

doi: 10.12452/j.fxcxb.26062501

基于快速衍生化的展青霉素单克隆抗体制备及免疫层析检测应用

王璐¹, 陈芬³, 钟钰¹, 蔡翠玲¹, 王水树², 宋阳¹, 官咏仪¹,
徐惠金¹, 付辉², 谢本华^{2*}

(1. 广州海关技术中心, 广东 广州510623; 2. 深圳易瑞生物科技有限公司, 广东 深圳518038; 3. 华南农业大学 食品学院, 广东 广州510642)

摘要: 该研究基于快速衍生化反应, 设计合成了一种新型展青霉素衍生物半抗原, 采用活泼酯法合成人工抗原, 经动物免疫和杂交瘤技术筛选获得高灵敏度、高特异性的单克隆抗体。该抗体的 IC_{50} 值为0.383 ng/mL, 与展青霉素结构类似物及常见真菌毒素均无交叉反应。基于该抗体制备胶体金免疫层析试纸条, 建立了果蔬汁中展青霉素的快速检测方法。该检测方法的检出限为50 μ g/kg, 在此加标水平下, 苹果汁和果酒的阳性检出率分别为96%和98%, 且可特异性识别展青霉素。采用该方法与LC-MS/MS同步检测20份市售果蔬汁饮料, 两种方法的检测结果完全一致。该方法操作简便、灵敏度高、特异性强, 适用于果蔬汁中展青霉素的现场快速筛查。

关键词: 展青霉素; 快速衍生化; 单克隆抗体; 胶体金免疫层析法

中图分类号: O657.7; R446.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-08

Preparation of Patulin Monoclonal Antibodies Based on Rapid Derivatization and Application of Immunochromatographic Detection

WANG Lu¹, CHEN Fen³, ZHONG Yu¹, CAI Cui-ling¹, WANG Shui-shu², SONG Yang¹,
GUAN Yong-yi¹, XU Hui-jin¹, FU Hui², XIE Ben-hua^{2*}

(1. Guangzhou Customs Technical Center, Guangzhou 510623, China; 2. Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen 518038, China; 3. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: This study designed and synthesized a novel patulin derivative hapten based on rapid derivatization reactions, synthesized an artificial antigen using the active ester method, and obtained high-sensitivity, high-specificity monoclonal antibodies through animal immunization and hybridoma technology. The IC_{50} value of this antibody was 0.383 ng/mL, showing no cross-reactivity with patulin structural analogs or common fungal toxins. A colloidal gold immunochromatographic test strip was developed based on this antibody, establishing a rapid detection method for patulin in fruit and vegetable juices. The detection limit of this method was 50 μ g/kg. At this spiked level, the positive detection rates for apple juice and fruit wine were 96% and 98%, respectively, with specific recognition of patulin. Twenty commercially available fruit and vegetable juice beverages were simultaneously detected using this method and LC-MS/MS, with identical results from both methods. The test strip features simple operation, high sensitivity, and strong specificity, making it suitable for on-site rapid screening of patulin in fruit and vegetable juices.

Key words: patulin; rapid derivatization; monoclonal antibody; colloidal gold immunochromatographic assay

展青霉素(PAT)是扩展青霉产生的有毒次级代谢产物, 广泛存在于谷物、水果及其制品(如果汁、果酱、果脯等)中^[1], 受损水果更易被扩展青霉侵染并产生PAT^[2]。PAT具有遗传毒性^[3-5], 可引

收稿日期: 2026-06-25; 修回日期: 2026-08-11

基金项目: 广州海关科研项目(2024GZCK07)

* 通讯作者: 谢本华, 硕士, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: 15019206391@yeah.net

网络首发日期: XXXX-XX-XX

起肾、肝、肠、皮肤等多器官毒性^[3, 6-8], 还会干扰免疫反应^[9], 并引发代谢紊乱^[10]。鉴于PAT的毒性危害, 我国GB 2761-2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》明确规定, 以苹果或山楂为原料的水果制品及果蔬汁饮料中PAT的限量值为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[11]。

PAT的常用检测方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)^[12-15]和液相色谱-质谱法(LC-MS)^[16-19]。这些仪器方法虽在灵敏度和准确性上表现优异^[20], 但其操作繁琐、耗时长且成本高, 难以适配现场快速检测场景。胶体金免疫层析法作为即时检测领域的成熟技术, 凭借简便、灵敏、高通量、快捷等优势^[21], 更适合PAT现场快速筛查。

