

免疫法快速检测食品中黄曲霉毒素的研究进展

毕水莲*, 黄思敏

(广东药学院食品科学学院, 中山 528458)

摘 要: 黄曲霉毒素(aflatoxin)是由霉菌黄曲霉和寄生曲霉感染后产生的次生代谢产物, 是自然界中毒性最强的化合物之一, 被世界卫生组织的癌症研究机构(IARC)划定为 I 类致癌物质, 与肝癌的发生密切相关。黄曲霉毒素很容易污染谷物、坚果、香料、植物油脂、乳类及其制品等多种食品。因此, 研究出快速、准确、高效的食品中黄曲霉毒素的检测方法是政府、企业和研究者们一直以来的共同目标。本文综述了近年来基于免疫技术发展的各种快速检测黄曲霉毒素方法, 主要包括酶联免疫吸附测定法、胶体金免疫层析法、免疫传感器、免疫亲和柱-高效液相色谱法、免疫荧光法、放射免疫法、时间分辨荧光免疫分析法和量子点探针法的基本原理、适用范围、检测效果、优缺点及国内外应用等方面进展, 为今后研发更优的检测黄曲霉毒素新方法提供借鉴。

关键词: 黄曲霉毒素; 免疫法; 快速检测

Advances in the rapid detection of aflatoxin in foodstuffs by immunising method

BI Shui-Lian*, HUANG Si-Min

(School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

ABSTRACT: Aflatoxin is secondary metabolites produced by *Aspergillus* species of fungi. As one of the most toxic compounds in nature, aflatoxin has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as group I carcinogen and is closely related to the development of liver cancer. Cereals, nuts, spices, vegetable oil, milk and their products are the most susceptible commodities to aflatoxin. Therefore, it is a common goal for the government, enterprises and researchers to detect aflatoxin in foodstuffs rapidly, accurately and efficiently. In this paper, the principle, effect, characteristics and application of the methods, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), colloidal gold immunoassay, immunosensor assay, immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography (HPLC), immunofluorescence-based measurement, radio immunoassay, time resolved fluoroimmunoassay and quantum dots as fluorescent probes assay based on immune technology, were reviewed, so as to provide important references for the development of new superior detection methods of aflatoxin.

KEY WORDS: aflatoxin; immunising method; rapid detection

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401596)、广东省自然科学基金资助项目(S2013040013491)、广东省科技计划项目(2014A040401087)、广东省医学科研基金项目(B2014205)和广东省大学生创新创业训练计划项目(201410573030)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31401596), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2013040013491), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014A040401087), Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (B2014205) and Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Guangdong Province (201410573030)

*通讯作者: 毕水莲, 副教授, 主要研究方向为食品质量安全及检测技术研究。E-mail: bishuilian@163.com

*Corresponding author: BI Shui-Lian, Associate Professor, School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China. E-mail: bishuilian@163.com

1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)是由霉菌黄曲霉和寄生曲霉感染后产生的次生代谢产物^[1],目前已发现的黄曲霉毒素有20多种^[2],主要为B₁、B₂、G₁、G₂、M₁和M₂。从化学结构上看,各种黄曲霉毒素的结构非常相似,均含有二呋喃环和氧杂萜邻酮(香豆素)。黄曲霉毒素的理化性质比较稳定,难溶于水、己烷、乙醚和石油醚,易溶于甲醇、乙醇、氯仿、乙腈和二甲基甲酰胺等有机溶剂,对光、热和酸稳定,遇碱后能迅速分解。黄曲霉毒素的毒性极强,且具有明显的致癌能力。其中AFB₁毒性最大,致癌能力最强,G₁、M₁其次,B₂、G₂和M₂相对较弱。AFB₁的LD₅₀为0.249 mg/kg,属于剧毒物质,其毒性为氰化钾的10倍、砒霜的68倍、三聚氰胺的416倍。其致癌力为已知致癌物二甲基亚硝胺的70倍、奶油黄(甲基偶氮苯)的900倍、六六六的10000倍,1993年被世界卫生组织癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)划定为I类致癌物质^[3]。

