

• 基础实验研究论著 •

电化学免疫传感器检测样品中黄曲霉毒素 B1 的误差分析*

冯 甜, 张 弦, 杨弦弦, 李朝睿[△]

(重庆医科大学公共卫生与管理学院, 重庆 400016)

摘 要:目的 探讨扩大电化学免疫传感器在检测食品及饲料中黄曲霉毒素 B1(AFB1)的应用范围, 分析抗体孵育时间及各种前处理方法对检测结果的影响。方法 利用 AFB1 和羧基化单壁碳纳米管构建的双层免疫传感器, 采用循环伏安法对传感器进行验证, 研究了抗体孵育时间和样品前处理方法对检测结果的影响。结果 AFB1 抗体和二抗的最佳孵育时间为 90 min, 且不同的前处理方法对检测结果影响较大, 粗提溶液经过 AFB1 亲和柱纯化、浓缩能够有效排除样品基质干扰物对测定结果的影响。结论 电化学免疫传感器检测 AFB1 具有快速、简便、检测限低等特点, 其稳定性受到抗体孵育时间以及样品前处理等因素影响。

关键词: 电化学传感器; 黄曲霉毒素 B1; 误差分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-0947-03

Study on error analysis during detecting aflatoxin B1 in food by using electrochemical immunosensor*

Feng Tian, Zhang Xian, Yang Xianxian, Li Chaorui[△]

(School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To expand the application of electrochemical immunosensor during detecting aflatoxin B1 in foods and feeds through analyzing impacts of the time of antibody incubation and sample preparation. Methods The double self-assembly immunosensor combined with aflatoxin B1 and carboxylated single-walled carbon nanotubes (SWNTs) was characterized by cyclic voltammetry and impacts of the time of antibody incubation and sample preparation methods were investigated. Results The signal increased gradually following the increasing time of antibody incubation and reached a plateau at 90 min and sample preparation methods showed a comparatively large impact on results. Additionally, the crude extractions purified through removing interfering compounds by immunoaffinity column could effectively eliminate the interference effects of sample matrix. Conclusion Detecting aflatoxin B1 by electrochemical immunosensor is characterized by various features, such as fast, simple and low detection limits. The present study shows that stability of the electrochemical immunosensor is affected by the time of antibody incubation and sample preparation.

Key words: electrochemical immunosensor; aflatoxin B1; error analysis

黄曲霉毒素(AFT)是一类结构和性质相似的真菌次生代谢产物, 具有强毒性、高稳定性、强致癌性, 产 AFT 的细菌包括黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉菌(*Aspergillus parasiticus*)^[1]。常见的 AFT 主要有 B1、B2、G1、G2、M1、M2 等亚型, 其中黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 的存在量和毒性都是最大的^[2]。AFB1 广泛存在于粮油食品中, 尤其是在高温高湿地区的玉米、花生、大米、大豆的污染最为严重^[2]。研究表明, AFB1 能够诱发肝癌、胃癌、肾癌或食道癌等严重疾病^[3]。

电化学免疫传感器是将免疫技术和电化学检测技术相结合的一种新分析方法, 利用信号转换器(电化学工作站)把分子识别器(探针)与被测对象发生的物理或化学变化转变成电信号^[4]。该技术具有快速、灵敏、选择性高、操作简便等特点, 因此应用电化学免疫传感器检测样品中 AFB1 具有重要的意义^[5]。

电化学免疫传感器自建立以来, 主要应用于重大疾病标志物的检测^[6-7]。近年来, 该技术逐步被应用于食品中真菌毒素的检测, 但相对文献较少, 尤其针对食品中 AFB1 的电化学生

物传感器检测技术的研究与应用尚不成熟^[8-12]。

作者成功构建了 AFB1 的电化学免疫传感器检测体系, 但在实际应用时发现, 样品的前处理过程、反应抗体的量都对检测结果有明显影响, 尤其是对某些成分复杂的样品进行检测时, 会出现假阳性和假阴性结果。本研究针对电化学免疫传感器检测法在检测样品中 AFB1 时, 遇到的实际问题展开研究, 对抗体孵育时间、样品前处理等影响因素进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料 AFB1-牛血清清蛋白偶联物 (AFB1-BSA)、AFB1 单克隆抗体、碱性磷酸酶标记二抗、AFB1 标准溶液、1-乙基-3-(3-二亚胺(EDC)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、 α -萘基磷酸盐(α -NP)均购自 Sigma-Aldrich 公司, 玉米粉阳性样品购自 Trilogy 分析实验室, AFB1 免疫亲和柱购自北京华安麦科生物技术有限公司, 羧基化单壁碳纳米管购自南京先丰纳米材料科技有限公司, 甲醇、乙腈等其他试剂均购于重庆茂业化学试剂有限公司。

