

利用时间分辨荧光免疫层析法同时定量检测玉米中的伏马毒素B₁、B₂和B₃

张佳林, 马立才, 侯璐, 孟和那仁, 温凯, 侯晓林

Application of Time-resolved Fluorescence Immunoassay to Concurrently Quantify Fumonisin B₁, B₂ and B₃ in Corn

ZHANG Jialin, MA Licai, HOU Lu, Menghenaren, WEN Kai, and HOU Xiaolin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080334>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定玉米中9种真菌毒素

Determination of 9 Kinds of Mycotoxins in Maize by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

食品工业科技. 2021, 42(7): 240-245 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050057>

基于荧光微球的免疫层析法快速检测黄曲霉毒素B₁

Rapid Detection of AFB₁ by Immunochromatographic Assays based on Fluorescent Microspheres

食品工业科技. 2018, 39(23): 272-275,281 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.23.047>

伏马毒素的危害及防控技术研究进展

Research advances on the hazards and control of fumonisins

食品工业科技. 2018, 39(7): 335-339,347 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.07.060>

有机溶剂萃取-高效液相色谱法检测玉米浆中黄曲霉毒素B₁

Determination of Aflatoxin B₁ in Corn Syrup by Organic Solvent Extraction and High Performance Liquid Chromatography

食品工业科技. 2018, 39(23): 267-271 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.23.046>

呕吐毒素时间分辨荧光免疫层析法的建立与评价

Establishment and Evaluation of Time-Resolved Fluorescence Immunochromatographic Assay for Detecting Deoxynivalenol

食品工业科技. 2018, 39(20): 233-239 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.20.039>

玉米赤霉烯酮与黄曲霉毒素B₁对HepG2细胞的联合毒性研究

Joint Toxicity of Zearalenone and Aflatoxin B₁ on HepG2 Cells

食品工业科技. 2019, 40(18): 91-96 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.18.015>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张佳林, 马立才, 侯璐, 等. 利用时间分辨荧光免疫层析法同时定量检测玉米中的伏马毒素 B₁、B₂ 和 B₃[J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 265–271. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080334

ZHANG Jialin, MA Licai, HOU Lu, et al. Application of Time-resolved Fluorescence Immunoassay to Concurrently Quantify Fumonisin B₁, B₂ and B₃ in Corn[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 265–271. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080334

· 分析检测 ·

利用时间分辨荧光免疫层析法同时定量检测玉米中的伏马毒素 B₁、B₂ 和 B₃

张佳林^{1,2}, 马立才², 侯璐¹, 孟和那仁³, 温凯⁴, 侯晓林^{1,*}

(1.北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206;

2.北京维德维康生物技术有限公司, 北京 100095;

3.赤峰市农牧业综合行政执法支队, 内蒙古赤峰 024000;

4.中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要: 建立了一种可同时定量检测玉米中伏马毒素 B₁、B₂ 和 B₃ 的时间分辨荧光免疫层析方法。利用活化酯法制备时间分辨荧光微球和伏马毒素抗体的偶联物, 将伏马毒素抗原包被到硝酸纤维素膜上作为 T 线, 通过优化不同 T 线包被条数, 最终建立伏马毒素竞争性免疫层析方法。并对所建立方法的灵敏度、特异性、准确度、精密度和与国标方法分析结果的相关性进行评价。包被两条 T 线建立的检测方法检出限为 107.68~168.28 μg/kg, 定量限为 283.46~444.63 μg/kg; 与伏马毒素 B₁、伏马毒素 B₂ 和伏马毒素 B₃ 的交叉反应率分别为 100%、85.59% 和 72.72%, 与其它 5 种常见的真菌毒素均无明显交叉; 加标回收率范围 88.37%~117.42%, 变异系数小于 10%; 该方法与国标方法 GB 5009.240-2016 中规定的免疫亲和柱净化-高效液相色谱法 (IAC-HPLC) 检测结果的符合度在 92.17%~107.21% 之间。建立的时间分辨荧光免疫层析检测方法能满足对玉米中伏马毒素 B₁、B₂ 和 B₃ 的现场快速定量检测。

关键词: 时间分辨荧光微球, 伏马毒素 B₁, 伏马毒素 B₂, 伏马毒素 B₃, 玉米, 定量检测

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)13-0265-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080334

本文网刊:



Application of Time-resolved Fluorescence Immunoassay to Concurrently Quantify Fumonisin B₁, B₂ and B₃ in Corn

ZHANG Jialin^{1,2}, MA Licai², HOU Lu¹, Menghenaren³, WEN Kai⁴, HOU Xiaolin^{1,*}

(1.College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agricultural, Beijing 102206, China;

2.Beijing WDWK Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100095, China;

3.Chifeng City Agriculture and Animal Husbandry Comprehensive Administrative Law Enforcement Detachment, Chifeng 024000, China;

4.College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: This study aimed to establish a time-resolved fluorescence immunoassay method for the simultaneous quantitative detection of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in corn. The EDC/NHS active ester method was used to prepare time-resolved fluorescent microspheres and fumonisin antibody conjugates. Fumonisin antigen was immobilized on a nitrocellulose membrane as the test line. By optimizing the number of test line, a competitive immunoassay method for detecting fumonisin was eventually established. Subsequently, the sensitivity, specificity, accuracy, precision, and correlation with the national standard method were evaluated for the established method. The detection limits of the established method by using two test line pattern were 107.68~168.28 μg/kg, and the quantification limits were

