

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231208006

量子点荧光微球免疫法定量检测小麦中 黄曲霉毒素 B₁

范雅靓, 吴才章*, 赵志科

(河南工业大学电气工程学院, 郑州 450001)

摘要: **目的** 建立量子点荧光微球免疫法快速检测小麦中黄曲霉毒素 B₁ 的方法。**方法** 采用量子点荧光微球作为荧光标记物, 与黄曲霉毒素 B₁ 的单克隆抗体偶联, 构建量子点荧光微球探针。优化缓冲液 pH、抗体最小标记量、荧光探针用量和包被抗原浓度等实验条件, 建立检测卡上 T 线和 C 线信号峰值面积的比值与样本中黄曲霉毒素 B₁ 浓度的关系, 构建定量标准曲线。针对小麦样品, 将该检测方法与时间分辨荧光定量检测方法进行比较。**结果** 本研究建立的荧光定量免疫层析检测方法最佳反应条件为: pH 7.5 磷酸钠缓冲液, 抗体标记量为 20 μg , 荧光探针用量为 4.0 μL , 抗原质量浓度使用 0.40 mg/mL 。小麦中黄曲霉毒素 B₁ 的定量检测线性范围为 0.05~25.00 $\mu\text{g/kg}$, 相关系数(r^2)为 0.9994, 检出限为 0.02 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 。加标回收率为 91.50%~115.00%, 变异系数为 1.88%~5.46%。**结论** 本研究建立的荧光定量免疫层析方法快速、准确、稳定性好、可靠性高, 适用于小麦中黄曲霉毒素 B₁ 的现场快速检测。

关键词: 量子点荧光微球; 黄曲霉毒素 B₁; 荧光免疫; 小麦

Quantitative determination of aflatoxin B₁ in wheat by quantum dot fluorescence microsphere immunoassay

FAN Ya-Jing, WU Cai-Zhang*, ZHAO Zhi-Ke

(College of Electrical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid detection of aflatoxin B₁ in wheat by quantum dot fluorescent microsphere immunoassay. **Methods** Quantum dot fluorescent microspheres were constructed as a fluorescent marker coupled to a monoclonal antibody to aflatoxin B₁. Experimental conditions of buffer pH, the minimum amount of antibody labeling, the amount of fluorescent probe used, and the concentration of coated antigen were optimized to establish the relationship between the ratio of the peak area of T line and C line signal on the detection card and the concentration of aflatoxin B₁ in the sample, and construct a quantitative standard curve. For the wheat samples, this assay was compared with the time-resolved fluorescence immunoassay. **Results** The best reaction conditions for fluorescence quantitative immunochromatography established in this study were pH 7.5

基金项目: 河南省科技研发计划联合基金(应用攻关类)项目(222103810084)、郑州市科技局自然科学项目(22ZZRDZX07)

Fund: Supported by the Henan Provincial Science and Technology Research and Development Plan Joint Fund (Application Research Category) Project (222103810084), and the Natural Science Project of Zhengzhou Science and Technology Bureau (22ZZRDZX07)

***通信作者:** 吴才章, 博士, 教授, 主要研究方向为智能传感与光电检测。E-mail: wucaizhang@haut.edu.cn

***Corresponding author:** WU Cai-Zhang, Ph.D, Professor, College of Electrical Engineering, Henan University of Technology, No.100, Lianhua Street, Zhongyuan District, Zhengzhou 450001, China. E-mail: wucaizhang@haut.edu.cn

sodium phosphate buffer, antibody labeling of 20 μg , fluorescent probe of 4.0 μL , and antigen mass concentration of 0.40 mg/mL. The linear range of quantitative detection of aflatoxin B₁ in wheat was 0.05–25.00 $\mu\text{g/kg}$, and the correlation coefficient (r^2) was 0.9994, with the limit of detection of 0.02 $\mu\text{g/kg}$ and the limit of quantification of 0.05 $\mu\text{g/kg}$. The addition recoveries ranged from 91.50% to 115.00%, and the coefficients of variation ranged from 1.88% to 5.46%.

Conclusion The fluorescence quantitative immunochromatography method established in this study is rapid, accurate, stable and reliable, and is suitable for the rapid detection of aflatoxin B₁ in wheat.

KEY WORDS: quantum dot fluorescent microspheres; aflatoxin B₁; fluorescent immunity; wheat

0 引言

黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 是最常见和最具毒性的黄曲霉毒素之一, 也是食品和饲料中最具致癌性的天然毒素之一。它由黄曲霉属真菌产生, 属于类黄酮毒素的一种。黄曲霉毒素主要存在于谷物、坚果、油料等农产品中。黄曲霉毒素具有强烈的毒性和致癌性^[1-2], 对人类和动物的健康构成严重威胁。摄入含有黄曲霉毒素的食物或饲料会引起多种健康问题, 包括肝脏损害、免疫抑制、癌症和生殖系统异常等^[3-4]。为了保障食品安全, 许多国家和组织制定了严格的标准和监管措施来限制黄曲霉毒素的含量。因此食品和饲料行业广泛采用各种检测方法来监测黄曲霉毒素的残留量, 以确保产品的安全性和合规性^[5]。

目前 AFB₁ 的主要检测方法包括色谱法^[6-7], 胶体金法^[8], 酶联免疫吸附法^[9-11], 荧光免疫法^[12]等。其中, 色谱法检测成本高, 操作步骤复杂。胶体金法的抗体选择性受限, 检测灵敏度相对较低。酶联免疫吸附法易出现假阳性, 且用于标记的抗体酶的纯度容易受环境影响导致稳定性降低, 影响检测结果。荧光免疫法是一种利用荧光标记物和免疫反应相结合的技术, 具有灵敏度高, 稳定性强, 应用范围广等优势, 适用于检测低浓度毒素。

