



基于比色型适配体传感器高灵敏快速检测磷脂酰丝氨酸

王 赛¹, 徐佳朔¹, 李 玲¹, 毛相朝^{1,2*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要:近年来,利用生物加工法制备海洋食品活性物质成为研究热点,对加工过程中目标产物进行定量检测十分重要,而传统的检测方法面临很多限制,迫切需要新型简便的分析方法。实验以磷脂酰丝氨酸(PS)为待检物代表,构建了一种比色型适配体传感器,用于快速检测生物加工体系中的PS。带正电的壳寡糖与带负电的适配体先经静电吸附结合,PS存在条件下,适配体特异性地与PS结合导致壳寡糖释放,后者进而与带负电的纳米金结合,形成具有高催化活性的过氧化物纳米酶,催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)产生与PS浓度成正相关的颜色信号,测定各样品的光吸收值,并与无PS的阴性样品相比计算光吸收变化率,从而实现快速定量。期间对适配体浓度、壳寡糖浓度、纳米酶催化参数进行了详细优化。在最优条件下,传感器具有良好的线性检测范围(0.50~50.00 nmol/L)和较高的灵敏度,检测限(LOD)低至93.84 pmol/L,且具有较好的选择性、准确性和重复性,用于分析实际生物加工样品中的PS时,回收率为95.63%~110.76%,相对标准偏差(RSD)均小于9%,整个分析过程仅需40 min。本研究成功构建了一种能高灵敏快速检测PS的比色型适配体传感器,为PS以及其他生物加工产物的快速检测提供了新思路和研究基础。

关键词: 磷脂酰丝氨酸; 生物加工产物; 快速检测; 适配体; 壳寡糖; 金纳米酶

中图分类号: TS 254.7

文献标志码: A

海洋生物资源多种多样,数量庞大,且海洋生物特定的生存环境使得其产生的活性物质具有不同于陆生生物的特殊性能。目前已发现的海洋生物活性物质有磷脂类、多不饱和脂肪酸类、多糖类海洋活性物质、海洋生物皂苷等^[1-5]。相对于传统的物理、化学法获得海洋生物活性物质,生物加工制备法可实现海洋物质的绿色、无污染的高效制备,利用生物加工技术制备海洋食品生物活性物质逐渐成为近年来的研究热点。

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)是一种受到广泛关注的优质磷脂,由三部分组成,头部是甘油骨架,尾部是两条较长的亲油基团,其中在头部的甘油羟基上连接着丝氨酸残基,是唯

一可以调控细胞膜的关键蛋白功能状态的磷脂^[6-8],有修复大脑损伤、提高大脑机能、缓解紧张情绪、治疗抑郁症、激活酶^[9-10]等功能。国家管理部门已于2010年第15号公告批准PS为新资源食品^[11]。2017年10月,国家食品药品监督管理局批准,PS可作为特殊医疗用途配方食品。在制备方面,由于PS在磷虾油等天然原料中含量较少,需利用基于酶法的生物加工技术由磷脂酰胆碱(PC)进行转化以制备PS。为获得较高品质和产量的PS,在加工过程中对目标产物进行定量检测非常重要。目前,针对PS等生物活性物质的检测技术主要是高效液相色谱法^[12-13],但该方法需使用大量的有机溶剂,操作步骤较为繁琐,对分析样品的前处理

收稿日期: 2021-05-14 修回日期: 2021-06-06

资助项目: 国家自然科学基金(31922072); 山东省自然科学基金(ZR2020JQ15); 山东省高等学校优秀青年创新团队支持计划(2019KJF012); 山东省泰山学者项目(tsqn201812020)

第一作者: 王赛(照片), 从事食品生物传感分析研究, E-mail: wangesai@ouc.edu.cn

通信作者: 毛相朝, 从事水产品生物加工研究, E-mail: xzhmao@ouc.edu.cn



要求较高,且需要专业的人员操作,耗时较长。因此,当前迫切需要新型、便捷的检测方法,以实现 PS 的快速定量检测。

适配体 (aptamer) 是一类在体外筛选的、能与靶标特异性结合的一类单链寡核苷酸序列,通过自身发生适应性折叠,形成一些稳定的空间三维结构^[14-16]。近年来,针对食品领域的需求,研究者们将适配体的生物识别与光、热、电等信号结合,构建了多种适配体,用于对食品中的汞离子、赭曲霉素 A (OTA) 等靶标的快速检测^[17-19]。针对上述 PS 生物加工过程对快速检测的迫切需求,可基于 PS 的适配体对 PS 的特异性结合性能,再结合信号转导技术,构建新型的适配体传感器以实现 PS 的快速检测。

纳米酶是一类具有催化活性的纳米材料,大多具有类过氧化物酶及类水解酶等催化活性^[20-23],由于其特殊性质而在传感分析领域引起广泛关注。其中,纳米金颗粒 (gold nanoparticle, AuNPs) 是粒径小于 100 nm 的均匀球状颗粒,通常由柠檬酸还原法制备,表面带有较多的负电荷,其制备方法简单,易于推广和大量合成,AuNPs 可作为纳米酶,催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 产生显色反应,并且在正电荷物质辅助下,该纳米酶的催化活性可显著增强。因此,AuNPs 纳米酶可作为良好的信号转导载体,用于构建比色型适配体传感器,可实现简便、快速检测。

