

基于AIE-适配体与酶切放大的荧光传感器 检测氟虫腓

韩芳, 张锐, 马生龙, 李云霞, 聂莹莹, 马莉萍*

(甘肃省科学院传感技术研究所 甘肃省传感器与传感技术重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 针对氟虫腓的快速、高灵敏检测需求, 该研究通过系统比较4条已知序列的适配体(Aptamer), 筛选出对氟虫腓亲和力最优的适配体。在此基础上, 利用核酸外切酶I(Exonuclease I, Exo I)特异性水解单链DNA的特性和聚集诱导发光(AIE)分子4, 4'-(IE, I'E)-2, 2'-(蒽-9, 10-二芳基)双(乙烯-2, 1-二基)双(N, N-二甲基苯胺)(DSAI)与适配体结合后荧光显著增强的特性, 建立了一种针对氟虫腓的灵敏荧光检测方法。该方法检测氟虫腓的线性范围为1.00~12.50 nmol/L, 检出限为2.23 nmol/L。在实际样本(白菜、玉米和自来水)检测中的平均回收率为89.2%~107%, 相对标准偏差为0.80%~4.3%。结果表明, 所构建的传感器具有灵敏度高、选择性好等优势, 在农药残留快速筛查领域展现出良好的应用潜力。

关键词: 适配体; 聚集诱导发光; 氟虫腓; 荧光检测

中图分类号: O657.3; S481.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)05-1021-09

Fluorescence Sensor Based on AIE-Aptamer and Enzymatic Amplification for the Detection of Fipronil

HAN Fang, ZHANG Rui, MA Sheng-long, LI Yun-xia, NIE Ying-ying, MA Li-ping*

(Key Laboratory of Sensor and Sensing Technology of Gansu Province, Institute of Sensor Technology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To meet the requirement for rapid and highly sensitive detection of fipronil, this study systematically compared four known aptamer sequences and selected the aptamer with the highest affinity for fipronil. Based on this, a sensitive fluorescence detection method for fipronil has been established by utilizing the property of Exonuclease I to specifically hydrolyze single-stranded DNA and the significant fluorescence enhancement of the aggregation-induced emission molecule DSAI upon binding to the aptamer. The linear range of this method for the detection of fipronil was 1.00–12.50 nmol/L and the limit of detection was 2.23 nmol/L. In the detection of practical samples (cabbage, corn, and tap water), the average recoveries ranged from 89.2% to 107%, with relative standard deviations between 0.80% and 4.3%. The experimental findings indicate that the developed sensor exhibits high sensitivity and excellent selectivity, suggesting substantial potential for its application in the rapid screening of pesticide residues.

Key words: aptamer; aggregation induced emission; fipronil; fluorescence detection

氟虫腓(Fipronil)作为一种新型苯基吡唑类杀虫剂, 其作用机制是通过阻断昆虫神经系统中由 γ -氨基丁酸介导的氯离子通道, 从而表现出快速且显著的杀虫活性。自问世以来, 氟虫腓被广泛用于农作物、家禽害虫防治及土壤处理等领域, 且应用范围逐年持续扩大^[1-2]。据统计, 2021年氟虫腓在全球杀虫剂销售额中位列第七, 我国年销售量超过1 000吨, 销售额逾1亿美元, 约占全球杀虫剂市场份额的三分之一^[3]。

由于用途广泛, 氟虫腓已成为一种普遍存在的环境污染物, 可通过职业暴露、误食受污染食品或饮用水等多种途径进入人体^[4], 并在农作物、果蔬、禽蛋以及各类水体和室内灰尘中频繁检出^[5-6]。研究显示, 饮用水是重要暴露源之一, 多国饮用水中均检出氟虫腓, 浓度可达0.04~153.0 ng/L^[7]。国内

收稿日期: 2026-01-09; 修回日期: 2026-02-04

基金项目: 甘肃省科学院项目(2025QD-05); 甘肃省知识产权计划资助(25ZSCQG02044)

* 通讯作者: 马莉萍, 硕士, 研究员, 研究方向: 生物传感技术, E-mail: 279559916@qq.com

网络首发日期: 2026-03-24

监测数据进一步表明, 蔬菜与水果中氟虫腈残留仍有一定检出率^[8], 该化合物甚至在孕妇与新生儿血样中被发现, 提示其潜在的遗传毒性^[9]。在健康与生态层面, 氟虫腈不仅可通过氧化途径干扰人体甲状腺细胞功能, 进而影响儿童神经发育与生长进程^[10], 还对水生生物表现出多重毒性, 其半致死浓度低于常见环境相关浓度, 且在亚致死剂量下仍能破坏河流生态健康^[11-14]。此外, 它对爬行动物、两栖动物、鸟类及哺乳动物等各类生物均具有负面影响^[15-17]。因此, 为有效评估与控制其环境与健康风险, 发展准确、快速的氟虫腈检测技术已成为构建有效监控体系的关键所在。

当前的氟虫腈残留监测主要依赖仪器分析(如色谱/质谱^[18-19])和免疫分析^[20-22]等方法, 但这些技术或因前处理复杂、操作专业性强而难以满足现场快速检测需求, 或因抗体制备成本高、易出现交叉反应而限制了广泛应用。相比之下, 基于核酸适配体的生物传感技术具有识别特异性高、合成与修饰简便等优势, 成为一种前景广阔的替代方案^[23]。其中, 荧光适配体传感器因灵敏度高、响应快速而备受关注, 然而传统荧光染料的聚集诱导猝灭效应制约了其应用。新兴的聚集诱导发光材料(AIE)在分散状态下荧光微弱, 而在聚集状态下发光显著增强, 有效克服了这一局限并已在多个检测领域展现出良好性能^[24]。此外, 引入特异性核酸外切酶构建“酶切保护”策略, 可进一步简化操作流程并实现信号放大, 从而提升检测灵敏度与实用性^[25]。

