

基于免疫脂质体的荧光分析法检测棒曲霉素

宋新杰¹, 吕天凤¹, 吴丽¹, 孙娟¹, 张尧¹, 金明姬^{2*}, 吴元锋^{1*}

(¹浙江科技学院生物与化学工程学院 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室 杭州 310023

²岭南大学 韩国庆山 38541)

摘要 棒曲霉素是一种霉菌产生的天然毒素,曲霉菌、丝衣霉菌、青霉菌、毛霉和根霉等真菌均可产生,能污染水果、蔬菜、谷物和奶酪等多种食物,对食品安全造成威胁。传统的棒曲霉素检测方法需用有机溶液进行分离和浓缩,对环境产生一定的压力。针对传统方法的缺陷,本文利用兔抗棒曲霉抗体及其修饰的脂质体开发一种快速、灵敏、环境友好的荧光检测方法,检测限可达 8 $\mu\text{g/L}$,低于欧洲婴儿和幼儿食品监管要求(10 $\mu\text{g/L}$)。本方法快速、灵敏、环境友好,可用于苹果汁等食品中棒曲霉毒素的检测。

关键词 棒曲霉素抗体;免疫脂质体;棒曲霉素;灵敏;快速检测

文章编号 1009-7848(2023)05-0381-07 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.038

棒曲霉素是一些真菌如曲霉菌、青霉菌、丝衣霉菌等的有毒次生代谢物^[1],这些物种包括土曲霉、巨大曲霉、展青霉、圆弧青霉、扩展青霉、棒型青霉和白丝衣霉等^[2-3]。棒曲霉素能污染多种食品,如水果、蔬菜、谷物和奶酪等,进入身体会引起人和动物的多种健康风险。毒理学研究表明棒曲霉素能入侵皮肤、肾脏、肝脏、胃肠道和神经系统,对人体的组织和器官造成损伤^[4]。在一些动物研究中,棒曲霉素还具有急性和亚急性毒性、免疫毒性、致畸形、致突变性、致癌性等^[5-6]。

棒曲霉素的检测方法主要为色谱法,例如薄层色谱法、高效液相色谱法和气相色谱法等^[7-9]。这几种方法虽然对检测棒曲霉素有高灵敏性和高特异性,但是需要复杂的净化步骤、大量的原材料和昂贵的仪器,难以满足实时检测的需求。有关棒曲霉毒素的新型检测方法引起广泛的研究兴趣^[10-13]。免疫化学法基于高特异性抗原-抗体的相互作用,可进行有效的检测^[14-15]。由抗体和脂质体纳米颗粒组成的免疫脂质体纳米颗粒在食品安全中广泛应用于检测食源性细菌、毒素和食品添加剂等有害物质^[16]。抗体的存在使免疫脂质体纳米粒子对靶标具有高度特异性,能有效提高分析的灵敏度。为

了开发一种棒曲霉素的快速、灵敏检测方法,本文用兔抗棒曲霉素 BSA 抗体研制棒曲霉素免疫脂质体,并用于棒曲霉素的检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)购于美国 Avanti Polar Lipids 公司;乙酸、乙腈、硫酸铵、辛酸、乙酸乙酯、乙二胺四乙酸(EDTA)、二甲基亚砜(DMSO)、乙酰胺、棒曲霉素、棒曲霉素牛血清白蛋白(patulin-BSA)、硫酸钠、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、甲醇、*n*-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷(OG),商业化的兔抗、蛋白质标记物、三乙胺、Tween 20、蔗糖、氯仿、胆固醇、磷酸氢钾、磷酸二氢钾、琼脂糖凝胶 CL-4B、醋酸钠、叠氮化钠、碳酸钠、氯化钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂和聚丙烯酰胺购于 Sigma 公司;*N*-琥珀酰-s-乙酰硫代乙酸酯(SATA)、磺基罗丹明 B(SRB)、盐酸羟胺和 *N*-(*k*-马来酰亚胺基)磺基琥珀酰亚胺(sulfo-KMUS)购于 Pierce 公司;透析膜(截留分子量:12~14 ku)购于 Spectrum Laboratories, Inc. 公司;磁力分离器购于 Dynal Inc.公司;聚碳酸酯过滤器(孔径为 0.4 μm 和 0.8 μm)和注射器过滤器购于 Whatman 公司;96 孔微量滴定板购于 SPL Life Sciences 公司;磷酸酶标

