

基于量子点标记的赭曲霉毒素 A 快速、高灵敏荧光免疫层析检测方法的建立及应用

杨眈^{1A} 王作欢^{4A} 蒋小武⁵ 方维焕^{1, 2, 3, 4} 宋厚辉^{1, 2, 3A} 章先^{1, 2, 3, 4A}

① 浙江农林大学动物科技学院 浙江 临安 311300

② 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室 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 宁波出入境检验检疫局 浙江 宁波 315000

摘要: 赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 具有肾毒性、致畸性、致癌性和免疫毒性, 广泛存在于各种粮食作物及其副产品中, 是食品和饲料原料的重要污染物, 可在人类及动物体内蓄积, 在已知发现的真菌毒素中, 重要性和危害性仅次于黄曲霉毒素。本研究通过采用量子点荧光微球 (quantum dots, QDs) 标记 OTA 单克隆抗体, 并基于免疫层析原理, 优化、建立了 OTA 高灵敏荧光免疫层析检测方法 (FICGA), 15min 即可实现对农产品中 OTA 污染的快速定量检测。该方法检测下限 (IC_{10}) 达到 0.04ng/mL, 检测区间 (IC_{20} - IC_{80}) 为 0.05-0.59ng/mL, 半数抑制率 (IC_{50}) 为 0.18ng/mL。与 OTA 类似物 OTB、OTC 交叉反应性为 7.3%和 11.9%, 对其他常见真菌毒素 AFB₁、ZEN、FB₁ 和 DON 均无交叉反应。在玉米、面粉和大豆样本中的加标回收率可达 83.2%-117.8%, 与 LC-MS/MS 同时对天然样本中 OTA 含量的检测结果表明, 两种方法相关性良好。本研究建立的 FICGA 快速、灵敏, 可满足基层单位和现场的快速检测需求, 具有很好的应用前景。

关键词: 赭曲霉毒素 A, 免疫层析, 量子点, 单克隆抗体, 定量检测

Rapid and sensitive detection of ochratoxin A by using a quantum dots-based immunochromatographic assay

YANG Dan^{1A} WANG Zuo-Huan^{4A} JIANG Xiao-Wu⁵ FANG Wei-Huan^{1, 2, 3, 4} SONG Hou-Hui^{1, 2, 3A}
ZHANG Xian^{1, 2, 3, 4A}

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQ17C170002); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目 (2019R412036); 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 University Students Science and Technology Innovation Program and Xin Miao Talents Program (2019R412036), Zhejiang A&F University Talent Initiative Project (2016FR025), 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).

^A Contributed equally to this article.

[✉] Corresponding authors. E-mail: zhangxian073@163.com, songhh@zafu.edu.cn

ORCID: YANG Dan (0000-0003-4173-883X), WANG Zuo-Huan (0000-0001-5484-4581)

Received: 2018-12-24, accepted: 2019-04-01

- ① College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Lin'an, Zhejiang 311300, China
- ② Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Lin'an, Zhejiang 311300, China
- 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 Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo, Zhejiang 315000, China

Abstract: Ochratoxin A (OTA) produced by *Aspergillus* and *Penicillium* species, is one of the most widespread toxic members of ochratoxins and has been shown to be nephrotoxic, teratogenic, carcinogenic and immunotoxic to several animal species. Rapid detection of OTA is important to prevent contaminated food from entering into the food chain. A rapid and sensitive fluorescent immunochromatographic assay (FICGA) based on the use of quantum dots (QDs) was prototyped and applied for detecting OTA in cereal samples. The detection signal was enhanced which in turn improved the sensitivity of the assay. The limit of detection of FICGA was 0.04ng/mL while the IC_{50} was 0.18ng/mL. The linear working range was 0.05–0.59ng/mL. The cross-reactivities to the OTA analogues, ochratoxin B and ochratoxin C, were 7.3% and 11.9% respectively. No cross-reactivity (<0.01%) was observed to other co-occurring mycotoxins (AFB₁, ZEN, FB₁ and DON). The recovery rates in spiked corn, wheat and soybean samples were 83.2%–117.8%, and the intra-day and inter-day relative standard deviations were <10%. Simultaneous analysis of commercial samples (corn, wheat, and feedstuff) showed a good correlation between FICGA and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). Hence, this developed quantum dots-based FICGA shows great potential for rapid, sensitive, simple and cost-effective quantitative detection of OTA in food safety control.

Key words: ochratoxin A, immunochromatographic, quantum dots, monoclonal antibody, quantification

真菌毒素 (mycotoxin) 又称霉菌毒素, 是一类小分子次级代谢产物。其中, 赭曲霉毒素 (ochratoxins) 由赭曲霉 *Aspergillus ochraceus* 和疣孢青霉 *Penicillium verrucosum* 等产生, 主要包括有赭曲霉毒素 A (OTA)、赭曲霉毒素 B (OTB) 和赭曲霉毒素 C (OTC) 等, 其中 OTA 的分布最广, 毒性最强, 关注度最高, 危害性和重要性仅次于黄曲霉毒素。OTA 具有“三致”作用, 即可致癌、致畸和致突变, 并对人肝脏组织存在遗传毒性 (Bui-Klimke & Wu 2015; Brennan *et al.* 2017)。OTA 可污染谷物、饲料和干果等农作物, 通过采食被污染的植物性食物进入人体或动物

体, 经蓄积, 可二次污染相关动物源性食品 (王健等 2018)。OTA 已被列为人类潜在的致癌物质即 group B 类 (II B) 致癌物。

在真菌毒素检测领域, 免疫分析法近年来发展迅速 (Zheng *et al.* 2006; Meulenberg 2012; Bueno *et al.* 2015)。其中, 免疫层析法, 凭借肉眼即可判定检测结果, 通过读取信号数值便能进行定量分析。免疫层析法快速、简单且无需特殊仪器支持, 目前, 基于纳米金标记的免疫层析法已有较多报道 (Huang *et al.* 2016; Hao *et al.* 2017)。

