

黄伟,何慧禹,鲁鹏,等.化学发光光纤免疫传感器的研制及其对谷物中呕吐毒素的快速检测[J].华中农业大学学报,2022,41(5):273-282.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.033

# 化学发光光纤免疫传感器的研制及其对谷物中 呕吐毒素的快速检测

黄伟,何慧禹,鲁鹏,陈翊平

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070

**摘要** 为实现谷物中呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)的快速、灵敏检测,采用生物传感和化学发光技术相结合的方式,研制应用于现场快速检测谷物中呕吐毒素的化学发光光纤免疫传感器,并搭建用于化学发光信号检测的便携式传感平台。整个检测平台集成到一个32 cm×15 cm×25 cm的黑色避光盒中,质量小于3 kg。结果显示:所研制的化学发光光纤免疫传感器在0.1~1 200 ng/mL呈现出良好的线性关系,检出限为62.7 pg/mL;功能化的光纤探针能够稳定保存30 d且具有良好的特异性和抗干扰性;其应用于谷物样品的呕吐毒素检测回收率为81.00%~107.33%,相对标准偏差小于8.69%。结果表明,该方法较ELISA法的灵敏度提高了30倍,线性范围拓宽了3个数量级,适合应用于谷物样品中呕吐毒素的现场快速检测。

**关键词** 呕吐毒素; 光纤免疫传感器; 化学发光; 免疫分析; 现场快速检测; 粮食安全

**中图分类号** TS207.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0273-10

呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)是粉红镰刀菌、谷禾镰刀菌等镰刀菌群产生的一种单端孢霉烯族类代谢产物,属于剧毒或中等毒物<sup>[1-2]</sup>,广泛存在于小麦、大米、玉米等谷物中,在世界范围内污染程度较高,其进入人体后可能引起腹泻、呕吐、神经紊乱、肾脏衰竭等一系列症状,严重者甚至会导致死亡<sup>[3-4]</sup>。我国食品安全国家标准 GB 2761—2017《食品中真菌毒素限量》中规定呕吐毒素在食品中最大残留限量(MRL)为1 000 μg/kg<sup>[5]</sup>,而欧盟要求更为严格,欧盟委员会条例(EC)429/2008中规定 DON 在谷物原料中的 MRL 为750 μg/kg<sup>[6]</sup>。因此,为保障我国粮食安全以及符合国际贸易规则的要求,减少或避免 DON 的危害,开发针对谷物中 DON 的高效、灵敏的现场快速检测方法具有重要意义。

目前,针对谷物中 DON 的检测方法主要有大型仪器分析法<sup>[7]</sup>和免疫分析法<sup>[8]</sup>。大型仪器分析方法如高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)等具有高效、灵敏、精确等优势,但是其设备昂贵、样品前处理复杂、需要专业的技术人员,难以满足现场即时检测的需

求<sup>[9]</sup>。传统的免疫分析法如酶联免疫吸附法(ELISA)具有成本低、特异性强等特点<sup>[10]</sup>,广泛应用于食品安全领域中危害因子的检测,但其仍存在操作繁琐、耗时较长、稳定性和精确性差等问题<sup>[11]</sup>。

近年来,由免疫识别元件(抗原/抗体)与信号转换单元(如电、光、声、热等)组成的免疫传感器成为谷物中 DON 高效检测的有力工具<sup>[12]</sup>。根据换能器工作原理的不同可以分为光学免疫传感器<sup>[13]</sup>、压电免疫传感器<sup>[14]</sup>和磁免疫传感器<sup>[15]</sup>等。在这些免疫传感器中,化学发光免疫传感器作为光学衍生发展的一种传感手段,兼具生物识别反应的高特异性和化学发光的高灵敏度,在食品安全、疾病诊断、环境监测等领域得到了广泛的应用<sup>[16]</sup>。光纤具有优异的导光性能,且易与生物识别分子偶联,是理想的化学发光生物传感器固相载体之一<sup>[17]</sup>。此外,光纤体积小、质量轻,易于实现仪器的小型化和自动化<sup>[18]</sup>。因此,化学发光光纤免疫传感器对于谷物中 DON 的特异性较强,且具有灵敏度高、准确性好的特点,在现场即时检测方面有着良好的应用前景。基于此,本研究根据免疫反应-化学发光的光纤传感系统设计了一

收稿日期:2022-05-03

基金项目:岭南现代农业重点实验室项目(NZ2021036);国家重点研发计划项目(2019YFC1605502)

黄伟, E-mail: 2020309120024@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:陈翊平, E-mail: chenyping@mail.hzau.edu.cn

种便携式、集成化的化学发光信号检测装置,旨在为谷物中DON的高灵敏现场快速检测提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 化学试剂

呕吐毒素(DON)、鼠源呕吐毒素抗体(DON-Ab, 3 mg/mL)、呕吐毒素完全抗原(DON-BSA, 3.5 mg/mL)购自山东蓝都生物科技有限公司。HRP标山羊抗小鼠IgG(1 mg/mL)购自上海碧云天生物技术有限公司。吐温-20、甲苯、戊二醛(GA)、牛血清白蛋白(BSA)、氢氟酸(质量分数48%)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。Lumigen SPARCL™化学发光试剂盒购自广州市进德生物科技有限公司。

磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)和磷酸盐吐温缓冲溶液(PBST含0.05%吐温-20)均用美国Millipore公司的离子交换装置产生的去离子水制备。使用的其他普通化学品和试剂均为分析级,购自中国国药集团。大米、小麦、玉米样品由中国检验检疫科学研究院提供。

石英光纤(SFS400/440/700T Superguide UV-Vis)购自上海闻奕光电科技有限公司,数值孔径(NA)为0.22,光纤纤芯直径400 μm。

### 1.2 试验设备

光子计数探测器(CH326)、光子计数单元

(CH297-01)及其软件模块购自北京滨松光子技术有限公司。傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet iS5)购自美国赛默飞公司;扫描电子显微镜(FIB-910)购自德国蔡司公司;原子力显微镜(Alphacn 300)购自瑞士纳瑟公司;酶联免疫光谱分析仪(AQT90 FLES)购自丹麦雷度公司;液相色谱-质谱联用分析仪(Vanquish Core)购自美国赛默飞公司。

