

赭曲霉毒素 A 的高灵敏时间分辨荧光免疫分析*

黄 飏^{1,2)} 陶文沂¹⁾ 张莲芬¹⁾ 时 瑾¹⁾ 杨海麟¹⁾ 金 坚^{1)**}

(¹⁾江南大学生物工程学院生物制药系, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036;

²⁾江苏省原子医学研究所, 无锡 214063)

摘要 采用时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术建立快速的高灵敏度的赭曲霉毒素 A (OTA) 全自动检测方法. 将 OTA-BSA 作为免疫分子免疫 Balb/c 小鼠, OTA-KLH 为筛选用抗原包被板, 用间接酶联免疫分析 (ELISA) 法筛选出专一针对 OTA 的高效价的阳性克隆 3G9, 用杂交瘤细胞制备抗 OTA 单克隆抗体. 用 OTA-BSA 包被 96 孔板为固相抗原, 与游离 OTA 共同竞争有限的抗 OTA 单克隆抗体, 以稀土离子 Eu^{3+} 标记的羊抗鼠抗体进行示踪, 采用间接竞争免疫分析方法在解离增强荧光免疫分析体系中建立 OTA-TRFIA. 该方法的灵敏度为 $0.03 \mu\text{g/L}$, 测量范围为 $0.03 \sim 1000 \mu\text{g/L}$, 批内和批间变异分别为 3.7% 和 5.3%, 平均回收率为 94.2%, 与赭曲霉毒素 B 的平均交叉反应为 3.7%, 与黄曲霉毒素 B1、牛血清白蛋白和苯基丙氨酸无交叉反应, 说明抗体的特异性很好. 8 条不同时间进行的间接竞争 OTA-TRFIA 的效应点均值 ED_{50} 、 ED_{50} 、 ED_{20} 分别为 $(0.33 \pm 0.02) \mu\text{g/L}$ 、 $(1.44 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$ 和 $(5.22 \pm 0.12) \mu\text{g/L}$, 说明方法的稳定性好, 样品经 TRFIA 和 ELISA 试剂盒同时检测 OTA, 两者的相关系数为 0.925, 结果相符. 研究表明, OTA-TRFIA 是目前报道的 OTA 检测中最灵敏的方法, 该分析方法稳定性好, 可测范围宽, 具有很好的应用前景.

关键词 赭曲霉毒素 A (OTA), 时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA), 真菌毒素, 单克隆抗体

学科分类号 R155.31

赭曲霉毒素是真菌曲霉 *Ochraceous* 和几种 *Penicillium* 真菌产生的一种毒素, 它包括 7 种结构类似的化合物, 其中赭曲霉毒素 A (OTA) 的毒性最强. OTA 的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$, 分子质量为 403.8. OTA 在大多数谷物中均可分离到, 包括大麦、小麦、燕麦、玉米等, 以这些谷物作为饲料的家禽也会受到污染, 如 OTA 会影响动物的肾导致进食消化能力下降、生长减慢, 同时, 家禽表现为繁殖力下降, 影响母鸡的产蛋量. 人食用被霉菌污染的粮食, 油料作物以及发酵食品等也会引起 OTA 中毒, 其中毒往往表现为明显的地方性和季节性. OTA 已经被证明也对人的肾脏产生损害, 也是一种致癌物质, 临床表现较为复杂, 有急性中毒、慢性中毒以及致癌、致畸和致突变等^[1,2].

一般人或动物所摄入的食物中赭曲霉毒素的含量达到 $10 \sim 20 \mu\text{g/kg}$, 就会导致中毒, 因此为了保障人们的健康, 开展食品中 OTA 的卫生检测研究是很有必要的. 由于 OTA 的毒性大, 一些国家的限量标准很低, 这就需要采用高灵敏的检测方法, 我们采用时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 报道了高灵敏的 OTA-TRFIA 检测方法, 其灵敏度、可测范围和稳定性大大好于现有的酶联免疫分析 (ELISA).

