

基于金纳米花的双信号适配体传感器 检测红酒中真菌毒素

祁兴普¹, 董骐玮², 朱麟菲², 邹婷婷², 郑义¹, 张婧怡¹, 李倩^{2,*}

(1.江苏农牧科技职业学院食品科技学院, 江苏 泰州 225300;

2.扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

摘要: 构建基于金纳米花 (gold nanoflower, AuFL) 和适配体的双信号荧光适配体传感器用于同时检测赭曲霉毒素A (ochratoxin A, OTA) 和玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN)。以AuFL为载体, 将含OTA和ZEN适配体的单链DNA共价交联在AuFL表面, 进一步将其与两种荧光染料 (FAM和Cy3) 标记的互补DNA杂交, 制备DNA功能化纳米探针。荧光染料和AuFL之间发生荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 导致纳米探针自身无荧光。加入OTA和ZEN后, FAM和Cy3从探针表面脱落会扰乱FRET过程, 导致两者荧光的恢复。优化条件下, 该双信号荧光适配体传感器对OTA检测的线性范围为0.05~500 ng/mL, 检出限为0.017 ng/mL。对ZEN检测的线性范围为0.1~500 ng/mL, 检出限为0.033 ng/mL。该双信号荧光适配体传感器具有良好的选择性和重现性, 并能够成功应用于红酒实际样中OTA和ZEN的检测。

关键词: 双信号; 适配体传感器; 荧光检测; 赭曲霉毒素A; 玉米赤霉烯酮

A Gold Nanoflower-Based Dual-Signal Fluorescent Aptasensor for Detection of Mycotoxins in Red Wine

QI Xingpu¹, DONG Qiwei², ZHU Linfei², ZOU Tingting², ZHENG Yi¹, ZHANG Jingyi¹, LI Qian^{2,*}

(1. College of Food Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: A dual-signal fluorescent aptasensor based on gold nanoflower (AuFL) was constructed for the simultaneous detection of ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEN). Single-stranded DNA containing OTA and ZEN aptamers were covalently cross-linked on the surface of AuFL as a nanocarrier and hybridized with complementary DNA labeled with two fluorescent dyes (FAM and Cy3) to prepare a DNA functionalized nanoprobe. Because of fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the fluorescent dyes and AuFL, the nanoprobe itself had no fluorescence. When OTA and ZEN were added, FAM and Cy3 were shed from the probe's surface, disturbing the FRET process and consequently restoring the fluorescence of both fluorescent dyes. Under optimized conditions, the linear range was from 0.05 to 500 ng/mL, and the detection limit was 0.017 ng/mL for OTA; the linear range was from 0.1 to 500 ng/mL, and the detection limit was 0.033 ng/mL for ZEN. The dual-signal fluorescent aptasensor had good selectivity and reproducibility and was successfully applied to the detection of OTA and ZEN in real wine samples.

Keywords: dual-signal; aptasensor; fluorescence detection; ochratoxin A; zearalenone

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230418-179

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0308-07

引文格式:

祁兴普, 董骐玮, 朱麟菲, 等. 基于金纳米花的双信号适配体传感器检测红酒中真菌毒素[J]. 食品科学, 2024, 45(2):

308-314. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230418-179. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-04-18

基金项目: 江苏农牧科技职业学院校科研项目 (NSF2021ZR07); 泰州市第五期“311工程”科研资助项目 (RCPY202115);

泰州市科技支撑计划项目 (SSF20210108); 江苏省农业科技自主创新项目 (CX (21) 3005)

第一作者简介: 祁兴普 (1982—) (ORCID: 0009-0008-4506-6544), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品加工与快速检测。

E-mail: 6354752@qq.com

*通信作者简介: 李倩 (1991—) (ORCID: 0000-0003-3457-5796), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: liqian0101@yzu.edu.cn

QI Xingpu, DONG Qiwei, ZHU Linfei, et al. A gold nanoflower-based dual-signal fluorescent aptasensor for detection of mycotoxins in red wine[J]. Food Science, 2024, 45(2): 308-314. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20230418-179. <http://www.spkx.net.cn>

