

# 农药核酸适配体筛选及应用的研究进展

孔倩倩<sup>1,2,3</sup>, 岳凤玲<sup>1,2,3</sup>, 刘梦悦<sup>1,2,3</sup>, 郭业民<sup>1,2,3</sup>, 孙霞<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 山东省蔬菜质量安全溯源工程技术研究中心, 淄博 255049; 2. 淄博市农产品安全追溯重点实验室, 淄博 255049; 3. 山东理工大学农业工程与食品科学学院, 淄博 255049)

**摘要:** 核酸适配体是通过指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术在体外筛选到的单链寡核苷酸, 与靶标具有高亲和力和特异性, 且稳定性好, 易于合成和修饰, 被认为是生物传感器的理想识别元件之一, 在农药残留快速检测应用中表现出极大的潜力。近年来, SELEX技术在农药适配体筛选方面不断发展, 目前已筛选获得多种农药适配体, 并且通过诸多方法研究所筛选的适配体与农药分子的结合机理, 为适配体在农药残留快速检测的进一步应用提供参考依据。本文概括和总结了以农药为靶标的适配体筛选方法、农药分子与适配体的结合机理, 并简要总结了以适配体为识别元件的生物传感器在农药残留快速检测中的应用。

**关键词:** 农药; 核酸适配体; 筛选; 结合机理; 检测

## Recent advances in screening and application of aptamers in pesticides

KONG Qian-Qian<sup>1,2,3</sup>, YUE Feng-Ling<sup>1,2,3</sup>, LIU Meng-Yue<sup>1,2,3</sup>, GUO Ye-Min<sup>1,2,3</sup>, SUN Xia<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Shandong Provincial Engineering Research Center of Vegetable Safety and Quality Traceability, Zibo 255049, China; 2. Zibo City Key Laboratory of Agricultural Product Safety Traceability, Zibo 255049, China; 3. School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

**ABSTRACT:** Aptamers are single stranded oligonucleotides screened *in vitro* by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), which can bind to targets with high affinity and specificity, have good stability, and easy synthesis and modification. Aptamers are considered as one of the ideal recognition elements of biosensors, and show great potential in the rapid detection of pesticide residues. In recent years, SELEX technology has been developing continuously in pesticide aptamers screening, and has been screened to obtain a variety of pesticide aptamers. Moreover, the binding mechanism of aptamers and pesticides has been studied by many methods, which providing reference for the further application of aptamers in rapid detection of pesticides residues. This paper mainly introduced the screening method of pesticide target, the binding mechanism of pesticide molecules with aptamers, and briefly summarizes the application of biosensor based on aptamer in the rapid detection of pesticide residues.

**KEY WORDS:** pesticides; aptamer; selection; bonding mechanism; detection

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31872909, 31772068)

Fund: Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31872909, 31772068)

\*通信作者: 孙霞, 博士, 教授, 主要研究方向为农业信息及农产品安全检测技术。E-mail: sunxia2151@sina.com

\*Corresponding author: SUN Xia, Ph.D, Professor, Shandong Provincial Engineering Research Center of Vegetable Safety and Quality Traceability, No.266, Xincun West Road, Zibo 255049, China. E-mail: sunxia2151@sina.com

## 0 引言

农药旨在控制和预防危害农林牧业生产的有害生物, 从而提高作物产量、质量以及农作物存储的时长。然而, 由于农药的过度及不规范使用, 农药残留已成为农产品及环境中普遍存在的问题, 给人类健康及其他生物带来了极大的危害, 及时准确地检测出农药残留是否超标对食品质量安全至关重要。目前农药残留的检测主要是仪器分析法, 该法有较高的灵敏度和可靠性, 但样品前处理复杂、设备昂贵, 不能满足日益增加的快速检测需求<sup>[1-3]</sup>。常用的快速检测方法如酶抑制法, 具有简单、快速等特性, 但检测的专一性较差、准确度不高<sup>[4]</sup>。酶联免疫分析法检测速度快、专一性强, 但抗体制备繁琐、周期长, 且有些农药分子不能诱导免疫反应, 制约了其在农药残留快速检测中的应用<sup>[5-6]</sup>。

适配体是通过指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术在体外筛选到的单链寡核苷酸(RNA 或 ssDNA)<sup>[7-8]</sup>, 在靶标的存在下, 可发生自适应构象变化折叠成特定的三维结构, 如凸环、发夹、假结、G-四联体等, 并通过形状互补、范德华力、氢键、疏水、静电、碱基堆积等相互作用力与靶标特异性结合, 因此, 具有高亲和力和特异性。另外, 与抗体相比, 适配体具有靶标范围广稳定性好, 易于合成和修饰等优势, 被认为是作为生物传感器的理想识别元件, 在农药残留快速检测中表现出极大潜力。通过使用新技术、新材料不断发展的 SELEX 技术已筛选多种新型适配体, 不但亲和力和特异性明显增加, 而且所用时间已从数月缩短至数周甚至数小时, 极大的提高了适配体的性能及筛选效率。此外, 许多方法如测量结合过程中的动力学或热力学参数, 监测适配体的构象变化, 对接模拟适配体与靶标的结合位点等已用于阐明适配体与农药的作用机制及识别机制, 为基于适配体的农药残留快速检测技术的发展提供了依据。近年来, 以适配体为识别元件的生物传感器迅速发展, 并且已经建立了各种传感策略的适配体传感器, 如基于适配体的电化学传感器、荧光传感器及比色传感器等用于用于农药残留快速检测。以此为基础, 本文归纳总结了农药这一类靶标适配体的筛选方法及获得的适配体序列, 并介绍了适配体与农药分子的结合机制, 最后简要介绍了适配体传感器在农药残留快速检测中的应用。

## 1 农药适配体的体外筛选

适配体体外筛选一般过程包括: (1)构建文库。体外设计单链寡核苷酸文库。(2)孵育结合。在一定离子浓度和 pH 值的缓冲液体系中将靶标与文库共同孵育, 结合形成靶标-适配体复合物。(3)分离洗脱。通过磁珠、离心、毛细管