收稿日期: 2022-05-29

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2021C02061)

第一作者: 宋新杰,女,博士生,讲师

通信作者: 金明姬 E-mail: foodtech@ynu.ac.kr

吴元锋 E-mail: wuyuanfeng@zju.edu.cn

记的山羊抗兔 IgG 购于 Kirkegaard & Perry Laboratories 公司。无棒曲霉素的苹果汁购于韩国 Gyeongsan 的当地超市。兔抗棒曲霉素的 BSA-IgG 由韩国岭南大学食品科学与技术系, 食品安全与微生物实验室制得。

1.2 仪器与设备

R100 真空旋转蒸发仪, 瑞士 BUCHI 公司; 超声粉碎仪韩国 Hitech 有限公司; Zetasizer Nano ZS90 粒径仪, 英国 Malvern 公司; Infinite M200 酶标仪, 瑞士 TECAN 公司。

1.3 脂质体和免疫脂质体的制备

DPPE、DPPC、DPPG、胆固醇和 SRB 用于制备荧光染料封装的脂质体^[7]。将 DPPE(7.2 μmol) 和 SATA(14.3 μmol) 溶解于 1 mL 含 0.7% 三乙胺的氯仿溶液中, 氮气吹扫下超声处理 1 min 形成 DPPE-SATA。DPPC(40.3 μmol)、DPPG(4.2 μmol) 和胆固醇(40.9 μmol) 溶解于 3 mL 氯仿和 0.5 mL 甲醇的混合溶液中, 并在 45 $^{\circ}\text{C}$ 和氮气吹扫下, 超声 1 min 以形成脂质, 然后立即向脂质混合物中加入 2 mL 的密封剂 (100 mmol/L SRB 溶解于 0.02 mol/L HEPES 缓冲液, pH 7.5), 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 和氮气吹扫下超声 3 min。之后, 45 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发去除有机溶剂, 留下深紫色的凝胶状悬浮液。向脂质悬浮液中再加入 2 mL 的密封剂, 进行 1 min 超声处理, 重复涡流, 蒸发, 超声处理直到混合物变成均匀的悬浮液。将悬浮液依次通过 0.8 μm 和 0.4 μm 膜过滤器, 获得均匀大小的脂质体。将制得的脂质体在包含 0.2 mol/L NaCl 和 0.01% NaN_3 (pH 7.5) 的 0.01 mol/L HEPES 缓冲液中, 用透析膜透析过夜。收集透析后的脂质体溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存备用。

制备 IgG 标记的脂质体时, 将溶解在 $V_{\text{DMSO}}:V_{\text{甲醇}}=2:1$ 的混合溶剂中的 sulfo-KMUS(2 mg/mL) 加入到 1 mL 的抗棒曲霉素-BSA IgG 溶液中, 室温下以 70 r/min 的振摇反应 3 h, 得到带有马来酰亚胺基团的衍生化 IgG。被衍生化的抗棒曲霉素-BSA IgG 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下, 用透析膜在含有 0.15 mol/L NaCl 和 0.01% NaN_3 (pH 7.0) 的 0.02 mol/L HEPES 溶液中透析过夜。同时, 将 30 μL 0.5 mol/L 盐酸羟胺溶解在含有 25 mmol/L EDTA (pH 7.5) 的 0.1 mol/L HEPES 溶液中, 与 300 μL

脂质体溶液混合, 以去除脂质体纳米颗粒上的乙酰硫代乙酸基团。用氮气吹扫 1 min 后, 脂质体溶液在室温下轻轻摇动反应 2 h。含有巯基的脂质体溶液用 0.5 mol/L HEPES 溶液调节 pH 至 7.0, 再与带有马来酰亚胺基团的衍生化 IgG 混合。混合物用氮气吹扫 1 min 并在室温下培养 4 h, 接着在 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下培养过夜。将溶解在 0.02 mol/L TBS(pH 7.0) 溶液中浓度为 100 mmol/L 的乙基马来酰亚胺添加到反应中, 在室温下 70 r/min 轻轻摇晃 30 min 以猝灭未反应的巯基。将混合物通过用 0.02 mol/L TBS 平衡的 Sepharose CL-4B 柱过滤, 收集的免疫脂质体溶液并置于透析管中在 0.02 mol/L TBS 溶液中透析。收集透析后的免疫脂质体并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光的条件下保存备用。

