

基于核酸适配体调控噻菁染料聚集体构建 铅离子检测方法

Construction of lead (II) ion detection method based on regulation of
thiocyanine self-assembly by nucleic acid aptamer

赵 晗¹ 于丽佳¹ 吴志生² 张颖琳¹

ZHAO Han¹ YU Li-jia¹ WU Zhi-sheng² ZHANG Ying-lin¹

张华伟¹ 师晓栋¹

ZHANG Hua-wei¹ SHI Xiao-dong¹

(1. 国家卫生健康委职业安全卫生研究中心, 北京 102308;

2. 泰州医药高新技术产业开发区管理委员会, 江苏 泰州 225300)

(1. National Center for Occupational Safety and Health, NHC, Beijing 102308, China;

2. Taizhou Medical New & Hi-tech Industrial Development Zone, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

摘要:基于调控噻菁染料(Dye2)的超分子自组装性质及其与核酸适配体(T30695)特异性结合的能力,构建了Pb²⁺的特异性识别模块。结果表明,当体系中加入Pb²⁺时,T30695单链形成G-四链体,并将二聚体形式存在的噻菁染料诱导解聚为单体,引起422,445 nm处紫外吸收峰变化,仅需通过UV-vis光谱仪便可实现对Pb²⁺的高选择性、高灵敏度识别。该体系在Pb²⁺浓度为0.25~10.00 μmol/L时具有线性关系($R^2 = 0.9927$),其检出限为0.115 μmol/L。

关键词:核酸适配体;噻菁染料;铅离子(II);G-四链体;检测

Abstract: In this paper, regulation of self-assembly properties of thiocyanine dye (Dye2) by nucleic acid aptamer (T30695) was used to construct a specific recognition unit for detecting Pb²⁺. G-quadruplexes were formed to interact with dye 2 monomers, which could disassemble dimers of Dye2 into monomer, in the presence of Pb²⁺. The absorption values at 422 nm via 445 nm was used as a specific recognition signal to achieve the purpose of specificity and high sensitivity identification of Pb²⁺ only by UV-vis

基金项目:国家自然科学基金(批准号:21907021);国家卫生健康委职业安全卫生研究中心重点资助项目(编号:2020017,2020020,2020021)

作者简介:赵晗,男,国家卫生健康委职业安全卫生研究中心研究实习生,硕士。

通信作者:于丽佳(1986—),女,国家卫生健康委职业安全卫生研究中心副研究员,博士。E-mail:yulijia@iccas.ac.cn

收稿日期:2020-06-09

spectra. This system has a good linear relationship from 0.25 to 10.00 μmol/L ($R^2 = 0.9927$), and the detection limit is 0.115 μmol/L.

Keywords: nucleic acid aptamer; thiocyanine dye; lead ion (II); G-quadruplexes; detection

铅(Pb)在自然环境中稳定性强且不易降解,长期接触会在人体内累积^[1],对中枢神经系统^[2-4]、肾脏^[5]、生殖系统^[6]、骨骼^[7]等造成损害。因此,开发一种快速、高效且特异性强的铅离子检测方法对人体健康和环境保护具有重要意义。

目前,关于重金属检测比较成熟的方法主要有原子吸收法^[8]、原子荧光法^[9]、电感耦合等离子体质谱法^[10]、双硫腟比色法^[11]等,这些方法具有准确度高、选择性好、抗干扰能力强等优点,但存在前处理复杂、需要大型仪器支持、检测速度慢等缺点。近年来,一些依赖于纳米材料或核酸适配体的新型检测技术也常被用于重金属检测,主要包括电化学分析法^[12]、荧光法^[13]、化学发光法^[14]、比色分析法^[15]等。核酸适配体是一段具有三维空间结构的单链DNA或RNA,其可以与靶标发生特异性结合^[16]。因此,构建检测方法时,适配体可被用作一种优良的分子识别元件。由于适配体是在体外设计和筛选的,原则上任何靶标都可以有其对应的适配体,且适配体在信号传导和化学修饰方面具有更加优良的特性,因此应用适配体技术的检测方法往往具有更高的灵敏度。

