

# Fe<sup>3+</sup>掺杂聚多巴胺纳米球荧光适配体传感器对小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测

路念<sup>1,2,3</sup>, 马骥<sup>1,2,3,4</sup>, 成军虎<sup>1,2,3</sup>, 孙大文<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510641; 2. 华南理工大学现代食品工程研究中心, 广东 广州 510006;  
3. 广东省冷链食品智能感知与过程控制工程技术研究中心, 广东省农产品智能冷链物流设备工程实验室, 广东 广州 510006;  
4. 华南理工大学发光材料与器件国家重点实验室, 广东 广州 510640)

**摘要:** 目的: 构建一种基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理的荧光适配体传感器, 用于检测小麦中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)。通过掺入Fe<sup>3+</sup>提高传感器中聚多巴胺纳米球 (polydopamine nanospheres, PDANS) 对6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein, FAM) 的猝灭能力。方法: 标记有FAM的DON核酸适配体 ( $P_{DON}$ ) 通过π-π堆积的非共价作用吸附到Fe-PDANS上, 由于FRET, FAM的荧光被Fe-PDANS猝灭。在DON存在的情况下,  $P_{DON}$ 可以和DON特异性结合, 改变 $P_{DON}$ 的构象, 使其难以吸附到Fe-PDANS上, 从而增强传感器的荧光信号, 实现对DON的检测。结果: 该传感器在DON质量浓度0.266 7~133.3 ng/mL范围内具有良好的线性关系, 其检出限为0.118 2 ng/mL; 同时, 对阳性小麦中的DON进行检测, 其检测结果与酶联免疫检测法所得结果无显著差异 ( $P>0.05$ )。结论: 所构建的荧光适配体传感器反应快速、灵敏, 且具有良好的特异性和重复性, 提供了检测小麦中DON的新方法。

**关键词:** 核酸适配体; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 铁掺杂聚多巴胺纳米球; 荧光传感器

A Fluorescent Aptasensor Based on Fe<sup>3+</sup> Doped Polydopamine Nanospheres for Detection of Deoxynivalenol in Wheat

LU Nian<sup>1,2,3</sup>, MA Ji<sup>1,2,3,4</sup>, CHENG Junhu<sup>1,2,3</sup>, SUN Da-wen<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China; 2. Academy of Contemporary Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 3. Engineering and Technological Research Centre of Guangdong Province on Intelligent Sensing and Process Control of Cold Chain Foods, Guangdong Province Engineering Laboratory for Intelligent Cold Chain Logistics Equipment for Agricultural Products, Guangzhou 510006, China;  
4. State Key Laboratory of Luminescent Materials and Devices, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Objective: A fluorescent aptasensor based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) was constructed for the detection of deoxynivalenol (DON) in wheat. The ability of polydopamine nanospheres (PDANS) in the sensor to quench 6-carboxyfluorescein (FAM) was improved by doping with Fe<sup>3+</sup>. Methods: FAM labeled DON aptamer ( $P_{DON}$ ) was adsorbed on the surface of PDANS (Fe-PDANS) doped with Fe<sup>3+</sup> via π-π stacking non-covalent interactions, and Fe-PDANS quenched the fluorescence of FAM through FRET. In the presence of DON,  $P_{DON}$  could specifically combine with DON, changing the conformation of  $P_{DON}$ , making it difficult to adsorb onto Fe-PDANS, and finally enhancing the fluorescence signal of the sensor for the detection of DON. Results: The aptasensor exhibited a linear range from 0.266 7 to 133.3 ng/mL for DON, and the detection limit was 0.118 2 ng/mL. The results of this aptasensor for DON in positive wheat samples were not significantly different ( $P>0.05$ ) from those obtained by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Conclusion: The fluorescent aptasensor is characterized by rapid detection, excellent sensitivity, high specificity and good repeatability, which will provide a new method for the detection of DON in wheat.

**Keywords:** aptamer; deoxynivalenol; Fe<sup>3+</sup> doped polydopamine nanospheres; fluorescent sensor

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220228-241

中图分类号: TS207

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 04-0313-08

收稿日期: 2022-02-28

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021A1515110396)

第一作者简介: 路念 (1998—) (ORCID: 0000-0003-1200-1994), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品有害物快速检测。

E-mail: 1072817462@qq.com

\*通信作者简介: 孙大文 (1960—) (ORCID: 0000-0002-3634-9963), 男, 教授, 博士, 研究方向为先进冷冻冷链技术、食品安全检测及其控制技术、先进食品加工技术。E-mail: fedwsun@scut.edu.cn

引文格式:

路念, 马骥, 成军虎, 等.  $\text{Fe}^{3+}$ 掺杂聚多巴胺纳米球荧光适配体传感器对小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测[J]. 食品科学, 2023, 44(4): 313-320. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220228-241. <http://www.spkx.net.cn>

LU Nian, MA Ji, CHENG Junhu, et al. A fluorescent aptasensor based on  $\text{Fe}^{3+}$  doped polydopamine nanospheres for detection of deoxynivalenol in wheat[J]. Food Science, 2023, 44(4): 313-320. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220228-241. <http://www.spkx.net.cn>

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON), 是黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)产生的高毒性次级代谢产物, 属于单端孢霉烯B族化合物<sup>[1]</sup>。因为该种毒素可以引起猪产生呕吐症状, 故又命名为呕吐毒素。DON的主要污染对象为小麦、玉米、燕麦等农副产品<sup>[2-4]</sup>, 且容易引起动物的拒食反应, 还具有免疫毒性、器官毒性、抑制蛋白合成和致畸性等毒性作用<sup>[5-6]</sup>。此外, DON具有很强的热稳定性, 一般的食品加工和烹饪方法均不能破坏其毒性<sup>[7-8]</sup>, 对食品安全存在隐患。DON是粮食库中小麦等农副产品入库的必要检测指标之一。

