有很高灵敏度和准确性, 但仪器昂贵, 并要求操作人员技术熟练, 使其难以满足基层相关部门快速检测 AFB<sub>1</sub> 的要求。酶联免疫吸附测定法(ELISA)具有特异、灵敏、快速、耗时短等优点。

本研究旨在制备特异性 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体, 建立间接竞争 ELISA (ic-ELISA)检测 AFB<sub>1</sub> 的方法, 用于实际样品的初筛。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器:** NanoDrop 1000 蛋白核酸微量紫外分光光度计, 购自美国 Thermo Fisher 公司; SpectraMax M5 酶标仪, 购自美国 Molecular Device 公司; 96 孔 ELISA 酶标板、细胞培养板和细胞培养皿购自美国 Corning 公司。

**1.1.2 主要试剂:** 黄曲霉毒素 B1 (AFB<sub>1</sub>)、黄曲霉毒素 B1 多克隆抗体、牛血清白蛋白(BSA)、聚乙二醇 1450 (PEG-1450)、弗氏完全佐剂(FCA)和不完全佐剂(FIA)、N、N-二环己基碳二亚胺(DCC), 均购

自 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基和次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷(HAT)和次黄嘌呤胸腺嘧啶脱氧核苷(HT), 均购自 GIBCO 公司; 新生牛血清, 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG, 均购自天津三箭生物技术有限公司; TMB 显色液, 购自北京泰天河生物技术有限公司; 黄曲霉毒素 B1 ELISA 检测试剂盒, 购自德国拜发公司。

**1.1.3 实验动物:** 5 周龄 Balb/c 雌性小鼠购自浙江省中医学实验动物中心; SP2/0 细胞由本实验室保存。

### 1.2 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备

**1.2.1 AFB<sub>1</sub> 完全抗原的制备及鉴定:** 参考文献[5]的方法合成黄曲霉毒素 B1 肟化物(AFB<sub>1</sub>O), 经质谱鉴定正确。然后用碳二亚胺法(DCC 法)<sup>[5-6]</sup>将 AFB<sub>1</sub>O 与载体蛋白 BSA 进行偶联, 偶联产物用 PBS 溶液 (0.01 mol/L, pH 7.2)于 4 °C 条件下透析至液体颜色澄清, 3 000 r/min 离心 10 min 去沉淀, 上清储存于 -20 °C 备用。

用紫外分光光度计分别扫描载体蛋白 BSA 溶液(1 g/L)、AFB<sub>1</sub> 标准品溶液和偶联产物(在 200–650 nm 波长范围内), 根据各物质吸收曲线在偶联前后波形及吸收峰的变化<sup>[7]</sup>, 判断偶联是否成功。然后利用紫外分光光度计分别测定浓度为 10.0、7.5、5.0、2.5、1.25、0.625、0.312 5 mg/L 的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液的吸光度。以各浓度在 363 nm (AFB<sub>1</sub> 在 363 nm 处存在特征吸收峰)处的吸光度值作为横坐标、对应的 AFB<sub>1</sub> 浓度作为纵坐标构建标准曲线, 并求得回归方程。测定偶联产物在 363 nm 处的

吸光度值, 代入上述回归方程可得半抗原 AFB<sub>1</sub> 的浓度。测定偶联产物 AFB<sub>1</sub>-BSA 的蛋白浓度并经过单位换算可求得偶联比<sup>[8-10]</sup>。

取偶联产物 AFB<sub>1</sub>-BSA 作为抗原包被于酶标板, 同时包被 BSA 作为阴性对照、PBS 作为空白对照, 以黄曲霉毒素 B1 多克隆抗体作为一抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗进行间接 ELISA 鉴定偶联效果。

**1.2.2 动物免疫:** 将完全抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 与等量弗氏完全佐剂混合, 乳化后对 8 周龄 Balb/c 雌性小鼠进行皮下多点注射, 200 μg/只。二、三免时改用弗氏不完全佐剂进行乳化, 皮下多点免疫, 100 μg/只, 每隔两周免疫一次。三免两周后眼眶采血测定抗体效价。细胞融合前 3 天腹腔注射抗原 AFB<sub>1</sub>-BSA 进行加强免疫, 100 μg/只。