近年来,菁染料以其良好的物理化学性质在生物检

测领域受到广泛的关注^[17-18]。菁染料是一类非常重要的有机功能染料,具有摩尔吸收系数高、光谱范围广、荧光量子产率高等优点^[19]。相比于传统单分子探针,菁染料超分子聚集体的优越性主要体现在:①菁染料在溶液体系中可以自组装形成高级聚集体;②菁染料的聚集体对环境敏感,超分子聚集体可以被调控,自身的浓度、结构、体系中所带的电荷和环境温度可以调控菁染料聚集体;③菁染料的聚集体识别信号可以级联放大^[20]。研究拟利用 Pb^{2+} 适配体和噻菁染料结合生成特异识别模块,使其与 Pb^{2+} 发生高特异性结合形成 G-四链体结构,此 G-四链体可将体系中以二聚体形式存在的噻菁染料(Dye2)诱导解聚为单体,比较其吸光度差异,以实现快速、简便、快速、高效的检测,旨在构建一种快速高效检测水中 Pb^{2+} 的方法。

1 试验部分

1.1 试剂与仪器

铅离子适配体:序列为 T30695 (5'-GGGTGGGT-GGGTGGGT-3'),生工生物工程(上海)股份有限公司;

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $ZnCl_2$ 、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ 、NaCl:分析纯,北京化工集团有限公司;

Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 标准溶液:1 000 $\mu g/mL$,中国计量学院;

2-甲基苯并[1,2-d]噻唑:萨恩化学技术(上海)有限公司;

2-(甲硫基)苯并噻唑、1,3-丙磺酸内酯:梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101K 型,郑州恒岩仪器有限公司;

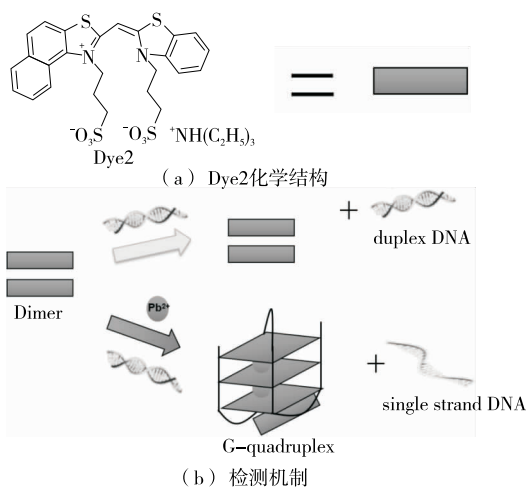
旋转蒸发器:RE-201D 型,巩义市河洛德正仪器厂;

紫外可见分光光度计:UV 3600 Plus 型,日本岛津公司;

手提式紫外分析仪:WFH-2048 型,杭州齐威仪器有限公司。

1.2 重金属 Pb^{2+} 检测原理

T30695^[21]作为 Pb^{2+} 适配体,可以在 Pb^{2+} 存在的情况下形成 G-四链体。试验研究在 Pb^{2+} 存在下通过寡核苷酸序列 T30695 对噻菁染料的二聚体和单体进行组装和拆卸的物理过程。该噻菁染料(Dye2)在甲醇中主要以单体形式存在,在水溶液中主要以二聚体形式存在,以 T30695 为模板可将 Dye2 的二聚体诱导成单体。基于噻菁染料在二聚体和单体之间的组装转化特性,通过 UV-vis 光谱变化在 T30695 的存在下构建一种简单的 Pb^{2+} 检测方法(见图 1)。在体系中缺乏 Pb^{2+} 的情况下,Dye2 的二聚体不能被 T30695 解聚;加入 Pb^{2+} 后,二聚体可被诱导成单体与 G-四链体相互作用。



矩形代表 Dye2 单体,菱形代表 G-四分体

图 1 重金属 Pb^{2+} 检测机制示意图

Figure 1 Schematic diagram of heavy metal Pb^{2+} detection mechanism

1.3 试验方法

1.3.1 噻菁染料(Dye2)的合成 采用阎文鹏等^[22]的方法,将 2-甲基-3-(3'-磺酸丙基)- β -萘并噻唑季铵盐与 2-甲硫基-3-(3'-磺酸丙基)-苯并噻唑季铵盐通过缩合反应得到噻菁(Dye2),并通过质谱和核磁共振(NMR)进行表征[ESI⁺ m/z : calcd for $C_{31}H_{39}N_3O_6S_4^+$: 677.1, found: 678.2, $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.16 (9H, t), 2.10~2.20(4H, m), 2.90 (2H, t), 2.67 (2H, t), 3.07~3.11(6H, q), 5.22(2H, t), 4.89(2H, s), 7.25(1H, s), 7.36~8.69(10H, m)];

