

引用格式: 章先, 林旭瑗, 李可, 等. 基于纳米磁珠和生物素-链霉亲和素系统的玉米赤霉烯酮高灵敏检测方法的建立及应用[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(6): 1201–1209. ZHANG Xian, LIN Xu'ai, LI Ke, *et al.* Development and application of a highly sensitive detection method for zearalenone based on magnetic nanoparticles and biotin-streptavidin system[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(6): 1201–1209.

基于纳米磁珠和生物素-链霉亲和素系统的玉米赤霉烯酮高灵敏检测方法的建立及应用

章 先¹, 林旭瑗¹, 李 可², 彭慧琴¹, 魏思雨¹, 李肖梁³, 程昌勇⁴, 宋厚辉⁴

(1. 浙江大学基础医学院, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 311202; 3. 浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310058; 4. 浙江农林大学动物科技学院/动物医学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】作为镰刀菌属 *Fusarium* 产生的具有类雌激素效应的有毒次级代谢产物, 玉米赤霉烯酮 (ZEN) 可广泛污染玉米 *Zea mays*、大豆 *Glycine max* 和小麦 *Triticum aestivum* 等农作物, 在谷物类食品和饲料中较为常见。因具有慢性、免疫和生殖毒性, 建立 ZEN 高灵敏检测方法, 对其进行暴露评估和风险控制具有重要意义。【方法】通过制备 ZEN 完全抗原-纳米磁珠复合物和生物素标记的 ZEN 单克隆抗体, 并基于生物素-链霉亲和素系统, 建立 ZEN 高灵敏酶联免疫检测方法 (MNPs-ELISA)。【结果】建立的 MNPs-ELISA 对 ZEN 检测下限 (10% 抑制质量浓度, IC_{10}) 达 $0.05\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 定量检测区间 (20%~80% 抑制质量浓度, $IC_{20}\sim IC_{80}$) 为 $0.08\sim 1.04\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 为 $0.29\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 与其他常见真菌毒素几乎无交叉反应。加标回收率高且稳定性好, 对天然污染样本中 ZEN 的定量检测结果显示: 该方法与商品化试剂盒及液相色谱-串联质谱联用技术一致性较好。【结论】本研究建立的 MNPs-ELISA 可满足对谷物和饲料样本中 ZEN 的快速定量检测, 适用于基层检验机构和农产品加工企业对本样本进行 ZEN 的筛查, 具有较好的应用前景。图 7 表 4 参 26

关键词: 玉米赤霉烯酮; 纳米磁珠; 生物素-链霉亲和素系统; 单克隆抗体; 定量检测

中图分类号: S859.84

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2025)06-1201-09

Development and application of a highly sensitive detection method for zearalenone based on magnetic nanoparticles and biotin-streptavidin system

ZHANG Xian¹, LIN Xu'ai¹, LI Ke², PENG Huiqin¹, WEI Siyu¹, LI Xiaoliang³,
CHENG Changyong⁴, SONG Houhui⁴

(1. School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 311202, Zhejiang, China; 3. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 4. College of Animal Science and Technology/College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Zearalenone (ZEN), an estrogenic mycotoxin produced by *Fusarium* species, can widely contaminate cereal crops such as *Zea mays*, *Glycine max*, and *Triticum aestivum*, and is commonly found in cereal foods and feed. Due to its chronic, immunological, and reproductive effects, ZEN poses significant health risks. It will be of great significance to establish a highly sensitive ZEN detection method for exposure assessment and risk prevention and control. [Method] Based on the biotin-streptavidin amplification system, a

收稿日期: 2025-01-17; 修回日期: 2025-05-08

基金项目: 浙江大学实验技术研究项目 (SYBGL202301); 浙江省重点研发计划项目 (2021C02058); 浙江省万人计划项目 (2021R52041)

作者简介: 章先 (ORCID: 0000-0003-4903-3009), 讲师, 博士, 从事病原生物学研究。E-mail: zhangxian073@163.com。

通信作者: 宋厚辉 (ORCID: 0000-0001-6530-5794), 教授, 博士, 从事病原生物学研究。E-mail: songhh@zafu.edu.cn

highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (MNPs-ELISA) for ZEN detection was developed by preparing ZEN complete antigen-conjugated magnetic nanoparticles (MNPs) and biotin-labeled ZEN monoclonal antibodies. [Result] The established MNPs-ELISA achieved a detection limit of $0.05 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ for ZEN (10% inhibitory concentration, IC_{10}), a quantitative detection range of $0.08\text{--}1.04 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (20%–80% inhibitory concentration range, $\text{IC}_{20}\text{--}\text{IC}_{80}$) and 50% inhibitory concentration of $0.29 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (IC_{50}), and there was almost no cross-reactivity with other common mycotoxins. Spike-recovery tests revealed high accuracy and stability. The quantitative detection results of ZEN in natural contaminated samples demonstrated that this method had good consistency with both commercial ELISA kits and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). [Conclusion] The established MNPs-ELISA method can meet the requirements for rapid quantitative detection of ZEN in cereal and feed samples, suitable for screening ZEN samples by grassroots inspection institutions and agricultural product processing enterprises, with good application prospects. [Ch, 7 fig. 4 tab. 26 ref.]

