

文章编号: 1005-5630(2021)01-0069-07

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.2021.01.011

用于黄曲霉素 B1 检测的表面增强型 荧光光学传感器

陈海虹, 张 玲

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

摘要: 黄曲霉素 B1 (aflatoxin B1, AFB1) 是一种常见于农作物中的真菌毒素, 是所有真菌毒素中毒性最强且具有致癌性。因此, 快速、有效地检测出食品中 AFB1 对于食品安全来说具有重要意义。设计了一种基于表面增强荧光 (surface-enhanced fluorescence, SEF) 技术的光学芯片用于 AFB1 灵敏检测。该光学芯片以纳米多孔金 (nanoporous gold, NPG) 作为荧光增强基底, 通过在其表面先后组装适体 SH-DNA2 和互补适体 Cy5-DNA1 构建针对 AFB1 的功能芯片。该芯片利用 AFB1 和 Cy5-DNA1 与 SH-DNA2 之间竞争结合, 释放 Cy5-DNA1 引发来自 Cy5 荧光信号的衰减, 通过监测 Cy5 的荧光强度的变化实现对 AFB1 的检测, 检测极限可达到 10^{-7} $\mu\text{g/L}$ 且线性动态范围有 4 个量级。

关键词: 表面增强荧光; 黄曲霉素 B1; 纳米多孔金; 核酸适配体
中图分类号: O 433.1 **文献标志码:** A

A surface-enhanced fluorescent sensor for sensitive detection of aflatoxin B1

CHEN Haihong, ZHANG Ling

(School of Optical-Electrical and computer Engineering, University of Shanghai for
science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Aflatoxin B1 (AFB1) is a fungal toxin common in crops and it is the most toxic of all mycotoxins which can cause cancer. Thus, quick and effective detection of AFB1 is important for food security. Here, a simple and sensitive optical sensor based on surface-enhanced fluorescence (SEF) technique was designed to detect AFB1. We used nanoporous gold (NPG) as the substrate. The AFB1 aptamer (Cy5-DNA1) and AFB1 complementary aptamer (SH-DNA2) were successively assembled on the surface of NPG to form the optical sensor for AFB1. Competitive binding between AFB1 and Cy5-DNA1 released Cy5-DNA1 from NPG, leading fluorescence intensity of Cy5 to fall. AFB1 was detected by monitoring the variation of the fluorescence

收稿日期: 2020-05-05

基金项目: 国家自然科学基金(61675133、61875126); 上海市自然科学基金(17ZR1447500)

作者简介: 陈海虹(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为灵敏光谱检测。E-mail: haihongchen1994@163.com

通信作者: 张 玲(1981—), 女, 教授, 研究方向为纳米结构材料及灵敏光谱检测。E-mail: lzhang@usst.edu.cn

intensity of Cy5 and the final detection limit was 10^{-7} $\mu\text{g/L}$ with a linear dynamic range 4 orders of magnitude.

Keywords: surface-enhanced fluorescence; aflatoxin B1; nanoporous gold; aptamer

引 言

在湿热的环境中, 农副产品及动物饲料的表面极易产生霉菌。霉菌的次生代谢产物是真菌毒素, 黄曲霉素 B1(aflatoxin B1, AFB1)作为真菌毒素的一种, 它的毒性最强且具有强致癌性, 严重影响人体健康^[1-4]。为了防止对动物和人体产生负面影响, 许多国家规定了饲料和农副产品中 AFB1 的含量。欧盟规定直接供人类食用的食物中 AFB1 含量不得超过 2 $\mu\text{g/kg}$, 日本规定不得超过 10 $\mu\text{g/kg}$, 中国规定不得超过 20 $\mu\text{g/kg}$ 。因此, 针对微量 AFB1 的检测对于公共卫生及食品安全至关重要。

