研究论文

基于纳米金标记–适配体识别的伏马菌素 B_1 检测新方法

王文凤， 吴世嘉， 马小媛， 夏 雨， 王周平*
（食品科学与技术国家重点实验室，江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要：基于核酸适配体识别和纳米金变色效应构建了伏马菌素 B1(FB1)的可视化检测新方法。实验以纳米金为载体，首先在纳米金表面组装巯基化的适配体互补短链 DNA1/FB1–适配体复合物；当加入目标物时，适配体链与目标物结合，与互补短链 DNA1 发生解离；此时再加入纳米金标记的与适配体互补短链 1 互补的短链 DNA2，二者杂交可导致纳米金粒子的聚集而使溶液颜色发生变化，进而实现目标物的可视化检测。通过条件优化，有效避免了由于盐浓度过高使纳米金发生聚集所产生的误差。同时在纳米金与短链 DNA 孵化时加入表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)，使 NaCl 浓度达到了 500 mmol/L 而纳米金颜色仍不发生改变，打破了以往熟化 NaCl 浓度 100 mmol/L 就使纳米金颜色发生变化的界限，使附着在纳米金上的 DNA 量扩大了 3 倍。方法检测线性范围为 125~1 500 ng/L，检测限为 125 ng/L。该方法已成功应用于啤酒中 FB_1 的检测。

关键词：适配体识别；纳米金变色；可视化
中图分类号：TS 201.6；TS 207.5　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)05—0501—08

Novel Methods for Fumonisins B_1 Detection Based on AuNPs Labeling and Aptamer Recognition

WANG Wen-feng, *WU Shi-jia*, *MA Xiao-yuan*, *XIA Yu*, *WANG Zhou-ping**
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This work set up a new naked eye detection method for FB_1 abased on the high identification function of DNA aptamer and the color changing effect of AuNPs.This assay method taked AuNPs as carrier and firstly linked to DNA1 and then assembled FB_1–aptamer–DNA1–AuNPs complex throuth the hybridzation process between FB1–aptamer and DNA1–AuNPs . When added different concentrations of FB_1, FB_1–aptamer prefered to connect to FB1 and then subsequently additional DNA2 chain that matched with DNA 1 chain can hybrid with exposed DNA1 resulting in AuNPs aggregation.Thus the color changes from red to purple and blue could be observed by the naked eye. Optimal conditions avoided to much salt induced AuNPs aggregation caused error effectively.Furthermore, we added SDS in DNA1 or DNA2 chain connected to AuNPs to maintain

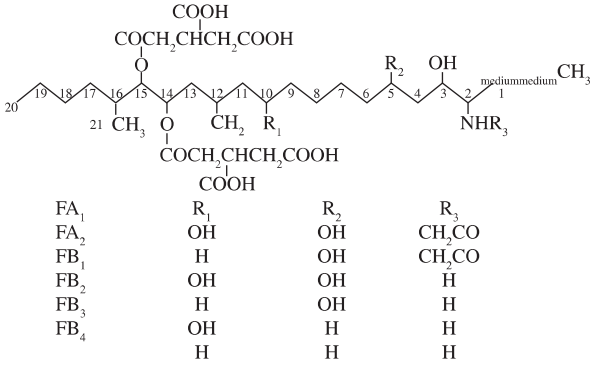
收稿日期：2012–05–11
基金项目：国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAK08B01)；江苏省科技支撑计划项目(BE2011621)。
* **通信作者**：王周平(1974—)，男，陕西宝鸡人，教授，博士研究生导师，主要从事营养与食品卫生研究。E–mail：wangzp@jiangnan.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

the color of AuNPs and improved the concentration of NaCl to 500 mmol/L and DNA loading enlarge 3 times.This breaks the traditional boundary of 100 mmol/L NaCl can caused the color change of AuNPs.The linear range of the colorimetric aptasensor covers a large variation of FB_1 concentration from 125 ng/L to 1500 ng/L and the detection limit of 125 ng/L is obtained.

Keywords: aptamer recognition, AuNPs color changes, naked eye detection

伏马菌素 Fumonisins 是由南非的 Gelderblom 等于 1988 年首次发现[1]，它主要包括串珠镰刀菌 *Fusarium moniliforme* 产生的一组结构相关的 6 种水溶性真菌毒素(FB_1、FB_2、FB_3、FB_4、FA_1、FA_2)如图 1 所示[2]。其中 FB 是天然污染玉米样品或真菌培养物中伏马素的主要组成成分。伏马素的结构与神经鞘氨醇十分相近，因而能特异性地干扰神经鞘氨醇的生物合成。伏马菌素的毒性存在种属特异性和靶器官特异性，现有资料表明，FB 能引起马脑白质软化症(ELEM)、猪肺水肿(PPE)、大鼠原发性肝癌，对家禽的免疫系统有免疫抑制作用，此外，FB 还被怀疑是人食道癌的致病因子[3]。FB 中的 FB_1，相对分子质量 721，是污染玉米或串珠镰刀菌培养物中伏马菌素的主要组分，也是导致伏马菌素毒性作用的主要原因。世界卫生组织联合专家委员会规定了其临时的每天摄入量最大值[4]。欧盟在 98/53/EC 指令中规定人类直接食用的花生中 AFs (B1+B2+G1+G2)应小于 4 μg/kg[5]。



