

分类号: S377
密 级:

单位代码: 10433
学 号: 17503060214

山东理工大学

农业硕士学位论文

基于免疫分析的黄曲霉毒素 M1 和呕吐毒素
高灵敏快速检测方法研究

Research of highly sensitive and rapid detection method
of aflatoxin M1 and deoxynivalenol based on immunoassay

研 究 生: 安兴爽

指 导 教 师: 孙 霞 教授

协 助 指 导 教 师: 郭业民 教授

协 助 指 导 教 师: 杨青青 讲师

学 位 类 别: 农业硕士

专 业 领 域: 农业机械化

论 文 完 成 日 期: 2020 年 4 月 7 日

独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得山东理工大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名: 安兴爽

时间: 2020年6月7日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解山东理工大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅；学校可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名: 安兴爽

时间: 2020年6月7日

导师签名: 孙书

时间: 2020年6月8日

《学位论文出版授权书》

本人完全同意《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》(以下简称“章程”),愿意将本人的学位论文提交“中国学术期刊(光盘版)电子杂志社”在《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》中全文发表。《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》可以以电子、网络及其它数字媒体形式公开出版,并同意编入《中国知识资源总库》,在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播,同意按“章程”规定享受相关权益。

作者签名: 安兴爽

导师签名: 孙书

2020年6月7日

2020年6月8日

研究生学号	10433-17503060214	所在院系	农业工程与食品科学学院
-------	-------------------	------	-------------

摘要

真菌毒素是农产品在生产、存储、运输及加工过程中由产毒真菌产生的次级代谢产物。黄曲霉毒素 M1 (Aflatoxin M1, AFM1)、呕吐毒素 (Deoxynivalenol, DON) 是两种常见的真菌毒素。AFM1 主要存在于牛奶及乳制品中, DON 主要存在于粮食、饲料和食品中。人类和动物误服真菌毒素超标的农产品后容易导致脏器损伤、生殖异常、免疫抑制、器官癌变等。因此, 建立快速、便捷、高灵敏度、特异性高的农产品中真菌毒素检测方法对于政府监管和保障消费安全具有重大意义。本论文建立了两种基于免疫分析的快速检测方法, 主要研究内容如下:

(1) 基于氧化石墨烯-壳聚糖 (graphene oxide-chitosan, GO-CS) /二氧化铈-壳聚糖 (cerium dioxide-chitosan, CeO₂-CS) 纳米复合材料修饰的 AFM1 电化学免疫传感器的制备及应用。首先, 将制备的 GO-CS 和 CeO₂-CS 逐层修饰在丝网印刷电极 (Screen printed electrodes, SPEs) 表面, 以放大其电化学信号。利用氧化石墨烯 (GO) 和二氧化铈 (CeO₂) 良好的生物化学特性, 将 AFM1 单克隆抗体更好的固定在 SPEs 上。AFM1 免疫传感器的性能通过差分脉冲伏安法 (Differential pulse voltammetry, DPV) 和循环伏安法 (Cyclic voltammetry, CV) 进行了研究。在最佳条件下, 在 0.01~1 ng/mL 之间呈现了良好的线性关系, 检测限为 0.009 ng/mL。该方法特异性好, 灵敏度高, 利用该免疫传感器对牛奶样品进行了检测, 加标回收率在 96.15%~104.25% 之间。

(2) 基于二抗标记法的 DON 时间分辨荧光免疫层析检测技术研究。将 DON 作为目标分析物, 将聚苯乙烯荧光微球作为标记材料, 与羊抗鼠 IgG 进行偶联制备了基于二抗标记的荧光探针, 优化了 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 用量、羊抗鼠 IgG 标记量、免疫试剂喷涂量、DON 单克隆抗体用量等参数, 开发了基于二抗标记法的 DON 时间分辨荧光免疫层析检测方法。由于单分子的 DON 单克隆抗体可以结合多个荧光探针, 所以基于二抗标记法的检测方法可以放大单位抗体上的荧光信号强度, 提高了检测灵敏度。在甲醇溶液、玉米基质、饲料基质中, 该方法对 DON 的检测灵敏度分别为 0.121、0.206、0.216 ng/mL。对空白玉米、饲料基质进行加标实验, 在玉米基质中的回收率在 88.07%~121.22% 之间, 相对标准偏差低于 10.49%; 在饲料基质中的回收率在 94.8%~107.49% 之间, 相对标准偏差低于 8.74%。将该检测方法与高效液相色谱串联质谱法 (Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 进行了对比, 回收率在 80.24%~117.4% 之间。该方法检测灵敏度高、精确度和准确度良好、特异性好, 节省了单克隆抗体用量, 可以在短时间内实现对 DON 的检测。

关键词: 黄曲霉毒素 M1; 呕吐毒素; 电化学免疫传感器; 时间分辨荧光免疫层析技术; 快速检测方法

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites that are produced by toxin-producing fungi during production, storage, transportation, and processing of agriculture products. Aflatoxin M1 (AFM1), deoxynivalenol (DON) are two common mycotoxins, which AFM1 is mainly found in milk and dairy products, and DON is mainly found in grain, feed and food. Humans and animals may easily cause organ damage, reproductive abnormalities, immunosuppression, and canceration after ingesting agricultural products with excessive mycotoxins. Therefore, it is of great significance to establish a rapid, convenient, sensitive and specific method to detect mycotoxins in agricultural products for the government supervision and protection of consumer safety. This paper established two rapid detection methods based on immunoassay, the main research contents are as follows::

(1) Preparation and application of AFM1 electrochemical immunosensor based on graphene oxide-chitosan (GO-CS)/cerium dioxide-chitosan (CeO₂-CS) nanocomposite. First, the prepared GO-CS and CeO₂-CS were modified layer-by-layer on the surfaces of screen-printed electrodes (SPEs) to amplify their electrochemical signals. The good biochemical properties of graphene oxide (GO) and cerium dioxide (CeO₂) could be used for immobilizing AFM1 monoclonal antibodies on SPEs greatly. The performance of AFM1 immunosensor was studied by differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV). Under optimal conditions, with a good linear relationship of 0.01~1 ng/mL, and detection limit of 0.009 ng/mL. This method had good specificity and high sensitivity. The immunosensor had been used to detect milk samples with spike recovery rate of 96.15%~104.25%.

(2) Study on time-resolved fluorescence immunochromatographic detection of DON based on IgG labeling. DON used as the target analyte, and polystyrene fluorescent microspheres used as the labeling material, a secondary antibody-labeled fluorescent probe prepared by coupling with goat anti-mouse IgG, with the amount of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and the amount of goat anti-mouse IgG labeled, spraying amount of immune reagent, the amount of DON monoclonal antibody and other parameters optimized, a resolution fluorescence immunochromatographic detection method had been developed. Because a single-molecule DON monoclonal antibody could bind multiple fluorescent probes, a detection method based on a secondary antibody labeling method could amplify the intensity of the fluorescent signal on a unit antibody and improve detection sensitivity. In methanol solution, corn matrix and feed matrix, the detection

sensitivity of this method to DON was 0.121, 0.206 and 0.216 ng/mL respectively. The blank corn and feed matrix were spiked. The recovery rate in corn matrix was 88.07%~121.22% with the relative standard deviation lower than 10.49%. The recovery rate in feed matrix was 94.8%~107.49% with the relative standard deviation below 8.74%. The detection method was compared with Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), with the recovery rate of 80.24%~117.4%. The method had high detection sensitivity, good precision and accuracy, good specificity, saved the amount of monoclonal antibody, and could realize the detection of DON in a short time.

Key words: Aflatoxin M1; Deoxynivalenol; Electrochemical immunosensor; Time-resolved fluorescence immunochromatography; Rapid detection method

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
目录.....	IV
第一章 绪论.....	1
1.1 真菌毒素种类及其危害.....	1
1.1.1 黄曲霉毒素 M1.....	1
1.1.2 呕吐毒素.....	2
1.2 真菌毒素检测技术研究现状.....	3
1.2.1 生物鉴定法.....	3
1.2.2 化学分析方法.....	3
1.2.3 仪器分析方法.....	3
1.2.4 免疫分析方法.....	4
1.3 本研究的目的是和意义.....	9
1.4 本课题的研究内容.....	9
第二章 基于纳米复合材料的黄曲霉毒素 M1 电化学免疫传感器的制备与应用.....	11
2.1 引言.....	11
2.2 材料与方法.....	12
2.2.1 试剂和仪器.....	12
2.2.2 氧化石墨烯-壳聚糖和二氧化铈-壳聚糖的制备.....	13
2.2.3 丝网印刷电极的预处理.....	13
2.2.4 电化学免疫传感器的制备.....	13
2.2.5 免疫传感器的电化学测量.....	14
2.2.6 免疫传感器的特异性分析.....	14
2.2.7 实际样品的前处理.....	14
2.3 结果与讨论.....	15
2.3.1 纳米材料的表征.....	15
2.3.2 免疫传感器组装过程的电化学表征.....	16
2.3.3 电化学免疫传感器的条件优化.....	17
2.3.4 电化学免疫传感器的性能分析.....	18
2.3.5 电化学免疫传感器的特异性和稳定性.....	19
2.3.6 实际样品的检测.....	21
2.4 本章小结.....	21
第三章 基于二抗标记法的呕吐毒素时间分辨荧光免疫层析检测技术研究.....	22
3.1 引言.....	22
3.2 材料.....	22
3.2.1 试剂和仪器.....	22
3.2.2 主要溶液的配方.....	24

3.3 实验方法	25
3.3.1 抗体与聚苯乙烯荧光微球的偶联	25
3.3.2 免疫层析试纸条的构建	27
3.3.3 反应时间的优化	28
3.3.4 基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术的原理	28
3.3.5 基于二抗标记法的呕吐毒素检测曲线建立	29
3.3.6 样品前处理方法的确定	30
3.3.7 基于二抗标记法的呕吐毒素免疫层析试纸条评价	30
3.4 结果与讨论	30
3.4.1 抗体与聚苯乙烯荧光微球的偶联	30
3.4.2 基于二抗标记法的免疫层析反应条件优化	32
3.4.3 基于二抗标记法的呕吐毒素检测曲线建立	34
3.4.4 基于二抗标记法的呕吐毒素免疫层析试纸条评价	35
3.5 本章小结	37
第四章 结论与展望	39
4.1 结论	39
4.2 展望	40
参考文献	41
在读期间成果	46
致谢	48

第一章 绪论

1.1 真菌毒素种类及其危害

真菌毒素 (Mycotoxins) 广泛存在于各种植物源性食品中, 是一种由曲霉属 (*Aspergillus*)、镰刀菌属 (*Fusarium*) 等真菌 (Fungi) 代谢产生的有害物质^[1]。真菌毒素污染的农产品包括粮食、动物饲料、蔬菜、水果、坚果等^[2]。真菌毒素每年导致的粮油损失约有 3100 万吨, 直接经济损失高达 680~850 亿元^[3], 真菌毒素超标的粮油产品被人类和动物误食后, 会在体内不断聚积, 进而引发癌变, 严重危害了人、畜健康。真菌毒素已经成为危害粮油产品安全的世界性难题, 引发了世界各国的广泛关注。鉴于真菌毒素的巨大危害性和普遍性, 世界卫生组织和联合国粮农组织将真菌毒素列为引发食源性疾病的罪魁祸首。目前已经鉴别的真菌毒素有三百多种, 黄曲霉毒素 M1 和呕吐毒素作为两种常见的真菌毒素引起了广泛关注。

1.1.1 黄曲霉毒素 M1

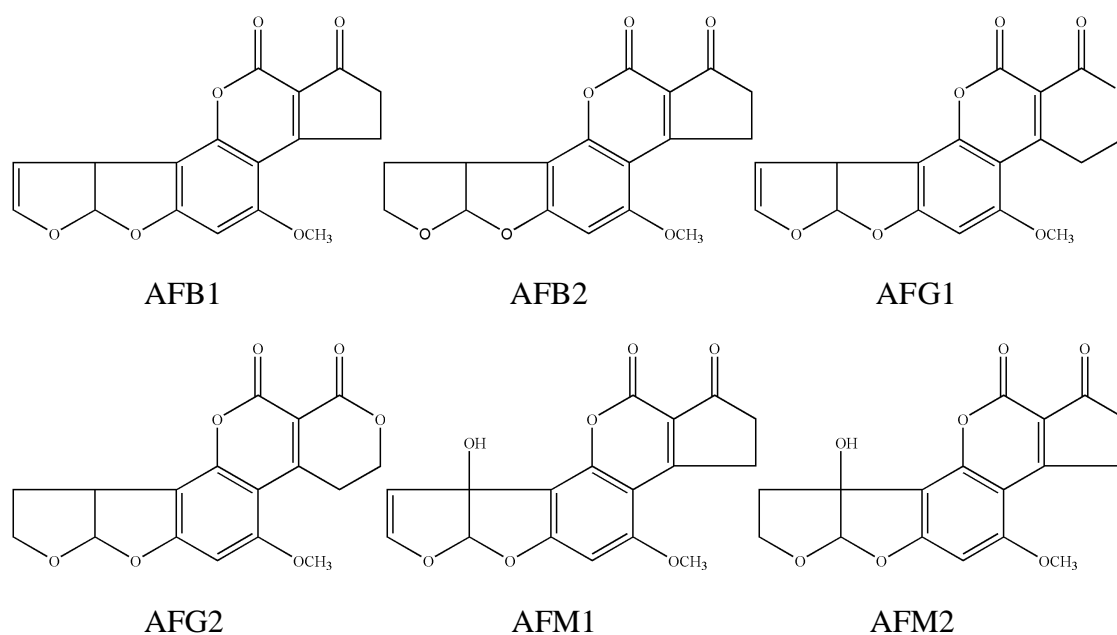


图 1.1 常见的黄曲霉毒素化学结构式

Fig. 1.1 Chemical structure of common aflatoxins

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFTs) 是一种由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉

(*Aspergillus parasiticus*) 产生的具有高致癌性的次级代谢产物, 自十九世纪六十年代以来受到了广泛关注, 是农产品领域中的主要真菌毒素^[4,5]。现在, 已经验证了 20 多种黄曲霉毒素 (包括 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 和 AFM2 等)^[6,7], 它们的化学结构如图 1.1 所示。AFM1 是 AFB1 的羟基化代谢产物, 泌乳动物 (如奶牛) 在摄入被 AFB1 污染的食物或饲料后的 12~24 h 内, 可以在尿液和乳汁中检测到 AFM1。牛奶中 AFM1 的含量会随着饲料中 AFB1 含量的增加而显著增加^[8,9]。其他乳制品也可能被 AFM1 污染, 尤其是奶酪中, 其浓度甚至高于牛奶中的含量^[10], 而且 AFM1 具有较强的热稳定性, 巴斯德消毒法不能破坏其化学结构。AFM1 可以抑制 DNA, RNA, 肝脏内蛋白质的合成, 从而损伤组织器官, 抑制免疫功能^[11-13], 是人类发生胃癌、肝癌和肾癌的一大元凶^[14], 被国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 归为 I 类致癌物^[15]。世界各国均规定了牛奶和乳制品中的 AFM1 法定限量标准^[16], 在中国和美国, 牛奶中 AFM1 的最大允许含量为 0.5 ng/mL; 根据欧洲标准, 成人乳制品中 AFM1 的最大允许含量为 0.05 ng/mL, 婴儿乳制品限定标准为 0.025 ng/mL^[17]。

1.1.2 呕吐毒素

呕吐毒素又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON), 是一种主要由禾谷镰刀菌和粉红镰刀菌等镰刀菌类产生的单端孢霉烯族毒素^[18], 主要存在于玉米、小麦、大麦等粮食作物中^[19]。人和动物食用了 DON 含量超标的谷物后, 会引起恶心、腹泻、呕吐、头痛、发烧等症状, “呕吐毒素”因此得名。DON 具有明显的细胞毒性, 通过抑制 DNA 和蛋白质的合成对免疫系统形成干扰。鉴于 DON 的高危害性和普遍存在性, 世界各国制定了相应的限量标准, 我国规定在谷物及其制品中的 DON 含量不能超过 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 欧美国家也对谷物和加工产品中的 DON 含量制定了相应的标准。DON 的化学结构如图 1.2 所示。

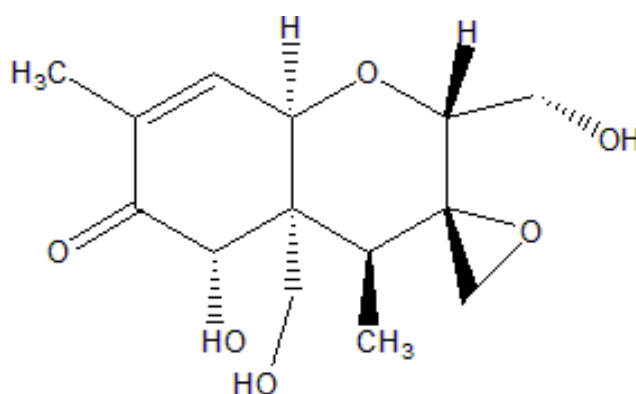


图 1.2 呕吐毒素化学结构式

Fig. 1.2 DON chemical structural formula

1.2 真菌毒素检测技术研究现状

目前针对真菌毒素的检测方法有很多种, 主要包括生物鉴定法、化学分析方法、仪器分析方法、免疫分析方法^[20]等, 化学比色法和表面增强拉曼光谱技术 (SERS) 也会在真菌毒素的检测中用到。

1.2.1 生物鉴定法

生物鉴定法是一种传统的真菌毒素检测方法^[21], 可以通过对微生物、水生生物、家禽等生物体的细胞代谢过程进行鉴定来判断真菌毒素的存在, 根据生物体的异常、病变、死亡分析真菌毒素的危害。目前共有十种生物鉴定法^[22], 此类方法对样品的纯度要求不高, 检测灵敏度低, 难以进行具体含量的分析, 一般用于真菌毒素的定性分析。生物鉴定法一般用作其他检测方法的佐证方法。

1.2.2 化学分析方法

化学分析方法是最早应用于真菌毒素检测的方法, 其中最常见的是薄层分析法(Thin Layer Chromatography, TLC), 早在 20 世纪就被许多国家广泛使用。TLC 可以用于真菌毒素的定性或半定量检测, TLC 主要有以下几个操作步骤^[23]: (1) 提取样品中的真菌毒素; (2) 浓缩提纯; (3) 对真菌毒素进行净化薄层分离; (4) 紫外照射呈现荧光特性^[24]; (5) 分析荧光确定真菌毒素含量^[25]。TLC 的优点在于检测仪器简单, 价格低廉, 可以用于大批量样品的筛选^[26]; 缺点是操作步骤复杂, 样品的前处理过程琐碎, 操作过程容易出现不确定性因素, 检测特异性差, 而且需要专门的工作人员在真菌毒素环境中进行操作, 对于检测人员的身体健康不利。TLC 的出现在上世纪真菌毒素的检测中具有重要意义, 随着时代的发展经济水平的提高, 人民对于食品质量安全的要求越来越高。TLC 检测步骤复杂、检测灵敏度较低, 难以满足人们的实际检测要求, 正在逐渐地被其他检测方法所取代。