收稿日期: 2023-09-04

作者简介: 张佳林 (1991-), 男, 硕士, 研究方向: 动物源性食品安全检测, E-mail: zhangjialin63@outlook.com。

* 通信作者: 侯晓林 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 兽医药理学研究, E-mail: hxlsx@163.com。

283.46~444.63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。The cross-reactivity with fumonisin B₁, fumonisin B₂ and fumonisin B₃ were 100%, 85.59% and 72.72%, respectively, and no significant cross-reactivity was observed with five other common mycotoxins. The recovery rates ranged from 88.37% to 117.42%, and the coefficients of variation were lower than 10%. The conformity of the results obtained by the established method, as compared to the immunoaffinity column purification-high performance liquid chromatography (IAC-HPLC) method specified in the national standard GB 5009.240-2016, fell within the range of 92.17% to 107.21%. The established time-resolved fluorescence immunoassay method meets the requirements for rapid on-site quantitative detection of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in corn.

Key words: time-resolved fluorescent microsphere; fumonisin B₁; fumonisin B₂; fumonisin B₃; corn; quantitative detection

伏马毒素(Fumonisin, FB)主要由串珠镰刀菌、黑曲霉、链格孢霉菌产生的一种代谢产物,又名烟曲霉毒素。该类毒素是由不同的多氢醇和丙三羧酸组成的双酯类化合物,易溶于水,热稳定性强。已发现的天然伏马毒素共有FA、FB、FC和FP四种类型,28种不同的异构体,其中的FB族的污染占比最高,毒性也最强。FB族主要包括FB₁、FB₂、FB₃,FB₁被国际癌症研究机构(IARC)评定为2B类致癌物^[1-2]。国内饲料霉菌污染调查显示2015年至2020年在玉米及加工副产品中FB₁的阳性检出率均在60%以上,2020年检出率高达100%,阳性平均值大于1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$;在2015年阳性平均值高达4500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3]。一份针对四川地区真菌毒素污染的调查报告也显示抽检的玉米样品中FB₁、FB₂、FB₃均有检出,总检测率为30.56%^[4]。研究表明,FB可以通过对鞘脂代谢通路和氧化应激的影响从而对实验动物产生神经毒性、免疫毒性、组织器官毒性等毒性作用^[5-7]。FB也与人类的食管癌有密切关系^[8]。因其危害较大,国际食品法典委员会和欧盟规定玉米中FB₁和FB₂总量不得超过4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,美国食品及药物管理局规定脱胚的干磨玉米制品中FB₁、FB₂和FB₃不得超过2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[9]。我国《饲料卫生标准》中饲料玉米及其加工品中FB₁与FB₂含量总和不高高于60 mg/kg ^[10]。

目前检测谷物饲料中FB的常用方法主要分为仪器分析方法和免疫学分析方法两大类^[11]。其中仪器分析方法主要有高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC),液相色谱-质谱联用(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)法^[12-14]。HPLC和LC-MS具有良好的灵敏度、选择性和重复性,但设备昂贵需特殊的清理步骤,并且检测周期长成本高不适合现场快速检测。免疫学分析方法主要有联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[15]和胶体金侧向免疫法^[16-17]。ELISA具有样本制备简单、成本低、无放射性等优点,但也存在操作步骤繁琐的缺点。胶体金侧向免疫层析可以用较低的成本,较少的实验步骤对FB进行检测,但具有灵敏度低,定量范围窄,结果随环境变化波动较大的缺点。

时间分辨荧光免疫层析(Time-resolved fluorimmunoassay, TRFIA)方法利用铕、钆、镨等稀土元素及螯合物组成的荧光微球作为标记物标记抗原或者抗体。因其荧光衰变期长,Stokes位移大,发射峰

狭窄的特点,使其可以消除各种非特异性荧光的干扰,能够实现对谷物饲料中FB的准确定量检测^[18]。现有应用TRFIA方法对谷物饲料中FB检测的对象只有FB₁,对FB₂和FB₃的检测相对较少,并且采用的均为一条T线模式,未对不同T线条数做对比测试^[19-21]。本研究拟对不同T线条数做对比,选定最佳T线条数后建立能够同时检测FB₁、FB₂、FB₃的定量检测方法,以期为更加准确全面地检测玉米中FB提供可行的检测方案。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

铕元素羧基时间分辨荧光微球(365/610 nm, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) 美国Bangs Laboratories; FB单克隆抗体、FB抗原 北京维德维康生物技术有限公司; 酶标二抗、鸡IgY、兔抗鸡多克隆抗体 苏州博特龙免疫技术有限公司; 吐温20、甲醇 分析纯,国药集团化学试剂有限公司; 硝酸纤维素膜(NC膜) 德国Sartorius; FB阳性、FB阴性玉米样本 国家粮食和物资储备局科学研究院; FB₁、FB₂、FB₃标准品、碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 美国sigma-Aldrich; PVC背板、吸水纸、样品垫 上海金标生物科技有限公司; 微孔板 江苏迪默生物科技有限公司。

