基于核酸适配体的上转换荧光纸基传感器用于测定茶水中的黄曲霉毒素B1

金碧瑞^{1,3}, 杨叶欣^{2,3}, 卢天健^{3,4}, 徐峰^{2,3}, 林敏^{2,3*}

1. 西安交通大学材料力学性能国家重点实验室, 西安 710049

2. 西安交通大学生命科学与技术学院生物信息工程教育部重点实验室, 西安 710049

3. 西安交通大学仿生工程与生物力学中心, 西安 710049

4. 西安交通大学多功能材料与结构教育部重点实验室, 西安 710049

*通讯作者, E-mail: minlin@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-26; 接受日期: 2018-05-22; 网络版发表日期: 2018-07-02

陕西省创新人才推进计划(编号: 2017KJXX-28)、中央高校基本科研业务费专项资金(编号: 2016qngz03)、航天营养与食品工程重点实验室开放基金(编号: SNFE-KF-15-09)、陕西省创新团队(编号: 2017KCT-22)和榆林市重点科技创新团队(编号: 2017KJH-02)资助项目

摘要 黄曲霉毒素大量存在于花生、玉米、稻米、大豆、小麦和茶叶中, 其毒性、致癌力在霉菌毒素中都居首位, 是对人类健康危害极为突出的一类霉菌毒素. 本研究使用上转换纳米材料为荧光标记物, 在其表面修饰可特异性地结合黄曲霉毒素B1的核酸适配体, 构建出一种基于竞争法的荧光侧流试纸检测技术. 该技术可实现对黄曲霉毒素B1的快速检测, 在0.1~100 ng/mL的浓度范围内具有良好的线性度, 最低检出限为0.03 ng/mL, 并实现了对实际茶水样品的定量检测. 该方法灵敏度高、特异性强、适用于现场的快速检测, 具有良好的经济价值和应用前景.

关键词 黄曲霉毒素B1, 上转换纳米颗粒, 核酸适配体, 侧流试纸

1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxins)是由黄曲霉、寄生曲霉产生的一类化学结构类似的代谢产物^[1]. 它们大多存在于花生、玉米、稻米、大豆、小麦等变质的粮油产品中, 近年来也有报道在茶叶中发现了黄曲霉毒素^[2,3]. 黄曲霉毒素的毒性、致癌力在霉菌毒素中都居首位. 黄曲霉毒素的主要分子型式含B1、B2、G1、G2、M1、M2等, 其中M1和M2主要存在于牛奶中, B1为毒性及致癌性最强的物质, 是对人类健康危害极为突出

的一类霉菌毒素. 因此, 世界各国对黄曲霉毒素在食品、农产品和饲料中的最高允量进行了严格规定. 综上, 快速、准确地检测黄曲霉毒素的含量对于保障食品安全、提高人民生活质量和农业可持续发展均有极其重要的意义.

目前, 检测黄曲霉毒素B1的常用方法有薄层层析法(thin-layer chromatography, TLC)、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)等^[4-7]. 薄层层析法虽然设备简单, 但操作过程过于繁琐且灵敏度差(最低检测限为5 g/kg, 与毒性安全剂量

引用格式: Jin B, Yang Y, Lu T, Xu F, Lin M. Lateral flow aptamer assay for detection of aflatoxin B1 in tea using upconversion nanoparticles. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 353–359, doi: [10.1360/N032018-00060](https://doi.org/10.1360/N032018-00060)

0.01 g/kg相差很大). 高效液相色谱法虽然结果可靠、灵敏度高(达到0.005 g/kg), 但是依赖于昂贵的仪器、复杂的样品前处理工艺以及高素质的操作人员, 因此常被限制在实验室内使用^[8]. 免疫分析法是现今应用较为广泛的检测方法, 其中包括胶体金免疫层析技术(检测限可达到25 µg/L)^[8]、基于荧光标记的免疫竞争法(检测限可达到5 µg/L)^[9]. 与化学分析法比较, 免疫分析法前处理简单、特异性强、样品用量少, 可同时检测多个样品, 但其存在的缺点是所使用的抗体制备时间较长、成本较高且不稳定. 适配体(aptamer)是一种经过筛选的能够通过氢键、范德华力等作用与目标物特异性结合并形成特定三维结构的DNA或RNA单链. 相对于抗体而言, 适配体的特异性更强、稳定性更高且更易于合成和修饰^[10]. 因此适配体在基础研究、医疗诊断及分析检测方面已逐渐开始替代抗体并有了广泛的应用. 目前大多采用适配体作为捕获探针的检测方法都是基于一些昂贵的实验室设备, 能够达到非常高的灵敏度, 然而无法做到即时检测^[11]. 虽然有一些研究采用纸基芯片作为适配体探针的载体, 采用显色颗粒的聚集显色作为检测信号, 但是这些基于比色原理的检测方法往往达不到所需的灵敏度^[12].