本实验基于核酸外切酶 I (Exo I) 的剪切活性和 AIE 分子 4, 4'-(IE, I'E)-2, 2'-(蒽-9, 10-二芳基)双(乙烯-2, 1-二基)双(N, N-二甲基苯胺) (DSAI) 能够结合适配体并具有水溶性聚集诱导发光的特性, 构建了一种用于检测氟虫腈的适配体生物传感器。其检测原理如下: 当体系中存在氟虫腈时, 适配体与之特异性结合并折叠成稳定的 G-四链体结构; 该构象可抵抗 Exo I 的水解, 从而保持 DNA 链完整。随后加入的 DSAI 分子能够与该复合物结合并发生聚集, 使 DSAI 分子内运动受限(RIM), 抑制非辐射跃迁, 此时激发态能量以荧光形式释放, 产生显著的荧光信号。若体系中无氟虫腈存在, 适配体维持单链状态并被 Exo I 彻底水解为单核苷酸, 此时 DSAI 因缺乏稳定的结合模板而保持分散状态, 其分子可通过内部运动消耗激发态能量, 导致体系荧光信号微弱(图 1)。本方法将 AIE 荧光信号与酶催化反应相结合, 实现了基于核酸适配体的氟虫腈快速检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

BioTek Synergy H1 酶标仪(Agilent 科技有限公司); 透射电子显微镜 JEM-2100(日本电子株式会社); MICRICAL PEAQ 等温滴定量热仪(英国马尔文帕纳科)。

氟虫腈适配体^[26-28] Apt 1: 5'-ACGCGAATCGGAGTTGGGGT-3'; Apt 2: 5'-GGGACGACA-GATAGTGTGTACATGAAGGGTCGTCCC-3'; Apt 3: 5'-AGTTTCTGGAGGACTGGCGGGGTGACGGTTA-TG-3'; Apt 4: 5'-TGTACCGTCTGAGCGATTCGTACAGTTTCTGGAGGACTGGCGGGGTGACGGTTATG-AGCCAGTCAGTGTAAAGGAGTGC-3'(上海生工生物工程有限公司); Exonuclease I(赛默飞世尔科技公司); DSAI(西安齐岳生物科技有限公司); SYBR Green I(北京兰杰柯科技有限公司); 氯金酸(上海展云化工有限公司); 氟虫腈、啶虫脒、毒死蜱、多菌灵、吡蚜酮、莠去津均购于 MCE 公司; 三羟甲基氨基甲烷(北京索莱宝科技有限公司); 柠檬酸三钠、NaCl、KCl、MgCl₂ 和 CaCl₂ 均购于天津市大茂化学试剂合伙企业。

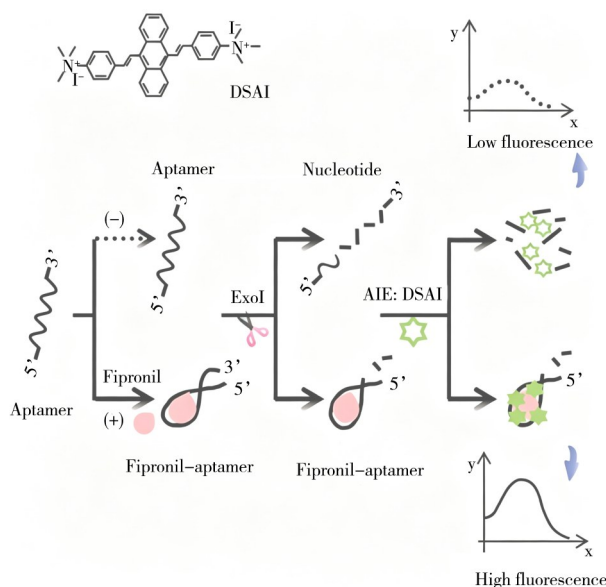


图 1 检测氟虫腈的荧光传感器示意图
Fig. 1 Schematic diagram of the fluorescence sensor for fipronil detection

1.2 溶液配制

氟虫腈适配体储备液的制备: 根据适配体合成说明, 加入对应体积去离子水, 稀释其浓度至 $10 \mu\text{mol/L}$, -20°C 冰箱保存, 备用。

氟虫腈标准溶液配制: 取 4.4 mg 氟虫腈标准品粉末, 用甲醇稀释至 5 mL , 得到浓度为 2 mmol/L 的氟虫腈溶液, 用锡箔纸包住试管, 保存于 -20°C 冰箱中。

Tris 缓冲溶液的配制: 分别称取 0.372 g KCl、 2.032 g MgCl_2 、 7.012 g NaCl、 2.218 g CaCl_2 和 1.211 g Tris 定容于 1 L 蒸馏水中, 用 HCl 调至 pH 8.0, 高温高压灭菌后使用。

SYBR Green I (SGI) 溶液配制: 取 $1 \mu\text{L}$ SGI 染料原液 ($10\ 000\times$), 加入 $99 \mu\text{L}$ Tris 缓冲液, 稀释为 $100\times$ 溶液, Tris 缓冲液继续稀释至 $5\times$, -20°C 冰箱避光保存, 备用。

纳米金溶液的制备: 首先, 所有玻璃器皿均经王水浸泡处理, 随后用蒸馏水反复冲洗并烘干备用。在 250 mL 三口烧瓶中加入 100 mL 0.01% 氯金酸水溶液, 置于磁力搅拌器上加热至沸腾, 在持续搅拌条件下, 迅速加入 3.5 mL 1% 柠檬酸钠溶液, 继续加热并保持回流约 6 min , 反应过程中溶液颜色由浅黄色逐渐变为无色、灰蓝色, 最终形成稳定的酒红色溶胶。停止加热后, 将反应液自然冷却至室温, 所得纳米金溶液于 4°C 条件下避光储存备用。

DSAI 储备液配制: 称取 16.395 mg DSAI 粉末, 加入 2 mL 去离子水, 配制成浓度为 15 mmol/L 的 DSAI 储备液, -20°C 避光保存。

