

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.81133

核酸适配体的序列优化策略及其在食品危害物检测中的应用

袁 洁^{1,2,3} 姚 军^{2,3} 张思程^{2,3} 秦亚迪^{2,3}

(1. 新疆第二医学院药学院, 新疆 克拉玛依 834000; 2. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017; 3. 新疆医科大学新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017)

摘要: 食源性疾病已成为食品安全领域突出问题, 快速、准确地对食品危害物进行检测是控制食源性疾病的关键环节。核酸适配体作为一种新型的生物识别分子, 以其为识别元件构建快速、灵敏的生物传感器用于检测食品危害物已成为研究热点。然而, 经指数富集配体系统进化技术筛选出的适配体与目标分子结合的亲和力和选择性还有待提升, 不能很好地满足分析检测的需求。文章分析了影响适配体性能的内在因素, 重点综述了核酸适配体的优化策略, 介绍了核酸适配体在食品危害物检测中的具体应用, 并展望了核酸适配体的发展趋势。

关键词: 核酸适配体; 优化策略; 食品危害物

Optimization strategies for nucleic acid aptamer sequences and its application in the detection of food hazards

YUAN Jie^{1,2,3} YAO Jun^{2,3} ZHANG Sicheng^{2,3} QIN Yadi^{2,3}

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Second Medical College, Karamay, Xinjiang 834000, China; 2. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830017, China; 3. Key Laboratory of Active Components and Drug Release Technology of Natural Medicines in Xinjiang, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830017, China)

Abstract: Foodborne diseases have become a prominent problem in the field of food safety. Rapid and accurate detection of food hazards is a key step in controlling foodborne diseases. As a novel biological recognition molecule, nucleic acid aptamers have become a research hotspot for constructing rapid and sensitive biosensors for the detection of food hazards. However, the affinity and selectivity of aptamers screened by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) still need improvement to fully meet the requirements of analytical detection. This paper analyzes the intrinsic factors affecting aptamer performance, focuses on optimization strategies for nucleic acid aptamers, introduces their specific applications in the detection of food hazards, and discusses the future development trends of nucleic acid aptamers.

Keywords: nucleic acid aptamer; optimization strategy; food hazards

食源性疾病是全球重要的公共卫生问题之一^[1], 通常由食品中的细菌、霉菌毒素、农药残留、重金属等引起。对食品危害物进行快速、灵敏的检测是有效预防和控制食源性疾病的关键环节。

核酸适配体(以下简称“适配体”)是通过指数富集配体系统进化技术(SELEX)从核酸文库中筛选得到的单链 DNA 或 RNA^[2-3]。它们能够高度特异地识别和结合各种靶标分子, 具有稳定性好、修饰容易、可快速大量合成

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(编号: 2022D01B153)

通信作者: 姚军(1973—), 男, 新疆医科大学教授, 博士。E-mail: xydyaojun@163.com

收稿日期: 2024-11-06 **改回日期:** 2025-07-14

引用格式: 袁洁, 姚军, 张思程, 等. 核酸适配体的序列优化策略及其在食品危害物检测中的应用[J]. 食品与机械, 2025, 41(9): 209-217.

Citation: YUAN Jie, YAO Jun, ZHANG Sicheng, et al. Optimization strategies for nucleic acid aptamer sequences and its application in the detection of food hazards[J]. Food & Machinery, 2025, 41(9): 209-217.

等优点,因而在食品危害物如抗生素、激素、真菌毒素和过敏原等有毒有害成分快速检测方面的报道越来越多。然而,经 SELEX 筛选出的适配体与靶标分子结合的亲和力和选择性还有待进一步提升^[4]。为了提高适配体的性能以满足分析方法的灵敏度和特异性,出现了各种 SELEX 后优化(post-SELEX)技术,如截短、突变、延伸、化学修饰等。目前仅有少量文献对适配体的 post-SELEX 技术进行了部分总结,且并未详细介绍这些优化策略在食品危害物检测中的应用^[5-7]。基于此,文章拟对适配体的 post-SELEX 策略及其在食品危害物检测中的应用进行综述,旨在为今后开发高性能的适配体提供借鉴,推动适配体在食品安全检测分析方面的发展。

1 影响适配体性能的内在因素

适配体性能的优劣受自身因素的显著影响,这些因素包括序列长度、核苷酸组成以及空间结构等^[8]。

(1) 序列长度:适配体的序列长度直接影响其三维结构的复杂性和与靶标分子的结合能力。较短的序列可能无法形成足够的二级或三级结构来有效识别靶标,而较长的序列可能增加非特异性结合的风险或者形成较大的空间位阻。因此,适配体的序列长度需要精心设计,以平衡结合能力和特异性。

(2) 核苷酸组成:适配体中核苷酸的组成以及特定修饰核苷酸的存在,对其稳定性和亲和力有重要影响。例如,富含鸟嘌呤的序列可能形成 G-四链体(G4)结构,这可能会增强适配体的稳定性和靶向能力。此外,将天然核苷酸修饰为非天然核苷酸(XNA)或者进行荧光标记、生物素化等可以提高适配体的稳定性和功能性。

(3) 空间结构:适配体的空间结构是其与靶标分子特异性结合的关键。当存在靶分子时,适配体通过链内碱基配对及氢键作用、静电吸附作用、范德华力等发生适应性折叠,形成茎环、发卡、假结、凸起、G4 等二级结构或者三级结构,去除或者诱导这些结构的形成将显著影响适配体的性能。

以上这些因素共同决定了适配体的亲和力、特异性和稳定性,进而影响其在食品安全检测领域的应用效果。通过控制这些因素可以设计出性能更优的适配体,以满足特定的应用需求。

2 适配体的优化策略及其在食品危害物检测中的应用

2.1 截短

通过 SELEX 筛选得到的适配体长度一般为 80~130 个碱基^[9],而通常在检测过程中适配体上只有部分碱基参与了靶标识别^[8],剪除适配体中与靶标结合力较低的非关键碱基序列,不仅能降低适配体生产的难度和成本,

