

基于链置换扩增的电化学适配体生物传感器检测食品中的赭曲霉毒素 A

刘伟¹, 张蕴哲¹, 杨倩², 范少华³, 田益玲¹, 张伟^{1,4,5*}

¹河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

²河北大学公共卫生学院 河北保定 071000

³河北软件职业技术学院 河北保定 071000

⁴河北农业大学生命科学学院 河北保定 071000

⁵河北省人畜共患病原微生物分析与防控重点实验室 河北保定 071000

摘要 为构建一种基于链置换扩增技术(SDA)和电化学适配体传感器技术检测食品中赭曲霉毒素 A(OTA)的方法,根据 OTA 特异性适配体设计发卡结构,并在发卡结构的茎部设置 SDA 反应识别位点,进行 SDA 扩增。将扩增产物与修饰二茂铁(Fe)的电化学探针进行杂交,使电信号发生变化,从而建立电化学适配体传感器检测 OTA 的方法。通过对 7 组不同毒素的测定评价该方法的特异性,测定其灵敏度和检出限,并与赭曲霉毒素 A 酶联免疫分析方法(ELISA)国家标准(GB 5009.96-2016)进行对比试验。结果表明:最优条件下,电化学适配体传感器灵敏度线性范围为 0.1 pg/mL~10 ng/mL,检出限(LOD)为 0.05 pg/mL。当 OTA 存在时,检测结果为阳性,当 OTA 不存在时,检测为阴性,说明该方法特异性良好。在人工加标试验中,该电化学适配体传感器的加标回收率为 96.60%~99.04%,ELISA(国家标准)的加标回收率为 94.00%~98.50%,该方法的加标回收率优于国家标准。结论:该方法能够快速检测食品中的 OTA,具有实用应用价值。

关键词 赭曲霉毒素 A; 核酸适配体; 链置换扩增; 电化学生物传感器

文章编号 1009-7848(2024)01-0232-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.01.024

赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)主要是由曲霉属和青霉属产生的次级代谢产物,常见于咖啡、小麦粉、葡萄酒、乳制品和水果等日常食品和食品原材料中^[1-3]。OTA 理化性质较稳定,不易清除,对人类的肾、肝和脑等重要器官具有强烈毒性^[4-5]。国际癌症研究机构(International agency for research on cancer, IARC)于 1993 年将 OTA 归类为可能的人类致癌物 2B 组^[6]。

传统检测 OTA 的方法包括:高效液相色谱法

(High performance liquid chromatography, HPLC)^[7]、气相色谱与质谱联用(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[8]和薄层色谱(Thin-layer chromatography, TLC)^[9]等色谱方法。其中高效液相色谱法具有高灵敏度,是检测 OTA 的主要方法之一。然而,其存在耗时长,设备昂贵,需要专业人员和大量试剂^[10]等不足。传统的酶联免疫分析方法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)具有检测时间较短的优点,然而其存在检出限较高,所需抗原抗体合成价格昂贵,试剂需要冷藏保存,不适宜运输^[11]等不足。而生物传感器作为一种成本低廉的快速检测手段,有望完善这些缺点^[12]。

在 OTA 特异性识别方面,传统方法将抗体作为分子识别工具^[13],在食品分析中发挥至关重要的作用。这些基于蛋白质的抗体通常在动物体内产生,导致其相对复杂的生产过程和昂贵的价格^[14]。相比之下核酸适配体的获取比传统抗体更方便^[15],显示出许多优点,例如批次间变异低,免疫原性低,易用纳米材料或有机染料分子进行修饰等^[16-17]。人们开始将核酸适配体作为识别分子来

收稿日期: 2023-01-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172288, 31371772); 河北省自然科学基金重点项目(C2019204342); 中央引导地方科技发展资金项目(216Z5501G, 226Z5503G, 236Z5502G); 河北省外专百人计划(360-0803-JSN-3YGS); 河北省重点研究开发计划项目(18275501D); 河北省教育厅科研项目(QN2022073); 河北省自然科学基金项目(C2019204284)

第一作者: 刘伟,男,硕士生

通信作者: 张伟 E-mail: zhangwei631126@163.com

替代抗体的作用^[18]。近些年,链置换扩增(Strand displacement amplification, SDA)技术成为研究热点,SDA 不需要精确控制温度,可以与各种信号分子结合,增加其使用范围^[1]。同时电化学生物传感器技术是公认的应用范围广、成本低的生物传感器,其原理是通过生物识别元件与电化学换能器之间的结合,通过电分析技术进行最终的信号响应和测量^[19-20]。电化学生物传感器除了表现出生物传感器本身固有的高特异性外,还结合了电分析技术的高灵敏度和低检出限的优点^[21]。其样品制备简单,可以进行现场快速检测^[22]。

目前,关于应用链置换扩增技术与电化学适配体传感器进行 OTA 定量检测鲜见报道。本文利用 OTA 适配体的高特异性和链置换扩增技术的宽线性检测范围,以及电化学生物传感器技术的信号输出反应灵敏等优点,将它们相结合,拟建立一种基于电化学适配体传感器的定量检测 OTA 的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 B(Ochratoxin B, OTB)、黄曲霉毒素 B1(Aflatoxin B1, AFB1)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、伏马毒素 B1(Fumonisin B1, FB1), 普瑞邦生物工程有限公司提供。

