

竞争免疫荧光分析法高灵敏、高选择性检测赭曲霉毒素

任姿静 张迎红 吕鑫 张远馥 王术皓

(聊城大学 化学化工学院, 山东 聊城 252059)

摘要 基于半抗原与二抗竞争结合固相抗体的免疫模式,建立了一种高灵敏、高选择性检测赭曲霉毒素的新型免疫荧光分析法。赭曲霉毒素具有半抗原性,可与基底抗体作用。当赭曲霉毒素加入到该体系后,与异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔(IgG-FITC)发生竞争反应,随着赭曲霉毒素浓度的增加,IgG-FITC与抗体结合的浓度减少,荧光强度降低。在最佳实验条件下,荧光强度的变化值(ΔF)与赭曲霉毒素浓度的对数在1 nmol/L-100 μ mol/L范围内呈良好的线性关系,相关系数 $R = 0.9932$ 。方法的检出限为0.35 nmol/L。将该方法用于不同种类的酒样中赭曲霉毒素的测定,结果令人满意。与传统方法相比,本方法是一种低成本、高灵敏度、高选择性的检测方法,在食品安全领域中具有潜在的应用价值。

关键词 荧光分析;免疫竞争反应;赭曲霉毒素

中图分类号 O657

文献标识码 A

0 引言

赭曲霉毒素(ochratoxin A, OTA)是很多真菌的次级代谢产物^[1,2],据报道摄入或接触极少量赭曲霉毒素即可使人或禽畜的肝脏发生病变^[3]。因此超微量赭曲霉毒素的检测受到了各国的重视。目前检测赭曲霉毒素的方法主要包括液相色谱法^[4]、荧光光谱法^[5]和表面增强拉曼法^[6,7]。中国国标法主要采用液相色谱法,虽然液相色谱法具有灵敏度高、特异性强、高通量的特点,但仪器昂贵、操作繁琐、耗时长等不足限制了其实际应用。因此,建立和发展一种简单、高灵敏、高选择性和低成本的方法具有重要的应用价值。

荧光免疫分析技术是一种将高特异性的免疫反应与高灵敏性的荧光分析法相结合的生物检测技术。它因其操作简便、高通量、灵敏度高的特点,近些年在医学、生物学、食品安全发展尤为迅速,已经用来测定内分泌激素^[8]、蛋白质^[9]、核酸^[10]、体内药物^[11]等生物分子。对于传统的荧光免疫夹心模式来说,只可检测一些大分子,而对于一些半抗原分子^[12]如赭曲霉毒素来说,由于分子体积和空间位阻的影响,无法直接与酶标板结合形成固相抗体,所以一般采用竞争性分析模式^[13-15]。传统的竞争免疫分析通常为目标抗原与被标记抗原对固相抗体的竞争结合,但这一过程需要对目标物进行逐个标记^[16],操作步骤极为繁琐。本工作以赭曲霉毒素为研究对象,提出了一种新的竞争免疫模式,引入具有抗原性、能与抗体发生特异性反应的二抗^[17,18]。该方法已经成功地应用于不同种类酒中赭曲霉毒素的测定,大大简化了操作步骤,提高了检测效率,有望用于赭曲霉毒素食品安全领域。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

所有实验均在96孔聚乙烯平板酶标板(Costar,美国基因有限公司)反应,荧光强度由多功能自动酶标仪(TECAN,瑞士)采集得到。

实验所用抗体异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔(IgG-FITC)、抗OTA抗体、牛血清白蛋白(BSA)及赭曲霉

毒素(OTA)购买于美国 Sigma-Aldrich 公司, KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaCl 等各种盐均购自于天津化学试剂厂),所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

首先向 96 微孔板中加入 $100\ \mu\text{L}$ 抗 OTA 抗体,在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下孵育过夜.然后用磷酸缓冲液(PBST)和超纯水洗板三次,除去未包被的抗体,使用 BSA 溶液封闭后,用 PBST 和超纯水再洗涤三次甩干,再同时加入 $50\ \mu\text{L}$ 不同浓度的赈曲霉毒素溶液和 $50\ \mu\text{L}$ IgG-FITC 溶液,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下孵育 1 h.此时,赈曲霉毒素和标记二抗 IgG-FITC 对酶标板上的抗体进行竞争结合.洗涤甩干后用酶标仪测定其荧光强度,检测其荧光强度($\lambda_{\text{ex}} = 475\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520\ \text{nm}$),根据相对荧光强度变化值 $\Delta F(\Delta F, \Delta F = F_0 - F)$,其中 F 、 F_0 分别为有或无 OTA 时体系的荧光强度,对 OTA 进行定量测定。