### 1.3 检测原理

由化学发光光纤免疫传感器原理图(图1)可见,光纤纤芯通过硅烷化试剂(APTES)和戊二醛(GA)与一定浓度呕吐毒素完全抗原(DON-BSA)进行共价偶联,制备得到可用于免疫反应检测的光纤探针。将光纤传感区域浸入含有样品和鼠源DON抗体(DON-Ab)的混合溶液中,当样品中含有目标物DON时,光纤上固定的DON-BSA与溶液中DON竞争性地结合DON-Ab, DON浓度越大,固定在光纤上的DON-Ab浓度越小,加入HRP酶标山羊抗小鼠IgG后,光纤上捕获的HRP酶越少,其与触剂接触后,HRP酶催化发光底物吖啶酯从基态跃迁到激发态,当其回到基态时产生一个较弱的化学发光信号;相反,当样品中没有目标物时,抗体仅与化学发光光纤传感器上固定的DON-BSA形成免疫复合物,加入HRP酶标山羊抗小鼠IgG后,光纤上捕获的HRP酶浓度较大,加入过氧化脲触发剂后,产生一个较强的化学发光信号,其强度与目标物DON浓度呈负相关,进而通过计算化学发光信号强度的差值( $\Delta CL$ )可以间接实现对目标物的定量分析。

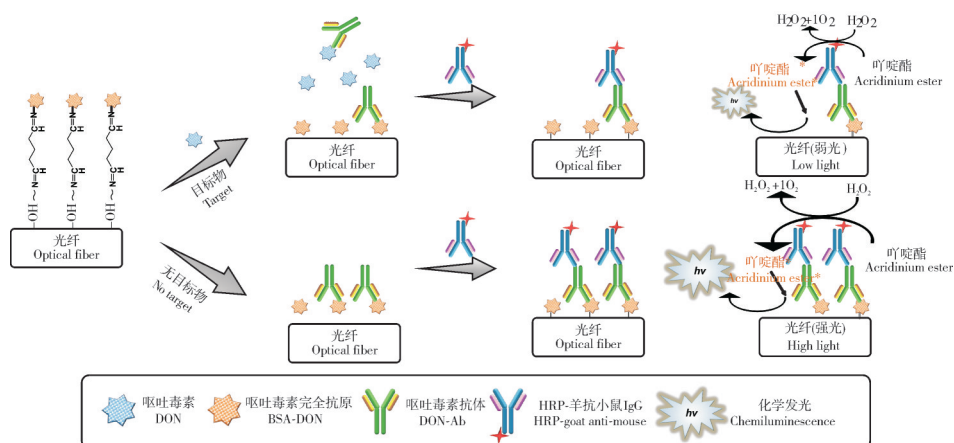


图1 化学发光光纤免疫传感器检测呕吐毒素原理图

Fig.1 Schematic diagram of chemiluminescent fiber optic immunosensor for detection of DON

### 1.4 化学发光光纤探针的制备和免疫检测方法

1) 化学发光光纤探针的制备。首先将光纤切成6 cm的小段,用小刀刮去前端约为0.5 cm的亚克力

保护壳。然后将光纤浸入24%氢氟酸中30 min,以去除光纤表面包层。用0.1 mol/L NaOH中和氢氟酸,并用超纯水洗净后氮气吹干。将光纤浸泡在0.1

mol/L NaOH中30 min以活化纤芯表面硅羟基。随后,处理过的光纤芯分别使用水和甲苯洗涤3次并浸入含APTES的甲苯溶液(体积分数1%)中引入氨基。氮气吹干后将光纤芯浸入体积分数2.5%戊二醛水溶液孵育2 h,洗净后将光纤插入5  $\mu\text{g/mL}$ 的DON-BSA中4  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜,使用PBST洗涤3次。用5% BSA封闭未结合的位点,用PBST洗涤3次后,保存于4  $^{\circ}\text{C}$ 。此时化学发光光纤免疫传感器已制备完成,放置于4  $^{\circ}\text{C}$ 备用。

2)DON检测过程。将制备好的光纤探针插入含有50  $\mu\text{L}$ 鼠源DON抗体(10  $\mu\text{g/mL}$ )和等体积不同浓度DON溶液的离心管中进行免疫反应,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,并用PBST洗涤3次。然后,将免疫反应后的光纤探针反应区插入1  $\mu\text{g/mL}$  HRP标记山羊抗小鼠IgG中,37  $^{\circ}\text{C}$ 免疫反应30 min后,用PBST洗涤3次。最后将光纤免疫反应区域与20  $\mu\text{L}$ 化学发光底物吡啶酯(10 mg/mL)和20  $\mu\text{L}$ 触发剂(含0.1 mmol/L过氧化脲的Tris-HCl缓冲溶液)等体积混合溶液接触,通过光子计数器在避光条件下记录化学发光信号。

### 1.5 化学发光光纤免疫传感器检测装置的研制

化学发光光纤免疫传感器检测装置由显示器、光纤固定器、试剂盘、旋转升降台、检测器、数据采集模块、电源7个部分组成,所有元件集成在一个32 cm $\times$ 15 cm $\times$ 25 cm黑色亚克力板搭建而成的避光盒中。如图2所示,检测器和数据采集模块安装在黑色盒子的顶部用于收集处理光纤传递的化学发光信号,平台内置离心管架的升降平台由开关控制,固定在端口上的光纤通过升降平台的运动与离心管中的反应试剂接触。产生的化学发光信号由光子计数探测器(CH326,购自北京滨松光子计数股份有限公司)进行数据采集,并通过光子计数单元(CH297-01)及其配套“光子计数软件.exe”进行数据处理,最终结果会在顶部的屏幕中显示。所研制的检测装置质量约3 kg。

### 1.6 光纤探针的表征手段

为了验证生物识别分子在光纤纤芯上的标记效果以及光纤探针的表面形貌,本研究采用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)、能量色散光谱仪(EDS)对完全抗原修饰的光纤探针进行表征。使用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)对光纤表面的特定官能团和化学键进行分析,检测光谱波谱为500~4 000  $\text{cm}^{-1}$ ;通过能量色散光谱仪(EDS)对光纤探针修饰前后的元素进行考察,检测元素为C、N、O、Si、P和S;采用原