	R_1	R_2	R_3
FA_1	OH	OH	CH_2CO
FA_2	H	OH	CH_2CO
FB_1	OH	OH	H
FB_2	H	OH	H
FB_3	OH	H	H
FB_4	H	H	H

图 1 伏马菌素的化学结构

Fig. 1 Structure Chart of Fumonisins

FB_1 高温不能使其失去活性，鉴于 FB_1 的剧毒性和广泛的流行性，以及它所带来的危害，建立一定的 FB1 检测方法尤为必要。目前已经建立起的检测方法包括薄层层析法 TLC、气谱质谱联用法 GC/MS、高效液相色谱法 HPLC、毛细管电泳法、酶联免疫吸附法(ELISA)，日本 Kikkoman 公司用 KLH 和 OVA 作为 FB_1 的载体蛋白，制备了抗 FB1 的单克隆抗体 mAb，建立了以 mAb 为基础的 ELISA 检测方法，并制成试剂盒[6]，但价格昂贵。这些方法虽具较高的灵敏度和特异性，但成本较高而且需要精密的仪器和专门的从业人员，需要稳定的抗体来源，耗时耗力。

因此，有必要发展一种低成本，不使用复杂仪器，方便快捷而又灵敏的检测方法。比色法因易于观察而成为受欢迎的技术。由于纳米金粒子的高触灭系数、光特性的距离依赖性，近来在 DNA 相关的比色分析中常被用作比色的介质[7]。纳米金的聚集最早是由 Mirkin 等发现[8]，他们报道了一种新的利用纳米金光学特性的距离依赖性来检测多核苷酸。这为纳米金的应用开辟了一个新的途径。

Aptamer 是通过 SELEX 技术从随机寡核苷酸库中筛选得到的单链寡核苷酸[9]。在某种理化条件下，Aptamer 可以折叠形成发夹，颈环等结构与目标物质特异性结合。相对于传统的抗原抗体等技术，Aptamer 具有更高的选择行、特异性、亲和性[10-11]，而且能够区分结构及其相似的物质[12-13]如 FB_1、FB_2 等，因此受到一些专家学者的极大关注。FB_1 的 Aptamer 是由 Maureen Mc Keague 等在 2010 年筛选得到的[14]。这为FB_1 的高灵敏度检测提供了一种有效的工具。

本实验中用纳米金作为介质，FB_1-aptamer 作为识别元素来检测 FB_1。以前报道纳米金的聚集大都是由盐诱导引起的，作者采用 DNA 杂交互补的方式来达到聚集的目的，当 FB_1-aptamer 与目标物质 FB_1 特异性结合后，两条互补的 DNA 就会杂交，导致纳米金的聚集，实现快速可视化的检测。

1 材料与方法

1.1 试剂

短连 DNA1 序列 5′SH—3′ AAT TGA ATA AGC TGG TA；短连 DNA2 序列 5′—3′SH TAC

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

CAG CTT ATT CAA TT;伏马菌素适配体序列 5′–ATA CCA GCT TAT TCA ATT —AAT CGC ATT ACC TTA TAC CAG CTT ATT CAA TTA CGT CTG CAC ATA CCA GCT TAT TCA ATT—AGA TAG TAA GTG CAA TCT–3。上述 DNA 都在"上海生工"合成,用含有质量分数 1% SDS 的 10 mmol/L 的 PB(pH 7.4)溶液来稀释。DNA 浓度通过紫外在波长 260 nm 处的吸收值来获得。伏马菌素购买于 Sigma 公司,氯金酸(HAuCl4)购买于上海久岳化工有限责任公司,柠檬酸钠购买于中国医药上海化学试剂公司,其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

UV–Vis (–NIR)UVProbe 2.33 版分光光度计,日本岛津公司产品;JEM–2100HR 透射电镜(TEM),日本 JEOL 公司产品;DF–101S 型集热式磁力加热搅拌器,河南巩义市予华仪器厂产品;Centrifuge 5804R 台式高速冷冻离心机器,上海安亭科学仪器厂产品;Biorad 电泳仪,美国 Bio–rad 伯乐公司产品;Biorad 凝胶成像仪,美国 Bio–rad 伯乐公司产品;MOS–450 AF–CD 圆二色光谱仪,France,Bio–Logic 公司产品。

