

三链核酸在食品安全检测中的研究进展

Research progress of triplex nucleic acid in food safety detection

孙海燕^{1,2} 雷艳丽^{1,2} 谌委菊^{1,2} 全珂^{1,2}

SUN Hai-yan^{1,2} LEI Yan-li^{1,2} CHEN Wei-ju^{1,2} QUNA Ke^{1,2}

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114;

2. 长沙理工大学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 University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:文章综述了三链核酸的结构与稳定性,重点介绍了基于三链核酸的荧光、电化学、比色分析法在食源性有害物质检测中的研究进展,并探讨了三链核酸在食品安全检测领域中面临的挑战和发展前景。

关键词:三链核酸;稳定性;食品安全;快速检测;功能核酸

Abstract: This paper reviews the structure and stability of triplex nucleic acid, the progress of triplex nucleic acid-based fluorescence, electrochemical, colorimetric platform in detecting food borne hazards, and discusses the challenges and future development prospect of triplex nucleic acid-based detection technology in food safety field.

Keywords: triplex nucleic acid; stability; food safety; rapid detection; functional nucleic acid

随着经济的快速发展和生活水平的提高,近年来对食品安全的关注度也得到了极大提升。影响食品安全的因素主要包括非法成分添加、真菌毒素污染、食源性致病菌污染、农兽药残留、重金属污染等^[1-3]。这些食源性有害物质的摄取对人体健康造成了一定威胁,轻则腹泻,重则死亡^[4]。因此,建立食品中痕量有害物的分析检测技术对于评估食物产业链中各阶段潜在有害因素、减少被污染食物的市场流通十分必要。传统的食源性有害物质检测方法主要包括色谱分析法^[5-6]、质谱法^[7-8]、化学免疫分析法^[9-10]、聚合酶链式反应^[11-13]等,上述方法虽然准

确性高,但是前处理复杂、对操作者专业素养要求高,抑或涉及大型仪器设备,不适用于食品的日常、现场检测需求。因此,开发简单、快速、可推广的食品有害物质检测新方法是近年来食品安全领域关注的重点和热点。

三链核酸(triplex nucleic acid, TNA)是在 Watson-Crick 双链核酸基础上,由第 3 条寡核苷酸链以 Hoogsteen 氢键嵌入到双链大沟中形成的三螺旋核酸结构。三链核酸结构具有柔软、可设计性强的特点,因此可对其环部或茎部进行理性设计,使三链核酸能够响应特定刺激物或靶标发生构象转化,进而实现功能活化^[14]。此外,区别于其他功能核酸,三链核酸可实现信号识别单元和信号输出单元的分离,在信号转导方面具有明显优势,易与多种信号输出模式结合,如荧光、比色、电化学、拉曼等,便于根据实际检测需求开发适宜传感平台^[15-16]。研究拟综述三链核酸的结构与性质,以及基于三链核酸构建的荧光传感器、电化学传感器、比色传感器、其他小众传感器在食品安全分析领域的应用,并对三链核酸在食品安全快速分析检测中的发展前景与挑战进行展望,以期对食品有害物的快速检测提供新思路。

1 三链核酸的结构与稳定性

1.1 三链核酸结构

在核酸双螺旋结构中,处于两条链之间的碱基对并不在核酸链的轴上,因此造成双链结构的不对称性,形成大沟和小沟。其中,大沟中存在多余的氢键给体和受体,为第 3 条核酸链附着进而形成三链复合体提供了结构基础。就具体结合方式而言,第 3 条核酸链既能以平行方式,也能以反平行的方式与双链核酸缠绕在一起,如图 1(a)所示^[17]。通常,富含嘧啶的单链 DNA 以平行的方式与双链 DNA 中富含嘌呤的链经 Hoogsteen 键结合,而富含嘌呤的单链 DNA 则以反平行的方式与双链 DNA

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:孙海燕,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:2022-04-11