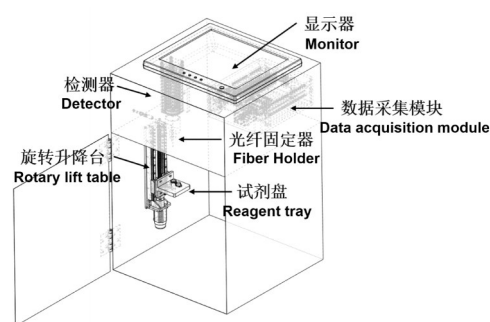


图2 化学发光光纤免疫传感器检测平台的结构

Fig.2 Structure of the detection platform for chemiluminescent fiber optic immunosensor

子力显微镜(AFM)对光纤表面微观构造进行直观分析,比例尺为400 nm。

### 1.7 性能评价

以DON浓度为横坐标、化学发光信号强度的差值( $\Delta\text{CL}$ )为纵坐标,建立标准曲线,线性关系和相关系数 $R^2$ 由标准曲线拟合得出,其中 $\Delta\text{CL}=\text{CL}_{\text{空白}}-\text{CL}_{\text{DON}}$ ,CL为3次平行试验的平均值( $n=3$ )。根据 $3\delta/S$ ( $\delta$ 为样品空白响应值的标准偏差, $S$ 为校正曲线的斜率)求得方法的检出限(LOD)。

### 1.8 特异性和抗干扰性能测试

使用呕吐毒素(DON)、黄曲霉毒素(AFB1)、赭曲霉毒素(OTA)、玉米赤霉烯酮(ZEN)对生物传感器特异性进行评估。所有真菌毒素均为1  $\mu\text{g/mL}$ ,其他反应条件相同,根据测得的化学发光差值 $\Delta\text{CL}$ 来评价该传感器对DON的特异性。

使用含有黄曲霉毒素(AFB1)、赭曲霉毒素(OTA)、玉米赤霉烯酮(ZEN)的DON溶液评估该传感器的抗干扰能力。试验溶液分别为DON和AFB1溶液,DON和OTA溶液,DON和ZEN溶液,DON和谷蛋白混合溶液,DON和葡萄糖混合溶液,对照组为不含干扰抗原的DON溶液,所有真菌毒素均为1  $\mu\text{g/mL}$ ,谷蛋白为100  $\mu\text{g/mL}$ ,葡萄糖为1 mg/mL。其他反应条件相同,根据测得的化学发光差值 $\Delta\text{CL}$ 来评价该传感器的抗干扰能力。

### 1.9 光纤探针的稳定性评价

首先,按照本文“1.3 1)”所述方法,制备15支光纤探针,并将其浸泡在PBS溶液中,4  $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存30 d,每隔5 d检测1次化学发光强度,每次测试3组,每组1根,根据化学发光信号差值 $\Delta\text{CL}$ 判断光纤探针的稳定性。

### 1.10 实际样品的检测方法

分别称量10.0 g小麦、大米和玉米样品,充分研

磨过孔径 180  $\mu\text{m}$  的筛子后置于锥形瓶中,向其中加入 200 mL 乙腈-水(体积比 1:9)混合溶液,在摇床上室温混匀 20 min。将混合液过滤并取 10 mL 滤液用 PBS 稀释至 50 mL。将预先保存在 4  $^{\circ}\text{C}$  的免疫亲和柱恢复到室温,取 25 mL 上述样液移至玻璃注射器筒中,将空气泵与注射器另一端相连调节下滴速度,控制液体以 1~2 滴/s 的速度流出,直至有空气进入柱内。弃置剩余液体后,向免疫亲和柱中加入 2 mL 甲醇洗脱,将洗脱液收集于离心管中用于测试分析。

在小麦、大米和玉米样品提取液中加入不同质量浓度(0.1、5、50、250 和 1 000 ng/mL)的 DON 标准溶液,按照本文“1.3.3”所述的方法进行目标物检测。同时,所有样品均按照食品安全国家标准 GB 5009.111—2016《食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定》中 HPLC-MS 方法进行测定( $n=3$ )。

### 1.11 数据采集及分析

本研究的数据采集主要使用光子计数探测器(CH326),该探测器通过光纤介质传导收集免疫反应产生的光子信号,随即传输至光子计数单元

(CH297-01)内统计发光时间内产生的光子数,经光信号-电信号转换后经显示屏读出化学发光强度 CL,最终数据收集后采用 Origin 2019 软件作图,并对化学发光免疫传感器的检测性能进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 光纤探针的结构表征

由红外光谱图(图 3A)可知,未修饰的光纤在 3 440  $\text{cm}^{-1}$  和 1 260  $\text{cm}^{-1}$  处分别出现硅醇弯曲振动吸收峰和硅氧基反对称伸缩峰,这与光纤的二氧化硅纤芯材质相符。而对于 DON-BSA 修饰的光纤,在 1 640  $\text{cm}^{-1}$  和 1 540  $\text{cm}^{-1}$  处出现的酰胺 I 带的 C=O 伸缩振动峰和酰胺 II 带的 N-H 伸缩振动峰能够与 BSA 的二级结构完全对应。此外,根据光纤表面的能量色散光谱图(图 3B)分析结果,光纤修饰前主要由 C、O 和 Si 元素组成,而修饰 DON-BSA 的 EDS 分析图中可以明显看出 N、P 和 S 等蛋白质基础元素的出现。为进一步证明光纤探针的成功制备,采用原子力显微镜(AFM)对光纤探针表面的 DON-BSA 进行观察,可以明显看出经过修饰后的光纤表

