

基于抗体协同组合的 ELISA 检测线性范围拓宽策略

郭翠丽¹ 彭娟¹ 赖卫华¹ 邢克宇² 甘蓓³

(1. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 长沙理工大学食品科学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 3. 江西省检验检测认证总院工业产品检验检测院, 江西 南昌 330047)

摘要: [目的] 拓宽脱氧雪腐镰刀菌烯醇 ELISA 检测方法的线性范围。[方法] 经小鼠免疫、细胞融合与筛选、腹水制备及抗体纯化得到 3 株灵敏度不同的抗体, 优化抗体协同组合的工作浓度和组成比例, 将最佳抗体协同组合比例用于 ELISA 检测, 确定线性范围。[结果] 协同抗体 ic-ELISA 的最优反应条件: 包被原和抗体最佳工作质量浓度分别为 0.3, 0.1 $\mu\text{g/mL}$; 抗体协同检测的线性范围较初始单一抗体均有明显的拓宽, 当 1E2-mAb 与 2A11-mAb 按体积比 4:1 混合时, 协同抗体的线性范围较单一抗体 1E2-mAb 提升 47.7 倍, 较单一抗体 2A11-mAb 提升 148.6 倍。[结论] 该抗体协同组合策略可有效拓宽 ELISA 检测方法的线性范围。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 线性范围拓宽; 协同抗体; 酶联免疫吸附法

Strategy for linear range broadening of ELISA based on antibody synergistic combination

GUO Cuili¹ PENG Juan¹ LAI Weihua¹ XING Keyu² GAN Bei³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China; 2. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 3. Institute of Industrial Product Testing and Certification, Jiangxi General Institute of Testing and Certification, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

Abstract: [Objective] To broaden the linear range of ELISA for deoxynivalenol detection. [Methods] This paper obtains three antibodies with different sensitivities via mouse immunization, cell fusion and screening, ascites preparation and antibody purification. By optimizing the working concentration and composition ratio of the antibody synergistic combination, the optimal antibody synergistic combination ratio is applied to ELISA to determine the linear range. [Results] The optimal reaction conditions for the ic-ELISA based on synergistic antibodies are as follows: the optimal working concentrations of the coating antigen and antibody are 0.3 and 0.1 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The linear range of the synergistic antibody is obviously broadened compared with the initial single antibody. When 1E2-mAb and 2A11-mAb are mixed at a volume ratio of 4:1, the linear range of the synergistic antibody is 47.7 times higher than that of the single antibody 1E2-mAb and 148.6 times higher than that of the single antibody 2A11-mAb. [Conclusion] This antibody synergistic combination strategy can effectively broaden the linear range of ELISA.

Keywords: deoxynivalenol; linear range broadening; synergistic antibody; ELISA

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON), 是由禾谷镰刀菌、尖孢镰刀菌等镰刀菌产生的一种单端孢霉烯族毒素^[1-2]。DON 因其水溶性较强^[3], 容易污染粮食谷

物、土壤和水源。DON 具有较强的细胞毒性和免疫抑制作用, 对人类和动物的健康构成了一定的威胁^[4-5]。目前, 在全球范围内有 100 多个国家和地区对食品中 DON

基金项目: 赣鄱俊才支持计划—主要学科学术和技术带头人培养项目(编号: 20243BCE51066)

通信作者: 彭娟(1989—), 女, 南昌大学副教授, 博士。E-mail: pengjuan2016@163.com

收稿日期: 2025-08-14 改回日期: 2026-01-25

引用格式: 郭翠丽, 彭娟, 赖卫华, 等. 基于抗体协同组合的 ELISA 检测线性范围拓宽策略[J]. 食品与机械, 2026, 42(6): 46-52.

Citation: GUO Cuili, PENG Juan, LAI Weihua, et al. Strategy for linear range broadening of ELISA based on antibody synergistic combination[J]. Food & Machinery, 2026, 42(6): 46-52.

的限量标准作出了严格的规定^[6]。中国GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》要求,谷物及其制品中的DON限量为1 000 μg/kg。基于此,DON的检测对于保障粮食安全和消费者健康至关重要。

目前,针对DON的检测方法主要有液相色谱串联质谱法^[7-8]和高效液相色谱法^[9]等方法。这些仪器方法准确度高、精密度好,但存在仪器设备较昂贵、检测时间较长以及对操作人员要求较高等缺点,因此不适合于快速检测。免疫学检测方法如酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[10-12]因操作简便、检测快速高效、成本低廉等优点被广泛应用于DON的快速检测。

