

基于 Exo III 信号放大的荧光适配体传感器检测 Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制因子

李心珠¹, 谷春梅^{1*}, 于寒松^{2*}, 董鹏超¹, 鲍云翔¹

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118)

(2. 国家大豆产业技术体系加工研究室, 吉林长春 130118)

摘要: Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制因子 (Kunitz Soybean Trypsin Inhibitor, KTI) 是一种很关键的抗营养因子, 不仅对动物消化系统和生长发育有不良影响, 还制约各个行业对大豆的利用率, 因此快速有效的检测方法是非常必要的。该研究建立一种基于核酸外切酶 III (Exonuclease III, Exo III) 和碳纳米颗粒 (Carbon Nanoparticles, CNPs) 的信号辅助放大荧光传感体系用于 KTI 的检测。具体体系包括 KTI 适配体 (Aptamer, APT)、互补链 (Complementary DNA, cDNA)、信号探针 (Signal Probe, SP)、Exo III 和 CNPs 共 5 个部分。通过可行性分析和 CNPs 浓度优化试验, 测得 KTI 在 100~600 ng/mL 范围内呈线性相关, 检测限为 12.59 ng/mL。以豆浆作为样品, 采用加标回收测得回收率为 97.42%~102.85%, RSD 在 0.61%~2.36% 之间, 该方法可对实际样品中的 KTI 进行测定。

关键词: KTI; 适配体生物传感器; 核酸外切酶 III; 碳纳米颗粒; 荧光检测

文章编号: 1673-9078(2023)12-279-285

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.1622

Detection of the Kunitz Soybean Trypsin Inhibitor Using a Fluorescence Aptamer Biosensor Based on Exo III Signal Amplification

LI Xinzhu¹, GU Chunmei^{1*}, YU Hansong^{2*}, DONG Pengchao¹, BAO Yunxiang¹

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

(2. National Soybean Industry Technology System Processing Laboratory, Changchun 130118, China)

Abstract: The Kunitz soybean trypsin inhibitor (KTI) is a key antinutritional factor, which not only has adverse effects on the digestive system and growth of animals, but also restricts the utilization of soybean in various industries. Therefore, a rapid and effective detection method is imperative. In this study, a signal-assisted amplification fluorescence sensing system based on exonuclease III (Exo III) and carbon nanoparticles (CNPs) was established for the detection of KTI. The specific system consisted of the KTI aptamer (APT), complementary DNA (cDNA), signal probe (SP), Exo III, and CNPs. Through feasibility analysis and a CNP concentration optimization test, KTI was linearly correlated in the range of 100~600 ng/mL, and the detection limit was 12.59 ng/mL. The recovery rates of soybean milk were 97.42%~102.85% and the residual standard deviations were 0.61%~2.36%. This method can be used to determine KTI in actual samples.

Key words: Kunitz soybean trypsin inhibitor; aptamer biosensor; exonuclease III; carbon nanoparticles; fluorescence detection

引文格式:

李心珠, 谷春梅, 于寒松, 等. 基于 Exo III 信号放大的荧光适配体传感器检测 Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制因子[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 279-285

LI Xinzhu, GU Chunmei, YU Hansong, et al. Detection of the kunitz soybean trypsin inhibitor using a fluorescence aptamer biosensor based on Exo III signal amplification [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 279-285

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-04); 吉林省科技厅中青年科技创新创业卓越人才 (团队) 项目 (创新类) (20210509015RQ)

作者简介: 李心珠 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 大豆胰蛋白酶抑制因子检测, E-mail: 1504713821@qq.com

通讯作者: 谷春梅 (1976-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品加工及营养调控, E-mail: jjnong2008@126.com; 共同通讯作者: 于寒松 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 豆制品加工, E-mail: yuhansong@163.com

