

赭曲霉毒素 A 时间分辨荧光侧流 层析试纸条的研究

白福军¹, 郑梦瑶², 陈晋莹³, 赵 皖⁴, 丁 丽⁴, 谈 婷⁴, 肖理文⁵,
叶 金², 王松雪², 刘洪美^{2*}

(1. 中储粮承德粮油质监中心有限公司, 承德 067102; 2. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 粮油质量安全研究所, 北京 102629; 3. 中储粮成都储藏研究院有限公司, 成都 610091; 4. 南京微测生物科技有限公司, 南京 210031; 5. 上海飞测生物科技有限公司, 上海 201400)

摘 要: 目的 构建一种基于时间分辨荧光纳米微球的赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)侧流层析试纸条。**方法** 基于免疫层析原理, 以时间分辨荧光纳米微球为信号探针, 降低非特异性荧光的干扰, 提高检测灵敏度, 并通过优化样品提取液和样品稀释液, 进一步提高现场检测 OTA 的灵敏度和准确性。**结果** OTA 在 1.0~50.0 $\mu\text{g/kg}$ 范围内, T 线和 C 线荧光强度比值与 OTA 浓度的对数线性关系良好, 相关系数 r^2 为 0.9981~0.9998。不同基质中 OTA 的检出限和定量限分别为 0.401~0.614 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.973~1.617 $\mu\text{g/kg}$, 加标回收率为 89.53%~118.37%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)小于 12% ($n=3$), 且与将呕吐毒素、伏马菌素 B₁、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的交叉反应率均小于 5%, 特异性良好。OTA 侧流层析试纸条基于荧光定量快速检测技术平台可在 8 min 内快速准确地定量测定出待测样本中 OTA 含量。**结论** 本研究所制备的时间分辨荧光侧流层析试纸条可实现玉米、小麦和饲料中 OTA 的快速定量检测, 并具有成本低、灵敏度高、操作简便、准确高、重复性好、特异性好的优点, 可满足国内外 OTA 检测的技术要求, 为真菌毒素的快检技术的发展提供了技术支撑。

关键词: 赭曲霉毒素 A; 时间分辨荧光纳米微球; 荧光定量免疫层析; 快速定量检测

Study of time-resolved fluorescence lateral flow chromatographic test strips of ochratoxin A

BAI Fu-Jun¹, ZHENG Meng-Yao², CHEN Jin-Ying³, ZHAO Wan⁴, DING Li⁴, TAN Ting⁴,
XIAO Li-Wen⁵, YE Jin², WANG Song-Xue^{2*}, LIU Hong-Mei^{2*},

(1. Sinograin Chengde Grain and Oil Quality Supervision Center Co., Ltd., Chengde 067102, China; 2. Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Institute of Grain and Oil Quality and Safety, Beijing 102629, China; 3. Sinograin Chengdu Storage Research Institute Co., Ltd., Chengdu 610091, China;
4. Nanjing Microtest Biotechnology Co., Ltd., Nanjing 210031, China; 5. Shanghai Femdetection Biology Science & Technology Co., Ltd., Shanghai 201400, China)

基金项目: 北京市自然科学基金项目(7192026)、中国科协青年人才托举工程项目(2021QNRC001)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZX1922、ZX2001)、广西重点研发计划项目(桂科 AB20238018)

Fund: Supported by the Beijing Municipal Natural Science Foundation (7192026), the Association for Science and Technology Youth Talent Promotion Project of China (2021QNRC001), the Fundamental Research Funds for the Academy of National Food and Strategic Reserves Administration (ZX1922, ZX2001), and the Key Research and Development Program of Guangxi (AB20238018)

***通信作者:** 刘洪美, 博士, 副研究员, 主要研究方向为粮油质量安全检测。E-mail: lhm@ags.ac.cn

***Corresponding author:** LIU Hong-Mei, Ph.D, Associate Professor, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Institute of Grain and Oil Quality and Safety, No.11 Baiwanzhuang Street, Beijing 102629, China. E-mail: lhm@ags.ac.cn

