

胶体金免疫层析法快速检测食品中的米酵菌酸

曹雪铭¹, 徐振林^{1*}, 苏燕瑜², 王宇², 雷红涛¹, 肖剑²

¹华南农业大学 广东省食品质量安全重点实验室 广州 510642

²广州市食品检验所 广州 510410

摘要 制备特异性识别米酵菌酸的单克隆抗体,并以胶体金标记用作示踪物,建立胶体金免疫层析快速检测方法。研究胶体金标记体系 pH 值、抗原、抗体质量浓度、离子强度、表面活性剂以及样品前处理方法等对胶体金层析卡性能的影响。结果表明:在最适条件下,所建立的胶体金免疫层析方法对米酵菌酸的定量检出限为 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,线性范围 1.8~7.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定性检出限 16.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法特异性良好,与食品中常见的毒素无交叉反应,对银耳、木耳和米粉等样品的添加回收率在 80.2%~101.2%之间,相对标准偏差小于 6.4%,且结果与 LC-MS/MS 法一致。该方法具有准确、灵敏、简便、快速和低成本等特点,可以满足食品中米酵菌酸现场大批量筛查的需求。

关键词 米酵菌酸;单克隆抗体;胶体金免疫层析;快速检测

文章编号 1009-7848(2023)02-0309-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.02.030

米酵菌酸(Bongkrekic acid, BA)是唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种(*Burkholderia gladioli* pv. *Cocovenenans*, BGC)分泌的一种毒素,最早于 20 世纪 30 年代被荷兰学者 Mertens 和 Vanveen 在研究爪哇居民椰子发酵食物中毒时发现^[1]。流行病学研究表明,BGC 极易污染谷类制品(发酵玉米面、糯玉米汤圆、玉米淀粉等)、变质银耳和薯类制品(马铃薯粉条、甘薯淀粉、山芋淀粉等)等^[2]。BA 是一种强呼吸毒素,主要靶器官是肝、脑、肾等脏器^[3],一旦中毒会因呼吸衰竭而死亡^[4-6],其次由于 BA 有较强的热稳定性,普通的烹饪方式很难将其去除。有研究表明人体摄入 1~1.5 mg 的 BA 可能引起生命垂危,而另一项研究则认为口服 BA 对人体的半数致死量为 3.16 mg/kg^[7]。据不完全统计,自 2014 年以来,我国由 BA 引起的食物中毒事件高达几十起,病死率高达 50%以上^[8]。2018 年 11 月广东省东莞市先、后出现 5 例不明原因急性肝衰竭的病例,其中 3 例死亡,在疑似变质的银耳和患者血液标本中均检出高浓度 BA^[9]。2020 年 7 月 28 日,11 位顾客在广东省揭阳市惠来县神泉镇石头肠粉店食用河粉后,先、后出现呕吐、腹泻等疑

似食物中毒症状,其中 1 人死亡;2020 年 10 月 5 日黑龙江鸡东县发生一起因家庭聚餐食用酸汤子引发的食物中毒事件,9 人食用后全部死亡^[10]。为了预防中毒事件的发生和应对中毒后的快速治疗处理,建立 BA 的快速灵敏检测方法十分必要。

目前针对 BA 的检测方法主要包括高效液相色谱法^[11-12]、高效液相色谱-串联质谱^[13-15]、超高效液相色谱^[16]、超高效液相色谱-串联质谱^[17-18]以及荧光层析法^[19]等。这些方法虽然准确可靠,但是往往操作比较复杂,检测时间长,成本也较高。基于抗原、抗体特异性结合的免疫分析方法因其快速、灵敏、准确和高通量等优点而深受青睐,特别是胶体金免疫层析法(Colloidal gold immunochromatography, GICA)易操作和低成本的优势,而被广泛应用于食品安全快速筛查^[20-23]。早期,刘秀梅等^[24-25]制备了抗 BA 的抗体并建立了间接竞争酶联免疫分析方法。然而,该方法灵敏度欠佳且尚未在实际检测中应用。对此,本研究开展了 BA 特异性单克隆抗体的制备与筛选,并建立了 GICA 检测方法,对影响 GICA 检测性能和稳定性的条件进行系统优化,最后用于银耳、木耳和米粉等实际样品的检测。

收稿日期: 2022-02-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(32061160473);广州市科技重点研发计划项目(107218553095)

第一作者: 曹雪铭,女,博士生

通信作者: 徐振林 E-mail: jallent@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品垫、硝酸纤维素膜(NC 膜)、吸水垫和聚氯

乙烯底板(PVC底板),上海金标生物技术有限公司;样品垫处理液、金标复溶液,广州万联生物科技有限公司;氯金酸、柠檬酸三钠,国药集团化学试剂有限公司;羊抗鼠 IgG,北京全式金生物技术有限公司;米酵菌酸标准品,上海安谱实验科技股份有限公司;米酵菌酸包被原(BA-BSA)、抗米酵菌酸单克隆抗体(Anti-bongkrelic acid monoclonal antibody, Anti-BA mAb),实验室自制;银耳、木耳、米粉,广州食品检验所;其余试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

HGS510 划膜仪、HGS201 裁条机、GIC-Q 金标读数仪,杭州峰航科技有限公司;低温高速离心机,德国 Eppendorf 公司;MS 漩涡震荡器,德国 IKA 公司;SKFG-01 烘箱,湖北黄石市恒丰医疗器械有限公司;Waters 2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 Anti-BA mAb 的制备 将 BA 通过活泼酯法与乳铁蛋白(LF)偶联制备免疫抗原,以皮下注射的方式免疫 Balb/c 小鼠。选择免疫原效价最高的小鼠作为脾细胞供体,用于杂交瘤的产生。将上述脾细胞通过细胞融合技术与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞,然后通过有限稀释的方法,将分泌 BA 特异性抗体的杂交瘤细胞亚克隆 5 次,并对最佳的抗体产生克隆进行筛选和扩增,以获得高质量的抗体。

