

基于核酸适配体的侧流层析技术同步检测 赭曲霉毒素 A 和黄曲霉毒素 B₁

王宇龙^{1,2}, 王 荷^{1,2}, 赵志磊², 熊 科³, 陈爱亮⁴, 王 蒙^{1,2*}

(1. 北京农业质量标准与检测技术研究中心, 北京 100097; 2. 河北大学质量技术监督学院, 保定 071002;
3. 北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048; 4. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

摘 要: **目的** 建立基于适配体互补链同时检测赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)和黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁) 2 种真菌毒素的荧光试纸条。**方法** 通过优化 2 种适配体的浓度以及缓冲体系的 pH 值, 提高同步检测 OTA 和 AFB₁ 的灵敏度和准确性。**结果** OTA 和 AFB₁ 的 T 线(T_O 和 T_A)和 C 线荧光强度比值与对应真菌毒素的浓度对数具有良好的线性关系, 线性范围为 0.5~50 ng/mL, 相关系数 r^2 分别为 0.9887 和 0.9910, 检出限低至 0.51 和 0.38 ng/mL。通过对花生和葡萄干进行加标回收和实际样品检测, 试纸条检测的 OTA 和 AFB₁ 的回收率分别为 82.06%~109.69%和 83.34%~110.06%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.89%~8.17%, 检测结果与高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrum/mass spectrometry, HPLC-MS/MS)一致。**结论** 该生物传感器可在 20 min 内实现花生和葡萄干等样品中 OTA 和 AFB₁ 的同步快速检测, 并具有成本低、检测速度快和易于操作等优点, 可为多种真菌毒素的同步快检提供技术支撑。

关键词: 赭曲霉毒素 A; 黄曲霉毒素 B₁; 适配体; 试纸条; 花生和葡萄干

Synchronous detection of ochratoxin A and aflatoxin B₁ by lateral flow chromatography based on nucleic acid aptamers

WANG Yu-Long^{1,2}, WANG He^{1,2}, ZHAO Zhi-Lei², XIONG Ke³, CHEN Ai-Liang⁴, WANG Meng^{1,2*}

(1. Beijing Agricultural Quality Standards and Testing Technology Research Center, Beijing 100097, China; 2. College of Quality and Technical Supervision, Hebei University, Baoding 071002, China; 3. Beijing Business University, College of Food and Health, Beijing 100048, China; 4. Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To establish a fluorescent test strip based on the aptamer complementary strand for the simultaneous detection of 2 mycotoxins, ochratoxin A (OTA) and aflatoxin B₁ (AFB₁). **Methods** The sensitivity and accuracy of simultaneous detection of OTA and AFB₁ were improved by optimizing the concentration of the 2 aptamers and the pH value of the buffer system. **Results** The T line (T_O and T_A) and C line fluorescence intensity ratios of OTA and AFB₁ showed a good linear relationship with the logarithm of the concentration of the

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0400902)、北京市自然科学基金重点项目(6191001)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0400902), and the Key Program of Beijing Natural Science Foundation (6191001)

***通信作者:** 王蒙, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全。E-mail: wangm@brcast.org.cn

***Corresponding author:** WANG Meng, Associate Professor, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, No.9 Shuguang Huayuan Middle Road, Haidian District, Beijing 100097, China. E-mail: wangm@brcast.org.cn

corresponding mycotoxin in the linear range of 0.5–50 ng/mL, with the correlation coefficients r^2 of 0.9887 and 0.9910, respectively. The detection limits were as low as 0.51 and 0.38 ng/mL. The recoveries of OTA and AFB₁ detected by test strips were 82.06%–109.69% and 83.34%–110.06%, respectively, and the relative standard deviations were 1.89%–8.17%. The detection results were consistent with those of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Conclusion** The biosensor can realize synchronous and rapid detection of OTA and AFB₁ in peanut, raisin and other samples within 20 min, has the advantages of low cost, high detection speed, easy operation and the like, and can provide technical support for synchronous and rapid detection of a plurality of mycotoxins.

