

基于聚集诱导荧光微球的 T-2 毒素免疫层析快速检测方法

张 干 赖卫华 赖怡辉 郑祖兰 徐 蔚

(南昌大学食品学院,江西 南昌 330047)

摘要: [目的]为实现 T-2 毒素的现场快速筛查,建立聚集诱导发光荧光免疫层析试纸条测定玉米中 T-2 毒素的分析方法。[方法]采用溶胀法制备聚集诱导发光荧光微球,通过静电吸附偶联抗体,得到免疫探针。通过优化试验参数,构建荧光免疫层析试纸条。[结果]构建的聚集诱导发光荧光免疫层析法具有良好的线性关系($0.10\sim5.00 \text{ ng/mL}$),回归方程为 $y=-0.571\ 41\ \lg(x)+0.750\ 88 (R^2=0.967\ 5)$,方法检测限为 0.09 ng/mL ,加标回收率为 $81.82\%\sim92.46\%$,变异系数低于 10% 。[结论]该方法准确性好,灵敏度高,适用于玉米中 T-2 毒素的现场大批量筛查。

关键词: T-2 毒素;聚集诱导发光;免疫层析试纸条;玉米

Rapid immunochromatographic detection method for T-2 toxin based on aggregation-induced emission fluorescent nanoparticles

ZHANG Gan LAI Weihua LAI Yihui ZHENG Zulan XU Wei

(College of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

Abstract: [Objective] To achieve rapid on-site screening of T-2 toxin and establish an analytical method for the determination of T-2 toxin in corn using aggregation-induced emission (AIE) immunochromatographic test strips. [Methods] Aggregation-induced emission fluorescent nanoparticles (AIEFNPs) were prepared by the swelling method, and antibodies were coupled via electrostatic adsorption to obtain immune probes. The fluorescent immunochromatographic test strips were constructed by optimizing the experimental parameters. [Results] The constructed AIE fluorescent immunochromatographic method exhibits a good linear relationship in the range of $0.10\sim5.00 \text{ ng/mL}$. The regression equation was $y=-0.571\ 41\ \lg(x)+0.750\ 88 (R^2=0.967\ 5)$, with a method detection limit of 0.09 ng/mL . The spiked recovery rates range from 81.82% to 92.46% , and the coefficient of variation is less than 10% . [Conclusion] This method demonstrates good accuracy and high sensitivity, making it suitable for on-site large-scale screening of T-2 toxin in corn.

Keywords: T-2 toxin; AIE; immunochromatographic test strip; corn

谷类作物在收获前后,以及在不利条件下的运输和贮藏过程中容易受到真菌污染^[1]。T-2 毒素是一种由镰刀菌产生的次级代谢产物^[2],广泛存在于各种谷类作物及其衍生制品中^[3],可通过食物链对人类健康构成严重威胁。目前,T-2 毒素的检测主要依赖于传统仪器方法,如气相色谱—质谱联用^[4]、高效液相色谱—质谱联用^[5-6]及酶联免疫吸附法^[7]。尽管仪器分析法准确率高,然而这些方法

通常费时、费力,而且需要昂贵的仪器设备,限制了其在大批量样本筛查中的应用^[8-9]。

胶体金免疫层析试纸条(lateral flow immunoassay, LFIA)因其快速、便捷和低成本等优势^[10-11],被广泛应用于食品安全、环境监测和临床诊断。但由于胶体金的吸光性能差,导致免疫层析试纸条灵敏度低,难以满足痕量靶标的检测需求^[12]。近年来,研究者开发了各种荧光免

基金项目:中国科协青年人才托举工程博士生专项计划(编号:156-O-550-0000528-3);国家重点研发计划(编号:2024YFF1105703)
通信作者:赖卫华(1968—),男,南昌大学教授,博士。E-mail: talktolaiwh@163.com

收稿日期:2025-04-18 **改回日期:**2025-09-30

引用格式:张干,赖卫华,赖怡辉,等.基于聚集诱导荧光微球的 T-2 毒素免疫层析快速检测方法[J].食品与机械,2026,42(1):30-35.