黄曲霉毒素广泛存在于谷物农产品和食品中,因其危害巨大,世界各国普遍制定了黄曲霉毒素的最大限量标准。我国卫生部规定玉米、花生仁、花生油中AFB₁的含量不能超过20 μg/kg,大米、其他食用油中AFB₁的含量不能超过10 μg/kg,豆类、发酵食品中AFB₁的含量不能超过5 μg/kg,鲜乳中AFM₁含量不能超过0.5 μg/kg,婴幼儿食品及乳粉中的黄曲霉毒素不得检出。美国联邦政府有关法律规定人类消费食品和奶牛饲料中的黄曲霉毒素含量(指B₁+B₂+G₁+G₂的总量)不能超过20 μg/kg,牛奶中的含量不能超过0.5 μg/kg。而欧盟规定比较严格,要求人类生活消费品谷物中的黄曲霉毒素B₁的含量不能超过2 μg/kg,总量不能超过4 μg/kg,牛奶及奶制品中的AFM₁含量不能超过0.05 μg/kg,花生及其他直接供人类食用的坚果中黄曲霉毒素含量(指B₁+B₂+G₁+G₂的总量)不能超过5 μg/kg。这些严格的黄曲霉毒素限量要求,使得黄曲霉毒素的检测受到了广泛关注。

免疫学方法具有特异性强、灵敏度高、快速简便等特点,近年来国内外学者不断将免疫学方法引入黄曲霉毒素的测定中,本文就近年来国内外广泛采用的食品中黄曲霉毒素免疫检测法的研究进展进行综述。

2 黄曲霉毒素免疫检测方法研究现状

近年来,国内外广泛采用的检测黄曲霉毒素的免疫学方法主要有酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金免疫层析法、免疫传感器、免疫亲和柱-高效液相色谱法、免疫荧光法和放射免疫法(radio immunoassay, RIA)。其中ELISA是最经典、最常见的免疫学检测方法,免疫亲和柱-高效液相色谱法是

现行的饲料中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂测定的国标方法。随着免疫学检测方法研究的深入进行,一些新方法应运而生,如时间分辨荧光免疫分析法(time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)、量子点标记荧光免疫法等,检测性能大大提高。

2.1 常规的黄曲霉毒素检测方法

2.1.1 酶联免疫吸附测定法(ELISA)

ELISA的基本原理是将已知的抗原或抗体固定在固相载体上,再用标记的酶与底物反应而显色,以此来判断是否有相应的免疫反应^[4]。该法的优点是反应特异性强、灵敏度高、干扰小、样品预处理简便、检测结果准确且稳定、成本低,现已成为最常见的快速检测食品中霉菌毒素的方法^[5]。

Zhang等^[6]采用改良的两步筛选法筛选出与AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂具有广泛交叉反应的单克隆抗体,这些抗体可用于同时分析样品中总黄曲霉毒素。Guan等^[7]采用半固体筛选法筛选出了抗AFM₁的细胞株,该细胞株亲和力高,且均不与AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂发生交叉反应。利用此抗体建立的超灵敏间接竞争ELISA方法,可用于检测牛奶和乳制品,检测限分别为3 ng/L和6 ng/L,样品检测时,回收率为91%~110%,变异系数小于10%,与高效液相色谱法(HPLC)检测法的相关性很好。Jiang等^[8]研发出一种快速、简便、可靠的同时筛查不同食品基质中AFB₁和AFM₁的间接ELISA方法,该法的平均回收率为73%~121%,相对标准偏差小于15%,灵敏度与液相色谱串联质谱联用法(LC-MS/MS)相近。所检测的8个农产品中AFB₁的检测限为(0.52±0.36) μg/kg(平均值+3SD),4种乳制品中AFM₁的检测限为(0.031±0.015) μg/kg(平均值+3SD)。Tsakiris等^[9]调查了希腊市场上婴幼儿奶粉中AFM₁的污染情况,采用ELISA法检测了196份奶粉样品,结果阳性检出率为46.5%,其中2份样品超过了欧盟要求的最大限量。Yu等^[10]建立了一种高灵敏度的ELISA方法。通过改变包被抗体的浓度来改变抗体的活性,使之达到最佳状态。改进后的ELISA法,其灵敏度可达0.0015 ng/mL。Sun等^[5]研究并评估了5个用于检测AFB₁的商业ELISA试剂盒的质量,结果表明,5个来自不同供应商生产的AFB₁试剂盒的质量区别显著。

