

核酸适配体技术在食品中霉菌毒素检测的研究进展

杜兵耀^{1,2,3,4}, 文芳^{1,3,4,*}, 王加启^{1,3,4}, 郑楠^{1,3,4}, 张养东^{1,3,4}, 赵圣国^{1,3,4}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部奶产品质量安全风险评估实验室(北京), 北京 100193;
2. 新疆农业大学动物科学学院, 乌鲁木齐 830052; 3. 农业部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京), 北京 100193;
4. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:近年来,我国食品质量安全事件频发,对人们的身体健康构成严重威胁,人们对食品质量安全也逐渐重视起来。核酸适配体是利用指数富集的配基系统进化技术体外筛选得到的单链DNA或RNA片段,能特异性地结合目标分子。具有操作简单、灵敏度高、选择性好、检测成本低等优点,已经广泛地应用于食品中蛋白质、霉菌毒素等方面的检测。本文主要综述了核酸适配体技术检测食品中霉菌毒素的研究进展。

关键词:核酸适配体;检测;食品;霉菌毒素

Advances in the Application of Aptamers to Detect Mycotoxin in Foods

DU Bingyao^{1,2,3,4}, WEN Fang^{1,3,4,*}, WANG Jiaqi^{1,3,4}, ZHENG Nan^{1,3,4}, ZHANG Yangdong^{1,3,4}, ZHAO Shengguo^{1,3,4}

(1. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Dairy Products (Beijing), Ministry of Agriculture, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Ürümqi 830052, China; 3. Milk and Dairy Product Inspection Center (Beijing), Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China; 4. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In recent years, food quality and safety events have occurred frequently in China and they have posed serious health hazards. Consequently, there are rising concerns about the issue of food safety and quality. Aptamers are single-stranded DNA or RNA molecules obtained by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). They possess high affinity to target molecules. Aptamers have the advantages of low cost, simple operation, high sensitivity and selectivity. Therefore, they have been applied for the determination of proteins and mycotoxins. This paper reviews the latest advances in the application of aptamer-based methods for the detection of mycotoxins in foods.

Key words: nucleic acid aptamer; detection; food; mycotoxin

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201617039

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2016)17-0230-06

引文格式:

杜兵耀, 文芳, 王加启, 等. 核酸适配体技术在食品中霉菌毒素检测的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 230-235.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201617039. <http://www.spkx.net.cn>

DU Bingyao, WEN Fang, WANG Jiaqi, et al. Advances in the application of aptamers to detect mycotoxin in foods[J]. Food Science, 2016, 37(17): 230-235. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201617039. <http://www.spkx.net.cn>

随着科学技术的突飞猛进和人们生活水平的日益提高,人们对食品安全日益重视起来。尤其近年来食品安全事件频发,像“三聚氰胺”事件、“霉菌毒素超标”事件,严重威胁着人们的健康与生命安全^[1-2]。霉菌毒素

是由真菌或霉菌产生的次级代谢产物,农作物在加工、存放过程中很容易被霉菌毒素污染^[3]。联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)调查发现全球约有1/4的作物有真菌污

收稿日期: 2016-01-04

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(21305158); 国家现代农业(奶牛)产业技术体系建设专项(nycytx-04-01); 中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IAS12)

作者简介: 杜兵耀(1990—),男,硕士,主要从事奶牛营养与牛奶质量安全研究。E-mail: bingyaochina@163.com

*通信作者: 文芳(1985—),女,助理研究员,博士,主要从事牛奶质量安全研究。E-mail: bnu104@126.com

染。目前发现的霉菌毒素已经超过400种,其分子结构复杂、分析难度大,是具有致癌、致畸等强毒性的化合物,当摄入一定量被污染的食物后,会对人体健康造成严重的伤害,引发多种中毒症状,甚至死亡^[4-5]。

1 传统的霉菌毒素检测方法

食品中常见的霉菌毒素有黄曲霉毒素M₁ (aflatoxin M₁, AFM₁)、赭曲霉毒素A (ochratoxin A, OTA)、玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN)、T-2毒素、HT-2毒素 (HT-2 toxin) 以及伏马菌素 (fumonisin B₁, FB₁)^[6-7]。由于它们易造成食品的污染,对人体健康构成很大的威胁,因此食品中霉菌毒素的污染已经成为我国重点关注的一个问题。为加强对食品中霉菌毒素的检测,国家已经设置了不同食品中霉菌毒素的限量标准^[8-9]。传统的霉菌毒素检测方法有薄层色谱法、酶联免疫 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法和高效液相色谱法等^[10-16]。表1列举了对OTA、黄曲霉毒素B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、AFM₁、FB₁、ZEN常见传统的检测方法。这些检测方法具有一定的准确性和灵敏度,但是也存在操作过程复杂、成本高、前处理时间长等缺陷,因此需要开发一种具有操作简单、灵敏度高、选择性好、检测成本低等优点的检测方法用于食品中霉菌毒素的检测。