量子点 (quantum dots, QDs) 作为新型的

纳米材料, 具有很好的光稳定性和生物相容性, 与传统有机荧光染料相比, 发射光谱窄而对称, 是理想的荧光标记物 (Wang *et al.* 2016)。近年来量子点在免疫检测领域应用广泛, 如基于量子点的电化学传感技术、多重芯片技术和分子印迹技术等 (Zrazhevskiy *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2016; Hu *et al.* 2016; Bilan *et al.* 2017)。前期, 本课题组通过使用胶体金颗粒标记真菌毒素单克隆抗体, 并经系列优化, 制备的胶体金免疫层析试纸条, 可满足相关真菌毒素的快速定性检测和定量分析 (Zhang *et al.* 2018)。本研究拟基于此, 采用量子点取代常规胶体金颗粒, 制备 OTA 荧光免疫层析检测方法, 借助量子点的荧光特性, 以实现农产品中 OTA 的快速、高灵敏度定量检测。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 羧基修饰的水溶性量子点-625 (JQ625) 购自无锡景麒生物科技有限公司; 不同真菌毒素标准品、牛血清白蛋白 (BSA)、卵白蛋白 (OVA)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 购自 Sigma 公司; 不同类型的硝酸纤维素膜 (Millipore 135/180, PALL Vivid 90/170 和 Sartorius UniSart CN140)、玻璃纤维 (SB06, SB08)、聚酯膜 (Ahlstrom 6613) 和吸水板等耗材购自杭州奥唯生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器: 免疫层析试纸条制备所需相关设备购自美国 BioDot 公司; 旋转浓缩仪购自美国 CentriVap 公司; 量子点荧光免疫层析读数仪由浙江大学动物预防医学研究所研制。

1.2 偶联抗原 (OTA-BSA/OVA) 的制备与鉴定

OTA 偶联抗原 (OTA-BSA/OVA) 的制备参考相关文献进行合成 (Kawamura *et al.* 1989)。制

备的偶联抗原经鉴定和测定偶联比后, -20°C 保存备用 (Zhang *et al.* 2015)。

1.3 抗体量子点荧光标记物 (anti-OTA-QDs) 的制备与鉴定

单克隆抗体 Anti-OTA 腹水为实验室前期制备, 纯化后测定亲和力为 $2.37 \times 10^9 \text{L/mol}$, 一般认为亲和常数为 $10^7 - 10^{12} \text{L/mol}$ 的抗体亲和力高 (Schell *et al.* 1993), 因此该抗体满足免疫检测的需求。本研究采用羧基修饰的水溶性量子点, 通过在偶联剂 EDC 的作用下, 量子点上的羧基与单克隆抗体氨基缩合形成共价键, 以制备得到抗体-量子点荧光标记物。具体操作如下: 取量子点溶液 $100 \mu\text{L}$ (浓度 $8 \mu\text{mol/L}$) 至 EP 管中, 加入 $6 \mu\text{g}$ 纯化后的 Anti-OTA 单克隆抗体, 并加入 $13.7 \mu\text{L}$ 偶联剂 EDC (10mg/mL), 最后补充反应体系至 $800 \mu\text{L}$ (量子点溶液终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$), 混合均匀后置于 25°C 反应 2h, 8000r/min 离心 3min, 取上清。偶联过程中抗体和偶联剂的稀释以及反应体系均采用硼酸盐缓冲液 (BB, 50mmol/L , $\text{pH} 9.0$)。

由于标记过程中可能会形成团聚, 并且反应体系中可能存在未标记的抗体或游离的量子点, 这都将影响最终免疫层析检测体系的建立, 故需对产物进行纯化, 以达到后期最佳的试验效果。本研究采用尺寸排阻色谱柱对标记产物进行纯化, 标记量子点的抗体、未标记的抗体和游离的量子点由于尺寸大小不一, 在色谱柱中的流动速度不同, 通过分段收集, 可获得抗体-量子点荧光标记物 (Anti-OTA-QDs), 产物经琼脂糖凝胶电泳和荧光免疫反应鉴定后, 保存备用。

1.4 量子点荧光免疫层析检测方法 (FICGA) 的优化

层析检测示意图见图 1。检测线 (test line, T 线) 包被 OTA 偶联抗原, 质控线 (control line, C 线) 包被山羊抗鼠抗体 (goat anti mouse IgG),

