

荧光免疫定量法即时检测谷物中黄曲霉毒素 B₁

苗银萍^{1,2}, 付燕峰^{1,2}, 赵光升^{2,3}, 瞿超杰^{1,2}, 娄亚坤^{1,2},
李 宁^{1,2}, 任宝红^{1,2}, 许洪超^{1,2}, 赵林萍^{1,2*}

[1. 郑州中道生物技术有限公司, 郑州 450000; 2. 国家市场监管重点实验室(食品安全快速检测与智慧监管技术), 郑州 450000; 3. 河南省食品和盐业检验技术研究院, 郑州 450000]

摘 要: **目的** 建立荧光免疫定量法即时检测谷物中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。**方法** 以荧光微球为标记物, 采用 2,4 二硝基苯酚独立质控体系和竞争法检测原理, 构建谷物中黄曲霉毒素 B₁ 荧光免疫定量即时检测方法。评价其准确度、重复性、特异性、稳定性及与仪器确证方法符合度。**结果** 该方法最适条件为: pH 7.8 硼酸盐缓冲液活化、pH 7.5 磷酸缓冲液偶联、微球抗体质量比为 5:4、抗原抗体反应质量比为 50:1。试纸条检出限为 0.299~0.997 μg/kg, 定量限为 0.544~2.663 μg/kg。代表性样本准确度为 92.20%~111.80%, 重复性为 3.2%~10.6%。除与黄曲霉毒素 B₂ 有交叉反应(6.1%), 与其他类似物无交叉反应(<0.1%)。该法检测结果与超高效液相色谱法结果一致性好, 相关系数(r^2)为 0.997。**结论** 该方法准确、快速、灵敏、便捷, 适合于现场即时检测谷物中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

关键词: 谷物; 黄曲霉毒素 B₁; 荧光免疫; 定量; 即时检测

Point-of-care testing of aflatoxins B₁ in cereals by fluorescence immunoquantitative assay

MIAO Yin-Ping^{1,2}, FU Yan-Feng^{1,2}, ZHAO Guang-Sheng^{2,3}, QU Chao-Jie^{1,2}, LOU Ya-Kun^{1,2},
LI Ning^{1,2}, REN Bao-Hong^{1,2}, XU Hong-Chao^{1,2}, ZHAO Lin-Ping^{1,2*}

(1. Zhengzhou Zhongdao Biotechnology Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China; 2. State Key Laboratory of Market Regulation (Food Safety Rapid Testing and Smart Supervision Technology), Zhengzhou 450000, China; 3. Henan Institute of Food and Salt Industry Inspection Technology, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the point-of-care testing of aflatoxins B₁ in cereals by fluorescence immunoquantitative assay. **Methods** Using fluorescent microspheres as markers, point-of-care testing of aflatoxins B₁ in cereals by fluorescence immunoquantitative assay was established. It adopted 2,4-dinitrophenol independent quality control system, and was based on the detection principle of competition method. The accuracy, repeatability, specificity, stability and conformity with the instrument confirmation method were evaluated. **Results** The optimum conditions for the method were as follows: pH 7.8 borate buffer activation, pH 7.5 phosphate buffer coupling, microsphere antibody mass ratio was 5:4, antigen antibody mass ratio was 50:1. The limits of detection were 0.299–0.997 μg/kg, and the limits of quantitation was 0.544–2.663 μg/kg. The accuracy of the representative samples ranged from 92.20% to 111.80%, and the repeatability ranged from 3.2% to 10.6%. Except for cross-reaction

基金项目: 河南省市场监督管理局科技计划项目(2022sj26)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Administration for Market Regulation Henan Province (2022sj26)

*通信作者: 赵林萍, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测与。E-mail: zlp369@vip.163.com

*Corresponding author: ZHAO Lin-Ping, Ph.D, Senior Engineer, Zhengzhou zhongdao Biotechnology Co., Ltd., No.11, Changchun Road, Zhongyuan District, Zhengzhou 450000, China. E-mail: zlp369@vip.163.com

with aflatoxin B₂ (6.1%), there was no cross-reaction with other analogates (<0.1%). The correlation coefficient (r^2) was 0.997 comparing these 2 methods, the consistency was good. **Conclusion** The method is accurate, rapid, sensitive and convenient, and is suitable for the in-situ point-of-care testing of aflatoxins B₁ in cereals.

KEY WORDS: cereals; aflatoxins B₁; fluorescence immunity; quantitative; point-of-care testing

0 引言

黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 主要分布在玉米、小米、大米、小麦、花生等谷物及其加工品中^[1-2], 其毒性约为三聚氰胺的 416 倍、二甲基亚硝胺的 75 倍、砒霜的 68 倍、氰化钾的 10 倍, 被世界卫生组织认定为 IA 级危险物^[3-6], 国际癌症研究机构将其划定为 I 类致癌物^[7]。据联合国粮农组织 (Food and Agriculture Organization, FAO) 报道, 全球使用的谷物中, 有 25% 受到霉菌毒素污染^[8]。据估计, 全球每年不少于 2% 的农作物因黄曲霉毒素污染量超过限值而被销毁^[9], 给食品行业造成了极大的经济损失。鉴于 AFB₁ 对人类健康的巨大危害性和污染广泛性, 我国制定了严格的食品安全国家标准。

GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》对其做了明确的规定, 谷物及其制品中 AFB₁ 的限量标准为小麦(粉)、大麦及其谷物为 5 μg/kg, 稻谷(以糙米计)、糙米、大米为 10 μg/kg, 玉米、玉米面(渣、片)及玉米制品为 20 μg/kg。监管部门需要开展样本检测及时跟踪谷物中真菌毒素含量是否超标。因此, 提供一种有效的检测技术加强对黄曲霉毒素 B₁ 监测, 及时处理超标污染谷物是避免其引起危害的重要途径。

目前, 国内外已开发了多种用于黄曲霉毒素 B₁ 测定方法, 包括高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[10]、液相色谱-质谱法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)^[11]、薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC)^[12]、放射免疫法 (radioimmunoassay, RIA)^[13]、荧光偏振免疫法 (fluorescence polarization immunoassay, FPIA)^[14]、酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[15-16]、胶体金免疫层析法等^[17-18]。HPLC、LC-MS、TLC 等方法虽然灵敏度和准确度高, 但存在前处理复杂, 仪器采购成本高, 且要求专业人员操作, 不适用在基层使用。PIA 需要特殊设备, 实验涉及的放射性元素还会污染环境。FPIA 操作简单快捷, 适合大规模样品的快速检测。然而, 该方法灵敏度低、检测范围狭窄、易出现假阳性结果。ELISA 对于复杂基质试样可能会扰乱分析结果。胶体金免疫层析法适用基质范围广、操作简便、检测效率高、成本低及现场适应能力强, 但不能定量, 检测临界值样本时, 不同人之间的主观判断存在结果判读差异。

