

2020-06-28

## A Simple and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Sensor for Determination of Aflatoxin B1

Bing LIU

1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin 300457, China; 2. College of Food Science and Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; ice6377@tust.edu.cn

Yao-shuai ZHAO

Yue QIN

Yi WANG

Yan-jie ZHU

Shuo WANG

---

### Recommended Citation

Bing LIU, Yao-shuai ZHAO, Yue QIN, Yi WANG, Yan-jie ZHU, Shuo WANG. A Simple and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Sensor for Determination of Aflatoxin B1[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2020, 26(3): 422-430.

DOI: 10.13208/j.electrochem.190219

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol26/iss3/13>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

DOI: 10.13208/j.electrochem.190219

Article ID:1006-3471(2020)03-0422-09

Cite this: *J. Electrochem.* 2020, 26(3): 422-430

Http://electrochem.xmu.edu.cn

# 一种简单灵敏的基于适配体的 黄曲霉毒素 B1 电化学传感器

刘冰<sup>1,2\*</sup>, 赵耀帅<sup>1,2</sup>, 秦月<sup>1,2</sup>, 王怡<sup>1,2</sup>, 朱艳杰<sup>1,2</sup>, 王硕<sup>1,2\*</sup>

(1. 食品营养与安全国家重点实验室, 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457;

2. 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 以其高毒性和致癌性成为食品安全隐患而备受关注. 本文拟构建一种新颖、简单、快速、灵敏的传感器用于谷物食品中 AFB1 的痕量检测. 将介孔碳 (CMK) 修饰在工作电极表面来增大电极的表面积, 再将工作电极恒电位沉积金纳米粒子 (AuNPs), 提高电信号的同时, 为下一步巯基化适配体的连接提供位点. 检测过程中, AFB1 可以竞争性地去除吸附在适配体链上的亚甲基蓝 (MB) 引起电信号的变化, 对 AFB1 进行定量检测. 修饰的工作电极导电性能得到改善, 灵敏度大大提高, 对 AFB1 的线性响应范围为  $0.1 \sim 75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 检出限低至  $36 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . 在对不同谷物食品 (大米、玉米、糯米) 进行加标回收实验中, 回收率在  $92.3\% \sim 103.6\%$  范围之间, 实现对目标物的定量检测. 本文为食品中 AFB1 快速检测方法提供了一种新思路和新方法.

**关键词:** 黄曲霉毒素 B1; 适配体; 传感器; 检测方法

**中图分类号:** O646

**文献标识码:** A

霉菌毒素 (mycotoxins) 是霉菌侵染食品样品或动物饲料后在增长过程中产生的次级代谢产物<sup>[1]</sup>. 由于霉菌毒素会随食物链进入动物体或人体内诱发疾病、威胁健康而备受关注<sup>[2-3]</sup>. 在霉菌毒素中以黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1) 的毒性最强, AFB1 进入动物体后会快速转移至肝脏引起肝脏出血、脂肪变性、肝脏硬化. 此外, 黄曲霉毒素 B1 还会引发免疫功能的损害等其他系统的病变<sup>[4-5]</sup>. 目前, AFB1 的常规检测方法有薄层色谱法 (TLC)<sup>[6]</sup>、高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[7]</sup>、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)<sup>[8-9]</sup>. 这些传统的检测方法存在操作复杂, 检测成本高, 无法实现现场检测的缺点. 因此, 亟需开发一种低成本、操作简单又适合现场检测的新检测技术, 以便在食品和饲料生产的不同阶段有效监测 AFB1 水平, 确保被 AFB1 污染的食品和饲料进入人体和动物体之前被识别.

电化学生物传感器是以酶、抗体、核酸、细胞等作为敏感原件<sup>[10]</sup>, 利用化学反应机制将检测底物的组成和浓度转变为电信号, 通过电信号来实现

对待测物质的定量检测<sup>[11]</sup>. 电化学生物传感器以其响应速度快、操作简单、灵敏度高、成本低的优势在分析化学的发展中发挥着重要的作用. Rawal R 开发一种固定了漆酶修饰的氧化铁纳米颗粒的电极, 构建对酚类化合物检测的电流型生物传感器<sup>[12]</sup>. Talemi R P 等在铅笔石墨电极表面修饰金纳米星, 以适配体为敏感元件实现了对多巴胺的检测<sup>[13]</sup>.

纳米材料结构单元的尺寸介于  $1 \sim 100 \text{ nm}$  范围之间, 具有极大的比表面积, 在光学、电学、化学及机械性能等方面表现出特殊的性能<sup>[14]</sup>. 金纳米粒子 (AuNPs) 不但具有纳米材料的一般性能, 还具有良好的生物催化特性、导电性、生物相容性和稳定性<sup>[15-16]</sup>. 有序介孔碳材料 (CMK) 具有较高的比表面积、导电性、规则的孔道、优良的热力学稳定性, 它成为一种优越的电极材料<sup>[17-18]</sup>. 将 AuNPs 与 CMK 结合用于电极的表面修饰有望获得一种灵敏度高, 稳定性强的电化学传感器. 适配体是一类寡核苷酸, 通过指数富集的配基系统进化技术 (SELEX) 获得<sup>[19]</sup>. 由于适配体可以与目标物准确结

收稿日期: 2019-02-19, 修订日期: 2019-04-11 \* 通讯作者: Tel: (86-22)60912483, E-mail: ice6377@tust.edu.cn

国家重点研发计划项目 (No. 2018YFC1604000) 资助

合,有高度重复性和易于制备的特点,作为传感器的识别元件成为近几年研究的热点<sup>[20]</sup>. 亚甲基蓝是一种生物染料,现发现作为电化学指示剂可以吸附在适配体链上催化产生电信号<sup>[21]</sup>. MB通过与两个鸟嘌呤碱基的相互作用介导的插入到 DNA 或 RNA<sup>[22-24]</sup>. 因此,利用 CMK/AuNPs 复合纳米材料,连接 AFB1 适配体作为敏感元件,MB 作为探针,通过 AFB1 与 MB 竞争的结合适配体产生电信号的差异,构建一种快速、简便的电化学传感器,检测谷物食品中痕量的 AFB1.