KEY WORDS: ochratoxin A; aflatoxin B₁; aptamer; test strip; peanut and raisin

0 引言

真菌毒素是真菌的天然次生代谢产物,并存在于动植物来源的食品中^[1]。黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)是来源于自然界的致癌、致畸和致突变化合物,已被国际癌症研究机构归为人类第 1 类致癌物^[2]。研究指出赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)能够诱导遗传毒性、致癌性、肝毒性和哺乳动物的肾毒性^[3]。OTA 和 AFB₁ 会污染各种各样的食品,例如谷物产品、花生、豆类、葡萄干和可可制品等^[4–5]。近年来,食品和饲料中的真菌毒素污染对畜产品安全和人类健康构成严重威胁,且真菌毒素污染极为广泛。对哥伦比亚的一项调查表明,38.6%的谷物受到 AFB₁ 的污染;而在捷克的一项调查中,62.7%的咖啡样品受到 OTA 的污染^[6–7]。因此,欧盟规定,在食品中 AFB₁ 的最低限量标准为 2 ng/mL,OTA 为 5 ng/mL^[8]。

一直以来,对真菌毒素检测技术的开发是食品安全领域重要的研究内容。目前常用的 OTA 和 AFB₁ 的检测方法有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[9–10]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry)^[11]、高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[12–13]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[14]和免疫层析试纸条^[15–17],其中试纸条法因其检测迅速、灵敏度高、操作简单以及成本低等优点被广泛应用。与传统的单一试纸条相比,越来越多的学者致力于研究各种基于抗体的多残留试纸条方法^[18–20],快速并同时监测多种真菌毒素污染。然而,抗体的生产存在明显的缺点,例如动物免疫的过程耗时费力,且由于抗体对温度和 pH 值敏感,生化活性易受影响,甚至会产生变性,进而影响检测^[21–22]。

适配体(aptamer)作为一种新的识别元件,近年来在分子检测领域引起了广泛的关注^[23]。与抗体相比,适配体不仅显示出高亲和力和选择性,而且还具有合成简单、化学稳定性、易于储存和运输以及良好的再现性等优势^[24]。目前已有文献报道使用荧光适配体传感器^[25–26]和微芯片毛细管电

泳法^[27]同时检测 OTA 和 AFB₁。然而,将适配体的优势与侧流层析技术相结合可以提高适配体的实用性和灵活性。

本研究结合了侧流层析试纸的简单性和便携性以及适配体的高亲和力、特异性和稳定性,首次开发了一种基于适配体的侧流层析试纸条同步检测 OTA 和 AFB₁,具有成本低、检测速度快和易于操作等优点,可满足花生和葡萄干等实际样品中 OTA 和 AFB₁ 的现场同步快速检测,也为多种真菌毒素污染的同步检测提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 实验试剂

AFB₁、OTA、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、展青霉素(patulin, PAT)、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)和伏马毒素 B₁(fumonisin, FB₁)[纯度(99.4±0.6)%,北京 Romer 国际贸易有限公司];链霉亲和素、三(羟甲基)氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane, THAM]、吐温-20、蔗糖(96%,北京索莱宝生物技术公司);PEG20000(分析纯,北京百灵威科技有限公司);所有其他化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。实验中所用的 OTA 和 AFB₁ 适配体以及其他核苷酸序列^[28–29](表 1)均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,且经 HPLC 纯化。

1.1.2 实验材料

H5076 吸水垫、GL-b04 样品垫、Sartorius CN140 硝化纤维素(NC)膜、PVC 底板(上海杰一生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

BioDot-XYZ3210 三维喷点平台(美国 BioDot 公司);KM-3100 切条机(昆山博锦贸易有限公司);荧光定量读数仪(上海飞测生物科技有限公司)。

