

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241211004

引用格式: 田秀梅, 陈晓阳, 杨天宝, 等. 聚多巴胺侧流免疫层析法检测谷物中呕吐毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(4): 62–70.

TIAN XM, CHEN XY, YANG TB, *et al.* Detection of the deoxynivalenol in cereals by polydopamine-based lateral flow immunochromatography assay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(4): 62–70. (in Chinese with English abstract).

# 聚多巴胺侧流免疫层析法检测谷物中呕吐毒素

田秀梅<sup>1</sup>, 陈晓阳<sup>2</sup>, 杨天宝<sup>3</sup>, 罗昌伟<sup>2</sup>, 毛焯炫<sup>2</sup>, 补彤<sup>2</sup>, 张西亚<sup>2\*</sup>

(1. 北京美正生物科技有限公司, 北京 102200; 2. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002;  
3. 新乡医学院三全学院, 新乡 543000)

**摘要:** **目的** 制备一种基于聚多巴胺(polydopamine, PDA)纳米载体的免疫层析试纸条, 用于高灵敏检测谷物中的呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)。**方法** 本研究通过多巴胺自氧化聚合制备 PDA, 一步结合制备 PDA-单克隆抗体(monoclonal antibody, PDA-mAb)探针, 以呕吐毒素抗原为检测线(T线)、羊抗鼠二抗作为质控线(C线)建立 PDA 免疫层析试纸条。**结果** 该试纸条检测 DON 的消线值为 6.0 ng/mL, 视觉检出限为 0.9 ng/mL,  $IC_{50}$  = 1.13 ng/mL, 比荧光微球试纸条和胶体金试纸条分别高 0.88 倍和 3.08 倍, 且该试纸条稳定性与特异性良好。此外, 该试纸条已经成功用于玉米、小米和燕麦样品中 DON 的检测, 最低检出限分别为 8.40、6.87、9.89  $\mu$ g/kg, 回收率为 80.10%~122.05%, 相对标准偏差均小于 12.01%。**结论** 本研究建立的 PDA 免疫层析试纸条具有灵敏、准确、快速和简便等特点, 为谷物中真菌毒素的检测提供技术支撑。

**关键词:** 聚多巴胺; 呕吐毒素; 侧流免疫层析检测

## Detection of the deoxynivalenol in cereals by polydopamine-based lateral flow immunochromatography assay

TIAN Xiu-Mei<sup>1</sup>, CHEN Xiao-Yang<sup>2</sup>, YANG Tian-Bao<sup>3</sup>, LUO Chang-Wei<sup>2</sup>,  
MAO Ye-Xuan<sup>2</sup>, BU Tong<sup>2</sup>, ZHANG Xi-Ya<sup>2\*</sup>

(1. Beijing Meizheng Bio-Tech Co., Ltd., Beijing 102200, China; 2. School of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 3. Sanquan College of Xinxiang Medical College, Xinxiang 543000, China)

**ABSTRACT: Objective** To prepare a polydopamine (PDA)-based lateral flow immunochromatography assay for the highly sensitive detection of deoxynivalenol (DON) in cereals. **Methods** In this paper, PDA was synthesized by dopamine self-oxidative polymerization, and the PDA labeled monoclonal antibody (PDA-mAb) probe was prepared by a one-step conjugation method. Subsequently, the PDA lateral flow immunochromatography assay was established using DON antigen as the test line (T line) and goat anti-mouse antibody as the control line (C line). **Results** The results showed that the cut-off value of the PDA lateral flow immunochromatography assay for detecting DON was

收稿日期: 2024-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172298); 中国博士后科学基金资助项目(2023M741056)

第一作者: 田秀梅(1987—), 女, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 562990313@qq.com

\*通信作者: 张西亚(1987—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: zhangxiya@henau.edu.cn

6.0 ng/mL, the visual limit of detection was 0.9 ng/mL, half maximal inhibitory concentration was 1.13 ng/mL, which were 0.88 times and 3.08 times higher than those of fluorescent microsphere test strip and colloidal gold test strip, respectively. Meanwhile, the PDA lateral flow immunochromatography assay possessed well stability and specificity. In addition, the proposed lateral flow immunochromatography assay has been successfully used for the detection of DON in corn, millet, and oats samples, with minimum detection limits of 8.40, 6.87, and 9.89  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , recoveries ranging from 80.10%–122.05%, and relative standard deviations less than 12.01%. **Conclusion** In summary, the PDA lateral flow immunochromatography assay established in this work is sensitive, accurate, rapid and simple, and provides technical support for the detection of mycotoxins in cereals.

**KEY WORDS:** polydopamine; deoxynivalenol; lateral flow immunochromatography assay; detection

## 0 引言

呕吐毒素(deoxynivalenol, DON), 又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 一种 B 型单端孢霉烯, 是由禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌产生的次级代谢产物, 广泛存在于玉米、小麦及其副产品中, 被国际癌症研究机构列为第 3 类致癌物<sup>[1-2]</sup>。DON 能够产生肝肾毒性、神经毒性、细胞毒性及免疫毒性等作用, 误食被 DON 污染的食物后, 会导致厌食、呕吐、腹泻等症状, 严重时会造成死亡<sup>[3-4]</sup>。为了保障人类粮食安全, 我国 GB 2761–2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定谷物及其制品中 DON 的最大残留量为 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。此外, 植物饲料原料和配方饲料中的 DON 含量分别控制在 5 mg/kg 和 1 mg/kg 以内(GB 13078–2017《饲料卫生标准》)。因此, 建立一种操作简单、成本较低、快速、高灵敏的方法检测谷物中的 DON 对于保障我国粮食安全具有重要意义。

目前, DON 常用的检测方法包括仪器分析法和免疫分析方法。仪器分析法主要有高效液相色谱法和液相色谱-质谱法<sup>[5-6]</sup>等, 虽然仪器检测法具有高灵敏度和可靠的结果, 但其样品处理复杂, 设备昂贵, 耗时且需要专业人员操作等缺点不适合即时检测。免疫测定法主要有酶联免疫分析法<sup>[7]</sup>和侧流免疫层析法(lateral flow immunochromatography assay, LFIA)<sup>[8]</sup>。其中, LFIA 具有操作简单、检测快速、价格低廉和灵敏度高等特点, 已广泛应用于真菌毒素的快速检测<sup>[9-10]</sup>。但传统以胶体金(gold nanoparticles, AuNPs)作为标记物的 LFIA, 由于 AuNPs 的摩尔消光系数和粒径小, 导致灵敏度逐渐不能满足检测需求<sup>[11]</sup>。近年来, 研究学者通过构建多种新型载体, 如荧光材料, 以提高灵敏度。如 HOU 等<sup>[12]</sup>利用量子点纳米球标记抗体作为探针构建荧光试纸条检测 DON, 结果表明该方法检测 DON 的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)值为 2.97 ng/mL, 比酶联免疫分析法低 2 倍(6.05 ng/mL)。CHEN 等<sup>[13]</sup>合成 UiO-66-NH<sub>2</sub>@量子点应用于免疫层析检测谷物中 DON, 检出限(limit of detection, LOD)为 0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 低于已报道的胶体金和量子点免疫层析。然而, 部分载体存在合成复杂、稳定性差以及标记抗体步骤烦琐等缺点, 影响

