

基于磁性纳米颗粒伏马菌素B双探针竞争ELISA检测方法的建立

孙宇, 孟宪梅, 林超, 李冰, 张亮*
(吉林工商学院粮食学院, 吉林 长春 130507)

摘要: 建立一种基于磁性纳米颗粒能同时检测样品中伏马菌素B₁ (fumonisin B₁, FB₁)、FB₂和FB₃总量的双探针竞争酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测方法。采用通过活化酯法制备磁性纳米颗粒-FB₁捕获探针, 利用改良过碘酸钠法合成McAb-HRP探针, 对检测步骤进行优化, 确定最佳反应条件。所建立检测方法对FB₁和FBs的检测范围分别为0.07~1.98 ng/mL和0.10~9.86 ng/mL。在玉米样品中加标回收率范围为86.2%~105.1%。所建立方法检测结果与液相色谱-串联质谱检测结果的相关系数 (R^2) 为0.996 6。双探针竞争ELISA检测法检测速度快、准确性高、重复性好, 为玉米中伏FBs的快速筛选提供了新方法。

关键词: 磁性纳米颗粒伏马菌素B₁探针; 抗FBs单克隆抗体-辣根过氧化物酶探针; 伏马菌素; 双探针检测方法

Development of a Dual-Probe Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Magnetic Nanoparticles for the Detection of Fumonisin B

SUN Yu, MENG Xianmei, LIN Chao, LI Bing, ZHANG Liang*
(Grain College, Jilin Business and Technology College, Changchun 130507, China)

Abstract: In this study, a dual-probe competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on magnetic nanoparticles for the simultaneous detection of fumonisin B₁ (FB₁), FB₂ and FB₃ in maize samples was established. A magnetic capture probe (MNPs-FB₁) was synthesized by the active ester method, and a monoclonal antibody-horseradish peroxidase (McAb-HRP) probe was prepared by a modified sodium periodate method. The reaction conditions of the assay were optimized. The linear ranges for FB₁ and the total amount of FB₁, FB₂ and FB₃ (FBs) were 0.07–1.98 and 0.10–9.86 ng/mL, respectively. The average recoveries of FBs from spiked maize samples ranged from 86.2% to 105.1%. The correlation coefficient between the results of the developed assay and those of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was 0.996 6. These results suggest that this assay is characterized by rapidity, high accuracy and good repeatability and provides a new method for the detection of FBs in maize samples.

Keywords: magnetic nanoparticle-fumonisin B₁ probe; monoclonal antibody-horseradish peroxidase probe; fumonisin; dual-probe assay

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220402-021

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 08-0345-07

引文格式:

孙宇, 孟宪梅, 林超, 等. 基于磁性纳米颗粒伏马菌素B双探针竞争ELISA检测方法的建立[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 345-351. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220402-021. <http://www.spkx.net.cn>

SUN Yu, MENG Xianmei, LIN Chao, et al. Development of a dual-probe competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on magnetic nanoparticles for the detection of fumonisin B[J]. Food Science, 2023, 44(8): 345-351. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220402-021. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-04-02

基金项目: 吉林省教育厅科学技术研究项目 (JJKH20210210KJ); 吉林省科技厅基础研究专项 (202002006JC); 2022年吉林工商学院科学技术研究项目 (KZ[2022]第002号)

第一作者简介: 孙宇 (1985—) (ORCID: 0000-0001-7356-8893), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全控制。

E-mail: sunyu@jlbtc.edu.cn

*通信作者简介: 张亮 (1986—) (ORCID: 0000-0002-6006-5151), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为粮食加工与检测。

E-mail: zhangliang@jlbtc.edu.cn

伏马菌素为真菌毒素的一种,是由串珠镰刀菌产生的次生代谢产物,主要污染玉米、小麦、玉米制品等^[1]。到目前为止,已鉴定出A、B、C和P四种类型的伏马菌素,其中伏马菌素B(fumonisin B, FBs)污染最为普遍、毒性最强^[2]。在自然污染的情况下,FBs中FB₁、FB₂和FB₃占比为12:4:1^[3]。FB₁是伏马菌素中毒性最强、最为常见的真菌毒素,可引起大鼠肝癌、马脑白质软化等症状,并可能会诱发人类患食管癌等疾病^[4]。因此,国际癌症机构将其列入2B类致癌物质^[5]。美国食品药品监督管理局规定在人类食物和动物饲料中总伏马菌素的最大残留限量分别为2~4 mg/kg和5~100 mg/kg^[6]。因此,建立FBs快速、灵敏、准确的检测方法意义深远。

目前,对于FBs的检测,仪器检测方法已有高效液相色谱法^[7]、液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)联用法^[8]、气相色谱-质谱联用法^[9]及薄层色谱法^[10]等。仪器检测法虽然灵敏度高、准确性好,但需要昂贵的仪器以及繁琐的前处理过程^[11]。基于抗原抗体特异性反应的免疫分析方法,作为高效筛选技术已被广泛用于医疗诊断^[12]、环境监测^[13]及食品安全^[14]等领域。与仪器分析方法相比,免疫分析方法具有高效、简单、方便等优点^[15]。在早期的研究中,酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[16]、荧光免疫分析^[17]和电化学传感器^[18]等已被用于FBs检测。

磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs)由于其尺寸均匀、磁性分离、生物兼容性好、高比表面积和可悬浮于溶液中等优点近年来已被广泛应用于生物医学和食品安全等领域^[19-20]。MNPs可与抗体/抗原通过共价键连接在一起。当溶液中存在目标抗原/抗体时,可与MNPs上的抗体/抗原发生特异性结合,并在磁场的作用下与其他物质快速的分离出来^[21]。该技术具有液相免疫反应的优点,缩短了检测时间,提高了检测的灵敏度^[22]。

在本实验中,羧基修饰的MNPs通过活化酯法活化羧基,直接与带有氨基的FB₁进行偶联合成MNPs-FB₁探针(图1A),采用改良过碘酸钠法合成McAb-HRP探针。应用所合成的两个探针,建立了快速、灵敏检测玉米中FBs的双探针检测方法(图1B)。在所建立的方法中,MNPs-FB₁探针作为捕获探针,与溶液中的FBs竞争结合McAb-HRP探针上的McAb,形成MNPs-FB₁-McAb-HRP,通过磁性分离、洗涤过程,再加入TMB显色溶液,反应终止后,在450 nm波长处测定OD值。OD值与待测溶液中的FBs浓度呈反比。在此方法中,由于使用了MNPs,缩短的抗原抗体反应的时间,同时HRP与McAb连接,没有引入二抗,进一步缩短了反应步骤,减少了检测时间。并在玉米中进行标准品添加回收实验,将实验结果与LC-MS/MS结果进行比较分析,评估该

方法的准确性,旨在为玉米中FBs的快速筛查提供新的检测技术。

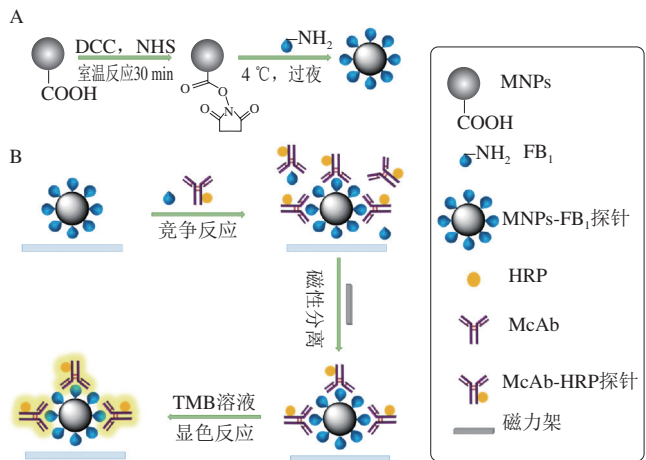


图1 MNPs-FB₁探针合成(A)及双探针检测方法(B)示意图
Fig. 1 Schematic diagrams of the synthesis of MNPs-FB₁ probe (A) and the principle of dual-probe assay (B)

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

FB₁、FB₂、FB₃、玉米赤霉烯酮、T-2毒素、展青霉素、橘青霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、TMB底物溶液美国Sigma-Aldrich公司;牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、*N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)、二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)、辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)上海阿拉丁生化科技股份有限公司;96孔酶标板美国Costar公司;MNPs(粒径200 nm)无锡百运纳米科技有限公司;抗FBs单克隆抗体(McAb)由实验室制备^[23];实验用水为超纯水(18.2 MΩ·cm);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

EnSpire多功能酶标仪 美国PerkinElmer公司;Zetasizer Nano ZS90动态光散射仪(dynamic light scatterer, DLS) 英国Malvern公司;NanoDrop 2000型分光光度计 美国Thermo公司;Maxi MR 1数显型磁力搅拌器 德国IKA公司;H-7650透射电镜(transmission electron microscope, TEM) 日本Hitachi公司;API 4000 QTRAP[®] LC-MS/MS系统 美国AB SCIEX公司。

1.3 方法

1.3.1 MNPs-FB₁探针合成及鉴定

MNPs-FB₁探针的合成方法如图1A所示。吸取2 mL质量浓度为10 mg/mL的MNPs,采用磁性分离的原理,

利用磁力架将其与保护液分离,并重悬于1 mL DMF溶液中,分别加入1 mg DCC和1 mg NHS,室温下振荡反应30 min,活化MNP_s上的羧基,形成活化酯溶液;再向上述溶液中加入2 mg的FB₁,4 °C振荡过夜;反应完成后,利用磁性分离,弃去上清液,除去多余的FB₁;2 mL含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液(PBST, pH 7.4)洗涤3次后,加入1 mL 10% BSA溶液,室温振荡反应6 h,用于封闭MNP_s上的未结合的位点;封闭反应完成后,2 mL PBST洗涤3次,将MNP_s-FB₁探针重悬于1 mL磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) (10 mmol/L, pH 7.4)中,4 °C保存,备用。