1.3 多种毒素同步检测适配体试纸条的制备

适配体试纸条由 4 部分组成:样品垫、NC 膜、吸水

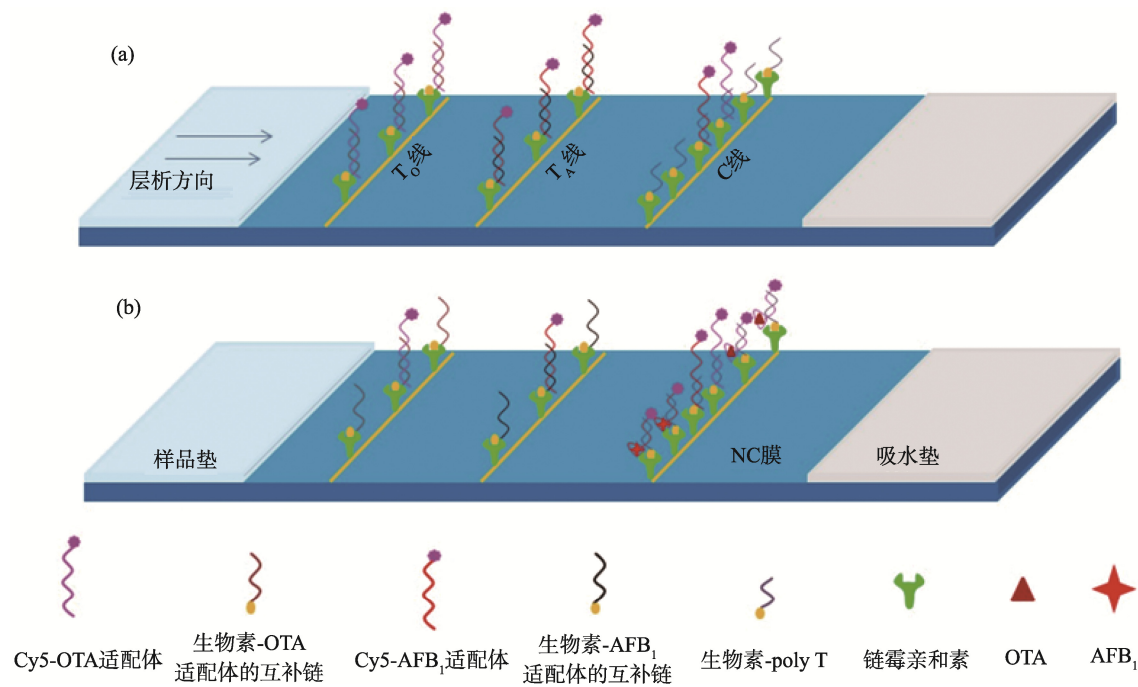
垫和 PVC 底板。样品垫、NC 膜和吸水垫按照如图 1 示顺序从左到右依次附着到 PVC 底板上。样品垫和吸收垫分别覆盖 NC 膜 3 mm, 以确保溶液的平稳迁移。由于 NC 膜只能将蛋白质固定在其表面上, 因此用生物素标记的检测探针和质控探针分别与链霉亲和素反应形成链霉亲和素-生物素偶联物, 将该偶联物预先固定在 NC 膜上。将 3 μmol/L 生物素标记的 OTA 适配体互补链、AFB₁ 适配体互补链和 poly-T 分别与链霉亲和素(1 mg/mL)以 7:1(V:V)混合, 并在室温下孵育 2 h。使用三维喷点平台将链霉亲和素-生物素复合物(OTA 适配体互补链、AFB₁ 适配体互补链和 poly-T)分别固定在 NC 膜上的两条检测线(T_O和 T_A 线)和质控线(C 线)处, 每两条线之间的距离为 5 mm。然后将制备好的试纸条在 37 °C 下干燥 1 h, 最后使用切条机将整个组装好的试纸条切至 4 mm 的宽度, 并且放置于干燥器中备用。

1.4 多种毒素同步检测适配体试纸条的检测原理

基于适配体的多毒素同步检测试纸条的检测原理两条检测线上 OTA 和 AFB₁ 适配体的互补链分别与样品中的 OTA 和 AFB₁ 竞争结合 Cy5 标记的 OTA 和 AFB₁ 的适配体, 质控线上的适配体互补链与未结合的游离适配体相结合(图 1)。在没有 OTA 和 AFB₁ 的情况下, 溶液将从样品垫通过 NC 膜进行层析, Cy5 标记的 OTA 和 AFB₁ 适配体首先与 T_O和 T_A 线处的适配体互补链结合; 由于适配体连接一段 poly A, 所以剩余的适配体与 C 线的 poly T 结合以保证试纸条的有效性(图 1a)。相反, 在 OTA 和 AFB₁ 存在的情况下, 适配体优先与靶标结合, 而不与 T_O和 T_A 线上的互补链结合。两条适配体探针均会与 C 线上的 poly T 杂交, 而不与 Cy5 标记的 OTA 和 AFB₁ 的适配体结合, 导致 T_O和 T_A 线上的荧光下降, 而 C 线的荧光增强(图 1b), 从而实现 OTA 和 AFB₁ 的检测。

表 1 研究中使用的核苷酸序列
Table 1 Sequences of oligonucleotides used in the study

名称	序列(5'-3')
OTA 适配体	Cy5-A ₁₂ -GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA
OTA 适配体的互补链	biotin-TGTCCGATGCTCCCTTTACGCCACCCACACCCGATC
AFB ₁ 适配体	Cy5-A ₁₂ -GGGCACGTGTGTCTCTCTGTGTCTCGTGCCC
AFB ₁ 适配体的互补链	biotin-GACACAGAGAGACAA
poly T	biotin-TTTTTTTTTTTT



注: (a)在没有 OTA 和 AFB₁ 的情况下, Cy5 标记的 OTA 和 AFB₁ 适配体首先与两条检测线(T_O和 T_A 线)处的适配体互补链结合, 剩余的适配体与质控线(C 线)的 polyT 结合; (b)在存在 OTA 和 AFB₁ 的情况下, Cy5 标记的适配体优先与 AFB₁ 结合, T_O和 T_A 线的荧光强度降低, 而 C 线的荧光强度增加。