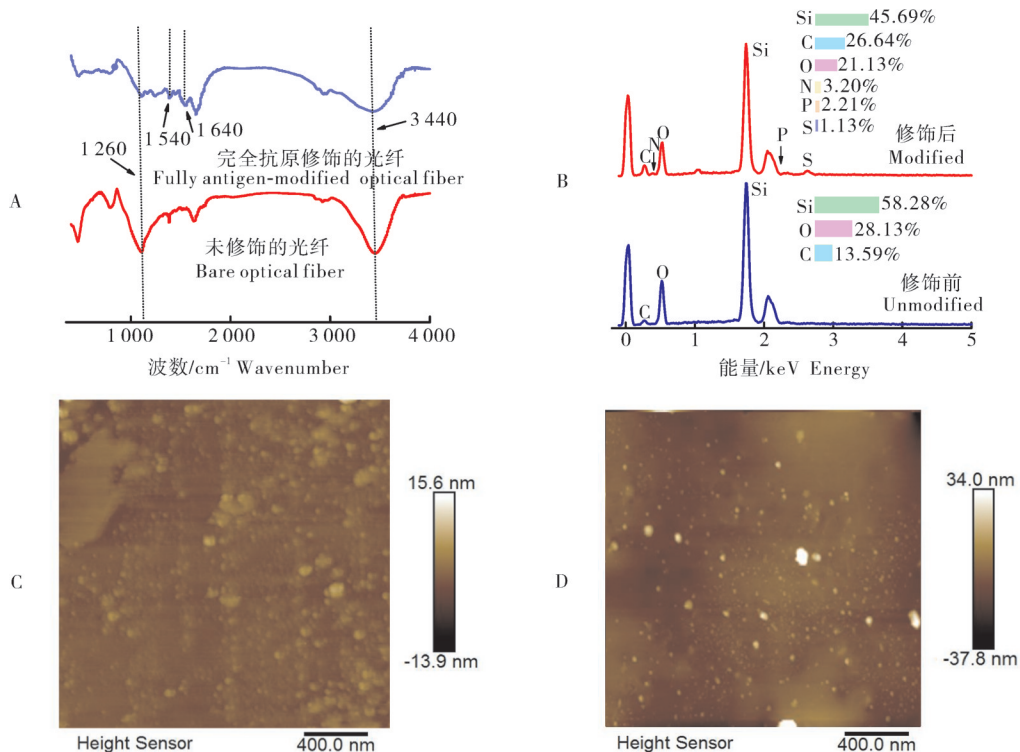


图3 傅里叶变换红外光谱图(A)、能量色散光谱图(B)、修饰前的光纤探针(C)和修饰完全抗原(BSA-DON)后的光纤探针(D)的原子力显微镜图

Fig.3 Fourier transform infrared spectrum (FT-IR) characterization diagram (A), energy dispersive spectroscopy diagram (B), atomic force microscope characterization diagram of the optical fiber probe without modification (C) and after BSA-DON modification (D)

面(图3C,D)粗糙且出现了很多直径约为30 nm的白色颗粒突起附着在光纤表面,与图3A、B的表征结果一致,说明DON-BSA成功固定在光纤表面,所制备的光纤探针可用于后续DON的快速检测。

## 2.2 光纤探针的稳定性

光纤探针的稳定性对于评价该传感器的使用成本和检测效果至关重要。如图4结果显示,相较于最初的响应值,第30天的化学发光响应值降低了大约4 000,但剩余响应值仍在11 000以上,仍可以保持在一个较高的响应水平。因此,在检测过程中依然可以实现DON的准确定量检测。这说明光纤上固定的DON-BSA在4℃的PBS缓冲溶液中至少可以稳定保存30 d,该结果有力证明了有效的共价固定策略可实现DON-BSA与光纤的紧密结合。

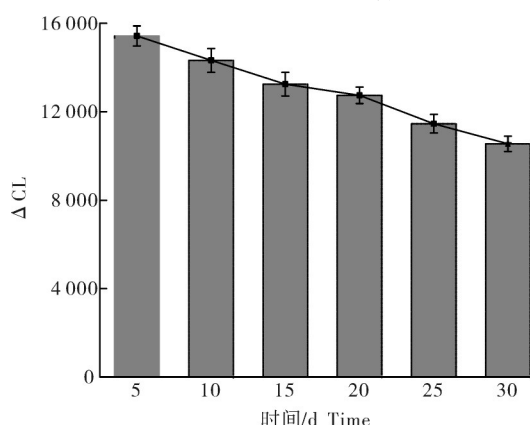


图4 不同时间下光纤探针的稳定性

Fig.4 Stability of fiber optic probe at different time

## 2.3 化学发光光纤免疫传感器的条件优化

为了保证化学发光光纤免疫传感器达到最佳的检测效果,需要对试验中可能影响结果的参数进行优化。在光纤探针构建过程中,涉及探针表面DON-BSA的浓度优化,如图5A所示,当DON-BSA质量浓度为5 μg/mL时有最大化学发光值,之后DON-BSA浓度增加但化学发光值反而有所下降,这说明DON-BSA浓度过高出现了空间位阻效应抑制了后续免疫反应的进行。因此,DON-BSA为5 μg/mL时具有最大固定效率。此外,在免疫反应过程中,考察了溶液中DON-Ab的浓度,如图5B所示,DON-Ab质量浓度从3 μg/mL逐渐升高到10 μg/mL时,化学发光值也随之升高,但DON-Ab浓度继续升高,化学发光值逐渐降低,推测是由于光纤表面的完全抗原结合位点有限导致竞争反应效率下降,因此,将10 μg/mL的DON-Ab确定为最佳质量浓度。免疫反应时间也是重要参数之一,如图5C所示,60 min时明显

