

# 上转换荧光-适配体免疫层析试纸条的构建及其在黄曲霉毒素 B1 检测上的应用

李丹阳, 李立煌, 艾超超, 任 磊\*

(厦门大学材料学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 随着生活水平的提高, 人们对食品安全的要求越来越高, 而存在于食品及农产品中因真菌而产生的黄曲霉毒素 B1 是人们健康的一大威胁。因此, 探寻一种简便快速检测黄曲霉毒素 B1 的方法对食品安全、农产品质量等方面具有重要意义。该文通过配体交换的方法, 使用磷酸化的黄曲霉毒素 B1 适配体将油酸分子包裹的油溶性上转换纳米颗粒改为水溶性纳米颗粒。在构建水溶性纳米荧光探针的同时, 保留了适配体识别黄曲霉毒素 B1 的能力, 结合免疫层析试纸条, 采用小分子竞争法快速定量检测黄曲霉毒素 B1。该检测方法的线性范围为 5~100 ng/mL, 检测限为 2.4 ng/mL。

**关键词:** 上转换荧光纳米颗粒; 黄曲霉毒素; 适配体; 免疫层析试纸条

中图分类号: Q 819

文献标志码: A

黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1) 是来自于黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 等霉菌所产生的一种次生代谢物, 广泛存在于花生油、牛奶、饲料和粮食中<sup>[1]</sup>。国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 将 AFB1 归类为 I 类致癌物, 具有致突变、致畸、免疫抑制和致癌等作用, 可能导致肝癌和皮下肉瘤等疾病<sup>[2]</sup>。但是目前无有效措施可以阻断 AFB1 污染, 其污染食品的问题被认为是食品安全中最关键的问题之一<sup>[3]</sup>。传统的 AFB1 检测方法主要有色谱法、免疫检测和酶联免疫法吸附等。其中高效液相<sup>[4]</sup>和液相色谱-质谱<sup>[5]</sup>具有精度高、准确性好和重复性高的优点, 但该检测方法需要繁琐的检测步骤以及专业的检测人员, 要求较高<sup>[6]</sup>。而基于抗体和 AFB1 之间特异性识别的免疫检测虽然不依赖于大型仪器且检测的灵敏度也比较高, 但是其检测性能主要取

收稿日期: 2019-06-26 录用日期: 2019-11-06

基金项目: 福建省科技计划项目 (2017Y0078)

\*通信作者: renlei@xmu.edu.cn

决于保存条件高、制备困难和价格昂贵的抗体<sup>[7]</sup>。因此,开发一种简单、快速、低成本的 AFB1 检测方法成为当务之急。

核酸适配体 (Aptamer, Apt), 又称核酸配体, 简称适配体, 是通过指数富集配体系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 在体外筛选得到的一段单链寡核苷酸, 可以通过特定的三维结构与靶标高特异性、高亲和力结合<sup>[8]</sup>。Apt 不仅可以和抗体一样通过自身特殊构象识别特定的靶标, 而且具有生产简单、结构可逆、结合靶标范围广、稳定性好和易修饰等优点<sup>[9]</sup>。Jin 等<sup>[10]</sup>通过构建基于适配体传感器的纳米金和上转换纳米颗粒能量共振转移体系获得了对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的高特异性、高灵敏度检测。

免疫适配体层析技术通过毛细管原理使得样品垫上的样品逐渐向另一端渗移, 利用胶体金、量子点等标记物质与靶标物的特异性结合从而呈现独特的光学信号<sup>[11]</sup>。Wu 等<sup>[12]</sup>通过胶体金技术成功构建了一种基于适配体识别玉米赤霉烯酮的试纸条, 获得了对玉米赤霉烯酮的简单、快速和低成本的检测方法。然而, 传统的标记物质由于光稳定性不高、背景信号干扰强等缺点, 从而难以实现高灵敏度条件下的定量检测。

稀土掺杂的上转换荧光纳米颗粒具有吸收近红外光并转换为可见光的荧光特性, 该类材料相比于传统的荧光染料具有发光稳定, 抗光漂白, 生物背景荧光低以及发光寿命长 (可长达数十毫秒) 等优势, 在免疫层析检测领域具有重要的应用潜力。Jin<sup>[13]</sup>等通过构建核酸适配体的上转换荧光纸基传感器实现了茶水中黄曲霉毒素 B1 的快速检测, 但所构建的上转换荧光纳米颗粒-适配体复合材料的工艺过程较为复杂, 并且上转换纳米颗粒的荧光效率较低, 从而难以实现对 AFB1 的高效痕量检测。

为此, 本文构建了发效率较高的核壳结构上转换纳米颗粒, 并通过磷酸化的 AFB1 适配体相偶联, 具有制备工艺简单等优点。基于高效的上转换发光效率及高度特异性的 AFB1 适配体, 本文实现了对 AFB1 的高度灵敏的痕量检测, 进一步拓展了上转换荧光-适配体在免疫层析技术领域中的应用。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和材料

六水合氯化铈 ( $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 纯度 99.99%)、六水合氯化镱 ( $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 纯度 99.99%)、