目前DON的测定方法主要有液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)法<sup>[9-10]</sup>、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法<sup>[11-12]</sup>、薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)法等<sup>[13-14]</sup>, 这些方法虽然具有高准确性、高灵敏性、高选择性等优势, 但所需设备昂贵、样品前处理繁琐, 且需要专门的技术操作人员。酶联免疫检测法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)具有成本低、操作简便、灵敏度高、样品前处理简单等优势, 但抗体与酶易变质, 且存在非特异性反应、假阳性等问题<sup>[15]</sup>。因此, 开发一种简单、灵敏、快速且准确性高的DON检测方法具有十分重要的意义。

荧光分析方法是一种基于荧光信号探针的荧光强度对物质进行分析的方法, 近年来被广泛应用于生物医学诊断<sup>[16]</sup>、环境检测<sup>[17]</sup>、食品安全检测<sup>[18-20]</sup>等方面。核酸适配体是利用指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术从核酸分子文库中得到的一段寡聚核苷酸序列(DNA或RNA), 它能与目标物质高特异性、高选择性地结合<sup>[21]</sup>。此外, 核酸适配体还具有分子质量小、易于修饰功能性基团等特点, 因此被广泛应用于生物传感器领域<sup>[22]</sup>。聚多巴胺纳米球(polydopamine nanospheres, PDANS)是一种由多巴胺在碱性条件下发生自聚集形成的类黑色素聚合物, 具有良好的生物相容性和生物降解性。有研究表明PDANS对氨基甲基香豆素乙酸酯、6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM)、6-羧基四甲基罗丹明和Cy5具有优异的猝灭能力<sup>[23]</sup>。基于上述优点, 研究者们利用PDANS作为猝灭剂设计了多种荧光适配体传

感器用于对DNA、RNA、蛋白质、真菌毒素等物质进行检测<sup>[24-28]</sup>。然而, 将基于PDANS的荧光适配体传感器用于食品中DON的检测鲜见报道。

本研究利用PDANS材料高效的猝灭性能, 结合核酸适配体的特异性识别能力, 通过掺入 $\text{Fe}^{3+}$ 提高PDANS对FAM的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)效率, 从而提高PDANS对FAM的荧光猝灭效率, 构建一种荧光适配体传感器用于DON的检测。该传感器设计简单、响应快速, 可用于小麦中DON的定量检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

盐酸多巴胺、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、NaCl、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、KCl、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  上海麦克林生化科技有限公司; DON、 $\text{NH}_4\text{OH}$ (质量分数25%) 美国Sigma-Aldrich公司; 玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、黄曲霉毒素G<sub>1</sub>(aflatoxin G<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>)、黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(flatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 坛墨质检科技股份有限公司; DON核酸适配体(5'-FAM-GCA TCA CTA CAG TCA TTA CGC ATC GTA GGG GGG ATC GTT AAG GAA GTG CCC GGA GGC GGT ATC GTG TGA AGT GCT GTC CC-3')由生工生物工程(上海)股份有限公司合成及纯化。所用试剂均为分析纯, 实验用水均为超纯水(18.2 MΩ·cm)。

### 1.2 仪器与设备

Merlin高分辨场发射扫描电子显微镜 德国Zeiss公司; Nicolet Is50傅里叶变换红外光谱仪 美国ThermoFisher公司; UV-1800紫外-可见分光光度计、RF-6000荧光分光光度计 日本岛津公司; 圆二色光谱仪英国Applied Photophysics Ltd.公司; SCIENTZ-18N冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; JW-3024HR高速冷冻离心机 安徽嘉文仪器装备有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 传感器的构建

适当修改已报道文献<sup>[29]</sup>的方法, 合成了PDANS。将24 mL无水乙醇与56 mL超纯水混合均匀后, 加入0.8 mL氨水溶液( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 25%)并在室温下搅拌30 min, 然

后加入200 mg盐酸多巴胺，持续搅拌30 h后于9 000 r/min离心20 min，收集沉淀并用超纯水洗涤3次，冻干后获得PDANS，并于4 °C保存备用。合成Fe<sup>3+</sup>掺杂聚多巴胺纳米(Fe-PDANS)的方法与合成PDANS相似，区别是在加入盐酸多巴胺的同时加入0.8 mL 10 mg/mL FeCl<sub>3</sub>溶液，其他步骤不变。

将40 μL 100 nmol/L标记有FAM的DON核酸适配体(P<sub>DON</sub>)和40 μL 1 μg/mL的DON溶液于37 °C振荡孵育30 min，然后加入35 μL 1 mg/mL Fe-PDANS继续振荡孵育35 min，最后将溶液体积补充至1 500 μL。

### 1.3.2 实验可行性验证

#### 1.3.2.1 圆二色谱测定

通过圆二色谱验证DON和P<sub>DON</sub>间的结合作用。吸取500 μL 100 nmol/L P<sub>DON</sub>分别和500 μL 1.5、2 μg/mL和2.5 μg/mL DON于37 °C反应30 min，将该溶液在1 cm路径长度的石英比色皿中进行圆二色谱测定，分析该混合物的椭圆度光谱，并与作为参考的100 nmol/L P<sub>DON</sub>的光谱进行比较。