1.3.2 Dye2 在溶液中的聚集状态 将 3.5 μL 500 $\mu mol/L$ 的 Dye2 储备液分别加入到 346.5 μL 不同比例的甲醇—超纯水混合液中($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{超纯水}}$ 分别为 0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 10:0),室温下避光反应 2 h,测定紫外吸收光谱。

1.3.3 体系中适配体 T30695 浓度优化 将 3.5 μL 500 $\mu mol/L$ 的 Dye2 储备液分别加入到不同体积的超纯水中,再加入不同体积的 100 $\mu mol/L$ 的 T30695 和 21 μL 500 $\mu mol/L$ 的铅离子溶液,室温下避光反应 2 h,测定紫外吸收光谱。

1.3.4 体系反应时间优化 向超纯水中加入 500 $\mu mol/L$ 的 Dye2 储备液 3.5 μL 和 100 $\mu mol/L$ 适配体 T30695 26.25 μL ,再加入 500 $\mu mol/L$ 铅离子溶液 21 μL ,涡旋后立即检测紫外吸收光谱,并每隔 2 min 检测一次,直至混合液的紫外吸收光谱无变化。

1.3.5 铅离子紫外光谱检测 将 Dye2 溶解于甲醇中,制成 500 $\mu mol/L$ 的储备液。先向 EP 管中加入不同体积的超纯水,再加入 500 $\mu mol/L$ 的 Dye2 储备液 3.5 μL ,涡旋并避光保存 10 min。然后加入 100 $\mu mol/L$ 的核酸适配体

T30695 26.25 μL 和不同体积的铅离子溶液 500 $\mu\text{mol/L}$, 涡旋, 最终混合液总体积为 350 μL 。将混合液于室温下避光反应 2 h, 同时配制空白样品作为比对。将混合液转移至比色皿中, 检测 300~600 nm 的紫外吸收光谱。

1.3.6 离子特异性 向每个 EP 管中依次加入超纯水, 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 Dye2 储备液 3.5 μL 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 适配体 T30695 26.25 μL , 分别向每个 EP 管中加入不同的金属离子溶液 (Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Na^+ 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+}), 最终混合液总体积为 350 μL 。溶液充分振荡, 避光反应 2 h, 测定紫外吸收光谱。

1.3.7 回收率试验 向每个 EP 管中加入稀释 1 000 倍后的自来水(稀释是为了减少自来水中其他离子对试验的干扰)、500 $\mu\text{mol/L}$ 的 Dye2 储备液 3.5 μL 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 适配体 T30695 26.25 μL , 再加入不同浓度的铅离子储备液, 涡旋, 最终混合液总体积为 350 μL 。将混合液于室温下避光反应 0.5 h, 检测 300~600 nm 的紫外吸收光谱。

1.3.8 数据处理 采用 Origin 8.5 软件对试验数据进行处理分析。

2 结果与讨论

2.1 噻菁染料 Dye2 的聚集状态

由图 2 可知, 超纯水中, Dye2 在 422 nm 处有主要吸收峰, 445 nm 处有一个小肩峰, 与文献[23-25]报道相似。422 nm 处的吸收峰为二聚体峰, 445 nm 处为单体峰, 二聚体的形成主要归因于染料与水分子之间的氢键作用形成面对面的堆积模式。

由图 3 可知, 随着溶剂中甲醇比例的增加, Dye2 紫外吸收峰由 422 nm(二聚体)向 445 nm(单体)转化, 即二聚体转变为单体; 当 $V(\text{甲醇}) : V(\text{超纯水}) \geq 7 : 3$ 时, $A_{422 \text{ nm}} / A_{445 \text{ nm}}$ 几乎不变, 表明此时体系中反应已达平衡。

Chibisov 等^[26] 研究发现, Dye2 的类似物即芳环上修饰甲氧基和氯原子的化合物, 单体和二聚体之间的转化受体系温度的影响。由图 4 可知, 当体系温度为 4~