随着生活质量的提高,食品安全越来越受到人们的关注,尤其是真菌毒素污染问题。真菌毒素是丝状真菌产生的一组有毒次生代谢产物,由于真菌毒素的热稳定性和化学稳定性极强,高温烹饪、工业加工都不会造成其结构性质的破坏或分解,因此食物中可能存在真菌毒素,对动物或人健康有很大危害^[1]。赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)主要由赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)、碳黑曲霉(*A. carbonarius*)、纯绿青霉(*Penicillium viridicatum*)产生。由于其具有免疫毒性、肾毒性和潜在“三致”作用,国际癌症研究中心将OTA列为2B类致癌物质^[2-3]。玉米赤霉烯酮(zearealenone, ZEN)主要由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)产生,是具有类雌激素样性质的非甾体毒素。由于其具有生殖系统、神经系统毒性及潜在致癌性,被国际癌症研究中心归为第3类致癌物^[4-6]。OTA和ZEN是广泛存在于食品中的真菌毒素,会对人体的肝脏、肾脏和免疫系统产生不良影响。因此,建立一种可同时检测OTA及ZEN的方法具有重要意义,而且与单一毒素检测法相比,可以提供更为准确的安全监测信息,同时在缩短周转时间、提高筛选效率、降低检测成本和样本量等方面有明显的优势^[7-9]。迄今为止,酶联免疫分析法^[10-11]、电化学法^[12-14]、表面增强拉曼散射法^[15]和化学发光法^[16]等方法已被报道用于真菌毒素的测定,均具有优越的性能。然而,这些方法大多只能对单一真菌毒素进行检测,不能对多种真菌毒素进行检测,这限制了它们在实际中的应用。多种真菌毒素检测所用色谱方法包括高效液相色谱和液相色谱-质谱联用^[17-19]。然而,这些色谱方法的仪器昂贵,对专业人员训练素养要求高,程序繁琐,这限制了它们在实际生活中的应用。

荧光分析法是通过研究荧光探针的荧光强度与目标物浓度之间的线性关系来对目标物实现定量检测的一种分析方法,具有操作简便、灵敏度高、分析速度快等优点^[20]。其中,荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是该方法的检测原理,具有能量供体和能量受体两个重要的组成部分。当供体与受体的距离在10 nm以内时,供体激发态的能量转移给受体的非辐射过程即为共振能量转移^[21-22]。金纳米粒子(Au nanoparticles, AuNPs)具有很强的吸附能力和优异的生物相容性,被广泛用作负载材料。AuNPs作为常用的等离子体材料,具有独特光学、热学和电子特性、良好的生物相容性、优异的化学稳定性,较强的信号产生和

转导能力,使基于AuNPs的纳米探针在开发先进的传感器、实现更灵敏的诊断方面发挥着重要作用^[23]。在荧光传感器构建过程中,AuNPs主要发挥固定生物分子猝灭荧光和放大信号等作用,由于其宽吸收光谱能和大多供体发射图谱发生重叠,常常在FRET体系中扮演重要角色^[24]。适配体的特异性和亲和性较高,正越来越多地被用于食品安全和其他生物检测,例如天然毒素、环境污染物、代谢产物等,适配体具有良好的热稳定性和结构转换特性,基于适配体构建荧光传感器具有操作简单、灵敏度高、特异性强等优点,在真菌毒素检测领域得到广泛关注^[25-27]。基于适配体和荧光分析开发一种灵敏、准确、快速的OTA和ZEN同时检测方法对食品安全监测具有重要意义。

本研究利用具有分支状纳米花瓣结构的金纳米花(gold nanoflower, AuFL)为载体,以特异性识别的核酸适配体为分子识别元件,基于新颖的AuFL、核酸适配体和修饰有荧光染料的DNA制备一种新型功能纳米探针。结合荧光技术,利用功能纳米探针上两种荧光染料供体和AuFL受体之间的FRET和靶标诱导的荧光恢复,构建一种简单、新颖的双信号荧光适配体传感器用于同时检测OTA和ZEN。红酒中的真菌毒素是研究热点,本研究采用红酒作为样品,验证基于AuFL的双信号适配体传感器检测技术检验效果,以期利用功能探针进行多种毒素检测提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

长城红酒 苏果超市(中国);聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)、盐酸羟胺($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$)、巯基聚乙二醇和双(对-磺酸苯基)苯基膦(bis(*p*-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt, BSPP) 美国Sigma-Aldrich公司;柠檬酸三钠、盐酸多巴胺、氯金酸(HAuCl_4) 国药控股化学试剂有限公司;所有寡核苷酸DNA包括R1(5'-SH-ATCGTGGAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA)、R2(5'-TCATCTATCTATGGTACAT TAC TAT CTG TAA TGT GAT ATGCACGAT-SH-3')、F1(5'-FAM-CGC CAC CCA CAC CCG ATC-3')、F2(5'-CAT ATC ACA TTA CAG ATA-Cy3-3')以及pH 7.4的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(含136.7 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、8.72 mmol/L Na_2HPO_4 和1.41 mmol/L KH_2PO_4) 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

JEM-2010透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM)、JSM-7001F扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 日本电子株式会社; UV-2450紫外-可见光谱仪 日本岛津公司; FluoroMax-4荧光光谱仪 美国HORIBA公司。

1.3 方法

1.3.1 AuNPs的制备

首先, 通过柠檬酸三钠还原法制备AuNPs种子: 将柠檬酸三钠溶液 (38.8 mmol/L, 5 mL) 快速加入搅拌中且沸腾的氯金酸溶液 (1 mmol/L, 50 mL)。混合溶液颜色在2 min内依次从透明变为黑色、紫色和深红色。溶液继续搅拌并保持沸腾15 min, 待自然冷却至室温后, 4 °C冰箱中贮存备用。然后, 通过种子生长法制备粒径为50 nm的AuNPs: 将25 mL超纯水, 1 mL新鲜制备的AuNPs种子和400 μ L 0.2 mol/L的 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 溶液依次加入50 mL烧杯中。室温下将4 mL质量分数为0.2%氯金酸逐滴加入上述混合溶液中剧烈搅拌30 min, 所制得的AuNPs于4 °C冰箱中贮存备用。

