

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.80126

基于脱氧核酶的食品安全快速检测方法研究进展

Progress in food safety rapid analysis based on deoxyribozyme

曾 瑜^{1,2} 谌委菊^{1,2} 全 珂^{1,2} 雷艳丽^{1,2}ZENG Yu^{1,2} CHEN Wei-ju^{1,2} QUAN Ke^{1,2} LEI Yan-li^{1,2}

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 2. 细胞化学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410114)

(1. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Cytochemistry, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:文章阐述了脱氧核酶的结构与分类,综述了脱氧核酶在重金属离子、食源性致病菌、微生物毒素、其他非法成分等食品有害物质检测中的应用进展,分析总结了脱氧核酶在食品有害物质实际检测中面临的挑战,并展望了其在快速、现场检测中的发展前景。

关键词:脱氧核酶;功能核酸;食品安全;快速检测

Abstract: The article expounds the structure and activity of DNAzyme, and reviews the application progress of DNAzymes in the detection of heavy metal ions, pathogenic bacteria, microbial toxin and other illegal chemical components in food. The challenges faced by DNAzymes in the actual detection of food harmful substances are analyzed and summarized, and future development prospect in rapid and on-site detection are prospected.

Keywords: DNAzyme; functional nucleic acids; food safety; rapid detection

食品在加工、运输、贮存等过程中易引入有害物质,如重金属、病原微生物、非法添加剂等,使得食品质量与安全面临严峻考验^[1]。近年来,随着食品安全事件的频繁爆发,食品安全已发展成为危害人体健康的全球性问题。全球每年约 6 亿人口因食用被污染的食物而生病,其中 42 万人口因此丧生^[2]。传统的食源性有害物质分析方法包括高效液相色谱法^[3]、液质联用法^[4]、聚合酶链式反应^[5]、免疫分析法^[6]等,具有良好的准确性和灵敏度,但是存在仪器昂贵、样品前处理过程复杂且对操作者专业素养要求高等不足,难以实现食物样品的现场快速检测。因此,发展高效、简便的食源性有害物传感技术已

成为当前食品安全领域关注的焦点。

脱氧核酶(DNAzyme)是一类经指数富集的配基系统进化筛选技术获得的,具有高特异性底物识别能力和高效催化能力的单链 DNA 分子^[7]。Breaker 等^[8]发现短的单链 DNA 可以催化 RNA 磷酸二酯键水解断裂,并提出了脱氧核酶的概念。脱氧核酶的发现打破了人们对 DNA 是一种结构、功能单一的惰性分子的认知。随后一系列具有不同催化活性的脱氧核酶被相继发现,如介导核酸连接、磷酸化等^[9]。与传统的蛋白质酶相比,脱氧核酶具有以下优势:① 性质稳定,在高温、极度酸碱环境下发生变性后可复性,且复性前后催化活性基本没有变化,便于存储与运输;② 易化学合成与修饰,合成成本低且批次差异小;③ 依赖特定辅因子激活催化活性,辅因子种类丰富,涉及金属离子、小分子、氨基酸、蛋白质、致病微生物等;④ 结构柔软,可设计性强,如能对其进行劈裂处理或改变其催化构象;⑤ 基于其核酸本质,能够与滚环扩增(RCA)^[10]、杂交链式反应(HCR)^[11]等核酸等温扩增技术完美结合,在不借助特定仪器设备的情况下对检测信号进行放大。因此,基于上述优点,脱氧核酶为开发高灵敏、高效的临场检测方法提供了理想的分子工具,近年来在食品安全检测领域得到了广泛应用。

研究拟综述基于脱氧核酶的食品安全快速检测方法的研究进展,以期对食品有害物的现场检测提供借鉴。

1 脱氧核酶的结构与活性

1.1 具有 RNA 切割活性的脱氧核酶

根据催化功能的不同,当前脱氧核酶大体可以分为 5 类:① 具有核酸切割活性的脱氧核酶^[12];② 具有核酸连接活性的脱氧核酶^[13];③ 具有 DNA 激酶活性的脱氧核酶^[14];④ 具有 DNA 戴帽活性的脱氧核酶^[15];⑤ 具有过氧化物酶活性的脱氧核酶^[16]。其中,具有 RNA 切割活性的脱氧核酶应用最为广泛。该类核酶由催化功能域和位于两侧的结合臂组成,其可通过结合臂与底物序列进行碱基

基金项目:湖南省自然科学基金青年项目(编号:2020JJ5568);长沙市自然科学基金(编号:kq2007021)

作者简介:曾瑜,女,长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者:雷艳丽(1990—),女,长沙理工大学讲师,博士。

E-mail: leiyanli222@126.com

收稿日期:2022-03-30

互补配对进而发生特异性结合,在金属离子或生物分子等辅因子作用下,诱导催化功能域折叠形成特定的二级结构,随后催化底物序列中 RNA 碱基上的 2'-OH 位置发生酯交换反应,最终将底物链裂解成两段^[17-18]。

以筛选过程中第 10 轮循环中的第 23 个克隆(10-23)和第 8 轮循环中的第 17 个克隆(8-17)2 种研究最为深入的脱氧核酶为例,两者的辅因子均为 Mg^{2+} ,前者能够识别并催化 RNA 底物的 5'-R/Y-3' 位点断裂(Y 为嘧啶核苷酸,R 是嘌呤核苷酸),后者能够识别并催化 RNA 底物的 5'-G/rA-3' 位点断裂(图 1)^[19]。研究^[19]表明,这 2 种脱氧核酶催化功能域的碱基序列高度保守,且决定了其具体切割位点,催化功能域的碱基突变会导致脱氧核酶催化活性降低甚至丧失。与之不同,脱氧核酶的结合臂为可变序列,可根据底物 RNA 的具体序列进行灵活调节。因此,脱氧核酶的催化域决定了其催化活性的高低(或有无),而结合臂则决定了其底物选择性。此外,脱氧核酶结合臂的长度还将影响其催化的周转化率。随着结合臂长度的增加,脱氧核酶与底物的杂交稳定性逐渐增加,有助于两者靠近结合。但当稳定性过强,脱氧核酶切割底物产生的断裂片段不易从脱氧核酶上解离下来,将阻碍下一个底物与核酶结合,进而影响脱氧核酶循环。最佳的结合臂长度取决于底物的序列组成和反应条件。