免疫分析法的性能高度依赖抗体, 而半抗原设计是成功制备抗体的关键。早期王欣然^[22]利用琥珀酸酐-活泼酯法合成PAT完全抗原, 仅得到鼠多克隆抗体; 张培蕾^[23]以丁二酸酐取代PAT上的羟基引入活性羧基, 制备半抗原后获得了单克隆抗体, 其 IC_{50} 为29.69 ng/mL 。本研究采用快速衍生化策略, 先将PAT转化为结构更稳定的衍生物, 以此为半抗原制备人工抗原, 进而筛选出高亲和力和单克隆抗体(IC_{50} 为0.383 ng/mL)。用胶体金标记该抗体后, 构建胶体金免疫层析试纸条, 实现了对PAT的间接高灵敏检测。该研究为果蔬汁饮料中PAT的现场快速筛查提供了可靠手段, 对保障食品安全和促进行业发展具有积极意义。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

氯金酸(HAuCl_4)购于上海Sigma Aldrich有限公司; 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、聚乙二醇20000(Polyethylene glycol, PEG20000)购于上海国药集团化学试剂有限公司; 牛血清白蛋白(BSA)、牛乳铁蛋白(BLF)、弗式完全与不完全佐剂购于美国Sigma公司; 4-硝基苯基丁酸酯(PNPB)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、无水磷酸二氢钾、磷酸氢二钠十二水合物、1,2-苯二硫醇、叔丁醇钠、无水四氢呋喃、无水硫酸镁、甲酸、甲醇、乙醚、乙酸乙酯购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; BALB/c小鼠购于广东省实验动物中心。

5-羟基糠醛(5-HMF)、黄曲霉毒素 B_1 (AFB_1)、PAT、玉米赤霉烯酮(ZEN)、T-2毒素(T-2)标准品购于中国计量科学研究院; 赭曲霉毒素A(OTA)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、伏马毒素 B_1 (FB_1)标准品购于上海市农业科学院; 青霉酸(PCN)标准品购于北京百奥莱博科技有限公司。

单克隆抗体由本课题组制备。实验用水为Milli-Q超纯水。

1.2 仪器与设备

Multiskan FC型酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司), PW-960Plus洗板机(深圳市汇松科技发展有限公司), 磁力搅拌器(北京艾普立邦科技有限公司), 离心机(美国Thermo Scientific公司), RV3旋转蒸发仪(德国IKA公司), 恒温鼓风干燥箱(上海叶拓科技有限公司), 真空冷冻干燥机(上海田枫实业有限公司), 1290-6475A超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国Agilent公司), ZQ 4000数控高速斩切机、HM 3260 XYZ三维大平台感应喷金划膜仪(上海金标生物科技有限公司), 便携式读数仪(深圳市易瑞生物技术股份有限公司)。

1.3 PAT衍生物半抗原的合成与鉴定

准确称取200 mg 1,2-苯二硫醇, 溶于1.5 mL 3.37 mmol叔丁醇钠的甲醇中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应1 h。反应结束后, 冷却至室温, 蒸干反应液。残留物依次用无水四氢呋喃和乙醚各洗涤两次, 真空干燥过夜, 得到1,2-苯二硫醇二钠盐。准确称取PAT 10 mg, 加入5 mL 0.1 mol/L的PB缓冲液(pH 7.4), 溶解后, 缓慢滴加0.0714 mmol 1,2-苯二硫醇二钠盐溶液, 继续搅拌, 反应20 min后, 冰浴中冷却, 甲酸调至pH 3.0~4.0。然后用60 mL乙酸乙酯分3次萃取, 合并有机相, 再用15 mL盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 得到PAT衍生物半抗原。合成的PAT衍生物半抗原采用气相色谱-质谱法(GC-MS/MS)进行鉴定。合成路线见图1。

1.4 PAT衍生物免疫用抗原及包被用抗原的合成

准确称取PAT衍生物0.01 mmol于2 mL DMF中, 磁力搅拌溶解, 依次加入0.2 mmol DCC和0.15 mmol NHS, 持续搅拌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应12 h。然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min条件下离心15 min, 收集上清液, 得

