文章编号:1673-1689(2006)06-0037-05

黄曲霉毒素 B_1 金标检测体系建立过程中的影响因素

孙秀兰[1]， 张银志[2]， 汤坚[2]， 赵晓联[3]

(1. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 分析测试中心,江苏 无锡 214036;3. 江苏省微生物研究所有限公司，江苏 无锡 214038)

摘 要: 详细研究了纳米金标记免疫检测体系建立过程中的影响因素,包括检测带的信号强度、封闭试剂,纳米金探针的浓度、包被试剂A和B的浓度、纳米金溶胶的颗粒尺寸,及检测过程中的化学体系等。通过参数优化,确立了建立快速、简易的金标试剂条检测方法的最佳条件。探针溶液中加入保护试剂K后,试剂条的稳定性有明显的提高,常温下试剂条保存期可达120 d(信噪比保留70%以上)。

关键词: 黄曲霉毒素 B_1;纳米金;免疫层析;试剂条

中图分类号:TS 201.6 **文献标识码**: A

Study on Factors Influencing on the Development of Nanogold-Labeled Assay System of Aflatoxin B_1 in Foods

SUN Xiu-lan[1], ZHANG Yin-zhi[2], TANG Jian[2], ZHAO Xiao-lian[3]

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036,China;2. Testing & Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036,China;3. Microbiology Company Jiangsu Province, Wuxi 214038,China)

Abstract: Effect of the detection line signal, the blocking reagent, the colloidal gold-labelled probe concentration, the coating reagent A and B concentration, the nanogold size and the chemical system on the development of nangold-labeled immunchromatographic strip (GICA) for analysisi aflatoxin B1 was investigated. The results showed that, the analysis time of aflatoxin B1 only 10 min with the optimal conditions.

Key words: Aflatoxin B1; nano-gold ; Immunochromatographic;Strip

自从 AFB_1 被发现以来,为了降低 AFB_1 对人类和动物的危害,世界许多国家都开展了食品和饲料中 AFB_1 的检测方法的研究,其中有些方法已经被AOAC所采纳[1-3]。常用的化学方法主要包括薄层色谱法(TLC)和液相色谱法(HPLC),常用的免疫分析方法为酶联免疫吸附法(ELISA)[3-4]。传统的TLC方法也是我国国标检测中的第一法,一直是检测部门普遍使用的方法。但是,TLC方法的检测灵敏度很低,操作人员暴露于有潜在危害的有机溶剂威胁中,而且要与高浓度毒素标准品直接接触,存在明显的安全隐患。而ELISA和HPLC方法虽然提供了良好的敏感度,但是分析过程繁琐,

收稿日期:2006-04-30; **修回日期**:2006-07-20.

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK2002406).

作者简介: 孙秀兰(1976-),女,山东聊城人,副教授.

万方数据

检测时间较长，必须借助分析仪器，不能适应现场快速检测的要求[5-6]。新型检测技术——金标免疫层析（Gold Labeled Immunochromatographic Assay，简称GICA）是20世纪80年代初发展起来的一种快速免疫诊断技术[7]。利用纳米金作为标记物，短时间（15 min）之内便可得到直观的结果。它不需进行结合标记物与自由标记物的分离，省去了繁琐的加样、洗涤步骤，不仅提高了检测速度，而且检测过程中无需处理试剂，真正实现了一步法（One-step）检测。该方法操作简单快速，人员只需短期简单培训，非常适合现场检测的要求，亦适用于家庭中食物安全的自我监测（Point-of-care）。文中将根据免疫层析的原理，建立 AFB_1 快速金标检测方法，并对其进行方法学评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

包被A试剂为黄曲霉毒素 B_1 抗原，包被B为黄曲霉毒素 B_1 二抗，A试剂、B试剂和金标探针均为作者所在实验室自制；纤维膜、金标垫、样品吸收垫、吸水纸购自Dassel公司；AFB_1 标准溶液（溶于甲醇）购自Sigma公司；大米、玉米、花生、花生油和饲料样品，采集自陕、桂、鄂、赣的有关粮库或加工厂；实验用水均为去离子水。