壳寡糖 (chitosan oligosaccharide, COS) 是由壳聚糖水解得到的一类具有特定聚合度、分子量和长度的寡糖,带有正电荷,且具有较好的水溶性^[24-26]。理论上,其既可以与带负电的适配体结合,又可以与带负电的 AuNPs 结合。因此,壳寡糖可作为中介桥梁,应用于基于 AuNPs 纳米酶的适配体传感器中。

基于上述需求和背景,本研究以 PS 为生物加工物质的代表物,结合适配体、壳寡糖及 AuNPs 纳米酶,构建一种新型的比色型适配体生物传感器,实现生物加工体系中 PS 的高灵敏快速检测。检测原理如图 1 所示,首先将带正电荷的壳寡糖与带负电荷的适配体静电吸附,加入待检样品,当靶标分子 PS 存在时,适配体会优先与靶标特异性结合,使得壳寡糖释放;再加入带负电荷的 AuNPs,则带正电荷的壳寡糖与其发生静电吸附作用,形成催化能力被增强的壳寡糖-AuNPs 纳米酶,催化 TMB 产生颜色反应。而当样品中不含 PS 时,适配体与壳寡糖保持结合,缺乏壳寡糖辅助的 AuNPs 仅表现出微弱的催化能力。通过测定加入各样品后的溶液的吸光度值,并与无 PS 的阴性样品所对应的信号比较,利用公式 $(A_i - A_0)/A_0 \times 100\%$ 计算变化率 (A_i 为待测样对应的 650 nm 处的吸光度值, A_0 为阴性样对应的 650 nm 处的吸光度值),最终实现对 PS 的快速定量。

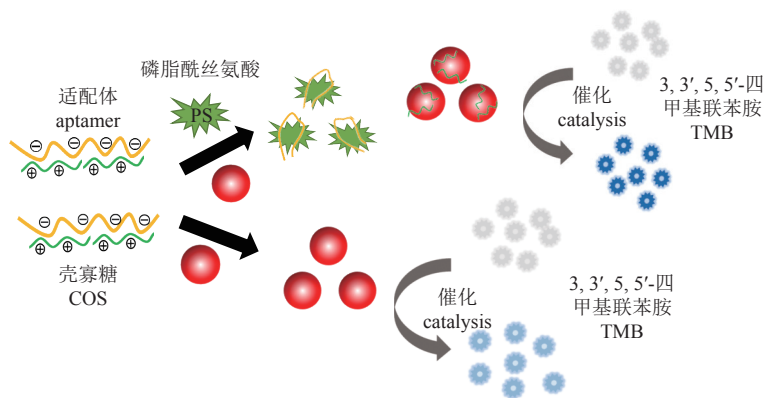


图 1 比色型适配体传感器检测 PS 的原理图

Fig. 1 Schematic diagram of the colorimetric aptasensor for the detection of PS

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料及仪器

氯金酸、冰乙酸购自国药集团化学试剂有限公司, TMB 购自北京索莱宝科技有限公司, 30% H_2O_2 购自天津鼎盛鑫化工有限公司, 壳五糖购自青岛博智汇力生物科技有限公司, PS 的适配体

<https://www.china-fishery.cn>

AAAGAC 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酸 (PA)、磷脂酰乙醇胺 (PE) 均购自上海源叶生物科技有限公司, 磷脂酰胆碱 (PC) 购自美国 Avanti Polar Lipids 公司。

实验所用仪器主要有多功能酶标仪 (UV-

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

2550, 日本岛津公司), 超纯水机 (PSHB-3.2G, Reverse Osmosis Storage Tank), 低速离心机 (Mini-6KS, 杭州米欧仪器有限公司), 涡旋振荡仪 (QL-866, 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司) 等。

1.2 比色型适配体传感器的构建

纳米金的制备 采用氧化还原法制备 AuNPs^[27], 将 96 mL 0.01% 的 HAuCl_4 在沸点加热搅拌, 将 4 mL 0.04% 的柠檬酸三钠溶液快速加入到煮沸的 HAuCl_4 溶液中, 继续加热、剧烈搅拌 30 min, 待溶液颜色变成酒红色后继续加热 10 min, 然后将溶液冷却到室温, 4℃ 避光保存。

传感器关键参数优化 将 10 μL 适配体与 10 μL 壳寡糖混匀后, 孵育 10 min, 加入 30 μL PS/缓冲液混匀后, 孵育 30 min, 然后加入 150 μL AuNPs 溶液。取 50 μL 的混合液加入到 50 μL 含有 TMB/ H_2O_2 /乙酸的催化反应体系中, 用多功能酶标仪检测 400~800 nm 的光谱, 记录 650 nm 处的吸光度值。对各步骤中的关键参数进行优化, 包括壳寡糖浓度、适配体浓度、 H_2O_2 浓度、TMB 浓度和乙酸 pH 值。

标准曲线的建立 将 10 μL 最佳浓度的适配体与 10 μL 最佳浓度的壳寡糖混匀后, 孵育 10 min, 加入 30 μL PS/缓冲液混匀后, 孵育 30 min, 然后加入 150 μL AuNPs 溶液。取 50 μL 的混合液加入到 50 μL 的优化 TMB/ H_2O_2 /乙酸的催化反应体系中, 用多功能酶标仪检测 400~800 nm 的光谱, 记录 650 nm 处的吸光度值。配制不同浓度的 PS 溶液 (0.5、1.5、5.0、15.0、50.0、150.0、500.0

nmol/L) 分别进行反应, 用于标准曲线的建立。

1.3 比色型适配体传感器性能评价

回收率研究 准备由 10 mg/mL 磷脂酰胆碱 (PC) 生物加工转化得到的具有不同转化率的 PS 样品, 并利用高效液相色谱 (HPLC) 法测定, 确定其转化率和含量, 分别稀释后, 利用构建的适配体传感器分析各样品的光吸收值, 用公式 $(A_i - A_0)/A_0 \times 100\%$ 计算吸光度值变化率, 并代入标准曲线求出测得值, 利用测得值/加入值计算回收率。 A_i 为待测样在 650 nm 处的吸光度值, A_0 为阴性样在 650 nm 处的吸光度值。

