

doi: 10.19969/j.fxcsxb.22031601

基于溴化银-银-碳纳米管复合物与核酸适配体的 阴极光电化学传感器检测赭曲霉毒素A

周建红^{1*}, 令玉林², 曾伯平¹, 张衡³, 邓克勤³

(1. 遵义师范学院 生物与农业科技学院, 贵州 遵义 563006; 2. 遵义师范学院 资源与环境学院, 贵州 遵义 563006; 3. 湖南科技大学 化学化工学院, 湖南 湘潭 411201)

摘要: 该研究利用水热法制备了一种新的溴化银-银-碳纳米管(AgBr-Ag-CNTs)复合材料, 并通过扫描电子显微镜、X-射线衍射和X-射线光电子能谱对其进行表征。以AgBr-Ag-CNTs作为光电阴极, 相比于单一的AgBr和二元的AgBr-Ag复合材料, 其具有更高的光电化学活性。采用 $K_3[Fe(CN)_6]$ 作为光电子受体能进一步提高光电流信号。基于AgBr-Ag-CNTs为光电阴极传感基底, 构建了一种灵敏检测赭曲霉毒素A(OTA)的核酸适配体传感器。对目标物的线性浓度范围为4.0 pg/mL~2.5 ng/mL, 相关系数(r^2)为0.994, 检出限为1.5 pg/mL。该传感器制备简单、成本低、灵敏度高、抗干扰强, 对样品检测的回收率为92.0%~108%, 可用于实际样品中OTA的分析。

关键词: 溴化银-银-碳纳米管; 光电阴极传感器; 核酸适配体; 赭曲霉毒素A

中图分类号: O657.1; O614.12 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2022)08-1253-06

Determination of Ochratoxin A Using a Cathodic Photoelectrochemical Sensor Based on AgBr-Ag-CNTs Composite and Aptamer

ZHOU Jian-hong^{1*}, LING Yu-lin², ZENG Bo-ping¹, ZHANG Heng³, DENG Ke-qin³

(1. College of Biological and Agricultural Science and Technology, Zunyi Normal University, Zunyi 563006, China; 2. College of Resources and Environment, Zunyi Normal University, Zunyi 563006, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract: Photocathode-based sensors possess the advantages of high selectivity and anti-interference in real sample detection, though photocathode produces low photocurrent signal and gives rise to poor sensitivity. Herein, a novel silver bromide-silver-carbon nanotubes (AgBr-Ag-CNTs) composite was synthesized by solvothermal method, and was characterized by scanning electronic microscopy, X-ray diffraction and X-ray photoelectron spectroscopy. Because reduced Ag has revealed localized surface plasmon resonance effect (LSPR), it can amplify light absorption efficiency. Furthermore, CNTs could optimize the electric field near metallic Ag, strengthen light absorption and improve the separation efficiency of photo-generated carriers. Thus AgBr-Ag-CNTs displayed a better cathodic photoelectrochemical activity, compared with AgBr or AgBr-Ag. With $K_3[Fe(CN)_6]$ as photoelectron acceptor, the photocurrent response could be further increased. To develop the practicality of AgBr-Ag-CNTs, an ochratoxin A (OTA) aptasensor was constructed by using AgBr-Ag-CNTs as photocathodic sensing interface, an aptamer as target recognition site, and $K_3[Fe(CN)_6]$ as photoelectron acceptor. Since the aptamer/OTA complex has a rigid structure with weak conductivity, it could effectively block the absorption of light with the sensing interface, inhibit the transfer of photoelectrons toward electron receptors, and reduce the photocurrent signal. Based on the changed photocurrent as signal, the sensor showed a wide linear response from 4.0 pg/mL to 2.5 ng/mL ($r^2 = 0.994$) and a low detection limit of 1.5 pg/mL. It was used for detection of OTA in real samples, with recoveries of 92.0%~108%. This work provided a novel photoelectrochemical method for OTA detection, with high sensitivity, specificity and good anti-interference.

