基于荧光生物传感技术检测牛奶中 金黄色葡萄球菌肠毒素 B

王美玲^{1,2}, 胡 婷^{1,2}, 李昌哲¹, 周焕英³, 高志贤^{1,3*}, 罗 鹏^{1,2*}

 (1.贵州医科大学公共卫生与健康学院,环境污染与疾病监控教育部重点实验室,贵阳 561113;2.贵州医科大学 省部共建地方病及民族区域性疾病防控协同创新中心,贵阳 561113;3.军事科学院军事医学研究院 环境医学与作业医学研究所,天津市环境与食品安全风险监控技术重点实验室,天津 300050)

摘 要:目的 利用纳米金粒子(gold nanoparticles, AuNPs)荧光猝灭性能和核酸适配体的高亲和力,构建一种简便、灵敏的纳米金"Turn-on"型荧光生物传感方法检测牛奶中金黄色葡萄球菌肠毒素 B (staphylococcal enterotoxins B, SEB)的方法。方法 以 AuNPs 作为荧光体的能量受体(猝灭剂),荧光素-单链 DNA (fluorescein-ssDNA, FAM-ssDNA)作为荧光能量供体,冷冻法制备 AuNPs-SEB 适配体复合物,基于 AuNPs-SEB 适配体复合物/SEB/FAM-ssDNA 的竞争性结合,构建纳米金"Turn-on"型荧光生物传感检测方法。对缓冲体系 pH 和反应时间等条件进行优化,以牛奶为代表对方法检测性能进行验证。结果 在优化好的实验条件 (pH 7.5、反应时间 15 min 和反应温度 25℃)下,在 10⁻¹~10⁴ ng/mL 范围内,荧光强度与 SEB 质量浓度之间呈 现良好的线性关系,其相关系数为 0.995,检出限为 0.062 ng/mL。应用于牛奶样品中 SEB 的测定,方法回收率 为 91.2%~108.0%,相对标准偏差在 2.6%~5.2%范围之间。结论 该纳米金"Turn-on"型荧光生物传感检测技术 具有简便、灵敏和准确等优点,可为食品中污染物的检测提供一种可行的新方法。

关键词: 纳米金粒子; 核酸适配体; 荧光生物传感; 金黄色葡萄球菌肠毒素 B; 牛奶

Detection of staphylococcal enterotoxins B in milk based on fluorescence biosensing technique

WANG Mei-Ling^{1,2}, HU Ting^{1,2}, LI Chang-Zhe¹, ZHOU Huan-Ying³, GAO Zhi-Xian^{1,3*}, LUO Peng^{1,2*}

(1. School of Public Health, the Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China; 2. Collaborative Innovation Center for Prevention and Control of Endemic and Ethnic Regional Diseases Co-constructed by the Province and Ministry, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Risk Assessment and Control Technology for Environment and Food Safety, Tianjin Institute of Environmental and Operational Medicine, Tianjin 300050, China)

*通信作者: 高志贤, 研究员, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: gaozhx@163.com

罗 鹏, 教授, 主要研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: luopeng@gmc.edu.cn

*Corresponding author: GAO Zhi-Xian, Professor, Tianjin Key Laboratory of Risk Assessment and Control Technology for Environment and Food Safety, Tianjin Institute of Environmental and Operational Medicine, Tianjin 300050, China. E-mail: gaozhx@163.com

LUO Peng, Professor, School of Public Health, the Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China. E-mail: luopeng@gmc.edu.cn

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFF1101103)、贵州省科技厅基金项目(黔科合基础-ZK[2023]一般 318)、贵州省教育厅青年科技人 才成长项目(黔教合 KY 字[2022]218)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1101103), the Science and Technology Foundation of Guizhou Province (Qiankehe Foundation-ZK[2023] General 318), and the Department of Education Youth Science and Technology Talent Growth Program of Guizhou Province (Qianjiaohe KY word [2022] 218)

