DOI:10.12441/spyswjs.20241126002 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0137-12

基于量子点的丁香酚快速免疫分析方法的研究与初步应用

孙俊杰[1] 刘晓霞[1] 陈子怡[1] 李因来[2] 翟 璐[2] 陈青舟[3] 金仁耀[1*]

(1. 浙江工商大学海洋食品研究院,浙江 杭州 310012; 2. 杭州博岳生物技术有限公司,浙江 杭州 310018; 3. 杭州南开日新生物技术有限公司,浙江 杭州 310051)

摘要:【目的】建立定量检测丁香酚的快速免疫分析方法。**【方法】**以量子点作为荧光标记物,通过1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(EDC-NHS)偶联方法将丁香酚单克隆抗体结合至量子点表面,用牛血清白蛋白(BSA)进行封闭,用荧光显微镜、琼脂糖凝胶电泳及酶标仪进行鉴定,并将该方法与高效液相色谱(HPLC)法进行了比较。**【结果】**量子点免疫探针(QDs-mAb)的最优合成条件为:量子点活化时间30 min,偶联pH 8.0,抗体添加量21 μL,偶联孵育时间3.0 h;最佳缓冲体系:包被缓冲溶液为0.05 mol/L、pH 9.6的碳酸盐缓冲溶液(CBS),QDs-mAb缓冲溶液为0.01 mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(PBS)。在优化条件下建立了量子点荧光免疫分析(quantum dots fluorescence immunoassay,QDs-FIA)法,线性拟合方程为y=13.098ln x+9.625 8,R^2=0.993 1,IC_{20}、IC_{50}和IC_{80}分别为2.21、21.81、215.49 ng/mL;对水样和鲈鱼肉样本进行回收试验,水样的回收率为96.32%~103.01%,鲈鱼肉样本的回收率为94.16%~102.28%,且变异系数均小于7%。**【结论】**作者建立的QDs-FIA法具有较好的检测灵敏度和准确性,可为后期荧光检测试剂盒的开发提供理论基础。

关键词:丁香酚;单克隆抗体;量子点;荧光免疫分析

Research and Preliminary Application of a Rapid Immunoassay Method for Eugenol Based on Quantum Dots

SUN Junjie[1] *LIU Xiaoxia*[1] *CHEN Ziyi*[1] *LI Yinlai*[2] *ZHAI Lu*[2] *CHEN Qinzhou*[3] *JIN Renyao*[1*]

(1. Institute of Sea Food, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China; 2. Hangzhou Bioeast Biotech Co., Ltd., Hangzhou 310018, China; 3. Hangzhou Nankai Biotech Co., Ltd., Hangzhou 310051, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to establish a rapid immunoassay method for the quantitative detection of eugenol. [**Method**] The eugenol monoclonal antibody was conjugated to the surface of quantum dots by the 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxy-succinamide (NHS) (EDC-NHS) coupling method, with quantum dots as fluorescent markers. Bovine serum albumin (BSA) was used for blocking, and fluorescence microscopy, agarose gel electrophoresis, and a microplate reader were used for identification. Furthermore, the established method was compared with high performance liquid chromatography (HPLC). [**Result**] The optimal synthesis conditions were as follows: quantum dot activation time of 30 min, conjugation pH with 8.0, antibody addition of 21 μL, and conjugation incubation time of 3.0 h. The optimal buffer system was as follows: carbonate buffered solution (CBS) with the

基金项目:浙江省科技厅公益性研究项目(LGN22C200028)。

通信作者:金仁耀(1981—),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事水产品加工与质量安全快速检测技术研究。E-mail: nodjin@163.com

收稿日期:2024-11-26 **修回日期:**2025-01-03

coating buffer solution of 0.05 mol/L and pH 9.6, phosphate buffered solution (PBS) with the quantum dots-monoclonal antibody (QDs-mAb) concentration of 0.01 mol/L and pH 7.4. The quantum dots-fluorescence immunoassay (QDs-FIA) method was established under optimized conditions, with the linear equation of y=13.098ln x+9.625 8, R^2=0.993 1. The IC_{20}, IC_{50}, and IC_{80} were 2.21, 21.81, and 215.49 ng/mL, respectively. Recovery test were performed on water samples and bass meat samples, with recovery rate ranging from 96.32% to 103.01% for water samples and 94.16%~102.28% for bass meat samples, and the coefficients of variation were less than 7%. [**Conclusion**] The established QDs-FIA method has good sensitivity and accuracy, which can provide a theoretical basis for the development of fluorescent assay kit in the future.

Keywords: eugenol; monoclonal antibody; quantum dots; fluorescent immunoassay

丁香酚主要来源于桃金娘科植物丁香的干燥花蕾，是从中经蒸馏获得的挥发油成分[1-2]。此外，肉桂和其他香料中也含有少量的丁香酚[3]。丁香酚具有良好的药理活性，在抗菌、镇痛方面具有一定的临床效果，丁香酚作为高反应活性物质有机合成的中间体，在医药、化工、香料等诸多领域也获得了广泛应用[4]，如将其作为麻醉剂应用于水产养殖[5-7]。然而，丁香酚的安全性问题不容忽视，研究显示其有潜在致癌性[8-9]，对大鼠肝脏癌变有显著促进作用，并已由国际癌症研究机构和美国国家毒理学计划归类为III类致癌物[10-11]。

丁香酚的国际监管与应用现状呈现多样化发展趋势。世界卫生组织以及粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会建议丁香酚的可接受日摄入量为0~2.5 mg/kg[12]。日本明确了丁香酚类化合物在水产品中的残留限量不得高于50 μg/kg[13]。在欧洲，尽管丁香酚被列入欧洲食品安全局（European Food Safety Authority，EFSA）的香料清单之中[14]，但EFSA指出丁香酚有潜在的刺激性及可能引发皮肤过敏反应，需谨慎使用[15]。鉴于丁香酚具有潜在的肝毒性和致癌风险，多数国家和组织规定，在运输供人类食用的鱼类时，需谨慎使用丁香酚化合物或丁香油作为麻醉剂[16]。

开展丁香酚的检测是加强丁香酚监管的重要手段。当前，丁香酚常见的检测方法主要包括HPLC、超高效液相色谱-串联质谱法（UPLC-MS/MS）[17-18]，气相色谱-串联质谱法（GC-MS/MS）[8,19]和液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）[13]等高端仪器分析方法，这些方法虽然具备精度高等优点，但操作复杂且成本高，难以满足现场快速检测的需求[20]。因此，研发一种针对丁香酚的高特异性、高灵敏度且快速的检测方法尤为重要。作为一种新兴技术，QDs-FIA利用量子点作为荧光标记物，结合抗体（或抗原）[21]，通过竞争反应捕获荧光信号，具有良好的光稳定性和荧光性能，适用于生物分子、细胞及组织的追踪标记[22-24]。作者采用量子点标记丁香酚单克隆抗体并构建QDs-mAb，通过优化体系条件，旨在建立一种新型的QDs-FIA检测方法，为丁香酚的检测与监管提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BALB/C小鼠：雌性，6~8周龄，浙江中医药大学动物实验研究中心；抗丁香酚单克隆杂交瘤细胞：作者所在实验室；甲醇（色谱级）、乙腈（色谱级）及其他化学试剂（分析纯）：国药集团化学试剂有限公司；BSA、丁香酚、2-吗啉乙磺酸：德国Merck公司；CdSe/ZnS荧光量子点：上海昆道生物技术有限公司；丁香酚单克隆抗体：作者所在实验室制备；96孔不可拆黑色酶标板：北京兰杰柯科技有限公司。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪：IMARK型，美国Bio-rad公司；电子天平：BSA124S-CW型，德国Sartorius公司；台式低温高速离心机：Fresco21型，美国Thermo Fisher Scientific公司；高速冷冻离心机：Sorvall RC-6 Plus型，美国Thermo Fisher Scientific公司；纯水仪：Milli-Q® Reference型，德国Merck公司；自动洗板机：Aquamax® Microplate Washers型，美国Molecular Devices公司；恒温恒湿培养箱：LHS-150SC型，上海一恒科学仪器有限公司；振荡器：HZQ-300A型，北京海淀电子医疗仪器厂；荧光显微镜：Ti-U型，日本Nikon公司。