**1.2.3 细胞融合及筛选:** 取血清抗体效价较高的小鼠的脾细胞与瘤细胞进行细胞融合, 先后用含 HAT 和 HT 的细胞培养基对融合后的细胞进行筛选。当 96 孔细胞板内长出细胞集落并占据 30% 板内面积时, 取杂交瘤细胞上清进行间接 ELISA 检测, 以 P/N>2.1 为阳性筛选出阳性杂交瘤细胞。经过至少 4 次有限稀释和克隆筛选获得了稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 扩大培养并冻存。

**1.2.4 腹水的制备及纯化:** 选择稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株采用小鼠体内诱生腹水的方法制备单克隆抗体。8-10 周龄的 Balb/c 雌性小鼠一周前用无菌液体石蜡预处理, 每只腹腔注射 0.5 mL。当杂交瘤细胞处于对数生长期时, 将其注射至小鼠腹腔内, 7 d 后采集腹水。用 Protien A/G 抗体纯化柱纯化离心处理过的腹水, 利用 SDS-PAGE 对纯化效果进行鉴定。

### 1.3 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的鉴定

**1.3.1 单克隆抗体效价的测定:** 采用间接 ELISA 方法测定杂交瘤细胞分泌抗体的效价。用适量浓度的 AFB<sub>1</sub>-BSA 进行包被, 将腹水从 1:100 开始倍比稀释作为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 选择阳性的最高稀释度作为该细胞株分泌腹水的

效价。

**1.3.2 单克隆抗体亚型的鉴定:** 采用间接 ELISA 的方法, 用针对不同亚型抗体的酶标二抗对单克隆抗体的亚型进行鉴定。

**1.3.3 单克隆抗体亲和力常数的测定:** 参考 Batty 等<sup>[11-12]</sup>所述方法测定单克隆抗体的亲和力常数。用质量浓度分别为 2.5 mg/L 和 1.2 mg/L 的 AFB<sub>1</sub>-BSA 进行包被, 倍比稀释已知浓度的单克隆抗体进行间接 ELISA。以单抗质量浓度为横坐标、OD<sub>450</sub> 为纵坐标, 分别绘出间接 ELISA 反应曲线。将每条曲线平坦段的 OD<sub>450</sub> 看作 100%, 计算出 50% OD<sub>450</sub> 处所对应的单抗质量浓度, 根据以下公式计算单克隆抗体亲和力常数:

$$K_a = (n-1)/2 (n \times A_{b1} - A_{b2}), n = A_{g2}/A_{g1}$$

式中:  $A_{g1}$ 、 $A_{g2}$  为两个不同的抗原包被质量浓度(mg/L);  $A_{b1}$ 、 $A_{b2}$  为两个包被质量浓度对应的抗体质量浓度(mg/L)<sup>[13-14]</sup>。

### 1.4 间接竞争 ELISA 检测方法的建立

**1.4.1 标准曲线的绘制:** 采用间接 ELISA 棋盘阵法确定最佳抗原包被浓度及抗体稀释倍数。抗原包被浓度为 0.156、0.312 5、0.625、1.25 和 2.5 mg/L, 抗体从 1:200 开始倍比稀释至 1:409 600, 选取 OD<sub>450</sub> 最接近 1.0 的浓度为最佳。然后用间接竞争 ELISA 方法确定最佳竞争反应时间和竞争反应模式。

根据优化的实验条件, 竞争抗原的浓度从 0.1-400 μg/L 开始倍比稀释进行间接竞争 ELISA。以 AFB<sub>1</sub> 的浓度对数为横坐标、竞争抑制率为纵坐标构建间接竞争 ELISA 标准曲线, 并求得曲线方程和相关系数。

**1.4.2 单克隆抗体的特异性鉴定:** 选择黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1, 赭曲霉毒素 A (OTA), 伏马毒素 (FB1) 和玉米赤霉烯酮 (ZEN) 分别作为竞争抗原, 选取最佳抗原包被浓度和抗体浓度进行间接竞争 ELISA 检测单克隆抗体的特异性。

**1.4.3 加标回收检测:** 参照文献<sup>[15-18]</sup>所述方法并进行优化。对玉米样品进行前处理后<sup>[19]</sup>称取 5 g,

分别加入一定量的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液,使其浓度分别为 3、9、15 和 30 ng/g,每个浓度做 3 个平行,再加入 15 mL 甲醇-水溶液(甲醇:水=1:1,含 4% NaCl),瓶口水封后强力振荡 20 min,用快速定性滤纸过滤,分别取 50  $\mu$ L 滤液进行检测。实测浓度除以添加的浓度即为回收率。