## 1 实验

### 1.1 试剂与仪器

亚铁氰化钾( $K_4[Fe(CN)_6]$ )、硝酸钾( $KNO_3$ )、铁氰化钾( $K_3[Fe(CN)_6]$ )均购买于天津市化学试剂一厂. 巯基乙醇(MCH)和 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)购买于国药集团化学试剂有限公司. 氯金酸( $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ )购买于美国 Sigma 公司. 介孔碳(CMK)购买于南京先丰纳米材料科技有限公司. 所有试剂均为分析纯并且在使用之前不用进一步纯化. 对于 5'端修饰有-SH 的 AFB1 适配体委托上海生工生物工程技术有限公司合成.

工作电极为玻碳电极( $d = 4 \text{ mm}$ ),对电极为铂柱电极,参比电极为饱和甘汞电极,购自于武汉高仕睿联科技有限公司. 三电极体系的电化学工作站(LK2006型,天津兰立科化学电子高科技公

司),CHI 电化学分析仪(上海辰华仪器有限公司),扫描电子显微镜(日本 HITACHI 公司),高效液相色谱质谱联用仪(美国 Agilent technologies 公司).

### 1.2 适配体传感器的工作原理

将 CMK 修饰在工作电极表面,提高电信号的同时,增加了工作电极的比表面积. 在修饰有 CMK 的工作电极上恒电位沉积金纳米粒子,增强电信号的同时为巯基化的适配体提供连接位点. 通过金硫键的相互作用将含有巯基的 AFB1 适配体固定在修饰工作电极表面,然后浸泡于 MB 溶液中,MB 首先吸附在适配体链上;当滴加不同浓度的 AFB1 后,AFB1 与适配体特异性结合,并与已经吸附在适配体链上的 MB 发生竞争,导致电信号的变化<sup>[25-26]</sup>,从而实现 AFB1 定量、灵敏的检测. 实验流程如图 1 所示.

### 1.3 电极的预处理

将玻碳电极依次在  $0.3 \mu\text{m}$ 、 $0.05 \mu\text{m}$  的氧化铝粉末中打磨抛光,再在洁净的鹿皮绒布上打磨,用超纯水彻底冲洗干净后氮气吹干. 在  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的铁氰化钾溶液(含  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硝酸钾)中循环伏安扫描,电压范围为  $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$ ,扫描速率为  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ,氧化峰与还原峰之间电压之差小于  $100 \text{ mV}$  即视为电极清洁、稳定,预处理完毕.

### 1.4 AuNPs/CMK/GCE 的制备

准确量取  $1 \text{ mg}$  CMK 溶解在  $2 \text{ mL}$  N,N-二甲

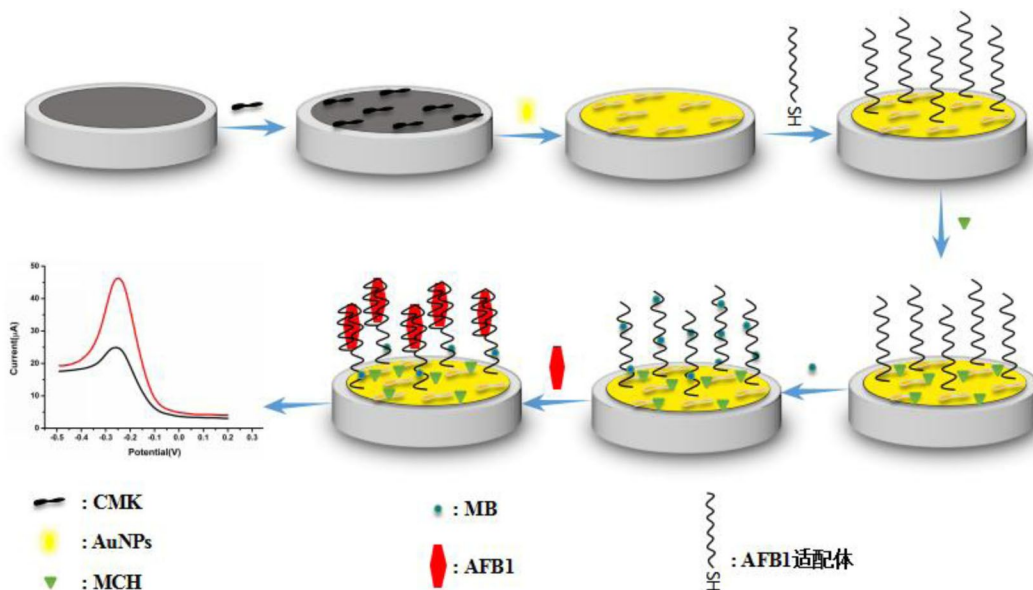


图 1 传感器的工作流程图

Fig. 1 Working principle flowchart of the sensor

基甲酰胺(DMF)水溶液中(1:1, *v/v*), 超声 30 min 使 CMK 良好地分散到有机溶剂中, 得浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 CMK 悬浊液. 取  $8 \mu\text{L}$  充分分散的 CMK 悬浊液滴加到预处理好的洁净玻碳电极上, 自然晾干, 得到 CMK/GCE. CMK/GCE 电极浸没于  $5 \text{ mL}$  含有  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HAuCl}_4$  和  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  溶液中. 采用恒电位沉积技术, 在  $-0.2 \text{ V}$  的电压下, 沉积 240 s. 将沉积好 AuNPs 的电极用超纯水小心冲洗干净, 用氮气吹干, 得到 AuNPs 修饰的电极 AuNPs/CMK/GCE.