ABSTRACT: Objective To construct a simple and sensitive "Turn-on" fluorescence biosensor based on the good fluorescence quenching of gold nanoparticles (AuNPs) and the high affinity of aptamers, and apply to the detection of staphylococcal enterotoxins B (SEB) in milk samples. **Methods** AuNPs was used as the energy acceptor of fluorophore and fluorescein-ssDNA (FAM-ssDNA) as the fluorescence energy donor. The AuNPs-SEB aptamer complex was prepared by the freezing method. The AuNPs based "Turn-on" fluorescent biosensing assay was constructed due to the competitive binding of AuNPs-SEB aptamer complex/SEB/FAM-ssDNA. Conditions such as pH of the buffer system and reaction time were optimized. The performance of the proposed method was validated with real milk samples. **Results** Under the optimized experimental conditions (pH 7.5, reaction time 15 min and reaction temperature 25° C), there was a good linear relationship between fluorescence intensity and SEB mass concentration in the range of 10^{-1} – 10^{4} ng/mL, with a correlation coefficient of 0.995 and a limit of detection of 0.062 ng/mL. The method was applied to the determination of SEB in milk samples, and the recoveries were 91.2%–108.0%, and the relative standard deviations were 2.6%–5.2%. **Conclusion** The AuNPs based "Turn-on" fluorescence biosensor has the advantages such as simplicity, sensitivity, and accuracy, which can provide a feasible new method for the detection of contaminants in food.

KEY WORDS: gold nanoparticles; nucleic acid aptamer; fluorescent biosensing; staphylococcal enterotoxins B; milk

0 引 言

金黄色葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)是一种常见的食物中毒致病因素,其中葡萄球菌肠毒 素 B (staphylococcal enterotoxins B, SEB)是引起食源性中 毒的主要蛋白毒素之一^[1]。SEs 中毒是由于改变细胞因子 表达导致空肠和回肠受损,常见症状是呕吐、腹泻、恶心 和腹部绞痛^[2-3]。牛奶作为均衡饮食的重要食物受到 SEB 的污染风险较高,食用被 SEB 污染的牛奶可能会导致中 毒。SEs 引起的食源性中毒不仅威胁人类健康,还会造成 严重的公共卫生风险和经济损失^[4-5]。因此,构建一种简 便、灵敏的牛奶中 SEB 检测技术具有重要意义。

目前已有许多技术用于 SEB 检测,包括表面等离子 体共振法^[6]、高效液相色谱法^[7]、酶联免疫吸附法^[8]、电化 学传感器^[9]等。虽然这些检测技术满足分析要求,但也存 在一定的局限性:传统的生物测定方法成本高且耗时、方 法的重现性差;仪器分析方法通常设备昂贵、需要复杂的 预处理、且操作人员要掌握专业技术;免疫学方法往往因 其价格高、稳定性差而受到限制。因此,有必要开发一种 简便、稳定且高灵敏的方法用于检测 SEB。

核酸适配体可以与特定的靶标物结合,具有高亲和力,作为识别元件已广泛应用于各类生物传感器^[10]。与抗体相比,核酸适配体具有成本低、合成时间短、稳定性好等优点^[11]。纳米金粒子(gold nanoparticles, AuNPs)因其优异而独特的生物相容性成为与核酸适配体连接的理想底物,而且对 AuNPs 表面的硫醇单层进行修饰可以增强纳米材料的表面性能^[12-13]。因此,基于适配体和 AuNPs 相互作用的生物传感器已广泛应用于各种生物分子的特异性检

测^[14]。生物毒素的生物传感检测技术已有较多报道,如: 电化学适配体传感器^[15]、比色适配体传感器^[16]、荧光适配 体传感器^[17]和表面增强拉曼散射适配体传感器^[18]等。其 中荧光适配体传感器因具有灵敏度高、信号响应快、操 作简便等特点在毒素检测中被广泛应用,有较好的应用 前景^[19-21]。因此,开发一种有效且简便用于检测食品样品 中 SEB 的荧光适配体传感技术具有重要意义。

本研究利用 AuNPs 的荧光猝灭性能和核酸适配体的 亲和力,以 AuNPs 作为荧光体的能量受体(猝灭剂),荧光 素-单链 DNA (fluorescein-ssDNA, FAM-ssDNA)作为荧光 能量供体,冷冻法制备 AuNPs-SEB 适配体复合物,基于 AuNPs-SEB 适配体复合物/SEB/FAM-ssDNA 的竞争性结 合,构建一种基于 AuNPs 的"Turn-on"型荧光生物传感检 测技术,用于牛奶中 SEB 的快速检测。如图 1 原理图所示, 带有 FAM 荧光基团修饰的适配体互补链和靶标竞争结合 修饰在 AuNPs 表面的 SEB 适配体,通过检测解离后的 FAM-ssDNA 荧光强度变化对靶标进行定量检测。