Citation:ZHANG Gan, LAI Weihua, LAI Yihui, et al. Rapid immunochromatographic detection method for T-2 toxin based on aggregation-induced emission fluorescent nanoparticles[J]. Food & Machinery, 2026, 42(1): 30-35.

疫层析试纸条^[13],以提高检测灵敏度。然而,传统的荧光材料在聚集状态下,存在聚集诱导猝灭(aggregation-caused quenching, ACQ)现象,限制了其在构建高亮度荧光微球中的应用^[14]。Luo等^[15]研究发现,荧光分子在聚集状态下能够显著增强荧光强度。这一特性源于聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)的分子结构,AIE分子在聚集条件下分子运动受限,会抑制非辐射衰减,使荧光强度显著提升^[16],从而提高荧光性能。此外,与单一荧光团标签相比,荧光纳米粒子能通过装载大量荧光材料,提高荧光信号亮度^[17]。Zhang等^[18]研究发现,绿色AIE荧光微球由于其发射波长较短(<560 nm)难以避免样本或体系中的荧光背景干扰,而红色发射的AIE荧光微球有望解决这一问题,并提高信噪比。

研究拟通过溶胀法合成超亮AIE荧光微球(aggregation-induced emission fluorescent nanoparticles, AIEFNPs),其中聚苯乙烯微球作为聚合物骨架,通过疏水驱动力装载大量AIE荧光染料。通过优化免疫层析试纸条制备条件,建立T-2毒素聚集诱导发光荧光免疫层析法,并研究该方法的准确度、灵敏度和特异性,以期为谷物中T-2毒素的现场大规模筛查提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

T-2全抗原(质量浓度4.64 mg/mL)和T-2抗体(编号#1B10,抗体亚型IgG1,抗体质量浓度12.9 mg/mL,IC₅₀为0.516 ng/mL):实验室自制;

AIE染料:97%,徐州达杨生化科技有限公司;

聚苯乙烯微球:2.5%,广州泽元生物科技有限公司;

甲醇、二氯甲烷和氯仿:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

T-2毒素、黄曲霉毒素B₁(aflatoxin B₁,AFB₁)、呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)、伏马毒素B₁(fumonisin B₁,FB₁)和赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA):上海源叶生物科技有限公司;

硝酸纤维素膜(NC膜):CN140型,德国Sartorius AG公司;

PVC底板、样品垫和吸水纸:上海金标生物科技有限公司;

超声波细胞破碎仪:SCIENTZ-IIID型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

磁力搅拌机:RCT basic型,艾卡(广州)仪器设备有限公司;

多功能酶标仪:Varioskan LUX型,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 荧光微球的制备

高分子聚合物如聚苯乙烯微球在溶剂中会出现膨胀

现象,溶质分子可以通过疏水驱动力进入高分子聚合物内腔,而不仅仅是吸附在高分子聚合物表面,具体合成步骤^[19]:称取4 mg AIE染料溶解于1 mL氯仿和二氯甲烷(1:1)溶液中,得到AIE溶液。吸取50 μL 50 mg/mL SDS至5 mL 2 mg/mL聚苯乙烯微球,随后加入上述的AIE溶液。在超声条件下,混匀得到乳液,在室温下搅拌过夜。通过旋蒸除去体系中有机试剂,12 000 r/min离心20 min,弃上清。沉淀复溶于1 mL硼酸盐缓冲溶液中,得到10 mg/mL的AIEFNPs,4 °C贮藏。

1.3 荧光免疫探针的制备

通过静电吸附法制备荧光免疫探针。根据文献[20],具体合成步骤:吸取100 μL的T-2抗体于1 mL 0.1 mg/mL AIEFNPs硼酸盐缓冲溶液中,反应1 h。向上述溶液中滴加100 μL 1%酪蛋白用于封闭AIEFNPs表面未结合的活性位点,反应1 h。将上述混合物溶液10 000 r/min离心20 min,沉淀复溶至0.1 mL缓冲液中,4 °C贮藏。