1.3 氟虫腈适配体亲和力比较

为筛选出对氟虫腈具有最佳识别性能的适配体, 采用以下 3 种方法对 4 条候选适配体序列 (Apt 1~4) 进行亲和力评估。

荧光染料法: 取 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 的候选适配体溶液, 与 $50 \mu\text{L}$ 100 nmol/L 氟虫腈溶液混合, 室温孵育 40 min 。随后加入 $20 \mu\text{L}$ $5\times$ SYBR Green I (SGI) 荧光染料, 继续孵育 20 min , 最后加入 $20 \mu\text{L}$ ddH_2O 使总体积为 $100 \mu\text{L}$ 。使用酶标仪进行检测, 激发波长设为 485 nm , 发射光谱采集范围为 $500\sim 650 \text{ nm}$ 。以不含氟虫腈的样品荧光强度作为空白对照 (F_0), 含氟虫腈样品的荧光强度记为 F , 计算荧光强度变化 $\Delta F = F - F_0$ 。 ΔF 值最大者对应的适配体判定为亲和力最优适配体。

纳米金比色法: 参照前期优化条件, 向 $100 \mu\text{L}$ 纳米金溶液中加入 $10 \mu\text{L}$ $1 \mu\text{mol/L}$ 适配体溶液, 室温振荡孵育 30 min , 使适配体修饰于纳米金表面。随后加入 $10 \mu\text{L}$ 不同浓度梯度的氟虫腈溶液, 室温振荡反应 40 min , 最后加入 $10 \mu\text{L}$ 700 mmol/L NaCl 溶液, 室温孵育 20 min 。通过观察溶液颜色变化评估适配体与氟虫腈的结合能力: 在较低氟虫腈浓度下即发生由红变蓝颜色变化的适配体, 与靶标结合后更易引起纳米金聚集, 即亲和力更高。

等温滴定量热仪 (ITC) 法: 使用等温滴定量热仪进行测定。将 $50 \mu\text{mol/L}$ 氟虫腈溶液装入滴定针, 向样品池中装有 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 适配体溶液的体系进行逐步滴定。通过记录结合过程中热量吸收或释放的变化, 经仪器自带软件拟合得到各适配体与氟虫腈的结合等温线, 并计算其平衡解离常数 K_d 。选取 K_d 值最小的适配体作为后续实验所用识别元件。

1.4 氟虫腈检测

取 $40 \mu\text{L}$ 浓度为 100 nmol/L 的氟虫腈适配体溶液, 于 95°C 加热 5 min 使其变性, 随后加入 $80 \mu\text{L}$ 不同浓度的氟虫腈标准溶液, 室温静置 30 min , 使适配体与靶标充分结合。然后向体系中加入 $40 \mu\text{L}$ Exo I 酶液 (含量为 10 U), 充分混匀后于 37°C 反应 30 min , 再经 80°C 加热 10 min 使酶失活。反应结束后, 加入 $40 \mu\text{L}$ DSAI 溶液 (浓度为 $15 \mu\text{mol/L}$), 混匀后避光静置 30 min , 使 DSAI 与完整的适配体-氟虫腈复合物结合并发光。整个反应体系最终体积为 $200 \mu\text{L}$, 每组实验设置 3 个重复。采用酶标仪的广谱扫描模式测定荧光强度, 具体参数设置为: 激发波长 430 nm , 发射波长范围 $450\sim 650 \text{ nm}$, 发射步幅为 10 nm 。

1.5 实际样品检测

白菜、玉米样品前处理方法参考文献^[29-30], 准确称取 5.0 g 样品, 破碎后加入 15 mL 乙腈充分涡旋混匀 10 min 后, 进行超声处理 15 min 。以 $8\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min 后收集上清液。重复上述提取步骤一

次, 合并上清液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后蒸干上清液, 加入 15 mL Tris 缓冲液再溶解, 备用。自来水样品则直接进行加标处理后检测。

2 结果与讨论

2.1 氟虫腈适配体的选择

本研究选取 4 条已知序列的氟虫腈适配体 (Apt 1~4), 采用 3 种方法系统比较其亲和力。图 2 显示了荧光染料法的结果, 基于竞争置换原理, SGI 嵌入适配体/互补链双链结构后产生高荧光(初始荧光强度 F_0); 加入靶标氟虫腈后, 适配体优先与靶标结合, 双链解离, 荧光显著降低(终点荧光强度 F)。通过 $\Delta F = F_0 - F$ 表征结合强度, 结果表现为 Apt 4 > Apt 2 > Apt 1 > Apt 3 (图 2)。图 3 显示了纳米金比色法结果, 透射电镜 (TEM) 确认所用纳米金颗粒形貌均一、分散良好 (图 3A)。经优化, 确定引起裸金聚集的 NaCl 临界浓度为 700 mmol/L (图 3B), 适配体最佳保护浓度为 1000 nmol/L (图 3C)。在优化条件下 (图 3D), 加入 80 nmol/L 氟虫腈时, Apt 4 与 Apt 2 保护体系均发生聚集(溶液变蓝), 且 Apt 4 体系颜色变化更为显著; 氟虫腈浓度升至 100 nmol/L 时, Apt 1 体系亦发生明显聚集, 而 Apt 3 体系始终无明显变化。结果表明, 与氟虫腈的亲和力强弱顺序为 Apt 4 > Apt 2 > Apt 1 > Apt 3。图 4 采用 ITC 法直接测定适配体与氟虫腈结合的热力学参数。实验显示结合过程均为放热反应, 测得解离常数 (K_d) 分别为: (529.9 ± 31.9) nmol/L 、(323.8 ± 18.8) nmol/L 、(436.0 ± 16.2) nmol/L 、(343.0 ± 20.1) nmol/L , 依据 K_d 越小代表亲和力越强的原则, 亲和力顺序为 Apt 2 > Apt 4 > Apt 3 > Apt 1。综合考虑各方法特点, 本研究最终选定 Apt 4 进行后续实验。

