

基于间接竞争原理的流式微球技术 快速检测麦芽中赭曲霉毒素 A

肖昌彬^{1,2} 刘秋桃^{2,3} 豆小文² 杨美华² 孔维军^{*2} 万丽^{*1}

¹(成都中医药大学 药学院, 成都 611137)

²(中国医学科学院 北京协和医科大学, 药用植物研究所, 北京 100193)

³(辽宁医学院 药学院, 锦州 121001)

摘 要 建立了一种快速、灵敏检测中药麦芽中赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA) 含量的间接竞争流式微球方法。麦芽样品经 60% 甲醇/PBS 提取, 加入 20% 甲醇/PBS 溶液稀释 5 倍后, 离心取上清液制备样品。在编码荧光微球上偶联牛血清白蛋白-OTA(BSA-OTA) 复合物, 与样品中 OTA 竞争结合抗 OTA 特异性抗体, 然后加入 FITC-IgG 孵育, 离心洗涤后, 用流式细胞仪检测微球表面的平均荧光强度, 实现样品中 OTA 的准确定量测定。本方法检测 OTA 的半数抑制浓度 IC_{50} 为 1.20 ng/mL, 相关系数 $R^2 = 0.9892$, 检出限(IC_{10}) 为 0.12 ng/mL, 加样回收率为 93.9% ~ 97.4%, $RSD < 3.6\%$ 。16 份实际麦芽样品中检测到 2 个阳性样品, OTA 的最高含量为 3.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 未超出欧盟的 OTA 限量标准, 与液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS) 法检测结果相一致。本方法简单、快速、灵敏、可靠, 可拓展用于其它复杂基质中多种真菌毒素的定性定量检测。

关键词 流式微球技术; 间接竞争; 麦芽; 赭曲霉毒素 A; 快速检测

1 引 言

赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA) 是由曲霉属和青霉属真菌产生的有毒次生代谢产物^[1], 具有严重的致癌、致畸、致突变及肝细胞毒性、免疫抑制和生殖紊乱等毒性作用^[2], 已被国际癌症研究机构^[3]列为人类可能的致癌物(2B 级), 也被美国国家毒理学计划^[4]定为极有可能对人类产生致癌性的物质。OTA 是食品、农产品及农作物、药用植物中主要的外源性有害污染物, 不仅会影响相关产品的质量, 而且对人类健康和生命安全存在潜在的威胁^[5,6]。世界各国已对其制定了严格的限量标准, 如欧盟联合委员会规定谷物中 OTA 的限量为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 谷物制品及其相关产品中 OTA 的限量为 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 酒和葡萄汁饮料中 OTA 的限量为 2.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[7]。因此, 开发简单、快速、准确、灵敏且特异性的检测方法, 对于保证食品、农产品及药用植物的安全使用以及保证人类健康至关重要^[8]。

OTA 的检测大多采用仪器分析技术^[9~11], 如液相色谱-荧光法(HPLC-FLD) 及串联质谱法(LC-MS/MS) 等。虽然这些分析方法具有灵敏、准确的特点, 但需大型的昂贵的仪器, 操作步骤繁琐、耗时; 此外, 食品、农产品、中药材等基质成分复杂, 需要严格的前处理和净化步骤, 给实际操作带来诸多困难。酶联免疫吸附技术(ELISA) 以其高特异性、高选择性、对样品纯度要求不高及样品处理量大的优点, 而被用于复杂基质中 OTA 的快速筛查检测^[12,13], 但存在灵敏度低、重复性差等不足^[14]。

流式微球技术(Cytometric bead array, CBA) ^[15~20] 以一系列荧光强度不同的编码微球为载体, 通过激光束激发荧光编码微球, 利用流式细胞仪分析微球本身和表面荧光强度完成数据收集和分析, 可实现复杂基质中目标物灵敏、准确的快速检测, 且重复性和稳定性好、分析时间短、假阳率低。该技术已被应用到多种基质中大分子及小分子化合物的高通量检测^[21~25]。OTA 为小分子化合物, 具有半抗原性、分子量小、单一抗原表位、本身不具免疫原性等特点^[26], 多采用基于“抗体-抗原”特异性识别的竞争型流式微球免疫分析技术, 而间接竞争模式因其偶联过程中不损伤, 且不阻碍抗体与抗原的识别位点等优势被广泛应用^[27,28]。

2015-12-23 收稿; 2016-03-07 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 81473346, 81274072) 和协和新星人才支持计划资助

* E-mail: kongwj302@126.com; wanli8801@163.com

麦芽为中医临床常用的中药材,具有行气消食、健脾开胃、退乳消肿^[29]等功效。现代药理研究表明,麦芽还具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抑制胆固醇与血脂增加、预防心血管疾病、增强免疫能力等作用^[30]。麦芽还是粮食、饲料和酿酒的重要原料。麦芽的制备加工过程中^[31]极易霉变变质产生真菌毒素如 OTA 等。所以,有必要建立适合麦芽中 OTA 的现场、灵敏、高效的检测方法^[32,33]。