1.2 实验仪器

XYZ 3000型金标点样仪，CA92614型金标切条机，SR3000型金标试条扫描仪，美国Bio-dot公司制造；TK型微量移液器，芬兰雷勃公司制造；小型粉碎机，MS2型微量振荡器，德国IKA公司制造；HH-S型恒温水浴锅，金坛国盛实验仪器厂制造；隔水式电热恒温培养箱，上海跃进医疗器械厂制造；pH计，上海梅特勒—克利多公司制造；SK250LH型超声波清洗器，上海科导仪器公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 GICA检测技术的建立 测试条由样品垫、金标垫、硝酸纤维膜（NC膜）和样品吸收垫4个部分组成。将制备好的金标抗体稀释后分散在玻璃纤维滤膜上，自然干燥后备用。将硝酸纤维素膜活化处理后，用自动点样仪对硝酸纤维膜进行检测试剂线性包被，下端横线包被A试剂，质量浓度100 μg/mL为检测线；上端横线包被B试剂，质量浓度为2.0 mg/mL。自然干燥后用0.1 mol/L的BSA的PBS溶液（pH 7.4）浸泡30 min进行封闭处理，干燥后备用。将4个部分依次相互叠加粘贴于试剂板上，以宽3.5 mm/条切条后备用。

1.3.2 AFB_1 标准溶液的检测 用甲醇将 AFB_1 配制成10.0 mg/mL的溶液，再用甲醇-PBS溶液（20+80）稀释至约10 μg/mL，紫外分光光度计测定溶液（361 nm波长）的光密度值，代入下式计算：

$$X = A \times M \times 1000 \times f / E$$

式中：X 为该溶液中 AFB_1 的质量浓度，μg/mL；A 为测得的光密度值；M 为 AFB_1 的相对分子质量，312；E 为摩尔消光系数，21 800；f 为使用仪器的校正因素。根据计算将该溶液配制成10 μg/mL的标准溶液，检测时，用甲醇-PBS溶液将该标准溶液稀释至所需质量浓度（0.05、0.1、0.5、1、2、5、10 ng/mL）或质量分数（0.05、0.1、0.5、1、2、5、10 μg/kg）。分别将不同质量浓度的 AFB_1 准溶液滴加于微孔中，将测试条垂直插入微孔，5～10 min左右目测检测结果。

1.3.3 抑制率的测定 通过测试条扫描仪检测信号强度，将颜色信号通过试剂条光度计，即可转变为光密度值进行定量检测。

$$F = \frac{A_i}{A_0} \times 100\%$$

式中：F 为抑制率；A_i 为样品检测的信号强度的OD值，A_0 为AFB质量浓度为0时的信号强度的OD值。

1.3.4 食品样品的检测

1）样品采集：本实验所做样品有大米、玉米、小麦粉和饲料。根据国家取样暂行标准，从陕西、广西、湖北、湖南、江西省有关粮库和食品加工厂采集。

2）样品提取与纯化：参照国标中ELISA测定方法中的样品提取。固体样品（大米、玉米和花生）粉碎后，过20目筛，充分混合，按四分法取20 g于250 mL的磨口三角瓶中，准确加入100 mL甲醇-水（体积比55∶45）溶液，振荡15 min，过滤，弃去初滤液。准确吸取20 mL滤液（相当于4 g样品）于250 mL的分液漏斗中，加入80 mL氯仿，加塞振摇5 min，静置分层（约30 min），放出下层氯仿层，经盛有约20 g预先用氯仿湿润的无水 Na_2SO_4 定量，慢速滤纸漏斗过滤于100 mL的蒸发皿中，再加入10 mL氯仿于分液漏斗中，重复振摇提取，氯仿一并滤于蒸发皿中，最后用少量氯仿洗涤过滤漏斗，洗液并入蒸发皿中。将蒸发皿放入通风橱，于65 ℃水浴上通风挥干后，冷却。准确加入20 mL甲醇-PBS（体积比1∶1）溶液，充分溶解凝结物，即为待测样品提取液。