Nb.BsrDI 切刻内切酶、*Bst* DNA 聚合酶, NEB(北京)有限公司; $MgSO_4$, 宝生物工程(大连)有限

公司; 氯金酸, 源叶生物有限公司; 铁氰化钾、亚铁氰化钾, 天津市光复科技发展有限公司; 巯基乙醇(MCH), 上海麦克林生化科技有限公司; 三-膦酸盐(TCEP), 合肥博美生物科技有限公司; 氧化铝抛光粉、玻碳电极(GCE)、铂丝电极、Ag/AgCl 参比电极, 武汉科斯特仪器股份有限公司; 过硫酸铵溶液(AP), 北京雷根生物技术有限公司; 甲醇(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司

1.2 仪器与设备

场发射扫描电镜 (TESCAN MIRA LMS), 泰思肯(中国)有限公司; CS350H 电化学工作站, 武汉科思特仪器股份有限公司; 凝胶成像仪(BINDA 2020D)北京君意东方电泳设备有限公司; Step One Plus 荧光定量 PCR 仪, 新加坡生命科技控股有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 试验原理 SDA 的电化学适配体生物传感器的检测原理见图 1。首先利用 OTA 适配体对 OTA 进行特异性识别, 形成反平行 G-四链体结构^[23], 触发 SDA 反应产生大量目标产物(图 1a)。通过 Au-S 键将发夹探针修饰在金电极表面, 加入 MCH 封闭电极表面活性位点, 实现电化学探针的垂直定向, 使二茂铁(Fc)靠近电极表面^[24], 此时电流峰值为 I_0 。电极与 SDA 产物 DNA 反应后, 探针颈部被打开, Fc 与电极表面距离发生改变, 此时电流峰值为 I (图 1b)。通过计算得出产物 DNA 的反应生成浓度, 即 $\Delta I\% = (I_0 - I)/I_0$ 。

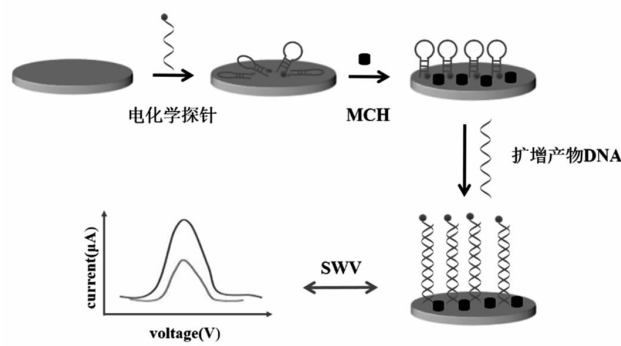
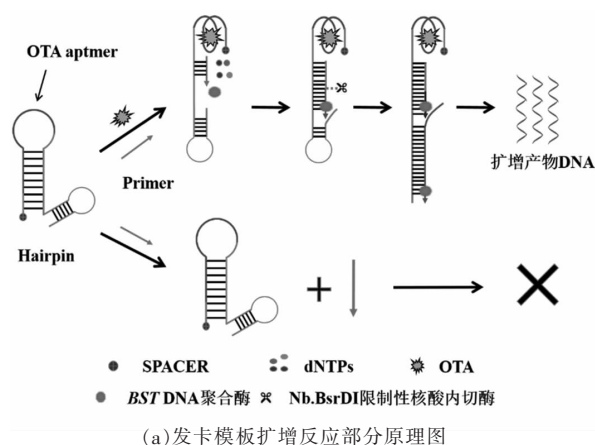


图 1 本研究检测原理图

Fig.1 Schematic diagram of the detection principle in this study

1.3.2 发卡、引物与电化学探针设计 通过 NU-PACK 设计发卡、引物与电化学探针,其核酸序列见表 1。发卡模板由 Wang 等^[25]筛选出的 OTA 适配体序列、Nb.BsrDI 内切酶识别序列以及电化学探针互补序列组成,发卡模板序列的 3'端修饰

spacer。由于 Nb.BsrDI 内切酶的识别序列为 5'-NNCATTGC-3'(N 代表任意 G、A、T、C 碱基),因此本试验在发卡模板中设计的序列为该识别序列的反向互补序列 5'-GCAATGNN-3'。

表 1 试验所用核酸序列

Table 1 The nucleic acid sequences used in this study

类型	序列(5'-3')
发卡	CGTGCCGCGAGTACGAGTTTCCGGCGGCAATGTGTGGCCGCTGGTGTCCGATG TTTGATCGGGTGGGTGGGGCGTAAGGAGCATCGGACACCCGCGGC-spacer
引物	ATCGGACACCAGCGGC
电化学探针	SH-(CH ₂) ₆ -CGTGCCGCGAGTACGAGTTTCCGGCG-Fe