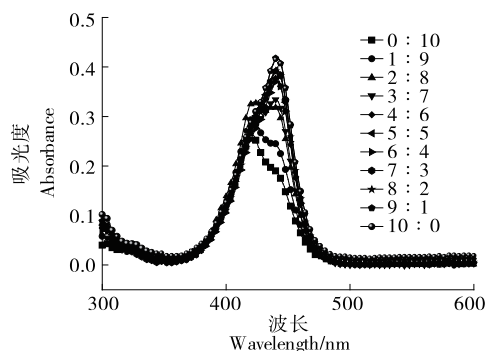


图 2 Dye2 在不同比例的甲醇和超纯水中的聚集状态
Figure 2 Aggregation state of Dye2 in different $V_{\text{MeOH}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$

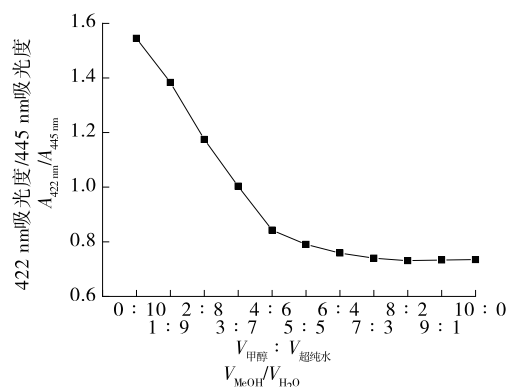


图 3 不同比例的甲醇和超纯水对 Dye2 聚集状态的影响
Figure 3 Effects of different $V_{\text{MeOH}}/V_{\text{H}_2\text{O}}$ on the aggregation state of Dye2

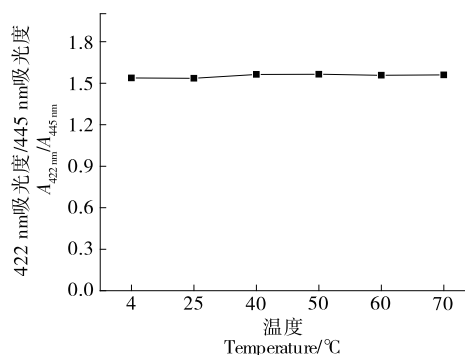


图 4 温度对 Dye2 聚集状态的影响
Figure 4 Effects of different temperature on the aggregation state of Dye2

70 $^{\circ}\text{C}$ 时, 二聚体与单体的吸光度比值不变, 说明低于 70 $^{\circ}\text{C}$ 时, Dye2 聚集体受外界温度影响不大, 因此试验选择室温条件下进行。

2.2 T30695 浓度优化

T30695 作为 Pb^{2+} 的核酸适配体, 在铅离子存在条件下能形成 G-四链体, 该过程涉及到序列由单链转化 DNA 二级结构 G-四链体, 核酸空间结构的转化可能会影响聚集体的空间构型。由图 5 可知, 随着 T30695 浓度的增加, Dye2 在 422 nm 处吸收峰(二聚体)逐渐降低, 445 nm 处吸收峰(单体)逐渐升高。由图 6 可知, $A_{422 \text{ nm}} / A_{445 \text{ nm}}$ 随铅离子浓度的增加逐渐降低, 说明体系中 T30695 的浓度会影响 Dye2 的聚集状态。当 T30695 浓度增加至 3 $\mu\text{mol/L}$ 时, $A_{422 \text{ nm}}$ 值达到峰值, 体系主要以二聚体形式存在, 当 T30695 浓度增加至 15 $\mu\text{mol/L}$ 时, $A_{422 \text{ nm}} / A_{445 \text{ nm}}$ 不再改变, 体系主要以单体形式存在, 说明此时体系达到平衡。

2.3 体系反应平衡时间

固定铅离子的浓度, 考察不同时间点 Dye2 聚集体转化情况。先检测未加 Pb^{2+} 的情况, 再加入 Pb^{2+} 后立即进

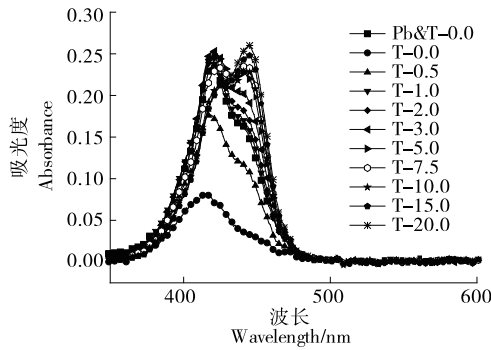


图 5 T30695 浓度对 Dye2 紫外吸收的影响

Figure 5 Effects of different concentrations of T30695 on absorption spectra of Dye2