到半抗原溶液(A液)。准确称取BSA 140 mg,溶于10 mL 0.1 mol/L PBS溶液(pH 8.0)中,磁力搅拌溶解,加入1 mL DMF,搅拌均匀,得到载体蛋白溶液(B液)。在磁力搅拌下,将A液逐滴滴入B液中,4℃反应12 h。然后在4℃、10 000 r/min条件下离心15 min,收集上清液。将上清液转移至10 kDa截留分子量透析袋中,在4℃条件下用生理盐水透析纯化。持续3 d,期间每8 h更换一次生理盐水。透析完成后收集袋内溶液,得到PAT衍生物-BSA偶联物,即PAT衍生物免疫用抗原。分装后,-20℃下冻存备用。将BSA替换为BLF,其余步骤同上,得到PAT衍生物-BLF偶联物,即PAT衍生物包被用抗原。

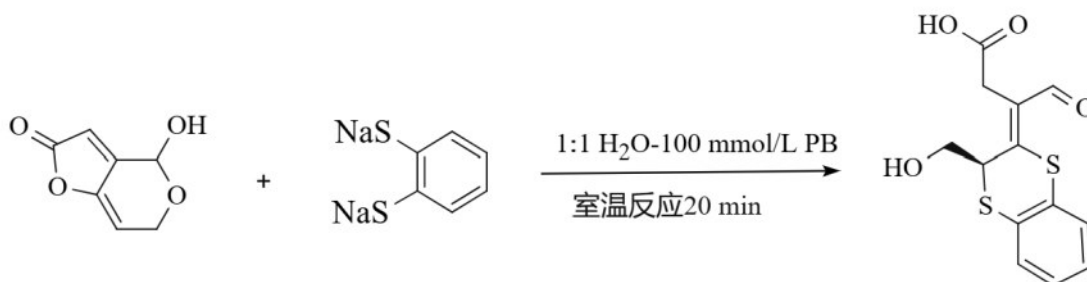


图1 PAT衍生物半抗原的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of PAT derivative hapten

1.5 PAT衍生物单克隆抗体的制备

1.5.1 动物免疫 选取6~8周龄健康BALB/c小鼠10只,将“1.4”合成的PAT衍生物-BSA偶联物与弗氏佐剂按1:1(体积比)充分乳化。首次免疫时,使用完全弗氏佐剂乳化抗原,颈背部皮下多点注射方式接种,抗原剂量为200 μg/只。4周后实施第一次加强免疫,使用不完全弗氏佐剂乳化抗原,抗原剂量为100 μg/只。此后每隔3周进行一次加强免疫。融合前3 d,使用稀释后的生理盐水进行腹腔注射,抗原剂量降至50 μg/只。自第3次免疫起,通过断尾采血获取血清样本,采用间接竞争酶联免疫吸附测定法(ic-ELISA)^[24]进行抗血清分析,检测效价及抑制率,筛选高免疫应答的BALB/c小鼠个体用于后续细胞融合实验。

1.5.2 细胞融合与克隆化 取“1.5.1”筛选出的高免疫应答BALB/c小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞,按8:1比例混合,采用电融合技术实现细胞融合。融合后的细胞用HAT选择性培养基培养,通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行单克隆化筛选,最终获得能稳定分泌抗PAT单克隆抗体的杂交瘤细胞株,杂交瘤细胞用冻存液重悬至 1×10^6 个/mL,分装后液氮保存。

1.5.3 单克隆抗体的制备与纯化 选取BALB/c小鼠,每只腹腔注射0.5 mL灭菌石蜡油进行预处理。7 d后,向每只小鼠腹腔注射 5×10^5 个单克隆杂交瘤细胞。再经7 d,采集小鼠腹水。采用辛酸-饱和硫酸铵法纯化腹水,获得抗PAT衍生物单克隆抗体,-20℃保存。

1.6 PAT胶体金层析检测装置的制备

1.6.1 胶体金粒子的制备与表征 取0.01%氯金酸溶液100 mL于锥形瓶中,加热搅拌,沸腾后迅速加入1.8 mL 1%柠檬酸三钠溶液,继续搅拌15 min至溶液呈透亮红色,冷却至室温后,加水至原体积,4℃保存。通过肉眼观察颜色及透射电镜(TEM)表征胶体金粒子。

1.6.2 胶体金标记单克隆抗体的制备 将1 mL胶体金溶液(pH 8.5)与10 μg PAT单克隆抗体混合,室温避光反应1 h,加入100 μL 1% PEG 20000反应30 min,再加入50 μL 10% BSA终止反应。先1500 r/min离心5 min弃沉淀,再12 000 r/min离心30 min收集沉淀,用100 mL PNPB溶液重悬,经0.22 μm滤膜过滤后,4℃避光保存。

