

指数富集的配体系统进化技术研究进展及在食品检测中的应用

谭建锡^{1,2}, 陈盼³, 莫瑾¹, 彭梓¹, 朱金国^{1*}

- (1. 湖南出入境检验检疫局, 国家食品安全检测重点实验室, 食品安全科学技术湖南省重点实验室, 长沙 410004;
2. 湖南师范大学生命科学院, 长沙 410081; 3. 长沙县食品安全检测中心, 长沙 410100)

摘要: 核酸适配体是指能以极高的亲和力和特异性与靶分子结合的寡核苷酸序列, 可识别的靶分子范围非常广, 并均可通过指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术筛选得到。近年来, 在传统 SELEX 技术的基础上, 新的 SELEX 技术不断出现。这些新技术的出现, 在不断完善 SELEX 技术的同时, 也极大地推动了适配体技术在各学科领域中的发展及应用。本文对核酸适配体的筛选方法进行了总结, 并介绍了其在食品检测领域的应用现状和发展方向, 为核酸适配体的筛选与应用提供了参考。

关键词: 核酸适配体; 筛选方法; 指数富集的配体系统进化技术; 食品检测

Research progress and application of systematic evolution of ligands by exponential enrichment technology in food detection

TAN Jian-Xi^{1,2}, CHEN Pan³, MO Jin¹, PENG Zi¹, ZHU Jin-Guo^{1*}

- (1. Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, State Key Laboratory of Food Safety Testing, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Changsha 410004, China; 2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 3. Changsha County Food Safety Testing Center, Changsha 410100, China)

ABSTRACT: Aptamers are oligo-nucleotides that screened by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) theoretically, binding to a wide range of target molecules with high affinity and specificity. In recent years, new SELEX technologies are emerging on the basis of traditional SELEX technology. The new technologies improved the SELEX process gradually and promoted their application in various fields. This article mainly summarized the methods for screening of aptamers, described the current status in food detection and predicated the development of aptamers possibly, which provided a reference for aptamers screening and applications.

KEY WORDS: aptamers; screening methods; systematic evolution of ligands by exponential enrichment; food detection

1 引言

指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of

ligands by exponential enrichment, SELEX)是指从单链寡核苷酸文库中筛选出能与靶物质有高亲和力和特异性结合的寡核苷酸序列的方法。利用该筛选技术制备出的产物被称

*通讯作者: 朱金国, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: zhujg@hnciq.gov.cn

*Corresponding author: ZHU Jing-Guo, Researcher, Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China. E-mail: zhujg@hnciq.gov.cn

为适配体(aptamer)。适配体在不同的文献资料中有不同的名称, 比如适体、适配子, 最早由美国科学家发现并筛选得到^[1,2]。它的靶标范围很广, 包括小分子物质、抗生素、核苷酸、氨基酸、多肽、酶、抗体以及转录因子等^[3-5], 甚至还能结合病毒和细胞^[6-8]。适配体与蛋白的结合不同于抗体, 抗体以初级结构去识别抗原决定簇, 而适配体通过形成多种热力学稳定的三维空间结构, 从而与靶分子特异、高效结合。依赖于其结构互补性和多变性, 通过静电引力、分子间氢键、分子堆积及形状互补匹配等作用形式, 特异性结合蛋白、小分子、离子及细胞等多种靶物质。溶液中存在靶分子时, 单链脱氧核糖核酸(ssDNA)或核糖核酸(RNA)适配体就会折叠形成发夹(hairpin)、凸环(bulge)、假结(pseudoknot)、G-四联体(G-quartet)等三维空间结构, 确保了其可与靶分子高特异性的互补结合, 并可进一步改变靶分子的生物活性和生命进程。适配体最大优势是没有免疫原性, 并且分子量小、可化学合成、稳定性强、易于修饰和标记, 与传统化学方法和免疫学方法相比, 具有无可比拟的优越性^[9,10]。

近年来在传统 SELEX 技术基础上, 各类衍生 SELEX 技术也被不断发展和完善, 被广泛应用在生命科学、生物医药等领域。核酸适配体特异性结合的特性为检测食品中化学残留物、生物毒素、重金属、病原微生物以及非法添加物提供了一种新型、高效、快速的检测平台。本文主要综述核酸适配体的筛选方法及其在食品有害物检测中的研究进展, 并展望了核酸适配体在该领域的研究方向。

2 适配体的筛选技术(SELEX 技术)