本研究建立了一种基于间接竞争模式的流式微球方法,在荧光微球表面偶联牛血清白蛋白(BSA)-OTA 复合物,与样品中 OTA 共同竞争特异性抗体,加入荧光标记的二抗探针后,通过流式细胞仪检测微球本体和表面荧光,实现 OTA 的定性定量测定。本方法操作简单、检测通量大、检出限低、灵敏度高、特异性好、受基质干扰小,可推广用于中药材等复杂基质中其它真菌毒素的分析和检测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);液相色谱-串联质谱系统:LC-20AD XR 液相色谱仪(日本岛津公司);5500 QTRAP[®]质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);TUS-200P 恒温振荡金属浴(上海一恒公司);KQ-500 超声仪(昆山市超声仪器有限公司);ANKE TGL-16C 高速离心机(上海安亭公司);AB-135-S 电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);pH 计(德国 Sartorius 公司)

羧基化红色荧光微球 FC05F(Φ 4.95 μm ,激发波长 630 nm,发射波长 690 nm)购自美国 Bangs Laboratories 公司;OTA 对照品(浓度为 1.0 mg/mL)购于新加坡 Pribolab 公司;牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA)购自 Sigma-Aldrich 公司;OTA-牛血清白蛋白(BSA-OTA,7.8 mg/mL)、OTA 单克隆抗体(mAb,7.2 mg/mL)购自山东绿都生物工程有限公司;异硫氰酸荧光素标记羊抗小鼠二抗(Fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled goat anti-mouse IgG(H+L),1.5 mg/mL)购自美国 Fitzgerald 公司;吗啉乙磺酸(MES)、N-羟基琥珀酰亚胺盐酸盐(NHS)、碳化二亚胺(EDC)购自美国 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯。

2.2 缓冲液的配制

10 mmol/L PBS(pH=7.4):NaCl 8.0 g、 Na_2HPO_4 1.2 g、 KH_2PO_4 0.2 g、KCl 0.2 g 加蒸馏水溶解并定容至 1000 mL;封闭液:PBSBT(pH 7.4,含 1% BSA 和 0.1% Tween20);洗涤缓冲液:PBST(pH 7.4,含 0.1% Tween20);保存缓冲液:PBSBTN(pH 7.4,含 0.1% BSA、0.01% Tween20 和 0.05% NaN_3);活化缓冲液:50 mmol/L MES(pH 5.0);偶联缓冲液:50 mmol/L MES(pH 6.0);偶联剂:0.32 mol/L EDC、0.33 mol/L NHS;样品提取液:甲醇-PBS(60:40,V/V);样品稀释液:甲醇-PBS(20:80,V/V),均用 2 mol/L HCl 和 2 mol/L NaOH 调节 pH 值,溶液在使用前均用 0.22 μm 滤膜过滤。

2.3 羧基荧光微球偶联 BSA-OTA

根据 Bangs laboratories(TechNote 205 Covalent Coupling)提供的方案制备微球偶联 BSA-OTA 免疫分析物。取 10 μL (约 1.433×10^6 个)荧光微球于 2 mL 离心管中,加入 200 μL 活化缓冲液振荡 30 s,充分混匀后静置 5 min,14000 r/min 离心 15 min,弃去上清液。微球用活化缓冲液清洗 2 次后,加入 160 μL 偶联缓冲液、20 μL EDC、20 μL NHS,于恒温振荡,金属浴中孵育(25 $^{\circ}\text{C}$ 600 r/min)30 min,14000 r/min 离心 15 min,弃去上清液;加入 200 μL 偶联缓冲液及 BSA-OTA 蛋白偶联物,充分混匀后恒温振荡金属浴上孵育 2 h,14000 r/min 离心 15 min,弃去上清液。微球清洗 2 次,加入 500 μL 封闭液,再于恒温振荡金属浴中孵育 2 h。离心弃去上清液,偶联好的微球用缓冲液清洗 2 次,加入 1 mL 保存缓冲液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 储藏备用。分别取 1,2,4,8,10,20 和 30 μL 偶联 BSA-OTA 的微球,加入 200 μL PBS 混匀,流式细胞仪检测。偶联微球制备及检测过程均在避光条件下进行。

2.4 样品及标准品溶液的制备

称取麦芽粗粉(过 2 号筛)1 g 于 10 mL 离心管中,加入 2 mL 样品提取液,涡旋混匀 1 min,超声提取 15 min,12000 r/min 离心 10 min,吸取上清液过 0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜。滤液稀释 5 倍后,14000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