LFIA 性能。因此设计合成简单、生物相容性好、标记稳定的新型载体对于构建高性能 LFIA 具有重要作用。

聚多巴胺(polydopamine, PDA)作为贻贝仿生类材料, 由多巴胺在弱碱性环境下自聚而得。PDA 表面有大量儿茶酚结构, 对有机和无机物质具有强烈附着力以及很高的结合强度。同时, 作为一种天然黑色素, PDA 具有颜色鲜亮、生物相容性好以及成本低廉的特点<sup>[14-15]</sup>。此外, PDA 可以通过共价键与有机物质结合, 其利用迈克尔加成或希夫碱反应实现与生物分子的稳定结合<sup>[16]</sup>。如 LIU 等<sup>[17]</sup>合成了 160 nm 的 PDA 高亲和力和标记抗体构建试纸条灵敏检测咪唑啉酮。ZHAO 等<sup>[18]</sup>制备聚多巴胺包覆的氧化铈纳米载体作为信号标签灵敏检测沙丁胺醇。因此, 基于上述这些优势, PDA 可成为建立 LFIA 的优良载体, 以提高 LFIA 检测 DON 的性能。

本研究以多巴胺自氧化聚合合成 PDA, 随后通过一步结合法制备 PDA 标记的单克隆抗体(monoclonal antibodies, mAb)作为探针, 通过优化实验条件, 构建 PDA-LFIA 检测 DON 的方法。同时, 与荧光微球(quantum dot microspheres, QDMs)免疫层析和胶体金免疫层析对比灵敏度。最后将 PDA-LFIA 应用于玉米、小米和燕麦中 DON 的检测以验证构建方法的实际应用性, 为谷物中真菌毒素的检测提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

玉米、小米和燕麦样品(郑州当地超市)。

DON-牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)抗体(质量浓度 8.2 mg/mL)、DON 抗体(质量浓度 10 mg/mL)(实验室自制); DON、展青霉素(patulin, PAT)、赭曲霉毒素(ochratoxin A, OTA)、T-2 毒素、伏马菌素(fumonisin B<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub>)、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyl deoxynivalenol, 15AC-DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl deoxynivalenol, 3AC-DON)、雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)(质量浓度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 美国 Sigma 公司); 盐酸多巴胺(纯度  $\geq 98\%$ )、氨水、甲醇、乙醇(分析纯)(阿

拉丁试剂有限公司); 牛血清蛋白(纯度 $\geq 98\%$ , 美国 Amresco 公司); 硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)(德国赛多利斯公司); 聚氯乙烯底板(polyvinyl chloride, PVC)、吸水垫(上海金标生物科技有限公司); QDMs(北京纳诺金生物科技有限公司); 羊抗鼠二抗免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)(北京厚生正德有限公司)。

## 1.2 仪器与设备

Sorvall Contifuge Stratos Centrifuge 高速冷冻离心机(上海巴玖实业有限公司); RCT 磁力加热搅拌机(德国 IKA 公司); MD-600 金标读数仪、MD-210 试纸条切条机(南京微测生物科技有限公司); HGS510 划膜喷金标仪(杭州峰航科技有限公司); KQ2200DB 台式数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9000 鼓风干燥箱(上海一恒仪器有限公司); BSA124S 电子天平(精度 0.1 mg, 上海赛多利斯贸易有限公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 PDA 纳米载体的制备

通过溶液氧化法合成 PDA<sup>[19]</sup>, 具体步骤如下: 在 250 mL 的烧杯中加入 8 mL 乙醇、0.8 mL 氨水和 18 mL 超纯水, 搅拌 30 min, 然后将 2 mL 盐酸多巴胺溶液(0.05 g/mL)快速注入混合溶液, 搅拌 24 h 之后, 8500 r/min 离心 30 min, 去除上清液, 收集沉淀并重悬, 在 4 °C 下保存备用。

### 1.3.2 PDA-mAb 探针的制备

通过一步结合法合成 PDA-mAb 探针<sup>[20]</sup>, 具体步骤如下: 向 1 mL PDA 溶液(2 mg/mL)中加入 12  $\mu$ L DON 抗体(1 mg/mL), 混合均匀, 常温孵育 30 min, 随后加入 30  $\mu$ L 10%的 BSA 溶液, 封闭 30 min。最后将溶液以 8500 r/min 的速度离心 10 min, 去除上清液, 将沉淀用复溶液复溶至 200  $\mu$ L, 混合均匀后放置于 4 °C 下备用。此外, 分别利用静电吸附法和 N-羧基琥珀酰亚胺活化法制备 AuNPs-mAb 和 QDMs-mAb<sup>[11]</sup>。

### 1.3.3 试纸条的组装

试纸条由样品垫、NC 膜、吸水垫、和 PVC 底板 4 个部分组成<sup>[21]</sup>。将 NC 膜固定于 PVC 底板, 0.5 mg/mL DON-BSA 作为 T 线, 1 mg/mL 羊抗鼠二抗 IgG 作为 C 线, 采用划膜仪以 0.8  $\mu$ L/cm 的速度喷洒在 NC 膜的检测区域和质控区域。置于 37 °C 的热鼓风干燥箱中烘干 6 h, 将样品垫、吸水垫与 PVC 底板进行组装, 与 NC 膜重叠 1~2 mm, 切成宽 3.20 mm 的试纸条, 用塑封袋避光干燥保存。

### 1.3.4 检测步骤与结果判定

取 6  $\mu$ L PDA-mAb 与 200  $\mu$ L 含 Tween 20 的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline with tween 20, PBST)或 DON 标准溶液反应, 孵育 3 min, 随后将试纸条插入微孔板中, 反应 8 min, 利用定量读数仪进行定量分析, 以试纸条 T 线显色情况(T 线强度 $\geq 800$ )和抑制率为优化标准, 并判

