

# 基于荧光染料 PicoGreen 和核酸适配体的伏马毒素 B<sub>1</sub> 检测方法

桂海变\*, 金庆日\*, 张亚军, 王晓杜, 杨永春, 邵春艳, 程昌勇, 卫芳芳, 杨杨, 杨梦华, 宋厚辉

浙江农林大学动物科技学院, 浙江 临安 311300

桂海变, 金庆日, 张亚军, 等. 基于荧光染料 PicoGreen 和核酸适配体的伏马毒素 B<sub>1</sub> 检测方法. 生物工程学报, 2015, 31(9): 1393-1400.

Gui HL, Jin QR, Zhang YZ, et al. Development of an aptamer/fluorescence dye PicoGreen-based method for detection of fumonisin B<sub>1</sub>. Chin J Biotech, 2015, 31(9): 1393-1400.

**摘要:** 伏马毒素 B<sub>1</sub> 是主要存在于玉米及玉米制品中的一种可以引起癌症的霉菌毒素。针对霉菌毒素精准检测技术的开发对于保障食品安全至关重要。本研究利用核酸适配体与伏马毒素 B<sub>1</sub> 结合后不再结合其互补核酸序列的选择性以及 PicoGreen 与双链 DNA 结合的特异性, 开发了一种快速检测伏马毒素 B<sub>1</sub> 的适配体方法。PicoGreen 与双链 DNA 反应 15 min 后激发产生的荧光达到峰值 (激发波长为 480 nm, 发射波长为 520 nm)。该方法的最低检测限为 0.1 μg/L (0.1 ppb), 线性范围为 0.1-1 μg/L (0.1-1 ppb), 整个检测流程可在 40 min 内完成。特异性试验显示伏马毒素 B<sub>1</sub> 适配体与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、赭曲霉毒素、桔霉素和玉米赤霉烯酮等常见霉菌毒素无交叉反应。结果表明适配体方法与基于抗体的检测伏马毒素 B<sub>1</sub> 商品化 ELISA 试剂盒相当, Kappa 值为 0.857。由于核酸适配体比抗体成本低, 检测时间短, 因此基于核酸适配体的方法比基于抗体的 ELISA 方法更具有推广应用价值。

**关键词:** 伏马毒素 B<sub>1</sub>, 核酸适配体, 荧光染料, PicoGreen, 检测

**Received:** November 30, 2014; **Accepted:** January 30, 2015

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA101602), Project Supported by Zhejiang Province University Student Science and Technology Innovation Plan (Fresh Talent Program) (No. 2014R412040), Zhejiang A&F University Talent Starting Program (Nos. 2011FR025, 2013FR012, 2012FR047, 2013FR076, 2013FR054).

**Corresponding authors:** Houhui Song. Tel: +86-571-63741392; Fax: +86-571-63741731; E-mail: songhh@zafu.edu.cn  
Minghua Yang. Tel: +86-571-63741392; Fax: +86-571-63741731; E-mail: yangmh@zafu.edu.cn

\*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA101602), 浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) (No. 2014R412040), 浙江农林大学人才启动项目 (Nos. 2011FR025, 2013FR012, 2012FR047, 2013FR076, 2013FR054) 资助。

网络出版时间: 2015-03-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150325.1129.006.html>

## Development of an aptamer/fluorescence dye PicoGreen-based method for detection of fumonisin B<sub>1</sub>

Hailuan Gui\*, Qingri Jin\*, Yajun Zhang, Xiaodu Wang, Yongchun Yang, Chunyan Shao, Changyong Cheng, Fangfang Wei, Yang Yang, Menghua Yang, and Houhui Song