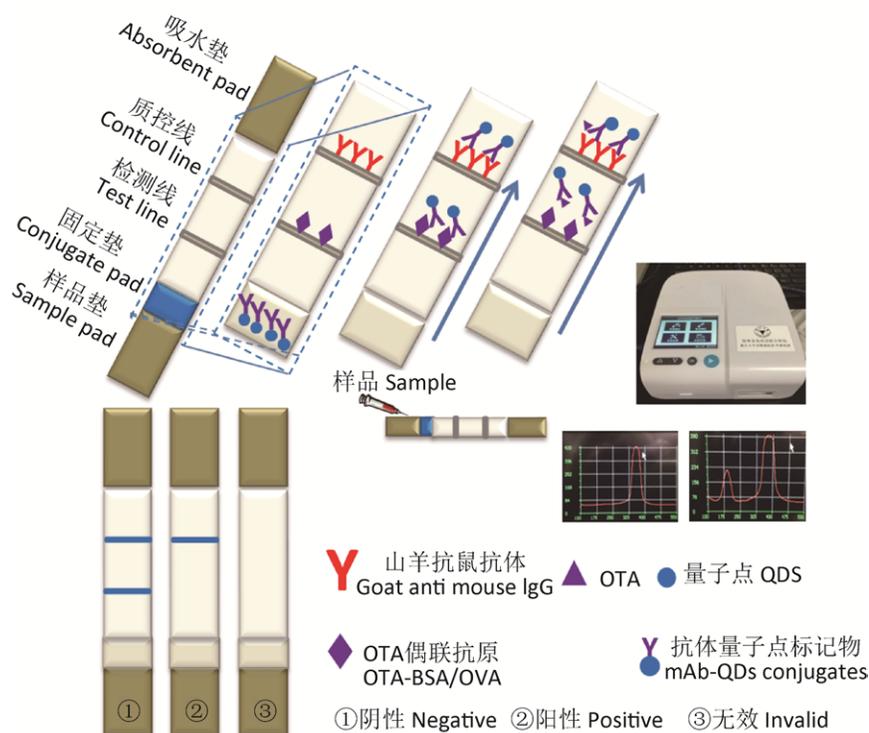


图 1 赭曲霉毒素 A 量子点荧光免疫层析检测方法示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay (FICGA) for the quantitative detection of ochratoxin A.

抗体量子点标记物 (anti-OTA-QDs) 置于固定垫。检测时取适量待测样本滴于加样孔, 并通过设置梯度稀释 OTA 标准品溶液, 经层析作用后分别检测 T 线信号强度, 绘制标准曲线并对待检样本进行定量分析。

在免疫层析体系中, 本研究通过选取牛血清白蛋白和卵白蛋白 (BSA、OVA) 合成的偶联抗原 (OTA-BSA 和 OTA-OVA) 作为 T 线包被抗原, 确定最优; 试纸条组成材料优化涉及硝酸纤维素膜 (NC 膜)、样品垫和固定垫。本研究, 选用了 5 种较常用的 NC 膜, 通过比较效果, 确定最佳; 对于样品垫, 则主要针对 SB06 和 SB08, 通过滴加阳性、阴性样品提取液, 比较吸收情况, 选择最佳样品垫; 固定垫的作用为固化荧光抗体, 影响其释放效果和稳定性。为比较固定垫种类, 本研究选取 3 种固定垫 (SB06、SB08、Ahlstrom 6613), 以荧

光抗体干燥后的稳定性和释放效率为标准, 选取最优; 除此之外, 不同摩尔浓度 (10、20、50mmol/L) 的 Tris-HCl、磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 和硼酸盐缓冲液 (BB, pH 7.4), 分别含不同浓度蔗糖 (0、2%、4%、6%) 和 BSA (0、0.5%、1%、2%), 优化后作为样品垫和固定垫的前处理液。

抗原包被缓冲液、硝酸纤维素膜封闭液以及量子点标记抗体稀释液的选择与确定参考本团队前期发表的文献进行 (Zhang *et al.* 2018)。

1.5 量子点荧光免疫层析检测方法 (FICGA) 的建立

按照上述模式图 1, 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上 T 线包被 OTA 偶联抗原, C 线包被山羊抗兔抗体, 量子点标记 OTA 单克隆抗体置于固定垫, 并按图 2 所示, 将处理后的样品垫、固定垫、



图 2 量子点免疫层析试纸条侧面结构示意图

Fig. 2 Sketch map of the quantum dots-based fluorescent immunochromatographic (side view).

NC 膜和吸水垫依次粘贴在 PVC 底板上，每两部分相互重叠，组装完成后，切割备用（0.5cm）。

层析完成后，使用荧光读数仪测定 T 线信号强度，绘制标准曲线，并计算相关参数。

分别选择 OTA 结构类似物和其他常见真菌毒素，包括 OTB、OTC、黄曲霉毒素 B₁（AFB₁）、玉米赤霉烯酮（ZEN）、伏马毒素（FB₁）和呕吐毒素（DON）作为竞争抗原，分别测量 IC₅₀ 值（孙清等 2015）。

1.6 基质影响的消除

为降低检测体系的基质效应，同时避免因稀释倍数过高，降低灵敏度，本研究分别将玉米、面粉和大豆萃取液梯度稀释后，再稀释 OTA 标准品，绘制基质添加标准曲线，确保消除基质和获得最佳的检测效果。

1.7 量子点荧光免疫层析检测方法（FICGA）稳定性试验

本研究采用 37℃ 加速试验判定试纸条稳定性。将组装好的试纸条装入锡箔袋（1 个/袋），每袋放入两包干燥剂，真空包装机压膜包装。包好的试纸条置于 37℃ 恒温箱，分别于第 7、15、30d 取出，采用梯度稀释的标准品溶液验证其检测灵敏度，评价试纸条稳定性，预测保存期。

1.8 样本萃取与加标试验

样本（20g）置于三角烧瓶（250mL）中，加入 100mL 萃取液（甲醇:水=7:3，V/V），涡旋振荡后离心（4 000r/min，10min），上清过滤后经超纯水稀释后进行检测。OTA 阴性样本经研磨并过筛，干燥后加入 OTA 标准品溶液，混匀后放置过夜待检。每个加标浓度不同时间点重复测

定 3 次，计算回收率以及标准偏差。

1.9 量子点荧光免疫层析检测方法（FICGA）与 LC-MS/MS 比较试验

同时采用量子点免疫层析试纸条和 LC-MS/MS 两种方法平行检测天然样本（包括玉米、小麦和饲料）。

2 结果与分析

2.1 偶联抗原（OTA-BSA/OVA）的制备

采用 MALDI-TOF-MS 测定偶联比。经计算，OTA-BSA 偶联比（OTA:BSA）约为 13.7:1，OTA-OVA 偶联比（OTA:OVA）约为 5.3:1。