针对现有技术存在的问题, 科研工作者以荧光微球

为信号传导载体开展时间分辨荧光免疫层析技术, 发挥简单、快速、定量、适合现场检测的优势^[19-22]。然而, 现有荧光免疫层析技术鲜有对前端微球标记抗体工艺进行系统性研究, 未深入对比缓冲体系种类、pH、微球抗体质量比对灵敏度和荧光信号强度的影响。另外, 现有质控体系鼠二抗随样本中 AFB₁ 含量变化而改变, 导致标准曲线 T/C 值有两个变量, 不利于单独研究检测线。但是, 在实际研究工作中发现, 以上两因素对检测结果的稳定性、重复性和准确性有一定影响^[23]。故本研究基于荧光免疫定量法即时检测谷物中 AFB₁, 重点探讨了独立质控体系、微球标记抗体工艺(缓冲体系、球和抗体质量比)、铺垫量和划膜量对检测方法的影响, 筛选合适的样本前处理方法, 基于标准曲线评价其灵敏度、准确度、重复性、特异性、稳定性及与仪器确证法的一致性。同时, 将试纸条、荧光读卡仪、样本前处理仪器耗材整合成检测箱, 实现批量样品现场快速、即时检测, 为保障农产品质量安全提供了一种适合谷物中 AFB₁ 现场、快速、定量的检测方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, CN140, 德国赛多利斯公司); 时间分辨荧光微球(粒径 200 nm, 固含 1%, 含-COOH, 苏州为度生物技术有限公司); AFB₁ 标准品(纯度 ≥ 99%, 青岛普瑞邦生物工程有限公司); 兔抗二硝基苯酚(dinitrophenol, DNP)单抗(纯度 99.0%); 二硝基苯酚牛血清蛋白偶联物(2,4-dinitrophenol bovine serum protein conjugate, DNP-BSA)(纯度 99.0%)(北京佰桥瑞景生物科技有限公司); AFB₁ 单克隆抗体和 AFB₁-BSA 抗原(纯度 99.5%, 武汉纯度生物科技有限公司); 结合垫(型号 RB45)、样品垫(型号 GL-b04)、聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)底板(型号 DB-4)、吸水纸(型号 CH37)(上海金标生物科技有限公司); 碳二亚胺(carbodiimide, EDC, 纯度 98.0%)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS, 纯度 > 99.0%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-hydroxyethyl piperazine ethyl sulfonic acid, HEPES, 纯度 ≥ 99.0%)、2-(N-吗啡啉)乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid hydrate, MES, 纯度 ≥ 99.0%)、磷酸缓冲溶液(0.02 mol/L, phosphate buffer, PB, 纯度 ≥ 99.0%)、硼酸盐缓冲液(0.02 mol/L, borate buffer, BB, 纯度 ≥ 99.0%)、柠檬酸盐缓冲液(0.02 mol/L, citrate buffer, CA, 纯度 ≥

99.0%)、碳酸盐缓冲液(0.02 mol/L, citrate buffer, CB, 纯度≥99.0%)、牛血清白蛋白(北京博奥拓达科技有限公司)。

玉米、小麦等样品购于超市。

1.2 仪器与设备

GL-21M 高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司); JY96-IIN 超声仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); HM3030 三维划膜喷金仪、CTS300 数控裁条机、ZQ200 自动斩切机(上海金标生物科技股份有限公司); XW-80A 垂直混匀仪(大龙兴创实验仪器(北京)有限公司); ZD-001 干式荧光免疫分析仪(郑州中道生物技术有限公司); DZF-6020 真空干燥箱(上海精宏实验仪器有限公司); DH-500 恒温培养箱(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 试纸条的制备与检测

(1)微球标记物的制备

取微球 50 μL, 加入 450 μL pH 5.0 MES, 300 W 超声 2 min。依次加入 10 μL 10 mg/mL NHS 和 EDC 至微球中, 混匀 60 min。13000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 加入 500 μL pH 7.0 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-hydroxyethyl piperazine ethyl sulfonic acid, HEPES), 300 W 超声 2 min。加入 50 μg AFB₁ 单克隆抗体(Ab), 混匀 2 h。加入 200 μg BSA, 摇匀 1 h, 13000 r/min 离心 15 min, 弃上清。加入 500 μL pH

7.4 PBS 溶解, 即为 AFB₁ 微球标记物。按同样方法制备 DNP-BSA 微球标记物。2~8℃避光保存。

(2)包被膜和结合垫的制备

取硝酸纤维素膜(NC膜)包被检测线(T线)和质控线(C线)。T线包被 AFB₁-BSA, 质量浓度为 0.5 mg/mL。C线包被鼠抗 DNP 单抗, 质量浓度 1 mg/mL, 37℃干燥 3 h。将 AFB₁ 微球标记物和 DNP-BSA 微球标记物分别稀释至 20 μg/mL 和 0.8 μg/mL, 3 μL/cm 喷垫, 真空干燥 3 h。

(3)试纸条的组装

如图 1 所示, 以 30 cm×6 cm 的 PVC 胶粘板为底板, 依次粘贴 NC 膜、结合垫、样品垫和吸水纸, 相邻组分间重叠 1~2 mm。使用微电脑自动斩切机裁成 4 mm 宽, 装入卡壳, 封袋置阴凉干燥处保存。

(4)样本前处理

取样本 2 g, 加入 10 mL 60%甲醇水, 振荡提取 5 min。4000 r/min 离心 2 min, 取上清 100 μL, 加入 500 μL PBS 混匀, 获取检测液。

(5)检测

取 80 μL 检测液至检测卡中, 计时反应 15 min。读取 T 线和 C 线的荧光信号强度。同时通过公式(1)计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = (B_0 - B) / B_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: B₀ 为阴性样本的 T/C 值, B 是待测样本的 T/C 值。