近年来, 在经典的 SELEX 技术基础上, 各种新型 SELEX 技术不断涌现, 大部分方法是以提高筛选效率、提高特异性和减少筛选选轮数为目的, 扩展筛选功能的技术改良等。

2.1 经典的 SELEX 技术

主要包括以下几个基本步骤:

(1) 设计并人工合成两端为引物结合位点的固定序列, 中间为随机序列寡核苷酸序列文库, 随机序列一般为 20~60 个碱基, 文库的容量一般在 $10^{14} \sim 10^{18}$ 之间; 随机序列越长, 整个文库的库容量也越大, ssDNA 分子形成的结构越多, 越有机会筛选到合适的适配体与靶标结合。通常情况下还可以在引物的两端进行生物素或者荧光染料的修饰, 以便于后续的单链分离或者结合率的荧光测定。

(2) 在筛选缓冲体系中寡核苷酸库与靶分子孵育后, 将与靶分子结合的寡核苷酸序列从体系中分离, 再进行聚合酶链式反应(PCR)扩增亲和力相对较高的 ssDNA, 此时文库一般为双链文库。利用不对称 PCR 等方法拆分形成次级单链文库后可进入下一轮筛选。

(3) 不断重复筛选, 文库里亲和力和低的寡核苷酸序列被逐渐淘汰, 测定文库和靶标的结合率不再升高时即可停止筛选, 此时得到的最后一轮筛选亚文库即为适配体文库。

(4) 对最终筛选到的寡核苷酸序列进行克隆测序, 并对寡核苷酸序列与相应的靶分子结合的特异性和亲和力进行鉴定, 用于各种适配体探针为基础的检测体系。

2.2 毛细管电泳法(CE-SELEX)

ssDNA 与靶标结合后形成的单链核酸-靶标复合物, 结构和质量上都发生了改变, 而这种改变可以通过毛细管电泳来区分。CE-SELEX 对 ssDNA 结合前后的靶标进行分离, 从而筛选到能和靶标特异性结合的适配体。通常在 ssDNA 上一般会做荧光标记, 便于毛细管电泳检测仪对结合复合物的发现。Tang 等^[11]利用 CE 法为分离手段筛选蓖麻毒素的适配子, 与亲和层析法分离结合复合物相比, 筛选轮数减少了 5 轮, 而结合率却增加了 48.7%。Yang 等^[12]利用此技术, 仅用了 3 轮筛选就获得了 NMM(N-methyl mesoporphyrin) 的适体。Tran 等^[13]经过 8 轮筛选成功获得了花生过敏原之一的阿糖胞苷 H1 的适体。CE-SELEX 技术最大的优点就是能极大地提高筛选效率, 尤其对常规筛选不易获得的极少量靶物质的适体, 这可能和毛细管电泳仪对结合复合物选择性很高, 而非特异性吸附几率更低有关。其主要缺陷是进样体积小(nL 级), 文库中 DNA 分子的数量一般只有 10^{13} 个^[14,15]。

2.3 自动化筛选技术

传统的 SELEX 筛选过程需要完成一套重复繁琐的操作, 使得筛选相对耗时耗力, 开发自动化系统和装置是 SELEX 筛选技术发展的方向。自动化 SELEX 技术的建立可以简化筛选过程, 节约时间和物品的消耗, 实现高通量和限定范围, 达到同时筛选多个靶分子的效果, 这使筛选过程所需时间由数月/周缩短至几天^[16,17]。Eulberg 等^[18]应用 RoboAmp4200E 仪器全自动筛选出 P 物质的适配子。与经典 SELEX 技术相比, 这套系统既可以通过半定量 PCR 实现在线监测与靶物质结合的核酸量, 又可满足在不同缓冲液和试剂条件下进行快速筛选适配体的要求。Hybarger 等^[19]建立了由 PCR 仪和 LabView 共同控制组成的微流 SELEX 样机, 所有操作移到芯片微流系统完成, 实现了 SELEX 的标准化, 提高筛选速度、降低了筛选成本。虽然这些自动化装置能实现高效筛选, 但是由于自动控制系统投入成本很高, 适用性较差, 目前仍然难以实现大规模应用。

2.4 荧光磁珠法(FluMag-SELEX):

2005 年 Stoltenburg 等^[20]将链霉亲和素蛋白固定到磁珠结合上进行 SELEX 筛选, 采用荧光标记来进行 DNA 定量和计算结合率, 建立了荧光磁珠法 SELEX。主要步骤是将链霉亲和素包被在磁珠上, 然后与文库孵育, 将未与靶分子结合的核酸分离除去, 对洗脱下来的目标核酸用荧光