1.3.2 AuFL的制备

将1 mL的AuNPs离心后重新分散在pH 8.5的10 mmol/L Tris缓冲液中, 加入5 μ L 0.5 mg/mL盐酸多巴胺溶液, 并在25 °C下涡旋振荡4 h。最后, 将该混合物在6 000 r/min下离心5 min, 制得的聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 包覆的AuNPs (PDA/AuNPs) 重新分散在1 mL超纯水中。1 mL新鲜制备的PDA/AuNPs溶液、150 μ L 5 mmol/L HAuCl_4 溶液、100 μ L 5 g/100 mL PVP溶液和150 μ L 50 mmol/L羟胺溶液混合均匀, 25 °C剧烈搅拌5 min。6 000 r/min离心5 min, 并用超纯水洗涤数次后, 将制得的AuFL分散在1 mL超纯水中并在4 °C贮存备用。

1.3.3 DNA功能化纳米探针的制备

首先, 将1 mg的BSPP加入1 mL AuFL (0.1 nmol/L) 溶液中, 并在室温下孵育过夜。6 000 r/min离心5 min并用超纯水洗涤数次后, 将得到的1 mL BSPP修饰的AuFL (0.1 nmol/L) 与5 μ L R1 (100 μ mol/L) 和5 μ L R2 (100 μ mol/L) 一起混合, 并在室温下振荡24 h。然后, 加入5 μ L 0.2 mmol/L巯基聚乙二醇, 在室温下反应60 min来阻断粒子的非特异性结合位点。6 000 r/min离心水洗后, 重新分散在1 mL PBS (pH 7.4) 中, 加入5 μ L F1 (100 μ mol/L) 和5 μ L F2 (100 μ mol/L), 并在37 °C孵育6 h。最后, 通过6 000 r/min离心洗去未键合的DNA,

将DNA功能化纳米探针, 将其重新分散在1 mL PBS (pH 7.4) 中, 并在4 °C冰箱中贮存备用。

1.3.4 荧光传感器对OTA和ZEN检测

200 μ L DNA功能化的纳米探针溶液和不同质量浓度OTA和ZEN溶液混合, 振荡孵育60 min, 转移至荧光吸收池, 荧光分光光度计扫描得到荧光图谱, 测定其荧光强度。对于OTA的检测, 设置激发波长为495 nm, 检测518 nm波长处的荧光强度。对于ZEN的检测, 设置激发波长为550 nm, 检测570 nm波长处的荧光强度。

1.3.5 实际样品检测

首先, 将1 mL红酒用pH 7.4的PBS稀释50倍。然后, 将不同质量浓度的已知OTA和ZEN加入预处理样品中。最后, 按照构建的荧光传感器检测方法, 对加入已知质量浓度的OTA和ZEN红酒样品进行定量检测。

1.4 数据处理

以上实验均做3个平行, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分别采用Excel和Origin软件进行数据处理及图表绘制。

2 结果与分析

2.1 OTA和ZEN同时检测的原理

基于双荧光信号对OTA和ZEN同时检测的原理如图1所示。R1和R2为修饰有巯基的单链DNA, 且部分序列可互补杂交 (黑色部分), 不互补的部分分别含特异性识别OTA (绿色部分) 和ZEN (红色部分) 的适配体。F1和F2为与OTA适配体和ZEN适配体互补的单链DNA, 且分别修饰荧光染料FAM和Cy3, 作为FRET过程的两个不同的能量供体。首先, 制备了AuFL作为能量受体, 通过Au-S键将R1和R2组装在AuFL表面; 然后, 加入互补链F1和F2进行碱基互补配对, 将F1和F2组装到AuFL表面形成DNA功能化纳米探针。适配体和互补链之间的杂交反应使两种荧光染料 (FAM和Cy3) 和AuFL之间距离足够接近, 引起供体向受体的能量转移。因此, 由于FRET的发生, 导致FAM和Cy3荧光的猝灭, 纳米探针溶液自身无荧光。当加入OTA后, OTA和R1上的适配体特异性结合, R1-F1双链发生解离, 导致修饰有FAM的F1从探针上脱落和FRET过程的中断, 518 nm波长处FAM的荧光得到恢复。当加入ZEN后, ZEN和R2上的适配体特异性结合, R2-F2双链发生解离, 导致修饰有Cy3的F2从探针上脱落和FRET过程的中断, 570 nm波长处Cy3的荧光得到恢复。因此, 通过利用两个供体和单个受体的双信号FRET和靶标诱导的荧光恢复, 可以实现基于荧光“关-开”的方式同时检测OTA和ZEN。