### 1.5 适配体的修饰

吸取  $23 \mu\text{L}$  TE 缓冲液将适配体充分分散获得浓度为  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液. 为将适配体固定在 AuNPs/CMK/GCE 电极表面制备适配体传感器, 将储备液稀释后取  $10 \mu\text{L}$  滴加在电极表面孵育过夜. 在此期间, 适配体 5' 端修饰的 -SH 官能团与 AuNPs 通过金硫键连接使其牢固的固定于电极表面. 为封闭住未连接适配体的空余金的位点, 避免引起 AuNPs 与 AFB1 的非特异性结合, 将电极在  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的巯基乙醇(MCH)中封闭 1 h, 用 PBS 小心冲洗, 氮气吹干备用.

### 1.6 引入亚甲基蓝探针

准确称量  $33.7 \text{ mg}$  MB 加入  $10 \text{ mL}$  PBS 溶液中超声 30 min 配置为浓度为  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液. 将修饰了适配体的 AuNPs/CMK/GCE 电极浸泡在  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MB 溶液中吸附 10 min, 取出后用 PBS 仔细冲洗干净, 氮气吹干. AFB1 适配体传感器电极修饰完成, 在不使用时储存在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中.

## 2 结果与讨论

### 2.1 电极修饰过程的扫描电镜表征

电极修饰过程中每一步通过扫描电镜(SEM)观察其在电极表面的形貌, 结果如图 2 所示, A 为 AuNPs/GCE, B 为 CMK/GCE, C 为 AuNPs/CMK/GCE. 图 2A 中可以看出, AuNPs 在电极表面形成致密金层, 将原本的电极表面全部覆盖而略显粗糙, 同时电极表面积增大可为适配体的连接提供更多的结合位点. 从图 2B 中可以看出, CMK 的立体形态以及枝状结构的典型特征. 当 CMK、AuNPs 先后在玻碳电极表面沉积, 由图 2C 中可以明显观察到, 在经 CMK 修饰后的电极表面形成一层凹凸不平又沉积致密的金膜, 增大表面积的同时为适配体的连接提供更多的结合位点.

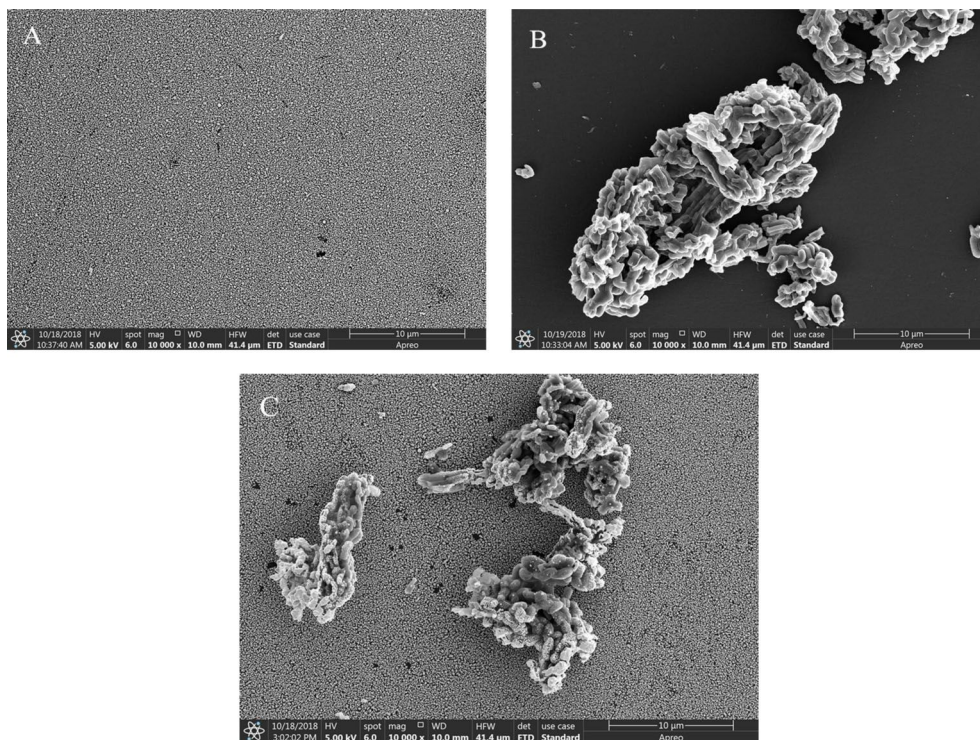


图 2 不同电极修饰方法(AuNPs/GCE(A); CMK/GCE(B); AuNPs/CMK/GCE(C))扫描电镜图像  
Fig. 2 SEM images of AuNPs/GCE (A); CMK/GCE (B); AuNPs/CMK/GCE (C)