标记的引物进行PCR扩增,最后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,回收正义链生成次级文库进入下一轮筛选。应用该筛选方法,已成功筛选到对于布洛芬和四氯联苯(PCB77)具有较高特异性的适体^[21,22]。该方法简便,操作快捷,筛选快速高效,靶蛋白需要量小,特别对于一些靶蛋白昂贵的筛选非常适合。

2.5 细胞-SELEX(cell-SELEX)技术

cell-SELEX 技术是指使用完整的细胞与核酸文库直接作用,从而筛选出能与细胞表面分子特异性结合的适体的技术。目前,采用该技术用于疾病诊断和实验中。已成功获得了大肠埃希菌 K88 的适体、沙门氏菌 O8 的适体和李斯特菌的适体^[23-25]。这些适体有望成为快速筛查和检测食源性疾病的潜在工具。临床治疗中,利用 cell-SELEX 技术成功筛选到了动脉粥样硬化斑块组织发炎的内皮细胞和宫颈癌细胞的适体,可用作确定病变的新的生物标志物,该方法简化了 SELEX 技术繁琐和耗时的步骤,为疾病的早期诊断与治疗提供了新的思路^[26,27]。

2.6 结合定量 PCR 的 SELEX 技术

该方法将适体的特异性与定量 PCR 的放大性相结合,从而有助于筛选到高亲和力的适体,同时也大大提高了对靶物质的检测水平^[28]。抗狂犬病毒感染的活细胞等一些高亲和力适体的成功获得,有望成为治疗对应疾病的良药^[29],但由于定量 PCR 技术具有高度的灵敏性,为了保证特异性,必须对 PCR 的条件、洗涤等进行严格控制。

3 SELEX 技术在食品检测中的应用

3.1 抗生素检测

目前对抗生素的检测大都采用免疫检测法、色谱法、分光光度法等方法。核酸适配体以其在选择性、灵敏性、稳定性等方面的优势,成为一种比较好的检测抗生素残留的方法。Song 等^[30]利用卡那霉素 B 适配体在 5'端都有一个茎环突起的特性,通过 5'-FAM 标记进行荧光强度分析,测定了解离常数,建立了仅通过肉眼观察就可以检测卡那霉素的方法,灵敏度可以达到 25 nmol/L。Zhou 等^[31]建立了一种基于多壁碳纳米管修饰的电化学四环素适体传感器,对四环素最优的检出限是 5 nmol/L。智文婷^[32]筛选到了以四环素为靶物质的核酸适配体(76 bp),并将其用于核酸适配体-纳米金探针比色和共振光散射测定四环素体系的构建,比色与共振光散射法的最低检测限分别为 17.6 nmol/L 和 24.2 nmol/L。上述基于核酸适配体检测抗生素的研究方法为抗生素的药理以及食品残留检测方面提供了良好的辅助手段。

3.2 重金属检测

在食品中重金属检测研究中,蒋治良等^[33]、凌邵明等

^[34]分别利用基于核酸适配体的原理,用单链核酸适配体修饰金硒(AuSe)纳米合金,制备了重金属离子的核酸适配体纳米探针(Apta-AuSe)用于检测重金属汞和铅。当溶液中存在重金属离子时,可以稳定 aptamer 序列中的 T-T 错配,形成较稳定的双链 T-重金属离子-T 错配物,从而使释放出来的 AuSe 纳米合金聚集形成较大的微粒,使得在 590 nm 处共振散射峰增强,通过离子浓度与共振散射光强度的线性关系来计算重金属离子的浓度。结果表明,用核酸适配体修饰金硒纳米合金共振散射光谱法检测水样中的痕量 Hg²⁺和 Pb²⁺,检出限分别为 0.74 nmol/L 和 0.3 nmol/L,此方法简单可靠。