1.3 纳米金的制备

采用对 Grabar 等[15]的方法略加改进来制备纳米金溶液,在三口圆底烧瓶中加入 95.8 mL 超纯水,再加入 4.2 mL 质量分数 1%氯金酸溶液,磁力、回流加热搅拌,持续煮沸 10 min,然后迅速加入 10 mL 质量分数 1%柠檬酸三钠溶液,煮沸 10 min。最后将热源除去,继续搅拌 15 min,将圆底烧瓶取下,冷却至室温,得到的棕红色液体,即为纳米金。主要通过紫外、可见吸收图谱、透射电子显微镜对其进行了表征。

1.4 FB_1 的检测

取 1000 μL 的纳米金于 2.5 mL 的离心管中(事先用缓冲液清洗干净,避免使纳米金颜色发生改变),12 000 r/min 离心 20 min,取上清 500 μL,然后分别取短连 DNA 1、DNA 2 各 15 μL 每管中,37 ℃摇床孵化 12 h,然后逐步加入 NaCl(1 mol/L),加之前进行超声,每次增加 50 mmol/L,直至 DNA1 中的 NaCl 浓度达到 500 mmol/L,DNA2 中的 NaCl 浓度达到 300 mmol/L,再孵化过夜。离心去上清液,再用 1×PCR 扩增缓冲液进行溶解。得到短链修饰的纳米金。取 DNA 1 修饰的纳米金 500 μL,加入 FB_1 适配体并保证其过量进行杂交,得到适配体修饰的纳米金,然后加入不同浓度的 FB_1,孵化 30 min,离心去上清液再加入 DNA2 链修饰的纳米金,PCR 仪 95 ℃ 5 min 后关闭电源,让其自然降温,观察颜色变化并在 400~800 nm 进行 UV–vis 扫描。

1.5 啤酒中 FB_1 的加标回收

按照 2.3 FB_1 的检测中的方法制备适配体修饰的纳米金和短链 DNA2 修饰的纳米金,在购买来的啤酒中加入 FB_1,使 FB_1 的质量浓度分别为 190、450、600、800、1 250 ng/L,过膜脱气后采用甲醇–水提取法,加入体积分数 75%的甲醇水溶液,振荡提取 30 min,静置后取上清分装,–20 ℃保存待测。再按照上述方法进行孵化杂交,最后在 UV–vis 分光光度计上测波长为 520 nm 和 630 nm 处的吸收值。

2 结果与讨论

2.1 FB_1 检测的原理

纳米金本身在柠檬酸钠的缓冲溶液中,由于斥力大于万德华力,相对稳定而呈现红色。当在纳米金的表面连接上 DNA1 链和 FB_1–aptamer 之后(见图 2),加入目标物质 FB_1,这时 FB_1–aptamer 就会优先与目标物质 FB_1 结合,DNA1 链暴露出来,再加入与 DNA1 链互补的 DNA2 链,通过杂交互补的方式使纳米金的距离靠近。由于纳米金的颜色具有光距离依赖特性,距离拉近就会引起纳米金颜色的变化,加入的目标物质浓度不同,纳米金聚集的程度不同,导致纳米金呈现不同颜色的变化,从而实现可视化的检测。

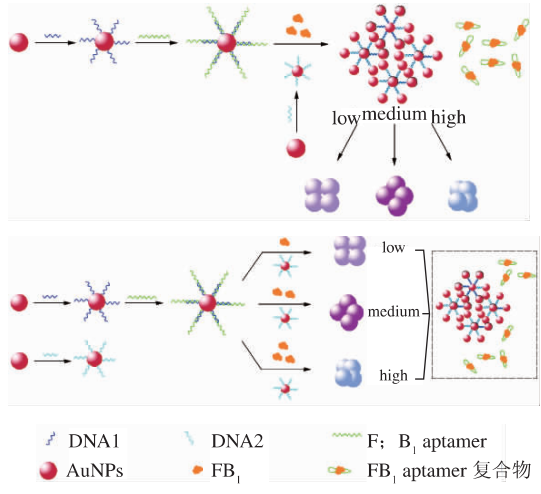


图 2 用纳米金和 FB_1–aptamer 检测 FB_1 的原理

Fig. 2 Schematic representation of detection FB_1 using nanoparticles linked FB_1–aptamer

