

黄曲霉毒素 B₁ 高灵敏定性定量免疫层析检测方法的建立

章 先¹, 王继璇¹, 程高钊², 李 可³, 张晓峰³, 孙孟娇⁴, 程昌勇², 宋厚辉²

(1. 浙江大学 医学院, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江农林大学 动物科技学院/动物医学院, 浙江 杭州 311300;

3. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 311202; 4. 浙江大学 动物科技学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 【目的】真菌毒素可污染农产品和动物源性食品, 其中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁) 毒性强、危害大, 建立 AFB₁ 快速、高灵敏和便捷的检测方法对于监测相关产品中 AFB₁ 污染水平, 保障人和动物健康均具有重要意义。基于侧向层析技术原理, 采用竞争模式, 优化建立免疫层析检测方法, 以实现 AFB₁ 的快速定性检测和定量分析。【方法】通过比较分析不同粒径金颗粒标记抗体效果, 优化确定免疫层析各组分材料类型、相关缓冲液配方及最佳使用质量浓度, 建立 AFB₁ 高灵敏定性定量免疫层析检测方法。【结果】优化建立的 AFB₁ 免疫层析检测法在实际样本中的定性和定量检测限分别为 2.5 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 灵敏度高、特异性强, 与其他常见真菌毒素无交叉反应, 加标回收实验结果显示: 该方法准确稳定, 且对 AFB₁ 天然污染样本的定量检测结果与商品化试剂盒及 LC-MS/MS 一致性较好。【结论】本研究制备的免疫层析检测法可用于样本中 AFB₁ 污染的快速定性检测与定量分析, 适合缺乏实验条件的基层检验检疫机构和农产品加工企业大量样本进行快速筛查, 样本检测结果疑似阳性再采用仪器法进行确认, 可降低检测成本, 提升检测效率, 同时为建立其他病原微生物免疫层析检测方法提供参考。图 9 表 2 参 26

关键词: 定性检测; 定量分析; 黄曲霉毒素 B₁; 免疫层析; 单克隆抗体

中图分类号: S859.84

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2022)05-1096-08

A highly sensitive qualitative and quantitative immunochromatographic method for the detection of aflatoxin B₁

ZHANG Xian¹, WANG Jixuan¹, CHENG Gaochuan², LI Ke³, ZHANG Xiaofeng³,

SUN Mengjiao⁴, CHENG Changyong², SONG Houhui²

(1. College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 2. College of Animal Science and

Technology/College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;

3. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 311202, Zhejiang, China;

4. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Fungal metabolites, commonly known as mycotoxins, can pollute agricultural products and food of animal origin, among which aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most common, toxic and detrimental. Establishing a rapid, highly sensitive and convenient detection method of AFB₁ is of great significance for the protection of human and animal health. The objective of this study is to optimize the immunochromatographic detection method based on the principle of lateral-flow chromatography and competitive mode, so as to realize the rapid qualitative detection and quantitative analysis of AFB₁. [Method] A highly sensitive qualitative and quantitative immunochromatographic detection method for AFB₁ was established by comparing and analyzing

收稿日期: 2021-11-29; 修回日期: 2022-03-31

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2021C02058); 国家自然科学基金资助项目 (32002358); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202010341040)

作者简介: 章先 (ORCID: 0000-0003-4903-3009), 讲师, 博士, 从事病原生物学研究。E-mail: zhangxian073@163.com。通信作者: 宋厚辉 (ORCID: 0000-0001-6530-5794), 教授, 博士, 从事病原生物学研究。E-mail: songhh@zafu.edu.cn

the labeling effects of gold particles of varying sizes, optimizing the material types of each component of immunochromatography, as well as relevant buffer solution and the optimal mass concentration. [Result] The qualitative and quantitative detection limits of the optimized AFB₁ immunochromatographic method in samples were 2.5 and 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively, with high sensitivity and specificity and no cross reaction with other common mycotoxins. Standard addition recovery experiment showed that the method was accurate and stable, and the quantitative detection results of AFB₁ natural contamination samples were in good agreement with commercial kit and LC-MS/MS. [Conclusion] The immunochromatographic detection method prepared in this study can be used for rapid qualitative detection and quantitative analysis of AFB₁ contamination in samples. It is suitable for grass-roots inspection and quarantine institutions and agricultural product processing enterprises that lack experimental conditions to quickly screen a large number of samples. If the sample test result is suspected to be positive, the instrument method can be used for confirmation, which can reduce the test cost, improve the test efficiency and provide reference for the establishment of immunochromatographic detection methods for other pathogenic microorganisms. [Ch, 9 fig. 2 tab. 26 ref.]