注:下划线部分为 Nb.BsrDI 内切酶识别序列的反向互补序列,斜体加粗部分为 OTA 适配体序列。

1.3.3 电化学适配体传感器的方法的建立

1) 孵育过程 先将发卡模板在 95 °C 条件下预变性 5 min。将不同浓度的 1.0 μL OTA 与 1.0 μL 发卡(10 μmol/L)、1.0 μL 引物(10 μmol/L)、1.0 μL dNTPs(10 mmol/L)、2.0 μL Bst DNA 聚合酶缓冲液(10×)和 2.0 μL Cutsmart 缓冲液(10×)混匀,加入蒸馏水(ddH₂O),体系共 16 μL,在 37 °C 下避光孵育 30 min。

2) 扩增过程 在孵育后的体系中加入 2.0 μL Bst DNA 聚合酶(8 U/μL)、2.0 μL Nb.BsrDI 内切酶(10 U/μL),终体系为 20 μL。振荡混匀后 65 °C 条件下反应 30 min。

3) 电化学反应过程 将试验所用玻碳电极用粒径分别为 1.0,0.3,0.05 μm 的 Al₂O₃ 粉末抛光,再用乙醇和超纯水去除残留的 Al₂O₃ 粉末。在 1%AuNPs 溶液中采用恒电位极化,得到 AuNPs 修饰的电极。

将电化学探针用 10 mmol/L 的 TCEP 稀释至 100 μmol/L,于 37 °C 避光还原 1 h。再将电化学探针稀释至 6 μmol/L,取 10 μL 滴加在电极表面,37 °C 避光孵育 4 h。将修饰好的电极浸入 10 mmol/L Tris 缓冲液中浸泡 30 min。浸入 2 mmol/L MCH 中处理 30 min 后通过方波伏安法(SWV)测量其初始信号强度。

将测量初始信号后的电极于 37 °C 浸泡在含有扩增产物的离心管中 80 min,清洗晾干后,通过 SWV 方法测量其电信号强度。

1.3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳验证 将 DNA 扩增产物与 DNA 上样缓冲液(体积比 4:1)混合后,每个样品加入新制备的 20%聚丙烯酰胺凝胶(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)中^[26-27]。在 1×TBE 缓冲液(pH 8.0)中,电压 120 V 条件下电泳 60 min。最终将凝胶在染色液中染色 60 min,使用凝胶成像仪成像。

1.3.5 方波伏安法检测验证 为验证本试验开发的电化学适配体传感器的可行性,分别设计阳性对照和空白对照试验。分别浸泡在测试液中通过 SWV 方法测量电信号强度,以评估该传感器的可行性。

1.3.6 电化学表征 将未修饰的裸电极(玻碳电极)和修饰上 AuNPs 的金电极用 SEM 方法观察。通过 CV 和 EIS 电化学表征方法表征。

1.3.7 电化学适配体传感器的灵敏度和检出限

各取 1 μL 的不同浓度的 OTA 进行电化学信号检测,得到的电流变化值 ΔI(%)数据。以不同浓度的 OTA 浓度和电流变化值 ΔI(%)为横、纵坐标绘制曲线,得到线性回归方程,确定灵敏度与检测限。

1.3.8 电化学适配体传感器的特异性、重复性和稳定性 为了验证本试验的特异性,选取 OTB、FB1、AFB1、ZEN 为对比毒素。在最适反应条件下,将 1 ng/mL OTA 扩增体系与质量浓度均为 1 ng/mL 的参考毒素(OTB、FB1、AFB1、ZEN)、混合组 1(含 OTA、OTB、FB1、AFB1、ZEN,质量浓度均为 1

ng/mL)、混合组 2(含 OTB、FB1、AFB1、ZEN, 质量浓度均为 1 ng/mL)和空白对照共 8 组进行特异性验证。

本试验同时用 8 根电极在相同条件下对于同一质量浓度(1 ng/mL)的 OTA 毒素进行检测,验证该方法的重复性。

此外,为研究本方法的稳定性,将数根修饰电化学探针的电极存放于 4 °C 条件储存 2 周来评估该传感器的稳定性,分别在第 1,2,3,5,7,14 天取出与相同扩增产物反应后,进行 SWV 方法测量,得到的信号值与初始信号值进行对比分析,以验证该方法的稳定性。

1.3.9 人工加标试验 在小麦粉原材料、咖啡和红酒等食品中进行人工污染检测。为了验证检测结果的准确性,同时使用本方法和商业 ELISA 试剂盒方法的检测结果进行对比。

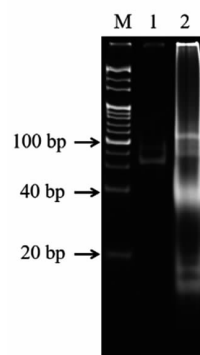
将小麦和咖啡固体样品用粉碎机粉碎后过 20 目的筛。称取小麦粉样品 5.0 g、咖啡粉样品 2.5 g,分别加入 25 mL 60%甲醇溶液,剧烈振荡 5 min,4 000 r/min 离心 10 min。取上清液,采用孔径 0.22 μm 的针头式过滤器过滤,向滤液中加入不同浓度的 OTA 标准品。取红酒样品 1 mL,加入 4 mL 蒸馏水,再加入不同浓度的 OTA 标准品。将处理完毕的样品同时用电化学适配体传感器和商业 ELISA 试剂盒检测。