2.1.2 胶体金免疫层析法

胶体金免疫层析技术是于20世纪80年代在ELISA、乳胶凝集试验、单克隆抗体技术、胶体金免疫技术和新材料技术的基础上发展起来的一种免疫分析方法,它是以胶体金为显色媒介,利用免疫学中抗原与抗体能够特异性结合原理,在层析过程中完成反应,从而进行检测。胶体金免疫层析法在现场监控和大规模样品筛查时发挥了巨大作用,已被广泛应用于生物学诊断检测,在农产品质量安全检测中也得到了应用^[11-15]。

Wang 等^[16]研制出一种用于检测乳及乳制品中的 AFM₁ 纳米金免疫层析试纸条。该试纸条检测 AFM₁ 所需时间为 10 min, 检测限为 0.028 ng/mL, 15 种受检乳及乳制品中, 有 6 种受到轻微的 AFM₁ 污染, 所有样品中 AFM₁ 含量均低于 1 ng/mL。Song 等^[17]研制出了针对黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇 3 类真菌毒素进行同时定性、定量检测的免疫胶体金试纸条, 检测限分别为 0.05、1 和 3 μg/kg, 回收率为 80%~122%。Chen 等^[18]建立了基于胶体金抗体探针快速检测 AFB₁ 的竞争免疫层析法, 该方法特异性强, 对其他常见的黄曲霉毒素(AFB₂、AFM₁、AFG₂、AFG₁)基本无交叉反应。对 AFB₁ 标准液和食品样品的检测限分别为 0.5 ng/mL、10 μg/kg。

2.1.3 免疫传感器

免疫传感器是将高灵敏的传感技术与特异性免疫反应结合起来, 用于监测抗原抗体反应的传感器^[19]。其基本原理与传统的免疫检测方法一致, 也是将抗原或抗体固定在载体上。特殊之处在于要运用传感器来测量电流、电位等变化情况并以此达到检测的目的。因其具有快速、灵敏和仪器设备简单等优点^[20], 在用于黄曲霉毒素分析时受到国内外研究者的广泛关注^[21,22]。

Dinckaya 等^[23]研制了一种新型免疫传感器用于快速检测 AFM₁, 该传感器是以纳米金粒子为金电极, 搭配半胱胺的单层膜, 外加探测器组成。其检测 AFM₁ 的浓度范围为 1~14 ng/mL, 偏差为 0.36 ng/mL。基于无标记的电化学阻抗谱, Chen 等^[24]研制了一种快速检测 AFB₁ 的新型免疫传感器。该传感器是由 1,6-己二硫醇、胶体金、黄曲霉毒素-牛血清白蛋白(AFB₁-BSA)通过自组装技术的金电极上逐步固定化而形成。在优化条件下, AFB₁ 检测浓度范围为 0.08~100 ng/mL, 阻抗增量呈线性关系, 相关系数为 0.9919, 检测限为 0.05 ng/mL。冯甜等^[25]采用循环伏安法对使用 AFB₁ 和羧基化单壁碳纳米管构建的双层免疫传感器进行验证, 研究了抗体孵育时间和样品前处理方法对检测结果的影响。结果显示 AFB₁ 抗体和二抗的最佳孵育时间为 90 min, 且不同的前处理方法对检测结果影响较大。此外, 粗提溶液经过 AFB₁ 亲和柱纯化、浓缩能够有效排除样品基质干扰物对测定结果的影响, 并得出了电化学免疫传感器稳定性受到抗体孵育时间以及样品前处理等因素影响的结论。Liu 等^[26]研制了一种基于 CdS-Fe₃O₄ 纳米复合材料检测花生中 AFB₁ 的光电管传感器。在最佳条件下, 该传感器的检测限为 5.0×10^{-3} ng/mL, 线性范围为 0.1~80 ng/mL。