图 1 基于纳米金"Turn-on"型荧光适配体传感器检测 SEB 的原理图 Fig.1 Schematic diagram of SEB detection based on nanogold "Turn-on" fluorescent aptamer sensor

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

四氯金酸三水合物[纯度 99.9%, 普洛恩(天津)科技有限公司]; 柠檬酸钠(纯度 99%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); TAE 缓冲液[赛默飞世尔科技(北京)有限公司]; SEB、黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN)、赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)、伏马菌素 B₁ (fumonisin B₁, FB₁)、T-2 毒素(镰刀菌属)[纯度 99.9%, 毒素科技(中国上海)]; 伊利纯牛奶(全脂灭菌纯牛乳 250 mL, 内蒙古伊利实业集团股份有限公司)。实验所用试剂均为化学试剂等级, 无需进一步纯化, 实验用水均为超纯水。实验中所有的寡核苷酸 DNA 均由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列(5'~3')如下: SEB 适配体 (SEB aptamer)^[22]: SH-(CH2)6-CAACGACACGAGGAAAG CCAAACCTCCTCGTGTCGTTGTAGTCTGTTGTCAGTTC TGATCTATGCA; FAM-ssDNA: TGGCTTTCCTCGTGTC GTTG-6-FAM。

1.2 仪器与设备

SB25-12D 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); L-200分析天平(精度 0.0001 g, 瑞士梅特勒-托多利仪器有限公司); HH-100恒温混匀仪(杭州佑宁仪器有限公司); Eppendorf 5425 R 小型高速冷冻离心机(Eppendorf 中国有限公司); BCD-189WDPV 冰箱(青岛海尔股份有限公司); TU-1901紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); F97pro 荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司)。实验中所用的玻璃器皿均用王水浸泡, 去离子水冲洗 3 次后干燥备用。

1.3 实验方法

1.3.1 AuNPs 的制备

采用柠檬酸钠还原法制备 AuNPs^[23]。2 mL 质量浓度 为 5 mg/mL 的 HAuCl₄溶液与 98 mL 去离子水混合均匀后, 140°C油浴搅拌反应。溶液回流时将 2.7 mL 浓度为 1%的柠 檬酸钠迅速加入烧瓶中,继续反应 15 min,混合溶液的颜 色从黄色、紫色变成深酒红色后停止加热,继续搅拌至溶 液冷却至室温,保存备用。

1.3.2 AuNPs-SEB 适配体探针的制备

采用冷冻法制备 SEB 适配体修饰 AuNPs 探针^[24]。首 先,1 mL AuNPs 溶液与 10 μL 浓度为 100 μmol/L 的巯基修 饰 SEB 适配体混合,在-20℃冰箱中冷冻 2 h 以上,随后在 室温下解冻;上述溶液 4℃离心 15 min (13000 r/min)后,取 下层沉淀加入 1 mL 浓度为 0.01 mol/L TAE 缓冲液充分混 匀,13000 r/min 离心 15 min 洗涤 3 次备用。

1.3.3 荧光生物传感检测技术构建

取 1 mL 的 AuNPs-SEB 适配体探针,加入 10 μL 的标 准溶液和 10 μL 浓度为 10 μmol/L 的 FAM-ssDNA,将混合 溶液在恒温混匀仪上反应 15 min,上述溶液 13000 r/min 离 心 15 min 后,下层沉淀加入 1 mL 浓度为 0.01 mol/L TAE 缓冲液混匀,95℃加热 5 min, 13000 r/min 离心 15 min 后取 上清液,在激发光波长为 470 nm,发射波长范围为 500~700 nm 的条件下进行波长扫描测量荧光强度。

1.3.4 实验条件的优化

溶液 pH优化: 按照1.3.2 的检测步骤, 解冻后13000 r/min 离心 15 min, 下层沉淀加入 1 mL pH 分别为 6.0、6.5、7.0、 7.5、8.0、8.5 和 9.0 的 TAE 缓冲液, 离心洗涤 3 次后取 1 mL 的 AuNPs-SEB 适配体探针, 加入 10 µL 质量浓度为 100 ng/mL 的标准溶液和 10 µL 浓度为 10 µmol/L 的 FAM-ssDNA 溶液, 将混合溶液在恒温混匀仪上反应 15 min, 离心后下层沉淀加 入 1 mL pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0 的 TAE 缓冲液, 95℃加热 5 min, 13000 r/min 离心 15 min 后取 上清液检测荧光强度。