大豆含有丰富的蛋白质和各种必需氨基酸，是主要的工业原材料及经济作物。同时富含多种抗营养因子，其中大豆胰蛋白酶抑制因子（Soybean Trypsin Inhibitor, STI）是一种很重要的抗营养因子，包括 Kunitz 胰蛋白酶抑制因子（Kunitz Trypsin Inhibitor, KTI）和 Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制因子（Bowman-Birk Inhibitor, BBI）^[1]。一方面，其与胰蛋白酶、糜蛋白酶相互作用，形成一种不易降解的稳定复合物，导致蛋白质的消化吸收与利用减弱。另外，因为人体蛋白酶降低，造成体内含硫氨基酸降低，引起胰腺肿大、免疫功能下降等，危害人类及动物健康，制约各行业大豆利用率^[2]，因此对其检测势在必行。目前对于 KTI 的检测有脲酶检测、酶化学检测法，酶联免疫吸附试验是目前最广泛的一种免疫检测法，用于大豆抗营养成分测定^[3,4]，通过酶高效催化作用，使抗体的特异性结果放大。由于抗体合成成本高以及本身易受到外界环境的干扰，因此，有必要建立高效的 KTI 检测技术。

作为一种新型信号分子，核酸适配体具有高亲和力、易于合成修饰、成本低、靶标范围大等优点^[5-8]，使其在蛋白质作用研究^[9-11]、环境监测^[12-14]、食品安全检测^[15-17]等众多领域受到了广泛重视^[18]。核酸适配体作为寡核苷酸片段与靶分子结合，通过构建适配体生物传感器将结合信号转化为易于检测的信号^[19]，分为荧光适配体传感器^[20-22]、比色适配体传感器^[23,24]、电化学适配体传感器^[25,26]等。目前纳米材料被用于多种方面^[27]，由于其灵敏、操作简单等被作为辅助元件^[28]。CNP 为其中一种，具有价格低廉、生物相容性好、无毒害等优点^[29]。由于 CNPs 具有纳米尺度和碳物质特性，对平面型染料分子的作用强，利用 $\pi-\pi$ 堆积作用，可以使单链 DNA 在其表面产生强烈的吸附，吸附在 CNPs 表面上的荧光团通过电子或能量转移被有效淬灭，因此 CNPs 作为荧光淬灭剂，将为生物分子荧光识别技术的发展奠定基础^[30]。

近年来，核酸信号放大技术广泛用于不同物质的分析检测，其中 Exo III 能不断催化降解双链 DNA，并特异性催化其从 3' 末端水解^[31]，其信号放大不需要特定的识别序列，适用于生物传感平台的构建，已被用于核酸^[32,33]、金属离子^[34]、有机物^[35]等的检测。本

研究构建一种 Exo III 信号放大技术与 CNPs 结合的方法，实验原理如图 1 所示，由 KTI 适配体、cDNA、SP、Exo III 和 CNPs 5 个部分组成。不存在 KTI 时，APT 与 cDNA 产生互补双链，SP 为单链结构，加入 CNPs 后，SP 被 CNPs 吸附淬灭；当 KTI 存在时，KTI 与 APT 结合，cDNA 和 SP 互补成双链，无法被 CNPs 吸附，SP 依然呈现荧光态，同时 Exo III 在 3' 末端对其进行降解，并通过 Exo III 的周期性切割释放出大量荧光团，使荧光强度得到明显提高，基于此可对 KTI 进行灵敏检测。

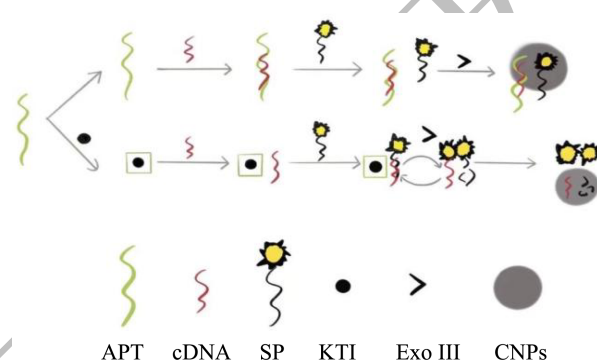


图 1 荧光适配体生物传感器检测原理图

Fig.1 Fluorescence aptamer biosensor detection schematic

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

KTI、BBI、SBA 标准品，均购于美国 Sigma-Aldrich 公司；碳纳米颗粒，购于北京德科岛金；核酸外切酶 Exo III，购于苏州近岸蛋白质科技股份有限公司；豆浆；DNA 序列，均由上海生工生物工程技术有限公司合成。据文献报道，在 3'-端的双链 DNA 必须至少有 4 个不匹配的碱基，以阻止 Exo III 的水解^[36]。因此将 4 个胸腺嘧啶 T 添加到 APT 与 cDNA 的 3'-端，以阻止 Exo III 的 DNA 水解，表 1 是用于实验的所有序列。

