

核酸适配体在食品危害物多靶标检测中的应用进展

Recent advances in simultaneous detection of food hazards based on aptasensor

高林晨萌¹ 叶 华¹ 黄圣博¹ 李占明¹

GAO Lin-chen-meng¹ YE Hua¹ HUANG Sheng-bo¹ LI Zhan-ming¹

郭元新¹ 李 超² 王周平³

GUO Yuan-xin¹ LI Chao² WANG Zhou-ping³

(1. 江苏科技大学粮食学院, 江苏 镇江 212004; 2. 江苏雨润肉食品有限公司肉品加工与
质量控制国家重点实验室, 江苏 南京 211806; 3. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. School of Grain Science and Technology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212004, China; 2. State Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Yurun Group, Nanjing, Jiangsu 211806, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:文章总结了已报道筛选获得的致病菌、生物毒素、抗生素、兽药、农药、重金属等食品危害物核酸适配体现状,重点综述了近年来利用核酸适配体技术实现食品危害物多靶标检测研究进展,并展望了其未来发展方向。

关键词:核酸适配体;食品危害物;多靶标;同时检测

Abstract: The aptamers used for screening various food hazards, such as pathogens, biotoxins, antibiotics, veterinary drugs, pesticides, heavy metal ions and so on, was firstly introduced in this review, and then the advances in simultaneous detection of these food hazards based on aptasensor were summarized. Finally, the future prospects were discussed in the perspectives section.

Keywords: aptamer; food hazards; multiple targets; simultaneous detection

食品危害物是引发食品安全问题的主要因子,是指食品在生产加工过程中因质量控制不到位而产生的可能导致疾病或伤害的生物性、化学性或物理性因子,包括致病菌、生物毒素、农药兽药残留、重金属以及非法添加物等。目前对这些食品危害物检测方法主要有生物鉴定法、色

谱法、免疫分析法等^[1-2],这些方法各有优缺点和适用范围,比如生物鉴定法需要进行微生物培养,检测耗时长;色谱法不仅仪器昂贵、前处理繁琐,而且对操作人员技术要求较高;免疫分析法所使用的抗体制备难且容易变性,同时难以应用于无免疫原性的靶标检测^[3-4]。近年来,核酸适配体的出现为食品危害物检测技术开辟了一条新途径。核酸适配体是可以通过指数富集的配体系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)体外筛选获得的单链 DNA 或 RNA 功能序列,它们能特异性结合各种靶标,小到 Hg^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子,大到细胞甚至细菌^[5]。由于其具有合成成本低、亲和力高、特异性强等特点,在食品安全检测^[6]、生物医学分析^[7]、疾病诊断^[8]等方面具有广阔的应用前景。

随着人们对食品安全问题的关注,以核酸适配体为分子探针构建的分析检测方法在食品危害物检测方面得到了广泛应用,尤其是在致病菌、生物毒素、重金属等食品危害物单靶标方面的分析检测。单靶标检测技术针对性强,由于无需考虑其他靶标的影响,一般来说试验设计简单,很受研究工作者欢迎。然而很多食品危害物如沙门氏菌、大肠埃希氏菌等致病菌,黄曲霉毒素 B₁、赭曲霉毒素 A 等真菌毒素并不是单独存在于某一食品或食品原料中,实际上多是同时共存。因此,单一的危害物靶标检测有可能顾此失彼,难以全面评价食品的安全性,多靶标同时检测是未来检测技术发展的必然趋势。尽管可以通过多次单靶标检测进行安全监测和分析,但这样的检测方式耗时长,有可能有潜在危害的食品或食品原料已进

基金项目:江苏省自然科学基金面上项目(编号: BK20201452);
国家自然科学基金面上项目(编号: 31871881);南京市浦口区社会事业科技发展计划项目(编号: S2020-17);
江苏省高等学校大学生创新创业训练计划一般项目(编号: 202010289039Y)

作者简介:高林晨萌,女,江苏科技大学在读本科生。

通信作者:叶华(1981—),男,江苏科技大学副教授,工学博士。

E-mail: huaye@just.edu.cn

收稿日期:2020-12-07

入流通市场或人们的消费餐桌上,造成食源性疾病事件的发生。另外多次单靶标检测取样用量多、经济成本高,容易造成资源浪费,增加食品安全监管成本。因此,多靶标同时检测具有良好的时效性、经济型和高效性。近年来相关研究报道逐年增多,然而目前尚未有基于核酸适配体技术的食品危害物多靶标同时检测技术的相关综述报道。基于此,文章拟对近年来利用核酸适配体技术实现食品危害物如致病菌、毒素、重金属离子的多靶标检测研究进展进行总结,以期今后开发基于核酸适配体技术的高灵敏、高通量多靶标快速检测方法和产品提供借鉴和指导,继而推动核酸适配体在食品安全检测领域方面的发展。

1 食品危害物核酸适配体现状

自 20 世纪 90 年代 Tuerk 等^[9]和 Ellington 等^[10]报道核酸适配体技术以来,经过 30 年的发展,广大科研工作者开发了很多新的核酸适配体筛选技术,获得上千种靶标物质的核酸适配体。在食品安全领域,致病菌、生物毒素、农兽药、重金属离子等危害物受到广泛关注,已通过建立的各种筛选方法筛选获得并得到应用。表 1 列举了已报道筛选或应用的各类食品危害物核酸适配体情况。由表 1 可以看出,自 2008 年以来,至今已有 60 余个食品危害物核酸适配体被报道成功筛选获得,主要为生物毒素、抗生素、致病菌、重金属和农残兽残等几大类,且大多都是 ssDNA 核酸适配体,仅有大肠埃希氏菌 O157、妥布霉素、达氟沙星、环丙沙星、孔雀石绿 5 种危害物筛选过 RNA 核酸适配体。这主要是由于 ssDNA 比 RNA 相对稳定,在生物传感器开发和应用上更受青睐。从序列长度来看,致病菌、生物毒素等大分子危害物核酸适配体序列基本上都是在 80 bp 左右,即是从筛选文库中直接筛选获得的。而抗生素、重金属离子、有机磷农药等小分子危害物核酸适配体序列长度大多经过截短优化,缩短为 21~66 bp,优化后其仍然具有较好的亲和性和特异性,有利于其生物传感器性能的提升和经济成本的降低^[70]。

