

# 核酸适配体生物传感技术在食品污染物检测中的应用

梁 刚, 满 燕, 李 安, 潘立刚\*

(北京市农林科学院, 北京农业质量标准与检测技术研究中心, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(北京), 农产品产地环境监测北京市重点实验室, 北京 100097)

**摘 要:** 核酸适配体生物传感技术是近些年发展起来的一种新的检测技术, 具有靶向性强、灵敏度高、价格低廉等优点, 被广泛应用于医药工业、生物医学、环境分析、食品分析等领域。其中, 在食品分析领域主要体现在农残、重金属、食品添加剂以及生物毒素等检测方面。本文首先介绍了核酸适配体的概念、筛选方法、核酸适配体传感器优点, 重点从传感器的设计、传感检测原理、检测性能等方面综述了核酸适配体生物传感器在  $Pb^{2+}$ 、农残等食品污染物检测中的应用; 最后对核酸适配体生物传感器的发展趋势进行了展望。

**关键词:** 食品安全; 适配体; 生物传感器; 重金属; 农药

## Applications of aptamer-based biosensing technology in the detection of food contaminants

LIANG Gang, MAN Yan, LI An, PAN Li-Gang\*

(Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Risk Assessment Lab for Agro-products(Beijing), Ministry of Agriculture, Beijing Municipal Key Laboratory of Agriculture Environment Monitoring, Beijing 100097, China)

**ABSTRACT:** Aptamer-based biosensing technology is a new detecting technique in recent years with the advantages of good target ability, high sensitivity and low cost, etc, which has been widely applied in the pharmaceutical industry, biology and medicine, environmental analysis and food analysis. For food analysis, aptamer-based biosensing technology is mainly used for detection of pesticide residues, heavy metals, food additives and biotoxin. This paper introduced the concept of aptamer, screening methods and the advantages of aptamer sensor firstly, and then emphatically reviewed the applications of aptamer sensor for the detection of food contaminants of  $Pb^{2+}$  and pesticide residues from the points of conception of the sensor, sensing principle and detection performance. Finally, the development trends of the aptamer sensor in the future were prospected.

**KEY WORDS:** food safety; aptamer; biosensor; heavy metal; pesticide

基金项目: 北京市农林科学院院创新能力建设专项(KJCX20170420)、国家农产品质量安全风险评估重大专项子课题(GJFP201701403)

**Fund:** Supported by Special Projects of Construction of Science and Technology Innovation Ability of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX20170420) and National Major Projects of Risk Assessment of Agricultural Product Quality and Safety (GJFP201701403)

\*通讯作者: 潘立刚, 研究员, 博士, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: panlg@nrcita.org.cn

\*Corresponding author: PAN Li-Gang, Professor, Ph.D, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China. E-mail: panlg@nrcita.org.cn

## 1 引言

食品安全问题是关系国计民生的重大问题。重金属、农药、生物毒素等有毒有害物质是食品的重要污染源, 进入人体后可对人体产生毒害作用, 诱发疾病或癌症等, 因此建立简单、快速、灵敏的检测方法, 可以有效避免人们食用受污染食品, 具有重要的研究意义。

目前, 检测重金属离子采用的主要方法是原子荧光法<sup>[1]</sup>、原子吸收法<sup>[2]</sup>、电感耦合等离子体原子发射光谱法<sup>[3]</sup>、电感耦合等离子体质谱<sup>[4]</sup>等方法; 而农药、生物毒素、食品添加剂等污染物的检测主要是采用液相色谱、液相色谱-质谱联法、气相色谱-质谱联用等方法<sup>[5-11]</sup>, 这些方法可以准确定量目标污染物的含量, 但也在一些不足, 如设备昂贵、检测费用高、便携性差、样品前处理时间长及过程烦琐、需专门技术人员操作、不能实现在线检测等, 这也限制了分析工作中追求的实时、快速、野外现场检测方法的需求。市场上虽然也有定性和定量的快速农药残留检测方法, 但这些方法也存在一些致命缺陷, 如指示剂法准确性差, 用于定性检测的可信度不够, 不易推广; 紫外检测仪的仪器价格和配套试剂盒价格太贵, 不利于日常农贸市场农产品中残留农药的监测。此外, 针对生物毒素快速检测也有 ELISA 试剂盒研究报道, 但是目标毒素抗体筛选过程需要投入较多资金和较长时间, 抗体制备难度较大, 易失活、对结构类似的化合物有一定的交叉反应、只适用于单一目标的检测分析等问题, 也限制了基于抗原抗体反应原理的检测技术的发展。生物传感器因其制备简单、检测快速、价格低廉、稳定重现性好等优点得到迅速的发展并被广泛应用于疾病诊断<sup>[12,13]</sup>、病毒检测、生物技术<sup>[14]</sup>、环境分析<sup>[15,16]</sup>、食品分析<sup>[17,18]</sup>等领域。特别是对靶标物具有高亲和力、特异性的核酸适配体 DNA 的出现及适配体筛选技术的发展, 核酸适配体生物传感技术在食品污染物分析中引起了科研工作者极大的兴趣, 展示了广阔的应用前景, 成为当前的食品安全分析的研究热点。

