

基于复合纳米材料比色/荧光双信号的黄曲霉毒素B₁检测

李 阳¹, 鲁 迨¹, 周 州², 陈丽叶¹, 谢新辉¹, 吴家浩¹, 赵 倩^{1,*}, 石星波¹

(1.湖南农业大学食品科学技术学院, 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128;

2.湖南省产商品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410007)

摘要:以黄曲霉毒素B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)为检测目标物, 使用二氧化硅纳米颗粒为载体富集谷胱甘肽和黄曲霉毒素适配体制备识别探针, 二氧化锰纳米颗粒与石墨烯量子点偶联的复合纳米材料为底物, 通过谷胱甘肽与底物的反应构建了一种比色和荧光双模信号输出的高灵敏便携式检测平台。在优化条件下, 对本方法的检测性能及特异性进行研究, 得到比色信号的回归方程为 $\Delta A = -0.275 - 0.021 \lg C$, 检出限为 2.732×10^{-12} g/mL; 荧光信号的回归方程为 $\Delta F = 928.733 + 71.779 \lg C$, 检出限为 1.667×10^{-12} g/mL, 两种方法都具备良好检测特异性。将该方法用于牛奶、大米、麦片、酱油和白醋5种实际样品中AFB₁的检测, 并与传统方法进行对比, 本方法结果具有较高的准确度。

关键词:黄曲霉毒素B₁; 二氧化锰纳米颗粒; 石墨烯量子点; 核酸适配体; 双模信号

Colorimetric and Fluorescent Dual-Mode Detection of Aflatoxin B₁ Using Composite Nanomaterial

LI Yang¹, LU Dai¹, ZHOU Zhou², CHEN Liye¹, XIE Xinhui¹, WU Jiahao¹, ZHAO Qian^{1,*}, SHI Xingbo¹

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Provincial Institute of Product and Goods Quality Inspection, Changsha 410007, China)

Abstract: In this study, a highly sensitive portable platform with colorimetric and fluorescent dual-mode signal output for the detection of aflatoxin B₁ (AFB₁) was developed based on the reaction between glutathione and a composite nanomaterial consisting of manganese dioxide (MnO₂) nanoparticles and graphene quantum dots (GQDs) as a substrate. The recognition probe was prepared by using silica nanoparticles as a carrier to enrich glutathione and AFB₁ aptamers. Under optimal conditions, analytical figures of merit such as specificity of this method were studied. The regression equation for colorimetric signal was $\Delta A = -0.275 - 0.021 \lg C$ and the detection limit was 2.732×10^{-12} g/mL; the regression equation for fluorescence signal was $\Delta F = 928.733 + 71.779 \lg C$ and the detection limit was 1.667×10^{-12} g/mL. Both methods had good detection specificity. The proposed method was applied in the detection of food samples, such as milk, rice, oatmeal, soy sauce and white vinegar with higher accuracy, compared with the traditional method.

Keywords: aflatoxin B₁; manganese dioxide nanoparticles; graphene quantum dots; aptamer; dual-mode signal

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221222-219

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 24-0297-09

引文格式:

李阳, 鲁迨, 周州, 等. 基于复合纳米材料比色/荧光双信号的黄曲霉毒素B₁检测[J]. 食品科学, 2023, 44(24): 297-305.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221222-219. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yang, LU Dai, ZHOU Zhou, et al. Colorimetric and fluorescent dual-mode detection of aflatoxin B₁ using composite nanomaterial[J]. Food Science, 2023, 44(24): 297-305. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221222-219. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-12-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32001778)

第一作者简介: 李阳 (1998—) (ORCID: 0000-0001-7028-0405), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全微纳生物传感分析。

E-mail: young0816@qq.com

*通信作者简介: 赵倩 (1989—) (ORCID: 0000-0003-4182-0657), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品分析。

E-mail: zhaoqian@hunau.edu.cn

黄曲霉毒素是主要由黄曲霉和寄生霉产生的有毒次生代谢物, 结构为二呋喃环和香豆素环组成的二呋喃酮萘酮的衍生物^[1]。黄曲霉毒素B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 毒性最大、致癌性最强, 已被世界卫生组织列为I类致癌物^[2-3]。为了保障食品安全, 开发准确检测食品中AFB₁含量的方法尤其重要, 常用的检测方法主要有薄层色谱法^[4]、高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法^[5]、免疫化学检测法^[6]等。色谱法灵敏度高、稳定性好, 但仪器设备昂贵和需要专业技术人员。免疫化学检测法中酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 应用最为广泛, 但ELISA依赖昂贵的抗体^[7]和酶, 而天然酶具有制备成本高、耐酸碱碱性低、稳定性差、储存不便的缺陷^[8], 同时单一信号输出容易出现假阳性。因此, 构建新型ELISA传感策略以实现AFB₁的高灵敏便携检测至关重要。

纳米材料的引入为开发新型的ELISA带来了机遇, 如可作为载体负载识别分子或者酶用于信号放大、作为纳米酶偶联抗体用于信号调节以及作为底物用于信号输出^[9]。石墨烯量子点 (graphene quantum dots, GQDs) 是一种零维碳纳米材料, 制备简单且具有很强的荧光特性^[10-11], 可以作为底物实现荧光信号输出, 同时提高ELISA检测的灵敏度。二氧化锰纳米颗粒 (MnO₂ nanoparticles, MnO₂NPs) 比表面积大、具有较宽的光吸收性能^[12], 可以作为能量受体有效地猝灭荧光物质的荧光, 此外其还具有优异的模拟酶性能^[13], 可以催化酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 显色^[14], 实现比色信号输出。若将两种材料组合, 则可实现比色/荧光信号同时输出, 为构建双模信号ELISA提供选择^[15]。

核酸适配体 (aptamer, Apt) 作为一种新型识别元件, 亲和力和特异性高、免疫原性低, 已广泛应用于食品安全检测中^[16-17]。真菌毒素等小分子分子质量小、抗原表位单一, 不能同时结合两个抗体, 一般使用竞争ELISA对其进行检测^[18], 特异性不够好。将抗体与Apt组合对目标物的识别表现出了较好的特异性, 可以实现小分子“三明治”夹心ELISA检测^[19]。

本实验基于GQDs与MnO₂NPs构建了一种比色/荧光双信号输出平台用于AFB₁的高灵敏便携式检测。使用SiO₂纳米颗粒 (SiO₂ nanoparticles, SiO₂NPs) 为载体, 将谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和AFB₁-Apt富集在SiO₂NPs上制备SiO₂NPs@GSH@Apt识别探针。使用MnO₂NPs偶联GQDs的复合纳米材料MnO₂NPs@GQDs为底物, 基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), MnO₂NPs有效地猝灭GQDs的荧光, 同时MnO₂NPs@GQDs能有效地催化TMB氧化为蓝色氧化态TMB。SiO₂NPs@GSH@Apt识别探针与AFB₁抗

