

# 基于吖啶酯-磁微球的自动化学发光免疫法 检测赭曲霉毒素 A

林健聪<sup>1</sup>, 梁科<sup>1</sup>, 柳彬<sup>2</sup>, 吴民富<sup>3</sup>, 罗林<sup>1</sup>, 雷红涛<sup>1</sup>, 沈玉栋<sup>1</sup>, 徐振林<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东食品安全重点实验室, 广东广州 510642) (2. 福建省东山海关综合技术服务中心, 福建漳州 363400) (3. 佛山职业技术学院食品科学系, 广东佛山 528137)

**摘要:** 该研究建立了一种基于吖啶酯-磁微球的自动化学发光免疫法 (Chemiluminescence Immunoassay, CLIA) 检测牛奶中的赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)。采用磁微球偶联二抗, 吖啶酯标记 OTA-BSA 偶联物, 优化了磁微球浓度、OTA 抗体浓度、吖啶酯标记物浓度、抗体和标记物稀释液、反应时间、样品预处理条件等各种 CLIA 方法的试验条件。结果表明, CLIA 方法对 OTA 的检出限为 6.38 ng/kg, 半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 31.40 ng/kg, 线性范围为 11.23~99.20 ng/kg, 批内和批间的变异系数 <8%; 测定牛奶样品中的 OTA 时, 检出限为 25.52 ng/kg, IC<sub>50</sub> 为 125.60 ng/kg, 线性范围为 44.92~396.80 ng/kg, 添加回收率为 95.08%~105.83%; 对赭曲霉毒素 B、赭曲霉毒素 C 的交叉反应率为 6.52% 和 24.57%, 对其他真菌毒素均无明显的交叉反应; 对牛奶样品的检测结果与高效液相色谱-串联质谱法一致; 且 CLIA 方法的试剂能在 2~8 °C 稳定保存 9 个月以上。该研究建立的 CLIA 方法, 具有灵敏、准确、快速和操作便捷等特点, 检测时长仅 30 min, 尤其适用于大规模牛奶样品中 OTA 残留的快速筛查。

**关键词:** 牛奶; 赭曲霉毒素 A; 真菌毒素; 化学发光免疫分析法

文章编号: 1673-9078(2023)03-313-322

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0369

## Detection of Ochratoxin A Using An Automated Chemiluminescent Immunoassay Based on Acridinium Ester-magnetic Microspheres

LIN Jiancong<sup>1</sup>, LIANG Ke<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>2</sup>, WU Minfu<sup>3</sup>, LUO Lin<sup>1</sup>, LEI Hongtao<sup>1</sup>, SHEN Yudong<sup>1</sup>, XU Zhenlin<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Dongshan Customs Comprehensive Technical Service Center of Fujian Province, Zhangzhou 363400, China) (3. Department of Food Science, Foshan Polytechnic, Foshan 528137, China)

**Abstract:** An automated chemiluminescent immunoassay (CLIA) based on acridinium ester-magnetic microspheres was established for the detection of ochratoxin A (OTA) in milk. Anti-mouse IgG antibodies were conjugated to magnetic microspheres and the OTA-BSA conjugates were labeled with acridinium ester. Different CLIA experimental conditions, including magnetic microsphere concentration, OTA antibody concentration, labeled OTA-BSA conjugate concentration, OTA antibody and labeled OTA-BSA dilution, reaction time, and sample pre-treatment conditions, were optimized. Under the established optimal conditions, the following results were obtained using the CLIA method: a limit of detection of 6.38 ng/kg, a half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 31.40 ng/kg, a linear range of 11.23 to 99.20 ng/kg, and intra- and inter-assay coefficients of variation <8%. When determining OTA in milk samples, the limit of detection was 25.52 ng/kg, the IC<sub>50</sub> was 125.60 ng/kg, the linear range was 44.92 to 396.80 ng/kg, and the addition recovery was 95.08% to 105.83%. The cross-reactivities with ochratoxin B and ochratoxin C were 6.52% and 24.57%, respectively, and there was no obvious cross-reaction with other mycotoxins. Milk

引文格式:

林健聪, 梁科, 柳彬, 等. 基于吖啶酯-磁微球的自动化学发光免疫法检测赭曲霉毒素 A [J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 313-322.

LIN Jiancong, LIANG Ke, LIU Bin, et al. Detection of ochratoxin a using an automated chemiluminescent immunoassay based on acridinium ester-magnetic microspheres [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 313-322.

收稿日期: 2022-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32061160473); 广东省普通高校重点研究项目 (2019KJDXM002)

作者简介: 林健聪 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: ljcong0831@sina.com

通讯作者: 徐振林 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全检测与控制, E-mail: jallent@163.com

sample detection values obtained using the CLIA method were consistent with those obtained using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Moreover, the reagents used for the CLIA method could be stored stably for more than 9 months at 2~8 °C. In conclusion, the CLIA method established in this study is sensitive, accurate, rapid, and easy to operate. The detection time is only 30 min, and the method is particularly suitable for the rapid screening of OTA residues in large-scale milk samples.

**Key words:** milk; ochratoxin A; mycotoxin; chemiluminescent immunoassay

赭曲霉毒素 (Ochratoxins) 是多种曲霉和青霉菌产生的次级代谢产物, 共有 7 种结构类似物, 其中毒性最强、分布最广泛的是赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) [1,2]。研究表明, OTA 具有致畸性、致突变、致癌性、肾毒性、肝毒性、免疫毒性和神经毒性等多种毒性作用, 被国际癌症研究机构 (IARC, 1993) 列为 2B 类致癌物 [3-5]。