六水合氯化铒( $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 纯度 99.99%)均购于济宁天亿新材料有限公司; 环己烷( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ , 分析纯)和氢氧化钠( $\text{NaOH}$ , 分析纯)均购于西陇化工股份有限公司; 氟化铵( $\text{NH}_4\text{F}$ , 纯度 98%)、油酸(oleic acid, OA, 纯度 90%)和 1-十八烯(1-octadecene, ODE, 纯度 90%)均购于阿法埃莎(中国)化学有限公司; 超纯水( $\text{H}_2\text{O}$ , 18.2 M $\Omega$ )由实验室超纯水机(Smart-S15, 和泰)制得; PBS (0.01 mol/L, pH=7.4)由实验室制得; 黄曲霉毒素 B1 偶联抗原(AFB1-BSA)购于山东绿都生物科技有限公司; 链霉亲和素及黄曲霉毒素的 Apt 购于上海生工生物工程有限公司, 单链核酸序列<sup>[14]</sup>为: 5'-GTT GGG CAC GTG TTG TCTC TCT GTG TCT CGT GCC CTT CGC TAG GCC CACA-3', 生物素修饰的互补链为: 5'-TG TGG GCC TAG CGA AGG GCA CGA GAC ACA GAG AGA CAA CAC GTG CCC AAC-3'-Biotin; 试纸条(由样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板组成)由厦门信德科创生物科技有限公司提供。

## 1.2 仪 器

ZNCL-TS100 型智能数显磁力电热套, 巩义市予华仪器有限责任公司; SXJQ-1 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; BS-210S 型电子分析天平, 北京赛多利斯仪器有限公司; H1650-W 型高速离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; RE-5298 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器有限公司; Rigaku Ultima IV 型 X-射线衍射(XRD)分析仪, 日本理学株式会社; LOS-BLD-0980-1300-C 型 980 nm 连续激光器, 北京海特光电有限责任公司; JEM1400 型透射电子显微镜(TEM), 日本 JEOL 公司; Fluoromax-4 型荧光分光光度计, Horiba 公司; UV-2550 型紫外-分光光度计, 岛津企业管理(中国)有限公司; 免疫荧光分析仪, 厦门信德科创生物科技有限公司。

## 1.3 荧光纳米探针的构建

构建 Apt-荧光纳米探针主要分为两个部分: 1) 单一核结构上转换纳米颗粒(core upconversion nanoparticles, C-UCNPs)及核壳结构上转换纳米颗粒(core-shell upconversion nanoparticles, CS-UCNPs)的制备, 2) 利用 Apt 修饰 CS-UCNPs 构建荧光纳米探针。

采用经典的溶剂热法<sup>[15-16]</sup>合成 C-UCNPs, 主要步骤如下: 将  $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $n(\text{Y}^{3+}):n(\text{Yb}^{3+}):n(\text{Er}^{3+})=40:9:1$ , 共 0.5 mmol) 与 3 mL OA 和 7.5 mL ODE 在 100 mL 三口瓶中搅拌均匀, 在真空环境下加热至 130 °C, 保持 2 h, 自然冷却至室温。将含有 2 mmol  $\text{NH}_4\text{F}$  和 0.125 mmol  $\text{NaOH}$  的 5 mL 甲醇溶液缓慢加入三口瓶中, 搅拌加热至 80 °C

以除去溶液中的甲醇，在无氧无水的环境下，以 10 °C/min 的速度升至 100 °C 保温 5 min，之后继续升温至 120 °C 保温 5 min，再升温至 290 °C 并保温 1 h。待反应结束后自然冷却，并将溶液以 12 000 r/min 的速度离心 20 min，收集产物，重新分散在 10 mL 环己烷溶剂中，再加入 10 mL 50%（体积分数）乙醇，轻微震荡数次后静置分层过夜。收集上层溶液，将制备的 C-UCNPs 分散于 10 mL 的环己烷中于 4 °C 下保存备用。

采用层层生长法<sup>[17]</sup>制备 CS-UCNPs 来提高 C-UCNPs 的发光强度，从而提高其检测灵敏度。具体制备步骤如下：将上述 10 mL 纯化后的 C-UCNPs、3 mL OA 和 7.5 mL ODE 加入到 100 mL 四口瓶内，并在 60 °C 下旋转蒸发除去环己烷溶剂；然后将其置于磁力加热套搅拌加热，设定其升温温度为 290 °C，其间抽真空通氮气保持无氧无水条件；待其升温至 290 °C 后依次加入含 0.05 mmol Y<sup>3+</sup> 和 0.02 mmol F 的 OA 复合物前驱体，时间间隔为 15 min。在此制备过程中，须保持真空无氧无水条件，壳层厚度可以通过调节 OA 复合物前驱体的加入次数进行控制。产物收集纯化后置于 4 °C 下保存备用。本文中所用 CS-UCNPs 的壳层厚度为 30 层 (50.0 ± 2.5) nm。

