

基于荧光传感器检测食品中赭曲霉毒素 A 的研究进展

吴昊, 孙旭飞, 张蕴哲, 张伟*

(河北农业大学食品科技学院, 保定 071001)

摘要: 赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 是曲霉菌属和青霉菌属产生的一种次级代谢产物, 具有较强的肾毒性、肝毒性、神经毒性和免疫毒性。因其较为稳定的物理化学性质, 使其在食品加工过程中难以被有效去除。OTA 广泛存在于谷物、葡萄等多种食品原料及其制品中, 严重威胁人体健康。近年来, 光学传感器作为生命科学领域中的研究热点, 得到了学者们的关注, 其中荧光传感器凭借其简单快捷的优势, 在酶促反应、免疫反应等许多领域得到了广泛应用, 并产生了基于仪器分析、免疫分析学和分子生物学的 OTA 检测技术。本文基于食品中 OTA 荧光传感器检测技术发展近况, 综述了荧光检测技术中不同原理、纳米材料和荧光染料在检测中的应用, 从技术分类、应用特点及范围 3 个角度进行介绍, 为相关农产品中 OTA 的检测与发展提供参考。

关键词: 荧光传感器; 赭曲霉毒素 A; 纳米材料; 荧光染料

Research progress of detection of ochratoxin A in food based on fluorescence sensor

WU Hao, SUN Xu-Fei, ZHANG Yun-Zhe, ZHANG Wei*

(College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

ABSTRACT: Ochratoxin A (ochratoxin A, OTA) is a secondary metabolite produced by *Aspergillus* and *Penicillium*. It has strong nephrotoxicity, liver toxicity, neurotoxicity and immunotoxicity. Due to its stable physical and chemical properties, it is difficult to be effectively removed in food processing. OTA is widely present in various food materials such as grains and grapes and other food raw materials, and their products, which seriously threaten human health. In recent years, as a research hotspot in the field of life sciences, optical sensors have attracted the attention of scholars. Among them, fluorescent sensors have been widely used in many fields such as enzymatic reactions and immune reactions due to their simple and fast advantages, and OTA detection technology for instrumental analysis, immune-analysis and molecular biology is produced. Based on the recent development of OTA fluorescence sensor detection technology in food, this article reviewed the application of different technical principles, nanomaterials and fluorescent dyes in fluorescence detection, and introduced them from 3 perspectives: Technical classification,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371772)、河北省自然科学基金项目(C2019204342)、河北省重点研究开发项目(18275501D)、河北农业大学食品加工学科群经费项目(2021-06)、博士后科研项目择优资助项目(B2021005007)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371772), the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2019204342), the Key Research and Development Project of Hebei Province (18275501D), the Funding from the Food Processing Discipline Group of Hebei Agricultural University (2021-06), and the Post-Doctoral Research Project Selection Funding (B2021005007)

*通信作者: 张伟, 教授, 主要研究方向为食品安全。E-mail: zhangwei631126@163.com

*Corresponding author: ZHANG Wei, Professor, College of Food Science and Technology, No.289, Lingyu Temple Street, Baoding 071001, China. E-mail: zhangwei631126@163.com

application characteristics and scope, so as to provide reference for OTA detection and development in related agricultural products.

KEY WORDS: fluorescence sensor; ochratoxin A; nanomaterials; fluorescent dye

0 引言

赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)是由曲霉和青霉属真菌在食品贮藏过程中产生的一种次级代谢产物^[1],有极强的肾毒性、肝毒性、免疫毒性、致畸性和致癌性^[2],其污染广泛存在于咖啡、水果、可可、葡萄酒和各种谷物当中^[3-6]。通过对 OTA 致毒机制的研究,发现其毒性作用机制主要体现在氧化损伤、破坏细胞周期及抑制蛋白质合成^[7-9]。同时,OTA 有较强的热稳定性,在食品加工过程中难以被去除^[10]。国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将 OTA 作为可能的人类致癌物并归类为 2B 组^[11]。各个国家也制定了严格的卫生标准,表 1 列举了我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》及部分国家对食品中 OTA 最大限量标准^[12]。

表 1 部分国家对食品中 OTA 最大限量标准
Table 1 Maximum limits of OTA in food in some countries

国家	食品分类	限量标准/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
中国	谷物及其制品	5.0
	豆类及其制品	5.0
	酒类(葡萄酒)	2.0
	研磨/速溶咖啡	5.0/10.0
欧盟	葡萄酒、葡萄汁	2.0
	谷物及其制品	3.0
意大利	烘焙、速溶咖啡	4.0
	谷物及其制品	5.0

传统 OTA 检测的方法有高效液相色谱法、液相色谱-质谱法、气相色谱-质谱法、毛细管电泳法等^[13-16]。这些方法灵敏度高、特异性强,但样品前处理复杂、成本较高,需要大量的溶剂且专业人员操作。经典免疫分析技术酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)基于抗体抗原特异性识别进行检测,适用于大批量样本检测,能有效简化样本前处理操作^[17]。但检测结果依赖高亲和、高特异性 OTA 抗体抗原,且抗体制备技术复杂、稳定性差,可能存在假阳性结果。

随着生物技术的快速发展,传感器技术在食品安全检测中发挥了不可替代的作用。OTA 适体和纳米材料的出现,使得 OTA 传感器检测方法更加多元化。这其中,光学传感器得到了广泛应用。依据检测原理不同,可分为比色

传感器、荧光传感器、化学发光传感器、表面等离子体共振传感器和表面增强拉曼传感器等^[18-22]。其中荧光传感器由于其较高的灵敏度和操作简便性得到了快速发展。

本文将综述近年受关注度较高的食品中 OTA 检测方面荧光传感技术的研究进展,分别从检测技术、纳米材料和荧光染料 3 个角度对荧光传感技术进行介绍,旨在让读者了解食品中 OTA 检测荧光传感器的发展现状,为将来 OTA 新型检测技术的发展提供参考。

1 不同荧光检测技术的应用

近年来,荧光传感器技术凭借其优异的检测性能得到了快速发展。荧光信号的产生从本质上来讲是荧光物质受激发光激发,电子从基态跃迁到激发态,再返回基态时所发射的光。在实际检测当中,根据荧光激发机制的不同,可以将其大致分为电子转移(激发态光诱导电子转移)、质子转移(分子内质子转移)和能量转移(荧光共振能量转移)3 种^[23]。统计过程中发现,目前 OTA 检测技术大多基于能量转移机制,即利用荧光团中能量的转移完成荧光的激发与淬灭过程。目前食品中 OTA 的荧光检测主要利用以下 3 种技术。