体共同识别目标物AFB₁, 形成夹心型结构。GSH具有很强的还原性, 能将MnO₂NPs还原成Mn²⁺^[20], MnO₂NPs@GQDs的类过氧化物酶能力减弱, 而GQDs被猝灭的荧光不断恢复, 通过底物荧光强度以及TMB颜色的变化对实现对AFB₁的可视化及荧光检测。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

柠檬酸、氢氧化钠、30% H₂O₂、硫酸 国药集团化学试剂有限公司; 高锰酸钾 衡阳市凯信化工试剂有限公司; 聚丙烯胺盐酸盐 (poly(allylamine hydrochloride), PAH)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺 (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydro, EDC) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; *N*-羟基丁二酰亚胺 (*N*-hydroxy succinimide, NHS)、磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 北京索莱宝科技有限公司; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 上海源叶生物科技有限公司; AFB₁标准品 山东美正生物科技有限公司; 二氧化硅纳米颗粒 天津均益佳科技有限责任公司; 谷胱甘肽 合肥博美生物科技有限责任公司; TMB 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; AFB₁-Apt序列 (5'-3') GTT GGG CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG TGC CCT TCG CTA GGC CC^[21] 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

BSA124S电子天平 赛多利斯科学仪器有限公司; SPARK 20M多功能酶标仪 瑞士帝肯公司; Zetasizer Nano ZS90纳米粒度电位仪 马尔文帕纳科公司; Heraeus Pico 17离心机 美国赛默飞世尔科技公司; TCS-10金属恒温振荡器 杭州瑞诚仪器有限公司; JEM-2100F透射电子显微镜 日本电子光学公司; F-7000荧光分光光度计 日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 GQDs的制备

参考文献[22]采用直接热解法。称取2 g柠檬酸, 200 °C反应30 min, 得到橙色液体时标志GQDs形成。将GQDs逐滴加入到100 mL (0.25 mol/L) 的NaOH溶液中, 随后调节溶液pH值至7.0得到GQDs溶液。将其放入干燥箱中60 °C烘干至质量恒定后称量, 得到所制备的GQDs质量浓度为19.8 mg/mL。

1.3.2 MnO₂NPs的制备

参考文献[23]的方法用PAH将高锰酸钾还原成MnO₂NPs。称取35 mg高锰酸钾溶于40 mL去离子水中, 加入5 mL 40 mg/mL的PAH溶液, 在超声的辅助下反应15 min, 随后透析48 h (3 000 Da) 得到纯化的

MnO₂NPs。将其放入干燥箱中60 °C烘干至质量恒定后称量,得到所制备的GQDs质量浓度为3.7 mg/mL。

1.3.3 MnO₂NPs@GQDs复合底物的合成及性质

取5 mL 198 μg/mL的GQDs溶液与5 mL质量浓度为7.4、18.5、37、74、185、370 μg/mL的MnO₂NPs室温反应得到不同质量浓度的MnO₂NPs@GQDs复合材料,将未加入与加入MnO₂NPs的GQDs的荧光强度分别记为 F_0 、 F_1 ,以 F_0 与 F_1 差值 ΔF_1 为参考确定底物合成最佳的MnO₂NPs质量浓度。接下来探究底物合成所需的时间,在GQDs溶液加入MnO₂NPs后,每隔10 min测量其荧光强度,确定最佳反应时间。

考察MnO₂NPs、GQDs、底物以及底物在引入GSH后的类过氧化物酶特性和荧光特性的变化,分别配制4种溶液:1) MnO₂NPs溶液:250 μL MnO₂NPs+750 μL H₂O;2) GQDs溶液:250 μL GQDs+750 μL H₂O;3) MnO₂NPs@GQDs溶液:500 μL MnO₂NPs@GQDs+500 μL H₂O;4) MnO₂NPs@GQDs+GSH溶液:500 μL MnO₂NPs@GQDs+500 μL GSH。将4种溶液置于45 °C反应40 min,待反应完成后各取200 μL液体测定荧光光谱,同时各取50 μL液体加入50 μL TMB和50 μL H₂O₂,室温反应45 min,加入50 μL 1 mol/L的H₂SO₄溶液终止反应,测定紫外-可见吸收光谱并记录在450 nm波长处的吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 。

1.3.4 SiO₂NPs@GSH@Apt探针的制备及优化

对探针上的GSH浓度进行优化,将1 mL表面氨基化的SiO₂NPs溶液(0.1 mg/mL)与1 mL不同浓度(0、0.5、2.5、5、7.5、10、12.5、15 mmol/L)的GSH溶液室温反应1 h,随后将1 mL 100 nmol/L用4 mmol的EDC和1 mmol的NHS活化后的Apt加入其中室温反应1 h。接着8 000 r/min离心3 min,重复3次得到纯化的探针。400 μL不同GSH浓度的探针与400 μL底物45 °C反应40 min,测定同1.3.3节。将有、无GSH的探针加入到底物后的荧光值分别记为 F_2 、 F_3 ,以 F_2 与 F_3 荧光差值 ΔF_2 和 $A_{450\text{nm}}$ 为参考得到最佳GSH浓度。对SiO₂NPs表面富集GSH的温度与时间进行优化,考察SiO₂NPs在不同温度下(15、25、35、45、55、65 °C)以及不同反应时间下(10、20、30、40、50、60、70、80 min)对GSH富集情况,以 ΔF_2 和 $A_{450\text{nm}}$ 为参考得到最优反应温度与反应时间。

1.3.5 基于SiO₂NPs@GSH@Apt探针和MnO₂NPs@GQDs底物对AFB₁的检测

基于探针和底物构建了基于夹心法ELISA用于AFB₁的检测,具体操作步骤如下:1) AFB₁抗体包被:将100 μL 0.01 mg/mL AFB₁抗体加入96微孔板中,4 °C孵育12 h。2) 封闭:取出微孔板,弃去液体,PBS洗涤3次后加入100 μL 0.01 mg/mL BSA,37 °C孵育1 h。3) 连

接抗原:取出微孔板,弃去液体,PBS洗涤3次后加入100 μL不同质量浓度AFB₁,37 °C孵育1 h。4) 弃去液体,PBS洗涤3次后加入100 μL探针,25 °C反应1 h。5) 弃去液体,PBS洗涤3次后加入100 μL底物,45 °C反应40 min。测定同1.3.3节。

