

# 基于纳米磁珠和双标记抗体的玉米赤霉烯酮快速、高灵敏检测方法的建立及应用

肖佳丽<sup>1</sup> 叶青<sup>5</sup> 方云<sup>6</sup> 方维焕<sup>1, 2, 3, 4</sup> 宋厚辉<sup>1, 2, 3</sup> 章先<sup>1, 2, 3, 4</sup>

① 浙江农林大学动物科技学院 浙江 临安 311300

② 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室 浙江 临安 311300

③ 动物健康检测互联网技术浙江省工程实验室 浙江 临安 311300

④ 浙江大学动物科学学院 浙江 杭州 310058

⑤ 浙江大学学报英文版 浙江 杭州 310027

⑥ 浙江省检验检疫科学技术研究院 浙江 杭州 310012

**摘要:** 玉米赤霉烯酮 (zeralenone, ZEN) 具有雌激素活性, 主要污染谷物和饲料, 大量聚积可导致流产和死胎, 给动物和人类健康带来严重威胁。本研究通过将 ZEN 偶联抗原 ZEN-BSA 包被于纳米磁珠 (magnetic nanoparticles, MNPs), 制备纳米磁珠-偶联抗原复合物 (MNPs-BSA-ZEN), 同时使用金颗粒 (Au nanoparticles, AuNPs) 和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 双标记的 ZEN 单克隆抗体, 建立新型酶联免疫检测方法 (MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA)。检测下限 (IC<sub>10</sub>) 达到 0.03ng/mL, 检测区间 (IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>) 为 0.05-0.89ng/mL, 半数抑制率 (IC<sub>50</sub>) 为 0.22ng/mL, 与 ZEN 类似物 ( $\alpha$ -zearalanol、zearalanone、 $\alpha$ -zearalenol、 $\beta$ -zearalenol 和  $\beta$ -zearalanol) 的交叉反应性依次为 19.2%、11.7%、8.3%、1.2%和 4.3%, 与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、赭曲霉毒素 A、伏马毒素 B<sub>1</sub>、桔青霉素和展青霉毒素几乎不存在交叉反应。在玉米、面粉和大豆样本中的加标回收率可达 81.6%-113.5%, 与 LC-MS/MS 同时对天然样本中 ZEN 含量的检测结果表明, 两种方法相关性良好。本研究建立的 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 具备快速和高灵敏的双重优势, 也可为其他霉菌毒素精准检测技术的开发提供参考。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮, 纳米磁珠, 金颗粒, 辣根过氧化物酶, 单克隆抗体

基金项目: 浙江省自然科学基金(LQ17C170002); 浙江农林大学人才项目(2016FR025); 浙江省重点研发计划(2018C02041); 国家高新技术研究发展计划(863计划)(2012AA101602)

Supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ17C170002), Zhejiang A & F University Talent Initiative Project (2016FR025FR), Key Research and Development Project Funds of Zhejiang Provincial Science and Technology Department (2018C02041) and National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2012AA101602).

✉ Corresponding authors. E-mail: zhangxian073@163.com, songhh@zafu.edu.cn

ORCID: XIAO Jia-Li (0000-0003-4123-0569), YE Qing (0000-0002-6681-4731), ZHANG Xian (0000-0003-4903-3009),

SONG Hou-Hui (0000-0001-6530-5794)

✉ Contributed equally to this article.

Received: 2018-10-30, accepted: 2018-11-26

## Efficient detection of zeralenone by using magnetic-nanoparticle and double-labeled monoclonal antibody complex

XIAO Jia-Li<sup>1</sup>✉ YE Qing<sup>5</sup>✉ FANG Yun<sup>6</sup> FANG Wei-Huan<sup>1, 2, 3, 4</sup> SONG Hou-Hui<sup>1, 2, 3</sup>✉ ZHANG Xian<sup>1, 2, 3, 4</sup>✉

① College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Lin'an, Zhejiang 311300, China

② Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Lin'an, Zhejiang 311300, China

③ Zhejiang Provincial Engineering Laboratory for Animal Health Inspection and Internet Technology, Lin'an, Zhejiang 311300, China

④ College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

⑤ Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology), Hangzhou, Zhejiang 310027, China

⑥ Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou, Zhejiang 310012, China

**Abstract:** Zearalenone (ZEN), a mycotoxin, is produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium roseum* growing primarily on corn or hay exposed to high moisture and threatens to food safety and public health. Children are more vulnerable to ZEN than adults. Sensitive, accurate and rapid analytical methods with new strategies for signal enhancement are needed for detection of ZEN. Therefore, a novel enzyme linked immunosorbent assay (MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA) using magnetic nanoparticles (MNPs) and double labeled monoclonal antibody complex (Anti-ZEN-HRP-AuNPs) was prototyped and used for detecting ZEN in cereal samples. The detection signal was enhanced which in turn improved the sensitivity of the assay. The lower limit of detection using MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA was 0.03ng/mL while the IC<sub>50</sub> was 0.22ng/mL. The linear working range was 0.05–0.89ng/mL. The cross-reactivities with zeralenone analogues ( $\alpha$ -zearalanol, zearalanone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalanol) were 19.2%, 11.7%, 8.3%, 1.2% and 4.3%, respectively. No cross-reactivity (<0.01%) was observed with other co-occurring mycotoxins (AFB<sub>1</sub>, OTA, FB<sub>1</sub>, CIT and PAT). The recovery rates in spiked corn, wheat and soybean samples were 81.6%–113.5%, and the intra-day and inter-day relative standard deviations were <10%. Simultaneous analysis of commercial samples (corn, wheat, and feedstuff) showed a good correlation between MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). Hence, this new method can be used as a rapid, sensitive, and less time-consuming method to determine levels of zeralenone in cereal and feedstuff samples.