采用 ELISA 对制备的偶联抗原进行鉴定(图 3)。标记产物的 OD₄₅₀ 与对照比值远大于 2.1，显示偶联抗原 OTA-BSA 和 OTA-OVA 满足相关免疫学检测的需求。

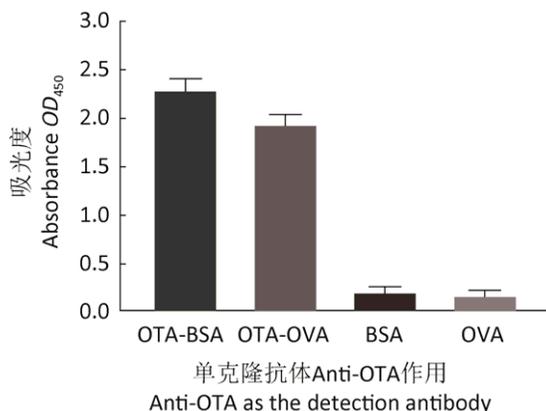


图 3 OTA 偶联抗原 OTA-BSA 和 OTA-OVA 的 ELISA 鉴定

Fig. 3 Identification of the ochratoxin A-bovine serum albumin (OTA-BSA) and ochratoxin A-ovalbumin (OTA-OVA) by ELISA.

2.2 单克隆抗体量子点荧光标记物 (Anti-OTA-QDs) 的纯化与鉴定

抗体量子点荧光标记物 (Anti-OTA-QDs) 按照 1.3 中所述方法合成、浓缩后, 采用尺寸排阻色谱柱进行纯化 (图 4A)。琼脂糖凝胶电泳和荧光免疫学方法鉴定结果见图 4B, 相比对照组 BSA-QDs 和游离的 QDs, Anti-OTA-QDs 迁移速度较慢。由于迁移速度与分子量有关, 说明抗体与量子点偶联成功, 且免疫学结果表明 Anti-OTA-QDs 仍具备识别特异性抗原的能力, 具备抗体活性。综上表明抗体-量子点荧光标记物制备成功, 可用于免疫学检测方法的建立。

2.3 量子点荧光免疫层析检测方法 (FICGA) 相关条件的确定

硝酸纤维素膜 (NC 膜) 的对比结果表明, Sartorius CN140 最优, 层析 10min 后, 竞争反应充分, 条带清晰且背景值较低。检测时, T 线包被 OTA-OVA 时灵敏度更高, 这与前期建立胶体金免疫层析检测方法时的结果相符 (Zhang *et al.* 2018), 故最终选择 OTA-OVA 作为包被抗原。

对于样品垫的选择, 由于 SB08 在使用时, 可在完全吸收样本的同时获得更强的检测信号, 选取为后续样品垫材料; 固定垫的选择则通过对比荧光抗体固化后溶解的效率, 由于 Ahlstrom 6613 溶解、释放荧光抗体所需时间最短且最充

分, 作为最佳固定垫。样品垫和固定垫的处理液均为 20mmol/L 的硼酸盐缓冲液 (BB, pH 7.4), 其中分别含有 4%蔗糖和 1% OVA, 并且同时添加 0.25% TritonX-100 (表面活性剂)。

经优化, 抗原包被缓冲液为含 3% 甲醇的 50mmol/L 碳酸盐缓冲液 (CBS, pH 9.6); 硝酸纤维素膜封闭液为含 2%蔗糖、2% OVA 和 0.02% NaN₃ 的 10mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4); 荧光标记抗体稀释液为含 5%海藻糖、1% OVA、0.02% NaN₃ 的 50mmol/L 硼酸盐缓冲液 (BB, pH 8.0)。

为获得最佳检测效果, 本研究还对 OTA-OVA 和荧光标记抗体 Anti-OTA-QDs 浓度进行了优化, 最终确定 OTA-OVA (2.9mg/mL) 的包被浓度为 0.08mg/mL, 山羊抗鼠抗体包被浓度为 0.2mg/mL, 15 倍稀释后的 Anti-OTA-QDs 喷涂量为 70 μ L/cm²。

2.4 量子点荧光免疫层析检测方法 (FICGA) 的建立

经过对免疫层析相关条件的优化, 本研究建立的 FICGA 检测效果见图 5。

通过设置梯度浓度的 OTA 标准品溶液, 取 100 μ L 滴至加样孔, 经层析作用后, 荧光读数仪读取 T 线信号强度, 以 OTA 标准品浓度为横坐标, 检测线信号强度抑制率为纵坐标, 绘制抑制曲线 (图 6), 线性方程为 $y=0.5838x+0.9355$ ($R^2=0.9889$), 线性范围为 0.05–0.59ng/mL, 检测下限为 0.04ng/mL, 半数抑制率 (IC₅₀) 为 0.18ng/mL。

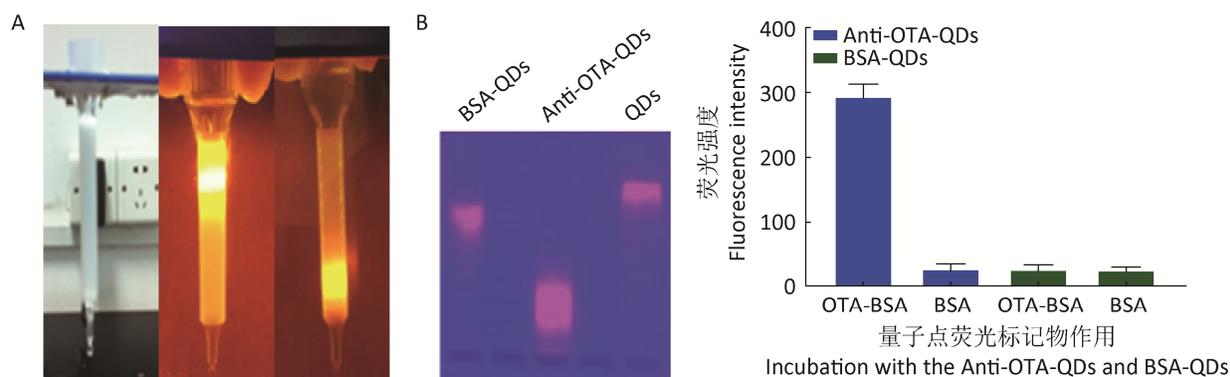


图 4 抗体-量子点荧光标记物的纯化 (A) 与鉴定 (B) B: 左: 琼脂糖凝胶电泳; 右: 免疫荧光

Fig. 4 Purification (A) and identification (B) of the quantum dots labeled antibody. B: Left: Agarose gel electrophoresis; Right: Immunofluorescence.