样品测定:首先将酒样离心($15000\ \text{r}/\text{min}$)5 min,然后稀释 100 倍,再按照上述步骤包板,将 $50\ \mu\text{L}$ 稀释的酒样溶液和 $50\ \mu\text{L}$ IgG-FITC 溶液滴加在酶标板上, $37\ ^\circ\text{C}$ 下孵育 1 h,洗板甩干后用酶标仪测定其荧光强度,根据相对荧光强度变化值测定酒样中 OTA 的含量。

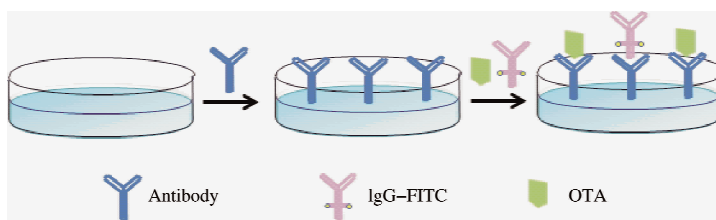


图 1 免疫反应原理图

2 结果与讨论

2.1 二抗与半抗原竞争反应

本工作采用的异硫氰酸荧光素具有良好的荧光特性(图 2).在免疫反应中,二抗(具有抗原性)与半抗原(抗原决定簇)均能与抗体发生特异性结合,但二者与抗体发生的结合位点不同、并且存在空间位阻、极性等其他因素,所以当二者同时存在时,二者发生竞争结合.为了验证半抗原与二抗之间是否存在竞争关系,如图 3 所示,当赈曲霉毒素的浓度为 $0.1\ \text{nmol}/\text{L}$ 至 $10\ \text{nmol}/\text{L}$,荧光强度基本无变化,说明赈曲霉毒素浓度过低,未与 IgG-FITC 发生竞争;随着赈曲霉毒素浓度的增加,荧光强度迅速减小,说明赈曲霉毒素与 IgG-FITC 发生竞争,且赈曲霉毒素与抗体的作用力大于 IgG-FITC 与抗体的作用.当赈曲霉毒素的浓度大于 $100\ \mu\text{mol}/\text{L}$,荧光强度趋于平稳,说明多余的赈曲霉毒素不再与固相抗体结合,结合位点趋于饱和。

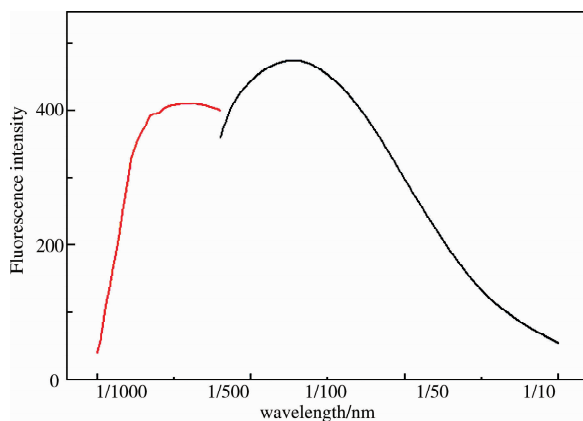


图 2 IgG-FITC 的吸收光谱和荧光光谱

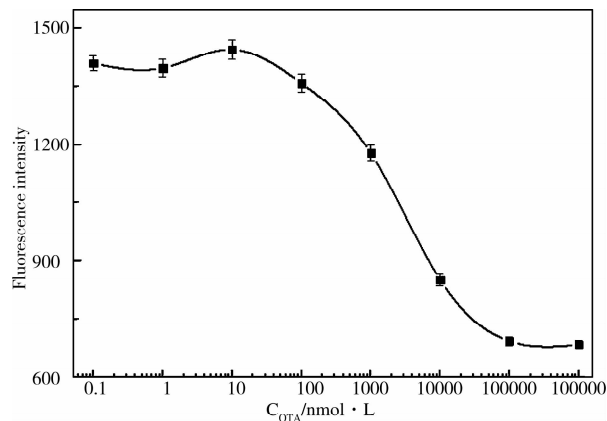


图 3 荧光强度随赈曲霉毒素浓度的变化趋势图

2.2 抗体浓度的选择

为了研究酶标板表面的抗体密度对荧光信号响应的影响,将不同浓度的抗体滴加于酶标板,测定荧光强度的变化值.实验结果表明,荧光相应信号随着抗体浓度的增加而增加.当抗体浓度为 $40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其变化

值达到最大,说明酶标板上抗体达到饱和.故本选取 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 抗赭曲霉毒素为实验条件.

