

基于杂交链式反应的新型荧光适体传感器检测食品中的 OTA

贾耀博¹, 张蕴哲¹, 李子坤², 卢鑫³, 徐慧³, 张伟^{1,3,4,5*}

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河北省人畜共患病病原微生物分析与防控重点实验室 河北保定 071000)

摘要 赭曲霉毒素 A(OTA)是一种常见的霉菌毒素,常常污染食品,造成不同程度的危害。为开发一种基于杂交链式反应(HCR)的新型荧光适体传感器,用于快速灵敏地检测食品中的 OTA,首先将 OTA 与适体结合,释放出触发链 cDNA,进而触发发卡 HP1 与 HP2 发生 HCR 反应,使 HP1 中的 G-四链体序列形成 G-四链体结构,与此同时 N-甲基中卟啉 IX(NMM)染料插入到 G-四链体结构中,从而显著增强荧光信号。通过荧光信号强度的变化,实现对 OTA 无酶、免荧光标记的定量检测。结果表明:本方法特异性强,在 7 组试验中,含有 OTA 的两组试验结果均是阳性,不含 OTA 的 5 组试验结果均为阴性。其线性回归方程为 $Y = 0.71133lgC_{OTA} + 3.21383$,相关系数 $R^2 = 0.9942$,线性范围为 0.1 pg/mL~5 ng/mL,检出限为 0.1 pg/mL。将该方法应用于小麦、红酒和咖啡人工加标样品的检测,其回收率均在 92%~97.88%之间,高于 ELISA 试剂盒的回收率(90.5%~95.78%),表明该方法的检测结果优于国标方法。本研究开发的新型荧光适体传感器可实现对食品中 OTA 的快速、灵敏、特异和准确地检测,也为其它毒素以及影响食品安全的其它化学污染物的快速检测提供了新思路。

关键词 赭曲霉毒素 A; 杂交链式反应; G-四链体; 荧光适体传感器; 检测

文章编号 1009-7848(2025)01-0391-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.037

赭曲霉毒素 A(OTA)是一种由霉菌和青霉菌产生的真菌毒素^[1],它容易对咖啡、红酒、谷物等食品和一系列农副产品造成污染^[1-2]。OTA 是赭曲霉毒素中毒性最强、污染最严重的一种,具有肾毒性、肝毒性、神经毒性、致畸性、致癌性和免疫毒性^[3-4]。OTA 会令人类和动物患上不同形式的肾脏、肝脏和脑部疾病。研究快速、灵敏的检测技术,对准确监测食品中 OTA 安全风险至关重要^[5]。

ELISA 是国家标准中检测 OTA 的方法之一,

具有特异性强,操作简单等优点,其检测 OTA 的原理是使用对 OTA 具有高亲和力和特异性的抗体^[6],然而该方法存在消耗时间长,试剂复杂和不易于保存等缺点。色谱方法中最常用的主要是高效液相色谱法和薄层色谱法^[7-8]。然而,其具有操作复杂,仪器昂贵,对操作人员有极高的要求且需要消耗大量的生物试剂等不足^[9],因此新型荧光适体传感器的研究与开发有望弥补这些方法的局限性,同时提高检测灵敏度^[10]。

适体(Aptamer, Apt)具有高稳定性、高亲和力以及生产成本低廉等优点^[11],在检测基质较为复杂的情况下,可有效识别目标分子^[12]。适体传感器以适体作为特殊的生物识别元件,首先通过适体与不同目标分析物之间的高特异性进行生物识别,再结合各种信号放大技术和相应的信号转导识别方法,实现对目标分析物的定性或定量检测^[13-14]。近年来,无酶扩增信号放大技术和免标记技术相继成为检测研究热门^[15]。杂交链式反应(HCR)是一种新型无酶信号放大技术^[16],在没有目标触发物的情况下,2 个 DNA 发夹结构稳定存

收稿日期: 2024-01-07

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项目(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)

第一作者: 贾耀博,男,硕士生

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

在于检测体系中^[17-18]。当引入目标触发物时,发卡1与其结合,暴露出来的单链区域可与发夹2结合,其结合后可形成与触发剂相同的区域以打开更多的发夹^[19-20],形成大量的双链DNA,以此放大信号^[21],提高检测的灵敏度。

目前,基于HCR杂交链式反应和免荧光标记的荧光适体传感器技术检测OTA未见研究报道。本研究将HCR杂交链式反应技术与适体技术相结合,并将G-四链体序列设计到HCR发卡结构中,通过引入NMM染料插入到G-四链体结构,显著增强荧光信号的方法,建立一种无酶、免荧光标记的新型荧光适体传感器,实现对食品中OTA的灵敏、高效的定量检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