1.2.3 仪器分析方法

仪器分析方法是一种常用的对真菌毒素实现定性、定量检测的方法。主要的仪器分析方法分为经典仪器分析方法和新型仪器分析方法。

经典的仪器分析方法有高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC)^[26]、高效液相色谱串联质谱法 (Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[27]、超高效液相色谱法 (Ultra performance liquid chromatography, UPLC)、气相色谱与质谱联用法 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[28]、高效液相毛细管电泳法 (High performance liquid capillary electrophoresis, HPCE)^[29]等。HPLC 是目前最常用的真菌毒素确证性检测方法^[30], 该方法具有检测灵敏度高、结果可靠、特异

性好的特点,在国内外被广泛应用在 AFTs, DON 等真菌毒素的检测中,但是 HPLC 存在只能检测某种分子结构和某一类型真菌毒素的缺陷;为了解决这一问题,LC-MS/MS 应运而生,其相比 HPLC 具有高效率、快速、更高的检测灵敏度、可以同时检测多种真菌毒素的特点,目前已经被广泛的应用到多种真菌毒素的同步检测中去。但是传统的仪器分析方法大多具有仪器价格高、前处理工序复杂、需要专门的操作人员的缺陷,难以实现现场快速筛查的需求。

新型的仪器分析方法主要指的是高光谱成像检测技术 (Hyperspectral imaging detection technology)^[31]、红外线光谱检测技术以及电子鼻检测技术^[32]。高光谱成像技术利用真菌毒素在纳米范围内可以光谱成像的特点进行检测,此项技术需要专门的工作人员,操作要求高,在实际的检测中很少应用。红外线光谱检测技术是通过真菌毒素受到红外线照射产生生理特性改变的原理进行检测,具有快速准确的优势,在检测工作中受到欢迎。电子鼻技术是识别农产品受到真菌毒素污染时发出刺鼻气味进行检测,电子鼻的气体传感器与电子系统结合,可以在识别气味后发出警报,电子鼻技术只能识别出农产品是否被农产品污染,但不能检测出具体含量,而且此项技术对传感器要求高,如果样品中真菌毒素含量少,电子鼻可能存在难以检测的情况,在实际的检测工作中应用较少。

1.2.4 免疫分析方法

免疫分析方法起源于 20 世纪 50 年代,是一种基于抗原、抗体间的特异性反应,对化合物、酶、蛋白质等进行定性、定量分析检测的方法。免疫分析方法以抗体作为核心识别元件,可以与相应的目标物进行特异性结合。真菌毒素是小分子物质,不具备免疫原性,不能直接刺激动物体产生抗体,所以需要先将真菌毒素与载体蛋白进行偶联,形成具有免疫原性的抗原,再对动物体进行免疫,从而获得特异性抗体。免疫分析方法具有灵敏度高、特异性强、操作简单等优点,在真菌毒素的检测中得到了广泛的应用。

目前在真菌毒素的检测中常用的免疫分析方法有:酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[33]、免疫传感器方法 (Immunosensor method)^[34]、胶体金免疫层析技术 (Colloidal gold immunochromatography, CG-ICA)^[35]、量子点荧光免疫层析技术 (Quantum dot fluorescence immunochromatography, QDF-ICA)^[36]、时间分辨荧光免疫层析技术 (Time-resolved fluorescence immunochromatography, TRFIA)^[37]、免疫芯片技术 (Immuno chip)^[38]等。

1.2.4.1 酶联免疫吸附法

ELISA 在 20 世纪 70 年代首次被应用于真菌毒素的检测之中,是一种将抗原、抗体间的特异性反应和酶的高效催化作用相结合的检测方法。ELISA 根据反应模式的不同可

以分为夹心 ELISA 和竞争 ELISA，夹心 ELISA 主要应用于大分子化合物的检测中，竞争 ELISA 主要应用于小分子化合物的检测中，真菌毒素的检测最常用到的是竞争 ELISA 方法。竞争 ELISA 的原理是样品中游离的目标物分子和固相化的抗原竞争性与抗体结合，样品中的目标物分子含量越高，与固相结合的抗体愈少，随之结合的酶标二抗也就愈少，在最后的显色反应的颜色就越浅。Guan^[39]等人建立了乳制品中 AFB1 的超灵敏间接竞争 ELISA，在牛奶中的检测灵敏度为 3 ng/L，加标回收率在 91%~110% 之间。Yan^[40]等人建立了针对 DON 的 ELISA 方法，最低检测限为 0.20 ng/mL，检测范围在 0.90~83.07 ng/mL 之间。ELISA 检测方法具有操作简单、灵敏度高、特异性强的特点，在农产品中真菌毒素的检测中已经得到了广泛应用。

1.2.4.2 免疫传感器法

免疫传感器是生物传感器的一种，主要由免疫识别元件与信号转换元件组成。在适当的条件下，免疫识别元件与检测目标物发生特异性反应，反应产物会对转换器产生化学或物理影响，然后转换器将化学或物理信号转换为电信号输出，根据电信号的变化达到定性、定量检测的目的。真菌毒素检测的免疫传感器方法中最常见的是电化学免疫传感器（Electrochemical immunosensor）。

电化学免疫传感器的原理是基于抗原、抗体的特异性反应，将抗原或抗体作为识别元件和电化学传感元件连接，通过传感元件将化学信号转变为电信号（电流、电压、电阻等）^[41]。电化学免疫传感器具有诸多优点：（1）检测时间短；（2）检测成本低；（3）检测特异性高；（4）简单易携带，不需要大型的分析仪器；（5）应用价值大。因此被广泛应用在食品检测、医疗卫生、环境保护等各个领域^[42]。Srivastava^[43]研制了基于镍纳米颗粒修饰的还原氧化石墨烯（rGO-NiNPs）的电化学免疫传感器，用于 AFB1 的检测，rGO-NiNPs 通过电沉积在涂有氧化铟锡（ITO）的玻璃电极，该免疫传感器在磷酸盐缓冲溶液中对 AFB1 的检测灵敏度达 0.16 ng/mL。Costa^[44]等研制了一种基于碳纳米管（CNT）的无标记电化学免疫传感器用于 AFB1 的检测，检测灵敏度达到了 0.79 pg/g，检测线性范围在 0.1~20 pg/g 之间，该方法的检测灵敏度远远高于 ELISA 方法。Regiart^[45]等建立了一种准确、灵敏的针对牛尿样品中麦角酚（ZER）测定方法，在丝网印刷电极电合成双金属 Au-Pt 纳米粒子（Au-PtNPs），使用特定的 ZER 抗体将获得的 Au-PtNPs 平台进行免疫功能化，计算的检出限为 0.01 ng/mL，检测线性范围为 0.03~30 ng/mL。Kaushik^[46]等建立了一种 BSA/r-IgGs/nanoCeO₂/ITO 的免疫传感器用于对赫曲霉毒素（ochratoxin A, OTA）的检测，检测线性范围在 0.5~6 ng/dL 之间，最低检测限为 0.25 ng/dL。

1.2.4.3 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术是一种以胶体金为标记物建立的免疫层析检测技术^[47]，将胶体金标记技术、免疫分析技术、层析技术相结合^[48]，利用抗原和目标物竞争性与特异性抗体结合的原理进行定性、定量检测的方法。目前，CG-ICA 的研究应用已经比较成熟，具有快速、简单、方便实用、安全可靠、稳定等特点，被广泛应用于真菌毒素的快速检测中。张道宏^[22]建立了 AFB₁ 的高特异性免疫层析检测方法，检测限达到 1 ng/mL，该方法具有高特异性、准确度和精密度，与 HPLC 检测的符合率达到了 98.39%，该方法的技术原理和判定结果示意图如图 1.3 所示。Yan^[40]等建立了针对 DON 的胶体金免疫层析技术，最低检测限达到了 12.5 ng/mL。唐晓倩^[49]等研制了玉米赤霉烯酮（Zearalenone, ZEN）免疫层析试纸条，采用物理吸附法将 ZEN 单克隆抗体 2D3 与胶体金颗粒偶联形成探针，肉眼检测限为 0.5 ng/mL，加标回收率达到 90%~95%，在应用到实际样品的检测中，该方法与 HPLC 相比没有显著差距。

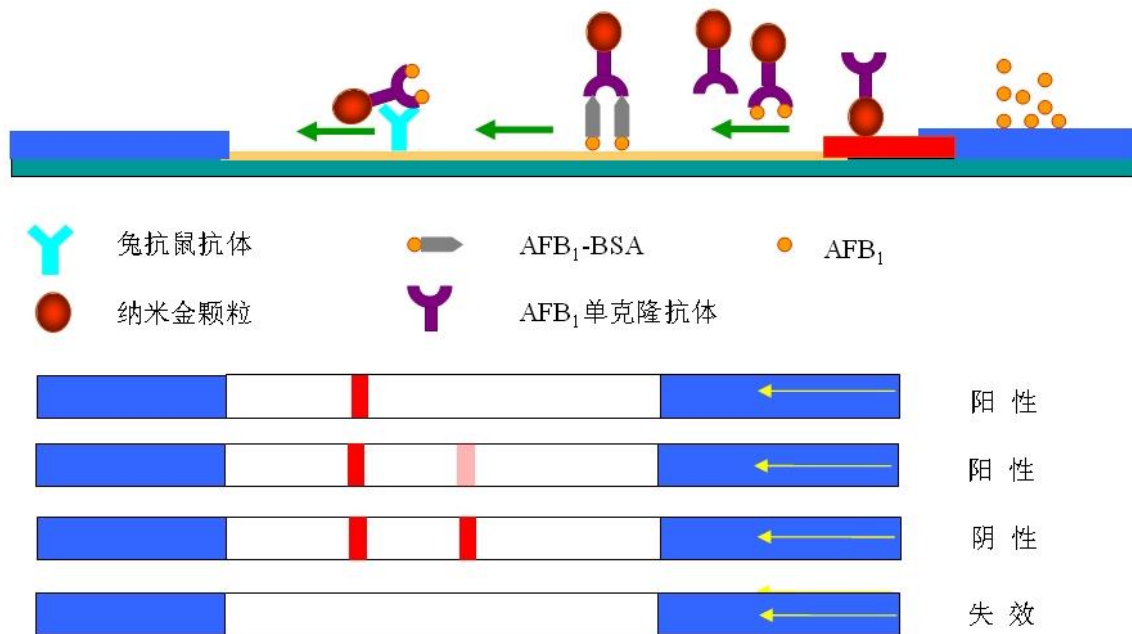


图 1.3 胶体金免疫层析技术原理及判定结果示意图^[22]

Fig. 1.3 Principle of colloidal gold immunochromatography and schematic diagram of the determination results^[22]

1.2.4.4 量子点荧光免疫层析技术

量子点荧光免疫层析技术是一种以量子点荧光材料为标记物的快速检测方法。量子

量子点是近年来发展较快的一种新型纳米荧光材料^[50]，相较于传统有机染料，量子点具有激发光谱宽、发射光谱窄、荧光寿命长等优点^[51]，作为荧光标记材料具有广阔的发展前景。量子点直径在 1~10 nm 之间，经过修饰后可以与核酸、抗体等特异性连接，生物相容性良好。而且当量子点受到单一光源激发时，不同的量子点可以发出不同的荧光，因此量子点在多组分检测领域的应用前景广阔。

Suiyan Ouyang^[52]等构建了一种基于量子点荧光材料的免疫层析检测技术用于黄曲霉总量的检测，反应原理如图 1.4 所示，该方法对大米的检测限为 1.4 pg/mL，检测线性范围在 2~250 pg/mL 之间，对花生的检测限为 2.8 pg/mL，线性范围在 2~125 pg/mL 之间。杨旸^[53]等利用量子点免疫层析技术建立了 OTA 的检测方法，该方法检测下限为 0.04 ng/mL，检测区间为 0.05~0.59 ng/mL，该方法特异性、准确性良好。任美玲^[50]建立了针对 AFB1 的量子点免疫层析检测技术，得到了直径为 247±13 nm 的量子点微球，IC50 为 13.87±1.54 pg/mL，检测线性范围为 5~60 pg/mL。欧阳岁燕^[1]构建了同步检测 AFB1、ZEN、伏马毒素 B1 (Fumonisin B1, FB1) 的量子点免疫层析技术，在甲醇溶液、玉米基质、花生基质中对 AFB1 的检测限分别为 2.4、2.5、4.5 ng/kg，对 ZEN 的检测限分别为 20.4、28.1、36.3 ng/kg，对 FB1 的检测限分别为 2.5、3.2、4.0 ng/kg，该方法具有良好的特异性、准确度和灵敏度。

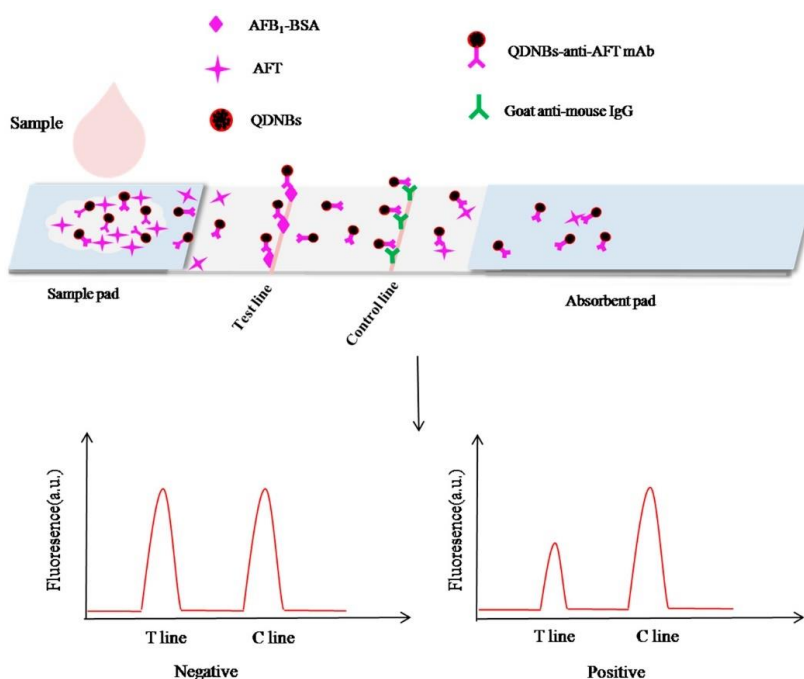


图 1.4 黄曲霉毒素总量量子点纳米球免疫层析试纸条的构建^[1]

Fig. 1.4 Construction of aflatoxin total quantum dot nanosphere immunochromatographic test strip^[1]

1.2.4.5 时间分辨荧光免疫层析技术

时间分辨荧光免疫层析检测技术 (TRFIA) 是免疫层析试纸条技术的一种, 最早起源于 19 世纪 80 年代^[54], 具有操作简单、检测快捷、成本低廉等优点^[55], 被广泛的应用在医学、生命科学、免疫学等学科领域。它利用镧系元素铕 (Eu)、铥 (Tm)、钐 (Sm) 等作为标记材料, 取代了荧光染料、酶、纳米金等传统的标记材料, 对抗体等生物材料进行标记, 进而在试纸条 NC 膜区域进行免疫反应, Eu 在紫外灯照射下可以发出橘红色的荧光。“时间分辨”指的是通过波长分辨和时间延迟检测技术检测待测物的信号强度并对其定量分析。在时间分辨荧光检测技术中应用最广的是 Eu, 它在经过一定的螯合反应后, 具有较长的 Stokes 位移, 荧光寿命长, 发射峰狭窄^[56], 而且可以避免激发光的干扰^[57]。

张兆威^[54]等建立了农产品中黄曲霉毒素的 TRFIA, 在花生、稻米、植物油中的检测范围分别为 0.8~25、0.8~15、0.8~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检测限均为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 该方法具有较好的准确度和精密度, 和 HPLC 检测结果的误差小于 10%, 具有良好的应用前景。肖理文^[37]等创建了针对 DON 的快速定量时间分辨荧光检测技术, 该方法的检出限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 82 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检测的线性范围是 100~5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 实际样品的加标回收率达到 83.51%~113.84%, 该技术特异性良好、灵敏度高、重现性好、操作简单, 适合谷物饲料中 DON 的快速定量检测。王文珺^[58]等对 DON 的 TRFIA 进行了体系适用性评价, 该方法的检出限为 154 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 414 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检测结果和 LC-MS/MS 相比没有明显差异, 证实了系统的稳定性和重复性良好。

随着人们对于农产品中真菌毒素的检测标准越来越高, 检测灵敏度高、使用简单方便的时间分辨荧光检测技术将拥有更广阔的发展前景。

1.2.4.6 免疫芯片技术

20 世纪 80 年代, 由 Roger Ekin 最先提出了蛋白芯片的检测原理。免疫芯片是一种特殊的蛋白芯片, 由电子芯片与免疫反应共同作用产生的生物芯片技术。免疫芯片具有检测灵敏度高、样品需要量少、重现性好、检测通量高、应用性强等优点, 在多组分真菌毒素的检测中得到了广泛应用。

王莹^[38]研制了一种可以同时检测 AFB1、AFM1、DON、OTA、T-2 毒素 (T-2 toxin, T-2)、ZEN 六种真菌毒素的免疫芯片, 该方法对六种毒素的检测范围达到了 2~3 个数量级, 实现了对六种真菌毒素的同步、准确、定量、快捷检测。Kloth^[59]等通过使用间接竞争化学微阵列免疫测定法 (CL-MIA), 开发了一种可以实现对牛奶中 13 种不同抗生素同时检测的可再生微阵列芯片。Soares^[60]等人建立了对农产品中 OTA、DON、AFB1 三种真菌毒素同步检测的免疫芯片, 该方法可以在 20 min 内实现对目标物的检测, 对三种毒素的检测灵敏度分别为 100、100、3 ng/mL 。

免疫芯片存在以上诸多优点的同时,还存在着工艺复杂昂贵,芯片需要琼脂糖凝胶、醛基化修饰处理等缺点,这些缺点限制了其推广应用。而且我国目前的芯片技术发展较为落后,商品化程度低,在未来可以作为发展热点。

