

doi:10.3788/gzxb20184711.1128001

高灵敏磁分离荧光传感法检测黄曲霉毒素 B1

曾云龙¹, 张敏¹, 易守军^{1,2}, 何盼¹, 赵敏¹, 夏晓东¹, 唐春然¹

(1 湖南科技大学 化学化工学院, 理论有机和功能分子教育部重点实验室,
精细聚合物可控制备与功能应用湖南省重点实验室, 湖南 湘潭 411201)

(2 湖南科技大学 材料科学与工程学院, 湖南 湘潭 411201)

摘 要:以自组装方式制备了 Au@Fe₃O₄/核酸适体/氨基-碳量子点磁性生物纳米复合物, 并提出一种磁分离荧光传感法用于黄曲霉毒素 B1 的检测。当样品中有黄曲霉毒素 B1 时, 磁性生物纳米复合物中核酸适体选择性地与黄曲霉毒素 B1 结合并释放出氨基-碳量子点, 经磁性分离后, 氨基-碳量子点留在溶液中, 体系溶液荧光强度随黄曲霉毒素 B1 浓度的增大而增强。黄曲霉毒素 B1 浓度在 0.001~1.0 ng/mL 范围与溶液荧光强度成良好线性关系, 线性相关系数为 0.996 4, 检测限为 0.3 pg/mL。该方法利用磁性分离技术, 有效地消除了背景荧光影响, 改善了荧光传感性能。

关键词: 荧光传感器; 痕量分析; 黄曲霉毒素 B1 测定; 磁性分离; 核酸核酸适体; 氨基-碳量子点

中图分类号: O611.4

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2018)11-1128001-8

Magnetic Separation Fluorescent Sensor for Highly Sensitive Detection of Aflatoxin B1

ZENG Yun-long¹, ZHANG Min¹, YI Shou-jun^{1,2},

HE Pan¹, ZHAO Min¹, XIA Xiao-dong¹, TANG Chun-ran¹

(1 Key Laboratory of Theoretical Organic Chemistry and Functional Molecule, Ministry of Education, Hunan Province Key Laboratory of Controllable Preparation and Function Application of Fine Polymer, School of Chemistry and Chemical Engineering of Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, Hunan 411201, China)

(2 School of Materials Science and Engineering of Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, Hunan 411201, China)

Abstract: A fluorescent aptasensor was developed and applied to detect aflatoxin B1 based on Au@Fe₃O₄/aptamers/aminofunctioned carbon quantum dots magnetic nanocomposites which were constructed self-assembly. The selective interactions between aflatoxin B1 and the aptamer in the samples cause release of the aminofunctioned carbon quantum dots which remains in the solution after magnetic separation. A linear fluorescence signal response to aflatoxin B1 concentration is obtained over a wide aflatoxin B1 concentration range of 0.001~1.00 ng/mL with a detection limit of 0.3 pg/mL, and the correlation coefficient is 0.996 4. The performances of the fluorescent sensor are significantly improved as the background fluorescence is effectively removed by magnetic separation.

Key words: Fluorescent sensor; Trace analysis; Detection of aflatoxin B1; Magnetic separation; Aptamers; Aminofunctioned carbon quantum dots

OCIS Codes: 280.1415; 230.0040; 230.0250; 260.2510; 300.6280

0 引言

碳量子点具有优异的光学特性和很好的生物相容性, 同时还具有碳源来源广、制备方法简单、成本低廉、

基金项目: 国家自然科学基金(No. 21475040)资助

第一作者: 曾云龙(1955—), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为量子点荧光材料合成及其在化学生物传感中的应用. Email: yunlongzeng1955@126.com

收稿日期: 2018-05-25; 录用日期: 2018-08-31

<http://www.photon.ac.cn>

环境生物毒性低等突出优点,广泛应用于生命科学、环境科学、以及成像和化学生物传感领域^[1-3].量子点荧光受其表面特性和环境条件影响.量子点发生团聚、或其表面电荷发生改变、或其能量发生转移,都能使其荧光强度发生改变(荧光猝灭与荧光恢复).量子点的这一特性已在化学生物传感领域中得到广泛应用^[4-6].该方法具有操作简单、快速、条件易于控制等优点,不足之处是荧光猝灭不够完全.体系的背景荧光高,严重影响检测方法的灵敏性,限制了该方法的应用范围.因此希望荧光能完全猝灭,但在实际中,荧光猝灭程度通常小于50%,很难达到理想的70%以上. Fe_3O_4 纳米颗粒具有很好的顺磁性和大的表面积,广泛应用于环境痕量物质的分离、富集与药物筛选和食品安全检测^[7-9].同样,若将量子点与磁性纳米粒子结合,使其荧光猝灭(或恢复),在荧光猝灭-恢复体系中,就能将处于不同状态(猝灭状态、恢复状态)的量子点分离,能有效地消除背景荧光的干扰.