1.6.3 微孔试剂的制备 用冻干保护剂稀释金标抗体重悬液,以100 μL/孔加到微孔板中,冷冻干燥,4℃下密封保存。

1.6.4 PAT免疫层析试纸条的制备与组装 PAT免疫层析试纸条采用PVC底板、样品垫、结合垫、

NC膜及吸水垫的层叠结构(见图2)。具体制备步骤如下:15 mm 玻璃纤维样品垫经处理液浸泡后37℃烘干2 h,6 mm 结合垫包被胶体金标记单克隆抗体后,同条件烘干。用自动划膜仪将PAT包被抗原与羊抗鼠二抗以1.0 μL/cm 喷量分别划于NC膜的T线、C线,37℃固化1 h。最后将各组件按序组装于PVC底板,切割成4 mm 宽试纸条,装卡密封后室温干燥保存。

1.7 样品前处理与检测

1.7.1 样品前处理 称取(5±0.1) g 待测水果样品,加入25 mL 蒸馏水,用匀浆机打浆后,转移至50 mL 离心管中,于10 000 r/min 离心5 min。取1 mL 上清液于15 mL 离心管中,加入5 mL 0.1 mol/L PB 缓冲液(pH 7.4)(待测果汁样品为山楂等酸性较强的样品时,先用1 mol/L NaOH 溶液调至pH 值中性,再按上述比例加入PB 缓冲液),混匀。然后加入10 μL 2 mg/mL 的1,2-苯二硫醇二钠盐-水溶液,涡旋振荡10 s,室温静置20 min,完成衍生化反应,经0.22 μm 滤膜过滤,得到待测液。

1.7.2 检测步骤 吸取200 μL 待测液至微孔杯中,涡旋振荡10 s,室温进行第一步反应3 min。随后将胶体金试纸条样品垫端垂直插入微孔杯,使液体沿试纸条向上层析,进行第二步反应3 min。取出试纸条,用洁净吸水纸轻轻吸去样品垫多余液体,立即进行结果判读。

1.7.3 结果判定 **1.7.3.1 肉眼判读:**无效结果:当质控线(C线)未显色时,表明操作失误或试纸条失效,需重新检测;阴性结果:当质控线(C线)显色,且检测线(T线)颜色≥质控线(C线)颜色时,表明未检出展青霉素或含量低于检出限;阳性结果:当质控线(C线)显色,且检测线(T线)颜色<质控线(C线)颜色,或检测线(T线)不显色时,表明检出展青霉素,需采用国标方法进一步确证。结果肉眼判定示意图见图3。

1.7.3.2 读数仪判读:参照读数仪的使用说明书进行结果判读,判读依据为检测线(T线)与质控线(C线)的信号强度的比值: $R = T/C$ 。

阴性结果:当 $R > 1.2$ 时,表明检测线(T线)信号强于质控线(C线),提示样本中目标物低于检出限;弱阳性结果:当 $0.8 \leq R \leq 1.2$ 时,表明检测线(T线)信号接近于质控线(C线),建议复测或采用国标方法进一步确证;阳性结果:当 $R < 0.8$ 时,表明检测线(T线)信号弱于质控线(C线),提示样本中目标物浓度超标,需采用国标方法进一步确证。

2 结果与讨论

2.1 PAT 衍生物半抗原的质谱鉴定

PAT的内酯环结构在动物体内易与含巯基化合物(如谷胱甘肽)发生开环反应,导致免疫原性降低,进而影响获得抗体的亲和力。本研究使用1,2-苯二硫醇二钠盐代替传统的芳基单硫代醇钠与PAT反应,将第一个硫醇基团加成到PAT的亲电C-7位,有利于分子内的硫代-迈克尔加成,反应20 min 即可观察到黄色,改变了芳基硫醇与PAT的加成反应的机理途径,形成了更稳定的新型PAT衍生物半抗原。采用GC-MS/MS 鉴定该合成产物,质谱图如图4所示,分子离子峰 m/z 295.3 $[M-H]^-$ 为最高峰,与其分子量296.36 相符,表明成功合成了PAT衍生物半抗原。