1.3 本研究的目的和意义

真菌毒素存在于粮油奶产品的加工、生产、运输、贮藏等各个环节,对玉米、大麦、小麦、高粱及动物饲料进行污染。真菌毒素可以致使植物体产生霉变,人和其他动物误食了真菌毒素超标的食品后,真菌毒素会在体内积累,影响核酸、蛋白质和酶类物质的合成,还会对免疫细胞进行破坏,影响免疫系统的正常功能,重度中毒可能会导致癌变甚至死亡。目前在我国的农产品真菌毒素污染中,黄曲霉毒素、呕吐毒素是两种常见的真菌毒素污染物。我国是农产品生产和消费大国,农产品的质量安全是关乎国计民生的大事,然而真菌毒素污染的普遍存在,给我国带来了巨大的经济损失,而且严重危害了国民的身体健康。近年来,食品质量安全问题频出,人民对食品质量的要求越来越高,解决真菌毒素的污染已经成为刻不容缓的问题。

目前针对真菌毒素的确证性检测方法主要有 HPLC、LC-MS/MS 等,这些检测方法需要用到大型分析仪器和专业的检测人员,虽然检测灵敏度高、检测结果准确,但是操作复杂、检测成本高,需要专业的检测人员进行操作,不适用于农产品的现场快速检测。因此,建立针对真菌毒素的高灵敏、快速、准确、特异性强的快速检测方法具有科学意义,可以适用于农产品的现场快速检测,满足农产品在各个环节快速筛查的需求,为保障农产品的质量安全提供有力支撑。

1.4 本课题的研究内容

本研究在前人的基础上创新,建立了针对牛奶中 AFM1 和粮食、饲料产品中 DON 的快速检测方法。主要研究内容如下:

(1) 基于纳米复合材料的牛奶中 AFM1 电化学免疫传感器的制备。利用氧化石墨烯良好的导电性、二氧化铈良好的生物相容性、壳聚糖优异的成膜性和粘附作用等特性,制备了新型的纳米复合材料修饰丝网印刷电极。对纳米复合材料进行了电化学表征,纳米复合材料在电极表面形成均匀的纳米复合膜,依次将 AFM1 单克隆抗体和牛血清白蛋白固定在电极表面,制备免疫传感器。AFM1 单克隆抗体作为特异性识别元件,优化了免疫传感器的制备条件等参数,对免疫传感器的特异性、稳定性、准确性等性能进行了评价,实现了对牛奶中的 AFM1 进行定性、定量检测。

(2) 建立了基于二抗标记法的 DON 时间分辨荧光免疫层析检测技术。本研究先将荧光材料与羊抗鼠 IgG 偶联制备荧光探针,单克隆抗体间接标记在荧光探针上,相比传统的荧光材料与单克隆抗体直接连接,这种新型的间接标记方法节省了单克隆抗体用

量,降低了荧光材料对单克隆抗体活性的影响,提高了检测灵敏度,对免疫层析检测技术的特异性、准确性等性能进行了评价,并将该方法应用于玉米和饲料的检测中,与LC-MS/MS确证性检测方法进行了检测结果对比。

第二章 基于纳米复合材料的黄曲霉毒素 M1 电化学免疫传感器的制备与应用

2.1 引言

一系列的食品安全问题促进了各种黄曲霉毒素检测方法的兴起^[61]。一些检测牛奶中 AFM1 的方法具有准确性高的优点, 例如 LC-MS/MS^[62], HPLC^[63], 表面等离子体共振 (Surface plasmon resonance, SPR)^[64], 表面等离子荧光光谱 (Surface plasma fluorescence spectrum, SPFS)^[65]和 ELISA^[66, 67]等。然而, 这些检测方法具有检测费用高, 耗时且不便的缺点。快速检测方法是检测 AFM1 污染的有效方法之一, 在过去的几十年中, 发展用于黄曲霉毒素检测的快速、灵敏免疫传感器是一个重要的研究方向。近年来, 基于纳米材料的真菌毒素 (包括 AFM1) 电化学免疫传感器的研究作为一种广泛开发和应用的快速检测方法, 受到了研究人员的广泛关注^[68]。

氧化石墨烯 (Graphene oxide, GO) 是石墨烯的重要衍生物^[69]。GO 具有高比表面积、电导率、热性能、柔韧性和极好的溶解性等优势^[70], 是修饰电极的重要材料^[71]。二氧化铈 (Cerium oxide, CeO₂) 是一种价格低廉且用途广泛的稀土半导体材料^[72], 它具有许多优良特性, 如生物相容性、高等电点 (Higher electricity point, IEP)、宽带隙、无毒、电子电导率高、电化学稳定性好^[73]等, GO 和 CeO₂ 在生物传感器开发中具有的独特特性引起了人们的极大兴趣, GO 的高电导率可以大大加快电极表面电子的转移速度, CeO₂ 的高电点 (IEP~9.2) 有助于将生物分子固定在丝网印刷电极 (Screen printed electrodes, SPEs) 表面^[74]。壳聚糖 (Chitosan, CS) 具有无毒特性, 并且可以使被固定的生物分子保持高生物活性^[75], 更重要的是壳聚糖溶液具有一定的粘度, 可以将 GO 和 CeO₂ 稳定地固定在电极表面。与其他电极相比, SPEs 具有价格低廉、易于携带、操作简单等特点, 适用于快速检测^[76]。

本项研究将氧化石墨烯-壳聚糖 (GO-CS) 和二氧化铈-壳聚糖 (CeO₂-CS) 的纳米复合材料固定在 SPEs 表面, 以改善电信号并固定 AFM1 单克隆抗体 (ab-AFM1)。用扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM) 和傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR) 对 CeO₂-CS/GO-CS 修饰电极的涂膜进行了表征。使用循环伏安法 (Cyclic voltammetry, CV) 和差分脉冲伏安法 (Differential pulse voltammetry, DPV) 研究免疫传感器对 AFM1 的电流响应^[77]。经过优化实验后, 本工作中提出的电化学免疫传感器显示出高灵敏度、优异的稳定性、强特异性, 在牛奶样品的实际检测中效果良好。

2.2 材料与方法

2.2.1 试剂和仪器

本实验用到的主要实验耗材与试剂如表 2.1 所示。

本实验所用主要仪器如表 2.2 所示。

表 2.1 实验中所用的主要耗材与试剂

Tab. 2.1 Main reagents used in the experiment

名称	规格	厂家
丝网印刷电极	TE100, 3.0 mm	台湾禅谱科技股份有限公司
真菌毒素	标准品	美国 Sigma 公司
黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体	2C9	中国农业科学院油料作物研究所
壳聚糖	分析纯	上海生工生物工程有限公司
二氧化铈	20 nm	上海阿拉丁生物技术有限公司
氧化石墨烯溶液	1 mg/mL	上海源叶科技有限公司
磷酸二氢钠	分析纯	天津市北方天医化学试剂厂
磷酸氢二钠	分析纯	天津市北方天医化学试剂厂
铁氰化钾	分析纯	莱阳经济开发区精细化工厂
亚铁氰化钾	分析纯	莱阳经济开发区精细化工厂
氯化钾	分析纯	天津永晟精细化工有限公司
牛血清白蛋白 (BSA)	分析纯	美国 Sigma 公司

表 2.2 实验所用主要仪器

Tab. 2.2 Main instruments used in the experiment

名称	型号	厂家
电化学工作站	CHI660D	上海辰华仪器有限公司
电子分析天平	AL-104	梅特勒托利仪器有限公司
超声波清洗仪	SK3300H	上海科导超声仪器有限公司
pH 计	FE20K	上海智光仪器仪表有限公司
数显恒温磁力搅拌器	GL-3250A	梅特勒托利仪器有限公司
高速离心机	TGL-20B	上海安亭科学仪器厂
程控混合器	PTR-35	英国 Grant 公司
移液枪	1~5000 μ L	德国 Eppendorf 公司

2.2.2 氧化石墨烯-壳聚糖和二氧化铈-壳聚糖的制备

用电子分析天平称取 0.2 g CS 溶解在 100 mL 1.0% 乙酸溶液中，用磁力搅拌器搅拌 8 h 以上，以制备 0.2% 的 CS 溶液^[78]。将 1 mg/mL 活化好羧基的 GO 添加到制备好的 CS 溶液中，经超声波处理后得到均匀分散的 GO-CS 溶液。随后，称取 4 mg CeO₂ 溶解在 4 mL 0.2% 的 CS 溶液中，并进行超声处理直至分散均匀，得到 CeO₂-CS 溶液。将制备好的溶液放在 4°C 冰箱中保存。

2.2.3 丝网印刷电极的预处理

本实验使用的 SPEs 为传统的三电极体系，碳电极作为工作电极，Ag/AgCl 是参比电极，石墨作为辅助电极。在制备免疫传感器之前，先对 SPEs 进行预处理，以确保测试的稳定性。将未处理的 SPEs 置于 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中在 +1.75 V 的电压下扫描 300 s，并在 +0.3 V ~ +1.25 V 和 -1.3 V ~ +0.3 V 的电位范围内扫描电极直到 CV 曲线稳定为止。高电位可以氧化电极表面上的杂质，从而起到清洁 SPEs 的作用。在以下实验中使用预处理过的电极。

2.2.4 电化学免疫传感器的制备

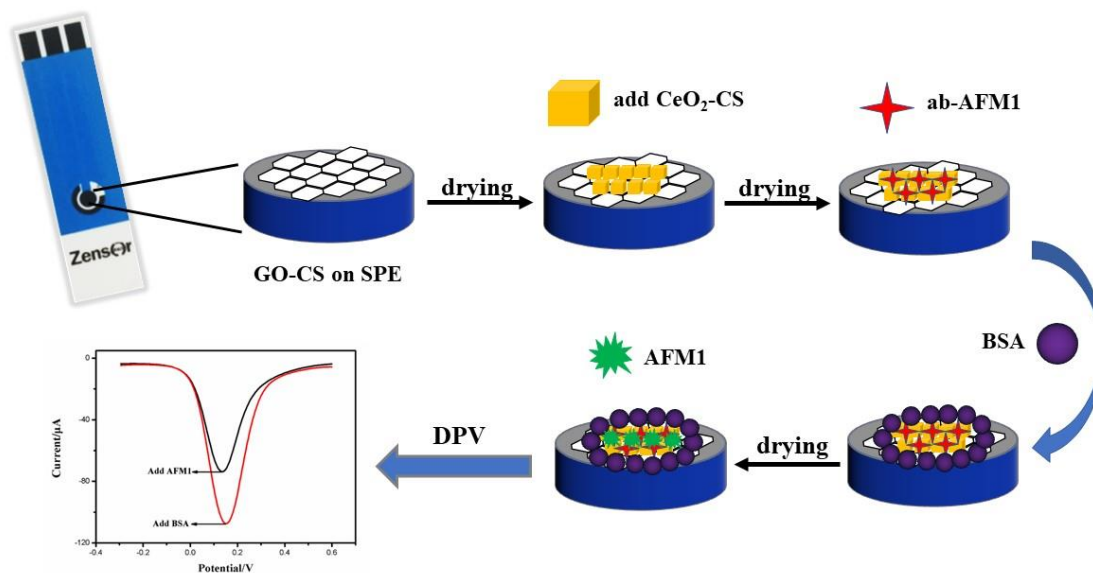


图 2.1 免疫传感器 AFM1/BSA/ab-AFM1/CeO₂-CS/GO-CS/SPE 的组装原理图

Fig. 2.1 Schematic diagram of the immunosensor (AFM1/BSA/ab-AFM1/CeO₂-CS/GO-CS/SPE)

采用层层自组装的方法制备电化学免疫传感器。首先，将 8 μL 的 GO-CS 滴加到 SPEs

表面，并自然干燥以获得GO-CS/SPE；第二，将8 μL CeO_2 -CS滴加至所得电极的表面并自然干燥以获得 CeO_2 -CS/GO-CS/SPE；第三，8 μL 适量浓度的ab-AFM1滴加到电极表面并在20 $^\circ\text{C}$ 下干燥以获得ab-AFM1/ CeO_2 -CS/GO-CS/SPE；然后滴加8 μL 0.1%的BSA溶液到经过处理的SPEs表面，自然干燥得到BSA/ab-AFM1/ CeO_2 -CS/GO-CS/SPE；制备的免疫传感器保持干燥并在4 $^\circ\text{C}$ 下存储。最后将含有AFM1的样品添加到已制备的电化学免疫传感器中，以获得AFM1/BSA/ab-AFM1/ CeO_2 -CS/GO-CS/SPE。由于ab-AFM1和AFM1的复合物阻止了电子到达电极表面，电流信号减小，从而降低了DPV峰值电流。AFM1电化学免疫传感器的制备过程如图2.1所示。

2.2.5 免疫传感器的电化学测量

本实验是基于高特异性单克隆抗体与目标物分子的免疫反应原理完成的。在制备的AFM1 电化学免疫传感器上，ab-AFM1 与 AFM1 进行特异性结合，减缓了SPEs表面电子的传递速率，从而导致电化学信号产生变化，根据电化学信号的改变规律以达到对AFM1 进行定性、定量检测的目的。在AFM1 电化学免疫传感器的组装过程中，将每一步修饰好的丝网印刷电极放在含有5.0 mM 铁氰化钾 ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$)、0.1 M KCl 的 0.1 M PBS 中，进行CV（电位范围为-1.0 V~+1.0 V，速率为100 mV/s，静止时间为2 s）和DPV（电位范围为-0.3 V~+0.6 V，速率为100 mV/s，静止时间为2 s）扫描表征，所有数据进行三组平行测试以评估所制备的免疫传感器的灵敏度、特异性、稳定性等性能。此外，还对免疫传感器的反应底液pH值、抗体浓度、反应时间等参数进行了优化。将免疫传感器特异性识别之前产生的氧化峰稳定电流记录为 I_0 ，免疫传感器与目标物充分反应后测得的氧化峰稳定电流记录为 I ，变化的免疫传感器响应电流（ ΔI ）确定如下： $\Delta I = I_0 - I$ ^[79]。通过 ΔI 研究分析免疫传感器与AFM1浓度的关系。

2.2.6 免疫传感器的特异性分析

用免疫传感器分别对DON、OTA、ZEN、FB1、AFB1、AFM1六种真菌毒素进行电化学测定，以验证该方法的特异性。保证其他实验条件一致，用制备的免疫传感器分别检测这六种真菌毒素，比较响应电流 ΔI 的差异。

2.2.7 实际样品的前处理

在实际样品检测之前，先对脂肪含量为6%的牛奶样品进行前处理，牛奶样品的前处理步骤如下：用等体积的0.1 M PBS（pH 7.4）稀释牛奶样品，高速离心（20000 rpm，1.5 h）^[80]。离心后牛奶分为三层不同的物质，上、下层是乳白色脂肪和酪蛋白等大分子物质，为了减少大分子夹杂物对检测精度的影响，收集了中间的乳清层进行检测。接下来，将不同浓度的AFM1标准品（0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 ng/mL）添加到空白样品中，

并通过 AFM1 免疫传感器检测获取回收率。

2.3 结果与讨论

2.3.1 纳米材料的表征

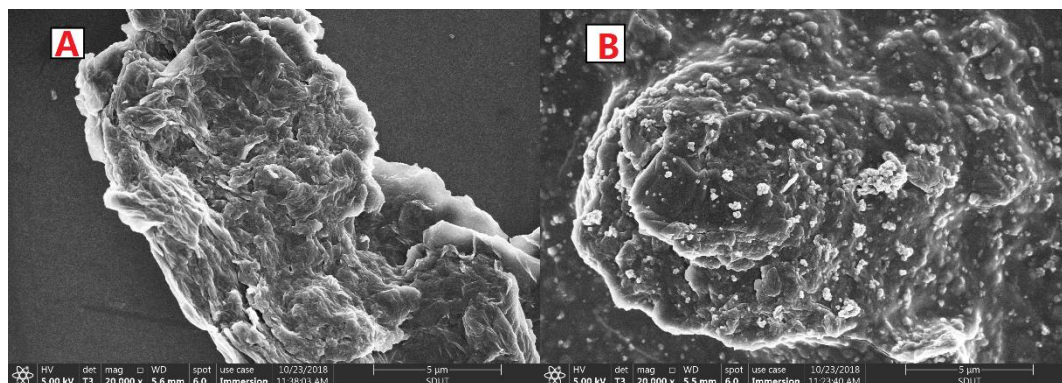


图 2.2 (A) GO-CS/SPE 的 SEM 表征; (B) CeO₂-CS/GO-CS/SPE 的 SEM 表征

Fig. 2.2 (A) SEM image of GO-CS/SPE; (B) SEM image of CeO₂-CS/GO-CS/SPE

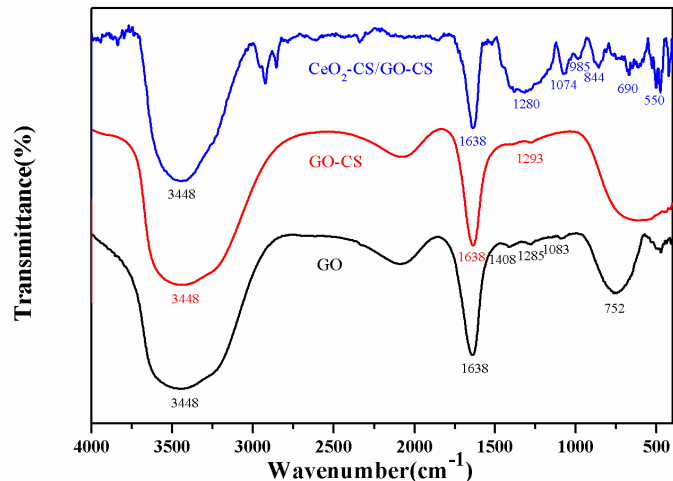


图 2.3 GO, GO-CS, CeO₂-CS/GO-CS 的 FT-IR 表征

Fig. 2.3 FT-IR spectra of GO, GO-CS, CeO₂-CS/GO-CS

用 SEM 对所制备的纳米材料 GO-CS 和 CeO₂-CS 进行表征, 如图 2.2 所示, SEM 图像清晰显示了 GO-CS 和 CeO₂-CS 在电极表面的改性状态。图 2.2(A) 显示了 GO-CS/SPE 的形态, 图 2.2(B) 显示了 CeO₂-CS/GO-CS/SPE 的形态。可以看出, GO-CS 和 CeO₂-CS 已经成功修饰在电极表面。