ELISA检测方法的线性范围是实际检测中的关键因素^[13-14]。传统ELISA检测的线性范围通常由单一抗体的性能决定,有时线性范围较窄。针对这一问题,目前的研究中主要通过改进标记材料^[15-16]、复合多种信号输出模式^[17-18]等方式拓宽线性范围。这些方式虽能在一定程度上拓宽检测的线性范围,但通常涉及复杂的材料合成以及繁琐的条件优化等步骤,难以作为一种普适性的方法拓宽线性范围。对于协同组合灵敏度不同的抗体以提高检测线性范围的相关研究未见报道。

研究拟制备得到灵敏度不同的DON单克隆抗体,将其中灵敏度差异较大的抗体协同组合,通过棋盘法确定协同抗体的工作点,优化不同抗体之间的组合比例,探究不同组合比例对协同抗体线性范围的影响,以及灵敏度不同抗体之间相互协同作用的规律。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

脱氧雪腐镰刀菌烯醇、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)、HAT补充剂(50×)、HT补充剂(100×):美国Sigma-Aldrich公司;

不完全培养基(RPMI-1640):美国Gibco公司;

聚苯乙烯96孔微孔板、胎牛血清:苏州依科赛生物科技股份有限公司;

其他试剂:分析纯,市售;

雌性BALB/c小鼠:无特定病原体(SPF)级,6~8周龄,河南斯克贝斯生物科技股份有限公司;

全自动酶标仪:Multiskan FC型,美国Thermo Fisher公司;

电子天平:CN-LQC10002型,昆山优科维特电子科技有限公司;

涡旋混匀仪:SMV-4500B型,武汉塞维尔生物科技有限公司;

CO₂培养箱:WCI-180型,北京维根技术有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1F型,苏州安泰空气技术有限公司;

倒置显微镜:CKX53SF型,日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 单克隆抗体的制备与筛选 通过对DON进行衍生得到含羧基的DON半抗原,再通过碳化二亚胺法将其与KLH偶联,制得用于免疫的完全抗原。通过1,1'-羰基二咪唑法将DON直接与BSA偶联,制得用于包被的完全抗原。偶联产物置于透析液中透析3 d,透析后的完全抗原置于-20℃保存。

将上述方法制得的免疫原用于免疫12只BALB/c小鼠,免疫方法为颈背部皮下多点注射。使用间接竞争性酶联免疫吸附法(indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA)评价小鼠尾部血清,根据血清评价结果挑选抑制效果不同的小鼠分别进行细胞融合。

在细胞融合及筛选阶段,通过对细胞上清液添加不同浓度的DON标准品溶液,筛选多株阳性值高但抑制率差异较大的细胞株进行扩大培养,并通过小鼠腹水瘤诱生法制备腹水,通过抗体纯化得到多株灵敏度不同的抗体。

所有动物试验均按照提供的方案进行,并经南昌大学动物护理审查委员会(批准号0064257)批准。骨髓瘤细胞为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0,由实验室保存。

1.2.2 协同抗体工作点的确定 用棋盘法ic-ELISA对上述方法制得的多株抗体进行包被抗原浓度和检测抗体浓度的优化。将包被原用包被稀释液分别稀释成1.00, 0.30, 0.10, 0.03 μg/mL,用于包被96孔酶标板,将单克隆抗体用抗体稀释液分别稀释成1.00, 0.30, 0.10, 0.03 μg/mL,根据抗体的灵敏度添加一定量的DON标准品溶液,进行ELISA检测。最终根据阴性对照组在450 nm处的吸光度值(OD₄₅₀)和阳性试验组的抑制率(计算方法如式(1)所示)两个指标作为选择工作点的依据。协同抗体的工作点确定为3株抗体的阴性对照组的OD₄₅₀均在1.0以上、抑制率均在30%以上时对应的工作点。

$$R = \left(1 - \frac{B}{B_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R ——抑制率, %;

B ——试验组的OD₄₅₀;

B_0 ——对照组的OD₄₅₀。

1.2.3 协同抗体比例的优化及线性范围的比较 将多株抗体分别稀释到工作点对应的浓度。将灵敏度差异较大的抗体协同组合,灵敏度更高的抗体作为主要抗体,与另一抗体按比例混合, $V_{\text{高灵敏度抗体}}:V_{\text{低灵敏度抗体}}$ 分别为5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 混合后的抗体用于ic-ELISA中进行标准曲线的建立。标准曲线的标准品添加范围以同时覆盖两株抗体的线性范围为准,每条标准曲线包含16个工作点,每个工作点3个平行。将抑制率作为纵坐标,标准品质量浓度为横坐标,用Origin软件进行四参数拟合得到标准曲线,对应的IC₂₀~IC₈₀即为线性范围。

1.2.4 实际样本的检测

(1) 协同抗体 ELISA 样品前处理: 将经液相色谱串联质谱(LC-MS)验证为阴性的小麦或燕麦样本粉碎, 过 20 目筛, 得到样品粉末。准确称取 2.50 g 小麦或燕麦样本于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 水溶液, 置于涡旋振荡仪上振荡提取 30 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。0.5 mL 上清液加入 0.5 mL 0.01 mol/L PBS 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待用。

