

核酸适配体及其在食品安全领域中的应用研究进展

Progress on application of aptamers on food safety detection

张辉¹ 叶华^{2,3} 吴世嘉^{2,3} 王周平^{2,3}

ZHANG Hui¹ YE Hua^{2,3} WU Shi-jia^{2,3} WANG Zhou-ping^{2,3}

(1. 中国农村技术开发中心, 北京 100045; 2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122;
3. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. China Rural Technology Development Center, Beijing 100045, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要: 文章对适配体的本质、作用机理、特点等进行了介绍, 同时从固定对象及库的构成角度分类介绍了四大类适配体筛选技术, 最后, 就适配体在食品安全领域中的应用现状和发展方向作一总结和展望。

关键词: 核酸适配体; 筛选技术; 食品安全检测; 进展

Abstract: This review mainly focuses on the progress on the application of aptamers on food safety detection. Firstly, the nature, mechanism and characteristics of aptamers were introduced; Secondly, four types of SELEX technology from the angle of the fixed objects and the composition of library were classified; finally, the application and development of aptamers in food safety detection were reviewed and prospected.

Keywords: Aptamers; SELEX; food safety detection; progress

随着人们生活水平和生活质量的不断提高, 食品的质量安全越来越受到人们的关注和重视。尽管当前中国食品安全总体形势趋向较好, 但食品安全事件仍屡有发生。有统计^[1]表明, 仅 2016 年第一季度, 中国大陆累计发生了近 4 000 起食品安全事件, 平均发生率达 43.8 起/d。而产生这些食品安全事件的主要风险因子包括农兽药残留、致病性微生物、重金属超标、物理性异物及违规使用食品添加剂、非法添加违禁物等。当前对这些风险因子的监测方法虽然技术上比较成熟, 但在应用方面有一定的局限性, 难以满足现场快速检测的要求。如农兽药残留的气液相色谱法样品前处理要求严格、毛细管电泳法重复性差、致病菌的平板分离法耗时长、免疫检测法易出现假阳性等。因此, 快速、灵敏、高

效的食品风险因子检测方法一直是学者们研究和开发的重点。

近年来, 适配体 (aptamer) 的出现为食品安全快速检测技术的实现开辟了一条新的路径。有学者^[2]认为, 凡是涉及抗体的应用领域, 几乎都可以用适配体代替。因此, 适配体又称为“化学抗体”^[3]。作为一种新型的仿生识别分子, 核酸适配体能选择性地特异结合靶标分子。由于其具有靶分子范围广、可体外化学合成、稳定性好、制备及修饰方便、成本低等优点, 而广泛应用于医疗诊断、环境监测、生物分析等众多领域。当前, 适配体在食品安全领域的研究报道越来越多, 但多集中在某一具体方面^[4-7]。本文拟从适配体的本质、作用机理及特点入手, 介绍蛋白质、细胞等 5 大类适配体, 同时阐述适配体筛选技术流程并对其进行分类, 最后就适配体在食品安全领域中的应用现状和发展方向作一总结和展望。

1 核酸适配体概述

1.1 核酸适配体的本质

适配体最早由 Ellington 等^[8]于 1990 年提出, 他们将体外筛选试验中得到的能特异性结合有机染料的 RNA 序列称之为 aptamers。之后, 人们又成功筛选到许多对各自靶标有特异性和亲和力的 DNA 或 RNA 适配体。进一步研究^[9]表明, 适配体之所以能特异性结合靶标, 可能是它在某种条件下能折叠形成特定的三维结构。因此, 核酸适配体本质上是一段具有特定复杂三维结构并能特异性结合靶标分子的单链 DNA 或 RNA 序列, 一般长度在 10~100 个碱基之间。

1.2 核酸适配体的作用机理及特点

由于适配体是一段短的单链核酸序列, 它可以通过氢键作用、静电作用、碱基堆积作用、范德华力以及构象互补等方式, 形成发夹、G 四聚体、茎环、假结等稳定的结构与靶标分

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 21375049)