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 NaCl 浓度的优化及杂交条件的选择

纳米金与 DNA 的连接主要是在 DNA 上修饰 SH,通过 S-Au 键将 DNA 修饰在纳米金的表面[16-17],而纳米金上 DNA 的附着量和孵化时 NaCl 的浓度相关,以往研究中采用的大都是 100 mmol/L 的 NaCl 浓度,冰箱 4 ℃,48 h 以上的孵化条件[18-19]。但当采用这个方法加入 NaCl 为 100 mmol/L 时,纳米金的颜色就发生了变化。本实验成功的一个前提就是在最后一步 DNA2 链与 DNA1 链杂交之前的任何一步都应保持纳米金的颜色不发生改变,为此作者对实验条件进行了探索。见表 1、表 2 和图 3。

表 1 DNA1 链即 5′端与纳米金孵化条件的选择

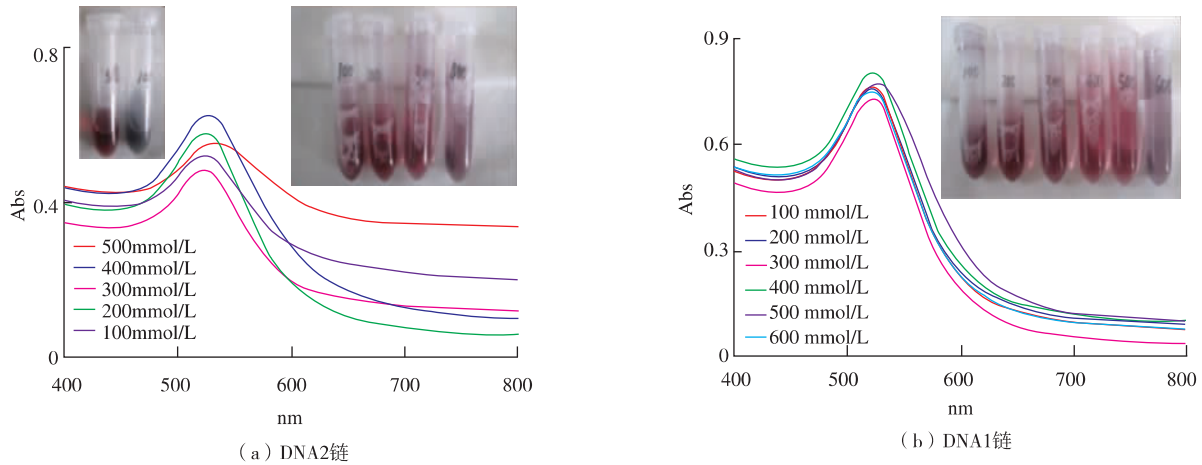
Table 1 Incubation conditions choice of DNA1(5′end)chain and AuNPs

NaCl mmol/L	总 DNA 260	T/℃	余 DNA 260	有效 DNA 260	T/℃	余 DNA 260	有效 DNA 260
100	0.390 8	37	0.291 4	0.099 4	4	0.312 1	0.078 7
200	0.390 8	37	0.275 2	0.115 6	4	0.285 3	0.105 5
300	0.390 8	37	0.212 8	0.178	4	0.231 4	0.159 4
400	0.390 8	37	0.184 5	0.206 3	4	0.200 9	0.189 9
500	0.390 8	37	0.143 2	0.247 6	4	0.189 5	0.201 3
600	0.390 8	37	0.120 7	0.270 1	4	0.164 6	0.226 2

表 2 DNA2 链即 3′端与纳米金孵化条件的选择

Table 2 Incubation conditions choice of DNA2(3′end)chain and AuNPs

NaCl mmol/L	总 DNA 260	T/℃	余 DNA 260	有效 DNA 260	T/℃	余 DNA 260	有效 DNA 260
100	0.372 9	37	0.320 3	0.052 6	4	0.341 5	0.031 4
200	0.372 9	37	0.281 4	0.091 5	4	0.320 4	0.052 5
300	0.372 9	37	0.240 6	0.132 3	4	0.305 7	0.067 2
400	0.372 9	37	0.210 7	0.162 2	4	0.274 6	0.098 3
500	0.372 9	37	0.180 9	0.192	4	0.233 8	0.139 1