1.2 仪器与设备

MB-102 恒温金属振荡浴，杭州博日科技有限公司；YHZ-112B 恒温振荡培养摇床，苏州市国飞仪器有限公司；infiniteM200 型多功能酶标仪，Nano Quant；TGL-16 型高速台式离心机，上海安亭仪器厂。

表 1 DNA 序列

Table 1 DNA sequences

名称	序列 5'-3'
APT	GGGAGTCGGGAATAACCGTCCGCGACATCACTAGGAAAACTTTT
SP	FAM-TCGGGAATAACCGTCCGCGACATCACTAGG
cDNA	CCTAGTGATGTCGCGACGGTTATCCCGACTCCCTTTT

1.3 试验方法

1.3.1 荧光适配体生物传感器检测 KTI

首先,将 APT、cDNA、SP 的浓度分别配置为 0.2、0.2、1 $\mu\text{mol/L}$,取 50 μL APT 与 50 μL 的 KTI 溶液进行混合,其中 KTI 的质量浓度为 200 ng/mL ,室温反应 1 h;然后分别取 50 μL cDNA 和 50 μL SP 加入到上述混合物中,在室温下反应 30 min;最后,添加含 40 U Exo III 的缓冲液 100 μL ,对 SP 进行消化,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 2 h;当酶解结束以后,将体系加热到 75 $^{\circ}\text{C}$ 进行 5 min 后停止反应;然后,在反应混合物中添加 200 μL 的 CNPs 溶液,最后的体积是 500 μL ,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗的条件下培养该混合物 30 min^[37]。荧光发射光谱测试条件为:激发波长为 490 nm,发射波长范围为 500~640 nm,入射狭缝以及出射狭缝宽度为 5 nm。依照 523 nm 处的峰值强度对 KTI 的浓度做定量分析。

1.3.2 CNPs 质量浓度的优化

CNPs 在本研究中用作检测平台,它的质量浓度是影响检测结果的主要因素。如果系统中 CNPs 质量浓度太低,无法有效地消除未被水解的信号探针 SP 的荧光,从而使背景荧光强度太高影响检测限;在质量高浓度下淬灭过大会使测定结果不精确,所以必须优化 CNPs 的质量浓度。CNPs 的添加质量浓度为 20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$,采用与上述 1.3.1 荧光适配体生物传感器检测 KTI 相同的方法进行测定。

1.3.3 可行性试验

核酸外切酶 III 作为一种切割酶,具有高效的酶催化活性,对靶标循环有促进作用^[38]。为了增加检测的灵敏度,使用 Exo III 对荧光信号进行辅助放大,为了验证该方法是否可行需对其进行试验分析,试验共分为 a、b、c、d 四组,试剂组合如下表 2 所示,其中没有添加的试剂被 ddH₂O 取代,KTI 的质量浓度是 200 ng/mL ,最终体积为 500 μL ,反应过程同 1.3.1。

表 2 试剂及组合

Table 2 Reagent and combination

序号	试剂组合
a	APT+cDNA+SP+CNPs+Exo III
b	APT+KTI+cDNA+SP+CNPs
c	APT+cDNA+SP+CNPs
d	APT+KTI+cDNA+SP+CNPs+Exo III

1.3.4 特异性研究

为了检验该方法对 KTI 的特异性,分别加入质量浓度为 200 ng/mL 的 KTI、BBI、SBA 标准溶液,其余操作与 1.3.1 相同。通过比较不同种类的 KTI 类似物

