

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHẾ TẠO QUE THỬ SẮC KÝ MIỄN DỊCH CẠNH TRANH PHÁT HIỆN OCHRATOXIN A TRONG CÀ PHÊ

**Tổng Đức Minh^{1*}, Nguyễn Văn Chuyên¹, Bùi Khánh Toàn², Nguyễn Văn Ba³,
Nguyễn Thị Thu Trang¹, Lê Tuấn Anh¹, Hoàng Thị Trường¹, Đoàn Bảo Hà¹,
Nguyễn Mạnh Tuấn⁴, Tạ Quang Thành⁵, Vũ Hoàng Anh⁶**

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng quy trình chế tạo que thử sắc ký miễn dịch (lateral flow immunochromatography assay - LFIA) cạnh tranh phát hiện Ochratoxin A (OTA) trong cà phê. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thử nghiệm trong labo. Thực hiện theo 8 bước, với mỗi bước thực hiện nghiên cứu tối ưu các thông số để tăng độ nhạy của que thử. Hiệu quả phát hiện của que thử bao gồm giới hạn phát hiện, độ lặp lại, độ ổn định và phản ứng chéo. **Kết quả:** Kích thước hạt nano vàng 30nm được lựa chọn là thông số tối ưu. Nồng độ kháng thể tối ưu phủ lên hạt nano vàng là 10 µg/mL. Nồng độ OTA-BSA (bovine serum albumin) tối ưu trải trên vạch phát hiện là 1 mg/mL, tạo ra tín hiệu màu đậm và ổn định, giúp phân biệt rõ giữa mẫu dương tính và âm tính. **Kết luận:** Đã phát triển thành công que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện OTA trong cà phê với giới hạn phát hiện (limit of detection - LOD) là 4 µg/L.

Từ khóa: Que thử sắc ký miễn dịch; Độ nhạy; Ochratoxin A.

DEVELOPMENT OF A COMPETITIVE LATERAL FLOW IMMUNOCHROMATOGRAPHY ASSAY STRIP FOR THE DETECTION OF OCHRATOXIN A IN COFFEE

Abstract

Objectives: To develop a competitive lateral flow immunochromatography assay (LFIA) strip for the detection of Ochratoxin A (OTA) in coffee. **Methods:** The study was conducted through laboratory experiments following an 8-step process,

¹Khoa Vệ sinh Quân đội, Học viện Quân y

²Viện Vệ sinh Dịch tễ Tây Nguyên

³Bệnh viện Quân y 175

⁴Viện Sốt rét, Ký sinh trùng, Côn trùng Trung ương

⁵Bệnh viện Bắc Thăng Long

⁶Trung tâm Kiểm soát bệnh tật Thành phố Hà Nội

*Tác giả liên hệ: Tổng Đức Minh (minhhoa142@gmail.com)

Ngày nhận bài: 28/4/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 22/7/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i7.1318>

with each step involving the optimization to enhance the sensitivity of the test strip. Main performance indicators of test strips include limit of detection, stability, repeatability, and cross-reaction. **Results:** The optimal size of the gold nanoparticles was determined to be 30nm. The optimal concentration of antibodies coated on the gold nanoparticles was 10 $\mu\text{g/mL}$. The optimal concentration of OTA-BSA applied on the test line was 1 mg/mL, which produced a strong and stable color signal, allowing for a clear distinction between positive and negative samples. **Conclusion:** A competitive lateral flow immunoassay strip for the detection of OTA in coffee was successfully developed, with a limit of detection of 4 $\mu\text{g/L}$.

Keywords: Lateral flow immunoassay; Sensitivity; Ochratoxin A.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ochratoxin A là độc tố nấm mốc, chủ yếu được sản sinh bởi các loài nấm *Aspergillus* và *Penicillium* [1]. Cơ quan Nghiên cứu Ung thư quốc tế đã phân loại OTA là chất gây ung thư nhóm 2B [2]. OTA là chất gây ô nhiễm trong nhiều loại thực phẩm như ngũ cốc, các loại hạt, cà phê... Nếu con người ăn phải thực phẩm bị ô nhiễm OTA với nồng độ $> 5 \mu\text{g/L}$ sẽ gây nguy hiểm nghiêm trọng tới sức khỏe [3]. Để bảo vệ sức khỏe cho con người, việc phát hiện thực phẩm bị nhiễm độc tố nấm mốc là cần thiết.