1.1 荧光共振能量转移技术

尽管 OTA 荧光检测技术发展应用愈加广泛,但其仍有一些问题无法解决。这是因为荧光信号容易受到许多因素的干扰,如周围环境(酸碱度和温度)和荧光染料(激发光、发射光的强度变化)^[24]。为解决该问题,研究人员探究开发了一种比率型荧光传感器,即通过 2 个发射峰的荧光强度的比值,实现定量检测 OTA,已成功用于实际检测当中^[25]。与单信号荧光传感器相比,比率型传感器在一定程度上,降低了温度、激发光强度、溶液极性和环境 pH 的影响,使检测结果更加准确。该传感器共有 2 个荧光峰,这就要求不能有较宽的荧光光谱,否则两个峰可能会发生重叠,难以确定 2 个荧光峰的比值。此外,高能量可见光的持续照射,也会对检测体系造成不可逆的损伤。比率型传感器又可分为分子内电荷转移和荧光共振能量转移两种,其中后者应用最为广泛^[26]。

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是针对均相体系开发的一种分析技术,具体原理是指体系中一个荧光基团(供体)的发射光谱与另一个基团吸收光谱发生重叠,供体能量/电子会转移到受体上,从而达到荧光淬灭的过程^[27]。该过程一般在两基团空间距离小于 10 nm,重叠大于 30%时发生^[28]。在理想情况下,

FRET 供体的发射光谱与受体的吸收光谱应尽可能的重合, 同时供体和受体的发射光谱要尽可能分开。在一定激发波长下, 彼此不会相互影响。但现实情况是, 使用可见光作为激发光源时, 传统荧光基团之间往往会产生相互影响, 供体与受体往往会被同时激发, 造成假阳性结果^[29]。

纳米材料的应用, 替代传统荧光染料并克服了供体-受体相互干扰的问题, 使 FRET 技术得到了更广泛的应用与发展^[30]。在实际检测过程中, 选择合适的能量供体-受体, 对检测结果至关重要。BI 等^[31]开发了一种基于石墨氮化碳量子点(g-CNQDs)-钴氧化氢(CoOOH)为能量供体-受体的荧光传感器。将标记有 g-CNQDs 的 OTA 适体(g-CNQDs-apt)吸附到 CoOOH 上, 此时发生 FRET, 荧光淬灭。OTA 存在时, g-CNQDs-apt 与 OTA 结合, 诱导形成反平行 G-四链体, 从 CoOOH 上脱离, FRET 消失, 荧光恢复。QIAN 等^[32]利用 2 个纳米材料供体和一个纳米受体开发了一种双色 FRET 技术。利用碳点(carbon dots, CDs)和碲镉量子点(CdZnTe QDs)具有差距明显的发射峰, 被分别用来修饰黄曲霉毒素 B₁ 适体和 OTA 适体。由于范德华力的作用, 带有标记的单链适体可以稳定地吸附在单个纳米受体二硫化钼(MoS₂)纳米片表面, 发生 FRET。当适体与 AFB₁ 和 OTA 孵育时, 适体与毒素的特异性结合导致部分能量供体标记的适体的释放, 从而阻碍了 FRET 进程, 荧光恢复。该传感器的设计利用具有相似发射光谱的纳米材料作为供体, 为真菌毒素多重检测提供了新的思路。

1.2 荧光偏振技术

荧光偏振技术(fluorescence polarization assay, FPA)是一种简单、快速、精确度较高的荧光检测技术。其检测原理是一种偏振光(与含荧光分子样品垂直)与荧光分子结合表现出不对称光发射, 检偏器检测到的荧光信号同待检样品浓度之间建立线性关系, 从而达到检测的目的。该技术可有效检测

体系中分子的迁移率、旋转运动和相互作用等信息^[33]。

该检测原理表明, 荧光检测信号取决于荧光标记分子的内在性质, 如分子量、空间结构、识别结合作用的强度和环境因素(如溶液粘度和温度), 而与荧光团浓度无关^[34]。如果检测体系中荧光分子是自由旋转且无序的, 则会检测到较小的荧光偏振值。当荧光分子与另一种物质结合形成大分子时, 荧光分子旋转速率则会降低, 荧光偏振值就会升高。与其他荧光分析方法相比, 荧光偏振信号检测对荧光信号的波动和染料光漂白效应不太敏感, 因而被广泛应用于蛋白质、小分子、金属离子的检测^[35]。

偏振信号的变化可以有效检测溶液自然状态下的分子运动, 对分子间相互作用过程实现实时监测。例如 SAMOKHVALOV 等^[36]提出了一种基于 FPA 技术检测 OTA 荧光传感器, 原理如图 1 所示。当修饰羧基的 OTA 与其适体结合, 复合物的形成导致荧光基团空间尺寸产生变化, 荧光偏振信号也相应改变, 从而完成检测。然而, 考虑到部分被筛选出的 OTA 适体与 OTA 的结合常数较低, 在没有对信号进行二次放大的前提下, 无法得到更为准确的结果。

参照其他毒素检测技术, 在对食品中 OTA 进行检测时, 可以开发利用一些大分子和纳米材料, 让其与适体结合以增加适体的分子尺寸, 放大荧光各向异性信号。在未来检测发展方向上, 可以设计筛选大分子物质, 如蛋白质。蛋白质通常比适体大, 可以设计筛选与 OTA 适体特异性结合的蛋白质。在没有 OTA 的情况下, 荧光标记的适体与单链结合蛋白结合, 由于适体-蛋白复合物分子体积的增加而产生高荧光偏振信号, 达到检测目的; 小分子物质如寡核苷酸链。设计筛选用于增加 OTA 适体分子质量的单寡核苷酸链(single-stranded DNA, ssDNA)。还可以利用酶反应, 对 OTA 适体进行延伸、切割或扩增, 改变荧光团空间结构, 产生信号改变。