赭曲霉毒素A(Ochratoxin A,OTA)、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。

乙二胺四乙酸(EDTA)、磷酸盐缓冲液(PBS),北京索莱宝科技有限公司;盐酸(HCl)、氯化镁(MgCl₂)、氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)、Triton X-100,国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇(C₂H₆O)、二甲基亚砜(DMSO),天津市天力化学试剂有限公司;DNA Marker DL2000,捷瑞生物工程(大连)有限公司;6×RNA/DNA Loading Buffer,北京博迈德基因技术有限公司;N-甲基吡啶二丙酸IX(NMM),北京百灵威科技有限公司。

设计发卡和cDNA序列并使用NUPACK软件进行模拟分析及验证。本研究所需的所有DNA序列均通过生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 仪器与设备

MIX-25P迷你混合仪,杭州米欧仪器有限公司;TG16A离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;DYY-8C电泳仪,北京佳航博创科技有限公司;BINDA 2020D凝胶成像仪,上海牧德如生物科技有限公司;F-320荧光分光光度计,青岛路博伟业环保科技有限公司;DK-8D恒温水浴锅,上

海一恒科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 试验原理 本研究基于HCR杂交链式反应和适体技术构建新型荧光适体传感器,用于检测食品中的OTA。当毒素与适体结合后,释放出触发链cDNA并触发HCR反应,HP1与HP2部分互补结合^[21],在发卡HP1的颈环部分设计可折叠形成G-四链体结构的序列^[22],cDNA与HP1的b链结合打开发卡HP1的同时,发卡HP1中暴露出来的a链可以与HP2中的a'链互补配对结合,同时引发HP2发卡打开,HP2打开后,暴露出的b'链可与HP1的b链互补配对结合^[23],如此反复进行多个组装,生成的产物是大量超长的dsDNA双链,并且形成G-四链体结构。加入NMM后,NMM通过 $\pi-\pi$ 堆积相互作用插入G-四链体结构时,NMM的荧光信号显著增强^[24]。如图1所示,当不存在OTA时,适体与cDNA互补杂交结合^[25],cDNA处于双链状态且无暴露触发位点,无法触发HCR反应,NMM只有微弱的荧光信号^[26];当存在OTA时,OTA与适体结合,Apt-cDNA双链结构解体,游离的单链cDNA可触发HCR反应,生成含有G-四链体结构的双链产物,随即NMM插入到G-四链体结构中,荧光信号显著增强,从而实现OTA的定量分析。

1.3.2 发卡和cDNA序列设计 本试验所采用的核酸序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成纯化,核酸序列如表1所示。OTA适体序列采用Guo等^[27]筛选的OTA特异性核酸适体序列(5'-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA-3')。设计cDNA,其5'端与适体3'端部分序列反向互补(5'-TGTCCGATGCTC-3')。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳试验验证 提前配制好质量分数为2%的琼脂糖凝胶,将HCR反应产物与上样缓冲液以1:9的体积比充分混合后,将每个样品加入到琼脂糖凝胶孔道中,在1×TBE缓冲液(pH=8.0)的条件下进行电泳,电泳电压为120V,电泳时间为50min,取出后使用凝胶成像仪成像^[28]。