1.2 具有过氧化物酶模拟活性的脱氧核酶

另一类常用的脱氧核酶为具有过氧化物酶模拟活性的脱氧核酶,包括 G-四链体和 G-三链体。不同于具有 RNA 切割活性的脱氧核酶,这类核酶由富含鸟嘌呤(G)的 DNA 序列在低价阳离子(如 K^+ 、 Pb^{2+} 、 NH_4^+ 等)介导下,经 Hoogsteen 氢键作用折叠形成^[20]。所形成的特定拓扑结构(如 G-四链体、G-三链体),需进一步结合氯化血红素(hemin)后才能发挥催化活性^[21-22]。其中,G-四链体由 G-四分体平面堆叠组成,拓扑结构稳定,应用较 G-三链体广泛。

根据 G-四链体中链的走向差异进行划分,可分为平行 G-四链体、反平行 G-四链体和混合型 G-四链体(图 2),而 G-四链体的拓扑结构与 G4/hemin-DNAzyme 的催化活性密切相关。有研究^[23-24]报道,平行结构有利

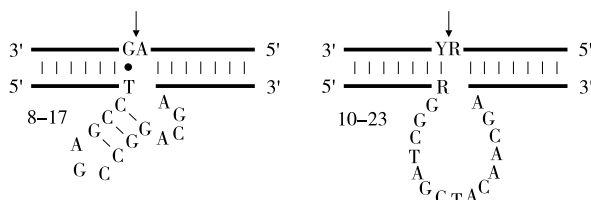


图 1 脱氧核酶 8-17 和 10-23 催化域的序列信息^[19]

Figure 1 Schematic illustration of sequence information of catalytic domains of deoxyribozymes 8-17 and 10-23

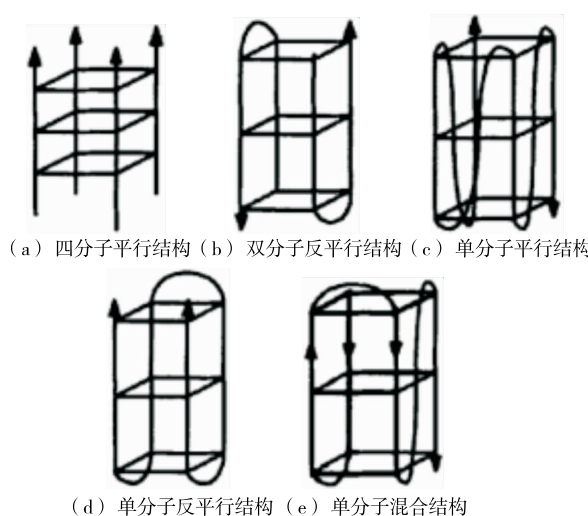


图 2 G-四链体的结构示意图^[21]

Figure 2 Schematic diagram of the structure of G-quadruplex

于氯化血红素通过末端堆叠的方式与其配位,因而平行 G-四链体结构能够结合更多血红素,催化活性明显高于其他几种结构。G4/hemin-DNAzyme 的催化活性还受 G-四链体所结合的阳离子种类、环部及末端序列的影响。例如,相比于 G-四链体 3'-端,只有在 5'-端增加胸腺嘧啶(T)才能明显提高 G4/hemin-DNAzyme 的催化活性^[25]。此外,对辅因子血红素进行优化或化学修饰亦可以改善 G4/hemin-DNAzyme 的催化活性。如 Liu 等^[26]发现带组氨酸末端的氯化血红素与 G-四链体的结合能力得到明显改善,因而所形成的复合体催化活性也得以增强。

G-三链体由 G-三分体平面堆叠组成,存在时间短,稳定性较差,被认为是 G-四链体形成过程中的中间态^[27]。与 G-四链体相比,虽然 G-三链体在拓扑结构上存在明显差异,但是具有类似的过氧化物酶模拟活性。此外,由于基于 G-三链体的分子探针涉及更少的 G-C 碱基对,因此在设计上更为灵活,近年来引起了科研者的广泛关注。

基于 G4/hemin-DNAzyme、G3/hemin-DNAzyme 的催化特性,目前该类酶已被用作信号输出单元用于构建各种各样的生化传感器。例如,利用该类酶模拟辣根过氧化物酶活性,催化 H_2O_2 氧化 ABTS 产生颜色变化,进而构建比色型传感器(图 3)^[28-29];催化鲁米诺产生化学发光,构建荧光型传感器(图 3)^[30]。还可将 G4/hemin-DNAzyme 修饰在电极上,通过催化 H_2O_2 氧化还原性底物产生电信号变化,构建电化学传感器^[31-32]。

2 脱氧核酶在食品安全检测中的应用

2.1 重金属离子的检测

重金属具有危害性大、生物富集性强的特征,其会经工业三废进入食物链,在人体内积累可引起慢性中毒甚

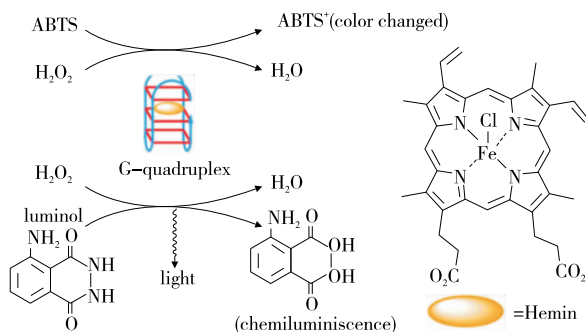


图3 G-四链体/血红素的过氧化物酶模拟
脱氧核糖核酸酶^[28]

