

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240407006

β -乳球蛋白光热免疫层析试纸条的研制

张丕显¹, 邢晓睿¹, 黄续芳¹, 李诗洁^{2*}, 王 硕^{2*}

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457;
2. 南开大学医学院, 天津市食品科学与健康重点实验室, 天津 300071)

摘 要: **目的** 研制 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -Lg)光热免疫层析试纸条。**方法** 合成了具有高光热转换效率($\eta=47.5\%$)的硫化钴-单宁酸(cobalt sulfide-tannic acid, CoS@TA)纳米球, 并将其与多克隆抗体偶联制备光热免疫探针, 同时优化了抗体标记量、抗体包被浓度以及试纸条的各项工作条件, 在此基础上建立了一种基于 CoS@TA 的 β -Lg 光热免疫层析试纸条(photothermal immuno-chromatographic test strip, PITS)检测方法。**结果** 该免疫层析法中视觉检出限为 250 $\mu\text{g/L}$, 光热检出限为 26.44 $\mu\text{g/L}$, 比视觉检出限高出 9.5 倍, 同时具有良好的特异性, 并通过在婴幼儿氨基酸奶粉中的添加回收实验和商用酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒验证了该方法在实际样品检测中的有效性。**结论** 该方法使用便携仪器即可实现对 β -Lg 的快速、高灵敏定量检测, 可用于奶粉的快速检测。

关键词: 光热效应; 单宁酸修饰的硫化钴纳米球; 试纸条; β -乳球蛋白; 定量检测

Development of photothermal immunochromatographic test strips for β -lactoglobulin

ZHANG Pi-Xian¹, XING Xiao-Rui¹, HUANG Xu-Fang¹, LI Shi-Jie^{2*}, WANG Shuo^{2*}

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Food Science and Health, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China)

ABSTRACT: Objective To develop photothermal immunochromatographic test strips for β -lactoglobulin (β -Lg). **Methods** The cobalt sulfide-tannic acid (CoS@TA) nanospheres with high photothermal conversion efficiency ($\eta=47.5\%$) were synthesized and coupled with polyclonal antibodies to prepare photothermal immunoprobes, and the amount of antibody label, concentration of antibody encapsulation, and working conditions of the test strips were optimized. A photothermal immunochromatographic test strip (PITS) method based on CoS@TA was established. **Results** The immunochromatographic method had a visual detection limit of 250 $\mu\text{g/L}$ and a photothermal detection limit of 26.44 $\mu\text{g/L}$, which was 9.5 times higher than the visual detection limit, and also had good specificity, which was validated by the spiked recovery experiment in infant amino acid milk powder and a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. **Conclusion** The method can realize rapid and highly sensitive quantitative detection of β -Lg using a portable instrument, and can be used for rapid detection of infant formula.

*通信作者: 李诗洁, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。E-mail: lsj930427@126.com

王 硕, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: wangshuo@nankai.edu.cn

*Corresponding author: LI Shi-Jie, Ph.D, Professor, Tianjin Key Laboratory of Food Science and Health, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China. E-mail: lsj930427@126.com

WANG Shuo, Ph.D, Professor, Tianjin Key Laboratory of Food Science and Health, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China. E-mail: wangshuo@nankai.edu.cn

KEY WORDS: photothermal effect; tannic acid-modified cobalt sulfide nanospheres; test strips; β -lactoglobulin; quantitative detection

0 引言

β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -Lg)主要存在于牛乳中, 占牛乳总蛋白含量的 10%^[1], 由于其稳定的三级结构而不易被胃蛋白酶分解^[2], 因此能够在消化过程中保持完整并最终进入血液循环系统^[3]。对于牛乳过敏者而言, 摄入到 β -Lg 可能会触发包括荨麻疹、血管性水肿、哮喘、鼻炎、呕吐和肠胃痉挛在内的多种临床症状, 严重时甚至可能导致过敏性休克^[4-5]。这些过敏反应不仅严重干扰了牛乳过敏者对牛乳中营养成分的正常吸收, 还可能对其生长发育产生不利影响, 甚至威胁到生命安全^[6]。在食品加工领域, 牛乳蛋白作为一种常见添加剂被广泛应用于各类食品中。而在食品的加工、储存和运输等各个环节都存在着牛乳蛋白污染的风险, 这使得牛乳过敏的人群更容易接触到牛乳过敏原, 从而对他们的身体健康和生活质量造成严重影响^[7]。

研究表明, 82%的过敏患者对牛乳中的 β -Lg 过敏^[8]。因此, β -Lg 被认为是牛乳乳清蛋白过敏的最主要因素^[9], 从而可以将 β -Lg 作为检测食品中是否含有牛乳蛋白的一种有效标志物^[10]。目前, 针对食物过敏尚未研发出特效疗法, 因此牛乳过敏患者必须严格避免摄入含有牛乳蛋白的食品^[11]。为了确保牛乳过敏原的正确标识和保护牛乳过敏者的安全, 开发一种灵敏、可靠且快速的 β -Lg 检测方法至关重要。目前, 已有多种技术被用于检测 β -Lg, 包括酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[12]、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)^[13]和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[14]等。这些方法虽然能实现对食品中危害物的高灵敏分析, 然而这些分析方法需要昂贵的设备、专业人员和大量样品处理, 因此非常耗时, 且依赖实验室环境, 因此不适合现场快速检测^[15-16]。

