

核酸适配体生物传感器 在食品霉菌毒素检测中应用的研究进展

乔勤勤^{1,2}, 文芳^{1,*}, 郑楠¹, 薛秀恒², 程建波³, 张昊¹, 李松励¹, 王加启¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室,

农业农村部奶产品质量安全风险实验室(北京), 北京 100193;

2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽农产品加工工程实验室, 安徽合肥 230036;

3. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要:霉菌毒素是由霉菌产生的次级代谢物, 是人类健康的主要威胁之一。食品中霉菌毒素的污染已经成为人们热切关注的主要食品安全问题之一, 所以开发出用于简便、快速和灵敏检测食品中霉菌毒素的方法显得尤为重要。核酸适配体是在体外筛选, 并能特异性识别目标物的单链寡核苷酸序列, 因具有易合成、易标记、易修饰、灵敏度高、特异性高、分子量小等优势而广泛应用于蛋白质、霉菌毒素、农兽药等目标物检测的生物传感器。本文主要综述了食品中霉菌毒素的限量和危害, 以及核酸适配体生物传感器筛选技术用于食品中霉菌毒素检测的研究进展。

关键词:核酸适配体, 生物传感器, 霉菌毒素, 限量, 危害, 食品中检测方法

Research Progress of Nucleic Acid Aptamer Biosensors on Application of Mycotoxin Detection in Food

QIAO Qin-qin^{1,2}, WEN Fang^{1,*}, ZHENG Nan¹, XUE Xiu-heng²,
CHENG Jian-bo³, ZHANG Hao¹, LI Song-li¹, WANG Jia-qi¹

(1. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Dairy Products of Agriculture and Rural Affairs(Beijing), State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. Anhui Agricultural Products Processing Engineering Laboratory, Tea and Food Science and Technology College, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

3. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Mycotoxin, a secondary metabolite produced by different molds, is one of the major threats to human health. The contamination of mycotoxin in food has become one of the main food safety problems, so it is very important to develop a simple, rapid and sensitive method for the detection of mycotoxins in foods. Nucleic acid aptamer, single chain oligonucleotide sequences, is widely used in the detection of proteins, mycotoxins and agricultural veterinary drugs to identify the targets *in vitro*, because of their advantages such as easy synthesis, easy labeling, easy modification, high sensitivity, high specificity and small molecular weight. The review summarized the limitations and hazards of mycotoxins in food and the research progress on nucleic acid aptamer screening assay for detection of mycotoxins in food.

Key words: nucleic acid aptamer; biosensors; mycotoxin; limitation; hazards; detection method in food

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)16-0294-10

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.16.050

引文格式: 乔勤勤, 文芳, 郑楠, 等. 核酸适配体生物传感器在食品霉菌毒素检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 294-303.

霉菌毒素是由霉菌产生的次级代谢物, 通过污染饲料和动物性食品(肉、蛋、奶等), 对动物生产性能以及人类的组织和器官产生极大的危害^[1-2]。谷

物在生长、收获、储藏或加工过程中容易被霉菌毒素污染, 世界上每年大约有 25% 的谷物遭受霉菌毒素的污染, 严重影响人们健康饮食同时也造成巨大的

收稿日期: 2018-08-20

作者简介: 乔勤勤(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 牛奶质量安全研究, E-mail: 1205525113@qq.com。

* 通讯作者: 文芳(1985-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 牛奶质量安全研究, E-mail: bnu104@126.com。

基金项目: 生鲜乳质量安全评价技术及生产规程研究与示范(201403071); 国家自然科学基金青年科学基金项目(21305158); 产业技术体系(CARS-36); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS12)。

经济损失^[3-4]。食品中霉菌毒素污染已成为我国乃至全世界重点关注的问题之一,所以研发出简便、快速、灵敏的霉菌毒素检测方法对于食品安全和检测方面具有重要意义。近些年来,核酸适配体检测技术因具有高亲和力、高特异性、稳定性好、易修饰等优点得到快速发展,目前已经研发出的核酸适配体检测方法成功应用于食品中霉菌毒素的检测^[5]。

本文介绍了我国和其他国家对食品中部分霉菌毒素的限量规定及其危害,简要概括了基于 SELEX 技术筛选核酸适配体的过程,详细地叙述了基于核酸适配体的生物传感器在食品中检测霉菌毒素的相关应用,总结出核酸适配体研究现状,进一步指出该研究现状的发展趋势以及对后续研究的借鉴意义。

1 食品中霉菌毒素限量规定及其危害

目前有 400 多种已知的霉菌毒素对人类和动物具有潜在毒性,常见的霉菌毒素主要包括黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 M₁ (Aflatoxin M₁, AFM₁)、赭曲霉毒素 (Ochratoxin A, OTA)、伏马菌素 (Fumonisin B₁, FB₁)、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 以及 T-2 毒素 (Mitsubishi T-2)^[6-7]。霉菌毒素是人类健康的主要威胁之一^[1], AFB₁ 是一种高毒性的食品污染物,已被国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 列为第 1 类致癌物^[8-9]。OTA 对大多数哺乳类动物有高度的致肝癌、致肾癌、致突变和致畸形等^[10]。ZEN 及其代谢物会影响雌性激素分泌,尤其是在哺乳动物生殖过程中^[11]。T-2 毒素可抑制蛋白质以及 DNA 和 RNA 的合成^[12]。因为在自然条件下霉菌毒素天然存在,所以农作物在加工、运输和储存中容易被霉菌毒素污染^[13]。因此,只要条件(湿度和温度)合适,霉菌毒素会污染食品、农作物和饲料^[14]。对含有相对较高霉菌毒素水平的母牛饲料的研究表明,霉菌毒素及其代谢产物可转移到相应的食品中^[15]。为了保护消费者的健康和减少经济损失,我国标准 GB 13078-2017^[16]中明确规定奶牛饲料中霉菌毒素最大残留限

量(表 1),标准 GB 2761-2017^[17]对食品中部分霉菌毒素的限量做出了相关规定(表 2),欧洲委员会 (European Commission)^[18]和国际癌症研究组织^[19]规定了大多数食物中霉菌毒素限量标准(表 3)。

2 霉菌毒素检测方法

2.1 霉菌毒素传统检测方法

传统检测霉菌毒素的方法主要包括高效液相色谱法 (HPLC)、薄层色谱法 (TLC)、气相色谱法 (GC) 和质谱法 (MS) 等仪器分析方法以及基于抗体的酶联免疫反应 (ELISA)、免疫传感器和表面等离子共振 (SPR) 等免疫分析方法^[20-24]。仪器分析方法具有较高的灵敏度、特异性和重复性等优点,免疫分析方法操作便捷、快速以及样品需要少等,但这些检测方法仍然存在一些问题,比如在仪器分析方法在样品前处理过程中,步骤繁杂、耗时长且不适合现场操作,同时需要大量的专业技术人员,而免疫分析方法中使用的抗体价格昂贵且不稳定,制备时间长,不容易长期存储,检测的结果容易出现假阳性、假阴性等^[25-26]。所以研发出简单、便捷、灵敏的霉菌毒素的检测方法显得尤为重要。