Một số phương pháp phân tích để xác định OTA bao gồm sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography - HPLC), xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với Enzyme (Enzyme-linked immunosorbent - ELISA)... Các phương pháp này yêu

cầu cần có trang thiết bị máy móc, cơ sở vật chất hiện đại, cán bộ thực hiện cần được đào tạo bài bản, thời gian cho kết quả lâu, chi phí cao... Một phương pháp phân tích được ngay ở nơi lấy mẫu, thời gian cho kết quả nhanh, độ nhạy cao, tiết kiệm chi phí và làm được trên cỡ mẫu lớn là cần thiết. Phương pháp đảm bảo được tiêu chí trên là que thử sắc ký miễn dịch dòng chảy bên. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm: *Xây dựng quy trình chế tạo que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện OTA trong cà phê.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

* *Đối tượng nghiên cứu:* Que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện nhanh OTA.

* *Vật liệu nghiên cứu:* Độc tố nấm mốc OTA (kháng nguyên OTA).

* *Hóa chất:* Kháng thể kháng OTA (GMP-SMT-147-Ab-1; Genemedi; lô số: P-230730-B55); kháng nguyên OTA (01877; Sigma).

* *Vật tư tiêu hao:* Màng nitrocelullose (HF090MC100; Merck Đức); màng cộng hợp (Standard 17 whatman); màng hút mẫu và màng hút trên (CF4 whatman).

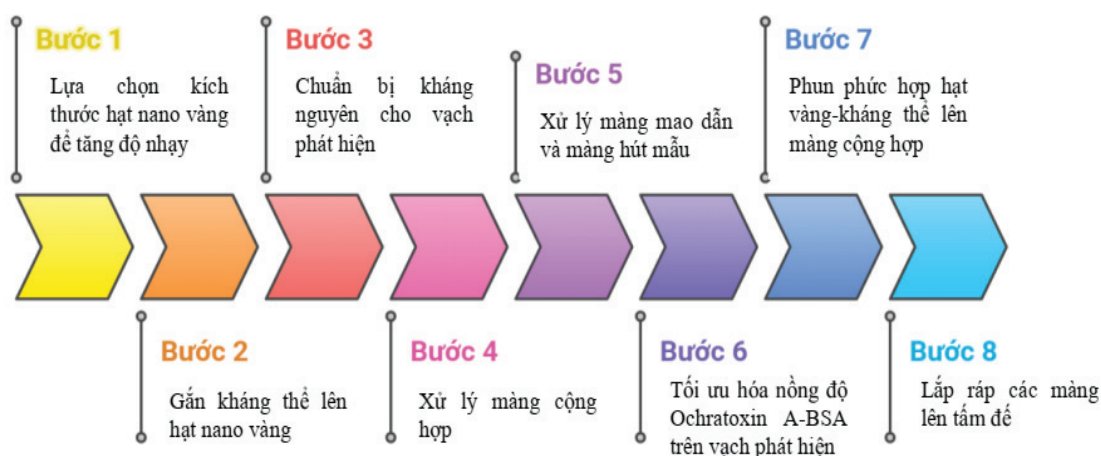
* *Thiết bị nghiên cứu:* Cân phân tích CPA 324S; máy rung, lắc ELISA; máy ly tâm; máy sấy chân không EYELA; hệ thống phun, trải kháng thể CAMAG-AUTOKUN; máy cắt...

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu thử nghiệm trong phòng thí nghiệm.

* *Thời gian và địa điểm nghiên cứu:* Từ tháng 01/2022 - 6/2024 tại Khoa Vệ sinh Quân đội, Học viện Quân y.

Xây dựng quy trình lý thuyết chế tạo que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh độc tố OTA trong cà phê. Xây dựng lên quy trình chế tạo bộ xét nghiệm nhanh phát hiện độc tố nấm mốc OTA gồm 8 bước tham khảo từ tác giả Wong RC và CS [4]. Tất cả các bước trong quy trình chế tạo chúng tôi đều tối ưu các thông số xét nghiệm và thực hiện trên cơ sở tiến hành nghiên cứu từ đầu.



