学校代码：10327
学　　号：1120190757

南京财经大学

硕 士 学 位 论 文

AFB_1 和 DON 单克隆抗体的制备以及胶体金免疫层析试纸条的开发

院　　系：食品科学与工程学院
专　　业：食品科学与工程
研 究 方 向：粮油质量安全
姓　　名：孔志康
指 导 教 师：邢常瑞　副教授
完 成 日 期：二〇二二年四月
答 辩 日 期：二〇二二年五月

PREPARATION OF AFB1 AND DON MONOCLONAL ANTIBODIES AND DEVELOPMENT OF COLLOIDAL GOLD IMMUNOCHROMATOGRAPHIC STRIP

A Dissertation Submitted to

Nanjing University of Finance and Economics

For the Academic Degree of Master of Food Science

BY

Kong ZhiKang

Supervised by

Associate professor Xing ChangRui

School of Food Science and Engineering

Nanjing University of Finance and Economics

April.2022

摘　要

粮食在生长、储存和运输等过程中极易受到霉菌污染，产生有毒次级代谢产物——真菌毒素。真菌毒素具有强大的致癌和致突变作用，粮食中常见的黄曲霉毒素 B_1（AFB_1）和呕吐毒素（DON）分别被国际癌症研究机构（IARC）认定为 1 类和 3 类致癌物质。在我国，小麦、玉米和大米等粮食中真菌毒素的污染情况较为普遍，因此粮食中真菌毒素的快速准确检测近年来也得到了迅速发展，其中以胶体金免疫层析试纸条的应用最为广泛。胶体金试纸条具有成本低廉、操作方便、适用于现场检测、无需大型仪器设备等优点，但目前也存在一些不足。首先，试纸条的灵敏度受到抗体影响，而高灵敏度抗体难以获得；其次，胶体金试纸条通常可以用作肉眼定性或者仪器协助定量检测，难以通过肉眼进行半定量检测；再者，胶体金试纸条检测的样品前处理通常都是直接稀释法，这样会降低检测灵敏度。为了解决以上问题，本文进行了研究与探索：

（1）通过完全抗原的合成、小鼠免疫、血清检测、细胞融合与筛选和单克隆抗体纯化等实验过程，制备了针对 AFB_1 和 DON 的高灵敏度单克隆抗体。AFB_1 和 DON 单抗都属于 IgG1 亚型，亲和力分别为 6.22×10^9 L/mol 和 7.69×10^8 L/mol，属于高亲和力抗体。经过棋盘法获得最佳包被浓度后，测得 AFB_1 和 DON 单抗的半数抑制浓度（IC_{50}）分别达到 0.058 ng/mL 和 7.88 ng/mL。AFB_1 单抗对 AFB_2、AFG_1、AFG_2 和 AFM_1 交叉反应率分别为 12.5%、50%、0%和 3%。DON 单抗对 3-AcDON 和 15-AcDON 的交叉反应率为 376.1%和 3.43%。

（2）开发了三重检测线胶体金免疫层析试纸条（TTLS）用于对小麦中的 DON 进行肉眼半定量与仪器协助定量检测。通过对小麦阴性添加样品进行 TTLS 检测可获得 4 个视觉阈值用于 DON 的半定量，分别是 200、500、1000 和 2000 μg/kg。将对 35 个小麦样品进行半定量测定，并与 UPLC-MS/MS 的检测结果进行相比，结果表明 TTLS 的肉眼半定量阈值代表了实际样品的最低 DON 含量。TTLS 可以在胶体金读数仪的辅助下根据检测线的 RLU 值进行 DON 定量检测。检测结果表明，三条检测线的检测平均值与 UPLC-MS/MS 的检测值一致性良好，并且对低 DON 污染小麦的检测稳定性优于传统胶体金定量试纸条。

（3）以稻壳为原料，通过一步法合成了磁性稻壳生物炭（MB）并建立了免洗脱磁性固相萃取前处理结合胶体金试纸条对 AFB_1 检测的方法。实验结果表明：1mg MB 在水中对 AFB_1 吸附容量达到 892 ng 以上，25 mg MB 在 10 min 内对 1mL 水中的 200 ng AFB_1 的吸附率达到 97%。MB 对金标抗体不存在特异性吸附，对抗原-抗体结合反应无干扰。MB 表面吸附的 AFB_1 与金标抗体结合后会在层析时通过溶液流动力脱离 MB，并且 MB 对试纸条层析显色无不良影响。以上情况

满足于免洗脱磁性固相萃取前处理结合胶体金试纸条对 AFB_1 检测方法的建立。胶体金试纸条可以检测到 MB 表面吸附的大部分 AFB_1，将 MB-AFB_1 用有机溶剂洗脱后再检测，发现洗脱效率低且操作繁琐。在对大米、糙米和玉米中 AFB_1 进行检测后，发现免洗脱磁性固相萃取前处理结合胶体金试纸条方法的灵敏度高于传统样品稀释前处理，可以显著提升胶体金试纸条的抗基质干扰能力。

关键词：真菌毒素；单克隆抗体；胶体金免疫层析试纸条；肉眼半定量检测；免洗脱磁性固相萃取

ABSTRACT

Mycotoxin, a toxic secondary metabolite, is produced in the process of food growth, storage and transportation. Mycotoxins have powerful carcinogenic and mutagenic effects. Aflatoxin B_1 (AFB_1) and Deoxynivalenol (DON) commonly found in food were identified as class 1 and 3 carcinogens respectively by the International Agency for Research on Cancer (IARC). In China, mycotoxin contamination in wheat, corn and rice is common, so the rapid and accurate detection of mycotoxin in grain has been developed rapidly in recent years, among which colloidal gold immunochromatographic strip is the most widely used. Colloidal gold immunochromatographic strip has the advantages of low cost, convenient operation, suitable for on-site detection, without large instruments and equipment, but there are also some shortcomings. Firstly, the sensitivity of the strip is affected by antibodies, and high sensitivity antibodies are difficult to obtain. Secondly, colloidal gold immunochromatographic strip can usually be used as naked eye qualitative or instrumental to assist quantitative detection, but not through the naked eye semi-quantitative detection. Moreover, the sample pretreatment of colloidal gold immunochromatographic strip test is usually diluted, which leads to low detection sensitivity. In order to solve the above problems, this paper conducted research and exploration:

(1) High sensitivity monoclonal antibodies against AFB_1 and DON were prepared by complete antigen synthesis, mouse immunization, serum detection, cell fusion with screening, and monoclonal antibody purification. Both AFB_1 and DON mab belong to IgG1 subtype with affinity of 6.22×10^9 L/mol and 7.69×10^8 L/mol, respectively, which were high affinity antibodies. After the checkerboard method, the IC_{50} of AFB_1 and DON reached 0.058 ng/mL and 7.88 ng/mL, respectively. The cross-reactivity rates of AFB_1 mab to AFB_2, AFG_1, AFG_2 and AFM_1 were 12.5%, 50%, 0% and 3%, respectively. The cross-reaction rates of DON mab to 3-AcDON and 15-AcDON were 376.1% and 3.43% respectively.

(2) Triple test lines strip (TTLS) was developed for the visual semi-quantitative and instrument-assisted quantitative detection of DON in wheat. Four visual thresholds, 200, 500, 1000 and 2000 μg/kg, were obtained for semi-quantification of DON by TTLS detection of negative wheat samples which spiked with a series of concentrations of DON. 35 wheat samples were semi-quantified by TTLS and compared with UPLC-MS /MS. The results showed that the visual semi-quantified threshold of TTLS

represented the minimum DON content of actual samples. TTLS can be used for DON quantitative detection according to the RLU value of the test line with the assistance of colloidal gold reader. The results showed that the average values of the three detection lines were in good agreement with the UPLC-MS/MS values, and the stability of the detection of wheat with low DON contamination was better than that of the traditional colloidal gold quantitative test strips.

(3) Magnetic rice husk biochar (MB) was synthesized by one-step method from rice husk, and a method for the detection of AFB_1 was established by the pretreatment of free elution magnetic solid phase extraction combined with colloidal gold immunochromatographic strip. The results showed that the adsorption capacity of AFB_1 by 1mg MB in water reached 892 ng, and the adsorption rate of 200 ng AFB_1 by 25 mg MB in 1mL water reached 97% in 10 min. There was no specific adsorption for gold label antibody and no interference for antigen-antibody binding reaction. AFB_1 adsorbed on the surface of MB combined with gold-labeled antibody would be separated from MB by solution flow force during chromatography, and MB had no adverse effect on the chromatographic rendering of the strip. The above conditions met the establishment of AFB_1 detection method combined with the pre-treatment of free elution magnetic solid phase extraction with colloidal gold immunochromatographic strip. The strip detected most AFB_1 adsorbed on the surface of MB. After eluting MB-AFB_1 with organic solvent, it was found that the elution efficiency was low and the operation was tedious. AFB_1 was detected in rice, brown rice and corn. It was found that the sensitivity of free elution magnetic solid phase extraction combined with colloidal gold immunochromatographic strip was higher than that of traditional sample dilution pretreatment, which could significantly improve the anti-matrix interference ability of colloidal gold immunochromatographic strip.

KEY WORDS: Mycotoxin; Monoclonal antibody; Colloidal gold immunochromatographic strip; Visual semi-quantitative detection; Free elution magnetic solid phase extraction

目　录

第一章 绪论.....1
1.1 研究背景.....1
1.2 两种粮食中主要真菌毒素概述.....1
1.2.1 黄曲霉毒素 B_1.....1
1.2.2 呕吐毒素.....2
1.3 真菌毒素的前处理.....3
1.3.1 直接稀释法.....4
1.3.2 液液萃取法.....4
1.3.3 固相萃取法.....4
1.4 真菌毒素常用的定量检测技术.....5
1.4.1 传统仪器分析法.....5
1.4.2 免疫学检测技术.....6
1.5 研究目的和意义.....8
1.6 研究内容.....9
第二章 黄曲霉毒素 B_1 与呕吐毒素单克隆抗体的制备.....10
2.1 材料与设备.....10
2.1.1 实验试剂与材料.....10
2.1.2 实验设备.....10
2.1.3 实验溶液.....11
2.2 实验方法.....12
2.2.1 完全抗原的合成.....12
2.2.2 完全抗原的表征.....13
2.2.3 小鼠免疫.....13
2.2.4 血清检测.....14
2.2.5 单克隆抗体的制备.....15
2.2.6 单克隆抗体性质测定.....18
2.2.7 数据分析.....19
2.3 结果与分析.....19
2.3.1 完全抗原的表征.....19
2.3.2 小鼠血清检测.....22
2.3.3 细胞融合与筛选.....25
2.3.4 纯化抗体电泳分析.....26
2.3.5 单克隆抗体性质测定.....26
2.4 本章小结.....28

第三章 小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇肉眼半定量和仪器协助定量胶体金试纸开发.....29
3.1 材料与设备.....30
3.1.1 实验试剂与材料.....30
3.1.2 实验设备.....30
3.1.3 主要溶液.....30
3.2 实验方法.....31
3.2.1 金标抗体的制备.....31
3.2.2 DON 三重检测线胶体金试纸条的制备.....31
3.2.3 试纸条的检测过程及原理.....32
3.2.4 DON 三重检测线胶体金试纸条的优化.....33
3.2.5 传统单检测线胶体金试纸条对小麦 DON 样品预处理及检测.....33
3.2.6 UPLC-MS/MS 对小麦样品 DON 的检测.....34
3.3 结果与分析.....35
3.3.1 金标抗体的制备.....35
3.3.2 DON 三重检测线胶体金试纸条模型建立及优化.....36
3.3.3 传统单检测线胶体金试纸条与 UPLC-MS/MS 对小麦中 DON 的检测.....39
3.3.4 TTLS 对小麦中 DON 的肉眼半定量检测研究.....40
3.3.5 TTLS 与 UPLC-MS/MS、STLS 对小麦中 DON 定量检测比较.....42
3.4 本章小结.....44
第四章 免洗脱磁性固相萃取结合胶体金免疫层析试纸条对粮食中黄曲霉毒素 B1 检测研究.....46
4.1 材料与设备.....47
4.1.1 实验试剂与材料.....47
4.1.2 实验设备.....47
4.2 实验方法.....47
4.2.1 磁性稻壳生物炭的制备.....47
4.2.2 磁性稻壳生物炭的表征.....48
4.2.3 AFB_1 胶体金免疫层析试纸条的制备与检测.....48
4.2.4 MB 对 AFB_1 吸附性能验证.....48
4.2.5 基于免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测模式原理.....49
4.2.6 免洗脱磁性固相萃取增敏胶体金试纸条验证.....49
4.2.7 传统有机试剂洗脱研究.....50
4.2.8 胶体金试纸条在实际样品中的应用效果研究.....50

4.3 结果与分析.....51
4.3.1 磁性稻壳生物炭的表征.....51
4.3.2 MB 对 AFB_1 吸附性能验证.....52
4.3.3 免洗脱磁性固相萃取增敏胶体金试纸条验证与优化.....54
4.3.4 传统有机试剂洗脱研究.....56
4.3.5 胶体金试纸条在实际样品中的应用.....57
4.4 本章小结.....60
结论与展望.....62
参考文献.....65

第一章 绪论

1.1 研究背景

真菌毒素是许多丝状真菌，如曲霉、青霉菌和镰刀菌等产生的有毒次级代谢产物（Marie-Caroline 等，2016；Alshannaq 等，2017）。在粮食的生产和储存过程中，由于受到各种环境条件的影响，极易发生霉变，进而产生大量的霉菌毒素（Kolawole 等，2021）。真菌毒素具有很强的毒性和致癌、致畸、致突变作用，对人体健康会产生很大的影响，大大降低了粮食的食用价值和经济价值（Zain 等，2011）。目前，世界上已知的真菌毒素大概有 300 多种，谷物中常见的真菌毒素有脱氧雪腐镰刀菌醇、玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素和伏马菌素等（Cüce 等，2020）。粮食中真菌毒素的降解是个比较棘手的课题，目前发现等离子体、臭氧和二氧化氯等处理方法对真菌毒素具有一定的降解作用（周煜等，2020；张崇霞等，2021；常晓娇等，2016）。但粮食中真菌毒素的降解除去成本因素外，经过处理的粮食的品质也可能受到一定的损害，因此粮食中真菌毒素的控制以早发现、早控制为主，所以真菌毒素的快速准确检测一直是学者们研究的热门课题。

目前，真菌毒素的检测主要包括传统的仪器检测、无损检测和免疫学检测方法。传统的仪器检测方法，如高效液相色谱法（High performance liquid chromatography, HPLC）和液相色谱串联质谱（Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS），它们具有灵敏度高、检测限低和重复性好等优点，但其仪器昂贵，样品的检测通常需要复杂前处理，并且检测成本较高（刘胜利，2011；Dong-Ho 等，2017）。近年来发展的无损检测技术有电子鼻、近红外光谱、荧光光谱、拉曼光谱和高光谱成像技术等（沈飞等，2017；Elem 等，2020；Alisaac 等，2019；陈瑞鹏等，2021；吴启芳，2020），它们具有简单快速、无样品损耗等优点，但检测准确度较差（武琳霞等，2020）。目前，主要的快速检测方法为免疫分析法，如酶联免疫吸附测定法（Enzyme-Linked immunoSorbent assay, ELISA）、胶体金试纸条法（Colloidal gold immunochromatographic strip）等，其具有方便、快速、灵敏度高的优点，并且不需要昂贵和复杂的仪器和设备，所以更适合快速的现场检测。

1.2 两种粮食中主要真菌毒素概述

1.2.1 黄曲霉毒素 B_1

黄曲霉毒素（Aflatoxins, AF）是一类高毒性的真菌毒素，其主要由黄曲霉

（Aspergillus flavus）和寄生曲霉（Aspergillus parasiticus）等真菌所产生，特曲霉也能产生少量的黄曲霉毒素。黄曲霉毒素的的基本结构为二呋喃环和香豆素（叶萍等，2021），黄曲霉毒素根据紫外灯下所激发出的荧光颜色可大致分为 B 和 G 两族，AFB_1 和 AFB_2 产生蓝色荧光，AFG_1 和 AFG_2 产生绿色荧光。荧光颜色差异的主要原因为 B 族的组成结构是甲氧基、二呋喃环、香豆素、环戊烯酮，而 G 族结构中的环戊烯酮被替换为环内酯（胡冰等，2022）。黄曲霉毒素 B 族和 G 族通常在谷物或饲料如花生、玉米和小麦中被发现，而 AFM_1 则在牛奶被发现，这是因为奶牛食用被 AFB_1 污染的饲料，导致 AFB_1 在体内经过羟基化形成了代谢产物 AFM_1（J.L 等，2018；华宇等，2020）。此外，M 族黄曲霉毒素也被报道出现在人乳中（J Csapó 等，2020）。黄曲霉毒素具有高度的稳定性，不易被常规热处理破坏。黄曲霉毒素在甲醇、乙腈和氯仿等有机溶剂中，难溶于水。在目前被发现的二十多种黄曲霉毒素中，AFB_1 毒性最大，被国际癌症研究机构（IARC）认定为 1 类致癌物质（Xiong 等，2018）。AFB_1 致癌性大约为砒霜的 68 倍、氰化物的 10 倍（陈敏，2021）。AFB_1 可以通过食物摄入的方式在动物肝脏积聚，AFB_1 及其代谢产物能对动物的肝脏造成急、慢性肝损伤，甚至是肝癌，并且也具有遗传毒性（Vicente 等，2019）。因为黄曲霉毒素的强烈毒性，即使是痕量的毒素也能对人体造成损害，所以为了保护人体健康，世界各地规定了黄曲霉毒素在各种粮食和饲料中的限量标准。美国规定食品中 AFB_1 的最高含量限定为 20 μg/kg，欧盟规定食品中 AFB_1 含量不得高于 12 μg/kg，总黄曲霉毒素不得超过 15 μg/kg。我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定各种谷物中的 AFB_1 限量在 5-20 μg/kg 之间。

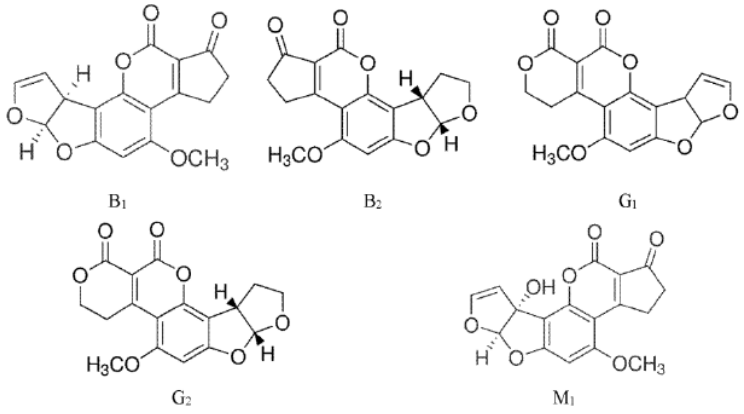

图 1.1 黄曲霉毒素化学结构式

Fig 1.1 Chemical formula of aflatoxin

1.2.2 呕吐毒素

脱氧雪腐镰刀菌烯醇（Deoxynivalenol, DON）又称为呕吐毒素，是一种单端孢霉烯族化合物，其化学结构式如图 1.2 所示。DON 化学性质稳定，耐热、耐酸，易溶于水中，在乙醇、乙腈和甲醇等有机溶剂中的溶解性也很强。DON 主要存在于小麦、玉米和大麦等粮食中，小麦等作物的真菌毒素污染主要与小麦赤霉病(Fusarium head blight, FHB)有关，FHB 已成为影响小麦生产的最严重的真菌病害之一（蒋雪松等，2019；Mielniczuk E 等，2020）。研究表明，小麦赤霉病是由小麦在生长期感染禾谷镰刀菌复合体（Fusarium graminearum species complex, FGSC）引起的（Shao 等，2021）。它不仅造成小麦产量损失，而且还产生有毒的次生代谢物镰刀菌毒素。根据结构差异，镰刀菌毒素主要可分为单端孢霉烯族化合物（trichothecenes，TS）、玉米赤霉烯酮（zearalenone，ZEN）和伏马菌素（Fumonisin，FB）（Urbanek 等，2018）。在这些真菌毒素中，DON 是小麦中最常见的真菌毒素。DON 具有细胞毒性、免疫抑制和致畸作用。当人们摄入受 DON 污染的食物时，会出现呕吐、厌食、腹泻、发热等现象，故又称“呕吐毒素”（Pestka 等，2010）。DON 已被国际癌症研究机构（IARC）列为三级致癌物。它具有较强的细胞毒性、神经毒性、免疫毒性、遗传毒性和致畸性（Huang 等，2020；Li 等，2018；Pedroso 等，2019）。我国小麦中 DON 污染情况相当严峻，资料显示 2015-2020 年间抽查到的真菌毒素污染小麦样品中，DON 污染可以达到 76.6%，这对人们的身体健康造成了极大威胁（戴煌等，2021）。此外，根据调查，2018-2019 年间我国六大小麦产区所产小麦中 DON 的平均含量为 1335 μg/kg，远超我国小麦中 DON 限量 1000 μg/kg 的标准（郭红艳等，2021）。

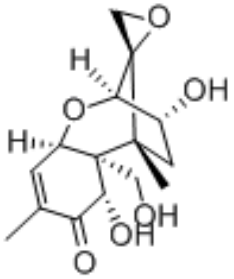

图 1.2 脱氧雪腐镰刀菌烯醇化学结构式

Fig 1.1 Chemical formula of deoxynivalenol

1.3 真菌毒素的前处理

粮食中真菌毒素的提取通常是在样品粉末中按照一定的固液比添加水或各种有机溶剂进行提取操作后离心，上清液便是样品提取液。根据不同检测方法以及各种灵敏度要求，样品提取液还需进行不同的处理步骤。

1.3.1 直接稀释法

直接稀释法是操作最简单、成本最低以及危险性最小的前处理方法（王蓓蓓等，2021）。直接稀释法是将样品稀释液通过一定的比例再稀释，从而使得基质效应降低到较小的水平，但是直接稀释法在稀释基质的同时也会稀释真菌毒素，所以稀释倍数受到不同检测方法的检测限的制约。质谱类仪器对样品的净化程度要求较高，所以通常不采用直接稀释法。由于免疫学检测对真菌毒素的特异性强，并且免疫学检测追求的是方法的简便、易操作，所以直接稀释法前处理目前应用最多的是免疫学检测方法。虽然直接稀释法在免疫学检测中具有诸多优点，但其目前也存在较多问题。由于免疫学检测的灵敏度普遍没有传统仪器检测高，所以样品稀释倍数有限，样品基质容易对抗原-抗体结合造成影响，从而降低了检测的灵敏度。

1.3.2 液液萃取法

液液萃取（Liquid-liquid extraction, LLE）的原理是利用真菌毒素在不同溶剂中的溶解度不同，将样品提取液中的真菌毒素萃取到另一溶剂中，而样品中的基质还保留在原提取液里，从而达到净化样品的作用（王晓等，2019）。液液萃取的优点是操作简单、设备简易、成本低，因为发展较早而十分成熟，但大量的有机溶剂对人体危害大，容易造成环境污染（胡文尧等，2020）。近年来发展出了一种微型化的液液萃取技术——分散液液微萃取，其原理是萃取溶液在分散剂的作用下均匀的分散在提取液中，形成微小的液滴（Pallarés 等，2017）。该方法萃取真菌毒素更为高效，并且减少了传统液液萃取中有机溶剂的使用量（张蕊，2019）。韩艺烨等通过酸辅助分散液液微萃取对果汁中 AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2、OTA 等 8 种真菌毒素进行富集，并结合高效液相色谱-串联质谱法进行检测（韩艺烨等，2019）。结果表明采用 60 μL 三氯苯胺和 1500 μL HCl 溶液分别作为萃取剂和分散剂时萃取效果最佳，8 种真菌毒素在 1~500 μg/L 范围内呈良好的线性关系，相关系数>0.994。

1.3.3 固相萃取法

固相萃取（Solid phase extraction, SPE）的原理是将流动相中的真菌毒素吸附到固定相上，然后再用有机溶剂将真菌毒素从固定相上洗脱下来，从而达到样品富集与去除基质的目的。固相萃取所用的有机溶剂较少，并且操作方便。固定相的选择对真菌毒素的吸附至关重要，不同的材料对真菌毒素具有不同的键合作用，常用的固定相材料有十八烷基硅烷 （C_{18}）、离子交换材料、硅镁型吸附剂、免疫亲和凝胶、硅胶、氨基丙基、苯基等（傅勇等，2012）。

近年来，人们在传统固相萃取的基础上发展出了各种新型的萃取技术，其中以磁性固相萃取技术（Magnetic solid phase extraction, MSPE）最具发展潜力。磁性固相萃取是基于磁性纳米材料的固相萃取技术，操作过程是将磁性纳米材料加入到样品提取液中，涡旋振荡使之均匀分散在溶液中吸附真菌毒素，吸附达到平衡后在磁场作用下收集磁性纳米材料，将磁性纳米材料所吸附的真菌毒素洗脱下来，从而达到对真菌毒素的富集。与传统固相吸附材料相比，纳米材料比表面积大且易于改性，所以对真菌毒素的富集效果更好。通常磁性纳米材料是通过 Fe_3O_4 纳米粒子提供磁力，将其连接到其他材料的表面或者在其基础上进行修饰而合成的。近年来，由于碳基材料环境友好且对真菌毒素的吸附作用强，所以在其前处理富集上应用越来越广泛（孔志康等，2020）。碳纳米管和氧化石墨烯等碳材料表面富含多种官能团，可以通过多种作用力与真菌毒素结合，如静电相互作用、π-π 堆积、疏水相互作用和螯合作用等。Li 等人在磁性多壁碳纳米管表面修饰聚乙烯亚胺用于对牛奶中的多种真菌毒素分离富集，并通过 LC-MS/MS 进行检测。实验表明在最佳提取条件下，聚乙烯亚胺修饰磁性碳纳米管对真菌毒素的最大吸附量达到 4.9~10.2 mg/g，并且对 10 种真菌毒素的绝对回收率达到 88.3 %~103.5 %（Li 等，2020）。Pirouz 等人将磁性氧化石墨烯（MGO）用壳聚糖（CTS）修饰用于增强材料对真菌毒素的吸附能力，研究表明 CTS 和 MGO 的羟基、胺和铁离子（Fe^{2+}和 Fe^{3+}）是影响真菌毒素结合的主要因素（Pirouz 等，2018）。

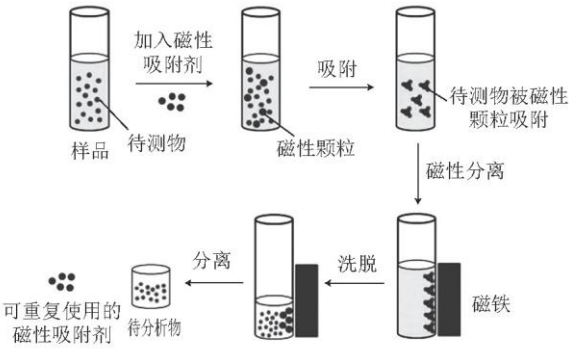

图 1.3 磁性固相萃取流程图

Fig 1.3 Flow chart of magnetic solid phase extraction

1.4 真菌毒素常用的定量检测技术

1.4.1 传统仪器分析法

传统的大型仪器分析是目前真菌毒素检测的主要方式之一。传统仪器方法主要有高效液相色谱（High performance liquid chromatography, HPLC）、液相色谱联串联质谱（Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS）、

气相色谱联用质谱（Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）等，色谱类仪器一般的工作原理是将真菌毒素通过色谱柱吸附，然后利用不同真菌毒素极性的差异将其按照一定的顺序洗脱，通过不同的检测仪器如紫外检测器或者质谱检测器对其进行分析（Rahman 等，2013）。这类检测仪器具有灵敏度高，分辨力强的优点。徐洪文等人建立了一种以分散液液微萃取为前处理技术结合 HPLC 对植物油中 6 种真菌毒素同时进行检测的方法，实验结果表明，该方法对 6 种真菌毒素的检测效果良好，线性相关系数均大于 0.999，样品平均加标回收率为 75.88%~105.25%（徐洪文等，2020）。Tahoun 等人建立并验证了一种灵敏、快速、可靠的玉米和燕麦中 DON 和 T-2 毒素的 LC-MS/MS 分析方法，采用乙腈/水混合物对样品进行提取，经过超高效液相色谱系统分离真菌毒素，最后通过三重四极杆质谱进行分析（Tahoun 等，2021）。实验结果表明，两种真菌毒素的检测线性相关系数大于 0.999，并且检出限（0.04~0.12 g/kg）和定量限（0.13~0.38 g/kg）分别达到均低于欧盟规定的最高检出限。传统的仪器检测方法在灵敏度方面有独特优势，但是其复杂的前处理过程、昂贵的仪器以及需要专业的人员操作等问题也一定程度上制约了它的广泛应用。

