



生物实验室

## 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

章先<sup>1,2,3,4,5</sup> 付子贤<sup>1,2,3,4</sup> 周一钊<sup>1,2,3,4</sup> 方维焕<sup>1,2,3,4,5</sup> 宋厚辉<sup>\*1,2,3,4</sup>

1 浙江农林大学动物科技学院 浙江 杭州 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 杭州 311300

4 中澳动物健康大数据分析联合实验室 浙江 杭州 311300

5 浙江大学动物科学学院 浙江 杭州 310058

**摘要:**【背景】真菌毒素为真菌的有毒次级代谢产物,混合污染时毒性显著增强,可对人类和动物健康造成严重伤害。制备二联胶体金免疫层析试纸条,实现对常见真菌毒素混合污染的快速监测,具有重要意义。【目的】制备赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)和玉米赤霉烯酮(Zeralenone, ZEN)金标单克隆抗体,基于免疫层析原理,采用竞争反应模式,建立二联胶体金免疫层析检测法用于污染样品中 OTA 和 ZEN 的同时快速检测。【方法】采用柠檬酸钠还原法制备胶体金颗粒,并标记获得两种真菌毒素金标单克隆抗体,通过优化相关条件,建立稳定的二联胶体金免疫层析检测方法,用于同时检测谷物和饲料样品中的 OTA 和 ZEN。【结果】制备的 OTA 和 ZEN 二联胶体金试纸条对 OTA 和 ZEN 的检测限分别为 0.625 ng/mL 和 1.25 ng/mL,且与谷物和饲料中其它真菌毒素(黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、伏马毒素 B<sub>1</sub>、桔青霉毒素、展青霉毒素和呕吐毒素)均无交叉反应,人工添加试验结果准确。对天然样本检测结果表明该方法与 LC-MS/MS 一致性良好。【结论】本研究制备的二联胶体金试纸条可用于实际样品中 OTA 和 ZEN 的同时快速筛查。

**关键词:** 赭曲霉毒素 A, 玉米赤霉烯酮, 胶体金, 免疫检测

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ17C170002); Talent Initiative Project of Zhejiang A&F University (2016FR025); National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA101602)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-571-63741392; E-mail: songhh@zafu.edu.cn

**Received:** 25-05-2018; **Accepted:** 30-07-2018; **Published online:** 15-08-2018

**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); 国家高技术研究发展计划(863 计划) (2012AA101602)

**\*通信作者:** Tel: 0571-63741392; E-mail: songhh@zafu.edu.cn

**收稿日期:** 2018-05-25; **接受日期:** 2018-07-30; **网络首发日期:** 2018-08-15

## Dual flow immunochromatographic assay for simultaneous determination of ochratoxin A and zearalenone in cereal and feed samples

ZHANG Xian<sup>1,2,3,4</sup> FU Zi-Xian<sup>1,2,3</sup> ZHOU Yi-Zhao<sup>1,2,3</sup> FANG Wei-Huan<sup>1,2,3,4</sup>  
SONG Hou-Hui<sup>\*1,2,3</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang 311300, China

2 Zhejiang Provincial Engineering Laboratory for Animal Health Inspection and Internet Technology, Hangzhou, Zhejiang 311300, China

3 China-Australian Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, Hangzhou, Zhejiang 311300, China

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

**Abstract:** [Background] Mycotoxins produced by different species of fungi may coexist in single cereal or feed samples, which could become highly toxic for humans and animals. In this context, a dual flow immunochromatographic assay for rapid monitoring mixed mycotoxin contamination has become a necessity. [Objective] Development of the colloidal gold dual immunoassay for simultaneous detection of ochratoxin A and zearalenone in cereal and feed samples. [Methods] Mycotoxins monoclonal antibodies were labeled with colloidal gold nanoparticles. After optimizing the materials, reagents as well as the experimental conditions, a dual flow immunochromatographic assay was developed and tested for determining the ochratoxin A and zearalenone in cereal and feed samples. [Results] The detection limit for ochratoxin A and zearalenone was 0.625 ng/mL and 1.25 ng/mL, respectively. Naturally contaminated cereal and feed samples were analyzed using both immunochromatographic assay and LC-MS/MS, and showed a good agreement between these two methods. [Conclusion] This immunoassay could detect ochratoxin A and zearalenone in cereal and feed samples rapidly and accurately, more easily and at a lower cost.

**Keywords:** Ochratoxin A, Zearalenone, Colloidal gold nanoparticles, Immunoassay

赈曲霉毒素 (Ochratoxins) 主要由赈曲霉 (*Aspergillus ochraceus*)、疣孢青霉 (*Penicillium verrucosum*) 等产生<sup>[1]</sup>, 包括赈曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)、赈曲霉毒素 B (Ochratoxin B, OTB) 以及赈曲霉毒素 C (Ochratoxin C, OTC) 等 7 种化合物。其中 OTA 因分布最广、毒性最强且具有致癌性和免疫毒性, 已被国际癌症研究机构(IARC)列为 II B 类致癌物质, 备受关注<sup>[2-3]</sup>。玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)由镰刀菌属(*Fusarium*), 如合谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和粉红镰刀菌(*Fusarium roseum*)等产生, 可影响动物机体内分泌功能, 导致流产和死胎<sup>[4-5]</sup>。2 种甚至多种毒素混合污染农产品时毒性显著增强<sup>[6]</sup>。

近年来, 真菌毒素多重检测方法发展迅速, 如利用稀土离子 Eu<sup>3+</sup>和 Sm<sup>3+</sup>作为示踪剂<sup>[7]</sup>建立的时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA), 可实现对呕吐毒素

和玉米赤霉烯酮的同时检测; 采用液相色谱质谱联用法(LC-MS/MS)同时检测谷物中多种真菌毒素<sup>[8]</sup>以及利用超高压液相色谱(UPLC)同时检测咖啡豆中真菌毒素的混合污染等<sup>[9]</sup>。这些方法特异性好, 灵敏度较高, 但操作复杂, 耗时较长, 无法满足大量样本的快速筛查。胶体金免疫层析技术由于具备快速、简便、低成本的特点, 近年来发展迅速, 主要包括竞争法和双抗体夹心法<sup>[10]</sup>。真菌毒素属于小分子, 多采用竞争反应模式, 待检样本阴性时, 检测线显色, 待检样本阳性时, 检测线不显色。由于胶体金颗粒制备简单且标记过程温和, 以免疫层析为基础的多重检测模式目前已成为食品安全检测领域的研究热点<sup>[11]</sup>。