2.2 霉菌毒素生物传感器检测

目前,基于核酸适配体的生物传感器因具有易合成、易标记、易修饰、灵敏度高、特异性高、分子量小、检测成本低等优势而受到广泛的关注^[27-28]。国际理论与应用化学联合会 (IUPAC) 对生物传感器的定义为利用全细胞、细胞器、组织、酶或免疫制剂等生物识别元件的特异性生化反应,借助电、光、热等各种信号对化学物质进行检测的一类装置^[29]。其优点是特异性好、灵敏度高、检测快速、样品前处理简单且可操作性强,在食品分析、医学检验、环境监测、工业检测与控制等领域具有广泛的应用^[30]。最常用的生物识别元件为核酸适配体、抗体和酶^[31-32]。

2.3 生物传感器中核酸适配体的筛选

核酸适配体是在体外筛选,能高亲和力和高特异性结合目标物的单链寡核苷酸序列(单链 DNA

表 1 我国标准 GB 13078-2017 中规定奶牛饲料中霉菌毒素最大残留限量
Table 1 Maximum residue of mycotoxins in dairy feed in China's standard GB 13078-2017

霉菌毒素种类	饲料产品	最高限量	单位
AFB ₁	浓缩和配合饲料(仔猪、雏禽)、泌乳期精料补充料	10	μg/kg
	浓缩和配合饲料(肉用仔鸭后期、生长鸭、产蛋鸭)	15	
	精料补充料(犊牛、羔羊)、其他浓缩和配合饲料	20	
	其他精料补充料	30	
OTA	配合饲料	100	μg/kg
	精料补充料(马、兔)、猪浓缩饲料、配合饲料(猪、兔、马)	5	
FB ₁ , FB ₂	鱼配合饲料	10	mg/kg
	家禽浓缩和配合饲料	20	
	其他反刍动物精料补充料	50	
T-2	猪、禽配合饲料	0.5	mg/kg
	青年母猪配合饲料	0.10	
ZEN	仔猪配合饲料	0.15	mg/kg
	其他猪配合饲料	0.25	
	其他配合饲料	0.50	

表2 我国标准 GB 2761-2017 规定了食品中部分霉菌毒素的限量

Table 2 Limited amount of some mycotoxins in food in China's standard GB 2761-2017

霉菌毒素种类	食品种类	限量(μg/kg)
AFB ₁	婴幼儿配方食品(以大豆及大豆蛋白制品为主的原料)	0.5
	小麦、大麦、麦片、发酵豆制品、酱油、醋、酿造酱、除花生外其他熟制坚果及籽类等	5
	稻谷、糙米、大米、植物油脂(花生油、玉米油外)	10
	玉米、花生、坚果(花生及其制品)、油脂(玉米油、花生油)	20
AFM ₁	乳及乳制品(乳粉按生乳折算)	0.5
	婴幼儿配方食品(以乳类及乳蛋白制品为主的原料)	0.5
OTA	葡萄酒	2
	谷物、谷物碾磨加工物、豆类、烘焙咖啡豆、研磨咖啡	5
	速溶咖啡	10
ZEN	小麦、小麦粉、玉米、玉米面(渣、片)	60

表3 欧洲委员会和国际癌症研究组织对部分霉菌毒素的限量规定

Table 3 The limitation of European Commission and IARC for some mycotoxins

霉菌毒素种类	食品种类	限量(μg/kg)	IARC 分类
AFB ₁	花生、坚果、香料玉米、大米、无花果、植物油	2	1
AFM ₁	牛奶和奶制品	0.05	1
OTA	葡萄干、葡萄酒、葡萄汁、小麦、咖啡、豆类、加工谷物	0.5~10	2B
FB ₁	主要在玉米、小麦和大麦等谷物中	50~1000	2B
T-2	燕麦和燕麦制品、大麦、大米和玉米等	50~100	-
ZEN	小麦、大麦玉米、高粱和玉米	100~400	-

注:-:文献未说明;表4同。

(ssDNA) 或 RNA), 最早由 Tuerk 等^[33]发现, 由 Ellington 等^[34]命名。核酸适配体一般由 20~100 个核苷酸组成, 其相对分子质量小、性质稳定、易穿透细胞膜, 可通过重复的变性循环来维持其结构, 可用于检测多种目标物, 包括蛋白质、霉菌毒素、农兽药和金属离子等^[35-38]。核酸适配体筛选技术基本上都是通过指数富集的配基系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)完成的, 主要过程包括结合、分离、洗脱、扩增和调节^[39]。几乎所有通过 SELEX 筛选的适配体在微摩尔(μmol)至纳摩尔(nmol)范围内的解离常数(K_d)都表现出高亲和力。因此, 适配体也被称为“化学抗体”^[40]。基于抗体的筛选方法具有操作简便、灵敏等优点, 但在运输和储存过程中抗体稳定性较差的问题意味着该技术仅限于高度严格控制的环境中^[41]。具有与抗体相似功能的核酸适配体, 因具有成本低、稳定性高、易修饰、易合成、不需要活体动物或细胞、反复使用、可长期保存等优点, 渐渐将抗体取代^[42-43]。此外, 当核酸适配体作为实时定量聚合酶链式反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)中的模板, 可使核酸适配体以指数形式扩增, 以大大提高检测灵敏度^[44]。因此, 在许多生物学应用中, 核酸适配体被认为是抗体的更好替代物^[45]。

核酸适配体一般是通过 SELEX 筛选得到的, 其筛选过程是从随机寡核苷酸文库开始, 筛选的复杂度和多样性取决于其随机核苷酸的数目。在 SELEX 筛选过程中, 随机寡核苷酸文库在 pH、离子强度和温度的作用下暴露于靶标, 与非结合物分离洗脱, 对靶标具有亲和性的寡核苷酸进行 PCR 扩增。然后对

从第一轮筛选产生的富集池进一步选择循环, 用于增加反应池对靶标的亲和力(即正筛选)或消除可能与其它相关化合物交叉反应的成员池(即负筛选)。经过数轮筛选后, 对富集的核苷酸文库进行测序和表征, 通过测定 K_d来评估适配体的亲和力, 筛选出高亲和力的核酸适配体。在这些序列被测序之后, 可化学合成大量高纯度的目的核酸适配体序列, 以便并入感兴趣的生物传感器平台中, 同时也可对靶标或者适配体进行各种的修饰, 以便得到高灵敏、高选择的核酸适配体生物传感器^[46]。随着分子生物学技术的快速发展, 核酸适配体检测技术在食品安全检测、临床诊断、生物分析以及环境污染物监测等领域得到了广泛的应用, 表 4 列举了目前文献中报道的常见霉菌毒素(AFB₁、AFM₁、OTA、FB₁、ZEN)的核酸适配体序列。

