

杨永坛研究员主持“粮油污染物检测及控制”专栏文章之一

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.05.019

刘洪美, 沈文洁, 轩志宏, 等. 基于适配体亲和磁珠的黄曲霉毒素 B₁ 单样本前处理试剂盒的制备及应用[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(5): 160-169.
LIU H M, SHEN W J, XUAN Z H, et al. Preparation and application of aflatoxin B₁ single sample pretreatment kit based on aptamer affinity magnetic beads[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(5): 160-169.

基于适配体亲和磁珠的黄曲霉毒素 B₁ 单样本前处理试剂盒的制备及应用

刘洪美¹, 沈文洁², 轩志宏¹, 倪保霞¹, 石亚坤³, 叶金¹

- (1. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮油质量安全研究所, 北京 100037;
2. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093;
3. 河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 适配体共价偶联于磁珠表面制备适配体亲和磁珠 (aptamer affinity magnetic beads, AAMB), 将 AAMB、孵育液、洗涤液和洗脱液预封装于试剂条中开发了 AFB₁ 单样本前处理试剂盒, 借助真菌毒素全自动净化仪实现了 AFB₁ 前处理的自动化, 使用超高效液相色谱仪对洗脱液中 AFB₁ 的含量进行测定。通过优化磁珠粒径、适配体间接臂长度、适配体亲和磁珠用量、孵育液体积确定了 AAMB 的制备条件以及 AFB₁ 单样本前处理试剂盒的使用条件, 对比了手动和自动两种前处理方式下 AAMB 回收率的差异。在优化条件下, AFB₁ 的检出限 (limit of detection, LOD) 为 0.6 ng/mL, 玉米和小麦中低、中、高三个水平的加标回收率在 92.8%~110.1%之间, 日内精密度的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 小于 5.1%, 日间精密度的 RSD 为 6.7%, 具有良好的灵敏度、准确性和重复性; 粮油基质 (玉米、糙米、花生油和花生酱) 中 AFB₁ 成分国家有证标准物质的测定结果在其扩展范围内, 具有良好的基质适用性。开发的单样本前处理试剂盒借助真菌毒素全自动净化仪仅需一步操作即可在 20 min 内自动完成 10 个样品的前处理, 具有时间短、通量高、批次间差异小的优点, 在真菌毒素定量检测方面具有良好的应用前景, 为开发针对其它靶标的自动化前处理方法奠定了基础。

关键词: 核酸适配体; 黄曲霉毒素 B₁; 磁珠; 粮油; 单样本前处理试剂盒

中图分类号: TS207; Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2023)05-0160-10

网络首发时间: 2023-09-11 10:16:15

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.ts.20230908.1008.006>

收稿日期: 2023-06-02

基金项目: 中国科协青年人才托举工程项目(2021QNRC001); 国家自然科学基金 (32202157); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZX2228)

Supported by: China Association For Science and Technology Youth Talent Lifting Project (No. 2021QNRC001); National Natural Science Foundation of China (No. 32202157); Fundamental Research Funds of the Central Research Institutes (No. ZX2228)

作者简介: 刘洪美, 女, 1989 年出生, 博士, 副研究员, 研究方向为粮油质量安全检测。E-mail: lhm@ags.ac.cn。

本专栏背景详细介绍见 PC28。

Preparation and Application of Aflatoxin B₁ Single Sample Pretreatment Kit Based on Aptamer Affinity Magnetic Beads

LIU Hong-mei¹, SHEN Wen-jie², XUAN Zhi-hong¹, NI Bao-xia¹, SHI Ya-kun³, YE Jin¹

(1. Institute of Grain and Oil Quality and Safety, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China; 2. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 3. College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: In this study, aflatoxin B₁ (AFB₁) aptamers were covalently coupled on the surface of magnetic beads to prepare aptamer affinity magnetic beads (AAMBs). Furthermore, the AAMBs, incubation solution, washing solution and eluate were pre-encapsulated in reagent strips to develop a single sample pretreatment kit of AFB₁. The automatic pretreatment of AFB₁ was realized through the automatic mycotoxin purifier. The content of AFB₁ in the eluate was determined by ultra high performance liquid chromatography (UPLC). The preparation conditions of AAMB and the use conditions of AFB₁ single sample pretreatment kit were determined by optimizing the particle size of magnetic beads, the indirect arm length of aptamer, the amount of AAMB, and the volume of incubation solution. Recoveries was compared by manual and automatic pretreatment methods. Under the optimized conditions, the limit of detection (LOD) was 25 pg/mL, and the spiked recoveries at low, medium and high levels in corn and wheat ranged from 92.8% to 110.1%, with the relative standard deviation (RSD) of intra-day precision less than 5.1% and the RSD of 6.7% in term of inter-day precision, which showed good sensitivity, accuracy and repeatability. The results of AFB₁ in the national certified reference materials of grain and oil substrates (corn, brown rice, peanut oil and peanut butter) were within their extended uncertainty range. The single sample pretreatment kit developed could automatically complete the pretreatment of 10 samples within 20 min with the aid of mycotoxin automated purification instrument. This method has the advantages of short time, high throughput, small batch-to-batch variation and no need of cold chain storage and transportation. It has a good application prospect in the quantitative detection of mycotoxins, and could lay a foundation for the development of automatic pretreatment methods for other targets.