Key words: zearalenone; magnetic nanoparticles; biotin-streptavidin system; monoclonal antibody; quantitative detection

玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN) 是由镰刀菌属 *Fusarium* 产生的一类具有类雌激素效应的有毒次级代谢产物, 1962 年首次从霉变玉米 *Zea mays* 中分离得到^[1-2]。因具有细胞、免疫和生殖等多种毒性以及可致癌、致畸和致突变, ZEN 已被国际癌症研究机构 (IARC) 列为Ⅲ类致癌物^[3-4]。在中国, ZEN 是小麦 *Triticum aestivum* 和玉米及其制品中最常见的真菌毒素, 可通过污染谷类作物或动物源性食品, 经食物链危害动物及人类健康^[5-7]。鉴于其污染的广泛性和危害的严重性, 建立快速高灵敏的定量分析方法, 实现 ZEN 暴露评估和风险控制, 对保障人畜健康具有重要意义。

目前, ZEN 的常用检测方法主要包括仪器分析法和免疫学检测法^[8]。其中, 以液相色谱-串联质谱联用技术 (LC-MS/MS) 为代表的仪器分析法虽可实现精准检测, 但繁琐的样品前处理、昂贵的设备和复杂的检测流程使其难以在基层单位推广使用^[9-10]。免疫学分析法由于对操作人员和场地要求低, 特别是酶联免疫吸附法 (ELISA), 检测信号易读取, 省时高效的同时成本较低, 并且对实验结果可进行定量分析, 在真菌毒素检测领域备受青睐^[11-13]。

近年来, 为提高检测灵敏度, 包括量子点、荧光微球和磁性颗粒等在内的新型标记物以及基于化学发光、电信号转导和离子交换等策略的信号增强系统被广泛应用于免疫学方法的建立^[14-16]。其中磁性颗粒如纳米磁珠, 因粒径小且具有超顺磁性, 可与抗原/抗体进行偶联修饰, 已成为免疫标记领域的研究热点^[17-18]; 生物素-亲和素信号增强系统 (biotin-avidin-system, BAS) 不受反应环境温度、酸碱度以及离子种类和浓度的干扰, 在提高检测灵敏度的同时具有较高的稳定性^[19-20]。利用上述原理, 本研究设计了一种基于纳米磁珠和生物素-链霉亲和素系统的高灵敏检测方法, 以实现农产品中 ZEN 的快速定量检测与分析。

1 材料与方法

1.1 材料

真菌毒素标准品、N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、二甲基甲酰胺 (DMF)、羧甲基羟胺半盐酸盐 (CMO) 购自 Sigma 公司; 生物素标记试剂盒 (21435)、Zeba™ 脱盐柱和羧基修饰的纳米磁珠 M270 (15305D) 购自 Thermo 公司; 牛血清白蛋白 (BSA) 和 BSA 多克隆抗体购自上海生工; 辣根过氧化物标记的链霉亲和素 (HRP-SA) 购自 Anaspec 公司; 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 购自泰天和生物科技有限公司; 玉米赤霉烯酮单克隆抗体 (mAb) 和辣根过氧化物酶标记玉米赤霉烯酮单克隆抗体 (mAb-HRP) 为实验室自制; 其他试剂购自上海国药; 谷物样本由浙江省检验检疫科学技术研究院提供。

1.2 玉米赤霉烯酮完全抗原 (BSA-ZEN) 的合成

称取 2 mg ZEN 标准品、4 mg CMO 溶于 2.0 mL 吡啶, 37°C 振荡 ($100 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$) 反应 6 h; 所得产物

经旋转蒸发仪干燥后溶于 8.0 mL 蒸馏水并调 pH 至 8.0；使用苯溶液分 3 次 ($2.0 \text{ mL} \cdot \text{次}^{-1}$) 对产物抽提以去除未反应的 ZEN；收集液相，调 pH 至 3.0，出现白色沉淀；使用 20.0 mL 乙酸乙酯分 4 次 ($5.0 \text{ mL} \cdot \text{次}^{-1}$) 抽提沉淀；产物蒸发干燥后即为 ZEN 肟化物 (ZENO)；ZENO 溶于 0.8 mL 无水四氢呋喃后再分别加入 12.0 mg DCC 和 6.0 mg NHS，常温条件下振荡反应 ($100 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$) 2 h 后，常温条件下离心 ($2\ 500 \text{ g}$) 45 min 弃沉淀；上清经真空干燥后溶于 4.0 mL 二甲基甲酰胺；称取 40 mg 牛血清白蛋白溶于 4.0 mL $0.13 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液 (pH 7.4)，并将 ZENO 溶液逐滴加至其中，常温缓慢混匀反应 2 h 后离心弃沉淀；上清经 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 透析 48 h 后所得产物即为完全抗原 BSA-ZEN，ELISA 鉴定后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱分装保存。

