

AFM1劈裂适配体的识别能力研究

郑业坤, 杜聪聪, 李泓霖, 郭婷, 张宇昊, 马良

Investigation on the Recognition of Split Aflatoxin M1 Aptamer

ZHENG Yekun, DU Congcong, LI Honglin, GUO Ting, ZHANG Yuhao, and MA Liang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110024>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于还原氧化石墨烯的电化学适配体传感器对黄曲霉毒素M₁的检测

An Electrochemical Aptasensor for Detection of Aflatoxin M₁ Based on Reduced Graphene Oxide

食品工业科技. 2021, 42(14): 249-256 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090147>

两种常用适配体的纳米金比色法快速检测牛奶中黄曲霉毒素M₁的评价研究

Evaluation of Gold Nanoparticles Colorimetric Sensing Based on Two Commonly Aptamer for Rapid Detecting Aflatoxin M₁ in Milk

食品工业科技. 2024, 45(8): 284-292 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050332>

基于铂@金纳米线作为信号放大物的电化学适配体传感器检测黄曲霉毒素

Electrochemical Aptasensor Based on Platinum @ Gold Nanowires as Signal Amplifier for Aflatoxin B1 Detection

食品工业科技. 2023, 44(24): 294-300 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020181>

核酸适配体在食源性致病菌检测中应用的研究进展

Research Progress on Utilization of Nucleic Acid Aptamer in Detection for Foodborne Pathogenic Bacteria

食品工业科技. 2019, 40(9): 315-322 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.09.054>

基于适配体识别的金黄色葡萄球菌定性检测试纸条的研制及应用

Study of Aptamer-Based Lateral Flow Strip and Its Application for Qualitative Detection of *Staphylococcus aureus*

食品工业科技. 2021, 42(19): 291-297 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120169>

电化学生物传感器在黄曲霉毒素检测中的应用研究进展

Application Research Development of Electrochemical Biosensors in Detection of Aflatoxins

食品工业科技. 2019, 40(2): 300-305,311 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.02.052>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

郑业坤, 杜聪聪, 李泓霖, 等. AFM1 劈裂适配体的识别能力研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(19): 296–306. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110024

ZHENG Yekun, DU Congcong, LI Honglin, et al. Investigation on the Recognition of Split Aflatoxin M1 Aptamer[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(19): 296–306. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110024

· 分析检测 ·

AFM1 劈裂适配体的识别能力研究

郑业坤¹, 杜聪聪¹, 李泓霖¹, 郭 婷^{1,2,3}, 张宇昊^{1,2}, 马 良^{1,2,3,*}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715;

2. 川渝共建特色食品重庆市重点实验室, 重庆 400715;

3. 国家市场监管重点实验室(调味品监管技术), 重庆 400715)

摘要: 本研究以黄曲霉毒素 M1 为研究对象, 采用劈裂适配体的方式, 克服适配体构象不稳定造成的灵敏度不高的问题, 利用电化学方法研究劈裂适配体的识别能力及特异性, 并通过圆二色谱初步探究结合机制。结果表明, 将适配体核苷酸链按照 1:1 进行劈裂得到的识别效果最佳, 并且对黄曲霉毒素 M1 具有较高的特异性。劈裂适配体后单独两个片段与 AFM1 作用后圆二色谱图没有改变, 正峰强度明显增大, 负峰移动并且强度增大, 证明适配体构象发生改变。基于劈裂适配体可以改善方法的灵敏度, 通过对完整适配体进行劈裂, 得到了构建传感器的更佳识别元件。本研究为提高适配体快速检测方法的灵敏度提供了一种新思路。

关键词: 黄曲霉毒素 M1, 劈裂适配体, 识别能力, 电化学

中图分类号: O657.1; TS207.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2024)19-0296-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110024



本文网刊:

Investigation on the Recognition of Split Aflatoxin M1 Aptamer

ZHENG Yekun¹, DU Congcong¹, LI Honglin¹, GUO Ting^{1,2,3}, ZHANG Yuhao^{1,2}, MA Liang^{1,2,3,*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-built by Sichuan and Chongqing, Chongqing 400715, China;

3. Key Laboratory of Condiment Supervision Technology for State Market Regulation, Chongqing 400715, China)

Abstract: In this work, AFM1 was chosen as the target, and the aptamer was split to solve the low sensitivity due to unstable structure of the aptamer. The recognition ability and specificity of the split aptamer were evaluated using electrochemical methods, and the binding mechanism was explored through the circular dichroism. The results showed that the split aptamer employing a 1:1 split mode exhibited the best performance in the recognition and specificity for AFM1. The circular dichroism spectrum remained unchanged. The positive peak intensity of the circular dichroism spectrum increased significantly and the negative peak moved and the intensity increased, which demonstrated that the conformation of the aptamer changed. The sensitivity was enhanced by employing split aptamers. Superior recognition elements for the construction of sensors was obtained by the fragmentation of intact aptamers. The investigation provides a new idea to enhance the sensitivity of the detection methods based on the aptamer.

Key words: aflatoxin M1; split aptamer; recognition ability; electrochemistry

随着人们生活水平的提高, 乳及乳制品已成为重要的消费品之一, 其安全性受到社会广泛关注, 而黄曲霉毒素 M1 (Aflatoxin M1, AFM1) 是影响乳及乳制品安全的主要因素。AFM1 具有致畸、致癌、致突变的作用, 被国际癌症机构列为 I 类致癌物, 严重

危害人类健康。另外, AFM1 热稳定性很强, 不能通过巴氏灭菌、超高温杀菌等加工方式将其降解^[1-3]。因此, 构建快速、灵敏的 AFM1 检测方法对于保障人体健康具有重要意义。

由于适配体的高灵敏、高稳定性及低成本等特

收稿日期: 2023-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072137); 国家自然科学基金联合基金项目 (U22A20551); 重庆市自然科学基金 (cstc2021jcyj-msxmX0371)。

作者简介: 郑业坤 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: zykl181497117@163.com。

* 通信作者: 马良 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: zhyhml@163.com。

点, 基于适配体的快速检测技术发展迅速。自发现 AFM1 适配体可通过 SELEX 法成功筛选后^[4-6], 科研人员已成功构建了多种基于 AFM1 适配体的快速检测传感器^[7-10]。Sameiyan 等^[11] 基于二价适配体-适配体互补链(Bivalent binding aptamer-cDNA, BBA-cDNA)结构及二硫化钼(MoS₂)构建一种新型荧光适配体传感器检测 AFM1。与之前研究不同^[12-13], 实验中 BBA-cDNA 结构未破坏, cDNA 吸附在二价适配体上, 然而此传感器仍然能实现对 AFM1 的快速响应。Ge 等^[14] 开发了一种基于自组装双交叉 DNA 纳米机器, 由于能量共振转移, 荧光强度降低。加入 AFM1 和 AFB1 后, 适配体识别黄曲霉毒素, 双交叉 DNA 纳米结构被破坏, 猝灭基团远离荧光染料, 荧光强度恢复。Yadav 等^[15] 构建了基于金属硫化物的适配体荧光传感器同时检测 AFB1 和 AFM1, 并比较了基于聚乙二醇改性前后的金属硫化物构建传感器的灵敏度, 结果表明, 与为改性材料相比, 利用聚乙二醇改性后的纳米材料所构建传感器的检出限低 248 倍。Yang 等^[16] 建立了基于分子印迹聚合物(Molecular imprinting, MIP)和适配体的双识别电化学传感器检测牛奶中 AFM1。

尽管小分子的适配体筛选技术及应用研究不断发展^[17-18], 但由于小分子尺度较小, 结合位点少^[19-20], 引起传感信号的变化也非常有限, 开发的适配体存在灵敏度低、特异性差的问题^[21-22]。另外, 适配体因其柔性结构的问题, 在环境中变现出结构不稳定的现象, 而发生非特异性识别, 造成假阳性信号的产