(a) DNA2链　　(b) DNA1链

图 3 不同 NaCl 浓度条件下 DNA1、DNA2 链与纳米金孵化后的扫描光谱和颜色比较

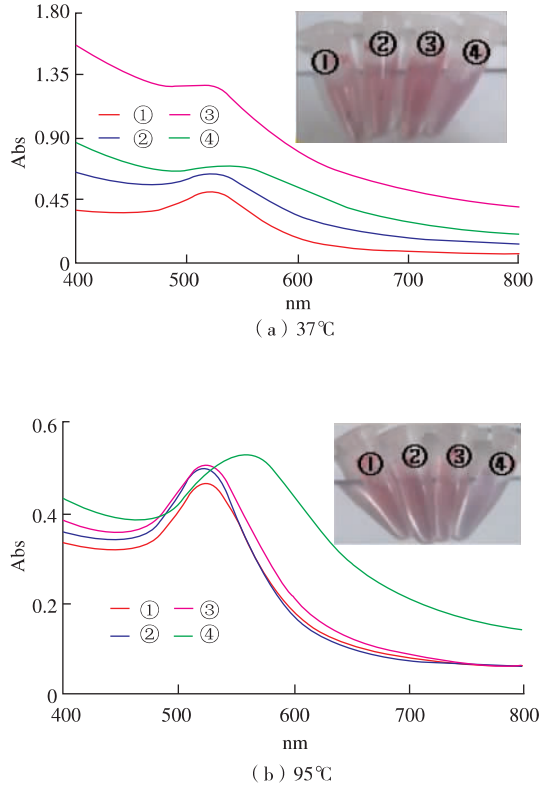
Fig. 3 UV-vis absorption spectra and chart of AuNPs linked DNA1 or DNA2 at Different conditions of NaCl concentration

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图 3 中的 100~600 mmol/L 代表的是 NaCl 浓度,其中 a 图是 DNA2 链(左上角是没有加入 SDS,NaCl 浓度为 100 mmol/L 时的纳米金颜色,其余都为加了 SDS 纳米金的颜色),b 图是 DNA1 链。

从表 1 和表 2 可以推算出,无论是 DNA1 还是 DNA2 链,无论是 37 ℃还是 4 ℃,附着在纳米金表面的有效 DNA 量都是随着 NaCl 浓度的增加而增大的,37 ℃的孵化要好于 4 ℃的孵化。从表 1 和表 2 还可以算出,NaCl 为 100 mmol/L 时,DNA1 链的孵化率只有 20.3%,DNA2 链的孵化率只有 14.1%。为了保持纳米金的颜色在连上 DNA 之后不发生变化,提高 DNA 在纳米金表面的附着量,本实验中加入了表面活性剂 SDS,从图 3(b)可以看出当加入 SDS 后,DNA1 链的 NaCl 浓度可以达到 500 mmol/L 时颜色仍不发生改变,而当加到 600 mmol/L 时,颜色开始变紫,400~800 nm 的紫外扫描光谱也显示了 NaCl 浓度为 500 mmol/L 时,峰的位置没有发生红移,而当 NaCl 浓度为 600 mmol/L 时,峰宽几乎没有变化,但却发生了红移。同样,如图 3(a)所示,当 DNA2 链的 NaCl 浓度达到 300 mmol/时 L,纳米金颜色不发生改变,峰位也没有出现红移;而当 NaCl 浓度达到 400 mmol/L 时,颜色开始变化,峰位也发生了红移;NaCl 浓度为 500 mmol/L 时,峰位红移得更多,而且峰开始变宽。所以作者最后选择了 DNA1 链熟化的 NaCl 浓度为 500 mmol/L,此时的孵化率为 63.3%,是之前的 3 倍。DNA2 链的 NaCl 浓度为 300 mmol/L,此时的孵化率为 30.6%。本实验中加入 SDS 的主要作用一是增加纳米金的稳定性,降低其对管壁的吸附性;二是缩短了实验时间,以前的孵化一般都要在 48 h 以上,本实验只需 10 多个小时;三是在维持纳米金颜色不变的同时增加了 NaCl 的浓度,进而增加了纳米金表面 DNA 的附着量,这对于以纳米金和 DNA 链为基础的其他实验都是至关重要的环节,因为 DNA 附着量的增加可以大大地提高实验的灵敏度。

得到 DNA1 链和 DNA2 链修饰的纳米金之后,选择了 4 种常见的缓冲液分别作 37 ℃ 2 h 和 95 ℃ 5 min 然后让其自然降温的方式对杂交条件进行了筛选。从图 4 可以看出,95 ℃ 5 min 然后让其自然降温的方式得到的扫描图更稳定,1×PCR 扩增缓冲液纳米金颜色开始变紫,峰位红移得多而且峰也变得较宽,这对实验极其有利,因此最后选择的杂交温度为 95 ℃,杂交缓冲液为 1×PCR 扩增缓冲液。



注:①0.001 mol/L EDTA,0.05 mol/L NaCl,0.02 mol/L Tris–HCl;②超纯水;③20 mmol/L NaCl+10 mmol/L PB;④1×PCR 扩增缓冲液

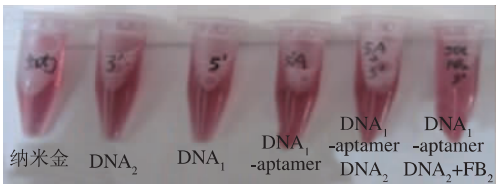
图 4 4 种缓冲液杂交光谱及颜色比较

Fig. 4 UV–vis absorption spectra and chart of AuNPs after DNA1 and DNA2 hybridzation at different experimental conditions of temperature and buffer