**1.4.4 样品检测应用:**用进口 ELISA 试剂盒和自建的 ic-ELISA 方法分别对 30 份饲料样品进行初筛,比对检测结果,判断该检测方法与 ELISA 试剂盒检测结果的相关性。

## 2 结果

### 2.1 黄曲霉毒素 B1 完全抗原的鉴定

**2.1.1 偶联产物紫外扫描鉴定:**用紫外分光光度计分别扫描 BSA 蛋白溶液、AFB<sub>1</sub> 标准品溶液和偶联产物,发现 AFB<sub>1</sub> 在 363 nm 处存在特征吸收峰,载体蛋白 BSA 在 278 nm 处存在特征吸收峰,偶联产物集合了 AFB<sub>1</sub> 和 BSA 的吸收峰特征,在约 278 nm 和 363 nm 处出现特征吸收峰,说明偶联成功。

**2.1.2 AFB<sub>1</sub>-BSA 偶联比:**测定不同浓度的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液在 363 nm 处的吸光度值,构建标准曲线,得到标准方程:  $y=184.200 0x+0.121 1$ ,其中  $R^2=0.998$ 。用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测得偶联产物的浓度为 2.5 g/L,通过计算可得偶联比为 8.4:1-9.3:1。

**2.1.3 偶联产物的 ELISA 鉴定:**用间接 ELISA 鉴定载体蛋白与半抗原 AFB<sub>1</sub> 的偶联效果,偶联产物的 OD<sub>450</sub> 与阴性对照的比值远大于 2.1,确定偶联成功(图 1)。

### 2.2 小鼠血清抗体效价的测定

小鼠三免后采集血清,利用间接 ELISA 的方法测定效价,发现 3 只小鼠血清效价均可达 1:10 000 以上,选取 1 号小鼠进行细胞融合,结果见图 2。

### 2.3 单克隆杂交瘤细胞株的建立

细胞融合成功后,用间接 ELISA 检测细胞上清,经过 4 次有限稀释筛选单克隆细胞株,共获得 4 株稳定分泌抗 AFB<sub>1</sub> 的杂交瘤细胞株 1D6、2D9、

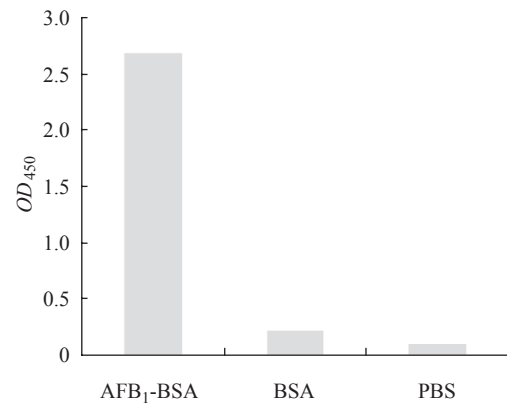


图 1 偶联产物的 ELISA 鉴定

Figure 1 Identification of the conjugated antigens

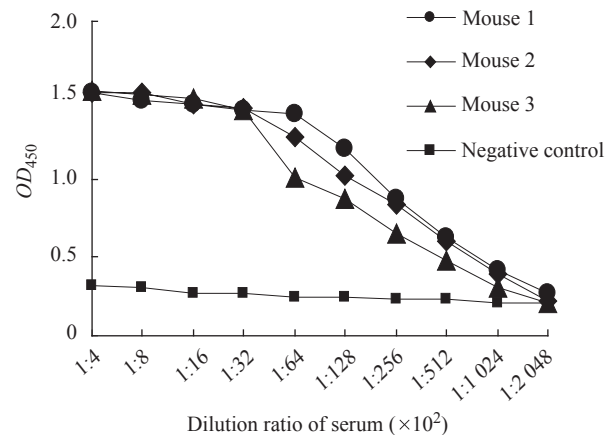


图 2 小鼠三免后血清效价测定

Figure 2 Titer of third immunization serum of Balb/c mouse

3B9 和 1H4,经反复传代、冻存和复苏,4 株杂交瘤细胞株分泌能力和抗体效价稳定。

### 2.4 腹水制备与纯化

选取 3B9 制备小鼠腹水,用 Protien A/G 抗体纯化柱进行纯化,洗脱后的抗体在泳道中仅出现两条带,分子量在 50 kD 和 25 kD 左右,与抗体的重、轻链分子量大小一致,其他条带均消失,说明腹水纯化效果良好。