目前, 常规的 AFB1 检测方法主要有高效液相色谱法 (high-performance liquid chromatography, HPLC)^[5], 液相色谱/质谱法 (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS)^[6], 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[7] 和电化学法 (electrochemical method, EM)^[8] 等。以上几种检测分析方法, 灵敏度较高, 重复性较好, 但是处理样品的手段相对较繁琐, 并且需要昂贵的仪器和专业的检测人员操作, 因此需要开发一种便捷、灵敏、经济的检测方式。表面增强荧光 (surface-enhanced fluorescence, SEF) 是利用金属纳米颗粒和纳米结构金属薄膜等纳米金属材料在光的激发下产生局域表面等离子体共振来提高荧光团的发光效率。它被广泛应用于生物传感^[9]、医学成像^[10] 及光电子器件^[11] 等领域。纳米多孔金 (nanoporous gold, NPG) 是一种新型的纳米金属材料, 在三维结构上具有双连续贯通无序的纳米网状孔结构。与其他金属纳米结构比较, 它具有高比表面积, 高活性位点, 结构尺寸连续可调并且稳定性较好^[12-13]。正是由于它的特殊结构, 使得其在受到光激发时可以产生比较强的局域电磁场, 从而提高荧光团发光效率。

利用纳米多孔金作为荧光增强基底进行

AFB1 检测, 将标记有花氰素 (Cy5) 的核酸适体 DNA1 与另一条与 DNA1 互补的核酸适体 DNA2 共同组装在 NPG 表面, 形成功能化的检测芯片。通过 AFB1 与 DNA1 竞争结合导致的 Cy5 荧光信号强度的变化实现对黄曲霉素 B1 的痕量检测, 检测极限高达 10^{-7} $\mu\text{g/L}$, 并且基底表现出 4 个量级的动态响应范围, 可用于 AFB1 的定性定量检测。

1 实验原理

利用 Cy5 标记的 AFB1 适配体即在 3'端修饰一个 Cy5 分子 (5'-GTTGG GCA CGT GTT GTC TCT CTG TGT CTC GTG CCC TTC GCT AGG CCC-3'-cy5, Cy5-DNA1) 和在 5'端修饰硫醇键的 (SH-5'-CAGAGAGACAACACGTGCCCAA C-3', SH-DNA2)^[14] AFB1 互补适配体, 开发了一种新型的基于 NPG 的表面增强荧光传感器用于 AFB1 检测 (见图 1)。金和硫醇间存在特殊的化学键, 因而在 NPG 表面可以固定大量的 SH-DNA2。根据碱基配对原则, Cy5 标记的 DNA1 将与 DNA2 形成核酸双链, 依附在 NPG 表面。未加入 AFB1 状态下, 基于 NPG 局域电磁场增强特性, 可得到来自荧光标记分子 Cy5 较强的荧光信号; 加入 AFB1 分子后, 由于 AFB1 与 DNA1 序列存在竞争结合 DNA2 的特性, 导致 DNA1 与 DNA2 之间的键合断裂, 而 AFB1 与 DNA2 键合留于 NPG 表面, 随着 AFB1 量的增加, 位于 NPG 表面的 Cy5 标记的 DNA1 逐渐减少, 导致来自 Cy5 的荧光信号减弱。因此, 通过测量 Cy5 的荧光强度可间接判断溶液中 AFB1 的质量浓度。