电泳等分离方法<sup>[9-14]</sup>将未与靶标结合及结合能力弱的序列分离除去, 再通过加热或者调节 pH 值, 将与靶标结合的序列洗脱。(4)扩增。通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)或逆转录聚合酶链式反应将洗脱所获得的序列扩增富集。(5)制备单链。通过热变性<sup>[15]</sup>、不对称 PCR<sup>[16-17]</sup>、核酸外切酶消化<sup>[18]</sup>等方法<sup>[19-20]</sup>将双链核苷酸解离为单链, 并用作下一轮筛选的初始文库。重复循环此过程, 经过数轮或十几轮的筛选, 与靶标亲和力高的序列呈指数增加。(6)克隆测序。当序列富集到一定程度时克隆测序, 以获得适配体序列。SELEX 基本流程图如图 1 所示。

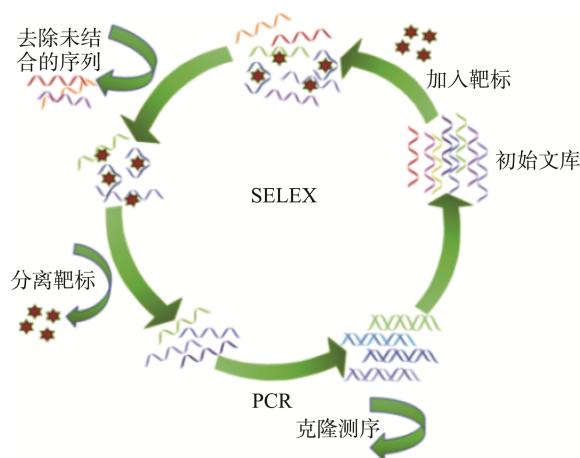


图 1 SELEX 流程图

Fig.1 General scheme of the SELEX procedure

传统的 SELEX 技术是一种成熟而有效的筛选方法, 但由于其费力费时, 不断更新适配体的筛选方法已成为必然。近年来, 科研工作者将一些新理念、新技术及材料与传统的 SELEX 技术结合, 开发出了多种新型 SELEX 技术, 如: 微孔板-SELEX、磁珠-SELEX、Capture-SELEX、氧化石墨烯-SELEX、毛细管电泳-SELEX 及计算机辅助-SELEX 等, 根据农药适配体所用的筛选方法中是否涉及固定及固定对象, 将其分为 4 大类, 并总结了针对不同筛选方法所获得的农药适配体及解离常数, 如表 1 所示。

### 1.1 固定靶标

#### 1.1.1 微孔板-SELEX

微孔板固定靶标是将农药小分子与牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)等大分子蛋白偶联, 通过蛋白载体将小分子靶标固定于微孔板。张玉荣等<sup>[21]</sup>在氟乙酰胺分子中引入一个活性基团用于与 BSA 偶联, 将其固定于微孔板, 经 10 轮筛选, 获得 2 条能识别氟乙酰胺的 ssDNA 适配体, 其  $K_d$  分别为 1、1.2  $\mu\text{mol/L}$ 。EISSA 等<sup>[22]</sup>利用此方法筛选多菌灵适配体时, 为了防止 BSA 非特异性吸附 ssDNA 序列, 采用游离的多菌灵特异性洗脱。经过 10 轮筛选, 最终获得  $K_d$  为 65 nmol/L 的高亲和力和特异性 ssDNA

表1 农药适配体筛选方法、序列及解离常数  
Table 1 Aptamer screening method, sequence and dissociation constant( $K_d$ ) of pesticide

筛选方法	靶标	序列名	序列(5'-3')	解离常数测定方法	$K_d$	参考文献
微孔板-SELEX	氟乙酰胺	1-1.SEQ	ACCTGCAGGGCGGAGTTTCAGATCAAAACTTGTCTGGCGT	表面等离子体共振法	1 $\mu\text{mol/L}$	[21]
	氟乙酰胺	6-1.SEQ	GGCGTGTGCCCTGCGGATGAAGACTGGTCT	表面等离子体共振法	1.2 $\mu\text{mol/L}$	[21]
	多菌灵	CZ13	GGGCACAAACAACCGATGGTCCAGCCACCCGAAATGACCAG CCCACCCGCCACCCCGCG	荧光法	65 nmol/L	[22]
	除草定	R13.2	TGTACCGTCTGAGCGATTTCGTAATCGTGGCACCAATCGTACC CAATACTTGGGAATCAGCCAGTCAGTGTAAAGGAGTGC	荧光法	(9.6 $\pm$ 7.8) nmol/L	[23]
	阿特拉津	R12.23	TGTACCGTCTGAGCGATTTCGTAACGAACGGCTTTGTACTGHTT GCACTGGCGGATTAAGCCAGTCAGTGTAAAGGAGTGC	荧光法	(0.62 $\pm$ 0.21) nmol/L	[24]
磁珠-SELEX	氟虫腴	R12.51	TGTACCGTCTGAGCGATTTCGTAACGATCTCTGGAGGACTGGG CGGGGTGACGGTTATGAGCCAGTCAGTGTAAAGGAGTGC	荧光法	(48 $\pm$ 8) nmol/L	[25]
	倍硫磷、对硫磷、 杀螟松、丰索磷、 辛硫磷、甲基对硫磷	PES11	ATACCAGCTTATCAATTGTGACGGGGGAGGGGATGGTGG CTCGGGTGGTGGTGGCTGTAGATAGTAAGTGAATCT	荧光法	(276 $\pm$ 13.4) nmol/L	[26]
亲和层析柱-SELEX	草甘膦	A08	GCTAGACGATATTCGTCATCCGAGGCCGTTGGCGGCTTTA GGACTGTGGGGCTTCGGGGCGCTGCAGACTGAATATGTC	酶联寡核苷酸测定法	(38.38 $\pm$ 9.094) nmol/L	[27]
	马拉硫磷	R12.20	ATCCGTCACACCTGCTTTATACACAATTTGTTTTCTCTTAAC TTCTTGACTGCTGGTGTGGCTCCCGTAA	荧光法	(2.43 $\pm$ 0.68) nmol/L	[28]
	啶虫脒	S18	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTTGTAATTTGTCTGCAGCGGT CTTGATCGCTGACACCATATTATGAAAGATAAGCTTGGCACC CGCATCGT	超滤法	4.98 $\mu\text{mol/L}$	[29]
Capture-SELEX	毒死蜱	N23	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTAGGTTACGCCCTGCAGCGGT TCTTGATCGCGCTGCTGGTAATCCTTCTTTAAGCTTGGCACC CGCATCGT	—	—	[30]
	甲拌磷、丙溴磷、 水胺硫磷、氧化乐果	SS2-55	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTAAGCTTGTCTTATAGCCTGCA GCGATTCTTGATCGGAAAAGGCTGAGACTACGCTAAGCTT GCACCCGCATCGT	荧光结合超滤法	0.83-2.5 $\mu\text{mol/L}$	[31]
	甲拌磷、丙溴磷、 水胺硫磷、氧化乐果	SS2-54	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTAAGCTTTTGTACTGACTGCA GCGATTCTTGATCGCGACGCTTGGAAAAGAGTAAAGCTTG CACCCCGCATCGT	荧光结合超滤法	0.90-2.0 $\mu\text{mol/L}$	[31]
	阿特拉津	R12.45 Trunc	ACCGTCTGAGCGATTTCGTAATTTATTCGGGAAAGGGTATCAG CGGG	等温量热滴定法	3.7 nmol/L	[32]
	百草枯	PQ-15	ACCGACCGTGTGGACTCTCGGCCAGGCCGAGTCCGAACT GGGTGGGAGTATGAGCGAGCGTGGC	荧光法	(54 $\pm$ 4) nmol/L	[33]