ABSTRACT: Objective To establish a time-resolved fluorescent microsphere-based lateral flow chromatographic test strip for ochratoxin A (OTA). **Methods** Based on the principle of immunochromatography, time-resolved fluorescent nanospheres were used as signal probes to reduce the interference of non-specific fluorescence and improve the detection sensitivity. Furthermore, the sensitivity and accuracy of the on-site detection of OTA were improved by optimizing the sample extract and sample diluent. **Results** The ratio of the T-line and C-line fluorescence intensity had a good log-linear relationship with the OTA concentration in the range of 1.0–50.0 $\mu\text{g/kg}$, and the correlation coefficient r^2 was in the range of 0.9981–0.9998. The limits of detection and limits of quantitation of OTA in different matrices were in the range of 0.401–0.614 $\mu\text{g/kg}$ and 0.973–1.617 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The recoveries ranged from 89.53% to 118.37% with relative standard deviations (RSDs) all less than 12% ($n=3$), and the cross-reaction rates with deoxynivalenol, fumonisin B₁, aflatoxin B₁, zearalenone and T-2 toxin were all less than 5%, showing good specificity. The OTA lateral flow chromatographic test strips based on the fluorescent quantitative rapid detection technology platform could quickly and accurately quantify the content of OTA in samples within 8 minutes. **Conclusion** The time-resolved fluorescence lateral flow chromatographic test strip prepared in this study can realize the rapid quantitative detection of OTA in corn, wheat and feed, with the advantages of low cost, high sensitivity, simple operation, high accuracy, good repeatability and good specificity, which meets the technical requirements of OTA detection at home and abroad, and provides technical supports for the development of mycotoxins rapid detection technology.

KEY WORDS: ochratoxin A; time-resolved fluorescent microsphere; fluorescence quantitative immunochromatography; rapid quantitative detection.

0 引言

赭曲霉毒素是由曲霉属 (*Aspergillus*) 和青霉属 (*Penicillium*) 真菌产生的聚酮类毒性次生代谢产物^[1-2], 包括 7 种结构类似的化合物, 其中毒性最强、污染最为严重的是赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA), 常见于谷物、饲料、坚果、水果、咖啡豆等食品中^[3-4], 具有肾毒性、肝毒性、免疫毒性、神经毒性及致癌、致畸和致突变等作用^[5-8], 国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 已将其归类为 2B 类致癌物^[9]。OTA 的物理和化学性质极其稳定, 较难去除或降解, 而食用 OTA 污染的作物会对人和动物健康造成严重危害^[10-14]。因此, 欧盟规定原料谷物和谷类加工产品中 OTA 的限量标准分别为 5 和 3 $\mu\text{g/kg}$ ^[15]。我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定谷物、豆类及其相应制品中 OTA 的限量标准为 5 $\mu\text{g/kg}$, 样品中待测组成含量低于 100 $\mu\text{g/g}$ 时为痕量分析, 因此, OTA 的检测属于痕量检测的范畴, 对其检测方法提出更高的要求。

目前, OTA 常用的检测方法包括薄层色谱法、高效液相色谱法、液相色谱串联质谱法等精密仪器法^[2,13,16-18]和酶联免疫吸附、胶体金免疫层析等免疫分析法^[13,19-23]。其中薄层色谱法所用试剂价格便宜、仪器设备简单, 是较早使用的检测方法, 但该方法存在操作烦琐、灵敏度低的缺点, 一般无法达到痕量检测的要求^[24]。目前, 高效液相色谱法是最常用的检测方法^[2,25-27], 具有灵敏度高、准确性高、重现性好、适用范围广的优点, 但检测成本高、需要借助昂贵且

操作复杂的大型仪器及专业的技术人员, 并且通常需要复杂的前处理技术进行 OTA 的净化和富集, 无法满足现场检测的需求^[28-30]。而免疫分析法既不需要昂贵的大型仪器和专业的操作人员, 也不需要复杂的样品前处理过程, 操作简单且灵敏度高, 较好地弥补了精密仪器法的缺陷。但现有的免疫分析法如酶联免疫吸附法重现性较差^[22], 酶与底物反应时间较长, 很难满足现场快速检测的需求^[31]。而胶体金试纸条虽然具有成本低、操作简单、检测迅速及便携的优点, 但金纳米粒子光学亮度不足的瓶颈导致胶体金试纸条的检测灵敏度不足, 抗干扰能力较差^[31]。

时间分辨荧光微球 (time-resolved fluorescent microsphere) 是一种特殊的功能微球, 每个微球内包裹成千上万个荧光分子, 具有荧光效率高、Stokes 位移大 ($>150\text{ nm}$) 且荧光寿命长的优点, 可区分有效信号与非特异性的背景荧光信号, 从而降低时间分辨荧光侧流层析试纸条非特异性荧光的干扰, 提高检测灵敏度^[32]。近年来, 基于时间分辨荧光微球的侧流层析技术广泛应用于医疗、环境、食品等领域^[32-35], 但关于 OTA 的报道较少。卢迪莎等^[34]以稀土铕荧光微球作为检测信号, 将荧光探针置于微孔中, 开发了一种可同时检测黄曲霉毒素 (aflatoxin B₁, AFB₁) 和 OTA 的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 先将待测样品液加入含有荧光探针的微孔中吹打混匀, 37℃ 孵育 3 min; 再将试纸条插入微孔, 37℃ 反应 7 min, 操作过程烦琐, 检测时间较长。