2.1.4 免疫亲和柱-高效液相色谱法

免疫亲和柱-高效液相色谱法是将样品中的黄曲霉毒素用适当比例的甲醇-水的提取液进行过滤、稀释后, 用免疫亲和柱净化, 甲醇将亲和柱上的黄曲霉毒素淋洗下来, 在淋洗液中加入溴溶液衍生, 以提高检测的灵敏度, 然后用荧光分光光度计定量。也可以将甲醇-黄曲霉毒素淋洗液

的一部分注入 HPLC 中, 对黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 分别进行定量分析^[27]。

陈冬东等^[28]将试样进行离心处理、免疫亲和柱净化后, 再应用液相色谱-紫外法检测牛奶及奶粉中 AFM₁。结果表明, 不同加标水平下牛奶和奶粉添加 AFM₁ 回收率分别为 87.4%~108%、89.5%~103%, RSD 分别为 2.61%~7.83%和 2.07%~4.15%, 检测牛奶、奶粉样品的灵敏度分别为 0.1 ng/mL、2.0 ng/g。朱鹏飞等^[29]采用免疫亲和层析柱净化、柱前衍生、高效液相色谱荧光检测器测定的方法, 分析粮谷类食物(包括花生酱、大米、玉米)中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的含量, 结果表明在 0.15~50 ng/mL 时, 所得回归方程的相关系数均大于 0.99, AFB₁、AFG₁ 的方法检测限为 0.10 ng/g, AFB₂、AFG₂ 的方法检测限为 0.03 ng/g。该方法的精密度为 0.13%~9.5%, 加标回收率为 70%~106%。

2.1.5 免疫荧光法

免疫荧光技术是将已知的抗原或抗体标记上荧光素或有荧光的物质, 制成荧光标记物, 再用这种荧光抗体(或抗原)作为分子探针检查细胞或组织内的相应抗原(或抗体)。然后用荧光显微镜进行观察, 从而确定抗原或抗体的性质, 并对其定位及定量分析^[30,31]。该方法通常与免疫层析法配合使用。

Beloglazova 等^[32]用荧光标记技术定量测定牛奶中 AFM₁, 得到的最低检出限达 0.014 μg/kg, 假阳性和假阴性结果的比率分别为 2.6%和 3.3%, 均低于 5%。李卫丽^[33]以 60%甲醇提取样品中黄曲霉毒素, 经免疫亲和柱净化、洗脱后, 用荧光光度计进行检测, 将方法与免疫亲和柱-高效液相色谱法检测结果进行对比, 结果表明, 2 种方法的精密度回收率高, 检出限均能够满足欧盟针对花生中黄曲霉毒素最新限量的要求。

2.1.6 放射免疫法(RIA)

RIA 与 ELISA 方法的原理相似, 唯标记物不同, ELISA 标记的主要是类似辣根过氧化物酶一类的物质, 而 RIA 使用的标记物则是一类具有放射性的元素^[34,35]。闰磊等^[36]采用放射免疫分析方法检测牛奶样品中黄曲霉毒素, 检出限可达 0.25 g/kg。

2.2 黄曲霉毒素检测的新技术

2.2.1 时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)

TRFIA 是使用三价稀土离子代替酶标物或其他荧光物质, 用时间分辨荧光仪来测定样品中荧光强度, 从而进行定量。TRFIA 利用稀土离子的荧光波长与激发波长之间的巨大差异, 克服了普通分光光度法中杂色光的影响, 因而灵敏度得以提高。一般荧光物质光谱的 Stokes 位移非常小, 只有几十纳米, 导致激发光谱和发射光谱通常会出现叠加到一起的现象, 彼此产生较大的影响。所以 TRFIA 方法的优点就在于镧系离子在经过一定的螯合反应后,

