

综述

免疫分析技术在检测真菌毒素中的研究进展

刘颖达¹, 刘海媛¹, 苏娜¹, 明亮¹, 何静¹, Tuyatsetseg Jambal², B. Maizul³, 吉日木图^{1,4}, 伊丽¹

(1. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古呼和浩特 010018; 2. 蒙古国立科技工业学院, 蒙古国乌兰巴托 999097; 3. 中-蒙生物高分子应用研究联合实验室, 蒙古国乌兰巴托 999097; 4. 内蒙古中哈骆驼研究院, 内蒙古阿拉善 750306)

摘要: 真菌毒素是真菌在适宜条件下产生的次级代谢产物。真菌毒素不仅会危害人类和动物的健康, 还对农业经济造成无法估量的损失。常见的真菌毒素检测方法以大型仪器检测为主, 需要专业的实验人员进行检测, 且耗时长。新兴的免疫分析技术具有操作简便、耗时短、成本低、干扰小、能同时处理大量样品等优点。本文综述了近年来几种常见的免疫分析技术中免疫原、抗体的开发, 系统地对比了各类免疫分析技术的优缺点, 为免疫分析技术在检测真菌毒素中的发展提供了新的思路。

关键词: 真菌毒素; 免疫分析; 快速检测; 食品安全; 研究进展

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)11-1678-10

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.11.020

Research progress of immunoassay technology in mycotoxin detection

LIU Yingda¹, LIU Haiyuan¹, SU Na¹, MING Liang¹, HE Jing¹, Tuyatsetseg Jambal²,
B. Maizul³, Jirimutu^{1,4}, YI Li¹

(1. Inner Mongolia Agriculture University, Inner Mongolia Hohhot 010018, China; 2. Mongolia College of Industrial Technology, Mongolian University of Science and Technology, Ulaanbaatar 999097, Mongolia; 3. China-Mongolia Joint Laboratory for Biomacromolecule Research, Ulaanbaatar 999097, Mongolia; 4. CHN-KAZ camel research institute of Inner Mongonlia, Inner Mongolia Alxa 750306, China)

Abstract: Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi under suitable conditions. Mycotoxins not only endanger humans and animals, but also cause immeasurable damage to the agricultural economy. The common mycotoxin detection methods mainly feature large-scale instrument detection, which requires professional laboratory personnel and takes a long time. Emerging immunoassay technologies have the advantages of simple operation, speed, low cost, minimal interference, and the ability to process several samples simultaneously. This paper reviews the development of immunogens and antibodies in several common immunoassay techniques in the recent years and systematically compares the advantages and disadvantages of various immunoassay techniques. This review provides a novel idea for the development of immunoassay technology in mycotoxin detection.

Key words: Mycotoxins; immunoassays; rapid detection; food safety; research progress

真菌毒素是由镰刀菌属、青霉菌属、曲霉菌属等一类真菌在适宜的生长环境下所产生的次级代

谢产物^[1]。目前已知的真菌毒素共 400 余种^[2]。主要污染粮食谷物、农作物、奶制品等人类生活中常见的食物。据联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)调查显示, 每年被真菌毒素污染的粮食达全球粮食总产量的 25%, 直接经济损失达数千亿美元^[3]。常见的真菌毒素有黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂(Aflatoxin B₂, AFB₂)、黄曲霉毒素 M₁(Aflatoxin M₁, AFM₁)、黄曲霉毒素 G₁(Aflatoxin G₁, AFG₁)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxins, OTA)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮毒素

收稿日期: 2022-08-26

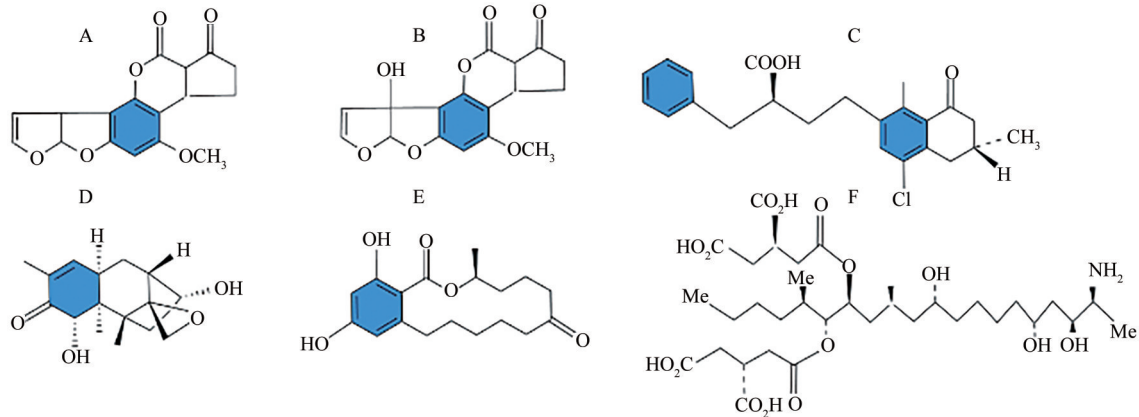
基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2020BS03011); 国家重点研发项目(2020YFE0203300); 内蒙古自治区科技成果转化项目(2021CG0021); 高层次人才引进科研启动项目(NDYB2018-48); 双一流学科创新团队建设项目(NDSC2018-14)

作者简介: 刘颖达 男 硕士研究生 研究方向为骆驼纳米抗体
E-mail: 15847538153@163.com

通信作者: 伊丽 女 讲师 研究方向为骆驼纳米抗体与驼乳营养成分
E-mail: yili_imau@163.com

(Zearalenone)、T-2 毒素和伏马菌素(Fumonisin, FB)、桔霉素(Citrinin, CIT)等^[4],结构式见图 1。由于真菌毒素的结构单一特性导致一般加工方式难以

处理^[5]。表 1 为一些主要的真菌毒素及其相关的真菌产生者,受污染的宿主、毒性效应以及国标对该类真菌毒素在食品中的最低检测限度。



注:A:AFB₁ B:AFM₁ C:OTA D:T-2毒素 E:ZEN F:FB₁

图1 常见的真菌毒素结构

Figure 1 The structure of common mycotoxins

表 1 各类真菌毒素的宿主、毒性作用,以及国标规定中的最低检测限度

Table 1 The toxic effect of various mycotoxins, and the minimum detection limit in the national standard