2 结果与分析

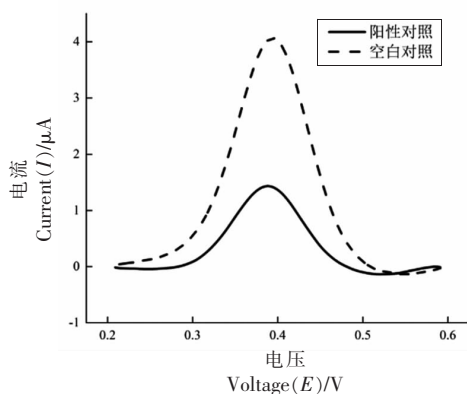
2.1 试验可行性验证

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)结果如图 2a 所示,在泳道 1 中,没有 OTA 存在的情况下,在 70~80 bp 处产生明亮条带,表明发卡结构未打开,无法产生后续反应,在 20 bp 处未发现目标长度条带。泳道 2 中,存在 OTA 的情况下,发卡结构打开,引物与发卡模板结合并进行扩增,在接近 20 bp 处发现目标长度条带,表明反应正常发生。这些结果证实基于发卡结构的用于检测 OTA 的 SDA 扩增反应成功构建。

SWV 分析结果如图 2b 所示,当电化学探针修饰到电极表面时,可以在 0.2~0.6 V 点位区间内观察到二茂铁(Fc)的信号。当溶液中不存在 OTA 时,Fc 信号电流值(曲线 a)依旧可以保持较



(a)PAGE 凝胶电泳图



(b)可行性验证 SWV 图

注:M. 20 bp Maker;1. 空白对照;2. 阳性对照。

图 2 可行性分析图

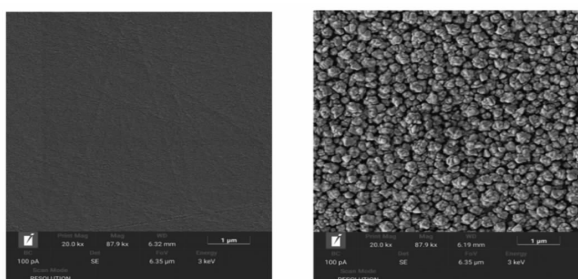
Fig.2 Feasibility analysis diagram

强的电信号。当溶液中存在 OTA 时,电极上修饰的 Fc 与电极表面的距离变大,使 Fc 信号电流值(曲线 b)变小。由可行性试验结果可知,所建立的电化学传感器可用于检测 OTA。

2.2 修饰电极的表征

2.2.1 修饰电极的扫描电镜表征分析 用扫描电镜观察玻碳电极和镀金电极的表面,结果如图 3a 所示。改性前,在玻碳电极上未观察到杂质,为后续的 AuNPs 修饰提供了良好的条件。在玻碳电极上电沉积金后,由图 3b 可知,玻碳电极表面形成一层均匀的 AuNPs,表明玻碳电极与 AuNPs 成功结合,与文献[28]报道一致。

2.2.2 修饰电极的电化学表征 通过 EIS 和 CV 对修饰电极进行电化学表征,结果如图 4 所示。图 4a 为 CV 图,由于 AuNPs 导电性较强,修饰 AuNPs 电极的氧化-还原峰值(曲线 a)较玻碳电极的氧化-还原峰值(曲线 b)有明显的上升。固定

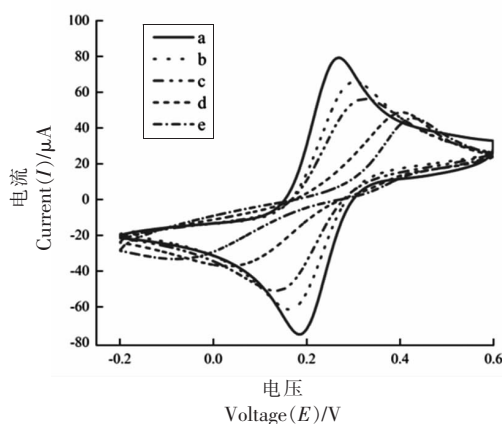


(a)玻碳电极扫描电镜图像 (b)金修饰电极扫描电镜图像

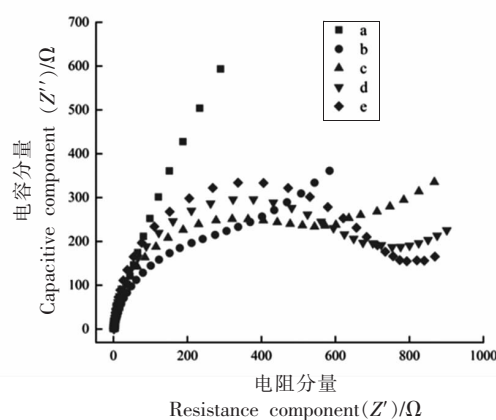
图3 电极表征扫描电镜图

Fig.3 SEM of electrode characterization of electrode characterization

电化学探针后,电极的氧化-还原峰值(曲线c)降低,表明电化学探针成功固定在电极表面^[29]。将电极用MCH浸泡,电极的氧化-还原峰值(曲线d)降低,表明MCH成功封闭电极。最后,将电极浸泡在扩增反应液后,观察到氧化-还原峰值(曲线e)