1.3.4 荧光光谱试验验证 为了验证本方法构建的荧光生物传感器的可行性,分别设计在有无赭曲霉毒素A存在条件下的试验方案,通过使用荧

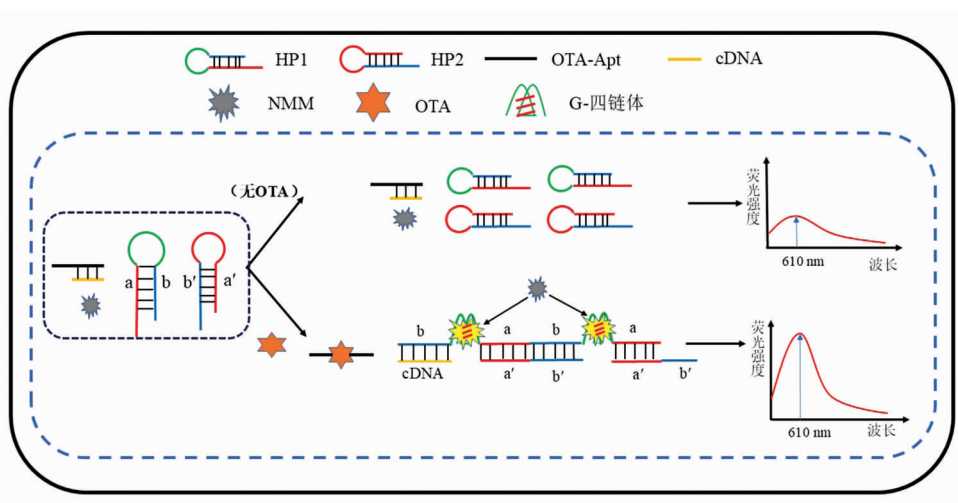


图 1 检测原理图

Fig.1 Detection principle diagram

表 1 本研究所用序列

Table 1 Sequence used in this study

类型	序列(5'-3')
cDNA	<u>TGTCCGATGCTCTCTCCACA</u> ACTG
HP1	TAACGTGTTCAAGTTGTGGAGAGAGTGGGTAGGGCGGGTTGGGAAATCAGTTGTGGAGAGAGCATCGGACA
HP2	CTCTCTCCACA <u>ACTAAACACGTTATGTCCGATGCTCTCTCTCCACA</u> ACTG

注:cDNA 结构中下划线部分序列设计为 OTA 适体反向互补序列。

光分光光度计测量荧光强度, 评估该传感器的可行性。

1.3.5 新型荧光适体传感器方法的建立

1) 孵育过程 在检测 OTA 之前, 首先将 HP1、HP2 两个发卡溶液分别在 95 °C 下变性 5 min, 缓慢冷却至室温至少 1 h; 将 cDNA 和 OTA 适体溶液充分混合, 于 37 °C 下孵育 0.5 h, 取出混合物加入稀释过的不同浓度的 OTA 与处理过的发卡溶液, 在 37 °C 下反应 1 h; 加入 NMM 染料后用含 K⁺ 的缓冲溶液补充至总体积为 150 μL, 在 37 °C 避光条件下孵育 0.5 h。

2) 检测过程 向窄缝石英器皿中加入 150 μL 待测液, 放置在荧光分光光度计器皿凹槽中, 测定荧光强度。荧光分光光度计设置参数: 发射波长 483~684 nm, 激发和发射狭缝均为 10 nm, 扫描速度为 1 200 nm/min。

1.3.6 新型荧光适体传感器的特异性 为探究本方法检测 OTA 的特异性, 选择 OTB、FB₁、AFB₁、ZEN 作为干扰毒素。组 1 为空白对照, 组 2 为质量

浓度为 1 ng/mL 的 OTA, 组 3~6 分别为质量浓度均为 1 ng/mL 的 OTB、FB₁、AFB₁、ZEN, 混合组 7 为质量浓度均为 1 ng/mL 的含 OTA、OTB、FB₁、AFB₁、ZEN 的混合物, 混合组 8 为质量浓度均为 1 ng/mL 的含 OTB、FB₁、AFB₁、ZEN 的混合物, 共 8 组做对比试验, 进行特异性验证。所有试验均重复 3 次。

1.3.7 新型荧光适体传感器的检出限 以 $\lg C_{\text{OTA}}$ 和相对荧光强度为横纵坐标绘制标准曲线, 通过数据分析获得线性回归方程, 从而得到检出限。相对荧光强度通过计算 $(F_1 - F_0)/F_0$ 得到。

1.3.8 人工加标试验方法 为了验证新型荧光适体传感器在实际样品检测中的可靠性, 选择小麦、咖啡和红酒作为食品基质进行研究, 按照本试验方法进行定量检测, 同时与商业 ELISA 试剂盒的检测结果进行对比。

小麦、咖啡和红酒样品均从当地超市购买, 试验前先使用商业 ELISA 试剂盒检测, 保证样品本身不含有 OTA。用研磨机研磨 5 g 小麦和咖啡, 研

磨完成后过 20 目筛,然后用甲醇水溶液(1:1,V/V) 将其定容至 10 mL。使用涡旋混合仪旋转 5 min,充分混合提取,5 000 r/min 离心 2 min,用 0.45 $\mu\text{mol/L}$ 注射式过滤器过滤^[29]。之后,用 PBS 缓冲液将滤液稀释为 50 mL,重复过滤,直到得到清晰的溶液。将不同浓度的 OTA 标准液加入滤液中。

取葡萄酒样品,用 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 滤纸过滤去除颗粒杂质,加入不同浓度的 OTA 标准液,然后用 NaOH 溶液调整样品溶液的 pH 值为 7.4^[30]。

