

基于纳米金和辣根过氧化物酶双标记抗体的黄曲霉毒素 B₁ 高灵敏检测方法的建立及应用

章先^{1,2,3,4} 方云⁵ 付子贤^{1,2,3} 周一钊^{1,2,3} 方维焕^{1,2,3,4} 宋厚辉^{1,2,3*}

①浙江农林大学动物科技学院 浙江 临安 311300

②中澳动物健康大数据分析联合实验室 浙江 临安 311300

③动物健康检测互联网技术浙江省工程实验室 浙江 临安 311300

④浙江大学动物科学学院 浙江 杭州 310058

⑤浙江省检验检疫科学技术研究院 浙江 杭州 310012

摘要: 黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 在自然界普遍存在, 可污染多种粮食作物和饲料, 给动物和人类健康造成严重威胁。为建立 AFB₁ 高灵敏度的快速检测方法, 本研究通过采用纳米金颗粒 (Au nanoparticles, AuNPs) 和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 双标记 AFB₁ 单克隆抗体, 建立新型酶联免疫检测方法 (HRP-AuNPs IC-ELISA), 检测下限 (IC₁₀) 为 0.017ng/mL, 检测区间 (IC₂₀-IC₈₀) 为 0.026-0.376ng/mL, 半数抑制率 (IC₅₀) 为 0.099ng/mL, 与黄曲霉毒素 B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 的交叉反应率分别为 2.7%、9.3%、2.1% 和 5.3%, 与赭曲霉毒素 A、伏马毒素 B₁、桔青霉素、展青霉素和玉米赤霉烯酮几乎不存在交叉反应。在玉米和面粉样本中的加标回收率可达 88.93-103.55%, 与 LC-MS/MS 同时对天然样本中 AFB₁ 含量进行检测, 结果表明, 两种方法相关性良好。本研究建立的 HRP-AuNPs IC-ELISA 耗时短且灵敏度高, 可用于实际样本中 AFB₁ 的快速定量检测与分析, 也为其他霉菌毒素的精准检测技术开发提供参考。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁, 纳米金颗粒, 辣根过氧化物酶, 单克隆抗体

An efficient method for aflatoxin B₁ detection based on gold nanoparticles labeled with monoclonal antibody-horseradish peroxidase complex

ZHANG Xian^{1,2,3,4} FANG Yun⁵ FU Zi-Xian^{1,2,3} ZHOU Yi-Zhao^{1,2,3} FANG Wei-Huan^{1,2,3,4}
SONG Hou-Hui^{1,2,3*}

①College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an, Zhejiang 311300, China

②China-Australian Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, Lin'an, Zhejiang 311300, China

基金项目: 浙江省自然科学基金(LQ17C170002); 浙江农林大学人才项目(2016FR025); 浙江省重点研发计划(2018C02041); 国家高新技术研究发展计划(863计划)(2012AA101602)

Supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ17C170002), Zhejiang A & F University Talent Initiative Project (2016FR025FR), Key Research and Development Project Funds of Zhejiang Provincial Science and Technology Department (2018C02041) and National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2012AA101602).

ORCID: ZHANG Xian (0000-0003-4903-3009); SONG Hou-Hui (0000-0001-6530-5794)

*Corresponding author. E-mail: songhh@zafu.edu.cn

Received: 2018-05-25, accepted: 2018-08-07

③ Zhejiang Provincial Engineering Laboratory for Animal Health Inspection and Internet Technology, Lin'an, Zhejiang 311300, China

④ College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

⑤ Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou, Zhejiang 310012, China

Abstract: Aflatoxin B₁ (AFB₁), a potent carcinogen, is one of the most toxic molecules occurring in natural world. Setting up a rapid and efficient method for detection of AFB₁ would help guarantee the food safety and promote export of agricultural products. A novel enzyme linked immunosorbent assay (HRP–AuNPs IC-ELISA) using double-codified gold nanoparticles (AuNPs) labels modified with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-AFB₁ was developed and applied in detection of AFB₁ in cereal samples. Concentrations of the reagents and the reaction times were optimized to improve the performances of this analytical method. For the HRP–AuNPs IC-ELISA, the limit of detection was 0.017ng/mL and the IC₅₀ was 0.099ng/mL. The linear working range was 0.026–0.376ng/mL. The cross-reactivities with the aflatoxin B₁ analogues (aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ and aflatoxin M₁) were 2.7%, 9.3%, 2.1% and 5.3%, respectively. No cross-reactivity (<0.01%) was observed with other mycotoxins (OTA, FB1, CIT, PAT and ZEN) which usually occur together in cereal samples. The recovery rates in spiked corn and wheat samples were 88.93%–103.55%, and the intra-day and inter-day relative standard deviations were both <10%. Parallel analysis of naturally contaminated cereal samples showed a good correlation between this novel HRP–AuNPs IC-ELISA and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. This method provides a rapid, accurate, and highly sensitive method to determine the levels of AFB₁ in food samples.