2.3 FB_1 的定量检测

保持连有适配体的纳米金在加入 DNA2 链后颜色不发生改变是本实验成功的另一个关键因素,如图 5(a),因此在 DNA1 链与 Aptamer 杂交时,要使 Aptamer 的量足够的大,直至加入 DNA2 链颜色不发生变化为止,然后再进行后续的实验。而当加入与目标物质结构相似的物质 FB2 时,纳米金的颜色也几乎没有发生变化,这充分证明了适配体的高特异性,能够区分结构相似的物质。图 5(b)显示的是 DNA1、DNA2 以及 DNA1 连接上 Aptamer 后的电泳图,DNA1 链连接上 FB1–aptamer 之后,相对分子质量变大,同样条件下跑得较慢,这也证明了作者在纳米金表面成功连接上了 FB_1–aptamer。

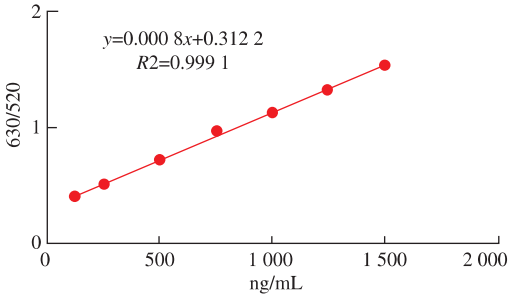
© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



（a）颜色



（b）电泳

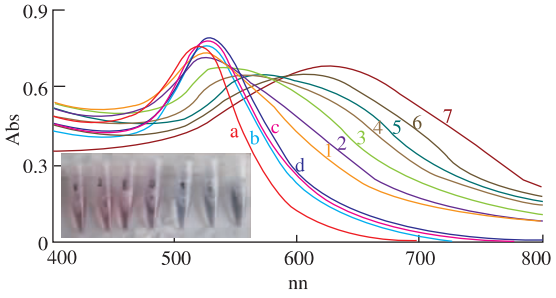


（c）线性关系

图 5 纳米金连接上 DNA1 DNA2 及 DNA1 连接上 Aptamer 后的电泳图以及加入不同浓度的 FB_1 与 630/520 比值之间的线性关系

Fig. 5 Electrophorogram of AuNPs linked DNA1 or DNA2 or DNA1-aptamer and Calibration curve of the ratio of 630/520 and different FB_1 concentrations

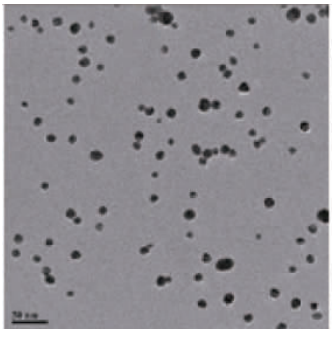
当加入不同质量浓度的目标物质 FB1 时，Aptamer 优先与目标物质结合，暴露的 DNA1 链就会与 DNA2 链杂交互补，使纳米金颗粒发生聚集，如图 6 所示，FB_1 质量浓度逐渐增大，纳米金聚集程度也越大，导致了纳米金颜色由红色到紫色再到蓝色的逐渐变化。从图 6 紫外扫描光谱上也可以看出，当纳米金上连接了 DNA 链之后，它的峰位发生微弱的红移，但峰宽仍保持不变，而且纳米金的颜色也没有发生改变。当加入的目标物质质量浓度逐渐增大之后，它的峰红移越来越多，而且峰变得很宽，520 nm 处纳米金的特征峰值逐渐减小，而接近 630 nm 处的吸收值逐渐增大，630/520 的比值也规律性地变化。以加入的目标物质质量浓度为横坐标，630/520 的比值为纵坐标，在目标物质质量浓度 125~1 500 ng/L 范围内其线性回归方程为 $y=0.000\ 8x+0.313\ 1$，$R^2=0.999\ 3$，线性关系良好（图 5（c）），对加入目标物质质量浓度 125、250、500、750、1 000、1 250、1 500 ng/L 重复 3 次，测得其在 520 nm 和 630 nm 处的吸收值，630/520 的相对标准偏差（RSD）分别为 2.53%、2.46%、2.53%、2.52%、3.10%、2.72%、2.53%，重复性较好，检测限为 125 ng/L。透射电镜也显示了纳米金逐渐聚集的过程，见图 7。但当目标物质质量浓度进一步增大即大于 1 500 ng/L，峰位红移得更多而且峰值减小，630/520 的比值不再在这个线性范围之内。CD 图是检测 DNA 二、三级结构的有效工具，本实验中对加入不同质量浓度的目标物质之后的混合物进行了 CD 190~350 nm 的扫描，结果如图 8 所示，波长在 270 nm 附近，峰值随着 FB_1 质量浓度的增加而加大，证明 Aptamer 形成了发卡、颈环等结构并与目标物质发生了特异性结合。



a:AuNPs；b:AuNPs +DNA2； c:AuNPs +DNA1；
d:AuNPs + DNA1+FB1-aptamer；
1:125 ng/L； 2:250 ng/L； 3:500 ng/L； 4:750 ng/L；
5:1000 ng/L； 6:1250 ng/L； 7:1500 ng/L。

