

基于金属有机骨架 (ZIF-8) 的酶联免疫法灵敏检测米粉中的黄曲霉毒素 B₁

黄周梅^{1,2}, 武旭悦^{1,3}, 黄金发⁴, 袁真宏^{1,2}, 毕洁^{1,3}, 王加华^{1,2}, 舒在习¹, 肖安红^{1,3}, 戴煌^{1,2*}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023) (2. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 湖北武汉 430023) (3. 湖北省农产品加工与转化重点实验室, 湖北武汉 430023) (4. 山东新希望六和集团有限公司, 山东青岛 266100)

摘要: 为解决黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 快速检测方法中信号标记物稳定性差的问题, 建立基于金属有机骨架的酶联免疫法检测米粉中 AFB₁。该研究采用仿生矿化方法将辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 封装在沸石咪唑骨架结构材料 (zeolite imidazole frameworks-8, ZIF-8) 中作为信号标记物。发现 HRP@ZIF-8 复合材料在碱性条件、高温等极端条件下能保持稳定的催化活性。在此基础上建立间接竞争免疫比色法检测 AFB₁, 通过肉眼可直接分辨含有 AFB₁ 样品。在最佳条件下, 随着 AFB₁ 浓度的增加, 吸光度在 0.01~20 ng/mL 内递减, 具有明显的线性关系 $y=0.03 \times C_{[AFB_1]}+0.79$, $R^2=0.99$, 检测限为 72 pg/mL, 同时精密度和特异性都达到可接受的水平, AFB₁ 在米粉和面粉中的添加回收率分别在 96.00%~105.00%、82.00%~110.00% 之间, 相对标准偏差均小于 5%。该法操作简单、快速、灵敏、特异性好, 可用于米粉、面粉等谷类食品中 AFB₁ 的痕量检测。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 沸石咪唑骨架结构-8; 仿生矿化; 酶联免疫法; 米粉

文章编号: 1673-9078(2022)03-299-306

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0691

Sensitive Detection of Aflatoxin B₁ in Rice Flour by Enzyme-linked Immunoassay Based on Metal Organic Framework (ZIF-8)

HUANG Zhoumei^{1,2}, WU Xuyue^{1,3}, HUANG Jinfa⁴, YUAN Zhenhong^{1,2}, BI Jie^{1,3}, WANG Jiahua^{1,2}, SHU Zaixi¹, XIAO Anhong^{1,3}, DAI Huang^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China) (2. The Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil (Wuhan Polytechnic University) Ministry of Education, Wuhan 430023, China) (3. Hubei Provincial Key Laboratory of Agricultural Products Processing and Transformation, Wuhan 430023, China) (4. Shandong New Hope Liuhe Group Co. Ltd., Qingdao 266100, China)

Abstract: In order to solve the problem of poor stability of signal markers in the rapid detection method of aflatoxin B₁ (AFB₁), an enzyme-linked immunoassay based on metal organic frameworks (MOFs) was established to detect AFB₁ in rice flour. In this study, a biomimetic mineralization method was used to encapsulate horseradish peroxidase (HRP) in the zeolite imidazole framework structure material-8 (ZIF-8) as a signal marker. HRP@ZIF-8 composites could maintain stable catalytic activity under extreme conditions such as alkaline condition and high temperature. On this basis, an indirect competitive immunocolorimetry was established to detect AFB₁. The samples containing AFB₁ can be directly identified by naked eyes. Under the optimum conditions, the absorbance decreased in the range of 0.01~20

引文格式:

黄周梅,武旭悦,黄金发,等.基于金属有机骨架(ZIF-8)的酶联免疫法灵敏检测米粉中的黄曲霉毒素 B₁ [J].现代食品科技,2022,38(3): 299-306,+327

HUANG Zhoumei, WU Xuyue, HUANG Jinfa, et al. Sensitive detection of aflatoxin B₁ in rice flour by enzyme-linked immunoassay based on metal organic framework (ZIF-8) [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 299-306, +327

收稿日期: 2021-07-05

基金项目: 大宗粮油精深加工教育部重点实验室(武汉轻工大学)开放基金项目(2019GYBQGDKFA01; 2020JYBQGDKFB10)

作者简介: 黄周梅(1997-),女,硕士研究生,研究方向:粮油品质分析与检验, E-mail: 18771235761@163.com

通讯作者: 戴煌(1987-),男,博士,讲师,研究方向:食品、农产品品质安全与检测, E-mail: huangdai9@126.com

ng/mL with the increase of AFB₁ concentration, showing an obvious linear relationship with $y = 0.03 \times C_{[AFB_1]} + 0.78$, $R^2 = 0.99$. The limit of detection was 72 pg/mL, and the precision and specificity were both acceptable. The recoveries of AFB₁ in rice flour and flour were 96.00%~105.00% and 82.00%~110.00%, respectively, with relative standard deviations less than 5%. The method is simple, rapid, sensitive and specific. It can be used for trace determination of AFB₁ in cereals such as rice flour and flour.