本文综述了适配体 DNA 生物传感技术在食品污染物分析中的应用, 重点介绍了适配体 DNA 生物传感器对重金属  $Pb^{2+}$ 、农药等食品污染源的检测研究, 最后对适配体 DNA 生物传感器的发展前景进行了展望。

## 2 核酸适配体生物传感器

### 2.1 核酸适配体

适配体 (aptamer) 是从合成的 DNA、RNA 文库中经指数富集的配基系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选获得能与靶物质 (蛋白、核酸或其他小分子) 高特异性、高亲和力结合的单链寡核苷酸序列<sup>[19]</sup>。该技术最初由美国的 Szostak、Therk 等研

究小组分别报道<sup>[20]</sup>。在过去的几十年中, SELEX 技术得到了突飞猛进的发展, 筛选得到了大量能与小分子、核酸、蛋白甚至整个细胞均有高亲和力、特异性的适配体序列。

### 2.2 核酸适配体生物传感器

核酸适配体生物传感器 (aptamer-based biosensors) 是以适配体 (aptamer) 为分子识别物质, 以与目标物的特异性作用引起的直接或间接信号变化对目标分子进行检测的传感器。到目前为止, 适配体传感器实现了对农残、POPs 污染物、抗生素、重金属、生物毒素等的检测<sup>[21-29]</sup>。

核酸适配体生物传感器具有以下优点: (1) 适配体与目标分子的结合具有高特异性和高亲和力, 适配体与目标分子间的解离常数一般为  $10^{-9} \sim 10^{-12} \text{ mol}^{[19]}$ 。(2) 目标分子范围广。适配体不仅可以与酶、抗体等分子结合, 而且也可以与金属离子、生物毒素、药物等小分子结合。(3) 廉价易得, 重现性好, 易标记。筛选出的适配体可以通过化学合成生产, 纯度高、组成确定, 消除了制备的批间误差, 较单抗制备更快速、更廉价。(4) 分子量小。适配体一般是由 25~90 个碱基组成的单链寡核苷酸片段<sup>[30]</sup>, 与目标分子结合空间位阻小, 从而有利于构建高密度阵列传感器。(5) 稳定性好, 可复性强。相对于酶和抗体/抗原, 适配体不仅具有良好的稳定性, 而且可反复变性、复性, 进行重复利用。这有利于提高生物传感器的寿命和降低了传感器的成本。

## 3 食品污染物核酸适配体生物传感器研究及应用

### 3.1 $Pb^{2+}$ 核酸适配体生物传感器

#### 3.1.1 $Pb^{2+}$ -DNA 酶核酸适配体

$Pb^{2+}$ 核酸适配体主要包括 2 类:  $Pb^{2+}$ -DNA 酶、富 G 碱基 DNA 序列。 $Pb^{2+}$ -DNA 酶通常由酶链和底物链组成, 二者可以部分互补杂化成双链结构, 在  $Pb^{2+}$  离子的作用下, 底物链的特定识别位点被切断, 断裂成两部分的底物链与酶链杂化的稳定性降低, 因而使底物链和酶链解链, 基于 DNA 酶与  $Pb^{2+}$  离子的这种特异性作用, 发展了  $Pb^{2+}$  选择性生物传感器。

Li 等<sup>[31]</sup>首次设计了  $Pb^{2+}$ -DNA 酶荧光生物传感器实现了对  $Pb^{2+}$  的高灵敏、选择性检测, 检测限  $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。除将荧光信号分子标记于 DNA 链, 有些有机分子在水溶液自由态或与单链 DNA 链作用、双链 DNA 发生作用后荧光信号差异较大<sup>[32]</sup>, 如荧光核酸染料 PG 分子与单链 DNA 作用后只有较弱的荧光信号, 而与双链 DNA 发生作用后可以产生显著的荧光信号, 基于此 Zhang 等<sup>[33]</sup>设计了无标记 signal-off 型荧光生物传感器实现了对  $Pb^{2+}$  的检测, 检测限  $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ; 溶液中的锌卟啉分子与单链/双链 DNA 作用较弱后只有较弱的荧光信号, 但是可以与 G-四联体 DNA 结构发生特异性作用, 基于此 Fu 课题组报道了一种基于

Pb<sup>2+</sup>-DNA 酶循环作用信号放大荧光生物传感器, 基于荧光信号的变化实现了对 Pb<sup>2+</sup>的高灵敏定量分析<sup>[34]</sup>, 检测限  $3 \times 10^{-9}$  mol/L。