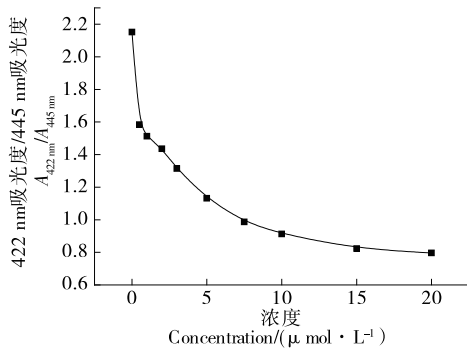


图 6 T30695 浓度对 $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ 的影响

Figure 6 Line chart of $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ in Uv-vis spectra

行检测,此后每 2 min 检测一次。由图 7 可知,当加入 Pb^{2+} 6 min 后,样品的 Uv-vis 光谱再无变化,此时的 $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ 变化幅度较小(见图 8),反应接近平衡,表明此方法需 6 min 即可检测样品中的 Pb^{2+} ,因此,铅离子最佳的反应时间为 6 min。

2.4 线性范围与检测限

在最佳试验条件下,向体系中加入不同浓度的 Pb^{2+} 标准溶液,考察 Dye2 聚集体转化与铅离子浓度的关系(图 9)。由图 9、10 可知,最佳试验条件下,当 Pb^{2+} 浓度

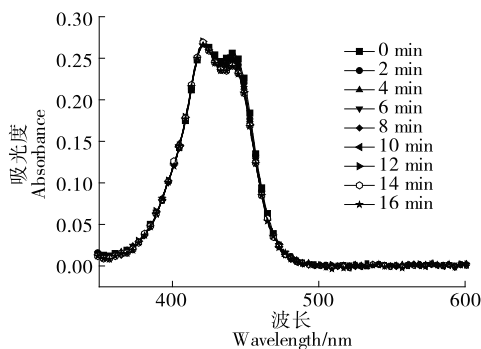


图 7 不同反应平衡时间的 Uv-vis 光谱

Figure 7 The Uv-vis spectra of the reaction equilibrium time

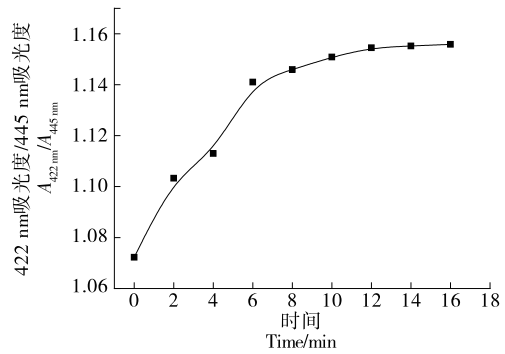


图 8 反应平衡时间对 $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ 的影响

Figure 8 Effect of reaction equilibrium time on $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$

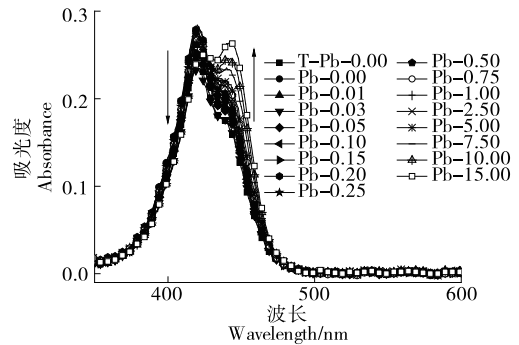


图 9 Pb^{2+} 浓度对聚集体的影响

Figure 9 Effect of increasing Pb^{2+} concentration on aggregates

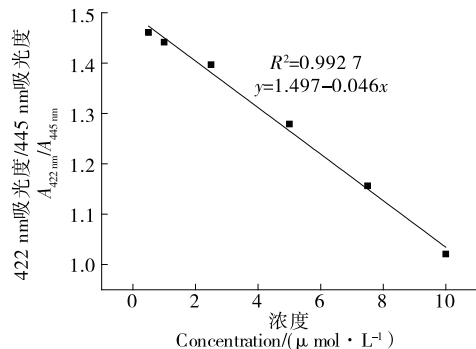


图 10 $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ 与 Pb^{2+} 浓度的关系

Figure 10 The illustration is the relationship between $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ and Pb^{2+} concentration