1.3 纳米磁珠-玉米赤霉烯酮完全抗原复合物 (MNPs-BSA-ZEN) 的制备

采用两步法制备。第 1 步，制备纳米磁珠-抗体复合物 (MNPs-Anti-BSA)。取 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 磁珠储存液 200 μL 置于 eppendorf 管 (EP 管) 中，磁性分离后弃去液体，使用 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 为 5.0 的等体积硼酸盐缓冲液重悬洗涤 3 次后收集磁珠；加入 200 μL 预冷的含 10 mg EDC 和 12 mg NHS 混合溶液 (摩尔比为 1:2)，常温振荡活化 45 min 后采用上述相同方法重悬洗涤 3 次弃上清；加入 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 多克隆抗体 (Anti-BSA) 溶液 200 μL ，常温振荡反应 2 h；洗涤 3 次后加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 缓冲液 (Tris, pH 7.4) 100 μL ，常温振荡反应 15 min，淬灭未反应的羧基；洗涤收集磁珠，经 200 μL pH 为 7.4 的 PBS，重悬， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

第 2 步，将 BSA-ZEN 与 MNPs-Anti-BSA 孵育，制备 MNPs-BSA-ZEN。取 75 μL 上述制备的 MNPs-Anti-BSA 置于 EP 管中，磁性分离后使用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次；加入 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA-ZEN 500 μL ， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 45 min，按照相同方法洗涤 3 次后加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 200 μL 重悬，ELISA 鉴定后， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 生物素标记玉米赤霉烯酮单克隆抗体 (mAb-Bio) 的制备

使用 Thermo fisher 公司的 EZ-Link™ Sulfo-NHS 生物素化试剂盒 (21425) 对抗体进行标记。称取 3.5 mg 磺基琥珀酰亚胺-6-(生物素) 己酸 (Sulfo-NHS-LC-Biotin) 溶于 700 μL 超纯水，配置质量浓度为 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生物素溶液。标记时，生物素的摩尔数应为抗体的 20 倍左右。经计算，吸取 145 μL 上述生物素溶液加入待标记的 1 mL 单克隆抗体 mAb 中 (质量浓度为 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)，上下颠倒充分混匀后常温静置反应 2 h；标记产物经 Zeba™ 脱盐柱 $1\ 000 \text{ g}$ 离心 1 min，重复 3 次，以去除体系中未反应的生物素分子，采用 4'-羟基偶氮苯-2-羧酸 (HABA) 法^[21] 和 ELISA 鉴定后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 基于纳米磁珠和生物素-链霉亲和素系统检测 ZEN 方法 (MNPs-ELISA) 的建立

检测原理如图 1 所示：包被 MNPs-BSA-ZEN 与游离 ZEN 竞争结合 mAb-Bio，再与 HRP-SA 形成免疫反应复合物，催化底物显色后通过测定产物吸光度，对样本中 ZEN 质量浓度进行分析。

具体步骤：取稀释后的 MNPs-BSA-ZEN 10 μL 于 96 孔板，设置 3 个平行孔，250 μL 梯度稀释的 ZEN 标准品与 250 μL 生物素标记 mAb-Bio 混匀后，加入反应孔， $150 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水平振荡充分反应；待反应结束后，富集并洗涤磁珠，洗涤缓冲液为体积分数为 0.05% 吐温-20 (Tween-20) 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS (PBST)， $200 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ；每孔加入 150 μL 辣根过氧化物酶标记的 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ HRP-SA， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水平振荡反应 45 min；按照相同方法富集和洗涤磁珠后，加入底物 TMB， $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水平混匀显色 5 min， $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 终止反应 ($50 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$)，读取 450 nm 处的吸光度 [$D(450)$]。

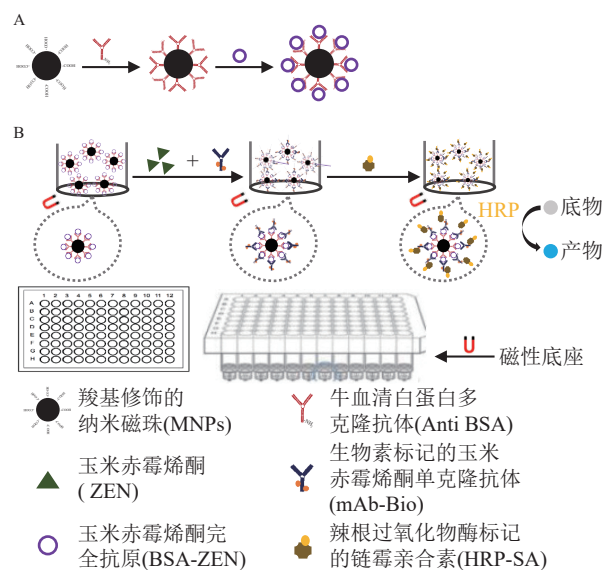


图 1 基于纳米磁珠和生物素-链霉亲和素系统检测 ZEN 原理图

Figure 1 Schematic diagram of MNPs-ELISA for the detection of ZEN

在该反应模式下 MNPs-BSA-ZEN 过量会造成背景值过高, 导致检测灵敏度降低, mAb-Bio 用量同样影响检测效果。采用棋盘阵法^[22]对 MNPs-BSA-ZEN 和 mAb-Bio 作用稀释倍数进行优化, 在达到最佳检测灵敏度的同时降低实验成本。MNPs-BSA-ZEN 稀释倍数依次为 1:10、1:20、1:40 和 1:80; mAb-Bio 稀释倍数依次为 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000 和 1:16 000。选择 $D(450)$ 在 1.0 左右的抗原抗体稀释倍数组合为最佳。

