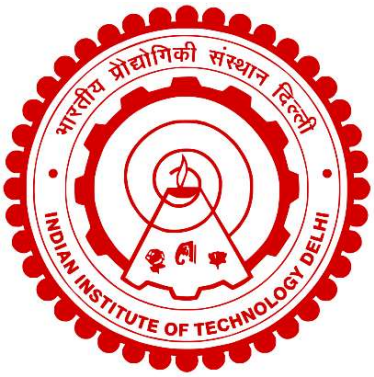
DESIGN, DEVELOPMENT, AND METHOD EVALUATION OF APTAMER-BASED AFLATOXIN DETECTION

SHAZIA SHAREEF



CENTRE FOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

MAY 2025

DESIGN, DEVELOPMENT, AND METHOD EVALUATION OF APTAMER-BASED AFLATOXIN DETECTION

by

SHAZIA SHAREEF

Centre for Rural Development and Technology

Submitted

In fulfilment of the requirements for the degree of

Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

MAY 2025

Dedicated to Mumma and

Papa, my foundation…

Certificate

This is to certify that the thesis entitled " **Design, Development, and Method Evaluation of Aptamer-based Aflatoxin Detection**" being submitted by **Ms. Shazia Shareef** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of "**Doctor of Philosophy**" is a record of Bonafide research work carried out by her. She has worked under my guidance and supervision and has fulfilled the requirements for the submission of this thesis. To the best of my knowledge, the results contained in this thesis have not been submitted in part or full to any other university or institute for the award of any degree or diploma.

Prof. Hariprasad P.

Associate Professor

Centre for Rural Development and Technology

Indian Institute of Technology Delhi

Hauz Khas, New Delhi

110016

Acknowledgement

All praise and gratitude are due to **ALLAH (SWT)**, the Almighty, whose countless blessings, mercy, and guidance have been my source of strength throughout this transformative journey. It is only through His wisdom, support, and grace that I have been able to overcome challenges, persevere through hardships, and achieve this significant milestone in my life.

My Ph.D. journey has been a profound and dynamic blend of **challenges**, **milestones**, **growth**, and **self-discovery**—a transformative experience that has shaped me into a more determined and resilient individual. This milestone would not have been possible without the guidance, support, and encouragement of numerous individuals to whom I am deeply indebted.

First and foremost, I extend my heartfelt gratitude to my Ph.D. supervisor, **Prof. Hariprasad P.**, for his unwavering support, invaluable guidance, and insightful counsel throughout this journey. His meticulous attention to detail and constructive feedback, coupled with his motivating words and contagious enthusiasm for research, kept me inspired even during the most challenging times.

I am immensely thankful to **Prof. Vivek Kumar**, the current Head of the CRDT), and his predecessors, for ensuring access to all necessary facilities. My sincere appreciation goes to my Student Research Committee members-**Prof. Satyawati Sharma, Prof. S. N. Naik, Prof. Sampa Saha, Prof. Vivek Kumar,** and CRC Chairperson **Prof. V. M. Chariar**—for their valuable time, insights, and support. I would also like to acknowledge the faculty and staff of CRDT for their assistance and encouragement.

I sincerely acknowledge the **Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), Government of India**, for the Ph.D. fellowship and contingency grant, and **IIT Delhi's Central Research Facility (CRF), Nano Research Facility (NRF)**, and **High-Performance Computing (HPC) facility** for providing instrumental and computational support crucial to my research and in-silico studies.

A special mention goes to my lab mates and colleagues, whose camaraderie and shared experiences have been an integral part of my Ph.D. journey. I extend my heartfelt thanks to **Dr. Leena** for her constant support, and to **Dr. Supreet, Dr. Ayushman, Dr. Pratibha, Dr. Durai, Dr. Umesh Chandra Sharma, Mr. Kapil, Dr. Gourav, Dr. Vasanth, Dr. Bhani, Dr. Monu, Mr. Ajay,** and **Ms. Anjali** for fostering a positive and encouraging lab environment. I am thankful to my friends and labmates—**Mrs. Priyanka, Ms. Lemnaro, Ms. Shivangni,** and **Ms. Jaya**—for their companionship and support. I am also grateful to my newer lab mates—**Dr. Shubhra, Dr. Saiema,**

Dr. Dipayan, Dr. Gunjan, Ms. Sabia, Ms. Prerna, Mr. Ankur, Mr. Amar, and **Ms. Subhashree—**for their warmth and cooperation. Additionally, I sincerely thank **Mrs. Pratibha** and **Mr. Hridyaram** for their kind assistance with tasks beyond laboratory work.