传统微球荧光强度低, 且其光稳定性较差, 可能在长时间的光照作用下发生光漂白现象, 导致荧光信号逐渐减弱。制备传统微球时, 难以确保其尺寸的均匀性, 可能导致在实验中难以控制的变异性^[13], 而量子点荧光微球具有优越的物理和化学稳定性, 以及卓越的荧光性能。目前标记抗体所用量子点荧光微球大多都为羧基化量子点荧光微球, 但羧基化量子点在某些生物体系或环境中可能不够稳定, 容易受极端的 pH 条件、高离子强度的溶液或者长时间曝光于强烈光照下光照的影响, 导致其荧光性能随时间降低^[14]。而链霉亲和素有 4 个结合位点, 生物素的尾部可以嵌入到链霉亲和素的结合位点中, 并与位点中的氨基酸残基形成氢键和范德华力相互作用, 这种结合非常牢固, 具有很高的结合亲和力。将链霉亲和素与量子点荧光微球结合, 不仅能够利用微球的稳定性维持探针的性能, 还可以通过微球的荧光性能获得高亮度和长寿命的信号^[15-19], 但目前鲜少有将两者结合应用于 AFB₁ 的检测中。

鉴于此, 本研究基于链霉亲和素量子点荧光微球与 AFB₁ 单克隆抗体偶联做荧光探针, 使用荧光免疫法快速检测谷物中 AFB₁, 重点探讨了缓冲液 pH、抗体最小标记量、荧光探针用量和包被抗原浓度等实验条件对检测方法的影响, 基于标准曲线评价其重复性、特异性、稳定性及与仪器确证法的一致性, 以期为食品安全提供了一种适合小麦 AFB₁ 现场、快速、定量的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦购于郑州某农贸市场。

AFB₁ 单克隆抗体(生产批号: 20230411, 中国农科院油料作物研究所); 羊抗鼠抗体(上海生工生物工程公司); 链霉亲和素修饰量子点荧光微球(streptavidin quantum dot fluorescent microspheres, SAQDMS, 激发波长 365nm, 发射波长 613 nm, 粒径为 135 nm)、Biotin 溶液(0.2 mmol/L)、磷酸缓冲溶液(phosphate buffer, PB, pH=7.0, 10 mmol/L, 纯度 $\geq 99.0\%$)、Sartorius CN140 硝酸纤维素膜(NC 膜)、SB08 样品垫、SMA31-40 聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)底板、CH37K 吸收垫、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, pH=5.5 和 pH=8.0, 10 mmol/L, 纯度 $\geq 99.0\%$)、羧甲基羟胺半盐酸盐(carboxymethoxylamine hemihydrochloride, CMO, 分析纯)(上海皓鸿生物医药科技有限公司); 吡啶(分析纯)、N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF, 分析纯)、双蒸水、碳二亚胺(carbodiimide, EDC)、NaHCO₃ 溶液(0.13 mol/L)、牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)、氯化钠(分析纯)、无水乙醇、样品稀释液(pH=7.4, 0.01 mmol/L PBS)、黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂, 纯度 $\geq 99\%$)、黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁, AFG₁, 纯度 $\geq 99\%$)(北京中科二环科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

LC-LX-H1850 台式高速离心机、DF-101S 磁力搅拌器(上海力辰邦西仪器科技有限公司); 101-0AB 电热鼓风干燥箱(上海坤天实验仪器有限公司); JP-030PLUS 医用超声清洗仪(深圳市洁盟清洗设备有限公司); BCD-117AD 普通低温冰箱(奥克斯集团有限公司); 7010101017 微量移液

器(北京大龙兴创实验仪器有限公司); MS105 电子天平[精度 0.01 mg, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司]; MD-510 划膜喷膜仪(南京微测生物科技有限公司); xc-150T 粉碎机(永康市沃美工贸有限公司); Litesizer DLS 500 动态光散射仪(奥地利安东帕有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 检测卡的制备与检测

(1) 荧光探针的制备

取 0.256 μL AFB₁ 单克隆抗体加入 0.6 μL Biotin-LC-NHS 后, 37°C 反应 2 h。在离心管中加入 80 μL SAQDMS 后, 37°C 孵育 1 h。加入 8 μL Biotin 溶液, 37°C 孵育 30 min。15000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 加入 80 μL 10 mmol/L pH 7 PBS 缓冲液复溶, 超声 5 min, 弃去上清, 沉淀即为偶联产物。

(2) 完全抗原 AFB₁-BSA 的制备

AFB₁ 肝化物的制备: 将 2 mg AFB₁ 与 4 mg 的 CMO 溶解于 400 μL 吡啶中, 25°C 避光振摇反应。每 4 h 取出微量进行薄层层析(thin layer chromatography, TLC)定性分析, 直至 AFB₁ 完全转化为 AFB₁ 肝;

完全抗原的制备: 用 0.4 mL DMF 溶解 AFB₁ 肝, 取 0.2 mL 再加入 0.3 mL 双蒸水 DMF:H₂O=2:3 (V:V) 的混合溶液, 加入 1 mg EDC, 室温避光活化 4 h 后, 再补加 1 mg EDC, 此为 A 液。取 3.35 mg BSA, 用 2.76 mL 0.13 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液制成 10% BSA 活化溶液, 此为 B 液。将 B 液逐滴加入 A 液中, 避光搅拌 24 h。在 4°C 下用 PBS 搅拌透析 3 d, 每天换液 4 次, 离心去沉淀获得纯化的 AFB₁-BSA^[20-22]。

(3) 检测卡的组装

利用划膜仪在 NC 膜上依次喷涂一定质量浓度的包被原 (0.4 mg/mL, 0.8 $\mu\text{L}/\text{cm}$) 和羊抗鼠抗体 (0.5 mg/mL, 0.8 $\mu\text{L}/\text{cm}$) 分别作为检测线(T线)和质控线(C线), 喷洒完毕后, 将 NC 膜置于 37°C 的烘箱中干燥 12 h。样品垫浸泡于样品垫处理液 (10% Tween-20、15% PVP、15% BSA、0.5 mol/L PB 溶液、超纯水) 中浸泡处理后, 置于 37°C 的烘箱烘干 7 h。将 NC 膜贴在聚氯乙烯底板中央, 吸水纸和样品垫装配在 NC 膜上下两端; 最后, 使用切条机将其切成宽为 3 mm 的长条, 并保存在密封干燥的自封袋中, 备用。