1.4 试纸条测试条件的优化

为了获得试纸条的最佳检测性能,对抗体偶联过程中缓冲溶液的pH值、抗体添加量、探针添加量和孵育时间等进行优化。使用荧光读取仪读取T、C线的荧光信号值,按式(1)计算抑制率。

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

式中:

H——抑制率,%;

B₁——阳性样本的T/C值;

B₀——阴性样本的T/C值。

(1) 抗体偶联过程中缓冲溶液的pH值:用0.1 mol/L HCl调节硼酸缓冲溶液,以5 μg的抗体添加量制备免疫探针。取2 μL免疫探针分别与阴性样本和阳性样本孵育10 min,随后滴加至试纸条中获取阴性样本和阳性样本的T、C线信号值,计算抑制率。

(2) 抗体添加量:在最佳pH值的条件下,设置1,3,5,7,9 μg的抗体添加量以制备免疫探针。取2 μL的免疫探针分别与阴性样本和阳性样本孵育10 min,随后滴加至试纸条中获取阴性样本和阳性样本的T、C线信号值,计算抑制率。

(3) 探针添加量:在最佳pH值和抗体添加量的条件下,制备免疫探针。使用1,2,3,4,5 μL的免疫探针分别与阴性样本和阳性样本孵育10 min,随后滴加至试纸条中获取阴性样本和阳性样本的T、C线信号值,计算抑制率。

(4) 孵育时间:在最佳pH值和抗体添加量的条件下,制备免疫探针。使用2 μL的免疫探针分别与阴性样本和阳性样本孵育0,3,5,10,15 min,随后滴加至试纸条中获

取阴性样本和阳性样本的 T、C 线信号值,计算抑制率。

1.5 试纸条性能评价

1.5.1 灵敏度 用 PBS 作为缓冲溶液,将 T-2 标准品稀释至 0.025, 0.050, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.00, 25.00, 50.00, 100.00 ng/mL, 并以 PBS 作为阴性样本,用荧光免疫层析试纸条进行测试。用荧光读取仪分别读取 T、C 线信号值,并计算 T/C 值。标准曲线以 T-2 质量浓度为横坐标,T/C 值为纵坐标。检测限定义为抑制率为 10% 时 T-2 质量浓度。

1.5.2 特异性 配制 10 ng/mL 的 T-2、AFB₁、OTA、DON、FB₁ 和 ZEN 标准品溶液,分别添加至荧光免疫层析试纸条中,用于评估方法的特异性。

1.5.3 加标回收率 根据文献[21],称取 2 g 玉米粉于 50 mL 离心管中,向其中加入不同浓度的 T-2 毒素标准品。随后,加入 10 mL 提取液($V_{\text{PBS}}:V_{\text{甲醇}}=1:4$),涡旋 5 min 后超声提取 20 min。5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 PBS 稀释至原体积的 9.1 倍,备用。

1.6 数据分析

试验平行测定 3 次,试验数据使用 Origin 2022、Excel 进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 荧光免疫层析试纸条原理

如图 1(a)所示,先通过溶胀法合成 AIEFNPs,再通过静电吸附法偶联 T-2 毒素单克隆抗体,得到免疫探针,用于后续免疫层析试纸条。AIEFNPs 免疫层析试纸条的构造如图 1(b)所示,分别由 PVC 底板、测试线、质控线、吸水纸和样本垫组成。当上样液为阴性样本时,免疫探针与包被原(T2-BSA)结合,使 T 线出现荧光信号。而未结合的免疫探针与质控线上喷涂的羊抗鼠二抗结合,使 C 线出现荧光信号。对于阳性样本而言,由于 T-2 毒素对免疫探针的竞争,导致更少的免疫探针结合在 T 线,使 T 线荧光信号下降。T 线的荧光信号随 T-2 浓度的增加而降低。Peng 等^[22]研究发现,使用 T/C 值作为信号输出有利于降低基质效应,展现了更加稳定的信号输出。因此,采用 T/C 值作为信号输出以提高稳定性。

