

酶联吸附免疫法和胶体金免疫色谱技术在中药黄曲霉毒素检测中的应用进展

公爱娟¹, 刘春娟², 辛 杰¹, 何 珊¹, 刘言娟¹, 张 波^{1*}

1. 临沂大学药学院, 山东 临沂 276000

2. 枣庄市妇幼保健院, 山东 枣庄 277100

摘 要: 黄曲霉毒素是中药中较易产生的毒性极强的真菌毒素之一。建立黄曲霉毒素简单、快速、高通量、现场化的检测方法对实现中药黄曲霉毒素限量监控、保障中药安全性具有重要意义。酶联吸附免疫法(ELISA)和胶体金免疫色谱(GICA)技术为中药黄曲霉毒素的大批量快速检测和现场单个或少数样品即时检测提供了有效的技术手段。虽然现在已有较多关于此类检测方法的报道, 但没有形成标准方法。对已报道的中药黄曲霉毒素检测方法进行综述, 以期形成方法标准提供参考。

关键词: 中药; 黄曲霉毒素; 酶联吸附免疫法; 胶体金免疫色谱法; 高通量

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2195-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.032

Research progress on ELISA and GICA for aflatoxin determination in Chinese materia medica

GONG Ai-juan¹, LIU Chun-juan², XIN Jie¹, HE Shan¹, LIU Yan-juan¹, ZHANG Bo¹

1. College of Pharmacy, Linyi University, Linyi 276000, China

2. Maternity and Child Health Care of Zaozhuang, Zaozhuang 277100, China

Abstract: Aflatoxins, one of highly toxic and carcinogenic mycotoxins, are widespread in nature including Chinese materia medica (CMM). A simple, fast, high-throughput and on-site detection method is urgent needed for the screening the aflatoxins content in CMM to guarantee its safety. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and gold immune chromatographic assay (GICA) provide an effective technique for the high-throughput detection and on-site single or a few of samples real-time detection of aflatoxin. There have no standard methods though many immunoassays have been established in some studies. The objective of our work is to make a research on the progress of immunoassay for aflatoxin determination and to provide a reference for the standard establishment.

Key words: Chinese materia medica; aflatoxin; enzyme linked immunosorbent assay; gold immune chromatographic assay; high-throughput

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFT)是由真菌黄曲霉 *Aspergillus flavus* 和寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* 等产生的二氢呋喃香豆素类衍生物, 由于其毒性大且难以消除, 被世界卫生组织确认为 I 类致癌物。黄曲霉毒素约有 17 种衍生物, 其中以黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、B₂ (AFB₂)、G₁ (AFG₁) 和 G₂ (AFG₂) 最为常见(图 1), 以 AFB₁ 毒性最强。中药在采收加工及储存过程中极易引起 AFT 污染, 影响中药质量和临床用药安全。《中国药典》2015 年版明确限定了 19 种中药中 AFT 含量(每公斤药

材含 AFB₁ 不得超过 5 μg, AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 总量不得超过 10 μg), 其中包括水蛭、地龙、全蝎、蜈蚣、僵蚕 5 种动物药; 大枣、肉豆蔻、决明子、麦芽、使君子、柏子仁、胖大海、莲子、桃仁、槟榔、酸枣仁、薏苡仁 12 种果实种子类中药; 远志、陈皮 2 种富含油脂类中药^[1]。

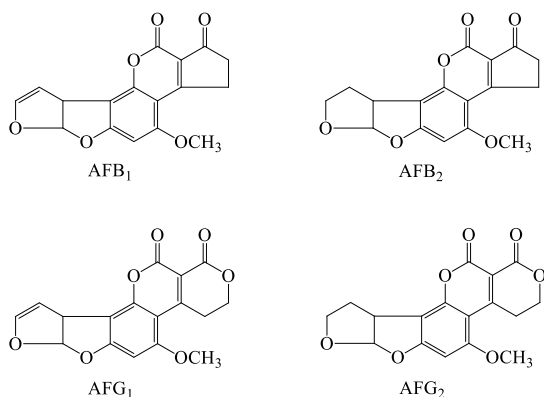
目前, AFT 的检测方法主要有薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS)、酶联吸附免疫法(ELISA)、胶体金免疫色谱法(GICA)等^[2-3]。HPLC

收稿日期: 2018-03-05

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2017BH010)

作者简介: 公爱娟, 本科, 制药工程专业。E-mail: gongaijuan2018@163.com

*通信作者 张 波, 讲师, 研究方向为中药质量控制与品质评价。E-mail: zhangboyxy@lyu.edu.cn

图 1 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂的化学结构Fig. 1 Chemical structures of AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂

和 HPLC-MS 具有专属性强、重现性好、假阳性率低等优点，被药典收录为标准方法。鉴于市场对检测方法“简单、快速和现场化”的需求，ELISA 和 GICA 等免疫检测技术在 AFT 的分析检测中的应用逐渐增多。《中国药典》2015 年版“中药中真菌毒素测定指导原则”（通则 9305）中指出“酶联吸附免疫法适宜大批样品集中检测，胶体金免疫层析方法适合现场单个或少数样品即时检测”^[1]，因此，免疫检测技术有望作为药典标准检测方法的补充，具有极高的开发应用前景。本文概述了免疫检测技术在中药 AFT 检测的研究进展，为进一步扩大免疫检测技术在中药安全性评价中的研究应用及免疫检测方法标准的制定提供参考。

1 免疫抗原的制备

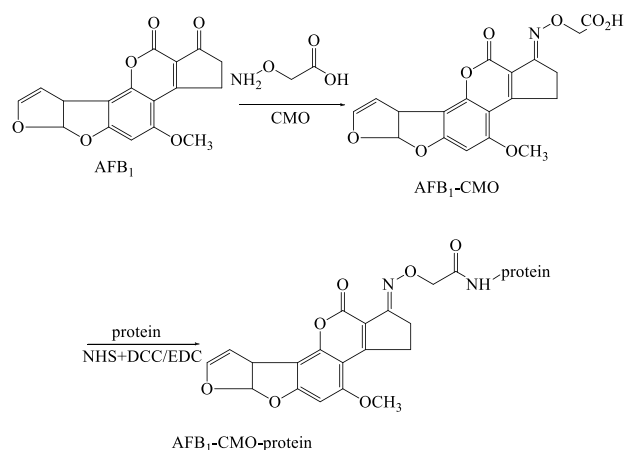
免疫检测技术是基于抗原抗体的特异性结合反应以实现相应抗原或抗体定性或定量检测的一种快速检测方法。抗原与抗体是免疫检测技术最重要的 2 个组成部分，也是免疫检测技术开发的重要研究对象。抗原物理（主要是溶解度）及化学性质（主要是偶联部位）的不同直接影响到动物免疫效果以及抗体的亲和性、特异性等。因此，在建立检测方法之前，应根据检测目的设计不同的合成路线，制备不同的抗原，进而获得高特异性的或者“广谱”的抗体。

AFT 是一类小分子化合物，本身不具有免疫原性，无法直接免疫动物获得抗体。因此，需通过化学方法将 AFT 与载体蛋白偶联以获得免疫原性。由于 AFT 结构中无氨基或羧基等活性基团，无法与载体蛋白的羧基或氨基直接偶联，通常需要将 AFT 进行衍生化后再与蛋白质结合。目前常用的 AFT 抗原

合成方法有脲化合成法、氨甲基缩合法、半缩醛合成法等。

1.1 脲化合成法

脲化反应具有操作简单、产率高等优点，是最常用的 AFT 完全抗原合成方法之一，其原理是利用 AFB₁ 环戊烯酮环上的羰基与羧甲基羟胺半盐酸盐的氨基缩合将羰基转化为 *N*-*O*-甲基羧酸，再通过活泼酯法将羧基与载体蛋白的氨基脱水酯化，最终获得 AFB₁-蛋白质完全抗原（图 2）^[4]。

图 2 脲化反应合成 AFB₁-蛋白完全抗原Fig. 2 Complete antigen of AFB₁-protein synthesized by oximation reaction

1.2 半缩醛合成法

AFB_{2a} 是 AFB₁ 的半缩醛形式，在水溶液中以二醛酚盐的形式存在，醛基与蛋白质的氨基生成不稳定的席夫碱，在还原剂硼氢化钠（NaBH₄）的还原作用下，C = N 双键被还原，生成 AFB_{2a}-蛋白完全抗原（图 3）^[5]。

同样在 AFB_{2a} 的缩醛基团上，通过添加一定长度的连接臂进而偶联载体蛋白获得的完全抗原更有利于抗体对 AFT 母核结构的识别。Lau 等^[6]将 AFB_{2a} 溶解在四氢呋喃溶液中作为反应原料，加入戊二酸酐，在 4-*N,N*-二甲基氨吡啶催化作用下，与 AFB_{2a} 的羟基反应；而后加入三乙胺和氯甲酸异丁酯生成酸酐；最后与蛋白质通过置换反应，得到 AFB_{2a}-蛋白完全抗原（图 4）。

此外，Cervino 等^[7]将 AFB₁ 溶液与乙醇酸、三氟乙酸混合，振荡反应，溶液在数秒内会出现黄绿色。挥去溶剂后得到淡黄绿色油状物即 AFB₂-缩酸；然后通过活泼酯法将羧基与蛋白质氨基偶联，得到 AFB₂-蛋白完全抗原（图 5）。