粮油作物在生长、收获和贮存中极易受真菌黄曲霉等污染霉变,并留下其代谢物黄曲霉毒素,尤其是黄曲霉毒素 B1(Aflatoxin B1, AFB1). AFB1 毒性强,是已知的最强致癌物之一,也是引起食品安全事故的重要因素. AFB1 残存量通常非常低,对其检测需要高灵敏、高选择性方法.目前 AFB1 的检测方法主要有色谱/质谱法、高效液相色谱法、免疫法等^[10-12].这些方法通常需要进行繁琐的试样制备,所用仪器设备昂贵,技术要求高,试剂易失活,检测成本高,难于推广.核酸适体(Apt)具有高特异性识别与结合功能,使得试样处理大为简化.与免疫试剂相比,核酸适体稳定性高、成本低廉,被广泛地用于食品药品分析、环境检测、药物筛选等领域^[13-15].本文综合利用核酸适体的高特异性、碳量子点优异的荧光特性、磁性 Fe_3O_4 颗粒易于分离等优势,提出高灵敏磁分离荧光传感检测 AFB1 的方法.

1 实验

1.1 主要试剂和仪器

实验用的巯基修饰的 AFB1 核酸适体序列为 HS-AAA AAA GTT GGG CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG TGC CCT TCG CTA GGC CCA CA^[16](生工生物工程(上海)股份有限公司).主要试剂有:用于标准曲线和回收率实验的黄曲霉毒素 B1(AFB1)、用于选择性实验的黄曲霉毒素 B2(AFB2)、黄曲霉毒素 G1(AFG1)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)、伏马毒素 B1(Fumonisin B1, FB1)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)和玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)(北京华安麦科生物技术有限公司);用于制备金纳米粒子(AuNPs)的柠檬酸三钠和氯金酸、制备氨基碳量子点(N-Carbon Quantum Dots, N-CQDs)用的葡萄糖和乙二胺、配制缓冲溶液用的酒石酸、HCl、磷酸二氢钠和磷酸氢二钾、以及用于活化 DNA 的三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)等均为分析纯(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);顺磁性 $\text{Au}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子($\text{Au}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs, $d = 100 \text{ nm}$, 西安瑞禧生物科技有限公司).金纳米粒子按文献^[17]方法以柠檬酸还原氯金酸制备,其浓度按文献^[18]测得为 2.4 nmol/L ;各种茶籽油均购自本市超市.实验用水为二次蒸馏水.实验仪器为 RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司).

1.2 氨基碳量子点的制备

氨基碳量子点按文献^[19]方法合成:取葡萄糖 0.5 g 用 20 mL 水溶解,再加 0.25 mL 乙二胺,搅拌 10 min,然后置于水热反应釜中,在 $200 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温下反应 8 h,取出自然冷却至室温,过滤、离心除去大颗粒,得到氨基修饰的碳量子点,按葡萄糖(碳)计,浓度为 10 mg/mL .

1.3 $\text{Au}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs/Apt 的制备

先将巯基 AFB1 核酸适体用 10 mmol/L TCEP(DNA:TCEP=1:5)活化 1 h,得到活化的 DNA.然后将活化的 DNA 与 $\text{Au}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs 混合,再加入 0.50 mol/L 、pH 为 3.0 的酒石酸-HCl 缓冲溶液,在室温下轻摇孵化 30 min,磁性分离,用 pH 为 7.0 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)在超声下清洗 5 次,再将沉淀物分散至水中,即得到 $\text{Au}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs/Apt 复合物分散液, 4°C 下避光保存备用.

1.4 AFB1 分析程序

取 $\text{Au}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs/Apt 分散溶液 0.25 mL 置于 2 mL 离心管中,加入 5 mg/mL N-CQDs、 10 mmol/L PBS (pH 7.0)溶液,混匀,轻摇 5 min,放置 30 min,磁性分离,用 PBS 溶液洗涤 5 次,再分散到 pH 为 7.0 的 PBS 溶液中,即得到 $\text{Au}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs/Apt/N-CQDs 荧光传感体系分散液.然后依次向 $\text{Au}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs/Apt/N-CQDs 分散液中加入不同浓度的 AFB1 混匀,孵育 6 min,磁性分离,取溶液测定荧光强度,在同样条

件下做空白试验,依据荧光强度变化实现 AFB1 定量检测.所有的光谱测定都在室温下 10 mmol/L PBS (pH 7.0)中进行,以氙灯为光源,在激发波长 472 nm 下测定荧光发射光谱.所得数据均为 3 次测定平均值.