由于在试纸条检测的应用过程中，样本的检测需要在水溶液中进行，而由溶剂热法合成的 CS-UCNPs 表面被非极性的 OA 分子包覆，使得 CS-UCNPs 无法稳定地分散在水溶液中，所以需要先对油溶性的 CS-UCNPs 进行改性。研究表明，与 OA 配体相比，磷酸根与稀土离子的配位能力更强<sup>[18]</sup>，因此可以采用配体交换的方法对 CS-UCNPs 进行改性并进一步进行纳米探针的构建。如图 1 (a) 所示，本研究选择磷酸化的 Apt 对油相的 CS-UCNPs 进行改性，从而得到了具有良好亲水性和生物相容性，同时保留 DNA 的碱基识别能力的纳米粒子<sup>[19-20]</sup>。主要实验步骤如下：取 1 mg OA 包裹的 CS-UCNPs，将其溶于 1 mL 三氯甲烷中；取 1.5 nmol Apt 溶于 2 mL 水中。将 CS-UCNPs 三氯甲烷溶液缓慢滴到含 Apt 的水溶液中，并剧烈搅拌过夜。反应结束后，在 980 nm 激光器平行照射油水界面的情况下，可以清楚地看到 CS-UCNPs 从下方三氯甲烷有机相（图 1 (b)）转移到上方水相中（图 1 (c)），表明 CS-UCNPs 改性成功。取上清液以 16 000 r/min 的速度离心 20 min，收集产物，并将其重新分散到水溶液中。

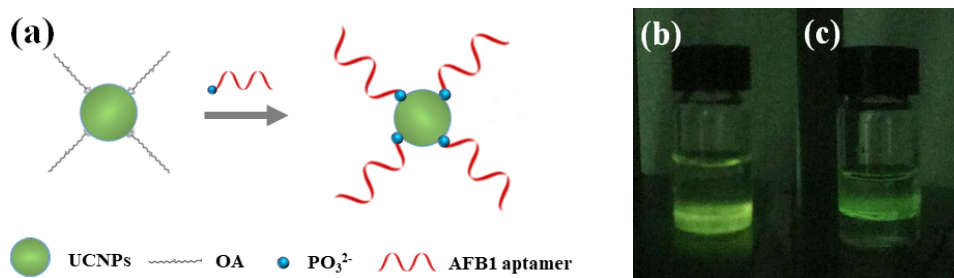


图 1 荧光纳米探针制备示意图 (a) 及表面改性前 (b) 与改性后 (c) 的光学图

Fig. 1 Schematic diagram of preparation of fluorescent nanoprobe (a) and its optical image of surface modification before (b) and after (c)

## 1.4 免疫层析试纸条的构建及检测过程

免疫层析试纸条由样品垫、硝酸纤维素反应膜和吸水垫依次按顺序粘贴在底板上, 将 0.8 mg/mL 的 AFB1-BSA 固定到硝酸纤维素膜构建检测线 (T 线), 生物素修饰的 Apt 互补链通过与链霉亲和素按照摩尔比 4:1 混合后 (SA-Biotinlated DNA) 固定到硝酸纤维素膜上构建质控线 (C 线)。检测过程如图 2 所示: 当待测溶液中不存在 AFB1 时, T 线中的 AFB1 和 C 线中的互补链均可与 CS-UCNPs-Apt 结合, CS-UCNPs-Apt 分别被 T 线和 C 线拦截, 在 980 nm 激光激发下看到两条绿色条带。当待测溶液中存在 AFB1 时, CS-UCNPs-Apt 优先与 AFB1 结合, 从而在流经 T 线时与 AFB1-BSA 结合的 CS-UCNPs-Apt 减少, 表现为在 980 nm 激光激发下 T 线亮度减弱。随着待测液中 AFB1 浓度的增加, T 线亮度逐渐降低直到消失。而 C 线上的互补序列可以通过碱基互补的方式捕获流经的 CS-UCNPs-Apt, 不受待测液中 AFB1 浓度的影响从而保持稳定的亮度。为降低荧光背景、提高灵敏度, 通过计算  $I_T/I_C$  值作为 AFB1 检测的依据。

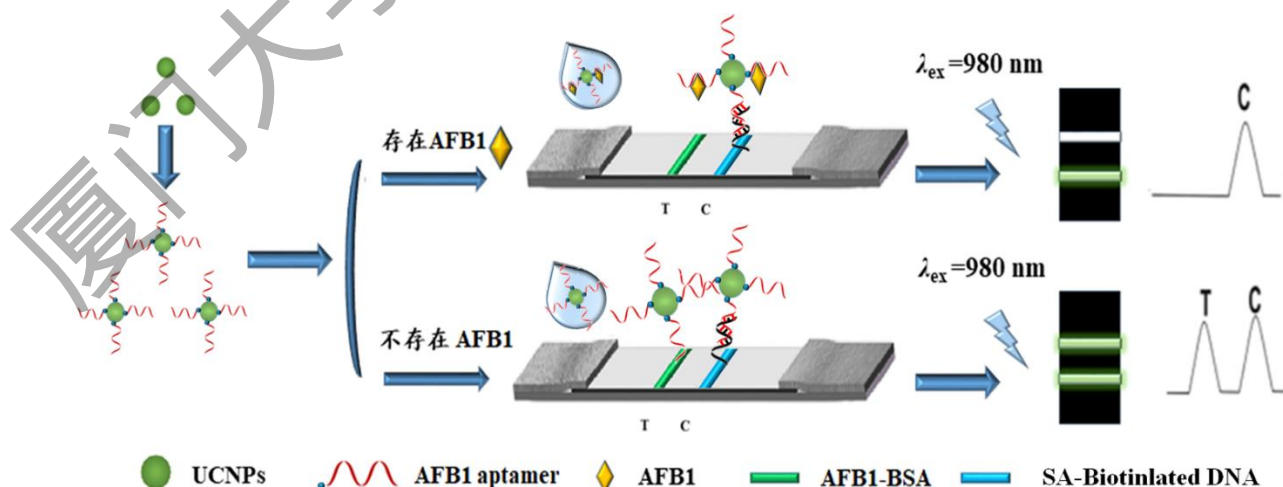


图 2 上转换纳米荧光试纸条检测 AFB1 的原理

Fig. 2 The principle of upconversion fluorescence test strips for the detection of AFB1

