

# 纳米金生物条形码技术检测坚果中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

余宇燕, 王彤颖, 邹艳辉, 高璇, 邱亚利

(福建中医药大学药学院, 福建福州 350122)

**摘要:** 利用金纳米颗粒、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)多抗和互补纳米金探针链、条形码 DNA 链制备纳米金探针 (NP), 纯化后进行透射电子显微镜 (TEM)、紫外-可见光谱 (UV-vis) 和浓度鉴定。将其与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 单抗修饰的磁性微球探针 (MMP) 通过抗原抗体作用连接, 制备 MMP-AFB<sub>1</sub>-NP 三明治复合物结构, 利用实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 检测在高温低盐条件下解链的条形码 DNA, 通过考察反应结束后每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数值与相应起始模板拷贝数之间的线性相关程度, 建立黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的生物条形码检测方法, 并对检测体系进行了方法学评价。结果表明, 本实验所建立的方法具有快速灵敏、特异性高等特点, 每个模板的循环数值与该模板的起始拷贝数的对数具明显的线性关系  $y = -2.9054x + 54.581$ ,  $r = 0.9991$ , 检测灵敏度远远超过酶联免疫吸附法 (ELISA) 可达  $10^{-8}$  ng/mL, 批间批内差值均小于 5%, 用建立的生物条形码检测方法 (BCA) 对结构类似物进行特异性交叉试验, 特异性良好。本法可用于花生、腰果等坚果类食品中 AFB<sub>1</sub> 的痕量检测。

**关键词:** 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>; 生物条形码; 三明治结构; 荧光定量 PCR; 坚果

文章编号: 1673-9078(2016)8-278-283

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.042

## Detection of AFB<sub>1</sub> in Nuts by a Nanoparticle-based Bio-Barcode Assay

YU Yu-yan, WANG Tong-ying, ZOU Yan-hui, GAO Xuan, QIU Ya-li

(College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**Abstract** Gold nanoparticle probes (NP) were prepared using gold (Au) nanoparticles, AFB<sub>1</sub> polyclonal antibodies, a complementary gold nanoparticle probe, and barcode DNA, and was characterized after purification using transmission electron microscopy (TEM), ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy, and concentration measurement. NPs were coupled with AFB<sub>1</sub> monoclonal antibody-modified magnetic microspheres (MMPs) through an antigen-antibody interaction to yield NP-AFB<sub>1</sub>-MMP sandwich compounds. Fluorescence quantitative-polymerase chain reaction (FQ-PCR) was employed to detect the bio-barcode DNA that was released under high temperature and low salt conditions. A bio-barcode assay for detecting AFB<sub>1</sub> was established by investigating the linear correlation between the number of the cycles required for the fluorescence signal in each tube to reach the set threshold value after the reaction, and the number of the corresponding initial template copies, and methodological evaluation was conducted on the detection system. The results indicated that the method established in this experiment is rapid, sensitive, and highly specific. A significant linear relationship was observed between the number of the cycles in each template and the logarithm of the number of initial copies of this template ( $y = -2.9054x + 54.581$ ,  $r = 0.9991$ ). The detection sensitivity limit was about  $10^{-8}$  ng/mL, much more sensitive than the limit of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The intra- and inter-assay CV (coefficient of variation) values of FQ-PCR were less than 5%, indicating satisfactory accuracy. The established bio-barcode assay (BCA) was used to conduct a crossover experiment on compounds with similar structures, and the results showed a good specificity. This method can be used to determine trace amounts of AFB<sub>1</sub> in peanuts, cashews, and other nuts.