1.5 山茶籽油中 AFB1 分析

取中山茶籽油样品 5 mL,加入 70 % 甲醇溶液 50 mL,搅拌 10 min,再超声 30 min,离心 5 min(离心速度 6000 r/min),吸取上层清液 10 mL,用水稀释至 20 mL,摇匀,即得试样溶液.

取试样溶液适量置于 Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 荧光传感体系分散液中,混匀,再加入 PBS 缓冲溶液,摇匀,孵化 6 min,磁性分离,取溶液测定荧光强度,确定试样中 AFB1 含量.

2 结果与讨论

2.1 N-CQDs 荧光特性

图 1 是 N-CQDs 的最大荧光激发和发射光谱曲线.从图 1 可知,在 472 nm 激发下,最大发射波长为 543 nm;荧光发射光谱的半峰宽为 87 nm,表明碳量子点的粒径分布较窄;以罗丹明 6G 为标准物(量子效率 QY=95%),按文献[20]方法测定和计算,可得制备的 N-CQDs 荧光量子效率为 19.3%.表明所制备的碳量子点具有优异的荧光特性和高荧光量子效率,可满足构建高灵敏荧光传感器应用的要求.

2.2 磁性纳米金核酸适体传感体系条件优化

研究了 Apt 用量对检测体系荧光强度的影响.在向 40 μg/mL Au@Fe₃O₄ 酒石酸-HCl(pH 3.0)体系中,加入 Apt 孵育 30 min,磁性分离,用 pH 为 7.0 的 PBS 溶液洗涤 3 次,去除未结合的 Apt;然后加入过量 N-CQDs,自组装 1 h 后磁性分离,去除过剩的 N-CQDs,加入 AFB1 溶液孵育 6 min,磁性分离,测定溶液荧光强度,结果见图 2.试验表明,10 μg/mL Au@Fe₃O₄ 体系中,AFB1 核酸适体用量在 30 至 60 nmol/L 范围,荧光强度迅速增强,其用量达到 60 nmol/L 时,荧光强度最强,随后下降.这可能是由于 Apt 带负电荷、N-CQDs 带正电荷所致,当 AFB1 与复合物 Au@Fe₃O₄/Apt/N-CQDs 中的 Apt 反应生成 Au@Fe₃O₄/Apt-AFB1,释放出 N-CQDs,使复合物带负电荷.这时,溶液中的 N-CQDs 受到带负电荷的复合物的静电吸引作用、复合物表面上邻近 Apt/N-CQDs 的 N-CQDs 静电排斥作用和空间位阻效应的影响.Apt 用量小,复合物表面的 Apt(Apt/N-CQDs)之间距离大,空间位阻可以忽略,N-CQDs 受到的静电斥力小,主要呈现复合物的静电吸引作用,被复合物吸附的 N-CQDs 量较大,溶液荧光较弱;随着 Apt 用量增大,复合物表面 Apt(Apt/N-CQDs)之间的距离变小,静电排斥力增大,被复合物吸附的 N-CQDs 量降低,溶液荧光增强;当 Apt 用量达到 60 nmol/L 时,溶液的荧光强度最强.再继续增大 Apt 的用量,复合物表面上 Apt(Apt/N-CQDs)

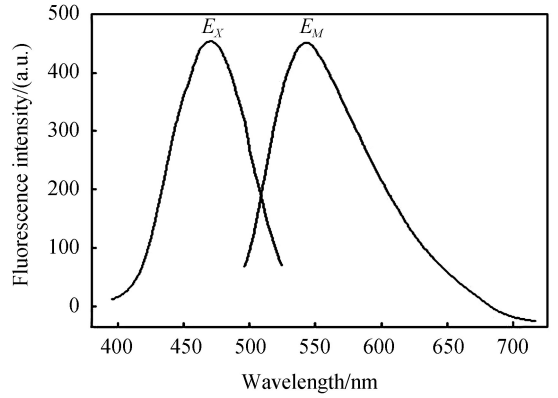


图 1 N-CQDs 的荧光激发和发射光谱

Fig.1 Fluorescence excitation and emission spectra of N-CQDs

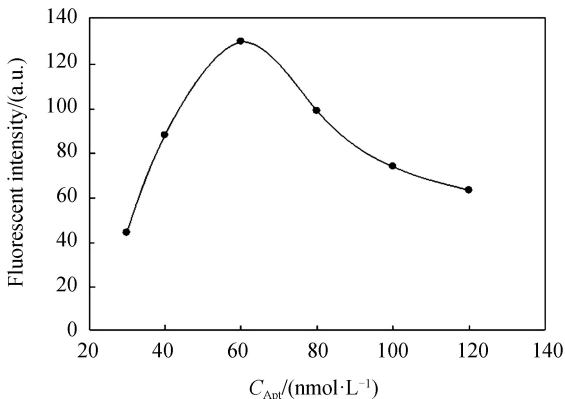


图 2 核酸适体用量对溶液荧光强度的影响

Fig.2 Influence of the amount of aptamer on fluorescence intensity in the solution