万方数据

2　结果与讨论

2.1　GICA 检测带的信号强度

溶解有金标探针的检测缓冲液在向上迁移产生检测信号的过程中，不可避免地吸附在 NC 膜上，使得检测区之外的部分也产生了红色印记，这就产生了检测的背景值。检测液体积一定的情况下，信号值和背景值主要是由探针的浓度和膜上包被试剂 A 的浓度所决定。通过改变二者的浓度配比，可以筛选和优化最佳信号强度产生的条件。实验中首先保证检测液体积(100 μL)不变，改变金标垫上的纳米金探针的稀释倍数，结果如图 1 所示。可知，随着探针稀释度升高，信号值和背景值降低，而信噪比却呈升高的趋势。因为提高探针的稀释度，使得金溶胶浓度降低，而使得信号和背景值降低，背景值降低的幅度大于信号值。该结果与其它免疫分析方法中的经验结果相一致，标记探针的稀释度越大，背景值就越大幅度降低，所得到检测信号的敏感度增强，而且研究过程中也发现，探针浓度过高使得检测液的层析速度降低。考虑到金溶胶浓度过低，其产生的颜色信号太浅不易识别，所以，选择探针喷布于金标垫前的工作浓度为 1∶500。

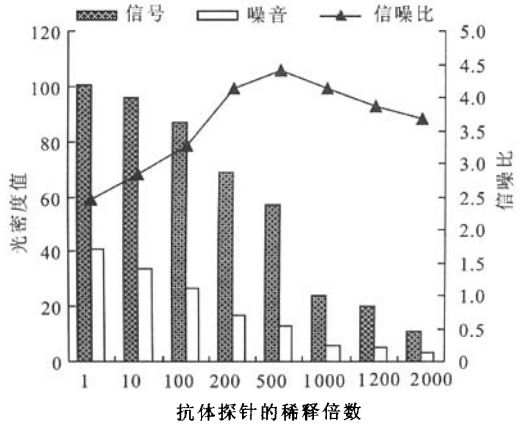

图 1　抗体探针的稀释度对信号强度的影响

Fig. 1　Effect of gold-labeled probe dilution times on signal

研究了包被试剂 A 的浓度对检测信号带强度的影响，结果如图 2 所示。可以看出，随着包被试剂 A 浓度升高，检测带的信号值增大，但同时背景值也增大。信噪比先增加后又微弱降低的趋势，说明试剂 A 浓度过高能引起信号强度下降，选择试剂 A 包被质量浓度范围为 50～200 μg/mL 均可使信号与噪音之比达到 3 左右，其中试剂 A 质量浓度为 100 μg/mL 为最适合包被的试剂 A 质量浓度。

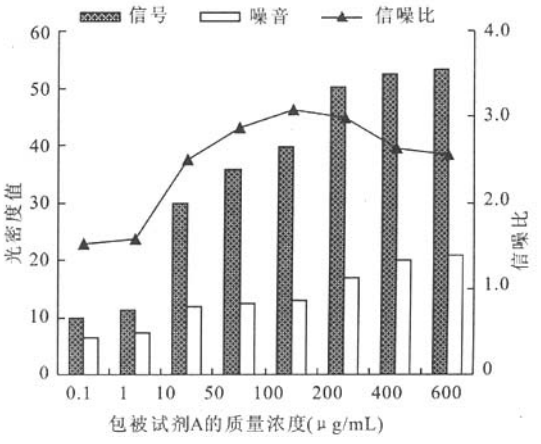

图 2　包被试剂 A 浓度对检测带信号强度的影响

Fig. 2　Effect of immobilized antigen concentration on the signal

NC 膜对生物分子的非特异性吸附，是背景值产生的重要原因。对膜其它区域进行蛋白质分子封闭的办法可以降低这种影响。实验中选取了浓度为 0. 1 mol/L 的 BSA 溶液和脱脂奶粉溶液进行封闭，封闭前后检测区信号强度的变化如图 3 所示。可知，封闭后信号值和背景值都降低，背景值的降低幅度明显大于信号值，信噪比增加。BSA 溶液的封闭效果明显优于脱脂奶粉。