Key words: qualitative detection; quantitative analysis; aflatoxin B₁; immunochromatography; monoclonal antibody

黄曲霉毒素 (aflatoxins, AFs) 主要是由黄曲霉 *Aspergillus flavus* 和寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* 产生的有毒次级代谢物, 可通过污染食品和饲料进入食物链, 严重威胁动物和人类健康^[1]。目前, 国内外已发现超 20 种 AFs, 其中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁) 毒性最强, 危害最大, 已被国际癌症研究机构 (IARC) 列为 I 类致癌物^[2-4]。AFB₁ 具有强烈的“致突变、致癌和致畸作用”和免疫毒性, 过量摄入可破坏人和动物的肝脏组织, 引发急性中毒, 长期摄入则会引发各组织器官癌变^[5-6]。建立快速、高灵敏的 AFB₁ 检测方法对于保障食品安全具有重要意义。在 AFB₁ 检测手段中, 仪器法如高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法 (GC) 和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 等虽灵敏度高, 准确性和重现性较好, 但设备耗材昂贵且操作繁琐, 难以用于样本的初筛和在基层使用^[7-10]; 相比仪器分析法, 基于抗原抗体反应的免疫分析法因操作简单、灵敏度高且特异性好, 在真菌毒素检测领域应用较广, 特别是免疫层析法, 省时高效且无需借助复杂仪器, 尤其适合大量样本的现场筛查^[11-16]。本研究基于免疫层析技术原理, 采用金颗粒标记 AFB₁ 单克隆抗体, 在竞争反应模式下, 优化金颗粒尺寸、层析体系各组成材料及相关缓冲液配方, 最终建立 AFB₁ 高灵敏定性定量免疫层析检测法, 通过肉眼直接对检测结果定性判定, 或借助便携式信号读取设备实现定量分析, 以满足对 AFB₁ 污染情况快速筛查的检测需求。

1 材料与方法

1.1 材料

牛血清白蛋白 (BSA)、卵白蛋白 (OVA)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、羧甲基羟胺半盐酸盐 (CMO)、N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)、二甲基亚砜 (DMSO)、各真菌毒素标准品购自 Sigma 公司; AFB₁ 单克隆抗体 (Anti-AFB₁)、硝酸纤维素膜和玻璃纤维等免疫层析耗材购自奥唯生物; 黄曲霉毒素 B₁ 商品化检测试剂盒购自无锡景麒生物; 其他试剂购自上海国药; 谷物样本由浙江省检验检疫科学技术研究院提供。

1.2 AFB₁ 完全抗原的制备与鉴定

选取不同载体蛋白 (BSA 和 OVA) 制备 AFB₁ 完全抗原。步骤: AFB₁ 标准品 (2 mg) 溶解于甲醇-吡啶溶液 (体积比 1:1), 加入 5 mg CMO 震荡至完全溶解, 70 °C 下搅拌活化 2 h; 活化产物自然干燥后, 加入 1 mL 蒸馏水并使用氢氧化钠溶液 (1 mol·L⁻¹) 调 pH 至 8.0, 为去除体系中未反应的 AFB₁, 使用 5 mL 苯溶液抽提 3 次, pH 调至 3.0 (0.2 mol·L⁻¹ 盐酸), 产物经 5 mL 乙酸乙酯抽提 3 次后干燥得到 AFB₁ 脎化物 AFB₁O; 所得 AFB₁O 溶解于 2 mL 二甲基甲酰胺 (DMF), 分别加入 DCC (8.9 mg) 和 NHS (5.0 mg) 室温搅拌活化 4 h; BSA (14.0 mg) 或 OVA (9.3 mg) 溶解于 1 mL 碳酸氢钠溶液 (0.1 mol·L⁻¹, pH 9.5), 将上一步所得的 AFB₁O 活化产物缓慢滴加至载体蛋白溶液, 室温混匀反应 2 h; 反应结束后在磷

酸盐缓冲液 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 中 4°C 透析 72 h, 每 12 h 换液, 产物即为 AFB₁ 完全抗原, 经酶联免疫检测法 (ELISA) 鉴定后保存备用。

1.3 金颗粒的制备与鉴定

采用柠檬酸钠还原法分别制备不同粒径的金颗粒 (20 和 40 nm) 用于单克隆抗体的标记^[17]。具体步骤: 250 mL 三角烧瓶 (在浓硫酸-重铬酸钾溶液中浸泡并使用去离子水冲洗干净) 置于磁力搅拌加热器, 加入 100 mL 质量分数为 0.01% 氯金酸溶液加热至沸腾, 迅速加入 0.750 或 0.375 mL 质量分数为 2% 的柠檬酸钠溶液分别制备 20 和 40 nm 粒径的金颗粒, 搅拌加热至混合液颜色至酒红色, 调低功率继续加热 5 min, 室温自然冷却后即得到金颗粒溶液, 采用目测法和透射电镜扫描鉴定后备用。