采用TEM及DLS对MNP_s-FB₁探针的合成情况进行鉴定;采用竞争ELISA法对MNP_s-FB₁探针的稳定性进行测定,利用*t*检验判断OD值间的差异显著性。

1.3.2 McAb-HRP探针的合成及鉴定

参照文献[24]方法,采用改良过碘酸钠法合成McAb-HRP探针,合成方法稍作修改。准确称取5 mg HRP溶于1 mL去离子水中,加入0.2 mL 0.1 mol/L现配制的过碘酸钠溶液,室温下避光搅拌30 min;加入0.5 mL乙二醇溶液,室温下避光静置30 min;将上述溶液在1 mmol/L乙酸盐缓冲溶液(pH 4.4)中透析过夜,中间换液3~4次;再加入1 mL 5 mg/mL纯化后的McAb,在碳酸盐缓冲溶液(pH 9.5)中透析过夜。透析结束后,向析出的溶液中加入0.2 mL 5 mg/mL硼氢化钠溶液,混匀后4 °C静置2 h;采用饱和硫酸铵法进行纯化;纯化后的探针中等体积加入甘油,混匀后分装,-20 °C保存,备用。

采用紫外分光光度法和直接ELISA法鉴定McAb-HRP探针生物活性。

1.3.3 双探针检测方法的实验步骤

双探针检测程序如图1B所示,具体操作步骤如下:酶标板中每孔加入200 μL 1% BSA溶液,4 °C过夜,用于封闭板底结合位点;反应结束后,弃去BSA溶液,使用PBST缓冲溶液洗涤3次,最后一次于滤纸拍干;每孔中分别加入50 μL MNP_s-FB₁探针和50 μL McAb-HRP探针,再加入50 μL FB₁标准溶液或50 μL待测样品溶液,37 °C振荡反应,PBS作为空白对照;反应结束后,将酶标板置于磁力架上,磁性分离1 min,弃去上清液,使用PBST洗涤4次;酶标板每孔中加入100 μL现配制的TMB底物溶液,37 °C暗处振荡反应后,每孔再加入50 μL反应终止液;450 nm波长处测定OD值。

1.3.4 双探针检测方法的优化

1.3.4.1 最适MNP_s-FB₁探针用量和McAb-HRP探针稀释倍数的确定

MNP_s-FB₁探针使用PBS溶液由200 μg/mL梯度稀释至6.25 μg/mL,每孔50 μL纵向加入已封闭结合位点的酶标板中,McAb-HRP探针使用PBS稀释倍数分别为10、

100、200、400、1 000倍和2 000倍,每孔50 μL横向加入酶标板中,其余步骤用同1.3.3节,采用棋盘法根据OD值优化MNP_s-FB₁探针质量浓度和McAb-HRP探针稀释倍数。

1.3.4.2 最适竞争反应时间的确定

在1.3.4.1节确定条件的基础上,在37 °C条件下,竞争反应时间分别设置为20~60 min,根据阳性/阴性比值(*P/N*值)判定最佳反应时间。

1.3.4.3 最适底物作用时间的确定

在上述优化条件下,显色时间分别设置为4~14 min,根据*P/N*值判定最佳底物作用时间。

1.3.5 双探针检测方法标准曲线的建立

将FB₁标准溶液由40 ng/mL梯度稀释至20 pg/mL,用1.3.4节优化的检测条件进行测定,以FB₁质量浓度对数为横坐标,抑制率为纵坐标,应用Origin 9.0软件采用四参数Logistic曲线进行标准曲线拟合。

1.3.6 方法的特异性

将FB₁、FB₂、FB₃、玉米赤霉烯酮、T-2毒素、展青霉素、橘青霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液梯度稀释后,作为样品溶液采用已建立的双探针检测方法进行测定,绘制标准曲线,计算半数抑制浓度(IC₅₀),按下式计算交叉反应率:

$$\text{交叉反应率}/\% = \frac{IC_{50, FB_1}}{IC_{50, \text{其他毒素}}} \times 100$$

根据交叉反应结果,将FB₁、FB₂、FB₃按照质量浓度比12:4:1配制成1 mg/L的FBs混合溶液。再将此混合溶液梯度由40 ng/mL梯度稀释至20 pg/mL,以FBs质量浓度对数为横坐标,抑制率为纵坐标,建立标准曲线。

1.3.7 应用研究

1.3.7.1 加标回收实验

阴性玉米样品,粉碎后60 °C烘干过夜,向其中添加FB₁、FB₂、FB₃和FBs混合标准溶液(FB₁:FB₂:FB₃=12:4:1),使其终加标量分别为0、1、5 μg/kg和10 μg/kg。分别称取加标后的样品1 g,加入5 mL体积分数为70%的甲醇溶液,剧烈振荡3 min,4 000 × g离心10 min,取上清液用0.45 μm滤器过滤后,对添加量为5 μg/kg和10 μg/kg的提取上清液用0.01 mol/L PBS分别进行5倍稀释,再取各提取液50 μL进行回收率测定。