Key words: aptamer; Aflatoxins B₁; magnetic bead; grain and oil; single sample pre-treatment kit

黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 是由真菌属的黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 产生的有毒次生代谢物^[1], 属于二呋喃环和香豆素环组成的二呋喃酮萜酮的衍生物^[2]。AFB₁ 作为真菌毒素的代表种类之一, 是迄今为止发现的最强致癌物^[3], 已被国际癌症研究机构 (IARC) 列为 I 类致癌物^[4], 广泛存在于粮食、坚果、棉籽和其他农产品以及饲料中^[5]。因此许多国家和组织设定了 AFB₁ 残留的最高限量标准, 我国对小麦、大麦及其制品中 AFB₁ 残留量最高限量为 5 μg/kg, 玉米、玉米面和玉米制品中 AFB₁ 残留量最高限量为 20 μg/kg^[6]; 欧盟规定所有谷物和谷物制品中的 AFB₁ 的最大残留限

量为 2 μg/kg^[7]。由于农产品的基质较为复杂, 组成也各不相同, 因此, 对样品中的痕量 AFB₁ 进行富集净化, 对保障检测的准确性和可靠性至关重要^[8]。

目前, 黄曲霉毒素的前处理方法主要有免疫亲和柱法^[9]、固相萃取柱法^[10]、QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) 法^[11]等, 其中免疫亲和柱法应用最为广泛, 已经被国家标准、行业标准、中国药典、ISO 标准等国内外标准收录, 但是存在操作复杂、耗时长、成本高等缺点。近年来, 本团队建立了基于免疫磁珠 (IMB) 的真菌毒素前处理方法并在粮油中得到初步应用^[12], 具有操作简单、批量处理、耗

时短和净化效果良好等优点,并且将免疫磁珠与自动化仪器相结合可减少人工操作带来的误差,提高检测效率及准确性。

随着生物技术的发展,核酸适配体在分析和诊断领域广泛应用,核酸适配体是通过指数富集配体系统进化(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术筛选得到的一段单链寡核苷酸序列(DNA或RNA)^[13],能够与金属离子、药物、有机小化合物、代谢产物、蛋白质甚至细胞等多种靶标分子高亲和力、高特异性结合^[14-17],并且与抗体相比,具有易合成、易修饰、热稳定性高、可长期保存、批次间差异小等优势。

基于此,本研究综合利用磁珠和核酸适配体的优良性能,以超顺磁性磁珠为载体,以高亲和力、高特异性核酸适配体为识别原件,首先将核酸适配体通过酰胺键共价固定在磁珠表面制备AFB₁适配体亲和磁珠(aptamer affinity beads, AAMB),并基于AAMB进一步开发了AFB₁单样本前处理试剂盒,借助真菌毒素全自动净化仪,适配体亲和磁珠依次进入①孔、③孔、④孔、⑤孔和②孔,完成AAMB的孵育、洗涤和洗脱流程,从而实现样品中的AFB₁的净化和富集,结合UPLC-FLD实现样品中AFB₁免衍生、高效准确定量检测。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

4-吗啡磺酸(MES)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydro, EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxy succinimide, NHS):美国Sigma-Aldrich公司;经HPLC纯化的黄曲霉毒素B₁适配体序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列如下^[18-19]:5'-GTTGGGCACGTGT-TGTCTCTCTGTGTCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCACA-3',并将其进行氨基修饰或荧光素(FAM)修饰;乙腈(色谱纯):美国Fisher公司;羧基聚合物磁珠(2 μm, 10 mg/mL)和羧基琼脂糖磁珠(30~150 μm, 20 mg/mL):苏州海狸生物医学工

程有限公司;黄曲霉毒素B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素G₁(AFG₁)、黄曲霉毒素G₂(AFG₂)、赭曲霉毒素A(OTA)标准品溶液:国家粮食和物资储备局科学研究院提供;0.22 μm针孔式滤器(PTFE):由颇尔(中国)有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、氯化钠(NaCl)、氯化镁(MgCl₂)、盐酸(HCl)、氯化钾(KCl):北京化工厂;吐温-20:天津市光复精细化工研究所;吗啉乙磺酸一水合物(MES, 纯度≥99%):上海麦克林生化科技有限公司;甘氨酸(Gly, 纯度≥99%):北京索莱宝科技有限公司;实验用水:Millipore公司的Milli-Q系统净化而得;玉米粉、小麦粉等样品:本地超市。

结合缓冲液(Binding buffer, BB, pH 7.5)中含有10 mM Tris、120 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl₂。洗涤缓冲液(Washing buffer, WB)中含有10 mM Tris、1 mM EDTA、0.1% Tween 20, 4 °C保存,备用。

适配体序列用结合缓冲液配制成10 μmol/L的储备液,使用前于95 °C加热5 min,之后缓慢冷却至室温,备用。

所有实验室玻璃器皿及受黄曲霉毒素污染的废弃物均在特定容器内以5%次氯酸钠溶液浸泡24 h以上,然后再用洗涤剂及清水洗涤^[9]。

1.2 仪器设备

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM, 莱卡TCS SP8):徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;电子天平(SQP):赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;多管漩涡混合仪(MTV-100):杭州奥盛仪器有限公司;离心机(H1850):湖南湘仪仪器有限公司;试管旋转混匀仪:赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;BEH C18色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和超高效液相色谱仪(Waters Acquity UPLC),配有自动进样器、四元泵、荧光检测器(FLD):美国Waters公司;Chemi DOCTM XRS+化学发光凝胶成像系统、Mini-PROTEAN @tetra电泳设备:美国Bio-Rad公司。

1.3 适配体亲和磁珠的制备

参考已报道的适配体亲和柱的制备方法^[5], 将氨基修饰的适配体与羧基修饰的磁珠共价偶联制备适配体亲和磁珠。取 20 mg 充分混匀后的羧基琼脂糖磁珠, 磁分离去除上清液后, 依次加入 200 μ L MES 缓冲液 (10 mM, pH 5.0)、10 μ L 新鲜配制的 EDC 溶液 (10 mg/mL) 和 10 μ L NHS 溶液, 置于试管旋转混匀仪 (20 rpm) 上活化 30 min, 磁分离去上清, 并用 MES 缓冲液洗涤磁珠 2 次。然后, 加入 1 nmol AFB₁ 适配体溶液 (10 μ mol/L), 并用 MES 缓冲液补足 1 mL, 置于试管旋转混匀仪 (20 rpm) 上活化 120 min。磁分离去上清后, 加入 1% 甘氨酸溶液 (MES 缓冲液配制), 继续反应 2 h 封闭剩余活性位点。最后, 磁分离去除上清液依次用洗涤缓冲液和结合缓冲液清洗 3 次, 重新分散于 10 mL 结合缓冲液中, 得到 AFB₁ 适配体亲和磁珠 (1 mg/mL), 4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳实验采用由 5 \times TBE 缓冲液和尿素制备的 12% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行。将 3 μ L 待测样品与 3 μ L 2 \times TBE 尿素上样缓冲液均匀混合, 然后取 4 μ L 混合溶液注入相应胶孔。电泳条件: 300 V 恒定电压运行 30 min。然后将凝胶用 SYBR tm Gold 染色 5 min, 最后进行凝胶成像观察。