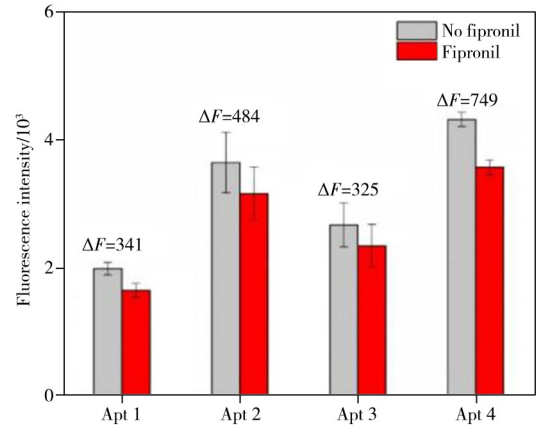


图 2 荧光法的 4 条适配体亲和力对比图
Fig. 2 Affinity comparison diagram of four aptamers for fluorescence method
data represent mean \pm SEs of four independent experiments (数据表示 4 次独立实验的平均值及其标准误差)

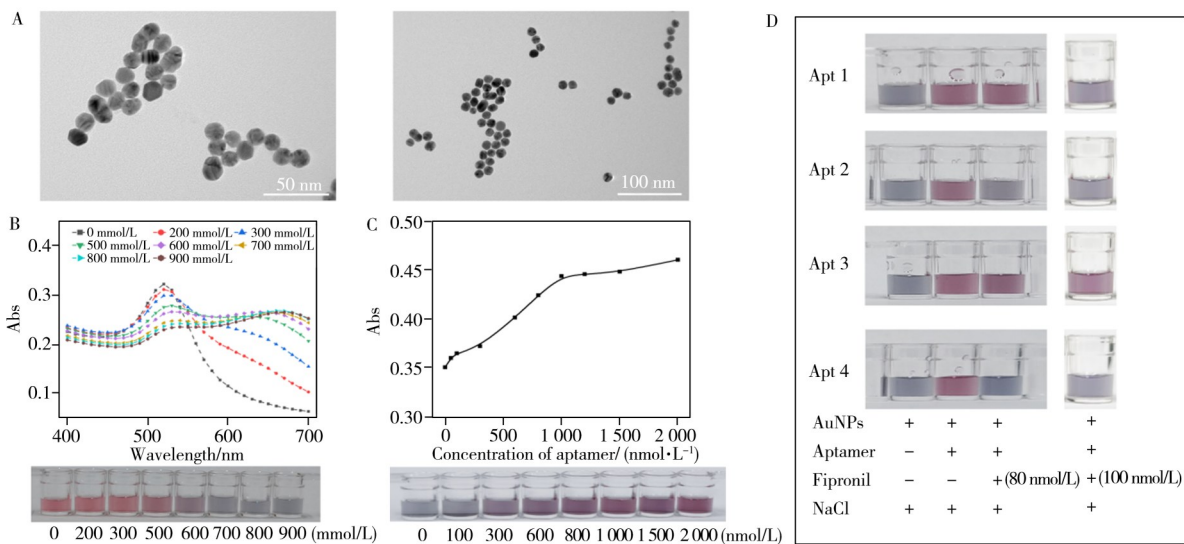


图 3 纳米金比色实验结果

Fig. 3 Results of the gold nanoparticle-based colorimetric assay

A. transmission electron microscopy (TEM) image of the gold nanoparticle solution; B. wavelength scanning spectra and visual color images of the gold nanoparticle solution under different NaCl concentrations; C. absorbance at 520 nm and visual color images under different aptamer concentrations; D. visual color images under different fipronil concentrations, +/- indicate the presence/absence of the corresponding substance (A. 纳米金溶液透射电镜图; B. 不同 NaCl 浓度下纳米金溶液扫描波长光谱图及显色可视图; C. 不同适配体浓度下 520 nm 处的吸光度及显色可视图; D. 不同氟虫腈浓度下显色可视图, +/- 表示是否添加对应物质)

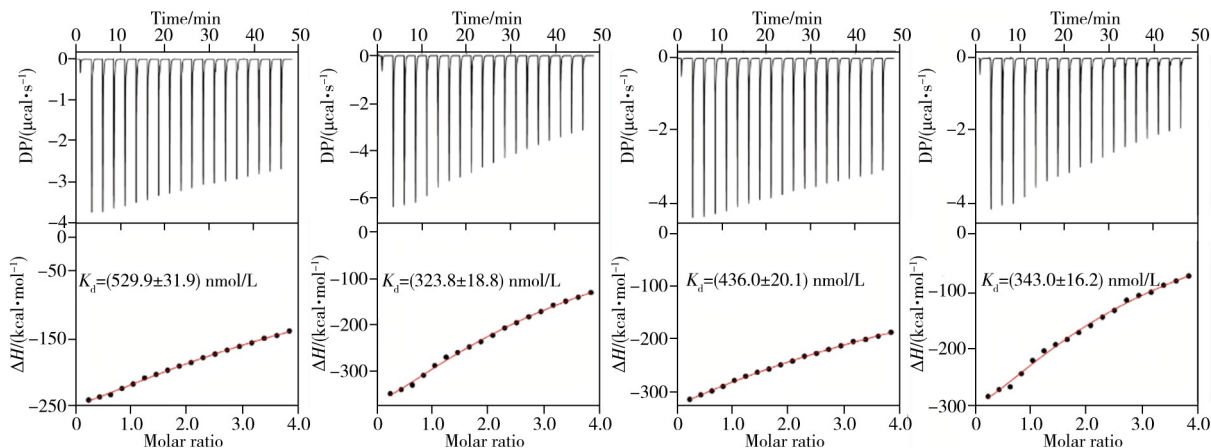


图4 ITC实验结果

Fig. 4 Results of the ITC experiment

the results for Apt 1 to Apt 4 are displayed sequentially from left to right; top panels present raw data showing the heat generated from each titration, while bottom panels show the heat of each titration (从左到右依次是 Apt 1~4 的结果, 上方图片显示每次滴定产生的热量的原始数据, 下方图片显示每次滴定的热量)