收稿日期: 2022-01-17; 修回日期: 2022-02-20

基金项目: 遵市科合HZ字(2022)134号; 贵州省省级科技计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般572); 2021年“乡村振兴”专项(黔教合KY字[2012]017-18号); 湖南省教育厅重点科研基金项目(21A0295); 遵义师范学院博士基金项目(遵师BS[2020]02号); 赤水河流域环境保护与山地农业发展人才基地开放基金项目

* 通讯作者: 周建红, 博士研究生, 研究方向: 分析化学, E-mail: jianhongzhou@163.com

Key words: AgBr – Ag – CNTs; photocathode sensor; aptamer; ochratoxin A

赭曲霉毒素 A (OTA) 是几种菌株的有毒次生代谢物, 其毒性大、分布范围广, 易对农产品、食品造成污染^[1-2]。由于人类与 OTA 的过度接触具有致畸、致癌等风险, 世界不同的国家和组织均制定了严格的 OTA 限量标准。如欧盟委员会 (EU) 对谷物产品中的 OTA 限量小于 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3], 中国国家标准限定谷类、豆类中的 OTA 标准应低于 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4]。

OTA 常见的检测方法有色谱法^[5-6]和免疫分析法^[7-8]。适配体传感器作为一种成本低廉、制备简单、灵敏度高的分析技术^[9-11], 也被用于 OTA 的检测, 并显示了对目标分子的特异性生物识别能力。近年来, 新涌现的光电化学传感器 (尤其是阴极光电化学传感器) 具有操作方便、背景低、灵敏度高等优点, 引起了广泛关注^[12-16], 进一步开发特殊的阴极光电活性材料可提高阴极光电化学传感器的性能。AgBr 具有光学不稳定性, 通过部分被还原为金属 Ag 显示的局域表面等离子体共振效应 (LSPR) 可提高光吸收效率。此外, 金属 Ag 的 LSPR 效应还与周围介质密切相关, 通过采用各种支撑材料 (如 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 、CNTs、BiOI 等) 优化金属 Ag 附近的电场, 可增强光吸收, 提高光活性材料的性能^[15-16]。

目前, 基于 OTA 适配体的阴极光电化学传感器研究不多。本文通过简单的水热法和光还原法制备了 AgBr – Ag – CNTs, 利用金属 Ag 的 LSPR 效应和 CNTs 优异的电子传输性能, 将 AgBr 的光生电子快速传输给溶液中的光电子受体 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 有效地降低了光生电子—空穴复合, 显著提升了阴极光电流强度; 进一步采用 AgBr – Ag – CNTs 作为阴极传感界面固定 OTA 核酸适配体, 对目标分子进行特异性识别, 因形成的适配体/OTA 配合物具有刚性的三级结构和弱导电性, 能有效阻碍传感界面对光的吸收及抑制光电子向电子受体传递^[17], 显著降低光电流信号 (原理如图 1 所示), 以此构建了用于检测 OTA 的光电适配体传感器。本传感器制备简单、成本低、灵敏度高、抗干扰强, 可用于实际样品中 OTA 的测定, 具有潜在的应用价值。

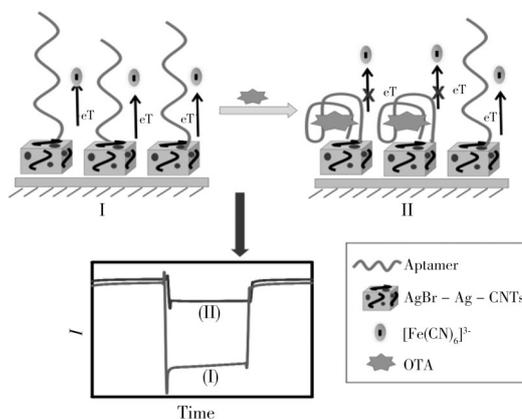


图 1 检测 OTA 的示意图

Fig. 1 Schematic diagram for detection of OTA

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

采用 X-射线光电子能谱 (XPS, PHI5300)、扫描电子显微镜 (SEM, Sigma 500, 德国 Zeiss 公司)、能量色散光谱仪 (EDS, XFlash 6130, 布鲁克科技有限公司)、X-射线衍射仪 (XRD – 6000, 日本岛津公司) 表征材料。光电测试使用光电化学系统 (PEAC 200A, 天津艾达恒晟科技发展有限公司) 和 CHI 760C 电化学工作站 (上海辰华仪器有限公司)。实验采用 LED 白光光源 ($20 \text{ mW}/\text{cm}^2$), 三电极体系分别为 ITO 工作电极、Pt 丝对电极和饱和甘汞辅助电极 (SCE)。