A heartfelt thanks to **Mr. Upanshu** and **Ms. Pooja** for their motivational support during my final years, their unwavering friendship, and their stress-relieving company. I am also thankful to my friends—**Ms. Leena, Ms. Aishwarya, Ms. Mamta, Mr. Nayeem, Mr. Sachin, Ms. Divya, Ms. Zoya, Dr. Kiran, Dr. Kaushalya, Mr. Komalkant, Mr. Gyan, Dr. Vikas, Mr. Tushar, Mr. Subodh, Mr. Dushyant,** and **Dr. Manoj—**for their constant encouragement and support.

Above all, I owe everything to **my family**, whose unconditional love and unwavering support have been the cornerstone of my success. To my parents, **Dr. Shareef Ahmad** and **Mrs. Aneesa Shareef**, who instilled in me the values of hard work, perseverance, and integrity, I owe my deepest gratitude. Their **sacrifices, prayers**, and **belief in me** have been the driving force behind my achievements. I feel deeply blessed to have **my siblings**, whose loving support, encouragement, endless patience, uplifting words, and shared moments of joy have been a constant source of strength throughout this journey.

I am deeply grateful to my fiancé, **Mr. Sameer Khan**, whose love, patience, and unwavering support have been my greatest strength throughout this journey. His constant encouragement and belief in me have filled my heart with hope and confidence, making even the toughest moments feel manageable. Having him by my side has been a true blessing, and his kindness and understanding have made this achievement even more meaningful.

Throughout my **Ph.D. journey**, I have learned to handle myself with patience and resilience, never giving up despite difficulties. I stayed motivated and focused, knowing that hard work and perseverance are key to overcoming obstacles. Mentally, emotionally, and physically, I committed to continuous improvement, embracing setbacks as opportunities to learn and grow. This mindset helped me navigate tough situations with calm determination and a positive outlook, enabling me to emerge stronger and more confident. Above all, I am **thankful** to **myself** for the perseverance, self-belief, and courage to keep moving forward even when the path was difficult.

Finally, I once again bow my head in gratitude to **ALLAH (SWT)**, the ultimate source of strength and inspiration, for His countless blessings and for guiding me through every step of this journey. Without His mercy and wisdom, none of this would have been possible.

Abstract

Aflatoxins are the carcinogenic secondary metabolites produced by fungi such as ***Aspergillus flavus*** and ***A. parasiticus***. These fungi are widely spread in nature and have severely contaminated food supplies for humans and animals. Consuming food or feed contaminated with aflatoxins can lead to hepatocellular carcinoma, immunosuppression, growth retardation, acute hepatic toxicity, reproductive toxicity, malnutrition, and increased susceptibility to infections and liver cirrhosis. Therefore, the detection and quantification of aflatoxins in foods and feeds are critical aspects of safety and health concerns. The challenges are (a) Aflatoxins are low molecular weight, non-immunogenic, monoepitopic antigens, and (b) Their concentration in contaminated food/feed is very low (ppb to ppm). The primary strategy to eliminate Aflatoxin from food/feed is to eliminate the contaminated commodities through detection at various levels of the food supply chain. Several methods are currently being used to detect Aflatoxin in food/feeds, which include Thin Layer Chromatography (TLC), High-performance liquid chromatography (HPLC), Liquid chromatography – Mass spectroscopy (LC-MS) and Antibody-based techniques [Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Radioimmunoassay (RIA)]. Though TLC is a comparatively simpler and cheaper method, it is not specific to anyone analyte. It required sample cleaning, processing, and derivatization, as well as a precise mobile phase and a UV cabinet to visualize the results and is referred for only qualitative analysis. Hence, HPLC and LC-MS are more accurate in quantitative analysis. However, their initial investment, maintenance and running costs are high. Requires sample preparation and purification stages. Skilled labour is required to handle the instrument and interpret the results. HPLC and LC-MS are highly recommended to laboratories. ELISA is both quantitative and qualitative in nature and can be used at the field level. However, the cost of the ELISA kits is still considered higher as they involve antibody production and a cold supply chain.