### 2.5 单克隆抗体的鉴定

**2.5.1 单克隆抗体的亚类鉴定:**单抗亚型的间接 ELISA 鉴定结果如图 3 所示,3B9 的亚类为 IgG1。

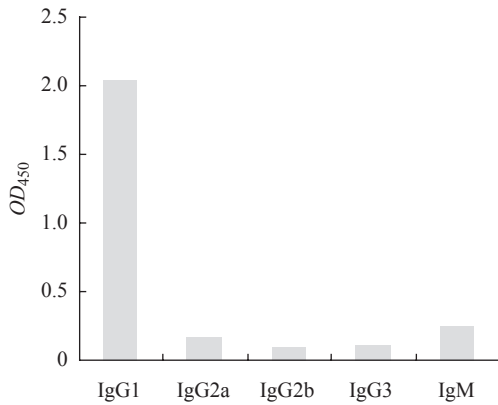


图 3 单克隆抗体亚类测定  
Figure 3 Subclass of anti-AFB<sub>1</sub> mAb

2.5.2 单克隆抗体的亲和力测定: 用间接 ELISA 方法测定单克隆抗体 3B9 的腹水效价为 1:204 800。如图 4 所示, 当包被浓度为 2.50 mg/L 及 1.25 mg/L 时, 抗原与抗体结合达到 50%饱和所需单抗质量浓度均为 0.034 2 mg/L, 代入公式计算得  $K_a$  约为  $2.2 \times 10^9$  L/mol, 一般认为亲和常数为  $10^7$ – $10^{12}$  L/mol 的抗体亲和力高<sup>[20]</sup>, 所以获得的单克隆抗体具有较高的亲和力。

2.6 间接竞争 ELISA 检测方法的构建

2.6.1 标准曲线绘制: 按照 1.3.1 的方法确定了间接竞争 ELISA 的反应条件: 4 °C 包被过夜; 抗原最佳包被浓度为 0.312 5 mg/L, 单克隆抗体最佳稀释倍数为 1:51 200; 5%脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h; 选取

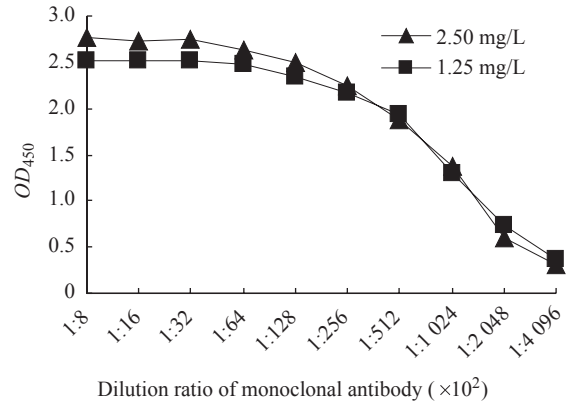


图 4 单克隆抗体亲和常数测定曲线  
Figure 4 Affinity constant ( $K_a$ ) curve of anti-AFB<sub>1</sub> mAb

板内竞争反应模式, 37 °C 竞争反应 45 min。

以竞争抗原 AFB<sub>1</sub> 标准品的浓度为横坐标、竞争抑制率为纵坐标绘制标准曲线(图 5A、5B)。分析曲线可知, 当竞争抗原 AFB<sub>1</sub> 溶液的浓度在 1.04–25.00  $\mu$ g/L 时有较好的线性关系, 得到的标准方程为:  $y=53.2610x+8.0136$ , 其中  $R^2$  值为 0.993 1, 检测限为 1.04  $\mu$ g/L, 半数抑制率( $IC_{50}$ )为 6.03  $\mu$ g/L。

2.6.2 单克隆抗体的特异性测定: 通过间接竞争 ELISA 检测, 结果显示该单克隆抗体对黄曲霉毒素 G1 的交叉反应率为 33.9%, 对其他 AF 类似物的交叉反应率小于 5%, 与赭曲霉毒素 A、伏马毒素和玉米赤霉烯酮的交叉反应率均小于 0.6%, 说明制备的 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的特异性良好(表 1)。