Key words: aflatoxin B₁, gold nanoparticles, horseradish peroxidase, monoclonal antibody

真菌毒素为真菌产生的有毒次生代谢产物,种类多,毒性强,危害严重 (Sorrenti *et al.* 2013)。全球范围内约 25%的谷物因受到真菌毒素污染而无法食用,其中黄曲霉毒素 (aflatoxins, AFs) 的毒性、致癌性及污染频率最为严重 (Zhao *et al.* 2017)。AFs 主要由黄曲霉 *Aspergillus flavus* 以及寄生曲霉 *A. parasiticus* 等产生 (Ardic *et al.* 2008),可长期稳定存在,在谷物中污染尤为严重。迄今发现的 20 余种黄曲霉毒素中,黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 毒性最强,为 I 类致癌物质 (Taghdisi *et al.* 2018)。我国对 AFB₁ 在豆类及发酵类食品中的限量为 5μg/kg (Yu *et al.* 2018),欧盟则规定 AFB₁ 在人类消费的谷物中含量不得超过 2μg/kg (Vargas *et al.* 2001)。由于我国黄曲霉毒素的检测标准低于欧美国家,玉米和花生多次因黄曲霉毒素超标而被拒绝出口 (Medina *et al.* 2014)。为维护食品安全以及保障出口贸易,建立针对黄曲霉毒素的快速、高灵敏度检测方法迫在眉睫。

近年来,黄曲霉毒素新型检测方法不断涌出,

如荧光偏振免疫测定法、量子点标记荧光免疫法和电化学传感器法等 (Sheng *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014; Wu *et al.* 2017)。综合来说,高效液相色谱 (HPLC) 应用最为广泛,但因检测仪器昂贵,前处理复杂耗时,而且对操作人员要求高而应用受限 (Zhang *et al.* 2015)。酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 由于具有快速、低成本等优势,逐渐得到更多关注。

纳米金 (AuPNs) 作为一种良好的生物相容性材料 (Elahi *et al.* 2018),其标记过程温和,可通过氯金酸还原法制备,快捷且成本低,颜色依直径大小而呈红色至紫色,在各种生物研究中广泛使用 (Rezaei *et al.* 2011; Bakir *et al.* 2018; Razo *et al.* 2018)。近年来,众多研究通过将纳米金作为固相载体用于提高检测灵敏度,如在癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 检测领域,相关学者利用纳米金修饰工作电极固定葡萄球菌 A 蛋白,成功制备出了免疫传感检测法 (Zhou *et al.* 2014); 利用纳米金同时固定鲁米诺和抗体,建立

的免疫学检测方法同样取得较好的检测效果 (Yang *et al.* 2010); 有研究则通过纳米金标记抗体增强检测信号, 实现了对 α -甲胎蛋白的高灵敏度检测 (Yang *et al.* 2009); 在真菌毒素检测领域, 有报道经纳米金固定生物素标记的辣根过氧化物酶, 进行信号增强, 建立了针对玉米赤霉烯酮的高灵敏度化学发光检测法 (Wang *et al.* 2013)。

辣根过氧化物酶 (HRP) 比活力高, 性质较为稳定 (Yang *et al.* 2018), 可将纳米金 (AuPNs) 作为载体, 固定多个辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗体, 达到类似多聚 HRP 的效果, 提高检测灵敏度。本研究正是利用这个原理, 设计了一种基于 AuPNs 和 HRP 双标记单克隆抗体的 AFB₁ 高灵敏度检测方法, 用于农产品中 AFB₁ 的快速定量检测, 满足我国及欧盟对 AFB₁ 的限量标准。

1 材料与方 法

1.1 材料和仪器

1.1.1 主要试剂: 不同真菌毒素标准品、牛血清白蛋白 (BSA)、柠檬酸钠和氯金酸购自 Sigma 公司; AFB₁ 单克隆抗体 (Anti-AFB₁)、偶联抗原 (AFB₁-BSA) 为本实验室前期制备; HRP 快速标记试剂盒购自湖州英创生物科技有限公司; 其他相关试剂购自于国药集团化学试剂有限公司; 谷物阴性和天然样本由浙江省检验检疫科学技术研究院提供。

1.1.2 主要仪器: SpectraMax M2 酶标仪购自美国 Molecular Device 公司, 微孔板快速振荡器 (QB-9001) 购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 高速离心机 (D-37520) 购自 Thermo 公司; 透射电镜 (JEOL-JEM1230) 为浙江大学农业与生命环境学部公共平台所有。

1.2 辣根过氧化物酶标记抗体的制备

辣根过氧化物酶标记抗体采用快速标记试剂盒制备。具体操作步骤如下: 将纯化后的 AFB₁ 单克隆抗体 (Anti-AFB₁) 稀释至 1mg/mL, 取 100 μ L 向其中加入 10 μ L 反应启动液, 再将上述混合液加至 100 μ g HRP (预先从 -20 $^{\circ}$ C 取出), 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 反应 2h; 加入 10 μ L 终止液, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h; 标记产物经 ELISA 鉴定后 -20 $^{\circ}$ C 分装保存备用。