1.5 基于适配体亲和磁珠的单样本前处理试剂盒的制备

依次将 1 mL AFB₁ 适配体亲和磁珠 (1 mg/mL, ②孔)、9 mL 结合缓冲液 (①孔)、1 mL 洗涤缓冲液 (③孔)、1 mL 洗涤缓冲液 (④孔) 和 0.5 mL 甲醇 (⑤孔) 依次加入 5 孔试剂条中, 将热封膜放于试剂条上方, 220 $^{\circ}$ C 热封 10 s, 制得 AFB₁ 单样本前处理试剂盒。

1.6 色谱条件

BEH-C18 色谱柱的柱温为 40 $^{\circ}$ C, 样品盘温度为 10 $^{\circ}$ C; 进样量为 10 μ L; 等度洗脱: 流动相为甲醇: 乙腈: 水 (17.5: 17.5: 65, v/v/v), 流速为 0.2 mL/min。荧光检测器的激发波长为 360 nm, 发射波长为 440 nm。

1.7 样品测定

称取 5 g 小麦粉或玉米粉, 加入 20 mL 乙腈-水溶液 (84: 16, v/v) 于 50 mL 离心管中, 2 500 r/min 涡旋 20 min, 7 000 r/min 离心 5 min。撕开并去掉 AFB₁ 单样本前处理试剂盒的封口膜, 然后移取 1 mL 上清液加入试剂盒的①孔中。然后, 将试剂盒放置在托盘上, 放到真菌毒素全自动净化仪内, 选择 AFB₁-AAMB 程序 (表 1), 点击运行进行样品中 AFB₁ 的净化和富集。运行结束后, 向洗脱孔中加入 0.5 mL 水, 混匀后过 0.22 μ m 有机滤膜, 按照“1.6 色谱条件”上机检测。

表 1 AFB₁-AAMB 程序运行参数
Table 1 Running parameters of AFB₁-AAMB program

| 步骤编号 | 孔位 | 任务 | 目的 |
|------|----|--------------|---|
| 1 | ② | 上下振荡混匀 1 min | 适配体亲和磁珠均匀分散于②孔中 |
| 2 | ② | 磁吸附 1 min | 适配体亲和磁珠吸附于磁棒套表面 |
| 3 | ① | 左右振荡混匀 5 min | 孵育: 适配体亲和磁珠均匀分散于①孔中, 特异性捕获 AFB ₁ |
| 4 | ① | 磁吸附 2 min | 适配体亲和磁珠吸附于磁棒套表面 |
| 5 | ③ | 上下振荡混匀 1 min | 洗涤: 适配体亲和磁珠均匀分散于③孔中, 去除干扰物质 |
| 6 | ③ | 磁吸附 1 min | 适配体亲和磁珠吸附于磁棒套表面 |
| 7 | ④ | 上下振荡混匀 1 min | 洗涤: 适配体亲和磁珠均匀分散于④孔中, 去除干扰物质 |
| 8 | ④ | 磁吸附 1 min | 适配体亲和磁珠吸附于磁棒套表面 |
| 9 | ⑤ | 上下振荡混匀 1 min | 洗脱: 适配体亲和磁珠均匀分散于⑤孔中, 释放步骤 3 中捕获的 AFB ₁ |
| 10 | ⑤ | 磁吸附 1 min | 适配体亲和磁珠吸附于磁棒套表面 |
| 11 | ② | 上下振荡混匀 1 min | 适配体亲和磁珠再次分散于②孔中 |

2 结果分析

2.1 检测原理

本研究基于适配体的高亲和力构建的单样本前处理试剂盒的工作原理如图 1 所示。首先,采用 EDC 和 NHS 交联剂对适配体亲和磁珠进行偶联,将适配体共价修饰在磁珠表面,以获得适配体亲和磁珠(图 1A),然后按照“1.5”制备 AFB₁ 单样本前处理试剂盒。再按照“1.7”的流程对

样品中的 AFB₁ 进行前处理。如图 1B 所示,磁珠表面的适配体可以特异性结合①孔样本提取液中的 AFB₁,经过磁吸附、转移依次进入③孔和④孔,洗涤 2 次去除基质干扰,然后,⑤孔中的甲醇使磁珠表面适配体的三维结构发生改变从而将 AFB₁ 溶液释放于甲醇溶液中。最后,将适配体亲和磁珠重新转移回②孔中。为了保证较好的色谱峰峰形,将 0.5 mL 水加入⑤孔中,混匀后用 0.22 μm 有机滤膜过滤于进样瓶中,上机检测。