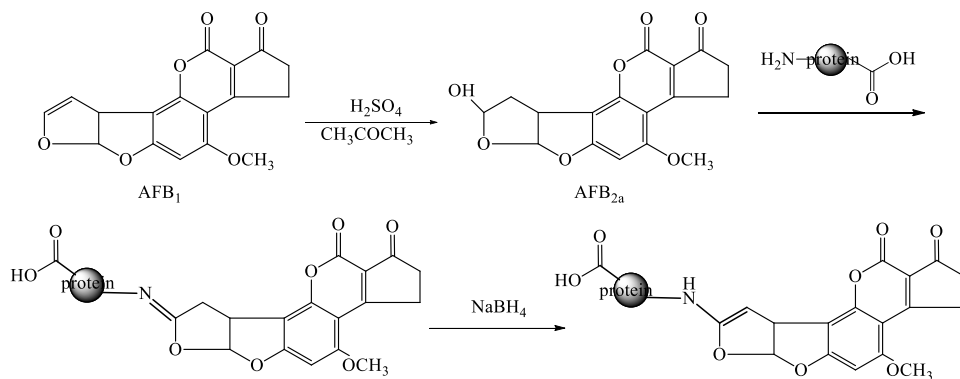


图 3 半缩醛法合成 AFB_{2a}-蛋白完全抗原

Fig. 3 Complete antigen of AFB_{2a}-protein synthesized by hemiacetal reaction

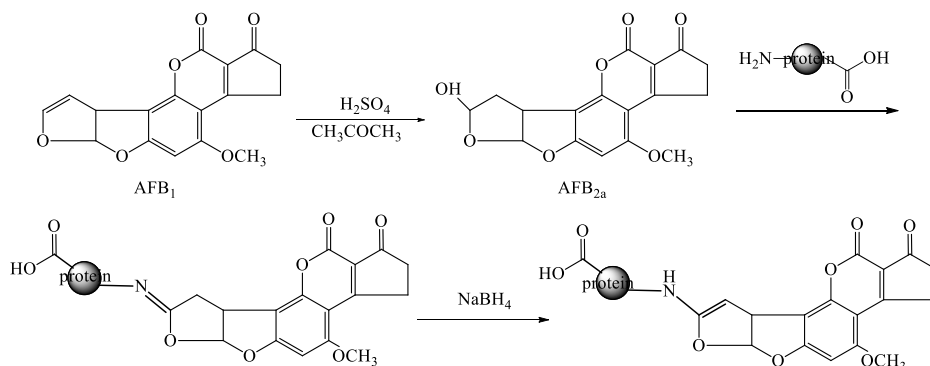


图 4 AFB_{2a}-蛋白完全抗原合成路线

Fig. 4 Synthetic route of AFB_{2a}-protein complete antigen

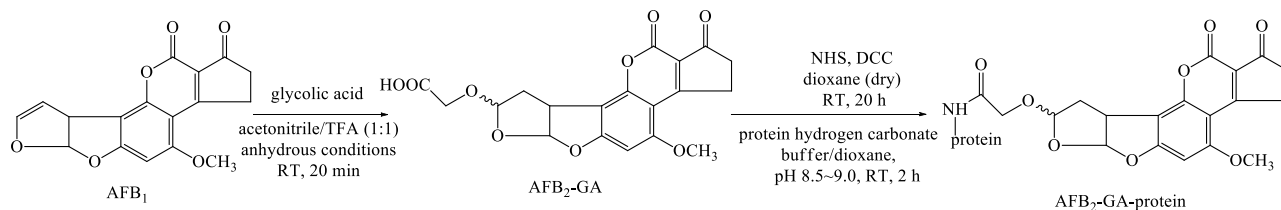


图 5 AFB₂-蛋白完全抗原合成路线

Fig. 5 Synthetic route of AFB₂-protein complete antigen

1.3 氨甲基缩合法

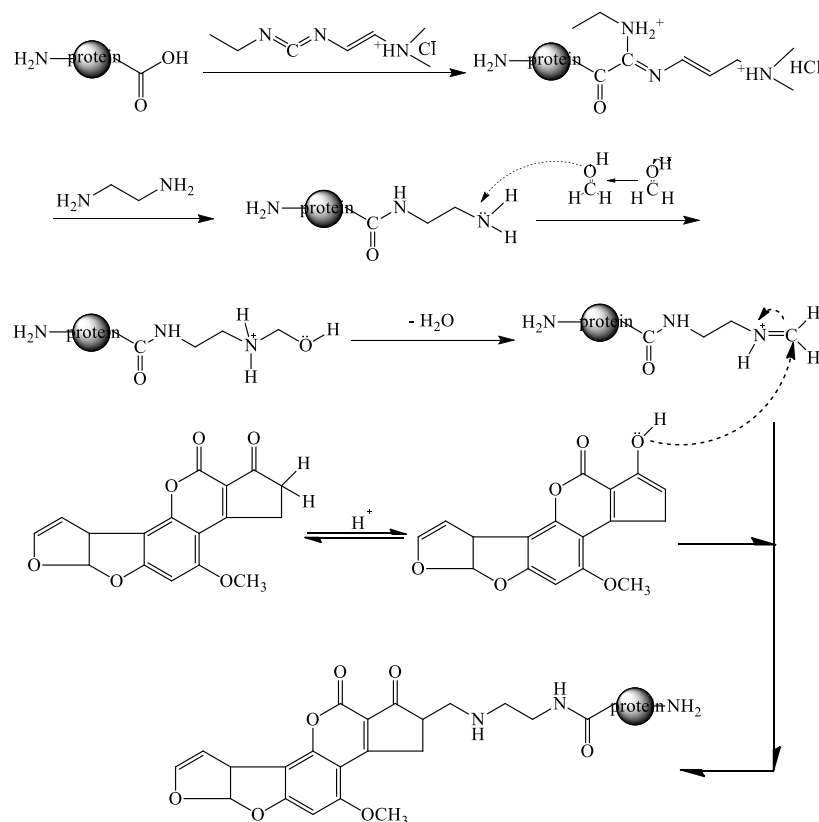
在酸性条件下, AFB₁ 环戊烯酮环上 2 个 α 活泼氢、甲醛和蛋白质的氨基三者可以发生缩合反应, 从而实现 AFB₁ 与载体蛋白的偶联。为提高 AFB₁ 与载体蛋白的偶联率, 增强免疫效果, 许多学者通过合成带有正电荷的阳离子蛋白作为载体蛋白。Zhou 等^[8]以阳离子蛋白为载体通过氨甲基缩合反应制备了 AFB₁ 完全抗原 (图 6)。

比较而言, 脎化反应和半缩醛反应是目前应用较广的 2 种 AFT 完全抗原合成方法, 其优点在于方

法简便易行, 且免疫效果良好。阳离子蛋白结合氨甲基缩合反应制备 AFT 完全抗原则大大提高了 AFT 与载体蛋白的偶联率, 同时增强了抗原的溶解度, 有助于增强免疫效果, 同时提升抗体亲和力。而通过添加连接臂合成 AFT 完全抗原的方法 (图 4、5), 则易于制备交叉反应率高的抗体, 从而实现对 AFT 总量的检测。因此, 可以根据研究需要与检测目的选择相应的 AFT 抗原合成方法。

2 抗体的制备

抗体是免疫检测技术的关键因素, 关系到检测

图 6 氨甲基缩合反应合成 AFB₁-蛋白完全抗原Fig. 6 Complete antigen of AFB₁-protein synthesized by ammonia-methyl condensation reaction