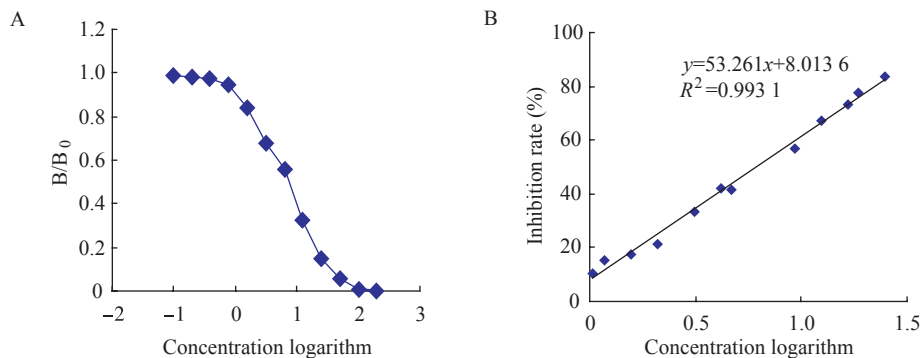


图 5 AFB<sub>1</sub> 间接竞争 ELISA 竞争抑制曲线(A)和抑制率线性回归分析(B)  
Figure 5 Competitive inhibition (A) of AFB<sub>1</sub> in ic-ELISA and linear analysis of percent inhibition against AFB<sub>1</sub> concentration (B)

表 1 单克隆抗体特异性鉴定

Table 1 Analysis of the specificity of monoclonal antibody

竞争物 Competiter	半数抑制率 $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	交叉反应性 Cross reactivity (%)
AFB <sub>1</sub>	6.03	100
AFB <sub>2</sub>	269.20	2.2
AFG <sub>1</sub>	17.80	33.9
AFG <sub>2</sub>	331.30	1.8
AFM <sub>1</sub>	148.00	4.1
OTA	>1 000	<0.6
FB1	>1 000	<0.6
ZEN	>1 000	<0.6

### 2.7 加标回收率

在样品中加入不同浓度的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液并进行提取,通过间接竞争 ELISA 进行检测,平均加标回收率在 85%–120%之间,并且变异系数均小于 10%,表明该检测方法可以用于实际样品的检测(表 2)。

### 2.8 样品检测

用进口 ELISA 试剂盒和自建 ic-ELISA 方法分

别对 30 份饲料样品进行初筛,其中进口 ELISA 试剂盒共筛出 13 份污染样品,ic-ELISA 方法共筛出 11 份污染样品,ic-ELISA 方法未筛出的样品经进口 ELISA 试剂盒检测毒素含量分别为 0.32  $\mu\text{g/kg}$  和 0.45  $\mu\text{g/kg}$ ,已低于自建方法的检测范围,因此二者符合率为 84.6%,ic-ELISA 方法在其线性范围内与进口 ELISA 试剂盒检测结果一致性良好(表 3)。

## 3 讨论

AFB<sub>1</sub> 是一种小分子真菌毒素,属于半抗原。本研究选取 BSA 作为载体蛋白,主要是因为理化性质稳定,在有机溶剂存在的情况下仍然可与半抗原偶联,并且偶联产物可溶性好<sup>[21]</sup>。AFB<sub>1</sub> 肟化物与载体蛋白进行偶联通常采用碳二亚胺法,可分为二环己基碳二亚胺法(DCC 法)和二甲基丙基碳二亚胺法(EDC 法),其中 DCC 法需在有机相中进行,可减少 BSA 蛋白分子发生自身交联反应形成沉淀,使 BSA 与半抗原发生偶联的效率较高<sup>[22-23]</sup>。通常认为每个 BSA 蛋白分子上连接 5–20 个半抗原为宜,以血清蛋白为载体,偶联比应以 10 左右最佳<sup>[24]</sup>。

表 2 样品加标回收检测

Table 2 Recoveries of AFB1 spiked samples

加标浓度 Added concentration ( $\mu\text{g/kg}$ )	回收率 Recovery (%)	标准差 Standard deviation (%)	变异系数 Coefficient of variation (%)
3	108.0	3.24	6.97
9	95.7	3.28	8.06
15	93.8	1.65	4.37
30	87.1	2.64	7.71

表 3 两种方法对 30 份饲料样品的检测结果比较

Table 3 Comparison of screening results of 30 feed samples detected by two different methods

	样品总数 Samples quantity	阳性样品数 Positive quantity	阳性率 Positive rate (%)
ELISA 试剂盒 ELISA kit	30	13	43.3
自建 ic-ELISA ic-ELISA	30	11	36.7