In the recent past, DNA-based aptamers have been gaining attention in the area of biosensors. **Aptamers** are short oligonucleotides of 20 – 80 bases. They function similarly to antibodies by forming a three-dimensional structure, enabling specific and highly sensitive interactions with the target analyte. Once the aptamer generated against a target analyte through the **systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)** process, they can be easily reproduced. Moreover, as DNA based aptamers are stable at high temperatures, aptamers-based kits can be stored and transported at room temperature. In addition, these aptamers are highly versatile and robust, which

can be used to develop various types of assays and kits without compromising sensitivity and specificity.

In this regard, the present study focused on developing aflatoxin-specific aptamers with high affinity and specificity. In the first phase of the study, **AuNPs-based SELEX** procedure performed to screen and evaluate aptamers specific to Aflatoxin B_1 (AFB_1). The SELEX cycles involved systematic optimization of ssDNA library enrichment using AuNP-based colorimetric assays for real-time monitoring.

Following this, **next-generation sequencing (NGS)** was performed to analyze aptamer pools enriched through AuNP-based SELEX. Two methodologies were employed: **MiSeq NGS** for the 12^{th} SELEX cycle pool following vector-based library preparation and **NovaSeq NGS** for direct sequencing of 4^{th}, 8^{th}, 12^{th}, and 15^{th} cycle pools. The raw reads quality control analysis, merging reads, and adapter removal, were conducted using FastQC, Trimmomatic, and AptaSUITE tools. MiSeq sequencing identified clusters of aptamer sequences, while NovaSeq revealed 22 motifs. Motif analysis using MEME and MAST further refined aptamer selection.

Further, the sensitivity, specificity, and binding characteristics of top **17 DNA aptamers** were evaluated against AFB_1. Using **AuNP-based colorimetric assay**, the dissociation constants (Kd) of the aptamer-AFB_1 complexes were determined, revealing robust binding affinities even at nanomolar concentrations for AFB_1. The top four aptamers with the lowest K_d values **CPMA1, L1, L2, and L3** were shortlisted for further analysis. **Circular Dichroism (CD) Spectropolarimetry** demonstrated conformational changes in aptamers upon AFB_1 binding, indicating stable aptamer-AFB_1 complex formation. **Fluorescence-based assays**, including a SyBr Green-I label-free approach and a graphene oxide (GO) and FAM-labelled aptamer assay, further confirmed the strong binding kinetics of these aptamers. **Specificity** and **cross-reactivity** studies using AuNPs-based assay revealed minimal binding to non-target analytes, including AFB_2, AFG_1, AFG_2, AFM_1, Ochratoxin A, Fumonisin B1, and Bovine Serum Albumin (BSA), demonstrating high specificity towards AFB_1.

Additionally, computational methods performed to analyze the binding specificity and stability of ssDNA selected aptamers towards AFB_1. **Secondary structures** of aptamers were predicted using the MFold webserver, revealing diverse folding patterns. The tertiary structures were modeled with RNA Composer and refined to DNA-like configurations. **Molecular docking** with AutoDock tools demonstrated strong binding affinities, with aptamer L1 showing the lowest binding

energy (-5.06 kcal/mol). **Molecular dynamics simulations** in GROMACS validated the stability and dynamics of aptamer-AFB_1 complexes over 100 ns, with RMSD, RMSF, Rg, SASA, and hydrogen bond analyses confirming equilibrium and interaction stability.

In the final objective, a rapid, on-site, and cost-effective **lateral flow assay (LFA)** was developed for the detection of AFB_1 using the **L2 aptamer** and complementary cDNA-thiol-gold nanoparticles (cDNA-SH-AuNPs) as colorimetric probes, with poly (diallyl dimethylammonium chloride) (PDDA) incorporated at the control line. The assay followed a dual-line detection format: in the absence of AFB_1, cDNA-SH-AuNPs hybridize with the biotinylated aptamer at the test line and bind at the PDDA control line, resulting in visible signals at both lines. In the presence of AFB_1, its specific binding to the aptamer disrupts the aptamer-cDNA interaction, preventing capture at the test line and allowing the cDNA-SH-AuNPs to migrate and bind only at the control line, producing a single visible signal. This design provides an internal validation mechanism, ensuring proper sample migration and reagent functionality. The assay exhibited high specificity with negligible cross-reactivity to other mycotoxins. **A limit of detection (LOD) of 0.648 µM** and a **sensitivity** range of **0.01–0.2 µM (~3–6 ppb)** were achieved, indicating its suitability for detecting AFB_1 even at low concentrations. Successful detection of AFB_1 in spiked maize and groundnut samples confirmed the assay's practical applicability, establishing it as a sensitive, reliable, and field-deployable tool for monitoring AFB_1 contamination in food and feed commodities.