1.3.2 胶体金的制备 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒^[21]。准确称量 100.0 mL 屈臣氏水于干净的圆底烧瓶,置于磁力搅拌油浴锅中搅拌加热回流至煮沸,随后加入 4.0 mL 10.0 g/L 的氯金酸溶液,持续加热搅拌至再次沸腾后,迅速加入 4.6 mL 10.0 g/L 的柠檬酸三钠溶液,待溶液颜色变成透亮的酒红色,持续搅拌 10 min 后停止加热,并利用余热继续搅拌 5 min 后冷却至室温,4℃保存备用。

1.3.3 单克隆抗体-胶体金标记物的制备 取 1.0 mL 1.3.2 节制备的胶体金溶液,用 0.2 mol/L 碳酸钾溶液将胶体金溶液调节至合适的 pH 值,加入一定量的抗体,室温下振荡反应 15 min,再加入 40.0 μL 100.0 g/L 的 BSA 溶液封闭没有结合抗体

的位点,继续室温下振荡反应 1 h。4℃条件下,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1.0 mL 金标复溶液使红色沉淀物复溶并混匀,最后将其包被在 96 孔的酶标板中,包被体积为 40 μL,45℃过夜烘干待用。

1.3.4 GICA 方法的建立

1.3.4.1 试纸条的组装 试纸条是由 PVP 底板、样品垫、NC 膜以及吸水垫组成。首先将 BA-BSA 和羊抗鼠 IgG 用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释至适合浓度,用划膜仪喷洒于 NC 膜上,分别作为检测 T 线和质控 C 线,45℃干燥箱中静置过夜待用。另外将玻璃纤维素膜(预先切割成 22 mm 宽)在样品垫处理液中浸泡 10 min,取出后在 45℃下过夜烘干待用。最后将样品垫、NC 膜和吸水垫依次粘贴在 PVP 板上,用切条机切割成 4 mm 宽的试纸条用于后续试验。

1.3.4.2 检测步骤和原理 取 100.0 μL 配好的标准溶液或样品提取液加入金标微孔中吹打混匀,反应 3 min 后,将微孔内的所有溶液吸出,加到试纸条的样品垫上反应 5 min。如图 1 所示,胶体金标记的 Anti-BA mAb 会被固定在 NC 膜上的 BA-BSA 捕捉,形成一条红色的检测线,而过量的 Anti-BA mAb 进一步迁移,并被形成对照的羊抗鼠 IgG 抗体捕获。当样品中有目标分析物 BA 存在时,它将与检测线上的 BA-BSA 竞争,并优先结合胶体金标记的 Anti-BA mAb,检测线从而表现为不显色。通过读数仪测定,建立标准曲线,可对样品中 BA 含量进行测定。

1.3.5 GICA 检测条件的优化 为了实现最佳的检测灵敏度、稳定性和良好的色彩强度,探究了几个重要参数的优化,包括标记体系 pH 值、标记抗体质量浓度、T、C 线质量浓度、样品垫处理液以及样品前处理方法。为了准确地说明优化过程,筛选出最佳抑制率条件,应用读数仪对检测线进行扫描,可得到 T 线和 C 线的信号值。抑制率按以下公式计算, B_x 为阳性样品 T 线和 C 线信号强度比值, B_0 为阴性样品 T 线和 C 线信号强度比值。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{B_0 - B_x}{B_0} \times 100$$

1.3.6 试纸条的性能评价

1.3.6.1 灵敏度 GICA 方法不仅可以定性检测

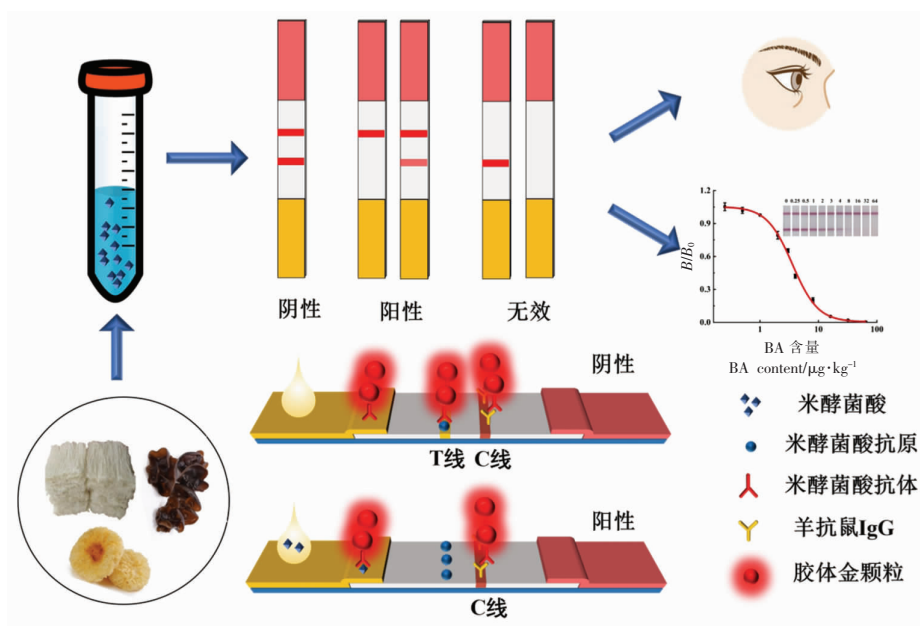


图 1 GICA 检测示意图

Fig.1 Schematic diagram of GICA

目标分析物,还可以利用读卡仪定量检测。定性检测时,试纸条的检出限定义为肉眼消线值,即引起检测线颜色消失的最低分析物浓度^[26]。使用 0.01 mol/L PB 溶液配制系列标准品溶液(0.00,0.25,0.50,1.00,2.00,3.00,4.00,8.00,16.00,32.00,64.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$),定量分析时,以检测样本与阴性样本的检测线信号值的比值(B/B_0)为纵坐标,以 BA 含量或含量的对数值为横坐标绘制散点图,用 Origin 8.0 拟合后得标准曲线和标准曲线方程。根据线性曲线方程可计算出 GICA 方法的半抑制浓度(IC_{50}) (用于评估试纸条灵敏度)和检出限(LOO),同时通过相关数(R^2)判断线性回归方程的拟合优度。