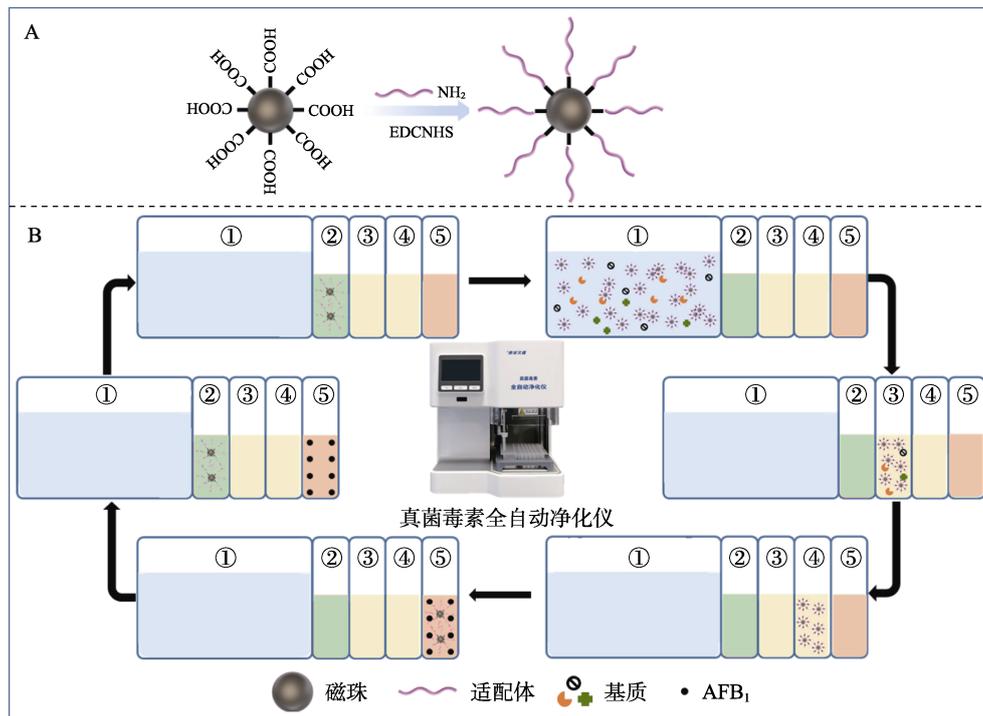


图 1 适配体亲和磁珠的制备 (A) 及单样本前处理试剂盒 (B) 的原理图

Fig.1 Schematic diagram of the preparation of aptamer affinity magnetic beads (A) and single sample pretreatment kit (B)

2.2 磁珠的选择

磁珠作为适配体的固相载体,除具有高磁响应性、高比表面积、单分散的性质^[20-22]外,还应具有促进固定化适配体的活性,降低材料本身的非特异性吸附,加快特异性识别速度等性能,从而为痕量真菌毒素的富集净化提供有力的保障。为了考察磁珠粒径的影响,分别将 1 nmol 适配体与 2 μm 羧基聚合物磁珠和 25 μm 琼脂糖羧基磁珠按照“1.3”的方法进行偶联。利用 12%变性聚丙烯酰胺电泳对偶联前后的适配体溶液进行表征(图 2(A)),泳道 1~4 的条带分别属于 2 μm 羧基聚合物磁珠与适配体偶联前、后的溶液和 25 μm

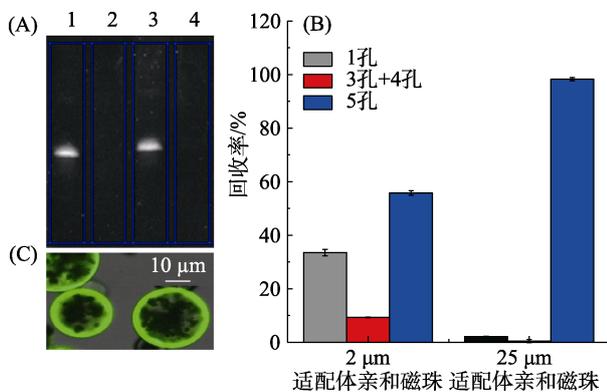
琼脂糖羧基磁珠与适配体偶联前、后的溶液,其中泳道 2 和泳道 4 中无适配体条带,表明 2 μm 羧基聚合物磁珠和 25 μm 琼脂糖羧基磁珠均可与适配体成功偶联,制得 2 μm 适配体亲和磁珠和 25 μm 适配体亲和磁珠。

为了考察适配体固定在两种磁珠表面后的亲和力,分别将 2 μm 适配体亲和磁珠和 25 μm 适配体亲和磁珠制备单样本前处理试剂盒。将 5 ng AFB₁ 真菌毒素标准品加入两种试剂盒的①孔中,按照表 1 进行运行,考察两种适配体亲和磁珠对 AFB₁ 的特异性结合能力。运行结束后,分别将①孔(孵育液)、③、④孔(洗涤液)和⑤孔(洗脱

液)过 0.22 μm 有机滤膜,上机检测各孔中 AFB₁ 的含量,并计算回收率,结果如图 2(B)所示,由 2 μm 适配体亲和磁珠制备的单样本前处理试剂盒的①孔孵育液中 AFB₁ 的回收率为 33.5%,⑤孔洗脱液中 AFB₁ 的回收率为 50.7%;而由 25 μm 适配体亲和磁珠制备的单样本前处理试剂盒的①孔、③孔和④孔中 AFB₁ 的回收率均小于 5%,且⑤孔洗脱液中 AFB₁ 的回收率为 89.3%,表明 25 μm 琼脂糖羧基磁珠更适合作为 AFB₁ 适配体的载体。

2.3 适配体亲和磁珠的表征

为了研究固定在磁珠表面的适配体分布情况,将适配体的 3'端用 Cy3 染料标记,同时将其 5'端标记氨基。3'-Cy3-5'-氨基标记的适配体根据“1.3”的方法制备 Cy3-标记的适配体亲和磁珠。然后,用 Binding buffer 将 Cy3 标记的适配体亲和磁珠洗涤 5 次,以去除未偶联的适配体。在激光扫描共聚焦显微镜的 550 nm 的激光下,Cy3-标记的适配体亲和磁珠呈现出明亮且稳定的荧光图像。如图 3(C)所示,磁珠表面可见明显的绿色荧光,间接表明适配体在磁珠表面呈均匀分布。



(A)偶联前后适配体溶液的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;(B)各孔中 AFB₁ 的回收率和(C) Cy3-标记的适配体亲和磁珠激光共聚焦显微镜图

(A) Polyacrylamide gel electrophoresis of aptamer solution before and after coupling; (B) The recovery rate of AFB₁ in every hole and the (C) laser Confocal microscopy of Cy3 labeled AAMB