Overall, this study successfully developed highly specific and sensitive DNA-based aptamers for the detection of AFB_1 using a combination of AuNP-based SELEX, next-generation sequencing, and computational analysis. The resulting aptamers were applied to create a rapid and cost-effective LFA, which demonstrated robust performance in detecting AFB_1 in real spiked samples, offering a practical solution for monitoring aflatoxin contamination in food and feed commodities.

सार

अफ्लाटॉक्सिन कार्सिनोजेनिक माध्यमिक मेटाबोलाइट्स हैं, जो *एस्परगिलस फ्लेवस और ए. पैरासिटिकस* जैसे कवकों द्वारा उत्पन्न होते हैं। ये कवक प्रकृति में व्यापक रूप से फैले हुए हैं और उन्होंने मनुष्यों और पशुओं के खाद्य आपूर्ति को गंभीर रूप से दूषित किया है। अफ्लाटॉक्सिन से दूषित खाद्य या चारे के सेवन से हेपाटोसेलुलर कार्सिनोमा (लिवर कैंसर), इम्यूनोसप्रेशन, विकास अवरोध, तीव्र यकृत विषाक्तता, प्रजनन विषाक्तता, कुपोषण, संक्रमण के प्रति बढ़ी हुई संवेदनशीलता और लिवर सिरोसिस जैसी समस्याएं हो सकती हैं। इसलिए, खाद्य और चारे में अफ्लाटॉक्सिन की पहचान और मात्रात्मक विश्लेषण करना सुरक्षा और स्वास्थ्य संबंधी चिंताओं का एक महत्वपूर्ण पहलू है। अफ्लाटॉक्सिन के संदर्भ में कुछ चुनौतियां हैं: **(a)** अफ्लाटॉक्सिन कम आणविक भार वाले, गैर-प्रतिरक्षात्मक और मोनोएपिटोपिक एंटीजन हैं। **(b)** दूषित खाद्य/चारे में इनकी सांद्रता बहुत कम होती है (पीपीबी से पीपीएम स्तर तक)। अफ्लाटॉक्सिन को खाद्य/चारे से समाप्त करने की प्राथमिक रणनीति यह है कि दूषित वस्तुओं की पहचान कर उन्हें खाद्य आपूर्ति श्रृंखला के विभिन्न स्तरों पर अलग किया जाए। वर्तमान में अफ्लाटॉक्सिन का पता लगाने के लिए कई विधियों का उपयोग किया जा रहा है, जिनमें शामिल हैं: थिन लेयर क्रोमैटोग्राफी, हाई-परफॉर्मेंस लिक्विड क्रोमैटोग्राफी, लिक्विड क्रोमैटोग्राफी–मास स्पेक्ट्रोस्कोपी, और एंटीबॉडी-आधारित तकनीकें जैसे [एंजाइम-लिंक्ड इम्यूनोसॉरबेंट असे और रेडियोइम्यूनोअसे]। हालांकि, थिन लेयर क्रोमैटोग्राफी तुलनात्मक रूप से सरल और सस्ती विधि है, लेकिन यह किसी एक विशिष्ट एनालाइट के लिए सटीक नहीं है। इसमें नमूनों की सफाई, प्रोसेसिंग और डेरिवेटाइजेशन की आवश्यकता होती है, साथ ही एक सटीक मोबाइल फेज और परिणामों को देखने के लिए एक यूवी कैबिनेट चाहिए। इसे केवल गुणात्मक विश्लेषण के लिए उपयोग किया जाता है। इसलिए, हाई-परफॉर्मेंस लिक्विड क्रोमैटोग्राफी और लिक्विड क्रोमैटोग्राफी–मास स्पेक्ट्रोस्कोपी मात्रात्मक विश्लेषण में अधिक सटीक हैं। हालांकि, इनकी शुरुआती लागत, रखरखाव और संचालन खर्च अधिक हैं। नमूनों की तैयारी और शुद्धिकरण के चरणों की आवश्यकता होती है। उपकरण को संभालने और परिणामों की व्याख्या के लिए कुशल श्रमिकों की आवश्यकता होती है। ये विधियां प्रयोगशालाओं के लिए अत्यधिक अनुशंसित हैं। एंजाइम-लिंक्ड इम्यूनोसॉरबेंट असे मात्रात्मक और गुणात्मक दोनों प्रकार का विश्लेषण प्रदान करती है और इसे क्षेत्र स्तर पर उपयोग किया जा सकता है। हालांकि, ELISA किट की लागत अभी भी अधिक मानी जाती है क्योंकि इसमें एंटीबॉडी उत्पादन और कोल्ड सप्लाई चेन शामिल है।