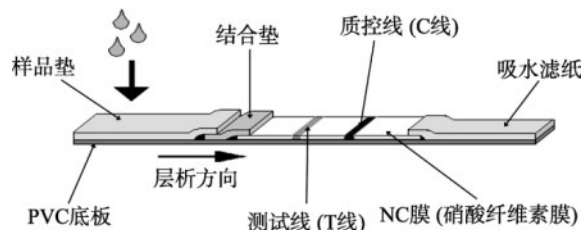


图2 免疫层析试纸条结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the structure of immunochromatographic test strips

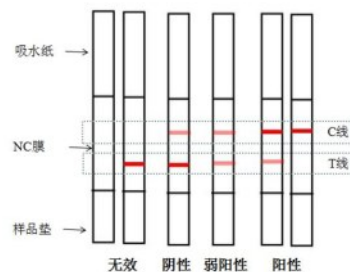


图3 肉眼判定结果示意图

Fig. 3 Schematic diagram of visual judgment results

2.2 PAT 衍生物血清抑制效果及包被用抗原的筛选

实验对比了两种 PAT 衍生物包被用抗原（PAT-BLF-1 和 PAT-BLF-2）的免疫效果。以 1 μg/mL 包被酶标板，采用间接竞争酶联免疫吸附测定法（ic-ELISA）测定 10 只 BALB/c 小鼠血清在不同条件下的吸光度值抑制率。表 1 结果显示，所有小鼠均产生免疫应答，其中小鼠 2 对 PAT-BLF-1 和 PAT-BLF-2 的抑制率分别为 92.38% 和 90.70%，显示出强特异性。小鼠 7 虽然对 PAT-BLF-1 的抑制率达 94.07%，但稀释倍数仅为 1 000，且对 PAT-BLF-2 的抑制率明显降低（81.82%）。综合比较，小鼠 2 抗体效价高，特异性强，因此选择其进行细胞融合，并确定 PAT-BLF-1 为最佳包被用抗原。

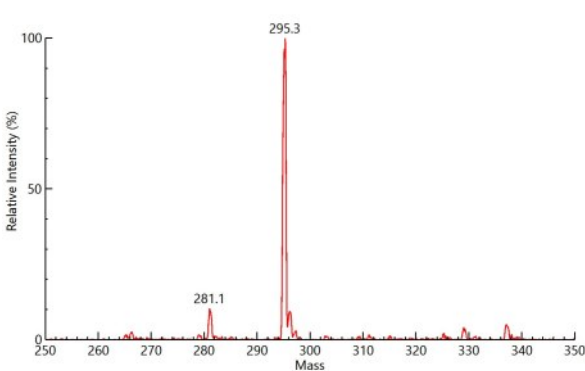


图4 PAT 衍生物扫描质谱图
Fig. 4 Scan mass spectrum of PAT derivative

表 1 PAT 衍生物血清抑制效果
Table 1 Serum inhibition effects of PAT derivatives

Mouse se- rum	Dilution ratio	PAT-BLF-1			Dilution ratio	PAT-BLF-2		
		Absorbance val- ue (0 μg/L)	Absorbance value (1 000 μg/L)	Inhibition rate/%		Absorbance val- ue (0 μg/L)	Absorbance value (1000 μg/L)	Inhibition rate/%
1	2 500	2.9071	0.4479	84.59	800	2.5903	0.3954	84.74
2	2 000	2.4336	0.1855	92.38	1 000	2.3352	0.2171	90.70
3	2 000	2.4728	0.3910	84.19	1 000	2.4830	0.2339	90.58
4	2 000	2.2331	0.2145	90.39	1 500	0.2296	0.0601	73.82
5	400	2.0281	0.6946	65.75	2 500	2.1571	0.6398	70.34
6	1 000	2.7905	0.2012	92.79	800	2.4564	0.3534	85.61
7	1 000	2.3259	0.1380	94.07	2 000	2.0292	0.3689	81.82
8	2 500	2.5739	0.2414	90.62	800	2.0725	0.1879	90.93
9	1 500	2.4839	0.5525	77.76	2 000	2.2114	0.2589	88.29
10	1 500	2.4121	0.2396	90.07	1 500	0.8899	0.1450	83.71