选择性评价 分别配制 5 nmol/L 的 PI、PA、PE、PC 和 PS, 利用构建的适配体传感器, 分析各样品的光吸收值, 利用 $(A_i - A_0)/A_0 \times 100\%$ 计算变化率, 评价该适配体传感器的选择性。

2 结果

2.1 AuNPs 的表征

对制备得到的 AuNPs 进行表征, 其在 520 nm 处有最大吸收值 (图 2-a); 通过透射电镜表征可知, 该溶液中的纳米金颗粒大小分布均匀, 约为 13 nm (图 2-b)。

2.2 传感器关键参数优化

壳寡糖浓度的优化 本研究采用带较多正电荷的壳五糖, 带负电荷的 AuNPs 会与带正电荷的壳寡糖产生静电吸附作用, 导致 AuNPs 发生聚

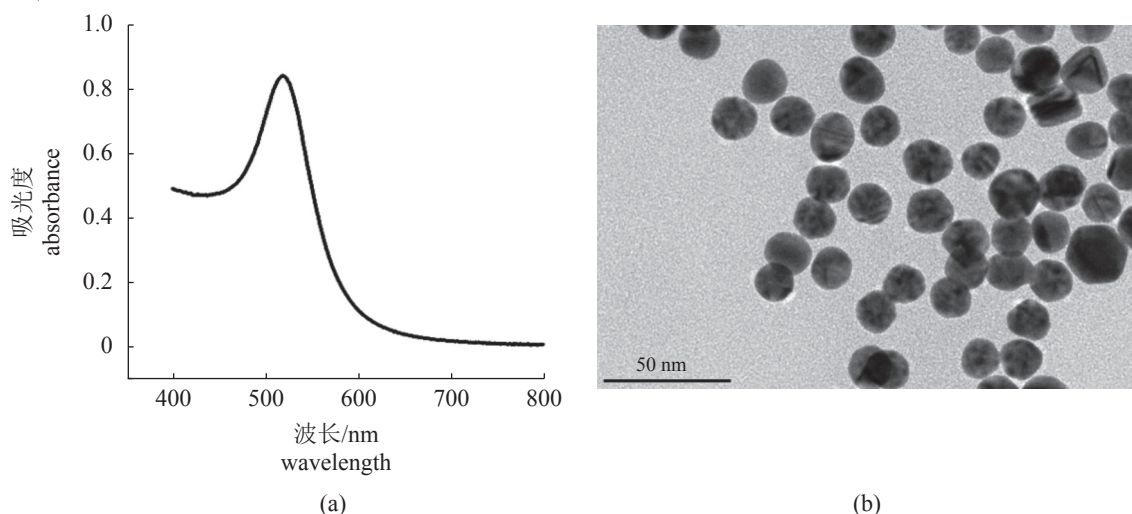


图 2 纳米金性能表征

(a) 纳米金光谱图, (b) 纳米金透射电镜表征

Fig. 2 Performance characterization of AuNPs

(a) pectrogram, (b) the TEM imaging of the AuNPs

集, 溶液变蓝, 因此需要首先优化壳寡糖的浓度。将 10 μL 不同浓度的壳寡糖溶液加入到含 40 μL 缓冲液和 150 μL AuNPs 的混合溶液中, 随着壳寡糖浓度的增大, 混合溶液在 520 nm 处的吸光度值逐渐减小, 在 650 nm 处的吸光度值逐渐增大, 特定吸收峰比 ($A_{650\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$) 随之逐渐增大 (图 3-a, b), 说明聚集程度越来越大。当壳寡糖浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, $A_{650\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ 达到最大值, 说明此时为饱和状态。因此, 选择壳寡糖的浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

适配体浓度的优化 在壳寡糖浓度确定之后, 对适配体浓度进行了优化。将不同浓度 10 μL

适配体溶液加入到含 30 μL 缓冲液、10 μL 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壳寡糖溶液和 150 μL AuNPs 的混合溶液中孵育 10 min。随着适配体浓度的增大, A_{520} 逐渐增大, A_{650} 逐渐减小, $A_{650\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ 逐渐减小 (图 3-c, d)。当适配体溶液浓度为 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 带负电荷的适配体刚好可以与带正电荷的壳寡糖完全吸附。因此, 适配体浓度选择 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

催化体系中 H_2O_2 浓度的优化 AuNPs-壳寡糖酶作为纳米酶催化过氧化氢氧化 TMB 是产生颜色信号的关键, 因此需要对 TMB 反应体系中的 H_2O_2 浓度、TMB 浓度、乙酸 pH 分别进行优化。