Hình 1. Quy trình chung về chế tạo que thử phát hiện nhanh độc tố OTA.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung làm rõ một số kết quả nổi bật của các bước trong quy trình nghiên cứu chế tạo que thử. Tối ưu hóa các thông số xét nghiệm.

- Lựa chọn kích thước của hạt nano vàng để tăng độ nhạy của que thử. Để cải thiện độ nhạy của xét nghiệm kích thước hạt chỉ thị màu đã được tối ưu hóa. Chúng tôi sử dụng 3 loại hạt nano

vàng có kích thước khoảng: 5nm; 20nm và 30nm để tối ưu hóa xét nghiệm.

Đánh giá mẫu đạt: Khi thử nghiệm với cùng một nồng độ kháng nguyên là 1 $\mu\text{g/L}$, hạt có kích thước tối ưu sẽ cho tín hiệu nhạt nhất trên vạch phát hiện.

- Gắn kháng thể nhận diện lên hạt nano vàng và xác định giới hạn phát hiện của que thử.

Đối với LFIA cạnh tranh, mật độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng tăng sẽ cần nhiều kháng nguyên trong mẫu để bão hòa kháng thể và ngăn kháng thể kết hợp với kháng nguyên trên vạch thử. Điều này có nghĩa là LOD sẽ cao hơn dự kiến. Do đó, để hạ thấp LOD, chúng tôi cần tối ưu nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng, để tạo ra cường độ màu là đậm cho mẫu âm tính và mất màu ở vạch thử nghiệm ở nồng độ kháng nguyên thấp.

Do đó, lượng kháng thể đơn dòng kháng OTA khác nhau được thêm vào với nồng độ là 5 $\mu\text{g/mL}$; 7,5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; trong 200 μL hạt nano vàng OD 50.

Sau khi tìm được nồng độ kháng thể tối ưu để LFIA có tín hiệu màu và độ nhạy tốt nhất, chúng tôi khảo sát giải nồng độ kháng nguyên OTA là: 0 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 2 $\mu\text{g/L}$; 4 $\mu\text{g/L}$; 8 $\mu\text{g/L}$; 20 $\mu\text{g/L}$ để tìm giới hạn phát hiện của que thử.

Đánh giá mẫu đạt: Nồng độ kháng thể gắn trên hạt nano vàng được xác

định là tối ưu khi dựng thành que thử và có tín hiệu màu sắc là đậm nhất khi thử nghiệm trên mẫu âm tính.

- Chuẩn bị kháng nguyên OTA-BSA trải trên vạch phát hiện. Chúng tôi xây dựng lên quy trình gắn OTA với BSA.

Đánh giá mẫu đạt: Để kiểm tra gắn OTA với BSA thành công, chúng tôi phân tích kỹ thuật dot-blot. Nồng độ OTA-BSA được nhỏ lên màng mao dẫn để thử nghiệm là 0,1 $\mu\text{g/mL}$ và 1 $\mu\text{g/mL}$. Sau đó dựa vào cường độ tín hiệu màu của OTA-BSA và phức hợp hạt vàng - kháng thể kháng OTA để đánh giá hiệu quả gắn.

- Xử lý màng cộng hợp: Lựa chọn nhiệt độ sấy khô là 27°C và 37°C để đánh giá độ ổn định của màng cộng hợp.

Đánh giá mẫu đạt: Độ ổn định của màng cộng hợp khi khảo sát quá trình sấy khô được đánh giá bằng cường độ màu của que thử khi thử nghiệm trên mẫu âm tính.

- Xử lý màng mao dẫn và xử lý màng hút mẫu: Ngâm màng mao dẫn trong dung dịch đệm bao gồm BSA, chất hoạt động bề mặt và đường trước khi dựng que thử. Hóa chất xử lý màng hút mẫu gồm đệm Borat, Glycine và Tween 20.

- Tối ưu nồng độ kháng nguyên OTA-BSA trên vạch phát hiện: Theo khuyến nghị, LFIA cạnh tranh thường sử dụng nồng độ kháng nguyên trên vạch phát hiện trong khoảng 0,1 -

1 mg/mL [5]. Do đó chúng tôi khảo sát nồng độ kháng nguyên OTA-BSA ở vạch phát hiện là 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL và 0,0625 mg/mL, sau đó phủ lên vạch phát hiện của màng nitrocelullose.