表 1(续)

筛选方法	靶标	序列名	序列(5' → 3')	解离常数测定方法	K <sub>d</sub>	参考文献
	戊唑醇	T1	CGTACGGAAATTCGCTAGCAGCGTCCACGAGTGTGGTGTGGA TCCGAGCTCCACGTG	等温量热滴定法	1 nmol/L	[34]
	抗倒胺、苯噻草胺	T1	CGTACGGAAATTCGCTAGCAGCGTCCACGAGTGTGGTGTGGA TCCGAGCTCCACGTG	等温量热滴定法	10~100 nmol/L	[34]
GO-SELEX	异稻瘟净	EIA2	CGTACGGAAATTCGCTAGCTAAGGGATTCTGTAGAAGGAGC AGTCTGGATCCGAGCTCCACGTG	等温量热滴定法	1.67 μmol/L	[35]
	克瘟散	EIA2	CGTACGGAAATTCGCTAGCTAAGGGATTCTGTAGAAGGAGC AGTCTGGATCCGAGCTCCACGTG	等温量热滴定法	38 nmol/L	[35]
	吡虫啉	Apta-1	AGGAAATTCAGATCTCCCTGCAGTCTGCTACGGTTTTGGTT GTTGTTTGGTGGTGTACTCGAGGAGCTCAGGATCCCCG	—	—	[36]
CE-SELEX	阿特拉津	At-Apt-25	CTACGGTAGCTTGTATGCCCATCTGACCCTCTGTGCTGCTA	亲和毛细管电泳法	890 nmol/L	[37]
	甲拌磷、丙溴磷、水 胺硫磷、氧化乐果	SS24-S-35	AGCTTGTGCAGCGGATCTTTGATCGCCACAGAGCT	—	—	[38]
	对氧磷	T17C-C18T	AGCTTGTGCAGCGGATCTTTGATCGCCACA GAGC	—	1 μmol/L	[39]
计算机辅助-SELEX	对氧磷	T17C	AGCTTGTGCAGCGGATCTTTGATCGCCACA GAGCT	—	1 μmol/L	[39]
	二嗪农	DF20	ATCCGTCACACCTGCTCTAATATAGAGGTAATTGCTCTTGGAC AAGGTACAGGGATGGTGTGTCGCTCCCGTAT	—	—	[40]

适配体。另外, HONG 等<sup>[25]</sup>在筛选氟虫腈时, 在反筛选中用 BSA 作为反筛选靶标, 以除去与 BSA 结合的序列, 但在实际检测中发现, 筛选获得的适配体仍能与 BSA 结合。分析原因: 可能是由于蛋白质的大球形特性对 ssDNA 的吸附作用较强, 且反筛选是在筛选的第 6 轮进行的, 此时与 BSA 结合的序列已经得到了富集, 仅经过一轮反筛选并不能完全除去与 BSA 结合的核苷酸。

采用微孔板为固体基质固定靶标的 SELEX 技术, 对筛选设备的要求低、操作简单、样品用量少。但筛选效率较低, 且在筛选过程中需利用载体蛋白等大分子固定靶标, 由于蛋白质的大球形特性, 加之载体蛋白的分子量比农药分子的大得多, 因此, 载体蛋白对 ssDNA 的吸附能力较强, 这就可能导致在洗脱时产生与载体蛋白具有亲和力的非特异性序列。