表1 传统的霉菌毒素检测方法

Table 1 Traditional methods for the detection of mycotoxins

检测目标	检测方法	基质	检出限	参考文献
OTA	利用免疫亲和柱和高效液相色谱技术结合荧光检测	药食两用食品	1 µg/kg	[17]
OTA	利用免疫亲和柱净化样品后采用高效液相色谱-荧光检测	中药	0.8 µg/kg	[18]
OTA	利用氨基羧基琥珀酸制备OTA-牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的偶联物,在胶金垫上喷有金标抗体,在硝酸纤维素膜 (nitrocellulose filter membrane, NC) 上喷有偶联了BSA的OTA和驴抗小鼠二抗	标准品	10 µg/L	[19]
AFB ₁	利用AFB ₁ 的抗体建立的ELISA检测	饲料	1.04 µg/L	[20]
AFB ₁	利用羧基超顺磁珠与抗AFB ₁ 的抗体偶联的方法	酱油	0.05 µg/kg	[21]
AFB ₁	基于侧流免疫层析技术利用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,金颗粒标记单克隆抗体制成金标偶联物作为结合垫,特异性抗原 (AFB ₁ -BSA) 和羊抗小鼠IgG二抗分别作为检测线和控制线	莲子	2.5 µg/L	[22]
AFM ₁	利用ELISA测定生乳中的AFM ₁	生鲜乳	0.5 µg/kg	[23]
AFM ₁	利用在线固相萃取富集-高效液相色谱技术	牛奶	0.04 µg/kg	[24]
FB ₁	运用戊二醛法合成伏马菌素-孔雀绿蛋白免疫抗原,采用单克隆抗体技术进行抗体的制备,建立了ELISA的测定方法	玉米	0.051 mg/L	[25]
FB ₁	以钼孔血蓝蛋白为载体,采用碳化亚二胺法人工合成FB ₁ 抗原,免疫大白兔获得特异性良好的抗FB ₁ 多克隆抗体;建立FB ₁ 的间接竞争ELISA	谷物	1.1 µg/L	[26]
ZEN	利用胶体金试纸条对样品中的ZEN进行系统检测	谷物	5 µg/kg	[27]
ZEN	采用棋盘滴定法确定化学发光检测的最佳工作条件,建立化学发光的检测方法并对实际样品进行检测	谷物	0.15 µg/kg	[28]

2 核酸适配体霉菌毒素检测方法

核酸适配体最早在1990年由Ellington等^[29]提出。核酸

适配体是体外人工筛选得到的单链DNA或RNA片段,碱基数一般在20~100个左右,在筛选过程中,通过将目标与随机核酸文库孵育,分离得到可以与靶标有高亲和力的核酸序列,然后将它扩增并进入下一次的筛选^[30-31]。对于大多数的靶标,一般经过8~15轮的孵育筛选,就可以得到与靶标具有很强结合力的核酸,最后进行核酸分子的测序检测以验证得到核酸适配体的序列^[32-34]。核酸适配体在分子探针设计中作为信号识别单元,结构灵活多变,它与靶标分子作用后结构可发生改变或重构,是实现信号转导的最佳选择,可以用于多种目标物的测定,包括蛋白质、细胞、霉菌毒素、重金属等^[35-36],与抗体相比,适配体化学和物理结构稳定,可以体外生成,不受自然和物理条件的限制,从而受到研究者们广泛的关注,因此,核酸适配体检测技术成为食品中霉菌毒素快速检测的新方法^[37]。近年来随着分子生物学技术的不断发展,核酸适配体技术已经被广泛应用于多个研究领域中,并发挥着至关重要的作用。目前,研究者们已经对霉菌毒素OTA、AFB₁、AFM₁、FB₁、ZEN等筛选出相关的适配体 (表2),应用于进一步的检测。表3列举了利用核酸适配体技术对OTA、AFB₁、AFM₁、FB₁、ZEN进行检测的方法。

