

# 免疫学技术在霉菌毒素检测中的应用

胡晓飞<sup>1</sup>, 李艳梅<sup>2</sup>, 王方雨<sup>1</sup>, 邢广旭<sup>1</sup>, 孙亚宁<sup>1</sup>, 全其宾<sup>3</sup>

(1. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点实验室/河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002;

2. 河南省土壤肥料管理站, 河南 郑州 450002; 3. 商丘学院, 河南 商丘 476000)

**摘要:** 中国是饲料生产第一大国, 饲料质量安全关系到养殖业发展的兴衰。霉菌毒素污染严重危害饲料及饲料原料质量安全, 因此, 建立毒素检测方法对预防霉菌毒素污染, 减少毒素中毒事件发生至关重要。综述了霉菌毒素的性质、危害及免疫学检测方法的发展, 并展望了毒素检测方法的发展趋势。

**关键词:** 霉菌毒素; 饲料安全; 检测方法; 免疫检测

**中图分类号:** S859.84 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)04-0157-04

## Application of Immunological Techniques in Mycotoxin Detection

HU Xiao-fei<sup>1</sup>, LI Yan-mei<sup>2</sup>, WANG Fang-yu<sup>1</sup>, XING Guang-xu<sup>1</sup>,  
SUN Ya-ning<sup>1</sup>, TONG Qi-bin<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Immunology of Ministry of Agriculture/Henan Key Laboratory of  
Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou 450002, China;

2. Soil and Fertilizer Management Station of Henan Province, Zhengzhou 450002, China;

3. Shangqiu University, Shangqiu 476000, China)

**Abstract:** China is the biggest country for feed production in the world. Feed safety is closely related to the development of animal husbandry. Mycotoxin contamination is a serious threat to the safety of feed and feed ingredients. Thus to develop the methods for detecting mycotoxin is critical for the prevention of mycotoxin contamination and the reduction toxin poisoning events. This paper reviews the nature and harm, as well as the progresses of immunological detection methods of mycotoxin. The trends of methods for mycotoxin detection are also discussed.

**Key words:** mycotoxin; feed safety; detection methods; immunological detection

中国是饲料生产大国, 饲料总产量居世界第一位, 2011 年饲料产量达 1.81 亿 t, 占全球总产量的 24.6%。饲料工业的发展为畜牧养殖业持续、健康发展提供了坚实的物质基础, 饲料质量安全关系到我国养殖业发展的兴衰及食品质量安全。但目前我国饲料质量安全状况不容乐观, 继兽药违禁、超量超期添加三聚氰胺不法使用事件之后, 饲料及饲料原料中霉菌毒素污染问题又成为近期人们关注的热点。因此, 有必要对霉菌毒素的性质、危害、霉菌毒素检测方法的研究进展及其发展趋势进行全面地了解和认识。

### 1 毒素性质和危害

霉菌毒素(mycotoxin)是霉菌产生的次级代谢产物, 广泛存在于各种农作物及其副产品、水果及其制品、调味品及动物源性食品中, 全世界每年约 25% 的粮食受到霉菌毒素污染。据联合国粮农组织估算, 世界每年由霉菌毒素污染造成的损失高达数千亿美元, 霉菌毒素污染已成为全球食品安全主要威胁因素之一<sup>[1]</sup>。2011 年, 我国某品牌牛奶中检出了霉菌毒素, 最终源头是奶牛饲料原料受到黄曲霉毒素污染; 广东省质量技术监督局在 20 家中小企业

收稿日期: 2012-11-08

基金项目: 农业科技成果转化项目(2011GB2D000001); 农业部公益性行业(农业)科研专项(201203040); 河南省扶持企业自主创新资金项目

作者简介: 胡晓飞(1972-), 男, 河南汝南人, 副研究员, 博士, 主要从事食品、饲料安全免疫学检测技术研究。

E-mail: hxf1972@126.com

生产的食用油中检出了黄曲霉毒素超标,而超标主要由原料花生霉变所致。这些事件的发生时刻提醒我们,要加强对食品及粮食中霉菌毒素污染的检测。

## 2 霉菌毒素理化检测方法

霉菌毒素检测目前常用的方法是理化检测方法,包括色谱法及衍生方法<sup>[2-3]</sup>、质谱法及衍生方法<sup>[4]</sup>、液质联用法<sup>[5-6]</sup>、近红外光谱技术(NIR)<sup>[7]</sup>等。尽管上述方法的检测结果比较精确可靠,但所用检测仪器昂贵,费用较高,需要专业技术人员进行操作,严重制约了这些方法的普及应用。免疫学检测技术的出现,为霉菌毒素快速检测提供了技术手段。