(2) LC-MS/MS 样品前处理: 将小麦样本粉碎, 过 20 目筛, 得到样品粉末。准确称取 2.50 g 小麦或燕麦样本于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈—水—乙酸混合液 ($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{乙酸}}=70:29:1$), 置于涡旋振荡仪上振荡提取 30 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。0.5 mL 上清液加入 0.5 mL 纯水混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 尼龙 66 滤膜, 滤液待用。

(3) LC-MS/MS 条件: ACE EXCEL 2 C₁₈-PFP 色谱柱 (2.1 mm×150 mm), 进样体积 5 μL , 流量 0.2 mL/min, 流动相为 0.1% 甲酸水+乙腈, 梯度洗脱。洗脱程序为 0~2.0 min, 95% 甲酸水+5% 乙腈; 2.0~4.0 min, 80% 甲酸水+20% 乙腈; 4.0~4.5 min, 95% 甲酸水+5% 乙腈; 4.5~8.0 min, 10% 甲酸水+90% 乙腈; 8.0~9.0 min, 10% 甲酸水+90% 乙腈; 9.0~13.0 min, 95% 甲酸水+5% 乙腈。

(4) 质谱参数: 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 电喷雾离子源, 喷雾器 103.4 kPa, 离子源温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压 4 000 V, MRM 参数见表 1。

表 1 DON 分析的 MRM 参数

化合物	母离子	子离子	碰撞能量/eV
DON	297.0	249.0	5
DON	297.0	231.0	8
¹³ C ₁₅ -DON	312.2	263.0	7
¹³ C ₁₅ -DON	312.2	245.0	10

(5) 加标回收试验: 根据抗体 IC₅₀ 和线性范围, 向样本中添加不同浓度的待测物标准品溶液。经协同抗体 ELISA 检测, 计算回收率和变异系数, 从而评估协同抗体 ELISA 的准确性和精密度。回收率计算方法如式 (2) 所示。

$$R = \frac{C_{\text{spiked}} - C_{\text{unspiked}}}{C_{\text{added}}} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:

R——回收率, %;

C_{spiked}——加标样本的测定质量分数, $\mu\text{g/kg}$;

C_{unspiked}——未加标样本的本底质量分数, $\mu\text{g/kg}$;

C_{added}——加入样品中的标准物质质量分数, $\mu\text{g/kg}$ 。

(6) 盲样检测: 选择 10 份小麦盲样样本经前处理后得

到样本液, 分别用于协同抗体 ELISA 和 LC-MS/MS 检测, 根据检测结果评估协同抗体 ELISA 的准确性和可靠性。

1.3 数据处理

利用 Excel 2019 进行数据处理及分析, 每个试验中的工作点均重复 3 次, 结果以均值±标准偏差表示; 使用 Origin 2021 软件进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体的制备与筛选

2.1.1 小鼠多抗血清的鉴定 棋盘法 ic-ELISA 测定 3 次免疫之后的小鼠尾部多抗血清, 表 2 列出了在工作点 (包被原质量浓度 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 血清稀释倍数 1 000 倍) 下 3 只小鼠的多抗血清效果。结果表明: 在添加标准品质量浓度为 500 ng/mL 时, 1、2 号小鼠多抗血清在阴性 OD₄₅₀ 值≥1.0 时, 抑制率在 70% 左右; 3 号小鼠多抗血清在阴性 OD₄₅₀ 值≥1.0 时, 抑制率为 18%。

表 2 小鼠多抗血清效果的 ic-ELISA 测定结果

Table 2 Results of polyclonal antiserum effect in mice by ic-ELISA

小鼠编号	对照组	试验组	抑制率/%
1	1.527±0.034	0.546±0.007	64
2	1.463±0.039	0.303±0.020	79
3	1.348±0.012	1.102±0.094	18

2.1.2 DON 单克隆抗体的制备 根据小鼠多抗血清评价结果, 将 1、2 号小鼠的脾脏取出分别进行细胞融合, 用于筛选灵敏度较高的抗体。初次筛选 96 孔细胞板中的强阳性细胞株, 将强阳性细胞株转入新的 96 孔细胞板中进行扩大培养, 通过 3 次亚克隆, 最终分别筛选得到一株效价高、灵敏度高的杂交瘤细胞, 分别命名为 2D11 和 1E2。将 3 号小鼠的脾脏取出进行细胞融合, 用于筛选灵敏度较低的抗体。通过初次筛选和多次亚克隆, 最终筛选得到一株效价高的杂交瘤细胞, 命名为 2A11。通过小鼠腹水瘤诱生法得到腹水 1E2、2D11 和 2A11, 通过腹水纯化得到以上 3 株抗体。