## 2.2 电极修饰过程的电化学表征

电化学循环伏安法(CV)作为一种电化学分析方法,主要是根据实验条件来控制电压范围和速率,形成电流-电势曲线图,经常被用作电化学传感器实际性能表征的一种方式<sup>[27-28]</sup>.因此在本实验中选用CV对电极的修饰过程进行电化学表征,如图3所示.图3中检测过程是在 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (包含 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$ )中进行的,扫描速率为 $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .a是裸GCE的循环伏安曲线,可以看到在 $0.6\sim-0.2\text{ V}$ 的电压范围内电化学探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 的氧化还原反应产生一对明显的氧化还原峰,且峰间距小于 $100\text{ mV}$ ,说明裸GCE光滑洁净.b为电极表面修饰CMK后的CV曲线,明显看出峰电流值有所增大,这表明CMK大的比表面积和优良的导电性能,同时也显示出经CMK修饰的电极电子传递速率加快,电极性能得到改善.c是将CMK/GCE电极在 $\text{HAuCl}_4$ 和 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 混合溶液中恒电位沉积后得到AuNPs/CMK/GCE电极的CV曲线,可以看出峰电流值进一步增大,氧化还原峰典型且较尖锐,这是由于AuNPs沉积在了经过CMK改性的电极表面,使电极性能得到进一步优化,比表面积增加,促进 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 向电极表面扩散.d为含有巯基适配体与电极表面的AuNPs通过Au-S键连接后的CV曲线,可以发现峰电流值下降明显,正是由于适配体的连接使 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 更不易到达电极表面引起电信号的下降.e为AFB1特异性

结合适配体后的CV曲线,可以看出峰电流值进一步下降,证明适配体可以特异性结合AFB1,进而表明传感器可以实现对AFB1检测.

电化学阻抗谱(EIS)是研究电极和溶液之间的界面电荷转移的有效方法<sup>[29]</sup>.通过EIS表征实验过程的电化学行为,进一步阐明电极修饰过程,交流阻抗表征如图4所示.EIS检测是在 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (其中包含 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$ )中进行的,频率范围为 $100\text{ mHz}\sim 100\text{ kHz}$ ,交流电振幅为 $10\text{ mV}$ .图中a显示出裸GCE阻抗( $R_a$ )值为 $100\ \Omega$ ;b为修饰CMK后的EIS图,CMK的大比表面积促进电极表面电子的转移引起 $R_a$ 的下降;c曲线显示的是恒电位沉积AuNPs后的EIS曲线,产生了一个很小的 $R_a$ 值,可以看出经过修饰后的电极电化学性质良好,电子传输速率快;d为修饰适配体后的EIS曲线,适配体修饰后阻碍了电子的转移引起 $R_a$ 的增大,约为 $300\ \Omega$ ;e是检测AFB1的EIS曲线,AFB1与适配体特异性结合造成 $R_a$ 进一步增加, $R_a$ 值约为 $400\ \Omega$ .CV图与EIS图的结果一致,说明电极修饰过程每一步清晰明了,构建的电化学传感器的性能稳定.

## 2.3 实验条件的优化

### 1) 电极修饰过程优化

电极修饰过程中,CMK的量以及恒电位沉积AuNPs的量至关重要,因此首先优化CMK的滴加量和恒电位沉积AuNPs的沉积时间.分别选择了

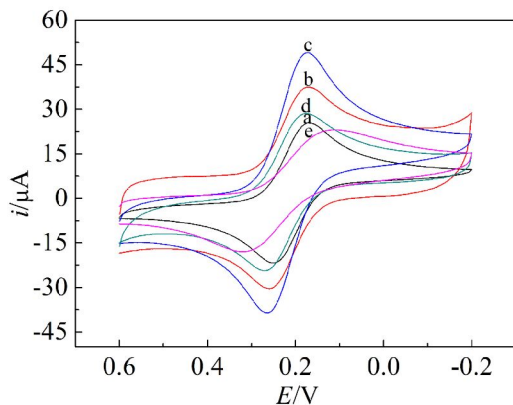


图3 电极修饰过程的循环伏安表征图(GCE(a),CMK/GCE(b),AuNPs/CMK/GCE(c),Apt/AuNPs/CMK/GCE(d),AFB1/Apt/AuNPs/CMK/GCE(e))

Fig. 3 CVs of GCE (a), CMK/GCE (b), AuNPs/CMK/GCE (c), Apt/AuNPs/CMK/GCE (d) and AFB1/Apt/AuNPs/CMK/GCE (e)

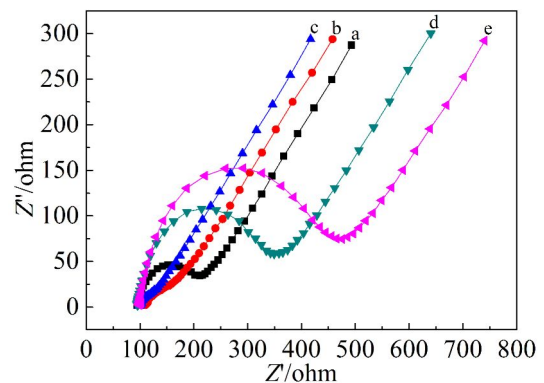


图4 电极修饰过程的交流阻抗表征图(GCE(a),CMK/GCE(b),AuNPs/CMK/GCE(c),Apt/AuNPs/CMK/GCE(d),AFB1/Apt/AuNPs/CMK/GCE(e))

Fig. 4 EIS curves of GCE (a), CMK/GCE (b), AuNPs/CMK/GCE (c), Apt/AuNPs/CMK/GCE (d) and AFB1/Apt/AuNPs/CMK/GCE (e)