ES520电子天平 天津德安特传感技术有限公司; XYZ3060划膜仪 美国BIODOT; Fresco21冷冻离心机 美国Thermo Fisher Scientific; KQ-100E超声波清洗仪 昆山市超声仪器有限公司; MX-F涡动仪 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司; WH-400检测卡恒温孵育器、FQ-S3时间分辨荧光免疫定量分析仪 北京维德维康生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 荧光微球复溶液配制: Tris 12.11 g, 加入适量纯水溶解后用浓盐酸调节pH为8.0, BSA 20 g, 吐温20 20 g, 蔗糖 100 g, NaCl 9 g, Proclin 300防腐剂 0.2 g, 用纯水定容至1000 mL。冻干保护液配制: 硼酸 3.7 g, 十水合四硼酸钠 13.3 g, 蔗糖 20 g, BSA 10 g, PVP 5 g, Proclin 300防腐剂 0.2 g, 用纯水定容至1000 mL。样品稀释液配制: Tris 40.38 g, 加入适量纯水溶解后, 用浓盐酸调节pH至8.0, 加入50 g PVP, 加入5 g S9, 用纯水定容至1000 mL。

1.2.2 硝酸纤维素膜包被及不同包被模式测试 制备一条 T 线和两条 T 线两种包被模式的 FB 膜^[22-23]。其中一条 T 线膜是将 FB 抗原 (3.5 mg/mL) 用 0.02 mol/L PB 缓冲液 (pH7.4) 2 倍稀释作为包被液, 用划膜仪以 0.8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷量包被到 NC 膜上。两条 T 线膜是将 FB 抗原 (3.5 mg/mL) 用 0.02 mol/L PB 缓冲液 (pH7.4) 4 倍稀释平行包被两条 T 线到 NC 膜上。两种膜均以兔抗鸡多克隆抗体 (5 mg/mL) 用 0.02 mol/L PB 缓冲液 (pH7.4) 6 倍稀释作为 C 线。将制备好的 NC 膜置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干 16 h。用两种膜分别检测浓度为 0、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 FB₁ 标准品, 用 FQ-S3 时间分辨荧光免疫定量分析仪读取各浓度点 T/C 及 (T1+T2)/C 值, 每个浓度点测试三次取均值, 通过公式抑制率 (%) = (阴性 TC 比值 - 加标准品后 TC 比值) / 阴性 TC 比值 $\times 100$ 计算各点抑制率。根据抑制率的结果, 确定最终包被模式。

1.2.3 FB 及鸡 IgY 荧光探针制备 FB 荧光探针制备^[24-25]。取 100 μL 时间分辨荧光微球 (0.19 μm , 1%), 加入 900 μL 活化缓冲液 (0.05 mol/L MES, pH6.0) 涡旋仪振动 5 s, 离心机 15000 $\times g$, 离心 15 min, 弃上清加入 520 μL 活化缓冲液, 使用超声仪超声 5 min, 依次加入 Sulfo-NHS (0.001 mol/L) 315 μL 和 EDC (0.001 mol/L) 165 μL , 水平摇床上室温 200 r/min 活化 15 min; 之后加千分之一吐温, 用离心机 15000 $\times g$, 离心 15 min, 弃上清。向沉淀中加入 500 μL 偶联缓冲液 (0.04 mol/L BBS, pH8.0), 超声仪超声 5 min, 使沉淀复溶。取 10 μL FB 单克隆抗体 (6.1 mg/mL) 加入到 490 μL 偶联缓冲液中, 混匀, 将混匀后液体加入到复溶后的荧光微球中, 水平摇床室温 200 r/min 反应 2 h。加千分之一吐温, 离心机 15000 $\times g$, 离心 15 min, 弃上清。向沉淀中加入 400 μL 封闭缓冲液 (0.01 mol/L PBS+2% BSA) 封闭荧光微球, 超声 2 min, 水平摇床室温 200 r/min 反应 2 h; 加万分之一吐温, 用离心机 15000 $\times g$, 离心 15 min, 弃上清。使用 1000 μL 荧光微球复溶液复溶微球, 超声仪超声 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。鸡 IgY 荧光探针制备与 FB 荧光探针制备步骤相同, 只有在标记抗体步骤将用鸡 IgY (10 mg/mL) 替代 FB 单克隆抗体, 抗体加入量 100 μL 。将上述 FB 荧光探针, 鸡 IgY 荧光探针与冻干保护液按照 1:0.1:48.9 (V:V:V) 充分混匀, 按照 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 添加到 96 孔板中进行真空冷冻干燥。冻干程序为: 冷冻阶段: 标准大气压, -40 $^{\circ}\text{C}$, 保持 120 min。升华阶段: 5 Pa, -10 $^{\circ}\text{C}$, 再干燥阶段: 5 Pa, 30 $^{\circ}\text{C}$ 600 min^[26]。

1.2.4 检测卡的组装 将制备完成的样品垫裁为长 300 mm 宽 28 mm 的规格, 吸水纸裁为长 300 mm 宽 30 mm 的规格, 依次粘贴到长 300 mm 宽 80 mm 的 PVC 背板上, 每种组分衔接约 2 mm, 最后用裁刀裁为宽 4 mm 的试剂条 (图 1), 安装到规格为长 100 mm 宽 20 mm 的荧光卡壳中 (图 2)。

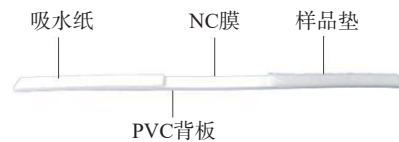


图 1 试纸条结构

Fig.1 Test strip structure

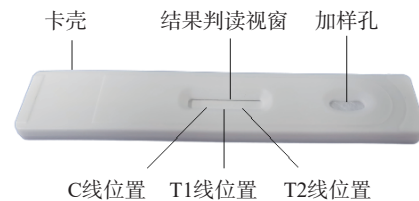


图 2 检测卡结构

Fig.2 Detection card structure

1.2.5 样品前处理 称取粉碎后 (过 20 目筛) 的国家粮食和物资储备局科学研究院玉米样本 $5 \pm 0.05 \text{ g}$ 于 50 mL 离心管中, 加入 70% 甲醇-水溶液 25 mL, 2500 r/min 涡动 5 min, 室温 4000 $\times g$ 离心 5 min。取 5 μL 上清液于 800 μL 样品稀释液中稀释混匀, 待检。