### 1.1.2 磁珠-SELEX

磁珠是近年来广泛使用的固相载体, 通过化学偶联反应将靶标连接到磁珠表面<sup>[41]</sup>。WILLIAMS 等<sup>[23]</sup>采用生物素-链霉素和素相互作用, 将生物素化的除草定固定在链霉素和素修饰的磁珠上进行筛选。在筛选的过程中为增加筛选压力, 减少了孵育时间, 并用结构类似物为反筛选靶标进行反筛选, 获得了高亲和力和特异性的除草定 ssDNA 适配体。HONG 等<sup>[25]</sup>将氟虫腈固定在羧基化的磁珠进行正、反筛选, 并引入游离的氟虫腈用于特异性洗脱, 在反筛选中也是用来游离的反筛选物质进行特异性洗脱。经过 12 轮筛选, 获得了平均解离常数为(48±8) nmol/L 的氟虫腈 ssDNA 适配体。此外, 李吉<sup>[26]</sup>通过磁珠固定有机磷农药的共性结构 OP3, 筛选出了能识别倍硫磷、对硫磷、甲基对硫磷等 7 种有机磷农药的广谱适配体。

磁珠-SELEX 可利用磁分离方便快捷的获得与靶标结合的序列, 且磁珠表面修饰形式种类较多, 如羧基、氨基、链霉素和素等修饰磁珠, 利用靶标分子结构选择合适的磁珠修饰方法, 能有效实现靶标的固定。但农药分子可用于偶联的功能基团较少, 且偶联过程比较繁琐。

固定靶标可能会改变靶标的结构状态, 产生新的识别位点, 而在实际应用中, 靶标处于一种自由状态, 这就有可能导致所筛选的适配体在实际应用中与靶标的亲和力不高<sup>[42]</sup>。虽然 EISSA<sup>[22]</sup>及 HONG 等<sup>[25]</sup>在筛选的过程中加入游离的靶标进行特异性洗脱, 但这种烦琐的筛选步骤可能会导致 ssDNA 序列丢失, 减少文库的多样性。在另一项研究中, LIM<sup>[43]</sup>开发了一种不需要化学偶联反应就可以将靶标固定的方法, 即利用溶胶-凝胶水解和缩合反应所形成的纳米级的空洞和微米级的通道固定靶标, ssDNA 通过表面纳米孔进入腔体与二噁农结合, 通过热洗脱即可从溶胶-凝胶基质中提取与二噁农结合的适配体。

## 1.2 固定文库

NUTIU<sup>[44]</sup>开发了一种适用于小分子的 SELEX 方法,

不需要固定靶标, 而是设计一个短链核苷酸作为桥接序列, 利用碱基互补配对原则, 将寡核苷酸文库固定桥接序列所在的固相载体上, 当靶标特异性识别核苷酸序列时, 诱导其构象发生变化, 进而从固相载体上脱离下来。此方法有效的解决了固定靶标所产生的不利影响, 后将此方法改名为 Capture-SELEX, 并将其逐渐运用到农药小分子的适配体筛选中<sup>[45-46]</sup>。贺江<sup>[29]</sup>通过桥接序列将 ssDNA 文库固定在琼脂糖凝胶上, 首次进行农药适配体筛选, 经过 18 轮重复筛选, 获得了  $K_d$  为 4.98  $\mu\text{mol/L}$  的啉虫脒适配体。王丽等<sup>[31]</sup>利用 Capture-SELEX 获得了可识别甲拌磷、丙溴磷、水胺硫磷和氧化乐果 4 种有机磷农药的广谱 ssDNA 适配体。最初基于固定文库的 Capture-SELEX 随机序列仅 30~50 个碱基, 且桥接序列位于随机序列之间, 此设计有利于适配体构象变化, 诱导寡核苷酸序列从固相载体上脱离。但在寡核苷酸文库中较长的随机序列可以组成更复杂的结构, 可更高特异性的结合靶标<sup>[45]</sup>。为此, 冉旭东等<sup>[33]</sup>利用位于固定引物区的 12 个碱基作为桥接序列, 将 ssDNA 文库固定在磁珠上。仅需 9 轮就获得了对百草枯具有高亲和力的序列, 其  $K_d$  为(54±4) nmol/L。

固定文库有效的解决了固定靶标所产生的影响。但文库的固定会影响寡核苷酸序列的多样性, 且固定效率不稳定, 这就有可能会对初始文库中对靶标具有高亲和力和特异性的序列丢失。此外, 通过碱基互补配对形成的氢键相互作用力较弱, 易被非特异性洗脱, 且桥接序列也可能会再次与已洗脱序列重新结合, 降低筛选效率<sup>[47]</sup>。再者, 也有一些靶标与寡核苷酸序列结合不能产生构象变化, 序列不能从固相载体上脱离, 因此就不适用于此方法<sup>[48]</sup>。

## 1.3 非固定方法

### 1.3.1 GO-SELEX

氧化石墨烯(graphene oxide, GO)可通过  $\pi-\pi$  堆叠相互作用吸附游离的 ssDNA 或 RNA, 但对于适配体-靶标复合物这种结构发生变化了的寡核苷酸不吸附。利用这一原理 GU 等<sup>[34]</sup>开发了一种简单、快速、高通量的适配体筛选方法。采用氧化石墨烯辅助的多重 GO-SELEX, 进行了 1 组农药(戊唑醇、抗倒胺及苯噻草胺)适配体筛选, 仅经过 5 轮就成功筛选到了 10 条对 3 种农药均具亲和力的 ssDNA 序列, 其中序列 T1 对戊唑醇的  $K_d$  可达 1 nmol/L, 对另外 2 种农药的  $K_d$  也在 10~100 nmol/L 范围内。此后该团队<sup>[35]</sup>运用改良的 GO-SELEX 也筛选出能识别 2 种农药异稻瘟净和克瘟散广谱适配体。

GO-SELEX 是一种无需将靶标或文库固定的筛选方法, 有效保证了靶标或寡核苷酸的天然构象, 减少了空间阻抗性, 也减少了固定靶标或文库所用的固体基质的非特异性吸附。另外, 通过离心, 即可快速实现与靶标结合的序列和未结合的序列分离, 简化了筛选步骤, 提高筛选效

率。同时,寡核苷酸序列可与多种靶标在自由溶液中结合,是获得广谱适配体的一种有效方法。但通过  $\pi$ - $\pi$  堆叠相互作用吸附在 GO 表面的寡核苷酸序列可能存在自解吸附,导致非特异性序列增加。此外,能被 GO 吸附的靶标分子则不能利用此方法获得适配体序列。