2 实验步骤

2.1 多孔金基底制备

实验所用的多孔金基底采用一步脱合金法制

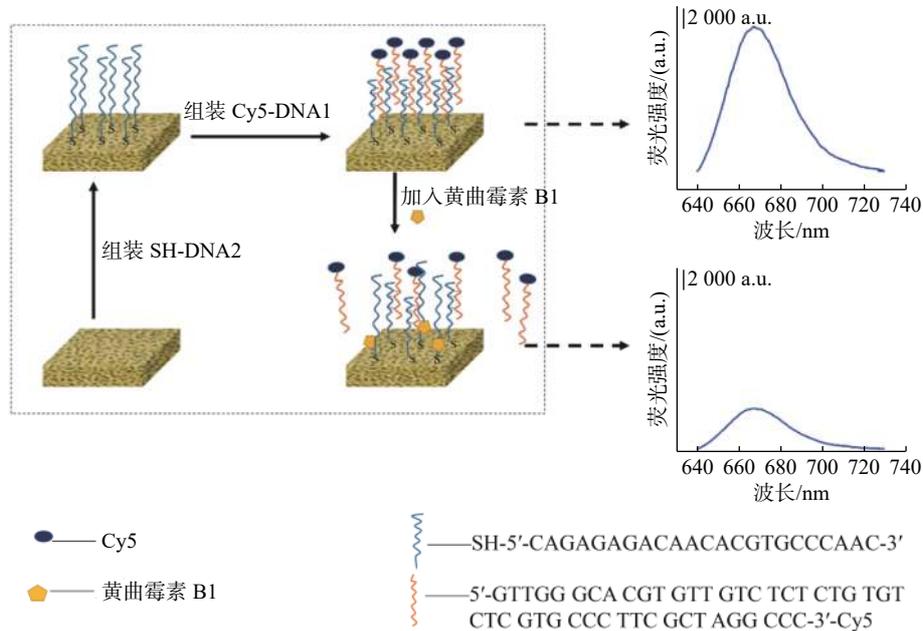


图 1 AFB1 光学检测芯片原理图

Fig. 1 The schematic diagram of the optical sensor of AFB1

备。根据金属在酸中的活泼性差异, 将金银合金浸泡在浓硝酸溶液中, Ag 原子被选择性腐蚀后以离子形式融入硝酸, 残留的 Au 原子经过自由扩散组装成具有连续韧带和孔洞的纳米网状结构。其韧带和孔洞大小可通过控制前躯体合金成分、腐蚀电位、脱合金时间及后期退火进行调控。实验采用 100 nm 厚的 $\text{Ag}_{65}\text{Au}_{35}$ (原子百分比为 Ag65%, Au35%) 薄膜为前躯体, 在室温下使用 65% 浓硝酸进行自由脱合金反应, 通过控制脱合金时间得到不同孔径的 NPG 薄膜, 然后将 NPG 薄膜反复浸泡在超纯水中清洗多次以去除残留的酸液。最后将 NPG 固定在塑料基板 (polymer) 上干燥备用。

2.2 多孔金基底表面功能化

制作用于 AFB1 检测的生物传感器通过在 4℃ 环境中, 将 NPG 薄膜先后浸泡在 10 mol/L SH-DNA2 磷酸缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 和 20 mol/L Cy5-DNA1 PBS 中各 12 h 进行功能化处理 (见图 1)。利用硫醇键将 DNA2 固定在 NPG 表面, 然后通过浸泡使 DNA1 与 DNA2 之间形成双螺旋结构, 共同组装在多孔金表面, 形成功能化的基底。将已经修饰好的基底取出, 在去离子水中反复浸泡, 清洗掉游离态的核酸适

配子, 放在 PBS 中 4℃ 保存待测。

2.3 荧光光谱采集

采用 Nikon 显微镜和上海复享 NOVA 制冷型光谱仪进行荧光光谱检测, 测试系统及测试方法如图 2 所示。在荧光光谱检测过程中, 将光学基底置于磷酸缓冲溶液 (PBS, pH=7.4) 中保持 DNA 的活性。通过滴加不同质量浓度的 AFB1 溶液来改变测试环境中的 AFB1 浓度。由于荧光标记分子 Cy5 在可见光波段的吸收峰值位于 650 nm 左右^[12], 基于共振效应, 使用红色激光可以得到更好的增强效果。因此, 以 632 nm 激光作为激发波长, 激发功率为 0.03 mW, 采集时间为 120 s, 每条谱线为基底表面 5 个不同位点的平均光谱。

3 结果和讨论

由于 NPG 的荧光增强特性与孔径相关, 为了使荧光信号尽可能放大, 制备了不同孔径的 NPG 薄膜, 并对其荧光增强特性进行比较。图 3(a)~(c) 分别为腐蚀时间为 1, 5, 10 min 所得 NPG 的扫描电镜图 (scanning electron microscope, SEM)。腐蚀 1 min 的 NPG 孔径约为 5 nm, 腐蚀 10 min

