A Biosensor for Rapid Detection of Aflatoxin B1 at Ultralow Concentrations*

ZHAO Wenci[1], YOU Fangshuo[1], HUANG Chenwei[1], WANG Tao[1], ZHANG Jian[2], QI Haochen[2*]
(1.School of Microelectronics, Hefei University of Technology, Hefei Anhui 230009, China;
2.College of Electrical and Electronic Engineering, Wenzhou University, Wenzhou Zhejiang 325035, China)

Abstract: To fast and conveniently detect aflatoxin B1 (AFB1), a simple and sensitive biosensor has been developed for real-time detection of AFB1 based on an aptamer-modified gold interdigital electrode (IDE). Without any additional apparatuses or steps for pre-concentration, target enrichment and quantitative detection of AFB1 are realized via microfluidic AC electrothermal effect and interface capacitance sensing, respectively. This biosensor combines target enrichment with detection in a single process with a response time as short as 30 s from-sample-to-result. Meanwhile, it achieves a wide linear range (1 fmol/L~10 pmol/L), a detection limit of 0.472 fmol/L and a good selectivity of 2 296∶1. the proposed biosensor as well as the detection strategy provides a competitive solution for rapid detection of trace AFB1 in food.

Key words: biosensor; Aflatoxin B1 detection; AC electrothermal effect; aptamer; interface capa-citance
EEACC: 7230J **doi**: 10.3969/j.issn.1004-1699.2023.04.23

一种用于超低浓度黄曲霉毒素 B1 快速检测的生物传感器*

赵文辞[1], 尤方朔[1], 黄陈炜[1], 汪 涛[1], 张 鉴[2], 戚昊琛[2*]
(合肥工业大学微电子学院, 安徽 合肥 230009; 温州大学电气与电子工程学院, 浙江 温州 325035)

摘 要: 基于适配体修饰的金叉指电极(IDE), 研发了一种简单灵敏的生物传感器, 用于实现对超低浓度黄曲霉毒素 B1(AFB1)的快速检测。在不使用额外预富集装置与步骤的前提下, 利用交流电热微流体作用实现对 AFB1 分子的快速定向驱动与富集, 并通过界面电容传感机制反映被测溶液中 AFB1 的浓度。该传感器集目标物富集和信号检测过程于一体, 从加样到结果的时间短至 30 s, 并具有较宽的线性范围(1 fmol/L~10 pmol/L), 其检出限低至 0.472 fmol/L。同时, 通过选择性实验验证了该传感器对 AFB1 的特异性识别功能, 其对非目标物的选择比为 2 296∶1。所提出的生物传感器及其检测方法为快速检测食品中的 AFB1 提供了一种具有竞争力的解决方案。

关键词: 生物传感器; 黄曲霉毒素 B1 检测; 交流电热效应; 适配体; 界面电容
中图分类号: TP212.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1004-1699(2023)04-0667-06

黄曲霉毒素是黄曲霉和寄生曲霉等菌株产生的双呋喃环类毒素, 目前已鉴定出包括 B1、B2、G1、G2 等 20 种不同的黄曲霉毒素[1]。其中黄曲霉毒素 B1(AFB1)是食品中最常见的一种真菌毒素, 也是毒性最大、致癌性最强的毒素之一[2]。AFB1 可广泛存在于多种食品和饲料中, 如粮食、食用油、牛奶、调味品、坚果等[3]。此外, AFB1 结构稳定, 在高温下仍可存活, 加热或烹饪过程很难对其破坏或降解[4]。暴露于高水平的 AFB1 可导致人类和动物的肝出现坏死、硬化和肝细胞癌变, 甚至会引发免疫系统的损坏或其他系统的病变[5]。国际癌症研究机构(IARC)将 AFB1 列为第 1 类致癌物[5]。因此, 对 AFB1 的快速、灵敏检测具有重要的应用价值。

传统的黄曲霉毒素检测方法有薄层色谱法(TLC)[6]、高效液相色谱法(HPLC)[7]、液相色谱-串联质谱法(LC/MS)[8]、酶联免疫法(ELISA)[9]