1.3　方法

1.3.1　丁香酚单克隆抗体的制备与纯化

利用亲核取代反应[25]合成丁香酚半抗原，随后用碳二亚胺偶联法[26]制备人工抗原（Eugenol-BSA和Eugenol-OVA）。通过SDS-PAGE技术和紫外光谱分析，验证丁香酚半抗原和人工抗原的合成是否成功。通过免疫小鼠筛选出能够稳定分泌丁香酚单克隆抗体的杂交瘤细胞。对这些小鼠进行腹腔注射并收集其产生的腹水。最后，用辛酸-硫酸铵法对腹水进行纯化，获得单克隆抗体。

1.3.2　QDs-mAb的制备

通过EDC-NHS介导的方法，对量子点表面的羧基进行活化处理，随后将量子点与抗体进行偶联，偶联过程见图1。反应原理如图2所示，主要步骤为：EDC首先与量子点表面的羧基发生反应，生成一种中间体；随后，NHS与该中间体结合，形成酯类化合物；最后，该酯类化合物与伯胺基团反应生成酰胺键[27]，具体试验过程如下。

1）量子点活化：对10 mg/mL量子点溶液进行超声振荡处理，持续5 min以确保其分散均匀。然后从中取出15 μL量子点溶液置于1.5 mL离心管中，向该离心管中加入150 μL的2-吗啉乙磺酸缓冲溶液（MES）（0.05 mol/L，pH 6.0），并分别加入50 μL新配的EDC-NHS溶液（50 mg/mL），充分混合均匀后，在室温条件下避光孵育30 min。孵育结束后，于4 ℃下以13 000 r/min离心20 min。

2）复溶与偶联：离心完成后弃上清液，向离心管中加入200 μL的MES（0.05 mol/L，pH 8.0），以复溶活化后的荧光量子点。待复溶完全后，加入21 μL的丁香酚单克隆抗体，继续在室温条件下避光振荡孵育3 h。

3）量子点封闭：偶联完成后向溶液中加入25 μL质量分数2%的BSA封闭液，在室温条件下避光反应30 min，于4 ℃下以13 000 r/min离心20 min，弃上清液。向离心管中加入50 μL的MES（0.05 mol/L，pH 8.0），超声振荡5 min使溶液充分混合均匀，将QDs-mAb于4 ℃保存，以备后续使用。

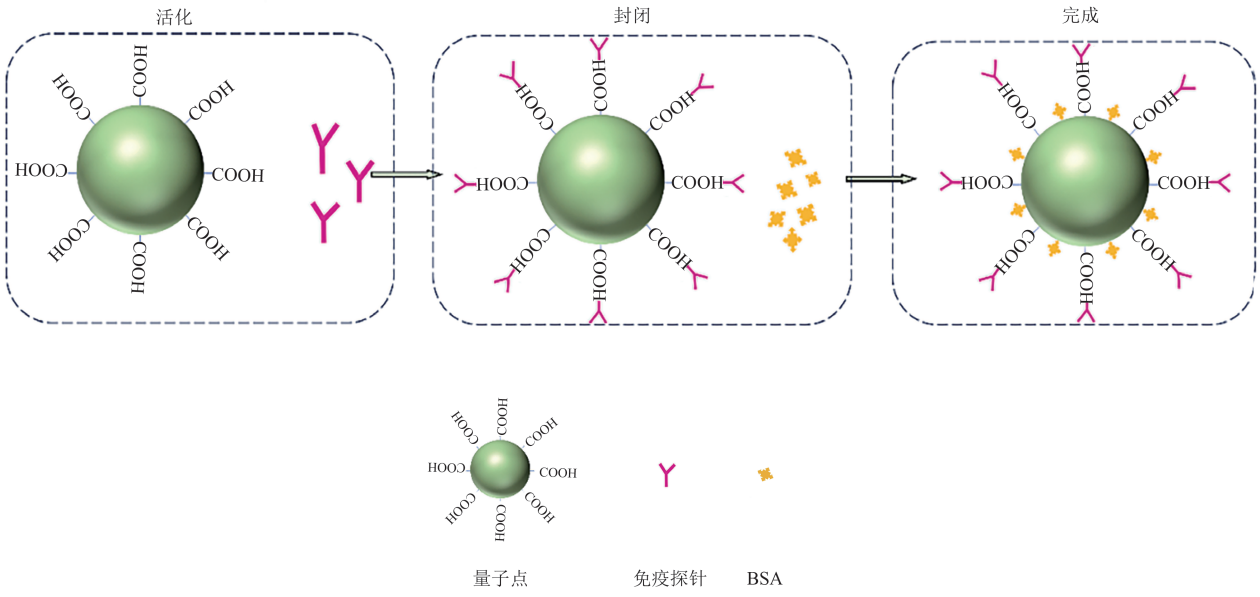


图1　QDs-mAb合成流程图

Fig. 1　Flow chart of QDs-mAb synthesis

1.3.3　QDs-mAb的制备条件优化及鉴定

利用多功能酶标仪检测，实际相对荧光强度为样品相对荧光强度与空白对照组的相对荧光强度的差值，以该实际荧光强度作为评价指标。在室温且避光的条件下，设定6个时间点（10、15、20、25、30、35 min），筛选最适活化时间；选取上述最适条件，进一步对0.05 mol/L MES的pH进行调整，分别调节至6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5，筛选反应最适偶联pH；选取上述最适活化时间和pH，将活化完成的量子点进行离心，去除上清液后