**Key words:** aflatoxin B<sub>1</sub>; bio-barcode assay; sandwich structure; fluorescence quantitative-polymerase chain reaction; nuts

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFs) 是黄曲霉、寄生曲霉和特曲霉产生的次级代谢物, 在目前已发现的黄曲霉毒素中, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>) 毒性最强、分布最广、含量最高, 被称为第一大类致癌物, 其急性毒性

收稿日期: 2015-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81202914); 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目 (2015-ZQN-JC-33)

作者简介: 余宇燕 (1973-), 女, 博士, 副教授, 主要从事免疫分析的新技术新方法研究

是氰化钾的 10 倍, 是砒霜的 68 倍; 其诱发肝癌的能力是二甲基亚硝胺的 75 倍, 是 3,4-苯并芘的 4000 倍<sup>[1]</sup>。研究表明, 体内黄曲霉毒素在含量在 1 mg/kg 的水平以上就可诱发癌症<sup>[2]</sup>。坚果在采集、加工、贮藏的过程中, 由于污染黄曲霉产生黄曲霉毒素, 从而影响人体的健康。随着人们对 AFB<sub>1</sub> 的危害不断了解, 以及对食品药品质量安全意识逐步增强, 各国政府对 AFB<sub>1</sub> 含量要求越来越严格, 美国联邦政府有关法律规

过 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 欧盟对坚果中 AFB<sub>1</sub> 限量标准为 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 我国食品安全国家标准《食品中真菌毒素限量》GB 2761-2011 规定坚果类食品中 AFB<sub>1</sub> ≤ 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此, 研究快速准确、高灵敏度、高选择性、高通量的 AFB<sub>1</sub> 分析检测技术和方法, 可对食品及相关制品的污染状况、污染途径和影响因素加以防范, 提高食品安全性和保障人民健康有着非常重要的意义。

目前检测药品食品中黄曲霉毒素的方法主要有色谱法、免疫分析法以及生物传感器法等<sup>[3-6]</sup>。2003 年, 美国科学家 Mirkin 等<sup>[7]</sup>人首次报道的生物条形码检测技术 (Bio-barcode assay, BCA), 是利用直径在一个或几个微米的磁性微球包被抗目标蛋白的抗体, 制成的磁性探针可以吸附目标蛋白, 此技术可以对痕量蛋白和核酸进行检测<sup>[8]</sup>。该技术利用纳米金作为信号放大工具, 满足了高敏感性和低费用的要求, 每一个直径为 30 nm 的胶体金上大约都能标记 400 条左右的条形码 DNA 链, 利用磁场作用使“金纳米颗粒-目标物-磁性微球”复合物聚集, 再释放金纳米颗粒上的 DNA 条形码链, 选用多种方法对释放的 DNA 条形码链进行检测<sup>[9-10]</sup>。该技术具有聚合酶链扩增反应灵敏度但不需要酶放大, 其技术的突出特点是具有极高的灵敏度, 能检出浓度低至几百个分子的抗原物质, 为现行任何一种免疫定量方法所不及<sup>[11]</sup>。目前生物条形码技术在核酸和蛋白的应用上比较多, 在小分子的应用上基本处于空白状态, 本研究所建立快速高灵敏度的 AFB<sub>1</sub> 的纳米粒子-生物条形码检测新技术, 检测灵敏度较 ELISA 法低 8 个数量级, 可用于食品中 AFB<sub>1</sub> 组分的痕量测定, 也为其他小分子化合物的痕量测定提供了一个新的研究思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

#### 1.1.1 试剂

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 标准品 (北京华安麦科生物技术有限公司, 纯度 > 99%); 氯金酸、N,N'-二甲基甲酰胺 (美国 Sigma 公司); 柠檬酸三钠 (国药集团化学试剂有限公司); M-270 Amine 磁珠 (Invitrogen 公司); 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 单克隆抗体 (本实验室自制); 花生、腰果、核桃、葵花子 (各 100 g, 均购自福州家乐福超市); 高纯水。

#### 1.1.2 仪器

H-7900 荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统中国公司), 微量核酸蛋白分析仪 (Thermo), 台式高速大容量离心机 (Eppendorf), 恒温培养摇床

(SUKUN), H-7650 透射电子显微镜 (日立高新技术国际贸易有限公司) 等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 NP 探针的制备