3.3 生物毒素检测

黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、赭曲霉毒素(ochratoxin, OT)、葡萄球菌肠毒素 B(SEB)是最常见的导致食品中毒的生物毒素,目前常用的检测方法包括免疫学法、细胞毒性法和高效液相色谱法等。免疫学方法特异性强,但易出现假阳性,另外,有些毒素存在多种亚型,会干扰实验结果。细胞毒性法容易受细胞的种类、密度等因素的影响,且周期较长;高效液相色谱法对样品的预处理要求比较多。核酸适配体技术是无需抗体的生物技术,检测时间短、灵敏度高、特异性强。Shim 等^[35]已应用化学发光竞争性适配体检验玉米样品中的黄曲霉毒素 B₁,马文蔚^[36]采用竞争法定性及半定量检测检测 OT,并有很好的灵敏度。Liu 等^[37]筛选出葡萄球菌肠毒素 B 适配体,并基于此修饰金纳米颗粒,用比色法对葡萄球菌肠毒素 B(SEB)进行检测,并显示出了良好的选择性,大大缩短了检测时间,且灵敏度高。核酸适配体和辣根过氧化物酶-脱氧核糖核酸酶(HRP-DNAzyme)联合可能是一种有用的探索,也为以后发展检测生物毒素的核酸适配体提供了依据。

3.4 微生物检测

核酸适配体已广泛用于微生物的检测研究中,目前已报道了针对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、空肠弯曲菌等的适配体检测。Dwarakanath 等^[38]由 SELEX 筛选得到一条针对 *E. coli* O111:B4 的适配体,然后适配体-量子点和 *E. coli*:B4 细胞结合,在 140 nm 波长处发生了明显的蓝移现象,这项开创性工作提示可以采用适配体与量子点结合的方法检测病原菌。Ma 等^[39]以氧化石墨烯和纳米金颗粒为主要介质的电化学传感器用于沙门氏菌的检测,通过检测电化学阻抗光谱来对沙门氏菌定量,其最低检出限为 3 cfu/mL。Hernandez 等^[40]以石墨烯为转导层,适配体为感应层,制成电势适配体传感器用于金黄色葡萄球菌的检测,不仅最低检出限可达 1 cfu/mL,同时能够保证高选择性。Bruno 等^[41]采用氯化镁萃取法从空肠弯曲菌提取的表面蛋白,然后筛选出核酸适配体,其中将亲和力最高的 2 个适配子应用到磁珠(ba)红色量子点(量子点)为

基础的夹心法检测中, 用于检测空肠弯曲菌, 该法显示与其他菌种交叉反应的可能性较小。与传统方法相比, 核酸适配体具有低检测限和快速检测等优势, 有望成为病原微生物检测的新方法。

4 展 望

自 20 世纪 90 年代, 第一个以 T4 DNA 聚合酶为靶标的核酸适体被筛选出来, 使人们对于核酸有了新的认识。经过 20 多年的发展, 核酸适体的 SELEX 筛选技术也得到了不断改进和完善, 逐渐出现了很多新型 SELEX 筛选方法。这些方法的建立, 极大提高了筛选效率, 扩展了核酸适体的应用范围, 使其不但可以作为遗传信息存储和转运的载体, 也可以作为各种功能分子。SELEX 技术作为一种极其有用的分子生物学工具而越来越受到重视, 核酸适体与靶分子结合的高特异性、高亲和性以及不易变性、体外易合成、易修饰等特性, 使得它在疾病检测、分析化学、食品检测等领域都被广泛研究与应用^[42-47]。

当然, 目前核酸适体技术要实现真正意义上的广泛应用仍然存在一定的问题和局限性。首先大部分的适配子都是在实验室特定环境之下筛选而来, 其与靶标的结合特性可能会受到多种因素的影响, 有研究^[48]称某些适配子在不同的温度条件下和靶标的亲和力存在较为明显的差异。在变化的环境中, 某一适配子能否保持其高度的敏感性 & 特异性还有待验证; 适体在体内易被降解, 尚未有普适性的修饰方法解决; 但是, 核酸适体依然在科研领域展现出很大的研究前景, 为很多之前没有攻克的难题提供了新的解决思路和方法。相信在不久的将来, 核酸适体会像传统抗体一样成为检测、诊断和治疗不可或缺的手段之一。