断检测结果。若只有 C 线显色, 则为阳性, 说明样品中含有 DON; 若 T 线和 C 线都显色, 说明样品中不含 DON; 若 C 线不显色, 说明试纸条异常。

### 1.3.5 聚多巴胺免疫层析检测方法的优化与评价

为了获得最佳检测条件, 本研究以 T 线显色情况与抑制率为优化标准, 对 PDA 浓度、抗原浓度、抗体添加量、探针添加量、反应时间及反应 pH 进行优化。利用定量读数仪检测 C、T 线显色强度, 用公式(1)计算抑制率(inhibition rate, IR)。

$$IR/\% = \frac{B_0 - B_1}{B_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $B_0$  为阴性样品 T 线信号读值;  $B_1$  为阳性样品 T 线信号读值。

#### (1) 灵敏度评价

在最佳反应条件下, 用 PBST 溶液将 DON 标准品质量浓度分别稀释至为 0.3、0.6、0.9、1.8、3.0、6.0 ng/mL, 并用 PBST 作为空白对照组, 用于试纸条灵敏度检测, 通过视觉及定量读数仪判定结果, 根据定量读数仪检测的信号强度, 通过 Origin 2021 软件绘制标准标准曲线。

#### (2) 特异性评价

选择 100 ng/mL 的 PAT、OTA、T-2 毒素、FB<sub>1</sub>、15AC-DON、3AC-DON、NIV 7 种常见的真菌毒素进行特异性检测, DON 的质量浓度为 6 ng/mL。用试纸条检测, 确定其交叉反应率, 评价其特异性。

#### (3) 精密度评价

根据试纸条的线性范围选定 3 个不同浓度的标准品, 分别从同一批试纸条和 3 批试纸条中随机抽取若干试纸条, 对 3 个不同浓度标准品做 3 次平行测定, 根据测定结果的平均值计算其变异系数, 评价同一批次和不同批次试纸条之间的精密度。

### 1.3.6 样品回收实验

#### (1) 提取溶液稀释倍数的优化

本研究在提取实际样本中的 DON 时, 选用甲醇溶液(甲醇:水=9:1, V:V)作为提取液提取样品中的 DON, 但提取液的基质干扰会影响抗原抗体的免疫结合, 从而导致试纸条的灵敏度降低。通过探究提取液的不同稀释倍数对试纸条的影响选出最佳的稀释倍数以消除基质干扰。

分别将上清液稀释 2、4、6、8、10 倍, 按照 1.3.4 检测步骤进行实验, 通过定量读数仪测定, 选择抑制率高且显色情况好的为提取液稀释倍数。

#### (2) 添加回收实验

将磨碎的谷物样品通过筛网过滤后, 称取 1 g 置于 10 mL 离心管中, 向其中加入 DON 标准品, 混合均匀, 然后加入 5 mL 甲醇:水(9:1, V/V), 并将混合物涡旋 2 min, 超声 20 min; 6000 r/min 离心 10 min, 将上清液移入 10 mL 离心管。

测定 20 份空白样本, 根据测定值和标准差计算该试

纸条在实际样本检测时的最低 LOD, 计算公式见式(2)。

$$\text{LOD}=X+3\text{SD} \quad (2)$$

式中:  $X$  为 20 份样品的平均值;  $\text{SD}$  为标准偏差。

## 1.4 数据处理

采用 Origin 2021、Excel 2016 和 Adobe Photoshop 2020 对实验数据和图表进行处理, 每组样品均设置平行重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 PDA-mAb 探针的合成及 PDA-LFIA 检测原理

本研究将盐酸多巴胺通过溶液氧化法合成 PDA 纳米

载体, 随后向其加入 DON-mAb 通过醌-胺基相互作用共价结合形成 PDA-mAb 探针<sup>[17]</sup>(图 1A)。随后以 PDA-mAb 探针构建 PDA-LFIA 检测玉米中的 DON。图 1B 为试纸条检测样品中 DON 的原理图, 若玉米样品中不含 DON, DON-mAb 会与 T 线上的抗原 DON-BSA 结合, 多余未被结合的 DON-mAb 会与 C 线上的羊抗鼠 IgG 结合, T 线和 C 线均显色; 若玉米样品中含有 DON, DON-mAb 会与样品中游离的 DON 发生特异性结合, 占据抗体中与抗原的结合位点, 层析经过 T 线时, 由于能与抗原结合的 DON-mAb 数量减少, 使得 T 线颜色变浅, 甚至不显色, 最终试纸条上只有 C 线显色。

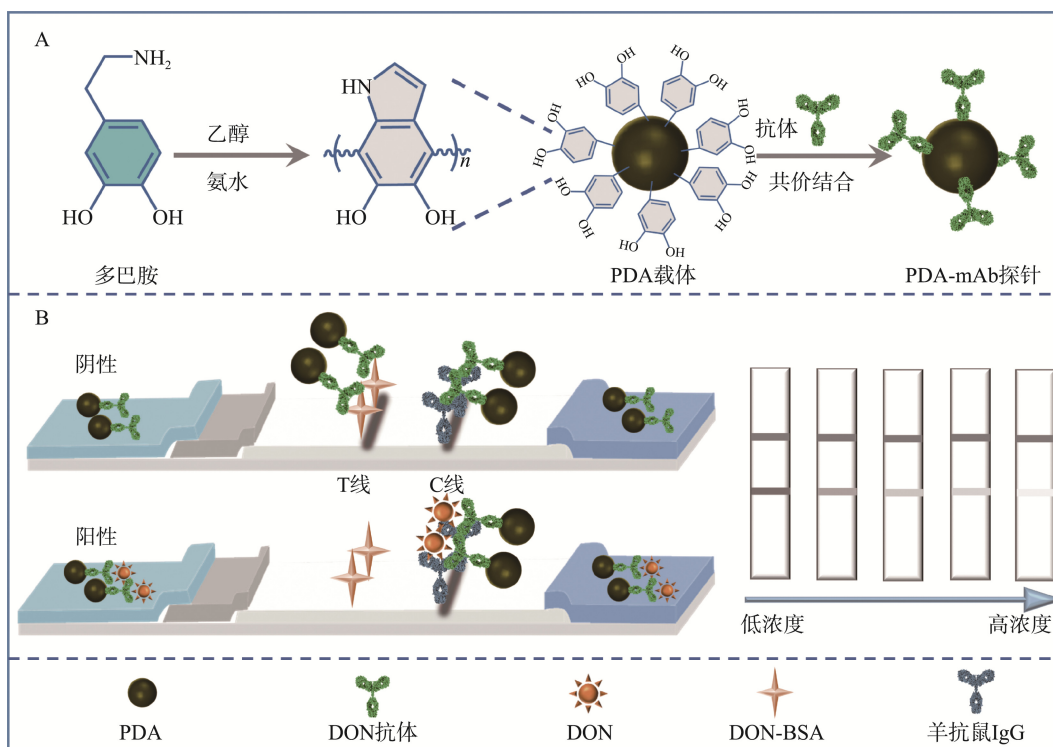


图 1 PDA、PDA-mAb 探针的合成图(A)和 PDA-LFIA 检测原理图(B)