鉴于 OTA 的危害, 国家卫计委、食药监在《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761-2017) 中制定了食品中 OTA 残留的限量标准 [6], 谷物(糙米)、谷物碾磨加工物、豆类、烘焙咖啡豆、研磨咖啡(烘焙咖啡) 限量 5 μg/kg, 葡萄酒和速溶咖啡分别限量 2 μg/kg 和 10 μg/kg。但除上述食品以外, 牛奶中 OTA 的污染情况, 也不容忽视, 尤其是近年来, 国内外屡次报道牛奶中检出 OTA 残留 [7,8]。Huang 等 [9] 检测了国内的生鲜乳样品, 共 30 份原料乳、12 份液态奶和 8 份奶粉, OTA 的检出率分别为 96.67%、91.67% 和 62.50%, 平均残留量分别为 56.70、26.80、27.00 ng/kg; Meucci 等 [10] 从在意大利销售的 14 种婴儿配方奶粉领先品牌中, 收集了 185 份的样品, 其中 133 份 (71.89%) 样品检出 OTA 阳性 (35.10 ng/L~689.50 ng/L); Erhan 等 [11] 检测了 40 份土耳其布尔杜尔省的散装牛奶样品, OTA 残留量为 2~270 ng/L, 其中 37 份样品 (92.50%) 的 OTA 残留量超过 50 ng/L; Elaridi 等 [12] 研究发现, 从黎巴嫩各地药店收集了在售的婴儿配方奶粉, 涵盖 42 个品牌共 84 份样品, 其中 80 份样品 (95.24%) 检出 OTA, 其平均残留量为 0.37 μg/kg, 14 个品牌共 24 份样品 (33.33%) 的 OTA 残留量超过 0.50 μg/kg, 超出欧盟国家对婴儿食品中 OTA 的限量要求。上述研究报道, 充分说明了牛奶中 OTA 残留的严峻状况, 但世界各国暂未建立牛奶中 OTA 残留的限量标准。为了研究牛奶中 OTA 的危害水平, 联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 设立了 OTA 的暂定每周耐受摄入量 (Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI) 和婴幼儿每日允许摄入量 (Tolerably Daily Intake, TDI), 其中 PTWI 为 100 ng/kg (按体质量计), 婴幼儿 TDI 为 5 ng/kg (按体质量计) [13-15]。

当前, 检测食品中 OTA 残留的方法主要有仪器分

析法、免疫分析法、适配体快速检测法, 以及一些新型的技术, 如流式微球技术、近红外光谱成像技术等 [16]。其中, 免疫分析法, 因其操作便捷、成本低廉、灵敏度高、特异性好, 尤其适合大批量样品的现场快速筛查, 而成为食品有害物质快速检测的研究热点。如 Thirumala-Devi K 等 [17] 建立了检测辣椒中 OTA 残留的酶联免疫法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), LOD 达到 0.10 ng/mL, 半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 达到 5 ng/mL; 刘星等 [18] 建立了检测谷物中 OTA 残留的化学发光酶免疫分析法 (Chemiluminescence Enzyme Immunoassay, CLEIA), LOD 达到 2.47 ng/kg, IC<sub>50</sub> 为 112 ng/kg; 张继斌等 [19] 研究了检测高粱中 OTA 残留的免疫层析法 (Immunochromatography Assay, ICA), LOD 为 3.00 μg/kg。但上述免疫分析法也有不足之处, 如 ELISA 法, 受限于微孔板的固相载体和酶标记物, 其反应速率较低, 整体的反应时间较长, 检测重复性也较差; 传统的 CLEIA 法, 以辣根过氧化物酶为标记物, 鲁米诺为发光底物, 存在反应时间长、重复性差、易受基质影响等缺点, 且发光底物多为进口试剂, 成本较高; ICA 法, 其抗原抗体的反应时间短, 难以充分反应, 且金纳米粒子的光学亮度不足, 导致检测灵敏度难以提高, 故 ICA 法的灵敏度较 ELISA 法低, 多适用于灵敏度要求不高但需要快速检测的场合 [20]。因此, 为研究市售牛奶中 OTA 的污染情况, 需要一种快速、准确、灵敏度高、通量高的 OTA 检测方法。本研究选用了吖啶酯-磁微球的免疫反应体系, 以磁微球作为固相载体, 通过化学键将抗体偶联到磁微球上, 利用磁微球超高的比表面积, 提高了免疫反应的速率, 缩短了反应的时间; 以吖啶酯 (Acridinium Ester, AE) 作为示踪物, 借助其分子量小、信噪比高、化学发光效率高、易于标记、无需催化剂等特点 [21], 提高了小分子免疫检测的灵敏度和准确度, 最终建立测定牛奶中 OTA 残留的全自动化学发光免疫分析方法, 并研究其线性、检出限、线性范围、回收率、精密性、特异性等分析性能, 以验证该免疫分析方法的可行性, 旨在更好地满足市售牛奶中 OTA 残留情况的研究需求, 满足企业单位、政府监管部门等开展相关检测工作的需求。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Shine i2910 全自动化学发光免疫分析仪购自菲鹏生物股份有限公司；磁珠混匀仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司；5425 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司；磁力搅拌器购自德国 IKA 公司；Waters ACQITY Xevo TQ-S systems (液相色谱串联质谱系统) 购自美国 Waters 公司。

MS300/Carboxyl 磁微球, 日本 JSR 公司；超滤离心管, 美国 Millipore 公司；透析袋, 生工生物工程(上海)股份有限公司；1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS)、甲醇 ( $\geq 99.90\%$ )、OTA 纯品 ( $\geq 98.00\%$ )、赭曲霉毒素 B (OTB,  $\geq 99.00\%$ )、赭曲霉毒素 C (OTC)、黄曲霉毒素 M1 (AFM1,  $\geq 98.00\%$ )、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON,  $\geq 98\%$ )、玉米赤霉烯酮 (ZEN,  $\geq 98\%$ )、棒曲霉素 (PAT,  $99\%$ )、阿拉丁试剂(上海)有限公司；吡啶酯 ( $\geq 95.0\%$ )、苏州亚科科技股份有限公司；牛血清白蛋白 (BSA,  $\geq 98.0\%$ )、明胶、吐温-20、Proclin 300, 美国 Sigma 公司；黄曲霉毒素 B1 (AFB1,  $\geq 98\%$ )、青岛普瑞邦生物工程有限公司；U-[ $^{13}\text{C}_{20}$ ]-Ochratoxin A 标准溶液, 美国 Romer Labs 公司；羊抗鼠多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司；预激发液、激发液、发光仪器试剂瓶, 菲鹏生物股份有限公司；牛奶样品, 广州大型连锁超市。其它化学试剂购自广州化学试剂厂。OTA 鼠单克隆抗体、OTA-BSA 偶联物由本实验室根据刘仁荣等<sup>[22]</sup>的研究成果优化制备而来, 活泼酯法合成 OTA-BSA 偶联物, OTA-KLH 偶联物免疫 BALB/C 小鼠并筛选单克隆抗体, 抗体经过亲和层析纯化得到。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 磁微球的偶联

磁微球的活化: 吸取 10 mg 磁微球, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, 20 mmol/L, pH 值 7.4, 以下如未说明, 均为此浓度) 清洗 3 次后, 加入 1 mL PBS 缓冲液将磁微球重悬浮, 再加入含 10 mg/mL EDC 和 Sulfo-NHS 的 PBS 溶液各 40  $\mu\text{L}$ , 室温 (20~26  $^{\circ}\text{C}$ ) 旋转震荡反应 30 min。