作者简介: 张辉, 男, 中国农村技术开发中心副研究员, 博士。

通讯作者: 王周平 (1974—), 男, 江南大学教授, 博士。

E-mail: wangzpl1974@163.com

收稿日期: 2016-07-17

子特定区域结合,从而对靶标分子具有较高的特异性和较好的亲和性^[10]。

适配体与不同大小的靶标分子作用方式有可能不同,但基本原理相似。一般认为,适配体结合于大分子的某一特定部位(图1),而小分子则主要是结合在适配体三维结构的某一特定部位(图2)。虽然适配体与靶标分子的具体作用机理尚未得到证实,但是与传统的抗体相比,适配体具有靶分子广、亲和力高、特异性强、可重复利用、穿透性好、免疫原性小、易于修饰、方便合成等众多优点。

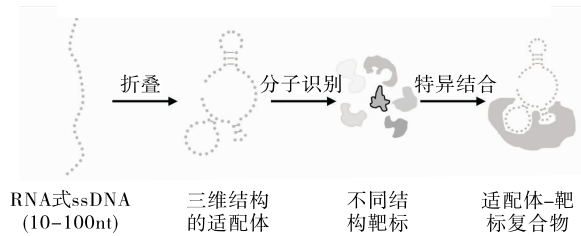


图1 核酸适配体与大分子靶标相互作用示意图

Figure 1 Schematic of aptamers interaction with macromolecule target



图2 核酸适配体与小分子靶标相互作用示意图^[9]

Figure 2 Schematic of aptamers interaction with micromolecule target^[9]

1.3 核酸适配体的种类

经过近30年的发展,目前已经报道的核酸适配体已超过560余种^[11]。随着对适配体研究的不断深入,适配体的种类还将进一步得到扩展^[12]。当前有关适配体的研究和进展报道越来越多,但都没有系统地将其进行分类。本文在现有研究的基础上将适配体分为以下5类进行介绍。

1.3.1 蛋白质适配体 蛋白质是生命物质的基础,是人体一切细胞、组织的重要组成部分,很多生命现象均与蛋白质有关。因此,蛋白质适配体自然是适配体研究的热点。第一个报道^[13]的适配体即是蛋白质适配体(T4 DNA聚合酶RNA适配体)。近年来,已报道^[4]的蛋白质类适配体主要包括生长因子、酶、激素、毒素、细胞表面受体、微生物蛋白质等。目前,蛋白质适配体在医学成像^[14-15]、疾病诊断与治疗^[16]、药物研发^[17]、生物安全检测^[18]等方面应用较多。另外,第一个也是目前唯一一个获得美国FDA批准的适配体药物Macugen(pegaptanib sodium, 哌加他尼钠)也是蛋白质适配体^[17]。

1.3.2 细胞适配体 细胞是生物体基本的结构和功能单位,具有运动、营养和繁殖的机能。因此人们对其研究比较重视,但是由于细胞结构比较复杂,其表面分子形态比较特殊,即使将它们分离纯化用来检测,其实际检测效果也可能出现假阳性,这就限制了对细胞表面的分子水平方面的研究。而细胞适配体的出现有可能突破这一限制。目前报道的细胞适配体主要包括癌细胞、炎症细胞和感染细胞等,尤其是癌细胞适配体居多,如呼吸系统癌细胞、消化系统癌细胞、生殖系统癌细胞、血液系统癌细胞等^[5]。

1.3.3 抗生素适配体 抗生素是一类由细菌、霉菌或其他微生物在生活过程中所产生的具有不同抗病原体的抗生素药物或其他活性物质,可用于治疗各种非病毒感染,包括链霉素、青霉素、多粘菌素、四环素等。但近期很多研究^[19]表明,使用抗生素容易产生许多副作用,如导致细菌产生抗药性等。而以抗生素适配体作为一种识别原件来检测抗生素残留,具有比抗体检测更好的优越性。因此,近年来筛选到的抗生素适配体有四环素^[20]、卡那霉素A^[21]、卡那霉素B^[22]、链霉素^[23]等。

1.3.4 细菌适配体 细菌无处不在,广泛存在于空气、水、土壤甚至食物。细菌对人类、动物以及环境的影响是双面的,但某些细菌尤其是致病菌给人们的生活和健康带来较大的危害,如容易引起食源性疾病的沙门菌、容易造成腹泻和败血症的大肠杆菌等。而筛选这类有害的细菌适配体有利于对其进行有效地分析和检测。目前关于沙门菌^[24]、大肠杆菌^[25]、金黄色葡萄球菌^[26]、副溶血性弧菌^[27]、李斯特菌^[28]、阪崎肠杆菌^[29]等细菌的适配体报道较多。当前,细菌适配体的应用还难以达到实际期望值,因此,筛选更好的细菌适配体以满足实际需求仍需要更大的发展空间。