有研究表明, 采用荧光颗粒代替显色颗粒, 将颗粒产生的荧光作为信号, 能够极大地提高检测限^[13]. 传统的荧光颗粒(如有机荧光染料和量子点)大都在紫外光激发下产生可见光的发射, 而大多生物毒素在紫外激发下会产生强烈的背景荧光. 较之传统的荧光颗粒, 上转换纳米颗粒具有独特的上转换发光机制, 能将近红外光转化为荧光, 因此避免了由生物毒素产生的背景荧光, 有望进一步提高检测的灵敏度^[14]. 本实验采用上转换纳米颗粒表面修饰特异性捕获黄曲霉毒素B1的寡核苷酸适配体构建荧光侧流试纸平台, 可快速、准确地对茶水样品中黄曲霉毒素B1的含量进行检测. 该方法具有高灵敏度、高特异性的优点并适用

于现场的快速检测, 具有良好的经济价值和应用前景.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

YCl₃·6H₂O、ErCl₃·6H₂O、YbCl₃·6H₂O、TmCl₃·6H₂O、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自Sigma公司(美国). 油酸(90%)和十八烯(90%)购自Alfa Aesar有限公司(美国). 无水甲醇、氢氧化钠、乙醇、Tris-HCl、吐温20、牛血清白蛋白(BSA)和氯仿购自天津致远化学有限公司(中国). 聚丙烯酸购自天津永胜化学试剂有限公司(中国). 黄曲霉毒素的适配体序列及互补配对的cDNA序列(表1)选自参考文献, 由上海生工生物工程合成.

所用表征设备: 透射电子显微镜(transmission electronic microscope, TEM, HT7700, Hitachi, 日本, 工作电压为100 kV), 高分辨透射电子显微镜(high resolution transmission electron microscopy, HRTEM, JEM 2100, 日本, 工作电压为200 kV), X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD, XRD-7000, Cu靶, Kα射线), 傅里叶红外光谱(Fourier transforming infrared spectrum, FTIR, Thermo IS-50, 美国), 荧光分光光度计(Quanta-MasterTM40, 美国), 紫外分光光度计(UV-Vis, lambda35, 美国), CCD相机(尼康D90), 980 nm近红外激光器(长春亮丽光电有限公司, 中国).

2.2 实验方法

2.2.1 上转换纳米颗粒的合成

上转换纳米颗粒依照文献采用热分解法合成^[15]. 合成过程如下: 将YCl₃·6H₂O (242.69 mg, 0.8 mmol), ErCl₃·6H₂O (7.64 mg, 0.02 mmol)和YbCl₃·6H₂O (69.75 mg, 0.18 mmol)溶于2 mL超纯水, 将其加入含有7.5 mL油酸和15 mL十八烯的三口烧瓶内并在室温

表1 黄曲霉毒素B1适配体序列及cDNA序列

Table 1 The sequences of aflatoxins B1 aptamer and cDNAs

名称	序列5'-3'	修饰
适配体	GCTGAGTCTGAGTCG GTTGGGCACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCGTGCCCT TCGCTAGGCCACACA	5'-氨基
捕获探针	TGTGGGCCTAGCGAAGGGCACGA	3'-生物素
对照探针	CGACTCAGACTCAGC	3'-生物素

下搅拌 30 min. 在氩气的保护下升温至 120℃ 保温 30 min 后, 在 166℃ 保温 2 h 后降至室温. 加入 NaOH (100 mg, 2.5 mmol) 和 NH_4F (148.15 mg, 4 mmol) 的甲醇溶液 (10 mL) 在室温下搅拌 2 h. 待甲醇蒸发后, 在氩气的保护下在 300℃ 保温 2.5 h, 降至室温后用环己烷和乙醇清洗 3 次, 得到的上转换纳米颗粒保存于 10 mL 环己烷溶液中. 通过 X 射线衍射仪、透射电子显微镜和荧光光谱对其进行表征.