基于以上研究, 本研究将时间分辨荧光微球标记的特异性 OTA 单克隆抗体喷涂于结合垫上, 通过侧向免疫层析作用结合荧光定量快速检测技术平台, 通过一步孵育

反应建立一种 OTA 竞争型时间分辨荧光侧流层析试纸条, 从而实现谷物如玉米、小麦、大米和饲料及其制品中 OTA 的检测, 以期替代胶体金免疫层析试纸条和酶联免疫吸附试剂盒等产品, 为 OTA 的现场快速检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米、小麦、浓缩饲料、酒糟蛋白饲料(distillers dried grains with solubles, DDGS)、喷浆玉米皮、玉米蛋白粉等从超市购得或由生产企业提供。

牛血清白蛋白偶联 OTA 复合物(OTA-bovine serum albumin conjugate, OTA-BSA)、小鼠抗 OTA 单克隆抗体、山羊抗小鼠 IgG、时间分辨荧光纳米微球(平均粒径 200 nm, 表面活性基团-COOH, 激发波长 365 nm、发射波长 615 nm)(上海飞测生物科技有限公司); Sartorius CN140 硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC 膜)[赛多利斯(上海)贸易有限公司]; SB08 样品垫、SMA31-40PVC 底板、CH37K 吸收垫(上海金标生物科技有限公司)。

牛血清白蛋白(bovine serum albumin conjugate, BSA)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺[1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC]、N-羧基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)(美国 Sigma 公司); 海藻糖、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TRIS hydrochloride, Tris-HCl)、Tween-20、proclin300(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); OTA 标准品溶液(1.9 $\mu\text{g/mL}$)、呕吐毒素(deoxynivalenol, DON, 100 $\mu\text{g/mL}$)、伏马菌素 B₁ (fumonisin B₁, FB₁, 50 $\mu\text{g/mL}$)、AFB₁ (2 $\mu\text{g/mL}$)、玉米赤霉烯酮(zearealenone, ZEN, 100 $\mu\text{g/mL}$)、T-2 毒素(T-2 toxin, T-2, 100 $\mu\text{g/mL}$)(北京 Romer 国际贸易有限公司); 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器与设备

FD-100 型荧光免疫定量分析仪(激发波长 365 nm、发射波长 615 nm)、FD-5000 型检测卡恒温孵育器(室温 5~105℃)(上海飞测生物科技有限公司); 3-30K 高速离心机(配 No. 12111H 角转子, 美国 Sigma 公司); MX-F 漩涡混匀器[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]; PL-E 便携式天平[精度 0.01 g, 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];

88881002 试管旋转混匀仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]; FSJ-A03D1 小型粉碎机(小熊电器股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 时间分辨荧光侧流层析试纸条的制备

(1)结合垫的制备

将表面羧基修饰的时间分辨荧光微球超声分散均匀后准确移取 50 μL 至 2 mL 离心管中, 并依次加入 100 μL 超纯水, 20 μL 45 mg/mL EDC 溶液和 10 μL 45 mg/mL NHS 溶液, 将离心管置于试管旋转混匀仪上 20 r/min 混匀活化 30 min。然后, 12000 r/min 离心 30 min, 去上清, 加入 1 mL 超纯水和 OTA 单克隆抗体, 置于试管旋转混匀仪上 20 r/min 混匀反应 120 min, 加入 100 μL 50 mg/mL BSA 溶液, 继续 20 r/min 混匀反应 60 min 以封闭剩余的活性位点。最后, 12000 r/min 离心 30 min, 去上清液, 加入 1 mL 保存液, 得到时间分辨荧光纳米微球标记的 OTA 单克隆抗体复合物, 超声分散混匀后, 喷涂于结合垫上, 45℃干燥 24 h, 干燥保存备用^[32-34]。

(2)硝酸纤维素膜的制备

将牛血清白蛋白偶联 OTA 复合物(OTA-BSA)和山羊抗小鼠 IgG 分别用磷酸缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) (0.01 mol/L pH 7.2, 1.5%蔗糖和 1.5%海藻糖)稀释至 0.5 和 1.0 mg/mL。将 OTA-BSA 溶液在 NC 膜距离左端 10 mm 处划线作为 T 线(检测线); 将山羊抗小鼠 IgG 溶液在 T 线右侧 5 mm 处划线作为 C 线(质控线), 45℃干燥 72 h, 干燥保存备用^[31]。