生^[23-25], 进一步限制了适配体快速检测技术的发展。有研究发现将一段完整的适配体劈裂成两段或两段以上, 当添加目标物后, 劈裂的适配体仍然可以重新结合共同识别目标物^[26-29]。与单适配体相比, 具有合作识别的分裂适配体可能会增强靶标结合的亲和力^[30-32]。基于劈裂适配体构建的检测方法可以有效减少假阳性结果, 提高方法的准确性^[33-35]。目前, 基于劈裂适配体已成功用于 ATP^[36-38]、多巴胺^[39]、凝血酶^[40] 等的检测。

因此, 本文以 AFM1 为研究对象, 利用电化学方法。原理如图 1 所示, 将 AFM1 适配体劈裂成两段, 一段修饰巯基(SH-S1)通过 Au-S 固定在电极表面, 另一段修饰二茂铁(Fc-S2)作为响应信号。将 S1 固定到电极表面后, 采用 6-巯基乙醇(MCH)封闭未结合位点, 减小非特异性结合。在体系中添加 AFM1, S1 与 S2 形成一定构象共同识别 AFM1, S2 一端的响应信号 Fc 靠近工作电极, 与电极进行电子传递, 产生 Fc 信号。本文通过研究劈裂适配体的亲和力、特异性以及对 AFM1 的检测效果, 利用圆二色谱法初步探究的结合机制, 为后续建立传感检测方法打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

铁氰化钾、过氧化氢、亚铁氰化钾、三羟甲基氨基甲烷(Tris) 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 氯化钾、磷酸三氯乙酯(TCEP)、氯化钠、三氯化六铵合钨、98% 6-巯基乙醇(MCH) 分析纯, 上海阿

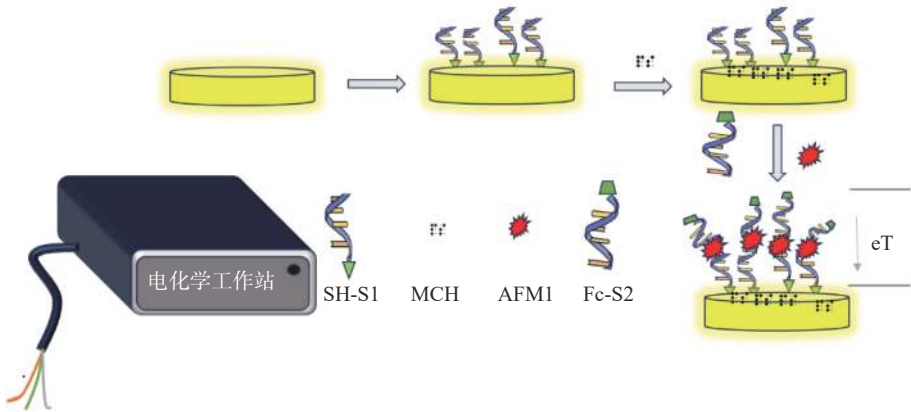


图 1 生物传感器的传感机理
Fig.1 Sensing mechanism of biosensors

表 1 适配体序列
Table 1 Aptamer sequence

适配体	序列	
AFM1适配体	5'-SH-ACTGCTAGAGATTTCCACAT-Fc-3' ^[38]	
mode 1(3:1)	5'-SH-ACTGCTAGAGATTTTC-3	5'-CACAT-Fc-3'
mode 2(2:1)	5'-SH-ACTGCTAGAGATTT-3'	5'-TCCACAT-Fc-3'
mode 3(1:1)	5'-SH-ACTGCTAGAGA-3'	5'-TTTCCACAT-Fc-3'
mode 4(1:2)	5'-SH-ACTGCTA-3'	5'-GAGATTTTCCACAT-Fc-3'
mode 5(1:3)	5'-SH-ACTGC-3'	5'-TAGAGATTTTCCACAT-Fc-3'

拉丁生化科技有限公司; 盐酸 分析纯, 成都科龙化工试剂公司; 98% 硫酸、无水乙醇 分析纯, 重庆市钛新化工有限公司; 劈裂适配体 由生物工程(上海)股份有限公司合成, 适配体序列见表 1。

电化学工作站 CHI660E、CHI111 银/氯化银、CHI115 铂丝电极、CHI101 金电极 上海辰华仪器有限公司; HH-4J 型磁力搅拌恒温水浴锅 江苏金坛白塔新宝仪器厂; KQ3200DB 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; NK200-1B 氮吹仪 常州朗越仪器制造有限公司; Multifuge X3R 离心机 赛默飞世尔科技公司; Milli-Q 超纯水仪 美国 Millipore 公司; J-81010400 圆二色谱仪 日本分光株式会社。

1.2 实验方法

1.2.1 劈裂适配体识别效果 电极的预处理^[41]: 依次取直径为 0.3、0.05 μm 的抛光粉(氧化铝)按照“8”字手法将金电极打磨至表面光滑, 然后将电极分别置于无水乙醇和超纯水中超声清洗。随后将电极置于食人鱼溶液($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, 3/1)中浸泡, 10 min 后超纯水清洗表面, 氮吹至干燥。最后, 在 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液中, 设置扫描速度和扫描点位分别为 0.1 V/s 和 -0.2~+1.6 V, 采用循环伏安法(Cyclic voltammetry, CV)进行扫描, 待扫描曲线稳定后对电极进行电化学抛光处理。抛光完成后用超纯水洗净, 氮吹干燥备用。

AFM1 原始序列按照比例 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3 进行劈裂(表 1)。采用相同浓度(0.5 $\mu\text{g/L}$) AFM1, 探究五种劈裂模式的适配体识别 AFM1 的效果。

1.2.2 劈裂适配体固定环境的研究 S1 在电极表面的实际修饰密度可以准确反映适配体在电极表面的状态。本文基于 Cottrell 方程^[42]来计算适配体的实际修饰密度见公式(1):

$$Q = \frac{(2nFAD_0^{1/2}C_0t^{1/2})}{\pi^{1/2}} + Q_{dl} + nFA\Gamma_0 \quad \text{式(1)}$$

式中, Q 代表 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 扩散到电极表面产生的电荷(C); n 为每摩尔中用于还原的电子数量; F 代表法拉第常量, 即每摩尔电子所携带的电荷量, 其值为 96485 C/mol; A 为电极面积(cm^2); D_0 为扩散系数(cm^2/s); C_0 为体积浓度(mol/cm^3); t 代表时间(s); Q_{dl} 表示电层电容(F), 可根据计时库伦法(Chronocoulometry, CC)测试曲线的截距差计算得出; $nFA\Gamma_0$ 表示吸附 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 产生的电荷(mol/cm^2); Γ_0 表示吸附到 S1 骨架上的 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 的密度, 可以通过两条 CC 测试曲线的截距差计算得出。

S1 在电极表面的密度 Γ_0 可根据公式(1)、(2)^[43]计算得出:

$$\Gamma_{\text{DNA}} = \Gamma_0 \times \frac{z}{m} \times N_A \quad \text{式(2)}$$

式中, Γ_{DNA} 表示 S1 的电极表面修饰密度(mol/cm^2); m 表示 S1 的碱基数目; z 表示氧化还原

分子的电荷量; N_A 表示 Avogadro 常数 6.02×10^{23} 。

1.2.2.1 离子强度对劈裂适配体固定电极的影响

将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SH-S1 溶液和 1 mmol/L 的 TCEP 溶液各取 10 μL 混合并孵育 1 h, 分别加入 Na^+ 浓度为 50、100、150、200、250 mmol/L 的 Tris-HCl 溶液(pH7.4), 至溶液的终体积为 200 μL , SH-S1 溶液终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。金电极与该溶液孵育 16 h, 通过 Au-S 键将 SH-S1 在电极表面固定, 氮吹干燥。最后置于 MCH(1 mmol/L)溶液中孵育 1 h, 用缓冲溶液洗涤, 氮气吹干, 传感器平台构建完成。随后将其与含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fc-S2 及 0.5 $\mu\text{g/L}$ 靶标物 AFM1 的混合溶液孵育 1 h。置于电解支持液(5 mmol/L 铁氰化钾、5 mmol/L 亚铁氰化钾混合溶液与 0.1 mol/L 氯化钾水溶液等体积混合)中, 根据 CC 计时测试结果按照公式计算电极表面 S1 的密度, 再通过 CV 及电化学阻抗法(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS), 以电流峰值和奎斯特曲线半径来研究固定情况^[44]。