2 结果与分析

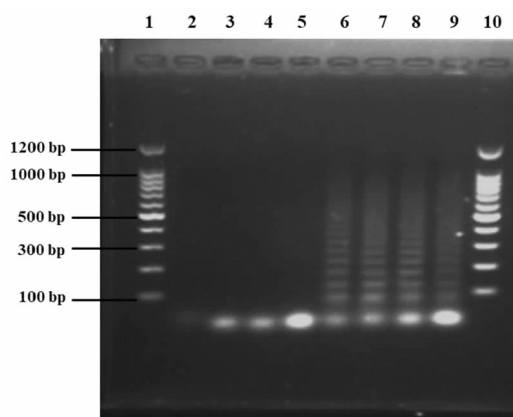
2.1 可行性验证

为了验证 HCR 反应放大信号体系的可行性,进行琼脂糖凝胶电泳试验。根据图 2 所示,泳道 5:当体系中无 cDNA 时,只有 HP1 和 HP2 时未发生杂交反应,无高分子质量 DNA 产物生成。泳道 6~9:当加入不同浓度 cDNA 后,生成了不同长度的高分子质量 DNA,表明成功构建了 HCR 体系且反应正常,生成了高分子质量 DNA,这些结果证实了基于发卡和 cDNA 成功构建了 HCR 反应。

如图 3a 曲线所示,无 OTA 存在情况下,cDNA 与适体部分互补结合,无法触发 HCR 反应,无 G-四链体结构生成,NMM 保持弱荧光。图 3b 曲线所示,在有 OTA 存在情况下,OTA 与适体结合,导致 cDNA-Apt 双链结构解体,cDNA 以单链状态存在,从而触发 HCR 反应,此时,生成大量含有 G-四链体结构的双链 DNA,NMM 随即插入到 G-四链体结构中,发出强荧光,荧光信号显著增强,验证了本研究建立的新型荧光适体传感器可有效检测 OTA。

2.2 传感器特异性分析

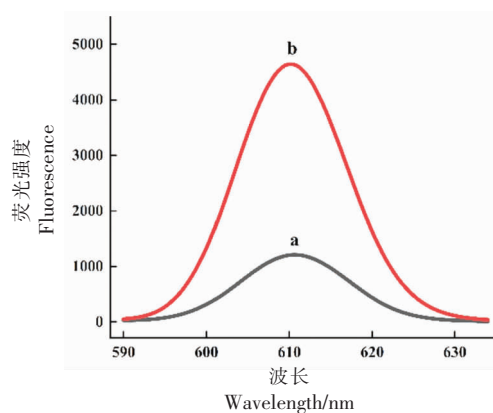
为探究该方法的特异性,评估其对其它真菌毒素的抗干扰性,选择 OTB、AFB₁、FB₁、ZEN 共 4 种毒素作为干扰物质。设立 8 个试验组进行特异性检测试验,8 组样品的配制方法详见 1.3.6 节。如图 4 所示,4 种单一毒素组 3,4,5,6 和混合毒素组 8 均呈阴性结果,且几乎与空白对照试验结果一致。只添加了 OTA 的组 2 和添加了 OTA 的混合组 7 的荧光信号显著增强。该结果表明本方



注:泳道 1:100~1 200 bp;泳道 2:1 $\mu\text{mol/L}$ cDNA;泳道 3:1 $\mu\text{mol/L}$ HP1;泳道 4:1 $\mu\text{mol/L}$ HP2;泳道 5:1 $\mu\text{mol/L}$ HP1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ HP2;泳道 6~9 分别为 1 $\mu\text{mol/L}$ HP1,1 $\mu\text{mol/L}$ HP2 与 1,0.8,0.5,0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 cDNA 的混合物;泳道 10:100~1 200 bp。

图 2 HCR 体系验证图

Fig.2 HCR system verification diagram



注:曲线 a 为 Apt-cDNA+HP1+HP2+NMM;曲线 b 为 Apt-cDNA + HP1+HP2+NMM+OTA。

图 3 荧光信号响应验证图

Fig.3 Fluorescence signal response verification diagram

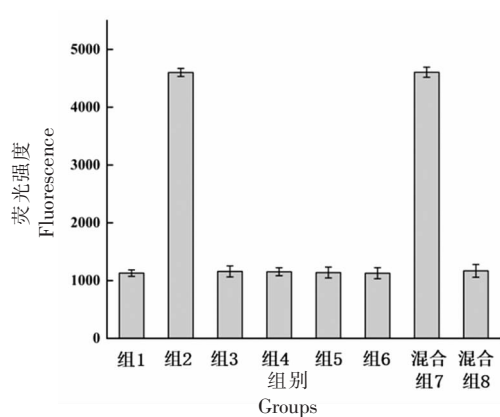


图 4 基于 HCR 技术的新型荧光适体传感器特异性检测
Fig.4 Novel fluorescent aptamer sensor specific detection based on HCR technology