表2 常见霉菌毒素的适配体

Table 2 Aptamers for common mycotoxins

目标名称	序列 (5'→3')	参考文献
OTA	GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGA GCATCGGACA	[38]
AFB ₁	GTTGGGCACGTGTGTCTCTCTGTGTCT CGTGCCCTTCGCTAGGCCACACA	[39]
AFM ₁	ATCCGTCACACCTGCTCTGACGCTGGG GTCGACCCGGAGAAATGCATTTC CCCTGTGGTGTGGCTCCCGTAT	[40]
FB ₁	ATACCAGCTTATTCAATTAATCGCATT ACCTTATACCAGCTTATTCAATTAC GTCTGCACATACCAGCTTATTCAATTA GATAGTAAGTGCAATCT	[41]
ZEN	GGAATTCCTTGATGTTGCCTGGGATTGT TTGGCCCTTGTGTTTTCTTCGCT TCCAACCTAGTAGGATCCCGAA	[42]

表3 基于核酸适配体的方法检测霉菌毒素

Table 3 Aptamer-based methods for the detection of mycotoxins

检测目标	检测方法	基质	检出限	参考文献
OTA	利用纳米-石墨适配体和脱氧核酶混合放大的策略	红酒	8.06 µg/L	[43]
OTA	结合核酸外切酶T7信号放大和聚苯乙烯纳米粒子放大开发新的荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 适配体传感器	缓冲液	0.01 ng/L	[44]
AFB ₁	利用一种超灵敏的比色法的策略进行检测	谷物	0.1 µg/L	[45]
AFB ₁	采用AFB ₁ 适配体作为分子识别元件,与适配体互补的DNA作为信号产生模板通过实时定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 进行信号放大	米粉和羊草	25 pg/L	[46]
AFM ₁	通过传感器表面硅烷化处理,抗体被固定到1,4-苯二异硫氰酸酯上,并利用微阵列电极进行辣根过氧化物酶的检测作为信号,建立微阵列电极免疫传感器	牛奶	8 ng/L	[47]
AFM ₁	利用间接竞争ELISA反应,金标记的AFM ₁ 抗体固定到丝网印刷电极上,实现信号放大,建立了阻抗型免疫传感器	牛奶	15 ng/L	[48]
FB ₁	利用金纳米颗粒和荧光纳米颗粒标记在分子信标两端组成荧光共振能量转移体系,在适配体体系的作用下进行FB ₁ 的检测	玉米	10 ng/L	[49]
FB ₁	基于金纳米离子和石墨烯的信号放大检测FB ₁	小麦	1 ng/L	[50]
ZEN	适配体和ZEN的单克隆抗体具有高度的特异性和亲和力,纯化过的ZEN的单克隆抗体被包被到微孔板上作为靶标识别元件进行检测	玉米	0.01 µg/L	[42]

3 核酸适配体技术在食品中霉菌毒素检测方面的应用

核酸适配体含有高特异性的功能识别元件, 由于其独特的三维结构, 适配体绑定靶标分子的时候利用不同的空间结构和折叠模式, 具有高度的亲和性和特异性, 且合成简单、靶标广泛^[51-52], 在食品检测中具有良好的应用前景。近年来, 随着核酸适配体技术知识的增加, 核酸适配体技术被广泛用于分析霉菌毒素。

3.1 在OTA检测中的应用

随着科学技术的不断发展, 具有高度特异性和高亲和力的OTA的适配体已经被筛选出来, 并显示出了良好的应用前景。Wei Yin等^[43]利用纳米-石墨适配体和脱氧核酶混合放大检测OTA。筛选出来OTA的适配体的5'端被羧基荧光素标记, 纳米-石墨可以有效地猝灭OTA适配体上标记的羧基荧光素, 对OTA而言, 当加入OTA时, OTA诱导适配体发生构象的变化, 和适配体结合折叠成反向平行的G-四链体结构, 从而脱离纳米石墨烯的表面而保留强的荧光。由于G-四链体可以被DNA脱氧核酶裂解, 导致OTA的释放, 释放出的OTA重新和其他羧基荧光素标记的适配体结合在纳米石墨烯的表面, 导致荧光染料标记的适配体从纳米石墨烯表面的连续释放, 从而导致信号的放大。在优化的条件下, 该传感器具有很高的灵敏度, 检出限达到8.06 $\mu\text{g/L}$ 。Huang Yong等^[44]等结合核酸外切酶T7信号放大和聚苯乙烯纳米粒子放大开发新的FP适配体传感器。荧光染料标记的DNA绑定到PS NP上, 靶标和适配体的发夹结构结合, 发生构象的变化, 导致颈的分离, 从而和荧光标记的DNA结合, 核酸外切酶T7可以从双链DNA的5'端有选择性的裂解中荧光标记的DNA链。这导致荧光信号的大幅下降, 放大传感过程, 实现信号放大。该方法开发的适配体传感器对于靶标分子具有很高的特异性, 表现出的灵敏度比传统均质传感器的灵敏度高出5个数量级, 检出限达到0.01 ng/L。Jorge等^[53]建立荧光标记的适配体传感器用于OTA的检测, 该方法克服了荧光猝灭系统和稳定状态不能修饰适配体和靶标的缺点, 可以用于快速灵敏的检测OTA, 检出限达到2.15 $\mu\text{g/L}$ 。Jo等^[54]研究基于化学发光共振能量转移体系的适配体用于OTA的检测, 适配体序列的5'链接脱氧核酶, 3'修饰猝灭荧光基团, 当加入血红素和靶标后, 猝灭基团标记的适配体形成G-四链体结构。其中G-四链体血红素的复合物具有辣根过氧化物酶的活性, 因此 H_2O_2 存在时, 辣根过氧化物酶模拟脱氧核酶的催化功能, 在供体和猝灭荧光基团间形成能量转移, 猝灭发光信号。信号值随着靶标质量浓度的增加而降低, 线性范围为0.1~100 $\mu\text{g/L}$, 检出限为0.22 $\mu\text{g/L}$ 。