1.4.2 免疫学检测技术

免疫学检测是基于抗原抗体结合的检测技术，因此抗体对目标物的亲和力和交叉反应大小主要决定了免疫学检测的灵敏度。免疫学检测使用的抗体分为多克隆抗体和单克隆抗体。多克隆抗体通常是将通过采集兔血清纯化得到的，多抗是由多种 B 淋巴细胞产生的，所以可以针对多种抗原表位进行结合，因此多抗的特异性不高，但是其具有制备简单、价格便宜的优点。鼠源单克隆抗体的制备首先要将小鼠的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，通过筛选后获得的杂交瘤细胞可以无限增殖并稳定分泌单克隆抗体。单克隆抗体具有特异性强、稳定性高、交叉反应低等优点，在免疫学检测中应用广泛。免疫学检测在保证灵敏度的同时具有操作简单、成本低和适用于现场快速筛查等优点。

1.4.2.1 酶联免疫吸附

酶联免疫吸附（ELISA）是将抗原抗体反应与酶促反应相结合的免疫学检测技术。ELISA 主要分为竞争法和双抗体夹心法。竞争法主要是针对一些小分子抗原所设计，竞争法又分为直接竞争（dcELISA）和间接竞争（icELISA）两种。

dcELISA 原理是将抗体包被在孔板上,然后同时加入样本和酶标抗原（一般为辣根过氧化物酶），样本中的抗原便会与酶标抗原竞争结合包被的抗体，最后加入底物进行酶促反应显色，最终样品中抗原的含量会与显色程度呈反比。dcELISA 具有操作简单，交叉反应小等优点。张银志通过制备的 DON 抗体和

DON 酶标抗原建立了一种直接竞争 ELISA 方法用于检测食品中的 DON 含量。DON 抗体的半数抑制浓度 IC_{50} 为 10 ng/mL，所建立的 dcELISA 检测范围为 1-100 ng/mL,灵敏度达 0.56 ng/mL，并且玉米淀粉样品回收率达 80.2%~91.1%（张银志等，2012）。Zhan 开发了一种动态光散射增强的直接竞争酶联免疫吸附方法（DLS-dcELISA），用于超灵敏地检测玉米中的 AFB_1（Zhan 等，2021）。动态光散射增强是利用羟基自由基诱导的金纳米颗粒的聚集来放大其散射信号。DLS-dcELISA 对 AFB1 的检测具有超高的灵敏度，实验结果表明 DLS-dcELISA 的检测限为 0.12 pg/mL，比比色和等离子体 dcELISA 的检测限分别低 385 倍和 153 倍。

icELISA 则是将抗原进行包被，然后加入样品与抗体，包被的抗原会与样品中的抗原竞争游离的抗体，之后加入与抗体结合的酶标二抗，经过显色即可对样品中的抗原进行定量。样品中的抗原与加入的抗体都是游离的，所以抗体会优先与样品中抗原结合，这就导致 icELISA 对样品中微量抗原的定量比 dcELISA 更为灵敏。Wang 建立了一种灵敏的 icELISA，用于快速筛查动物源性中药中的 AFB_1（Wang 等，2021）。实验结果表明 4 个动物源药用样品的 IC_{50} 范围为 0.092~0.135 ng /mL，检测限（LOD）达 0.008 ~ 0.020 ng/mL。潘明飞建立了一种检测花生中 AFB_1 的 icELISA，该方法通过高亲和力的抗体和各种优化使得灵敏度和准确性极大的提高。结果表明该方法灵敏度（IC_{50}）和检出限（IC_{15}）分别达到 0.027 ng/mL 和 0.0066 ng/mL，线性范围为 0.0097~0.088 ng/mL。Ji 建立了一种快速、灵敏定量小麦样品中 DON 的 icELISA 方法。小鼠抗血清对单孢霉烯 3-乙酰基-DON 和 T-2 毒素的交叉反应不显著，麦粒中 DON 的线性检测范围为 0.01~100 μg/mL，DON 的回收率为 82~93%（Ji 等，2011）。

双抗体夹心法是针对大分子抗原设计的 ELISA 方法。双抗体夹心法需要两种针对同一抗原不同抗原表位的抗体，首先将一抗包被在孔板上，然后加入样品与一抗反应，接着加入酶标二抗与抗原结合，经过洗脱后加入底物反应显色。双抗体夹心法最大的优势就是高度的专一性，两种抗体的特异性导致交叉反应率极低，但是其定量灵敏度不如竞争法高，常用于大分子过敏原的筛查。

1.4.2.2 免疫层析技术

免疫层析技术（Immunochromatography assay，ICA）是将免疫学与色谱学相结合的一门技术。免疫层析技术也分为竞争法与夹心法。由于真菌毒素是小分子，所竞争免疫层析是常用于真菌毒素定量检测的模式，其原理是抗体从层析试纸条的下方通过毛细管作用移动经过的硝酸纤维素膜时，会与硝酸纤维素膜上的包被抗原条带（检测线）结合，未结合的抗体会继续向上移动从而与控制线（通常喷

涂有抗 IgG 抗体）结合。抗体溶液在层析前会与样品溶液反应，因此样品中抗原的含量会决定游离的抗体的含量，从而导致检测线上抗体含量的差异。条带的颜色由抗体的标记物颜色决定，常于用标记抗体的显色物有胶体金、荧光微球等。

胶体金免疫层析试纸条是应用最为广泛的免疫层析技术。胶体金作为显色标记物具有诸多优点。首先，胶体金具有明亮的色彩，金纳米颗粒直径在 20~40 nm 时会呈现鲜艳的橙红色；其次，金纳米颗粒具有高电子密度，胶体金溶液稳定性优秀，并且易于标记抗体；再者，胶体金价格便宜且安全无毒。胶体金免疫层析试纸条在真菌毒素快速检测中发挥着重要作用。Li 建立了一种基于竞争法的胶体金免疫层析法，用于同时快速检测粮食中的 AFB_1、赭曲霉毒素 A（OTA）和玉米赤霉烯酮（ZEN）。结果表明，三种抗体在检测中无交叉反应，试纸条对 AFB_1、OTA 和 ZEN 的检测限分别为 0.25 ng/mL、0.5 ng/mL 和 1ng/mL，并且在花生、玉米和水稻实际样品中的检测结果与 ELISA 一致性高（Li 等，2013）。朱云建立了一种胶体金试纸条法用于测定小麦及其制品中的 DON（朱云等，2017）。结果表明，试纸条的样品回收率为 86.67 %~120 %，该方法检测时间短、定量准确且与高效液相色谱法所测结果不明显差异。

荧光微球是另一类常见的显色标记物，荧光作为标记物最大的优点是其极高的信噪比。荧光材料在受到激发光照射时会吸收能量，电子从基态跃迁到激发态再回到基态过程中会以荧光的方式散发出能量。常见的荧光微球有镧系元素和量子点两类。镧系元素是时间分辨荧光免疫层析的标记物，荧光微球的合成需要两种不同的镧系元素分别作为光吸收子和发射子掺入亚微米级的陶瓷微粒中，这种荧光微球具有高敏感性和高稳定性。量子点荧光微球是将量子点包埋进微球中而制得一种荧光标记物。量子点可以通过调谐发射波长和粒子大小而得到不同的发射光谱，显现不同的荧光颜色，所以其做大的优点是通过不同的荧光标记实现同时检测多种分析物。张东升以 Eu^{3+}螯合物的纳米微球为荧光探针,通过竞争法建立了时间分辨荧光免疫层析法对粮食中的 DON 含量进行检测。结果表明，方法的线性范围为 0.5~25.0 ng/mL，灵敏度为 0.25 ng/mL, 小麦和玉样品种的平均加标回收率为 91.4%~109.3%（张东升等，2018）。任美玲基于 FIT/FIC 比值定量，以量子点荧光微球为标记探针偶联 AFB_1 抗体建立了的 AFB_1 量子点荧光微球免疫层析定量模型（任美玲，2015）。实验表明，该荧光试纸条 IC_{50} 为 13.87±1.54 pg/mL，灵敏度比传统量子点免疫层析方法提高了 39 倍。

1.5 研究目的和意义

真菌毒素是一种粮食中的重要危险污染物，目前对真菌毒素的以传统仪器检测和免疫学检测为主。仪器法对真菌毒素的检测由于其特性无法做到现场快速

检测，而免疫学检测尤其是免疫层析试纸条由于其便携方便、操作简单和检测快速等优点得到了越来越多的关注和应用。免疫层析方法目前仍然具有一些局限性：免疫层析法对真菌毒素的定量检测不能做到脱离仪器，需要依赖胶体金读数仪进行判定；粮食中真菌毒素的前处理基本通过稀释样品提取液来减少基质效应，这种方式会使得稀释液中真菌毒素含量大大降低从而影响了免疫学检测的灵敏度。本文致力于制备出高亲和力的 AFB_1 和 DON 抗体，开发出更适于现场检测的肉眼定量胶体金试纸条，同时对胶体金免疫层析试纸条的前处理进行富集增敏优化，提高传统胶体金试纸条的检测灵敏度的同时减少前处理的复杂操作。

1.6 研究内容

（1）AFB_1 和 DON 免疫原和包被原的合成，小鼠免疫后通过血清检测选择适合的小鼠进行杂交瘤细胞的筛选制备，然后将筛选出的杂交瘤细胞培养并制备小鼠腹水，接着进行抗体纯化并对抗体做相应表征，测量抗体的亲和力和 IC_{50}。

（2）将制备的 DON 抗体通过胶体金进行标记，设计由三条检测线和一条控制线构成的胶体金试纸条。优化检测线包被原的浓度、样品与金标抗体温育反应时间和样品稀释液体积，实现通过肉眼对小麦中 DON 的半定量检测，同时也可通过读数仪进行精确检测。最后将试纸条与传统单检测线胶体金试纸条以及 UPLC-MS/MS 的检测进行比较。

（3）以稻壳为原料合成磁性稻壳生物炭并对其进行表征，研究磁性稻壳生物炭在 AFB_1 的前处理方面的潜力，研究 MB 对 AFB_1 的吸附和洗脱效果。建立免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条对 AFB_1 检测的方法，最后研究不同粮食样品基质中该方法对 AFB_1 检测灵敏度的提升效果。

第二章 黄曲霉毒素 B_1 与呕吐毒素单克隆抗体的制备

黄曲霉毒素 B_1 和呕吐毒素是谷物及其加工制品中常见的真菌毒素，具有强大的致癌、致畸和致突变作用（Pedroso 等，2019）。AFB_1 和 DON 不仅对人体造成了巨大的伤害，每年也因污染粮食造成了巨大的经济损失。AFB_1 和 DON 的快速准确检测一直是人们致力于研究的方向。免疫学检测方法由于其简单的操作、低廉的价格并且易于现场和偏远地区的快速检测而得到了广泛应用。除了方法学的优化外，提高免疫学检测方法灵敏度的最直接的方式就是采用高特异性和高亲和力的单克隆抗体。由于真菌毒素是小分子，不具有免疫原性，所以本章在前人的研究基础上，采用效果较为出色的完全抗原合成方案，通过对 BALB/c 小鼠的免疫与细胞融合筛选获得能产生高灵敏度和高亲和力的 AFB_1 和 DON 抗体，从而为接下来的免疫学检测方法的研究奠定坚实基础。

2.1 材料与设备

2.1.1 实验试剂与材料

黄曲霉毒素 B_1 与呕吐毒素及其类似物购于北京美正生物科技有限公司。钥孔血蓝蛋白（KLH）、牛血清白蛋白（BSA）、O-（羧甲基）羟胺半盐酸盐（CMO）、水溶性碳二亚胺盐酸盐（EDC.HCL）、N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）、丁二酸酐、4-二甲胺基吡啶（DMAP）、丁基硼酸（BBA）、弗式完全佐剂（CFA）、弗式不完全佐剂（IFA）、3,3′,5,5′-四甲基联苯胺（TMB）、聚乙二醇溶液（50% PEG solution（w/v），二甲亚砜（DMSO，生化纯）、明胶购于 Sigma 公司。氯化钾、氯化钠、十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、辛酸、硫酸铵、硫酸等试剂购于上海麦克林生化科技有限公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体 IgG (H+L) 购于 Jackson ImmunoResearch Laboratories 公司。鼠源 Ig 类亚型鉴定用 ELISA 试剂盒购于洛阳佰奥通实验材料中心。0.9%生理盐和 75%酒精购于山东利尔康医疗科技股份有限公司。RPMI 1640 不完全培养基、胎牛血清（FBS）、HAT（50×）、HT（100×）培养基购于 Gibco 公司。蛋白 G 琼脂糖凝胶购于北京博奥龙免疫技术有限公司。吐温 20、蔗糖购于国药集团。

2.1.2 实验设备

磁力搅拌器	德国 heidolph 公司
酶标仪 Multiskan mk3	美国 Themofisher 公司
高速冷冻离心机	美国 Themofisher 公司
电热鼓风干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司

电子分析天平	德国 Sartorius 公司
涡旋振荡器	德国 IKA 公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
AB SCIEX Triple TOF® 5600 质谱仪	美国 AB SCIEX 公司
紫外扫描仪（U-3900）	日本日立公司
生物电泳图像分析系统（FR-980A）	上海复日科技有限公司
超滤管 AmiconUltra-4Ultracel-3K	美国 Millipore 公司

2.1.3 实验溶液

0.01 M 的碳酸盐缓冲液（CBS）：称取 2.93 g 碳酸氢钠（$NaHCO_3$）和 1.59 g 碳酸钠（$Na2CO_3$）溶于 900 mL 超纯水，调节 pH 至 9.6 后定容到 1 L。

0. 1 M 的磷酸盐缓冲液（PBS）：称取 2 g 氯化钾（KCl）、80 g 氯化钠（NaCl）、 2 g 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）、36.2g 十二水合磷酸氢二钠（Na $HPO_4 12H_2O$）溶于 900 mL 超纯水，调节 pH 至 7.4 后定容到 1L。

封闭液：含有 PVP（0.1%）的 0.01 M pH 9.6 CBS。

抗体稀释液：含有 Tween-20（0.1%）和 PVA（0.02%）的 0.01 M pH 7.4 PBS。

洗涤液（PBST）：含有 Tween-20（0.05%）的 0.01 M pH 7.4 PBS。

显色液：A 液：B 液=5:1，现配现用。

A 液：9.33 g 一水合柠檬酸和 36.8 g Na_2HPO_4•12H2O 溶于 900 mL 超纯水中，混合均匀后加入 180 μL 的 30% H_2O_2，用超纯水定容到 1 L；

B 液：0.3 g TMB 加入装有 500 mL 乙二醇的棕色瓶中，超声溶解后于 4℃储存

终止液：2 M 的稀硫酸。112 mL 浓硫酸缓慢加入到冰浴降温的 888 mL 超纯水中。

10% 1640 培养基：加入 50 mL 胎牛血清到 450 mL1640 不完全培养基中，用 5 mL 移液器吸打均匀备用，于 4℃储存。

20% HAT 培养基：将 100 mL 胎牛血清和 10 mL HAT 加入到 390 mL 1640 不完全培养基中，用 5 mL 移液器吸打均匀备用，于 4℃储存。

20% HT 培养基：将 100 mL 胎牛血清和 5 mL HT 加入到 395 mL 1640 不完全培养基中，用 5 mL 移液器吸打均匀备用，于 4℃储存。

细胞冻存液：将胎牛血清与 1640 不完全培养基与 DMSO 按照：2：7：1 的比例配置，于-20℃储存。

2.2 实验方法

2.2.1 完全抗原的合成

2.2.1.1 AFB_1 完全抗原的合成

AFB_1 的分子结构表面没有与蛋白直接偶联的活性基团位点，所以需要将 AFB_1 进行衍生化，通过肟化反应在 AFB_1 表面引入活性羧基（Devi 等，2010；张勋，2014）：采用 0.8 mL 甲醇：吡啶：水（4: 1: 1）溶液将 1mg AFB_1 固体粉末溶解，涡旋震荡 5 min，加入 2 mg CMO，水浴加热搅拌反应 6 h，温度为 70℃，然后在室温下静置过夜。反应溶液用氮气吹干后将沉淀物用 1 mL 三氯甲烷溶解，然后用 1mL 超纯水连续萃取三次。将有机相收集并用氮气吹干，沉淀物即为衍生产物，用 200 μL 二甲基甲酰胺（DMF）溶解。

AFB_1 分子衍生化后即可与蛋白偶联：载体蛋白采用 KLH 和 BSA 分别作为免疫原和包被原，首先向衍生化的 1mg AFB_1 溶液中加入 2.4 mg EDC 与 1.3 mg NHS，室温下磁力搅拌反应 12 h。将反应溶液逐滴加入到含有载体蛋白（KLH：5 mg；BSA：7.16 mg）的 CBS 缓冲液中，室温条件下磁力搅拌反应过夜（谢珲等，2015；管笛 2011；孔德昭，2017）。将偶联产物在 8000 rpm 下超滤 30 min，重复三次，将溶液体系置换成 0.01M PBS 缓冲液，然后将免疫原进行分装，在-20℃保存。

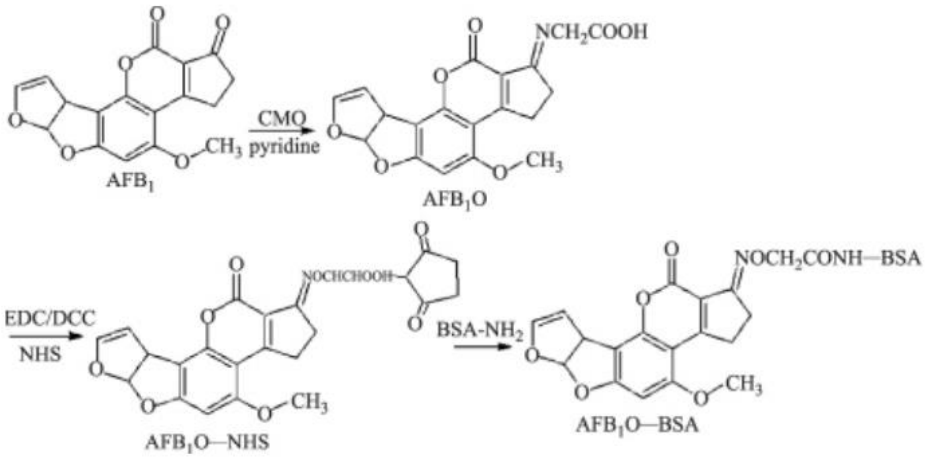

图 2.1 AFB_1 完全抗原的合成

Fig 2.1 Synthesis of AFB_1 complete antigen

2.2.1.2 DON 完全抗原的合成

DON 在分子表面的 3、7、15 位上拥有三个自由羟基，前人的研究表明通过

封闭 7、15 位的羟基，在 3 位羟基上进行衍生出羧基与载体蛋白偶联效果良好（孙震，2012）。首先取在 0.6 mL 吡啶中加入 1 mg DON 并涡旋震荡 5min，然后加入 5 mg 丁基硼酸，避光磁力搅拌反应过夜后得到封闭产物 DON-BBA。接着向反应液中加入 7 mg 丁二酸酐与 3.2 mg DMAP，50℃加热搅拌反应 4 h 之后，加入 100 μL 超纯水用于终止反应从而得到衍生产物 3-HS-DON-BBA。将反应液用氮气吹干，加入超纯水涡旋震荡 5min 将沉淀复溶，然后通过三氯甲烷进行三次萃取。将三氯甲烷萃取液用氮气吹干，使用甲醇震荡过夜复溶，最终得到衍生产物 3-HS-DON。

DON 与载体蛋白的偶联与 AFB_1 类似：载体蛋白采用 KLH 和 BSA 分别作为免疫原和包被原。将得到的衍生产物 3-HS-DON 用 400 μL DMF 溶解，然后加入 2.5 mg EDC 与 1.2 mg NHS，室温下磁力搅拌反应 6 h。将反应液逐滴加入载体蛋白溶液中（KLH：5 mg；BSA：7.54 mg），室温下磁力搅拌反应过夜。将偶联产物在 8000 rpm 下超滤 30 min，重复三次，将溶液体系置换成 0.01M PBS 缓冲液然后将免疫原进行分装，在-20℃保存。

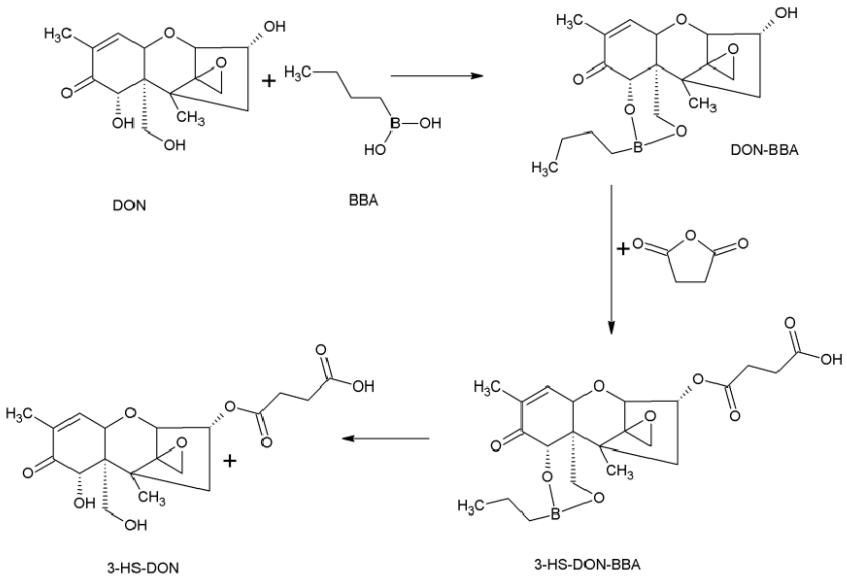

图 2.2 DON 完全抗原的合成

Fig 2.2 Synthesis of DON complete antigen

2.2.2 完全抗原的表征

对包被抗原 AFB1-CMO-BSA 和 DON-3-HS-BSA 进行紫光吸收分析、电泳分析和分子量测定，通过与 BSA 的对比分析抗原合成情况。

2.2.3 小鼠免疫

以 AFB_1-CMO-KLH 和 DON-3-HS-KLH 作为免疫原，各选取 20 只 8-10 周

龄的 BALB/c 小鼠进行免疫。首先将免疫原用生理盐水稀释到合适的浓度，然后与佐剂按照 1: 1.2 的比例进行乳化，直至达到入水不散的状态。将乳化好的免疫原按照每只小鼠 100 μL 的量进行背部多点注射，一个月后按照同样步骤进行加强免疫。多次加强免疫后选择免疫效果最好的小鼠进行冲刺免疫，将免疫原通过生理盐水稀释到 300 μL 体积，注射到小鼠腹部。

表 2.1 免疫计划表

Table 2.1 Immunization schedule

免疫计划	AFB_1 免疫原剂量（μg）	DON 免疫原剂量（μg）	佐剂种类	注射部位	免疫周期
首免	15	70	完全佐剂	背部	2020.06.18
加强免	10	50	不完全佐剂	背部	2020.07.18
加强免	10	50	不完全佐剂	背部	2020.08.16
加强免	8	35	不完全佐剂	背部	2020.09.15
加强免	5	25	不完全佐剂	背部	2020.10.15
冲刺免疫	5	15	无	腹部	2020.11.18

2.2.4 血清检测

小鼠免疫四次左右后一周进行血清检测。将小鼠断尾进行取血，约 100 μL 左右，将尾血在冷冻离心机中以 5000 rpm 离心 10 min，收集上层血清检测。

由于每种真菌毒素各采用 20 只小鼠进行免疫，所以血清检测不采用传统的棋盘法布局，而是将 20 只小鼠的血清在同等稀释倍数与标品浓度下进行 ic-ELISA 检测，找出其中效价高并且抑制好的小鼠血清，从而为接下来冲刺免疫和细胞融合做准备。血清检测 ic-ELISA 过程如下：

（1）包板：将两种真菌毒素包被原通过 0.01 M 的 CBS 缓冲液稀释到合适的浓度。通过排枪在 96 孔板的每个微孔中加入 100 μL，在 37℃下孵育 2h 或者在 4℃下孵育过夜。孵育结束后将孔板中的包被原拍掉，然后用 PBST 冲洗 2 次并拍干。

（2）封闭：在包板后的 96 孔板中加入 200 μL 封闭液，在 37℃下孵育 2 h 或者在 4℃下孵育过夜，然后用 PBST 冲洗 2 次并拍干。

（3）一抗：在孔板同一列中加入同一浓度的真菌毒素标品（用 0.01 M PBS 稀释），浓度梯度为 0、1、5、10、50 ng/mL。在同一行中加入同一只小鼠经过适度稀释的血清，然后在 37℃下孵育 30 min。孵育完成后拍掉板中溶液，然后用 PBST 冲洗 3 次并拍干。

（4）二抗：将经过 HRP 酶标记的羊抗鼠 IgG 用抗体稀释液稀释 3000 倍，然后在每孔中加入 100 μL，然后在 37℃下孵育 30 min。孵育完成后拍掉板中溶液，然后用 PBST 冲洗 4 次并拍干。

（5）显色：将显色液 A 与显色液 B 按照 5：1 的比例涡旋混匀后，在每个微孔中加入 100 μL，然后在 37℃下孵育 15 min，显色完成后每孔加入 50 μL 终止液。

（6）终止：将 50 μL 终止液加入孔板中，然后在酶标仪中检测 450 nm 下每孔的吸光值。

2.2.5 单克隆抗体的制备

2.2.5.1 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 的培养

冲刺免疫前两天进行 SP2/0 细胞的复苏。将储存在液氮中的 SP2/0 取出，迅速在 37℃水浴锅中搅拌解冻，解冻过程要在 2 min 内完成。解冻后的细胞在超净台内按照 1:10 的体积与加入 10 % 1640 培养基混匀，在离心机中 1000 rpm 离心 5 min。离心后弃去上清液，然后加入 5 mL 培养基，用移液枪吸打均匀。在 T75 培养瓶中加入 20 mL 培养基，然后将细心管中的细胞加入到培养瓶中并混合均匀。将细胞在培养箱中培养，条件为温度 37℃和 5% CO_2，第二天更换培养基。当培养瓶中细胞体积占瓶底一半时进行扩培至两瓶，扩培时先将培养基倒掉，然后加入 40 mL 10 % 1640 培养基，通过 5 mL 移液枪以适当的力度将贴在培养瓶底的 SP2/0 吹下来，然后用细胞刷继续轻轻将剩余的细胞刮下来，用 5mL 移液枪吸打均匀，最后吸取 20mL 加入到新的培养瓶中。SP2/0 细胞每天扩培一次，三天后可获得 8 瓶 SP2/0 细胞。

2.2.5.2 细胞融合

本实验采用聚乙二醇（PEG）融合技术制备单克隆抗体。SP2/0 细胞第一次扩培后立即对小鼠进行冲刺免疫，三天后即可进行细胞融合。细胞融合前先将小鼠脱颈致死，然后浸泡在 75%酒精中 10 min 用于消毒灭菌。将小鼠尸体用镊子夹进超净台中的无菌培养皿，左侧朝上，用镊子夹起左腹部皮肤，然后剪开并撕扯。用新的镊子夹起腹腔膜，然后剪开，用镊子夹起褐色长条状的脾脏，将镊子把粘连的内脏剪去，接着拿起 1ml 移液枪用 1640 不完全培养基冲洗 10 次。将脾脏放在 200 目的研磨器上，滴上少许 1640 不完全培养基润湿脾脏，使用 5 mL 注射器内芯充分研磨至研磨筛网上方的脾脏只剩少许白色组织，用 1640 不完全培养基将筛网上的脾脏细胞充分冲刷到下方培养皿中。将培养皿中的脾脏细胞吸到 10 mL 离心管中，体积补充到 10 mL。在脾脏细胞在 1000 rpm 离心 8 min 后弃去

上清液，用 1640 不完全培养基重悬细胞，弃去原来离心管中结块的细胞组织，将混合均匀的细胞吸入另一个离心管中，重复离心去除杂质两次，最后垂悬到 20 mL1640 不完全培养基中后在离心管架放置。

在脾脏细胞离心的间隙，将八瓶 SP2/0 细胞培养基倒去，加入 5 mL TrypLE™ Express 将细胞消化下来，三分钟后摇晃培养瓶，将细胞倒进 50 mL 离心管中，然后在 1000 rpm 离心 8 min，去除上清液后用 1640 不完全培养基重悬，加入 20 mL1640 不完全培养基重复离心两次，最后一次重悬后与脾脏细胞混合。混合后继续离心一次，倒去培养基，用手指轻轻的将管底的两种细胞弹均匀后开始细胞融合。细胞融合步骤如下：

（1）0-1 min：将 1 mL 聚乙二醇（PEG）沿着离心管壁缓缓加入，同时用手轻轻摇晃离心管。

（2）1-2 min：手心握住离心管底部温育细胞。

（3）2-4 min：沿着离心管壁缓缓加入 2 mL 1640 不完全培养基，同时用手轻轻摇晃离心管，将细胞均匀分散。

（4）4-6 min：沿着离心管壁缓缓加入 4 mL 1640 不完全培养基，同时用手轻轻摇晃离心管，将细胞均匀分散.