磁微球偶联抗体: 活化反应结束, 用 PBS 缓冲液清洗磁微球 1 次, 依次加入 PBS 缓冲液和 0.25 mg 羊抗鼠多克隆抗体, 并定容至 1.0 mL, 室温旋转震荡反应 2 h。反应后, 用磷酸盐-吐温缓冲液 (PBST,

10 mmol/L, pH 值 7.4, 含 0.05% 吐温-20) 清洗 3 次, 加入 1 mL 封闭液[含 0.5% 明胶 ( $m/V$ )、0.05% 吐温-20 ( $m/V$ ) 的 PBS 缓冲液], 混匀, 室温旋转震荡反应过夜 (18~20 h)。最后, 吸掉封闭液, 加入 1 mL 磁微球稀释液[含 0.5% 明胶 ( $m/V$ )、5% 海藻糖 ( $V/V$ ), 50 mmol/L, pH 值 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液]。偶联好抗体的磁微球, 置于 2~8  $^{\circ}\text{C}$  中备用。

#### 1.2.2 吡啶酯标记抗原的制备

吸取 1.0 mg OTA-BSA 偶联物, 放入超滤离心管柱中, 加入适量 PBS 缓冲液, 于低温高速离心机中, 9 000 r/min 离心 5 min, 弃滤液。重复上述步骤 5 次后, 将离心管柱中剩余的 OTA-BSA 偶联物转移至空白的离心管中, 再加入 0.1 mg DMF 溶解的吡啶酯, 室温震荡反应 2 h。反应后, 将混合溶液加入透析袋中, 两端密封好, 于 2 L 磷酸盐缓冲液 (PB, 20 mmol/L, pH 值 6.3) 中透析过夜 (18~20 h)。次日, 收取透析袋中纯化好的吡啶酯标记抗原, 加入防腐剂 Proclin 300, 置于 2~8  $^{\circ}\text{C}$  中备用。

#### 1.2.3 CLIA 方法的建立

用稀释液 (含 0.5% 明胶, 5% 海藻糖, 0.05% 吐温-20, 50 mmol/L, pH 值 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液) 分别将上述制备的磁微球、OTA 单克隆抗体和 AE 标记抗原稀释至一定的浓度, 转移至全自动化学发光免疫分析仪配套的试剂瓶中, 并在仪器上装好试剂, 设定样品、磁微球试剂、抗体试剂和 AE 试剂的加样量分别为 50、50、30 和 50  $\mu\text{L}$ 。设置反应模式为: 第一步, 将样品或系列浓度的 OTA 标准品、抗体试剂和 AE 试剂加入反应杯中, 开始竞争反应; 第二步, 加入磁微球试剂, 进行孵育反应; 第三步, 吸附磁微球, 使用 PBST 缓冲液清洗 5 次, 先后加入预激发液 (含  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{H}^+$ ) 和激发液 (含  $\text{OH}^-$ ) 各 100  $\mu\text{L}$ , 测定发光值 (Relative Luminescence Units, RLU); 最后, 仪器根据 OTA 标准品的 RLU 值和浓度值, 自动绘制标准曲线, 计算并输出样品的浓度值。具体反应过程见图 1。

#### 1.2.4 CLIA 方法单因素优化试验

##### 1.2.4.1 磁微球使用浓度的选择

将磁微球稀释为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL, 测定系列浓度的 OTA 标准品, 根据最大 RLU 值 ( $\text{RLU}_{\text{max}}$ )、 $\text{IC}_{50}$  及  $\text{RLU}_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$  等因素, 确定最佳的磁微球使用浓度。

##### 1.2.4.2 OTA 抗体浓度的选择

将 OTA 抗体稀释为 5、10、25、50、100 ng/mL, 测定系列浓度的 OTA 标准品, 根据最大 RLU 值 ( $\text{RLU}_{\text{max}}$ )、 $\text{IC}_{50}$  及  $\text{RLU}_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$  等因素, 确定最佳的 OTA 抗体浓度。

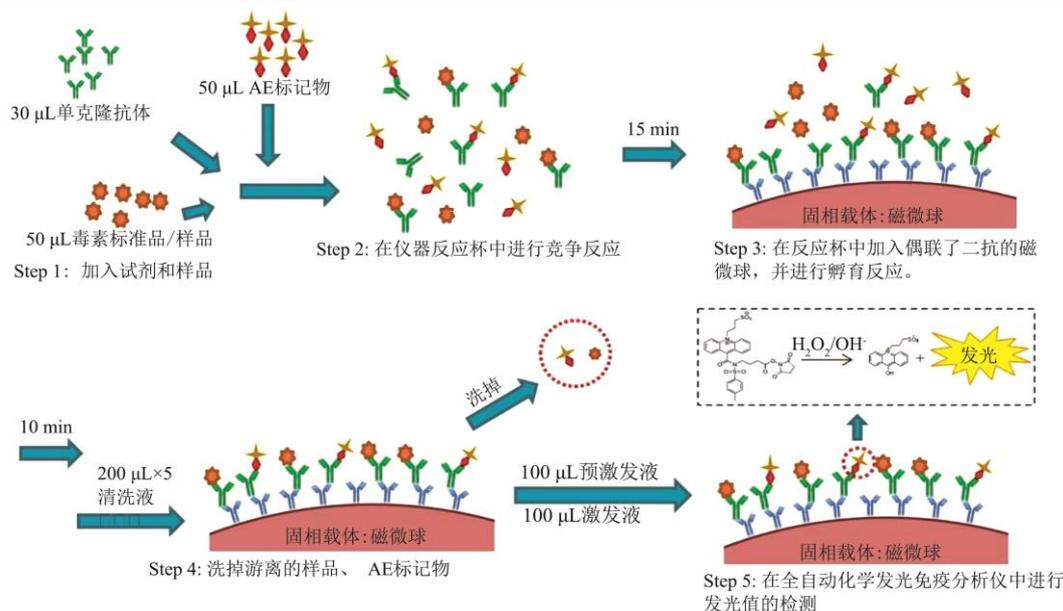


图1 CLIA方法测定OTA的示意图

Fig.1 Schematic illustration of the CLIA method for quantitative detection of OTA

### 1.2.4.3 吡啶酯标记物稀释比例的选择

将吡啶酯标记物按 1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:40 000 的稀释比例进行稀释,测定系列浓度的 OTA 标准品,根据  $RLU_{max}$ 、 $IC_{50}$  及  $RLU_{max}/IC_{50}$  等因素,确定最佳的吡啶酯标记物稀释比例。