3.2 在AFB₁检测中的应用

随着人们对AFB₁的研究, 目前已经筛选出AFB₁的

具有特异性高、亲和力强的核酸适配体, 并得到了广泛应用。Seok等^[45]利用一种超灵敏的比色法的策略进行AFB₁的检测。部分血红素结合脱氧核酶绑定AFB₁的适配体生成一个比色传感器。当没有AFB₁时, 过氧化物酶模拟脱氧核酶的催化活性产生颜色的变化。当存在AFB₁时, 通过适配体元件特异性的识别AFB₁导致适配体中脱氧核酶复合物结构的改变, 引起脱氧核酶的分裂, 导致过氧化物酶的活性降低, 检出限达到0.1 $\mu\text{g/L}$ 。该技术结合核酸适配体特异性的靶标通过脱氧核酶产生肉眼可见颜色信号, 操作简单。Guo Xiaodong等^[46]利用简单、灵敏、可靠的核酸适配体用于AFB₁的检测, AFB₁适配体作为分子识别元件, 与适配体互补的DNA作为信号产生模版, 通过实时定量PCR进行信号放大。生物素标记的适配体固定到链霉亲和素包被的PCR管的表面, 单链的DNA和单链的适配体的互补部分杂交形成双链的复合物固定到PCR管的表面, 当AFB₁存在时, 诱导AFB₁和适配体的结合, 互补的单链DNA被释放, 形成AFB₁和适配体的复合物, 通过实时定量PCR的信号放大导致单链DNA的减少, AFB₁的浓度与PCR放大的信号相关, 因此可以用来量化AFB₁的浓度。线性检测范围为 $5 \times 10^{-5} \sim 5 \mu\text{g/L}$, 检出限为25 pg/L。Castillo等^[55]开发的传感器利用循环伏安法和电化学阻抗光谱法通过氧化还原反应指示剂 $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ 来获取信号响应。聚胺树状大分子固定在金电极的表面, 利用氨基修饰的单链DNA适配体特异性的结合到AFB₁, 灵敏度高、重现性好, 检出限达到0.125 $\mu\text{g/L}$ 。Lu Zhisong等^[56]建立的适配体利用石墨烯对荧光CdTe量子点的猝灭, 巯基修饰的AFB₁的适配体连接到量子点的表面, 通过适配体修饰的量子点荧光被石墨烯猝灭。当AFB₁存在时, 荧光恢复, 荧光恢复程度取决于AFB₁的浓度。线性检测范围为 $0.99 \sim 9.9 \times 10^4 \mu\text{g/L}$, 检出限达到0.312 $\mu\text{g/L}$ 。徐霞^[57]以适配体作为分子识别元件, 建立了简单快速金纳米棒局域等离子共振吸收光谱和动态光散射的传感器方法检测AFB₁。功能化的金纳米棒-AFB₁-BSA偶合物与AFB₁的抗体混合后聚集, 导致金纳米棒吸收强度的降低, 从而产生传感器信号。当抗体质量浓度为15 mg/L时, 检出限为0.035 $\mu\text{g/L}$ 。