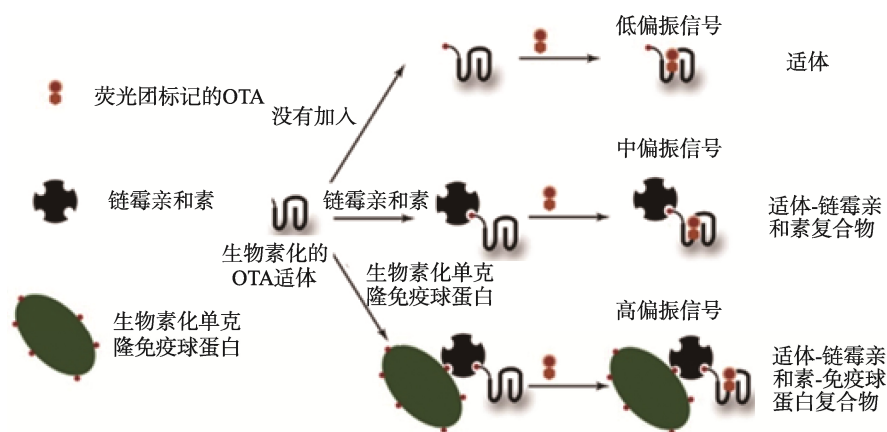


图 1 基于 FPA 技术检测 OTA 原理

Fig.1 Principle of detecting OTA based on FPA technology

1.3 时间分辨荧光分析技术

时间分辨荧光分析(time-resolved fluorescence analysis, TRFA)是近年发展较为迅速的一种灵敏微量分析技术。该技术以镧系元素及其复合物作为荧光标记物,用脉冲光激发待测产物,待短寿命背景信号衰减后,收集长寿命荧光信号(由镧系螯合物生成),从而达到检测目的^[37]。不同于稳态光谱测量(如 FRET、FPA),TRFA 技术采用的镧系螯合物具有较长的荧光寿命和较大的斯托克斯位移(Stokes shift),且采用波长与时间 2 个参数进行信号收集,因而在实际测量时能有效排除非特异性荧光信号的干扰^[38]。

TRFA 技术已被广泛应用于食品真菌毒素的检测。基于检测原理不同,又可分为免疫学检测传感器^[39]和适体检测传感器^[40]。例如 ZHANG 等^[41]利用稳定的激发光和 TRFA 技术照射含铱(Ir^{3+})与 OTA-适体(形成 G-四链体)体系,得到不同的荧光光谱,以此达到对 OTA 的特异性检测。与稳态发射光谱检测限(40 nmol/L)相比,TRFA 技术的检测限(10.8 nmol/L)比稳态模式的灵敏度高约 4 倍。

随着科学技术的发展,各种新型荧光传感器检测技术被研究发现并成功用于 OTA 检测。方法灵敏度不断提高,检测更加便捷。依据荧光传感器的构建元件不同,可将其分为纳米材料和荧光染料两类。

2 纳米材料在 OTA 检测中的应用

在荧光传感器发展的早期阶段,有机染料和荧光蛋白以其低成本和易获得的优势被普遍用作荧光探针,但其量子产率低和光稳定性差等缺点限制了它们的应用范围^[42]。近几十年来,基于纳米材料的 OTA 荧光传感器技术取得了较大进展,纳米材料因其优异的光学和电子特性而被广泛应用于荧光传感器中。

2.1 纳米材料的分类

纳米材料的选择对 OTA 的有效检测至关重要。目前已成功用于检测的纳米材料包括碳纳米材料、量子点、金属纳米材料和上转换纳米粒子等^[43]。

2.1.1 碳纳米材料

碳纳米材料(carbon nanomaterials, CNs)具有独特的电学、光学、力学和化学性质,包括石墨烯、单壁碳纳米管和碳纳米管等多种形式^[44]。其中石墨烯是一种二维的六边形碳环片,这种单层片状的结构方式使它具有优异的导热性能、较大的比表面积和良好的结构相容性,同时也是构成碳纳米管和石墨等材料的基本单元^[45]。TIAN 等^[46]设计了修饰氧化铈纳米粒子的 DNA1(与 OTA 适体互补)和修饰石墨烯量子点的 DNA2(OTA 适体),两者发生碱基互补配对,发生 FRET,荧光淬灭。加入 OTA 后,由于 OTA 与适体特异性结合形成复合物,双链打开,FRET 消失,荧光恢复,从而达到检测目的。

2.1.2 量子点

量子点(quantum dots, QDs)是一种半导体纳米粒子,其直径一般在 1~20 nm 之间,结构为核/壳型,这种结构可大幅度提高发光效率。量子点具有高量子产率、高摩尔消光系数、宽吸收光谱、窄对称发射带以及对光漂白和化学降解的高耐受性等良好特性^[47]。其荧光寿命为传统荧光团的十几倍,还可根据实际需求调节吸收、发射光谱的波长范围^[48]。但量子点也存在制备方法复杂,且具有一定的毒性等缺陷。在实际应用过程中,量子点还存在闪点(由激发光导致)问题,但研究发现加厚量子点外壳可有效抑制闪点现象^[49]。

目前,基于量子点的荧光传感器技术已成功用于检测小分子和蛋白质,同时也被用于 FRET 技术,其窄发射带和宽激发光谱特性能有效降低比率型荧光传感器假阳性率^[50]。ZHOU 等^[51]利用 ZnCdSe/ZnS(核/壳)量子点作为标记团(激发光谱在 520 nm 处和 610 nm 处分别为绿色和橙红色),以抗玉米赤霉烯酮抗体量子点和抗 OTA 单克隆抗体量子点作为荧光探针。在相同的激发波长和不同的发射波长下测量荧光强度,成功建立了基于量子点的多重荧光标记免疫吸附分析方法。

2.1.3 金属纳米材料

金属纳米材料(metal nanomaterials, MNs),通常是指金纳米粒子(AuNPs)、银纳米粒子(AgNPs)和铜纳米粒子(CuNPs)。当粒子尺寸小于 2 nm 时,就会形成金属纳米簇,具有较大的 Stokes 位移、高发光效率和光稳定性,可有效提高荧光传感器的特异性和灵敏度^[52]。ALIZADEH 等^[53]利用 OTA 和 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 络合前后荧光强度变化的特性,开发一种快速检测小麦中 OTA 的荧光传感器技术。