2.2 AIEFNPs 免疫探针的合成与表征

如图 2 所示,溶胀前后微球形貌未发生改变,且呈球形结构,均一性良好。Li 等^[23]通过溶胀法合成了荧光微球,其溶胀前后微球形貌一致。通过紫外可见光吸收光谱表征,由图 3(a)可知,PS 微球在染料溶胀后于 480 nm 处展现出明显的吸收峰,表明 AIE 染料成功嵌入 PS 微球中。由图 3(b)可知,AIEFNPs 产生了显著的荧光信号,而 PS 微球无荧光信号,进一步表明 AIEFNPs 的成功制备。Zhang 等^[1]通过装载 AIE 染料至纳米微球中,以限域效应有效抑制了染料的非辐射弛豫通道,从而大幅提升荧光

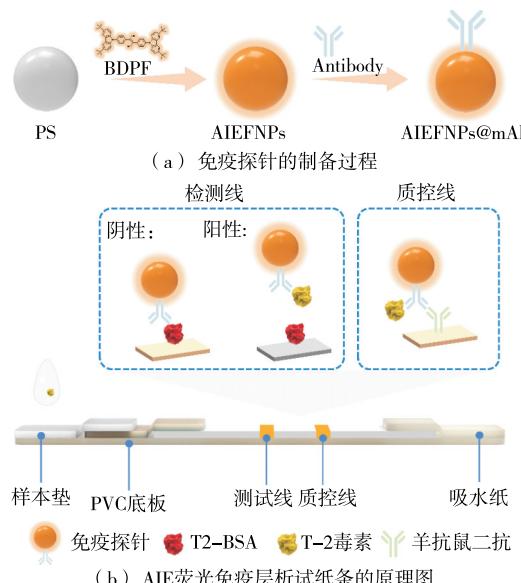


图 1 AIEFNPs 检测 T-2 毒素的原理图

Figure 1 Principle of AIEFNPs for T-2 toxin detection

强度。因此,AIEFNPs 产生显著的荧光信号是源于 AIE 染料在微球内受限后荧光增强的现象。由图 3(c)可知,AIEFNPs 与抗体静电吸附后,其粒径由 269.8 nm 增加至 364.3 nm, 表明抗体在 AIEFNPs 上的成功修饰。由图 3(d)可知,在修饰抗体后,AIEFNPs 的 Zeta 电位值由 -39.2 mV 增加至 -36.7 mV , 进一步表明 AIEFNPs 与抗体的成功偶联。AIEFNPs@mAb 的 Zeta 电位(-36.7 mV)低于 -30 mV ^[20], 表明有足够的静电斥力,以确保分散稳定性,可以作为稳定的探针应用于 LFIA。

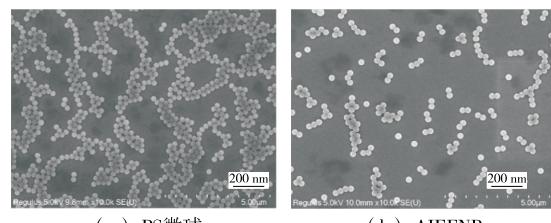


图 2 PS 微球和 AIEFNPs 的扫描电镜图

Figure 2 Scanning electron microscope images of PS nanoparticles and AIEFNPs

2.3 AIEFNPs 免疫层析试纸条优化

由图 4(a)可知,随着缓冲溶液的 pH 值逐渐增加,T/C 值先上升后显著下降。偏酸性的条件可能更适合抗体与 AIEFNPs 的结合,导致酸性条件下的 T/C 值显著高于碱性条件下的。然而,过高的抗体偶联效率不利于免疫竞争反应。因此,选择抑制率最佳时的缓冲溶液 pH 值(7.5)。由图 4(b)可知,过高和过低的抗体添加量都会导致抑制率下降。因此,选择抑制率最佳时的抗体添加量(5 μg)。