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料. 赭曲霉毒素 A、偶联牛血清白蛋白的赭曲霉毒素 A (OTA-BSA)、二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)、牛血清白蛋白 (BSA)、钥蓝蛋白 (KLH)、福氏完全佐剂和不完全佐剂为 Sigma 公司产品. Balb/c 小鼠为江苏省原子医学研究所动物中心提供. 亲和层析纯化的羊抗鼠 IgG 为洛阳华美生物工程公司产品. 超纯水由本室采用 Barnstead 公司的超纯水器 (D7033) 制备. Eu^{3+} 标记盒 (1244-302) 为 PE-Wallac 产品; Sephadex G-25、PD-10 和 Sepharose CL-6B 为 Pharmacia 公司产品. 96 孔微孔板为 Nunc 公司产品. 其他试剂均为国产分析纯. OTA-ELISA 试剂盒为美国 NEOGEN 公司产品.

1.1.2 仪器. 紫外吸收测定仪 DU-650 为 Beckman 公司产品, 酶标测定仪 3550-UV 为 BIO-RAD 公司

*国家“十五”科技公关项目 (2004BA501A16) 和江苏省无锡市社会发展项目 (SC030006).

** 通讯联系人.

Tel: 051-05860236, E-mail: jinjian31@hotmail.com

收稿日期: 2005-01-26, 接受日期: 2005-03-28

产品, 全自动 TRFIA 检测仪 Auto DELFIA₁₂₃₅ 为 PE-Wallac 产品.

1.2 方法

1.2.1 人工抗原的制备.

OTA 是典型的半抗原, 需与大分子物质结合形成人工抗原后才有免疫原性. 免疫时采用 OTA-BSA 人工抗原, 产生的抗体要通过固相抗原筛选. 由于 OTA 是小分子化合物, 难以直接吸附到酶标板上, 因此筛选时需制备另一种人工抗原. OTA 中的羧基为活性基团, 可与蛋白质的氨基结合, 因此可用碳二亚胺法, 使 OTA 与大分子蛋白 KLH 结合, 以合成的 OTA-KLH 作为固相筛选抗原.

OTA-KLH 抗原的制备步骤如下: 用 1 ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解 1 mg OTA; 用 1 ml 的 0.1 mol/L PBS pH 7.0 缓冲液溶解 1 mg KLH 载体蛋白. 取 0.5 ml OTA 的溶液加到 KLH 的溶液中; 溶解 2 mg 碳二亚胺 (EDC) 于 1 ml 双蒸水, 并取 50 μ l 加入到上述混合液中, 室温反应 2 h 后离心, 取上清液用 Sephadex G-25 分离, 第一个洗脱峰合并后进行紫外扫描检测, 合格后分装备用.

1.2.2 抗 OTA 单克隆抗体的制备. 用 OTA-BSA 人工抗原免疫 Balb/c 小鼠, 首次用 OTA-BSA 与福氏完全佐剂混匀后于每只小鼠皮下和腹腔注射 0.1 mg, 以后每隔 2 周将 OTA-BSA 与福氏不完全佐剂混匀后再免疫 4 次. 待产生抗体后取小鼠脾细胞与 SP2/O 骨髓瘤细胞融合, 融合剂为 50% 聚乙二醇 (PEG), 加 HAT (含胎牛血清) 选择性培养液于 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 培养箱培养. 酶标板包被 OTA-KLH 形成筛选用抗原, 用间接 ELISA 法筛选阳性克隆. 筛选到的阳性克隆再用有限稀释法克隆化, 经 3 次克隆后建立了 3 株分泌高专一性抗 OTA 的杂交瘤细胞株 2D8、3G9 和 5D6. 其中 3G9 的效价最好, 将 3G9 杂交瘤细胞注射到以降植烷敏化的 Balb/c 小鼠腹腔中, 10 日后取腹水, 分装后 -20 $^{\circ}$ C 存放备用^[3].