取适量 1.0 mg/mL OTA 甲醇储备液,加入阴性样品提取液,制备 0,0.001,0.01,0.098,0.391,

1.56, 6.25, 25 和 100 ng/mL 的基质匹配 OTA 标准溶液。

2.5 样品中 OTA 的检测

取 100 μ L 不同浓度的基质匹配标准品或样品溶液, 加入 100 μ L 50 ng/mL 抗体孵育 20 min, 加入 10 μ L 偶联 BSA-OTA 微球孵育 40 min, 离心去上清液; 微球清洗 2 次, 加入 1: 4000 倍稀释的 FITC-IgG 荧光二抗孵育 1 h, 离心, 用缓冲液清洗 2 次, 加入 200 μ L PBS 振荡混匀后用流式细胞仪检测。检测时, 635 nm 激光激发微球本体荧光, 在流式细胞仪的 APC 荧光值通道检测; 488 nm 激光激发微球表面结合的 FITC-IgG 荧光, 在流式细胞仪的 FITC 荧光值通道检测。收集 2000 个微球的检测信号, 约 90 s 后结束检测, 每个样品平行制备 3 份检测样品进行平行检测, 分析微球表面的平均荧光强度 (Mean fluorescence intensity, MFI), 对样品中 OTA 进行定量分析^[33]。

2.6 数据分析

参照文献[35~39]方法, 采用 Origin 8.5.1 软件依据 Logistics5 参数非线性拟合方程绘制标准竞争抑制曲线, 计算方法的检出限、半数抑制浓度 IC_{50} (50% inhibitory concentration)、线性范围等。

$$\text{结合率}^{[40]}: R(\%) = [(MFI_s - MFI_{\min}) / (MFI_{\max} - MFI_{\min})] \times 100\%$$

其中, MFI_s : 添加样品或标品微球表面平均荧光强度; $MFI_{\min}$: 背景荧光强度; $MFI_{\max}$: 阳性对照样品荧光强度。

$$\text{标准竞争抑制曲线: } Y = R_{hi} + (R_{lo} - R_{hi}) / (1 + (X_0/X)^h)^s$$

其中, Y : 结合率; R_{hi} : 分析物浓度最大时的结合率; R_{lo} : 分析物浓度为 0 时的结合率; h : 斜率; X : 分析物浓度; X_0 : IC_{50} 值; S : 控制因子。

2.7 液相色谱-质谱分析条件

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (50 mm $\times$ 4.6 mm, 1.8 μ m, 美国 Agilent 公司); 流动相: 乙腈-水 (70: 30, V/V), 0.1% 甲酸。流速: 0.3 mL/min; 进样量: 1.0 μ L。电喷雾离子源 (ESI), 喷雾电压 (IS): +5.5 kV, 雾化气 (GS1) 压力: 55 psi, 辅助气 (GS2) 压力: 55 psi, 气帘气 (CUR) 压力: 35 psi, 离子源温度: 550 $^{\circ}$ C, 去簇电压 (DP): 110 V, 碰撞能量 (CE): 30 eV, 正离子模式检测, 多反应监测 (MRM) 扫描。OTA 用于 MRM 分析的离子对为 m/z 404.2 $\rightarrow$ 358 及 m/z 404.2 $\rightarrow$ 239.1。

3 结果与讨论

采用基于间接竞争模式的流式微球免疫分析技术检测麦芽中 OTA 含量, 样品中的 OTA 与微球上偶联的 BSA-OTA 竞争同一单克隆抗体, 最终根据微球表面的 FITC-IgG 平均荧光强度, 实现样品中 OTA 的定量分析。

3.1 实验条件优化

3.1.1 偶联 BSA-OTA 微球和抗体量的优化 采用棋盘法^[41]筛选检测时加入的偶联 BSA-OTA 微球与抗体的最适量。实验结果如表 1 所示。固定偶联 BSA-OTA 微球的量, 微球表面荧光强度值随着抗体加入量的增加逐渐增强, 达到 10 ng 及以上时, 荧光强度增加不明显, 表明微球表面抗原量已饱和。固定抗体浓度, 微球表面的荧光强度随着偶联 BSA-OTA 微球加入量的增加逐渐增强。综合考虑偶联

表 1 棋盘法筛选牛血清白蛋白-赭曲霉毒素 A 偶联微球与抗体的最适量*

Table 1 Optimization of the amount of bovine serum albumin (BSA)-ochratoxin A (OTA) conjugated microbeads and antibody by the checkerboard method*

抗原加入量** Added amount of antigen** (ng)	抗体加入量 Addition of antibody				
	1 ng	2.5 ng	5 ng	10 ng	20 ng
72	726.08	1318.59	1350.16	1556.95	1816.35
144	1000.66	1671.38	2380.32	2542.41	2701.69
288	2383.02	2934.08	3830.65	4207.89	4300.92
360	3854.22	4945.39	6374.09	6701.2	7158.69
576	4166.72	5670.13	6664.4	6954.64	7837.02

* 表中数字为测得的微球表面平均荧光强度值; ** 偶联 BSA-OTA 的微球量。

* Numbers in the table are the mean fluorescence intensities on microbead surface; ** Amount of BSA-OTA labeled microbeads.