图 1 用于同步检测 OTA 和 AFB₁ 的适配体试纸条的示意图。
Fig.1 Schematic diagram of aptamer multi-residue test strips for detecting OTA and AFB₁

1.5 检测方法

将样品与 Cy5 标记的适配体在离心管中以 9:1(V:V)的比例混合,并在室温下孵育 10 min。之后,将 60 μL 混合物滴加到试纸条的样品垫上,使液体在 NC 膜上层析,直到被吸水垫吸收。10 min 后,通过用荧光定量读数仪扫描试纸条记录 T_O 、 T_A 和 C 线的荧光强度,每个实验重复 2 次。为了定量分析,以两条 T 线分别与 C 线处的荧光强度比值对 OTA 和 AFB₁ 的浓度作图,绘制标准曲线。为了提高多毒素同步检测试纸条的灵敏度,对 OTA 和 AFB₁ 的适配体浓度以及缓冲体系中的 pH 进行优化。利用 T 线的荧光强度(T_O 和 T_A)和 T_X/C 抑制率(公式 1)评估试纸条的性能以确定最佳条件。

$$T_X/C \text{ 抑制率} = \left(\frac{T_{X0}}{C_0} - \frac{T_{X1}}{C_1} \right) / \frac{T_{X0}}{C_0} \quad (1)$$

其中 T_{X0} (T_{O0} 和 T_{A0}) 和 C_0 指在没有 OTA 和 AFB₁ 的情况下 T_O 、 T_A 和 C 线的荧光强度,而 T_{X1} (T_{O1} 和 T_{A1}) 和 C_1 代表存在 20 ng/mL 靶标物的情况下 T_O 、 T_A 和 C 线的荧光强度。

1.6 特异性实验

为了考察制备的多毒素同步检测适配体试纸条的特异性,在最优条件下分别加入 AFB₁、OTA、DON、PAT、T-2 毒素、ZEN 和 FB₁ 等标准品,通过扫描荧光强度进行对比以判断试纸条的特异性。

1.7 灵敏度和线性范围

在最佳条件下,将 OTA 和 AFB₁ 储备溶液用缓冲液稀释至 0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL,并将标准液与 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 适配体溶液以 9:1 的体积比例混合。10 min 后,将混合溶液滴加到试纸条上,然后用荧光定量读数仪进行扫描得到 T_O 、 T_A 和 C 线的荧光强度,计算 T_O/C 和 T_A/C 值作为纵坐标,OTA 和 AFB₁ 浓度的对数作为横坐标,绘制

OTA 和 AFB₁ 的标准曲线。

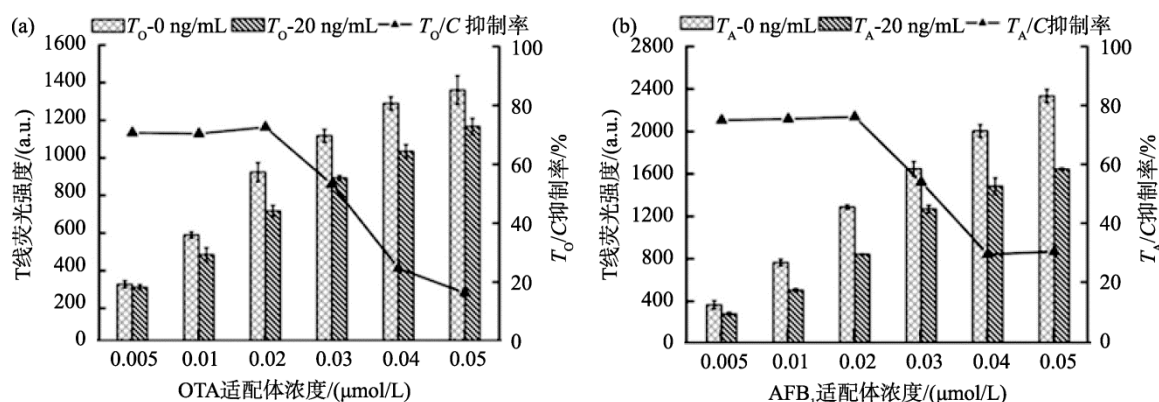
1.8 加标回收实验与实际样品检测

选择经 HPLC-MS/MS 检测为无污染的花生和葡萄干作为空白样品,加入 OTA 和 AFB₁ 标准溶液,使之终浓度分别为 2.5、5 和 10 $\mu\text{g/kg}$ 。通过加标计算回收率进一步验证多种毒素同步检测适配体试纸条的实际应用。从中国北京的不同超市和当地市场中随机抽取了 14 份样品,包括 9 份花生和 5 份葡萄干,作为实际样品检测。将样品使用研磨机粉碎后,依次称取 5.0 g 样品,并用 25 mL 含 100 mmol/L 柠檬酸的 80% 乙腈水溶液稀释,混匀后在室温下以 180 r/min 的速度振荡 30 min。随后,使用高速离心机将样品在 10000 r/min 的转速下离心 10 min。吸取 5 mL 上清液,使用氮气在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至干,然后重新溶解于 1 mL 结合缓冲液中。每次检测时,将提取液和适配体溶液混合后滴加到制备好的试纸条上,通过计算 T_X/C 值得到实际浓度和回收率,检测结果和 HPLC-MS/MS 进行比较。