## 3 霉菌毒素免疫学检测方法

免疫标记技术是指用荧光素、放射性同位素、酶、发光剂或电子致密物质等作为示踪剂,标记抗体或抗原。免疫学检测方法是利用抗原抗体特异性反应与免疫标记技术相结合建立起来的灵敏度高、特异性强的检测方法,包括放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、荧光免疫分析(FIA)、化学发光免疫分析(CLIA)等<sup>[8]</sup>。RIA 技术是将放射性同位素测量高灵敏性、精确性与抗原抗体反应特异性相结合的体外测定超微量物质的技术,已被用于霉菌毒素测定,检测限在纳克级<sup>[9]</sup>。尽管 RIA 技术灵敏度高、特异性强,但由于放射性同位素有效期短,所以测定过程受时间限制,而且放射性物质对环境及人类都有危害,限制了其使用。EIA 技术是把酶催化放大作用与免疫反应特异性相结合的微量分析技术,该方法灵敏度可达到皮克水平。酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是酶免疫分析技术的经典代表,也是最常用的技术,并成功应用于检测饲料、食品中霉菌毒素<sup>[10-11]</sup>。FIA 是利用荧光物质标记抗体或抗原,根据抗原抗体反应,在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应对抗原或抗体进行测定分析。其中时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluorescent immunoassay, TR-FIA)是以镧系螯合物铕( $\text{Eu}^{3+}$ )、铽( $\text{Tb}^{3+}$ )、铈( $\text{Ce}^{3+}$ )等标记抗原或抗体建立的免疫分析方法。由于镧系元素所发射的荧光寿命长,在测定特异性荧光时,可通过延迟检测时间而将标本或环境中的非特异荧光扣除,使其具有良好信噪比,已有应用于霉菌毒素检测的研究报道<sup>[12-13]</sup>。CLIA 是继 RIA、EIA 和 FIA 之后发展的一项新兴测定技术,其基本原理是将化学发光系统与免疫反应相结合,以检测样本中的抗原或抗体,由于它既具有免疫反应的高

度特异性,又具有发光反应的高敏感性,且对环境公害小,因此近年来被广泛应用于霉菌毒素检测<sup>[14-15]</sup>。

尽管 RIA、EIA、FIA、CLIA 等免疫分析检测技术缩短了毒素检测时间,但检测耗时仍在一个小时以上,并且需要仪器辅助,不能实时检测,限制了这些检测技术的现场应用。随着社会发展以及人们对食品安全的重视,实时、快速、简便的检测方法显得越发重要,而胶体金标记及量子点技术的出现使霉菌毒素实时检测变为可能。

### 3.1 胶体金技术

胶体金又称为胶体纳米金,是由氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸等作用下聚合成一定大小的金颗粒,并在静电作用下成为一种稳定的胶体状态,形成带负电的疏水胶溶液。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质及其他大分子的正电荷基团形成牢固的结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响蛋白质的生物特性,并可通过透射电子显微镜或扫描电子显微镜对标记物进行观察<sup>[16]</sup>。胶体金技术利用金颗粒具有高电子密度的特性,金标蛋白结合处在显微镜下可见黑褐色颗粒;当这些标记物在相应的配体处大量聚集时,肉眼可见红色或粉红色斑点。这种标记物在液体或干燥状态下均非常稳定,因而被用于定性或半定量的快速免疫检测方法中<sup>[17]</sup>。由于胶体金容易制备,价格便宜,胶体金标记已成为目前侧流层析免疫分析中应用最广的标记材料<sup>[17]</sup>。