## 1.5 AFB1 定量检测

取 30  $\mu\text{L}$  2 mg/mL 的 CS-UCNPs-Apt 纳米荧光探针，分别加入不同浓度的 AFB1，使 AFB1 的最终浓度分别为 5, 10, 25, 50, 100, 200 和 300 ng/mL，共孵育 10 min 后取 30  $\mu\text{L}$  溶液进行滴样测试。将滴样后的试纸条静置 5 min，并用 200  $\mu\text{L}$  PBS 冲洗以降低荧光背景强度从而提高检测信号强度。待试纸条干燥后用荧光免疫仪分析仪器读取信号并计算  $I_{\text{T}}/I_{\text{C}}$  值。每组平行试验进行 3 次，并通过 SPSS 20.0 进行数据分析与处理。

## 1.6 实际样品检测

取花生样品进行研磨，称取 2 g 粉末于 50 mL 离心管中，加入 8 mL 正己烷和 10 mL 的 70%（体积分数）甲醇水溶液，振荡 5 min。在 4000 r/min 的速度下离心 10 min 后，去除上层液体。取 0.5 mL 下层液体并加入 0.5 mL 去离子水混匀，再取 0.5 mL 混匀液体加入 0.5 mL 甲醇-水溶液(体积比为 7:20)，振荡 30 s 后取 100  $\mu\text{L}$  进行分析。

# 2 结果与讨论

## 2.1 荧光纳米探针的表征

由于 C-UCNPs 的比表面积较高，掺杂的一部分稀土离子暴露在颗粒表面，使这些稀土离子所处的晶体场环境比内部的晶体场环境的不对称性高。另一方面，溶剂分子等外部环境会与颗粒表面的这些稀土离子接触，使上转换发光过程中的非辐射跃迁的几率增大，导致上转换发光的猝灭。因此，通过在 C-UCNPs 外部包覆基质结构类似的壳层，将稀土离子与外部环境隔开，从而提高 C-UCNPs 的发光强度<sup>[21]</sup>。TEM 图（图 3（a）~（c））显示所制备的纳米颗粒尺寸均一，分散性较好，其中单一核结构 C-UCNPs 的平均粒径和核壳结构 CS-UCNPs 的平均粒径分别为  $(15.0 \pm 2.5)$  和  $(50.0 \pm 2.5)$  nm，CS-UCNPs-Apt 的平均粒径为  $(52.0 \pm 2.5)$  nm；HRTEM 图（图 3（d）~（e））显示 C-UCNPs 及 CS-UCNPs 有相同的晶面间距，均是对应  $\text{NaYF}_4$ ，为 0.51 nm，证明该核壳结构的成功制备<sup>[21]</sup>。其中，通过图 3（f）（放大 3 万倍）可明显观察到纳米粒子外面包裹着一层有机物，表明 Apt 成功连接在粒子表面。

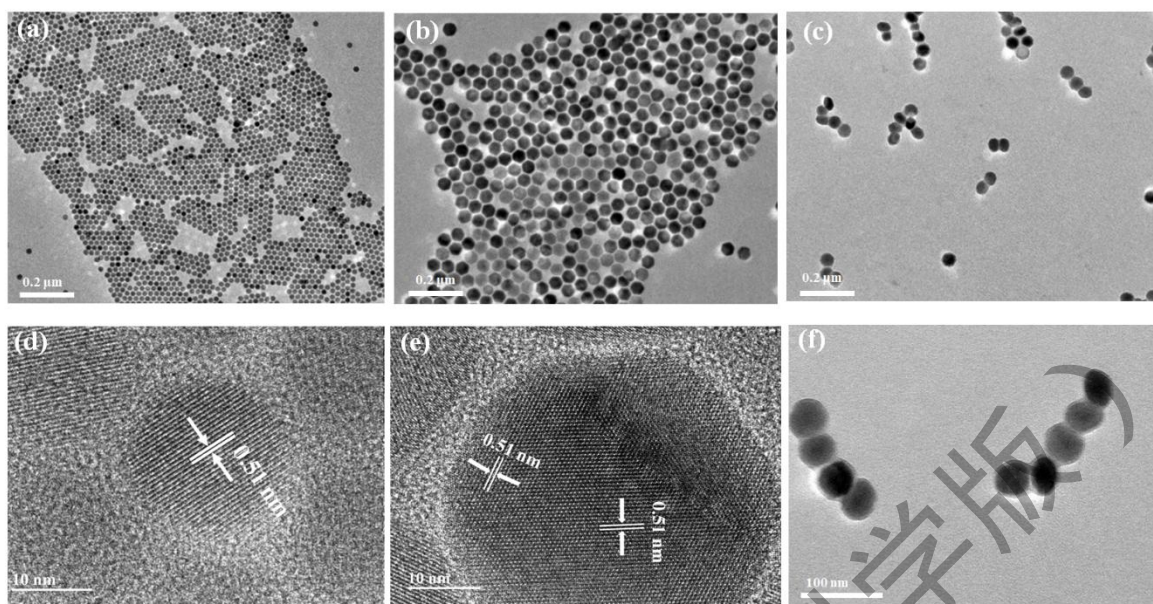


图 3 C-UCNPs (a), CS-UCNPs (b) 和 CS-UCNPs-Apt (c, f) 的 TEM 图及 C-UCNPs 的 HRTEM 图 (d) 和 CS-UCNPs 的 HRTEM 图 (e)