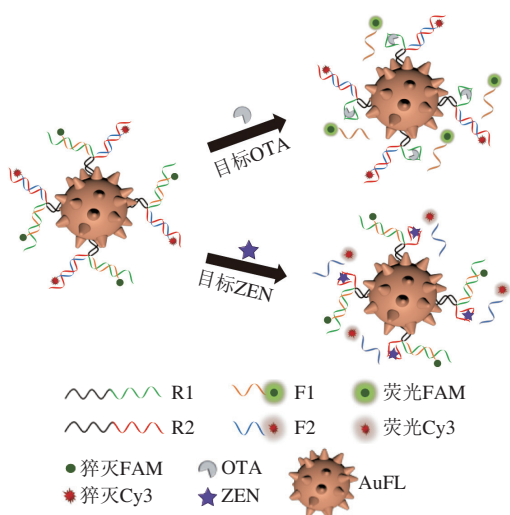


图1 双信号荧光适体传感器检测OTA和ZEN的原理图
 Fig. 1 Schematic illustration of dual-signal fluorescent aptasensor for the detection of OTA and ZEN

2.2 纳米探针的表征

如图2所示, 首先, 通过种子生长方法制备了平均粒径为50 nm的AuNPs, 其在530 nm波长处具有最大吸收峰, 形状为明显的球形结构, 且具有良好的单分散性和均匀的尺寸。然后, 在AuNPs溶液中加入盐酸多巴胺和氯金酸制备得到AuFL, 通过TEM和SEM对其形貌进行了表征。如图3A、B所示, AuFL相比于AuNPs表现出明显的形态变化, 具有高度分枝的花瓣结构, 且同样显示出良好的单分散性和均匀的尺寸。最后, 通过在AuFL表面修饰4条DNA (R1、R2、F1、F2) 得到DNA功能化纳米探针。如图3C紫外光谱所示, AuFL在595 nm波长处有一个特征吸收峰, 而DNA功能化纳米探针显示出两个特征吸收峰: 一个位于260 nm波长处, 对应偶联DNA的吸收峰; 另一个位于595 nm波长处, 对应AuFL的吸收峰。通过测定FAM和Cy3的荧光发射峰, 验证了两者和AuFL发生FRET的可行性, 如图3C所示, AuFL在350~700 nm范围内有较宽的紫外吸收峰。FAM的发射峰位于518 nm波长处, Cy3的荧光发射峰位于570 nm波长处, 均与AuFL较宽的紫外吸收峰发生一定程度重叠, 表明AuFL可以有效地猝灭FAM和Cy3的荧光。另外, DNA杂交反应使两种荧光染料和AuFL之间距离足够接近, 引起供体向受体的能量转移。如图3D所示, 纳米探针负电荷比AuFL更多, 这表明带负电荷的DNA在AuFL上成功组装。为了测得AuFL上DNA的结合量, 通过100 °C高温加热解开DNA双螺旋结构, 并根据上清液中DNA的荧光强度, 计算得到单个AuFL上F1和F2的量分别为335条和355条。以上实验证明了DNA功能化纳米探针的成功制备。

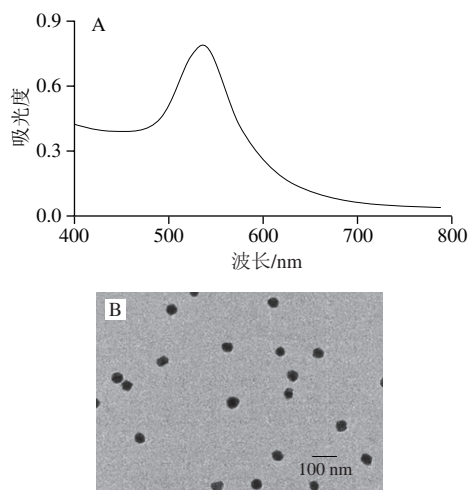
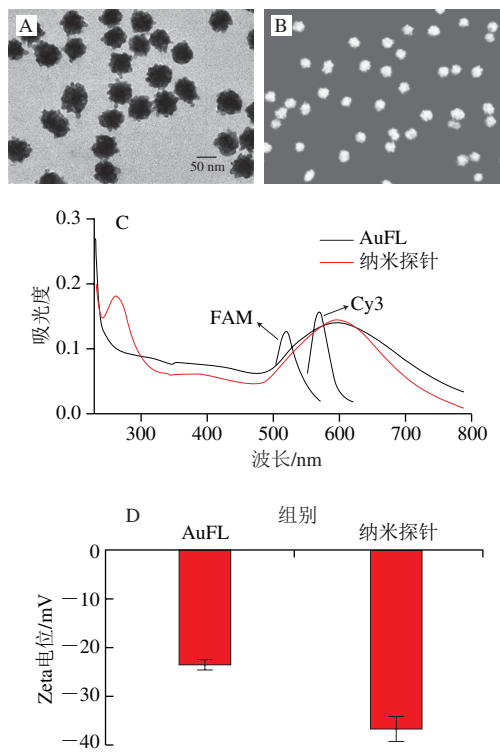


图2 AuNPs的可见光图谱 (A) 和TEM图像 (B)
 Fig. 2 Visible absorption spectrum (A) and TEM image (B) of AuNPs