Fig.1 Composite image of PDA and PDA-mAb probes (A) and detection principle diagram of PDA-LFIA (B)

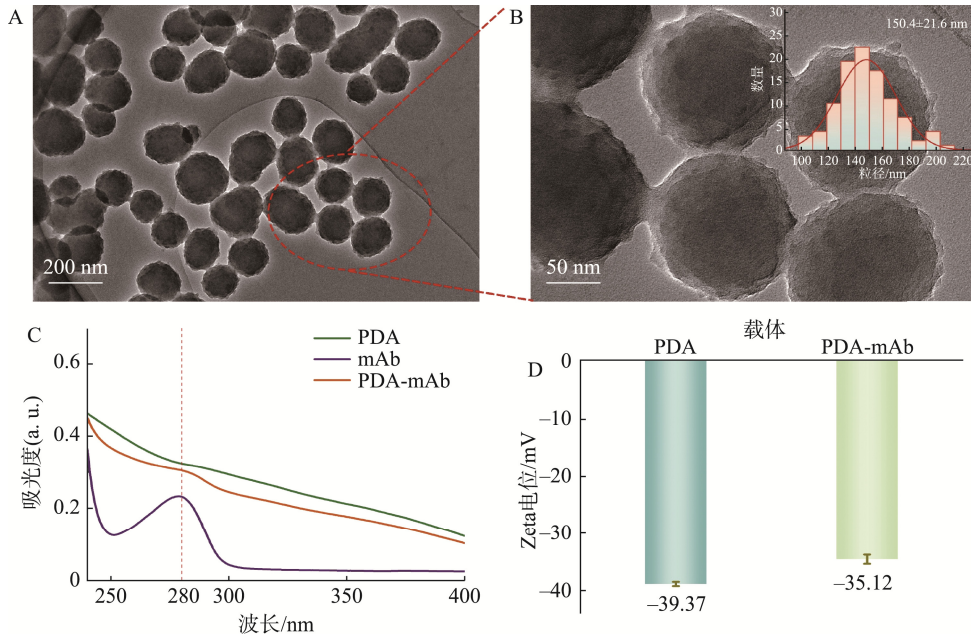
### 2.2 PDA-mAb 探针的鉴定

本研究通过多巴胺氧化自聚合制备 PDA。透射电镜显示 PDA 为球状, 粒径为(150.4±21.6) nm(图 2A、2B)。随后通过紫外吸收光谱和 Zeta 电位验证 PDA-mAb 探针的成功制备。如图 2C, PDA 没有明显的紫外特征峰<sup>[22]</sup>, 偶联 DON 单克隆抗体后, 在 280 nm 处出现抗体的紫外吸收峰。如图 2D, 通过纳米粒度电位仪测定 PDA 和 PDA-mAb 的电位, 结果显示, PDA 电位为-39.37 mV、PDA-mAb 为-35.12 mV, 表明 PDA 与抗体的偶联成功。

### 2.3 PDA-LFIA 优化结果

本研究制备了 PDA-LFIA, 通过对 PDA 质量浓度、抗原浓度、抗体添加量和 PDA-mAb 探针添加量进行优

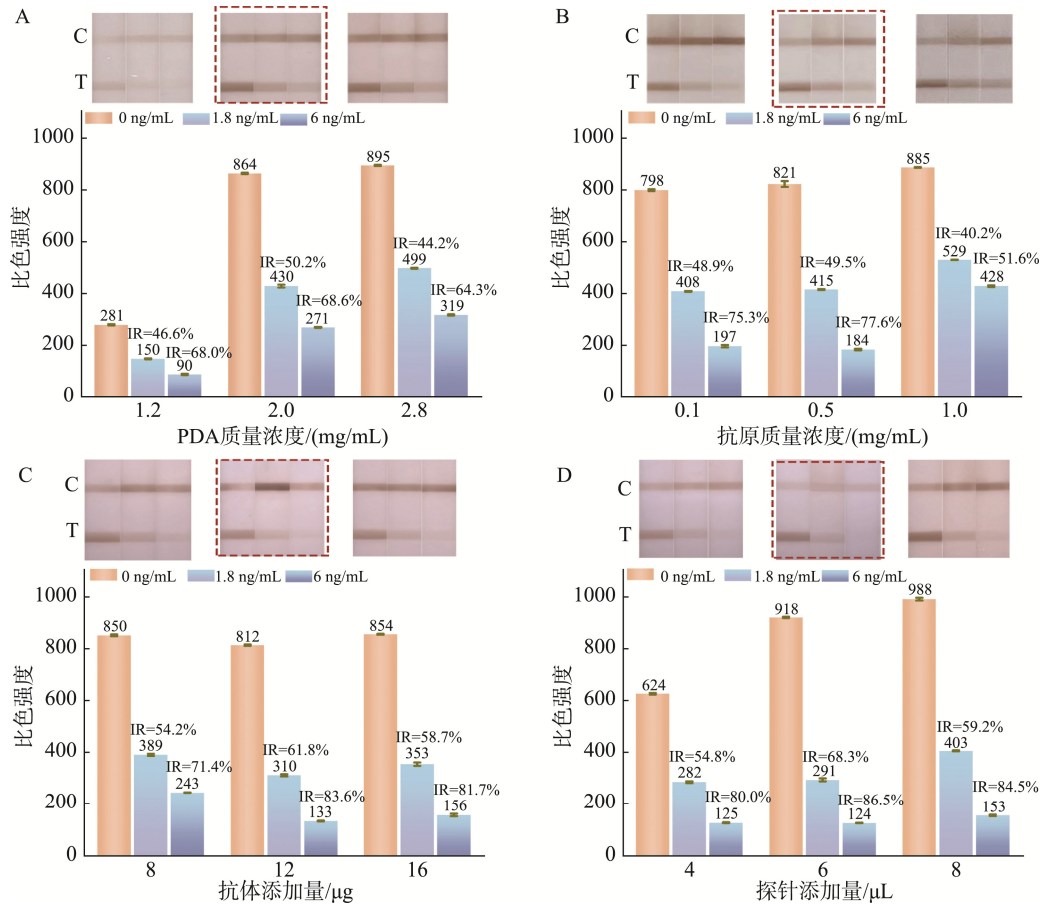
化, 以空白试纸条显色情况(T 线强度  $\geq 800$ )和 1.8 ng/mL 和 6 ng/mL 的 DON 抑制率为优化标准。图 3A 为 PDA 质量浓度优化结果图, PDA 质量浓度过低显色较差, 但 PDA 质量浓度过高, 会使抑制率下降, 且样品垫与 NC 膜之间会有聚集, 从而影响检测性能。当 PDA 质量浓度为 2.0 mg/mL 时, 试纸条显色明显, 且抑制率最高, 分别为 50.2%和 68.6%。图 3B 为抗原质量浓度优化结果图, 抑制率随着抗原浓度的增大呈现先增后降的趋势, 当抗原包被质量浓度为 0.5 mg/mL 时, 试纸条检测抑制率高(49.5%和 77.6%)且显色情况好。图 3C 为抗体添加量的优化结果图, 抗体浓度过低或过高会使检测性能下降, 且过高使成本增加, 当抗体添加量为 12  $\mu\text{L}$ , 试纸条的抑制率最高(61.8%和 83.6%)且显色效果较好。图 3D 为 PDA-mAb 探