存在时,体系的相对荧光强度大小来判断本方法的选择性。

1.3.5 豆浆样品中 KTI 加标回收测定

取豆浆样品作为检测对象,验证体系在实际样品中的实用性,具体方法如下:用 ddH₂O 将豆浆配置为 $\rho=1\%$ 的缓冲体系,加入不同量的 KTI 溶液,KTI 的质量浓度为 50、100、500 ng/mL ,获得了一系列浓度的加标 KTI 标准溶液。将 APT、cDNA、SP 的浓度分别配置为 0.2、0.2、1 $\mu\text{mol/L}$,取 50 μL APT 与 50 μL 加标 KTI 溶液进行混合,室温反应 1 h;分别取 50 μL cDNA 和 50 μL SP 加入到上述混合物中,在室温下反应 30 min;然后,添加含 40 U Exo III 的缓冲液 100 μL ,消化 SP,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 2 h;当酶解结束以后,将体系加热到 75 $^{\circ}\text{C}$ 进行 5 min 后停止反应;最后,在反应混合物中添加 200 μL 的 CNPs 溶液,反应总体积为 500 μL ,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗的条件下培养该混合物 30 min,测试条件同 1.3.1。

1.3.6 数据分析

试验中的分析数值均采用三次平行试验进行处理,以“平均值 \pm 标准差”表示;采用 Origin 2021 和 GraphPad Prism 8 软件绘图;采用 Excel 2010 进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 CNPs 质量浓度优化结果

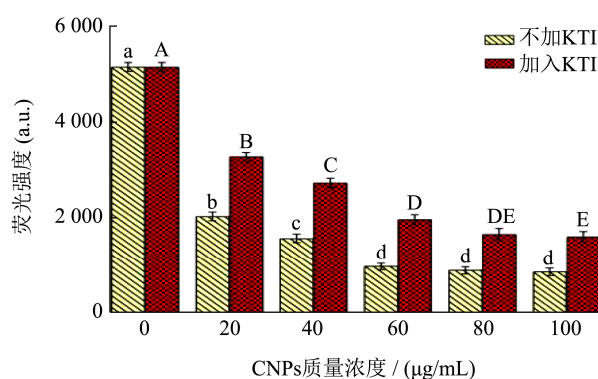


图 2 CNPs 在不同质量浓度下的荧光强度对照图

Fig.2 Comparison of fluorescence intensity of CNPs at different mass concentrations

注:不同小写字母表示不加 KTI 时的荧光强度具有显著性差异,不同大写字母表示加入 KTI 时的荧光强度具有显著差异, $P<0.05$ 。

CNPs 是传感器的检测平台,其质量浓度对检测结果有重要影响^[39],因此需要对其质量浓度进行优化。图 2 为体系中加入不同浓度的 CNPs, KTI 是否存在的条件下荧光强度值的变化,其中红色柱状为添加

KTI 溶液时的荧光强度,黄色柱状为未添加 KTI 时的荧光强度。从图 2 中可以看到, CNPs 质量浓度越来越高,系统的荧光强度逐渐降低, CNPs 质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,荧光强度显著高于其他更高质量浓度 ($P<0.05$),当 CNPs 质量浓度达到 60 $\mu\text{g/mL}$ 后,质量浓度增大对荧光强度的变化影响不显著,逐渐趋于平稳。是因为随着 CNPs 质量浓度的增加,荧光信号被大量淬灭。

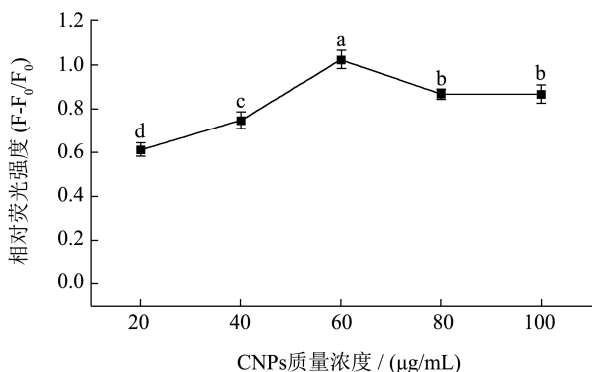


图 3 CNPs 在不同质量浓度下的相对荧光强度

Fig.3 The relative fluorescence intensity of CNPs at different mass concentrations