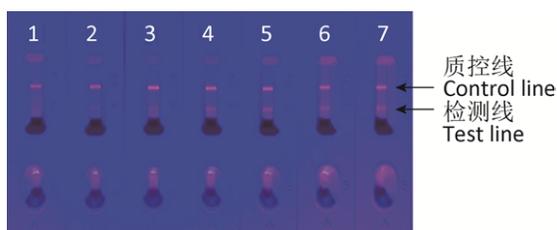


图 5 赭曲霉毒素 A 量子点荧光免疫层析检测效果图 OTA 浓度 1-7: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 和 0ng/mL
Fig. 5 Visual observation of the results of quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay for OTA. The concentrations of OTA from 1 to 7: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 and 0ng/mL.

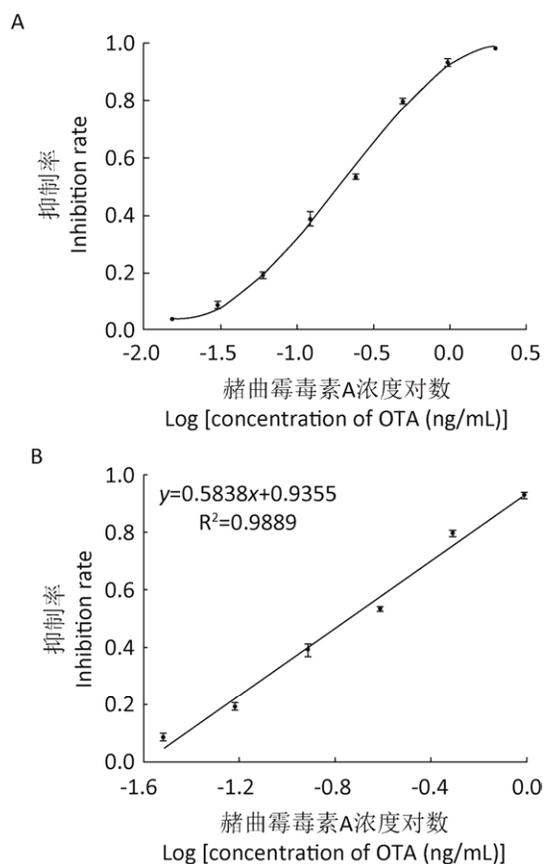


图 6 基于量子点的 OTA 荧光免疫层析检测方法竞争抑制曲线 (A) 和抑制率线性分析 (B)
Fig. 6 Competitive inhibition of OTA in quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay (A) and linear analysis of percent inhibition against OTA concentration (B).

基于相同抗体建立的间接竞争 ELISA (IC-ELISA) 的检测下限 (IC_{10}) 为 0.07ng/mL , 半数抑制率 (IC_{50}) 为 0.38ng/mL , 检测时长约 2h (Zhang *et al.* 2015); 基于相同抗体的胶体金免疫层析检测方法检测下限 (IC_{10}) 为 0.32ng/mL , 半数抑制率 (IC_{50}) 为 2.63ng/mL , 检测时长约为 20min (Zhang *et al.* 2018)。相比 IC-ELISA 和胶体金免疫层析, 本研究建立的基于量子点标记的 FICGA 在简单快捷的同时, 灵敏度更高 (IC_{10} : 0.04ng/mL ; IC_{50} : 0.18ng/mL)。

2.5 量子点荧光免疫层析检测方法 (FICGA) 检测 OTA 特异性分析

特异性分析结果显示, 建立的 FICGA 对 OTA 类似物 OTB、OTC 交叉反应性依次为 7.3% 和 11.9%, 对其他常见真菌毒素 AFB₁、ZEN、FB₁ 和 DON 均无交叉反应, 表明该方法特异性高。

2.6 量子点荧光免疫层析检测方法 (FICGA) 稳定性的验证

按照 1.7 中所述进行稳定性检测, 结果表明 37°C 放置 30d 后, 试纸条检测灵敏度未下降, 对 OTA 仍能特异性检出。证明制备的 FICGA 稳定性好, 至少可在 37°C 保存 30d, 因试纸条通常室温放置, 故预测其在室温可稳定保存一年。

2.7 基质效应的消除

基质效应分析结果 (图 7) 表明当 3 种样本提取液经超纯水 1:3 倍稀释后进行检测时, 此时的基质效应基本消除, 故后续样本检测时, 提取液经 1:3 倍稀释后, 取 $100\mu\text{L}$ 滴入加样孔即可。

2.8 加标回收试验

按照 1.8 中所述, 取 OTA 阴性样本 (玉米、小麦和大豆) 进行加标试验。根据该检测方法的检测区间, 设置 OTA 的加标浓度依次为 1.25、2.5、5 和 $10\mu\text{g/kg}$ 。各浓度 3 个平行, 重复 3 次, 分别计算回收率和相关参数。