2、4、6、8、10、12、14  $\mu\text{L}$ . CMK 滴加量对电极进行修饰,自然晾干后在  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  中进行 CV 检测,结果如图 5A 所示. 图中可以看出,在 2 ~ 8  $\mu\text{L}$  CMK 范围内,电流信号增长明显. 当滴加体积超过 8  $\mu\text{L}$  后,电信号增长缓慢. 考虑到电极表面的容积能力,最终选择 8  $\mu\text{L}$  为最终滴加量. 同时,对恒电位沉积 AuNPs 的沉积时间进行优化,沉积时间分别选择 60、120、180、240、300、360 s,结果如 5B 图所示. 可以看出,沉积时间在 60 ~ 240 s 时间范围内,电信号持续增长,再延长沉积时间电信号有下降趋势,这是由于 AuNPs 电极沉积过程具有一定饱和量. 最终,选取了 240 s 为最优沉积时间.

2) 适配体浓度以及 MB 的吸附时间的优化

适配体的量直接关系到传感器的检测范围,实验选择了 0.5、1、2、4、6、8、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度梯

度进行优化,结果如图 6 A 所示. 图中可以看出,在 0.5 ~ 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内,电流信号急剧下降;4 ~ 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内,电流信号仅有小范围下降,因此实验选择了 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为最终添加浓度. 选择 MB 与适配体的吸附时间 1、5、10、15、20、25、30 min, 吸附完成后在  $\text{pH} = 7.4$  的 PBS 中进行 DPV 检测, 结果如图 6B 所示. 当连接时间达到 10 min 后再延长吸附时间,信号改变量不大,因此选择了 10 min 为 MB 与适配体的吸附时间.

3) 检测时间的优化

检测过程中, AFB1 与电极表面的适配体特异性结合, 竞争性的去除吸附于适配体链上的 MB. 为确保 AFB1 将 MB 全部替换完成, 因此对 AFB1 在电极表面的结合时间进行优化, 取同浓度的 AFB1 标准液在修饰好的电极表面常温结合 10 ~ 60 min 后, 在  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PBS 中进行测定, 获得

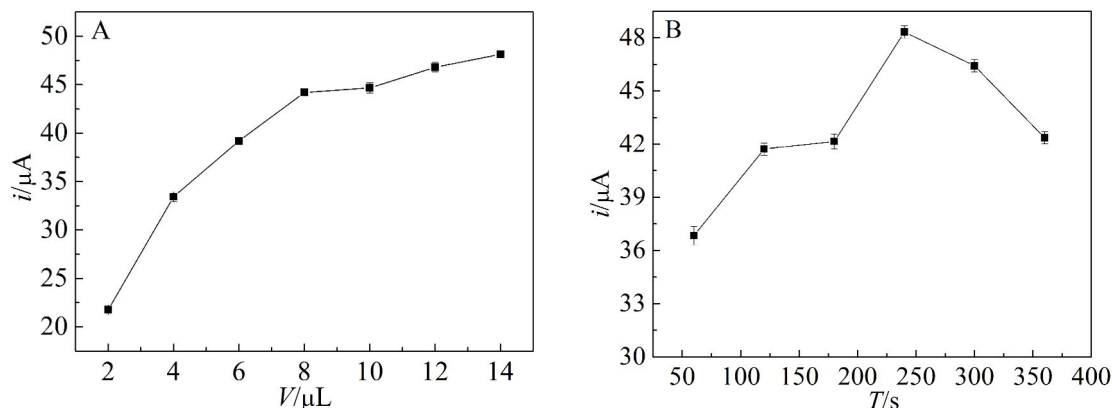


图 5 CMK 的滴加量(A)和  $\text{H[AuCl}_4]$  沉积时间(B)对修饰电极电流的影响  
Fig. 5 Effects of CMK volume (A) and  $\text{H[AuCl}_4]$  deposition time (B) on current responses

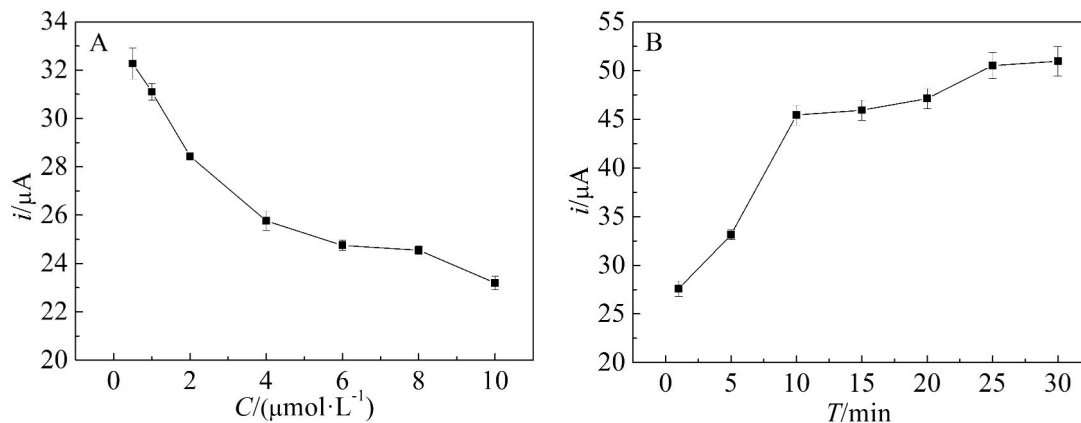


图 6 适配体的添加浓度(A)及 MB 的吸附时间(B)对修饰电极电流值的影响  
Fig. 6 Effects of aptamer concentration (A) and MB adsorption time (B) on current responses