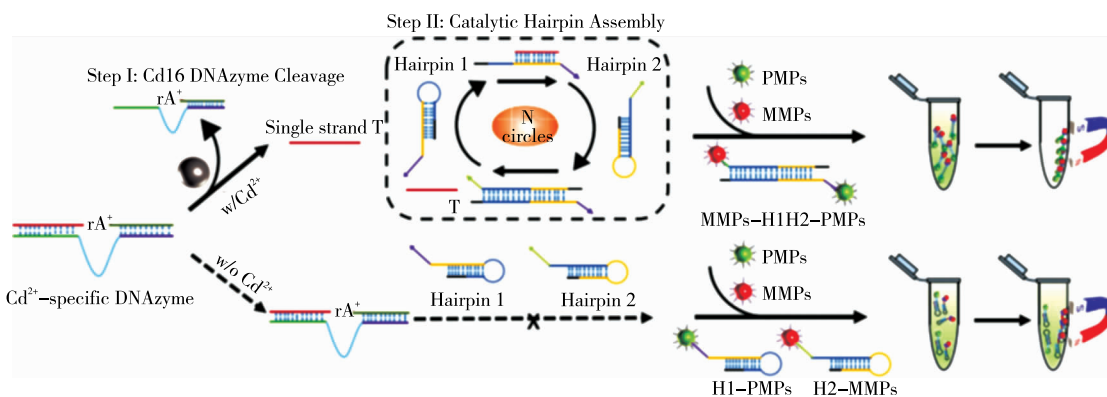
Figure 3 Peroxidase-like deoxyribonuclease activity of
G- quadruplex/heme

至死亡。建立痕量重金属离子检测技术成为迫切需求,对于防止重金属摄入、保障食品安全具有重要意义。传统的重金属分析方法(如电感耦合等离子体质谱法、原子吸收/发射光谱法)虽然具有准确度、灵敏度高的优点,但涉及复杂的样品前处理和大型仪器设备,难以满足食品样品日常快速检测需求^[33]。目前,已有以铅^[34]、汞^[35]、镉^[36]、铜^[37]等重金属为辅因子的特异性脱氧核酶相继被筛选出。利用脱氧核酶对靶标金属离子的高亲和力,可开发重金属离子选择性激活的脱氧核酶探针,在此基础上,对核酶探针进行化学修饰或结合纳米材料,构建荧光、比色、电化学传感平台,有望实现对食源性重金属离

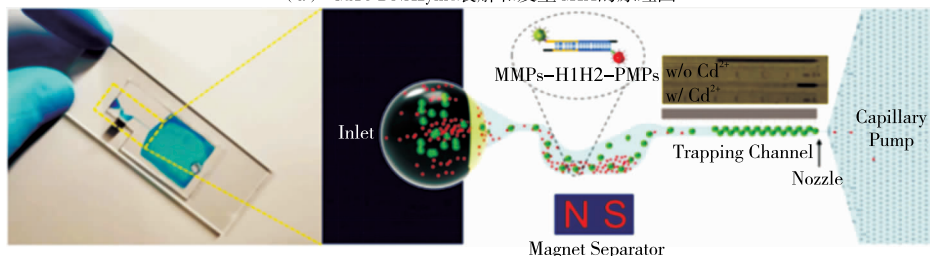
子的快速、精准检测。

例如,Vijitvarasan等^[38]基于脱氧核酶开发了一种适用于现场的纸质扫描法检测 Pb^{2+} 。首先,将含核酶切割位点(rA位点)底物链修饰于AuNP上, Pb^{2+} 特异性核酶链修饰在磁性微珠(MB)上。两者混合后,经底物链和核酶链杂交,可形成MB-脱氧核酶-AuNP复合物。在 Pb^{2+} 存在下,脱氧核酶被激活,将底物链切割成长短不一的两个片段。附着在AuNP上的DNA短链与核酶链结合不稳定,容易地从复合体中脱落下来。故施加磁场后,可将AuNP从MB-DNAzyme-AuNP复合物中分离出来。收集上清液中的AuNP并在色谱纸上点样进行浓缩,然后采用银增强剂溶液处理。由于硝酸银能在AuNP表面被还原为灰色的银颗粒,且银沉积量与 Pb^{2+} 的浓度呈正比,因而可根据灰色强度定量分析 Pb^{2+} 。该方法能选择性检测河水中的 Pb^{2+} ,检测限为1.1 nmol/L。在该设计中,由于底物链修饰于信号输出基元(AuNP)上,因而底物链加入的比例需小于或等于核酶链,否则易造成假阳性。然而有限的底物链则制约了核酶本身循环切割底物的放大效应,导致检测灵敏度不佳。

为了避免上述问题,Wang等^[39]在设计中引入催化发卡自组装放大技术,开发了一款基于脱氧核酶的便携式微流控装置用于饮用水中 Cd^{2+} 的超灵敏检测。其原理如图4所示,当引用水中存在 Cd^{2+} 时, Cd^{2+} 能特异性激活脱氧核酶切割底物,产生并释放短的切割片段。后者



(a) Cd16 DNAzyme裂解和发生CHA的原理图



(b) 用于定量检测镉离子的微流控芯片

图4 使用脱氧核酶功能化微流控芯片可视化检测饮用水中的镉离子^[39]

Figure 4 DNAzyme-functionalized portable microfluidic device for visual quantitation of
Cadmium (II) contamination in drinking water

可打开 DNA 发卡结构 1(H1),暴露与 DNA 发卡结构 2(H2)杂交位点。由于 H2 与 H1 的结合力强于切割片段,故 H2 能够竞争性将切割片段挤下来,得到 H1 和 H2 的杂交体(H1H2),实现催化发卡自组装。释放出的切割片段又可诱发下一轮催化发卡自组装,如此循环,即可得到大量 H1H2。H1H2 的黏性末端能分别与 DNA 功能化的磁性微珠(MMP)和聚苯乙烯微珠结合,得到 MMPs-H1H2-PMPs 复合体。将整个反应体系转移到微流控芯片上,在引入磁场分离 MMPs-H1H2-PMPs 复合体后,由于进入微孔道的 PMPs 减少,孔道中的液面柱高明显低于无 Cd^{2+} 的水样。