College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China

**Abstract:** Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) is a carcinogenic mycotoxin found in commodities such as corn and corn-originated products. An aptamer-based method for detection of FB<sub>1</sub> was developed using the fluorescent dye PicoGreen, which can recognize and bind double-stranded DNA. A peak fluorescence of PicoGreen was obtained in 15 min in the presence of FB<sub>1</sub> aptamer, which formed a double-stranded hybridizer DNA with its complementary strand. The excitation and emission wavelengths for PicoGreen detection were 480 nm and 520 nm, respectively. The sensitivity of this aptamer/PicoGreen-based method was 0.1 µg/L. This method showed a good linearity for FB<sub>1</sub> concentration ranging from 0.1 to 1 µg/L. The entire detection procedure for FB<sub>1</sub> could be completed within 40 min. No cross reactions were observed with any other mycotoxins against aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A, citrinin and zearalenone, demonstrating high specificity towards FB<sub>1</sub> aptamer. Agreement between commercial, antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and aptamer method was excellent with a kappa value of 0.857. Taken together, this aptamer/PicoGreen-based method is more cost-effective, time-saving and useful than ELISA for detection of FB<sub>1</sub>.

**Keywords:** fumonisin B<sub>1</sub>, aptamer, fluorescent dye, PicoGreen, detection

伏马毒素 (Fumonisin, FB) 是一种对啮齿动物具有致癌作用的真菌毒素, 主要破坏肝肾功能<sup>[1]</sup>, 诱发多种疾病, 如马脑白质软化症和猪肺水肿综合症<sup>[2]</sup>, 已被证明对多种家畜、实验动物有害<sup>[3]</sup>。目前 FB 有 11 种, 主要由轮状、层状镰刀霉菌产生, 其中 FB<sub>1</sub> 最常见<sup>[4]</sup>。FB<sub>1</sub> 主要存在于玉米及玉米制品中, 小麦、牛奶等食品及饲料易被污染<sup>[5]</sup>。世界卫生组织对 FB 限量标准因各地的玉米及玉米制品的产量不同而异, 美国食品与药物管理局规定以玉米为原料的食品中 FB 的最高限量为 2 mg/kg, 动物饲料的限量范围为 1–50 mg/kg。

目前检测 FB<sub>1</sub> 的方法主要是薄层色谱法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7]</sup>、酶联免疫吸附试验 (ELISA)<sup>[8]</sup>等。这些方法对检测仪器及操作人员

要求较高, 因此不宜进行现场检测; 其中, 基于抗体的 ELISA 方法所需的抗体制备繁琐<sup>[9]</sup>, 因此亟待建立一种快速检测 FB<sub>1</sub> 的方法。

核酸适配体 (Aptamer) 是一种功能与抗体相似的单链寡核苷酸。经指数富集配体的系统进化技术<sup>[10]</sup>筛选得到的核酸适配体可与目标物质特异性结合<sup>[11]</sup>, 如蛋白质<sup>[12]</sup>和药物<sup>[13]</sup>等。核酸适配体可直接合成使用, 经济实用, 易修饰且无免疫原性<sup>[14]</sup>。现已报道的基于核酸适配体的检测方法有: 磁珠法<sup>[15]</sup>、胶体金法<sup>[16]</sup>、荧光标记法<sup>[17]</sup>等。

本文选用已报道的亲和力最高的 FB<sub>1</sub> 特异性核酸适配体, 利用非标记荧光染料 PicoGreen 识别双链核酸的特异性, 建立了一种快速、高效检测 FB<sub>1</sub> 的方法。该方法的原理<sup>[18]</sup>是: 当核

酸适配体与 FB<sub>1</sub> 结合后, 多余的、未结合 FB<sub>1</sub> 的核酸适配体可以与反应体系中核酸适配体的互补链杂交生成双链 DNA。由于 PicoGreen 不结合单链核苷酸, 仅识别并结合双链 DNA 的螺旋沟, 继而可以释放荧光信号<sup>[19]</sup>。当不同浓度的 FB<sub>1</sub> 与特定浓度的核酸适配体结合时, 反应液中的荧光强度不同, 从而可以实现快速定量检测 FB<sub>1</sub> 的目的。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

