

基于异源策略的黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫(ELISA)分析方法的建立

李 敏^{1,3}, 马 飞^{1,5}, 李培武^{1,2,3,4,5*}, 张 奇^{1,3,5*}, 张 文^{1,5},
周海燕^{1,5}, 印南日^{1,5}, 王恒玲^{1,3}, 吴 慧^{1,3}

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

摘要:为提高黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 酶联免疫分析灵敏度, 建立了基于异源策略的间接竞争酶联免疫分析(IC-ELISA)方法。首先采用黄曲霉毒素 B₁ 与羟基乙酸(glycolic acid, GA)进行衍生化反应, 生成缩醛(AFB₂-GA), 即 AFB₁ 半抗原, 质谱鉴定结果为 ESI-MS: 388.07[M + H]⁺, 表明半抗原合成成功。然后采用活泼酯法, 将 AFB₁ 半抗原羧基与牛血清白蛋白(BSA)的氨基经脱水反应实现化学共价偶联, 得到 AFB₁ 人工抗原 AFB₂-GA-BSA。紫外扫描结果表明人工抗原 AFB₁ 特征吸收峰与 BSA 和 AFB₁ 的特征吸收峰有明显差异, BSA 与黄曲霉毒素 B₁ 成功偶联, 摩尔结合比分别为 8.45: 1。最后将黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原 AFB₂-GA-BSA 作为包被原, 利用黄曲霉毒素 B₁ 高特异性 3G1 抗体, 建立了基于异源策略的 IC-ELISA 方法。利用该方法测定了 3G1 抗体的灵敏度, 检测灵敏度达到 0.3 ng/mL, 比同源 ELISA 方法检测灵敏度(1.6 ng/mL)提高了 81.25%, 并将方法应用于花生中黄曲霉毒素的实际检测。测定结果与高效液相色谱法结果进行比对, 结果符合曲线 $y = 1.0444x + 0.0902$, $R^2 = 0.9751$, 说明该方法能满足花生中黄曲霉毒素快速筛查的测定准确度的要求。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 人工抗原; 合成鉴定; ELISA; 异源策略

中图分类号: S379.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2014)06-0802-06

Heterology strategy - based competitive indirect enzyme - linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁

LI Min^{1,3}, MA Fei^{1,5}, LI Pei-wu^{1,2,3,4,5*}, ZHANG Qi^{1,3,5}, ZHANG Wen^{1,5},
ZHOU Hai-yan^{1,5}, YIN Nan-ri^{1,5}, WANG Heng-ling^{1,3}, WU Hui^{1,3}

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

Abstract: To improve the sensitivity of enzyme - linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁, indirect competitive enzyme - linked immunosorbent assay (IC - ELISA) was developed with selective antibody 3G1. The procedure was modified by working preoperatively under dry conditions and using glycolic acid as a spacer providing a nucleophilic hydroxyl group for formation of aflatoxin acetal AFB₂ - GA in 8 - position on one side. The structure was successfully identified by MS. The ESI - MS identification demonstrated that [M + H]⁺ was 388.07. Active ester method (AEM) was used to couple the acetal of aflatoxin B₁ to carrier protein (BSA) to obtain artificial anti-

收稿日期: 2013-08-13

基金项目: 农业行业科技专项(201303088); 国家科技支撑计划(2012BAB19B09); 国家农产品质量安全风险评估重大项目(GJFP2014006)

作者简介: 李 敏(1989-), 男, 山东滨州人, 硕士研究生, 研究方向为农产品质量标准与检测技术, E-mail: LiMin1006@126.com

* 通讯作者: 李培武(1961-), 二级研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事农产品质量标准与检测技术研究, E-mail: peiwuli@oilcrops.cn;