Key words: aflatoxin B₁; zeolite imidazole framework structure-8; biomimetic mineralization; enzyme-linked immunoassay; rice flour

黄曲霉毒素主要是由黄曲霉、寄生曲霉和黑曲霉及亚种等在合适的温度和湿度条件下产生的次级代谢产物, 对人畜有强烈的致病性、致癌性, 严重危害人体健康, 在粮油、饲料以及副产品中广泛存在^[1-3]。黄曲霉毒素性质稳定、毒性高、易致癌, 已被视为世界范围内重要的食品污染物^[4]。黄曲霉毒素有多种亚型结构^[5], 其中黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 被认为是已知化学致癌物质中最强的致癌物质, 常见于花生、玉米、小麦等粮食及其制品中^[4,6,7]。因此, 准确检测食品中 AFB₁ 含量对保障食品安全, 维护人类健康至关重要。传统的仪器检测方法, 如高效液相色谱、薄层色谱和液相色谱-质谱联用^[8-12], 具有检测结果准确、灵敏度高、重复性好等优点, 但这些方法耗时长且难以实现快速灵敏的检测^[13,14]。近年来食品安全事件屡见不鲜, 消费者对食品安全关注越来越关注, 市场对快速检测技术需求也日益旺盛。基于免疫法开发出的快速检测方法具有高度的选择性和灵敏度, 已成为极具竞争力的检测技术之一。然而这些快速检测方法在使用过程中往往受到高成本和稳定性差等缺点的限制^[5]。其次, 基于免疫法的信号标记物不稳定, 检测结果易受环境因素影响而导致假阳性。为了克服这些缺陷, 急需寻找能稳定信号物的新方法。因此, 开发新型材料来保持信号标记物生物催化活性, 使信号标记物能够在复杂多变的环境下保持着优异的稳定是当前研究的重点和难点。

金属-有机框架(metal-organic frameworks, MOFs)材料是一类结晶无机-有机杂化材料, 具有多种独特的性质^[15-17]。例如, 其开放式结构和多峰孔隙率允许有效的传质, 在温和条件下合成, 具有良好生物相容性、化学和热稳定性。这些特性引起了研究者们极大兴趣, 采用 MOFs 作为固定基质来解决酶稳定性和降低检测成本^[18-20]。研究发现, 利用仿生矿化方法将酶封装到 MOFs 中, 复合物在极端环境下能有效保持酶的生物催化活性, 同时能扩展酶催化环境中 pH 和温度的应用范围^[21,22]。目前已经开发出多种 MOFs 作为酶载体, 如沸石咪唑酯骨架结构材料-8 (zeolitic imidazolate framework-8, ZIF-8)^[23]、HKUST-1^[24]、MIL-101 (Cr)^[15]、HP-PCN-224 (Fe)^[25]等。最近, 以 ZIF-8 作为固定化载体, 利用仿生矿化方法在酶表面生成的保护涂

层, 以提高酶的稳定性和可重复性是研究热点^[26,27]。在此启发下, 利用仿生矿化方法在酶表面生成保护层作为酶联免疫法的信号标记物, 以增加酶抗极端环境干扰能力, 提高检测信号稳定性是可行的尝试。

本研究中, 利用仿生矿化方法在 ZIF-8 包埋 HRP (HRP@ZIF-8) 作为信号标记物, 在 HRP 表面生成的 ZIF-8 保护层, 结合酶联免疫技术(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 建立比色法对 AFB₁ 灵敏检测。ZIF-8 的高表面积和有序的孔隙率可以增强 HRP 负载量以获得较强的比色信号。为了构建良好的比色信号探针, 在 HRP@ZIF-8 表面修饰多巴胺(dopamine, DA)形成聚多巴胺(polydopamine, PDA)层。金属-聚多巴胺框架同时具有 MOFs 和 PDA 的优点, 表面富含芳环的 PDA 可以通过疏水-亲水相互作用或 π - π 堆积来修饰生物分子。以 ZIF-8 作为模板制备了具有丰富 π 电子的 HRP@ZIF-8/PDA 复合物与免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 偶联, 合成信号标记物 HRP@ZIF-8/PDA/IgG。利用该复合物催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 显色来构建间接竞争免疫比色法检测 AFB₁, 基于 MOF-ELISA 检测法中 HRP@ZIF-8/PDA/IgG 增加了酶抗极端环境干扰的能力, 提高了检测信号的稳定性。该系统建立了一种通用、快速、灵敏的比色法, 实现了 AFB₁ 的肉眼快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

Zn(NO₃)₂·6H₂O、2-甲基咪唑(2-methylimidazole, 2-MI)、即用型 TMB 显色液、HRP、96 孔微孔板(高结合力, 白色)购自武汉飞扬生物科技有限公司; 多巴胺盐酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris) 等化学试剂均为分析纯, 购买于天津化学试剂公司。脱氧雪腐烯醇 (deoxynivalenol, DON)、AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 小鼠单克隆抗 AFB₁ 抗体 (Ab1, 10.0 mg/mL, 1 mL), AFB₁ 偶联 BSA (AFB₁-BSA, 5.0 mg/mL), 兔抗鼠 IgG 购自山东绿都生物科技有限公司 (中国山东); N-羧基-磺基琥珀酰亚胺 (NHS)/N-(3-二甲基氨基丙基)-N'

乙基碳二亚胺 (EDC) 来自 Sigma-Aldrich 公司 (中国上海)。Milli-pore 超纯水 (18.2 MΩ/cm, 美国 Millipore 公司) 用作溶剂。除非特别说明, 所有实验均在室温下进行。

1.2 仪器

EnVision 多功能酶标仪, 新加坡 Perkin Elmer 公司; JEM-2010 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM), 日本电子株式会社; RigakuD/max-2400 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD), 日本岛津公司; TGA 4000 热重分析仪 (thermal gravimetric analyzer, TGA), 美国林赛斯公司; DXR 2xi 显微拉曼成像光谱仪, 英国雷尼绍公司; 3H24RI 台式智能高速冷冻离心机, 德国贺利氏公司。