(4) 样品前处理

取 5 g 小麦样品, 通过粉碎机将其研磨成粉末置于离心管中。向离心管中加入 70% 的甲醇 25 mL, 进行 20 min 的振荡提取, 并用离心机 12000 r/min 离心 5 min。取上清液 30 μL , 吹干后与样品稀释液 (pH=7.4, 0.01 mmol/L PBS) 100 μL 混合, 浸泡 3 min 后进行 20 次吹打混匀, 获得样品检测液。

(5) 检测

取 500 mL 纯水加入 20 g 氯化钠, 搅拌至完全溶解, 再

加入 500 mL 无水乙醇, 搅拌均匀后为样品提取液。取 40 μL 样品检测液加入 20 μL 样品提取液, 滴加至检测卡的样品垫处, 待反应 8 min, 读取 T 线和 C 线的荧光信号强度。

1.3.2 量子点荧光免疫层析检测卡制备条件优化

(1) 缓冲液 pH 优化

缓冲液 pH 会影响微球的偶联效率、稳定性和偶联过程中抗体的生物活性^[23-24]。当合适的 pH 被选定后, 可以提升活化的效力并有助于抗体与荧光微球之间的有效连接^[25]。按照 1.3.1 中方法(1), 通过选择不同的 pH 来调整 PBS 以达到最佳的效果, 设定 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 在相同检测条件下(基于预实验结果的选择, C 线 0.5 mg/mL, T 线 0.4 mg/mL), 对量子点荧光微球和 AFB₁ 单抗偶联过程中缓冲液 pH 进行优化。抑制率计算如式(1):

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

注: B_0 为阴性样本的 T 线波峰面积/C 线波峰面积; B 为待测样本的 T 线波峰面积/C 线波峰面积。

(2) 抗体最小标记量优化

抗体在标记过程中的使用量直接影响荧光探针的制备有效率, 当抗体浓度过高时, 在偶联过程中, 多余未与微球结合的抗体可能与 T 线的包被抗原、C 线的羊抗鼠 IgG 竞争结合, 从而干扰结果的判断, 导致出现假阴性反应, 降低检测卡的检测灵敏度^[26]。按照 1.3.1 中方法(1), 设置抗体加入量分别为 5、10、15、20、25、30 μg , 对抗体标记量进行优化。

(3) 荧光探针用量优化

荧光探针添加量过少时, 可能导致与包被抗原结合的量减少, 使 T 线显色不明显, 容易产生假阳性结果; 相反, 若添加过量荧光探针, 与样品结合后, 过剩的探针可能结合到 T 线上的包被抗原位点, 引起假阴性结果^[27], 因此在检测卡结合垫处分别添加 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μL 荧光探针对荧光探针用量进行优化。

(4) 检测线上包被抗原质量浓度的优化

测试线包被抗原浓度会影响测试结果的精确度, 抗原浓度过低时, 测试线上捕获的荧光探针数量减少, 荧光信号变弱, 导致结果数值偏大; 抗原浓度过高时, 荧光信号接近饱和, 过量的抗原会因空间位阻造成抗原和荧光探针结合率降低, 还会造成实验材料的浪费^[28]。因此, 设置在检测卡检测线处分别添加质量浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 的包被抗原进行实验。

1.3.3 标准曲线的建立

取空白小麦样品 10 份, 使用 AFB₁ 标准溶液进行加标处理, 加标质量浓度分别设置为 0.00、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 经样品前处理后, 取 30 μL 滴加在检测卡的样品垫上, 将检测卡插入检测仪, 读取检测卡的 T 线与 C 线波峰面积比值, 以 AFB₁

浓度(X , $\mu\text{g/kg}$)为横坐标, 以 T/C 值为纵坐标(Y), 经线性拟合分析得到标准曲线。

1.3.4 量子点荧光免疫层析检测卡性能评价

(1)与高效液相色谱-串联质谱法方法对比

通过测试确定检测卡的检出限和定量限, 评价其重复性、特异性、稳定性, 并将检测结果与高效液相色谱/串联质谱法方法结果比较。

(2)与 AFB₁ 时间分辨荧光免疫检测卡检测结果比对

取 20 份空白小麦样品, 分成 5 组, 每组分别添加 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 的 AFB₁ 标准品, 每组样品分别用 AFB₁ 量子点荧光免疫层析检测卡和 AFB₁ 时间分辨荧光免疫检测试剂卡进行检测, 对比实验结果, 每份样本重复 3 次。

1.4 数据处理

所有实验都进行 5 次独立平行重复测定, 实验数据统计分析通过 Origin 2020 软件进行分析处理, 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 量子点荧光微球的表征和荧光探针的合成

使用 365 nm 紫外光照射量子点荧光微球, 如图 1 所示, 量子点荧光微球发射出红光, 发射波长为 613 nm, 如图 2 所示。通过透射电子显微镜观察量子点荧光微球内部结构与表面形态。采用动态光散射仪测量量子点荧光微球的粒径, 如图 3, 量子点荧光微球平均水化粒径为 135 nm, 而荧光探针平均水化粒径增加至 146 nm, 表明 AFB₁ 单克隆抗体成功偶联至量子点荧光微球表面。



图1 量子点荧光微球在365 nm紫外光激发下发出红光
Fig.1 Quantum dot fluorescent microspheres emit red light under UV excitation at 365 nm