项目来源: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605302); 国家自然科学基金项目(62074047); 安徽省自然科学基金项目(1908085MF180)
收稿日期: 2022-04-07 **修改日期**: 2022-06-06

等。这些方法存在一定的局限性,如检测仪器昂贵、操作复杂、检测速度慢、灵敏度较低等,无法满足实时现场检测的需求。核酸适配体的出现,则为生物传感器的实现提供了一种新的识别探针。适配体是一类寡核苷酸序列,通过指数富集的配基系统进化技术(SELEX)筛选获得[10]。由于适配体在可合成性、亲和力、目标识别特异性、分子稳定性方面的优势,已成为生化传感器的一个研究热点[11]。

本文研发了一种基于金叉指电极(IDE)的生物传感器,通过交流电热(ACET)效应实现超低浓度 AFB1 的微流控富集,并在 30 s 富集过程中测量界面电容的变化,实现对 AFB1 的定量检测。该传感器制备成本低、响应速度快、灵敏度高、易操作,其检出限(LOD)低至 0.472 fmol/L,线性范围达到(1 fmol/L~10 pmol/L)。此外,该传感器对 AFB1 良好的选择性也得到了实验验证。

1 传感机制

1.1 界面电容感应原理

当电极浸入电解质溶液,其表面会积聚电荷,为了保持电平衡,会在固液边界形成一个反型离子薄层,被称为双电层(EDL)[12]。EDL 为界面电容的介质层,当目标分子吸附在电极表面时,界面电容介质层的厚度将增加,导致界面电容发生变化。图 1 中,(a)为裸电极表面的 EDL,其中 λ_{EDL} 表示 EDL 的厚度;(b)为电极功能化后,由于适配体层的沉积致使界面介电层变厚,其中 λ_{APT} 表示适配体层的厚度;(c)描述了施加 ACET 力后适配体-目标物的特异性结合过程。

如图 1 所示,在适配体与 AFB1 分子结合前,电极表面的介质层由 EDL 的厚度 λ_{EDL} 和适配体层的

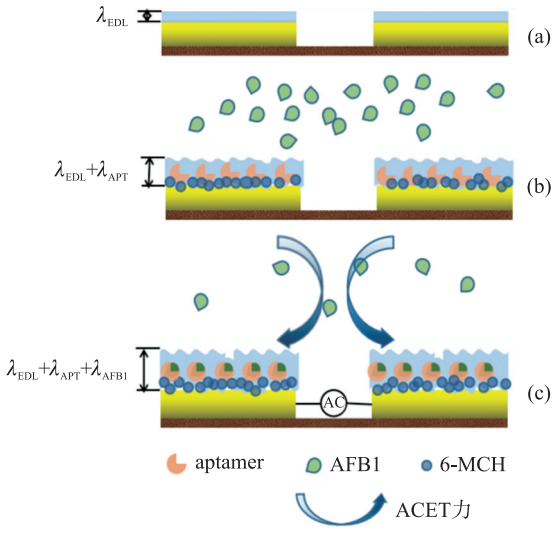


图 1 电极表面电容传感机制

厚度 λ_{APT} 组成,初始界面电容 $C_{initial\text{-}int}$ 表达式为:

$$C_{initial\text{-}int}=\frac{A_{int}}{\frac{\lambda_{EDL}}{\varepsilon_{EDL}}+\frac{\lambda_{APT}}{\varepsilon_{APT}}} \tag{1}$$

式中:ε_{EDL} 和 ε_{APT} 分别为样品溶液和适配体的介电常数,A_{int} 为电极界面电容的表面积。

检测过程中,由于 ACET 力的施加会引起涡流的产生,驱动 AFB1 分子向电极表面的适配体富集,电极表面的介质层则由 EDL 的厚度 λ_{EDL}、适配体层厚度 λ_{APT} 和 AFB1 分子层厚度 λ_{AFB1} 组成,此时界面电容 $C_{after\text{-}int}$ 可表示为:

$$C_{after\text{-}int}=\frac{A_{after\text{-}int}}{\frac{\lambda_{EDL}}{\varepsilon_{EDL}}+\frac{\lambda_{APT}}{\varepsilon_{APT}}+\frac{\lambda_{AFB1}}{\varepsilon_{AFB1}}} \tag{2}$$