A、B. AuFL的TEM、SEM图像; C. AuFL和纳米探针的紫外图谱, FAM和Cy3的荧光图谱; D. AuFL和纳米探针的Zeta电位。

图3 AuFL和纳米探针的表征

Fig. 3 Characterization of AuFL and nanoprobes

2.3 OTA和ZEN检测的条件优化

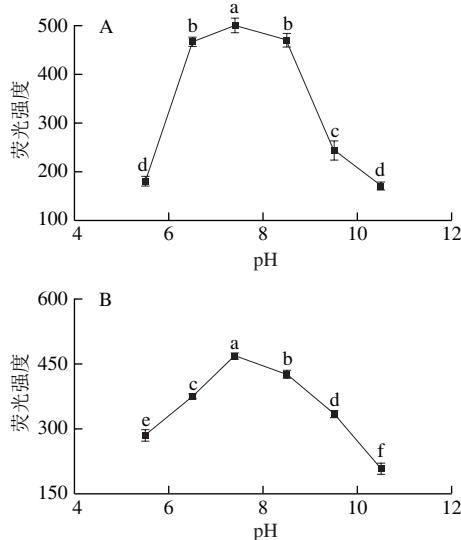
基于纳米探针溶液体积、检测溶液pH值、检测时间会影响适配体和OTA/ZEN的结合, 因此本研究对检测溶液体积、溶液pH值、检测时间进行了优化。本实验中使用的荧光吸收池最低检测体积是200 μL, 首先考察了不同纳米探针溶液体积实现OTA和ZEN检测的最低质量浓度, 如表1所示。随着探针溶液体积的升高, OTA和

ZEN检测的最低质量浓度逐渐升高,因此选取200 μL 的探针溶液体积为最优探针体积。如图4A、B所示,不同检测溶液的pH值对FAM和Cy3的荧光恢复效果差异显著 ($P < 0.05$)。随着缓冲溶液pH值的增大,FAM和Cy3的荧光恢复强度逐渐增大,在pH 7.4时达到最大值。当pH值继续升高,荧光恢复强度开始明显减弱。因此,选取7.4为检测溶液的最佳pH值。图5A、B为检测时间对纳米探针的荧光响应,检测时间由0 min延长到60 min时,在518 nm波长处FAM的荧光强度以及570 nm波长处Cy3的荧光强度随着检测时间的延长均逐渐增大;检测时间超过60 min后,荧光强度均趋于稳定,FAM和Cy3完全脱离纳米探针。因此,选取60 min为最优检测时间。

表1 传感器探针溶液体积实现OTA和ZEN检测的最低质量浓度
Table 1 Determination of optimal volume of probe solution for minimum detection concentrations of OTA and ZEN

检测溶液体积/ μL	OTA质量浓度/(ng/mL)	ZEN质量浓度/(ng/mL)
200	0.050 ± 0.005^c	0.102 ± 0.020^b
300	0.090 ± 0.005^b	0.150 ± 0.050^{ab}
400	0.150 ± 0.010^a	0.201 ± 0.050^a

注: 同列肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。图5同。

图4 检测溶液的pH值对含500 ng/mL OTA (A)和500 ng/mL ZEN (B) 纳米探针的荧光强度影响

Fig. 4 Effect of pH on fluorescence intensity of nanoprobes containing OTA (500 ng/mL) (A) and ZEN (500 ng/mL) (B)

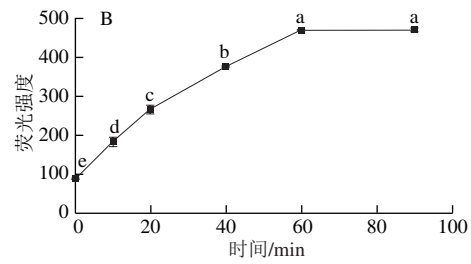
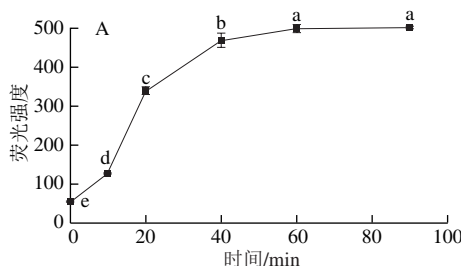


图5 检测时间对含500 ng/mL OTA (A)和500 ng/mL ZEN (B) 纳米探针的荧光强度影响

Fig. 5 Effect of detection time on fluorescence intensity of nanoprobes containing OTA (500 ng/mL) (A) and ZEN (500 ng/mL) (B)

2.4 OTA和ZEN检测的性能分析

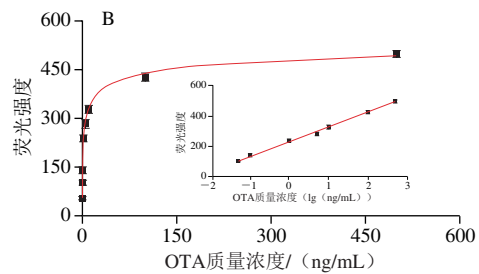
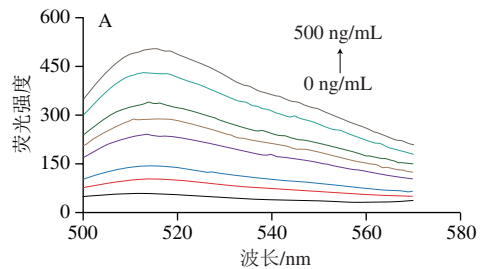