免疫层析试纸条检测法, 亦称为侧流免疫测定法, 是一种基于层析原理的免疫学检测方法^[17]。该技术具有易于施行、耗时短、成本效益高、无需依赖专业设备或技术人员操作等优点, 适用于现场快速检测^[18]。常见的试纸条主要有基于比色信号的胶体金免疫层析试纸条^[19-21]、纳米酶免疫层析试纸条^[22]以及基于荧光信号的荧光免疫层析试纸条^[23]。然而比色、荧光免疫层析试纸条存在一些明显的缺点, 如背景水平高、灵敏度不足和成本高昂等, 严重限制了其实用性^[24-25]。 β -Lg 光热免疫层析试纸条(photothermal immuno-chromatographic test strip, PITS)能够通过特定波长激光照射试纸上的 T 线区域, 并利用红外传

感器来监测由此引发的温度变化, 以此来实现对目标物的定量检测^[26], 因此 PITS 可以有效克服上述方法的缺点, 有望成为一种替代策略^[27]。但目前鲜少有此方面的研究。

本研究使用硫化钴-单宁酸纳米球(cobalt sulfide-tannic acid, CoS@TA)偶联 β -Lg 多克隆抗体作为免疫探针, 制备一种能够定量检测 β -Lg 的 PITS, 为大分子类物质的快速定量检测提供了指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

婴幼儿氨基酸奶粉(天津当地超市)。

醋酸钴、硫代乙酰胺、单宁酸(tannic acid, TA)(分析纯, 麦克林科技有限公司); 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 卵清蛋白(ovalbumins, OVA)(纯度 $\geq 90\%$)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)(纯度 $\geq 98\%$)、酪蛋白(casein, CN)(纯度 $\geq 98\%$)、 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α -La)(纯度 $\geq 85\%$)、 β -Lg(纯度 $\geq 90\%$)(美国 Sigma 公司); 山羊抗兔二抗(北京索莱宝生物科技有限公司); 硝酸纤维素膜(CN 140, 美国密理博有限公司); 聚氯乙烯板、样品垫、吸水垫(上海金标生物科技有限公司); β -Lg 单克隆抗体、 β -Lg 多克隆抗体(实验室自制)。

1.2 仪器与设备

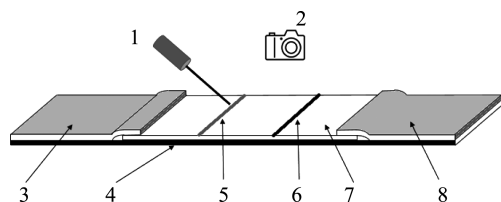
F48020-33CN 台式马弗炉(美国赛默飞世尔科技公司); RH basic 磁力搅拌器(德国艾卡仪器设备有限公司); HM3030 划膜喷金仪、ZQ2402 试纸条斩切机(上海金标生物科技有限公司); ghg-125d-100 真空干燥箱(江苏德菲瑞斯有限公司); 808 nm 近红外激光发射器(上海熙隆光电科技有限公司); FOTRIC 220s 红外热像仪(上海飞础科智慧科技有限公司); Agilent Cary 7000 紫外-可见吸收光谱(美国安捷伦公司); Jeol 2100 Plus 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(日本电子株式会社)。

1.3 方法

1.3.1 检测原理

检测原理如图 1 所示, 基于双抗体夹心法检测 β -Lg: 试纸条 T 线处为 β -Lg 单克隆抗体, C 线处为羊抗兔二抗, 将 β -Lg 标准品溶液与探针混合, 其中探针会与游离的 β -Lg 相结合形成复合物, 将溶液滴加在样品垫, 经毛细作用力作用, 液体沿着吸水垫方向逐渐层析, 当液体经过 T 线时, 其中的 β -Lg 会被 T 线上预包被的 β -Lg 单克隆抗体捕获从而形成夹心式结构, T 线颜色强度与 β -Lg 的浓度呈正相关, 随着液体的进一步层析, 多余的探针会被 C 线上

预包被的羊抗兔二抗捕获形成条带。通过肉眼观察实现对 β -Lg 的视觉半定量检测, 使用红外热成像仪获得光热信号实现对 β -Lg 的定量检测。



注: 1: 808 nm 近红外激光; 2: 红外热像仪; 3: 样品垫; 4: 聚氯乙烯底板; 5: 检测线; 6: 质控线; 7: 硝酸纤维素膜; 8: 吸水垫。