取 10 mL 金纳米颗粒, 用 0.1 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节 pH, 加入 1.3 mg 自制 AFB<sub>1</sub> 多抗<sup>[12]</sup>, 搅拌 10 min, 缓慢逐滴加入 11% 的 BSA 1 mL 静置 30 min; 4 °C, 13000 r/min 离心 1 h, 沉淀物用含 1% BSA 的 0.01 mol/L、pH 7.6 PBS 混悬至原量; 平衡过夜后, 同上离心 2 次; 最后沉淀用 PBS 混悬为 1 mL; 取 1 mL AFB<sub>1</sub> 多抗修饰的金纳米颗粒, 加入 500  $\mu\text{L}$  浓度为 2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的互补探针链, 25 °C 放置 16 h; 调整 pH 至 7.0, 增强离子浓度至 0.1 mol/L NaCl, 25 °C 放置 40 h, 离心得到含互补探针链修饰的金纳米颗粒; 沉淀用 PBS 溶液洗涤 3 次, 去除未标记的金纳米颗粒; 取 500  $\mu\text{L}$  浓度为 2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的条形码 DNA 链加入上述标记有互补探针链修饰的金纳米颗粒中, 25 °C 杂交 4 h, 离心得到 NP 探针, 沉淀用 PBS 溶解备用。

#### 1.2.2 MMP 探针的制备<sup>[13]</sup>

取 200  $\mu\text{L}$  的磁珠用 2 mL 的 PBS 重悬, 磁性分离弃上清, 用 200  $\mu\text{L}$  的 PBS 重悬磁珠备用; 加入 1.6 mL PBS, 振荡后弃上清, 加入 0.8 mL 5% 的戊二醛, 剧烈振荡; 将离心管放到一个无磁性的混合器上反应 3 h, 分离弃上清后, 再加入 1.6 mL PBS, 磁性分离弃上清。将 60  $\mu\text{g}$  自制 AFB<sub>1</sub> 单抗溶于 12 mL PBS 中<sup>[12]</sup>, 加入激活的磁珠, 剧烈振荡, 然后将离心管置于混合器上反应 20 h, 磁性分离弃上清; 在 24 mL PBS 中重悬磁珠; 加入 12 mL 淬灭剂 (0.1 mol/L 甘氨酸), 剧烈振荡, 将其放在混合器上反应 30 min; 磁性分离弃上清; 用 PBS 清洗 3 次, 磁性分离弃上清; 用 1.6 mL 洗液重悬磁珠, 4 °C 保存。

#### 1.2.3 制备 MMP-AFB<sub>1</sub>-NP 三明治结构

将 10 ng AFB<sub>1</sub> 加入至 200  $\mu\text{L}$  抗 AFB<sub>1</sub> 抗原的单抗功能化的磁性微球中, 37 °C 下剧烈震荡 1 h; 用磁场固定 MMP 探针, 用 PBS 溶液清洗 4 遍, 除去未连接的 AFB<sub>1</sub> 抗原和其他杂质蛋白; 加入 200  $\mu\text{L}$  被双链 DNA 和抗 AFB<sub>1</sub> 的多抗修饰的金纳米颗粒, 剧烈震荡 30 min, 以形成三明治结构; 用磁铁固定 MMP 探针, 用 400  $\mu\text{L}$  的 PBS 缓冲液反复冲洗 4 次, 除去未连接的 NP 探针。

#### 1.2.4 释放条形码 DNA

加入 100  $\mu\text{L}$  灭菌水到三明治结构中, 60 °C 剧烈震荡 45 min, 使条形码 DNA 链去杂交, 用磁铁固定 MMP 探针, 收集的上清液中含条形码 DNA 链。其过

程如图 1 所示:

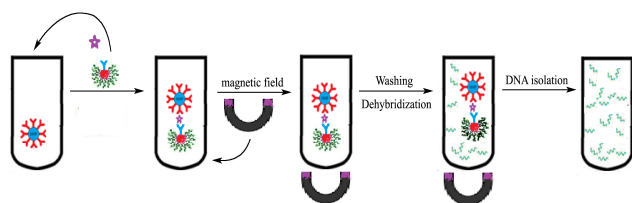


图 1 生物条形码制备过程示意图

Fig.1 Schematic diagram for the bio-barcode assay

注: ● 磁珠 magnetic microspheres; ● 纳米金 gold nanoparticles; Y 单抗 Monoclonal antibody; Y 多抗 Polyclonal antibody; ☆ 样品 Sample; ★ NP-探针 NP Probe; ★ MMP-探针 MMP Probe; ~ 条形码 DNABarcode DNA; U 磁铁 magnet.