毒素名称	主要产生者	主要宿主	毒性作用	最低可检测限度/(μg/kg)	参考文献
黄曲霉毒素(AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFM ₁ 、AFG ₁)	黄曲霉、寄生曲霉	玉米、坚果、花生、棉花	致癌性、致畸性、免疫抑制	≤20(AFB ₁) ≤0.5(AFM ₁)	[7]
伏马菌素(FB ₁ 、FB ₂)	串珠镰刀菌	玉米	肝毒性、癌症、肺水肿、脑白质软化症	≤1 000	[8]
脱氧血腐镰刀烯醇(DON)	黄色镰刀菌	玉米、小麦、大麦	中枢神经中毒性	≤1 000	[7]
玉米赤霉烯酮(ZEN)	禾谷镰刀菌	玉米、小麦、大麦、水稻	致畸性、不孕性	≤60	[7]
赭曲霉毒素(OTA)	疣状青霉	谷物衍生物、香料、葡萄酒	肾毒性、致癌性、致畸性、免疫毒性	≤5.0	[7]
桔霉素(CIT)	红曲霉	玉米、小麦、大麦、水稻	肾毒性、肝毒性、免疫毒性、致癌毒性	≤2 000	[9]

目前,对于真菌毒素检测常见的方法是大型仪器检测和免疫分析。仪器分析具有着高精度、快速、不受时间、环境影响等优点^[6]。但对专业的操作人员需求和严格的样品前处理过程限制了仪器检测的通用性^[7]。新兴的免疫分析因其高灵敏度、即时性、高通量的筛选能力已经被广泛应用于真菌毒素的现场快速检测。本文总结了免疫分析技术在真菌毒素检测中的应用进展,并比较其优劣性。最后讨论了该领域方面面临的挑战和未来的发展前景。

1 免疫分析方法的建立

1.1 免疫原的选择与制备

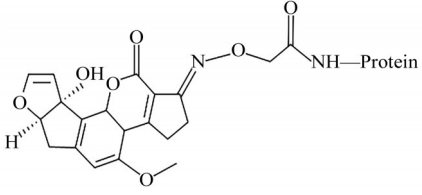
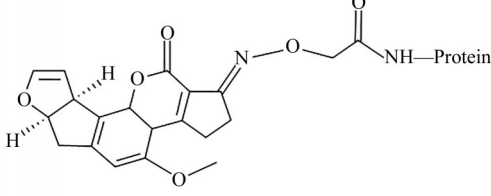
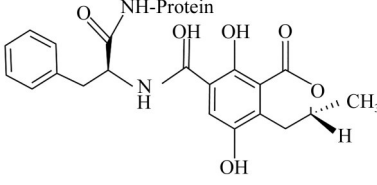
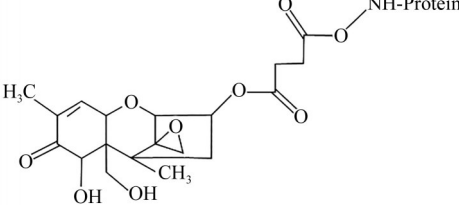
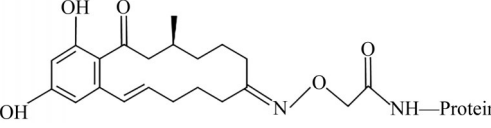
免疫分析方法的基础是抗体—抗原(Ab-Ag)的特异性反应^[10]。构建免疫分析方法的基础是获得真菌毒素相对应的抗原和抗体。由于真菌毒素是不具有免疫原性的小分子物质,不能够直接刺激动物机体产生相对应的抗原^[11]。所以设计并合成一个合理的半抗原是获得针对小分子物质的特异性

抗体的关键。半抗原的选择应该以目标分析的小分子在结构与物理化学性质方面相似,一般应以 4~6 个碳原子组成带有活性基团(—COOH 和 NH₂)的附着臂与载体蛋白结合^[12],其中半抗原又称不完全抗原,单独使用时,不能诱导机体的免疫应答,不具备免疫原性,当与大分子蛋白质或非抗原性氨基酸经载体交联结合后,获得免疫原性,可以对机体诱导免疫应答。真菌毒素均为不具备免疫原性的小分子物质,当利用化学合成手段将小分子半抗原物质与特定蛋白结合,即获得具有免疫原性的真菌毒素抗原,再利用此抗原进行周期性的动物免疫实验,可刺激动物机体产生免疫应答,产生特异性抗体。表 2 为一些常见真菌毒素抗体。

1.2 抗体的类型与特点

由于抗体的产生方法不同,抗体可分为 5 种类型:单克隆抗体(Monoclonal antibodies, mAbs)^[13]、多克隆抗体(Polyclonal antibodies, pAbs)、重组抗体(Recombinant antibodies, rAbs)、纳米抗体(Nanobodies, Nbs)^[14-16]和鲨鱼新抗原受体(VNAR)。其中,1975 年

表2 常见的真菌毒素抗体
Table 2 Antibodies of mycotoxins

目标物	免疫原	免疫原结构	类型	效价	参考文献
AFM1	AFM1-BSA AFM1-oxime-BSA		IgG ₁	1:250 000	[26]
AFB1	AFB _{2a} -BSA		IgG ₁	1:51 200	[26]
OTA	OTA-BSA OTA-KLH		IgM	1:210 000	[27]
DON	3-HS-DON-BSA 3-HS-DON-OVA		IgM	1:51 200	[27]
ZEN	ZEN-BSA ZEN-OVA		IgG ₁	1:51 200	[25]