碳纳米管 (CNTs, 直径 $20 \sim 30 \text{ nm}$, 长度 $0.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$)、 AgNO_3 、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、KBr、乙醇胺、壳聚糖 (CS)、Tris – HCl、戊二醛 (GLD) 购于上海阿拉丁公司。玉米赤霉烯酮 (ZEA)、赭曲霉毒素 A (OTA)、赭曲霉毒素 B (OTB)、黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 由英格兰 New England Biolabs, Inc. 提供。OTA 的核酸适配体 $5' \text{-NH}_2 \text{-(CH}_2\text{)}_6 \text{-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA-3'}$ 由上海生工公司合成。所用试剂均为分析纯, 实验用水均为超纯水。

1.2 AgBr – Ag – CNTs 的制备

先将多壁碳纳米管 (CNTs) 在浓 HNO_3 和 H_2SO_4 (3:1, 体积比) 中酸化处理^[18], 然后采用溶剂热法制备 AgBr – Ag – CNTs。具体方法如下: 分别使用 25 mL 乙二醇溶解 240 mg KBr 和 340 mg AgNO_3 , 将 20 mg CNTs 加入 AgNO_3 溶液中, 缓慢磁搅拌 1 h 后, 将 KBr 溶液缓慢滴加到上述悬浮液中, 搅拌 30 min , 置于紫外光下照射 1 h 后, 将混合液倒入高压反应釜中, $160 \text{ }^\circ\text{C}$ 下加热 6 h , 离心、洗涤并干燥, 制得 AgBr – Ag – CNTs。为了比较性能, 采用相似方法, 在不加入 CNTs 的条件下制备 AgBr – Ag。AgBr 也在无 CNTs 和紫外光照下制得。

1.3 核酸适配体传感器的制备与OTA的检测

将AgBr-Ag-CNTs分散在0.1%壳聚糖(CS)溶液中,取8 μL AgBr-Ag-CNTs分散液(5.0 mg/mL)滴于洁净的ITO表面,干燥后,用戊二醛(2.5%)活化CS膜30 min,然后将8 μL 核酸适配体(1.0 $\mu\text{mol/L}$)滴于ITO表面并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下培育12 h,最后用乙醇胺封闭活性位点30 min。传感器在制备过程的每一步都需仔细清洗。

OTA的检测采用Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl和20 mmol/L MgCl_2 , pH 8.0)。取10 μL 不同浓度的OTA样品溶液滴加至传感器表面,室温反应30 min,洗净。在0.1 V电压下,以0.1 mol/L KCl为电解质溶液,20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 作为光电子受体,检测传感器与OTA反应前/后的光电流强度(I_p/I)。

2 结果与讨论

2.1 材料的表征

利用扫描电镜(SEM)表征了AgBr-Ag-CNTs复合物的形貌和尺寸。从图2A可观察到,复合物呈类立方体形态,CNTs嵌入或覆盖在立方体表面,其尺寸约0.4~2.0 μm 。AgBr-Ag-CNTs的EDS谱图表明其特征峰分别对应C、O、Br、Ag四种元素(图2B),证实了复合材料中存在CNTs和AgBr。其中,Ag原子占32.86%,Br原子占26.41%。过量的Ag原子(6.46%)可能来自 Ag^+ 的还原。图2C为AgBr-Ag-CNTs的XRD谱图,其在31.0 $^{\circ}$ 、44.3 $^{\circ}$ 、55.0 $^{\circ}$ 、64.5 $^{\circ}$ 、73.2 $^{\circ}$ 的特征衍射峰,分别对应AgBr立方晶相的(200)、(220)、(222)、(400)、(420)晶面(JCPDS No. 06-0438)^[19]。未发现明显的Ag特征峰,可能是由于AgBr-Ag-CNTs中金属Ag含量较低或粒径太小所致。进一步利用XPS分析AgBr-Ag-CNTs的元素组成和化学状态(图2D-F)。C 1s和O 1s的特征峰来自CNTs(图2D)。Ag的XPS峰可拆分为4个拟合峰。367.1 eV和373.2 eV处的两个峰属于AgBr中Ag 3d_{5/2}和Ag 3d_{3/2},368.0 eV和374.2 eV处的两峰属于金属Ag^[20],这表明 Ag^0 的存在(图2E)。Br 3d在68.0 eV和69.1 eV处有拟合峰,分别属于Br 3d_{5/2}和Br 3d_{3/2}的结合能(图2F),表明元素Br主要以Br⁻存在^[20]。