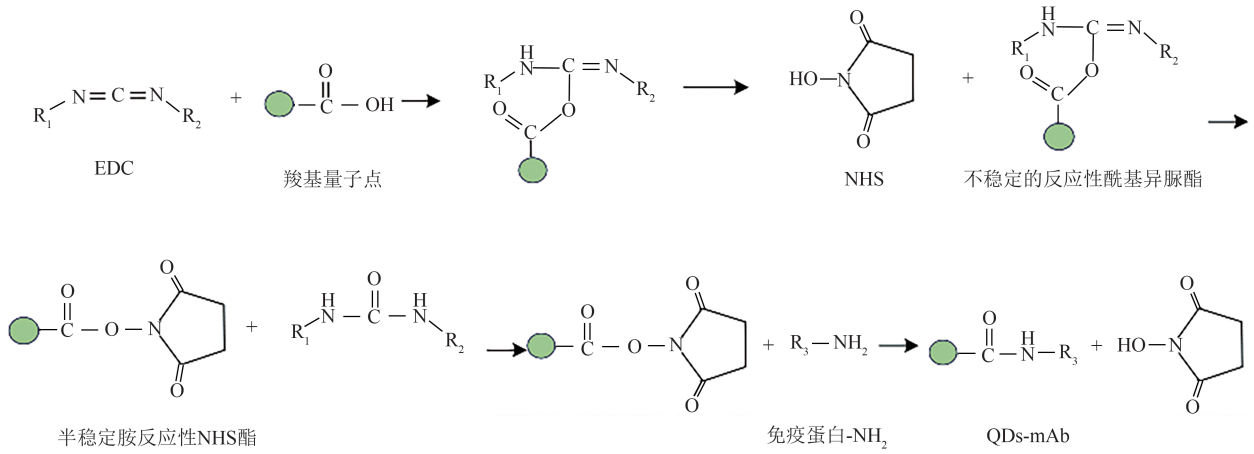


图 2　QDs-mAb 的制备原理图

Fig. 2　Schematic diagram of QDs-mAb preparation

加入 0.05 mol/L 的 MES 进行复溶，随后分别加入 1、7、14、21、28 μL 的丁香酚单克隆抗体进行偶联反应，筛选最适抗体添加量；选取上述最适条件，将偶联孵育时间分别设置为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h，筛选最适偶联孵育时间。最后分别采用荧光显微镜、琼脂糖凝胶电泳和多功能酶标仪等对 QDs-mAb 进行鉴定，以确认其是否成功偶联。

1.3.4　最适包被质量浓度和 QDs-mAb 稀释倍数的优化

采用棋盘法以优化 QDs-mAb 稀释倍数及最适包被质量浓度。将抗原分别稀释至 20.000、10.000、5.000、2.500、1.250、0.625 μg/mL，以 100 μL/孔添加至 96 孔不可拆黑色酶标板中，在 37 ℃恒温恒湿培养箱中孵育 2 h 后用洗板机清洗 3 次并拍干。以 300 μL/孔加入质量分数 5% 的脱脂牛奶，37 ℃孵育 30 min 后洗板 3 次，将制备的 QDs-mAb 分别稀释 10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、100 倍和 200 倍，然后以 100 μL/孔加入酶标板中，于 37 ℃孵育 1 h 后洗板 3 次。向酶标板中加入 0.01 mol/L 的 PBS（pH 7.4），每孔 100 μL，并将只有 0.01 mol/L 的 PBS（pH 7.4）设置为空白对照组，使用多功能酶标仪测定其相对荧光强度。

1.3.5　QDs-FIA 反应体系的优化

1）包被缓冲体系的优化：通过多功能酶标仪测定相对荧光强度，计算抑制率并将其作为评价指标。选用 PBS、CBS 和 Tris-HCl 溶液（0.05 mol/L，pH 9.6）以及质量分数 0.9% 的生理盐水（pH 9.6）这 4 种包被缓冲溶液进行试验，筛选最适包被缓冲溶液。选取最适 QDs-mAb 的制备条件、包被质量浓度、QDs-mAb 稀释倍数，将包被缓冲溶液浓度分别设定为 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20 mol/L，确定最适包被缓冲溶液浓度。在最适包被缓冲溶液种类和浓度下，设定 pH 分别为 8.0、8.5、9.0、9.6、10.0、10.5，并进行检测，确定最适包被缓冲溶液 pH。

2）最适 QDs-mAb 缓冲溶液的优化：在确定包被缓冲体系的最适条件之后，选用 PBS、Tris-HCl 溶液和 MES（0.01 mol/L，pH 7.4）以及质量分数 0.9% 的生理盐水（pH 7.4）这 4 种不同类型的 QDs-mAb 缓冲溶液，以抑制率作为评价指标，筛选最适 QDs-mAb 缓冲溶液的种类。在确定最适 QDs-mAb 缓冲溶液后，将 QDs-mAb 缓冲溶液浓度分别设置为 0.005、0.010、0.020、0.050、0.100 mol/L，确定最适的 QDs-mAb 缓冲溶液浓度。在此基础上，调节 QDs-mAb 缓冲溶液的 pH 至 6.0、6.5、7.0、7.4、8.0、8.5，并进行检测，以确定最适 QDs-mAb 缓冲溶液 pH。

1.3.6　标准曲线的建立

丁香酚质量浓度越高，其抑制作用越强，通过测定抑制率可推算其质量浓度。将 1 000 ng/mL 丁香酚标准品按 4 倍稀释比例进行连续 7 个梯度的稀释，并额外添加 2 个不同稀释倍数，即将质量浓度设置为 0.4、500.0 ng/mL，共计获得 9 个质量浓度梯度。每个质量浓度梯度均进行 3 次重复检测，并设立空白对照组与阴性对照组。对各样本的相对荧光强度进行检测，并按照式（1）计算丁香酚抑制率。以丁香酚质量浓度的对数值为横坐标、丁香酚抑制率为纵坐标绘制标准曲线。

$$I=\frac{F_1-F'}{F_1-F_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

I——丁香酚抑制率，%；

F_1——阴性对照组的相对荧光强度；

F'——阳性对照组的相对荧光强度；

F_0——空白对照组的相对荧光强度。

1.3.7 特异性分析

选取丁香酚的结构类似物，包括异丁香酚、丁香酚甲醚、异丁香酚甲醚、乙酰基异丁香酚。将丁香酚的结构类似物分别稀释至100、50、10、5、1 μg/mL，参照丁香酚的检测方法对这些结构类似物进行检测，并基于检测结果构建标准曲线，计算IC_{50}。IC_{20}、IC_{50}和IC_{80}本质上是通过不同抑制水平（20%、50%、80%）下的质量浓度，反映体系对目标物质的响应能力，还可结合IC_{20}、IC_{50}和IC_{80}进行灵敏度评估。根据式（2）计算交叉反应率（cross reactivity rate，CR）。CR越低，表明该结构类似物的特异性越强。

$$C=\frac{I_{50\text{-E}}}{I_{50\text{-O}}}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

C——CR，%；

$I_{50\text{-E}}$——丁香酚的IC_{50}，ng/mL；

$I_{50\text{-O}}$——丁香酚结构类似物的IC_{50}，ng/mL。

1.3.8 样本的回收率测定

对仪器检测丁香酚为阴性的菜场水样和鲈鱼肉样本进行加标回收试验。

水样：从菜市场采集鱼类生活水样，经离心过滤后，向水样中分别加入质量浓度为5、10、20、50、100 ng/mL的丁香酚标准品，混合均匀后，每个质量浓度设置3个检测孔，并重复检测3次。

鲈鱼肉样本：从菜市场购买鲈鱼，取50.0 g鲈鱼肉置于研磨器中研磨成糜状。称取5.0 g放入50 mL离心管中，加入丁香酚标准品，使丁香酚质量分数分别达到10、20、50、100、150 ng/g。样本静置30 min后加入5 mL含体积分数10%甲醇的0.01 mol/L PBS，经2 min旋涡混匀及15 min超声处理后，8 000 r/min离心5 min。取上清液再以10 000 r/min离心15 min，将最终得到的上清液用于检测。