### 1.2.4.4 稀释液的选择

分别配制含 0.5% 明胶的 Tris-HCl 稀释液、含 0.5% BSA 的 Tris-HCl 稀释液、含 0.5% 酪蛋白的 Tris-HCl 稀释液,以及 0.5% 明胶、0.5% 酪蛋白的 Tris-HCl 稀释液。依次使用以上稀释液,按最优的磁微球使用浓度、OTA 抗体使用浓度、吡啶酯标记物使用浓度配制 CLIA 方法的试剂,测定系列浓度的 OTA 标准品,根据  $RLU_{max}$ 、 $IC_{50}$  及  $RLU_{max}/IC_{50}$  等因素,确定最佳的稀释液。

### 1.2.4.5 竞争反应时间的选择

在全自动化学发光免疫分析仪上设置第一步的竞争反应时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min 以及 30 min,测定系列浓度的 OTA 标准品,根据  $RLU_{max}$ 、 $IC_{50}$  及  $RLU_{max}/IC_{50}$  等因素,确定最佳的竞争反应时间。

### 1.2.4.6 二抗孵育时间的选择

在全自动化学发光免疫分析仪上设置第二步的孵育反应时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min 以及 30 min,测定系列浓度的 OTA 标准品,根据  $RLU_{max}$ 、 $IC_{50}$  及  $RLU_{max}/IC_{50}$  等因素,确定最佳的二抗孵育时间。

## 1.2.5 CLIA 方法标准曲线的建立

参照 GB 5009.96-2016 中“第四法 酶联免疫吸附测定法”,选用 5.0% (V/V) 的甲醇水溶液作为 OTA 的标准品稀释液,将 OTA 纯品稀释成系列浓度,作为

OTA 标准品,并进行 CLIA 方法试验。根据试验结果,以 OTA 标准品的  $RLU/RLU_{max}$  值为纵坐标,以 OTA 标准品浓度 (ng/kg) 的对数值为横坐标,绘制标准曲线,并计算 OTA 的  $IC_{50}$  和线性测量范围 ( $IC_{20}$ ~ $IC_{80}$ )。再次测定 20 次零浓度的 OTA 标准品,计算其 RLU 值均值和标准偏差 (SD),将计算出来的 RLU 值均值和 3 倍标准偏差的差值代入标准曲线,计算 CLIA 方法的检出限 (LOD)。

$$LOD = RLU_0 - 3SD \quad (1)$$

式中:

LOD——CLIA 方法的检出限;

$RLU_0$ ——20 次零浓度的 OTA 标准品 RLU 值均值;

SD——标准偏差。

## 1.2.6 CLIA 方法的分析性能

### 1.2.6.1 精密性

CLIA 方法的精密性,以样品测值的变异系数 (Coefficient of Variation, CV) 来表示。批内精密性,使用  $IC_{30}$  和  $IC_{70}$  的 OTA 样品,各重复检测 10 次,计算 10 次测量结果的平均值 M 和标准偏差 SD,计算批内 CV。

$$CV = \frac{SD}{M} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

CV——变异系数, %;

SD——OTA 样品测量结果的标准偏差;

M——OTA 样品测量结果的平均值。

批间精密性,使用  $IC_{30}$ 、 $IC_{70}$  的 OTA 样品,各重复检测 10 次,连续检测 3 批试剂,计算 30 次测量结

果的平均值和标准偏差,根据公式(2)计算批间 CV。

### 1.2.6.2 特异性

CLIA 方法的特异性,采用交叉反应率(Cross-Reactivity, CR)来评估。使用 CLIA 方法对功能结构类似物 OTB、OTC,及其他真菌毒素 AFB1、AFM1、DON、ZEN、PAT 等进行测定,并计算各物质的  $IC_{50}$ ,再根据公式(3)计算交叉反应率。

$$CR = \frac{IC_{50(OTA)}}{IC_{50(Other)}} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

CR——交叉反应率, %;

$IC_{50(OTA)}$ ——CLIA 方法测定 OTA 的半抑制浓度;

$IC_{50(Other)}$ ——CLIA 方法测定 OTA 结构类似物和其他真菌毒素的半抑制浓度。

### 1.2.6.3 样品预处理方法和添加回收率

牛奶的成分较为复杂,含有多种蛋白质、脂肪等,会干扰免疫反应中抗原抗体的结合,影响检测结果。为降低牛奶成分对检测结果的影响,需要对牛奶样品进行预处理。本研究参考《食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》(GB 5009.96-2016)<sup>[23]</sup>中“第四法 酶联免疫吸附测定法”中样品提取的方法,结合样品特性,设计了几种牛奶样品的预处理方法,并通过添加回收率的方法,确定最佳的样品预处理方法。具体试验方法为:在经液相色谱-串联质谱法确证为 OTA 阴性的牛奶样品中,添加 50.00、200.00 和 500.00 ng/kg 的 OTA 纯品,配制成 3 份牛奶样品,再加入牛奶:甲醇=1:0、1:1、1:3、1:7、1:15 (体积比, V/V) 的甲醇,在涡旋振荡器上振荡 1 min 后,静置 5 min,离心取上清进行试验,根据试验结果,计算添加回收率。

### 1.2.6.4 稳定性评估

本研究采用加速热稳定性的方法,评估 CLIA 方法的稳定性。将 CLIA 方法的试剂盒放置于 37 °C 的恒温箱中,在 0、3、5、7 d 时,各测定 1 次,并绘制标准曲线,计算  $RLU_{max}$ 、 $IC_{50}$  和线性范围  $IC_{20} \sim IC_{80}$ 。

### 1.2.6.5 与仪器分析法比对

取 37 份牛奶样品(购自广州大型连锁超市),分别采用本研究所建立的 CLIA 方法和曾羲等<sup>[24]</sup>建立的同位素内标高效液相色谱-串联质谱法(High-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS)进行检测,并对检测结果的一致性进行分析。

## 1.3 数据分析

上述试验,除精密性验证试验外,每个试验条件,均进行 3 个平行测试。试验结果的数据,通过 Origin

2021 进行分析和绘图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CLIA 方法的优化试验

#### 2.1.1 磁微球使用浓度的选择

本研究采用磁微球作为固相载体,与捕获抗体偶联,这是由于磁微球具有超大的比表面积和液相的反应环境,能极大地提高免疫反应的反应速率和灵敏度,但磁微球的价格高昂,应在保证 CLIA 方法性能的情况下,尽量降低磁微球的使用浓度。本研究对比测试了 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL 的磁微球使用浓度,测定 OTA 系列浓度标准品的效果,详见图 2。当磁微球使用浓度为 0.05、0.1 mg/mL 时,OTA 标准品的 CV 为 10.07%~14.20%,当磁微球使用浓度为 0.2~0.8 mg/mL 时,OTA 标准品的 CV 为 2.44%~3.38%,结果表明,当磁微球使用浓度不低于 0.2 mg/mL 时,CLIA 方法的 CV 较低,具有良好的重复性。此外,当磁微球浓度为 0.2 mg/mL 时,其  $RLU_{max}$  值适中,  $IC_{50}$  较低,  $RLU_{max}/IC_{50}$  值最高,因此确定磁微球的最佳浓度为 0.2 mg/mL。