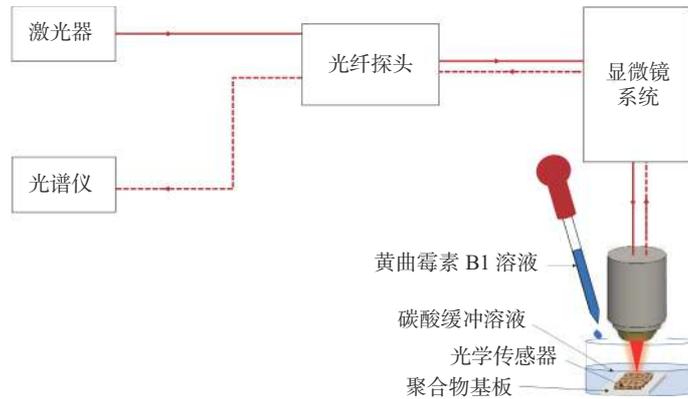


图 2 黄曲霉素 B1 的荧光光谱测试系统及方法

Fig. 2 Fluorescence spectrum system and method of testing aflatoxin B1

的 NPG 孔径约为 13 nm，并且孔状结构均匀。图 3(d) 为固定在不同孔径多孔金表面的 Cy5 荧光光谱，由图可见，Cy5 荧光信号强度随着多孔

金孔径的增大而增强。当 NPG 孔径约为 13 nm 时，多孔金基底表现出更好的荧光增强特性。

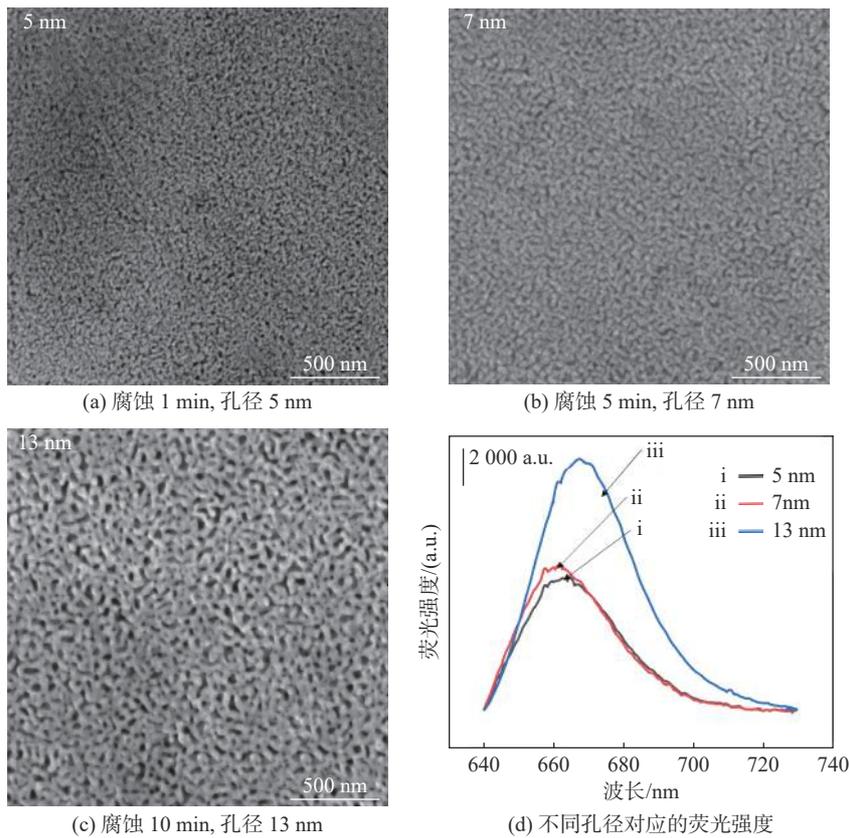


图 3 不同腐蚀时间的 NPG 基底扫描电镜图及其荧光增强特性谱线

Fig. 3 The SEM of NPG with different corrosion time and its fluorescence enhancement spectra

为了增强 100 nm 厚的 NPG 薄膜与支撑基板 polymer 之间的结合力，提高芯片整体的稳定性和可操作性，采用低温退火的方式适度软化 polymer 增强附着力，进而实现 NPG 薄膜与

polymer 一体化。图 4(a) 为将固定在 polymer 上的 13 nm NPG(NPG13) 置于真空干燥箱中，在 100 °C 退火 2 h 之后所得基底的扫描电镜图。通过比较图 3(c) 和图 4(a) 发现，退火后的 NPG