（5）6-7 min：沿着离心管壁缓缓加入 5 mL 1640 不完全培养基，同时用手轻轻摇晃离心管，将细胞均匀分散.

（6）7-8 min：将离心管中的培养基定容到 20 mL,，然后将细胞轻轻摇晃均匀。

将离心管盖上并用封口膜封好，在 37℃水浴锅中静置温育 5 min。将细胞在 800 rpm 离心 8 min，然后弃去上清液，接着轻轻将细胞团用手指拨弹松散。缓缓加入 20 mL 含有 20% HAT 培养基，并轻轻摇晃均匀。将细胞均匀的加入 10-15 块 96 孔板中（每孔 200 μL），然后放在 CO_2 培养箱中培养。在第二天观察细胞是否染菌，如有个别孔染菌，需要扔掉整块板。

2.2.5.3 杂交瘤细胞筛选

细胞融合后的第三天进行半换液：将 96 孔板从培养箱取出，用排枪从每孔的中上部吸出 100 μL，注意不要吸出贴壁的活细胞，然后每孔加入 100 μL 预热的 20% HAT 培养基，最后放入培养箱培养。

细胞融合后的第六天进行全换液： 将 96 孔板从培养箱取出，用排枪将每孔培养基全部吸出，注意不要吸出贴壁的活细胞，然后每孔加入 200 μL 预热的 20% HT 培养基，最后放入培养箱培养。

细胞融合后的第七天进行阳性与抑制检测筛选：细胞阳性通过非竞争 ELISA

来测定，过程与血清检测类似，但不添加真菌毒素标品。从 96 孔板的每孔细胞培养基中取出 50 μL 加入到经过包被的 ELISA 板中，为了避免污染，每一个孔用一个新的枪头，然后将细胞放入培养箱中继续培养。ELISA 板在 37℃温育 30 min，后续过程与 2.2.4 相同。将 OD 值在 0.5 以上的孔挑出（0.5 以下为阴性和假阳性）， 然后将细胞培养板中对应孔中的培养基取出 100 μL 到 PCR 板中，接着在细胞孔中补充 150 μL 20% HT 培养基。将 PCR 板中的培养基用 0.01M PBS 缓冲液稀释到合适的倍数，然后进行 ic-ELISA 检测。选出阳性与抑制较好的孔，进行亚克隆培养。亚克隆需要将孔中的细胞反复吸打后取出到新的 96 孔板中，然后进行五倍稀释，共稀释五次，然后再显微镜下计数，接着将细胞通过 20% HT 培养基稀释后在新的 96 孔板中铺板培养。首次亚克隆（一克）需要控制每孔中细胞数量在 3~4 左右，这样是为了防止阳性细胞的丢失。五天后可以根据细胞的生长速度进行一克检测。二克是根据一克检测后所挑的孔进行亚克隆，过程与一克类似，但是二克需要控制铺板后孔中细胞数量在 1~2 之间，这样有利于筛选效果更好的细胞。三克时，可以用 10 %1640 培养基培养细胞，同时需要控制孔中细胞数量在 0~1 之间，三克检测后需要挑选孔中细胞团数量为 1 并且抱团生长、状态好的细胞转移到六孔板中进行扩培。当六孔板中细胞达到一定密度时转移到培养瓶中培养。培养瓶中密度达到一半即可扩培或冻存，前一天需要进行换液，保证细胞处于对数生长期。冻存时需要将细胞用 TrypLE^{TM} Express 消化三分钟，然后 1000 rpm 离心 5 min，接着弃去上清，并重复离心一次。在离心管中加入 1 mL 冻存液，缓慢吸打均匀，然后转移到细胞冻存管中封口，最后放入冻存盒中，在-80℃存放过夜后转移到液氮中长期保存。

2.2.5.4 杂交瘤细胞小鼠腹水制备

采取体内诱生腹水瘤法制备杂交瘤细胞腹水。选择 10 只 10 周龄的 BALB/c 小鼠，每只腹部注射 0.5 mL 不完全佐剂或者 1 mL 液体石蜡，10 天后注射杂交瘤细胞。

杂交瘤细胞经过扩培后数量达到 5 瓶，同时密度达到一半时可以进行腹水制备。首先，在前一晚进行换液，保证细胞活力。第二天将细胞用胰酶消化 3 min，然后在 1000 rpm 离心 5 min，弃去上清液，用 40 mL 1640 不完全培养基将细胞垂悬。重复离心三次，最后一次用 2 mL 1640 不完全培养基垂悬细胞。5 瓶细胞共获得 10 mL 细胞液，每只小鼠腹部注射 1 mL。一周后每天观察小鼠腹部鼓起情况，当腹部显著鼓起时可通过无菌的 2 mL 注射器抽取腹水，抽完腹水的小鼠可继续饲养产生腹水。采集到的腹水需要通过 10000 rpm 4℃离心 10 min 去除沉淀的血细胞，上清液去除漂浮的脂质后在-20℃保存。

2.2.5.5 单克隆抗体的纯化

单克隆抗体通过辛酸-硫酸铵沉淀法结合蛋白 G 交联琼脂糖凝胶亲和层析法进行纯化：

（1）取 5 mL 腹水 到 50 mL 离心管中，边震荡边缓慢加入 5 mL 的 0.06 M 的乙酸钠缓冲液（pH 4.4），此时 pH 值约为 4.4（刑常瑞，2016）。

（2）边震荡边逐滴缓慢加入 167 μL 辛酸，然后置于水平摇床上，室温慢速振荡 30 min。

（3）8000 rpm 4℃ 离心 10 min，弃去沉淀，除去上清表面的少量乳状脂肪。如上清液有少量絮状物，过 0.45 μm 微孔滤膜。

（4）上清液 4 ℃预冷 15 min，测量上清的体积，然后转移到 20 mL 玻璃样品瓶中，边搅拌边缓慢滴加等体积的饱和硫酸铵溶液，使硫酸铵浓度为 50%。

（5）4 ℃静置 30 min，使其充分沉淀。10000 rpm 离心 20 min，弃上清液，收集沉淀。

（6）用原腹水体积的 0.01 M PBS（pH 7.4）溶解沉淀,放置于 4℃冰箱

（7）将 1 mL 重组蛋白 G 琼脂糖凝胶柱中的保护液排干，用 5 mL 超纯水将柱子中残留的保存液冲洗净

（8）加入 5 mL 0.02 M PBS（pH 7.4）平衡柱体

（9）将第 6 步中经过粗提纯的抗体用 0.02 M PBS（pH 7.4）稀释 10 倍上样

（10）用 5 mL 0.02M PBS（pH 7.4）平衡至柱体基线

（11）用 0.1 M 甘氨酸-盐酸缓冲液（pH 2.7）洗脱抗体，收集洗脱峰，并且用 1 M Tris-HCl（pH9.0）调节 pH 至中性。

（12）将抗体用 0.01 M PBS 稀释到 1 mg/mL，然后在-20℃保存。

2.2.6 单克隆抗体性质测定

2.2.6.1 抗体亚型测定

通过小鼠单抗 Ig 类亚型鉴定用 ELISA 试剂盒对 AFB_1 和 DON 单克隆抗体的亚型进行鉴定。Ig 类亚型鉴定用 ELISA 是一种非竞争 ELISA，过程与细胞融合阳性筛查类似。首先在微孔中加入 100 μL 包被原（1 μg/mL）并温育 2h，洗板后将纯化的抗体稀释 1000 倍后加入 100 μL 到微孔中，37℃温育 30 min，洗板后分别加入 100 μL 针对 IgG1，IgG2a，IgG2b，IgG3，IgM，IgA 亚型的酶标二抗，温育 30 min 后洗板。最后加入显色液进行显色与终止。阳性孔中所加入的酶标二抗亚型即为该抗体的 Ig 亚型。

2.2.6.2 抗体亲和力测定

按照 Beatty 提出的方法，采用非竞争 ELISA 来测定单克隆抗体亲合常数（Beatty，1987）。将包被原从 1μg/mL 开始倍比稀释多个不同的浓度进行包被，每个包被浓度做 4 个平行，单克隆抗体从 1μg/mL 开始倍比稀释。以 OD_{450nm} 为纵坐标，以抗体浓度的对数值为横坐标绘制出多条 S 型曲线，计算每条曲线上最大吸光值和 50%吸光值时所对应的抗体摩尔浓度。根据公式 Ka＝（n-1）/2（n[Ab']t－[Ab]t）计算出抗体的亲和常数（n：两条曲线对应包被原浓度的倍数之比；[Ab']t 和[Ab]t ：分别为两条曲线最大吸光值的 50%时所对应的抗体摩尔浓度。）。

2.2.6.3 抗体交叉反应测定

采用 ic-ELISA 测定 AFB_1 单克隆抗体对不同的亚类（如 AFB_2、AFG_1、AFG_2 等）的 IC_{50} 并计算交叉反应率。交叉反应率计算公式如下：交叉反应率（Cross-Reactivity %）=（AFB_1 IC_{50} 值/其它黄曲霉毒素亚类 IC_{50} 值）×100%。DON 单克隆抗体交叉反应率计算过程与 AFB_1 类似。

2.2.7 数据分析

使用 Fireworks 与 Origin 2018 进行图像与数据分析。

2.3 结果与分析

2.3.1 完全抗原的表征

由于 KLH 的分子量巨大并且分子量不统一，所以本实验采用通过 BSA 合成的包被抗原进行表征分析。

2.3.1.1 紫外吸收分析

将 BSA、AFB_1-BSA 与 DON-BSA 浓度稀释到 0.5 mg/mL，加入 200 μL 96 孔板中，在多功能酶标测试仪中测定，结果如图 2.3 所示。BSA、AFB_1-BSA 与 DON-BSA 在 300 nm 以下的紫外吸收波形基本一致，可以看到 AFB_1-BSA 在 360 nm 出有显著的吸收峰，这是 AFB_1 的特征吸收峰，可以确定 BSA 表面成功偶联 AFB_1，并且从峰型分析 AFB_1 的量较多。DON-BSA 与 BSA 在紫外可见光波段的峰型是基本一致的，这是由于 DON 在在紫外可见光波段没有特征吸收所导致。

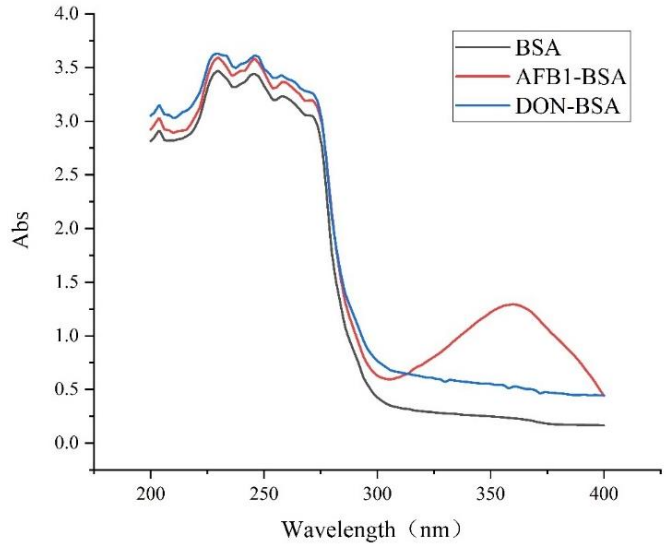

图 2.3 包被抗原紫外表征图谱

Fig 2.3 UV spectrum of coating antigen

2.3.1.2 电泳分析

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）是测定蛋白分子量的一种十分成熟的技术，其原理是通过 SDS 与蛋白的结合使其表面携带大量的负电荷，从而使蛋白在电泳中运动方向一致，并且运动速度只取决于蛋白分子大小。蛋白分子越大，受到阻力越大，从而运动越慢，这样就达到了区分蛋白分子量的目的。如图 2.4 所示，DON-BSA 的条带在 BSA 偏左上的位置，由于其表面偶联的 DON 增加了蛋白分子量，导致其运动速度略慢于 BSA。AFB_1-BSA 的条带不清晰，蛋白分子大小不一，这可能是合成过程中使蛋白受到剪切力而破裂导致的。但是仍然可以发现其最深的条带依然在 BSA 的右上方，即分子量略大于 BSA，这说明 AFB_1-BSA 的合成是成功的。

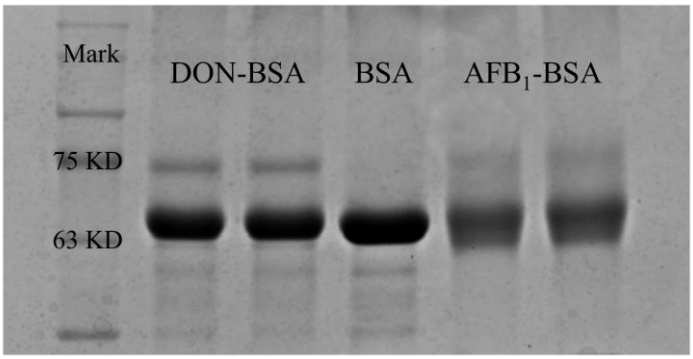

图 2.4 完全抗原的电泳鉴定图

Fig 2.4 Electrophoretic identification of complete antigen

2.3.1.3 分子量测定

在对抗原进行电泳测定后，通过 AB SCIEX Triple TOF® 5600 对其分子量进

行了精确测定。如图 2.5 所示，AFB_1-BSA 的分子量与电泳结果一致，蛋白在抗原合成过程中破裂形成一些小分子蛋白，但是最大的分子量超过 BSA 的分子量（66.43 KDa），说明未裂解的 BSA 偶联了大量的 AFB_1。如图 2.6 所示，DON-BSA 的主要分子量在 67.1 KDa 左右，并且峰型较好，说明 DON 与 BSA 的偶联是成功且稳定的。

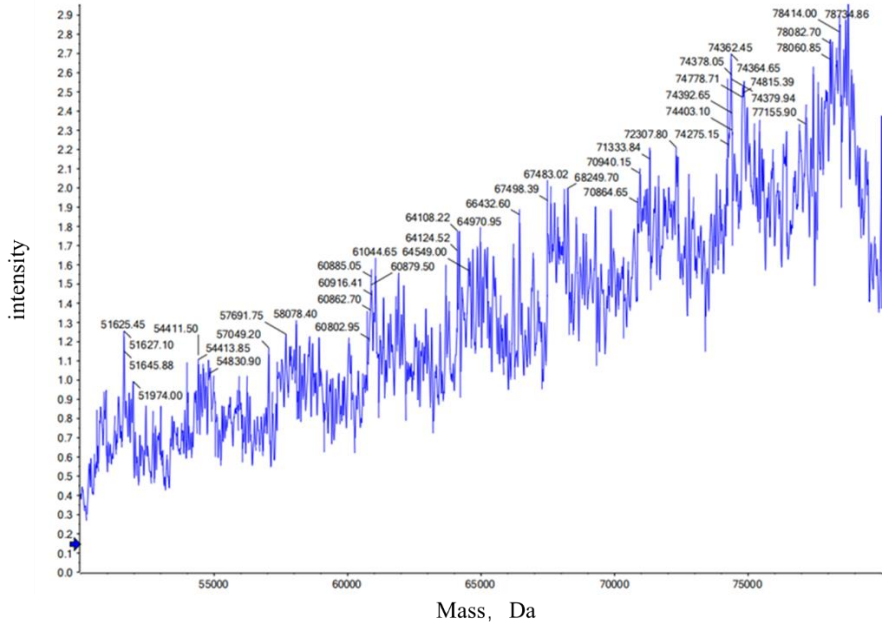

图 2.5 AFB_1-BSA 分子量质谱图

Fig 2.5 AFB_1-BSA molecular weight mass spectrometry

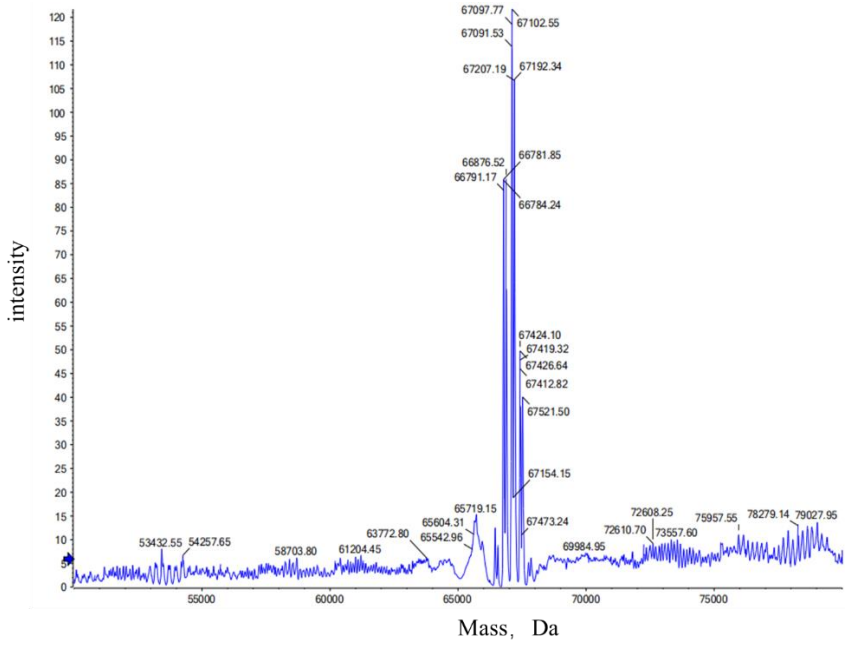

图 2.6 DON-BSA 分子量质谱图

Fig 2.6 DON-BSA molecular weight mass spectrometry

2.3.2 小鼠血清检测

在小鼠加强免疫 4 次左右时，取小鼠血清进行检测。通常免疫小鼠是选择 5 只左右 BALB/c 小鼠，每只小鼠通过 ELISA 棋盘法对抗原的效价和抑制进行详细的测定，这种方法较为耗时耗力，一般不同时免疫多只小鼠。本实验选择每种毒素选用 20 只小鼠进行免疫，在血清检测时将所有小鼠的血清在同等稀释倍数与毒素标品浓度下进行 ELISA 检测，这样可以高效的筛选出多只小鼠中效价和抑制综合效果最好的小鼠，为下一步的细胞融合与筛选打好基础。

2.3.2.1 AFB_1 小鼠血清检测

在第三次冲刺免疫和第四次冲刺免疫后一周进行血清检测，此时有一只小鼠已经死亡。三免时，根据前人 AFB_1 抗体制备实验进行优化后，选择包被原浓度为 1 μg/mL，血清稀释 30000 倍。如表 2.2 所示，小鼠血清普遍具有强阳性，说明包被原浓度过高或血清稀释倍数不够，从而显示不出最佳抑制效果。

在四免后，采取降低包被原浓度与提高血清稀释倍数的方法进行 ic-ELISA 筛选（包被浓度 0.15 μg/mL，血清稀释 180000 倍）。如表 2.3 所示，4、10 和 18 号小鼠在具有高阳性结果的同时也具有良好的抑制效果。其他的小鼠有些阳性不够，不利于细胞融合筛选；有的虽然阳性较强，但是抑制效果不佳，获得高灵敏度抗体的几率较小。

表 2.2 AFB_1 三免小鼠血清检测

Table 2.2 Mouse serum detection of AFB_1 after three immunizations

小鼠编号	AFB_1 标品（ng/mL）					
	0	0	1	5	10	50
1	2.657	2.763	2.729	2.303	2.007	1.299
2	2.261	2.464	2.176	1.760	1.582	1.233
3	2.108	1.801	1.226	0.953	0.878	0.703
4	2.494	2.753	1.317	0.930	0.765	0.436
5	2.811	2.570	2.027	1.854	1.543	1.009
6	2.635	2.712	2.237	1.970	1.932	1.563
7	2.999	2.983	2.747	2.572	2.369	2.120
8	2.071	2.909	2.959	2.550	2.498	2.312
9	2.776	2.889	2.814	2.601	2.675	2.444
10	2.611	2.605	1.819	1.482	1.317	0.877
11	2.790	2.852	2.229	2.141	1.919	1.906
12	2.827	2.782	2.136	1.212	1.843	1.492
13	2.308	2.531	1.641	1.531	1.394	1.020
14	2.734	2.728	2.598	2.370	2.223	1.635
15	2.934	2.896	2.822	2.711	2.487	2.098
16	2.586	2.898	2.282	1.864	1.556	1.210

17	2.982	3.062	3.135	3.122	3.086	2.847
18	2.991	3.032	2.227	1.682	1.554	1.139
19	2.838	2.827	2.730	2.730	2.633	2.252

表 2.3 AFB_1 四免小鼠血清检测

Table 2.3 Mouse serum detection of AFB_1 after four immunizations

小鼠编号	AFB_1 标品（ng/mL）					
	0	0	1	5	10	50
1	2.170	2.422	0.992	0.544	0.403	0.161
2	1.741	1.698	0.871	0.643	0.530	0.307
3	0.909	0.872	0.437	0.343	0.288	0.182
4	1.535	1.525	0.352	0.242	0.186	0.105
5	1.834	1.731	0.861	0.607	0.390	0.218
6	2.402	2.442	1.384	1.044	0.834	0.602
7	1.796	2.242	1.838	1.682	1.442	1.051
8	1.801	2.437	2.317	2.082	1.602	0.766
9	2.383	2.415	2.018	1.643	1.641	1.311
10	1.877	1.918	0.670	0.401	0.350	0.185
11	1.770	1.857	0.854	0.685	0.693	0.429
12	1.840	1.863	0.928	0.680	0.640	0.356
13	0.831	0.859	0.341	0.221	0.197	0.133
14	1.786	1.855	1.148	0.742	0.677	0.377
15	1.851	2.624	1.697	1.247	0.980	0.555
16	1.950	1.915	0.831	0.514	0.444	0.304
17	2.805	1.903	2.419	2.536	2.296	1.373
18	1.769	1.922	0.575	0.398	0.347	0.264
19	2.163	2.115	1.723	1.339	1.102	0.619

2.3.2.2 DON 小鼠血清检测

DON 三免和四免时与 AFB_1 一样，存在一只小鼠死亡的情况。对剩余 19 只小鼠进行 ic-ELISA 检测。三免时，包被浓度 0.3 μg/mL，血清稀释 30000 倍。如表 2.4 所示，在这样的包被浓度与血清稀释倍数下，抗 DON 血清对 DON 的抑制效果不如抗 AFB_1 血清对 AFB_1 的抑制效果好。这主要是因为不同的真菌毒素的结构不一样，因此刺激机体产生的抗体对其的亲和力不同；另一方面也可能是包被原浓度过高或血清稀释倍数不够而产生的强阳性效果所致。

DON 四免后，选择降低包被原浓度至 0.1 μg/mL 进行检测。如表 2.5 所示，19 只小鼠的效价相差较大。1 号小鼠的阳性最强，但是抑制效果不佳，2 号和 16 号的抑制效果相对较好，但是效价不如 1 号。在这种情况下，对 1、2 和 16 号小鼠又进行一次 ELISA 检测，通过不同的稀释倍数使得三种血清的阳性相当，在此情况下比较抑制效果。如表 2.6 所示，在阳性强度相当情况下，16 号小鼠血清

对 DON 的抑制效果最佳。

表 2.4 DON 三免小鼠血清检测

Table 2.4 Mouse serum detection of DON after three immunizations

小鼠编号	DON 标品（ng/mL）					
	0	0	1	5	10	50
1	2.977	3.146	2.856	3.063	2.993	3.123
2	2.755	2.379	2.5	2.293	2.393	1.806
3	0.735	0.764	0.697	0.743	0.771	0.807
4	1.412	1.306	1.269	1.267	1.232	1.223
5	1.669	1.662	1.763	1.694	1.723	1.727
6	0.566	0.604	0.618	0.592	0.578	0.448
7	3.031	2.966	3.048	2.981	3.106	2.966
8	3.019	2.966	3.102	3.039	3.102	3.039
9	1.197	1.122	1.086	1.05	0.958	1.019
10	1.902	1.651	1.515	1.751	1.961	1.431
11	2.89	2.932	2.903	2.932	3.033	3.191
12	1.408	1.33	1.209	1.151	1.208	0.844
13	2.109	2.133	2.056	2.079	2.232	2.361
14	3.544	3.787	3.787	3.31	3.787	3.348
15	2.665	2.872	2.86	2.747	2.816	2.729
16	2.649	2.691	2.457	2.156	1.898	1.045
17	1.221	1.179	1.117	1.095	0.841	0.784
18	0.728	0.634	0.423	0.374	0.333	0.335
19	0.254	0.212	0.218	0.231	0.224	0.204

表 2.5 DON 四免小鼠血清检测

Table 2.5 Mouse serum detection of DON after four immunizations

小鼠编号	DON 标品（ng/mL）					
	0	0	1	5	10	50
1	2.95	2.778	3.021	2.912	2.9	2.845
2	1.774	1.617	1.537	1.361	1.252	0.673
3	0.084	0.081	0.076	0.084	0.084	0.073
4	0.338	0.345	0.314	0.333	0.318	0.302
5	0.22	0.228	0.242	0.236	0.225	0.205
6	0.151	0.157	0.153	0.15	0.159	0.118
7	2.669	2.829	2.819	2.891	2.774	2.88
8	1.806	1.935	1.919	1.92	1.893	1.818
9	0.701	0.718	0.663	0.791	0.692	0.689
10	0.294	0.289	0.309	0.299	0.259	0.227
11	2.279	2.231	2.241	2.223	2.205	2.288
12	0.474	0.456	0.431	0.371	0.308	0.2
13	0.795	0.756	0.716	0.767	0.737	0.707

14	1.829	1.816	1.82	1.576	1.64	1.234
15	1.174	1.085	1.064	1.082	0.949	0.756
16	0.613	0.621	0.495	0.393	0.268	0.132
17	0.108	0.086	0.081	0.081	0.072	0.074
18	0.268	0.27	0.239	0.235	0.209	0.183
19	0.085	0.08	0.065	0.067	0.071	0.07

表 2.6 DON 小鼠选优检测

Table 2.6 Mouse selection test of DON

小鼠编号	DON 标品（ng/mL）						血清稀释倍数
	0	0	1	5	10	50	
1	1.527	1.573	1.475	1.437	1.416	1.095	180000
2	1.752	1.666	1.625	1.49	1.297	0.916	30000
16	1.562	1.582	1.597	1.256	0.966	0.477	10000

2.3.3 细胞融合与筛选

2.3.3.1 AFB_1 杂交瘤细胞制备

通过血清检测可以发现，4 号小鼠的抑制效果最佳，同时小鼠健康状况良好，所以最终选择 4 号小鼠进行细胞融合筛选。冲刺免疫 3 天后进行细胞融合，细胞融合后第 7 天进行阳性筛查，共发现 32 个阳性孔。将 32 个阳性孔的培养基取出稀释进行 AFB_1 抑制测定，选取其中效果较好的孔进行亚克隆。经过三次亚克隆后，筛选出一株效果最好的杂交瘤细胞 F1，如表 2.7 所示。

表 2.7 AFB_1 细胞筛选结果

Table 2.7 Cell screening results of AFB_1

标准品	筛选过程	细胞株编号	OD（空白对照）	OD（标准品 0.1ng/ml）	抑制率
AFB_1	融合	4F11	1.72	0.85	49.42%
	一克	3F10	2.05	1.29	62.93%
	二克	E7	1.73	0.64	37%
	三克	F1	2.41	1.17	48.55%