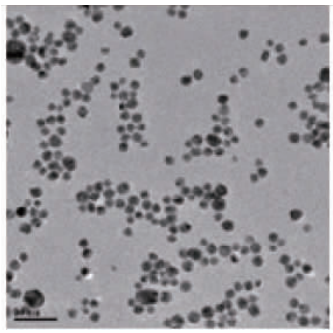
图 6 不同 FB_1 浓度条件下的扫描光谱及纳米金颜色比较

Fig. 6 UV-vis absorption spectra and chart of AuNPs at different FB_1 concentrations

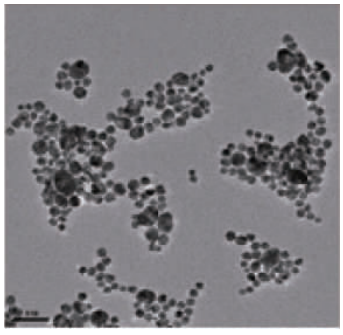


(a) 纳米金+aptamer

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



(b) FB_1质量浓度500 ng/mL
时纳米金的聚集



(c) FB_1质量浓度1 000 ng/mL
时纳米金的聚集

图 7　纳米金的 TEM 电镜图

Fig. 7　TEM image of AuNPs

另外，本实验中还发现稀释 DNA 粉末时 PB 要好于 Tris–buffer，这可能是因为 DNA 的骨架是电负性的，而 Tris 中含有氨基带正电，二者之间存在的静电作用占有了 DNA 在纳米金表面的大部分有效空间，从而降低了 DNA 的附着量。超声也可以增加 DNA 的附着量，可能是因为超声打破了纳米金表面 DNA 分子间的相互作用，创造了更多的剩余空间，导致了 DNA 附着量的增加。而纳米金粒径增大也会增加 DNA 的附着量。

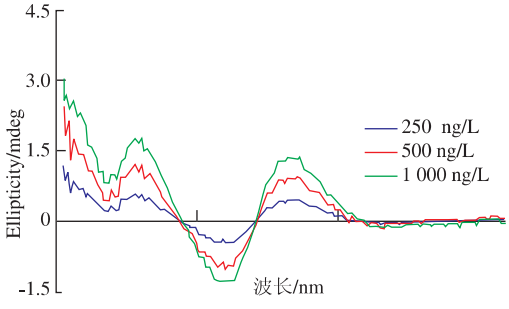


图 8　不同浓度下的 CD 图

Fig. 8　CD spectra of different concentrations of FB1

2.4　啤酒中伏马菌素 FB_1 的加标回收

因谷物和水果受到伏马菌素的污染，以它们为原料生产的啤酒、黄酒等发酵酒及以感染了黑曲霉的葡萄等水果为原料制成的果汁、果(葡萄)酒中都极易含有对人体有害的伏马菌素，但目前对于伏马菌素的限量标准都集中在消费量较大的玉米谷物及制品，对于酒类产品中伏马菌素的限量及检测方法报道很少。很多研究者都在致力于酒中伏马菌素的脱毒研究，因此将作者新建立的方法应用于啤酒(以大麦为主要原料，玉米、小麦等为辅助原料发酵而成)中伏马菌素 FB1 的检测，其加标回收率见表 3，重复测定 3 次，在 190、450、600、800、1 250 ng/L 的 RSD 值分别为 6.38、8.70、10.67、6.38、6.38。

表 3　啤酒中伏马菌素 FB_1 的加标回收率

添加量/(ng/L)	测得量/(ng/L)	回收率/%
190	181.0	95.3
450	438.1	97.4
600	562.2	93.7
800	732.8	91.6
1 250	1 186.2	94.8

3　结　语

本实验中以纳米金为介质，以适配体为识别元素，实现了对 FB1 的可视化检测。当加入 SDS 时，DNA 链与纳米金的孵化过程中，NaCl 浓度可以达到 500 mmol/L 而纳米金仍不变色，打破了以前报道中只加入 100 mmol/L 的界限 [20]，进而增加了 DNA 的附着量，提高了实验的灵敏度。当加入不同质量浓度的 FB1 时，纳米金颜色发生改变，630/520 的值也发生规律性变化，进而实现定量检测的目的，最低检测限为 125 ng/L。CD 光谱显示了 Aptamer 与目标物质特异结合后发卡、颈环、G–四聚体等结构的存在。在啤酒中的加标回收率良好。这种简单快速低成本的可视化检测方法越来越受到科学工作者的重视，它将为分析检测提供一种全新的而且可行的途径。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献:

[1] Grelderblom W C,Jaskiewicz K,Marasas W F,et al. Fumonisins novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*[J]. **Appl Environ Microbio**,1988,54(7):1806-1811.