#### 1.3.2.2 荧光发射光谱扫描

荧光扫描参数设置激发波长为470 nm，发射波长测量范围为490~650 nm，激发带宽和发射带宽均为5 nm，记录520 nm波长下的最佳荧光发射强度。将测量体系仅存在P<sub>DON</sub>时的荧光强度记为F<sub>0</sub>，测量体系不存在DON时加入Fe-PDANS后的荧光强度记为F<sub>1</sub>，测量体系存在DON时加入Fe-PDANS后的荧光强度记为F<sub>2</sub>。

#### 1.3.3 反应条件优化

为了获得最佳的传感性能，优化反应条件，包括Fe-PDANS合成过程中Fe<sup>3+</sup>掺入量、DON检测过程中Fe-PDANS加入量、Fe-PDANS和P<sub>DON</sub>孵育时间。

##### 1.3.3.1 Fe<sup>3+</sup>掺入量对P<sub>DON</sub>猝灭性能的影响

在Fe-PDANS的合成过程中，分别加入0、0.2、0.4、0.8 mL和1.0 mL 10 mg/mL的FeCl<sub>3</sub>溶液，制备Fe<sup>3+</sup>掺入量相当于盐酸多巴胺加入量1%、2%、3%、4%和5%的Fe-PDANS。使用上述不同Fe<sup>3+</sup>掺入量的Fe-PDANS构建传感器并对传感器进行荧光扫描。经重复实验，根据所得荧光强度计算Fe-PDANS对P<sub>DON</sub>的猝灭效率Q，通过比较猝灭效率得出最佳的Fe<sup>3+</sup>掺入量。

$$Q/\% = \frac{F_0 - F_1}{F_0} \times 100$$

式中：F<sub>0</sub>为测量体系仅存在P<sub>DON</sub>时的荧光强度；F<sub>1</sub>为测量体系不存在DON时的荧光强度；F<sub>2</sub>为测量体系存在DON时的荧光强度。

##### 1.3.3.2 Fe-PDANS加入量的优化

将40 μL 100 nmol/L P<sub>DON</sub>和40 μL 1 μg/mL DON溶液于37 °C振荡孵育30 min，分别加入10、15、20、25、30、35、40、45 μL 1 mg/mL Fe-PDANS，振荡孵育30 min

后取出，将溶液体积补充至1 500 μL后进行荧光扫描。经重复实验，选取最佳的荧光强度比值(F<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>)所对应的Fe-PDANS用于构建传感器。

##### 1.3.3.3 Fe-PDANS与P<sub>DON</sub>的孵育时间优化

将40 μL 100 nmol/L P<sub>DON</sub>和40 μL 1 μg/mL DON溶液于37 °C振荡孵育30 min，然后加入35 μL Fe-PDANS分别振荡孵育10、15、20、25、30、35、40 min和45 min后取出，将溶液体积补充至1 500 μL后进行荧光扫描。经重复实验，选取最佳的F<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>值所对应的孵育时间用于构建传感器。

#### 1.3.4 标准曲线的建立

在上述步骤所得的最优实验条件下分别测定DON质量浓度为0.266 7、1.333、2.667、13.33、26.67 ng/mL和133.3 ng/mL条件下传感器获得的荧光强度，并根据DON质量浓度及F<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>值的关系建立标准曲线并进行比较，考察线性范围以及检出限。

#### 1.3.5 传感器特异性和重复性分析

在上述步骤所得的最优实验条件下构建传感器，分别检测1 μg/mL DON、1 μg/mL ZEN、1 μg/mL AFG<sub>1</sub>、1 μg/mL AFB<sub>1</sub>。经重复实验，分析比较DON以及其他毒素存在时传感器的荧光强度比值，以评估所构建传感器对DON的特异性。

在相同条件下，连续6 d用所构建的传感器测量1 μg/mL的DON，每批检测重复3次，以评估传感器的重复性。

#### 1.3.6 阳性样品检测

根据呕吐毒素检测试剂盒中的方法对小麦进行预处理。将受DON污染的小麦经研磨机磨碎后称取2 g于50 mL离心管中，加入10 mL水，置于涡旋振荡器中振荡5 min，于4 000 r/min离心10 min后收集上清液于干净的容器中，得到阳性样品。然后使用ELISA和本研究的方法对阳性样品分别进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 实验原理

利用Fe-PDANS材料高效的猝灭性能、P<sub>DON</sub>的识别能力和Fe-PDANS对P<sub>DON</sub>的吸附能力，构建一种基于FRET的荧光适配体传感器。其检测原理如图1所示。

当体系中不存在DON时，向体系中加入Fe-PDANS后，单链P<sub>DON</sub>通过其碱基芳香环结构与Fe-PDANS间通过π-π堆积的非共价作用吸附到Fe-PDANS上，形成P<sub>DON</sub>/Fe-PDANS复合物。此时，由于FAM与Fe-PDANS间的FRET作用，FAM的荧光被Fe-PDANS猝灭，此时传感体系的荧光信号较弱。当体系中存在DON时，P<sub>DON</sub>将会首先与DON特异性结合，其空间构象发生改变，阻碍了P<sub>DON</sub>与Fe-PDANS间的π-π堆积的非共价作用，从而使得FAM的荧光不能被Fe-PDANS所猝灭，产生荧光信号。