注: 不同字母表示差异性显著, $P<0.05$, 下同。

如图 3 所示为体系的相对荧光强度,呈现先升高后下降趋势,当 CNPs 质量浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ 时,相对荧光强度值最高,为 1.0 左右,与其他数据之间具有显著差异 ($P<0.05$),之后的相对荧光强度没有显著差异 ($P>0.05$),因此选择 60 $\mu\text{g/mL}$ 作为最终的优化结果。与冯婷婷等^[40]基于 CNPs 传感器检测腺苷脱氨酶实验结果相比, CNPs 优化质量浓度相似。

2.2 方法可行性分析

为了考察实验方法的有效性,该实验采用了检测体系中是否出现 Exo III 时对荧光强度的影响来检验实验方法的准确性,如图 4 所示。在体系中不具有 Exo III 时,加入 KTI 与不加入 KTI 的荧光强度对比有较小范围的不同(图 4 中的 b、c),但 KTI 的引入使适配体与 KTI 结合, cDNA 与信号探针 SP 互补,由此产生了双链 DNA,不能完全被 CNPs 吸附,从而增加

了溶液的荧光强度;当体系中加入 Exo III 时,体系与 CNPs 进行酶促切割,从而使检测信号放大,荧光强度显著增加(图 4 中的 a、d),但是体系的背景荧光没有太大变化,此时的荧光信号是背景信号的 3 倍左右。相对于没有 Exo III 的情况下,添加之后荧光信号增加约 80% (图 4 中的 b、d)。实验结果显示,利用 Exo III 循环放大技术可以提高荧光信号的强度,与赵阳阳^[41]实验关于适配体生物传感器检测赭曲霉毒素 A 的可行性分析中的结果基本相同,说明此方法可行。

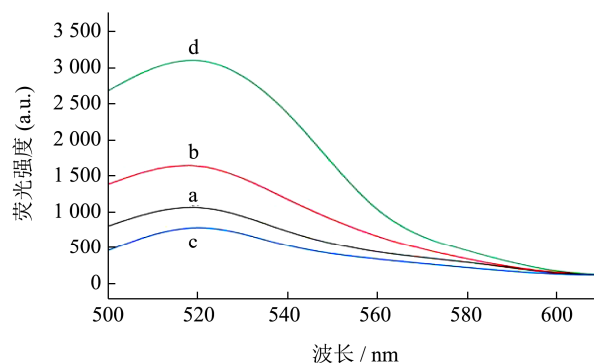


图 4 不同体系的荧光光谱图

Fig.4 Fluorescence spectra of different systems

注: a 为 APT+cDNA+SP+CNPs+Exo III; b 为 APT+KTI+cDNA+SP+CNPs; c 为 APT+cDNA+SP+CNPs; d 为 APT+KTI+cDNA+SP+CNPs+Exo III。

2.3 标准曲线的绘制

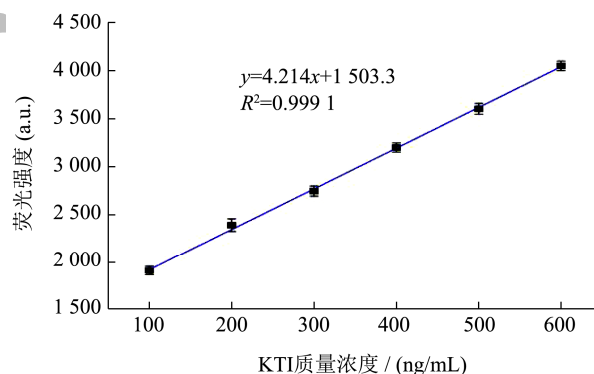


图 5 传感器在不同 KTI 质量浓度下的标准曲线

Fig.5 The standard curve of the sensor at different KTI mass concentrations

表 3 本方法与现有检测技术对比

Table 3 This method is compared with existing detection techniques

检测方法	检测性能
脲酶检测法	适用性较差
酶化学检测法	检测灵敏度相对较低
免疫检测法	利用兔源多克隆抗体建立的 3 种检测 KTI 的 ELISA 法,检测限均能达到 20 ng/mL
本方法	操作简便、灵敏度高,检测限为 12.59 ng/mL