张 奇(1975-), 副研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事农产品质量标准与检测技术研究, E-mail: zhangqi@oilcrops.cn

gen for aflatoxin B₁. Hapten was then linked to BSA through active ester, and this was confirmed by UV spectrum. A result of UV spectra of AFB₂ - GA - BSA was obviously different from BSA and aflatoxin B₁, showing that the preparation of artificial antigen for aflatoxin B₁ was successful. The coupling ratio of AFB₁ to BSA was 8.45: 1 in the conjugate. Consequently, using novel AFB₂ - GA - BSA as envelope antigen, indirect competitive enzyme - linked immunosorbent assay (IC - ELISA) method was developed with selective antibody 3G1 for aflatoxin B₁. Sensitivity of 0.3ng/mL for 3G1 was achieved by heterologous ELISA with working range of 0.03 - 1.08ng/mL, which was 81.25% higher than that obtained by homologous detection. 12 peanut samples were analyzed by this method, fitted well with standard curve of $y = 1.0444x + 0.0902$ and corresponding coefficient of determination $R^2 = 0.9751$, comparing with the result by high - performance liquid chromatography (HPLC).

Key words: Aflatoxin B₁; Artificial antigen; Synthesis and identification; ELISA; Heterology strategy

真菌毒素是由真菌产生的一种分子量较小的次生代谢产物^[1]。黄曲霉毒素作为一种重要的真菌毒素,主要是由产毒黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等霉菌产生^[2~5]。它在农产品和食品中分布极为广泛,尤其是以花生、玉米及其制品为主。黄曲霉毒素是一种毒性极强的物质^[5,6],其毒性是氰化钾的10倍,砒霜的68倍,是目前发现的最强的致癌物质^[7,8],主要有黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、B₂、G₁和 G₂,其中黄曲霉毒素 B₁占70%以上^[9]。1993年黄曲霉毒素被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为I类致癌物,是一种强毒性物质^[7]。黄曲霉毒素不仅能降低饲料利用率,导致家畜死亡,同时对人类具有致癌、致畸、致突变和免疫抑制毒性,另外,流行病学研究指出肝炎B病毒感染与黄曲霉毒素的暴露量可作为肝癌两个主要的风险因子^[10,11]。因此建立 AFB₁ 特异性免疫分析技术对保障人们食物安全有十分重要的意义。

目前,黄曲霉毒素的测定方法主要有薄层层析法、高效液相色谱法、免疫亲和柱 - 高效液相色谱法、LC - MS/MS、免疫分析法等^[8]。基于高效液相色谱仪等精密仪器的确证性检测方法灵敏度高、结果准确,但是前处理繁琐,仪器设备昂贵,并且需要严格的操作环境以及专业的操作人员,使得该方法不能从根本上满足我国农产品及食品中黄曲霉毒素的现场快速检测需求^[4]。免疫分析是现行的一种黄曲霉毒素快速检测方法,它是利用抗原和抗体的高度特异性结合反应以及抗体或抗原上标记物的生物、物理或化学信号放大作用,实现对微量残留物的定性定量检测^[12],由于其灵敏度高、检测时间短、操作简单,因此,该方法特别适合我国小农户、分散种植农业模式的污染监测^[7,13]。ELISA^[14]作为免疫分析方法的典型代表,由于其具备快速、灵敏、准确、操作简便^[15],且对样品纯度要求不高的特点,特别适用于大批量样品的检测。