### 1.2.5 条形码 DNA 链的 FQ-PCR 检测

采用天根公司生产的 SuperReal 荧光定量预混试剂增强版检测试剂盒, 以获得的条形码 DNA 链为模板进行 FQ-PCR 检测。

引物 1: CGC ATT CAG GAT TGC ATG AT

引物 2: TAC GAC TTG ACA CCG TTA AG

条形码 DNA 链: 5'-CGC ATT CAG GAT TGC ATG ATT GCC TCG TCT TAA CGG TCT CAA CTC GTA-3'

互补探针链: 5'-TAC GAG TTG AGA CCG TTA AGA CGA GGC AAT CAT GCA ATC CTG AAT GCG A<sub>10</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-SH-3'

本实验采用两步法进行 FQ-PCR 检测。

### 1.2.6 样品测定

取供试品花生、核桃、腰果和葵花子经粉碎过筛后, 取 5 g 于 125 mL 的具塞三角瓶中, 准确加入 25 mL 70% 甲醇水溶液, 超声波提取 30 min, 静置 5 min 后, 用快速定性滤纸过滤, 收集滤液, 再过 0.45 μm 微孔滤膜, 将其用样品稀释液稀释 20 倍用于检测。将检测结果与 ELISA 法进行比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 NP 探针的制备、纯化及鉴定

#### 2.1.1 金纳米颗粒的制备和鉴定

采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金, 经肉眼观察到的溶液不浑浊、无沉淀、无漂浮物, 将制备好的胶体金在 200~800 nm 范围内进行紫外扫描, 以 λ(nm) 为横坐标, 吸光值 A/1 cm 为纵坐标作图, 得一条光滑曲线 (如图 2), 最大吸收波长 λ<sub>max</sub>=520 nm, 其对应的 A 值为 0.721。