进一步比较了几种材料的阴极光电化学活性(见图3)。在外加偏压0.1 V条件下,AgBr显示较低的阴极光电流,AgBr-Ag的阴极光电流强度明显增强。与前二者相比,AgBr-Ag-CNTs的光电流强度大大提升,其强度分别为AgBr的2.7倍和AgBr-Ag的2.1倍,这表明AgBr-Ag-CNTs拥有更高的阴极光电化学活性。

2.2 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的影响

为提高AgBr-Ag-CNTs在光激发下的电子-空穴对(e^-/h^+)的分离效率,提高光电流信号,构建高性能传感器,本实验考察了 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 作为光电子受体时的信号变化。由图4A可见,无 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 时,光照下的电流(曲线a')比无光照时的电流(曲线a)明显增强;加入 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 后,开启灯源时电流急剧增加(图4B, b'),与曲线a'相比,对应电位的电流大大增强。为了进一步验证 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的作用,本实验采用恒电位法比较了AgBr-Ag-CNTs/ITO电极在有/无 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 时的光电流。结果显示,在0.1 V电位下,当存在 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 作为光电子受体时,电极的光电流是无 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 时的2.9倍,且光电流在瞬间达到最大。这表明光照条件下,AgBr导带激发出的光电子可经CNTs快速传递到溶液中的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$,促进其还原为 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 。由于CNTs具有优良的电荷传输效率,可加速电荷分离并抑制电子-空穴对(e^-/h^+)复合,从而显著增强光电流信号^[16]。

2.3 传感器的构建

利用电化学阻抗谱(EIS)研究了核酸适配体传感器的制备过程。图5A显示AgBr-Ag-CNTs/ITO的电荷转移电阻(R_{ct})相对较低(曲线a)。修饰CS膜后,增强了 R_{ct} 值(曲线b);固定适配体和封闭乙醇胺后, R_{ct} 值显著增加(曲线c);与OTA反应后进一步降低了 R_{ct} (曲线d)。采用瞬态光电流对传感器的制备进行考察(见图5B),可观察到AgBr-Ag-CNTs/ITO产生极高的阴极光电流(曲线a)。随着CS的修饰、核酸适配体的固定和乙醇胺的封闭,光电流逐步降低(曲线b、c)。与OTA反应后,光电流密度进一步减小(曲线d),这表明传感器已成功制备且实现了对目标OTA的特异性识别。

2.4 实验条件的优化

外加电位是影响光电流信号的重要因素。如图4B所示,阴极光电流强度随扫描电位(0.6~0.05 V)的降低而升高,但扫描电位<0 V时,AgBr-Ag-CNTs不稳定,当扫描电位低于0.05 V时,负向电流急剧升高,这可能是由于AgBr-Ag-CNTs复合物中的 Ag^+ 被快速还原所致。因此,本实验选择0.1 V作为偏置电位。