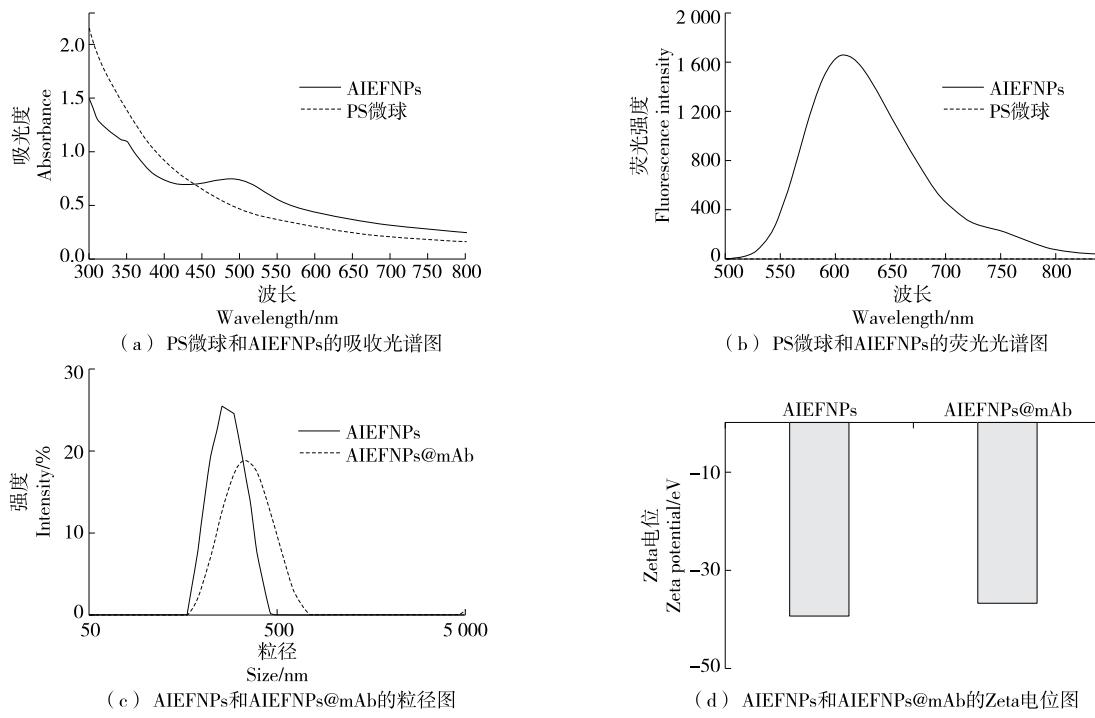


Figure 3 Synthesis and characterization of AIEFNP_s and AIEFNP_s@mAb

由图4(c)可知,当探针添加量为2 μ L时,抑制率最佳。样本与探针提前孵育对灵敏度有显著提升。孵育时间过短对试纸条灵敏度提升有限,孵育时间过长不满足快速检

测的需求。由图4(d)可知,孵育时间为10 min与孵育时间为15 min相比,抑制率接近,因此选择10 min为最优孵育时间。

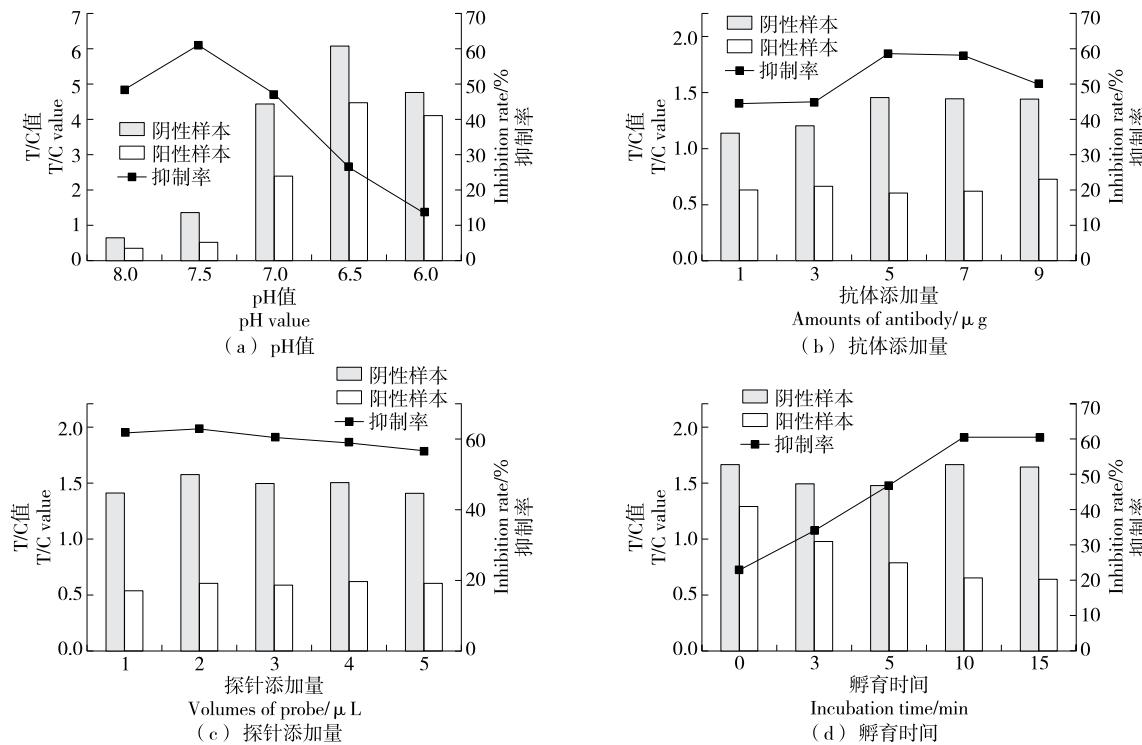


Figure 4 Optimization of AIE fluorescent immunochromatographic test strips

2.4 AIEFNP_s 免疫层析试纸条性能测定