1.3 胶体金颗粒的制备

100mL 0.01% 氯金酸溶液置于磁力搅拌加热器, 加热至沸腾, 迅速加入 2% 柠檬酸钠溶液 0.75mL, 以制备粒径为 20nm 的金颗粒, 持续加热至溶液颜色均匀稳定, 继续煮沸 5min, 室温自然冷却。采用目测法和透射电镜扫描进行鉴定。

1.4 纳米金标记 Anti-AFB₁-HRP 的制备

取制备的 20nm 胶体金溶液 50mL, 使用 0.2mol/L K₂CO₃ 溶液调节溶液 pH 至 8.0; 500 μ g Anti-AFB₁-HRP 溶于 5mL 硼酸盐缓冲液 (2mmol/L) 中, 并调节 pH 至 7.4, 缓慢加入胶体金溶液中, 室温搅拌反应 30min 后, 加入 5mL 10% 的牛血清白蛋白 (BSA) (溶解于 2mmol/L 硼酸盐缓冲液, pH 7.4), 室温磁力搅拌反应 30min; 标记产物 2 000 \times g 离心 20min 后去沉淀, 经 8 000 \times g 离心 30min, 弃上清; 收集红色沉淀, 用硼酸盐缓冲液 (2mmol/L, pH 7.4) 重悬沉淀物, 体积恢复至 10mL; 6 000 \times g 离心 30min 弃上清, 重复洗涤 3 次, 将所得红色沉淀重悬溶于 2.5mL PBS 缓冲液 (10mmol/L) 中; 标记产物置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 常规间接竞争 ELISA 检测 AFB₁ 方法的建立

检测原理见图 1。采用棋盘阵法确定最佳抗原包被及抗体作用浓度 (Zhang *et al.* 2015)。将浓

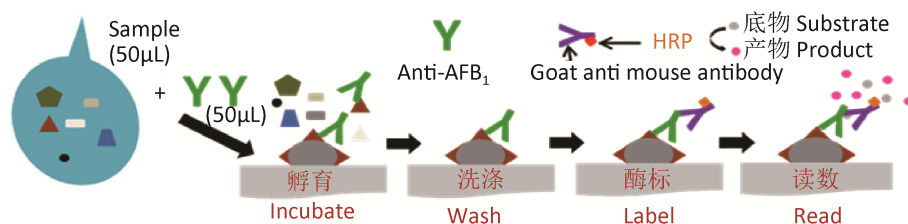


图 1 间接竞争 ELISA 检测黄曲霉毒素 B₁ 原理示意图

Fig. 1 Schematic presentation of indirect competitive ELISA for the detection of aflatoxin B₁.

度为 2mg/mL 的偶联抗原 AFB₁-BSA 稀释为 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625μg/mL 的浓度进行包被，每孔 100μL；单克隆抗体 Anti-AFB₁ (2mg/mL) 从 2μg/mL 依次倍比稀释至 0.0625μg/mL，辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠抗体 1:5 000 倍稀释后使用。选取最佳抗原包被和抗体使用浓度(OD₄₅₀ 接近 1.0 对应)，并通过间接竞争 ELISA 方法确定最佳竞争反应时间。

根据优化的最佳试验条件，AFB₁ 标准品浓度从 8ng/mL 依次倍比稀释到 0.0156ng/mL，同时设置标准品稀释液和含 0.05%脱脂奶粉的 PBST 等体积混合溶液作为阴性对照，抗体和标准品稀释液等体积混合溶液作为空白对照，每个浓度设置 3 个平行。以 AFB₁ 的浓度对数为横坐标、抑制率为纵坐标，构建间接竞争 ELISA 标准曲线，并求得曲线方程和相关系数。

1.6 基于纳米金和辣根过氧化物酶双标记的 AFB₁ 检测方法 (HRP-AuNPs IC-ELISA) 的建立

检测原理见图 2。包被抗原和双标记抗体的使用浓度优化同 1.5。抗原包被浓度设置同上，双标记抗体初始稀释倍数为 1:50，依次倍比稀释至 1:6 400 倍。选取最佳抗原包被和抗体使用浓度，并通过直接竞争 ELISA 方法确定最佳竞争反应时间。

根据优化的最佳试验条件，构建直接竞争 ELISA 标准曲线，并求得曲线方程和相关系数。

1.7 HRP-AuNPs IC-ELISA 检测法特异性分析

分别选择黄曲霉毒素 B₁ 类似物 B₂、G₁、G₂、M₁，赭曲霉毒素 A (OTA)，伏马毒素 (FB₁)、桔青霉素 (CIT)、展青霉毒素 (PAT) 和玉米赤霉烯酮

(ZEN) 作为竞争抗原，配制成不同浓度溶液，测量 IC₅₀ 值，按下式计算交叉反应率 (孙清等 2015)：

$$\text{交叉反应率}(\%) = (\text{AFB}_1 \text{ IC}_{50}) / (\text{类似物 IC}_{50}) \times 100\%$$

1.8 基质影响的消除

实际样本的检测过程涉及到萃取，萃取液中的有机溶剂 (如甲醇)、样本中的蛋白质、纤维素等均会对检测反应产生较大影响 (张宁等 2014)。本研究将萃取液经超纯水梯度稀释 (1:1, 1:3, 1:7) 后稀释 AFB₁ 标准品，绘制基质添加标准曲线，与已建立的标准曲线进行比较，分析基质的影响。