图6 加入不同质量浓度OTA的传感器荧光图谱 (A) 以及荧光强度与OTA质量浓度的关系 (B)

Fig. 6 Fluorescence spectra of the sensor with different concentrations of OTA (A) and relationship between fluorescence intensity and OTA concentration (B)

在最优检测溶液pH值、检测时间条件下,构建了双信号荧光适配体传感器,考察不同质量浓度OTA和ZEN加入后,518 nm和570 nm波长处的荧光响应情况。如图6所示,随着OTA质量浓度的增大,检测溶液位于518 nm波长处的FAM荧光逐渐恢复,这是由于高特异性的适配体和OTA结合导致FAM从纳米探针释放的结果。在0.05~500 ng/mL质量浓度范围内,检测溶液在518 nm波长处的荧光强度 ($FL_{518 \text{ nm}}$) 与OTA质量浓度的对数之间呈现良好的线性关系。线性方程为 $FL_{518 \text{ nm}} = 231.799 + 97.8571 \lg \rho_{\text{OTA}}$ (OTA质量浓度单位为ng/mL), $R^2 = 0.998$,检出限为0.017 ng/mL。如图7所示,检测溶液位于570 nm波长处的Cy3荧光强度随着ZEN质量浓度的增加而连续增加,同样是由于高特异性的适配体和ZEN结合导致Cy3从纳米探针释放的结果。0.1~500 ng/mL质量浓度范围内,检测溶液在570 nm波长处的荧光强度

(FL_{570 nm}) 与ZEN质量浓度的对数呈线性关系。线性方程为 $FL_{570\text{ nm}}=241.821+83.874\lg \rho_{ZEN}$ (ZEN质量浓度单位为ng/mL), $R^2=0.995$, 检出限为0.033 ng/mL。因此, 所构建的双信号荧光传感器可以实现对OTA和ZEN的定量检测, 且具有较高的灵敏度和优异的性能(表2)。

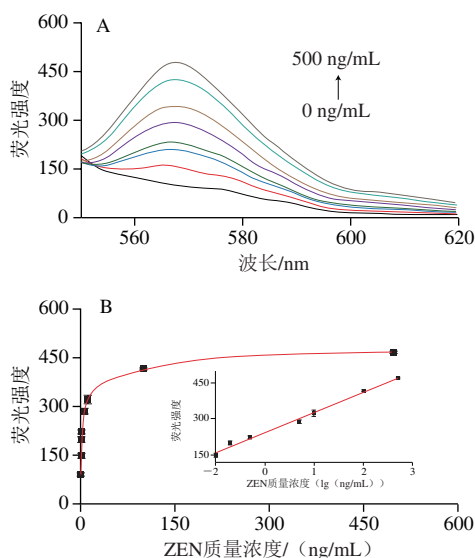


图7 加入不同质量浓度ZEN的传感器荧光图谱(A)以及荧光强度与ZEN质量浓度的关系(B)

Fig. 7 Fluorescence spectra of the sensor with different concentrations of ZEN (A) and relationship between fluorescence intensity and ZEN concentration (B)

表2 本研究传感器与其他真菌毒素检测方法的比较

Table 2 Comparison of analytical figures of merit of the sensor with those of other mycotoxin detection methods

检测方法	线性范围/(ng/mL)	检出限/(ng/mL)	检测对象	参考文献
化学发光	0.1~100	0.22	OTA	[28]
电化学发光	1~100	0.89	OTA	[29]
比色	8~250	8	OTA	[30]
荧光	4~80	4	OTA	[31]
荧光	2~40	1.95	OTA	[32]
荧光	0.05~500	0.017	OTA	本研究
	0.1~500	0.033	ZEN	本研究

2.5 选择性实验

在实际样品检测中传感器的选择性至关重要。为了评估双信号荧光适配体传感器的选择性, 选用了3种潜在的干扰物质——伏马毒素B₁ (fumonisins B₁, FB₁)、黄曲霉毒素B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、赭曲霉毒素B (ochratoxin B, OTB) 进行实验。5 μg/mL上述干扰物、100 ng/mL OTA、100 ng/mL ZEN分别加入检测溶液并进行测定。如图8所示, 相比于加入OTA和ZEN后检测溶液荧光恢复显著, 加入其他干扰物质检测溶液基本没有荧光变化, 这证明该双信号荧光适配体传感器具有良好的选择性和抗干扰能力。