BSA-OTA 微球的用量大时可能会造成 BSA-OTA 偶联物及抗体的浪费,以及微球表面过载等因素均会影响抗体与微球表面抗原的结合率,最终确定采用偶联 BSA-OTA 微球 360 ng 与 5 ng 抗体反应,用于后续分析。此时阳性对照与背景干扰比值($MFI_{\max}/MFI_{\min}$)较好,可满足线性分析的需要。

3.1.2 FITC-IgG 稀释倍数的优化 如图 1a 所示,随着 FITC-IgG 的稀释倍数增大,微球表面的荧光强度逐渐减弱。稀释 1:4000 倍时,微球表面的荧光强度较大,且此时阳性对照与背景干扰比值荧光强度($MFI_{\max}/MFI_{\min}$)最优,因此选择 1:4000 倍稀释的 FITC-IgG 荧光二抗进行后续实验。

3.1.3 孵育时间 如图 1b 所示,随着偶联微球与一抗孵育时间的延长,微球表面的荧光强度逐渐增强,当孵育时间超过 90 min 时,荧光强度逐渐降低。FITC-IgG 与 mAb 孵育的情况与此类似。为节约时间和减少荧光素 FITC 的淬灭几率,最终确定 mAb、FITC-IgG 孵育时间分别为 60 min。

3.1.4 孵育温度 适当的温度能促进抗原抗体免疫识别反应,但温度过高也会对抗体和微球的稳定性带来不利影响。由图 1c 可见,随着孵育温度的升高,微球表面荧光强度逐渐增大,37℃ 时达到最大,而后随温度升高而逐渐降低。最终确定微球偶联 BSA-OTA 免疫分析物与抗体的最佳孵育温度为 37℃。

3.1.5 pH 值的优化 中药材提取液大多偏酸或偏碱,而抗体在接近中性的条件下比较稳定。考察了不同 pH 值时的微球表面荧光强度。由图 1d 可见,当反应溶液的 pH 为 6~9 时,微球表面荧光强度变化不明显,因此选择溶解和稀释抗体的 PBS 溶液的 pH 值为 7~8 之间。