2 食品危害物多靶标同时检测

2.1 致病菌多靶标同时检测

主要的食源性致病菌如金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单增李斯特菌和致病性大肠埃希氏菌等,目前已有利用核酸适配体作为分子探针,构建了对多种致病菌的同时检测方法,效果良好。如 Zhang 等^[71]基于核酸适配体特异性识别技术和纳米离子增强拉曼信号原理,构建了对鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌进行同时检测的拉曼核酸适配体生物传感器,最低检测限分别达 15, 35 CFU/mL。Li 等^[72]也采用表面增强拉曼技术和金纳米棒建立了大肠埃希氏菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌

的同时检测。这个生物传感器的设计策略是适配体不仅作为生物识别分子,还和拉曼报告分子一起诱导金纳米棒生长成特定的形状从而增强拉曼信号实现灵敏检测。Wang 等^[73]则将鼠伤寒沙门氏菌核酸适配体和金黄色葡萄球菌核酸适配体分别标记在 NaGdF₄:Eu 和 NaYF₄:Ce/Tb 两种掺镧时间分辨荧光纳米颗粒上作为信号探针,以 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒固定化的核酸适配体作为捕获探针,在同一波长的激发光下进行激发,产生不重叠的发射光谱,从而实现了鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的核酸适配体同时检测技术。通过优化试验条件,检测限分别达 15, 20 CFU/mL,且在 10²~10⁵ 范围内具有很好的线性关系,在实际样品检测中与平板计数法结果具有较好的一致性。

除两种致病菌同时检测之外, Lu 等^[74]基于双适配体夹心模型设计了一种核酸适配体测流试纸条,实现了鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌 3 种致病菌的同时检测,检测原理如图 1 所示。但该方法灵敏度相对较低,其 LOD 分别达 10³, 10⁴, 10⁴ CFU/mL。由此可见,两种以上的致病菌多靶标检测由于标记的多样性和体系的复杂性,其检测难度加大,检测限下降明显,还有提升的空间。

2.2 生物毒素多靶标同时检测

生物毒素是引发食品安全问题的主要因素之一。生物毒素按其来源可分为细菌毒素、真菌毒素、动物毒素、植物毒素、海洋生物毒素等,种类繁多、分布广泛,通常以某种高特异性方式作用于离子通道、酶、受体、基因等靶位,其中微生物毒素不仅影响范围广,而且危害极大。目前已报道筛选获得的生物毒素类核酸适配体有金黄色葡萄球菌肠毒素核酸适配体、黄曲霉毒素 B₁ 核酸适配体、赭曲霉毒素 A 核酸适配体、T-2 毒素核酸适配体、微囊藻毒素等,这些毒素核酸适配体筛选的获得为它们的多靶标检测技术的构建奠定了良好的基础。Huang 等^[75]则利用筛选获得的金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B 和 C₁ 核酸适配体分别作为识别探针,以互不干扰的多色镧系掺杂纳米颗粒为信号探针,利用氧化石墨烯作为荧光猝灭剂构建了基于多色时间分辨荧光共振能量转移的检测技术,实现了 3 种肠毒素的同时检测,其检测限分别达 0.062, 0.069, 0.040 ng/mL,具有较好的灵敏性和高通量特点。

然而目前生物毒素多靶标检测报道较多的还是两种靶标的同时检测,且其检测灵敏度明显高于 3 种毒素的同时检测。如王成全^[76]将赭曲霉毒素 A 和伏马菌素 B₁ 核酸适配体偶联量子点形成纳米生物复合物,建立了基于 SiO₂@CdTe 和 SiO₂@PbS 为标记物的电化学核酸适配体生物传感器实现了玉米样品中两种真菌毒素的同时检测,最低检测限分别达 5, 20 pg/mL。Qian 等^[77]利用核酸适配体构建了一种磁控荧光生物传感器实现了赭

曲霉毒素 A 和黄曲霉毒素 B₁ 的同时检测,检测原理如图 2 所示。不仅检测线性范围宽,而且检测限达到皮克数量级,分别达 0.67,1.70 pg/mL。Wang 等^[78]将玉米赤霉烯酮核酸适配体和赭曲霉毒素 A 核酸适配体分别标记 Cy3 和 Alexa Fluor488 荧光基团作为分子探针,设计了一种基于氧化石墨烯的核酸适配体生物传感器,实现了两种毒素的同时检测,最低检测限分别达 1.797,

1.484 ng/mL。综上,利用荧光标记技术在生物毒素同时检测方面应用更为常见,主要是利用在不同的核酸适配体分子上标记不同的荧光分子构建相应的检测方法从而实现检测,但是荧光标记一定程度上增加了检测成本。