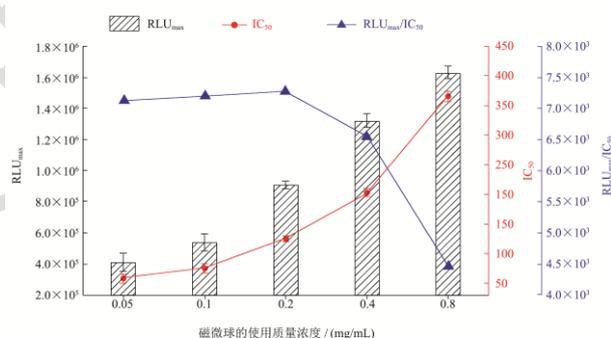


图 2 磁微球使用浓度对 CLIA 方法测定 OTA 的影响

Fig.2 Effects of concentration of magnetic microspheres on the performance of CLIA for OTA (n=3)

#### 2.1.2 OTA 抗体浓度的优化

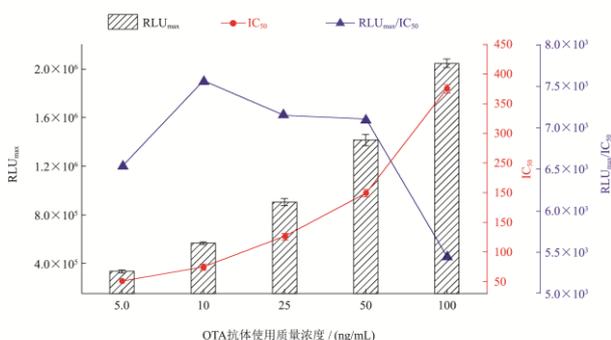


图 3 OTA 抗体浓度对 CLIA 方法测定 OTA 的影响

Fig.3 Effects of concentration of OTA antibody on the performance of CLIA for OTA (n=3)

本研究的 CLIA 方法, 样品中的待测 OTA 和 AE 标记 OTA-BSA 偶联物竞争结合到 OTA 抗体上, 再根据竞争反应的强弱, 确定样品中 OTA 的残留量。因此, 合适的 OTA 抗体浓度, 既可以保证充分的竞争反应, 还可以提高方法的灵敏度。本研究对比测试了 5、10、25、50、100 ng/mL 等 OTA 抗体浓度, 通过图 3 的结果可知, OTA 抗体浓度越高,  $RLU_{max}$  值和  $IC_{50}$  越高, 当 OTA 抗体浓度为 10 ng/mL 时,  $RLU_{max}/IC_{50}$  值最高。因此, 确定最佳的 OTA 抗体浓度为 10 ng/mL。

### 2.1.3 吡啶酯标记物稀释比例的优化

本研究的 CLIA 方法, 采用了 AE 作为示踪物, 理论上提高了 CLIA 方法的准确性和灵敏度, 但只有合适的 AE 标记物稀释比例, 才能保证样品中的待测 OTA 和 AE 标记物维持平衡的竞争反应, 提高测定 OTA 的准确性和灵敏度。本研究对比测试了 1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:40 000 等 AE 标记物的稀释比例, 通过图 4 的结果可知, 当 AE 标记物的稀释比例为 1:10,000 时, CLIA 方法的  $RLU_{max}$  值适中,  $IC_{50}$  较低,  $RLU_{max}/IC_{50}$  值最高。因此, 确定最佳的 AE 标记物稀释比例为 1:10 000。

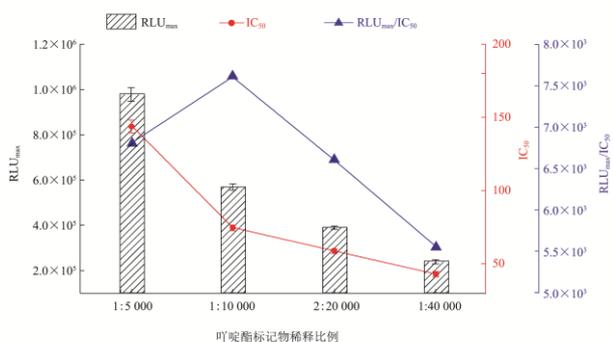


图 4 吡啶酯标记物稀释比例对 CLIA 方法测定 OTA 的影响

Fig.4 Effects of dilution ratio of AE markers on the performance of CLIA for OTA (n=3)

### 2.1.4 稀释液的优化

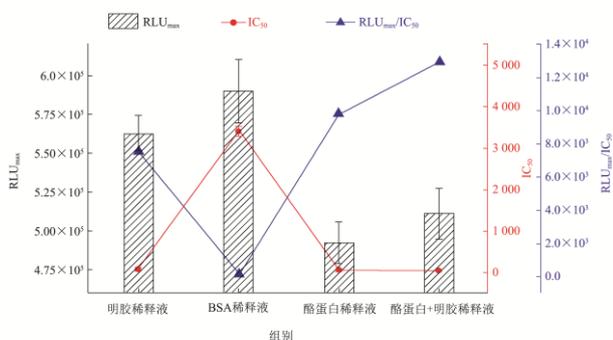


图 5 稀释液对 CLIA 方法测定 OTA 的影响

Fig.5 Effects of Diluent on the performance of CLIA for OTA (n=3)

磁微球、OTA 抗体和 AE 标记物的稀释液, 是免疫反应的溶液, 其中的蛋白质成分, 对 OTA 抗体的特异性、灵敏度有重大的影响, 更是会影响免疫反应的平衡, 本研究对比了 4 种稀释液对 CLIA 方法测定 OTA 的影响。通过图 5 可知, 含明胶、酪蛋白的稀释液, 其  $RLU_{max}/IC_{50}$  值最高, 因此, 选用含 0.5% 明胶、0.5% 酪蛋白的 Tris-HCl 稀释液作为 CLIA 方法各组分的稀释液。