相对于荧光传感方法, 比色法具有可以直接通过肉眼观察到颜色变化而无需采用仪器检测的优点更有利于实现野外样品的原位、实时检测。研究表明, 金纳米粒子具有较高的消光系数且在不同聚集态时产生不同的颜色变化<sup>[35,36]</sup>, 因此以 DNA-金纳米粒子体系作为比色传感器的信号探针被广泛用于生物分析领域。Liu 等<sup>[37]</sup>设计了第一个 Pb<sup>2+</sup>-DNA 酶-金纳米粒子比色法生物传感器实现了对 Pb<sup>2+</sup>的检测, 检测限  $1 \times 10^{-7}$  mol/L。然而上述比色法检测过程需要 2 h, 因此存在费时的缺点。Liu 等<sup>[38]</sup>对 DNA 酶-金纳米粒子比色法生物传感器进行了改进, 优化了 DNA 酶链长度、金纳米粒子大小等, 将检测时间缩短到 10 min, 最终实现了对 Pb<sup>2+</sup>的快速检测。此外, 基于单、双链 DNA 与金纳米粒子作用强弱的差异, Wei 等<sup>[39]</sup>设计了快速、灵敏、无标记 Pb<sup>2+</sup>-DNA 酶-金纳米粒子比色法生物传感器实现了对 Pb<sup>2+</sup>的检测, 检测限  $5 \times 10^{-7}$  mol/L。为提高比色法传感器监测的灵敏度, Yun 等<sup>[40]</sup>在传感器的设计中引入了分子信标, 基于 Pb<sup>2+</sup>-DNA 酶与分子信标的循环作用实现了信号放大, 实现了 Pb<sup>2+</sup>的高灵敏检测, 检测限  $2 \times 10^{-11}$  mol/L。

荧光及比色法虽然可以实现 Pb<sup>2+</sup>的灵敏检测, 但光信号容易受到检测体系共存物的干扰, 从而影响结果的准确度。电化学方法具有灵敏度高、响应快速、抗干扰性强等优点。采用电化学传感法对 Pb<sup>2+</sup>检测通常需要电化学活性分子标记。如 Plaxco 等<sup>[41]</sup>将亚甲基蓝(methylene blue, MB)分子标记 Pb<sup>2+</sup>-DNA 酶链, 设计并制备了用于检测 Pb<sup>2+</sup>的电化学传感器。当传感器与 Pb<sup>2+</sup>共孵育 60 min 时检测限  $3 \times 10^{-7}$  mol/L。Shen 等<sup>[42]</sup>将纳米金用于传感器的制备, 纳米金表面修饰多条 DNA 分子可以吸附更多的 Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>探针增强电化学信号, 提高了检测的灵敏度, 检测限  $1 \times 10^{-9}$  mol/L。Yang 等<sup>[43]</sup>设计了基于纳米金颗粒信号放大的 Pb<sup>2+</sup>-DNA 酶生物传感器, 实现了对 Pb<sup>2+</sup>的高灵敏检测, 检测限  $2.8 \times 10^{-11}$  mol/L。量子点也可以实现电信号的放大, 因此通过引入以量子点可以实现 Pb<sup>2+</sup>的超高灵敏检测。除此之外, 电化学阻抗检测技术具有高灵敏特点, Shi 等<sup>[44]</sup>设计了超高灵敏的 Pb<sup>2+</sup>适配体传感器, 检测限  $1 \times 10^{-13}$  mol/L。

### 3.1.2 富 G 碱基 DNA 序列

第 2 类适配体是富 G 碱基 DNA 序列。一些富 G 碱基 DNA 序列可与 Pb<sup>2+</sup>发生特异性作用形成 G-四链体结构, Pb<sup>2+</sup>位于 G-四链体结构的两个相邻的 G-四平面之间的空腔处, 并与 2 个 G-四平面的 8 个 C=O 的 O 原子结合形成一个稳定的结构<sup>[45]</sup>。该结构可以与某些大分子结合直接或间接产生紫外吸收、荧光、电化学信号的变化进而发展各式各样的生物传感器。

基于上述原理, Li 等<sup>[46]</sup>采用锌卟啉为荧光信号探针,

当存在 Pb<sup>2+</sup>时, Pb<sup>2+</sup>可以与目标 G 碱基 DNA 发生作用生成 G-四链体结构, 锌卟啉分子与 G-四链体结构 DNA 发生作用产生强荧光信号, 从而实现了对 Pb<sup>2+</sup>的检测。Li 等<sup>[47]</sup>采用结晶紫作为电化学信号探针, 设计了电化学 Pb<sup>2+</sup>生物传感器, 当存在 Pb<sup>2+</sup>时与电极表面生成的 G-四链体结构可以与结晶紫特异性结合, 基于结晶紫的电化学信号实现了对 Pb<sup>2+</sup>的检测, 检测限  $4 \times 10^{-10}$  mol/L。Zhai 等<sup>[48]</sup>利用 G-四链体结构与 Pb<sup>2+</sup>的特异性作用及 Pb<sup>2+</sup>自身还原电信号, 设计了 Pb<sup>2+</sup>电化学适配体传感器, 根据 -0.365 V 处 Pb<sup>2+</sup>的还原峰可对其进行定量检测。