2.3 农兽药残留多靶标同时检测

在农作物生产和畜产养殖过程中,为了保证其良好生长和健康成长,通常要使用农药和兽药,因此农兽药残

表 1 已报道的食品危害物核酸适配体情况
Table 1 List of the reported aptamers of food hazards

危害物类别	具体靶标	适配体类型	序列长度/bp	参考文献	危害物类别	具体靶标	适配体类型	序列长度/bp	参考文献
致病菌	弯曲杆菌	ssDNA	59	[11]	抗生素及兽药	恩诺沙星	ssDNA	95	[38]
	大肠埃希氏菌 O157:H7	RNA	65	[12]		氯霉素	ssDNA	79	[39]
	坂崎肠杆菌	ssDNA	80	[13]		苜蓿霉素	ssDNA	60	[40]
	副溶血弧菌	ssDNA	80	[14]		链霉素	ssDNA	80	[41]
	鼠伤寒沙门氏菌	ssDNA	80	[14]		环丙沙星	RNA	84	[42]
	链球菌	ssDNA	80	[15]		地塞米松	ssDNA	59	[43]
	单增李斯特菌	ssDNA	81	[16]		磺胺二甲嘧啶	ssDNA	96	[44]
	志贺氏菌	ssDNA	80	[17]		磺胺喹啉	ssDNA	38	[45]
	赭曲霉毒素 A	ssDNA	76	[18]		有机磷农药	ssDNA	55	[46]
	麦角生物碱	ssDNA	80	[19]	农药	敌蚜胺	ssDNA	66	[47]
生物毒素	玉米赤霉烯酮	ssDNA	80	[20]		多菌灵	ssDNA	58	[48]
	伏马菌素 B ₁	ssDNA	80	[21]		Zn ²⁺	ssDNA	61	[49]
	T ₂ 毒素	ssDNA	80	[22]		As ³⁺	ssDNA	99	[50]
	金黄色葡萄球菌肠毒素 C ₁	ssDNA	80	[23]		Cd ²⁺	ssDNA	68	[51]
	内毒素	ssDNA	75	[24]		Hg ²⁺	ssDNA	51	[52]
	金黄色葡萄球菌肠毒素 B	ssDNA	80	[25]		Cu ²⁺	ssDNA	51	[52]
	棒曲霉素	ssDNA	80	[26]		Pb ²⁺	ssDNA	51	[53]
	大田软海绵酸	ssDNA	80	[27]		Sr ²⁺	ssDNA	16	[54]
	微囊藻毒素 RR	ssDNA	80	[28]		Ag ⁺	ssDNA	12	[55]
	霍乱毒素	ssDNA	76	[29]	重金属	β-蓝豆蛋白	ssDNA	93	[56]
抗生素及兽药	金黄色葡萄球菌肠毒素 A	ssDNA	82	[30]		花生过敏原 Ara h 1	ssDNA	80	[57]
	软骨藻酸	ssDNA	80	[31]		醇溶蛋白	ssDNA	49	[58]
	河豚毒素	ssDNA	80	[31]		β-乳球蛋白	ssDNA	58	[59]
	石房哈毒素	ssDNA	76	[32]		孔雀石绿	RNA/ssDNA	26/38	[60—61]
	四环素类 (OTC、TET、DOX)	ssDNA	76	[33]		双酚 A	ssDNA	60	[62]
	卡那霉素	ssDNA	21	[34]		可卡因	ssDNA	89	[63]
	妥布霉素	RNA	27	[35]		三聚氰胺	ssDNA	80	[64]
	氨基青霉素	ssDNA	21	[36]		盐酸克伦特罗	ssDNA	80	[65]
	达氟沙星	RNA	36	[37]		莱克多巴胺	ssDNA	80	[66]
						苏丹红 III	ssDNA	84	[67]
非法添加物及其他						精胺	ssDNA	80	[68]
						组胺	ssDNA	90	[69]

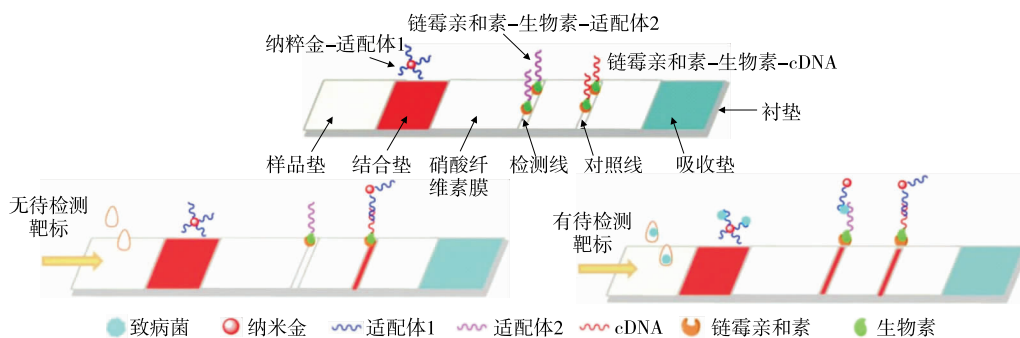
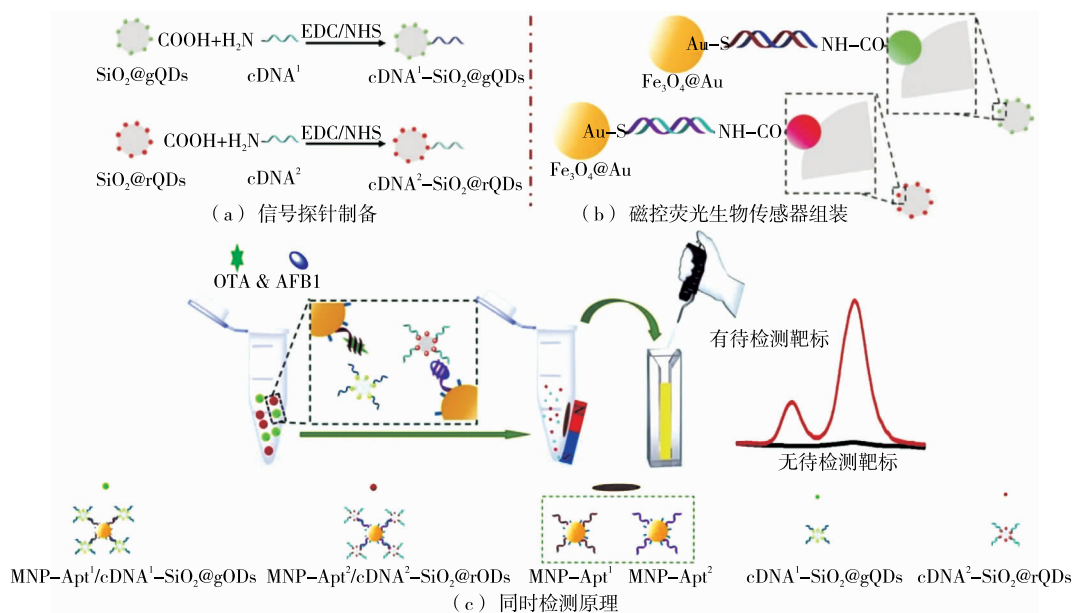
图 1 构建核酸适配体测试纸条实现 3 种致病菌同时检测原理图^[74]