基于以上优化条件,建立 AIEFNP_s 免疫层析试纸条方法用于检测一系列质量浓度的 T-2 毒素,并依据 T/C 值和 T-2 质量浓度建立标准曲线。由图 5 可知,随着 T-2 毒素质量浓度增加,T/C 值逐渐下降;在 0.10~5.00 ng/mL 检测范围内,AIE 荧光免疫层析方法具有良好的线性关系,回归方程为 $y = -0.57141 \lg(x) + 0.75088$ ($R^2 = 0.9675$),方法检测限为 0.09 ng/mL。由图 6 可知,T-2 毒素的存在会导致 T/C 值下降,而 AFB₁、OTA、DON、FB₁ 和 ZEN 不会导致 T/C 值变化。说明所建立的 AIE 荧光免疫层析方法特异性良好。

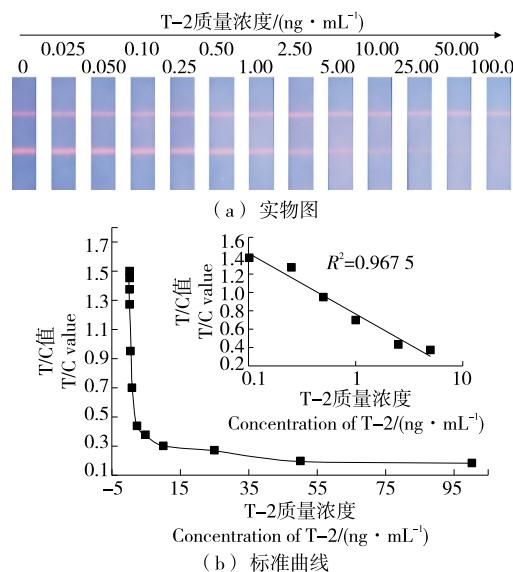


图 5 荧光免疫层析试纸条检测 T-2 毒素的性能测定结果

Figure 5 Performance measurement results of fluorescent immunochromatographic test strips for T-2 toxin detection