使用 FT-IR 对获得的 GO, GO-CS 和 CeO₂-CS/GO-CS 进行表征。如图 2.3 所示, 可以找到与 GO 光谱中的氧官能团相对应的特征峰, 包括在 1408 cm⁻¹ 处的=CH 拉伸振动峰, 在 1285 cm⁻¹ 处的 CO (环氧) 拉伸振动峰, CO (烷氧基) 在 1083 cm⁻¹ 处, 未氧化石墨分子的 C=C 在 1638 cm⁻¹ 处, 羟基的拉伸振动在 3448 cm⁻¹ 谱带上给出^[81, 82]。CS 和 GO 的混合物在 1638 cm⁻¹ 和 1293 cm⁻¹ 处显示出特征峰。与 GO 相比, GO-CS 混合物的振动峰的相对强度没有显著变化, 表明 GO 均匀分散在 CS 中^[83]。根据 CeO₂-CS/GO-CS 的光谱, 报告显示, 在大约 844 cm⁻¹ 处可以看到与 Ce-O 的拉伸振动特性相对应的谱带^[84, 85], 在 1280~985 cm⁻¹、844~690 cm⁻¹ 和 550~450 cm⁻¹ 的范围内出现了 CeO₂ 的特殊条带^[86], 由于 GO 和 CeO₂ 的结合, 条带总体上略有移动。FT-IR 图像证明纳米复合材料结合状态良好。

2.3.2 免疫传感器组装过程的电化学表征

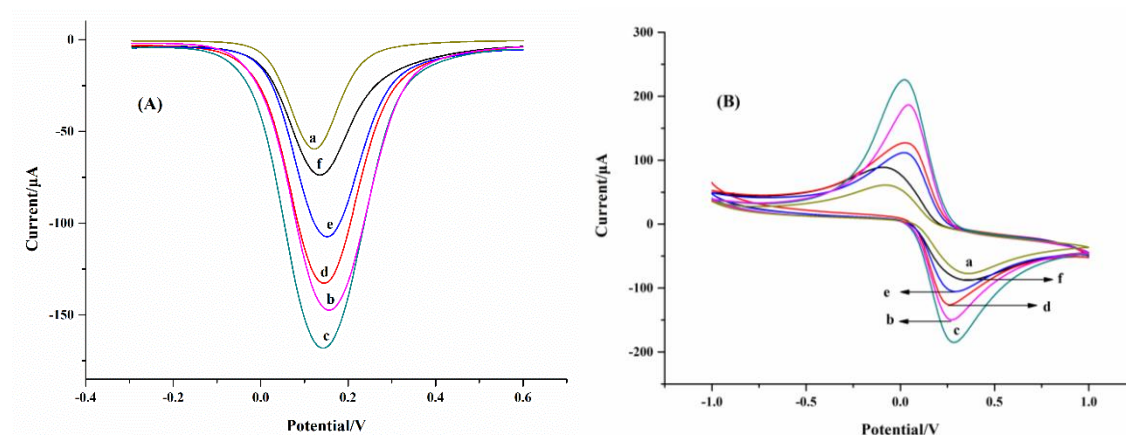


图 2.4 (A) 免疫传感器的 DPV 表征; (B) 免疫传感器的 CV 表征

(a) 空白 SPE; (b) GO-CS/SPE; (c) CeO₂-CS/GO-CS/SPE; (d) ab-AFM1/CeO₂-CS/GO-CS/SPE;
(e) BSA/ab-AFM1/CeO₂-CS/GO-CS/SPE; (f) AFM1/BSA/ab-AFM1/CeO₂-CS/GO-CS/SPE

Fig. 2.4 (A) DPV characterization of immunosensors; (B) CV characterization of immunosensors

(a) bare SPE; (b) GO-CS/ SPE; (c) CeO₂-CS/GO-CS/SPE; (d) ab-AFM1/CeO₂-CS/GO-CS/SPE;
(e) BSA/ab-AFM1/CeO₂-CS/GO-CS/SPE; (f) AFM1/BSA/ab-AFM1/CeO₂-CS/GO-CS/SPE

免疫传感器组装和检测过程的 DPV 表征如图 2.4(A)所示, DPV 曲线在 5.0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-}和 KCl (0.1 M) PBS 溶液中得到。裸电极氧化还原峰 (曲线 a) 明显; 首次通过 GO-CS 修饰裸电极时, 峰值电流 (曲线 b) 显著增加, 表明 GO-CS 在电极上成功修饰, 从而促进了 [Fe(CN)₆]^{3-/4-}的加速移动, 电流信号增强; 当用 CeO₂-CS/GO-CS 处理过电极时, 免疫传感器的电流信号值进一步增加 (曲线 c); 当把 ab-AFM1 滴加到电极

表面后，电流信号减小，因为抗体是一种阻止电子传输的蛋白质分子，因此峰值电流降低（曲线 d）；为了促进 AFM1 与抗体的完全反应，减少实验误差，在电极表面添加了 BSA 以封闭非特异性结合位点，BSA 使 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 传输被阻止，电流信号进一步减小（曲线 e）；在加入 AFM1 样品进行检测时，ab-AFM1 与 AFM1 特异性反应后产生了一种不导电的复合材料，从而减慢了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的转移，这进一步降低了电流信号（曲线 f）。如图 2.4(B)所示，显示了免疫传感器的 CV 响应信号，结果与 DPV 曲线吻合情况良好。当 GO-CS（曲线 b）和 $\text{CeO}_2\text{-CS}$ （曲线 c）修饰在电极表面时，电化学信号显示出峰值并且电流显著增加，结果表明可以通过复合纳米材料大幅度提高电化学信号；当 AFM1（曲线 f）和 ab-AFM1（曲线 d）作用于电极表面时，电流信号相应地发生不同程度降低。结果表明，电化学免疫传感器被成功构建并应用于 AFM1 的检测。

2.3.3 电化学免疫传感器的条件优化

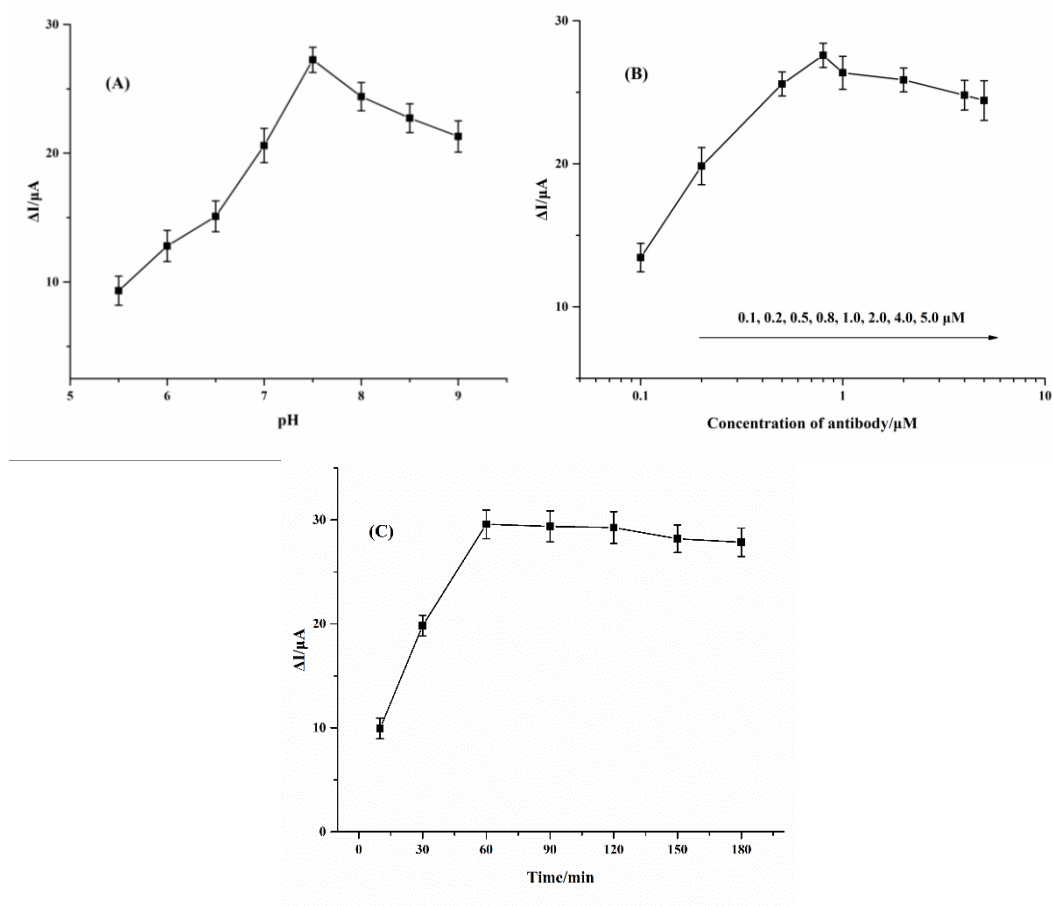


图 2.5 免疫传感器的优化: (A) PBS 溶液 pH 的影响; (B) ab-AFM1 浓度的影响; (C) 孵育时间的影响

Fig. 2.5 Optimization of the immunosensor: (A) effect of the PBS pH; (B) effect of the concentration of ab-AFM1; (C) effect of incubation time.

免疫传感器的性能受到诸多因素的影响，我们对测试底液的 pH 值、抗体浓度、反应时间进行了优化实验，以探究免疫传感器的最佳反应条件。

PBS 的 pH 值对于免疫传感器的分析性能有一定的影响。配置了一系列 pH 浓度 (pH 5.5~9.0) 的含有 0.1 M KCl 的 PBS，分别用于免疫传感器的检测过程。如图 2.6(A)所示，免疫传感器的性能与 pH 值有关。当反应底液 pH 在 5.5~7.5 时，电流差值逐渐升高，当反应底液 pH 在 7.5~9 时，电流差值逐渐降低。结果表明，反应底液在 pH 值为 7.5 时，电流信号变化最明显，因此我们选择 pH 7.5 作为最佳反应 pH。

抗体浓度是影响免疫传感器效果的重要因素，我们研究了 ab-AFM1 浓度对免疫传感器的影响。如图 2.6(B)所示，电流信号随抗体浓度的增加而增加，当抗体浓度为 0.8 μM 时，电流信号达到最大值，随着抗体浓度的持续增加，免疫传感器的电流信号并未增加。因此，我们选择 0.8 μM 的抗体来制备免疫传感器。

优化这两个参数后，我们继续对孵育时间进行优化。单克隆抗体和目标物的孵育时间也可能强烈影响免疫传感器的响应信号。如图 2.6(C)所示，60 min 内 ΔI 的变化随孵育时间的延长而增加。在之后较长的时间内，电流信号基本不变，甚至有所降低。结果表明，AFM1 和 ab-AFM1 在 60 min 时已经完全反应。因此，我们认为 60 min 的反应时间是最合适的。

2.3.4 电化学免疫传感器的性能分析

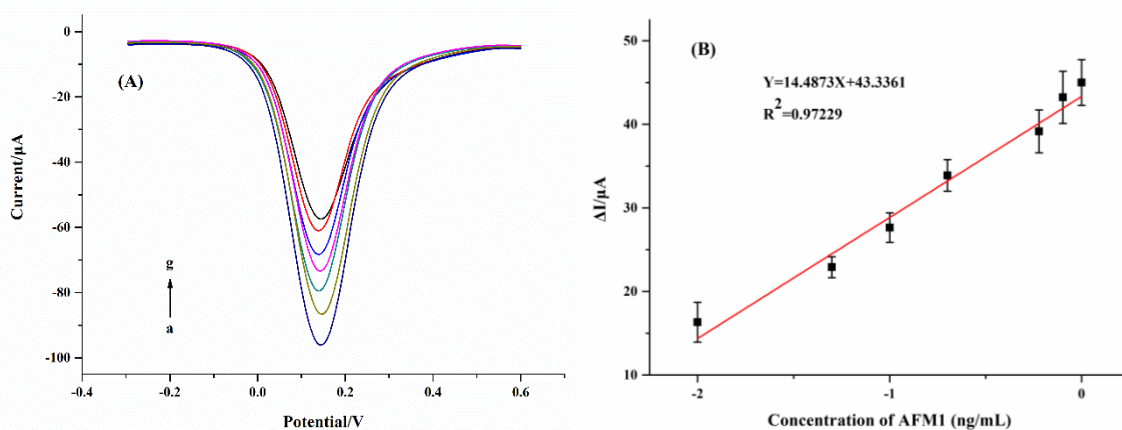


图 2.6 (A) 在不同浓度的 AFM1 中免疫传感器的 DPV 曲线 (a-g: 0.01、0.05、0.1、0.2、0.6、0.8、1 ng/mL); (B) ΔI 变化与 AFM1 浓度对数之间的线性关系

Fig. 2.6 (A) DPV curves of immunosensor incubated with different concentrations of AFM1 (a-g: 0.01、0.05、0.1、0.2、0.6、0.8、1 ng/mL.); (B) Linear relationship between ΔI changes and logarithm of AFM1 concentration

在预先确定的最佳实验条件下,我们通过添加不同浓度的 AFM1 来测定免疫传感器的性能,得出了 AFM1 浓度的对数与 ΔI 之间的线性关系。如图 2.6(A)所示,通过 DPV 表征出不同浓度的 AFM1 的电流变化,抗体与 AFM1 的特异性结合降低了电子传输的速度;随着 AFM1 浓度的增加,DPV 峰值电流逐渐减小。AFM1 浓度的对数 (X) 与 ΔI (Y) 之间的线性关系如图 2.6(B)所示。线性方程为 $Y=14.4873X+43.3361$ ($R^2=0.97229$), 计算得到 AFM1 的检测灵敏度 (LOD) 为 0.009 ng/mL。此外,我们将制备的免疫传感器的性能与已报道的方法进行了比较,如表 2.3 所示,该免疫传感器具有合适的检测线性范围和较低检测限,与传统的检测方法相比,该方法具有轻巧、快捷、高效的优点,传感器的性能可以满足快速检测筛选的要求。

表 2.3 本方法与其他 AFM1 检测方法的比较

 Table 2.3 Comparison with other AFM₁ detection methods.

检测方法		LOD (ng/mL)	线性范围 (ng/mL)	参考 文献
Immuno -assays	ABIA-ICPMS	0.0004	0.0012~1.2	[87]
	Direct competitive ELISA	0.001	0.002~0.0075	[67]
	Indirect competitive ELISA	0.04	0.04~0.5	[88]
Highly-sensitive time-resolved fluorescent				
Liquid Chromat -ography	immune-chromatographic Assay	0.0003	0.0001~0.2	[89]
Rapid detection method	UHPLC-MS/MS/MS	0.00018	0.05~500	[90]
	Solid phase extraction-UPLC-MS/MS/MS	0.0003	0.001~0.3	[91]
	Flow injection immunoassay	0.011	0.02~0.5	[92]
	Detection Paper. electrochemical immunosensor	0.009	0.02~0.4	[93]
	Fluorescence resonance energy transfer aptasensor	0.025	0.03~0.16	[69]
	Pt microelectrode-Fe ₃ O ₄ NPs-PANI-APT	0.00198	0.006~0.06	[94]
	BSA/ab-AFM1/CeO ₂ -CS/GO-CS/SPE	0.009	0.01~1	本项 研究

2.3.5 电化学免疫传感器的特异性和稳定性

为了测试免疫传感器的特异性,在同样的实验条件下,用本免疫传感器分别对六种

真菌毒素 (DON、OTA、ZEN、FB1、AFB1 和 AFM1) 进行检测。如图 2.7(A)所示, 其他 5 种真菌毒素的响应电流几乎与空白样品的响应电流接近, 而检测 AFM1 的 DPV 响应电流仍然很大。结果表明, 该免疫传感器对不同类型的真菌毒素具有足够的识别能力, 适用于 AFM1 的特异性和选择性检测。

为了确定免疫传感器的稳定性, 将制备的免疫传感器保存在 4°C 下, 并每隔 1、2、3 和 4 周进行测试。如图 2.7(B)所示, 经过 1 周的检测, 工作电极的响应电流仍保持原始响应电流的 94.32%; 2 周后, 电极响应电流保持在 91.87%; 3 周后, 电极响应电流保持在 84.97%; 4 周后, 电极响应电流保持在 80.67%。结果表明该免疫传感器具有良好的稳定性。

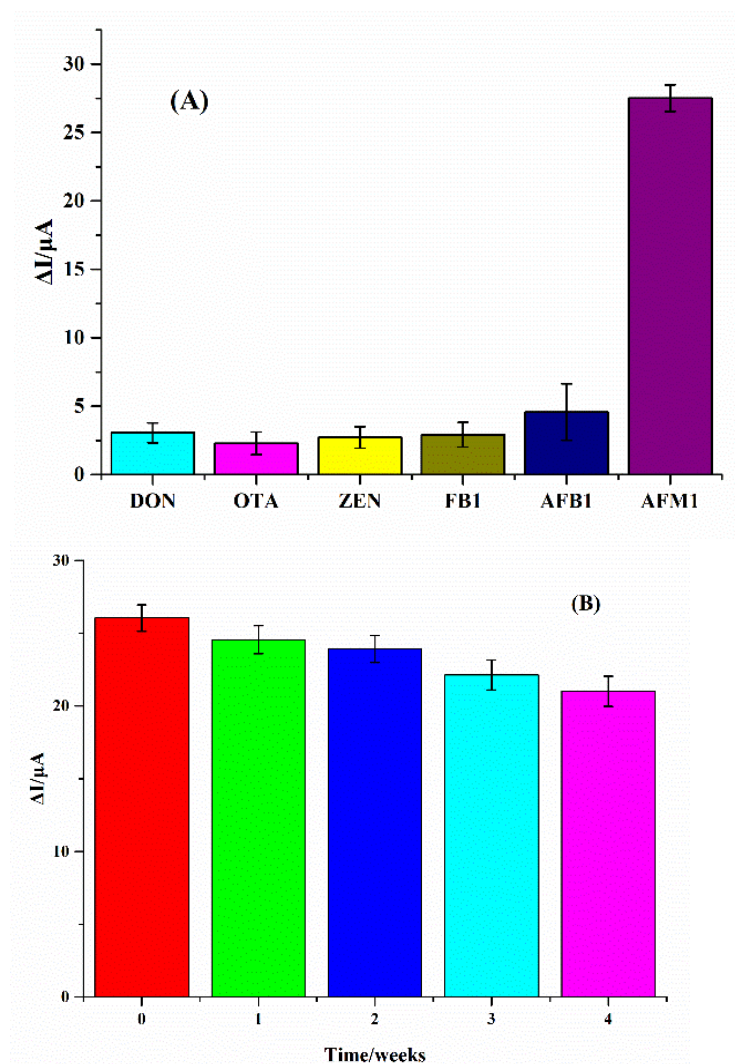


图 2.7 免疫传感器的性能: (A) 免疫传感器的特异性; (B) 免疫传感器的稳定性。

Fig. 2.7 Performance of the immunosensor: (A) specificity of the immunosensor; (B) stability of the immunosensor.