此外, Pb<sup>2+</sup>诱导形成的 G-四链体结构可以与 hemin 分子结合并表现出过氧化物酶的活性, 该酶可以催化双氧水氧化一些底物分子产生较强的荧光/比色信号变化, 基于荧光/颜色变化从而实现了对 Pb<sup>2+</sup>的定量分析。基于此 Li 等<sup>[49]</sup>采用 AUR 荧光底物分子设计了荧光生物传感器实现了对 Pb<sup>2+</sup>的检测, 检测限  $4 \times 10^{-10}$  mol/L。基于相类似的检测原理, Liu 等<sup>[50]</sup>设计了比色法传感器实现了对 Pb<sup>2+</sup>的检测。该方法以邻甲氧基苯酚为信号底物分子(溶液无色, 但其氧化产物具有明显的颜色), 基于紫外-可见吸收信号变化从而实现了对 Pb<sup>2+</sup>的定量分析, 检测限  $1 \times 10^{-9}$  mol/L。Li 等<sup>[51]</sup>采用苯胺为催化底物, 基于其催化氧化产物聚苯胺优良的电化学特性, 设计了电化学生物传感器实现了对 Pb<sup>2+</sup>的检测, 检测限  $5 \times 10^{-10}$  mol/L。采用电化学方法也可以不用电化学底物信号分子, 如 Lin 等<sup>[52]</sup>设计了 haipin DNA 生物传感器, 当 Pb<sup>2+</sup>与 haipin 作用后生成 G-四链体结构, 基于电化学阻抗信号的变化实现了对 Pb<sup>2+</sup>的检测, 检测限  $5 \times 10^{-10}$  mol/L。之后 Lin 等<sup>[53]</sup>对 DNA 序列进行了改进, 设计了可以同时检测 Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> 3 种重金属离子的传感器, Pb<sup>2+</sup>检测限  $1 \times 10^{-11}$  mol/L。

## 3.2 农药核酸适配体生物传感器

采用核酸适配体对有机农药进行检测, 其基本原理是核酸适配体可以与农药分子发生作用并产生响应的构型变化, 从而产生直接或间接的光、电信号变化, 并最终实现目标农药的定量分析。核酸适配体及农药分子本身均不存在荧光及电化学信号, 因此在传感器的设计中需要引入其他信号探针以便实现信号的放大、测定。

Wang 等<sup>[29]</sup>建立了金纳米粒子-适配体比色法生物传感器, 实现了对氧化乐果的检测。其原理是基于不同聚集状态的纳米金的颜色存在差异。分散态的金纳米粒子在 520 nm 处有较强的吸收峰(红色), 加入适配体 DNA 后适配体吸附在金纳米粒子表面, 此时加入高浓度氯化钠, 由于适配体对金纳米粒子体系的稳定作用, 体系颜色未发生变化; 当加入氧化乐果时, 氧化乐果与金纳米粒子表面适配体发生作用并从其表面脱离, 此时加入高浓度氯化钠, 金纳米粒子发生聚集作用, 在 650 nm 处有吸收峰并体系颜

色发生变化(蓝色)。该比色法既可以实现肉眼对氧化乐果的定性分析, 又可以根据吸收峰强度变化实现氧化乐果的定量分析, 检测限达到  $1 \times 10^{-7}$  mol/L。基于类似的原理, Bai 等<sup>[54]</sup>建立了金纳米粒子-适配体比色法生物传感器, 实现了对水胺硫磷、甲胺磷、高灭磷、毒死蜱、敌百虫、伏杀磷等 6 种农药的分析检测。但该方法不足之处是检测灵敏度差、选择性差, 因此筛选更优的适配体提高对目标农药的检测灵敏度及特异性仍需努力。Bala 等<sup>[55]</sup>将巯基修饰的适配体修饰于金纳米粒子表面, 大大提高了比色传感器检测灵敏度。其检测原理是先将巯基修饰的适配体修饰于金纳米粒子制备适配体修饰的金纳米粒子体系。当不存在甲拌磷时加入高浓度氯化钠, 由于适配体对金纳米粒子的稳定作用, 金纳米粒子不会发生聚集作用, 体系没有颜色变化(红色); 当加入甲拌磷时, 甲拌磷与金纳米粒子表面的适配体发生作用, 导致适配体构型发生变化, 当加入高浓度氯化钠后, 由于适配体对金纳米粒子的稳定作用变弱, 金纳米粒子逐渐发生聚集作用, 导致体系颜色发生变化(蓝色)。基于体系颜色变化可以实现对目标农药甲拌磷的快速、高灵敏分析, 检测限  $1 \times 10^{-11}$  mol/L。该传感器成功用于苹果汁中甲拌磷的检测。