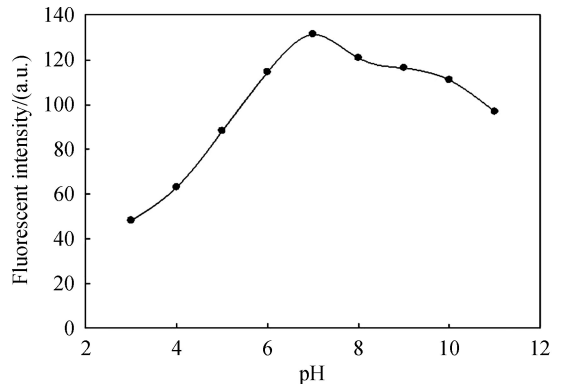


图 3 pH 对体系荧光强度的影响

Fig.3 Influence of pH on fluorescence intensity of the system

之间的距离越来越小,从而呈现明显的空间位阻效应,阻止 N-CQDs 进入溶液,空间位阻效应与静电力作用的结果使荧光强度减弱.故在后续试验中,每 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Au@Fe₃O₄ 的 Apt 用量为 60 nmol/L.

在 pH 为 3.0~11.0 范围内,研究了 pH 对测试体系荧光强度的影响,结果如图 3 所示.在 pH 为 3.0~7.0 时,体系荧光强度随 pH 升高而成线性增强,当溶液 pH 升至 7.0 时荧光强度达到最大值,之后随 pH 的增大呈现逐渐降低趋势.测定体系荧光强度呈现这一现象是因为 N-CQDs 表面氨基对 H⁺ 敏感.在酸性环境中, N-CQDs 接受质子,引起荧光猝灭,其荧光强度降低;在酸性环境时,溶液 pH 值升高,酸度降低,溶液中 H⁺ 浓度降低, N-CQDs 荧光猝灭程度降低,荧光强度增强.当 pH 大于 7.0 时,荧光强度逐渐下降,这可能是在碱性环境中, N-CQDs 表面氨基间可以互相作用形成氢键团聚,发生荧光猝灭而使荧光强度降低.

由于 pH 为 7.0 时荧光强度最大,在后续试验中,以 PBS 溶液控制测试体系 pH 值为 7.0.

在室温下,考察了孵育时间对测试体系荧光强度的影响,结果如图 4 所示.从图 4 可见,孵化开始后,体系荧光强度迅速增强,孵化时间达到 5 min 后,体系荧光强度已基本恒定,并能维持 1 h 不变.试验表明,核酸适体与 AFB1 毒素之间迅速发生特异性反应并释放出 N-CQDs,可满足快速检测要求.同时考虑到检测试验的可重现性,孵化时间确定为 6 min.试验了 Au@Fe₃O₄ NPs/Apt/N-CQDs 传感体系对一些其它真菌毒素的响应情况,其中 AFB1 浓度为 1.0 ng/mL,其余真菌毒素(AFB2, DON, FB1, OTA 和 ZEN 等)的浓度为 10 ng/mL,结果见图 5.从图 5 可知,所构建的 AFB1 核酸适体传感体系具有高特异性,对其它真菌毒素无明显干扰.