2.3.6 实际样品的检测

为了测试 AFM1 免疫传感器在牛奶中的实际应用, 对该方法准确性进行了研究。使用的牛奶样品经大型分析仪器检测, 已确认不含 AFM1。按照预处理方法处理牛奶样品。将已知不同浓度的 AFM1 标准品 (0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 ng/mL) 添加到处理过的样品中。充分振荡混匀后, 使用免疫传感器测试牛奶样品。实验结果如表 2.4 所示, 实际样品加标回收率在 96.15%~104.25% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 在 2.7%~4.3% 之间, 在允许的回收范围内。结果表明, 该免疫传感器具有较高的检测准确度和精密度, 适用于牛奶中 AFM1 的检测。

表 2.4 免疫传感器在牛奶样品检测中的准确性

Tab. 2.4 Accuracy of the proposed immunosensor in milk samples

牛奶样品	AFM1 添加量 (ng/mL)	AFM1 检出量 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%) n=3
1	0.02	0.01953	97.65	2.7
2	0.05	0.04808	96.15	4.3
3	0.1	0.10237	102.37	3.2
4	0.2	0.19694	98.47	3.6
5	0.5	0.52125	104.25	3.5

2.4 本章小结

本章建立了基于 GO-CS 和 CeO₂-CS 纳米复合材料修饰免疫传感器检测 AFM1 的电化学方法, 实现了对牛奶样品中 AFM1 的检测。利用了 CS 高生物活性和粘度的特点将 GO 和 CeO₂ 固定在电极表面, 利用了 GO 的高比表面积和电导率、CeO₂ 的生物相容性和电化学稳定性等特点提高电化学信号并将 ab-AFM1 稳定固定在电极表面。采用层层组装法将材料依次固定在 SPEs 上, 制备了免疫传感器, 使用 DPV 和 CV 对制备过程进行了电化学表征, 并对免疫传感器的反应底液的 pH、抗体浓度、孵育时间等条件进行了优化。在最佳实验条件下, 我们得到了电化学响应与 AFM1 浓度之间的良好线性关系, 检测线性范围为 0.01~1 ng/mL, 计算得到的 LOD 为 0.009 ng/mL, 该免疫传感器检测灵敏度高、线性范围良好。免疫传感器在特异性和稳定性评价中表现良好, 在牛奶样品中的加标回收率在 96.15%~104.25% 之间, 相对标准偏差在 2.7%~4.3% 之间。

第三章 基于二抗标记法的呕吐毒素时间分辨荧光免疫层析检测技术研究

3.1 引言

随着国家和社会对于农产品中真菌毒素相关限量和标准的调整,传统的基于一抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术在灵敏度上愈发难以达到我们的要求。在传统的一抗标记方法中,我们为了提高检测的灵敏度,通常采用降低单抗标记量的方法,但是过低的单抗标记量会使荧光材料的偶联率降低,导致在检测时试纸条 NC 膜背景色过重,影响检测效果;而且单抗在与荧光材料的偶联过程中,会使其自身识别抗原的能力降低,影响方法的检测灵敏度等指标。所以需要开发新型的检测方法满足当前市场要求。

为了进一步提高检测的灵敏度,采用基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术。这项技术的原理是将羊抗鼠 IgG 与聚苯乙烯荧光微球进行偶联作为荧光探针,探针进一步与目标物特异性单克隆抗体结合,进而将单抗间接标记在荧光微球上。由于一分子的单克隆抗体可以结合多个二抗,从而将单抗的荧光信号强度放大多倍,达到提高检测灵敏度的目的。二抗标记法的优势在于节省昂贵的单克隆抗体消耗,同时避免了直接标记过程中单抗识别抗原能力的下降。Marjan Majdinasab^[96]等已将二抗标记法成功应用 OTA 的时间分辨免疫层析检测技术中,与传统的单抗法相比检测限提高了 100 倍,达到了 0.4 pg/mL;李广华^[97]将二抗标记法应用在牛奶中三聚氰胺和 AFM1 的检测中,检测灵敏度提高了一百倍以上。研究表明,基于二抗标记法的时间分辨荧光检测技术相比传统的单抗法可以提高检测灵敏度,在真菌毒素的检测中具有广阔的发展空间。

本章运用时间分辨荧光技术,以 DON 为目标分析物,建立了基于二抗标记法的免疫层析检测方法。通过将羊抗鼠 IgG 与聚苯乙烯荧光微球进行偶联制备荧光探针, DON 单克隆抗体(ab-DON)与荧光探针进行间接连接。以 ab-DON 作为核心识别元件,优化了 EDC 用量、样品垫材料、缓释液成分、二抗标记量、单抗偶联量、免疫试剂喷涂量等条件,建立了基于二抗标记法的呕吐毒素时间分辨荧光免疫检测技术。我们在本章中探索了该方法的灵敏度、稳定性、准确性、特异性等性能,将其应用于玉米、饲料样品的检测,并与 LC-MS/MS 的分析结果进行比对。

3.2 材料

3.2.1 试剂和仪器

本实验所用的主要试剂及药品如表 3.1 中所示。

本实验所用的主要仪器如表 3.2 所示。

表 3.1 实验中所用的主要试剂及药品

Tab. 3.1 Main reagents used in the experiment

名称	规格	厂家
磷酸氢二钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氯化钾	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
聚苯乙烯荧光微球	200nm	国药集团化学试剂有限公司
叠氮钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
硼酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
硼酸钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
蔗糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
聚乙烯吡咯烷酮 (PVPK-30)	分析纯	上海优你生物科技有限公司
吐温-20	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
牛血清白蛋白 (BSA)	分析纯	美国 Sigma 公司
EDC	分析纯	美国 Sigma 公司
0.22 μm 滤膜	有机系	美国 Millipore 公司
0.45 μm 滤膜	有机系	美国 Millipore 公司

表 3.2 本实验所用主要仪器设备

Tab. 3.2 Main equipment used in the experiment

名称	厂家
XYZ3050 点膜仪器	美国 BioDot 公司
CM4000 切条机	美国 BioDot 公司
送风定温干燥箱	盐城欧莱克电子设备有限公司
防潮柜干燥箱	上海爱朗仪器有限公司
漩涡振荡器	深圳安必胜科技有限公司
CF16RX 高速冷冻离心机	日本 Hitachi 公司
数控高功率超声仪	昆山超声仪器有限公司
365 nm 紫外灯	上海拜力生物有限公司
时间分辨荧光速测仪	上海优你生物科技有限公司
电子分析天平 (CAP224S)	德国 Sartorius 公司
LC-MS/MS	日本岛津公司
Milli-Q 超纯水系统	美国 Millipore 公司

本实验所用的主要免疫试剂如表 3.3 中所示。

表 3.3 实验中所用免疫试剂

Tab. 3.3 Main immune reagents used in the experiments

名称	厂家
羊抗鼠 IgG	武汉博士德生物工程有限公司
兔抗羊 IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司
呕吐毒素单克隆抗体	实验室自制
呕吐毒素包被原	美国 Sigma 公司
呕吐毒素标准品	美国 Sigma 公司
T-2 毒素标准品	美国 Sigma 公司
玉米赤霉烯酮标准品	美国 Sigma 公司
伏马毒素 B1 标准品	美国 Sigma 公司
黄曲霉毒素 M1 标准品	美国 Sigma 公司
硝酸纤维素膜 (NC 膜)	美国 Millipore 公司
吸水垫 (CFSP223000)	美国 Millipore 公司
玻璃纤维样品垫	上海捷宁生物科技有限公司
Fusion 5 样品垫	上海捷宁生物科技有限公司
滤血膜样品垫	上海捷宁生物科技有限公司
背衬板	上海捷宁生物科技有限公司
可拆卸反应微孔	上海拜力生物科技有限公司

3.2.2 主要溶液的配方

(1) 0.01 M 的磷酸盐缓冲液 (PBS): 准确称取 NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄ 2.9 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.02 g, 加超纯水定容至 1 L, 调节溶液 pH 至 7.4;

(2) 0.2 M 的硼酸缓冲液 (pH=8.18): A 液, 准确称取 1.237 g 硼酸 (H₃BO₃) 溶于 100 mL 超纯水中; B 液, 准确称量 1.907 g 硼酸钠 (Na₂B₄O₇·10H₂O) 溶于 100 mL 超纯水中; 取 65.0 mL A 液和 35.0 mL B 液并充分混匀, 使用 0.22 μm 的滤膜过滤可得 100.0 mL 0.2 M 硼酸缓冲液;

(3) EDC 水溶液 (15 mg/mL): 准确称取 15.0 mg EDC 溶于 1 mL 超纯水中 (现配现用);

(4) 包被原缓释液: 准确称取 1.0 g BSA, 0.02 g NaN₃ 溶解于 100.0 mL 0.01 M PBS (pH=7.4) 中, 用 0.22 μm 滤膜过滤后定容得到;

(5) 含 0.5% BSA 的硼酸缓冲液: 准确称量 0.05 g BSA 并溶解于 10 mL 配好的硼酸缓冲液中 (现配现用);

(6) 玻璃纤维样品垫封闭液: 2.9% Na_2HPO_4 + 0.3% NaH_2PO_4 +1% Tween-20+1% PVPK-30+0.25% EDTA+0.5% BSA+0.02% NaN_3 ; 准确称取叠氮钠 0.02 g, 磷酸氢二钠 2.9 g, 磷酸二氢钠 0.3 g, 聚乙烯吡咯烷酮 (PVPK-30) 1.0 g, BSA 0.5 g, Tween-20 1.0 g, EDTA 0.25 g, 溶解于 100.0 mL 超纯水中。

3.3 实验方法

3.3.1 抗体与聚苯乙烯荧光微球的偶联

3.3.1.1 羊抗鼠 IgG 与聚苯乙烯荧光微球的偶联

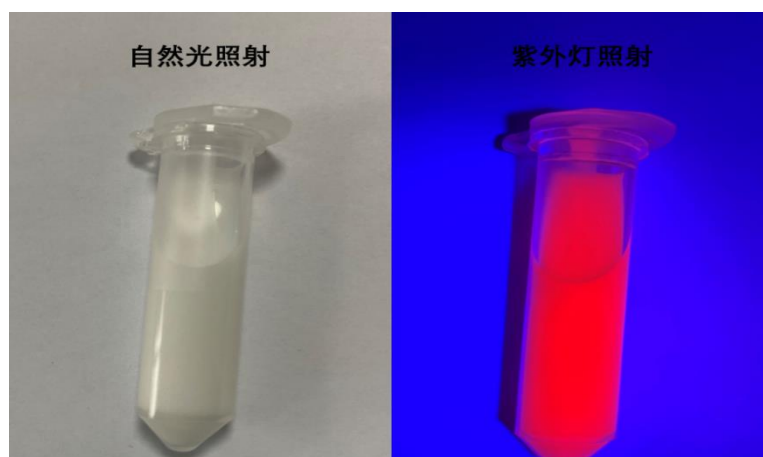


图 3.1 氧化铕乳胶在可见光和紫外灯照射下的颜色对比

Fig. 3.1 Color comparison of Eu under visible light and ultraviolet light

如图 3.1 所示, 聚苯乙烯荧光微球在可见光下为乳白色液体, 经 365 nm 紫外灯照射呈现明亮的橘红色。聚苯乙烯荧光微球的激发波长为 365 nm, 发射波长为 613 nm, 颗粒直径为 200 nm 左右。羊抗鼠 IgG 与聚苯乙烯荧光微球的偶联步骤为:

精确量取 100 μL 聚苯乙烯荧光微球加入到 400 μL 硼酸缓冲液 (0.2 M, pH=8.18) 中, 使用旋涡振荡器混匀, 再放入超声仪中超声 10 min, 使聚苯乙烯荧光微球颗粒均匀分散在硼酸缓冲液中; 加入一定量新鲜配置的 15 mg/mL EDC 溶液高速混匀 15 min, 以活化聚苯乙烯荧光微球颗粒上的羧基用于偶联抗体, 高速离心 10 min (13300 $\times g$, 10 $^{\circ}\text{C}$), 弃去上清液以去除过量的 EDC, 将沉淀用 500 μL 硼酸缓冲液复溶振荡混匀, 超声 10 min 使聚苯乙烯荧光微球颗粒充分混匀; 复溶的溶液加入合适量的羊抗鼠 IgG 涡旋混匀, 低温振荡 12 h, 随后离心去上清用 1 mL 含 0.5% BSA 的硼酸缓冲液复溶, 并低温振荡 3 h

(BSA 的作用在于封闭聚苯乙烯荧光微球表面的非特异性结合位点)；制备的探针置于 4°C 保存备用。偶联原理如图 3.2 所示。

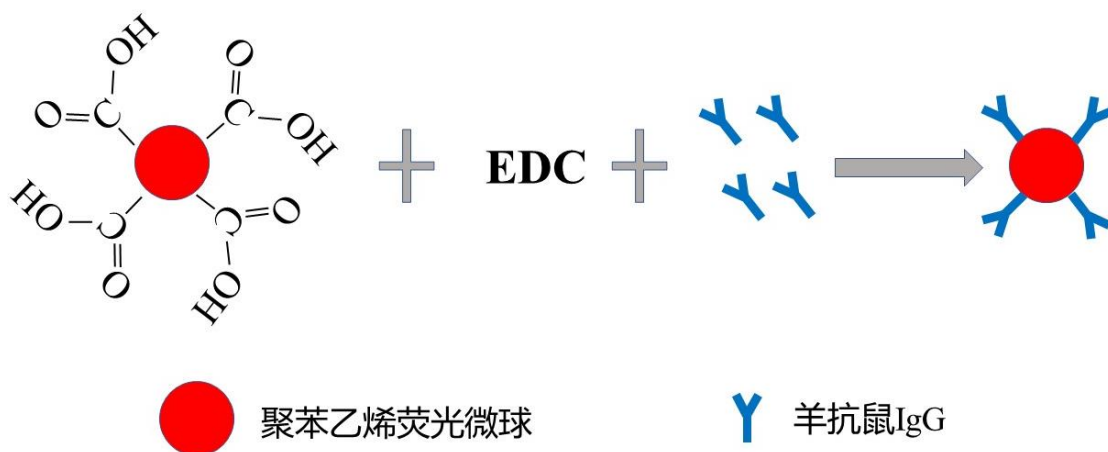


图 3.2 聚苯乙烯荧光微球与羊抗鼠 IgG 的偶联

Fig. 3.2 Coupling of polystyrene fluorescent microspheres with goat anti-mouse IgG

3.3.1.2 EDC 用量的优化

本次实验采用 EDC 对荧光微球的羧基进行活化，EDC 的用量不同，荧光微球的活化程度也就不同。分别添加 10、20、30、40 μL 的 15 mg/mL EDC 溶液到 500 μL 聚苯乙烯荧光微球-硼酸缓冲混合溶液中，进行反复试验，观察结果。

3.3.1.3 羊抗鼠 IgG 标记量的优化

当羊抗鼠 IgG 与聚苯乙烯荧光微球进行偶联时，分别添加 40、60、80、100、120、140 μL 的 1 mg/mL 羊抗鼠 IgG 与活化好的聚苯乙烯荧光微球进行偶联。选择偶联好的荧光探针分别与适量的 ab-DON 进行混合，孵育一定时间后用同一批试纸条进行检测，并用时间分辨荧光检测仪进行读数，比较阴性条件下质控线 (C 线) 荧光信号值的大小，选择 C 线荧光强度最大的实验组对应的羊抗鼠 IgG 偶联量为最佳用量。

3.3.1.4 单克隆抗体标记量的优化

Ab-DON 的用量是本实验的重要参数，直接影响到免疫层析检测技术的灵敏度和检测范围。我们将不同量的 ab-DON 与荧光探针混合，然后对阴性样和不同浓度的阳性样进行检测。使用 70% 甲醇水溶液对 DON 标准品进行稀释。分别将 5 μL 的 0.005、0.01、0.02、0.05 mg/mL ab-DON 与荧光探针混合并孵育一段时间，将 80 μL 混合溶液分别加入 DON 浓度为 0、10、30、50、75、100 ng/mL 的 70% 甲醇水溶液，用同一批次试纸

条进行检测，反应一段时间后用时间分辨荧光仪读取试纸条上的检测线（T 线）荧光强度，选择合适量的单抗用量。

3.3.2 免疫层析试纸条的构建

基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测试纸条主要由四部分构成：背衬板、硝酸纤维素膜（NC 膜）、样品垫、吸水垫。如图 3.3 所示，样品垫、NC 膜、吸水垫依次粘贴在背衬板上，各组分之间交叠 1 mm，NC 膜是免疫层析反应的区域，上面喷涂有 T 线和 C 线。T 线喷涂的是目标物抗原（DON-BSA），C 线喷涂的是兔抗羊 IgG。使用 XYZ3050 喷条仪在 NC 膜上进行喷涂操作，喷好的试纸条放在 37℃烘箱中 2 h。烘好后用切条机切成 4 mm 左右宽的试纸条，放置在装有干燥剂的试纸条筒中保存备用。

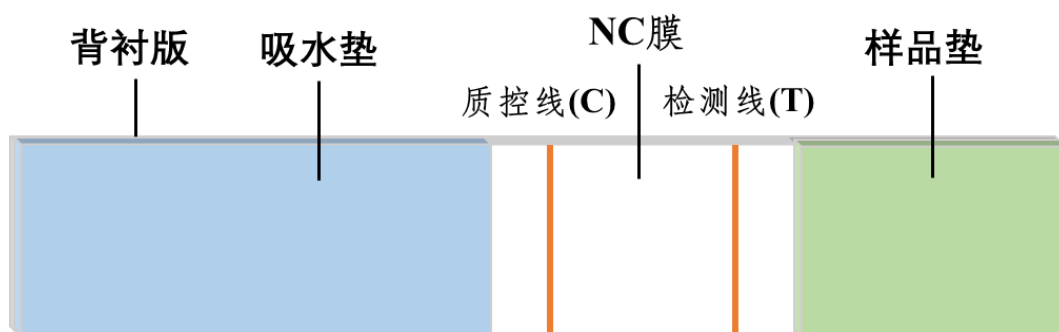


图 3.3 免疫层析试纸条示意图

Fig. 3.3 Schematic diagram of immunochromatographic test strip

3.3.2.1 免疫试剂用量

喷涂在 T 线上的抗原量和 C 线上的兔抗羊 IgG 量直接影响到试纸条的荧光强度和灵敏度。C 线上兔抗羊 IgG 的浓度设置为 0.1、0.2、0.25 mg/mL 三个浓度，喷涂速度设置为 0.5、0.7、1.0 $\mu\text{L}/\text{cm}$ ，T 线上抗原浓度分别设置为：0.2、0.5、1.0 mg/mL。

