

发卡探针介导等温扩增荧光适体传感器检测玉米赤霉烯酮

佟欣¹, 李子坤², 张蕴哲¹, 卢鑫³, 马晓燕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河北农业大学 河北保定 071000

³河北农业大学理工系 河北沧州 061100

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 玉米赤霉烯酮(ZEN)主要由禾谷镰刀菌产生,广泛存在于小麦、大豆等谷物及其衍生产品中,具有雌激素作用和多种毒性,可造成神经系统的亢奋。本研究基于发卡探针介导等温扩增(HIAmp)的荧光适体传感器,定量检测食品中的ZEN。首先依据ZEN适体序列设计新型发卡探针,其次利用ZEN与适体特异性结合的特性,打开发卡结构启动扩增反应,最后结合荧光技术建立定量检测ZEN的方法,并对该方法进行评价。结果表明,在最优反应条件下,约1h即可完成检测,检出限可达0.2 pg/mL, $-\lg C_{ZEN}$ 与Ct值构建的线性方程为 $Ct = -1.195 \lg C_{ZEN} + 14.082 (R^2 = 0.9975)$,线性关系良好。特异性分析表明,仅存在ZEN的两组样品产生信号,其余5组不含有ZEN的样品皆未产生信号。加标回收率显示,此方法所得回收率为93.4%~99.6%,高于液相色谱法(92.5%~99.0%)和ELISA试剂盒方法(93.1%~98.4%)的回收率。本研究构建的基于发卡探针介导等温扩增的荧光适体传感器具有特异性强、耗时短、操作简便、灵敏度高及准确度高的优点,其检出限远低于国标液相色谱法(5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和ELISA试剂盒方法(0.5 ng/mL)的检出限,为谷物食品中ZEN的定量检测提供了一个新策略,在食品安全检测领域具有良好的应用前景。

关键词 玉米赤霉烯酮;核酸适体;等温扩增;检测

文章编号 1009-7848(2024)12-0313-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.12.028

玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)是一种具有雌激素样结构的真菌次生代谢物^[1],具有神经毒性、生殖毒性和致癌性^[2]。国际癌症研究机构将ZEN归类为III类致癌物^[3]。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)规定ZEN的耐受日摄入量(Tolerable Daily Intake, TDI)为0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW/d。中国规定谷物及其制品

中ZEN的最大残留限量(Maximum Residue Limit, MRL)为60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4-7]。近年来,ZEN造成的公共卫生事件不断发生,给人们健康带来严重危害,对社会经济也造成较大的损失。

目前用于真菌毒素检测的方法主要有高效液相色谱法^[8]、超高效液相色谱-质谱法^[9-10]、气相色谱-质谱法^[11]和毛细管电泳^[12]等。这些方法虽较为准确,但耗时长、操作繁琐,不能满足快速的检测要求^[13]。建立一种快速、灵敏、准确的ZEN检测方法对保障公共卫生安全至关重要。

适体是指具有功能性的寡核苷酸序列^[14],其从人工合成的单链DNA/RNA文库中通过指数富集配体系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)体外筛选获得^[15-16]。适体与抗体相比具有特殊优势:适体具有不同的空间构象,它们可以识别不同类型的靶标,如小分子^[17]、大分子^[18]、微生物^[19]、细胞^[20]和病毒^[21]等,其可在体外人工合成,具有低水平的免疫原性和毒性,且通量高,成本低,批量差异小,纯

收稿日期: 2023-12-27

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);河北省博士后科研项目(B2021005007);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);河北省燕赵黄金台聚才计划骨干人才项目(A20240025)

第一作者: 佟欣,女,硕士生

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

度高,结构稳定性高^[22-23]。

等温扩增技术效率高,对仪器的要求低,更能满足现代分子检测技术快速、简便的需求。目前开发的多种等温扩增技术,已应用于商业领域^[24-25],用于检测多种靶标,包括蛋白质、细胞、小分子、离子等^[26-28]。此外,等温扩增技术可与各种信号转换器连用,在生物传感领域^[29]亦具有广阔的应用前景。

基于荧光的传感器是最常用的光学传感技术之一,由于操作简单、效率高、灵敏度高等特点,已广泛应用于适体传感器中^[30]。本研究旨在建立基于发卡探针介导等温扩增的荧光适体传感器,利用适体的可修饰性、高稳定性和高亲和性^[31],同发卡相结合,通过等温扩增方法将反应产物进行指数放大,并利用实时荧光技术实现信号转化,最终实现对食品中 ZEN 的灵敏、特异、快速检测,克服传统技术费时费力等问题。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验毒素 本研究所使用的毒素有:玉米赤霉烯酮(ZEN)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, O-TA)、T-2 毒素、黄曲霉毒素 B1 (Aspergillus flavus, AFB 1)、呕吐毒素(Deoxynivalenol, DON),皆购买于普瑞邦生物工程有限公司。并使用 60%