(3)OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条的组装

从左到右依次将样品垫、结合垫、NC 膜和吸水纸粘贴在 8 cm 长的 PVC 底板上, 并且相邻部分有 2~3 mm 的交联, 从而保证溶液平稳迁移, 试纸条的结构图如图 1 所示。组装完成后, 将其切成宽度为 4 mm 的板条, 将板条依次装入塑料卡壳中, 并用压卡机压紧, 装入带干燥剂(5 g/袋)的铝箔袋中, 铝箔袋封口后, 4℃保存即可^[32,35]。

1.3.2 样品前处理

首先从待测样品中选取 500 g 代表性样品, 小型粉碎机粉碎 1 min 后, 准确称取(1.0±0.02) g 待测样品粉末(过 20 目筛)置于 10 mL 离心管中, 加入 5 mL 80%甲醇水溶液(含 2%氯化钠), 2500 r/min 涡旋 5 min 后, 4000 r/min 离心 5 min 得上清液, 备用^[20,26]。

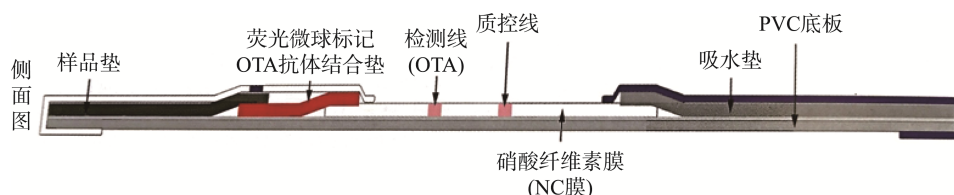


图 1 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条的结构图

Fig.1 Schematic diagram of ochratoxin A time-resolved fluorescence lateral flow chromatography test strip

1.4 时间分辨荧光侧流层析试纸条的检测步骤

首先将待用未开封的 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条、80%甲醇水溶液(含 2%氯化钠)、样品稀释液恢复至室温。其中样品稀释液为 0.1 mol/L 的 pH 为 8.0 的 PBS 缓冲液,加入 1%的氯化钠、1%海藻糖、0.5% BSA、0.1% Tween 20 和 0.1% proclin300。

准确吸取 100 μ L 1.3.2 的上清液,加入 400 μ L 样品稀释液,至漩涡混匀器上混匀后,准确吸取 100 μ L 混合液滴加在试纸条的加样孔中,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育器中温育 8 min。反应结束后,使用荧光定量快速检测仪读取 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条 T 线和 C 线的荧光强度,计算 T 线和 C 线荧光强度的比值,通过标准曲线计算出样品中 OTA 的含量。当荧光定量快速检测仪的检测结果大于 50 μ g/kg 时,需将 1.3.2 中的上清液用 80%甲醇水溶液(含 2%氯化钠)稀释 5 倍后重新进行检测,荧光定量快速检测仪的检测结果乘以 5 即为最终样品中 OTA 的含量。

1.5 数据处理

使用 Microsoft Excel 2010 和软件包 OriginPro 8.5 版 (Origin Lab Corporation, Northampton, USA)进行整个研究期间的数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 提取液中氯化钠浓度选择

在真菌毒素的提取过程中,使用盐析剂可提高真菌毒素的提取效率,常用的盐析剂有氯化钠、无水硫酸钠、硫酸铵和柠檬酸钠等。盐析剂可以吸引一部分自由水分子,减少水溶液中自由水分子的量,降低被提取物和提取溶液在水中的溶解度,从而提高提取效率^[36],其中氯化钠显中性,是盐析剂产生作用的基础试剂,因此本研究对提取液中氯化钠的浓度进行了考察。采用 GB 5009.96—2016《食品安全国家标准

食品中赭曲霉毒素 A 的测定》中第一法免疫亲和层析净化液相色谱法对收集的样品进行检测,将未检出 OTA 污染的样品作为无污染阴性样品。取 2 个无污染阴性玉米样品、2 个无污染阴性小麦样品,分别添加 5、10 μ g/kg 的 OTA 标准品,并分别用 80%甲醇、80%甲醇+1%氯化钠、80%甲醇+2%氯化钠、80%甲醇+3%氯化钠共 4 种提取液进行提取,用 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条进行检测,3 个平行样,检测结果见图 2。80%甲醇+2%氯化钠提取液对于玉米和小麦的回收率偏差最小,且重复性较好,故选择 80%甲醇+2%氯化钠为提取液。