(a)不同时期检测电极表面的CV图像



(b)不同时期检测电极表面的EIS图像

图4 电化学传感器的CV(a)和EIS(b)图

Fig.4 CV (a) and EIS (b) diagrams of the electrochemical sensor

2.3 电化学适配体传感器灵敏度和检出限

在最优条件下,通过SDA扩增反应,将所制备的电化学传感器用于检测不同浓度的OTA。如图5a所示,用该方法检测不同浓度OTA后所对应的不同电流信号 I ,随着OTA浓度不断增大,SWV检测的电流值不断减小。结果表明,随着SDA扩增产物单链DNA的不断增多,与其结合的电化学探针不断增加,电流值不断降低,呈良好的线性关系。

如图5b所示, $\Delta I(\%)$ 随OTA质量浓度(0.05 pg/mL~10 ng/mL)的增加而增加,电流峰值的变化

降低,表明电极表面的电化学探针与扩增反应所产生的单链产物发生DNA互补杂交。

电化学阻抗谱通常用于研究不同物质对电极表面的修饰^[30]。EIS曲线中,半圆半径与法拉第反应电荷转移阻抗(R_{ct})相关^[31]。图4b为EIS图,金电极几乎呈直线(曲线a),与裸电极的半径(曲线b)相比,有较快的电子转移率,电阻率更低,表明AuNPs成功修饰。当电化学探针固定在电极上时,观察到曲线半径增大(曲线c), R_{ct} 值增加,表明电化学探针成功修饰。随后,电极表面被MCH钝化,曲线半径进一步增大(曲线d), R_{ct} 值增加。将电极与扩增产物单链DNA反应后,单链DNA与分子开关的环区完全互补,曲线半径(曲线e)达到最大值, R_{ct} 值增大,EIS结果与CV结果保持一致,表明本研究中传感器被成功构建。

量 $\Delta I(\%)$ 与OTA浓度的对数在0.1 pg/mL~10 ng/mL范围内保持良好的线性关系,相关系数 $R^2=0.997$,线性回归方程为 $y=9.2846 \lg C_{OTA}+68.9217$ 。OTA电化学适配体传感器方法的检测限为0.05 pg/mL,综上所述表明本研究的方法可用于定量检测OTA。

2.4 传感器特异性

电化学适配体生物传感器的特异性结果如图6所示。图6a为该试验特异性的PAGE结果,胶图中显示的OTA和混合组A产生扩增反应,而OTB、AFB1、FBI、ZEN和混合组B的条带与空白

对照结果相同,表明该电化学适配体传感器的特异性良好。图 6b 为电流变化比(ΔI)的结果,OTB、AFB1、FB1、ZEN 和混合组 B 的 $\Delta I(\%)$ 几乎与空白对照的 $\Delta I(\%)$ 相同,而 OTA 与混合组 A 的

$\Delta I(\%)$ 基本处于较高水平。证实了电化学生物传感器的特异性良好,混合类样品对传感器的影响较低,在区分 OTA 与其它毒素方面表现出高特异性。

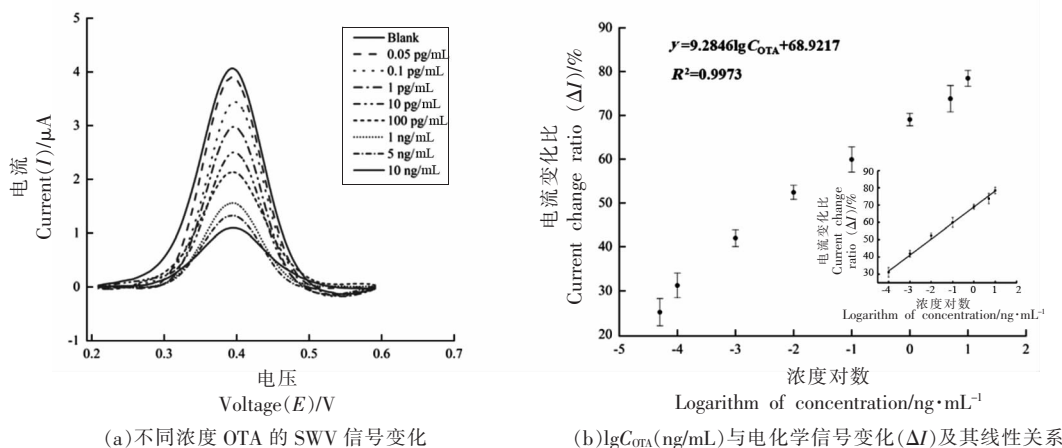
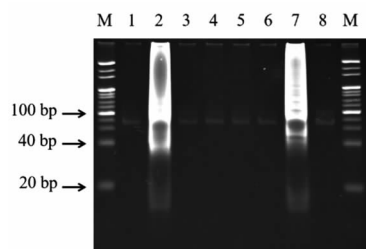
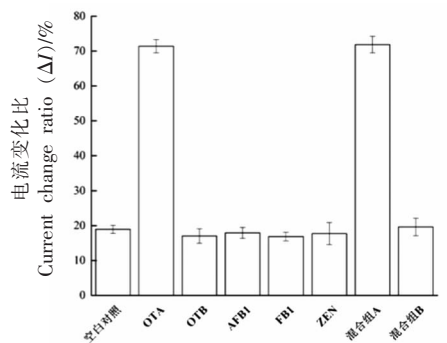