96 孔板购自 Conning 公司 (Costar2592); 荧光检测仪购自 BioTek 公司 (Synergy™ H1); 超纯水仪购自 Thermo Fisher Scientific 公司 (D11921)。

FB<sub>1</sub>、赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (Aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>)、桔霉素 (Citrinin, CTN) 和玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 购自 Sigma 公司; PicoGreen 购自 Life Technologies 公司 (P7581); 伏马毒素 ELISA 检测试剂盒购自 Reagen 公司 (RNM98009, 检测线性范围: 1–50 ppb)。

FB<sub>1</sub> 核酸适配体 (FB<sub>1</sub> 39 号)<sup>[20]</sup>、核酸适配体互补链 Seq1 (表 1) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 本研究所用的寡核苷酸名称与序列

Table 1 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5'–3')
FB <sub>1</sub> aptamer	AATCGCATTACCTTATACCAGCTTAT TCAATTACGTCTGCACATACCAGCT TATTCAATT
Seq1	AATTGAATAAGCTGGTATGTGCAGA CGTAATTGAATAAGCTGGTATAAGG TAATGCGATT

### 1.2 检测原理

PicoGreen 是一种定量检测双链 DNA 的染料, 灵敏度可达 pg 级, 与双链 DNA 结合后荧光增强 1 000 倍以上, 且不与单链 DNA 结合。当 FB<sub>1</sub> 核酸适配体结合 FB<sub>1</sub> 后, 适配体的空间构象发生变化, 不能再与其互补链 Seq1 结合。未与 FB<sub>1</sub> 结合的核酸适配体可与其互补链杂交形成双链 DNA。由此产生的双链 DNA 可通过由 PicoGreen 检测, 通过荧光信号的变化确定样品中的 FB<sub>1</sub> 浓度<sup>[21]</sup> (图 1)。

### 1.3 PicoGreen 检测双链核酸的反应条件

所有反应试剂以 10 mmol/L Tris、120 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、20 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (pH 8.5) 组成的缓冲液<sup>[22]</sup>为稀释溶液。分别取 50 μL 10 nmol/L 核酸适配体与 50 μL 10 nmol/L 互补链 Seq1, 于 95 °C 变性 5 min, 静置于冰上 10 min<sup>[23]</sup>。将核酸适配体与互补链于孔内混匀, 于 25 °C 反应 5 min<sup>[24]</sup>, 再加入 10 μL 10×PicoGreen 溶液避光反应, 检测荧光强度 (参数设置: 激发波长为 480 nm, 发射波长为 520 nm)。

### 1.4 PicoGreen 识别双链 DNA 的时间优化

取 50 μL 核酸适配体和 50 μL 互补链 Seq1 于孔内混匀 (1:1), 于 25 °C 反应 5 min, 再加入

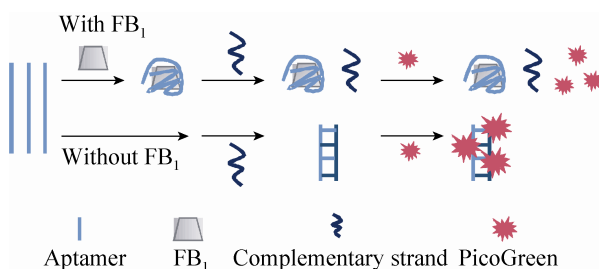


图 1 PicoGreen 和适配体检测 FB<sub>1</sub> 的原理图

Fig. 1 Schematic presentation of the PicoGreen/apptamer-based method for detection of FB<sub>1</sub>.