金纳米颗粒的 TEM 鉴定结果如图 3 所示, 金纳米颗粒的形态为圆形或椭圆形, 粒径基本一致, 大小

约为 30 nm。

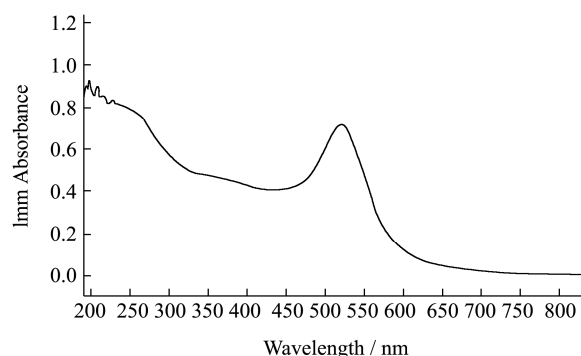


图 2 胶体金 UV-vis 扫描图谱

Fig.2 UV-vis spectrum of colloidal gold

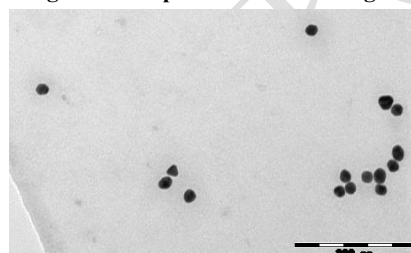


图 3 胶体金的 TEM 图

Fig.3 TEM image of colloidal gold

#### 2.1.2 NP 探针的制备、纯化及鉴定

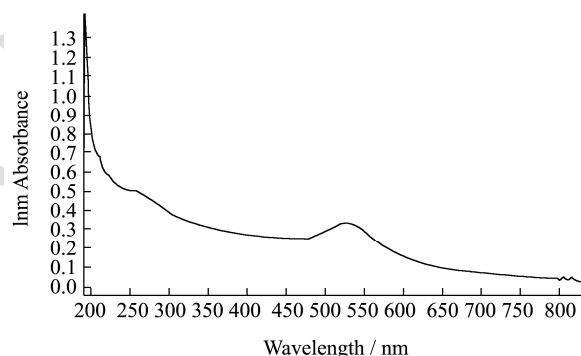


图 4 NP 探针的 UV-vis 鉴定结果

Fig.4 UV-vis spectrum of NP probes

将制备好的 NP 探针在 200~800 nm 范围内进行紫外扫描, 结果如图 4 所示 λ<sub>max</sub>=528 nm, 对应的 A 值为 0.324。含互补探针 NP 链修饰的金纳米溶液的最大吸收波长有所红移。蛋白质溶液内多余的电解质会降低胶体金颗粒的 Zeta 电位, 影响蛋白质的吸附, 因此, 标记之前须彻底除盐。将蛋白质用低浓度的盐水 (0.005 mol/L NaCl, pH 7.0) 透析 3 d, 每 6 h 换一次透析液, 4 °C 下 12000 r/min 离心 30 min, 去除聚合物。pH 过酸、过碱会影响金纳米颗粒的稳定, 考察得出蛋白标记最适 pH 范围为 7~8。考察蛋白标记最适用量, 当加入的 AFB<sub>1</sub> 多抗量不足, 不能稳定金纳米颗粒, 故在最低稳定量的基础上是增加 20% 则为实验用量, 实验选用多抗用量 26 μg。

### 2.1.3 MMP 探针的制备与鉴定

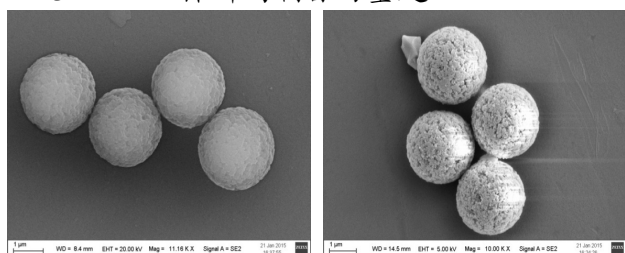


图5 磁珠及 MMP 探针的 SEM 扫描结果

Fig.5 SEM image of magnetic beads and MMP probes

注:上-磁珠;下-MMP 探针。

采用戊二醛法对磁珠进行激活,并对 MMP 探针进行扫描电子显微镜 (SEM) 检测。如图 5 所示,磁珠耦合前后,表面发生了明显的变化,由较光滑的表面变为较粗糙的表面,磁珠偶联全过程都处于温和的环境中,表面的变化说明磁珠与 AFB<sub>1</sub> 单抗发生了耦合。整个过程对磁珠的磁性要求极高,因此在磁珠的激活、标记以及形成三明治结构和 DNA 的释放过程中,磁珠的清洗非常关键,任何一步中磁珠没有清洗干净都会对后面的结果造成极大的影响;只有在高温低盐的情况下双链 DNA 才会解链释放,因此获取 DNA 链时的温度要控制好。

表 1 FQ-PCR 检测体系的重复性

Table 1 Repeatability examined by FQ-PCR

拷贝数	批间实验	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	Ct 均值	SD	CV/%批内	CV/%批间
1×10 <sup>11</sup>	1	21.933	22.010	22.000	21.744	21.425	21.822	0.22	1.01	
	2	21.569	22.330	21.225	21.931	21.732	21.757	0.37	1.69	1.53
	3	21.731	21.038	22.018	21.821	21.837	21.689	0.34	1.56	
1×10 <sup>8</sup>	1	23.502	23.351	24.220	23.650	22.283	23.401	0.63	2.70	
	2	22.948	23.298	24.018	23.840	23.628	23.546	0.38	1.63	2.37
	3	23.847	22.498	23.447	24.073	23.747	23.522	0.55	2.34	
1×10 <sup>5</sup>	1	26.023	26.638	26.107	27.796	27.038	26.720	0.65	2.44	
	2	27.450	26.581	27.021	26.471	27.434	26.991	0.41	1.52	2.44
	3	28.135	26.133	26.734	27.766	26.902	27.134	0.72	2.67	
阴性对照	1	0	0	0	0	0	0	0		
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		