1.3 HRP@ZIF-8/PDA/IgG 生物复合材料的合成

2 mol/L 锌离子、1 mg/mL HRP 和 0.5 mol/L 2-MI 在离心管中混合, 总体积为 720 μL, 混合液振荡后在室温下保持 30 min。悬浮液在 4 °C 下 11000 r/min 离心 15 min, 沉淀用去离子水洗。取 500 μL HRP@ZIF-8 溶液与 1 mL 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液混合, 加入 500 μL 0.1 mol/L DA 溶液, 剧烈搅拌 5 min 后, 在室温下轻微振摇 2 h, 形成的悬浮液在 4 °C 下 11000 r/min 离心 15 min。沉淀用去离子水清洗后分散在 1 mL 10 mmol/L pH 7.4 PBS 中。将 EDC/NHS 活化后的 20 μL 0.5 mg/mL IgG 添加到悬浮液中, 在室温下孵育 30 min, 置于 4 °C 冰箱中连续振摇过夜。离心收集沉淀, 用 10 mmol/L pH 7.4 PBS 洗涤 3 次, 去除未结合的 IgG。将获得的 HRP@ZIF-8/PDA/IgG 复合物重新分散在 1.0 mL 10 mmol/L pH 7.4 PBS 中, 置于冰箱中备用。

1.4 酶浓度和封装效率的测定

将 300 μL 2 mol/L 锌离子、300 μL 0.5 mol/L 2-MI 和 120 μL 不同浓度 HRP 在离心管中混合, 混合液振荡后在室温下保持 30 min。悬浮液在 4 °C 下 11000 r/min 离心 15 min, 取上清液检测。固定化后上清液的酶浓度根据 HRP 标准曲线计算来确定。封装率定义为包埋在 HRP@ZIF-8 复合材料中的 HRP 含量与 HRP 初始量的比值, 其计算公式如下:

$$\text{封装效率}/\% = \frac{C_2 - C_1}{C_2} \times 100\%$$

式中:

C_1 ——HRP@ZIF-8 复合材料中的上清液 HRP 浓度;

C_2 ——最初的 HRP 浓度, mg/mL。

1.5 HRP@ZIF-8/PDA 复合材料稳定性检测

热稳定性: 分别将 HRP、HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 复合材料置于不同温度下 (30~100 °C) 孵育 30 min, 分别取出后用于评估复合材料在不同温度环境中的稳定性, 通过测定不同温度处理后 HRP 的相对活性来表示。

pH 稳定性: 分别将 HRP、HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 复合材料置于 pH 3 HCl 溶液、pH 9 KOH 溶液和不同 pH 的 PBS 缓冲液 (pH 4~8.0) 中 1 h, 分别取出后用于评估复合材料在不同 pH 环境中的稳定性, 通过测定不同 pH 处理后 HRP 的相对活性来表示。

1.6 基于 MOF-ELISA 检测 AFB₁ 的原理

利用仿生矿化将 HRP 包裹在 ZIF-8 中, 提高 HRP 在极端环境下的耐受能力和稳定性, 随后将盐酸多巴胺修饰在 HRP@ZIF-8 复合物表面, 为 IgG 提供结合位点, 合成 HRP@ZIF-8/PDA/IgG 信号标记物。在检测 AFB₁ 时, 采用间接竞争法检测, 将 AFB₁-BSA 固定在酶标板上, 加入固定浓度的抗体, 样品中 AFB₁ 与酶标板上固定的 AFB₁ 竞争结合抗体, 清洗移除未结合抗体后加入 HRP@ZIF-8/PDA/IgG, 加入即用型 TMB 显色液检测可见光谱信号, 通过测定结合在酶标板上信号分子的量来确定 AFB₁ 浓度, 具体如图 1 所示。

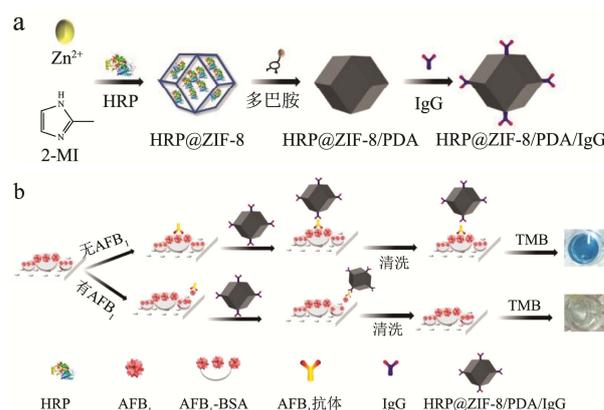


图 1 基于 MOFs 的 ELISA 检测 AFB₁ 原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of MOFs-based enzyme-linked immunoassay for AFB₁ detection

1.7 AFB₁ 比色法的建立和选择性检测

取 96 孔板, 在每个孔内加入 100 μL 0.1 mg/mL AFB₁-BSA, 37 °C 孵育 2 h 后清洗, 用含有 1.5% BSA-PBST 在 37 °C 封闭 1 h 后清洗。每孔中加入 50 μL

0.1 mg/mL AFB₁ 抗体溶液和 50 μL 标准 AFB₁/分析溶液, 37 °C 孵育 1 h 后清洗。每孔中加入 100 μL HRP@ZIF-8/PDA/IgG 孵育 1 h 后清洗; 加入 50 μL 即用型 TMB 溶液反应, 随后加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪在 450 nm 测吸光度。为了评估所建立方法的选择性, 在相同的实验条件下研究了其他常见真菌毒素 (AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 DON)。每次测试至少 3 次平行实验。