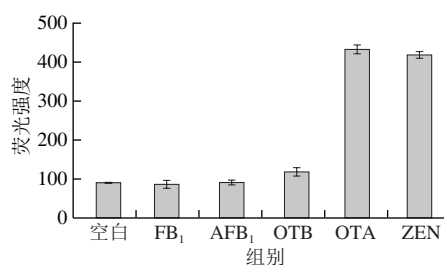


图8 双信号荧光适配体传感器的选择性

Fig. 8 Selectivity of the dual-signal fluorescent aptasensor

2.6 实际样品检测

所制得的双信号荧光适配体传感器通过采用标准加入法, 检测了处理过的红酒中的OTA和ZEN。实际样品检测结果如表3所示, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)和回收率(OTA为95.0%~97.4%, ZEN为92.0%~94.0%)符合GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范食品理化检测》^[33]要求。结果证明了该双信号荧光适配体传感器检测的准确性, 可用于实际样品中OTA和ZEN的检测。

表3 红酒样品中OTA和ZEN的检测结果(n=3)

Table 3 Recoveries and precision of OTA and ZEN in spiked red wine samples (n=3)

OTA				ZEN			
加标量/(ng/mL)	检测值/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%	加标量/(ng/mL)	检测值/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%
0	—	—	—	0	—	—	—
1	0.96	96.0	3.7	1	0.94	94.0	4.1
10	9.50	95.0	3.8	10	9.20	92.0	3.6
100	97.40	97.4	5.1	100	92.70	92.7	4.5

注: —.未检测到OTA和ZEN。

3 结论

本实验基于AuFL供体和两种荧光染料受体之间的FRET机理, 构建了一种双信号荧光适配体传感器用于OTA和ZEN的检测。该传感器对OTA和ZEN检测具有高灵敏度、选择性和准确性, 可通过显著的荧光变化进行定量分析。在最优条件下, 对OTA的检测范围为0.05~500 ng/mL, 检出限为0.017 ng/mL。对ZEN的检测范围为0.1~500 ng/mL, 检出限为0.033 ng/mL。此外, 该传感器还成功地应用于红酒样品中OTA和ZEN的同时检测。OTA回收率为95.0%~97.4%, ZEN回收率为92.0%~94.0%, 相对标准偏差小于5.2%。这种基于双荧光信号响应构建的适配体传感器在真菌毒素的同时检测方面具有巨大潜力。

参考文献:

[1] ZHANG L, DOU X W, ZHANG C, et al. A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines[J]. Toxins, 2018, 10(2): 65. DOI:10.3390/toxins10020065.