的甲醇将毒素稀释至试验所需浓度。

1.1.2 试验试剂 本研究所用试剂有:DNA Ladder(50, 100 bp)、MgSO₄, 宝生物工程(大连)有限公司;dNTPs Mixture、Nb.BsrDI 内切酶、Bst DNA 聚合酶, NEB(北京)有限公司;EvaGreen 荧光染料, 上海开放生物科技有限公司;甲醇(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司;过硫酸铵溶液(AP), 北京雷根生物技术有限公司;10×TBE 缓冲液、PAGE 胶促凝剂(TEMED)、30%制胶液(29:1), 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

MIX-25P 迷你混合仪, 杭州米欧仪器有限公司;DYY-8C 电泳仪, 北京六一仪器厂;BINDA 2020D 凝胶成像仪, 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;TG16A 离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发卡及引物的设计 本研究通过 NUPACK 软件(<https://nupack.org/partition/new>)分析并设计了发卡和引物,并由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成纯化。核酸序列如表 1 所示。发卡由 ZEN 特异性适体序列、Nb.BsrDI 内切酶识别序列的互补序列、引物互补序列及触发探针的互补序列组成。

表 1 核酸序列信息

Table 1 Nucleic acid sequence information

类型	序列(5'-3')
发卡	GACCTCCTCCTGCTCCGCG <i>CAATGGT</i> CCTGTTGGCCATATCATCATCTATCTATGGTACATTACTATC TGTAATGTGATATGGCCAACAGACAGGCTCAATG TGACCTCCTCCTGCTCCGC
引物	CATGAGCCTGTCTGTT

注:发卡结构中下划线标注为 ZEN 适体序列,加粗且有斜体标注为内切酶识别序列的互补序列,着重号标记为引物的互补序列。

1.3.2 检测体系的建立 发卡及引物的稀释:设置离心机转速为 4 000 r/min,离心 1 min 后缓慢开盖加入 dd H₂O,稀释至所需浓度,振荡混匀后置于-20 °C 保存备用。

孵育过程:将发卡溶液在 95 °C 条件下高温变性 5 min,后缓慢降温至室温。将 1.0 μL 不同浓度的 ZEN 分别与 2.0 μL 发卡(5 μmol/L)、1.0 μL 引

物(5 μmol/L)、2.0 μL dNTPs(2.5 mmol/L)、2.0 μL ThermoPol Reaction Buffer(10×)和 2.0 μL Cutsmart 缓冲液(10×)混匀,再加入 dd H₂O,体系共 16 μL,在 37 °C 下避光孵育 30 min。

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)、1.0 μL Nb.BsrDI 内切酶(10 U/μL)和 1.0 μL EvaGreen 荧光染料,终体

表 2 扩增预反应体系

Table 2 Pre-reaction system of amplification

成分	加入体积/ μL
ZEN	1/0
发卡 (5 $\mu\text{mol/L}$)	2.0
引物 (5 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
10 \times ThermoPol Reaction Buffer	2.0
10 \times CutSmart Buffer	2.0
dNTPs (2.5 mmol/L)	2.0
<i>Bst</i> DNA 聚合酶 (8 U/ μL)	2.0
Nb.BsrDI 内切酶 (10 U/ μL)	1.0
EvaGreen 荧光染料	1.0
dd H ₂ O	6/7

系为 20 μL 。设置荧光定量 PCR 仪的温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ 并反应 30 min, 每隔 1 min 采集一次荧光信号, 共 30 个循环。此外, 由于 ZEN 具有热稳定性和强烈的致畸致癌性, 需要将反应后的体系回收进行专门处理。

1.4 特异性分析

为了验证本研究对 ZEN 检测的特异性, 选用了真实样品中可能与 ZEN 共存的 4 种霉菌毒素进行评价, 包括 OTA、T-2、AFB 1 和 DON。ZEN 特异性适体具有选择性识别并与其特异性靶点结合的能力, 从而极大地保证了本方法的特异性。本研究在最适反应条件下, 将质量浓度为 1 ng/mL 的 ZEN 与 1 ng/mL 的 OTA、T-2、AFB 1、DON 以及混合组 1 (含有 ZEN、OTA、T-2、AFB 1、DON 且浓度均为 1 ng/mL)、混合组 2 (含有 OTA、T-2、AFB 1、DON 且质量浓度均为 1 ng/mL) 在相同体系下进行对比实验, 从而验证本研究的特异性。

1.5 灵敏度分析

本研究在最优化条件的基础上, 对不同浓度的 ZEN 进行实时荧光曲线扩增检测, 并记录 Ct 值。参考 1.3.2 节检测步骤, 取 1 μL 不同浓度的 ZEN 进行荧光信号检测, 每种浓度重复检测 3 次, 得到实时扩增曲线。通过运用 Origin 作图, 设置不同浓度 ZEN 的负对数为横坐标, Ct 值为纵坐标构建标准曲线, 分析得到线性回归方程, 从而确定本研究的检出限。

1.6 加标回收率测定

本研究选取小麦、玉米和啤酒等食品进行加

标回收率测定, 同时使用液相色谱法和 ZEN 快速检测 ELISA 试剂盒进行对比。小麦、玉米和啤酒样品皆采购于本地超市 (河北省保定市)。

本研究前处理方法为: 每个样品均质后随机取 3 份, 小麦及玉米样品均利用粉碎机粉碎, 后通过 1 mm 试验筛过筛。取 2 g 过筛后的小麦及玉米样品, 溶解在 10 mL 的 70% 甲醇溶液中, 剧烈振荡 3 min, 静置沉淀溶液, 并 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液, 通过孔径为 0.22 μm 的针头式过滤器进行过滤。向滤液中加入不同浓度的 ZEN 样品, 充分混匀。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