Figure 1 Schematic illustration of aptamer-based lateral flow test strip for the simultaneous detection of three types of pathogens

图 2 磁控荧光生物传感器同时检测 OTA 和 AFB₁ 设计原理图^[77]Figure 2 Schematic illustration of the simultaneous detection of OTA and AFB₁

留在农产品、畜产品中较为常见。中国是农业大国,农兽药残留是食品安全监督管理部门重点监测方向之一。农兽药分子的核酸适配体筛选目前报道将近 20 种(见表 1),以它们为分子探针开发的同时检测技术报道近年来逐渐增多。如周佳伟^[79]基于核酸适配体识别和量子点技术构建了一种荧光生物传感器用于卡那霉素和妥布霉素的同时检测,最低检测限分别为 0.11, 0.21 mg/L,并成功应用于牛奶产品中的卡那霉素和妥布霉素残留检测。王叶^[80]结合荧光法和微流控方法构建了一种新型的适配体生物传感器用于同时检测卡那霉素和氯霉素残留,经优化试验条件,其最低检测限分别为 0.7, 0.9 pg/mL。

除了利用多条核酸适配体实现多靶标同时检测之外,人们还通过改进筛选技术或裁剪优化序列获得广谱型核酸适配体,用于同一类危害物分子的同时检测。如 Kwon 等^[70]对长度 76 bp 的土霉素 OTC 核酸适配体进行

一级结构序列同源性分析,获得保守序列并对其加以优化最终获得一条长 8 bp 的广谱型四环素类核酸适配体,它能同时识别四环素、土霉素、脱氧土霉素、氯四环素 4 种抗生素,并以此为分子探针构建了超灵敏比色法实现了多种抗生素的同时检测,检测原理如图 3 所示。该方法的最低检测限达 0.1 nmol/L。而 Zhang 等^[81]通过裁剪、突变等手段设计了一种有机磷农药的广谱适配体,并结合分子信标技术实现了对 4 种有机磷农药(甲拌磷、丙溴磷、水胺硫磷和氧化乐果)的同时检测。这些通过下游工程改造核酸适配体分子探针为广谱型探针,实现了一个核酸适配体分子探针能同时识别多个危害物靶标,在定性分析中具有较好的应用前景。

2.4 重金属多靶标同时检测

随着工业化进程的加快发展,工业三废给生态环境带来严重危害,尤其是汞、镉、砷、铅等的排放不仅污染了

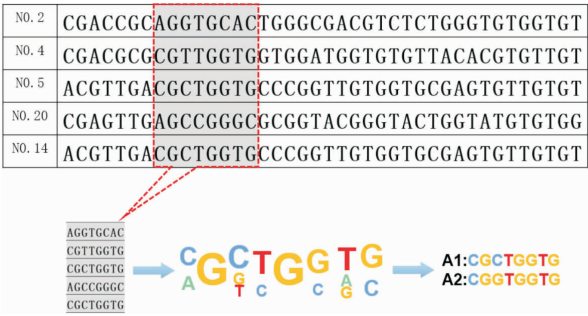


图3 四环素类广谱型核酸适配体设计原理图
Figure 3 Schematic illustration of the design of tetracyclines broad spectrum aptamers

土壤、水资源,还对其周围种植养殖的农作物、畜产品及水产品等带来危害,进而通过食物链进入人体,可能聚集于某些器官造成慢性中毒,对人类健康危害极大^[82]。目前汞、镉、砷、铅等重金属的核酸适配体均已成功筛选并报道,因此,基于核酸适配体的多种重金属同时检测方法相应受到关注。如 Wu 等^[83]引入双色上转换荧光纳米颗粒构建了一种可控的金纳米材料为荧光能量受体的双重荧光共振能量转移检测体系,实现了 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的同时检测,其检测限分别为 50, 150 pmol/L。Khoshbin 等^[55]开发了一种简单易行、快速灵敏的纸基核酸适配体传感器,可在 10 min 内完成 Hg^{2+} 和 Ag^{+} 的同时检测,其检测限分别低至 1.33, 1.01 pmol/L,且成功应用于水、牛奶等实际样品的分析检测。周羽婷等^[54]用 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Sr^{2+} 离子核酸适配体作为分子探针,根据核酸结构转换原理,结合纳米孔膜技术开发了一种新型高灵敏电化学传感器,实现了 3 种金属离子的分步同时检测。该电

化学传感器具有优秀的灵敏性和选择性,最低检测限分别达 0.013, 0.017, 0.022 nmol/L。

2.5 非同类型危害物多靶标同时检测

除了同一类型危害物多靶标的同时检测技术外,还有学者报道了不同类型食品危害物混合多靶标同时检测技术。这种不同类型危害物多靶标同时检测体系可能更复杂,但是更能适应实际需求。如 Yan 等^[84]利用 Fe_3O_4 和 SiO_2 纳米颗粒作为载体,将赭曲霉毒素 A 适配体和 ATP 适配体通过非共价键方式固定在纳米颗粒上,建立了一种发光化学分析法,实现了啤酒样品中赭曲霉毒素 A 和 ATP 的同时检测。该检测方法线性范围宽,回收率好,最低检测限分别达 9.02, 9.31 nmol/L。除了两种不同类型危害物同时检测外, Jin 等^[85]还设计了 3 种不同类型危害物的同时检测方法,将 Hg^{2+} 、赭曲霉毒素 A 和沙门氏菌核酸适配体分别标记在不同上转换纳米材料上,构建了一种测流适配体分析技术,并结合智能手机开发了一种便携式检测设备,该方法灵敏特异、操作方便,可满足现场快速检测要求,其最低检测限分别为 5 ng/mL, 3 ng/mL 和 85 CFU/mL,进一步研究表明其可在 30 min 内完成水样中 3 种危害物的同时检测。He 等^[86]则将卡那霉素、黄曲霉毒素 M_1 和 17β -雌二醇 3 种核酸适配体分子探针组装到磁性纳米颗粒上,建立了一种微流控芯片技术实现了多靶标同时检测,检测原理如图 4 所示。最低检测限分别达 0.32, 0.95, 6.80 pg/mL。该微流控芯片不仅解决了复杂基质的干扰问题,还极大地增强了检测的灵敏性和选择性,而且检测性能稳定,耗时短,3 min 即能实现牛奶样品中卡那霉素、黄曲霉毒素 M_1 和 17β -雌二醇 3 种靶标的同时检测。