**Key words:** zeralenone, magnetic nanoparticles, gold particles, horseradish peroxidase, monoclonal antibody

真菌毒素 (mycotoxins) 为真菌产生的小分子次级代谢产物, 世界上约 1/4 的谷物受到真菌毒素污染, 其中曲霉菌 *Aspergillus* 和镰刀菌 *Fusarium* 的危害最为严重 (Škrbića *et al.* 2012; Mousavi Khaneghah *et al.* 2018)。玉米赤霉烯酮

(zeralenone, ZEN) 由镰刀菌属如合谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* 和粉红镰刀菌 *Fusarium roseum* 产生, 具有雌激素活性, 1962 年首次从发霉的玉米中分离得到 (Tanaka *et al.* 2007)。ZEN 的大量聚积可导致流产和死胎, 并且相对于成

人, 婴幼儿更易受到伤害, 世卫组织规定 ZEN 的每日最大耐受量为  $0.5\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$  (Efsa 2004; Dellafiora *et al.* 2015; Knutsen *et al.* 2017)。ZEN 污染主要存在谷物类粮食作物中, 如小麦、大麦和玉米等, 动物性产品如牛奶中则多为奶牛食用受污染的饲料所致 (Ul Hassan *et al.* 2018)。为保障谷物和动物性食品安全, 建立 ZEN 快速高灵敏的检测方法迫在眉睫。

目前, ZEN 常见检测手段包括仪器法和免疫分析法。免疫分析法主要有酶联法 (ELISA)、胶体金免疫层析和化学发光检测法等 (Cha *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013; Sun *et al.* 2014; Dong *et al.* 2018)。ELISA 和胶体金免疫层析方便快捷, 已被广泛应用于大量样本的初筛, 灵敏度有限; 化学发光法灵敏度较高, 但信号读取易产生误差从而影响结果; 相比免疫分析法, 仪器法虽稳定且灵敏度高, 由于样本前处理过程较复杂且对操作人员和仪器的要求较高, 难以推广 (Zhang *et al.* 2018a; Zhang *et al.* 2018b)。

近年来, 为提高灵敏度, 不同类型的信号增强策略被应用于相关免疫学检测方法的建立, 如生物素链霉亲和素系统、金颗粒标记、纳米磁珠 (magnetic nanoparticles, MNPs) 富集以及增强型化学发光剂的使用等 (Wang *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2014; Yao *et al.* 2017; Li *et al.* 2018; Wang *et al.* 2018)。纳米磁珠粒径小且具有超顺磁性, 在磁场中可迅速聚集, 离开磁场又能够均匀分散, 通过表面修饰的活性基团与相关物质偶联, 可在外磁场的作用下实现目标物质的快速分离 (Smith *et al.* 2011; Wang *et al.* 2016)。前期, 本团队结合纳米磁珠和生物素-亲和素系统, 建立了 ZEN 高灵敏度检测方法, 但需两步反应, 在检测时间上并无太大优势 (Zhang *et al.* 2015b)。近期, 本团队通过金颗粒和辣根过氧化物酶双标记抗体, 成功建立了针对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的快速高灵敏度检测方法, 该方法将金颗粒作为载体, 制备的多聚 HRP 复合物使得检测信号

大幅增强, 一步反应, 耗时短 (章先等 2018)。本研究正是综合上述成果, 设计了一种基于纳米磁珠和双标记抗体的 ZEN 新型快速高灵敏度检测方法, 用于农产品中 ZEN 的快速定量检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂:** 羧基修饰的纳米磁珠 M270 (15305D) 购自 Thermo 公司; 不同真菌毒素标准品、牛血清白蛋白 (BSA)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、柠檬酸钠和氯金酸, 购自 Sigma 公司; BSA 多克隆抗体 (Anti-BSA) 购自上海生工生物工程股份有限公司; ZEN 单克隆抗体 (Anti-ZEN)、偶联抗原 (ZEN-BSA) 为本实验室前期制备; HRP 快速标记试剂盒购自湖州英创生物科技有限公司; ELISA 显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 购自山东济南泰天和生物科技有限公司; 其他相关试剂购自于国药集团化学试剂有限公司; 谷物阴性和天然样本由浙江省检验检疫科学技术研究院提供。

**1.1.2 主要仪器:** SpectraMax M<sub>2</sub> 酶标仪购自美国 Molecular Device 公司, 96 孔板水平快速振荡器 (QB-9001) 购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 高速离心机 (D-37520) 购自 Thermo 公司; EP 管磁力架 (MS-12) 购自美国 Bangs laboratories 公司; 96 孔板配套磁性底座为本实验室研制。

### 1.2 纳米磁珠-ZEN 偶联抗原复合物 (MNPs-BSA-ZEN) 的制备

本研究采用两步法制备 MNPs-BSA-ZEN。第一步, 制备磁珠抗体复合物 MNPs-Anti-BSA。采用羧基修饰的纳米磁珠, 抗体的氨基与活化的羧基经缩合作用形成稳定的共价键。操作步骤如下: 磁珠贮存液 (30mg/mL) 充分振荡 30s, 取 100 $\mu\text{L}$  置于 EP 管中, 磁性分离, 弃去液体, 加入等体积的硼酸盐缓冲液 (25mmol/L, pH 5) 重

悬, 重复洗涤 3 次; 取 50 $\mu$ L 预冷的 EDC 和 NHS 混合溶液 (50mg/mL) 加至磁珠并室温振荡活化 30min, 按照上述相同方法洗涤 3 次; 取 100 $\mu$ L Anti-BSA 抗体溶液 (0.6mg/mL) 加至到活化后的磁珠中, 室温反应 2h 后洗涤 3 次, 加入 100 $\mu$ L 淬灭缓冲液 (50mmol/L Tris, pH 7.4), 室温振荡反应 15min, 淬灭未反应的羧基, 最后取 100 $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 重悬, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