方法可行性和 CNPs 质量浓度优化试验条件确定后,将不同质量浓度的 KTI (100~600 ng/mL) 加入到检测体系,以研究适配体生物传感器对于 KTI 检测的灵敏度。如图 5 所示,实验结果表明,随着 KTI 浓度的增加荧光强度逐渐增加,在此范围内呈线性相关,线性相关系数 $R^2=0.999 1$,检测限 (LOD) 设定为三倍空白溶液的荧光信号的标准偏差,因此得出适配体生物传感器检测限 (LOD) 为 12.59 ng/mL。对照现有 KTI 检测技术,如表 3 所示,本方法对于 KTI 的检测优于文献报道^[42],具有更低的检测限,灵敏度较高。

2.4 特异性研究

选择以下两种 KTI 类似物 BBI、SBA 进行特异性试验,通过对 KTI 适配体生物传感器的特异检测,是测定其可靠性的一个重要参数。主要在于检测其能特异性结合 KTI 外,是否还与其他 KTI 结构相似的物质结合。如图 6 所示,实验结果表明,与其他两种类似物 BBI、SBA 相比,KTI 体系中相对荧光强度最高,为 0.9 左右,与其他两组数据之间存在显著性差异 ($P<0.05$),两种类似物的相对荧光强度较小,核酸适配体不能识别,两者数据间没有显著性差异 ($P>0.05$)。结果表明,KTI 适配体能够进行 KTI 的特异性识别,因此验证了该适配体生物传感器对 KTI 具有良好的选择性和特异性。

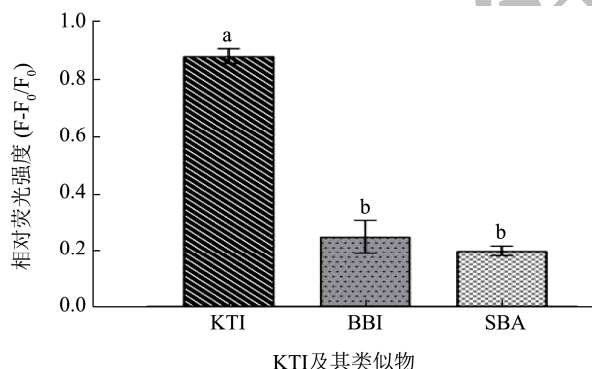


图 6 KTI 的特异性试验

Fig.6 Specificity test of KTI

2.5 豆浆样品中 KTI 回收率试验结果

基于这种适配体生物传感器具有良好的检测能力和良好的选择性,在实际样本中评价其检测方法的可行性。用 ddH₂O 将豆浆配置为 1% 的缓冲体系,加入不同量的 KTI 溶液用于分析测定,KTI 的质量浓度分别为 50、100、500 ng/mL,采用加标回收法对三种不同 KTI 质量浓度的回收率进行测定,如表 4 所示。回收率介于 97.42%~102.85% 范围内,数据之间没有显著性差异 ($P>0.05$),相对标准偏差 (RSD) 在

0.61%~2.36% 之间,检测准确度良好。结果表明 Exo III 辅助放大信号检测法对于实际样品中的 KTI 表现出良好的检测性能,能有效用于实际样品的检测。

表 4 适配体生物传感器用于豆浆样品中 KTI 的测定

Table 4 Aptamer biosensor for the determination of KTI in soybean milk samples

样品	加入值/(ng/mL)	检测值/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%
1	50	51.42±1.21	102.85±0.02 ^a	2.36
2	100	97.42±1.79	97.42±0.02 ^a	1.84
3	500	503.01±3.04	100.60±0.01 ^a	0.61

