

文章编号:1673-1689(2009)05-0675-07

纳米金标记黄曲霉毒素 B₁ 新型检测方法

李井泉^{1,2}, 毛秀君^{1,3}, 王周平^{*1}, 王丽¹, 施用晖¹

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 汉台区北关农业技术综合服务站, 陕西 汉中 723000)

摘要: 本文建立了两种基于银增强纳米金标记探针的高灵敏度免疫分析方法。方法一是用黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 抗体与金标抗原、待测抗原进行竞争免疫反应, 然后加入银增强溶液, 以金为核沉积生长银, 通过检测光密度来确定待测物中 AFB₁ 的含量, 该方法的检出限可达到 0.01 ng/mL。方法二是在前一种方法的基础上, 将银化学溶出, 通过化学发光法检测沉积的银量来确定待测物中 AFB₁ 的含量, 该方法的检出限可达到 0.002 ng/mL。

关键词: 纳米金; 化学发光; 银增强; 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)

中图分类号: TL 271. 5

文献标识码: A

Nanogold Labeling Based Novel Detection Method for Aflatoxin B₁

LI Jing-quan¹, MAO Xiu-jun^{1,3}, WANG Zhou-ping^{*1}, WANG Li¹, SHI Yong-hui¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Beiguan Agricultural Technique Comprehensive Service Station of Hantai District, Hanzhong 723000, China)

Abstract: The rapid, sensitive measurement of Aflatoxin B₁ is of great importance in food safety detection. In the present work, two methods for the competitive heterogeneous immunoassay of aflatoxin B₁ (AFB₁) was developed. The first one is based on the competitively immune bind to AFB₁ antibody between the tested antigen and nanogold-labeled antigen. A silver enhancement process then was conducted to deposit silver around nanogold. Measuring the absorbance of silver at 630 nm can identify the content of AFB₁. The detection limit for the proposed method is 0.01 ng/mL (3 σ). Based upon the first method, the deposited silver was then dissolved to form Ag⁺, which was measured with a sensitive CL system. And the CL intensity was found to be proportional with the content of AFB₁ with a detection limit of 0.002 ng/mL (3 σ).

Key words: gold nanoparticle, chemiluminescent, silver enhancement, AFB₁

黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 是黄曲霉菌和寄生曲霉的二次代谢产物, 有极强的毒性和致癌性, 可引

发动物的肝癌、胃癌、肾癌等, 是目前发现的最强的化学致癌物质, 还可以通过食物链在生物体之间转

收稿日期: 2008-06-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20805019); 国家 863 计划项目 (2008AA10Z419); 江苏省自然科学基金项目 (BK20081603); 教育部博士点基金新教师项目 (20070295014); 江苏省大学生实践创新项目。

* 通讯作者: 王周平 (1974-), 男, 陕西凤翔人, 理学博士, 教授, 博士生导师。主要从事食品营养与安全分析研究。

Email: wangzp@jiangnan.edu.cn

移,造成威胁^[1]。因此,建立准确、灵敏、快速的 AFB₁ 检测技术对于食品安全具有重要意义。迄今为止,已建立的 AFB₁ 检测方法主要包括薄层色谱法、酶联免疫吸附法和 HPLC 法等^[2]。这些方法各有其优点,能不同程度的满足实践当中对 AFB₁ 检测的需求。随着对涉及食品安全的危害因子(如 AFB₁)的限量标准的降低,同时国际食品贸易壁垒的加剧都要求能尽快发展出更灵敏、快速的检测方法。

纳米探针技术是近年来迅速发展的一项重要纳米技术,已越来越受到人们的重视。由于纳米材料所具有的发光效应、氧化还原效应、催化效应、抑制效应、浓缩效应、微环境效应等,比传统标记更稳定、使用寿命更长、可检测模式更多、更灵敏,在生物分析应用中已显现出极大的优越性^[3-5]。但在食品真菌毒素检测方面,纳米探针技术的应用只涉及一些初级应用,充分利用纳米材料特殊的光电效应、催化效应等实现对真菌毒素的准确灵敏快速检测国内外报道还很少。

化学发光法具有灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单、无背景光干扰等优点,近年来在生物分析领域得到了广泛的应用^[6]。将高灵敏化学发光检测技术与特异性的免疫亲和反应结合,发展起来的化学发光免疫分析技术也越来越收到人们的重视^[7]。