1.2.6 检测步骤 检测卡恒温孵育器调整至 40 $^{\circ}\text{C}$, 并将 FB 检测卡提前置于检测卡恒温孵育器中, 打开 FQ-S3 荧光免疫定量分析仪预热。取 100 μL 待检样品加入到 FB 冻干微孔中, 吹打混匀后将液体转移至 FB 检测卡的加样孔中, 准确反应 6 min, 将反应结束的 FB 检测卡用 FQ-S3 时间分辨荧光免疫定量分析仪进行检测。

1.2.7 检测方法的评价

1.2.7.1 定量曲线 取国家粮食和物资储备局科学研究院玉米阴性样本, 分别加入不同量的 FB₁、FB₂、FB₃ 标准溶液至样品含量为 0、250、500、1000、2000、4000、8000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。涡动混匀后按 1.2.5 进行样本前处理, 再按照 1.2.6 所述进行检测, 每个浓度水平 6 组平行实验。以浓度值作为横坐标, 以 (T1+T2)/C 的均值为纵坐标, 用 Origin 2018 软件中 logistic 函数进行非线性拟合。

1.2.7.2 特异性测试 以 FB₁ 为基准分别测试与 FB₂、FB₃、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素的交叉反应率 (Cross-reactivity, CR)。具体方法为按 1.2.7.1 所述方式分别绘制上述霉菌毒素的定量曲线, 根据标准曲线分别拟合得出半抑制浓度 (Half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 并按下述公式计算 CR。

$$\text{CR}(\%) = \frac{\text{IC}_{50}(\text{FB}_1)}{\text{IC}_{50}(\text{待检物})} \times 100$$

式中: CR 表示交叉反应率, %; IC₅₀(FB₁) 表示 FB₁ 半数抑制浓度, $\mu\text{g}/\text{kg}$; IC₅₀(待检物) 表示待检物的半数抑制浓度, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.2.7.3 检出限与定量限测试 取 20 个 FB 阴性玉米样本, 按照 1.2.5 和 1.2.6 所述方法进行测试, 并依

据 1.2.7.1 所绘制标准曲线分别拟合 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 测量值, 计算 20 份阴性样本平均值和标准差。检出限(Limits of detection, LOD)等于 20 份阴性样本读值的平均值加 3 倍标准差, 定量限(Limits of quantitation, LOQ)等于 20 份阴性样本读值的平均值加 10 倍标准差^[27]。

1.2.7.4 准确度与精密度测试 在 FB 阴性玉米样本中分别添加浓度梯度为 1000、2000、4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 FB_1 、 FB_2 和 FB_3 三类标准品。按照上述测试方法平行测试 6 次, 汇总计算出准确度和精密度。其中准确度按回收率计算。

$$R(\%) = \frac{A}{E} \times 100$$

式中: R 表示回收率, %; A 表示测量值, $\mu\text{g}/\text{kg}$; E 表示阳性样本的理论值, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

精密度以变异系数计算。

$$CV(\%) = \frac{AVR}{STD} \times 100$$

式中: CV 表示变异系数, %; AVR 表示 6 次测量结果平均值, $\mu\text{g}/\text{kg}$; STD 表示 6 组平行测量结果的标准差, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.2.7.5 与国标方法分析结果对比 用本研究所建立的时间分辨荧光免疫层析检测方法检测不同含量的 FB 实际阳性玉米样本, 每个样本平行测试 3 次取平均值, 与 GB 5009.240-2016《食品安全国家标准食品中伏马毒素的测定》规定的第一法免疫亲和柱净化-柱后衍生高效液相色谱法^[28] 检测结果对比, 通过符合度表述两种方法结果的一致性^[19]。

$$\text{符合度}(\%) = \frac{X}{Y} \times 100$$

式中: X 表示 TRFIA 方法三次测量结果的平均值, $\mu\text{g}/\text{kg}$; Y 表示 IAC-HPLC 方法测量值, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.3 数据处理

拟合曲线时以添加的 FB 浓度值作为横坐标(每个浓度点测量 6 次取平均值), 以时间分辨荧光免疫定量分析仪检测到的 T 线值之和与 C 线值的比值作为纵坐标用 Origin 2018 软件进行四参数拟合绘制曲线。包被条件确定时分别测试 FB 不同浓度点对应 TC 比值, 测试三次取平均值, 对比抑制率。确定检测限和定量限时阴性样本测量 20 次, 计算平均值和标准差, 进而计算出检测限和定量限。测试准确度时每个浓度点独立平行测试 6 次, 计算均值与添加

浓度对比, 计算回收率。测试精密度时每个浓度点独立平行测试 6 次计算平均值和标准差, 进一步计算出相对标准偏差。测试与国标方法结果相关性时, 同一实际阳性样品独立平行测试 3 次取平均值, 与国标方法测量结果进行符合度比较。