Fig. 3 Typical TEM image of C-UCNPs (a), CS-UCNPs (b) and CS-UCNPs-Apt (c,f) and HETEM mage of C-UCNPs (d) and CS-UCNPs (e)

荧光光谱结果表明(图 4(a)), 核壳结构 CS-UCNPs 的荧光强度是单一核结构 C-UCNPs 的 9.02 倍, 在进一步修饰 Apt 后 CS-UCNPs 的荧光强度略有下降但是仍然要比单一核结构材料高。对 CS-UCNPs 进行晶相结构分析(图 4 (b)), 可以看出核壳结构 CS-UCNPs 与 $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>的标准峰完全匹配。通过动态光散射测量纳米材料的粒径和电位(图 4 (c)), 可以看出通过 Apt 修饰后纳米探针的水合粒径由 90.2 nm 增厚至 171 nm, 电位由 21.13 mV 降至-10.60 mV, 进一步证明 Apt 成功连接在 CS-UCNPs 表面。如图 4 (d) 所示, CS-UCNPs-Apt 在 260 nm 处展示出明显的紫外吸收峰(DNA 的特征吸收峰), 而 CS-UCNPs 在 260 nm 处无明显吸收, 更进一步表明 Apt 成功修饰到 CS-UCNPs 表面上。

## 2.2 纳米探针浓度对试纸条检测的影响

纳米探针的荧光强度对于检测信号存在较大影响, 荧光免疫分析仪器在检测荧光信号时, 如果纳米探针浓度过低会使得荧光强度信号低、噪声信号大。因此寻求合适浓度的纳米探针作为样品检测的最佳条件是必不可少的。结果如图 5 (a) 所示, 当纳米探针质量浓度为 2 mg/mL 时荧光强度最高。因此后续实验采用 2 mg/mL 的纳米探针作为样品检测使用的最佳浓度条件。

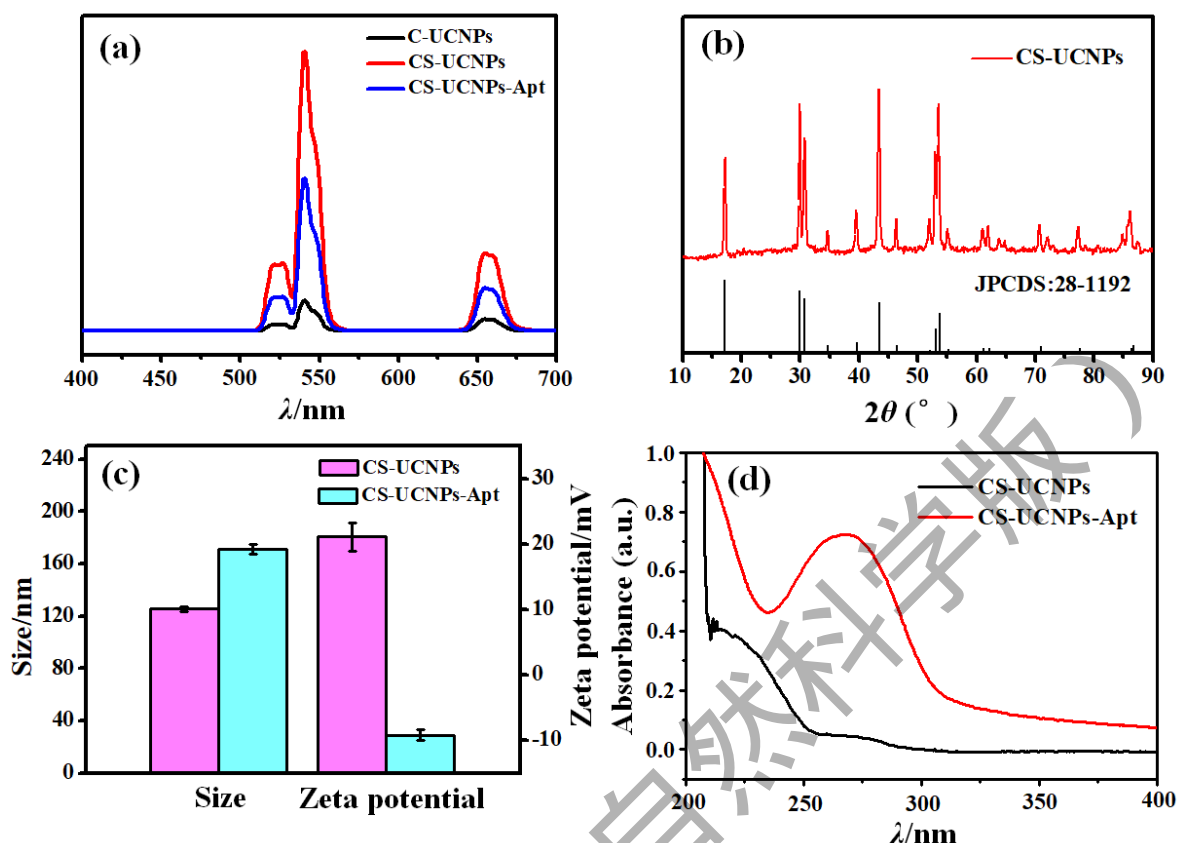


图 4 C-UCNPs , CS-UCNPs 及 CS-UCNPs-Apt 的荧光光谱图 (a), CS-UCNPs 的 XRD 谱图 (b) 及其连接 Apt 前后的粒径和电位 (c) 和紫外可见光吸收光谱图 (d)