2.3.3.2 DON 杂交瘤细胞制备

在 DON 血清检测中，可以发现 16 号小鼠的 DON 抑制率最低，效果最好。尽管该小鼠血清效价不是很高，但为了获得高灵敏度的抗体还是选择融合 16 号小鼠。如果因为效价低而无法融合成功将考虑继续融合 1 号或 2 号小鼠。在经过细胞融合与三次亚克隆后筛选出一株效果最好的杂交瘤细胞 1E3，如表 2.8 所示。

表 2.8 DON 细胞筛选结果

Table 2.8 Cell screening results of DON

标准品	筛选过程	细胞株编号	OD（空白对照）	OD（标准品）	标准品浓度	抑制率
DON	融合	8B6	2.94	1.28	25 ng/mL	43.54%
	一克	6E9	2.28	0.48	25 ng/mL	21.05%
	二克	2A4	2.42	0.52	20 ng/mL	21.49%
	三克	1E3	0.95	0.26	10 ng/mL	27.39%

2.3.4 纯化抗体电泳分析

传统的抗体纯化方法主要有辛酸-硫酸铵沉淀法和蛋白 G 交联琼脂糖凝胶亲和层析法。辛酸-硫酸铵沉淀法原理是通过辛酸在酸性条件下沉淀腹水中的白蛋白或其他非 Ig 蛋白质，此法简单且成本低，但是抗体纯度不高。蛋白 G 交联琼脂糖凝胶亲和层析法是利用蛋白 G 可以特异性吸附 IgG 的特性进行抗体纯化，成本较高但是纯化出的抗体纯度高，适用于对抗体纯度要求较高的实验。本实验将两种抗体纯化方法相结合，目的是获得纯度更高的抗体。经过纯化后的 AFB1 抗体用电泳测定其纯度，如图 2.7 所示，AFB_1 的抗体有两个蛋白条带，分别为抗体的重链和轻链，从电泳图像可以看到抗体的纯度在 95%以上。

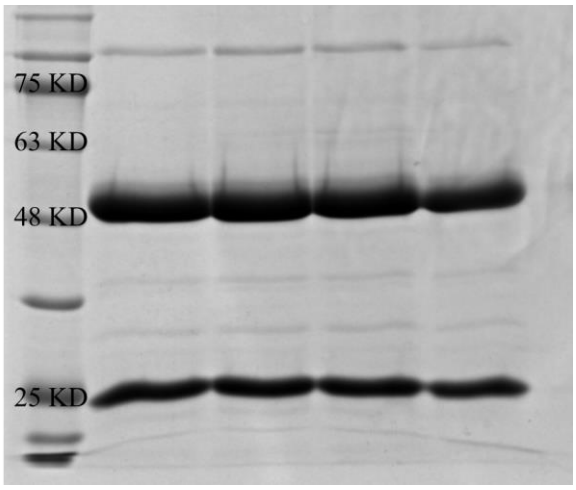

图 2.7 AFB_1 抗体纯化后电泳图

Fig 2.7 Electrophoretic diagram of AFB_1 antibody after purification

2.3.5 单克隆抗体性质测定

2.3.5.1 抗体亚型测定

将纯化后的抗体用抗体亚型检测试剂盒进行测定，结果如表 2.9 所示。AFB1 和 DON 单克隆抗体的亚型都是 IgG1。

表 2.9 抗体亚型鉴定结果表

Table 2.9 Results of antibody subtype identification

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA

AFB_1	1.95	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
DON	1.80	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

2.3.5.2 抗体亲和力测定

抗体与抗原结合能力的强弱是抗体的重要性质，一般通过亲和力常数 Ka 来表示。高亲和力的抗体在免疫学检测中可以提高检测的灵敏度，降低反应的时间，也减少了抗体的用量。特别是在免疫层析试纸条法的建立中，高亲和力的抗体才能确保层析反应的顺利进行。在小鼠加强免疫的过程中，小鼠分泌的抗体会趋于变成高亲和力抗体，一般将亲和力常数（Ka）范围在 10^7~10^{12} L/mol 的抗体称为高亲和力抗体。通过棋盘法建立的亲和力标准曲线如图 2.8 所示，通过亲和力常数计算公式求得 AFB_1 抗体的亲和力常数为 6.22×10^9 L/mol，DON 抗体亲和力常数为 7.69×10^8 L/mol，都属于高亲和力抗体。

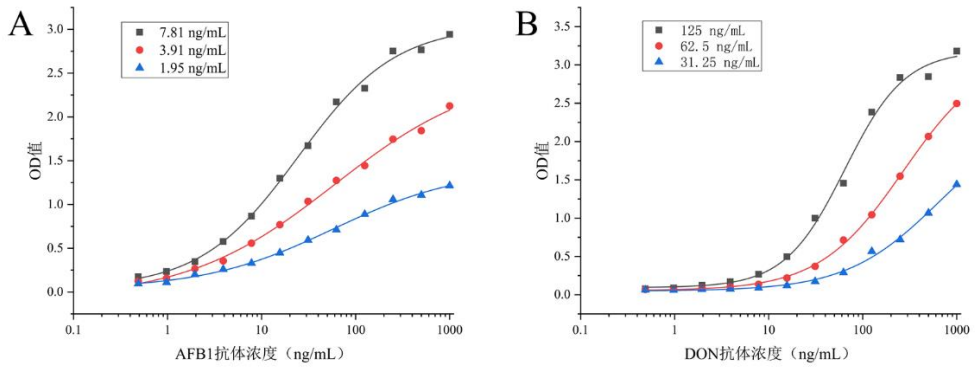

图 2.8 AFB_1 和 DON 抗体亲和力曲线

Fig 2.8 AFB_1 and DON antibody affinity curves

2.3.5.2 抗体交叉反应测定

首先，通过棋盘法优化包被浓度，然后通过 ic-ELISA 测定 AFB_1 和 DON 单克隆抗体的半数抑制率（IC_{50}）及交叉反应率（CR%）。对同一包被浓度采用三种抗体浓度进行测定，抑制曲线见图 2.9。将三条曲线的 IC50 取平均值后，AFB_1 单抗的 IC_{50} 为 0.058 ng/mL，DON 单抗的 IC_{50} 为 7.88 ng/mL，两种单克隆抗体都具有很强的灵敏度。按照同样的方法将其他真菌毒素亚型的 IC_{50} 测出，然后计算 AFB_1 和 DON 单抗的交叉反应率。AFB_1 单抗对 AFB_2、AFG_1、AFG_2 和 AFM_1 交叉反应率分别为 12.5%、50%、0%和 3%，交叉反应率较低。DON 单抗对 3-AcDON 和 15-AcDON 的交叉反应率为 376.1%和 3.43%，说明 DON 抗体对 3-AcDON 更具亲和力。

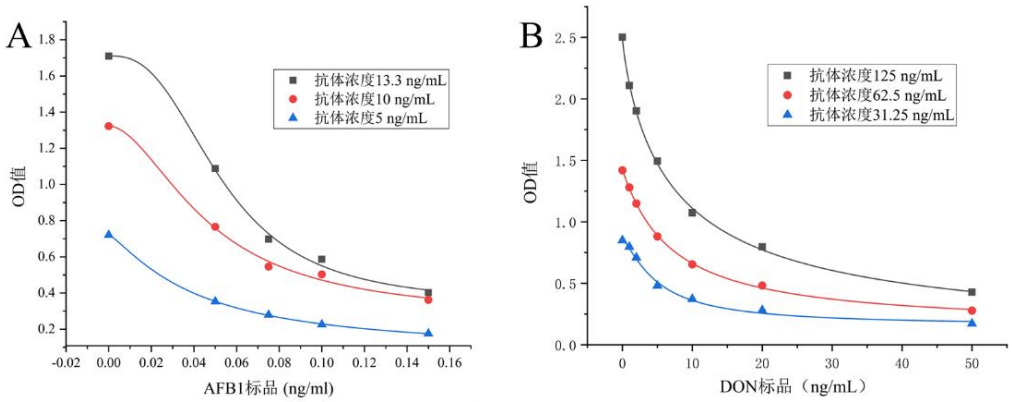

图 2.9 AFB_1 和 DON 抗体的 ic-ELISA 曲线

Fig 2.9 ic-ELISA curve of AFB_1 and DON antibodies

2.4 本章小结

1、AFB_1 和 DON 是不具有免疫原性的小分子，本实验将 AFB1 和 DON 经过衍生并通过碳亚二胺法与载体蛋白（KLH、BSA）偶联后合成了免疫抗原与包被抗原。对两种包被抗原进行了紫外分光光度法、SDS-PAGE 电泳以及分子量质谱检测进行表征，结果表明 AFB_1 和 DON 成功与 BSA 偶联。

2、将两种免疫原按照免疫计划通过多只 BALB/c 小鼠进行免疫，三免和四免后采用高效的 ic-ELISA 方法，在同等血清稀释倍数与毒素标品浓度下挑选出了免疫效果最好的小鼠，分别为 AFB_1 的 4 号和 DON 的 16 号。

3、采用传统的 PEG 细胞融合方法，将小鼠脾脏细胞与 SP2/0 细胞进行融合，成功筛选出两株可以稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞，创新的将辛酸-硫酸铵沉淀法和蛋白 G 交联琼脂糖凝胶亲和层析法相结合，通过多种纯化原理与步骤制备出高纯度的抗体。实验所制备的 AFB_1 和 DON 抗体都属于 IgG1 亚型，具有高度的亲和力和灵敏度。AFB_1 和 DON 的亲和力常数分别为 6.22×10^9 L/mol 和 7.69×10^8 L/mol，IC_{50} 分别达到 0.058 ng/mL 和 7.88 ng/mL。AFB_1 单抗对 AFB_2、AFG_1、AFG_2 和 AFM_1 交叉反应率分别为 12.5%、50%、0%和 3%，DON 单抗对 3-AcDON 和 15-AcDON 的交叉反应率为 376.1%和 3.43%。

第三章 小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇肉眼半定量和仪器协助定量胶体金试纸开发

由于真菌毒素强大的毒性和对粮食经济价值的影响，粮食中真菌毒素的控制一直是人们致力于研究的方向，而粮食中真菌毒素的日常检测是控制其发展的重要方面。小麦是中国主要的谷物之一，脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）是小麦中主要的真菌毒素污染物（Morimura 等，2020）。目前，DON 的检测主要包括传统的仪器检测和免疫学快速检测方法。传统的仪器检测方法如高效液相色谱（HPLC）、液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）具有较高的灵敏度和良好的重复性，但仪器价格昂贵、需要专业操作且样品通常需要复杂的前处理，因此费时费力（Xing 等，2020；Vega 等，2009）。酶联免疫吸附法和免疫层析试纸条法等免疫学检测方法具有方便、快速、灵敏度高的优点（Foubert 等，2017；Urusov 等，2018；Suquan 等，2014；Wu 等，2021）。它们不需要昂贵、复杂的仪器设备，更适合快速现场检测（D’Agnello 等，2021；Heussner 等，2010；）。

胶体金具有其鲜艳的颜色，所以胶体金试纸条常用于肉眼定性检测。例如，Yang 等人用免疫层析条对小麦和玉米中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）进行定性，试纸条的肉眼判断结果为阳性和阴性（Yang 等，2010）。胶体金试纸条在定量检测中也发挥着重要作用，但其定量检测需要读数仪来协助检测，这提高了检测成本。考虑到胶体金具有良好的可见性，已经有许多学者根据不同的颜色长度、颜色深度对比度和视觉阈值等方向，开发了几种胶体金试纸条在无设备协助下进行肉眼半定量检测（Li 等，2011；Li 等，2021；Cate 等，2013；Zhang 等，2014；Leung 等 2008）。最近，Gasperino 等人发现可以通过对多线胶体金试纸条中每条检测线包被浓度的设定实现每条检测线不同的消线值，分别为 0.1、1 和 10 μg/mL（Gasperino 等，2018）。该方法进行检测物肉眼半定量是基于检测限消线阈值判断，由于不同人肉眼对检测线消线的判断存在差异，所以检测容易出现误差。同时，该方法中半定量值之间差距较大，达到 10 倍。

本研究在 Gasperino 等人的研究基础上，开发肉眼半定量和定量的三重检测线层析试纸条（Triple test lines strip，TTLS）用于小麦中 DON 检测。 为了可以产生更多肉眼可以判断的信息，所开发的 DON 胶体金免疫层析试纸条有三条检测线，三条检测线通过包被原浓度的差异实现了对金标抗体捕获能力的差异。在 DON 含量由低到高的过程中，三条检测线和控制线的显色差异会不断变化，以此制定了基于检测线与控制线颜色强度关系进行 DON 肉眼半定量的判定规则。除此之外， 由于设计了控制线，TTLS 同时还有结合胶体金读数仪进行定量判断的能力。将三条检测线的标准曲线信息输入读数仪中，然后进行小麦样品中 DON

的定量检测。最后，为了了解 TTLS 的检测性能，将 TTLS 的检测结果与 UPLC-MS/MS 及传统单检测线试纸条（Single test lines strip，STLS）的检测结果进行了对比。

3.1 材料与设备

3.1.1 实验试剂与材料

DON 单克隆抗体于于上一章实验制备。氯金酸、柠檬酸三钠、硝酸、盐酸、硼砂、硼酸、碳酸钾（K_2CO_3）、氯化钠（NaCl）、PVP 购于国药集团。其余试剂参见 2.1.1。

3.1.2 实验设备

聚氯乙烯薄片（PVC 板）、样品垫、吸水垫均购自上海杰一生物技术有限公司。硝化纤维素膜（NC 膜，UnisartCN140）购自德国 Sartorius 公司。试纸条斩切机（ZQ2002）购自上海 Kinbio 科技有限公司。多管涡旋器（HMG-WX）和胶体金读数仪（HM3030）购自北京美正生物技术有限公司。

3.1.3 主要溶液

氯金酸储备液（1mg/mL）：将 1 g 氯金酸（$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$）溶于 900 mL 超纯水中，涡旋溶解后定容至 1000 mL，在棕瓶中 4°C 保存。

柠檬酸三钠溶液（1%，m/v）：将 0.5g 二水合柠檬酸三钠（$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$）溶于 30 mL 超纯水后定容至 50 mL，过 0.22 μm 滤膜，现配现用。

0.1 M K_2CO_3：称取 13.82 g K_2CO_3 加入 800 mL 超纯水中，涡旋溶解后定容至 1000 mL。

10% BSA 溶液：将 1 g BSA 加入到 6 mL 超纯水中，涡旋溶解后定容至 10 mL。

硼酸盐缓冲液（BB，pH 8.0，0.002 M）：量取 3 mL 0.05 M 硼砂和 7 mL 0.2 M 硼酸，用超纯水定容至 1000 mL。

金标抗体洗涤液：含有 BSA（2%）、Tween-20（2%）和蔗糖（5%）的 BB 缓冲液。

金标抗体重悬浮液：含有蔗糖（10%）、BSA（0.5%）、Tween-20（0.1%）和 PVP（0.5%）的 PBS 缓冲溶液。

样品稀释液：即 PBST，含有 Tween-20（0.05%）的 0.01 M pH 7.4 PBS。

3.2 实验方法

3.2.1 金标抗体的制备

3.2.1.1 金纳米粒子的制备

将 500 mL 锥形瓶和转子用超纯水清洗，然后加入新配置的王水浸泡过夜，用超纯水冲洗干净后，在烘箱中烘干。金纳米粒子的制备按照文献中的方法（Kuang 等，2011；Cvak 等，2012）。加入 200 mL 超纯水到 500 mL 锥形瓶中，剧烈搅拌之后缓慢加入 20 mL 氯金酸溶液（1 mg/mL），磁力搅拌加热，沸腾 10 min 后，加入 0.7 mL 新鲜配制的 2%柠檬酸三钠溶液，当溶液颜色变成深红色后，保持沸腾加热 10 min，然后在室温下搅拌冷却，之后在 4 ℃保存备用。

3.2.1.2 金标抗体标记体系 pH 的优化

在 8 个 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 胶体金溶液，然后分别加入 2、3、4、5、6、7、8、9 μL 的 K_2CO_3 溶液（0.1 M），盖紧后摇晃均匀。将 1 mg/mL 的 DON 单克隆抗体用 0.002 M 的硼酸盐缓冲液（BB，pH 8.0）稀释到 0.2 mg/mL，分别取 100 μL 稀释的抗体溶液（20 μg 抗体）加入 8 个离心管中，将各个离心管在 25℃ 500 rpm 下恒温振荡 1h，然后分别加入 100 μL 10% NaCl 溶液，室温静置 30 min，然后观察胶体金溶液的颜色变化。选择颜色未变蓝同时添加 K_2CO_3 量最少的 pH 体系。

3.2.1.3 标记体系抗体用量的优化

准备 8 个离心管，按照上一步优化好的 pH 体系添加 K_2CO_3。然后加入 2 、4 、6 、8 、10、12 、16、20 μg 的抗体溶液，将各个离心管在 25℃ 500 rpm 下恒温振荡 1h，然后分别加入 100 μL 10% NaCl 溶液，室温静置 30 min，然后观察胶体金溶液的颜色变化。选择溶液颜色为红色时抗体用量较少的体系。

3.2.1.4 DON 金标抗体的制备及保存

在 50 mL AXYGEN 离心管中加入 10 mL 胶体金溶液，按照前面优化好的 pH 体系和抗体用量标记金纳米颗粒，之后加入 2 mL 的 10% BSA 用于封闭，在 25℃ 500 rpm 下振荡 2h。接着将溶液 10000 rpm 离心 30 min，弃去上清液，将沉淀物用 2 mL 金标悬浮液涡旋溶解。将制备好的金标抗体溶液加入到 96 孔板中（每孔 50 μL），真空冷冻干燥后密封以防受潮，在 4℃长期保存。

3.2.2 DON 三重检测线胶体金试纸条的制备

如图 3.1 所示，将样品垫、NC 膜、吸收垫逐层粘贴在 PVC 板上。以 1.0 μL/cm

的速率将 3 种不同浓度梯度的包被抗原（DON-BSA）喷于硝酸纤维素膜上形成三条检测下(T1、T2、T3)，以喷涂的 0.5 mg/mL 羊抗鼠 IgG 条带作为控制线，每条线之间的距离为 4 毫米。将组装好的卡片在 37℃下干燥 2 小时。最后，将组装好的卡片用微型自动斩切机切成 4 毫米宽的试纸条，储存在干燥柜中。

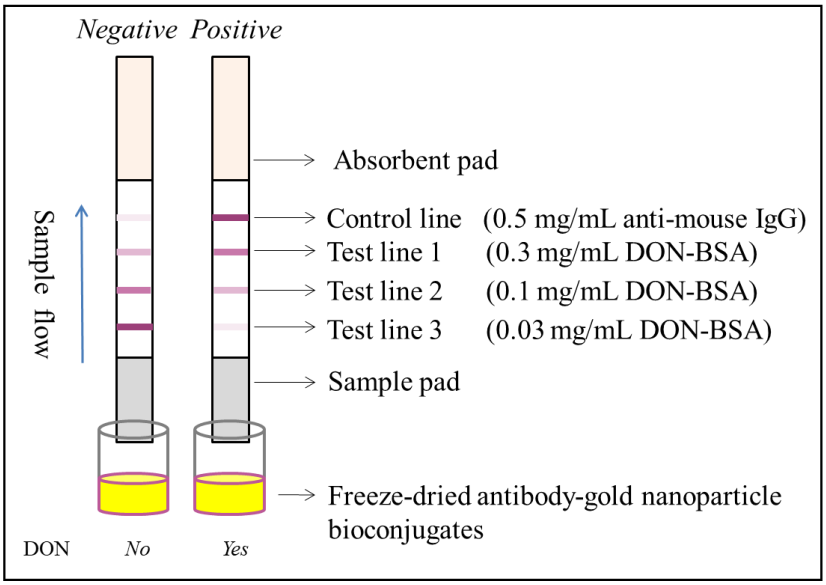

图 3.1 DON 三重检测线胶体金试纸条（TTLS）示意图

Fig 3.1 Schematic diagram of Triple test lines strip (TTLS) for detection of DON

3.2.3 试纸条的检测过程及原理

3.2.3.1 样品前处理与检测

先称取 1 g 小麦粉（过 20 目筛）于 10ml 离心管中，加入 4 mL 80%乙醇水溶液，盖上后摇晃均匀。为了保证充分的提取 DON，将离心管放置在多管涡旋仪上 2500 rpm 涡旋 5 min。然后，在离心机中 6000 rpm 离心 5 min。离心后取上清液 0.4 mL 加入到 10ml 离心管中，氮气吹干，加入 1ml PBST 并涡旋 5 min 复溶。将 100 μL 复溶的样品溶液加入含有冻干金标抗体的微孔中，并缓慢吸打 5 秒。接着，将 TTLS 立即插入微孔中，在 40 ℃下反应 5 min，最后取出试纸条停止反应。

3.2.3.2 工作原理

当样品中 DON 含量很低时，大多数金标抗体是游离形式的，在层析过程中首先与金标抗体接触的检测线 3（T3）能够捕获大部分金标抗体，少部分的金标抗体能够通过 T3，并依次被检测线 2（T2）和检测线 1（T1）捕获。当样品中 DON 含量很高时，样品中的 DON 会与游离的金标抗体结合形成复合物。大多数的 DON-金标抗体复合物沿着样品垫向上移动，并依次穿过三条检测线。由于 T1、T2 和 T3 的包被原浓度依次递减，它们对 DON-金标抗体复合物的竞争能力从 T3

到 T1 逐渐增强。检测线上包被原浓度越高，能捕捉到的金标抗体越多。在这两种极端条件下，颜色强度以相反的阶梯形式表示（图 3.1）。样品中 DON 含量由低到高的过程中，试纸条四条线的显色不断变化，通过检测线之间显色差异的变化产生肉眼半定量阈值。

3.2.3.3 试纸条检测数据采集

试纸条反应结束后，用吸水纸将样品垫上的残余溶液擦干。将试纸条显色结果拍摄下来，并通过比较四条线的颜色强度用肉眼来直观地进行判断，即进行 DON 的半定量检测。同时，可以利用胶体金读数仪得到每条检测线的 RLU 值（RLU 值与检测线的灰度值/控制线的灰度值呈正相关）。采用阴性小麦提取液制备 DON 标准溶液，将得到的 RLU 值制作标准曲线输入胶体金读数仪，用于检测真实的样本。本文对 35 个含有不同浓度 DON 的小麦实际样品通过 TTLS 进行肉眼半定量判定与仪器协助定量检测。

3.2.4 DON 三重检测线胶体金试纸条的优化

3.2.4.1 包被抗原浓度的优化

TTLS 的半定量原理是根据不同检测线显色程度的对比获得视觉阈值，而不同检测线显色差异是根据包被原浓度得到的。本文采用 3 种浓度梯度的包被原对检测线（依次为 T1、T2、T3）进行喷涂。按照以下三种方案进行对比优化：（1）0.3 0.1 0.03 mg/mL，（2） 0.03 0.015 0.007 mg/mL，（3）0.03 0.03 0.03mg/mL

3.2.4.2 样品稀释液体积优化

加入到含有冻干金标抗体微孔中的样品稀释液的体积与试纸条显色情况密切相关。样品稀释液体积过大会导致试纸条显色偏浅，体积过小会导致胶体金浓度过大而增加检测误差，本实验采用 100 和 150 μL 两种体积进行优化。

3.2.4.3 金标抗体-抗原温育时间优化

样品中 DON 与金标抗体的结合受到众多因素的影响，尤其是当抗体亲和力不够时需要增加反应时间。将冻干的金标抗体与样品的温育反应时间按照 0、5、10、15 min 进行优化。

3.2.5 传统单检测线胶体金试纸条对小麦 DON 样品预处理及检测

制备市场上广泛使用传统的单检测线胶体金试纸条（STLS），将其与 TTLS

进行比较。首先取 5 g 小麦粉，加入 20 mL 超纯水，用手摇晃均匀后固定在多管涡旋仪上，2500 rpm 涡旋提取 5 min, 提取完成后在离心机中 4000 rpm 离心 3 min，将 50 μL 上清液用样品稀释液稀释至 1000 μL。将 200 μL 稀释后的溶液加入含有冻干金标抗体的微孔中，将溶液缓慢吸打 5 秒，确保溶液充分混合。将 STLS 插入微孔中，在 40℃下反应 5 min，反应结束后立即将试纸条取出。最后，对试纸进行拍照，并立即通过胶体金读数仪进行读取。通过 STLS 以及建立的标准曲线测定 35 个小麦样品中的 DON 浓度。

3.2.6 UPLC-MS/MS 对小麦样品 DON 的检测

采用 UPLC-MS/MS 检测小麦样品中 DON 的含量。在离心管中加入 2 g 小麦粉和 8 mL 水。在多管涡旋仪上以 2500 rpm 振荡 5 min, 然后 4000 rpm 离心 5 min，取出上清液，接着以 10000 rpm 离心 5 min，取 2 mL 上清液通过免疫亲和柱纯化。免疫亲和柱最后用 1 mL 甲醇洗脱后，用 0.22 μm 滤膜过滤，然后通过 UPLC-MS/MS 进行分析。以 DON 阴性小麦样品提取液为空白基质。在空白基质中加入不同浓度的 DON 标准溶液，建立基质添加标准曲线，最后对 35 个小麦样品进行分析，重复试验 3 次。

UPLC-MS/MS 条件：色谱柱为 Waters UPLC BEH C18（2.1 mm x100 mm,1.7 μm），流速为 0.4 mL/min，柱温为 40 ℃，进样量为 2 μL，采用电喷雾离子源，电离方式为 ESI，检测模式为多响应检测模式 （MRM），工作电压为 3.0 KV，脱溶剂气温度为 500 ℃，脱溶剂气流量为 1000 L/Hr，锥孔反吹气流量为 150 L/h。

表 3.1 UPLC-MS/MS 梯度洗脱程序

Table 3.1 UPLC-MS /MS conditions

梯度洗脱程序	A 相	B 相
1 min	90%	10%
3 min	40%	10%
3.5 min	40%	60%
4 min	90%	60%
5 min	90%	10%

表 3.2 DON 内标在 MRM 模式下质谱参数

Table 3.2 Mass spectrum parameters of DON internal standards detected in MRM mode

化合物	母离子	子离子	锥孔电压	碰撞能（V）
Deoxynivalenol	297.1	231.1	23	13
Deoxynivalenol	297.1	249.1	23	10

3.3 结果与分析

3.3.1 金标抗体的制备

3.3.1.1 金纳米粒子表征

本实验通过柠檬酸三钠还原法合成了金纳米粒子。用于胶体金试纸条检测的金纳米粒子通常粒径在 20~40 nm，在这个区间的胶体金颜色呈鲜艳的橙红色并且稳定性强。当添加柠檬酸三钠过量时，金纳米粒子粒径过小，不利于标记抗体，导致试纸条灵敏度降低；当添加柠檬酸三钠不足时，金纳米粒子的粒径过大，导致胶体金溶液呈暗紫色，并且造成金纳米粒子的聚集。本实验合成的金纳米粒子通过粒径仪的检测到的结果如图 3.2 所示，金纳米粒子的大小较为均一，大部分的粒径在 40 nm 左右，适用于胶体金试纸条的开发。