1.4 金颗粒标记单克隆抗体的制备

金颗粒标记抗体最佳 pH 和抗体标记最佳结合质量浓度参考文献 [18]。金颗粒标记抗体步骤: 使用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCL 溶液 (pH 7.4) 稀释单克隆抗体 Anti-AFB₁ 至最佳结合质量浓度, 金颗粒溶液经 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钾调节至抗体标记最佳 pH; 取 50 mL 已调节 pH 的金颗粒溶液, 边搅拌边加入待标记抗体, 室温混匀 30 min; 反应结束后加入 BSA 溶液 (终质量分数为 1%), 混匀 30 min 后 4°C 2 000 g 离心 30 min, 弃沉淀; 上清 8 000 g 离心 30 min, 将所得沉淀重悬于 $10 \text{ mL } 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含质量分数为 1% BSA 的硼酸盐缓冲液 (pH 7.4), 8 000 g 离心 20 min 去除未结合的抗体, 重复 2 次; 所得沉淀溶解于 5 mL 硼酸盐缓冲液, 4°C 保存备用。

1.5 定性定量免疫层析检测法原理

定性定量免疫层析检测法如图 1 所示。检测线包被 AFB₁ 完全抗原, 质控线包被山羊抗鼠二抗, 金颗粒标记的 Anti-AFB₁ 固定于金标垫。滴加待检样品, 经层析作用后, 可通过肉眼观察检测线与质控线颜色差异进行定性判定或经便携式信号读取仪检测线信号值进行定量分析。

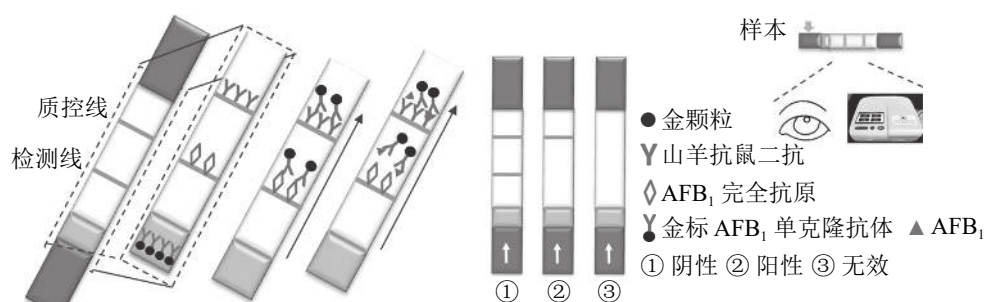


图 1 黄曲霉毒素 B₁ 定性定量免疫层析检测法示意图

Figure 1 Schematic diagram of the qualitative and quantitative immunochromatographic assay for the detection of aflatoxin B₁

1.6 定性定量免疫层析检测体系的优化

免疫层析法检测效果受多种参数影响, 如标记抗体所用金颗粒粒径、检测线包被抗原类型、层析各组分材料品种 (包括硝酸纤维素膜、金标抗体固定垫和样品垫) 和各组分材料前处理液的类型和浓度^[19-21]。优化策略: 采用不同粒径金颗粒标记单克隆抗体, 评价稳定性和敏感性, 选取最优; 对不同硝酸纤维素膜 (Millipore 135、Millipore 180、Pall 170 和 Sartorius CN 140)、金标抗体固定垫 (Ahlstrom 8964、Ahlstrom 6613、国产 GF06 和国产 GF08) 和样品垫 (国产 SB08 和 SB06) 层析效果进行比较; 以金标抗体稳定性和检测效果为标准, 优化金标抗体保存液、抗原包被液、金标抗体固定垫和样品垫前处理液的最佳配方与浓度; 确定样本萃取液稀释倍数, 在消除基质影响的同时, 获得最佳检测灵敏度。上述各参数优化均参考文献 [22] 进行。

1.7 定性定量免疫层析检测方法的建立

优化处理后的样品垫、金标固定垫、硝酸纤维素膜和吸水板按图 2 所示粘贴于 PVC 底板, 相邻部分依次重叠, 压实并切割成条 (宽 0.5 cm)。取 $100 \mu\text{L}$ 梯度质量浓度的 AFB₁ 标准液滴至加样孔, 15 min 后判定检测结果。

1.8 样本萃取与加标试验

样本萃取: 取待检样本 5 g 置于 250 mL 三角烧瓶, 分别加入 1 g 氯化钠和 25 mL 甲醇-水溶液 (体积

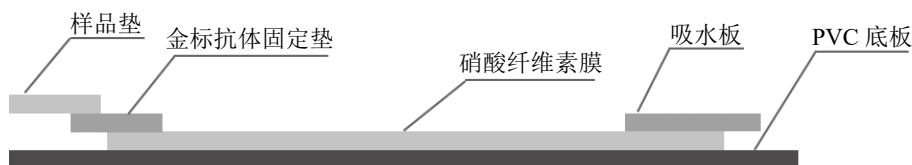


图 2 免疫层析体系各组分组成结构示意图

Figure 2 Sketch map of the immunochromatographic system

比 7:3), 剧烈震荡 15 min, 4 000 g 离心 5 min 后过滤, 所得萃取液经超纯水稀释后待检。样本加标: 阴性样本烘干后研磨过筛, 加入 AFB₁ 标准品溶液, 充分混匀后, 室温过夜放置后待检。