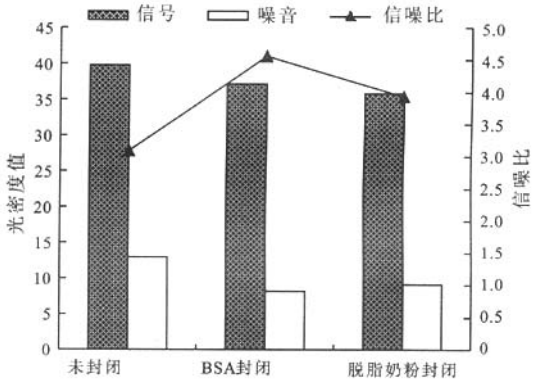

图 3　封闭对信号光密度值的影响

Fig. 3　Effect of blocking on signal by BSA and nonfat milk

2.2　GICA 检测过程中的化学体系

试剂 A 和金标探针复合物的形成受到检测体系化学环境的影响，可以通过优化检测体系的化学环境而加强，如分析试剂的酸度、离子强度和有机溶剂的含量等[8]。合适的缓冲体系可以加强信号的产生。研究证明，该分析体系的离子浓度调整到最小(即 0.01 mol/L)和溶液的酸度为 pH 7.4 是最适的缓冲液离子条件。

黄曲霉毒素易溶于甲醇、氯仿和丙酮等有机溶

万方数据

剂中，其中甲醇对反应的影响最小，是在 AFB_1 免疫分析中主要使用的检测试剂[5-6]。对不含 AFB_1 的样品缓冲液体系磷酸盐缓冲液(PBS，pH 为 7.4)中甲醇体积分数对信号的影响进行了研究，结果如图4所示。可知，随着缓冲体系中甲醇体积分数的升高，信号和噪音的光密度强度均增加，而信噪比却逐渐降低。实验结果说明，样品缓冲体系中甲醇与PBS的最适体积比例为1∶9。在这个水平上，即体积分数10%甲醇的信噪比与PBS无明显差异。

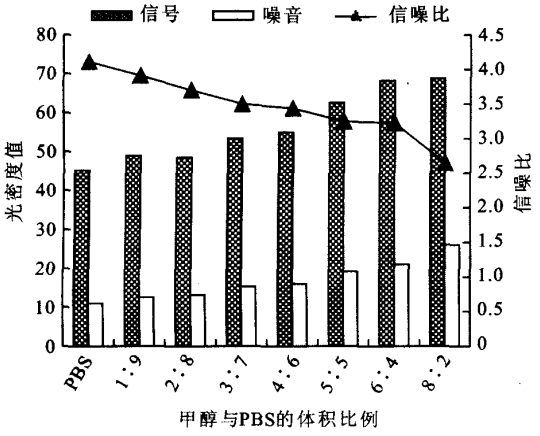

图4 甲醇体积分数对信号强度的影响

Fig. 4 Effect of methanol in test solution on signal generated in GICA-strip for AFB_1 analysis

2.3 标记探针中金溶胶粒径大小对信号强度的影响

对不同大小颗粒的金标探针进行信号产生的研究，结果如图5所示。可知，在一定范围内，随着金颗粒增大，信号强度增加。但是超过一定粒径后，背景增加的幅度大于信号值，所以标记探针中金溶胶最佳颗粒尺寸为25～30 nm。原因可能是因为颗粒越大，对抗体蛋白质的吸附能力降低，致使探针稳定性降低，所以非特异性吸附增加。实验中选择平均直径为25 nm的金溶胶标记探针为检测探针。