式中:ε_{AFB1} 为 AFB1 分子的介电常数,$A_{after\text{-}int}$ 为结合后界面电容的表面积(假设界面电容表面积在 AFB1 分子结合前后不变,即 $A_{int}=A_{after\text{-}int}$)。在整个检测过程中,以单位时间内电容的变化 $\Delta C(\mathrm{d}C/\mathrm{d}t)$ 作为指标来反映不同浓度 AFB1 溶液中目标分子与适配体的结合程度。由于传感器件的表面电容初始值不严格相同,为减小初始电容不一致引起的检测误差,引入归一化电容变化率 $\Delta C/C_{initial\text{-}int}$,其表达式为:

$$\frac{\Delta C}{C_{initial\text{-}int}}=\frac{C_{after\text{-}int}-C_{initial\text{-}int}}{C_{initial\text{-}int}}=\frac{-\lambda_{AFB1}}{\lambda_{AFB1}+\frac{\varepsilon_{AFB1}}{\varepsilon_{EDL}}\lambda_{EDL}+\frac{\varepsilon_{AFB1}}{\varepsilon_{APT}}\lambda_{APT}} \tag{3}$$

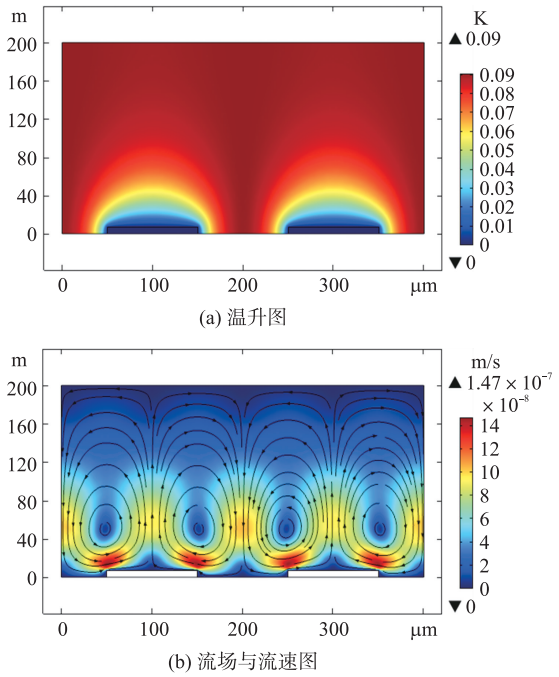
由式(3)可知,归一化电容变化率 $\Delta C/C_{initial\text{-}int}$ 为负值,这与介质层厚度增加导致电容减小有关。归一化电容变化率可以直接反映电极表面所结合的 AFB1 数量,从而定量检测 AFB1 浓度,同时提高实验的稳定性与可重复性。

1.2 交流电热富集机制

传统检测分析中,目标分子的富集常采用微泵装置或增加反应的预沉积时间来实现,可控性差,且效率低下。本文利用交流电热(ACET)富集的方法,以电信号诱导的方式驱动并加速目标分子[13]。交变非均匀电场施加于溶液产生焦耳热,从而产生温度梯度,诱导溶液产生电导率梯度与介电梯度,溶液中随之出现空间电荷。这些电荷在交变电场的作用下流动,带动粘性流体发生运动,并形成涡流。于是,涡流中夹带的目标分子被不断输运到电极附近。利用 COMSOL 将该过程进行仿真,得到如图 2(a)所示的温升以及图 2(b)所示的流场和流速图。其中图 2(a)的温升基础为 293.15 K。图 2 说明,在高电