首次实现了将杂交瘤细胞技术应用到小鼠体内,产生了单克隆抗体,其特点是长度相同、特异性高、均匀统一、可大批量复制^[17]。目前大部分真菌毒素单克隆抗体(mAb)进入商品化时代。表2为部分已经筛选出的真菌毒素单克隆抗体。由多种抗原决定簇刺激机体,相应地产生各种各样的单克隆抗体,多种单克隆抗体混合后产生的即为多克隆抗体^[18]。重组抗体通常由哺乳动物细胞产生。在已知抗体基因序列的情况下,将该基因序列克隆到相应载体中,表达后获得的抗体即为重组抗体。其中,单链可变区(Single-chain variable region, ScFv)和单链抗体(Single-chain antibody, ScFab)是常用的抗体片段。将抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)由连接肽连接后重组表达,可获得单链可变区。相应地,一个轻链(LC)和一个无法分割的片段构成了单链抗体。由不同抗体的VH和VL功能域配对,将形成二聚体结构,通过类比,也存在三聚体(Triabodies),多聚体抗原结合价越高,亲和力越高^[19-23]。纳米抗体(Variable domain of heavy chain of

the chain antibody, VHH)为目前发现的最小的具有抗原结合片段,传统的单克隆抗体分子量为150 kDa,为纳米抗体的十倍。目前已知的纳米抗体有驼源纳米抗体和鲨源纳米抗体。纳米抗体直径为2.5 nm,高度为4 nm,其结构如图2所示。1995年,ANDREW等^[24]在鲨鱼体内发现了全新的免疫球蛋白IgNAR(Immunoglobulin new antigen receptor)该种抗体不同于传统抗体,是由两条重链组成的同源二聚体。VHH整体结构紧密呈扁长形,该种结构决定在免疫反应中更易接触到分析物,抗原结合能力较强。SPIEES等^[25]首次提出了从噬菌体展示库中分离了抗ZEN的重组单链可变区抗体,并进行鉴定,将该ScFv基因克隆至大肠杆菌B株进行表达,结果表明,融合后的抗体半数抑制浓度(IC50)大大降低,检测线进一步提高。

1.3 免疫检测的方式

1.3.1 非竞争性免疫分析

非竞争性免疫分析常用于大分子抗原的检测,常见为夹心ELISA法。在检测过程中,使用不同的

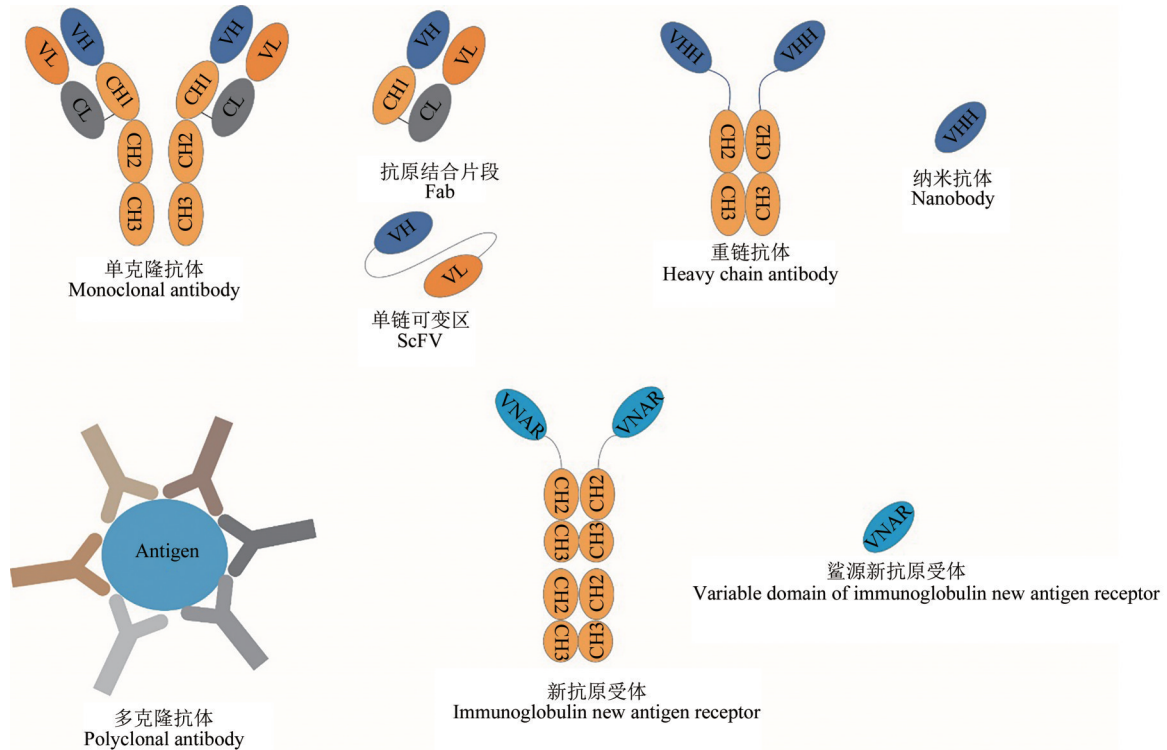


图2 单克隆抗体、多克隆抗体、纳米抗体、新抗原受体结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of the structures of monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, nanobodies, and neoantigen receptors

抗体在目标分析物的两侧,其中一种抗体的目的是用于捕获分析物,另一种抗体与目标分析物结合以形成浓度信号,便于观察检测结果。在真菌毒素的检测过程中,目标分析物以小分子结构为主,而双位点的免疫分析法测定难以检测^[28]。通过改造表位的识别强度可以有效提高检测效率及检测准确性。基于生物素提高非竞争性免疫分析是可提高灵敏度的方法。HUANG等^[29]通过生物亲和素法改造了夹心ELISA以检测玉米中的ZEN,最低检测限为0.35 ng/mL,灵敏度得到了较大提高。

1.3.2 竞争免疫分析

在间接竞争免疫分析中,将特异性抗体加入到已经被固定在载体中的真菌毒素的半抗原和待测分析物中。在经过自由结合后,固定的半抗原竞争性结合到抗体,然后加入标记的二抗并结合到一抗上。相比直接竞争免疫分析,不需要被标记的二抗加入^[30]。

2 免疫分析技术在检测真菌毒素方面的应用

2.1 真菌毒素检测中样品的制备

由于农作物的生长特性,许多在售食品中的真菌毒素分布是不均匀的,因此在真菌毒素检测中,样品的制备起着关键作用。必须保证所提取的样品的分析结果具有整个批次的代表性。根据近年研究,真菌毒素检测中大部分错误源自样品提取的错误操作。增加样本数量可以降低样本的不确定

性。此类研究也减少了真菌毒素检测中基质的干扰。为了在一定程度上统一真菌毒素采样的程序,欧盟制定了法规控制采样的标准。目前,已经有较多的预处理步骤,如固相萃取法(Solid phase extraction, SPE)、磁性固相萃取法(Magnetic solid phase extraction, MSPE)、免疫亲和柱(Immunoaffinity columns, LAC)等。有效的预处理方法决定了样品的检测结果。免疫分析技术在样品的预处理方面具有特定优势,免疫分析技术中的抗体与抗原的特异性结合可以降低样品杂质的干扰性,所以免疫分析技术适用于真菌毒素的现场检测。