分别按照式（3）~（4）计算样本的回收率和变异系数。

$$R=\frac{E_0}{E}\times 100\% \quad (3)$$

式中：

R——样本的回收率，%；

E_0——样品实测质量浓度，ng/mL；

E——标准品添加质量浓度，ng/mL。

$$D=\frac{S}{M}\times 100\% \quad (4)$$

式中：

D——变异系数，%；

S——多次回收率测定结果的标准差；

M——多次回收率测定结果的算术平均值。

1.3.9 QDs-FIA法的准确性分析

于水样中分别添加5、10、20、50、100 ng/mL的丁香酚标准品。称取5.0 g鱼肉样本于50 mL离心管中，加入丁香酚标准品，使其质量分数分别达到10、20、50、100、150 ng/g，其他步骤与1.3.8小节相同。同时使用QDs-FIA法和HPLC法进行检测和比较，以此来评价所建立检测方法的准确性。

1.4 数据分析

采用Excel 2019和IBM SPSS Statistics 25.0进行数据处理，用Origin 2021软件进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 QDs-mAb的制备条件确定及鉴定

2.1.1 QDs-mAb制备条件的确定

为了优化QDs-mAb制备条件，以实际相对荧光强度作为评价指标，筛选出最适活化时间、偶联pH、抗体添加量和偶联孵育时间。

如图3（a）所示，随着活化时间的递增，实际相对荧光强度呈现上升趋势，30 min时达到最大值。且在35 min时的实际相对荧光强度与30 min时相比，无明显差异。因此，为降低制备过程的时间成本，选择30 min作为最适活化时间。

如图3（b）所示，在pH为6.0的弱酸性环境下，实际相对荧光强度最低，表明此条件不利于量子点与抗体的结合。随着pH的增加，实际相对荧光强度逐渐增强，直至pH为8.0时达到最大值。继续提高pH，实际相对荧光强度反而下降，且在pH超过9.0后，实际相对荧光强度基本保持稳定，表明量子点在弱碱性环境下的偶联效果更好。因此，确定最适偶联pH为8.0。

如图3（c）所示，随着抗体添加量的增加，实际

相对荧光强度呈现上升趋势。当添加量达到21 μL时，实际相对荧光强度达到最大值。之后继续增加抗体的添加量，实际相对荧光强度也未出现明显上升，反而略有下降。有研究者[28]发现，当抗体含量过高时，量子点无法进一步结合抗体，而抗体作为蛋白质，对量子点的荧光产生了猝灭效应，从而使得实际相对荧光强度略有降低。因此，选择最适抗体添加量为21 μL。

偶联孵育时间的长短对QDs-mAb的制备有重要影响，偶联孵育时间过短，会造成反应不完全；偶联孵育时间过长，则很可能影响QDs-mAb的信号强度，同时会增加不必要的时间成本[28]。如图3(d)所示，随着偶联孵育时间的延长，实际相对荧光强度逐渐上升，直至偶联孵育时间为3.0 h时，实际相对荧光强度达到最大值。此后，即使继续延长偶联孵育时间，实际相对荧光强度也基本保持稳定。因此，选择3.0 h作为最适偶联孵育时间。

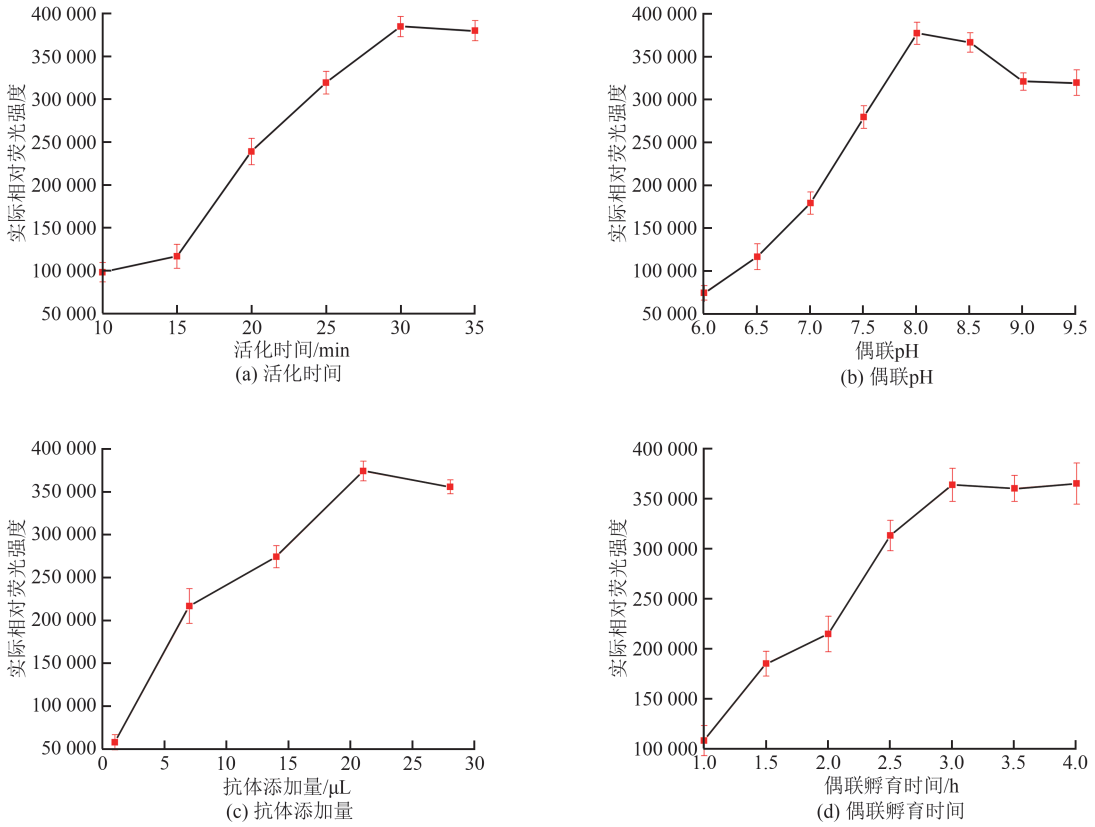


图 3　活化时间、偶联pH、抗体添加量、偶联孵育时间对量子点偶联效果的影响

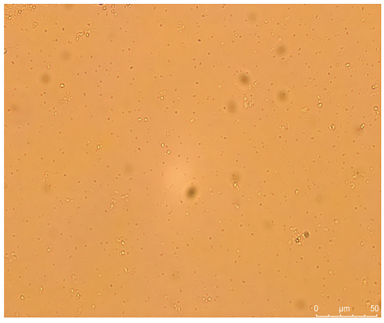
Fig. 3　Effects of activation time, conjugation pH, antibody addition levels, and conjugation incubation time on the conjugation effect of quantum dots

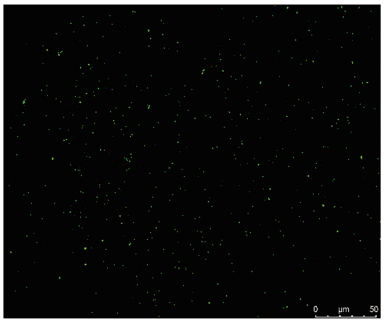
2.1.2　QDs-mAb的鉴定

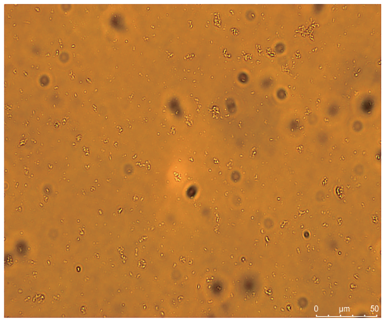
采用荧光显微镜观察、琼脂糖凝胶电泳分析及多功能酶标仪测定等方法对QDs-mAb进行表征。通过荧光显微镜对比观察量子点在偶联抗体前后的状态，发现游离量子点分散均匀，见图4(a)~(b)；成功偶联的量子点(QDs-mAb)在同一抗体位置发生聚集，如图4(c)~(d)所示，大量明亮的量子点聚集在一起。琼脂糖凝胶电泳结果见图4(e)，在相同条件下，游离量子点的迁移速率比QDs-mAb更快。使用多功能酶标仪检测QDs-mAb和游离量子点的实际相对荧光强度，结果见图4(f)。在相同的检测体系下，游离量子点的实际相对荧光强度大于QDs-mAb，这可能是由于偶联过程中发生了荧光猝灭现象。综上所述，QDs-mAb已成功偶联，这为构建丁香酚荧光免疫分析方法奠定了基础。