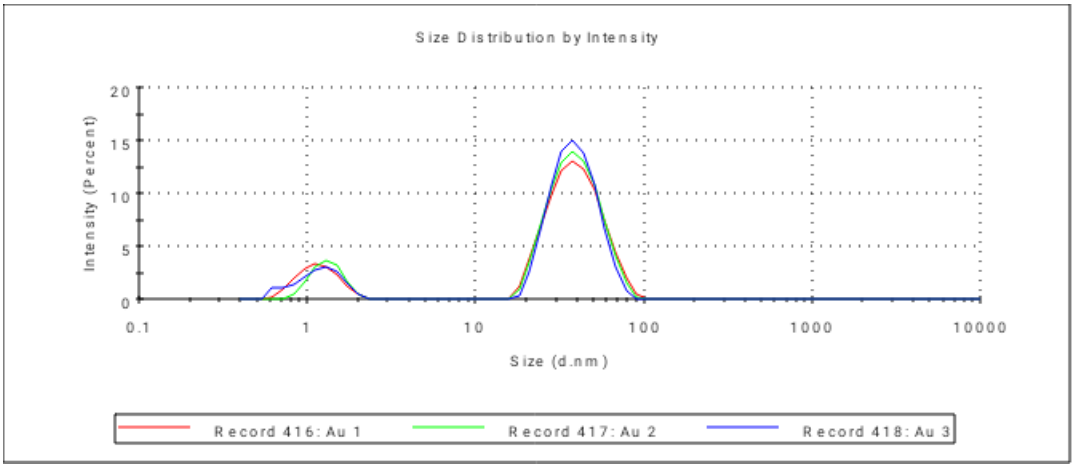

图 3.2 金纳米粒子粒径表征图

Fig 3.2 Particle size characterization of gold nanoparticles

3.3.1.2 金标抗体标记体系优化

金纳米粒子对抗体的标记是依靠静电作用相互吸附。金纳米粒子表面带有负电荷，而 IgG 在 pH 较低时，碱性氨基酸的残基带正电，此时金纳米粒子可以吸附标记抗体，并且此时带负电的酸性氨基酸残基会与纳米粒子有排斥力，使得抗体的抗原结合位点充分暴露（孔德昭，2017）。当溶液 pH 过低时，金纳米粒子会因相互聚集而不能标记抗体。因此，溶液的 pH 对金标抗体的合成有重要影响。本实验在溶液中添加不同含量的 K_2CO_3 来调节 pH，通过肉眼观察溶液颜色来判断添加 K_2CO_3 的最适量。实验结果表明，DON 抗体标记的最适 K_2CO_3 添加量为 5 μL。

3.3.1.3 标记抗体用量优化

标记抗体用量对胶体金试纸条的灵敏度有较大影响，过高和过低的标记抗体用量会造成试纸条检测线过深或过浅。本实验通过不同抗体浓度下金标抗体的颜色变化来判断 DON 抗体用量。结果表明标记体系中 DON 抗体的最佳使用量为每毫升胶体金溶液 10 μg。

3.3.2 DON 三重检测线胶体金试纸条模型建立及优化

一般而言，胶体金试纸条的检测高度依赖于检测线（T 线）和控制线（C 线）的颜色强度，这与样品中抗原和游离的金标抗体之间的特异性反应以及在 NC 膜上吸附的包被抗原量有关。在结束层析后，T 线与 C 线的最终颜色强度及两者的比值表示样品抗原的浓度。为了提高试纸条的敏感性，许多学者尝试提高抗体亲和力或优化抗体标记物，同时也开发了许多理论模型用于分析反应。受到前人的启发，本研究开发了一种三重检测线胶体金试纸条用于肉眼半定量或仪器协助定量检测小麦中的 DON。

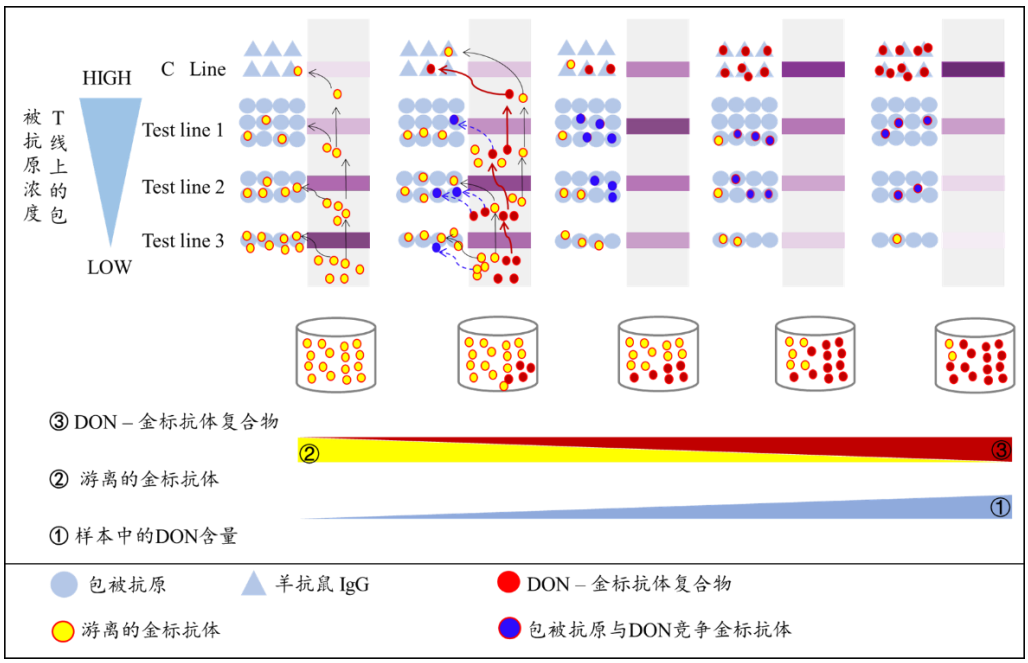

图 3.3 样品抗原、包被抗原和金标抗体之间的多重反应机制

Fig 3.3 Multiple reaction mechanism among sample antigen, coated antigen and gold-labeled antibody

TTLS 是基于质量作用动力学和对流-分散-反应方程而设计的。在将样品中 DON 加入微孔中与金标抗体反应后，溶液沿试纸条向上流动发生复杂的反应，图 3.3 表示了 TTLS 的反应结合行为。高亲和力抗体通常是试纸条开发的关键，抗体的亲和力越高，试纸条法灵敏度越高。本实验所开发的 DON 抗体属于高亲和力抗体，所以 DON 与金标抗体结合形成复合物是在很短的时间内完成并达到

平衡。在检测线中，首先由 T3 捕获游离金标抗体，检测线包被的 0.03 mg/mL DON-BSA 对金标抗体具有较高的捕获能力。随着样品中 DON 含量的增加，T3 处的颜色强度随着游离金标抗体浓度的降低而降低。然而， T2 和 T1 所包被的 DON-BSA 浓度较高，它们会通过竞争将金标抗体表位与其结合的 DON 剔除，然后与形成的游离金标抗体结合。在图 3.3 中，T2 和 T1 处的 DON-BSA 浓度分别为 0.1 和 0.3 mg/mL。当样品中 DON 含量略有增加时，形成少量的 DON-金标抗体复合物穿过 T3，T2 和 T1 的颜色强度首先随着其浓度的增加而增加。当游离的金标抗体与较多的 DON 结合时，三条检测线的颜色强度会同时降低，因为它们与 DON-金标抗体的竞争没有优势。此时，由于控制线处喷涂浓度为 0.5 mg/mL 的山羊抗小鼠 IgG，可以与游离的金标抗体或者 DON-金标抗体复合物两者结合，所以控制线颜色逐渐加深。

通过优化检测线上的包被抗原浓度，可获得 4 个视觉检测阈值，并且实现视觉检测阈值的调整。在优化过程中，用 PBST 缓冲液制备浓度为 1、5、10、50、100、200 和 500 ng/mL 的 DON 标准液，并采用 150 μL 溶液进行检测。如图 3.4A 所示，3 个检测线均采用相同的包被抗原浓度（0.03 mg/mL），当样品中 DON 含量逐渐增加时，T1 和 T2 的颜色强度没有增加。无论在低 DON 范围内还是在高 DON 范围内，这两条线的颜色强度均无明显变化，颜色强度的差异不容易用肉眼来区分。当包被浓度梯度使用 0.03、0.015 和 0.0075 mg/mL DON-BSA 时，如图 3.4B 所示，检测线颜色强度过低，无法进行肉眼半定量测定。在优化后的包被抗原浓度下（T1、T2、T3 分别为 0.3、0.1、0.03 mg/mL DON-BSA），如图 3.4C 所示，观察到颜色强度及与 DON 浓度相关的变化。检测线包被浓度优化过程中，控制线喷涂羊抗鼠 IgG 浓度均为 0.5 mg/mL。

在优化包被原条件下，可以发现加入到微孔中的样品稀释液的体积会影响试纸条显色强度，这是由于试纸条层析过程中流经 NC 膜的溶液体积是固定的，而大量的样品稀释液会导致金标抗体浓度的降低，从而使得与检测线结合的金标抗体量减少。结果表明通过将样品溶液体积从 150 μL 调整到 100 μL，可以使得检测线和控制线的颜色易于用肉眼区分。

抗体是胶体金试纸条的关键，抗体的灵敏度和亲和力会影响胶体金试纸条的检测。由于不同的抗体对抗原的亲和力存在差异，增加样品溶液中抗原与金标抗体在微孔中反应的时间，有时会增加抗原和抗体之间的反应程度，从而增加试纸条灵敏度。因此对样品稀释液与金标抗体的孵育时间进行了对比优化，小麦基质中 DON 含量在 0~5000 μg/kg 范围内。如图 3.6 所示，样品稀释液与金标抗体反应 0、5、10、15 min 后再插入试纸条进行层析反应 5 min，试纸条的显色没有明显变化，这是由于开发的单克隆抗体对 DON 具有高亲和力。抗原-抗体孵育时间

优化对试纸条的提升可能更适用于低亲和力的抗体，而对高亲和力抗体无明显提高。最终，选择将样品稀释液加入微孔中与金标抗体混合均匀后立即插入试纸条进行检测。

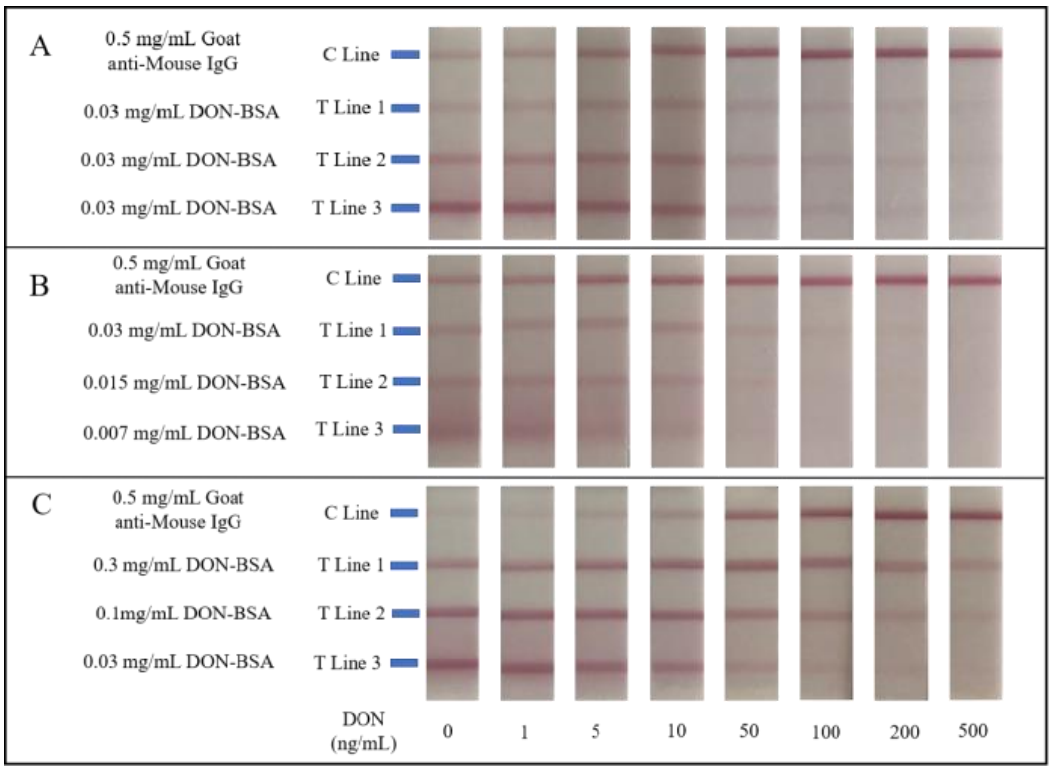

图 3.4 TTLS 检测线的包被抗原优化

Fig 3.4 Optimization of coating antigen for TTLS test line

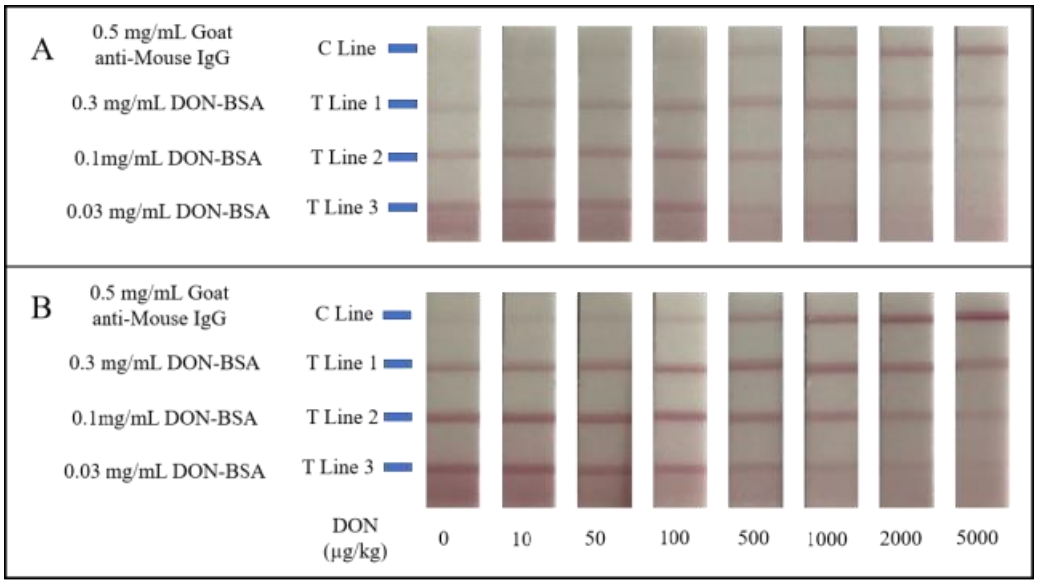

图 3.5 小麦样品稀释液反应体积优化（A：150 μL，B：100 μL）

Fig 3.5 Optimization of diluent reaction volume of wheat samples (A: 150 μL, B: 100 μL)

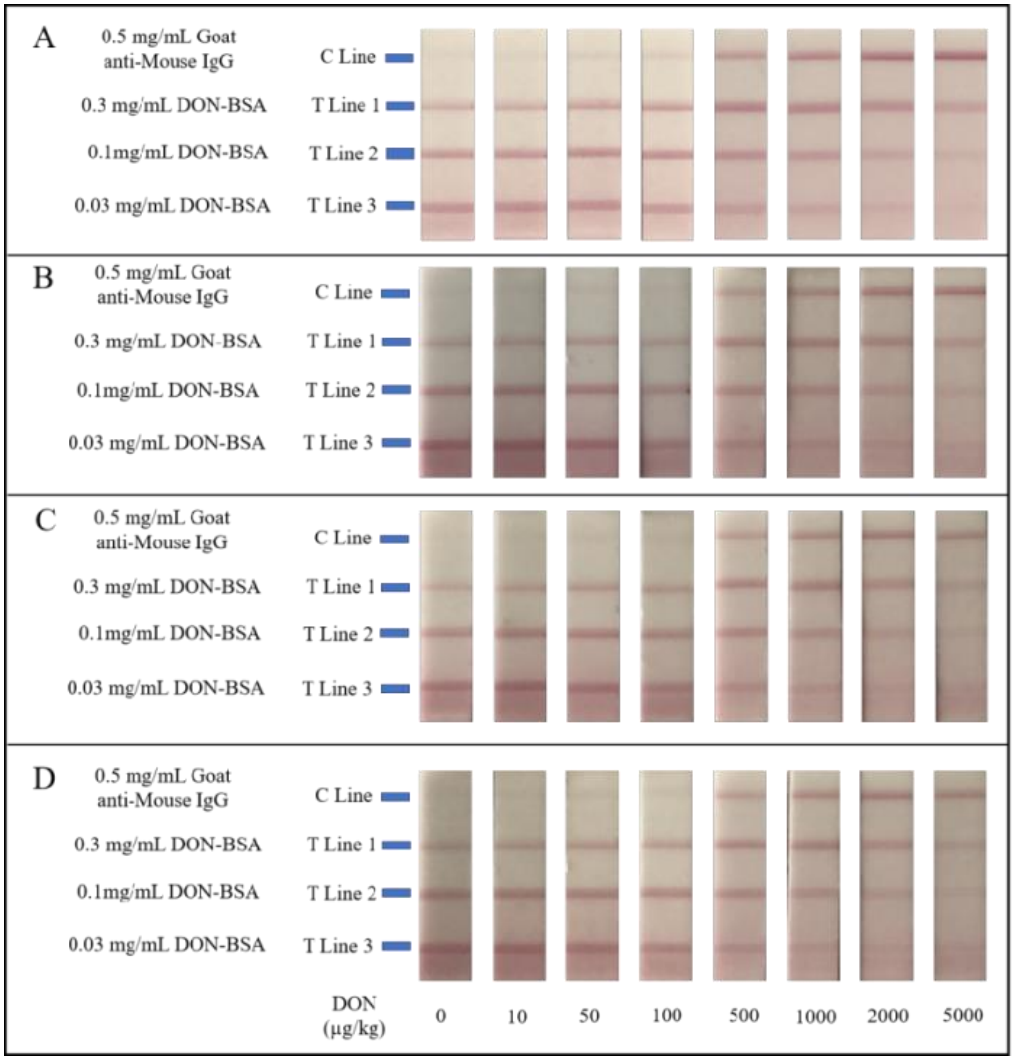

图 3.6 小麦样品稀释液与金标抗体孵育时间优化（A：0 min，B：5 min，C：10 min，D：15 min）

Fig 3.6 Optimization of incubation time of wheat sample dilution and gold-labeled antibody (A: 0 min, B: 5 min, C: 10 min, D: 15 min)

3.3.3 传统单检测线胶体金试纸条与 UPLC-MS/MS 对小麦中 DON 的检测

小麦 DON 污染样品首先通过 UPLC-MS/MS 进行验证。如图 3.7A 所示，UPLC-MS/MS 检测到的 DON 标准曲线呈高度线性关系，R^2 =0.999。结果表明 35 个小麦样品中的 17 个小麦样品的 DON 浓度超过 1000 μg/kg，4 个小麦样品的浓度超过 2000 μg/kg。这些样品中的 DON 含量覆盖了不同的 DON 污染水平，适用于进行 TTLS 和 STLS 检测性能的验证。

单检测线试纸条在商业中应用较多，并且研究广泛。为了保证制备的 STLS 与市场产品性能一致，首先对 STLS 进行了优化。经过一系列优化后，将 NC 膜

上喷涂浓度为 0.4 mg/mL 的 DON-BSA 作为检测线，喷涂浓度为 0.1 mg/mL 的羊抗鼠 IgG 作为控制线。本实验获得了 35 个样品的单检测线胶体金试纸条（STLS）检测结果，并与 TTLS 进行比较。在对阴性加标小麦样品经过 STLS 检测后，通过胶体金读数仪获得的 RLU 值范围为 2.18~0.82，RLU 值与样品中 DON 含量（250~4000 μg/kg）呈负相关。该范围内的 DON 含量与 RLU 值呈高度的线性关系，$R^2 = 0.998$。在图 3.7D 中，除去 DON 低于 250 μg/kg 的样品和第 15 个样品（#15 小麦）外，STLS 的 DON 定量结果均在 UPLC-MS/MS 检测值的 80~120% 范围以内。对于 DON 低于 250 μg/kg 的样品（亮蓝色矩形区域），检测到的 RLU 高于 2.59，因为受到 DON 抗体的灵敏度和样品前处理稀释倍数的影响，已经超出了 STLS 的线性范围，所以这些小麦样品的检测稳定性较差。此外，STLS 不适合用肉眼定量判断，这是因为 DON 含量在 4000 μg/kg（小麦 DON 最大允许残留量的 4 倍）以下时，T 线与 C 线颜色没有显著差异。

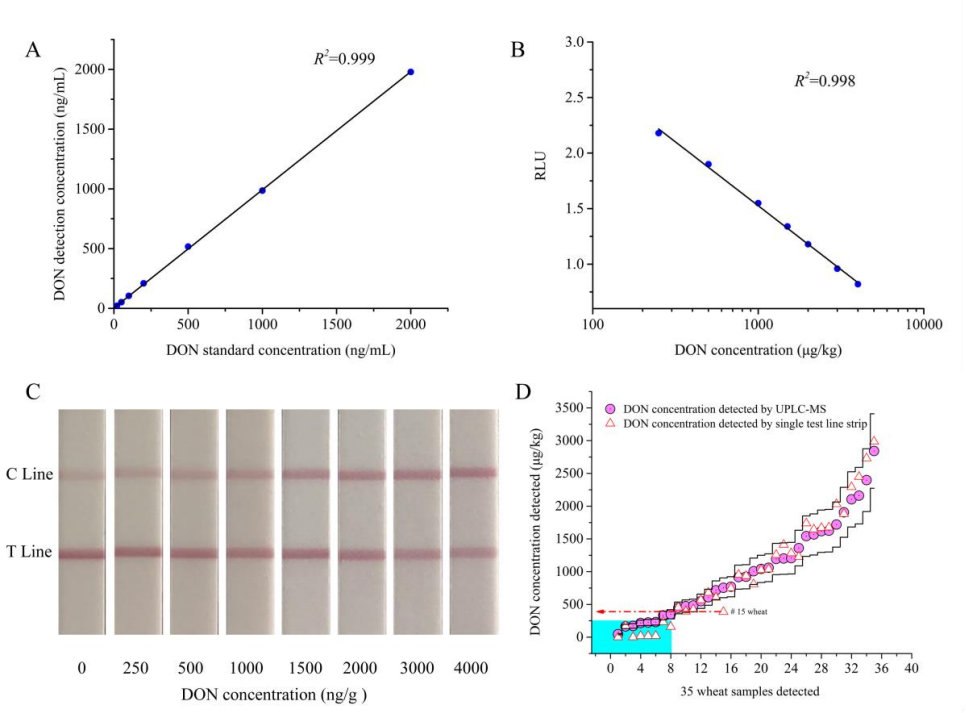

图 3.7 35 个小麦样品的标准曲线和检测结果。（A：UPLC-MS/MS 所得标准曲线，B：STLS 所得标准曲线，C：典型的 STLS 试纸条，D：通过 UPLC-MS/MS 和 STLS 对 35 个小麦样品的检测结果）

Fig 3.7 Standard curves and test results of 35 wheat samples. (A: standard curve obtained by UPLC-MS/MS, B: standard curve obtained by STLS, C: STLS, D: detection results of 35 wheat samples by UPLC-MS/MS and STLS)

3.3.4 TTLS 对小麦中 DON 的肉眼半定量检测研究

TTLS 的肉眼半定量检测是其设计的出发点。如图 3.8A 所示，根据 C 线与 3 条 T 线之间的关系，可以定义 4 个视觉检测阈值。当样品中的 DON 低于 200 μg/kg 时，C 线的强度均低于 3 个检测线。当样品中 DON 约为 500 μg/kg 时，C 线颜色强度较小，低于 T1 和 T2，高于 T3。当样品中 DON 约为 1000 μg/kg 时，C 线的显色强度高于 T2 和 T3，且轻于 T1。当样品中的 DON 大于 2000 μg/kg 时，C 线的显色强度均高于 3 个检测线。

将 35 个小麦真实样品通过 TTLS 进行检测，试纸条反应完成后通过 4 个视觉阈值进行 DON 半定量测定。样品根据 DON 含量从低到高在图 3.8B 中列出。将样品用 TTLS 检测重复三次，肉眼半定量结果见图 3.8C。从图 3.8 可以看出，从样本 1（小麦#1）到样本 9（小麦#9），肉眼判断的 DON 浓度约为 200 μg/kg，研究发现这些样品的真实值大多都超过了这个肉眼半定量检测阈值，其他三个肉眼检测阈值的情况也是相同。这说明 TTLS 定量检测通常低于真实值，这些阈值应视为样品中 DON 的最低含量。造成这种情况的原因一方面是小麦样品中 DON 含量相似，无法很显然的从肉眼直观上区分；另一方面，样品的基质干扰也可能是产生这种情况的原因。由于 TTLS 的显色差异来自于样品中 DON 的浓度差异，因此前处理稀释倍数不能过多，从而导致了一定样品基质干扰。

Gasperino 等人基于检测线消线的肉眼半定量阈值为 0.1、1.0 和 10 μg/mL，这三个阈值之间有 10 倍的差异，远大于 TTLS 的阈值差。所以 TTLS 的基于检测线之间显色强度对比的模式可以减小试纸条的肉眼半定量阈值差。

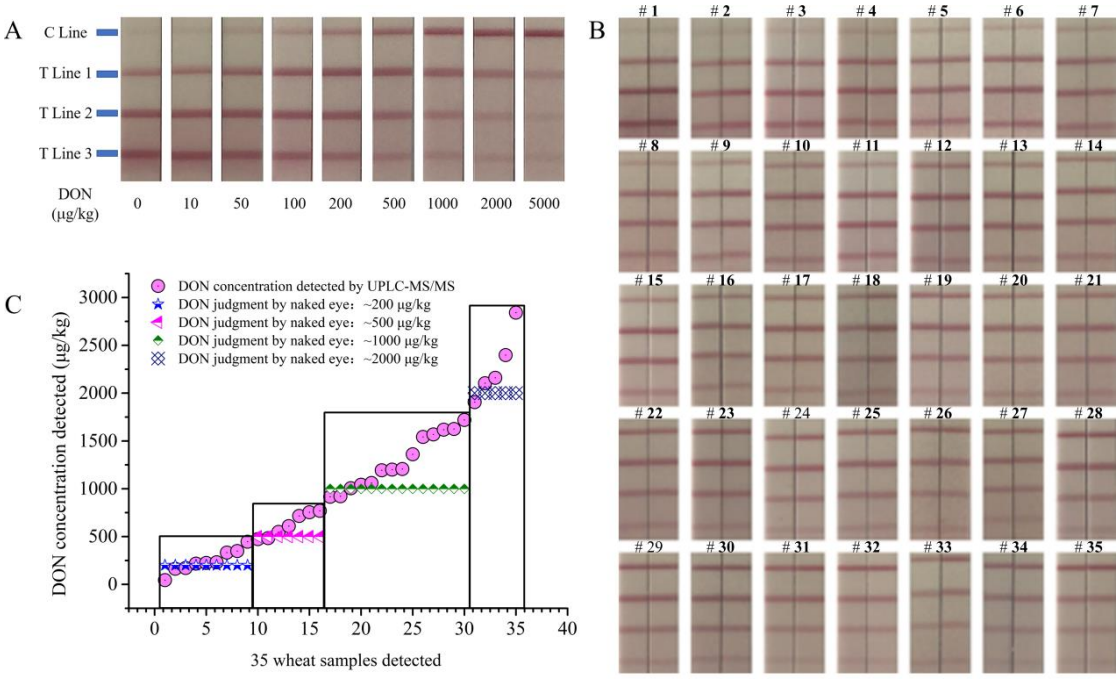

图 3.8 TTLS 对小麦中 DON 含量肉眼半定量结果（A：TTLS 的小麦阴性添加标准显色卡，B：35 个小麦真实样品的 TTLS 显色结果，C：TTLS 的小麦样品肉眼半定量结果与

UPLC-MS/MS 定量结果比较）

Fig 3.8 Naked eye semi-quantitative results of TTLS on DON content in wheat. (A: wheat negative adding standard color cards of TTLS, B: color rendering results of 35 real wheat samples of TTLS, C: semi-quantitative results obtained by TTLS of wheat samples were compared with UPLC-MS/MS quantitative results)