1.2.2.2 pH 对劈裂适配体固定电极的影响 将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SH-S1 溶液和 1 mmol/L 的 TCEP 溶液各取 10 μL 混合并孵育 1 h, 分别用不同 pH(5.4、6.4、7.4、8.4、9.4)的 Tris-HCl(150 mmol/L)溶液稀释至溶液的终体积为 200 μL , SH-S1 溶液终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。金电极与该溶液孵育 16 h 后, 氮吹干燥。最后置于 MCH(1 mmol/L)溶液中孵育 1 h, 用缓冲溶液洗涤, 氮气吹干, 传感器平台构建完成。检测内容同 1.2.2.1。

1.2.3 劈裂适配体构建传感器检测条件的研究

1.2.3.1 SH-S1 孵育浓度对检测的影响 将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SH-S1 溶液和 1 mmol/L TCEP 溶液各取 10 μL 混合并孵育 1 h, 用 Tris-HCl 溶液(pH7.4, 200 $\mu\text{mol/L}$ Na^+)将溶液分别稀释至 SH-S1 终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 $\mu\text{mol/L}$ 。按上述步骤构建传感器平台。然后将其与含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fc-S2 及 0.5 $\mu\text{g/L}$ 靶标物 AFM1 的混合溶液孵育 1 h。通过方波伏安法(Square wave voltammetry, SWV), 以 I_{Fc} 信号值为指标, 研究不同浓度适配体的检测效果^[45]。

1.2.3.2 孵育时间对检测效果的影响 将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SH-S1 溶液和 1 mmol/L 的 TCEP 溶液各取 10 μL 混合并孵育 1 h 后, 用 Tris-HCl 溶液(pH7.4, 200 $\mu\text{mol/L}$ Na^+)稀释至 SH-S1 终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。按上述步骤构建传感器平台。然后与含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fc-S2 及 0.5 $\mu\text{g/L}$ 靶标物 AFM1 的混合溶液分别孵育 30、60、90、120 min。通过 SWV 探究适配体在不同孵育时间下的检测效果。

1.2.3.3 离子强度对识别效果的影响 缓冲溶液 Tris-HCl(pH7.4)中分别添加 0、50、100、200、300、400、500、600 $\mu\text{mol/L}$ 的 Na^+ , 将 SH-S1 稀释至终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 按上述步骤构建传感器平台。然后

与含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fc-S2 及 0.5 $\mu\text{g/L}$ 靶标物 AFM1 的混合溶液孵育 1 h。通过 SWV 研究不同离子强度对适配体识别性能的影响。

1.2.3.4 pH 对识别效果的影响 将缓冲溶液 Tris-HCl(200 $\mu\text{mol/L}$ Na^+) pH 分别调至 5.4、6.4、7.4、8.4、9.4, 将 SH-S1 稀释至终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 按上述步骤构建传感器平台。然后与含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fc-S2 及 0.5 $\mu\text{g/L}$ 靶标物 AFM1 的混合溶液孵育 1 h。通过 SWV 研究 pH 对适配体识别性能的影响。

1.2.4 劈裂适配体识别能力和亲和力研究 将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SH-S1 溶液和 1 mmol/L 的 TCEP 溶液各取 10 μL 混合, 孵育时间 1 h, 用 Tris-HCl 溶液(pH7.4)稀释至 SH-S1 终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。加入离心管内, 将金电极浸入其中 16 h, 氮气吹干后。置于 MCH(1 mmol/L)溶液中孵育 1 h, 将未结合的位点除掉。用缓冲溶液洗涤, 氮气吹干, 传感器平台构建完成。将电极完全沉浸在含有 Fc-S2(0.5 $\mu\text{mol/L}$) 与不同浓度 AFM1 溶液中孵育。利用 CV 和 EIS 研究电极修饰过程, 并利用 SWV 研究劈裂适配体的识别效果和亲和力。

通过电化学方法研究劈裂适配体的亲和力。在一定浓度范围内, 随着 AFM1 浓度的增加, 电响应信号逐渐增加。基于电信号数据利用公式(3)^[46-47] 计算解离常数 K_d , K_d 值表征五种劈裂适配体的亲和力, K_d 值越小, 代表适配体和靶标物的结合能力越强。

$$\log \frac{1}{[\text{DNA}]} = \log K_d + \log \frac{\Delta I}{(\Delta I_{\max} - \Delta I)} \quad \text{式 (3)}$$

式中, $[\text{DNA}]$ 代表适配体的浓度(nmol/L), $I_{\max}$ 代表产生的最大电流信号值(nA), I 代表不同 AFM1 浓度下产生的电流信号值(nA)。

线性范围和检测限: 将亚甲基蓝(MB)-S2 和 Fc-S1 与一定浓度的 AFM1 溶液混合, 将建立的传感器平台浸入上述溶液中孵育一段时间, 用 SWV 进行检测。以 AFM1 标准品浓度为横坐标, $I_{\text{MB}}/I_{\text{Fc}}$ 为纵坐标, 建立标准曲线, 确定线性范围并计算检测限。

1.2.5 劈裂适配体特异性研究 配制与 AFM1 相同浓度(0.5 $\mu\text{g/L}$)的 AFM2、AFB1、AFG1、AFG2 作为干扰毒素研究劈裂适配体的特异性。将建立的传感器平台置于含有 Fc-S2(0.5 $\mu\text{mol/L}$)和不同种类毒素的溶液中孵育 1 h。用 SWV 进行检测。

1.2.6 利用圆二色谱研究劈裂适配体构象 将完整的 AFM1 适配体(10 mmol/L)和劈裂后的两段适配体 S1(10 mmol/L)、S2(10 mmol/L)在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性处理 10 min。取等量的 S1 和 S2 进行混合得到 S1+S2, 将完整 AFM1 适配体、S1、S2、S1+S2 静置 30 min, 使其形成稳定空间构象。另取等量 S1 和 S2 与 AFM1 孵育 60 min, 使 S1、S2 共同识别 AFM1, 将上述溶液均进行圆二色谱测定^[48]。

1.3 数据处理

亲和力数据处理: 采用电化学方法得到相关数据, 以适配体浓度的对数为横坐标, 电信号变化量的对数为纵坐标, 使用线性回归分析绘制曲线, 得到劈裂适配体的解离常数。

2 结果与分析

2.1 劈裂适配体识别效果

研究五种劈裂模式下的适配体对 AFM1 的识别效果, 结果如图 2, 加入 0.5 $\mu\text{g/L}$ AFM1 后, 以 mode 3(1:1)为识别元件时, Fc 信号最大, 为 546 ± 24 nA, 表明在五种劈裂方式中, 以 mode 3(1:1)模式劈裂的适配体具有最好的识别效果。

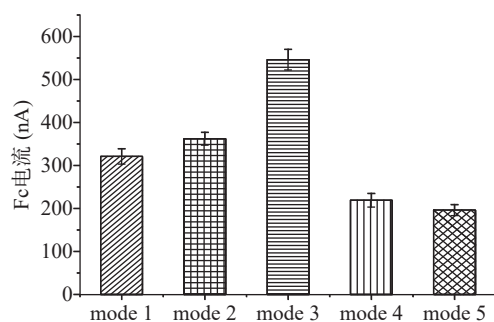


图 2 不同劈裂适配体的识别效果(0.5 $\mu\text{g/L}$ AFM1)
Fig.2 Signal of Fc at different modes under the same con AFM1 (0.5 $\mu\text{g/L}$)

2.2 劈裂适配体固定环境的研究

适配体构象可能会受到体系中离子强度和 pH 的影响, 从而影响其在电极表面的固定。因此, 本文以识别效果最好的 mode 3(1:1)模式的劈裂适配体为研究对象, 选择 0.5 $\mu\text{mol/L}$ SH-S1 固定电极, 采用 CC 研究电极表面 S1 的密度, 利用 CV 和 EIS 研究 S1 在电极表面的固定情况。