2 结果与分析

2.1 适配体浓度优化

适配体的浓度对试纸条的灵敏度和检测限有直接的影响。为了确定最佳的适配体浓度,将目标物与不同浓度的 OTA 和 AFB₁ 适配体(0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 $\mu\text{mol/L}$)混合,然后将 60 μL 混合物滴加到样品吸收垫。结果显示,随着适配体浓度的提高, T_O 、 T_A 和 C 线的荧光强度都逐渐增强;适配体浓度在 0.005 至 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 时, T_X/C 抑制率没有显著差异,但当适配体浓度大于 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 时, T_X/C 抑制率急剧降低。重复测定 3 次,效果显著,结果如图 2。T 线荧光强度较低时可能导致较大的系统误差。因此,选 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 作为进一步研究的最佳浓度。



注: (a)不同浓度的 OTA 适配体时, T 线的荧光强度和 T_O/C 抑制率; (b)不同浓度的 AFB₁ 适配体时, T 线的荧光强度和 T_A/C 抑制率。

图 2 OTA 和 AFB₁ 适配体浓度优化($n=3$)

Fig.2 Optimization of OTA and AFB₁ aptamer concentrations ($n=3$)

2.2 缓冲液 pH 值的优化

配制不同 pH 的 Tris-HCl 缓冲液(5~9), 为适配体和靶标的结合提供不同 pH 的反应体系, 探究不同 pH 对于多种毒素同步检测的适配体试纸条的影响。重复测定 3 次, 结果如图 3 所示, 当缓冲体系为酸性和碱性时, 两条 T 线荧光强度都显著低于 pH=7 和 7.5; pH=7 的 T_X/C 抑制率明显低于 pH=7.5 的 T_X/C 抑制率, 最终选择检测体系缓冲液 pH 值为 7.5。

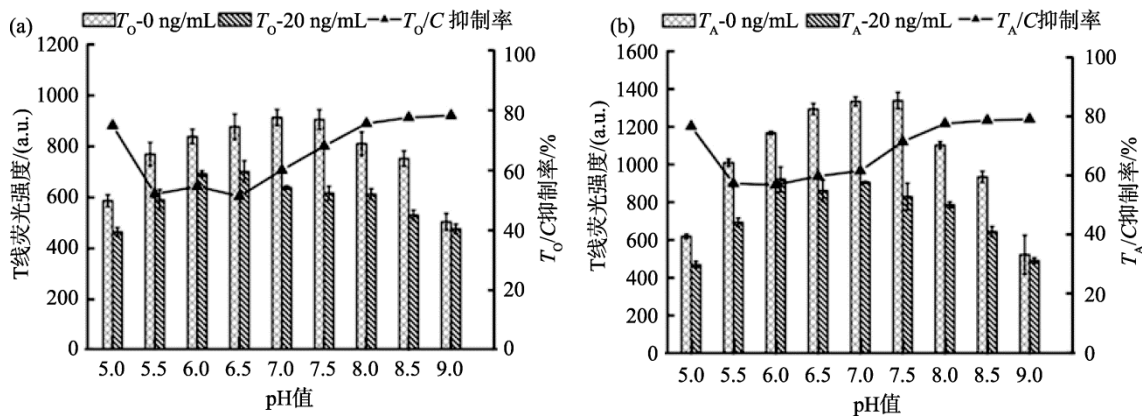
2.3 特异性实验

适配体试纸条对靶标(OTA 和 AFB₁)的特异性结果如图 4 所示。与对照相比, 其他 5 种真菌毒素的两条 T 线(T_O 和 T_A)荧光强度并未观察到明显变化, 而 OTA 和 AFB₁ 的 T