2 结果与分析

2.1 FB 膜包被模式确定

用制备的一条 T 线的 FB 膜和两条 T 线的 FB 膜, 分别检测浓度为 0、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 FB_1 标准品, 测得各浓度点 T/C 和 $(T_1+T_2)/C$ 值, 每个浓度点测试三次取均值, 通过公式得出各点抑制率数据(表 1), 两种模式下随标准品浓度变化对应显色变化如图 3 及图 4。



图 3 一条 T 线模式下的显色梯度
Fig.3 Color gradient in a T-line pattern

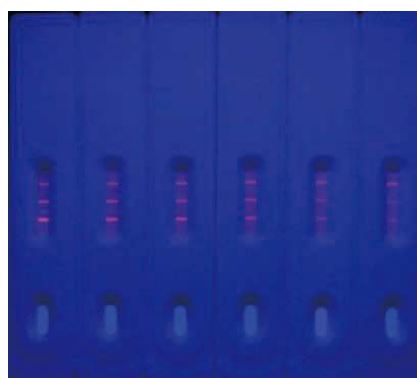


图 4 两条 T 线模式下的显色梯度
Fig.4 Color gradient in two T-line pattern

通过数据对比可知两条 T 线的 FB 膜在各个浓度点的抑制率均优于一 T 线, 表明两条 T 线的膜具有更好的灵敏度。导致此现象的原因是相对比两条 T 线模式, 一条 T 线模式中抗原与抗体接触时间短, 空间位阻大, 抗原抗体反应不够充分, 会导致灵敏

表 1 不同 T 线条数抑制率对比

Table 1 Comparison of suppression rates for different numbers of T-lines

包被模式	0	0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	8 $\mu\text{g}/\text{kg}$
一条 T 线 T/C 值	5.79±0.09	4.34±0.01	3.45±0.11	2.71±0.02	1.72±0.02	1.03±0.04
两条 T 线 $(T_1+T_2)/C$ 值	5.69±0.18	3.57±0.07	2.68±0.01	1.84±0.01	1.19±0.06	0.75±0.01
一条 T 线抑制率(%)	0	25.04	40.41	53.20	70.29	82.21
两条 T 线抑制率(%)	0	37.26	52.90	67.66	79.09	86.82

度降低。在相关利用 TRFIA 方法检测其它霉菌毒素的研究中均证实了此结论^[23,29-30]。因此本次研究将 FB 膜包被模式确定为两条 T 线的模式。

2.2 检测方法评价

2.2.1 定量曲线绘制 向阴性玉米样本中分别加入不同浓度梯度的 FB₁、FB₂、FB₃ 标准品,按已建立的前处理方法及检测方法进行测试,每个浓度水平 6 组平行实验。以浓度值作为横坐标,以 (T1+T2)/C 的均值为纵坐标,用 Origin 2018 软件中 logistic 函数进行非线性拟合得到 FB₁、FB₂、FB₃ 随标准品浓度变化的定量曲线(图 5)。荧光检测卡随标准品浓度变化对应显色变化如图 6。

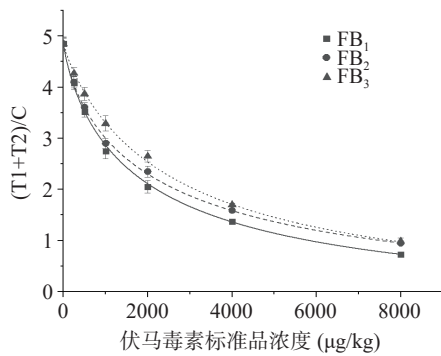


图 5 TRFIA 检测 FB₁、FB₂ 和 FB₃ 定量曲线
Fig.5 Standard curve of TRFIA for FB₁, FB₂ and FB₃

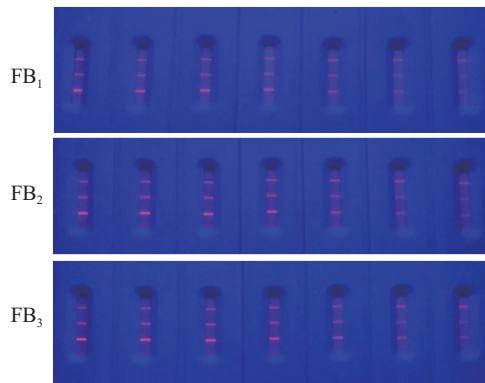


图 6 FB₁、FB₂ 和 FB₃ 三种标准品梯度实物图
Fig.6 Physical gradients of the three standard samples for FB₁, FB₂ and FB₃

FB₁ 拟合曲线的回归方程为: $y = -0.58683 + (4.88473 + 0.58683) / (1 + (x/1897.5007)^{0.79534})$, 决定系数 $R^2 = 0.9987$ 。FB₂ 拟合曲线的回归方程为: $y =$

$-0.49451 + (4.8806 + 0.49451) / (1 + (x/2217.04761)^{0.77834})$, 决定性系数 $R^2 = 0.9988$ 。FB₃ 拟合曲线的回归方程为: $y = -0.39709 + (4.83214 + 0.39709) / (1 + (x/2609.44216)^{0.92147})$, 决定系数 $R^2 = 0.9983$ 。三种霉菌毒素的拟合曲线的决定系数均在 0.99 以上,表明曲线拟合良好。