2.4 GICA方法定量或半定量分析的方法学评价

2.4.1 检测时间与目测结果 将 AFB_1 标准溶液(缓冲液体系为甲醇/PBS，体积比1∶9溶液)进行免疫层析试条测定。整个检测分析过程在10 min内即可完成。在缓冲液中没有 AFB_1 时，在检测区产生信号强的深红色带。相反，当检测溶液中 AFB_1 质量分数高于1.0 μg/kg时，检测带的信号几乎消失。在检测加标浓度(质量分数)为1.0 μg/kg的大米提取液时，检测带的信号也呈现消失的状态。

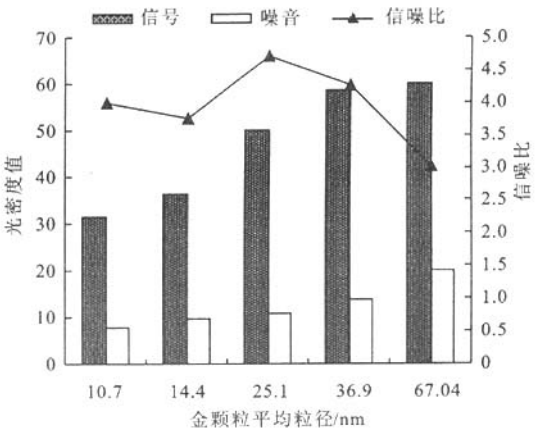

图5 金颗粒粒径对信号强度的影响

Fig. 5 Effect of colloidal gold particle size on signal

2.4.2 精密度 在GICA检测范围0.01～20 μg/kg，进行试剂条的精密度实验，重复次数为10，计算抑制率的平均值、标准偏差和变异系数。见表1，在0.01～20 μg/kg范围内测定结果的变异系数均小于10.0%，平均值为7.43%。

表1 GICA测定结果的重复性

Tab. 1 Results of assay reproducibility

AFB_1 质量分数/(μg/kg)	平均抑制率/%	SD	变异系数/%
0.01	94.99	4.98	5.24
0.05	80.6	6.54	8.11
0.1	70.24	4.66	6.63
0.2	53.54	4.49	8.39
0.5	37.41	2.82	7.54
1.0	24.54	2.26	9.21
2.5	18.91	1.02	5.39
5.0	16.22	1.18	7.27
10.0	13.06	0.9	6.89
20	9.99	0.96	9.61

2.4.3 稳定性 GICA试剂条的稳定性主要是由金标探针的稳定性决定的。作为一种高分子蛋白质和金纳米颗粒的复合物，抗体探针分子很容易发生热变性，导致探针失活。所以，选择合适的抗体探针稳定剂，有效保护探针的活性，对提高GICA检测方法的稳定性，延长试剂条的货架期起到非常关键的作用。分别在常温、37 ℃、56 ℃下做GICA试剂条的稳定性实验。结果表明，探针溶液中加入10%(体积分数)保护试剂K(3%的NaCl溶液)后，试剂条的稳定性有明显的提高，常温下试剂条保存

万方数据

期可达 120 d(信噪比保留 70%以上)。图 6 显示的是 GICA 检测试剂条的信号强度随热处理(56 ℃)时间的变化。加入保护剂后，在高温(56 ℃)放置 20 d 抗体探针的信号强度仍可保留 70%以上，而对照放置 10 d，信号强度降低至 40%以下。

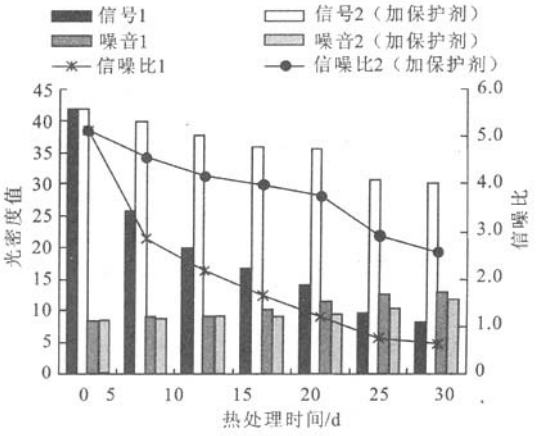

图 6　金标免疫层析试剂条的热稳定性(56 ℃)