第二步, 将偶联抗原 ZEN-BSA 与已制备的 MNPs-Anti-BSA 孵育, 形成外层包被 ZEN 偶联抗原的纳米磁珠复合物 (MNPs-BSA-ZEN)。操作步骤如下: 取 50 $\mu$ L 制备的纳米磁珠-BSA 多克隆抗体复合物 (MNPs-Anti BSA) 于 EP 管中, 磁性分离, 磷酸盐缓冲液 (10mmol/L, pH 7.4) 洗涤 3 次; 200 $\mu$ L ZEN-BSA 溶液 (5 $\mu$ g/mL) 加至 MNPs-Anti-BSA 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 30min 后置于磁场中磁性分离, 清洗缓冲液清洗磁珠 3 次后转移至新 EP 管, 弃掉清洗缓冲液, 100 $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (10mmol/L, pH 7.4) 重悬, 产物经 ELISA 鉴定后, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 金颗粒和辣根过氧化物酶双标记抗体 (Anti-ZEN-HRP-AuNPs) 的制备

单克隆抗体 Anti-ZEN 为实验室前期制备, 参照 Zhang *et al.* (2015a) 所述方法测定抗体亲和力和为 5.73 $\times 10^9$ L/mol, 一般认为亲和常数为 10<sup>7</sup>-10<sup>12</sup>L/mol 的抗体亲和力高 (Schell *et al.* 1993), 该单克隆抗体满足免疫检测的需求。双标记抗体的制备和鉴定参考本团队前期发表的文献进行 (章先等 2018)。

### 1.4 基于纳米磁珠和双标记抗体检测 ZEN 方法 (MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA) 的建立

检测原理见图 1。基于酶联免疫检测原理, 将偶联抗原 ZEN-BSA 包被于纳米磁珠表面, 采用竞争反应模式, 磁珠的流动性及富集作用使得竞争反应更加充分, 同时使用双标记抗体 (Anti-ZEN-HRP-AuNPs) 进行催化显色, 提高检测灵敏

度, 实现 ZEN 的快速高灵敏度检测。

具体检测步骤如下: (1) 稀释后的磁珠偶联抗原复合物 (MNPs-BSA-ZEN) 加入 96 孔板中 (10 $\mu$ L/孔), 3 个平行, 250 $\mu$ L 梯度稀释的 ZEN 标准品与 250 $\mu$ L 金颗粒和辣根过氧化物酶双标记抗体 (Anti-ZEN-HRP-AuNPs) 等体积混匀后加入反应孔中 (150 $\mu$ L/孔), 3 个平行, 37 $^{\circ}$ C 水平混匀作用; (2) 反应结束后, 利用 96 孔板配套磁性底座富集、洗涤磁珠, 洗涤缓冲液为 10mmol/L PBST (200 $\mu$ L/孔), 每次 5min, 共 3 次; (3) 每孔加入 100 $\mu$ L TMB 底物, 置于 37 $^{\circ}$ C 水平混匀显色 7min 后加入 50 $\mu$ L 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 酶标仪读取 OD<sub>450</sub>。由于在 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 检测模式中, MNPs-BSA-ZEN 和 Anti-ZEN-HRP-AuNPs 的使用量均会影响最终的检测结果, MNPs-BSA-ZEN 过量会造成背景值偏高, 检测灵敏度降低。

参考 Jiang *et al.* (2012) 的方法, 采用棋盘方阵法对 MNPs-BSA-ZEN 和 Anti-ZEN-HRP-AuNPs 的作用浓度进行优化。MNPs-BSA-ZEN 稀释倍数依次为 1:25、1:50、1:100 和 1:200, 双标记抗体 Anti-ZEN-HRP-AuNPs 初始稀释倍数为 1:50, 依次倍比稀释至 1:6 400 倍。选取最佳 MNPs-BSA-ZEN 和 Anti-ZEN-HRP-AuNPs 作用浓度 (OD<sub>450</sub> 接近 1.0 对应) 后优化竞争反应时间。设置竞争时间依次为 15、30、45 和 60min, 各竞争反应加入等量竞争抗原, 分别计算抑制率。

根据优化的最佳条件, ZEN 标准品浓度从 7.8ng/mL 依次倍比稀释到 0.015ng/mL, 同时设置标准品稀释液和含 0.05% 脱脂奶粉的 PBST 等体积混合溶液作为阴性对照, Anti-ZEN-HRP-AuNPs 和标准品稀释液等体积混合溶液作为空白对照, 每个浓度 3 个平行。以 ZEN 的浓度对数为横坐标、抑制率为纵坐标, 构建 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 标准曲线, 并求得曲线方程和相关系数。