胶体金标记技术成为继荧光标记、同位素标记、酶标记及乳胶标记技术之后的一种新型标记技术。胶体金作为标记物,不存在内源酶干扰及放射性同位素污染等问题,并且利用胶体金颗粒大小可以作双重甚至多重标记,使定位更加精确。胶体金与固相膜结合形成了免疫胶体金试纸条诊断技术,由于该检测技术快速(10 min 内得出结果)、方便(无需特殊设备及试剂)、结果判断直观,被广泛应用于霉菌毒素检测<sup>[18-19]</sup>。胶体金侧流层析免疫分析的敏感性还可以通过银染增加 1 到 2 个数量级<sup>[20]</sup>。

### 3.2 荧光量子点技术

量子点是继胶体金之后新兴的免疫层析荧光标记技术<sup>[21-25]</sup>。量子点是由 CdSe、CdS、ZnSe、InP、InAs 等,或 CdSe 核表面包被一层 AnS 或 CdS 组成的纳米晶或半导体纳米晶。能表现出很强的三维量子约束。量子点通过吸收高能量的光子形成配对的电子-阳离子电荷空穴,电子和空穴结合产生亮光,光谱长度分布在可见光区。量子点的荧光强度比较高,不同量子点尺寸或组成可以产生不同的荧光

色泽,比如 CdS 产生蓝色光,而 InP 产生红色光。量子点对光致漂白有很强的抵抗作用,显色半衰期比较长,能掩蔽很多介质产生的荧光颜色,提高了检测灵敏性和特异性。

量子点具有吸收谱带较宽、发射光谱窄、对称强度高、荧光强度高、光稳定性好等独特的光学性质。量子点结合免疫学技术形成的量子点免疫检测技术,不但克服了传统检测方法成本高、操作费时费力等缺点,而且弥补了现有免疫学快速检测方法操作步骤复杂繁琐、假阳/阴率高、灵敏度低等不足。该技术在生命科学研究领域备受青睐,而且在生物医学、农药残留、环境卫生方面的应用已经产生了一系列良好的效果<sup>[21-23]</sup>。量子点免疫检测近些年也开始应用于粮食中霉菌毒素检测<sup>[24]</sup>。量子点标记与固相膜结合形成量子点试纸条诊断技术,该项技术已经在疾病诊断中得以应用<sup>[25]</sup>。

尽管霉菌毒素免疫检测方法缩短了检测时间,使用方便简洁,但检测中需要使用到毒素标准品,对实验人员有潜在的健康危害,而且易造成环境污染。因此,建立安全的毒素检测技术,对维护人类安全,减少霉菌毒素造成的环境污染意义重大,而噬菌体展示技术的出现为实现霉菌毒素安全检测提供了技术支撑。

#### 4 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术是一种设计精巧且功能强大的技术方法,能够从表达在噬菌体颗粒表面及其繁杂的肽库中分离出目标多肽,包括抗体、蛋白和肽类。噬菌体展示技术无论在学术还是在工业生产中均是一个多功能的工具,用途广泛。该技术从探索蛋白互相作用的本质到制药工业中治疗蛋白的分离,从细胞抗原表位鉴定到免疫诊断、疫苗研制、毒素或病毒模拟表位筛选等各方面均发挥着重要作用<sup>[26]</sup>。

噬菌体展示技术的基本原理是将外源蛋白或多肽的编码 DNA 或目的基因片段序列插入到经过改造的噬菌体外壳蛋白结构基因特定位置,在阅读框正确且不影响其他外壳蛋白正常功能的情况下,使外源插入基因与噬菌体外壳蛋白一同表达,外源蛋白随噬菌体重新组装而展示在噬菌体表面,且被展示的蛋白质或多肽保持相对独立的空间结构和生物学活性。目前,已开发出了单链丝状噬菌体展示系统<sup>[27]</sup>,λ 噬菌体展示系统<sup>[28]</sup>,T4、T7 噬菌体展示系统等数种噬菌体展示系统<sup>[29-30]</sup>。