1.3.6 可行性分析

将100 μL同浓度的SiO₂NPs、SiO₂NPs@GSH、SiO₂NPs@Apt、SiO₂NPs@GSH@Apt分别加入到铺好AFB₁抗原的微孔板中,25 °C反应1 h,弃去液体,PBS洗涤3次后加入100 μL底物,45 °C反应40 min。测定同1.3.3节。

1.3.7 反应条件优化

将200 μL探针加入到200 μL底物中,考察其在不同温度下(15、25、35、45、55、65 °C)以及不同反应时间下(10、20、30、40、50、60 min)的荧光强度和类过氧化物酶特性变化,确定最优反应温度与反应时间。

1.3.8 特异性分析

为验证本方法检测AFB₁的特异性,选择黄曲霉毒素B₂(aflatoxin B₂, AFB₂)、黄曲霉毒素M₁(aflatoxin M₁, AFM₁)、赭曲霉毒素(ochratoxin A, OTA)、T-2毒素(trichothecenes, T-2)、棒曲霉毒素(Patulin)、伏马毒素(fumonisin B₁, FB₁)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)以及混合毒素进行特异性验证,其中单一毒素质量浓度为10⁻⁸ g/mL,混合毒素中的干扰毒素质量浓度为10⁻⁸ g/mL、AFB₁质量浓度为10⁻⁹ g/mL。操作同1.3.5节,将AFB₁分别用上述毒素代替。

1.3.9 实际样品中AFB₁的检测

使用商业化的ELISA试剂盒和HPLC检测牛奶、大米、麦片、酱油、白醋5种实际样品中的AFB₁含量,验证本方法的准确性。检测前需对所选的样品进行预处理,步骤如下:1) 牛奶:取1 mL样品加入3 mL去离子水混合均匀。2) 大米、麦片、酱油:将样品粉碎后取5 g样本加入60%甲醇溶液25 mL,振荡10 min;取液体于4 000 r/min离心5 min;取上清液1 mL加入4 mL去离子水混合均匀。3) 白醋:取1 mL样品加入60%甲醇溶液5 mL,振荡均匀;取液体1 mL加入4 mL去离子水混合均匀。操作同1.3.5节,将AFB₁分别用上述预处理过的实际样品代替。

选择牛奶样品作为加标样品进行加标回收的检测。分别取1 mL待测液加入AFB₁标准品溶液,使AFB₁的终质量浓度分别为1×10⁻⁹、1×10⁻¹⁰、1×10⁻¹¹ g/mL,计算得到加标回收率。

1.4 数据处理

所有实验均重复3次,从酶标仪和荧光分光光度计中导出数据,利用Excel进行数据处理,使用Origin 2021软件绘图。

2 结果与分析

2.1 检测原理

检测原理如图1所示,使用SiO₂NPs作为载体富集GSH和AFB₁-Apt构建SiO₂NPs@GSH@Apt识别探针, MnO₂NPs偶联GQDs的复合纳米材料MnO₂NPs@GQDs为底物。在聚苯乙烯微孔板上包被AFB₁抗体,当有目标物AFB₁存在时,探针上的AFB₁-Apt和抗体共同识别并捕获AFB₁,形成夹心结构,以GSH控制底物荧光及比色信号的输出。底物具有MnO₂NPs类过氧化物酶的特性,能够有效地催化酶底物TMB显色,且MnO₂NPs具有较宽的光吸收性能,能有效猝灭GQDs的荧光。但由于探针上的GSH具有很强的还原性,能将MnO₂NPs还原成Mn²⁺,此时底物的类过氧化物酶特性消失,不能催化TMB氧化变色,但底物中GQDs被猝灭的荧光恢复。当目标物AFB₁浓度越高,溶液的荧光信号逐渐增强,比色信号逐渐减弱,通过底物荧光强度以及TMB颜色的变化对AFB₁进行定量及可视化检测。

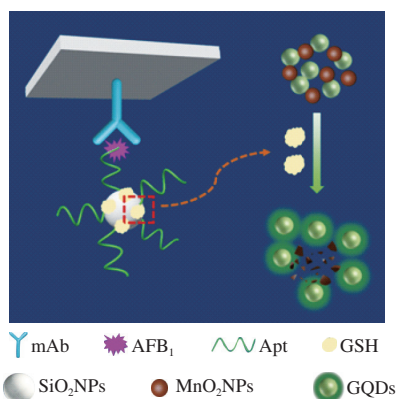


图1 比色/荧光双模信号检测AFB₁原理图

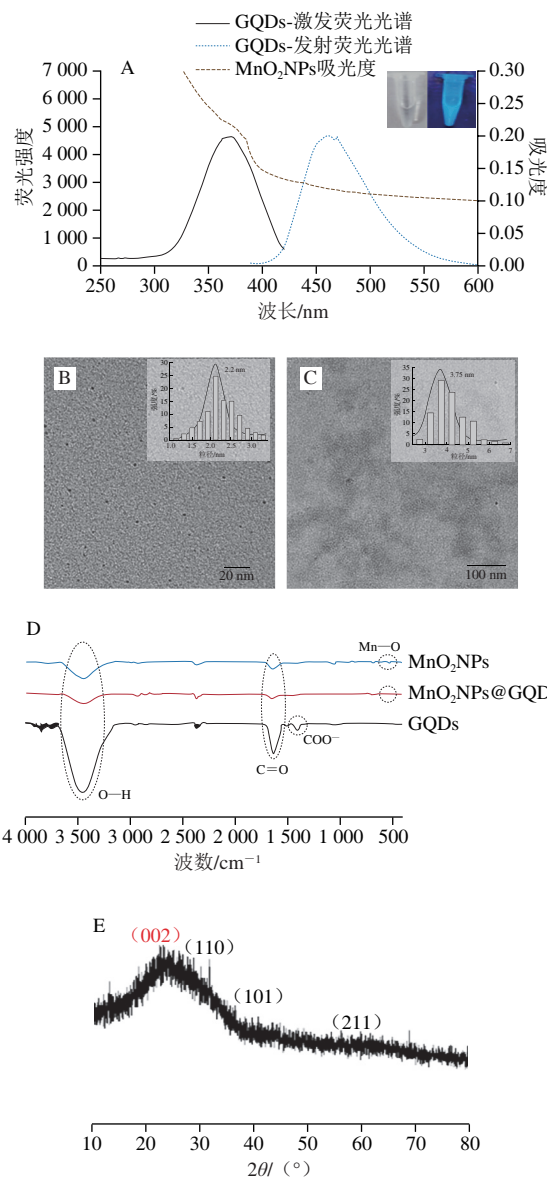
Fig.1 Schematic illustration of the dual-mode signal for colorimetric and fluorescence detection of AFB₁