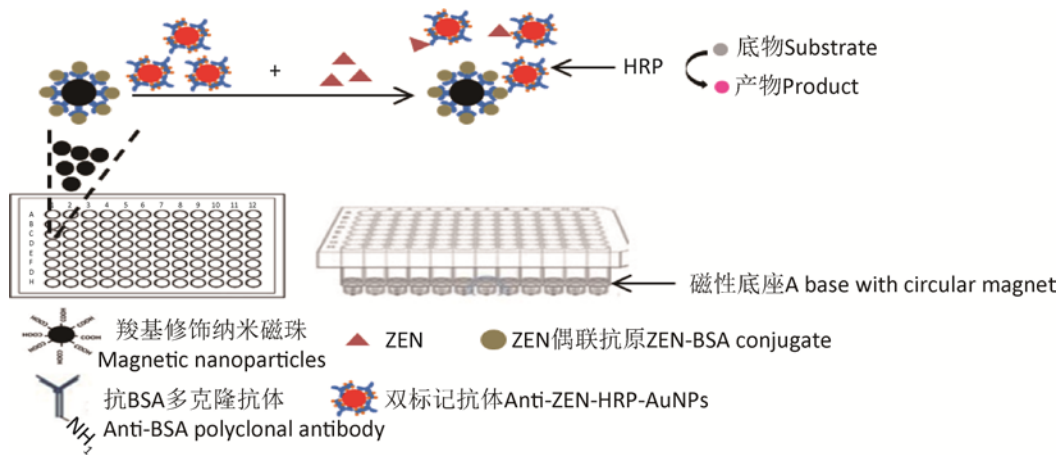


图 1 基于纳米磁珠和双标记抗体的玉米赤霉烯酮检测方法示意图

Fig. 1 Schematic presentation of MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA for the detection of zearalenone.

### 1.5 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 检测法特异性分析

分别选择 ZEN 结构类似物, 包括  $\alpha$ -玉米赤霉醇 ( $\alpha$ -zearalanol)、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇 ( $\alpha$ -zearalenol)、 $\beta$ -玉米赤霉醇 ( $\beta$ -zearalanol)、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇 ( $\beta$ -zearalenol) 和玉米赤霉酮 (zearalanone)、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)、赭曲霉毒素 A (OTA)、伏马毒素 (FB<sub>1</sub>)、桔青霉素 (CIT) 和展青霉毒素 (PAT) 作为竞争抗原, 配制成不同浓度溶液, 测量 IC<sub>50</sub> 值, 按下式计算交叉反应率 (孙清等 2015):

$$\text{交叉反应率}(\%) = (\text{ZEN IC}_{50}) / (\text{类似物 IC}_{50}) \times 100\%$$

### 1.6 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 稳定性试验

本研究采用 37°C 加速试验判定该检测方法的稳定性。将制备的磁珠复合物 MNPs-BSA-ZEN 和双标记抗体 Anti-ZEN-HRP-AuNPs 置于 37°C 恒温箱, 分别于 7、15、30d 取出, 求得曲线方程和相关系数, 以评价检测方法稳定性, 预测保存期。

### 1.7 基质影响的消除

为降低萃取试剂中有机溶剂和待检样本中蛋白质、纤维素等对检测效果的影响, 同时避免因稀释倍数过高, 降低检测灵敏度。本研究将萃取液经超纯水梯度稀释 (1:1、1:3、1:7) 后稀释 ZEN 标准品, 绘制基质添加标准曲线, 优化萃取

液的最佳稀释倍数, 在消除基质的影响的同时获得最佳的检测效果。

### 1.8 样本萃取与加标试验

5g 样本置于 250mL 三角烧瓶中, 加入 25mL 萃取液 (甲醇:水=7:3, V/V), 剧烈振荡 20min 后, 4 000×g 离心 10min, 上清经玻璃纤维滤纸过滤, 超纯水稀释后进行检测。

玉米赤霉烯酮阴性样本 (经 LC-MS/MS 验证) 充分研磨过筛, 置于 60°C 烘箱干燥后, 加入 ZEN 标准溶液, 混匀后放置过夜待检。不同加标样本设置 3 个平行, 且不同时间重复测定 3 次, 分别计算回收率和相对标准偏差。

### 1.9 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 与 LC-MS/MS 比较试验

对天然样本 (包括玉米、小麦和饲料) 同时采用 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 和 LC-MS/MS 两种方法平行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 纳米磁珠-ZEN 偶联抗原复合物 (MNPs-BSA-ZEN) 的制备

分别取等量纳米磁珠 (MNPs)、纳米磁珠 BSA 多克隆抗体偶联物 (MNPs-Anti-BSA) 以及纳米磁珠-ZEN 偶联抗原复合物 (MNPs-BSA-

ZEN), 使用酶标 ZEN 单克隆抗体 (Anti-ZEN-HRP) 进行 ELISA 鉴定, 步骤同 1.4。标记产物的  $OD_{450}$  与对照比值远大于 2.1, 显示 MNPs-BSA-ZEN 制备成功 (图 2)。

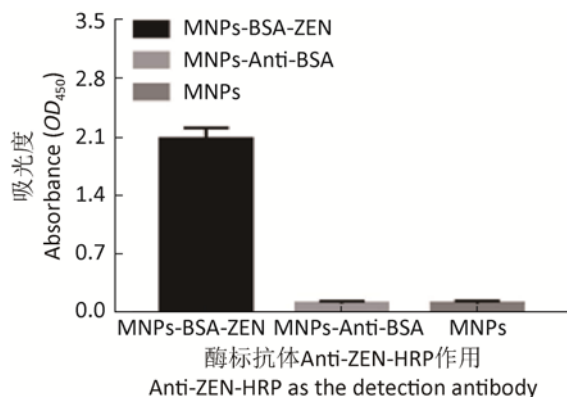


图 2 纳米磁珠-偶联抗原复合物的 ELISA 鉴定

Fig. 2 Identification of the ZEN conjugates coated magnetic nanoparticles.