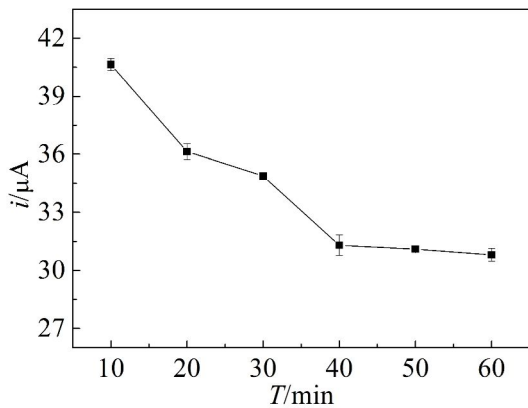


图 7 AFB1 检测时间对最终 DPV 检测的电流影响  
Fig. 7 Effect of AFB1 detection time on the current for the final DPV detection

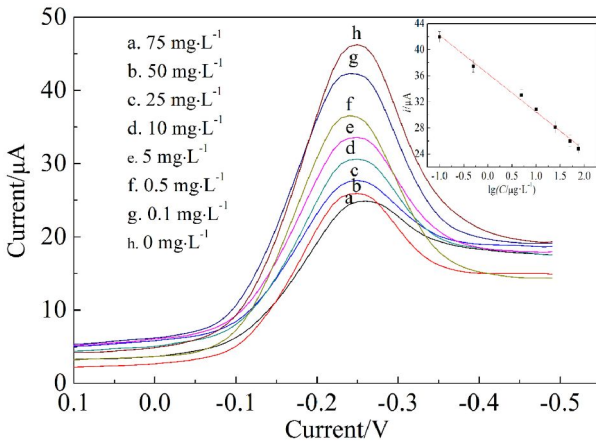


图 8 不同浓度 AFB1 对检测电流的影响(插图显示检测电流与 AFB1 对数浓度呈线性关系)  
Fig. 8 Polarization curves obtained with different AFB1 concentrations. The inset shows a linear current response with logarithmic AFB1 concentration

结果如图 7 所示. 图中可以看出,在结合 40 min 中后达到稳定值,再延长结合时间信号几乎不再

改变,因此选择结合时间为 40 min.

### 2.4 传感器对 AFB1 的定量分析

在最优的实验条件下,选取了不同浓度 AFB1 (0.1 ~ 75 μg·L<sup>-1</sup>) 在 0.1 ~ -0.5 V 电位范围下进行 DPV 检测,结果如图 8 所示.用 电流 值 为 纵 坐 标,以 AFB1 lg(C/(μg·L<sup>-1</sup>))为横坐标做图,分析差分脉冲的响应值与 AFB1 的浓度可得在 75 μg·L<sup>-1</sup> ~ 100 ng·L<sup>-1</sup> 范围内呈良好的线性关系,其中斜率为 -5.8547,相关系数 R<sup>2</sup> 为 0.9905,最低检出限(S/N = 3)为 36 ng·L<sup>-1</sup>.

与不同文献所报道 AFB1 传感器相比,本文所涉及的检测方法的检出限更低,修饰过程相对简单,对比结果见表 1.

### 2.5 传感器的特异性和重现性

选择 AFB2、AFG1、AFG2 作为 AFB1 的结构类似物用于传感器特异性的研究.检测的目标物(AFB1、AFB2、AFG1、AFG2 和混合四种物质)以相同的实验方法和实验条件进行检测,得到图 9 结果.图中结果发现,传感器对类似物 AFB2、

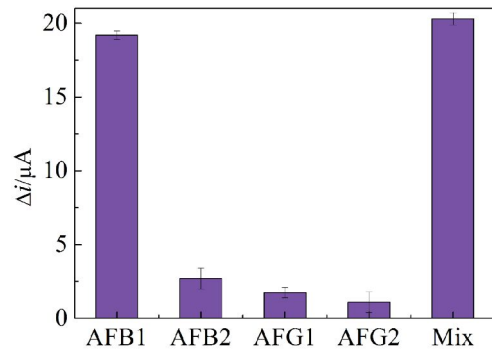


图 9 传感器对相同浓度的 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2 和混合四种物质的特异性  
Fig. 9 Selectivities of electrochemical immunosensor to AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2 alone, and the mixed four structural analogs

表 1 文中构建的传感器方法和其它文献中传感器方法比较

Tab. 1 Comparison of sensor method constructed in this work with other sensor methods in literatures

Sensor	Linear range	Detection limit	Reference
Aptamer/QDs conjugates sensor	10 ~ 400 nmol·L <sup>-1</sup>	3.4 nmol·L <sup>-1</sup>	[30]
Aptamer/split DNAzyme sensor	0.1 ~ 1×10 <sup>4</sup> ng·mL <sup>-1</sup>	0.1 ng·mL <sup>-1</sup>	[31]
Molecularly imprinted polymer sensor	14 ~ 500 ng·mL <sup>-1</sup>	14 ng·mL <sup>-1</sup>	[32]
Aptamer-based electrochemical sensor	75 μg·L <sup>-1</sup> ~ 100 ng·L <sup>-1</sup>	36 ng·L <sup>-1</sup>	This work

表 2 传感器与高效液相色谱法对实际样品中 AFB1 的检测结果  
Tab. 2 AFB1 results detected with the proposed sensor and analyzed by HPLC in actual samples