2.2 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是目前适用范围最为广泛的免疫分析检测方法^[31]。该方法是基于抗体和抗原特异性结合的免疫学特性,其原理是将具有免疫活性的抗体(或抗原)吸附固定在固相载体表面,将酶与固相化的抗体(或抗原)相连接,既保留了酶标抗体(或抗原)的免疫活性,又具有酶活性,根据加入底物的显色程度进行结果的判定^[32-36]。1995年,ABRAMSON首次将桔霉素(CIT)与匙孔贝血蓝蛋白(KLH)偶连制成抗原进行动物免疫后得到带有抗体的血清,建立了CIT间接竞争ELISA,其检测范围为1~13 ng/mL^[37]。WANG等^[38]首次开发了基于天然纳米抗体文库的ELISA法检测AFM₁,此方法是从羊驼天然纳米抗体文库中筛选出对AFM₁特异性较好的纳米抗体。结

果表明该方法的最低检测线为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, 该方法的提出, 为现场快速检测 AFM_1 提供了一种简便的方法。LEE 等开发了四种基于直接竞争的 ELISAs, 包含了两种快速检测方法和两种标准分析方法, 其中快速检测方法可在 15 min 内完成, 但是需要将样本提取液稀释至 5 倍, 以降低基质干扰^[38]。该方法均适用于玉米、花生、大豆等食品中的 AFB_1 的检测。

ELISA 检测实际检测操作过程中, 每孔的包被状态差异较大, 难以达到一致, 且酶活性受环境影响大, 所以易出现假阳性结果, 常作为初步检测手段应用于现场检测^[39]。由于需要将有毒抗原包被至固相载体, 难以避免操作人员与真菌毒素接触^[40]。

2.3 胶体金免疫层析

胶体金免疫层析法 (Colloidal gold immune chromate graphic assay, GICA) 是将胶体金标技术与抗原抗体特异反应相结合的免疫分析方法^[41], 原理是将具有特异性的抗原 (或抗体) 固定在硝酸纤维素膜的一端, 胶体金标记的试剂吸附在结合垫上, 在样本垫上滴入处理好的待测样本, 待测样本经过抗原 (或抗体) 结合区域, 待测样本中的真菌毒素会与抗原 (或抗体) 发生特异性结合从而停止向前流动, 并且会富集在显色带上^[42]。

胶体金又称纳米金, 稳定性好, 溶液为酒红色胶体状, 其制备过程简单, 通过还原性氯金酸形成, 且反应条件可控, 根据需求调节反应条件生产出大小和形状均不同的颗粒。标记抗体或抗原后形成的探针可长期在 4°C 下保存不失活, 此特性使得胶体金在真菌毒素检测中较为广泛。并在层析过程中, 胶体金会发生聚集, 表现出肉眼可见的红色, 能够直接观察出结果或者通过仪器读取后进行定量分析。

一种基于 GICA 方法可同时检测 4 种黄曲霉毒素总量 (AFB_1 、 AFB_2 、 AFG_1 、 AFG_2), 定量检测范围为 $2\sim 40 \mu\text{g}/\text{kg}$, 最低检测线是 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。胶体金免疫层析法具有着快捷、简便, 特异性好, 易操作等优点, 但胶体金免疫层析技术造价成本高, 可重复性差^[43]。同时胶体金溶液难以长时间保存, 稳定性较差, 这使得胶体金免疫层析技术在实际使用中受到限制。

2.4 时间分辨荧光免疫分析法

时间分辨荧光免疫分析法 (Time resolve fluorescence immunoassay, TRFIA) 是在荧光分析 (FIA) 的基础上发展而来的一种特殊荧光分析法^[44]。其原理是依赖于稀土元素的独特荧光性质及其螯合物作为示踪剂, 对抗体、抗原、多肽、核酸探针等进行标记, 通过分析产物的荧光强度和相对

荧光强度的比值, 准确地分析反应体系中的物质浓度。卢迪莎^[45]等根据时间分辨荧光免疫分析方法为基础, 开发研制了可同时快速定量检测 AFB_1 和 OTA 的二联时间分辨荧光免疫层析试纸条, 结果显示检测 AFB_1 和 OTA 的 IC_{50} 分别为: 1.58 、 $3.91 \mu\text{g}/\text{kg}$, 线性范围分别为: $0.26\sim 9.73 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1.14\sim 13.29 \mu\text{g}/\text{kg}$, 两种毒素的回收率范围为 $92\%\sim 103\%$ 。检测效果良好, 并且可在 4°C 条件稳定保存 5 个月, 检测结果与高效液相色谱检测结果对比后一致。

TRFIA 具有稳定性较好、特异性强、灵敏度高等特点^[46]。适用于大批量的现场初步筛查, 但是 TRFIA 所使用的螯合剂为有毒物质, 在检测过程中带来风险。而且螯合剂中的荧光物质易受环境影响而失效或变性, 使得检测结果不准确。

2.5 荧光偏振免疫分析

荧光偏振免疫分析法 (Fluorescence polarization immunoassay, FPLA) 是一种较为简便的免疫学分析方法, 具有操作简单、通量高的特点。该方法的原理是根据不同种类荧光素的激发和发射波长不同, 检测荧光分子在溶液中的旋转速率。因为旋转速率与分子的大小有关, 较大的分子旋转较慢, 并且比较小的分子发出强度更高的信号。如果荧光分子是真菌毒素竞争性偶联物, 抗体与真菌毒素的结合可以限制偶联物荧光部分的旋转, 从而增加荧光偏振的信号。HUANG 等^[47]研发了一种超灵敏的荧光偏振免疫分析法用于检测水稻中的 OTA, 该方法合成了四种荧光示踪剂, 检测范围达到 $0.03\sim 0.78 \text{ ng}/\text{mL}$, 其中样品平均回收率为 $70.0\%\sim 110.0\%$, 相对偏差 $\leq 20\%$, 该方法的灵敏度、快速性、准确性均表明此方法适用于现场快速检测。在真菌毒素存在的情况下, 会有较少的荧光分子附着在抗体, 因此信号会减少。新式的检测设备用二极管激光器来提供激发光。所以该设备可以用玻璃管进行检测, 成本较低。