基于式(1)、式(2)和计时库伦测试结果(图 3A) 计算电极表面 S1 的密度。如图 3B 所示, 随着 Na^+ 浓度增加, 电极表面 S1 的密度逐渐增加, 当 Na^+ 为 150 mmol/L 时, 密度达到最大且不再随 Na^+ 浓度的增加而变化, 说明 0.5 $\mu\text{mol/L}$ S1 几乎都修饰在电极表面。

图 3C 和 D 显示不同 Na^+ 浓度固定劈裂适配体 S1 的 CV 图及 EIS 图。如图所示, 随着 Na^+ 浓度的增加, 氧化还原的电流峰值逐渐增大后几乎不变, 奈奎斯特曲线半径逐渐减小后几乎不变。说明随着 Na^+ 浓度增加, 修饰 S1 后电极表面电子传递速度逐渐增加。结合电极表面 S1 密度及 CV 和 EIS 图发现, 在低 Na^+ 浓度环境中, 电极表面 S1 密度较小, 而且电子传递速度较慢, 这种现象的原因可能是 S1 的柔性结构, 在电极表面呈平铺覆盖状, 阻碍了电子传递速度。在高浓度 Na^+ 环境下, 由于 S1 与足够 Na^+ 之间的静电相互作用, S1 保持刚性结构, 在电极表面可以固定更多的 S1, S1 密度逐渐增大(图 3B)。因此, 150 mmol/L 为固定劈裂适配体的最佳 Na^+ 浓度。

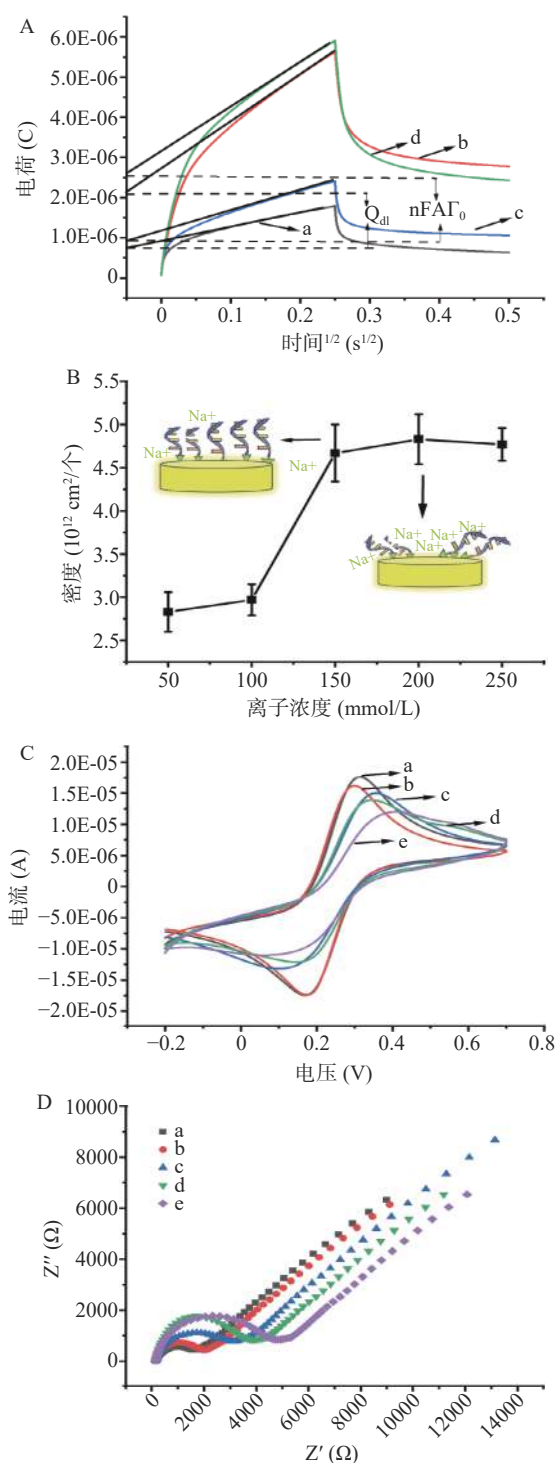


图3 离子强度对适配体固定的影响

Fig.3 Influence of ionic strength on aptamer immobilization

注: A: 计时库伦曲线, B: 不同 Na⁺ 浓度下电极表面适配体密度图, C: 不同 Na⁺ 浓度下循环伏安图, D: 不同 Na⁺ 浓度下阻抗图; 图 A 中 a~d 表示: a: MCH 修饰电极在不含 [Ru(NH₃)₆]³⁺, b: MCH 修饰电极在含 [Ru(NH₃)₆]³⁺, c: MCH/S1 修饰电极在不含 [Ru(NH₃)₆]³⁺, d: MCH/S1 修饰电极在含 [Ru(NH₃)₆]³⁺; 图 C、D 中 a~e 表示: a: 250 mmol/L, b: 200 mmol/L, c: 150 mmol/L, d: 100 mmol/L, e: 50 mmol/L。

图 4 为 pH 对 S1 固定电极密度和固定情况的影响。如图 4A 所示, pH 对电极表面 S1 的固定密度无明显影响。同时图 4B 和 C 的 CV 和 EIS 结果显示, 不同 pH 下氧化还原电流峰和奈奎斯特曲线半径

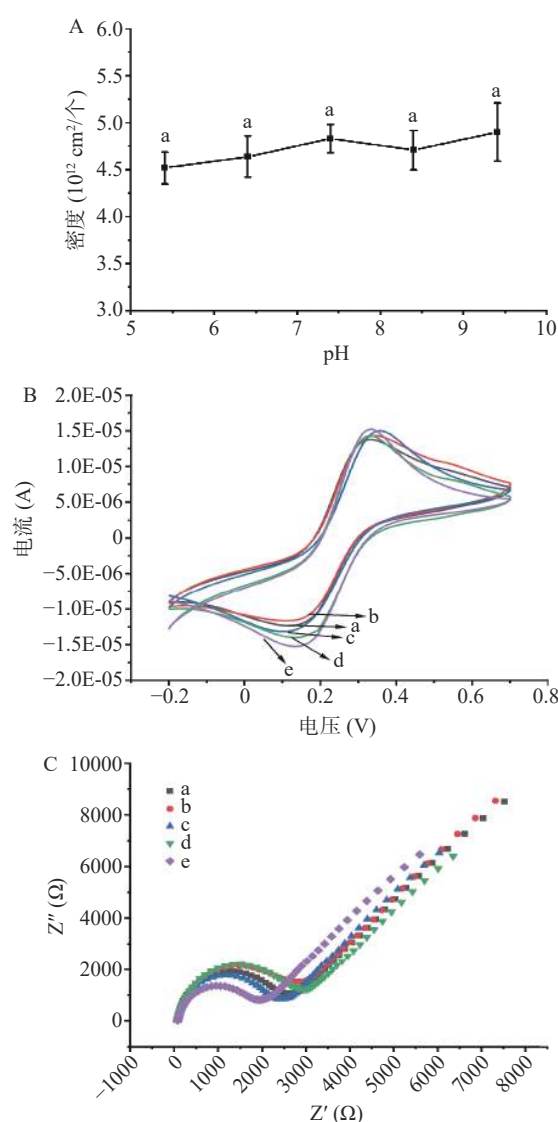


图4 不同 pH 条件下适配体密度变化(A)、循环伏安(B)与阻抗(C)

Fig.4 Aptamer density change (A), cyclic voltammetry (B) and impedance (C) at different pH

注: 图 A 中相同小写字母表示差异不显著, $P > 0.05$; 图 B、C 中 a~e 分别表示 pH 5.4、6.4、7.4、8.4、9.4。

均无明显差异。说明在一定范围内 pH 对 S1 在电极表面的固定及 S1 的结构无明显影响, 选择 7.4 为后续固定电极时溶液 pH。

2.3 劈裂适配体构建传感器检测条件的研究

本文以二茂铁产生的信号值(I_{Fc})研究 S1 浓度、孵育时间及识别环境对识别效果的影响(图 5)。图 5A 显示 S1 浓度对识别效果的影响。从图可知, 传感信号值(I_{Fc})随着 S1 浓度的增加呈现快速增加后减小的趋势。因为 S1 浓度低时, 固定在电极表面的 S1 数量较少, 检测的灵敏度不高。而高浓度的 S1 固定在电极表面后, 会产生空间位阻, 灵敏度也会受到影响^[49]。S1 浓度到 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 传感信号达到最大, 说明此时识别效果最好。