## 2.2 MNPs-BSA-ZEN、Anti-ZEN-HRP-AuNPs 作用浓度和竞争孵育时间的确定

通过方阵滴定法 ( $OD_{450}$  接近 1.0 对应), 确定 MNPs-BSA-ZEN 和 Anti-ZEN-HRP-AuNPs 的稀释倍数依次为 1:100 和 1:800。竞争孵育时间优化结果见图 3, 综合反应时间和灵敏度, 确定为 45min。

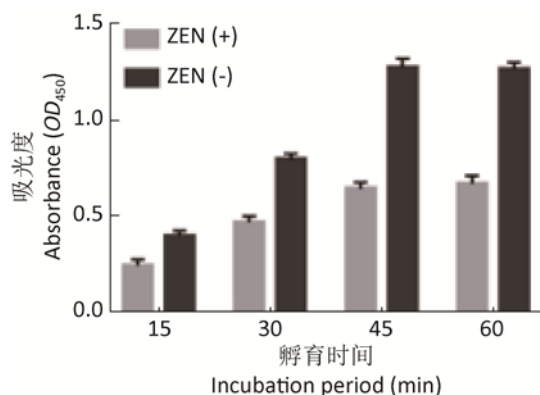


图 3 不同竞争反应时间对 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 检测效果的影响

Fig. 3 Determination of suitable incubation period by MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA with (+ ZEN) or without (-ZEN) addition of zearalenone.

## 2.3 基于纳米磁珠和双标记抗体的 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 检测 ZEN 方法的建立

按照 1.4 中所述, 确定了 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 的反应条件: MNPs-BSA-ZEN 和 Anti-ZEN-HRP-AuNPs 的稀释倍数依次为 1:100 和 1:800, 竞争时间为 45min。

以竞争抗原 ZEN 标准品的浓度对数为横坐标, 以抑制率为纵坐标, 通过 GraphPad Prism 7 软件绘制抑制曲线 (图 4), 线性方程为  $y=0.491x+0.8228$  ( $R^2=0.9914$ ), 线性范围为 0.05–0.89ng/mL, 检测下限为 0.03ng/mL, 半数抑制率 ( $IC_{50}$ ) 为 0.22ng/mL。

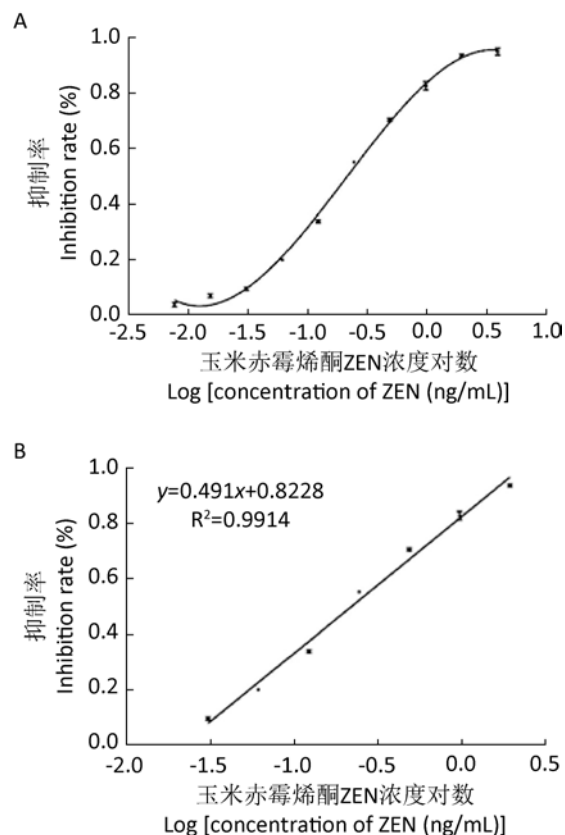


图 4 基于纳米磁珠和双标记抗体的 ZEN 检测方法竞争抑制曲线 (A) 和抑制率线性分析 (B)

Fig. 4 Competitive inhibition of ZEN in MNPs-HRP-AuNPs ELISA (A) and linear analysis of percent inhibition against ZEN concentration (B).

在前期的研究中,基于该抗体建立的间接竞争 ELISA(IC-ELISA)检测下限( $IC_{10}$ )为 0.12ng/mL,半数抑制率( $IC_{50}$ )为 1.24ng/mL,检测时长约 2h(王元凯等 2011);基于该抗体建立的纳米磁珠-生物素亲和素检测法(MNPs-bsELISA)检测下限( $IC_{10}$ )为 0.04ng/mL,半数抑制率( $IC_{50}$ )为 0.37ng/mL,耗时约 1.5h(Zhang *et al.* 2015b),相比 IC-ELISA 和 MNPs-bsELISA,本研究建立的 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 灵敏度更高( $IC_{10}$ : 0.03ng/mL;  $IC_{50}$ : 0.22ng/mL)且耗时更短(45min)。

#### 2.4 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 检测 ZEN 特异性分析

对本方法特异性分析结果表明,建立的 MNPs-HRP-AuNPs ELISA 对玉米赤霉烯酮类似物( $\alpha$ -zearalanol、zearalanone、 $\alpha$ -zearalenol、 $\beta$ -zearalenol 和  $\beta$ -zearalanol)的交叉反应性依次为 19.2%、11.7%、8.3%、1.2%和 4.3%,对其他农产品中常见真菌毒素 OTA、AFB<sub>1</sub>、FB<sub>1</sub>、CIT 和 PAT 均无交叉反应,特异性高。

#### 2.5 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 稳定性的验证

按照 1.6 中所述对该方法进行稳定性检测。结果表明 MNPs-BSA-ZEN 和 Anti-ZEN-HRP-AuNPs 在 37°C 放置 30d 后,检测灵敏度并未下降,对 ZEN 仍能特异性检出。本试验证明建立的 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 稳定性好,相关组分至少可在 37°C 保存 30d,若低温储存,预测至少可稳定保存一年。

#### 2.6 基质效应的消除

MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 基质效应分析结果(图 5)表明玉米、面粉和大豆提取液,经超纯水 1:3 倍稀释后所得的基质添加标准曲线与标准抑制曲线(PBS 稀释)基本相同,此时基质效应基本消除,故在后续样本检测时,提取液经 1:3 倍稀释后即可检测。