Stokes 位移能够达到 200 nm 以上, 很容易分辨激发光和发射光, 从而可以排除激发光的干扰, 此外, 它合成的螯合物荧光的衰变时间非常长, 为传统荧光的 $10^3\sim10^6$ 倍^[37]。

Huang 等^[38]建立了以 Eu^{3+} 螯合物为标签用于检测黄曲霉毒素的双标记 TRFIA, 结果表明, 该方法检测 AFB_1 的灵敏度为 $0.02\text{ }\mu\text{g/L}$, 测量范围为 $0.02\sim100\text{ }\mu\text{g/L}$, 批内和批间变异系数分别为 3.2%和 7.3%, 平均回收率为 88.1%。张兆威等^[39]通过对铕标记 TRFIA 进行方法学考核, 测定花生、稻米、植物油等样品中 AFB_1 。得出该法检测花生样品中 AFB_1 的检测限为 $0.3\text{ }\mu\text{g/kg}$, 线性范围为 $0.8\sim25\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。批内添加回收率在 $81.0\%\sim113.0\%$ 之间, 变异系数范围是 $7.2\%\sim14.2\%$; 批间添加回收率在 $75.8\%\sim114.9\%$ 之间, 变异系数范围是 $7.7\%\sim15.3\%$, 批间和批内都具有良好的准确度和精密度。

2.2.2 量子点标记荧光免疫法

量子点(quantum dots, QDs)又称半导体纳米晶体, 具有良好的化学惰性、优良的荧光性能和良好的生物相容性,

且毒性低、易于合成^[40]。与传统有机染料相比, 量子点具有发射光谱窄、激发光谱宽、荧光可通过控制粒径进行调节等光学特性^[41], 被广泛应用于重金属检测、生物成像等领域^[42-47]。近年来, 将量子点作为一种新型荧光标记物的免疫法开始逐步应用于黄曲霉毒素的检测^[48]。

Zhang 等^[49]提出了一种对 AFB_1 使用量子点作为荧光标记的荧光免疫分析法。将 T 碲化镉量子点成功连接到 AFB_1 单克隆抗体上, 基于共轭配合物, 进行直接竞争链接荧光酶联免疫吸附试验。在 AFB_1 空白花生示例设置的 3 个级别(0.075 、 0.3 和 0.15 ng/g)下, 得到的检测限为 0.016 ng/mL , 回收率为 $85\%\sim117\%$, 变异系数也小于 10%。

3 各种免疫检测方法的比较

各种黄曲霉毒素免疫检测方法均有其各自的优缺点及适用范围, 见表 1。

表 1 各种黄曲霉毒素免疫检测方法的对比
Table 1 Comparison of different detection methods of aflatoxin by immunising technology

检测方法	优点	缺点
ELISA	反应快速、灵敏度高、干扰小、对样品纯度要求不高、样品预处理简便、检测结果稳定且准确, 适合大批量样品的检测	对检测人员和酶标仪器的要求均较高, 检测时间较长, 不适合现场快速检测
胶体金免疫层析法	操作过程简单, 不需要任何仪器设备, 成本低, 检测快速, 结果判定简单直观, 既适用于大批量样品中黄曲霉毒素的初筛, 也适合现场的快速检测	灵敏度低, 只能定性检测
免疫传感器	操作简便、灵敏度高、有机溶剂的用量少、耗时短, 适合痕量黄曲霉毒素的检测	实验结果复杂、检测系统抗干扰能力较差, 难以实现产业化, 不适合大批量样品的检测
免疫亲和柱-高效液相色谱法	无需荧光检测器, 灵敏度高, 前处理简便, 实用性强	分析成本高, 液相色谱仪价格及日常维护费用昂贵
免疫荧光法	特异性高, 抗原制备较容易	较难达到分析自动化, 检测成本较高, 样品处理完全依赖免疫亲和柱, 未经色谱柱分离的样品提取液, 如果遇到复杂的基质样品或共存干扰物, 可能会导致结果出现偏差
RIA	灵敏度高, 特异性强, 前处理简单, 测定周期短, 检测速度快	检测成本较高, 检测品种少, 标记物稳定性较差, 对环境和人体的污染非常严重
TRFIA	灵敏度高、线性范围宽, 重复性和稳定性好, 应用前景广阔	极易受到环境中稀土元素的污染
量子点标记荧光免疫法	量子点荧光强度大、寿命长、稳定性好, 方法简单易行, 应用范围广	需要专门的检测仪器, 可能存在非特异性结合的量子点, 从而降低量子点检测的灵敏度