1.9 样本萃取与加标试验

将 5g 样本置于 250mL 三角烧瓶中，加入 25mL 萃取液 (甲醇:水=7:3, V/V) 和 1g NaCl，剧烈振荡 20min 后，4 000×g 离心 10min，取上清经玻璃纤维滤纸过滤，超纯水稀释后进行检测。将经 LC-MS/MS 检测过的 AFB₁ 阴性样本 (浙江省检验科学技术研究院提供) 烘干后，研磨过筛，加入 AFB₁ 标准品溶液，充分混匀后，室温放置过夜待检。

1.10 HRP-AuNPs IC-ELISA 与 LC-MS/MS 比较试验

对天然样本 (包括玉米、小麦和饲料) 同时采用 HRP-AuNPs IC-ELISA 和 LC-MS/MS 平行检测。

2 结果与分析

2.1 辣根过氧化物酶标记抗体的鉴定

包被偶联抗原 AFB₁-BSA，ELISA 鉴定辣根过氧化物酶标记抗体的效果。结果显示，标记产物的 OD₄₅₀ 与对照的比值远大于 2.1 (图 3)，显示标记成功。

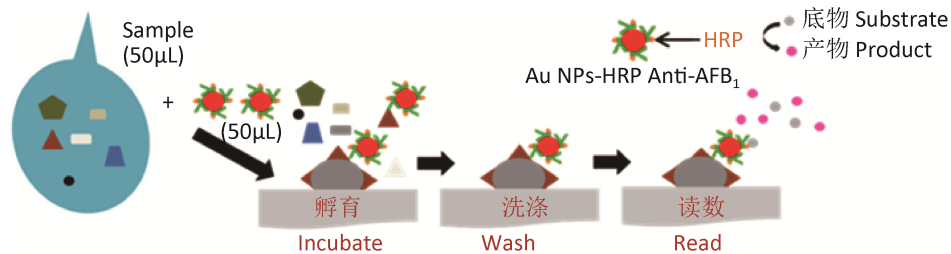


图 2 双标记抗体间接竞争 ELISA 检测黄曲霉毒素 B₁ 原理示意图

Fig. 2 Schematic presentation of HRP-AuNPs IC-ELISA for the detection of aflatoxin B₁.

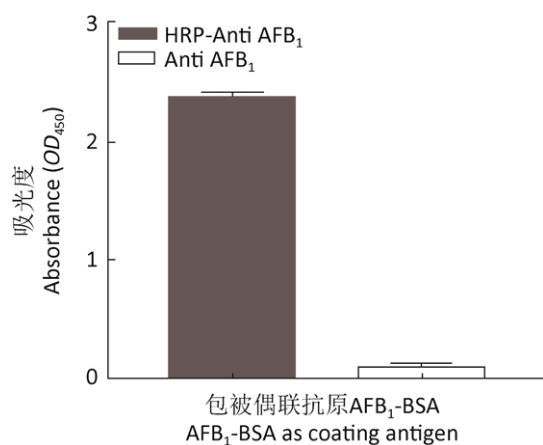


图 3 辣根过氧化物酶标记产物的 ELISA 鉴定

Fig. 3 Identification of the horseradish peroxidase labelled product.

2.2 胶体金溶液的鉴定

采取目测和透射电镜法对制备的胶体金溶液进行鉴定。结果显示，胶体金溶液外观澄清，色泽鲜艳，无颗粒物沉淀，在日光灯下透光检测，透射电镜扫描结果可见粒径均匀（图 4），大小与预期相符。

2.3 常规间接竞争 ELISA 检测 AFB₁ 方法的建立

按照 1.5 中所述，确定了间接竞争 ELISA 的反应条件：抗原最佳包被浓度为 0.5 μ g/mL，单克隆抗体最佳作用浓度为 0.5 μ g/mL（4 000 倍稀释）；竞争反应 45min，二抗孵育 45min。

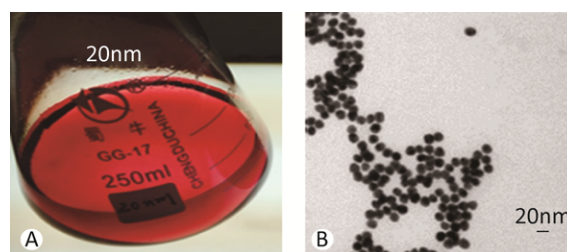


图 4 目测法 (A) 和透射电镜 (B) 对纳米金颗粒的鉴定
Fig. 4 Au nanoparticles as observed by naked eyes (A) and TEM (B).