导率条件下(所涉及溶液的电导率约为 0.15 S/m),ACET 是一种十分有效的纳米粒子富集手段[14]。这种微流体驱动方式将加速被分析物与识别探针的结合,达到增敏的效果,并加快检测时间。

在本文工作中,我们将连续的交流信号加载到微叉指电极上,非均匀交变电场诱导 ACET 效应将随之产生,携带溶液中的黄曲霉毒素分子向电极表面富集。该富集的时长为 30 s,同时,该时长被用于计算得到界面电容的变化量 ΔC,从而在富集过程中同步实现归一化电容变化率 $\Delta C/C_{\text{initial-int}}$ 的测量。



(a) 温升图

(b) 流场与流速图

图 2　ACET 效应导致的温升和流场与流速图

2　实验方案

2.1　试剂与仪器

本文使用 5′氨基修饰的适配体作为 AFB1 的识别探针[15-16]。6-巯基-1-己醇(6-MCH)作为封闭剂。将 10×PBS(磷酸盐缓冲盐水)用去离子水稀释成 0.1×PBS 和 0.05×PBS 用于稀释适配体、封闭剂和标准样品溶液。使用阻抗分析仪测量传感器电极阵列的界面电容。

将 AFB1 标准溶液在 0.1×PBS 缓冲液中稀释至 1 fmol/L、10 fmol/L、100 fmol/L、1 pmol/L、10 pmol/L 一系列浓度备用。用 0.05×PBS 缓冲液将适配体和 6-MCH 分别稀释到 2.5 μmol/L 和1 mmol/L浓度。

2.2　传感器制备及功能化

本文使用叉指电极(IDE)阵列作为传感器件,其叉指电极阵列位于厚度为 1.6 mm 的玻璃纤维板上,借助镍结合层将金膜电镀在铜电极上。整个 IDE 的尺寸为 3 cm × 1.5 cm,每个电极的宽为 0.125 mm,相邻电极之间的距离为 0.1 mm。芯片表面粘贴孔径为 4 mm 的硅胶围栏形成体积约为 20 μL的腔室,用来装载样品溶液。

在电极功能化之前,使用丙酮、异丙醇及去离子水对电极表面进行超声清洗,清除电极加工中电极表面的污染物,然后放入紫外线发生器中处理 30 min,用以增加电极表面的亲水性。之后,吸取 20 μL适配体(2.5 μmol/L)滴在电极表面,孵育 24 h,再滴加 20 μL 的 6-MCH,封闭 2.5 h,防止测试过程中的非特异性结合。

2.3　传感器及测试系统

上述 IDE 经功能化操作后,将其两个引脚连接到阻抗分析仪上即可进行 AFB1 的检测。图 3(a)为传感器实物图,图 3(b)为测试系统示意图。在后续检测中,测试电压设为 850 mV,信号频率为 1.5 kHz,测试时长为 30 s。

(a) 实物图

(b) 测试系统示意图

图 3　传感器实物图和测试系统示意图

3　结果与讨论

3.1　传感器表征

通过测量初始电容的变化和阻抗的变化初步判断适配体和 6-MCH 是否固定在电极表面。设置频率为 1 kHz,图 4(a)所示为 IDE 不同功能化阶段的电容,图 4(b)所示为 IDE 不同功能化阶段的阻抗。通过孵育前后电容的大幅下降和阻抗的大幅增加,表明适配体被很好地固定在电极表面,又因 6-MCH 分子与适配体相比尺寸较小,故在封闭前后电容值的下降幅度和阻抗值的增加幅度均较小。