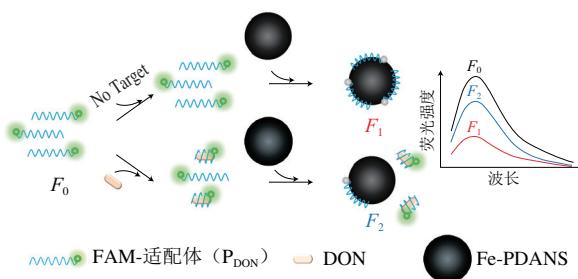
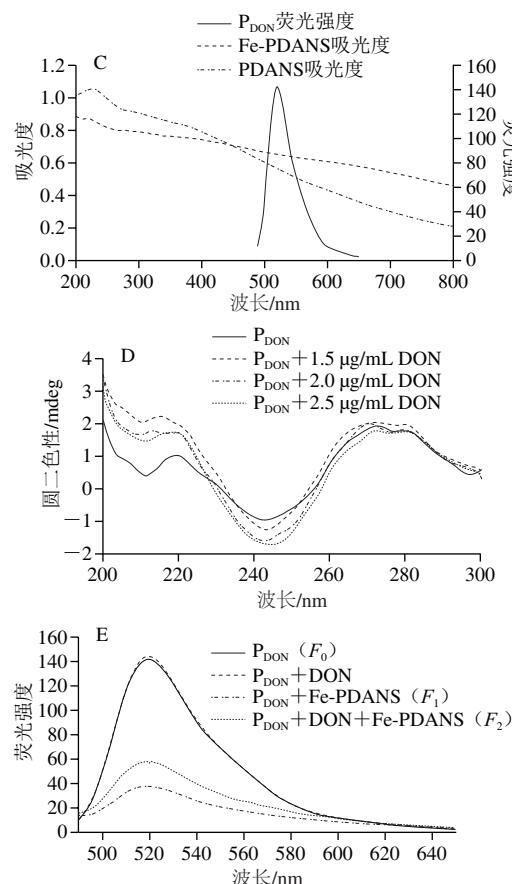
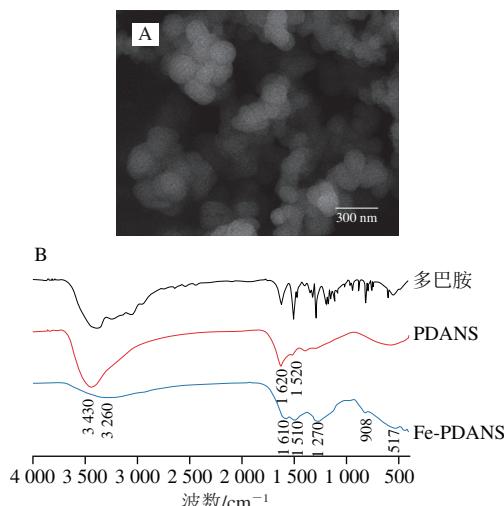


图1 基于Fe-PDANS的荧光适配体传感器对DON检测原理图  
Fig. 1 Schematic illustration of the fluorescent aptasensor based on polydopamine nanospheres for DON detection

## 2.2 验证实验的可行性

### 2.2.1 Fe-PDANS的形貌及光谱表征

利用扫描电镜观察Fe-PDANS的形貌及粒径,如图2A所示,Fe-PDANS维持着较好的球形,尺寸约为170 nm。图2B是多巴胺、PDANS和Fe-PDANS的傅里叶红外光谱图,其中,多巴胺在3 370 cm<sup>-1</sup>和3 340 cm<sup>-1</sup>处分别有一个宽峰和一个小峰,对应N—H的伸缩振动峰。PDANS在3 430 cm<sup>-1</sup>处有一个峰,属于N—H的伸缩振动峰;在1 620 cm<sup>-1</sup>处和1 520 cm<sup>-1</sup>处分别有一个峰,为吲哚和吲哚二氢的特征峰,这与相关文献报道一致<sup>[26]</sup>,表明成功合成出PDANS。Fe-PDANS在3 260 cm<sup>-1</sup>处有一个弱峰,且相对于PDANS发生了蓝移。此外,1 610 cm<sup>-1</sup>和1 510 cm<sup>-1</sup>两处的峰也发生了蓝移,表明酚羟基上的氧原子参加了金属配位,间接表明Fe<sup>3+</sup>成功掺杂到PDANS中<sup>[30]</sup>。同时,由图2C可知,PDANS和Fe-PDANS的紫外吸收光谱均与P<sub>DON</sub>的荧光发射光谱存在部分重叠,证明PDANS和Fe-PDANS均可与P<sub>DON</sub>发生FRET效应<sup>[22]</sup>。此外,由于Fe-PDANS的光谱重叠部分大于PDANS的光谱重叠部分,因此Fe-PDANS比PDANS具有更高的FRET效率,这证明掺入Fe<sup>3+</sup>可以提高FRET效率<sup>[22,31]</sup>。上述实验结果表明成功制备出Fe-PDANS,且将其用作P<sub>DON</sub>的猝灭剂可行。



A. Fe-PDANS扫描电镜图; B.多巴胺、PDANS和Fe-PDANS红外光谱图; C. Fe-PDANS的紫外-可见吸收光谱图和P<sub>DON</sub>的荧光发射光谱图; D. FAM-适配体 (P<sub>DON</sub>) 在不同质量浓度DON存在下的圆二色谱图。E. DON检测的荧光发射光谱图。

### 2.2.2 圆二色谱分析

为进一步验证实验原理的可行性,使用圆二色谱仪考察P<sub>DON</sub>与DON孵育引起P<sub>DON</sub>的构象发生变化情况。如图2D所示,P<sub>DON</sub>的圆二色谱显示在243 nm处存在一个负峰,在272 nm处存在一个正峰,表明该适配体形成了具有小发夹结构的主环<sup>[32-33]</sup>。加入DON后,272 nm处的正峰没有显著变化,但243 nm处的负峰随着DON质量浓度的增加而逐渐加深,这是由DON嵌入到P<sub>DON</sub>中,引起螺旋碱基数的增加所导致的<sup>[32,34]</sup>。证明该适配体可以和DON有效结合并导致适配体的空间构象发生改变,从而可以通过改变适配体的空间构象达到阻止其吸附到Fe-PDANS上的目的。

