

基于 HRP 标记抗体的黄曲霉毒素 M1 的直接竞争 - ELISA 快速检测方法

裴世春¹, 肖理文²

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 上海优你生物科技股份有限公司, 上海 201616)

摘要: 为构建快速检测乳制品中黄曲霉毒素 M1(AFM1)的直接竞争 - 酶联免疫吸附(dc-ELISA)体系, 将辣根过氧化物酶(HRP)与高纯度抗 AFM1 单克隆抗体进行偶联后对其与 AFM1 竞争性反应条件进行优化, 并利用 AFM1 污染标准物质 ERMI-BD282(0)、ERMI-BD 283(0.11 $\mu\text{g/kg}$)、ERMI-BD 284(0.44 $\mu\text{g/kg}$)等对检测体系的灵敏度和精确性进行验证。结果当 AFM1-BSA 包被质量浓度 0.25 $\mu\text{g/L}$ 、抗 AFM1 mAb-HRP 稀释 2000 倍时 dc-ELISA 检测 AFM1 的 IC_{50} 为 0.75 $\mu\text{g/L}$, 检测范围为 0.015~4.05 $\mu\text{g/L}$, 添加 AFM1 至 0.45 $\mu\text{g/L}$ 的鲜奶样品中检测回收率平均为 80%, dc-ELISA 可满足鲜乳中 AFM1 国家残留限量标准 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 的检测要求。该体系可应用于鲜奶制品中 AFM1 大于 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 污染样品的快速初筛。

关键词: 直接竞争 - 酶联免疫法(dc-ELISA); 黄曲霉毒素 M1(AFM1); 乳品; 检测

Rapid Detection of Aflatoxin M1 by Anti-AFM1 mAb-HRP Based Dc-ELISA

PEI Shi-chun¹, XIAO Li-wen²

(1. College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

2. Shanghai Uni Biotech Co. Ltd., Shanghai 201616, China)

Abstract: A rapid and sensitive direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-AFM1 mAb with horseradish peroxidase (HRP) to measure aflatoxin M1 (AFM1) in milk was described. Using AFM1 contaminated milk ERMI-BD282 (zero), ERMI-BD 283 (0.11 $\mu\text{g/kg}$) and ERMI-BD 284 (0.44 $\mu\text{g/kg}$), the sensitivity and accuracy of the developed assay was validated. The optimized assay conditions regarding sensitivity and stability were found to be: coating AFM1-BSA antigen concentration 0.25 $\mu\text{g/kg}$ and dilution factor of anti-AFM1 mAb-HRP conjugate 2000. Assays of ERMI-BD282 samples spiked with AFM1 at the level of 0.45 $\mu\text{g/L}$ revealed an average recovery of around 80%. The developed method showed an IC_{50} of 0.75 $\mu\text{g/L}$ and a linear range of 0.015—4.05 $\mu\text{g/L}$. This assay may be used in rapid screening of contaminated milk at AFM1 > 0.5 $\mu\text{g/L}$.

Key words: direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dc-ELISA); aflatoxin M1 (AFM1); milk; detection
中图分类号: R446.61 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)18-0221-04

黄曲霉毒素 M1(aflatoxin M1, AFM1)的高通量快速检测方法主要是以酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法为主, 包括直接竞争-ELISA、间接竞争-ELISA 等, 其中间接竞争-ELISA 方法相对直接竞争-ELISA(direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay, dc-ELISA)方法时间长、检测步骤多, 因此目前国外黄曲霉毒素 M1 检测 ELISA 试剂盒多以直接竞争-ELISA 原理为基础, 即利用 AFM1 偶联

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)后在包被有 AFM1-BSA 的 96 孔板或层析板进行竞争性反应, 再依据标准曲线 OD 值进行定量检测, 其灵敏度可达到 4 ng/L^[1-2], 国内也有部分研究者^[3-9]对 AFM1 的各种酶联免疫分析方法进行了研究, 但是在抗 AFM1 抗体偶联 HRP 后, 在包被有 AFM1-BSA 的 96 孔板进行直接竞争-ELISA 的未见有报告。

由于黄曲霉毒素 M1 标准品价格昂贵、毒性巨大,

收稿日期: 2011-06-08

基金项目: 黑龙江省留学归国人员项目(Lc05c11)

作者简介: 裴世春(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为真菌毒素检测。E-mail: peisc2002cn@yahoo.com.cn