反应时间优化:按照上述检测步骤,取 1 mL 的 AuNPs-SEB 适配体探针,加入 10 µL 质量浓度为 100 ng/mL 的标准溶液和 10 µL 浓度为 10 µmol/L 的 FAM-ssDNA 溶 液,将混合溶液在恒温混匀仪上反应 1、3、5、7、10、15、 20、25 min,离心后下层沉淀加入 TAE 缓冲液,95℃加热 5 min, 13000 r/min 离心 15 min 后取上清液在最佳荧光激发波长 条件下测量荧光强度。

反应温度优化:按照上述检测步骤,取 1 mL 的 AuNPs-SEB 适配体探针,加入 10 µL 质量浓度为 100 ng/mL 的标准溶液和 10 µL 浓度为 10 µmol/L 的 FAM-ssDNA 溶 液,将混合溶液分别在 15、25、35、45、55 和 65℃条件 下反应 15 min,离心后下层沉淀加入 TAE 缓冲液,95℃加 热 5 min,13000 r/min 离心 15 min 后取上清液在最佳荧光 激发波长条件下测量荧光强度。

1.3.5 标准曲线的建立

取 1 mL 的 AuNPs-SEB 适配体探针,加入 10 µL 质量 浓度为 10^{-2} 、 10^{-1} 、 10^{0} 、 10^{1} 、 10^{2} 、 10^{3} 、 10^{4} ng/mL 的 SEB 标准溶液和 10 µL 浓度为 10 µmol/L 的 FAM-ssDNA 溶液。 将混合溶液放置在恒温混匀仪上反应 15 min,离心后下层 沉淀加入 1 mL pH 为 7.5 的 TAE 缓冲液,95°C加热 5min。 13000 r/min离心 15 min后取上清液,荧光分光光度计激发 光波长为 470 nm,发射波长范围为 500~700 nm 的条件下 进行波长扫描测定。以发射波长为横坐标(X),不同浓度 SEB 的荧光强度为纵坐标(Y)绘制标准曲线。

1.3.6 方法特异性

取 6 个离心管分别加入 1 mL 的 AuNPs-SEB 适配体探 针,再分别加入 10 µL 质量浓度为 100 ng/mL 的 SEB 标准 溶液和 10 µL 质量浓度为 1 µg/mL 的 AFB₁、ZEN、OTA、 FB₁和 T-2 毒素,每个离心管加入 10 µL 浓度为 10 µmol/L 的 FAM-ssDNA,将混合溶液放置在恒温混匀仪上反应 15 min, 离心后下层沉淀加入 1 mL pH 为 7.5 的 TAE 缓冲液,95℃ 加热 5 min, 13000 r/min 离心 15 min 后取上清液检测荧光 强度,重复测量次数为3次。

1.3.7 实际样品检测

10 mL 牛奶室温条件下离心 20 min 去除上层脂肪,将样品稀释 20 倍后备用,加标样品 SEB 含量为 1、10、100 ng/mL。取 1 mL 的 AuNPs-SEB 适配体探针,分别加入 10 µL 样品溶液和 10 µL 浓度为 10 µmol/L 的 FAM-ssDNA,将混合溶液放置在恒温混匀仪上反应 15 min,离心后下层沉淀加入 1 mL pH为 7.5 的 TAE 缓冲液,95℃加热 5 min, 13000 r/min 离心 15 min 后取上清液检测荧光强度。

1.4 数据处理

本研究的所有数据统计及图像处理均采用 Origin 2021 进行分析,所涉及的实验数据均取 3 次重复实验的平均值。

2 结果与分析

2.1 材料表征

为了验证 AuNPs 的成功合成,使用透射电子显微镜

(transmission electron microscope, TEM)表征 AuNPs 的结构 和形态特征。如图 2A(1)所示, 合成的 AuNPs 分散性良好, 为整体粒径均匀的球形颗粒, AuNPs-DNA 偶联物的 TEM 图像如图 2A(2)所示,仍然稳定且分散良好。采用紫外可见 分光光度计对 AuNPs 和 AuNPs-SEB 适配体进行了表征, 图 2B 中 AuNPs 在 520 nm 处显示出最大紫外吸收峰,用 SEB 适配体修饰后的 AuNPs 最大紫外吸收峰位置在最高 点发生了红移,相应的峰位置出现在 526 nm 左右。这证实了 局部表面等离子体共振中的变化,表明AuNPs与SEB适配体 偶联成功^[25]。在这项研究中,采用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)观察到 AuNPs 和 AuNPs-SEB 适配体的流体 动力学直径分别为 11.2 nm 和 21.0 nm(图 2C), 表明 AuNPs-SEB 适配体比 AuNPs 的尺寸增加。如图 2D 所示, AuNPs 和 AuNPs-SEB 适配体的 Zeta 电位分别为-27.6 mV 和-33.1 mV, 这些研究均验证了 SEB 适配体成功地修饰在 AuNPs 的表面。