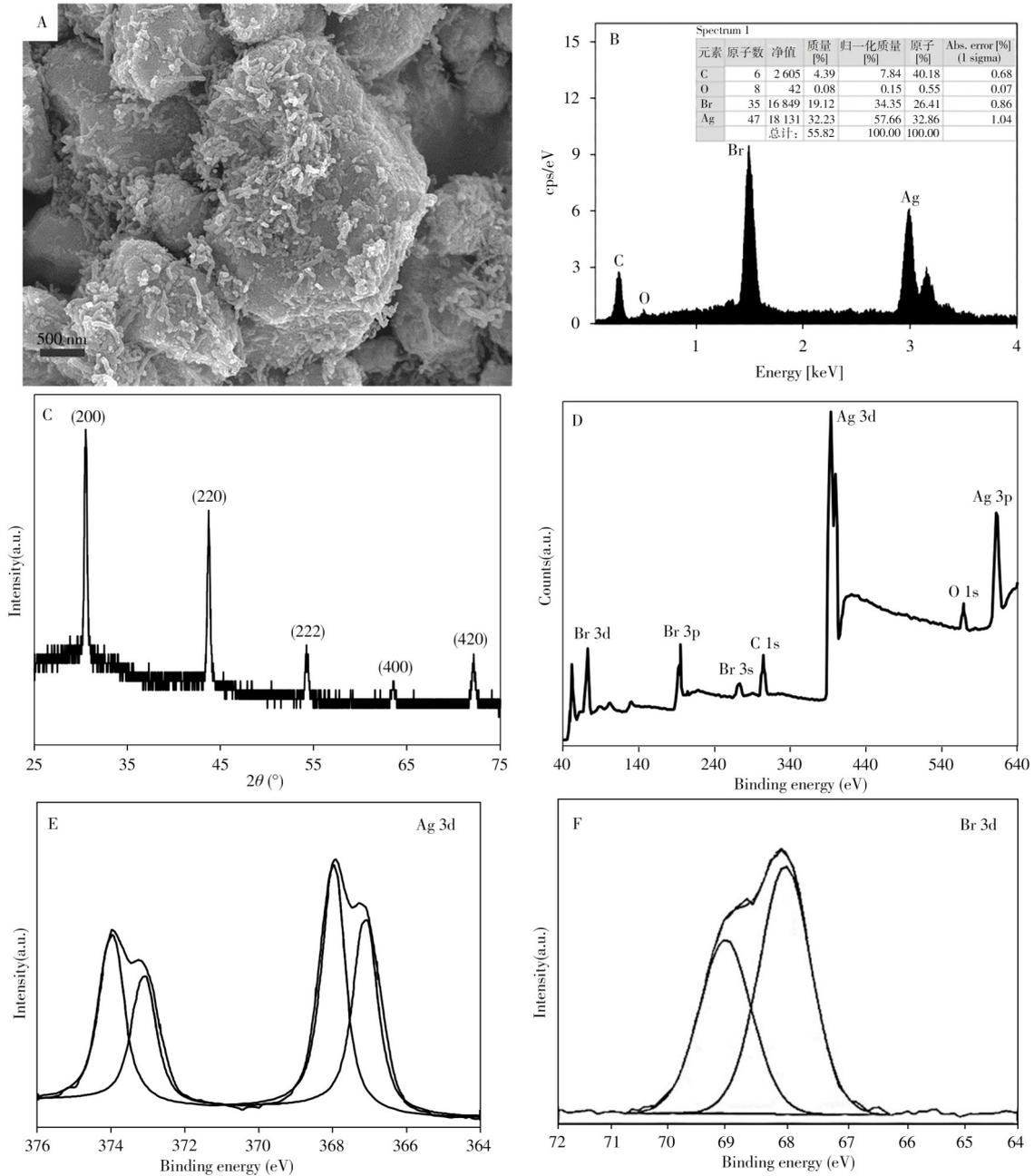


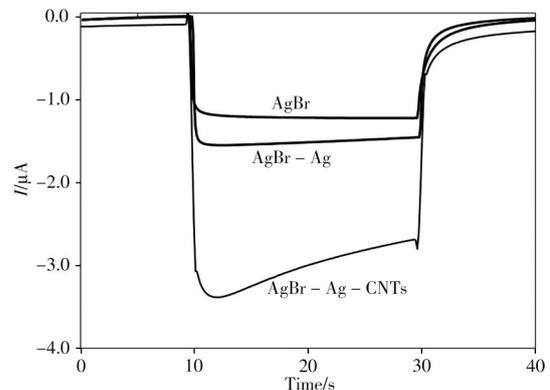
图 2 AgBr-Ag-CNTs 的 SEM 图(A)、EDS 谱图(B)、XRD 谱图(C)和 XPS 谱图(D-F)

Fig. 2 SEM image(A), EDS spectrum(B), XRD pattern(C) and XPS spectrum(D-F) of AgBr-Ag-CNTs