同时受到各国政府的严格控制,使得在国内研发与国外同等性能的 AFM1 快速检测 ELISA 产品难度较大,基于此,本研究旨在利用自主开发的抗 AFM1 单克隆抗体^[5]为基础,通过在单克隆抗体上偶联 HRP 后构建直接竞争 ELISA 检测 AFM1 的检测体系,该检测体系能保障检测时间短、检测灵敏度可满足国标中 AFM1 在乳中最高残留限量标准的检测要求,而且所用抗 AFM1 单克隆抗体可通过所筛选的分泌抗 AFM1 单克隆抗体的杂交瘤细胞批量生产,可解决难以购买大量剧毒 AFM1 标准品的难题,为保障我国 AFM1 检测试剂产品的国产化提供个有效途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄曲霉毒素-牛血清白蛋白偶联物(aflatoxin M1-bovine serum albumin conjugate, AFM1-BSA)、AF M1、HRP、BSA、ERMI-BD282(0)、ERMI-BD 283(0.11 μg/kg)、ERMI-BD 284(0.44 μg/kg)、蛋白质 A(SPA)亲和柱 美国 Sigma 公司;抗 AFM1 单克隆抗体、AFM1 mAb-HRP 自制;MD6 无血清培养基 大庆麦伯康生物技术有限公司;其他分析和有机试剂均为优级纯及以上纯度。

1.2 仪器与设备

VICTOR X4 多功能酶标仪 美国 PE 公司;Wahser400 96 孔洗板机、NanoVue 100 微量紫外分光光度计 美国 GE 公司;超滤杯 美国密理博公司。

1.3 方法

1.3.1 缓冲液的组成及制备

缓冲液 A: 1mol/L pH8.6 Glycine-HCl Prosep A Binding Buffer、35.06g NaCl、150.2g 甘氨酸、14mL 10mol/L 的 NaOH 溶液以及 1.0mL 2000 × Proclin300 添加到 2000mL 去离子水中用于培养基上样;缓冲液 B: 0.1mol/L pH3.75 柠檬酸缓冲液、8.77g NaCl、11mL 10mol/L 的 NaOH 以及 0.5mL 2000 × ProClin300 添加到 1000mL 去离子水中用于抗体洗脱。

1.3.2 抗 AFM1 单克隆抗体的纯化

将分泌抗 AFM1 单克隆抗体的杂交瘤细胞用 MD6 无血清培养基扩大培养至细胞死亡,过滤培养基与等体积缓冲液 A 混合后上样至预先处理好的 Protein A 亲和层析纯化柱 10~15 个柱体积,用缓冲液 B 进行洗脱,洗脱液按每管 2mL 收集到预先添加了 200 μL 1g/mL K₂HPO₄ 溶液的 15mL 离心管中,利用微量紫外分光光度计测定所有离心管中抗体含量,取抗体含量多的离心管中洗脱液合并后,用 30kD MWCO 膜在超滤杯上进行浓缩后定量分装,并利用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE)鉴定纯化效果。

1.3.3 HRP 标记抗体

HRP 标记抗体参照高碘酸钠方法^[7]进行,称取 3.0mg 辣根过氧化物酶,溶于 0.6mL 超纯水中,并加入 150 μL 0.1mol/L Na₂IO₄-磷酸盐缓冲液混匀,室温避光静置 20min 后转入透析管(#UFC803096, Ultracel 30kD MWCO)中,加满 1.0mol/L pH4.0 的醋酸盐缓冲液,4℃、3000r/min 离心 20min,重复用醋酸盐缓冲液透析 3~4 次至残留溶液在 0.5~1.0mL 时将其转入新的 15mL 的离心管中待用。

取溶于 PBS 缓冲液的抗 AFM1 单克隆抗体 2.0~3.0mg 加入新的透析管中,4℃、3000r/min 离心 10min 至抗体溶液总体积在 0.5~1.0mL 之间时将其转入 15mL 离心管中并添加 0.5mL 0.2mol/L pH9.5 的碳酸盐缓冲液使其 pH 值为 9.5 后与透析的 HRP 溶液合并,轻轻混匀,室温、避光、轻微振荡 2h 后加入 40 μL 现配制的 4.0mg/mL 的 NaBH₄ 溶液,混匀、室温、避光孵育 1.5h。

最后将混合溶液全部转入透析管中,加满 PBS,4℃、3000r/min 离心 20min,重复用 PBS 透析 3~4 次,使溶液 pH 值达到 7.4,混合液体积达到 2.0mL 左右时为止,加入等体积的甘油后分装,在 -20℃ 保存待用。