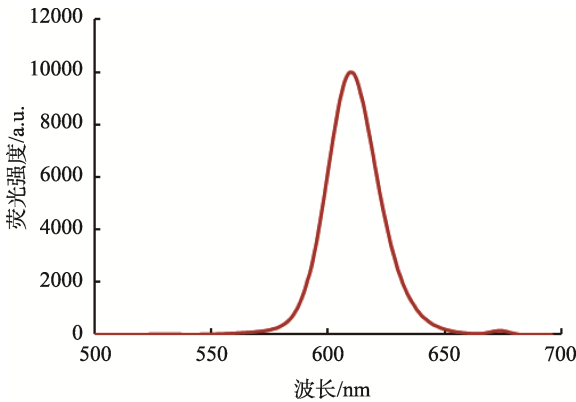
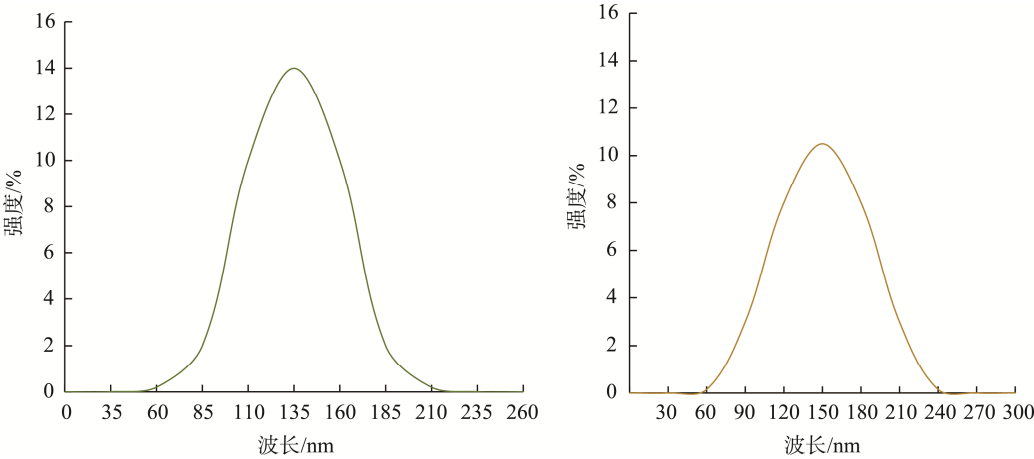


图2 量子点荧光微球在365 nm激发光下的荧光强度
Fig.2 Fluorescence intensity of quantum dot fluorescent microspheres under 365 nm excitation light



注: a为偶联前特征荧光发射峰; b为偶联后特征荧光发射峰。

图3 偶联前与偶联后特征荧光发射峰
Fig.3 Characteristic fluorescence emission peaks before and after coupling

2.2 免疫荧光快速试剂卡的优化结果

2.2.1 缓冲液 pH 优化实验结果

通过调整磷酸钠缓冲液的 pH, 为量子点荧光微球和单克隆抗体的偶联提供多种反应体系。研究不同 pH 对 AFB₁ 检测的量子点荧光免疫层析检测卡影响, 结果如图 4 所示, pH=7.0 时, T 线荧光强度最高, 此条件下 T/C 抑制率低于 pH=7.5 下的 T/C 抑制率, 而 pH=7.5 时 T 线荧光强度仅次于 pH=7.0 时, 最终将检测缓冲液 pH 确定为 7.5, 确保在最适宜的 pH 环境下获得最佳的检测性能。

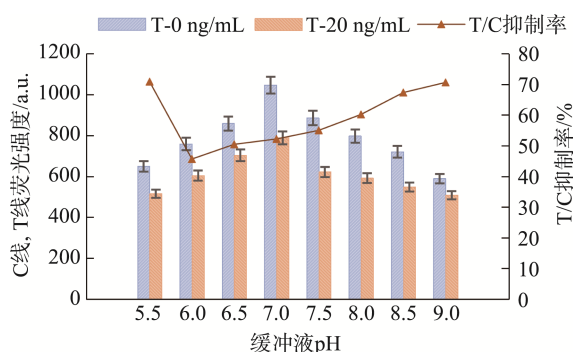


图4 不同pH下T线、C线的荧光强度和T/C抑制率

Fig.4 Fluorescence intensity of T line, C line and T/C inhibition at different pH

2.2.2 抗体最小标记量优化实验结果

不同抗体标记量下的 T 线荧光强度如图 5 所示, 当抗体标记量在 5~20 μg 范围时, 随抗体标记量增加, T 线荧光强度增强, 继续增大抗体标记量, T 线荧光强度不再增加, 反而减少。当抗体标记量在 20 μg 时, 荧光强度达到顶峰。在微球和抗体偶联过程中, 抗体标记量过少, 会导致偶联的抗体标记量过少, 而抗原抗体结合率下降, 荧光强度低; 抗体标记量过多, 抗原抗体结合时出现位阻反应, 降低 AFB₁ 与 AFB₁-BSA 的竞争作用, 检测卡灵敏度减弱。因此, 选择抗体标记量为 20 μg 。

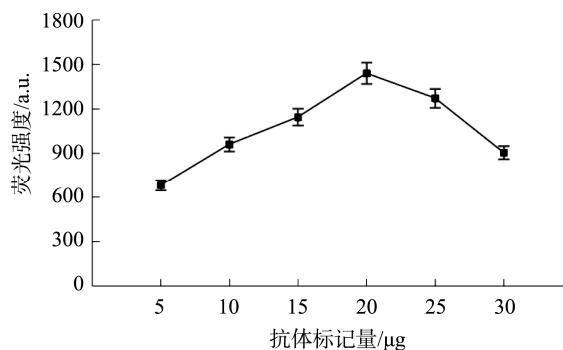


图5 不同抗体标记量下的T线荧光强度

Fig.5 T-line fluorescence intensity at different amounts of antibody labeling

2.2.3 荧光探针用量优化实验结果

荧光探针用量对检测卡的灵敏度和检测限有直接的影响, 荧光探针用量优化实验结果如图 6 所示, T 线和 C 线的荧光强度随着荧光探针用量的增加逐渐增强; 当荧光探针用量为 1.0 至 4.0 μL 时, T/C 抑制率变化不大, 但当荧光探针用量大于 4.0 μL 时, T/C 抑制率急剧降低。因此, 选 4.0 μL 作为进一步研究的最佳荧光探针用量。