由于啤酒样品中含有二氧化碳, 所以提前在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 30 min, 然后用超声波脱气。取 10 mL 脱气后的啤酒样品, 加入不同浓度的 ZEN 样品, 补充 40 mL 去离子水稀释, 剧烈振荡 3 min 充分混合, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2 结果与分析

2.1 试验原理

本试验构建了基于发卡探针介导等温扩增的荧光传感器, 对玉米赤霉烯酮进行定量检测。如图 1 所示, 首先将 ZEN 和发卡于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min, 使 ZEN 与发卡环部特异性适体序列结合, 从而打开发卡颈部, 暴露引物结合位点, 进而引物与发卡颈部结合。后升温至 65 $^{\circ}\text{C}$, 在 *Bst* DNA 聚合酶的作用下, 引物从 5'-3' 延伸, 并产生内切酶识别位点。在 Nb.BsrDI 内切酶作用下切割出大量触发探针 (TP), TP 可以与发卡 3' 端的互补位点结合并延伸, 形成 ds DNA, 也可直接与 ds DNA 的 3' 端互补位点结合、延伸, 并置换出一条 ss DNA。置换下来的 ss DNA 可以与发卡结合, 形成 ds DNA, 从而实现循环扩增。结果产生大量 ds DNA, 反应体系中添加 EvaGreen 荧光染料, 其嵌合在 ds DNA 上, 利用实时荧光 PCR 仪进行荧光信号采集, 最终实现定量检测。

2.2 可行性验证

为探究本方法的可行性, 进行了发卡结构表征、紫外可见吸收光谱图分析、实时荧光曲线和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) 验证, 结果如图 2~4 所示。