Fig. 4 Fluorescence spectra of C-UCNPs, CS-UCNPs and CS-UCNPs-Apt (a), XRD spectra of CS-UCNPs (b), the size and zeta potential of CS-UCNPs and CS-UCNPs-Apt (c) and the UV-vis absorption spectra of CS-UCNPs and CS-UCNPs-Apt (d)

## 2.3 上转换纳米颗粒免疫层析试纸条的性能

以检测区 (T 线) 与质控区 (C 线) 荧光强度的比值 ( $I_T/I_C$ ) 为纵坐标, AFB1 质量浓度的对数为横坐标, 所得 AFB1 的检测标准曲线如图 5 (b) 所示, 其在 5~100 ng/mL 范围内线性良好。其线性回归方程为:  $y = -0.53241x + 1.63081$ ,  $R^2 = 0.99423$ , 并通过计算可知检测限为 2.4 ng/mL。相对于文献中的其他检测方法 (表 1), 该检测方法具有简单快速、灵敏度高的优点。图 5 (c) 显示了在 980 nm 近红外激发光下的不同浓度 AFB1 的荧光检测结果, 随着待测液中 AFB1 浓度的增加, T 线亮度逐渐降低直到消失, 而 C 线上的互补序列可以通

过碱基互补的方式捕获流经的 CS-UCNPs-Apt，不受待测液中 AFB1 浓度的影响从而保持稳定的亮度。

为考察本方法的重复性，将 10 ng/mL 的 AFB1 标准品溶液用构建的 5 条试纸条进行测试，结果如图 5 (d) 所示，且其相对标准偏差 (RSD) 小于 4.73%，表明该方法具有良好的重复性。为验证本方法具有良好的特异性，选择几种相似的毒素：赭曲霉毒素 (Ochratoxin A, OTA)、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN)、呕吐毒素 (Deoxynivalenol, DON) 及 AFB1，分别将它们与 CS-UCNPs 混合共孵育并使它们的最终浓度均为 100 ng/mL，并进行试纸条测试，结果如图 5 (e) 所示，表明本研究建立的检测 AFB1 的特异性较好。