方法的灵敏度与特异性。根据抗体的来源不同,目前已报道的抗 AFT 抗体可分为多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体。多克隆抗体多来源于免疫后的动物血清,通常采用新西兰大耳兔作为免疫动物,其优点在于免疫原使用量少,血清获得量较多,且免疫效果良好。Li 等^[9]通过免疫雌鸡,从鸡蛋中获取了抗 AFB₁的多克隆抗体,该抗体对 AFB₂、AFG₁、AFG₂均有一定交叉反应,交叉反应率分别为 25%、23%、4%。与兔血清的制备相比,从鸡蛋中获取抗体免疫周期更长(6 个月),且从鸡蛋中获取的抗体量较少,分离纯化较为繁琐,目前应用较少。Zhang 等^[10]以 AFB₁-BSA 为免疫原,免疫 Bal b/c 雌性小鼠后,从小鼠血清中分离得到 2 份多克隆抗体,抗体特异性良好(方法灵敏度分别为 2.68、3.74 ng/mL),但由于小鼠血清量极少,所以动物个体差异而导致的抗体性质差异就更加明显,因而鼠多抗的利用严重受限,通常仅作为单克隆抗体制备的前期动物免疫效果检测。单克隆抗体技术自问世以来得到了快速的发展与应用,其主要优势在于解决了多克隆抗体不可大量制备、抗体批次间差异较大等

问题。基因工程抗体是将克隆抗体的功能基因转入原核或真核生物中表达,进而获得的单链抗体。基因工程抗体可大量制备且无需免疫动物,但抗体的亲和力相对偏低,因此, Li 等^[3]指出如何保持或提高抗体与抗原的结合能力是制备重组抗体的最大难题。相比较而言,抗 AFT 的基因工程抗体研究偏少。Moghaddam 等^[11]克隆抗体的重链可变区、轻链可变区以及连接链基因作为 NcoI-NotI 限制片段,插入质粒载体 pHOG-21 上,以大肠杆菌表达,然后分离纯化可溶性的基因工程抗体(scFv),抗体亲和常数(K_D)为 6×10^{-9} mol。同样, Kalinichenko 等^[12]制备的重组抗体 K_D 值也在 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-9}$ mol。