1.9 免疫层析检测法稳定性试验

采用 37 °C 加速试验判定稳定性^[18]。组装密封好的试纸条置于 37 °C 恒温箱, 不同天数 (7、15、30 d) 后取出, 对其检测灵敏度进行评价, 预测常温储存保存期。

1.10 免疫层析检测法与 LC-MS/MS 比较试验

采用免疫层析检测法、商品化检测试剂盒和 LC-MS/MS 平行检测天然 AFB₁ 阳性样本, 并对检测结果的一致性进行分析。

2 结果与分析

2.1 AFB₁ 完全抗原的鉴定

采用 AFB₁ 单克隆抗体对 AFB₁-BSA/OVA 进行 ELISA 鉴定, 结果如图 3 所示, 完全抗原组 $D(450)$ 与对照比值 (BSA/OVA) 远大于 2.1, 表明制备成功, 可用于免疫学方法的建立。

2.2 金颗粒的鉴定

制备的金颗粒溶液颜色澄清鲜艳, 40 nm 金颗粒溶液颜色较 20 nm 深, 无颗粒沉淀 (图 4A), 透射电镜扫描结果显示颗粒粒径与预期相符, 尺寸均匀 (图 4B), 可用于后续抗体的标记。

2.3 定性定量免疫层析检测法相关条件的确定

2.3.1 不同粒径金颗粒标记单克隆抗体效果评价 40 和 20 nm 金颗粒标记物层析效果相当, 但 4 °C 储存时前者性质更稳定, 可保存 4 周, 因此综合考虑灵敏度和稳定性, 后续试验将采用 40 nm 金颗粒进行单克隆抗体的标记。

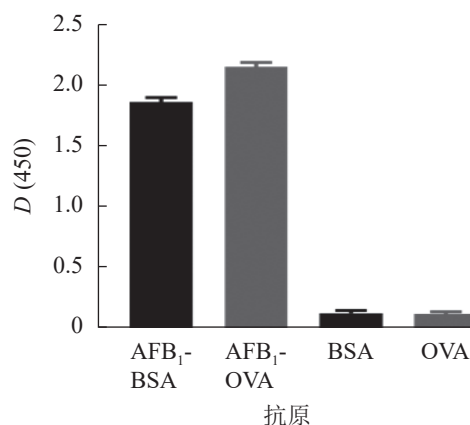
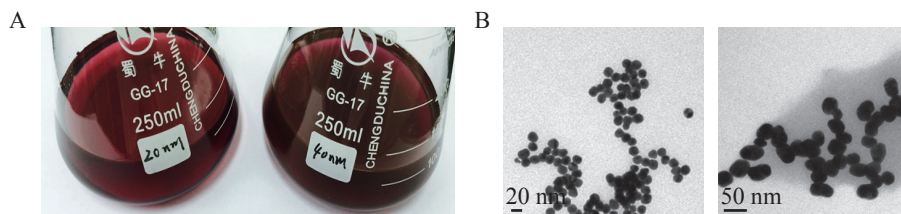
图 3 AFB₁ 完全抗原 AFB₁-BSA 和 AFB₁-OVA 的 ELISA 鉴定Figure 3 Absorbance of the AFB₁ conjugates by indirect ELISA using their specific monoclonal antibodies

图 4 目测法 (A) 和透射电镜 (B) 对金颗粒的鉴定

Figure 4 Colloidal solution of 20 nm and 40 nm diameter gold nanoparticles by visualization by naked eye (A) and images from TEM (B)

2.3.2 检测线包被抗原的选择 包被 AFB₁-BSA 时, 检测线显色清晰且灵敏度更好, 后续试验将采用 AFB₁-BSA 作为检测线包被抗原。

2.3.3 层析各组分材料种类和处理液的确定 层析组分材料会影响层析灵敏度、时间和稳定性。对各组分材料进行筛选, 硝酸纤维素膜的比较结果显示: Sartorius CN 140 相较于其他, 流动性更佳且检测线不易弥散, 层析 15 min 后即可判定结果, 背景值低, 为最优, 封闭液为含质量分数为 0.5% 吐温 20