本研究旨在选取 OTA 和 ZEN 为检测对象, 建立二联胶体金免疫层析检测法, 在满足方便、快捷和低成本的同时, 实现对谷物和饲料中上述两种真

菌毒素的同时快速检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

不同真菌毒素标准品、卵白蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、二甲基亚砜(DMSO)和氯金酸(Tetrachloroauric III acid)购自 Sigma 公司; 山羊抗小鼠抗体购自上海捷宁生物科技有限公司; 硝酸纤维素膜(Millipore 180, PALL VividTM170, YN120B, Sartorius UniSart CN140, YNHS120B 和 YNHS140B)、玻璃纤维、聚酯膜和吸水板等常规耗材购自杭州奥唯生物科技有限公司; OTA 和 ZEN 单克隆抗体(Anti-OTA, Anti-ZEN)、偶联抗原(OTA-OVA/BSA、ZEN-OVA/BSA)为本实验室前期制备; 谷物、饲料阴性和天然样本由浙江省检验检疫科学技术研究院提供。

胶体金试纸条制备所需相关设备(划线仪 XYZ 3060、贴合机 LM4000 和切割仪 CM4000), BioDot 公司; SpectraMax M2 酶标仪, Molecular Device 公司; 透射电镜为浙江大学农业与生命环境学部公共平台所有。

### 1.2 胶体金颗粒的制备

胶体金颗粒的制备参考文献[12]。100 mL 0.01% 的氯金酸溶液置于磁力搅拌加热器, 加热至沸腾时, 迅速加入 2% 柠檬酸钠溶液 0.75 mL 或 0.375 mL, 分别制备粒径为 20 nm 和 40 nm 的金颗粒, 持续加热至溶液颜色均匀稳定, 并继续煮沸 5 min, 室温自然冷却。通过目测法和透射电镜扫描, 鉴定所制备的胶体金颗粒。

### 1.3 金标抗体的制备

#### 1.3.1 胶体金标记抗体最佳 pH 的确定

取 7 个 2 mL EP 管, 分别加入 1.5 mL 胶体金溶液, 0.2 mol/L 的  $K_2CO_3$  调整胶体金溶液 pH 依次至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0; 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 稀释抗体(0.1 mg/mL), 每管加入 150  $\mu$ L, 混匀后室温放置 30 min; 每管加入 150  $\mu$ L 体积分数为 10% 的氯化钠溶液, 混匀后室温静置 2 h; 反

应结束后测定各管液体的吸光度。最适 pH 下溶液颜色均匀, 吸光值最高。

#### 1.3.2 胶体金标记抗体最佳浓度的确定

将待标记单克隆抗体用 20 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.4) 稀释, 每 100  $\mu$ L 溶液中加入的抗体量分别为 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9  $\mu$ g; 将胶体金溶液调至 1.3.1 中优化的最佳结合 pH, 分别取 1 mL 加入 9 个 1.5 mL 离心管中; 向每个 1.5 mL 离心管中分别加入 100  $\mu$ L 不同浓度的抗体溶液, 充分混匀 20 min 后室温静置 10 min; 每管内加入 100  $\mu$ L 10% NaCl 溶液, 混匀, 室温静置 2 h; 反应结束后, 测定溶液吸光值, 最高吸光值相对应的最低抗体量即为最佳使用量; 实际操作中抗体最佳标记量为最佳使用量的 120%。

#### 1.3.3 胶体金标记抗体方法

10 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 7.4)稀释抗体, 取 50 mL 处于最佳标记 pH 的胶体金溶液, 边搅拌边迅速加入待标记抗体, 室温混匀作用 30 min 后, 加入 BSA 蛋白溶液, 终浓度为 1%, 充分混匀作用 30 min 后 4  $^{\circ}$ C、2 000 $\times$ g 离心 20 min; 上清以 4  $^{\circ}$ C、8 000 $\times$ g 离心 30 min 后弃上清; 使用 10 mL 2 mmol/L 含有 1% BSA 的硼酸盐缓冲液(pH 7.4)重悬后, 以 8 000 $\times$ g 离心 20 min, 重复 2 次, 洗涤未结合抗体; 沉淀用 5 mL 硼酸盐缓冲液重悬, 置于 4  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 二联胶体金免疫层析试纸条的检测原理

二联胶体金免疫层析试纸条检测示意图与结果判定方法如图 1 所示。

检测线 T-1、T-2 分别包被 OTA 和 ZEN 偶联抗原, 质控线包被山羊抗兔抗体, 胶体金标记的 OTA、ZEN 单克隆抗体和兔源多克隆抗体按最适比例混匀后固定于金标垫。滴加待检样品后, 通过比较检测线与质控线颜色的差异对结果进行判定。