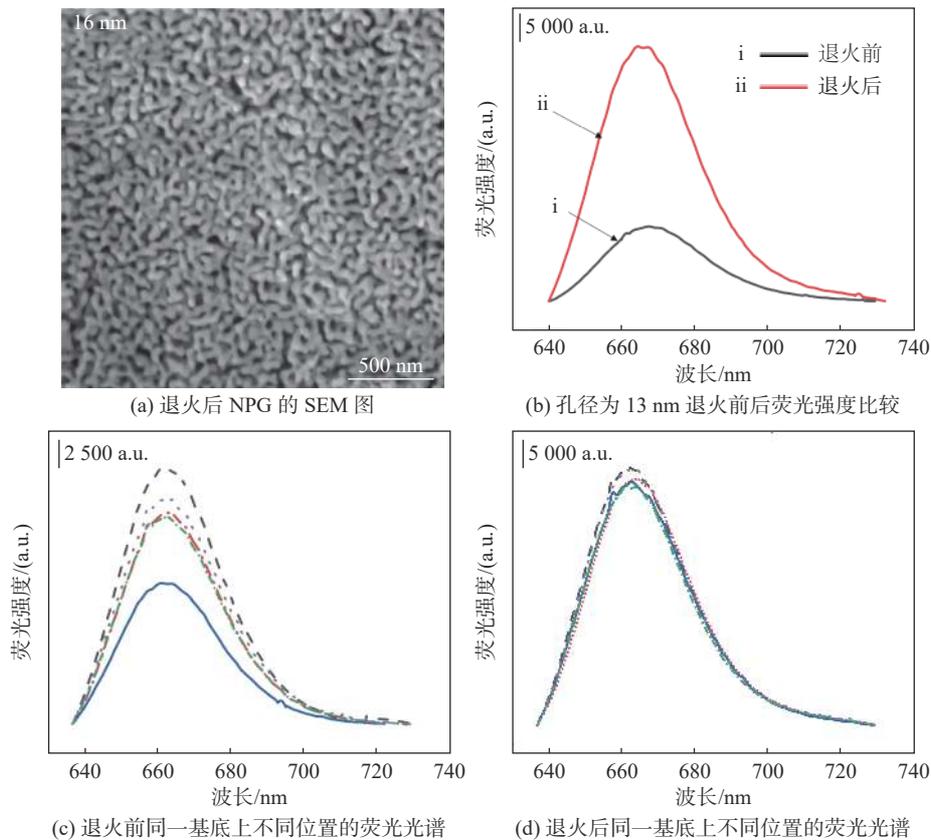


图 4 退火对基底结构及荧光增强特性的影响

Fig. 4 Annealing influence on the microstructure and SEF property of substrate

孔径轻度粗化, 从 13 nm(NPG13)扩大到了 16 nm(NPG16)。为了确认退火是否影响 NPG 的荧光增强特性, 对退火后的 NPG16 表面进行核酸适体功能化处理。组装了 SH-DNA2 和 Cy5-DNA1 序列之后的 NPG16 表面的荧光光谱显示在图 4(b) 中, 比较退火前后来自 Cy5 的荧光信号可见, 退火在一定程度上可以进一步提高芯片的荧光增强特性。同时比较图 3(c)和图 4(a)可以发现, 退火之后的 NPG 表面比退火前更加均匀。这一点通过在同一样品上不同位置 Cy5 的荧光光谱(见图 4(c)和图 4(d))可以得到进一步的印证。在后续实验中, 为了保证光学芯片的均匀性以及耐用性, 选择退火后的 NPG16 作为光学芯片的基底材料。

以 NPG16 为增强基底, 通过核酸适体进行表面功能化, 随后浸泡在不同浓度的 AFB1 中进行荧光光谱检测, 观察荧光强度变化与 AFB1 之间的关系。当检测环境中没有 AFB1 时, Cy5-DNA1 通过碱基配对原则与固定在 NPG 表面的