[2] **郭云昌,刘秀梅,刘江. 抗伏马菌素 B_1 单克隆抗体的制备及鉴定**[J]. **卫生研究**,1999,28(5):297.
GUO Yun-chang,LIU Xiu-mei,LIU Jiang. Preparation and identification of anti-fumonisin B_1 monoclonal antibody[J]. **Journal of Hygiene Research**,1999,28(5):297.(in Chinese)

[3] William Pnorred. Fumonisins-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*[J]. **Journal of Toxicolo gyand Environment Health**,1993,38:309-328.

[4] SCF. Updated Opinion on Fumonisin B_1,B_2 and B_3 [EB/OL]. [2010-11-18]Available online:http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out185_en.pdf

[5] **李军,于一茫,田苗,等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素 玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素** A[J]. **色谱**,2006,24(6):581-584.
LI Jun,YU Yi-mang,TIAN Miao,et al. imultaneous determination of aflatoxins,zearalenone and ochratoxin a in cereal grains by immunoaffinity column and high performance liquid chromatography coupled with Post2Column photochemical derivatization[J]. **Chinese J ournal of Chromatography**,2006,24(6):581-584.(in Chinese)

[6] Satoshi Fukuda,Ayumu Nagahara,Mamoru Kikuchi,et al. Prearation and characterization of anti fumonisin monoclonal antbodies [J]. **Biosci Biotech Biochem**,1994,58(4):765-767.

[7] YANG Cheng,WANG Yong,Marty Jean-Louis,et al. Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodied gold nanoparticles indicator[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2001,26:2724-2727.

[8] Mirkin C A,Letsinger R L,Mucic R C,et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials[J]. **Nature**,1996,382:60-76.

[9] Tombelli S,Minunni M,Mascini M. Analytical applications of aptamers[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2005,20:2424-2434.

[10] Stoltenburg R,Reinemann C,Strehlitz B. FluMag-SELEX as anadvantageous method for DNA aptamer selection[J]. **Anal Bioanal Chem**,2005,383:83-91.

[11] Shaun D Mendonsa,Michael T Bowser. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis[J]. **Anal Chem**,2004,76:5387-5392.

[12] Jorge A Cruz Aguado,Gregory Penney. Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer[J]. **Journal of agricultural and food chemistry**,2008,56(22),10456-10461.

[13] Camillel A Hamula,Jeffrey W Guthrie,ZHANG Hong-quan,et al. Selection and analytical applications of aptamers[J]. **Trends in Analytical Chemistry**,2006,25(7):681-691.

[14] Maureen Mc Keague,Charlotte R. Bradley,Annalisa De Girolamo,et al. Screening and initial binding assessment of Fumonisin B_1 aptamers[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2010,11:4864-4881.

[15] Grabar K C,Smith P C,Musick M D,et al. Natan,Kinetic control of interparticle spacing in Au colloid-based surfaces:rational nanometer-scale architecture[J]. **J Am Chem Soc**,1996,118(5):1148-1153.

[16] **胡瑞省,刘善堂,朱涛,等. 金纳米粒子通过形成** Au-S **键的组装**[J]. **物理化学学报**,1999,15(11):961-964.
HU Rui-sheng,LIU Shan-tang,ZHU Tao,et al. Covalent attachment of Gold Nanoparticles onto the Thiol-Terminated surface through Au-S bonging[J]. **Journal of Physics and Chemistry**,1999,15(11):961-964.(in Chinese)

[17] Mirhin C A,Letsinger R L,Mucic R C,et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials[J]. **Nature**,1996,382:607-609.

[18] Mucic R C,Storhoff J J,Mirkin C A,et al. DNA-directed synthesis of binary nanoparticle net work materials[J]. **J Am Chem Soc**,1998,120:12674-12675.

[19] Elghanian R,Storhoff J J,Mucic R C,et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides-based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles[J]. **Science**,1997,277:1078-1081.

[20] **缪婷婷. 新型发光纳米结构的制备及其分析应用**[D]. **无锡:江南大学食品学院**,2010.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net