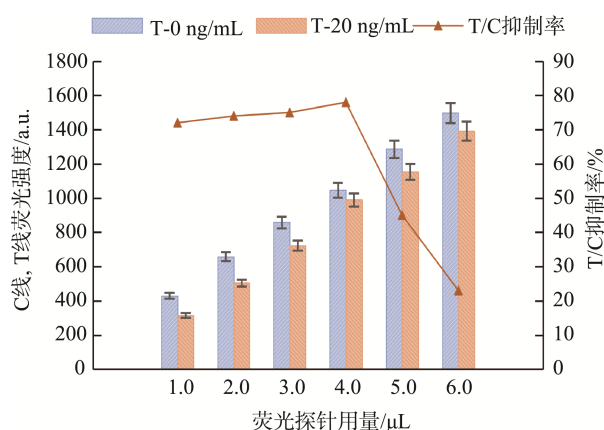


图6 不同荧光探针用量下T线、C线的荧光强度和T/C抑制率

Fig.6 Fluorescence intensity of T lines, C lines and T/C inhibition at different amounts of fluorescent probes

2.2.4 检测线上包被抗原质量浓度优化实验结果

不同包被抗原浓度下, T 线的荧光强度和 T/C 抑制率如图 7 所示。T 线抗原包被浓度升高, 增强了抗体的吸附能力, 进而提升了 T 线的荧光读数。同时, 由于 T 线和 C 线存在竞争关系, T 线信号的增强可能导致 C 线的荧光读数下降, 最终导致 T/C 值升高。T/C 抑制率随着包被抗原浓度升高而降低, 所以包被 T 线抗原时, 抗原质量浓度使用 0.40 mg/mL。

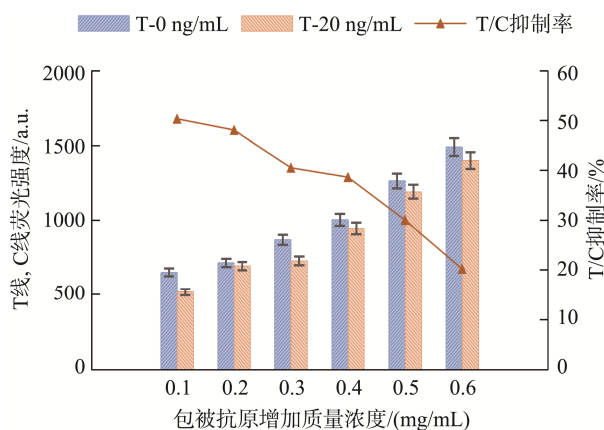


图7 不同包被抗原浓度下T线、C线的荧光强度和T/C抑制率

Fig.7 Fluorescence intensity of T lines, C lines and T/C inhibition at different coated antigen concentrations

2.3 标准曲线的建立

2.3.1 荧光信号的采集与处理

将检测卡插入仪器的卡槽内对 AFB₁ 浓度进行检测, 得到荧光信号曲线。采用滑动平均滤波对采集到的信号进行处理, 该方法实时性好, 平滑度高, 稳定性高, 不会引起局部的剧烈变化, 且善于处理信号的边缘值。计算如式(2):

$$\overline{X}_n = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} X_{n-i} \quad (2)$$

注: $\overline{X}_i$ 为第 n 次采样经滤波后的输出; X_{n-i} 为未经滤波的第 $n-i$ 次采样值; N 为滑动平均项数。滑动平均滤波法通过设置一个容量为 N 的缓存区, 对最近的 N 个采样值进行平均值计算。每当有新的采样值到来时, 该值被添加到缓存区的末尾, 同时移除缓存区的首个旧数据, 以保持缓存区中一直有最新的 N 个数据。

2.3.2 标准曲线拟合

得到处理过后的样品荧光信号曲线, 分别计算出 T 线和 C 线对应的曲线波峰的面积之比, 由此得出待测样品的浓度。通过加标实验得出的数据建立 T 线和 C 线波峰面积比值与样品浓度之间的数学模型。T 线和 C 线的面积比值采用面积法计算, 计算如式(3):

$$ST/SC = \frac{\sum_{P-N}^{P+N} T_i}{\sum_{Q-N}^{Q+N} C_i} \quad (3)$$

式中, ST 表示 T 线波峰面积, SC 表示 C 线波峰面积, ST/SC 为 T 线和 C 线的面积比值, T_i 为 T 线 AD 采样值, C_i 为 C 线 AD 采样值, P 为 T 线最大值点对应的位置, Q 为 C 线最大值点对应的位置, N 为包络两侧取的叠加点数。

使用最小二乘法拟合标准曲线, 设通过使用获得自变量 X_i (样品浓度) 与因变量 Y_i (T 线波峰面积/C 线波峰面积, ST/SC) 对应数据 (X_i, Y_i) , 使 $\sum [y_i - f(x_i)]^2$ 最小, 得到函数 $y = f(x)$, 确定其中参数。计算拟合直线如式(4):

$$\begin{cases} y = kx + b \\ k = \frac{\overline{xy} - \overline{x}\overline{y}}{x^2 - (\overline{x})^2} \end{cases} \quad (4)$$