3 基于核酸适配体的生物传感器检测食品中霉菌毒素的方法

食品中的霉菌毒素污染一直是全球关注的问题。近年来由于基于核酸适配体的生物传感器具有灵敏度高、选择性好、成本低和便于携带等优点被广泛关注, 目前已有部分核酸适配体检测技术成功应用于食品和饲料中霉菌毒素的检测。表 5 列举了基于核酸适配体的生物传感器检测 AFB₁、AFM₁、OTA、FB₁、ZEN 的方法。

3.1 在 AFB₁检测中的应用

AFB₁是毒性最强的霉菌毒素之一, 引起了全球食品安全领域的广泛关注。在食品和农产品检测中, 时常发现 AFB₁的存在, 尤其是在花生、玉米、饲料

表4 常见的霉菌毒素的核酸适配体序列
Table 4 The sequence of aptamers for commom mycotoxins

目标名称	核苷酸数目	序列(5'→3')	K _d (nmol/L)	参考文献
AFB ₁	50	GTTGGGCACGTGTTGTCTCTGTGTCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCCACA	—	[47]
	49	TTGGGCACGTGTTGTCTCTGTGTCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCCACA	—	[48]
	80	AGCAGCACAGAGGTCAGATGGTGCTATCATGCGCTCAATGGGAG ACTTTAGCTGCCCCACCTATGCGTGCTACCGTGAA	11.29 ± 1.27	[49]
AFM ₁	21	ACTGCTAGAGATTTTCCACAT	—	[50]
	72	ATCCGTCACACCTGCTCTGACGCTGGGGTCGACCCGG AGAAATGCATTCCCCTGTGCTGTTGGCTCCCGTAT	35.6 ± 2.6	[51]
	36	GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA	200	[52]
OTA	40	GGCAGTGTGGGCGAATCTATGCGTACCGTTTCGATATCGTG	406 ± 166	[53]
	76	AGCCTCGTCTGTTCTCCCGGCAGTGTGGGCGAATCTAT GCGTACCGTTTCGATATCGTGGGGAAGACAAGCAGACGT	290 ± 150	[54]
	60	AATCGCATTACCTTATACCAGCTTATTCAATT ACGTCTGCACATACCAGCTTATTCAATT	195 ± 45	[55]
FB ₁	78	ATACCAGCTTATTCAATTAATCGCATTACCTTATACCAGCTT ATTCAATTACGTCTGCACATACCAGCTTATTCAATT	184 ± 43	[55]
	96	ATACCAGCTTATTCAATTAATCGCATTACCTTATACCAGCTTATTCAATTACG TCTGCACATACCAGCTTATTCAATTAGATAGTAAGTGCAATCT	100 ± 30	[56]
	40	AGCAGCACAGAGGTCAGATGCCTATGCGTGCTACCGTGAA	41 ± 5	[57]
ZEN	72	GGAATTCTTGATGTTGCCTGGGATTGTTTGGGCCTTGT GTTTTCTCCGTTCCAACCTAGTAGGATCCCGAA	—	[58]

表5 基于适配体的生物传感器检测霉菌毒素的方法
Table 5 The method of aptamer-based biosensors for the detection of mycotoxins

目标名称	检测方法	检测限	真实样品分析	参考文献
AFB ₁	基于实时定量 PCR 测定	25 pg/L	黑麦和米粉	[28]
	基于适配体的荧光试纸测定	0.10 ng/mL	玉米	[59]
	利用金纳米棒局域等离子共振吸收光谱和动态光散射的传感器	0.035 μg/L	花生	[60]
	利用血红素结合脱氧核酶绑定 AFB ₁ 的比色适配体传感器	0.1 μg/L	玉米	[61]
AFM ₁	基于结构转换的荧光适配体传感器	1.7 ng/mL	米粉	[29]
	电化学 Fe ₃ O ₄ /聚苯胺传感器	1.98 ng/L	牛奶	[62]
	以辣根过氧化物酶作为标签的竞争性电化学免疫传感器	0.01 μg/L	牛奶	[63]
	基于胶体金和银电沉积的阻抗型免疫传感器	15 ng/L	牛奶	[64]
OTA	基于化学发光共振能量转移体系的适配体传感器	0.22 μg/L	咖啡豆	[65]
	基于适配体的色谱条带测定	0.18 ng/mL	红葡萄酒	[66]
	设计一种简单的新型光子晶体编码悬浮阵列适配体	0.25 pg/mL	谷物	[67]
	利用纳米-石墨适配体和脱氧核酶混合放大检测	8.06 μg/L	红葡萄酒	[38]
FB ₁	基于 GS-TH 纳米复合材料的电化学适配体传感器	1 pg/mL	小麦	[68]
	基于上转换荧光纳米颗粒与金纳米颗粒的共振能量转移适配体	0.01 ng/mL	玉米	[69]
	以适配体为基础并由光子晶体编码的悬浮阵列	0.16 pg/mL	谷物	[67]
	基于金纳米颗粒的电化学发光适配体传感器	0.27 ng/mL	小麦	[70]
ZEN	基于上转换纳米颗粒和磁性纳米粒子的适配体传感器	0.25 μg/L	玉米和啤酒	[71]
	基于磁珠分离/富集的简单而快速的 SELEX 检测方法	0.785 nM	啤酒	[57]
	利用适配体和单克隆抗体的特点开发一种低氧免疫吸附方法	0.01 ng/mL	玉米	[58]
	以功能性氧化石墨烯为基础适配体传感器	0.5 ng/mL	酒精饮料、啤酒和葡萄酒	[72]

及谷物作物中^[59]。为了使人类健康免受 AFB₁ 的危害,许多国家都制定了相关限量,如欧盟委员会规定所有谷类及谷类相关食品中 AFB₁ 含量不超过 2 μg/kg^[73]。为了阻止污染食品带来的食品安全恐慌和经济损失,开发出快速检测 AFB₁ 的核酸适配体传感器显得极其重要。

Chen 等^[74]开发了能快速、灵敏检测 AFB₁ 的荧光传感器,首先将荧光修饰的适配体与其修饰淬灭基团的互补 DNA 杂交,荧光因适配体靠近淬灭基团而被淬灭;当体系中加入 AFB₁ 后,适配体与 AFB₁ 结合形成适配体/AFB₁ 复合物导致适配体结构发生改变,从而释放 cDNA,使适配体恢复荧光。通过监测荧光值的变化定量分析 AFB₁ 的浓度,在优化条件下,该方法的检测范围为 5~100 ng/mL,检出限为 1.6 ng/mL;该检测方法应用到不同品牌的婴幼儿配方米粉中,其回收率为 93.0%~106.8%。Sun 等^[75]开发了基于适配体表面等离子体共振的生物传感器,可用于直接定量分析 AFB₁,首先将链霉亲和素固定在 SPR 芯片表面上,然后通过链霉亲和素与生物素之间强相互作用,捕获到生物素化的适配体;AFB₁ 与 SPR 芯片上适配体的结合导致质量浓度发生变化,进而使 SPR 芯片上有明显反应;将适配体固定在 SPR 芯片表面上,监测 AFB₁ 与适配体在 SPR 芯片上的结合程度,可实时监测 AFB₁ 的浓度。该方法测定 AFB₁ 的浓度范围为 0.4~200 nmol/L,其检出限为 0.4 nmol/L。在复杂的样品基质中测定 AFB₁,例如稀释 100 倍的红葡萄酒和 50 倍的啤酒,其检测的回收率范围为 87%~102%。该 SPR 传感器稳定可重复使用并有实时、灵敏度高、特异性强和高通量等优点。