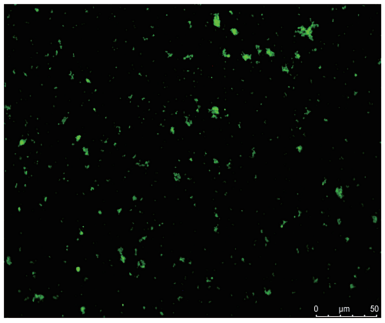
2.2　最适包被质量浓度和QDs-mAb稀释倍数的确定

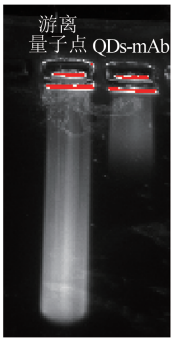
采用棋盘法确定最适包被质量浓度和QDs-mAb稀释倍数。由表1可知，当包被质量浓


(a) 游离量子点的显微镜图

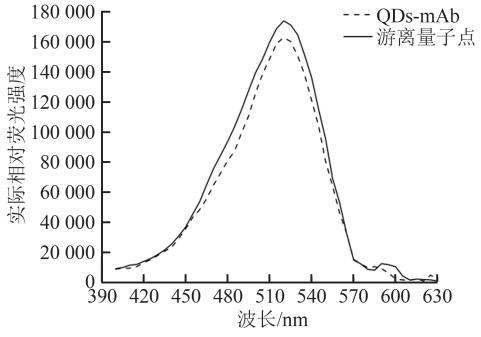

(b) 游离量子点的荧光显微镜图


(c) QDs-mAb的显微镜图


(d) QDs-mAb的荧光显微镜图



(e) 琼脂糖凝胶电泳图



(f) 游离量子点与QDs-mAb的多功能酶标仪检测结果

图 4　QDs-mAb 的鉴定结果

Fig. 4　Identification results of QDs-mAb

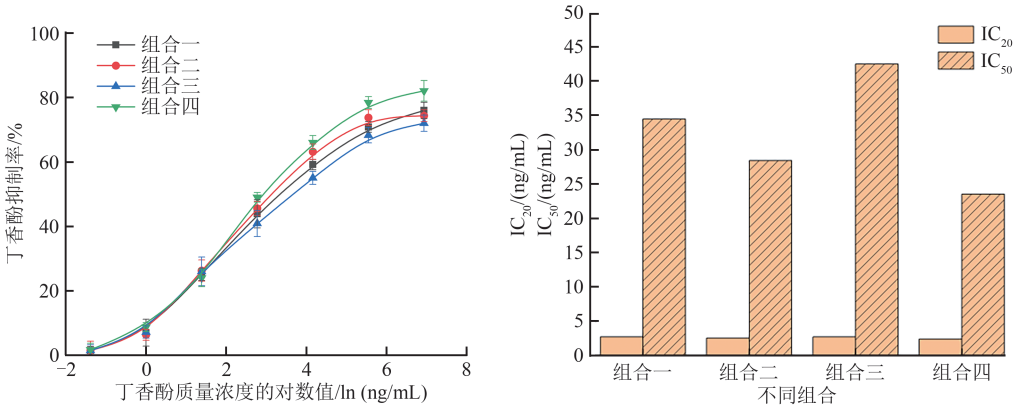
度为5.000、2.500 μg/mL，且QDs-mAb分别稀释50倍和100倍时，QDs-mAb的实际相对荧光强度随包被质量浓度的降低明显变化。虽然QDs-mAb分别稀释30倍与40倍，包被质量浓度为20.000、10.000 μg/mL时，QDs-mAb的实际相对荧光强度也有明显变化，但是成本更高。因此，将包被质量浓度为5.000、2.500 μg/mL与QDs-mAb稀释50倍、100倍分别进行搭配，筛选最适组合。将包被质量浓度为2.500 μg/mL、QDs-mAb稀释倍数为50倍时定义为组合一，包被质量浓度为5.000 μg/mL、QDs-mAb稀释倍数为100倍时定义为组合二，包被质量浓度为2.500 μg/mL、QDs-mAb稀释倍数为100倍时定义为组合三，包被质量浓度为5.000 μg/mL、QDs-mAb稀释倍数为50倍时定义为组合四。包被质量浓度为5.000、2.500 μg/mL时，添加丁香酚标准品，利用多功能酶标仪检测各样品的实际相对荧光强度，并计算IC_{20}与IC_{50}来评估灵敏度。

4种不同包被质量浓度和QDs-mAb稀释倍数组合下的丁香酚抑制率见图5(a)，其中组合四(包被质量浓度为5.000 μg/mL、QDs-mAb稀释50倍)的丁香酚抑制率最高；4种组合的IC_{20}与IC_{50}见图5(b)，尽管IC_{20}在各组合间差异不明显，但IC_{50}差异明显，特别是组合四的IC_{50}最低，表明该组合具备最佳的灵敏度。因此，确定抗原的最佳包被质量浓度为5.000 μg/mL，QDs-mAb的最适稀释倍数为50倍。

表 1 棋盘法确定最适包被质量浓度和 QDs-mAb 稀释倍数

Table 1 Optimum coating mass concentration and QDs-mAb dilution factor determined by the chessboard method

包被质量浓度/（μg/mL）	实际相对荧光强度						
	QDs-mAb 稀释 10 倍	QDs-mAb 稀释 20 倍	QDs-mAb 稀释 30 倍	QDs-mAb 稀释 40 倍	QDs-mAb 稀释 50 倍	QDs-mAb 稀释 100 倍	QDs-mAb 稀释 200 倍
20.000	2 240 470.5±33 723.0	1 810 066.5±9 500.0	1 105 843.5±51 841.0	815 954.0±25 170.0	784 880.0±12 633.0	351 422.5±23 312.0	104 305.0±12 885.0
10.000	2 027 198.0±14 483.0	1 770 970.5±6 342.0	1 047 637.5±5 390.0	667 085.5±21 156.0	458 097.0±6 586.0	285 032.5±12 738.0	101 790.0±19 137.0
5.000	1 864 116.0±12 898.0	1 067 908.0±19 430.0	715 551.5±12 358.0	545 367.5±14 501.0	348 005.5±21 176.0	136 631.0±21 042.0	52 581.5±9 200.0
2.500	1 144 812.0±16 040.0	792 286.0±26 428.0	332 786.0±22 732.0	255 227.0±26 596.0	123 490.0±14 602.0	77 508.5±11 538.0	46 287.5±10 183.0
1.250	459 037.0±17 375.0	289 336.0±13 654.0	184 765.0±12 807.0	155 323.0±12 749.0	101 406.5±8 866.0	36 407.5±11 710.0	25 266.5±8 610.0
0.625	121 857.5±13 071.0	99 789.5±8 509.0	73 118.5±3 181.0	48 110.5±9 078.0	44 404.0±13 552.0	34 673.0±9 772.0	15 809.5±5 875.0