核酸适配体在光电阴极界面的固定密度影响光电化学响应。实验发现,在适配体浓度为 $0 \sim 1.0 \mu\text{mol/L}$ 范围内,光电流强度随浓度的升高急剧下降。在 $1.0 \sim 5.0 \mu\text{mol/L}$ 范围,光电流缓慢下降最后趋于稳定。考虑到高密度的适配体会阻碍光电子转移,而低密度的适配体不能有效捕获 OTA 并与其反应。因此,本实验采用 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的适配体浓度进行后续实验。

2.5 性能检测

在最佳实验条件下,测试了传感器与不同浓度 OTA 反应后的阴极光电流响应(图 6A)。在 $4.0 \text{ pg/mL} \sim 2.5 \text{ ng/mL}$ 范围内,光电流密度随 OTA 质量浓

图 3 不同材料修饰的 ITO 玻璃在 0.1 V 偏压下的光电流Fig. 3 Photocurrent of ITO glass modified by different materials at potential of 0.1 V

度的升高而降低, 且降低的光电流 $\Delta I(I - I_0)$ 与 OTA 质量浓度的对数 ($\log C$) 呈线性关系, 线性方程为: $\Delta I(\mu A) = -0.179 + 0.917 \log C(\text{pg/mL})$ (图 6A, 插图), 相关系数 (r^2) 为 0.994, 检出限 (LOD) 为 1.5 pg/mL, 远低于欧盟和中国规定的谷物和豆类原料中 OTA 的限定含量^[3-4]。

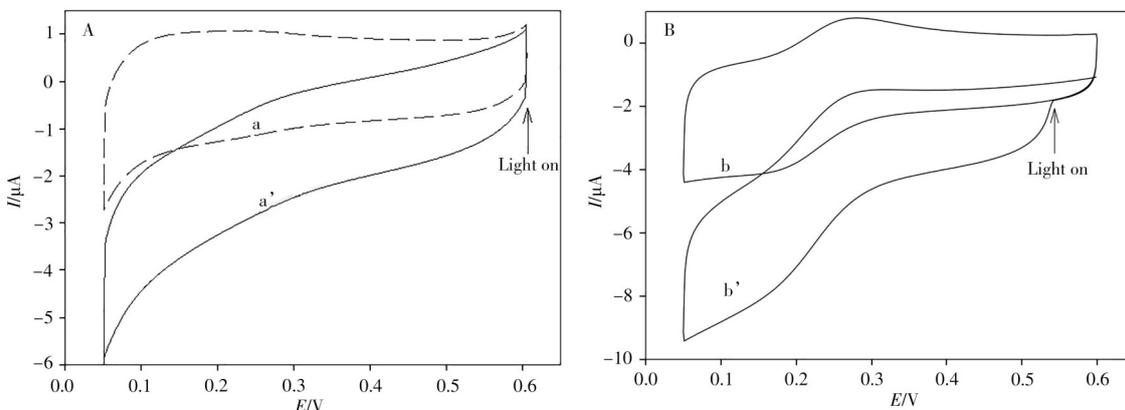


图 4 AgBr-Ag-CNTs/ITO 在 0.1 mol/L KCl (A) 和 20 μmol/L K₃[Fe(CN)₆] (B) 溶液中于黑暗 (a, b) 和光照 (a', b') 条件下的循环伏安图

Fig. 4 CV curves of AgBr-Ag-CNTs/ITO in 0.1 mol/L KCl solution (A) and 20 μmol/L K₃[Fe(CN)₆] (B) under darkness (a, b) and light irradiation (a', b')