为 $0.25 \sim 10.00 \mu\text{mol/L}$ 时, $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ 与铅离子浓度呈良好的线性关系,校正曲线方程为 $y = 1.497 - 0.046x$,检出限为 $0.115 \mu\text{mol/L}$ 。

2.5 特异性

为了验证此方法的特异性,一共选择了 11 种金属离子 (Pb^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} 和 Fe^{3+} 母液浓度为 $500 \mu\text{mol/L}$,工作液浓度为 $7.5 \mu\text{mol/L}$) 在最优条件下进行试验(图 10)。将每种离子测得的 $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ 比值作对比(图 11),与其他金

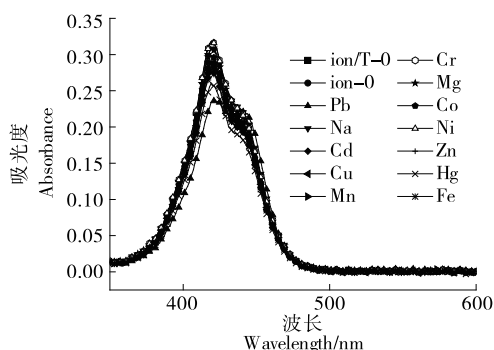


图 11 体系中加入不同金属离子的 Uv-vis 光谱
Figure 11 The Uv-vis spectra of different metal ions added to the system

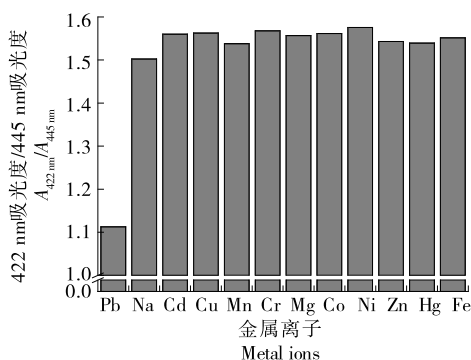


图 12 Dye2/T30695 体系对 Pb^{2+} 的特异性影响
Figure 12 The specificity of Dye2/T30695 system for Pb^{2+}

属离子相比,加入铅离子的 $A_{422\text{ nm}}/A_{445\text{ nm}}$ 显著下降,且差异最大,表明此方法具有良好的 Pb^{2+} 特异性。虽然 T30695 序列中含有碱基 T,但是 Hg^{2+} 离子没有产生较大干扰,可能是没有形成 T-Hg-T 的双链构型^[27]。研究^[28]表明, K^+ 可诱导 T30695 形成 G-四链体,尤其是低浓度下也可形成 G-四链体。试验发现 K^+ 的干扰显著降低。

2.6 回收率试验

为了测试噻菁染料 Dye2 的潜在应用能力,用该方法进行了回收率试验,结果见表 1。由表 1 可知,当加标量为 2,4,5,7 $\mu\text{mol/L}$ 时,实际测试的样品浓度与加入量的浓度差值较小,回收率为 93.5%~101.4%, $RSD < 7\%$,具有较好的准确度和回收率,表明所建立的方法可用于自来水中铅离子检测。

3 结论

研究建立了一种基于噻菁染料 Dye2-适配体 T30695 快速、高灵敏度、高特异性检测重金属铅离子的方法,此方法的检出限为 $0.115\ \mu\text{mol/L}$,加入铅离子后仅用 6 min 即可使反应达到平衡,从而实现快速高效的检测水中铅离子。由于自来水中含有一定的钾离子且适配体对其

表 1 自来水中的 Pb^{2+} 回收率

Table 1 The recovery results of Dye2 with addition of different concentrations of Pb^{2+} in tap water ($n=3$)

| 加标量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ | 测试量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ | 回收率/% | RSD/% |
|--|--|-------|-------|
| 2 | 2.028 | 101.4 | 6.02 |
| 4 | 3.985 | 99.6 | 5.98 |
| 5 | 4.973 | 99.5 | 2.34 |
| 7 | 6.543 | 93.5 | 2.01 |