与上述检测体系不同,Lim 等^[40]采用了具有过氧化物酶模拟活性的 G-四链体构建比色型 3D 打印芯片,用于饮用水中无机汞离子(Hg^{2+})的检测研究。首先使用 3D 打印技术制造 x 含环形 DNA 模板的一次性芯片,在无 Hg^{2+} 存在时,含 12 个 T 碱基的引物可与环形 DNA 模板特异性杂交并触发滚环扩增反应(RCA)产生含多个 G-四链体结构的长链序列。G-四链体结构结合氯化血红素后可催化 H_2O_2 氧化 ABTS 发生颜色变化。而当 Hg^{2+} 存在时,由于 Hg^{2+} 可与引物上的 T 碱基结合形成 T- Hg^{2+} -T 复合物^[41],无法引发 RCA 反应生成 G-四链体,因而最终不能观察到溶液颜色变化。由于引入了 RCA 核酸放大技术,该芯片可灵敏检测自来水样品中的 Hg^{2+} ,检测限低至 $3.6 \mu\text{g/L}$ 。该策略将检测平台转移到芯片上,实现了设备的微型化,在此基础上采用肉眼可观察的比色信号输出模式,有望在现场、快速检测方面取得突破。

2.2 食源性致病菌的检测

食源性致病菌是指通过食物或饮用水进入人体,并引起机体功能障碍的致病性微生物,主要包括大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、幽门螺杆菌等。当前,食源性致病菌污染已成为食品安全问题的重要来源,对公共卫生体系造成了巨大冲击。尽早发现并实现致病菌的现场快速检测,对于避免致病菌

引起的疾病暴发及减少其持续流行所带来的负面影响具有重要意义。然而传统检测技术,如菌落形态观察、生物发光法、聚合酶链式反应法等,难以满足快速检测需求^[42]。以 DNA 为基础的脱氧核酶将分子识别元件和催化信号放大元件双重功能集成于一体,在致病菌的快速、灵敏检测中显示出良好的应用前景。

如 Yousefi 等^[43]基于脱氧核酶设计了一种应用于食品包装袋上的生物传感器,旨在通过食品包装袋即可实时评估大肠杆菌污染情况,检测原理如图 5 所示。该传感器通过将大肠杆菌特异性响应的荧光脱氧核酶探针与透明的环烯烃聚合物薄膜(COP)共价连接而成。当大肠杆菌存在时,荧光脱氧核酶探针被激活,进而切割 rA 位点产生标记有淬灭基团的短链。由于短链与脱氧核酶臂结合不稳定,可从脱氧核酶上脱落下来,使得荧光基团和淬灭基团相互远离,荧光恢复。试验结果显示,这种生物传感器在 pH 为 3~9 条件下至少能稳定保存 14 d,并且能实现肉、苹果汁中大肠杆菌的即时检测,检测限低至 10^3 CFU/mL 。该检测方法简单、快速,但是由于核酶探针直接与食品接触,因此有两个方面的问题值得关注:① 保证核酶探针在复杂食品基质中的稳定性是实现精准检测的关键;② 引入化学荧光基团的安全性,以及消费者的认可度。

而将核酶探针与便携式检测平台结合,不仅可以保证检测的便捷性和时效性,还可规避探针与复杂基质长期接触带来的各种隐患。基于这种理念,Ali 等^[44]利用脱氧核酶构建了便携式纸基传感器检测幽门螺杆菌。其检测原理如图 6 所示,首先将脱氧核酶修饰于琼脂糖珠上,后者固定在纸基芯片上。在脱氧核酶的 5'-末端设计 DNA 标签,以便通过碱基互补与连接有尿素酶的 DNA 相结合。当幽门螺杆菌存在时,脱氧核酶发生特异性切割反应,得到含有尿素酶的 DNA 片段,并随着溶液从纸芯片的传感域移动到检测域。之后,尿素酶水解检测域中的尿素,使溶液 pH 值升高,最终导致酚红指示剂的颜色

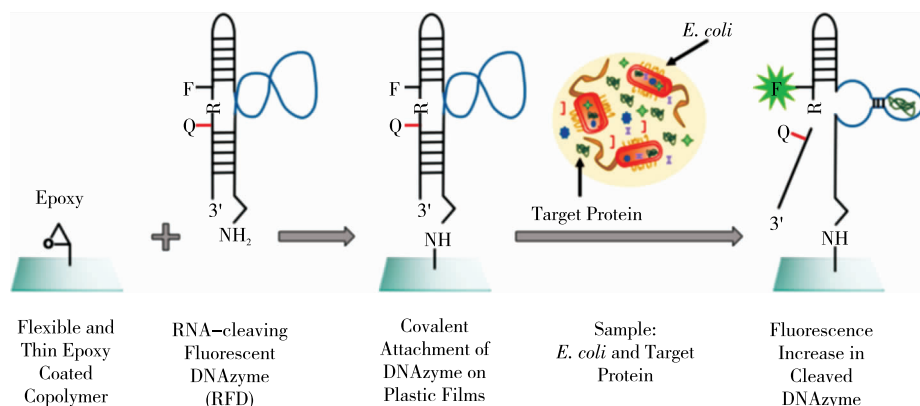


图 5 通过在食品包装上打印大肠杆菌激活的脱氧核酶探针实时监测食品污染的原理图^[43]

Figure 5 Schematic illustration of real-time monitoring of food contamination by printing *E. coli*-activated DNzyme probes on food packaging

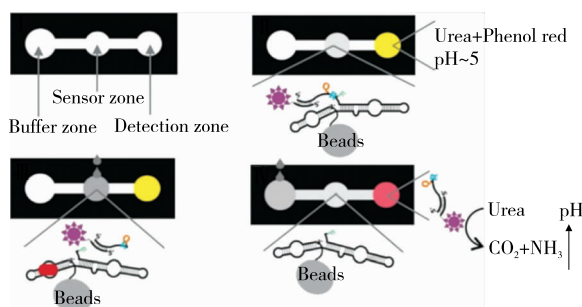


图6 基于脱氧核酶的比色型纸芯片用于幽门螺杆菌检测的原理图^[44]