Sample	Initial concentration/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Proposed sensor		HPLC	
		Amount/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Recovery/% (means $\pm$ SD, $n=3$ )	Amount/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Recovery/% (means $\pm$ SD, $n=3$ )
Rice	10.0	10.36	103.6 $\pm$ 2.4	10.15	101.7 $\pm$ 0.8
	25.0	23.76	95.1 $\pm$ 3.0	23.38	93.3 $\pm$ 1.6
	50.0	46.31	92.7 $\pm$ 5.6	48.91	97.8 $\pm$ 0.2
Glutinous rice	10.0	9.75	97.9 $\pm$ 1.3	9.42	93.6 $\pm$ 0.8
	25.0	24.23	97.2 $\pm$ 3.8	23.64	94.3 $\pm$ 7.8
	50.0	48.04	96.2 $\pm$ 4.3	45.08	90.0 $\pm$ 0.6
Corn	10.0	9.52	95.2 $\pm$ 2.8	10.56	106.3 $\pm$ 1.3
	25.0	23.73	95.0 $\pm$ 3.8	21.35	84.8 $\pm$ 0.4
	50.0	46.49	92.3 $\pm$ 1.8	44.95	89.9 $\pm$ 3.3

AFG1、AFG2 的识别能力远远小于 AFB1，但混合物中由于 AFB1 的存在而具有很高的识别能力，构建的传感器对 AFB1 具有很好的特异性。重现性评价实验通过平行 5 次实验的测定结果获得，计算测得结果的相对标准偏差为 2.75%，结果表明建立的传感器具有优良的抗干扰能力和良好的重现性。

## 2.6 实际应用能力测定

黄曲霉毒素经常污染粮食作物，实验选取三种谷物(大米、糯米、玉米)进行了实际样品的测定。样品的前处理及检测方法参阅 GB5009.22-2016，结果汇总在表 2 中。由表中可以看出，构建的传感器检测 AFB1 的回收率在 92.3% ~ 103.6% 范围之间，高效液相色谱法的检测结果的回收率在 84.8% ~ 106.3% 范围之间，两者结果一致性良好，证明该传感器具有良好的实际应用能力。

## 3 结 论

玻碳电极先后通过 CMK 和 AuNPs 的修饰后，明显改变了电极表面性质，同时提高电极检测信号；固定高特异性 AFB1 适配体后成功实现对 AFB1 的检测。方法的检出限低至  $36\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本文设计的基于适配体电化学传感器所用原料环境友好，操作简单，检测用时短，灵敏度高，为谷物中 AFB1 检测提供了一种新的检测技术，可以推广到食品中其他有毒有害物的快速检测中。

## 参考文献(References):

[1] Zhang Z, Nie D, Fan K, et al. A systematic review of

plant-conjugated masked mycotoxins: Occurrence, toxicology, and metabolism[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 60(9): 1523-1537.

[2] Li P W(李培武), Ding X X(丁小霞), Bai Y Z(白艺珍), et al. Advance in research on risk assessment of aflatoxin in agricultural products[J]. *Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)*, 2013, 46(12): 2534-2542.

[3] Salati S, D Imporzano G, Panseri S, et al. Degradation of Aflatoxin B1 during anaerobic digestion and its effect on process stability[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 94: 19-23.

[4] Ma Y L, Kong Q B, Hua H, et al. Aflatoxin B1 up-regulates insulin receptor substrate 2 and stimulates hepatoma cell migration[J]. *PLOS ONE*, 2012, 7(10): e47961.

[5] Moon J, Kim G, Lee S. A Gold Nanoparticle and Aflatoxin B1-BSA conjugates based lateral flow assay method for the analysis of Aflatoxin B1[J]. *Materials*, 2012, 5(12): 634-643.

[6] Kotinagu K, Mohanamba T, Kumari L R. Assessment of Aflatoxin B1 in livestock feed and feed ingredients by high-performance thin layer chromatography[J]. *Veterinary World*, 2015, 8(12): 1396-1399.

[7] Amirkhizi B, Arefhosseini S R, Ansarin M, et al. Aflatoxin B1 in eggs and chicken livers by dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC[J]. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2015, 8(4): 245-249.

[8] Zhou G H, Chen Y J, Kong Q, et al. Detoxification of Aflatoxin B1 by *Zygosaccharomyces rouxii* with solid state fermentation in peanut meal[J]. *Toxins*, 2017, 9(1): 42.

[9] Luo D Q(罗定强), Huang Y(黄艳), Fan B J(樊宝娟), et al.