注: A. 透射电镜 200 nm; B. 透射电镜 50 nm; C. 紫外吸收光谱表征; D. Zeta 电位表征。

图 2 PDA 及 PDA-mAb 探针的表征图

Fig.2 Characterization of PDA and PDA-mAb probes



注: A. PDA 浓度优化; B. 抗原浓度优化; C. 抗体添加量优化; D. 探针添加量优化。抑制率(inhibition ratio, IR), %; 条形图上方为不同优化参数对应的 0、1.8、6.0 ng/mL 的 DON 试纸条检测结果图。

图 3 聚多巴胺免疫层析条件优化结果

Fig.3 Optimization results of PDA-LFIA

针添加量优化结果图,随着 PDA-mAb 探针添加量的增加,试纸条显色强度越高,但抑制率呈现先增加后减少的趋势,当 PDA-mAb 添加量为 6  $\mu\text{L}$  时,试纸条的抑制率优异(68.3% 和 86.5%)且显色效果很好。综上所述,本研究最终以 PDA 质量浓度为 2.0 mg/mL、抗原包被质量浓度为 0.5 mg/mL、抗体添加量为 12  $\mu\text{g}$  和 PDA-mAb 探针添加量为 6  $\mu\text{L}$  为最佳检测条件。

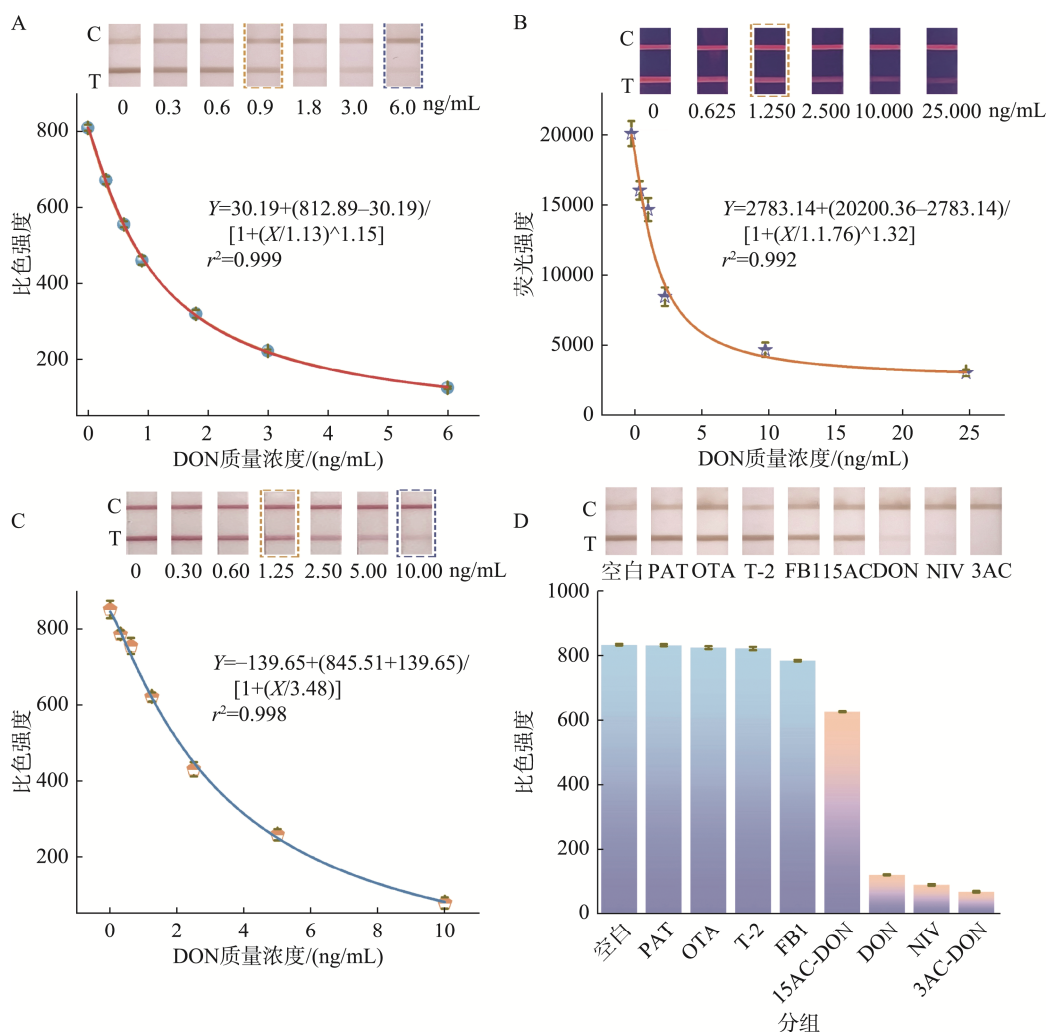
## 2.4 PDA-LFIA 灵敏度检测结果

在最优检测条件下,通过配制一系列浓度梯度的 DON 标准溶液绘制标准曲线,以确定 PDA-LFIA 检测 DON 的灵敏度。如图 4A 所示,随着 DON 标准液质量浓度的增加,试纸条 T 线颜色逐渐变浅。消线值为 6 ng/mL,视觉检出限为 0.9 ng/mL。此外,采用定量读数仪 MD-600 检测 T 线信号强度,并用 Origin 2021 软件分析其与 DON 浓度的关系。T 线强度与 DON 浓度呈现负相关,标准曲线