1.3.6.2 特异性 将食品中常检的其它毒素:毒黄素(TF)、呕吐毒素、T-2 毒素(T-2)、伏马毒素(FB)、赭曲霉毒素(OTA)、黄曲霉毒素 B_1 (AFB_1)、玉米赤霉酮(ZEN)用 0.01 mol/L 的 PB 缓冲液稀释后用试纸条进行检测,判断试纸条的特异性。

1.3.6.3 实际样品检测 首先对阴性银耳、木耳及米粉进行米酵菌酸添加回收试验。选择 3 个不同含量(2.0,10.0,50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的样品用本试验所优化的样品前处理方法和 GICA 测定。其次是盲样检测。参考曾雪芳等^[17]使用 LC-MS/MS 方法进行检测,最后将结果与 GICA 方法检测结果比较,

以其验证 GICA 方法的准确度。

2 结果与讨论

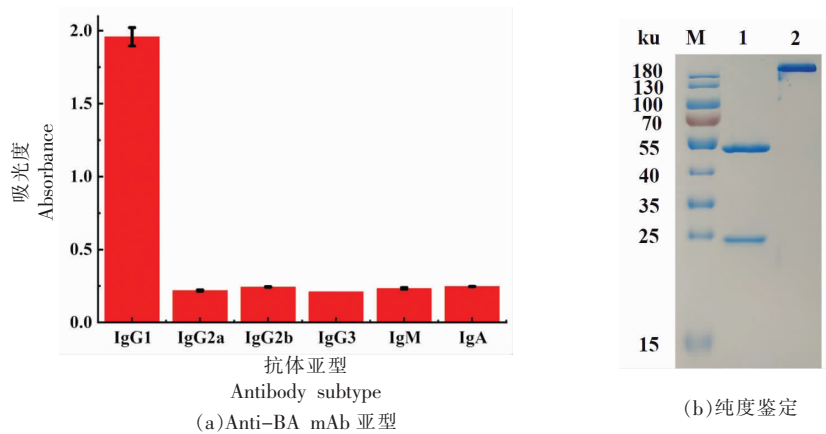
2.1 抗 BA 单克隆抗体性能鉴定

本研究通过细胞融合和有限稀释筛选获得了一株分泌特异性识别 BA 的单克隆抗体的细胞株,命名为 C3。该抗体亚型为 IgG1(图 2a)。将该细胞株注射小鼠腹腔制备腹水,并经亲和柱纯化获得单克隆抗体,经凝胶电泳鉴定,抗体纯度良好(图 2b)。

2.2 胶体金免疫层析条件优化

2.2.1 标记 pH 值和抗体标记体积的优化 胶体金溶液 pH 值会影响抗体与标记物的结合效率以及抗体活性^[27-28]。胶体金溶液 pH 值一般是通过控制标记过程中 K_2CO_3 溶液的体积来调节。如图 3a 所示,探究 0.2 mol/L K_2CO_3 溶液的体积(5,10,15,20,25 μL)对胶体金性能的影响。当 K_2CO_3 用量从 5.0 μL 增加为 10.0 μL 时,试纸条 T、C 线的颜色明显变深;而随着 K_2CO_3 体积的增加,试纸条 T 线颜色逐渐变浅且 T/C 比值无明显变化。综上, K_2CO_3 的体积为 10.0 μL 时,该试纸条的灵敏度和显色情况表现为最佳。