1.2 检测仪器 CHI660D 型电化学工作站为上海辰华仪器

* 基金项目: 重庆市科技攻关计划项目(CSTC, 2011AB5092)。 作者简介: 冯甜, 女, 在读硕士研究生, 主要从事食品安全方面的研究工作。

[△] 通讯作者, E-mail: robin20000@gmail.com。

应用不多有关^[6]。喹诺酮类抗菌药物(NOR、OFL、LEV)对支原体也呈现较高的耐药性,对中国籍患者其敏感率均低于30%。喹诺酮类耐药的主要原因是靶酶-DAN 解旋酶的改变,从而降低药物积累而产生耐药性,也是引起治疗 NGU 治愈率下降的重要原因^[7]。两组患者对四环素类抗菌药物(MIN、DOX)最为敏感,其抗菌机制为特异地与敏感株核糖体 30 S 亚基结合,抑制蛋白质合成^[1]。国外有不少学者认为 MIN、DOX 可作为经验治疗的首选^[8],本研究结果同样表明其敏感性较高。

综上所述,中国籍 NGU 患者支原体感染率略高于外籍患者,感染类型均以 Uu 为主;女性高于男性;外籍患者药物敏感性均高于中国籍患者,这可能与不同国家和地区用药习惯有关。两组患者在体外药物敏感试验中,无论单一的 Uu、Mh 感染还是 Uu 合并 Mh 混合感染,对四环素类抗菌药物(MIN、DOX)及大环内酯类抗菌药物(JOS)敏感率较高,与其他相关报道较一致^[6-7],可作为治疗 NGU 支原体感染的首选药物^[10-11]。由于支原体感染时间长、疗效慢,故对于 NGU 患者应及时采样送检,并根据药敏结果合理选用并调整抗菌药物,已达到临床治疗效果和减少耐药菌株的增加和播散。

参考文献

[1] 宋国蓉,吴晓燕. 嘉兴地区支原体属感染率及药敏分析[J]. 中华医院感染杂志,2012,22(3):649-651.

[2] Couldwell DL,Gidding HF,Freeman EV,et al. Ureaplasma urealyticum is significantly associated with non-gonococcal urethritis in heterosexual Sydney men[J]. Int J STD A IDS,2010,21(5):337-341.

[3] 宋国蓉,吴晓燕. 嘉兴地区支原体属感染率及药敏分析[J]. 中华医院感染杂志,2012,22(3):649-651.

[4] Couldwell DL,Gidding HF,Freeman EV,et al. Ureaplasma urealyticum is significantly associated with non-gonococcal urethritis in heterosexual Sydney men[J]. Int J STD A IDS,2010,21(5):337-341.

[5] Shrier LA. Limitations of screening tests for the detection of chlamydia trachomatis in asymptomatic adolescent and young adult women[J]. Am J Obstet Gynecol,2004,190(3):654-662.

[6] 欧成举,李小宁,俞璇. 1266 例患者支原体检测阳性率与耐药性分析[J]. 检验与临床医学,2011,8(10):1168-1169,1172.

[7] 罗晓云. 967 例泌尿生殖道支原体药敏试验结果分析[J]. 中华医院感染杂志,2010,20(24):4034-4035.

[8] Karabay O,Topcuoglu A,Kocoglu E,et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of genital mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum in a university hospital in Turkey[J]. Clin Exp Obstet Gynecol,2006,33(1):36-38.

[10] Domingues D,Távora L,Duarte A,et al. Genital mycoplasma in women attending a family planning clinician, Guinea-Bissau and their susceptibility to antimicrobial agents[J]. Acta Trop,2003,86(1):19-23.

[11] 张国雄. 9 857 例泌尿生殖道解脲支原体人支原体检测及耐药性分析[J]. 河北医学,2013,19(1):74-76.

[12] 张艳,张波. 解脲支原体致病机制与耐药机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(13):1715-1717.

(收稿日期:2013-11-28)

(上接第 948 页)

for functional food safety and analysis [J]. Adv Exp Med Biol, 2010,698(2):267-281.

[6] Centi S,Laschi S,Mascini M. Strategies for electrochemical detection in immunochemistry[J]. Bioanalysis,2009,1(7):1271-1291.