1.3.7.2 方法验证实验

应用LC-MS/MS对所建立的双探针检测方法的准确性进行验证。采用LC-MS/MS和双探针检测方法同时对1.3.7.1节所提取的上清液进行测定,分别以双探针检测方法和LC-MS/MS所测浓度为横纵坐标,应用Origin 9.0软件拟合回归方程,计算两种方法检测结果的相关系数。

1.4 数据分析

利用SPSS 22.0对数据进行统计分析, 利用Origin 9.0制图。所有实验平行测定3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 双探针检测方法原理

如图1B所示, MNPs-FB₁探针作为捕获探针, 用于和检测样品中的FB₁竞争结合McAb。由于MNPs的分散特性和悬浮特性, 与传统的间接竞争ELISA中的检测抗原相比, MNPs-FB₁探针可悬浮于反应溶液中, 缩短了与McAb的反应距离, 加速MNPs-FB₁-McAb反应平衡, 从而缩短抗原抗体竞争反应时间^[25]。在本方法中(图1B), 当有FB₁存在时, MNPs-FB₁探针和FB₁竞争结合McAb-HRP探针上的McAb。当反应结束后, 所形成的MNPs-FB₁-McAb-HRP可通过磁性分离的方法与反应溶液分开, 当撤去磁场后, MNPs-FB₁-McAb-HRP又可重新悬浮于溶液中^[26]。复合物上的HRP作为催化剂催化TMB与H₂O₂间的显色反应, 只需要一步竞争反应就可以完成整个检测过程, 因此进一步缩短了检测时间, 提升了检测速度。

2.2 MNPs-FB₁探针鉴定

羧基修饰的磁性纳米颗粒与DCC和NHS反应, 形成活化酯溶液, 与FB₁上的氨基反应, 制备出MNPs-FB₁探针。所合成的探针采用TEM进行形貌表征, 从图2A可以看出, MNPs为球形, 平均粒径为200 nm。当FB₁成功连接到MNPs表面后, 平均粒径由200 nm增加到220 nm(图2B)。从TEM可以看出(图2B), 在MNPs表面上有细微的突起, 说明FB₁成功连接到MNPs表面。同时采用DLS测定MNPs和MNPs-FB₁探针的水化粒径, 如图3所示, MNPs和MNPs-FB₁探针的平均粒径分别为200 nm和220 nm, 与TEM所测得的粒径一致, 进一步证明MNPs-FB₁探针制备成功。将MNPs-FB₁探针作为检测抗原, 采用ic-ELISA方法对其稳定性进行测试, 如图4所示, 在4 °C存放条件下, MNPs-FB₁探针的OD值变化在5个月内小于0.15, 通过*t*检验发现, 在5个月内, 各OD值之间无差异显著性($P > 0.05$), 说明所制备的MNPs-FB₁探针在4 °C可稳定保存使用5个月。

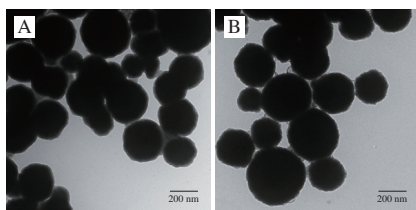


图2 MNPs (A) 和MNPs-FB₁ (B) TEM图
Fig. 2 TEM images of MNPs (A) and MNPs-FB₁ (B)

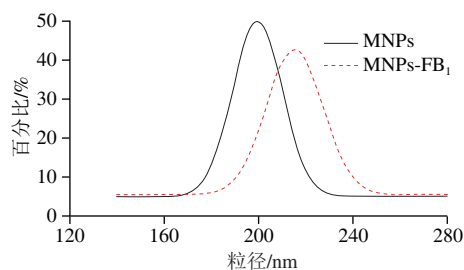
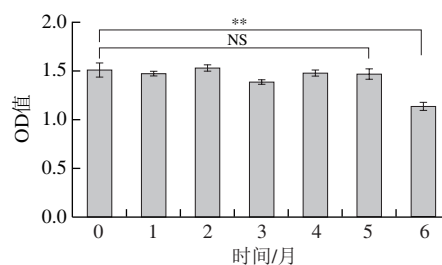


图3 MNPs和MNPs-FB₁水化粒径图
Fig. 3 Hydration diameters of MNPs and MNPs-FB₁



** . 1%显著水平, $0.01 \leq P < 0.05$; * . 5%显著水平, $P \leq 0.05$; NS. 无显著差异, $P > 0.05$ 。

图4 MNPs-FB₁探针稳定性
Fig. 4 Stability of MNPs-FB₁ probe

2.3 McAb-HRP探针鉴定

采用紫外分光光度法和直接ELISA法对所合成的McAb-HRP探针进行鉴定。如图5A所示, McAb的吸收峰在280 nm, HRP的两个吸收峰分别为275 nm和403 nm, McAb-HRP探针的吸收峰为290 nm。McAb-HRP探针的最大吸收波长与McAb和HRP不同, 表明McAb-HRP探针合成成功^[13]。