见图 4A,相关系数  $r^2=0.999$ ,  $\text{IC}_{20}\sim\text{IC}_{80}=0.33\sim 3.75$  ng/mL,  $\text{IC}_{50}=1.13$  ng/mL。

另外,本研究也探究了基于荧光 QDMs-LFIA 和 AuNPs-LFIA 检测 DON 的灵敏度,如图 4B 和 4C。QDMs-LFIA 检测 DON 的  $\text{IC}_{50}$  为 1.76 ng/mL,线性范围为 0.62~5.62 ng/mL。AuNPs-LFIA 检测 DON 的  $\text{IC}_{50}$  为 3.48 ng/mL,线性范围为 1.08~11.27 ng/mL。结果表明 PDA-LFIA 检测 DON 的灵敏度比 QDMs-LFIA 和 AuNPs-LFIA 分别高 0.88 倍和 3.08 倍。因此,利用 PDA 载体能够提升 LFIA 的检测灵敏度。

此外,将本研究建立的 PDA-LFIA 与其他检测方法进行对比,如表 1 所示,本研究构建的试纸条相较于其他检测方法,如 SERS、ELISA、荧光法和比色法等,具有较高的灵敏度,且检测迅速。此外,灵敏度也优于其他载体的试纸条,如胶体金、胶体碳和量子点等,因此具有良好的应用潜力。



注: A. PDA-LFIA 检测 DON 标准曲线, 图上方为 PDA-LFIA 检测不同浓度 DON 的结果图; B. QDMs-LFIA 检测 DON 标准曲线, 图上方为 QDMs-LFIA 检测不同浓度 DON 的结果图; C. AuNPs-LFIA 检测 DON 标准曲线, 图上方为 AuNPs-LFIA 检测不同浓度 DON 的结果图; D. DON 与常见真菌毒素的特异性检测结果, 图上方为 PDA-LFIA 检测不同真菌毒素的结果图。

图 4 PDA-LFIA、QDMs-LFIA 和 AuNPs-LFIA 检测性能测定结果

Fig.4 Performance assay results of PDA-LFIA、QDMs-LFIA and AuNPs-LFIA

表 1 不同方法检测 DON 的性能比较  
Table 1 Comparison of the performance of different methods for detecting DON

方法	线性范围	缓冲溶液 IC <sub>50</sub> /LOD/(ng/mL)	实际样品 LOD/(μg/kg)	参考文献
适配体传感器	6.25~125 ng/mL	2.5	20	[23]
SERS	50~10000 ng/mL	24.8	/	[24]
荧光法	1~500 ng/mL	0.64	/	[25]
ELISA	5~135 μg/kg	/	5	[26]
ELISA	1~113.24 ng/mL	6.61	62	[27]
金纳米棒比色法	0~1000 ng/mL	264.71	/	[28]
AuNPs-LFIA	3.46~43.64 ng/mL	3.46	/	[29]
TRFIA	50~10000 μg/kg	/	28.16	[30]
AuNPs-LFIA	1~65/1~75/1.5~85 ng/mL	/	2.20/6.45/2.90	[31]
AuNPs-LFIA	2.5~80 ng/mL	11.1	/	[32]
ACNPs-LFIA	0.625~20 ng/mL	2.4	20	[32]
QDs-LFIA	0.625~20 ng/mL	2.8	/	[32]
QDMs-LFIA	0.62~5.62 ng/mL	1.76	/	本研究
PDA-LFIA	0.33~3.75 ng/mL	1.13	8.4	本研究

注: /表示未提及; 胶体碳(amorphous carbon nanoparticles, ACNPs); 量子点(quantum dots, QDs); 时间分辨荧光免疫测定(time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA); 量子点微球(quantum dot microspheres, QDMs); 表面增强拉曼检测(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS); 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。

## 2.5 PDA-LFIA 特异性检测结果

特异性是评价 LFIA 的重要参数。本研究选择 PAT、OTA、T-2、FB1、15AC-DON、3AC-DON、NIV 7 种常见的真菌毒素进行特异性检测, 其质量浓度为 100 ng/mL, DON 质量浓度为 6 ng/mL。如图 4D 所示, PAT、OTA、T-2、FB1 的试纸条 T 线颜色与空白对照组显色情况相当, 但 DON 结构类似物 15AC-DON、NIV、3AC-DON 的 T 线均有明显抑制, 表明 PDA-LFIA 检测 T-2、PAT、FB1 和 OTA 的特异性良好, 但与其类似物 15AC-DON、3AC-DON、NIV 存在交叉反应。

通过构建 DON 结构类似物 15AC-DON、NIV、3AC-DON 的标准曲线, 计算其各自与 DON 的交叉反应率。结果显示, 3AC-DON 的 IC<sub>50</sub> 为 3.85 ng/mL, 交叉反应率为 29.39%; NIV 的 IC<sub>50</sub> 为 4.37 ng/mL, 交叉反应率为 25.93%; 15AC-DON 的 IC<sub>50</sub> 为 343.65 ng/mL, 交叉反应率为 0.33%, 交叉反应率均低于 30%, 表明 PDA-LFIA 对 DON 及其类似物具有良好的特异性。交叉反应率不同主要在于前期以 DON 的 3 位引入载体合成免疫原制备抗体<sup>[33]</sup>。DON 与 15AC-DON、3AC-DON 和 NIV 的区别在于 15 位、3 位和 4 位的官能团不同。其中, 15AC-DON 中 15 位的乙酰官能团支链较长, 可能影响了抗体的识别能力。

## 2.6 PDA-LFIA 精密度检测结果

通过添加 1、2、3 ng/mL 的 DON 标准品, 评估试纸条的精密度。结果如表 2 所示, 批次内变异系数为 0.54%~7.57%, 批次间变异系数为 1.36%~4.08%, 表明实验具有优异的精密度和重复性。

表 2 PDA-LFIA 精密度的测定(n=3)

Table 2 Determination of precision of PDA-LFIA (n=3)