首先使用 NUPACK 软件模拟验证发卡 and 引

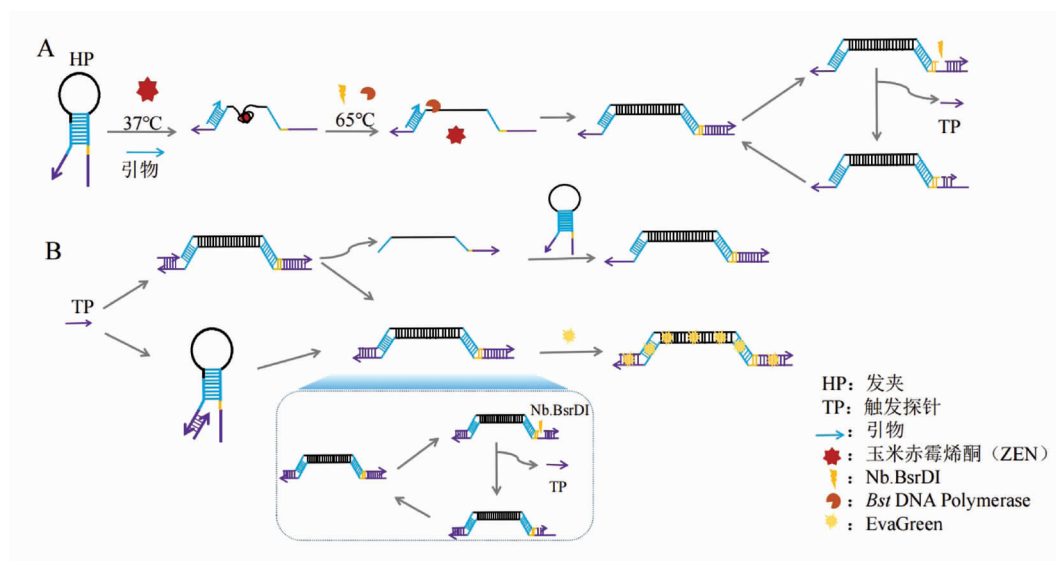


图1 检测示意图

Fig.1 Detection principle diagram

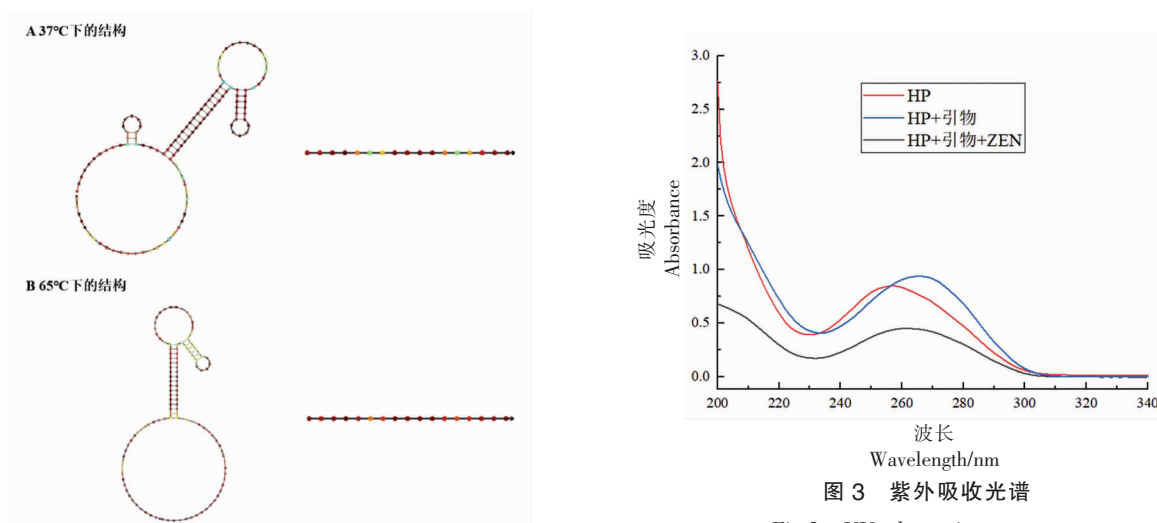


图2 NUPACK分析得到发卡及引物在37℃(a)和65℃(b)最小自由能结构

Fig.2 The minimum free energy structure of hairpin and primer at 37℃ (a) and 65℃ (b) was obtained by NUPACK analysis

物在37℃和65℃下的二级结构,以及二者与自身的结合情况,如图2所示。结果表明,本研究设计的发卡与引物的结构良好,在孵育和扩增过程中能保持各自结构稳定不变。

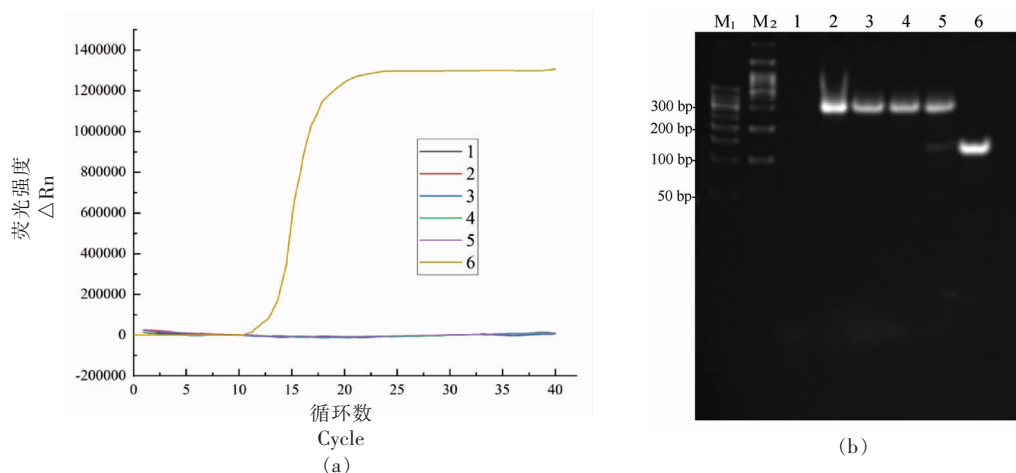
其次利用紫外吸收光谱图分析试验可行性。将浓度为500 nmol/L的发卡、500 nmol/L引物及50 ng/mL的ZEN避光孵育30 min,进行吸光度测

定,如图3所示。当只有发卡存在时,在257 nm处存在吸收峰。随着引物加入,外露碱基逐渐增多,吸光度增加。但加入ZEN后,吸光度降低。这是由于ZEN与适体结合打开发卡结构,引物与发卡结合并扩增出大量双链,碱基在双链内,外露碱基减少,从而导致吸光度降低。将紫外吸收光谱图结合原理分析,印证了发卡及引物序列的合理性。

最后在不同体系下对其扩增结果进行实时荧光曲线分析和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析,如图4a所示。当体系中含有发卡、引物和酶且有ZEN存在时,能够检测到荧光曲线。当ZEN不存在时,则没有检测到荧光曲线。

采用 PAGE 分析扩增过程,进一步验证本研究的可行性,如图 4b 所示。泳道 1、2 分别为引物及发卡的条带位置。泳道 3、4 条带位置未发生变化,表明未有反应发生,即当体系中不存在 ZEN 时,发卡结构未被打开,引物也无法与发卡结合,从而无法进行后续反应。泳道 5 产生了新条带,表明当体系存在 ZEN 时,其与适体结合并打开发卡

结构,同时引物也成功与发卡上互补位点结合。泳道 6 产生目的条带,表明发生扩增反应,即 ZEN 与适体的结合能够打开发卡结构,且 *Bst* DNA 聚合酶和 *Nb.BsrDI* 内切酶均为扩增反应必要条件。上述结果表明,本研究所开发的荧光适体传感器方法可行。



注: M₁: 50 bp DNA Ladder; M₂: 100 bp DNA Ladder; 1. 引物; 2. 发卡; 3. 发卡+引物; 4. 发卡+引物+Nb.BsrDI 内切酶+Bst DNA 聚合酶; 5. 发卡+引物+ZEN; 6. 发卡+引物+ZEN+Nb.BsrDI 内切酶+Bst DNA 聚合酶; ZEN 浓度: 50 ng/mL; 引物浓度: 500 nmol/L; 发卡浓度: 500 nmol/L; Bst DNA 聚合酶活力: 8 U/μL; Nb.BsrDI 内切酶活力: 10 U/μL; EvaGreen 浓度: 1×。