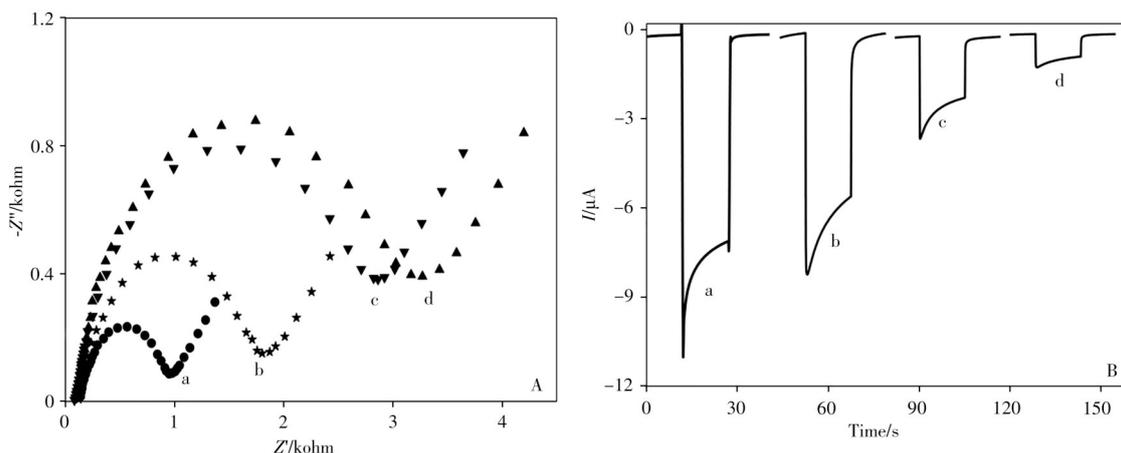


图 5 不同电极在 5 mmol/L K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 溶液中的电化学阻抗谱 (A), 以及 0.1 V 偏压下, 不同电极在 20 μmol/L K₃[Fe(CN)₆] 中的光电流 (B)

Fig. 5 EIS curves of different electrodes in 5 mmol/L K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] solution (A), and photocurrent response of different electrodes at 0.1 V in 0.1 mol/L KCl containing 20 μmol/L K₃[Fe(CN)₆] (B)
a: AgBr-Ag-CNTs/ITO; b: after CS modification; c: after aptamer and ethanolamine immobilization; d: after incubation with OTA (1.0 ng/mL)

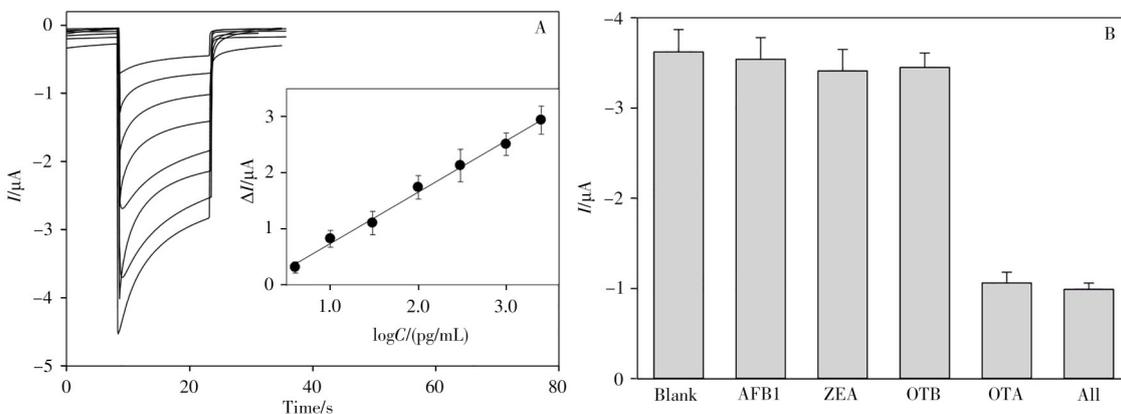


图 6 光电流响应与 OTA 浓度的关系 (A), 及方法对 OTA 检测的特异性 (B)

Fig. 6 Relationship between photocurrent response and concentration of OTA (A), and specificity of the method for OTA assay (B)
concentration of OTA: 1.0 ng/mL; concentration of aflatoxin B1 (AFB1), zearalenone (ZEA), and ochratoxin B (OTB): 50.0 ng/mL; inset: the log-linear correlation between ΔI and content of OTA