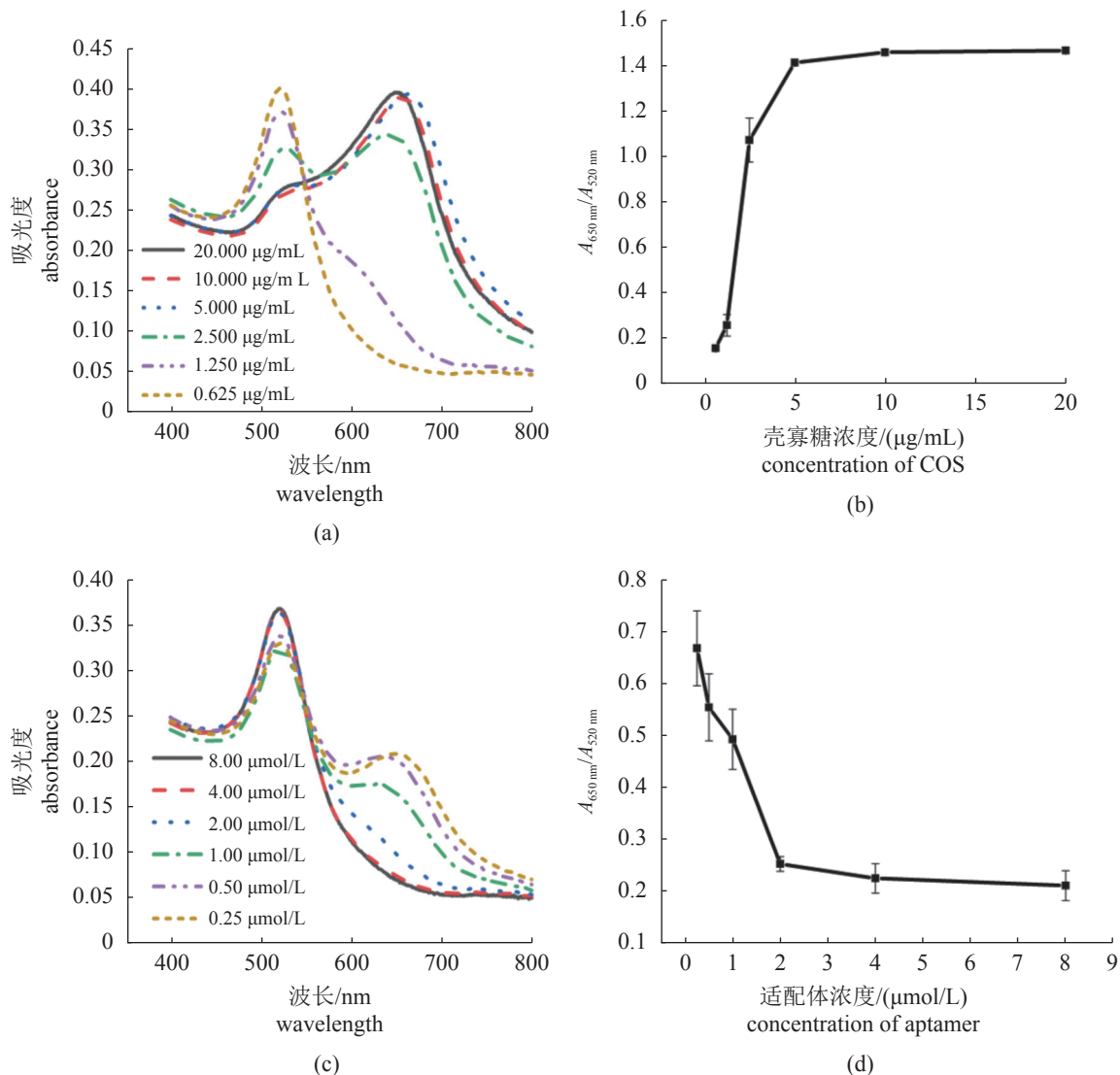


图 3 优化壳寡糖浓度和适配体浓度

(a) 不同壳寡糖浓度下的混合溶液光谱图, (b) $A_{650\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ 与壳寡糖浓度关系图, (c) 不同适配体浓度下的混合溶液光谱图, (d) $A_{650\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ 与适配体浓度关系图

Fig. 3 Optimal concentration of COS and aptamer

(a) spectrogram corresponding to the mixture solutions with different concentrations of COS, (b) the $A_{650\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ vs. concentration of COS, (c) the spectrogram corresponding to the mixture solutions with different concentrations of aptamer, (d) the $A_{650\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ vs. concentration of aptamer

将含 10 μL 壳寡糖溶液、40 μL 缓冲液和 150 μL AuNPs 的混合溶液加入到含有不同浓度 H_2O_2 的 TMB/ H_2O_2 /乙酸体系, 催化反应后的溶液在 650 nm

处有最大吸光度值 (图 4-a)。在 H_2O_2 浓度小于 15% 时, 随着 H_2O_2 浓度的升高, 溶液在 650 nm 处吸光度值不断升高 (图 4-b), 当 H_2O_2 浓度大于 15%