1.4 棒曲霉素免疫脂质体荧光检测方法的设计

用含有 0.04 mol/L 蔗糖的 0.01 mol/L Tris 缓冲液(TBS)以 1:10 比例稀释制备得到免疫脂质体原液。首先, 将 100 μL 抗棒曲霉素-BSA IgG(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被于 96 孔微量滴定板上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。96 孔微量滴定板用 200 μL 含有 0.05% Tween 20 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBST)冲洗。将 100 μL 稀释后的棒曲霉素溶液加入到洗涤后的 96 孔微量滴定板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h。将 100 μL 的稀释后的免疫脂质体溶液加入到用 200 μL PBST 洗涤后的 96 孔微量滴定板。免疫脂质体用 96 孔微量滴定板在 4 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h 后, 滴定板用 200 μL 的 PBST 洗涤 3 次。最后, 将 200 μL 的 OG 溶液加入到 96 孔微量滴定板以溶解免疫脂质体释放出荧光剂 SRB。在激发波长为 550 nm 和发射波长为 585 nm 的条件下测量荧光强度信号。分析棒曲霉素的梯度稀释液以确定检测限。

1.5 基于免疫脂质体的荧光检测法特异性

为了验证基于免疫脂质体的荧光检测特异性, 将 0.01 mol/L PBS 中的赭曲霉毒素 A 溶液稀释至质量浓度为 10, 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。这些不同质量浓度的赭曲霉毒素 A 通过开发的基于免疫脂质体的荧光检测法进行测定。同时, 为了确认 BSA 对所开发的测定法的副作用, 苹果汁中不同浓度的 BSA 也通过基于免疫脂质体的荧光检测法进行测定。

1.6 HPLC 法测定棒曲霉素含量

采用 HPLC 法对人工污染 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ 和 500 $\mu\text{g/L}$ 棒曲霉素的苹果汁样品进行分析。使用乙酸乙酯从人工污染的苹果汁样品中萃取棒曲霉素, 乙酸乙酯用 0.5% 的碳酸钠和无水硫酸钠处理。滤液经真空干燥并溶解在乙酸溶液 (pH 4.0) 中, 在配备紫外线探测器的 Ultimate 3000 进行 HPLC 分析。将 20 μL 样品注入 C18 柱 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 使用 5% 乙腈以 0.5 mL/min 的恒定流速进行洗脱。检测波长为 276 nm。通过标准曲线计算苹果汁样品中棒曲霉素含量。

2 结果与讨论

2.1 脂质体与免疫脂质体的表征

封装 SRB 的脂质体颗粒通过反相蒸发法制得。脂质体和抗棒曲霉-BSA IgG 包被的免疫脂质体的表征如表 1 所示。脂质体粒径为 (179.5 \pm 1.7) nm, 而在脂质体表面覆盖抗棒曲霉-BSA IgG 的免疫脂质体颗粒粒径为 (211.81 \pm 0.97) nm。当其它化合物结合到脂质体表面时, 脂质体粒径增大。颗粒粒径的变化表明了用抗棒曲霉-BSA IgG 包被在脂质体上成功制备了免疫脂质体。SRB 的起始浓度为 100 mmol/L, 所开发的脂质体和免疫脂质体的内部体积均为 3.03×10^{-12} μL , 并且浓度为 3.03×10^{-13} μmol 的 SRB 被封装在内部。如表 1 所示, 脂质体和免疫脂质体的多分散指数分别为 0.19 ± 0.00 和 0.17 ± 0.01 , 低多分散指数表明该脂质体和免疫脂质体具有良好的稳定性。纳米颗粒的 zeta 电位反映了胶体系统的电位稳定性。当悬浮液中的颗粒具有较大的负或正 zeta 电位时, 颗粒之间会相互排斥, 使悬浮液稳定。如表 1 所示, 脂质体和免疫脂质体都有负 zeta 电位, 这表明悬浮颗粒具有聚集在一起的阻力。此结果显示制备的脂质体和免疫脂质体稳定、均一, 适合开发棒曲霉素快速检测新方法。

2.2 免疫脂质体荧光法检测棒曲霉素

如图 1 所示, 当棒曲霉素的质量浓度由 0 $\mu\text{g/L}$ 增加到 150 $\mu\text{g/L}$ 时, 荧光强度急剧增加。该信号与棒曲霉素质量浓度有很好的线性关系, R^2 达 0.9641。然而, 当棒曲霉素的质量浓度高于 150 $\mu\text{g/L}$ 后, 荧光强度不再增加。以上结果表明建立的