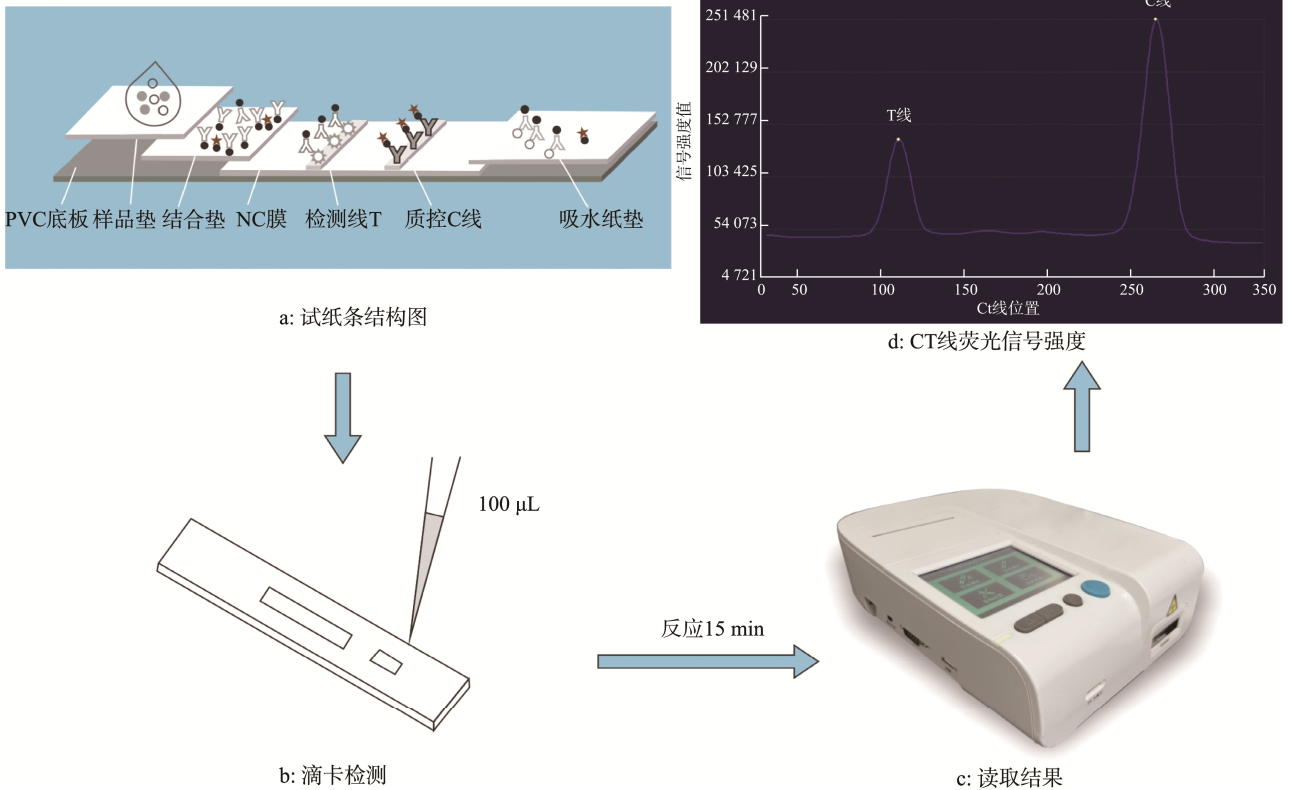


图 1 时间分辨荧光免疫层析法操作流程
Fig.1 Operation procedure of time resolved fluorescence immunochromatography

1.3.2 试纸条制备条件优化

(1) 微球标记抗体工艺优化

① 活化缓冲液筛选

取柠檬酸、MES、HEPES、PB 和 BB 分别作为活化缓冲液,按照 1.3.1 中方法(1)筛选最适种类。然后梯度设定最适活化缓冲液 pH 为 7.4、7.8、8.2、8.6 和 9.0 比较,确定最佳条件。

② 偶联缓冲液筛选

HEPES、PB、BB 和 CB 分别作为偶联缓冲液,按照 1.3.1 中方法(1)筛选最适条件。同时梯度设定 pH 为 6.5、7.0、7.5 和 8.0 进行优化。

③ 微球和 AFB₁ Ab 质量比优化

质量为 20、30、40、50、60、70、80 μg 的 AFB₁ Ab 分别和 50 μg 微球偶联。依据蛋白质浓度测定公式(2)计算反应后剩余单抗量,根据偶联率公式(3)确定标记单抗量。

$$\text{蛋白质浓度} = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260} \quad (2)$$

$$\text{偶联率}/\% = \frac{(\text{添加单抗量} - \text{上清单抗量})}{\text{添加单抗量}} \times 100\% \quad (3)$$

(2) 铺垫量和划膜量优化

固定 C 线 DNP 单抗浓度,梯度设定抗原划膜浓度和抗体铺垫浓度。T 线 AFB₁-BSA 质量浓度分别定为 0.12、0.25、0.50、0.75 mg/mL。结合垫 AFB₁ 抗体偶联物分别为 10、20、30 μg/mL。独立质控体系 DNP-BSA 微球偶联物以 0.8 μg/mL 和不同浓度 AFB₁ 混匀喷垫。通过棋盘法优化抗原抗体工作量^[24]。

1.3.3 AFB₁ 标准曲线拟合

基于 1.3.2 确定的最佳条件,用 0.01 mol/L PBS 配制质量浓度为 0、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 和 20.00 ng/mL 的 AFB₁ 标准品滴卡。每个浓度重复 3 次,室温反应 15 min,荧光读卡仪读取 T/C 值,四参数法拟合标准曲线^[25]。

1.3.4 样本前处理方法优化

选择甲醇、乙醇、乙腈和三氯甲烷 4 种有机试剂与水按照 6:4 (V:V) 配制提取液。称量(5.00±0.02) g 粉碎样本至离心管中,分别添加终浓度 0 μg/kg 和 10 μg/kg 标准品,加入 25 mL 提取液,振荡 5 min,4000 r/min 离心 2 min;取上清液 100 μL,再加入 500 μL PB,混匀。每个条件重复 3 次。另外,通过单因素试验优化提取时间和提取液体积。