Hosseini 等^[47]开发了一种以未修饰的金纳米颗粒(AuNPs)作为指示剂,AFB₁ 适配体作为特异性识别元件的比色适配体传感器,在 AuNPs 表面上,AFB₁ 结合适配体产生的解吸作用引起了 AuNPs 的聚集,使适配体与靶标相互作用,导致 AuNPs 的颜色从红色变成紫色。该传感器检测 AFB₁ 浓度的线性范围为 80~270 nmol/L,检测限为 7 nmol/L。此外,聚集的 AuNPs 的催化活性大大增强了化学发光反应,其中检测限为 0.5 nmol/L,回归系数 $R^2 = 0.9921$;该方法对 AFB₁ 检测具有较高的灵敏和选择性,避免了 AFB₂、AFM₁、AFG₂、AFG₁ 和 OTA 等常见霉菌毒素的干扰。Mukherjee 等^[48]研究了一种以基于 AFB₁ 特异性适配体与 AFB₁ 半抗原偶联物之间的荧光竞争性反应的检测方法,可用于快速、灵敏以及高通量检测 AFB₁,在最佳条件下,检测的线性范围为 50 pg/mL~50 ng/mL,检测限为 10 pg/mL;并以干红辣椒、花生和全椒为例验证该试验,在 10 ng/mL 和 100 pg/mL 水平下其回收率为 92%~102%。

这些检测方法具有灵敏度高、特异性强和高通量等优点,也为之后适配体传感器发展提供了研究和探索的方向,但它们也存在一些不足,比如不能便携,不能更好地应用现场检测,对于实际样品中的 AFB₁ 的检测也不具有普遍适用性。所以为了更好的应用到实际生活中,需开发操作简单、便携、灵敏度更高的适配体传感器。

3.2 在 AFM₁ 检测中的应用

AFM₁ 是源自肝细胞色素 P450 相关酶活性的 AFB₁ 羟基化代谢产物,可从摄入黄曲霉或寄生虫污染的动物性食品的家畜生产的奶或乳制品中发现^[19,64]。在欧洲,牛奶中 AFM₁ 的浓度不得超过

0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 中国和美国规定牛奶中 AFM₁ 的浓度必须低于 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[76-77]。所以开发出快速、灵敏的适配体传感器检测食品中 AFM₁ 极其重要。

Sharma 等^[78]利用荧光标记的 AFM₁ 适配体与 TAMRA 标记的互补 DNA 序列杂交,荧光基团和猝灭剂紧密接近导致荧光猝灭。在添加 AFM₁ 后,靶向诱导的反平行 G-四链体适配体-AFM₁ 复合物构象形成导致荧光恢复。在优化条件下,AFM₁ 检出限为 5.0 ng/kg。该检测方法已经应用于加标牛奶样品中 AFM₁ 的检测,回收率为 94.40%~95.28% ($n = 3$)。Khoshfetrat 等^[8]研究了一种用封闭双极电极(BPE)阵列检测 AFM₁ 的电化学发光(ECL)适配体传感器,将硫醇化的 AFM₁ 适配体固定在金纳米颗粒磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒(Apt-GMNPs)上,之后将功能化纳米银修饰的石墨烯氧化鲁米诺(GO-L-AgNPs)通过未配对碱基的 $\pi-\pi$ 相互作用连接到固定适配体(Apt-GMNPs-GO-L-AgNPs)上,将 Apt-GMNPs-GO-L-AgNPs 引入金阳极 BPE 阵列后,使各个电极经受不同浓度的 AFM₁,在 AFM₁ 与适配体相互作用后,GO-L-AgNPs 从适配体上分离,用光电倍增管(PMT)或智能手机监测阳极中鲁米诺和 H₂O₂ 的 ECL,并用软件分析图像,在最佳条件下,基于 PMT 的 BPE-ECL 适配体传感器检测在 5~150 ng/mL 宽动态范围内呈线性关系,检测限为 0.01 ng/mL;此外,基于智能手机的检测结果显示 ECL 图像灰度值与 AFM₁ 靶标对数浓度在 10~200 ng/mL 范围内呈线性关系,检出限为 0.05 ng/mL。

Guo 等^[79]开发了一种用于检测 AFM₁ 的灵敏可靠的适配体传感器,通过生物素-链霉亲和素强相互作用使适配体在链霉抗生物素包被的 PCR 管表面上固定,作为 PCR 扩增模板的互补 ssDNA 与单链适配体部分杂交形成 dsDNA,dsDNA 在无 AFM₁ 体系下具有稳定性,在添加 AFM₁ 后,适配体和 AFM₁ 之间的结合诱导适配体构象发生变化,使互补 ssDNA 释放以及模板数量减少,因此,该适配体传感器可通过监测 PCR 扩增信号强弱变化定量测 AFM₁ 的浓度;在优化条件下,使 AFM₁ 浓度在 1.0×10^{-4} ~1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内呈现线性关系,检测限低至 0.03 ng/L。该方法已成功应用于婴幼儿谷物和奶粉样品中 AFM₁ 的定量测定。陈璐^[25]设计了一种基于结构转换的荧光适配体传感器用于检测 AFM₁,用 FAM 修饰适配体,同时用 TRAMA 修饰 cDNA。当体系中不存在 AFM₁ 时,适配体与 cDNA 杂交,由于适配体与 cDNA 相互靠近,导致适配体的荧光被淬灭;当体系中加入 AFM₁ 后,AFM₁ 更易于与适配体结合,形成 AFM₁/aptamer 复合物,导致适配体结构发生改变,从而释放 cDNA;当 cDNA 远离适配体后,适配体荧光恢复;在最优条件下,检测到的荧光值与 AFM₁ 浓度在 5~100 ng/mL 之间呈线性关系,检出限为 1.7 ng/mL。

这些检测方法具有操作简单、灵敏度高等优点,但不能更好应用到实际样品中 AFM₁ 的检测,特别是奶及奶制品。在未来的研究中,需要提高适配体传感器在实际样品检测中的灵敏度,解决因反应基质

的不同导致适配体灵敏度降低的困难。

3.3 在 OTA 检测中的应用

OTA 对人体和动物具有潜在致癌性,能引起免疫抑制以及免疫毒性,目前由 OTA 引起的食品污染现象广泛存在^[38]。考虑到 OTA 的这些潜在毒性作用,欧盟委员会明确规定未加工谷物中 OTA 的最大限量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,加工后的谷物为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,咖啡豆为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,葡萄酒为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[80]。为了避免 OTA 污染的风险,检测和定量食品及其原料中 OTA 的含量具有重要意义,所以更加灵敏、快速的检测 OTA 的核酸适配体传感器不断被研究出来。