2.2.2 特异性评价 分别拟合 FB₁、FB₂、FB₃、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素的定量曲线,得出 IC₅₀ 值并以 FB₁ 为基准计算交叉反应率(表 2)。结果显示与 FB₂、FB₃ 的交叉反应率分别为 85.59% 和 72.72%,其余霉菌毒素在 8000 μg/kg 添加水平时仍无明显抑制,进行数据拟合计算 IC₅₀ 值,表明交叉反应率很低。所以本研究所建立的 FB 时间分辨荧光免疫层析检测方法 FB₁、FB₂ 和 FB₃ 彼此交叉良好,可同时检测 FB₁、FB₂、FB₃。与其它霉菌毒素基本无交叉。检测方法对应的检测靶标是由所用抗体特异性决定的,本研究因选择对 FB₁、FB₂ 和 FB₃ 交叉反应率更加全面又与其它真菌毒素交叉反应率低的 FB 抗体,从而保证了方法的特异性。

表 2 所建方法与 FB₂、FB₃ 及其它真菌毒素的交叉反应率
Table 2 Cross-reactivity of the established method with FB₂, FB₃ and other mycotoxins

霉菌毒素类型	IC ₅₀ (μg/kg)	交叉反应率(%)
FB ₁	1897.50	100
FB ₂	2217.05	85.59
FB ₃	2609.44	72.72

2.2.3 检出限和定量限 采用上述所建立的时间分辨荧光免疫层析检测方法测量 20 份阴性样本,测得 FB₁ 的 LOD 为 121.48 μg/kg, LOQ 为 316.48 μg/kg。FB₂ 的 LOD 为 107.68 μg/kg, LOQ 为 283.46 μg/kg。FB₃ 的 LOD 为 168.28 μg/kg, LOQ 为 444.63 μg/kg(表 3),满足不同标准的限量要求^[9-10]。

2.2.4 准确度与精密度 采用上述所建立的时间分辨荧光免疫层析检测方法分别测量 FB₁、FB₂、FB₃ 含量为 1000、2000、4000 μg/kg 的加标样本,每个浓度点均做 6 次平行测试。FB₁ 回收率在 88.37%~114.20% 之间,变异系数在 5.44%~8.92% 之间。FB₂ 回收率在 89.50%~111.51% 之间,变异系数在 3.99%~6.25% 之间。FB₃ 回收率在 94.48%~117.42% 之间,

表 3 时间分辨荧光免疫层析方法的检出限与定量限
Table 3 Detection limit and quantification limit of the TRFIA method

毒素类型	测量值(μg/kg, n=20)										平均值(μg/kg)	标准差(μg/kg)	检出限(μg/kg)	定量限(μg/kg)
	0.00	48.87	0.00	10.11	5.92	51.52	73.55	65.12	0.00	59.62				
FB ₁	21.38	43.64	23.74	51.52	3.92	85.10	43.64	28.55	59.62	82.18	37.90	27.86	121.48	316.48
	0.00	41.19	0.00	6.82	3.65	43.72	65.33	56.96	0.00	51.55				
FB ₂	16.12	36.24	18.16	43.72	2.24	76.99	36.24	22.40	74.02	51.55	32.35	25.11	107.68	283.46
	0.00	64.01	0.00	8.75	3.58	67.99	101.67	88.68	0.00	80.26				
FB ₃	23.94	56.19	27.26	67.99	1.35	119.62	56.19	34.10	115.07	80.26	49.85	39.48	168.28	444.63
	0.00	64.01	0.00	8.75	3.58	67.99	101.67	88.68	0.00	80.26				

表4 时间分辨荧光免疫层析方法的标准差和变异系数

Table 4 Standard deviation and coefficient of variation for TRFIA method

毒素类型	浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	6次检测结果($\mu\text{g}/\text{kg}$)						均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收范围(%)	标准差($\mu\text{g}/\text{kg}$)	变异系数(%)
FB ₁	1000	1116.73	1064.39	935.92	919.66	910.73	883.74	971.86	88.37~111.67	86.67	8.92
FB ₁	2000	2038.39	1947.80	1888.41	2284.08	2266.72	1934.60	2060.00	94.42~114.20	158.73	7.71
FB ₁	4000	3799.95	3929.37	4348.82	4071.72	4108.91	3684.30	3990.51	92.11~108.72	217.11	5.44
FB ₂	1000	1040.13	1077.32	1115.12	1027.54	931.92	955.52	1024.59	93.19~111.51	64.01	6.25
FB ₂	2000	1962.83	1940.59	1891.88	1789.99	2016.34	2034.76	1939.40	89.50~101.74	81.80	4.22
FB ₂	4000	3601.57	3701.57	3860.30	3710.68	4060.30	3901.44	3805.98	90.04~101.51	151.94	3.99
FB ₃	1000	1001.28	1000.29	1095.58	1174.25	1131.61	944.79	1057.97	94.48~117.42	81.35	7.69
FB ₃	2000	2279.83	2204.36	2085.59	2221.31	2326.19	2103.45	2203.46	104.28~116.31	86.71	3.94
FB ₃	4000	4489.94	4230.76	4294.26	4146.14	3803.43	4210.52	4195.84	95.09~112.25	205.78	4.90

变异系数在 3.94%~7.69% 之间(表 4)。优于伏马毒素胶体金定量检测标准方法中对准确度和精密度的要求^[31]。

2.2.5 与国标方法分析结果对比 用建立的时间分辨荧光免疫层析检测方法测定实际阳性玉米样本, 每个样本平行测试 3 次取平均值, 测量值与 GB 5009.240-2016 规定的 IAC-HPLC 方法的测量结果对比, 计算符合度。结果符合度在 92.17%~107.21% 之间, 表明两种方法检测同一样本时结果一致性良好(表 5)。