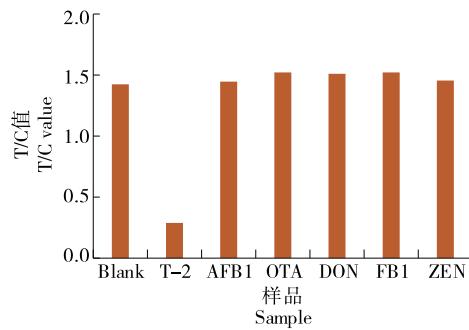


图 6 荧光免疫层析试纸条检测 T-2 毒素的特异性试验

Figure 6 Specificity assay of fluorescent immunochromatographic test strips for T-2 toxin detection

2.5 加标回收率

由表 1 可知,该方法的加标回收率为 81.82%~

92.46%,变异系数低于 10%,表明该方法在玉米粉中对 T-2 毒素的检测具有较好的准确性,可以用于实际样品的检测。

表 1 荧光免疫层析试纸条在玉米样品中检测 T-2 毒素的回收率

Table 1 Recovery rate of fluorescent immunochromatographic test strips for T-2 toxin detection in corn samples

添加量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均回收量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率/%	变异系数/%
200	180.4	90.18	7.35
50	46.2	92.46	9.73
20	16.4	81.82	6.63

3 结论

该研究合成的聚集诱导发光荧光微球形貌与荧光性能良好。将聚集诱导发光荧光微球与抗体静电吸附后作为免疫探针,构建了荧光免疫层析试纸条并用于检测玉米中的 T-2 毒素。结果表明,所构建的聚集诱导发光荧光免疫层析试纸条在 0.10~5.00 ng/mL 检测范围内具有良好的线性关系,其中,回归方程为 $y = -0.57141 \lg(x) + 0.75088$ ($R^2 = 0.9675$),方法的检测限为 0.09 ng/mL,加标回收率为 81.82%~92.46%,变异系数低于 10%。该方法准确性好,灵敏度高,适用于玉米中 T-2 毒素的现场大批量筛查。

参考文献

- [1] ZHANG G, LIU T T, CAI H D, et al. Molecular engineering and confinement effect powered ultrabright nanoparticles for improving sensitivity of lateral flow immunoassay[J]. ACS Nano, 2024, 18(3): 2346-2354.
- [2] WU H Y, BU T, CAO Y Y, et al. Double-enzyme active vanadium nanospheres-mediated ratiometric multicolor immunosensors for sensitive detection of the T-2 toxin[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(12): 5275-5284.
- [3] WANG Y S, WANG B, WANG P L, et al. Review of neurotoxicity of T-2 toxin[J]. Mycotoxin Research, 2024, 40(1): 85-95.
- [4] YUE Y T, ZHANG X F, OU-YANG Z, et al. Determination of T-2 toxin in traditional Chinese herbal medicines by gc-ecd[J]. Chromatographia, 2009, 70(9): 1495-1499.
- [5] MARTINEZ DOMINGUEZ G, ROMERO R, FRENICH A G. Determination of toxic substances, pesticides and mycotoxins, in ginkgo biloba nutraceutical products by liquid chromatography orbitrap-mass spectrometry[J]. Microchemical Journal, 2015, 118: 124-130.