[7] Kong W,Wei R,Logrieco AF,et al. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets[J]. Food Chem,2014,146(3):320-326.

[8] Zhang Z,Li Y,Li P,et al. Monoclonal antibody-quantum dots CdTe conjugate-based fluoroimmunoassay for the determination of aflatoxin B1 in peanuts[J]. Food Chem,2014,146(3):314-319.

[9] 赵晓联,赵春城,纽伟民. 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B1 误差分析[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11(4):473-474.

[10] 孙秀兰,张银志,汤坚. 金标免疫层析试条检测样品中黄曲霉毒素

B1 的误差分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(7):188-192.

[11] 鲍蕾,刘心同,张艺兵. 多功能柱净化高效液相色谱法检测花生中的黄曲霉毒素[J]. 检验检疫科学杂志,2005,15(5):23-25.

[12] 谢刚,王松雪,张艳. 超高效液相色谱法快速检测粮食中黄曲霉毒素的含量[J]. 分析化学杂志,2013,41(2):223-228.

[13] 霍群,蔡豪斌. 电化学免疫传感器[J]. 临床检验杂志,2003,21(3):181-182.

[14] 朱祯敏. 电化学免疫传感器在肿瘤标志物检测中的应用[J]. 现代科学仪器,2011(5):48-50.

[15] 陈钰,刘仲明,王捷. 用于肿瘤标志物检测的电化学免疫传感器[J]. 生物磁学,2009(16):3166-3168,3197.

[16] 许园园,吴雅欣,潘家荣. 自组装膜电化学免疫传感器测定甲基对硫磷[J]. 核农学报,2009,23(3):497-500.

(收稿日期:2014-01-11)

欢迎投稿

欢迎订阅

公司产品;三电极体系:工作电极为自制免疫电极,参比电极为银/氯化银(Ag/AgCl)电极,对电极为铂丝电极。

1.3 检测原理 在玻碳电极表面通过化学法修饰铺上一层羧基化单壁碳纳米管(SWNTs),并利用 3-二甲基氨基丙基亚胺(EDC)/NHS 连接剂共价键合。AFB1-BSA 通过蛋白质氨基端与羧基化单壁碳纳米管上的活化羧基反应连接,并通过抗原抗体反应与同时加入的 AFT 单体来竞争吸附一抗,再加入碱性磷酸酶标记的二抗,通过碱性磷酸酶与底物反应产生的电化学信号绘制标准曲线和得到实测样品 AFT 水平。

1.4 样品前处理方法 (1)方法 1:参照酶连免疫吸附试验(ELISA)样品前的处理方法。玉米样品经粉碎后取 25 g(过 2 mm 分样筛)加入 5 g 氯化钠与 125 mL 60%的甲醇溶液混匀;200~300 r/min 剧烈振荡 20 min,用快速定性滤纸过滤;取滤液 1 mL,再加入 4 mL 去离子水混匀,取 50 μ L 进行分析。(2)方法 2:参照 Trilogy 试验样品前处理方法。玉米样品经粉碎后取 5 g(过 2 mm 分样筛)加入 1 g 氯化钠与 25 mL 84%的乙腈溶液混匀;200~300 r/min 剧烈振荡 20 min,用快速定性滤纸过滤;取滤液 1 mL,再加入 4 mL 去离子水混匀,取 50 μ L 进行分析。(3)方法 3:在方法 1 的基础上,取 10 mL 滤液并用 20 mL 蒸馏水稀释,再用微纤维滤纸过滤;取 15 mL 上 AFB1 亲和柱(此溶液的 pH 需调至 6~8);待液体排干后,用去离子水洗涤 2 次,每次 10 mL,流速 2~3 滴/秒;待液体排干后,上样 1 mL 甲醇,用样品瓶接洗脱液,流速 1 滴/秒;取洗脱液 1 mL,再加入 4 mL 去离子水混匀,取 50 μ L 进行分析。