	添加质量浓度 /(ng/mL)	测定质量浓度 /(ng/mL)	变异系数/%
批次内	1	0.74±0.05	6.56
	2	1.80±0.14	7.57
	3	2.67±0.01	0.54
批次间	1	0.71±0.01	1.36
	2	1.72±0.07	4.08
	3	2.87±0.10	3.56

## 2.7 添加回收实验结果

将构建的 PDA-LFIA 应用于谷物样品中检测 DON。首先通过探究样品提取液的不同稀释倍数, 考察 PDA-LFIA 的甲醇耐受性。当样品提取液稀释 8 倍时所获得的标准曲线与在缓冲溶液中建立的标准曲线基本重合, 表明该稀释倍数能够基本消除甲醇对该检测体系的影响。因此选择将提取液稀释 8 倍进行测定。

通过研究玉米、小米和燕麦样品中 DON 的回收率来判定试纸条的准确性。通过测定 20 份玉米、小米和燕麦样品获得 LOD 值分别为 8.40、6.87、9.89 μg/kg。DON 添加量为 40、80、120 μg/kg, 结果如图 5 所示, 玉米、小米和燕麦中添加回收率分别为 83.77%~115.97%、80.10%~96.52%和 103.74%~122.05%, 变异系数分别小于 12.01%、8.17%和 6.37%。这些结果表明, PDA-LFIA 在多种样品基质中具有较好的稳定性和可靠性。

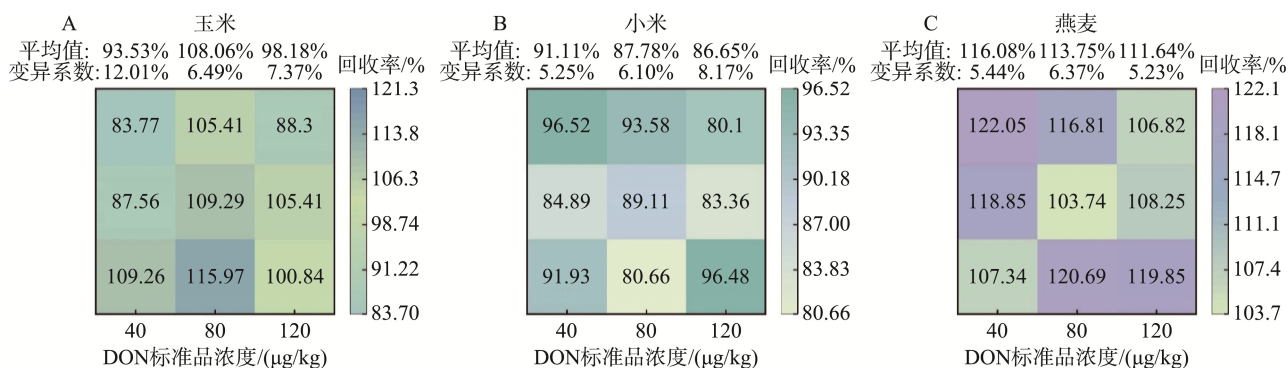


图 5 PDA-LFIA 检测玉米、小米和燕麦样品中 DON 的回收率和变异系数

Fig.5 Recovery rate and coefficient of variation of DON in maize, millet and oats samples detected by PDA-LFIA

目前, PDA 试纸条在实际应用中可能存在以下挑战:

(1)环境因素(如湿度、温度)对试纸条性能的影响。例如,湿度过高可能导致试纸条材料的受潮,从而降低其反应效率,而温度波动则可能影响反应物的稳定性及其反应速率。(2)在批量生产过程中一致性,如试纸条的划线均匀性、反应试剂的稳定性、以及设备精度的控制等因素都可能影响试纸条的性能。

因此,针对环境影响问题,在实际应用中对试纸条进行合理的包装和储存,如放入干燥器或者自封袋保存,避免长时间暴露在高温或高湿环境中。此外,通过改进试纸条的材料和制备工艺,使其对环境变化具有更好的稳定性。例如,使用吸湿性较低的基材,或者在试纸条表面涂覆防潮层,可以有效提高其在复杂环境条件下的适用性。针对批量生产中的技术瓶颈,通过优化生产设备和工艺参数,如划线设备的精准度和试剂的稳定性,来提高生产的一致性。此外,对于探针采用冻干工艺,也能减少批次间的性能波动,从而确保试纸条在实际应用中的可靠性。

### 3 结 论

本研究通过多巴胺氧化自聚合方法成功合成 PDA 载体,该载体合成简单,具有大的比表面积、良好的生物相容性及颜色鲜亮的特点。利用一步混合法简单标记抗体制备了稳定的 PDA-mAb 探针,构建了灵敏的 PDA-LFIA。通过优化实验参数,从而确定最佳实验条件,成功用于玉米、小米和燕麦中 DON 的快速检测。结果表明,该试纸条的  $IC_{50}$  为 1.13 ng/mL,灵敏度优于 QDMs-LFIA 和 AuNPs-LFIA。同时,所构建试纸条具有较好的特异性和精密度。此外,在玉米、小米和燕麦样品中最低检出限分别为 8.40、6.87、9.89 µg/kg,添加回收率在 80.10%~122.05%之间,变异系数均小于 12.01%。综上所述,本研究构建的 PDA-LFIA 不仅成本低、操作简单,而且具有高灵敏度、优异稳定性的特点,为谷物种真菌毒素的快速检测提供技术支撑。