还能增加适配体与食品中残留的抗生素、激素、兽药及存在的致病菌、真菌毒素等靶标的亲和力,提高检测的灵敏度^[10-11],但是适配体太短有可能无法形成稳定的二级结构^[12]。截短的方法最初主要是基于适配体的二级结构,如茎环、发卡、突环、假结等,进行经验试错。郭华麟^[10]基于二级结构预测的截短策略对水果中常见的真菌毒素棒曲霉素(PAT)原始适配体的茎环结构逐次裁剪,过程如图 1(a)所示,当截去茎环(a)后适配体亲和力值(K_d 值)下降,继续截去茎环(b)后 K_d 值显著下降,这可能是因为茎环(b)产生的较大空间位阻阻碍了适配体与靶标的结合,在此基础上继续截短 10 个碱基,得到了亲和力最佳的截短适配体 P-30,比原始适配体减少了 50 个碱基,而只截取茎环(c)后的适配体几乎丧失了与 PAT 的结合能力,证实适配体的关键碱基位于茎环(c)中。Jia 等^[13]将靶向双酚 A 的适配体在多个位点进行截短,得到了 38-mer、12-mer 和 23-mer 的截短适配体,如图 1(b)所示,38-mer 和 12-mer 适配体对靶标的亲和力是原适配体的 37.3 倍和 18.2 倍,而 23-mer 对靶标的亲和力不及原始适配体。尽管随机截短策略能够有效优化适配体,但是需要大量的试验和尝试,效率较低。

分子对接和分子动力学模拟可预测适配体与靶标之间的关键结合位点,为核酸适配体的截短设计提供更准确的依据^[14]。Li 等^[15]基于二级结构预测和分子对接技术预测 α -鹅膏蕈毒肽(α -AMA)适配体与靶标的结合位点,如图 1(c)所示,根据预测结果,逐渐将茎环结构中中与结合位点无关的核苷酸对和未配对的核苷酸去除,将已报道的含有 82 个碱基的 α -AMA 原始适配体缩短为 20 个碱基,提高了适配体的亲和力,识别过程更快、更灵敏,以其为识别元件的电化学生物传感器已成功用于野生蘑菇样品中 α -AMA 的检测,准确度与 UPLC/MS/MS 一致。Zhang 等^[16]依据分子对接结果对链霉素适配体 Apt5 进行有效截短,获得了 K_d 值为 14.52 nmol/L 的适配体 Apt52,基于该适配体开发了比率荧光适配体传感器检测限仅为 0.98 nmol/L。此外,Yang 等^[17]将高亲和力的截短适配体 A9P-43 用于水、婴儿配方奶粉、冰淇淋及牛奶样品中克罗诺杆菌属的检测,均表现出良好的回收率。

2.2 诱变

诱变是一种通过突变单个或多个碱基来改变适配体的核苷酸序列以优化适配体性能的一种有效方法^[18],其不仅改变了适配体与靶标之间的作用力,也会影响适配体的空间结构,从而增强适配体与靶标的亲和力。诱变方法主要包括计算机辅助的定点诱变、基于特定碱基的诱变、基于诱导 G4 形成的诱变策略。