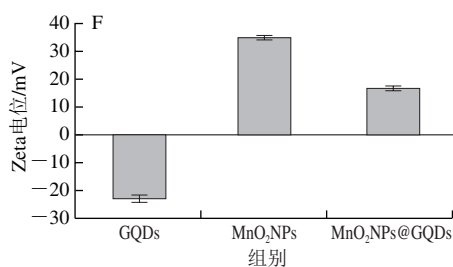
2.2 GQDs、MnO₂NPs和MnO₂NPs@GQDs制备及表征

如图2A所示, GQDs的最大激发波长为370 nm,最大发射波长为465 nm,在紫外灯照射下发出了很强的蓝色荧光。对MnO₂NPs紫外-可见吸收光谱进行测定,其在250~600 nm波长处有比较宽的吸收范围。由图2B可以看到, MnO₂NPs为球状,且分散性较好。随机选取100个MnO₂NPs进行粒径分析,结果表明该尺寸分布在1.2~3.4 nm之间,平均粒径为2.2 nm。由图2C可以看出, GQDs也为球状结构。GQDs粒径分布在2.7~6.7 nm之间,平均粒径为3.75 nm。

为考察MnO₂NPs@GQDs复合纳米材料是否成功合成,通过红外光谱图分析MnO₂NPs、GQDs及MnO₂NPs@GQDs表面功能基团,如图2D所示,1 600 cm⁻¹是C=O的不对称伸缩振动,3 500 cm⁻¹为O—H的面内弯曲振动^[22],

GQDs表现出了对羧基和羟基的吸收,表明其含有一COOH基团; MnO₂NPs表现出了对羰基和羟基的吸收,且Mn—O的伸缩振动导致MnO₂NPs在527 cm⁻¹处出现小的特征峰;复合纳米材料在527 cm⁻¹处也有小的特征峰^[24],对羰基和羟基也表现出吸收,说明MnO₂NPs与GQDs偶联形成了MnO₂NPs@GQDs复合纳米材料。通过X射线衍射仪对MnO₂NPs@GQDs进行晶体结构分析,如图2E所示,2θ为28.7°、37.3°、56.7°时出现的特征峰与β-MnO₂的110、101、211晶面匹配^[25],2θ=24°附近出现的宽峰对应于石墨的002平面,来源于GQDs的石墨结构^[26]。从3种材料的电位表征图(图2F)可见, GQDs带负电, MnO₂NPs带正电,由于静电吸附作用MnO₂NPs与GQDs结合得到MnO₂NPs@GQDs复合纳米材料, MnO₂NPs@GQDs带正电,提示MnO₂NPs@GQDs的成功合成。





A. GQDs的荧光发射与激发光谱和MnO₂NPs的紫外吸收光谱图, 插图为GQDs在日光及紫外灯下的照片; B、C. 分别为MnO₂NPs、GQDs的透射电镜图, 右上角为粒径分布图; D. MnO₂NPs、GQDs和MnO₂NPs@GQDs的红外光谱图; E. MnO₂NPs@GQDs的X射线衍射光谱图; F. MnO₂NPs、GQDs和MnO₂NPs@GQDs的Zeta电位图。

图2 GQDs、MnO₂NPs和MnO₂NPs@GQDs的表征

Fig. 2 Characterization of GQDs, MnO₂NPs and MnO₂NPs@GQDs

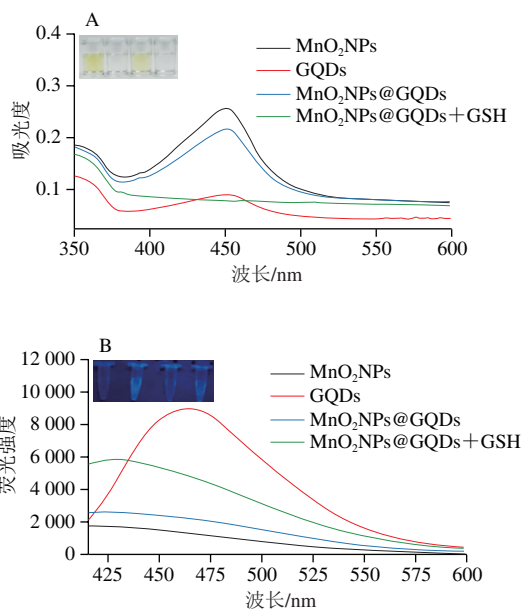


图3 GSH加入前后MnO₂NPs@GQDs的类过氧化物酶特性(A)及荧光特性(B)

Fig. 3 Peroxide-like properties (A) and fluorescence intensity (B) of MnO₂NPs@GQDs before and after adding GSH

对底物的类过氧化物酶特性和荧光特性进行探究。由图3A所示, MnO₂NPs具有类过氧化物酶特性, 能将TMB氧化成蓝色产物, 在硫酸终止下变成黄色; 而GQDs没有类酶活性, 在GQDs中加入TMB与H₂O₂以及终止液后溶液呈无色状态; MnO₂NPs@GQDs底物在加入TMB与H₂O₂以及终止液后溶液呈黄色, 说明底物也具有类过氧化物酶特性; 在加入GSH后, GSH将MnO₂NPs还原成Mn²⁺, 底物的类酶活性消失, 插图为MnO₂NPs、GQDs、MnO₂NPs@GQDs、MnO₂NPs@GQDs+GSH四种溶液加入TMB与H₂O₂以及终止液后的颜色图片。如图3B所示, MnO₂NPs不发荧光; 而GQDs具有很强的荧光特性, 在465 nm处具有很高的荧光发射峰; MnO₂NPs

与GQDs复合形成MnO₂NPs@GQDs底物后, 基于FRET, GQDs的荧光被MnO₂NPs猝灭导致底物荧光强度很低; 加入GSH后, MnO₂NPs还原成Mn²⁺, MnO₂NPs对GQDs荧光的猝灭效果减弱, 底物荧光逐渐恢复。插图为MnO₂NPs、GQDs、MnO₂NPs@GQDs、MnO₂NPs@GQDs+GSH四种溶液在360 nm紫外灯下的图片, 可以清楚看到4种溶液的荧光强度变化。

2.3 MnO₂NPs@GQDs底物条件优化

如图4A所示, 随着MnO₂NPs质量浓度不断的增大, GQDs的荧光不断被猝灭, 当质量浓度达到74 μg/mL时ΔF₁最大, 所以以此为最佳质量浓度。对MnO₂NPs与GQDs的孵育时间进行优化, 从图4B可以看出, ΔF₁随着时间的延长而增加, 在90 min后趋于稳定, 因此选择最佳孵育时间为90 min。