图 5 基于链置换扩增的电化学生物传感器的检测性能

Fig.5 The detection performance of an electrochemical biosensor based on strand displacement amplification



(a) 特异性聚丙烯酰胺电泳图



(b) 不同毒素试验组间电化学信号变化

注: 1. 空白对照; 2. OTA; 3. OTB; 4. AFB1; 5. FB1; 6. ZEN; 7. 混合组 A (OTA+OTB+AFB1+FB1+ZEN); 8. 混合组 B (OTB+AFB1+FB1+ZEN); M. 20 bp Marker。

图 6 基于链置换扩增的电化学适配体传感器的特异性检测

Fig.6 Specificity detection of electrochemical biosensor based on strand displacement amplification

2.5 传感器重复性及稳定性

验证该电化学适配体传感器的重复性和稳定性结果如图 7 所示。图 7a 表示该方法的重复性结果,在相同试验操作下,本试验的 $\Delta I(\%)$ 的 RSD 为 2.63,表明本方法具有良好的重复性。图 7b 表示该方法的稳定性,第 14 天的 $\Delta I(\%)$ 仍达到其初始值(91.51%),反应后的电极经 14 d 保存,其结果准确率仍保持在 90%以上,表明电化学适配体传感器具有高稳定性。

2.6 方法的回收率

为了研究电化学适配体传感器检测实际样品的能力,用小麦粉、咖啡和红酒样品进行回收率测定。在不同处理后的食品样品中加入终质量浓度为 5 ng/mL 和 10 ng/mL 的 OTA 标准品,进行电化学适配体传感器和 ELISA 检测,结果见表 2。电化学适配体传感器的加标回收率在 96.60%~99.04% 之间,RSD 低于 5%,而商业 ELISA 试剂盒的加标回收率在 94.00%~98.50% 之间。表明本试验开发

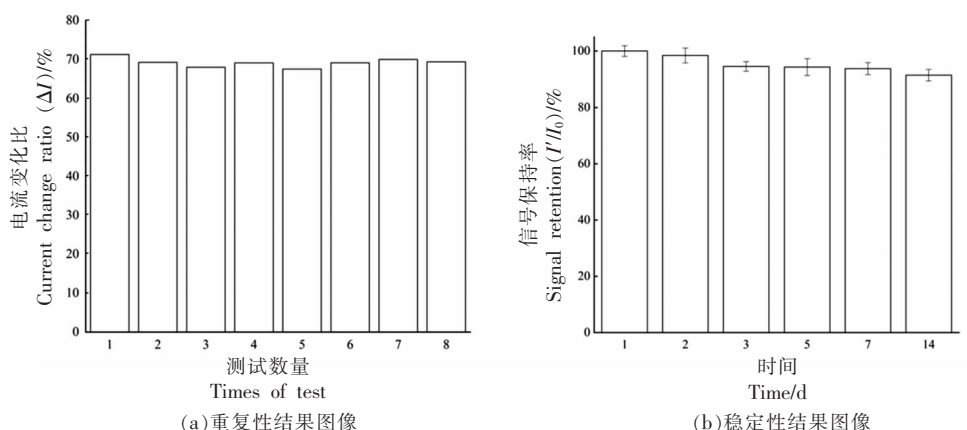


图7 基于链置换扩增的电化学适配体传感器的重复性和稳定性检测

Fig.7 Repeatability detection of electrochemical aptamer sensor based on strand displacement amplification

表2 人工加标食品样品中 OTA 含量检测及与 ELISA 方法比较

Table 2 The content of OTA in artificially labeled food samples was detected and compared with ELISA

样品	加入质量浓度/ng·mL ⁻¹	检测值/ng·mL ⁻¹	ELISA/ng·mL ⁻¹	回收率/%	RSD/%
小麦粉	5.0	4.94	4.90	98.80	2.71
	10.0	9.91	9.63	99.06	2.56
咖啡	5.0	4.90	4.88	98.04	3.34
	10.0	9.66	9.72	96.60	2.15
红酒	5.0	4.88	4.70	97.66	2.76
	10.0	9.82	9.85	98.22	3.83