1.2.3 Eu³⁺-羊抗鼠抗体的制备. 取溶解于 50 mmol/L PBS pH 7.0 的 10 g/L 羊抗鼠抗体 2 ml, 经 PD-10 柱转换缓冲条件, 洗脱液为含 0.155 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 8.5 缓冲液. 收集蛋白质峰, 经紫外吸收分析定量 (1.46A₂₈₀ ~ 0.74A₂₆₀), 用上述洗脱液稀释羊抗鼠抗体至 2 g/L. 取 1 ml 已转换缓冲液的羊抗鼠抗体, 加入 Eu³⁺ 标记盒中的含 0.5 mg Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-

苄基]-二乙烯三胺四乙酸 (Eu³⁺-DTTA) 的小瓶中, 30 $^{\circ}$ C 磁力搅拌反应 20 h. 反应液经用 80 mmol/L Tris-HCl pH 7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1 cm $\times$ 40 cm) 层析, A₂₈₀ 监测收集蛋白质峰, 稀释分装备用^[4].

1.2.4 固相抗原的制备. 将 OTA-BSA 用 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 9.6 缓冲液稀释至 2 mg/L, 96 孔微孔板各孔加 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜. 弃去包被液, 冲洗 3 次, 加 150 μ l 含 3 g/L BSA 的上述缓冲液封闭, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜. 弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存^[4].

1.2.5 主要试剂的配制.

a. 用 OTA 纯品制备 OTA 标准溶液, 浓度分别为 0.1 μ g/L, 0.5 μ g/L, 1 μ g/L, 5 μ g/L, 10 μ g/L, 100 μ g/L, 1 000 μ g/L, 稀释液为甲醇:水 = 7:3 的溶液, 它也是 0 μ g/L 的标准溶液.

b. 分析缓冲液为含 8 mmol/L NaCl、0.1% BSA、0.2% 牛 IgG、50 μ mol/L 二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)、0.1 ml/L Tween-80 和 0.1% NaN₃ 的 pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液.

c. 洗涤液为 14.5 mmol/L NaCl、0.2 ml/L Tween-80 和 0.2% NaN₃ 的 50 mmol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液.

d. 增强液的配制: 1 L pH 3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮 (β -NTA), 50 μ mol 三正辛基氧化膦 (TOPO), 1 ml Triton X-100.

1.2.6 检测步骤.

a. 样品处理: 将玉米等样品粉碎至 20 目, 取 5 g 样品放在试管中, 加入提取液 12.5 ml (甲醇:水 = 7:3). 加塞振荡 3 min, 用新华 1 号滤纸过滤. 取 1 ml 滤液用 1 ml 蒸馏水进行稀释, 备用.

b. 间接竞争免疫分析检测步骤: 取 OTA-BSA 板条, 每孔加入 50 μ l OTA 标准或处理好的样品到各自的微孔中, 加缓冲液稀释的抗 OTA 小鼠腹水 50 μ l, 25 $^{\circ}$ C 振荡 0.5 h, 洗涤液洗 3 次, 没有连接到固相抗原上的 OTA 抗体在洗涤步骤中被除去. 再加分析缓冲液稀释的 Eu³⁺-羊抗鼠抗体 100 μ l, 25 $^{\circ}$ C 振荡 0.5 h, 用洗涤液洗 6 次, 加 200 μ l 增强液振荡 5 min 后测量, 从标准曲线计算样品中的 OTA 含量.

全部过程可在 Auto DELFIA₁₂₃₅ 上自动完成, 软件设置由本所自编.

1.2.7 考核.

a. 稳定性. 比较计数为 0 浓度点计数的 20%、50%、80% 时的效应点对应的浓度 (ED_{20} 、 ED_{50} 、 ED_{80}), 根据长期多次测定判断剂量反应曲线的位置漂移来考核方法的稳定性.

b. 灵敏度. 计算 8 组标准曲线零浓度点计数的平均值 ($\bar{x}$) 和标准差 (s), 以 $\bar{x}-2s$, 从标准曲线中找到对应浓度.

c. 回收率. 对每克样品分别加入 200 ng、50 ng、10 ng、5 ng、1 ng 不同量的 OTA, 然后按检测步骤测量, 计算实测值与理论值比值.

d. 特异性. 实验采取浓度为 10、100、1 000 $\mu\text{g/L}$ 的赭曲霉毒素 B (OTB) 及浓度为 100、1 000 $\mu\text{g/L}$ 的黄曲霉毒素 B1 (AFB1)、BSA 和 KLH 等为被测样品, 检测抗体与被测物质的交叉反应程度.

e. 与商品化的 OTA-ELISA 试剂盒比较. 严格按照 OTA-ELISA 试剂盒说明书操作, 与 OTA-TRFIA 分别同时做 12 份样品.