1.3.5 金属离子适配体 金属离子有些是维持多相体系渗透平衡的主要组成部分,有些是酶活性中心的组成部分,有些酶分子虽然不含金属离子,但缺少金属离子,其催化能力丧失或较低。另外在工业生产过程中由于未经科学处理一些重金属离子被直接排放到环境中,极易造成重金属离子污染,对环境、农作物产生极大的危害。因此这类金属离子尤其是重金属离子的适配体也是人们筛选的热点。目前,已报道的金属离子适配体有 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 等^[6,30-31]。

1.3.6 其他小分子适配体 最先提出aptamer概念的Elington等^[8]就是第一个以小分子(有机染料)为靶分子来筛选适配体的,他们不但成功地筛选得到了有机染料小分子适配体,还证明了这些适配体对6种不同但非常相关的有机染料能特异性识别,表明这些适配体对染料靶标具有较高的特异性,对其他染料则没有。这为人们对小分子的筛选奠定了良好的基础。从筛选技术角度来说,相对于大分子适配体,小分子适配体较难筛选,但目前筛选成功的小分子适配体除有机染料外,荧光染料、核苷酸、核苷、碱基、氨基酸、糖和一些辅助因子的适配体等^[32]均有报道。

2 核酸适配体筛选技术流程和分类

2.1 核酸适配体筛选技术流程

获得适配体的筛选技术称之为 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment,指数富集的配体系统进化),这个概念最早由 Tuerk 等^[14]提出。SELEX 技术摆脱了对生物系统的依赖性,完全是一种在体外进行的组合化学方法。其基本流程见图 3,主要包括孵育、分离、洗脱、PCR 扩增、选择、克隆测序、序列分析等步骤。

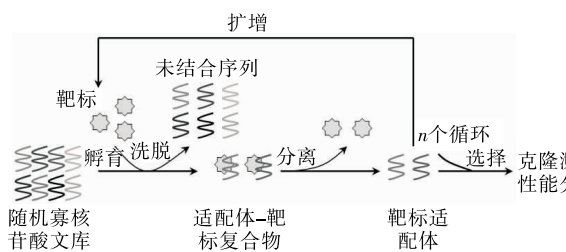


图 3 SELEX 技术基本流程
Figure 3 Schematic of SELEX

2.2 核酸适配体的筛选技术分类

SELEX 技术的关键是如何回收所需要的适配体,换句话说,就是适配体与靶标物质的分离效果决定了筛选的效率。近年来科研工作者将一些新的试验技术和新的理念注入到传统的 SELEX 技术中,开发出了许多新型 SELEX 技术,如:毛细管电泳 SELEX、基因 SELEX、细胞 SELEX 等^[7]。但目前有关 SELEX 技术没有具体的分类方法,这里在分离技术的基础上,根据待固定对象及库的构成将其分为以下四大类。

2.2.1 固定靶标的适配体筛选技术 固定靶标的适配体筛选技术,顾名思义,就是将待筛选的目标物质固定在一定的基质上,然后将寡核苷酸文库与其进行孵育,使两者结合,再通过一定的分离方法将其分离从而进行筛选。目前大多数筛选方法都是将靶标固定,常用的固定基质有琼脂糖凝胶、磁珠纳米颗粒、聚丙烯微孔板、芯片等,这种方法的前提条件是靶标分子必须有固定位点,如有氨基或羧基等基团的存在。陈秀娟^[33]将玉米赤霉烯酮、伏马菌素 B1 活化后,分别固定在氨基化的磁珠上,利用磁珠-SELEX 技术分别经过 14 轮和 13 轮筛选成功得到玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B1 的适配体。如果靶标物质没有固定位点则需要进行修饰后方可固定,但是并不是所有的靶标物质都能修饰。另外,修饰后的靶标与天然的靶标在结构等方面有一定的区别,也许这个区别对适配体的应用存在不利影响。