基于纳米金标记 AFB₁,结合纳米金银增强、光密度检测/溶出化学发光检测技术,初步建立了两种 AFB₁ 新型超灵敏检测体系。首先,采用纳米金标记 AFB₁ 酶标抗原,通过抗黄曲霉毒素 B₁ 抗体与金标抗原、待测抗原的竞争免疫反应,结合纳米金粒子的银增强信号放大技术,通过光密度检测来定量 AFB₁;其次,在吸光度检测方法的基础上,建立了金标银增强-溶出化学发光检测体系,进一步将银化学溶出,采用溶出化学发光检测技术,通过二次信号放大,实现了 AFB₁ 的超灵敏化学发光检测。

1 材料与方 法

1.1 仪器

采用 Multiskan MK3 酶标仪;美国 Thermo 公司产品;采用 MPI-B 型多参数化学发光分析系统;西安瑞迈分析仪器有限公司生产;DF-101S 型集热式磁力加热搅拌器;河南巩义市予华仪器厂生产;TU-1900 紫外可见分光光度计;北京普析通用仪器有限责任公司生产;TecnaiG220 透射电镜(TEM)美国 FEI 公司生产;LH586-2 型恒温水槽;上海精科实业有限公司产品。5804R 高速离心机;

上海泰亚赛福科技发展有限公司产品。96 微孔板为 BBI 公司(加拿大)产品。

1.2 试剂

黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫定量试剂盒购于无锡省微生物研究所有限责任公司,试剂盒由包被抗体反应板(48 孔);A 试剂:样品稀释液(1 瓶);B 试剂:AFB₁ 标准溶液 [1 套(0、0.1、0.25、0.5、1、2 ng/mL)];C 试剂:酶标抗原(2/1/1 瓶);D 试剂:酶标抗原稀释液(1 瓶);E 试剂:浓缩洗涤液(1 瓶);F 试剂:显色底物液 a(1 瓶);G 试剂:显色底物液 b(1 瓶);H 试剂:终止液(1 瓶);反应板框架(1 块)组成。

柠檬酸,柠檬酸钠,氢醌,,硝酸银(AgNO₃),浓硝酸,磷酸,硫酸锰,过硫酸钾,二水乙二胺四乙酸二钠等均购于中国医药上海化学试剂公司,氯金酸(HAuCl₄)购于上海久岳化工有限责任公司,鲁米诺购于 Merck 公司(德国),牛血清蛋白(BSA)购于北京鼎国生物工程有限公司,超纯水购于无锡华润华晶微电子有限公司。试验所用试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

采用纳米金标记 AFB₁ 酶标抗原,使其与 AFB₁ 标准抗原直接竞争同固定化抗体发生免疫反应,进而银增强进行吸光度检测,或银增强后将银化学溶出,在一定的化学发光体系中检测其化学发光强度,具体实验原理如图 1 所示。

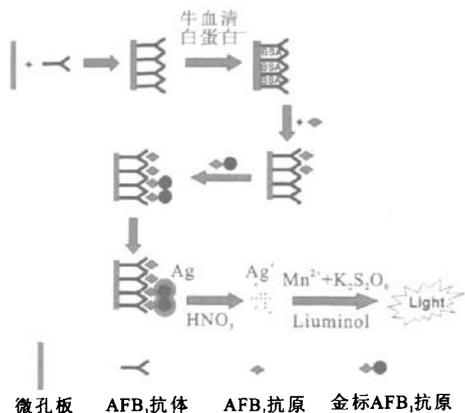


图 1 AFB₁ 化学发光免疫检测示意图

Fig. 1 Schematic representation of the CL immunoassay of AFB₁

1.3.1 纳米金的制备 按照 Nie^[8] 所述方法制备纳米金,并对其通过紫外-可见吸收光谱以及 TEM 进行表征。

1.3.2 纳米金标记 AFB₁ 酶标抗原复合物制备 参考 Mirkin^[9], Fan^[10] 等方法原理,用金纳米粒子标记 AFB₁ 酶标抗原,具体是:取 1mL 纳米金于离

血管中,加 1.5 mL 溶于 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 中的酶标抗原于其中,充分混合。室温下放置 1 h, 12 000 g 离心 45 min, 除去上清液后,加入 1.5 mL 1% BSA, 重悬沉淀物,置冰箱 4 °C 保存备用。

1.3.3 金标抗原直接竞争免疫反应过程 试验前需将试剂盒于室温中放置 15 min 以上,平衡至室温,待用;用 0.01 mol/L PBS 将 AFB₁ 标准溶液稀释出 0.05、0.025、0.01、0.005、0.002 5、0.001 ng/mL 系列浓度待用;取 3 mL E 试剂用蒸馏水稀释 20 倍至 60 mL 待用。