图1 PITS原理

Fig.1 Principle of PITS

1.3.2 CoS@TA 的合成与表征

首先通过溶剂热法合成硫化钴纳米球(cobalt sulfide nanospheres, CoS NPs)^[28]。将 177 mg 乙酸钴与 1051.9 mg 硫代乙酰胺在 50 mL 无水乙醇中混合, 溶液呈现为棕色, 并用磁力搅拌器剧烈搅拌 1 h。混合均匀后将溶液转移到 100 mL 聚四氟乙烯内衬高压釜中, 并在马弗炉中 150°C 下保持 3 h 形成黑色溶液, 将产物在 8500 r/min 下离心 15 min 并使用超纯水和无水乙醇交替洗涤 3 次。最后, 将产物在 60°C 的真空烘箱中干燥 12 h 得到黑色粉末状产物, 即 CoS NPs。采用 YIN 等^[29]的方法将 TA 整合在 CoS NPs 表面, 将 20 mg TA 溶于 10 mL 10 mmol/L 的 Tris 缓冲液中, 加入 10 mg 上述产物, 在 500 r/min 下磁力搅拌 5 h, 然后在 8500 r/min 下离心 15 min 并用超纯水洗涤 3 次, 最后将获得的 CoS@TA 分散于超纯水中备用。使用紫外-可见吸收光谱和 TEM 对其进行表征。

1.3.3 CoS@TA 的光热稳定性分析

为了评估材料的光热稳定性, 使用 808 nm 近红外激光对其进行连续的激光开/关周期性照射, 并使用红外热像仪记录温度变化。

1.3.4 CoS@TA 的光热转换效率分析

取一定浓度的 CoS@TA 溶液于玻璃比色皿中, 通过 808 nm 近红外激光照射溶液 10 min 后关闭激光, 使其自然冷却 10 min, 用红外热像仪记录整个过程的温度变化, 并绘制出温度随时间变化的曲线图。其中的光热转换效率(η)根据公式(1)求得:

$$\eta = \frac{hA(T_{\max} - T_{\text{sur}}) - hA(T_{\max, \text{water}} - T_{\text{sur, water}})}{I(1 - 10^{-A_i})} \times 100\% \quad (1)$$

其中, h 代表传热系数[W/(m²·K)], A 代表溶液的表面积(m²), A_i 代表待测溶液在 808 nm 处的吸光度值, $T_{\max}$ 和 T_{sur} 分别代表溶液最高温度(°C)和环境温度(°C), I 代表激光功率(W)。

1.3.5 光热免疫探针的制备

通过物理吸附的方式实现探针材料对抗体的偶联,

向 1 mL 的 CoS@TA 溶液中加入一定量的 β -Lg 多克隆抗体, 混合均匀后室温下孵育 1 h。将含有 20% BSA 和 10% 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)的封闭液加入到上述溶液中以封闭多余的结合位点, 混合均匀后室温下孵育 30 min。在 4°C 8500 r/min 下离心 10 min 用于去除多余的 BSA 和 PEG, 弃去上清液, 使用 200 μ L 的工作液将沉淀复溶, 4°C 下避光保存。

1.3.6 工作条件的优化

(1)最佳抗体标记量的确定

分别将 15.0、12.5、10.0、7.5、5.0、2.5 μ g 的 β -Lg 多克隆抗体添加到 1 mL 的 CoS@TA 溶液中制备光热免疫探针, 随后取一定量的探针分别与 80 μ L 一定浓度的 β -Lg 标准品溶液混合进行 PITS 实验, 通过观察 T 线的颜色强度, 选择 T 线颜色较深试纸条的抗体标记量为最佳标记量。

(2)最佳抗体包被浓度的确定

使用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) (0.01 mol/L, pH=7.4)将 β -Lg 单克隆抗体质量浓度分别稀释为 0.5、1.5、2、2.5、3.0、3.5 mg/mL, 使用划膜仪将其固定在硝酸纤维素膜上以组装试纸条, 将光热免疫探针分别与 80 μ L PBS 和 80 μ L 一定浓度的 β -Lg 标准品溶液混合进行免疫层析试纸条实验, 通过视觉观察选择阳性组 T 线颜色最深且阴性组没有非特异性吸附的单抗稀释倍数作为最佳包被浓度。

(3)其他工作条件的优化

对其他实验条件: 探针上样量、材料浓度、硝酸纤维素膜种类、缓冲液等进行优化。如对探针上样量的优化: 等分别设置探针上样量为 4、6、8、10、12 μ L 进行免疫层析实验, 根据试纸条显色结果选择 C、T 线显色较深且背景干扰小的探针上样量为最佳探针上样量。