2 结 果

2.1 Eu^{3+} -羊抗鼠抗体的理化和免疫学鉴定

Eu^{3+} 标记物经 Sepharose CL-6B 层析, 收集第一洗脱峰. 以 PE- Wallac 提供的 Eu^{3+} 标准为参考, Eu^{3+} -羊抗鼠抗体第一洗脱峰的 Eu^{3+} 含量为 75.2 $\mu\text{mol/L}$, 蛋白质含量为 10.5 $\mu\text{mol/L}$, 即平均每个羊抗鼠抗体分子上连接了 7.16 个 Eu^{3+} .

2.2 抗 OTA 小鼠腹水的稀释实验

在 OTA-BSA 板条加分析缓冲液稀释的不同浓度的抗 OTA 小鼠腹水, 结果见图 1, 抑制率为最高

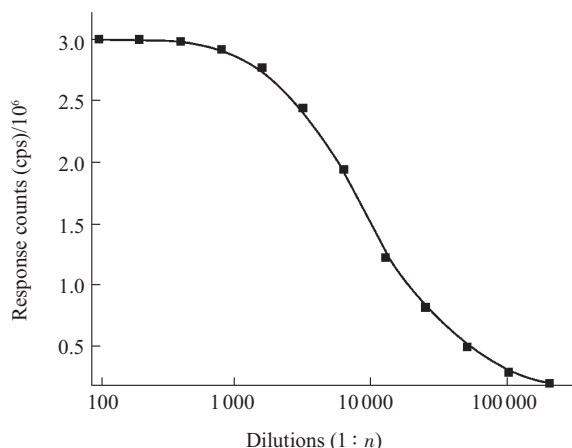


Fig.1 Dilution curve of antibody by indirect competitive OTA-TRFIA

浓度腹水结合率的 50% 时, 对应的稀释度约为 1:10 000 倍.

2.3 OTA-TRFIA 的考核

间接竞争 OTA-TRFIA 的结果经双对数函数数据处理程序处理所得的标准曲线见图 2.

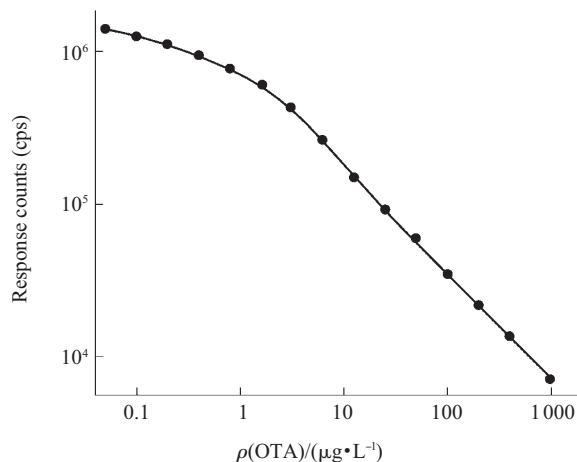


Fig.2 Calibration curve of indirect competitive OTA-TRFIA

2.3.1 方法的灵敏度和稳定性. 以零剂量点计数率 (cps) 均值减 $2s$ 后的计数率在标准曲线上得到的相应浓度值为检测的灵敏度, 间接竞争 OTA-TRFIA 的灵敏度为 0.03 $\mu\text{g/L}$. 8 条不同时间进行的间接竞争 OTA-TRFIA 的效应点均值 ED_{80} 、 ED_{50} 和 ED_{20} 分别为 $(0.33 \pm 0.02) \mu\text{g/L}$ 、 $(1.44 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$ 和 $(5.22 \pm 0.12) \mu\text{g/L}$, 说明剂量反应曲线的位置漂移小, 方法的稳定性好. 试剂盒放于 4°C 6 个月后测定, 各浓度点的结合率平均只下降 9%, 说明试剂盒的货架期可以满足实际应用的需要.