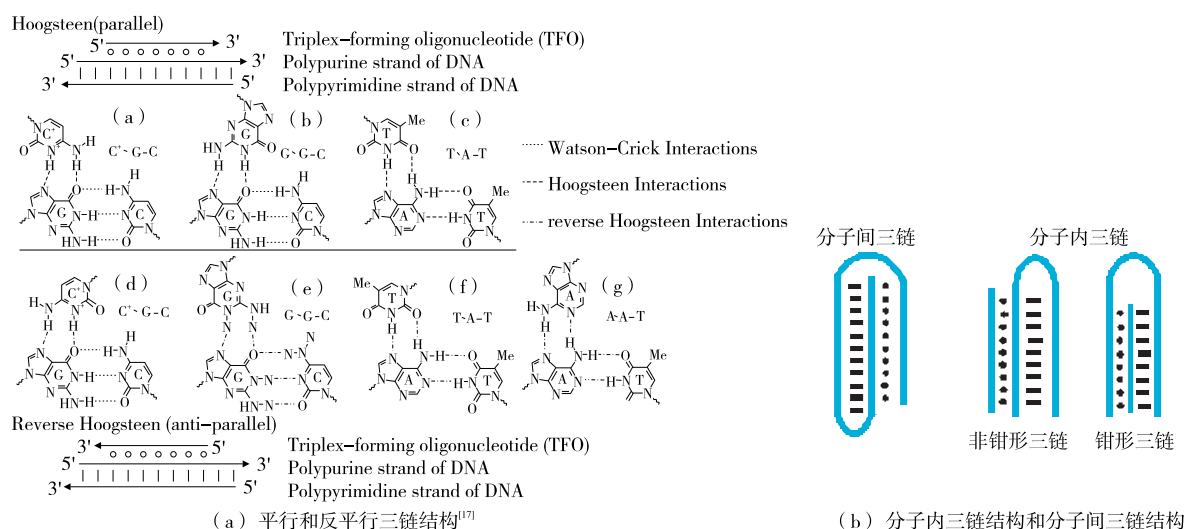


图 1 三链核酸结构

Figure 1 Different triplex structures

中富含嘌呤的链经反 Hoogsteen 键结合。与双链核酸类似,三链核酸的形成建立在碱基特异性键合基础上,主要分为 C · G-C、G · G-C、T · A-T 的平行三重结构以及 C · G-C、G · G-C、T · A-T、A · A-T 的反平行三重结构[图 1(a)]。根据第 3 条链的来源,三链核酸可分为分子内三螺旋结构和分子间三螺旋结构[图 1(b)]。前者是由一条单链寡核苷酸通过自身折叠缠绕形成的三螺旋结构,其碱基序列具有一定镜像重复性。后者又可分为两种形式:① 单链核酸与双链核酸经 Hoogsteen 或反 Hoogsteen 键形成的三螺旋结构;② 一条单链核酸与另一单链核酸经 Watson-Crick 和 Hoogsteen 双重作用形成的钳夹式三螺旋结构。

1.2 影响三链核酸稳定性的因素

目前,已有一系列以三螺旋结构为基础的三链核酸分子探针被开发用于生化传感分析,而其实现功能的基本前提是三螺旋结构的稳定形成。影响三螺旋结构稳定性的因素可分为内因和外因两个方面,其中内因主要来源核酸序列本身,包括三螺旋区域的链长度^[18]、碱基组成^[19]、骨架本性^[20]等因素。外因则指外界环境对三螺旋结构形成的影响,主要涉及溶液中阳离子浓度^[21]、pH^[22]、温度^[23]等因素。上述因素往往通过影响第 3 条核酸链与核酸双链结合时的氢键作用强度或双链核酸重排时的能量大小,来影响三螺旋结构的稳定性^[24]。

1.2.1 链长度的影响 参与三螺旋结构形成的寡聚脱氧核苷酸(ODN)长度是影响其稳定性的重要因素。一般来说,链长度太短,Hoogsteen 氢键作用力太弱,不易形成稳定的三螺旋结构。链长度过长,则会发生自折叠形成稳定的二级结构,不利于三螺旋结构的形成。研究^[25]表明,在分子间嘌呤·嘌呤·嘧啶三螺旋 DNA 的形成中,最佳链长

度为 12 个碱基。Brown 等^[26]发现,在 RNA · DNA-DNA 型三螺旋结构形成中,第 3 条 RNA 链长度不得少于 19 个核苷酸,但将其长度延长至 27 个核苷酸并不会提高三链的稳定性。此外,Francesco 等^[27]发现钳形三链环部长度亦会影响其稳定性。环部长度缩短,一方面可以降低三链形成所需熵变,进而有利于三链的形成,使其稳定区间向碱性 pH 移动;另一方面,其可提高三链结构的解链温度(T_m),改善热稳定性。

1.2.2 碱基组成的影响 三螺旋结构的形成严格遵循碱基配对原则。碱基错配、缺失均会导致第 3 条链扭曲,显著降低三链结构的稳定性^[28]。Pan 等^[29]发现,三螺旋结构稳定性的破坏程度与具体的错配位置有关。一般而言,由于中间位置的错配能够干扰相邻位置碱基的相互作用,因此中间错配比末端错配更容易破坏三螺旋结构。此外,三螺旋结构的稳定性与 T · A-T/C · G-C 三联体的相对含量密切相关^[30]。当 T · A-T 含量由 50% 提升至 100% 时,三链稳定的 pH 区间可向右拓宽 4 个单位,表明序列的碱基组成对三链形成的影响不可忽视。

1.2.3 碱基及核酸骨架修饰的影响 甲基化是最常见的碱基修饰方式之一,通常选择胞嘧啶的 5 位点修饰。甲基化修饰可增强三链核酸的疏水作用力,进而拓宽三链稳定存在的 pH 区间,同时提高其解链温度和亲和常数^[31]。然而并不是所有取代基都能增加三链的稳定性,且相同化学基团在不同位点取代对三链稳定性的影响也不尽相同。若在胞嘧啶的 5 位点采用丙基或溴取代会降低三链的稳定性,但若在尿嘧啶的 5 位点取代,则有利于三链的形成^[32]。这可能与取代后成键原子的电荷密度变化有关。此外,核酸骨架特性也与三螺旋结构的稳定性有关。研究^[33]表明,以多肽骨架取代磷酸二酯骨架所得到的肽核酸与 DNA 形成三链结构的稳定性得到明显改

善有关。

1.2.4 pH 和温度的影响 通常,第3条链中胞嘧啶(C)的N3位点发生质子化后才可与双螺旋中鸟嘌呤(G)形成 Hoogsteen 氢键。因此,C·G-C 含量较高的三螺旋结构对环境 pH 更敏感,且 C·G-C 含量越高,相应三螺旋结构稳定存在的 pH 值越低。与之相比,T·A-T 碱基对的形成不涉及碱基的质子化,因而富含 T·A-T 的三螺旋结构能在中性甚至碱性环境中稳定存在。Liu 等^[34]发现,随着 pH 的降低,含有 60% C·G-C 的三链核酸形成率逐渐升高,而含 100% T·A-T 的三链核酸形成率并未发生改变。此外,对胞嘧啶的 C5 位点进行甲基化修饰或引入嵌入剂噻唑橙(TO),均可提高 C·G-C 型 DNA 三链在中性或更高 pH 下的稳定性^[35]。而增加三螺旋结构中 T·A-T/C·G-C 的比例亦可缓解 pH 对三链稳定性的影响^[30]。