表 1 脂质体和免疫脂质体的特性

Table 1 Characterization of liposomes and immuneliposomes

	脂质体	免疫脂质体
粒径/nm	179.5 \pm 1.7	211.81 \pm 0.97
内容积/ μL	3.03×10^{-12}	3.03×10^{-12}
每粒 SRB 含量/ μmol	3.03×10^{-13}	3.03×10^{-13}
多分散指数	0.19 \pm 0.00	0.17 \pm 0.01
zeta 电位/mV	-18.39 \pm 1.27	-18.39 \pm 1.27

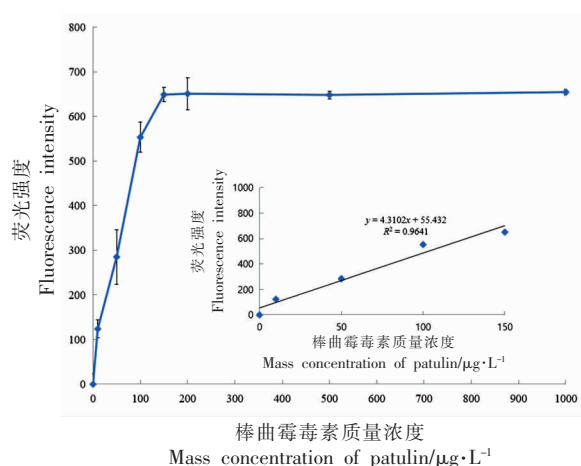


图 1 基于免疫脂质体的荧光分析法对棒曲霉素的检测

Fig.1 Detection of patulin by immuneliposome-based fluorescence

方法当棒曲霉素质量浓度高于 150 $\mu\text{g/L}$ 仅能给出定性检测的结果。通过线性回归计算, 这种基于免疫脂质体的荧光检测法对棒曲霉素的检测限为 8 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3 基于免疫脂质体的荧光检测法的灵敏性和特异性

用赭曲霉毒素 A 作为对照毒素检验所建立的方法的特异性。当赭曲霉毒素 A 的质量浓度从 0 $\mu\text{g/L}$ 增加到 200 $\mu\text{g/L}$ 时, 荧光信号没有改变 (图 2), 这表明该方法与赭曲霉毒素 A 无交叉反应。如图 2 所示, BSA 作为免疫原的组成部分, 显示了较明显的交叉反应, 当 BSA 存在于食品样品中时, 该结果可能限制开发的检测棒曲霉素的方法的应用。

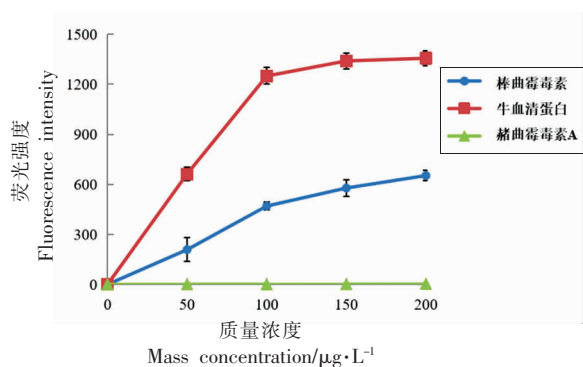


图2 基于免疫脂质体的荧光分析法
对其它毒素的交叉反应

Fig.2 Cross-reactivity of immunoliposome-based
fluorescence assay with other toxins

2.4 基于免疫脂质体的荧光检测法与 HPLC 的比较

比较了基于免疫脂质体的荧光检测法和 HPLC 检测人工污染的苹果汁中棒曲霉素的回收率,以确认所开发方法的可靠性,结果如表 2 所示。当棒曲霉素的加标质量浓度为 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ 和 500 $\mu\text{g/L}$ 时, HPLC 检测到的棒曲霉素质量浓度分别为 (6.19 ± 0.31) , (35.63 ± 0.62) , (74.38 ± 6.88) , (151.88 ± 3.12) $\mu\text{g/L}$ 和 (481.88 ± 1.31) $\mu\text{g/L}$, 表明回收率分别为 $(61.88 \pm 0.03)\%$, $(71.25 \pm 0.01)\%$, $(74.38 \pm 0.07)\%$, $(75.94 \pm 0.02)\%$, 和 $(96.38 \pm 0.03)\%$ 。在棒曲霉素的 HPLC 分析中,