竞争反应体系中, 竞争时间会影响最终的检测效果。时间过短会导致竞争不完全, 影响检测灵敏度, 时间过长则影响检测效率。分别设置竞争时间为 15、30、45、60、75 min, 在相同稀释倍数竞争抗原条件下, 计算抑制率, 确定最佳时间。相关实验条件的优化均重复进行 3 次测定, 取均值进行数据分析。

在最佳条件下, 梯度稀释 ZEN 标准品 (起始质量浓度为 $8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 依次进行 2 倍稀释, 共 10 个梯度), 每个稀释倍数 3 个平行, 同时设置阴性对照和空白对照。阴性对照为标准品稀释液和含质量分数为 0.05% 脱脂奶粉的 PBST 等体积混合液, 空白对照为 mAb-Bio 和标准品稀释液等体积混合液。以 ZEN 质量浓度的对数为横坐标, 抑制率为纵坐标, 进行线性拟合分析, 计算检测限 (10% 抑制质量浓度, IC_{10})、检测区间 (20%~80% 抑制质量浓度, IC_{20} ~ IC_{80}) 和半数抑制质量浓度 (IC_{50}), 评价该检测方法的敏感性。

1.6 MNPs-ELISA 检测法特异性分析

分别将 ZEN、黄曲霉毒素 B_1 (AFB₁)、赭曲霉毒素 A (OTA)、伏马毒素 (FB₁)、呕吐毒素 (DON)、桔青霉毒素 (CIT) 和展青霉毒素 (PAT) 作为竞争抗原, 通过配制成梯度质量浓度的标准品溶液, 作为竞争抗原, 绘制标准抑制曲线并获得 IC_{50} , 按照下列公式计算交叉反应率, 确定该方法的特异性^[23]。交叉反应率 = $(A_{ZEN}) / (A_{\text{类似物}}) \times 100\%$ 。其中: A_{ZEN} 为 ZEN 的 IC_{50} , $A_{\text{类似物}}$ 为类似物的 IC_{50} 。

1.7 基质影响的消除

检测时因涉及对谷类样本的萃取, 为降低有机溶剂和样本中蛋白质、纤维素等对检测效果的影响, 同时避免稀释倍数过高降低检测灵敏度, 参考文献 [24] 对萃取液的最佳稀释倍数进行优化。

1.8 样本萃取和加标试验

参考文献 [25] 进行样本萃取和加标。萃取: 待检样本干燥后研磨过筛, 取 3 g 置于 50 mL 离心管, 加入 15 mL 体积比为 7:3 的甲醇:水溶液, 振荡萃取 ($150 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$) 15 min, 静置 10 min 后 4 000 g 离心 20 min, 取上清定量滤纸过滤, 检测前需使用超纯水稀释。加标: ZEN 阴性样本烘干后研磨过筛, 加入 ZEN 标准品溶液并充分混匀, 放置过夜待检。不同质量分数分别设置 3 个平行, 重复测定 3 次, 分别计算回收率和变异系数。

1.9 MNPs-ELISA 检测法与商品化试剂盒和 LC-MS/MS 比较试验

分别采用 MNPs-ELISA 检测法、商品化检测试剂盒和 LC-MS/MS 平行检测天然 ZEN 阳性样本, 并分析检测结果的一致性。

2 结果与分析

2.1 ZEN 完全抗原的鉴定

使用辣根过氧化物酶标记的 ZEN 单克隆抗体对两步法制备的 BSA-ZEN 进行 ELISA 鉴定。结果如图 2 所示: BSA-ZEN 的 $D(450)$ 与 BSA 对照组比值远大于 2.1, 表明其可被特异性抗体检出, 完全抗原合成成功, 满足建立相关免疫学检测方法的需求。

2.2 MNPs-BSA-ZEN 的鉴定

取等量纳米磁珠 (MNPs)、纳米磁珠-BSA 多克隆抗体复合物 (MNPs-Anti-BSA) 和纳米磁珠-ZEN 完全抗原复合物 (MNPs-BSA-ZEN), 使用辣根过氧化物酶标记的 ZEN 单克隆抗体 (mAb-HRP) 进行 ELISA 鉴定。结果如图 3 所示: MNPs-BSA-ZEN 的 $D(450)$ 与各对照组比值均远大于 2.1, 表明复合物制备成功, 后续可作为免疫反应载体用于检测方法的建立。

2.3 mAb-Bio 的鉴定

分别采用 HABA 法和 ELISA 对生物素标记抗体进行鉴定。经 HABA 法计算单克隆抗体标记效率,

结果显示：mAb 与 Bio 的摩尔比为 4.5:1.0，即每分子单克隆抗体上约标记有 4.5 分子的生物素，初步证明标记成功。

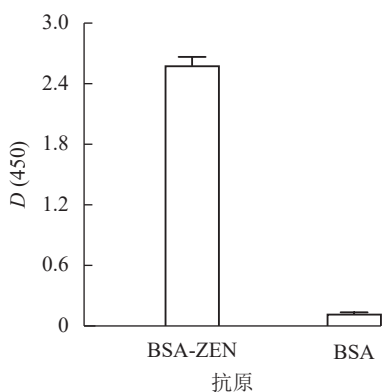


图 2 BSA-ZEN 的 ELISA 鉴定

Figure 2 Identification of the ZEN conjugates by ELISA using specific monoclonal antibody