筛选出其中的 5 个点 (10<sup>15</sup>~10<sup>11</sup> copies/μL) 作为线性范围,此时两者有良好的线性关系。线性方程 y=-2.9054x+54.581, r=0.9991。

### 2.2.2 重复性

分别对不同拷贝数的 AFB<sub>1</sub> 对照品进行 FQ-PCR 检测,计算它们的批内及批间重复性。由表 1 可知,FQ-PCR 对不同拷贝数检测结果的批内及批间 CV 值均小于 5%,说明重复性好

### 2.2.3 特异性

## 2.2 BCA 检测体系的建立

### 2.2.1 标准曲线

反应结束后考察每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数值 (Ct) 与相应起始模板拷贝数 (copies) 之间的线性相关程度。将 10 倍梯度稀释的对照品 (10<sup>15</sup>~10<sup>0</sup> copies/μL) 同时进行 FQ-PCR 扩增,扩增结果见图 6。

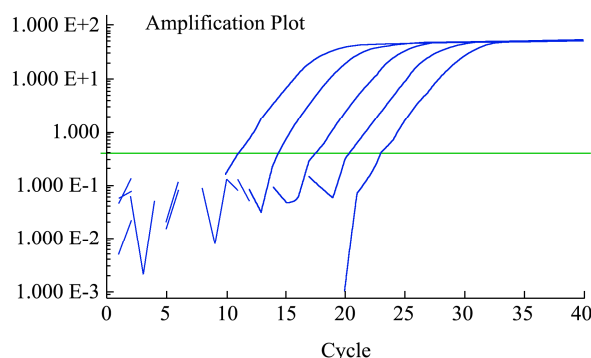


图 6 对照品的扩增结果

Fig.6 PCR amplification of the standard

注:从左至右分别为条形码 DNA 10<sup>15</sup>~10<sup>11</sup> copies/μL。

根据图 7 可知,AFB<sub>1</sub> 与玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 的 FQ-PCR 无交叉反应,与 AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 由于结构非常相似,有一定的交叉反应。未来可考虑新的人工抗原制备方法以提高的单克隆抗体和多克隆抗体的特异性,或建立对黄曲霉毒素总量的生物条形码体系测定。

### 2.2.4 灵敏度

将释放得到的条形码 DNA 链进行 FQ-PCR 检测,结果见表 2。结果表明,FQ-PCR 检测灵敏度可达 10<sup>-8</sup>

ng/mL, 较传统的 ELISA 法低数个数量级。

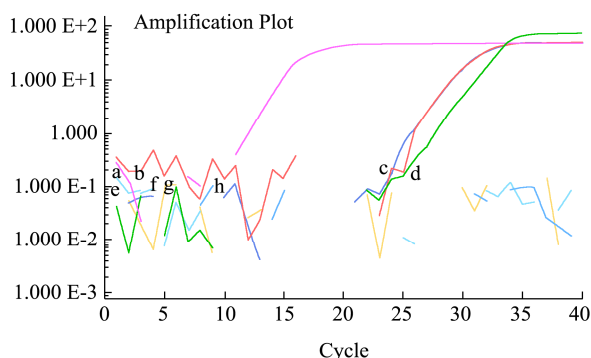


图7 FQ-PCR 特异性检测结果

Fig.7 Specificity examined by FQ-PCR

注: 图中 a-h 分别代表 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、赭曲霉毒素 A。

表 2 AFB<sub>1</sub> 各个稀释度的 Ct 值

Table 2 Cycle number of AFB<sub>1</sub> at different concentrations

AFB <sub>1</sub> 浓度/(ng/mL)	Ct 值±RSD
10 <sup>-3</sup>	13.966±0.016
10 <sup>-4</sup>	17.695±0.047
10 <sup>-5</sup>	19.139±0.032
10 <sup>-6</sup>	21.284±0.014
10 <sup>-7</sup>	23.782±0.027
10 <sup>-8</sup>	22.795±0.041
10 <sup>-9</sup>	undetermind
0	undetermind