图2 适配体亲和磁珠的表征

Fig. 2 Characterization of aptamer affinity magnetic beads

2.4 适配体间接臂长度确定

通过磁珠表面的羧基与适配体修饰的氨基之间的酰胺反应制备适配体亲和磁珠。适配体和氨基之间增加适当的间接臂有利于减小适配体的空

间位阻从而形成活性构象。我们之前的研究表明 3'端通过 C7 间接臂 (A3'C7) 对适配体进行氨基化修饰时,溴化氰修饰的琼脂糖凝胶表面偶联的适配体更多^[23]。因此,本研究中进一步考察了间接臂的长度对氨基适配体与羧基磁珠偶联的影响。分别将 1 nmol 具有 C7 间接臂 (A3'C7) 和 C12 间接臂 (A3'C12) 的适配体与 200 μL 琼脂糖羧基磁珠偶联,制备相应的单样本前处理试剂盒。①孔中加入 20 μL 500 ng/mL AFB₁ 标准品溶液,运行结束后,上机检测⑤孔中 AFB₁ 的含量,并计算回收率。结果如图 3(A)所示,两种试剂盒⑤孔洗脱液中 AFB₁ 的回收率分别为 103.0%和 101.3%,表明具有 C7 间接臂的适配体和具有 C12 间接臂的适配体亲和力无显著性差异,为了降低检测成本,故后续选用具有 C7 间接臂的适配体,无需增加间接臂的长度。

2.5 适配体亲和磁珠用量确定

适配体亲和磁珠的多少直接影响富集净化效果。适配体亲和磁珠用量过少,导致其富集净化能力较弱,回收率偏低;而适配体亲和磁珠用量过多则会造成试剂浪费,增加检测成本。分别取 50、100、150、200、250、300 μL 1.3 中的适配体亲和磁珠,制备相应的单样本前处理试剂盒,按照表 1 运行,考察适配体亲和磁珠用量对 AFB₁ 特异性结合能力的影响。运行结束后,分别将①孔、③孔和⑤孔过 0.22 μm 有机滤膜,上机检测各孔中 AFB₁ 的含量,并计算回收率。结果如图 3(B)所示,随着磁珠用量的增加 (50~200 μL),⑤孔洗脱液中的回收率逐渐增加,而①孔孵育液中 AFB₁ 的回收率逐渐降低,表明增加适配体亲和磁珠的用量可以增加适配体对 AFB₁ 的特异性结合能力,而当磁珠用量大于 200 μL 时, AFB₁ 的回收率差别不大,故最终选用的磁珠用量为 200 μL (1 mg/mL, pH7.4)。

2.6 孵育条件的优化

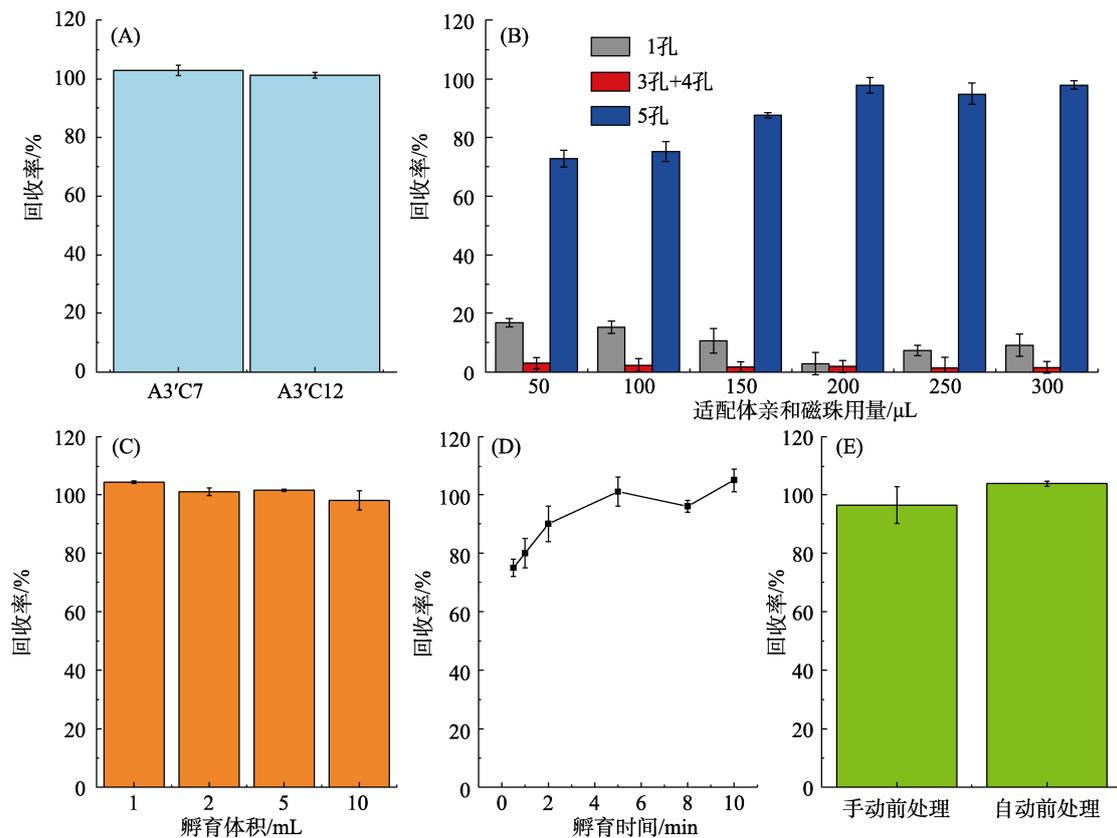
在①孔孵育的过程中样本中的 AFB₁ 被 AAMB 表面的适配体特异性捕获。因此,对影响孵育过程的关键参数进行了优化。(a)孵育液体积:实际样品中的真菌毒素的提取通常使用有机溶剂,比