Đánh giá mẫu đạt: Nồng độ kháng nguyên tối ưu là nồng độ OTA-BSA thấp nhất cho tín hiệu màu sắc đậm trên vạch phát hiện khi thử nghiệm trên mẫu âm tính.

- Trải kháng nguyên OTA-BSA lên vạch thử và kháng thể kháng chuột lên vạch kiểm soát. Chúng tôi sử dụng máy phun Autokun HGS 510 để phun kháng nguyên OTA-BSA và kháng thể kháng chuột lên vạch phát hiện và vạch kiểm chứng để tăng độ nhạy của que thử.

- Lắp ráp các màng lên tấm đế: Để tối ưu hóa LFIA, các khoảng cách chồng lấn giữa các vật liệu đã được sửa đổi để được dòng chảy tốt hơn trong giải thử nghiệm do đó cải thiện được sự hình thành phức hợp. Thể tích mẫu tối thiểu là 80 μ L.

* *Chuẩn bị mẫu thực nghiệm (pha chủ động OTA vào cà phê):*

Các mẫu cà phê (n = 25) được xác định là âm tính với OTA bằng phương pháp phân tích HPLC được chuẩn bị như sau. Cân 1 gam cà phê xay, hòa tan trong 5mL PBS 10mM chứa 50% methanol, sau đó mẫu được trộn, lắc mạnh và rung siêu âm. Sau khi ly tâm ở

tốc độ 10.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút; phần dung dịch nổi phía trên được lọc qua màng lọc kích thước 0,45 μ m để loại bỏ tạp chất. Tiếp theo dung dịch lọc được pha loãng với đệm chạy theo tỷ lệ 1:20. Sau đó, chất chuẩn OTA ở các nồng độ 0; 1; 2; 4; 8 μ g/L được thêm vào phần dung dịch cà phê đã pha loãng. Cuối cùng, que thử được sử dụng để phân tích mẫu cà phê có chứa OTA.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu thuộc đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu đặc điểm nhiễm độc tố vi nấm trong một số thực phẩm tại Việt Nam và chế tạo que thử bán định lượng phát hiện nhanh, đồng thời một số độc tố vi nấm”, mã số ĐTĐL.CN-04/21, được thực hiện theo Quyết định số 1707/QĐ-BKHCN ngày 23/6/2020 của Bộ Khoa học và Công nghệ. Số liệu nghiên cứu được Khoa Vệ sinh Quân đội, Học viện Quân y cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Qua nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng được quy trình chế tạo que thử phát hiện nhanh OTA trong cà phê quy mô phòng thí nghiệm như sau:

* *Lựa chọn kích thước của hạt nano vàng:*

Qua nghiên cứu, cho thấy hạt nano vàng kích thước 30nm có độ nhạy cao

nhất với LOD là 4 $\mu\text{g/L}$ và khoảng phát hiện từ 1 - 4 $\mu\text{g/L}$. Do đó, kích thước 30nm được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

* *Gắn kháng thể nhận diện lên hạt nano vàng:*

Kết quả khi gắn kháng thể nhận diện lên hạt nano vàng như sau:

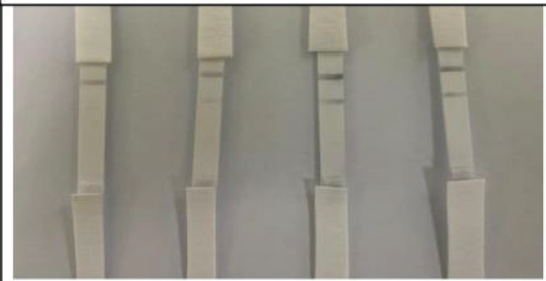
pH tối ưu khi gắn kháng thể: pH 7,2 tạo ra hiệu quả gắn kháng thể cao nhất.

Nồng độ kháng thể tối ưu: 10 $\mu\text{g/mL}$ giúp tạo ra tín hiệu màu rõ nhất trên que thử.

Dùng que thử với lượng kháng thể thêm vào là 5 $\mu\text{g/mL}$; 7,5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Nồng độ kháng nguyên OTA chuẩn được khảo sát là

1 $\mu\text{g/L}$. Kết quả thử nghiệm trên que thử cho thấy khi tăng nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng tạo ra cường độ màu trên vạch phát hiện và vạch chứng đậm hơn (Hình 2a). Nồng độ kháng thể nhìn rõ vạch phát hiện và vạch đối chứng là 10 $\mu\text{g/mL}$ (cỡ mẫu $n = 5$, độ lặp lại của thử nghiệm là 5/5 mẫu). Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng là 10 $\mu\text{g/mL}$.