1.3.5 试纸条性能评测

确定试纸条的检出限和定量限,评价其准确性、重复性、特异性、稳定性,并将检测结果与仪器确证方法结果比较。

1.3.6 检测箱设计

将谷物中黄曲霉毒素 B₁ 检测过程使用的仪器、耗材、试剂模块化分布到箱内,完成检测箱设计,便于现场快速

开展试验。

1.4 数据处理

实验重复 3 次测定,数据统计分析采用 Origin 9.0 软件进行分析和图像处理。

2 结果与分析

2.1 2 种质控体系差异性比较

样本检测过程中,干式荧光免疫分析仪获取检测卡 T 线信号强度和 C 线信号强度,二者比值作为 Y 值带入标准曲线计算待测物质浓度。由此可知,质控线 C 线不仅起到质量控制的作用,而且参与计算待测样本浓度。C 线选择羊抗鼠二抗包被模式时,C 线信号强度随待测物含量的增加而增加,而此时 T 线信号强度不断较少,Y 值(T/C 值)的变化由两个变量引起。C 线选择 DNP 独立质控体系时,C 线基本处于稳定状态,Y 值(T/C 值)的变化仅由 T 线峰面积变化引起。

本研究同时比对两种模式质控拟合的标曲,由图 2、3 可知,独立质控拟合标准曲线 Y 值下降幅度慢,斜率低,有利于拉长线性范围,保证高浓度加标样本准确度和重复性。试验进行 10 μg/kg 加标时,两种质控体系回收率分别为 97.6% 和 98.9%,与真实加标量较接近。20 μg/kg 加标时,独立质控回收率 106.8%,基本接近真实加标量,但非独立质控回收率 118.9%,与真实加标量偏差稍大(18.9%),回收率偏高,基本接近快检试剂回收率最高临界点(120%)。加标样本进行重复性检测,非独立质控 20 μg/kg 变异系数(variable coefficient, CV)相对较大,为 12.5%,其余为 4.7%~6.2%,较佳。重复性试验反映多次检测结果间的相似程度。非独立质控 20 μg/kg 重复性相对较差,不利于检测结果的再现,对数据的分析干扰性较大。

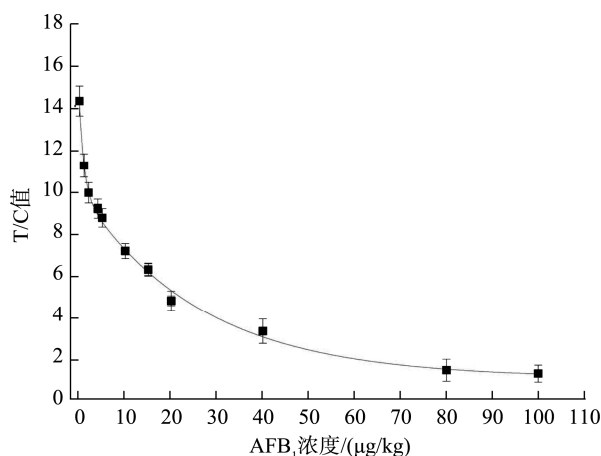


图 2 独立质控体系

Fig.2 Independent quality control system

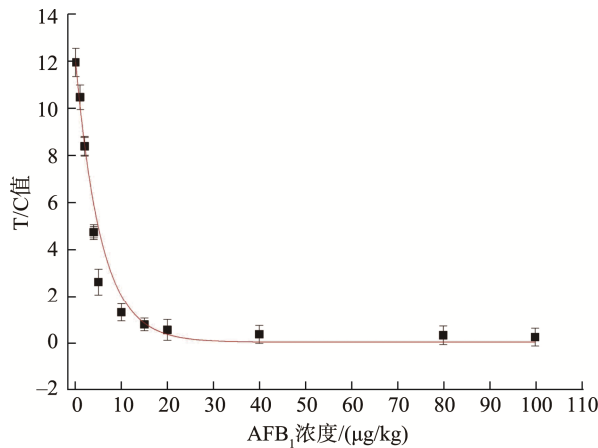


图 3 非独立质控体系

Fig.3 Non-independent quality control system

2.2 优化微球偶联抗体缓冲液

缓冲液 pH 是保证活化效率的关键, 同时, 缓冲液种类影响微球和抗体的偶联效率^[26-27]。在优化过程中, 依据 T 线荧光强度、1 ng/mL AFB₁ 标准品抑制率确定最适条件。从图 4 和 5 可知, 活化缓冲液 BB 的 T 线荧光强度最高, 抑制率最高, 活化效果最佳; pH 7.4~9.0 范围内, 7.8 时活化效果相对最好, 亮度高且抑制率最高, 说明适当的 pH 提高了活化效率, 保证了 T 线较高强度及对标准品的抑制率。同时, 微球分散性较好, 便于长期保存使用。在标记抗体过程中(图 6 和 7), PB 缓冲液 T 线荧光强度最高, 抑制率相对较好, 仅低于最佳抑制率 1%, 且微球分散性好, pH 在 7.5 相对最佳, T 线荧光强度和抑制率均最高。此外, 活化缓冲液柠檬酸和标记缓冲液 CB 引起微球聚集, 试纸条表现出结合垫释放不充分, T 线亮度下降。因此, pH 7.8 BB、pH 7.5 PB 分别作为活化缓冲液和偶联缓冲液既可有效提高试纸条的灵敏度和特异性, 又避免微球间的非特异性结合引起结合垫释放不充分。