具体试验过程为:截取 13 孔已包被好 AFB₁ 抗体的酶标板孔放置反应板框架上,设定 1 号孔为仪器调零孔,2~13 号孔为免疫反应测定孔。每孔用 250 μ L 洗涤液洗涤,放置 1 min 后,甩掉洗涤液,在吸水板上拍干,重复洗板一次。1 号孔加入 50 μ L A 试剂和 50 μ L D 试剂,2~13 号孔分别加入系列的 B 试剂和纳米金标记的黄曲霉毒素 B₁ 抗原溶液各 50 μ L。轻轻振摇,使各孔中的反应物混匀。将反应板放入 37 °C 恒温培养箱中孵育 30 min。取出反应板,用力甩掉反应液,拍干。每孔加入 250 μ L 洗涤液,放置 2 min,甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干,重复洗涤 4 次,备用。

1.3.4 银增强及吸光度值的检测 按参考文献 [11] 方法并稍加改动。取银增强液 (0.85 g 氢醌溶于 15 mL 超纯水中;1.175 g 柠檬酸三钠/1.275 g 柠檬酸溶于 5 mL 超纯水中;0.5 g 硝酸银溶于 2 mL 超纯水中,溶液均需新鲜配制,确保无结晶析出且无色,氢醌和柠檬酸混合液应在银增强前 30 min 左右保持 37 °C 温育) 迅速混匀立即加入各酶标板孔内,每孔 100 μ L,置于温箱里反应,反应一定时间后,置入超纯水中,终止反应。然后将银增强后的微孔板放入酶标仪中,在 630 nm 处检测其吸光度值。

银增强反应在暗处避光进行,以减少银自身成核反应,增强特异性。

1.3.5 化学发光检测条件优化 银增强后,将银进一步化学溶出做化学发光检测。溶出的银离子催化 $\text{MnSO}_4\text{-K}_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ 体系生成 $\text{K}_2\text{Mn}_2\text{O}_4$, 进而氧化 luminol 化学发光,通过 Ag^+ 浓度与化学发光信号之间良好的线性关系完成对目标物质的检测。在银的化学溶出体系中,如果不加 $\text{MnSO}_4\text{-K}_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$, 重复这个试验则观察不到发光增强信号,可见银在 HNO_3 溶液中溶解后做化学发光受到 $\text{MnSO}_4\text{-K}_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ 、luminol 的浓度等因素的影响^[12]。

1) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 质量浓度的优化

100 μ L 1 nmol/L 的 AgNO_3 溶解于 200 μ L 硫代硫酸钾,40 μ L MnSO_4 ,36 μ L HPO_3 的混合溶液中,加入 60 μ L 5 mol/L NaOH。90 °C 水浴锅中保温 7 min,流动的冷水终止反应。然后将其稀释至一定浓度,吸取 100 μ L 稀释液加入 100 μ L 1 μ mol/L 的 luminol (溶解于 1 mol/L NaOH) 中测化学发光强度。其中 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g/dL, MnSO_4 6.0×10^{-3} mol/L, HPO_3 1 : 1 (V/V), 试验中将银离子用超纯水取代作为对照,结果以相对化学发光强度值表示。

2) MnSO_4 浓度的优化

100 μ L 1 nmol/L 的 AgNO_3 溶解于 200 μ L 硫代硫酸钾,40 μ L MnSO_4 ,36 μ L HPO_3 的混合溶液中,加入 60 μ L 5 mol/L NaOH。90 °C 水浴锅中保温 7 min,流动的冷水终止反应。然后将其稀释至一定浓度,吸取 100 μ L 稀释液加入 100 μ L 1 μ mol/L 的 luminol (溶解于 1 mol/L NaOH) 中测化学发光强度。其中 MnSO_4 6.0×10^{-2} 、 20.0×10^{-3} 、 10.0×10^{-3} 、 6.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-3} mol/L、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2.0%, HPO_3 1 : 1 (V/V), 试验中将银离子用超纯水取代作为对照,结果以相对化学发光强度值表示。