1.8 加标回收实验

从湖北省武汉市当地超市收集大米样品和面粉样品储存在 4 °C 冰箱中备用。样品提取步骤如下: 取 4.00 g 经过研磨的大米与 10 mL 甲醇水溶液 (80:20, V/V) 混合, 然后剧烈搅拌 5 min。将混合物以 5000 r/min 离心 20 min。离心后的 100 μL 上清液用 500 μL pH 7.4 PBS 稀释。将 4.00 g 面粉与 10 mL 甲醇水溶液混合, 剧烈搅拌 5 min。混合物离心后取 5 μL 上清液用 PBS 稀释。将不同浓度的 AFB₁ 加入稀释液中, 作为 AFB₁ 的加标样品进行定性或定量检测。加标样品中 AFB₁ 的浓度通过给出的比色法测定, 然后计算回收率。每次测试至少 3 次平行实验。

1.9 数据处理

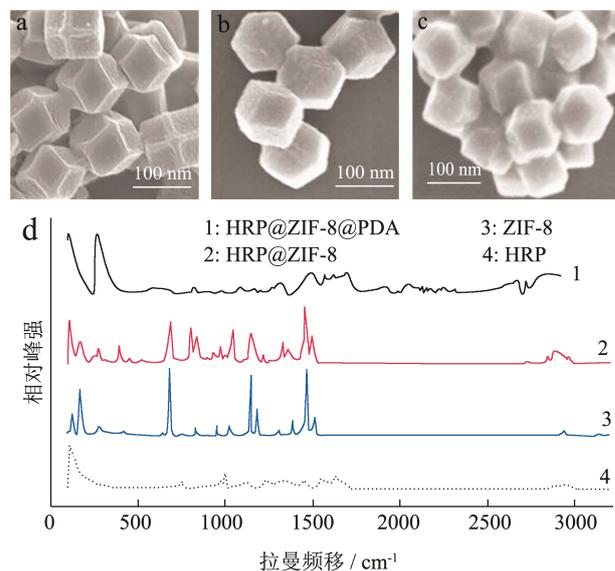
每个试验处理均作 3 个平行, 试验中测定所得的数据使用 Origin 2017 软件进行分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 HRP@ZIF-8/PDA 复合材料的表征

采用 SEM、XRD、TGA 来表征 ZIF-8 和 HRP@ZIF-8 复合材料的晶体结构和形貌。图 2a 和 2b 为 ZIF-8 封装 HRP 前后的 SEM 图, 可以看出其平均粒径分别为 100±2.8 nm 和 100±3.2 nm。ZIF-8 的形貌表现为典型的菱形十二面体几何结构, 其形貌在 HRP 封装前后没有明显变化。从图 2c 中可看出, HRP@ZIF-8/PDA 较 ZIF-8 和 HRP@ZIF-8 的形貌并无明显变化, 平均粒径为 102±3.5 nm, 表明 HRP 和 PDA 的修饰不会破坏 ZIF-8 的结构。为了进一步验证 HRP@ZIF-8/PDA 合成, 采用拉曼光谱表征。图 2d 显示了 HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 纳米复合材料的拉曼光谱图。1500 cm⁻¹ 的吸收峰主要源自于 C=C 键振动, 1550 cm⁻¹~1580 cm⁻¹ 主要是 N=N 键振动, 2800 cm⁻¹~3000 cm⁻¹ 谱带主要源于 C-H 键振动, 此外 687 cm⁻¹ 和 1142 cm⁻¹ 处呈现出强烈的吸收谱带, 来自咪唑和 Zn-N^[28], 表明 ZIF-8 成功合成。1680 cm⁻¹~1820 cm⁻¹

处的谱带, 对应于酰胺 I 带, 主要源自 C=O 拉伸模式, 表明复合材料中存在酶。同时 550 cm⁻¹~800 cm⁻¹ 处的谱带主要是 C-Cl 键的振动, 1610 cm⁻¹~1680 cm⁻¹ 谱带的振动主要是 C=N 键的振动, 表明 PDA 已成功修饰到 HRP@ZIF-8 上。结果表明 HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 纳米复合材料成功合成。为了确认添加 HRP 和 PDA 后 ZIF-8 的结晶度有没有被破坏, 采用 XRD 衍射进行验证, HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 纳米复合材料的 XRD 图案 (图 2e) 与模拟 ZIF-8 的图案相同, 该结果表明 HRP 的封装和 PDA 的封装不影响 ZIF-8 的晶体结构。为了验证复合材料的热稳定性, 在氦流下对合成样品进行热重分析 (图 2f)。ZIF-8 表现出 11.8% 的逐渐失重, 温度升高直至约 200 °C, 对应于从纳米晶体表面去除空腔中的客体分子 (主要为 H₂O) 或未反应的物质 (如 2-MI)。在 200~500 °C 范围内相对质量显示在长平台内稳定, 表明 ZIF-8 具有良好的热稳定性。HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 的 TGA 曲线都显示出从 150~400 °C 逐渐分解, 这是由于复合材料中蛋白质的降解导致。HRP@ZIF-8/PDA 在 500~700 °C 逐渐分解主要是去除未反应的 PDA。从紫外可见吸收光谱可以看出 HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 催化 TMB 反应在 450 nm 处都出现了典型的特征峰 (图 2g), ZIF-8 的多峰孔隙率允许有效传质, 使显色底物 TMB/H₂O₂ 靠近包埋的 HRP 而发生反应。图 2g 插图也证明 HRP 已成功被包埋到 ZIF-8 中, 使得 TMB 转变成蓝色, 具有优异的催化能力, 同时 HRP@ZIF-8/PDA 较 HRP@ZIF-8 的吸收峰没有明显差异, 这表明 PDA 不会影响 HRP@ZIF-8 的催化能力。以上事实验证了 HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 生物复合材料已成功合成, 并具有良好的催化活性。