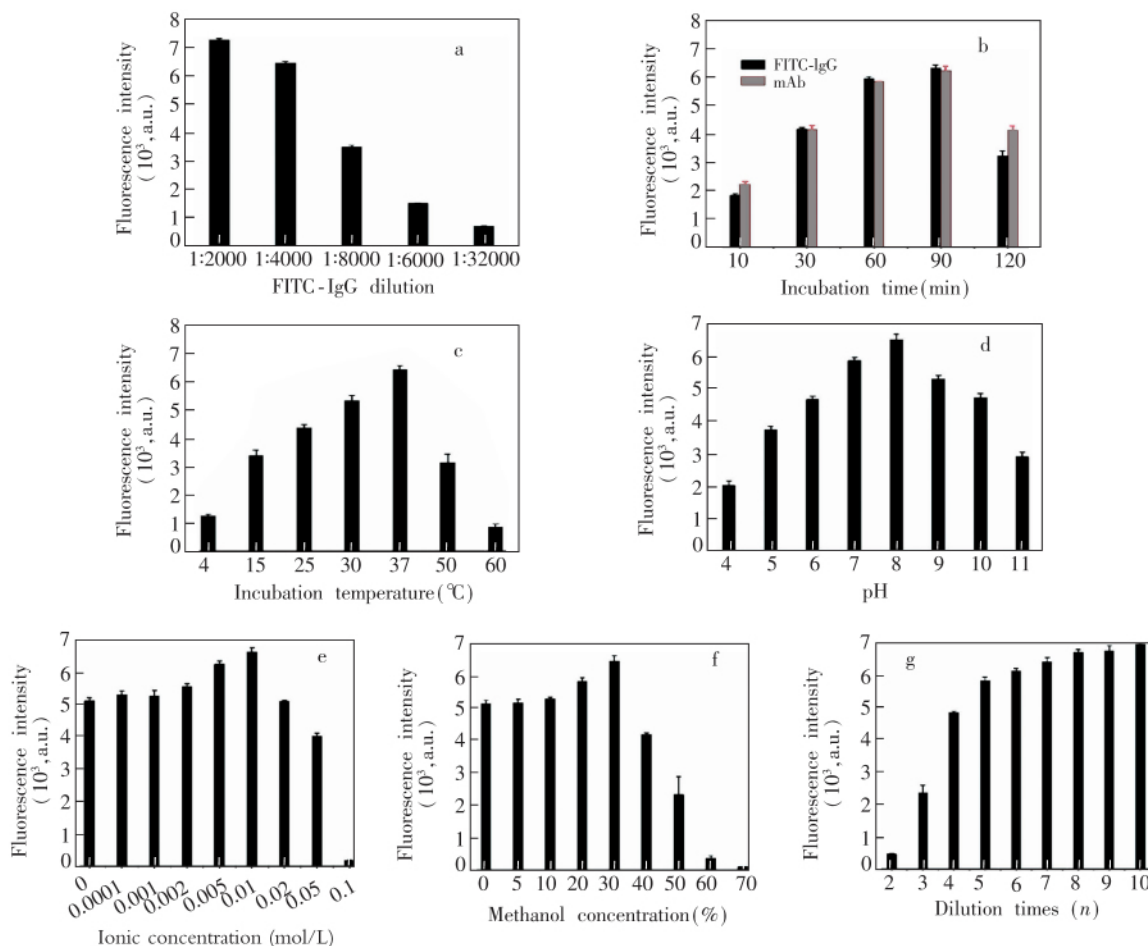


图1 流式微球免疫分析检测 OTA 的影响因素考察

Fig. 1 Investigation of influence factors on cytometric bead array (CBA) detection of OTA

(a) FITC-IgG 稀释倍数; (b) 孵育时间; (c) 孵育温度; (d) pH; (e) 盐离子浓度; (f) 甲醇浓度; (g) 麦芽提取液稀释倍数。

(a) Dilution of FITC-IgG; (b) Incubation time; (c) Incubation temperature; (d) pH; (e) Ionic concentration; (f) Methanol concentration; (g) Dilution of malt extract.

3.1.6 盐离子浓度的影响 考察了 PBS 溶液中的盐离子浓度(以 HPO_4^{2-} 和 H_2PO_4^- 计)对检测结果的影响。由图 1e 可见,随着 PBS 溶液中盐离子浓度的增加,微球表面的荧光值逐渐增强,当盐离子浓度为 0.01 mol/L 时达到最大;随盐离子浓度继续升高,荧光强度降低;当盐离子浓度为 0.1 mol/L 时,微球表面的荧光值几乎为 0,说明此时抗体已经变性或者高浓度的盐致使微球变形、溶解。最终确定最适盐离子浓度为 0.01 mol/L。

3.1.7 甲醇浓度的影响 麦芽样品经 60% 甲醇/PBS 溶剂提取,但 60% 甲醇浓度易使抗体变性失活,样品提取液需经稀释后才能用于流式微球免疫分析。由图 1f 可见,随着甲醇浓度的升高,微球表面的荧光强度逐渐增强,当甲醇浓度达到 30% 时,微球表面荧光值最强;随着甲醇浓度的继续增加,荧光强度急剧降低。考虑到提取溶液中甲醇的存在,最终选择 20% 甲醇-PBS 对样品提取液和标准品溶液进行稀释,然后进样分析。

3.1.8 基质成分对流式微球免疫分析的影响 如图 1g 所示,样品基质液稀释倍数越多,基质成分对微球表面的荧光值影响越小。但稀释倍数越大,达不到方法的灵敏度和检出限要求。因此选择样品提取液稀释 5 倍后,进行检测以及基质加标实验。

3.2 非特异性吸附的考察

在流式细胞仪检测过程中,流式编码荧光微球在鞘液流中分布不均一发生粘连或非特异性吸附,均会影响流式细胞仪对微球表面荧光强度的检测。微球在 APC 通道的荧光峰出现峰高钝化或者肩峰,表明微球发生粘连,在溶液中分布不均一;在 FITC 通道的荧光峰出现峰形低、峰位变宽、峰形分叉,表明微球表面存在非特异性吸附。实验表明,微球表面的平均荧光强度与背景干扰荧光值相当,说明偶联 BSA-OTA 微球表面的非特异性吸附量很少。

3.3 竞争抑制曲线的建立

标准品经样品稀释液或基质稀释液稀释成不同浓度后在优化的条件下进行检测,绘制竞争抑制曲线,计算方法的检出限、线性范围($\text{IC}_{10} \sim \text{IC}_{90}$)及 IC_{50} 值。由图 2 和表 2 可以看出,样品稀释液与基质稀释液对间接竞争的流式微球分析法影响较小,麦芽基质液对微球、抗体及微球表面的荧光强度淬灭少,对方法的灵敏度影响小。但抗原抗体之间的免疫反应受诸多实验因素的影响,因此选用基质校正曲线作为测定麦芽中 OTA 的标准竞争抑制曲线,以减少误差。

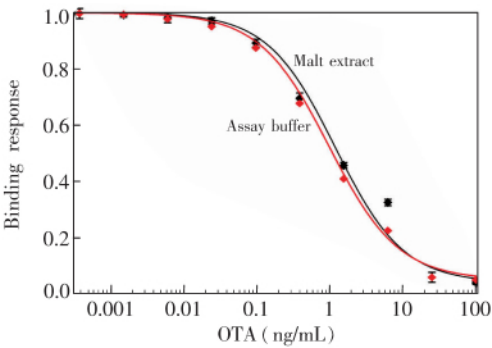


图2 缓冲液和麦芽样品提取液的竞争抑制校正曲线 (n = 3)
Fig.2 Calibration curves for inhibition immunoassay in buffer and malt extract (n = 3)