与双链核酸类似,三链核酸也存在 T_m 值。当环境温度大于三链核酸的 T_m 时,三螺旋结构将被破坏,增加三螺旋结构中 C·G-C 含量可以提高其 T_m 。

1.2.5 阳离子浓度的影响 影响三螺旋结构稳定性的盐离子主要是带正电的阳离子,是因为阳离子可以屏蔽核酸骨架的负电荷,进而降低核酸链之间的排斥力;同时,阳离子骨架的脱水作用有利于三链核酸结构的稳定^[36]。Thomas 等^[37]发现,阳离子类型及离子强度均对三链结构的稳定性有影响,金属离子对三链稳定性的改善作用由大到小依次为 $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} > Na^+$ 。此外,三螺旋结构的 T_m 随二价阳离子浓度的增加而增加。当离子浓度相同时,溶液中阳离子价态越高,所形成的三链结构越稳定。在含多种不同阳离子的溶液中,还存在离子竞争性抑制作用。如浓度过高的 Na^+ 可与 Mg^{2+} 竞争核酸上的盐离子位点,从而降低三链核酸的稳定性^[38-39]。

2 基于三链核酸的分析传感方法

2.1 荧光分析法

荧光分析法具有灵敏度高、需样量少、检测快速等特

点,在痕量食源性有害物的检测中具有独特优势。基于三链核酸的荧光分析法基本原理为:利用靶标诱导三链核酸形成或解体,产生荧光变化,从而将生物识别事件转化为荧光信号。基于三链核酸的传感策略大体分为两类:传感探针与靶标作用后,荧光产生或增强(“off-on”策略);传感探针与靶标作用后,荧光降低或熄灭(“on-off”策略)。在一定浓度范围内,传感探针强度变化与靶标浓度呈正比。因此,可以根据荧光变化与否判定靶标是否存在,根据荧光强度变化程度确定靶标浓度。相比于“off-on”策略,“on-off”的荧光检测策略易受非靶物质干扰,产生假阳性信号,且难以确定检测上限,应用的广泛程度不如前者。

食品中农、兽药残留超标会对人们的生命健康造成危害。如抗生素常被添加于饲料中用以避免养殖动物发生细菌性传染疾病,其经食物链在人体中富集后,可引起人体内菌群紊乱及抗生素耐药等不良影响^[40]。Wen 等^[41]结合三链核酸和杂交链式反应(HCR)发展了一种“on-off”型荧光检测平台用于牛奶中氯霉素的放大检测。该工作利用氯霉素触发 HCR 反应,形成修饰有多个荧光受体的 DNA 双链。所得 DNA 双链又可与荧光供体标记的第3条链特异性作用形成三链复合体,将荧光受体和供体拉近,导致二者发生荧光共振能量转移,供体荧光降低。该方法具有良好的检测灵敏性,检测限为 1.2 pg/mL,检测加标牛奶样品的平均回收率为 97.5%~106.0%。Deng 等^[42]构建了一种基于双重三螺旋结构的“off-on”型荧光探针用于氯霉素的检测[图 2(a)]。利用三链核酸环部核酸适配体序列在识别氯霉素后发生构象变化,导致三链结构被破坏,荧光基元和淬灭基团远离,从而实现荧光恢复。该设计中,由于一个荧光基团可同时被两个淬灭基团熄灭荧光,因此在背景信号和检测信噪比方面,此探针较传统的 1:1 熄灭型探针更具优势,检测限低至 0.18 nmol/L,并能精确测定鱼和牛奶加标样品中氯霉素含量。在农药残留检测方面,Qu 等^[43]结合三链核酸和 G-四聚体,开发了一种免标的荧光分子开关用

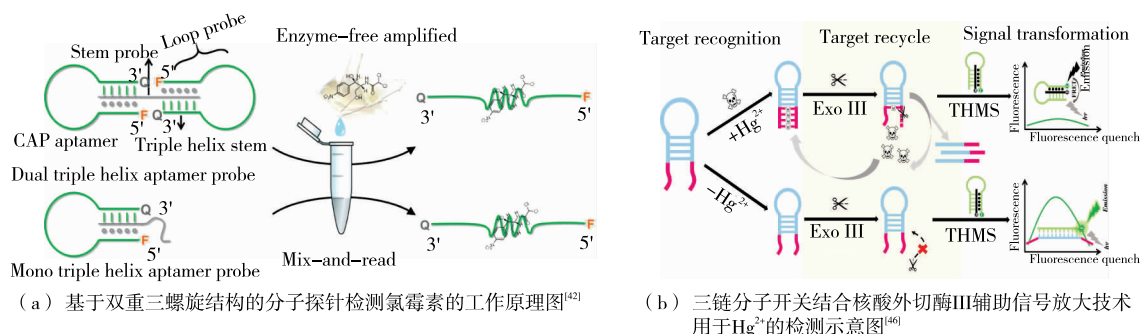


图2 基于三链核酸的荧光分析方法用于食品有害物的检测研究

Figure 2 Application of fluorescence analysis method based on triplex nucleic acid in the detection of food pests

于噬虫脒的检测。该分子开关的环部设计为噬虫脒的核酸适配体序列,作为信号识别单元,其在识别噬虫脒后导致三链解体,释放出中间信号链。后者可形成 G-四聚体,结合并增强 N-甲基卟啉二丙酸 IX(NMM)荧光,从而实现噬虫脒的检测,检测限为 2.38 nmol/L。

此外,基于三链核酸的荧光传感方法在食品中重金属离子、非法添加剂的检测也相继被报道^[44-45]。Liu 等^[46]利用 T-Hg²⁺-T 碱基配对作用稳定核酸发卡结构,在此基础上引入外切酶辅助放大技术和三链核酸开关,实现了对 Hg 离子的高灵敏荧光检测,检测限为 1.04 pmol/L,检测线性范围为 0.01 ~ 50.00 nmol/L [图 2(b)]。Yuan 等^[47]设计了一种 T-三聚氰胺-T 碱基错配导的滚环信号放大(RCA)方法,实现了对牛奶中三聚氰胺的荧光检测,检测限为 2.5 nmol/L。将荧光分析法与核酸放大技术联用,可极大改善探针检测灵敏度,为痕量食源性有害物的检测提供了重要技术支撑。然而,荧光信号易受复杂基质影响,开发新型荧光基团或荧光产生模式以满足在复杂体系中的检测需求将是未来的发展方向。