2.1.4 上转换纳米材料

上转换纳米材料(up-conversion nanoparticles, UCNPs)是新一代荧光纳米材料,可以将长波光(通常是 800~1000 nm)转换成短波光(通常在 350~800 nm)^[54]。目前所利用的多是掺杂稀土元素构成的固体化合物,具有独特的物理化学特性,包括不易光致漂白、光降解和无光闪烁、长荧光寿命和易多色发光^[55]。同时由于其激发光在红外光区,对检测样品的损伤也较小^[56]。基于以上优点,上转换纳米材料也得到了非常广泛的应用。DAI 等^[57]使用修饰有核/壳上转换纳米粒子(CS-UNCNPs)的 OTA 适体作为能量供体,氧化石墨烯(GO)作为能量受体。适体和 GO 之间的 π - π 堆积作用使 CS-UNCNPs 和 GO 相互靠近,引发了 FRET,导致 CS-UNCNPs 荧光猝灭。当 OTA 存在时,适体与 OTA 特异性结合,结合后的复合物由于空间位阻无法与 GO 靠近,FRET 作用消失,荧光恢复。

2.2 纳米技术分类

不同纳米材料拥有不同的性质,在利用荧光传感器进行 OTA 检测的过程中,根据纳米材料作用不同,可将其分为 3 个方面,即荧光信号放大、作为荧光团和作为猝灭剂。

2.2.1 作为荧光信号放大元件

当食品中 OTA 污染含量较低时,则对检测方法灵敏

度和检出限有较高的要求。在荧光信号放大分析方法中, 大多是基于各种扩增技术实现对底物的大量扩增, 该类方法操作复杂、成本高。当需要检测无法扩增的物质(如毒素)时, 该方法便受到了限制。纳米技术的出现和纳米材料的应用, 使基于荧光复合纳米材料所构建的荧光信号放大分析方法成为可能^[58]。

研究发现, 纳米材料在检测过程中可以作为荧光信号放大元件和修饰承载元件。这其中, 二氧化硅(SiO_2)纳米材料和 AgNPs 应用最为广泛。金属放大荧光信号的原因在于其表面发生等离子体共振, 位于金属纳米粒子附近的荧光分子受到金属表面环境的影响(荧光激发过程缩短、发射波长变长)。在荧光分子距离金属表面空间距离短的情况下, 可有效提高染料的光稳定性, 同时实现荧光信号放大^[59]。

2.2.2 作为荧光团

作为荧光基团, QDs 是具有独特电子和光学性质的半导体纳米粒子^[60]。通常与高特异性生物分子如抗体和适体结合^[61-62], 以提高分析的选择性。QIAN 等^[63]开发了一种双信号比率荧光传感器, 该传感器由两种 CdTe 量子点制成。作为供体的绿色发光 CdTe 量子点修饰在 OTA 适体上, 作为参考信号的红色发光 CdTe 量子点被包裹在 SiO_2 中。金纳米粒子(AuNPs)受体附着在 SiO_2 表面, 与巯基化互补核苷酸链(cDNA)结合。在没有 OTA 的情况下, OTA 适体与 cDNA 杂交, 使 gQDs 和 AuNPs 相互靠近, 从而发生 FRET。当 OTA 存在时, OTA 与适体结合, 形成复合物, gQDs 部分释放到溶液中, 进而阻断 FRET。该方法已被成功用于红酒中 OTA 的检测, 加标样品的平均回收率为 94.0%~97.3%。

2.2.3 作为猝灭剂

作为猝灭剂时, 纳米材料有比传统猝灭剂更为明显的优势。如低背景信号和对许多荧光团(如有机染料、共轭聚合物和量子点)优异的荧光猝灭能力。还可以将官能团(如 COOH、 $-\text{NH}_2$ 、生物素、链霉亲和素)修饰到纳米粒子上用于特定检测^[64]。有机荧光染料或荧光基团(如 6-羧基荧光素)作为 FRET 供体, 纳米材料作为 FRET 受体是最简单且最常见的形式^[65]。例如, GUO 等^[66]用单壁碳纳米角(single-walled carbon nanohorns, SWCNHs)作为受体, 当 OTA 存在时, OTA 与适体特异性结合, 形成反平行 G-四链体, 无法与 SWCNHs 结合, 能够检测到荧光。不存在 OTA 时, 修饰 SYBR Gold 的适体与 SWCNHs 结合, 存在激发光时, 发生 FRET, 荧光猝灭。该方法成功用于红酒中 OTA 的定量检测, 加标回收率在 91.5%~108.3%之间, 检出限为 2.3 ng/mL, 显示了良好的检测性能。

随着纳米技术的应用, 荧光传感器的检测性能不断提高。单个荧光团分子作为受体时, 往往会降低反应灵敏度。此外, 目前广泛使用的荧光团均表现出较短的荧光寿命和低稳定性, 使荧光传感器检测成本偏高。近几十年来, 纳米材料的研究开发取得了较大发展, 不同纳米技术赋予

纳米材料新的特性, 从而进一步推动荧光传感器技术发展。综上所述, 基于纳米材料生物传感器的发展正处于一个蓬勃发展的趋势, 应继续研究开发各种新型纳米材料, 进一步推动各类检测技术的发展。

3 荧光染料标记类型

3.1 标记型

在利用荧光传感器进行检测时, 因核酸本身并无荧光, 量子产率较低, 所以会在核酸的特定位置标记荧光基团, 进而产生检测信号。根据标记荧光基团的数目不同, 可分为单标记型与多标记型。

单标记型适体荧光传感器指将单一荧光基团修饰于 OTA 适体一侧作为信号元件。当待检物(OTA)存在时, OTA 与适体特异性结合, 致使构象发生改变, 利用荧光基团信号的变化达到检测的目的。该类传感器制备简单、重现性良好, 但成本较高、操作烦琐^[67]。常见的单标记型传感器主要为荧光猝灭(Turn-off)模式, 一般需要借助纳米材料作为荧光基团的猝灭剂, 如 QDs、AuNPs 等^[68]。SHAO 等^[69]利用 GO 和 OTA 适体研制了一种用于检测 OTA 的高灵敏荧光传感器, 原理如图 2 所示。两种类型的 ssDNA (H1 和 H2)进行 DNA 自组装, 其中 H1 用荧光团标记, H2 是 OTA 适体(如图 2a 所示)。图 2b 为 OTA 检测过程, 当 OTA 存在时, 适体被特异性识别, 形成适体-OTA 复合物, 导致自组装 DNA 分离。加入 GO 后, 荧光猝灭。当 OTA 不存在时, H1 和 H2 的自组装无法被 GO 吸附, 此时荧光强度较强。该实验中 OTA 的检测限可达 4.59 nmol/L。