4 结论与展望

黄曲霉毒素毒性强,且容易污染食品,对身体健康造成极大的威胁。2015年4月24日,新修订的史上最严《中华人民共和国食品安全法》经十二届全国人大常委会第十四次会议审议通过,并将于2015年10月1日起正式施行,意味食品安全问题已经成为了政府今后整治的重点工作之一。以最为经济快捷、高效的手段提高食品中黄曲霉毒素的检测能力是政府和企业迫在眉睫的刚性需求,也是国内外专家关注的热点。为保障食用者的健康及出口贸易需要,提高黄曲霉毒素的检测能力,发展快速、简便、准确、灵敏的检测技术已经成为黄曲霉毒素研究中亟需解决的任务之一。而黄曲霉毒素化学检测方法通常存在测试成本高、分析时间长、检测所需样品量大(通常>500 mL)及前处理步骤繁琐等缺点,未来将会涌现更多、更好的免疫检测新方法和新技术来克服这些不足。

参考文献

- [1] Wilkinson JR, Kale SP, Bhatnagar D, *et al.* Expression profiling of non-aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* mutants obtained by 5-azacytosine treatment or serial mycelial transfer [J]. *Toxins*, 2011, 3(8): 932–948.
- [2] Bryden WL. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security [J]. *Anim Feed Sci Tech*, 2012, 173(1): 134–158.
- [3] Medina A, Rodriguez A, Magan N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ production [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 348.
- [4] Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(9): e12.
- [5] Sun DD, Gu X, Li J, *et al.* Quality evaluation of five commercial enzyme linked immunosorbent assay kits for detecting aflatoxin B₁ in feedstuffs [J]. *Asian Austral J Anim*, 2015, 28(5): 691–696.
- [6] Zhang D, Li P, Zhang Q, *et al.* Production of ultrasensitive Genetic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 636(1): 63–69.
- [7] Guan D, Li P, Zhang Q, *et al.* An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M₁ in milk and infant milk products [J]. *Food Chem*, 2011, 125(4): 1359–1364.
- [8] Jiang W, Wang Z, Nolke G, *et al.* Simultaneous determination of aflatoxin B₁ and aflatoxin M₁ in food matrices by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Food Anal Method*, 2013, 6(3): 767–774.
- [9] Tsakiris IN, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, *et al.* Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M₁ residues in different milk types from the Greek market [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 56: 261–265.
- [10] Yu FY, Gribas AV, Vdovenko MM, *et al.* Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin B₁ in food products [J]. *Talanta*, 2013, 107: 25–29.
- [11] Hou W, Wang S, Wang X, *et al.* Development of colloidal gold immunochromatographic strips for detection of *Riemerella anatipestifer* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122952.
- [12] Ling S, Chen QA, Zhang Y, *et al.* Development of ELISA and colloidal gold immunoassay for tetrodotoxin detection based on monoclonal antibody [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 71: 256–260.
- [13] Zhang L, Li D, Liu L, *et al.* Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for the rapid detection of soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus [J]. *J Virol Methods*, 2015, 221: 39–45.