基于金纳米粒子的拉曼光谱信号增强作用, Barahona 等<sup>[56]</sup>采用表面增强拉曼检测手段制备了检测马拉硫磷的核酸适配体 DNA 生物传感技术。其原理是制备甲基丙烯酸和乙二醇二甲基丙烯酸酯聚合物颗粒并在其表面修饰金纳米粒子, 然后将巯基修饰的适配体 DNA 固定到金纳米颗粒表面, 最终制备得到聚合物颗粒-金纳米粒子-适配体微颗粒传感检测球。当检测体系中存在目标马拉硫磷时会与微颗粒表面的适配体发生作用, 基于目标农药特征拉曼光谱信号变化从而实现目标农药的定量分析, 检测限  $1 \times 10^{-5}$  mol/L。基于金纳米粒子的催化活性, Weerathunge 等<sup>[57]</sup>制备了比色法适配体 DNA 生物传感器对啉虫脒进行的检测。其检测的原理是, 金纳米粒子具有催化活性, 可以催化双氧水氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, TMB)分子并伴随颜色变化(TMB 氧化产物具有颜色), 单链适配体 DNA 于金纳米粒子与发生作用后吸附在其表面导致其催化活性降低。当存在啉虫脒农药时, 啉虫脒与单链适配体 DNA 发生作用构型发生变化从而脱离金纳米粒子表面, 金纳米粒子活性催化活性恢复, 基于溶液颜色变化从而可以实现对啉虫脒的定量分析, 该方法检测时间短, 10 min 即可实现啉虫脒的检测, 检测限  $4.49 \times 10^{-7}$  mol/L。

Wang 等<sup>[58]</sup>和 Zhang 等<sup>[59]</sup>筛选了针对甲拌磷、丙溴磷、水胺硫磷、氧化乐果的广谱性核酸适配体, 并建立了荧光核酸适配体生物传感检测方法。其检测原理是设计的分子信标(hairpin DNA, 一端标记荧光基团, 另一端标记淬灭基团)及农药分子均可以和适配体发生作用, 分子信标与适

配体发生作用后分子信标打开, 标记的荧光基团会产生荧光信号, 而存在农药分子时会与分子信标发生竞争作用导致荧光信号强度发生变化, 基于此实现目标农药的定量分析。该荧光传感器对 4 种农药具有较高的灵敏度, 检测限分别为  $1.92 \times 10^{-8}$ 、 $1.34 \times 10^{-8}$ 、 $1.72 \times 10^{-8}$ 、 $2.34 \times 10^{-8}$  mol/L。金纳米粒子对荧光分子羧基荧光素(FAM)具有淬灭作用, 基于此 Dou 等<sup>[60]</sup>以金纳米粒子-荧光分子作为信号探针, 实现了对水胺硫磷、丙溴磷、甲胺磷、氧化乐果等 4 种农药的检测。其检测的原理是将与目标农药适配体互补的 DNA 分子设计成 hairpin DNA 结构, 其一端通过 Au-S 键固定于金纳米粒子表面, 另一端修饰荧光分子 FAM, 由于荧光分子与金纳米粒子表面很近, 所以在此状态下其荧光被淬灭。当加入农药适配体 DNA 后部分 hairpin DNA 与适配体 DNA 杂化成双链, 荧光分子 FAM 远离电极表面, 此状态下其荧光性能恢复。当同时加入适配体 DNA 和目标农药时, 部分适配体 DNA 会与目标农药作用, 剩余的适配体 DNA 与金纳米粒子表面的 hairpin DNA 作用从而产生减弱的荧光信号变化, 基于荧光信号的变化实现目标农药分子的检测, 4 种农药的检测限分别为  $3.5 \times 10^{-8}$ 、 $1.34 \times 10^{-7}$ 、 $3.84 \times 10^{-7}$ 、 $2.35 \times 10^{-6}$  mol/L。此外, 该传感器亦成功用于柑橘样品目标农药含量分析, 其结果与液相色谱-质谱联用仪分析结果一致。Tang 等<sup>[61]</sup>首次报道了基于荧光量子点的毛细管电泳-激光诱导荧光分析系统及对目标农药传感检测方法。在该传感器的设计中, 将农药适配体互补链修饰于荧光量子点, 然后与适配体 DNA 链杂化形成双链 DNA 修饰的荧光量子点, 当存在目标农药时农药分子与适配体 DNA 发生作用并从量子点脱落, 并产生单链 DNA 修饰的荧光量子点。根据体系单、双链修饰量子点的荧光信号比从而可以实现对目标农药的定量分析。该传感方法对甲拌磷、丙溴磷、水胺硫磷、氧化乐果 4 种农药的检测限分别为  $2.0 \times 10^{-7}$ 、 $1.0 \times 10^{-7}$ 、 $1.7 \times 10^{-7}$ 、 $2.3 \times 10^{-7}$  mol/L。此外, 该传感器对实际水果样品中目标农药进行了加标含量分析, 回收率达到 90.5%~104.0%。

适体 DNA 虽然对靶分子具有较强的亲和力, 但是对于结构相似的农药分子则特异性较差, 从而难于选择性识别共存体系中目标靶分子, 这是适体传感分析方法难以克服的“瓶颈”问题。因此, 如何结合其它分析手段实现不同目标的选择性识别具有重要的研究意义。Pang 等<sup>[61]</sup>采用表面增强拉曼技术并结合统计分析方法, 建立了有机磷农药的表面增强拉曼适配体传感检测方法。首先将巯基修饰的单链核酸适配体通过 Ag-S 作用固载于银纳米粒子表面, 当目标农药分子被修饰于银纳米粒子表面的适配体捕获后, 基于银纳米粒子对目标农药特征拉曼光谱信号的增强作用实现了对水胺硫磷、氧化乐果、甲拌磷、丙溴磷 4 种农药的定量检测及识别分析, 检测限分别是  $3.4 \times 10^{-6}$ 、 $2.4 \times 10^{-5}$ 、 $4.0 \times 10^{-7}$ 、 $1.4 \times 10^{-5}$  mol/L。