多标记型适体荧光传感器是在适体上标记多个荧光基团, 依靠目标物识别荧光团前后空间距离的远近产生荧光信号的改变, 从而达到检测的目的。较单标记型而言, 复杂体系中 OTA 的检测更适合用多标记型, 这样能更好地降低外界体系及分子之间所带来的误差。双标记型中最常用的修饰方式是在单链 DNA 两侧修饰荧光基团和猝灭基团, 或多条 ssDNA 上修饰不同激发波长的荧光团, 该模式大多也利用 FRET 原理^[70-71]。例如 HAN 等^[72]提出了一种新的利用级联链置换反应检测 OTA 的荧光传感器, 如图 3 所示。OTA 适体修饰于磁珠表面。OTA 存在时, OTA 及其适体在磁珠表面结合, 此时, 适体互补链(cDNA)游离, 经磁分离后, cDNA 可诱导与 p1-F、p2-Q 引发链置换反应, FRET 效应消失, 荧光信号增强, 检测限可达 0.63 ng/mL, 回收率较高。彭臻菲等^[73]以微孔板为载体, 采用偶联生物素和 Cy3 荧光标记的 OTA 适体与 OTA 的特异性结合, 导致偶联黑洞猝灭探针的互补序列无法配对, 导致荧光值变化从而实现 OTA 的定量检测。

标记型传感器往往能够实现 OTA 的快速检测, 设计简单, 特异性较高。缺点在于核酸标记往往会降低核酸

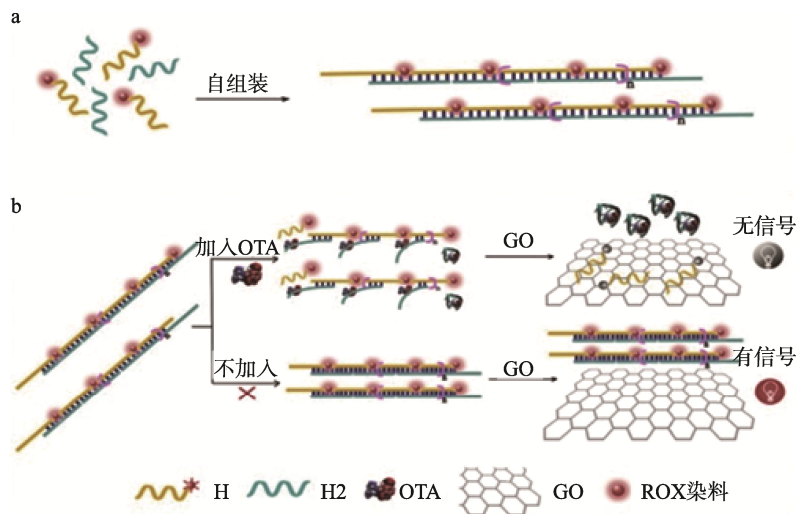
的稳定性,也会影响与互补链或识别物之间的亲和力,降低方法的灵敏性,同时实验成本也大大提高。人们在开发利用的基础上,也将目光转向了另一个研究热点,即无标记型荧光传感器。

3.2 无标记型

无标记型与标记型相反,无需对核酸进行任何标记和修饰,荧光染料/基因依赖荧光探针与核酸分子之间非共价相互作用,功能核酸修饰成本降低。实验设计中,利用一些有特殊荧光性质的染料,实现对 OTA 的检测。但该传感器的设计往往需要根据具体反应产生的核酸结构选择合适的荧光物质,依赖核酸链在构象上的变化。常用的无标记型染料按作用功能大致可分为 4 类,如表 2 所示。

无标记型传感器除去对 OTA 适体及扩增产物的标识,

保留检测的特异性,可以保持在较长时间内检测结果的稳定性,便于多次分析,且分析速度较快。无标记型荧光生物传感器主要有 2 种荧光激发方式:一是有机染料与核酸发生的静电吸附作用,从而激发荧光信号^[74]。LV 等^[75]基于适体、SYBR Gold 和核酸外切酶 I (Exo I)开发了一种荧光传感器。当 OTA 存在时,OTA 与适体特异性结合,诱导形成反平行 G-四链体。当 OTA 不存在时,Exo I 会水解未折叠的适体。此时再加入 SYBR Gold,如果含有 OTA,则会有较高的荧光强度。这种适体传感器显示出对 OTA 的高选择性和低检测限(16.5 nmol/L)。红酒加标检测表现出良好的回收率,显示无标记型在复杂样品基质中良好的检测效率。二是纳米材料作为能量供体或受体与 OTA 发生 FRET,产生荧光信号变化。基于不同的检测方法,采用合适的无标记型染料,将会使研究更为方便灵敏。



注: a: DNA 自组装; b: OTA 检测原理。

图 2 基于 GO 和 DNA 自组装检测 OTA

Fig.2 Detection of OTA based on Go and DNA self-assembly

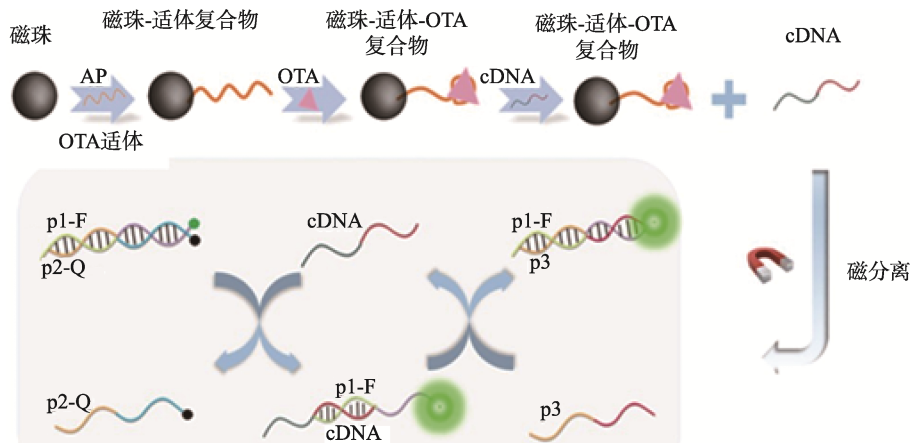


图 3 基于级链置换反应检测 OTA

Fig.3 Detection of OTA based on cascade strand displacement reaction

表 2 常用无标记型染料按作用机制的分类
Table 2 Classification of common unmarked dyes according to action mechanism