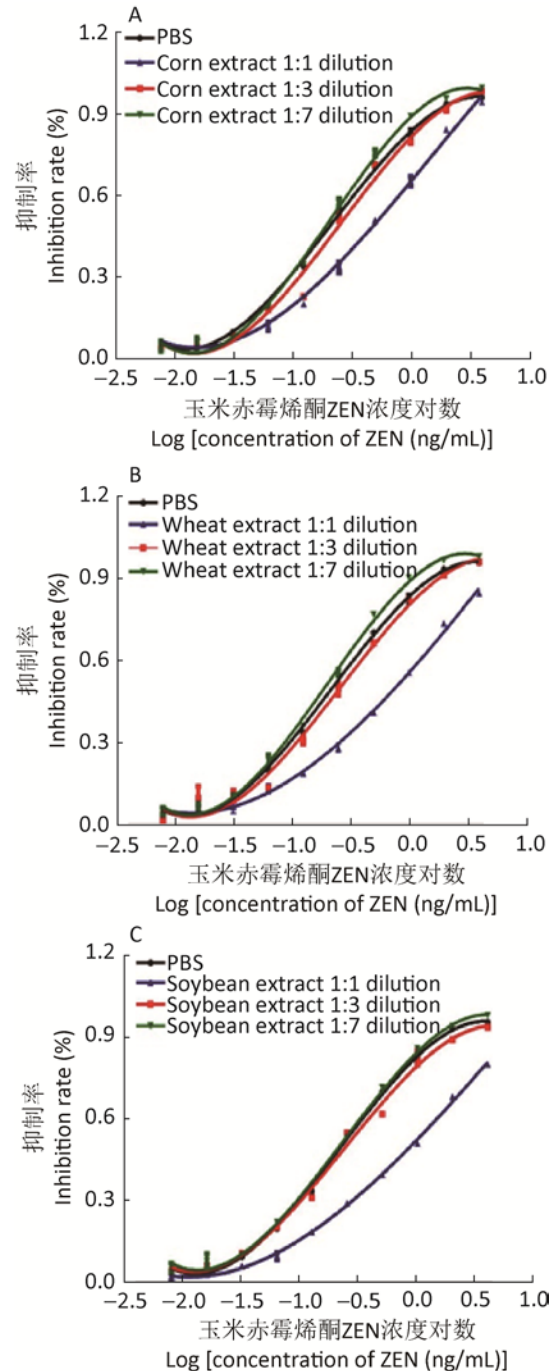


图 5 玉米(A)、面粉(B)和大豆(C)提取液基质影响消除试验

Fig. 5 Matrix interferences of extracts from corn (A), wheat (B) and soybean (C) spiked with zearalenone and diluted in different ratios with phosphate buffered saline as measured by MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA.

## 2.7 加标回收试验

按照 1.7 所述方法, 取 ZEN 阴性玉米、小麦和大豆样本进行加标试验, ZEN 含量依次为 1.25、2.5、5 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。使用建立的 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 检测, 各浓度 3 个平行, 且重复 3 次, 计算回收率和相关参数。

结果表明, 本研究建立的 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 的加标回收率在 81.6%–113.5%之间, 日内、日间相对标准偏差分别为 4.5%–8.2%和 5.1%–9.4% (表 1), 符合残留检测的相关标准, 表明该检测方法准确率高且稳定性好, 具有很好的实用性和可靠性。

## 2.8 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 与 LC-MS/MS 相关性分析

运用 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 和 LC-MS/MS 法, 对 66 份天然样本中 ZEN 进行平行测定, 其中阳性样本的定量结果见表 2, 并经线性回归分析 (图 6), 线性回归方程为: LC-MS/MS=1.0098 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA+0.1596

( $R^2=0.8728$ ), 该方法与 LC-MS/MS 相关性良好, 可满足实际样本中 ZEN 的检测需求。

## 3 讨论

玉米赤霉烯酮 (ZEN) 具有很强的生殖毒性、致畸和免疫抑制毒性, 长期食用 ZEN 污染的食物, 会对机体造成严重伤害。为克服现有仪器检测法前处理复杂, 需要大型设备的缺点, 同时保证检测的灵敏度和便捷性, 本研究在前期工作的基础上, 利用酶联免疫检测法快速、低成本的优势, 结合纳米磁珠和双标记抗体, 建立了一种针对 ZEN 的快速、高灵敏度检测方法, 经验证该方法准确便捷, 可为食品安全提供有效保障。

本研究将玉米赤霉烯酮偶联抗原 (ZEN-BSA) 包被于羧基修饰的纳米磁珠 (MNPs) 表面, 制备的磁珠-偶联抗原复合物 (MNPs-BSA-ZEN) 与对待检样本中靶分子竞争结合抗体, 在液相环境中, 免疫反应耗时短且灵敏度更高 (Hu *et al.* 2010), 同时, ZEN 单克隆抗体 (Anti-ZEN) 经金

表 1 样本的加标回收率和批内批间相对标准偏差

Table 1 Recovery and relative standard deviations of samples spiked with different levels of zeralenone by MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA

样本 Sample	ZEN 浓度 Concentration of ZEN ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		批内 Intra-assay RSD (%) (n=3)	批间 Inter-assay RSD (%) (n=3)	回收率 Recovery rate (%)
	加标 Spiked	检出 Detected			
	玉米 Corn	1.25			
	2.5	2.14	5.3	6.1	85.6
	5	5.17	4.5	5.9	103.4
	10	11.35	6.8	6.3	113.5
小麦 Wheat	1.25	1.19	5.2	7.8	95.2
	2.5	2.37	7.3	6.1	94.8
	5	5.41	6.9	7.7	108.2
	10	9.23	5.7	7.4	92.3
大豆 Soybean	1.25	1.02	4.6	5.1	81.6
	2.5	2.07	7.2	8.5	82.8
	5	4.81	5.1	7.3	96.2
	10	9.17	8.2	9.4	91.7