2.2.2 固定文库的适配体筛选技术 在实际筛选中,有些靶标分子因为没有适合的固定位点,所以不能用上述方法进行筛选。而且在实际检测中,有时无法固定样品中的待测物质,从而导致利用适配体的检测技术所得到的结果与实际情况不符。因此,将文库进行固定、靶标游离的筛选方法即固定文库的适配体筛选技术应运而生,这类筛选方法有学者将其称为捕获-SELEX(Capture-SELEX)^[21]。它的固定基质和固定靶标所用的基质基本相同。Nutiu 等^[34]将文库固定在

亲和素包被的磁珠上,成功地筛选得到 ATP(16 轮)和 GTP(18 轮)的适配体。Wu 等^[30]将文库固定在链霉亲和素标记的琼脂糖颗粒上,经过 10 轮的正筛和 1 轮的反筛得到 28 个克隆体,并对其进行测序得到 12 条非重复序列的适配体,这些适配体均不同程度地特异性识别 Cd^{2+} ,而且不能识别其他金属离子,其中 Cd-4 适配体结合能力最强,其解离常数 K_d 值达 34.5 nmol/L。

2.2.3 非固定靶标或文库的适配体筛选技术 无论是固定靶标还是固定文库,或多或少地都会对适配体或靶标的天然结构产生一定的影响,如改变适配体或靶标的三维结构,会导致实际检测效果不好。因此,在筛选过程中,保持靶标或适配体的天然状态有利于提高适配体的应用效果。而这一类筛选方法比较有代表的就是硝酸纤维素膜筛选^[35]、毛细管电泳筛选^[36]、氧化石墨烯筛选法^[37]等。

2.2.4 人工扩展的基因信息系统筛选技术 目前 SELEX 技术所使用的基因文库大多是 ATGC(ssDNA 文库)或 AUGC(RNA 文库)化学合成的,而且筛选出了很多不同靶标的适配体,并取得了一定的效果。科研工作者们对 SELEX 技术的改进起初都是从下游着手的,如对筛选得到的适配体加以修饰改造,提高适配体的稳定性等,后来逐渐对文库加以修饰或标记,如在核苷酸上加入功能基团等。最近有学者^[38]根据碱基配对原则合成了新的碱基,Sebah 等^[39]选择其中一种新配对碱基用来构建了一种新的文库,并将这种筛选技术称之为人工扩展遗传信息系统-SELEX(Artificially expanded genetic information systems, AEGIS-SELEX)。在 ATGC 的基础上增加了 ZP 两个碱基(ZP 配对),构建了 ATGCZP 6 个碱基的文库,以该文库筛选 12 轮得到了乳房癌细胞 MDA-MB-231 的适配体,该适配体序列中仅含有 1 个 Z 和 1 个 P。Sebah 等^[39]通过进一步研究发现,如果 Z 或 P 被其他碱基(ATGC)所取代,则其亲和力降低甚至消失;该文库的使用能够降低筛选轮数、提高适配体的亲和力,具有很大的应用前景。

3 核酸适配体在食品安全领域中的应用

3.1 在食源性致病菌检测方面的应用

传统的食源性致病菌检测方法主要是微生物检验技术、仪器分析法、分子生物学技术和免疫学检测方法等。近年来,基于适配体的食源性致病菌的检验方法报道越来越多。Joshi 等^[40]利用 SELEX 技术筛选得到鼠伤寒沙门氏菌 DNA 适配体,并结合实时定量 RT-PCR 法对食品样品和环境样本中的沙门氏菌进行了检测,检测限在 4~40 CFU/mL。Duan 等^[41]利用 whole-bacterium-SELEX 技术,筛选得到了高亲和力的鼠伤寒沙门氏菌适配体,并以此适配体为识别元件,结合荧光技术构建了一种测定检测鼠伤寒沙门氏菌的新方法(图 4),该方法对目标菌具有良好的线性响应,其线性检测范围为 50~10⁶ CFU/mL,检测限达 25 CFU/mL。Duan 等^[42]还结合表面增强拉曼光谱技术建立了适配体传感器用来检测副溶血弧菌,其线性检测范围为 10~10⁶ CFU/mL,检测限达 10 CFU/mL。

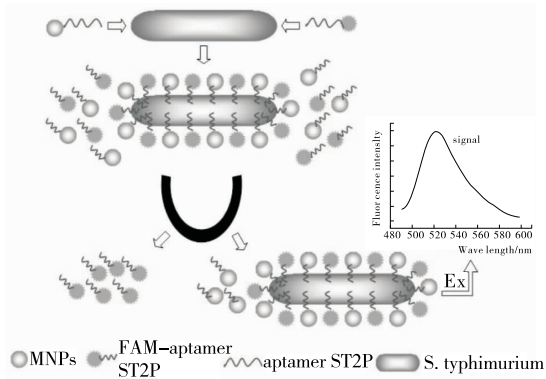


图4 基于适配体的荧光生物法检测鼠伤寒沙门氏菌原理图^[41]