### 1.5 二联胶体金免疫层析检测方法的优化

#### 1.5.1 金标抗体保存液的优化

选取 5 mmol/L pH 7.4 的硼酸盐缓冲液, 分别加入不同浓度的蔗糖(4%、8%、10%、20%)、叠氮钠

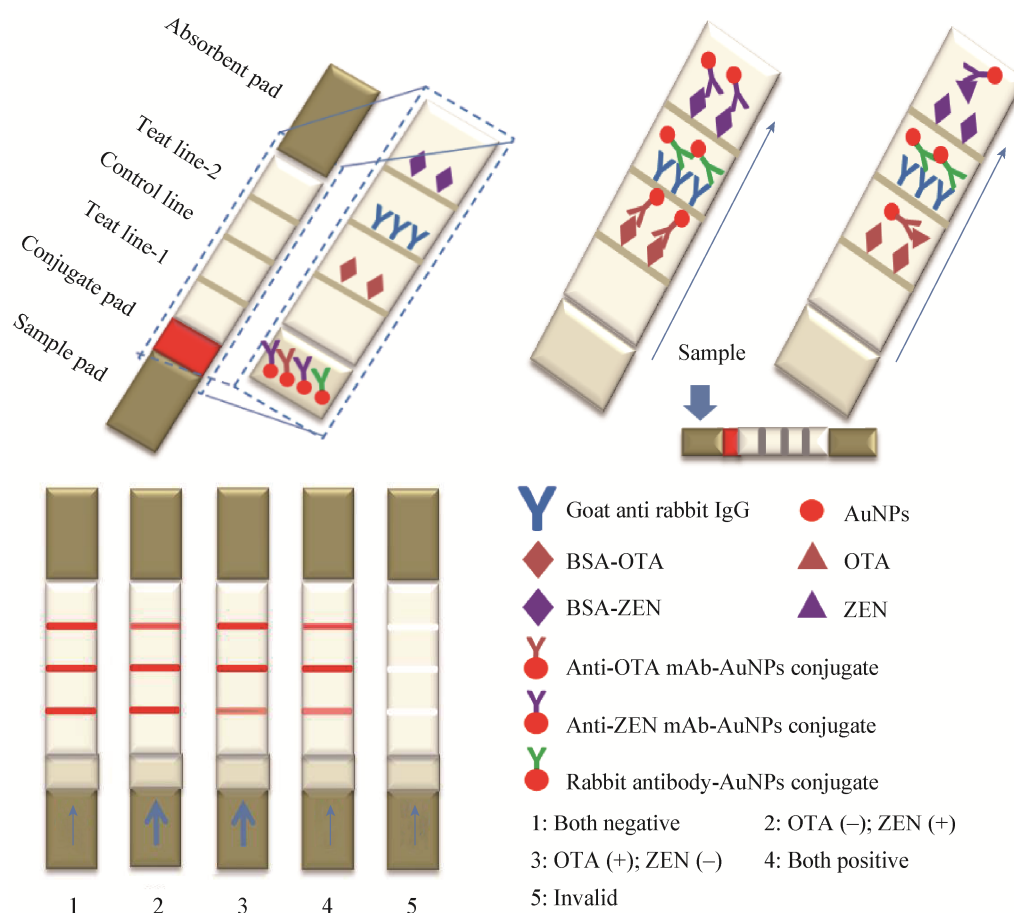


图1 赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮ZEN定性胶体金免疫层析试纸条示意图

Figure 1 Schematic diagram of the dual flow immunoassay for the qualitative detection of ochratoxin A and zearalenone

(0、0.05%)、不同浓度BSA(0、0.5%、1%、2%)配成不同金标抗体保存液。将制备的金标抗体加入配置的保存液中，4℃保存1个月，观察金标抗体溶液有无沉淀产生，并同时检测金标抗体活性，选择最佳抗体储存液配方。

### 1.5.2 免疫层析试纸条包被抗原的选择

分别选取BSA、OVA作为载体蛋白合成的偶联抗原作为检测线包被抗原，比较检测的特异性和灵敏度，选择最优。

### 1.5.3 免疫层析试纸条组成材料的优化

硝酸纤维素膜(NC膜)的优化：分别选用Millipore 180、PALL VividTM170、Sartorius UniSart CN140、YN120B、YNHS120B和YNHS140B 6种较为常用的NC膜，通过比较流速、检测线与质控

线颜色强度和均一性以确定最优NC膜。

金标垫种类和前处理液的优化：3种不同金标垫(SB06、SB08、6613)，处理液选择不同摩尔浓度(10、20、50 mmol/L)的Tris-HCl、磷酸盐缓冲液(PBS)和硼酸盐缓冲液(BB) (pH 7.4)，分别含不同的蔗糖浓度(0、2%、4%、6%)和牛血清白蛋白BSA(0、0.5%、1%、2%)。并选取不同浓度(0、0.05%、0.25%、0.5%、1%)的Tween-20或TritonX-100作为表面活性剂，以金标抗体干燥后的稳定性和释放效率为标准，选取最优金标垫和前处理液配方。

样品垫种类和前处理条件的优化：本研究对于样品垫，主要针对SB06和SB08择优选择，前处理液的优化同上，最终通过滴加阳性、阴性样品提取液，比较吸收情况以选择最佳样品垫种类和前处

理条件。PVC 底板和吸水垫对层析体系影响较小, 选用常规型号。

#### 1.5.4 胶体金免疫层析相关条件的优化

抗原包被缓冲液的优化: 分别对比含 3% 甲醇的 10 mmol/L Tris-盐酸缓冲液(pH 9.0, TBS)、10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4, PBS)、10 mmol/L 硼酸盐缓冲液(pH 9.0, BB)以及 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6, CBS)的包被效率, 以检测线颜色均匀、清晰且检测灵敏度高的为最优。

硝酸纤维素膜封闭液的选择: 分别使用含不同浓度 Tween-20 (0.5%和 1%)、PEG 2000 (0.5%和 1%)、BSA (0.5%和 2%)、NaN<sub>3</sub> (0 和 0.01%)的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)作为封闭液并观察封闭效果。

金标抗体稀释液的选择: 2 种不同 pH 值(7.4 和 8.2)的 10 mmol/L 碳酸盐缓冲(CBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、硼酸盐缓冲液(BB), 加入不同添加物, 蔗糖(2%、4%、8%和 10%)或海藻糖(2%、4%、8%和 10%)、BSA (0.5%、1%和 2%)、NaN<sub>3</sub> (0、0.05%), 比较胶体金试纸条的灵敏度和稳定性。

基质影响的消除: 样本萃取时, 加入的高浓度有机试剂以及样本中蛋白质、纤维素等均会对层析效果产生影响, 即基质效应。检测时需对样本进行稀释, 稀释倍数过高会降低检测灵敏度, 过低则不足以消除基质影响, 本研究将综合考虑, 优化得到最佳稀释倍数。

#### 1.5.5 金标抗体与包被抗原浓度的优化

双重检测时, 金标垫上需同时固定 3 种金标抗体, 因此需要对不同金标抗体的混合比例进行优化, 保证检测阴性样本时, 检测线 T1、T2 与质控线 C 显色效果一致。