图 5B 显示了劈裂适配体与靶标物 AFM1 的孵育时间对识别效果的影响。传感信号(I_{Fc})会随孵

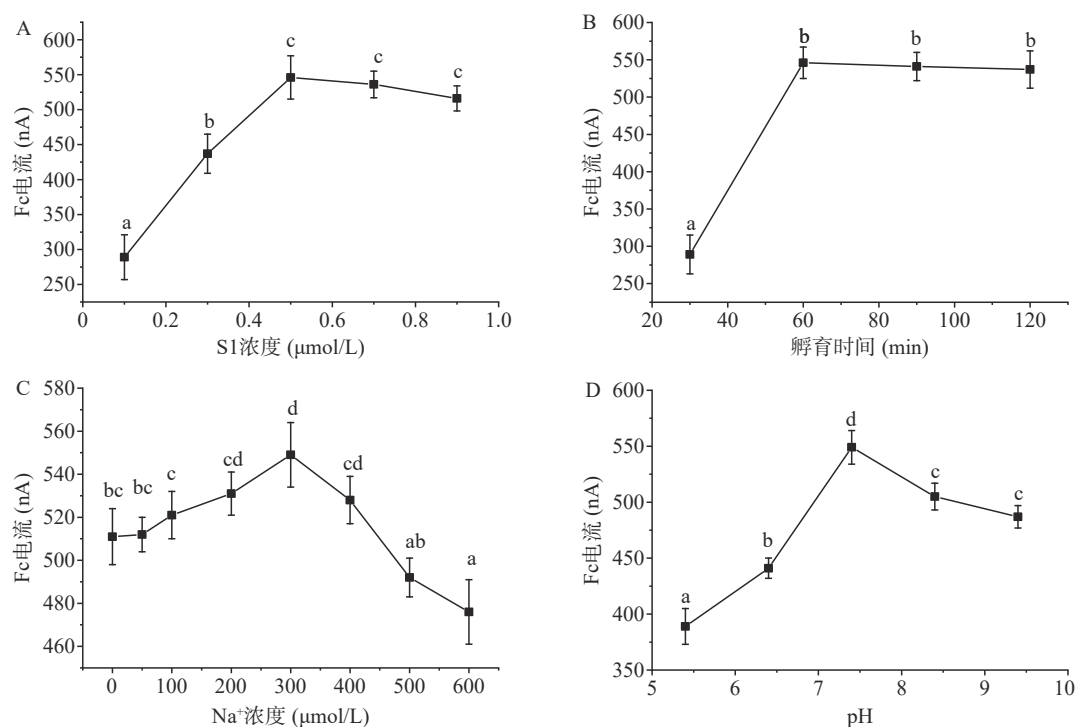


图 5 不同识别条件下的劈裂适配体识别效果

Fig.5 Recognition efficiency of split aptamers under different identification conditions

注: 图中不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

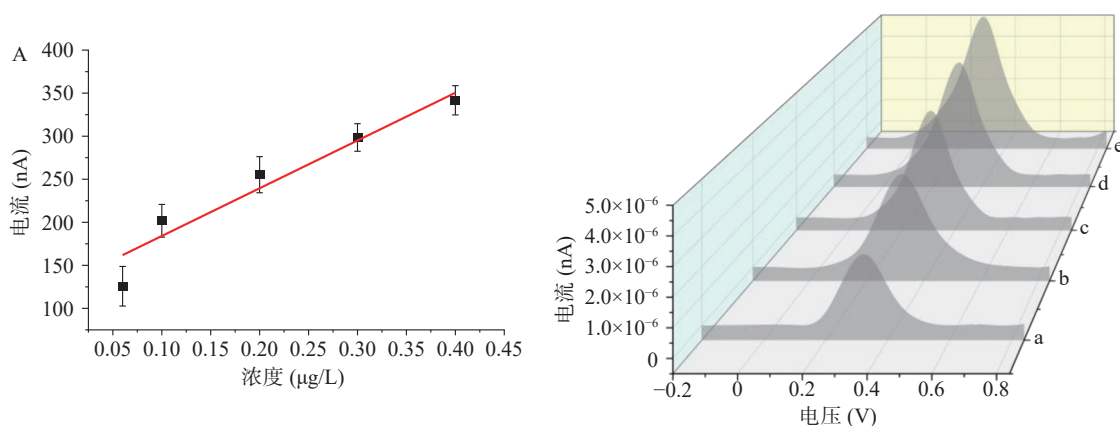
育时间增加而增大, 因为孵育时间较短, 劈裂适配体不能形成构象完全识别 AFM1, 影响响应电信号。当孵育 60 min 后, 信号值(I_{Fc})达到最高且趋于平衡。说明此时劈裂适配体已完成目标物 AFM1 的识别。因此最佳孵育时间确定为 60 min。

识别环境的离子强度和 pH 对适配体构象的形成和稳定有一定的影响, 进而影响适配体对目标物的识别。在一定范围内, I_{Fc} 响应信号随着 Na^+ 浓度增加先增加后减小。因为离子浓度过低, 劈裂适配体 S1 和 S2 自身发生卷曲, 影响对目标物 AFM1 的识别效果。当检测环境中离子浓度过高时, S1 和 S2 呈刚性结构, 同样影响对目标物的识别。当 Na^+ 浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 时, I_{Fc} 信号值最大。因此识别环境中的最适离子强度为 300 $\mu\text{mol/L}$ Na^+ 。如图 5D 可知, 在 pH 为 5.4 到 7.4 范围内, 随着 pH 增加 I_{Fc} 信号值逐渐增加, 当 pH 大于 7.4 时, I_{Fc} 信号值随着 pH 的

增加而逐渐减小。表明中性环境下(pH7.4)劈裂适配体结合靶标物的效果最佳。

2.4 劈裂适配体识别能力的研究

为了分析劈裂后的适配体识别能力, 构建基于五种劈裂适配体的电化学传感器。根据传感器对目标物检测的线性范围和检出限, 评价电化学传感器的传感性能。结果显示(图 6), 随着 AFM1 浓度增加, 基于不同劈裂适配体的传感器响应信号均逐渐增加。由于 AFM1 的加入, S1 与游离 S2 形成一定构象共同识别 AFM1, 导致 Fc 响应电信号增加。通过实验考察了五种电化学传感器的线性范围和检出限。结果表明, mode 1~5 的电化学传感器线性范围分别为 0.06~0.4、0.06~0.4、0.08~0.5、0.08~0.5、0.1~0.4 $\mu\text{g/L}$ 。以 mode 1、mode 2 和 mode 3 构建的传感器检出限为 0.02 $\mu\text{g/L}$, 以 mode 4 和 mode 5 构建的传感器检出限为 0.03 $\mu\text{g/L}$ 。与另外四种传感器相