- Determination of aflatoxin B1, B2, G1, G2 in nelumbinisemen by LC-MS/MSLC-MS/MS[J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal(安徽医药)*, 2014, 18(1): 41-44.
- [10] Zhang M H(张铭函), Jiang J Q(姜俊巧), Ge J J(葛君杰), et al. Acetylcholinesterase biosensor platform based on BP2000 for the detection of carbaryl[J]. *Journal of Electrochemistry(电化学)*, 2018, 24(4): 4-9.
- [11] Li W J(李文进), Liu X(刘霞), Li R Z(李蓉卓), et al. Progress on pesticide residues detection by electrochemical sensor[J]. *Food & Machinery(食品与机械)*, 2013, 29(4): 241-245.
- [12] Rawal R, Chawla S, Devender, et al. An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>NPs/cMWCNT/PANI/Au electrode for determination of phenolic content in tea leaves extract[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(4): 179-185.
- [13] Talemi R P, Mousavi S M, Afruzi H. Using gold nanostars modified pencil graphite electrode as a novel substrate for design a sensitive and selective dopamine aptasensor[J]. *Materials Science & Engineering C - Materials for Biological Applications*, 2017, 73:700-708.
- [14] Xue X Y, Cheng R, Shi L, et al. Nanomaterials for water pollution monitoring and remediation[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 15(1): 23-27.
- [15] Liu W, Luo J, Zhao M, et al. Effect of amino compounds on luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gold nanoparticle chemiluminescence system[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(30): 8821-8830.
- [16] Cheng C E, Lin C Y, Chang H Y, et al. Surface-enhanced Raman scattering of graphene with photo-assisted-synthesized gold nanoparticles[J]. *Optics Express*, 2013, 21(5): 6547-6554.
- [17] Lang J W, Yan X B, Yuan X Y, et al. Study on the electrochemical properties of cubic ordered mesoporous carbon for supercapacitors[J]. *Journal of Power Sources*, 2011, 196(23): 10472-10478.
- [18] Liu F L, Guo Z B, Ling H G, et al. Effect of pore structure on the adsorption of aqueous dyes to ordered mesoporous carbons[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2016, 227: 104-111.
- [19] Cho M S, Kim Y W, Han S Y, et al. Detection for folding of the thrombin binding aptamer using label-free electrochemical methods[J]. *BMB Reports*, 2008, 41(2): 126-131.
- [20] Nimjee S M, Rusconi C P, Sullenger B A. APTAMERS: an emerging class of therapeutics[J]. *Annual Review of Medicine*, 2005, 56(1): 555-583.
- [21] Wang J, Wang F, Dong S. Methylene blue as an indicator for sensitive electrochemical detection of adenosine based on aptamer switch[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2009, 626(1/2): 1-5.
- [22] Bang G S, Cho S, Kim B G. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005, 21(6): 863-870.
- [23] Wang J, Wang F, Dong S. Methylene blue as an indicator for sensitive electrochemical detection of adenosine based on aptamer switch[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2009, 626(1/2): 1-5.
- [24] Erdem A, Kerman K, Meric B, et al. Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 422(2): 139-149.
- [25] Bagheri H, Talemi R P, Afkhami A. Gold nanoparticles deposited on fluorine-doped tin oxide surface as an effective platform for fabricating a highly sensitive and specific digoxin aptasensor[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(72): 58491-58498.
- [26] Mashhadizadeh M H, Talemi R P. Application of diazothiurea and gold nano-particles in the design of a highly sensitive and selective DNA biosensor[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2015, 26(1): 160-166.
- [27] Yu X Y(于雪云). The application of cyclic voltammetry experimental technique is briefly described[J]. *Journal of Dezhou University(德州学院学报)*, 2012, 28(S1): 204-205.
- [28] Qi Q D(乔庆东), Li Q(李琪). Electrochemical behaviors of ferrocene using cyclic voltammetry[J]. *Journal of Liaoning Shihua University(辽宁石油化工大学学报)*, 2013, 34(3): 5-7.
- [29] Park J S, Kim H J, Lee J H, et al. Amyloid beta detection by faradaic electrochemical impedance spectroscopy using interdigitated microelectrodes[J]. *Sensors*, 2018, 18(2): 426.
- [30] Sabet F S, Khabbaz H, Hosseini M, et al. FRET-based aptamer biosensor for selective and sensitive detection of Aflatoxin B1 in peanut and rice[J]. *Food Chemistry*, 2016, 220: 527-532.
- [31] Seok Y, Byun J Y, Shim W B, et al. A structure-switchable aptasensor for aflatoxin B1 detection based on assembly of an aptamer/split DNAzyme[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 886: 182-187.
- [32] Sergeyeva T, Yarynka D, Piletska E, et al. Fluorescent sensor systems based on nanostructured polymeric membranes for selective recognition of Aflatoxin B1[J]. *Talanta*, 2017, 175: 101-107.

## A Simple and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Sensor for Determination of Aflatoxin B1

LIU Bing<sup>1,2\*</sup>, ZHAO Yao-shuai<sup>1,2</sup>, QIN Yue<sup>1,2</sup>, WANG Yi<sup>1,2</sup>,  
ZHU Yan-jie<sup>1,2</sup>, WANG Shuo<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin 300457, China; 2. College of Food Science and Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Aflatoxin B1 has attracted much attention because of its high toxicity and carcinogenicity, which has become a great concern in food safety. Based on the principle of specific binding between Aflatoxin B1 and its aptamer, an aptamer-based electrochemical sensor had been designed and developed for the determination of minor Aflatoxin B1 contained in grain. The mesoporous carbons were first modified on the surface of the working electrode, and then the gold nanoparticles were on-site electrodeposited at a constant potential. Each modified electrode was characteritised by scanning electron microscopy (SEM) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). As a result, the surface area and the electrochemical signal of the modified electrode were all greatly increased, providing more attachment sites for the following conjugation of the aptamer. During the detecting process, Aflatoxin B1 could compete with methylene blue on the aptamer chain to cause methylene blue shedding and the electrochemical signals were changed which could be used to quantify the concentration of Aflatoxin B1. The surface modifications could evidently improve the conductivity and sensitivity of the sensor. A linear response in current to Aflatoxin B1 was found ranging from 0.1 to 75  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  with the detection limit as low as 36  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $S/N = 3$ ). The spiked recovery tests of different grains (rice, corn, glutinous rice) revealed that the recovery rates were between 92.3 and 103.6%, showing excellent accuracy, sensitive quantitative detection of the target substance and good reproducibility. This work has demonstrated a new method to develop a novel, simple, fast and sensitive sensor for the detection of trace amount of Aflatoxin B1 in grains.

**Key words:** Aflatoxin B1; aptamer; sensor; detection method