2.2.1 定点诱变 采用完全随机突变策略会大大增加适配体筛选的工作量,借助分子动力学模拟、等温量热滴定

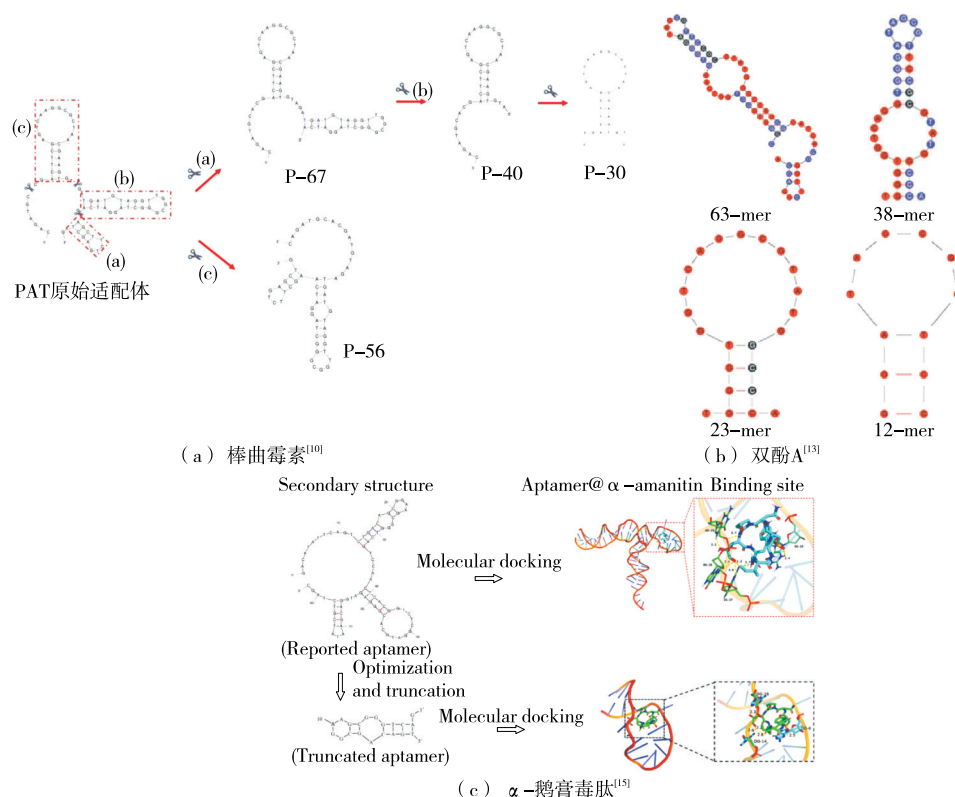


图1 截短型核酸适配体的获得

Figure 1 Acquisition of truncated aptamers

法(ITC)、荧光偏振(FP)等技术先预测适配体中与靶标结合的关键碱基后再进行突变可大大减少工作量,提高突变的成功率。韩静^[19]利用 NuPack 软件模拟了卡那霉素原始适配体的二级结构,采用 FP 及 ITC 技术得到卡那霉素适配体的关键结合碱基为 T7、T8、C13 和 A15,继而对 T8 碱基附近碱基进行突变或将茎环 C13 突变为 G13 以及将 5'端的 G2 突变为 T2,得到了 8 个定点突变的适配体,ITC 结果显示突变体 Kmut3 的亲合力是原始适配体的 3 倍,以其为识别元件构建的荧光传感器检测限为 59 nmol/L,比以原始适配体构建的同种传感器检测限低 89 nmol/L,在牛奶样品中的回收率为 95%~105%。Gao 等^[20]借助结构分析和分子动力学模拟预测了双靶标赭曲霉毒素 A(OTA)和诺氟沙星(Norfloracin, NOR)的适配体 OBA3 中的碱基 T15 是对 OTA 具有特异性识别和亲和力的关键碱基,对其进行定点突变后得到的适配体 T15C 可实现对 NOR 的特异性检测,这可能是因为碱基的改变使第 15 位的核苷酸丧失了与 OTA 苯环的相互作用,而增加了与 NOR 分子中喹诺酮骨架、哌嗪基之间的 π - π 堆积作用,促进了盐桥和氢键的形成,从而提高对 NOR 的特异性识别。

2.2.2 基于特定碱基的诱变 Kimoto 等^[21]提出用高能 G-C 碱基对替换茎环结构中低能的 A-T 碱基对可以增加

适配体与靶标的亲和力,并在 9 种不同的靶向蛋白质和癌细胞的 DNA 适配体中得到了证实。杨妍^[22]在优化食源性致病菌黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)的适配体序列 A80 时就采用了该策略,其采用 3 种方案对 A80 经两次截短后的适配体 A22 进行改造,其中就包括了将 A22 末端的 T-A 碱基对替换为 G-C 碱基对,从而得到了亲和力与 A80 相当的截短突变适配体 A22-m2,并以其为识别元件构建了简单、快速、灵敏的适配体-纳米金比色传感法用于检测玉米油样品中的 AFB₁。Sha 等^[23]研究表明,将单碱基 A 和 T 分别突变为 G 和 C 也有同样的效果。Zhang 等^[24]基于此原理对已报道的甲硝唑适配体进行了优化,通过 A-G、T-C、C-G 和 G-C 碱基突变得到了 15 个新适配体。分子对接显示 Apt8 和 Apt11 与甲硝唑的亲和力优于原始适配体,结合能分别为 -16.82, -14.56 kJ/mol,进一步将 Apt8 和 Apt11 的突变方式结合起来所得的新适配体 Apt1-3 与甲硝唑的亲和力更强,以该突变适配体为识别元件并巧妙结合智能手机的取色软件 Color Picker 和 3D 暗盒成功构建了一种便携式比色适配体生物传感器,并在牛奶中表现出了良好的回收率。该检测方法快速、灵敏、简便,在食品安全检测领域有一定的推广价值。但是过度增加 G/C 碱基可能会增强适配体对非目标分子的结合力,降低适配体的特异性。

2.2.3 基于诱导 G-四链体形成的诱变策略 G4 是由富含鸟嘌呤的序列先通过 Hoogsteen 氢键结合形成两个或两个以上的 G-四分体,再经 $\pi-\pi$ 堆积自发形成的非经典二级结构^[25]。多项研究^[26-28]表明,G4 结构有助于提高适配体和靶标的结合亲和力。Zheng 等^[29]对已报道的靶向石房蛤毒素(STX)的 DNA 适配体 APT^{STX1} 进行突变,突变位点位于鸟嘌呤碱基两侧,并借助 QGRS 映射对 G4 结构进行分析,得到 9 个可以形成 G4 结构的突变体,其中 M-30 的亲和力最强,是原始适配体的 30 倍,可能是因为 G4 区域加强了适配体口袋与 STX 的相互作用。Qin 等^[30]将靶向地塞米松的最优截短适配体 APT-2 序列中 G 碱基周围的非 G 碱基突变成 G 碱基,以诱导适配体形成 G4 结构,QGRS Mapper 预测结果显示单点突变的 14 个序列均未能形成 G-四链体结构,多位点突变的 19 个适配体序列中有 9 个可以生成 G4 结构,其中 APT-M13 与地塞米松的亲和力最大,以其为识别元件制备的金纳米粒子无标记比色适配体传感器的检测限比原始适配体的显著降低。但是该突变策略需要适配体序列中富含一定数量的鸟嘌呤,并不适用于所有适配体的优化,在应用上具有一定的局限性。

2.3 裂分

裂分适配体是将初始适配体分裂成两个片段,只有存在特异性靶标时,两个片段才与靶标结合,形成三元复合物,由于裂分适配体的碱基序列比母体短,因而能有效地减少假阳性信号,且合成过程也比初始适配体更简单^[31-32]。Stojanovic 等^[33]根据可卡因适配体的二级结构,从预测处将其分割成两个适配体片段(即“裂分适配体”)并用荧光基团标记,以此为识别元件,成功构建了自组装荧光生物传感器。自此以后,基于裂分适配体构建的生物传感器在食品安全检测中的研究越来越多。通常认为,原始适配体裂分时应从结构中的非功能性位点处裂分(比如辅助环),尽可能保留功能环,即裂分应遵循“保留规则”^[28]。Chen 等^[34]通过去除非功能性的 GAGA 环将完整的 38nt 孔雀石绿适配体分成两个部分,并将它们连接到 5'和 3'端富含 G 的 DNA 序列上,构建了二价劈裂变构适配体传感器,机制如图 2 所示,实现了鱼类产品中孔雀石绿残留物的简便、快速、低成本和超灵敏检测。Du 等^[35]利用 Mfold 软件预测长度为 60nt 的恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)适配体二级结构,在不影响环状位点的情况下,从 32C 和 33T 之间进行裂分,得到了长度为 32 bp(Apt1)和 28 bp(Apt2)的核酸适配体片段,并结合末端脱氧核糖核酸转移酶(TdTase)和滚轮扩增(RCA)技术,构建了一种新型的 TdT-RCA 比色生物传感器用于检测 ENR,检测限低至 2.5 pg/mL。Shang 等^[36]基于同样的裂分适配体开发了一种新型的 DNA 镊子荧光生物传