1.3.7 光热免疫层析试纸条的检测限和灵敏度评价

根据优化得到的最佳工作条件进行 PITS 检测, 使用 PBS 将 β -Lg 标准品稀释成一系列浓度, 与一定量的光热免疫探针混合后滴加在样品垫上, 15 min 时通过肉眼观察 T 线, 当 T 线显示出明显的条带时所对应的标准品浓度定义为视觉检出限。在使用光热信号定量检测时, 待试纸条完全干燥后, 使用 808 nm 近红外激光照射 T 线处, 并使用红外热成像仪记录在不同浓度 β -Lg 下所对应的温度, 通过测量 808 nm 激光照射下 T 线的温度变化进行定量检测。光热模式下的检出限所对应的温度信号值定义如下: $\Delta T + 3SD$, 其中 ΔT 为阴性组试纸条与空白组试纸条的平均光热信号差值, SD 为其标准差^[30]。

1.3.8 光热免疫层析试纸条的特异性评价

选择 4 种蛋白进行 PITS 的特异性评价, 分别为 α -La、CN、BSA、OVA, 在 100 μ g/L 质量浓度下与光热免疫探针混合后进行 PITS 测定, 通过将光热信号值代入标准曲线

计算出检出值, 对该方法特异性进行评价。

1.3.9 样品的前处理

称取 2 g 婴幼儿氨基酸奶粉, 使用 20 mL 的 PBS 将其溶解, 然后在 4°C 10000 r/min 下离心 20 min 取上清去除脂肪和不溶性沉淀, 向上清中加入适量 2 mol/L 的盐酸将上清 pH 调至 4.6 并在室温下静置 1 h, 随后在 4°C 10000 r/min 下离心 15 min 取上清去除 CN, 在上清液通过滤膜后加入适量 1 mol/L 的氢氧化钠将 pH 调至 7.4, 样品溶液经过前处理后使用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 稀释一定倍数进行 PITS 检测。

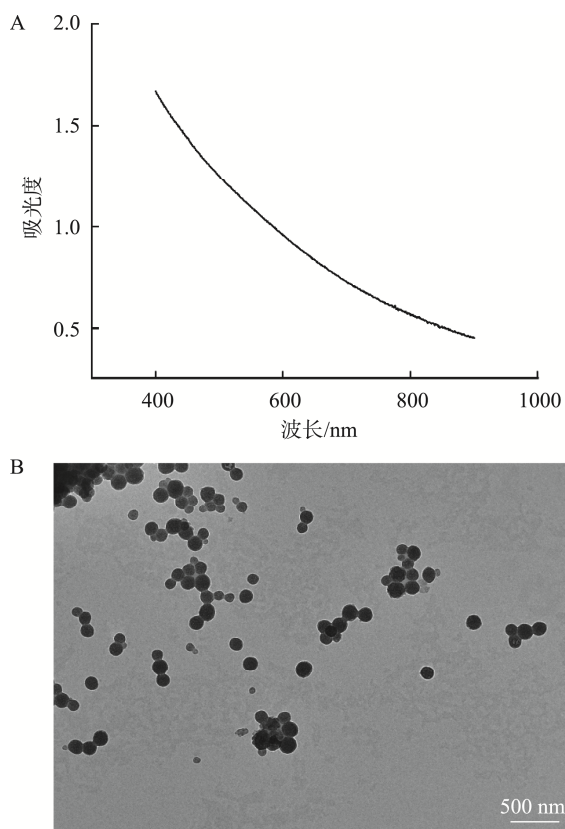
1.4 数据处理

使用 Origin 2019b 软件处理数据与绘图, 使用 Excel 2016 软件制作表格。

2 结果与分析

2.1 CoS@TA 的表征

如图 2A 可知, CoS@TA 在 400~900 nm 处具有广泛的吸收, 有利于材料对近红外光的吸收, 表明材料具有较好的光热转换潜力。如图 2B 所示, 使用 TEM 对 CoS@TA 的形貌进行了表征, 合成的材料为尺寸均匀的球状结构, 在 190 nm 左右。



注: A. CoS@TA 的紫外-可见吸收光谱图; B. CoS@TA 的透射电镜扫描图。

图2 CoS@TA 的表征

Fig.2 Characterization of CoS@TA

2.2 CoS@TA 光热稳定性的评价

如图 3 所示, 为了评估 CoS@TA 的光热稳定性, 进行了 4 次连续的开/关激光辐照循环, 每次循环使用激光辐照 600 s, 冷却 600 s, 在 4 次连续的开/关激光辐照循环中, 温度都出现可重复的升高, 表明 CoS@TA 具有良好的光热稳定性。