Figure 6 Working principle of DNAzyme-based colorimetric paper sensor for *Helicobacter pylori*

色由黄色变为红色。该传感器能够灵敏、特异性地检测人类粪便样本中的幽门螺杆菌,并在几分钟内提供结果,检测限低至 10^4 CFU/mL。该策略无需借助外界仪器即可完成检测,为食源性致病菌的快速检测提供了新思路。

2.3 微生物毒素的检测

微生物毒素是指由细菌或真菌合成分泌的、不可自复制的有毒化学物质,种类繁多且普遍具有致癌、致畸作用。如赭曲霉毒素 A 是由青霉菌属和曲霉菌属经次级代谢产生的毒素,常见于未妥善保存的谷物、葡萄酒、果汁中,被国际癌症研究机构列为 2B 类致癌物质^[45]。黄曲霉毒素则是由黄曲霉和寄生曲霉等菌株产生的双呋喃环类毒素,常见于发霉的花生、玉米、大米等农产品中,1993 年被世界卫生组织划定为 1 类致癌物^[46]。不同于食源致病菌可通过热处理灭活,大多微生物毒素性质稳定,难以被破坏。因此,发展分析准确、鉴定微生物毒素的传感技术是避免毒素中毒最有效的途径。

Zhang 等^[47]巧妙结合磁分离技术和便携式血糖仪检测平台,开发了功能核酸探针用于赭曲霉毒素的特异、灵敏分析。其原理如图 7 所示,通过在磁珠上固定脱氧核酶底物链和特异性识别赭曲霉毒素的核酸适配体,构建传感平台。其中底物链末端修饰了转化酶,核酸适配体的部分序列可与脱氧核酶杂交,从而使脱氧核酶也锚定于磁珠表面。当赭曲霉毒素存在时,可诱导核酸适配体发生构象变化释放脱氧核酶。后者则可与底物链结合,在 Zn^{2+} 的辅助下切割底物,使修饰了转化酶的短链从磁珠表面脱落进入溶液。同时,释放的脱氧核酶又可催化下一个底物断裂,实现循环释放大量短链。溶液中的转化酶可催化蔗糖转化为葡萄糖,后者可通过便携式血糖仪检测。试验表明,该平台能选择性检测食物中的曲霉毒素,检测限为 0.88 pg/mL。

Wang 等^[48]则开发了基于适体/G-四链体脱氧核酶探针的适体传感器,通过荧光信号变化判断食品中是否存在黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)。当 AFB₁ 不存在时,重组的 G-四链体/氯化血红素体系可催化无荧光邻苯二胺

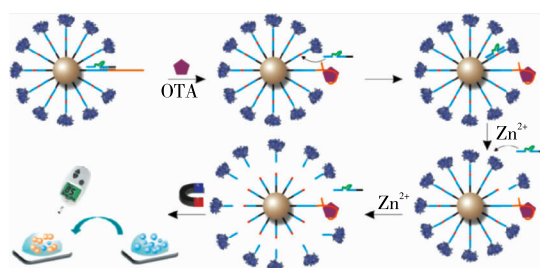


图7 基于脱氧核酶放大技术的适配体传感平台检测赭曲霉毒素的工作原理图^[47]

Figure 7 Schematic illustration of aptasensing platform for OTA detection based on DNAzyme amplification

(OPD)生成有荧光的 2,3-二氨基吩嗪(DAP)。而当 AFB₁ 存在时,将诱导核酸适配体发生构象变化,进而破坏 G-四链体/氯化血红素体系,因而检测不到荧光产生。该研究引入磁氧化多壁碳纳米管吸附多余的血红素,有效降低了检测背景信号,从而实现对 AFB₁ 的高灵敏检测,检出限低至 0.02 ng/mL。相比于比色传感平台,荧光传感平台在检测灵敏度方面具有明显优势,更加适合微生物毒素这种痕量、高危害性食品污染物的检测。

2.4 兽药残留的检测

抗生素是最广泛使用的一类兽药,常被用于防治畜禽传染性疾病和抗寄生虫。残留在畜禽体内的抗生素最终可通过食物链进入人体并富集,从而威胁人类健康^[49]。针对抗生素滥用问题,Zhou 等^[50]构建了一种基于引物交换反应(PER)和脱氧核酶的信号放大方法检测卡拉霉素,检测原理如图 8 所示。当检测样品中存在卡拉霉素时,其可诱导核酸适配体发生构象变化,进而从发卡 1 (HP1)上脱落下来,暴露引物结合位点。之后,引物与 HP1 杂交,在 Bst-DNA 聚合酶启动作用下自主合成 Mg^{2+} 依赖性脱氧核酶序列,该过程可重复进行,产生大量脱氧核酶序列。在 Mg^{2+} 辅因子的存在下,脱氧核酶循环切割信号夹底物中的 rA 位点,释放出大量游离的 G-四链体片段。后者与有机染料硫黄素 T(ThT)结合后,可显著增强 ThT 的荧光,从而实现对卡拉霉素的高灵敏度检测,检测限低至 0.36 nmol/L,且实现对真实牛奶样品中的卡拉霉素的检测。

同样采用了 G-四链体结构,Tang 等^[51]则利用其过氧化物酶模拟活性实现了对四环素的可视化检测。当检测体系中不存在四环素时,G-四链体结构可顺利结合氯化血红素,之后催化 H_2O_2 彻底氧化 TMB,颜色由无色变成黄色。当四环素存在时,其可通过 $\pi-\pi$ 堆积力竞争性结合氯化血红素,大大降低 G4/hemin-DNAzyme 复合体的生成,导致 TMB 不能被充分氧化,溶液颜色呈绿色。该方法通过简单的颜色变化即可检测四环霉素,检测限为 3.1 nmol/L。