表5 时间分辨荧光免疫层析方法与国标仪器分析方法结果一致性

Table 5 Consistency between TRFIA method and national standard instrumental analysis method

毒素类型	IAC-HPLC 测量值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TRFIA测量值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$, n=3)	均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	符合度 (%)
FB ₁	1320	1360.45 1382.42 1250.20	1331.02	100.83
FB ₁	2530	2801.11 2653.34 2683.13	2712.53	107.21
FB ₁	3910	3500.39 3609.19 3702.31	3603.96	92.17
FB ₂	420	415.37 465.34 435.29	438.67	104.44
FB ₂	770	703.31 747.92 789.89	747.04	97.02
FB ₂	1140	1098.81 1273.31 1041.23	1137.78	99.81
FB ₃	490	490.12 510.34 509.18	503.21	102.69

3 结论

本研究以镧元素时间分辨荧光微球作为示踪物, 通过对比优化不同 T 线条数的划膜模式, 最终建立伏马毒素时间分辨荧光侧向免疫层析检测方法。该方法可同时检测 FB₁、FB₂ 和 FB₃, 同时与其它常见真菌毒素无明显交叉, 特异性良好, 符合相关标准对伏马毒素的限量要求。方法的检出限为 107.68~168.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 283.46~444.63 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 灵敏度良好。回收率在 88.37%~117.42% 之间, 批内变异在 3.94%~8.92% 之间, 准确度、精密度表现良好。此外该方法还具有操作简便、检测快速、成本低廉等优点, 为 FB 的现场定量快速检测提供了可行的方法。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] FARHADI A, FAKHRI Y, KACHUEI R, et al. Prevalence and concentration of fumonisins in cereal-based foods: A global systematic review and meta-analysis study[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(17): 20998-21008.
- [2] BRYLA M, WASKIEWICZ A, SZYMCZYK K, et al. Effects of pH and temperature on the stability of fumonisins in maize products[J]. *Toxins*, 2017, 9(3): 2-16.
- [3] 丁燕玲, 李孟聪, 钟名琴, 等. 2015-2020 年国内饲料霉菌毒素污染调查报告统计分析[J]. *中国动物检疫*, 2021, 38(3): 29-36. [DING Yanling, LI Mengcong, ZHONG Mingqin, et al. Statistical analysis of domestic feed mycotoxin contamination investigation reports from 2015 to 2020[J]. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2021, 38(3): 29-36.]
- [4] 杨晓冬, 赵凤, 罗靖, 等. 2022 年四川省三地区谷物及制品真菌污染现状调查[J]. *预防医学情报*, 2023, 39(7): 830-834. [YANG Xiaodong, ZHAO Feng, LUO Jing, et al. Investigation of fungal contamination status in grains and grain products in three regions of Sichuan Province in 2022[J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2023, 39(7): 830-834.]
- [5] SOUSA F C, SCHAMBER C R, AMORIN S S, et al. Effect of fumonisin containing diet on the myenteric plexus of the jejunum in rats[J]. *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical*, 2014, 185(15): 93-99.
- [6] GRENIER B, BRACARENSE A P, SCHWARTZ H E, et al. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2012, 83(10): 1465-1473.
- [7] TARANU I, MARIN D E, BOUHET S, et al. Mycotoxin fumonisin B₁ alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs[J]. *Toxicological Sciences*, 2005, 84(2): 301-307.
- [8] YOSHIZAWA T, YAMASHITA A, LUO Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1994, 60(5): 1626-1629.
- [9] 尚艳娥, 杨卫民. CAC、欧盟、美国与中国粮食中真菌毒素限量标准的差异分析[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 37(1): 10-15. [SHANG Yane, YANG Weimin. Comparative analysis of limits for mycotoxins in food between Codex Alimentarius Commission, the European Union, the United States, and China[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 37(1): 10-15.]
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB13078-2017 饲料卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [General

Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB13078-2017 Feed hygiene standards[S]. Beijing: China Standards Press, 2017.]

[11] 李寒松, 樊海新, 李复辉, 等. 伏马菌素 B₁ 的毒性、污染及其检测技术[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(3): 275-278. [LI Hansong, FAN Haixin, LI Fuhui, et al. Toxicity, contamination, and detection techniques of fumonisin B₁[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(3): 275-278.]

[12] SMITH L L, FRANCIS K A, JOHNSON J T, et al. Quantitation of fumonisin B₁ and B₂ in feed using FMOC pre-column derivatization with HPLC and fluorescence detection[J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 174-179.

[13] ZHANG S, ZHOU S, YU S, et al. LC-MS/MS analysis of fumonisin B₁, B₂, B₃, and their hydrolyzed metabolites in broiler chicken feed and excreta[J]. *Toxins*, 2022, 14(2): 131.

[14] 李莉, 李硕. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定玉米油中伏马毒素 B₁、B₂、B₃[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(19): 7006-7011. [LI Li, LI Shuo. Determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn oil by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2020, 11(19): 7006-7011.]

[15] 刘师文, 何庆华, 邹龙, 等. 谷物中伏马菌素 B₁ 酶联免疫分析法的建立[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 350-354. [LIU Shiwen, HE Qinghua, ZOU Long, et al. Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for fumonisin B₁ in cereals[J]. *Food Science*, 2010, 31(18): 350-354.]