有机溶剂提取在过程的影响将显著影响回收率,低回收率表明在提取过程中有棒曲霉素的损耗。当棒曲霉素的加标质量浓度为 10, 50 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 时,该方法的回收率分别为 $(73.24 \pm 0.06)\%$, $(101.73 \pm 1.55)\%$ 和 $(98.74 \pm 4.88)\%$, 表明该方法检测棒曲霉素是灵敏且可靠的。当棒曲霉素的加标质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 和 500 $\mu\text{g/L}$ 时,回收率为 $(69.97 \pm 0.17)\%$ 和 $(32.7 \pm 1.31)\%$, 该结果与棒曲霉素纯溶液的检测结果,在 0 至 150 $\mu\text{g/L}$ 的范围内具有良好的线性关系。然而,在纯溶液和人为污染的苹果汁溶液中,当棒曲霉素的质量浓度高于 200 $\mu\text{g/L}$ 时,该方法的线性均有所下降。Pennacchio 等^[18]报道了一种近红外荧光分析方法,该方法可以检测食品中的棒曲霉素且无需提取和洗涤过程。Sadok 等^[19]报道了一种结合 HPLC 和二极管阵列检测草莓中棒曲霉素的方法,其检测限满足棒曲霉素监测水平的灵敏度要求。类似地, Ahmadi 等^[20]开发了用于棒曲霉素检测的 DNA 双探针辐射荧光传感器,其线性范围为 15 ng/L 至 35 $\mu\text{g/L}$, 检测限为 6 ng/L 。相较于 HPLC 及相关的方法,这种基于免疫脂质体的荧光检测法非常迅速,能在 3 h 之内检测苹果汁样品中的棒曲霉素。此外,该免疫脂质体荧光分析方法简便易行,无需有机溶剂提取和洗涤过程。

表 2 基于免疫脂质体的荧光脂质体的荧光分析法与 HPLC 方法的比较

Table 2 Comparison of HPLC and developed immunoliposome-based fluorescence assay for the detection patulin in artificial contaminated apple juice

人工污染质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	HPLC 法		荧光脂质体的荧光分析法	
	检测结果/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%	检测结果/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%
0	0	0	0	
10	6.19 ± 0.31	61.88 ± 0.03	7.32 ± 0.01	73.24 ± 0.06
50	35.63 ± 0.62	71.25 ± 0.01	50.86 ± 0.08	101.7 ± 1.55
100	74.38 ± 6.88	74.38 ± 0.07	98.74 ± 4.88	98.74 ± 4.88
200	151.88 ± 3.12	75.94 ± 0.02	139.96 ± 3.40	69.97 ± 0.17
500	481.88 ± 1.31	96.38 ± 0.03	163.50 ± 6.55	32.7 ± 1.31

3 结论

为了建立一种快速、灵敏的果汁中棒曲霉素检测方法,以抗棒曲霉素 BSA IgG、DPPE、DPPC、DPPG、胆固醇和 SRB 为原料合成了免疫脂质体,

建立了基于免疫脂质体的荧光检测方法。该检测方法快速、简单、方便,检测限可达 8 $\mu\text{g/L}$ 。当棒曲霉素质量浓度在 0~150 $\mu\text{g/L}$ 之间时,该方法的线性相关系数 R^2 为 0.9641。此外,该基于免疫脂质