2.2 电化学分析法

电化学分析方法具有灵敏度高、成本低、操作简单、设备易微型化等优点,非常适用于食品的现场、快速检测。电化学生物传感器的基本原理是以酶、抗体、核酸等生物材料作为识别元件,利用固体电极将识别元件与靶标之间的特异性相互作用转换为电化学信号(如电势、电阻、电容或电流等),根据输出信号的变化实现对靶标定量或定性分析。在基于三链核酸的电化学分析法中,三链核酸通常被固定于电极上,用于捕获电活性分子。

食源性致病菌及生物毒素污染是引起食源性疾病和食物中毒的主要原因,对人体健康造成了不良影响,轻度导致肠胃炎,重则引起器官功能障碍^[48]。食源性致病菌和毒素的快速、灵敏检测是当前食品安全领域的重要挑战。Zhou 等^[49]发展了一种基于三链核酸分子开关的电化学传感器用于金黄色葡萄球菌的检测[图 3(a)]。通过利用核酸适配体-磁珠系统特异性识别金黄色葡萄球

菌,进而释放并分离封闭 DNA 链。后者参与酶辅助的链置换反应,产生大量信号 DNA 链,将生物识别事件放大。信号 DNA 能够特异性结合并破坏固定于电极表面的三链分子开关,暴露出位于三链茎部的富 G 序列。富 G 序列折叠形成 G-四聚体后将捕获电活性分子 hemin,使得电流信号发生变化。相较于无信号放大过程的传感策略,该方法的灵敏度得到显著改善,检测限低至 8 CFU/mL,能准确检测加标蜂蜜样品中的金黄色葡萄球菌。Jie 等^[50]将用于捕获 hemin 的三链核酸分子修饰于电极上,并在体系中引入聚合酶和外切酶辅助的双重信号放大反应,实现了对内毒素脂多糖的超灵敏电化学检测,检测限可达 0.012 fg/mL。

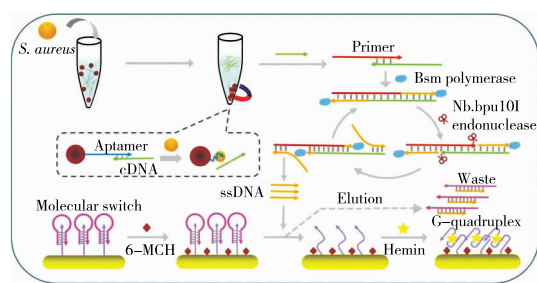
三聚氰胺是一种非法食品添加剂,常被不法商家添加至奶粉及动物饲料中。Liu 等^[51]利用碱性位点(AP)对三聚氰胺的高亲和性,构建了三聚氰胺稳定的钳形三链结构,通过核酸外切酶 III 切割钳形三链结构,生成亚甲基蓝标记的核酸短链,后者扩散到电极表面,产生亚甲基蓝信号,从而实现对三聚氰胺的灵敏检测[图 3(b)]。根据输出的电化学信号强度可确定三聚氰胺含量,检测线性范围为 50 nmol/L ~ 500 μ mol/L,检测限为 8.7 nmol/L,显著低于传统的 ELISA 分析方法。

总体而言,当前基于三链核酸的电化学分析方法在检测灵敏度和检测成本方面具有优势,但是在快速、现场检测方面略显不足。加速推进三链核酸探针与微型化电化学信号发生器(如血糖仪)联用将是该领域的现实需求。

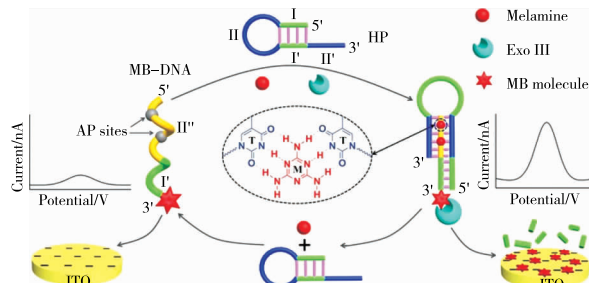
2.3 比色分析法

与荧光分析法和电化学分析法相比,比色分析法在检测灵敏度方面略显不足,但是其检测结果更加直观、可肉眼观测,非常适用于食品污染物的快速、现场检测。在基于三链核酸的比色传感平台中,三链核酸通常用来固定或封闭具备催化显色反应能力的酶(包括蛋白酶、核酸酶、纳米酶)。

真菌毒素容易在食品加工、贮藏等环节进入食物链,是常见的食品污染物,具有致畸、致癌等副作用,且大部



(a) 金黄色葡萄球菌电化学检测示意图^[49]



(b) 均相电分析方法用于三聚氰胺检测的原理图^[51]

图 3 基于三链核酸的电化学分析方法用于食品有害物的检测研究

Figure 3 Electrochemical analysis method based on triplex nucleic acid for the detection of food pests

分性质稳定,难以被破坏,是食品安全检测领域关注的重点^[52]。Xu等^[53]利用三链核酸封闭脱氧核酶活性,开发了一种比色传感平台用于赭曲霉素的快速检测(图4)。将三链核酸的环部设计为核酸适配体序列,其结合赭曲霉素后发生构象变化,导致三链解体,核酶链被释放。核酶链继而结合 hemin 形成具有催化活性的复合体,催化 H_2O_2 氧化 ABTS 显色。检测过程可在 22~37 °C 的温度范围内进行,1 h 即可获得检测结果,检测限为 10~1 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Luo等^[54]利用脂多糖诱导三链解体进而触发 HCR 反应,在磁珠上形成修饰有多个辣根过氧化物酶的 DNA 长链,磁分离后,利用辣根过氧化物酶催化 TMB 显色。该方法检测过程不超过 4 h,肉眼观察的检测