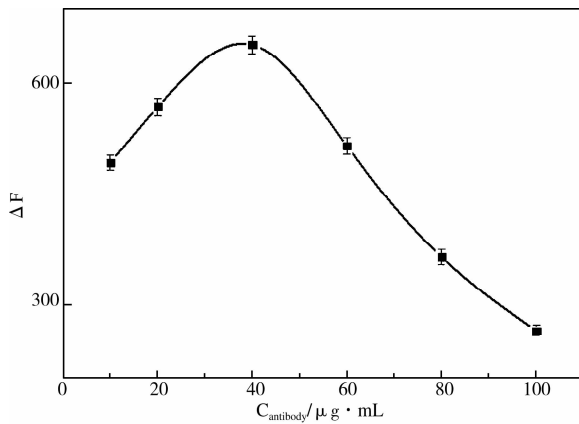


图4 抗体浓度的优化

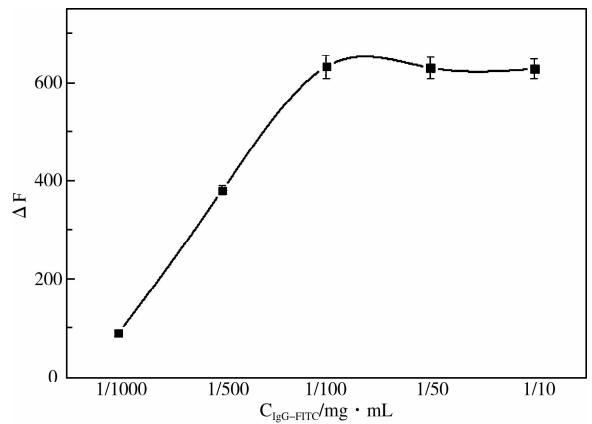


图5 二抗浓度的选择

2.3 二抗浓度的选择

二抗的浓度不仅影响该方法的灵敏度,而且影响其工作曲线.如图5所示,随着二抗的浓度增大, ΔF 也逐渐增加,当 IgG-FITC 为 $0.01 \text{ mg}/\text{mL}$, ΔF 达到最大.当二抗浓度继续增大时, ΔF 稍有下降且趋于平稳,说明过量的二抗影响竞争反应.这种影响可能是因为二抗的空间位阻阻碍了赭曲霉毒素与抗原的作用.最终选取 $0.01 \text{ mg}/\text{mL}$ IgG-FITC 作为反应条件.

2.4 竞争时间的选择

在本工作中,二抗与赭曲霉毒素之所以产生竞争,是因为二者与抗体作用的动力学差异.所以时间是一个关键因素,我们考察了竞争时间对该体系的影响(图6).结果表明 ΔF 随着时间延长而增加,当时间为 60 min 时, ΔF 值达到最大且稳定.当反应时间超过 60 min , ΔF 反而有所下降,这是因为随着时间的增长,光的漂白性增强,荧光强度降低.因此我们选择 60 min 为竞争反应时间.