(a) 4种组合的丁香酚抑制率曲线 (b) 4种组合的IC_{20}和IC_{50}

图 5 4 种组合的抑制率曲线、IC_{20}和IC_{50}的对比

Fig. 5 Comparison of inhibition rate curves, IC_{20}, and IC_{50} for four combinations

2.3 QDs-FIA 反应体系条件的确定

2.3.1 包被缓冲体系条件的确定

1）包被缓冲溶液种类的确定：由表 2 可知，包被缓冲溶液为 CBS 的标准曲线方程的斜率最大；相比之下，质量分数 0.9% 的生理盐水的斜率最低，表明丁香酚抑制率相对最低。IC_{20}代表检测系统的灵敏度；IC_{50}用于评估对丁香酚的抑制效果，IC_{50}越低，表明对丁香酚的抑制作用越强；而 IC_{80}则代表样品检测的上限。通过比较 4 种不同包被缓冲溶液的 IC_{20}、IC_{50}和 IC_{80}，发现 CBS 的这 3 个值均最低，说明 CBS 的包被效果最优，抑制作用最强。因此，最适包被缓冲溶液为 CBS。

表 2 包被缓冲溶液种类对 QDs-FIA 法的影响

Table 2 Effect of coating buffer solution type on QDs-FIA method

包被缓冲溶液	标准曲线方程	R^2	IC_{20}/（ng/mL）	IC_{50}/（ng/mL）	IC_{80}/（ng/mL）
PBS	y=11.103ln x+8.192 1	0.994 5	2.90	43.18	643.83
CBS	y=12.787ln x+8.486 4	0.991 2	2.46	25.70	268.45
Tris-HCl溶液	y=11.467ln x+7.236	0.998 4	3.04	41.65	569.93
质量分数 0.9% 的生理盐水	y=9.511 8ln x+5.380 9	0.995 9	4.65	108.95	2 552.68

2）包被缓冲溶液浓度的确定：有研究认为离子浓度可能影响抗原表位或抗体结合位点上的带电基团的结合，从而影响抗原与抗体的结合[29]。如表 3 所示，随着包被缓冲溶液浓度的增加，标准曲线的斜率呈现先上升后下降的趋势。通过对比分析 IC_{20}、IC_{50}和 IC_{80}，当包被

缓冲溶液浓度为0.01~0.05 mol/L时，IC_{20}、IC_{50}和IC_{80}同样呈现先增大后减小的趋势；当包被缓冲溶液浓度为0.10~0.20 mol/L时，IC_{20}、IC_{50}和IC_{80}逐渐上升。当包被缓冲溶液浓度为0.01 mol/L时，IC_{20}最低，表明此浓度下的灵敏度最高；而当包被缓冲溶液浓度为0.05 mol/L时，IC_{50}最低，说明该浓度下的抑制效果最佳。综合考量标准曲线的斜率、灵敏度以及抑制率等因素，选择0.05 mol/L作为包被缓冲溶液的最适浓度。

表3　包被缓冲溶液浓度对QDs-FIA法的影响

Table 3　Effect of coating buffer solution concentration on QDs-FIA method

包被缓冲溶液浓度/（mol/L）	标准曲线方程	R^2	IC_{20}/（ng/mL）	IC_{50}/（ng/mL）	IC_{80}/（ng/mL）
0.01	y=9.342 5ln x+10.811	0.980 6	2.67	66.33	1 645.56
0.02	y=9.767 2ln x+7.524 6	0.984 4	3.59	77.38	1 669.51
0.05	y=13.328ln x+6.686 7	0.998 4	2.72	25.79	244.86
0.10	y=11.753ln x+6.724	0.992 5	3.09	39.73	510.13
0.20	y=11.523ln x+5.826 9	0.986 0	3.42	46.22	624.51

3）包被缓冲溶液pH的确定：反应体系的pH会破坏抗原、抗体的稳定性，极端的pH会导致抗原、抗体变性，破坏抗原的识别表位，从而影响抗原与抗体的结合[29]。由表4可知，随着pH的增加，标准曲线的斜率呈现先上升后下降的趋势，IC_{20}、IC_{50}、和IC_{80}表现出先减小后增大的变化规律。当pH达到10.0时，IC_{20}取得最小值；当pH为9.6时，IC_{50}达到最小值，且此时标准曲线的斜率最大。综合上述分析，确定最适包被缓冲溶液pH为9.6。

表4　包被缓冲溶液pH对QDs-FIA法的影响

Table 4　Effect of coating buffer solution pH on QDs-FIA method

pH	标准曲线方程	R^2	IC_{20}/（ng/mL）	IC_{50}/（ng/mL）	IC_{80}/（ng/mL）
8.0	y=9.214 8ln x+2.676	0.971 6	6.55	169.98	4 408.47
8.5	y=10.702ln x+6.275 8	0.997 6	3.61	59.48	981.25
9.0	y=11.969ln x+8.604 7	0.994 3	2.59	31.77	389.56
9.6	y=13.301ln x+8.277	0.991 4	2.41	23.03	219.71
10.0	y=11.801ln x+9.892 4	0.988 9	2.36	29.92	380.25
10.5	y=11.656ln x+9.265 2	0.984 0	2.51	32.94	432.05

2.3.2　最适QDs-mAb缓冲溶液的确定

1）QDs-mAb缓冲溶液种类的确定：QDs-mAb缓冲溶液可以维持QDs-mAb的pH以及分析物与抗体之间特异性吸附的稳定性，但也可能影响实际相对荧光强度。由表5可知，相较于其他3种缓冲溶液，PBS作为QDs-mAb缓冲溶液时的IC_{20}和IC_{50}最低，表明PBS的效果最好、抑制率最高。因此，选择PBS作为最适QDs-mAb缓冲溶液。

表5　QDs-mAb缓冲溶液种类对QDs-FIA法的影响

Table 5　Effect of QDs-mAb buffer solution type on QDs-FIA method

QDs-mAb缓冲溶液种类	标准曲线方程	R^2	IC_{20}/（ng/mL）	IC_{50}/（ng/mL）	IC_{80}/（ng/mL）
PBS	y=13.05ln$x$+5.979	0.994 4	2.93	29.17	290.65
MES	y=11.69ln$x$+6.184 5	0.997 3	3.26	42.44	552.48
Tris-HCl溶液	y=9.840 9ln$x$+7.871 8	0.994 3	3.43	72.31	1 524.51
质量分数0.9%的生理盐水	y=11.924ln$x$+7.111 1	0.996 2	2.95	36.48	451.60

2）QDs-mAb缓冲溶液浓度的确定：在中性或弱碱环境中，抗原、抗体表面带有负电荷，适当浓度的缓冲离子会使其失去一部分电荷而相互结合。当缓冲溶液浓度太低时，无法提供充足的阳离子；当缓冲溶液浓度太高时，过量离子会竞争抗原、抗体表面的结合位点，影响抗原与抗体的结合效果[29]。由表6可知，0.010 mol/L的QDs-mAb缓冲溶液展现出最低的IC_{20}和IC_{50}，表明在此浓度下，抗原与QDs-mAb的结合效果最佳，且灵敏度最高。同时，该条件下的标准曲线斜率最大，抑制率也最高。因此，选择最适QDs-mAb缓冲溶液浓度为0.010 mol/L。