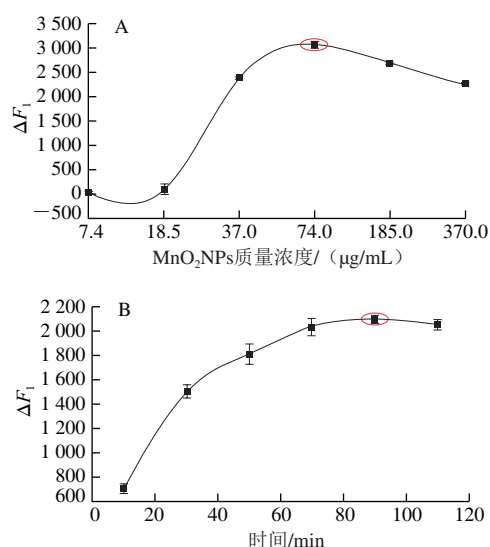


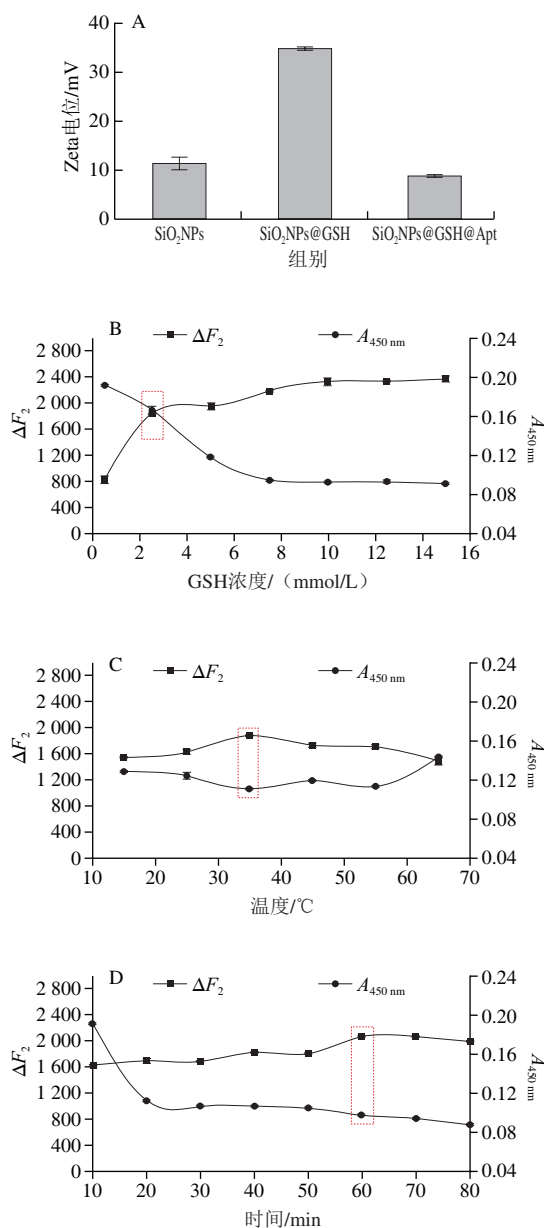
图4 底物制备时MnO₂NPs质量浓度(A)和反应时间(B)条件的优化
Fig. 4 Optimization of concentration of MnO₂NPs (A) and reaction time (B) for substrate preparation

2.4 SiO₂NPs@GSH@Apt探针制备及条件优化

SiO₂NPs@GSH@Apt探针是通过氨基修饰的SiO₂NPs首先与GSH羧基结合、接着与羧基化的Apt静电吸附偶联而成。对探针进行Zeta电位表征, 如图5A所示, 氨基修饰的SiO₂NPs带正电, 加入GSH后由于缩合反应SiO₂NPs@GSH正电位值增加, 但加入羧基化Apt后, SiO₂NPs@GSH@Apt正电位值减少, 说明GSH、Apt已成功富集在SiO₂NPs表面, 证实了SiO₂NPs@GSH@Apt探针的成功合成。

对探针制备过程中GSH浓度及SiO₂NPs富集GSH温度与时间进行优化。如图5B所示, 随着探针上的GSH浓度不断增大, 底物的荧光强度逐渐增强, 对TMB的氧化效果逐渐减弱。当GSH终浓度为5 mmol/L时, 底物的荧光强度恢复接近稳定, 但底物与TMB反应得到的TMB氧化

产物吸光度很低, 为了实现比色及荧光的双模信号同时输出, 选择终浓度为2.5 mmol/L的GSH进行后续实验。如图5C所示, 在35 °C条件下底物的荧光强度恢复最多且对TMB的氧化效果最弱, 说明此温度下SiO₂NPs表面富集的GSH最多, 所以选择35 °C作为最佳反应温度。如图5D所示, 反应时间到60 min时底物的荧光强度恢复接近稳定且对TMB的氧化效果也趋于稳定, 说明此时SiO₂NPs表面的GSH富集达到饱和, 因此SiO₂NPs富集GSH的时间选择为60 min。



A. SiO₂NPs、SiO₂NPs@GSH、SiO₂NPs@GSH@Apt的Zeta电位图; B. GSH浓度优化; C. 反应温度优化; D. 反应时间优化。

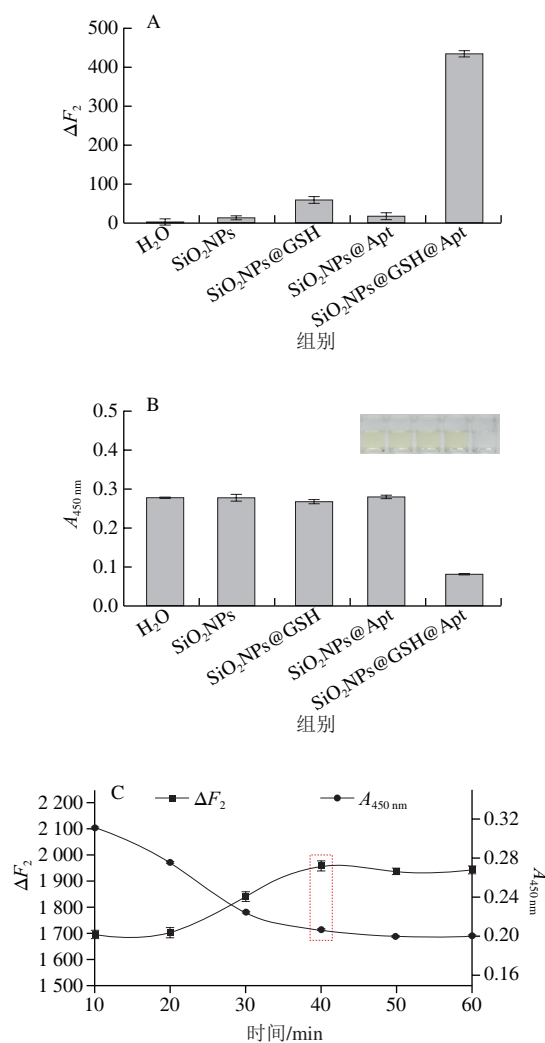
图5 SiO₂NPs@GSH@Apt的表征及制备条件优化

Fig. 5 Characterization of SiO₂NPs@GSH@Apt and optimization of its preparation conditions