3.3 在AFM₁检测中的应用

近年来, 随着核酸适配体技术的快速发展, 利用核酸适配体技术对AFM₁检测方法的研究也引起人们极大的兴趣。Parker等^[47]建立了微阵列电极免疫传感器进行牛奶中AFM₁的检测, 传感器表面硅烷化处理后, 抗体被固定到1,4-苯二异硫氰酸酯上, 并利用微阵列电极进行辣根过氧化物酶的检测作为信号, 线性检测范围为10~100 ng/L, 检出限达到8 ng/L, 灵敏度高, 满足国家规定的最大残留限量。Vig等^[48]建立的阻抗型免疫传感器进行AFM₁的检

测,利用间接竞争ELISA反应,胶体金标记的AFM₁抗体固定到丝网印刷电极上,通过在胶体金上电沉积银实现信号放大,电荷的转移与AFM₁呈良好的线性关系。线性范围为15~1000 ng/L,检出限为15 ng/L。Dinckaya等^[58]利用一种新型的DNA生物传感器检测AFM₁。将巯基修饰的单链DNA探针固定到半胱胺自组装膜和纳米金颗粒修饰的电极上,特异性的结合AFM₁,通过电化学阻抗技术和伏安法进行监测K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]溶液作为氧化还原反应的探针进行电化学的测量。虽然线性检测范围只有1~14 μg/L,但检出限低、灵敏度高。Binh等^[59]用Fe₃O₄-聚苯胺聚合在微电极表面,固定的适配体作为特异性的捕获元件和磁性纳米粒子作为信号放大元件构建AFM₁的电化学传感器。作用时,AFM₁的适配体在Fe₃O₄-聚苯胺的表面发生电化学信号的变化。该方法策略简单、灵敏度高,线性范围在6~60 ng/L,检出限达到1.98 ng/L。Paniel等^[60]开发了一种电化学免疫传感器用于牛奶中黄曲霉毒素的检测。该传感器使用辣根过氧化物酶作为标记,将AFM₁抗体固定到磁选纳米颗粒上。含有AFM₁的样品与一定量的抗体和示踪剂(AFM₁共轭到辣根过氧化物酶)发生竞争,直到达到平衡状态,实现AFM₁的自动分析,检出限达到0.01 μg/L。Paniel等^[61]设计了一个电化学传感器用于牛奶中AFM₁的检测。利用DNA适配体作为识别元件和电化学阻抗进行检测,六乙二醇修饰的适配体序列固定到碳丝网印刷电极上,表面活化后,在亚铁氰化物探针存在的条件下,黄曲霉毒素和适配体相互作用诱导电子转移,电子的转移与黄曲霉毒素的质量浓度呈线性关系,线性范围为2~150 ng/L,检出限为1.15 ng/L。

3.4 在FB₁检测中的应用

由于FB₁引起的食品污染现象的广泛存在,以及它的致癌作用而引起世界范围内的广泛关注。因此灵敏高效快捷的检测FB₁的方法相继被开发出来。吴世嘉^[49]利用金纳米颗粒和荧光纳米颗粒标记在分子信标两端组成荧光共振能量转移体系,在适配体体系和磁分离富集效应的作用下进行FB₁的检测,检出限为0.01 μg/L,在此基础上利用石墨烯氧化物作为荧光能量受体,同时猝灭多种不同的荧光能量供体,建立了多重荧光共振能量转移体系,同时检测FB₁和OTA,检出限分别达到0.1 μg/L和0.02 μg/L,实现了多霉菌毒素的同时检测。Shi Zhiyu等^[50]基于金纳米离子和石墨烯的信号放大检测FB₁,金纳米离子修饰在电极的表面增加导电性,探针DNA和适配体杂交作为伏马菌素特定的信号识别元件,大量的纳米粒子作为探针附着在石墨烯的表面实现信号的增强。线性范围为1~1×10⁶ ng/L,检出限为1 ng/L。Sun Yue等^[62]以光子晶体悬浮阵列液相载体,FB₁和OTA的适配体被固定到光子晶体的表面,当样品中存在靶标时,适配体中荧

光标记的互补DNA序列与靶标结合,形成复合物,导致荧光强度的减弱,而荧光信号的强弱取决于霉菌毒素的浓度,从而达到多霉菌毒素检测的效果。线性范围分别为0.001~1 mg/L和0.01~1 μg/L。