2.3 单克隆抗体灵敏度评价

采用 ic-ELISA 法对“1.5”所获得的单克隆抗体进行灵敏度检测。以 PAT 衍生物浓度为横坐标，B/B₀ 为纵坐标（B 为添加 PAT 衍生物时的吸光度值，B₀ 为空白组的吸光度值），采用 Origin 2021 软件进行对数拟合，绘制标准曲线并计算半数抑制浓度（IC₅₀）。IC₅₀ 是评价抗体亲和力的关键指标，值越低表明抗体与抗原结合的亲和力越高，检测灵敏度越好。结果显示，经过四参数对数拟合，得到典型的 S 型剂量-反应曲线（图 5），拟合方程的相关系数（r²）大于 0.99，表明该标准曲线具有良好的相关性。当 B/B₀ 为 0.5 时，PAT 衍生物的质量浓度为 0.383 ng/mL，即 IC₅₀，显著低于张培蕾^[23] 报道的 29.69 ng/mL，表明本方法所获得的单克隆抗体具有较高的灵敏度，可满足后续实际样品的检测需求。

2.4 单克隆抗体特异性评价

为验证所获得单克隆抗体的特异性, 采用 ic-ELISA 法测定 PAT、展青霉素结构类似物 (PCN) 以及常见展青霉素交叉物 (5-HMF、AFB₁、ZEN、T-2、OTA、DON、FB₁) 的 IC₅₀, 并计算交叉反应率 (CR)。结果如表 2 所示, 本方法所获得的单克隆抗体对 PAT 的 CR 值为 100%, 对 PCN 的 CR 值仅为 0.16%, 对其他 7 种常见交叉物的 CR 值均低于 0.1%。此外, PAT 的 IC₅₀ 值为 0.383 ng/mL, 低于 PCN 及其他真菌毒素的 IC₅₀ 值, 表明本方法所获得的单克隆抗体对 PAT 的特异性识别高。

2.5 胶体金粒子的表征结果

对合成的胶体金溶胶进行肉眼观察, 其外观呈酒红色, 透亮无杂质, 表明胶体金初步制备成功。透射电镜的观察结果 (图 6) 显示: 合成的纳米金颗粒基本呈规则球形, 在视场中分散性良好, 无明显严重团聚。然而, 颗粒粒径存在一定的多分散性, 主要分布于 15~50 nm 范围, 需在后续的实验中进一步优化, 提高颗粒的均一性。

表 2 单克隆抗体与常见交叉物的交叉反应率

Table 2 The cross-reactivity of the monoclonal antibody with common cross-reactants

Drug	IC ₅₀ / (ng·mL ⁻¹)	CR/%
PAT	0.383	100
PCN	239.09	0.16
OTA	>1 000	<0.1
AFB ₁	>1 000	<0.1
DON	>1 000	<0.1
ZEN	>1 000	<0.1
FB ₁	>1 000	<0.1
T-2	>1 000	<0.1
5-HMF	>1 000	<0.1

2.6 检测方法的验证

2.6.1 检出限的确定 向经确证方法检测的 PAT 阴性的空白苹果汁样品中分别添加 PAT 标准品, 加标水平分别为 25、50、100 μg/kg, 按 “1.7” 方法进行检测, 每个样本重复测定 3 次。结果显示, 加标水平为 25 μg/kg 时, 检测结果为阴性; 加标水平为 50、100 μg/kg 时, 检测结果均为阳性。基于此, 本方法的检出限 (LOD) 为 50 μg/kg。

2.6.2 假阳性率和假阴性率试验 选取苹果汁和果酒两种典型基质进行验证, 分别设置空白、0.5 倍 LOD、1 倍 LOD、2 倍 LOD 4 个浓度水平, 每个浓度水平各检测 50 个样品。结果显示, 苹果汁和果酒空白样品的假阳性率为 0%, 在 50 μg/kg 加标水平下, 苹果汁和果酒中展青霉素的阳性检出率分别为 96% 和 98%, 达到 95% 的 LOD 置信标准; 在 100 μg/kg 加标水平时, 检出率为 100%。上述结果表明, 该胶体金检测方法对苹果汁和果酒中 PAT 的检测灵敏度高、特异性强, 假阳性率和假阴性率低, 可有效确保检测结果的准确性。

2.6.3 特异性试验 为验证该胶体金方法对 PAT 的特异性, 排除结构类似物及其他真菌毒素的干扰, 选取 PCN、5-HMF、AFB₁、ZEN、T-2、OTA、DON、FB₁ 作为对照物质, 进行特异性试验。称取 9 份空白苹果汁样品, 分别添加 PAT、PCN、OTA、AFB₁、DON、ZEN、FB₁、T-2、5-HMF 标准溶液, PAT 的加标水平为 50 μg/kg, 其余化合物加标水平为 5 000 μg/kg, 按 “1.7” 步骤进行检测, 每个样本重复测定 3 次, 根据读数仪 R 值进行判定。表 3 结果显示: 仅添加 PAT 的样品, R 值介于 0.83~0.84 之