- [6] BERNHARDT K, VALENTA H, KERSTEN S, et al. Determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, and three other type a trichothecenes in layer feed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) - comparison of two sample preparation methods[J]. *Mycotoxin Research*, 2016, 32(2): 89-97.
- [7] AROLA H O, TULLILA A, NATHANAIL A V, et al. A simple and specific noncompetitive elisa method for HT-2 toxin detection[J]. *Toxins*, 2017, 9(4): 145.
- [8] XING K Y, SHAN S, LIU D F, et al. Recent advances of lateral flow immunoassay for mycotoxins detection[J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 133: 116087.
- [9] WANG D M, HE S G, WANG X H, et al. Rapid lateral flow immunoassay for the fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2020, 4(12): 1 150-1 158.
- [10] WANG S C, DU T, ZHU Y, et al. Natural needle microstructure-based immunochromatographic assay for sensitively detecting streptomycin in food products[J]. *Food Chemistry*, 2024, 434: 137413.
- [11] JIANG X Q, XU X X, KUANG H, et al. A gold-based immunochromatographic strip for the specific detection of tacrolimus in whole blood[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11(20): 4 464-4 474.
- [12] CHEN X R, DING L, HUANG X L, et al. Tailoring noble metal nanoparticle designs to enable sensitive lateral flow immunoassay[J]. *Theranostics*, 2022, 12(2): 574-602.
- [13] 张富生, 王宇宸, 卢礼生, 等. 量子点微球免疫层析纸条检测鸡蛋中恩诺沙星的性能评价[J]. *食品与机械*, 2023, 39(9): 32-37.
- ZHANG F S, WANG Y C, LU L S, et al. Evaluation of the performance of enrofloxacin in the detection of egg by quantum dot microsphere immunochromatography strip[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(9): 32-37.
- [14] HUANG M N, YU R N, XU K, et al. An arch-bridge-type fluorophore for bridging the gap between aggregation-caused quenching (ACQ) and aggregation-induced emission (AIE) [J]. *Chemical Science*, 2016, 7(7): 4 485-4 491.
- [15] LUO J D, XIE Z L, LAM J W Y, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole[J]. *Chemical Communications*, 2001(18): 1 740-1 741.
- [16] MEI J, LEUNG N L C, KWOK R T K, et al. Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar! [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(21): 11 718-11 940.
- [17] XIONG H P, CHEN P, CHEN X R, et al. Aggregation-induced red emission nanoparticle-based lateral flow immunoassay for highly sensitive detection of *Staphylococcal* enterotoxin A[J]. *Toxins*, 2023, 15(2): 113.
- [18] ZHANG G G, XU S L, XIONG Y H, et al. Ultrabright fluorescent microsphere and its novel application for improving the sensitivity of immunochromatographic assay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 135: 173-180.
- [19] CHEN R, REN C P, LIU M, et al. Early detection of SARS-CoV-2 seroconversion in humans with aggregation-induced near-infrared emission nanoparticle-labeled lateral flow immunoassay[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(5): 8 996-9 004.
- [20] ZHANG G, HU H, DENG S L, et al. An integrated colorimetric and photothermal lateral flow immunoassay based on bimetallic Ag-Au urchin-like hollow structures for the sensitive detection of *E. coli* O157: H7[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 225: 115090.
- [21] 罗昌伟, 陈晓阳, 黄现青, 等. 碳化钒免疫层析法检测玉米中T-2毒素[J]. *食品科学*, 2024, 45(19): 227-234.
- LUO C W, CHEN X Y, HUANG X Q, et al. Development of vanadium carbide-based immunochromatographic assay for T-2 toxin detection in maize samples [J]. *Food Science*, 2024, 45(19): 227-234.
- [22] PENG T, YANG W C, LAI W H, et al. Improvement of the stability of immunochromatographic assay for the quantitative detection of clenbuterol in swine urine[J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(18): 7 394-7 398.
- [23] LI Z H, LIU Q Y, LI Y F, et al. One-step polymerized lanthanide-based polystyrene microsphere for sensitive lateral flow immunoassay[J]. *Journal of Rare Earths*, 2021, 39(1): 11-18.