结果表明, 本研究建立的 FICGA 加标回收率在 83.2%–117.8% 之间, 批内、批间相对标准偏差分别为 3.9%–8.6% 和 5.2%–9.7% (表 1), 符合

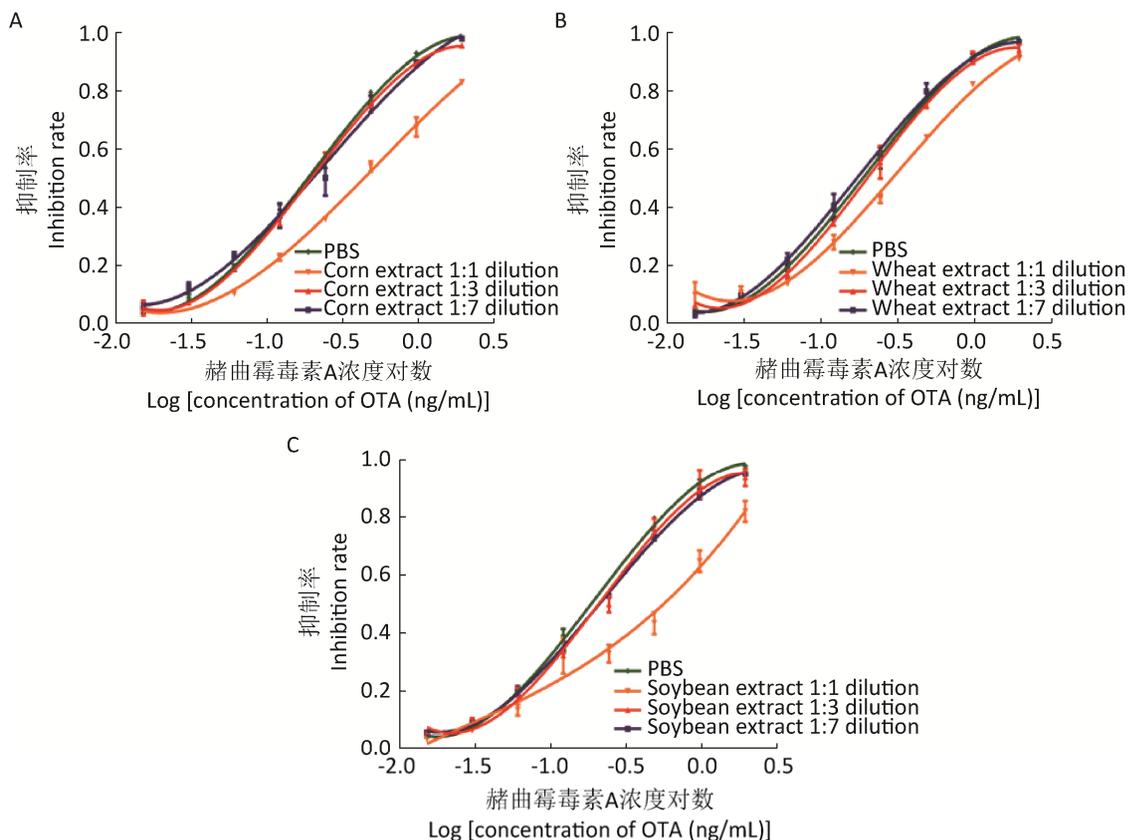


图 7 玉米 (A)、面粉 (B) 和大豆 (C) 提取液基质影响消除试验

Fig. 7 Matrix interferences of extracts from corn (A), wheat (B) and soybean (C) spiked with ochratoxin A and diluted in different ratios with phosphate buffered saline as measured by quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay.

表 1 样本的加标回收率和批内、批间相对标准偏差

Table 1 Recovery and relative standard deviations of samples spiked with different levels of ochratoxin A by quantum dots based fluorescent immunochromatographic assay

样本 Sample	OTA 浓度 Concentration of OTA (μg/kg)		批内 Intra-assay RSD (%) (n=3)	批间 Inter-assay RSD (%) (n=3)	回收率 Recovery rate (%)
	加标 Spiked	检出 Detected			
	玉米 Corn	1.25			
	2.5	2.34	4.7	6.2	93.6
	5	4.17	6.3	5.9	83.4
	10	11.35	8.2	8.7	113.5
小麦 Wheat	1.25	1.09	6.3	7.1	87.2
	2.5	2.24	3.9	5.8	89.6
	5	5.12	5.7	6.8	102.4
	10	9.79	8.6	9.1	97.9
大豆 Soybean	1.25	1.19	4.6	5.2	95.2
	2.5	2.64	5.9	6.4	105.6
	5	5.89	6.1	8.3	117.8
	10	8.97	7.6	9.7	89.7

残留检测的相关标准 (European 2002), 表明该检测方法准确率高且稳定性好, 具有很好的实用性和可靠性。

2.9 量子点荧光免疫层析检测法 (FICGA) 与 LC-MS/MS 相关性分析

对天然样本中 OTA 含量, 同时运用 FICGA 和 LC-MS/MS 法进行测定, 定量结果见表 2 (阳性样本), 线性回归方程为: $LC-MS/MS=1.0098FICGA-1.6932$ ($R^2=0.8391$) (图 8), 表明两种检测方法相关性良好, 故本研究制备的荧光免疫层析法可满足样本中 OTA 的定量检测需求。

表 2 自建量子点荧光免疫层析和 LC-MS/MS 对天然样本中 OTA 的定量检测结果

Table 2 Quantitative detection of OTA in natural samples by the developed FICGA and LC-MS/MS