2.5 可行性验证及反应条件优化

将SiO₂NPs、SiO₂NPs@GSH、SiO₂NPs@Apt、SiO₂NPs@GSH@Apt分别加入到底物中, 对底物的比色/荧光信号输出进行探究。从图6A、B可以看到, SiO₂NPs两种信号与空白响应值相差不大, 没有识别目标物和与底物反应的功能; SiO₂NPs@GSH对两种信号都有轻微的反应, 但其缺少对目标物的识别功能; SiO₂NPs@Apt具备识别功能, 但其没有信号响应; SiO₂NPs@GSH@Apt具备识别功能且比色与荧光信号明显响应, 这说明基于SiO₂NPs@GSH@Apt探针与MnO₂NPs@QDs底物构建检测AFB₁的方法可行。

对探针与底物的反应时间与温度进行优化。如图6C所示, 随着反应时间延长, 探针上的GSH与底物不断反应使MnO₂NPs还原成Mn²⁺, 到40 min底物的荧光及类过氧化物酶活性趋于稳定, 因此后续实验中探针与底物反应时间选择为40 min。由图6D可以看到, 在45 °C条件下底物的荧光和类过氧化物酶活性效果最好, 所以选择此温度作为探针与底物最佳反应温度。



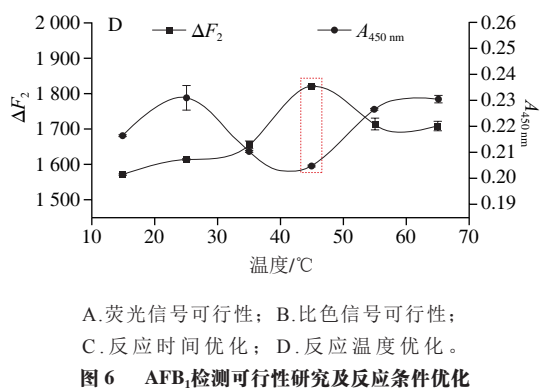


Fig. 6 Feasibility of AFB₁ detection and optimization of reaction conditions

2.6 AFB₁检测灵敏度及特异性分析

在最优化条件下, 向检测体系中加入AFB₁标准溶液 (10⁻¹²~10⁻⁶ g/mL), 以底物荧光差值ΔF (ΔF=F₄-F₅, F₄、F₅分别为加入毒素和超纯水后底物的荧光值) 和TMB显色的吸光度差值ΔA (ΔA=A₁-A₀, A₁、A₀分别为加入毒素和超纯水后底物与TMB反应后的A_{450nm}) 作为信号输出, 建立标准曲线。如图7A所示, 随着AFB₁质量浓度不断增大, GQDs的荧光不断恢复, 恢复的荧光强度ΔF与AFB₁质量浓度在10⁻¹²~10⁻⁶ g/mL范围内呈明显正相关, 得到荧光信号的线性方程为ΔF=928.733+71.779lgC, R²=0.990 2, 检出限计算为1.667×10⁻¹² g/mL。检出限的定义如下: 3S₀/S (3为置信水平为99%的因子, S₀为空白测量的标准偏差 (n=3), S为标准曲线的斜率)。由图7C可以看到, 随着AFB₁质量浓度不断增大, TMB氧化产物在450 nm波长处的吸光度逐渐减低, 以AFB₁质量浓度 (C) 为横坐标, ΔA为纵坐标, 在10⁻¹²~10⁻⁶ g/mL范围内得到了比色信号的线性方程为ΔA=-0.275-0.021lgC, R²=0.998 9, 计算得到检出限为2.732×10⁻¹² g/mL。此外, 通过AFB₁检测方法与其他方法比较 (表1) 表明, 本研究所得结果具有较宽的线性范围和更低的检出限, 对AFB₁具有良好的检测性能, 可实现对AFB₁的高灵敏便携检测。

表1 不同AFB₁检测方法的比较

Table 1 Comparison of different methods for the determination of AFB₁

检测方法	质量浓度范围/(ng/mL)	检出限/(ng/mL)	参考文献
荧光	5~200	1.89	[27]
荧光	40~300	27.3	[28]
比色	1~100	0.36	[29]
比色	5~1 000	4.56	[30]
电化学	1~30	0.62	[31]
压力	0.05~10	0.03	[32]
比色/荧光	0.01~1 000	0.002 732/0.001 667	本研究

探讨该方法对检测AFB₁的特异性, 选择与AFB₁结构类似的毒素AFB₂、AFM₁、OTA、T-2毒素、Patulin、FB₁、DON以及混合毒素进行验证。如图7B所示, 只有

AFB₁和混合毒素才有明显的荧光信号响应, 说明荧光信号有良好的特异性。如图7D所示, TMB氧化产物的颜色在有AFB₁存在时最浅, 说明比色信号对AFB₁也具有良好的特异性。