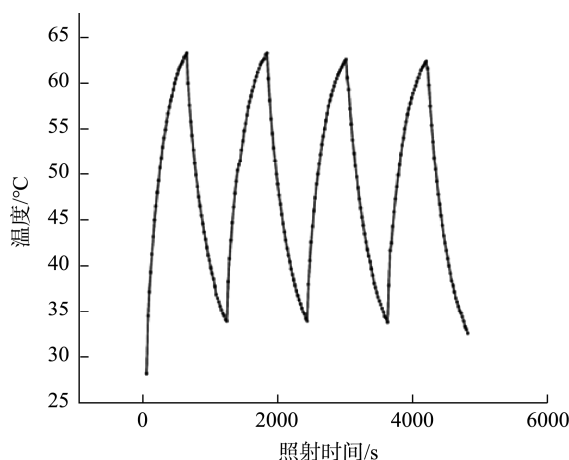


图3 对CoS@TA 4个连续的开/关激光照射循环

Fig.3 Four consecutive on/off laser irradiation cycles for CoS@TA

2.3 CoS@TA 光热转换效率的计算

通过式(1)计算出 CoS@TA 的光热转换效率(η)为 47.5%, 表明 CoS@TA 具有良好的光热转换效率, 可在后续实验中用作 PITS 检测的探针材料。

2.4 实验条件的优化

2.4.1 最佳抗体标记量的确定

如图 4 所示, 随着抗体标记量的增加, T 线颜色先呈现由浅到深的趋势, 当抗体标记量为 7.5 μg 时, T 线颜色达到最深, 随后又呈现出逐渐变浅的趋势, 推测其中的原因可能是抗体标记量过多时产生了空间位阻, 从而对夹心复合物(探针- β -Lg-捕获抗体)的形成产生了反作用, 因此选择 7.5 μg 为最佳抗体标记量。

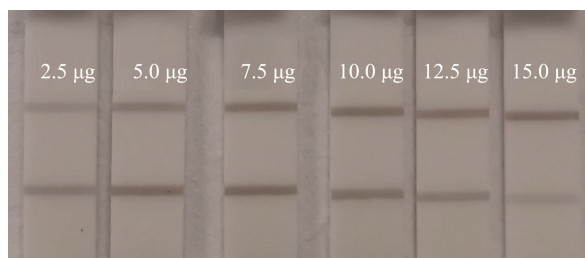


图4 抗体标记量的确定

Fig.4 Determination of the amount of antibody labeling

2.4.2 最佳抗体包被浓度的确定

根据实验室经验选择羊抗兔二抗包被质量浓度为 0.1 mg/mL。将 β -Lg 单克隆抗体作为捕获抗体固定在 T 线, 当抗体浓度过低时, 产生的信号强度不足, 但抗体质量浓度过大时, 一方面会产生浪费, 增大成本; 另一方面可能会使 T 线处产生非特异性吸附, 导致假阳性, 从而影响检测结果的准确度。如图 5 所示, 随着抗体包被浓度的增大, T 线颜色呈现逐渐变深的趋势, 当抗体包被质量浓度为 2.5 mg/mL 时, T 线颜色不再随着抗体包被量的增大而增大, 同时阴性组 T 线未出现非特异性吸附, 因此选择 2.5 mg/mL 为最佳抗体包被量。

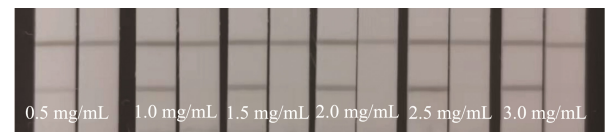


图5 抗体包被浓度的确定
Fig.5 Determination of antibody coating concentration

2.4.3 其他工作条件的优化

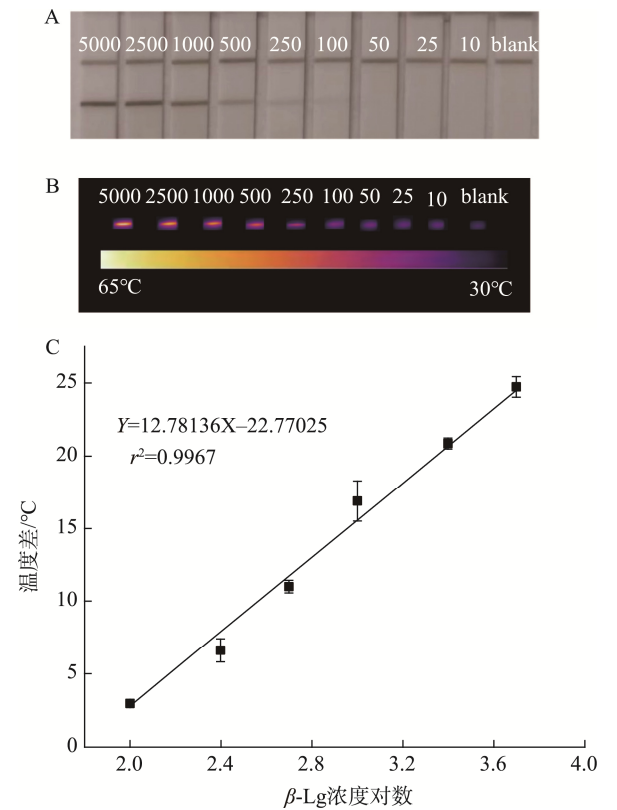
其他实验条件, 如材料浓度、硝酸纤维素膜类型、缓冲液、免疫探针和样品、缓冲液、免疫探针和样品孵育时间等对实验结果也有着重要影响。根据优化结果, 最终选择探针添加量为 10 μ L, 探针与样品孵育反应时间为 3 min, 激光照射功率为 2.5 W/cm², 硝酸纤维素膜型号为 CN 140, 优化结果见表 1。