样本编号 Sample No.	量子点免疫层析 FICGA ($\mu\text{g}/\text{kg}$), Mean \pm SD	液相二级质谱 LC-MS/MS ($\mu\text{g}/\text{kg}$), Mean \pm SD
1	4.52 \pm 0.95	3.98 \pm 0.73
2	16.39 \pm 1.72	14.87 \pm 1.21
3	30.73 \pm 2.59	22.94 \pm 1.32
4	28.93 \pm 2.68	25.57 \pm 2.71
5	6.29 \pm 1.02	4.18 \pm 0.31
6	20.16 \pm 1.96	15.97 \pm 1.41
7	21.75 \pm 1.62	18.39 \pm 1.03
8	25.81 \pm 2.29	20.01 \pm 1.61
9	2.13 \pm 1.67	1.36 \pm 0.12
10	22.38 \pm 2.32	27.71 \pm 2.13
11	25.67 \pm 2.13	20.99 \pm 2.71
12	37.29 \pm 3.62	45.62 \pm 3.12
13	28.56 \pm 2.41	32.36 \pm 2.14
14	20.71 \pm 1.56	16.62 \pm 1.35
15	31.89 \pm 2.89	26.71 \pm 2.13
16	16.23 \pm 1.41	19.28 \pm 1.26

3 讨论

赭曲霉毒素 A (OTA) 分布广泛, 具有强致癌性和免疫毒性, 主要靶器官为肾脏, 长期食用 OTA 污染的食物, 会对机体造成严重伤害。免疫

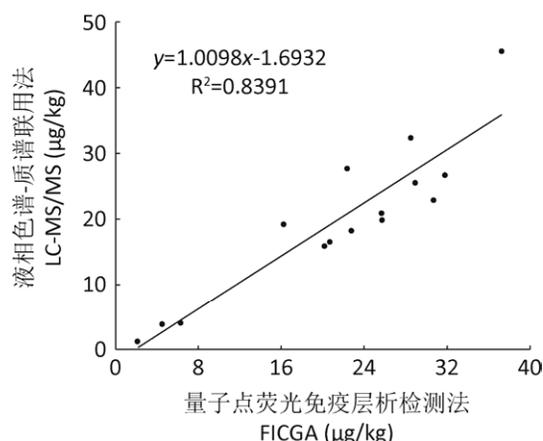


图 8 FICGA 与 LC-MS/MS 检测结果的相关性分析

Fig. 8 Correlation of results obtained by quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay and LC-MS/MS for OTA detection in natural samples.

层析技术因具有快速、简单、高通量和无需复杂仪器支持等诸多优势, 近年来在医学相关参数的现场筛查和食品安全快速检测领域应用广泛 (Kitidee *et al.* 2016; Kong *et al.* 2017; Watanabe Pinhata *et al.* 2018)。相比免疫层析的传统标记物胶体金颗粒, 荧光量子点作为检测探针时, 灵敏度更高, 且更适用于定量分析。本研究在前期工作的基础上, 利用量子点取代金颗粒标记真菌毒素单克隆抗体, 经优化相关反应条件, 成功制备了 OTA 快速、高灵敏度荧光免疫层析检测法, 该方法准确便捷, 具有很好的应用前景。

在偶联剂 EDC 的作用下, 抗体的氨基和量子点的羧基共价缩合形成抗体-量子点标记物, 建立的 OTA 荧光免疫层析检测法 (FICGA), 通过荧光读数仪读取检测线信号强度, 绘制标准抑制曲线, 可实现对样本中 OTA 的快速定量检测。相比本实验室前期建立的常规间接竞争 ELISA (IC-ELISA) 和胶体金免疫层析检测法 (DICGA), 该研究建立的 FICGA 灵敏度高且方便快捷, 样本处理后 15min 即可完成检测, 检测下限达到 0.04ng/mL, 实际样品检出限为 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 加标回收率在 83.2%–117.8%之间, 与 LC-MS/MS 相关

性良好。近年来,已有 OTA 相关检测方法的报道,如周耀峰等(2015)建立了 OTA 量子点荧光微球免疫层析试纸条,虽然灵敏度与本研究相近,但检测对象仅限于玉米,应用受限;李鑫等(2014)建立的免疫层析试纸条,可对农产品中 OTA 含量进行检测,由于是基于胶体金显色,灵敏度低,且只能定性判定无法定量分析;免疫传感器法(Wang *et al.* 2019)在实现痕量检测的同时,操作复杂且需要特殊仪器的支持的劣势使其难于推广使用;因此本研究建立的基于量子点标记的赭曲霉毒素 A 免疫层析试纸条具有应用对象广、灵敏度高和简单快捷等优势。

本研究基于免疫层析体系,采用间接竞争反应模式,用量子点作为标记物标记抗体,经优化各项条件,包括层析系统的主要组成原件(样品垫、固定垫、NC 膜和吸水垫)以及相关缓冲液(如抗原包被缓冲液、前处理液和 NC 膜封闭液)的浓度、种类和 pH,并确定了基质影响消除方法,最终建立了能够有效定量监测多种谷物样本中 OTA 含量的 FICGA,特别适用于对大量样本的快速初筛,因检测过程无需特殊仪器的支持,对基层检验检疫机构和农产品加工企业来说,更易推广使用。多种真菌毒素混合污染现象时有发生,且混合污染时毒性显著增强(Smith *et al.* 2016),后续我们将在此基础上,开发出二联或多联量子点免疫层析检测方法,以实现农产品中两种或两种以上真菌毒素的同时定量检测。

[REFERENCES]