相对于比色及荧光传感法, 电化学方法特别是采用电化学阻抗技术作为信号检测手段时, 不需要引入或修饰任何信号探针, 如基于啉虫脒与适配体的特异性作用, Fan 等<sup>[62]</sup>制备了检测啉虫脒的电化学适配体生物传感器。其检测原理是修饰于电极表面的适配体 DNA 与目标农药发生作用后会导致 DNA 构型发生变化, 电极表面 DNA 更加紧凑, 负电荷密度增强, 电化学阻抗信号增大, 根据阻抗信号的变化实现对啉虫脒的定量分析。该传感器具有较高的灵敏度, 检测限  $1 \times 10^{-9}$  mol/L, 并成功用于番茄中啉虫脒的检测。氯硝柳胺是目前主要的杀螺剂, 大量氯硝柳胺的使用对水体环境特别是水生生物产生了毒性作用。目前尚未有其核酸适配体报道, Liang 等<sup>[63]</sup>在研究中发现, 氯硝柳胺在水体中可以水解成乙醇胺, 而乙醇胺适配体已经筛选获得, 基于此制备了乙醇胺适配体生物传感器, 建立了乙醇胺电化学阻抗检测方法, 间接地实现了对氯硝柳胺的定量检测, 检测限  $8 \times 10^{-11}$  mol/L。

#### 4 总结与展望

经过几十年的发展, 核酸适配体生物传感技术已经愈发成熟, 并建立了比色法、荧光法、电化学法实现了食品污染物的检测。但到目前为止, 现有农药核酸适配体数量仍非常有限, 而且对于结构相似的农药分子选择性较差, 严重限制了农药核酸适配体生物传感器的开发及应用; 此外, 虽然有些农药如马拉硫磷及除草定核酸适配体已经筛选获得<sup>[64,65]</sup>, 但尚未有生物传感检测方法研究。适配体的诸多优点使其具备很大的潜力成为酶、抗体的替代品。虽然核酸适配体传感技术展示了广阔的应用前景, 但改进筛选方法, 提高对目标分子特异性或解决结构相似分子选择性识别仍是科研工作者未来需努力的方向。

#### 参考文献

- [1] Wan Z, Xu Z, Wang J. Flow injection on-line solid phase extraction for ultra-trace lead screening with hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. *Analyst*, 2006, 131(1): 141–147.
- [2] Ma R, Van MW, Adams F. Determination of cadmium, copper and lead in environmental samples. An evaluation of flow injection on-line sorbent extraction for flame atomic absorption spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 1994, 285(1): 33–43.
- [3] Ochsenkühn-Petropoulou M, Ochsenkühn KM. Comparison of inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, anodic stripping voltammetry and instrumental neutron-activation analysis for the determination of heavy metals in airborne particulate matter [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 369(7–8): 629–632.
- [4] Cocherie A, Robert M. Direct measurement of lead isotope ratios in low concentration environmental samples by MC-ICP-MS and multi-ion counting [J]. *Chem Geol*, 2007, 243(1): 90–104.
- [5] Golge O, Hepsag F, Kabak B. Determination of aflatoxins in walnut sujuk and Turkish delight by HPLC-FLD method [J]. *Food Control*, 2016, 59: 731–736.
- [6] Hepsag F, Golge O, Kabak B. Quantitation of aflatoxins in pistachios and groundnuts using HPLC-FLD method [J]. *Food Control*, 2014, 38: 75–81.
- [7] Herzallah SM. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors [J]. *Food Chem*, 2009, 114(3): 1141–1146.
- [8] Liang H, Bilon N, Hay MT. Analytical methods for pesticide residues in the water environment [J]. *Water Environ Res*, 2015, 87(10): 1923–1937.
- [9] Chamkasem N, Ollis LW, Harmon T, *et al.* Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(10): 2315–2329.
- [10] Fernández M, Picó Y, Girotti S, *et al.* Analysis of organophosphorus pesticides in honeybee by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(8): 3540–3547.
- [11] Dai GH, Liu XH, Liang G, *et al.* Distribution of organochlorine pesticides(OCPs)and polychlorinated biphenyls(PCBs)in surface water and sediments from Baiyangdian Lake in North China [J]. *J. Environ Sci*, 2011, 23(10): 1640–1649.
- [12] Du YH, Huang J, Weng XC, *et al.* Specific recognition of DNA by small molecules [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(2): 173–189.
- [13] Guo K, Li X, Kraatz HB. Exploiting the interactions of PNA-DNA films with Ni<sup>2+</sup> ions: Detection of nucleobase mismatches and electrochemical genotyping of the single-nucleotide mismatch in apoe 4 related to alzheimer's disease [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 27: 187–191.
- [14] Hart J, Crew A, Crouch E, *et al.* Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses [J]. *Anal Lett*, 2005, 37(5): 789–830.
- [15] Liang G, Li T, Li XH, *et al.* Electrochemical detection of the amino-substituted naphthalene compounds based on intercalative interaction with hairpin DNA by electrochemical impedance spectroscopy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 48(15): 238–243.
- [16] Tang T, Deng J, Zhang M, *et al.* Quantum dot-DNA aptamer conjugates coupled with capillary electrophoresis: A universal strategy for ratiometric detection of organophosphorus pesticides [J]. *Talanta*, 2016, 146: 55–61.
- [17] Thakur M, Ragavan K. Biosensors in food processing [J]. *J Food Sci Technol*, 2013, 50(4): 625–641.
- [18] Liu X, Zhang X. Aptamer-based technology for food analysis [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175(1): 603–624.
- [19] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers [J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20(12): 2424–2434.
- [20] Bang GS, Cho S, Kim BG. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, 21(6): 863–870.
- [21] He JL, Wu ZS, Zhou H, *et al.* Fluorescence aptameric sensor for strand displacement amplification detection of cocaine [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(4): 1358–1364.
- [22] Ying YL, Wang HY, Sutherland TC, *et al.* Monitoring of an ATP-binding aptamer and its conformational changes using an  $\alpha$ -hemolysin nanopore [J]. *Small*, 2011, 7(1): 87–94.
- [23] Hu K, Liu J, Chen J, *et al.* An amplified graphene oxide-based fluorescence aptasensor based on target-triggered aptamer hairpin switch and strand-displacement polymerization recycling for bioassays [J].