2.6 电化学免疫分析法

电化学免疫传感器是一种结合电化学测定和免疫反应的分析元件, 通过探测免疫反应中的电信号的传导。其特点是检测效率高、特异性好、操作简单等优点, 相较于其他免疫分析方法, 电化学免疫分析具有着精确的传感器, 可以对输出进行数字化处理, 可以实现定量检测效果。无论在食品分析还是临床诊断都具有着重要的应用价值。传统的电化学具有着高灵敏度、高信号比的特点, 后续研究以信号放大策略以及信号可视化为主, 例如等温扩增法, 外切酶催化目标回收, 亚甲基蓝标记信号扩增方法等。王周平等^[48]开发了一种绿色且高效的

电化学免疫传感器方法检测赭曲霉毒素 A(OTA),该方法通过以 OTA 噬菌体模拟肽代替真菌毒素抗原,进行竞争性检测。通过优化实验条件,该方法的最低检测线为 2.04×10^{-14} ng/mL,线性范围为 $7.17 \times 10^{-14} \sim 5.49 \times 10^{-12}$ g/mL,结果表明该方法可适用于赭曲霉毒素的现场快速检测。LIU 等^[49]开发了一种基于碳纳米管修饰 GCE 电极(Glass carbon electrode, GCE)并且使用阻抗免疫传感器对 AFB₁ 进行定量检测,其中 GCE 电极是电化学中较为常用的电极,为玻碳电极,使用沉积法对 GCE 电极进行修饰,以提高反应中传导率。利用该方法检测橄榄油中的 AFB₁,其最低检测限为 0.03 ng/mL。丝网印刷电极(Screen-printed electrode, SPCE)的开发实现了电化学传感器的商业用途。SPCE 的构建包括工作电极、参比电极和辅助电极 3 部分,由于其造价低、便于携带、无需预处理等优点深受广大电化学研究者的青睐。GOUND 等^[50]成功将核酸适配体作为生物识别分子应用于 SPCE 传感器,构建了电化学免疫分析法检测红酒中的 ZEN 含量,检测限位 0.25 ng/mL。

2.7 免疫芯片技术

免疫芯片技术于 20 世纪 80 年代由 ROGER EKIN 率先提出,蛋白质芯片技术又称为蛋白质微阵列技术,其中,免疫芯片(Immunchip),又称为抗体芯片(Antibody-chip)。其原理是将抗原密集于芯片上的某一介质载体上,形成探针。该装置具有着良好的生物活性,与待测目标分子进行特异性结合,通过特殊的检测设备进行定量分析,从而达到反应信号数据实时上传,将检测结果达到肉眼可视化。免疫芯片技术在发展过程中信号传导设备逐步提升,从较为传统的信号强度传导设备到可视化定量检查设备,如智能手机^[51]。免疫芯片技术的优点在于高通量、特异性强、重复性好、应用性强等。但是目前来看,多数芯片需要经过琼脂糖凝胶、醛基化修饰,此项工艺复杂成本较高且芯片与抗原或抗体结合这一过程尚未成熟,结合成功率较难保证,仍需发展。万亮等^[52]提出一种新型的免疫芯片,可同时检测 AFB₁、DON、ZEN 3 种真菌毒素,得出 3 种真菌毒素的检测线范围分别为 0.125~0.6、2.5~4 和 0.75~6 ng/mL。

2.8 免疫磁珠法

免疫磁珠为磁性微球和免疫配基结合形成的纳米级材料,表面通常带有氨基、羧基、羟基或巯基等不同的化学官能团,该官能团与不同的免疫配基如活性蛋白、抗体、抗原、亲和素、生物素等结合形成免疫磁珠。检测过程中,将制备的免疫磁珠对样

品中的目标分析物进行富集,然后使用带有荧光结合的抗体作为探针进行检测,磁分离后,使用荧光光谱仪检测其发光强度,从而使样品中的目标分析物含量可视化^[51]。免疫磁珠已经广泛应用于食品分析之中,因其具有可以净化体系的外界磁场,纳米级颗粒在磁场中进行定向运动,从而在反应结束时实现反应体系与未反应体系的快速分离,减少了前处理时间。

邵亮亮等^[52]研发了一种全自动免疫磁珠净化高效液相色谱快速测定小麦中的呕吐毒素,处理过程中净化液无需氮吹,结果表明 30 min 内可以完成样品的前处理,6 min 以内可以完成检测反应的全过程,其平均回收率 94.96%~108.58% 之间,结果表明该方法可以适用于批量小麦中呕吐毒素的检测。该方法表明免疫磁珠法可以提高样品的检测成功率,且具有着较为高效、安全的样品处理方法,可以规模化地投入到食品中真菌毒素分析中。

2.9 适配体

传统的免疫分析技术基于抗原-抗体的特异性结合作为检测基础。相较于大型仪器检测,已经减少了繁琐的样品前处理过程^[53]。但抗体的制备过程中,动物的免疫过程较为费时,又难以保证抗体稳定性。适配体(Aptamer)是通过指数富集的配体系统进化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)技术人工合成的随机核酸文库中筛选出具有高亲和力、可特异性识别的单链 DNA/RNA 片段^[54-59]。适配体文库由随机序列区和引物结合区构成,经过孵育结合过程获得靶标-DNA 复合物,多数以固定性筛选技术为基础进行特异性筛选。再将筛选后的文库进行负筛和反筛,除去与目标分子结构类似物的干扰和除去靶标分子结合能力弱的序列。对具有亲和力的序列进行 PCR 扩增,制备成单链寡核苷酸构建成次级文库。再经过测序分析和特异性评估后挑选出适合的适配体进行构建免疫分析^[60]。适配体自身可以进行折叠,构建成复杂的二级结构如环状、茎状、G-四链体结构等,从而实现高特异性和高亲和力的识别。最终如抗体-抗原稳定结合一样形成靶标-适配体的稳定复合物。目前已经构建的适配体有 AFB₁、AFM₁、OTA、ZEN 和 FB₁。

近年来,使用适配体检测真菌毒素的科研人员越来越多。KHAN 等^[61]开发了一种以二硫化钨纳米片和双色金纳米簇基于荧光能力共振转移实时检测黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮,该方法可以利用人眼观察检测中发射光的明暗程度,实现对毒素可视化的检测。

各种免疫分析方法检测真菌毒素的比较见表3。

3 展望

目前通过免疫分析技术对食品中的真菌毒素进行检测已成为有效的方法,并随着检测灵敏度和稳定性提高可适用于不同检测环境。高效、快速、灵敏等优点也使得免疫分析技术更适用于现场快速检测。相较于传统大型仪器检测真菌毒素,免疫