以竞争抗原 AFB₁ 标准品的浓度对数为横坐标，以抑制率为纵坐标，通过 GraphPad Prism 7 软件绘制抑制曲线（图 5），线性方程为 $y=0.7524x+0.7913$ ($R^2=0.9825$)，线性范围为 0.164–1.027ng/mL，检测下限为 0.121ng/mL，半数抑制率 (IC_{50}) 为 0.410ng/mL。

2.4 纳米金和辣根过氧化物酶双标记 HRP-AuNPs IC-ELISA 检测 AFB₁ 方法的建立

按照 1.6 中所述，确定了间接竞争 ELISA 的反应条件：抗原最佳包被浓度为 2 μ g/mL，双标记单克隆抗体 (AuNPs-HRP Anti-AFB₁) 最佳稀释倍数为 1:100，竞争时间为 45min。

以竞争抗原 AFB₁ 标准品的浓度对数为横坐标，以抑制率为纵坐标，通过 GraphPad Prism 7 软件绘制抑制曲线（图 6），线性方程为 $y=0.5207x+1.021$

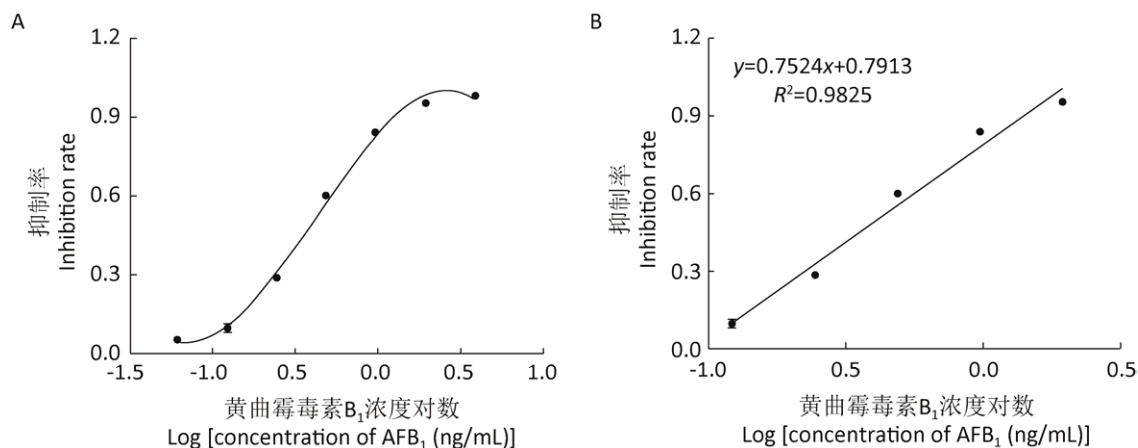


图 5 间接竞争 ELISA 检测 AFB₁ 竞争抑制曲线 (A) 和抑制率线性分析 (B)

Fig. 5 Competitive inhibition of AFB₁ in IC-ELISA (A) and linear analysis of percent inhibition against AFB₁ concentration (B).

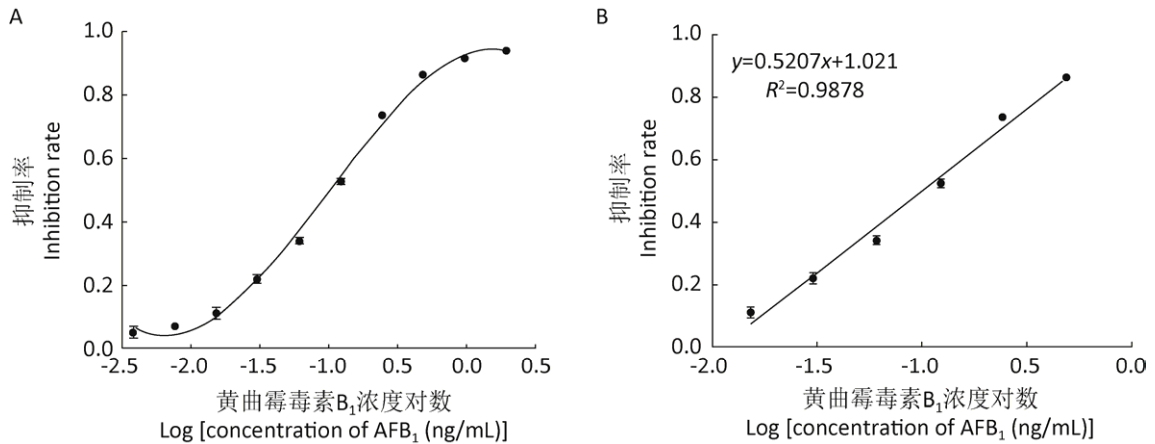


图 6 基于双标记抗体的 AFB₁ 检测方法竞争抑制曲线 (A) 和抑制率线性分析 (B)

Fig. 6 Competitive inhibition of AFB₁ in HRP-AuNPs IC-ELISA (A) and linear analysis of percent inhibition against AFB₁ concentration (B).