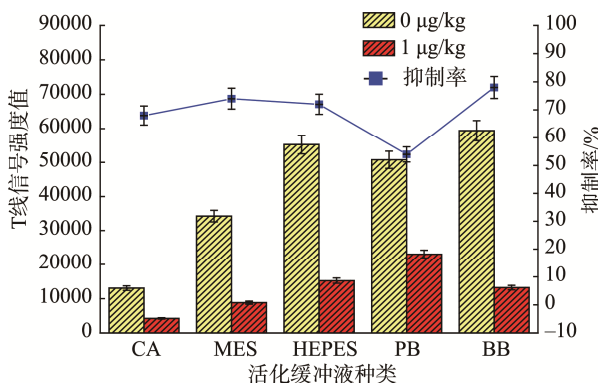


图 4 活化缓冲液种类优化

Fig.4 Species optimization of activation buffer

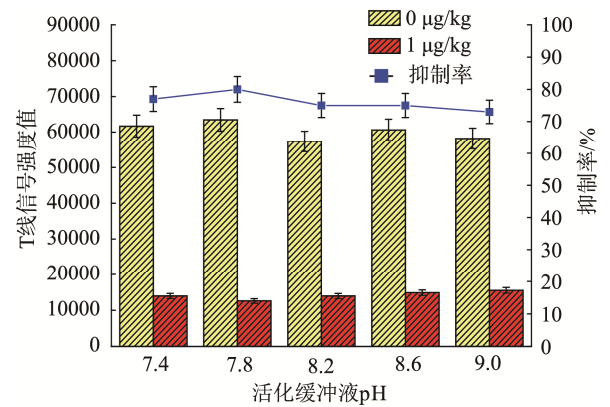


图 5 活化缓冲液 pH 优化

Fig.5 pH optimization of activation buffer

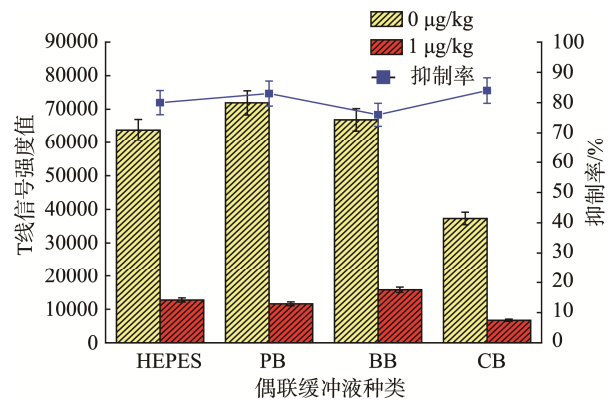


图 6 偶联缓冲液种类优化

Fig.6 Species optimization of coupling buffer

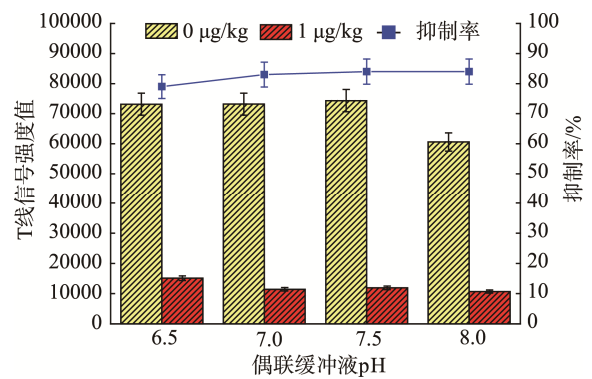


图 7 偶联缓冲液 pH 优化

Fig.7 pH optimization of coupling buffer

2.3 优化抗体用量

荧光微球标记抗体的量有一定的限度, 最佳抗体量既可保证微球表面的羧基与抗体高效率结合, 又可避免抗体用量过高导致资源浪费。因此, 确定抗体的加入量至关重要。试验结果显示, 随着 AFB₁ 单抗量增加, 标记效率增加, 偶联率在 90%~95% 时, 说明反应液中抗体多数与微球

结合。随着 AFB₁ 单抗加入量不断增加, 超过微球可偶联的最大量时, 偶联效率降低。如图 8 所示, 40 μg AFB₁ 单抗为最佳偶联量, 此时微球和抗体的质量比为 5:4。

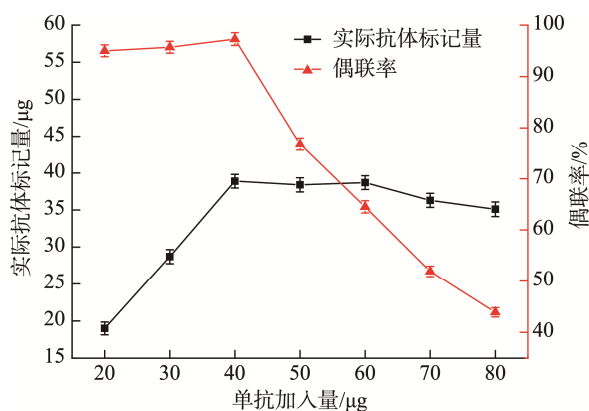


图 8 抗体实际标记量和抗体偶联率

Fig.8 Actual antibody labeling amount and antibody coupling rate

2.4 铺垫量和划膜量优化

在免疫层析过程中, T 线抗原包被浓度和结合垫喷微球 AFB₁ 单抗偶联物量是影响试纸条灵敏度和线性范围的关键因素。基于前期试验, 确定 C 线为 1.0 mg/mL, 设计一系列微球 AFB₁ 单抗偶联物浓度和 AFB₁-BSA 浓度组合, 由表 1 可知, 随着 T 线抗原浓度增大和单抗量增加, 0 ng/mL 和 1 ng/mL 试纸条的荧光信号强度增加, 高浓度的抗原和微球 AFB₁ 单抗偶联物反而使试纸条抑制率出现下降趋势。选用结合垫喷垫质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, T 线包被质量浓度 0.50 mg/mL 时, 抗原抗体质量比为 50:1, 此时 T 线荧光强度和抑制率相对最好, 为最适铺垫量和划膜量。

2.5 标准曲线拟合

以不同浓度标准品对应 T 线荧光峰值和质控线 C 线荧光峰值比值(T/C 值)为纵坐标(Y), 以标准品浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线。利用 ELISA Calc 软件将标准曲线拟合成四参数方程。方程为 $Y=11.93/[1+(X/0.71)^{1.62}]+0.69$, r^2 为 0.9968, 标准曲线半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值为 5.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 标准曲线线性范围为 0.5~100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.6 样本前处理方法确定

2.6.1 提取液中有有机试剂种类筛选

谷物 AFB₁ 检测过程中, 代表性样本有效提取方能保证检测结果准确性。而提取剂种类是影响有效提取的关键因素。本研究通过对比体积比 6:4 的甲醇水、乙醇水、乙腈水和三氯甲烷水发现, 甲醇提取液基质干扰小, T 线亮度较高, 回收率最接近 100% (97.02%); 乙醇 T 线亮度高, 提取效果和甲醇相当, 回收率 96.76%, 但乙醇刺激性小, 较

安全; 乙腈和三氯甲烷 T 线亮度低, 且回收率低, 分别为 82.38% 和 65.19%, 可能有机试剂对免疫层析反应副作用较明显。最终确定乙醇为 AFB₁ 最佳提取剂。

2.6.2 样本提取时间确定

为准确、高效提取样本中 AFB₁, 优化提取时间。分别对比 5、10、15、20 min 加标样本提取效果。振荡提取 5 min 时, 回收率最低(83.6%), 说明 AFB₁ 提取不充分。10、15、20 min 时提取效率相当, 在 99.8%~101.5% 之间, AFB₁ 可达到充分提取效果。从提取效率方面考虑, 确定 10 min 为最佳提取时间。