2.2 协同抗体工作点的确定

棋盘法 ic-ELISA 测定上述 3 株抗体的结果如表 3~表 5 所示。结果表明, 3 株抗体同时满足阴性对照组的 OD₄₅₀ 在 1.0 以上、抑制率均大于 30% 时对应的工作点为包被原质量浓度 0.30 $\mu\text{g/mL}$, 抗体质量浓度 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 。因此, 协同抗体的工作点定为包被原质量浓度为 0.30 $\mu\text{g/mL}$, 抗体质量浓度为 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 协同抗体比例的优化及线性范围的比较

分别建立 1E2-mAb、2D11-mAb、2A11-mAb 3 株抗体的标准曲线, 结果如图 1~图 3 所示。其中 1E2-mAb 的 IC₅₀ 为 11.9 ng/mL, 线性范围 (IC₂₀~IC₈₀) 为 2.8~51.5 ng/mL;

表3 1E2-mAb的ic-ELISA测定结果(OD₄₅₀)
Table 3 Results of 1E2-mAb by ic-ELISA (OD₄₅₀)

包被原质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	1.00 μg/mL 抗体			0.30 μg/mL 抗体			0.10 μg/mL 抗体			0.03 μg/mL 抗体		
	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%
1.00	2.632	2.233	15	2.169	1.824	16	1.641	1.109	32	0.790	0.453	43
0.30	2.459	2.057	16	2.063	1.368	34	1.461	0.625	57	0.636	0.251	61
0.10	2.301	1.542	33	1.797	0.730	59	1.071	0.296	72	0.419	0.142	66
0.03	1.992	0.742	63	1.159	0.287	75	0.533	0.138	74	0.211	0.095	55

表4 2D11-mAb的ic-ELISA测定结果(OD₄₅₀)
Table 4 Results of 2D11-mAb by ic-ELISA (OD₄₅₀)

包被原质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	1.00 μg/mL 抗体			0.30 μg/mL 抗体			0.10 μg/mL 抗体			0.03 μg/mL 抗体		
	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%
1.00	2.387	1.956	18	1.995	1.415	29	1.381	0.732	47	0.577	0.309	46
0.30	2.288	1.460	36	1.818	0.722	60	1.121	0.323	71	0.452	0.146	68
0.10	1.845	0.717	61	1.300	0.286	78	0.660	0.139	79	0.266	0.089	67
0.03	0.972	0.253	74	0.576	0.122	79	0.287	0.077	73	0.132	0.074	44

表5 2A11-mAb的ic-ELISA测定结果(OD₄₅₀)
Table 5 Results of 2A11-mAb by ic-ELISA (OD₄₅₀)

包被原质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	1.00 μg/mL 抗体			0.30 μg/mL 抗体			0.10 μg/mL 抗体			0.03 μg/mL 抗体		
	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%	阴性组	阳性组	抑制率/%
1.00	2.515	2.274	10	2.166	1.982	9	1.637	1.440	12	0.720	0.634	12
0.30	2.022	1.681	17	1.709	1.255	27	1.086	0.713	34	0.456	0.297	35
0.10	1.129	0.834	26	0.861	0.530	38	0.513	0.279	45	0.229	0.136	40
0.03	0.424	0.299	30	0.311	0.194	37	0.204	0.116	43	0.115	0.084	27

2D11-mAb的IC₅₀为121.7 ng/mL,线性范围(IC₂₀~IC₈₀)为38.1~388.3 ng/mL;2A11-mAb的IC₅₀为561.9 ng/mL,线性范围(IC₂₀~IC₈₀)为231.9~1 361.4 ng/mL。

1E2-mAb与2A11-mAb、2D11-mAb与2A11-mAb两组抗体按比例混合之后的线性范围如表6~表7所示。结果表明,当1E2-mAb与2A11-mAb按体积比4:1混合时,协同抗体的线性范围为1.5~1 315.3 ng/mL,相较于单一抗

体1E2-mAb的线性范围2.8~51.5 ng/mL拓宽了47.7倍、相较于单一抗体2A11-mAb的线性范围231.9~1 361.4 ng/mL拓宽了148.6倍;当2D11-mAb与2A11-mAb按体积比4:1混合时,协同抗体的线性范围为20.2~499.9 ng/mL,相较于单一抗体2D11-mAb的线性范围(38.1~388.4 ng/mL)拓宽了2.4倍、相较于单一抗体2A11-mAb的线性范围(231.9~1 361.4 ng/mL)拓宽了4.2倍。