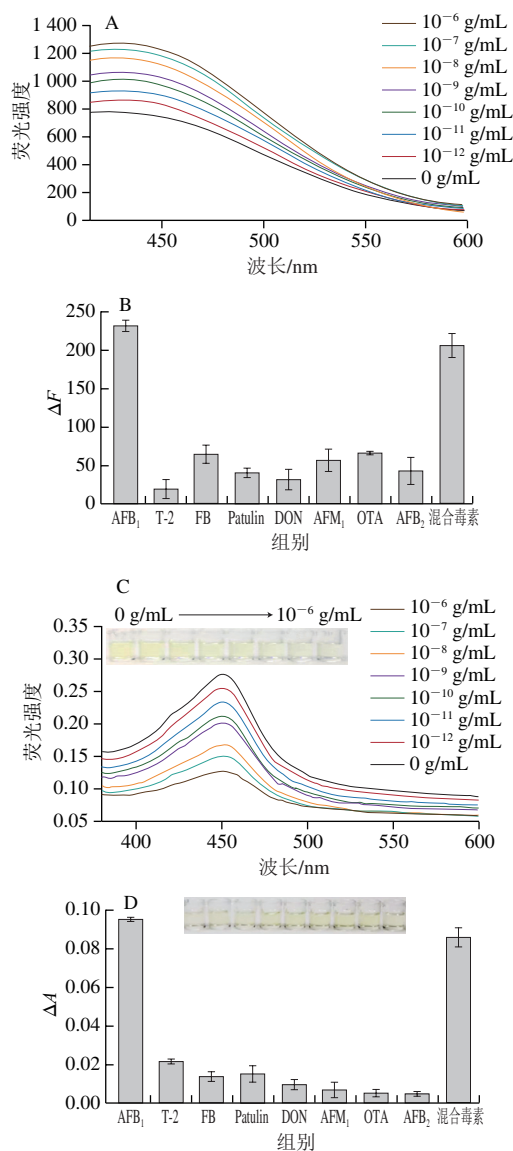


图7 AFB₁检测灵敏度及特异性

Fig. 7 Sensitivity and specificity of AFB₁ detection

2.7 实际样品中AFB₁的检测分析

使用本方法对牛奶、大米、麦片、酱油和白醋共5种实际样品中的AFB₁进行检测, 根据标准曲线计算得到样品中AFB₁的含量, 同时与商业化的ELISA试剂盒和HPLC进行方法对比, 结果如表2所示。商业化的ELISA试剂盒检出了大米与酱油两种样品, 含量分别为0.111、3.41×10⁻² μg/kg, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 分别为2.7%、1.5%。HPLC只检出了大

米一个样品, 含量为 $0.100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法中比色信号检出了大米与酱油两种样品, 而荧光信号检出了大米酱油和麦片3种样品, 比色信号检出大米、酱油中的 AFB_1 含量分别为 0.114 、 $3.44 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{kg}$, RSD分别为 2.2% 、 0.8% ; 荧光信号检出大米、酱油与麦片中的 AFB_1 含量分别为 0.108 、 3.26×10^{-2} 、 $1.94 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{kg}$, RSD分别为 2.4% 、 1.2% 、 0.9% 。两种信号的检测结果与ELISA试剂盒和HPLC所测得的结果保持在同一水平, 且RSD均小于 3% , 说明检测结果具有一定的准确性。此外, 两种信号能测出ELISA试剂盒和HPLC未能检出的样品, 说明本方法能有效地检测出实际样品中的 AFB_1 含量并且比传统方法的灵敏度更高。两种信号得到的结果可以看到本方法中荧光信号的灵敏度更高。

表2 不同方法检测实际样品中 AFB_1 的含量

Table 2 Comparison of results of AFB_1 detection in real food samples by different methods

样品	ELISA结果/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD/%	HPLC检测		比色		荧光	
			结果/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD/%	检测结果/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD/%	检测结果/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD/%
牛奶	未检出		未检出		未检出		未检出	
大米	0.111	2.7	0.100		0.114	2.2	0.108	2.4
麦片	未检出		未检出		未检出		1.94×10^{-3}	0.9
酱油	3.41×10^{-2}	1.5	未检出		3.44×10^{-2}	0.8	3.26×10^{-2}	1.2
白醋	未检出		未检出		未检出		未检出	

为进一步验证本方法的实际应用性能, 在牛奶中添加不同含量的 AFB_1 标准液制备不同质量浓度的 AFB_1 牛奶加标样品进行加标回收率实验。如表3所示, 比色信号与荧光信号均有效检出, 并与加标含量几乎持平。其中比色信号的加标回收率为 $96.03\% \sim 112.27\%$, 荧光信号回收率为 $91.50\% \sim 117.20\%$, 两种信号的RSD均小于 3% , 说明本方法具有很好的准确性和特异性, 可用于牛奶等相关实际样品中 AFB_1 的检测。

表3 牛奶样品中 AFB_1 加标回收率

Table 3 Recoveries of AFB_1 in spiked milk samples

信号输出	加标值/ (g/mL)	测定值/ (g/mL)	回收率/%	RSD/%
比色信号	1×10^{-9}	1.07×10^{-9}	107.11	1.72
	1×10^{-10}	9.60×10^{-11}	96.03	1.42
	1×10^{-11}	1.12×10^{-11}	112.27	2.27
荧光信号	1×10^{-9}	9.15×10^{-10}	91.50	2.04
	1×10^{-10}	9.23×10^{-11}	92.30	1.94
	1×10^{-11}	1.17×10^{-11}	117.20	2.83

3 讨论

将GSH和 AFB_1 -Apt富集在 SiO_2 NPs表面制备了 SiO_2 NPs@GSH@Apt识别探针, MnO_2 NPs与QDs偶联合成 MnO_2 NPs@QDs信号读出底物, Apt和抗体组合识别目标物 AFB_1 。在聚苯乙烯微孔板上, 基于探针上GSH

与底物的反应设计了一种具有比色/荧光双信号的 AFB_1 检测方法, 实现了 AFB_1 的可视化比色及荧光信号高灵敏检测。两种信号得到的结果互相佐证, 避免了单信号输出时容易出现假阳性的后果。Apt与抗体共同识别捕获目标物, 避免其他毒素干扰, 具有良好的特异性, 且相较于2个抗体组合使用的成本更低。与商业化ELISA试剂盒和HPLC相比, 本方法具有更高的灵敏度, 可用于痕量检测 AFB_1 , 为食品安全快速、灵敏检测提供了技术支撑。

参考文献:

- [1] LI C C, LIU X D, WU J, et al. Research progress in toxicological effects and mechanism of aflatoxin B₁ toxin[J]. PeerJ, 2022, 10: 13850. DOI:10.7717/peerj.13850.
- [2] BRASE S, ENCINAS A, KECK J, et al. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites[J]. Chemical Reviews, 2009, 109(9): 3903-3990. DOI:10.1021/cr050001f.
- [3] ISMAIL A, GONCALVES B L, DE NEEFF D V, et al. Aflatoxin in foodstuffs: occurrence and recent advances in decontamination[J]. Food Research International, 2018, 113: 74-85. DOI:10.1016/j.foodres.2018.06.067.
- [4] HUSSAIN A, RAHMAN Z, KHAN M. Detection of aflatoxins in peanut oils marketed in Peshawar, Pakistan using thin layer chromatography[J]. Journal of Food Quality and Hazards Control, 2021, 8(2): 87-91. DOI:10.18502/jfqhc.8.2.6473.
- [5] ZAHRA Z, ROBAB B, HASTIN, et al. Detection of aflatoxin and ochratoxin A in spices by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Quality, 2020, 2020: 8858889. DOI:10.1155/2020/8858889.
- [6] RAYSAN A, EREMIN S A, BELOGLAZOVA N V, et al. Immunochemical approaches for detection of aflatoxin B₁ in herbal medicines[J]. Phytochemical Analysis, 2020, 31(5): 662-669. DOI:10.1002/pca.2931.
- [7] ZHANG J, XU X J, QIANG Y. Ultrasensitive electrochemical aptasensor for ochratoxin A detection using AgPt bimetallic nanoparticles decorated iron-porphyrinic metal-organic framework for signal amplification[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2020, 312: 127964. DOI:10.1016/j.snb.2020.127964.
- [8] WU L, LI G H, XU X, et al. Application of nano-ELISA in food analysis: recent advances and challenges[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 113: 140-156. DOI:10.1016/j.trac.2019.02.002.
- [9] ASHRAFI A M, BYTESNIKOVA Z, BAREK J, et al. A critical comparison of natural enzymes and nanozymes in biosensing and bioassays[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 192: 113494. DOI:10.1016/j.bios.2021.113494.
- [10] LI Y Q, XIAO Y, TAO Q, et al. Selective coordination and localized polarization in graphene quantum dots: detection of fluoride anions using ultra-low-field NMR relaxometry[J]. Chinese Chemical Letters, 2021, 32(12): 3921-3926. DOI:10.1016/j.ccl.2021.05.014.
- [11] XU A L, WANG G, LI Y Q, et al. Carbon-based quantum dots with solid-state photoluminescent: mechanism, implementation, and application[J]. Small, 2020, 16(48): 2004621. DOI:10.1002/sml.202004621.
- [12] YAN X, SONG Y, ZHU C Z, et al. Graphene quantum dot-MnO₂ nanosheet based optical sensing platform: a sensitive fluorescence "Turn Off-On" nanosensor for glutathione detection and intracellular imaging[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(34): 21990-21996. DOI:10.1021/acsami.6b05465.