- [14] Wang Y, Deng R, Zhang G, *et al.* Rapid and sensitive detection of the food allergen glycinin in powdered milk using a lateral flow colloidal gold immunoassay strip test [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(8): 2172–2178.
- [15] Moutet P, Lacroix LM, Robert A, *et al.* Directed assembly of single colloidal gold nanowires by AFM nanoxerography [J]. *Langmuir*, 2015, 31(14): 4106–4112.
- [16] Wang JJ, Liu BH, Hsu YT, *et al.* Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M₁ in milk [J]. *Food Control*, 2011, 22(6): 964–969.
- [17] Sone S, Liu N, Zhao Z, *et al.* Multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(10): 4995–5001.
- [18] Chen XQ, Lu SS, Sun Q, *et al.* Development of a colloidal gold-based immunochromatographic assay for the rapid detection of aflatoxin B₁ in food samples [J]. *Adv Mater Res*, 2013, 726: 1279–1282.
- [19] Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 632(2): 168–180.
- [20] Arredondo M, Stoytcheva M, Zlatev R, *et al.* Some clinical applications of the electrochemical biosensors [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2012, (12): 1301–1310.
- [21] Yu L, Zhang Y, Hu C, *et al.* Highly sensitive electrochemical impedance spectroscopy immunosensor for the detection of AFB₁ in olive oil [J]. *Food Chem*, 2015, 176: 22–26.
- [22] Wang D, Hu W, Xiong Y, *et al.* Multifunctionalized reduced graphene oxide-doped polypyrrole/ pyrrolepropylic acid nanocomposite impedimetric immunosensor to ultra-sensitively detect small molecular aflatoxin B₁ [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 185–189.
- [23] Dinckaya E, Kmk O, Sezgentiirk MK, *et al.* Development of an impedimetric Aflatoxin M₁ biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(9): 3806–3811.
- [24] Chen L, Jiang J, Shen G, *et al.* A label-free electrochemical impedance immunosensor for the sensitive detection of aflatoxin B₁ [J]. *Anal Method*, 2015, 7(6): 2354–2359.
- [25] 冯甜, 张弦, 杨弦弦, 等. 电化学免疫传感器检测样品中黄曲霉毒素 B₁ 的误差分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(8): 947–948.
- [25] Feng T, Zhang X, Yang XX, *et al.* Study on error analysis during detecting aflatoxin B₁ in food by using electrochemical immunosensor [J]. *Int J Lab Med*, 2014, 35(8): 947–948.
- [26] Liu Y, Yan T, Li Y, *et al.* A simple label-free photoelectrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B₁ based on CdS-Fe₃O₄ magnetic nanocomposites [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(25): 19581–19586.
- [27] 张文玲, 袁涛, 李书国. 近 10 年粮油食品中黄曲霉毒素检测技术的研究进展[J]. *粮食加工*, 2012, 37(1): 77–81.