- [2] ZHANG R, YAN C, ZONG Z W, et al. Taking glucose as intermediate bridge-signal-molecule for on-site and convenient detection of ochratoxin A in rice with portable glucose meter[J]. Food Chemistry, 2023, 400: 134007. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134007.
- [3] MEJRI-OMRANI N, MIODEK A, ZRIBI B, et al. Direct detection of OTA by impedimetric aptasensor based on modified polypyrrole-dendrimers[J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 920: 37-46. DOI:10.1016/j.aca.2016.03.038.
- [4] HE B S, YAN X H. Ultrasensitive electrochemical aptasensor based on CoSe₂/AuNRs and 3D structured DNA-PtNi@Co-MOF networks for the detection of zearalenone[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2020, 306: 12755. DOI:10.1016/j.snb.2019.127558.
- [5] LUO L J, MA S, LI L B, et al. Monitoring zearalenone in corn flour utilizing novel self-enhanced electrochemiluminescence aptasensor based on NGQDs-NH₂-Ru@SiO₂ luminophore[J]. Food Chemistry, 2019, 292: 98-105. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.04.050.
- [6] RODRÍGUEZ-CARRASCO Y, MOLTÓ J, BERRADA H, et al. A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2014, 146: 212-219. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.09.053.
- [7] WEI T, REN P P, HUANG L L, et al. Simultaneous detection of aflatoxin B₁, ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in corn and wheat using surface plasmon resonance[J]. Food Chemistry, 2019, 300: 125176. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125176.
- [8] LIN X F, LI C X, TONG X Y, et al. A portable paper-based aptasensor for simultaneous visual detection of two mycotoxins in corn flour using dual-color upconversion nanoparticles and Cu-TCPP nanosheets[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134750. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134750.
- [9] ZHANG J, XIA Y K, CHEN M, et al. A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver nanoclusters coupling with Zn (II)-ion signal-enhancement for simultaneous detection of OTA and AFB₁[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 235: 79-85. DOI:10.1016/j.snb.2016.05.061.
- [10] ZUO H, WANG X Y, LIU W T, et al. Nanobody-based magnetic chemiluminescence immunoassay for one-pot detection of ochratoxin A[J]. Talanta, 2023, 258: 124388. DOI:10.1016/j.talanta.2023.124388.
- [11] URUSOV A E, ZHERDEV A V, PETRAKOVA A V, et al. Rapid multiple immunoenzyme assay of mycotoxins[J]. Toxins, 2015, 7(2): 238-254. DOI:10.3390/toxins7020238.
- [12] ZHANG Q X, ZHANG M R, GUO Z Q, et al. DNA tetrahedron-besieged primer and DNzyme-activated programmatic RCA for low-background electrochemical detection of ochratoxin A[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1242: 340782. DOI:10.1016/j.aca.2023.340782.
- [13] BARTHELMEBS L, HAYAT A, LIMADI A W, et al. Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 156(2): 932-937. DOI:10.1016/j.snb.2011.03.008.
- [14] WEI M, WANG C L, XU E S, et al. A simple and sensitive electrochemiluminescence aptasensor for determination of ochratoxin A based on a nicking endonuclease-powered DNA walking machine[J]. Food Chemistry, 2019, 282: 141-146. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.011.
- [15] SHAO B Y, MA X Y, ZHAO S, et al. Nanogapped Au (core)@Au-Ag (shell) structures coupled with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for the detection of ochratoxin A[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1033: 165-172. DOI:10.1016/j.aca.2018.05.058.
- [16] WANG Y H, FANG Z Y, NING G, et al. G-quadruplex-bridged triple-helix aptamer probe strategy: a label-free chemiluminescence biosensor for ochratoxin A[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 298: 126867. DOI:10.1016/j.snb.2019.126867.
- [17] KOKKONEN M, JESTOI M, RIZZO A. Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry[J]. Food Additives & Contaminants, 2005, 22(5): 449-456. DOI:10.1080/02652030500089861.
- [18] CECILE L G. Updated overview of infrared spectroscopy methods for detecting mycotoxins on cereals (corn, wheat, and barley)[J]. Toxins, 2018, 10(1): 38. DOI:10.3390/toxins10010038.
- [19] TURNER N W, BRAMHMBHATH, SZABO-VEZSE M, et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: an update (2009–2014)[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 901(2), 12-33. DOI:10.1016/j.aca.2015.10.013.
- [20] WU K F, MA C B, ZHAO H, et al. Sensitive aptamer-based fluorescence assay for ochratoxin A based on RNase H signal amplification[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 273-278. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.10.130.
- [21] WU H, LIU R J, KANG X J, et al. Fluorometric aptamer assay for ochratoxin A based on the use of single walled carbon nanohorns and exonuclease III-aided amplification[J]. Microchimica Acta, 2018, 185(27): 1-7. DOI:10.1007/s00604-017-2592-6.
- [22] ZENG H L, ZHU Y L, MA L L, et al. G-quadruplex specific dye-based ratiometric FRET aptasensor for robust and ultrafast detection of toxin[J]. Dyes and Pigments, 2019, 164: 35-42. DOI:10.1016/j.dyepig.2019.01.005.
- [23] HE Y, TIAN F Y, ZHOU J, et al. Colorimetric aptasensor for ochratoxin A detection based on enzyme-induced gold nanoparticle aggregation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 388: 121758. DOI:10.1016/j.jhazmat.2019.121758.
- [24] GUO Z J, TIAN J, CUI C B, et al. A label-free aptasensor for turn-on fluorescent detection of ochratoxin A based on SYBR gold and single walled carbon nanohorns[J]. Food Control, 2021, 123: 107741. DOI:10.1016/j.foodcont.2020.107741.
- [25] 郭婷, 叶志杰, 周鸿媛, 等. 基于染料Genefinder和适配体的荧光传感体系检测赭曲霉毒素A[J]. 食品科学, 2021, 42(20): 305-309. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201016-144.
- [26] 易守军, 何盼, 欧宝立, 等. 适配体传感法快速测定啤酒中赭曲霉毒素A[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(7): 2283-2287. DOI:CNKI:SUN:GUAN.0.2019-07-054.
- [27] 王琦, 杨庆利, 吴薇. 基于氧化石墨烯的荧光适配体传感器检测食品中真菌毒素[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 318-322. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200907-091.
- [28] JO E J, MUN H, KIM S J, et al. Detection of ochratoxin A (OTA) in coffee using chemiluminescence resonance energy transfer (CRET) aptasensor[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 1102-1107. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.07.152.
- [29] JIA M X, JIA B Y, LIAO X F, et al. A CdSe@ CdS quantum dots based electrochemiluminescence aptasensor for sensitive detection of ochratoxin A[J]. Chemosphere, 2022, 287: 131994. DOI:10.1016/j.chemosphere.2021.131994.
- [30] YIN X T, WANG S, LIU X Y, et al. Aptamer-based colorimetric biosensing of ochratoxin A in fortified white grape wine sample using unmodified gold nanoparticles[J]. Analytical Sciences, 2017, 33(6): 659-664. DOI:10.2116/analsci.33.659.
- [31] LV L, LI D H, CUI C B, et al. Nuclease-aided target recycling signal amplification strategy for ochratoxin A monitoring[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 87: 136-141. DOI:10.1016/j.bios.2016.08.024.
- [32] ZHAO Y Y, LIU R J, SUN W Y, et al. Ochratoxin A detection platform based on signal amplification by Exonuclease III and fluorescence quenching by gold nanoparticles[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 1640-1645. DOI:10.1016/j.snb.2017.08.176.
- [33] 国家标准化管理委员会. 实验室质量控制规范食品理化检测: GB/T 27404—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-28.