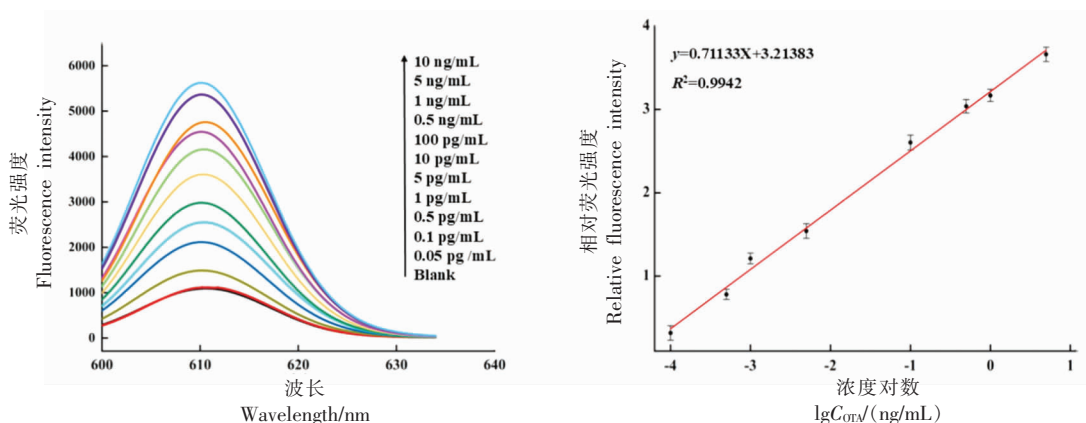
法检测 OTA 具有高选择性和较好的特异性,且可以有效区分部分毒素。

2.3 新型荧光适体传感器标准曲线的建立

优化后的最佳反应条件:cDNA 浓度为 60 nmol/L;发卡浓度为 75 nmol/L;HCR 杂交时间为 60 min; k^+ 浓度为 20 mmol/L;NMM 浓度为 1.5 μ mol/L;NMM 孵育时间为 30 min。

在上述最佳反应条件下,使用荧光分光光度计测定不同 OTA 质量浓度下的荧光信号响应,根据相对荧光强度评价本方法的检测灵敏度。结果

如图 5a 所示,在最优反应条件下,随着 OTA 质量浓度 (0.1 pg/mL~10 ng/mL) 的增加,在波长 610 nm 处的荧光强度逐渐增强,这表明随着 OTA 质量浓度的增加,荧光信号逐渐增强。如图 5b 所示,以 $\lg C_{OTA}$ 为横坐标,相对荧光强度值为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,OTA 质量浓度的对数值与相对荧光强度在 0.1 pg/mL~5 ng/mL 范围内呈现良好的线性关系,回归方程为 $Y = 0.71133\lg C_{OTA} + 3.21383$,相关系数 $R^2=0.9942$,新型荧光适体传感器方法的检出限为 0.1 pg/mL。



(a)不同质量浓度的 OTA 在该检测方法下的荧光信号响应变化

(b) $\lg C_{OTA}$ (ng/mL)与相对荧光强度之间的线性关系

图 5 基于 HCR 的新型荧光适体传感器灵敏度分析

Fig.5 Sensitivity analysis of novel fluorescent aptamer sensor based on HCR

2.4 人工加标试验

为了探究本方法所提出的新型荧光适体传感器在实际样品中的应用,利用红酒、咖啡和小麦作为食品复杂基质,进行人工加标试验并测定回收率。在优化的最佳试验条件下,在预处理后的样品中加入 OTA 标准液,按照本方法开发的新型荧光适体传感器检测并分析 OTA 水平,同时使用

ELISA 商业试剂盒检测,所有试验均重复 3 次。结果如表 2 所示,样品中加标 OTA 的回收率从 92.46%到 97.88%不等,RSD 低于 5%。略优于 ELISA 方法(91.45%~96.82%)的回收率。因此本研究开发的新型荧光适体传感器检测 OTA 具有较高的准确性和实用价值。