拟合前的值为 x , 拟合后的值为 y , 且斜率为已知量。若假设拟合后的值与原来值的误差平方和为 $L(a, b)$, 则计算如式(5):

$$L(a, b) = \sum_{i=1}^n (ax_i + b - y_i)^2 \quad (5)$$

当 $\frac{\partial L}{\partial a} = 0$ 且 $\frac{\partial L}{\partial b} = 0$ 时, $L(a, b)$ 的值最小, 计算如式(6):

$$\begin{cases} \frac{\partial L}{\partial a} = 2 \sum_{i=1}^n (ax_i + b - y_i)x_i = 0 \\ \frac{\partial L}{\partial b} = 2 \sum_{i=1}^n (ax_i + b - y_i) = 0 \end{cases} \quad (6)$$

解方程得计算如式(7):

$$\begin{cases} a = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - n \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}}{\sum_{i=1}^n x_i x_i - n \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}} \\ b = \frac{(\sum_{i=1}^n x_i x_i) \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} - (\sum_{i=1}^n x_i y_i) \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}}{\sum_{i=1}^n x_i x_i - n \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}} \end{cases} \quad (7)$$

由此可得出最接近实验数据的直线公式, 使其到所有数据点的距离之和最小, 即偏差平方和最小时, 便可达到最佳拟合效果, 利用最小二乘法得出的样品质量浓度与 ST/SC 的关系, 拟合直线的表达式如式(8)所示:

$$Y = -0.6058X + 12.523 \quad (8)$$

式中, X 为检测物质质量浓度, Y 为 ST/SC 值。拟合直线相关系数 $r^2 = 0.9994$, 表明样品质量浓度与 ST/SC 之间存在线性关系。

2.4 免疫荧光检测试剂卡性能评价

2.4.1 检出限和定量限

检测小麦空白样本 20 份, 分别依据检测结果平均值 +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^[29-30], 由此可得, 小麦的检出限为 0.02 μg/kg, 定量限为 0.05 μg/kg。

2.4.2 重复性实验结果

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。在小麦空白样本中分别加入质量浓度为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 μg/kg 的 AFB₁ 进行检测, 由表 1 可知, 批内检测卡加标回收率为 91.50%~115.00%, 变异系数(coefficient of variation, CV)为 1.88%~4.35%; 批间检测卡加标回收率为 101.33%~110.00%, 变异系数 CV 为 1.91%~5.46%, 满足真菌毒素快速检测的需求。

2.4.3 特异性实验结果

量子点荧光免疫层析检测卡对 AFB₁ 的特异性结果如图 8 所示。与对照相比, 其他 2 种真菌毒素的 T 线荧光强度并未观察到明显变化, 而 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, 说明检测卡对 AFB₁ 表现出良好的特异性。

2.4.4 量子点荧光免疫层析检测卡性能评价

(1) 与高效液相色谱/串联质谱法方法对比结果

随机取 10 份不同水平 AFB₁ 污染的小麦样品, 每份样品分别用 AFB₁ 量子点荧光免疫层析检测卡和 GB 5009.22—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B

表 1 空白加标样本重复性
Table 1 Repeatability of the blankspiked samples

样本	加标浓度/(μg/kg)	批内			批间		
		(平均值±标准偏差) /(μg/kg)	加标回收率/%	CVs/%	(平均值±标准偏差) /(μg/kg)	加标回收率/%	CVs/%
第 1 组	0.05	0.054±0.002	108.00	3.70	0.055±0.003	110.00	5.46
第 2 组	0.10	0.115±0.005	115.00	4.35	0.110±0.003	110.00	2.73
第 3 组	0.20	0.183±0.004	91.50	2.19	0.209±0.004	104.50	1.91
第 4 组	0.30	0.320±0.006	106.70	1.88	0.304±0.015	101.33	4.93
第 5 组	0.40	0.416±0.010	104.00	2.40	0.411±0.014	102.75	3.40
第 6 组	0.50	0.527±0.015	105.40	2.85	0.520±0.016	104.00	3.08
第 7 组	0.60	0.631±0.014	105.17	2.22	0.620±0.015	103.33	2.42
第 8 组	0.70	0.739±0.018	105.57	2.44	0.731±0.017	104.43	2.33

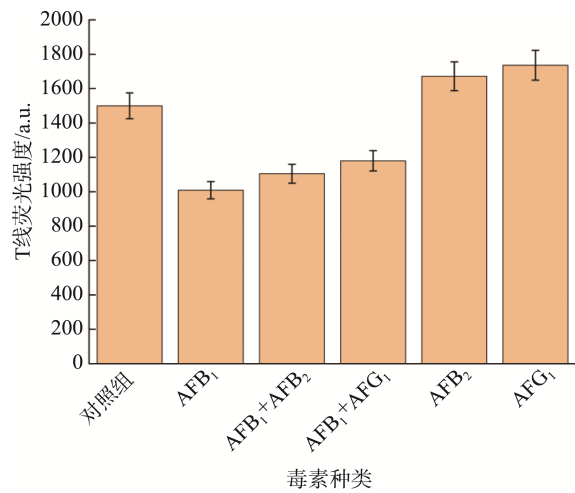


图8 特异性实验结果
Fig.8 Results of specific experiments

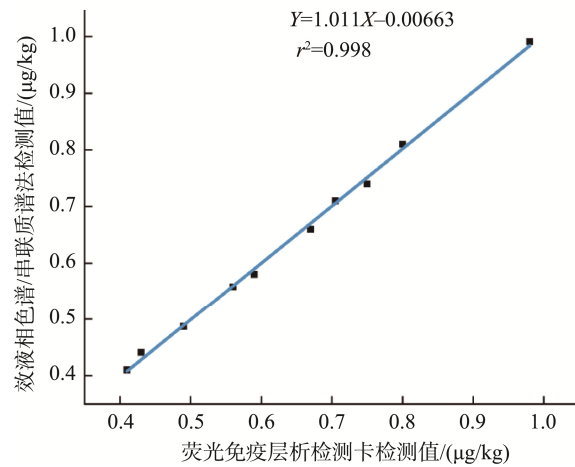


图9 两种检测方法结果比较
Fig.9 Comparison of results of 2 kinds of detection methods

族和 G 族的测定》中高效液相色谱-串联质谱法进行检测^[31-32], 比较检测结果, 每份样本重复 3 次。如图 9 所示, 两种方法的线性相关系数 $r^2=0.998$, 具有良好的一致性, 表明该检测方法可用于 AFB₁ 的快速定量检测。