注:表中不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

3 结论

开发了一种以核酸适配体作为识别单元,核酸外切酶 III 作为信号放大元件以及碳纳米颗粒作为信号开关的荧光型适配体生物传感器,利用 Exo III 不断降解-杂交循环,结合 CNPs 的荧光淬灭效果对检测信号进行放大,可以有效提高 KTI 检测的灵敏度。KTI 的荧光强度与 KTI 浓度之间存在着一定的线性关系,线性相关系数 $R^2=0.999 1$,检测限 (LOD) 为 12.59 ng/mL,所设计的核酸适配体生物传感器显示出良好的选择性。以豆浆作为样品,采用加标回收法测得回收率为 97.42%~102.85%,相对标准偏差 (RSD) 在 0.61%~2.36% 之间。相对于常规的测定方法,该方法具有操作简便、灵敏度高、专一性良好等优点,可以作为一种新的测定方法用于实际样品中 KTI 的检测。

参考文献

- [1] 刁恩杰,丁晓雯.大豆抗营养因子的研究概况[J].粮油加工与食品机械,2003,8:40-42.
- [2] 姚怡莎,谷旭,商方方,等.大豆和膨化大豆主要抗营养因子分析[J].中国农业科学,2016,49(11):2174-2182.
- [3] Chen J, Wang J, Song P, et al. Determination of glycinin in soybean and soybean products using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food Chemistry, 2014, 162(nov.1): 27-33.
- [4] Hei W, Li Z, Ma X, et al. Determination of beta-conglycinin in soybean and soybean products using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 734(1): 62-68.
- [5] Keefe A D, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(7): 537-550.
- [6] Hu P, Liu Z, Tian R, et al. Selection and identification of a DNA aptamer that mimics saxitoxin in antibody binding [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(14):

- 3533-3541.
- [7] Wang R, Zhao J, Jiang T, et al. Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1 [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 189(2): 362-369.
- [8] Lan L, Yao Y, Ping J, et al. Recent progress in nanomaterial-based optical aptamer assay for the detection of food chemical contaminants [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(28): 23287-23301.
- [9] Zhang Y, Lai B S, Juhas M. Recent advances in aptamer discovery and applications [J]. *Molecules*, 2019, 24(5): 941.
- [10] 崔承,蒋宇扬.核酸适配体及其相关药物研究进展[J].*中国新药杂志*,2011,20(5):407-410.
- [11] Xia Y, Liu M, Wang L, et al. A visible and colorimetric aptasensor based on DNA-capped single-walled carbon nanotubes for detection of exosomes [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 92: 8-15.
- [12] Chen M, Gan N, Zhang H, et al. Electrochemical simultaneous assay of chloramphenicol and PCB72 using magnetic and aptamer-modified quantum dot-encoded dendritic nanotracers for signal amplification [J]. *Microchimica Acta*, 2016, 183(3): 1099-1106.
- [13] Chen D, Yao D, Xie C, et al. Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline [J]. *Food Control*, 2014, 42(42): 109-115.
- [14] Jin B, Wang S, Lin M, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 90(1): 525-533.
- [15] 王周平,张维潇.适配体及其研究进展[J].*食品与生物技术学报*,2014,32(9):897-906.
- [16] Zhang Y, Lu T, Wang Y, et al. Selection of a DNA aptamer against zearalenone and docking analysis for highly sensitive rapid visual detection with label-free aptasensor [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(45): 12102-12110.
- [17] Castillo G, Lamberti I, Mosiello L, et al. Impedimetric DNA aptasensor for sensitive detection of ochratoxin A in food [J]. *Electroanalysis*, 2012, 24(3): 512-520.
- [18] Liu J. DNA-stabilized, fluorescent, metal nanoclusters for biosensor development [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 58: 99-111.
- [19] 田静,孙文怡,黄宝玺,等.基于纳米材料的适配体生物传感器在真菌毒素检测中的应用研究进展[J].*延边大学农学报*,2019,41(2):102-109.
- [20] Lu C, Fang W, Ming L, 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.
- [21] Zongbing L, Ning X, Haiyan M, et al. An ultrasensitive and switch-on platform for aflatoxin B1 detection in peanut based on the fluorescence quenching of graphene oxide-gold nanocomposites [J]. *Talanta*, 2018, 181: 346-351.
- [22] Fereshte S S, Morteza H, Hossein K, et al. FRET-based aptamer biosensor for selective and sensitive detection of aflatoxin B1 in peanut and rice [J]. *Food Chemistry*, 2017, 220(apr.1): 527-532.
- [23] Youngung S, Ju-Young B, Won-Bo S, et al. A structure-switchable aptasensor for aflatoxin B1 detection based on assembly of an aptamer/split DNAzyme [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 886: 182-187.
- [24] 曾宪冬,曾灼祥,陈兴会.基于核酸适配体-金纳米粒子比色传感器快速检测食品中赭曲霉毒素 A[J].*食品安全导刊*, 2018,7:72-75.
- [25] Chen M, Gan N, Zhou Y, et al. A novel aptamer-metal ions-nanoscale MOF based electrochemical bio-codes for multiple antibiotics detection and signal amplification [J]. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2017, 242: 1201-1209.
- [26] Feng X, Gan N, Zhang H, et al. A novel "dual-potential" electrochemiluminescence aptasensor array using CdS quantum dots and luminol-gold nanoparticles as labels for simultaneous detection of malachite green and chloramphenicol [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 74: 587-593.
- [27] 万梦飞,刘钟栋,戚燕,等.磁性纳米材料的功能化及其在农药残留检测中的应用[J].*分析实验室*,2020,39(5):605.
- [28] Jiang C, Lan L, Yao Y, et al. Recent progress in application of nanomaterial-enabled biosensors for ochratoxin A detection [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 102: 236-249.
- [29] Tian L, Li Z, Wang P, et al. Carbon quantum dots for advanced electrocatalysis [J]. *Journal of Energy Chemistry*, 2021, 55: 279-294.
- [30] 刘金华.功能化碳纳米颗粒的制备、性质及其分析应用研究[D].长沙:湖南大学,2012.
- [31] Richardson C C, Kornberg A. A deoxyribonucleic acid phosphatase-exonuclease from *Escherichia coli* [J]. *J. Biol. Chem*, 1964, 239(1): 242-250.
- [32] Qi Y, Xiu F, Weng Q. A novel and convenient chemiluminescence sensing of DNA: Nanometer interface effect and DNA action mechanism [J]. *Sensors and Actuators*