抗体标记体积是影响胶体金试纸条检测效果



注: M. 标准分子质量蛋白; 1. 还原胶, 2. 非还原胶。

图2 抗米酵菌酸单克隆抗体的性能鉴定

Fig.2 Performance evaluation of the Anti-BA mAb

的关键性因素, 适量的抗体标记体积有利于胶体金-抗体结合物的稳定性, 而标记过量可能导致灵敏度下降^[29-30]。在最适标记 pH 值条件下, 比较不

同抗体标记体积对试纸条检测效果的影响。结果显示, 在 1 mL 胶体金溶液中, 当标记的抗体浓度较低时阴性 T 线显色不明显, 当标记体积分别为

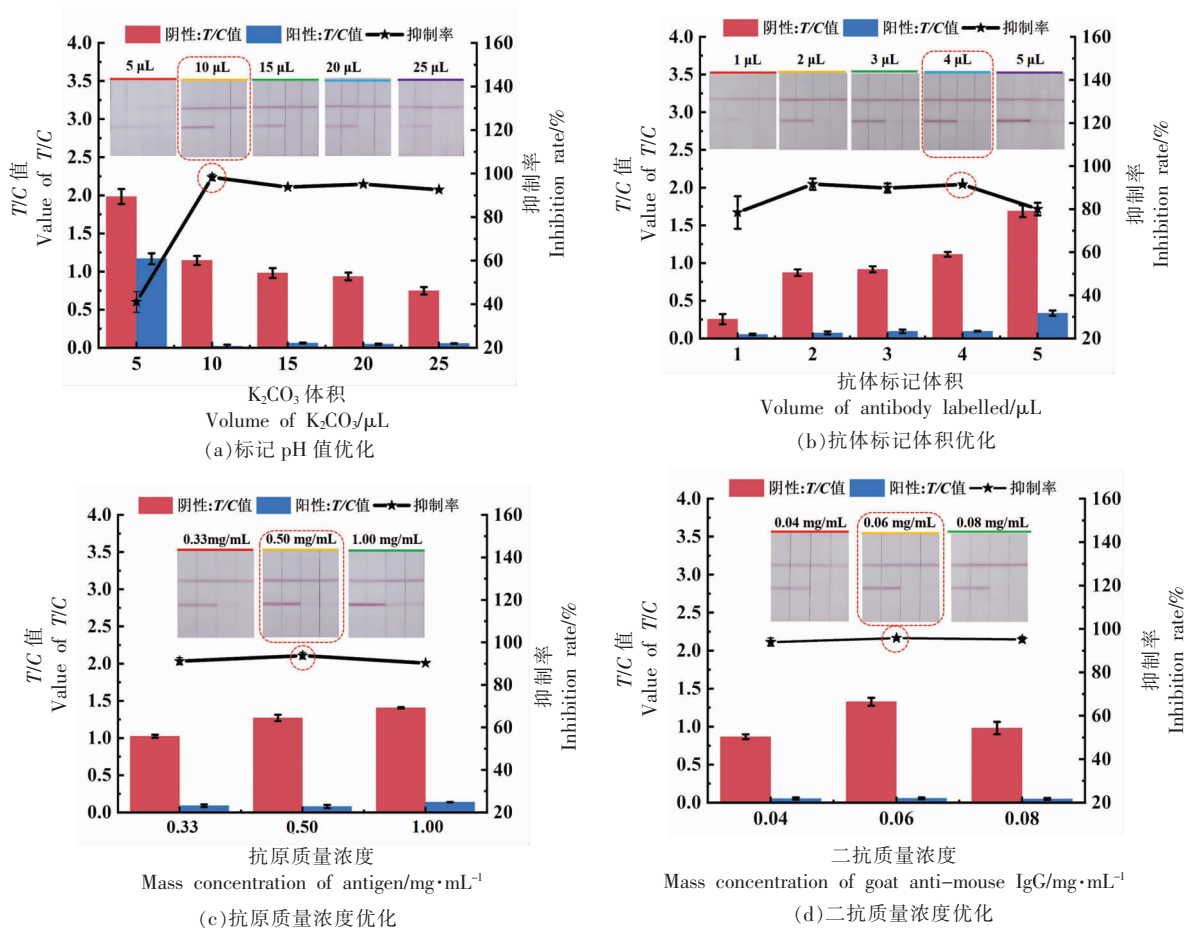


图3 不同反应条件对 GICA 性能的影响

Fig.3 Effects of different reaction conditions on GICA performance

4.0 μL 和 5.0 μL 时 (对应抗体标记量为 16.0 μg 和 20.0 μg), 试纸条的 T、C 线显色明显。标记过程中添加抗体的体积为 4.0 μL 可达到检测要求且在后期实验中抑制率较好, 因此选择 4.0 μL 作为最佳抗体标记体积(图 3b)。

2.2.2 T 线(抗原)和 C 线(二抗)包被质量浓度优化 为了使试纸条的灵敏度和显色达到最佳效果, 对 T 线和 C 线的包被质量浓度进行优化。从图 3c 可以看出, 随着抗原质量浓度的增加, 肉眼观察时试纸条的 T 线颜色逐渐变深; 使用读数仪测定时, 试纸条的 T/C 值虽不断增大, 但抑制率却呈现先上升后逐渐下降的趋势。当包被质量浓度为 0.50 mg/mL 时试纸条的 T/C 值更接近 1.0 且抑制率较高, 故选择 0.50 mg/mL 作为最佳 T 线包被质量浓度。

在最佳 T 线包被质量浓度下, 对 C 线包被质量浓度进行优化, 随着二抗质量浓度的增加, 肉眼观察时, 试纸条 C 线的颜色不断加深, ; 使用读数仪测定时, 虽然包被质量浓度为 0.06 mg/mL 和 0.08 mg/mL 时试纸条的抑制率无明显区别, 但包被质量浓度为 0.06 mg/mL 条件下试纸条 T、C 线显色较明显, 故选择 0.06 mg/mL 为最佳 C 线包被质量浓度(图 3d)。

2.2.3 样品垫缓冲液中离子浓度和吐温-20 质量浓度优化 样品垫的缓冲体系不仅影响抗原、抗体在 NC 膜上的结合, 还对样品待测液起到一定的缓冲作用^[31]。样品垫中缓冲液离子浓度和表面活性剂对试纸条检测性能的影响。如图 4a 所示, 当离子浓度为 0.5 mol/L (PB 缓冲液) 时, 抗原抗体的结合受到较大影响, 试纸条显色不明显。随着缓冲液离子浓度降低, 试纸条的显色逐渐增强, 当离子浓度为 0.2 mol/L 时, 试纸条阴性 T/C 值比 0.01 mol/L 更接近 1.0, 且显色明显。因此样品垫缓冲体系中最佳离子浓度为 0.2 mol/L。

在最优离子浓度条件下, 对表面活性剂吐温-20 的质量浓度进行优化。结果表明, 在同一检测条件下, 不添加吐温-20 的试纸条显色很淡, 随着吐温-20 添加量的增大, 试纸条显色逐渐加深; 使用读数仪测定时, 吐温-20 质量浓度为 5.0 mg/mL 时试纸条的阴性 T/C 值为 1.1, 抑制率为 93.6%, 相比更高添加量的吐温-20, 该添加量的抑制效果