器,检测限与 TdT-RCA 比色生物传感器相当,但是构建传感器的方法更为简单,通过更换 DNA 镊子和裂分适配体的序列,可实现对其他目标物的检测,这为食品中兽药残留检测提供了更多的可能性。基于“保留规则”裂分适配体显然限制了裂分适配体的发现能力。Wang 等^[37]提出了对适配体功能环结构进行裂分,仍能保留对靶标的生物识别能力的假说,最终在四环素、妥布霉素和新霉素适配体上得到了证实。虽然裂分适配体在食品安全分析检测方面展现了独特的优越性和较大的应用前景,但在设计过程中,确定母体适配体中合适的切割位点仍然是一个难题,需要开发新型的裂分适配体策略以提高优化过程的效率。

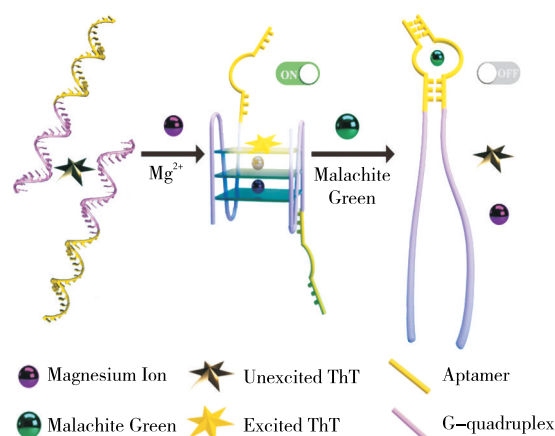


图2 二价劈裂变构适配体传感器检测孔雀石绿的传感机制^[34]

Figure 2 Sensing mechanism of fusion of binary split allosteric aptasensor for malachite green

2.4 延伸

适配体的延伸是在适配体序列中添加一些核苷酸或者对适配体片段进行克隆以提高其对靶标的亲和力、特异性以及稳定适配体的二级结构。Luo 等^[38]在噻虫嗪截短适配体的末端添加 T-A 碱基对以稳定二级结构,同时在 5'端延伸 5 个碱基(CTCAG)使其能够和含 13 个碱基的淬灭链互补,进一步开发了荧光“开启”适配体生物传感器,检测限为 1.23 nmol/L,比欧盟标准中规定的牛奶和蜂蜜中噻虫嗪的残留量(约 171.4 nmol/L)低很多,为食品中农药残留检测提供了新的思路。Zhang 等^[39]以已报道的 26nt 卡那霉素适配体为模板,经克隆分别得到了 52nt 和 78nt 的二价适配体和三价适配体,以此为识别元件构建的非荧光标记传感器结果显示二价适配体的灵敏度最高,检测限为 0.097 nmol/L,比原始适配体的检测限低很多,三价适配体的检测限略低于原始适配体,可能是因为三价适配体序列过长反而会降低其与卡那霉素的亲和力。

兰欣悦等^[40]以 8nt 四环素适配体为基础,经克隆得到 16nt 二价四环素适配体,与 Zhang 等^[36]不同的是,其在克隆序列间还引入适当长度的连接臂,如 TT、AA、GG、GGG 等,以减小功能序列折叠时的空间位阻,使适配体更易形成稳定的 G4 结构,荧光检测结果显示以 GGG 作为间隔的适配体激发硫黄素 T 产生荧光的能力最强,所产生荧光强度是原始适配体同样处理的近 40 倍,将硫黄素 T 的荧光强度变化作为输出信号,构建的双价适配体非酶标记传感器可在 20 min 内完成牛奶样品中四环素的检测。碱基片段的延长可能会因碱基数量的增加使适配体骨架的柔性过度增加,导致构象不稳定而降低适配体对靶标的特异性和结合亲和力。为了稳定适配体的构象,Zhao 等^[41]在溶菌酶原适配体两端嫁接了 2 个含 CT 的嘧啶序列和 1 个含 GA 的嘌呤序列,形成的三螺旋结构固定了原始适配体的末端,以稳定适配体的构象结构,新适配体表现出了与溶菌酶更强的结合力,在此基础上设计出了电化学适配体生物传感器,并用于检测红酒中的溶菌酶,检测限比无三螺旋固定适配体的方法低很多。但是这种策略需要巧妙的设计来使 DNA 三螺旋结构锁定适配体的两端,增加了设计和合成的复杂性。

2.5 化学修饰

适配体的化学修饰一般是指对天然核苷酸的糖环、碱基及磷酸骨架进行修饰,以提高适配体的化学稳定性,改善适配体的功能活性^[42]。比如将 DNA 脱氧核糖环上的 2'-H 或 RAN 核糖环上的 2'-OH 替换为 2'-F、2'-NH₂、2'-OCH₃等^[43],使其转变为 XNA,也可用非天然糖苏糖、阿拉伯糖等直接取代原有的糖环,以增强适配体对核酸酶降解的抵抗能力和对靶标的亲和力^[42]。此类化学修饰主要用于改善适配体的药效学性质、促进基于适配体的疾病诊断和治疗的研发^[44],而对食品安全检测相关的适配体研究仅有少量文献报道^[45]。