- Biosens Bioelectron, 2012, 42(15): 598–602.
- [24] Liu YR, Hu R, Liu T, *et al.* Label-free dsDNA-Cu NPs-based fluorescent probe for highly sensitive detection of *L*-histidine [J]. *Talanta*, 2013, 107(2): 402.
- [25] Liang G, Man Y, Li A, *et al.* DNAzyme-based biosensor for detection of lead ion: A review [J]. *Microchem J*, 2017, 131: 145–153.
- [26] Liang G, Liu XH G-quadruplex based impedimetric 2-hydroxyfluorene biosensor using hemin as a peroxidase enzyme mimic [J]. *Microchim Acta*, 2015, 182(13): 2233–2240.
- [27] Mehta J, Rouah-Martin E, Van DB, *et al.* Selection and characterization of PCB-binding DNA aptamers [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(3): 1669–1676.
- [28] Niazi JH, Lee SJ, Gu MB Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(15): 7245–7253.
- [29] Wang P, Wan Y, Ali A, *et al.* Aptamer-wrapped gold nanoparticles for the colorimetric detection of omethoate [J]. *Sci China Chem*, 2015, 59(2): 237–242.
- [30] Wu J, Zhu Y, Xue F, *et al.* Recent trends in SELEX technique and its application to food safety monitoring [J]. *Microchim Acta*, 2014, 181(5): 479–491.
- [31] Li J, Lu Y A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(42): 10466–10467.
- [32] Long M, Deng H, Tian G, *et al.* A novel detection of radon based on its decay product inducing conformational changes of an aptamer probe [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 936(14): 202–207.
- [33] Zhang L, Han B, Li T, *et al.* Label-free DNAzyme-based fluorescing molecular switch for sensitive and selective detection of lead ions [J]. *Chem Commun*, 2011, 47(11): 3099–3101.
- [34] Fu T, Ren S, Gong L, *et al.* A label-free DNAzyme fluorescence biosensor for amplified detection of Pb<sup>2+</sup>-based on cleavage-induced G-quadruplex formation [J]. *Talanta*, 2016, 147: 302–306.
- [35] Niemeyer CM. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40(22): 4128–4158.
- [36] Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology [J]. *Chem Rev*, 2004, 104(1): 293–346.
- [37] Liu J, Lu Y A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(22): 6642–6643.
- [38] Liu J, Lu Y Accelerated color change of gold nanoparticles assembled by DNAzymes for simple and fast colorimetric Pb<sup>2+</sup> detection [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(39): 12298–12305.
- [39] Wei H, Li B, Li J, *et al.* DNAzyme-based colorimetric sensing of lead (Pb<sup>2+</sup>) using unmodified gold nanoparticle probes [J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(9): 95501.
- [40] Yun W, Cai D, Jiang J, *et al.* Enzyme-free and label-free ultra-sensitive colorimetric detection of Pb<sup>2+</sup> using molecular beacon and DNAzyme based amplification strategy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 187–193.
- [41] Xiao Y, Rowe AA, Plaxco KW Electrochemical detection of parts-per-billion lead via an electrode-bound DNAzyme assembly [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(2): 262–263.
- [42] Shen L, Chen Z, Li Y, *et al.* Electrochemical DNAzyme sensor for lead based on amplification of DNA-Au Bio-Bar codes [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(16): 6323–6328.
- [43] Yang XR, Xu J, Tang XM, *et al.* A novel electrochemical DNAzyme sensor for the amplified detection of Pb<sup>2+</sup> ions [J]. *Chem Commun*, 2010, 46: 3107–3109.
- [44] Shi L, Liang G, Li XH, *et al.* Impedimetric DNA sensor for detection of Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> [J]. *Anal Methods*, 2012, 4(4): 1036–1040.
- [45] 孔德明 G-四链体-氯化血红素 DNA 酶在传感器设计中的应用[J]. *化学进展*, 2011, 23(10): 2119–2131.
- Kong DM. Application of G-Quadruplex-Hemin DNAzymes in sensor design [J]. *Prog Chem*, 2011, 23(10): 2119–2131.
- [46] Li T, Dong SJ, Wang EK. A lead(II)-driven DNA molecular device for turn-on fluorescence detection of lead(II) ion with high selectivity and sensitivity [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(38): 13156–13157.
- [47] Li F, Feng Y, Zhao C, *et al.* Crystal violet as a G-quadruplex-selective probe for sensitive amperometric sensing of lead [J]. *Chem Commun*, 2011, 47(43): 11909–11911.
- [48] Zhai W, Li X, Du C A series of logic gates based on electrochemical reduction of Pb<sup>2+</sup> in self-assembled G-quadruplex on the gold electrode [J]. *Chem Commun*, 2013, 50: 2093–2095.
- [49] Zhao XH, Gong L, Wu Y, *et al.* Cationic-perylene-G-quadruplex complex based fluorescent biosensor for label-free detection of Pb<sup>2+</sup> [J]. *Talanta*, 2016, 149: 98–102.
- [50] Liu T, Nie G, Zhang X, *et al.* Development of a detection kit based on G-quadruplex DNAzyme for detection of lead (II) ion in food samples [J]. *Food Anal Methods*, 2015, 8(5): 1133–1140.
- [51] Li F., Yang L, Chen M, *et al.* A novel and versatile sensing platform based on HRP-mimicking DNAzyme-catalyzed template-guided deposition of polyaniline[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 41: 903–906.
- [52] Lin Z, Chen Y, Li X, *et al.* Pb<sup>2+</sup> induced DNA conformational switch from hairpin to G-quadruplex: electrochemical detection of Pb<sup>2+</sup> [J]. *Analyst*, 2011, 136(11): 2367–2372.
- [53] Lin ZZ, Li XH, Kraatz HB, Impedimetric immobilized-DNA based sensor for simultaneous detection of Pb<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> and Hg<sup>2+</sup> [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(17): 6896–6901.
- [54] Bai W, Zhu C, Liu J, *et al.* AuNP-based colorimetric aptasensor for rapid detection of six organophosphorus pesticides [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2015, 34(10): 2244–2249.
- [55] Bala R, Sharma RK, Wangoo N. Development of gold nanoparticles-based aptasensor for the colorimetric detection of organophosphorus pesticide phorate [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 408(1): 333–338.
- [56] Barahona F, Bardliving CL, Phifer A, *et al.* An aptasensor based on polymer-gold nanoparticle composite microspheres for the detection of malathion using surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Ind Biotechnol*, 2013, 9(1): 42–50.
- [57] Weerathunge P, Ramanathan R, Shukla R, *et al.* Aptamer-controlled reversible inhibition of gold nanozyme activity for pesticide sensing [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(24): 11937–11941.
- [58] Wang L, Liu X, Zhang Q, *et al.* Selection of DNA aptamers that bind to four organophosphorus pesticides [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(5): 869–874.
- [59] Zhang C, Wang L, Tu Z, *et al.* Organophosphorus pesticides detection using broad-specific single-stranded DNA based fluorescence polarization