(2)与 AFB₁ 时间分辨荧光免疫检测卡检测结果比对
由表 2 可知, 相同样本条件下, 通过对比 AFB₁ 时间分辨荧光免疫检测试剂卡检测结果对比, AFB₁ 量子点荧光免疫层析检测卡检测精度高于 AFB₁ 时间分辨荧光免疫检测卡, 并且只需要 8 min 即可获得检测结果, 具有检测快速, 结果精确的特点。

表 2 加标样品使用 AFB₁ 量子点荧光免疫层析检测卡与 AFB₁ 时间分辨荧光免疫检测卡检测结果比对

Table 2 Test results of the labeled samples were compared using the AFB₁ quantum dot fluorescence immunochromatographic detection card, AFB₁ time-resolved fluorescent immunodetection card

样本	AFB ₁ 量子点荧光 免疫层析检测卡 /(μg/kg)	AFB ₁ 时间分辨荧 光免疫检测卡 /(μg/kg)
第 1 组/(0.50 μg/kg)	0.502±0.001	0.514±0.0001
第 2 组/(1.00 μg/kg)	1.004±0.007	1.036±0.0005
第 3 组/(1.50 μg/kg)	1.500±0.001	1.512±0.0001
第 4 组/(2.00 μg/kg)	2.000±0.005	2.062±0.0080
第 5 组/(2.50 μg/kg)	2.500±0.002	2.522±0.0020

2.4.5 稳定性实验结果

取 3 种不同批次的检测卡, 在鼓风干燥箱 55℃条件下连续放置 30 d, 分别于第 1、7、15、20 和 30 d 时, 随机抽取各个批次产品对加标样品进行检测, 用荧光免疫定量检测系统读数, 每个批次重复 3 次。如表 3 所示, 放置时间为 1、7、15、20、30 d 时, 检测范围变化很小, 故该量子点荧光免疫层析检测卡稳定性较好。

表 3 稳定性测试
Table 3 Stability test

批次	放置时间/d	检测范围/ (μg/kg)
1	1	0.05~25.00
	7	0.05~25.00
	15	0.08~25.00
	20	0.09~25.00
	30	0.10~25.00
2	1	0.05~25.00
	7	0.05~25.00
	15	0.08~25.00
	20	0.09~25.00
	30	0.10~25.00
3	1	0.05~25.00
	7	0.05~25.00
	15	0.08~25.00
	20	0.09~25.00
	30	0.10~25.00

3 结 论

本研究建立了一种简便、快速、高精度的荧光免疫层析定量检测 AFB₁ 的方法, 用于对食物中 AFB₁ 进行定量检测。经实验结果显示, pH 为 7.5, 抗体标记量为 20 μg, 荧光探针为 4.0 μL, 抗原质量浓度为 0.40 mg/mL 时, 为最佳的测定条件, 具有较高的特异性。该检测卡对小麦样本的检出限为 0.02 μg/kg, 定量限为 0.05 μg/kg。不同样本回收率在 91.50%~115.00%之间, 变异系数在 1.88%~5.46%之间。与高效液相色谱/串联质谱法检测结果相比, 具有良好的一致性。实验结果证明, 该方法具有较好的重复性、特异性、稳定性。相比传统方法, 荧光免疫定量检测通常具有短暂的检测时间, 其高灵敏度使得该技术能够在低浓度范围内迅速、准确地检测微量的 AFB₁。此外, 荧光免疫系统实现高通量、高效的检测, 提高了实验的自动化程度, 逐渐在食品安全、环境监测等领域得到广泛应用。

参考文献

[1] SAFAVIZADEH V, MOGADDAM MRA, FARAJZADEH MA, *et al.* Descriptions in toxicology, interactions, extraction, and analytical methods of aflatoxins; a 10-year study performed in Iranian foodstuffs [J]. *Int J Environ Anal Chem*, 2023, 103(3): 701–711.

[2] EL-SAYED RA, JEBUR AB, KANG WY, *et al.* An overview on the major mycotoxins in food products: Characteristics, toxicity, and analysis [J]. *J Futr Foods*, 2022, 2(2): 91–102.

[3] SUO ZQ, NIU XY, WEI M, *et al.* Latest strategies for rapid and point of care detection of mycotoxins in food: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1246: 340888.

[4] ROCHA AR, CARDOSO MS, JÚNIOR JAS, *et al.* Occurrence of

aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk evaluation [J]. *Food Control*, 2023, 145: 109348.

[5] 马利霞. 饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法研究进展[J]. *现代畜牧兽医*, 2023, (2): 74–78.

MA LX. Detection method of aflatoxin B₁ in feed [J]. *Mod J Anim Husband Vet Med*, 2023, (2): 74–78.

[6] ROMERO-SÁNCHEZ I, RAMÍREZ-GARCÍA L, GRACIA-LOR E, *et al.* Simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2022, 395: 133611.

[7] LIU WJ, HUANG B, FU JW, *et al.* Simultaneous determination of 16 mycotoxin residues in aged tea by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Shipin Kexue/Food Sci*, 2023, 42(2): 299–305.

[8] ZHANG JY, LI XJ, XIE JH, *et al.* Rapid and simultaneous detection of aflatoxin B₁, zearalenone, and T-2 toxin in medicinal and edible food using gold immunochromatographic test strip [J]. *Foods*, 2023, 12(3): 633.

[9] 张宁, 赵志琴, 范志华, 等. 酶联免疫吸附法快速检测黄曲霉毒素[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(3): 146–150.

ZHANG N, ZHAO ZQ, FAN ZH, *et al.* Rapid detection of aflatoxin by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Food Res Dev*, 2021, 42(3): 146–150.