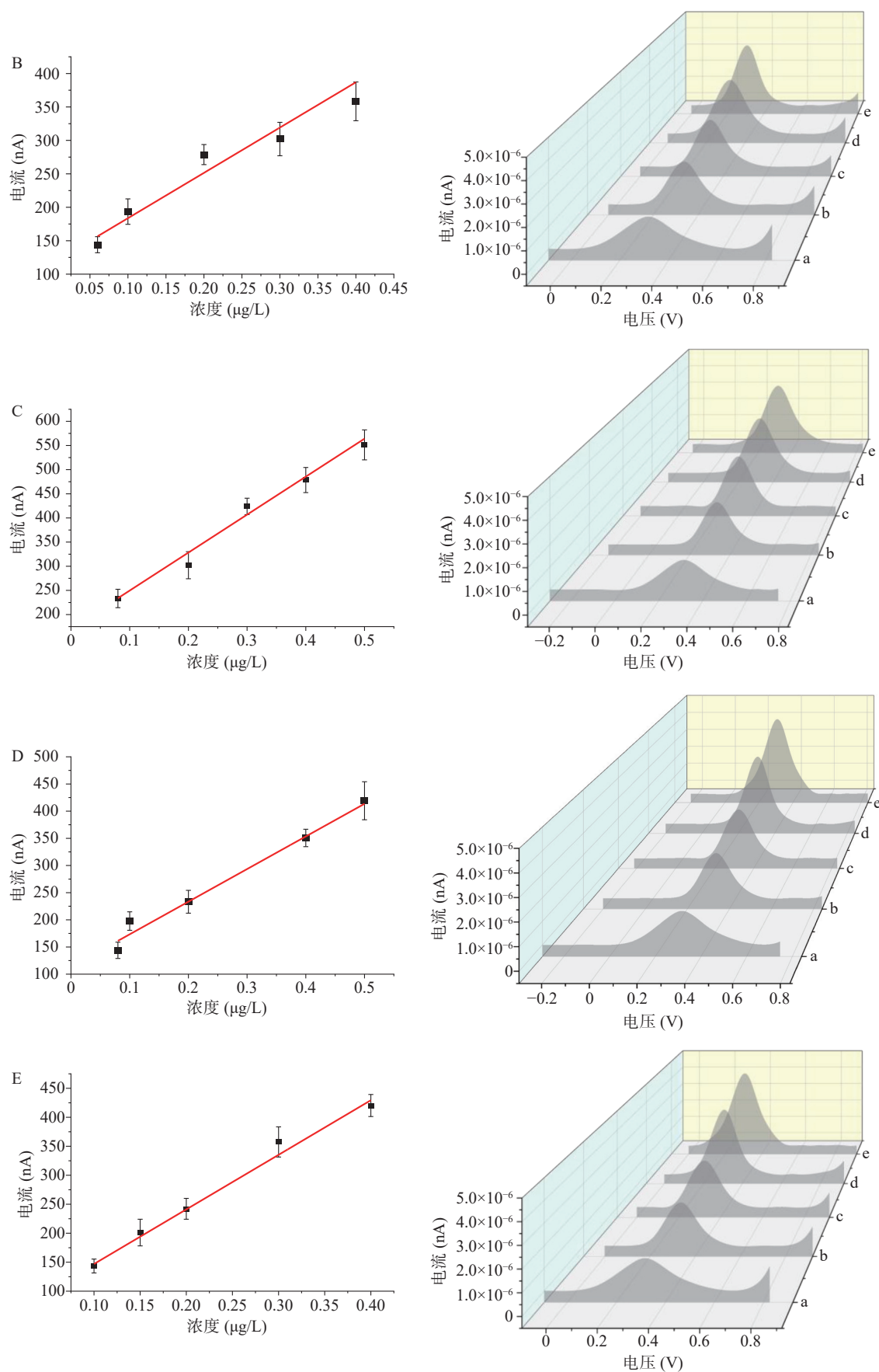


图6 基于不同劈裂适配体的传感器与一定浓度 AFM1 作用后的 SWV 图和线性图

Fig.6 SWV and linear plots of sensors based on different splitting adaptors interacting with a certain concentration of AFM1

注: A~E: mode 1~5; a~e 对应浓度: 0.06、0.1、0.2、0.3、0.4 μg/L(A); 0.06、0.1、0.2、0.3、0.4 μg/L(B); 0.08、0.2、0.3、0.4、0.5 μg/L(C); 0.08、0.1、0.2、0.4、0.5 μg/L(D); 0.1、0.15、0.2、0.3、0.4 μg/L(E)。

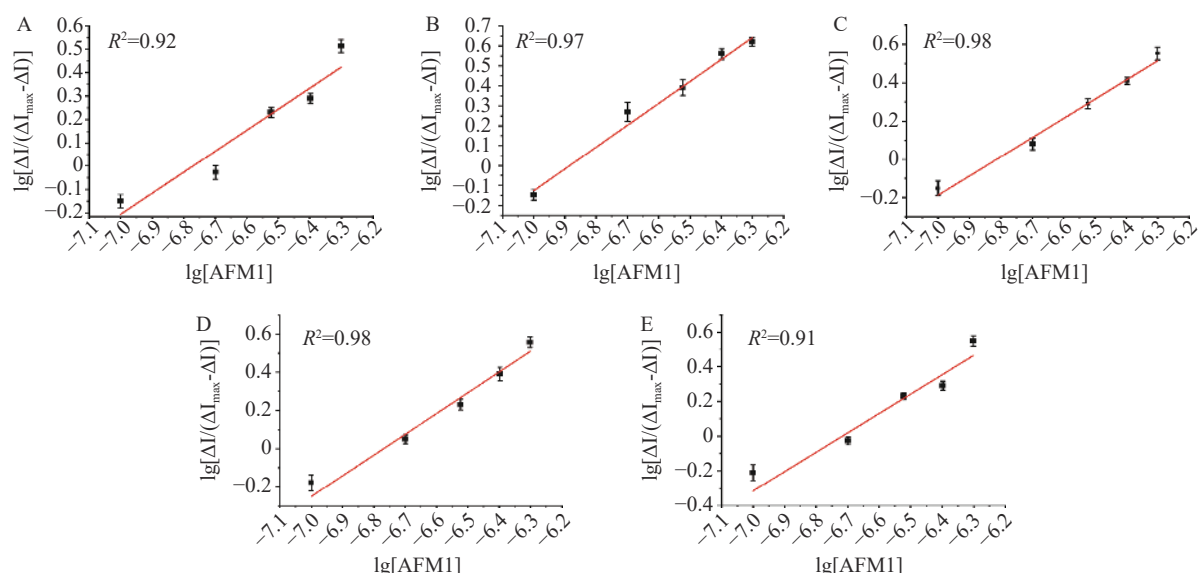


图 7 劈裂适配体的电化学方法拟合曲线不同适配体的解离常数

Fig.7 Electrochemical method fitting curves for the dissociation constants of different aptamers in split aptamer assays

注: A: mode 1; B: mode 2; C: mode 3; D: mode 4; E: mode 5。

比,基于 mode 3 建立的传感器明显拥有更宽的线性范围和更高的灵敏度。证明了以 mode 3(1:1)劈裂适配体得到劈裂适配体识别效果最好。

2.5 劈裂适配体亲和力的研究

如图 7 所示,五种劈裂适配体电信号结果拟合效果好,拟合的函数可靠度高,计算得到的 Kd 值分别是: 128.77 ± 41 、 262.80 ± 53 、 87.12 ± 29 、 339.78 ± 101 、 454.19 ± 112 nmol/L。由结果可知,以 mode 3(1:1)得到的劈裂适配体与目标物的亲和力最强,解释了以 mode 3 模式劈裂适配体为识别元件的传感器灵敏度更高。

2.6 劈裂适配体特异性的研究

为了进一步说明劈裂适配体对目标物的识别能力,研究劈裂适配体对目标物结构类似物质的响应,分析劈裂适配体的特异性。以 mode 3 为例,选择相同浓度($0.5 \mu\text{g/L}$)结构类似物 AFM2、AFB1、AFG1 和 AFG2,以及包含 AFM1($0.5 \mu\text{g/L}$)的混合毒素研究劈裂适配体的特异性。如图 8 可知,与其他对照组毒素相比,AFM1 引起的 I_{Fc} 电信号值最大。而包含 AFM1 的混合毒素引起的 I_{Fc} 电信号与 AFM1