2.6.3 样本和提取液质量体积比确定

基于最佳提取液和提取时间, 比较样本:提取液为 1:3、1:5、1:7 (m:V) 时回收率差异性, 1:5 (m:V) 时回收率最佳, 接近 100%, 且样本基质干扰小。因此选择样本:提取液为 1:5 (m:V)。

2.7 荧光免疫定量即时检验方法试纸条性能评测

2.7.1 检出限和定量限

检测小麦、玉米、小米和大米空白样本各 20 份, 分别依据公式平均值+3 倍空白样本噪音、平均值+10 倍空白样本噪音计算检出限和定量限^[28-29]。小麦、玉米、小米和大米样本的检出限分别为 0.356、0.997、0.316、0.299 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限分别为 0.769、2.663、0.603、0.544 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.7.2 准确性与重复性

通过空白样本加标回收试验对本研究建立方法的准确性和重复性进行评价^[30]。依据 GB 2761—2017《食品中真菌毒素限量》在大米、玉米样本中分别加入 5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个不同浓度梯度的 AFB₁, 使用本方法进行检测。由表 2 可知, 批内检测卡加标回收率为 92.20%~111.40%, CV 为 3.2%~7.5%; 批间检测卡加标回收率为 92.60%~111.80%, CV 为 3.7%~10.6%, 满足真菌毒素快速检测的需求。

2.7.3 特异性

选择其他 6 种常见真菌毒素标准品分别添加空白玉米样本。按照公式交叉反应率% = $\text{IC}_{50}(\text{AFB}_1)/\text{IC}_{50}(\text{其他毒素}) \times 100\%$ 计算。该检测卡对黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂、黄曲霉毒素 M₁、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素的交叉反应率 <0.1%。而因与黄曲霉毒素 B₂ 结构类似, 有一定交叉性, 交叉反应率 6.1%。上述结果表明, 检测卡对常见真菌毒素交叉反应性小, 样本检测过程中, 真菌毒素对目标物 AFB₁ 干扰性较小, 可以作为谷物中黄曲霉毒素 B₁ 特异性检测。

2.7.4 与超高效液相色谱法结果比较

采用荧光免疫定量即时检验方法及仪器确证法(LS/T 6128—2017《粮油检验 粮食中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定 超高效液相色谱法》)检测常见谷物小麦、玉米、大米、小米中 AFB₁, 结果进行线性回归分析, 如图 9, 两种方法的线性相关系数 $r^2=0.997$, 结果高度相关, 具有良好的一致性。本方法较为可靠, 适合谷物中 AFB₁ 的现场快速检测。

表 1 微球单抗偶联物与抗原工作浓度棋盘法
Table 1 Checkerboard method of microsphere mab conjugate and antigen working concentration

抗体/ ($\mu\text{g/mL}$)	标准品/ (ng/mL)	浓度 1				浓度 2				浓度 3				浓度 4			
		T 均值	C 均值	抑制率/%	标准偏差/%	T 均值	C 均值	抑制率/%	标准偏差/%	T 均值	C 均值	抑制率/%	标准偏差/%	T 均值	C 均值	抑制率/%	标准偏差/%
10	0	26580	3452			47743	3612			61527	3452			67149	3452		
	1	3883	3496	86.2	0.3	6852	3557	85.1	0.6	9270	3496	85.4	0.3	12531	3496	82.6	0.7
20	0	40674	3497			76285	3628			75162	3497			79602	3497		
	1	7716	3508	81.5	0.9	13002	3561	83	0.3	13351	3508	82.3	0.6	15264	3508	81.3	0.4
30	0	58017	3492			105236	3509			86414	3492			90310	3492		
	1	14261	3507	76.3	0.5	21087	3584	80.7	0.6	16817	3507	81.5	1.1	20086	3507	78%	0.5

注: 浓度 1~4 分别表示 T 线 AFB₁-BSA 质量浓度为 0.12、0.25、0.50、0.75 mg/mL。

表 2 不同种类样本准确性和重复性
Table 2 Accuracy and repeatability of different types of samples

空白样本种类	加标浓度 (μg/kg)	批内			批间		
		平均值±标准偏差 (μg/kg)	回收率/%	CV/%	平均值±标准偏差 (μg/kg)	回收率/%	CV/%
大米	5.00	4.61±0.26	92.20	5.8	4.63±0.31	92.60	6.9
	10.00	9.76±0.32	97.60	3.3	9.85±0.42	98.50	9.5
	20.00	20.24±0.90	101.20	4.5	20.07±1.13	100.35	6.2
玉米	5.00	5.49±0.17	109.80	3.2	5.24±0.28	104.80	3.7
	10.00	9.88±0.34	98.80	3.5	10.32±0.73	103.20	7.2
	20.00	22.28±1.68	111.40	7.5	22.36±1.27	111.80	10.6

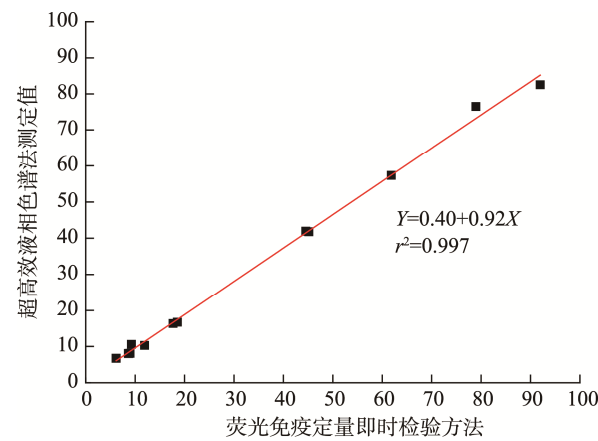


图 9 两种检测方法结果比较
Fig.9 Comparison of results of the 2 detection methods

2.7.5 稳定性

基于阿伦尼乌斯公式，将试纸条放置于 50℃加速破坏 23 d 性能稳定相当于室温有效存放 1 年。本试验将试纸条置于 50℃加速破坏 44 d 后与室温存放的试纸条比对。试纸条存放 0~36 d 范围内, T/C 值相对稳定, 但 40 d 开始出现下降, 试纸条稳定性能下降, 导致样本浓度值偏高。由图 10 可知, 加速破坏试验可知, 试纸条可在室温存放 18 个月。