图 4 实时荧光曲线及 PAGE 可行性验证

Fig.4 The feasibility was verified by real-time fluorescence curve and PAGE

2.3 特异性

为了验证本研究对 ZEN 检测的特异性,选用了 OTA、T-2、AFB 1 和 DON 4 种霉菌毒素进行试验。本研究在最适反应条件下,将浓度为 1 ng/mL 的 ZEN 与 1 ng/mL 的 OTA、T-2、AFB 1、DON 以及混合组 1、混合组 2 在相同扩增体系下进行对比试验,从而验证本研究的特异性。结果如图 5 所示。以上 4 种对照毒素及混合组 2 的结果与空白对照组的的结果相同,皆未发生扩增反应。在实时荧光曲线谱图中(图 5a),只有含有 ZEN 的 2 与 7 两组产生了荧光曲线,3~6 与 8 皆未出现荧光曲线。在 PAGE 谱图中(图 5b)也产生了同样的结果,只有 2 与 7 两组发生了扩增,观察到了目的条带。该结果表明,本研究所开发的方法能够用于 ZEN 的高特异性检测。

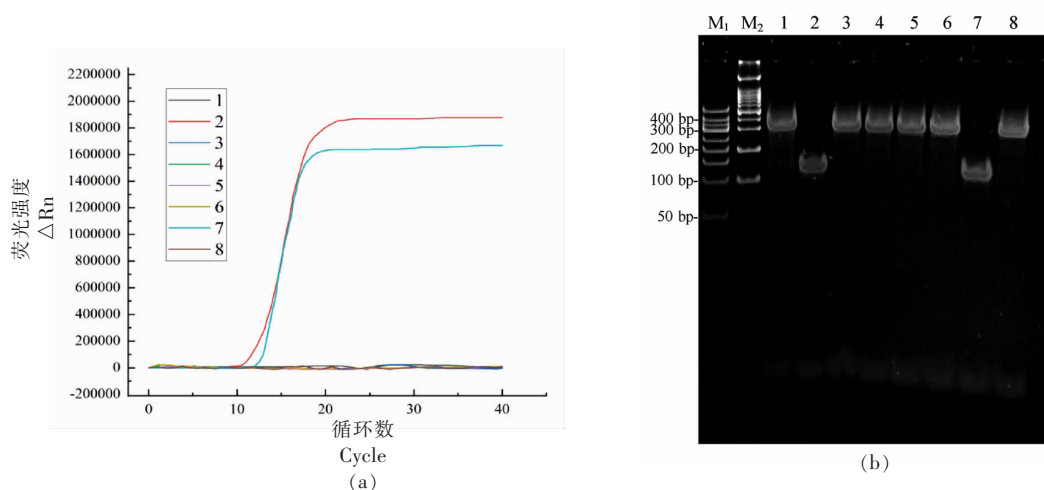
2.4 灵敏度

经优化后,确定本研究的孵育时间为 30

min、引物与发卡比例为 1:8、反应温度为 65 ℃、*Bst* DNA 聚合酶添加量为 2.0 μL、*Nb.BsrDI* 切割内切酶添加量为 1.0 μL。

在上述优化后的最佳体系下,利用荧光定量 PCR 仪测定不同 ZEN 浓度下的 Ct 值,从而评价该方法的检测性能,确定检出限。结果如图 6 所示。随着 ZEN 质量浓度(0.2 pg/mL~100 ng/mL)的增加,扩增效率越高,Ct 值越小,当 ZEN 浓度大于 100 ng/mL 时,Ct 值无明显变化,达到平台期。此外,当 ZEN 质量浓度为 0.2 pg/mL 时,可以检测到起峰,但继续稀释至 0.02 pg/mL 时,没有检测到起峰。因此认定该方法的检出限为 0.2 pg/mL (图 6a)。

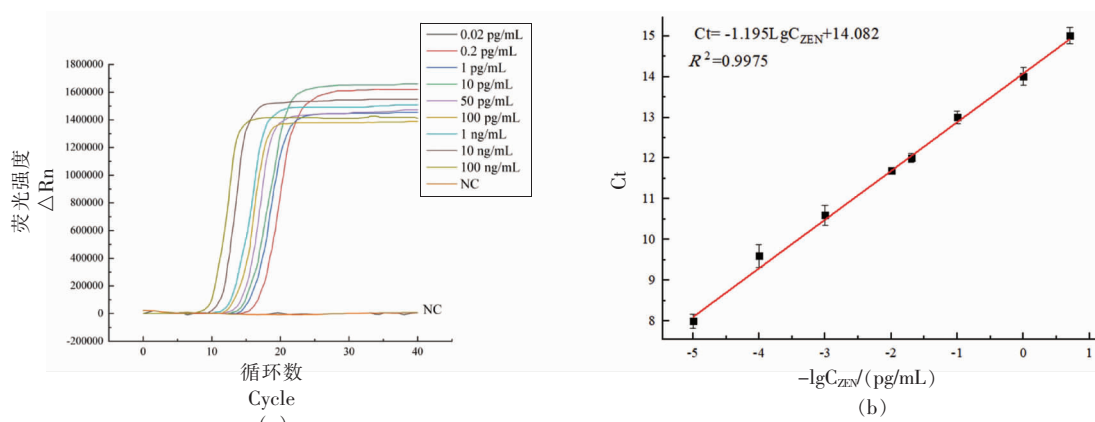
以 $-\lg C_{ZEN}$ 为横坐标,Ct 值为纵坐标构建线性方程为 $Ct = -1.195 \lg C_{ZEN} + 14.082$,相关系数 $R^2 = 0.9975$ (图 6b),由结果可知,ZEN 质量浓度在 0.2 pg/mL 至 100 ng/mL 范围内,浓度负对数值与对应