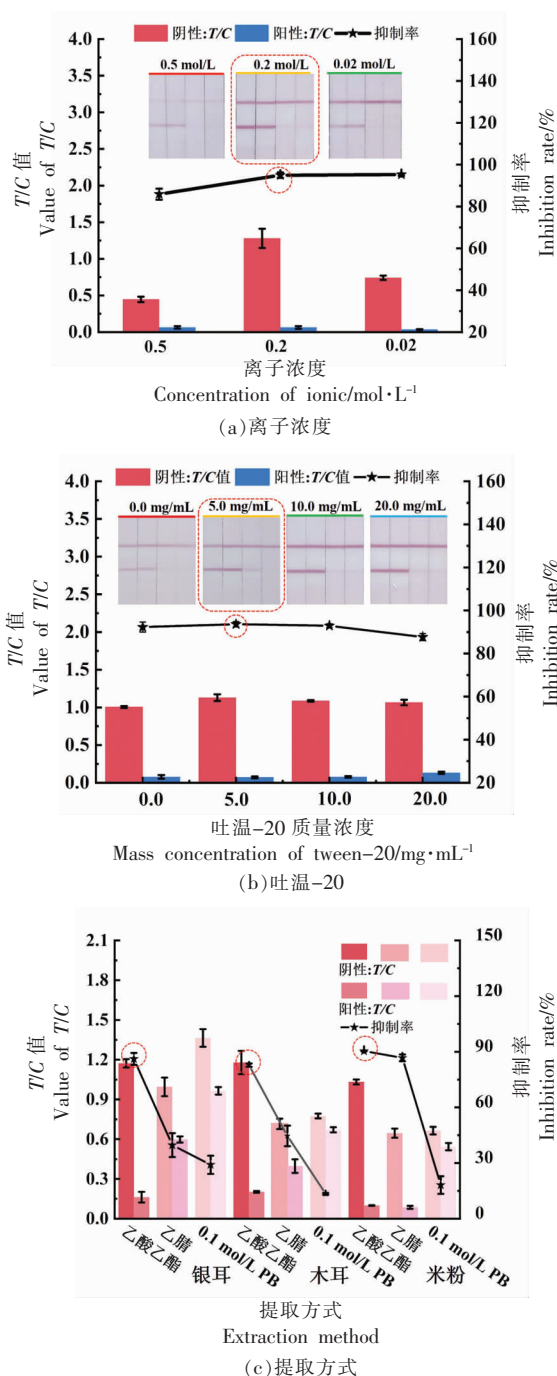


图 4 工作缓冲液和不同提取剂对 GICA 性能的影响
Fig.4 Effects of buffer solution and sample extractant on GICA performance

已经达到最大(图 4b), 体系中选择吐温-20 添加质量浓度为 5.0 mg/mL。

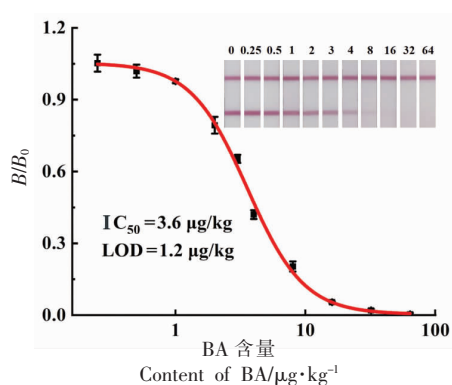
2.3 样品前处理提取溶剂的优化

银耳、木耳和米粉 3 种样品经粉碎后, 分别使用 0.01 mol/L 的 PB 缓冲液、乙腈和乙酸乙酯进行

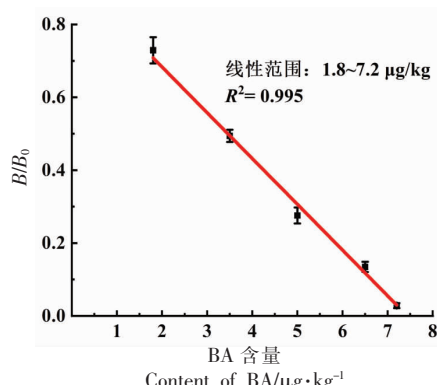
提取。PB 缓冲液直接提取的样品液基质干扰大,无法提取样品中的米酵菌酸。采用有机溶剂提取后吹干复溶进行检测,发现乙腈提取银耳和木耳样品有干扰,阴性样品出现假阳性(T/C 值 <1.0),且 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 加标样品回收率均低于 50% ;相比之下,乙酸乙酯提取效果较好,基质干扰小,加标样品回收率均高于 80% (图 4c)。因此,选择乙酸乙酯最为提取溶剂。

2.4 试纸条性能评价

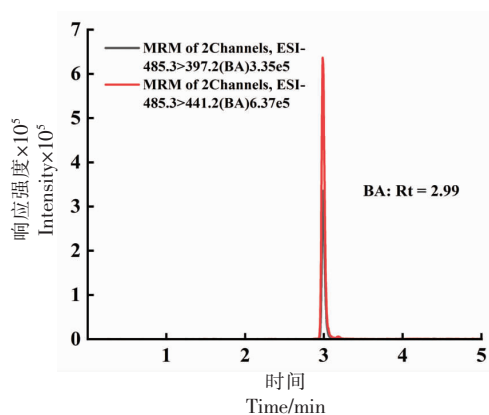
2.4.1 灵敏度 在上述的优化条件下进行试验。在 $0\sim 64.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的 BA 含量范围内,根据检测 BA 含量和试纸条检测结果绘制标准曲线。当 BA 含量达到 $16.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时,胶体金试纸条检测线条带完全消失,因此该试纸条检测 BA 的肉眼消线值为 $16.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (图 5a)。通过拟合结果,本研究建立的方法检出限为 (LOD) $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}$, IC_{50} 为 $3.6 \mu\text{g}/\text{kg}$,其中在 $1.8\sim 7.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的 BA 含量范围内,所建立的 GICA 方法对 BA 检测有良好的线性关系,其线性回归方程为 $Y=0.93-0.13X$ ($R^2=0.995$)