注: A: AuNPs 的 TEM 图像; B: AuNPs 和 AuNPs-SEB 适配体的紫外图谱; C: AuNPs 和 AuNPs-SEB 适配体的 DLS 表征图; D: AuNPs 和 AuNPs-SEB 适配体的 Zate 电位表征图。

图 2 AuNPs 的表征

Fig.2 Characterization of AuNPs

2.2 可行性验证

AuNPs 与 SEB 适配体序列通过金巯键偶联, FAM-ssDNA 可与 SEB 适配体互补配对, FAM-ssDNA 靠近 AuNPs 时,由于 AuNPs 的荧光猝灭效应, AuNPs-SEB 适配 体-FAM-ssDNA 的荧光强度降低^[26]。当 SEB 适配体 -FAM-ssDNA 双链解离时, FAM 荧光基团的荧光信号恢复, 荧光"Turn-on"。在此检测体系中, 以 AuNPs 作为荧光体的 能量受体, FAM-ssDNA 作为荧光能量供体。如图 3 所示, AuNPs-SEB 适配体-FAM-ssDNA 荧光强度较低, 对其进行 退火后使 FAM-ssDNA 荧光信号分子释放, 测得的荧光强 度明显提高^[27],这充分说明 AuNPs-SEB 适配体被 FAM 荧 光信号分子标记,进一步证实 SEB 适配体和 FAM-ssDNA 的成功配对,也说明了 AuNPs 良好的荧光猝灭效应。当加 入 100 ng/mL 靶标溶液后荧光值下降, 相较于无靶标溶液, 荧光响应变化了 400 左右的荧光强度, 这验证了靶标与 SEB 适配体的成功杂交,也说明了 FAM-ssDNA 和 SEB 与 AuNPs-SEB 适配体的竞争性结合。综上所述,纳米金 "Turn-on"型荧光生物传感技术对 SEB 的检测具有可行性。



注: A: AuNPs-SEB 适配体-FAM-ssDNA 双链退火解离时的荧光信 号强度曲线; B: AuNPs-SEB 适配体-FAM-ssDNA 未退火时的荧光 信号强度曲线; C: AuNPs-SEB 适配体-FAM-ssDNA 体系加入 100 ng/mL 靶标 SEB 后退火解离时的荧光信号强度曲线。 图 3 470 nm 荧光发射光谱图 Fig.3 Fluorescence emission spectra at 470 nm

2.3 实验条件的优化

该检测技术的性能受到缓冲体系 pH、反应时间和温度的影响,为提高检测效率,对其进行了优化。如图 4A 所示,本研究考察了不同缓冲溶液 pH 对荧光响应值的影响,体系 pH 为 7.5 时荧光响应值最大。从图 4B 可以看出, SEB 适配体与靶标和 FAM-ssDNA 的反应在 10 min 后荧光响应值处于平衡状态,表明适配体与靶标和 FAM-ssDNA 的偶联处于饱和状态,为保证反应完全,选用 15 min 作为本研

究的最佳反应时间。图 4C 优化了 SEB 适配体与靶标和 FAM-ssDNA 的反应温度,在 25℃时荧光响应值处于最高 位置,选用 25℃作为本研究的最佳反应温度。



注: A: 不同 pH 对荧光强度的影响(SEB 质量浓度: 100 ng/mL); B: 反应时间对荧光强度的影响(SEB 质量浓度: 100 ng/mL); C: 反应 温度对荧光强度的影响(SEB 质量浓度: 100 ng/mL); ΔF=F0-F (F0 为不加靶标时整个体系的荧光信号强度, F 为加入靶标后整个体 系的荧光信号强度)。