线荧光强度明显下降, 并且 2 种真菌毒素间并无交叉反应, 说明适配体试纸条对 OTA 和 AFB₁ 表现出良好的特异性。

2.4 灵敏度和检测范围

将 OTA 和 AFB₁ 标准溶液稀释至 0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL, 并将其分别与 0.02 $\mu\text{mol/L}$ OTA 和 AFB₁ 适配体溶液混合。10 min 后, 将混合溶液滴加到适配体试纸条上, 然后用荧光定量读数仪进行扫描。结果表明, 随着 OTA 和 AFB₁ 浓度的增加, T 线的荧光强度逐渐降低, C 线的荧光强度增加, 导致 T_X/C 值降低。计算出的 $T_X/C(T_O/C$ 和 $T_A/C)$ 值与 OTA 和 AFB₁ 浓度的对数具有良好的线性关系, 线性范围为 0.5~50 ng/mL, 相关系数 r^2 分别为 0.9887 和 0.9910(图 5), OTA 和 AFB₁ 检出限分别为 0.51 和 0.38 ng/mL。



注: (a)不同 pH 下, T_O 线的荧光强度和 T_O/C 抑制率; (b)不同 pH 下, T_A 线的荧光强度和 T_A/C 抑制率。

图 3 Tris-HCl 缓冲液不同 pH 的优化($n=3$)

Fig.3 Optimization of Tris-HCl buffer solution with different pH ($n=3$)

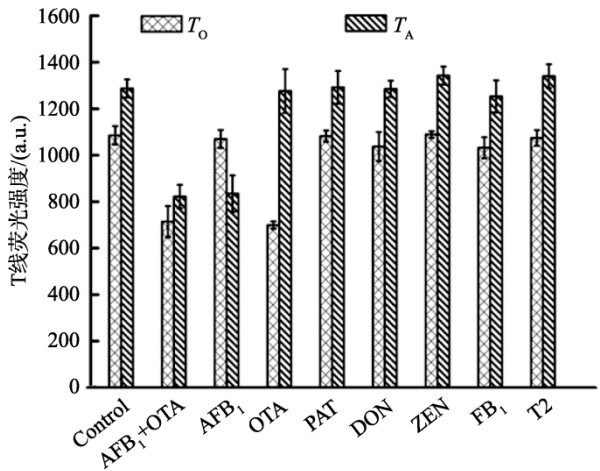


图 4 通过对比其他真菌毒素的 T_O 和 T_A 荧光强度分析适配体试纸条的特异性($n=3$)

Fig.4 Analysis of the specificity of multi-residue test strips by comparing the T_O and T_A lines fluorescence intensities of other mycotoxins ($n=3$)

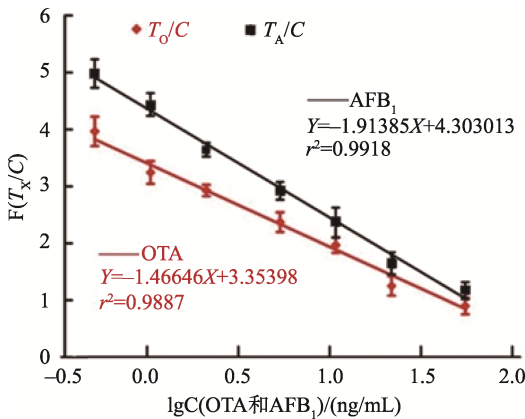


图 5 适配体试纸条两条检测线(T_O 和 T_A)和对照线的荧光强度的比值 $[F(T_X/C)]$ 与 OTA 和 AFB₁ 浓度的对数之间的线性关系

Fig.5 Linear relationship of the multi-residue strip between the ratio of the fluorescence intensity of two detection lines (T_O and T_A) and the control line [$F(T_X/C)$] to the logarithm of the concentration of OTA and AFB₁

2.5 加标回收实验及实际样品检测

在 HPLC-MS/MS 检测确定为空白样品的花生和葡萄干样品中加入 OTA 和 AFB₁ 标准溶液, 使之终质量浓度分别为 2.5、5 和 10 μg/kg。将样品提取液通过多种毒素同步检测的适配体试纸条进行分析。回收率结果如表 2 所示, OTA 的回收率范围为 82.06%~109.69%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 2.67%~8.17%; AFB₁ 的回收率为 83.34%~110.06%, RSD 为 1.89%~6.46%。该检测结果与 HPLC-MS/MS 检测方法非常接近。这项研究表明, 该试纸条能同时检测食品中的 OTA 和 AFB₁。分别使用该试纸条和 HPLC-MS/MS 对 9 份花生、5 份葡萄干等实际样品进行检测, 结果表明, 采集的样品中均未检出 OTA 和 AFB₁, 2 种检测方法的结果一致。