食品危害物适配体的化学修饰常见于在适配体上修饰—SH、—NH₂、—COOH、亚甲基蓝和生物素等,以实现与其他物质的连接或者作为信号分子,用于信号转导和放大^[46-47]。Li 等^[48]将黄曲霉毒素 M₁(AFM₁)适配体裂分成两条短链,并分别修饰上巯基(SH-S1)和亚甲基蓝(MB-S2),将 SH-S1 通过“Au-S”键固定在 Au-rGO 复合材料修饰的电极上,体系中无 AFM₁ 时, S1 与经二茂铁(ferrocene, Fc)修饰的其互补链(Fc-CS1)结合, Fc 信号增强,当体系中添加 AFM₁ 时, S1 和 S2 与靶标结合,释放 CS1,导致 Fc 信号降低, MB 信号增强,基于此原理建立的双信号比率型电化学生物传感器可以实现对牛奶样品中 AFM₁ 的快速高灵敏检测,检测限为 0.05 μg/L。王瑞安等^[49]将修饰有生物素以及包含触发序列的阪崎肠杆菌适配体通过生物素—亲和素反应连接到亲和素修饰的纳米

磁珠上,成功构建了一种基于杂交链式反应扩增的高灵敏度检测阪崎肠杆菌的荧光生物传感器并以奶粉作为样品进行检测,回收率为 98.5%~110.0%。

2.6 多价适配体的组装

与上述优化策略相比,将一价适配体经自组装或者通过共价键形成多价适配体是提高适配体性能的有效策略,多价适配体具有多个重复的识别区域,可以形成“协同”的结合构型,因而大大增加了适配体与靶标的结合机会^[7],但是多价适配体的设计和合成过程比单价适配体更为复杂,需要精确的结构设计以确保适配体的功能。Qi 等^[50]将截短和突变优化后的食物过敏原糖蛋白 Ara h1 的特异适配体 A1-a.31C 经 RCA 反应驱动的超长聚合 DNA 扩增子自组装形成了多价适配体编码的 DNA 花朵(Mul-DNFs),多孔花状结构使 Mul-DNFs 具有更大的表面积,增加了适体捕获靶标的空间范围。此外,独特的结构为多价适体提供了支架,使其形成“协同”构型,有利于控制靶标在动态结合过程中的行为,从而增强了适体与 Ara h1 的结合性能。将 Mul-DNFs 同时与 Cy3-cDNA 和 Cy5-cDNA 杂交,构建了双色荧光标记的 Mul-DNFs 比率型荧光适配体生物传感器,如图 3(a)所示。该传感器具有优异的线性响应(0.05~2 000.00 ng/L)和较低检测限(0.02 ng/mL),可用于饼干、面包、巧克力等食品中 Ara h1 的检测。Chen 等^[51]将氨基修饰的组胺适配体通过酰胺化反应将其修饰到磁性金纳米颗粒 Fe₃O₄@Au NPs 上,形成特异性识别组胺的多价探针,同时以携带“生物静默”区表面增强拉曼散射(SERS)标签的互补 DNA 作为 SERS 信号探针,成功构建了一种“核—卫星”型 SERS 适配体传感器,可实现对酱油、米醋、樱桃酒和鱼肉中组胺的快速高特异性检测,准确度可以与高效液相色谱法相媲美。

基于同种适配体组装构建的生物传感器只能检测单一成分,将不同适配体进行组装可以实现对多种分析物的同时检测^[52]。Ge 等^[53]设计了一种自组装 DNA 双交叉荧光适体传感器用于同时检测 AFB₁ 和 AFM₁,双交叉 DNA 纳米分子由 5 条 DNA 链组成,如图 3(b)所示, C2 与标记荧光猝灭基团 BHQ2 的 C1 和 C3 互补配对,形成 DNA 双交叉分子的骨架。Cy3 修饰的 AFM₁-APT 和 Cy5 修饰的 AFB₁-APT 互补到该结构的两端,使两对荧光团和猝灭基团产生荧光共振能量转移(FRET),导致 Cy3 和 Cy5 荧光信号显著猝灭。在 AFM₁ 和 AFB₁ 同时存在的情况下, AFM₁-APT 和 AFB₁-APT 可以与特定的霉菌毒素结合,从而脱离纳米分子的结构,使纳米分子末端的荧光团靠近抑制子,导致荧光信号明显增强,该传感器在花生和牛奶样品中 AFM₁ 和 AFB₁ 的检测中表现出了良好的回收率。祁兴普等^[54]将巯基化的且部分序列可以互补杂交的 OTA 和玉米赤霉烯酮(ZEN)适配体组装到金纳米花表