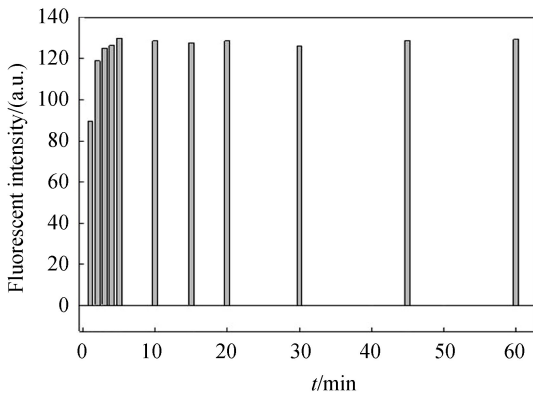


图 4 孵育时间对体系荧光的影响

Fig.4 Influence of incubation time on fluorescence intensity of the system

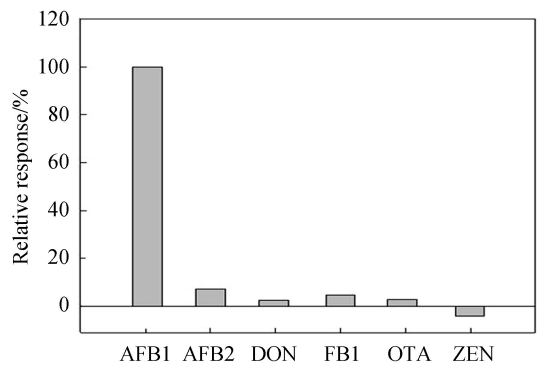


图 5 核酸适体传感分析的选择性

Fig.5 Selectivity of the aptasensor assay

2.3 工作曲线

金纳米粒子具有强烈的荧光猝灭作用^[21].依次将 Apt、N-CQDs 在 AuNPs 表面自组装形成 AuNPs/Apt/N-CQDs 复合物体系.该体系中, N-CQDs 受到 AuNPs 作用,发生荧光猝灭现象,其荧光猝灭程度为 44.6%(见附录).本工作研究 Au@Fe₃O₄ NPs/Apt/N-CQDs 体系和 AuNPs/Apt/N-CQDs 体系检测 AFB1 的情况.

取 Au@Fe₃O₄ NPs/Apt/N-CQDs 分散液适量,用 pH 为 7.0、浓度为 10 mmol/L 的 PBS 溶液稀释至 2 mL,然后向体系中加入不同浓度的 AFB1 标准溶液孵化 5 min,磁分离,测定溶液荧光强度,记为 F ;以 PBS 缓冲溶液代替 AFB1 溶液(做空白试验)孵化 5 min,磁分离,测定溶液荧光强度,记为 F_0 ,试验结果如图 6(a)所示.经磁分离后的溶液荧光强度随着 AFB1 的浓度增大而迅速增强;浓度在 0.001~1.0 ng/mL 范围内呈现出良好的线性关系,其线性方程为

$$(F - F_0) / F_0 = (11.39 \pm 0.19) C + (0.580 \pm 0.052)$$

式中, C 为 AFB1 的浓度,单位为 ng/mL.线性相关系数 R^2 为 0.996 4,方法检出限按 3 倍标准偏差与斜率 ($3\sigma/k$) 的比值计算为 0.000 3 ng/mL.

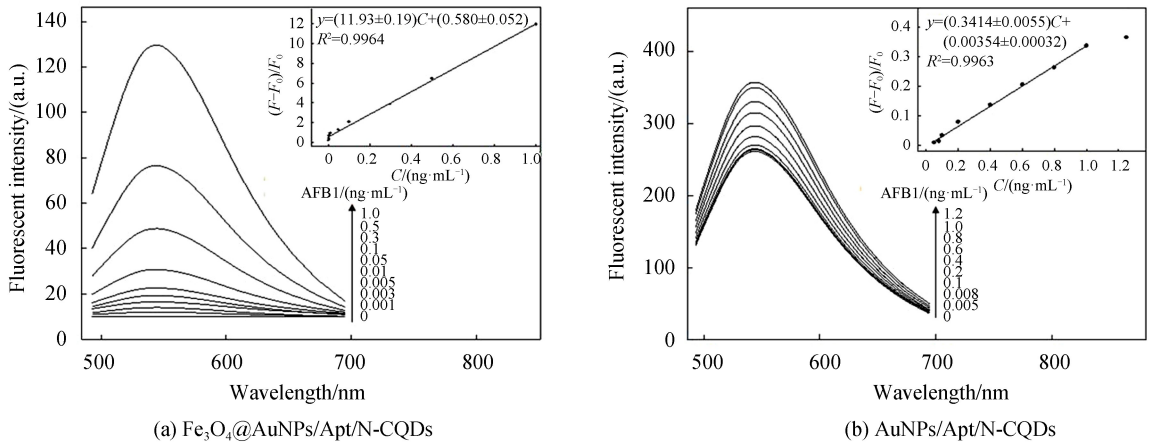


图6 体系的荧光强度随 AFB1 浓度的变化情况以及 $(F-F_0)/F_0$ 与 AFB1 浓度的线性关系

Fig.6 Dependence of FL intensity on the concentration of AFB1, insets show the linear relationship between $(F-F_0)/F_0$ and AFB1 concentration

作为对照,在 AuNPs/Apt/N-CQDs 体系优化分析条件下(见附录),研究了基于 AuNPs/Apt/N-CQDs 体系检测 AFB1 的情况.取 0.1 mL AuNPs/Apt/N-CQDs 分散液适量,用 pH 为 7.0、浓度为 10 mM 的 PBS 溶液稀释至 2 mL,测定体系的荧光强度,记为 F_0 ;再加入不同浓度的 AFB1 标准溶液孵化 5 min,测定其荧光,记为 F ;体系荧光恢复程度为 $F-F_0$.试验结果如图 6 (b)所示,体系的荧光强度随着 AFB1 的浓度增大而增强;浓度在 0.05~1.0 ng/mL 范围内呈现出良好的线性关系,其线性回归方程为

$$(F-F_0)/F_0 = (0.3414 \pm 0.0055)C + (-0.00354 \pm 0.00032)$$

线性相关系数 R^2 为 0.9963,方法检出限($3\sigma/k$)为 0.04 ng/mL.

Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 荧光传感体系中,没有 AFB1 时,复合物不能释放出 N-CQDs,经磁性分离后,溶液无荧光发射;溶液中有 AFB1 存在时,Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 复合物中 Apt 对 AFB1 呈现高特异性识别并与其结合,同时释放出 N-CQDs,经磁性分离后,Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 被分离出去,复合物所释放的 N-CQDs 留在溶液中,溶液在 472 nm 波长的光激发下发射荧光.从图 6 可以观察到,Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 体系的背景荧光很低(10.4 a.u.),且为一直线,表明磁分离很完全,消除了背景荧光;而 AuNPs/Apt/N-CQDs 体系有很强的背景荧光(261 a.u.).

在 AuNPs-Apt-N-CQDs 体系中,AFB1 的检测线性范围为 0.05~1.0 ng/mL,检测限为 0.04 ng/mL;在 Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 体系,AFB1 的检测线性范围为 0.001~1.0 ng/mL,检测限为 0.0003 ng/mL.由于 Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 体系消除了背景荧光影响,线性检测范围显著扩大,检测限大大降低,适用于更低浓度样品的分析;同时,Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 体系的线性方程的斜率为 11.39,是 AuNPs-Apt/N-CQDs 体系的线性方程的斜率的 33.36 倍,检测灵敏性得到显著提高.因此,应用磁性分离方法消除了背景荧光,提高了传感器性能,使荧光猝灭程度不高的体系也能满足荧光传感器设计的要求,大大拓展了应用范围.

研究表明降低线性方程式荧光项 $(F-F_0)/F_0$ 中的 F_0 值,能有效提高方法的灵敏性,扩大线性检测范围并减小检测限.在实际工作中,采用分离除去测试体系中的背景荧光物质,用试剂空白溶液进行仪器基线校准等方法,可以有效地降低 F_0 值.

2.4 食用油中 AFB1 测定

将所构建的核酸适体传感体系应用于 12 个冷榨茶油样品、15 个物理压榨茶油样品中的 AFB1 测定.2 个冷榨茶油、5 个物理压榨茶油中检出 AFB1.检出 AFB1 的样品中黄曲霉毒素 B1 含量(3 次测定的结果)见表 1.表中 1 号和 2 号山茶籽油为冷榨山茶籽油样品,其余为物理压榨山茶籽油样品.

表 1 山茶籽油中 AFB1 的检测
Table 1 Detection of AFB1 in camellia seed oil

Camellia seed oil samples	Fund/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Added/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Fund/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Recovery/%	Relative standard deviations/%
1	0.12	0.015	0.028	106.7	3.8
2	0.008	0.015	0.024	106.7	4.2
3	0.086	0.15	0.24	102.7	3.3
4	0.97	1.50	2.55	105.3	2.8
5	1.73	1.50	3.28	103.3	2.2
6	1.25	1.50	2.70	96.7	2.6
7	0.47	0.50	0.99	104.0	2.9

从表 1 可知,冷榨山茶籽油中 AFB1 残存量很低,分别为 0.012 和 0.008 mg/kg;物理压榨的山茶籽油中,AFB1 残存量要高一些,最高残存量为 1.73 mg/kg,仍然大大低于国家标准的其它油类 AFB1 允许含量(10 mg/kg)。从表 1 还可知,该方法测定 AFB1 的回收率和相对标准偏差都较好,同时有低的检测限和高的检测灵敏性,能满足 AFB1 检测的要求。

3 结论

以磁性纳米金核酸适体复合物构建了荧光传感器,实现山茶籽油中痕量 AFB1 的高特异性和高灵敏检测。研究结果表明,将荧光猝灭程度不高的体系设计成磁分离荧光传感器,通过磁分离方法,可以方便地将磁性纳米金核酸适体复合物与荧光量子点 N-CQDs 完全分离,即将荧光猝灭体系的复合物从与荧光恢复体系荧光的量子点溶液中完全分离除去,有效地消除了背景荧光,显著提高了传感法检测灵敏性,扩展了可供荧光传感器设计、研究与应用的荧光材料和体系,在环境检测、食品安全等领域具有应用潜力。