2.2.2 上转换纳米颗粒的表面修饰

上转换纳米颗粒的表面改性基于表面配体交换技术. 选择聚丙烯酸作为多齿的亲水配体取代原上转换纳米颗粒表面的疏水配体. 具体流程如下: 将 14.5 μL 聚丙烯酸溶于 2 mL 无水乙醇中. 取 1 mL 制备好的上转换纳米颗粒在 8000 r/min 速度下离心并重悬于 1 mL 氯仿中, 再逐滴加入聚丙烯酸-乙醇溶液中并搅拌过夜. 用超纯水清洗 2~3 次后保存于磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中. 采用傅里叶红外光谱、高分辨透射电子显微镜对其进行表征.

2.2.3 寡核苷酸适配体在上转换纳米颗粒表面的修饰

将 500 μL 制备好的聚丙烯酸-上转换纳米颗粒在 8000 r/min 速度下离心并重悬于 0.5 mM 2-(*N*-吗啉)乙磺酸 (MES) 缓冲溶液 (pH 6.1) 中, 加入 60 μL EDC (2 mg/mL) 和 30 μL NHS (2 mg/mL) 活化 2 h. 加入 400 μL 修饰氨基的寡核苷酸适配体 (2 nmol/mL) 后稍微振荡并静置过夜. 用超纯水清洗后保存在 Tris-HCl 缓冲液 (10 mM, pH 7.4) 中. 将修饰适配体前后的上转换纳米颗粒在紫外-可见光谱仪中扫描, 对其表面修饰情况进行表征.

2.2.4 上转换纳米颗粒侧流试纸的制备

根据文献描述的方法制备侧流试纸^[16]. 具体步骤如下: 将结合垫 (1.9 cm×30 cm)、硝化膜 (NC 膜, 2.0 cm×30 cm) 和吸水垫 (2.5 cm×30 cm) 安装在一个塑料胶黏剂衬垫上 (6.0 cm×30 cm), 每两个相邻的衬垫之间有 2 mm 的重叠. 随后, 将装配后的衬垫切割成宽度为 2.5 mm 的试纸条.

为了在 NC 膜上固定捕获和对照探针, 我们采用链霉亲和素作为中间体, 对生物素和 NC 膜进行结合反

应. 具体如下: 将 34.2 和 66.7 μL 链霉亲和素 (1 mg/mL) 加入生物素修饰的捕获探针和对照探针 (干粉) 中, 振荡并静置 40 min 获得 100 μM 捕获探针和对照探针溶液. 然后将 0.3 μL 捕获探针和对照探针溶液分别用移液枪滴加在 NC 膜上, 在 37℃ 烘箱中干燥.

为了将上转换纳米颗粒探针保存在结合垫上, 我们将 0.1 μL 制备好的上转换纳米颗粒-适配体探针与 20 μL 标准缓冲液均匀混合后滴加在结合垫上, 同样在 37℃ 烘箱中干燥. 经过优化, 标准缓冲液的成分如下: Tris-HCl (10 mM, pH 7.4)、SSC (8×)、Tween 20 (2%, v/v)、BSA (16%, w/v).

2.2.5 目标物的制备及检测

将黄曲霉毒素 B1 标准品溶于甲醇溶液并与超纯水以不同比例混合获得梯度浓度的黄曲霉毒素 B1 标准品. 将 80 μL 不同梯度的目标物水溶液滴加到制备好的试纸条的结合垫上. 反应 40 min 后取出, 在 980 nm 近红外激光器的照射下, 在 4 s 的曝光时间下使用 CCD 相机在暗室下拍摄荧光照片并在 ImageJ 软件中框取检测线范围, 分析图片中检测区域的平均灰度值. 实验中设置不加目标物的空白对照实验和不同梯度浓度目标物的实验组, 以检测线的灰度值为纵坐标, 黄曲霉毒素 B1 的浓度作为横坐标, 绘制标准曲线.

2.2.6 茶水中的黄曲霉毒素 B1 的测定

将市售茶叶冲泡后取上清液, 取液溶于甲醇, 用 0.22 μm 有机滤膜过滤, 用高效液相色谱法证明茶水本身不含黄曲霉毒素 B1. 将梯度浓度的黄曲霉毒素 B1 加入茶水原溶液中, 按本实验构建的方法 (见 2.2.5 节) 进行检测.