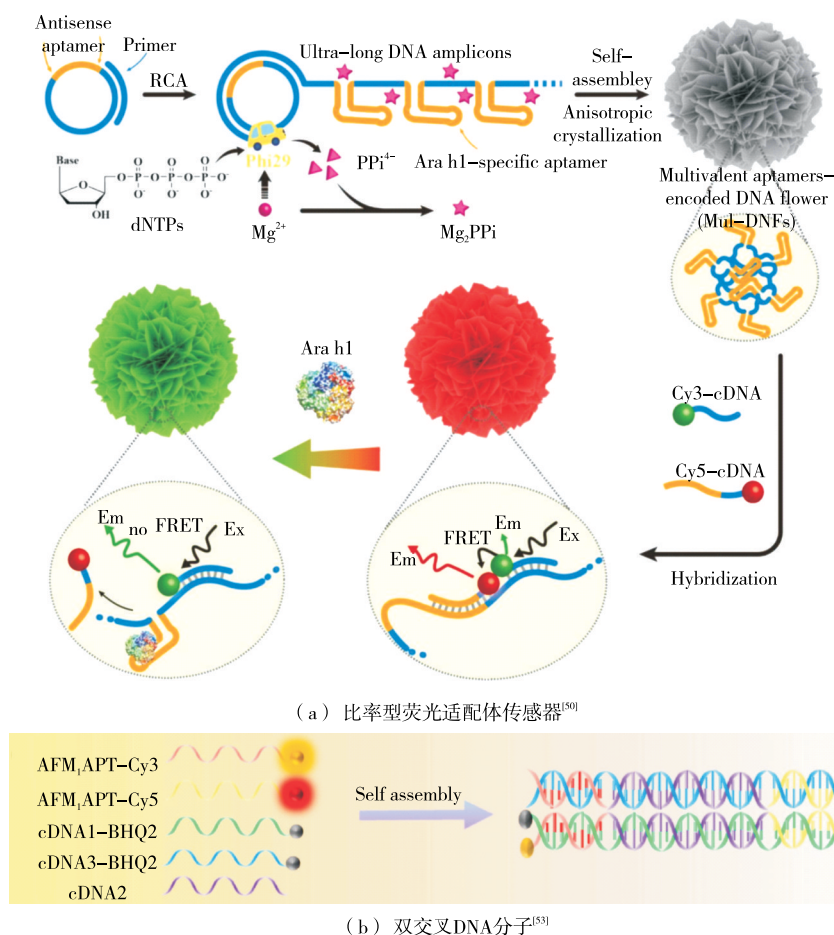


图3 多价适配体编码DNA花朵的比率型荧光适配体传感器和双交叉DNA分子构建示意图

Figure 3 Schematic diagram of the ratiometric fluorescence aptasensor based on multivalent aptamer encoded DNA flowers and DNA double-crossing molecule construction

面,形成多价适配体,同时用荧光染料FAM修饰OTA适配体的互补链,Cy3修饰ZEN适配体的互补链,当体系中没有OTA和ZEN时,适配体和互补链之间杂交,FAM和Cy3不发光,当体系中有OTA或ZEN时,其特异性适配体的互补链将解离,荧光恢复,从而实现对OTA和ZEN的同时检测。但是复杂的DNA纳米结构构建难度较大。

2.7 结合多种优化策略

通过SELEX技术筛选得到的适配体可以通过前述的优化策略进行改进,但是每种优化策略都有其独特的优势和局限性。因此,研究人员往往会综合运用多种优化手段,以尽可能地提升适配体与靶标的结合力和选择性^[55-56]。Sha等^[23]结合裂分、诱变、延伸3种优化策略对其前期研究中获得的ENR适配体SEQ.3进行改造,首先将SEQ.3从茎部切分成两部分,得到 K_d 值为132.26 nmol/L的SEQ.A,继续将低能量的A-T碱基对突变成高能量的G-C碱基对,得到了 K_d 值为20.13 nmol/L的新突变适配体SEQ.A5,随后以TT碱基为连接臂,对SEQ.A5序列上的

5个关键碱基(GCCAG)进行2~4次克隆,获得了 K_d 值仅为11.07 nmol/L双克隆适配体SEQ.A52,比原始适配体SEQ.3亲和力提高了19倍。以其为识别元件构建的荧光适配体传感器对ENR的检测限仅为41.35 pmol/L,较原始适配体的检测限显著降低。通过合理的裂分、定点诱变、利用对接模拟寻找结合位点并进行适当延伸,可以大大提高适配体的结合性能。

3 结论与展望

通过合理的截短、修饰、延伸等策略可显著提高适配体的性能,进而在食品安全检测领域发挥更大的作用。但是适配体传感器在信号处理和数据读取方面仍然需要使用电化学分析仪、荧光分光光度计、拉曼光谱仪等专业仪器设备,这种依赖限制了适配体传感器在食品危害物检测中的便携性和实际应用,开发便携式适配体传感器是当前重点发展的方向之一。此外,由于适配体的筛选需要构建容量较大的寡核苷酸文库,筛选步骤复杂且耗时较长,使得最终能够成功筛选出的适配体数量相对较

少,从源头上制约了适配体的发展,需要开发可以在更短的时间内筛选出更多核酸适配体的新技术。除了技术层面的挑战,适配体作为一种新型的检测手段,其在食品安全检测中的应用还需要相应的法规和标准化支持,包括适配体的筛选、合成、检测方法等方面,都需要建立统一的标准和规范。相信随着研究的不断深入和技术的持续进步,通过解决上述挑战,适配体传感器有望在食品安全检测领域实现更广泛的应用。

参考文献

- [1] 孙静怡, 边万超, 刘婷. 基于可变带宽的食源性疾病的制图方法构建: 以副溶血性弧菌为例[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2024, 23(2): 218-224.
SUN J Y, BIAN W C, LIU T. Construction of mapping method for foodborne diseases based on variable bandwidth: a case study of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition), 2024, 23(2): 218-224.
- [2] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4 968): 505-510.
- [3] QIAN S W, CHANG D R, HE S S, et al. Aptamers from random sequence space: accomplishments, gaps and future considerations[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1 196(8): 339511.
- [4] WANG T, CHEN C Y, LARCHER L M, et al. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: lessons learned, progress and opportunities on aptamer development[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(1): 28-50.
- [5] 孙玉琼, 袁宝银, 邓美桃, 等. 核酸适配体序列优化策略的研究进展[J]. 化学传感器, 2018, 38(2): 12-22.
SUN Y Q, YUAN B Y, DENG M T, et al. Recent development of the optimization strategies of aptamer sequences[J]. Chemical Sensors, 2018, 38(2): 12-22.
- [6] 梁好, 徐学明. 食品危害物适配体截短优化及其应用研究进展[J]. 食品安全导刊, 2021(29): 189-192.
LIANG H, XU X M. Research progress on truncation optimization and application of aptamers for food hazards[J]. China Food Safety Magazine, 2021(29): 189-192.
- [7] QI S, DUAN N, KHAN I M, et al. Strategies to manipulate the performance of aptamers in SELEX, post-SELEX and microenvironment[J]. Biotechnology Advances, 2022, 55(2): 107902.
- [8] YU H, ZHU J X, SHEN G Q, et al. Improving aptamer performance: key factors and strategies[J]. Microchimica Acta, 2023, 190(7): 1-15.
- [9] DUAN N, REN K X, LYU C, et al. Discovery and optimization of an aptamer and its sensing ability to amantadine based on