- Zhang WL, Yuan T, Li SG. Research progress on the detection of aflatoxin in grain and oil food in recent 10 years [J]. Grain Proc, 2012, 37(1): 77–81.
- [28] 陈冬东, 代汉霞, 彭涛, 等. 免疫亲和柱-高效液相色谱紫外法检测牛奶及奶粉中黄曲霉毒素 M₁ [J]. 中国乳品工业, 2014, 42(3): 52–53.
- Chen DD, Dai HX, Peng T, *et al.* Method for the determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder by immunoaffinity column clean-up and HPLC-UV [J]. China Dairy Ind, 2014, 42(3): 52–53.
- [29] 朱鹏飞, 刘文卫, 凌霞, 等. 柱前衍生-高效液相色谱荧光法测定粮食类食物中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(6): 807–809.
- Zhu PF, Liu WW, Ling X, *et al.* Determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ in cereal food by high performance liquid chromatography with fluorescence detector and pre-column derivatization [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(6): 807–809.
- [30] Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, *et al.* Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay [J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(12): 801–808.
- [31] Çelik S. Understanding the complexity of antigen retrieval of DNA methylation for immunofluorescence- based measurement and an approach to challenge [J]. J Immunol Methods, 2015, 416: 1–16.
- [32] Beloglazova NV, Shmelin PS, Goryacheva IY, *et al.* Liposomes loaded with quantum dots for ultrasensitive on-site determination of aflatoxin M₁ in milk products [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(24): 7795–7802.
- [33] 李卫丽. 两种方法测定花生中黄曲霉毒素之比较 [J]. 吉林农业, 2011, (8): 62.
- Li WL. Comparison of two methods for determination of aflatoxin in Peanut [J]. Jilin Agric, 2011, (8): 62.
- [34] Ehrhardt RA, Slepatis RM, Siegal-Willott J, *et al.* Development of a specific radio immunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep [J]. J Endocr, 2000, 166(3): 519–528.
- [35] Jafri L, Khan AH, Siddiqui AA, *et al.* Comparison of high performance liquid chromatography, radio immunoassay and electrochemiluminescence immunoassay for quantification of serum 25 hydroxy vitamin D [J]. Clin Biochem, 2011, 44(10–11): 864–868.
- [36] 闫磊, 李卓, 张燕. 牛奶中黄曲霉毒素的放射免疫法检测 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1): 135–137.
- Yan L, Li Z, Zhang Y. Aflatoxins in milk by radio immunoassay method [J]. Food Res Dev, 2010, 31(1): 135–137.
- [37] Hagan AK, Zuchner T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(9): 2847–2864.
- [38] Huang B, Xiao H, Zhang J, *et al.* Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A [J]. Arch Toxicol, 2009, 83(6): 619–624.
- [39] 张兆威, 李培武, 张奇, 等. 农产品中黄曲霉毒素的时间分辨荧光免疫层析快速检测技术研究 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(18): 3668–3674.
- Zhang ZW, Li PW, Zhang Q, *et al.* Study on immunochromatography for aflatoxin determination in agricultural product [J]. Sci Agric Sin, 2014, 47(18): 3668–3674.
- [40] Shen JH, Zhu YH, Yang XL, *et al.* Graphene quantum dots : emergent nanolights for bioimaging , sensors, catalysis and photovoltaic devices [J]. Chem Commun, 2012, 48(31): 3686–3699.
- [41] Perez-Lopez B, Merkoci A. Nanoparticles for the development of improved (bio) sensing systems [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 399(4): 1577–1590.
- [42] Liu M, Liu T, Li Y, *et al.* A FRET chemsensor based on graphene quantum dots for detecting and intracellular imaging of Hg(2.) [J]. Talanta, 2015, 143: 442–449.
- [43] Liu H, Tang W, Li C, *et al.* CdSe/ZnS quantum dots-labeled mesenchymal stem cells for targeted fluorescence imaging of pancreas tissues and therapy of type 1 diabetic rats [J]. Nanoscale Res Lett, 2015, 10(1): 959.
- [44] Dong YQ, Wang RX, Li GL, *et al.* Polyamine-functionalized carbon quantum dots as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions [J]. Anal Chem, 2012, 84(14): 6220–6224.
- [45] Zhang RZ, Chen W. Nitrogen-doped carbon quantum dots: Facile synthesis and application as a "turn -off" fluorescent probe for detection of Hg²⁺ ions [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 55: 83–90.
- [46] Ananthanarayanan A, Wang XW, Routh P, *et al.* Facile synthesis of graphene quantum dots from 3D graphene and their application for Fe³⁺ sensing [J]. Adv Funct Mater, 2014, 24(20): 3021–3026.
- [47] Zheng XT, Than A, Ananthanarayanan A, *et al.* Graphene quantum dots as universal fluorophores and their use in revealing regulated trafficking of insulin receptors in adipocytes [J]. Acsnano, 2013, 7(7): 6278–6286.
- [48] Beloglazova NV, Shmelin PS, Goryacheva IY, *et al.* Liposomes loaded with quantum dots for ultrasensitive on-site determination of aflatoxin M₁ in milk products [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(24): 7795–7802.
- [49] Zhang Z, Li Y, Li P, *et al.* Monoclonal antibody-quantum dots CdTe conjugate-based fluoroimmunoassay for the determination of aflatoxin B₁ in peanuts [J]. Food Chem, 2014, 146: 314–319.
- [50] Zhang Z, Tang X, Wang D, *et al.* Rapid on-site sensing aflatoxin B₁ in food and feed via a chromatographic time-resolved fluoroimmunoassay [J]. PLoS One. 2015, 10(4): e0123266.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



毕水莲, 副教授, 主要研究方向为食品安全及检测技术研究。
E-mail: bishuilian@163.com