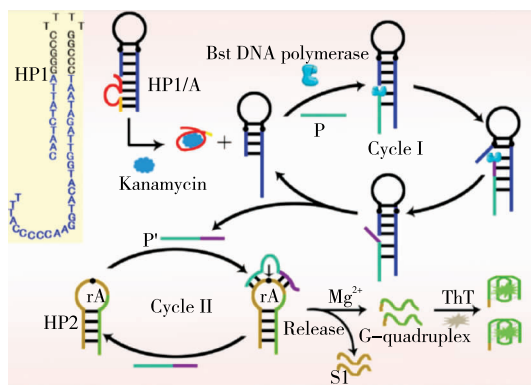


图 8 基于引物交换反应和 Mg^{2+} 依赖性脱氧核酶的同步信号放大检测卡那霉素的平台原理图^[50]

Figure 8 Schematic illustration of platform for detecting kanamycin based on the synchronization signal amplification of primer exchange reaction and Mg^{2+} dependent DNAzyme

总体而言,当前基于脱氧核酶的抗生素检测方法大多需要与核酸适配体结合,通过将核酸适配体对抗生素的特异性识别事件转化为脱氧核酶的激活事件,从而实现抗生素的选择性检测。因此,促进脱氧核酶在抗生素检测方面广泛应用的前提在于丰富识别元件或识别机理。

2.5 其他非法成分的检测

非法食品添加剂、食品接触材料中有害小分子的迁移等是引发食品安全问题的又一来源。针对上述物质开发精确、快速的检测技术是食品安全检测的重要内容之一。如双酚 A (BPA) 是一种内分泌干扰化合物,即使在非常低的浓度下也会对人体健康产生不利影响^[52]。设计可靠、灵敏的双酚 A 检测方法对于保护食品安全和人类健康具有重要意义。基于此, Pan 等^[53]将具有信号放大功效的 DNA 电路与 Mg^{2+} 依赖性脱氧核酶集成到传感系统,用于检测双酚 A。双酚 A 与结合适配体结合后,可激活 DNA 电路,通过链置换反应输出大量辅助链。辅助链可稳定 Mg^{2+} 依赖性脱氧核酶构象,使其在 Mg^{2+} 存在的情况下能将双标记 (FAM 和 Dabcyl) 的底物 DNA 切割成两段,导致荧光团和猝灭团的分离,产生荧光信号。该生物传感器具有良好的选择性和超高灵敏度,检测限低至 50 fmol/L,能实现牛奶样品中双酚 A 的检测,且检测结果与液相色谱结合质谱 (LC-MS) 无明显差异。

3 总结与展望

综上所述,脱氧核酶凭借合成成本低、靶标丰富、特异性高、可设计性强的优点,目前已作为信号识别元件或信号输出元件被广泛应用于食品安全检测领域。结合当前研究开发现状和未来实际应用需求,基于脱氧核酶的食品检测传感器在以下 3 个方面有待改善:① 在实际检测体系中的稳定性,尽管脱氧核酶的热稳定性和耐酸碱

性能均优于传统蛋白酶,但脱氧核酶的构象稳定性很大程度依赖于环境中金属离子的含量,而大多数情况下实际检测体系无法满足这一需求。因此,如何提高脱氧核酶在苛刻环境下的构象稳定性应该是未来研究的重点。② 在复杂体系中的抗干扰能力,由于食品基质复杂,脱氧核酶生物传感器在实际应用中面临着其他物质或核酸酶的影响,导致二级结构被破坏。因此,需要综合评价其不同复杂样品基质中对靶标的特异性、灵敏度以及稳定性等性能,并在此基础上选择性引入化学修饰以提高其抗酶切稳定性。③ 目前大部分研究工作还停留于实验室阶段,检测过程繁琐。与微流控芯片、试纸条、移动设备结合的快速、现场检测方法的开发将是未来的发展方向。随着机理的完善及多学科交叉融合,基于脱氧核酶的分子传感器在检测性能、平台构建、应用革新方面都将得到完善,有望在食品安全分析领域发挥重要作用。

参考文献

- [1] 韩爽, 丁雨欣, 冷秋雪, 等. 分子印迹电化学传感器在食品检测中的研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(2): 205-210.
HAN Shuang, DING Yu-xin, LENG Qiu-xue, et al. Application of magnetic covalent organic frameworks in food safety analysis[J]. Food & Machinery, 2021, 37(2): 205-210.
- [2] Food Standards Agency. The FSA foodborne disease strategy 2010-15 (England) [S]. London: Food Standards Agency, 2011.
- [3] 董浩爽, 尚久舒. 食品安全检验中高效液相色谱法的应用现状[J]. 中国食品, 2021(13): 56-57.
DONG Hao-shuang, SHANG Jiu-shu. Application status of high performance liquid chromatography in food safety inspection[J]. China Food, 2021(13): 56-57.
- [4] 谢少冬, 王园, 范春蕾, 等. 液质联用法快速分析畜禽肉中多肽类抗生素[J]. 中国口岸科学技术, 2021, 3(12): 79-84.
XIE Shao-dong, WANG Yuan, FAN Chun-lei, et al. Rapid analysis of polypeptide antibiotics in livestock and poultry meat by LC-MS[J]. China Port Science and Technology, 2021, 3(12): 79-84.
- [5] 李传友, 曾宝锋, 赵燕英, 等. 恒温隔绝式聚合酶链式反应检测食品中金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 339-345.
LI Chuan-you, ZENG Bao-feng, ZHAO Yan-ying, et al. Detection of Staphylococcus aureus in food by thermostatic isolation polymerase chain reaction[J]. Food Science, 2022, 43(2): 339-345.
- [6] 龚蕾, 周陶鸿, 彭青枝, 等. 免疫层析法快速检测动物源性食品中五氯酚酸钠含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(3): 888-893.
GONG Lei, ZHOU Tao-hong, PENG Qing-zhi, et al. Rapid determination of sodium pentachlorophenolate in animal derived foods by immunochromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(3): 888-893.
- [7] MADSEN M, GOTHELF K V. Chemistries for DNA nanotechnology[J]. Chemical Reviews, 2019, 119(10): 6 384-6 458.
- [8] BREAKER P R, JOYCE G F. A DNA enzyme that cleaves RNA[J].