响应,因此需对自来水进行倍比稀释以降低背景干扰。试验所建立的方法在实际样品检测过程中可满足高浓度铅离子($>23.8\ \text{mg/L}$)的检测需求,后续可通过构建双链体系来降低钾离子的干扰,同时提高其检测限。

参考文献

- [1] RABINOWITZ M B, WETHERILL G W, KOPPLE J D. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans[J]. Journal of Clinical Investigation, 1976, 58(2): 260-270.
- [2] WANG Hui-li, CHEN Xiang-tao, YANG Bin, et al. Case-control study of blood lead levels and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese children [J]. Environmental Health Perspectives, 2008, 116(10): 1 401-1 406.
- [3] GODWIN H A. The biological chemistry of lead[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5(2): 223-227.
- [4] VERSTRAETEN S V, AIMO L, OTEIZA P I. Aluminium and lead: Molecular mechanisms of brain toxicity[J]. Archives of Toxicology, 2008, 82(11): 789-802.
- [5] 李加兴, 陈奇, 陈双平, 等. 铅对儿童健康的危害及猕猴桃促进排铅机理[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 38-40.
- [6] ZHANG Jin, TANG Ying, TENG Liu-mei, et al. Low-cost and highly efficient DNA biosensor for heavy metal ion using specific DNAzyme-modified microplate and portable glucometer-based detection mode[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 68: 232-238.
- [7] 杨依锦, 王俊平, 王津, 等. 重金属铅酶联免疫检测方法的研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 80-83.
- [8] 黄冰玲, 张丽平. 原子吸收分光光度法测工业废水中重金属的含量[J]. 山东化工, 2010, 39(11): 51-53.
- [9] 王志嘉, 尤海丹, 吴志刚. 微波消解-原子荧光光谱法测定中药材中铅、镉、砷、汞、铋的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(5): 388-392.
- [10] 朱影, 付文雯, 姚晓帆. 电感耦合等离子体质谱测定食盐中的铅含量[J]. 食品与机械, 2017, 33(5): 91-94.
- [11] 耿巧红, 焦培福, 李玮, 等. 石墨炉原子吸收法和双硫踪法测定铅结果的比较[J]. 山东化工, 2017, 46(12): 86-88.
- [12] 赵东江, 马松艳. 电化学分析法在食品安全检测中的应用[J]. 绥化学院学报, 2016, 36(2): 141-144.