2.3.2 方法的特异性. 采用间接竞争 OTA-TRFIA 检测, OTB 的浓度在 10、100 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 时测定值分别为 0.3 $\mu\text{g/L}$ 、3.5 $\mu\text{g/L}$ 和 47 $\mu\text{g/L}$, 说明不同浓度的 OTB 与 OTA 的平均交叉反应为 3.7%, AFB1、BSA 和 KLH 的浓度分别在 100、1 000 $\mu\text{g/L}$ 时对 OTA 无交叉反应, 说明抗体的特异性很好.

2.3.3 方法的精密度和回收率. 间接 OTA-TRFIA 在 0 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 之间的批内和批间变异系数 (CV) 分别为 3.7% 和 5.3%, 都符合批内 $CV < 5\%$ 和批间 $CV < 10\%$ 的要求, 5 个添加样品的平均回收率为 94.2%, 见表 1.

Table 1 Recovery of OTA using OTA-TRFIA

Sample No.	n	OTA added /($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	OTA detected /($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Recovery/%
1	3	1	0.85	85.0
2	3	5	5.3	106
3	3	10	9.5	95.0
4	3	50	46.1	92.2
5	3	200	186	93

2.3.4 OTA-TRFIA 与 OTA-ELISA 试剂盒的比较.玉米、小麦、大豆等 24 份样品经 TRFIA 和美国 NEOGEN 公司 ELISA 试剂盒同时检测, 有 8 份样品的 OTA 浓度低于 ELISA 试剂盒的测量下限, 有 16 份样品的 OTA 浓度在 ELISA 试剂盒的可测范围之内, 该 16 份样品两者检测结果的相关系数为 0.925.

3 讨 论

由于 OTA 毒性强、污染频率高, 具有致癌性和遗传毒性的特点, 为了预防污染和中毒, 最有效的方法就是检测食品和饲料中 OTA 的含量, 并且要对谷物从收获到最终产品的全过程进行检测, 因此, 迅速发展 OTA 的高灵敏快速检测非常重要. 目前 OTA 的测定方法有多种, 主要为色谱法和免疫分析法, 它们的灵敏度如下: 薄层色谱法(TLC)为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ ^[5], 高效液相色谱法 (HPLC) 在 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ 左右^[6], 免疫荧光染色法为 $25\text{ }\mu\text{g/L}$ ^[7]. 色谱法除灵敏度低外, 还存在费时、仪器设备昂贵、操作复杂且不适用于大批量样品的检测等缺点. 新发展的免疫分析技术在食品安全检测中最常见的是 ELISA, 由于其特异性强, 灵敏度高, 操作简便, 特别适于大批量样品的检测, 因而越来越被人们所重视和采用. 在 OTA 的免疫学检测中, 主要注重于研究 ELISA 反应条件的优化和相关抗体的制备. 由于 ELISA 抗体效价的不同, 不同报道 ELISA 的灵敏度在 $0.042\sim 10\text{ }\mu\text{g/L}$ 之间, 而商品化的 ELISA 试剂盒的灵敏度一般在 $0.2\text{ }\mu\text{g/L}$ 左右^[3,8-10].

随着人们对食品安全的要求越来越高, OTA 的限量标准也在不断提高. 如在 2004 年底, 一些欧盟国家已经将婴儿食品中 OTA 限量标准由 $5\text{ }\mu\text{g/kg}$ 提高到 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$. 近日, 欧美国家新制定的食品和饲料中 OTA 的限量标准范围一般在 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ 到 $50\text{ }\mu\text{g/kg}$ 和 $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 到 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{g/kg}$ 之间, 所以理想的 OTA 检测方法应同时适用于食品和饲料的检测. 考虑到样品提取过程中一般会稀释 5 倍左右,

因此检测的范围应包括 $0.1\sim 200\text{ }\mu\text{g/L}$ 这一范围. 而目前商品化的 OTA-ELISA 的灵敏度一般在 $0.2\sim 1\text{ }\mu\text{g/L}$ 之间, 可测范围在 $0.2\sim 25\text{ }\mu\text{g/L}$ 之间, 所以 ELISA 受到方法学上的限制, 检测的灵敏度和试剂的可测范围均无法充分满足实际需求, 因此要发展新的技术来适应检测的需要.

