

# 饲料及饲料原料中霉菌毒素快速检测技术研究进展

孟卫芹<sup>1</sup> 王金良<sup>1</sup> 沈志强<sup>1,2\*</sup> 陈金龙<sup>2</sup>

1.山东省滨州畜牧兽医研究院,山东滨州 256600;2.山东绿都生物科技有限公司,山东滨州 256600

**摘要** 霉菌毒素是由真菌产生的有毒代谢产物或次生代谢产物,在自然界中分布广泛,对动物和人类健康造成了极大危害。为此,本文介绍了饲料及饲料原料中常见的霉菌毒素及其对动物的危害,总结了近年来几种快速检测技术(酶联免疫吸附法、化学发光酶免疫分析法、免疫层析法、核酸适配体生物传感器)在霉菌毒素检测方面所取得的进展和存在的问题,并对霉菌毒素快速检测技术发展前景作出了展望。

**关键词** 霉菌毒素;快检技术;饲料

霉菌毒素 (mycotoxins) 是一类低分子质量化合物,是由霉菌或者丝状真菌在适宜条件下产生的有毒次生代谢产物<sup>[1]</sup>,广泛存在于粮食、饲料及饲料原料中,动物食用感染的饲料可引起机体多种中毒症状甚至死亡,并可通过食物链威胁人类健康。根据联合国粮农组织(FAO)统计,全球每年约有 25% 的农作物受到霉菌毒素不同程度的污染,约 2% 的农作物因污染严重失去应用价值,由此造成的经济损失可达数千亿美元。我国是家畜养殖大国,畜牧业也是我国农业的重要支柱产业,而微量的霉菌毒素便可产生巨大的毒害作用,对我国畜牧业的健康可持续发展 and 人类食品安全构成了巨大挑战<sup>[1-3]</sup>。因此,快速、准确检测饲料及饲料原料中霉菌毒素含量,是保障动物和人类健康的重要手段,现对国内

外霉菌毒素及其快速检测方法进行综述。

## 1 霉菌毒素的主要种类及危害

目前,可产生霉菌毒素的真菌主要来自曲霉属、镰刀菌属、麦角菌属、链格孢属以及青霉菌属。发现的霉菌毒素种类已超过 500 种,在饲料及原料中常见、且对动物健康危害严重的霉菌毒素主要有 6 种,即黄曲霉毒素 B1、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、赭曲霉毒素 A、伏马毒素 B1、T-2 毒素,这些毒素即使在饲料及饲料原料中含量很低,也会使其营养价值和适口性下降,引起动物免疫机能下降、生长受阻、繁殖性能降低等,且毒素间的毒副作用具有协同或加和效应<sup>[4-5]</sup>。饲料中常见霉菌毒素及其危害见表 1,残留在动物组织和动物制品中的霉菌毒素导

表 1 霉菌毒素及其危害

霉菌毒素种类	饲料及原料	敏感动物	危害性
黄曲霉毒素	花生、玉米及其副产物、小麦、棉籽、鱼粉等	雏鸡和雏鸭最敏感,猪、鸡、鸭等	肝硬化、肝癌等
玉米赤霉烯酮	玉米、小麦、稻谷、高粱、鱼粉等	猪、牛和禽,青年母猪	破坏繁殖能力
呕吐毒素	玉米、小麦、大麦、燕麦、米、麦芽等	猪最敏感,鸡、鸭以及成年反刍动物等次之	呕吐及腹泻
赭曲霉毒素	玉米、小麦和大麦等	猪和禽类	脂肪肝及流产等
T-2 毒素	玉米、小麦、大麦、燕麦、米、鱼粉等	猪最敏感,家禽次之	机体免疫力下降
伏马毒素	玉米、稻谷、大豆、高粱等	马最敏感,猪次之	马脑坏死,猪肺水肿、呼吸障碍等

收稿日期:2020-07-11

基金项目:山东省重大科技创新工程项目资助(2019JZZY020606);山东省现代农业产业技术体系羊创新团队岗位专家项目(SDAIT-10-07)