表 2 人工加标食品样品中 OTA 含量检测及与 ELISA 方法的比较

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)	本方法			ELISA	
		检测结果/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%	检测结果/(ng/mL)	回收率/%
小麦	5	4.91	95.84	2.57	4.87	93.52
	10	9.75	92.46	3.73	9.75	91.45
红酒	5	4.8	96.51	1.95	4.86	94.83
	10	9.86	97.88	2.41	9.72	95.35
咖啡	5	4.78	97.53	2.86	4.80	96.82
	10	9.71	96.75	3.55	9.82	94.79

3 讨论

本研究构建了一种无酶、免荧光标记且快速、灵敏地检测食品中 OTA 的新型荧光适体传感器,利用 NMM 染料可插入 G-四链体结构中,显著增强荧光信号的特性,通过荧光信号变化实现对 OTA 灵敏检测。该传感器达到了 0.01 pg/mL~5 ng/mL 的线性检测范围,检出限达到 0.1 pg/mL,与其它检测 OTA 的传感器方法对比,本方法显示出良好的线性范围和灵敏度。本研究经过特异性试验,

在 8 组试验中,只有 2 组含 OTA 的试验组呈现出阳性结果,其它 6 组均呈现阴性结果。具有较高的特异性。在人工加标试验中,本文构建的新型荧光适体传感器回收率在 92.46%~97.88% 之间,RSD 低于 5%,表明该方法准确,具有实用价值。

本研究开发的定量检测赭曲霉毒素 A 的新型荧光适体传感器,与 5 种荧光检测赭曲霉毒素 A 的方法进行比较,如表 3 所示。

表 3 荧光适体传感器技术检测 OTA 与其它方法的比较

Table 3 Comparison of OTA detection methods based on fluorescence aptasensor technology

序号	检测方法	线性范围	检出限	检测时间	参考文献
1	荧光+适体+PDANSs	0.05~100 ng/mL	45 pg/mL	130 min	[27]
2	荧光+FRET+AuNPs	0.09~3.12 ng/mL	20 pg/mL	2 h	[31]
3	荧光+TMSD+/ThT	10 pg/mL~50 ng/mL	8 pg/mL	5.5 h	[32]
4	荧光+适体+FL-SERS	5~250 pg/mL	1.03 pg/mL	4 h	[33]
5	荧光+适体+GO	0.04~30 ng/mL	11 pg/mL	85 min	[22]
6	荧光+HCR+NMM	0.1 pg/mL~5 ng/mL	0.1 pg/mL	125 min	本研究

由此可知,本研究建立的方法与其它方法相比,耗时相对较短,且灵敏度较高。

本研究采取无酶、免荧光标记策略,无酶信号放大技术可在一定程度上避免非特异性扩增,提高对 OTA 检测的特异性^[34];利用 NMM 染料插入到 G-四链体结构中增强荧光信号的特性,免去了繁琐的荧光标记过程^[35],简化了试验步骤,同时降低了检测成本,缩短了检测时间。

4 结论

综上所述,本方法构建的新型荧光适体传感器具有快速、灵敏、特异性强、操作简便、成本低等特点。该传感器无酶参与,可减少非特异性扩增,且不需要标记任何荧光信号分子或基团,避免了繁琐的试剂制备过程,还可降低检测成本,在食品安全检测领域具有较好的应用前景。

参 考 文 献

[1] YANG Q Y, DHANASEKARAN S, NGEA G L N, et al. Unveiling ochratoxin A controlling and biotodetoxification molecular mechanisms: Opportunities

to secure foodstuffs from OTA contamination[J]. Food and Chemical Toxicology, 2022, 169: 113437.

- [2] WANG L R, WANG Q, WANG S Q, et al. Bio-control on the contamination of ochratoxin A in food: Current research and future prospects[J]. Current Research in Food Science, 2022, 5: 1539-1549.
- [3] GANESAN A R, MOHAN K, KARTHICK RAJAN D, et al. Distribution, toxicity, interactive effects, and detection of ochratoxin and deoxynivalenol in food: A review[J]. Food Chemistry, 2022, 378: 131978.
- [4] WANG L, HUA X, SHI J, et al. Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification[J]. Toxicon, 2022, 210: 11-18.
- [5] EL-SAYED R A, JEBUR A B, KANG W Y, et al. An overview on the major mycotoxins in food products: Characteristics, toxicity, and analysis[J]. Journal of Future Foods, 2022, 2(2): 91-102.
- [6] BAO K L, LIU X, XU Q, et al. Nanobody multimerization strategy to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of ochratoxin A in coffee samples[J]. Food Control, 2021, 127: 108167.
- [7] KYEI-BAFFOUR V O, KONGOR J E, ANYEBUNO G, et al. A validated HPLC - FLD method for the