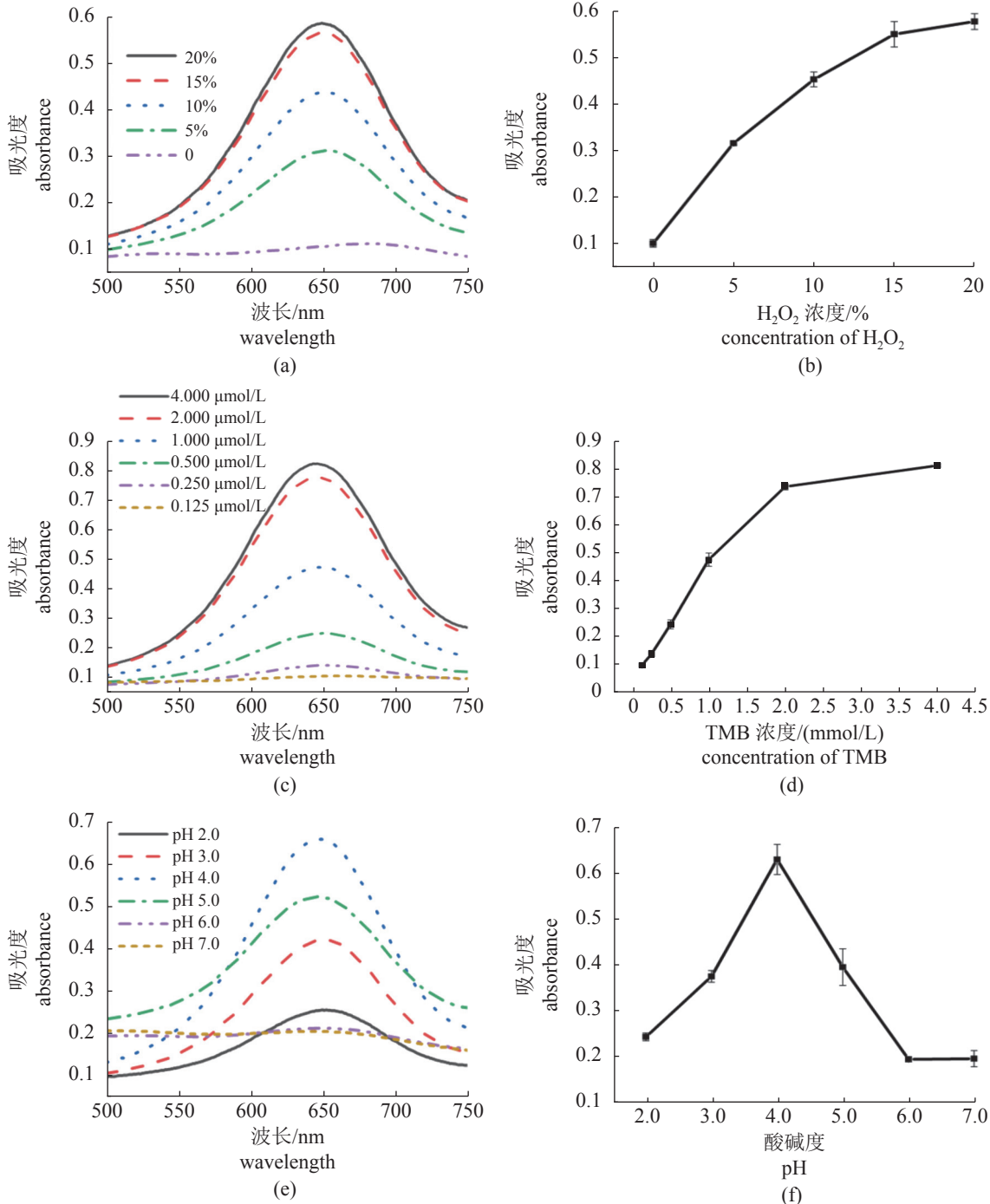


图 4 催化体系中 H_2O_2 浓度、TMB 浓度和乙酸 pH 的优化

(a) 不同 H_2O_2 浓度下催化体系的光谱图, (b) 不同 H_2O_2 浓度下溶液在 650 nm 处的吸光度值, (c) 不同 TMB 浓度下催化体系的光谱图, (d) 不同 TMB 浓度下溶液在 650 nm 处的吸光度值, (e) 不同 pH 下催化体系的光谱图, (f) 不同 pH 下溶液在 650 nm 处的吸光度值

Fig. 4 Optimization of H_2O_2 concentration, TMB concentration and pH of acetic acid in the catalytic system

(a) spectrogram of catalytic reaction system with the different concentration of H_2O_2 , (b) the absorbance at 650 nm with different concentration of H_2O_2 , (c) spectrogram of catalytic reaction system with different concentration of TMB, (d) the absorbance at 650 nm with different concentration of TMB, (e) spectrogram of catalytic reaction system with different pH, (f) the absorbance at 650 nm with different pH

时,随着 H_2O_2 浓度升高,溶液在 650 nm 处的吸光度值变化缓慢,因此选择 H_2O_2 溶液的浓度为 15%。

催化体系中 TMB 浓度的优化 在 TMB 浓度小于 2 mmol/L 时,随着 TMB 浓度的升高,催化反应后的溶液在 650 nm 处吸光度值不断升高(图 4-c)。当 TMB 浓度大于 2 mmol/L 时,随着 TMB 浓度升高,溶液在 650 nm 处的吸光度值变化缓慢,因此选择 TMB 溶液的浓度为 2 mmol/L(图 4-d)。

催化体系中乙酸 pH 值的优化 在 pH 值为 4.0 时,催化反应后的溶液吸光度值最大,推测可能在 pH 为 4.0 时,TMB 被氧化地更加充分,因

此选择最佳 pH 值为 4.0(图 4-e, f)。

2.3 标准曲线的建立

在上述优化条件下,利用不同浓度的 PS 进行分析,获得检测方法的标准曲线。体系中加入不同浓度的 PS (0.50~500.00 nmol/L) 时,溶液在 650 nm 处的吸光度值随 PS 浓度的增加而升高,吸光度变化率相对于阴性样品逐渐增大,在 0.50~50.00 nmol/L 内,吸光度值变化率与 PS 浓度的 lg 值呈较好的线性关系,线性方程为 $y=19.12 \lg x+23.55$ ($R^2=0.9964$),检出限 (LOD) 为 93.84 pmol/L(图 5-a~c)。