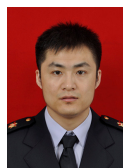
参考文献

- [1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to Bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510.
- [2] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind special ligands [J]. *Nature*, 1990, 346(30): 818-822.
- [3] Tanaka Y, Akagi K, Nakamura Y, *et al.* RNA aptamers targeting the carboxyl terminus of KRAS on co-protein generated by an improved SELEX with isothermal RNA amplification [J]. *Oligonucleotides*, 2007, 17(1): 12-21.
- [4] Naimuddin M, Kitamura K, Kinoshita Y, *et al.* Selection-by-function: efficient enrichment of cathepsin E inhibitors from a DNA library [J]. *J Mol Recognit*, 2007, 20(1): 58-68.
- [5] Nitsche A, Kurth A, Dunkhorst A, *et al.* One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX [J]. *BMC Biotechnol*, 2007, 7(15): 1-12.
- [6] Shigdar S, Lin J, Yu Y, *et al.* RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(5): 991-998.
- [7] Shamah SM, Healy JM, Cload ST. Complex target SELEX [J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41(1): 130-138.
- [8] Avci-Adali M, Metzger M, Perle N, *et al.* Pitfalls of cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX): existing dead cells during *in vitro* selection anticipate the enrichment of specific aptamers [J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20(6): 317-323.
- [9] Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers [J]. *Science*, 2000, 287: 820-825.
- [10] 谢海燕, 陈薛钊, 邓玉林. 核酸适配体及其在化学领域的相关应用[J]. *化学进展*, 2007, 19(6): 1026-1033.
Xie HY, Chen XC, Deng YL. Advance in aptamer research [J]. *Prog Chem*, 2007, 19(6): 1026-1033.
- [11] Tang J, Xie J, Shao N, *et al.* The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two *in vitro* selection methods [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(7): 1303-1311.
- [12] Yang J, Bowser MT. Capillary electrophoresis-SELEX selection of catalytic DNA aptamers for a small-molecule porphyrin target [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(3): 1525-1530.
- [13] Tran DT, Knez K, Janssen KP, *et al.* Selection of aptamers against AraH1 protein for FO-SPR bio-sensing of peanut allergens in food matrices [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 43(1): 245-251.
- [14] Mosing R K, Mendonsa S D, Bowser M T. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(19): 6107-6712.
- [15] 徐敦明, 吴敏, 邹远, 等. 核酸适体技术在食品安全分析中的应用[J]. *分析化学*, 2011, 39(6): 925-933.
Xu DM, Wu M, Zou Y, *et al.* Application of aptamers in food safety [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(6): 925-933.
- [16] 王巍, 贾凌云. 适配体筛选方法研究进展[J]. *分析化学*, 2009, 37(3): 454-460.
Wang W, Jia LY. Progress in aptamer screening methods [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37(3): 454-460.
- [17] Cox J C, Ellington AD. Automated selection of anti-protein aptamers [J]. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(10): 2525-2531.
- [18] Eulberg D, Buehner K, Maasch C, *et al.* Development of an automated *in vitro* selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance Pantagonist [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): e45.
- [19] Hybarger G, Bynum J, Williams RF, *et al.* A micro-fluidic SELEX prototype [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384(1): 191-198.
- [20] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. Flu mag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(1): 83-91.
- [21] Kim YS, Hyun CJ, Kim IA, *et al.* Isolation and characterization of enantioselective DNA aptamers for ibuprofen [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(10): 3467-3473.
- [22] Xu SM, Yuan H, Chen SP, *et al.* Selection of DNA aptamers against polychlorinated biphenyls as potential biorecognition elements for environmental analysis [J]. *Anal Biochem*, 2012, 423(2): 195-201.
- [23] Li H, Ding XH, Peng ZH, *et al.* Aptamer selection for the detection of *Escherichia coli* K88 [J]. *Can J Microbiol*, 2011, 57(6): 453-459.
- [24] Liu GQ, Yu XF, Xue F, *et al.* Screening and preliminary application of a DNA aptamer for rapid detection of *Salmonella* O8 [J]. *Microchim Acta*, 2012, 178(1-2): 237-244.