看出化学发光值达到最大且不再随时间的延长而增长,表明此时免疫反应已经完成,确定免疫反应最佳时间为60 min。

## 2.4 化学发光光纤免疫传感器的特异性和抗干扰性

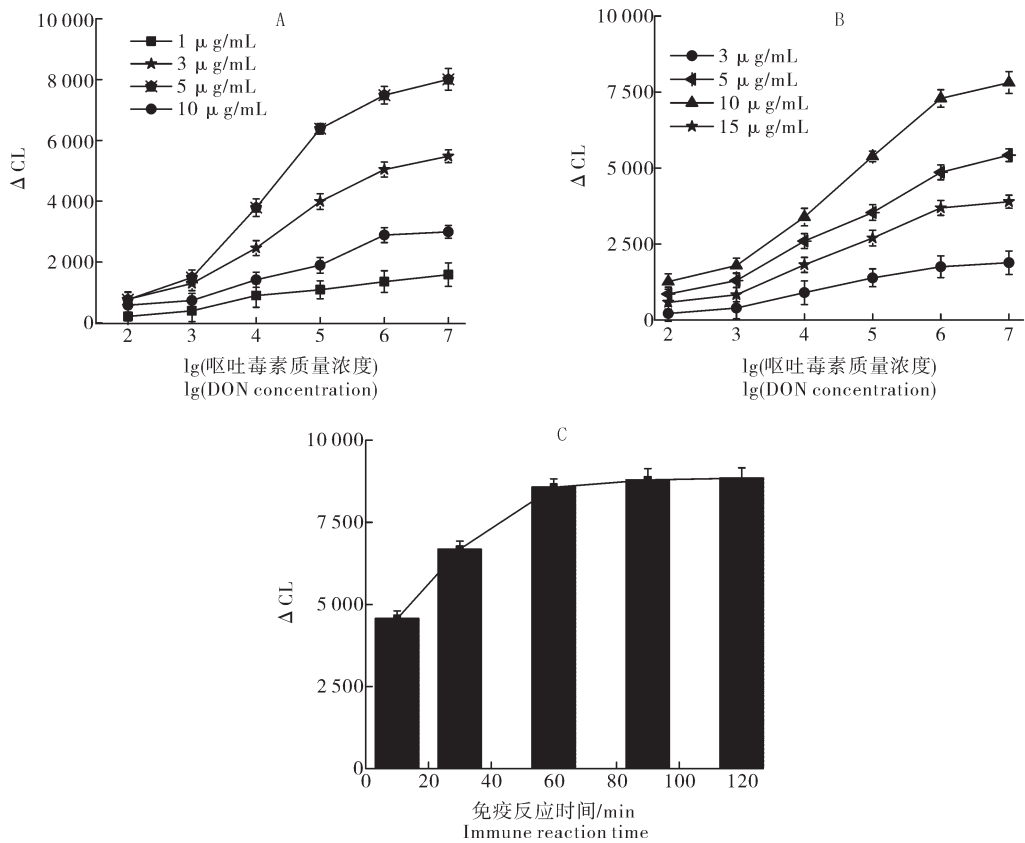
考虑到实际检测过程中谷物样品中真菌毒素的多样性,化学发光光纤免疫传感器对DON的特异性检测是十分必要的。因此,引入了几种常见的真菌毒素AFB1、OTA、ZEN进行特异性反应,所有真菌毒素质量浓度均为1 μg/mL。从图6A可以看出,化学发光光纤免疫传感器仅对DON有明显的化学发光信号响应值,而对于其他真菌毒素的信号响应可以忽略不计,这表明该传感器的信号ΔCL由特异性免疫反应产生,可特异性识别DON。误差棒表示3次测定的标准偏差。

为进一步证明ΔCL信号是由化学发光光纤免疫传感器对DON的特异性识别产生,并且确保复杂环境对特异性检测的干扰极小,抗干扰实验将常见的真菌毒素(AFB1、OTA、ZEN)以及谷蛋白和葡萄糖分别作为干扰物与DON溶液进行混合,如图6B所示,3种混合溶液AFB1和DON、OTA和DON、ZEN和DON与无干扰物的DON溶液的ΔCL值基本保持一致,且谷物基质成分也对检测的干扰影响极小,证明了化学发光光纤免疫传感器的抗干扰性较好。

## 2.5 化学发光光纤免疫传感器的灵敏度测试

在最优条件下,通过化学发光光纤免疫传感器对检测DON的灵敏度进行了分析。根据竞争免疫原理,DON浓度与ΔCL呈正相关。图7A中结果显示与预期保持一致,随着DON质量浓度从10 pg/mL增加到10 μg/mL,ΔCL明显增强,并且在0.1~1 200 ng/mL范围内线性响应关系良好。如图7B所示,线性方程为 $y=2697.72x-3641$ (其中 $x$ 表示样品中目标物浓度, $y$ 表示化学发光信号的差值), $R^2=0.997$ ,检出限为62.7 pg/mL,远低于国家标准GB 2761—2017中的要求(1 000 μg/kg),可满足DON在各种基质中的检测需要。化学发光光纤免疫传感器的高灵敏度可能与3个因素相关:(1)化学发光底物的高灵敏度,低背景值;(2)较合理的完全抗原固定浓度保证了充足的结合位点,降低了空间阻抗效应;(3)光纤载体具有优异的光传导性,实现微环境内免疫反应到化学发光信号的快速转化。

表1为化学发光免疫传感器法与其他文献中报道的DON快速检测方法的试验结果对比。由表1可



A:完全抗原(BSA-DON)浓度优化;B:呕吐毒素抗体(DON-Ab)浓度优化;C:免疫反应时间优化 .A:Optimized concentration of complete antigen (BSA-DON); B:Optimized concentration of DON-antibody (DON-Ab); C:Optimized immune response time.

图5 完全抗原、呕吐毒素抗体和免疫反应时间对化学发光强度的影响

Fig.5 Effects of complete antigen ,DON-antibody and immune response time on chemiluminescence intensity

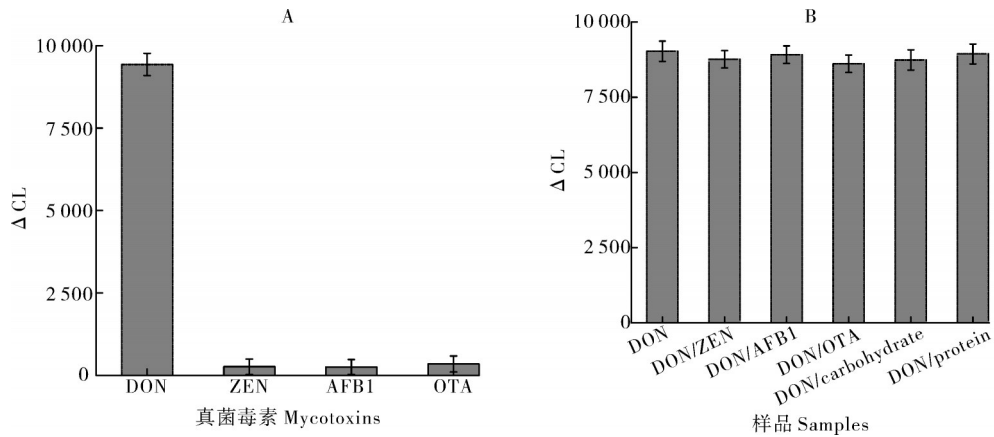


图6 化学发光光纤免疫传感器检测DON的特异性(A)和抗干扰性能(B)