SH-DNA2 形成稳定的核酸双螺旋结构, 测得荧光光谱强度为 I_0 。当加入 AFB1 后, 由于 AFB1 和 Cy5-DNA1 产生竞争性结合, SH-DNA2 和 Cy5-DNA1 中的配对碱基发生解离, 游离态 Cy5-DNA1 远离 NPG 表面, 导致 Cy5 的荧光强度减弱, 此时测得荧光光谱强度为 I 。因此, Cy5 的荧光强度变化与环境中 AFB1 的浓度相关。图 5(a)为浸泡在 PBS 及不同浓度的 AFB1 溶液中芯片表面检测到的来自于 Cy5 的荧光光谱。由图可见, 随着 AFB1 的质量浓度的增加, 来自于 Cy5 的荧光信号越来越弱, 表明越来越多的 Cy5-DNA1 与 DNA2 解离, 游离到溶液中, 导致基底对其失去增强特性, 引发基底表面整体荧光信号的衰减。为了清楚的显示荧光强度与 AFB1 浓度之间的关系, 我们对不同环境下基底表面的荧光强度进行了归一化处理(见图 5(b)), 以 PBS 中来自 Cy5 的 665 nm 峰为参照。由图 5(b)可见, 当溶液中存在质量浓度为 10^{-7} $\mu\text{g/L}$ 的 AFB1 时, 荧光强度衰减了近 10%; 当溶液中

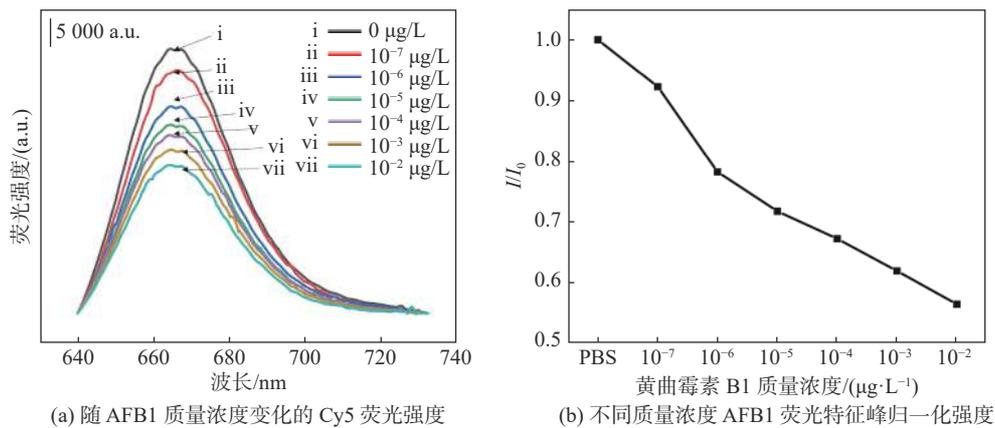


图 5 Cy5 荧光强度与 AFB1 质量浓度关系图

Fig. 5 Relationship between Cy5 fluorescence intensity and AFB1 mass concentration

AFB1 质量浓度提高到 10^{-6} $\mu\text{g/L}$ 时, 荧光强度衰减了 20%; 随着 AFB1 质量浓度的增加, 荧光强度逐渐衰减, 当 AFB1 质量浓度为 10^{-2} $\mu\text{g/L}$ 时, 荧光强度基本变为初始强度的一半。同时发现, 在 AFB1 质量浓度低时, 芯片表现出更好的灵敏度, 而随着 AFB1 质量浓度的增加, 荧光强度衰减比例有所减小, 分析主要原因是, 基底表面组装的核酸适体数量有限, 随着 AFB1 质量浓度的提高, Cy5-DNA1 与 AFB1 的数量差异在扩大, 基底本身在向饱和状态转化, 因此衰减速率有所下降。基于目前多孔金基底表面功能化条件, 在 10^{-6} $\mu\text{g/L}$ 到 10^{-2} $\mu\text{g/L}$ 动态范围内, 荧光信号强度与 AFB1 质量浓度表现出较好的线性关系, 检测极限可达 10^{-7} $\mu\text{g/L}$, 远小于传统检测技术的检测极限 3.3×10^{-4} $\mu\text{g/L}$ ^[8] 和同类荧光检测技术的检测极限 3×10^{-4} $\mu\text{g/L}$ ^[15]。可以预见, 通过控制多孔金表面组装核酸适体的数量, 可进一步提高检测灵敏度和扩大检测动态响应范围。