测限为 20 ng/mL ,利用光学仪器获得的检测限为 50 pg/mL 。该方法通过引入 HCR 核酸放大步骤,在一定程度上弥补了比色法检测灵敏度低的不足,为微量或痕量食源性有害物的现场、高灵敏检测提供了重要思路。

与上述利用酶催化底物显色的检测思路不同,Ling等^[55]利用金黄色葡萄球菌核酸序列的 PCR 产物诱导三链核酸形成,进而介导金纳米颗粒聚集发生颜色变化,10 min 内实现了金黄色葡萄球菌的可视化检测。根据紫外吸收测定的检测限为 0.28 $\text{pg}/0.05 \text{ mL}$,检测线性范围为 16.0 $\text{fg}/\mu\text{L}$ ~1.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。但是基于金纳米颗粒聚集的比色法易受复杂基质的影响,难以适用于实际样品的检测。若能引入磁分离技术,有望克服上述不足。

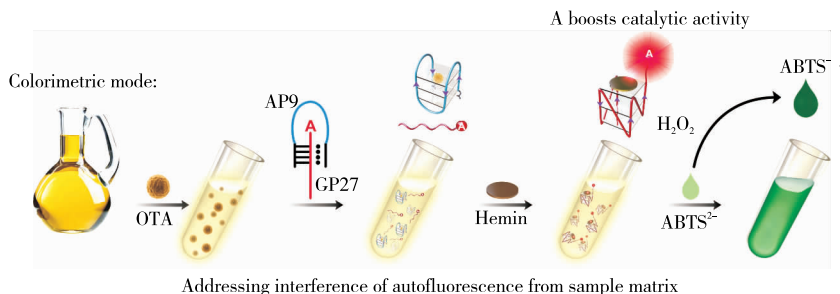


图4 基于三链DNA的比色传感平台检测赭曲霉素原理图^[53]

Figure 4 Illustration of triplex DNA-based colorimetric platform for rapid detection of Ochratoxin A

2.4 其他分析方法

除上述分析方法外,Xu等^[56]建立了一种基于核酸三链体系的表面增强拉曼光谱方法用于 Ag^+ 的快速检测。当 Ag^+ 存在时,其可介导 $\text{C}-\text{Ag}^+-\text{C}$ 配位作用,促使核酸三链形成,导致修饰有罗丹明 6G 的金纳米颗粒团聚,产生罗丹明 6G 的拉曼信号峰,从而达到检测 Ag^+ 的目的。Ebrahim等^[57]针对多氯联苯这种具有持久生物累积毒性的物质,开发了一种基于液晶的无标记、快速分析方法(图5)。该方法利用多氯联苯破坏三螺旋结构,释放中间信号链与固定于玻片上互补序列杂交,进而扰乱玻片上物质的垂直定向,导致从暗到亮的光信号变化。该方法的检测下限为 $1.5 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{L}$,能选择性检测自来水、环境水和牛奶中的多氯联苯。目前已有报道将液晶传感模式与手机等便携设备整合,因此利用该传感模式有望在食品有害物的现场、快速检测方面取得突破。

3 总结与展望

综上,三链核酸具有易设计与修饰、结构可控以及信号识别单元与信号报告单元分离等优点,被广泛用于构建生物传感器,目前已在食品安全检测领域中开展应用研究。在生化分析应用中,基于材料的同质性,常将核酸适配体、G-四连体等功能核酸与三链核酸整合为一体,前者可赋予三链核酸以高靶标选择性,后者一般设计成三螺旋结构中的中间链,作为三链核酸的信号输出单元。

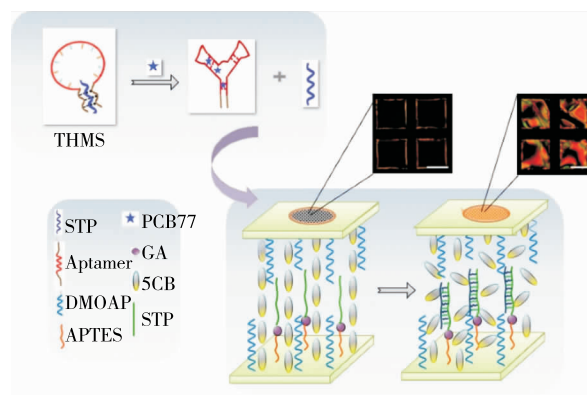


图5 基于三链DNA的液晶传感平台检测多氯联苯的示意图^[57]

Figure 5 The schematic diagram of the triplex DNA-based LC biosensor for PCB77 detection

此外,三链核酸还能够与催化发卡自组装(HCR)、链置换(CHA)等核酸放大方法结合,提高对靶标的检测灵敏度。

虽然基于三链核酸的传感平台在食源性有害物的检测中已取得一些进展,但结合当前研究开发现状和未来发展实际需求,该传感平台在以下3个方面有待改善:

① 提高三链核酸的稳定性,使其能够直接用于复杂食品基质中有害物的检测,如此,可避免复杂的前处理,使真正意义上的快速、临场检测成为可能;② 丰富三链核酸的

靶识别模式和机理,拓展其在食品安全检测应用中的广度;③加强与纸芯片、微流控、血糖仪、智能手机等便携设备的联用,加速临场检测产品的开发和商业化。随着基于三链核酸的分析方法在稳定性、检测机理、应用革新方面的不断完善,三链核酸有望在食品安全即时、快速检测方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] CHAZELAS E, PIERRE F, DRUESNE Pecollo N, et al. Nitrites and nitrates from food additives and cancer risk: Results from the Nutri-Net-Santé cohort[J]. *European Journal of Public Health*, 2021, 31(S3): ckab165.244.
- [2] WINTER G, PEREG L. A review on the relation between soil and mycotoxins: Effect of aflatoxin on field, food and finance[J]. *European Journal of Soil Science*, 2019, 70(4): 882-897.
- [3] 米彦飞. 畜产品兽药残留危害及检测方法[J]. *畜牧兽医学科* (电子版), 2021(15): 176-177.
MI Yan-fei. Hazard and detection method of veterinary drug residues in animal products[J]. *Animal Science and Veterinary Science*(Electronic), 2021(15): 176-177.
- [4] LI Qi, SONG Pan, WEN Jiang-wen. Melamine and food safety: A 10-year review[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2019, 30: 79-84.
- [5] QU Ling-li, YU Huan, YIN Shuo, et al. Solid-phase extraction combined with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 5 trace nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued foods[J]. *Journal of Aoac International*, 2020, 103(6): 1 512-1 520.
- [6] 易守福, 梁锋, 何青科, 等. QuEChERS-气相色谱—三重四级杆质谱法同时测定黑茶中 10 种酰胺类除草剂残留[J]. *食品与机械*, 2021, 37(8): 57-62.
YI Shou-fu, LIANG Feng, HE Qing-ke. Simultaneous determination of 10 kinds of amide herbicide residues in dark tea by quechers with gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(8): 57-62.
- [7] 刘正富, 敖云胜, 孙东红, 等. 液相色谱—串联质谱技术在食品安全检测中的应用[J]. *中国食品*, 2022(4): 135-137.
LIU Zheng-fu, AO Yun-sheng, SUN Dong-hong, et al. Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in food safety detection[J]. *China Food*, 2022(4): 135-137.
- [8] 林津, 范小龙, 江丰, 等. 固相萃取—高效液相色谱—串联质谱法测定动物源食品中万古霉素类抗生素残留量[J]. *食品与机械*, 2020, 36(9): 67-71.
LIN Jin, FAN Xiao-long, JIANG Feng, et al. Determination of vancomycin antibiotics residues in animal derived food by solid phase extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(9): 67-71.
- [9] WANG Feng, WAN De-bin, SHEN Yuan-dong, et al. Development of a chemiluminescence immunoassay for detection of tenuazonic acid mycotoxin in fruit juices with a specific camel polyclonal antibody[J]. *Analytical Methods*, 2021, 13(15): 1 795-1 802.
- [10] 王宝新, 张爱萍. 化学发光免疫方法在食品安全检测中的应用及展望[J]. *中国食品工业*, 2021(18): 61-63.
WANG Bao-xin, ZHANG Ai-ping. Application and prospect of chemiluminescence immunoassay in food safety detection [J]. *China Food Industry*, 2021(18): 61-63.
- [11] REMFRY S E, AMACHAWADI R G, ATOBATELE M, et al. Shiga toxin-producing escherichia coli in wheat grains: Detection and isolation by polymerase chain reaction and culture methods[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2021, 18(10): 752-760.
- [12] 曲识. 食品沙门氏菌检测中 PCR 技术的应用分析[J]. *航空航天医学杂志*, 2021, 32(10): 1 230-1 233.
QU Shi. Application and analysis of PCR technology in food salmonella detection [J]. *Journal of Aerospace Medicine*, 2021, 32(10): 1 230-1 233.
- [13] 廖小艳, 陈丽丽, 白亚龙. 食品中诺如病毒检测技术研究进展[J]. *食品与机械*, 2021, 37(4): 200-206.
LIAO Xiao-yan, CHEN Li-li, BAI Ya-long. The progress of detection methods for norovirus in foods[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(4): 200-206.
- [14] TU Chun-yan, DAI Yuan-yuan, ZHANG Ying, et al. A simple fluorescent strategy based on triple-helix molecular switch for sensitive detection of chloramphenicol[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 224: 117415.
- [15] HE Hui, XIE Chu-chu, YAO Liu, et al. A sensitive fluorescent assay for tetracycline detection based on triple-helix aptamer probe and cyclodextrin supramolecular inclusion [J]. *Journal of Fluorescence*, 2021, 31(1): 63-71.
- [16] QI Xiao-yan, YAN Xiao-chen, ZHAO Lian-hui, et al. A facile label-free electrochemical aptasensor constructed with nanotetrahedron and aptamer-triplex for sensitive detection of small molecule: Saxitoxin [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, 858: 113805.
- [17] HU Yu-wei, CECCONELLO A, IDILI A, et al. Triplex DNA nanostructures: From basic properties to applications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(48): 15 210-15 233.
- [18] CHEN Jin, TANG Qing-nan, GUO Shi-wen, et al. Parallel triplex structure formed between stretched single-stranded DNA and homologous duplex DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(17): 10 032-10 041.
- [19] BHUMA N, TÄHTINEN V, VIRTÄ P. Synthesis and applicability of base-discriminating DNA-triplex-forming ¹⁹F NMR probe [J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2018, 2 018(5): 605-613.
- [20] KUMAR V, BRODYAGING N, ROZNER E. Triplex-forming peptide nucleic acids with extended backbones[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 21(23): 3 410-3 416.
- [21] SU Yang-dong, BAYARJARGAL M, HALE T K, et al. DNA with zwitterionic and negatively charged phosphate modifications: Formation of DNA triplexes, duplexes and cell uptake studies[J]. *Beil-*