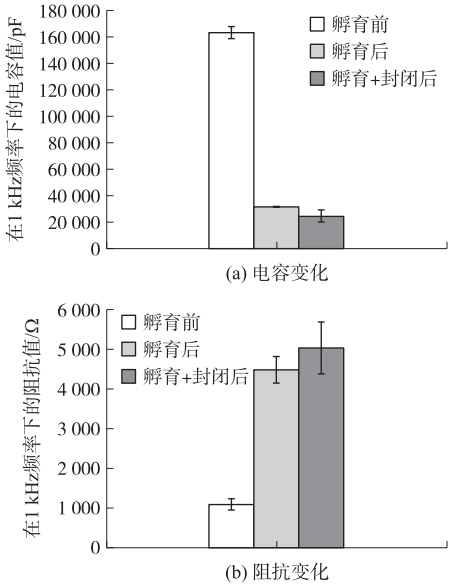


图 4　固定频率下功能化过程中的电容和阻抗变化

3.2　适配体选择

AFB1 适配体的合理选择是提高检测精度与灵敏度的关键之一。根据文献报道,我们选择了两种不同的适配体 AFB1-1 和 AFB1-32 作为候选[17]。其序列如表 1 所示。两种适配体均已被证实能与 AFB1 结合。

表 1　两种适配体的寡核苷酸序列

适配体类型	寡核苷酸序列(5′-3′)
AFB1-1	gTTgggCACgTgTTgTCTCTCTgTgTCTCgTgCCCTTCgCTAggCCCACA
AFB1-32	gggCACgTgTTgTCTCTCTgTgTCTCgTgCCC

我们分别用 AFB1-1 和 AFB1-32 对同一浓度的 AFB1 进行检测,交流信号为 850 mV、1.5 kHz。实验结果如图 5 所示,其中纵坐标 dC/dt(%/min)为利用归一化电容在 0~30 s 期间的瞬态曲线,用最小二乘法拟合得到的斜率。对于 dC/dt,我们将其定义为传感器的“响应”。柱状图为三次平行实验平均值,误差线表示其标准方差。由图 5 可知,AFB1-1 所显示的响应值比 AFB1-32 更为显著。

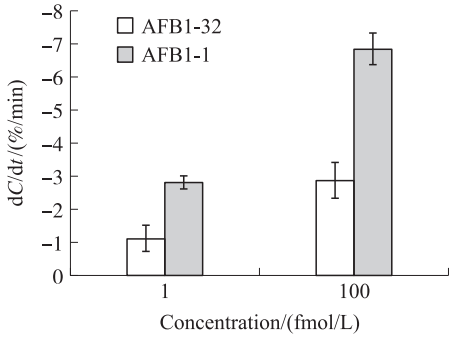


图 5　不同适配体对同一浓度目标物的检测

尽管较短的适配体(AFB1-32)在合成成本上有优势,但在检测灵敏度和准确性上有所欠缺。因此,选择 AFB1-1 序列作为适配体。

3.3　传感器的功能化验证

对一组功能化电极和另一组未功能化(未修饰适配体直接封闭)的电极,在 850 mV、1.5 kHz 条件下检测 30 s 内对背景缓冲液和不同 AFB1 浓度标准溶液的响应。如图 6 所示,功能化传感器的电容响应与浓度之间呈线性关系,而无适配体的传感器其电容响应与功能化电极没有明显区别,且与背景较为接近。这表明该适配体与 AFB1 的结合是特异性的,且不同浓度可通过不同的界面电容变化率进行区分。

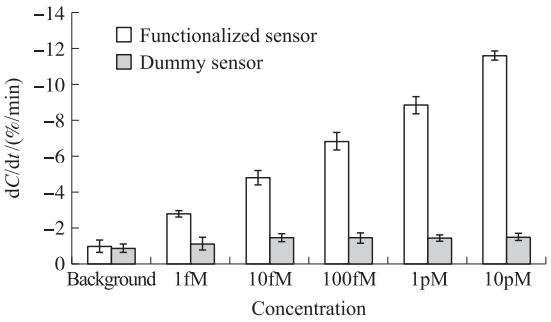


图 6　传感器的功能化验证

3.4　传感器的动态响应与标定

检测不同浓度水平的 AFB1(1 fmol/L,10 fmol/L,100 fmol/L,1 pmol/L,10 pmol/L),其 30 s 内的归一化电容瞬态曲线如图 7(a)所示,可以发现,不同的 AFB1 浓度,其瞬态电容的响应曲线可清晰区分,因