[10] BARTINO A, HOUHOULA D, PAPAGEORGIOU E. Rapid detection of mycotoxins on foods and beverages with enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Qual Assur Saf Crop*, 2020, 1(40): 40–49.

[11] PEREIRA CS, CUNHA SC, FERNANDES JO. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit for determination of aflatoxin B₁ in corn feed and comparison with liquid-chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method [J]. *Food Anal Method*, 2020, 13(9): 1806–1816.

[12] 蔡爱丽, 鲁迨, 石星波, 等. 荧光免疫分析技术检测食品中 AFB₁ 的研究进展[J]. *包装与食品机械*, 2022, 40(1): 106–112.

CAI AIL, LU D, SHI XB, *et al.* Progress in fluorescent immunoassay detection for AFB₁ in food [J]. *Pack Food Mach*, 2022, 40(1): 106–112.

[13] 王楠, 邹剑, 王迪, 等. 荧光微球的应用与发展前景[J]. *当代化工*, 2021, 50(7): 1728–1731.

WANG N, ZOU J, WANG D, *et al.* Application and development prospects of fluorescent microspheres [J]. *Contem Chem Ind*, 2021, 50(7): 1728–1731.

[14] 谢采阳, 王斌珂, 翟晶晶, 等. 羧基功能化聚合物-量子点荧光微球探针的制备及其在槲皮素含量检测中的应用[J]. *河南大学学报(医学版)*, 2022, 41(2): 91–98.

XIE CY, WANG BK, ZHAI JJ, *et al.* Preparation of a carboxyl-functionalized polymer-quantum dot fluorescent microsphere probe and its application in the detection of quercetin content [J]. *J Henan Univ (Med Ed)*, 2022, 41(2): 91–98.

[15] PIKETTY ML, POLAK M, FLECHTNER I, *et al.* False biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin-biotin-based immunoassays: The problem of biotin intake and related interferences [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(6): 780–788.

[16] KUROISHI T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015, 93(12): 1091–1096.

[17] PAZY Y, EISENBERG-DOMOVICH Y, LAITINEN OH, *et al.*

- Dimer-tetramer transition between solution and crystalline states of streptavidin and avidin mutants [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(14): 4050–4056.
- [18] LIVNAH O, BAYER EA, WILCHEK M, *et al*. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(11): 5076–5080.
- [19] TASKINEN B, AIRENNE TT, JANIS J, *et al*. A novel chimeric avidin with increased thermal stability using DNA shuffling [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 92058.
- [20] 蔡敏, 周常义, 李健, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原的制备及鉴定[J]. 湖南农业科学, 2013, (23): 10–13.
- CAI M, CHOU CY, LI J, *et al*. Preparation and characterization of the artificial antigen for aflatoxin B₁ [J]. *Hunan Agric Sci*, 2013, (23): 10–13.
- [21] SUN JD, MIAO L, XING FG, *et al*. Novel dual immunochromatographic test strip based on double antibodies and biotin-streptavidin system for simultaneous sensitive detection of aflatoxin M₁ and ochratoxin A in milk [J]. *Food Chem*, 2022, 375: 1316.
- [22] SALVADOR JP, VASYLIEVA N, GONZALEZ-GARCIA I, *et al*. Nanobody-based lateral flow immunoassay for the rapid detection of aflatoxin B₁ in almond milk [J]. *ACS Food Sci Technol*, 2022, 8: 1276–1282.
- [23] 陈发荣, 韩琰旭, 吴月皓, 等. 检测花生油中黄曲霉毒素 B₁ 免疫胶体碳层析试纸条的制备[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(10): 146–149, 158.
- CHEN FR, HAN YX, WU YH, *et al*. Preparation of aflatoxin B₁ in peanut oil [J]. *Cere Oils*, 2022, 35(10): 146–149, 158.
- [24] WANG H, REN HL, HU P, *et al*. A fluorescence immunochromatographic strip based on quantum dot nanobeads for the rapid detection of okadaic acid [J]. *Food Anal Method*, 2022, 15(9): 2470–2478.
- [25] YANG QB, QI YH, ZHOU JM, *et al*. Development of fluorescent immunochromatographic test strip for qualitative and quantitative detection of zearalenone [J]. *Food Anal Method*, 2022, 15(9): 2547–2557.
- [26] SHENG W, GUO J, LIU CC, *et al*. Quantitative determination of four mycotoxins in cereal by fluorescent microsphere based immunochromatographic assay [J]. *J Sci Food Agric*, 2023, 103(8): 4017–4024.
- [27] ZHOU JM, QIAN WJ, YANG QB, *et al*. Analysis of virginiamycin M₁ in swine feed, muscle and liver samples by quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2022, 39(8): 1390–1400.
- [28] ZHANG HY, LUO JX, BELOGLAZOVA N, *et al*. Portable multiplex immunochromatographic assay for quantitation of two typical algae toxins based on dual-color fluorescence microspheres [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(21): 6041–6047.
- [29] 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.
- [30] 段宏, 陈雪岚, 江湖, 等. 量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测恶性疟原虫[J]. 分析化学, 2015, 43(3): 338–343.
- DUAN H, CHEN XL, JIANG H, *et al*. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* by quantum dot fluorescent microspheres immunochromatography strip [J]. *Anal Chem*, 2015, 43(3): 338–343.
- [31] DI NARDO F, ALLADIO E, BAGGIANI C, *et al*. Colour-encoded lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B₁ and type-B fumonisins in a single test line [J]. *Talanta*, 2019, 192: 288–294.
- [32] DUAN H, HUANG XL, SHAO YN, *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.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)

作者简介



范雅靓, 硕士研究生, 主要研究方向为光电检测技术。

E-mail: 864414989@qq.com



吴才章, 博士, 教授, 主要研究方向为智能传感与光电检测。

E-mail: wucaizhang@haut.edu.cn