注:1. 空白对照;2. ZEN;3. OTA;4. T-2;5. AFB 1;6. DON;7. 混合组 1 (ZEN+OTA+T-2+AFB 1+DON);8. 混合组 2 (OTA+T-2+AFB 1+DON);M1:50 bp DNA Ladder;M2:100 bp DNA Ladder 所有质量浓度皆为 1 ng/mL。

图 5 ZEN 荧光适体传感器特异性检测

Fig.5 ZEN fluorescent aptasensor specific detection



注:ZEN 质量浓度依次为:0.2 pg/mL, 1 pg/mL, 10 pg/mL, 50 pg/mL, 100 pg/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL。

图 6 荧光适体传感器的灵敏度分析

Fig.6 Sensitivity analysis of fluorescent aptamer sensors

Ct 值成良好的线性关系。

2.5 加标回收率

为了验证所提出的荧光适体传感器在实际样品中的应用,选用小麦、玉米和啤酒等食品进行加标回收率测定,同时使用液相色谱法和 ZEN 快速检测 ELISA 试剂盒进行对比。在上述最佳试验条件下,将 5 ng/mL 和 10 ng/mL 的 ZEN 分别加入预处理后的小麦、玉米和啤酒样品中,均重复 3 次测定。结果如表 3 所示。本方法所得回收率为 93.4%~99.6%,优于液相色谱法(92.5%~99.0%)及 ELISA 方法(93.1%~98.4%)的回收率,本方法相对标准

偏差在 2.33%~3.91%之间。这些结果证实了本研究所开发的荧光适体传感器在实际检测中有一定的实用价值。

3 讨论

本研究建立了基于发卡探针介导等温扩增的荧光适体传感器,成功用于玉米赤霉烯酮的定量检测。

发卡的设计在本研究中至关重要。发卡中需包含适体序列、引物互补序列、触发探针互补序列和内切酶识别序列的互补序列。在其二级结构良

好的前提下,通过优化确定最适发卡颈部长度为 17 bp,引物长度为 19 bp,确保仅在毒素存在的情况下,引物方可与发卡结合,触发后续反应,保证了扩增反应的准确性。

为综合评价该荧光适体传感器,将其与不同荧光传感器检测 ZEN 的研究进行了比较(见表 4)。本研究与其它研究相比较,具有更宽的线性范围、更低的检出限以及更短的检测时间,这得益于

本方法所采用的自行设计的发卡与引物,二者间适配度较高。扩增过程均以原始发卡为模板,保证了扩增产物的正确性。EvaGreen 为无标记型荧光染料,与 ds DNA 有良好的结合特性,且自身无荧光,只有与 ds DNA 结合时发出强荧光。本研究通过触发探针的产生,实现了循环扩增,极大的提高了扩增的效率,缩短了检测时间,使得本研究的检测时间快于其它研究。

表 3 人工加标谷物样品中 ZEN 含量检测并与液相色谱法及 ELISA 方法比较

Table 3 Determination of ZEN content in artificially spiked cereal samples and comparison with liquid chromatography and ELISA method

样品	质量浓度/ (ng/mL)	本方法			HPLC		ELISA	
		检测结果/ (ng/mL)	回收率/%	RSD/%	检测结果/ (ng/mL)	回收率/%	检测结果/ (ng/mL)	回收率/%
小麦	5.0	4.93	98.6	2.38	4.79	95.8	4.92	98.4
	10.0	9.96	99.6	3.91	9.67	96.7	9.67	96.7
玉米	5.0	4.93	98.6	3.38	4.63	92.5	4.89	97.8
	10.0	9.34	93.4	2.33	9.41	94.1	9.31	93.1
啤酒	5.0	4.89	97.8	3.52	4.83	96.7	4.75	95.0
	10.0	9.86	98.6	2.88	9.90	99.0	9.82	98.2

表 4 不同荧光适体传感器方法检测 ZEN 的比较

Table 4 Comparison of different fluorescent aptamer sensor methods for detecting ZEN

序号	检测方法	线性范围	检出限	检测时间/h	参考文献
1	荧光+适体+量子点	9.99~199.93ng/mL	2.39 ng/mL	3.5	[32]
2	荧光+适体+Exo III	0.01~100 ng/mL	0.004 ng/mL	1	[33]
3	荧光+适体+纳米粒子	0.005~500 ng/mL	0.001 ng/mL	1.5	[5]
4	荧光+适体+MOF	0.01~100 ng/mL	0.36 pg/mL	2	[6]
5	荧光+适体+AuNPs	2.5~100 ng/mL	0.98 ng/mL	3	[34]
6	荧光+适体+HIamp	0.2 pg/mL~100 ng/mL	0.2 pg/mL	1	本研究