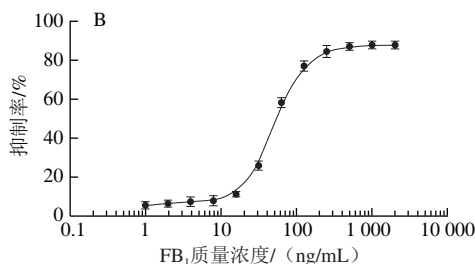
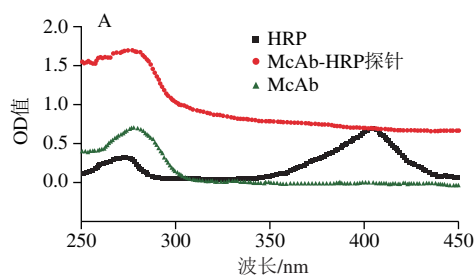


图5 McAb-HRP探针紫外-可见光谱(A)和生物活性(B)鉴定
Fig. 5 UV-visible absorption spectrum (A) and bioactivity evaluation (B) of McAb-HRP probe

同时采用直接ELISA方法对McAb-HRP探针的生物活性进行鉴定,从图5B可以看出,所合成的探针上的McAb对FB₁具有较高抑制活性,说明合成探针的方法,没有降低McAb对FB₁的亲性和HRP的催化能力。

2.4 双探针检测方法优化

MNPs-FB₁探针质量浓度与McAb-HRP探针稀释倍数的优化参照间接竞争ELISA的方法,采用棋盘法对其进行优化,当OD值在1.0左右时,所建立标准曲线的线性关系较好^[27]。从表1可以看出,当MNPs-FB₁探针质量浓度为12.5 μg/mL, McAb-HRP探针稀释倍数为400倍时, OD值为1.024,此时MNPs-FB₁探针用量较少, McAb-HRP探针稀释倍数适中,确定为最佳实验条件。

表1 MNPs-FB₁探针质量浓度与McAb-HRP探针稀释倍数的确定
Table 1 Determination of optimal concentration of MNPs-FB₁ probe and optimal dilution factor of McAb-HRP probe

MNPs-FB ₁ 探针质量浓度/(μg/mL)	McAb-HRP探针稀释倍数					
	10	100	200	400	1 000	2 000
200	3.204	2.781	2.427	2.034	1.521	1.158
100	2.478	2.224	1.981	1.527	1.145	0.948
50	1.756	1.572	1.494	1.368	0.985	0.732
25	1.437	1.214	1.247	1.198	0.546	0.384
12.5	1.320	1.194	1.150	1.024	0.421	0.251
6.25	0.752	0.640	0.590	0.587	0.355	0.213

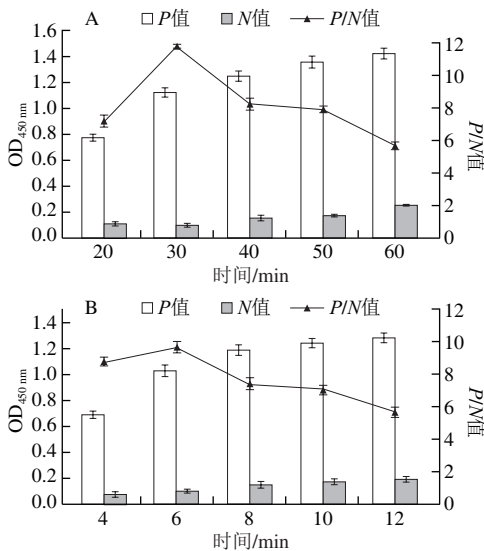


图6 竞争反应时间(A)和底物作用时间(B)的确定

Fig. 6 Optimization of the competitive immunoreaction time (A) and the substrate reaction time (B)

根据P/N值确定最佳竞争反应时间和底物作用时间。从图6可以看出,当竞争反应时间为30 min时, P/N值最高,确定为最佳竞争反应时间,同理,最佳底物作用时间为8 min。

2.5 标准曲线建立

在最优实验条件下,以抑制率为纵坐标,FB₁质量浓度对数为横坐标,采用四参数logistic曲线进行标准曲线拟合。如图7所示,所建立的双探针检测方法检测范围

(IC₁₅~IC₈₅)为0.07~1.98 ng/mL,检出限(IC₁₀)和IC₅₀分别为0.04 ng/mL和0.29 ng/mL。本检测方法使用MNPs-FB₁探针作为捕获探针,悬浮于反应溶液中,可加速抗原抗体之间的特异性反应,同时HRP连接在McAb上,无需再引入酶标二抗,减少了实验中的操作步骤,进一步缩短了反应时间,也减少了在实验过程中可能会出现的实验误差。所建立的检测方法与已发表文献相比,检测灵敏度更高(表2)。