Figure 4 Principle of detecting *Salmonella typhimurium* by the fluorescent bioassay based on aptamer^[41]

3.2 在生物毒素检测方面的应用

近年来,基于适配体的生物毒素的检测方法已有报道。Aguado等^[43-45]筛选得到了赭曲霉毒素A(OTA)核酸适配体并初步应用于检测OTA,通过比较,检测限最低可低至1 nmol/L。Huang等^[46-47]利用磁珠法筛选得到金黄色葡萄球菌肠毒素A和C1的适配体,建立了基于氧化石墨烯-荧光共振能量转移效应的一种快速、准确且方便的用于牛奶中SEA和复原乳中SEC1定量检测方法,检测限分别为8.7 ng/mL和6.0 ng/mL。Bruno等^[48]将筛选到的金黄色葡萄球菌B型肠毒素(SEB)适配体结合电化学发光法用于检测SEB,其检测限达到10 pg。Amanda等^[49]采用亲和探针毛细管电泳技术建立了基于荧光标记的RNA适配体检测方法,对蓖麻毒素进行定量分析和检测,研究表明,即使加入RNase A来降解适配体,其检测限能达到 10^{-9} mol/L,说明该检测体系中适配体具有较好的稳定性。

3.3 在重金属离子检测中的应用

Miyake等^[50-51]报道了 Hg^{2+} 的筛选,他们用试验证明了所筛选得到的适配体对T碱基有很强的选择性,据此推测该适配体和靶标 Hg^{2+} 之间的相互作用是通过T- Hg^{2+} -T的碱基配对方式结合的。此后,有关基于核酸适配体技术检测 Hg^{2+} 的研究报道越来越多。Wang等^[52]利用这一结合原理,利用含有T碱基的凝血酶适配体成功构建了基于适配体和纳米金探针的色度传感器来检测 Hg^{2+} ,其检测限达200 nmol/L。凌绍明等^[53]将核酸适配体修饰纳米金作为探针,利用共振散射光谱法建立了快速、灵敏的 Pb^{2+} 的检测方法(图5),其检出限达0.03 nmol/L。

Kim等^[54]利用亲和柱技术进行体外筛选得到砷的核酸适配体,并通过构型转换形成特定的二级结构用于检测地下水中 As^{3+} 和 As^{5+} ,其结合常数分别达到7 nmol/L和5 nmol/L。Wu等^[55]建立了一种基于核酸适配体的新型双重荧光共振能量转移同步检测 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 的检测系统,实现了同时检测两种金属离子,不仅缩短了检测时间、降低了检测成本,还提高了检测效率。该系统采用双色上转换纳米粒子作为供体,纳米金粒子作为受体,根据上转换荧光强度

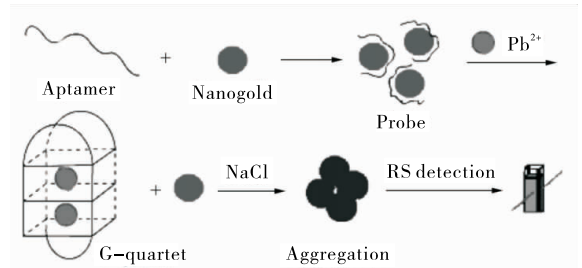


图5 适配体纳米金共振散射光谱探针检测 Pb^{2+} 原理图
Figure 5 Principle of RS assays for Pb^{2+} by aptamer-NG

的变化分别同时检测受污染样品和人血清样品中的 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} ,结果表明,其检测限分别达到50,150 pmol/L,具有较高的灵敏度。