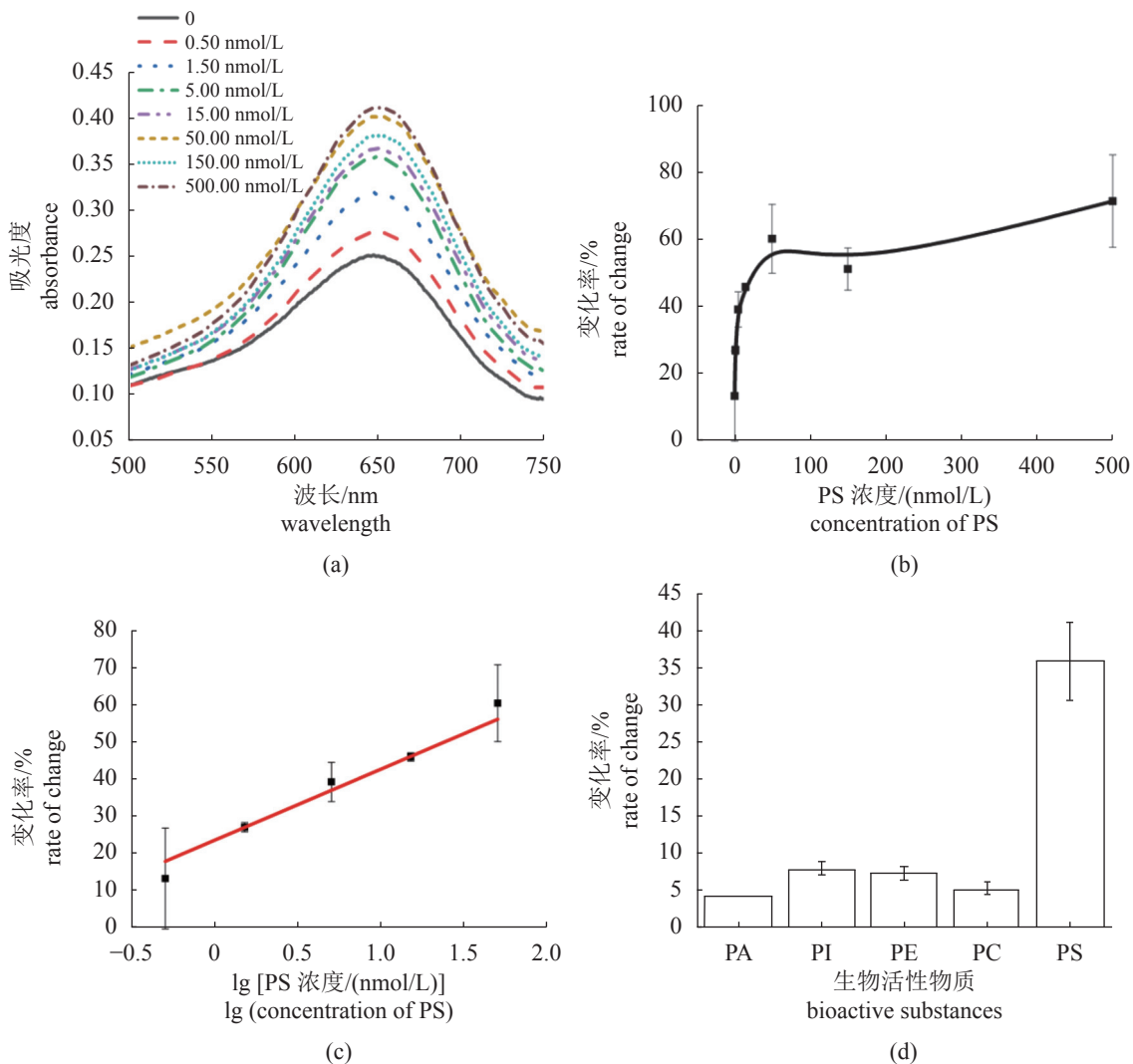


图 5 适配体传感器性能表征

(a) 不同浓度 PS 检测体系的吸光度值, (b) 变化率与 PS 浓度的关系图, (c) 变化率与 PS 浓度的线性关系图, (d) 选择性分析: PA. 磷酸, PI. 磷脂酰肌醇, PE. 磷脂酰乙醇胺, PC. 磷脂酰胆碱, PS. 磷脂酰丝氨酸

Fig. 5 Performance characterization of the aptasensor

(a) spectrogram of the detection system with different concentrations of PS, (b) rate of change vs concentration of PS, (c) linear relationship between rate of change and PS concentration, (d) selectivity analysis of the developed aptasensor; PA. phosphatic acid, PI. phosphatidylinositol, PE. phosphatidylethanolamine, PC. phosphatidylcholine, PS. phosphatidylserine

2.4 回收率

将 10 mg/mL PC 经酶法生物加工制备 PS, 经 HPLC 确认, 得到转化率分别为 15.20%、36.08% 和 75.90% 的样品, 对样品进行稀释, 使 PS 浓度分别为 1.50、5.00 和 15.00 nmol/L。利用构建的适配体传感器进行分析, 加标回收率为 95.63%~110.76%, RSD 均小于 9% (表 1)。