10  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PicoGreen 后立即放入荧光检测仪内, 连续检测 30 min。

### 1.5 $\text{FB}_1$ 检测的灵敏度试验

将  $\text{FB}_1$  稀释成质量浓度为 0–1  $\mu\text{g}/\text{L}$  的溶液, 取 50  $\mu\text{L}$   $\text{FB}_1$  溶液与 25  $\mu\text{L}$  20 nmol/L 核酸适配体混匀, 25  $^\circ\text{C}$  反应 20 min, 加入 25  $\mu\text{L}$  20 nmol/L 互补链 Seq1 溶液反应 5 min, 再加入 10  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PicoGreen, 混匀避光, 检测荧光强度。

### 1.6 核酸适配体特异性试验

稀释  $\text{FB}_1$ 、OTA、AFB<sub>1</sub>、CTN 和 ZEN 质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 分别取 50  $\mu\text{L}$  霉菌毒素溶液与 25  $\mu\text{L}$  20 nmol/L  $\text{FB}_1$  核酸适配体混匀, 25  $^\circ\text{C}$  反应 20 min, 加入 25  $\mu\text{L}$  20 nmol/L 互补链 Seq1 溶液反应 5 min, 再加入 10  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PicoGreen, 混匀避光, 检测荧光强度。

### 1.7 检测样品试验

在含 1% 牛奶的溶液内添加  $\text{FB}_1$ , 其中 28 份样品内含有  $\text{FB}_1$ , 浓度分别为 1、2、2.5、5、10、50 和 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  (样品重复数  $n=4$ ), 10 份样品无  $\text{FB}_1$ , 使用本文建立的方法检测, 计算实际检测值与理论值的比值。同时用商品化的 ELISA 试剂盒方法进行检测, 计算 Kappa 值, 并评估两种方法是否一致。本研究方法: 将样品稀释为 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 取 50  $\mu\text{L}$  样品溶液与 25  $\mu\text{L}$  20 nmol/L 核酸适配体混匀, 25  $^\circ\text{C}$  反应 20 min, 加入 25  $\mu\text{L}$  20 nmol/L 互补链 Seq1 溶液反应 5 min, 再加入 10  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PicoGreen, 混匀避光, 检测荧光强度。ELISA 检测试剂盒操作方法: 在包被有  $\text{FB}_1$  抗原的微孔板中, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  样品溶液, 再依次加入 50  $\mu\text{L}$  HRP 标记的二抗, 50  $\mu\text{L}$   $\text{FB}_1$  抗体, 室温孵育 30 min, 用 300  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液清洗 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 溶液, 室温孵育 15 min,

再加入 100  $\mu\text{L}$  终止液终止反应, 读取  $OD_{450}$ , 根据制作的标准曲线计算样品中 OTA 含量。计算 ELISA 方法和本试验建立的核酸适配体-荧光染料检测法之间的 Kappa 值<sup>[25]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 PicoGreen 对 $\text{FB}_1$ 核酸适配体形成的双链 DNA 的检测

建立基于 PicoGreen 和核酸适配体方法检测  $\text{FB}_1$  的前提是确定 PicoGreen 分别与适配体单链核苷酸、适配体和互补链之间形成的双链核苷酸、缓冲液、 $\text{FB}_1$  反应后是否释放荧光, 该荧光是否可以被仪器识别并能用于后续的检测。

结果显示, 核酸适配体与互补链 Seq1 的杂交产物双链 DNA 结合 PicoGreen 后能够释放荧光信号, 可以被荧光检测仪捕捉。单链核苷酸或缓冲液本身不与 PicoGreen 结合, 不能释放出荧光信号 (图 2)。这说明 PicoGreen 和核酸适配体可以用于  $\text{FB}_1$  毒素检测技术的开发。

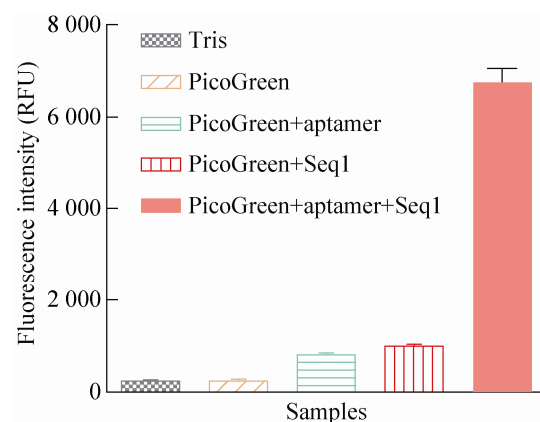


图2  $\text{FB}_1$  核酸适配体形成的双链 DNA 与 PicoGreen 结合后的荧光检测

Fig. 2 Detection of PicoGreen fluorescence in the presence of  $\text{FB}_1$  aptamer hybridizer.