Giới hạn phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi là 4 $\mu\text{g/L}$ (Hình 2b). Vì tiêu chuẩn cho phép của OTA trong cà phê là 5 $\mu\text{g/L}$, nên với LOD là 4 $\mu\text{g/L}$ chúng tôi có thể đánh giá mẫu cà phê là đạt tiêu chuẩn hay vượt tiêu chuẩn cho phép.

5	7,5	10	12,5 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/L}$	4 $\mu\text{g/L}$	2 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	0 $\mu\text{g/L}$
								
(a) Cường độ màu ở vùng thử nghiệm phụ thuộc nồng độ kháng thể gắn trên hạt nano vàng				(b) Nồng độ chất chuẩn OTA là 0 $\mu\text{g/L}$; 1,0 $\mu\text{g/L}$; 2,0 $\mu\text{g/L}$; 4,0 $\mu\text{g/L}$; 8,0 $\mu\text{g/L}$				

Hình 2. (a) Hình ảnh que thử OTA với nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt từ là 5 $\mu\text{g/mL}$; 7,5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; (b) Giới hạn phát hiện của que thử.

* *Chuẩn bị kháng nguyên để phủ OTA-BSA trên vạch phát hiện trên màng nitrocellulose:*

Tỷ lệ mol OTA:BSA tối ưu là 40:1 tại pH 9,5.

Nhiệt độ tối ưu: 27°C cho hiệu quả gắn tốt hơn so với 37°C.

- * *Xử lý màng cộng hợp:*
Dung dịch đệm tối ưu: Borat 10mM (pH 7,2) chứa trehalose 10%, Sucrose 10%, Glycine 2%, tween 20 1% giúp ổn định kháng thể trên màng cộng hợp.
Nhiệt độ sấy tối ưu: 27°C với thời gian 1 giờ giúp duy trì độ ổn định của kháng thể.
- * *Xử lý màng mao dẫn và màng hút mẫu:*
Màng mao dẫn: Dung dịch đệm Borat pH 7,2 chứa Sucrose 3%, Glycine 2%, Tween 20 1% đạt hiệu quả tốt nhất trong việc ổn định tín hiệu màu.
Màng hút mẫu: Dung dịch đệm Borat pH 9,0 chứa Glycine 2%, tween 20 0,05% giúp tối ưu tín hiệu màu trên màng hút mẫu.
- * *Tối ưu hóa nồng độ OTA-BSA trên vạch phát hiện:*
Nồng độ OTA-BSA tối ưu: 1 mg/mL trên vạch phát hiện.

Bảng 1. Tối ưu nồng độ kháng nguyên OTA-BSA.

Thử nghiệm trên mẫu âm tính	Nồng độ OTA-BSA (mg/mL)					
	2,0	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625
Cường độ màu trên vạch phát hiện	++	++	+	-	-	-
Số lần tiến hành	5	5	5	5	5	5
Số mẫu đạt	5	5	3	0	0	0

(++: Cường độ màu đỏ đậm; +: Cường độ màu nhạt; -: Không màu)

Nồng độ kháng nguyên OTA-BSA là 1 mg/mL và 2 mg/mL có tín hiệu màu đậm hơn so với các nồng độ khác (độ lặp lại của thử nghiệm là 5/5 mẫu). Nồng độ tối ưu là nồng độ OTA-BSA thấp nhất cho tín hiệu màu sắc đậm trên vạch phát hiện khi thử nghiệm trên mẫu âm tính. Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ OTA-BSA tối ưu là 1 mg/mL. Nồng độ kháng thể IgG kháng chuột trải trên vạch đối chứng là 1 mg/mL.

* *Phun kháng thể và trải kháng nguyên trên vạch phát hiện:*

Thể tích phun tối ưu: 5μL phức hợp hạt vàng - kháng thể lên màng cộng hợp.

Nồng độ kháng nguyên OTA-BSA trải trên vạch phát hiện là 1 mg/mL.