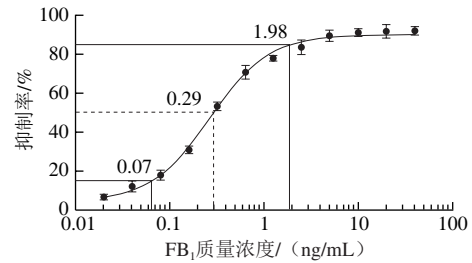


图7 双探针检测方法标准曲线

Fig. 7 Standard curve of the dual-probe assay

表2 FB₁检测方法的比较

Table 2 Comparison of different detection methods for FB₁

检测方法	检测范围/(ng/mL)	检出限/(ng/mL)	参考文献
磁酶免疫吸附分析法	0.1~25.0	0.071	[28]
侧流免疫层析法	200~5 000	120	[29]
酶联免疫吸附法	1.563~50	1.638	[30]
增强化学发光酶联免疫分析	200~1 400	91.3	[31]
比色分析	3.125~25	12.5	[32]
间接ELISA法	1.25~250	1.15	[33]
双探针检测法	0.07~1.98	0.04	本方法

2.6 方法特异性

FB₁、FB₂、FB₃、玉米赤霉烯酮、T-2毒素、展青霉素、橘青霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇8种常见真菌毒素用于为检测该方法的特异性。由表3可知,所建立的检测方法与FB₁、FB₂、FB₃交叉反应率较高,与玉米赤霉烯酮、T-2毒素、展青霉素、橘青霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇交叉反应率低于1%。将FBs混合标准溶液由40 ng/mL梯度稀释至20 pg/mL,建立标准曲线(图8),检测范围(IC₁₅~IC₈₅)为0.10~9.86 ng/mL, IC₅₀为0.78 ng/mL。以上结果表明,所建立的双探针检测方法可用于检测样品中的FBs总量。

表3 双探针检测方法与其他毒素的交叉反应

Table 3 Cross-reactivity of the dual-probe assay with other mycotoxins

真菌毒素	IC ₅₀ /(pg/mL)	交叉反应率/%
FB ₁	290	100
FB ₂	170	169
FB ₃	410	70
玉米赤霉烯酮	>10 ⁴	<1
T-2毒素	>10 ⁴	<1
展青霉素	>10 ⁴	<1
橘青霉素	>10 ⁴	<1
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	>10 ⁴	<1

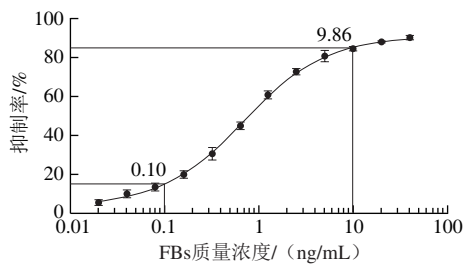


图8 FBs混合溶液标准曲线

Fig. 8 Standard curve of mixed solution of FBs

2.7 精密性

通过板间和板内变异系数 (coefficient of variation, CV) 对双探针检测方法的精密性进行研究。将FBs混合标准溶液 (FB₁:FB₂:FB₃=12:4:1) 稀释至终质量浓度分别为500、1 000、1 500 pg/mL。每个样品每天测定3次, 共测定3 d。如表4所示, 板间CV和板内CV均低于3%, 表明所建立的双探针检测方法的精密性较好。

表4 双探针检测方法的精密性
Table 4 Precision of the dual-probe assay

FBs质量浓度/ (pg/mL)	板内			板间		
	平均值/ (pg/mL)	标准差/ (pg/mL)	CV/%	平均值/ (pg/mL)	标准差/ (pg/mL)	CV/%
500	503	10.45	2.08	507	8.91	1.76
1 000	1 024	15.24	1.49	1 037	17.82	1.72
1 500	1 487	20.31	1.37	1 521	19.87	1.31

2.8 双探针检测方法的应用

向阴性玉米粉中分别添加FB₁、FB₂、FB₃和FBs混合标准溶液, 使其终添加量分别为1、5、10 μg/kg, 分别采用本方法和LC-MS/MS法进行检测, 计算样品加标回收率。如表5所示, 本方法和LC-MS/MS法的加标回收率范围分别为86.2%~105.1%和90.0%~107.8%, 符合样品加标回收率要求, 表明所建立的方法的重复性较好、准确度较高。

表5 玉米样品中添加FBs回收率
Table 5 Recoveries of FBs from spiked maize samples

FBs	添加量/ (μg/kg)	回收率/%	
		双探针检测方法	LC-MS/MS法
FB ₁	1	95.3±0.8	106.8±4.2
	5	86.2±1.2	103.2±2.0
	10	98.6±0.8	95.6±1.3
FB ₂	1	105.1±2.1	90.6±3.2
	5	88.8±1.0	95.7±2.9
	10	97.7±1.8	107.8±5.1
FB ₃	1	93.6±1.3	103.8±2.7
	5	104.6±0.9	103.1±0.8
	10	99.7±4.6	90.5±2.2
FBs混合 标准溶液	1	103.7±1.5	103.4±4.6
	5	97.6±1.7	90.0±2.9
	10	98.6±2.0	106.3±0.6

注: 数据为 $\bar{x} \pm s$ 。

为进一步验证所建立方法的准确性, 采用本方法和LC-MS/MS法同时对加标样品提取液进行测定。如图9所示, 以双探针检测方法的测定值为横坐标, LC-MS/MS法测定值为纵坐标, 拟合回归方程: $y=0.99x-0.02$, $R^2=0.9966$ ($P<0.0001$), 表明所建立的双探针检测方法可用于测定玉米样品中的FBs。