### 2.1.5 反应时间的优化

本研究的 CLIA 方法, 其竞争反应和二抗孵育反应在全自动化学发光免疫分析仪上进行, 既避免了人工操作的失误, 还提供了全封闭的恒温反应环境, 进一步保证了 CLIA 方法的重复性和准确性。本研究先后对比了 5、10、15、20 和 30 min 的竞争反应时间和二抗孵育时间, 结果详见图 6, 根据  $RLU_{max}/IC_{50}$  值, 确定最佳的竞争反应时间为 15 min, 二抗孵育时间为 10 min。此时, CLIA 方法在全自动化学发光免疫分析仪上测定样品中的 OTA 残留, 检测时长为 30 min。

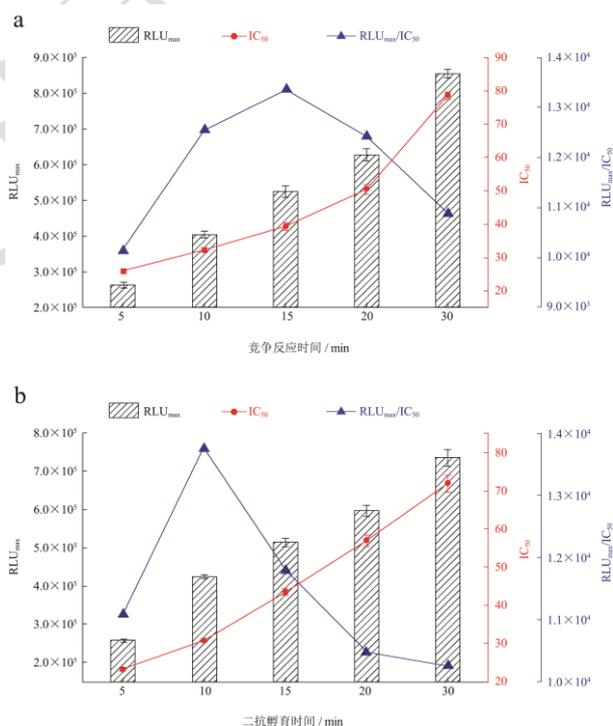


图 6 (a) 竞争反应时间对 CLIA 方法检测 OTA 残留的影响; (b) 二抗孵育时间对 CLIA 方法检测 OTA 残留的影响

Fig.6 (a) Effects of competitive reaction time on the performance of CLIA for OTA; (b) Effects of secondary antibody incubation time on the performance of CLIA for OTA

## 2.2 标准曲线的建立

在最佳试验条件下, 以 OTA 标准品浓度的对数

值为横坐标, RLU/RLU<sub>max</sub> 值为纵坐标, 建立 CLIA 方法的标准曲线 (见图 7), 方法的半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为 31.40 ng/kg, 线性范围(IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub>)为 11.23~99.20 ng/kg, 线性方程为  $y = -0.654 6x + 1.487 1$  ( $R^2 = 0.996 4$ ), 检出限为 6.38 ng/kg。

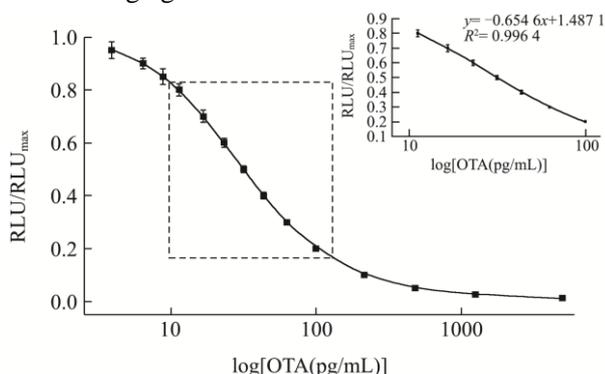


图 7 CLIA 方法测定 OTA 的标准曲线

Fig.7 Standard cures for CLIA of OTA (n=3)

### 2.3 CLIA 方法的分析性能

#### 2.3.1 CLIA 方法的精密性

本研究测定了 IC<sub>30</sub>、IC<sub>70</sub> 的 OTA 样品, 以评价 CLIA 方法的精密性, 详细结果见表 1。结果显示, CLIA 方法的批内 CV 为 3.46%~4.84%, 批间 CV 为 4.01%~4.77%, 表明 CLIA 方法测定 OTA 样品的精密性良好, 不同批次的检测结果具有良好的一致性。

表 1 批内和批间测定精密度

Table 1 The precision of intra-batch (n=10) and inter-batch (n=30)

分析	样品	Mean±SD/(ng/kg)	CV/%
批内分析 (n=10)	IC <sub>30</sub>	16.22±0.78	4.84
	IC <sub>70</sub>	63.03±2.18	3.46
批间分析 (n=30)	IC <sub>30</sub>	16.49±0.79	4.77
	IC <sub>70</sub>	63.10±2.53	4.01

表 2 CLIA 方法对 OTA 结构类似物和真菌毒素的交叉反应率

Table 2 Cross-reactivity of OTA analogs and mycotoxins by CLIA method

分析物	分子结构式	IC <sub>50</sub> /(ng/kg)	CR/%
赭曲霉毒素 A		31.40	100.00
赭曲霉毒素 B		481.76	6.52
赭曲霉毒素 C		127.82	24.57
黄曲霉毒素 B1		>40 000	<0.10
黄曲霉毒素 M1		>40 000	<0.10
脱氧雪腐镰刀菌烯醇		>40 000	<0.10
玉米赤霉烯酮		>40 000	<0.10
棒曲霉素		>40 000	<0.10

### 2.3.2 CLIA 方法的特异性

本研究使用 CLIA 方法测定 OTA 的功能结构类似物 OTB、OTC, 及其他真菌毒素 AFB1、AFM1、DON、ZEN、PAT, 计算各物质的 IC<sub>50</sub>, 并根据公式 (3) 计算各物质的交叉反应率, 结果详见表 2。由表 2 可见, OTA 对赭曲霉毒素 B、赭曲霉毒素 C 的交叉反应率 (CR) 为 6.52% 和 24.57%, 与其他真菌毒素均没有明显的交叉反应, 表明 CLIA 方法的特异性好, 不容易出现假阳性。

### 2.3.3 样品预处理和添加回收率

通过对牛奶样品进行预处理, 可以避免牛奶的成分干扰 CLIA 方法中抗原抗体的反应。常见的预处理方法有两种, 即免疫亲和柱净化法和离心去脂处理, 其中前者操作繁琐, 耗时较多, 成本高。为此, 本研究测试了几种简易的牛奶样品预处理方法, 并计算各方法的添加回收率 (详见表 3)。结果显示, 牛奶样品中, 加入 3 倍、7 倍、15 倍体积的甲醇进行样品预处理时, CLIA 方法的添加回收率为 95.08%~105.83%, 效果较好。而不加入或仅加入等体积的甲醇, CLIA