Fig.6 Specificity analysis (A) and anti-interference performance analysis (B) of chemiluminescent fiber optic immunosensor for DON detection

见,与其他现场快速检测方法相比,化学发光免疫传感器法适用于DON的高灵敏检测。但与其他非现场快速检测方法相比,笔者所在实验室研制的化学发光免疫传感器平台具有体积更小、质量更轻等优势,并且独特的插拔式构造简化了检测流程,更有利

于非专业人员的现场快速检测。此外,化学发光免疫传感器由于设备简单,还极大降低了分析成本,整个分析平台成本仅为2 000元,单个样品的检测成本为3元,更有利于该传感器在现场快速检测领域的进一步应用。

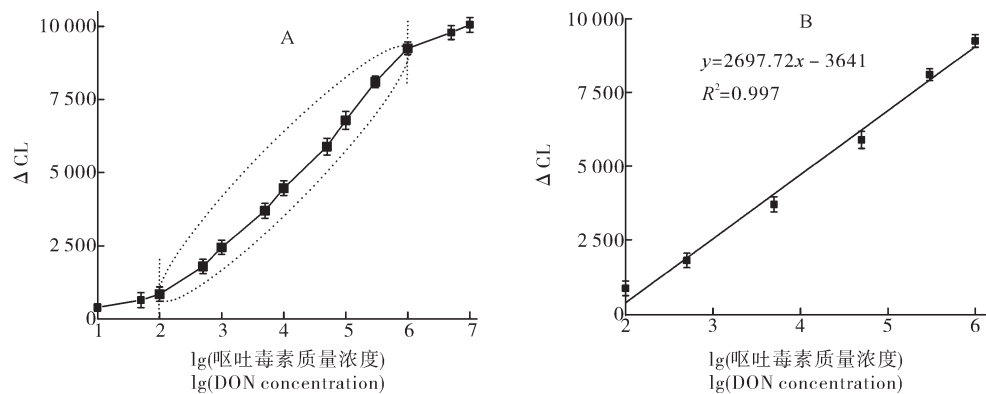


图 7 化学发光光纤免疫传感器检测 DON 的标准曲线(A)和线性范围(B)

Fig.7 Standard curve (A) and linear range (B) of chemiluminescent fiber optic immunosensor for DON detection

表 1 化学发光光纤免疫传感器与参考文献中呕吐毒素检测方法的对比

| 方法<br>Method                                                                                                    | 样品<br>Sample                          | 检出限/<br>(ng/mL)<br>LOD | 分析时间/h<br>Analysis<br>time | 现场检测<br>Field<br>operable | 参考文献<br>Reference |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------|
| 倏逝波光流体免疫传感器<br>Evanescent wave opto-fluidic immunosensor                                                        | 玉米、小麦和猪饲料<br>Corn, wheat and pig feed | 0.110                  | <2.0                       | 是<br>Yes                  | [19]              |
| 纸基微流控装置<br>Paper-based microfluidic device                                                                      | 食品和饲料<br>Food and feed                | 0.644                  | <2.0                       | 是<br>Yes                  | [20]              |
| 超高效液相色谱与三重四极杆质谱联用<br>Ultraperformance liquid chromatography coupled with<br>triple-quadrupole mass spectrometry | 食用动物组织<br>Food animal tissues         | 0.070                  | <2.0                       | 否<br>No                   | [21]              |
| 基于重组 Fab 片段的电化学免疫传感器<br>Recombinant fab-fragment based electrochemical im-<br>munosensor                        | 婴儿食品和麦片<br>Baby food and cereal       | 63.000                 | <2.5                       | 否<br>No                   | [22]              |
| 化学发光光纤免疫传感器<br>Chemiluminescent fiber optic immunosensors                                                       | 玉米、大米和小麦<br>Corn, rice and wheat      | 0.062 7                | <1.5                       | 是<br>Yes                  | 本研究<br>This study |

2.6 化学发光光纤免疫传感器与 ELISA 法的比对

ELISA 法是一种广泛应用于谷物中 DON 检测的商业化方法,因此,采用 ELISA 法与化学发光光纤免疫传感器进行方法比对。如图 8A 所示,ELISA 检测 DON 在目标物质量浓度 1~100 ng/mL 内呈线性关系,线性方程为  $y=0.4057x-1.17$  (其中  $x$  表示样品中目标物质量浓度, $y$  表示吸光度), $R^2=0.976$ ,检出限为 2.13 ng/mL。由图 8B 可见,相较于 ELISA 法,化学发光光纤免疫传感器的灵敏度提高了 30 倍,线性范围拓宽了 3 个数量级,同时由于光纤免疫传感器尺寸小的特点,更适合现场快速检测的需要。

2.7 谷物样品中呕吐毒素的检测及回收率测试

3 种谷物样品(小麦、玉米、大米)的加标回收结果和 RSD 测试结果见表 2。结果显示,不同加标浓度下同批次制备的化学发光光纤免疫传感器对谷物样品中 DON 检测的回收率均在 81.00%~107.33%,RSD 均低于 8.69%。表明该方法应用于谷物样品中

呕吐毒素的检测具有较好的稳定性和较强的抗干扰能力,几乎不受样品中复杂基质干扰。此外,我们将测试的结果与国家标准方法液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)测试结果进行对比验证,如表 2 所示,显示二者的检测结果具有较好的吻合性。但是化学发光光纤免疫传感器的成本远低于 HPLC-MS,且检测过程操作简单、检测设备集成便携,因此,其更适合应用于现场快速检测。

3 讨 论

本研究通过生物识别分子与光纤的固定化方法,采用共价结合策略实现了呕吐毒素完全抗原(DON-BSA)与光纤的稳定结合,研制了完全抗原功能化的光纤探针。以化学发光免疫分析为基础,使用固定完全抗原的光纤作为检测元件,以吖啶酯为化学发光底物,建立了一种 DON 现场快速检测的化学发光光纤免疫传感器,并通过一系列表征证明了