半抗原的结构对于 ELISA 检测的灵敏度有很大影响,所以半抗原的设计与合成是建立 ELISA 检测方法的关键环节。本研究参考 Christian^[1]所述方法,并在此基础上进行改进,即采用 AFB₁ 与羟基乙酸(glycolic acid, GA)进行衍生化反应,生成缩醛(AFB₂ - GA),即 AFB₁ 半抗原。然后,将新合成的黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原 AFB₂ - GA - BSA 作为包被原,利用本实验室肖智采用的与 AFB₂ - GA 结构相似的黄曲霉毒素 B_{2a} 为半抗原制备的抗黄曲霉毒素 B₁ 高特异性单克隆抗体 3G1^[9],建立了基于异源策略^[16]间接竞争酶联免疫分析(IC - ELISA)方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花生(山东日照盛康粮油工贸有限公司);黄曲霉毒素 B₁(Sigma 公司);羟基乙酸(GA, Sigma 公司);三氟乙酸(TFA,成都格雷西亚化学技术有限公司);N - 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1,3 - 二环己基碳二亚胺(DCC)(成都贝斯特试剂有限公司),试剂均为分析纯或色谱纯。Aflatoxin B₁ - BSA(牛血清白蛋白)、卵清白蛋白(Ovalbumin, OVA)、AFB₁ 标准品(美国 Sigma 公司);甲醇、石油醚(分析纯 AR)(国药集团化学试剂有限公司);羊抗小鼠 IgG - HRP(武汉博士德生物公司);抗黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体 3G1 为本实验室自制。

1.2 仪器与设备

DF - 1 集热式油浴锅(常州国华电器有限公司);Riosl6 + Mili - Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);B - 480 旋转蒸发仪(Buchi 公司);DH2500AB 型电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司);F - 4500 型荧光分光光度计(日本日立公司);2K15 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);WA II AC1420 荧光酶标仪(PE 公司);TSQ Quantum Ultra 液相 - 质谱联用仪(美国 Thermo 公司);微量移液器(德国

Eppendorf 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Capcell Pak C₁₈ 色谱柱(4.6mm × 150mm × 5μm); 进样量 10μL; 流动相为乙腈和水, 梯度洗脱, 流速 1.0mL/min; 荧光检测器激发波长 360nm, 发射波长 440nm。梯度洗脱条件^[17]见表 1。

表 1 黄曲霉毒素检测 HPLC 梯度洗脱条件
Table 1 Elution condition for aflatoxin detection by HPLC

时间 Time/min	乙腈 Acetonitre/%	水 Water/%
0	15	85
6	17	83
8	25	75
14	15	85
22	85	15
26	15	85
29	15	85

1.3 人工抗原的合成

参照 Christian^[1]的方法, 有所改进: 量取 1mL 无水乙醇酸溶于 4mL TFA。称取 10mg Aflatoxin B₁ 标准品溶于 4mL 乙腈中(置于带有隔膜的小瓶)。用注射器将黄曲霉毒素 B₁ 溶液与乙醇酸/TFA 混合, 振荡 20min, 溶液在数秒内会出现黄绿色, 得到的产物质谱鉴定。

将反应溶液旋转蒸发, 得到淡黄绿色油状物即黄曲霉毒素 B₁ 缩醛。称取 8mg NHS 于反应瓶中, 反应 1h。称取 15mg DCC 溶于 0.2mL 的 1,4-二氧六烷。将 DCC 缓慢滴加于反应瓶, 常温反应 4h, 直至反应瓶中有白色沉淀生成。反应结束后, 将反应物装入 1mL 离心管中, 室温静置过夜。次日, 将上述装有反应物的 EP 管在 8 000r/min 条件下离心 5min。分别称取 20mg BSA, 15mg OVA 溶于 5mL PBS 中(0.2mol/L, pH 8.0)。将反应物离心后的上清分成两部分, 然后逐滴加入 PBS 中, 加样结束后计时, 反应 4h。将最终反应液置于透析袋内, 再将透析袋置于 PBS 中(0.01mol/L, pH8.0), 4℃搅拌透析。每 4~8h 更换一次透析液, 透析 3d。

1.4 人工抗原的鉴定

半抗原鉴定: 半抗原 AFB₂-GA 反应液进行前处理后, 经 LC-MS/MS 和核磁进行结构确证。

完全抗原鉴定: 将 AFB₁、BSA、AFB₂-GA-BSA 适当稀释, 以 PBS 为空白, 进行 200nm~600 nm 全波段紫外线扫描, 分析扫描图谱, 并计算偶联物中 AFB₁ 与 BSA 的摩尔比。称取一定量的 BSA 和偶联物分别溶于 PBS 溶液中, 配制成为 0.33mg/mL 的溶液, 在激发波长为 365nm, 发射波长为 440nm 条件