3）QDs-mAb 缓冲溶液 pH 的确定：pH 会影响 QDs-mAb 的稳定性和识别能力。由表 7 可知，随着 pH 的增加，标准曲线的斜率呈现先增大后减小的趋势，在 pH 达到 7.4 时，斜率最大，随后逐渐减小。IC_{20}、IC_{50} 和 IC_{80} 均随着 pH 的增大呈现先降低后升高的趋势。当 pH 为 7.0 时，IC_{20} 取得最小值，表明此时的检测灵敏度最高。然而，相较于 pH 为 7.0 时，pH 为 7.4 时的 IC_{50} 更小。因此，选择最适 QDs-mAb 缓冲溶液 pH 为 7.4。

表 6　QDs-mAb 缓冲溶液浓度对 QDs-FIA 法的影响

Table 6　Effect of QDs-mAb buffer solution concentration on QDs-FIA method

QDs-mAb 缓冲溶液浓度/（mol/L）	标准曲线方程	R^2	IC_{20}/（ng/mL）	IC_{50}/（ng/mL）	IC_{80}/（ng/mL）
0.005	y=11.917ln x+9.133 4	0.994 1	2.49	30.85	382.48
0.010	y=13.194ln x+8.484 4	0.991 6	2.39	23.26	225.95
0.020	y=11.363ln x+7.513 8	0.997 1	3.00	42.06	589.42
0.050	y=10.808ln x+7.700 4	0.993 4	3.12	50.09	803.88
0.100	y=10.166ln x+5.890 7	0.990 4	4.01	76.62	1 465.45

表 7　QDs-mAb 缓冲溶液 pH 对 QDs-FIA 法的影响

Table 7　Effect of QDs-mAb buffer solution pH on QDs-FIA method

pH	标准曲线方程	R^2	IC_{20}/（ng/mL）	IC_{50}/（ng/mL）	IC_{80}/（ng/mL）
6.0	y=9.761 3ln x+2.674 3	0.960 8	5.90	127.52	2 756.34
6.5	y=10.756ln x+3.786 6	0.988 8	4.52	73.44	1 194.72
7.0	y=11.295ln x+11.299	0.995 3	2.16	30.77	438.09
7.4	y=13.377ln x+8.362 5	0.995 0	2.39	22.48	211.72
8.0	y=12.435ln x+6.801 5	0.987 0	2.89	32.26	360.14
8.5	y=12.644ln x+2.059 8	0.983 7	4.13	44.32	475.42

2.3.3　QDs-FIA 分析方法的建立

在各项因素经过筛选并确定之后，构建了以丁香酚质量浓度的对数值为横坐标、丁香酚抑制率为纵坐标的 S 形标准曲线。该曲线的线性回归方程为 y=13.098ln x+9.625 8，R^2=0.993 1。在此标准曲线上，得到的 IC_{20}、IC_{50} 和 IC_{80} 分别为 2.21、21.81、215.49 ng/mL。

2.3.4　特异性结果

对比了丁香酚与丁香酚结构类似物的 CR，结果见表 8。丁香酚单克隆抗体与异丁香酚的 CR 为 3.97%，而其他结构类似物的 CR 均低于 0.44%，表明丁香酚单克隆抗体具有较高的特异性，满足检测标准。

表 8　丁香酚与其结构类似物测定结果

Table 8　Determination results of eugenol and its structural analogues

丁香酚及其结构类似物	IC_{50}/（ng/mL）	CR/%
异丁香酚	548.73	3.97
丁香酚甲醚	>5 000.00	<0.44
异丁香酚甲醚	>5 000.00	<0.44
乙酰基异丁香酚	>5 000.00	<0.44
丁香酚	21.81	100.00

2.3.5　样本的回收率与 QDs-FIA 法的准确性结果

由表 9~10 可知，在 QDs-FIA 法中，水样的回收率为 96.32%~103.01%，而鲈鱼肉样本的回收率为 94.16%~102.28%；在 HPLC 法中，水样的回收率为 96.07%~102.47%，而鲈鱼肉样本的回收率为 96.77%~102.45%。所有样本的变异系数均在 7%

表 9　QDs-FIA 法与 HPLC 法对水样中丁香酚的检测结果对比

Table 9　Comparison of the results between QDs-FIA and HPLC method on the detection of eugenol in water samples

标准品质量浓度/（ng/mL）	QDs-FIA 法（n=5）		HPLC 法（n=5）	
	回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%
5	103.01	6.02	96.07	2.42
10	97.99	3.27	99.72	1.51
20	98.96	1.72	101.14	1.69
50	100.31	2.10	102.47	0.92
100	96.32	3.77	101.45	2.31

表 10　QDs-FIA 法与 HPLC 法对鲈鱼肉样品中丁香酚的检测结果对比

Table 10　Comparison of the results between QDs-FIA and HPLC on the detection of eugenol in bass meat samples

标准品质量分数/（ng/g）	QDs-FIA 法（n=5）		HPLC 法（n=5）	
	回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%
10	102.28	6.60	98.07	3.12
20	100.12	3.39	101.62	1.70
50	94.16	3.60	102.45	2.35
100	99.71	2.57	96.77	2.65
150	97.02	3.44	97.56	3.25

以下，表明该方法的检测结果与HPLC法具有良好的一致性。这一结果充分证明了QDs-FIA法的精确度较高，适用于水产品中丁香酚的检测。

3 结论

用于检测丁香酚的传统方法存在效率低、成本高的问题。作者选取量子点作为荧光标记介质，借助EDC-NHS偶联策略合成QDs-mAb，并确定了最优合成参数。为验证QDs-mAb是否成功制备，采用了荧光显微镜观察、琼脂糖凝胶电泳分析及多功能酶标仪测定等方法进行表征，结果均证实了QDs-mAb被成功合成。利用所制备的QDs-mAb建立了QDs-FIA法，并确定最优反应条件为：包被缓冲溶液为0.05 mol/L、pH 9.6的CBS，QDs-mAb缓冲溶液为0.01 mol/L、pH 7.4的PBS，后续有关稀释标准品的有机溶剂仍需进一步探究。通过棋盘法，确定了最适包被质量浓度为5.000 μg/mL，最适QDs-mAb稀释倍数为50倍。基于上述优化条件，建立了以丁香酚质量浓度的对数值为横坐标、丁香酚抑制率为纵坐标的标准曲线，所得线性拟合方程为 y=13.098ln x+9.625 8，R^2=0.993 1，IC_{50}为21.81 ng/mL。水样及鲈鱼肉样本的加标回收试验结果显示，水样的回收率为96.32%~103.01%，鲈鱼肉样本的回收率为94.16%~102.28%，且所有样本的变异系数均低于7%，该法与HPLC法的测定结果相比无明显差异，表明该方法具有高精确度，一定程度上弥补了传统检测方法的缺陷，为丁香酚的检测提供了一种新颖且有效的方法。

参考文献

[1] KALITA D J，TARNAVCHYK I，SELVAKUMAR S，et al. Poly（vinyl ethers）based on the biomass-derived compound，eugenol，and their one-component，ambient-cured surface coatings[J]. Progress in Organic Coatings，2022，170：106996.