हाल के वर्षों में, डीएनए-आधारित एप्टामर बायोसेंसर्स के क्षेत्र में विशेष ध्यान आकर्षित कर रहे हैं। एप्टामर 20-80 बेस लंबे छोटे ओलिगोन्यूक्लियोटाइड्स होते हैं। ये एंटीबॉडी के समान कार्य करते हैं, क्योंकि ये

एक त्रि-आयामी संरचना बनाते हैं, जो लक्ष्य एनालाइट के साथ विशिष्ट और अत्यधिक संवेदनशील इंटरैक्शन को सक्षम बनाती है। जब एक लक्ष्य एनालाइट के खिलाफ एप्टामर का उत्पादन सिस्टमेटिक इवोल्यूशन ऑफ लिगैंड्स बाय एक्सपोनेंशियल एनरिचमेंट (SELEX) प्रक्रिया के माध्यम से किया जाता है, तो इन्हें आसानी से पुन: उत्पादित किया जा सकता है। इसके अलावा, डीएनए-आधारित एप्टामर उच्च तापमान पर स्थिर रहते हैं, जिससे एप्टामर-आधारित किट्स को कमरे के तापमान पर संग्रहीत और परिवहन किया जा सकता है। साथ ही, ये एप्टामर अत्यधिक बहुमुखी और मजबूत होते हैं, जिन्हें विभिन्न प्रकार के परीक्षणों और किटों को विकसित करने के लिए उपयोग किया जा सकता है, वह भी संवेदनशीलता और विशिष्टता से समझौता किए बिना।

इस संदर्भ में, वर्तमान अध्ययन का उद्देश्य उच्च अभिप्रेरणा और विशिष्टता के साथ अफ्लाटॉक्सिन-विशिष्ट एप्टामर विकसित करना था। अध्ययन के पहले चरण में, अफ्लाटॉक्सिन B_1 (AFB_1) के लिए एप्टामर की स्क्रीनिंग और मूल्यांकन करने के लिए AuNPs-आधारित SELEX प्रक्रिया को लागू किया गया। SELEX चक्रों में AuNP-आधारित कलोरेटिमेट्रिक assays का उपयोग करके ssDNA पुस्तकालय को समर्पित रूप से समृद्ध करना और वास्तविक समय में निगरानी के लिए इसके अनुकूलन की प्रक्रिया शामिल थी।

इसके बाद, AuNP-आधारित SELEX के माध्यम से समृद्ध किए गए एप्टामर पूल्स का विश्लेषण करने के लिए नेक्स्ट-जनरेशन सीक्वेंसिंग (NGS) किया गया। दो पद्धतियों का उपयोग किया गया: MiSeq NGS का उपयोग 12वें SELEX चक्र पूल के लिए किया गया, जिसमें वेक्टर-आधारित पुस्तकालय तैयारी का पालन किया गया और NovaSeq NGS का उपयोग 4वें, 8वें, 12वें और 15वें चक्र पूल्स की सीधे सीक्वेंसिंग के लिए किया गया। कच्ची पढ़ाई की गुणवत्ता नियंत्रण विश्लेषण, पढ़ाई का विलय, और अडैप्टर हटाने का कार्य FastQC, Trimmomatic, और AptaSUITE उपकरणों का उपयोग करके किया गया। MiSeq सीक्वेंसिंग ने एप्टामर अनुक्रमों के क्लस्टर पहचाने, जबकि NovaSeq ने 22 मोटिफ़्स का खुलासा किया। MEME और MAST का उपयोग करके मोटिफ़ विश्लेषण ने एप्टामर चयन को और परिष्कृत किया।