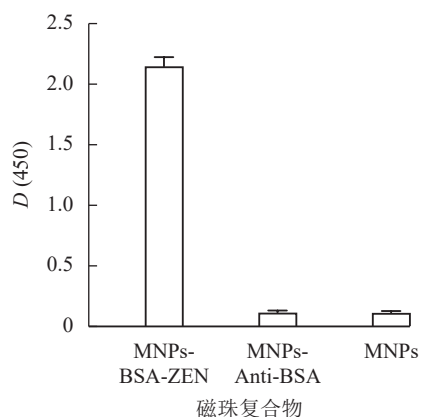


图 3 MNPs-BSA-ZEN 的 ELISA 鉴定

Figure 3 Identification of the ZEN conjugates coated magnetic nanoparticles

将 mAb-Bio 和未标记单克隆抗体 (mAb) 作为包被原，使用辣根过氧化物标记的链霉亲和素 (HRP-SA) 进行 ELISA 鉴定，结果如图 4 所示。mAb-Bio 的 $D(450)$ 与未标记对照组的比值远大于 2.1，表明抗体标记成功，为基于生物-链霉亲和素系统的高效识别奠定基础。

2.4 MNPs-ELISA 各组分作用浓度和竞争反应时间的确定

按照 1.5 中所述，棋盘阵法 $D(450)$ 结果如表 1 所示。MNPs-BSA-ZEN 和 mAb-Bio 最佳稀释倍数分别为 1:40 和 1:4 000。由竞争时间优化结果 (图 5) 可知：综合检测时间和灵敏度，将竞争反应时间确定为 45 min。

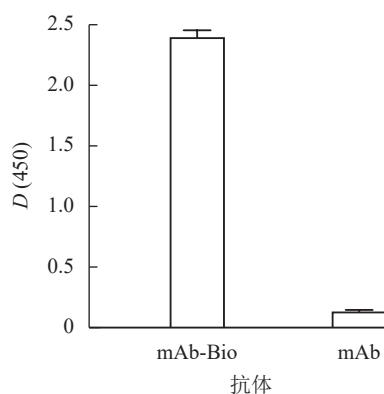


图 4 mAb-Bio 的 ELISA 鉴定

Figure 4 Identification of biotinylated monoclonal antibody against ZEN (mAb-Bio) by ELISA

表 1 纳米磁珠完全抗原复合物和生物素标记抗体组合浓度棋盘法结果

Table 1 Chessboard titration of MNPs-BSA-ZEN and the mAb-Bio						
MNPs-BSA-ZEN 稀释倍数	不同 mAb-Bio 稀释倍数所对应的 $D(450)$					阴性对照
	1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:16 000	
1:10	2.787 2	2.620 9	1.957 7	1.729 5	0.879 3	0.063 5
1:20	2.438 6	2.260 2	1.504 9	0.869 1	0.397 1	0.053 9
1:40	1.829 3	1.629 3	1.139 2	0.521 8	0.267 5	0.043 8
1:80	1.614 5	1.447 6	0.809 2	0.517 5	0.250 1	0.041 7

2.5 基于纳米磁珠和生物素-链霉亲和素系统检测 ZEN 方法 (MNPs-ELISA) 检测效果

在 2.4 中确定的最佳条件下，按照 1.5 中所述步骤，采用 MNPs-ELISA 对 ZEN 进行检测。以竞争抗原 ZEN 标准品质量浓度对数为横坐标，以抑制率为纵坐标，通过 GraphPad Prism 7 软件进行线性拟合分析 (图 6)。根据所得的线性方程，经计算，检测下限 (IC_{10}) 和半数抑制率 (IC_{50}) 分别为 0.05 和 0.29 $ng \cdot mL^{-1}$ ，定量检测范围 ($IC_{20} \sim IC_{80}$) 为 0.08~1.04 $ng \cdot mL^{-1}$ 。

2.6 MNPs-ELISA 检测 ZEN 特异性分析

采用建立的 MNPs-ELISA 按照 1.6 中所述对常见真菌毒素进行检测，并分别绘制标准抑制曲线

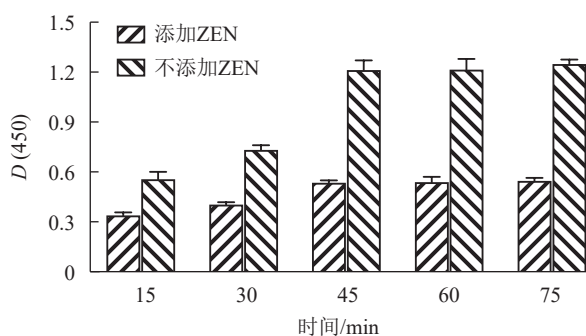


图5 不同竞争反应时间对 MNPs-ELISA 检测效果的影响

Figure 5 Determination of suitable incubation time by MNPs-ELISA with ZEN or without ZEN addition