### 2.2.3 传感器荧光光谱分析

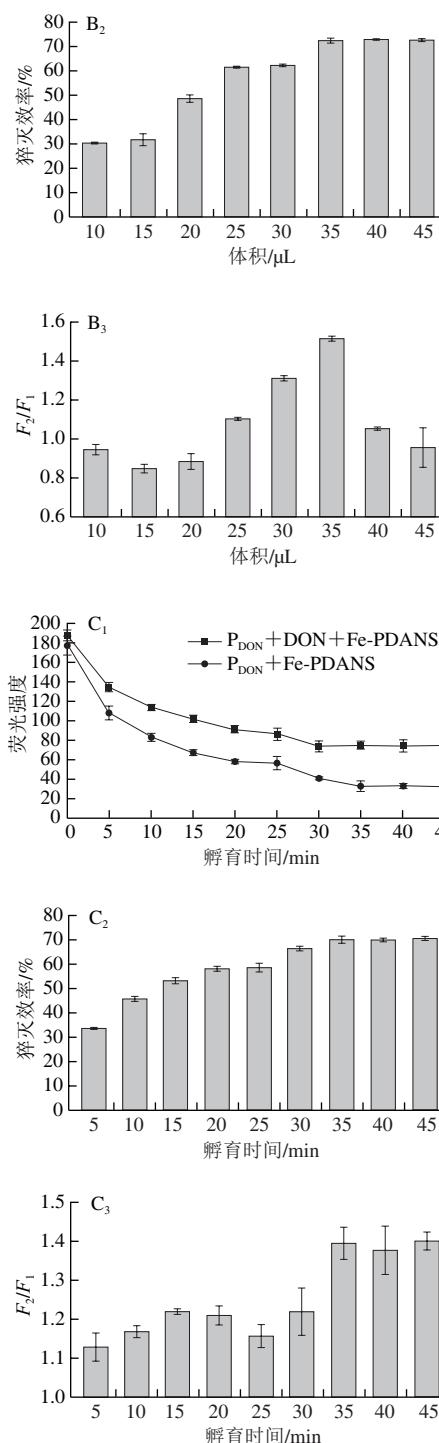
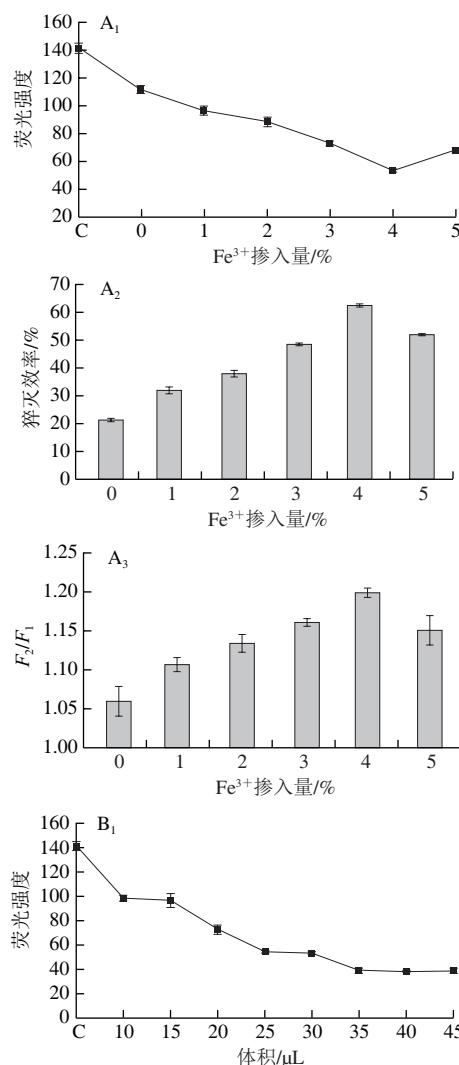
所制备的传感器对DON检测所获得的荧光发射光谱图如图2E所示。在传感器仅存在P<sub>DON</sub>时,荧光强度较高,而在传感器存在P<sub>DON</sub>和DON时,荧光强度与仅存在P<sub>DON</sub>时无明显差别,证明DON与P<sub>DON</sub>结合后对FAM的

发光性能没有影响，可将P<sub>DON</sub>用作传感器的信号探针。当向传感器中加入Fe-PDANS时，在不存在DON的情况下，传感器的荧光被猝灭。在存在DON的情况下，传感器的荧光被猝灭的程度降低，证明DON与P<sub>DON</sub>结合，阻碍了P<sub>DON</sub>与Fe-PDANS间的π-π堆积的非共价作用，从而降低了P<sub>DON</sub>与Fe-PDANS间的FRET效应。这与CD分析所得到的结果一致，进一步表明所构建的传感器具有可行性，能够实现检测DON的目的。

### 2.3 反应条件优化

#### 2.3.1 Fe<sup>3+</sup>掺入量对Fe-PDANS猝灭性能的影响

如图3A所示，P<sub>DON</sub>的荧光强度随着Fe<sup>3+</sup>掺入量的增加而下降，在掺入相当于盐酸多巴胺加入量4%的Fe<sup>3+</sup>时达到最低值，此时Fe-PDANS对P<sub>DON</sub>的荧光猝灭效率最高。此外，如图3A<sub>3</sub>所示，在DON存在的情况下，4% Fe-PDANS具有最高的F<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>值，说明在此条件下传感器具有最佳的检测性能。过少Fe<sup>3+</sup>对Fe-PDANS的猝灭性能有限，而过多Fe<sup>3+</sup>可能会破坏Fe-PDANS的形态，影响到其对P<sub>DON</sub>的吸附作用<sup>[35]</sup>。因此选择掺入4% Fe<sup>3+</sup>的Fe-PDANS作为P<sub>DON</sub>的猝灭剂。