(Tween-20)、1% 聚乙二醇 2000 (PEG 2000)、2%BSA 和 0.01% 叠氮钠 (NaN_3) 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, PBS); 金标抗体固定垫的比较结果显示: Ahlstrom 8964 上固定的金标抗体可在 15 min 内释放完全且无聚沉, 为最优, 处理液为含质量分数为 4% 蔗糖、1%BSA 和 0.25% 表面活性剂 TritonX-100 的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸盐缓冲液 (pH 7.4, BB); 样品垫的比较结果显示: 国产 SB08 对含甲醇、纤维素和蛋白质的样本承载能力和缓冲能力更强, 为最优, 前处理液种类与金标固定垫相同。

2.3.4 金标抗体储存稀释液以及抗原包被液的确定 对含不同质量浓度海藻糖、 NaN_3 和 OVA 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸盐缓冲液 (pH 7.4, BB) 在 4°C 条件下对金标抗体的储存和稀释效果进行比较, 结果显示: 在质量分数为 10% 海藻糖、1% BSA 的条件下, 金标抗体复溶效果较好且可稳定保存 30 d, 最终确定金标抗体存储稀释液为含质量分数为 10% 海藻糖、1%BSA 和 0.05% NaN_3 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸盐缓冲液 (pH 7.4, BB)。抗原包被液优化结果显示: 含体积分数为 3% 甲醇的 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸盐缓冲液 (pH 9.0, BB) 可使检测线颜色更加均匀和清晰。

2.3.5 金标抗体和包被抗原质量浓度的确定 为获得最佳的检测效果, 对完全抗原包被质量浓度和金标抗体的使用质量浓度进行优化, 最终确定 AFB₁-BSA 的包被质量浓度为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 倍稀释后的金标 AFB₁ 单克隆抗体喷涂量为 $20 \mu\text{L} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

2.4 定性定量免疫层析法的检测限与特异性

2.4.1 定性定量免疫层析检测法灵敏度的确定 如图 5 所示: 与对照相比, 随着 AFB₁ 质量浓度的升高, 检测线逐渐变浅直至消失, 肉眼条件下, 使检测线质量浓度发生明显变化的最低标准品质量浓度即为检测限, 因此, 本免疫层析法的检测限为 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。配制系列梯度质量浓度的 AFB₁ 标准品溶液进行检测, 层析结束后使用便携式信号读取仪分析检测线信号强度。以标准品质量浓度 (x) 为横坐标, 检测线信号强度抑制率 (y) 为纵坐标, 绘制标准抑制曲线, 进行线性回归分析 (图 6), 线性方程为 $y=0.6319x+1.1591$, $R^2=0.9843$, 定量区间为 $0.03\sim0.27 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测下限为 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



图 5 免疫层析法对黄曲霉毒素 B₁ 的定性检测限
Figure 5 Detection limits of immunochromatographic assay for aflatoxin B₁

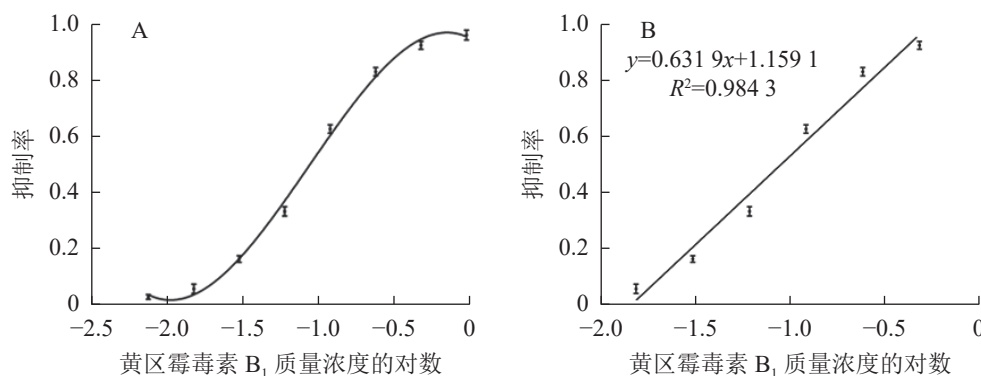


图 6 免疫层析法对黄曲霉毒素 B₁ 的抑制曲线 (A) 和定量标准曲线 (B)

Figure 6 Tri-parametric curve fitting of log concentration of aflatoxin B₁ vs inhibition rate by immunochromatographic assay (A) and the calibration curve for quantification of aflatoxin B₁ (B)

2.4.2 定性定量免疫层析检测法交叉反应性的确定 以谷物类样本中其他常见真菌毒素如赭曲霉毒素 A (OTA)、玉米赤霉烯酮 (ZEN)、伏马毒素 B₁ (FB₁) 和呕吐毒素 (DON) 作为竞争抗原, 进行特异性验