作用类型	荧光染料
嵌入型染料	与 dsDNA 结合: SYBR Green I、Eva Green 与 ssDNA 结合: SYBR Gold、SYBR Green II
与功能性 G-四链体结合	N-甲基卟啉二丙酸 IX (N-methyl mesoporphyrin IX, NMM)、硫磺素 T (thioflavine T, ThT)、噻唑橙(thiazole orange, TO)

4 结论与展望

本文综述了目前荧光传感器在 OTA 检测中的应用, 并从不同检测原理、纳米材料的应用和荧光染料 3 方面进行介绍。与其他类型的生物传感器相比, 荧光传感器优点在于检测速度快、特异性强、灵敏度高, 微量样本即可完成检测。荧光传感器虽然有突出的优势和广泛的应用, 但还有一些问题亟待解决。首先, 纳米材料是否会干扰待检物质的识别, 非均匀纳米材料(形状、尺寸等)是否会对传感器性能产生一定的影响。其次, 目前使用的大部分荧光染料具有较短的荧光寿命, 需要特殊的储存环境, 不适合现场快速检测。量子点、金属纳米粒子等具有优异荧光信号的材料无法得到大范围的普及应用。最后, 荧光探针的合成修饰需要较高的实验成本, 限制了荧光传感器技术的进一步推广。荧光信号检测结果还容易受到背景荧光信号和待检样品基质成分的干扰, 影响最终的检测结果。

在实际检测过程中针对性采用不同的技术手段(如 FRET、FPA、TRFA)、利用不同纳米材料和合适的荧光染料, 在一定程度上能有效降低背景荧光信号干扰, 提高结果准确性。为解决上述问题, 荧光传感器未来的发展方向应致力于新型荧光染料和纳米材料的开发应用, 探索新型染料核酸结合方式, 开发新型 OTA 检测技术, 实现对 OTA 的快速灵敏检测。

参考文献

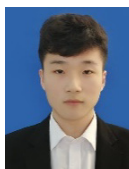
- [1] FRANTISEK M, VLADIMIR O, ANNIE PL, *et al.* Ochratoxin A: 50 years of research [J]. *Toxins*, 2016, 8(7): 191.
- [2] TAO Y, XIE S, XU F, *et al.* Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 112: 320–331.
- [3] AGUILAR-ALVAREZ ME, SAUCEDO CG, DURAND N, *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, (2): 108088.
- [4] OTEIZA JM, KHANEGHAH AM, CAMPAGNOLLO FB, *et al.* Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2017, 80: 200–207.
- [5] COPETTI BT, IAMANA KA, NESTER MA, *et al.* Taniwaki occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture [J]. *Food Chem*, 2013, 136: 100–104.
- [6] AHMED T, ABDELLAH Z, NOURREDINE B, *et al.* Exposure assessment to ochratoxin A through the intake of three cereal derivatives from the Moroccan market [J]. *Food Res Int*, 2020, 137: 109464.
- [7] MD B, SOUZA CF, SILVA J, *et al.* Dietary ochratoxin A (OTA) decreases growth performance and impairs muscle antioxidant system and meat fatty acid profiles in juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2020, 236: 108803.
- [8] LI H, MALYAR RM, ZHAI N, *et al.* Zinc supplementation alleviates OTA-induced oxidative stress and apoptosis in MDCK cells by up-regulating metallothioneins [J]. *Life Sci*, 2019, 234: 116735.
- [9] LIU K, MAO X, LI H, *et al.* Regulation of taurine in OTA-induced apoptosis and autophagy [J]. *Toxicol*, 2020, 181: 82–90.
- [10] GU KJ, RYU DJ, HYU JL. Ochratoxin A and its reaction products affected by sugars during heat processing [J]. *Food Chem*, 2021, 348(5): 129038.
- [11] VLADIMIR, OSTRY, FRANTISEK, *et al.* Mycotoxins as human carcinogens-the IARC monographs classification [J]. *Mycotoxin Res*, 2017, 33(1): 65–73.
- [12] VALENTINA M, ANDREA A, LARA T, *et al.* Natural occurrence of ochratoxin A (OTA) in edible and not edible tissue of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) sold on the Italian market [J]. *Food Control*, 2021, 120: 107537.
- [13] YIN ZP, ZHU L, LV ZJ, *et al.* Persistent luminescence nanorods-based autofluorescence-free biosensor for prostate-specific antigen detection [J]. *Talanta*, 2021, 233: 122563.
- [14] LUCI G. A rapid HPLC-FLD method for ochratoxin A detection in pig muscle, kidney, liver by using enzymatic digestion with MISPE extraction [J]. *Methods*, 2020, 7: 100873.
- [15] ZHANG X, LI M, CHENG Z, *et al.* A comparison of electronic nose and gas chromatography–mass spectrometry on discrimination and prediction of ochratoxin A content in *Aspergillus carbonarius* cultured grape-based medium [J]. *Food Chem*, 2019, 297: 124850.
- [16] XIAO MW, BAI XL, LIU YM, *et al.* Simultaneous determination of trace aflatoxin B₁ and ochratoxin A by aptamer-based microchip capillary electrophoresis in food samples [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1569: 222–228.
- [17] SUN ZC, WANG XR, TANG ZW, *et al.* Development of a biotin-streptavidin-amplified nanobody-based ELISA for ochratoxin A in cereal [J]. *Ecotox Environ Saf*, 2019, 171: 382–388.
- [18] LIN Y, WANG J, LUO F, *et al.* Highly reproducible ratio metric aptasensor based on the ratio of amplified electrochemiluminescence signal and stable internal reference electrochemical signal [J]. *Electrochim Acta*, 2018, 283: 798–805.
- [19] SONG XL, DING Q, PU YP, *et al.* Application of the Dimeric G-Quadruplex and toehold-mediated strand displacement reaction for fluorescence biosensing of ochratoxin A [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 192: 113537.