TRFIA 是超微量检测领域中一项新兴的检测技术, 是利用免疫反应的高度特异性和标记示踪物的高度灵敏性相结合而建立的一类微量物质检测技术. TRFIA 是以三价稀土离子, 如 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 等为标志物, 这些离子可产生荧光. 其荧光不仅强度高, 而且荧光衰变时间长, 利用延缓测量时间, 待测样品中短寿命的本底荧光衰变后再测稀土离子的特异荧光, 可消除本底荧光的干扰. 利用具有双功能基团结构的螯合剂, 其一端和镧系元素结合, 另一端和抗体分子上的自由氨基联接, 制成标记抗体, 它与待测样品中的抗原结合成免疫复合物. 检测时, 加入荧光增强液, 它可使原来荧光增强 100 万倍, 用时间分辨荧光仪测定其荧光强度, 即可确定样品中抗原的量. TRFIA 采用非放射性原子标记技术, 标记位点多, 极大地提高了方法学的灵敏度; 标记方法属原子标记, 对生物活性影响小; 激发光和发射光谱之间 Stock 位移大, 可提高方法学的稳定性; 相对长的荧光发射周期可有效避免环境因素的干扰. 采用 TRFIA 方法建立的试剂盒具有有效期长、操作流程短、灵敏度高、标准曲线量程宽、可全自动操作及应用范围十分广泛等优点. TRFIA 检测限在 10^{-18} mol/L , 大大高于 ELISA 的 10^{-10} mol/L 和放射免疫分析 (RIA) 的 10^{-12} mol/L , 所以世界卫生组织 (WHO) 推荐此技术为应用医学领域中的超微量检测技术^[4,11,12].

采用 TRFIA 技术进行 OTA 检测的灵敏度和量程较 ELISA 成倍增加, 其灵敏度可达 $0.03\text{ }\mu\text{g/L}$, 测量范围可以达到 $0.03\sim 1\text{ }000\text{ }\mu\text{g/L}$, 这都是目前其他方法无法达到的. 我们建立的全自动 OTA-TRFIA, 同批试剂连续 6 个月应用分析, 发现标准曲线基本重合, 无明显漂移, 非常稳定. 反应时间为一个小时且分析系统高度自动化, 这样可提高检测结果的速度, 又可大幅度降低人为误差和增加检出结果的可靠性. 建立的间接 OTA-TRFIA, 荧光计数可以跨越 4 个数量级, 克服了 ELISA 中的吸光度范围只有 2 个数量级的限制, 所以可测范围可以达到 $0.03\sim 1\text{ }000\text{ }\mu\text{g/L}$ 这样宽的范围, 既可以满足食品中 OTA 低浓度的限量要求, 也可以满