## 2.2 PicoGreen 释放荧光峰值时间

PicoGreen 结合双链 DNA 后会被瞬间激发产生荧光,随着时间推移荧光强度不断增强,直到反应体系中 PicoGreen 与双链 DNA 的结合达到饱和为止。对于 FB<sub>1</sub> 特异性检测技术的开发,加入反应体系中的 PicoGreen 和核酸适配体浓度均为固定值,因此需要确定在特定浓度下荧光强度达到峰值的时间。由图 3 可知,反应体系内加入 PicoGreen 后,PicoGreen 与 FB<sub>1</sub> 核酸适配体形成的双链 DNA 结合后随即释放出荧光,随着反应时间的推移,荧光强度在 15 min 时趋于稳定,并达到峰值。当 PicoGreen 浓度固定时,荧光强度随双链 DNA 的增多而增强,直到 PicoGreen 完全结合双链 DNA 为止。因此,在后续的检测技术的开发中,选择 15 min 作为 PicoGreen 与样品的反应时间。

## 2.3 基于核酸适配体的荧光检测法检测 FB<sub>1</sub> 的灵敏度

灵敏度又称敏感性或最低检测限,是检测技术开发的一个关键参数。根据上述确定的最

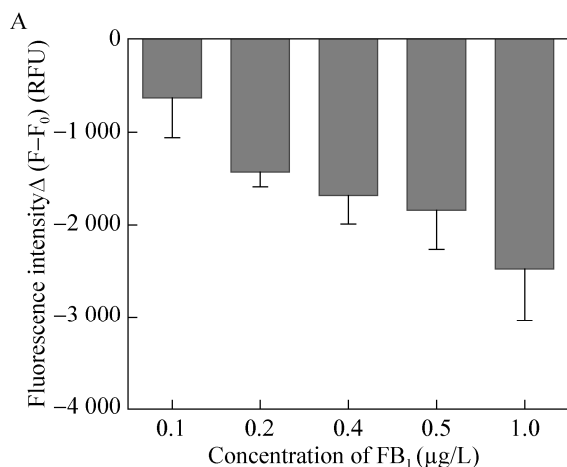


图 4 FB<sub>1</sub> 的灵敏度检测

Fig. 4 Sensitivity test of the aptamer/PicoGreen-based method. (A) Sensitivity determination at FB<sub>1</sub> concentrations ranging from 0.1 to 1 μg/L. (B) Standard curve plotted with  $F/F_0$  against the concentration of FB<sub>1</sub>.  $F_0$  and  $F$  stand for the fluorescence intensity with or without FB<sub>1</sub>.

佳反应时间,利用 PicoGreen 和核酸适配体方法对不同浓度的 FB<sub>1</sub> 进行检测。结果表明,在反应体系中随着 FB<sub>1</sub> 质量浓度的增加,PicoGreen 释放的荧光强度逐渐减小(图 4A)。这说明 FB<sub>1</sub> 结合的核酸适配体增多,导致与后加入的互补链 Seq1 结合的核酸适配体减少,因此与 PicoGreen 结合的双链 DNA 量减少,激发产生的荧光强度减小。该方法的检测下限为 0.1 μg/L (0.1 ppb),线性范围为 0.1–1 μg/L (0.1–1 ppb)(图 4B)。