色谱条件如下. 色谱柱: 12.5 cm×2.1 mm, 5 μm ; 柱温: 30℃; 进样量: 25 μL ; 流动相: 乙腈 (色谱纯), 水; 流速: 0.5 mL/min.

然后, 配置含有 0.01、0.1、1、10、100 ng/mL 不同浓度的黄曲霉毒素 B1 的茶水溶液, 按本实验构建的方法 (见 2.2.5 节) 进行检测, 将检测结果与实际加样进行比较.

3 结果与讨论

3.1 检测原理

使用上转换荧光纳米颗粒-适配体探针构建的侧

流试纸检测黄曲霉毒素B1的原理如图1所示. 一方面, 将氨基修饰的单链DNA序列(其中包括适配体部分和对照部分)与水溶性的上转换荧光颗粒通过缩合反应结合在一起. 另一方面, 利用链霉亲和素作为中间体, 将修饰有生物素的两段互补序列固定在硝化纤维膜上. 在检测中, 由于黄曲霉毒素B1与检测线上的互补探针竞争结合上转换颗粒表面的适配体, 从而导致检测线上的上转换颗粒的量发生变化, 进而导致检测线的荧光强度变化, 从而根据荧光信号强度判断样品中浓度. 当溶液中黄曲霉毒素B1含量越多, 将结合越多上转换颗粒表面修饰的适配体, 从而抑制检测线探针与适配体的碱基互补作用, 导致检测线荧光信号越弱. 通过分析检测线的亮度达到对目标物的定量检测.

3.2 上转换纳米颗粒的表征

为了确认上转换纳米颗粒的物相组成, 我们对其进行了XRD表征, 如图2(a)所示, 所有的衍射峰都可以与对六边形结构的 NaYF_4 (JCPDS No. 16-0334)标准卡一一对应. 我们还将上转换纳米颗粒滴在铺有纯碳支撑膜的铜网上, 并采用透射电子显微镜对本实验所制备的上转换纳米颗粒进行了形貌表征(图2(b)). 以上表征均证明所制备的上转换荧光纳米颗粒呈均匀的六棱柱. 粒径分析结果表明, 制备的上转换纳米颗粒的粒径为 35 ± 5 nm. 此外, 我们使用高分辨透射电子显微镜对包裹聚丙烯酸后的上转换纳米颗粒进行形貌表征(图2(c)), 可以观察到颗粒表面明显包裹着约1 nm厚度的聚合物层. 为了进一步表征聚丙烯酸的成功修饰, 使用傅里叶红外光谱对上转换荧光颗粒的表面修饰进行进一步表征(图2(d)). 在 3420 cm^{-1} 附近可以观察到一个宽波带, 这对应着O-H的伸缩振动. 在 2948 和 2862 cm^{-1} 的两个峰值分别对应着长烷基链中亚甲基($-\text{CH}_2-$)的不对称和对称伸缩振动. 在 1548 和 1450 cm^{-1} 处的两个强峰分别表示着在配体交换后上转换颗粒表面上存在的羧酸根阴离子的不对称和对称伸缩振动. 这证明了聚丙烯酸成功包裹在上转换荧光颗粒表面^[17]. 上转换纳米颗粒在 980 nm 的激发光下产生强烈的绿色荧光, 相对未包裹聚丙烯酸的上转换纳米颗粒, 包裹聚丙烯酸的上转换荧光颗粒的荧光强度减弱(图2(e)插图). 我们进一步使用荧光光谱对包裹聚丙烯酸前后的上转换荧光颗粒进行扫描, 可观察到其最大发射峰在 540 nm 处, 且包裹聚丙烯酸后有部分荧光衰减(图2(e)).