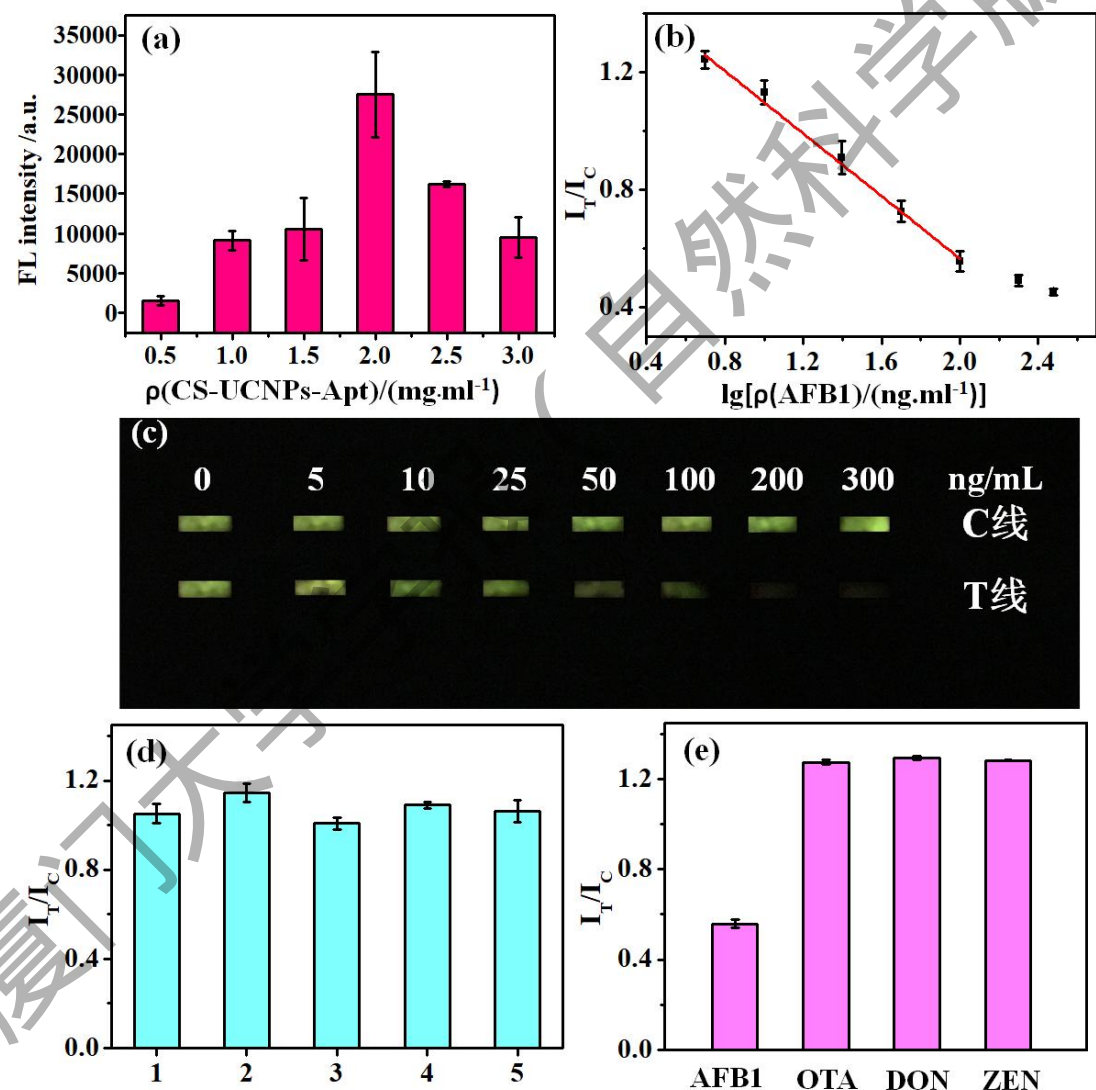


图 5 不同浓度 CS-UCNPs-Apt 的荧光强度 (a)，CS-UCNPs-Apt 免疫层析试纸条检测 AFB1 的标准曲线 (b)，不同浓度 AFB1 检测结果 (c) 及其重复性 (d) 和特异性 (e) 实验

Fig. 5 The fluorescence intensity of different concentrations of CS-UCNPs-Apt (a), the standard curve for AFB1 detection by CS-UCNPs-Apt immunochromatographic test strip (b), the detection result of different concentration of AFB1 (c) and the experiments of reproducibility (d) and specificity (e)

表 1 不同 AFB1 检测技术的性能

Tab. 1 Analytical performance of different AFB1 detection techniques

| 检测方法                | 线性范围/<br>(ng · mL <sup>-1</sup> ) | 检测限/<br>(ng · mL <sup>-1</sup> ) | 检测时间/min | 来源   |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------|------|
| 化学发光竞争适体传感器法        | 0.1~10                            | 0.11                             | ≤20      | [22] |
| 荧光诱导聚集适体传感器法        | 40~300                            | 27.3                             | ≤60      | [23] |
| 基于荧光能量共振转移适体传感器法    | 5~100                             | 1.6                              | ≤35      | [24] |
| 核酸酶切割扩增的适体传感器法      | 5~50                              | 15                               | ≤25      | [25] |
| 基于 CS-UCNPs 的适体传感器法 | 5~100                             | 2.4                              | ≤15      | 本研究  |

## 2.4 实际样品检测

为了验证上转换纳米颗粒免疫层析试纸条的可行性,使用花生作为实际样品进行检测。通过加标回收实验进行检测<sup>[26]</sup>,其结果如表 2 所示 ( $n=3$ ),由于实际样品花生没有 AFB1,所以未检测到 AFB1,其加标回收率在 99%~112%,具有良好的回收率,表明该方法具有较高的准确性,验证了该层析试纸条的可行性。

表 2 实际样品花生加标回收实验

Tab. 2 Actual sample peanut spike recovery experiment

| 加样浓度/ (ng · mL <sup>-1</sup> ) | 检测浓度/ ( ng · mL <sup>-1</sup> ) | 回收率/%    |
|--------------------------------|---------------------------------|----------|
| 0                              | 0                               | Negative |
| 10                             | 9.98                            | 99.8     |
| 25                             | 27.9                            | 111.6    |
| 50                             | 51.5                            | 103      |
| 100                            | 93.8                            | 93.8     |

## 3 结 论

本文通过制备核壳结构的上转换纳米颗粒 CS-UCNPs 来增强材料的发光强度,以提高最终产品的检测灵敏度;然后采用配体交换的方法成功构建了纳米荧光探针 CS-UCNPs-Apt, TEM、荧光光谱、动态光散射和紫外-可见吸收光谱等表征证明了 Apt 成功修饰到 CS-UCNPs 表面,并且保持了该材料优良的荧光性能。结合免疫层析试纸条技术,构建了一种基于 Apt 和 CS-UCNPs 的试纸条,成功地用于对 AFB1 的定性及定量检测。实验结果表明该方法具有检测限低、检测范围宽、灵敏度高和检测速度快等优点,其检测范围为 5~100 ng/mL,检测限为 2.4 ng/mL。实际样品加样回收实验结果表明该方法可以实现对 AFB1 的快速、定量检测,在农产品食品检测方面具有潜在的应用价值。