2.2 可行性分析

DSAI作为一种典型的聚集诱导发光分子,其发光行为遵循分子内运动受限机制。如图5A所示,在选定激发波长下,游离的DSAI在560 nm附近显示出较弱的荧光发射峰。当体系中引入适配体后,DSAI通过与适配体的相互作用发生聚集,其发射峰蓝移至540 nm,同时荧光强度显著提升。进一步加入目标物氟虫腓后,适配体与氟虫腓特异性结合形成稳定复合物,该复合物进一步限制DSAI的分子运动并促进其有序聚集,使体系荧光强度进一步增强。以上结果证实,该传感体系在检测氟虫腓过程中具备良好的荧光响应行为与机制可行性。

为考察体系的信号调控机制,在含适配体的体系中引入Exo I酶。结果显示,无氟虫腓存在时,Exo I将适配体完全酶切为单核苷酸,DSAI因失去结合载体而解聚并恢复分散状态,导致荧光强度急剧下降;而在氟虫腓存在下,适配体与靶标结合形成完整的DNA二级结构,可有效抵抗Exo I的水解作用,部分适配体得以保留并继续结合DSAI,因此荧光强度下降幅度较小(图5A)。这表明,氟虫腓的加入能通过保护适配体结构显著增强体系的荧光信号,验证了该方法用于氟虫腓检测的可行性。

凝胶电泳结果(图5B)进一步佐证了上述机制:适配体在Exo I作用下完全降解,电泳条带消失;而适配体与氟虫腓共存时,由于复合物对酶切的抵抗作用,仍可观察到明显的条带,但其亮度较无酶对照组有所减弱,说明Exo I主要切割未与靶标结合的游离适配体。该结果与荧光数据一致,共同支撑了所述检测策略的可靠性。

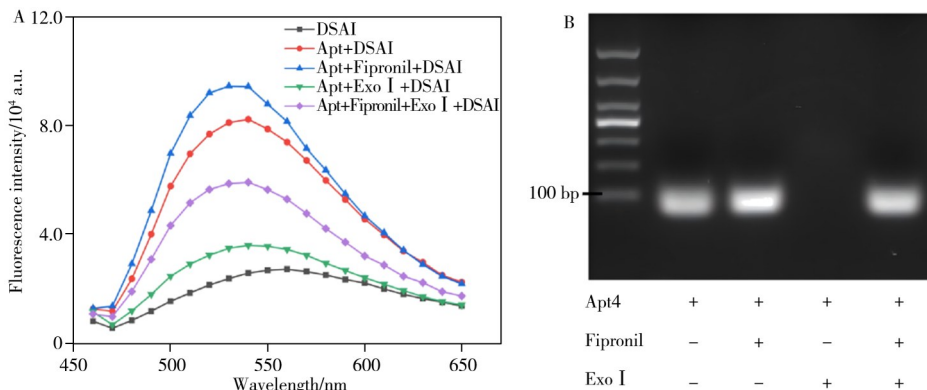


图5 各种溶液体系的荧光光谱(A)及凝胶电泳成像(B)

Fig. 5 Fluorescence spectra(A) and gel electrophoresis image(B) of various solution systems +/- indicate the presence/absence of the corresponding substance (+/- 表示是否添加对应物质)

2.3 反应条件优化

2.3.1 DSAI 浓度 DSAI浓度是影响体系检测灵敏度的重要因素。图6显示了DSAI浓度优化结果:

随着 DSAI 浓度升高, 体系荧光强度逐渐增强, 表明更高浓度的 DSAI 有助于实现与适配体的充分结合, 从而提升信号响应。当 DSAI 浓度达到 $15 \mu\text{mol/L}$ 时, 荧光强度达到最大值; 继续增加 DSAI 浓度, 荧光强度出现下降现象, 说明此时适配体结合位点已趋于饱和。因此, 本研究最终确定 $15 \mu\text{mol/L}$ 为体系中 DSAI 的最佳工作浓度。

2.3.2 Exo I 添加量 如图 7 所示, 随着 Exo I 酶浓度增加, 体系荧光强度呈逐渐下降趋势。这是由于 Exo I 能够特异性水解单链 DNA 适配体, 酶浓度越高, 适配体被切割的程度越大, 供 DSAI 结合的完整适配体数量减少, 因而荧光信号减弱。图中 F 和 F_0 分别代表存在与不存在氟虫腈时体系在 520 nm 处的荧光强度, 通过公式 $(F-F_0)/F_0$ 计算得到相对荧光强度。结果表明, 当 Exo I 添加量为 10 U 时, 体系获得最大的相对荧光强度响应。因此, 本研究最终选用 10 U 作为 Exo I 的最佳工作浓度。

2.3.3 反应时间 如图 8 所示, 随着酶切时间的延长, 体系的荧光强度逐渐降低。这是由于 Exo I 持续切割单链适配体, 与 DSAI 结合的完整适配体数量随时间减少, 从而引起荧光信号衰减。当酶切时间达到 30 min 时, 荧光强度趋于稳定; 继续延长反应时间, 荧光强度未见显著变化, 表明适配体酶切过程在 30 min 内已基本达到平衡。因此, 本研究选择 30 min 作为 Exo I 酶切反应的最佳时间。

2.4 方法性能评价

考察了氟虫腈浓度在 $0\sim 100 \text{ nmol/L}$ 范围内对荧光传感体系的影响。如图 9 所示, 随着氟虫腈浓度升高, 体系荧光强度逐渐增强, 这证实氟虫腈与适配体间的特异性结合可有效调控 DSAI 的聚集程度, 进而通过分子内运动机制实现荧光信号放大。进一步分析表明, 该传感体系在 $0.4\sim 5.0 \text{ ng/mL}$ ($1.00\sim 12.50 \text{ nmol/L}$) 浓度范围内呈现良好的线性关系, 以氟虫腈浓度对数值 (x) 对 520 nm 处荧光强度 (y) 进行线性拟合, 得到回归方程为 $y=54465.68+13780.98x$, 相关系数 $r^2=0.9902$ (图 9 插图)。根据 $3\sigma/k$ (其中 σ 为空白样品信号的标准偏差, $n=6$; k 为校准曲线斜率) 计算, 得到方法检出限 (LOD) 为 0.892 ng/mL (2.23 nmol/L)。根据《GB 2763-2021 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[31], 氟虫腈在玉米和叶菜类蔬菜中的最大残留限量分别为 0.1 mg/kg 和 0.02 mg/kg 。本方法的检出限显著低于现行国家标准限量值, 表明该方法能够满足实际样品中痕量氟虫腈残留的灵敏检测要求。