分析技术具有高通量、前处理简单、应用范围广、检测成本低、操作过程简单等优势,因此免疫分析技术检测真菌毒素适合应用于快速现场初筛。由于免疫分析技术的基础原理是抗体-抗原的特异性结合,生物活性物质在极端条件难以保证其检测效果,所以传统大型仪器检测真菌毒素在可靠性、准确性方面有着无法比拟的优势。因此,提高抗体的敏感性、稳定性、亲和力是开发免疫分析技术的重要方向。

表3 免疫分析方法检测真菌毒素比较

Table 3 Comparison of immunoassay methods for the detection of mycotoxins

检测方法	基质	真菌毒素	检测范围	检出限	优点	缺点	参考文献
ELISA	玉米	AFB ₁	10~1 000 g/mL	1 μg/mL			[29]
ELISA	发酵红曲米	CIT	2.5~100.0 μg/kg	10.9 ng/mL	耗时短、灵敏度高、操作简单、检测成本低	易出现假阳性、易受环境温度影响、对检测时间要求严格	[44]
GICA	玉米	FB ₁	11.2~199.03 ng/mL	11.24 ng/mL	特异性敏感、稳定性强、无需特殊设备和试剂、结果判断直观	研发成本高、易受环境杂质污染、操作不当极易检测失败	[49]
GICA	牛奶	AFM ₁	0.01~1.0 μg/mL	10 μg/mL			[50]
TRFIA	玉米	AFB ₁ 、OTA	0.26~9.73 μg/kg 1.14~13.29 μg/kg	1.58 μg/kg 3.91 μg/kg	保存时间长、标志物制备简单、操作流程短、标准曲线范围宽、应用范围广泛	制造成本昂贵、稀土离子合成探针难度较大、极易收到内源、外源的其他稀土离子感染	[52]
SPCE	红酒、啤酒	AFB ₁ 、DON、ZEN	0.125~0.6 ng/mL 2.5~4 ng/mL 0.45~0.6 ng/ml	0.64 ng/mL	特异性好、可同时检测多种真菌毒素、适用性广泛、高通量、结果明显	检测设备原件多、检测前处理繁琐	[51]
Antibody-chip	牛奶	FB ₁	0.45~6 ng/mL	1 μg/mL	检测数据实时反馈、样本容量大	制作成本高、制作工艺复杂	[62]
Immunomagnetic	谷物	OTA	0.01~0.5 ng/mL	10.23 ng/mL	反应速率快、结合效率高、降低基质干扰	实验过程较繁琐、需要仪器较多	[63]
SELEX	牛奶	AFM ₁	0.05~12.35 μg/mL	9.53 ng/mL	特异性强、制备方法简单、应用范围较广、稳定性较高	实际应用中相容性较差	[64]

由于真菌毒素相较其他污染物具有着高交叉反应性,特异性是真菌毒素检测的重要指标,因此筛选和生产更敏感的真菌毒素抗体是重要的研究方向。通过优化抗体制备的方法,如靶向功能基团、信号标签与抗体有效共价结合,制备出高质量抗体。食品基质复杂,在真菌毒素检测过程中会带来影响,因此,需要提高抗体在免疫反应检测中的抗干扰能力,也要优化检测过程中样品的预处理步骤,将基质影响降低。多种真菌毒素同时污染也是较为常见的情况,因此多重检测技术也是免疫分析技术发展的必然趋势,以生物工程手段制备的多价抗体也逐步被使用到真菌毒素检测中。双特异性单克隆抗体、多信号的输出方法越来越多地用于真菌毒素检测,同时检测多种真菌毒素的设备,试剂盒也逐渐被应用。近年来,以生物衍生的物质为代替品的免疫分析技术在真菌毒素的检测过程中展现出了广阔的应用前景,表现出了低成本、安全性

好、抗体特异性高的特点,实现无毒无害且快速的检测方法。

参考文献

- [1] LIU P, LIAO Y H, ZHENG H B, et al. Facile dispersive solid-phase extraction based on humic acid for the determination of aflatoxins in various edible oils[J]. Analytical Methods, 2020, 12(18): 2308-2316.
- [2] 陈瑞鹏,高志贤,梁俊.农产品中真菌毒素检测方法研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(6):2283-2291.
Chen R P, Gao Z X, Liang J. Research progress on detection methods of mycotoxins in agricultural products[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(6): 2283-2291.
- [3] 翟晨,穆蕾,杨悠悠.中国与欧盟粮油食品真菌毒素限量及减控措施对比[J].现代食品科技,2020,36(3):302-309.
ZHAI C, MU L, YANG Y Y. Comparison of mycotoxins limit standards and control measures of grain and oil foods between China and European union: A review[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 302-309.