体的检测方法环境友好,不需使用机溶剂萃取。

参 考 文 献

- [1] IOI J D, ZHOU T, TSAO R, et al. Mitigation of patulin in fresh and processed foods and beverages [J]. *Toxins*, 2017, 9(5): 157.
- [2] CHAMPDORE M D, BAZZICALUPO P, NAPOLI L D, et al. A new competitive fluorescence assay for the detection of patulin toxin[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79: 751–757.
- [3] 王亚楠, 王志青, 祖琳, 等. 食品中展青霉素的研究进展[J]. *食品安全质量学报*, 2021, 12(18): 7410–7416.
- WANG Y N, WANG Z Q, ZU L, et al. Research progress of patulin in food[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(18): 7410–7416.
- [4] DOS SANTOS I D, PIZZUTTI I R, DIAS J V, et al. Patulin accumulation in apples under dynamic controlled atmosphere storage [J]. *Food Chemistry*, 2018, 255: 275–281.
- [5] GUERRA-MORENO A, HANNA J. Induction of proteotoxic stress by the mycotoxin patulin[J]. *Toxicology Letters*, 2017, 276: 86–91.
- [6] SALEH I, GOKTEPE I. The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 129: 301–311.
- [7] CRISTIANE R S, CRISTINA T S, JULIANO K V. Development and validation of an extraction method using liquid chromatography–tandem mass spectrometry to determine patulin in apple juice[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130654.
- [8] SHEU F, LEE O, SHYU Y T. Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1999, 7(1): 65–72.
- [9] NIE D, GUO D, HUANG Q, et al. A novel insight into fluorescent sensor for patulin detection using thiol-terminated liposomes with encapsulated coumarin-6 as signal probe[J]. *Sensors and Actuators, B. Chemical*, 2021, 345: 130366.
- [10] 李姝芸, 刘微, 郭婷, 等. 基于 ZnO 纳米刷的展青霉素电化学适配体传感器的构建与应用[J]. *食品发酵与工业*, 2021, 47(3): 157–163.
- LI S H, LIU W, GUO T, et al. Construction and application of electrochemical aptasensor based on brush-shaped nano-ZnO for patulin detection [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(3): 157–163.
- [11] FUNARI R, VENTURE B D, CARRIERI R, et al. Detection of parathion and patulin by quartz-crystal microbalance functionalized by the photonics immobilization technique Biosens[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 67: 224–229.
- [12] PENNACCHIO A, VARRIALE A, ESPOSITO M G, et al. A near-infrared fluorescence assay method to detect patlin in food [J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 481: 55–59.
- [13] GUO Z H, CHEN P, WANG M M. Rapid enrichment detection of patulin and alternariol in apple using surface enhanced Raman spectroscopy with coffee-ring effect[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 152: 112333.
- [14] URUSOV A, ZHERDEV A V, DZANTIEV B B. Immunochemical methods of mycotoxin analysis [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, 46: 253–266.
- [15] TANG S Y, SHEN Z Q, FU S J, et al. Detection of patulin in dairy products by ELISA[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2018, 10(2): 142–144.
- [16] SONG X, SHUKLA S, KIM M. Detection of Cronobacter species in powdered infant formula using immunoliposome-based immunomagnetic concentration and separation assay [J]. *Food Microbiology*, 2018, 72: 23–30.
- [17] SONG X J, WANG D H, KIM M. Immunoliposome-based fluorometric patulin assay by using immunomagnetic nanoparticles [J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186: 834.
- [18] PENNACCHIO A, VARRIALE A, ESPOSITO M G, et al. A near-infrared fluorescence assay method to detect patlin in food [J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 481: 55–59.
- [19] SADOK I, SZMAGARA A, STANISZEWSKA M M. The validated and sensitive HPLC-DAD method for the detection of patulin in strawberries [J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 364–370.
- [20] AHMADI A, DANESH N M, RAMEZANI M, et al. A rapid and simple ratiometric fluorescent sensor for

patulin detection based on a stabilized DNA duplex probe containing less amount of aptamerinvolved base pairs[J]. *Talanta*, 2019, 204: 641–646.

An Immunoliposome-based Fluorescence Assay for the Detection of Patulin

Song Xinjie¹, Lü Tianfeng¹, Wu Li¹, Sun Juan¹, Zhang Yao¹, Kim Myunghee^{2*}, Wu Yuanfeng^{1*}
(¹Zhejiang Provincial Key Laboratory of Chemical and Biological Processing Technology for Agricultural Products, School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023
²Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea)

Abstract Patulin (4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pran-2[6H]-one) is a naturally occurring mycotoxin produced by a number of fungal including *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Penicillium*, *Mucor*, and *Rhizopus*, and contaminate a wide variety of food products such fruit products, vegetables, grains and cheeses. The conventional method for patulin detection required separation and concentration process with organic solvent which is environmentally harmful. Considering the limitation of the traditional methods, this study developed a rapid, sensitive and environmentally friendly method for detection of patulin by using of a rabbit antibody against patulin and antibody conjugated immunoliposome. The detection limit of developed assay had detection limit of 8 $\mu\text{g/L}$ without the need of organic solvent for extraction, separation, and purification. Overall, the detection limit meet well of European regulatory limit for infants and young children products (10 $\mu\text{g/L}$). The developed method was rapid, sensitive, environment-friendly, and reliable for the detection of patulin in apple juice.

Keywords anti-patulin-BSA IgG; immunoliposome; patulin; sensitive; rapid detection