3.5 在ZEN检测中的应用

ZEN具有致癌性和雌激素作用,引起DNA的损伤,主要作用于人和动物的生殖系统。欧盟规定婴幼儿食品中的最大残留限量为20 μg/kg。因此需要高灵敏度、快速、简单的检测方法用于食品中ZEN的检测。Wang Yuankai等^[42]利用单链的DNA适配体和ZEN的单克隆抗体具有高度的特异性和亲和力,纯化过的ZEN单克隆抗体被包被到微孔板上作为靶标识别元件。适配体和单克隆抗体的亲和力的测定通过生物素-酶链亲和素-辣根过氧化物酶系统。经过15轮的筛选,获得具有高亲和力的适配体。用于检测玉米中的ZEN,检出限为0.01 μg/L,回收率为95%~105%。

4 结 语

在食品安全的检测分析中,传统的霉菌毒素的检测方法由于前处理程序复杂、仪器设备昂贵、操作困难、成本高等缺点。而核酸适配体由于特异性强、灵敏度高、操作简单、体积小、成本低等诸多优势广泛受到研究者的关注。目前,核酸适配体在食品安全的检测中涉及微生物、霉菌毒素、重金属离子、蛋白质等领域,研究者已经开发了很多简单、快速、低耗、灵敏的核酸适配体用于霉菌毒素的检测,对于加强食品安全、保证人体健康,发挥着重要的作用。

参考文献:

- [1] 郭利亚,王加启,李发弟. 浅析我国生鲜乳质量安全监管及对策食品安全[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(12): 42-45.
- [2] 徐慧萍,李翠霞. 我国乳品质量安全的影响因素分析[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(8): 5-8.
- [3] OPLATOWSKA S M, HAUGHEY S A, CHEVALLIER O P, et al. Determination of the mycotoxin content in distiller's dried grain with solubles using a multianalyte UHPLC-MS/MS method[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(43): 9441; 9451. DOI:10.1021/acs.jafc.5b03844.
- [4] IQBAL S Z, JINAPA S, PIROUZA A A. Aflatoxin M₁ in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 46(1): 110-119. DOI:10.1016/j.tifs.2015.08.005.
- [5] SELVARAJ J N, WANG Yan, ZHOU Lu, et al. Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: a review[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2015, 32(4): 440-452. DOI:10.1080/19440049.2015.1010185.
- [6] 杜兵耀,臧长江,马晨,等. 生鲜乳检测技术的研究进展[J]. 天津农业科学, 2015, 21(9): 80-84. DOI:10.3969/j.issn.1006-6500.2015.09.018.