图 4 检测条件的优化 Fig.4 Optimization of the detection conditions

2.4 标准曲线的建立

基于上述实验参数的优化,本研究评估了 SEB 浓度与 荧光强度之间的线性关系,探索检测方法的灵敏度。从图 5A 可以看出, 荧光强度随着溶液中 SEB 质量浓度的增加而降低, 呈负相关。依据 SEB 质量浓度与相应荧光强度之间的关系构 建校准曲线, 如图 5B 所示: SEB 在 10⁻¹~10⁴ ng/mL 范围内表 现出良好的线性关系。通过拟合计算得到线性回归方程 *Y*=333.786*X*-115.291, 线性回归系数为 *r*²=0.995。SEB 的检出 限(3*N*/*S*)为 0.062 ng/mL, *N* 为 10 个空白溶液检测的标准偏差, *S* 为校准曲线的斜率。综上所述,本研究建立的检测方法灵敏快 速,具有良好的线性范围。表 1 与其他检测方法相比,本研究提 出的荧光适配体传感器提供的检出限更低,检测范围更广。



2.5 特异性与重复性

为了进一步验证方法的性能,本研究以目前食品的 常见几种典型生物毒素为代表,进一步评估了方法的特异 性。研究中选取的靶标和其他毒素(AFB₁、ZEN、OTA、 FB₁和 T-2 毒素)质量浓度分别为 100 ng/mL 和 1 μg/mL, 图 6A 结果表明,低浓度下的 SEB 溶液出现明显的荧光强度 响应,而其他毒素浓度比 SEB浓度高 10 倍的情况下,也只 检测到较低的非特异性信号,表明本研究建立的方法具有 优异的选择性。此外本研究还验证了该检测方法的重复性,



注: A: SEB 质量浓度对检测体系荧光强度的影响; B: 荧光强度与 SEB 浓度的线性拟合分析。 图 5 不同 SEB 质量浓度的荧光响应结果

Fig.5 Fluorescence response results for different SEB mass concentrations

| | 表 1 | 不同检测方法的性能比较 |
|---------|-------------|---|
| Table 1 | Performance | comparison of different detection methods |

| | - | | | |
|-----------------------|-------------|---------------------|-----------------------|------|
| 检测方法 | 检出限/(ng/mL) | 线性范围/(ng/mL) | 相关系数(r ²) | 参考文献 |
| 夹心化学发光免疫测定法 | 1.44 | 3.12~50.0 | 0.9887 | [28] |
| 夹心免疫测定法 | 2.47 | 4~250 | 0.996 | [29] |
| 电化学免疫测定法 | 0.24 | 2~512 | 0.998 | [30] |
| 荧光适配体传感技术 | 0.33 | 3.13~100 | 0.986 | [31] |
| 三明治免疫测定法 | 5 | 50~250 | — | [32] |
| 纳米金"Turn-on"型荧光生物传感技术 | 0.062 | $10^{-1} \sim 10^4$ | 0.995 | 本研究 |

注: —表示文献未提出。



图 6 检测体系的特异性和重复性

Fig.6 Specificity and stability of the assay system

选择低、中、高浓度的 SEB 进行 5 次重复实验, 如图 6B 所示:多次检测不同质量浓度 SEB 的荧光响应值几乎没有 变化, 且相对标准偏差小于 8.4%, 表明本研究设计的检测

2.6 实际样品检测

方法具有良好的重复性。

为评估所提出的荧光适配体传感器的实际适用性, 采用3种质量浓度(1、10、100 ng/mL)的 SEB 对牛奶样品 进行加标回收,通过计算加标回收率评价检测方法的准确 性。由表2可知,3种浓度 SEB 检测的平均回收率分别为 108.0%、93.0%和91.2%,相对标准偏差在2.6%~5.2%范围 之间。以上结果表明,本研究设计的检测方法具有可接受 的准确性和可靠性,在牛奶样品的检测中表现出良好的应 用潜力。

表 2 牛奶样品中添加 SEB 的回收率 Table 2 Recoveries of spiked SEB in milk samples

| | | • | | • |
|----|------------------|------------------|-----------|--------------|
| 样品 | 添加水平 /(ng/mL) | 检出水平 /(ng/mL) | 回收率 /% | 相对标准 偏差/% |
| | 1 | 1.08 | 108.0 | 3.1 |
| 牛奶 | 10 | 9.30 | 93.0 | 5.2 |
| | 100 | 91.20 | 91.2 | 2.6 |