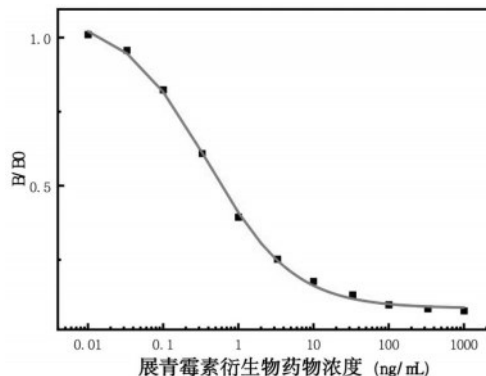


图 5 PAT 衍生物的 ic-ELISA 标准曲线

Fig. 5 Standard curve of ic-ELISA for PAT derivatives

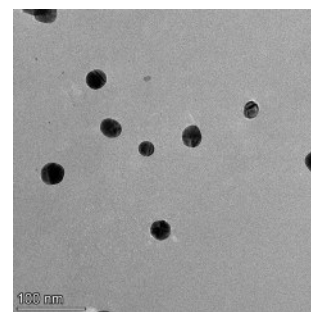


图 6 胶体金透射电镜扫描图
Fig. 6 Transmission electron microscopy (TEM) image of colloidal gold

间,检测结果为弱阳性,而添加PCN、OTA、AFB₁、DON、ZEN、FB₁、T-2、5-HMF的样品检测结果, R 值均大于1.2,均为阴性,说明该方法在苹果汁中具有良好的检测特异性。

表3 方法特异性评价结果

Table 3 Specificity evaluation results of the method

Matrix	Drug	Spiked/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	R value	Specificity evaluation
Apple juice	PAT	50	0.83, 0.84, 0.83	特异性识别
	PCN	5 000	1.54, 1.53, 1.53	无干扰
	OTA	5 000	1.63, 1.64, 1.64	无干扰
	AFB ₁	5 000	1.57, 1.56, 1.56	无干扰
	DON	5 000	1.68, 1.66, 1.68	无干扰
	ZEN	5 000	1.92, 1.94, 1.91	无干扰
	FB ₁	5 000	1.83, 1.84, 1.82	无干扰
	T-2	5 000	1.77, 1.75, 1.75	无干扰
	5-HMF	5 000	1.96, 1.98, 1.99	无干扰

2.7 实际样品检测

采用胶体金免疫层析法与LC-MS/MS法对随机采购的20份果蔬汁饮料进行同步检测,胶体金免疫层析法共检出18份阴性($R>1.2$),1份弱阳性(R 值为0.85),1份阳性(R 值为0.74),LC-MS/MS法对弱阳性和阳性样品的检测浓度分别为52.1、59.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其余样品均未检出。两种检测方法结果一致,表明该胶体金免疫层析法可实现对果蔬汁中PAT的定性及半定量检测,方法具有可行性和可靠性。