### 1.6 二联胶体金免疫层析检测方法的建立

按照模式图(图 1), 硝酸纤维素膜(NC 膜)上 T-1、T-2 分别包被 OTA 和 ZEN 偶联抗原, C 线包被山羊抗兔抗体, 金标 OTA 抗体、ZEN 抗体和兔源多克隆抗体按比例混合后固定于金标垫, 并按图 2 所示, 将处理后的样品垫、金标垫、NC 膜和吸水垫依次粘贴在 PVC 底板上, 每两部分相互重叠, 试纸条组装完成后, 切割成宽度 0.5 cm 的试纸条备用。配置不同浓度毒素标准品溶液, 取 100  $\mu$ L 滴加至加样孔, 层析 5 min 后观察显色结果, 判定最低检测限。

#### 1.7 样本萃取与加标试验

25 g 样本置于 250 mL 三角烧瓶, 加入 100 mL 萃取液(甲醇:水=7:3, 体积比), 剧烈振荡 5 min 后 4 000 $\times$ g 离心 10 min 后上清经快速定量滤纸过滤, 超纯水稀释后使用试纸条进行检测。将经 LC-MS/MS 检测过的 OTA 和 ZEN 阴性样本烘干后, 研磨过筛, 分别加入 OTA 或 ZEN 标准品溶液并充分混匀, 室温放置过夜待检。

#### 1.8 胶体金免疫层析试纸条稳定性试验

本研究采用 37  $^{\circ}$ C 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  $^{\circ}$ C 恒温箱, 分别于 7、15、30 d 取出, 采用梯度稀释的标准品溶液验证其检测灵敏度, 以评价试纸条稳定性, 预测保存期。

#### 1.9 胶体金免疫层析试纸条与 LC-MS/MS 比较试验

对天然样本(包括玉米、小麦和饲料)同时采用制备的二联胶体金试纸条和 LC-MS/MS 进行平行检测。

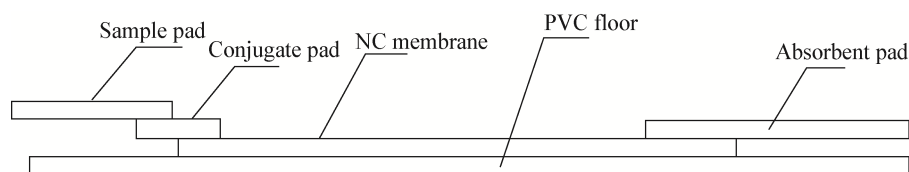


图 2 胶体金免疫层析试纸条侧面结构示意图

Figure 2 Sketch map of test strip (side view)

## 2 结果与分析

### 2.1 胶体金溶液的鉴定

分别采取目测和透射电镜法对制备的胶体金溶液进行鉴定。

#### 2.1.1 目测法鉴定

如图 3A 所示,制备的胶体金溶液外观澄清,色泽鲜艳,无颗粒物沉淀,在日光灯下透光度好,且随着颗粒粒径的增大,溶液颜色变深。

#### 2.1.2 透射电镜观察

透射电镜扫描结果见图 3B,胶体金粒径均匀,与标尺比较,大小与预期相符。

### 2.2 胶体金与单克隆抗体最佳结合 pH 和单克隆抗体最佳标记量

OTA、ZEN 单克隆抗体与胶体金颗粒最佳结合 pH 和最佳标记量的优化结果如图 4 所示。处于最佳标记 pH,胶体金颗粒与抗体吸附效果较好,此时胶体金-抗体复合物光密度较高,如图 4A 所示,

OTA 和 ZEN 抗体最佳标记 pH 分别为 7.5 和 6.5。

OTA、ZEN 抗体标记时,最佳标记浓度时吸光度值最高,抗体过量会影响检测灵敏度。如图 4B 所示,OTA 和 ZEN 抗体实际标记量分别为 8.4  $\mu\text{g/mL}$  和 6.0  $\mu\text{g/mL}$  (实际标记量=最佳使用量 $\times$ 120%)。

### 2.3 金标抗体的鉴定结果

图 5 所示,制备的金标抗体特异性良好,可用于二联胶体金免疫层析试纸条的制备。

### 2.4 金标抗体保存液的确定

5 mmol/L pH 7.4 的硼酸盐缓冲液中分别加入不同浓度的蔗糖、叠氮钠、BSA 配成不同金标抗体储存液,分别保存金标抗体(4 $^{\circ}\text{C}$ , 1 个月),结果发现不加叠氮钠和不加 BSA 组均出现沉淀,蔗糖含量超过 10%后金标抗体稳定性较好,为降低试验成本,选择含蔗糖 10%,叠氮钠 0.05%,BSA 0.5%的 5 mmol/L pH 7.4 的硼酸盐缓冲液作为金标抗体储存液。

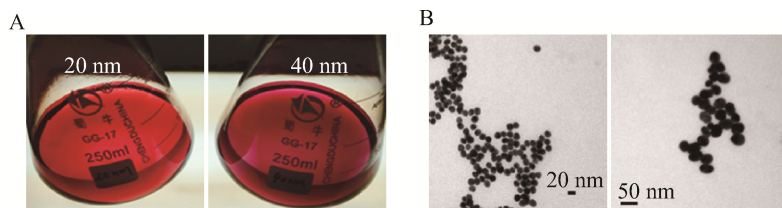


图 3 目测法(A)和透射电镜(B)对不同粒径胶体金颗粒的鉴定

Figure 3 Colloidal solution of various diameter gold nanoparticles

Note: A: Visualization with naked eyes; B: Images from transmission electron microscopic.