表2 缓冲液和麦芽提取液竞争抑制校正曲线的参数

Table 2 Parameters of calibration curves for inhibition immunoassays in assay buffer and malt extract

样品 Sample	标准曲线 Calibration equation	相关系数 R^2	半数抑制浓度 IC_{50} (ng/mL)	线性范围 $\text{IC}_{10} \sim \text{IC}_{90}$ (ng/mL)
样品稀释液 Buffer	$Y = 0.051 + (1 - 0.051) / (1 + (0.98/X)^{-0.9136})$	0.9899	0.98	0.09 ~ 23.8
麦芽提取液 Malt extract	$Y = 0.041 + (1 - 0.041) / (1 + (1.20/X)^{-0.9348})$	0.9892	1.20	0.12 ~ 22.1

3.4 标准加入实验

制备阴性(不含 OTA)麦芽样品溶液,添加不同浓度 OTA 标准品溶液,在优化条件下进行检测。结果如表 3 所示,加标回收率为 93.9% ~ 97.4%,相对标准偏差 0.9% ~ 3.6%。

3.5 交叉反应性

考察了黄曲霉毒素 B_1 (AFB_1)、呕吐毒素、伏马毒素、玉米赤霉烯酮对本方法的干扰情况,计算各个毒素与 OTA 的交叉反应率:交叉反应率(CR, %) = $\text{IC}_{50}(\text{OTA}) / \text{IC}_{50}(\text{干扰物}) \times 100\%$ 。结果表明,上述干扰物与抗体的交叉反应率均小于 1.2%,表明其它毒素与 OTA 的抗体几乎不产生交叉反应。

3.6 麦芽实际样品中 OTA 的检测

采用建立的间接竞争模式的流式微球分析方法检测 16 批不同地点购买的麦芽样品中 OTA 的含量。在 2 批样品中检测到 OTA, 阳性样品发生率为 12.5%, 但 OTA 的含量(3.36 和 3.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 均未超出欧盟联合委员会(European Commission)对 OTA 的限量标准(5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。同时采用液相色谱-串联质谱对上述样品进行检测, 采用 OTA 离子对 m/z 404.2 $\rightarrow$ 358 及 m/z 404.2 $\rightarrow$ 239.1 及保留时间来对阳性样品进行确证, 两种方法检测结果一致。上述结果证明建立的流式微球技术可用于复杂基质麦芽样品中 OTA 的定性与定量分析, 并可拓展用于其它复杂基质中更多真菌毒素的快速、灵敏检测。

4 结论

建立了简单、快速、灵敏、准确的定性定量分析麦芽中 OTA 的间接竞争流式微球分析方法, 考察了 FITC-IgG 稀释倍数、孵育时间、温度、pH 值、基质效应等条件对检测结果的影响, 优化了反应条件。流式微球技术以羧基化荧光编码微球为载体, 具有体积小、比表面积大、高扩散性、粒径及形态均一、荧光强度高特点, 检测灵敏度高, 但聚苯乙烯微球比重轻, 不易沉降, 离心时微球易损失, 清洗及离心过程耗时, 不利于快速检测。可以利用羧基荧光磁性微球, 借助磁性分离, 以减少微球损失, 节约时间, 且洗涤充分, 以提高方法的灵敏度。基于间接竞争模式的流式微球分析检测技术, 检测通量大、检出限低、分析速度快, 适于中药复杂基质体系中痕量小分子物质的检测。麦芽样品只需 60% 甲醇/PBS 简单提取、5 倍稀释并孵育后即可上样检测, 不需要额外的前处理步骤, 提高了样品的提取效率, 减少了样品处理过程中待测目标物真菌毒素的损失, 对实际麦芽样品的检测结果与 LC-MS/MS 检测结果一致。本研究运用流式微球技术快速检测麦芽中的 OTA, 为中药材质量监控提供了科学、有效的分析手段。