($R^2=0.9878$), 线性范围为 0.026–0.376ng/mL, 检测下限为 0.017ng/mL, 半数抑制率(IC_{50})为 0.099ng/mL。

综上所述, 相比常规 IC-ELISA, HRP-AuNPs IC-ELISA 检测更灵敏 (0.017ng/mL vs 0.121ng/mL) 且耗时更短 (45min vs 90min)。

2.5 HRP-AuNPs IC-ELISA 检测 AFB₁ 特异性分析

对本方法特异性分析结果表明, 建立的 HRP-AuNPs IC-ELISA 对 AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 AFM₁ 的交叉反应率分别为 2.7%、9.3%、2.1%和 5.3%,

对其他农产品中常见真菌毒素 OTA、FB₁、CIT、PAT 和 ZEN 均无交叉反应, 特异性高。

2.6 基质效应的消除

HRP-AuNPs IC-ELISA 基质效应分析结果(图 7)表明玉米和面粉提取液, 经超纯水 1:3 倍稀释后所得的基质添加标准曲线与标准抑制曲线 (PBS 稀释) 基本相同, 此时基质对检测结果基本不造成影响, 故后续检测时, 样本提取液需经 1:3 倍稀释, 以消除基质效应。

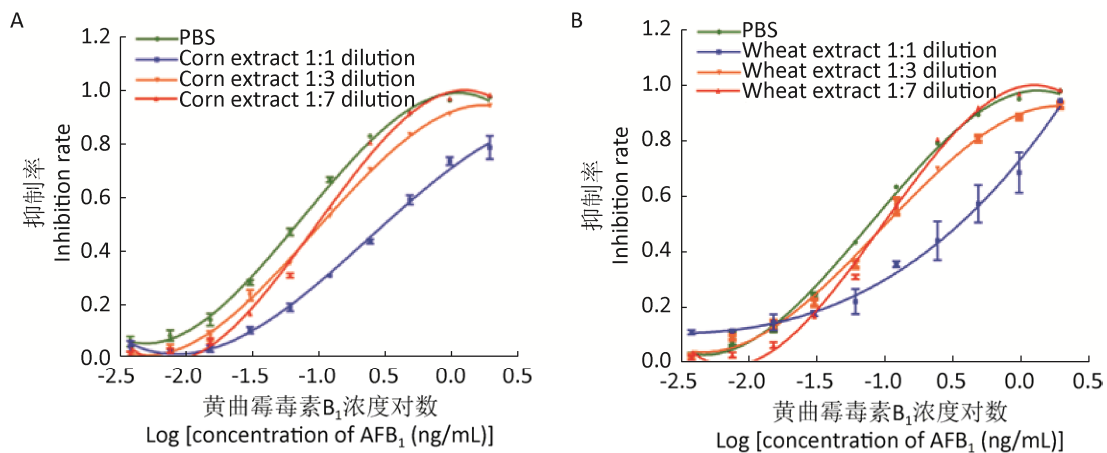


图 7 玉米 (A) 和面粉 (B) 提取液基质影响消除试验

Fig. 7 Matrix interferences of extract from corn (A) and wheat (B) spiked with aflatoxin B₁ and diluted in different ratios with phosphate buffered saline as measured by HRP-AuNPs IC-ELISA.

2.7 加标回收试验

按照 1.9 中所述的方法进行加标试验, 使得 AFB₁ 含量依次为 1、1.25、2.5 和 5 μg/kg, 萃取并稀释后, 采用自建 HRP-AuNPs IC-ELISA 进行检测, 每份样品 3 个平行, 并重复 3 次, 计算回收率和相关参数。结果表明, 该方法在玉米中的加标回收率在 87.48%–99.21% 之间, 批内、批间变异系数分别为 2.74%–3.98% 和 5.61%–9.71% (表 1); 在面粉中的加标回收率在 88.93%–103.55% 之间, 批内、批间变异系数分别为 3.58%–5.16% 和 4.89%–8.13% (表 2), 均符合我国和欧盟规定的 AFB₁ 限量标准。

2.8 HRP-AuNPs IC-ELISA 与 LC-MS/MS 相关性分析

运用 HRP-AuNPs IC-ELISA 和 LC-MS/MS 法, 对 56 份天然样本中 AFB₁ 进行平行测定, 其中阳性样本的定量结果见表 3, 并经线性回归分析 (图 8), 线性回归方程为: LC-MS/MS=1.2899 HRP-AuNPs

IC-ELISA-0.4142 ($R^2=0.7477$), 表明该方法与 LC-MS/MS 相关性良好, 可满足实际样本中 AFB₁ 的检测需求。

3 讨论

真菌毒素污染在全世界范围内广泛存在, 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 作为目前已知毒性最强的化学物质之一, 备受关注。目前, 黄曲霉毒素的检测方法众多, 其中仪器法如高效液相色谱法应用最为广泛, 但前处理复杂且耗时, 需要特殊的高效液相色谱仪, 检测成本昂贵, 因此, 该方法不适于基层检验检疫机构和针对大规模的样本快速筛查。酶联免疫检测法具有快速、低成本的优势, 在真菌毒素检测领域备受青睐。本研究通过纳米金和辣根过氧化物酶双标记抗体建立的 AFB₁ 检测方法, 具备高灵敏度、快速、准确和低成本的特点, 为食品安全分析和我国农产品对外贸易提供了有效保障。

表 1 玉米中的加标回收率和批内批间变异系数

Table 1 Recovery and coefficient of variances of corn samples spiked with different levels of aflatoxin B₁ by HRP-AuNPs IC-ELISA