此外,本研究基于 ZEN 特异性适体构建的食品中 ZEN 定量检测平台,适用于批量样本的快速检测,但其商业传感检测技术尚未开发,适体传感器在复杂食品基质中检测性能仍需进一步探究验证与提高。

4 结论

本研究构建了基于发卡探针介导等温扩增的荧光适体传感器定量检测玉米赤霉烯酮的方法,在最适反应条件下,该方法检出限为 0.2 pg/mL,低于国家标准所规定的限量。在 0.2 pg/mL~100

ng/mL 检测范围内,线性关系良好,线性方程为 $C_t = -1.195 \lg C_{ZEN} + 14.082 (R^2 = 0.9975)$ 。

该方法能有效排除其它毒素的干扰,具有较高的 ZEN 检测选择性,并能准确检测食品中的 ZEN,回收率在 93%~99.6%之间,具有较高的实用价值。

总之,本研究所开发的 ZEN 荧光适体传感器具有特异性强、灵敏度高、耗时短、定量检测范围广、准确性高等优点。此外,该方法通过改变发卡环部适体可应用于不同靶点的检测,在真菌毒素检测中具有较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] SUN Y H, ZHANG Y, WANG Z P. A 'turn-on' FRET aptasensor based on the metal-organic framework-derived porous carbon and silver nanoclusters for zearalenone determination[J]. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 2021, 347: 130661.
- [2] LUO L G, LIU X H, MA S, et al. Quantification of zearalenone in mildewing cereal crops using an innovative photoelectrochemical aptamer sensing strategy based on ZnO-NGQDs composites[J]. *Food Chem*, 2020, 322: 126778.
- [3] LIU M, ZHANG J X, LIU S S, et al. A label-free visual aptasensor for zearalenone detection based on target-responsive aptamer-cross-linked hydrogel and color change of gold nanoparticles [J]. *Food Chem*, 2022, 389: 133078.
- [4] 赵玉洁. 真菌毒素限量标准及检测方法分析[J]. *食品安全导刊*, 2019, 18(75): 115.
- ZHAO Y J. Analysis of fungicin limit standard and detection method[J]. *Food Safety Guide*, 2019, 18(75): 115.
- [5] CHEN R P, SUN Y F, HUO B Y, et al. Development of Fe₃O₄@Au nanoparticles coupled to Au@Ag core-shell nanoparticles for the sensitive detection of zearalenone[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1180: 338888.
- [6] SUN Y H, LÜ Y, QI S, et al. Sensitive colorimetric aptasensor based on stimuli-responsive metal-organic framework nano-container and trivalent DNzyme for zearalenone determination in food samples[J]. *Food Chem*, 2022, 371: 131145.
- [7] EUROPEAN UNION. Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products[S]. *European Union: Official Journal of the European Union*, 2007: 9.
- [8] MAZAHERI M, MAYMAND M M, GILASGAR A, et al. Quantification of the zearalenone in maize oil with no clean-up[J]. *Food Control*, 2021, 127: 108166.
- [9] SUN S J, YAO K, ZHAO S J, et al. Determination of aflatoxin and zearalenone analogs in edible and medicinal herbs using a group-specific immunoaffinity column coupled to ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1092: 228-236.
- [10] LIJALEM Y G, GAB-ALLAH M A, CHOI K, et al. Development of isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the accurate determination of zearalenone and its metabolites in corn[J]. *Food Chem*, 2022, 384: 132483.
- [11] PACK E, STEWART J, RHOADS M, et al. Quantification of zearalenone and alpha-zearalenol in swine liver and reproductive tissues using GC-MS[J]. *Toxicol X*, 2020, 8: 100058.
- [12] MARAGOS C M, APPELL M. Capillary electrophoresis of the mycotoxin zearalenone using cyclodextrin-enhanced fluorescence[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1143(1): 252-257.
- [13] LIAO Z B, YAO L, LIU Y, et al. Progress on nanomaterials based-signal amplification strategies for the detection of zearalenone[J]. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 2021, 9: 100084.
- [14] LYU C, KHAN I M, WANG Z. Capture-SELEX for aptamer selection: A short review [J]. *Talanta*, 2021, 229: 122274.
- [15] MOHAMAD N, AZIZAN N I, MOKHTAR N, et al. Future perspectives on aptamer for application in food authentication[J]. *Anal Biochem*, 2022, 656: 114861.
- [16] PHILIP A, KUMAR A R. The performance enhancement of surface plasmon resonance optical sensors using nanomaterials: A review[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 458: 214424.
- [17] JAUSET-RUBIO M, BOTERO M L, SKOURIDOU V, et al. One-Pot SELEX: Identification of specific aptamers against diverse steroid targets in one selection[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(23): 20188-20196.
- [18] TASSET D M, KUBIK M F, STEINER W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes [J]. *J Mol Biol*, 1997, 272(5): 688-698.
- [19] LI J X, GU J, ZHANG H F, et al. A highly specific DNA aptamer for RNase H2 from *Clostridium difficile* [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(8): 9464-9471.
- [20] ESPOSITO C L, QUINTAVALLE C, INGENITO F, et al. Identification of a novel RNA aptamer that selectively targets breast cancer exosomes [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23: 982-994.