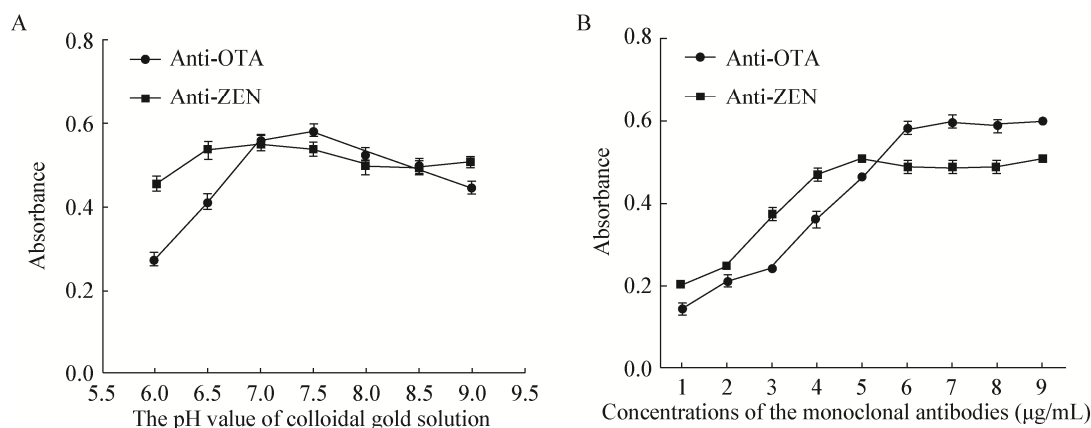


图 4 单克隆抗体与胶体金颗粒标记最佳结合 pH (A)和最佳标记量的优化(B)

Figure 4 Optimization results based on monoclonal antibodies labeling pH (A) and quantity (B)



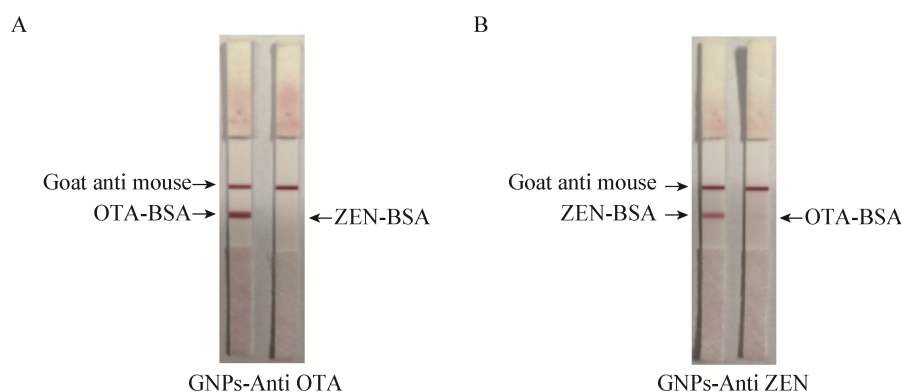


图5 金标抗体的免疫层析效果鉴定

Figure 5 Identification of gold nanoparticles labeled antibodies by lateral flow immunoassay

## 2.5 胶体金免疫层析试纸条包被抗原的确定

2 种金标抗体均与载体蛋白 BSA 或 OVA 均无交叉反应。OTA 检测时, 包被 OTA-OVA 时灵敏度更高, ZEN 检测时, 包被 ZEN-BSA 效果更优。因此选择 OTA-OVA、ZEN-BSA 作为包被抗原。

## 2.6 胶体金免疫层析试纸条组成材料的确定

硝酸纤维素膜(NC): 对比表明, Sartorius UniSart CN140 最优, 检测灵敏度较高, 点样后 5–10 min 内可读取结果, 竞争免疫反应充分, 背景值较低。

金标抗体固定垫和前处理液: 将金标抗体在不同金标垫(SB06、SB08、6613)冻干、复溶后比较层析效果, 结果表明聚酯膜 6613 效果最佳, 金标抗体 5 min 左右可释放完全, 处理液为 20 mmol/L 分别含有 4%蔗糖、1% BSA 和 0.25%表面活性剂 TritonX-100 的硼酸盐缓冲液(BB, pH 7.4)。

玻璃纤维: SB06、SB08 在检测时, 均能完全吸收 100  $\mu$ L 样品, SB08 时检测线信号更强, 因此选取为后续样品垫材料。处理液配方同上。

## 2.7 免疫层析相关条件的确定

经优化, 抗原包被液确定为含 3%甲醇的 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(CBS, pH 9.6); NC 膜封闭液则最终选择 10 mmol/L 含 0.5% Tween-20、0.5% PEG2000、2% BSA 和 0.02%  $\text{NaN}_3$  的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4), 金标抗体稀释液为 10 mmol/L 含 8% 蔗糖、2% BSA 和 0.05%  $\text{NaN}_3$  的硼酸盐缓冲液(BB, pH 8.2)。样本萃取后选择 1:9 的稀释比以达到最佳

的检测效果。

## 2.8 二联胶体金免疫层析试纸条检测特异性与检测限

### 2.8.1 3 种金标抗体交叉反应性的验证

结果如图 6 所示, 3 种金标抗体不发生交叉反应, 为后续两种真菌毒素的同时检测奠定基础。

### 2.8.2 金标抗体和包被抗原浓度的确定

为获得最佳检测效果, 对 OTA-OVA、ZEN-BSA 和金标抗体 GNP-Anti OTA 以及 GNP-Anti ZEN 的浓度进行优化, 最终确定 OTA-OVA (3.7 mg/mL) 的包被浓度为 0.06 mg/mL, ZEN-BSA (4.9 mg/mL) 包被浓度为 0.04 mg/mL, 山羊抗兔抗体包被浓度为 0.1 mg/mL, 10 倍稀释后的金标 OTA、ZEN 单克隆抗体和兔源多克隆抗体的使用比为 2:1:1, 总喷涂量为 60  $\mu$ L/cm<sup>2</sup>。

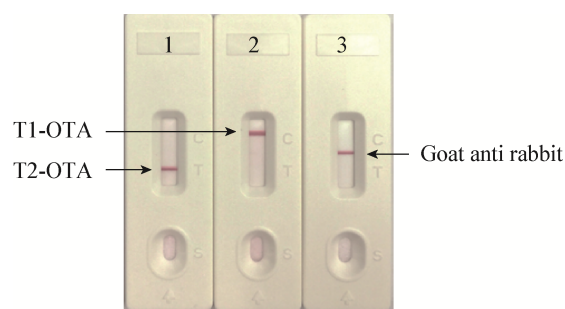


图6 3 种金标抗体交叉反应性的测定

Figure 6 The cross-reactivities of three different complex of gold nanoparticles labeled antibodies

Note: 1: GNP-Anti OTA; 2: GNP-Anti ZEN; 3: GNP-pAb (rabbit).