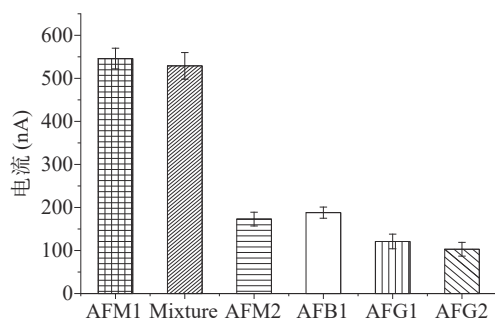


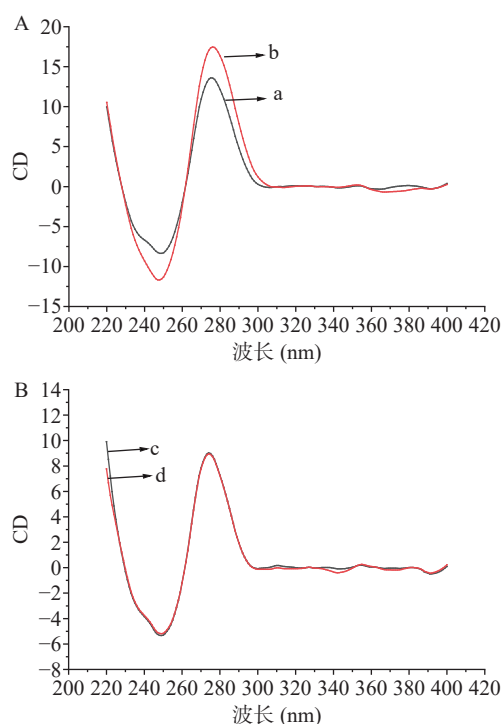
图 8 不同毒素的电化学响应情况对比

Fig.8 Comparison of electrochemical responses of different toxins

引起的信号无明显差异。说明劈裂适配体对 AFM1 的特异性较好。

2.7 劈裂适配体构象研究

圆二色谱法(CD)是研究适配体构象变化的常见方法,通过适配体与目标物结合前后的构象变化来研究适配体和目标物之间的相互作用。图 9 分别表示完整的适配体、mode 3 模式下单独的 S1、S2 及 S1 与 S2 协同识别目标物前后的圆二色谱图。从图 9A 可以看出,AFM1 适配体的圆二色谱图(曲线 a)在 248 nm 呈现负峰,在 275 nm 存在正峰,说明 AFM1 适配体是一种典型的 B 型 DNA^[50]。适配体与 AFM1 作用后(曲线 b),圆二色谱图显示出 275 nm



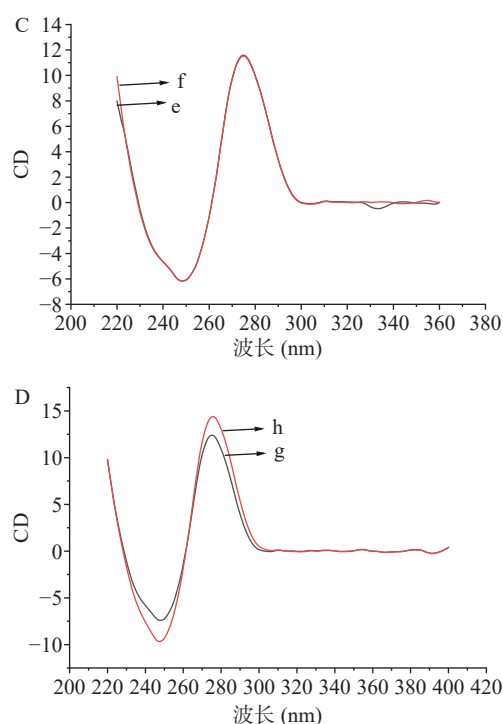


图9 适配体与 AFM1 作用前后的圆二色光谱

Fig.9 Circular dichroic spectra before and after the interaction between the adapter and AFM1

注: 图 A 中, a: 完整 AFM1 适配体; b: 完整适配体与 AFM1 作用后; 图 B 中, c: model 3 下 S1; d: S1 与 AFM1 作用后; 图 C 中, e: model 3 下 S2; f: S2 与 AFM1 作用后; 图 D 中, g: model 3 下 S1/S2; h: S1/S2 与 AFM1 作用后。

处正峰强度明显增加, 此正峰代表碱基堆叠作用, 负峰由 248 nm 移至 249 nm 且强度增加, 此处负峰代表 DNA 的螺旋性, 说明 AFM1 与适配体结合会诱导适配体碱基堆积效应增强, 同时螺旋增加, 适配体构象发生变化。从图 9B 和 9C 可知, S1 和 S2 分别与 AFM1 作用前后圆二色谱图并未发生变化, 说明 S1 和 S2 与 AFM1 作用后构象没有发生变化, 间接说明 S1 和 S2 不能识别 AFM1。从图 9D 可知, S1、S2 与 AFM1 作用后, 275 nm 处的正峰和 248 nm 的负峰强度均增加, 且负峰发生红移, 说明 S1 和 S2 与 AFM1 作用后构象发生变化。此现象与完整适配体结合 AFM1 后的圆二色谱图相一致, 说明 S1 和 S2 可以共同识别 AFM1。

3 结论

适配体的构象不稳定会造成适配体传感器的低灵敏度及假阳性问题。本文按照不同比例将适配体进行劈裂, 通过电化学方法研究劈裂适配体对目标物 AFM1 的识别能力及特异性。首先研究了适配体固定环境及识别环境的影响, 结果表明, 高浓度 Na^+ 有利于劈裂适配体在电极表面的固定, 150 mmol/L Na^+ 时固定效果最佳且趋于稳定, pH 则对固定效果影响不大。识别环境中 Na^+ 为 300 $\mu\text{mol/L}$, pH7.4 条件下, 劈裂适配体与 AFM1 孵育 60 min, 识别效果最佳。在此最佳条件下, 基于五种劈裂适配体构建的电

化学传感器中 mode 3 的线性范围为 0.08~0.5 $\mu\text{g/L}$, 检出限为 0.02 $\mu\text{g/L}$, 优于其他四种模式。通过计算五种模式的解离常数可以得知, 与其他四种劈裂方式相比, 按照 1:1 方式得到劈裂适配体的亲和力最强。另外, 圆二色谱结果也证明了 S1 和 S2 可以共同识别 AFM1。本研究旨在推动适配体传感器发展, 可以对解决适配体传感器灵敏度不高和假阳性问题起到参考作用。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] CAMPAGNOLLO, FERNANDA BOVO, et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review[J]. *Food Control*, 2016, 68: 310–329.
- [2] LIU S G, ZHANG D, HE Y, et al. A split aptamer sensing platform for highly sensitive detection of theophylline based on dual-color fluorescence colocalization and single molecule photo-bleaching[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 166: 112461.
- [3] AISSA S B, MARS A, CATANANTE G, et al. Design of a redox-active surface for ultrasensitive redox capacitive aptasensing of aflatoxin M1 in milk[J]. *Talanta*, 2019, 195: 525–532.
- [4] 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]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(19): 7546–7556.
- [5] LIU R, ZHANG F, SANG Y, et al. Selection and characterization of DNA aptamers for constructing aptamer-AuNPs colorimetric method for detection of AFM1[J]. *Foods*, 2022, 11(12): 1802.
- [6] PANDEY A K, RAJPUT Y S, SINGH D, et al. Prediction of shorter oligonucleotide sequences recognizing aflatoxin M1[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2018, 65(3): 397–406.
- [7] AHMADI S F, HOJATOLESLAMY M, KIANI H, et al. Monitoring of aflatoxin M1 in milk using a novel electrochemical aptasensor based on reduced graphene oxide and gold nanoparticles[J]. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131321.
- [8] PANG Y H, GUO L L, SHEN X F, et al. Rolling circle amplified DNAzyme followed with covalent organic frameworks: Cascade signal amplification of electrochemical ELISA for aflatoxin M1 sensing[J]. *Electrochimica Acta*, 2020, 341: 136055.
- [9] HE L, SHEN Z, WANG J, et al. Simultaneously responsive microfluidic chip aptasensor for determination of kanamycin, aflatoxin M1, and 17 β -estradiol based on magnetic tripartite DNA assembly nanostructure probes[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187: 1–11.
- [10] JALALIAN S H, RAMEZANI M, DANESH N M, et al. A novel electrochemical aptasensor for detection of aflatoxin M1 based on target-induced immobilization of gold nanoparticles on the surface of electrode[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 117: 487–492.
- [11] SAMEIYAN E, KHOSHBIN Z, LAVAE P, et al. A bivalent binding aptamer-cDNA on MoS2 nanosheets based fluorescent aptasensor for detection of aflatoxin M1[J]. *Talanta*, 2021, 235: 122779.