### 1.3.2 CE-SELEX

毛细管电泳 (capillary electrophoresis-SELEX, CE-SELEX) 是根据迁移率差异将结合的寡核苷酸序列与未结合的寡核苷酸序列在自由溶液中分离开<sup>[49-50]</sup>。毛细管电泳具有高效分离、高选择性等特点,一般仅需要 2~4 轮就可获得较高的文库富集率,极大的提高了筛选效率。但不适用不能引起高电泳迁移率的靶标分子,因此,CE-SELEX 常用于大分子靶标适配体的筛选,且依赖昂贵的毛细管电泳仪,筛选成本较高。PABIO<sup>[37]</sup>首次将 CE-SELEX 运用于农药小分子适配体筛选,在较短时间内获得了与阿特拉津结合的 ssDNA 适配体,其  $K_d$  为 890 nmol/L,表现出对阿特拉津具有较高亲和力。该实验的成功表明,对于较小的分子(214 g/mol)CE-SELEX 是可能的,大大降低了使用该技术的分子尺寸。

### 1.4 计算机辅助-SELEX

计算机辅助筛选是一种利用计算机技术发展的适配体筛选新方法,目前,已开发多种程序<sup>[51-53]</sup>用于预测寡核苷酸的二级、三级结构,计算适配体与靶标结合过程中的动力、热力学参数以及模拟适配体-靶标相互作用,以辅助 SELEX 筛选。JOKAR<sup>[40]</sup>利用分子对接及分子动力学 (molecular dynamics, MD), 从 12 条适配体序列中选取了对二嗪农亲和力最高的序列 DF20。此外, BELINSKAIA<sup>[39]</sup>以对氧磷为例,通过计算机技术开发了一种适合有机磷农药适配体的设计方法。从已发表的有机磷农药适配体序列 SS24-S-35<sup>[31,38]</sup>出发,建立了其三维模型。通过分子对接及(MD)模拟对氧磷与 SS24-S-35 可能的结合位点。然后对结合位点的核苷酸进行突变,并用 MD 轨迹和 MM-PBSA 方法计算自由结合能。在能量值的基础上,选择了 2 条与对氧磷亲和力高的序列 T17C-C18T 和 T17C, 其  $K_d$  值约为 1  $\mu$ mol/L。

## 2 适配体与农药分子的结合机理

大多数适配体在靶标的存在下可发生自适应的构象变化,形成凸环、发夹、假结、G-四联体等三维结构,并通过形状互补、范德华力、氢键、疏水、静电、碱基堆积等相互作用力或不同力的组合与靶标特异性结合<sup>[54-56]</sup>。因此,适配体与靶标分子之间的高特异的亲和力是基于核苷酸结构和空间构象的多样性。为此,针对 SELEX 筛选出的农药适配体,进一步深入分析适配体-靶标的结合机理,对适配体的合理设计及实际应用具有重大指导意义。目前,

关于适配体与农药分子的结合分析主要包括:分析适配体的一级、二级序列结构;剪切、拼接探究活性位点;光谱分析适配体的构象变化判断结合模式;测量结合过程的动力学或热力学参数变化探究结合位点及结合参数;利用模拟仿真软件建立适配体-靶标识别模型<sup>[57]</sup>。

贺江<sup>[29]</sup>对筛选出 4 条啉虫脒适配体,利用 Mfold 软件预测二级结构,其中,亲和力最高的序列 S18 的二级结构存在 4 个茎环,如图 2-A 所示,其中环 1、2、4 是由固定序列形成的,因此,推测富含 A、T 的环 3 是 S18 与啉虫脒结合的主要区域。此后,赵国华等<sup>[58]</sup>采用结合区域的 20mer(5'-CTGACACCATATTATGAAGA-3')作为啉虫脒的识别元件(acetamiprid binding aptamer, ABA),利用 ABA 与啉虫脒结合前后的圆二色光谱及紫外吸收光谱数据,发现啉虫脒诱导 ABA 的构象发生变化,形成了稳定的发夹结构与啉虫脒结合。为此,20 mer 序列可替代 S18 序列与啉虫脒相互作用。在另一项研究中,JOKAR<sup>[59]</sup>使用序列 S18 主要结合区域具有 2 个茎环结构的 49mer(5'-TGTAATTTGTCTGCAGCGTTCTTGATCGCTGACACCATATTATGAAGA-3')作为啉虫脒的识别序列<sup>[60]</sup>,通过分子模拟软件对接模拟,确定了与啉虫脒相互作用的碱基为 A38、T39、A43,如图 2-B 所示。此外,结合过程中的动力学及热力学数据表明,此序列比 ABA 更稳定,与啉虫脒的相互作用更强。综上,通过 SELEX 技术筛选获得的适配体序列中,并非所有碱基都参与到适配体-靶标的结合过程中。啉虫脒存在时,可诱导适配体的构象发生变化,形成发夹结构,并通过氢键分子间相互作用力形成稳定的适配体-靶标复合物。

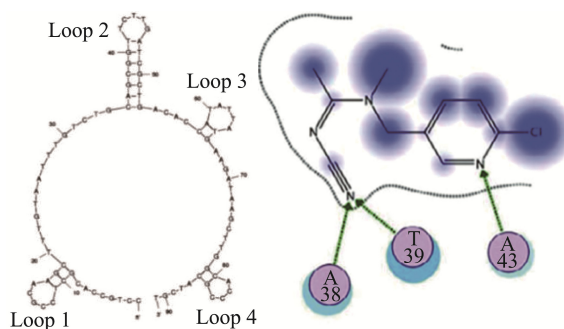


图 2 适配体 S18 二级结构<sup>[32]</sup>(A)及啉虫脒与适配体的相互作用<sup>[59]</sup>(B)