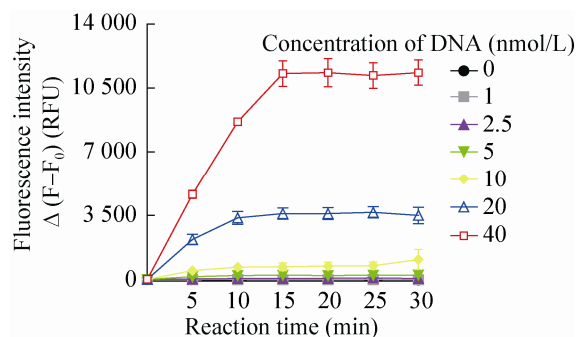
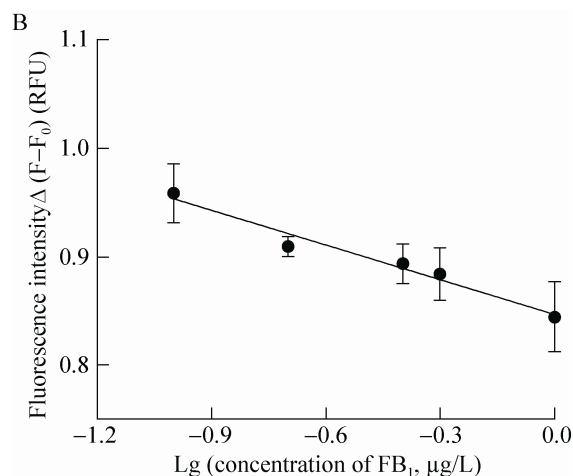


图 3 PicoGreen 与双链 DNA 最佳反应时间的确定  
Fig. 3 Determination of the optimal reaction time of PicoGreen and double-stranded DNA.  $F_0$  and  $F$  stand for the fluorescence intensity with or without DNA.



## 2.4 基于核酸适配体的荧光检测法检测 FB<sub>1</sub> 的特异性

特异性又称交叉反应性，是评价检测技术好坏的一个重要标志。为了证实本检测技术采用的核心试剂 FB<sub>1</sub> 适配体和 PicoGreen 是否只能用于检测 FB<sub>1</sub>，不能和其他毒素发生交叉反应。我们对食品中常见的霉菌毒素 FB<sub>1</sub>、OTA、ZEN、CTN、AFB<sub>1</sub> 进行了检测。结果表明，毒素质量浓度相同时，PicoGreen 检测 OTA、ZEN、CTN、AFB<sub>1</sub> 反应体系的荧光强度最大，而 FB<sub>1</sub> 反应体系的荧光强度最小（图 5）。这说明在有 FB<sub>1</sub> 的反应体系内，核酸适配体与 FB<sub>1</sub> 发生了特异性结合，少量的核酸适配体与互补链 Seq1 结合，产生与 PicoGreen 结合的双链 DNA，因此激发产生少许荧光；其他毒素的反应体系中的核酸适配体与互补链 Seq1 完全结合，产生大量双链 DNA，激发产生更多的荧光。即当样品中有 FB<sub>1</sub> 时，荧光强度较小，反之荧光强度较大。由此可知，本文选择的核酸适配体可特异性识别并结合 FB<sub>1</sub>，与 OTA、AFB<sub>1</sub>、CTN 或 ZEN 不发生交叉反应。

## 2.5 基于核酸适配体的荧光检测法与 ELISA 试剂盒的一致性

为了比较基于核酸适配体的荧光检测法与基于抗体的商业化 ELISA 检测试剂盒方法之间的符合度，以验证本方法检测样品的准确度。本实验室对 38 份牛奶样品进行了检测，计算出本方法的回收率（表 2），低浓度条件下，回收率较低；当浓度大于 10 μg/L 时，回收率高达 99%。利用统计方法计算 Kappa 值为 0.857（检测样品浓度为 0、1、2、2.5、5、10 μg/L），两种方法的检测结果具有良好的一致性（表 3），可用于样品中 FB<sub>1</sub> 的检测。