AFB ₁ 加标浓度 Spiked concentration (μg/kg)	批内 Intra-assay (n=3)		批间 Inter-assay (n=3)	
	回收率	变异系数	回收率	变异系数
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
1	91.84±3.66	3.98	98.19±7.39	7.49
1.25	87.48±3.32	3.81	98.13±9.52	9.71
2.5	94.82±2.18	2.29	96.88±6.49	6.69
5	99.21±2.72	2.74	93.73±5.26	5.61

表 2 面粉中的加标回收率和批内批间变异系数

Table 2 Recovery and coefficient of variances of wheat samples spiked with different levels of aflatoxin B₁ by HRP-AuNPs IC-ELISA

AFB ₁ 加标浓度 Spiked concentration (μg/kg)	批内 Intra-assay (n=3)		批间 Inter-assay (n=3)	
	回收率	变异系数	回收率	变异系数
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
1	103.55±4.17	4.03	99.05±8.05	8.13
1.25	98.78±4.49	4.54	101.41±7.31	7.21
2.5	91.39±3.28	3.58	95.61±4.67	4.89
5	88.93±4.59	5.16	93.73±5.26	5.60

表 3 自建 HRP-AuNPs IC-ELISA 和 LC-MS/MS 对天然样本中 AFB₁ 的定量检测结果

Table 3 Quantitative detection of AFB₁ in natural samples by the developed HRP-AuNPs IC-ELISA and LC-MS/MS (mean±SD)

样本编号	AuNPs 和 HRP 双标记 IC-ELISA	液相二级质谱
Sample No.	HRP-AuNPs IC-ELISA (μg/kg)	LC-MS/MS (μg/kg)
1	1.22±0.24	0.88±0.01
2	0.93±0.09	0.56±0.02
3	2.13±0.26	2.77±0.13
4	1.21±0.09	0.85±0.03
5	1.26±0.11	1.62±0.15
6	1.37±0.17	1.06±0.11
7	0.89±0.08	0.54±0.02
8	0.85±0.05	1.07±0.14
9	0.91±0.06	1.10±0.05
10	1.01±0.08	0.90±0.03
11	1.99±0.23	1.82±0.13

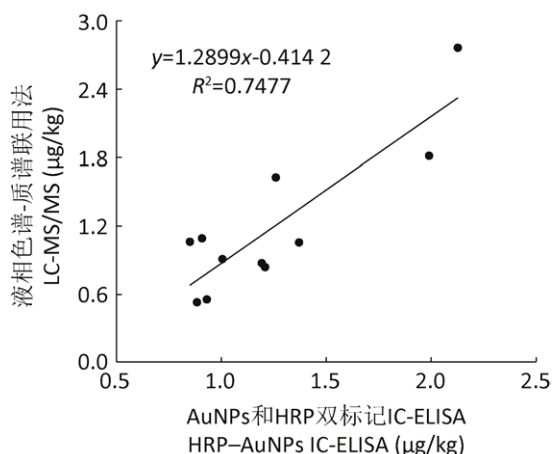


图 8 HRP-AuNPs IC-ELISA 与 LC-MS/MS 检测结果的相关性分析

Fig. 8 Correlation of results obtained by HRP-AuNPs IC-ELISA and LC-MS/MS for aflatoxin B₁ detection in natural samples.

常规间接竞争 ELISA 法在包被抗原与待检物质竞争结合抗体反应结束后,需加入酶标抗体进行信号增强,检测时间较长。在本研究中,基于该模式的 AFB₁ 检测法检测下限为 0.12ng/mL,实际样品检出限为 2.4μg/kg;而基于纳米金和辣根过氧化物酶双标记的 HRP-AuNPs IC-ELISA,将纳米金作为载体,

多个 Anti AFB₁-HRP 与一个纳米金颗粒结合,形成类似多聚 HRP 复合物,在竞争过程中,复合物 AuNPs-HRP Anti-AFB₁ 上的任一酶标抗体与包被抗原结合,固定于复合物上的所有 HRP 均会参与到后续显色反应中,使得检测信号大幅增强,且只需一步反应,相比常规间接竞争 ELISA,检测时间减半的同时,其灵敏度得到提升,检测下限达到 0.017ng/mL,实际样品的检出限为 0.34μg/kg。在玉米和面粉中的加标回收率在 88.93%~103.55%之间,与 LC-MS/MS 有较好的相关性,能够用于实际样品中 AFB₁ 的快速定量检测与分析,可满足我国及欧盟对农产品中 AFB₁ 的残留限量标准。

本研究基于纳米金和辣根过氧化物酶双标记检测 AFB₁ 的 HRP-AuNPs IC-ELISA 方法,具有成本低、快速和灵敏度高的特点,适于在基层单位推广使用,同时也为其他真菌毒素或其他小分子物质的快速高灵敏定量检测提供参考。

[REFERENCES]