[2] RADSETOULALOVA I，HUBERT J，HAMPEL D，et al. Active components of essential oils as acaricides against *Dermanyssus gallinae*[J]. British Poultry Science，2020，61(2)：169-172.

[3] BARBOZA J N，DA SILVA MAIA BEZERRA FILHO C，SILVA R O，et al. An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity，2018(1)：3957262.

[4] BEN KHEMIS I，MECHI N，BEN LAMINE A. Investigation of mouse eugenol olfactory receptor activated by eugenol，vanillin and ethyl vanillin：steric and energetic characterizations[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，163：2325-2333.

[5] 张环，陈欣，何家俊. 丁香油药理作用及在口腔护理产品中的应用[J]. 口腔护理用品工业，2009，19(5)：23-24.
ZHANG H，CHEN X，HE J J. Pharmacological effects of clove oil and its applications in oral care products[J]. Oral Carl Industry，2009，19(5)：23-24.(in Chinese)

[6] FU X，GAO Y，YAN W Y，et al. Preparation of eugenol nanoemulsions for antibacterial activities[J]. RSC Advances，2022，12(6)：3180-3190.

[7] 李宁，刘燕蓉，刘正群，等. 丁香酚对畜禽肠道健康的影响及其在畜禽生产中的应用[J]. 饲料研究，2023，46(10)：150-153.
LI N，LIU Y R，LIU Z Q，et al. Effect of eugenol on intestinal health of livestock and poultry and its application in livestock production[J]. Feed Research，2023，46(10)：150-153.(in Chinese)

[8] LI J C，ZHANG J，LIU Y. Optimization of solid-phase-extraction cleanup and validation of quantitative determination of eugenol in fish samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry，2015，407(21)：6563-6568.

[9] WANG M L，QIAO Y，LUO Z H，et al. Development of a QuEChERS combined with LC-MS/MS method for determining 24 sedatives and anesthetics in animal-derived foods[J]. Journal of Food Composition and Analysis，2024，127：106000.

[10] 张博文，李雪银，江改青，等. 水产品中常用麻醉剂及其检测方法的研究进展[J]. 食品安全导刊，2022(15)：180-184.
ZHANG B W，LI X Y，JIANG G Q，et al. Research progress on the common anesthetics and inspection methods in aquatic products[J]. China Food Safety Magazine，2022(15)：180-184.(in Chinese)

[11] 柯常亮，刘奇，陈洁文，等. 气相色谱-串联质谱联用法测定水中丁香酚残留[J]. 中国渔业质量与标准，2014，4(4)：49-55.
KE C L，LIU Q，CHEN J W，et al. Determination of eugenol in water using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Chinese Fishery Quality and Standards，2014，4(4)：49-55.(in Chinese)

[12] KE C L，LIU Q，HUANG K，et al. Effect of water temperature on the depletion of eugenol in sea bass under the simulated settings in handling and transport[J]. Applied Sciences，2021，11(22)：10882.

[13] SUN P，GAO Y L，LIAN Y F. Determination of eugenol in aquatic products by dispersive solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Analytical Methods，2017，10(10)：3217-3224.

[14] 赵东豪，王强，王旭峰，等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测鱼肉和暂养水中丁香酚残留量[J]. 食品科学，2016，37(24)：252-256.
ZHAO D H，WANG Q，WANG X F，et al. Determination of eugenol in fish and farming water by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science，2016，37(24)：252-256.(in Chinese)

[15] Authority European Food Safety. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance eugenol[J]. EFSA Journal，2012，10(11)：2914.

[16] PURBOSARI N，WARSIKI E，SYAMSU K，et al. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish：a review[J]. Aquaculture and Fisheries，2019，4(4)：129-133.

[17] 陈源. UPLC-MS/MS 同时测定水产品中 7 种丁香酚类麻醉剂残留量[J]. 食品工业，2024，45(1)：280-283.
CHEN Y. Determination of 7 eugenol residues in aquatic products by UPLC-MS/MS [J]. The Food Industry，2024，45(1)：280-283.(in Chinese)

[18] 倪峥飞，顾晔，冯永巍，等. UPLC-MS/MS 同时测定水产品中 4 种丁香酚类麻醉剂残留量[J]. 质谱学报，2018，39(4)：451-458.
NI Z F，GU Y，FENG Y W，et al. Simultaneous determination of 4 eugenol derivatives anesthetics residues in aquatic products by UPLC-MS/MS [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society，2018，39(4)：451-458.(in Chinese)

[19] KILDEA M A，ALLAN G L，KEARNEY R E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*)[J]. Aquaculture，2004，232(1/2/3/4)：265-277.

[20] 李小芳，张嘉，刘丽强，等. LC-MS/MS 和 GICA 检测小麦中呕吐毒素质量分数及分布规律[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(11)：90-97.
LI X F，ZHANG J，LIU L Q，et al. Determination of mass fraction and distribution pattern of deoxynivalenol in wheat by LC-MS/MS and GICA[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(11)：90-97.(in Chinese)

[21] 韩玉凤. 基于量子点标记免疫分析技术建立火锅底料中吗啡检测方法的研究[D]. 镇江：江苏大学，2017.

[22] OGUNDELE A K，MOLA G T. Semiconductor quantum dots as a mechanism to enhance charge transfer processes in polymer solar cells[J]. Chemosphere，2023，345：140453.

[23] 刘建军，杨雪，张弛，等. CdTe 半导体量子点的制备及其荧光性能测定[J]. 大学化学，2024，39(7)：307-315.
LIU J J，YANG X，ZHANG C，et al. Preparation and fluorescence characterization of CdTe semiconductor quantum dots[J]. University Chemistry，2024，39(7)：307-315.(in Chinese)

[24] 伍晓春，邓淞，曾睿源. 量子点的定义、发现、合成及应用[J]. 化学教育(中英文)，2024，45(3)：1-2.
WU X C，DENG S，ZENG R Y. Definition，discovery，synthesis and application of quantum dots[J]. Chinese Journal of Chemical Education，2024，45(3)：1-2.(in Chinese)

[25] HNASKO R M，STANKER L H. Hybridoma technology [M]//ELISA. New York：Springer，2015：15-28.

[26] 桑永玉，金仁耀. 喹乙醇单克隆抗体的研制及其 ELISA 方法的建立[J]. 核农学报，2015，29(6)：1081-1087.
SANG Y Y，JIN R Y. Production of a monoclonal antibody against olaquindox and development of an indirect competitive ELISA method [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences，2015，29(6)：1081-1087.(in Chinese)

[27] 孙范忱，郭静，杨强，等. EDC-NHS 交联壳聚糖-聚氧化乙烯-丝素蛋白静电纺丝纳米纤维的制备及生物相容性[J]. 复合材料学报，2020，37(11)：2889-2896.
SUN F C，GUO J，YANG Q，et al. Preparation and biocompatibility of EDC-NHS crosslinked chitosanpolyethyleneoxide-silk fibroin electrospun nanofibers[J]. Acta Materiae Compositae Sinica，2020，37(11)：2889-2896.(in Chinese)

[28] 陈义元. 孔雀石绿和结晶紫的免疫检测新方法研究[D]. 天津：天津科技大学，2018.

[29] REVERBERI R，REVERBERI L. Factors affecting the antigen-antibody reaction[J]. Blood transfusion，2007，5(4)：227-40.

（责任编辑：闫林红）