的电化学适配体传感器具有实际检测食品中 OTA 的能力,相较于 ELISA 方法具有更高的准确性。

有现场快速、准确检测食品中 OTA 毒素的能力,实用性较高。

3 结论

1) 构建了一种快速检测食品中 OTA 的电化学生物传感器,通过电信号快速响应,准确灵敏。

2) 开发的电化学适配体传感器,实现了 0.1 pg/mL~10 ng/mL 的线性检测范围,检出限为 0.05 pg/mL,低于国家标准(GB 5009.96-2016)。与其它检测 OTA 的生物传感器方法^[32-34]相比,本试验具有良好的线性检出范围及检出限。

3) 特异性试验中,2 组含有 OTA 的试验组呈阳性,6 组不含有 OTA 的试验组呈阴性,表明该方法具有较强的特异性。本试验的重复性 RSD 为 2.63%,稳定性结果:在 14 d 内信号保持率为 91.55%。

4) 人工加标回收率检测中,该电化学适配体传感器的检测回收率为 96.60%~99.04%,ELISA 的加标回收率为 94.00%~98.50%,表明该方法具

参 考 文 献

- [1] HAN B, FANG C, SHA L J, et al. Cascade strand displacement reaction-assisted aptamer-based highly sensitive detection of ochratoxin A[J]. Food Chemistry, 2020, 338(3): 127827.
- [2] COTON M, AUFFRET A, POIRIER E, et al. Production and migration of ochratoxin A and citrinin in Comté cheese by an isolate of *Penicillium verrucosum* selected among *Penicillium* spp. mycotoxin producers in YES medium[J]. Food Microbiology, 2019, 82(9): 551-559.
- [3] CSENKI Z, GARAI E, FAISAL Z, et al. The individual and combined effects of ochratoxin A with citrinin and their metabolites (ochratoxin B, ochratoxin C, and dihydrocitrinone) on 2D/3D cell cultures, and zebrafish embryo models[J]. Food and

- Chemical Toxicology, 2021, 158(12): 112674.
- [4] 苏敏. 离子液体-分散液液微萃取快速富集检测食品中痕量 AFB1 和 OTA 的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- SU M. Study on rapid enrichment of trace AFB1 and OTA in food by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.
- [5] BRERA C, SANTIS B D, DEBEGNACH F, et al. Chapter 12 Mycotoxins[J]. Comprehensive Analytical Chemistry, 2008, 51: 363-427.
- [6] LEE H J. Stability of ochratoxin A in oats during roasting with reducing sugars[J]. Food Control, 2020, 118(2): 107382.
- [7] 刘妍. 基于三维大孔径反蛋白石结构光子晶体免疫磁珠富集, 净化与 HPLC-FLD 检测 OTA, AFB1 及 ZEN 的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2018.
- LIU Y. The study on the enrichment, purification and HPLC-FLD detection for OTA, AFB1 and ZEN based on three-dimensional large porous inverse-opal photonic crystal immunomagnetic microspheres [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2018.
- [8] SOLEAS G J, YAN J, GOLDBERG D M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(6): 2733.
- [9] TRENK H L, SUN C F. Improved detection of Ochratoxin A on thin layer plates[J]. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 2020, 54(6): 1307-1309.
- [10] XIAO M W, BAI X L, LIU Y M, et al. Simultaneous determination of trace Aflatoxin B1 and Ochratoxin A by aptamer-based microchip capillary electrophoresis in food samples[J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1569(18): 222-228.
- [11] SUN Z C, WANG X R, TANG Z W, et al. Development of a biotin-streptavidin-amplified nanobody-based ELISA for ochratoxin A in cereal[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 171(8): 382-388.
- [12] ALHAMOUD Y, YANG D T, KENTON S S F, et al. Advances in biosensors for the detection of ochratoxin A: Bio-receptors, nanomaterials, and their applications[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 141(17): 111418.
- [13] JAYAN H, PU H B, SUN D W, et al. Recent development in rapid detection techniques for microorganism activities in food matrices using bio-recognition: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 95(1): 233-246.
- [14] ARMENTA S, ESTEVE-TURRILLAS F A, GARRIGUES S, et al. Smart materials for sample preparation in bioanalysis: A green overview[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2021, 21(6): 100411.
- [15] ZHAO Y, YAVARI K, LIU J. Critical evaluation of aptamer binding for biosensor designs[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021, 146(1): 116480.
- [16] HUANG Z K, QIU L P, ZHANG T, et al. Integrating DNA nanotechnology with aptamers for biological and biomedical applications[J]. Matter, 2021, 4(2): 461-489.
- [17] CHIU T C, HUANG C C. Aptamer-functionalized nano-biosensors[J]. Sensors, 2009, 9(12): 10356-10388.
- [18] NAKATSUKA N, CAO H H, DESHAYES S, et al. Aptamer recognition of multiplexed small-molecule-functionalized substrates[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 10(28): 23490-23500.
- [19] CHEN G F, LIANG Z Q, LI G X. Progress of electrochemical biosensors fabricated with nanomaterials[J]. Acta Biophysica Sinica, 2010, 26(8): 711-725.
- [20] HARA T O, SINGH B. Electrochemical biosensors for detection of pesticides and heavy metal toxicants in water: Recent trends and progress[J]. ACS ES&T Water, 2021, 1(3): 462-478.
- [21] YÁEZLOGEDEO P, VILLALONGA R, PINGARRÓN J M. Electroanalytical methods based on hybrid nanomaterials[M]. Spain: Madrid, 2019: 1-3.
- [22] ZENG Y, ZHU Z H, DU D, et al. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2016, 781: 147-154.
- [23] HE K Y, SUN L P, WANG L, et al. Engineering DNA G-quadruplex assembly for label-free detection of Ochratoxin A in colorimetric and fluorescent dual modes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423: 126962.
- [24] RAJU V M, BHAVANA V, GOPIKRISHNA G K, et al. A novel disposable electrochemical DNA biosensor for the rapid detection of *Bacillus*