足饲料中 OTA 较宽范围的限量要求, 是一种简便、快速、经济的可进行大批量样品筛查的方法, 更适于农产品的安全监测。

致谢 本文中抗 OTA 单克隆抗体的制备得到上海市肿瘤研究所赵新泰研究员的帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Abarca M L, Bragulat M R, Castellá G, *et al.* Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** (7): 2650~2652
- 2 Fink-Gremmels J, John A, Blom M J, *et al.* Toxicity and metabolism of ochratoxin A. *Nat Toxins*, 1995, **3** (4): 214~220
- 3 Gyongyosi-Horvath A, Barna-Vetro I, Solti L. A new monoclonal antibody detecting ochratoxin A at the picogram level. *Lett Appl Microbiol*, 1996, **22** (2): 103~105
- 4 Huang B, Xiao H L, Zhu L G, *et al.* Time-resolved fluoroimmunoassay of α -fetoprotein. *Asian J Nucl Med*, 2001, **1**(1): 40~42
- 5 Howell M V, Taylor W. Determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography. *J AOAC Int*, 1981, **64** (6): 1356~1363
- 6 黄化成, 赵尊行, 孙惠兰, 等. 用高效液相色谱法测定鸡肝中的棕曲霉毒素 A. 色谱, 1990, **8** (3): 189~190
Huang H C, Zhao Z X, Sun H L, *et al.* *Chromatography*, 1990, **8** (3): 189~190
- 7 孙惠兰, 朱瑞良, 牛钟相. 用免疫荧光、酶标技术检测赭曲霉毒素 A 的研究. 畜牧兽医学报, 1992, **23** (2): 152~155
Sun H L, Zhu R L, Niu Z X. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1992, **23** (2): 152~155
- 8 Thirumala-Devi K, Mayo M A, Reddy G, *et al.* Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. *J Agric Food Chem*, 2000, **48** (10): 5079~5082
- 9 王明林, 汪建民, 王汉忠, 等. 酶联免疫吸附测定分析玉米中的棕曲霉毒素 A. 山东农业大学学报, 1998, **29** (3): 384~386
Wang M L, Wang J M, Wang H Z, *et al.* *Shandong Agric University*, 1998, **29** (3): 384~386
- 10 Barna-Vetró I, Solti L, Téren J, *et al.* Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. *J Agric Food Chem*, 1996, **44**: 4071~4084
- 11 Hemmila I, Dakubu S, Mukkala V-M, *et al.* Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Anal Biochem*, 1984, **137** (2): 335~343
- 12 Fiet J, Giton F, Boudou P, *et al.* A new specific and sensitive time resolved-fluoroimmunoassay of 11-deoxycortisol in serum. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, **77** (1): 143~150

Ultrasensitive Time-resolved Fluoroimmunoassay of Ochratoxin A*

HUANG Biao^{1,2)}, TAO Wen-Yi¹⁾, ZHANG Lian-Fen¹⁾, SHI Jin¹⁾, YANG Hai-Lin¹⁾, JIN Jian^{1)**}

¹⁾The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;

²⁾Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China)

Abstract In order to provide a rapid, selectivity and very high sensitivity method for the determination of ochratoxin A (OTA), an indirect competitive time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) was used. Tests were performed in a 96-well microplate using the self-produced toxin-specific monoclonal antibodies 3G9, obtained from mice immunized with ochratoxin A - bovine serum albumin (OTA-BSA). In indirect TRFIA format, OTA-BSA was coated onto the microtitre plate and incubated with standard toxin and anti-OTA antibody. A goat antimice IgG- Eu³⁺ conjugate was used to enable detection. The suitability of the assay for quantification of OTA was also studied. Results showed ascitic fluids could be used at a dilution exceeding 1:10 000 and the OTA detection limit to be 0.03 $\mu\text{g/L}$ for indirect competitive TRFIA formats. The 80%, 50% and 20% inhibition binding effective dose (ED_{80} , ED_{50} , ED_{20}) of OTA were $(0.33 \pm 0.02) \mu\text{g/L}$, $(1.44 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$ and $(5.22 \pm 0.12) \mu\text{g/L}$. The assay range was $0.03 \sim 1\ 000 \mu\text{g/L}$. The cross reactivity with ochratoxin B was 3.7% and the antibodies did not react with aflatoxin B1, phenylalanine and BSA. The within-run and between-run CVs of the OTA- TRFIA were 3.7% and 5.3% respectively. The mean recoveries from OTA-free cereals spiked with $1 \sim 200 \mu\text{g/kg}$ OTA of cereals sample were 94.2%. Both OTA- TRFIA and OTA-ELISA test were applied for the quantitative measurement of OTA in the same cereals, and the coefficient of correlation was 0.925. It was shown that the newly developed TRFIA could be applied to detect the OTA contamination in cereals. The OTA-TRFIA provides very high sensitivity and optimal range, and it will be useful to screen OTA contamination easily, simply and economically when the number of samples is large.

Key words ochratoxin A, time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA), mycotoxin, monoclonal antibody

*This work was supported by grants from The National Tenth Five-Year Key Technologies R&D Program (2004BA501A16B) and The Funds for Society Development of Wuxi (SC030006).

**Corresponding author. Tel: 86-51-05860236, E-mail: jinjian31@hotmail.com

Received: January 26, 2005 Accepted: March 28, 2005