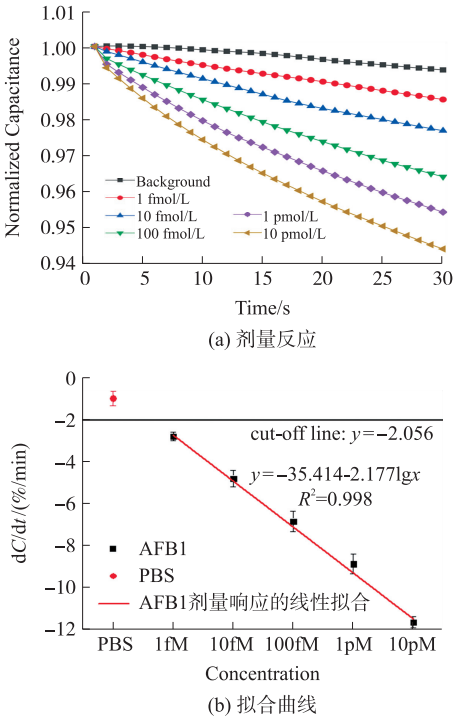


图 7　不同浓度 AFB1 的剂量反应和拟合曲线

此即使在小于 30 s 的实时检测过程中,剂量关系也是明确的。同样对其采用 dC/dt 的响应形式可得到图 7(b)。

我们对图 7(b)中的一系列响应进行拟合,得到的传感器标定曲线为直线,其表达式为 y(%/min)=−35.414−2.177log$x$,其中 x 为 AFB1 浓度(mol/L)。标定曲线的皮尔逊相关系数 R^2 为0.998。标定曲线表明传感器的响应与浓度对数呈线性关系。

将响应的阈值(cut-off line)定义为空白背景平均响应值向响应增大(坐标值变小)的方向加三倍标准方差,即−2.056%/min。将此值代入标定曲线计算得到 AFB1 的 LOD 为 0.472 fmol/L。与文献所报道其他 AFB1 传感器相比,该 LOD 处于极低的水平,说明该传感器具有较高的灵敏度,可定量检测超低浓度的 AFB1。

3.5　传感器的特异性

生物传感器对目标物的选择性是一个重要的性能。选择同为真菌毒素的赭曲霉毒素(Och)、玉米赤霉烯酮(Zen)和常见的有机磷农药氧化乐果(ome)、水胺硫磷(iso)作为黄曲霉毒素(AFB1)的对照组进行传感器特异性研究。以相同的实验条件进行检测,各进行三次平行实验,得到结果如图 8 所示。传感器对非目标物的响应远小于 AFB1。在所有的对照组中,水胺硫磷在 1 pmol/L 时达到最大响应值,为−4.15%/min,与用标定方程计算得到的 AFB1 在浓度 4.355 fmol/L 时的响应值相当,表明该传感器对于 AFB1 的选择比为 2 296∶1(1 pmol/L∶4.355 fmol/L),说明该传感器具有良好的特异性。

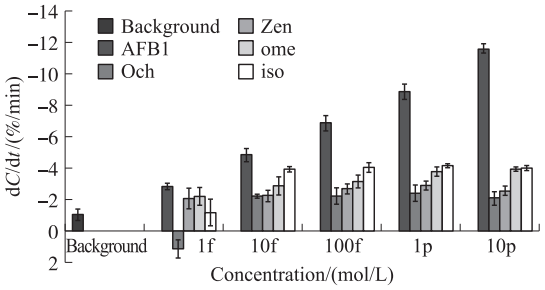


图 8　传感器的特异性

4　结论

本文提出一种基于金叉指电极阵列的生物传感器,先后修饰适配体和封闭剂对其功能化,采用交流电热微流体富集技术,不依赖额外预富集装置与步骤,在 30 s 内通过检测界面电容的微弱变化成功实现对痕量黄曲霉毒素 B1 的检测。该传感器的线性范围高达 5 个数量级,检出限低至亚飞摩水平,并具有良好的特异性。该传感器可快速、简便地检测超痕量黄曲霉毒素,为食品中的真菌毒素检测提供了一种新的传感器及测试方案,对食品安全的有效监测具有较大的应用前景。

参考文献:

[1] Abdel-Hadi A, Schmidt-Heydt M, Parra R, et al. A Systems Approach to Model the Relationship between Aflatoxin Gene Cluster Expression, Environmental Factors, Growth and Toxin Production by Aspergillus Flavus[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2012,9(69):757-767.