* *Lắp ráp các màng lên tấm đế:*

Độ rộng của que thử 3mm. Khoảng cách tối ưu đối với vạch thử: Cách màng cộng hợp 12 - 13mm; vạch kiểm soát cách vạch thử là 5mm.

BÀN LUẬN

1. Kết quả tối ưu hóa nồng độ kháng thể hấp thụ trên hạt nano vàng

Nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng trong nghiên cứu của chúng tôi là 10 $\mu\text{g/mL}$, thấp hơn so với tác giả Yiqiang Chen và CS [6]. Nồng độ kháng thể bao phủ trên bề mặt hạt nano vàng khác nhau giữa hai nghiên cứu có thể là do phương pháp gắn kháng thể. Phương pháp gắn kháng thể lên hạt nano vàng trong nghiên cứu của chúng tôi là gắn định hướng nên nồng độ kháng thể tiêu thụ sẽ ít hơn so với phương pháp gắn ngẫu nhiên.

2. Tối ưu nồng độ kháng nguyên OTA-BSA trên vạch phát hiện

Hiệu suất phân tích LFIA cạnh tranh bị ảnh hưởng bởi nồng độ OTA-BSA trải trên vạch phát hiện. Chúng tôi nhận thấy khi sử dụng nồng độ OTA-BSA trải trên vạch phát hiện là 1 mg/mL thì có cường độ màu đậm khi thử nghiệm trên mẫu âm tính. Đối với thử nghiệm nồng độ OTA-BSA trải trên vạch phát hiện 0,5 mg/mL , tín hiệu màu trên vạch phát hiện là nhạt. Điều này được giải thích do nồng độ thấp của kháng nguyên sẽ giữ được ít phức hợp hạt vàng - kháng thể. Do đó, thông số tối ưu là 1 mg/mL được lựa chọn để thử nghiệm các thông số tiếp theo.

3. Giới hạn phát hiện OTA bằng que thử được sản xuất

Giới hạn phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi là 4 $\mu\text{g/L}$. Giới hạn phát hiện của que thử trong nghiên cứu của chúng tôi là cao hơn so với nghiên cứu của tác giả Xin Li và thấp hơn so với Jihea Moon [7, 8]. Nếu so sánh phương pháp phát hiện độc tố nấm mốc OTA với các nghiên cứu khác trên thế giới thì giới hạn phát hiện là 4 $\mu\text{g/mL}$ chưa phải là tốt nhất. Vì vậy, chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu, và hy vọng rằng có thể phát triển thành công bộ kit có các ưu điểm tốt hơn trong tương lai.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phát triển thành công que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện OTA trong cà phê với ngưỡng phát hiện là 4 $\mu\text{g/L}$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. YN Gao, CQ Wu, JQ Wang, et al. N. Metabolomic Analysis Reveals the Mechanisms of Hepatotoxicity Induced by Aflatoxin M1 and Ochratoxin A. *Toxins (Basel)*. 2022 Feb 15; 14(2):141. DOI: 10.3390/toxins14020141.
2. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2002; 82:1-556. PMCID: PMC4781602.

3. Stoev SD. Long term preliminary studies on toxic and carcinogenic effect of individual or simultaneous exposure to ochratoxin A and penicillic acid in mice. *Toxicon*. 2020 Sep; 184:192-201. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.06.013.
4. Wong RC, Harley YT. Lateral Flow Immunoassay. Humana Press. *Springer Science & Business Media*. 2009. DOI 10.1007/978-1-59745-240-3.
5. Claudio Parolo, Amadeo Sena-Torralba, José Francisco Bergua, et al. Tutorial: Design and fabrication of nanoparticlebased lateral-flow immunoassays. *Nature Protocols*. 2020 Dec; 15(12): 3788-3816. DOI: 10.1038/s41596-020-0357-x.
6. Yiqiang Chen, Qian Chen, Miaomiao Han, et al. Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut. *Food Chemistry*. 2016 Dec 15; 213:478-484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.116.
7. Xin Li, Peiwu Li, Qi Zhang, et al. Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in agro-food. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013 Nov 15; 49:426-32. DOI: 10.1016/j.bios.2013.05.039.
8. Jihea Moon, Giyoung Kim, Sangdae Lee. Development of nanogold-based lateral flow immunoassay for the detection of Ochratoxin A in buffer systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2013 Nov; 13(11):7245-9. DOI: 10.1166/jnn.2013.8099.