3 类抗体各有优劣,单克隆抗体和基因工程抗体的特异性更强,而多克隆抗体的制备周期较短、操作简单,且识别位点较多,可用于识别结构相似的一类化合物。对于单克隆抗体而言,若在细胞筛选的过程中以高交叉反应率为指标,亦可筛选出广泛识别 AFT 类化合物的杂交瘤细胞株,如 Uchigashima 等^[13]以 AFB₂ 为半抗原,通过脲化反应与血蓝蛋白偶联制备完全抗原,进而进行细胞融合、

杂交瘤细胞株筛选与克隆, 最终制备的单克隆抗体对 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁ 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 1.9、2.1、2.1、2.4、2.8 ng/mL。Li 等^[14]以 AFB₁-BSA 为免疫原, 同样制备了一株单克隆抗体 10C9, 该抗体对 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁ 的 IC₅₀ 分别为 2.09、2.23、2.19、3.21、2.95 ng/mL。可见, 若想获得广泛识别某类化合物的单克隆抗体可以从抗原的设计以及后续的细胞筛选过程 2 部分着手。

综上, 根据我国药典对 AFT 的检测需求结合各类抗体的特性, 若建立 AFB₁ 的标准免疫检测方法, 选用单克隆抗体最佳。

3 ELISA 在中药 AFT 检测中的应用

ELISA 是将酶促反应的信号放大作用与免疫检测技术的定性定量检测原理相结合的技术。目前, 间接竞争 ELISA 试剂盒在中药 AFT 检测中已有较多应用, 且检测结果均表明中药中 AFT 普遍存在, 部分种子类中药及中成药 (尤其是丸剂) AFT 含量超标严重^[15-17]。

ELISA 灵敏度高, 其检测范围通常在纳克至皮克级别, 目前已报道的应用 ELISA 检测 AFB₁ 的最低 IC₅₀ 值可达到 1.2 pg/mL^[18]。ELISA 采用 96 孔酶标板进行检测, 每次检测时间在 1.5~2.0 h, 具有通量高、成本低、速度快等优点。此外, 由于抗体对抗原具有高度的特异性识别能力, 样品往往不需要复杂的前处理, 操作简便。但与药典标准检测方法 (HPLC-FLD、HPLC-MS) 相比, ELISA 的稳定性及重复性仍需要提高。影响 ELISA 稳定性的因素主要是抗体的稳定性和影响酶活性的诸多因素, 如溶液 pH 值、有机溶剂浓度、反应温度、反应时间甚至光照等。而影响 ELISA 重复性的因素主要是抗原与抗体的均一性, 单克隆抗体的应用使得抗体的均一性大大提高, 但人工合成的抗原往往是不同偶联比例的小分子与载体蛋白的混合物, 如何获得结构相对均一的抗原是目前需要解决的难题。此外, ELISA 的灵敏度越高其检测结果受环境的影响就相对越大, 且高灵敏度往往伴随着检测范围狭窄的问题, 如何权衡几者之间的关系仍需考量 (目前普遍认为灵敏度越高越好)。从目前已报道的应用 ELISA 检测 AFT 的方法 (表 1) 可以看出, 其 IC₅₀ 值分布在 0.001 2~20 ng/mL, 相差 16 000 多倍, 且各种抗体的交叉反应率差异显著, 因此若要扩大 ELISA 在中药 AFT 中的进一步应用, 使其真正发挥 AFT 高

通量监测的优势, 标准的建立势在必行。

4 GICA 在中药 AFT 检测中的应用

GICA 是胶体金标记抗体技术与纸色谱原理相结合的一项免疫检测技术。其本质是一种以硝酸纤维素膜为载体的固相吸附反应。胶体金是一种本身带有负电荷的呈胶状的纳米金颗粒, 根据其颗粒大小不同 (1~100 nm), 显橘红色至紫红色。因此, 其检测结果肉眼可辨, 极大地降低了对检测设备的依赖。此外, 胶体金试纸条使用简单、便于携带, 且检测时间短 (通常在 5~15 min)。凭借以上诸多优势, GICA 在 AFT 的现场化快速检测中广泛应用, 且非常适合基层推广。