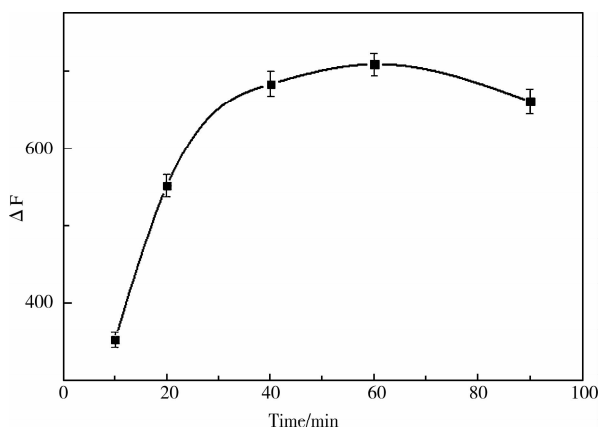


图6 竞争反应时间的选择

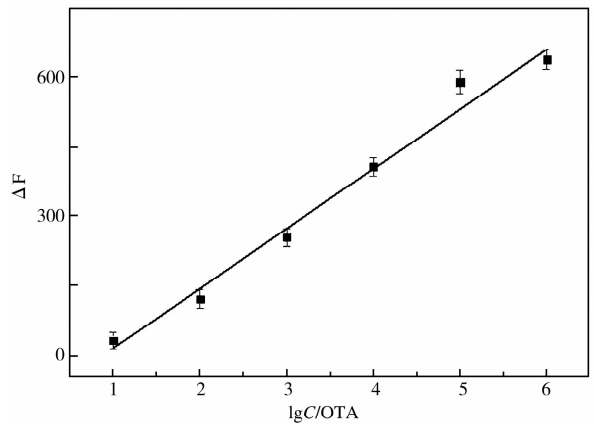


图7 本方法测定 OTA 的分析特性

2.5 该方法对 OTA 的分析检测和选择性研究

在最佳实验条件下,我们对该体系的分析特性进行了研究.如图7所示,荧光强度随着 OTA 浓度的增加而降低,其 ΔF 增加.结果表明赭曲霉毒素的浓度在 $1 \text{ nmol}/\text{L}$ - $100 \mu\text{mol}/\text{L}$ 范围内,荧光强度的变化值(ΔF)与赭曲霉毒素的浓度(C)对数呈良好的线性关系.其线性回归方程为 $\Delta F = 129 \lg C - 113$ ($C, \text{ nM}$),相关系数为 0.9932 ($n=8$),检出限为 0.35 nM .对 60 nM 的赭曲霉毒素平行测定 11 次,其相对标准偏差(RSD)为 3% .将本方法和文献报道的其他方法进行了比较,结果列于表1.对比可以看出,本方法的线性范围较宽,检测限低,因此有望用于实际样品的痕量赭曲霉毒素检测.

为了验证该方法是否适合对酒类中的赭曲霉毒素的测定,我们选择了一些在酒品测定时可能会产生干扰的物质,进行了对照试验.结果如图8所示,只有加入 $200 \mu\text{M}$ 赭曲霉毒素,荧光强度发生明显变化,而加入相当于赭曲霉毒素浓度 100 倍的其他物质,荧光强度变化甚微.这说明了该方法对赭曲霉毒素有较好的响

应,而对其它物质无响应,适合对酒品中赭曲霉毒素的测定.

表 1 不同方法对赭曲霉毒素检测的结果比较

方法	线性范围	检出限	文献
高效液相色谱法	1-100 ng/ mL	0.3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	[4]
表面等离子共振法	0.005-0.02 ng/mL	0.005 ng/mL	[6]
表面等离子共振法	0.094-10 ng/mL	0.005 ng/mL	[7]
荧光免疫法	0.05-10 pg /mL	0.05 pg /mL	[7]
荧光适配体法	0.15-6 nM	0.098 nM	[19]
荧光免疫法	2.4-625 pg /mL	2.2 pg /mL	[20]
本方法	1 nmol/L-100 $\mu\text{mol}/\text{L}$	0.34 nM	

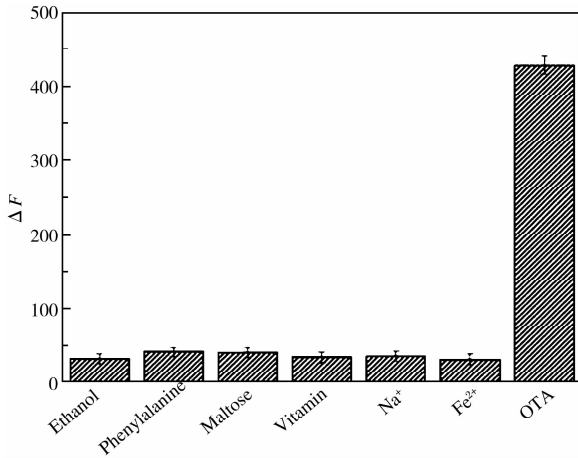


图 8 该方法对不同物质的响应

表 2 酒样品测定

样品	加入量/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	测定量/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%
红酒	0	—	—
	50	51.23	102
	500	497.1	99
白酒	0	—	—
	50	52.56	105
	500	493.1	99
啤酒	0	—	—
	50	48.83	98
	500	503.2	101

2.6 样品测定和加标回收

我们将这种方法应用于不同种类的酒(啤酒、红酒和白酒)中赭曲霉毒素含量的测量. 首先将酒样离心(15000 r/min)5 min,然后稀释 100 倍,按照本方法测定了样品中的赭曲霉毒素含量,测定回收率,结果见表 2,按照 95%的置信水平来看,无显著性差异,结果令人满意.

3 结论

本工作基于二抗与半抗原都可与抗体进行特异性结合,但其结合能不同进而产生竞争反应,结合荧光免疫法,建立了一种检测赭曲霉毒素的新方法. 该方法不仅具有线性范围宽(1 nmol/L-100 $\mu\text{mol}/\text{L}$),检出限低(0.35 nmol/L),高选择性的特点. 而且,由于引入了二抗,无需每一待测物的逐一标记,很大程度上简化了实验步骤,降低了成本. 该方法已经成功地应用于酒类 OTA 的测定,突显了在实际应用中潜在价值.