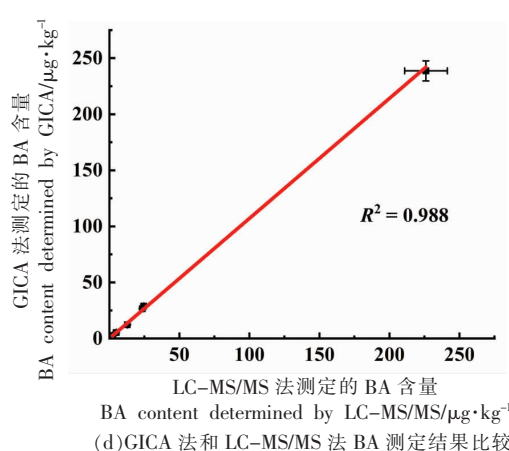
(a)GICA 法检测 BA 的 S 型曲线



(b)GICA 法检测 BA 的校正曲线



(c)LC-MS/MS 谱图

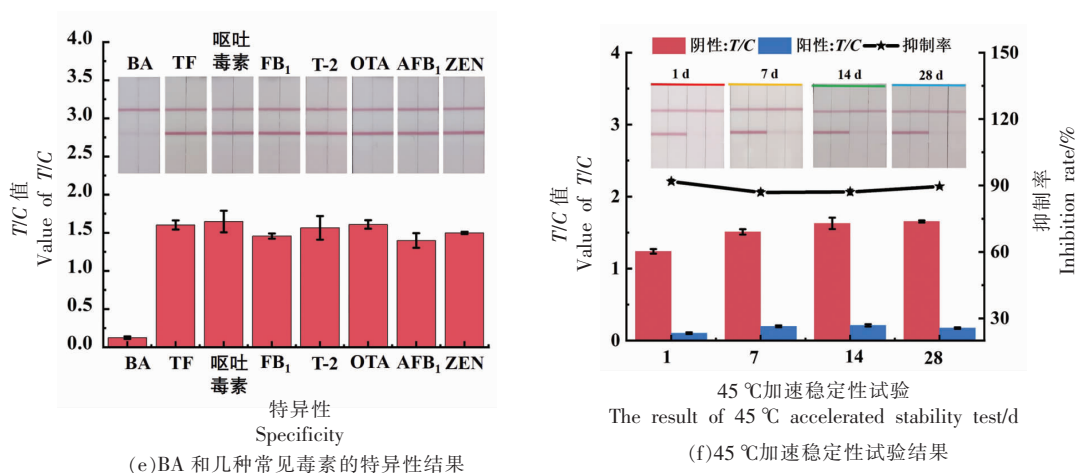


(d)GICA 法和 LC-MS/MS 法 BA 测定结果比较

(图 5b)。

2.4.2 实际样品检测 选择银耳、木耳和米粉 3 种样品进行添加回收实验,BA 添加量为 $2.0, 10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $50.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,每个添加量设 3 个重复。采用上述样品前处理后进行检测,结果如表 1 所示。3 个样品中 BA 的添加回收率在 $80.2\%\sim 101.2\%$ 之间, $RSD<6.4\%$ 。在盲样检测中,首先采用优化后的 LC-MS/MS 色谱条件和质谱参数进行测定,BA 的多反应检测 (MRM) 色谱图如图 5c 所示,峰型对称,分离效果好,响应灵敏度高,重现性好;最后对 GICA 方法的检测结果进行验证。如图 5d 所示,两种方法具有很好的相关性($R^2 = 0.988$),说明本研究所建立的免疫层析检测方法具有良好的准确性。最后对比了文献中关于 BA 的检测方法,本研究建立的免疫层析法不仅灵敏度高,而且操作简便、成本低,能满足市场的大批量筛查(表 2)。

2.4.3 特异性 选取另外几种常见的毒素如 TF、呕吐毒素、T-2、FB₁、OTA、AFB₁ 和 ZEN 进行特异性试验。如图 5e 所示,GICA 对低添加量 BA



注: a 插图图分别为 0.01 mol/L PB 含 0~64.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BA 的结果。

图 5 GICA 性能评价

Fig.5 Performance evaluation of the GICA

表 1 样品添加回收检测结果 ($n=3$)

Table 1 Recoveries of spiked samples ($n=3$)

样品	添加值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	实测值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
银耳	2.0	1.7 ± 0.1	86.1	5.4
	10.0	8.8 ± 0.4	87.7	4.8
	50.0	45.0 ± 1.8	90.0	4.1
木耳	2.0	1.6 ± 0.1	80.2	6.4
	10.0	8.4 ± 0.5	83.5	6.0
	50.0	42.6 ± 1.1	85.3	2.7
米粉	2.0	1.89 ± 0.1	94.4	2.8
	10.0	10.1 ± 0.2	101.2	2.5
	50.0	49.7 ± 1.4	99.4	2.9

(16.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 显示强阳性, 而对 7 种常见毒素在高含量下 (1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$) 均为阴性, 表明该方法的特异性强, 与常见的毒素无交叉反应。

2.4.4 试纸条稳定性 为了验证试纸条的稳定性, 参考 Liu 等^[32]的方法, 在 45 °C 下进行加速稳定性试验。图 5f 记录不同时间段试纸条的 T/C 值和抑制率。结果表明, 加速试验 7, 14 d 和 28 d 后, 试纸条的阴性显色和阳性抑制均保持良好的稳定性。