为系统评估该荧光传感体系对氟虫腈的选择性, 结合农药的复合施用以及共残留现象, 本研究选取 5

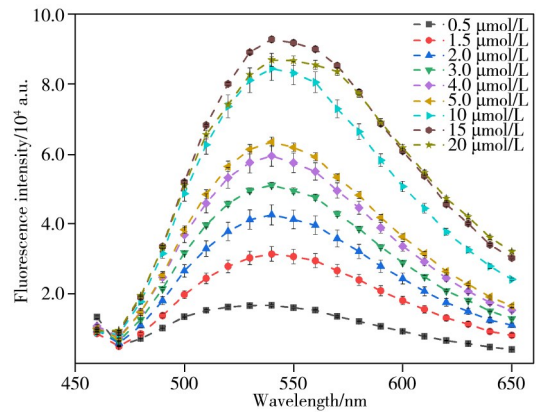


图 6 不同浓度 DSAI 的荧光强度值

Fig. 6 Fluorescence intensity values of different concentrations of DSAI

data represent mean \pm SEs of three independent experiments (数据表示 3 次独立实验的平均值及其标准误差)

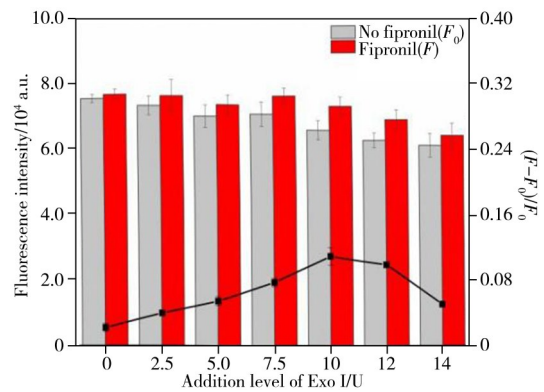


图 7 有 (F) 或无 (F_0) 氟虫腈时, 不同 Exo I 添加量下体系的荧光强度值 (柱状图) 和相对荧光强度 (折线图)
Fig. 7 Fluorescence intensity values (bar chart) and relative fluorescence intensity (line chart) of the system with (F) or without (F_0) fipronil under different Exo I addition amounts

($F-F_0$)/ F_0 represents the relative fluorescence intensity, data represent mean \pm SEs of four independent experiments (($F-F_0$)/ F_0 表示相对荧光强度, 数据表示 4 次独立实验的平均值及其标准误差)

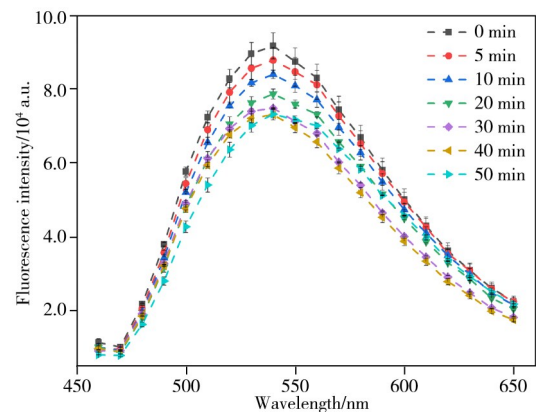


图 8 体系荧光强度随 Exo I 反应时间的变化

Fig. 8 Fluorescence intensity change of the system versus Exo I reaction time

data represent mean \pm SEs of three independent experiments (数据表示 3 次独立实验的平均值及其标准误差)

种在化学结构上与目标物氟虫腈(苯基吡唑类杀虫剂)分属不同类别的农药作为干扰物,分别是新烟碱类杀虫剂啉虫脞、有机磷类杀虫剂毒死蜱、吡啶类杀虫剂吡蚜酮、苯并咪唑类杀菌剂多菌灵及三嗪类除草剂莠去津,以考察方法对结构差异物质的区分能力。实验结果如图 10 所示,在方法线性范围上限浓度(5.0 ng/mL)条件下,5 种干扰物所产生的荧光信号均与空白对照相近,表明这些物质未能引起明显的荧光响应。结果证明,该荧光适配体生物传感器对氟虫腈具有优异的选择性与特异性。

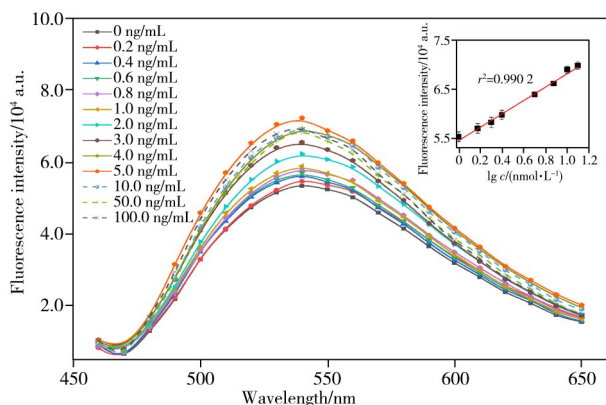


图 9 荧光传感器检测不同浓度氟虫腈的荧光光谱图
Fig. 9 Fluorescence spectra of fipronil detected by the fluorescence sensor

intert: the fluorescence intensity at 520 nm versus fipronil logarithm concentration, data represent mean of six independent experiments (插图: 520 nm 处的荧光强度与氟虫腈对数浓度的关系, 数据表示 6 次独立实验的平均值)