下测定其相应的荧光强度(重复 3 次取平均值)。

1.5 样品前处理

首先将花生样品进行粉碎, 然后称取 5.0g 样品于 50mL 离心管中, 加入 15.0mL 80% 甲醇水(V/V) 稀释混匀, 50~60℃ 水浴条件下超声提取 12min, 双层滤纸过滤。取 5mL 滤液, 用 0.45μm 有机滤膜过滤, 取出 250μL, 加入 PBS 定容至 1mL, ELISA 检测待用。

1.6 ELISA 方法检测

首先用包被液将包被原 AFB₁-BSA 稀释至 0.25μg/mL, 每孔 100μL, 4℃反应过夜。从冰箱中取出板条, 平衡至室温, 甩干, PBST 洗涤液洗板 3 次, 每孔加入 200μL 1.5% (质量浓度) OVA 的 PBST 溶液封闭, 37℃ 孵育 1h。将温育后的板条取出, 甩干, PBST 洗涤液洗板 3 次。加入 50μL 的 AFB₁ 系列标准溶液或处理好的待测样品提取液到各自的微孔, 加第一抗体 50μL, 37℃ 避光温育 1h。将温育后的板条取出, 甩干, PBST 洗涤液洗板 3 次, 没有连接的 AFB₁ 抗体在洗涤步骤中被除去, 再加入 PBST 稀释的 HRP 标记羊抗鼠二抗 100μL, 37℃ 孵育 45min。将温育后的板条取出, 甩干, PBST 洗涤液洗板 6 次, 拍干后各孔中分别加入 50μL 底物液和 50μL 显色剂, 37℃ 显色 15min 后加 50μL 终止液终止, 终止反应后, 立即用酶标仪在 450nm 波长处测定各孔 OD 值, 并绘制标准曲线, 计算 50% 的抑制率(IC₅₀)。

1.7 高效液相色谱法检测

准确称取样品 5g, 加入 50.0mL 甲醇水(70%, V/V, 含 4% NaCl), 高速均质 2min。双层滤纸过滤, 取滤液 3mL, 加纯水 6mL 稀释, 混匀, 玻璃纤维滤纸过滤, 收集滤液。取滤液 3mL, 以 1mL/min 的速率通过黄曲霉毒素免疫亲和柱, 然后用 10mL 纯水分 3 次淋洗亲和柱, 用 1 mL 甲醇洗脱(流速约为 1mL/min), 收集全部洗脱液于玻璃试管中, 待 HPLC 分析。

2 结果与分析

2.1 半抗原质谱及核磁鉴定分析

半抗原质谱鉴定结果: 将半抗原 AFB₂-GA, 采用 LC-MS/MS 正离子模式扫描, 得到质谱图谱(图 1), 可以看出半抗原的分子离子峰, ESI-MS: 388.07[M + H]⁺, 丰度较大, 与已有合成方法鉴定结果一致, 证明半抗原合成成功。