2.2 不同稀释液检测不同 pH 的样本兼容性分析

取浓缩饲料、DDGS、喷浆玉米皮和玉米蛋白粉 4 种不同类型的样品上清液,用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 2、4、6、8 和 10; 分别用两种样品稀释液进行一定比例稀释、8 和 10; 分别用两种样品稀释液进行一定比例稀释,每个不同 pH 的样品检测 3 个平行样,计算不同 pH 样本的检测结果与 pH 6 样本检测结果的相对偏差,结果见表 1,其中,优化前样品稀释液为: Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L pH 8.0),加入 1%的氯化钠、1%海藻糖、0.5% BSA、0.1% Tween-20 和 0.1% proclin 300; 优化后样品稀释液为 PBS 缓冲液(0.1 mol/L pH 8.0),加入 1%的氯化钠、1%海藻糖、0.5% BSA、0.1% Tween 20 和 0.1% proclin 300。优化前样品稀释液检测不同 pH 的样本相对偏差在-199.8%~104.2%之间,优化后样品稀释液检测不同 pH 样本相对偏差在-10.23%~10.89%之间,由此可见,0.1 mol/L PBS 体系比 0.05 mol/L Tris-HCl 体系对样本 pH 的兼容性更强,能够很大程度使 pH 在 2~10 范围的样本浓度值偏差减少,同时增加缓冲体系的离子浓度,也会使本身稀释液的缓冲能力变强,但离子浓度不是越大越好,考虑到成本的因素,同时也考虑到随着盐离子的增加,也会影响抗原抗体的结合能力^[37],故最终选用 0.1 mol/L pH 8.0 的 PBS 缓冲液为样本稀释液。

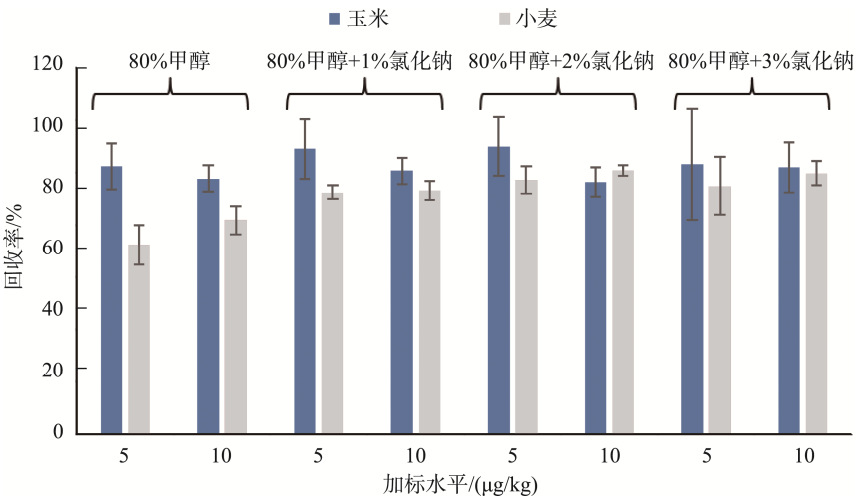


图 2 提取液中氯化钠浓度对回收率的影响(n=3)
Fig.2 Effects of sodium chloride concentrations of extraction solutions on recoveries (n=3)

表 1 不同 pH 样本的检测结果与 pH 6 样本检测结果的相对偏差(%)
Table 1 Relative deviations between samples with different pH and samples under pH 6 (%)

样品类型	优化前样品稀释液					优化后样品稀释液				
	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10
浓缩饲料	-199.80	104.20	0.00	-21.21	-28.57	-3.20	3.76	0.00	-10.23	1.83
DDGS	-24.28	7.31	0.00	-6.88	-12.6	-6.20	3.37	0.00	-4.94	-2.02
喷浆玉米皮	30.24	22.25	0.00	-75.44	-51.04	-1.37	-2.62	0.00	0.38	-6.29
玉米蛋白粉	-18.52	-4.73	0.00	-1.75	-5.23	-8.59	10.89	0.00	-8.38	-7.43