- [21] ANTON SCHMITZ A W M B. A SARS-CoV-2 spike binding DNA aptamer that inhibits pseudovirus infection by an RBD-independent mechanism [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2021, 60: 10279-10285.
- [22] MA P F, YE H, GUO H L, et al. Aptamer truncation strategy assisted by molecular docking and sensitive detection of T-2 toxin using SYBR Green I as a signal amplifier [J]. *Food Chemistry*, 2022, 381: 132171.
- [23] KICHKAILO A S, NARODOV A A, KOMAROVA M A, et al. Development of DNA aptamers for visualization of glial brain tumors and detection of circulating tumor cells [J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2023, 32: 267-288.
- [24] CHANG C, CHEN C, WEI C, et al. Compact optical diagnostic device for isothermal nucleic acids amplification [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 133(2): 493-501.
- [25] CRAW P, BALACHANDRAN W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: A critical review [J]. *Lab on A Chip*, 2012, 12(14): 2469-2486.
- [26] GOLDMEYER J, KONG H, TANG W. Development of a novel one-tube isothermal reverse transcription thermophilic helicase-dependent amplification platform for rapid RNA detection [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2007, 9(5): 639-644.
- [27] CHENG Y Q, ZHANG X, LI Z P, et al. Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(18): 3268-3272.
- [28] SHANG Y T, YE Q H, CAI S Z, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Salmonella* in foods based on new molecular targets [J]. *LWT*, 2021, 142: 110999.
- [29] ZHAO Y X, CHEN F, LI Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115: 12491-12545.
- [30] ZHAO X H, DAI X C, ZHAO S Y, et al. Aptamer-based fluorescent sensors for the detection of cancer biomarkers [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2021, 247: 119038.
- [31] HAN J, MA P F, KHAN I M, et al. Study of binding mechanism of aptamer to kanamycin and the development of fluorescent aptasensor in milk detection [J]. *Talanta (Oxford)*, 2023, 260: 124530.
- [32] TAN X L, WANG X Q, HAO A Y, et al. Aptamer-based ratiometric fluorescent nanoprobe for specific and visual detection of zearalenone [J]. *Microchemical Journal*, 2020, 157: 104943.
- [33] MA P F, GUO H L, YE H, et al. Aptamer-locker probe coupling with truncated aptamer for high-efficiency fluorescence polarization detection of zearalenone [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 380: 133356.
- [34] LIU M, ZHANG J X, LIU S S, et al. A label-free visual aptasensor for zearalenone detection based on target-responsive aptamer-cross-linked hydrogel and color change of gold nanoparticles [J]. *Food Chemistry*, 2022, 389: 133078.

Detection of ZEN Using Hairpin Probe Mediated Isothermal Amplification of Fluorescent Aptamer Sensor

Tong Xin¹, Li Zikun², Zhang Yunzhe¹, Lu Xin³, Ma Xiaoyan¹, Zhang Wei^{1,4,5*}

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

²Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

³College of Science and Technology, Hebei Agricultural University, Cangzhou 061100, Hebei

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

⁵Hebei Provincial Key Laboratory of Analysis and Control for Zoonoses Microbial, Baoding 071000, Hebei

Abstract Zearalenone (ZEN) is mainly produced by *Fusarium graminearum* and widely exists in wheat, soybean and other grains and their derivatives. It has estrogen effect and a variety of toxicity, which can cause nervous system excitement. In this study, a fluorescence aptamer sensor based on Hairpin probe-mediated Isothermal Amplification (HIamp)

was established to detect ZEN in food. Firstly, a new hairpin probe was designed according to the ZEN aptamer sequence. Secondly, the hairpin structure was opened to initiate the amplification reaction by using the specific binding property of ZEN to the aptamer. Finally, a quantitative detection method of ZEN was established by combining with fluorescence technology, and the method was evaluated. The results showed that this method can complete the detection in about 1 h under the optimal reaction conditions, and the detection limit can reach 0.2 pg/mL. The linear equation constructed by $-\lg C_{\text{ZEN}}$ and Ct value was $\text{Ct} = -1.195 \lg C_{\text{ZEN}} + 14.082$ ($R^2 = 0.9975$), and the linear relationship was good. The results of specific analysis showed that only two groups of samples containing ZEN produced signals, and the other five groups of samples without ZEN did not produce signals. The recoveries obtained by this method were 93.4%–99.6%, higher than those obtained by liquid chromatography (92.5%–99.0%) and ELISA kit (93.1%–98.4%). In summary, the fluorescent aptamer sensor based on hairpin probe mediated isothermal amplification constructed in this study has the advantages of strong specificity, short time consuming, simple operation, high sensitivity and high accuracy, and its detection limit is much lower than those of national standard liquid chromatography (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and ELISA kit method (0.5 ng/mL). It provides a new strategy for the quantitative detection of ZEN in cereal foods and has a good application prospect in the field of food safety detection.

Keywords zearalenone (ZEN); aptamer; isothermal amplification; detection