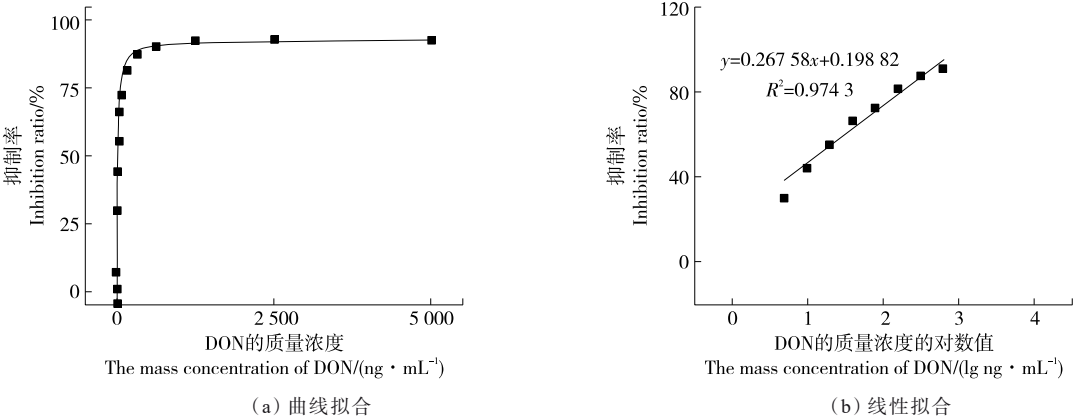


图1 1E2-mAb的标准曲线
Figure 1 Standard curve of 1E2-mAb

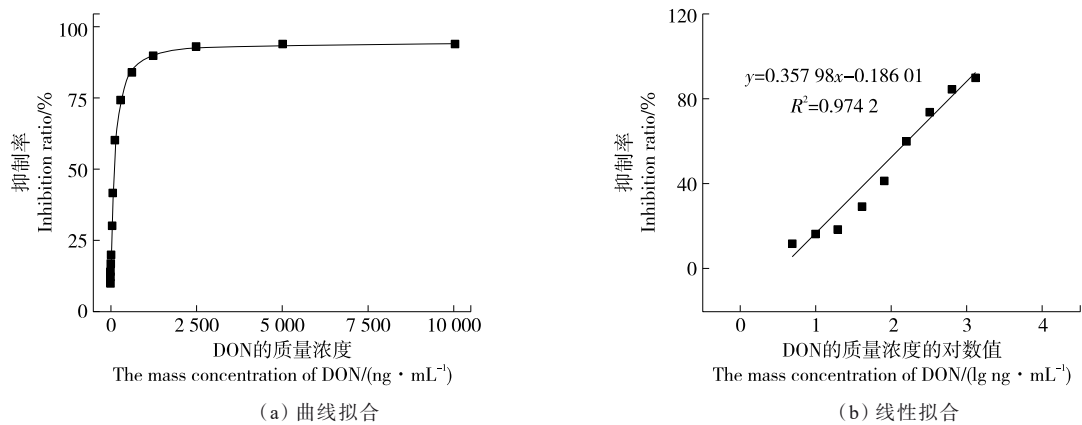


图2 2D11-mAb的标准曲线
Figure 2 Standard curve of 2D11-mAb

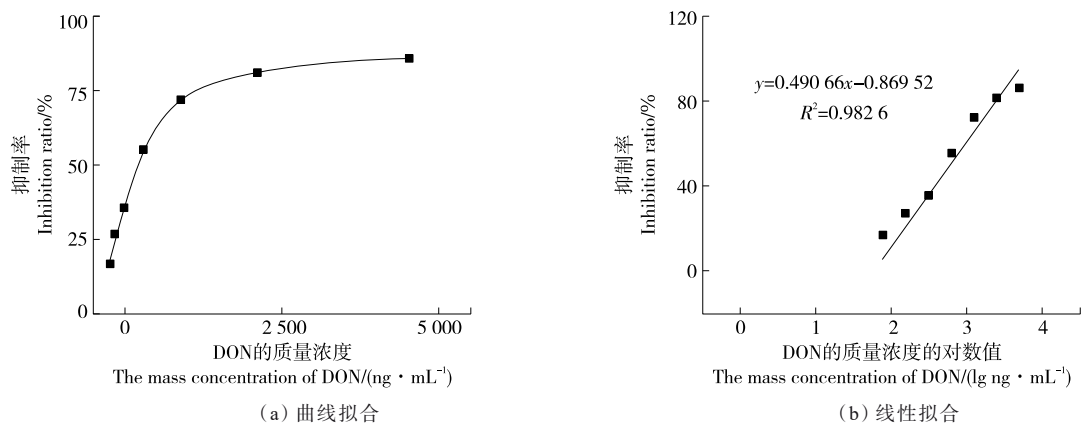


图3 2A11-mAb的标准曲线
Figure 3 Standard curve of 2A11-mAb

两组协同抗体拓宽线性范围的程度不同,主要是由两株抗体之间的灵敏度差异决定的。mAb-1E2的 IC_{50} 为11.9 ng/mL,mAb-2A11的 IC_{50} 为561.9 ng/mL,二者的比值为47.2;而mAb-2D11的 IC_{50} 为121.7 ng/mL,mAb-2A11的 IC_{50} 为561.9 ng/mL,二者的比值为4.6。前一组协同抗体中两株抗体灵敏度之间的差异更大,因此拓宽线性范围