表 1 工作条件的优化 Table 1 Optimization of working conditions	
实验条件	参数
探针材料质量浓度/(μ g/mL)	500
硝酸纤维素膜型号	CN 140
上样缓冲液	0.01 mol/L PBS, pH 7.4
上样液体积/ μ L	80
探针添加量/(μ L/strip)	10
探针与样品孵育反应时间/min	3
激光照射功率/(W/cm ²)	2.5
激光照射时间/s	40

2.5 PITS 检出限的确定

在最佳条件下评价了 PITS 的检出限和线性范围。分别采用视觉半定量和光热定量检测一系列质量浓度的 β -Lg 标准溶液(0、10、25、50、100、250、500、1000、2500、5000 μ g/L)。如图 6A 所示, 当样品中没有 β -Lg 时, T 线不显示任何颜色, 只有 C 线产生暗灰色条纹, 当 β -Lg 质量浓度增加到 250 μ g/L 时, T 线上出现较为明显的暗灰色条纹, 并且随着 β -Lg 浓度的增加, T 线上积累的探针材料

越来越多, T 线颜色越来越深。因此, 该方法的视觉检出限为 250 μ g/L。红外热像仪的检测结果如图 6B 所示, 随着 β -Lg 标准品浓度的逐渐增加, T 线处的温度逐渐升高, 图像由紫色逐渐变为亮黄色。



注: A. PITS视觉检测结果; B. PITS光热信号图; C. PITS的标准曲线。

图6 PITS的分析性能

Fig.6 Analytical performance of PITS

然后利用近红外激光和热成像仪测量光热信号。如图 6C 所示, 光热信号(ΔT)与 β -Lg 质量浓度在 100~5000 μ g/L 范围内呈良好的线性关系($r^2=0.997$)。将空白试纸条平均光热信号加上其 3 倍标准偏差代入标准曲线图计算出对应的光热模式检出限, 得到光热模式检出限为 26.44 μ g/L, 比视觉检出限高出 9.5 倍。这主要归功于探针良好的光热转换性能, 表明 PITS 在大分子物质的检测中具有很大的潜力。

2.6 光热免疫层析试纸条的特异性评价

通过其他 4 种蛋白在 PITS 中所产生的光热信号, 进一步评估了 PITS 的特异性。如表 2 所示, 当检测质量浓度为 100 μ g/L 的蛋白标准品溶液时, 通过光热信号计算出 β -Lg 的检出值为(100.30 $\pm$ 1.59) μ g/L, α -La 的检出值为(28.48 $\pm$ 4.66) μ g/L, 由于 α -La 和 β -Lg 同属于乳清蛋白, 具有一定的同源性, 因此本研究的 PITS 对 α -La 也有一定的识别作用, 但在检测相同浓度标准品得到的检出值明显低于 β -Lg。而其他 3 种蛋白在相同标准品浓度下均未检出, 这表明 β -Lg 与 CN、BSA、OVA 3 种蛋白之间不存在交叉反应。

表 2 不同蛋白的 PITS 特异性分析结果

Table 2 Results of PITS specificity analysis of different proteins

样品	(检出值±SD)/(μg/L)
β-Lg	100.3±1.59
α-La	28.48±4.66
CN	未检出
BSA	未检出
OVA	未检出

2.7 添加回收实验

为了评估本研究的 PITS 在实际样品分析中的有效性,

使用婴幼儿氨基酸奶粉作为实际样品进行分析, 并使用商用 ELISA 试剂盒确认样品中不含 β-Lg。样品预处理后, 在婴幼儿氨基酸奶粉样品中加入不同浓度的 β-Lg 标准品使其最终质量浓度为 0、200、800、1600 μg/L。如表 3 所示, β-Lg 的平均回收率在 97.7%至 108.2%之间, 变异系数不大于 10.85%。这表明所建立的 PITS 在检测乳制品中 β-Lg 方面展现出了广阔的应用前景。最后, 商用 ELISA 检测试剂盒的检测结果证明了本研究方法的有效性。相比于传统的 ELISA, 该检测法操作更加简单、所用试剂更少、设备更加便携、所需时间更短。同时, 该方法还支持通过视觉来进行半定量的检测分析。

表 3 PITS 和 ELISA 试剂盒添加回收测定结果(n=3)

Table 3 Results of PITS and ELISA kit addition recovery assays (n=3)