参考文献

- [1] SU A M, NHONG Q M, WANG Y L, *et al.* Preparation of carbon quantum dots from cigarette filters and its application for fluorescence detection of Sudan I[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, **1023**: 115-120.
- [2] GORYACHEVA I YU, SAPEL'KIN A V, SUKHORUKOV G B. Carbon nanodots: Mechanisms of photoluminescence and principles of application[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2017, **90**: 27-37.
- [3] ZHAO Z H, ZHANG J Q, WANG Y T, *et al.* Hydrothermal synthesis of fluorescent nitrogen-doped carbon quantum dots from ascorbic acid and valine for selective determination of picric acid in water samples[J]. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2016, **96**: 1402-1413.
- [4] LI Y, SHI F P, CAI N, *et al.* A biosensing platform for sensitive detection of concanavalin A based on fluorescence resonance energy transfer from CdTe quantum dots to graphene oxide[J]. *New Journal of Chemistry*, 2015, **39**: 6092-6098.
- [5] YUAN Y S, ZHAO X, QIAO M, *et al.* Determination of sunset yellow in soft drinks based on fluorescence quenching of carbon dots[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, **167**: 106-110.
- [6] SUN X C, LEI Y. Fluorescent carbon dots and their sensing applications[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2017, **89**: 163-180.
- [7] HOLA K, MARKOVA Z, ZOPPELLARO G, *et al.* Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, **33**: 1162-1176.
- [8] Rocha-Santos T A P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, **62**: 28-36.
- [9] HE J C, HUANG M Y, WANG D M, *et al.* Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, **101**: 84-101.
- [10] LIU L, JIN H, SUN L, *et al.* Determination of aflatoxins in medicinal herbs by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Phytochemical Analysis*, 2012, **23**(5): 469-476.
- [11] WEN J, KONG W J, HU Y C, *et al.* Multi-mycotoxins analysis in ginger and related products by UHPLC-FLR detection and LC-MS/MS confirmation [J]. *Food Control*, 2014, **43**(8): 82-87.
- [12] PAEK S H, LEE S H, CHO J H, *et al.* Development of rapid one-step immuno-chromatographic assay[J]. *Methods*, 2000, **22**(1): 53-60.
- [13] VAHID N, AMMAR C, ALI B, *et al.* Ultrasensitive aflatoxin B1 assay based on FRET from aptamer labelled fluorescent polymer dots to silver nanoparticles labeled with complementary DNA[J]. *Microchimica Acta*, 2017, **184**:

4655-4662.

- [14] WANG B, CHEN Y, WU Y, *et al.* Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB1[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, **78**: 23-30.
- [15] JIANG Li-ying, ZHOU Peng-lei, XIAO Xiao-nan, *et al.* Fluorescent aptamer biosensor for the detection of dopamine with graphene oxide[J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2016, **37**(7): 881-886.
姜利英, 周鹏磊, 肖小楠, 等. 基于氧化石墨烯荧光适配体传感器的多巴胺检测[J]. *发光学报*, 2016, **37**(7): 881-886.
- [16] WANG B, CHEN Y F, WU Y Y, *et al.* Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB1[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, **78**: 23-30.
- [17] WANG B, ZHU Q K, LIAO D L, *et al.* Perylene probe induced gold nanoparticle aggregation[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, **21**: 4821- 826.
- [18] JIN R C, WU G S, LI Z, *et al.* What controls the melting properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**: 1643-1654.
- [19] WANG C, HU T T, WEN Z Q, *et al.* Concentration-dependent color tunability of nitrogen-doped carbon dots and their application for iron(III) detection and multicolor bioimaging[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018, **521**: 33-41.
- [20] GRABOLLE M, SPIELES M, LESNYAK V, *et al.* Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: suitable procedures and achievable uncertainties[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, **81**: 6285-6294.
- [21] SAHA K, AGASTI S S, KIM C Y, *et al.* Gold nanoparticles in chemical and biological sensing[J]. *Chemical Reviews*, 2012, **112**: 2739-2779.