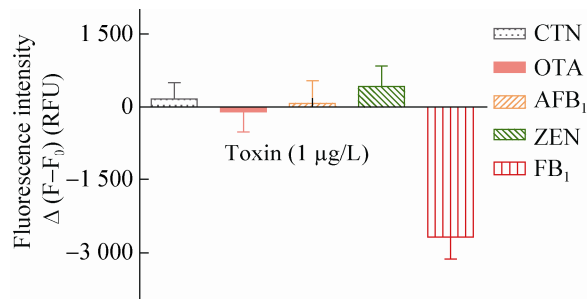


图 5 基于核酸适配体与 PicoGreen 检测 FB<sub>1</sub> 的特异性试验

Fig. 5 Specificity test of the aptamer/PicoGreen-based method.

表 2 基于 ELISA 和核酸适配体方法对牛奶样品中 FB<sub>1</sub> 检测的回收率比较

Table 2 FB<sub>1</sub> recovery rate comparison of FB<sub>1</sub> from milk samples using the aptamer/PicoGreen- and ELISA-based methods

Spiked (n=4)	FB <sub>1</sub> concentration (μg/L)		Recovery rate (%)	
	Aptamer/PicoGreen	ELISA	Aptamer/PicoGreen	ELISA
0	0	0	0	0
1.00	0.05	0.28	4.92	28.45
2.00	0.26	1.07	13.11	53.33
2.50	0.23	1.33	9.06	53.19
5.00	0.47	3.80	9.36	75.95
10.00	9.93	10.26	99.26	102.64
50.00	48.75		97.50	
100.00	112.01		112.01	

表 3 基于核酸适配体的荧光检测法与 ELISA 方法的 Kappa 值

Table 3 Kappa value of the aptamer/PicoGreen-based method and the commercial ELISA method

Aptamer/PicoGreen	ELISA		Total
	+	-	
+	18	0	18
-	2	10	12
Total	20	10	30
Kappa value	0.857		

+: positive; -: negative; n=4

### 3 讨论

食品安全问题一直是世界关注的焦点,其中霉菌毒素污染最为常见。FB<sub>1</sub> 主要污染玉米和玉米制品,严重危害人类和动物的健康<sup>[26]</sup>。食品和饲料行业的检测目前主要是免疫法和色谱分析法,存在设备与试剂昂贵、样品处理繁琐等不足之处<sup>[27]</sup>。

核酸适配体是完全不同于抗体的一种单链核苷酸,可形成茎环、发夹和 G-四聚体(G-quadruplex)等结构并与靶分子特异性结合,目前已被广泛应用于生物样品的检测<sup>[28]</sup>。

由本研究建立的基于核酸适配体的荧光检测法选择的 FB<sub>1</sub> 核酸适配体具有高特异性,与常见的霉菌毒素不发生交叉反应。该荧光检测法的检测灵敏度为:0.1 μg/L,比商业化的检测灵敏度高 10 倍(美国 Reagen 公司,RNM98009,检测灵敏度为:1.0 μg/L)。

本研究建立的检测方法线性范围 0.1–1 μg/L 是根据伏马毒素标准品(纯品)进行的检测。回收率是根据人工污染牛奶样品进行的检测。对于人工污染的样品,需要利用甲醇萃取等步骤进行回收,然后才能按照标准步骤进行 FB<sub>1</sub> 含量检测。原始样品中伏马毒素含量越少,回收时损失越大。当样品中伏马毒素含量超过 10 μg/L(μg/kg) 时,本方法的回收率可以达到 97%以上,而国际上对食品和动物性饲料中允许的最大残留量分别是 1 000–2 000 μg/kg,因此可以用于实际样品的检测。所以本实验针对的原始样品中伏马毒素的回收率是符合要求的,检测线性范围和回收率不矛盾。为保证检测结果的准确性,当样品中 FB<sub>1</sub> 含量超过 1 μg/L 时,需要将样品稀释到线性范围内。