样品	标品添加浓度/(μg/L)	PITS			(ELISA 试剂盒)	
		(检测值±SD) /(μg/L)	回收率 /%	变异系数 /%	视觉检测	检测值±SD)/ (μg/L)
氨基酸奶粉	0	ND			-, -, -	ND
	200	195.33±21.19	97.7	10.85	-, -, -	196.42±6.13
	800	809.16±73.99	101.1	9.14	-, -, -	812.68±20.16
	1600	1731.41±178.32	108.2	10.30	+, +, +	1616.9±24.36

注: ND. 表示未检出, 目标物浓度低于 ELISA 商业试剂盒最低检出限; -. 表示视觉检测结果为阴性; +. 表示视觉检测结果为阳性。

3 结 论

本研究使用溶剂热法合成了 CoS NPs, 以此为基础将 TA 整合至其表面, 得到 CoS@TA, 通过物理吸附手段偶联 β-Lg 多克隆抗体, 制备了光热免疫探针。当使用视觉观察对 β-Lg 进行半定量检测时, 在 β-Lg 质量浓度为 250 μg/L 时试纸条 T 线处出现明显的灰色条带。在基于光热效应的定量检测中, β-Lg 的检出限为 26.44 μg/L, 与视觉检出限相比其灵敏度提高了 9.5 倍。此外, 所建立的检测方法还具有良好的特异性, 并通过添加回收实验验证了该方法在奶粉样品检测方面的有效性, 回收率在 97.7%~108.2%之间, 变异系数不大于 10.85%。实验结果表明 PITS 能够实现对 β-Lg 的高灵敏快速定量检测, 同时为针对其他大分子目标物的检测提供了方法依据。

参考文献

[1] YANG F, ZOU L, WU Y, *et al.* Structure and allergenicity assessments of bovine β-lactoglobulin treated by sonication-assisted irradiation [J]. J Dairy Sci, 2020, 103(5): 4109–4120.

[2] ZHAO QR, WANG YW, ZHU ZM, *et al.* Efficient reduction of β-lactoglobulin allergenicity in milk using *Clostridium tyrobutyricum* Z816 [J]. Food Sci Human Wellness, 2023, 12(3): 809–816.

[3] 贾敏, 张银志, 张亦凡, 等. 牛奶 β-乳球蛋白实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(6): 605–612.

JIA M, ZHANG YZ, ZHANG YF, *et al.* Establishment of a real-time

fluorescence quantitative PCR assay for milk β-lactoglobulin [J]. J Food Biotechnol, 2015, 34(6): 605–612.

[4] 张文华, 朱丽, 付尚辰, 等. 牛乳蛋白过敏原检测与改性及低致敏性乳制品研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2023, 46(2): 42–49.

ZHANG WH, ZHU L, FU SC, *et al.* Progress in the detection and modification of cow's milk protein allergens and hypoallergenic dairy products [J]. Dairy Sci Technol, 2023, 46(2): 42–49.

[5] 吴佰林, 尤亮亮, 贾晓玲, 等. 牛奶过敏原主要检测技术和消减方法研究进展[J]. 食品工业, 2021, 42(12): 406–410.

WU BL, YU LL, JIA XL, *et al.* Progress of major milk allergen detection techniques and reduction methods [J]. Food Ind, 2021, 42(12): 406–410.

[6] 党慧杰, 郑远荣, 刘振民, 等. 牛乳蛋白过敏及酶水解降低其致敏性的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(8): 29–33, 45.

DANG HJ, ZHENG YR, LIU ZM, *et al.* Progress of cow's milk protein allergy and enzymatic hydrolysis to reduce its sensitization [J]. China Dairy Ind, 2020, 48(8): 29–33, 45.

[7] 李雪, 涂宗财, 齐午城, 等. 超声波处理对 β-乳球蛋白结构和抗原性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 106–110.

LI X, TU ZC, QI WC, *et al.* Effect of ultrasonic treatment on the structure and antigenicity of β-lactoglobulin [J]. Food Ind Sci Technol, 2016, 37(18): 106–110.

[8] LI X, FEI SW, XIE XL, *et al.* Effects of divalent cations on the physical, conformational and immunological properties of bovine allergen β-lactoglobulin aggregates [J]. LWT, 2022, 154: 112557.

[9] SAXENA R, VANGA SK, RAGHAVAN V. Effect of thermal and microwave processing on secondary structure of bovine β-lactoglobulin: A molecular modeling study [J]. J Food Biochem, 2019, 43(7): e12898.