Liu 等^[19]利用胶体金标记兔多抗并制备了 AFB₁ 检测试纸条, 其检测限为 2 ng/mL, 检测时间仅需 10 min。Sun 等^[20]制备的 AFB₁ 胶体金免疫检测试纸条检测限为 2.5 ng/mL, 检测时间 10 min 以内。Liu 等^[21]制备了一种能够同时识别 AFB₁ 和 AFB₂ 的单克隆抗体, 并利用胶体金标记抗体后, 制备了快速检测试纸条, 该试纸条可同时检测食品中的 AFB₁ 和 AFB₂ 总量, 其检测限为 1 ng/mL, 检测时间 10 min。试纸条的检测结果依据检测线的颜色进行判断, 但有时颜色的有无难以界定, 其主要原因在于试纸条的信号强度过低或显色物质的积聚量过少。针对此问题, Liao 等^[22]制备了一种银核金壳 (AgAu) 的纳米材料用于试纸条的制备, 其检测限为 0.1 ng/mL, 与以相同抗体和胶体金制备的试纸条相比灵敏度提高了约 10 倍, 且颜色亮度明显增强。GICA 多应用于半定量检测, 而非定量检测。其半定量的判断依据为控制线显色的前提下 (表明试纸条有效), 检测线显色则为阴性 (待检物质浓度低于检测极限), 检测线不显色则为阳性 (待检物质浓度高于检测极限), 根据检测限浓度及样品稀释倍数即可推算待检样品中的 AFT 含量。杨英等^[23]制备了专属性检测 AFB₁ 的试纸条 (灵敏度为 2.5 ng/mL), 通过甲醇-水 (80:20) 提取莲子后使用试纸条检测, 经检测 23 份莲子样品中, 6 份样品中含有 AFB₁, 且经过 UPLC/MS-MS 验证, 无假阳性和假阴性, 检测时间为 10 min, 表明 GICA 可用于中药 AFB₁ 的快速、现场化检测。从表 1 的统计来看, 目前 GICA 多用于 AFB₁ 的检测, 对 AFT 总量检测的试纸条研究较少, 且 GICA 的灵敏度分布在 0.1~2.5 ng/mL, 差异不大, 易于形成统一标准。

对于已有含量限定且有标准提取方法的待检物

表 1 ELISA 及 GICA 检测中药黄曲霉毒素方法

Table 1 Determination of ELISA and GICA used for aflatoxin in CMM

检测毒素	抗体类型	检测方法	IC ₅₀ /(ng·mL ⁻¹)	检出限/(ng·mL ⁻¹)	交叉反应率/%				文献
					AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	
AFB ₁	兔多抗	ELISA	0.210 0	0.010	100	16.80	0.8	0.8	5
AFB ₁	鸡多抗	ELISA	—	5.000	100	25.00	23.0	4.0	9
AFB ₁	鼠多抗	ELISA	3.740 0	0.002	—	—	—	—	10
AFB ₁	鼠多抗	ELISA	2.680 0	0.020	—	—	—	—	10
AFB ₁	单抗	ELISA	1.900 0	—	100	90.50	90.5	79.2	13
AFB ₁	单抗	ELISA	2.090 0	0.060	100	93.60	95.4	65.2	14
AFB ₁	单抗	ELISA	0.001 2	—	100	92.30	54.5	6.7	18
AFB ₁	单抗	ELISA	0.150 0	0.020	100	28.00	49.0	4.0	19
AFB ₁	单抗	GICA	—	2.000	—	—	—	—	19
AFB ₁	单抗	GICA	—	2.500	—	—	—	—	20
AFB ₁	单抗	ELISA	0.051 0	0.005	100	100.00	2.8	4.0	21
AFB ₁	单抗	GICA	—	1.000	—	—	—	—	21
AFB ₁	单抗	GICA	—	0.100	—	—	—	—	22
AFB ₁	单抗	GICA	—	2.500	—	—	—	—	23
AFB ₁	兔多抗	ELISA	—	0.010	100	—	7.5	—	24
AFB ₁	兔多抗	ELISA	1.000 0	0.025	100	125.00	31.3	1.3	25
AFB ₁	单抗	ELISA	0.050 0	0.210	100	125.00	100.0	83.3	26
AFB ₁	单抗	ELISA	—	0.020	100	12.60	14.3	1.2	27
AFB ₁	单抗	ELISA	0.620 0	0.050	100	5.00	31.0	2.4	28
AFB ₁	单抗	ELISA	8.000 0	1.000	100	1.50	4.0	—	29
AFB ₁	单抗	ELISA	0.130 0	—	100	59.00	162.0	33.0	30
AFB ₁	单抗	ELISA	0.059 0	—	100	74.20	42.2	23.6	31
AFB ₁	单抗	ELISA	1.530 0	—	100	95.00	100.0	100.0	32
AFG ₁	单抗	ELISA	13.920 0	—	0	0	100.0	58.9	33
AFB ₁	单抗	ELISA	1.600 0	0.190	100	6.40	<1	<1	34
AFB ₁	单抗	ELISA	—	0.036	100	133.00	13.4	14.7	35
AFB ₁	单抗	GICA	—	0.250	—	—	—	—	36
AFG ₁	单抗	ELISA	17.180 0	0.600	0	0	100.0	87.0	37
AFB ₁	单抗	ELISA	4.360 0	—	100	60.50	66.0	14.8	38
AFB ₁	单链抗体	ELISA	20.000 0	—	100	2.00	18.0	1.0	39
AFB ₁	单链抗体	ELISA	6.300 0	—	100	0.25	—	—	40