方法的添加回收率超出 85.0%~115.0% 区间, 效果较差。因此, 综合考虑甲醇的毒性及 CLIA 方法检测牛奶样品的灵敏度, 确定最佳的样品预处理方法为: 将牛奶样品与甲醇按 1:4 的体积比混合, 在涡旋振荡器上振荡 1 min 后, 静置 5 min, 离心取上清进行试验。使用该预处理方法, 牛奶样品会被稀释 4 倍, 故 CLIA 方法对牛奶样品的检出限为 25.52 ng/kg, IC<sub>50</sub> 为 125.60 ng/kg, 线性范围为 44.92~396.80 ng/kg, 添加回收率为 95.08%~105.83%, 准确度较高。

### 2.3.4 稳定性验证结果

本研究将同一批 CLIA 方法的试剂放置于 37 °C 的恒温箱中, 在 0、3、5、7 d 时, 各测定 1 次, 并绘制标准曲线, 计算 RLU<sub>max</sub>、IC<sub>50</sub> 和线性范围 IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub>, 结果见表 4。检测结果表明, 在 37 °C 放置 7 d 后, OTA CLIA 试剂的 RLU<sub>max</sub>、IC<sub>50</sub> 和线性范围 IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub> 无明显变化, 根据 Arrhenius 公式和文献报道, CLIA 方法的试剂盒在 37 °C 中放置 1 d, 即相当于在 2~8 °C 放置 45 d。因此, 可以认为研究建立的 CLIA 方法, 可在 2~8 °C 环境中, 维持不少于 9 个月的稳定性。

表 3 不同预处理方法测定牛奶中 OTA 的添加回收实验

Table 3 Recoveries of OTA in milk determined by different pretreatment methods

预处理方法	添加量/(ng/kg)	检测值/(ng/kg)	回收率/%	精密度 CV/%
牛奶样品原液	50.00	222.27±4.91	444.54	2.21
	200.00	1 057.56±43.04	528.78	4.07
	500.00	4 535.43±111.12	907.09	2.45
牛奶样品:甲醇=1:1	50.00	76.00±1.91	152.00	2.51
	200.00	304.42±3.15	152.21	4.32
	500.00	947.34±32.87	189.47	3.47
牛奶样品:甲醇=1:3	50.00	50.48±1.32	100.96	2.62
	200.00	190.16±6.07	95.08	3.19
	500.00	529.16±20.06	105.83	3.79
牛奶样品:甲醇=1:7	50.00	ND	ND	ND
	200.00	195.44±5.04	97.72	2.58
	500.00	501.84±9.48	100.37	1.89
牛奶样品:甲醇=1:15	50.00	ND	ND	ND
	200.00	211.36±8.69	105.68	4.11
	500.00	517.12±16.96	103.42	3.28

注: ND 是指测值低于检出限, 未检出。

表 4 CLIA 方法稳定性试验结果

Table 4 Stability of CLIA method (n=3)

检测时间	RLU <sub>max</sub>	IC <sub>50</sub> /(ng/kg)	线性范围 IC <sub>20</sub> ~IC <sub>80</sub> /(ng/kg)
第 0 天	418 782	30.37	10.14~102.95
第 3 天	424 492	30.58	10.37~105.39
第 5 天	416 350	31.22	10.64~103.75
第 7 天	400 496	32.19	10.85~106.24

## 2.3.5 不同方法学的比较

## 2.3.5.1 与仪器分析法的比较

根据文献报道<sup>[9-12]</sup>可知,牛奶样品中 OTA 的残留量约为 2~690 ng/kg,而国标 GB 5009.96-2016<sup>[23]</sup>中,灵敏度最高的方法学,其检出限为 0.1 μg/kg (即 100 ng/kg),难以检出牛奶样品中低浓度 OTA 的残留,因此本研究选用曾羲等<sup>[24]</sup>建立的 HPLC-MS/MS 方法作为对比方法,其测定样品的检出限为 18.0 ng/kg,与本研究的 CLIA 方法测定牛奶样品的检出限接近。两种方法学的检测结果如表 5 所示,CLIA 方法与 HPLC-MS/MS 方法检测结果的相关性较好 ( $R^2=0.8813$ ),检测出 OTA 残留的牛奶样品一致。由此可见,本研究建立的 CLIA 方法检测牛奶样品的结果准确,再考虑到其操作便捷,

检测时长仅为 30 min,可以说,CLIA 方法适用于大规模牛奶样品中 OTA 残留的快速筛查,其实用性较强。

## 2.3.5.2 与其他分析法的比较

在最优条件下,本研究的 CLIA 方法与其他检测方法进行样品检测性能的对比,结果见表 6。由表 6 可知,在测定对应的样品时,本研究的 CLIA 方法,在免疫分析法中,具有最高的灵敏度,且检出限接近仪器分析法,这一方面是由于试剂的灵敏度较高,另一方面是由于研究了新的样品预处理方式,降低了样品的稀释倍数,提高了对样品的检出限。总的来说,本研究的 CLIA 方法,具有较高的灵敏度和更短的检测时长,相比其他的检测方法,实用意义更大,更能满足大规模牛奶样品中 OTA 残留快速筛查的需求。

表 5 CLIA 方法、HPLC-MS/MS 方法检测牛奶样品中的 OTA

Table 5 Results of determination of OTA in milk samples by CLIA and HPLC-MS/MS ( $n=3$ )

样品编号	CLIA 法/(ng/kg)	HPLC-MS/MS 法/(ng/kg)	样品编号	CLIA 法/(ng/kg)	HPLC-MS/MS 法/(ng/kg)
1	ND	ND	20	ND	ND
2	ND	ND	21	34.83	33.97
3	ND	ND	22	ND	ND
4	39.55	39.97	23	ND	ND
5	28.52	29.60	24	39.31	35.62
6	ND	ND	25	33.82	34.01
7	31.79	30.56	26	31.36	29.87
8	ND	ND	27	ND	ND
9	34.76	34.90	28	33.21	32.71
10	ND	ND	29	42.63	44.48
11	ND	ND	30	37.36	35.27
12	43.91	41.68	31	ND	ND
13	38.08	36.63	32	43.89	44.95
14	ND	ND	33	ND	ND
15	39.11	37.54	34	31.25	30.09
16	38.97	40.48	35	40.68	41.84
17	ND	ND	36	ND	ND
18	ND	ND	37	ND	ND
19	26.76	27.12			