\* 通讯作者

孟卫芹,女,1985 年生,硕士,助理研究员。

致食品安全风险进而影响人类健康。

## 2 霉菌毒素快速检测技术

我国已经建立一些饲料中常见霉菌毒素的检测标准,如 GB/T 17480-2008 饲料中黄曲霉毒素 B1 的测定(酶联免疫吸附法)、GB/T 28716-2012 饲料中玉米赤霉烯酮的测定(免疫亲和柱净化-高效液相色谱法)、GB/T 8381.6-2005 配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定(薄层色谱法)、NY/T 1970-2010 饲料中伏马毒素的测定(液质法)。这些标准大多采用高效液相色谱法(HPLC)、液质联用技术(LC-MS/MS)、薄层层析法(TLC)、酶联免疫吸附法(ELISA)等。TLC 操作简便,但灵敏度差;仪器检测灵敏度高,但样品处理复杂,且仪器昂贵,标准品消耗大。目前霉菌毒素残留检测技术的发展趋势,要求样品提取方便、试剂耗用少、在线自动化处理、多组分高通量地快速检测。因此,快速检测技术必将成为霉菌毒素残留检测研究的重点。

### 2.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(ELISA)是利用酶分子与抗原或抗体相结合,然后用酶标记的抗原或抗体,与固定在聚苯乙烯材料上的抗体或抗原发生特异性反应,通过洗涤使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,经底物液反应显色,测定光学信号强度,进而确定待检物的含量。ELISA 方法比胶体金免疫层析快速检测技术灵敏度更高,具有低成本、快速、操作简单、便捷等优点,广泛应用于医疗、食品和饲料检测领域。龚阿琼等<sup>[4]</sup>采用 ELISA 法检测了我国饲料原料及配合饲料中 AFB<sub>1</sub>、ZEN、DON 的含量。李卫娟等<sup>[5]</sup>通过 ELISA 法对牧草、秸秆、青贮等反刍动物饲料中 AFB<sub>1</sub>、DON、ZEN、FB<sub>1</sub> 进行定量检测。

### 2.2 化学发光酶免疫分析法

化学发光酶免疫分析方法(CLEIA)是将化学发光分析和酶免疫反应相结合而建立的一种测定方法,兼具有化学发光的高灵敏性和抗原抗体反应的高度特异性,与传统 ELISA 的主要区别是显色系统的不同,比常规酶免疫分析法的灵敏度提高了 3~5 个数量级。因化学发光检测技术灵敏度高、特异性强、成本低廉、快速稳定、检测范围广、操作简便、自动化高等优点而被广大研究技术人员认可与推广,广泛应用于食品安全、环境检测、医药科学和临床

疾病诊断等方面,成为药物残留检测发展的一种趋势。叶云峰等<sup>[6]</sup>采用化学发光免疫分析方法实现了粮食作物中的 OTA 残留的快速检测。

### 2.3 免疫层析法

免疫层析法(IC)是以免疫渗滤为基础发展起来的一种简便快速的检测方法,其原理是将特异的抗体固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当一端浸入样品后,由于毛细管的作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体的区域时,样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合,根据颜色反应从而实现样品的特异性免疫诊断。该方法具有操作简便、快速经济、灵敏度高且不需要昂贵的仪器设备等优点,特别适用于大批量样本的快速筛查和基层检测。随着免疫层析技术的迅猛发展,多种纳米材料标记物被应用于免疫层析试纸条,常见的有胶体金、荧光微球、量子点等,呈现出高灵敏度、可定量检测、多元检测的发展趋势。与 ELISA 法相比,虽然胶体金免疫层析试纸条检测限高,但大大缩短了检测时间。为了提高灵敏度,Wang 等<sup>[7]</sup>用荧光微球标记 FB<sub>1</sub> 单克隆抗体,建立了一种检测玉米中 FB<sub>1</sub> 的免疫层析法,与 FB<sub>2</sub> 和 FB<sub>3</sub> 的交叉反应率分别为 1.5%和 67.3%,回收率在 90%以上。肖理文等<sup>[8]</sup>通过荧光纳米微球标记玉米赤霉烯酮抗体和羊抗鸡抗体,研发的玉米赤霉烯酮荧光定量试纸条,在样品中检测添加回收率为 90%以上,3 次重复的变异系数在 13.11%以内,与其他真菌毒素的交叉反应率均小于 5%,满足快速、简便、准确定量的需求。李鑫<sup>[9]</sup>研制的多元胶体金免疫层析试纸条,可同时检测 AFB<sub>1</sub>、OTA 和 ZEN 等 3 种组分,检测限分别为 0.25、0.5、1 ng/mL,该试纸条特异性好,3 种真菌毒素之间无交叉反应,满足多组分同步检测的需要,在饲料真菌毒素混合污染同步快速检测中具有应用前景。