- SERS via binary metal nanoparticles[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(46): 14 805-14 815.
- [10] 郭华麟. 基于适配体探针的苹果汁中真菌毒素检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022: 16-17.
GUO H L. Study on the detection method of mycotoxins in apple juice based on the aptamer probe[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022: 16-17.
- [11] YANG H, ZHU L J, WANG X X, et al. A label-free fluorescent magnetic dual-aptasensor based on aptamer allosteric regulation of β -lactoglobulin[J]. Talanta, 2024, 271: 125664.
- [12] CHEN Y Q, WANG Z M, LIU S Y, et al. A highly sensitive and group-targeting aptasensor for total phthalate determination in the environment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 412: 125174.
- [13] JIA M, SHA J Y, LI Z H, et al. High affinity truncated aptamers for ultra-sensitive colorimetric detection of bisphenol A with label-free aptasensor[J]. Food Chemistry, 2020, 317: 126459.
- [14] 黄强, 颜志超, 刘建平, 等. 一种基于分子动力学模拟的核酸适配体优化设计方法: 202110304532.4[P]. 2021-07-16.
HUANG Q, YAN Z C, LIU J P, et al. An optimization design method of nucleic acid aptamer based on molecular dynamics simulation: 202110304532.4[P]. 2021-07-16.
- [15] LI R Y, ZHU Q Y, SUN X L, et al. Electrochemical biosensor based on the integration of maple leaf-like gold nanocrystal and truncated aptamer for detection of α -amanitin with high sensitivity, selectivity and rapidity[J]. Food Chemistry, 2024, 453: 139639.
- [16] ZHANG W Q, SUN Z C, TIAN Y H, et al. Ratiometric fluorescent sensor based on a truncated specific aptamer by MGO-SELEX screening for streptomycin detection[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2024, 406: 135427.
- [17] YANG N R, DING N, QI S, et al. High-affinity truncated aptamers for detection of *Cronobacter* spp with magnetic separation-assisted DNAzyme-driven 3D DNA walker[J]. Mikrochimica Acta, 2024, 191(3): 130.
- [18] CHEN K M, ZHOU J, SHAO Z T, et al. Aptamers as versatile molecular tools for antibody production monitoring and quality control[J]. Journal of the American Chemical Society, 2020, 142(28): 12 079-12 086.
- [19] 韩静. 基于卡那霉素适配体结合机理的检测应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023: 30.
HAN J. Study on binding mechanism and detection application of kanamycin aptamer[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023: 30.
- [20] GAO L, ZHANG Y, CHEN L, et al. Study of dual binding specificity of aptamer to ochratoxin A and norfloxacin and the development of fluorescent aptasensor in milk detection[J]. Talanta, 2024, 273: 125935.

- [21] KIMOTO M, NAKAMURA M, HIRAO I. Post-ExSELEX stabilization of an unnatural-base DNA aptamer targeting VEGF 165 toward pharmaceutical applications[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(15): 7 487-7 494.
- [22] 杨妍. 基于适配体分子操纵和亲和优化策略的生物传感检测技术研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2022: 74-82.
- YANG Y. Aptamer-based molecular manipulation and affinity optimization strategy for biosensors development[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2022: 74-82.
- [23] SHA J Y, LIN H, ZHANG Z Y, et al. Preparation and validation of ultrasensitive aptamers by computer simulation and site-specific mutation[J]. *Food Analytical Methods*, 2023, 16(1): 215-224.
- [24] ZHANG S C, QIN Y D, YUAN J, et al. Based on mutated aptamer-smartphone colorimetric detection of metronidazole in milk[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1444846.
- [25] SIMONSSON T. G-quadruplex DNA structures-variations on a theme[J]. *Biological Chemistry*, 2001, 382(4): 621-628.
- [26] NONAKA Y, SODE K, IKEBUKURO K. Screening and improvement of an anti-VEGF DNA aptamer[J]. *Molecules*, 2010, 15(1): 215-225.
- [27] GAO S X, ZHENG X, WU J H. A graphene oxide-based aptasensor for ANGPTL4 biomarker detection[J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2021, 345: 130389.
- [28] 刘诺亚, 高加乐, 宋玉竹, 等. 腐霉利核酸适配体的筛选与鉴定[J]. *分析科学学报*, 2023, 39(2): 146-152.
- LIU N Y, GAO J L, SONG Y Z, et al. Screening and identification of procymidone nucleic acid aptamers[J]. *Journal of Analytical Science*, 2023, 39(2): 146-152.
- [29] ZHENG X, HU B, GAO S X, et al. A saxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation[J]. *Toxicon*, 2015, 101: 41-47.
- [30] QIN Y D, QIN Y N, BUBIAJIAER H, et al. Engineering constructed of high selectivity dexamethasone aptamer based on truncation and mutation technology[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 994711.
- [31] KENT A D, SPIROPULOS N G, HEEMSTRA J M. General approach for engineering small-molecule- binding DNA split aptamers[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(20): 9 916-9 923.
- [32] QIN Y Y, LIU S D, MENG S Y, et al. Split aptamer-based sandwich-type ratiometric biosensor for dual-modal photoelectrochemical and electrochemical detection of 17 β -estradiol[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1 285: 342030.
- [33] STOJANOVIC M N, DE PRADA P, LANDRY D W. Fluorescent sensors based on aptamer self-assembly[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(46): 11 547-11 548.
- [34] CHEN X, CHEN K R, DU Z H, et al. Fusion of binary split allosteric aptasensor for the ultra-sensitive and super-rapid detection of malachite green[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 425(5): 127976.
- [35] DU Y M, ZHOU Y Y, WEN Y L, et al. Multiplexed aptasensing of food contaminants by using terminal deoxynucleotidyl transferase-produced primer-triggered rolling circle amplification: application to the colorimetric determination of enrofloxacin, lead (II), *Escherichia coli* O157: H7 and tropomyosin[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186 (12): 840.
- [36] SHANG Z X, MA P F, KHAN I M, et al. A DNA tweezers fluorescence aptasensor based on split aptamer-assisted magnetic nanoparticles for the detection of enrofloxacin in food[J]. *Food Control*, 2023, 145(3): 109437.
- [37] WANG R Y, ZHANG Q S, ZHANG Y, et al. Unconventional split aptamers cleaved at functionally essential sites preserve biorecognition capability[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91 (24): 15 811-15 817.
- [38] LUO Y, JIN Z Y, WANG J E, et al. The isolation of a DNA aptamer to develop a fluorescent aptasensor for the thiamethoxam pesticide[J]. *Analyst*, 2021, 146(6): 1 986-1 995.
- [39] ZHANG Y, HU Y, DENG S, et al. Engineering multivalence aptamer probes for amplified and label-free detection of antibiotics in aquatic products[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2 554-2 561.
- [40] 兰欣悦, 刘宁宁, 朱龙佼, 等. 四环素双价适配体非酶免标记传感器[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(3): 276-284.
- LAN X Y, LIU N N, ZHU L J, et al. Tetracycline bivalent aptamer non-enzyme label-free sensor[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(3): 276-284.
- [41] ZHAO L H, QI X Y, YAN X C, et al. Engineering aptamer with enhanced affinity by triple helix-based terminal fixation [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(44): 17 493-17 497.
- [42] JI D Y, FENG H X, LIEW S W, et al. Modified nucleic acid aptamers: development, characterization, and biological applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(11): 1 360-1 384.
- [43] 罗明兰. 靶向蛋白靶标的 2'-F 及 2'-OMe 全修饰非天然核酸适配体的开发及表征[D]. 广州: 华南理工大学, 2023: 10.
- LUO M L. Development and characterization of 2'-F and 2'-OMe fully modified unnatural nucleic acid aptamers targeting protein targets[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2023: 10.
- [44] CHEN Z F, LUO H, GUBU A M, et al. Chemically modified aptamers for improving binding affinity to the target proteins via enhanced non-covalent bonding[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023, 11: 1091809.