3 结论

本文首次建立了基于单克隆抗体快速检测 BA 的胶体金免疫层析方法。该方法可以实现对食

表 2 检测米酵菌酸方法对比结果

Table 2 Comparison of the analytical methods for BA

方法	样品	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	参考文献
HPLC	糯米(玉米)面、年糕	100 ~ 40 000	30.00	[11]
UPLC	玉米面、银耳	100 ~ 40 000	2.50	[16]
SPE-HPLC	-	300 ~ 19 278	5.00	[12]
HPLC-MS/MS	银耳	0.5 ~ 50.0	5.00	[13]
HPLC-MS	木耳	5 ~ 120	1.00	[15]
UPLC-MS/MS	河粉、米粉	1 ~ 100	0.10	[17]
UPLC-MS/MS	柳州螺蛳粉	0.01	0.01	[18]
FIA	-	1 ~ 100	-	[19]
GICA	银耳、木耳、米粉	1.8 ~ 7.2	1.2	本文方法

注: “-”表示不可获得。

品中 BA 含量的快速定量检测,检出限为 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,线性范围为 1.8~7.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$;也可以进行定性检测,裸眼消线值为 16.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法特异性良好,与常见的其它毒素无交叉反应,且稳定性好,有较长的货架期。对实际样品进行添加回收试验,结果表明样品添加回收率在 80.2%~101.2%之间, RSD<6.4%,且结果与 LC-MS/MS 吻合度高,表明本研究建立的方法准确、灵敏、可靠,且检测时间短。总之,本研究建立的快速检测方法非常适用于食品中 BA 的现场快速筛查,可以作为风险监测和预警手段用于实际监管中。

参 考 文 献

- [1] FALCONER T M, KERN S E, BRZEZINSKI J L, et al. Identification of the potent toxin bongkrekic acid in a traditional African beverage linked to a fatal outbreak [J]. *Forensic Science International*, 2017, 270: E5-E11.
- [2] 汪廷彩, 雷毅, 周露, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)的研究进展[J]. *食品与机械*, 2021, 37(5): 194-202.
WANG T C, LEI Y, ZHOU L, et al. Recent advances on *Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farinofermentans*) [J]. *Food and Machinery*, 2021, 37(5): 194-202.
- [3] MOEBIUS N, ROSS C, SCHERLACH K, et al. Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli*[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(9): 1164-1174.
- [4] JIAO Z Q, KAWAMURA Y, MISHIMA N, et al. Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: Description of *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* and an emended description of *B. gladioli*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2003, 47(12): 915-925.
- [5] GUDO E S, COOK K, KASPRE A M, et al. Description of a mass poisoning in a rural district in mozambique: The first documented bongkrekic acid poisoning in Africa[J]. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2018, 66(9): 1400-1406.
- [6] SHI R J, LONG C Y, DAI Y, et al. Bongkrekic acid poisoning: Severe liver function damage combined with multiple organ failure caused by eating spoiled food[J]. *Legal Medicine*, 2019, 41(10): 16-22.
- [7] ANWAR M, KASPER A, STECKA R A, et al. Bongkrekic acid: A review of a lesser-known mitochondrial toxin [J]. *Journal of Medical Toxicology*, 2017, 13(2): 173-179.
- [8] 苏嘉妮, 杨丹婷, 李婉珊, 等. 2018年广东省米面制品、淀粉及其制品中椰毒假单胞菌酵米面亚种的调查分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(13): 4112-4118.
SU J N, YANG D T, LI W S, et al. Investigation and analysis of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* from rice flour products and starch and its products in Guangdong province in 2018[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(13): 4112-4118.
- [9] 王海燕, 宋曼丹, 王建, 等. 广东省首起米粉 BA 中毒病原菌鉴定研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(4): 394-398.
WANG H Y, SONG M D, WANG J, et al. Identification of the pathogen in rice noodles in relation to food poisoning caused by bongkrekic acid in Guangdong Province[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2019, 31(4): 394-398.
- [10] 孙欣, 古淑青, 周琬, 等. 美食变毒药:“酸汤子”事件之罪魁祸首竟是它[J]. *质量安全与检验检测*, 2021, 31(S1): 13-15.
SUN X, GU S Q, ZHOU W, et al. Food turns into poison: The culprit of ‘Sour Soup’ incident[J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2021, 31(S1): 13-15.
- [11] 李红艳, 金燕飞, 黄海智, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器结合固相萃取法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 247-251.
LI H Y, JIN Y F, HUANG H Z, et al. Fast determination of bongkrekic acid in foods using mixed-mode weak anion exchange solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) [J]. *Food Science*, 2016, 37(24): 247-251.
- [12] 侯佰立. 固相萃取-高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. *现代食品*, 2019(9): 169-172.
HOU B L. Fast Determination of bongkrekic acid in foods using solid phase extraction-high performance