证, 结果如图 7 所示, 建立的免疫层析检测法对上述毒素均不存在交叉反应, 特异性较好, 质量浓度均为 5.00 μg·L⁻¹。

2.4.3 定性定量免疫层析检测法对加标样本的检测 如图 8 所示: 对玉米 *Zea mays* 样本进行加标试验, 当 AFB₁ 加标质量分数为 2.5 μg·kg⁻¹ 可使检测线变化明显, 说明该免疫层析检测法在实际样本中的定性检测限为 2.5 μg·kg⁻¹。

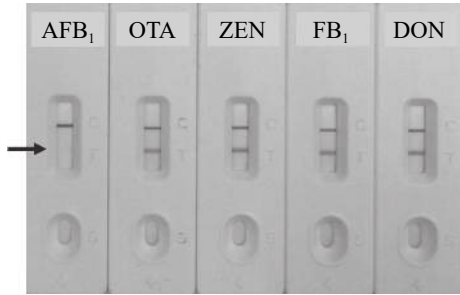


图 7 定性定量免疫层析法对其他真菌毒素的交叉反应性

Figure 7 Cross-reactivities of the qualitative and quantitative immunochromatographic assay for different mycotoxins

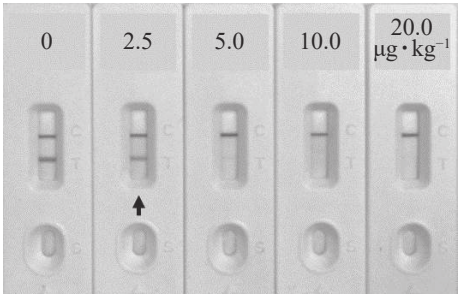


图 8 免疫层析法对黄曲霉毒素 B₁ 加标样本的定性检测

Figure 8 Qualitative detection of aflatoxin B₁ spiked samples by immunochromatography

当 AFB₁ 加标质量分数依次为 1.0、2.5、5.0 和 15.0 μg·kg⁻¹ 时, 如表 1 所示, 该免疫层析法在玉米样本中的加标回收率为 89.62%~110.43%, 批内变异系数为 4.51%~6.58%, 批间变异系数为 7.28%~9.72%, 说明该方法准确率较高且稳定性较好。

2.5 定性定量免疫层析检测法稳定性验证

37 ℃ 加速稳定性实验结果表明: 建立的免疫层析试纸条放置 30 d 后仍能对 AFB₁ 进行定性检测与定量分析, 灵敏度未受影响, 表明稳定性良好, 推测室温可稳定保存 1 a。

2.6 免疫层析检测法与 LC-MS/MS 结果的比对

如表 2 和图 9 所示: 免疫层析法检测结果与 LC-MS/MS 的相关性一致性较好 ($R^2=0.863\ 1$), 与商品化试剂盒的检测结果经 SPSS 软件分析, 同样显示显著相关 ($P<0.01$)。综上表明: 本研究建立的免疫层析检测法可适用于实际样本中 AFB₁ 的快速定量检测与分析。

表 1 免疫层析法对黄曲霉毒素 B₁ 加标样本的定量检测

Table 1 Quantitative detection of aflatoxin B₁ spiked samples by immunochromatography assay

AFB ₁ 加标质量 分数/(μg·kg ⁻¹)	批内		批间	
	回收 率/%	变异系 数/%	回收 率/%	变异系 数/%
1.0	89.62 ± 5.31	5.93	95.72 ± 8.03	8.39
2.5	96.47 ± 6.35	6.58	103.56 ± 7.54	7.28
5.0	95.16 ± 4.29	4.51	93.25 ± 9.06	9.72
10.0	110.43 ± 6.15	5.57	107.59 ± 8.56	7.96

说明: 数据为平均值±标准差, n=3

表 2 免疫层析法、商品化试剂盒和 LC/MS/MS 对天然样本中黄曲霉毒素 B₁ 的定量检测结果

Table 2 Quantitative detection of AFB₁ in natural samples by the developed immunochromatography assay, commercial ELISA kit and LC-MS/MS

样本编号	AFB ₁ /(μg·kg ⁻¹)			样本编号	AFB ₁ /(μg·kg ⁻¹)		
	免疫层析检测法	LC/MS/MS	商品化试剂		免疫层析检测法	LC/MS/MS	商品化试剂
1	5.11 ± 0.32	4.79 ± 0.29	5.65 ± 0.37	8	1.83 ± 0.14	2.15 ± 0.27	2.71 ± 0.19
2	3.17 ± 0.25	2.52 ± 0.16	2.08 ± 0.18	9	2.09 ± 0.17	2.86 ± 0.25	3.57 ± 0.26
3	1.06 ± 0.11	1.34 ± 0.14	2.33 ± 0.32	10	8.65 ± 0.35	7.21 ± 0.62	8.94 ± 0.19
4	6.63 ± 0.47	5.83 ± 0.43	5.36 ± 0.57	11	4.63 ± 0.29	5.93 ± 0.38	4.38 ± 0.23
5	2.69 ± 0.22	3.15 ± 0.29	2.25 ± 0.26	12	5.27 ± 0.41	6.07 ± 0.57	5.66 ± 0.35
6	1.82 ± 0.13	2.57 ± 0.15	3.35 ± 0.18	13	3.28 ± 0.37	2.19 ± 0.18	3.95 ± 0.31
7	7.16 ± 0.51	6.03 ± 0.31	7.82 ± 0.23				