- determination of mycotoxin levels in sun dried fermented cocoa beans: Effect of cola nut extract and powder[J]. *LWT*, 2021, 148: 111790.
- [8] 李克, 潘丽红, 罗小虎, 等. 高效液相法同时检测谷物中玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(6): 118-123.
- LI K, PAN L H, LUO X H, et al. Simultaneous determination of zearalenone and ochratoxin A in cereals by high performance liquid chromatography [J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(6): 118-123.
- [9] KHATAEE A, SOHRABI H, ARBABZADEH O, et al. Frontiers in conventional and nanomaterials based electrochemical sensing and biosensing approaches for ochratoxin A analysis in foodstuffs: A review[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 149: 112030.
- [10] ORLOV A V, MALKEROV J A, NOVICHIKHIN D O, et al. Express high-sensitive detection of ochratoxin A in food by a lateral flow immunoassay based on magnetic biolabels [J]. *Food Chemistry*, 2022, 383: 132427.
- [11] TAGHDISI S M, DANESH N M, RAMEZANI M, et al. A novel electrochemical aptasensor for ochratoxin a sensing in spiked food using strand-displacement polymerase reaction [J]. *Talanta*, 2021, 223: 121705.
- [12] XIONG Y, LI W, WEN Q, et al. Aptamer-engineered nanomaterials to aid in mycotoxin determination[J]. *Food Control*, 2022, 135: 108661.
- [13] LI S, KANG Y, SHANG M D, et al. Highly sensitive and selective detection of ochratoxin A using modified graphene oxide-aptamer sensors as well as application[J]. *Microchemical Journal*, 2022, 179: 107449.
- [14] ZHANG N, LI J R, LIU B S, et al. Signal enhancing strategies in aptasensors for the detection of small molecular contaminants by nanomaterials and nucleic acid amplification[J]. *Talanta*, 2022, 236: 122866.
- [15] LUO Z W, LI Y X, ZHANG P, et al. Catalytic hairpin assembly as cascade nucleic acid circuits for fluorescent biosensor: Design, evolution and application[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 151: 116582.
- [16] ZENG Z E, ZHOU R, SUN R W, et al. Nonlinear hybridization chain reaction-based functional DNA nanostructure assembly for biosensing, bioimaging applications[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 173: 112814.
- [17] WU G, XIONG Z W, SUK H O, et al. Two-color, ultra-sensitive fluorescent strategy for ochratoxin A detection based on hybridization chain reaction and DNA tweezers[J]. *Food Chemistry*, 2021, 356: 129663.
- [18] LI Y B, WANG L, ZHAO L T, et al. An fluorescence resonance energy transfer sensing platform based on signal amplification strategy of hybridization chain reaction and triplex DNA for the detection of chloramphenicol in milk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 357: 129769.
- [19] WU J T, LV J R, ZHENG X Q, et al. Hybridization chain reaction and its applications in biosensing [J]. *Talanta*, 2021, 234: 122637.
- [20] ZHU C X, LIU D, LI Y Y, et al. Label-free ratiometric homogeneous electrochemical aptasensor based on hybridization chain reaction for facile and rapid detection of aflatoxin B₁ in cereal crops [J]. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131443.
- [21] FENG C R, ZHANG C, GUO J X, et al. Novel preparation method of bipedal DNA walker based on hybridization chain reaction for ultrasensitive DNA biosensing[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1176: 338781.
- [22] ZHANG Q, KANG L Z, YUE P F, et al. Development of a graphene oxide nanosheet and double-stranded DNA structure based fluorescent "signal off" aptasensor for ochratoxin A detection in malt[J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 14: 100308.
- [23] 黄玉坤, 陶璇, 邵坤, 等. 基于适配体杂交链式反应检测郟县豆瓣中黄曲霉毒素 B₁[J]. *食品科学*, 2020, 41(22): 301-307.
- HUANG Y K, TAO X, SHAO K, et al. Determination of aflatoxin B₁ in Pixian Douban based on aptamer hybridization chain reaction [J]. *Food Science*, 2020, 41(22): 301-307.
- [24] CHEN Q A, GUO Q Q, CHEN Y, et al. An enzyme-free and label-free fluorescent biosensor for small molecules by G-quadruplex based hybridization chain reaction[J]. *Talanta*, 2015, 138: 15-19.
- [25] UHUO O V, WARYO T T, DOUMAN S F, et al. Bioanalytical methods encompassing label-free and labeled tuberculosis aptasensors: A review[J]. *Ana-*