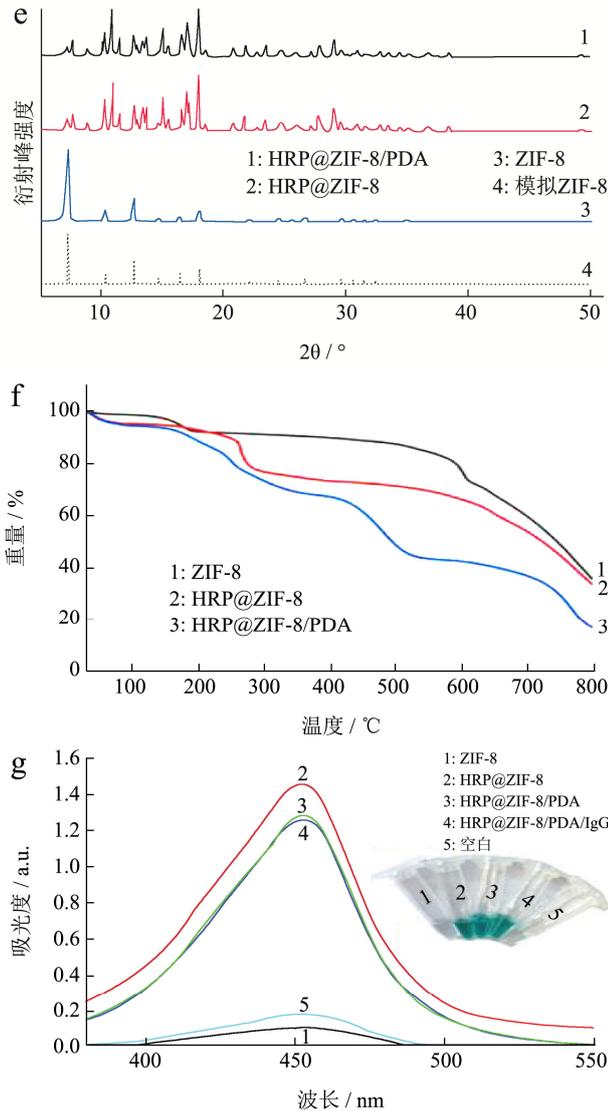


图2 ZIF-8 (a)、HRP@ZIF-8 (b) 和 HRP@ZIF-8/PDA (c) 的 SEM 图; (d) 拉曼光谱; (e) XRD 衍射; (f) TGA 分析图; (g) ZIF-8、HRP@ZIF-8、HRP@ZIF-8/PDA、HRP@ZIF-8/PDA/IgG 和空白的紫外可见吸收光谱及其插图

Fig.2 SEM images of ZIF-8(a), HRP@ZIF-8(b) and HRP@ZIF-8/PDA(c); (d) Raman spectra of HRP, ZIF-8, HRP@ZIF-8, HRP@ZIF-8/PDA; (e) XRD diffraction; (f) TGA analysis chart; (g) UV-vis spectra and digital image (inset) of ZIF-8, HRP@ZIF-8, HRP@ZIF-8/PDA, HRP@ZIF-8/PDA/IgG and blank samples

2.2 最适 HRP 浓度和封装效率的确定

HRP@ZIF-8 作为 ELISA 的信标物时, 包埋 HRP 的浓度影响 AFB₁ 检测的灵敏度和检测限。为了确定最佳的 HRP 浓度和封装效率, 利用一定质量的 ZIF-8 包埋不同浓度的 HRP, 并与初始 HRP 浓度进行比较, 以确定最佳酶浓度和封装效率。结果如图 3 显示, 随着 HRP 浓度从 0.2 mg/mL 增加到 1 mg/mL, HRP 的

包封效率从 58.00% 提高到 98.60%。当 HRP 浓度持续增加, 包封率却逐渐下降, 这可能是由于高 HRP 浓度下成核位点数量的增加, 导致 HRP 封装不足。因此, 最终选择包埋 HRP 浓度为 1 mg/mL。