参 考 文 献

- [1] Cho S H, Lee C H, Jang M R, et al. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea[J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1283-1288.
- [2] Alcaidemolina M, Ruizjiménez J, Matagranados J M, et al. High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solid-phase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and determination by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(7): 1115-1125.
- [3] Maqbool U, Ahmad M, Anwar-ul-Haq, et al. Determination of aflatoxin-B1 in poultry feed and its components employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. Toxicological & Environmental Chemistry Reviews, 2004, 86(4): 213-218.
- [4] Chen F, Luan C, Wang L, et al. Simultaneous determination of six mycotoxins in peanut by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector[J]. J Sci Food Agric 2017, 97: 1805-1810
- [5] Huang X, Zhan S, Xu H, et al. Ultrasensitive fluorescence immunoassay for detection of ochratoxin a using catalase-mediated fluorescence

- quenching of CdTe QDs[J]. *Nanoscale*, 2016, 8: 9390-9397
- [6] Biancoa M, Sonatob A, Girolamac A. An aptamer-based SPR-polarization platform for high sensitive OTA detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 241: 314-320.
- [7] Zhu Z, Feng M, Zuo L, et al. An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin a in wine and peanut oil [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 65: 320-326.
- [8] 王丽丽. 光色素荧光探针的制备及其在多环芳烃免疫分析中的应用[D]. 上海: 东华大学, 2009.
- [9] 刘婷婷, 宁志刚, 赫文龙, 等. 固相时间分辨荧光免疫分析的标记技术及标记过程中的蛋白质测定[J]. *标记免疫分析与临床*, 2009, 16(02): 108-111.
- [10] 陈敬华. 某些新型吡啶类发光探针的合成及其性质研究[D]. 福州: 福州大学, 2004.
- [11] 徐星杰. 荧光偏振免疫分析技术在临床治疗药物监测中的应用[J]. *海峡药学*, 2017, 29(4): 231-232.
- [12] 徐加发, 成义祥, 沈萍萍. 半抗原设计合成研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2009(5): 1178-1182.
- [13] Wu S, Duan N, Zhu C, et al. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin a using upconversion nanoparticles as multicolor labels[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 30(1): 35-42.
- [14] Barthelmebs L, Jonca J, Hayat A, et al. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs) based on a competition format for a rapid and sensitive detection of ochratoxin A in wine[J]. *Food Control*, 2011, 22(5): 737-743.
- [15] Zhang A, Ma Y, Feng L, et al. Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China[J]. *Food Control*, 2011, 22(11): 1723-1728.
- [16] Huang B, Xiao H, Zhang J, et al. Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A [J]. *Archives of Toxicology*, 2009, 83(6): 619-624.
- [17] Capper D, Preusser M, Habel A, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody[J]. *Acta Neuropathologica*, 2011, 122(1): 11-19.
- [18] Vande Veen W, Stanic B, Yaman G, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 131(4): 1204-1212.
- [19] Taghdisi S M, Danesh N M, Beheshti H R, et al. A novel fluorescent aptasensor based on gold and silica nanoparticles for the ultrasensitive detection of ochratoxin A [J]. *Nanoscale*, 2016, 8: 3439-3446.
- [20] Liang Y, Huang X, Yu R, et al. Fluorescence ELISA for sensitive detection of ochratoxin A based on glucose oxidase-mediated fluorescence quenching of CdTe QDs[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006: 936: 195-201.

Sensitive and Selective Detection of Ochratoxin a Using Fluorescent Competitive Immunoassay

REN Zi-jing ZHANG Ying-hong LV Xin ZHANG Yuan-fu WANG Shu-hao

(School of Chemistry and Chemistry Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract A highly sensitive and selective competitive immunoassay method is presented for fluorescence determination of ochratoxin A (OTA) based on competitive immune reaction between OTA and fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-rabbit (IgG-FITC). In the work, the fluorescence of IgG-FITC decreased with the increasing of the concentration of OTA, since IgG-FITC was replaced by OTA. The assay showed a good linear toward OTA concentration in the range of 1 nmol/L to 100 μ mol/L with a correlation of 0.9932. The limit of detection for OTA was experimentally determined to be 0.34 nM. The sensing system has been used for the determination of OTA in drink samples. Relative to conventional methods, this method offers the advantages of high-throughput, sensitive, low cost and selectivity, showing great potential for food security.

Key words fluorescent analysis; competitive immune reaction; ochratoxin A