- B: Chemical, 2018, 260(MAY): 303-310.
- [33] Wang W, Bao T, Zeng X, et al. Ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on functionalized gold clusters/graphene nano hybrids coupling with exonuclease *III*-aided cascade target recycling [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 91: 183-189.
- [34] Zhang H, lei Z, Fu X, et al. Hg²⁺-triggered exonuclease *III*-assisted dual-cycle targets recycling amplification for label-free and ultrasensitive colorimetric detection of Hg²⁺ [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 246: 896-903.
- [35] Chen P, Huang K, Zhang P, et al. Exonuclease *III*-assisted strand displacement reaction-driven cyclic generation of G-quadruplex strategy for homogeneous fluorescent detection of melamine [J]. Talanta, 2019, 203: 255-260.
- [36] Brutlag D, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid: *XXXVI*. A proofreading function for the 3'→5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(1): 241-248.
- [37] Hu P, Zhu C, Jin L, et al. An ultrasensitive fluorescent aptasensor for adenosine detection based on exonuclease *III* assisted signal amplification [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 34(1): 83-87.
- [38] Xu Q, Cao A, Zhang L, et al. Rapid and label-free monitoring of exonuclease *III*-assisted target recycling amplification [J]. Analytical chemistry, 2012, 84(24): 10845-10851.
- [39] 冯婷婷,王峥,王晓华,等.基于核酸外切酶*III*信号放大技术的荧光适配体传感器用于卡那霉素的检测[J].分析试验室, 2021,40(10):1140-1146.
- [40] 冯婷婷,王迎超,郭建花,等.基于碳纳米颗粒的荧光适配体传感器用于腺苷脱氨酶的检测[J].分析试验室,2020,39(8): 974-979.
- [41] 赵阳阳.适配体生物传感技术用于检测赭曲霉毒素 A 的研究[D].长春:吉林农业大学,2018.
- [42] 张国龙,李德发.大豆胰蛋白酶抑制因子酶联免疫吸附测定方法的研究[J].动物营养学报,1997,9(1):12-20.