- [20] YANG C, ZHANG YQ, LIN DQ, *et al.* Chemiluminescence sensor based on composite functional nucleic acid for detection of ochratoxin A in wine [J]. *Chin J Anal Chem*, 2021, 49(4): 496–503.
- [21] RAYSSA HAP, WANDERSON JK, ADILSON RP, *et al.* Rapid and sensitive detection of ochratoxin A using antibody-conjugated gold nanoparticles based on localized surface plasmon resonance [J]. *Toxicol*, 2021, 199: 139–144.
- [22] FYHK B, AAA A, VA A, *et al.* Signal-enhanced SERS-sensors of CAR-PLS and GA-PLS coupled AgNPs for ochratoxin A and aflatoxin B₁ detection [J]. *Food Chem*, 2020, 315: 126231.
- [23] SHARMA S, GHOSH KS. Recent advances (2017–20) in the detection of copper ion by using fluorescence sensors working through transfer of photo-induced electron (PET), excited-state intramolecular proton (ESIPT) and Förster resonance energy (FRET) [J]. *Spectrochim Acta A*, 2021, 254: 119640.
- [24] SHARMA A, MAJIDNASAB M, KHAN R, *et al.* Nanomaterials in fluorescence-based biosensors: Defining key roles [J]. *Nano Struct Nano Object*, 2021, 27: 100774.
- [25] CHEN L, LIU DH, PENG J, *et al.* Ratiometric fluorescence sensing of metal-organic frameworks: Tactics and perspectives [J]. *Coord Chem Rev*, 2020, 404: 213113.
- [26] LU XL, WEI HE. Research advances in excited state intramolecular proton transfer fluorescent probes based on combined fluorescence mechanism [J]. *Chin J Anal Chem*, 2021, 49(2): 184–196.
- [27] GANIGA M, CYRIAC J. FRET based ammonia sensor using carbon dots [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2016, 225: 522–528.
- [28] GANIGA M, CYRIAC J. Understanding the photoluminescence mechanism of nitrogen-doped carbon dots by selective interaction with copper ions [J]. *Chem Phys Chem*, 2016, 17(15): 2315–2321.
- [29] KAUR A, DHAKAL S. Recent applications of FRET-based multiplexed techniques [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2020, 123: 115777.
- [30] NEEMA PM, TOMY AM, JOBIN CYRIAC. Chemical sensor platforms based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) and 2D materials [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2020, 124: 115797.
- [31] BI XY, LUO LJ, LI LB, *et al.* A FRET-based aptasensor for ochratoxin A detection using graphitic carbon nitride quantum dots and CoOOH nanosheets as donor-acceptor pair [J]. *Talanta*, 2020, 218: 121159.
- [32] QIAN J, CUI H, LU XT. Bi-color FRET from two nano-donors to a single nano-acceptor: A universal aptasensing platform for simultaneous determination of dual targets [J]. *Chem Eng J*, 2020, 401: 1385–8947.
- [33] ZHANG HY, YANG SP, RUYCKARL KD. Fluorescence polarization assays for chemical contaminants in food and environmental analyses [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2019, 114: 293–313.
- [34] LEVITT JA, MATTHEWS DR, AMEER-BEG SM, *et al.* Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology [J]. *Curr Opin Biotech*, 2009, 20(1): 28–36.
- [35] CHEN J, LIU JW, CHEN XG. Recent progress in nanomaterial-enhanced fluorescence polarization/anisotropy sensors [J]. *Chin Chem Lett*, 2019, 30(9): 1575–1580.
- [36] SAMOKHVALOV AV, SAFENKOVA IV, EREMIN SA, *et al.* Use of anchor protein modules in fluorescence polarisation aptamer assay for ochratoxin A determination [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 962: 80–87.
- [37] 陈晖, 祁兴普, 郭丽, 等. 时间分辨荧光技术在食品品质检测中的应用 [J]. *食品科学*, 2017, 38(15): 250–255.
- CHEN H, QI XP, GUO L, *et al.* Application of time-resolved fluorescence technology in food quality inspection [J]. *Food Sci*, 2017, 38(15): 250–255.
- [38] JOSS D, HUSSINGER D. Design and applications of lanthanide chelating tags for pseudocontact shift NMR spectroscopy with biomacromolecules [J]. *Prog Nucl Mag Res Sp*, 2019, 114: 284–312.
- [39] CORRIE SR, PLEBANSKI M. The emerging role of nanomaterials in immunological sensing-A brief review [J]. *Mol Immunol*, 2018, 98: 28–35.
- [40] NIAZI S, WANG XL, PASHA I, *et al.* A novel bioassay based on aptamer-functionalized magnetic nanoparticle for the detection of zearalenone using time resolved-fluorescence NaYF₄: Ce/Tb nanoparticles as signal probe [J]. *Talanta*, 2018, 186: 97–103.
- [41] ZHANG JT, KANG TS, WONG SY, *et al.* An iridium (III) complex/G-quadruplex ensemble for detection of ochratoxin A based on long-lifetime luminescent [J]. *Anal Biochem*, 2019, 580: 49–55.
- [42] GHOSH T, MONDAL A, VAMSI SV, *et al.* A naturally fluorescent protein C-phycoerythrin and graphene oxide bio-composite as a selective fluorescence “turn off/on” probe for DNA quantification and characterization [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 185: 644–653.
- [43] JIANG CM, LAN LY, YAO Y, *et al.* Recent progress in application of nanomaterial-enabled biosensors for ochratoxin A detection [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2018, 102: 236–249.
- [44] ARANDA PR, MESSINA GA, BERTOLINO FA, *et al.* Nanomaterials in fluorescent laser-based immunosensors: Review and applications [J]. *Microchem J*, 2018, 141: 308–323.
- [45] LI BY, WANG YX, HUANG LJ, *et al.* Review of performance improvement strategies for doped graphene quantum dots for fluorescence-based sensing [J]. *Synthetic Met*, 2021, 276: 116758.
- [46] TIAN JY, WEI WQ, WANG JW, *et al.* Fluorescence resonance energy transfer aptasensor between nanoceria and graphene quantum dots for the determination of ochratoxin A [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1000: 265–272.
- [47] ERLI Y, ZHANG YJ, SHEN YF. Quantum dots for electrochemiluminescence bioanalysis-A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 10: 339140.
- [48] TAN AZ, YANG GH, WAN XJ. Ultra-high quantum yield nitrogen-doped carbon quantum dots and their versatile application in fluorescence sensing, bioimaging and anti-counterfeiting [J]. *Spectrochim Acta A*, 2021, 253: 119583.
- [49] LI L, TIAN G, LUO Y, *et al.* Blinking, flickering, and correlation in fluorescence of single colloidal CdSe quantum dots with different shells under different excitations [J]. *J Phys Chem C*, 2013, 117(9): 4844–4851.
- [50] SHEKARBEYGI Z, KARAMI C, ESMAEILI E. Development of Ag nanoparticle-carbon quantum dot nanocomplex as fluorescence sensor for determination of gemcitabine [J]. *Spectrochim Acta A*, 2021, 262: 120148.
- [51] ZHOU JM, LIU ZX, YANG QB, *et al.* Multiple fluorescence immunoassay for the simultaneous detection of zearalenone and ochratoxin A [J]. *Anal Biochem*, 2021, 628: 114288.
- [52] LIU YH, DONG P, JIANG QY, *et al.* Assembly-enhanced fluorescence from metal nanoclusters and quantum dots for highly sensitive biosensing [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2019, 279: 334–341.
- [53] ALIZADEH N, HASHEMI J, SHAHDOST-FARD F. Spectrofluorimetric study of the complexation of ochratoxin A and Cu²⁺: Towards the hybrid fluorimetric sensor and visual detection of ochratoxin A in wheat flour samples from farm to fork [J]. *Food Chem*, 2021, 350: 129204.
- [54] CHOSROWJAN H. Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry. 3rd