“—”表示未检测出

“—” means undetected

质,可以根据检测限及含量限定,通过标准方法提取后,固定稀释倍数,经试纸条检测后根据显色结果即可判断待检物质的含量是否达标,即实现含量合格性的快速判断。张波^[41]基于此策略,分别制备了快速检测绿原酸和木犀草苷的试纸条,并根据《中国药典》对金银花中二者含量的要求,通过提取后稀释,依据试纸条显色与否判断金银花中绿原酸或木犀草苷是否达标,实现了金银花质量合格性的快速评价。同理,根据《中国药典》对 AFT 的含量限

定和检测 AFT 试纸条的检测限,制定相应的提取及稀释标准,即可实现中药材中 AFT 含量是否合格的快速鉴定。其难点可能在于,不同的药材(植物药与动物药以及不同的用药部位)其提取的难易程度及稀释的倍数需因药而异,不易形成统一的方式。

5 结语与展望

中药外源性污染物是影响中药安全性的重要因素之一,也是影响中药声誉的原因之一。AFT 是中药中最常见且极易产生的真菌毒素之一,建立简单

快速的检测方法对提高监测水平、保障中药的安全性均具有重要意义。ELISA 和 GICA 技术为中药中 AFT 的高通量快速检测和现场化快速检测提供了有效的检测手段。虽然此类方法已建立较多,但如何形成检测标准仍需解决一些难题,如抗原的均一性、抗体的稳定性、检测方法的重复性与精密性、提取方法的合理性等。因此,笔者建议:(1)以抗原均一性为指标,进一步优化抗原合成途径;(2)以单克隆抗体作为标准抗体;(3)开发普遍适用各类中药的 AFT 有效提取方法。总之,免疫检测技术所具备的诸多优势,使其在中药安全性检测方面呈现出十分广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 冯旭,孔维军,杨美华,等. 中药中真菌毒素检测方法的最新研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(5): 1944-1953.
- [3] Li P W, Zhang Q, Zhang W. Immunoassays for aflatoxins [J]. *Trends Anal Chem*, 2009, 28(9): 1115-1126.
- [4] Chu F S, Ueno I. Production of antibody against aflatoxin B₁ [J]. *Appl Envir Microbiol*, 1977, 33(5): 1125-1128.
- [5] Gaur P K, Lau H P, Pestka J J, et al. Production and characterization of aflatoxin B_{2a} antiserum [J]. *Appl Envir Microbiol*, 1981, 41(2): 478-483.
- [6] Lau H P, Gaur P K, Chu F S. Preparation and characterization of aflatoxin B_{2a} hemiglutarate and its use for the production of antibody against aflatoxin B₁ [J]. *J Food Safety*, 1980, 3(1): 1-13.
- [7] Cervino C, Knopp D, Weller M G, et al. Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates [J]. *Molecules*, 2007, 12(3): 641-653.
- [8] Zhou Y X, Wu J J, Yu W, et al. Preparation for aflatoxin B₁-cationized bovine serum albumin based on mannich-type reaction [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 328(1/2): 79-88.
- [9] Li S Z, Marquardt R R, Frohlich A A, et al. The development of a quantitative ELISA for aflatoxin B₁ in ground peanuts using antibodies isolated from the yolk of a laying hen [J]. *J Food Prot*, 1994, 57(11): 1022-1024.
- [10] Zhang H T, Wang Z L. Preparation of artificial antigen and immunological trait for aflatoxin B₁ [J]. *Procedia Engineering*, 2012, doi: 10.1016/j.proeng.2012.01.610.
- [11] Moghaddam A, Lobersli I, Gebhardt K, et al. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten aflatoxin-B₁ from naive recombinant antibody libraries [J]. *J Immun Methods*, 2001, 254(1/2): 169-181.
- [12] Kalinichenko A A, Toporova V A, Panina A A, et al. Development and characterization of antibodies against aflatoxins [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2010, 36(1): 114-123.
- [13] Uchigashima M, Saigusa M, Yamashita H, et al. Development of a novel immunoaffinity column for aflatoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(19): 8728-8734.
- [14] Li P W, Zhang Q, Zhang W, et al. Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut [J]. *Food Chem*, 2009, 115(1): 313-317.
- [15] 张爱婷, 石延榜, 张振凌, 等. ELISA 法测定部分种子 and 果实类中药黄曲霉毒素 B₁ 含量 [J]. 医学研究杂志, 2008, 37(10): 48-49.
- [16] 李延生, 陈建民. ELISA 试剂盒定量检测中药材和中成药的黄曲霉毒素 B₁ [J]. 中草药, 2000, 31(8): 28-29.
- [17] 李汶, 庄学聪. ELISA 法检测常用中药黄曲霉毒素 B₁ [J]. 中国药事, 2000, 14(2): 29-30.
- [18] Zhang D H, Li P W, Zhang Q, et al. Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 636(1): 63-69.
- [19] Liu B H, Hsu Y T, Lu C C, et al. Detecting aflatoxin B₁ in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip [J]. *Food Control*, 2013, 30(1): 184-189.
- [20] Sun X L, Zhao X L, Tang J, et al. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B₁ in foods [J]. *Food Control*, 2006, 17(4): 256-262.
- [21] Liu J W, Lu C C, Liu B H, et al. Development of novel monoclonal antibodies-based ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for aflatoxin B₁ detection [J]. *Food Control*, 2016, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.038.
- [22] Liao J Y, Li H. Lateral flow immunodipstick for visual detection of aflatoxin B₁ in food using immuno-nanoparticles composed of a silver core and a gold shell [J]. *Microchimica Acta*, 2010, 171(3/4): 289-295.
- [23] 杨英, 谢艳君, 孔维军, 等. 基于侧流免疫层析技术制备胶体金试纸条检测莲子中黄曲霉毒素 B₁ 的研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(3): 246-250.
- [24] Lawellin D W, Grant D W, Joyce B K. Enzyme-linked immunosorbent analysis for aflatoxin B₁ [J]. *Appl Environ Microb*, 1977, 34(1): 94-96.
- [25] Pestka J J, Gaur P K, Chu F S. Quantitation of aflatoxin