Yue 等^[67]设计一种新型光子晶体编码悬浮阵列适配体,可同时量化和鉴定谷类样品中的 OTA 和 FB₁,将适配体通过化学键固定在光子晶体表面,当霉菌毒素出现在样品中时,适配体荧光标记的互补 DNA 从双链 DNA 杂交体中解离,导致荧光强度明显下降;该传感器以二氧化硅光子晶体微球 (SPCM) 的荧光强度差值定量霉菌毒素的浓度,再以 SPCM 的颜色或反射峰位置确定了霉菌毒素种类;该方法检测的 OTA 范围为 0.01~1 ng/mL,检测限为 0.25 pg/mL,加标谷物样品中 OTA 的回收率为 81.80%~116.38%。Sun 等^[81]利用无固定化适配体-氧化石墨烯纳米片与基于 DNA 酶 I 的循环信号放大相耦合的特点,开发了一种简单可行的用于检测食品中 OTA 的均相电化学传感器;氧化石墨烯纳米片与核碱基和芳族化合物的非共价结合使硫基标记的 OTA 适配体附着于纳米片的表面,再以带负电的丝网印刷碳电极 (SPCE) 获得的游离硫基分子为电子信号;由于形成的硫蛋白适配体/石墨烯纳米复合物悬浮在检测溶液中并远离电极,从而导致电子信号变弱;当添加 OTA 后,分析物与适配体反应并导致硫基还原蛋白-适配体从氧化石墨烯纳米片上解离;新形成的硫代-适配体/OTA 容易被 DNase I 切割并释放出 OTA,可重新触发硫基-适配体/石墨烯纳米复合物,并产生大量游离硫基分子;游离的硫基分子被负电荷的 SPCE 捕获,每个分子都可以在施加电位内产生电化学信号;通过监测电流的变化,定量评估样品中 OTA 的浓度;在最佳条件下,该传感器检测限为 5.6 pg/mL。

Samokhvalov 等^[82]提出了一种以适配体为受体,以锚蛋白为模板作为增强子的荧光偏振适配体传感器,这种方法利用增加结合和未结合荧光团的尺寸差异,通过荧光标记和游离的 OTA 与适配体之间的竞争性结合测定 OTA;由于荧光标记的 OTA 与包含在锚定复合物中适配体的结合比与游离适配体结合产生了更高的偏振,这使得该传感器检测限降低至 3.6 nmol/L,并能在 15 min 内完成测定;为了评估该方法对实际样品的具有适用性,在加标白葡萄酒中检出限为 2.8 nmol/L,回收率为 83%~113%。Modh 等^[83]开发了一种以适配体为辅助的基于实时 PCR 的靶向诱导解离方法;通过将 OTA 适配体固定在涂有 d(T)₂₅ 的磁珠 (dT 磁珠) 上,并与适配体中 OTA 结合部分的互补序列用作 dT 磁珠和适配体序列之间的接头,将适配体固定在 dT 磁珠上;当添加 OTA 时,

由于靶向诱导解离作用,使适配体从 dT 磁珠中释放,通过 qPCR 扩增定量适配体;该检测方法的浓度范围为 0.039~1000 ng/mL,检测限为 0.009 ng/mL。Apta-qPCR 检测方法具有灵敏、稳定和选择性,可用于检测复杂样品等优点。

目前研发的用于食品中 OTA 检测的适配体传感器种类繁多且操作简单,并具有实际应用价值,如结合血糖仪检测食品中 OTA^[84]。不过主要问题仍是在改变反应基质后,传感器灵敏度降低,所以这也是今后研究的关注点之一。

3.4 在 FB₁ 检测中的应用

FB₁ 是伏马毒素 B 系列中毒性最大的,可引起人体肝脏疾病和食道癌^[85]。因此需要高灵敏、便捷、简单的方法用于食品中 FB₁ 的检测。Ren 等^[86]开发了一种一次性适配体传感器装置,将预处理的 SPCE 用带孔的聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 膜覆盖,以构建具有常规三电极的微电池,之后在工作中的电极上电沉积分散良好的金纳米颗粒,作为硫醇化适配体固定的优良基质;由于单个金纳米颗粒可以装载大量对 FB₁ 特异性的硫醇化适配体,因此在 SPCE 上修饰 AuNPs 为适配体提供了丰富的结合位点,从而提供了一个 3D 感应界面,有效地提高了响应信号;在最佳条件下,FB₁ 浓度与 EIS 信号在 10 pg/mL~50 ng/mL 呈现良好的线性关系,检测限为 3.4 pg/mL (S/N=3)。该传感器装置具有成本低、操作简单、高灵敏度和试剂消耗少等优点。

Chen 等^[87]通过电化学阻抗谱开发了一种基于适配体的生物识别方法,将 FB₁ 的硫醇化适配体锚定在玻碳电极上的金纳米颗粒表面;当 FB₁ 浓度为 0.1 nmol/L~100 $\mu\text{mol}/\text{L}$,FB₁ 浓度与电阻数值呈线性关系,且检测限为 2 pmol/L;该测定法可用于加标玉米样品中 FB₁ 的测定,回收率为 91%~105%。桂海雯等^[88]利用非标记荧光染料 PicoGreen 特异性识别适配体,建立了一种快速、高效检测 FB₁ 的方法,利用适配体的选择性以及 PicoGreen 与双链 DNA 结合的特异性,通过荧光信号变化确定样品中 FB₁ 浓度,实现了快速定量检测 FB₁ 的目的;整个检测流程可在 40 min 内完成,线性范围为 0.1~1 $\mu\text{g}/\text{L}$,检测限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。Yue 等^[67]设计了一种以适配体为基础并由光子晶体编码的悬浮阵列,可同时定量和定性检测 OTA 和 FB₁。该方法对 FB₁ 的检测范围为 0.001~1 ng/mL,检测限为 0.16 pg/mL,加标谷物样品中 FB₁ 的回收率为 76.58%~114.79%。

这些传感器具有操作简单、灵敏度高和亲和力高等优点,其中研发的同时检测两种霉菌毒素的适配体传感器对之后同时检测多种霉菌毒素的传感器的发展提供了新的探索思路 and 方向。

3.5 在 ZEN 检测中的应用

ZEN 是由镰刀菌产生的非甾体雌激素霉菌毒素,可导致 DNA 损伤和染色体失常,并引起牛、猪和家禽等动物的生殖问题,甚至导致人类的生殖问题^[85,89]。目前检测食品中玉米赤霉烯酮的主要方法是仪器分析,该检测方法不适合现场检测,所以更需研发