注: ND 是指测值低于检出限,未检出。

表 6 OTA 不同检测方法学的比较

Table 6 Comparison of different measurement methods for ochratoxin A detection

方法学	样品	检出限/(ng/kg)	线性范围/(ng/kg)	检测时长/min	参考文献
CLEIA	牛奶	30.00	64.00~670	90	[20]
MNPs-bs-AuNPs-ELISA	玉米、面粉、大豆	40.00	80.00~2,920	60	[25]
双流免疫层析法	玉米、小麦	3840	6360~145920	20	[26]
全自动免疫亲和在线净化-HPLC	玉米、小麦	12.50	12.50~500	/	[27]
同位素内标法-HPLC-MS	大米、小麦粉和黄豆酱	18.00	250~2500	/	[24]
CLIA	牛奶	25.52	44.92~396.80	30	本研究

### 3 结论

本研究基于吖啶酯-磁微球体系,建立的测定牛奶中 OTA 残留的自动化学发光免疫分析方法,在最优条件下,CLIA 方法的检出限为 6.38 ng/kg, IC<sub>50</sub> 为 31.40 ng/kg,线性范围为 11.23~99.20 ng/kg,批内/批间的变异系数(CV)<8.0%,测定牛奶样品的检出限为 25.52 ng/kg, IC<sub>50</sub> 为 125.60 ng/kg,线性范围为 44.92~396.80 ng/kg,添加回收率为 95.08%~105.83%,对赭曲霉毒素 B、赭曲霉毒素 C 的交叉反应率(CR)为 6.52%和 24.57%,对其他真菌毒素均无明显的交叉反应。测定牛奶样品的结果与仪器分析法(HPLC-MS/MS 方法)一致。能在 2~8 °C 环境中,保持不少于 9 个月的稳定性。

综上所述,本研究建立的 CLIA 方法,具有良好的灵敏度、精密性、准确度、特异性和稳定性,样品前处理简单,可实现自动化测定,检测时长仅为 30 min,非常适用于牛奶样品中 OTA 残留的快速筛查,对市售牛奶中 OTA 残留的筛查研究,和企业单位、政府监管部门等开展筛查监控工作,有重要的意义。

### 参考文献

- [1] 夏骏,李勇,徐国茂,等.动物源性食品中赭曲霉毒素 A 毒性和检测方法研究进展[J].江西畜牧兽医杂志,2015,2:4-7.
- [2] 桑晓霞,马江媛,黄登宇.赭曲霉毒素 A 检测方法的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2019,10(21):7271-7277.
- [3] 佟翠,张诗萌,李鹏,等.赭曲霉毒素 A 免疫毒性研究进展[J].动物医学进展,2019,40(3):106-109.
- [4] 郝俊冉,许文涛,黄昆仑.赭曲霉毒素 A 生成转化及致毒机制的研究进展[J].食品工业科技,2012,33(12):427-433.
- [5] 刘静,张红英,张祥宏.赭曲霉毒素 A 致癌机制研究进展[J].武警医学,2017,28(1):95-99.
- [6] GB 2761-2017,食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
- [7] 郑楠,王加启,韩荣伟,等.牛奶质量安全主要风险因子分析 II.霉菌毒素[J].中国畜牧兽医,2012,39(3):1-9.
- [8] 郑楠,王加启,韩荣伟,等.牛奶中主要霉菌毒素毒性的研究进展[J].中国畜牧兽医,2012,39(3):10-13.
- [9] Huang L C, Zheng N, Zheng B Q, et al. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2014, 146: 242-249.
- [10] Meucci V, Razzuoli E, Soldani G, et al. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy [J]. Food Additives Contaminants, 2010, 27(1): 64-71.
- [11] Erhan K, Ozen Y, Fatma K, et al. Detection of Ochratoxin A in bulk tank milk [J]. Kocatepe Veterinary Journal, 2018, 11(3): 255-259.
- [12] Elaridi J, Dimassi H, Hassan H. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in baby formulae marketed in Lebanon: Occurrence and safety evaluation [J]. Food Control, 2019, 106: 106680.
- [13] 高亚男,王加启,郑楠.牛奶中霉菌毒素来源、转化及危害[J].动物营养学报,2017,29(1):34-41.
- [14] Boudra H, Barnouin J, Dragacci S, et al. Flatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from french dairy herds [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(7): 3197-3201.
- [15] Skaug M A. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A [J]. Food Additives and Contaminants, 1999, 16(2): 75-78.
- [16] 翟若涵,蔡瑞,高振鹏,等.食品中赭曲霉毒素 A 检测方法研究进展[J].食品安全质量检测学报,2020,11(12):3937-3944.
- [17] Thirumala-Devi K, Mayo M A, Reddy G, et al. Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chillies by ELISA [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(10): 5079-5082.
- [18] 刘星,许杨,何庆华.谷物中赭曲霉毒素 A 化学发光酶免疫分析法的建立[J].食品与发酵工业,2011,37(4):204-208.
- [19] 张继斌,汪咏曾,陈冬东,等.免疫层析法快速定量检测高粱中赭曲霉毒素 A[J].农产品加工(学刊),2014,9:44-46.
- [20] 孟辉.谷物、猪饲料和牛奶中赭曲霉毒素 A 的检测方法研究[D].北京:中国农业大学,2013.
- [21] 庞彬彬,孙海鹰,徐云根.化学发光试剂的研究新进展[J].化学试剂,2017,39(9):942-948.
- [22] 刘仁荣,余宙,何庆华,等.以赭曲霉毒素 A 单克隆抗体建立竞争酶联免疫吸附分析方法的研究[J].食品科学,2005, 26(11):174-177.
- [23] GB 5009.96-2016,食品中赭曲霉毒素 A 的测定[S].
- [24] 曾羲,林子豪,雷芬芬,等.同位素内标高效液相色谱-串联质谱法测定粮食及其制品中赭曲霉毒素 A、B 和 C[J].食品工业科技,2019,40(21):239-244.
- [25] Sun Zhichang, Wang Xuerou, Tang Zongwen, et al. Development of a biotin-streptavidin-amplified nanobody-based ELISA for ochratoxin A in cereal [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 171: 382-388.
- [26] Zhang X, He K, Fang Y, et al. Dual flow immunochromatographic assay for rapid and simultaneous quantitative detection of ochratoxin A and zearalenone in corn, wheat, and feed samples [J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 2018, 19(11): 871-883.
- [27] 谢刚,李丽,黎睿,等.全自动免疫亲和在线净化-高效液相色谱法快速测定粮食中赭曲霉毒素 A[J].中国粮油学报,2019, 34(6):114-119.