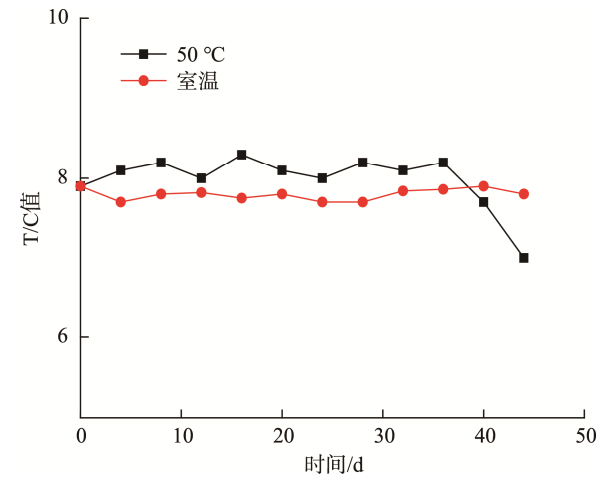


图 10 稳定性试验
Fig.10 Results of stability test

2.7.6 AFB₁ 检测箱开发

依据操作便携性、简便性、高效性等需求，本研究基于时间分辨荧光免疫层析试纸条、荧光读卡仪、样本前处理仪器(均质器、振荡器、离心机、天平)、离心管、剪刀、镊子、计时器、离心管架完成 AFB₁ 检测箱的开发，如图 11。



图 11 AFB₁ 检测箱
Fig.11 AFB₁ detection box

3 讨论与结论

本研究开展荧光免疫定量即时检验方法研究，通过比较微球和抗体偶联过程缓冲液种类、pH，微球抗体质量比等条件，系统进行微球偶联工艺优化，获取最佳微球标记抗体条件，提高了试纸条的灵敏度，1 ng/mL AFB₁ 标准品抑制率由 54%提高至 83%。通过棋盘法优化抗原包被浓度和微球抗体偶联物浓度，确定了试纸条制备条件。在检测大米、小米、小麦、玉米样本时，选择乙醇为提取剂，样

本提取液质量体积比为 1:5, 萃取 10 min 即可充分提取样本中 AFB₁。该试纸条对小麦、玉米、小米和大米样本的检出限分别为 0.356、0.997、0.316、0.299 μg/kg, 定量限分别为 0.769、2.663、0.603、0.544 μg/kg。不同样本回收率在 92.20%~111.80%之间, CV 在 3.2%~10.6%之间。与大型仪器检测结果相比, 结果一致性较好。试验结果显示, 该方法具有较好的准确性、重复性、稳定性和实际应用价值, 能有效提升实际样本 AFB₁ 检测能力, 同时配套携带方便、成本低的读卡仪实现快速定量检测, 为农作物生长、储运、加工等环节对大量样本中 AFB₁ 的快速筛选和现场快速检测提供强有力的保障。

影响时间分辨荧光免疫层析定量检测方法准确性的因素很多, 如微球粒径大小、微球偶联抗体工艺、样本前处理方法、抗原抗体性能等。对于微球粒径而言, 虽然 300 nm 粒径微球荧光强度大, 但其爬速慢, 也会出现堵膜情况。粒径微球爬速快, 但灵敏度低, 故本研究参考相关文献直接选择粒径 200 nm 开展试验^[31]。基于性能较佳的抗原抗体基础上, 本研究重点优化了微球标记抗体工艺、样本前处理方法。微球偶联抗体过程中, 活化和标记缓冲液种类对于偶联效果影响较明显, 较佳的缓冲液明显提升微球亮度, 同时也在一定程度上提高了灵敏度。在样本前处理过程中, 提取剂种类和含量影响提取效率, 本研究对比发现, 乙醇提取剂既能有效提高萃取效率, 又能经一定比例稀释后最大程度降低基质干扰效应, 保证检测结果的准确性。

在即时检验方法建立过程中, C 线的作用至关重要, 它能够对检测方法是否有效、批内/间差均一性和稳定性以及定量检测的准确性等方面准确、快速、直观判断。常规兔抗鼠多抗作为独立质控时, 随着样本中 AFB₁ 浓度增加, C 线逐渐升高, T 和 C 值均处于不断变化过程中, 拟合标曲过程中, 纵坐标 T/C 值引入两个变量, 导致 T/C 值的变化不完全是待测物质含量引起的目标抗原抗体反应。本研究选用 DNP 独立质控体系可解决这一问题, 保证了 T/C 值变化仅基于目标抗原抗体反应量。