- [12] FAN Y Y, WEN J, LI J, et al. Structure-switching aptasensors for sensitive detection of ochratoxin A[J]. *Luminescence*, 2023, 38(9): 1678–1685.
- [13] YU H, ZHU J, SHEN G, et al. Improving aptamer performance: Key factors and strategies[J]. *Microchimica Acta*, 2023, 190(7): 255.
- [14] GE G, WANG T, LLU Z, et al. A self-assembled DNA double-crossover-based fluorescent aptasensor for highly sensitivity and selectivity in the simultaneous detection of aflatoxin M1 and aflatoxin B1[J]. *Talanta*, 2023, 265: 124908.
- [15] YADAV K, MOOVENDARAN K, DHENADHAYALAN N, et al. From food toxins to biomarkers: Multiplexed detection of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in milk and human serum using PE-Gylated ternary transition metal sulfides[J]. *Sensors and Actuators Reports*, 2023, 5: 100156.
- [16] YANG D, HUI Y, LIU Y, et al. Novel dual-recognition electrochemical biosensor for the sensitive detection of AFM1 in milk[J]. *Food Chemistry*, 2023: 137362.
- [17] DONG Z, XU X, NI J, et al. Cruciate DNA probes for amplified multiplexed imaging of microRNAs in living cells[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11(1): 204–210.
- [18] BRINZA N D. Beyond the cycle: Investigating the sequencing, binding affinity, and utility of aptamers selected with CE-SELEX[D]. Minnesota: University of Minnesota, 2023.
- [19] YANO-OZAWA Y, LOBSIGER N, MUTO Y, et al. Molecular detection using aptamer-modified gold nanoparticles with an immobilized DNA brush for the prevention of non-specific aggregation[J]. *RSC advances*, 2021, 11(20): 11984–11991.
- [20] SONG J, ZHENG Y, HUANG M, et al. A sequential multidimensional analysis algorithm for aptamer identification based on structure analysis and machine learning[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 92(4): 3307–3314.
- [21] HU J, CHEN X, XU J, et al. A signal-enhanced regenerative electrochemical aptasensor for amyloid- β oligomers based on triple-helix aptamer probe[J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2023, 170(1): 017507.
- [22] YE H, YANG Z, KHAN I M, et al. Split aptamer acquisition mechanisms and current application in antibiotics detection: A short review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022: 1–12.
- [23] ALKHAMIS O, CANOURA J, LY P T, et al. Using exonucleases for aptamer characterization, engineering, and sensing[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2023: e81-9971.
- [24] AHO A, VIRTA P. Assembly of split aptamers by dynamic pH-responsive covalent ligation[J]. *Chemical Communications*, 2023, 59(38): 5689–5692.
- [25] ZHANG X, DU Y, LIU X, et al. Enhanced anode electrochemiluminescence in split aptamer sensor for kanamycin trace monitoring[J]. *Food Chemistry*, 2023, 420: 136083.
- [26] DEBIAIS M, LELIEVRE A, SMIETANA M, et al. Splitting aptamers and nucleic acid enzymes for the development of advanced biosensors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(7): 3400–3422.
- [27] PARK H, KWON N, PARK G, et al. Fast-response electrochemical biosensor based on a truncated aptamer and MXene heterolayer for West Nile virus detection in human serum[J]. *Bioelectrochemistry*, 2023, 154: 108540.
- [28] MA Y, GENG F, WANG Y, et al. Novel strategy to improve the sensing performances of split ATP aptamer based fluorescent indicator displacement assay through enhanced molecular recognition[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 134: 36–41.
- [29] YU H, CANOURA J, GUNTUPALLI B, et al. A cooperative-binding split aptamer assay for rapid, specific and ultra-sensitive fluorescence detection of cocaine in saliva[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(1): 131–141.
- [30] AFONIN K A, VIARD M, MARTINS A N, et al. Activation of different split functionalities on re-association of RNA–DNA hybrids[J]. *Nature Nanotechnology*, 2013, 8(4): 296–304.
- [31] QI X, YAN X, ZHAO Y, et al. Highly sensitive and specific detection of small molecules using advanced aptasensors based on split aptamers: A review[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 133: 116069.
- [32] CHEN A, YAN M, YANG S. Split aptamers and their applications in sandwich aptasensors[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 80: 581–593.
- [33] FENG L, LYU Z, OFFENHAUSSER A, et al. Multi-level logic gate operation based on amplified aptasensor performance[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(26): 7693–7697.
- [34] WALTER H K, BAUER J, STEINMEYER J, et al. “DNA origami traffic lights” with a split aptamer sensor for a bicolor fluorescence readout[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(4): 2467–2472.
- [35] WEN Y, PEI H, WAN Y, et al. DNA nanostructure-decorated surfaces for enhanced aptamer-target binding and electrochemical cocaine sensors[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(19): 7418–7423.
- [36] BING T, MEI H, ZHANG N, et al. Exact tailoring of an ATP controlled streptavidin binding aptamer[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(29): 15111–15114.
- [37] ZHANG H, LIU Y, ZHANG K, et al. Single molecule fluorescent colocalization of split aptamers for ultrasensitive detection of biomolecules[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(15): 9315–9321.
- [38] ZHENG X, PENG R, JIANG X, et al. Fluorescence resonance energy transfer-based DNA nanoprism with a split aptamer for adenosine triphosphate sensing in living cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(20): 10941–10947.
- [39] GUO T, WU C, OFFENHAUSSER A, et al. A novel ratio-metric electrochemical biosensor based on a split aptamer for the detection of dopamine with logic gate operations[J]. *Physica Status Solidi (a)*, 2020, 217(13): 1900924.
- [40] DUAN W, WANG X, WANG H, et al. Fluorescent and colorimetric dual-mode aptasensor for thrombin detection based on target-induced conjunction of split aptamer fragments[J]. *Talanta*, 2018, 180: 76–80.
- [41] 曾程. 物理打磨对玻碳电极性能影响的研究[J]. *广州化工*, 2020(9): 73–74. [ZENG C. Study on the effect of physical grinding on the performance of glassy carbon electrode[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2020(9): 73–74.]
- [42] STEEL A B, HERNE T M, TARLOV M J. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold[J]. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(22): 4670–4677.
- [43] ZHANG J, SONG S, ZHANG L, et al. Sequence-specific detection of femtomolar DNA via a chronocoulometric DNA sensor (CDS): Effects of nanoparticle-mediated amplification and nanoscale control of DNA assembly at electrodes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(26): 8575–8580.
- [44] YING G, WANG M, YIY, et al. Construction and application of an electrochemical biosensor based on an endotoxin apta-

mer[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2018, 65(3): 323–327.

[45] HU Z, ZHU R, FIGUEROA-MIRANDA G, et al. Truncated electrochemical aptasensor with enhanced antifouling capability for highly sensitive serotonin detection[J]. *Biosensors*, 2023, 13(9): 881.

[46] ZIA-UR-REHMAN, SHAH A, MUHAMMAD N, et al. Synthesis, characterization and DNA binding studies of penta- and hexa-coordinated diorganotin(IV) 4-(4-nitrophenyl)piperazine-1-carbodi-thioates[J]. *J Organomet Chem*, 2009, 694(13): 1998–2004.

[47] FENG Q, LI N Q, JIANG Y Y. Electrochemical studies of porphyrin interacting with DNA and determination of DNA[J]. *Anal Chim Acta*, 1997, 344(1): 97–104.

[48] YUE F, LI H, KONG Q, et al. Selection of broad-spectrum aptamer and its application in fabrication of aptasensor for detection of aminoglycoside antibiotics residues in milk[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 351: 130959.

[49] DONG N, LI Y, MENG S, et al. Tetrahedral DNA nanostructure-based ratiometric electrochemical aptasensor for fumonisin B1: A unity of opposites in binding site and steric hindrance of large-sized DNA for signal amplification[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 394: 134341.

[50] SUBASTRI A, RAMAMURTHY C H, SUYAVARAN A, et al. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of troxerutin with DNA[J]. [International Journal of Biological Macromolecules](#), 2015, 78: 122–129.