A. Fe<sup>3+</sup>掺入量；B. Fe-PDANS体积；C.孵育时间；  
下标1~3分别表示荧光强度、猝灭效率、  
 $F_2/F_1$ 。C为空白对照，即测量体系中仅存在P<sub>DON</sub>。

图3 传感器制备条件优化

Fig. 3 Selection of optimal preparation conditions for the aptasensor

#### 2.3.2 Fe-PDANS加入量的优化

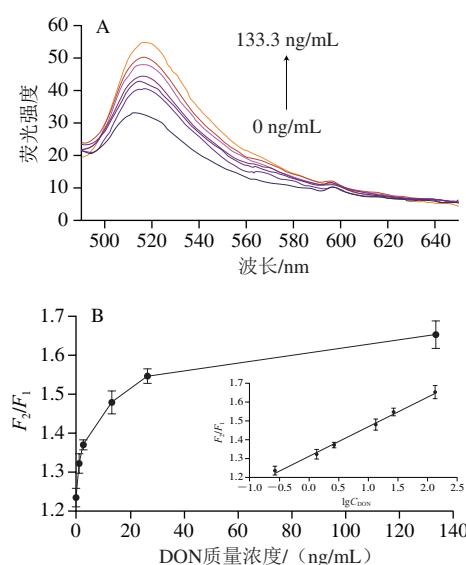
如图3B所示，P<sub>DON</sub>的荧光强度随着Fe-PDANS加入量的增加而逐渐下降，加入量达到35 μL后不再发生变化。相应的，Fe-PDANS对P<sub>DON</sub>的荧光猝灭效率随

着Fe-PDANS加入量的增加而逐渐上升，加入量达到35 μL后不再发生变化。此外，如图3B<sub>3</sub>所示，加入35 μL Fe-PDANS的传感器具有最高的 $F_2/F_1$ 值，在此之后 $F_2/F_1$ 值逐渐下降，这是由于过量的Fe-PDANS会对P<sub>DON</sub>产生过猝灭效应<sup>[36]</sup>。因此选择加入35 μL 1 mg/mL Fe-PDANS来构建传感器，此时传感器中Fe-PDANS终质量浓度为0.023 33 mg/mL。

### 2.3.3 Fe-PDANS与P<sub>DON</sub>孵育时间优化

如图3C所示，传感体系的荧光强度随着时间的延长逐渐下降，在不存在DON的情况下，至35 min时传感体系的荧光强度达到最小值，此后不再发生变化。相应的，Fe-PDANS对P<sub>DON</sub>的猝灭效率随着时间的延长逐渐升高，35 min后不再发生变化，这表明孵育35 min即可使传感体系中所有的P<sub>DON</sub>全部吸附到Fe-PDANS上。而当存在DON时，孵育30 min时传感体系的荧光强度达到最小值，此后不再发生变化。这可能是因为部分P<sub>DON</sub>与DON结合，减少了能与Fe-PDANS结合的P<sub>DON</sub>，因此反应时间缩短。此外，如图3C<sub>3</sub>所示，传感体系的荧光强度比值 $F_2/F_1$ 在35 min达到最佳，表明此时可达到最佳的传感性能。因此，为确保P<sub>DON</sub>可以识别传感体系内所有的DON，选择35 min作为Fe-PDANS与P<sub>DON</sub>的孵育时间。

### 2.4 标准曲线的建立



A.不同DON质量浓度对应的传感器荧光发射光谱（由下至上浓度依次为0、0.266 7、1.333、2.667、13.33、26.67 ng/mL和133.3 ng/mL）。B. DON质量浓度与 $F_2/F_1$ 的线性曲线。

图4 荧光强度与DON质量浓度的关系

Fig. 4 Relationship between fluorescence intensity and DON concentration

通过上述实验结果，在最优的条件下建立传感体系，对0.266 7、1.333、2.667、13.33、26.67 ng/mL和133.3 ng/mL质量浓度的DON进行测试，以研究DON质量

浓度与 $F_2/F_1$ 的相关性。由图4A可知，传感体系的荧光强度随着毒素质量浓度的上升而增强。由图4B可以看出， $F_2/F_1$ 在此质量浓度区间具有良好的线性关系，其线性方程为 $F_2/F_1=0.158 3\lg C_{DON}+1.311 2$  ( $R^2=0.995 4$ )，检出限为0.118 2 ng/mL ( $R_{SN}=3$ )。与现有的用于DON检测的荧光适配体传感器相比，本实验具有较高的灵敏度，表明本实验所制备的传感器具有优越性<sup>[37]</sup>。

### 2.5 传感器的特异性

通过检测质量浓度为1 μg/mL的不同真菌毒素(DON、ZEN、AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub>)评估所构建传感器的特异性。如图5所示，在DON存在的情况下， $F_2/F_1$ 大于1，而在其他毒素的 $F_2/F_1$ 值接近1，这表明该传感器仅与DON相互作用，具有良好的特异性。