References

- Reddy L, Bhoola K. *Toxins*, **2010**, 2(4): 771–779
- Liu J, Wang Y, Cui J, Xing L, Shen H, Wu S, Zhang X. *Toxicol. Lett.*, **2012**, 211(2): 164–171
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. **1993**
- Abnet C C. *Cancer Invest.*, **2007**, 25(3): 189–196
- Pereira V L, Fernandes J O, Cunha S C. *Trends Food Sci. Tech.*, **2014**, 36(2): 96–136
- Cao J L, Zhou S J, Kong W J, Yang M H, Wan L, Yang S H. *Food Control*, **2013**, 33(2): 337–343
- LI Jun-Yuan, WAN Li, YANG Mei-Hua. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*, **2011**, 42(3): 602–609
李俊媛, 万丽, 杨美华. *中草药*, **2011**, 42(3): 602–609
- ZHOU Yao-Feng, XIONG Si-Cheng, JIANG Hu, DUAN Hong, XIONG Yong-Hua, Andrew Wang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(12): 1837–1843
周耀锋, 熊斯诚, 江湖, 段宏, 熊勇华, Andrew Wang. *分析化学*, **2015**, 43(12): 1837–1843
- XIE Li-Wei, ZHAO Xiang-Sheng, KONG Wei-Jun, WANG Yu-Ting, HU Yi-Chen, OUYANG Zhen, YANG Mei-Hua. *Acta Pharm. Sin.*, **2014**, 49(4): 517–523
谢丽伟, 赵祥升, 孔维军, 王宇婷, 胡一晨, 欧阳臻, 杨美华. *药学报*, **2014**, 49(4): 517–523
- Pittet A, Royer D. *J. Agri. Food. Chem.*, **2002**, 50(2): 243–247
- Liu Q T, Kong W J, Guo W Y, Yang M H. *J. Chromatogr. B*, **2015**, 988: 175–181
- Zhang X, Sun M J, Kang Y, Wang X, Song H H, Li X L, Fang W H. *Toxicon*, **2015**, 106: 89–96
- Wang Y, Hu X H, Pei Y Y, Sun Y L, Wang F Y, Song C M, Yin M Q, Deng R Q, Li Z X, Zhang G P. *Anal. Methods*, **2015**, 7(5): 1849–1854
- Yu F Y, Chi T F, Liu B H, Su C Y. *J. Agri. Food. Chem.*, **2005**, 53(17): 6947–6953

表 3 样品中 OTA 的添加回收实验结果($n=3$)

Table 3 Recovery values of spiked samples ($n=3$)

序号 Number	添加水平 Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
1	5.0	93.9	3.6
2	25.0	96.6	1.4
3	125.0	97.4	0.9

- 15 YANG Li-Li , WANG Zhen-Guo , WANG Ming-Tai , MOU Jun , ZOU Ming-Qiang , LI Jin-Feng , QIAN Ai-Dong. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2008** , 36(1) : 29 – 33
杨丽丽,王振国,王明泰,牟峻,邹明强,李锦丰,钱爱东. 分析化学, **2008** , 36(1) : 29 – 33
- 16 GAO Hai-Xia , ZOU Ming-Qiang , LI Jin-Feng , WANG Ling , JIANG Ji-Zhi. *J. Instrum. Anal.* , **2008** , 27(2) : 222 – 226
高海霞,邹明强,李锦丰,王岭,蒋继志. 分析测试学报, **2008** , 27(2) : 222 – 226
- 17 Ren W , Liu H M , Yang W X , Fan Y L , Yang L , Wang Y C , Liu C H , Li Z P. *Biosens. Bioelectron.* , **2013** , 49: 380 – 386
- 18 Yan X M , Zhong W W , Tang A J , Erika G. Schielke , Hang W , John P , Nolan J P. *Anal. Chem.* , **2005** , 77(23) : 7673 – 7678
- 19 Shriver-Lake L C , Golden J , Bracaglia L , Ligler F S. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2013** , 405(16) : 5611 – 5614
- 20 Lim C T , Zhang Y. *Biosens. Bioelectron.* , **2007** , 22(7) : 1197 – 1204
- 21 Yang D L , Kraght P , Pentoney C S , Pentoney S L. *Anal. Chem.* , **2007** , 79(10) : 3607 – 3614
- 22 Li Y , Nath N , Reichert W M. *Anal. Chem.* , **2003** , 75(19) : 5274 – 5281
- 23 Wyns H , Croubels S , Demeyere K , Watteyn A , De Backer P , Meyer E. *Vet. Immunol. Immunop.* , **2013** , 151(1) : 28 – 36
- 24 Dabito D , Margolick J B , Lopez J , Bream J H. *J. Immunol. Methods* , **2011** , 372(1) : 71 – 77
- 25 Bienenmann-Ploum M E , Huet A C , Campbell K , Fodey T L , Vincent U , Haasnoot W , Nielen M W. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2012** , 404(5) : 1361 – 1373
- 26 Fodey T , Leonard P , O'Mahony J , O'Kennedy R , Danaher M. *TRAC-Trends Anal. Chem.* , **2011** , 30(2) : 254 – 269
- 27 Peters J , Bienenmann-Ploum M , de Rijk T , Haasnoot W. *Mycotoxin Res.* , **2011** , 27(1) : 63 – 72
- 28 Anderson G P , Kowtha V A , Taitt C R. *Toxins* , **2010** , 2(2) : 297 – 309
- 29 Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* S. 2010 Edition. Part I. Beijing: China Medical Science Press , **2010**: 11
国家药典委员会. 中国药典(一部) S. 北京: 人民卫生出版社 , **2010**: 11
- 30 YANG Tao , ZENG Ya-Wen , XIAO Feng-Hui , PU Xiao-Ying , DU Juan , YANG Shu-Ming. *J. Triticeae Crops* , **2007** , 27(6) : 1154 – 1158
杨涛,曾亚文,萧凤回,普晓英,杜娟,杨树明. 麦类作物学报, **2007** , 27(6) : 1154 – 1158
- 31 LING Jun-Hong , Wang Nan , Ren Yu-Zhen , WANG Long-Hu , WANG Jin-Hui , LI Xian. *Chin. Radit. Herbal Drugs* , **2006** , 36(11) : 1632 – 1634
凌俊红,王楠,任玉珍,王龙虎,王金辉,李铣. 中草药, **2006** , 36(11) : 1632 – 1634
- 32 Volkova T. *J. Food Sci. Eng.* , **2013** , 3(9) : 496 – 502
- 33 Al-Taher F , Banaszewski K , Jackson L , Zweigenbaum J , Ryu D , Cappozzo J. *J. Agri. Food Chem.* , **2013** , 61(10) : 2378 – 2384
- 34 XIAO Chang-Bin , KONG Wei-Jun , LIU Qiu-Tao , YANG Mei-Hua , WAN Li. *Chin. J. Chin. Mater. Med.* , **2015** , 40(8) : 3515 – 3523
肖昌彬,孔维军,刘秋桃,杨美华,万丽. 中国中药杂志, **2015** , 40(8) : 3515 – 3523
- 35 Rodríguez L P , Vilariño N , Louzao M C , Dickerson T J , Nicolaou K C , Frederick M O , Botana L M. *Anal. Biochem.* , **2014** , 447: 58 – 63
- 36 Fraga M , Vilariño N , Louzao M C , Campbell K , Elliott C T , Kawatsu K , Botana L M. *Anal. Chem.* , **2012** , 84(10) : 4350 – 4356
- 37 Rodríguez L P , Vilariño N , Molgó J , Aráoz R , Louzao M C , Taylor P , Botana L M. *Anal. Chem.* , **2013** , 85(4) : 2340 – 2347
- 38 Fraga M , Vilariño N , Louzao M C , Rodríguez L P , Alfonso A , Campbell K , Botana L M. *Anal. Chim. Acta* , **2014** , 850: 57 – 64
- 39 Fraga M , Vilariño N , Louzao M C , Rodríguez L P , Campbell K , Elliott C T , Botana L M. *Anal. Chem.* , **2013** , 85(16) : 7794 – 7802
- 40 Hartwell S K , Grudpan K. *Microchim. Acta* , **2010** , 169(3-4) : 201 – 220
- 41 Yu H W , Kim I S , Niessner R , Knopp D. *Anal. Chim. Acta* , **2012** , 750: 191 – 198