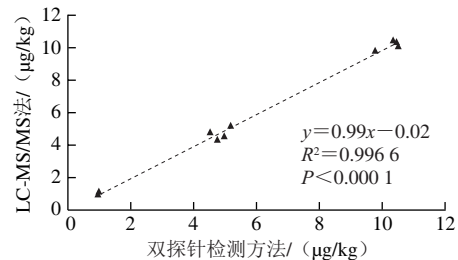


图9 双探针检测方法与LC-MS/MS法相关性

Fig. 9 Correlation between the dual-probe assay and LC-MS/MS for the detection of FBs in maize samples

3 结论

合成了MNPs-FB₁探针和McAb-HRP探针, 并应用所制备的两种探针建立了快速、灵敏的伏马菌素双探针检测方法。所建立的检测方法, 仅需38 min即可完成整个检测过程, 建立的检测方法对FB₁和FBs的检测范围分别为0.07~1.98 ng/mL和0.10~9.86 ng/mL。在玉米中的加标回收率范围分别为86.2%~105.1%, 具有较好的重复性和准确性。所建立检测方法检测结果与LC-MS/MS法检测结果的线性回归方程为 $y=0.99x-0.02$, $R^2=0.9966$, 该检测方法与LC-MS/MS法具有相同的检测能力, 提高了检测速度, 为玉米中FBs检测提供了有效的手段。

参考文献:

- [1] BRYLA M, ROSZKO M, SZYMCZYK K, et al. Fumonisin and their masked forms in maize products[J]. Food Control, 2016, 59: 619-627. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.06.032.
- [2] LI Y, ZHANG J, WANG Y, et al. Immunity theory-based high-specific monoclonal antibody preparation and application of fumonisin B₁[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(10): 3361-3367. DOI:10.1007/s12161-017-0912-4.
- [3] WEIDENBÖRNER M. Pumpkin seeds-the mycobiota and potential mycotoxins[J]. European Food Research and Technology, 2001, 212(3): 279-281. DOI:10.1007/s002170000238.
- [4] REN W, HUANG Z, XU Y, et al. Urchin-like gold nanoparticle-based immunochromatographic strip test for rapid detection of fumonisin B₁ in grains[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(24): 7341-7348. DOI:10.1007/s00216-015-8896-7.
- [5] International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances. Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins[M]. Lyon: IARC Press, 1993: 397-466.