3.4 在药物残留检测方面的应用

食品中抗生素、农药残留的检测越来越受到人们的重视,基于适配体的检测方法不仅稳定性好,而且灵敏度高,具有较好的应用前景。廖且根等^[56]将卡那霉素适配体修饰银纳米粒子,并以此作为探针,利用共振光散射技术检测卡那霉素,结果表明,该方法表现出了极高的选择性和特异性,其检测限为1.0 mg/kg。Yadav等^[57]将筛选得到的氯霉素DNA适配体,制备了基于适配体的电化学传感器对氯霉素进行了检测,也表现了良好的特异性和灵敏度,其检测限为0.02 nmol/L。Wang等^[58]将文库固定在凝胶上,利用Capture-SELEX技术同时筛选甲拌磷、丙溴磷、水胺硫磷、氧化乐果4种有机磷农药的核酸适配体,经过12轮筛选,最终得到5条核酸适配体,其中SS2-55和SS2-54两个适配体对4种农药具有较强的结合能力和较高的特异性,其平衡解离常数在0.83~2.50 mmol/L,因此,推测筛选得到的适配体有可能是结合4种有机磷农药的广谱型适配体。

4 总结与展望

核酸适配体发展近30年来,相关筛选技术越来越丰富,人们对适配体认识也越来越深入,适配体在实际应用中尤其是在食品安全检测方面取得了明显的成效,如降低了检测成本、缩短了检测时间,提高了检测灵敏度等。而且已有商品化的细菌、毒素的适配体检测试剂盒问世,这些产品的出现不仅证明了适配体在检测应用方面的优势,更降低了食品安全事件发生的概率。

但要使适配体成为食品安全保驾护航的有力工具,不仅在检测方面发挥作用,更重要的是在食品安全控制方面要有所建树,而在这方面的研究和报道很少。另外,要正视适配体在实际发展过程中面临着的一些问题,如核酸适配体的高效筛选难以实现,适配体与靶标相互作用的机理和构效关系急需阐明等。要解决这些问题,适配体今后的发展重点应该有以下三个方面:①适配体高效筛选方法的突破;②适配体与靶分子相互作用机制的揭示;③适配体在食品安全控制方面的应用。相信在科学家们的不断努力下,适配体作为一种新兴组合化学技术,其优势与应用必将在食品安全检测和