3.3.5 TTLS 与 UPLC-MS/MS、STLS 对小麦中 DON 定量检测比较

TTLS 对阴性加标样品检测时，通过胶体金读数仪可以获得的三条 T 线的 RLU 值，并建立标准曲线，TTLS 可以对 DON 进行定量测定。如图 3.9A 所示，通过 RLU 值和 DON 浓度得到了 3 条检测线的标准曲线。这些曲线通过形成的二维码扫描输入到胶体金读数仪上，然后用于检测实际的小麦样品。如图 3.9 所示，TTLS 通过三条检测线得到了 3 个检测结果，可以发现三条检测线对样品中 DON 的定量结果大体上呈现 T3>T2>T1 的现象。将其平均值与 UPLC-MS/MS 的定量结果进行比较，如图 3.9B 所示，除样品#15 和#19 外，前 29 个小麦样品的 TTLS 检测平均值都在 UPLC-MS/MS 定量值的 80~120%范围内。为了分别研究三个检测线的性能，将三条线的检测结果与 UPLC-MS/MS 的定量结果进行比较，如图 3.9C 和图 3.9D 所示。对于 DON 含量小于 1042 μg/kg 的前 20 个小麦样品，T3 对 DON 的定量偏高。在图 3.9D 中，其余 15 个 DON 含量大于 1042 μg/kg 的小麦样品，T2 和 T3 的定量结果较高，尤其是当 DON 含量大于 1500 μg/kg 时。呈现这种现象的原因主要是样品的基质干扰。一方面，TTLS 为了肉眼半定量检测时试纸条的明显显色差异，所以将样品的稀释倍数确定为 10 倍，而 STLS 无需考虑试纸条显色的差异，将样品稀释 20 倍进行检测。TTLS 所受到的基质干扰较大，因此出现三条检测线定量值得较大差异的现象。另一方面，由于 TTLS 得三条检测线都包被了 DON-BSA，所以后面与层析溶液接触的检测线会受到上一条检测线误差的影响，这也是三条检测线之间定量误差大的原因。

当 DON 含量小于 250 μg/kg 时，STLS 的检测结果非常不稳定，检测范围为 250~4000 μg/kg。不同于 STLS，TTLS 在低 DON 浓度样品的检测中并未出现检测结果极不稳定的情况，而 TTLS 的检测范围为 10~5000 μg/kg。

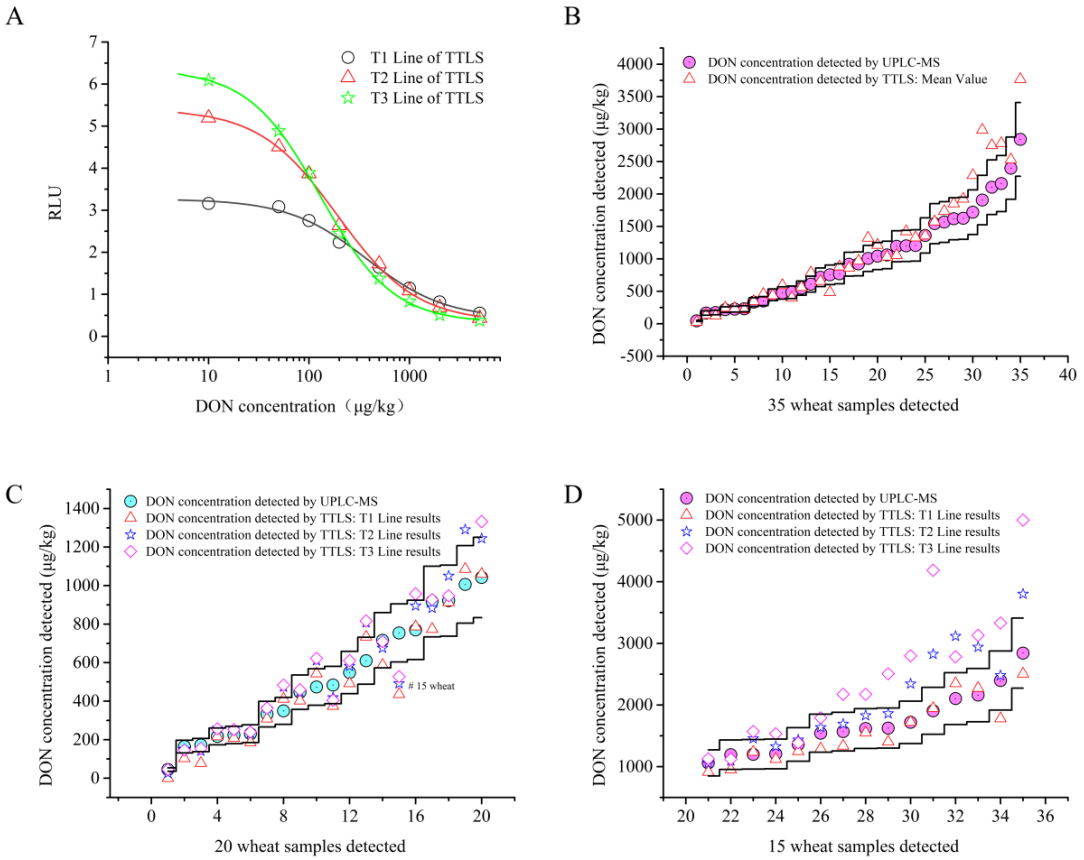

图 3.9 胶体金读数仪获得的 TTLS 定量结果 （A: 3 条通过 RLU 和 DON 浓度建立的标准曲线，B：TTLS 检测的 35 个小麦样品的三条检测线平均值并与 UPLC-MS/MS 结果的比较， C 和 D：TTLS 对 35 个样品的 3 个检测线的检测结果）

Fig 3.9 Typical TTLS quantitative results obtained by smart platform. (A：three standard curves obtained from RLU and DON concentration，B：mean value of 35 wheat samples detected by TTLS and compared with that by UPLC-MS/MS， C and D: results obtained from three test lines)

将 35 个样品通过 TTLS 检测 3 次，每次检测的结果取三条 T 线的平均值，将三次检测结果的平均值与与 UPLC-MS/MS 所得真实值进行比较，如图 3.10 所示。除部分高 DON 污染小麦外，TTLS 平均值与 UPLC-MS/MS 的检测结果一致性较高。将每条检测线在三次检测后的平均值分别进行比较，如图 3.11 所示。结果表明，三条 T 线的检测结果与 UPLC-MS/MS 的定量值依然具有一定的误差。

综上所述，当样品中 DON 污染较小时，TTLS 三条 T 线的检测平均值适合用于 DON 定量检测，并且与 STLS 相比具有较好的稳定性。当样品中 DON 污染较严重时，TTLS 定量检测误差较大，更适合于肉眼半定量检测。

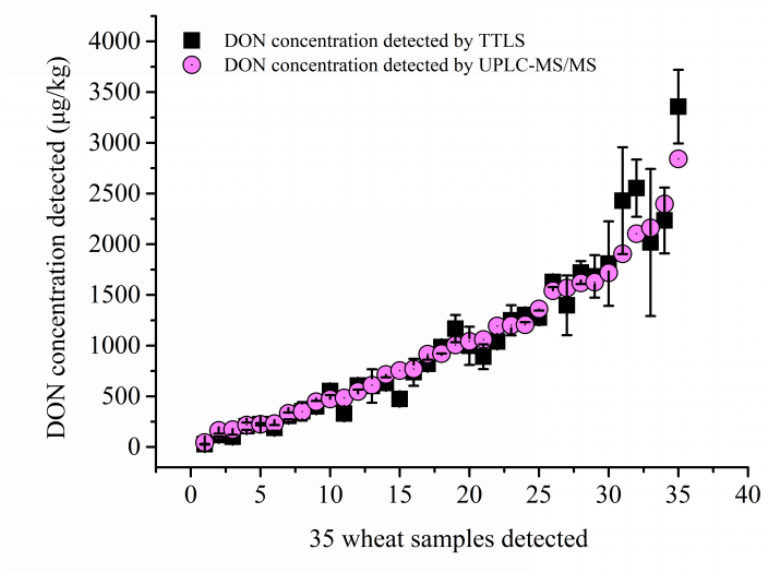

图 3.10 三次 TTLS 检测的平均值与 UPLC-MS/MS 值比较

Fig 3.10 The mean values detected by TTLS for three times and compared with the true values

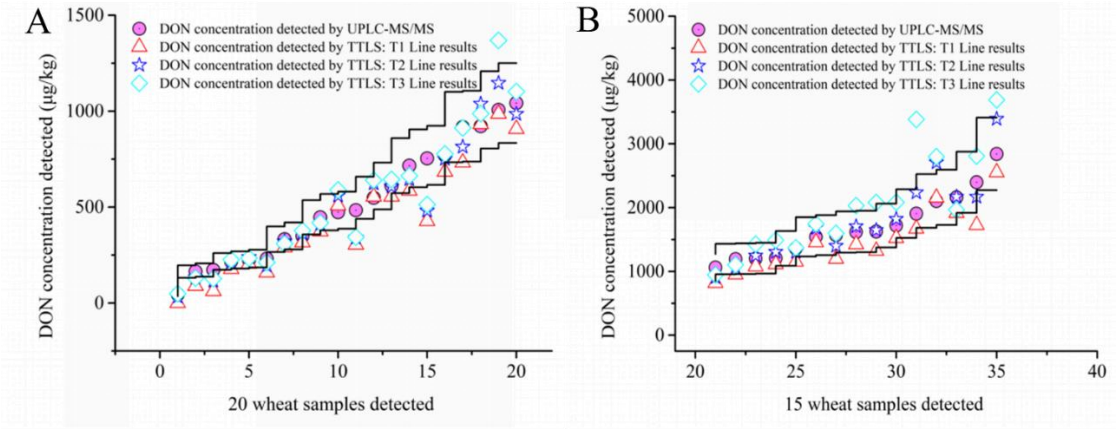

图 3.11 三次 TTLS 检测后各条检测线的平均值与 UPLC-MS/MS 值比较。 (A:低 DON 污染小麦，B:高 DON 污染小麦)

Fig 3.11 Comparison between the average value of each test line and UPLC-MS/MS value after three TTLS tests (A: wheat with low DON contamination, B: wheat with high DON contamination)

3.4 本章小结

1、包被抗原的浓度对游离金标抗体和 DON-金标抗体复合物具有不同的捕获和竞争效率，是设计 TTLS 肉眼半定量和仪器定量检测的关键。三条检测线和控制线捕获效率的差异导致了不同的颜色强度，这种效应依赖于样品抗原和包被抗原之间的竞争，以及它们之间的可逆反应。此外，抗体结合亲和力也是影响反

应平衡状态的潜在因素。

2、TTLS 通过 3 个检测线与控制线的颜色比较，最终可用于定义四个视觉检测阈值。可以通过肉眼半定量测定小麦 DON 含量，这是传统胶体金试纸条所不能达到的。在对 35 个 DON 污染小麦样品检测后，发现 TTLS 肉眼半定量值小于 UPLC-MS/MS 所测得的真实值，因此将 TTLS 肉眼半定量结果定义为小麦中 DON 的最小值。此外，通过胶体金读数仪得到的 RLU 值建立标准曲线，TTLS 的 3 条检测线的平均值与 UPLC-MS/MS 的一致性较高，可用于定量检测小麦中的 DON。TTLS 与传统单检测线胶体金试纸条相比，在 DON 低污染小麦样品的检测中更具稳定性。

3、综上所述，在某些不需要 DON 精确含量检测的情况下，如日常的小型仓储检测中，TTLS 的肉眼半定量检测降低了传统胶体金试纸条的仪器成本。TTLS 在拥有传统胶体金试纸条操作简单、价格亲民和易于现场检测等优点的同时，将胶体金可视化的优点更加得以体现，使得 TTLS 具有良好的市场应用前景。

第四章 免洗脱磁性固相萃取结合胶体金免疫层析试纸条对粮食中黄曲霉毒素 B_1 检测研究

黄曲霉毒素是粮食中由真菌产生的危险污染物，特别是黄曲霉毒素 B_1(AFB_1)，其经常存在于小麦、水稻和玉米中，并对人类健康造成严重影响（Zhao 等，2013）。因此，AFB_1 被 IARC 列为第 1 类致癌物（Saha 等，2019）。中国在 GB2761-2017 年的报告中，AFB_1 在水稻、小麦和玉米中的最大残留限值(MRLs)分别为 10、5 和 20 μg/kg。农作物中 AFB_1 水平较高通常是由于生长收获阶段无法控制的极端天气或贮藏条件不当（Giorni 等，2011；D Gizachew 等，2019；Lv 等，2019）。AFB_1 含量多于 MRLs 的粮食不宜食用，所以常用作饲料。为了监测粮食中 AFB_1 的浓度并评估其风险，人们广泛采用了许多方法对 AFB_1 的检测方法，如 UPLC-MS/MS、基于适配体的电化学法、激光诱导荧光法、基于抗体的免疫学检测等（Wang 等，2015；Beitollahi 等，2020；Chen 等，2021；Sun 等，2019；Wang 等，2022；Kong 等，2016）。其中，胶体金免疫层析试纸条因为价格便宜、灵敏度高、特异性强、操作简单、通量高而得到了广泛的应用。

胶体金免疫层析检测试纸条作为一种快捷的筛查工具，在食品污染物的检测方面发挥着越来越重要的作用。但是，试纸条的检测容易受到来自 pH、有机试剂、无机盐和食品中的大量基质干扰（Cruz 等，2012）。由于获得高敏感性抗体的难度高，所以在现有抗体的基础上，优化前处理方式是一种可行的解决方案。

迄今为止，磁性固相萃取（Magnetic solid phase extraction, MSPE）在环境净化与污染物富集检测等方面是十分有效的（Hendrickson 等，2022；Yin 等，2022；Climent 等，2021）。本实验室之前的研究中制备了磁性纳米材料 $Fe_3O_4@NH_2$，用于在湖水中吸收 Pb(II)，并采用免疫层析试纸条法检测（Xing 等，2015；Sun 等，2018）。但是这种方法在吸附后和检测之前需要从磁性材料的表面洗脱 Pb(II)，操作较为复杂繁琐。因此本研究考虑合成一种磁性纳米材料用于真菌毒素的前处理富集，同时可以免去有机溶剂洗脱步骤，直接将磁性纳米材料与金标抗体混合后采用胶体金试纸条检测。前人的研究表明碳基材料对真菌毒素具有强烈的吸附能力，并且可重复洗脱使用。多壁碳纳米管与氧化石墨烯等碳材料表面富含多种官能团，可以通过多种作用力与真菌毒素结合，如静电相互作用、π-π 堆积、疏水相互作用和螯合作用等。但其过于强大吸附能力会导致其通过静电相互作用与金纳米粒子产生吸附，从而无法满足免洗脱检测的要求，因此将目光转向另一类碳基材料——生物炭。

近年来，稻壳这类普遍存在的农业副产物作为一种能源被广泛关注，其经碳化形成的生物炭也在环境污染物吸附方面发挥着重要的作用。（Shen 等，2017；

Herath 等，2016；Vithanage 等，2016；Indika 等，2016；Chen 等，2011；Baig 等，2014）。受前人研究的启发，我们采用稻壳通过一步法制备了磁性生物炭（Magnetic rice husk biochar，MB）。由于稻壳生物炭不像碳纳米管与石墨烯拥有极多的片层或者蜂窝结构和众多的基团，所以其对真菌毒素的吸附力和吸附容量较小。研究表明磁性生物炭对真菌毒素的吸附力主要来源于铁离子对羰基的螯合以及疏水作用（Pirouz 等，2018）。由于 AFB_1 具有两个羰基并且 AFB_1 由于其极性而在水中溶解性低，因此磁性生物炭具有在水中吸附 AFB_1 的能力。此外，由于生物炭没有静电吸附力，所以对胶体金不存在静电相互作用，因而满足于免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测模式。在合成磁性稻壳生物炭后，通过 SEM-EDX、FTIR 和 XRD 对材料进行表征并研究其在水中对 AFB_1 的吸附能力。最终建立了基于磁性稻壳生物炭的免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条对 AFB_1 检测的方法，并研究了洗脱步骤和氮吹操作的影响，以提高试纸条的灵敏度。最后，通过在大米、糙米和玉米样品中检测 AFB_1，验证了该方法的可行性。

4.1 材料与设备

4.1.1 实验试剂与材料

AFB_1 单克隆抗体于第二章制备，$FeCl_3·6H_2O$、$FeCl_2·4H_2O$ 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司，甲醇、乙酸乙酯、乙醇、乙腈购于德国 Merck 公司，稻壳于本实验室将稻米脱壳后所得。其余药品与试剂见 2.1.1 与 3.1.1。

4.1.2 实验设备

管式炉（SK3-2-10-8）购于杭州卓驰仪器有限公司。其余仪器与设备见 2.1.2 与 3.1.2。

4.2 实验方法

4.2.1 磁性稻壳生物炭的制备

首先将洗净的稻壳粉置于真空烘箱中 50℃烘干。采用共沉淀法制备 Fe_3O_4 纳米颗粒，过程是将 9.00 g $FeCl_3·6H_2O$ 和 3.315 g $FeCl_2·4H_2O$ 溶解在 50 mL 超纯水中，在氮气保护下大力搅拌 35 min。加入 5g 稻壳粉（过 160 目筛），搅拌 130 min。然后将反应溶液的 pH 值调至 7.8~8.2，并进一步搅拌 2 小时。将得到的溶液在 110℃下干燥。接着将粗材料在 5℃/min 的氮气中，500℃下热解 7 小时。将热解后的磁性生物炭（过 100 目筛）用乙醇洗涤，通过外部磁场去除杂质，最后在 50℃的真空烘箱中干燥。

4.2.2 磁性稻壳生物炭的表征

通过 SEM-EDX 分析磁性生物炭（MB）的形态和元素分布。利用 X 射线衍射（XRD）和傅里叶变换红外光谱（FTIR）对其结构信息进行分析。

4.2.3 AFB_1 胶体金免疫层析试纸条的制备与检测

AFB_1 金标抗体的制备过程参考 3.3.1。将包被抗原 AFB_1-BSA 以 1 μL/cm 的速度喷涂在 NC 膜上作为检测线（T 线），浓度为 0.1 mg/mL。将 0.2 mg/mL 的羊抗鼠 IgG 喷涂在 NC 膜上作为控制线（C 线），两条线相距 6 mm。将板在 37℃下干燥 2 h，然后切成 4.0 毫米宽的试纸条，在 4℃保存。

将样品或溶液中的 AFB_1 用 PBST 稀释到 200 μL，移取 200 μL 溶液到含有 AFB_1 金标抗体的微孔中，缓慢抽吸至金标抗体溶解均匀后，将微孔在 40℃下插入试纸条反应 5 min。之后取出试纸并用胶体金读数仪读取，然后由相机将显色情况记录下来。所得照片和数据采用 Fireworks 和 Origin 2018 进行处理。

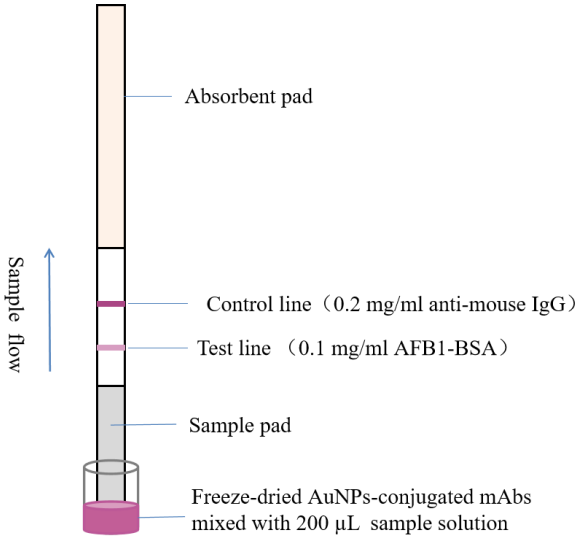

图 4.1 AFB_1 胶体金试纸条示意图

Fig 4.1 Schematic diagram of AFB_1 colloidal gold immunochromatographic test strip

4.2.4 MB 对 AFB_1 吸附性能验证

由于 AFB1 是极性真菌毒素，所以在水中可以通过疏水作用与 MB 吸附。为了研究 MB 在水中对 AFB_1 的吸附容量，将 5 mg MB 加入到含有 5 μg AFB_1 的超纯水中，盖上离心管盖，500 rpm 涡旋 5 min，然后将磁分离后的上清液吸出保存待测。UPLC-MS/MS 检测液相条件与 3.2.6 中 DON 的检测一致。

在通过验证 MB 对 AFB_1 吸附可行性后，增加 MB 的用量，将 25 mg MB 加入到 1mL 的 200 ng/mL AFB_1 溶液中，涡旋吸附时间分别设为 5 min 和 10 min，并通过胶体金试纸条对磁分离后上清液进行检测，研究高 MB 含量溶液对低浓

度 AFB_1 的吸附效率。

表 4.1 AFB_1 内标在 MRM 模式下质谱参数

Table 4.1 Mass spectrum parameters of AFB_1 internal standards detected in MRM mode

化合物	分子式	母离子	子离子	锥孔电压(V)	碰撞能（eV）
AFB_1	$C_{17}H_{12}O_6$	313.1	241	34	39
AFB_1	$C_{17}H_{12}O_6$	313.1	213	34	45

4.2.5 基于免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测模式原理

以往的磁性固相萃取前处理过程可以富集检测目标并降低样品基质效应。然而，大多数检测物在检测前都需要对磁性纳米材料进行清洗，再将得到的目标物进行分析。在这里，我们开发了基于免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测方法， MB 可以吸收样品中的 AFB_1，然后通过 AFB_1 胶体金试纸条检测 MB-AFB_1 复合物。将 MB-AFB_1 复合物与金标抗体在微孔中孵育。如图 4.2 所示，将 MB 应用于胶体金试纸条检测前处理，实现对粮食中低水平 AFB_1 检测的灵敏度提升。

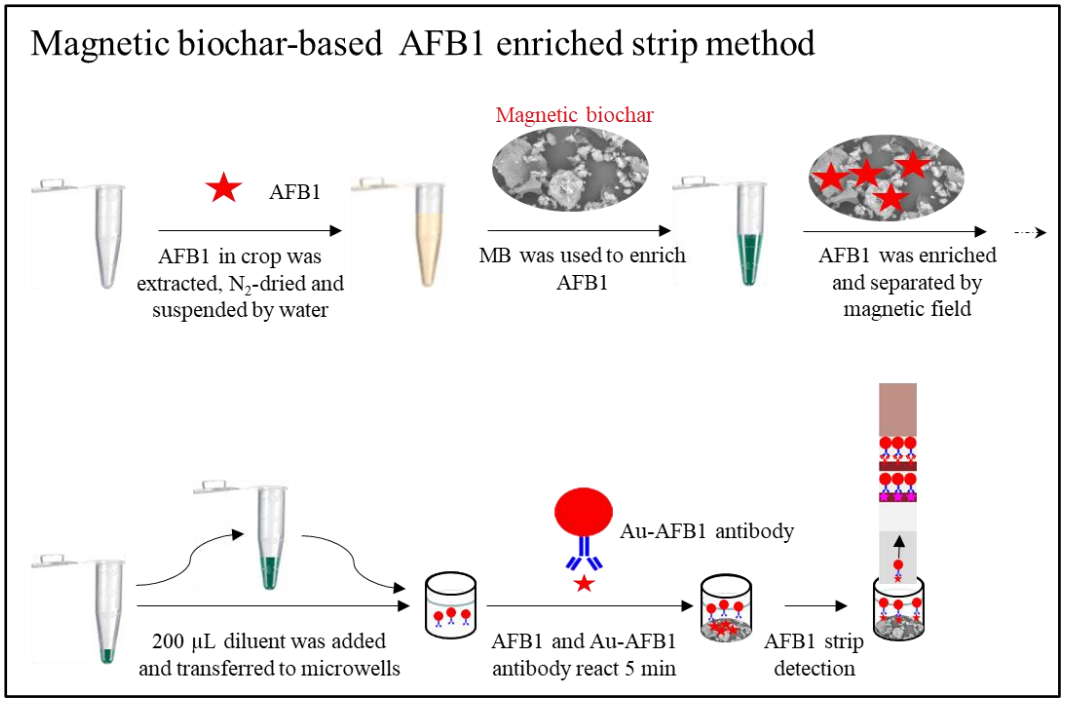

图 4.2 免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测模式

Fig 4.2 Detection mode of Free elution magnetic solid phase extraction combined with colloidal gold immunochromatography strip

4.2.6 免洗脱磁性固相萃取增敏胶体金试纸条验证

将 25 mg MB 加入到 1mL 的 200 ng/mL AFB_1 溶液中涡旋 10 min 后，不经过磁分离，分别将 1 和 20 μL 混合溶液用 PBST 定容至 200 μL，然后与金标抗体混合后插入试纸条反应 5 min。反应结束后用胶体金读数仪读取 RLU 值，并记录显色情况。将试纸条测量结果与 AFB_1 标准溶液试纸条检测的结果进行对比。

4.2.7 传统有机试剂洗脱研究

MB-AFB_1 通过胶体金试纸条进行免洗脱检测时，由于 MB 表面的 AFB_1 与金标抗体的结合可能是不完全的，因此对 MB-AFB_1 用有机溶剂洗脱后的检测效率与灵敏度进行研究。由于 AFB_1 是极性的真菌毒素，在有机溶剂中 MB 与 AFB_1 之间不存在疏水作用，所以 MB 表面的 AFB_1 需要通过有机试剂进行洗脱。选用甲醇、乙腈、乙醇、乙酸乙酯对 MB 表面 AFB_1 进行洗脱，为了减少有机试剂对抗原-抗体反应的负面影响，将洗脱后的 MB 用胶体金试纸条检测，并将洗脱效果较好的两种有机溶剂的洗脱液通过氮气吹干后经样品稀释液复溶，再通过胶体金试纸条进行检测。

4.2.8 胶体金试纸条在实际样品中的应用效果研究

将免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测方法在大米，糙米和玉米等 AFB_1 污染严重的粮食中进行检测验证。对免洗脱磁性固相萃取和传统稀释前处理方法两者对不同粮食中 AFB_1 检测的灵敏度进行对比。

样品提取：根据 AFB_1 的极性，采用 80%乙腈作为提取液，按照固液（w/v）比 1：4 提取 AFB_1，2500 rpm 涡旋 5 min，然后 4000 rpm 离心 3 min，取上清液。

免洗脱磁性固相萃取溶液体系：研究 MB 在以下两种溶液体系中对 AFB_1 的吸附效果。（1）在样品提取液直接加入 MB（2）将样品溶液氮吹干，去除乙腈后，加入超纯水复溶。

MB 的用量：根据 MB 在水中对 AFB_1 的吸附效率、MB 用量对试纸条检测的影响和经济因素适量添加。

免洗脱磁性固相萃取过程：将适量 MB 加入到样品溶液中，500 rpm 涡旋富集，时间根据 MB 的吸附效果决定。在磁场下分离 MB，弃去上清液

试纸条的检测：在含有 MB-AFB_1 的离心管中加入 200 μL PBST，吸打均匀后将含有 MB-AFB1 的样品稀释液转移到含有冻干金标抗体的微孔中，并缓慢吸打均匀，接着插入试纸条 40℃反应 5min。反应结束后用吸水纸吸干样品垫，拍照记录后通过胶体金读数仪读数。

4.3 结果与分析

4.3.1 磁性稻壳生物炭的表征

稻壳是大米加工中的副产物，本研究采用稻壳作为生物炭的原材料可以对其充分利用。如图 4.3A 和 4.3B 所示，由稻壳合成的 MB 呈不规则粒状，和前人所述一致。稻壳生物炭的大小从几微米到几十微米不等，这主要因为稻壳炭的形成是通过碳化并粉碎，很难保证合成的 MB 颗粒细小并且均一。粒径过大会导致稻壳生物炭在溶液体系中分散性差，具有一定的沉积能力，所以后续将 MB 应用于前处理过程中需要保证其在样本溶液中的均匀分散。

采用共沉淀法制备磁性纳米颗粒的方法是较为成熟的，所制备的磁性纳米颗粒尺寸合适并且稳定性强。从图 4.3C 可以看到，在稻壳碳的表面有许多直径在 1 μm 以内的颗粒，分布较为均匀，应该是通过共沉淀法在稻壳炭表面形成的磁性纳米颗粒。

稻壳中有较多的无机盐，在碳化过程中会保留下来，可以提高生物炭的吸附性能。从图 4.3D 可以看到， MB 的构成要素是 Cl、Na、Fe、Si、O 和 C 等在生物炭中常见的元素。其中，Fe 和 O 应该是在磁性纳米颗粒的的合成过程中引入 MB 的。

为了分析磁性纳米颗粒的分子结构，通过 XRD 和 FTIR 对其进行表征。图 4.3E 显示 MB 在 566 cm^{-1} 处有一个吸收峰，这是 Fe_3O_4 中 Fe-O 键的振动峰。472 cm^{-1} 和 1043 cm^{-1} 处的峰分别代表 Si-O-Fe 的弯曲振动和 Si-O-Si 的拉伸振动。在 1637cm^{-1} 处的峰值代表了 C=O 和 C=C 的弯曲振动。Fe_3O_4 在 2θ 值分别为 30.1°、35.7°、43.0°、53.8°、57.2°、62.8°和 74.3°时的衍射峰分别对应于（220）、（311）、（400）、（422）、（511）、（440）和（533）晶格面（Sun 等，2018）。图 4.3F 显示 31.7°、35.5°和 45.5°等 3 处有明显的衍射峰，与 Fe_3O_4 的衍射峰高度一致。综上所述，我们在稻壳炭的表面接入 Fe_3O_4 纳米颗粒，成功地合成了 MB 材料。