本研究建立的基于核酸适配体与荧光染料 PicoGreen 的新方法将反应体系内未知浓度的 FB<sub>1</sub> 转换为可以定量检测的荧光信号,达到检测 FB<sub>1</sub> 的目的,特异性强,灵敏度高。整个检测过程可在 40 min 内完成,具备快速、易操作的特点。本研究建立的基于核酸适配体与 PicoGreen 检测 FB<sub>1</sub> 的方法为霉菌毒素的检测提供了新的思路,具有广阔的应用前景。

### REFERENCES

- [1] Bryła M, Roszko M, Szymczyk K, et al. Fumonisin in plant-origin food and fodder—a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2013, 30(9): 1626–1640.
- [2] Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WF, et al. Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(7): 1806–1811.
- [3] Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, et al. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub> in rats. *Carcinogenesis*, 1991, 12(7): 1247–1251.
- [4] Queiroz B, Pereyra CM, Keller KM, et al. Fungal contamination and determination of fumonisins and aflatoxins in commercial feeds intended for ornamental birds in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 57(5): 405–411.
- [5] Chu FS, Li GY. Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(3): 847–852.
- [6] Shelby RA, Rottinghaus GE, Minor HC. Comparison of thin-layer chromatography and competitive immunoassay methods for detecting fumonisin on maize. *J Agric Food Chem*, 1994, 42(9): 2064–2067.
- [7] Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, et al.

- Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr*, 1990, 13(10): 2077–2087.
- [8] Quan Y, Zhang Y, Wang S, et al. A rapid and sensitive chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fumonisin B<sub>1</sub> in food samples. *Anal Chim Acta*, 2006, 580(1): 1–8.
- [9] De Girolamo A, Solfrizzo M, Visconti A, et al. Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize-based food products. *Food Addit Contam*, 2001, 18(1): 59–67.
- [10] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346(30): 818–822.
- [11] Ellington AD, Szostak JW. Selection *in vitro* of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, 1992, 335(27): 850–852.
- [12] Xu W, Ellington AD. Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(15): 7475–7480.
- [13] Cerchia L, Hamm J, Libri D, et al. Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Lett*, 2002, 528(1/3): 12–16.
- [14] Clark SL, Remcho VT. Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis*, 2002, 23(9): 1335–1340.
- [15] Nguyen BH, Tran LD, Do QP, et al. Label-free detection of aflatoxin M<sub>1</sub> with electrochemical Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> polyaniline-based aptasensor. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(4): 2229–2234.
- [16] Wang L, Ma W, Chen W, et al. An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(6): 3059–3062.
- [17] Zhao Q, Geng X, Wang H. Fluorescent sensing ochratoxin A with single fluorophore-labeled aptamer. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(19): 6281–6286.
- [18] Lv ZZ, Chen AL, Liu JC, et al. A simple and sensitive approach for ochratoxin A detection using a label-free fluorescent aptasensor. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85968.
- [19] Singer VL, Jones LJ, Yue ST, et al. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem*, 1997, 249(2): 228–238.
- [20] McKeague M, Bradley CR, Girolamo AD, et al. Screening and initial binding assessment of fumonisin B<sub>1</sub> aptamers. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(12): 4864–4881.
- [21] Lv ZZ, Liu JC, Zhou Y, et al. Highly sensitive fluorescent detection of small molecules, ions, and proteins using a universal label-free aptasensor. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49(48): 5465–5467.
- [22] Cruz-Aguado JA, Penner G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(22): 10456–10461.
- [23] Chen X, Huang Y, Duan N, et al. Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(20): 6573–6581.
- [24] Chen J, Fang Z, Liu J, et al. A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer. *Food Control*, 2012, 25(2): 555–560.
- [25] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977, 33(1): 159–174.
- [26] Visconti A, Doko MB. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J AOAC Int*, 1993, 77(2): 546–550.
- [27] Scott PM, Trucksess MW. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J AOAC Int*, 1996, 80(5): 941–949.
- [28] Song S, Wang L, Li J, et al. Aptamer-based biosensors. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2008, 27(2): 108–117.

(本文责编 郝丽芳)