噬菌体展示技术的出现及噬菌体展示肽库建立,为寻求霉菌毒素替代品、建立毒素安全检测方法

开辟了新思路。基于所制备的霉菌毒素单克隆抗体,利用噬菌体展示技术淘选各种霉菌毒素的模拟表位肽,利用该模拟表位肽建立相应毒素的安全检测方法成为目前毒素检测方法的研究热点。国内外已成功运用噬菌体展示技术及制备的噬菌体 7 肽库淘选出黄曲霉毒素 B1、呕吐毒素(DON)、赭曲霉毒素 A(OTA)、玉米赤霉烯酮(ZEN)等霉菌毒素的模拟表位肽(表 1)。利用淘选的阳性噬菌体克隆子建立的 ELISA 检测方法,灵敏度均比较高,特异性强,检测结果与常规的毒素检测试剂盒相比无显著差异<sup>[31-35]</sup>。利用合成的模拟表位肽建立的 ELISA 检测方法,检测结果比利用阳性噬菌体克隆子建立的 ELISA 检测方法的检测结果偏高一些<sup>[32-33]</sup>,这可能是因为合成的模拟表位肽在空间结构上与毒素的抗原表位空间结构有一定的差别造成的。因此,从提高检测结果灵敏度方面考虑,今后的研究应集中在确定模拟表位肽的正确空间结构上。

表 1 目前研究报道的霉菌毒素模拟表位肽

作者	毒素名称	淘选轮次	阳性克隆子/个	ELISA 检测灵敏度/(ng/mL)
邓省亮等 <sup>[31]</sup>	AFB1	4	4	0.05
Yuan 等 <sup>[32]</sup>	DON	4	2	100
邓舜洲等 <sup>[33]</sup>	DON	4	10	20
刘仁荣等 <sup>[34]</sup>	OTA	4	11	0.15
何庆华等 <sup>[35]</sup>	ZEN	3	9	0.10

#### 5 展望

2011 年在我国发生的由霉菌毒素污染引起的食品安全事件,凸显出霉菌毒素检测的重要性及紧迫性。目前,霉菌毒素简便、快速、灵敏、特异、准确、安全的检测方法尤显不足和匮乏。利用噬菌体展示技术淘选出毒素模拟表位肽,结合胶体金标记技术及量子点荧光标记技术,不但可以建立无毒、安全的霉菌毒素 ELISA 检测方法,而且可以制备快速简便的霉菌毒素检测试纸条;远景目标可以建立基于霉菌毒素模拟表位肽的蛋白质芯片或试纸芯片,实现毒素多靶标安全快速检测。因此,噬菌体展示技术结合胶体金标记技术或量子点标记技术,建立安全、简便的霉菌毒素检测新方法,应用前景比较广阔。

#### 参考文献:

- [1] 计成. 霉菌毒素与饲料食品安全[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [2] Munimbazi C, Bullerman L B. Chromatographic method for the determination of the mycotoxin moniliformin in corn [J]. Methods Mol Biol, 2001, 157: 131-145.
- [3] Rastogi S, Das M, Khanna S K. Quantitative determination of aflatoxin B1-oxime by column liquid chromatography