注: ---表示未检测出。

3 讨论与结论

综上所述,本研究构建了一种基于纳米金"Turn-on" 型荧光生物传感检测方法,可实现牛奶中 SEB 的简便、灵 敏测定。利用 AuNPs 的荧光猝灭效应和良好的生物相容性 对靶标进行检测,同时利用核酸适配体与靶标的高亲和力 来解决方法的特异性问题。在最佳实验条件下,SEB 在 10⁻¹~10⁴ ng/mL 的动态范围内表现出良好的线性关系,检 出限为 0.062 ng/mL。本研究设计的荧光适配体传感器检测 牛奶实际样品的回收率为 91.2%~108.0%。与大多数现有的 检测方法相比,该系统的检出限较低,线性范围较广,具 有快速、灵敏、操作简便且重复性较好的优异性能。此外, 该传感器成功应用于牛奶样品中 SEB 的检测,这为食品安 全监测平台提供了新的选择,是现有技术方法的有益补充, 在食品安全领域具有较好的应用前景。

参考文献

- TIAN LL, LI CH, YE QC, et al. A centrifugal microfluidic chip for point-of-care testing of staphylococcal enterotoxin B in complex matrices [J]. Nanoscale, 2022, 14(4): 1380–1385.
- [2] ABRIL AG, VILLA TG, BARROS-VELAZQUEZ J, et al. Staphylococcus aureus exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis [J]. Toxins, 2020, 12(9): 537.
- [3] CHEN H, ZHANG J, HE Y, et al. Exploring the role of Staphylococcus

aureus in inflammatory diseases [J]. Toxins, 2022, 14(7): 464.

- [4] ZHANG J, WANG J, JIN J, et al. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis [J]. Food Res Int, 2022, 162: 111969.
- [5] ABDEEN EE, MOUSA WS, SALAM SYA, et al. Antibiogram and phylogenetic diversity of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains from milk products and public health implications [J]. Saud J Biol Sci, 2020, 27(8): 1968–1974.
- [6] NAIMUSHIN AN, SOELBERG SD, NGUYEN DK, et al. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor [J]. Biosens Bioelectron, 2002, 17(6–7): 573–584.
- [7] MURATOVIC AZ, HAGSTROM T, ROSEN J, et al. Quantitative analysis of staphylococcal enterotoxins A and B in food matrices using ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. Toxins, 2015, 7(9): 3637–3656.
- [8] JANG JH, KIM S, KIM SG, et al. A sensitive immunodetection assay using antibodies specific to staphylococcal enterotoxin B produced by baculovirus expression [J]. Biosensors-Basel, 2022, 12(10): 787.
- [9] AITICHOU M, HENKENS R, SULTANA AM, et al. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxin A and B genes with PCR-EIA and a hand-held electrochemical sensor [J]. Mol Cell Probe, 2004, 18(6): 373–377.
- [10] MAO K, ZHANG H, WANG Z, et al. Nanomaterial-based aptamer sensors for arsenic detection [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 148: 111785.
- [11] BAI Y, SHU T, SU L, et al. Functional nucleic acid-based fluorescence polarization/anisotropy biosensors for detection of biomarkers [J]. Anal Bioanal Chem, 2020, 412(25): 6655–6665.
- [12] XU R, OUYANG L, CHEN H, et al. Recent advances in biomolecular detection based on aptamers and nanoparticles [J]. Biosensors-Basel, 2023, 13(4): 474.
- [13] HU L, FU X, KONG G, et al. DNAzyme-gold nanoparticle-based probes for biosensing and bioimaging [J]. J Mater Chem B, 2020, 8(41): 9449–9465.
- [14] NOORANIAN S, MOHAMMADINEJAD A, MOHAJERI T, et al. Biosensors based on aptamer-conjugated gold nanoparticles: A review [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2022, 69(4): 1517–1534.
- [15] GOUD KY, KAILASA SK, KUMAR V, et al. Progress on nanostructured electrochemical sensors and their recognition elements for detection of mycotoxins: A review [J]. Biosens Bioelectron, 2018, 121: 205–222.
- [16] WEI X, MA P, IMRAN MAHMOOD K, et al. Screening of a high-affinity aptamer for aflatoxin M₁ and development of its colorimetric aptasensor [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(19): 7546–7556.
- [17] YANG C, ABBAS F, RHOUATI A, *et al.* Design of a quencher-free fluorescent aptasensor for ochratoxin A detection in red wine based on the guanine-quenching ability [J]. Biosensors-Basel, 2022, 12(5): 297.
- [18] LI M, LIN H, PAIDI SK, et al. A fluorescence and surface-enhanced raman spectroscopic dual-modal aptasensor for sensitive detection of

cyanotoxins [J]. ACS Sens, 2020, 5(5): 1419-1426.