利用 AgBr-Ag-CNTs/ITO 对 1.0 ng/mL OTA 进行特异性测试。如图 6B 所示,与空白溶液相比,传感器对质量浓度为 50.0 ng/mL 的黄曲霉素 B1(AFB1)、玉米赤霉烯酮(ZEA)、赭曲霉毒素 B(OTB)的光电流响应降低小于 7.5%;当三者与 OTA 混合后,传感器响应的光电流与仅含 OTA 反应液的光电流相似。结果表明该方法对 OTA 具有良好的选择性。

为验证该传感器的可靠性,本课题组从当地超市购买了红酒、豆浆和花生牛奶 3 种不同样品,采用加标的方式考察其回收率,每个样品的加标质量浓度为 100 pg/mL,平行测定 3 次,测得回收率为 92.0%~108%,相对标准偏差(RSD)低于 9.3%,表明该传感器可用于实际样品中 OTA 的检测。

3 结 论

本文采用水热法和光化学还原法制备了具有优良阴极光电化学活性的 AgBr-Ag-CNTs 复合纳米材料。采用该材料作为阴极光电传感基底,以 $K_3[Fe(CN)_6]$ 作为光电子受体,制备了 OTA 适配体传感器,于 4.0 pg/mL~2.5 ng/mL 范围实现了对目标分子 OTA 的选择性检测,检出限为 1.5 pg/mL。本传感器制备简单、成本低、灵敏度高、抗干扰强,具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] Kumar P, Mahato D K, Sharma B, Borah R, Haque S, Mahmud M M C, Shah A K, Rawal D, Bora H, Bui S. *Toxicol.*, **2020**, 187: 151-162.
- [2] Chrouda A, Sbartaï A, Baraket A, Renaud L, Maaref A, Jaffreic-Renault N. *Anal. Biochem.*, **2015**, 488: 36-42.
- [3] Regulation E C. *Off. J. Eur. Union*, **2006**, L364: 5-18.
- [4] Qian M Y, Hu W X, Wang L H, Wang Y, Dong Y F. *Toxins*, **2020**, 12(6): 376-382.
- [5] Campone L, Piccinelli A L, Celano R, Pagano I, Russo M, Rastrelli L. *Food Chem.*, **2018**, 244: 128-135.
- [6] Armutcu C, Uzun L, Denizli A. *J. Chromatogr. A*, **2018**, 1569: 139-148.
- [7] Robinson A L, Lee H J, Ryu D. *Food Chem.*, **2017**, 214: 47-52.
- [8] Zhang T, Xing B, Han Q Z, Lei Y F, Wu D, Ren X, Wei Q. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1032: 114-121.
- [9] Qing Y, Li X, Chen S, Zhou X P, Lou M, Xu X, Li C R, Qiu J F. *Microchim. Acta*, **2017**, 184: 863-870.
- [10] Wei M, Zhang W Y. *Sens. Actuators B*, **2018**, 276: 1-7.
- [11] Suesa-Ngam A, Howes P D, Stanley C E, DeMello A J. *ACS Sens.*, **2019**, 4: 1560-1568.
- [12] Shu J, Tang D P. *Chem. Asian J.*, **2017**, 12: 2780-2789.
- [13] Shu J, Tang D P. *Anal. Chem.*, **2020**, 92: 363-377.
- [14] Xu Y T, Yu S Y, Zhu Y C, Fan G C, Han D M, Qu P, Zhao W W. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2019**, 114: 81-88.
- [15] Deng K Q, Xiao J, Liu Z, Li C X, Wang J L, Yi Q F, Huang H W, Zhou H. *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, 181: 113152.
- [16] Xiao J, Deng K Q, Liu Z, Li C X, Wang J L, Yi Q F, Huang H W, Zhou H. *Sens. Actuators B*, **2021**, 348: 130691.
- [17] Zhang J, Xu X J, Qiang Y. *Sens. Actuators B*, **2020**, 312: 127964.
- [18] Deng K Q, Liu X Y, Li C X, Hou Z H, Huang H W. *Sens. Actuators B*, **2017**, 253: 1-9.
- [19] Lin H L, Cao J, Luo B D, Xu B Y, Chen S F. *Catal. Commun.*, **2012**, 21: 91-95.
- [20] Lin S L, Liu L, Hu J S, Liang Y H, Cui W Q. *Appl. Surf. Sci.*, **2015**, 324: 20-29.

(责任编辑:龙秀芬)