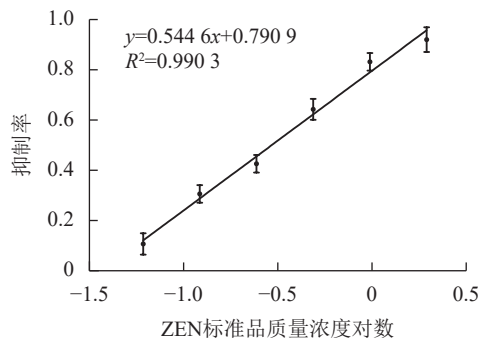


图6 MNPs-ELISA 检测 ZEN 竞争抑制率线性分析

Figure 6 Linear analysis of the rate of inhibition against ZEN with different concentration in MNPs-ELISA

(图 7), 交叉反应率计算结果见表 2, 表明该方法对农产品中其他常见真菌毒素基本无交叉反应, 特异性高。

2.7 基质影响的消除

分别选取玉米、小麦和大豆 *Glycine max* 阴性样本, 按照 1.8 所述制备萃取液, 采用稀释法消除基质影响。通过绘制不同稀释倍数萃取液的基质添加曲线, 并与标准抑制曲线进行对比。结果显示: 上述样本萃取液基质效应在经超纯水 4 倍稀释后, 基本消除。在后续检测时, 萃取样本经超纯水 4 倍稀释后即可用于检测, 简单快捷。

2.8 MNPs-ELISA 对 ZEN 加标样本的检测

根据 MNPs-ELISA 的定量检测范围, 设置加标质量分数依次为 1.25、2.50、5.00 和 10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别对玉米、小麦和大豆样本 (LC-MS/MS 验证 ZEN 阴性) 进行加标试验, 各质量分数设置 3 个平行且重复测定 3 次。结果表明: 本研究建立的 MNPs-ELISA 加标回收率为 83.2%~110.5%, 且较为稳定 (变异系数为 6.3%~10.5%, 表 3)。

2.9 MNPs-ELISA 与商品化试剂盒和 LC-MS/MS 检测结果相关性分析

分别运用 MNPs-ELISA、商品化试剂盒和 LC-MS/MS 对 ZEN 污染的阳性样本进行定量检测, 结果如表 4 所示。相关性分析显示: MNPs-ELISA 检测结果与商品化试剂盒和 LC-MS/MS 间一致性较好 (皮尔逊相关系数分别为 0.9647 和 0.9277), 表明 MNPs-ELISA 方法可满足对实际样本中 ZEN 污染的快速定量检测需求。

3 结论与讨论

本研究通过合成 ZEN 完全抗原, 并包被至纳米磁珠表面, 制备纳米磁珠-ZEN 完全抗原复合物 (MNPs-BSA-ZEN) 作为免疫反应载体; 同时采用生物素标记 ZEN 单克隆抗体 (mAb-Bio), 将纳米磁珠和生物素-链霉亲和素系统相结合, 优化建立了高灵敏酶联免疫检测法 (MNPs-ELISA)。与基于相同抗体的常规 ci-ELISA 相比 (检测下限为 0.12 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 在不增加检测时间的基础上, 检测下限达 0.05 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 灵敏度得到显著提升, 实际样品检出限为 1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 完全满足谷物及饲料中 ZEN 的限量标准^[26]。

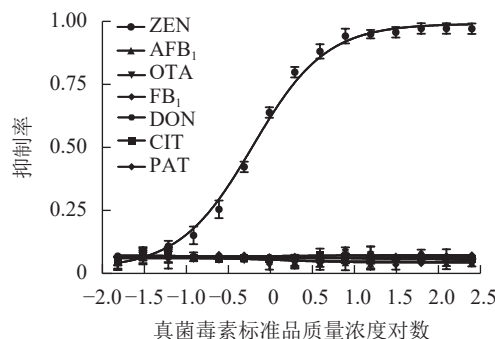


图7 MNPs-ELISA 检测不同真菌毒素标准抑制曲线

Figure 7 Competitive inhibition rates of different mycotoxins in MNPs-ELISA

表 2 MNPs-ELISA 交叉反应率计算结果

Table 2 Results of cross reactivity rate calculation for MNPs-ELISA

竞争物	IC ₅₀ / (ng·mL ⁻¹)	交叉反应率/%	竞争物	IC ₅₀ / (ng·mL ⁻¹)	交叉反应率/%
ZEN	0.29	100	DON	>500	<0.058
AFB ₁	>500	<0.058	CIT	>500	<0.058
OTA	>500	<0.058	PAT	>500	<0.058
FB ₁	>500	<0.058			

作为应用最为广泛的免疫标记技术，酶免疫技术具有特异性高和方便快捷等优势；纳米磁珠虽粒径小但总表面积大，能结合更多抗原或抗体，提升反应效率，其表面的特异性修饰可减少免疫反应过程的非特异性结合，降低背景信号，通过外部磁场即可实现磁珠-靶标复合物与样本的快速分离；生物素与链霉亲和素间的结合稳定且几乎不可逆，不受其他生物分子干扰，属于自然界中已知最强的非共价互作，可实现信号放大，提升检测灵敏度。基于此，本研究利用纳米磁珠和生物素-链霉亲和素系统建立的 MNPs-ELISA，相较常规固相反应模式，通过借助纳米磁珠的液相竞争使得反应更加充分；生物素-链霉亲和素系统的联合使用进一步提升了检测灵敏度；虽然纳米磁珠具有一定的使用成本，但该检测模式无需预包被检测板，磁珠复合物性质稳定，4 ℃ 条件可放置 1 a，根据样本的具体数量随用随取，节约时间和人力，并且对酶标板的要求较低，总体降低了使用成本；酶免疫技术经简单的免疫反应，通过检测吸光度即可对结果进行定量分析，相较于 LC-MS/MS 等仪器法，无需借助复杂设备，操作简单，因此该新型酶联免疫检测法在基层检验机构和饲料食品加工企业中更易推广使用，具有较好的应用前景。