4 结 论

本文利用 AFB1 和 Cy5-DNA1 之间的竞争结合关系, 成功研制了一种新型表面增强荧光基底, 实现了对 AFB1 的痕量检测。基于这个新型光学基底, 检测极限达到 10^{-7} $\mu\text{g/L}$, 远低于直接供人类食用的食品中 AFB1 标准, 同时, 基底表现出 4 个量级的线性动态响应范围, 为实现不同浓度的 AFB1 检测提供了可能性。该方法可通过改变特异性核酸适体拓展到其他真菌毒素的检

测, 具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] BEZERRA DA ROCHA M E, DA CHAGAS OLIVEIRA FREIRE F, FEITOSA MAIA F E, et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health[J]. *Food Control*, 2014, 36(1): 159 – 165.
- [2] SRIVASTAVA S, KUMAR V, ALI A, et al. Electrophoretically deposited reduced graphene oxide platform for foodtoxin detection[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(7): 3043 – 3051.
- [3] WU S S, WEI M, WEI W, et al. Electrochemical aptasensor for aflatoxin B₁ based on smart host-guest recognition of β -cyclodextrin polymer[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 129: 58 – 63.
- [4] ZHAO Y R, HUANG J X, MA L Y, et al. Development and validation of a simple and fast method for simultaneous determination of aflatoxin B₁ and sterigmatocystin in grains[J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 11 – 17.
- [5] LAI X W, SUN D L, RUAN C Q, et al. Rapid analysis of aflatoxins B₁, B₂, and ochratoxin A in rice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC[J]. *Journal of Separation Science*, 2014, 37(1/2): 92 – 98.
- [6] DA LUZ S R, PAZDIORA P C, DALLAGNOL L J, et al. Mycotoxin and fungicide residues in wheat grains from fungicide-treated plants measured by a validated LC-MS method[J]. *Food Chemistry*, 2017, 220: 510 –

- 516.
- [7] YU F Y, GRIBAS A V, VDOVENKO M M, et al. Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin B1 in food products[J]. *Talanta*, 2013, 107: 25 – 29.
- [8] HUI Y Y, WANG B N, REN R, et al. An electrochemical aptasensor based on DNA-AuNPs-HRP nanoprobe and exonuclease-assisted signal amplification for detection of aflatoxin B₁[J]. *Food Control*, 2020, 109: 106902.
- [9] WEI M, ZHAO F, XIE Y L. A novel gold nanostars-based fluorescent aptasensor for aflatoxin B1 detection[J]. *Talanta*, 2020, 209: 120599.
- [10] ZHAO T T, LI L, LI S, et al. Gold nanorod-enhanced two-photon excitation fluorescence of conjugated oligomers for two-photon imaging guided photodynamic therapy[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2019, 7(46): 14693 – 14700.
- [11] CHENG F, JOHNSON A D, TSAI Y, et al. Enhanced photoluminescence of monolayer WS₂ on Ag films and nanowire-WS₂-film composites[J]. *ACS Photonics*, 2017, 4(6): 1421 – 1430.
- [12] CHEN C, ZHANG L, YANG M, et al. Size and distance dependent fluorescence enhancement of nanoporous gold[J]. *Optics Express*, 2017, 25(9): 9901 – 9910.
- [13] ZHANG L, CHANG H X, HIRATA A, et al. Nanoporous gold based optical sensor for sub-ppt detection of mercury ions[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(5): 4595 – 4600.
- [14] CHEN Q S, YANG M X, YANG X J, et al. A large Raman scattering cross-section molecular embedded SERS aptasensor for ultrasensitive Aflatoxin B1 detection using CS-Fe₃O₄ for signal enrichment[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 189: 147 – 153.
- [15] 曾云龙, 张敏, 易守军, 等. 高灵敏磁分离荧光传感法检测黄曲酶毒素 B1[J]. *光子学报*, 2018, 47(11): 1128001.

(编辑: 张 磊)