3) HPO_3 浓度的优化

100 μ L 1 nmol/L 的 AgNO_3 溶解于 200 μ L 硫代硫酸钾,40 μ L MnSO_4 ,36 μ L HPO_3 的混合溶液中,加入 60 μ L 5 mol/L NaOH。90 °C 水浴锅中保温 7 min,流动的冷水终止反应。然后将其稀释至一定浓度,吸取 100 μ L 稀释液加入 100 μ L 1 μ mol/L 的 luminol (溶解于 1 mol/L NaOH) 中测化学发光强度。其中 MnSO_4 6.0×10^{-3} mol/L, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2.0%, HPO_3 1.75 : 1 (V/V), 1.50 : 1 (V/V), 1.25 : 1 (V/V), 1 : 1 (V/V), 0.5 : 1 (V/V), 试验中将银离子用超纯水取代作为对照,结果以相对化学发光强度值表示。

4) luminol 浓度的优化

配制 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 5×10^{-7} 、 1×10^{-7} mol/L 系列浓度鲁米诺,在上述优化出的实验条件下,分别取不同浓度的鲁米诺溶液 200 μ L 加入到化学发光石英管中,迅速注入反应液,测定化学发光强度。每个浓度平行地测定 3 次。

1.3.6 银的化学溶出与化学发光检测 用 1 : 3 (V/V) HNO_3 来溶解银增强后各酶标板孔内的银 (100 μ L/孔),溶解所得的银离子溶液中均加入 60 μ L 5 mol/L 的 NaOH 来调节其酸度。然后该溶液转移至含有 200 μ L 2 g/dL $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 40 μ L 6×10^{-3}

mol/L $MnSO_4$ 和 $36 \mu L$ 1:1(V/V) H_3PO_4 的离心管中,混合均匀后马上放入 $90^\circ C$ 水浴中加热 7 min。流水冷却中止该催化反应并用 5 mol/L NaOH 调节溶液的 pH 值至 10。取该溶液 $50 \mu L$ 转移至石英发光管中,然后注入 $200 \mu L$ luminol ($1 \mu mol/L$, pH 13.5) 同时在发光分析仪上记录发光信号。该实验中银离子的化学发光强度和金标抗原的浓度成正比(与样品中 AFB_1 的含量成反比),可以得出化学发光信号和待测 AFB_1 的关系。

1.3.7 酶联免疫吸附对照实验 按照《食品中黄曲霉毒素 B1 的测定方法》(GB/T 5009.22—1996) 第二法中食用油测定的样品制备方法略加改动,即:用小烧杯称取 4.0 g 食用花生油样品 6 份,分别添加不同浓度的 AFB_1 标准物质,用 20.0 mL 石油醚将样品移于 125 mL 分液漏斗中,用 20.0 mL 甲醇-水(55+45)溶液分次洗烧杯,溶液一并移入分液漏斗中,振摇 2 min。静置分层后,放出下层甲醇-水溶液于 75 mL 蒸发皿中,再用 5.0 mL 甲醇-水溶液重复振摇提取一次,提取液一并加入蒸发皿中, $65^\circ C$ 水浴通风挥干。用 2.0 mL 体积分数 20% 甲醇-磷酸缓冲液分 3 次(0.8、0.7、0.5 mL)溶解并彻底冲洗蒸发皿中凝结物,移至小试管,加盖振荡后静置待测。

2 结果与分析

2.1 纳米金的表征

纳米金^[13](nanogold)是指金微小颗粒,其直径为 1~100 nm,一般为分散在水中的水溶胶,故又称胶体金。由于其相容性(可以和大分子物质核酸、蛋白质很好的结合)好,无毒副作用,性质稳定而被广泛使用。图 2 为按照实验方法制备的纳米金颗粒的紫外-可见吸收光谱,其最大吸收波长为 520nm,根据彭剑淳^[14]等的计算方法可得其粒径约为 12.5 nm。图 3 的 TEM 照片也证实了这一点,综合诸多文献^[15-16]报道,12 nm 左右的纳米金适合做蛋白标记物,因此,后续研究采用所制备纳米金标记酶标 AFB_1 。

2.2 银增强及吸光度值的检测

通过黄曲霉毒素 B_1 抗体与金标抗原、待测抗原的竞争免疫反应以及银增强反应相结合来检测 AFB_1 。待测抗原的浓度越大,通过免疫反应结合的金标记抗原就越少,纳米金上沉积的银就越少,颜色(灰度)也越浅,所以用分光光度法测定该银增强产物的吸光度,即可得出待测 AFB_1 的量。