### 2.8.3 二联胶体金免疫层析试纸条检测限的确定

检测 OTA 时, 结果如图 7A 所示, 浓度为 0.625 ng/mL 时, T1 (OTA) 颜色与 C 相比, 变化明显, 说明对 OTA 标准品的检测限为 0.625 ng/mL, 检测 ZEN 时, 按照相同的判定方法, ZEN 标准品的检测限为 1.25 ng/mL, 图 7B 所示。

### 2.8.4 二联胶体金免疫层析试纸条特异性的鉴定

如图 8 所示, 制备的 OTA 和 ZEN 二联定性试纸条对常见的真菌毒素均不发生交叉反应, 特异性良好(浓度均为 5 ng/mL)。

### 2.8.5 二联胶体金免疫层析试纸条对加标样本的检测

如图 9 所示, 二联胶体金试纸条对 OTA 检测限为 20  $\mu\text{g/kg}$ , 对 ZEN 检测限为 40  $\mu\text{g/kg}$ , 判断标

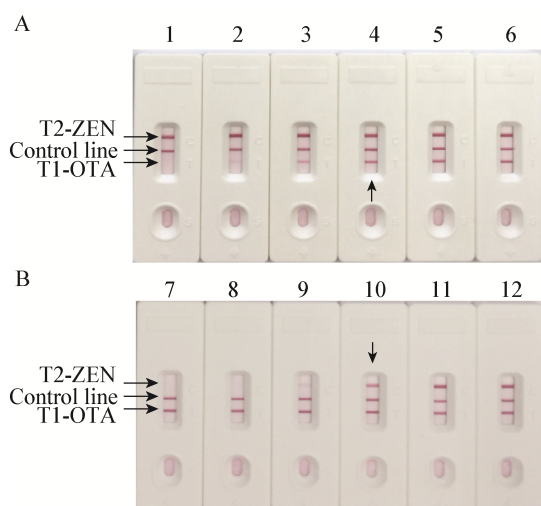


图 7 二联免疫层析试纸条对赭曲霉毒素 A (A) 和玉米赤霉烯酮 (B) 的检测限

Figure 7 Detecting limits of immunochromatographic strip for ochratoxin A (A) and zearalenone (B)

Note: 1–6: Concentrations of OTA 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 and 0 ng/mL; 7–12: Concentrations of ZEN 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 and 0 ng/mL.

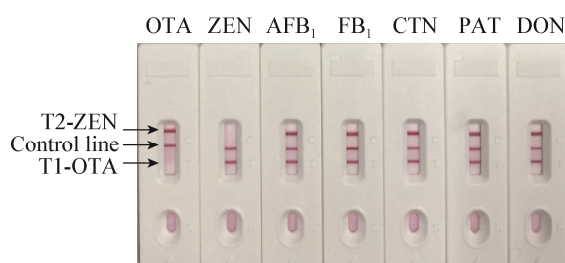


图 8 二联定性免疫层析试纸条对其他真菌毒素的交叉反应性

Figure 8 Cross-reactivities of the dual flow immunochromatographic strip for different mycotoxins

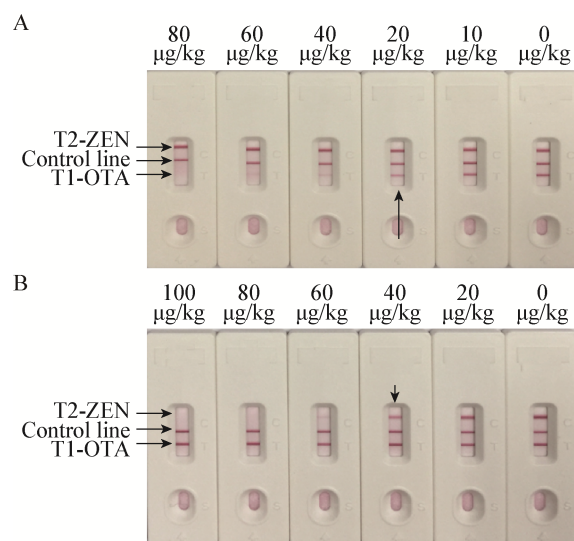


图 9 二联定性免疫层析试纸条对 OTA 和 ZEN 加标样本的检测

Figure 9 Sensitivity of the dual flow immunochromatographic strip for ochratoxin A (A) or zearalenone (B) in spiked samples

准为该浓度下检测线显色强度与质控 C 线相比差异明显。

### 2.9 二联胶体金免疫层析试纸条稳定性的验证

按照 1.8 中所述进行胶体金试纸条稳定性检测, 结果表明 37 °C 放置 30 d 后, 试纸条检测灵敏度未下降, 对 OTA 和 ZEN 仍能特异性检出。本试验证明制备的胶体金试纸条稳定性好, 至少可在 37 °C 保存 30 d, 胶体金试纸条通常室温放置, 因此预测其在室温可稳定保存一年。

### 2.10 二联胶体金免疫层析试纸条与 LC-MS/MS 比较

OTA 检测时, 使用 40 份天然样本。其中包括玉米、小麦和饲料, 由浙江省检验检疫科学技术研究院提供, 分别使用二联免疫层析试纸条和 LC-MS/MS 平行检测, 每种方法均重复 3 次, 结果表明, 当 OTA 含量超过 20  $\mu\text{g/kg}$  时, 二者具有较好的相关性(表 1)。

ZEN 检测时, 使用 40 份天然样本。其中包括玉米、小麦和饲料, 由浙江省检验检疫科学技术研究院提供。分别使用二联定性免疫层析试纸条和 LC-MS/MS 平行检测, 每种方法均重复 3 次。结果表明, 当 ZEN 含量超过 40  $\mu\text{g/kg}$  时, 两种方法相关性较好(表 2)。



表 1 二联胶体金免疫层析试纸条和 LC-MS/MS 对天然样本中 OTA 进行检测

Table 1 Comparison of strips with LC-MS/MS for the detection of ochratoxin A in cereal and feed samples

Sample No.	LC-MS/MS Mean±SD (μg/kg)	Strips	Sample No.	LC-MS/MS Mean±SD (μg/kg)	Strips
1	0.97±0.01	—	21	18.39±0.03	—
2	3.98±0.03	—	22	0.93±0.01	—
3	—	—	23	27.71±0.03	+
4	49.24±0.12	—	24	20.42±0.07	+
5	—	—	25	0.98±0.03	—
6	1.36±0.02	—	26	32.36±0.14	+
7	—	—	27	22.94±0.02	+
8	1.25±0.01	—	28	—	—
9	0.92±0.02	—	29	1.19±0.01	—
10	20.99±1.01	+	30	1.34±0.02	—
11	—	—	31	15.97±0.01	—
12	4.18±0.01	—	32	25.57±0.01	+
13	—	—	33	20.42±0.07	+
14	1.09±0.01	—	34	1.23±0.01	—
15	—	—	35	—	—
16	46.92±0.02	+	36	49.55±1.23	+
17	—	—	37	20.01±0.01	+
18	14.87±0.11	—	38	59.88±0.03	+
19	1.01±0.01	—	39	27.71±0.03	+
20	—	—	40	0.91±0.01	—

注: +: 试纸条判定阳性; -: 试纸条判定阴性.