1.4 dc-ELISA 反应条件优化及应用

1.4.1 AFM1 mAb-HRP 稀释倍数的确定

将 0.5、0.25、0.125 μg/mL 的 AFM1-BSA PBS (pH7.4)溶液 100 μL/孔包被 A、B 两套 96 孔酶标板,4℃过夜后洗板 3 次,加 150 μL 1.5g/L 的 BSA 溶液室温封闭 2h,洗板 3 次,A 板添加质量浓度为 0.1 μg/mL 的 AFM1 标准毒素 PBS 溶液 50 μL/well, B 板添加等量的 PBS 缓冲溶液后在两板中分别添加梯度稀释的 AFM1 mAb-HRP 溶液 50 μL/孔,室温反应 60min,洗板 3 次,加 TMB 显色液显色 15min 后添加反应终止液测定 OD 值,依据实验结果确定最佳 dc-ELISA 反应条件。

1.4.2 添加回收率的测定

为了评估对 AFM1 检测的准确性,首先取已知 AFM1 质量分数的标准奶粉 ERMI-BD282(0)、ERMI-BD283(0.11 μg/kg)、ERMI-BD284(0.44 μg/kg)各 1g 分别溶于 9mL 超纯水中制成奶粉溶液,并将一部分 ERMI-BD282(0)溶解奶粉中再添加 AFM1 标准物质至其质量浓度为 0.45 μg/L,利用建立的最佳 dc-ELISA 反应条件进行检测后应用回收率公式计算检测回收率。

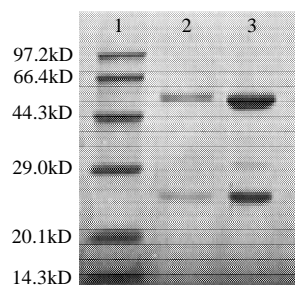
$$\text{回收率}/\% = \frac{A_2}{A_1} \times 100$$

式中: A₁ 为 AFM1 添加质量浓度/(μg/L); A₂ 为 dc-ELISA 检测质量浓度/(μg/L)。

2 结果与分析

2.1 抗AFM1单克隆抗体的纯化

利用HRP标记抗AFM1单克隆抗体需要高纯度抗体,本实验采用MD6无血清培养基经高密度培养分泌抗AFM1单克隆抗体杂交瘤细胞后收集培养基进行纯化,其结果如图1所示,在25kD和50kD处具有典型的单克隆抗体轻重链条带,从杂交瘤细胞培养上清液的SDS-PAGE图可以看出,细胞培养上清液中杂蛋白非常少,抗体纯度高,而且由于MD6培养基为无血清培养基,因此不含胎牛血清中的IgG,可以将细胞上清液经Protein A纯化和膜浓缩后直接利用紫外分光光度计进行抗体质量浓度的测定,HRP标记所需要的抗体定量未受其他杂蛋白的影响。



1. 蛋白Marker; 2. 纯化后抗体; 3. 细胞培养上清液。

图1 无血清培养基制备的抗AFM1单克隆抗体的SDS-PAGE图
Fig.1 SDS-PAGE patterns of anti-aflatoxin M1 monoclonal antibody prepared with serum-free medium

2.2 抗AFM1 mAb-HRP稀释倍数的确定

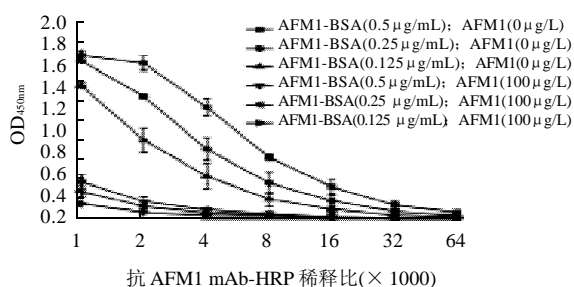


图2 利用dc-ELISA的AFM1 mAb-HRP稀释比的测定
Fig.2 Determination of optimal dilution factor of anti-AFM1 mAb-HRP for dc-ELISA

经过预实验后选择包被抗原质量浓度为0.125、0.25、0.5 μg/L的3个水平,选择抗AFM1-mAb-HRP从1000~64000倍的倍比稀释液进行不同因素间组合的dc-ELISA实验,其结果如图2所示。在包被AFM1-BSA 0.25 μg/mL、抗AFM1 mAb-HRP稀释2000倍时检测0 μg/L和0.1 μg/L的AFM1工作质量浓度的OD值,结果相差1.2以上;在包被质量浓度0.5 μg/L条件下的抗AFM1 mAb-HRP稀释4000倍时其检测0 μg/L和0.1 μg/L的AFM1工作质量浓度的OD值,结果也相差1.2以上。但是考虑到AFM1-BSA的价格昂贵,因此高质量浓度抗原包被条件不作为优选反应条件。而抗AFM1 mAb-HRP稀释1000倍时由于不同质量浓度包被AFM1-BSA的基线OD值均过高,因此也不作为优选反应条件。最终选择包被AFM1-BSA 0.25 μg/mL、抗AFM1 mAb-HRP稀释2000倍作为最佳反应条件。