2.3 时间分辨荧光侧流层析试纸条的性能评估

2.3.1 检出限和定量限

分别称取无 OTA 污染的小麦样品、玉米样品、大米样品各 10 份, 每份(1.0±0.02) g, 按照 1.3.2 步骤处理后, 依次用 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条进行检测。分别以 10 份无污染样品测定结果的平均值加 3 倍标准差(standard deviation, SD)为检出限(limits of detection, LOD), 以测定结果的平均值加 10 倍标准差为定量限(limit of quantitation, LOQ), 结果表明, 小麦中 OTA 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.614 和 1.617 μg/kg, 玉米中 OTA 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.401 和 0.973 μg/kg, 大米中 OTA 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.602 和 1.501 μg/kg, 均远低于的限量标准为 3~5 μg/kg, 表明 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条的灵敏度良好, 能够满足实际样品的检测需求。

2.3.2 线性范围分析

分别在无 OTA 污染的小麦样品、玉米样品、大米样品中添加 OTA 标准品溶液, 加标水平为 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/kg, 然后用 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条由低浓度到高浓度进行检测, 以加标水平(μg/kg)的对数为横坐标, T 线和 C 线荧光强度的比值为纵坐标绘制标准曲线, 计算线性相关系数。结果表明, 大米、小麦和玉米的线性范围均为 1.0~50.0 μg/kg, 回归方程分别为: Y=1.0192X+0.1818, 相关系数 $r^2=0.9998$ (大米); Y=0.9983X+0.1172, 相关系数 $r^2=0.9988$ (小麦); Y=1.0998X-0.1022, 相关系数 $r^2=0.9981$ (玉米), 表明线性关系良好且线性范围较宽。

2.3.3 准确性和重复性

准确称取(1.0±0.02) g 无 OTA 污染的小麦、玉米、大米样品, 分别添加 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/kg 6 个浓度水平的 OTA 标准品溶液(n=3)。OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条的检测结果表明, 不同粮食谷物中 OTA 的回收率在 89.53%~118.37%, 3 个平行的变异系数, 也即相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)小于 12%, 表明该时间分辨荧光侧流层析试纸条的准确性和重复性良好。

2.3.4 与色谱法的对比

分别取 2 个 OTA 污染的小麦、玉米、大米样品, 分别采用 GB 5009.96—2016 中第一法免疫亲和层析净化液相色谱法和本研究制备的 OTA 时间分辨荧光侧流层析试

纸条进行检测, 每个样品分别设置 3 个平行, 计算两种方法检测结果的符合度(符合度=x/y×100%, x: OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条 3 次检测结果的平均值, y: 液相色谱法 3 次检测结果的平均值), 两种方法检测结果的符合度为 87.28%~116.23%, 3 个平行的变异系数小于 10%, 符合度良好。

2.3.5 方法特异性分析

为了考察 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条的特异性, 分别将 OTA、DON、FB₁、AFB₁、ZEN、T-2 共 6 种常见的真菌毒素标准品添加在无真菌毒素污染的阴性玉米中, 添加水平为 5~1000 μg/kg, 然后用 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条进行检测, 表 2 的检测结果表明该时间分辨荧光侧流层析试纸条与其他常见的 5 种真菌毒素的交叉反应率(测定值/添加浓度×100%)均小于 5%, 变异系数小于 10%, 表明特异性良好。

表 2 交叉反应率表
Table 2 Table of cross-reaction rates

序号	名称	交叉反应率/%	变异系数/%
1	OTA	107.85	5.36
2	DON	2.95	2.38
3	FB ₁	4.80	6.21
4	AFB ₁	0.65	7.65
5	ZEN	3.30	4.78
6	T-2	0.50	9.21

3 结 论

本研究以时间分辨荧光微球为荧光探针, 基于竞争抑制的原理建立了 OTA 时间分辨荧光侧流层析试纸条, 并用于不同类型的基质中 OTA 的快速定量检测。通过对样品提取液中氯化钠浓度和样本稀释液的优化, 提高了 OTA 检测的灵敏度和准确性。本方法开发的时间分辨荧光侧流层析试纸条可在 8 min 内完成样品中 OTA 的定量检测, 在玉米、小麦和大米基质中的 LOD 为 0.401~0.614 μg/kg, 远低于 OTA 的限量标准, 具有线性范围宽、准确性高、重复性