3 结论与讨论

本研究基于 Cy5 荧光标记的适配体与靶标物特异性结合的原理, 建立了基于适配体互补链的侧流层析试纸条同时检测 OTA 和 AFB₁, 通过优化 2 种适配体的浓度以及缓冲体系的 pH 值, 提高了对 OTA 和 AFB₁ 同时检测的灵敏度和准确性, 使其更适合实际应用。研究结果表明, 两条 T 线(T_O 和 T_A)和 C 线荧光强度的比值与 OTA 和 AFB₁ 浓度的对数具有良好的线性关系。通过使用试纸条和 HPLC-MS/MS 这 2 种检测方法对花生和葡萄干进行加标回收分析, 证明该多毒素同步快检试纸条具有良好的检测精度和特异性。该生物传感器可以在 20 min 内同时检测 OTA 和 AFB₁, 并且具有成本低、检测速度快和易于操作等优点, 可用于花生和葡萄干中 OTA 和 AFB₁ 污染的现场同步快速检测。

表 2 加标花生和葡萄干样品中 OTA 和 AFB₁ 的检测结果
Table 2 Detection results of the OTA and AFB₁ levels in spiked peanut and raisins

样品	真菌毒素	加标浓度/(μg/kg)	HPLC-MS/MS 检测浓度/(μg/kg)	RSD/%	试纸条检测浓度/(μg/kg)	回收率/%	RSD/%
花生	OTA	2.5	2.45	3.89	2.74	109.69	4.49
		5	5.38	4.28	4.93	98.52	8.17
		10	9.54	8.62	9.37	93.70	6.32
	AFB ₁	2.5	2.32	2.78	2.70	107.93	1.89
		5	4.92	0.51	4.69	93.76	4.22
		10	10.18	3.50	11.01	110.06	5.9
葡萄干	OTA	2.5	2.65	2.21	2.42	96.61	6.19
		5	4.56	1.48	4.10	82.06	2.67
		10	9.15	2.52	8.95	89.53	4.39
	AFB ₁	2.5	2.23	3.56	2.33	93.20	5.06
		5	4.56	1.25	4.20	84.03	2.68
		10	9.79	7.21	8.33	83.34	6.46

参考文献

[1] OSTRY V, MALIR F, TOMAN J, *et al.* Mycotoxins as human carcinogens-the IARC monographs classification [J]. *Mycot Res*, 2016, 33(1): 65-73.

[2] HERNANDEZ-PATLAN D, SOLIS-CRUZ B, PONTIN KP, *et al.* Evaluation of ascorbic acid or curcumin formulated in a solid dispersion on salmonella enteritidis infection and intestinal integrity in broiler chickens [J]. *Pathogens*, 2019, 8(4). DOI: 10.3390/pathogens8040229

[3] DAMIANO S, NAVAS L, LOMBARI P, *et al.* Effects of 1'-tocotrienol on ochratoxin a-induced nephrotoxicity in rats [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(11). DOI: 10.1002/jcp.26753

[4] FRANTISEK M, VLADIMIR O, ANNIE PL, *et al.* Ochratoxin A: 50 years of research [J]. *Toxins*, 2016, 8(7): 191.

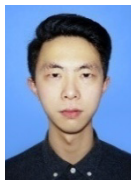
[5] BENNETT JW, KLICH M. Mycotoxins [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2003,