- Bilan R, Ametzazurra A, Brazhnik K, Escorza S, Fernández D, Uríbarri M, Nabiev I, Sukhanova A, 2017. Quantum-dot-based suspension microarray for multiplex detection of lung cancer markers: preclinical validation and comparison with the luminex xmap® system. *Scientific Reports*, 7: 44668
- Brennan KM, Oh SY, Yiannikouris A, Graugnard DE, Karrow NA, 2017. Differential gene expression analysis of bovine macrophages after exposure to the penicillium mycotoxins citrinin and/or ochratoxin a. *Toxins (Basel)*, 9(11): 366
- Bueno D, Istamboulie G, Muñoz R, Marty JL, 2015. Determination of mycotoxins in food: a review of bioanalytical to analytical methods. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(9): 728-774
- Bui-Klimke TR, Wu F, 2015. Ochratoxin a and human health risk: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(13): 1860-1869
- European C, 2002. Commission decision 2002/657/ec of 12 august 2002 implementing council directive 96/23/ec concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities L*, 221: 8-36
- Hao K, Suryoprabowo S, Song SS, Liu LQ, Kuang H, 2017. Rapid detection of zearalenone and its metabolite in corn flour with the immunochromatographic test strip. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1): 1-13
- Huang XL, Aguilar ZP, Xu HY, Lai WH, Xiong YH, 2016. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: a review. *Biosensor and Bioelectronics*, 75: 166-180
- Jiang LY, Liu HJ, Li M, Xing Y, Ren XQ, 2016. Surface molecular imprinting on cdte quantum dots for fluorescence sensing of 4-nitrophenol. *Analytical Methods*, 8(10): 2226-2232
- Kawamura O, Sato S, Kajii H, Nagayama S, Ohtani K, Chiba J, Ueno Y, 1989. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin a based on monoclonal antibodies. *Toxicon*, 27(8): 887-897
- Kitidee K, Khamaikawin W, Thongkum W, Tawon Y, Cressey TR, Jevprasesphant R, Kasinrerak W, Tayapiwatana C, 2016. Expedient screening for hiv-1 protease inhibitors using a simplified immunochromatographic assay. *Journal of Chromatography B*, 1021: 153-158
- Kong DZ, Xie ZJ, Liu LQ, Song SS, Kuang H, Xu CL, 2017. Development of ic-elisa and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of vancomycin in raw milk and animal feed. *Food and Agricultural Immunology*, 28(3): 414-426
- Li X, Li PW, Zhang Q, Zhang W, Ding XX, Tang XQ, 2014. Development of an immunochromatographic assay for ochratoxin a in agro-products. *Chinese Journal of Oil*

- Crop Sciences, 36(5): 648-652 (in Chinese)
- Meulenberg EP, 2012. Immunochemical methods for ochratoxin a detection: a review. *Toxins (Basel)*, 4(4): 244-266
- Schell C, Verkoyen C, Krewet E, Müller G, Norpoth K, 1993. Production and characterization of monoclonal antibodies to n7-phenylguanine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 119(4): 221
- Smith MC, Madec S, Coton E, Hymery N, 2016. Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their *in vitro* combined toxicological effects. *Toxins (Basel)*, 8(4): 94
- 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)
- Hu TX, Zhang L, Wen W, Zhang XH, Wang SF, 2016. Enzyme catalytic amplification of mirna-155 detection with graphene quantum dot-based electrochemical biosensor. *Biosensor and Bioelectronics*, 77: 451-456
- Wang J, Cheng GH, Ruan RY, He HW, Dou ML, He XP, Xu YC, 2018. Review of ochratoxin A pollution in animal-derived foods and its detection methods. *Journal of Food Safety and Quality*, 9(16): 4212-4217 (in Chinese)
- Wang XW, Sun GZ, Li N, Chen P, 2016. Cheminform abstract: quantum dots derived from two-dimensional materials and their applications for catalysis and energy. *Chemical Society Reviews*, 45(8): 2239-2262
- Wang YH, Ning G, Wu YH, Wu S, Zeng BQ, Liu GQ, He XX, Wang KM, 2019. Facile combination of beta-cyclodextrin host-guest recognition with exonuclease-assistant signal amplification for sensitive electrochemical assay of ochratoxin a. *Biosensor and Bioelectronics*, 124-125: 82-88
- Watanabe Pinhata JM, Lemes RA, Fcads S, Souza AR, Chimara E, Ferrazoli L, 2018. Use of an immunochromatographic assay for rapid identification of mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates in routine diagnosis. *Journal of Medical Microbiology*, 67(5): 683-686
- Zhang X, He K, Fang Y, Cao T, Paudyal N, Zhang XF, Song HH, Li XL, Fang WH, 2018. Dual flow immunochromatographic assay for rapid and simultaneous quantitative detection of ochratoxin a and zearalenone in corn, wheat, and feed samples. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 19(11): 871-883
- Zhang X, Sun MJ, Kang Y, Xie H, Wang X, Song HH, Li XL, Fang WH, 2015. Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin a and its application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*, 106: 89-96
- Zheng MZ, Richard JL, Johann B, 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161(5): 261-273
- Zrazhevskiy P, Sena M, Gao XH, 2010. Cheminform abstract: Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 39(11): 4326-4354
- Zhou YF, Xiong SC, Jiang H, Duan H, Xiong YH, Wang A, 2015. Immunochromatographic assay for quantitative detection of ochratoxin a in maize by quantum dot beads. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 43(12): 1837-1843 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 李鑫, 李培武, 张奇, 张文, 丁小霞, 唐晓倩, 2014. 农产品中赭曲霉毒素 A 免疫层析试纸条快速检测技术研究. *中国油料作物学报*, 36(5): 648-652
- 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
- 王健, 成桂红, 阮若云, 何恒纬, 窦明礼, 贺小萍, 徐跃成, 2018. 动物源性食品中赭曲霉毒素 A 污染概况及检测方法研究进展. *食品安全质量检测学报*, 9(16): 4212-4217
- 周耀锋, 熊斯诚, 江湖, 段宏, 熊勇华, Andrew Wang, 2015. 量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测玉米中赭曲霉毒素 A. *分析化学*, 43(12): 1837-1843

(本文责编: 韩丽)