- [13] LIU X, WANG Q, ZHAO H H, et al. BSA-templated MnO₂ nanoparticles as both peroxidase and oxidase mimics[J]. *Analyst*, 2012, 137(19): 4552-4558. DOI:10.1039/c2an35700c.
- [14] PENG B, WANG C J, HE X Y, et al. A smartphone-assisted ratiometric colorimetric and fluorescent probe for triple-mode determination of nitrite based on MnO₂ nanoparticles and carbon quantum dots[J]. *Food Chemistry*, 2022, 410: 135151. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.135151.
- [15] FAN P F, LIU C, HU C C, et al. Green and facile synthesis of iron-doped biomass carbon dots as a dual-signal colorimetric and fluorometric probe for the detection of ascorbic acid[J]. *New Journal of Chemistry*, 2022, 46(5): 2526-2533. DOI:10.1039/D1NJ05047H.
- [16] ZHANG K, LI H Y, WANG W J, et al. Application of multiplexed aptasensors in food contaminants detection[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(12): 3721-3738. DOI:10.1021/acssensors.0c01740.
- [17] SARKAR D J, BEHERA B K, PARIDA P K, et al. Aptamer-based NanoBioSensors for seafood safety[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 219: 114771. DOI:10.1016/j.bios.2022.114771.
- [18] MA T Y, LIU K X, YANG X, et al. Development of indirect competitive ELISA and visualized multicolor ELISA based on gold nanorods growth for the determination of zearalenone[J]. *Foods*, 2021, 10(11): 2654. DOI:10.3390/foods10112654.
- [19] TOH S Y, CITARTAN M, GOPINATH S C, et al. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 392-403. DOI:10.1016/j.bios.2014.09.026.
- [20] CAO Y, LIU J J, ZOU L N, et al. Ratiometric fluorescence sensing of glutathione by using the oxidase-mimicking activity of MnO₂ nanosheet[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1145: 46-51. DOI:10.1016/j.aca.2020.12.019.
- [21] HE H R, SUN D W, PU H B, et al. Bridging Fe₃O₄@Au nanoflowers and Au@Ag nanospheres with aptamer for ultrasensitive SERS detection of aflatoxin B₁[J]. *Food Chemistry*, 2020, 332: 127443. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127443.
- [22] DONG Y Q, SHAO J W, CHEN C Q, et al. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid[J]. *Carbon*, 2012, 50(12): 4738-4743. DOI:10.1016/j.carbon.2012.06.002.
- [23] ZHU W W, DONG Z L, FU T T, et al. Modulation of hypoxia in solid tumor microenvironment with MnO₂ nanoparticles to enhance photodynamic therapy[J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(30): 5490-5498. DOI:10.1002/adfm.201600676.
- [24] QAITOON A, YONG J X, ZHANG Z X, et al. Development of manganese dioxide-based nanoprobe for fluorescence detection and imaging of glutathione[J]. *New Journal of Chemistry*, 2021, 45(28): 12377-12383. DOI:10.1039/d1nj01843d.
- [25] YANG J, REN S, SU B X, et al. Insight into N₂O formation over different crystal phases of MnO₂ during low-temperature NH₃-SCR of NO[J]. *Catalysis Letters*, 2021, 151(10): 2964-2971. DOI:10.1007/s10562-021-03541-8.
- [26] OZYURT D, SHAFQAT S, PAKKANEN T T, et al. Aggregation induced emission transformation of liquid and solid-state N-doped graphene quantum dots[J]. *Carbon*, 2021, 175: 576-584. DOI:10.1016/j.carbon.2021.01.026.
- [27] QI X, LV L, WEI D X, et al. Detection of aflatoxin B₁ with a new label-free fluorescence aptasensor based on PVP-coated single-walled carbon nanohorns and SYBR Gold[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(9): 3087-3094. DOI:10.1007/s00216-022-03938-3.
- [28] XIA X H, WANG H B, YANG H, et al. Dual-terminal stemmed aptamer beacon for label-free detection of aflatoxin B₁ in broad bean paste and peanut oil via aggregation-induced emission[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(46): 12431-12438. DOI:10.1021/acs.jafc.8b05217.
- [29] LERDSRI J, CHANANCHANA W, UPAN J, et al. Label-free colorimetric aptasensor for rapid detection of aflatoxin B₁ by utilizing cationic perylene probe and localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 320: 128356. DOI:10.1016/j.snb.2020.128356.
- [30] VIJITVARASAN P, CHEUNKAR S, OAEW S. A point-of-use lateral flow aptasensor for naked-eye detection of aflatoxin B₁[J]. *Food Control*, 2022, 134: 108767. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108767.
- [31] MIGLIORINI F L, SANTOS D M D, SOARES A C, et al. Design of a low-cost and disposable paper-based immunosensor for the rapid and sensitive detection of aflatoxin B₁[J]. *Chemosensors*, 2020, 8(3): 87. DOI:10.3390/chemosensors8030087.
- [32] JIANG S, ZHANG L X, LI J Z, et al. Pressure/colorimetric dual-readout immunochromatographic test strip for point-of-care testing of aflatoxin B₁[J]. *Talanta*, 2021, 227: 122203. DOI:10.1016/j.talanta.2021.122203.