### 参考文献

- [1] PINTO ACSM, DE-PIERRI CR, EVANGELISTA AG, *et al.* Deoxynivalenol: Toxicology, degradation by bacteria, and phylogenetic analysis [J]. *Toxins*, 2022, 14 (2): 90.
- [2] CLAEYS L, ROMANO C, DE-RUYCK K, *et al.* Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(4): 1449–1464.
- [3] ZHANG Y, OUYANG B, ZHANG W, *et al.* Deoxynivalenol: Occurrence, toxicity, and degradation [J]. *Food Control*, 2024, 155: 110027.
- [4] 苗银萍, 赵光升, 赵林萍, 等. 呕吐毒素荧光免疫层析检测卡在谷物产品快速检测中的应用[J]. *农产品质量与安全*, 2023(5): 74–78.
- [5] MIAO YP, ZHAO GS, ZHAO LP, *et al.* Application of fluorescent immunochromatographic test card in rapid detection of DON in cereal products [J]. *Quality and Safety of Agricultural Products*, 2023(5): 74–78.
- [6] CAO M, LI Q, ZHANG Y, *et al.* Determination of deoxynivalenol and its derivative in corn flour and wheat flour using automated on-line solid-phase extraction combined with LC-MS/MS [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021, 107(2): 248–254.
- [7] YANG S, LUO Y, MU L, *et al.* Risk screening of mycotoxins and their derivatives in dairy products using a stable isotope dilution assay and LC-MS/MS [J]. *Journal of Separation Science*, 2021, 44(4): 782–792.
- [8] FENG S, HUA MZ, ROOPESH MS, *et al.* Rapid detection of three mycotoxins in animal feed materials using competitive ELISA-based origami microfluidic paper analytical device (µPAD) [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415: 1943–1951.
- [9] SUN J, WANG L, SHAO J, *et al.* One-step time-resolved fluorescence microsphere immunochromatographic test strip for quantitative and simultaneous detection of DON and ZEN [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(26): 6489–6502.
- [10] DING M, DOU L, BU T, *et al.* Nanometal surface energy transfer-based lateral flow immunoassay for T2 toxin detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2025, 267: 116779.
- [11] ZHOU M, CHEN X, SHEN X, *et al.* Highly sensitive immunochromatographic detection of zearalenone based on ultrabright red-emitted aggregation-induced luminescence nanoprobes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(10): 4408–4416.

- [11] HAO L, CHEN J, CHEN X, *et al.* A novel magneto-gold nanohybrid-enhanced lateral flow immunoassay for ultrasensitive and rapid detection of ochratoxin A in grape juice [J]. *Food Chemistry*, 2021, 336: 127710.
- [12] HOU S, MA J, CHENG Y, *et al.* Quantum dot nanobead-based fluorescent immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of fumonisin B1, deoxynivalenol, and zearalenone in grains [J]. *Food Control*, 2020, 117: 107331.
- [13] CHEN J, YANG Z, ZHANG J, *et al.* High bioaffinity controllable assembly nanocarrier UiO-66-NH<sub>2</sub>@Quantum dot-based immunochromatographic assay for simultaneous detection of five mycotoxins in cereals and feed [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(44): 16797–16806.
- [14] FENG J, XU L, QI L, *et al.* Polydopamine-mediated metal-organic frameworks modification for improved biocompatibility [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2024, 1: 2400071.
- [15] GUO X, XU H, MA X, *et al.* Photothermal polydopamine coated VO<sub>2</sub> nanoparticle thin film with enhanced optical property and stability [J]. *Vacuum*, 2022, 196: 110776.
- [16] LEE HA, PARK E, LEE H. Polydopamine and its derivative surface chemistry in material science: A focused review for studies at KAIST [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(35): 1907505.
- [17] LIU S, DOU L, YAO X, *et al.* Polydopamine nanospheres as high-affinity signal tag towards lateral flow immunoassay for sensitive furazolidone detection [J]. *Food Chemistry*, 2020, 315: 126310.
- [18] ZHAO S, BU T, YANG K, *et al.* Immunochromatographic assay based on polydopamine-decorated Iridium oxide nanoparticles for the rapid detection of salbutamol in food samples [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(24): 28899–28907.
- [19] HOU B, SONG X, SONG K, *et al.* Synchronous preparation and modification of LDH hollow polyhedra by polydopamine: Synthesis and application [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2024, 654: 235–245.
- [20] ZHANG X, DING M, MAO Y, *et al.* A comparative study of “turn-off” mode and “turn-on” mode lateral flow immunoassay for T-2 toxin detection [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2022, 359: 131545.
- [21] LI Z, WANG J, WANG Y, *et al.* Development of a lateral flow immunoassay based on a highly specific monoclonal antibody to detect 4-methylaminoantipyrine [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(28): 10841–10849.
- [22] ZHANG G, ZHANG G, LAI X, *et al.* Highly sensitive and ultrastable lateral flow immunoassay based on polydopamine-coated aggregation-induced emission fluorescent microspheres with excellent fluorescence performance and biofriendly coupling strategy [J]. *Chemistry of Materials*, 2023, 35(9): 3494–3502.
- [23] PAGKALI V, PETROU PS, MAKARONA E, *et al.* Simultaneous determination of aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>1</sub> and deoxynivalenol in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 445–453.
- [24] LI J, YAN H, TAN X, *et al.* Cauliflower-inspired 3D SERS substrate for multiple mycotoxins detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(6): 3885–3892.
- [25] LIN X, LI C, MENG X, *et al.* CRISPR-Cas12a-mediated luminescence resonance energy transfer aptasensing platform for deoxynivalenol using gold nanoparticle-decorated Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>TXene as the enhanced quencher [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 433: 128750.
- [26] WU Y, YU J, LI F, *et al.* A calibration curve implanted enzyme-linked immunosorbent assay for simultaneously quantitative determination of multiplex mycotoxins in cereal samples, soybean and peanut [J]. *Toxins*, 2020, 12(11): 718.
- [27] HAN L, LI YT, JIANG JQ, *et al.* Development of a direct competitive ELISA kit for detecting deoxynivalenol contamination in wheat [J]. *Molecules*, 2020, 25(1): 50.
- [28] 张颖, 刘洪美, 李丽, 等. 基于金纳米棒金属化的呕吐毒素多色可视化检测方法研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(8): 187–194.  
ZHANG Y, LIU HM, LI L, *et al.* Multicolor visual detection of deoxynivalenol based on metallization of gold nanorods [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(8): 187–194.
- [29] FENG J, XUE Y, WANG X, *et al.* Sensitive, simultaneous and quantitative detection of deoxynivalenol and fumonisin B1 in the water environment using lateral flow immunoassay integrated with smartphone [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 834: 155354.
- [30] WANG J, WANG L, ZHANG H, *et al.* Development of a time-resolved immunochromatographic strip for rapid and quantitative determination of deoxynivalenol [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1142820.
- [31] GIRMATSION M, TANG X, ZHANG Q, *et al.* Phycocyanin-based rapid fluorometric immunoassay for the determination of aflatoxin B1, deoxynivalenol, and zearalenone in food and feed matrices [J]. *Food Control*, 2024, 164: 110585.
- [32] ZHANG X, YU X, WEN K, *et al.* Multiplex lateral flow immunoassays based on amorphous carbon nanoparticles for detecting three fusarium mycotoxins in maize [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(36): 8063–8071.
- [33] ZHANG X, YU X, WANG J, *et al.* One-step core/multishell quantum dots-based fluoroimmunoassay for screening of deoxynivalenol in maize [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11: 2569–2578.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)