图1 上转换纳米颗粒-适配体探针用于侧流试纸的示意图. (a) 上转换纳米颗粒与适配体结合示意图; (b) 侧流试纸的结构图, 适配体序列通过缩合反应连接在上转换荧光颗粒表面, cDNA序列通过生物素-链霉亲和素的反应固定在NC膜表面形成检测线和对照线; (c) 当样本里不含有黄曲霉毒素B1时, 上转换纳米颗粒会与检测线上的cDNA结合, 形成明显的荧光条带; (d) 当样本中含有黄曲霉毒素B1时, 目标物会竞争性地结合适配体, 导致上转换纳米颗粒无法停留在检测线上, 从而导致检测线上的荧光减弱. 随着样品中分析物浓度的增加, 相应试验区的荧光强度逐渐减小(网络版彩图)

Figure 1 Schematic illustration of upconversion nanoparticles (UCNPs) modified with aptamers applied in lateral flow aptamer assays (LFAAs) as probes. (a) Schematic of UCNPs combining with aptamers. (b) The structure of the developed LFAAs. The aptamer of AFB₁ was attached to UCNPs by condensation reaction. Streptavidin was used as an intermediate to react with both biotin and the NC membrane to immobilize cDNA of aptamer parts and control parts on an NC membrane. (c) In the absence of target, UCNPs probes were separately hybridized with the corresponding cDNA. (d) In the presence of targets, the aptamers preferentially bonded to the corresponding targets and caused fewer aptamers hybridized with cDNA, thereby liberating UCNPs and resulting in fluorescence decrease. The color intensities of the corresponding test zones gradually decrease as the concentrations of the analytes in the samples increase (color online).

3.3 上转换纳米颗粒连接适配体的表征

为了证明上转换荧光纳米颗粒与适配体序列成功结合, 对空白的上转换荧光纳米颗粒和修饰适配体探

图 2 上转换荧光纳米颗粒的材料表征. (a) 上转换荧光颗粒的XRD图谱; (b) 上转换荧光颗粒的透射电子显微镜照片; (c) 修饰聚丙烯酸后的上转换荧光纳米颗粒的高分辨透射电子显微镜照片; (d) 上转换荧光纳米颗粒的傅里叶红外光谱图; (e) 修饰聚丙烯酸前后的上转换纳米颗粒的荧光光谱, 插图显示为修饰聚丙烯酸前后的上转换荧光颗粒的荧光照片; (f) 修饰适配体的上转换荧光纳米颗粒的紫外可见吸收光谱(网络版彩图)

Figure 2 Characterization of UCNPs. (a) XRD patterns for hexagonal β -phase NaYF_4 UCNPs. (b) TEM of UCNPs. (c) HRTEM of UCNPs modified with poly (acrylic acid). (d) FTIR spectrum of PAA-UCNPs. (e) Fluorescence emission spectrum of UCNPs, inset shows photograph of UCNPs excited by a 980 nm laser, before and after modified with PAA. (f) The UV-Vis absorption spectra of UCNPs-aptamers (color online).

针的上转换荧光纳米颗粒使用紫外-可见光谱进行扫描(图2(f)). 我们观察到空白的上转换荧光纳米颗粒在260 nm处没有出现波峰, 但修饰适配体探针的上转换荧光纳米颗粒在260 nm处有明显波峰. 由此证明上转换荧光纳米颗粒与适配体探针成功结合^[14].

3.4 上转换纳米颗粒-适配体探针浓度的优化

为了优化所开发侧流试纸的最小检测限, 提高对分析物进行精确和定量检测的可能性, 我们对缓冲液成分和上转换探针的浓度进行了优化.

经过实验确定缓冲液在Tris-HCl (10 mM, pH

7.4)、SSC (6 $\times$)、Tween 20 (2%, v/v)、BSA (16%, w/v) 的成分比下具有最佳的显色效果(图3(a)). 另外, 我们使用不同浓度的上转换纳米颗粒-适配体探针进行空白检测, 在980 nm的近红外激发光照射下, 使用CCD相机对检测结果进行拍照读取并分析检测区域的平均灰度值. 为了让检测结果的梯度更加明显, 选取荧光强度最大且没有过曝的探针浓度作为优化探针浓度. 最终, 我们选择0.1 μL 0.5 nM上转换探针作为优化后的探针浓度(图3(b)).

为了进一步优化检测体系, 我们针对缓冲液的pH进行优化. 由于茶水多显弱酸性, 我们配制了不同pH梯度(5.5~7.6)缓冲液, 并进行空白检测. 实验表示, 在所选pH梯度下, 检测体系对检测结果没有显著影响(图3(c)).