- stein Journal of Organic Chemistry, 2021, 17: 749-761.
- [22] GUO Yi-jun, YAO Dong-bao, ZHENG Bin, et al. pH-controlled detachable DNA circuitry and its application in resettable self-assembly of spherical nucleic acids[J]. ACS Nano, 2020, 14(7): 8 317-8 327.
- [23] OLIVEIRA L M, LONG A S, BROWN T, et al. Melting temperature measurement and mesoscopic evaluation of single, double and triple DNA mismatches[J]. Chemical Science, 2020, 11(31): 8 273-8 287.
- [24] 杜宇丹. 基于三链 DNA 分子开关的 Aptamer 传感方法构建与应用研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2014: 16.
DU Yu-dan. Study on the construction and application of aptamer sensing methods based on the triplex-stranded DNA molecular switch[D]. Changsha: Hunan University, 2014: 16.
- [25] ANN J C, MICHAEL W, VAN D. Oligodeoxyribonucleotide length and sequence effects on intermolecular purine purine pyrimidine triple-helix formation[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4 742-4 747.
- [26] KUNKLER C N, HULEWICZ J P, HICKMAN S C, et al. Stability of an RNA* DNA-DNA triple helix depends on base triplet composition and length of the RNA third strand[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(14): 7 213-7 222.
- [27] MARIOTTINI D, IDILI A, NIJENHUIS M A D, et al. Entropy-based rational modulation of the pKa of asynthetic pH-dependent nanoswitch[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(29): 11 367-11 371.
- [28] LI Xia, SONG Juan, XUE Qing-wang, et al. Sensitive and selective detection of the p53 gene based on a triple-helix magnetic probe coupled to a fluorescent liposome hybridization assembly via rolling circle amplification[J]. Analyst, 2017, 142(19): 3 598-3 604.
- [29] HU Ying-xin, WANG Zhi-yu, CHEN Zhe-kun, et al. Switching the activity of taq polymerase using clamp-like triplex aptamer structure[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(15): 8 591-8 600.
- [30] IDILIA A, VALLEE Belisle A, RICCI F. Programmable pH-triggered DNA nanoswitches[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(16): 5 836-5 839.
- [31] CARR C E, GANUGULA R, SHIKIYA R, et al. Effect of dC→d(m⁵C) substitutions on the folding of intramolecular triplexes with mixed TAT and C⁺ GC base triplets[J]. Biochimie, 2018, 146: 156-165.
- [32] COLOCCI N, DERVAN P B. Cooperative bundling of 8-mer oligonucleotide containing 5-(1-propynyl)-2'-deoxyuridine to adjacent DNA sites by triple-helix formation[J]. Journal of the American Chemical Society, 1994, 116(2): 785-786.
- [33] MIAO Shi-qin, LIANG Yu-feng, MARATHE I, et al. Duplex stem replacement with bPNA⁺ triplex hybrid stems enables reporting on tertiary interactions of internal RNA domains[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(23): 9 365-9 372.
- [34] CHEN Feng, LU Qiu-jun, HUANG Lin-na, et al. DNA triplex and quadruplex assembled nanosensors for correlating K⁺ and pH in lysosomes[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(10): 5 453-5 458.
- [35] WALSH S, ELS A H, BROWN T. Fluorogenic thiazole orange TOTFO probes stabilise parallel DNA triplexes at pH 7 and above[J]. Chemical Science, 2018, 9(39): 7 681-7 687.
- [36] YAMAYOSHI A, MIYOSHI D, ZOUZUMI Y K, et al. Selective and robust stabilization of triplex DNA structures using cationic comb-type copolymers[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2017, 121(16): 4 015-4 022.
- [37] ZHANG Zhong-liang, WU Yuan-yuan, XI Kun, et al. Divalent ion-mediated DNA-DNA interactions: A comparative study of triplex and duplex[J]. Biophysical Journal, 2017, 113(3): 517-528.
- [38] XI Kun, WANG Feng-hua, XIONG Gui, et al. Competitive binding of Mg²⁺ and Na⁺ ions to nucleic acids: From helices to tertiary structures[J]. Biophysical Journal, 2018, 114(8): 1 776-1 790.
- [39] SINGLETON S F, DERVAN P B. Equilibrium association constants for oligonucleotide-directed triple helix formation at single DNA sites: Linkage to cation valence and concentration[J]. Biochemistry, 1993, 32(48): 13 171-13 179.
- [40] 杨晓广. 超高效液相色谱-串联质谱在食品农药残留和兽药残留及添加剂检测分析中的应用[J]. 食品安全导刊, 2021(12): 171-172.
YANG Xiao-guang. Application of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the detection and analysis of pesticide residues and veterinary drug residues and additives in food[J]. Food Safety Guide, 2021(12): 171-172.
- [41] LI Yu-bin, WANG Lei, ZHAO Li-ting, et al. An fluorescence resonance energy transfer sensing platform based on signal amplification strategy of hybridization chain reaction and triplex DNA for the detection of Chloramphenicol in milk [J]. Food Chemistry, 2021, 357: 129769.
- [42] ZHANG Yong, DU Xiao-sheng, DENG Sha, et al. Dual triple helix-aptamer probes for mix-and-read detecting antibiotics in fish and milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(35): 9 524-9 529.
- [43] TANG Xiao-min, LI Xiao-ton, MA D L, et al. A label-free triplex-to-G-quadruplex molecular switch for sensitive fluorescent detection of acetamiprid[J]. Talanta, 2018, 189: 599-605.
- [44] LIU Xiao-juan, XU Ning-ning, GAI Pan-pan, et al. Triplex DNA formation-mediated strand displacement reaction for highly sensitive fluorescent detection of melamine[J]. Talanta, 2018, 185: 352-358.
- [45] YANG Yu-cai, HUANG Yue, LI Chao. A reusable electrochemical sensor for one-step biosensing in complex media using triplex-forming oligonucleotide coupled DNA nanostructure[J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1 055: 90-97.
- [46] ZHONG Miao, YANG Sheng-yuan, CHEN Lei, et al. Highly sensitive and efficient fluorescent sensing for Hg²⁺ detection based on triple-helix molecular switch and exonuclease III-assisted amplification[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1 205: 339751.