表 2 自建 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 和 LC-MS/MS 对天然样本中 ZEN 的定量检测结果

Table 2 Quantitative detection of ZEN in natural samples by the developed MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA and LC-MS/MS

样本编号 Sample No.	纳米磁珠和双标记抗体 IC-ELISA MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), Mean $\pm$ SD	液相二级质谱 LC-MS/MS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), Mean $\pm$ SD
1	5.24 $\pm$ 0.39	3.81 $\pm$ 0.55
2	11.74 $\pm$ 0.73	14.01 $\pm$ 0.45
3	7.32 $\pm$ 0.51	9.99 $\pm$ 0.08
4	22.32 $\pm$ 1.25	19.35 $\pm$ 0.15
5	6.19 $\pm$ 0.35	4.05 $\pm$ 0.16
6	18.96 $\pm$ 0.93	16.67 $\pm$ 0.05
7	14.71 $\pm$ 0.86	17.52 $\pm$ 0.29
8	12.64 $\pm$ 0.77	14.27 $\pm$ 0.15
9	24.83 $\pm$ 0.94	27.03 $\pm$ 0.31
10	16.12 $\pm$ 0.69	14.84 $\pm$ 0.28
11	12.83 $\pm$ 0.52	10.91 $\pm$ 0.28
12	18.26 $\pm$ 1.43	21.25 $\pm$ 0.11
13	13.07 $\pm$ 1.08	14.41 $\pm$ 0.35

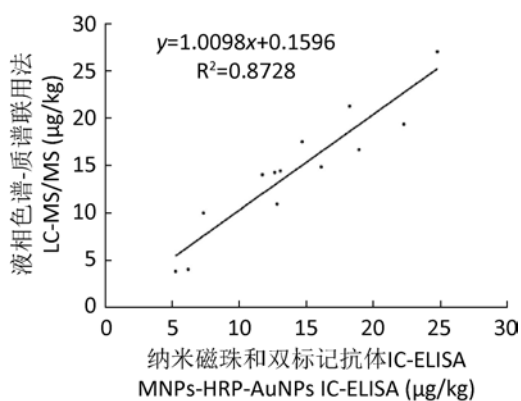


图 6 MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA 与 LC-MS/MS 检测结果的相关性分析

Fig. 6 Correlation of results obtained by MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA and LC-MS/MS for ZEN detection in natural samples.

颗粒和辣根过氧化物酶双标记形成的多聚 HRP 复合物 (Anti-ZEN-HRP-AuNPs) 使检测信号再次增强。相比前期建立的常规间接竞争 ELISA

(IC-ELISA) 和纳米磁珠生物素-亲和素检测法 (MNP-bsELISA), 该研究中的纳米磁珠和双标记抗体酶免法 (MNPs-HRP-AuNPs IC-ELISA) 具有高灵敏度和快速的双重优势, 检测下限达到 0.03ng/mL, 实际样品检出限为 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 样本加标回收率在 81.6%–113.5%之间, 且与 LC-MS/MS 有较好的相关性, 能够用于实际样品中 ZEN 的快速定量检测与分析。

本研究以纳米磁珠为固相载体, 使用金颗粒和辣根过氧化物酶双标记的单克隆抗体, 建立的 ZEN 新型酶联免疫检测方法, 在缩短检测时间的同时提高了灵敏度, 通过使用与 96 孔板配套的磁性底座富集洗涤磁珠, 方便快捷, 对于大量谷物样本的初筛, 具有很好的应用前景。磁珠偶联抗原复合物、双标记抗体的制备成本低, 且检测过程无需特殊仪器的支持, 与常规 ELISA 基本相同, 对于有真菌毒素检测需求的基层检验检疫机构和农产品加工企业来说, 更易于接受和推广。此外, 该方法在提供一种 ZEN 高灵敏度检测手段的同时, 提出的纳米磁珠和双标记抗体相结合使用的信号增强策略也为其他真菌毒素或小分子物质的定量检测提供了参考。

## [REFERENCES]

- Cha SH, Kim SH, Bischoff K, Kim HJ, Son SW, Kang HG, 2012. Production of a highly group-specific monoclonal antibody against zearalenone and its application in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Science*, 13(2): 119-125
- Dellafiora L, Galaverna G, Dall'asta C, Cozzini P, 2015. Hazard identification of *cis/trans*-zearalenone through the looking-glass. *Food and Chemical Toxicology*, 86: 65-71
- Dong GL, Pan YH, Wang YL, Ahmed S, Liu ZL, Peng DP, Yuan ZH, 2018. Preparation of a broad-spectrum anti-zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Chemistry*, 247: 8-15
- Efsa J, 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants

- in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 89: 1-35
- Hu Y, Shen GQ, Zhu HL, Jiang GX, 2010. A class-specific enzyme-linked immunosorbent assay based on magnetic particles for multiresidue organophosphorus pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5): 2801-2806
- Jiang W, Luo P, Wang X, Chen X, Zhao Y, Shi W, Wu X, Wu Y, Shen J, 2012. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of nitrofurantoin metabolite, 1-amino-hydantoin, in animal tissues. *Food Control*, 23(1): 20-25
- Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Edler L, Grasl-Kraupp B, 2017. Scientific opinion: risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA Journal*, 15(7): doi:10.2903/j.efsa.2017.4851
- Li Z, Li M, Li F, Zhang MZ, 2018. Paper-based chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay enhanced by biotin-streptavidin system for high-sensitivity C-reactive protein detection. *Analytical Biochemistry*, 559: 86-90
- Mousavi Khaneghah A, Fakhri Y, Raeisi S, Armoon B, Sant'ana AS, 2018. Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: A systematic review and meta-analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 118: 830-848
- Schell C, Verkoyen C, Krewet E, Müller G, Norpoth K, 1993. Production and characterization of monoclonal antibodies to *N*<sup>7</sup>-phenylguanine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 119(4): 221-226
- Škrbić B, Živančev J, Đurišić-Mladenović N, Godula M, 2012. Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: levels and assessment of the exposure by wheat-based products. *Food Control*, 25(1): 389-396
- Smith JE, Sapsford KE, Tan WH, Ligler FS, 2011. Optimization of antibody-conjugated magnetic nanoparticles for target preconcentration and immunoassays. *Analytical Biochemistry*, 410(1): 124-132
- Sun Q, Li GF, Deng QM, Liu JM, Shi GQ, 2015. Development and application of a highly sensitive ELISA kit for aflatoxin B<sub>1</sub>. *Environmental Chemistry*, 34(10): 1845-1853 (in Chinese)
- Sun YN, Hu XF, Zhang Y, Yang JF, Wang FY, Wang Y, Deng RG, Zhang GP, 2014. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of zearalenone in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(46): 11116-11121
- Tanaka K, Sago Y, Zheng YZ, Nakagawa H, Kushiro M, 2007. Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2): 59-66
- Ul Hassan Z, Al Thani R, F AA, Al Meer S, Migheli Q, Jaoua S, 2018. Co-occurrence of mycotoxins in commercial formula milk and cereal-based baby food on the Qatar market. *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance*, 11(3): 191-197
- Wang CQ, Qian J, Wang K, Yang XW, Liu Q, Hao N, Wang CK, Dong XY, Huang XY, 2016. Colorimetric aptasensing of ochratoxin A using Au@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as signal indicator and magnetic separator. *Biosensor and Bioelectronics*, 77: 1183-1191
- Wang YG, Zhao GH, Li XJ, Liu L, Cao W, Wei Q, 2018. Electrochemiluminescent competitive immunosensor based on polyethyleneimine capped SiO<sub>2</sub> nanomaterials as labels to release Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> fixed in 3D Cu/Ni oxalate for the detection of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Biosensors and Bioelectronics*, 101: 290-296
- Wang YK, Yan YX, Ji WH, Wang HA, Zou Q, Sun JH, 2013. Novel chemiluminescence immunoassay for the determination of zearalenone in food samples using gold nanoparticles labeled with streptavidin-horseradish peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18): 4250-4256
- Wang YK, Wang J, Wang YC, Chen ZF, Yan YX, Hao QW, Li SQ, Yu C, Yang CY, Sun JH, 2011. Preparation of anti-zearalenone monoclonal antibodies and development of an indirect competitive ELISA for zearalenone. *Microbiology China*, 38(12): 1793-1880 (in Chinese)
- Yao MW, Wang LY, Fang CZ, 2017. The chemiluminescence immunoassay for aflatoxin B<sub>1</sub> based on functionalized magnetic nanoparticles with two strategies of antigen

- probe immobilization. *Luminescence*, 32(4): 661-665
- Zhang X, Fang Y, Fu ZX, Zhou YZ, Fang WH, Song HH, 2018. An efficient method for aflatoxin B<sub>1</sub> detection based on gold nanoparticles labeled with monoclonal antibody-horseradish peroxidase complex. *Mycosystema*, 37(11): 1516-1524 (in Chinese)
- Zhang X, Sun MJ, Kang Y, Xie H, Wang X, Song HH, Li XL, Fang WH, 2015a. Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*, 106: 89-96
- Zhang X, Wang X, Sun MJ, Zhang XF, Song HH, Yan YX, Sun JH, Li XL, Fang WH, 2015b. A magnetic nanoparticle based enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive quantification of zearalenone in cereal and feed samples. *Toxins (Basel)*, 7(10): 4216-4231
- Zhang X, Wang ZH, Fang Y, Sun RJ, Cao T, Paudyal N, Fang WH, Song HH, 2018a. Antibody microarray immunoassay for simultaneous quantification of multiple mycotoxins in corn samples. *Toxins (Basel)*, 10(10): doi:10.3390/toxins/0100415
- Zhang X, Wang Z, Xie H, Sun R, Cao T, Paudyal N, Fang W, Song H, 2018b. Development of a magnetic nanoparticles-based screen-printed electrodes (mnps-spes) biosensor for the quantification of ochratoxin a in cereal and feed samples. *Toxins (Basel)*, 10(8): doi:10.3390/toxins/0080317
- Zhou J, Du LP, Zou L, Zou YC, Hu N, Wang P, 2014. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection based on staphylococcal protein a—au nanoparticle modified gold electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 197(7): 220-227

#### [附中文参考文献]

- 孙清, 李谷丰, 邓乾民, 刘杰民, 时国庆, 2015. 高灵敏黄曲霉毒素B<sub>1</sub>酶联免疫试剂盒的研制及应用. *环境化学*, 34(10): 1845-1853
- 王元凯, 王君, 王雨晨, 陈志飞, 严亚贤, 郝倩雯, 李树清, 于翠, 杨翠云, 孙建和, 2011. 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. *微生物学通报*, 38(12): 1793-1800
- 章先, 方云, 付子贤, 周一钊, 方维焕, 宋厚辉, 2018. 基于纳米金和辣根过氧化物酶双标记抗体的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>高灵敏检测方法的建立及应用. *菌物学报*, 37(11): 1516-1524

(本文责编: 韩丽)