出高灵敏、简便和快速的方法检测食品中的 ZEN。

Wu 等^[71]报道了一种基于上转换纳米颗粒 (UCNPs) 和磁性纳米粒子 (MNPs) 的适配体传感器, 用于定量检测 ZEN。将适配体及其 cDNA 固定在 MNP 和 UCNP 表面上来制备发光生物测定平台, 然后将 aptamer-MNPs 和 cDNA-UCNPs 混合形成双链体结构。当添加 ZEN, 适配体从 cDNA 上解离并优先结合 ZEN, 导致发射峰的荧光强度降低。结果表明, 该检测方法的检测限为 $0.25 \mu\text{g/L}$, 在 $0.05 \sim 100 \mu\text{g/L}$ 范围内信号发光强度与 ZEN 浓度呈显著的线性相关性 ($R_2 = 0.9957$)。Chen 等^[57]开发了一种基于磁珠分离/富集的简单而快速的 SELEX 检测方法。将 ZEN 包被的磁珠与 ssDNA ($0 \sim 1600 \text{ nmol/L}$) 温育 60 min 进行结合测定。通过热处理洗脱磁珠结合的适配体, 并测量 ssDNA 的浓度。经过 14 轮 SELEX, 筛选出最佳适配体并成功应用于实际样品中 ZEN 的检测。该检测方法对 ZEN 的线性范围为 $3.14 \times 10^{-9} \sim 3.14 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 检测限为 0.785 nmol/L 。

Wang 等^[58]通过利用单链 DNA 适配体和 ZEN 单克隆抗体 (mAb-ZEN) 具有高特异性和亲和性的特点, 开发了一种用于检测玉米中 ZEN 的低氧免疫吸附测定方法。通过将纯化的 mAb-ZEN 作为 ssDNA 识别的靶标, 并包被在微量滴定板上。经过 15 轮筛选, 获得了对 mAb-ZEN 有最高亲和力和特异性的适配体。该检测方法的检出限为 0.01 ng/mL , 检测范围为 $0.03 \sim 2.5 \text{ ng/mL}$, 加标样品的回收率为 $95\% \sim 105\%$ 。Goud 等^[72]开发了一种以功能性的氧化石墨烯作为 FAM 荧光猝灭剂为基础的适配体传感器方法。该方法测定 ZEN 的浓度范围为 $0.5 \sim 64 \text{ ng/mL}$, 检测限为 0.5 ng/mL 。并成功地应用于测定加标的酒精饮料、啤酒和葡萄酒中 ZEN, 回收率为 $87\% \sim 96\%$, 浓度范围为 $1 \sim 16 \text{ ng/mL}$ 。目前对于 ZEN 适配体传感器的研发较少, 主要难题是筛选 ZEN 的适配体数目较少, 对 ZEN 适配体传感器的发展具有一定的局限性。

目前研发的 ZEN 适配体传感器虽然灵敏度高、特异性高, 但存在检测操作繁杂, 操作时间长等缺点。所以 ZEN 适配体传感器的研究具有很大的发展空间。

4 结语与展望

近年来核酸适配体检测方法的发展证明了核酸适配体检测技术可作为取代食品中检测霉菌毒素的常规检测和分析方法, 对于食品中其他小分子有害物质的检测提供了新的思路和途径。核酸适配体因具有易合成、易标记、易修饰、灵敏度高、特异性高等优点, 使其在食品安全、医学检测、药物分析和疾病诊断等领域发挥着重要的作用。目前核酸适配体广泛应用于检测霉菌毒素、金属离子、微生物、蛋白质等目标物, 而大多数文献报道都以 AFB₁、AFM₁、OTA 和 FB₁ 为主, 其他霉菌毒素核酸适配体的文献报道几乎没有, 所以筛选出其他霉菌毒素适配体及研发出相关适配体生物传感器具有一定的挑战性。

目前, 已经开发出用于霉菌毒素的核酸适配体传感器包括基于比色、荧光和 PCR 方法的传感

器^[28,59,61], 也存在耗时且不易执行的缺点, 而且有些传感器在使用时仍需要修改仪器的检测步骤, 导致操作步骤繁琐, 也存在损坏仪器的可能。在检测食物样品中霉菌毒素时, 检测体系中的反应基质会严重影响适配体灵敏度和准确性, 特别是在测定食品中多种霉菌毒素时。通过简化的样品制备过程来降低基质效应, 这也是核酸适配体检测食品中霉菌毒素面临的挑战和今后发展的趋势。尽管多数霉菌毒素核酸适配体已经得到应用, 如试纸条, 结合血糖仪检测等, 将这些核酸适配体作为实际应用的现场检测工具仍有一定的难度, 对于未来快速检测食品中霉菌毒素提供了新的思路和挑战。未来的研究可能集中研发便携、亲和力高、成本效益高的核酸适配体传感器, 使这些方法更适合于现场检测。

参考文献

- [1] Li X, Li P, Zhang Q, et al. Molecular characterization of monoclonal antibodies against aflatoxins: A possible explanation for the highest sensitivity [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84 (12): 5229-5235.
- [2] 龙定彪, 罗敏, 肖融, 等. 霉菌毒素及其毒性效应的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 11: 77-79.
- [3] Oplatowska S M, Haughey S A, Chevallier O P, et al. The determination of the mycotoxin content in distiller's dried grain with solubles (DDGS) using a multi-analyte UHPLC-MS/MS method [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63 (43): 9441-9451.
- [4] 蒙讯. 霉菌毒素: 养殖业中的“隐形杀手” [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 11: 55.
- [5] 朱超, 白文荟, 张桂兰, 等. 核酸适配体技术在霉菌毒素检测中的应用 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 1-14.
- [6] Xu L, Zhang Z, Zhang Q, et al. Mycotoxin determination in foods using advanced sensors based on antibodies or aptamers [J]. Toxins, 2016, 8(8): 239.
- [7] Chen X, Huang Y, Duan N, et al. Selection and characterization of single stranded DNA aptamers recognizing fumonisin B₁ [J]. Microchimica Acta, 2014, 181: 1317-1324.
- [8] Khoshfetrat S M, Bagheri H, Mehrgardi M A. Visual electrochemiluminescence biosensing of aflatoxin M₁ based on luminol-functionalized, silver nanoparticle-decorated graphene oxide [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 100: 382-388.
- [9] Wang Y, Liu N, Ning B, et al. Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2012, 34(1): 44-50.
- [10] Pfohl L A, Manderville R A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(1): 61-99.
- [11] Kuiper G T, Scott P M, Watanabe H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 1987, 7(3): 253-306.
- [12] Doi K, Ishigami N, Sehata S. T-2 toxin-induced toxicity in pregnant mice and rats [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(11): 2146-2158.
- [13] Kokkonen M, Ojala L, Parikka P, et al. Mycotoxin production of selected fusarium species at different culture conditions [J].

International Journal of Food Microbiology, 2010, 143: 17–25.

[14] Mantle P G. Risk assessment and the importance of ochratoxins[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2002, 50: 143–146.

[15] Gareis M, Wolff J. Relevance of mycotoxin contaminated feed for farm animals and carryover of mycotoxins to food of animal origin[J]. Mycoses, 2000, 43(S1): 79–83.

[16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 13078–2017 饲料卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[17] 中华人民共和国国家卫生, 计划生育委员会, 国家食品药品监督管理局. GB2761–2017 食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[18] Chauhan R, Singh J, Sachdev T, et al. Recent advances in mycotoxins detection[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 81: 532–545.