控制领域得到进一步的发展。

参考文献

- [1] 江南大学国家社科重大课题《食品安全风险社会共治研究》研究团队. 1-3月我国食品安全事件分析[N]. 中国食品安全报, 2016-5-12(A2).
- [2] 满燕, 吕雪飞, 张玉奎, 等. 核酸适配体及其在生物医学研究中的应用[J]. 航天医学与医学工程, 2013, 26(6): 485-490.
- [3] GOLD L. Conformational properties of oligonucleotides[J]. Nucleic Acids Symposium, 1995(33): 20-22.
- [4] 杨歌, 魏强, 赵新颖, 等. 蛋白质的核酸适配体筛选的研究进展[J]. 色谱, 2016, 34(4): 370-381.
- [5] 刘品多, 屈锋. 全细胞的核酸适配体筛选的研究进展[J]. 色谱, 2016(4): 382-388.
- [6] 于寒松, 隋佳辰, 代佳宇, 等. 核酸适配体技术在食品重金属检测中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 228-233.
- [7] 王周平, 张维潇. 适配体及其研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(9): 897-906.
- [8] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346: 818-822.
- [9] HERMANN T, PATEL DJ. Biochemistry-Adaptive recognition by nucleic acid aptamer [J]. Science, 2000, 287 (5 454): 820-825.
- [10] 段诺. 食源性致病菌适配体的筛选及分析应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 5.
- [11] MCKEAGUE M, MCCONNELL E M, CRUZ-TOLEDO J, et al. Analysis of in vitro aptamer selection parameters [J]. Journal of Molecular Evolution, 2015, 81(5/6): 150-161.
- [12] 徐发良, 肖觉. SELEX 技术的靶标范围拓展[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(4): 432-435.
- [13] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249: 505-510.
- [14] JACOBSON O, YAN Xue-feng, NIU G, et al. PET imaging of tenascin-C with a radio labeled single-stranded DNA aptamer [J]. Journal of Nuclear Medicine, 2015, 56(4): 616-621.
- [15] ZENG Zi-hua, PAREKH Parag, LI Zheng, et al. Specific and sensitive tumor imaging using biostable oligonucleotide aptamer probes[J]. Theranostics, 2014, 4(9): 945-952.
- [16] LE TRINH T, ZHU Gui-zhi, XIAO Xi-lin, et al. A synthetic aptamer-drug adduct for targeted liver cancer therapy [J]. PLOS ONE, 2015, 10 (11): doi: 10. 1371/journal.pone.0136673.
- [17] NG E W M, SHIMA D T, CALIAS P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2006, 5(2): 123-132.
- [18] HUANG Yu-kun, CHEN Xiu-juan, WU Shi-jia, et al. Homogeneous time-resolved fluorescence assay for the detection of ricin using an aptamer immobilized on europium-doped KGdF4 nanoparticles and graphene oxide as a quencher [J]. Microchimica Acta, 2015, 182(5/6): 1 035-1 043.
- [19] 朱亚宝, 刘晓富, 翟丽芳, 等. 细菌耐药性与抗生素的合理使用[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(3): 286-288.
- [20] NIAZI J H, LEE Su-jin, GU Man-bock. Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16(15): 7 245-7 253.
- [21] STOLTENBURG R, NIKOLAUS N, STREHLITZ B. Capture-SELEX: Selection of DNA aptamers for Aminoglycoside antibiotics[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2012(1): 155-166.
- [22] KWON M, CHUN S M, JEONG S, et al. In vitro selection of RNA against kanamycin B[J]. Molecules and Celles, 2001, 11 (3): 303-311.
- [23] ZHOU Nan-di, WANG Jing-yuan, ZHANG Juan, et al. Selection and identification of streptomycin-specific single-stranded DNA aptamers and the application in the detection of streptomycin in honey[J]. Talanta, 2013, 108: 109-116.
- [24] DUAN Nuo, WU Shi-jia, CHEN Xiu-juan, et al. Selection and characterization of aptamers against salmonella typhimurium using whole-bacterium systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)[J]. J. Agric. Food Chem., 2013, 61: 3 229-3 234.
- [25] LEE YJ, HAN SR, MAENG JS, et al. In vitro selection of Escherichia coli O157: H7-specific RNA aptamer [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 417(1): 414-420.
- [26] HAN SR, LEE SW. In vitro selection of RNA aptamer specific to Staphylococcus aureus[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64 (2): 883-885.
- [27] DUAN Nuo, WU Shi-jia, CHEN Xiu-juan, et al. Selection and identification of a DNA aptamer targeted to Vibrio parahaemolyticus[J]. J. Agr. Food Chem., 2012, 60: 4 034-4 038.
- [28] DUAN Nuo, DING Xiao-ying, HE liang-xing, et al. Selection, identification and application of a DNA aptamer against Listeria monocytogenes[J]. Food Control, 2013, 33(1): 239-243.
- [29] 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: 17.
- [30] 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.
- [31] CHEN Zheng-bo, CHEN Liang, MA He, et al. Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of potassium ion based on DNA G-quadruplex conformation[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 48: 108-112.
- [32] SVEN Klussmann. 核酸适配体手册: 功能性寡核苷酸及其应用[M]. 屈锋, 译. 北京: 化学工业出版社, 2013: 84-99.
- [33] 陈秀娟. 镰刀菌毒素核酸适配体的筛选及分析应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015: 44, 60.
- [34] NUTTI R, LI Ying-fu. In vitro selection of structure-switching signaling aptamers[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2005, 44(7): 1 061-1 065.
- [35] 刘晓静. SELEX 技术筛选人 TGF- β R II 亲和核酸库方法的建