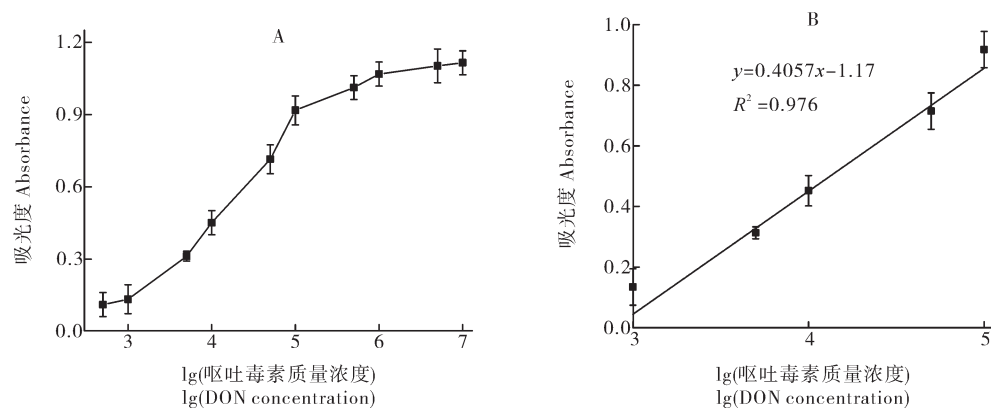


图 8 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 DON 的标准曲线(A)和线性范围(B)

Fig 8 Standard curve (A) and linear range (B) of enzyme-linked immunosorbent assay for DON detection

表 2 加标谷物中检测呕吐毒素的回收率  
Table 2 Recovery of DON in spiked grains

| 基质<br>Matrix | 加标质量浓度/<br>(ng/mL)<br>Spike<br>concentration | 化学发光光纤免疫传感器<br>Chemiluminescent fiber optic immunosensors |                                     |                     | 液相色谱-质谱联用<br>HPLC-MS                             |                                     |                     |
|--------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
|              |                                              | 检测质量浓度/<br>(ng/mL)<br>Detection<br>concentration          | 平均回收率/%<br>Average<br>recovery rate | 相对标准<br>偏差/%<br>RSD | 检测质量浓度/<br>(ng/mL)<br>Detection<br>concentration | 平均回收率/%<br>Average<br>recovery rate | 相对标准<br>偏差/%<br>RSD |
| 小麦<br>Wheat  | 0.1                                          | 0.081                                                     | 81.00                               | 7.33                | 0.083                                            | 83.00                               | 5.43                |
|              | 5.0                                          | 4.385                                                     | 87.70                               | 7.64                | 4.422                                            | 88.44                               | 6.29                |
|              | 50.0                                         | 44.120                                                    | 88.24                               | 7.05                | 46.570                                           | 93.14                               | 5.94                |
|              | 250.0                                        | 232.825                                                   | 93.13                               | 6.97                | 236.750                                          | 94.70                               | 6.71                |
|              | 1 000.0                                      | 1 020.220                                                 | 102.22                              | 7.69                | 1 024.700                                        | 102.47                              | 7.11                |
| 玉米<br>Corn   | 0.1                                          | 0.092                                                     | 92.00                               | 6.39                | 0.087                                            | 87.00                               | 7.16                |
|              | 5.0                                          | 4.823                                                     | 96.46                               | 6.27                | 4.743                                            | 94.86                               | 6.42                |
|              | 50.0                                         | 53.665                                                    | 107.33                              | 7.53                | 54.740                                           | 109.48                              | 6.37                |
|              | 250.0                                        | 255.400                                                   | 102.16                              | 7.72                | 237.100                                          | 94.84                               | 5.96                |
|              | 1 000.0                                      | 972.600                                                   | 97.26                               | 6.64                | 1 016.400                                        | 101.64                              | 7.33                |
| 大米<br>Rice   | 0.1                                          | 0.084                                                     | 84.00                               | 6.55                | 0.086                                            | 86.00                               | 6.26                |
|              | 5.0                                          | 4.108                                                     | 82.16                               | 8.69                | 4.331                                            | 86.62                               | 6.91                |
|              | 50.0                                         | 44.555                                                    | 89.11                               | 8.47                | 54.140                                           | 108.28                              | 8.01                |
|              | 250.0                                        | 260.300                                                   | 104.12                              | 6.65                | 263.250                                          | 105.30                              | 7.41                |
|              | 1 000.0                                      | 971.900                                                   | 97.19                               | 7.36                | 953.200                                          | 95.32                               | 6.77                |

固定方法的可行性,成功将其应用于谷物中 DON 的定量检测。与传统 ELISA 方法相比,该免疫传感器具有灵敏度高(62.7 pg/mL)、线性范围广(0.1~1 200 ng/mL)、检测效率高等优点,为基于酶的免疫传感分析策略提供了新的思路。

不同于常规免疫传感器,这种新型免疫传感器根据高灵敏和便携式两个特点将化学发光与光纤有效结合,集成化学发光和光纤传导等诸多优势,如:

(1)信号读出方法采用化学发光,其特点在于痕量水平的反应即可获得高灵敏的信号;(2)光纤内芯作为生物识别分子的固定化载体,具有优异的导光性能和抗干扰能力;此外,光纤小巧的尺寸和仪器接口紧密结合的优势也很适合便携式检测,以此为基础搭建了一台体积小、成本低、操作简单的化学发光光纤传感平台,较适合应用于现场即时检测。

目前本方法和检测设备还存在一些缺陷,如光

纤探针的商业化制备、设备无法同时对多根光纤探针同时进行检测等。在未来工作中,我们将在现有研究的基础上进一步创新,将这些新方法和新仪器朝向电器化、小型化、自动化的方向进一步发展,集生物学、物理学、化学于一体,推动现场快速检测技术在临床医学、食品安全、环境检测等方向的更多实用型研究。