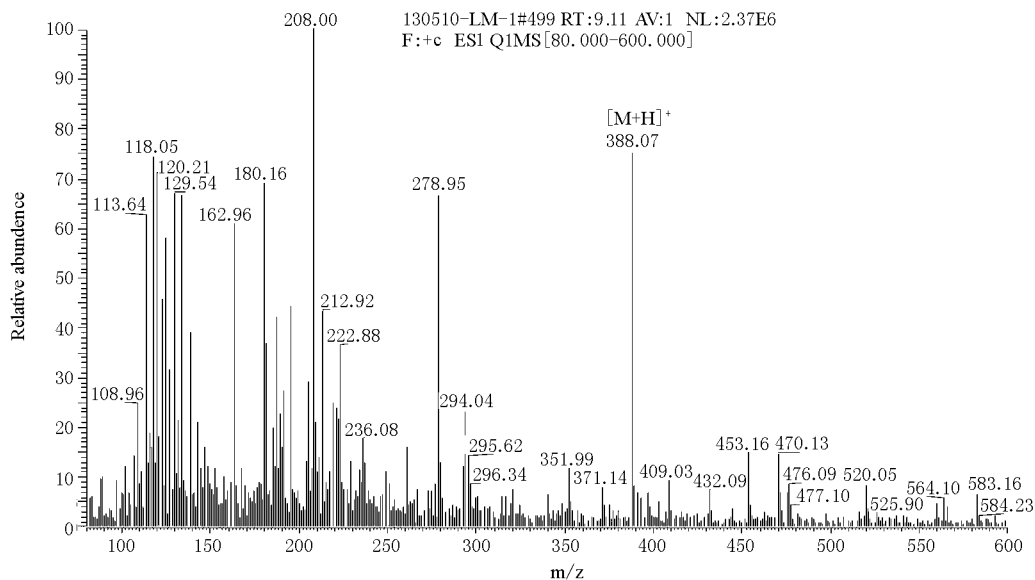


图 1 AFB₂-GA 的质谱图
Fig.1 Mass spectrum of AFB₂-GA

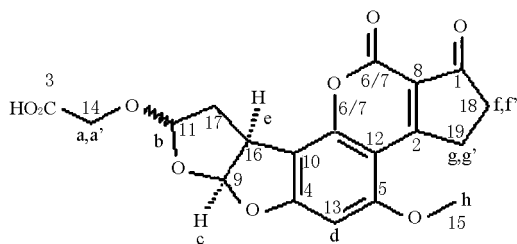


图 2 AFB₂-GA 结构图解析
Fig.2 Structure of AFB₂-GA

核磁鉴定结果:核磁共振氢谱(¹H-NMR,TMS 为内标),共振频率为 400MHz,溶剂为氘代氯仿,半抗原 AFB₂-GA 的核磁鉴定结果如下:δ(ppm): d, a, a':δ=4.05-4.22 (m,3H) b:δ=5.46 (d,1H,J=4.8 Hz) c:δ=6.55 (d,1H,J=6.1Hz) d:δ=6.32 (s,1H) f, f':δ=2.63 (m,2H) h:δ=3.94 (s,3H) g, g':δ=3.39 (m,2H) e:δ=2.54 (d,1H,J=13.8Hz),见图 2。

2.2 人工抗原浓度分析

用 Bradford^[18]方法测定偶联物的浓度。根据标准样品 BSA 的标准曲线(图 3),经过换算测得偶联物的浓度为:2.3 mg/mL,计算其收率为 67.8%。

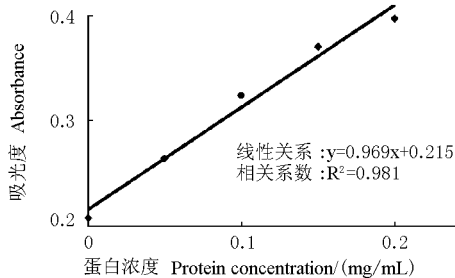


图 3 BSA 标准曲线
Fig.3 Standard curve from plot of maximum absorbance value versus concentrations of BSA

2.3 人工抗原紫外图谱鉴定与荧光分析

2.3.1 人工抗原紫外鉴定 根据吸光度可叠加的原理,本研究以 BSA、AFB₂-GA-BSA 在 BSA、AFB₁ 的最大吸收波长处的吸光度作为计算偶联率的吸收值,以降低实验的误差^[19]。AFB₂-GA-BSA 的紫外扫描结果如图 4。BSA 在 280nm 处有特征吸收峰,而产物在 411nm 处出现了特征吸收峰,比较 AFB₂-GA-BSA 与 BSA,AFB₁ 的特征吸收峰有明显的不同,表明 AFB₁ 与 BSA 成功实现偶联,人工抗原合成成功。