好和特异性高的优点。本方法的检测结果与高效液相色谱检测的检测结果一致,可以用于粮谷、饲料等样品中 OTA 的快速定量检测。

参考文献

- [1] 王刘庆, 焦健, 王蒙. 葡萄及其制品中赭曲霉毒素 A 的污染与控制研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 612–619.
WANG LQ, JIAO J, WANG M. Advances on contamination and control of ochratoxin A in grapes and their products [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(2): 612–619.
- [2] YE J, XUAN Z, ZHANG B, *et al.* Automated analysis of ochratoxin A in cereals and oil by immunoaffinity magnetic beads coupled to UPLC-FLD [J]. Food Control, 2019, 104: 57–62.
- [3] MONDANI L, PALUMBO R, TSITSIGIANNIS D, *et al.* Pest management and ochratoxin A contamination in grapes: A review [J]. Toxins, 2020, 12(5): 303.
- [4] WAN J, CHEN BC, RAO JJ. Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2020, 19: 928–953.
- [5] HEUSSNER AH, BINGLE LEH. Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data [J]. Toxins, 2015, 7: 4253–4282.
- [6] CUCIUREANU M, TUCHILUŞ C, VARTOLOMEI A, *et al.* An immunoenzymatic method for the determination of ochratoxin A in biological liquids (colostrum and cow's milk) [J]. Toxins, 2021, 13(10): 673.
- [7] XIA DY, YANG L, LI Y, *et al.* Melatonin alleviates ochratoxin A-induced liver inflammation involved intestinal microbiota homeostasis and microbiota-independent manner [J]. J Hazard Mater, 2021, 413: 125239.
- [8] KHOI CS, CHEN JH, LIN TY, *et al.* Ochratoxin A-induced nephrotoxicity: Up-to-date evidence [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11237.
- [9] WEI M, HE X, XIE Y. A novel signal-on fluorescent aptasensor for ochratoxin A detection based on RecJF exonuclease-induced signal amplification [J]. J Chin Chem Soc Taipei, 2020, 67(7): 1247–1253.
- [10] LV LR, WANG XY. Recent advances in ochratoxin A electrochemical biosensors: Recognition elements, sensitization technologies, and their applications [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68: 4769–4787.
- [11] ZEPNIK H, VÖLKE W, DEKANT W. Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 192(1): 36–44.
- [12] SAMUEL MS, JEYARAM K, DATTA S, *et al.* Detection, contamination, toxicity, and prevention methods of ochratoxins: An update review [J]. J Agric Food Chem. 2021, 69(46): 13974–13989.
- [13] KUMAR P, MAHATO DK, SHARMA B, *et al.* Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies [J]. Toxicon, 2020, 187: 151–162.
- [14] ZHAI S, ZHU Y, FENG P, *et al.* Ochratoxin A: Its impact on poultry gut health and microbiota, an overview [J]. Poult Sci, 2021, 100: 101037.
- [15] European Commission. Commission regulation no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [EB/OL]. [2006-12-19]. <https://www.legislation.gov.uk/eur/2006/1881> [2022-12-04].
- [16] ÖNCÜ KEM, KORKMAZ OT, YENİCELİ UD, *et al.* Determination of ochratoxin-A in the brain microdialysates and plasma of awake, freely moving rats using ultra high performance liquid chromatography fluorescence detection method [J]. J Chromatogr B, 2019, 1125: 121700.
- [17] ALGAMMAL AM, ELSAYED ME, HASHEM HR, *et al.* Molecular and HPLC-based approaches for detection of aflatoxin B and ochratoxin A released from toxigenic *Aspergillus* species in processed meat [J]. BMC Microbiol, 2021, 21: 82.
- [18] 史娜, 路勇, 吴颖, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测食品中的赭曲霉毒素 A[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 4.
SHI N, LU Y, WU Y, *et al.* Analysis of ochratoxin A in foods by HPLC-MS/MS [J]. Food Sci, 2011, 32(18): 4.
- [19] ZONG C, JIANG F, WANG X, *et al.* Imaging sensor array coupled with dual-signal amplification strategy for ultrasensitive chemiluminescence immunoassay of multiple mycotoxins [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 177: 112998.
- [20] ZHOU J, YANG Q, LIANG C, *et al.* Detection of ochratoxin A by quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay [J]. Anal Bioanal Chem, 2021, 413: 183–192.
- [21] PEREIRA RHA, KEIJOK WJ, PRADO AR, *et al.* Rapid and sensitive detection of ochratoxin A using antibody-conjugated gold nanoparticles based on localized surface plasmon resonance [J]. Toxicon, 2021, 199: 139–144.
- [22] 王健, 成桂红, 阮若云, 等. 动物源性食品中赭曲霉毒素 A 污染概况及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16): 4212–4217.
WANG J, CHENG GH, RUAN RY, *et al.* Review of ochratoxin A pollution in animal-derived foods and its detection methods [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(16): 4212–4217.
- [23] LIU BH, TSAO ZJ, WANG JJ, *et al.* Development of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip [J]. Anal Chem, 2008, 80: 7029–7035.
- [24] 夏骏, 李勇, 徐国茂, 等. 动物源性食品中赭曲霉毒素 A 毒性和检测方法研究进展[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2015, (2): 4–7.
XIA J, LI Y, XU GM, *et al.* Research progress on toxicity and detection methods of ochratoxin A in food of animal origin [J]. Jiangxi J Anim Husb Vet Med, 2015, (2): 4–7.
- [25] LI M, KONG W, LI Y, *et al.* High-throughput determination of multi-mycotoxins in Chinese yam and related products by ultra fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry after one-step extraction [J]. J Chromatogr B, 2016, 1022: 118–125.
- [26] 谢刚, 李丽, 黎睿, 等. 全自动免疫亲和在线净化-高效液相色谱法快速测定粮食中赭曲霉毒素 A[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(6): 114–119.
XIE G, LI L, LI R, *et al.* Development of a quick method of analysis of ochratoxin A in cereal using on-line immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography [J]. J Chin Cere Oils Ass, 2019, 34(6): 114–119.
- [27] 黎睿, 谢刚, 王松雪. 高效液相色谱法同时检测粮食中常见 8 种真菌毒素的含量[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 206–210.
LI R, XIE G, WANG SX. Simultaneous analysis of 8 mycotoxins in grains by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2015, 36(6): 206–210.
- [28] ALHAMOUD Y, YANG D, FIATI KSS, *et al.* Advances in biosensors for