Fig. 6　Thermal stability of the immunochromatographic strip(56 ℃)

3　结　论

1) 研究建立了一种快速、简易的检测食品中 AFB_1 的纳米金标免疫层析检测方法。在进行测定时无需分离步骤，不需加入任何试剂，方法简便快捷，10 min 内即可得到结果。利用金溶胶产生的信号颜色深浅，可进行定性或定量检测。

2) 当检测质量分数为 1.0 μg/kg AFB_1 的标准溶液时，检测带的信号差异非常明显，检测时间为 10 min 之内。方法的稳定性良好，试剂条常温保存期为 120 d。

参考文献：

[1]Richard J L, Payne G A. Mycotoxins: risks in plant, animal and humans[M]. Iowa: Council of Agricultural Science and Technology(CAST), 2003: 139－199.

[2] Chu Fan-shen. Mycotoxins[M]. NY: Academic Press, 2002.

[3] Chu Fan-shen, Bhatnagar D. Mycotoxins[M]. Basel: Marcel Dekker, 2004: 325－342.

[4] Horwitz W. Official Methods of Analysis of AOAC International[M]. [S. l.]: AOAC International, 2000.

[5] Gilbert J. Overview of mycotoxin methods, present status and future needs[J]. **Nat. Toxins**, 1999, 7: 347－352.

[6] Chu Fan-shen. Immunochemical methods for mycotoxin analysis: from radioimmunoassay to biosensors[J]. **Mycotoxins**, 2004, 54: 1－14.

[7] Paek S H, Lee C W, Yook S H, et al. Performance control strategies of one-step immuno-chromatographic assay system for Salmonella typhimurium[J]. **Anal Lett**, 1999, 32: 335－360.

[8] Horton J K, Swinburne S, Sullivan M J. A novel, rapid, single-step immunochromatograhic procedure for the detection of mouse immunoglobulin[J]. **J Immuno Method**, 1991, 140: 131－134.

[9] Richard J, Cole Joe W. Dorner. Extraction of aflatoxin from naturally contaminated peanuts and solvent/peanut rations [J]. **J AOAC**, 1994, 77(6): 1509－1511.

[10] 袁易全，陈思忠. 近代超声原理与应用[M]. 南京：南京大学出版社，1996：134.

[11] 赵晓联，赵春城，陆茂林，等. 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B_1 误差分析[J]. 中国卫生检验杂志，2001(11)：87－93.

(责任编辑：秦和平，杨萌)

(上接第 36 页)

参考文献：

[1] 陈红漫，祝令香，董志杨. 酿酒酵母海藻糖-6-磷酸合成酶基因克隆及植物表达载体的构建[J]. 微生物学报，2001，41(1)：409－411.

[2] 张红缨. 海藻糖生物合成和相关的酶学特性[J]. 微生物学通报，1998，25(4)：236－238.

[3] 陈炜，何秉旺. 酶法合成海藻糖研究的新进展[J]. 微生物学通报，1998，25(3)：164－166.

[4] Roser B. Trehalosedrying-a novel replacement for freeze drying[J]. **Biopharm**, 1991, 4(8): 47－53.

[5] 曾国驱. 海藻糖产生菌筛选及其发酵条件的研究[J]. 生物技术，2002，12(3)：28－31.

[6] 荣绍丰. 一株转化淀粉或麦芽糖寡糖生成海藻糖的菌株 D－97 的鉴定[J]. 微生物学通报，2003，30(2)：57－60.

(责任编辑：李春丽)

万方数据