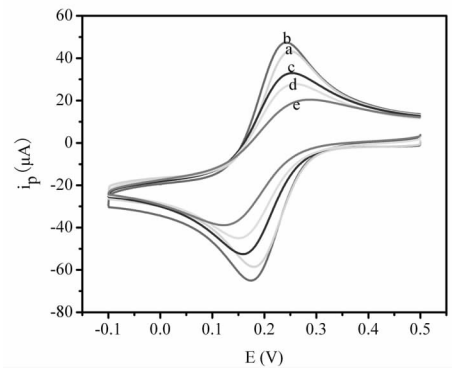
2 结 果

2.1 电化学免疫传感器电极修饰结果 由图 1 可以看出,曲线 a 为裸玻碳电极在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 溶液中呈现的可逆氧化还原峰;当裸玻碳电极修饰单壁碳纳米管(曲线 b)后,氧化还原电流明显增大,这是由于铺上 SWNTs 后促进电子的传递并增大了比表面积,溶液中的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 更易在电极表面发生电荷转移;当电极修饰 AFB1-BSA(曲线 c)、AFB1 抗体(曲线 d)、AP 标记二抗(曲线 e)之后,氧化还原电位依次逐步减小,这是因为 AFB1-BSA、AFB1 抗体、AP 标记二抗覆盖电极表面,膜厚度层层加大,溶液中的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 离子在电极表面发生电荷转移的难度也随之加大,因此有效证明电极修饰成功。

2.2 AFB1 抗体和二抗孵育时间对检测的影响 随着 AFB1 抗体孵育时间的增加,信号响应值也不断增强,并且在 90 min 达到最大。一抗孵育浓度一定时,经过 37 $^{\circ}\text{C}$ 90 min 孵育后检测效果最好,见图 2A(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。在最佳 AFB1 抗体浓度和孵育时间的基础上,继续在电极表面滴加二抗,孵育时间分别为 30、60、90、120、150 min 测量值比较,结果表明二抗的最佳孵育时间为 90 min,见图 2B(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 不同前处理方法对电化学免疫传感器测定结果的影响 样品中干扰物质的存在,是影响电化学免疫传感检测灵敏性和特异性的的重要因素。由图 3 可以看出,采用方法 1 和方法 2,即用 60%甲醇和 60%乙腈萃取粗提,样品信号峰与干扰物杂峰重叠,严重影响测定结果;采用方法 3,即用 60%甲醇萃取粗提后,再用 AFB1 免疫亲和柱纯化浓缩能够完全排除样品基质

和提取溶剂的影响。



a:裸玻碳电极在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 溶液中呈现的氧化还原峰;b:裸玻碳电极修饰单壁碳纳米管后的氧化还原峰;c:电极修饰 AFB1-BSA 后的氧化还原峰;d:电极修饰 AFB1 抗体后的氧化还原峰;e:电极修饰 AP 标记二抗后氧化还原峰。

图 1 电化学免疫传感器在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 溶液中的循环伏安图

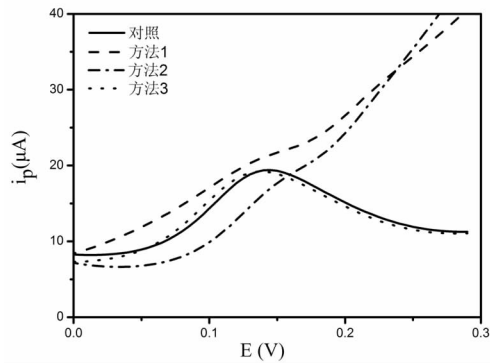


图 3 不同前处理方法对玉米粉中 AFB1 水平测定的影响

3 讨 论

电化学免疫传感器具有快速、简便、检测限低等特点,在食品安全检测方面获得越来越多的应用^[13-16]。本研究结果优化了电化学免疫传感器检测方法,确定 AFB1 抗体和二抗的孵育时间为 90 min 效果最好。进一步研究表明,由于样品基质中有干扰物存在,不同的前处理方法对样品检测结果有较大影响,其中利用 60%甲醇萃取粗提后,再用 AFB1 免疫亲和柱纯化浓缩,检测结果最好,回收率最高。

参考文献

[1] Mphande FA, Siame BA, Taylor JE, et al. aflatoxins and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana[J]. J Food Prot, 2004, 67(1): 96-102.

[2] Siddique NA, Mujeeb M, Ahmad S, et al. Determination of aflatoxins in medicinal plants by high-performance liquid chromatography [J]. J Pharm Pharm Sci, 2013, 16(2): 321-330.

[3] Ricci F, Volpe G, Micheli L, et al. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis[J]. Analytica chimica acta, 2007, 605(2): 111-129.

[4] Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, et al. Electrochemical biosensors-Sensor principles and architectures[J]. Sensors, 2008, 8(3): 1400-1458.

[5] Lavecchia T, Tibuzzi A, Giardi MT, et al. Biosensors(下转第 951 页)