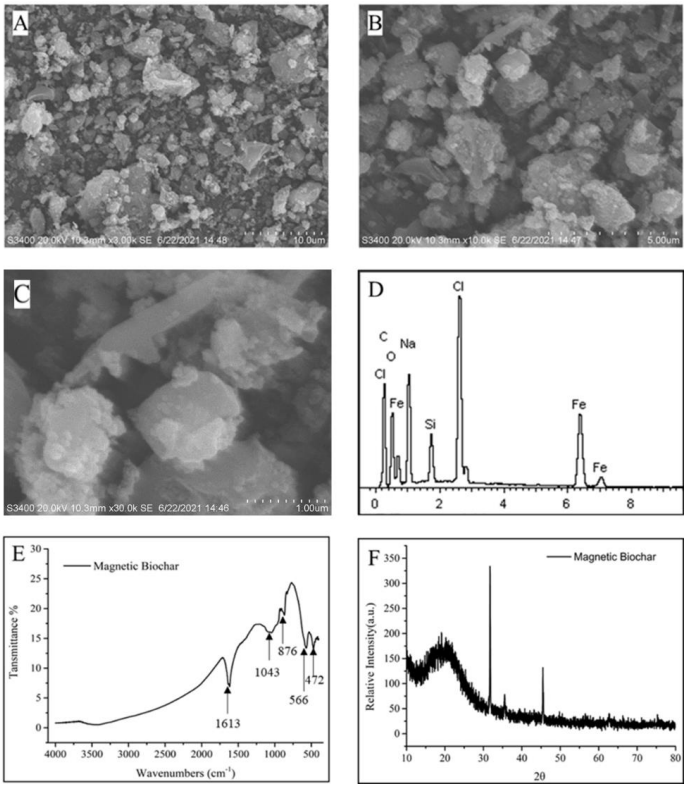

图 4.3 (A) (B) (C) MB 的扫描电子显微镜图, (D) MB 的元素分析图, (E) MB 的傅里叶红外变换光谱图, (F) MB 的 X 射线衍射图

Fig 4.3 (A) (B) (C) SEM of MB, (D) EDX of MB, (E) FTIR of MB, (F) XRD of MMB 对 AFB1 吸附能力和验证

4.3.2 MB 对 AFB_1 吸附性能验证

MB 不如多壁碳纳米管或者氧化石墨烯等碳材料表面拥有众多的基团，其对真菌毒素的吸附力主要来源于表面的 Fe^{2+}、Fe^{3+}以及疏水相互作用（Pirouz 等，2018）。由于 AFB_1 的结构中含有两个羰基与铁离子进行螯合，并且作为极性物质可以在水中与 MB 通过疏水作用吸附，所以本实验选用 AFB_1 作为分析物进行检测方法的构建。将 5 mg MB 加入到含有 5 μg AFB_1 的 1mL 超纯水中，盖上离心管盖，500 rpm 涡旋 5 min，然后将磁分离后的上清液吸出保存待测。将上清液用 UPLC-MS/MS 进行检测，发现 5 mg 的 MB 吸附了 4.46 μg 的 AFB_1，吸附率达到 89.2%，同时说明 1 mg 的 MB 对 AFB1 的吸附容量在 892 ng 以上。

为了了解高浓度 MB 对低浓度 AFB_1 的吸附效率是否更高，按照比率（w/v）1：40，将 25 mg MB 加入到 1mL 的 200 ng/mL AFB_1 溶液中，涡旋吸附时间分别设为 5 min 和 10 min，并通过胶体金试纸条对磁分离后上清液进行检测。

在对上清液进行胶体金试纸条检测之前，先对水溶液中 AFB_1 胶体金试纸条的检测建立标曲。使用浓度范围为 0~10 ng/mL 的 AFB_1 水溶液直接与金标抗体混合后使用胶体金试纸条进行检测，通过胶体金读数仪检测扫描输出 RLU 值建

立标曲。如图 4.4 所示，当水中 AFB_1 浓度达到 10 ng/mL 时，所测的 RLU 为 0.642，小于 1，此时 T 线颜色< C 线；5 ng/mL 的 AFB_1 溶液的 RLU 为 1.36，T 线颜色> C 线。因此可以通过 T 线与 C 线强度的比较对 AFB_1 的含量进行初步判断。从图 4.4 可以发现，当 AFB_1 浓度在 2 ng/mL 以内时，RLU 值在 1.62~1.68 之间，差距极小，说明试纸条在低 AFB_1 浓度下的灵敏度不高，所以本实验免洗脱磁富集 AFB_1 的目的即为提高样品溶液中 AFB_1 的浓度，进而提升试纸条的检测灵敏度。

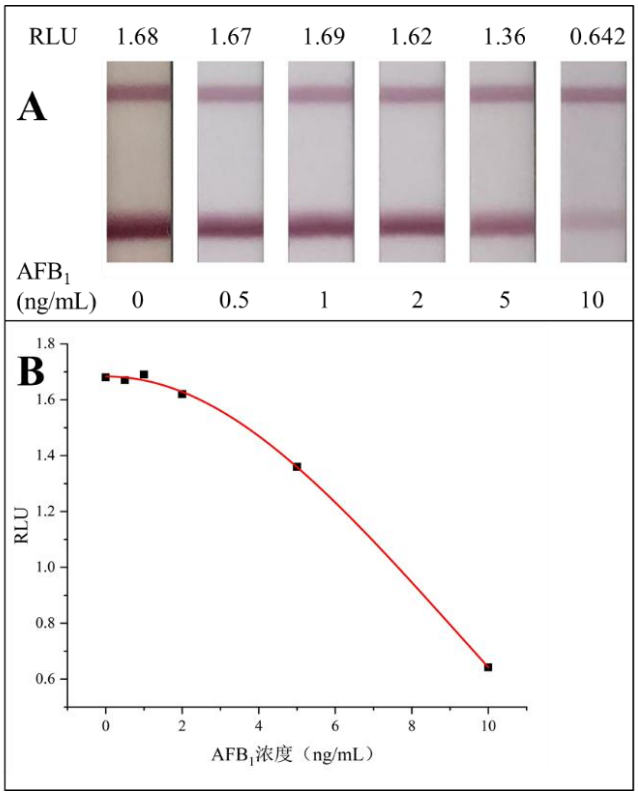

图 4.4 水溶液体系胶体金试纸条检测（A: 试纸条检测结果, B: 试纸条标准曲线）

Fig 4.4 Determination of colloidal gold immunochromatographic strip in aqueous solution (A: test results of strip, B: standard curve of strip)

在水溶液中 AFB_1 的胶体金试纸条标曲建立完成后，对 MB 吸附 25 mg MB 吸附 1mL 水中 200 ng 的 AFB_1 分别 5 min 和 10 min 并磁分离后的上清液进行检测。结果表明，200 ng/mL 的 AFB_1 溶液经试纸条检测后，T 线消线不显色。空白溶液的 T 线颜色较深，RLU 值在 1.6 以上。磁分离后的上清液经试纸条检测，发现 MB 吸附 5 min 和 10 min 后 AFB_1 浓度分别只有 4.7 和 5.7 ng/mL。这也表明 MB 对 AFB_1 的吸附效率在 97%以上，并且吸附 5 min 已经达到最大吸附效果。上述结果表明，MB 适用于对水溶液中 AFB_1 进行磁富集前处理。

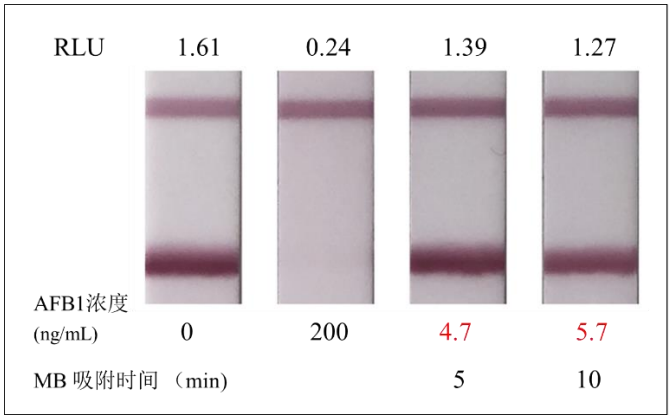

图 4.5 MB 吸附 AFB_1 后上清液胶体金试纸条检测

Fig 4.5 Colloidal gold immunochromatographic strip detection of AFB_1 supernatant in MB adsorption solution

4.3.3 免洗脱磁性固相萃取增敏胶体金试纸条验证与优化

为了研究 MB 与胶体金试纸条反应的影响，取 50 μL MB 溶液（AFB1 空白，1.25 mg MB）进行胶体金试纸条检测。将 MB 经过磁分离后，在离心管中加入 200 μL 样品稀释液，并混合均匀。接着将 200 μL 溶液加入到金标抗体微孔中，缓慢吸打均匀后插入试纸条进行检测。可以观察到部分 MB 材料聚集在样品垫和 NC 膜的连接处，由于 MB 的粒径较大所以不能通过 NC 膜。试纸条的 RLU 值为 1.63，与水溶液中 AFB_1 空白溶液的 RLU（1.68）没有明显差别。上述实验结果表明，MB 与金标抗体没有静电吸附，并且 MB 不会进入 NC 膜影响试纸条的正常反应。因此 MB 满足免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测的基本条件。

将 MB 与 200 ng/mL AFB_1 涡旋 10 min 后，分别取 1 和 20 μL MB 混合溶液，然后在磁场下弃去上清液，接着加入 200 μL 的样品稀释液并缓慢吸打均匀。然后将样品混合溶液加入含有冻干的金标抗体的微孔中。将微孔放置在磁体上，观察到 MB 沉淀后，用胶体金试纸条直接检测，反应 5 min 后取出试纸条进行读数分析。

如图 4.6 所示，胶体金试纸条可以检测到 AFB_1。说明作为具有较高亲和力的抗体，金标抗体可与 MB 表面吸附的 AFB_1 结合，并且 AFB_1-金标抗体复合物可以进行层析反应。我们收集了水、样品稀释液、金标抗体和磁分离后金标抗体，并进行紫外吸收光谱检测，如图中 4.7 所示。可以发现 MB-AFB_1 与金标抗体混合反应后的上清液与 AFB_1-金标抗体复合物的紫外吸收峰一致，说明金标抗体与 MB 表面吸附的 AFB_1 结合后，不会通过 MB 与 AFB_1 的吸附作用固定住。这是由于抗体对 AFB_1 的亲和力大于 MB 对 AFB_1 的螯合与疏水作用力，在抗原-抗体反应时起着洗脱 AFB_1 的作用。在试纸条层析过程中，AFB_1-金标抗体复合物受

到液体流动力的作用从 MB 表面脱落，然后通过 NC 膜，与 T 线和 C 线相互结合。

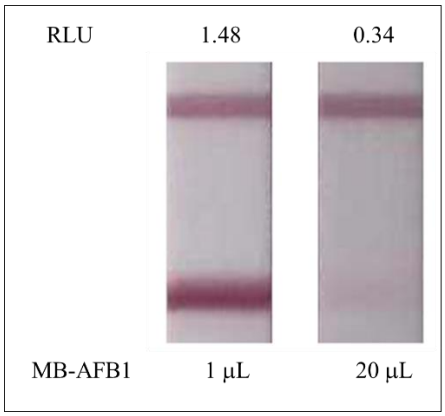

图 4.6 不同含量 MB-AFB1 经过磁分离后对 MB-AFB1 的胶体金试纸条检测

Fig 4.6 Colloidal gold immunochromatographic strip of MB-AFB1 with different contents after magnetic separation

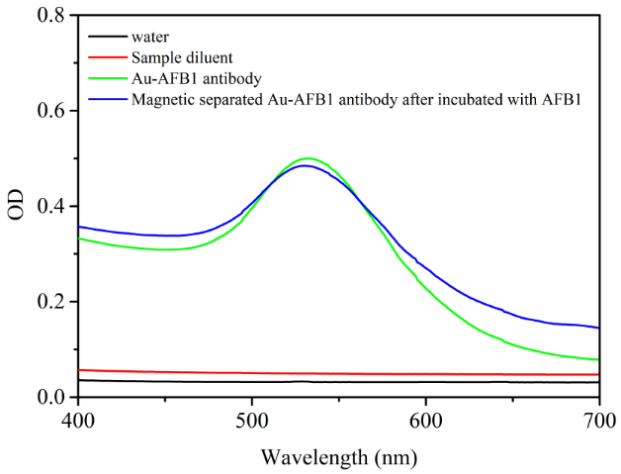

图 4.7 水、样品稀释液、金标抗体和磁分离后金标抗体的紫外光谱

Fig 4.7 UV spectra of water, sample dilution, gold-labeled antibody and gold-labeled antibody after magnetic separation

从图 4.6 可以看出，20 μL 的 MB-AFB_1 混合物经过胶体金试纸条检测后，试纸条的检测线消线，RLU 值明显低于 10 ng/mL 的 AFB_1 标准溶液。通过 RLU 标准曲线进行计算，得到金标抗体溶液中 AFB_1 的浓度为 16.87 ng/mL。这表示 20 μL 的 MB-AFB_1 混合物吸附了至少 3.37 ng AFB_1。即 25 mg MB 吸附了 168.7 ng 的 AFB_1。之前上清液的检测表明 MB 吸附了 97%以上的 AFB_1，即 25 mg MB 吸附了约 194 ng AFB_1。试纸条检测数值低于 MB 实际结合量，约为 86%。这主要由两方面引起，一方面可能是因为 MB 表面某些区域的 AFB_1 受到空间位阻的原因，使得抗原-抗体反应无法顺利进行，另一方面由于试纸条检测线几乎消线

导致检测不在线性范围。1 μL 的 MB-AFB_1 混合物由于取样体积小、MB 在溶液中稳定性不强并且容易沉降所以检测误差大。后续实际样品的检测中，MB 在使用前将进行超声处理，并且在样品富集后全部用于试纸条检测。

4.3.4 传统有机试剂洗脱研究

由于 AFB_1 与 MB 的结合主要是通过疏水作用，而有机溶剂中 MB 与 AFB_1 的疏水作用较小，因此可以将 AFB_1 洗脱下来。免洗脱的 MB-AFB_1 可以胶体金试纸条检测到 AFB_1，但无法将 MB 吸附的所有 AFB_1 检出，所以需要研究有机试剂洗脱对 AFB_1 检出率的影响。

将 25 mg MB 在含有 1 mL 200 ng/mLAFB_1 的离心管中涡旋 10 min 后，取 20 μL 的 MB-AFB_1 混合物，通过磁分离去除上清液，加入 200 μL 洗脱液涡旋 10 min 进行 AFB_1 的洗脱。选用甲醇、乙腈、乙醇、乙酸乙酯和水分别作为洗脱试剂对 MB-AFB_1 进行洗脱，将洗脱后的 MB 通过胶体金试纸条进行检测。试纸条检测结果如图 4.8 所示，各种洗脱溶剂洗脱后的 MB 的检测 RLU 值在 0.33-1.49 之间，按照洗脱效果进行排序：乙酸乙酯>乙醇>甲醇>乙腈>水。由于水无法洗脱 MB-AFB_1 表面的 AFB_1，所以根据 RLU 确定了各种洗脱溶剂的洗脱率。乙酸乙酯、乙醇、甲醇和乙腈分别为 76.9%、58.7%、51.4%、22.9%。由于 MB 对 AFB_1 的吸附力一部分来源于 Fe^{2+}和 Fe^{3+}对羰基的螯合，所以有机溶剂很难完全将 AFB_1 从 MB 表面洗脱下来，并且洗脱效率也会受到 AFB_1 在各种有机试剂中溶解度的影响。

将 MB-AFB_1 用洗脱效果较好的乙酸乙酯和乙醇重复洗脱 3 次，收集洗脱液，用氮气吹干后进行检测。如图所示 4.9，从 T 线颜色强度和 RLU 值可以发现，乙醇洗脱的 AFB_1 比乙酸乙酯洗脱的 AFB_1 多。通过 RLU 值标曲计算得到，乙醇和乙酸乙酯三次洗脱后，真实洗脱率分别为 74%和 45.5%。上述实验可以得出结论：MB 洗脱步骤不方便，耗时长，并且不能提高检测灵敏度。

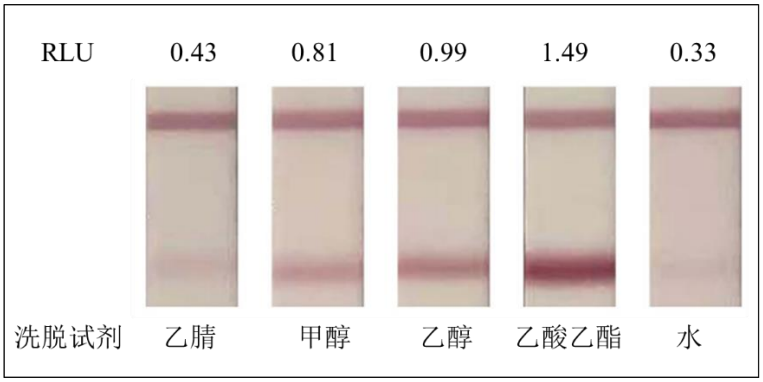

图 4.8 经过有机试剂洗脱的 MB-AFB_1 通过胶体金试纸条检测

Fig 4.8 MB-AFB_1 eluted with organic reagent was detected by colloidal gold immunochromatographic strip

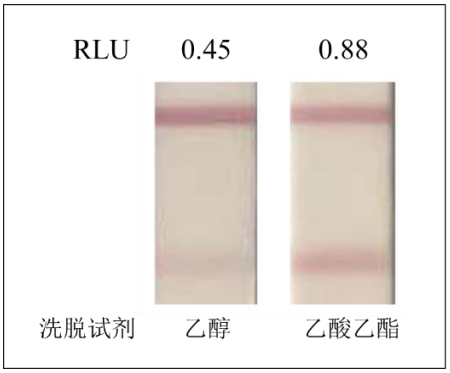

图 4.9 不同洗脱液三次洗脱下的 AFB_1 总量通过胶体金试纸检测

Fig 4.9 The total amount of AFB_1 under three elutions of different eluents was detected by colloidal gold immunochromatographic strip

4.3.5 胶体金试纸条在实际样品中的应用

4.3.5.1 大米样品基质

首先，将 20 mL 80%乙腈加入 5 g 大米中 2500 rpm 涡旋 5 min，然后 4000 rpm 离心 3 min，上清液用于制备 5 ng/mL AFB_1 样品溶液。为了研究 MB 在 80%乙腈对 AFB_1 的吸附能力，加入 1mg MB 到 1mL 样品添加溶液中进行富集，然后磁分离。磁分离后的 MB 不经过洗脱直接用胶体金试纸条检测。结果显示 AFB_1 含量很少，RLU 为 1.768。说明用 80%乙腈作为提取液时，提取物中的 AFB_1 很难被 MB 吸附。

传统的商业胶体试纸条减少有机试剂和样品基质干扰的最简单方法是将提取物用样品稀释液稀释后并进行检测。如图 4.10 所示，为了降低基质干扰，将大米阴性添加提取液（AFB_1 浓度为 0~80 ng/mL）用样品稀释液稀释 4 倍后检测时，RLU 从 1.51 降低到 0.46。由于受到有机溶剂和大米基质的影响，阴性样品的 RLU 值从水溶液基质中的 1.68（图 4.5）降低到 1.51，这样会使胶体金试纸条的检测灵敏度较低。

对于免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测，大米提取物液需要用氮气吹干，然后再用水复溶，这样能够使 MB 充分吸附样品中的 AFB_1。首先，制备一系列浓度的 AFB_1 样品提取溶液（0、2、5 和 10 ng/mL），将 1 mL 样品提取液氮吹干燥后，用 1mL 水涡旋 5 min 复溶。然后加入 1 mg MB 涡旋 5 min 富集 AFB_1。然后将 MB-AFB_1 磁分离后用 200 μL 样品稀释液混合均匀，并加入到含有冻干金标抗体的微孔中，插入试纸条进行检测。如图 4.11 所示，由于 MB 对胶体金试纸条的反应没有影响，所以空白样品的 RLU 值（1.67）与水溶液中的 RLU 值 1.68（图 4.5）是基本一致的。同时，由于样品经过了 MB 的富集，检测

的灵敏度得到了提高，这可以通过不同 AFB_1 浓度时的 RLU 与空白样品 RLU 的比值来体现。在通过传统稀释前处理方法进行检测时，RLU（10 ng/mL AFB_1）/RLU（空白）= 0.82，而用免洗脱磁性固相萃取进行前处理后 RLU（10 ng/mL AFB_1）/RLU（空白）= 0.36。这说明免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条可以显著提高大米中 AFB_1 的检测灵敏度。

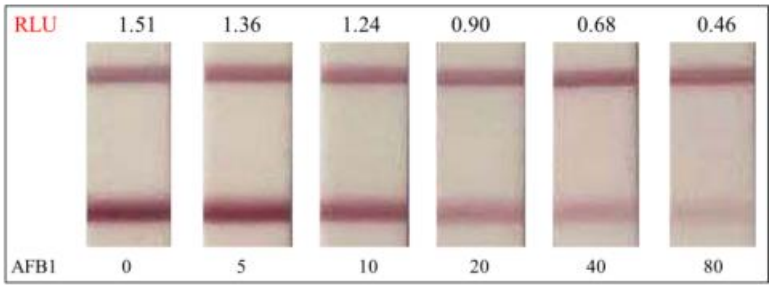

图 4.10 传统稀释法前处理结合胶体金试纸条对 AFB_1 的检测

Fig 4.10 Determination of AFB_1 by colloidal gold immunochromatographic strip with pretreatment by traditional dilution method

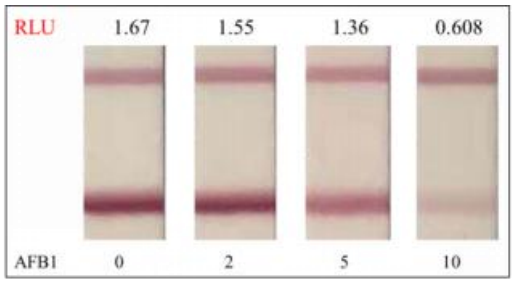

图 4.11 大米基质中免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条法对 AFB_1 的检测效果

Fig 4.11 Detection effect of AFB_1 in rice matrix by free elution magnetic solid phase extraction combined with colloidal gold immunochromatographic strip

4.3.5.2 糙米样品基质

糙米的基质复杂程度较大米而言较高，因为其表面比大米多了糊粉层。将糙米的阴性添加提取液按照与大米检测相同的方法进行传统稀释法前处理与免洗脱磁性固相萃取前处理分别进行试纸条检测。检测结果如图 4.12 所示，可以看到在低 AFB_1 浓度时，两种检测方法都不稳定，甚至稀释法的 RLU（4 ng/mL AFB_1）/RLU（空白）> 1。这表明非常低含量的 AFB_1 很难从复杂的基质中富集，糊粉层中的蛋白质和脂质会影响其吸收过程。但是在 AFB_1 浓度提高后，采用稀释法时，RLU（10 ng/mL AFB_1）/RLU（空白）= 0.85；而采用免洗脱磁性固相萃取时 RLU（10 ng/mL AFB_1）/RLU（空白）= 0.65，说明免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条检测的灵敏度要大于稀释法。

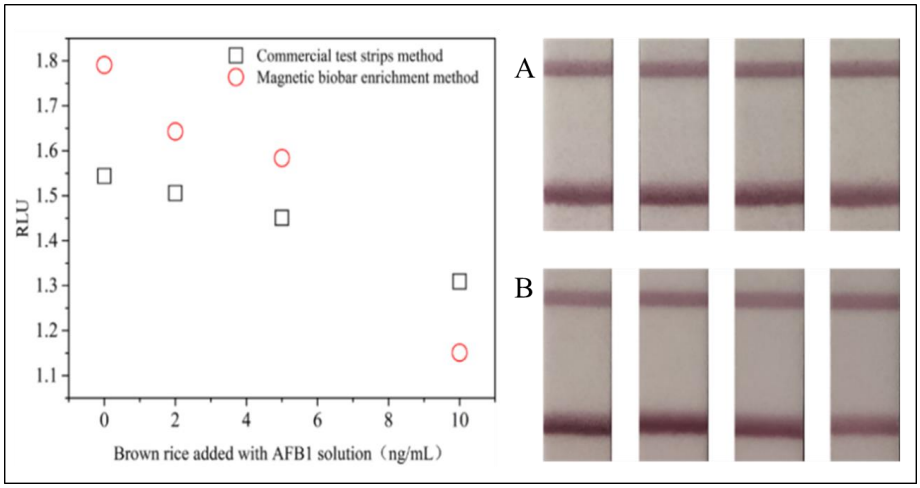

图 4.12 糙米基质中免洗脱磁性固相萃取与传统稀释法前处理通过胶体金试纸条法对 AFB_1 的检测效果（A:稀释法前处理，B:免洗脱磁性固相萃取前处理）

Fig 4.12 Detection effect of AFB_1 in brown rice matrix by free elution magnetic solid phase extraction or traditional dilution method combined with colloidal gold immunochromatographic strip (A: traditional dilution method, B: free elution magnetic solid phase extraction)

4.3.5.3 玉米样品基质

选用 AFB_1 参考物质（玉米）用于免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条方法的评价，玉米中 AFB_1 含量分别为 0.05、5.8 和 23.3 μg/kg。样品提取液经过氮吹、复溶、富集、磁分离后，通过试纸条检测。在大米和糙米的检测中，1 mL 样品提取液的富集效果较为良好，为了了解样品本提取液体积对免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条方法的影响，选择在玉米基质中 AFB_1 的 MB 富集时，使用 200 μL 和 1000 μL 两个样品本提取液体积，结果如图 4.13 所示。

AFB_1 含量为 0.05 和 5.8 μg/kg 的样品用稀释法前处理所测得 RLU 值分别为 1.74、1.41。当使用 200 μL 的样本提取液进行 AFB_1 富集时，试纸条的 RLU 值为 1.88 和 1.56，说明减小样本提取液体积后，MB 对 AFB_1 的吸附效率不高导致检测的灵敏度不如传统稀释法前处理。取 1000 μL 的样本提取液（AFB_1 含量 5.8 μg/kg）进行免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条法时 RLU 为 1.03，RLU 比稀释法（1.41）小。这表明大体积的样品提取液对 MB 的基质干扰的提升小于 MB 对 AFB_1 的富集程度的提高。以 MB 为 AFB_1 吸附材料建立的免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条法适合大体积的样本提取液，这样能够提高 MB 富集 AFB_1 的含量，从而提高该方法的检测灵敏度。

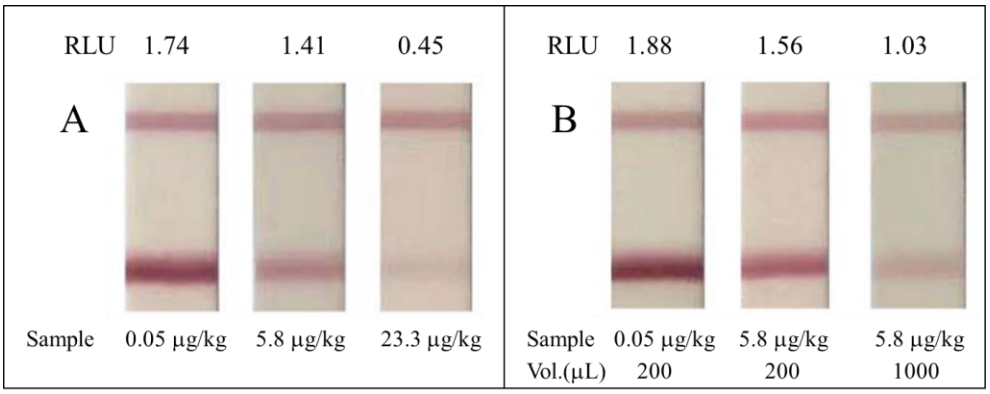

图 4.13 玉米基质中胶体金试纸条法对 AFB_1 的检测（A:稀释法前处理，B:免洗脱磁性固相萃取前处理）

Fig 4.13 Detection of AFB_1 in corn matrix with colloidal gold immunochromatographic strip (A: traditional dilution method, B: free elution magnetic solid phase extraction)