- [13] 刘大海, 张雪妍, 冯玉沙, 等. 基于荧光素硫代酰胺类 Hg^{2+} 荧光探针的合成及在生物成像中的应用[J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(7): 1 501-1 505.
- [14] GUO Zhi-qian, NAM S W, PARK S, et al. A highly selective ratiometric near-infrared fluorescent cyanine sensor for cysteine with remarkable shift and its application in bioimaging[J]. *Chemical Science*, 2012, 3: 2 760-2 765.
- [15] 李宸葳, 林晟豪, 杜再慧, 等. 铅离子功能核酸比色生物传感器的构建及应用[J]. 分析化学, 2019, 47(9): 1 427-1 432.
- [16] DUNN M R, JIMENEZ R M, CHAPUT J C. Analysis of aptamer discovery and technology [J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2017(10): 1-16.
- [17] SHINDY H A. Fundamentals in the chemistry of cyanine dyes: A review[J]. *Dyes & Pigments*, 2017, 145: 505-513.
- [18] WANG Hong-yan, CHENG Hui, WANG Jine, et al. Selection and characterization of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Cd(II)[J]. *Talanta*, 2016, 154: 498-503.
- [19] MISHRA A, BEHERA R K, BEHERA P K, et al. Cyanines during the 1990s: A review[J]. *Chemical Reviews*, 2000, 100(6): 1 973-2 012.
- [20] TANG Ya-lin, WANG Li-xia, SUN Hong-mei, et al. Controllable cy3-MTC-dye aggregates and its applications served as a chemosensor[J]. *Dyes & Pigments*, 2015, 122: 382-388.
- [21] DENG Han, LONG Min-zhi, GANG Tian, et al. Detection of radon based on the lead-induced conformational change in aptamer T30695[J]. *Rsc Advances*, 2016(43): 37 254-37 257.
- [22] YAN Wen-peng, PENG Bi-xian. Study on synthesis and absorption spectra of thiacyanine Dyes[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 1994, 14(5): 492-498.
- [23] CHIBISOV A, ZAKHAROVA G, HELMUT G. Photoprocesses in dimers of thiacyanines [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1999(7): 1 455-1 460.
- [24] ATABEKYAN L S, CHIBISOV A K. Photoprocesses in aqueous solutions of 9-ethylthiacyanine dyes in the presence of surfactants[J]. *High Energy Chemistry*, 2007, 41(2): 91-96.
- [25] SLAVNOVA T D, CHIBISOV A K, GÖRNER H. Photoprocesses of thiacyanine monomers, dimers, and aggregates bound to polyanions[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2002, 106(46): 10 985-10 990.
- [26] CHIBISOV A K, ZAKHAROVA G V, HELMUT G. Photoprocesses of thiamonomethinecyanine monomers and dimers[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2001, 3(1): 44-49.
- [27] 黄亚飞, 闫娇, 陈爱亮, 等. 核酸适配体在 Hg^{2+} 检测中的应用[J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 286-295.
- [28] LI Tao, LI Bing-ling, WANG Er-kang, et al. G-quadruplex-based DNzyme for sensitive mercury detection with the naked eye[J]. *Chemical Communications*, 2009(24): 3 551-3 553.
- (上接第 72 页)
- [13] 朱海滨, 王柱石, 胡战军, 等. 打叶复烤过程中烘烤调香烟叶香味成分及感官质量的变化研究[J]. 河南农业大学学报, 2018, 52(5): 671-676.
- [14] 华一崑, 汪显国, 袁逢春, 等. 打叶复烤对模块烟叶致香成分和感官质量的影响[J]. 江西农业学报, 2012, 24(6): 120-125.
- [15] LONG Ming-hai, HUA Yi-kun, WANG Xian-guo, et al. Effect of different combined moistening and redrying treatments on the physicochemical and sensory capabilities of smoking food tobacco material [J]. *Drying Technology*, 2018, 36(1): 52-62.
- [16] 胡有持, 牟定荣, 王晓辉, 等. 云南烤烟复烤片烟自然陈化时间与质量关系的研究[J]. 中国烟草学报, 2004, 10(4): 1-7.
- [17] 闫克玉, 赵铭钦. 烟草原科学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 469-528.
- [18] 刘红光, 胡玲, 赵斌, 等. 初烤、复烤烟叶协同醇化对烟叶品质的影响[J]. 烟草科技, 2017, 50(7): 31-39.
- [19] 武德传, 周冀衡, 李章海, 等. 复烤片烟醇化过程中几种化合物含量及相关酶活性的变化[J]. 中国烟草科学, 2010, 31(3): 78-81.
- [20] 宋鹏飞, 王萝萍, 钱颖颖, 等. 不同产地、品种、仓储地点烤烟片烟陈化中化学成分的变化[J]. 西南农业学报, 2018, 31(3): 488-493.
- [21] 李力, 李东亮, 罗诚, 等. 不同醇化时间烤烟中多酚的质量分数变化趋势研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(4): 19-24.
- [22] 闫铁军. 不同产区烤烟配方模块在醇化过程中质量的变化趋势及醇化周期研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009: 25-35.
- [23] 卢幼祥, 徐其敏, 杨波, 等. 基于正交设计的皖南烟叶叶片复烤工艺参数优化研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(27): 218-219, 224.
- [24] 史宏志, 刘国顺. 烟草香味学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 50-86.
- [25] 于存峰, 张峻松, 闫洪洋, 等. 烟草中多酚类化合物研究进展[J]. 河南农业科学, 2008(4): 10-14.
- [26] 朱小茜, 耿明, 鲁红侠. 云南烤烟标样烟叶中多酚类化合物与等级的关系[J]. 合肥师范学院学报, 2008(6): 102-103.
- [27] 宗浩, 王洪云, 陈刚, 等. 大理红大品种不同等级烟叶主要化学成分和多酚类物质分析[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(4): 22-27.