经进一步对反应条件优化后,利用无AFM1污染的ERMI-BD282奶粉标准物质0.1g/mL溶液作为标准AFM1毒素的稀释剂,建立鲜乳中AFM1检测dc-ELISA方法,该检测方法的检测范围如图3所示,在AFM1质量浓度为0.015~4.05 μg/L范围内具有良好的线性关系,该方法体系IC₅₀值为0.75 μg/L,检测灵敏度为0.05 μg/L(以B₀/B为85%时的样品质量浓度为方法最低检测灵敏度)。

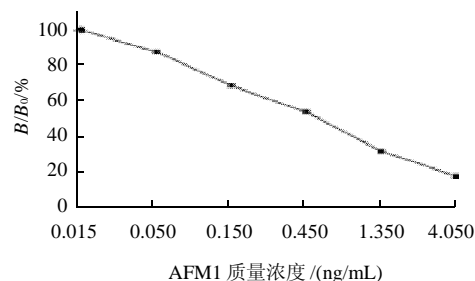


图3 AFM1直接竞争酶联免疫吸附反应标准曲线
Fig.3 Standard curve of Aflatoxin M1 in direct competitive ELISA

2.3 添加回收率

由表1可知,由于超纯水的溶解使ERMI-BD283(0.11 μg/kg)被稀释了10倍,超过了本方法的检测灵敏

表1 dc-ELISA检测AFM1的添加回收率实验结果(n=6)

Table 1 Recovery of AFM1 analyzed by the proposed ELISA assay (n=6)

AFM1含量/(μg/kg)	组内偏差			组间偏差		
	测定值	CV/%	回收率/%	测定值	CV/%	回收率/%
BD 282(0)	ND	—	—	ND	—	—
BD 283(0.11)	ND	—	—	ND	—	—
BD 284(0.44)	0.25 μg/kg ± 0.03 μg/kg	12	56.8	0.23 μg/kg ± 0.03 μg/kg	17.4	52.3
BD 282 溶液	0.37L ± 0.03L	8.1	82	0.35L ± 0.04L	11.4	78

注: AFM1溶液质量浓度0.45 μg/L; “ND”表示未检出; “—”表示无计算值。

度,利用dc-ELISA检测经超纯水稀释了10倍的ERMI-BD284(0.44 μg/kg)标准物质的检测值为0.025 μg/kg,再乘以稀释倍数得到的质量分数值为0.25 μg/kg,由于经10倍稀释后的ERMI-BD284溶液质量分数为0.044 μg/kg,接近本方法的检测限,至使其检测结果在实际质量分数的60%以下,该结果表明本研究制备的dc-ELISA方法在测定接近检测灵敏度质量浓度的鲜奶样品时会有一定的偏差,而添加AFM1至0.45 μg/L的样品平均回收率为80%,组内偏差为8.1%,组间偏差为11.4%,由此可认为建立的dc-ELISA方法可满足AFM1残留质量浓度为0.45 μg/L左右的牛奶样品的检测,但对于污染度接近或小于0.05 μg/L的牛奶样品,在测定过程中会存在较大的误差,考虑到我国鲜奶中AFM1残留限量标准为0.5 μg/L,因此本实验建立的dc-ELISA检测方法可以用于大量牛奶样品中超标样品的快速高通量初筛,也可作为精密仪器检测前快速筛选阳性样品的辅助工具,减少精密仪器分析时的工作量。

3 讨 论

目前国内基于HRP标记单克隆抗体的dc-ELISA方法在沙丁胺醇^[10]、拟除虫菊酯类农药^[11]等危害物的快速检测研究中有所应用,但是基于抗体标记的针对鲜奶中黄曲霉毒素M1的快速检测方面还未见有报告,而且国内针对黄曲霉毒素M1的免疫分析试剂盒的研发相对黄曲霉毒素B1滞后,其原因之一在于黄曲霉毒素M1的价格昂贵且难以购买,致使产业化批量制备AFM1-HRP和开发dc-ELISA检测试剂盒难度较大,本研究针对这一难题利用自主开发的抗AFM1单克隆抗体偶联HRP后建立了dc-ELISA检测AFM1体系,该体系相对于前期研制的间接竞争-ELISA方法^[5]更具有优势,从实验结果来看,其IC₅₀值为0.75 μg/L,检测范围为0.015~4.05 μg/L,同时相对于间接竞争-ELISA,其检测步骤少、检测时间短,而且抗AFM1 mAb-HRP可批量制备,可降低试剂盒制备成本,因此本研究建立的dc-ELISA体系可以用于开发大量牛奶中超标(>0.5 μg/L)样品的快速高通量初次筛选用国产化试剂盒,也可作为精密仪器检测的辅助工具。