Fig.2 Predicted secondary structures of aptamers S18<sup>[32]</sup> (A) Acetamiprid-aptamer interaction<sup>[59]</sup> (B)

此外,王丽<sup>[61]</sup>对亲和力和特异性较高的 2 个序列 SS2-55、SS4-54<sup>[31]</sup>按照茎环结构进行剪切,如图 3 所示,探究其活性位点,得出:环 Loop2-4 是序列 SS2-55 的重要活性位点,而环 Loop4-1、4-2 是序列 SS4-54 的重要活性位点。并对活性位点进行拼接,由两亲本活性位点组成的序列 SS24-PJ-35 对丙溴磷和水胺硫磷有更高的亲和力和特异性,



但其余 3 条由活性位点拼接而成的序列, 亲和力不但没有提升, 反而有所下降。由此可见, 适配体与农药分子的结合并不是简单的活性位点的堆积, 且有的活性位点可能不是结合位点, 但可以协助结合位点与靶标相互作用。张存政<sup>[38]</sup>在此基础上将亲本 SS2-55 与 SS4-54 的关键功能片段拼接, 获得 SS24-S-35 新序列, 利用分子对接模拟获得此序列与有机磷农药的识别位点及作用力, 如图 4 所示, 三维结构显示了 3 个可能的结合位点, 并通过范德华力、氢键等相互作用力与有机磷农药形成稳定的复合物。

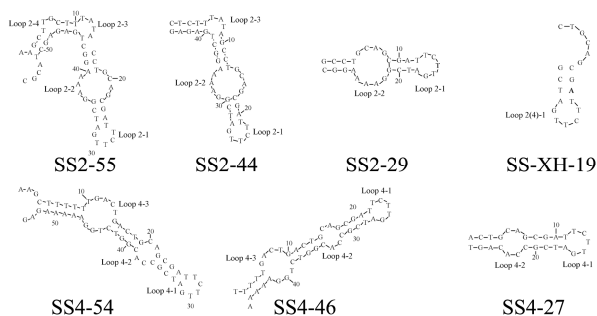


图 3 有机磷农药亲本适配体及其剪切片段的二级结构<sup>[61]</sup>  
Fig.3 Secondary structure of aptamers and their segments<sup>[61]</sup>

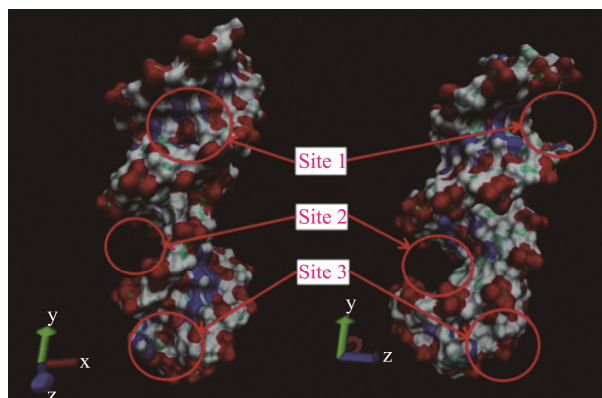


图 4 适配体 SS24-S-35 的三维结构模型及有机磷可能的结合位点<sup>[38]</sup>  
Fig.4 Three dimensions structure modeling of aptamer SS24-S-35 and its possible binding sites with organophosphorus<sup>[38]</sup>

王丽<sup>[62]</sup>利用紫外吸收光谱法进一步分析了有机磷农药与适配体碱基的结合规律, 得出: 水胺硫磷分子结构中的  $\text{-NH}_2$ 、 $\text{C=O}$  易与嘧啶碱基的  $\text{N}$ 、 $\text{O}$  形成  $\text{NH}\cdots\text{H}$ 、 $\text{NH}\cdots\text{O}$  氢键; 氧化乐果分子结构中的  $\text{C=O}$ 、 $\text{P=O}$  与嘌呤碱基的  $\text{-NH}_2$  和  $\text{-NH}$  形成  $\text{NH}\cdots\text{O}$  或  $\text{NH}\cdots\text{H}$  氢键; 丙溴磷分子中也含有  $\text{P=O}$ , 可与鸟嘌呤相互作用形成氢键, 此外, 丙溴磷分子中含有苯环, 也可能与碱基存在  $\pi\text{-}\pi$  堆积相互作用; 甲拌磷与 4 种碱基的相互作用较弱, 因此, 可能通过形状互补、静电等与适配体相互作用。在另一项研究中, BELINSKAIA<sup>[39]</sup>根据对氧磷的分子结构, 推测对氧磷分子中的磷酸根和硝基包含的  $\text{O}$  将与核苷酸的  $\text{NH}$  形成

氢键相互作用, 分子中的苯环将通过  $\pi\text{-}\pi$  堆积与核苷酸相互作用。但通过分子对接模拟对氧磷与适配体 T17C-C18T 和 T17C 的相互作用, 发现并非如此, 如图 5 所示, 对于 T17C, 苯环确实与核苷酸形成了  $\pi\text{-}\pi$  堆积相互作用, 然而对于对氧磷与 T17C-C18T 的复合物没有观察到氢键或  $\pi\text{-}\pi$  堆积相互作用。对此, 进一步通过 MD 探究对氧磷与适配体 T17C-C18T 和 T17C 结合过程中的静电和范德华力, 并结合作用位点的构象变化进行分析, 发现: 对于 T17C-C18T, 对氧磷与核苷酸 T20 之间确实形成了  $\pi\text{-}\pi$  键, 但此后  $\pi\text{-}\pi$  键断裂, 范德华力成为主要的作用力; 对于 T17C, 在模拟过程中也观察到对氧磷和核苷酸 T19 间形成  $\pi\text{-}\pi$  键, 然后  $\pi\text{-}\pi$  键断裂, 但最终又表现为较强的  $\pi\text{-}\pi$  堆积相互作用。