用反应缓释液分别稀释荧光探针 50 倍、100 倍、160 倍、200 倍。通过类似于 ELISA 实验棋盘法对三个因素的不同条件进行组合实验。通过多组试验测试，找到划线抗原、抗体量及荧光探针稀释倍数的最佳组合。

3.3.2.2 样品垫的选择

三种样品垫：玻璃纤维、Fusion 5、滤血膜用于制备免疫层析试纸条。它们的前处理方法不同，荧光探针层析程度也不同。用这三种不同材质的样品垫进行反复实验，比较荧光探针层析情况和荧光条带的亮度等方面的差异，选择层析速度快、条带明显、背

景色无干扰的样品垫使用。

3.3.2.3 反应缓释液的优化

反应缓释液用于荧光探针和样品提取液的稀释，合适的反应缓释液成分可以提高层析速度，减少非特异性结合、减少残留物，选择 5 种不同反应缓释液成分进行优化：

- (1) 超纯水；
- (2) 超纯水+1% 蔗糖；
- (3) 超纯水+1% 蔗糖+0.5% BSA；
- (4) 超纯水+1% 蔗糖+0.5% BSA+2% Tween-20；
- (5) 超纯水+1% 蔗糖+0.5% BSA+2% Tween-20+1% PVPK-30。

用 5 种不同的缓释液进行反复试验，在其余实验条件相同的情况下，比较荧光探针的层析情况和荧光条带的亮度，选择结果层析速度快、荧光条带明显、无背景色干扰的缓释液成分用于下面的实验。

3.3.3 反应时间的优化

反应时间会对检测技术的性能有一定的影响，对试纸条检测的时间进行优化实验。使用试纸条对空白样品进行检测，用时间分辨荧光速测仪分别对反应 1、2、3、5、7、10、12、15 min 时的 T、C 值进行记录，T/C 值趋于稳定时的反应时间为最佳反应时间。

3.3.4 基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术的原理

时间分辨荧光检测技术的原理是通过免疫层析试纸条和时间分辨荧光速测仪来完成定量检测的。在样品杯中加入适量的反应缓释液、荧光探针、单克隆抗体、样品提取液，使反应总体积为 160 μL ，在恒温孵育器中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。然后将准备好的试纸条插入可拆卸反应微孔中，反应后的荧光探针沿着样品垫层析到 NC 膜上，在反应区域发生间接竞争免疫反应。反应原理如图 3.4 所示，当样品中不含检测目标物时，单克隆抗体携带探针层析到 T 线上，与 T 线上的包被原结合，带有羊抗鼠 IgG 的游离荧光探针与 C 线上的兔抗羊 IgG 结合，此时 T 线上荧光强度最大，C 线上荧光强度最小，T 线荧光信号值与 C 线荧光信号值的比值 (T/C) 最大，检测结果呈阴性；当样品中含有少量检测目标物时，单克隆抗体会先与目标物反应，剩余的单抗与荧光探针结合，层析到 T 线处与包被原处反应，未与单抗结合的荧光探针层析到 C 线处，此时 T 线荧光信号减弱，C 线荧光信号增强，T/C 值相应降低；当样品中含有过量检测目标物时，单抗会被目标物消耗殆尽，无法与荧光探针结合层析到 T 线处，偶联有羊抗鼠 IgG 的荧光探针会在 C 线处聚集，此时 T 线信号最弱，C 线信号最强，T/C 值最小，检测结果呈阳性。反应溶液中目标物的浓度和荧光条带的 T/C 值呈现反比例关系。

基于二抗标记法的时间分辨免疫层析检测技术与传统的一抗标记法不同之处在于：先用

羊抗鼠 IgG 与聚苯乙烯荧光微球标记形成荧光探针，特异性单抗间接与荧光探针偶联；试纸条上 C 线处喷涂的为兔抗羊 IgG，用于与反应溶液中游离的标记有羊抗鼠 IgG 的荧光探针结合。

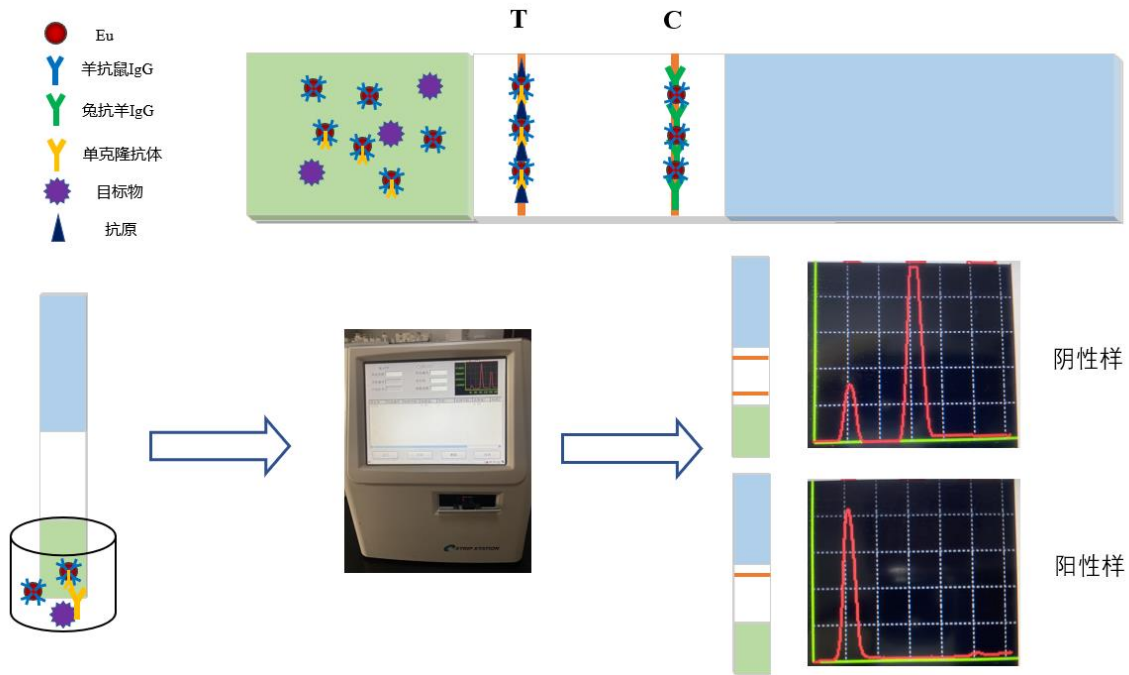


图 3.4 基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术原理

Fig. 3.4 Principle of time-resolved fluorescence immunochromatographic detection based on secondary antibody labeling

3.3.5 基于二抗标记法的呕吐毒素检测曲线建立

时间分辨荧光免疫层析检测技术是基于抗原、抗体、目标物与荧光探针间接免疫竞争反应原理建立的定性、定量检测技术。取经大型仪器测定为阴性的样品，对空白样品基质添加标准品进行检测。分别在样品提取液中加入 DON 标准品至 1~100 ng/mL，用于试纸条的检测。每个加标浓度重复进行 3 次测量，用时间分辨荧光检测仪对荧光条带读数，T 线荧光信号值与 C 线荧光信号值的比值 (T/C) 作为纵坐标值，毒素浓度的对数值为横坐标值，得到线性方程。对阴性样品进行 20 次测量，得到阴性样品的平均值 B_0 与标准偏差 SD ，将 $(LOD=B_0-3*SD)$ 带入标准曲线方程得到最低检测限。在本研究中，针对呕吐毒素建立了甲醇、玉米、饲料基质的检测曲线方程。

3.3.6 样品前处理方法的确定

玉米和饲料样品的前处理：分别称取玉米和饲料样品 5 g，研磨粉碎后分别加入 20 mL 70% 甲醇水溶液对基质提取 30 min，提取液用 0.45 μm 滤膜进行过滤，取 1 mL 滤液加入到 4 mL 反应缓释液进行 5 倍稀释，取样品稀释液过一次 0.45 μm 有机相滤膜，滤出液可以用试纸条进行检测。

3.3.7 基于二抗标记法的呕吐毒素免疫层析试纸条评价

3.3.7.1 特异性评价

使用不同种类的真菌毒素分别对试纸条进行特异性测试，每种测试进行 3 次重复。在缓释液中分别添加 AFM1、T-2、ZEN、FB1、DON 标准品，使其最终浓度分别为 20、50、5、50、100 ng/mL。另设立一组空白样品用作非目标物测试的对照，分别将四种不同种类的试纸条放在七种反应试剂中进行检测。用时间分辨荧光检测仪对试纸条 T 线荧光强度进行读数，比较 T 线信号值的差异，对检测方法的特异性进行评价。

3.3.7.2 精密度和准确性评价

取经 LC-MS/MS 检测的阴性玉米、饲料样品，并对其添加低、中、高浓度的目标物毒素，采用同一批次对应试纸条进行加标回收实验，通过测量 DON 的回收率和标准偏差，从而确定本研究的精密度和准确性。

3.3.7.3 实际样品的检测

为了验证基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术在实际样品中检测的可行性，分别用试纸条和 LC-MS/MS 对不同批次的玉米、饲料样品进行检测，将测量结果进行对比，比较快速检测方法和仪器分析方法的差异。

3.4 结果与讨论

3.4.1 抗体与聚苯乙烯荧光微球的偶联

3.4.1.1 EDC 用量的优化

分别使用 10、20、30、40 μL 的 EDC 溶液对聚苯乙烯荧光微球进行羧基活化，选最佳的 EDC 使用量。如表 3.4 所示，显示了不同的 EDC 用量对聚苯乙烯荧光微球活化效果的影响。由此可得，选用 30 μL 15 mg/mL EDC 水溶液进行聚苯乙烯荧光微球的活化。

表 3.4 EDC 用量的优化

Tab 3.4 Optimization of EDC usage

EDC 用量	10 μL	20 μL	30 μL	40 μL
乳胶状态	聚沉	少量聚沉	未聚沉	未聚沉

3.4.1.2 羊抗鼠 IgG 偶联量的优化

羊抗鼠 IgG 的偶联量可以间接影响到试纸条的灵敏度和检测范围。如图 3.5 所示，在 40~100 μL 的范围内，随着羊抗鼠 IgG 用量的增加，C 线荧光强度正比例升高，当羊抗鼠 IgG 用量超过 100 μL 之后，C 线荧光强度反而降低，证明羊抗鼠 IgG 的偶联量已经达到饱和。当羊抗鼠 IgG 用量过多时，会使单位抗体携带的荧光探针量下降。在试纸条检测过程中，荧光探针的浓度越大，单位抗体携带的荧光值越强，C 线的荧光值也会越大，在与单克隆抗体反应时可以减少单抗的损耗。所以，我们选择 100 μL 的 1 mg/mL 羊抗鼠 IgG 为最佳二抗偶联量。

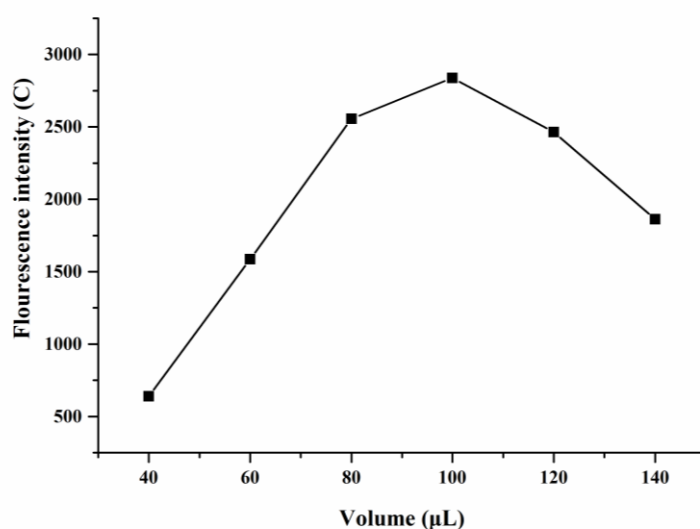


图 3.5 羊抗鼠 IgG 偶联量的优化

Fig. 3.5 Optimization of coupling amount of IgG

3.4.1.3 单克隆抗体标记量的优化

特异性单克隆抗体的用量是本方法的重要影响因素，不同量的 ab-DON 直接决定了该方法的灵敏度和检测范围。我们分别用 5、10、20、50 μg 的 ab-DON 对实验体系进行

优化。如图 3.5 所示, ab-DON 的浓度越高, 阴性条件下 T 线荧光强度越大, 这时就需要越高浓度的 DON 去消耗 ab-DON 以降低 T 线信号。在阴性样品中, 当单克隆抗体浓度越高时, 会结合越多的荧光探针, 相应的 T 线荧光强度越大; 在阳性样品中, 毒素会消耗单克隆抗体, 减少 ab-DON 与荧光探针的结合, 从而降低 T 线的荧光强度。过量的单克隆抗体量会降低检测灵敏度; 但是过少的单抗会得到较窄的检测范围, 并且会出现假阳性、假阴性的情况, 所以选择合适的单抗使用量以得到较高的检测灵敏度和合适的检测范围。由图 3.6 可知, 当 ab-DON 用量为 20 μg 时, 在样品中 DON 浓度为 100 ng/mL 时 T 线荧光信号消失, 此为最佳单克隆抗体用量。

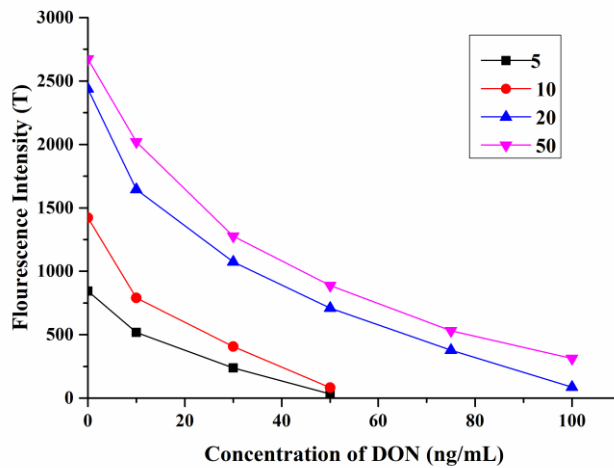


图 3.6 不同 ab-DON 用量与 T 线荧光强度

Fig. 3.6 Different DON monoclonal antibody dosages and T fluorescence intensity

3.4.2 基于二抗标记法的免疫层析反应条件优化

3.4.2.1 免疫试剂喷涂量

表 3.5 免疫试剂最佳喷涂量及荧光探针最佳组合

Tab. 3.5 Optimal spray volume of immunological reagents and optimal combination of fluorescent probes

	浓度(mg/mL)	速率($\mu\text{L}/\text{cm}$)	探针稀释倍数
DON-BSA	1.0	0.7	160 倍
兔抗羊 IgG	0.1		

经过反复试验, 得到的 DON 免疫试剂喷涂量如表 3.5 所示。DON-BSA 喷涂量设

置 1.0 mg/mL, C 线兔抗羊 IgG 喷涂量设置为 0.1 mg/mL, 喷涂速度为 0.7 $\mu\text{L}/\text{cm}$, 荧光探针的稀释倍数确定为 160 倍。在最佳组合下, 试纸条检测技术可以得到较高的检测灵敏度和合适的检测范围。

3.4.2.2 样品垫的选择

三种不同材质的样品垫用于试纸条层析实验: 玻璃纤维、Fusion 5、滤血膜, 用 Fusion 5 时荧光探针在样品垫和 NC 膜的连接处堵塞, 荧光条带不明显; 用滤血膜时荧光探针在样品垫上堵塞严重, 向上层析的探针量少, 荧光条带不明显; 用玻璃纤维时荧光探针层析较好, 荧光条带明显, 有利于间接免疫竞争反应的进行。所以选用玻璃纤维材质的样品垫用于本次实验。

3.4.2.3 反应缓释液的优化

反应缓释液的优化结果如表 3.6 所示, 蔗糖可以提高疏水性, 提高层析速度; BSA 可以封闭非特异性结合位点, 减少非特异性结合; Tween-20 可以提高反应的稳定性和免疫试剂的特异性识别能力; PVPK-30 具有较好的分散性, 消除了 NC 膜的背景色。根据实验结果选择超纯水+1% 蔗糖+0.5% BSA+2% Tween-20+1% PVPK-30 作为反应缓释液。

表 3.6 反应缓释液优化

Tab. 3.6 Reaction slow-release solution optimization

编号	配方	条带亮度	背景色
1	超纯水	暗	有
2	超纯水+1% 蔗糖	暗	有
3	超纯水+1% 蔗糖+0.5% BSA	较亮	有
4	超纯水+1% 蔗糖+0.5% BSA+2% Tween-20	亮	有
5	超纯水+1% 蔗糖+0.5% BSA+2% Tween-20+1% PVPK-30	很亮	无

3.4.2.4 反应时间的确定

如图 3.7 所示, 随着反应的进行, T/C 值逐渐变大, 当反应时间为 10 min 时, 反应进行充分, T/C 值达到最大并不在短时间内变化, 反应平衡。所以试纸条的最佳反应时间设置为 10 min。

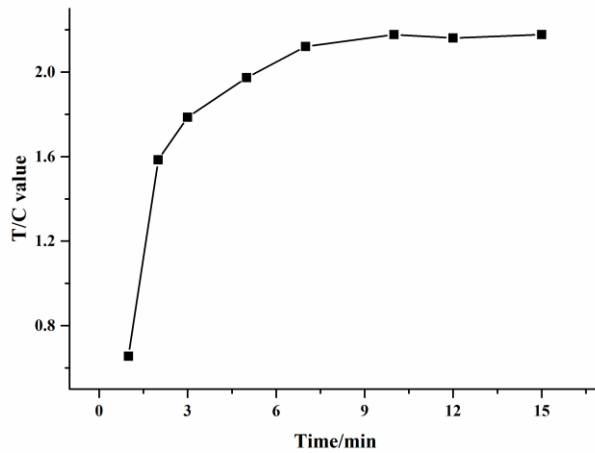


图 3.7 试纸条 T/C 值随时间变化曲线

Fig. 3.7 T/C value of test strip over time

3.4.3 基于二抗标记法的呕吐毒素检测曲线建立

对空白基质进行加标，我们建立了基于二抗标记法的 DON 检测的标准曲线。我们分别用三种不同的反应基质进行加标实验：70% 甲醇水溶液、玉米基质、饲料基质，用同一批试纸条进行检测。以毒素浓度的对数值作为 X 轴，T 线荧光强度与 C 线荧光强度的比值（T/C）作为 Y 轴得到检测曲线。