- [10] 燕燕, 董亚平, 龙彩云, 等. 牛乳过敏原 β -乳球蛋白核酸适配体在食品检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(18): 5831–5841.
YAN Y, DONG YP, LONG CY, *et al.* Application of milk allergen β -lactoglobulin nucleic acid aptamer in food testing [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(18): 5831–5841.
- [11] 何圣发, 陈红兵, 龙彩云, 等. 牛乳过敏原 β -乳球蛋白检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1763–1769.
HE SF, CHEN HB, LONG CY, *et al.* Research progress on the detection method of cow's milk allergen β -lactoglobulin [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(7): 1763–1769.
- [12] NEGRONI L, BERNARD H, CLEMENT G, *et al.* Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured β -lactoglobulin [J]. J Immunol Methods, 1998, 220(1): 25–37.
- [13] 孙国庆, 康小红, 刘卫星. 利用毛细管电泳法测定乳品中 β -乳球蛋白含量的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(5): 414–417.
SUN GQ, KANG XH, LIU WX. Determination of β -lactoglobulin in dairy products by capillary electrophoresis [J]. Chin J Food Hyg, 2010, 22(5): 414–417.
- [14] BOITZ LI, FIECHTER G, SEIFRIED RK, *et al.* A novel ultra-high performance liquid chromatography method for the rapid determination of β -lactoglobulin as heat load indicator in commercial milk samples [J]. J Chromatogr A, 2015, 1386: 98–102.
- [15] LEI XL, XU XX, WANG L, *et al.* A quadruplex immunochromatographic assay for the ultrasensitive detection of 11 anesthetics [J]. Nano Res, 2023, 16(8): 11269–11277.
- [16] XU XX, WU AH, GUO LL, *et al.* Gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for rapid detection of imazalil [J]. Nanoscale Horizons, 2024, 9(1): 123–131.
- [17] 淦露. 黄曲霉毒素检测技术研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(15): 114–117.
GAN L. Progress of aflatoxin detection technology [J]. Mod Food, 2022, 28(15): 114–117.
- [18] DI-NARDO F, BAGGIANI C, GIOVANNOLI C, *et al.* Multicolor immunochromatographic strip test based on gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B₁ and fumonisins [J]. Microchim Acta, 2017, 184: 1295–1304.
- [19] PAGE-FAULK W, MALCOLM TG. Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope [J]. Immunochemistry, 1971, 8(11): 1081–1083.
- [20] 况兆忠. 免疫胶体金技术在临床检验中的应用研究进展[J]. 医学信息, 2022, 35(10): 95–97.
KUANG ZZ. Progress in the application of immunocolloid gold technology in clinical testing [J]. Med Inf, 2022, 35(10): 95–97.
- [21] 曹德康, 苏建忠, 张瑛, 等. 胶体金免疫层析技术快速检测谷物中 3 种真菌毒素的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(3): 306–312.
CAO DK, SU JZ, ZHANG Y, *et al.* Rapid detection of three mycotoxins in cereals by colloidal gold immunochromatography [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 29(3): 306–312.
- [22] ZHOU L, LIU YF, LU Y, *et al.* Recent advances in the immunoassays based on nanozymes [J]. Biosensors, 2022, 12(12): 1119.
- [23] 周梦婕, 李小盼, 代荣阳, 等. 免疫层析试纸条检测技术的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(22): 3382–3386.
ZHOU MJ, LI XP, DAI RY, *et al.* Research progress of immunochromatographic test strip detection technology [J]. Lab Med Clin, 2019, 16(22): 3382–3386.
- [24] YIN XC, TIAN YL, CHEN YQ, *et al.* Accurate immunochromatography with colorimetric/photothermal dual-readout to detect nitrofurazone metabolites [J]. Sens Actuators B Chem, 2023, 380: 133323.
- [25] ZHANG C, WANG YQ, LIU ZL, *et al.* Nanobody-based immunochromatographic biosensor for colorimetric and photothermal dual-mode detection of foodborne pathogens [J]. Sens Actuators B Chem, 2022, 369: 132371.
- [26] WANG Y, WANG T, WANG ML, *et al.* Photothermal card reader assay using the commercial colloidal gold test strip for the rapid quantitative detection of food hazards [J]. Microchim Acta, 2022, 189(3): 112.
- [27] WANG Y, SU SP, DU SY, *et al.* Rapid detection for *Salmonella typhimurium* by conventional resistive temperature sensor based on photothermal effect of carboxylated graphene oxide [J]. Food Anal Methods, 2020, 13(9): 1755–1763.
- [28] GUAN GQ, WANG X, HUANG XJ, *et al.* Porous cobalt sulfide hollow nanospheres with tunable optical property for magnetic resonance imaging-guided photothermal therapy [J]. Nanoscale, 2018, 10(29): 14190–141200.
- [29] YIN XC, HOU JX, GUO J, *et al.* Nanocatalyst-triggered cascade immunoassay: Multi-model immunochromatography assay for sensitive detection of *Salmonella typhimurium* [J]. Chem Eng J, 2023, 469: 143979.
- [30] ZHANG G, HU H, DENG SL, *et al.* An integrated colorimetric and photothermal lateral flow immunoassay based on bimetallic Ag–Au urchin-like hollow structures for the sensitive detection of *E. coli* O157:H7 [J]. Biosens Bioelectron, 2023, 225: 115090.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



张丕显, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测技术。
E-mail: 18773687866@163.com



李诗洁, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。
E-mail: lsj930427@126.com



王 硕, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与营养。
E-mail: wangshuo@nankai.edu.cn