表 3 样本的加标回收率和批间变异系数

Table 3 Recovery and co-efficient of variances of samples spiked with different levels of ZEN by MNPs-ELISA

样本	ZEN质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)		回收率/%	变异系数/%
	加标	检出		
玉米	1.25	1.04	83.2±5.3	6.4
	2.50	2.16	86.4±6.5	7.5
	5.00	5.19	103.8±9.4	9.1
	10.00	9.37	93.7±7.1	7.6
小麦	1.25	1.12	89.6±5.6	6.3
	2.50	2.69	107.6±8.9	8.3
	5.00	5.23	104.6±7.7	7.4
	10.00	11.05	110.5±9.8	8.9
大豆	1.25	1.08	86.4±8.2	9.5
	2.50	2.13	85.2±6.1	7.2
	5.00	5.17	103.4±10.9	10.5
	10.00	9.53	95.3±8.3	8.7

说明：回收率数据为平均值±标准差。

表 4 MNPs-ELISA、商品化试剂盒和 LC-MS/MS 对天然样本中 ZEN 的定量检测结果

Table 4 Quantitative detection of ZEN in natural samples by the MNPs-ELISA, commercial ELISA kit and LC-MS/MS

样本 编号	ZEN/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)			样本 编号	ZEN/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
	MNPs-ELISA	商品化试剂	LC-MS/MS		MNPs-ELISA	商品化试剂	LC-MS/MS
1	6.21±0.75	5.98±0.62	8.35±0.69	9	24.59±1.62	23.17±2.06	27.16±1.35
2	17.39±1.53	18.05±1.71	21.47±1.82	10	8.16±0.65	7.93±0.61	10.86±0.57
3	7.13±0.61	6.95±0.52	9.31±0.29	11	17.68±1.39	18.03±1.67	15.71±1.35
4	9.07±0.82	10.35±0.97	12.91±1.14	12	11.32±0.83	10.65±0.83	13.74±1.03
5	14.25±1.46	13.81±1.15	16.07±1.45	13	20.71±1.63	21.29±1.95	23.51±2.17
6	3.93±0.68	5.07±0.43	4.32±0.29	14	19.34±2.05	20.17±1.63	18.05±1.39
7	15.23±1.37	16.15±1.45	18.68±0.87	15	11.17±0.56	15.61±1.25	13.92±0.61
8	14.38±1.21	17.59±1.62	16.03±1.18	16	17.67±1.45	16.28±1.46	14.15±1.26

说明：数据为平均值±标准差。

4 参考文献

[1] ZHEN Hongmin, HU Yumeng, XIONG Ke, *et al.* The occurrence and biological control of zearalenone in cereals and cereal-based feedstuffs: a review [J]. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2024, **41**(10): 1344–1359.

[2] NESIC K, IVANOVIC S, NESIC V. Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium fungi* [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, **228**: 101–120.

[3] RAI A, DAS M, TRIPATHI A. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, **60**(16): 2710–2729.

[4] ESCRIVÁ L, FONT G, MANYES L. *In vivo* toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: a review [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, **78**: 185–206.