- [25] Duan N, Ding XY, He LX, *et al.* Selection, identification and application of a DNA aptamer against *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Control*, 2013, 33(1): 239–243.
- [26] Graham JC, Zarbl H. Use of cell-SELEX to generate DNA aptamers as molecular probes of HPV-associated cervical cancer cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36103.
- [27] Ji K, Lim WS, Li SF, *et al.* A two-step stimulus-response cell-SELEX method to generate a DNA aptamer to recognize inflamed human aortic endothelial cells as a potential in vivo molecular probe for atherosclerosis plaque detection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(21): 6853–6861.
- [28] 詹少兵, 曾毅. SELEX 技术及近年研究进展[J]. *病毒学报*, 2013, 29(5): 573–577.
Zhan SB, Zeng Y. Recent progress on SELEX and its applications [J]. *Chin J Virol*, 2013, 29(5): 573–577.
- [29] Liang HR, Hu GQ, Zhang T, *et al.* Isolation of ssDNA aptamers that inhibit rabies virus [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012, 14(3): 341–347.
- [30] Song KM, Cho M, Jo H, *et al.* Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer [J]. *Anal Biochem*, 2011, 415(2): 175–181.
- [31] Zhou L, Li D J, Gai L, *et al.* Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multiwalled carbon nanotubes amplification [J]. *Sens Actuat Chem*, 2012, 162(1): 201–208.
- [32] 智文婷. 基于核酸探针检测四环素和卡那霉素的应用研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
Zhi WT. Based on the application of nucleic acid probe detection of tetracycline and kanamycin [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013.
- [33] 蒋治良, 张轶, 覃惠敏, 等. 适配体修饰金纳米合金共振散射光谱法检测痕量 Hg^{2+} [J]. *光谱学与光谱分析*, 2011, 31(5): 1371–1373.
Jiang ZL, Zhang Y, Qin HM, *et al.* Resonance scattering spectral detection of trace Hg^{2+} using aptamer modified nanogold as a probe [J]. *Chin J Chem*, 2011, 31(5): 1371–1373.
- [34] 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.
Ling SM, Fan YY, Jiang ZL, *et al.* Resonance scattering spectral detection of trace Pb^{2+} using aptamer modified nanogold as a probe [J]. *Acta Chim Sin*, 2010, 68(4): 339–344.
- [35] Shim WB, Mun H, Joung HA, *et al.* Chemiluminescence competitive aptamer assay for the detection of aflatoxin B₁ in corn samples [J]. *Food Control*, 2014, 36(1): 30–35.
- [36] 马文蔚. 基于核酸适配体的食品中 OTA 和 Hg(II) 的生物传感器检测方法[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
Ma WW. Studies on the development of biosensor detection of OTA and Hg in foods based on aptamer [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.
- [37] Liu AP, Zhang YX, Chen WF, *et al.* Gold nanoparticle-based colorimetric detection of *Staphylococcal enterotoxin B* using ssDNA aptamers [J]. *Eur Food Res Technol*, 2013, 237(3): 323–329.
- [38] Dwarakanath S, Bruno J G, Shastry A, *et al.* Quantum dot-anti-body and aptamer conjugates shift fluorescence upon binding bacteria [J]. *Biochem Biophys Res*, 2004, 325(3): 739–743.
- [39] Ma X, Jiang Y, Jia F, *et al.* An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of *Salmonella* [J]. *J Microbiol Methods*, 2014, 98: 94–98.
- [40] Hernandez R, Valles C, Benito AM. *et al.* Graphene-based potentiometric biosensor for the immediate detection of living bacteria [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54: 553–557.
- [41] Bruno JG, Phillips F, Carrillo MP, *et al.* Plastic-Adherent DNA aptamer-magnetic bead and quantum dot sandwich assay for *Canapylobacter* detection [J]. *J Fluoresc*, 2009, 19(3): 427–435.
- [42] Lee YJ, Lee SW. Regression of hepatocarcinoma cells using RNA aptamer specific to alpha-fetoprotein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 521–527.
- [43] Ray P, Rialon-Guevara KL, Veras E, *et al.* Comparing human pancreatic cell secretomes by in vitro aptamer selection identifies cyclophilin B as a candidate pancreatic cancer biomarker [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(5): 1734–1741.
- [44] Dua P, Kang HS, Hong SM, *et al.* Alkaline phosphatase ALPPL-2 is a novel pancreatic carcinoma-associated protein [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1934–1945.
- [45] Park JH, Jee MH, Kwon OS, *et al.* Infectivity of hepatitis C virus correlates with the amount of envelope protein E2: development of a new aptamer-based assay system suitable for measuring the infectious titer of HCV [J]. *Virology*, 2013, 439(1): 13–22.
- [46] Rotherham LS, Maserumule C, Dheda K, *et al.* Selection and application of ssDNA aptamers to detect active TB from sputum samples [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): 46862.
- [47] Wang MS, Black JC, Knowles MK, *et al.* C-reactive protein(CRP) aptamer binds to monomeric but not pentameric form of CRP [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(4): 1309–1318.
- [48] Zhou J, Soontornworajit B, Wang Y. A temperature-responsive antibody-like nanostructure [J]. *Biol macromol*, 2010, 11(8): 2087–2093.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



谭建锡, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学。

E-mail: tanjx@hnciq.gov.cn



朱金国, 研究员, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: zhujg@hnciq.gov.cn