由此可见, 适配体与农药分子的结合是一个动态过程, 相互作用主要体现在农药分子的特定基团与适配体形成氢键或  $\pi\text{-}\pi$  堆积相互作用力, 也会表现出范德华、疏水等相互作用力, 但最终会通过相互作用力形成一种稳定的适配体-靶标复合物。

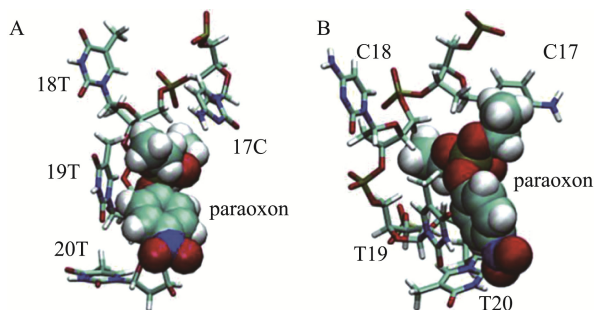


图 5 对氧磷与适配体 T17C-C18T(A)和 T17C(B)位点 1 结合的复合物<sup>[39]</sup>

Fig.5 The complexes of paraoxon with the site-1 of aptamers T17C-C18T (A) and T17C (B) according to molecular dynamics data<sup>[39]</sup>

### 3 适配体传感器在农药残留快速检测中的应用

随着适配体筛选技术的不断发展及结合机理的探究, 已将所获得适配体作为生物识别元件建立各种传感策略, 如基于适配体的电化学传感器、荧光传感器及比色传感器, 并成功运用于农药残留快速检测的实际应用。

#### 3.1 电化学适配体传感器

电化学适配体传感器由于其多重分析, 快速响应, 高灵敏度和特异性等优势在农药快速检测中广泛应用<sup>[63-64]</sup>。XU<sup>[65]</sup>利用氧化铜和羧基官能化的单壁碳纳米管等材料用于信号放大, 设计了一种高灵敏检测毒死蜱的再生电化学适配体传感器, 检测限(low limit of detection, LOD)为  $0.199 \text{ pmol/L}$ , 并用于测定苹果和芹菜实际样品中的毒死

蟀, 其加标回收率为 95.98%~106.72%。FU<sup>[66]</sup>基于适配体传感器制备过程复杂的问题, 首次提出利用一步电沉积技术将适配体、纳米材料固定在电极表面制备电化学适配体传感器, 实现丙溴磷、甲拌磷、水胺硫磷、氧化乐果 4 种有机磷农药的检测, 其 LOD 分别为 0.003、0.3、0.03、0.3 nmol/L, 并用于多种蔬菜样品加标回收实验中, 其回收率在 94.99%~121.3% 范围。此外, 电致化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 传感器结合了电化学和化学发光的优点, 作为一种有前途的分析方法, 逐渐用于农药残留检测<sup>[67]</sup>。GUO<sup>[68]</sup>利用鲁米诺和过氧化氢的发光特性作为辅助反应物, 研制了一种超灵敏的金-四面体适配体纳米结构的 ECL 传感器, 用于蔬菜中啉虫脒的检测, 其 LOD 为 0.0576 pmol/L, 加标回收率为 91.2%~99.3%。

电化学适配体传感器具有高灵敏度、低 LOD、较高的准确性, 广泛用于农药残留的定量快速检测中。其中, ECL 结合了电化学和化学发光的优点, 具有高灵敏度, 快速响应, 低背景信号等特性, 是一种有前途的分析方法。尽管如此, 电化学适配体传感器在农药残留检测中仍存在一些问题, 如信号重复性差、稳定性不好等问题。

### 3.2 比色适配体传感器

比色适配体传感器具有简单、快速、成本低、结果肉眼可见等优势, 被广泛应用于农药残留即时检测中<sup>[69]</sup>。目前为止, 许多纳米材料已用于比色测定中, 其中 AuNPs 因其制备简单、较高的摩尔消光系数和与距离有关的局部表面等离子体共振, 常用作比色探针<sup>[70]</sup>。SHI<sup>[58]</sup>报道了一种快速简单的适配体比色分析法, 利用柠檬酸根包被的 AuNPs 及 ABA 适配体检测啉虫脒, ABA 可被吸附在 AuNPs 表面, 稳定 AuNPs 以抑制盐诱导的聚集, 当加入啉虫脒时, ABA 与啉虫脒特异性结合, 从 AuNPs 上脱离下来, 从而导致 AuNPs 被盐聚集, 并产生明显的颜色变化, 因此, 可以通过肉眼观察, 也可以通过紫外可见分光光度计对其进行定量, 并用于实际土壤样品中啉虫脒的检测, 其 LOD 为 5 nmol/L。在另一项研究中, QI<sup>[71]</sup>采用利用带正电的金纳米颗粒((+)AuNPs)作信号探针, 依据不同构象适配体与 (+)AuNPs 相互作用方式不同直接导致 AuNPs 颜色不同, 无需高浓度的盐即可实现啉虫脒的检测。其 LOD 为 0.56 nmol/L 比(-)AuNPs<sup>[58]</sup>系统低约一个数量级。此外, 利用阳离子聚合物或互补 DNA 链与适配体序列杂交, 也可实现吸光度的变化从而实现农药残留的快速检测<sup>[72-73]</sup>。

比色适配体传感器具有肉眼可见的检测结果及快速分析的能力, 在农药残留即时检测中具有极大潜力。但若没有仪器的协助就无法实现定量检测, 且易受到实际样品及外界环境的影响, 因此灵敏度需进一步提高。