的效果更显著。
当1E2-mAb与2A11-mAb按体积比1:1混合时,协同抗体的 IC_{20} 为15.2 ng/mL,相较于单一抗体1E2-mAb的 IC_{20} 为2.8 ng/mL,增大了5.4倍。说明当灵敏度较低抗体占比过高时,协同抗体的线性范围下限会受到较大影响而导致数值增大,因此不利于拓宽线性范围;当1E2-mAb

表6 1E2-mAb与2A11-mAb协同抗体线性范围
Table 6 Linear range of 1E2-mAb and 2A11-mAb synergistic antibodies

$V_{1E2-mAb}:$ $V_{2A11-mAb}$	$IC_{50}/$ ($ng \cdot mL^{-1}$)	$IC_{20}/$ ($ng \cdot mL^{-1}$)	$IC_{80}/$ ($ng \cdot mL^{-1}$)	线性范围/ ($ng \cdot mL^{-1}$)
1:0	11.9	2.8	51.5	2.8~51.5
5:1	31.5	3.4	293.8	3.4~293.8
4:1	45.0	1.5	1 315.3	1.5~1 315.3
3:1	57.8	7.8	426.0	7.8~426.0
2:1	170.7	12.8	2 283.3	12.8~2 283.3
1:1	220.5	15.2	3 207.4	15.2~3 207.4
0:1	561.9	231.9	1 361.4	231.9~1 361.4

表7 2D11-mAb与2A11-mAb协同抗体线性范围
Table 7 Linear range of 2D11-mAb and 2A11-mAb synergistic antibodies

$V_{2D11-mAb}:$ $V_{2A11-mAb}$	$IC_{50}/$ ($ng \cdot mL^{-1}$)	$IC_{20}/$ ($ng \cdot mL^{-1}$)	$IC_{80}/$ ($ng \cdot mL^{-1}$)	线性范围/ ($ng \cdot mL^{-1}$)
1:0	121.7	38.1	388.4	38.1~388.4
5:1	115.9	27.6	486.3	27.6~486.3
4:1	100.4	20.2	499.9	20.2~499.9
3:1	114.8	32.1	411.0	32.1~411.0
2:1	165.0	48.0	566.7	48.0~566.7
1:1	155.7	45.3	535.3	45.3~535.3
0:1	561.9	231.9	1 361.4	231.9~1 361.4

与2A11-mAb按体积比5:1混合时,协同抗体的线性范围为3.4~293.8 ng/mL,相较于单一抗体1E2-mAb仅拓宽了4.7倍。说明当灵敏度较低抗体占比过低时,灵敏度较低的抗体难以对协同抗体的线性范围产生较大影响。两组协同抗体的最佳协同作用比例均为体积比4:1,说明在协同抗体中占主导作用的是灵敏度较高的抗体,同时需达到灵敏度较低抗体能发挥作用的浓度时有最佳线性范围拓宽效果。

试验证实,抗体协同组合策略通过综合灵敏度差异较大抗体的线性范围优势,可以显著拓宽线性范围,且协同抗体拓宽线性范围的效果是由两株抗体之间的灵敏度差异决定的,灵敏度差异越大,拓宽线性范围的效果越显著。因此,通过抗体协同组合可以灵活拓宽检测方法的线性范围。

如图4所示,协同抗体的抑制率随靶标物浓度变化的速率更慢(曲线的斜率更小),协同抗体的速率曲线位于两株抗体速率曲线之间。根据上述试验结果推测,两株抗体按一定比例混合后线性范围有所拓宽,这一现象是由两株抗体协同作用导致的。当存在低浓度靶标物时,主要是灵敏度较高的抗体发挥作用;当存在高浓度靶标物时,灵敏度较低的抗体与灵敏度较高的抗体竞争性地与靶标物结合,导致抑制率下降,即灵敏度较低抗体的存在延缓了灵敏度较高抗体的抑制率随靶标物浓度升高而升高的速率。说明协同抗体兼具了两株抗体特点,因此具有更宽的线性范围。