- 立[D]. 重庆: 第三军医大学, 2004: 12-19.
- [36] MENDONSA S D, BOWSER M T. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(1): 20-21.
- [37] 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; doi:10.1038/srep21665.
- [38] BENNER S A. Understanding nucleic acids using synthetic chemistry[J]. Accounts of Chemical Research, 2004, 37(10): 784-797.
- [39] SEFAH K, YANG Zun-yi, BRADLEY K M, et al. In vitro selection with artificial expanded genetic information systems[J]. PNAS, 2014, 111(4): 1 449-1 454.
- [40] JOSHI R, JANAGAMA H, DWIVEDI HP, et al. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars [J]. Molecular and Cellular Probes, 2009, 23(1): 20-28.
- [41] DUAN Nuo, WU Shi-jia, CHEN Xiu-juan, et al. Selection and characterization of aptamers against Salmonella typhimurium using whole-bacterium systemic evolution of ligands by exponential enrichment(SELEX) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 3 229-3 234.
- [42] DUAN Nuo, YAN Yi-ling, WU Shi-jia, et al. Vibrio parahaemolyticus detection aptasensor using surface-enhanced Raman scattering[J]. Food Control, 2016, 63: 122-127.
- [43] CRUZ-AGUADO JA, PENNER G. Determination of Ochratoxin A with a DNA aptamer[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(22): 10 456-10 461.
- [44] 段诺, 吴世嘉, 王周平. 核酸适配体识别荧光法检测赭曲霉毒素 A[J]. 分析化学, 2011, 39(3): 300-304.
- [45] PARK J H, BYUN J Y, MUN H, et al. A regeneratable, label-free, localized surface Plasmon resonance (LSPR) aptasensor for the detection of ochratoxin A[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 59: 321-327.
- [46] HUANG Yu-kun, CHEN Xiu-juan, XIA Yu, et al. Selection, identification and application of a DNA aptamer against staphylococcus aureus enterotoxin A[J]. Analytical Methods, 2014, 6(3): 690-697.
- [47] 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.
- [48] BRUNO J G, KIEL J L. Use of magnetic beads in selection and detection of biotoxin aptamers by electrochemiluminescence and enzymatic methods[J]. Biotechniques, 2002, 32(1): 178-180, 182-183.
- [49] HAES A J, GIORDANO B C, COLLINS G E. Aptamer-based detection and quantitative analysis of ricin using affinity probe capillary electrophoresis[J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(11): 3 758-3 764.
- [50] MIYAKE Y, TOGASHI H, TASHIRO M, et al. Mercury II-mediated formation of thymine-Hg II-Thymine base pairs in DNA duplexes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(7): 2 172-2 173.
- [51] TANAKA Y, ODA S, YAMAGUCHI H, et al. 15N-15N J-coupling across Hg II: Direct observation of Hg II-Mediated T-T base pairs in a DNA duplex[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 129(2): 244-245.
- [52] WANG Yong, YANG Fan, YANG Xiu-rong. Colorimetric biosensing of mercury II ion using unmodified gold nanoparticle probes and thrombin-binding aptamer[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2010, 25(8): 1 994-1 998.
- [53] 凌绍明, 范燕燕, 蒋治良, 等. 核酸适配体修饰纳米金共振散射光谱探针快速检测痕量 Pb^{2+} [J]. 化学学报, 2010, 68(4): 339-344.
- [54] KIM M, UM H J, BANG S, et al. Arsenic removal from Vietnamese groundwater using the arsenic-binding DNA aptamer [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(24): 9 335-9 340.
- [55] 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 Pb^{2+} and Hg^{2+} [J]. Chemistry Analytical, 2014, 128: 327-336.
- [56] 廖且根, 李伟红, 张金艳, 等. 基于核酸适配体与银纳米粒子探针共振光散射技术检测卡那霉素[J]. 农产品质量与安全, 2012(51): 17-19.
- [57] YADAV S K, AGRAWAL B, CHANDRA P, et al. In vitro chloramphenicol detection in a Haemophilus influenza model using an aptamer-polymer based electrochemical biosensor[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 55: 337-342.
- [58] 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.
-
- (上接第 136 页)
- [19] 黄才欢, 欧仕益, 张宁, 等. 膳食纤维吸附脂肪、胆固醇和胆酸盐的研究[J]. 食品科技, 2006(5): 133-136.
- [20] 刘静娜, 夏文水, 张家骊. 壳聚糖物化性质对其体外结合脂类和胆酸盐能力的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 45-49.
- [21] 王凯, 李敏, 张言捷, 等. 孔石莼多糖及其磺化衍生物 HU 体外结合脂类和胆固醇的研究[J]. 药学研究, 2013, 32(7): 379-383.
- [22] KAHLON T-S, SMITH G-E, SHAO Qiang. In vitro binding of bile acids by kidney bean (Phaseolus vulgaris), black gram (Vigna mungo), bengal gram (Cicer arietinum) and moth bean (Phaseolus aconitifolius) [J]. Food Chemistry, 2005, 90(1/2): 241-246.
- [23] 张慧娟, 王静, 张辉. 大米、糙米蛋白及其酶解产物的体外降脂研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 28-33.
- [24] 王文君, 欧阳克蕙, 许文凤, 等. 9 种植物粗多糖体外降脂及抑制非酶糖基化活性的研究[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(3): 593-597.