研究发现银增强过程中,随着时间的推移,增

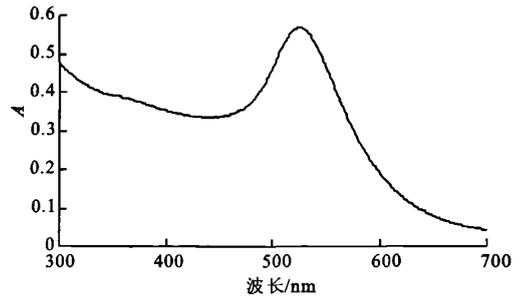


图 2 纳米金的紫外-可见吸收图谱

Fig. 2 UV-Vis spectra of gold nanoparticles

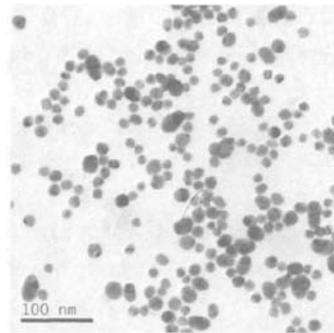


图 3 所制备纳米金的 TEM 形貌

Fig. 3 TEM image of gold nanoparticles

强液的灰度会不断增加,尤其是通过免疫吸附锚定于酶标板上的纳米金颗粒可显著加速银颗粒的聚集,即纳米金银增强信号的吸光度值变化是剂量时间依赖性的(见图 4)。在一定的时间控制下,银增强的灰度值变化与免疫反应体系中固定于酶标孔内的纳米金颗粒的量呈正相关。通过一系列实验优化,选择出最合适的时间点 120 s 终止银增强反应,得出银增强吸光度值与 0.01~0.25 ng/mL 浓度范围内的 AFB_1 呈良好的线性关系(见图 5),检测下限为 0.01ng/mL,较所购试剂盒的灵敏度提高了 1 个数量级。

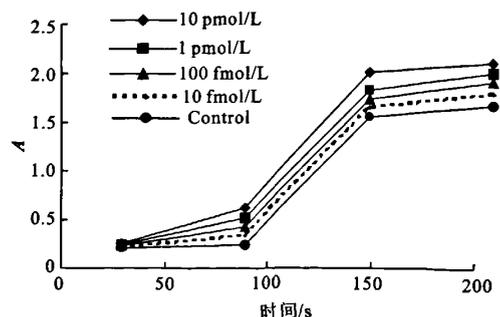


图 4 不同浓度 AFB_1 的银染时间与吸光度值的关系曲线

Fig. 4 The time-absorbance relationship of various concentrations of AFB_1 with silver staining enhancement

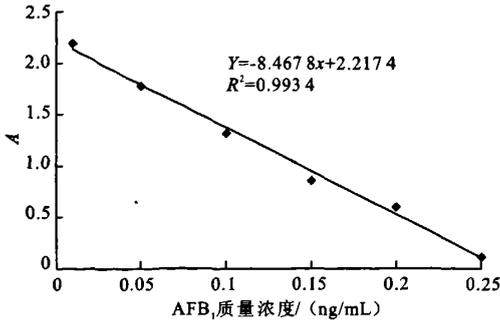


图 5 AFB₁ 浓度与吸光度值之间的关系曲线

Fig. 5 Correlation between the absorbance values of silver enhancement and concentrations of AFB₁

纳米金标记银增强方法不仅发挥了纳米金标记优势,更利用了银增强技术将信号有效放大。但值得注意的是,银增强过程中银原子的自身聚合所引起的一定背景值会干扰纳米金催化的银增强效应的观察,只有在信号扩增曲线的指数期内才可以获得吸光度值与 AFB₁ 浓度之间良好的梯度关系。若银增强反应时间过长(超过 4 min),则增强强度均到达平台期,不能区分浓度梯度关系。因此,银增强时间控制在时间-吸光度值曲线指数相内,多次实验优化后选择 120s。

2.3 银的化学溶解

由于纳米金银增强-吸光度检测方法是酶标仪检测吸光度做定量检测的,吸光度法固有的灵敏度限制了其发展,而化学发光检测的灵敏度可比吸光度法高出 2~3 个数量级^[14],所以我们在此基础上,将银增强后的银化学溶出做化学发光检测,进一步将检测信号放大以更大程度地提高检测灵敏度。

该化学发光检测方法是建立在对银离子的定量检测的基础上的^[17],所以本文采用体积比 1:3 HNO₃ 来溶解银。试验中将以超纯水取代化学溶出的银离子溶液做空白对照,结果用溶银测出的化学发光值与空白对照化学发光值差值即相对化学发光值表示。从图 6 可以看出,银在体积比 1:3 HNO₃ 中易于溶解,10 min 即可溶解完全,为保证其完全溶解,本实验中溶解时间都采用 15 min。