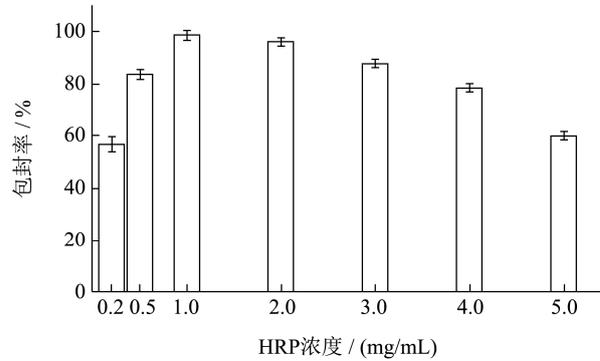


图3 HRP 浓度的优化

Fig.3 Optimization of HRP concentration

2.3 HRP@ZIF-8/PDA 稳定性的测定

为了验证 HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 生物复合材料的稳定性, 探究了不同温度和 pH 值对生物复合材料催化活性的影响。结果如图 4a 所示, 随着温度的升高, 游离 HRP 的相对活性在逐渐降低, 当温度升高到 100 °C 时, 相对活性仅为 47.78%。而 HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 生物复合材料随着温度的升高依然还保持到 70% 相对活性 (图 4a)。HRP@ZIF-8 的重要优势是 ZIF-8 作为保护层, 可以在高温 (80 °C、90 °C 和 100 °C) 下保持矿化使得 HRP 具有较高的活性。HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 生物复合材料广泛的温度范围最有可能来自于 ZIF-8 的刚性结构对 HRP 的紧密封装。ZIF-8 刚性结构将 HRP 限制在结构中, 限制了 HRP 结构因外界高温环境导致的展开运动^[26], 从而抑制了随后的聚集过程, ZIF-8 刚性结构一定程度上维持 HRP 原有结构, 使 HRP 保持生物催化活性。如图 4b 所示, 对于游离 HRP, 最佳 pH 值为 5.5, 当 pH 值为 3、6、7、8 和 9 时, 游离 HRP 分别保持其最高活性的 86.57%、82.23%、70.72% 和 63.53%。这表明游离 HRP 在极酸性或碱性条件下的催化活性较低。然而, HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 生物复合材料在 pH 3.0~9.0 范围内表现出比游离 HRP 更高的相对催化活性, 特别是在极酸性 (pH 3) 和碱性 (pH 9) 条件下分别达到 93.41%、79.24% 和 92.92%、80.30% 的相对催化活性。结果发现 HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 生物复合材料在酸性和碱性介质环境中表现出增强耐受性, 可能是由于 ZIF-8 作为固定基质具有合适的缓冲功能导致。结果验证了 HRP@ZIF-8 和

HRP@ZIF-8/PDA 生物复合材料可以忍受极端条件, 并保持较高的催化活性。

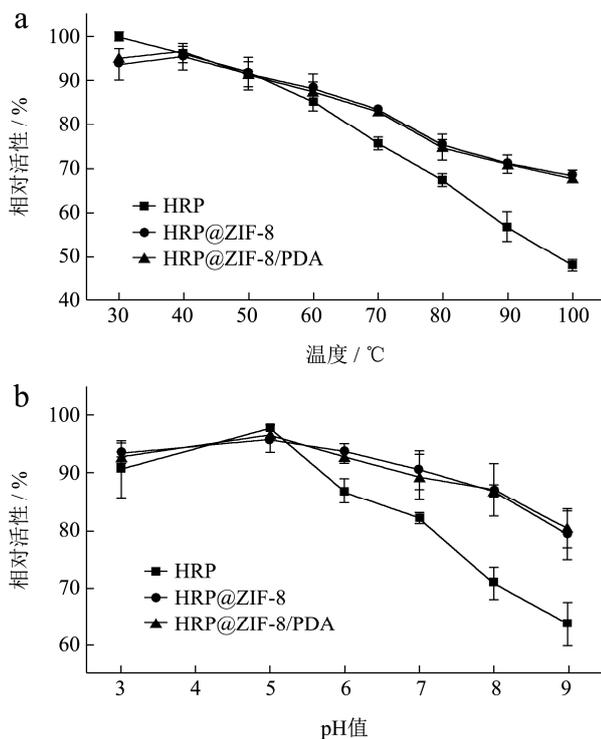


图4 HRP、HRP@ZIF-8 和 HRP@ZIF-8/PDA 的温度-相对活性曲线 (a) 和 pH-相对活性曲线 (b)

Fig.4 pH-relativity activity profile (a) and temperature-relativity activity profile (b) of HRP, HRP@ZIF-8 and HRP@ZIF-8/PDA

2.4 MOF-ELISA 检测方法的建立及灵敏度评价

通过向反应体系中分别加入 0、0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、15.00 和 20.00 ng/mL AFB₁, 观察溶液颜色变化情况并用酶标仪检测紫外可见吸收光谱。结果如图 5a 所示, 随着 AFB₁ 浓度升高, 反应后溶液颜色逐渐由蓝色变为无色, 在 450 nm 处吸光度逐渐降低。当 AFB₁ 浓度为 20 ng/mL, 溶液颜色几乎为无色透明。同时 AFB₁ 浓度与 450 nm 处吸光度值呈现出良好的线性关系, 如图 5b 所示。AFB₁ 浓度在 0.01~20.00 ng/mL 之间时, 得到的线性回归方程为 $y = -0.03 \times C_{[AFB_1]} + 0.79$, $R^2 = 0.99$, 检测限为 72.00 pg/mL, 低于国家标准《GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中对于谷物及其制品中 AFB₁ 的最大限量 (20 ng/mL), 其检测限降低了 3~4 个数量级。对比于利用 HRP 的商业 ELISA 试剂盒检测 AFB₁ 的方法, 试剂盒检测 AFB₁ 的线性检测范围为 0.1~10 ng/mL, 检

测限为 620.00 pg/mL^[29], 而本研究利用 ZIF-8 仿生矿化原理包埋 HRP 作为信标物, 使得线性检测范围更广, 检测限更低, 提高了 HRP 在极酸、极碱和极端温度下的耐受能力和 HRP 的稳定性, 在 AFB₁ 的检测中也可发挥更好的催化作用, 具有更高的灵敏度。结果表明, 所构建的 MOF-ELISA 比色法对于检测 AFB₁ 具有高灵敏度, 满足检测要求。