[16] 任文洁, 黄志兵, 许杨, 等. 伏马菌素 B₁ 胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 58-63. [REN Wenjie, HUANG Zhibing, XU Yang, et al. Development of colloidal gold immunochromatographic rapid test strip for fumonisin B₁[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2015, 36(24): 58-63.]

[17] 谢婷婷. 粮食中伏马毒素胶体金快速定量法研究[J]. 粮食与饲料工业, 2019, 9(15): 60-63. [XIE Tingting. Research on colloidal gold rapid quantitative method for fumonisins in grains[J]. *Cereal and Feed Industry*, 2019, 9(15): 60-63.]

[18] DEGAN P. Time-resolved fluoroimmuno assay[J]. *Molecular Biotechnology*, 2000, 13(3): 215-222.

[19] 刘洪美, 郑梦瑶, 袁华山, 等. 基于时间分辨荧光纳米微球的伏马毒素 B₁ 快速定量检测卡的制备及应用[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(4): 164-171. [LIU Hongmei, ZHENG Mengyao, YUAN Huashan, et al. Preparation and application of a rapid quantitative detection card for fumonisin B₁ based on time-resolved fluorescence nanospheres[J]. *Cereal and Oil Food Science and Technology*, 2022, 30(4): 164-171.]

[20] 陈建玲, 李文学, 董志宁, 等. 伏马毒素 B₁ 时间分辨免疫荧光检测试剂盒的研制[J]. 癌变畸变突变, 2012, 25(1): 48-52. [CHEN Jianling, LI Wenxue, DONG Zhining, et al. Development of a time-resolved immunofluorescence detection kit for fumonisin B₁[J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2012, 25(1): 48-52.]

[21] 张滢. 伏马毒素 B₁ 和 T-2 毒素荧光免疫层析试纸条的研制[D]. 天津: 天津科技大学, 2019. [ZHANG Ying. Development of fluorescent immunochromatographic test strips for fumonisin B₁ and T-2 toxin[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.]

[22] 叶金, 郑梦瑶, 马海华, 等. 基于时间分辨荧光快速定量检测谷物中的 T-2 毒素[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(1): 22-28. [YE Jin, ZHENG Mengyao, MA Haihua, et al. Rapid quantitative detection of T-2 toxin in cereals based on time-resolved fluorescence[J]. *Chinese Journal of Cereals and Oils*, 2023, 38(1): 22-28.]

[23] 魏黛娟. 快速检测玉米和大豆中呕吐毒素的荧光免疫层析试纸条的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2022. [WEI Daixian. Study on fluorescent immunochromatographic test strips for rapid detection of vomitoxin in corn and soybeans[D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.]

[24] 丁亚芳, 贾良义, 邢维维, 等. 基于免疫磁珠前处理的荧光免疫层析法定量检测牦牛肉中金刚烷胺[J]. 食品科技, 2021, 46(6): 294-300. [DING Yafang, JIA Liangxi, XING Weiwei, et al. Quantitative detection of clenbuterol in yak meat based on immunomagnetic bead pretreatment and fluorescence immunoassay[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(6): 294-300.]

[25] 赵维章, 崔乃元, 张汉青, 等. 时间分辨荧光免疫层析定量检测牦牛肉中喹诺酮类药物[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 239-251. [ZHAO Weizhang, CUI Naiyuan, ZHANG Hanqing, et al. Quantitative detection of quinolone residues in yak meat by time-resolved fluorescence immunoassay[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(18): 239-251.]

[26] TANG Xiaolin, PIKAL M J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice[J]. *Pharmaceutical Research*, 2004, 21(2): 191-199.

[27] 国家粮食局. LS/T 6402-2017 粮油检验 设备和方法标准适用性验证及结果评价一般原则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [State Administration of Grain. LS/T 6402-2017 General principles for applicability verification and result evaluation of equipment and methods standards for grain and oil inspection[S]. Beijing: China Standard Press, 2017.]

[28] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.240-2016 食品安全国家标准食品中伏马毒素的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.240-2016 National food safety standard-determination of fumonisins in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.]

[29] 巩性涛, 王培, 肖理文, 等. 呕吐毒素荧光定量快速检测试纸条及仪器技术性能优化的研究报告[J]. 粮食加工, 2021, 46(2): 84-91. [GONG Xingtao, WANG Pei, XIAO Wenli, et al. Research report on fluorescence quantitative rapid detection test card for vomitoxin and optimization of instrument technical performance[J]. *Cereal Processing*, 2021, 46(2): 84-91.]

[30] 孔繁霞, 赵皖, 丁丽, 等. 基于时间分辨荧光微球的黄曲霉毒素 B₁ 定量检测卡灵敏度的优化[J]. 粮食储藏, 2022, 51(3): 40-44. [KONG Fanxia, ZHAO Wan, DING Li, et al. Optimization of sensitivity for quantitative detection card of aflatoxin B₁ based on time-resolved fluorescence microspheres[J]. *Grain Storage*, 2022, 51(3): 40-44.]

[31] 江西省兽药饲料监察所. DB 36/T 1023-2018 饲料中伏马毒素的快速筛查胶体金快速定量法[S]. 南昌: 江西省质量技术监督所, 2018. [Jiangxi Provincial Institute for the Control of Veterinary Drugs and Feeds. DB 36/T 1023-2018 Rapid screening of fumonisins in feeds-colloidal gold rapid quantitative method[S]. Nanchang: Jiangxi Provincial Institute of Quality and Technical Supervision, 2018.]