2.4 化学发光检测条件优化

银离子的定量测定是基于 Ag⁺-K₂S₂O₈-Mn²⁺-H₃PO₄-luminol 偶合化学发光体系,本问系统研究了该体系各种因素对发光结果的影响。首先研究了 Mn²⁺, K₂S₂O₈ 和 H₃PO₄ 三者浓度的影响。参照文献^[12] 固定每种试剂用量,同时固定两种试剂浓度去改变另外一种试剂的浓度,测其对发光信号的影响。在选定 40 μL 6 × 10⁻³ mol/L MnSO₄, 36 μL 体

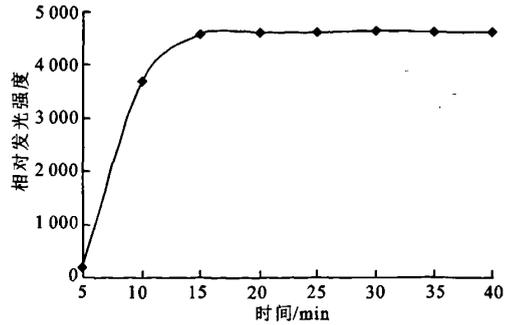


图 6 银溶解时间的影响

Fig. 6 Effect of the dissolving time of silver

积比 1:1 H₃PO₄ 和 1 μmol/L luminol(pH 13.5) 的条件下,考察了过硫酸钾质量浓度对化学发光强度的影响。结果表明(见图 7):相对化学发光强度随过硫酸钾质量浓度的增加而增强,但是,当过硫酸钾的含量达到 2% g/dL 时,样品的化学发光强度增加变缓慢,趋于平滑。所以,选择 2 g/dL K₂S₂O₈ 用于后续实验。在选定 200 μL 2 g/dL K₂S₂O₈, 36 μL 1:1(mL:mL) H₃PO₄ 和 1 μmol/L luminol (pH 13.5) 的条件下,考察了硫酸锰浓度对化学发光强度的影响,结果表明(见图 8):当 MnSO₄ 的浓度为 6 × 10⁻³ mol/L 时,样品的相对化学发光强度达到最大,所以,选 40 μL 6 × 10⁻³ mol/L MnSO₄ 用于后续实验。图 9 显示的是磷酸与水混合体积比对化学发光强度的影响。选定实验条件为 200 μL 2 g/dL K₂S₂O₈, 40 μL 6 × 10⁻³ mol/L MnSO₄ 和 1 μmol/L luminol(pH13.5),研究发现当磷酸与水的混合体积比为 1:1 时,相对化学发光强度达到最大,所以,实验选用 36 μL 1:1(V/V) H₃PO₄。最后确定 Ag⁺-K₂S₂O₈-Mn²⁺-H₃PO₄ 反应的最佳浓度为:2 g/dL K₂S₂O₈, 6 × 10⁻³ mol/L MnSO₄ 和 1:1(V/V) H₃PO₄。

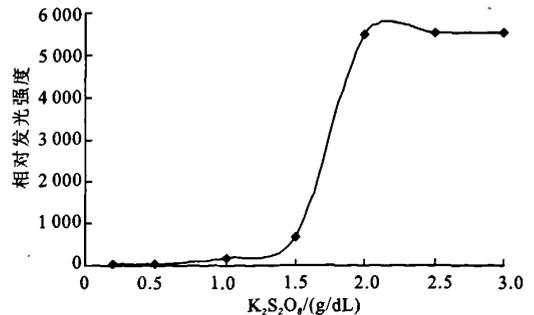


图 7 K₂S₂O₈ 质量浓度与相对化学发光强度的关系曲线

Fig. 7 Relative CL intensity versus the concentrations of K₂S₂O₈

本化学发光体系是由催化反应 Ag⁺-K₂S₂O₈-Mn²⁺-H₃PO₄ 的产物 KMnO₄ 对碱性的 luminol 的氧

化作用启动的,显然,luminol溶液的浓度是很重要的影响因素。在上述最佳优化条件下,研究了luminol溶液浓度对相对化学发光的影响。随着luminol溶液浓度的增大,相对化学发光强度增大,继而平稳,然后又逐渐减小,当浓度在1 μmol/L时,相对化学发光强度达到最大(见图10),所以我们选择1 μmol/L为luminol溶液的最佳反应浓度。