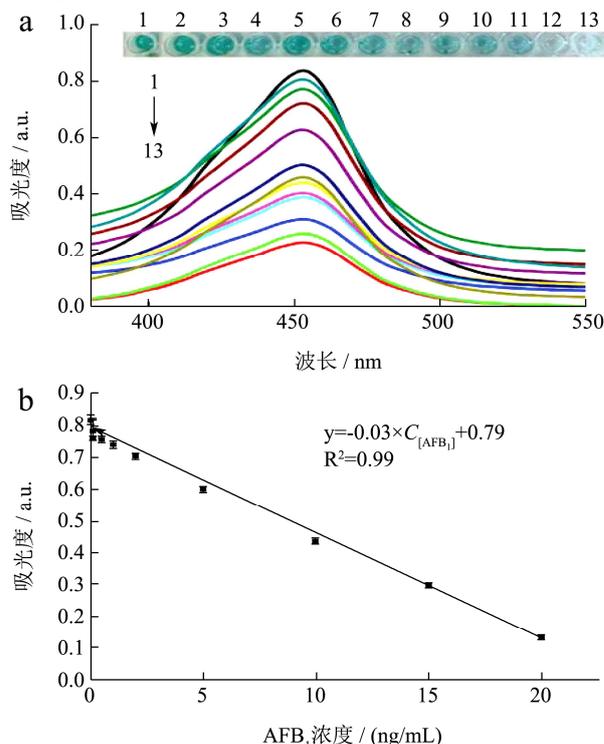


图5 (a) 不同浓度 AFB₁ 的紫外-可见光谱; (b) AFB₁ 浓度与吸光度的线性关系图

Fig.5 (a) The UV-visible spectra of AFB₁ with different concentrations; (b) Linear relationship between AFB₁ concentration and absorbance

注: 图 (a) AFB₁ 浓度从上到下 (1~13) 分别为 0、0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、15.00、20.00 ng/mL。

2.5 特异性实验

为了研究所建立的 MOF-ELISA 比色法对检测 AFB₁ 的特异性, 本研究选用 AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 DON 结构类似物作为潜在的干扰物, 来测试方法的特异性。MOF-ELISA 比色法对 5.00 ng/mL AFB₁ 和 50.00 ng/mL 其他真菌毒素在相同条件下进行检测。如图 6 所示, 其他真菌毒素溶液颜色与空白对照组 (即没有 AFB₁ 目标物) 溶液颜色均呈现出明显蓝色, 而含有 AFB₁ 样品溶液颜色明显浅于其他真菌毒素和对照组溶液颜色, 表明通过肉眼可直接分辨含有 AFB₁ 样品。在一定浓度 AFB₁ 抗体溶液中, 加入 AFB₁ 后, AFB₁ 被抗

体特异性捕获,导致吸光度值急剧下降,吸光度为 0.60,而 AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 DON 的吸光度变化较小,吸光度在 0.81~0.82 之间,与空白组的吸光度(0.83)相当。结果表明所建立的方法具有较好的选择性,基于此建立的 MOF-ELISA 比色法具有较好的特异性。

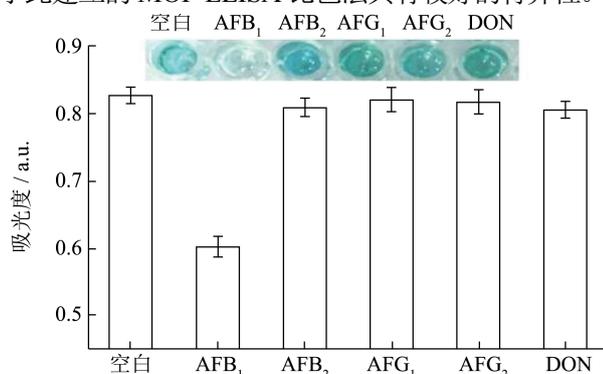


图 6 特异性实验

Fig.6 Specific experiment

表 1 米粉和面粉样品中 AFB₁ 的回收率研究Table 1 Detection results of the AFB₁ levels in spiked rice flour and wheat flour

食品基质	加标浓度/(ng/mL)	检测浓度/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%
米粉	0.50	0.48±0.17	96.00	2.26
	1.00	1.05±0.11	105.00	4.15
	2.00	1.88±0.05	94.00	2.32
	5.00	5.06±0.15	101.20	2.70
面粉	0.50	0.41±0.03	82.00	4.39
	1.00	1.10±0.03	110.00	2.18
	2.00	2.08±0.07	104.00	3.21
	5.00	5.06±0.06	101.20	1.20

3 结论

本研究基于 ZIF-8 仿生矿化原理,构建了间接竞争 ELISA 比色法,用于米粉和面粉中 AFB₁ 的检测。ZIF-8 通过仿生矿化方法完成了 HRP 的简单、快速封装。通过优化 HRP 浓度所获得的 HRP@ZIF-8 生物复合材料显著增强了对碱性环境和高温的耐受性,同时保持较高的酶催化活性。利用 HRP@ZIF-8/PDA/IgG 作为信号标记物,可以实现 AFB₁ 的快速肉眼检测,可见光吸光度与 AFB₁ 浓度具有良好的线性关系,检测限为 72 pg/mL,低于国家标准规定谷物中 AFB₁ 最大限量,比商业化的 AFB₁ 检测试剂盒检测限更低,降低了 3~4 个数量级,本研究开发的 AFB₁ 检测方法更灵敏,而且该方法对其他常见霉菌毒素具有良好的选择性,在米粉和面粉基质中具有良好的准确性和重复性。与其他检测方法相比,基于 ZIF-8 的 ELISA 比色法具有成本低、检测速度快和易于操作等优点,为粮食中 AFB₁ 的灵敏快速检测提供了新方法。该方法

2.6 加标回收实验

为了评估开发的 MOF-ELISA 比色法用于 AFB₁ 检测在实际样品分析中的准确性,将不同浓度 AFB₁ 添加到米粉和面粉样品提取液中进行回收率测试。根据上述拟合的回归方程 $y=0.03 \times C_{[AFB_1]}+0.79$ 来计算加标样品中的 AFB₁ 浓度,测定结果列于表 1。结果发现,在四种添加量中,含有 0.50、1.00、2.00 和 5.00 ng/mL AFB₁ 的米粉样品回收率在 96.00%~105.00%之间,RSD 范围为 2.26%~4.15% (n=3);在含有 0.50、1.00、2.00 和 5.00 ng/mL AFB₁ 的面粉样品回收率在 82.00%~110.00%之间,RSD 范围为 1.20%~4.39%。米粉和面粉的基质干扰几乎可以忽略不计,加标回收率的 RSD 均小于 5%,表明该方法的重复性良好。结果表明,所建立的 MOF-ELISA 比色法具有良好的抗基质干扰能力,可用于米粉和面粉中 AFB₁ 含量检测。