### 2.4 核酸适配体生物传感器

核酸适配体(aptamer)是利用体外筛选技术得到的一种能与抗体相似的寡核苷酸片段,可与多种目标物质高特异性、高选择性地结合,如蛋白质和药物等,被广泛应用于生物传感器领域。基于核酸适配体的生物传感器具有易合成、易标记、易修饰、灵敏度高、特异性高、分子质量小、检测成本低等优势而受到广泛的关注。桂海婵等<sup>[10]</sup>利用非标记荧光染料 PicoGreen 与双链核酸结合的特异性,建立了

一种快速检测伏马毒素 B1 的核酸适配体方法,该方法的最低检测限为  $0.1 \mu\text{g/L}$ , 线性范围为  $0.1 \sim 1 \mu\text{g/L}$ , 整个检测流程可在 40 min 内完成。乔勤勤等<sup>[11]</sup>设计的一种新型光子晶体编码悬浮阵列适配体,可同时量化和鉴定谷类样品中的 OTA 和 FB1。这些传感器具有操作简单、灵敏度高、亲和力高等优点,并且同时检测 2 种霉菌毒素的适配体传感器对之后同时检测多种霉菌毒素的传感器的发展提供了新的研究方向。

### 3 总结与讨论

霉菌毒素快速检测方法是在免疫学的基础上结合胶体金、酶标记、荧光免疫、核酸适配体等技术开发出的快速、高灵敏度、高特异性的检测方法。霉菌毒素的危害性现已被人们高度重视,而霉菌毒素的快速、准确检测方法是当今研发人员亟需解决的问题。通过广泛查阅文献发现 2 个问题:一是饲料中多种霉菌毒素共存的现象非常普遍,而多数检测方法只针对一种霉菌毒素,应该建立混合污染免疫检测技术,如研究一种便携、亲和力强、成本效益高的核酸适配体通过多种修饰,同时检测多种霉菌毒素的快速检测技术;二是隐蔽型霉菌毒素的检测问题,隐蔽型霉菌毒素是指霉菌毒素通常以与糖和氨基酸等极性物质共轭的方式同时存在,难以通过常规分析方法检测出,对动物和人类健康存在潜在风险。对于隐蔽型真菌毒素的测定思路,目前国外主要采用色谱法,学者提出理论上免疫组化法是可以替代色谱法的快速且经济的方法,但仍处于起步阶段,密切关注学习国外新技术、新方法,研发出新型霉菌毒素快速检测技术,对加强动物饲料安全监控,保证人们食品安全与身体健康,促进社会经济

稳定发展具有重大意义。

### 参 考 文 献

- [1] SHI H T, LI S L, BAI Y Y, et al. Mycotoxin contamination of food and feed in China: Occurrence, detection techniques, toxicological effects and advances in mitigation technologies[J]. Food control, 2018(91):202-215.
- [2] STEIN R A, BULBOACA A E. Foodborne Diseases [M]. 3rd ed. Cambridge: Academic Press, 2017:407.
- [3] XU Z, ZHENG L, YIN Y, et al. A sensitive competitive enzyme immunoassay for detection of erythrosine in foodstuffs[J]. Food control, 2015(47):472-477.
- [4] 龚阿琼, 全明旭, 周锋, 等. 2017 年上半年我国饲料原料及配合饲料霉菌毒素检测分析[J]. 中国饲料, 2017(4):38-44.
- [5] 李卫娟, 洪琼花, 高新, 等. 云南省反刍动物用饲草料霉菌毒素污染情况初报[J]. 中国草食动物科学, 2017, 37(2):20-23.
- [6] 叶云锋, 李研东, 吴雨洋, 等. 化学发光免疫分析方法检测粮食谷物中赭曲霉毒素 A 残留 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7):2787-2791.
- [7] WANG Z, LI H, LI C, et al. Development and application of quantitative fluorescence-based immunochromatographic assay for fumonisin B1 in maize[J]. J Agric food chem, 2014, 62(27):6294-6298.
- [8] 肖理文, 徐秀, 赵皖. 基于时间分辨荧光纳米微球的玉米赤霉烯酮快速定量检测试纸条的研制及性能研究 [J]. 粮食加工, 2017, 42(5):37-39.
- [9] 李鑫. 基于免疫分析的农产品真菌毒素混合污染同步检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院, 2014.
- [10] 桂海雯, 金庆日, 张亚军, 等. 基于荧光染料 PicoGreen 和核酸适配体的伏马毒素 B1 检测方法[J]. 生物工程学报, 2015, 31(9):1393-1400.
- [11] 乔勤勤, 文芳, 郑楠, 等. 核酸适配体生物传感器在食品霉菌毒素检测中应用的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(16):294-303.

【责任编辑:刘少雷】