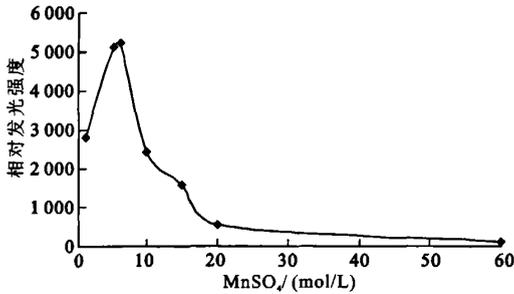


图8 MnSO₄浓度与相对化学发光强度的关系曲线
Fig. 8 Relative CL intensity versus the concentrations of MnSO₄

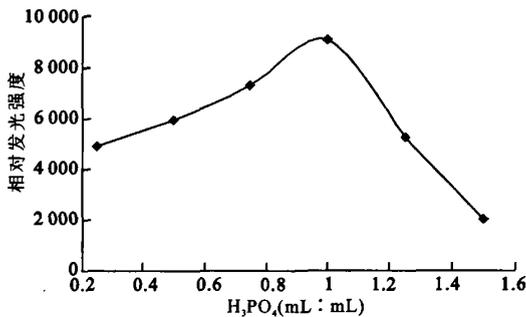


图9 H₃PO₄体积分数与相对化学发光强度的关系曲线
Fig. 9 Relative CL intensity versus the concentrations of H₃PO₄

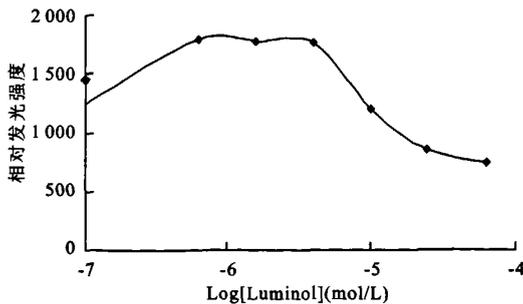


图10 Luminol浓度与相对化学发光强度的关系曲线
Fig. 10 Relative CL intensity versus the concentrations of luminol

2.5 分析性能

在选定的最佳条件下,考察了不同浓度 AFB₁

的化学发光响应曲线。研究发现(见图11所示),相对化学发光强度与 AFB₁质量浓度在 0.002 ~ 0.300 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,检出下限为 0.002 ng/mL,较所购试剂盒的灵敏度提高了约两个数量级。7次重复测量 0.01 ng/mL AFB₁来评价该方法的精密度,相对标准偏差为 3.8%。可见所建立方法具有很高的灵敏度且精密度良好,是一种较为理想的 AFB₁超灵敏分析方法。

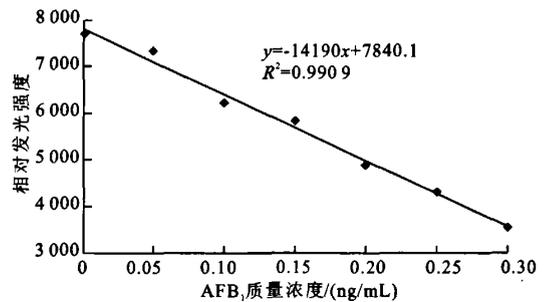


图11 AFB₁浓度与相对化学发光强度的关系曲线
Fig. 11 Calibration curve between the relative CL intensity and concentrations of AFB₁

2.6 分析应用

为了评价本文所建立方法的可靠性,我们将 AFB₁实际样品用本文建立的化学发光法与酶联免疫法同时测定,并绘制 AFB₁的标准曲线。根据 AFB₁标准曲线,得出样品中 AFB₁的浓度,与用酶联免疫法得出的结果进行比较,其结果如图12所示,二者的检测结果具有良好的相关性($p < 0.001$),表明本文建立的方法可靠,可用于实际样品的测定。

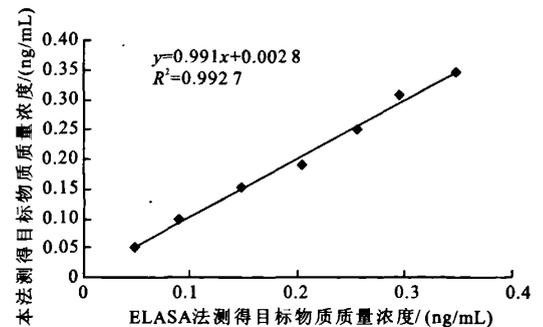


图12 本文化学发光法与酶联免疫法 ELISA 在 AFB₁检测中的结果相关性
Fig. 12 Correlation of CL with ELISA data for analysis of AFB₁