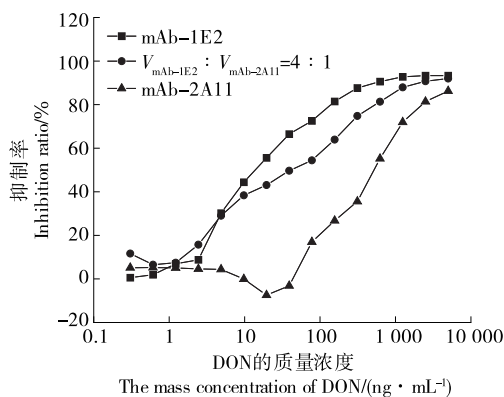


图4 抑制率随靶标物质量浓度的变化

Figure 4 Inhibition ratio varying with mass concentration of target substances

试验结果表明,通过协同不同灵敏度的抗体以拓宽检测的线性范围这一方法是有效的,这一现象可以从免疫学和动力学理论层面进行解释。首先,高灵敏度抗体与低灵敏度抗体的互补性识别窗口,构建了协同抗体拓宽检测范围的能力。协同效应的本质是构建了一个双通道识别系统。在低浓度区,推测由高灵敏度抗体主导反应,以保证信号灵敏;在高浓度区,低灵敏度抗体参与竞争,

防止信号过早饱和,最终形成一个跨越多个数量级的连续响应区间。其次,高灵敏度抗体与低灵敏度抗体的最佳协同作用比例可能是竞争性结合动力学达到平衡的结果。在最佳协同作用比例下,高灵敏度抗体保持主导作用且低灵敏度抗体能达到有效作用浓度,故协同抗体可发挥出最佳拓宽线性范围的效果。因此,协同抗体拓宽检测线性范围的现象可能是免疫学与动力学共同作用的结果。

2.4 实际样本的检测

2.4.1 DON的添加回收试验 选择 $V_{1E2-mAb}:V_{2A11-mAb}$ 为4:1这组协同抗体应用于实际样本检测,建立ELISA检测小麦中DON的标准曲线为 $y=0.330\ 51x-0.151\ 47$,燕麦的标准曲线为 $y=0.271\ 53x-0.015\ 29$ 。根据抗体 IC_{50} 和检测范围,确定小麦和燕麦中的DON添加量为100,200,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。协同抗体ELISA检测小麦和燕麦样本中DON的回收率如表8所示。

表8 协同抗体ELISA检测小麦和燕麦样本中DON的回收率

Table 8 Recovery of DON in wheat and oat samples by synergistic antibodies ELISA ($n=3$)

样本	添加量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	检测质量分数/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率/%	变异系数/%
小麦	100	105.2 ± 2.1	105.2	2.0
	200	218.5 ± 1.2	109.3	0.5
	500	555.0 ± 30.9	111.0	5.6
燕麦	100	110.7 ± 3.2	110.7	3.0
	200	214.4 ± 5.3	107.2	2.5
	500	564.7 ± 27.2	112.9	4.8

协同抗体ELISA检测小麦中DON的回收率为105.2%~111.0%,变异系数为0.5%~5.6%;检测燕麦中DON的回收率为107.2%~112.9%,变异系数为2.5%~4.8%。结果表明,协同抗体ELISA检测小麦和燕麦样本中DON的回收率和变异系数均在正常范围内,说明该方法检测实际样本的可行性。

2.4.2 协同抗体ELISA与LC-MS/MS的对比试验 协同抗体ELISA和LC-MS/MS检测10份小麦盲样的结果如表9所示。

协同抗体ELISA检测小麦盲样的结果与LC-MS/MS检测结果一致,说明该方法检测实际样本时的准确性和可靠性。结果表明,研究建立的协同抗体ELISA在拓宽检测线性范围的基础上,仍能保证检测实际样本的可行性与准确性。

3 结论

研究通过免疫BALB/c小鼠、细胞融合筛选、腹水制备及抗体纯化等技术,获得到3株灵敏度差异较大的抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体。基于对这3株抗体的灵

表 9 协同抗体 ELISA 和 LC-MS/MS 检测小麦样本的结果[†]
Table 9 Results of wheat samples detected by synergistic antibodies ELISA and LC-MS/MS ($n=3$) $\mu\text{g/kg}$

样品编号	ELISA	LC-MS/MS
1	ND	ND
2	ND	ND
3	1 599.2±53.6	1 620.3±42.4
4	ND	ND
5	ND	ND
6	ND	ND
7	632.7±17.6	576.7±43.8
8	ND	ND
9	ND	ND
10	ND	ND

[†] ND 表示未检出。

敏度与线性范围的差异分析,提出不同灵敏度的抗体协同组合拓宽线性范围这一观点。将这 3 株抗体两两组合并按一定比例进行混合后发现,协同抗体线性范围较初始单一抗体显著拓宽,且两株抗体灵敏度差异越大拓宽线性范围的效果越显著。同时,该研究仍存在不足之处,如对协同作用机理的解释仍停留在理论推测层面,缺乏直接的分子水平证据来证实不同抗体和抗原结合的动力学参数变化,同时抗体的最佳协同作用比例的经验依赖性较强,缺乏普适性预测模型,后续将着力研究不同抗体分子的互作动力学以及最佳作用比例数学模型的构建。

参考文献

[1] HUANG P P, YU X, LIU H Q, et al. Regulation of TRI5 expression and deoxynivalenol biosynthesis by a long non-coding RNA in *Fusarium graminearum*[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 1 216.