3.5 性能分析

为了评估开发的测流试纸的最低检出限, 我们制备了不同梯度浓度的黄曲霉毒素B1溶液进行检测, 在980 nm的近红外光激发下拍摄荧光照片, 并在ImageJ软件中分析其平均灰度值. 如图4(a)所示, 灰度值随着目标物浓度的增加而降低, 且目标物浓度与灰度值具有明显的线性关系. 最终我们得到线性方程为 $y = -39.7907x + 137.2690$ 的标准曲线(图4(b)), 检测范围在0.1~100 ng/mL. 依照统计分析, 最低检测限为0.03 ng/mL (S/N=3). 该检测限与已有报道的基于纳米金探针的黄曲霉毒素侧流试纸(25 ng/mL)^[8]相比, 灵敏度显著提高. 与基于传统荧光染料-适配体探针的黄曲霉毒素侧流试纸(0.3 ng/mL)相比, 检测限也提升了一

图 3 上转换纳米颗粒-适配体探针体系的优化. (a) 缓冲液成分优化; (b) 探针浓度优化; (c) 缓冲液的pH优化(网络版彩图)

Figure 3 Optimization of UCNPs-aptamers parameters. (a) The optimization of the running buffer. (b) The optimization of probe concentration. (c) The optimization of pH value (color online).

图 4 使用开发的侧流试纸对黄曲霉毒素B1进行检测。(a) 检测结果的照片显示, 随着目标物浓度的升高, 检测线的亮度逐渐降低; (b) 将检测线的灰度值进行量化得到的目标物浓度与检测结果照片灰度值的标准曲线。图中水平线表示空白结果的灰度值(网络版彩图)

Figure 4 Detection of AFB₁ by LFAAs. (a) The photo shows the color intensities of the corresponding test zones gradually decrease as the concentrations of the analytes in the samples increase. (b) Standard curve of AFB₁ concentration converting from grey level in test zone versus grey level in test zone. The horizontal line in the graph represents the grey level of the blank sample (color online).

个数量级。上述结果充分证明了上转换荧光颗粒提供的检测信号比传统方法具有更高的灵敏度。

3.6 茶水中的黄曲霉毒素B1检测

将市售茶叶冲泡后取上清液, 取液溶于甲醇, 用 0.22 μm 有机滤膜过滤, 用高效液相色谱法证明茶水本身不含黄曲霉毒素B1。在茶水原溶液中加入梯度浓度的黄曲霉毒素B1。使用上述侧流试纸, 对黄曲霉毒素B1浓度为0.1~100 ng/mL的茶水进行检测, 每一个浓度设置3次平行实验, 并设置不加入毒素的空白样本作为

图 5 在茶水中的检测结果与实际加入目标物浓度之间的关系(网络版彩图)

Figure 5 Relationship between real sample concentration and detection results (color online).

对照。如图5所示, 本实验构建的黄曲霉毒素检测方法能够准确地在茶水中对黄曲霉毒素进行检测, 通过观察发现, 随着茶水中黄曲霉毒素B1浓度的增加, 检测线的亮度逐渐降低, 这证明本文构建的检测方法在茶水中同样有效, 我们将检测结果量化后与3.4小节中的标准曲线进行对比, 结果如图5所示没有显著差异, 验证了本方案的可行性。

4 结论

本文基于目标物和互补配对的DNA序列会竞争性地结合寡核苷酸适配体的原理, 构建了纸基上转换荧光-适配体侧流试纸平台, 该平台以上转换荧光颗粒作为探针信号报告基团, 寡核苷酸适配体作为探针识别基团, 实现了茶水中黄曲霉毒素B1的快速、灵敏且特异性检测。与传统比色法相比, 该平台由于上转换荧光颗粒的使用, 一方面使用荧光颗粒代替了传统的显色颗粒, 从信号本身提高了灵敏度; 另一方面由于近红外激发, 大大消除了目标物本身的背景荧光, 提高了检测信噪比, 因此显著提升了最低检测限。且由适配体构建的探针相比传统抗体更稳定、易修饰、廉价。该方法是一种便捷、廉价、灵敏、稳定的即时检测平台, 在食品安全检测和环境监测等领域具有巨大潜力。

参考文献

- Ma HH, Sun JZ, Zhen T, Zhang Y, Xia SH. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37: 360–366 (in Chinese) [马海华, 孙楫舟, 甄彤, 张元, 夏善红. 食品工业科技, 2016, 37: 360–366]