- the detection of ochratoxin A: Bio-receptors, nanomaterials, and their applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111418.
- [29] BADIE BH, DANESH NM, KARIMI G, *et al*. Ultrasensitive detection of ochratoxin A using aptasensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 98: 168–179.
- [30] LIU ZW, HUA QC, WANG J, *et al*. A smartphone-based dual detection mode device integrated with two lateral flow immunoassays for multiplex mycotoxins in cereals [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 158: 112178.
- [31] 李森. 基于荧光免疫层析定量检测牛奶中真菌毒素的方法研究及试纸条研制[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- LI M. Research on quantitative detection of mycotoxins in milk and development of test strips based on fluorescence immunochromatography [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [32] 谭桂玉, 祝一帆, 张漫, 等. 转基因外源蛋白 Bt Cry1Ab/Ac 时间分辨荧光试纸条的制备与应用[J]. *分析化学*, 2021, 49(5): 752–758.
- TAN YZ, ZHU YF, ZHANG M, *et al*. Development and application of time-resolved fluorescence lateral flow immunoassay for Bt Cry1Ab/Ac protein detection in transgenic plant [J]. *Chin J Anal Chem*, 2021, 49(5): 752–758.
- [33] FANG S, ZHANG YZ, LIU X, *et al*. Development of a highly sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for the determination of trace salbutamol in environmental samples [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 679: 359–364.
- [34] 卢迪莎, 王序, 杨金易, 等. 同时检测玉米中黄曲霉毒素 B₁ 和赈曲霉毒素 A 的时间分辨荧光免疫层析试纸条的研制[J]. *食品科学*, 2022, 43(2): 346–354.
- LU DS, WANG X, YANG JY, *et al*. Development of a time-resolved fluorescence immunochromatographic strip for the simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in corn samples [J]. *Food Chem*, 2022, 43(2): 346–354.
- [35] LIU ZW, HUA QC, WANG J, *et al*. A smartphone-based dual detection mode device integrated with two lateral flow immunoassays for multiplex mycotoxins in cereals [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 158(6): 112178.
- [36] 严忠雍, 曾军杰, 龙举, 等. 液液萃取/液相色谱-串联质谱法分析海水中的短裸甲藻毒素[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(12): 1458–1463.
- YAN ZY, ZENG JJ, LONG J, *et al*. Determination of brevetoxins in seawater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with liquid-liquid extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2019, 38(12): 1458–1463.
- [37] 肖昌彬, 刘秋桃, 豆小文, 等. 基于间接竞争原理的流式微球技术快速检测麦芽中赈曲霉毒素 A[J]. *分析化学*, 2016, 44(4): 8.
- XIAO CB, LIU QT, DOU XW, *et al*. Rapid detection of ochratoxin a in malt by cytometric bead array based on indirect competition principle [J]. *Chin J Anal Chem*, 2016, 44(4): 8.

(责任编辑: 郑 丽 张晓寒)

作者简介



白福军, 工程师, 主要研究方向为粮油食品检测。

E-mail: maziye-11@163.com



刘洪美, 博士, 副研究员, 主要研究方向为粮油质量安全检测。

E-mail: lhm@ags.ac.cn