如甲醇或乙腈，而适配体亲和磁珠表面的适配体对有机溶剂的耐受性是有限的，过高的有机溶剂浓度会破坏靶标和适配体之间的相互作用。由于本实验的孵育过程是在试剂条的①孔中进行的，因此需要对①孔中孵育液体积进行优化，以确保适配体亲和磁珠的活性。将 20 μL 500 ng/mL AFB₁ 加入试剂盒的①孔中，并用 Binding buffer 定容至 1、2、5 和 10 mL，按照表 1 运行，考察孵育液体积对适配体亲和磁珠特异性结合能力的影响。运行结束后，分别将⑤孔中的洗脱液过 0.22 μm 有机滤膜，上机检测⑤孔中 AFB₁ 的含量，并计算回收率。结果如图 3(C)所示，洗脱液中 AFB₁ 回收率均在 94.2%~104.3%之间，表明上样体积为 1~10 mL 时，适配体磁珠均具有良好的亲和力。孵育液的体积越大，①孔中可以加入的样品提取液的体积越大，适配体亲和磁珠的富集效果越好，但是由于试剂条的①孔中最大可容量的

溶液体积为 10 mL，因此，最终选用的孵育液体积为 10 mL。(b)孵育时间：为了确定 AFB₁ 和 AAMB 能够充分结合的最短时间，对 AFB₁ (2 ng/mL)和 AAMB 在①孔中的孵育时间 (0.5~10 min) 进行了考察。如图 3(D)所示，0.5~5 min 之间，随着反应时间的增加，AFB₁ 的回收率逐渐增加；5~10 min 时，AFB₁ 的回收率均在 100%左右，表明孵育时间为 5 min 可以保证 AFB₁ 和 AAMB 的充分结合。

2.7 手动操作和真菌毒素全自动净化仪的比较

为了评估真菌毒素全自动净化仪的性能，分别采用手动和自动两种处理方式完成适配体亲和磁珠的孵育、洗涤和洗脱的过程。将 20 μL 500 ng/mL AFB₁ 分别用 Binding buffer 定容至 10 mL，真菌毒素全自动净化仪按照表 1 运行，而手动操作借助磁力架完成，并且整个前处理过程并时间参数与表 1 一致。最后，将洗脱液过滤后按照



(A)间接臂对 AFB₁ 回收率的影响；(B)适配体亲和磁珠用量对 AFB₁ 回收率的影响；(C)孵育体积对 AFB₁ 回收率的影响；(D)孵育时间对 AFB₁ 回收率的影响；(E)适配体亲和磁珠手动前处理和自动前处理的比较

(A) The effect of indirect arm on the recovery rate of AFB₁; (B) The effect of the amount of AAMB on the recovery rate of AFB₁; (C) The effect of incubation volume on AFB₁ recovery rate; (D) The effect of incubation time on AFB₁ recovery rate; (E) Comparison of manual preprocessing and automatic preprocessing of AAMB

图 3 单样本前处理试剂盒的优化与比较

Fig.3 Optimization and comparison of single sample pretreatment kit

“1.6”上机检测 AFB₁ 的含量，并计算回收率。图 3(E)的结果表明手动和自动处理的洗脱液中 AFB₁ 的回收率均在可接受范围内，且自动前处理的重复性较好。

2.8 方法评价

依照 EU Regulation NO. 401/2006, 从选择性、线性、检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)、精密性、稳定性和准确性方面对本方法进行考察^[24]。

2.8.1 灵敏度及线性范围评价

本研究采用 UPLC-FLD 技术对洗脱液中的 AFB₁ 进行定量检测，与常规 HPLC-FLD 技术相比，该技术无需对 AFB₁ 进行衍生化，可有效消除柱后衍生系统和柱后流量降低造成的谱带展宽，实现更精确的积分和定量，同时可明显减少溶剂消耗量，降低对培训、故障排除和维护的需求。将 AFB₁ 标准品溶液用 50% 甲醇水溶液依次稀释成浓度为 0.5、1、2、5、8 和 10 ng/mL 的标准工作液，按照“1.6”上机检测，以峰面积为纵坐标 (y)，浓度为横坐标 (x) 绘制标准曲线，回归方程为 $y = 17\ 040x - 126.8$ ，相关系数为 $r = 0.999\ 7$ ，表明仪器响应 (峰面积) 和毒素浓度之间具有很好的线性关系。以 3 倍信噪比 (S/N = 3) 计算检出限 (limit of detection, LOD) 为 0.6 ng/mL 和 10 倍信噪比 (S/N = 10) 计算定量限 (limit of quantitation, LOQ) 为 2 ng/mL，表明该方法具有良好的灵敏度。

2.8.2 准确度和重复性评价

为了验证该方法的准确性和重复性，分别在于无 AFB₁ 污染的玉米和小麦样品中添加低、中、高 3 种不同水平 (10、20 和 40 μg/kg) 的 AFB₁ 标准品溶液，3 个平行，按照“1.7”的方法进行检测，结果如表 2 所示。玉米和小麦中 AFB₁ 的加标回收率在 92.8%~110.1% 之间，相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)，小于 5.1%，表明该方法具有良好的准确性和日内精密性。

为进一步考察该方法的日间精密性，选取加标水平为 20 μg/kg 的玉米样品，按照 1.7 的方法进行检测，每天 2 个平行，连续检测 5 天，10 次检测回收率的相对标准偏差为 6.7%，表明该

方法具有良好的日间精密性。综合分析日内精密性和日间精密性的结果，表明该方法具有良好的重复性。

表 2 玉米和小麦中黄曲霉毒素的加标回收率和 RSD (n=3)

| | 加标水平/(μg/kg) | 回收率/% | 相对标准偏差/% |
|----|--------------|-------|----------|
| 玉米 | 10 | 98.9 | 1.52 |
| | 20 | 97.9 | 2.86 |
| | 40 | 97.4 | 4.97 |
| 小麦 | 10 | 110.1 | 1.56 |
| | 20 | 92.8 | 0.56 |
| | 40 | 101.9 | 5.10 |