- [47] XU Lin, DA Xiu, JIANG Bing-ying, et al. Melamine-mediated base mismatch for label-free and amplified sensitive fluorescent detection of melamine in milk[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(5): 1 255-1 261.
- [48] DUTTA D, KAUSHIK A, KUMAR D, et al. Foodborne pathogenic vibrios: Antimicrobial resistance [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 638331.
- [49] CAI Rong-feng, ZHANG Zhong-wen, CHEN Hao-han, et al. A versatile signal-on electrochemical biosensor for *Staphylococcus aureus* based on triple-helix molecular switch[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 326: 128842.
- [50] GAO Xiao-shan, LI Hong-kun, ZHAO Yu, et al. Triple-helix molecular switch-based versatile “off-on” electrochemiluminescence and fluorescence biosensing platform for ultrasensitive detection of lipopolysaccharide by multiple-amplification strategy[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 143: 111602.
- [51] LIU Xiao-juan, SONG Meng-meng, LI Feng. Triplex DNA-based bioanalytical platform for highly sensitive homogeneous electrochemical detection of melamine[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4 490.
- [52] 孙煜,高翠. 食品中真菌毒素的仪器分析技术研究[J]. 食品安全导刊, 2021(8): 68-69.
- SUN Yi, GAO Cui. Instrumental analysis of mycotoxins in food[J]. Food Safety Guide, 2021(8): 68-69.
- [53] HE Kai-yu, SUN Li-ping, WANG Liu, et al. Engineering DNA G-quadruplex assembly for label-free detection of Ochratoxin A in colorimetric and fluorescent dual modes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423: 126962.
- [54] XU Wen-tao, TIAN Jing-jing, SHAO Xiang-li, et al. A rapid and visual aptasensor for Lipopolysaccharides detection based on the bulb-like triplex turn-on switch coupled with HCR-HRP nano-structures[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 89: 795-801.
- [55] WANG Jing, LI Hai-gang, LI Ting-ting, et al. Determination of bacterial DNA based on catalytic oxidation of cysteine by G-quadruplex DNAzyme generated from asymmetric PCR: Application to the colorimetric detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Microchimica Acta, 2018, 185(9): 410.
- [56] XU Li-jun, GUO Ya-hui, WANG Ji-ne, et al. A H^+ / Ag^+ dual-target responsive label-free light-up probe based on a DNA triplex[J]. Chemistry An Asian Journal, 2015, 10(5): 1 126-1 129.
- [57] VERDIAN A, ROUHBAKHSH Z, FOOLADI E. An ultrasensitive platform for PCB77 detection: New strategy for liquid crystal-based aptasensor fabrication[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 402: 123531.

(上接第 179 页)

- [15] 王琴, 罗洁莹, 柳建良, 等. 响应面法优化超声—微波协同辅助提取金柚幼果总黄酮工艺[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(2): 83-91.
- WANG Qin, LUO Jie-ying, LIU Jian-liang, et al. Optimization of ultrasonic-microwave-assisted extraction of total flavonoids from pomegranate young fruit by response surface methodology[J]. Food Research and Development, 2020, 41(2): 83-91.
- [16] 朱瑜, 吴建华, 杨剑, 等. 辣蓼黄酮分离提取及 3 种黄酮类组分定量分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(4): 50-53.
- ZHU Yu, WU Jian-hua, YANG Jian, et al. Separation and extraction of flavonoids from *Polygonum Hydropiper* L. and quantitative analysis of three flavonoids[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 21(4): 50-53.
- [17] 郑云展, 罗杜康, 刘慧娟, 等. 苦甘陈凉茶总黄酮热水煎煮工艺优化[J]. 食品工业, 2017, 38(4): 155-159.
- ZHENG Yun-zhan, LUO Du-kang, LIU Hui-juan, et al. Optimization of hot water decocting process of total flavonoids from four kinds of herbal[J]. The Food Industry, 2017, 38(4): 155-159.
- [18] LIN C L, WANG C C, CHANG S C, et al. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus[J]. Biological Macromolecules, 2009, 45(2): 146-151.
- [19] 杨润亚, 明永飞, 王慧. 无花果叶中总黄酮的提取及其抗氧化活性测定[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 78-82.
- YANG Run-ya, MING Yong-fei, WANG Hui. Extraction and free radical scavenging activity of total flavonoids from the leaves of *Ficus carica* Linn.[J]. Food Science, 2010, 31(16): 78-82.

(上接第 232 页)

- [52] 魏亚儒. 黄花菜豆腐凝胶与力学特性对其加工工艺影响研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2021: 5-60.
- WEI Ya-ru. Study on the effect of gelatin and mechanical properties of daylily tofu on its processing technology[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021: 5-60.
- [53] 李泽, 曹佳惠, 刘文楠, 等. 黄花菜营养成分在护肤品中的应用分析[J]. 南方农业, 2020(21): 143-144.
- LI Ze, CAO Jia-hui, LIU Wen-nan, et al. Analysis of the nutrition application of day lily in skin care products[J]. Southern Agriculture, 2020(21): 143-144.
- [54] 吴天珍, 孙利平, 张庆霞, 等. 超声波辅助提取黄花菜中类胡萝卜素工艺研究[J]. 陕西农业科学, 2021, 67(7): 46-50.
- WU Tian-zhen, SUN Li-ping, ZHANG Qing-xia, et al. Study on technology of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids from daylily[J]. Shaanxi Agricultural Science, 2021, 67(7): 46-50.
- [55] 李小菊, 李治军, 李惠成, 等. 超声辅助提取庆阳黄花菜中多糖的动力学研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(4): 42-48.
- LI Xiao-ju, LI Zhi-jun, LI Hui-cheng, et al. Study on the kinetics of ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from qingyang daylily[J]. China Food Additives, 2020, 31(4): 42-48.