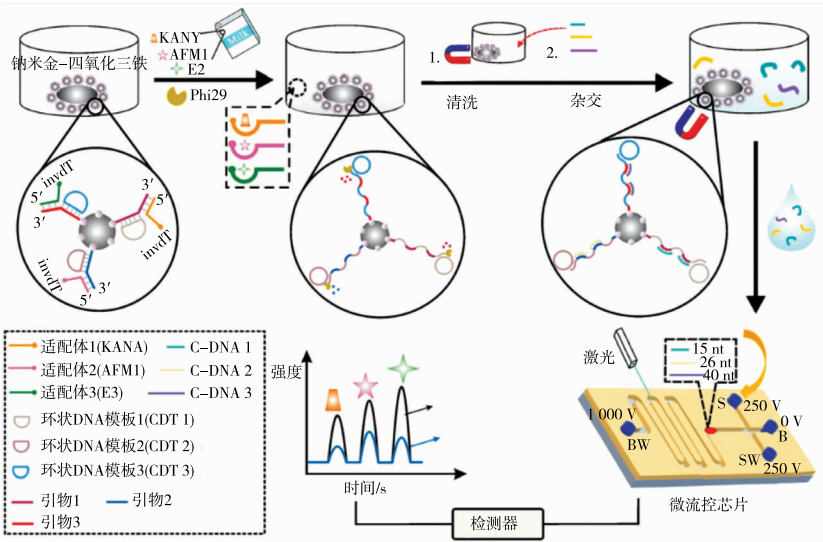


图4 基于磁纳米三元 DNA 分子探针的微流控芯片同时检测卡那霉素、黄曲霉毒素 M_1 和 17β -雌二醇原理图^[86]
Figure 4 Schematic illustration of method for simultaneous determination of kanamycin, aflatoxin M_1 , and 17β -estradiol

3 展望

综上所述,核酸适配体作为分子探针在食品安全检测研究领域的应用已取得了一定的成果,多靶标高通量检测技术的开发是未来发展必然趋势。结合当前研究开发现状和未来实际应用需求,基于核酸适配体技术的食品危害物生物传感器的研发还需在以下 4 个方面加强研究:① 要进一步加大单靶标检测向多靶标同时检测转变的力度,结合新兴的科学技术进行学科和技术交叉融合,开发更多、更灵敏、更快速而准确的高通量检测方法,其中微流控芯片是未来重点发展的方向之一;② 要进一步通过截短、裁剪等方式优化核酸适配体序列,在获得性能更好的分子探针基础上,短序列不仅有利于多靶标同时检测生物传感器的设计还有利于降低经济成本;③ 要进一步拓宽多靶标食品危害物检测方法范围,当前主要以荧光法为主,核酸适配体需要进行荧光标记,这在一定程度上增加了检测成本,因此免标记的同时检测方法具有较好的开发和应用前景;④ 要进一步加强快速、灵敏、便携的检测设备的研发,可利用大数据技术、可视化技术、人工智能技术等开发基于核酸适配体分子探针的现场快速检测设备,以满足实际应用需求。相信随着科技的不断发展和广大科研工作者的不懈努力,基于核酸适配体的高灵敏、高通量的多靶标快速检测技术必将迎来美好的春天。

参考文献

- [1] 吴有雪, 吴美娇, 田亚晨, 等. 沙门氏菌检测生物传感器研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 339-345.
- [2] XIONG Zheng-wei, WANG Qiang, XIE Yue-jie, et al. Simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in food samples by dual DNA tweezers nanomachine [J]. Food Chem, 2021, 338: 128122.
- [3] FU Ling-lin, QIAN Yi-fan, ZHOU Jin-ru, et al. Fluorescence-based quantitative platform for ultrasensitive food allergen detection: From immunoassays to DNA sensors [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(6): 3 343-3 364.
- [4] 陈婷婷, 王鑫, 陶晓奇. 基于特异性识别生物探针检测食品中雌激素残留研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 221-225.
- [5] 张辉, 叶华, 吴世嘉, 等. 核酸适配体及其在食品安全领域中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(10): 194-199.
- [6] 黄玉坤, 陶璇, 邵坤, 等. 基于适配体杂交链式反应检测郫县豆瓣中黄曲霉毒素 B₁ [J]. 食品科学, 2020, 41(22): 301-307.
- [7] KORDASHT H K, HASANZADEH M. Aptamer based recognition of cancer cells: Recent progress and challenges in bioanalysis[J]. Talanta, 2020, 220: 121436.
- [8] SOLHI E, HASANZADEH M. Critical role of biosensing on the efficient monitoring of cancer proteins/biomarkers using label-free aptamer based bioassay[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 110849.
- [9] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA Polymerase[J]. Science, 1990, 249: 505-510.
- [10] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346: 818-822.
- [11] STRATIS-CULLUM D N, MCMASTERS S, PELLEGRINO P M. Evaluation of relative aptamer binding to *Campylobacter jejuni* Bacteria using affinity probe capillary electrophoresis[J]. Anal Lett, 2009, 42(15): 2 389-2 402.
- [12] LEE Y J, HAN S R, MAENG J S, et al. In vitro selection of *Escherichia coli* O157:H7-specific RNA aptamer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 417(1): 414-420.
- [13] 韩晓晓. 阪崎肠杆菌适配体制备及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 27-33.
- [14] DUAN Nuo, WU Shi-jia, YU Ye, et al. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 804: 151-158.
- [15] 王鑫. 链球菌适配体制备及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 30-40.
- [16] SUH S H, JAYKUS L A. Nucleic acid aptamers for capture and detection of *Listeria spp*[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(4): 454-461.
- [17] GONG Wen-hui, DUAN Nuo, WU Shi-jia, et al. Selection, identification, and application of dual DNA aptamers against *Shigella sonnei* [J]. Anal Methods, 2015, 7(8): 3 625-3 631.
- [18] BARTHELMEBS L, JONCA J, HAYAT A, et al. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine[J]. Food Control, 2011, 22(5): 737-743.
- [19] ROUAH-MARTIN E, MEHTA J, VAN DORST B, et al. Aptamer-based molecular recognition of lysergamine, metergoline and small ergot alkaloids[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(12): 17 138-17 159.
- [20] CHEN Xiu-juan, HUANG Yu-kun, DUAN Nuo, et al. Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone[J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(20): 6 573-6 581.
- [21] CHEN Xiu-juan, HUANG Yu-kun, DUAN Nuo, et al. Selection and characterization of single stranded DNA aptamers recognizing fumonisin B₁ [J]. Microchimica Acta,