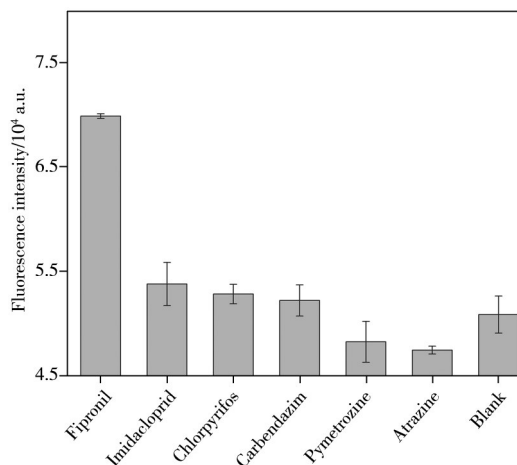


图 10 荧光传感器的选择性

Fig. 10 Selectivity of the fluorescence sensor
data represent mean±SEs of six independent experiments (数据表示 6 次独立实验的平均值及其标准误差)

2.5 实际样品分析

为了验证所建方法的实际应用能力,选择自来水、白菜、玉米作为实际样品,按“1.5”方法前处理后,加入不同浓度的氟虫腈标准溶液进行加标回收实验,结果见表 1。在不同基质中,氟虫腈的回收率为 89.2%~107%,整体符合痕量分析要求(80%~120%),相对标准偏差(RSD)不超过 5.0%,表明该方法在不同基质中均具有较好的准确度和精密度,具备可靠的检测性能,可用于实际样品中氟虫腈的定量检测。值得注意的是,玉米样品的回收率略高于水样与白菜样品,可能与基质组分对荧光信号的轻微增强效应或前处理中提取效率的差异有关,这提示在实际应用中可根据样品类型进一步优化提取与净化步骤。

表 1 实际样品检测结果

Table 1 Results of actual samples detection

Sample	Add/(nmol·L ⁻¹)	Found/(nmol·L ⁻¹)	Recovery/%	RSD/%
Tap water	0.00	0.00	-	-
	5.00	4.20	89.2	1.7
	10.00	10.66	103	1.6
Cabbage	0.00	0.00	-	-
	5.00	4.81	97.6	1.5
	10.00	10.43	102	4.3
Corn	0.00	0.00	-	-
	5.00	5.61	107	0.80
	10.00	11.85	107	2.3

将本方法与近年来报道的氟虫腈检测方法进行了系统比较(表 2),结果显示,本方法的线性范围虽不及部分电化学法与表面增强拉曼法,但检出限优于荧光法与比色法。在衡量方法准确性与精密度的核心指标上,本方法的回收率和 RSD 值与表 2 中采用国标核心原理的检测方法相当,这从侧面印证了检测结果的可靠性。综合来看,相较于依赖大型仪器的确证方法(如 HPLC、GC-MS),本方法作为一种快速筛查工具,具有操作简便、分析快速、成本较低的突出优点;其灵敏度与准确性满足实际样品中痕量氟虫腈的检测需求,为国标方法提供了高效的前期筛查支持,具备良好的实用性与推广潜力。

表2 不同检测方法的结果
Table 2 Results of different detection methods

Material	Method	Linear range	LOD	Recovery/%	Reference
-	HPLC	0~80 nmol/L	8 nmol/L	70~120	[1]
QuEChERS	GC-NCI/MS	0.2~10.0 $\mu\text{g/L}$	0.3 $\mu\text{g/kg}$	88.9~105.8	[32]
SWCNHs	Fluorescence	1~100 nmol/L	3 nmol/L	88.6~112.7	[33]
FAM	Fluorescence	25~300 ppb	68 $\mu\text{g/kg}$	94.7~115.4	[34]
TiO ₂ -PTI	Electrochemistry	0.01~10 $\mu\text{mol/L}$	8.42 nmol/L	90~106.6	[35]
BiFeO ₃	Electrochemistry	1~100 $\mu\text{mol/L}$	0.91 $\mu\text{mol/L}$	90~105	[36]
AgNPs	Surface-enhanced Raman	10 ng/L~10 mg/L	4.49 ng/L	81.34~88.89	[37]
GO-AuNR	Surface-enhanced Raman	1 nmol/L~1 mmol/L	0.1 nmol/L	86~97	[38]
ThT-aptamer	Colorimetric	0~80 nmol/L	3.4 nmol/L	92~99	[1]
AuNPs	Colorimetric	20~1 000 $\mu\text{g/kg}$	8.35 $\mu\text{g/kg}$	92.3~108.5	[21]
AIE: DSAI	Fluorescence	1.00~12.50 nmol/L	2.23 nmol/L	89.2~107	This work

3 结 论

本研究通过将核酸外切酶 Exo I 与 DSAI 相结合, 开发了一种方便、灵敏的氟虫腈荧光传感检测方法。该方法在 1.00~12.50 nmol/L 范围内呈现良好线性, 检出限低至 2.23 nmo/L, 并对氟虫腈与其他干扰性物质表现出高度的选择性。此外, 该传感器在实际样本检测中表现出高准确度(回收率 89.2%~107%)与良好的适用性, 突显了在实际应用中的巨大潜力。

参考文献:

- [1] Trinh K H, Kadam U S, Rampogu S, Cho Y, Yang K A, Kang C H, Lee K W, Lee K O, Chung W S, Hong J C. *J. Hazard. Mater.*, **2022**, 427: 127939.
- [2] Lautz L S, Stoopen G, Ginting A J, Hoogenboom R L A P, Punt A. *Food Chem. Toxicol.*, **2022**, 165: 113086.
- [3] Li L C, Chen J, Liu J W. *Agrochemicals* (李丽春, 陈坚, 刘婧微. 农药), **2022**, 61(6): 396~400.
- [4] Vermeulen R, Schymanski E L, Barabási A L, Miller G W. *Science*, **2020**, 367(6476): 392~396.
- [5] El-Sheikh E A, Ramadan M M, El-Sobki A E, Shalaby A A, McCoy M R, Hamed I A, Ashour M B, Hammock B D. *Molecules*, **2022**, 27(22): 8072.
- [6] Shi L S, Chen L, Wan Y J, Zeng H C, Xia W. *Chemosphere*, **2020**, 251: 126385.
- [7] Pettigrove V, Hassell K, Kellar C, Long S, MacMahon D, Myers J, Nguyen H, Walpitagama M. *Sci. Total Environ.*, **2023**, 863: 160556.
- [8] Brief Report on Agricultural Product Quality and Safety. Issue 5 (农产品质量安全工作简报. 第 5 期). [2021-01-15]. https://jgs.moa.gov.cn/gzjb/202102/t20210218_6361714.htm.
- [9] Lee S J, Mulay P, Diebolt-Brown B, Lackovic M J, Mehler L N, Beckman J, Waltz J, Prado J B, Mitchell Y A, Higgins S A, Schwartz A, Calvert G M. *Clin. Toxicol.*, **2010**, 48(7): 737~744.
- [10] Zhuang J H, Jiang Z Q, Chen D W, Li J G, Crabbe M J C, Qiu M Y, Zheng Y X, Qu W D. *Environ. Sci. Technol.*, **2023**, 57(15): 6072~6084.
- [11] Hu X P. *J. Econ. Entomol.*, **2005**, 98(2): 509~517.
- [12] Wagner S D, Kurobe T, Hammock B G, Lam C H, Wu G, Vasylieva N, Gee S J, Hammock B D, Teh S J. *Chemosphere*, **2017**, 166: 511~520.
- [13] Ma Y, Zhu Q C, Luo S L, Zhang F H, Liu L, Zhi M X, Zhang Z Y, Cao X L, Qiu X L, Zeng X Y, Ji D, Li C X, Zhong X L, Wang J S, Wei Y H. *Chemosphere*, **2023**, 335: 139146.
- [14] Liu F, Li H Z, Zhang X L, Hu H, Yuan B Y, You J. *Water Res.*, **2024**, 255: 121461.
- [15] Gibbons D, Morrissey C, Mineau P. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2015**, 22(1): 103~118.
- [16] da Silva Pinto T J, Martínez-Guitarte J L, Amaral Dias M, Montagner C C, Espindola E L G, Muñoz-González A B. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2024**, 43(2): 405~417.
- [17] Zhou R H, Liao C X, Wang L N, Xie Y, Wei J. *Guizhou Sci.* (周冉豪, 廖朝选, 王莉娜, 谢源, 魏杰. 贵州科学), **2023**, 41(4): 37~40.
- [18] Li X J, Li H M, Ma W, Guo Z, Li X Q, Song S J, Tang H, Li X M, Zhang Q H. *Food Chem.*, **2019**, 281: 85~90.
- [19] Aparicio-Muriana M M, Lhotská I, García-Campaña A M, Lara F J. *Electrophoresis*, **2020**, 41(3/4): 202~208.
- [20] Li P P, Bai Y C, Jiang H Y, Zhang Y J, Li Y, Duan C F, Wen K, Yu X Z, Wang Z H. *J. Hazard. Mater.*, **2023**, 441: 129931.
- [21] Kou S, Qiu G Y, Liu L Q, Wu A H, Zhang Z, Kuang H, Xu C L, Wu X L. *J. Hazard. Mater.*, **2025**, 489: 137634.
- [22] Ravindran N, Kumar S, Yashini M, Rajeshwari S, Mamathi C A, Thirunavookarasu S N, Sunil C K. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2023**, 63(8): 1055~1077.

- [23] Li F Q, Pan H C, Yuan Y L. *Chin. J. Anal. Lab.* (李凤球, 潘宏程, 袁亚利. 分析实验室), **2018**, 37(4): 488-496.
- [24] Cao Y Q, Zong J, Li L, Zhang F R, Liu B G, Wang X K, Liu G L, Lu J F. *J. Instrum. Anal.* (曹宇奇, 宗军, 李璐, 张发荣, 刘炳光, 王晓轲, 刘国良, 卢俊锋. 分析测试学报), **2024**, 43(7): 1063-1075.
- [25] Wu K F, Ma C B, Zhao H, Chen M J, Deng Z Y. *Food Chem.*, **2019**, 277: 273-278.
- [26] Cheng H, Feng H, Li S Y, Liu S, Zhou T H, Peng Q Z. *Food Sci.* (程慧, 冯灏, 李诗瑶, 刘顺, 周陶鸿, 彭青枝. 食品科学), **2021**, 42(4): 326-332.
- [27] Zhang Y H, Bai X L, Lv C Z, Fang Y Z, Tang Y L, Jiang H, Huang G R. *Eur. Food Res. Technol.*, **2023**, 249(11): 2887-2895.
- [28] Hong K, Sooter L. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19(1): 85.
- [29] Liu J, Chen Q H, Gan X Y, Yuan R, Xiang Y. *Anal. Chim. Acta*, **2025**, 1344: 343709.
- [30] Feng T T, Yan S Z, Huang Y. *Chin. J. Anal. Lab.* (冯婷婷, 闫姝竹, 黄瑜. 分析实验室), **2024**, 43(12): 1703-1707.
- [31] GB 2763-2021. National Food Safety Standard-Maximum Residue Limits for Pesticides in Food. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准-食品中农药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准).
- [32] Gao X, Chen H, Tan M, Li Y X, He H L. *Food Sci.* (高霞, 陈辉, 谭敏, 李玉秀, 何泓霖. 食品科学), **2021**, 42(14): 333-338.
- [33] Zhang J X, Feng T T, Zhang J Y, Liang N, Zhao L S. *Anal. Methods*, **2021**, 13(29): 3282-3291.
- [34] Kim T Y, Lim J W, Lim M C, Song N E, Woo M A. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2020**, 25(2): 246-254.
- [35] El-Akaad S, Morozov R, Golovin M, Bol'shakov O, De Saeger S, Beloglazova N. *Talanta*, **2022**, 238: 123025.
- [36] El-Akaad S, Mohamed M A, Elmasri M M, Abdelwahab N S, Abdelaleem E A, De Saeger S, Beloglazova N. *J. Electrochem. Soc.*, **2020**, 167(2): 027543.
- [37] Zhao H N, Huang D D, Zhu S H. *Sensors*, **2019**, 19(24): 5354.
- [38] Lai H L, Ghosh S, Chattopadhyay S. *Analyst*, **2021**, 146(11): 3557-3567.

(责任编辑: 盛文彦)