本研究获得的完全抗原的偶联比为 8.4:1-9.3:1, ELISA 和紫外鉴定均为阳性, 所以可认为获得了较好偶联效果的完全抗原, 这是获得特异性单抗的前提。

在用 ELISA 筛选杂交瘤细胞时, 由于 AFB<sub>1</sub> 分子量小, 载体蛋白 BSA 本身抗原表位多, 细胞分泌的抗体将大部分针对 BSA 自身的表位, 所以必须同时包被 BSA 作为阴性对照, 只有细胞上清与 BSA 不反应, 与 AFB<sub>1</sub>-BSA 反应强烈, 才能确定该细胞株为阳性, 并进行扩大培养。利用该方法, 共获得了 4 株分泌 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1D6、2D9、3B9、1H4。由于 AFB<sub>1</sub> 的分子量较小, 4 株单克隆抗体针对的抗原表位相近, 因此选取细胞状态最佳的 3B9 制备小鼠腹水, 纯化后测定该单克隆抗体的亲和常数 $2.2 \times 10^9$  L/mol, 属于高亲和力抗体, 这是构建灵敏的 ic-ELISA 检测方法的关键。

我国现行规定的 AFB<sub>1</sub> 在玉米、花生及其制品的限量标准为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、在植物油脂(花生油、玉米油除外)的限量标准为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、在小麦及其他谷物的限量标准为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、在熟制坚果及籽类(花生及其制品除外)的限量标准为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[25]</sup>。本研究用获得的高亲和力抗 AFB<sub>1</sub> 的单抗 3B9 构建的 ic-ELISA 的检测限为 1.04  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 人工样品加标回收试验中最低能检出 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 AFB<sub>1</sub>, 平均加标回收率为 85%-120%, 检测限低于食品中的 AFB<sub>1</sub> 限量指标(特殊膳食用食品除外)。同时, 用商品化进口 ELISA 试剂盒和自建方法分别对同一批饲料样品进行检测。由于自建方法与进口 ELISA 试剂盒所用抗原、抗体不同, 因此二者的检测线性范围、检测限和回收率存在差异, 本研究自建方法与进口 ELISA 试剂盒的初筛符合率为 84.6%, 但在自建方法的检测线性范围内与进口 ELISA 试剂盒的符合率可达 100%, 提示本试验建立的 ic-ELISA 可以用于 AFB<sub>1</sub> 污染的大批量样品初筛。

## 参 考 文 献

- [1] Deiner UL, Cole RJ, Sanders TH, et al. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1987, 25: 249-270
- [2] Cho SH, Lee CH, Jang MR, et al. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea[J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1283-1288
- [3] Uzma M, Maqbool A, Anwar UH, et al. Determination of aflatoxin-B1 in poultry feed and its components employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. Toxicological and Environmental Chemistry, 2004, 86(4): 213-218
- [4] Li WX, Sun J, Dong XL, et al. Comparison and analysis between new revised Chinese national standard of mycotoxins new CAC maximum standards[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2011(23): 41-43 (in Chinese)  
李为喜, 孙娟, 董晓丽, 等. 新修订真菌毒素国家标准与 CAC 最新限量标准的对比与分析[J]. 现代农业科技, 2011(23): 41-43
- [5] Jiang GM. Preparation and preliminary application of the monoclonal antibodies against AFB<sub>1</sub>[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2007 (in Chinese)  
蒋广明. 黄曲霉毒素 B1 单抗的制备及初步应用[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2007
- [6] Sun XR, Pei SC, Liu JP, et al. Preparation of immunoaffinity column for anti-AFM1[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(3): 306-309 (in Chinese)  
孙兴荣, 裴世春, 柳家鹏, 等. 抗黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱的制备[J]. 现代食品科技, 2011, 27(3): 306-309
- [7] Wu XR, Yang XJ, Zhao SQ, et al. Synthesis and identification of aflatoxin B1 artificial antigen[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(4): 796-799 (in Chinese)  
伍鑫茹, 杨雪娇, 赵肃清, 等. 黄曲霉毒素 B1 人工抗原的合成及鉴定[J]. 现代食品科技, 2013, 29(4): 796-799
- [8] Lü HT, Le JC, Chen CS. Research of determination of coupling rate of small molecule hapten-Clenbuterol Hydrochloride[J]. Feed Industry Magazine, 2005, 26(3): 57-59 (in Chinese)  
吕会田, 乐加昌, 陈存社. 克伦特罗小分子半抗原偶联率的测定方法研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(3): 57-59
- [9] Christian C, Dietmar K, Michael G, et al. Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates[J]. Molecules, 2007, 6(12): 641-653
- [10] Chai CY, Xu MG, Liu GY. Synthesis of catalase-chloramphenicol conjugation and ultraviolet determination of molar incorporation ratio of chloramphenicol into catalase[J]. Veterinary Science in China, 2006, 36(5): 406-410 (in Chinese)  
柴春彦, 徐明刚, 刘国艳. 过氧化氢酶-氯霉素偶联物的合成及其结合比的测定[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(5): 406-410
- [11] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. Journal of Immunological Methods, 1987, 100(1/2): 173-179
- [12] Wang WH. Determination of affinity constant of monoclonal antibodies[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 1993, 9(2): 72-75 (in Chinese)  
万文徽. 单克隆抗体亲和常数的测定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1993, 9(2): 72-75
- [13] Sun YN, Teng M, Hu XF, et al. Preparation and immunological characterization of monoclonal antibody against ochratoxin A[J]. Food Science, 2011, 32(9): 236-240 (in Chinese)  
孙亚宁, 滕蔓, 胡晓飞, 等. 抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的制备及免疫学鉴定[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 236-240
- [14] Song S, Lin T, Shao JJ, et al. Measurement of relative affinity for monoclonal antibody against type O foot-and-mouth disease[J]. Chinese Journal of Immunology, 2009, 25(4): 333-335 (in Chinese)  
宋帅, 林彤, 邵军军, 等. 抗 O 型口蹄疫病毒单克隆抗体相对亲和力的测定[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25(4): 333-335
- [15] GB/T 17480-2008. Determination of aflatoxin B1 in animal