- Cell Chemical Biology, 1994, 1(4): 223-229.
- [9] CAMDEN A J, WALSH S M, SUK S H, et al. DNA oligonucleotide 3'-phosphorylation by a DNA enzyme[J]. Biochemistry, 2016, 55(18): 2 671-2 676.
- [10] WANG Jing, YU Shan-shan, WANG Fu-an, et al. A self-catabolic multifunctional DNAzyme nanosponge for programmable drug delivery and efficient gene silencing[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(19): 10 766-10 774.
- [11] GAO Yu-hui, CHEN Ying-ying, SHANG Jin-hua, et al. Enzyme-Free autocatalysis-driven feedback DNA circuits for amplified aptasensing of living cells [J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2022, 14(4): 5 080-5 089.
- [12] CHANDRA M, SACHDEVA A, SILVERMAN S K. DNA-catalyzed sequence-specific hydrolysis of DNA [J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5: 718-720.
- [13] SEMLOW D R, SILVERMAN S K. Parallel selections in vitro reveal a preference for 2'-5'RNA ligation upon deoxyribozyme-mediated opening of a 2',3'-cyclic phosphate[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 61: 207-215.
- [14] LI Ying-fu, BREAKER R R. Phosphorylating DNA with DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(6): 2 746-2 751.
- [15] LI Ying-fu, LIU Yong, BREAKER R R. Capping DNA with DNA[J]. Biochemistry, 2000, 39(11): 3 106-3 114.
- [16] TRAVASCIO P, LI Ying-fu, SEN D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA-aptamer-hemin complex[J]. Cell Chemical Biology, 1998, 5: 505-517.
- [17] MCCONNELL E M, COZMA I, MOU Quan-bin, et al. Biosensing with DNAzymes[J]. Chemical Society Reviews, 2021, 50: 8 954-8 994.
- [18] BAUM D A, SILVERMAN S K. Deoxyribozymes: Useful DNA catalysts in vitro and in vivo[J]. Cellular and Molecular Life Sciences Cmls, 2008, 65: 2 156-2 174.
- [19] SANTORO S W, JOYCE G F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(9): 4 262-4 266.
- [20] MA Y, IIDA K, NAGASAWA K. Topologies of G-quadruplex: Biological functions and regulation by ligands[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 531(1): 3-17.
- [21] MERGNY J L, SEN D. DNA Quadruple helices in nanotechnology[J]. Chemical Reviews, 2019, 119(10): 6 290-6 325.
- [22] BONNAT L, DAUTRICHE M, SAIDI T, et al. Scaffold stabilization of a G-triplex and study of its interactions with G-quadruplex targeting ligands [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2019, 17: 8 726-8 736.
- [23] NAKAYAMA S, SINTIM H O. Colorimetric split G-quadruplex probes for nucleic acid sensing: improving reconstituted DNAzyme's catalytic efficiency via probe remodeling[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(29): 10 320-10 333.
- [24] ALIZADEH N, SALIMI A, HALLAJ R. Hemin/G-quadruplex horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme: Principle and biosensing application[J]. Advances in Biochemical Engineering/Bio-technology, 2020, 170: 85-106.
- [25] LI Wang, LI Yong, LIU Zhuo-liang, et al. Insight into G-quadruplex-hemin DNAzyme/RNAzyme: Adjacent adenine as the intramolecular species for remarkable enhancement of enzymatic activity[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(15): 7 373-7 384.
- [26] LIU Yan, LAI Pei-dong, XU Liang, et al. Superior G-quadruplex DNAzyme through functionalized modification of hemin cofactor[J]. Chemical Communications, 2020, 56: 2 427-2 430.
- [27] 温翠娇. 偶联物 pG3-RHAU 靶向识别 G-三链体及 SNP 与 G-四链体多态性研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2020: 29-33.
- WEN Cui-jiao. Sensing and Targeting G-triplex by pG3-RHAU and Study on SNP and G-quadruplex polymorphism[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2020: 29-33.
- [28] PENG Han-yong, NEWBIGGING A M, WANG Zhi-xin, et al. DNAzyme-mediated assays for amplified detection of nucleic acids and proteins [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(15): 190-207.
- [29] LI Rui-ying, LIU Qiang, JIN Yan, et al. G-triplex/hemin DNAzyme: An ideal signal generator for isothermal exponential amplification reaction-based biosensing platform [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1 079: 139-145.
- [30] ZHENG Jiao, WAI Jing-luen, LU Yi, et al. DNAzyme sensor uses chemiluminescence resonance energy transfer for rapid, portable, and ratiometric detection of metal ions[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(31): 10 834-10 840.
- [31] HASHKAVAVI A B, RAOOF J B, PARK K S. Sensitive electrochemical detection of tryptophan using a Hemin/G-Quadruplex aptasensor[J]. Chemosensors, 2020, 8(4): 100-110.
- [32] ZHAO Ling-li, PAN Hui-yu, ZHOU Ying-lin, et al. Ultrasensitive detection of microRNA based on a homogeneous label-free electrochemical platform using G-triplex/methylene blue as a signal generator[J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1 116: 62-69.
- [33] 韩世明, 李志, 王月霞, 等. 电感耦合等离子体质谱法同时检测贵州省芸豆中 13 种元素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(4): 1 185-1 192.
- HAN Shi-ming, LI Zhi, WANG Yue-xia, et al. Simultaneous determination of 13 kinds of elements in Phaseolus vulgaris in Guizhou Province by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(4): 1 185-1 192.
- [34] YANG Yong-jie, LI Wei-xuan, LIU Jue-wen. Review of recent progress on DNA-based biosensors for Pb²⁺ detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1 147: 124-143.
- [35] WANG Hui, YANG Liu, WANG Jun, et al. Electrochemical impedance biosensor array based on DNAzyme-functionalized single-walled carbon nanotubes using Gaussian process regression for Cu (II) and Hg(II) determination[J]. Microchimica Acta, 2020, 187: 207-215.
- [36] HUANG P J, LIU Jue-wen. Rational evolution of Cd²⁺-specific DNAzymes with phosphorothioate modified cleavage junction and Cd²⁺ sensing[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(12): 6 125-