## 参考文献 References

- [1] MOUSAVI K A, FAKHRI Y, SANT A S. Impact of unit operations during processing of cereal-based products on the levels of deoxynivalenol, total aflatoxin, ochratoxin a, and zearalenone: a systematic review and meta-analysis[J]. Food Chem, 2018, 268: 611-624.
- [2] TRAKSELYTE R K, JUODEIKIENE G, HAJNAL E J, et al. Challenges of *Lactobacillus* fermentation in combination with acoustic screening for deoxynivalenol and deoxynivalenol conjugates reduction in contaminated wheat-based products [J/OL]. Food control, 2022, 134: 108699 [2022-05-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108699>.
- [3] TANGNI E K, MOTTE J C, CALLEBAUT A, et al. Cross-reactivity of antibodies in some commercial deoxynivalenol test kits against some fusariotoxins[J]. J Agr Food Chem, 2010, 58(24): 12625-12633.
- [4] DYRE R B, PLATTNER R D, KENDRA D F, et al. *Fusarium graminearum* Tri14 is required for high virulence and DON production on wheat but not for DON synthesis *in vitro* [J]. J Agr Food Chem, 2005, 53(23): 9281-9287.
- [5] LIU Y, LU Y, WANG L, et al. Occurrence of deoxynivalenol in wheat, Hebei province, China[J]. Food Chem, 2016, 197: 1271-1274.
- [6] CAPRIOTTI A L, FOGLIA P, GUBBIOTTI R, et al. Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins subjected to commission regulation in cereals[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(39): 6044-6051.
- [7] OLCER Z, ESEN E, MUHAMMAD T, et al. Fast and sensitive detection of mycotoxins in wheat using microfluidics based real-time electrochemical profiling[J]. Biosens bioelectron, 2014, 62: 163-169.
- [8] OLDENBURG E, ELLNER F. *Fusarium* mycotoxins in forage maize-detection and evaluation[J]. Mycotoxin Res, 2005, 21(2): 105-107.
- [9] BERTHILLER F, SCHUHMACHER R, BUTTINGER G, et al. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2005, 1062(2): 209-216.
- [10] XU Y, YANG H, HUANG Z, et al. A peptide/maltose-binding protein fusion protein used to replace the traditional antigen for immunological detection of deoxynivalenol in food and feed [J]. Food Chem, 2018, 268: 242-248.
- [11] WU L, LI G, XU X, et al. Application of nano-elisa in food analysis: recent advances and challenges [J]. Trac-Trend Anal Chem, 2019, 113: 140-156.
- [12] ARDUINI F, CINTI S, SCOGNAMIGLIO V, et al. Nanomaterials in electrochemical biosensors for pesticide detection: advances and challenges in food analysis [J]. Microchim acta, 2016, 183(7): 2063-2083.
- [13] MIGNANI A G, CIACCHERI L, MENCAGLIA A A, et al. Rapid screening of wheat bran contaminated by deoxynivalenol mycotoxin using Raman spectroscopy: a preliminary experiment [J/OL]. J Opt Micro, 2016, 13: 2235910 [2022-05-03]. <https://doi.org/10.1117/12.2235910>.
- [14] KUCHMENKO T A, LVOVA L B. A perspective on recent advances in piezoelectric chemical sensors for environmental monitoring and foodstuffs analysis [J/OL]. Chemosensors, 2019, 7(3): 39 [2022-05-03]. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7030039>.
- [15] ZU P, CHAN C C, KOH G W, et al. Enhancement of the sensitivity of magneto-optical fiber sensor by magnifying the birefringence of magnetic fluid film with loyt-sagnac interferometer [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2014, 191: 19-23.
- [16] ZONG C, JIANG F, WANG X Y, et al. Imaging sensor array coupled with dual-signal amplification strategy for ultrasensitive chemiluminescence immunoassay of multiple mycotoxins [J/OL]. Biosens bioelectron, 2021, 177(1): 112998 [2022-05-03]. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.112998>.
- [17] BOSCH M E, SÁNCHEZ A J R, ROJAS F S, et al. Recent development in optical fiber biosensors [J]. Sensors, 2007, 7: 797-859.
- [18] NETO V F, SANTOS J A, ALBERTO N J, et al. Evaluation of diamond coatings on optical fibre sensors for biological use [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2011, 11(6): 5408-5412.
- [19] LIU Y, CHEN Y, XU W, et al. Rapid, sensitive on-site detection of deoxynivalenol in cereals using portable and reusable evanescent wave optofluidic immunosensor [J/OL]. Int J Env Res Pub He, 2022, 19(7): 3759 [2022-05-03]. <https://doi.org/10.3390/ijerph19073759>.
- [20] JIANG Q, WU J, YAO K, et al. Paper-based microfluidic device (DON-chip) for rapid and low-cost deoxynivalenol quantification in food, feed, and feed ingredients [J]. ACS sensors, 2019, 4(11): 3072-3079.
- [21] YANG S, WANG Y, BEIER R C, et al. Simultaneous determination of type a and b trichothecenes and their main metabolites in food animal tissues by ultraperformance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry [J]. J Agri Food Chem, 2015, 63(38): 8592-8600.
- [22] ROMANAZZO D, RICCI F, VOLPE G, et al. Development of a recombinant fab-fragment based electrochemical immunosensor for deoxynivalenol detection in food samples [J]. Biosens bioelectron, 2010, 25(12): 2615-2621.

## Development of a chemiluminescent optical fiber immunosensor and its application in rapid detection of deoxynivalenol in grains

HUANG Wei, HE Huiyu, LU Peng, CHEN Yiping

*College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/ Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China*

**Abstract** Deoxynivalenol (DON), as a trichothecenes metabolite produced by *Fusarium*, widely exists in grains including wheat, rice and corn, which seriously threatens human health. Therefore, based on the theoretical guidance of biochemistry, immunology and materials science, we constructed a chemiluminescent fiber optic immunosensor for the on-site rapid detection of DON in grains by using a combination of biosensing recognition and chemiluminescence technology. At the same time, a portable sensing platform for detecting the chemiluminescence signal was integrated into a black light-proof cassette of 32 cm×15 cm×25 cm, and the weight was less than 3 kg. The results showed that Fourier transform infrared, energy dispersive spectrometry and atomic force microscopy confirmed the successful preparation of fully antigenicized fiber probes. In addition, the constructed chemiluminescence optical fiber immunosensor had a good linear relationship between 0.1-1 200 ng/mL, with the detection limit of 62.7 pg/mL. The functionalized optical fiber probe can be stably stored for 30 days and has good specificity and anti-interference. The recovery rate of DON applied to grain samples was 81.00%-107.33%, and the relative standard deviation was less than 8.69%. Compared with ELISA, the sensitivity of this method was increased by 30 times, and the linear range was broadened by 3 orders of magnitude, indicating that it is suitable for the on-site rapid detection of DON in grain samples.

**Keywords** deoxynivalenol (DON); optical fiber immunosensor; chemiluminescence; immunoassay; on-site rapid detection; food security

(责任编辑:赵琳琳)