[19] Karczmarczyk A, Dubiakszepietowska M, Vorobii M, et al. Sensitive and rapid detection of aflatoxin M1 in milk utilizing enhanced SPR and p (HEMA) brushes [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 81: 159–165.

[20] Shephard G S. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(5): 1215–1224.

[21] Aydin H, Oguz H. Analyses of aflatoxin B₁ and zearalenone in corn silage by high performance thin layer chromatography (HPTLC) – fluorodensitometric method [J]. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2012, 18(1): 151–156.

[22] Cigie I K, Prosen H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(1): 62–115.

[23] Karoonuthaisiri N, Charlarmroj R, Uawisetwathana U, et al. Development of antibody array for simultaneous detection of foodborne pathogens [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2009, 24(6): 1641–1648.

[24] Park J H, Kim Y P, Kim I H, et al. Rapid detection of aflatoxin B₁ by a bifunctional protein crosslinker–based surface plasmon resonance biosensor [J]. Food Control, 2014, 36(1): 183–190.

[25] 陈璐. 基于适配体的食品中黄曲霉毒素 B1 和 M1 的生物传感器检测方法研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.

[26] Ma W, Yin H, Xu L, et al. Femtogram ultrasensitive aptasensor for the detection of ochratoxin A [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 42(1): 545–549.

[27] Pennacchio A, Varriale A, Scala A, et al. A novel fluorescence polarization assay for determination of penicillin G in milk [J]. Food Chemistry, 2016, 190(16): 381–385.

[28] Guo X, Wen F, Zheng N, et al. Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B₁ [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 56(1): 340–344.

[29] 蒋雪松, 许林云, 卢利群, 等. 生物传感器在食品污染物检测中的应用研究进展 [J]. 食品科学, 2013, 34(23): 357–362.

[30] 史建国, 李一苇, 张先恩. 我国生物传感器研究现状及发展方向 [J]. 山东科学, 2015, 28(1): 28–35.

[31] Omrani N M, Hayat A, Korri Y H, et al. Electrochemical biosensors for food security: Mycotoxins detection [J]. 2016: 469–490.

[32] Bazin I, Tria S A, Hayat A, et al. New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 87: 285–298.

[33] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249(4968): 505–510.

[34] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346(6287): 818–822.

[35] Feng C, Dai S, Wang L. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: A review [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 59: 64–74.

[36] Liu J, Bai W, Zhu C, et al. Sensitive colorimetric detection of cyromazine in cucumber samples by using label-free gold nanoparticles and polythymine [J]. Analyst, 2015, 140(9): 3064–3069.

[37] Hao Q, Csordas A T, Wang J, et al. Rapid and label-free strategy to isolate aptamers for metal ions [J]. ACS Nano, 2016, 10(8): 7558–7565.

[38] Wei Y, Zhang J, Wang X, et al. Amplified fluorescent aptasensor through catalytic recycling for highly sensitive detection of ochratoxin A [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 65(65): 16–22.

[39] 朱超, 白文荟, 颜朦朦, 等. 适配体试纸在霉菌毒素检测中的应用研究 [J]. 农产品质量与安全, 2016(2): 59–64.

[40] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX – A (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands [J]. Biomolecular Engineering, 2007, 24(4): 381–403.

[41] Jayasena S D. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics [J]. Clinical Chemistry, 1999, 45(9): 1628–1650.

[42] Wu Z, Shen H, Hu J, et al. Aptamer-based fluorescence-quenching lateral flow strip for rapid detection of mercury(II) ion in water samples [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(22): 5209–5216.

[43] Kim Y S, Raston N H, Gu M B. Aptamer-based nanobiosensors [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 76: 2–19.

[44] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101–1108.

[45] Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, et al. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 1141–1161.

[46] Jin C, Zheng J, Li C, et al. Aptamers selected by cell-SELEX for molecular imaging [J]. Journal of Molecular Evolution, 2015, 81(5–6): 162–171.

[47] Hosseini M, Khabbaz H, Dadmehr M, et al. Aptamer-based colorimetric and chemiluminescence detection of aflatoxin B₁ in foods samples [J]. Acta Chimica Slovenica, 2015, 62(3): 721–728.

[48] Mukherjee M, Bhatt P, M H K. Fluorescent competitive aptasensor for detection of aflatoxin B₁ [J]. Journal of Molecular

Recognition, 2017, 30(6): 1–6.

[49] Ma X, Wang W, Chen X, et al. Selection, identification, and application of aflatoxin B₁ aptamer [J]. European Food Research & Technology, 2014, 238(6): 919–925.

[50] Istambouli G, Panie L N, Zara L, et al. Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M₁ in milk [J]. Talanta, 2016, 146: 464–469.

[51] Malhotra S, Pandey A K, Rajput Y S, et al. Selection of aptamers for aflatoxin M₁ and their characterization [J]. Journal of Molecular Recognition Jmr, 2014, 27(8): 493–500.

[52] Cruzaguado J A, Penner G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(22): 10456–10461.

[53] McKeague M, Girolamo A D, Valenzano S, et al. Comprehensive analytical comparison of strategies used for small molecule aptamer evaluation [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(17): 8608–8612.

[54] McKeague M, Velu R, Hill K, et al. Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A [J]. Toxins, 2014, 6(8): 2435–2452.

[55] Frost N R, McKeague M, Falcioni D, et al. An in solution assay for interrogation of affinity and rational minimizer design for small molecule-binding aptamers [J]. Analyst, 2015, 140(19): 6643–6651.

[56] McKeague M, Bradley C R, Girolamo A D, et al. Screening and initial binding assessment of fumonisin B₁ aptamers [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(12): 4864–4881.

[57] Chen X, Huang Y, Duan N, et al. Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(20): 6573–6581.

[58] Wang Y K, Zou Q, Sun J H, et al. Screening of single-stranded DNA (ssDNA) aptamers against a zearalenone monoclonal antibody and development of a ssDNA-based enzyme-linked oligonucleotide assay for determination of zearalenone in corn [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(1): 136–141.

[59] Shim W B, Kim M J, Mun H, et al. An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B₁ [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 62(6): 288–294.

[60] 徐霞. 农产品中真菌毒素检测用新型光学纳米生物传感器的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.

[61] Seok Y, Byun J Y, Shim W B, et al. A structure-switchable aptasensor for aflatoxin B₁ detection based on assembly of an aptamer/split DNAzyme [J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 886: 182–187.

[62] Nguyen B H, Tran L D, Do Q P, et al. Label-free detection of aflatoxin M₁ with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor [J]. Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications, 2013, 33(4): 2229–2234.

[63] Panie L N, Radoi A, Marty J L. Development of an electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M₁ in milk [J]. Sensors, 2010, 10(10): 9439–9448.

[64] Vig A, Radoi A, Mu Oz-berbe L X, et al. Impedimetric

aflatoxin M₁ immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition [J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2009, 138(1): 214–220.

[65] 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.

[66] Wang L, Ma W, Chen W, et al. An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26(6): 3059–3062.