- [4] IQBAL S Z, REHMAN B, SELAMAT J, et al. Assessment of fumonisin B₁ concentrations in wheat and barley products in the punjab region of Pakistan[J]. *Journal of Food Protection*, 2020, 83(8): 1284-1288.
- [5] ZHOU S Y, XU L G, KUANG H, et al. Immunoassays for rapid mycotoxin detection: State of the art[J]. *The Analyst*, 2020, 145(22): 7088-7102.
- [6] OMUR A D, YILDIRIM B, SAGLAM Y S, et al. Activity of resveratrol on the influence of aflatoxin B₁ on the testes of sprague dawley rats[J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2019, 22(2): 313-320.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量: GB 2761—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission of the People' s Republic of China, State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety Mycotoxin Limits in Food. GB 2761—2017[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2017.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 进出口中伏马菌素B1的测定限量: DB34/T 2241—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission of the People' s Republic of China, State Food and Drug Administration. Determination of fumonisin B1 in livestock feed in limited quantities. DB34/T 2241—2014 [S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2017.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 进出口粮谷中桔霉素含量检测方法: SN/T 2426—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission of the People' s Republic of China, State Food and Drug Administration. Determination of oryzanamyacin in imported and exported grains and cereals. SN/T 2426—2010 [S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2017.
- [10] 蒋雪松, 张斌, 赵天霞, 等. 小麦呕吐毒素污染可见/近红外光谱快速筛查方法研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(12): 3904-3909.
JIANG X S, ZHANG B, ZHAO T X, et al. Screening of DON contamination in wheat based on visible/near infrared spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2019, 39(12): 3904-3909.
- [11] 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]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
TANG X Q. Development of bio-receptors and rapid detection methods for typical mycotoxins in agricultural products [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.
- [12] PONGPRAKET M, POAPOLATHEP A, WONGPANIT K, et al. Exposure assessment of multiple mycotoxins in black and white sesame seeds consumed in Thailand[J]. *Journal of Food Protection*, 2020, 83(7): 1198-1207.
- [13] 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(1): 66-70.
- XIAO Z, LI P W, ZHANG Q, et al. Production and characteristics of specialised monoclonal antibodies against aflatoxin B₁ [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2011, 33(1): 66-70.
- [14] 王沂雯, 刘晏霖, 付瑞杰, 等. 便携式生物传感器在真菌毒素检测中的应用研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(11): 234-245.
WANG Y W, LIU Y L, FU R J, et al. A review of portable biosensors for the field detection of mycotoxins[J]. *Food Science*, 2022, 43(11): 234-245.
- [15] 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(3):108167.
- [16] WANG X R, CHEN Q, SUN Z C, et al. Nanobody affinity improvement: Directed evolution of the anti-ochratoxin A single domain antibody [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 151: 312-321.
- [17] QIAO L, SHAO X, GAO S, et al. Research on endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probes and endoplasmic reticulum stress-mediated nanoanticancer strategies: A review. [J]. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 2021, 208112046-112046.
- [18] ZHANG Z L, SU B C, XU H, et al. Enzyme cascade-amplified immunoassay based on the nanobody-alkaline phosphatase fusion and MnO₂ nanosheets for the detection of ochratoxin A in coffee [J]. *RSC Advances*, 2021, 11(35): 21760-21766.
- [19] AKHLIAP P, SUNOOJ K V, AALIYAB, et al. Application of electromagnetic radiations for decontamination of fungi and mycotoxins in food products: A comprehensive review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 114: 399-409.
- [20] LI Y G. Preparation of a polyclonal antibody against the non-structural protein, NSS of SFTSV[J]. *Biomedical*, 2020(1).
- [21] DUBRAVKA R, DANIELA J, ANDREA H T, et al. Sterigmatocystin moderately induces oxidative stress in male Wistar rats after short-term oral treatment[J]. *Mycotoxin Research*, 2020, 36(2): 181-191.
- [22] WANG Z P, WEN K, ZHANG X Y, et al. [J]. *Food Anal Methods*, 2018, 11, 300-308.
- [23] ZHOU S Y, XU L G, KUANG H, et al. Immunoassays for rapid mycotoxin detection: State of the art [J]. *The Analyst*, 2020, 145(22): 7088-7102.
- [24] GREENBERG A S, AVILA D, HUGHES M, et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 1995, 374(6518): 168-173.
- [25] SPIESS C, ZHAI Q T, CARTER P J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies [J]. *Molecular Immunology*, 2015, 67(2): 95-106.
- [26] HARTMANN L, BOTZANOWSKI T, GALIBERT M, et al. VHH characterization. Comparison of recombinant with chemically synthesized anti-HER₂ VHH [J]. *Protein Science*, 2019, 28(10): 1865-1879.
- [27] 骆敏儿, 唐勇, 向军俭, 等. 玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析法的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,

- 2013, 29(7): 729-733.
- LUO M E, TANG Y, XIANG J J, et al. Preparation of anti-Zearalenone monoclonal antibody and preliminary establishment of colloidal gold immunochromatographic assay for Zearalenone [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2013, 29(7): 729-733.
- [28] 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.
- HOU X Y, WEN H L, YAN Y F, et al. Preparation of monoclonal antibody against ochratoxin A and establishment of ELISA to detect it [J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2009, 47(10): 60-63.
- [29] HUANG Y H, XU Y, HE Q H, et al. Determination of zearalenone in corn based on a biotin-avidin amplified enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food and Agricultural Immunology, 2014, 25(2): 186-199.
- [30] 吕俊美. 玉米赤霉烯酮及其衍生物单克隆抗体的制备及免疫试纸检测方法的建立[D]. 新乡: 河南科技学院, 2020.
- LV J M. Preparation of Zearalenone and its derivative monoclonal antibodies and establishment of immunoassay test [D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2020.
- [31] DESMYTER A, SPINELLI S, ROUSSEL A, et al. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2015, 32: 2-10.
- [32] WANG Y Z, FAN Z, SHAO L, et al. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications [J]. International Journal of Nanomedicine, 2016, 11: 3287-3303.
- [33] 刘运龙. 以赭曲霉毒素A多克隆抗体建立直接竞争酶联免疫吸附分析方法研究[J]. 广西科学, 2010, 17(3): 244-246.
- LIU Y L. Development of direct competitive ELISA for ochratoxin A assay [J]. Guangxi Sciences, 2010, 17(3): 244-246.
- [34] YAN J X, HU W J, YOU K H, et al. Biosynthetic mycotoxin conjugate mimetics-mediated green strategy for multiplex mycotoxin immunochromatographic assay [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(7): 2193-2200.
- [35] JAYATHILAKE C, KUMACHI S, ARAI H C, et al. *In vitro* selection of anti-gliadin single-domain antibodies from a naïve library for cDNA-display mediated immuno-PCR [J]. Analytical Biochemistry, 2020, 589: 113490.
- [36] 王海彬, 李培武, 张奇, 等. 粮油产品真菌毒素抗体制备研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(3): 336-342.
- WANG H B, LI P W, ZHANG Q, et al. A review on progress of preparation of antibodies against mycotoxins in foodstuff and oilseeds [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012, 34(3): 336-342.
- [37] WANG T, LI P W, ZHANG Q, et al. Determination of *Aspergillus* pathogens in agricultural products by a specific nanobody-polyclonal antibody sandwich ELISA [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 4348.
- [38] ABRAMSON D, USLEBER E, MÄRTLBAUER E. An indirect enzyme immunoassay for the mycotoxin citrinin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 2007-2009.
- [39] XU Y, XIONG L, LI Y P, et al. Anti-idiotypic nanobody as citrinin mimotope from a naïve alpaca heavy chain single domain antibody library [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(18): 5333-5341.
- [40] ZHAO F, TIAN Y, SHEN Q, et al. A novel nanobody and mimotope based immunoassay for rapid analysis of aflatoxin B₁ [J]. Talanta, 2019, 195: 55-61.
- [41] SUN Z C, LV J W, LIU X, et al. Development of a nanobody-AviTag fusion protein and its application in a streptavidin-biotin-amplified enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A in cereal [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(17): 10628-10634.
- [42] KÖNNING D, ZIELONKA S, GRZESCHIK J, et al. Camelid and shark single domain antibodies: Structural features and therapeutic potential [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2017, 45: 10-16.
- [43] FAN K L, JIANG B, GUAN Z, et al. Fenobody: A ferritin-displayed nanobody with high apparent affinity and half-life extension [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(9): 5671-5677.
- [44] VAN HOUWELINGEN A, DE SAEGER S, RUSANOVA T, et al. Generation of recombinant alpaca VHH antibody fragments for the detection of the mycotoxin ochratoxin A [J]. World Mycotoxin Journal, 2008, 1(4): 407-417.
- [45] 卢迪莎, 王序, 杨金易, 等. 同时检测玉米中黄曲霉毒素B₁和赭曲霉毒素A的时间分辨荧光免疫层析试纸条的研制[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 2346-2354.
- LU D S, WANG X, YANG J Y, et al. Development of a time-resolved fluorescence immunochromatographic strip for the simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in corn samples [J]. Food Science, 2022, 43(2): 2346-2354.
- [46] SUN Z C, WANG X R, CHEN Q, et al. Nanobody-alkaline phosphatase fusion protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for one-step detection of ochratoxin A in rice [J]. Sensors (Basel, Switzerland), 2018, 18(11): 4044.
- [47] HUANG X R, TANG X Q, JALLOW A, et al. Development of an ultrasensitive and rapid fluorescence polarization immunoassay for ochratoxin A in rice [J]. Toxins, 2020, 12(11): 682.
- [48] DONG Y L, HUAI Y X, YING Y S, et al. Colorimetric aptasensor for the sensitive detection of ochratoxin A based on a triple cascade amplification strategy [J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1237.
- [49] LIU X, WEN Y P, WANG W J, et al. Nanobody-based electrochemical competitive immunosensor for the detection of AFB₁ through AFB₁-HCR as signal amplifier [J]. Mikrochimica Acta, 2020, 187(6): 352.
- [50] GOUD Y K, KUMAR S V, HAYAT A, et al. A highly sensitive electrochemical immunosensor for zearalenone using screen-printed disposable electrodes [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2019, 832: 336-342.
- [51] 吴颖, 范丛丛, 苏晓娜, 等. 基于智能手机同时检测4种兽药残留的免疫芯片技术[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 278-282.
- WU Y, FAN C C, SU X N, et al. Simultaneous detection of four veterinary drugs using immunochip assay based on smart phone [J]. Food Science, 2021, 42(2): 278-282.
- [52] 邵亮亮, 杜京霖, 盛林霞, 等. 全自动免疫磁珠净化高效液相色谱法快速测定小麦中的呕吐毒素[J]. 分析仪器, 2021