### 2.2.5 样品测定

将用样品制备三明治结构释放得到的条形码 DNA 进行 FQ-PCR 检测, 与 ELISA 法进行比较结果见表 3。

表 3 样品测定结果

Table 3 Result of sample determination

方法	灵敏度 (ng/mL)	样品中 AFB <sub>1</sub> 检测浓度/(ng/mL)			
		花生	腰果	核桃	葵瓜子
FQ-BCA	10 <sup>-8</sup>	0.397±0.026	ND	0.172±0.075	ND
ELISA	1.59	ND	ND	ND	ND

注: ND-未检出。

### 3 结论

以胶体金标记多克隆抗体后连接互补探针链和条形码 DNA 链制备 NP 探针, 以单克隆抗体标记磁珠制备 MMP 探针, 最终形成“MMP-AFB<sub>1</sub>-NP”三明治结构, 并在高温低盐的环境下获取条形码 DNA 链, 用 FQ-PCR 对其进行检测, 建立了基于 FQ-PCR 的 BCA 检测技术。结果显示, 在 DNA 拷贝数为 10<sup>15</sup>~10<sup>11</sup>copies/μL 范围内 Ct 值与相应起始模板拷贝

数之间存在线性关系  $y=-2.9054x+54.581$ ,  $r=0.9991$ 。批间批内重复性好, 灵敏度为 10<sup>-8</sup> ng/mL, AFB<sub>1</sub> 与 AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 由于结构非常相似有一定的交叉反应, 与米赤霉毒素、呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 无交叉反应。目前, 国内外有关纳米金生物条形码技术主要运用于大分子物质的检测中, 本研究所建立的方法可用于坚果中黄曲霉毒素的测定, 此法也为小分子物质的痕量测定提供了新的思路。

### 致谢

感谢福建省中药学重点实验室平台支持; 感谢福建中医药大学中西医结合学院形态学平台提供 H-7900 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI) 和 H-7650 透射电子显微镜(日立)支持。

### 参考文献

- [1] Hussein H S, Brasel J M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals [J]. J. Toxicology, 2001, 167: 101-134
- [2] Peraica M, Radić B, Lucić A, et al. Toxic effects of mycotoxins in humans [J]. Bull World Health Organ, 1999, 77(9): 754-766
- [3] Han Z, Zheng Y L, Luan L J, et al. An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in traditional Chinese medicines [J]. Anal. Chim. Acta, 2010, 664(2): 165-171
- [4] Hassan Y, Afshin Z, Ali R S, et al. Analysis of aflatoxin b1 in Iranian foods using HPLC and a monolithic column and estimation of its dietary intake [J]. Iran. J. Pharm. Res., 2013, 12: 83-89
- [5] Ruchika C, Pratima R S, Jay S, et al. A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for aflatoxin B1 detection in groundnut [J]. Food Control, 2015, 52: 60-70
- [6] Liu B H, Hsu Y T, Lu C C, et al. Detecting aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip [J]. Food Control, 2013, 30(1): 184-189
- [7] Nam J M, Thaxton C S, Mirkin C A. Based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins [J]. Science, 2003, 301: 1884-1846
- [8] Stoeva S I, Lee J S, Smith J E, et al. Multiplexed detection of protein cancer markers with biobarcode nanoparticle probes [J]. Am. Chem. Soc., 2006, 128: 8378-8379
- [9] Hill H D, Vega R A, Mirkin C A. Nonenzymatic detection of

- bacterial genomic DNA using the bio bar code assay [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 9218-9223
- [10] Thaxton C S, Hill H D, Georganopoulou D G, et al. A bio-bar-code assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release [J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 8174-8178
- [11] Nam J M, Stoevam S I, Mirkin C A. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 26(19): 5932-5933
- [12] 余宇燕,邱亚利,张红艳,等.直接竞争荧光免疫法测定中药材中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>[J].*化学通报*,2015,78(9):830-834
- [13] YU Yu-yan, QIU Ya-li, ZHANG Hong-yan, et al. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in traditional Chinese medicines by direct competitive fluorescence immunoassay [J]. *Chemistry*, 2015, 78(9): 830-834
- [14] Nicole J R, Claude M, Yann C, et al. Biosensors and bio-bar code assays based on biofunctionalized magnetic microbeads [J]. *Sensors*, 2007, 7: 589-614