इसके अलावा, शीर्ष 17 डीएनए एपटामर्स की संवेदनशीलता, विशिष्टता और बाइंडिंग विशेषताओं का मूल्यांकन AFB_1 के खिलाफ किया गया। AuNP-आधारित कलोरिमेट्रिक ऐस्से का उपयोग करते हुए, एपटामर-AFB_1 परिसंयोजनों के डिससोसिएशन स्थिरांक (Kd) निर्धारित किए गए, जो AFB_1 के लिए नैनोमोलर सांद्रता पर भी मजबूत बाइंडिंग एफ़िनिटी को दर्शाते हैं। सबसे कम Kd मान वाले शीर्ष चार एपटामर्स CPMA1, L1, L2, और L3 को आगे की विश्लेषण के लिए चुना गया। सर्कुलर डाइक्रोइज़म (CD) स्पेक्ट्रोपोलारिमेट्री ने AFB_1 बाइंडिंग पर एपटामर्स में संरचनात्मक परिवर्तन दिखाए, जो स्थिर एपटामर-AFB1 परिसंयोजन गठन को संकेतित करते हैं। फ्लोरेसेंस-आधारित ऐस्से, जिसमें SyBr Green-I लेबल-रहित दृष्टिकोण और ग्रेफीन

ऑक्साइड (GO) और FAM-लेबल किए गए एपटामर ऐस्से शामिल हैं, ने इन एपटामर्स की मजबूत बाइंडिंग काइनेटिक्स की पुष्टि की। AuNPs-आधारित ऐस्से का उपयोग करके विशिष्टता और क्रॉस-रिएक्टिविटी अध्ययन ने गैर-लक्ष्य विश्लेषणों, जैसे AFB_2, AFG_1, AFG_2, AFM_1, Ochratoxin A, Fumonisin B1, और Bovine Serum Albumin (BSA) के लिए न्यूनतम बाइंडिंग को दर्शाया, जो AFB_1 के प्रति उच्च विशिष्टता को प्रदर्शित करता है।

इसके अतिरिक्त, AFB_1 के प्रति ssDNA चयनित एपटामर्स की बाइंडिंग विशिष्टता और स्थिरता का विश्लेषण करने के लिए संगणनात्मक विधियाँ की गईं। एपटामर्स की द्वितीयक संरचनाएँ MFold वेबसर्वर का उपयोग करके भविष्यवाणी की गईं, जो विविध फोल्डिंग पैटर्न दर्शाती हैं। तृतीयक संरचनाओं को RNA Composer के साथ मॉडल किया गया और DNA-जैसी विन्यासों में परिष्कृत किया गया। AutoDock उपकरणों के साथ आणविक डॉकिंग ने मजबूत बाइंडिंग एफ़िनिटी का प्रदर्शन किया, जिसमें एपटामर L1 ने सबसे कम बाइंडिंग ऊर्जा (-5.06 kcal/mol) दिखाई। GROMACS में आणविक डायनामिक्स सिमुलेशन ने 100 ns के भीतर एपटामर-AFB1 परिसंयोजनों की स्थिरता और डायनामिक्स को मान्य किया, जिसमें RMSD, RMSF, Rg, SASA, और हाइड्रोजन बांड विश्लेषणों ने संतुलन और इंटरैक्शन की स्थिरता की पुष्टि की।