- feeding stuffs—Enzyme-linked immunosorbent assay[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008 (in Chinese)
- GB/T 17480-2008. 饲料中黄曲霉毒素 B1的测定—酶联免疫吸附法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [16] Hou XY, Wen HL, Yan YF, et al. Preparation of monoclonal antibody against ochratoxin A and establishment of ELISA to detect it[J]. Journal of Shandong University (Health Science), 2009, 47(10): 60-63 (in Chinese)
- 侯霄煜, 温红玲, 闫玉芬, 等. 抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测方法的建立[J]. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47(10): 60-63
- [17] Wang YC, Wang J, Wang YK, et al. Preparation of monoclonal antibodies and development of an indirect competitive ELISA for Fumonisin B1 detection[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2011, 29(2): 69-74 (in Chinese)
- 王雨晨, 王君, 王元凯, 等. 伏马毒素 B1单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 方法的建立[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2011, 29(2): 69-74
- [18] Wang YK, Wang J, Wang YC, et al. Preparation of anti-zearalenone monoclonal antibodies and development of an indirect competitive ELISA for zearalenone[J]. Microbiology China, 2011, 38(12): 1793-1800 (in Chinese)
- 王元凯, 王君, 王雨晨, 等. 玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2011, 38(12): 1793-1800
- [19] GB/T 20195-2006. Animal feeding stuffs—Preparation of test samples[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006 (in Chinese)
- GB/T 20195-2006. 动物饲料—试样制备[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006
- [20] Goding JW. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice[M]. New York: Academic Press, 1986
- [21] Chen XJ, Chen MY, Zhao HJ. Application of Immunological Techniques in Plant Science[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1998 (in Chinese)
- 陈新建, 陈梅英, 赵会杰. 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998
- [22] Gendloff EH, Casal WL, Ram BR. Hapten protein conjugate prepared by the mixed anhydride method[J]. Journal of Immunological Methods, 1986, 92(1): 15-20
- [23] Jiang H. Development of indirect competitive ELISA for detection of aflatoxin B1 and the preparation of monoclonal antibody affinity chromatography column[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2005 (in Chinese)
- 江湖. 黄曲霉毒素 B1间接竞争 ELISA 检测方法的建立与单克隆抗体免疫亲和柱的初步研制[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2005
- [24] Li JS, Qian CF. Research of immunological analysis for veterinary drug residues[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1998, 18(4): 100-104 (in Chinese)
- 李俊锁, 钱传范. 兽药残留免疫分析及其进展[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(4): 100-104
- [25] GB 2761-2011. Maximum level of mycotoxins in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2011 (in Chinese)
- GB 2761-2011. 食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011