说明: 数据为平均值±标准差

3 结论与讨论

常规免疫层析检测法采用胶体金颗粒作为抗体标记物,通过在检测线和质控线形成明显的颜色反应,因此金颗粒粒径对抗体标记效率和检测灵敏度影响较大。本研究中,40 nm 金颗粒标记 AFB₁ 单克隆抗体后,与 20 nm 相比,虽在检测灵敏度上无明显优势,但稳定性更佳,故确定为最终的抗体标记物。作为免疫层析系统的重要组成部分,不同类型硝酸纤维素膜、金标抗体固定垫和样品垫,会直接影响检测效果^[21]。本研究经对比,选用 Sartorius CN 140、聚酯膜 Ahlstrom 8964 和玻璃纤维 SB08 分别作为硝酸纤维素膜、金标抗体固定垫和样品垫使用。层析体系中各缓冲液的种类和质量浓度同样影响检测效果,如检测线或质控线信号强度和清晰度、金标抗体释放效率和稳定性以及样本在硝酸纤维素膜上的迁移速率等^[23-24],并且适量质量分数蔗糖/海藻糖、BSA、PEG 2000、NaN₃ 以及表面活性剂 TritonX-100 或 Tween-20 的加入有助于获得更好的检测效果和稳定性^[23-26]。本研究制备的 AFB₁ 免疫层析检测法在实际样本中的定性和定量检测限分别为 2.5 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,满足谷物及饲料中 AFB₁ 快速定性检测和定量分析需求。相比 ELISA,该定性定量免疫层析法更加简单快速且成本低,适用于大量样本的快速初筛,样本结果疑似阳性再选用仪器法进行确认分析,可大大提升检测效率。

4 参考文献

- [1] NIERMANS K, MEYER A M, HOEK-VAN DEN HIL E F, *et al.* A systematic literature review on the effects of mycotoxin exposure on insects and on mycotoxin accumulation and biotransformation [J]. *Mycotoxin Res*, 2021, **37**(4): 279 – 295.
- [2] LI Min, FINK-GREMMELS J, LI Dagang, *et al.* An overview of aflatoxin B₁ biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows [J]. *Anim Nutr*, 2021, **7**(1): 42 – 48.
- [3] UMACA S R, VIJAYALAKSHMI Y C, SEJIAN V. Exploration of plant products and phytochemicals against aflatoxin toxicity in broiler chicken production: present status [J]. *Toxicon*, 2021, **200**(3): 55 – 68.
- [4] 张杏,岳晓凤,丁小霞,等.中国西南花生产区黄曲霉菌分布、产毒力及花生黄曲霉毒素污染[J].中国油料作物学报, 2019, **41**(5): 773 – 780.
ZHANG Xing, YUE Xiaofeng, DING Xiaoxia, *et al.* Distribution and aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus* in peanut from the southwest China [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2019, **41**(5): 773 – 780.
- [5] FAN Tingting, XIE Yanli, MA Weibin. Research progress on the protection and detoxification of phytochemicals against aflatoxin B₁-Induced liver toxicity [J]. *Toxicon*, 2021, **195**(suppl 3): 58 – 68.
- [6] ENGIN A B, ENGIN A. DNA damage checkpoint response to aflatoxin B₁ [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, **65**: 90 – 96.
- [7] ZHANG Xian, WANG Zuohuan, XIE Hui, *et al.* Development of a magnetic nanoparticles-based screen-printed electrodes (MNPs-SPEs) biosensor for the quantification of ochratoxin A in cereal and feed samples [J/OL]. *Toxins*, 2018, **10**(8) [2021-11-20]. doi: 10.3390/toxins10080317.
- [8] CHAUHAN R, SINGH J, SACHDEV T, *et al.* Recent advances in mycotoxins detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, **81**: 532 – 545.
- [9] WANG Yuankai, YAN Yaxian, LI Shuqing, *et al.* Simultaneous quantitative determination of multiple mycotoxins in cereal and feedstuff samples by a suspension array immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, **61**(46): 10948 – 10953.
- [10] ZHANG Xian, SUN Mengjiao, KANG Yue, *et al.* Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin

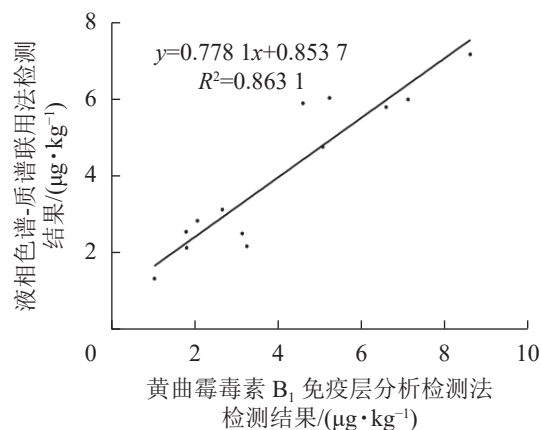


图9 免疫层析法与 LC-MS/MS 定量结果相关性分析

Figure 9 Correlation of results obtained by immunochromatography assay and LC-MS/MS for AFB₁ detection in natural samples

- A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Toxicon*, 2015, **106**: 89 – 96.
- [11] WANG Yuankai, YAN Yaxian, JI Wenhui, *et al.* Rapid simultaneous quantification of zearalenone and fumonisin B₁ in corn and wheat by lateral flow dual immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, **61**(21): 5031 – 5036.
- [12] 戴煌, 黄周梅, 李占明, 等. 免疫法在食品黄曲霉毒素检测中的应用[J]. 中国食品学报, 2021, **21**(10): 287 – 304.
- DAI Huang, HUANG Zhoumei, LI Zhanming, *et al.* Application of immunoassays in food aflatoxins detection [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, **21**(10): 287 – 304.
- [13] 王蕾, 张莉蕴, 王玉可, 等. 快速检测技术在食品真菌毒素检测中的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, **42**(4): 187 – 192.
- WANG Lei, ZHANG Liyun, WANG Yuke, *et al.* Research progress of rapid detection technology in the detection of mycotoxins in food [J]. *Food Res Dev*, 2021, **42**(4): 187 – 192.
- [14] ZHOU Jingming, YANG Qingbao, LIANG Chao, *et al.* Detection of ochratoxin A by quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, **413**(1): 183 – 192.
- [15] REN Wenjie, XU Yang, HUANG Zhibing, *et al.* Single-chain variable fragment antibody-based immunochromatographic strip for rapid detection of fumonisin B₁ in maize samples [J/OL]. *Food Chem*, 2020, **319**: 126546 [2021-11-20]. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126546.
- [16] WU Shiwei, YU Yao'an, LIU Binghui, *et al.* Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting citrinin in monascus fermented food [J/OL]. *Toxins*, 2018, **10**(9) [2021-11-20]. doi: 10.3390/toxins10090354.
- [17] ZHANG Daohong, LI Peiwu, YANG Yang, *et al.* A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B₁ [J]. *Talanta*, 2011, **85**(1): 736 – 742.
- [18] 章先, 付子贤, 周一钊, 等. 赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮-二联胶体金免疫层析试纸条的制备及应用[J]. 微生物学通报, 2019, **46**(5): 1235 – 1245.
- ZHANG Xian, FU Zixian, ZHOU Yizhao, *et al.* Dual flow immunochromatographic assay for simultaneous determination of ochratoxin A and zearalenone in cereal and feed samples [J]. *Microbiol China*, 2019, **46**(5): 1235 – 1245.
- [19] WANG Shuo, QUAN Ying, LEE Nanjun, *et al.* Rapid determination of fumonisin B₁ in food samples by enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, **54**(7): 2491 – 2495.
- [20] LATTANZIO V M T, NIVARLET N, LIPPOLIS V, *et al.* Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of *Fusarium* mycotoxins in cereals [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, **718**: 99 – 108.
- [21] WANG Yuankai, SHI Yibo, ZOU Qi, *et al.* Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B₁ in corn, wheat and feedstuff samples [J]. *Food Control*, 2013, **31**(1): 180 – 188.
- [22] ZHANG Xian, HE Ke, FANG Yun, *et al.* Dual flow immunochromatographic assay for rapid and simultaneous quantitative detection of ochratoxin A and zearalenone in corn, wheat, and feed samples [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, **19**(11): 871 – 883.
- [23] KOLOSOVA A Y, SAEGER S D, SIBANDA L, *et al.* Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, **389**(7/8): 2103 – 2107.
- [24] SHIM W B, DZANTIEV B B, EREMIN S A, *et al.* One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin a and zearalenone [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, **19**(1): 83 – 92.
- [25] KOLOSOVA A Y, SUBANDA L, DUMOULIN F, *et al.* Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, **616**(2): 235 – 244.
- [26] SHIM W B, KIM K Y, CHUNG D H. Development and validation of a gold nanoparticle immunochromatographic assay (ICG) for the detection of zearalenone [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, **57**(10): 4035 – 4041.