- 2014, 181(11/12): 1 317-1 324.
- [22] CHEN Xiu-juan, HUANG Yu-kun, DUAN Nuo, et al. Screening and identification of DNA aptamers against T-2 toxin assisted by graphene oxide[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(42): 10 368-10 374.
- [23] HUANG Yu-kun, CHEN Xiu-juan, DUAN Nuo, et al. Selection and characterization of DNA aptamers against *Staphylococcus aureus enterotoxin C1*[J]. Food Chemistry, 2015, 166: 623-629.
- [24] YING Guo-qing, ZHU Fang-fang, YI Yu, et al. Selecting DNA aptamers for endotoxin separation[J]. Biotechnology letters, 2015, 37(8): 1 601-1 605.
- [25] CH MOJTABA H, AMANI J, SEDIGHIAN H, et al. Isolation of a new ssDNA aptamer against staphylococcal enterotoxin B based on CNBr-activated sepharose-4B affinity chromatography[J]. J Mol Recognit, 2016, 29(9): 436-445.
- [26] WU Shi-jia, DUAN Nuo, ZHANG Wei-xiao, et al. Screening and development of DNA aptamers as capture probes for colorimetric detection of patulin [J]. Analytical Biochemistry, 2016, 508: 58-64.
- [27] GU Hua-jie, DUAN Nuo, WU Shi-jia, et al. Graphene oxide-assisted non-immobilized SELEX of okadaic acid aptamer and the analytical application of aptasensor[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21665.
- [28] WU Shi-jia, LI Qi, DUAN Nuo, et al. DNA aptamer selection and aptamer-based fluorometric displacement assay for the hepatotoxin microcystin-RR [J]. Microchim Acta, 2016, 183(9): 2 555-2 562.
- [29] FROHNMEYER E, FRISCH F, FALKE S, et al. Highly affine and selective aptamers against cholera toxin as capture elements in magnetic bead-based sandwich ELISA[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 269: 35-42.
- [30] SEDIGHIAN H, HALABIAN R, AMANI J, et al. Staggered target SELEX, a novel approach to isolate non-cross-reactive aptamer for detection of SEA by apta-qPCR[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 286: 45-55.
- [31] GU Hua-jie, DUAN Nuo, XIA Yu, et al. Magnetic separation-based multiple SELEX for effectively selecting aptamers against saxitoxin, domoic acid, and tetrodotoxin[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(37): 9 801-9 809.
- [32] HA S J, PARK J H, LEE B, et al. Label-free direct detection of saxitoxin based on a localized surface plasmon resonance aptasensor[J]. Toxins, 2019, 11(5): 274.
- [33] NIAZI J H, LEE S J, GU M B. Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines[J]. Bioorgan Med Chem, 2008, 16(15): 7 245-7 253.
- [34] SONG K M, CHO M, JO H, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 415(2): 175-181.
- [35] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ E, DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ N, LOBO-CASTAÑÓN M J, et al. Aptamer-based inhibition assay for the electrochemical detection of tobramycin using magnetic microparticles[J]. Electroanalysis, 2011, 23(1): 43-49.
- [36] SONG K M, JEONG E, JEON W, et al. Aptasensor for ampicillin using gold nanoparticle based dual fluorescence-colorimetric methods[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(6): 2 153-2 161.
- [37] HAN S R, YU J, LEE S W. In vitro selection of RNA aptamers that selectively bind danofloxacin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 448(4): 397-402.
- [38] NI Heng-jia, ZHANG Su-xia, DING Xing-hua, et al. Determination of enrofloxacin in bovine milk by a novel single-stranded DNA aptamer chemiluminescent enzyme immunoassay[J]. Anal Lett, 2014, 47(17): 2 844-2 856.
- [39] DUAN Ye, GAO Zhi-qiang, WANG Li-hui, et al. Selection and identification of chloramphenicol-specific DNA aptamers by mag-SELEX[J]. Appl Biochem Biotech, 2016, 180(8): 1 644-1 656.
- [40] LEE A Y, HA N R, JUNG I P, et al. Development of a ssDNA aptamer for detection of residual benzylpenicillin[J]. Analytical Biochemistry, 2017, 531: 1-7.
- [41] LIU Zhong-cheng, ZHANG Yan-fen, XIE Yao, et al. An aptamer-based colorimetric sensor for streptomycin and its application in food inspection[J]. Chem Res Chinese U, 2017, 33(5): 714-720.
- [42] JAEGER J, GROHER F, STAMM J, et al. Characterization and inkjet printing of an RNA Aptamer for paper-based biosensing of ciprofloxacin [J]. Biosensors-Basel, 2019, 9(1): 7.
- [43] MEHENNAOUI S, POORAHONG S, JIMENEZ G C, et al. Selection of high affinity aptamer-ligand for dexamethasone and its electrochemical biosensor [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 6 600.
- [44] YANG Ling, NI Heng-jia, LI Cheng-long, et al. Development of a highly specific chemiluminescence aptasensor for sulfamethazine detection in milk based on in vitro selected aptamers[J]. Sensor Actuat B-Chem, 2019, 281: 801-811.
- [45] SHI Hai-xing, KOU Qi-ming, WU Ping, et al. Selection and application of DNA aptamers against sulfaquinoxaline assisted by graphene oxide-based SELEX[J/OL]. Food Analytical Methods. [2020-10-12]. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01869-2>.
- [46] WANG Li, LIU Xian-jin, ZHANG Qiang, et al. Selection of DNA aptamers that bind to four organophosphorus pesticides[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(5): 869-874.
- [47] CAO Fang-qi, LU Xin-wei, HU Xiao-long, et al. In vitro selection of DNA aptamers binding pesticide