- aptamer assay [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 55: 216–219.
- [60] Dou X, Chu X, Kong W, *et al.* A gold-based nanobeacon probe for fluorescence sensing of organophosphorus pesticides [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 891: 291–297.
- [61] Pang S, Labuza TP, He L. Development of a single aptamer-based surface enhanced Raman scattering method for rapid detection of multiple pesticides [J]. *Analyst*, 2014, 139(8): 1895–1901.
- [62] Fan L, Zhao G, Shi H, *et al.* A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 43: 12–18.
- [63] Liang G, Man Y, Jin X, *et al.* Aptamer-based biosensor for label-free detection of ethanolamine by electrochemical impedance spectroscopy [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 936: 222–228.
- [64] Williams RM, Maher E, Sooter LJ. *In vitro* selection of a single-stranded DNA molecular recognition element for the pesticide malathion [J]. *Comb Chem High T Scr*, 2014, 17(8): 694–702.
- [65] Williams RM, Kulick AR, Yedlapalli S, *et al.* *In vitro* selection of a

single-stranded DNA molecular recognition element specific for bromacil [J]. *J Nucl Acids*, 2014, 2014: 1–8.

(责任编辑: 姜 珊)

## 作者简介



梁 刚, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为 POPs、农药、重金属等污染物电化学、光学生物传感分析。

E-mail: lghbsd2006@163.com



潘立刚, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: panlg@nrcita.org.cn