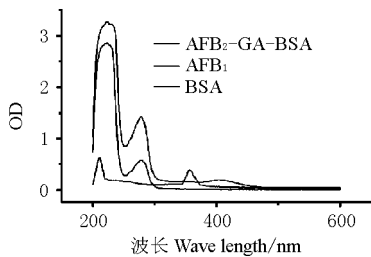


图 4 完全抗原紫外图谱
Fig.4 UV spectrum of AFB₁, BSA and AFB₂-GA-BSA

2.3.2 荧光分析结果 AFB₁ 在激发波长为 365nm,发射波长为 440nm 处能够产生荧光。图 5 表明,相同蛋白浓度的 AFB₂-GA-BSA 与 BSA 相比,其荧光强度增强了近 6 倍,表明完全抗原合成成功。

2.4 基于异源策略的酶联免疫分析

从图 6 和表 2 可知,抗体对黄曲霉毒素 B₁ 的灵敏度为 0.3ng/mL,与 AFB₂ 的交叉反应率小于 3%,与 AFG₁、AFG₂ 无交叉反应,最低抑制率为 0.03 ± 0.006ng/mL,比同源 ELISA 方法检测灵敏度^[9]

(1.6ng/mL)提高了81.25%,说明异源包被提高了包被原的特异性,可更好地应用于免疫分析以提高黄曲霉毒素B₁的检测灵敏度,同时也为抗原抗体识别位点和机制的探索提供了新的数据支撑。

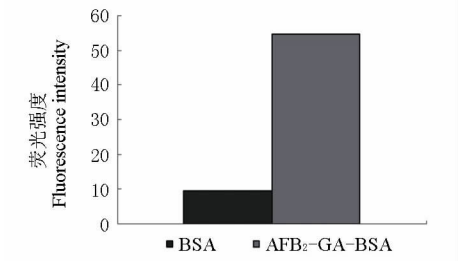


图5 偶联物荧光强度变化
Fig.5 Fluorescence intensity of the antigen

表2 3G1 异源 ELISA 与同源 ELISA 灵敏度、交叉反应率对比

黄曲霉毒素 Aflatoxin	异源 ELISA Heterogenous ELISA		同源 ELISA Homologous ELISA	
	灵敏度 Sensitivity/(ng/mL)	交叉反应率 Cross - reactivity	灵敏度 Sensitivity/(ng/mL)	交叉反应率 Cross - reactivity
B ₁	0.3	100%	1.6	100%
B ₂	>10	<3%	25	6.4%
G ₁	>1 000	0	>1 000	<0.1%
G ₂	>1 000	0	>1 000	<0.1%

算出该方法在实际样品 AFB₁ 检测中的灵敏度(IC₅₀)为5.34ng/mL,线性范围(IC₂₀ - IC₈₀)为1.43~16.31ng/mL,可以看出,样品通过实验室建立的前处理方法进行提取、净化以后,对于 AFB₁ 检测没有太大影响,可以对实际花生样品进行检测。

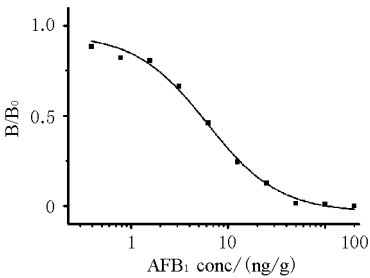


图7 基质稀释黄曲霉毒素B₁标准曲线
Fig.7 Standard curve for AFB₁

2.5 异源酶联免疫分析方法与高效液相色谱法结果比对

从日照盛康粮油工贸有限公司收集12种花生样品,分别采用黄曲霉毒素B₁异源酶联免疫分析方法和高效液相色谱法进行比对(图8),进一步考察验证方法的科学性和适用性。由表3数据可知,异源酶联免疫分析方法与高效液相色谱法测定结果的符合曲线为y=1.044 4x+0.090 2,R²=0.975 1,能满足花生中黄曲霉毒素快速筛查的测定准确度的要求。与高效液相色谱法相比,该方法具有操作简便、检测速度快、灵敏度高、不用接触毒素标准品、有机试剂用量少、对环境及检验人员安全性高等优点,适