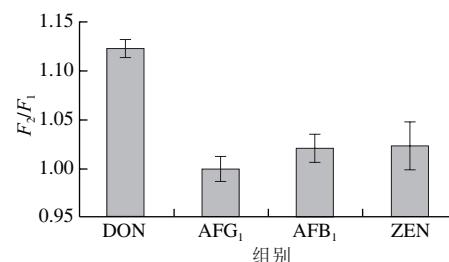


图5 传感器的特异性评估  
Fig. 5 Selectivity assessment of the aptasensor

### 2.6 重复性分析

为考察所制备的传感器的重复性，在最佳条件下，测定6批1 μg/mL DON溶液，结果见表1。相对标准偏差值小于3%，说明该传感器具有良好的重复性。

表1 重复性实验结果

Table 1 Results of repeatability tests

	测定结果/(μg/mL)						相对标准偏差/%
	1	2	3	4	5	6	
	0.987 3	1.016 0	1.035 4	1.058 9	1.014 4	1.022 4	2.605 7

### 2.7 阳性样品中DON的检测

为验证该荧光适配体传感器的可靠性，使用国标方法ELISA和所构建的荧光适配体传感器同时对受DON污染的小麦进行检测，测试结果如表2所示。同时利用统计学方法对两种方法的检测结果进行显著性分析，*t*检验和*f*检验的P值分别为0.451 3和0.529 7，在95%的置信水平下均超过0.05，结果表明，所构建的荧光传感器在精度上与ELISA无显著性差异。证明该荧光适配体传感器可应用于小麦中的DON检测。

表2 阳性小麦样品中DON的检测

Table 2 Results of detection of DON in positive wheat samples

检测方法	ELISA	本实验
测定值/(μg/kg)	124.15±10.105	133.58±16.779

### 3 结 论

利用PDANS材料良好的猝灭性能，以及对DON具有特异性识别能力的核酸适配体，通过掺入 $\text{Fe}^{3+}$ 提高PDANS与核酸适配体上修饰的FAM间的FRET效率，从而提高PDANS对FAM的荧光猝灭效率，构建一种基于FRET的荧光适配体传感器，用于检测DON。该传感器反应快速、灵敏，且具有良好的特异性和重复性，其检出限为0.118 2 ng/mL，对阳性小麦样品中DON的检测结果与ELISA所得结果无显著差异 ( $P>0.05$ )。

### 参考文献：

- [1] MISHRA S, SRIVASTAVA S, DEWANGAN J, et al. Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: a survey[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(8): 1346-1374. DOI:10.1080/10408398.2019.1571479.
- [2] HOLANDA D M, KIM S W. Mycotoxin occurrence, toxicity, and detoxifying agents in pig production with an emphasis on deoxynivalenol[J]. *Toxins*, 2021, 13(2): 1-22. DOI:10.3390/toxins13020171.
- [3] NARVÁEZ A, CASTALDO L, IZZO L, et al. Deoxynivalenol contamination in cereal-based foodstuffs from Spain: systematic review and meta-analysis approach for exposure assessment[J]. *Food Control*, 2022, 132: 1-11. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108521.
- [4] ZHAO L, ZHANG L, XU Z J, et al. Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, deoxynivalenol and zearalenone in feeds in China during 2018–2020[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, 12(1): 1-12. DOI:10.1186/s40104-021-00603-0.
- [5] SOBROVA P, ADAM V, VASATKOVA A, et al. Deoxynivalenol and its toxicity[J]. *Interdisciplinary Toxicology*, 2010, 3(3): 94-99. DOI:10.2478/v10102-010-0019-x.
- [6] 李国林, 薛华丽, 毕阳, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的毒性及脱毒研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 380-384. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2013.24.089.
- [7] MISHRA S, DIXIT S, DWIVEDI P D, et al. Influence of temperature and pH on the degradation of deoxynivalenol (DON) in aqueous medium: comparative cytotoxicity of DON and degraded product[J]. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2014, 31(1): 121-131. DOI:10.1080/1944049.2013.861613.
- [8] 蔡硕, 王周利, 岳田利, 等. 谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇控制的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(4): 1267-1275. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.04.002.
- [9] PANASIUK L, JEDZINIAK P, PIETRUSZKA K, et al. Simultaneous determination of deoxynivalenol, its modified forms, nivalenol and fusarenone-X in feedstuffs by the liquid chromatography-tandem mass spectrometry method[J]. *Toxins*, 2020, 12(6): 1-15. DOI:10.3390/toxins12060362.
- [10] 李瑞园, 刘红河, 康莉. HPLC-MS/MS法同时测定粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物[J]. 分析测试学报, 2014, 33(6): 660-665. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2014.06.007.
- [11] CHILDRESS W L, KRULL I S, SELAVKA C M. Determination of deoxynivalenol (DON, vomitoxin) in wheat by high-performance liquid chromatography with photolysis and electrochemical detection (HPLC-hv-EC)[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 1990, 28(2): 76-82. DOI:10.1093/chromsci/28.2.76.
- [12] 刘颖, 金永鹏, 罗荪琳, 等. 高效液相色谱同步检测饲料中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮及呕吐毒素的方法[J]. 动物营养学报, 2021, 33(8): 4684-4693. DOI:10.3939/j.issn.1006-267x.2021.08.047.
- [13] GANESAN A R, MOHAN K, KARTHICKRAJAN D, et al. Distribution, toxicity, interactive effects, and detection of ochratoxin and deoxynivalenol in food: a review[J]. *Food Chemistry*, 2021, 378: 1-12. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131978.
- [14] 冯莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>[J]. 现代畜牧科技, 2018(8): 20. DOI:10.19369/j.cnki.2095-9737.2018.08.012.
- [15] ANFOSSI L, GIOVANNOLI C, BAGGIANI C. Mycotoxin detection[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 37: 120-126. DOI:10.1016/j.copbio.2015.11.005.
- [16] WANG Y, XIA K, WANG L C, et al. Peptide-engineered fluorescent nanomaterials: structure design, function tailoring, and biomedical applications[J]. *Small*, 2021, 17(5): 1-29. DOI:10.1002/smll.202005578.
- [17] WANG G D, LI Y Z, SHI W J, et al. A robust cluster-based Eu-MOF as multi-functional fluorescence sensor for detection of antibiotics and pesticides in water[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 331: 1-9. DOI:10.1016/j.snb.2020.129377.
- [18] WANG C Q, ZHANG W H, QIAN J, et al. A FRET aptasensor for sensitive detection of aflatoxin B<sub>1</sub> based on a novel donor-acceptor pair between ZnS quantum dots and Ag nanocubes[J]. *Analytical Methods*, 2021, 13(4): 462-468. DOI:10.1039/d0ay02017f.
- [19] HAN B, FANG C, SHA L J, et al. Cascade strand displacement reaction-assisted aptamer-based highly sensitive detection of ochratoxin A[J]. *Food Chemistry*, 2021, 338: 1-6. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127827.
- [20] 王琦, 杨庆利, 吴薇. 基于氧化石墨烯的荧光适配体传感器检测食品中真菌毒素[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 318-322. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200907-091.
- [21] RÖTHLISBERGER P, HOLLENSTEIN M. Aptamer chemistry[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 134: 3-21. DOI:10.1016/j.addr.2018.04.007.
- [22] PEHLIVAN Z S, TORABFAM M, KURT H, et al. Aptamer and nanomaterial based FRET biosensors: a review on recent advances (2014–2019)[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(8): 1-22. DOI:10.1007/s00604-019-3659-3.
- [23] QIANG W B, LI W, LI X Q, et al. Bioinspired polydopamine nanospheres: a superquencher for fluorescence sensing of biomolecules[J]. *Chemical Science*, 2014, 5(8): 3018-3024. DOI:10.1039/c4sc00085d.
- [24] XU S H, NIE Y Y, JIANG L P, et al. Polydopamine nanosphere/gold nanocluster (Au NC)-based nanoplateform for dual color simultaneous detection of multiple tumor-related microRNAs with DNase-I-assisted target recycling amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(6): 4039-4045. DOI:10.1021/acs.analchem.7b05253.
- [25] GUO T, WANG C C, ZHOU H Y, et al. A facile aptasensor based on polydopamine nanospheres for high-sensitivity sensing of T-2 toxin[J]. *Analytical Methods*, 2021, 13(24): 2654-2658. DOI:10.1039/dlay00642h.
- [26] QIANG W B, WANG X, LI W, et al. A fluorescent biosensing platform based on the polydopamine nanospheres intergrating with Exonuclease III-assisted target recycling amplification[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 71: 143-149. DOI:10.1016/j.bios.2015.04.029.
- [27] WANG Z X, XING K Y, DING N S, et al. Lateral flow immunoassay based on dual spectral-overlapped fluorescence quenching of