- (1):146-151.
- SHAO L L, DU J L, SHENG L X, et al. Rapid determination of vomitoxin in wheat by HPLC with automatic immunomagnetic bead purification [J]. *Analytical Instrumentation*, 2021, (1): 146-151.
- [53] BONDARENKO A P, EREMIN S A. Determination of Zearalenone and ochratoxin a mycotoxins in grain by fluorescence polarization immunoassay [J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 67 (9): 790-794.
- [54] LIU X, TANG Z W, DUAN Z H, et al. Nanobody-based enzyme immunoassay for ochratoxin A in cereal with high resistance to matrix interference[J]. *Talanta*, 2017, 164: 154-158.
- [55] SUN Y Z, XIE J, PENG T, et al. A new method based on time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of streptomycin in milk[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(7): 2262-2269.
- [56] FELIX F S, ANGNES L. Electrochemical immunosensors - A powerful tool for analytical applications [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 102: 470-478.
- [57] TANG Z W, LIU X, WANG Y Y, et al. Nanobody-based fluorescence resonance energy transfer immunoassay for noncompetitive and simultaneous detection of ochratoxin a and ochratoxin B[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 251: 238-245.
- [58] 王战辉, 米铁军, 沈建忠. 荧光偏振免疫分析检测粮食及其制品中的真菌毒素研究进展[J]. *中国农业科学*, 2012, 45 (23): 4862-4872.
- WANG Z H, MI T J, SHEN J Z. Advance in fluorescence polarization immunoassay for the determination of mycotoxins in cereals and related products [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(23): 4862-4872.
- [59] 孟辉, 米铁军, 王战辉, 等. 玉米中赭曲霉毒素 A 的荧光偏振免疫分析方法研究[C]. 中国畜牧兽医学学会兽医药理毒理学分会第十一届会员代表大会暨第十三次学术讨论会与中国毒理学会兽医毒理专业委员会第五次学术研讨会论文集. 2015.
- MENG H, MI T J, WANG Z H, et al. Fluorescence polarization immunoassay for ochratoxin A in corn [C]. *Proceedings of the 11th Member Congress and 13th Symposium of the Veterinary Pharmacology-Toxicology Branch of the Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine and the 5th Symposium of the Veterinary Toxicology Committee of the Chinese Society of Toxicology*. 2015.
- [60] 秦鸣蔚. 呕吐毒素核酸适配体的筛选及两种快速检测方法的建立[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2020: 11-45.
- QIN M Y. Screening of DON aptamer and establishment of two rapid detection methods [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2020: 11-45.
- [61] KHAN I M, NIAZI S, YU Y, et al. Aptamer induced multicolored AuNCs-WS₂ “turn on” FRET nano platform for dual-color simultaneous detection of Aflatoxin B₁ and Zearalenone [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(21): 14085-14092.
- [62] CHEN C X, ZHAO D, WANG B, et al. Alkaline phosphatase-triggered *in situ* formation of silicon-containing nanoparticles for a fluorometric and colorimetric dual-channel immunoassay [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(6): 4639-4646.
- [63] BAKHERAD H, FARAHMAND M, SETAYESH N, et al. Engineering an anti-granulocyte colony stimulating factor receptor nanobody for improved affinity [J]. *Life Sciences*, 2020, 257: 118052. DOI:10.1016/j.lfs.2020.118052.
- [64] SETLEM K, MONDAL B, RAMLAL S, et al. Immuno affinity SELEX for simple, rapid, and cost-effective aptamer enrichment and identification against aflatoxin B₁ [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1909.