- [7] CHEN Xiujuan, HUANG Yukun, DUAN Nuo, et al. Selection and characterization of single stranded DNA aptamers recognizing fumonisin B₁[J]. *Microchimica Acta*, 2014, 181(11): 1317-1324. DOI:10.1007/s00604-014-1260-3.
- [8] 郑楠, 李松励, 徐晓敏, 等. 牛奶中霉菌毒素风险排序[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(增刊1): 9-11.
- [9] GB 2761—2011 食品中真菌毒素限量[S].
- [10] OSTRY V, SKARKOVA J. Development of an HPTLC method for the determination of deoxynivalenol in cereal products[J]. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2000, 13(6): 443-446.
- [11] MARAGOS C M. Recent advances in the development of novel materials for mycotoxin analysis[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(5): 1205-1213. DOI:10.1007/s00216-009-2728-6.
- [12] YANG Yang, ZHANG Hongxing, GAO Jingyu, et al. Determination of natural occurrence of ochratoxin A in naked oats of China by HPLC[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2012, 24(11): 5349-5351.
- [13] GEANA E I, IORDACHE A M, IONETE R E. Ochratoxin A occurrence in romanian wines[J]. *Revista de Chimie*, 2012, 63(9): 883-886.
- [14] AYDIN H, OGUZ H. Analyzes of aflatoxin B₁ and zearalenone in corn silage by high performance thin layer chromatography (HPTLC)-fluorodensitometric method[J]. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 2012, 18(1): 151-156.
- [15] DAHLEEN L S, MORGAN W, MITTAL S, et al. Quantitative trait loci (QTL) for fusarium ELISA compared to QTL for fusarium head blight resistance and deoxynivalenol content in barley[J]. *Plant Breeding*, 2012, 131(2): 237-243. DOI:10.1111/j.1439-0523.2012.01952.x.
- [16] RUBERT J, SOLER C, MANES J. Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(1): 176-183. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.12.035.
- [17] 傅武胜, 邱文倩, 郑奎城, 等. 药食两用类食品中赭曲霉毒素A的高效液相色谱-荧光检测方法[J]. *食品科学*, 2011, 32(14): 298-302.
- [18] 杨蕾. 中药中赭曲霉毒素A的检测方法研究[D]. 北京: 中国医学科学院, 2010.
- [19] 赖卫华, 熊勇华, 陈高明, 等. 应用胶体金试纸条快速检测赭曲霉毒素A的研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(5): 204-207.
- [20] 谢琿, 章先, 王歆, 等. 黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的制备及间接竞争ELISA检测技术研究[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(10): 2033-2040. DOI:10.13344/j.microbiol.china.141030.
- [21] 谢芳, 赖卫华, 史爱武, 等. 免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油中黄曲霉毒素B₁[J]. *食品科学*, 2013, 34(18): 165-169. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201318033.
- [22] 杨英, 谢艳君, 孔维军, 等. 基于侧流免疫层析技术制备胶体金试纸条检测莲子中黄曲霉毒素B₁的研究[J]. *中南药学*, 2015, 13(3): 246-250.
- [23] 蒙君丽, 宋荪阳, 郑百芹, 等. 酶联免疫法对生鲜乳中黄曲霉毒素M₁的快速检测[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(增刊1): 39-41.
- [24] 丁俭. 牛奶中黄曲霉毒素M₁和食用植物油中赭曲霉毒素A检测技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 11-20.
- [25] 薛秋艳. 抗伏马毒素FB₁单克隆抗体的制备及其检测方法的建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2010: 39-47.
- [26] 刘师文, 何庆华, 邹龙, 等. 谷物中伏马菌素B₁酶联免疫分析法的建立[J]. *食品科学*, 2010, 31(18): 350-354.
- [27] 贾寅, 杨宏伟. 胶体金快速定量法检测粮食中玉米赤霉烯酮[J]. *粮食科技与经济*, 2016, 41(1): 35-38.
- [28] 邱云青, 王伟, 李凤琴. 食品中玉米赤霉烯酮化学发光酶免疫方法建立[J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(12): 1561-1564.
- [29] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346: 818-822. DOI:10.1038/346818a0.
- [30] CHEN J H, FANG Z Y, LIU J, et al. A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer[J]. *Food Control*, 2012, 25(2): 555-560. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.11.039.
- [31] RHOATIA A, PANIELA N, MERAIHI Z, et al. Development of an oligosorbent for detection of ochratoxin A[J]. *Food Control*, 2011, 22(11): 1790-1796. DOI:10.1016/J.Foodcont.2011.04.021.
- [32] VANBRABANT J, LEIRS K, VANSCHOENBEEK K, et al. reMelting curve analysis as a tool for enrichment monitoring in the SELEX process[J]. *Analyst*, 2014, 139: 589-595. DOI:10.1039/c3an01884a.
- [33] TOLLE F, WILKE J, WENGEL J, et al. By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e114693. DOI:10.1371/journal.pone.0114693.
- [34] IÊDA M F, CAMILA M S L, LÍGIA S F, et al. Selection of peptidoglycan-specific aptamers for bacterial cells identification[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(7): 2548-2556. DOI:10.1007/s12010-014-1206-6.
- [35] FENG Chunjing, DAI Shuang, WANG Lei. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: a review[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 59: 64-74. DOI:10.1016/j.bios.2014.03.014.
- [36] BAO Ting, SHU Huawei, WEN Wei, et al. A sensitive electrochemical aptasensor for ATP detection based on exonuclease III-assisted signal amplification strategy[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 862: 64-69. DOI:10.1016/j.aca.2014.12.049.
- [37] TANG D, LIU B, NIESSNER R, et al. Target-induced displacement reaction accompanying cargo release from magnetic mesoporous silica nanocontainers for fluorescence immunoassay[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(21): 10589-10596. DOI:10.1021/ac402713a.
- [38] CRUZ-AGUADO J A, PENNER G. Determination of ochratoxin a with a dna aptamer[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(22): 10456-10461. DOI:10.1021/jf801957h.
- [39] VENTURES N. Biotechnology Limited. DNA ligands for aflatoxin and zearalenone, WO/2011020198[P]. 2011-02-24.
- [40] MALHOTRA S, PANDEY A K, RAJPUT Y S, et al. Selection of aptamers for aflatoxin M₁ and their characterization[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2014, 27(8): 493-500. DOI:10.1002/jmr.2370.
- [41] McKEAGUE M, BRADLEY C R, de GIROLAMO A, et al. Screening and initial binding assessment of fumonisin B₁ aptamers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(12): 4864-4881. DOI:10.3390/ijms11124864.
- [42] WANG Yuankai, ZOU Qi, SUN Jianhe, et al. Screening of single-stranded DNA(ssDNA) aptamers against a zearalenone monoclonal antibody and development of a ssdnabased enzyme-linked oligonucleotide assay for determination of zearalenone in corn[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(1): 136-141. DOI:10.1021/jf503733g.
- [43] WEI Yin, ZHANG Ji, WANG Xu, et al. Amplified fluorescent aptasensor through catalytic recycling for highly sensitive detection of ochratoxin A[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 65: 16-25. DOI:10.1016/j.bios.2014.09.100.
- [44] HUANG Yong, LIU Xiaoqian, SHI Ming, et al. Ultrasensitive fluorescence polarization aptasensors based on exonuclease signal amplification and polystyrene nanoparticle amplification[J]. *Chemistry: An Asian Journal*, 2014, 9(10): 2755-2760. DOI:10.1002/asia.201402563.
- [45] SEOK Y G, 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. DOI:10.1016/j.aca.2015.05.041.