表 1 适配体传感器用于分析生物加工样品中 PS 的回收率

Tab. 1 Recovery rate based on the developed aptasensor for analyzing PS in bioprocessing samples

样品 samples	加入值/(nmol/L) added	检测值/(nmol/L) measured	回收率/% recovery	相对标准偏差/% RSD
1	1.50	1.66±0.11	110.76	6.57
2	5.00	5.44±0.43	108.82	7.94
3	15.00	14.34±1.18	95.63	8.19

2.5 选择性评价

利用构建的适配体传感器分析 PS 的类似物 PI、PA、PE 和 PC。结果如图 5-d 所示, 仅 PS 引起较大的响应值, 除 PS 外, 其他物质响应值均较低。

综上, 本研究成功构建了一种比色型适配体传感器用于 PS 的高灵敏快速定量, 在壳寡糖浓度为 5 μg/mL、适配体浓度为 2 μmol/L、H₂O₂ 浓度为 15%、TMB 浓度为 2 mmol/L、pH 值为 4.0 的最佳条件下, 体系吸光度值的变化率与 PS 浓度的标准曲线为 $y=19.12 \lg x+23.55$ ($R^2=0.9964$), 线性检测范围为 0.50~50.00 nmol/L, LOD 为 93.84 pmol/L。该传感器具有较好的选择性、准确性和重复性, 用于分析实际生物加工体系中的 PS 时, 回收率为 95.63%~110.76%, RSD 均小于 9.00%。且整个分析过程仅需 40 min。

3 讨论

本研究以水产品生物加工产物磷脂酰丝氨酸为待测物代表, 构建针对其的快速、特异性检测方法。本研究所构建的传感检测方法可满足行业需求, 且该方法可为其他生物加工产物的分析检测提供新的思路和研究基础。与传统方法相比, 本研究构建的分析检测方法具有操作简单、无需大型仪器、成本低、检测时间短、响应快、可实现高通量检测等优点。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Li X H, Zhao H J, Chen X L. Screening of marine bioactive antimicrobial compounds for plant pathogens[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(2): 69.
- [2] Andryukov B G, Besednova N N, Kuznetsova T A, *et al.* Sulfated polysaccharides from marine algae as a basis of modern biotechnologies for creating wound dressings: current achievements and future prospects[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(9): 301.
- [3] Wang J, Zhang M, Fang Z X. Recent development in efficient processing technology for edible algae: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 88: 251-259.
- [4] Shao X F, Wang X B, Zhu K D, *et al.* Synthesis of sea cucumber saponins with antitumor activities[J]. *the Journal of Organic Chemistry*, 2020, 85(19): 12080-12096.
- [5] Yu B, Xiao G Z, Shao X F, *et al.* Chemical synthesis of marine saponins[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(5): 769-787.
- [6] Sengupta T, Koklic T, Lentz B, *et al.* Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine regulate the structure and function of FVIIa and its interaction with soluble tissue factor[J]. *Bioscience Reports*, 2021, 41(2): BSR20204077.
- [7] Qi G H, Wang J F, Ma K S, *et al.* Label-free single-particle surface-enhanced Raman spectroscopy detection of phosphatidylserine externalization on cell membranes with multifunctional micron-Nano composite probes[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(4): 2183-2190.
- [8] Zhou J W, Zhang Y, Wu J J, *et al.* Proteomic and lipidomic analyses reveal saturated fatty acids, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, and associated proteins contributing to intramuscular fat deposition[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 241: 104235.
- [9] Vijay R, Guthmiller J J, Sturtz A J, *et al.* Hemolysis-associated phosphatidylserine exposure promotes polyclonal plasmablast differentiation[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2021, 218(6): e20202359.
- [10] Yang Y M, Sun K X, Liu W J, *et al.* The phosphatidylserine flippase beta-subunit Tmem30a is essential for normal insulin maturation and secretion[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(9): 2854-2872.
- [11] 卫生部. 关于批准蔗糖聚酯、玉米低聚肽粉、磷脂酰丝氨酸等 3 种物品为新资源食品的公告. 卫生部公告