- fluoroacetamide[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2016, 80(5): 823-832.
- [48] EISSA S, ZOUBROB M. Selection and characterization of DNA aptamers for electrochemical biosensing of carbendazim[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(5): 3 138-3 145.
- [49] RAJENDRAN M, ELLINGTON A D. Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390(4): 1 067-1 075.
- [50] KIM M, UM H J, BANG S, et al. Arsenic removal from vietnamese groundwater using the arsenic-binding DNA aptamer[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(24): 9 335-9 340.
- [51] WU Yuan-gen, ZHAN Shen-shan, WANG Lu-mei, et al. Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles[J]. *Analyst*, 2014, 139(6): 1 550-1 561.
- [52] QU Hao, CSORDAS A T, WANG Jin-peng, et al. Rapid and label-free strategy to isolate aptamers for metal ions[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7 558-7 565.
- [53] CHEN Yang, LI Hao-huan, GAO Tian, et al. Selection of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Pb(II)[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, 254: 214-221.
- [54] 周羽婷, 汤玉娇, 邵爽, 等. 构象转换型传感器对汞、铅、镉离子的同时检测[J]. *高等学校化学学报*, 2019, 40(8): 1 621-1 627.
- [55] KHOSHBIN Z, HOUSAINDOKHT M R, VERDIAN A. A low-cost paper-based aptasensor for simultaneous trace-level monitoring of mercury (II) and silver (I) ions[J]. *Analytical Biochemistry*, 2020, 597: 113689.
- [56] NADAL P, PINTO A, SVOBODOVA M, et al. DNA Aptamers against the Lup an 1 Food Allergen[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): 1-8.
- [57] TRAN D T, KNEZ K, JANSSEN K P, et al. Selection of aptamers against Ara h 1 protein for FO-SPR biosensing of peanut allergens in food matrices[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 43: 245-251.
- [58] PINTO A, POLO P N, HENRY O, et al. Label-free detection of gliadin food allergen mediated by real-time apta-PCR[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(2): 515-524.
- [59] EISSA S, ZOUBROB M. In vitro selection of DNA aptamers targeting beta-lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 91: 169-174.
- [60] WANG Hong-yan, WANG Jine, SUN Na, et al. Selection and characterization of malachite green aptamers for the development of light-up probes[J]. *Chemistry Select*, 2016, 1(8): 1 571-1 574.
- [61] NGUYEN D H, DEFINA S C, FINK W H, et al. Binding to an RNA aptamer changes the charge distribution and conformation of malachite green[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(50): 15 081-15 084.
- [62] JO M, AHN J Y, LEE J, et al. Development of single-stranded DNA aptamers for specific bisphenol a detection[J]. *Oligonucleotides*, 2011, 21(2): 85-91.
- [63] HUANG Jin, CHEN Yan, YANG Liu, et al. Amplified detection of cocaine based on strand-displacement polymerization and fluorescence resonance energy transfer[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 28(1): 450-453.
- [64] GU Chun-mei, LAN Tian, SHI Han-chang, et al. Portable detection of melamine in milk using a personal glucose meter based on an in vitro selected structure-switching aptamer[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(15): 7 676-7 682.
- [65] DUAN Nuo, GONG Wen-hui, WU Shi-jia, et al. Selection and application of ssDNA aptamers against clenbuterol hydrochloride based on ssDNA library immobilized SELEX[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(8): 1 771-1 777.
- [66] DUAN Nuo, GONG Wen-hui, WU Shi-jia, et al. An ssDNA library immobilized SELEX technique for selection of an aptamer against ractopamine[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 961: 100-105.
- [67] WANG Ying, LI Jie, QIAO Pu, et al. Screening and application of a new aptamer for the rapid detection of sudan dye III[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2018, 120(6): 1700112.
- [68] TIAN Hui-li, DUAN Nuo, WU Shi-jia, et al. Selection and application of ssDNA aptamers against spermine based on capture-SELEX[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1 081: 168-175.
- [69] HO L S, FOGEL R, LIMSON J L. Generation and screening of histamine-specific aptamers for application in a novel impedimetric aptamer-based sensor[J]. *Talanta*, 2020, 208: 120474.
- [70] KWON Y S, AHMAD RASTON N H, GU M B. An ultra-sensitive colorimetric detection of tetracyclines using the shortest aptamer with highly enhanced affinity[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(1): 40-42.
- [71] ZHANG Hui, MA Xiao-yuan, LIU Ying, et al. Gold nanoparticles enhanced SERS aptasensor for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 74: 872-877.
- [72] LI Yu-zhi, LU Chang, ZHOU Shuai-shuai, et al. Sensitive and simultaneous detection of different pathogens by surface-enhanced Raman scattering based on aptamer and Raman reporter co-mediated gold tags[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2020, 317: 128182.
- [73] WANG Xiao-le, HUANG Yu-kun, WU Shi-jia, et al. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* using multicolor time-resolved