[67] Yue S, Jie X, Wei L, et al. Simultaneous detection of ochratoxin A and fumonisin B₁ in cereal samples using an aptamer-photonic crystal encoded suspension array [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(23): 11797–11802.

[68] Shi Z Y, Zheng Y T, Zhang H B, et al. DNA electrochemical aptasensor for detecting fumonisins B₁ based on graphene and thionine nanocomposite [J]. Electroanalysis, 2015, 27(5): 1097–1103.

[69] Wu S, Duan N, Li X, et al. Homogenous detection of fumonisin B₁ with a molecular beacon based on fluorescence resonance energy transfer between NaYF₄:Yb, Ho upconversion nanoparticles and gold nanoparticles [J]. Talanta, 2013, 116(22): 611–618.

[70] Zhao Y, Luo Y, Li T, et al. Au NPs driven electrochemiluminescence aptasensors for sensitive detection of fumonisin B₁ [J]. Rsc Advances, 2014, 4(101): 57709–57714.

[71] Wu Z, Xu E, Chughtai M F, et al. Highly sensitive fluorescence sensing of zearalenone using a novel aptasensor based on upconverting nanoparticles [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 673–680.

[72] Goud K Y, Hayat A, Satyanarayana M, et al. Aptamer-based zearalenone assay based on the use of a fluorescein label and a functional graphene oxide as a quencher [J]. Microchimica Acta, 2017, 184(11): 1–8.

[73] European Commission. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins [J]. Off J Eur Union, 2010, 50: 8–12.

[74] Chen L, Wen F, Li M, et al. A simple aptamer-based fluorescent assay for the detection of aflatoxin B₁ in infant rice cereal [J]. Food Chemistry, 2017, 215: 377–382.

[75] Sun L, Wu L, Zhao Q. Aptamer based surface plasmon resonance sensor for aflatoxin B₁ [J]. Microchimica Acta, 2017, 9: 1–6.

[76] Mao J, Lei S, Liu Y, et al. Quantification of aflatoxin M₁ in raw milk by a core-shell column on a conventional HPLC with large volume injection and step gradient elution [J]. Food Control, 2015, 51: 156–162.

[77] Busman M, Bobell J R, Maragos C M. Determination of the aflatoxin M₁ (AFM₁) from milk by direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) [J]. Food Control, 2015, 47: 592–598.

[78] Sharma A, Catanante G, Hayat A, et al. Development of structure switching aptamer assay for detection of aflatoxin M₁ in

milk sample[J]. Talanta, 2016, 158:35-41.

[79] Guo X, Wen F, Zheng N, et al. A qPCR aptasensor for sensitive detection of aflatoxin M₁ [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(20):5577-5584.

[80] European Commission. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs[J]. Off J Eur Union, 2006, 70:12-34.

[81] Sun A L, Zhang Y F, Sun G P, et al. Homogeneous electrochemical detection of ochratoxin A in food stuff using aptamer-graphene oxide nanosheets and DNase I-based target recycling reaction [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 89:659-665.

[82] Samokhvalov A V, Safenkova I V, Eremin S A, et al. Use of anchor protein modules in fluorescence polarisation aptamer assay for ochratoxin A determination[J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 962:80-87.

[83] Modh H, Scheper T, Walter J G. Detection of ochratoxin A by aptamer-assisted real-time PCR-based assay (Apta-qPCR) [J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 17:923-930.

(上接第 289 页)

[16] Wang Z, Hu J N, Yan M H, et al. Caspase-mediated anti-apoptotic effect of ginsenoside Rg5, a main rare ginsenoside, on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(42):9226-9236.

[17] 徐鑫, 屈彩芹. 药物性肝损伤机制[J]. 医学综述, 2008, 14(5):747-749.

[18] T K, I C, F C. Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury [J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2010, 88(10):960-967.

[19] Hartmut J, Knight T R, Mary Lynn B. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity[J]. Toxicology Letters, 2003, 144(3):279-288.

(上接第 293 页)

参考文献

[1] 杨芭梅, 林电, 李家均, 等. 香蕉营养规律的研究[J]. 云南农业大学学报, 2007, 37(1):56-79.

[2] 朱瑜安. 香蕉及其保健功能[J]. 中国食物与营养, 2006, 34(3):18-24.

[3] 廖一生. 香蕉的保健食疗与外用功效[J]. 湖南农机, 2013(12):39.

[4] 杨婧娟, 李娜, 赵声兰. 一种酵素的配方优化研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(1):95-99.

[5] 赵金凤. 植物酵素润肠通便保健功能研究[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(3):54-56.

[6] 任清. 微生物酵素美白抗衰老功效研究[J]. 香料香精化妆品, 2003(3):29-32.

[7] 何嘉欣. 台湾酵素营养保健品产业现状分析[J]. 趋势分

[84] 张勇, 郑楠, 文芳, 等. 适配体传感器结合便携式血糖仪定量检测赭曲霉毒素 A 的方法研究[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(1):182-188.

[85] Jonathan, Nimal, Selvaraj, et al. Mycotoxin detection: Recent trends at global level[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(11):2265-2281.

[86] Ren C, Li H, Lu X, et al. A disposable aptasensing device for label-free detection of fumonisin B₁ by integrating PDMS film-based micro-cell and screen-printed carbon electrode [J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2017, 251:192-199.

[87] Chen X, Huang Y, Ma X, et al. Impedimetric aptamer-based determination of the mold toxin fumonisin B₁ [J]. Microchimica Acta, 2015, 182(9):1-6.

[88] 桂海雯, 金庆日, 张亚军, 等. 基于荧光染料 PicoGreen 和核酸适配体的伏马毒素 B₁ 检测方法[J]. 生物工程学报, 2015, 31(9):1393-1400.

[89] 杜兵耀, 文芳, 王加启, 等. 核酸适配体技术在食品中霉菌毒素检测的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(17):230-235.

[20] Baek H J, Y M L, T H K, et al. Caspase-3/7-mediated cleavage of β 2-spectrin is required for acetaminophen-induced liver damage [J]. International Journal of Biological Sciences, 2016, 12(2):172-183.

[21] Sanda W, Tin Aung T, Derick H, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor (TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(40):35071-35078.

[22] Jaeschke H, McGill M R, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity [J]. Drug Metabolism Reviews, 2012, 44(1):88-106.

析, 2013(2):77-82.

[8] Nagai T, Inoue R, Inoue H, et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis[J]. Food Chemistry, 2003, 80(1):29-33.

[9] 樊青玲, 张耀兮, 李天才. 藜叶中黄酮类化合物体外抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009(4):672-675.

[10] 邹国林, 黄艳, 石巨恩, 等. 一种 SOD 的测活方法-邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1984, 23(4):478-491.

[11] 贺建华, 鹿麟, 邵纯君, 等. 福林酚法与考马斯亮蓝法测定甘露聚糖肽口服溶液中蛋白质含量的比较[J]. 中国药师, 2017, 20(10):1861-1863.

[12] 钟建平, 钟春燕, 赵道辉, 等. 苯酚-硫酸比色法测定保健食品多糖的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 11(6):675-678.