- 2010年第15号 [EB/OL]. (2010-10-21). http://www.gov.cn/gzdt/2010-11/01/content_1735405.htm.
- The ministry of Health of China. Ministry of Health Announcement No. 15, 2010[EB/OL]. (2010-10-21). http://www.gov.cn/gzdt/2010-11/01/content_1735405.htm (in Chinese).
- [12] 游景水, 莫毅梅, 林丽, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定保健食品中磷脂酰丝氨酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(10): 2537-2540.
- You J S, Mo Y M, Lin L, *et al.* Determination of phosphatidylserine in health food by high performance liquid chromatography-with evaporative light scattering detector[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2018, 9(10): 2537-2540 (in Chinese).
- [13] 黄兴民, 郑家概, 张飞, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定保健食品中磷脂酰丝氨酸的方法优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(12): 3806-3810.
- Huang X M, Zheng J G, Zhang F, *et al.* Optimization of determination of phosphatidylserine in health foods by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(12): 3806-3810 (in Chinese).
- [14] Lyu C, Khan I M, Wang Z P. Capture-SELEX for aptamer selection: a short review[J]. *Talanta*, 2021, 229: 122274.
- [15] Zhao L H, Qi X Y, Yan X C, *et al.* Engineering aptamer with enhanced affinity by triple helix-based terminal fixation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(44): 17493-17497.
- [16] Ahmed S R, Kumar S, Ortega G A, *et al.* Target specific aptamer-induced self-assembly of fluorescent graphene quantum dots on palladium nanoparticles for sensitive detection of tetracycline in raw milk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128893.
- [17] Shi Y Q, Li W T, Feng X P, *et al.* Sensing of mercury ions in porphyrin by Copper @ Gold nanoclusters based ratiometric fluorescent aptasensor[J]. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128694.
- [18] Hitabatuma A, Pang Y H, Yu L H, *et al.* A competitive fluorescence assay based on free-complementary DNA for ochratoxin A detection[J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128303.
- [19] Shirani M, Kalantari H, Khodayar M J, *et al.* An ultra-sensitive optical aptasensor based on gold nanoparticles/poly vinyl alcohol hydrogel as acceptor/emitter pair for fluorometric detection of digoxin with on/off/on strategy[J]. *Spectrochimica Acta-Part A: Molecular and Bimolecular Spectroscopy*, 2021, 250: 119345.
- [20] He J B, Liu G Y, Jiang M D, *et al.* Development of novel biomimetic enzyme-linked immunosorbent assay method based on Au@SiO₂ nanozyme labelling for the detection of sulfadiazine[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2020, 31(1): 341-351.
- [21] Asadpour F, Mazloum-Ardakani M, Hoseynidokht F, *et al.* In situ monitoring of gating approach on mesoporous silica nanoparticles thin-film generated by the EASA method for electrochemical detection of insulin[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 180: 113124.
- [22] 李芙蓉, 向发椿, 曹丽萍, 等. 纳米酶在食品检测中的应用研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(1): 285-297.
- Li F R, Xiang F C, Cao L P, *et al.* Recent advances and applications of nanozymes in food assay[J]. *Food Science*, 2022, 43(1): 285-297 (in Chinese).
- [23] 陈祥明, 李飞, 林妍, 等. 制备Fe₃O₄纳米酶用于检测食品中四环素类抗生素的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(2): 434-439.
- Chen X M, Li F, Lin Y, *et al.* Preparation of Fe₃O₄ nanozyme for detection of tetracycline antibiotics in foods[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2019, 10(2): 434-439 (in Chinese).
- [24] Mao S F, Wang B, Yue L, *et al.* Effects of citronellol grafted chitosan oligosaccharide derivatives on regulating anti-inflammatory activity[J]. *Carbohydrate polymers*, 2021, 262: 117972.
- [25] He W Y, Tian L, Fang F, *et al.* Limited hydrolysis and conjugation of zein with chitosan oligosaccharide by enzymatic reaction to improve functional properties[J]. *Food Chemistry*, 2021, 348: 129035.
- [26] Naveed M, Phil L, Sohail M, *et al.* Chitosan oligosaccharide (COS): an overview[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 827-843.
- [27] Zhang W W, Wang Y L, Nan M N, *et al.* Novel colorimetric aptasensor based on unmodified gold nanoparticle and ssDNA for rapid and sensitive detection of T-2 toxin[J]. *Food Chemistry*, 2021, 348: 129128.

Highly sensitive and rapid detection of phosphatidylserine based on a colorimetric aptasensor

WANG Sai¹, XU Jiashuo¹, LI Ling¹, MAO Xiangzhao^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts,

Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: Preparation of marine active substances by bioprocessing technologies is a hot research topic in recent years. During the bioprocessing, it is of great significance to achieve rapid detection of the target products, while the traditional detection methods are faced with many limitations, so there is an urgent need for novel and simple analytical methods. In this study, phosphatidylserine (PS) was chosen as the model target, a colorimetric aptamer-based biosensor (aptasensor) was developed for the rapid detection of PS in bioprocessing system. The positively-charged chitosan oligosaccharides and negatively-charged aptamers firstly bound through electrostatic adsorption. In the presence of PS, the aptamers specifically bound with the PS, causing the release of chitosan oligosaccharides, which in turn adsorbed onto the negatively-charged gold nanoparticles to form nanozymes with high peroxidase catalytic activity towards 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB), producing colorimetric signals which were positively correlated with the concentration of PS. The absorbance values were collected and processed into rate of change with comparison to that of the negative samples without PS, and the rapid quantification was thus achieved. The concentration of aptamers, the concentration of chitosan oligosaccharides, and the conditions of nanozyme catalysis reaction were optimized in detail. Under optimal conditions, the developed aptasensor exhibited a good linear detection range (0.50-50.00 nmol/L) and high sensitivity, with a limit of detection (LOD) as low as 93.84 pmol/L. Moreover, the aptasensor showed high selectivity, accuracy, and repeatability. Recovery rates of 95.63%-110.76% and RSD less than 9.00% were obtained, when analyzing the PS in the actual bioprocessing samples. Only 40 min was needed for the entire analysis. In short, an aptasensor was successfully developed for highly sensitive and rapid detection of PS. The study can provide new ideas and research basis for the rapid detection method of PS as well as other biological processed products.

Key words: phosphatidylserine; bioprocessed product; rapid detection; aptamer; chitosan oligosaccharide; AuNPs nanozyme

Corresponding author: MAO Xiangzhao. E-mail: xzhmao@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31922072); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020JQ15); Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program (2019KJF012); Taishan Scholar Project of Shandong Province (tsqn201812020)