- Ed [M]. New York: Academic Press, 2017.
- [55] KESAVAN AV, KUMAR MP, RAO AD, *et al.* Light management through up-conversion and scattering mechanism of rare earth nanoparticle in polymer photovoltaics [J]. *Opt Mater*, 2019, 94: 286–293.
- [56] GUPTA A, GHOSH S, THAKUR MK, *et al.* Up-conversion hybrid nanomaterials for light-and heat-driven applications [J]. *Prog Mater Sci*, 2021, 121: 100838.
- [57] DAI SL, WU SJ, DUAN N, *et al.* An ultrasensitive aptasensor for ochratoxin A using hexagonal core/shell up-conversion nanoparticles as luminophores [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 538–544.
- [58] FU SN, ZHANG TF, JIANG HL, *et al.* DNA nanotechnology enhanced single-molecule biosensing and imaging [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2021, 140: 116267.
- [59] RT A, RK B. Recent trends in surface plasmon resonance based fiber optic gas sensors utilizing metal oxides and carbon nanomaterials as functional entities [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2020, 310: 127813.
- [60] MS A, PL A, PPW B, *et al.* Quantum and carbon dots conjugated molecularly imprinted polymers as advanced nanomaterials for selective recognition of analytes in environmental, food and biomedical applications [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2021, 142: 116306.
- [61] JIANG Q, ZHANG DN, CAO YT, *et al.* An antibody-free and signal-on type electrochemiluminescence sensor for diethylstilbestrol detection based on magnetic molecularly imprinted polymers-quantum dots labeled aptamer conjugated probes [J]. *Electroanal Chem*, 2017, 789: 1–8.
- [62] CENTANE S, NYOKONG T. The antibody assisted detection of HER2 on a cobalt porphyrin binuclear framework and gold functionalized graphene quantum dots modified electrode [J]. *Electroanal Chem*, 2021, 880: 114908.
- [63] QIAN J, KAN W, WANG CQ, *et al.* A FRET-based ratio metric fluorescent aptasensor for rapid and onsite visual detection of ochratoxin A [J]. *Analyst*, 2015, 140: 7434–7442.
- [64] BINA GW, SAHU V, SHUKLA SS, *et al.* Quantum dots: Prospectives, toxicity, advances and applications [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2021, 61: 102308.
- [65] SANTOS M, ALGAR WR, MEDINTZ IL, *et al.* Quantum dots for Förster resonance energy transfer (FRET) [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2020, 125: 115819.
- [66] GUO ZJ, TIAN J, CUI CB, *et al.* A label-free aptasensor for turn-on fluorescent detection of ochratoxin a based on SYBR gold and single walled carbon nanohorns [J]. *Food Control*, 2021, 123: 107741.
- [67] LIU L, HUANG Q, TANVEER ZI, *et al.* “Turn off-on” fluorescent sensor based on quantum dots and self-assembled porphyrin for rapid detection of ochratoxin A [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2020, 302: 127212.
- [68] WANG YH, SONG W, ZHAO HY, *et al.* DNA walker-assisted aptasensor for highly sensitive determination of ochratoxin A [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 182: 113171.
- [69] SHAO XL, ZHU LJ, FENG YX, *et al.* Detachable nanoladders: A new method for signal identification and their application in the detection of ochratoxin A (OTA) [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1087: 113–120.
- [70] HE YH, YU YW, WEN XY, *et al.* A quencher-free 2-aminopurine modified hairpin aptasensor for ultrasensitive detection of ochratoxin A [J]. *Spectrochim Acta A*, 2020, 228: 117780.
- [71] QIAN J, REN CC, WANG CQ, *et al.* Magnetically controlled fluorescence aptasensor for simultaneous determination of ochratoxin A and aflatoxin B₁ [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1019: 119–127.
- [72] HAN B, FANG C, SHA LJ, *et al.* Cascade strand displacement reaction-assisted aptamer-based highly sensitive detection of ochratoxin A [J]. *Food Chem*, 2021, 338: 127827.
- [73] 彭臻菲, 魏碧娜, 叶丽颖, 等. 基于核酸适配体检测玉米中的赭曲霉毒素 A [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(19): 7617–7621.
- PENG ZF, WEI BN, YE LY, *et al.* Detection of ochratoxin A in corn based on nucleic acid aptamer [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(19): 7617–7621.
- [74] LAI ZZ, YANG X, QIN L, *et al.* Synthesis, dye adsorption, and fluorescence sensing of antibiotics of a zinc-based coordination polymer [J]. *J Solid State Chem*, 2021, 300: 122278.
- [75] LV L, LI DH, LIU RJ, *et al.* Label-free aptasensor for ochratoxin A detection using SYBR gold as a probe [J]. *Sens Actuat B*, 2017, 246: 647–652.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



吴昊, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: zhangwei631126@163.com



张伟, 教授, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: zhangwei631126@163.com