3 结语

本研究以纳米金标记 AFB₁为探针,采用银增强技术进行信号放大处理,通过检测纳米金表面沉

积的银的量对 AFB₁ 进行间接定量检测,建立了吸光度法与溶出化学发光两个检测体系,其中吸光度法检测体系的灵敏度较所购试剂盒约提高了一个数量级,而溶出化学发光检测体系又在其基础上提高了一个数量级,实现了 AFB₁ 的超灵敏分析。该

方法创新性的利用了金标银增强技术来检测黄曲霉毒素 B₁,不仅发挥了纳米金标记的优势,更利用了银增强技术将信号有效放大,建立了比传统方法更灵敏高效的检测手段。有可能为其他真菌毒素或微生物的超灵敏分析开辟一条新的途径。

参考文献(References):

- [1] Chu FS, Bhatnaar D. Mycotoxins. in Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications. (Arora, D. K. editor) [M]. New York: Marcel Dekker, Basel, 2004.
- [2] 王晶, 王林, 黄晓蓉. 食品安全快速检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
WANG Jing, WANG Lin, HUANG Xiao-rong. Rapid detection methods for food safety [M]. Beijing: Chemical Industry Press. 2002. (in Chinese)
- [3] LI Zheng-Ping, WANG Yu-Cong, LIU Cheng-Hui, et al. Development of chemiluminescence detection of gold nanoparticles in biological conjugates for immunoassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 551(1): 85-91.
- [4] Hansen JA, Wang J, Kawde AN, et al. Quantum-dot/ aptamer-based ultrasensitive multi-analyte electrochemical biosensor[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(7): 2228-2229.
- [5] LIU Jue-wen, LU Yi. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(1): 90-94.
- [6] Garc-Campa AM, Baeyens WRG. Chemiluminescence in analytical chemistry [M]. Marcel Dekker: New York, 2001.
- [7] 焦奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社. 2004.
- [8] NIE Libo, CHEN Hong, TAN Mei-jun, et al. Improvement of hybridization signals of gold label silver stain gene detection [J]. *Journal of Southeast University (English Edition)*, 2004, 10(2): 463-466.
- [9] Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials[J]. *Nature*, 1996, 382 (6592): 607-609.
- [10] FAN Ai-ping, LAU Choi-wan, LU Jian-zhong. Magnetic bead-based chemiluminescent metal immunoassay with a colloidal gold label [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(8): 3238-3242.
- [11] LI Yuan-yuan, ZHANG Chi, LI Bo-sheng, et al. Ultrasensitive densitometry detection of cytokines with nanoparticle-modified aptamers[J]. *Clinical Chemistry*, 2007, 653(6): 1061-1066.
- [12] 耿征, 武竟存, 陈战国, 等. 偶合反应化学发光法测定痕量银的研究[J]. 分析化学, 1995, 23(2): 401-403.
Geng Zheng, Wu Jing-cun, Chen Zhan-Guo, et al. Determination of trace- silver (I) by combined chemiluminescence reaction system[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1995, 23(2): 401-403. (in Chinese)
- [13] LI Jin, XIAO Lang-tao, LIU Xuan-ming, et al. Amperometric biosensor with HRP immobilized on a sandwiched nano-Au/polymerized m-phenylenediamine film and ferrocene mediator [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 07 (376): 902-907.
- [14] 彭剑淳, 刘晓达, 丁晓萍, 等. 可见光光谱法评价胶体金粒径及分布[J]. 军事医学科学院院刊. 2000, 09, 24(3): 211-212.
PENG Jian-Chun, LIU Xiao-Da, DING Xiao-Ping, et al. Evaluation of the particle diameter of colloidal gold and its distribution through visible spectroscopy[J]. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2000, 09, 24(3): 211-212. (in Chinese)
- [15] Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance dependent optical properties of fold nanoparticles[J]. *Science*, 1997, 277(5329): 1078-1079.
- [16] Horisberger M, Rosset J. Colloidal fold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy [J]. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 1997, 25(4): 295-301.
- [17] LIU Cheng-hui, LI Zheng-Ping, Du Bao-an, et al. Silver nanoparticle-based ultrasensitive chemiluminescent detection of DNA hybridization and single-nucleotide polymorphisms[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(8): 3738-3744.

(责任编辑: 杨萌)