- with ultraviolet detection[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 933(1/2): 91-97.
- [4] Sforza S, Dall'asta C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2006, 25(1): 54-76.
- [5] Beltran E, Ibanez M, Sancho J V, *et al.* Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(12): 1801-1809.
- [6] Vishwanath V, Sulyok M, Labuda R, *et al.* Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(5): 1355-1372.
- [7] Yi Y Y, Li D R, Zhang Y, *et al.* Applications of near infrared reflectance spectroscopy in detecting chitin, ergosterol and mycotoxins[J]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 2009, 29(7): 1826-1829.
- [8] Goslin J P. A decade of development in immunoassay methodology[J]. *Clin Chem*, 1990, 36(8): 1408-1427.
- [9] Candlish A A, Smith J E, Stimson W H. Monoclonal antibody technology for mycotoxins[J]. *Biotechnol Adv*, 1989, 7(3): 401-418.
- [10] Sibanda L, Saeger S De, Peteghem C Van, *et al.* Detection of T-2 toxin in different cereals by flow-through enzyme immunoassay with a simultaneous internal reference[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(12): 5864-5867.
- [11] 李华, 祭芳, 徐剑宏, 等. 赤霉毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 酶联免疫检测方法研究[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(4): 721-726.
- [12] 黄隼, 时瑾, 朱岚, 等. 赭曲霉毒素 A 时间分辨荧光免疫分析法的建立及其考核[J]. *标记免疫分析与临床*, 2008, 15(3): 174-177.
- [13] Zhang J, Gao L, Zhou B, *et al.* Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay[J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(2): 193-197.
- [14] Quan Y, Zhang Y, Wang S, *et al.* A rapid and sensitive chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fumonisin B1 in food samples[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 580(1): 1-8.
- [15] Fang L, Chen H, Ying X, *et al.* Micro-plate chemiluminescence enzyme immunoassay for aflatoxin B1 in agricultural products[J]. *Talanta*, 2011, 84(1): 216-222.
- [16] Horisberger M, Rosset J. Colloid gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy[J]. *J Histochem Cytochem*, 1977, 25(4): 295-305.
- [17] Wong R C, Tse H Y. Lateral flow immunoassay[M]. *Towata N J*; Humana Press, 2009.
- [18] Kolosova A Y, Saeger S De, Sibanda L, *et al.* Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(7/8): 2103-2107.
- [19] Kolosova A Y, Sibanda L, Dumoulin F, *et al.* Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 616(2): 235-244.
- [20] Horton J K, Swinburne S, O'Sullivan M J. A novel, rapid single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin[J]. *J Immunol Meth*, 1991, 140: 131-134.
- [21] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics[J]. *Sci*, 2005, 307(5709): 538-544.
- [22] 张春明. CdSe/CdS 量子点-酶生物共轭体的制备及其在有机磷农药分析中的应用研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [23] 孟元华. CdSe/CdS 量子点检测环境中的微囊藻毒素-LR 以及镉离子的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [24] 杨淑平, 金鑫, 郑佳, 等. 高性能 CdTe/CdS 核壳型量子点的制备及应用于小麦面粉中呕吐毒素的荧光免疫检测研究[J]. *化学学报*, 2011, 69(6): 687-692.
- [25] 沈鹤柏, 方菲. 量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法: 中国, CN101339196[P]. 2009-01-07.
- [26] Clackson T, Lowman H B. Phage display-a practical approach[M]. Oxford: Oxford University Press, 2004.
- [27] Gao C S, Mao S L, Kaufmann G, *et al.* A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display[J]. *PNAS*, 2002(20): 12612-12616.
- [28] Sternberg N, Hoess R D. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda[J]. *PNAS*, 1995(5): 1609-1613.
- [29] Hong Y R, Black L W. An expression-packaging-processing vector which selects and maintains 7-kb DNA inserts in the blue T4 phage genome[J]. *Gene*, 1993, 136(1/2): 193-198.
- [30] Houshmand H, Froman G, Magnusson G. Use of Bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction[J]. *Anal Biochem*, 1999, 268(2): 363-370.
- [31] 邓省亮, 许杨, 刘仁荣. 采用噬菌体展示技术筛选黄曲霉毒素 B1 模拟抗原表位[J]. *卫生研究*, 2007, 36(1): 59-62.
- [32] Yuan Q, Pestka J J, Hespeneide B M, *et al.* Identification of mimotope peptides which bind to the mycotoxin deoxynivalenol-specific monoclonal antibody[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3279-3286.
- [33] 邓舜洲, 余宙, 游淑珠, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇七肽模拟表位淘选及应用[J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(10): 1205-1206.
- [34] 刘仁荣, 余宙, 何庆华, 等. 随机肽库筛选赭曲霉毒素 A 模拟表位及其应用[J]. *中国公共卫生*, 2005, 21(8): 944-946.
- [35] 何庆华, 刘仁荣, 许杨. 利用噬菌体肽库淘选玉米赤霉烯酮的模拟表位[J]. *食品科学*, 2007, 28(8): 241-243.