- thuringiensis*[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 159(11): 105434.
- [25] WANG G, ZHANG H Y, WANG Y L, et al. Requirement of LaeA, VeA, and VelB on asexual development, ochratoxin A biosynthesis, and fungal virulence in *Aspergillus ochraceus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2759.
- [26] SONG X L, DING Q, PU Y P, et al. Application of the Dimeric G-quadruplex and toehold-mediated strand displacement reaction for fluorescence biosensing of ochratoxin A[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 192(21): 113537.
- [27] HUANG S Q, HU J, ZHU G, et al. Sensitive detection of point mutation using exponential strand displacement amplification-based surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 65(5): 191-197.
- [28] HUI 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*, 2019, 109(3): 106902.
- [29] RAJU V M, BHAVANA V, GOPIKRISHNA G K, et al. A novel disposable electrochemical DNA biosensor for the rapid detection of *Bacillus thuringiensis*[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 159(11): 105434.
- [30] ZHOU M, CHEN Y, FANG G Z, et al. Electrolyte/electrode interfacial electrochemical behaviors and optimization strategies in aqueous zinc-ion batteries [J]. 2022, 45(3): 618-646.
- [31] MAJHI K C, YADAV M. Bimetallic chalcogenide nanocrystallites as efficient electrocatalyst for overall water splitting[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2020, 852: 156736.
- [32] LI X Y, FALCONE N, HOSSAIN M N, et al. Development of a novel label-free impedimetric electrochemical sensor based on hydrogel/chitosan for the detection of ochratoxin A [J]. *Talanta*, 2021, 226(3): 122183.
- [33] ZHANG J, CHEN J H, ZHANG X, et al. An electrochemical biosensor based on hairpin-DNA aptamer probe and restriction endonuclease for ochratoxin A detection[J]. *Electrochem Commun*, 2012, 25(11): 5-7.
- [34] WANG X Y, SHAN Y Q, GONG M, et al. A novel electrochemical sensor for ochratoxin A based on the hairpin aptamer and double report DNA via multiple signal amplification strategy[J]. *Sensors and Actuators*, 2019, 281(2): 595-601.

Detection of Ochratoxin A in Food by Electrochemical Aptamer Biosensor Based on Strand Displacement Amplification

Liu Wei¹, Zhang Yunzhe¹, Yang Qian², Fan Shaohua³, Tian Yiling¹, Zhang Wei^{1,4,5*}

¹College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

²School of Public Health, Hebei University, Baoding 071000, Hebei

³Hebei Software Institute, Baoding 071000, Hebei

⁴College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

⁵Key Laboratory of Analysis and Prevention and Control of Pathogenic Microorganisms Caused by Zootopia in Hebei Province, Baoding 071000, Hebei)

Abstract A method based on strand displacement amplification (SDA) and electrochemical aptamer sensor technology was constructed to detect ochratoxin A (OTA) in food. According to the OTA specific aptamers, the hairpin structure was designed, and the SDA reaction recognition sites were set in the stems of the hairpin structure. SDA amplification was carried out. The amplified products were hybridized with the electrochemical probe modified ferrocene (FC) to change the electrical signal, so as to establish an electrochemical aptamer sensor for detecting OTA. The specificity of the method was evaluated through the determination of seven groups of different toxins, and its sensitivity and detection limit were determined. The results were compared with the national standard of ochratoxin A enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (GB 5009.96-2016). The results showed that under the optimal conditions, the linear range of the sensitivity of

the electrochemical aptamer sensor was 0.1 pg/mL – 10 ng/mL, the detection limit (LOD) was 0.05 pg/mL. When OTA exists, the test result is positive, and when OTA does not exist, the test result is negative, indicating that the specificity of this method is good. In the manual spiked test, the spiked recovery of the electrochemical aptamer sensor is 96.60%–99.04% and that of ELISA (national standard) is 94.00%–98.50%. Therefore, the spiked recovery of this method is better than that of the national standard method. In conclusion, this method has the potential of rapid detection of OTA in food, provides a new detection idea for rapid detection of OTA in food, and has high practical value.

Keywords Ochratoxin A; aptamer; strand displacement amplification (SDA); electrochemical biosensor