Rapid Detection of Ochratoxin A in Malt by Cytometric Bead Array Based on Indirect Competition Principle

XIAO Chang-Bin^{1,2}, LIU Qiu-Tao^{2,3}, DOU Xiao-Wen², YANG Mei-Hua², KONG Wei-Jun^{*2}, WAN Li^{*1}

¹ (Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

² (Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

³ (Pharmacy College, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract A cytometric bead array (CBA) method based on indirect competition mode was developed for the sensitive and rapid detection of ochratoxin A (OTA) in malt. The malt samples were extracted by 60% methanol/PBS and the extracts were diluted five times by 20% methanol/PBS, then the supernatant was collected to prepare sample solution for analysis. The fluorescence microsphere surface was labeled with bovine serum albumin-OTA (BSA-OTA) to compete with OTA in the sample for anti-OTA monoclonal antibody (mAb). Then FITC-IgG was added to bind with the captured mAb on the microsphere. Finally, the mean fluorescence intensity of FITC on the surface of microsphere was detected by a BD FACSCalibur analyzer for accurate qualitative and quantitative analysis of OTA. The results showed that the half inhibitory concentration (IC_{50}) was 1.20 ng/mL with a correlation coefficient (R^2) of 0.9892, and the limit of detection (LOD) for OTA was 0.12 ng/mL. The average recoveries in malt samples were 93.9% – 97.4% with the relative standard deviations (RSDs) less than 3.6% at three spiked levels. Sixteen malt samples were analyzed and OTA was found in two samples with the contents less than 3.83 $\mu\text{g/kg}$, which was lower than the maximum permitted residue level (5.0 $\mu\text{g/kg}$) proposed by the European Union. All the positive samples were confirmed by LC-MS/MS. In this study, the CBA technique based on indirect competition was developed for the first time for successful detection of OTA in malt samples. This method was easy, rapid, sensitive and reliable, and exhibited high potential in the qualitative and quantitative determination of multiple mycotoxins in other complex matrices.

Keywords Cytometric bead array; Indirect competition; Malt; Ochratoxin A; Rapid detection

(Received 23 December 2015; accepted 7 March 2016)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81473346, 81274072)