本实验发现虽然所用抗体为前期基于HTS-ELISA方法^[5]制备的高活性抗体,但是由于本实验建立的方法是采用了在包被AFM1-BSA的微孔板上利用抗AFM1 mAb-HRP与鲜奶中的AFM1在液体游离状态下进行竞争性反应,因此抗AFM1 mAb-HRP在与包被抗原反应过程中会受到鲜奶中未知成分的影响,特别是在测定接近AFM1检测限的质量浓度样品时其检测灵敏度受到了更多的影响,为了抵消牛奶成分对检测的影响,本方法采用无AFM1污染的ERMI-BD282奶粉标准物质0.1g/mL溶液作为标准AFM1毒素的稀释剂,使得检测过程中抵

消了牛奶成分的影响,使测定值更接近于真值。

通常国外AFM1检测试剂盒是采用在包被抗AFM1单克隆抗体的微孔板上利用AFM1-HRP与鲜奶中的AFM1进行竞争性反应的方法,该方法的优势在于抗体为包被状态,只要包被抗体充分就能保障AFM1-HRP有充分机会与包被抗体结合,同时不受洗板等因素的影响,相对减少了鲜奶成分的影响,因此,尽快开发国产优质价廉的AFM1标准品也是进一步开发高灵敏AFM1检测dc-ELISA试剂盒的前提之一。另外,由于AFM1人工合成难度大、成本高,天然AFM1价格昂贵和难以购买等因素的制约下,还需要研发AFM1替代物以进一步降低试剂盒成本和降低有毒物质的潜在危害性,因此可以利用“免疫网络学说”筛选制备一种AFM1抗独特型单克隆抗体用以替代AFM1^[12-15],而筛选到分泌高效价的AFM1抗独特型单克隆抗体和抗AFM1的单克隆抗体的细胞株就可以利用杂交瘤细胞培养方法批量制备替代抗原和抗体,结合本实验中HRP的标记方法就可为构建高灵敏环保无毒检测dc-ELISA体系提供保障。

参考文献:

- [1] RADOI A, TARGA M, PRIETO-SIMON B, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M1 detection[J]. *Talanta*, 2008, 77(1): 138-143.
- [2] CONROY P J, HEARTY S, LEONARD P, et al. Antibody production, design and use for biosensor-based applications[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(1): 10-26.
- [3] WANG J J, LIU B H, HSU Y T, et al. Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M1 in milk[J]. *Food Control*, 2011, 22(6): 964-969.
- [4] PEI Shichun, ZHANG Yuanyuan, SERGEI A, et al. Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies[J]. *Food Control*, 2009, 20(12): 1080-1085.
- [5] GUAN Di, LI Peiwu, ZHANG Qi, et al. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk and infant milk products[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(4): 1359-1364.
- [6] 江涛, 俞琼, 李敏, 等. 抗黄曲霉毒素M1抗体制备及检测方法建立[J]. *中国公共卫生*, 2007, 23(1): 43-45.
- [7] 裴世春, 何娜, 张立军, 等. 应用HTS-ELISA筛选方法制备抗黄曲霉毒素M1单抗[J]. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1406-1411.
- [8] 熊啸. 黄曲霉毒素M1直接竞争ELISA与无毒体系的建立[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [9] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 351-357.
- [10] 王宝玲, 袁利鹏, 雷红涛, 等. 沙丁胺醇直接竞争ELISA法快速检测[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 270-274.
- [11] 余向阳, 骆爱兰, 刘媛, 等. 拟除虫菊酯类农药多残留直接竞争ELISA的建立及初步应用[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(3): 249-252.
- [12] 江涛, 柳桢, 李楠, 等. 抗黄曲霉毒素B1单抗独特型抗体的制备[J]. *中国食品卫生杂志*, 2009, 21(5): 385-389.
- [13] 陈福生, 周启, 罗信昌, 等. 黄曲霉毒素B1抗独特型抗体的制备和应用研究 I [J]. *菌物学报*, 2004, 23(1): 93-101.
- [14] 熊啸, 熊勇华, 涂祖新, 等. 黄曲霉毒素M1模拟表位的筛选和鉴定[J]. *食品科学*, 2007, 28(7): 339-341.
- [15] 李敏, 计融. 抗独特型抗体研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2006, 18(1): 56-60.