- B₁ and aflatoxin B₁ antibody by an enzyme-linked immunosorbent microassay [J]. *Appl Environ Microb*, 1980, 40(6): 1027-1031.
- [26] Zhang X Y, Song M R, Yu X Z, *et al*. Development of a new broad-specific monoclonal antibody with uniform affinity for aflatoxins and magnetic beads-based enzymatic immunoassay [J]. *Food Control*, 2017, doi: 10.1016/j.foodcont.2017.02.049.
- [27] Ramakrishna N, Mehan V. Direct and indirect competitive monoclonal antibody-based ELISA of aflatoxin B₁ in groundnut [J]. *Mycotoxin Res*, 1993, 9(1): 53-64.
- [28] Kolosova A Y, Shim W B, Yang Z Y, *et al*. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁ stabilization of ELISA kit components and application to grain samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 383(1): 286-294.
- [29] Min W K, Kweon D H, Park K, *et al*. Characterisation of monoclonal antibody against aflatoxin B₁ produced in hybridoma 2C12 and its single-chain variable fragment expressed in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Food Chem*, 2011, 126(3): 1316-1323.
- [30] Jiang W X, Wang Z H, Nölke G, *et al*. Simultaneous determination of aflatoxin B₁ and aflatoxin M₁ in food matrices by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Food Anal Methods*, 2012, 6(3): 767-774.
- [31] Zhang X, Feng M, Liu L Q, *et al*. Detection of aflatoxins in tea samples based on a class-specific monoclonal antibody [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2013, 48(6): 1269-1274.
- [32] Soukhtanlooa M, Talebianb E, Golchinc M, *et al*. Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin B₁ [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2014, 35(4): 335-343.
- [33] Zhang J Y, Li P W, Zhang W, *et al*. Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin G₁ [J]. *Hybridoma*, 2009, 28(1): 67-70.
- [34] 肖 智. 高特异性黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的研制 [D]. 北京: 中国农业大学, 2010.
- [35] Rossi C N, Takabayashi C R, Ono M A, *et al*. Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed [J]. *Food Chem*, 2012, 132(4): 2211-2216.
- [36] Li X, Li P W, 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, doi: 10.1016/j.bios.2013.05.039.
- [37] Li P W, Zhou Q, Wang T, *et al*. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay method specific for the detection of G-group aflatoxins [J]. *Toxins*, 2015, 8(5): 1-11.
- [38] Kim S H, Cha S H, Karyn B, *et al*. Production of group specific monoclonal antibody to aflatoxins and its application to enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Toxicol Res*, 2011, 27(2): 125-131.
- [39] Edupuganti S R, Edupuganti O P, Hearty S, *et al*. A highly stable, sensitive, regenerable and rapid immunoassay for detecting aflatoxin B₁ in corn incorporating covalent AFB₁ immobilization and a recombinant Fab antibody [J]. *Talanta*, 2013, doi: 10.1016/j.talanta.2013.05.012.
- [40] Wang D, Xu Y, Tu Z, *et al*. Isolation and characterization of recombinant variable domain of heavy chain anti-idiotypic antibodies specific to aflatoxin B₁ [J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27(2): 118-121.
- [41] 张 波. 基于单克隆抗体的金银花指标性成分快速检测技术研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.