参考文献

- [1] COPPA C, CIRELLI AC, GONCALVES BL, *et al.* Dietary exposure assessment and risk characterization of mycotoxins in lactating women: Case study of Sao Paulo state, Brazil [J]. Food Res Int, 2020, 134(8): 109272. 1–109272. 7.
- [2] SCHABO DC, MARTINS LM, MACIEL JF, *et al.* Production of aflatoxin B₁ and B₂ by *Aspergillus flavus* in inoculated wheat using typical craft beer malting conditions [J]. Food Microbiol, 2020, 89(8): 103456. 1–103456. 7.
- [3] HEINRICH M. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [J]. J Ethnopharmacol, 2002, 88(2): 299–300.
- [4] VERHEECKE C, LIBOZ T, MATHIEU F. Microbial degradation of aflatoxin B₁: Current status and future advances [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 237: 1–9.
- [5] 李静, 李培武, 张奇, 等. 时间分辨荧光免疫层析试纸条在油料饼粕黄曲霉毒素 B₁ 检测中的应用[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(2): 256–262.
- LI J, LI PW, ZHANG Q, *et al.* Application of time-resolved fluorescence immunochromatography strip in detection of aflatoxin B₁ in oil cake [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2014, 36(2): 256–262.
- [6] 邢福国, 李旭, 张晨曦. 黄曲霉毒素的产生机制及污染防控策略[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(1): 13–26.
- XING FG, LI X, ZHANG CX. Production mechanism and pollution control strategy of aflatoxin [J]. J Food Sci Technol, 2021, 39(1): 13–26.
- [7] CARVAJAL-MORENO M. Metabolic changes of aflatoxin B₁ to become an active carcinogen and the control of this toxin [J]. Immunome Res, 2015, 11(3): 2–14.
- [8] ZHANG SY, WANG H, YANG M, *et al.* Versicolorin A is a potential indicator of aflatoxin contamination in the granary-stored corn [J]. Food Addit Contam A, 2018, 35(5): 972–984.
- [9] 孙明山. 检出限的分类与计算方法[J]. 现代化农业, 2012, 392(3): 33–34.
- SUN MS. Classification and calculation method of detection limit [J]. Mod Agric, 2012, 3: 33–34.
- [10] WANG ZF, LUO PJ, ZHENG BD. A rapid and sensitive fluorescent microsphere-based lateral flow immunoassay for determination of aflatoxin B₁ in distillers' grains [J]. Foods, 2021, 10(9): 2109–2122.
- [11] GUO L, SHAO Y, DUAN H, *et al.* Magnetic quantum dot nanobead-based fluorescent immunochromatographic assay for the highly sensitive detection of aflatoxin B₁ in dark soy sauce [J]. Anal Chem, 2019, 91(7): 4727–4734.
- [12] AKGONULLU S, YAVUZ H, DENIZLI A. SPR nanosensor based on molecularly imprinted polymer film with gold nanoparticles for sensitive detection of aflatoxin B₁ [J]. Talanta, 2020, 219: 121219.
- [13] 闫磊, 李卓, 张燕, 等. 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, *et al.* Detection of aflatoxins in milk by radioimmunoassay [J]. Food Res Dev, 2010, 31(1): 135–137.
- [14] 杨晓涵, 徐国杰, 张欣悦, 等. 基于荧光偏振免疫分析技术检测药茶中的黄曲霉毒素[J]. 药学报, 2017, 52(4): 620–624.
- YANG XH, XU GJ, ZHANG XY, *et al.* Detection of aflatoxin in medicinal tea by fluorescence polarization immunoassay [J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(4): 620–624.
- [15] SHI L, YU T, LUO M, *et al.* Preparation monoclonal β -type anti-idiotypic antibody of zearalenone and development of green ELISA quantitative detecting technique [J]. Preparat Biochem Biotechnol, 2019, 50(4): 1–6.
- [16] HOU S, MA J, CHENG Y, *et al.* One-stop rapid detection of fumonisin B₁, dextrovalenol and zearalenone in grains [J]. Food Control, 2020, 117: 107107.
- [17] PAN M, MA T, YANG J, *et al.* Development of lateral flow immunochromatographic assays using colloidal Au sphere and nanorods as signal marker for the determination of zearalenone in cereals [J]. Foods, 2020, 9(3): 281–291.

- [18] CHANG XX, ZHANG YQ, LIU HB, *et al.* A quadruple-label time-resolved fluorescence immunochromatographic assay for simultaneous quantitative determination of three mycotoxins in grains [Z]. 2019.
- [19] 张少波, 邓常继, 张海涛, 等. 时间分辨荧光免疫层析法测定粮食中的黄曲霉毒素 B₁ [J]. 粮食科技与经济, 2021, 46(6): 80–82.
- ZHANG SB, DENG CJ, ZHANG HT, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in grains by time-resolved fluorescence immunochromatography [J]. Food Sci Technol Econ, 2021, 46(6): 80–82.
- [20] 卢迪莎, 王序, 杨金易, 等. 同时检测玉米中黄曲霉毒素 B₁ 和赭曲霉毒素 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): 2346–2354.
- LU DS, WANG X, YANG JY, *et al.* Development of time-resolved fluorescence immunochromatographic test strip for simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in corn [J]. Food Sci, 2022, 43(2): 346–354.
- [21] MARJAN M, ZAREIAN M, ZHANG Q, *et al.* Development of a new format of competitive immunochromatographic assay using secondary antibody-europium nanoparticle conjugates for ultrasensitive and quantitative determination of ochratoxin A [J]. Food Chem, 2019, 275(3): 721–729.
- [22] YEO SJ, BAO DT, SEO GE, *et al.* Improvement of a rapid diagnostic application of monoclonal antibodies against avian influenza H7 subtype virus using Europium nanoparticles [J]. Sci Reports, 2017, 7(1): 7933.
- [23] WANG D, ZHANG Z, LI P, *et al.* Time-resolved fluorescent immunochromatography of aflatoxin B₁ in soybean sauce: A rapid and sensitive quantitative analysis [J]. Sensors, 2016, 16(7): 1094.
- [24] 王玉国, 曾常茜, 刘捷, 等. 尿液 sIgA ELISA 测定方法的建立 [J]. 北华大学学报(自然科学版), 2002, 2: 128–132.
- WANG YG, ZENG CQ, LIU J, *et al.* A method for the determination of urine sIgA ELISA [J]. J Beihua Univ (Nat Sci Ed), 2004, 3(2): 128–132.
- [25] 周芳, 窦彩云. 时间分辨荧光免疫层析快速检测牛奶中地塞米松 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(22): 7331–7338.
- ZHOU F, DOU CY. Rapid detection of dexamethasone in milk by time-resolved fluorescence immunochromatography [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(22): 7331–7338.
- [26] WANG D, ZHANG ZW, LI P, *et al.* Time-resolved fluorescent immunochromatography of aflatoxin B₁ in soybean sauce: A rapid and sensitive quantitative analysis [Z]. 2016.
- [27] LI X, CHEN X, WU J, *et al.* Portable, rapid, and sensitive time-resolved fluorescence immunochromatography for on-site detection of dexamethasone in milk and pork [J]. Foods, 2021, 10(6): 1339.
- [28] 周伟, 金磊, 孟伟, 等. 胃蛋白酶原光激化学发光免疫测定方法的建立 [J]. 中国医药指南, 2013, 12(11): 66–68.
- ZHOU W, JIN L, MENG W, *et al.* Establishment of a photochemiluminescence immunoassay for pepsinogen [J]. Guide China Med, 2013, 12(11): 66–68.
- [29] 陈强胜. 高效液相色谱-柱后衍生法检测大米中黄曲霉毒素 B₁ 方法分析 [J]. 现代食品, 2018, (15): 147–149.
- CHEN QS. Determination of aflatoxin B₁ in rice by high performance liquid chromatography-post column derivatization [J]. Grain Distrib Technol, 2018, (15): 147–149.
- [30] BEAVER RW, WILSON DM, TRUCKSESS MW. Comparison of postcolumn derivatization-liquid chromatography with thin-layer chromatography for determination of aflatoxins in naturally contaminated corn [J]. J Assoc Anal Chem, 1990, (4): 579–581.
- [31] LIU Z, HUA Q, 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): 158.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



苗银萍, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: miaoyinying@163.com



赵林萍, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测和管理。
E-mail: zlp369@vip.163.com