- liquid chromatography[J]. *Modern Food*, 2019 (9): 169-172.
- [13] 曾令浩, 李思颖, 李文倩, 等. 高效液相色谱-串联质谱法快速检测银耳中的米酵菌酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(19): 6538-6541.
- ZENG L H, LI S Y, LI W Q, et al. Rapid determination of bongkreki acid in tremella by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(19): 6538-6541.
- [14] LIANG M, CHEN R Q, XIAN Y P, et al. Determination of bongkreki acid and isobongkreki acid in rice noodles by HPLC-Orbitrap HRMS technology using magnetic halloysite nanotubes[J]. *Food Chemistry*, 2020, 344: 128682.
- [15] 张洁, 王谢, 马青青, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定木耳中米酵菌酸[J]. *河南预防医学杂志*, 2021, 32(7): 496-499.
- ZHANG J, WANG X, MA Q Q, et al. Determination of bongkreki acid in agaric by HPLC-MS/MS[J]. *Henan Journal of Preventive Medicine*, 2021, 32(7): 496-499.
- [16] 周霞, 陈万勤, 傅红雪, 等. 全自动固相萃取-超高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸含量[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(8): 159-160.
- ZHOU X, CHEN W Q, FU H X, et al. Fast determination of bongkreki acid in food by auto solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(8): 159-160.
- [17] 曾雪芳, 刘嘉飞, 王立亚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定米粉和河粉中的米酵菌酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(13): 4074-4079.
- ZENG X F, LIU J F, WANG L Y, et al. Determination of bongkreki acid in rice noodles and fried rice noodles by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(13): 4074-4079.
- [18] 覃冬杰, 陈荣珍, 卢艺, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定柳州螺蛳粉中米酵菌酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(13): 4273-4278.
- QIN D J, CHEN R Z, LU Y, et al. Determination of bongkreki acid in Liuzhou river snails rice noodle by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(13): 4273-4278.
- [19] 张小波, 温国原, 辛苗苗, 等. 米酵菌酸荧光定量检测卡的开发和应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(11): 3584-3589.
- ZHANG X B, WEN G Y, XIN M M, et al. Development and application of fluorescence quantitative detection card for bongkreki acid[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(11): 3584-3589.
- [20] 杜连启, 朱凤妹, 李楠. 胶体金免疫层析法检测猪肉中3种磺胺类药物残留[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(3): 151-160.
- DU L Q, ZHU F M, LI N. Colloidal gold immunochromatography assay for simultaneous detection of sulphonamides residue in pork[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(3): 151-160.
- [21] 罗云波, 程楠, 许文涛. 核酸侧流层析传感器的构建及其在食品安全快速检测中的应用[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(11): 1-12.
- LUO Y B, CHENG N, XU W T. Development of nucleic acid lateral flow biosensor and its application in rapid detection for food safety[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(11): 1-12.
- [22] YAO L J, LIU L Q, SONG S S, et al. Development of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent and immunochromatographic strip assays for carbofuran detection in fruits and vegetables[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28(4): 639-651.
- [23] LIU S J, DOU L N, YAO X L, et al. Polydopamine nanospheres as high-affinity signal tag towards lateral flow immunoassay for sensitive furazolidone detection[J]. *Food Chemistry*, 2019, 315: 126310.
- [24] 刘秀梅, 余东敏, 文卫华, 等. 米酵菌酸多克隆抗体的制备[J]. *卫生研究*, 1995, 24(2): 93-95.
- LIU X M, YU D M, WEN W H, et al. Production of polyclonal antibody against bongkreki acid[J]. *Journal of Hygiene Research*, 1995, 24(2): 93-95.
- [25] 刘秀梅, 文卫华. 米酵菌酸单克隆抗体细胞株的建立[J]. *卫生研究*, 1996, 25(4): 48-50.
- LIU X M, WEN W H. Development of a monoclonal antibody cell line against bongkreki acid[J]. *Journal of Hygiene Research*, 1996, 25(4): 48-50.
- [26] 那冠琼. 多肽类抗生素、吩噻嗪类和新型“瘦肉精”等兽药的免疫快速检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学,

- 2020.
- NA G Q. Rapid immunoassay for detecting polypeptide antibiotics, phenothiazines, new 'clenbuterol' and other veterinary drugs[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [27] CHEN Y, XIN Y, YANG H L, et al. Immobilization and stabilization of cholesterol oxidase on modified sepharose particles[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 56: 6–13.
- [28] HU J, ZHOU S, ZENG L F, et al. Hydrazide mediated oriented coupling of antibodies on quantum dot beads for enhancing detection performance of immunochromatographic assay[J]. *Talanta*, 2021, 223: 121723.
- [29] MEI Z L, DENG Y, CHU H Q, et al. Immunochromatographic lateral flow strip for on-site detection of bisphenol A [J]. *Microchimica Acta*, 2013, 180(3/4): 279–285.
- [30] MENG L L, SONG T T, MAO X. Novel immunochromatographic assay on cotton thread based on carbon nanotubes reporter probe [J]. *Talanta*, 2017, 167: 379–384.
- [31] LEI X L, XU X X, LIU L Q, et al. Rapid quantitative determination of fentanyl in human urine and serum using a gold-based immunochromatographic strip sensor[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(37): 8573–8584.
- [32] LIU Z W, HUA Q C, WANG J, et al. Prussian blue immunochromatography with portable smartphone-based detection device for zearalenone in cereals[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 131008.

The Rapid Detection of Bongkreic Acid in Foods Using Colloidal Gold Immunochromatographic Assay

Cao Xueming¹, Xu Zhenlin^{1*}, Su Yanyu², Wang Yu², Lei Hongtao¹, Xiao Jian²

¹State Key Laboratory of Food Quality and Safety, South China Agricultural University, Guangzhou 510642

²Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 510410

Abstract In this study, a specific monoclonal antibody against bongkreic acid (BA) was produced. The antibody was conjugated to colloidal gold as a tracer to develop a colloidal gold immunochromatography assay (GICA). The effect of working conditions, including pH value of labeling, mass concentrations of antibody and antigen, ionic strength, surfactant as well as sample pretreatment on GICA performance were studied. Under the optimal condition, the developed GICA showed a quantitative limit of detection of 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a detection range of 1.8–7.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and a qualitative detection limit of 16.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The proposed assay has shown good specificity, and exhibited no cross-reaction with other toxins commonly found in food. Recovery test was done by using tremella, agaric, and rice flour samples and ranged from 80.2% to 101.2% with the relative standard deviation (RSD) less than 6.4%. Besides, the results had good agreement with that of liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). In conclusion, the proposed assay can meet the demand for mass screening of bongkreic acid in food in an accurate, sensitive, convenient, rapid, and low-cost manner.

Keywords bongkreic acid; monoclonal antibody; colloidal gold immunochromatography; rapid detection