- Ardic M, Karakaya Y, Atasever M, Durmaz H, 2008. Determination of aflatoxin b(1) levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with elisa. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5): 1596-1599
- Bakir E, Gouda M, Alnajjar A, Boraie WE, 2018. Spectrofluorimetric method for atenolol determination based on gold nanoparticles. *Acta Pharmaceutica*, 68(2): 243-250
- Elahi N, Kamali M, Baghersad MH, 2018. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review. *Talanta*, 184: 537-556
- Medina A, Rodriguez A, Magan N, 2014. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin b1 production. *Frontiers in Microbiology*, 5: 348
- Razo SC, Panferov VG, Safenkova IV, Varitsev YA, Zherdev AV, Dzantiev BB, 2018. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus x based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 1007: 50-60
- Rezaei B, Majidi N, Rahmani H, Khayamian T, 2011. Electrochemical impedimetric immunosensor for insulin

- like growth factor-1 using specific monoclonal antibody-nanogold modified electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(5): 2130-2134
- Sheng YJ, Eremin S, Mi TJ, Zhang SX, Shen JZ, Wang ZH, 2014. The development of a fluorescence polarization immunoassay for aflatoxin detection. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27(2): 126-129
- Sorrenti V, Di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Bognanno M, Galvano F, 2013. Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: a review. *Toxins (Basel)*, 5(10): 1742-1766
- Sun Q, Li GF, Deng QM, Liu JM, Shi GQ, 2015. Development and application of a highly sensitive ELISA kit for aflatoxin B₁. *Environmental Chemistry*, 34(10): 1845-1853 (in Chinese)
- Taghdisi SM, Danesh NM, Ramezani M, Abnous K, 2018. A new amplified fluorescent aptasensor based on hairpin structure of g-quadruplex oligonucleotide-aptamer chimera and silica nanoparticles for sensitive detection of aflatoxin b1 in the grape juice. *Food Chemistry*, 268: 342-346
- Vargas EA, Preis RA, Castro L, Silva CM, 2001. Co-occurrence of aflatoxins b1, b2, g1, g2, zearalenone and fumonisin b1 in brazilian corn. *Food Additives and Contaminants*, 18(11): 981-986
- Wang YK, Yan YX, Ji WH, Wang HA, Zou Q, Sun JH, 2013. Novel chemiluminescence immunoassay for the determination of zearalenone in food samples using gold nanoparticles labeled with streptavidin-horseradish peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18): 4250-4256
- Wu L, Ding F, Yin W, Ma J, Wang B, Nie A, Han H, 2017. From electrochemistry to electroluminescence: development and application in a ratiometric aptasensor for aflatoxin b1. *Analytical Chemistry*, 89(14): 7578-7585
- Yang L, Shi Y, Li J, Fang L, Luan T, 2018. Transformation of aqueous sulfonamides under horseradish peroxidase and characterization of sulfur dioxide extrusion products from sulfadiazine. *Chemosphere*, 200: 164-172
- Yang X, Guo Y, Wang A, 2010. Luminol/antibody labeled gold nanoparticles for chemiluminescence immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Analytica Chimica Acta*, 666(1-2): 91-96
- Yang XY, Guo YS, Bi S, Zhang SS, 2009. Ultrasensitive enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of alpha-fetoprotein amplified by double-codified gold nanoparticles labels. *Biosensor & Bioelectronics*, 24(8): 2707-2711
- Yu Y-Y, Chen Y-Y, Gao X, Liu Y-Y, Zhang H-Y, Wang T-Y, 2018. Nanoparticle based bio-bar code technology for trace analysis of aflatoxin b1 in chinese herbs. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2): 815-822
- Zhang N, Li M, Li PW, Zhang Q, Zhang W, Li R, 2014. Effect of sample matrix on determination of aflatoxin B₁ by enzyme-linked immunosorbent assay. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 36(3): 404-408 (in Chinese)
- Zhang X, Sun M, Kang Y, Xie H, Wang X, Song H, Li X, Fang W, 2015. Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin a and its application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*, 106: 89-96
- Zhang Z, Li Y, Li P, Zhang Q, Zhang W, Hu X, Ding X, 2014. Monoclonal antibody-quantum dots cdte conjugate-based fluoroimmunoassay for the determination of aflatoxin b1 in peanuts. *Food Chemistry*, 146: 314-319
- Zhao Y, Huang J, Ma L, Wang F, 2017. Development and validation of a simple and fast method for simultaneous determination of aflatoxin b1 and sterigmatocystin in grains. *Food Chemistry*, 221: 11-17
- Zhou J, Du L, Zou L, Zou Y, Hu N, Wang P, 2014. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection based on staphylococcal protein a—au nanoparticle modified gold electrode. *Sensors & Actuators B Chemical*, 197(7): 220-227

[附中文参考文献]

- 孙清, 李谷丰, 邓乾民, 刘杰民, 时国庆, 2015. 高灵敏黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒的研制及应用. *环境化学*, 34(10): 1845-1853
- 张宁, 李敏, 李培武, 张奇, 张文, 李冉, 2014. 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定黄曲霉毒素 B₁ 的样品基质效应研究. *中国油料作物学报*, 36(3): 404-408

(本文责编: 王敏)