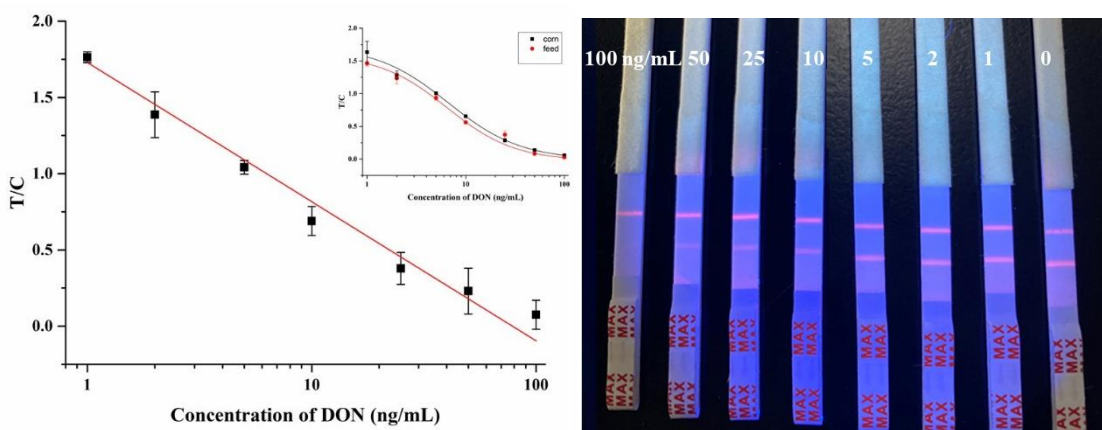


图 3.8 基于二抗标记法 DON 定量检测标准曲线与实物图

Fig. 3.8 Standard curve for quantitative detection of DON in IgG

如图 3.8 所示, DON 在甲醇基质中的检测限为 0.121 ng/mL, 在 1~100 ng/mL 内具有较好的线性范围, 标准曲线方程为 $Y=-0.91218X+1.72872$ ($R^2=0.98206$); 在玉米基质中的检测限为 0.206 ng/mL, 在饲料基质中的检测限为 0.216 ng/mL; 在实物图中可以看出, 随着 DON 浓度的升高, 试纸条上 T 线荧光强度逐渐减弱; 这是由于样品中目标物的浓度升高, 消耗的单克隆抗体量增加, 导致在 T 线上结合的荧光探针量减少, 使得 T 线亮度降低, 当目标物浓度超过最高线性浓度之后, T 线完全消失, 证明反应溶液中的单克隆抗体几乎消耗完全, 没有荧光探针在 T 线处反应。可以经过紫外灯照射的试纸条实物照片直接判定样品中 DON 含量是否超标。

3.4.4 基于二抗标记法的呕吐毒素免疫层析试纸条评价

3.4.4.1 特异性评价

如图 3.9 所示, 用试纸条分别对空白样品、AFM1、T-2、ZEN、FB1、DON 进行特异性测试。用时间分辨荧光检测仪读取 T 线荧光强度, 结果显示基于二抗法的时间分辨荧光免疫层析试纸条在 DON 的检测中具有较好的特异性。在实物图中可以看到, 当添加毒素为非目标物毒素时, T 线荧光强度相比空白样几乎没有变化, 当添加毒素为目标物毒素时, T 线条带消失。

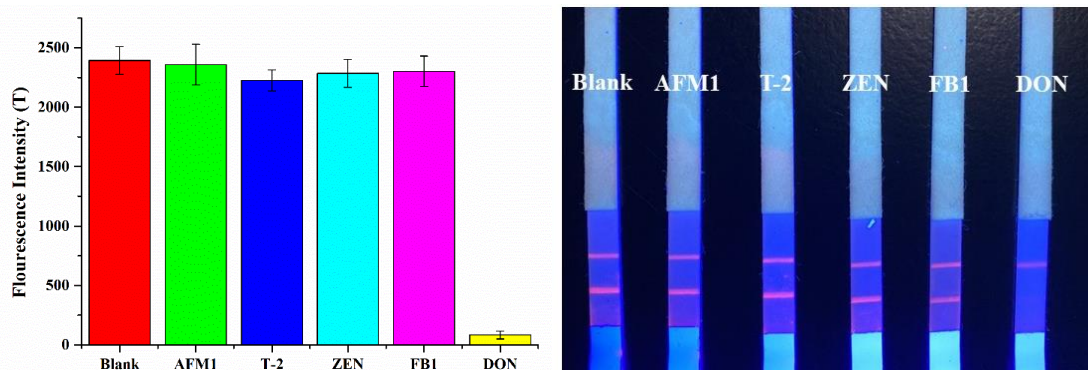


图 3.9 四种试纸条特异性评价

Fig. 3.9 Specific evaluation of four test strips

3.4.4.2 准确性和精密度评价

对玉米和饲料的样品添加高、中、低三个浓度的 DON 标准品进行准确性和精密度评价, 计算加标回收率, 考察方法的准确性; 每个浓度做 3 个计算, 计算变异系数, 考察方法的精密度。结果如表 3.7 所示, 在玉米样品中, DON 加标回收率 88.07%~121.22% 在之间, RSD 低于 10.49%; 在饲料样品中, DON 加标回收率在 94.8%~107.49% 之间,

RSD 低于 8.74%；本研究建立的针对 DON 的基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术回收率较高，精密度良好，可以满足实际检测要求。

表 3.7 玉米、饲料样品的加标回收实验

Tab. 3.7 Spike recovery experiment of corn and feed samples

样品	添加量 (ng/mL)	检测量 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
玉米	10	8.81	88.07	8.23
	50	60.61	121.22	10.49
	80	85.26	106.58	6.98
饲料	10	10.47	104.67	8.74
	50	53.74	107.49	8.28
	80	75.84	94.8	3.09

3.4.4.3 实际样品的检测

表 3.8 实际样品检测

Tab. 3.8 Actual sample detection

毒素种类	样品	LC-MS/MS (ng/mL)	试纸条 (ng/mL)	回收率(%)
DON	玉米 1	65.96	58.16	88.17
	玉米 2	33.19	26.63	80.24
	玉米 3	47.03	55.21	117.40
	饲料 1	26.97	31.02	115.02
	饲料 2	80.21	72.87	90.85
	饲料 3	55.76	52.35	93.88

将该方法应用于玉米、饲料样品的检测中，并与 LC-MS/MS 检测方法作为对比。结果如表 3.8 所示，DON 回收率在 80.24%~117.4%之间，回收结果良好。

3.4.4.4 与其他检测方法的对比

相比大型仪器分析方法，免疫层析技术具有操作简单、成本低、适用于现场检测等优点。本研究针对建立了基于二抗标记法的呕吐毒素时间分辨荧光免疫层析检测技术，

相比其他免疫层析方法，具有更低的灵敏度。表 3.9 总结了已报道的 DON 的检测方法与本方法的比较。

表 3.9 本研究与现有检测技术的对比

Tab. 3.9 Comparison of this study with existing detection technologies

真菌毒素	检测方法	LOD (ng/mL)	参考文献
DON	lateral-flow immunochromatographic assay strip	1.97~46.8	[98]
	nanogold probe-based immunochromatographic strip assay	12.5	[40]
	colloidal gold immunochromatographic assay	25	[99]
	direct competitive fluorescent-labeled immunosorbent assay	5.6	[100]
	Flower-like gold nanoparticles-based immunochromatographic test strip	5	[101]
	Immuno-chromatographic test card (DON-GICT)	40	[102]
	HPLC-UV immunochromatographic assay	4.4	[103]
	using secondary antibody-europium nanoparticle conjugates	0.121	本项研究

3.5 本章小结

1. 本研究采用将聚苯乙烯荧光微球与羊抗鼠 IgG 偶联的方式制备荧光探针，特异性单克隆抗体间接偶联到荧光探针。并对 EDC 用量、样品垫材质、反应缓释液成分、荧光探针用量、免疫试剂喷涂量、抗体偶联量等条件进行了优化，建立了基于二抗标记法的呕吐毒素时间分辨荧光免疫层析检测方法。

2. 基于二抗标记法的呕吐毒素时间分辨荧光检测技术的检测范围为 1~100 ng/mL，在甲醇基质中的最低检测限为 0.121 ng/mL，在玉米基质中的检测限为 0.206 ng/mL，在饲料基质中的检测限为 0.216 ng/mL；对玉米、饲料样品的加标回收率在 88.07%~121.22% 之间，相对标准偏差低于 10.49%；在实际样品的检测中，与 LC-MS/MS 方法对比，该方法的回收率在 80.24%~117.4% 之间。该方法具有良好的灵敏度、特异性、精密度和准确性。

3. 该方法与大型仪器分析方法相比具有操作简单、检测时间短、检测费用低的优点；

与其他快速检测方法相比具有检测的灵敏度高、节省单克隆抗体用量的优点。该方法与大型仪器分析方法相比具有较高的一致性，可以应用于大批量样品的筛查，应用前景广阔。

第四章 结论与展望

4.1 结论

本文以 AFM1 和 DON 为研究对象,建立了针对 AFM1 的电化学免疫传感器方法,针对 DON 的基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术。主要结论如下:

(1) 研究了一种基于 GO-CS 和 CeO₂-CS 纳米复合材料的电化学免疫传感器,用于牛奶中 AFM1 的检测。GO 具有很强的导电性和较大的比表面积,可以加速电子的转移并在 SPEs 上固定更多的 ab-AFM1。与 GO 相比,CeO₂ 纳米粒子的直径更小,并且 CeO₂ 可以均匀地附着在 GO 的表面;同时,CeO₂ 具有良好的氧化还原特性,可以进一步加速电子的转移,从而进一步放大传感器的电化学信号。CS 具有很强的络合能力,可以均匀分散 GO 和 CeO₂。在这里,GO-CS 和 CeO₂-CS 逐次修饰了 SPEs,以提高电化学反应信号并固定更多抗体。通过 DPV 和 CV 对 AFM1 免疫传感器的特性进行研究,对免疫传感器的反应底液 pH、ab-AFM1 浓度、反应时间等反应条件进行了优化。在最佳条件下,该免疫传感器表现出良好的特异性和高稳定性,最低检出限为 0.009 ng/mL,检测范围为 0.01~1 ng/mL 内,满足我国和世界其他国家对于 AFM1 的检测要求。此外,研制的免疫传感器已成功用于牛奶中 AFM1 的测定,加标回收率在 96.15%~104.25% 之间。相比传统的检测方法具有检测成本低、简单便捷、可以满足现场检测需求的优势。

(2) 建立了基于二抗标记法的 DON 时间分辨荧光免疫层析检测方法。本研究采用将聚苯乙烯荧光微球与羊抗鼠 IgG 偶联作为荧光探针,将特异性单克隆抗体进行间接标记,减小了单克隆抗体识别抗原能力的下降,而且单分子的单克隆抗体可以偶联多个荧光探针,大大提高了荧光信号强度,提高了检测灵敏度;实验中对 EDC 用量、样品垫材质、反应缓释液成分、荧光探针用量、免疫试剂喷涂量、抗体偶联量等条件进行了优化。基于二抗标记法的 DON 时间分辨荧光检测技术检测范围在 1~100 ng/mL 之间,在甲醇基质、玉米基质、饲料基质中的检测限分别为 0.121、0.206、0.216 ng/mL;对玉米、饲料样品的加标回收率在 88.07%~121.22% 之间,相对标准偏差低于 10.49%;在实际样品的检测中,与 LC-MS/MS 方法对比,该方法的回收率在 80.24%~117.4% 之间。该方法特异性强,灵敏度高,检测准确度和精确度良好;与大型仪器分析方法相比具有操作简单、检测时间短、检测费用低的优点,与其他快速检测方法相比具有检测的灵敏度高、节省单克隆抗体用量的优点,与 LC-MS/MS 检测结果相比具有较高的一致性,可以应用于大批量样品的筛查,应用前景广阔。

综上,本研究研制的针对 AFM1 检测的电化学免疫传感器应用了纳米复合材料,具有较高的灵敏度和合适的线性范围,在牛奶样品的检测中具有良好的回收率。针对 DON 的基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析检测技术,相比传统的一抗标记法提高了检测灵敏度,节省了单克隆抗体用量,为实现多种真菌毒素的同步检测奠定了基础。建立

的两种快速检测方法实现了对我国农产品污染中常见的 AFM1 和 DON 两种真菌毒素的快速、高灵敏、准确检测。

4.2 展望

本文建立了针对真菌毒素检测的两种快速检测方法，实现了对 AFM1 和 DON 的定性、定量检测。未来还可以从以下几个方面进行下一步深入的研究。

(1) 将基于纳米复合材料的 AFM1 免疫传感器用作研究基础，研制基于电化学信号的 AFM1 快速检测仪；

(2) 利用基于二抗标记法的时间分辨荧光免疫层析技术对 T-2 毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素 B1 等多种镰刀菌毒素的检测中，建立多种真菌毒素的同步检测技术；

(3) 将基于二抗标记法的免疫层析技术原理应用到胶体金检测技术中。

参考文献

- [1] 欧阳岁燕. 粮油中真菌毒素量子点纳米球同步检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院, 2017.
- [2] 赵玉洁. 真菌毒素限量标准及检测方法分析[J]. 食品安全导刊, 2019(18): 115.
- [3] 尚智慧. 能力验证中粮油真菌毒素检测技术研究进展[J]. 粮食科技与经济, 2019, 44(11): 63-67.
- [4] Wang X, Niessner R, Tang D, et al. Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 912: 10-23.
- [5] Kensler T W, Roebuck B D, Wogan G N, et al. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology[J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 120: 28-48.
- [6] 吴坤坦, 齐德生. 黄曲霉毒素 B1 在乳畜中的转化[J]. 饲料工业, 2018, 39(20): 59-64.
- [7] Vicente S, Pok P S, Londoño V A G, et al. Aflatoxins distribution in fractions derived from tofu production[J]. *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance*, 2019, 36: 1559-1566.
- [8] Gurban A M, Epure P, Oancea F, et al. Achievements and prospects in electrochemical-based biosensing platforms for aflatoxin M1 detection in milk and dairy products[J]. *Sensors*, 2017, 17: 2951-2972.
- [9] Prandini A, Tansini G, Sigolo S, et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47: 984-991.
- [10] Alshannaq A, Yu J-H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14: 632-652.
- [11] Aissa S B, Mars A, Catanante G, et al. Design of a redox-active surface for ultrasensitive redox capacitive aptasensing of aflatoxin M1 in milk[J]. *Talanta*, 2019, 195: 525-532.
- [12] Marchese S, Polo A, Ariano A, et al. Aflatoxin B1 and M1: biological properties and their involvement in cancer development[J]. *Toxins*, 2018, 10: 214-233.
- [13] Sharma A, Goud K Y, Hayat A, et al. Marty. Recent advances in electrochemical-based sensing platforms for aflatoxins detection[J]. *Chemosensors*, 2017, 5: 1-15.
- [14] 孙思, 王安波, 杨梅, 等. 生鲜乳中黄曲霉毒素 M1 检测技术研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2017(04): 12-13.
- [15] International agency for research on cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene; IARC: Lyon, France, 2002.
- [16] 梁杰. 奶牛鲜乳中黄曲霉毒素 M1 的危害及两种检测方法[J]. 现代畜牧科技, 2017(4): 154.
- [17] Official journal of the European Communities, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text No.1881 with EEA relevance), 2006, 5-24.
- [18] 吴琴燕, 赵飞, 杨红福, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测麦粒中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物[J]. 分析实验室: 1-8.
- [19] 靳梦瞳, 王建华, 林善海, 等. 室温下麦粒中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)及其隐蔽型(D3G)毒素累积分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 132-136+141.
- [20] 李鑫. 基于免疫分析的农产品真菌毒素混合污染同步检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院, 2014.
- [21] 税丕容. 食品中真菌毒素的污染与检测研究进展[J]. 现代食品, 2018(13): 130-131+136.
- [22] 张道宏. 黄曲霉毒素杂交瘤细胞株的选育及免疫层析检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院, 2011.
- [23] 赵晶晶, 张振华, 刘青. 粮油中真菌毒素检测技术及其应用解析[J]. 现代食品, 2019(12): 98-100.
- [24] 王代强, 陈岩. 谷物、饲料中霉菌毒素的特点与检测方法[J]. 养殖技术顾问, 2009(11): 49.
- [25] 吴丹. 黄曲霉毒素在粮食和食品中的危害及防治[J]. 粮食加工, 2007(03): 91-94.
- [26] 翟晓瑞, 李燕. 乳品中黄曲霉毒素 M1 残留检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(06): 2309-2313.
- [27] 王玉娇, 聂继云, 闫震, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测干果中 16 种真菌毒素[J]. 分析化学, 2017, 45(10): 1556-1563.
- [28] 李晓丹. 真菌毒素检测技术研究概述[J]. 现代食品, 2018(12): 93-97+101.
- [29] 马良. 黄曲霉毒素 B1 高灵敏检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院, 2007.