- 6 133.
- [37] NAKAMA T, TAKEZAWA Y, SASAKI D, et al. Allosteric regulation of DNzyme activities through intrastrand transformation induced by Cu (II)-mediated artificial base pairing[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(22): 10 153-10 162.
- [38] VILLITVARASAN P, OAEW S, SURAREUNGCHAI W. Paper-based scanometric assay for lead ion detection using DNzyme[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 896: 152-159.
- [39] WANG Gao-bo, WU Ming-hui, CHEN Ting-hsuan, et al. Portable microfluidic device with thermometer-like display for real-time visual quantitation of cadmium (II) contamination in drinking water[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1 160: 338444.
- [40] LIM J W, KIM T Y, WOO M A, et al. 3D-printed rolling circle amplification chip for on-site colorimetric detection of inorganic mercury in drinking water[J]. *Food Chemistry*, 2019, 300: 125177.
- [41] MIYAKE Y, TOGASHI H, AKIRA O, 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.
- [42] 张明娟, 王娟, 袁磊, 等. 多重聚合酶链式反应技术在食源性致病菌检测上的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(2): 305-310.
- ZHANG Ming-juan, WANG Juan, YUAN Lei, et al. Application of multiplex polymerase chain reaction in detection of foodborne pathogens[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(2): 305-310.
- [43] YOUSEFI H, ALI M M, DIDAR T F, et al. Sentinel wraps: real-time monitoring of food contamination by printing DNzyme probes on food packaging[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(4): 3 287-3 294.
- [44] ALI M M, LI Y F, BRENNAN J D. A DNzyme-based colorimetric paper sensor for *Helicobacter pylori* [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(29): 9 907-9 911.
- [45] 张红艳, 黄丽珊, 魏小红, 等. 基于适配体荧光传感器检测山药和薏苡仁中的赭曲霉毒素 A[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(3): 874-880.
- ZHANG Hong-yan, HUANG Li-shan, WEI Xiao-hong, et al. Detection of ochratoxin A in yam and coix seed based on aptamer fluorescence sensor[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(3): 874-880.
- [46] 叶萍, 张慧娥, 李光, 等. 质谱技术在黄曲霉毒素检测中的研究进展[J]. *食品与机械*, 2021, 37(10): 227-234, 240.
- YE Ping, ZHANG Hui-e, LI Guang, et al. Recent advances of mass spectrometry in the detection of aflatoxin[J]. *Food & Machinery*, 2021, 2021, 37(10): 227-234, 240.
- [47] ZHANG Song-bi, LUAN Yun-xia, LU Yi, et al. DNzyme amplified aptasensing platform for Ochratoxin A detection using a personal glucose meter [J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2021, 13(8): 9 472-9 481.
- [48] WANG Lu-min, ZHU Fa-wei, CHEN Xiao-qing, et al. Rapid and visual detection of aflatoxin B₁ in foodstuffs using aptamer/G-quadruplex DNzyme probe with low background noise[J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 581-587.
- [49] VALERIE G. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin: A comprehensive review [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 90: 363-377.
- [50] ZHOU Wen-jiao, XU Lin, JIANG Bing-ying. Target-initiated autonomous synthesis of metal-ion dependent DNzymes for label-free and amplified fluorescence detection of kanamycin in milk samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1 148: 238195.
- [51] TANG Yue, HUANG Xiao-huan, WANG Xue-li, et al. G-quadruplex DNzyme as peroxidase mimetic in a colorimetric biosensor for ultrasensitive and selective detection of trace tetracyclines in foods[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130560.
- [52] ZHANG Yu-huan, LEI Yan-an, LU Hao, et al. Electrochemical detection of bisphenols in food: A review[J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128895.
- [53] PAN Jia-feng, LIU Zhi, CHEN Jun-hua. An amplifying DNA circuit coupled with Mg²⁺-dependent DNzyme for bisphenol A detection in milk samples[J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128975.
- (上接第 116 页)
- [17] 宋海涛, 何文浩, 原魁. 一种基于 SIFT 特征的机器人环境感知双目立体视觉系统[J]. *控制与决策*, 2019, 34(7): 1 545-1 552.
- SONG Hai-tao, HE Wen-hao, YUAN Kui. A robot environment perception binocular stereo vision system based on SIFT feature[J]. *Control and Decision*, 2019, 34(7): 1 545-1 552.
- [18] 马伟苹, 李文新, 孙晋川, 等. 基于粗-精立体匹配的双目视觉目标定位方法[J]. *计算机应用*, 2020, 40(1): 227-232.
- MA Wei-ping, LI Wen-xin, SUN Jin-chuan, et al. Binocular vision target location method based on coarse fine stereo matching[J]. *Journal of Computer Applications*, 2020, 40(1): 227-232.
- [19] 罗久飞, 邱广, 张毅, 等. 基于自适应阈值的 SURF 双目视觉匹配算法研究[J]. *仪器仪表学报*, 2020, 41(3): 240-247.
- LUO Jiu-fei, QIU Guang, ZHANG Yi, et al. Research on SURF binocular vision matching algorithm based on adaptive double threshold[J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2020, 41(3): 240-247.
- [20] 程禹, 王晓华, 王文杰, 等. 基于改进 AKAZE 算法的图像特征匹配方法[J]. *西安工程大学学报*, 2020, 34(8): 51-56.
- CHENG Yu, WANG Xiao-hua, WANG Wen-jie, et al. Image feature matching method based on improved AKAZE algorithm[J]. *Journal of Xi'an Polytechnic University*, 2020, 34(8): 51-56.
- [21] 苏婷婷, 张好剑, 王云宽, 等. 基于费拉里法的 Delta 机器人动态目标抓取算法[J]. *华中科技大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(6): 128-132.
- SU Ting-ting, ZHANG Hao-jian, WANG Yun-kuan, et al. Dynamic target grasping algorithm of delta robot based on Ferrari method[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2018, 46(6): 128-132.