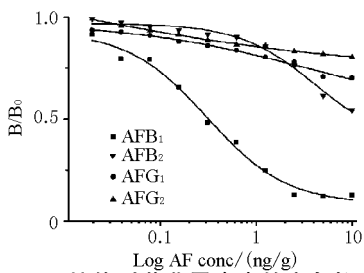


图6 3G1 抗体对黄曲霉毒素的竞争抑制曲线
Fig.6 Competitive inhibition curves of monoclonal antibody 3G1 for aflatoxins

考虑到基质对于ELISA检测的影响,选择空白样品提取液稀释标准品,建立了基于实际样品的异源ELISA分析方法,标准曲线见图7,定量分析可计

用于企业和基层质检机构对花生等农产品以及食品中黄曲霉毒素B₁的快速筛查。

表3 实际花生样品ELISA检测结果与HPLC检测结果的比对
Table 3 Comparison of results obtained by both heterogenous competitive ELISA and HPLC on peanut samples

花生样品 Peanut sample	HPLC(ng/g) ±SD(n=4)	ELISA(n=4)	
		浓度 Concentration/(ng/g)	CV/%
1	4.43 ± 0.21	4.31	3.6
2	8.14 ± 0.19	7.93	3.4
3	1.81 ± 0.05	1.91	7.1
4	1.90 ± 0.03	1.52	3.5
5	6.82 ± 0.27	7.45	5.2
6	7.42 ± 0.45	6.20	8.6
7	ND	ND	3.8
8	ND	ND	2.6
9	6.79 ± 0.04	5.59	7.4
10	3.47 ± 0.13	3.1	5.2
11	ND	ND	2.2
12	ND	ND	4.6

注/Note: * ND 未检出 Not detected

3 小结与讨论

黄曲霉毒素是迄今为止发现的最强的化学致癌物质之一,多年来,世界各国不断发生黄曲霉毒素引发的人畜等中毒死亡的恶性事件,不但严重威胁人畜健康和生命安全,造成严重的经济损失和各种附加值损失,还严重影响了和谐社会的构建。黄曲霉毒素污染对农产品和食品安全性产生的影响,已成为近年来人们关注的焦点。黄曲霉菌株代谢物同时

产生 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂,但由于 AFB₁ 的毒性最大,且含量远大于其他种类^[9],因此,制备高特异性的抗 AFB₁ 抗体,对 AFB₁ 快速、准确的定量分析具有重要意义。

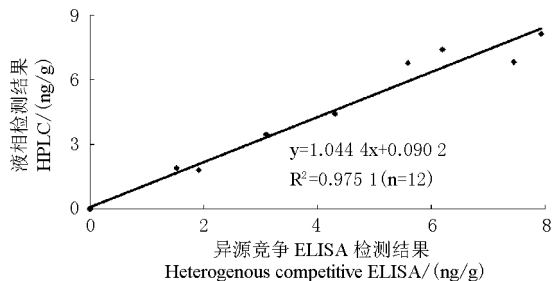


图 8 实际花生样品 ELISA 检测结果与 HPLC 检测结果符合曲线

Fig. 8 Correlation results obtained by both heterogenous competitive ELISA and HPLC on peanut samples