Note: +: Positive result; -: Negative result.

表 2 二联胶体金免疫层析试纸条和 LC-MS/MS 对天然样本中 ZEN 进行检测

Table 2 Comparison of strips with LC-MS/MS for the detection of zeralenone in cereal and feed samples

Sample No.	LC-MS/MS Mean±SD (μg/kg)	Strips	Sample No.	LC-MS/MS Mean±SD (μg/kg)	Strips
1	109.14±0.06	+	21	19.34±0.15	—
2	14.84±0.29	—	22	—	—
3	9.99±0.08	—	23	10.91±0.28	—
4	85.03±0.29	+	24	16.67±0.05	—
5	3.81±0.55	—	25	3.89±0.04	—
6	29.14±11	—	26	—	—
7	38.20±0.21	—	27	4.48±0.22	—
8	29.07±0.16	—	28	27.03±0.31	—
9	21.25±0.11	—	29	24.20±0.44	—
10	65.23±0.10	+	30	22.46±0.15	—
11	3.71±0.15	—	31	—	—
12	3.74±0.08	—	32	14.27±0.15	—
13	169.66±0.10	+	33	140.75±0.51	+
14	17.52±0.29	—	34	36.86±0.09	—
15	—	—	35	30.34±2.19	—
16	106.27±1.02	+	36	3.32±0.10	—
17	—	—	37	14.41±0.35	—
18	19.21±0.21	—	38	3.28±0.08	—
19	34.20±0.19	—	39	3.56±0.13	—
20	14.01±0.45	—	40	4.05±0.16	—

注: +: 试纸条判定阳性; -: 试纸条判定阴性.

Note: +: Positive result; -: Negative result.

综上所述,本研究制备的 OTA 和 ZEN 二联胶体金免疫层析试纸条快速、便捷且灵敏度高,并在其检测范围内,与 LC-MS/MS 结果一致性良好,可用于谷物和饲料中两种毒素的快速初筛。

### 3 讨论与结论

胶体金试纸条显色原理为:金标抗体或抗原在检测线或质控线上发生聚集,形成肉眼可见的颜色反应。因此胶体金粒径会直接影响检测体系的稳定性和灵敏度,粒径过大会阻碍金颗粒对小分子蛋白质的标记,过小则不足以产生可被肉眼识别的颜色信号。相关报道对胶体金粒径的选择并不一致<sup>[13-15]</sup>,本研究中我们分别制备了 20 nm 和 40 nm 金颗粒。经比较,20、40 nm 胶体金标记抗体后均可获得较高的检测灵敏度,但 40 nm 金颗粒标记产物稳定性更好,因此,本实验最终选择 40 nm 胶体金作为最佳抗体标记物。

层析系统主要由样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜(NC 膜)和吸水垫组成。样品垫主要作用为对将待检样本进行初步过滤,调节 pH 和粘度,并转运至金标垫和检测膜,减缓样本渗透速度,使其均匀展开;金标垫功能为固定金标抗体,决定其释放效果和稳定性;NC 膜筛选主要考虑包被效率、层析速度和背景信号等因素。本研究中我们分别对相关材料进行优化,选择聚酯膜 6613、玻璃纤维 SB08 和 Sartorius UniSart CN140 作为本实验中的样品垫、金标垫和硝酸纤维素膜。

相关缓冲液的浓度、种类和 pH 同样会影响层析系统的检测效果,如抗原包被缓冲液、金标抗体稀释液、样品垫和金标垫前处理液以及 NC 膜封闭液等<sup>[16]</sup>。缓冲液种类主要包括磷酸盐缓冲液(PBS)、硼酸盐缓冲液(BB)和碳酸盐缓冲液(CBS)<sup>[16-17]</sup>,通常为 10–50 mmol/L<sup>[13,15,18]</sup>,pH 一般为 7.4–9.0<sup>[16,19-20]</sup>,并添加不同浓度蔗糖、海藻糖和 BSA,保证金标抗体稳定性。在本研究中,我们通过比较检测灵敏度、肉眼观察检测线或质控线信号强度以及评价金标抗体释放效率和稳定性等对缓冲液种类、浓度和 pH

进行优化。结果表明碳酸盐溶液(CBS)作为抗原包被缓冲液时,包被效率更好,硼酸盐溶液(BB)作为前处理缓冲液时效果更佳;在维持金标抗体稳定性方面,海藻糖和蔗糖无明显差别,BSA 和  $\text{NaN}_3$  的加入均有助于增强检测体系稳定性。表面活性剂,例如 TritonX-100、Tween-20 和 Tetronic 1307 等同样可提高检测灵敏度,低浓度的表面活性剂可使 NC 膜的二次湿润,利于样本的迁移。与此同时,本研究发现在样品垫、金标垫前处理液和抗原包被缓冲液中添加 TritonX-100 和 Tween-20 后,可获得比其他表面活性剂更好的检测效果。

抗原包被浓度和金标抗体喷涂量通过方阵法确定,以获得最佳的显色效果和灵敏度为依据。制备二联检测层析试纸条时,还需综合考虑两种待检物质的信号强度和检测区间。不同批次偶联抗原和金标抗体效果、浓度存在差异,需经预试,并对抗原浓度和金标抗体稀释倍数进行调整,在满足检测要求后,再组装成试纸条。