4.4 本章小结

1、以稻壳为原料，通过一步法制备了磁性稻壳生物炭（MB），并且对其进行 SEM-EDX 、FTIR 和 XRD 表征。结果表明合成的 MB 粒径在几十微米以内，并且表面修饰了 Fe_3O_4 磁性纳米粒子，MB 的合成是成功的。

2、作为一种碳基材料，MB 对 AFB_1 的吸附作用主要来自疏水相互作用，由于 AFB_1 是极性真菌毒素，所以 MB 可以在水中吸附 AFB_1。实验结果表明，MB 在水中对 AFB_1 的吸附容量和吸附效率都较高。1mg MB 在水中对 AFB_1 吸附容量达到 892 ng 以上，25 mg MB 在 10 min 内对 1mL 水中的 200 ng AFB_1 的吸附率达到 97%。

3、MB 与其他碳基材料不同，它不具有大量的官能团和极大的比表面积，因此 MB 对 AFB_1 金标抗体不存在静电吸附力，不会影响胶体金试纸条的正常反应。当 MB-AFB_1 复合物与金标抗体混合反应时，由于抗体对 AFB_1 的亲和力大于 MB 对 AFB_1 的吸附力，所以 MB 表面的 AFB_1 会从其表面脱落，并形成 AFB_1-金标抗体复合物进行试纸条的层析反应。免洗脱磁性固相萃取后试纸条的检测结果表明 MB 表面的大部分 AFB_1 的可以被检出， MB 表面的一部分 AFB_1 可能受到空间位阻的影响，导致 AFB_1 无法与金标抗体结合。

4、AFB_1 经过磁性固相萃取后通过有机溶剂洗脱。结果表明不同有机试剂的洗脱效率存在差异，但有机试剂洗脱后的 MB-AFB_1 仍可通过试纸条检测到 AFB1。说明在有机溶剂中，MB 与 AFB_1 之间虽然不存在明显的疏水作用，但 MB 的铁离子与 AFB_1 的羰基之间仍有一定的螯合作用，所以无法完全洗脱。同时，有机溶剂洗脱操作复杂、危害大。

5、将免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条在优化后在大米、糙米和玉米基质中进行 AFB_1 的检测。在不同的样品基质中，免洗脱磁性固相萃取结合胶体金试纸条的灵敏度都大于传统稀释前处理，但是由于基质复杂程度不同，灵敏度的提升效果存在区别。总之，基于磁性稻壳生物炭的免洗脱磁性固相萃取前处理结合胶体金试纸条对 AFB_1 的检测方法在降低样品基质干扰、提升胶体金试纸条灵敏度方面具有巨大的应用前景。

结论与展望

全文总结

1、本实验通过对 AFB1 和 DON 衍生并通过碳二亚胺法与载体蛋白偶联合成了 AFB_1 和 DON 的免疫抗原和包被抗原，通过紫外吸收光谱、蛋白质电泳和分子量质谱对包被抗原进行了表征。两种抗原采用合适的剂量对小鼠免疫并进行血清检测后，选择了两只免疫效果较好的小鼠进行 PEG 细胞融合。经过三次细胞亚克隆筛选，得到了两株可以稳定分泌 AFB_1 和 DON 抗体的杂交瘤细胞。将辛酸-硫酸铵纯化法与蛋白 G 凝胶层析纯化法相结合，从小鼠腹水中得到了高纯度的 AFB_1 和 DON 单克隆抗体，两种单抗都是 IgG1 亚型。AFB_1 和 DON 单抗的亲和力分别为 6.22×10^9 L/mol 和 7.69×10^8 L/mol，都属于高亲和力抗体。经过棋盘法获得最佳包被浓度后，测得 AFB_1 和 DON 单抗的 IC_{50} 分别达到 0.058 ng/mL 和 7.88 ng/mL。AFB_1 单抗对 AFB_2、AFG_1、AFG_2 和 AFM_1 交叉反应率分别为 12.5%、50%、0%和 3%，DON 单抗对 3-AcDON 和 15-AcDON 的交叉反应率为 376.1%和 3.43%。

2、开发了三重检测线胶体金免疫层析试纸条（TTLS）用于对小麦中的 DON 进行肉眼半定量与仪器协助定量检测。TTLS 的设计是基于不同浓度包被抗原对金标抗体捕获能力的差异，经过优化后选择 0.3、0.1 和 0.03 mg/mL 的 DON 分别喷涂在 NC 膜上作为检测线 1、2 和 3，控制线喷涂 0.5 mg/mL 的羊抗鼠 IgG。同时，对与微孔中冻干金标抗体反应的样品稀释液的体积进行了优化，发现 100 μL 时试纸条显色较好。此外，由于 DON 单克隆抗体对 DON 的高亲和力，样品稀释液与金标抗体的反应无需温育。TTLS 在对阴性添加小麦样品检测时，通过四条线的显色对比获得了 4 个视觉阈值，分别是 200、500、1000 和 2000 μg/kg。在对 35 个小麦实际样品根据肉眼阈值进行半定量测定后，通过与 UPLC-MS/MS 的检测结果相比，发现 TTLS 的肉眼半定量阈值代表了实际样品的最低 DON 含量。此外，TTLS 的三条检测线和一条控制线可以在胶体金读数仪的协助下根据获得的 RLU 值进行 DON 定量检测。检测结果表明，三条检测线的检测平均值与 UPLC-MS/MS 的检测值一致性良好，其对低 DON 污染小麦的检测稳定性优于传统单检测线胶体金试纸条（STLS）。

3、为了改善传统胶体金试纸条直接稀释法对其检测灵敏度的影响，我们以稻壳为原料，通过一步法成功合成了磁性稻壳生物炭（MB）并建立了免洗脱磁性固相萃取前处理结合胶体金试纸条对 AFB_1 检测的方法。MB 在水中可以通过强烈的疏水作用以及较小的螯合作用对 AFB_1 进行吸附，其对 AFB_1 吸附容量与

吸附效率较高，1mg MB 在水中对 AFB1 吸附容量达到 892 ng 以上，25 mg MB 在 10 min 内对 1mL 水中的 200 ng AFB1 的吸附率达到 97%。MB 对金标抗体没有静电吸附，对金标抗体与 AFB_1 的结合反应无干扰。由抗体对 AFB_1 的高亲和力，MB 表面富集的 AFB_1 与金标抗体结合后会经过溶液流动脱离 MB，并且 MB 自身由于粒径大无法进入 NC 膜而对试纸条层析显色产生不良影响。以上情况满足于免洗脱磁性固相萃取前处理结合胶体金试纸条对 AFB_1 检测方法的建立。将 MB-AFB_1 混合溶液与金标抗体反应后通过胶体金试纸条检测，发现胶体金试纸条可以检测到 MB 吸附的大部分的 AFB_1。MB-AFB_1 用有机溶剂洗脱后再检测的方法由于洗脱效率低、操作复杂并且有机试剂具有毒性，不适用于对 AFB_1 的快速检测。在对大米、糙米和玉米中 AFB_1 进行检测后，发现免洗脱磁性固相萃取前处理结合胶体金试纸条方法灵敏度高于传统样品稀释前处理，尤其是在中等 AFB_1 污染的情况下。该方法可以显著提升胶体金试纸条的抗基质干扰能力和检测灵敏度。

创新点

1、制备了高灵敏度的 DON 单克隆抗体，在此基础上开发了三重检测线胶体金试纸条（TTLS）用于肉眼半定量检测 DON。通过 4 个视觉阈值实现小麦中 DON 的肉眼半定量检测。试纸条的三条检测线可通过胶体金读数仪实现 DON 的定量检测，并且低浓度 DON 下的检测稳定性优于传统胶体金试纸条

2、制备了高灵敏度 AFB_1 单克隆抗体，并基于合成的磁性稻壳生物炭开发了免洗脱磁性固相萃取前处理结合胶体金试纸条对粮食中 AFB_1 检测的方法。该方法免去传统固相萃取磁分离后对目标物洗脱的步骤，提高胶体金试纸条对粮食中 AFB_1 检测的抗基质干扰能力和灵敏度。

展望

1、本实验单克隆抗体的制备是传统的动物免疫结合细胞融合来实现的。未来可以通过抗体改造实现抗体性能的提升，从而使得免疫学检测更加灵敏。

2、开发的肉眼半定量检测试纸条（TTLS）只设置了三条检测线与一条控制线。未来可以通过更多检测线的设置实现更多肉眼检测阈值，提升半定量检测的精确性。同时，可以采用更样品进行前处理净化与毒素富集，实现肉眼半定量更小的误差。

3、由于 TTLS 需要 DON 浓度较高的样本溶液使得试纸条的显色差异明显，所以传统的样本直接稀释法无法稀释较多倍数，这使得实际样品的检测容易受到基质干扰的影响，导致检测结果具有一定偏差。另一方面，TTLS 的三条检测线包被同一种抗原，并且对同样的物质进行吸附，导致试纸条下方的检测线的误差会带来上方检测线的更大的误差，这也是 TTLS 抗基质干扰不够的一个方面。未来的发展方向可以在前处理方面继续研究，提高 TTLS 的检测精确度。

4、MB 是为了避免其对金纳米粒子的静电作用力而设计合成的，它对真菌毒素的吸附能力不如其他的碳基材料，对 AFB_1 的吸附主要是通过在 AFB_1 在水中的疏水作用，但对 DON 等在水中和有机溶剂中溶解性极强的真菌毒素无法通过强烈的疏水作用结合，所以限制了 MB 的使用范围，无法解决 TTLS 抗基质干扰能力较弱的缺点。未来可以在 MB 的基础上修饰和引入更多的官能团，实现在对金纳米粒子无吸附的同时增加对各种真菌毒素的吸附能力，将免洗脱磁性固相萃取结合免疫层析试纸条的检测方法应用更为广泛。

参考文献

[1] 常晓娇，王峻，孙长坡，等. 二氧化氯对几种主要真菌毒素的降解效果研究 [J]. 中国粮油学报, 2016, 31(09): 113-118.

[2] 陈敏. 花生油中黄曲霉毒素 B_1 激光诱导荧光检测方法研究 [D]. 南京：南京财经大学, 2021.

[3] 陈瑞鹏，孙云凤，霍冰洋，等. 表面增强拉曼光谱技术在真菌毒素检测中的应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(05): 342-348+356.

[4] 戴煌，武旭悦，黄金发，等. 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测方法研究进展 [J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 319-328.

[5] 傅勇，曹纪亮，杨小丽，等. 真菌毒素检测的前处理技术及其应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(06): 1462-1466.

[6] 管笛. 黄曲霉毒素 M_1 单克隆抗体及检测技术研究 [D]. 中国农业科学院, 2011.

[7] 郭红艳，杨家庆，刘园，等. 呕吐毒素的食品污染、吸收代谢及肠道毒性研究进展 [J]. 食品科学: 1-12

[8] 韩艺烨，邓年，谢建军，等. 酸辅助分散液液微萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定果汁中多种真菌毒素 [J]. 分析化学, 2019, 47(03): 455-462.

[9] 胡冰，时浩楠，胡本伦，等. 食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(01): 106-118.

[10] 胡文尧，龙美名，胡玉斐，等. 食品中真菌毒素样品前处理方法的研究进展 [J]. 色谱, 2020, 38(03): 307-316.

[11] 华宇，高和杨，聂兴娜，等. 同位素内标-高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶及奶粉中黄曲霉毒素 M1 [J].食品安全质量检测学报, 2020, 11(06): 1978-1984.

[12] 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.

[13] 孔德昭. 食品中真菌毒素抗体制备及其快速检测方法研究 [D]. 无锡：江南大学, 2017.

[14] 孔志康，袁建，邢常瑞，等. 磁性纳米材料在食品危害物质分析样品前

处理中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7346-7353.

[15]刘胜利. 四种真菌毒素高效液相色谱检测方法的建立和山东省饲料中真菌毒素污染调查 [D]. 南京：南京农业大学, 2011.

[16]任美玲. 量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测玉米中的黄曲霉毒素B1. 2015, 南昌大学.

[17]沈飞，吴启芳，姜大峰，等. 基于电子鼻技术的糙米黄曲霉毒素污染快速检测方法研究 [J]. 中国粮油学报, 2017, 32(06): 146-151.

[18]孙震, 冯才伟, 李勇, 等. 呕吐毒素单克隆抗体制备及鉴定 [J]. 动物医学进展, 2012, 33(11): 90-94.

[19]王晓，王秀嫔，李培武，等. 农产品中真菌毒素样品前处理和检测方法研究进展 [J]. 化学试剂, 2019, 41(04): 325-332.

[20]王蓓蓓，陈琛，李崇勇，等.食品中黄曲霉毒素的前处理与检测方法进展[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(11): 1-5.

[21]吴启芳. 激光诱导荧光光谱的开心果黄曲霉毒素 B_1 污染检测方法研究[D]. 浙江：浙江大学, 2020.

[22]武琳霞，翟文磊，韦迪哲，等. 无损检测技术在真菌鉴定及毒素检测中的应用 [J]. 食品科学, 2020, 41(21):248-258.

[23]谢珲，章先，王歆，等. 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及间接竞争ELISA 检测技术研究 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 2033-2040.

[24]邢常瑞. 重金属与微囊藻毒素单克隆抗体制备和快速检测技术研究 [D]. 无锡：江南大学,2016.

[25]徐洪文，朱瑜，徐华，等. 高效液相色谱法测定食用植物油中 6 种真菌毒素 [J]. 中国油脂, 2020, 45(11): 77-83.

[26]叶萍，张慧娥，李光，等. 质谱技术在黄曲霉毒素检测中的研究进展 [J]. 食品与机械, 2021, 37(10): 227-234+240.

[27]张崇霞，朱延光，李志民，等. 臭氧处理储粮中真菌毒素及对品质影响的研究进展 [J]. 粮油仓储科技通讯, 2021, 37(05):36-40.

[28]张东升，严艺琳，熊晓辉，等. 呕吐毒素时间分辨荧光免疫层析法的建立与评价 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 233-239.

[29]张蕊. 分散液液微萃取技术用于凉茶中农药和真菌毒素检测的研究 [D]. 广州：华南农业大学, 2019.

[30]张勋. 真菌毒素类高灵敏高通量快速检测方法研究 [D]. 无锡：江南大学, 2014.

[31]张银志，金萍，孙秀兰,等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)直接竞争 ELISA 方法的建立 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(01): 28-32.

[32]周煜，蔡瑞，岳田利，等. 低温等离子体在食品中杀灭微生物与降解真菌毒素研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(14): 209-218.

[33]朱云，徐琳娜，师征杰，等. 胶体金快速试纸条法测定小麦及其制品中呕吐毒素 [J]. 粮油食品科技, 2017, 25(03): 54-56.

[34]Alisaac E, Behmann J, Rathgeb A, et al. Assessment of Fusarium Infection and Mycotoxin Contamination of Wheat Kernels and Flour Using Hyperspectral Imaging [J]. Toxins, 2019, 11(10): 556.

[35]Alshannaq A, Yu J H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(6): 632.

[36]Baig S A, Jin Z, Muhammad N, et al. Effect of synthesis methods on magnetic Kans grass biochar for enhanced As(III, V) adsorption from aqueous solutions [J]. Biomass & Bioenergy, 2014, 71(dec.): 299-310.

[37]Beatty J D, Beatty B G. Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1-2): 173-179

[38]Beitollahi H, Tajik S, Dourandish Z, et al. Recent Advances in the Aptamer-Based Electrochemical Biosensors for Detecting Aflatoxin B1 and Its Pertinent Metabolite Aflatoxin M1 [J]. Sensors (Basel, Switzerland), 2020, 20(11): 3256.

[39]Cate DM, Dungchai W, Cunningham JC, et al., Simple, distance-based measurement for paper analytical devices [J]. Lab on a Chip, 2013, 13(12): 2397-2404.

[40] Chen B, Chen Z, Lv S. A novel magnetic biochar efficiently sorbs organic pollutants and phosphate [J]. Bioresource Technology 2011, 102 (2), 716-723.

[41] Chen M, He X, Pang Y, et al. Laser induced fluorescence spectroscopy for detection of Aflatoxin B1 contamination in peanut oil [J]. Journal of Food Measurement and Characterization 2021, 15(3), 2231-2239.

[42] Climent E, Rurack K. Combining Electrochemiluminescence Detection with Aptamer-Gated Indicator Releasing Mesoporous Nanoparticles Enables ppt Sensitivity for Strip-Based Rapid Tests [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(50): 26287-26297.

[43] Cruz A, Lynch T J, Dionysiou D D. The Effects of Sample Matrices on Immunoassays to Detect Microcystin-LR in Water [J]. Journal of Environmental Protection, 2012, 3(10): 1275-1285 .

[44] Cvak B, Pum D, Molinelli A, et al. Synthesis and characterization of colloidal gold particles as labels for antibodies as used in lateral flow devices [J]. Analyst, 2012, 137(8): 1882-1887.

[45] D Gizachew, Chang C H, Szonyi B, et al. Aflatoxin B1 (AFB1) production by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus on ground Nyjer seeds: The effect of water activity and temperature [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 296: 8-13.

[46] D'Agnello P, Vita V, Franchino C, et al. ELISA and UPLC/FLD as Screening and ConfirmatoryTechniques for T-2/HT-2 Mycotoxin Determination in Cereals [J]. Applied Sciences, 2021, 11(4): 1688.

[47] Devi K T, Mayo M A, Reddy K, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B1 [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 29(5): 284-288.

[48] Dong-Ho K, Sung-Yong H, Jea K, et al. Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS [J]. Toxins, 2017, 9(3): 106.

[49] Elem Tamirys Caramês, Piacentini K C, Alves L T, et al. NIR spectroscopy

and chemometric tools to identify high content of deoxynivalenol in barley [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2020: 1-11.

[50] Foubert A, Beloglazova N V, Gordienko A V, et al. Development of a Rainbow Lateral Flow Immunoassay for the Simultaneous Detection of Four Mycotoxins [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(33):7121-7130.

[51] Gasperino D J, Leon D, Lutz B, et al. Threshold-Based Quantification in a Multiline Lateral Flow Assay via Computationally Designed Capture Efficiency [J]. Anal Chem, 2018, 90(11): 6643-6650.

[52] Giorni P, Magan N, Pietri A, et al. Growth and aflatoxin production of an Italian strain of Aspergillus flavus: Influence of ecological factors and nutritional substrates [J]. World Mycotoxin Journal, 2011, 4(4):425-432.

[53] Hendrickson O D, Zvereva E A, Zherdev A V, et al. Ultrasensitive lateral flow immunoassay of phycotoxin microcystin-LR in seafood based on magnetic particles and peroxidase signal amplification [J]. Food Control. 2021.

[54] Heussner A H, Simon A, Dietrich D R. Development and Characterization of a Monoclonal Antibody against Ochratoxin B and Its Application in ELISA [J]. Toxins, 2010, 2(6):1582-1594.

[55] Hua Z, Yu T, Liu D, et al. Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021(6):113076.

[56] Huang X, Huang X, Xie J, et al., Rapid simultaneous detection of fumonisin B1 and deoxynivalenol in grain by immunochromatographic test strip [J]. Anal Biochem, 2020, 606: 113878.

[57] Indika, Herath, Prasanna, et al. Mechanistic modeling of glyphosate interaction with rice husk derived engineered biochar [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2016.

[58] J Csapó, Albert C, Sipos P. The aflatoxin content of milk and dairy products as well as breast milk and the possibilities of detoxification [J]. Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria, 2020, 13(1):99-117.

[59]J. L, Xiong, Y. M, et al. Effects of dietary adsorbent on milk aflatoxin M 1 content and the health of lactating dairy cows exposed to long-term aflatoxin B 1 challenge [J]. Journal of Dairy Science,2018,101(10).

[60]Ji F, Li H, Xu J, et al. Enzyme-linked immunosorbent-assay for Deoxynivalenol (DON) [J]. Toxins (Basel), 2011, 3(8): 968-78.

[61]Kolawole O, Meneely J, Petchkongkaew A, et al. A review of mycotoxin biosynthetic pathways: associated genes and their expressions under the influence of climatic factors [J]. Fungal Biology Reviews, 2021, 37(1): 8-26.

[62]Kong D, Liu L, Song S, et al. A gold nanoparticle-based semi-quantitative and quantitative ultrasensitive paper sensor for the detection of twenty mycotoxins [J]. Nanoscale，2016, 8 (9): 5245-5253.

[63]Kuang H, Chen W, Yan W, et al. Crown ether assembly of gold nanoparticles: melamine sensor [J]. Biosensors and Bioelectronics,2011,26(5): 2032-2037.

[64]Leung W, Chan C P, Rainer T H, et al. InfectCheck CRP barcode-style lateral flow assay for semi-quantitative detection of C-reactive protein in distinguishing between bacterial and viral infections [J]. Journal of Immunological Methods, 2008, 336(1): 30-36.

[65]Li C Z, Vandenberg K, Prabhulkar S, et al. Paper based point-of-care testing disc for multiplex whole cell bacteria analysis [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26(11): 4342-4348.

[66]Li N, Qiu J, Qian Y. Polyethyleneimine-modified magnetic carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the analysis of multi-class mycotoxins in milk via LC-MS/MS [J]. Journal of separation science,2020, 44(2): 636-644.

[67]Li R, Li Y, Su Y, et al., Short-term ingestion of deoxynivalenol in naturally contaminated feed alters piglet performance and gut hormone secretion [J]. Anim Sci J, 2018, 89(8): 1134-1143.

[68]Li X, Li P, Zhang Q, et al. Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in

agro-food [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 49: 426-32.

[69] Li Y A, Lr B, Qi C A, et al. Rapid and direct concentration range judgment of lamotrigine in plasma by the multi test lines with different detection limits on the same lateral flow strip [J]. Analytica Chimica Acta. 2022.

[70] Lv C, Jin J, Wang P, et al. Interaction of water activity and temperature on the growth, gene expression and aflatoxin production by Aspergillus flavus on paddy and polished rice [J]. Food Chemistry 2019, 293: 472-478.

[71] M Cüce. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and deoxynivalenol in food commodities from Turkey [J]. Journal of Food Safety, 2020, 40(6).

[72] Marie-Caroline S, Madec Stéphanie, Emmanuel C, et al. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects [J]. Toxins, 2016, 8(4):94.

[73] Mielniczuk E, Skwaryo-Bednarz B. Fusarium Head Blight, Mycotoxins and Strategies for Their Reduction [J]. Agronomy, 2020, 10(4): 509.

[74] Morimura H, Ito M, Yoshida S, et al. In Vitro Assessment of Biocontrol Effects on Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol (DON) Accumulation by DON-Degrading Bacteria [J]. Toxins, 2020, 12(6): 399.

[75] Pallarés N, Font G, Mañes J, et al. Multimycotoxin LC-MS/MS Analysis in Tea Beverages after Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2017, 65(47): 10282-10289.

[76] Pedroso Pereira L T, Putnik P, Iwase C, et al. Deoxynivalenol: insights on genetics, analytical methods and occurrence [J]. Current Opinion in Food Science, 2019, 30: 85-92.

[77] Pestka, J.J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance [J]. Arch Toxicol, 2010, 84(9): 663-79.

[78] Pirouz A A , Karjiban R A , Bakar F A , et al. A Novel Adsorbent Magnetic Graphene Oxide Modified with Chitosan for the Simultaneous Reduction of Mycotoxin s[J]. Toxins, 2018, 10(9): 361.

[79] Rahman M M, Park J H, El-Aty A M A, et al. Feasibility and application of an HPLC/UVD to determine dinotefuran and its shorter wavelength metabolites residues in melon with tandem mass confirmation [J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 1038-1046.

[80] Saha Turna N, Wu F. Risk assessment of aflatoxin-related liver cancer in Bangladesh. Food additives & contaminants [J]. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment，2019, 36(2): 320-326.

[81] Shao J, Pei Z, Jing H, et al. Antifungal activity of myriocin against Fusarium graminearum and its inhibitory effect on deoxynivalenol production in wheat grains [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2021, 114(12): 101635.

[82] Shen Z, Zhang Y, Mcmillan O, et al. Characteristics and mechanisms of nickel adsorption on biochars produced from wheat straw pellets and rice husk [J]. Environmental Science & Pollution Research, 2017, 24(14):12809-12819.

[83] Sun L, Li Y, Wan H, et al. An aptamer assay for aflatoxin B1 detection using Mg2+ mediated free zone capillary electrophoresis coupled with laser induced fluorescence [J]. Talanta，2019, 204: 182-188.

[84] Sun M, Li P, Jin X, et al. Heavy metal adsorption onto graphene oxide, amino group on magnetic nanoadsorbents and application for detection of Pb(II) by strip sensor [J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 1053-1073.

[85] Suquan, Song, Na, et al. Multiplex Lateral Flow Immunoassay for Mycotoxin Determination [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(10): 4995-5001.

[86] Tahoun I F, Gab-Allah M A, Yamani R N, et al. Development and validation of a reliable LC-MS/MS method for simultaneous determination of deoxynivalenol and T-2 toxin in maize and oats [J]. Microchemical Journal, 2021, 169.

[87] Urbanek KA, Habrowska-Górczyńska DE, Kowalska K, et al., Deoxynivalenol as potential modulator of human steroidogenesis [J]. J Appl Toxicol, 2018, 38(12): 1450-1459.

[88] Urusov AE, Gubaidullina MK, Petrakova AV, et al. A new kind of highly sensitive competitive lateral flow immunoassay displaying direct analyte-signal dependence. Application to the determination of the mycotoxin deoxynivalenol [J]. Mikrochimica Acta An International Journal for Physical & Chemical Methods of Analysis, 2017, 185(1): 29.

[89] Vega M, Mu?Oz, C Sepúlveda, et al. Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market [J]. Food Control, 2009, 20(7): 631-634.

[90] Vicente S, Pok PS, García Londoño VA, et al. Aflatoxins distribution in fractions derived from tofu production [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2019, 36(10): 1559-1566.

[91] Vithanage M, Mayakaduwa S S, Herath I, et al. Kinetics, thermodynamics and mechanistic studies of carbofuran removal using biochars from tea waste and rice husks [J]. Chemosphere, 2016, 150(May):781-789.

[92] Wang C, Zhang L, J Luo, et al. Development of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for high-throughput detection and risk assessment of aflatoxin B1 in animal-derived medicines [J]. Toxicon, 2021, 197: 99-105.

[93] Wang L, Sun J, Ye J, et al. One-step extraction and simultaneous quantitative fluorescence immunochromatography strip for AFB1 and Cd detection in grain [J]. Food Chemistry 2022, 374, 131684.

[94] Wang X, Li P. Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC-MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run [J]. Food Chemistry, 2015, 173(apr.15):897-904.

[95] Wu L, Wang M, Wei D. Advances in gold nanoparticles for mycotoxin analysis [J]. Analyst, 2021, 146(6): 1793-1806.

[96] Xing C, Dong X, Xu T, et al. Analysis of multiple mycotoxins-contaminated wheat by a smart analysis platform [J]. Analytical Biochemistry, 2020,

610:113928.

[97] Xing C, Liu L, Song S, et al. Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 66C: 445-453.

[98] Yang X, Huang Z B, He Q H, et al. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of deoxynivalenol in wheat and maize [J]. Food Chemistry, 2010, 119(2): 834-839.

[99] Yin H, Li Y, Tsai W, et al. An immunochromatographic assay utilizing magnetic nanoparticles to detect major peanut allergen Ara h 1 in processed foods [J]. Food Chemistry 2022, 375, 11.

[100] Zain M E. Impact of mycotoxins on humans and animals [J]. Journal of Saudi Chemical Society, 2011, 15(2):129-144.

[101] Zhan S, Hu J, Li Y, et al. Direct competitive ELISA enhanced by dynamic light scattering for the ultrasensitive detection of aflatoxin B1 in corn samples [J]. Food Chem, 2021, 342: 128327.

[102] Zhang Y, Zhou C, Nie J, et al. Equipment-Free Quantitative Measurement for Microfluidic Paper-Based Analytical Devices Fabricated Using the Principles of Movable-Type Printing [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(4): 2005-2012.

[103] Zhao X, Schaffner D W, Yue T. Quantification of aflatoxin risk associated with Chinese spices: Point and probability risk assessments for aflatoxin B1 [J]. Food Control, 2013, 33(2):366-377.