- fluorescence nanoparticles as labels [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 172-179.
- [74] LU Chun-xia, GAO Xiao-xu, CHEN Ya, et al. Aptamer-based lateral flow test strip for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* [J]. Anal Lett, 2020, 53(4): 646-659.
- [75] HUANG Yu-kun, ZHANG Hui, CHEN Xiu-juan, et al. A multicolor time-resolved fluorescence aptasensor for the simultaneous detection of multiplex *Staphylococcus aureus* enterotoxins in the milk [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 74: 170-176.
- [76] 王成全. 基于磁控适配体传感体系的农产品中典型霉菌毒素检测研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016: 85-86.
- [77] QIAN Jing, REN Chan-chan, WANG Cheng-quan, et al. Magnetically controlled fluorescence aptasensor for simultaneous determination of ochratoxin A and aflatoxin B₁ [J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1 019: 119-127.
- [78] WANG Qi, YANG Qing-li, WU Wei. Graphene-based steganographic aptasensor for information computing and monitoring toxins of biofilm in food [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 3 139.
- [79] 周佳伟. 量子点-适配体荧光传感器快速检测卡那霉素和妥布酶残留[D]. 镇江: 江苏大学, 2018: 37.
- [80] 王叶. 基于核酸适配体探针结合荧光和微流控方法检测食品中抗生素残留研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2017: 48.
- [81] ZHANG Cun-zheng, WANG Li, TU Zhui, et al. Organophosphorus pesticides detection using broad-specific single-stranded DNA based fluorescence polarization aptamer assay [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 55: 216-219.
- [82] 赵旭, 吴世嘉, 乐琳, 等. 基于核酸适配体的镉离子可视化检测方法 [J]. 食品与机械, 2018, 34(6): 35-38.
- [83] WU Shi-jia, DUAN Nuo, SHI Zhao, et al. Dual fluorescence resonance energy transfer assay between tunable upconversion nanoparticles and controlled gold nanoparticles for the simultaneous detection of Pb²⁺ and Hg²⁺ [J]. Talanta, 2014, 128: 327-336.
- [84] YAN Xi-luan, JIANG Meng-meng, JIAN Yu-ting, et al. Simultaneous aptasensor assay of ochratoxin A and adenosine triphosphate in beer based on Fe₃O₄ and SiO₂ nanoparticle as carriers [J]. Analytical Methods, 2020, 12(17): 2 253-2 259.
- [85] JIN Bi-rui, YANG Ye-xin, HE Rong-yan, et al. Lateral flow aptamer assay integrated smartphone-based portable device for simultaneous detection of multiple targets using upconversion nanoparticles [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2018, 276: 48-56.
- [86] HE Li-yong, SHEN Zhi-peng, WANG Jia-qi, et al. Simultaneously responsive microfluidic chip aptasensor for determination of kanamycin, aflatoxin M₁, and 17 β -estradiol based on magnetic tripartite DNA assembly nanostructure probes [J]. Microchimica Acta, 2020, 187(3): 1-11.

(上接第 164 页)

- [17] 王中风, 吴永娟, 曾凡坤, 等. 红景天固体饮料配方研究 [J]. 食品与机械, 1997, 13(2): 12-13.
- [18] 梁淑珍, 孟玉彩, 安锡忠, 等. 蔷薇红景天提取物不同极性部位体外抗氧化活性研究 [J]. 安徽农业科学, 2010(20): 10 682-10 683.
- [19] 吴锦健, 邓昌国, 孙殿甲, 等. 比色法测定不同红景天药材中酚性成分的含量 [J]. 中成药, 1996, 18(9): 47-48.
- [20] 田光辉, 庞海霞, 刘存芳, 等. 玫瑰红景天粗脂肪的成分及其性质分析 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(18): 205-210.
- [21] OLGA Kosakowska, KATARZYNA Baczek, JAROSŁAW Przybył, et al. Antioxidant and antibacterial activity of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) dry extracts [J]. Molecules, 2018, 23(7): 1 767-1 781.
- [22] 范桂强, 齐善厚, 庞红霞, 等. 红景天提取物与红景天苷体外抗氧化作用研究 [J]. 中国药房, 2016(13): 1 797-1 800.
- [23] 赵岩, 赵天琦, 蔡恩博, 等. 狭叶红景天乙醇提取物的降血脂和抗氧化活性研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015(12): 5 046-5 052.
- [24] 陆俊, 罗丹, 张佳琦, 等. 三叶木通不同部位多酚、黄酮含量及抗氧化活性比较 [J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 132-135, 223.

(上接第 188 页)

- [17] 陈曦, 李国林, 陈梦玉, 等. 响应面法优化发酵蓝莓果醋发酵工艺条件 [J]. 中国酿造, 2018, 37(9): 73-77.
- [18] 廖良坤, 黄晖, 袁源, 等. 菠萝皮渣果醋发酵特性及抗氧化性 [J]. 食品科技, 2018, 43(4): 87-91.
- [19] 丁一东, 卜春旭, 刘子菱, 等. 蜂蜜醋的品质及其抗氧化性的研究 [J]. 延边大学学报(自然科学版), 2018, 44(3): 256-259.
- [20] MERVE Özen, NILGÜN Özdemir, BILGE Ertekin Filiz, et al. Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) vinegars produced from fresh fruit or juice concentrate: Bioactive compounds, volatile aroma compounds and antioxidant capacities [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125664.
- [21] 陈怡, 范茹茹, 吴凯, 等. 不同酿造醋的抗氧化性能的对比研究 [J]. 激光生物学报, 2020, 29(3): 281-289.
- [22] 孙璐宏, 鲁周民, 包蓉, 等. 柿果醋酿造过程中抗氧化性能的变化 [J]. 食品科学, 2011, 32(19): 37-41.
- [23] 丁城, 高冰, 刘璐, 胡勇. 紫外诱变选育醋酸菌及其发酵梨醋风味研究 [J]. 中国酿造, 2016, 35(10): 51-55.
- [24] 贾娟, 王婷婷, 杨雯雯, 等. 香梨发酵酒发酵工艺的优化及其香气成分研究 [J]. 中国酿造, 2019, 38(5): 101-107.