- polydopamine nanospheres for sensitive detection of sulfamethazine[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423: 1-12. DOI:10.1016/j.jhazmat.2021.127204.
- [28] QIANG W B, HU H T, SUN L, et al. Aptamer/polydopamine nanocomplex for *in situ* molecular sensing in living cells[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(24): 12190-12196. DOI:10.1021/acs.analchem.5b03075.
- [29] JIANG X L, WANG Y L, LI M G. Selecting water-alcohol mixed solvent for synthesis of polydopamine nano-spheres using solubility parameter[J]. Scientific Reports, 2014, 4(1): 1-4. DOI:10.1038/srep06070.
- [30] CHEN L, LIN Z J, LIU L Z, et al. Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> ions chelated with ultrasmall polydopamine nanoparticles induce ferroptosis for cancer therapy[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2019, 5(9): 4861-4869. DOI:10.1021/acsbiomaterials.9b00461.
- [31] GUST A, ZANDER A, GIETL A, et al. A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research[J]. Molecules, 2014, 19(10): 15824-15865. DOI:10.3390/molecules191015824.
- [32] CHEN X J, HUANG Y K, DUAN N, et al. Screening and identification of DNA aptamers against T-2 toxin assisted by graphene oxide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(42): 10368-10374. DOI:10.1021/jf5032058.
- [33] LEE B H, NGUYEN V T, GU M B. Highly sensitive detection of 25-hydroxyvitaminD(3) by using a target-induced displacement of aptamer[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 88: 174-180. DOI:10.1016/j.bios.2016.08.011.
- [34] 刘振佳, 司伊康, 陈晓光. 圆二色谱测定技术在小分子化合物与DNA相互作用研究中的应用[J]. 药学学报, 2010, 45(12): 1478-1484. DOI:10.16438/j.0513-4870.2010.12.008.
- [35] QI P, ZHANG D, WAN Y. Morphology-tunable polydopamine nanoparticles and their application in Fe<sup>3+</sup> detection[J]. Talanta, 2017, 170: 173-179. DOI:10.1016/j.talanta.2017.03.093.
- [36] LIU Q, PU Z H, ASIRI A M, et al. Polydopamine nanospheres: a biopolymer-based fluorescent sensing platform for DNA detection[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 191: 567-571. DOI:10.1016/j.snb.2013.10.050.
- [37] QIN M W, ZHANG X M, ZHAO X Y, et al. Complementary chain competition and fluorescence quenching detection of deoxynivalenol and analytical applications using a novel aptamer[J]. Cytotoxicity and Safety of Food, 2021, 19(1): 257-264. DOI:10.1080/19476337.2021.1886176.