- [5] 李凯龙, 刘昆仑, 辛颖, 等. 玉米赤霉烯酮生物降解及其脱毒机制研究进展[J]. *食品科学*, 2025, **46**(1): 246–254.
LI Kailong, LIU Kunlun, XIN Ying, *et al.* Research progress on zearalenone biodegradation and its detoxification mechanism [J]. *Food Science*, 2025, **46**(1): 246–254.
- [6] HUDU A R, ADDY F, MAHUNU G K, *et al.* Zearalenone contamination in maize, its associated producing fungi, control strategies, and legislation in Sub-Saharan Africa [J]. *Food Science & Nutrition*, 2024, **12**(7): 4489–4512.
- [7] ESAN O O, OKANLAWON A A, OGUNRO B N, *et al.* Seasonal variation of mycotoxin levels in poultry feeds and feed ingredients in Oyo State, Nigeria [J]. *Mycotoxin Research*, 2024, **40**(2): 319–325.
- [8] QU Zheng, REN Xianfeng, DU Zhaolin, *et al.* Fusarium mycotoxins: the major food contaminants [J]. *mLife*, 2024, **3**(2): 176–206.
- [9] 莫凡, 姚婷, 胡深, 等. 免疫磁珠高通量全自动净化结合高效液相色谱快速测定饲料中玉米赤霉烯酮含量[J]. *动物营养学报*, 2024, **36**(11): 7454–7466.
MO Fan, YAO Ting, HU Shen, *et al.* Determination of feed zearalenone content using high-throughput automatic immunomagnetic beads purification combined with high-performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2024, **36**(11): 7454–7466.
- [10] 章先, 王继璇, 程高钊, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 高灵敏定性定量免疫层析检测方法的建立[J]. *浙江农林大学学报*, 2022, **39**(5): 1096–1103.
ZHANG Xian, WANG Jixuan, CHENG Gaochuan, *et al.* A highly sensitive qualitative and quantitative immunochromatographic method for the detection of aflatoxin B₁ [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, **39**(5): 1096–1103.
- [11] CHEN Chaochao, LUO Liang, SHEN Jianzhong, *et al.* Metal-organic framework-based cascade catalysis-enabled fluorescent ELISA with higher enzymatic stability for zearalenone detection in maize [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, **73**(1): 790–797.
- [12] 朱燕, 姚香澳, 宫智勇. 稻谷中真菌毒素的暴露污染、检测技术及防控研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, **15**(15): 264–274.
ZHU Yan, YAO Xiang'ao, GONG Zhiyong, *et al.* Research progress on exposure, detection and control of mycotoxins in rice grains [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, **15**(15): 264–274.
- [13] SARMAST E, FALLAH A A, JAFARI T, *et al.* Occurrence and fate of mycotoxins in cereals and cereal-based products: a narrative review of systematic reviews and meta-analyses studies [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2021, **39**: 68–75.
- [14] 文湘郡, 滕鑫, 丁星宇, 等. 一种新型检测大肠杆菌 O157:H7 的免疫磁珠-量子点纳米颗粒的制备和应用[J]. *食品与发酵工业*, 2022, **48**(13): 48–54.
WEN Xiangjun, TENG Xin, DING Xingyu, *et al.* Preparation and application of a novel immunomagnetic beads-quantum dot nanoparticles for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, **48**(13): 48–54.
- [15] XING Yanping, LAN Xianli, LIU Xiyu, *et al.* Nanomaterial-mediated immunosensors and their performance in detecting tumor markers [J]. *Discovery Medicine*, 2024, **36**(186): 1316–1333.
- [16] HANG Tianxiang, MENG Xingxing, WU Yueyue, *et al.* Ion-exchange reaction-mediated hierarchical dual z-scheme heterojunction for split-type photoelectrochemical immunoassays [J]. *Analytical Chemistry*, 2022, **94**(49): 17295–17302.
- [17] HA Y, KIM I. Recent developments in innovative magnetic nanoparticles-based immunoassays: from improvement of conventional immunoassays to diagnosis of COVID-19 [J]. *BioChip Journal*, 2022, **16**(4): 351–365.
- [18] HUANG Jingjie, ZHAO Kunxia, LI Miao, *et al.* Development of an immunomagnetic bead clean-up ELISA method for detection of Maduramicin using single-chain antibody in chicken muscle [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2021, **32**(1): 820–836.
- [19] DENG Daokun, LI Xuan, ZHANG Jiujie, *et al.* Biotin-avidin system-based delivery enhances the therapeutic performance of MSC-derived exosomes [J]. *ACS Nano*, 2023, **17**(9): 8530–8550.
- [20] WARD T R. Artificial Metalloenzymes Based on the biotin-avidin technology: enantioselective catalysis and beyond [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2011, **44**(1): 47–57.
- [21] DIDEVARA E, SADOOGH ABBASIAN S, SADEGHI A, *et al.* Production of mutant streptavidin protein and investigation

- of its effect on the performance of streptavidin [J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2023, **26**(5): 572–578.
- [22] JIANG Wenxiao, LUO Pengjie, WANG Xia, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of nitrofurantoin metabolite, 1-amino-hydantoin, in animal tissues [J]. *Food Control*, 2012, **23**(1): 20–25.
- [23] 章先, 徐浩瑜, 赵鹿如, 等. 基于 CdSe 阳离子交换的玉米赤霉烯酮新型荧光免疫检测方法的建立及应用[J]. 菌物学报, 2022, **41**(5): 819–829.
- ZHANG Xian, XU Haoyu, ZHAO Luru, *et al.* Sensitive fluorescence immunoassay for the detection of zearalenone base on signal amplification induced by cation exchange in CdSe quantum dots [J]. *Mycosystema*, 2022, **41**(5): 819–829.
- [24] 章先, 方云, 付子贤, 等. 基于纳米金和辣根过氧化物酶双标记抗体的黄曲霉毒素 B₁ 高灵敏检测方法的建立及应用[J]. 菌物学报, 2018, **37**(11): 1516–1524.
- ZHANG Xian, FANG Yun, FU Zixian, *et al.* An efficient method for aflatoxin B₁ detection based on gold nanoparticles labeled with monoclonal antibody-horseradish peroxidase complex [J]. *Mycosystema*, 2018, **37**(11): 1516–1524.
- [25] WANG Yuankai, YAN Yaxian, JI Wenhui, *et al.* Novel chemiluminescence immunoassay for the determination of zearalenone in food samples using gold nanoparticles labeled with streptavidin-horseradish peroxidase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(18): 4250–4256.
- [26] 魏振, 王秋玲, 石继超, 等. 玉米赤霉烯酮检测方法研究现状[J]. 动物医学进展, 2022, **43**(1): 117–121.
- WEI Zhen, WANG Qiuling, SHI Jichao, *et al.* Progress on detection methods of zearalenone [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, **43**(1): 117–121.