本研究参照 Christian^[1] 首先将黄曲霉毒素 B₁ 转化为其缩醛形式 AFB₂ - GA, 然后在其基础上进行改进,采用缩醛中间物,在 NHS 和 DCC 作用下,与 BSA 进行偶联,制得免疫原和包被原。制备的偶联物经紫外扫描,分析其紫外特征吸收峰,与 AFB₁ 标准品相比有了明显变化,说明合成成功。将黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原 AFB₂ - GA - BSA 作为包被原,利用黄曲霉毒素 B₁ 高特异性 3G1 抗体,首次建立了异源策略间接竞争酶联免疫分析(IC - ELISA)方法。将此方法应用于实际花生中黄曲霉毒素的检测,同时,将结果与高效液相色谱法结果进行比对,两者有很高的符合度,并且,在保证特异性检测黄曲霉毒素 B₁ 的条件下,比同源 ELISA 方法检测灵敏度提高了 81.25%,为进一步建立农产品中黄曲霉毒素 B₁ 快速特异性检测方法奠定了重要基础。在此理论基础上,我们将利用新合成的人工抗原 AFB₂ - GA - BSA 用于胶体金免疫层析方法研究,以建立一个黄曲霉毒素 B₁ 快速检测综合体系。

参考文献:

- [1] Christian C, Weller M G, Niessner R. Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates[J]. *Molecules*, 2007, 12: 641 - 653.
- [2] Hussein S. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans[J]. *Toxicology*, 2001, 167: 101 - 134.
- [3] Chu F S, Ueno I. Production of antibody against aflatoxin B₁ [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 33: 1 125 - 1 128.
- [4] Zheng M Z, Richard J L, Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins[J]. *Mycopathologia*, 2006, 161: 261 - 273.
- [5] Li P W, Zhang Q, Zhang W, et al. Development of a

- class - specific monoclonal antibody - based ELISA for aflatoxins in peanut[J]. *Food Chemistry*, 2009, 115: 313 - 317.
- [6] Zhang D H, Li P W, 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: 63 - 9.
- [7] Li P W, Zhang Q, Zhang W. Immunoassays for aflatoxins[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28: 1 115 - 1 126.
- [8] Li P W, Zhang Q, Zhang W, et al. Aflatoxin measurement and analysis[M]. 2011. Coratia: Intech Publisher, 2011.
- [9] 肖 智, 李培武, 张 奇, 等. 高特异性黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的制备及特性研究[J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33: 66 - 70.
- [10] Maryann E S, Elisabeth A, John M E, et al. The chemistry and biology of aflatoxin B₁ from mutational spectrometry to carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 535 - 545.
- [11] Yabe K, Nakajima H. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64: 745 - 55.
- [12] 陈小锋. 胶体金标记免疫分析及其在小分子化合物快速检测中的应用[J]. *药物生物技术*, 2004, 11: 278 - 280.
- [13] 李培武, 马 良, 张 文, 等. 粮油产品黄曲霉毒素 B₁ 检测技术研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2005, 27: 77 - 80.
- [14] Asis R, Paola R, Aldao M A J. Determination of Aflatoxin B₁ in highly contaminated peanut samples using HPLC and ELISA[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2002, 14: 201 - 208.
- [15] Tudorache M, Bala C. Sensitive aflatoxin B₁ determination using a magnetic particles - based enzyme - linked immunosorbent assay [J]. *Sensors*, 2008, 8: 7 571 - 7 580.
- [16] 汪培林, 蔡宝祥, 李劲松, 等. 异源抗原在建立间接酶联免疫试验检测传染性法氏囊病毒抗体中的应用[J]. *四川畜牧兽医*, 1997, 1: 6 - 8.
- [17] Ma F, Chen R, Li P W, et al. Preparation of an immunoaffinity column with amino - silica gel microparticles and its application in sample cleanup for aflatoxin detection in agri - products[J]. *Molecules*, 2013, 18: 2 222 - 2 235.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. *Analytical Chemistry*, 1976, 72: 248 - 254.
- [19] 张金阳, 李培武, 张 文, 等. 黄曲霉毒素 G₁ 人工抗原的合成[J]. *食品科学*, 2008, 29: 194 - 197.
- [20] 王廷华. 抗体理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005. 74.