附录

1 AuNPs/Apt/N-CQDs 体系中, N-CQDs 的荧光猝灭率为 44.6%

N-CQDs 的荧光发射光谱曲线和在复合物 AuNPs/Apt/N-CQDs 中荧光猝灭后的荧光发射光谱曲线。由图 S1 可知, 当 N-CQDs 形成 AuNPs/Apt/N-CQDs 复合物后, 由于 AuNPs 强烈的荧光猝灭作用, AuNPs/Apt/N-CQDs 体系荧光发生明显猝灭。从 471.0 降到 260.9, 猝灭率 $(471.0 - 260.9) / 471.0 = 44.6\%$ 。

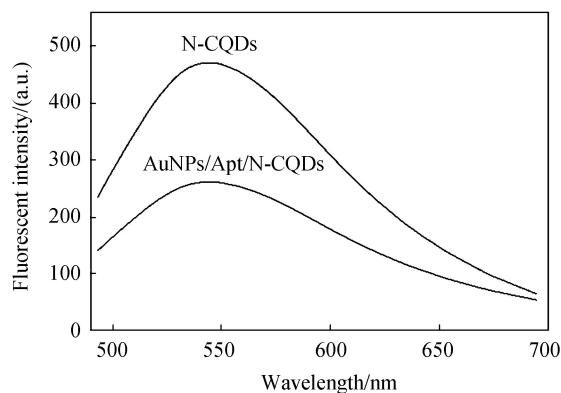


图 S1 N-CQDs 和 AuNPs/Apt/N-CQDs 的荧光发射光谱曲线

Fig.S1 Fluorescence emission spectra of N-CQDs and AuNPs/Apt/N-CQDs

2 AuNPs/Apt/N-CQDs 荧光传感及检测条件优化

1) Apt 的用量

研究了 Apt 与 AuNPs 摩尔用量比对荧光猝灭的影响, 结果见图 S2。由图可知, 最大荧光猝灭发生在 Apt:AuNPs(摩尔比)180 处, 最大猝灭率为 44.6%。同时, 研究还显示荧光猝灭与荧光恢复非常类似, 也即荧光猝灭程度越大, 荧光恢复程度也越高。Apt 用量为 AuNPs 的 180 倍最佳, 后续试验选用 Apt:AuNPs 为 180。

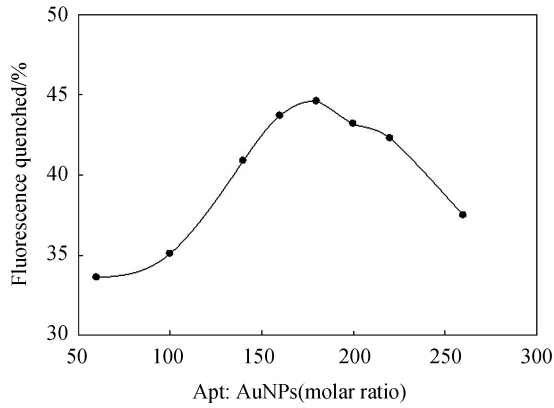


图 S2 Apt : AuNPs 比(摩尔比)对荧光猝灭的影响

Fig.S2 Influence of the molar ratio between Apt and AuNPs on fluorescence quenched

2) 最适宜 pH 值

在 pH 4.0 ~ 9.0 范围内, AFB1 浓度为 0.8 ng/mL, 研究了 pH 对测试体系荧光恢复影响. 结果见图 S3. 由图可知, AuNPs/Apt/N-CQDs 荧光传感体系检测 AFB1 最适宜的酸度为 pH 7.0, 即在中性溶液中进行. 与 Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 体系的一致.

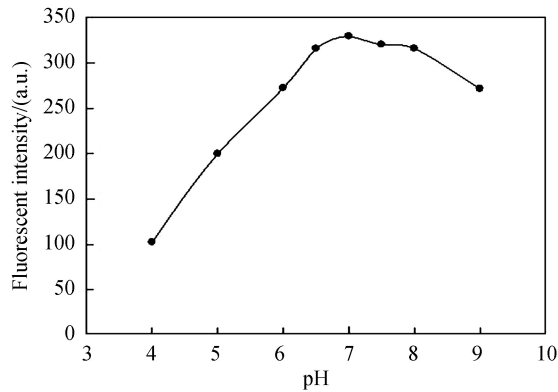


图 S3 pH 对荧光强度的影响

Fig.S3 Influence of pH on fluorescence intensity of the system

3) 孵育时间

研究显示, AuNPs/Apt/N-CQDs 与 Au@Fe₃O₄NPs/Apt/N-CQDs 体系的一致孵育时间一致, 故孵育时间选用 6 min.

Foundation item: The National Nature Science Foundation of China (No.21475040)

引用格式: ZENG Yun-long, ZHANG Min, YI Shou-jun, *et al.* Magnetic Separation Fluorescent Sensor for Highly Sensitive Detection of Aflatoxin B1[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2018, **47**(11): 1128001

曾云龙, 张敏, 易守军, 等. 高灵敏磁分离荧光传感法检测黄曲霉毒素 B1[J]. 光子学报, 2018, **47**(11): 1128001