- [45] RANGEL A E, CHEN Z, AYELE T M, et al. In vitro selection of an XNA aptamer capable of small-molecule recognition[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(16): 8 057-8 068.
- [46] 韦庆益, 林轩然, 张佩瑶, 等. 基于金纳米粒子的荧光适配体传感器检测食品中的 17 β -雌二醇[J]. *食品科学*, 2023, 44(14): 368-376.
- WEI Q Y, LIN X R, ZHANG P Y, et al. Detection of 17 β -estradiol in foods by a fluorescence aptasensor based on gold nanoparticles[J]. *Food Science*, 2023, 44(14): 368-376.
- [47] HUI Y Y, YANG D, WEI L S, et al. Rapid and label-free electrochemical aptasensor based on a palladium nanoparticles/titanium carbide/polyethyleneimine functionalized nitrogen-doped carbon nanotubes composite for amplified detection of streptomycin[J]. *Food Chemistry*, 2024, 432: 137271.
- [48] LI H L, DU C C, GUO T, et al. Ratiometric electrochemical aptasensor based on split aptamer and Au-rGO for detection of aflatoxin M₁[J]. *Journal of Dairy Science*, 2024, 107(5): 2 748-2 759.
- [49] 王瑞安, 杜再慧, 康帅帅, 等. 基于杂交链式反应扩增检测奶粉中阪崎肠杆菌的适配体磁珠荧光传感器[J]. *食品科学*, 2024, 45(1): 191-197.
- WANG R A, DU Z H, KANG S S, et al. Aptamer-functionalized magnetic bead-based fluorescence sensor for the detection of *Cronobacter sakazakii* in milk powder using hybridization chain reaction amplification[J]. *Food Science*, 2024, 45(1): 191-197.
- [50] QI S, DONG X Z, HAMED E M, et al. Ratiometric fluorescence aptasensor of allergen protein based on multivalent aptamer-encoded DNA flowers as fluorescence resonance energy transfer platform[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(18): 6 947-6 957.
- [51] CHEN C, ZHANG Y F, WANG X M, et al. A core-satellite self-assembled SERS aptasensor containing a "biological-silent region" Raman tag for the accurate and ultrasensitive detection of histamine[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(2): 1 029-1 039.
- [52] SEN D, LAZENBY R A. Selective aptamer modification of Au surfaces in a microelectrode sensor array for simultaneous detection of multiple analytes[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(17): 6 828-6 835.
- [53] GE G, WANG T L, LIU Z H, et al. A self-assembled DNA double-crossover-based fluorescent aptasensor for highly sensitivity and selectivity in the simultaneous detection of aflatoxin M₁ and aflatoxin B₁[J]. *Talanta*, 2023, 265: 124908.
- [54] 祁兴普, 董骥玮, 朱麟菲, 等. 基于金纳米花的双信号适配体传感器检测红酒中真菌毒素[J]. *食品科学*, 2024, 45(2): 308-314.
- QI X P, DONG Q W, ZHU L F, et al. A gold nanoflower-based dual-signal fluorescent aptasensor for detection of mycotoxins in red wine[J]. *Food Science*, 2024, 45(2): 308-314.
- [55] WANG W J, ZHANG L, DONG W H, et al. A colorimetric aptasensor fabricated with group-specific split aptamers and complex nanozyme for enrofloxacin and ciprofloxacin determination[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 458 (Suppl C): 131995.
- [56] WANG J, ZHU L J, LI T S, et al. In silico simulation-guided engineering of multifunctional bivalent light up aptamer for sensitive and on-site detection of AFB₁ using label-free ratiometric fluorescent aptasensor[J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2024, 420: 136425.