- [6] Food and Drug Administration. Guidance for industry: fumonisin levels in human foods and animal feeds; final guidance contains nonbinding recommendations[EB/OL]. [http://www.fda.gov/Food/Guidance Compliance Regulatory Information/Guidance Documents/Chemical Contaminantsand Pesticides/ucm109231.htm](http://www.fda.gov/Food/Guidance%20Compliance/Regulatory%20Information/Guidance%20Documents/Chemical%20Contaminantsand%20Pesticides/ucm109231.htm). 2001.
- [7] KONG W, XIE T, LI J, et al. Analysis of fumonisins B₁ and B₂ in spices and aromatic and medicinal herbs by HPLC-FLD with on-line post-column derivatization and positive confirmation by LC-MS/MS[J]. *Analyst*, 2012, 137(13): 3166-3174. DOI:10.1039/C2AN35164A.
- [8] TANSAKUL N, JALA P, LAOPIEM S, et al. Co-occurrence of five *Fusarium* toxins in corn-dried distiller's grains with solubles in Thailand and comparison of ELISA and LC-MS/MS for fumonisin analysis[J]. *Mycotoxin Research*, 2013, 29(4): 255-260. DOI:10.1007/s12550-013-0173-z.
- [9] RODRÍGUEZ-CARRASCO Y, FONT G, MAÑES J, et al. Determination of mycotoxins in bee pollen by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(8): 1999-2005. DOI:10.1021/jf400256f.
- [10] ŠEGVIĆ KLARIĆ M, CVETNIĆ Z, PEPELJNJAK S, et al. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography[J]. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 2009, 60(4): 427-433. DOI:10.2478/10004-1254-60-2009-1975.
- [11] SHU M, XU Y, LIU X, et al. Anti-idiotypic nanobody-alkaline phosphatase fusion proteins: development of a one-step competitive enzyme immunoassay for fumonisin B₁ detection in cereal[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 924: 53-59. DOI:10.1016/j.aca.2016.03.053.
- [12] HU X L, WU X M, FANG X, et al. Switchable fluorescence of gold nanoclusters for probing the activity of alkaline phosphatase and its application in immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 77: 666-672. DOI:10.1016/j.bios.2015.10.046.
- [13] SUN Y, LI Y, MENG X, et al. Fluorescence-linked immunosorbent assay for detection of phenanthrene and its homolog[J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 547: 45-51. DOI:10.1016/j.ab.2018.02.016.
- [14] ZHOU Y, TIAN X L, LI Y S, et al. A versatile and highly sensitive probe for Hg (II), Pb (II) and Cd (II) detection individually and totally in water samples[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 30(1): 310-314. DOI:10.1016/j.bios.2011.08.034.
- [15] LIN Z, WANG X, LI Z J, et al. Development of a sensitive, rapid, biotin-streptavidin based chemiluminescent enzyme immunoassay for human thyroid stimulating hormone[J]. *Talanta*, 2008, 75(4): 965-972. DOI:10.1016/j.talanta.2007.12.043.
- [16] LING S, PANG J, YU J, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against fumonisin B₁ and development of detection by Ic-ELISA[J]. *Toxicon*, 2014, 80: 64-72. DOI:10.1016/j.toxicon.2013.12.008.
- [17] PELTOMAA R, AMARO-TORRES F, CARRASCO S, et al. Homogeneous quenching immunoassay for fumonisin B₁ based on gold nanoparticles and an epitope-mimicking yellow fluorescent protein[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(11): 11333-11342. DOI:10.1021/acsnano.8b06094.
- [18] LU L, SEENIVASAN R, WANG Y C, et al. An electrochemical immunosensor for rapid and sensitive detection of mycotoxins fumonisin B₁ and deoxynivalenol[J]. *Electrochimica Acta*, 2016, 213: 89-97. DOI:10.1016/j.electacta.2016.07.096.
- [19] URUSOV A, PETRAKOVA A, ZHERDEV A, et al. Application of magnetic nanoparticles in immunoassay[J]. *Nanotechnologies in Russia*, 2017, 12(9): 471-479. DOI:10.1134/S1995078017050135.
- [20] HA Y, KO S, KIM I, et al. Recent advances incorporating superparamagnetic nanoparticles into immunoassays[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2018, 1(2): 512-521. DOI:10.1021/acsanm.7b00025.
- [21] OHNE K, KANI S, OHASHI M, et al. Clinical evaluation of a newly developed high-sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by a semi-automated immune complex transfer chemiluminescent enzyme immunoassay[J]. *The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 2013, 61(9): 787-794.
- [22] HU Y, SHEN G, ZHU H, et al. A class-specific enzyme-linked immunosorbent assay based on magnetic particles for multiresidue organophosphorus pesticides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(5): 2801-2806. DOI:10.1021/jf903897k.
- [23] LIANG Z, YU S, LIANG X Y, et al. Cysteamine triggered "turn-on" fluorescence sensor for total detection of fumonisin B₁, B₂ and B₃[J]. *Food Chemistry*, 2020, 327: 127058. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127058.
- [24] 袁利鹏, 卢倚群, 孙远明, 等. 盐酸克伦特罗抗体纯化及直接竞争ELISA方法研究[J]. *食品科学*, 2013, 34(14): 227-231. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201304046.
- [25] YU S, LI Y, MENG X, et al. Magnetic nanoparticles-phenanthrene conjugates (MNPs-Phe) probe based competitive chemiluminescence enzyme immunoassay (MNPs-icCLEIA) for phenanthrene and other homologous polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Sensors and Actuators*, 2017, 252: 633-640. DOI:10.1016/j.snb.2017.06.056.
- [26] BO W, FANG L, YANG H, et al. Magnetic beads-based enzymatic spectrofluorometric assay for rapid and sensitive detection of antibody against ApxIVA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 35(1): 390-393. DOI:10.1016/j.bios.2012.03.027.
- [27] 孟星宇. 苡和蔡单克隆抗体的制备及免疫检测技术的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 44-45.
- [28] 熊亚敏, 介明沙, 刘利娥, 等. 高灵敏的磁酶免疫吸附分析法用于谷物中伏马菌素FB₁的快速检测[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2016, 37(2): 59-63. DOI:10.16433/j.cnki.issn1673-2383.2016.02.012.
- [29] ANFOSSI L, CALDERARA M, BAGGIANI C, et al. Development and application of a quantitative lateral flow immunoassay for fumonisins in maize[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 682(1): 104-109. DOI:10.1016/j.aca.2010.09.045.
- [30] 赵悦, 陈巍, 刘蓓, 等. 酶联免疫吸附法测定谷物中伏马菌素的条件优化[J]. *吉林农业大学学报*, 2020, 42(6): 1-9. DOI:10.13327/j.jjlau.2020.5824.
- [31] 刘贝贝, 于斐, 玉崧成, 等. 增强化学发光酶免疫分析用于伏马菌素B₁的快速检测[J]. *郑州大学学报(理学版)*, 2017, 49(4): 76-81. DOI:10.13705/j.issn.1671-6841.2017026.
- [32] CHEN X, LIANG Y, ZHANG W, et al. A colorimetric immunoassay based on glucose oxidase-induced AuNP aggregation for the detection of fumonisin B₁[J]. *Talanta*, 2018, 186: 29-35. DOI:10.1016/j.talanta.2018.04.018.
- [33] WANG X C, BAO M, LI F H, et al. Development of a sensitive, competitive, indirect ELISA for the detection of fumonisin B₁ in corn originating from Anhui province, China[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2016, 51(2): 107-112. DOI:10.1080/03601234.2015.1092829.