- [19] AHMADI A, DANESH NM, RAMEZANI M, et al. A rapid and simple ratiometric fluorescent sensor for patulin detection based on a stabilized DNA duplex probe containing less amount of aptamer-involved base pairs [J]. Talanta, 2019, 204: 641–646.
- [20] TAGHDISI SM, DANESH NM, RAMEZANI M, et al. A new amplified fluorescent aptasensor based on hairpin structure of G-quadruplex oligonucleotide-Aptamer chimera and silica nanoparticles for sensitive detection of aflatoxin B₁ in the grape juice [J]. Food Chem, 2018, 268: 342–346.
- [21] YANG C, CHU X, ZENG L, et al. Development of fluorescent aptasensors based on g-quadruplex quenching ability for ochratoxin A and potassium ions detection [J]. Biosensors-Basel, 2022, 12(6): 423.
- [22] CHANG X, CHENG Y, WANG X, et al. A novel ultrasensitive and fast aptamer biosensor of SEB based on AuNPs-assisted metal-enhanced fluorescence [J]. Sci Total Environ, 2023, 858(Pt 2): 159977.
- [23] BOISSELIER E, ASTRUC D. Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity [J]. Chem Soc Rev, 2009, 38(6): 1759–1782.
- [24] LIU B, LIU J. Freezing directed construction of bio/Nano interfaces: Reagentless conjugation, denser spherical nucleic acids, and better nanoflares [J]. J Am Chem Soc, 2017, 139(28): 9471–9474.
- [25] 韩振宇,孙铁强,刘颖,等.基于局域表面等离子共振的比色法用于食品质量安全检测的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(14): 5568-5576.

HAN ZY, SUN TQ, LIU Y, *et al.* Research progress of colorimetry based on local surface plasmon resonance in food quality and safety detection [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(14): 5568–5576.

- [26] ANZALONE A, GABRIEL M, ESTRADA LC, et al. Spectral properties of single gold nanoparticles in close proximity to biological fluorophores excited by 2-photon excitation [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124975.
- [27] 王小娟,任舒悦,高志贤,等.金纳米粒子-DNA 折纸组装体的构建及 对 17β-雌二醇的检测[J].食品安全质量检测学报,2022,13(11): 3460-3466.

WANG XJ, REN SY, GAO ZX, *et al.* Construction of gold nanoparticle-DNA origami assemblies and application for detecting 17β -estradiol [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(11): 3460–3466.

- [28] SUN T, ZHAO Z, LIU W, et al. Development of sandwich chemiluminescent immunoassay based on an anti-staphylococcal enterotoxin B nanobody-alkaline phosphatase fusion protein for detection of staphylococcal enterotoxin B [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1108: 28–36.
- [29] JI Y, CHEN L, WANG Y, et al. Development of a double nanobody-based sandwich immunoassay for the detecting staphylococcal enterotoxin C in dairy products [J]. Foods, 2021, 10(10): 2426.
- [30] DENG R, WANG L, YI G, et al. Target-induced aptamer release strategy based on electrochemical detection of staphylococcal enterotoxin B using GNPs-ZrO₂-Chits film [J]. Colloid Surface B, 2014, 120: 1–7.
- [31] XU Y, HUO B, SUN X, et al. Rapid detection of staphylococcal enterotoxin B in milk samples based on fluorescence hybridization chain reaction amplification [J]. RSC Adv, 2018, 8(29): 16024–16031.
- [32] MUDILI V, MAKAM SS, SUNDARARAJ N, et al. A novel IgY-aptamer hybrid system for cost-effective detection of SEB and its evaluation on food and clinical samples [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15151.

(责任编辑:张晓寒郑 丽)

作者简介



王美玲,硕士,主要研究方向为营养 与食品卫生学。 E-mail: 1311968639@qq.com



高志贤,研究员,主要研究方向为食 品安全快速检测。 E-mail: gaozhx@163.com



罗 鹏,教授,主要研究方向为营养 与食品卫生学。 E-mail: luopeng@gmc.edu.cn