- 2 Tosun H, Ergönül PG, Üçok EF. *J Verbr Lebensm*, 2016, 11: 265–269
- 3 Zeng T, Luo X, Hu G, Li J, Huang C, Peng R. *Chin J Health Lab Technol*, 2016, 3: 323–325 (in Chinese) [曾涛, 罗晓燕, 胡国媛, 李静, 黄聪, 彭荣飞. 中国卫生检验杂志, 2016, 3: 323–325]
- 4 Chauhan R, Singh J, Sachdev T, Basu T, Malhotra BD. *Biosens Bioelectron*, 2016, 81: 532–545
- 5 Li Z, Ye Z, Fu Y, Xiong Y, Li Y. *Anal Methods*, 2016, 8: 548–553
- 6 Li K, Liang Z, Zeng S, Wen Q. *Chin J Food Hyg*, 2016, 28: 310–313 (in Chinese) [李可, 梁肇海, 曾胜波, 温权. 中国食品卫生杂志, 2016, 28: 310–313]
- 7 Xiong Y, Pei K, Wu Y, Xiong Y. *Food Control*, 2017, 78: 317–323
- 8 Li S, Ren D, Xie Y, Liu J, Yang Y. *J Food Safety Quality*, 2015, 4: 1107–1115 [李少晖, 任丹丹, 谢云峰, 刘佳, 杨永坛. 食品安全质量检测学报, 2015, 4: 1107–1115]
- 9 Li J, Hou S, Ji Z, Chen S. *Chin J Health Lab Technol*, 2015, 7: 963–965 (in Chinese) [李军涛, 侯水平, 姬泽薇, 陈守义. 中国卫生检验杂志, 2015, 7: 963–965]
- 10 Gopinath SCB, Lakshmi Priya T, Chen Y, Phang WM, Hashim U. *Biotech Adv*, 2016, 34: 198–208
- 11 Wang B, Chen Y, Wu Y, Weng B, Liu Y, Lu Z, Li CM, Yu C. *Biosens Bioelectron*, 2016, 78: 23–30
- 12 Wang L, Ma W, Chen W, Liu L, Ma W, Zhu Y, Xu L, Kuang H, Xu C. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 3059–3062
- 13 Berlina AN, Taranova NA, Zherdev AV, Vengerov YY, Dzantiev BB. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 4997–5000
- 14 Jin B, Wang S, Lin M, Jin Y, Zhang S, Cui X, Gong Y, Li A, Xu F, Lu TJ. *Biosens Bioelectron*, 2017, 90: 525–533
- 15 Jin B, Lin M, You M, Zong Y, Wan M, Xu F, Duan Z, Lu T. *Nanotechnology*, 2015, 26: 345601
- 16 Hu J, Wang L, Li F, Han YL, Lin M, Lu TJ, Xu F. *Lab Chip*, 2013, 13: 4352–4357
- 17 You M, Zhong J, Hong Y, Duan Z, Lin M, Xu F. *Nanoscale*, 2015, 7: 4423–4431

Lateral flow aptamer assay for detection of aflatoxin B1 in tea using upconversion nanoparticles

Birui Jin^{1,3}, Yexin Yang^{2,3}, Tianjian Lu^{3,4}, Feng Xu^{2,3}, Min Lin^{2,3*}

¹ State Key Laboratory for Mechanical Behavior of Materials, School of Materials Science and Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

² The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

³ Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBC), Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

⁴ MOE Key Laboratory of Multifunctional Materials and Structures, Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

*Corresponding author (email: minlin@mail.xjtu.edu.cn)

Abstract: Aflatoxin, extensively existing in peanuts, corn, rice, soybeans, wheat and tea, is a type of mycotoxins with the highest toxicity and carcinogenicity and thus poses a serious threat to human health. In this article, upconversion nanoparticles modified with aptamers specific to aflatoxin B1 were used as fluorescence markers. By this way, we constructed a paper-based lateral flow assays detection technology for rapid detection of aflatoxin B1 with good linearity in the concentration range of 0.1–100 ng/mL and detection limit of 0.03 ng/mL. This method can realize quantitative detection of aflatoxin B1 in real tea sample with high sensitivity and specificity. Hence it is suitable for rapid *on-site* detection of aflatoxin B1 by utilizing this method, which shows good economic value and application prospects.

Keywords: aflatoxin B1, upconversion nanoparticle, aptamers, lateral flow assays

doi: [10.1360/N032018-00060](https://doi.org/10.1360/N032018-00060)