- 16(3): 497–516.
- [6] MARTINEZ-MIRANDA MM, ROSERO-MOREANOM, TABORDA-OCAMPO G. Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice [J]. Food Control, 2019, 98: 359–366.
- [7] JONATOVA P, DZUMAN Z, PRUSOVA N, *et al.* Occurrence of ochratoxin A and its stereoisomeric degradation product in various types of coffee available in the Czech market [J]. World Mycotoxin J, 2020, 13(1): 1–12.
- [8] 贝君, 孔祥贞, 杨洋, 等. 2019年欧盟食品饲料快速预警系统通报中国输欧食品情况与风险分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(23): 8994–9000.
- BEI J, KONG XZ, YANG Y, *et al.* Report on China's food export to Europe and risk analysis based on the notifications of 2019 Eu rapid alert system for food and feed [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(23): 8994–9000.
- [9] KIM HJ, LEE MJ, KIM HJ, *et al.* Analytical method development and monitoring of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and ochratoxin A in animal feed using HPLC with fluorescence detector and photochemical reaction device [J]. Cogent Food Agric, 2017, 3(1). DOI: 10.1080/23311932.2017.1419788
- [10] YAMAMOTO R, SAWADA M, YAMATO N, *et al.* Back cover: High-performance liquid chromatography with fluorescence detection of ochratoxin A in cereal, coffee, and wine: Effective pretreatment with bovine serum albumin-immobilized adsorbent [J]. Sep Sci Plus, 2018, 1(3). DOI: 10.1002/sscp.201870011
- [11] 施琦, 杨嘉丽, 王雅玲, 等. 液相色谱-串联质谱法测定虾饲料中7种真菌毒素[J]. 分析化学, 2019, 38(3): 84–88.
- SHI Q, YANG JL, WANG YL, *et al.* Determination of 7 mycotoxins in shrimp feed by LC-MS/MS [J]. Instrum Anal, 2019, 38(3): 84–88.
- [12] MA S, WANG M, YOU TY, *et al.* Using magnetic multiwalled carbon nanotubes as modified QuEChERS adsorbent for simultaneous determination of multiple mycotoxins in grains by UPLC-MS/MS [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(28): 8035–8044.
- [13] 王玉娇, 聂继云, 闫震, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测干果中16种真菌毒素[J]. 分析化学, 2017, 45(10): 1556–1563.
- WANG YJ, NIE JY, YAN Z, *et al.* Simultaneous determination of 16 mycotoxins in dried fruits by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. Chin J Anal Chem, 2017, 45(10): 1556–1563.
- [14] PARK JW, KIM EK, SHON DH, *et al.* Natural co-occurrence of aflatoxin B₁, fumonisin B₁ and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea [J]. Food Addit Contam, 2002, 19(11): 1073–1080.
- [15] LIU JW, LU CC, LIU BH, *et al.* Novel monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M₁ in milk [J]. Food Control, 2016, 59: 700–707.
- [16] DUAN H, HUANG X, SHAO Y, *et al.* Size-dependent immunochromatographic assay with quantum dot nanobeads for sensitive and quantitative detection of ochratoxin A in corn [J]. Anal Chem, 2017, 89(13): 7062–7068.
- [17] 沙志聪, 其木格, 贾增艳, 等. 量子点标记免疫层析试纸条快速检测谷物中赭曲霉毒素A[J]. 食品工业科技, 2019, 40(17): 191–195, 190.
- SHA ZC, QI MG, JIA ZY, *et al.* Quantum dot-labeled immunochromatographic test strip for rapid detection of ochratoxin A in cereals [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(17): 191–195, 190.
- [18] SHAO Y, DUAN H, ZHOU S, *et al.* Biotin-streptavidin system-mediated ratiometric multiplex immunochromatographic assay for simultaneous and accurate quantification of three mycotoxins [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(32). DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03222
- [19] DUAN H, LI Y, SHAO YN, *et al.* Multicolor quantum dot nanobeads for simultaneous multiplex immunochromatographic detection of mycotoxins in maize [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2019, 291: 411–417.
- [20] 吴文晔, 徐炜, 李艳, 等. 同时检测两种真菌毒素的胶体金试纸条的研制[J]. 食品工程, 2011, (4): 46–49, 53.
- WU WY, XU W, LI Y, *et al.* Developing gold immunochromatography assay for simultaneously rapid detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A [J]. Food Eng, 2011, (4): 46–49, 53.
- [21] O'SULLIVAN CK. Aptasensors-The future of biosensing? [J]. Anal Bioanal Chem, 2002, 372: 44–48.
- [22] REN CC, LI HM, LU XT, *et al.* A disposable aptasensing device for label-free detection of fumonisin B₁ by integrating PDMS film-based micro-cell and screen-printed carbon electrode [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2017, 251: 192–199.
- [23] LIU Y, JIE Y, YING W, *et al.* An ultrasensitive aptasensor for detection of ochratoxin A based on shielding effect-induced inhibition of fluorescence resonance energy transfer [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2016, 222. DOI: 10.1016/j.snb.2015.09.007
- [24] TANG Z, MALLIKARATCHY P, YANG R, *et al.* Aptamer switch probe based on intramolecular displacement [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(34): 11268–11269.
- [25] ZHANG J, XIA YK, CHEN M, *et al.* A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver nanoclusters coupling with Zn(II)-ion signal-enhancement for simultaneous detection of OTA and AFB₁ [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2016, 235: 79–85.
- [26] QIAN J, REN CC, WANG CQ, *et al.* Magnetically controlled fluorescence aptasensor for simultaneous determination of ochratoxin A and aflatoxin B₁ [J]. Anal Chim Acta, 2018, 1019: 119–127.

- [27] XIAO MW, BAI XL, LIU YM, *et al.* Simultaneous determination of trace aflatoxin B₁ and ochratoxin A by aptamer-based microchip capillary electrophoresis in food samples [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1569: 222-228.
- [28] MA X, WANG W, CHEN X, *et al.* Selection, identification, and application of aflatoxin B₁ aptamer [J]. *Eur Food Res Technol*, 2014, 238(6): 919-925.
- [29] ZHANG G, ZHU C, HUANG Y, *et al.* A lateral flow strip based aptasensor for detection of ochratoxin A in corn samples [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 291.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



王宇龙, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量检测及标准化。

E-mail: 13292989671@163.com



王 蒙, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全。

E-mail: wangm@brcast.org.cn