- [30] 陈芳芳. 高效液相色谱法同时检测花生中 6 种真菌毒素的方法及应用研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [31] 褚璇. 谷物霉菌的高光谱成像辨识方法和霉变玉米籽粒检测方法研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [32] 沈飞, 吴启芳, 姜大峰, 等. 基于电子鼻技术的糙米黄曲霉毒素污染快速检测方法研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(06): 146-151.
- [33] 史春悦. 食品中黄曲霉毒素检测技术的研究进展[J]. 农产品加工, 2019(14): 86-89.
- [34] 张莉蕴, 王延新, 王玉可, 等. 电化学生物传感器在真菌毒素检测中的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(09): 2769-2777.
- [35] 娄亚坤, 柴茂, 苑述友, 等. 真菌毒素胶体金检测试剂条质量研究[J]. 畜禽业, 2018, 29(10): 4-5.
- [36] 沙志聪, 其木格, 贾增艳, 等. 量子点标记免疫层析试纸条快速检测谷物中赭曲霉毒素 A[J]. 食品工业科技, 2019, 40(17): 191-195+190.
- [37] 肖理文, 徐秀, 赵皖, 等. 基于时间分辨荧光纳米微球的玉米赤霉烯酮快速定量检测试纸条的研制及性能研究[J]. 粮食加工, 2017, 42(05): 37-39.
- [38] 王莹. 同时检测多种真菌毒素的生物芯片技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [39] Guan D, Li P W, Zhang Q, et al. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk and infant milk products[J]. Food Chemistry, 2011(125): 1359-1364.
- [40] Yan T T, Zhang Q, Wang D, et al. Determination of deoxynivalenol by ELISA and immunochromatographic strip assay based on monoclonal antibodies[J]. Toxin Reviews, 2019.
- [41] 黄品萱. 麦芽中真菌毒素的电化学免疫传感器检测新方法的建立及 LC-MS/MS 检测研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2019.
- [42] 张莉蕴, 王延新, 王玉可, 等. 电化学生物传感器在真菌毒素检测中的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(09): 2769-2777.
- [43] Srivastava S, Kumarb V, Aroraa K, et al. Antibody Conjugated Metal Nanoparticles Decorated Graphene Sheets for Mycotoxin Sensor[J]. RSC Advances, 2016(6): 56518-56526.
- [44] Costa M P, Frías I A M, Andrade C A S, et al. Impedimetric immunoassay for aflatoxin B1 using a cysteine modified gold electrode with covalently immobilized carbon nanotubes[J]. Microchim Acta, 2017(184): 3205-3213.
- [45] Regiart M, Pereira S V, Spotorno V G, et al. Food safety control of zeranol through voltammetric immunosensing on Au-Pt bimetallic nanoparticle surfaces[J]. Analyst, 2014, 139: 4702-4709.
- [46] Kaushik A, Solanki P R, Ansari A A, et al. A nanostructured cerium oxide film-based immunosensor for mycotoxin detection[J]. Nanotechnology, 2009, 20: 055105.
- [47] 吴成辉. 黄曲霉毒素 M1 免疫层析检测方法的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [48] 杨青青. 食用植物油外源污染物辣椒素及黄曲霉毒素免疫检测技术研究[D]. 武汉: 中国农业科学院, 2016.
- [49] 唐晓倩, 柯艳妮, 李培武, 等. 玉米赤霉烯酮免疫层析试纸条的研制及应用[J]. 化学试剂, 2015, 37(08): 673-677+746.
- [50] 任美玲. 量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测玉米中的黄曲霉毒素 B1[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- [51] 周耀锋, 熊斯诚, 江湖, 等. 量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测玉米中赭曲霉毒素 A[J]. 分析化学, 2015, 43(12): 1837-1843.
- [52] Ouyang S Y, Zhang Z W, He T, et al. An on-site, ultra-sensitive, quantitative sensing method for the determination of total aflatoxin in peanut and rice based on quantum dot nanobeads strip[J]. Toxins, 2017, 9(4): 137-152.
- [53] 杨眈, 王作欢, 蒋小武, 等. 基于量子点标记的赭曲霉毒素 A 快速、高灵敏荧光免疫层析检测方法的建立及应用[J]. 菌物学报, 2019, 38(06): 1003-1013.
- [54] 张兆威, 李培武, 张奇, 等. 农产品中黄曲霉毒素的时间分辨荧光免疫层析快速检测技术研究[J]. 中国农业科学, 2014, 47(18): 3668-3674.
- [55] 周梦婕, 李小盼, 代荣阳, 等. 免疫层析试纸条检测技术的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(22): 3382-3386.
- [56] 辛甜甜, 郭松林, 王艺磊, 等. 时间分辨荧光免疫分析的新进展[J]. 理化检验(化学分册), 2017,

- 53(01): 112-118.
- [57] 左晓维. 粮食中真菌毒素的荧光定量免疫层析技术研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [58] 王文珺, 刘磊, 叶金, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫检测体系适用性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3490-3496.
- [59] Kloth K, Johnsen M R, Didier A, et al. A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk[J]. *Analyst*, 2009, 134: 1433-1439.
- [60] Soares R R G, Santos D R, Chu V, et al. A point-of-use microfluidic device with integrated photodetector array for immunoassay multiplexing: detection of a panel of mycotoxins in multiple samples[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 87(15): 823-831.
- [61] Shephard G. S. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty first century[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395: 1215-1224.
- [62] Cavaliere C, Foglia P, Pastorini E, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk: comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources[J]. *J of Chromatography A*, 2006, 1101: 69-78.
- [63] Chavarria G, Chinchilla F G, Cascante M A, et al. Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour creamsamples from costa rica using enzyme-assisted extraction and HPLC[J]. *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance*, 2015, 8: 128-135.
- [64] Daly S J, Keating G J, Dillon P P, et al. Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B1[J]. *Journal of agricultural and food Chemistry*, 2000, 48: 5097-5104.
- [65] Wang Y, Dostalek J, Knoll W. Long range surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy for the detection of aflatoxin M1 in milk[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24: 2264-2267.
- [66] Neagu D, Perrino S, Micheli L, et al. Aflatoxin M1 determination and stability study in milk samples using a screen-printed 96-well electrochemical microplate[J]. *International dairy journal*, 2009, 19: 753-758.
- [67] Pei S C, Zhang Y Y, Eremin S A, et al. Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies[J]. *Food Control*, 2009, 20: 1080-1085.
- [68] Goud K. Y, Kailasa S K, Kumar V, et al. Progress on nanostructured electrochemical sensors and their recognition elements for detection of mycotoxins: A review[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 121: 205-222.
- [69] Wei P J, Zhu Z G, Song R M, et al. An ionimprinted sensor based on chitosan-graphene oxide composite polymer modified glassy carbon electrode for environmental sensing application[J]. *Electrochimica Acta*, 2019, 317: 93-101.
- [70] Jiao Y C, Hou W J, Fu J Y, et al. A nanostructured electrochemical aptasensor for highly sensitive detection of chlorpyrifos[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 243: 1164-1170.
- [71] Shehata M, Azab S M, Fekry A M. May glutathione and graphene oxide enhance the electrochemical detection of caffeine on carbon paste sensor in aqueous and surfactant media for beverage analysis[J]. *Synthetic Metals*, 2019, 256: 116-122.
- [72] Fu J Y, Zhang Q Q, Shi Z Q, et al. Sensitive acetylcholinesterase biosensor modified with cerium oxide/mesoporous carbon for organophosphorus pesticides residues detection using screen-printed carbon electrode[J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2018, 13: 9231-9241.
- [73] Nguyet N T, Thu V V, T H, L, et al. Simple Label-Free DNA Sensor Based on CeO₂ Nanorods Decorated with Ppy Nanoparticles[J]. *Journal of Electronic Materials*, 2019, 48: 6231-6239.
- [74] Kaushik A, Solanki P R, Ansari A A, et al. A nanostructured cerium oxide film-based immunosensor for mycotoxin detection[J]. *Nanotechnology*, 2009, 20: 55105-55113.
- [75] Hou W J, Zhang Q Q, Dong H W, et al. Acetylcholinesterase biosensor modified with ATO/OMC for detecting organophosphorus pesticides[J]. *New Journal of Chemistry*, 2018, 43: 946-952.
- [76] Sun X, Zhai C, Wang X Y. Amperometric acetylcholinesterase biosensor based on O-carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite by in situ synthesis method[J]. *IEEE Sensors Journal*, 2013, 13: 172-179.
- [77] Micheli L, Grecco R, Badea M, et al. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005, 21: 588-596.
- [78] 张前前. 基于丝网印刷电极酶传感器检测有机磷农药方法的研究及应用[D]. 淄博: 山东理工大学, 2017.
- [79] 焦艳翠. 基于适配体电化学生物传感器的有机磷农药检测方法研究[D]. 淄博: 山东理工大学,

- 2017.
- [80] Xu Q C, Liu Z N, Fu J Y, et al. Ratiometric electrochemical aptasensor based on ferrocene and carbon nanofibers for highly specific detection of tetracycline residues[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 14729-14739.
- [81] Hong Y L, Ryub S, Jeong H S, et al. Surface functionalization effect of graphene oxide on its liquid crystalline and assembly behaviors[J]. *Applied Surface Science*, 2019, 480: 514-522.
- [82] Dramoua P, Itatahinea A, Fizira M, et al. Preparation of novel molecularly imprinted magnetic graphene oxide and their application for quercetin determination[J]. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2019, 1124: 273-283.
- [83] Yao Y, Wang G X, Chu G L, et al. The development of a novel biosensor based on gold nanocages/graphene oxide-chitosan modified acetylcholinesterase for organophosphorus pesticide detection[J]. *New Journal of Chemistry*, 2019, 43: 13816-13826.
- [84] Thakur S, Patil P. Rapid synthesis of cerium oxide nanoparticles with superior humidity-sensing performance[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 194: 260-268.
- [85] Sharma A, Kumar P S. Synthesis and Characterization of CeO-ZnO Nanocomposites[J]. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2012, 2(3): 82-85.
- [86] Pop O L, Diaconasa Z, Mesaros A, et al. FT-IR Studies of Cerium Oxide Nanoparticles and Natural Zeolite Materials[J]. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 2015, 72(1): 50-55.
- [87] Perez E, Marco F M, Peinado P M, et al. Evaluation of different competitive immunoassays for aflatoxin M1 determination in milk samples by means of inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1049: 10-19.
- [88] Vdovenko M M, Lu C C, Yu F Y. Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin M1 in milk[J]. *Food Chemistry*, 2014, 158: 310-314.
- [89] Tang X Q, Zhang Z W, Li P W. Sample-pretreatment-free based high sensitive determination of aflatoxin M1 in raw milk using a time-resolved fluorescent competitive immunochromatographic assay[J]. *RSC Advances*, 2015, 5: 558-564.
- [90] Chen W L, Hsu T F, Chen C Y. Measurement of aflatoxin M1 in milk by ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Journal of AOAC International*, 2011, 94: 872-877.
- [91] Wang X P, Li P W. Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPEUPLC-MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 897-904.
- [92] Badea M, Micheli L, Messia M C, et al. Aflatoxin M1 determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 520: 141-148.
- [93] Li G H, Xu L, Wu W Q, et al. On-Site Ultrasensitive Detection Paper for Multiclass Chemical Contaminants via Universal Bridge-Antibody Labeling: Mycotoxin and Illegal Additives in Milk as an Example[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91: 1968-1973.
- [94] Li H, Yang D B, Li P W, et al. Nanoparticles-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor for Highly Sensitive Detection of Aflatoxin M1 in Milk[J]. *Toxins*, 2017, 9: 318-328.
- [95] Nguyen B H, Tran L D, Do Q P, et al. Label-free detection of aflatoxin M1 with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor[J]. *Materials Science and Engineering C*, 2013, 33: 2229-2234.
- [96] Majdinasab M, Zareian M, Zhang Q, et al. Development of a new format of competitive immunochromatographic assay using secondary antibody-europium nanoparticle conjugates for ultrasensitive and quantitative determination of ochratoxin A[J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 721-729.
- [97] 李广华. 乳制品中三聚氰胺和黄曲霉毒素M1 高灵敏快速检测技术的研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2018.
- [98] Kong D Z, Wu X L, Li Y, et al. Ultrasensitive and eco-friendly immunoassays based monoclonal antibody for detection of deoxynivalenol in cereal and feed samples[J]. *Food Chemistry*, 2019, 270: 130-137.
- [99] Xu Y, Yang H W, Huang Z B, 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 Chemistry*, 2018, 268: 242-248.
- [100] Zhang X Y, Yu X Z, Wang J Y, et al. One-Step Core/Multishell Quantum Dots-Based Fluoroimmunoassay for Screening of Deoxynivalenol in Maize, *Food Analytical Methods*[J]. 2018, 11: 2569-2578.
- [101] Huang X Y, Huang T, Li X J, et al. Flower-like gold nanoparticles-based immunochromatographic test strip for rapid simultaneous detection of fumonisin B1 and deoxynivalenol in Chinese traditional

- medicine[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 177: 112895-112904.
- [102] Jin Y, Liu R R, Zhu L X, et al. Quantitative detection of Deoxynivalenol in food and feed based on nanogold immunochromatographic assay[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 242: 042017-042023.
- [103] Lee S Y, Woo S Y, Malachová A, et al. Simple validated method for simultaneous determination of deoxynivalenol, nivalenol, and their 3- β -D-glucosides in baby formula and Korean rice wine via HPLC-UV with immunoaffinity cleanup[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2019, 36: 964-975.

在读期间成果

1. 发表相关研究论文:

- [1] **Xingshuang An**, Xiaojie Shi, Hui Zhang, Yao Yao, Guangxian Wang, Qingqing Yang*, Lianming Xia, Xia Sun. An electrochemical immunosensor based on a combined amplification strategy with the GO-CS/CeO₂-CS nanocomposite for the detection of aflatoxin M₁, *New Journal of Chemistry*, 2020, 44: 1362-1370. (SCI三区, IF=3.09);
- [2] Jiayun Fu, **Xingshuang An**, Yao Yao, Yemin Guo*, Xia Sun*. Electrochemical aptasensor based on one step co-electrodeposition of aptamer and GO-CuNPs nanocomposite for organophosphorus pesticide detection, *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2019, 287: 503-509. (SCI一区, IF=5.667);
- [3] Xiaojie Shi, **Xingshuang An**, Qingxue Zhao, Huimin Liu, Lianming Xia*, Xia Sun*, Yemin Guo*. State-of-the-Art Internet of Things in Protected Agriculture, *Sensors*, 2019, 19: 1833-1857. (SCI三区, IF=3.72);
- [4] Jiayun Fu, Yao Yao, **Xingshuang An**, Guangxian Wang, Yemin Guo*, Xia Sun*, Falan Li. Voltammetric determination of organophosphorus pesticides using a hairpin aptamer immobilized in a graphene oxide-chitosan composite, *Microchimica Acta*, 2020, 187: 36-44. (SCI二区, IF=5.22);
- [5] Yao Yao, Guangxian Wang, Guanglei Chu, **Xingshuang An**, Yemin Guo*, Xia Sun*. The development of a novel biosensor based on gold nanocages/graphene oxide-chitosan modified acetylcholinesterase for organophosphorus pesticide detection, *New Journal of Chemistry*, 2019, 43: 13816-13826. (SCI三区, IF=3.09);
- [6] Guangxian Wang, Jianfei Sun, Yao Yao, **Xingshuang An**, Hui Zhang, Guanglei Chu, Shui Jiang, Yemin Guo*, Xia Sun, Yuan Liu. Detection of inosine monophosphate (IMP) in meat using double enzymes sensor, *Food Analytical Methods*, 2020, 13: 420-432. (SCI二区, IF=2.48);
- [7] Guanglei Chu, Guangxian Wang, Yao Yao, **Xingshuang An**, Yanyan Zhang*. A novel non-enzyme sensor based on a PDDA-RGO/Pt NPs nanocomposite for electrochemical detection of ascorbic acid, *International Journal of Electrochemical Science*, 2019, 14: 11406-11418. (SCI四区, IF=1.36).

2. 硕士期间主要获奖:

- [1] 2020 年山东省优秀毕业生
- [2] 2020 年山东理工大学优秀学生
- [3] 2020 年山东理工大学优秀成果单项奖
- [4] 2019 年山东理工大学研究生一等学业奖学金
- [5] 2019 年山东理工大科学汇奖学金
- [6] 2019 年山东理工大学第六届“春天的诗会”二等奖
- [7] 2019 年山东理工大学优秀团干部
- [8] 2018 年山东理工大学研究生二等学业奖学金
- [9] 2018 年山东理工大学优秀学生干部
- [10] 2018 年山东理工大学优秀团干部
- [11] 2017 年山东理工大学研究生二等学业奖学金
- [12] 2017 年中国农业工程年会“优秀志愿者”

致谢

时光荏苒，岁月如梭。三年的硕士求学生涯转瞬即逝，一路走来感触良深。在即将毕业之际，向所有帮助我、引导我、教育我、陪伴我的人致以最诚挚的感谢和深深的祝福。

衷心感谢我的导师孙霞教授，感谢您对我的细心教导和热忱帮助。在论文选题、实验实施到写作完成的整个过程中倾注了您大量的心血，您治学态度严谨，学术知识渊博，对论文批改认真，提出许多中肯的意见，您严于律己、宽容待人的处世态度也使我受益良多。本人研究生期间的学习与生活得到了郭业民教授的悉心指导和帮助，您知识渊博，工作认真负责，对学生严格要求，在硕士生涯的学习工作生活中给我提出许多的建设性建议。感谢杨青青老师对我的学习上帮助和求学规划的指导，本文所有研究均得到了杨老师的悉心指导。感谢夏连明副教授在求学期间的陪伴，亦师亦友亦亲人；感谢课题组赵文苹副教授、赵继成老师、张妍妍老师、李发兰老师对我学业和生活上的帮助。感谢曹玉霞书记、高坤书记、周丽姐书记、苏新勇老师等在我求学期间给予我学生干部工作指导的领导老师们。

感谢中国农业科学院油料作物研究所李培武院士团队为我提供的优秀科研平台，让我拥有了实现梦想的机会。李培武院士严谨求实、奋力拼搏、追求完美的学术作风，对于科学的探索精神始终感染、激励着我。感谢张奇研究员对本文实验设计以及科技论文上事无巨细、亲力亲为的指导。感谢张文主任对我在学习和生活上的帮助。感谢质检中心王督老师、李慧老师、胡小风老师、唐晓倩老师、张兆威老师对我的耐心指导。感谢质检中心陈小媚、甘冬生、姜俊、王忠正、贾明明、陈琳等所有在我实习期间给予我的帮助的老师。

感谢山东理工大学史召强、符家昀、侯文杰、刘增宁等师兄师姐在我实验初期给予的指导，让我学会使用仪器、注意实验细节；感谢褚光雷、李少川、王广现、姚瑶、赵德楠、于兴瑞、刘洋成等硕士同学一直以来的陪伴，相信我们的友谊还将继续下去。感谢硕 1706 班同学们一直以来的支持；感谢张慧、董浩玮、赵庆雪、程淑婷等师妹对我的帮助。感谢中国农科院油料所李雪、任显凤、杨瑞楠、王晓、窦心静、孙迪等师姐给予我的帮助和鼓励，感谢质检中心的同学师弟师妹们，与你们相处的时光总是快乐的。感谢农工学院研究生篮球队给予我支持、帮助和鼓励，想念和你们一起在赛场上拼搏的日子。

感谢我的家人，二十载漫漫求学路，你们给了我美好的家庭和幸福的人生，是我拼搏的动力，也是我的精神支柱。

感谢篇幅有限无法一一提及的老师、朋友们，感谢你们的出现。

本论文在山东理工大学、山东省蔬菜质量安全溯源工程技术研究中心、中国农业科学院油料作物研究所、农业部生物毒素重点实验室完成。最后，感谢各位专家、老师对我的论文进行评阅。

特别致谢：2020 年是特殊的一年，一场新冠疫情牵动了全国人民的心，感谢在这场疫情防控攻坚战中奋战的伟大医务工作者们，你们的责任与担当换来祖国安康，向你们致敬！

安兴爽

2020 年 4 月