2.8.3 适配体亲和磁珠特异性考察

为保证检测结果的准确性，对适配体亲和磁珠的特异性进行了考察。我们之前的研究表明该 AFB₁ 适配体对 AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 OTA 存在较为明显的交叉反应，而对其他常见的真菌毒素 (DON、PAT、T-2、HT-2、FB₁、FB₂ 和 3-Ac-DON) 无交叉反应。因此，本研究重点考察适配体亲和磁珠对 AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 OTA 的交叉反应情况。将 AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 OTA 标准品工作液 (10 ng/mL) 加入单样本前处理试剂盒①孔中，3 个平行，按照表 1 运行，然后，分别检测①孔、③孔、④孔和⑤孔中 AFB₁ 的含量，并计算回收率。结果如图 4 所示，80% 以上的 OTA 在 1 孔孵育液中；①孔和⑤孔中的 AFG₂ 含量分别占 58.5% 和 27.5%；①孔和⑤孔中 AFG₁ 的含量均占 40% 左右；而⑤孔中 AFB₂ 的回收率大于 70%，

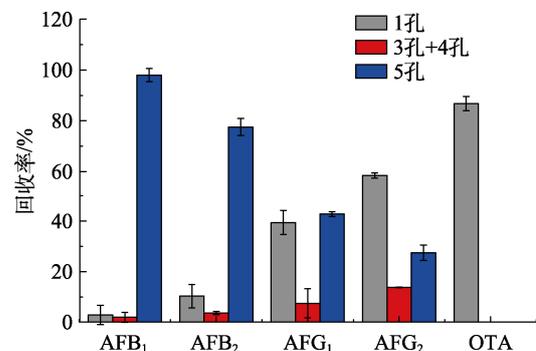


图 4 适配体亲和磁珠特异性
Fig.4 Specificity of AAMB

表明适配体亲和磁珠对 OTA 无交叉反应,对 AFB₂ 存在较为明显的交叉反应,而对 AFG₁ 和 AFG₂ 的交叉反应较小。通过查阅文献和本课题近期的研究得知^[5,25-26],我们之前研究中存在的 OTA 交叉反应,可能是由于封闭剂(牛血清白蛋白)引起的。

2.8.4 实际样品的检测

为了进一步验证该方法的基质适用性,采用本方法对空白玉米、糙米、花生油和花生酱样品及相应的 AFB₁ 国家有证标准物质进行检测,检测结果如表 3 所示,检测结果在其扩展范围内,表明该方法具有良好的基质适用性。AFB₁ 标准品工作液和不同基质的洗脱液中 AFB₁ 的色谱图如图 5 所示,目标峰附近无杂峰,表明适配体亲和磁珠对常见样品的净化效果较好。

表 3 玉米、糙米、花生油和花生酱中 AFB₁ 国家有证标准物质的检测结果

| 基质 | 标准物质编号 | 特性量值/ (μg/kg) | 扩展不 确定度/ (μg/kg) | 扩展 范围/ (μg/kg) | 检出量/ (ng/g) |
|-----|----------------|------------------|------------------------|----------------------|----------------|
| 玉米 | GBW (E) 100814 | 26 | 2.9 | 23.1 28.9 | 27.5 |
| 糙米 | GBW (E) 100609 | 30 | 4.2 | 25.8 34.2 | 26.9 |
| 花生酱 | GBW (E) 100604 | 15.6 | 1.6 | 14 17.2 | 15.5 |
| 花生酱 | GBW (E) 100611 | 50 | 6.2 | 43.8 56.2 | 45.3 |
| 糙米 | GBW (E) 100607 | 10.3 | 1.4 | 8.9 11.7 | 9.5 |
| 花生油 | GBW (E) 100604 | 15.6 | 1.6 | 14 17.2 | 13.7 |

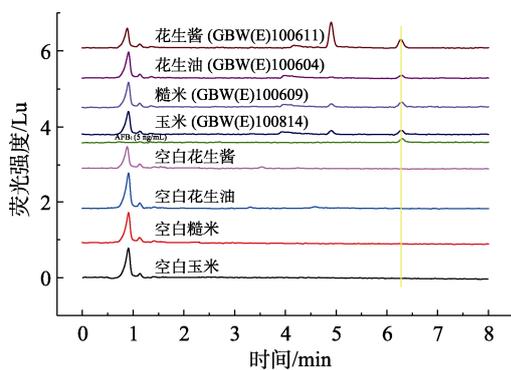


图 5 AFB₁ 标准品工作液和不同基质的洗脱液中 AFB₁ 的色谱图

Fig.5 Chromatogram of AFB₁ in the working solution of AFB₁ standard and in eluents of different substrates

3 结论

本研究将 AFB₁ 核酸适配体和磁珠共价偶联

制备了适配体亲和磁珠,开发了基于适配体亲和磁珠的 AFB₁ 单样本前处理试剂盒,借助真菌毒素全自动净化仪实现 AFB₁ 前处理的自动化、通量化,结合 UPLC-FLD 技术实现了粮谷中黄曲霉毒素 B₁ 免衍生准确定量检测。研究发现 25 μm 琼脂糖羧基磁珠更适合作为 AFB₁ 适配体的载体;C7 间接臂的适配体和具有 C12 间接臂的适配体亲和力无显著性差异;AFB₁ 单样本前处理试剂盒中适配体亲和磁珠用量为 200 μL (1 mg/mL, pH7.4);综合考虑富集效果和试剂条①孔的体积,最终选用的孵育液体积为 10 mL;基于适配体亲和磁珠的手动和自动处理的洗脱液中 AFB₁ 的回收率没有显著差异。然后,从线性、灵敏度、准确度、重复性、特异性、基质适用性对 AFB₁ 单样本前处理试剂盒进行了全面系统的评价,均能满足方法学考察的要求。

本研究实现了粮谷中 AFB₁ 的高通量、自动化前处理,批次间差异小,能够有效降低操作误差,可满足大批量检测要求,对于谷物安全监管、真菌毒素风险评估和守护人类健康具有重要意义。

参考文献:

- [1] BARAKAT G I I, KAMAL Y N, SULTAN A M. Could aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* affect the severity of keratitis: an experience in two tertiary health care centers, Egypt[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019, 38(11): 2021-2027.
- [2] LI C, LIU X, WU J, et al. Research progress in toxicological effects and mechanism of aflatoxin B₁ toxin[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13850.
- [3] 李晓哈, 路莹莹, 董永贞, 等. 基于 SiO₂@Fe₃O₄ 的磁性纳米材料分离富集谷物中痕量黄曲霉毒素 B₁[J]. *色谱*, 2022, 40(8): 694-703.
LI X H, LU Y Y, DONG Y Z, et al. Separation and enrichment of trace aflatoxin B₁ in grains by magnetic nanomaterials based on SiO₂@Fe₃O₄[J]. *Se Pu*. 2022, 40(8): 694-703.
- [4] IARC. A review of human carcinogens: chemical agents and related occupations[J]. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 2012, 100F.
- [5] LIU H M, ZHAO Y, LU A X, et al. An aptamer affinity column for purification and enrichment of aflatoxin B₁ and aflatoxin B₂ in agro-products[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(10).
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中真菌毒

- 素限量标准: GB 2761—2017[S].
National Health Commission of the People's Republic of China. Standards for Limits of Mycotoxins in Food: GB 2761—2017 [S].
- [7] European Commission regulation (EC) No. 1881 /2006 of 19 December, 2006, Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foods Tuff. Off. J. Eur. Union. L364/5: 15-17.
- [8] 袁艺, 陆廷瑾, 沈腾腾, 等. 免疫亲和柱的制备及在真菌毒素检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 396-400. YUAN Y, LU T J, SHEN T T, et al. Preparation of immunoaffinity column and advances in application of mycotoxin analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(24): 396-400.
- [9] ZHANG L, DOU X W, KONG W J, et al. Assessment of critical points and development of a practical strategy to extend the applicable scope of immunoaffinity column cleanup for aflatoxin detection in medicinal herbs[J]. Journal Chromatography A, 2017, 1483: 56-63.
- [10] TANVEER Z I, HUANG Q W, LIU L, et al. Reduced graphene oxide-zinc oxide nanocomposite as dispersive solid-phase extraction sorbent for simultaneous enrichment and purification of multiple mycotoxins in Coptidis rhizoma (Huanglian) and analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1630, 461515.
- [11] ZHAO Y R, ZENG R, WANG Q S, et al. Aflatoxin B₁ and sterigmatocystin: method development and occurrence in tea[J]. Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance, 2022, 15(1): 31-37.
- [12] 陈金男, 叶金, 郭旭光, 等. 免疫磁珠高通量自动净化-超高效液相色谱法测定粮食中玉米赤霉烯酮[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 318-323. CHEN J N, YE J, GUO X G, et al. Determination of zearalenone in grains by high-throughput automatic purification with immunomagnetic beads coupled with ultra-high performance liquid chromatography[J]. Food Science, 2021, 42(22): 318-323.
- [13] 杨妍, 尹盈爱, 董益阳. 纳米金-适配体比色传感法检测玉米油中黄曲霉毒素 B₁[J]. 分析化学, 2020, 48(5): 676-684. YANG Y, YIN Y A, DONG Y Y. Detection of Aflatoxin B₁ in corn oil by colorimetric gold nanoparticles-aptasensor[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2020, 48(5): 676-684.
- [14] ZHUO Z J, YU Y Y, WANG M L, et al. Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 18(10): 2142.
- [15] BAYAT P, NOSRATI R, ALIBOLANDI M, et al. SELEX methods on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers[J]. Biochimie. 2018, 154:132-155.
- [16] KAUR H. Recent developments in cell-SELEX technology for aptamer selection[J]. Biochimica et Biophysica Acta-general Subjects. 2018, 1862(10): 2323-2329.
- [17] 韩文浩, 李延生, 高国伟, 等. 适配体生物传感器在黄曲霉毒素 B₁ 检测中的应用[J]. 分析测试学报, 2023, 42(3): 368-374. HAN W H, LI Y S, GAO G W, et al. Application of aptamer biosensor in detection of Aflatoxin B₁[J]. Journal of Instrumental analysis., 2023, 42(3): 368-374.
- [18] LE CHRYSEIS L, CRUZ-AGUADO J A, PENNER G A. DNA ligands for aflatoxin and zearalenone[J]. USA patent PTC/CA2010/001292. 2012.
- [19] LIU H M, ZHAO Y, LU A X, et al. An aptamer affinity column for purification and enrichment of aflatoxin B₁ and aflatoxin B₂ in agro-products[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020 412(4): 895-904.
- [20] WU Z, ZHOU C H, CHEN J J et al. Bifunctional magnetic nanobeads for sensitive detection of avian influenza A (H7N9) virus based on immunomagnetic separation and enzyme-induced metallization[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 68: 586-592.
- [21] MOUSAVI M Z, CHEN H Y, HOU H S, et al. Label-free detection of rare cell human blood using gold nano slit surface plasmon resonance[J]. Biosensors (Basel), 2015, 5(1): 98-117.
- [22] SINGH A, SAHOO S K. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics[J]. Drug Discovery Today, 2014, 19(4): 474-481.
- [23] LIU H M, LUAN Y X, LU A X, et al. An oligosorbent-based aptamer affinity column for selective extraction of aflatoxin B₂ prior to HPLC with fluorometric detection[J]. Mikrochim Acta, 2017, 20, 185(1): 71.
- [24] European Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs[J]. Off J Eur Commun., L70/12 (9.3.2006).
- [25] LEAL T, ABRUNHOSA L, DOMINGUES L, et al, Oliveira C. BSA-based sample clean-up columns for ochratoxin A determination in wine: Method development and validation[J]. Food Chemistry. 2019, 300,125204.
- [26] YE J, BAO H, ZHENG M Y, et al. Development of a novel magnetic-bead-based automated strategy for efficient and low-cost sample preparation for ochratoxin a detection using mycotoxin-albumin interaction[J]. Toxins, 2023, 15, 270. 
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。