3 结 论

本研究基于创新的半抗原结构设计,合成了新型展青霉素半抗原,并成功制备出高灵敏度、高特异性的单克隆抗体,其半抑制浓度(IC_{50})为0.383 ng/mL 。利用该抗体研制的胶体金免疫层析试纸条,建立了果蔬汁中PAT的快速检测方法。该方法检出限为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在检出限浓度下,对苹果汁和果酒中展青霉素的检出率分别为96%和98%,具有良好的检测特异性。本方法操作简便、结果准确,适用于现场快速筛查,可与仪器确证方法相结合,为果蔬汁质量安全监管提供可靠的技术支持,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Wang Y N, Wang Z Q, Zu L, Li M J, Tong T. J. *Food Saf. Qual.* (王亚楠,王志青,祖琳,李梦杰,全涛.食品安全质量检测学报), **2021**, 12 (18): 7410-7416.
- [2] Li B Q, Chen Y, Xing M Y, Tian S P. *J. Food Sci. Technol.* (李博强,陈勇,邢孟阳,田世平.食品科学技术学报), **2023**, 41 (4): 16-25.
- [3] Zhang W, Qi L J, Gao S, Li G J. *J. Toxicol.* (张维,齐丽娟,高珊,李国君.毒理学杂志), **2025**, 39 (2): 89-95, 103.
- [4] Vidal A, Ouhibi S, Ghali R, Hedhili A, De Saeger S, De Boevre M. *Food Chem. Toxicol.*, **2019**, 129: 249-256.
- [5] Saleh I, Goktepe I. *Food Chem. Toxicol.*, **2019**, 129: 301-311.
- [6] Zhang T, Yan M, Hou X H, Chang M, Song W, Yue T L. *Food Res. Int.*, **2023**, 166: 112546.
- [7] Pillay Y, Nagiah S, Phulukdaree A, Krishnan A, Chuturgoon A A. *Sci. Rep.*, **2020**, 10 (1): 20115.
- [8] Singh N, Dev I, Pal S, Yadav S K, Idris M M, Ansari K M. *Mol. Cell. Biochem.*, **2022**, 477 (5): 1405-1416.
- [9] Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Varzakas T. *Foods*, **2020**, 9 (2): 137.
- [10] Pillay Y, Nagiah S, Chuturgoon A. *Toxins*, **2023**, 15 (4): 244.
- [11] GB 2761-2017. *Maximum Levels of Mycotoxins in Foods. National Standards of the People's Republic of China* (食品中真菌毒素限量. 中华人民共和国国家标准).
- [12] Wang Y L, Xu Y. *Food Saf. Guide* (王艺霖,许岩.食品安全导刊), **2025**, 19 (25): 140-142.
- [13] Lai W S, Wu A B, Liu H, Qin L X, Liu N. J. *Food Saf. Qual.* (赖文珊,武爱波,刘弘,秦璐昕,刘娜.食品安全质量检测学报), **2022**, 13 (4): 1286-1293.
- [14] Wang L P, Wang L X, Liu B Y, Zhang Y L, Zhang W. *Decid. Fruits* (王利平,王丽霞,刘保友,张悦丽,张伟.落叶果树), **2022**, 54 (3): 39-43.
- [15] Sadok I, Szmagara A, Staniszevska M M. *Food Chem.*, **2018**, 245: 364-370.
- [16] Zhao D, Yin D Y, Yuan W T, Zhang Y C. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (赵迪,尹丹阳,袁文婷,张宇晨.理化检验-化学分册), **2023**, 59 (12): 1443-1447.
- [17] Huang F, Ou J L. *Mod. Food* (黄飞,欧佳灵.现代食品), **2024**, 30 (21): 215-219, 223.

- [18] Lin M Y, Zhang G Q, Zhu Y C, Chen F. J. *Chin. Inst. Food Sci. Technol.* (林孟毅, 张国卿, 朱雨辰, 陈芳. 中国食品学报), **2026**, 26 (1): 292-304.
- [19] Zhang Q Y, Zhang X F, Li K, Wang X J, Shuai D Y, Gu Y T. *J. Instrum. Anal.* (张巧燕, 张晓峰, 李可, 王夏君, 帅大尧, 顾宇婷. 分析测试学报) **2026**, 45 (3): 405-411.
- [20] Lin W J, Li J, Jia Y B, Wang H Q, Sun L. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* (林伟杰, 励炯, 贾彦博, 王红青, 孙岚. 中国现代应用药学), **2019**, 36 (19): 2426-2430.
- [21] Wang X K. *Lab. Test.* (王星焜. 实验室检测), **2024**, 2 (12): 91-93.
- [22] Wang X R. *Preparation and Identification of Single-chain Fragment Variable Antibody against Patulin*. Changchun: Jilin University (王欣然. 抗展青霉素单链抗体的制备与鉴定. 长春: 吉林大学), **2015**.
- [23] Zhang P L. *Development and Preliminary Application of the Monoclonal Antibody against Patulin*. Zhengzhou: Henan Agricultural University (张培蕾. 展青霉素单克隆抗体的制备及免疫学检测方法的初步应用. 郑州: 河南农业大学), **2017**.
- [24] Zhu L, Chen Z J, Luo L, Wang Y, Zhong Y X, Shen Y D, Sun Y M, Xu Z L. *J. Instrum. Anal.* (朱琳, 陈子键, 罗林, 王宇, 钟玉心, 沈玉栋, 孙远明, 徐振林. 分析测试学报), **2022**, 41 (1): 128-135.

(责任编辑: 盛文彦)