未来可扩展用于其他真菌毒素检测研究,同时对实际霉变样品进行检测,探索实际应用的可行性。

参考文献

- [1] Bayram E, Yılmaz E, Uzun L, et al. Multiclonal plastic antibodies for selective aflatoxin extraction from food samples [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 829-837
- [2] Jin X, Jin X, Liu X, et al. Biocatalyzed deposition amplification for detection of aflatoxin B₁ based on quartz crystal microbalance [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 645(1-2): 92-97
- [3] Nirbhaya V, Chauhan D, Jain R, et al. Nanostructured graphitic carbon nitride based ultrasensing electrochemical biosensor for food toxin detection [J]. Bioelectrochemistry, 2021, 139: 107738
- [4] Yang Y, Li W, Shen P, et al. Aptamer fluorescence signal recovery screening for multiplex mycotoxins in cereal samples based on photonic crystal microsphere suspension

- array [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 248: 351-358
- [5] Chen L, Wen F, Li M, et al. A simple aptamer-based fluorescent assay for the detection of aflatoxin B₁ in infant rice cereal [J]. *Food Chemistry*, 2017, 215: 377-382
- [6] Wang L, Gan X-X. Biomolecule-functionalized magnetic nanoparticles for flow-through quartz crystal microbalance immunoassay of aflatoxin B₁ [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009, 32(1): 109-116
- [7] 王宇龙,王荷,赵志磊,等.基于核酸适配体的侧流层析技术同步检测赭曲霉毒素A和黄曲霉毒素B₁[J].*食品安全质量检测学报*,2021,12(9):3441-3448
WANG Yulong, WANG He, ZHAO Zhilei, et al. Synchronous detection of ochratoxin A and aflatoxin B₁ by lateral flow chromatography based on nucleic acid aptamers [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(9): 3441-3448
- [8] Jin X Y, Jin X F, Chen L G, et al. Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for quantification of aflatoxin B₁ [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24(8): 2580-2585
- [9] Li Q, Lu Z C, Tan X C, et al. Ultrasensitive detection of aflatoxin B₁ by SERS aptasensor based on exonuclease-assisted recycling amplification [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 97: 59-64
- [10] Zheng W L, Teng J, Cheng L, et al. Hetero-enzyme-based two-round signal amplification strategy for trace detection of aflatoxin B₁ using an electrochemical aptasensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 80: 574-581
- [11] Jia B Y, Liao X F, Sun C N, et al. Development of a quantum dot nanobead-based fluorescent strip immunosensor for on-site detection of aflatoxin B₁ in lotus seeds [J]. *Food Chemistry*, 2021, 356: 129614
- [12] 马江媛,桑晓霞,黄登宇.黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法[J].*食品安全质量检测学报*,2019,10(24):8399-8404
MA Jiangyuan, SANG Xiaoxia, HUANG Dengyu. Detection method for aflatoxin B₁ [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(24): 8399-8404
- [13] Wang B, Chen Y F, Wu Y Y, et al. Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB₁ [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 78: 23-30
- [14] 李彦伸,卢国柱,曲劲尧,等.霉菌毒素检测与脱毒技术研究进展[J].*食品安全质量检测学报*,2020,11(12):3919-3929
LI Yanshen, LU Guozhu, QU Jinyao, et al. Research progress of mycotoxin detection and detoxification techniques [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(12): 3919-3929
- [15] Gkaniatsou E, Sicard C, Ricoux R, et al. Enzyme encapsulation in mesoporous metal-organic frameworks for selective biodegradation of harmful dye molecules [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(49): 16141-16146
- [16] Yang Q J, Liu Y, Xiao L S, et al. Self-templated transformation of MOFs into layered double hydroxide nanoarrays with selectively formed Co9S8 for high-performance asymmetric supercapacitors [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 354: 716-726
- [17] Li L, Zhu Y, Zhou X, et al. Visible-light excited luminescent thermometer based on single lanthanide organic frameworks [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(47): 8677-8684
- [18] Cui J D, Ren S Z, Sun B T, et al. Optimization protocols and improved strategies for metal-organic frameworks for immobilizing enzymes: current development and future challenges [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, 370: 22-41
- [19] Ren S Z, Li C H, Tan Z L, et al. Carbonic anhydrase@ ZIF-8 hydrogel composite membrane with improved recycling and stability for efficient CO₂ capture [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(12): 3372-3379
- [20] Du Y J, Gao J, Zhou L Y, et al. Enzyme nanocapsules armored by metal-organic frameworks: A novel approach for preparing nanobiocatalyst [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 327: 1192-1197
- [21] Chen G S, Kou X X, Huang S M, et al. Modulating the biofunctionality of metal-organic-framework-encapsulated enzymes through controllable embedding patterns [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(7): 2867-2874
- [22] Ma X B, Sui H Y, Yu Q, et al. Silica capsules templated from metal-organic frameworks for enzyme immobilization and catalysis [J]. *Langmuir*, 2021, 37(10): 3166-3172
- [23] Chen G S, Huang S M, Kou X X, et al. A convenient and versatile amino-acid-boosted biomimetic strategy for the nondestructive encapsulation of biomacromolecules within metal-organic frameworks [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(5): 1463-1467

(下转第 327 页)