- lytica Chimica Acta, 2022, 13: 326–340.
- [26] DENG J K, HU J, ZHAO J J, et al. A novel ratiometric fluorescent aptasensor accurately detects patulin contamination in fruits and fruits products[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2022, 15(2): 103569.
- [27] GUO H L, MA P F, LI K, et al. A novel ratiometric aptasensor based on dual-emission fluorescent signals and the conformation of G-quadruplex for OTA detection[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 358: 131484.
- [28] BAI Y F, ZHANG H L, ZHAO L, et al. A novel aptasensor based on HCR and G-quadruplex DNzyme for fluorescence detection of carcinoembryonic antigen[J]. Talanta, 2021, 221: 121451.
- [29] AGUILAR-ALVAREZ M E, SAUCEDO-CASTAÑEDA G, DURAND N, et al. The variety, roasting, processing, and type of cultivation determine the low OTA levels of commercialized coffee in Chiapas State, Mexico[J]. Food Control, 2021, 126: 88–108.
- [30] LÓPEZ-PUERTOLLANO D, AGULLÓ C, MERCADER J V, et al. Immunoanalytical methods for ochratoxin A monitoring in wine and must based on innovative immunoreagents[J]. Food Chemistry, 2021, 345:128828.
- [31] ZHAO Y Y, LIU R J, SUN W Y, et al. Ochratoxin A detection platform based on signal amplification by exonuclease III and fluorescence quenching by gold nanoparticles[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 1640–1645.
- [32] 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: 113537.
- [33] WANG H, ZHAO B B, YE Y F, et al. A fluorescence and surface-enhanced Raman scattering dual-mode aptasensor for rapid and sensitive detection of ochratoxin A [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 207: 114164.
- [34] SHI X Y, ZHU X C, CHAI Y Q, et al. Non-enzymatic electrochemiluminescence biosensor for ultrasensitive detection of ochratoxin A based on efficient DNA walker [J]. Food Chemistry, 2023, 407: 135113.
- [35] YAN Y, HU T T, FANG Y K, et al. A fluorescence strategy for the rapid detection of miRNA-21 based on G-quadruplex and cyclic amplification signal [J]. Analytical Biochemistry, 2022, 652: 114775.

A Novel Fluorescent Aptamer Sensor Based on Hybridization Chain Reaction for Detection of OTA in Food

JIA Yaobo¹, ZHANG Yunzhe¹, LI Zikun², LU Xin³, XU Hui³, ZHANG Wei^{1,3,4,5*}

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

²Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

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

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

⁵Key Laboratory of Microbial Analysis and Prevention and Control of Zoonotic Diseases, Hebei Province, Baoding 071000, Hebei)

Abstract Ochratoxin A (OTA) is a common mycotoxin that often contaminates food and causes different degrees of harm. In this study, a novel fluorescent aptamer sensor based on hybridization chain reaction (HCR) was developed for the rapid and sensitive detection of OTA in food products. Firstly, OTA binds to the aptamer and releases the trigger strand cDNA, which then triggers the HCR reaction between the hairpin HP1 and HP2, resulting in the formation of a G-quadruplex structure of G-quadruplex sequence in HP1, and at the same time, the N-quadruplex structure of G-quadruplex sequence in HP1. Sequence to form a G-quadruplex structure, while at the same time N-methylmesoporphyrin IX (NMM) dye is inserted into the G-quadruplex structure (G-quadruplex), which significantly enhances the fluorescence signal. The enzyme-free and fluorescence-free quantitative detection of OTA was achieved by the change of fluorescence signal intensity. The results showed that the method was highly specific, and among the seven groups of tests, the re-

sults of the two groups containing OTA were positive, and the results of the other five groups without OTA were negative. The linear regression equation was $Y = 0.71133 \lg C_{\text{OTA}} + 3.21383$ with the correlation coefficient $R^2 = 0.9942$, the linear range was 0.1 pg/mL – 5 ng/mL, and the limit of detection was 0.1 pg/mL. The recoveries of this method applied to the detection of artificially spiked samples of wheat, red wine and coffee were all in the range of 92%–97.88%, which were higher than those of the recoveries of the ELISA kits (90.5%–95.78%) indicated that the method was superior to the national standard method. Therefore, the novel fluorescent aptasensor developed in this study can realize the rapid, sensitive, specific and accurate detection of OTA in food, and also provides a new idea for the rapid detection of other toxins as well as other chemical contaminants affecting food safety.

Keywords ochratoxin A; hybridization chain reaction (HCR); G-quadruplex; fluorescent aptamer sensor; detection