样本检测过程涉及待检物质的萃取、萃取液中有有机溶剂(甲醇)及样本中蛋白质和纤维素等均会对层析系统稳定性产生影响<sup>[21-22]</sup>,通常选择对萃取液进行稀释以降低其影响。一般来说,稀释度过高会降低检测灵敏度,过低则不足以消除基质的影响。本研究通过对基质影响和检测灵敏度综合考虑,优化得到最佳的稀释比例,达到最优检测效果。

相比常规的酶联免疫检测法(ELISA),试纸条检测时间短、操作简单、检测成本低并可满足大量样本快速检测的需求,可通过肉眼直接对检测结果进行判定。OTA 在谷物、豆类、小麦及其制品中限量标准为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,在饲料原料和猪饲料中的限量标准则分别为 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[23]</sup>,ZEN 在食品和饲料中的限量则分别为 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[24]</sup>,本研究制备的二联试纸条对 OTA 和 ZEN 的检测分别可达到 20、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,满足谷物及饲料原料中 OTA 和 ZEN 的快速初筛。相比针对单一目标分子的检测,二联免疫层析试纸条更加快速、高效。

本研究利用前期制备的 OTA 和 ZEN 单克隆抗

体, 建立的二联试纸条为基层检验检疫单位在真菌毒素快速检测方面提供支持, 具有很好的应用价值, 可大规模推广使用。后期我们将在此基础上结合胶体金读数仪, 提高检测灵敏度, 实现定量检测。

## REFERENCES

- [1] Delgado J, da Cruz Cabral L, Rodriguez M, et al. Influence of ochratoxin a on adaptation of *Penicillium nordicum* on a NaCl-rich dry-cured ham-based medium[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 272: 22-28
- [2] Amézqueta S, González-Peñas E, Murillo-Arbizu M, et al. Ochratoxin a decontamination: a review[J]. Food Control, 2009, 20(4): 326-333
- [3] He L, Zheng W, Liu YF, et al. Progress in ochratoxins A[J]. China Herbivore Science, 2017, 37(5): 59-61, 69 (in Chinese)  
贺亮, 郑文, 刘玉峰, 等. 赭曲霉毒素 A 研究进展[J]. 中国草食动物科学, 2017, 37(5): 59-61, 69
- [4] Collins TFX, Sprando RL, Black TN, et al. Effects of zearalenone on in utero development in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(9): 1455-1465
- [5] Yang LJ, Huang LB, Li SM, et al. Effects of zearalenone on ovary index, distribution and expression of progesterone receptors in ovaries of weaned gilts[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(12): 4510-4517 (in Chinese)  
杨立杰, 黄丽波, 李思梦, 等. 玉米赤霉烯酮对断奶小母猪卵巢指数及孕激素受体分布和表达的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(12): 4510-4517
- [6] Smith MC, Madec S, Coton E, et al. Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their *in vitro* combined toxicological effects[J]. Toxins, 2016, 8(4): 94
- [7] Zhang J, Gao L, Zhou B, et al. Study on rapidly simultaneous detection of deoxynivalenol and Zearalenone[J]. China Biotechnology, 2009, 29(11): 82-88 (in Chinese)  
张珏, 高雷, 周彬, 等. 快速同时检测玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(11): 82-88
- [8] Calbiani F, Careri M, Elviri L, et al. Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1042(1/2): 123-130
- [9] Vaclavik L, Vaclavikova M, Begley TH, et al. Determination of multiple mycotoxins in dietary supplements containing green coffee bean extracts using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(20): 4822-4830
- [10] Li RJ, Zhang XY, Yang C, et al. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic assay for the rapid detection of *Edwardsiella ictaluri*[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2018, 18(6): 3800-3805
- [11] Cao DK, Su JZ, Zhang Y, et al. Research progress in colloidal gold immune chromatographic techniques in food safety detection[J]. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2017, 35(10): 1322-1325 (in Chinese)  
曹德康, 苏建忠, 张瑛, 等. 胶体金免疫层析技术在食品安全检测中的应用研究进展[J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(10): 1322-1325
- [12] Zhang DH, Li PW, Yang Y, et al. A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. Talanta, 2011, 85(1): 736-742
- [13] Molinelli A, Grossalber K, Krska R. A rapid lateral flow test for the determination of total type B fumonisins in maize[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(5): 1309-1316
- [14] Luo SJ, Chen FR, Liu CM, et al. Effect of colloidal gold particle size on the performance of chloramphenicol test strips[J]. Food Science, 2011, 32(12): 120-124 (in Chinese)  
罗舜菁, 陈发荣, 刘成梅, 等. 胶体金粒径对氯霉素胶体金试纸条性能的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 120-124
- [15] Shim WB, Kim KY, Chung DH. Development and validation of a gold nanoparticle immunochromatographic assay (ICG) for the detection of zearalenone[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(10): 4035-4041
- [16] Kolosova AY, de Saeger S, Sibanda L, et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(7/8): 2103-2107
- [17] Shim WB, Dzantiev BB, Eremin SA, et al. One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin a and zearalenone[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(1): 83-92
- [18] Guo YR, Liu SY, Gui WJ, et al. Gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of carbofuran and triazophos in water samples[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 389(1): 32-39
- [19] Byzova NA, Zvereva EA, Zherdev AV, et al. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk[J]. Talanta, 2010, 81(3): 843-848
- [20] Song CM, Liu QT, Zhi AM, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of olaquinox residues[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(17): 9319-9326
- [21] Wang S, Quan Y, Lee NJ, et al. Rapid determination of fumonisin B<sub>1</sub> in food samples by enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(7): 2491-2495
- [22] Lattanzio VMT, Nivarlet N, Lippolis V, et al. Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of *Fusarium* mycotoxins in cereals[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 718: 99-108
- [23] Liu Y, Wang PY, Liu XP, et al. Review of current Chinese regulations of maximum residue levels and testing standard of mycotoxin in foods and feeds[J]. China Brewing, 2014, 33(7): 10-19 (in Chinese)  
刘莹, 王珮玥, 刘雪平, 等. 我国现行食品与饲料中真菌毒素限量及检测标准概述[J]. 中国酿造, 2014, 33(7): 10-19
- [24] Wang YK, Shi YB, Zou Q, et al. Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B<sub>1</sub> in corn, wheat and feedstuff samples[J]. Food Control, 2013, 31(1): 180-188