## 参考文献:

- [1] SHIM W B, KIM M J, MUN H, et al. An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B1[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 62: 288-294.
- [2] KHLANGWISSET P, SHEPHARD G S, WU F. Aflatoxins and growth impairment:a review[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2011, 41(9): 740-755.
- [3] EL DARRA N, RAJHAH N, SALEH F, et al. Food fraud detection in commercial pomegranate molasses syrups by UV-VIS spectroscopy, ATR-FTIR spectroscopy and HPLC methods[J]. *Food Control*, 2017, 78: 132-137.
- [4] ISIL A, KARA D. Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey[J]. *Food Chemistry*, 2014, 157(8): 70-76.
- [5] WARTH B, PETCHKONGKAEW A, SULYOK M, et al. Utilising an LC-MS/MS-based multi-biomarker approach to assess mycotoxin exposure in the Bangkok metropolitan area and surrounding provinces[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2014, 31(12): 2040-2046.
- [6] ZHAO H X, ZHANG Y X, YU W C, et al. Recent advances in aflatoxin B1 detection based on nanotechnology and nanomaterials: a review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1069: 1-27.
- [7] ZHANG Z J, ONI O, LIU J W. New insights into a classic aptamer: binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(13): 7593-7601.
- [8] STOLTENBURG R, REINEMANN C, STREHLITZ B. SELEX: a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands[J]. *Biomol Eng*, 2007, 24(4): 381-403.
- [9] TOH S Y, CITARTAN M, GOPINATH S C B, et al. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 64: 392-403.
- [10] JIN B R, WANG S R, LIN M, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 90: 525-533.
- [11] FU X, CHENG Z Y, YUI J M, et al. A SERS-based lateral flow assay biosensor for highly sensitive detection of HIV-1 DNA[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 78: 530-537.
- [12] WU S J, LIU L H, DUAN N, et al. An aptamer-based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(8): 1949-1954.
- [13] 金碧瑞, 杨叶欣, 卢天健, 等. 基于核酸适配体的上转换荧光纸基传感器用于测定茶水中的黄曲霉毒素 B1[J]. *中国科学:化学*, 2019, 49(2): 147-153.
- [14] SHIM W B , KIM M J , MUN H , et al. An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of

aflatoxin B1[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 62:288-294.

[15] LI Z Q, ZHANG Y. An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(34): 345606.

[16] LIU Q, FENG W, YANG T, et al. Upconversion luminescence imaging of cells and small animals[J]. *Nature Protocol*, 2013, 8(10): 2033-2044.

[17] LIU Y, KANG N, LV J, et al. Deep Photoacoustic/Luminescence/Magnetic Resonance Multimodal Imaging in Living Subjects Using High-Efficiency Upconversion Nanocomposites[J]. *Advanced Materials*, 2016, 28: 6411-6419.

[18] DUONG H T T, CHEN Y, TAWFIK S A, et al. Systematic investigation of functional ligands for colloidal stable upconversion nanoparticles[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(9): 4842-4849.

[19] LI L L, WU P, HWANG K, et al. An exceptionally simple strategy for DNA-functionalized upconversion nanoparticles as biocompatible agents for nanoassembly, DNA delivery, and imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(7): 2411-2414.

[20] REN W, WEN S, TAWFIK S A, et al. Anisotropic functionalization of upconversion nanoparticles[J]. *Chemical Science*, 2018, 9: 4352-4358.

[21] KANG N, ZHAO J, ZHOU Y M, et al. Enhanced upconversion luminescence intensity of core-shell NaYF<sub>4</sub> nanocrystals guided by morphological control[J]. *Nanotechnology*, 2019, 30(10): 105701.

[22] SHIM W B, MUN H, JOUNG H A, et al. Chemiluminescence competitive aptamer assay for the detection of aflatoxin B1 in corn samples[J]. *Food Control*, 2014, 36(1): 30-35.

[23] XIA X H, WANG H B, YANG H, et al. Dual-terminal stemmed aptamer beacon for label-free detection of aflatoxin B1 in broad bean paste and peanut oil via aggregation-induced emission[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(46): 12431-12438.

[24] CHEN L, WEN F, LI M, et al. A simple aptamer-based fluorescent assay for the detection of Aflatoxin B1 in infant rice cereal[J]. *Food Chemistry*, 2017, 215: 377-382.

[25] ZANG J J, LI Z, ZHAO S C, et al. Size-dependent modulation of graphene oxide-aptamer interaction for amplified fluorescent detection of aflatoxin B1 with tunable dynamic range[J]. *Analyst*, 2016, 141(13): 4029-4034.

[26] XU X, LIU X, LI Y, et al. A simple and rapid optical biosensor for detection of aflatoxin B1 based on competitive dispersion of gold nanorods[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 47: 361-367.

# Construction of immunochromatographic strip based on upconversion fluorescence-aptamer and its application for detection of aflatoxin B1

LI Danyang, LI Lihuang, AI Chaochao, REN Lei\*

(College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** With the improvement of living conditions, people's requirements for food safety are getting greater. However, aflatoxins existing in mildewed foods and agricultural products are a major threat to human health. Therefore, finding a simple and rapid method for aflatoxins detection is important for food safety and agricultural product quality. In this paper, a ligand-exchange method was used to synthesize the aflatoxin aptamer modified upconversion nanoparticles, which retained the ability of aptamer to recognize aflatoxin B1. The aflatoxin B1 can be rapidly and quantitatively detected using immunochromatographic test strips with high sensitivity (2.4 ng/mL) within a long linear range (5-100 ng/mL).

**Keywords:** upconversion nanoparticles; aflatoxin B1; aptamers; immunochromatographic test strips