अंतिम उद्देश्य के तहत, AFB1 के निर्धारण के लिए एक तीव्र, ऑन-साइट और किफायती लैटरल फ्लो एसे (LFA) विकसित किया गया, जिसमें L2 एप्टामर और पूरक cDNA-थियोल-गोल्ड नैनोपार्टिकल्स (cDNA-SH-AuNPs) को कलरिमेट्रिक जांच के रूप में उपयोग किया गया, तथा नियंत्रण रेखा पर पॉली (डायएलिल डाइमिथाइलअमोनियम क्लोराइड) (PDDA) को शामिल किया गया। यह एसे दोहरी-रेखा पहचान प्रारूप का अनुसरण करता है: AFB1 की अनुपस्थिति में, cDNA-SH-AuNPs बायोटिनिलेटेड एप्टामर से परीक्षण रेखा (टेस्ट लाइन) पर संकरण करते हैं और PDDA नियंत्रण रेखा (कंट्रोल लाइन) पर भी बाइंड होते हैं, जिससे दोनों रेखाओं पर दृश्यमान संकेत उत्पन्न होते हैं। AFB1 की उपस्थिति में, उसका विशिष्ट रूप से एप्टामर से बंधन एप्टामर-cDNA की पारस्परिक क्रिया को बाधित करता है, जिससे परीक्षण रेखा पर पकड़ नहीं बनती और cDNA-SH-AuNPs प्रवाहित होकर केवल नियंत्रण रेखा पर बाइंड होते हैं, जिसके परिणामस्वरूप केवल एक दृश्य संकेत बनता है। यह डिज़ाइन आंतरिक मान्यता तंत्र प्रदान करता है, जो नमूना प्रवास और अभिकर्मकों की कार्यक्षमता को सुनिश्चित करता है। इस एसे ने उच्च विशिष्टता प्रदर्शित की और अन्य माइकोटॉक्सिन्स के प्रति नगण्य क्रॉस-रिएक्टिविटी दिखाई। इसने 0.648 माइक्रोमोलर (μM) की न्यूनतम पहचान सीमा (LOD) और 0.01–0.2 μM (~3–6 ppb) की संवेदनशीलता सीमा प्राप्त की, जो AFB1 की अत्यल्प सांद्रता पर भी

सफल पहचान को इंगित करता है। स्पाइक किए गए मक्का और मूंगफली के नमूनों में AFB1 की सफल पहचान ने इस एसे की व्यावहारिक उपयोगिता को सिद्ध किया, जिससे यह खाद्य और चारा वस्तुओं में AFB1 संदूषण की निगरानी के लिए एक संवेदनशील, विश्वसनीय और क्षेत्रीय स्तर पर उपयोग योग्य उपकरण के रूप में स्थापित हुआ।

कुल मिलाकर, इस अध्ययन ने AuNP-आधारित SELEX, अगले पीढ़ी के अनुक्रमण और संगणनात्मक विश्लेषण के संयोजन का उपयोग करके AFB_1 के पता लगाने के लिए उच्च विशिष्टता और संवेदनशीलता वाले DNA-आधारित एपटामर्स को सफलतापूर्वक विकसित किया। परिणामस्वरूप, इन एपटामर्स का उपयोग करके एक त्वरित और लागत-कुशल LFA बनाई गई, जिसने वास्तविक स्पाइक किए गए नमूनों में AFB_1 का पता लगाने में मजबूत प्रदर्शन दिखाया, जिससे खाद्य और चारा सामग्रियों में अफ्लाटॉक्सिन संदूषण की निगरानी के लिए एक व्यावहारिक समाधान प्रदान किया।

Table of contents

List of Tables

List of Figures

Abbreviations

AFB_1	Aflatoxin B_1
AFB_2	Aflatoxin B_2
AFG_1	Aflatoxin G_1
AFG_2	Aflatoxin G_2
AFM_1	Aflatoxin M_1
AFM_2	Aflatoxin M_2
OTA	Ochratoxin A
FB1	Fumonisin B1
BSA	Bovine serum albumin
HCC	Hepatocellular carcinoma
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
AuNPs	Gold nanoparticles
LFAs	Lateral flow assays
SG-I	SyBr Green-I
GO	Graphene oxide
K_d	Dissociation constant
NGS	Next generation sequencing
MEME	Multiple Em for Motif Elicitation
MAST	Motif Alignment and Search Tool
μg	Microgram
ml	Microliter
Kcal	Kilocalorie
KJ	Kilo joule
M	Molar
mM	Mili Molar
μM	Micro Molar
nM	Nano Molar
TLC	Thin Layer Chromatography
GC	Gas Chromatography

IR	Infrared
HPLC	High performance liquid chromatography
HR-LCMS	High resolution liquid chromatography-mass spectrometry
RIA	Radioimmuno assay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
CD	Circular dichroism
BE	Binding energy
MD	Molecular dynamic
SDF	Structure Data File
PDB	Protein databank file
2D	2 dimension
3D	3 dimension
ns	nano second
nm	nano meter
NVT	Constant Number of atoms, Volume, and Temperature
NPT	Constant Number of atoms, Pressure, and Temperature
VWE	Van der Waals energy
EE	Electrostatic energy
RMSD	Root mean square deviation
RMSF	Root mean square fluctuation
Rg	Radius of gyration
SASA	Solvent accessible surface area