[2] Nleya N. Current Status of Mycotoxin Contamination of Food Commodities in Zimbabwe[J]. Toxins,2018,10(5):89.

[3] Chen Y. Recent Progress in Fluorescent Aptasensors for the Detection of Aflatoxin B1 in food[J]. Analytical Methods,2022,14(2):86-96.

[4] Alshannaq A, Yu J H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health,2017,14(6):632.

[5] Ammida N, Micheli L, Palleschi G. Electrochemical Immunosensor for Determination of Aflatoxin B1 in Barley[J]. Analytica Chimica Acta,2004,520(1-2):159-164.

[6] Li P, Qi Z, Wen Z. Immunoassays for Aflatoxins[J]. Trends in Analytical Chemistry,2009,28(9):1115-1126.

[7] Kotinagu K, Mohanamba T, Kumari L R. Assessment of Aflatoxin B1 in Livestock Feed and Feed Ingredients by High Performance Thin Layer Chromatography[J]. Veterinary World,2015,8(12):1396-1399.

[8] Zhou G, Chen Y, Kong Q, et al. Detoxification of Aflatoxin B1 by Zygosaccharomyces Rouxii with Solid State Fermentation in Peanut Meal[J]. Toxins,2017,9(1):42.

[9] Mukherjee M, Manonmani H K, Bhatt P. Aptamer as Capture Agent in Enzyme-Linked Apta-Sorbent Assay(ELASA) for Ultrasensitive Detection of Aflatoxin B1[J]. Toxicon,2018,156:28-33.

[10] Nimjee S M, Rusconi C P, Sullenger B A. Aptamers: An Emerging Class of Therap-eutics[J]. Annual Review of Medicine,2005,56(1):555-583.

[11] Qian J, Ren C, Wang C, et al. Magnetically Controlled Fluorescence Aptasensor for Simultaneous Determination of Ochratoxin A and Aflatoxin B1[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1019:119-127.

[12] Zhang J, Liu X, Wang J, et al. Rapid and Sensitive Detection of Formaldehyde Based on AC Electrokinetic Effects[J]. Micro & Nano Letters,2018,13(1):63-68.

[13] Zhang J, Oueslati R, Cheng C, et al. Rapid, Highly Sensitive Detection of Gramnegative Bacteria with Lipopolysaccharide Based Disposable Aptasensor[J]. Biosensors & Bioelectronics,2018,112:48-53.

[14] Zhang J, Zhang Y, Wu J, et al. Real-Time Cd^{2+} Detection at Sub-Femtomolar Level in Various Liquid Media by an Aptasensor Integrated with Microfluidic Enrichment[J]. Sensors and Actuators B: Chemical,2020,329:129282.

[15] Castillo G, Spinella K, Poturnayová A, et al. Detection of Aflatoxin

B1 by Aptamer based Biosensor using PAMAM Dendrimers as Immobilization Platform[J]. Food Control,2015,52:9-18.

[16] 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.

[17] Zhao Z,Wang H,Zhai W,et al. A Lateral Flow Strip Based on a Truncated Aptamer-Complementary Strand for Detection of Type-B Aflatoxins in Nuts and Dried Figs[J]. Toxins,2020,12(2):136.

赵文辞(1997—),女,安徽淮北人,合肥工业大学微电子学院硕士研究生,主要研究方向为微纳生物传感器,841690212@qq.com;

戚昊琛(1981—),女,浙江诸暨人,温州大学电气与电子工程学院副教授,主要研究方向为微流控与微纳传感器,haochenqi@wzu.edu.cn。