[2] TU Y, LIU S Q, CAI P R, et al. Global distribution, toxicity to humans and animals, biodegradation, and nutritional mitigation of deoxynivalenol: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(5): 3 951-3 983.

[3] MAGALLANES LÓPEZ A M, MANTHEY F A, SIMSEK S. Wet milling of deoxynivalenol -contaminated wheat: effect on physicochemical properties of starch[J]. Cereal Chemistry, 2020, 97(2): 293-303.

[4] ZHANG H S, ZHENG S Y, ZUO Y H, et al. A novel glutathione-conjugates of deoxynivalenol biotransformation *in vitro* and the cytotoxic properties evaluation[J]. Food Research International, 2025, 214: 116634.

[5] DAI C S, HAO Z H, LIU D K, et al. Deoxynivalenol exposure-related male reproductive toxicity in mammals: molecular mechanisms, detoxification and future directions[J]. Environment International, 2025, 199: 109478.

[6] ZHOU S Y, XU L G, KUANG H, et al. Fluorescent microsphere immunochromatographic sensor for ultrasensitive monitoring

deoxynivalenol in agricultural products[J]. Microchemical Journal, 2021, 164: 106024.

[7] GIANNIOTI Z, ALBERO B, HERNANDO M D, et al. Determination of regulated and emerging mycotoxins in organic and conventional gluten-free flours by LC-MS/MS[J]. Toxins, 2023, 15(2): 155.

[8] WANG L, YAN Z, ZHOU H Y, et al. Validation of LC-MS/MS coupled with a chiral column for the determination of 3- or 15-acetyl deoxynivalenol mycotoxins from *Fusarium graminearum* in wheat[J]. Toxins, 2021, 13(9): 659.

[9] MRUCZYK K, CISEK-WOŹNIAK A, MIZGIER M, et al. Natural occurrence of deoxynivalenol in cereal-based baby foods for infants from western poland[J]. Toxins, 2021, 13(11): 777.

[10] HONG F, CHEN R, LU P, et al. A universal, portable, and ultra-sensitive pipet immunoassay platform for deoxynivalenol detection based on dopamine self-polymerization-mediated bioconjugation and signal amplification[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 436: 129257.

[11] 张琛, 许慧卿, 崔桂友, 等. 纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* 16-1 对小麦粉中呕吐毒素的脱毒机制[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 8-14.

ZHANG C, XU H Q, CUI G Y, et al. Removal mechanisms of deoxynivalenol by *Bacillus natto* 16-1 in wheat flour[J]. Food & Machinery, 2019, 35(3): 8-14.

[12] 于小番, 张琛, 许慧卿, 等. 处理方式对米根霉菌 *Rhiz18* 清除呕吐毒素的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 69-73, 146.

YU X F, ZHANG C, XU H Q, et al. Effect of treatment on the elimination of deoxynivalenol by *Rhiz18*[J]. Food & Machinery, 2019, 35(9): 69-73, 146.

[13] 谢永富, 孙宏勋. 临床生化检测线性范围的应用及临床意义[J]. 河北医药, 2008(1): 79-80.

XIE Y F, SUN H X. Application and clinical significance of linear range in clinical biochemical testing[J]. Hebei Medical Journal, 2008(1): 79-80.

[14] 吴蕙, 吴炯, 郭玮, 等. 临床常用线性评价方案的应用比较[J]. 检验医学, 2006(6): 576-581.

WU H, WU J, GUO W, et al. The linearity evaluation guidelines in clinical practice[J]. Laboratory Medicine, 2006(6): 576-581.

[15] WANG Y, FENG Q L, YAN H Q, et al. Trifunctional nanocomposites with colorimetric magnetic catalytic activities labels in sandwich immunochromatographic detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(3): 1 232-1 240.

[16] ZHANG S B, WU Z S, GUO M M, et al. A novel immunoassay strategy based on combination of chitosan and a gold nanoparticle label[J]. Talanta, 2007, 71(4): 1 530-1 535.

[17] XIAO X Y, YU S, ZHANG G, et al. Efficient photothermal sensor based on coral - like hollow gold nanospheres for the sensitive detection of sulfonamides[J]. Small, 2024, 20(28): e2307764.

[18] ZHANG G, LAI K Y, ZHANG L L, et al. J-aggregated fluorescence nanoparticles with multichromatic performance enable sensitive LFIA platform[J]. Nano Letters, 2025, 25(23): 9 237-9 244.