- [46] GUO Xiaodong, WEN Fang, ZHENG Nan, et al. Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B₁[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 15(56): 340-344. DOI:10.1016/j.bios.2014.01.045.
- [47] PARKER C O, LANYON Y H, MANNING M, et al. Electrochemical immunochip sensor for aflatoxin M₁ detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(13): 5291-5298. DOI:10.1021/ac900511e.
- [48] VIG A, MUÑOZ-BERBEL X, GYEMANT G, et al. Impedimetric aflatoxin M₁ immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, 138(1): 214-220. DOI:10.1016/j.snb.2008.12.033.
- [49] 吴世嘉. 基于上转换荧光纳米探针的高灵敏微生物毒素检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 76-90.
- [50] SHI Zhiyu, ZHENG Yating, ZHANG Haobo, et al. DNA electrochemical aptasensor for detecting fumonisins B₁ based on graphene and thionine nanocomposite[J]. *Electroanalysis*, 2015, 27(5): 1097-1103. DOI:10.1002/elan.201400504.
- [51] FAN D W, GUO C J, MA H M, et al. Facile fabrication of an aptasensor for thrombin based on graphitic carbon nitride/TiO₂ with high visible-light photoelectrochemical activity[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 75(15): 116-122. DOI:10.1016/j.bios.2015.08.029.
- [52] LI Y, XU J Y, WANG L K, et al. Aptamer-based fluorescent detection of bisphenol A using nonconjugated gold nanoparticles and CdTe quantum dots[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 222: 815-822. DOI:10.1016/j.snb.2015.08.130.
- [53] JORGE C A, GREGORY P. Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(22): 8853-8855. DOI:10.1021/ac8017058.
- [54] JO E J, MUN H, KIM S J, et al. Detection of ochratoxin A (OTA) in coffee using chemiluminescence resonance energy transfer (CRET) aptasensor[J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 1102-1107. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.07.152.
- [55] CASTILLO G, SPINELLA K, POTURNAYOV A, et al. Detection of aflatoxin B₁ by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform[J]. *Food Control*, 2015, 52: 9-18. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.12.008.
- [56] LU Z S, CHEN X J, WANG Y, et al. Aptamer based fluorescence recovery assay for aflatoxin B₁ using a quencher system composed of quantum dots and graphene oxide[J]. *Microchimica Acta*, 2015, 182(3): 571-578. DOI:10.1007/s00604-014-1360-0.
- [57] 徐霞. 农产品中真菌毒素检测用新型光学纳米生物传感器的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 69-92.
- [58] DINCKAYA E, KINIK Ö, SEZGINTÜRK M K, et al. Development of an impedimetric aflatoxin M₁ biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26(9): 3806-3811. DOI:10.1016/j.bios.2011.02.038.
- [59] BINH N H, LAM T D, QUAN D P, et al. Label-free detection of aflatoxin M₁ with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor[J]. *Materials Science and Engineering C*, 2013, 33: 2229-2234. DOI:10.1016/j.msec.2013.01.044.
- [60] PANIEL N, RADOI A, MARTY J L. Development of an electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M₁ in milk[J]. *Sensors*, 2010, 10(10): 9439-9448. DOI:10.3390/s101009439.
- [61] ISTAMBOULIE J, PANIEL P, ZARA L, et al. Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M₁ in milk[J]. *Talanta*, 2016, 146: 464-469. DOI:10.1016/j.talanta.2015.09.012.
- [62] SUN Yue, XU Jie, LI Wei, et al. Simultaneous detection of ochratoxin A and fumonisin B₁ in cereal samples using an aptamer photonic crystal encoded suspension array[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(23): 11797-11802. DOI:10.1021/ac503355n.