### 3.3 荧光适配体传感器

荧光适配体传感器具有较高的灵敏度和简便性, 在

农药定量分析中广泛使用。JIANG<sup>[74]</sup>使用 6-羧基荧光素标记适配体作为探针, 并与缀合在磁性纳米颗粒表面上的互补 DNA 杂交, 当加入有机磷农药后, 适配体与互补 DNA 脱离产生荧光信号, 实现敌百虫、草甘膦和马拉硫磷 3 种有机磷农药的检测, 其 LOD 分别为 0.28、0.53、0.59 nmol/L。该方法用于检测生菜和胡萝卜实际样品中的 3 种有机磷农药, 其加标回收率在 79.4%~118.7% 范围内。另外, 利用适配体与靶标结合时构象变化, 改变荧光染料与猝灭分子 2 种染料之间的距离, 实现荧光的猝灭, 也被广泛应用于农药残留快速检测中<sup>[75-76]</sup>。为了提高检测的灵敏度, 许多纳米材料, 如 AuNPs、GO、双金属纳米颗粒、上转换纳米粒子等<sup>[77-81]</sup>已用于制作高灵敏度的荧光适配体传感器, 用于农药残留的快速检测。

荧光适配体传感器在农药残留检测中具有较高的灵敏度和较好的特异性。但荧光团的寿命及荧光背景会影响适配体传感器的准确性。

## 4 总结与展望

适配体可与对应靶标高亲和力、特异性结合, 且具有稳定性好、靶标范围广、易于合成和修饰等优点, 广泛受到人们的关注。以适配体为识别元件建立的传感策略, 更是表现出了响应速度快、灵敏度高、准确性强等优势, 在农药残留快速检测应用中具有极大潜力。虽然适配体传感器在农药残留检测应用中具有极大的潜力且取得了一些进展, 但进一步应用及商业化仍具有挑战: 首先, 农药适配体序列的数量及性能远远不能满足实际需要。理论上, 任何靶标都能筛选获得适配体序列, 但目前为止, 通过 SELEX 技术仅获得了部分农药的适配体, 且无统一的标准来评价所获得适配体的性能。为此, 将新材料、新技术、新方法运用于传统的 SELEX 技术, 开发新策略及评价标准是获得高性能适配体的关键。再者, 适配体与靶标的结合机制研究不深。虽有诸多方法探究适配体与靶标的结合机制, 但目前为止, 大多数农药分子与适配体的结合机制分析仍停留在适配体的二级结构, 缺乏详细结合机制分析。因此, 适配体与靶标相互作用的机制在今后的研究中需进一步阐明。最后, 对于目前所建立的适配体传感器仍存在信号重复性、稳定性差, 样品基质影响大等问题, 作为识别元件的适配体会直接影响传感器的性能, 因此在结合机制分析的基础上需进一步优化筛选获得的适配体, 设计新型的传感策略。

### 参考文献

- [1] LIU M, KHAN A, WANG Z, *et al.* Aptasensors for pesticide detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 130: 174-184.
- [2] SINGH R, KUMAR N, MEHRA R, *et al.* Progress and challenges in the detection of residual pesticides using nanotechnology based colorimetric



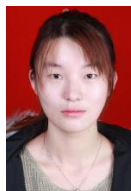
- techniques [J]. Trends Environ Anal, 2020, 26: e00086.
- [3] 满燕, 梁刚, 靳欣欣, 等. 生物传感技术在食品农药残留检测中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3431–3441.  
MAN Y, LIANG G, JIN XX, *et al.* Application of biosensor techniques in pesticides detection in food [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(9): 3431–3441.
- [4] LI S, ZHAO J, HUANG R, *et al.* Use of high-throughput enzyme-based assay with xenobiotic metabolic capability to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase activity by organophosphorous pesticides [J]. Toxicol *in Vitro*, 2019, 56: 93–100.
- [5] CUI N, CAO L, SUI J, *et al.* Quick and convenient construction of lambda-cyhalothrin antigen for the generation of specific antibody [J]. Anal Biochem, 2020, 597: 113669.
- [6] KUMAR V, VAID K, BANSAL SA, *et al.* Nanomaterial-based immunosensors for ultrasensitive detection of pesticides/herbicides: Current status and perspectives [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 165: 112382.
- [7] ELLINGTON A, SZOSTAK J. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346: 818–822.
- [8] 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.
- [9] MANSOURI A, ABNOUS K, NABAVINIA MS, *et al.* *In vitro* selection of tacrolimus binding aptamer by systematic evolution of ligands by exponential enrichment method for the development of a fluorescent aptasensor for sensitive detection of tacrolimus [J]. J Pharmaceut Biomed, 2020, 177: 112853.
- [10] GU HJ, DUAN N, XIA Y, *et al.* Magnetic separation-based multiple SELEX for effectively selecting aptamers against saxitoxin, domoic acid, and tetrodotoxin [J]. J Agr Food Chem, 2018, 66(37): 9801–9809.
- [11] XING L, ZHANG Y, YANG J. Graphene oxide-assisted non-immobilized SELEX of chiral drug ephedrine aptamers and the analytical binding mechanism [J]. Biochem Bioph Res Co, 2019, 514(1): 134–139.
- [12] LU TF, MA Q, YAN WZ, *et al.* Selection of an aptamer against muscovy duck parvovirus for highly sensitive rapid visual detection by label-free aptasensor [J]. Talanta, 2018, 176: 214–220.
- [13] 巫朦朦, 韩旭艳, 蔡蓉凤, 等. 庆大霉素特异性单链 DNA 适配体的筛选、表征和应用[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(5): 637–648.  
WU MM, HAN XY, CAI RF, *et al.* Selection and application of gentamicin-specific single-stranded DNA aptamers [J]. Sci Sin Vitae, 2019, 49(5): 637–648.
- [14] SATTARI R, PALIZBAN A, KHANAHMAD H. Single-strand DNA-like oligonucleotide aptamer against proproteinconvertasesubtilisin/kexin 9 using CE-SELEX: Pcsk9 targeting selection [J]. Cardiovasc Drug Ther, 2020, 34(4): 475–485.
- [15] DUAN N, DING X, HE L, *et al.* Selection, identification and application of a DNA aptamer against listeria monocytogenes [J]. Food Control, 2013, 33(1): 239–243.
- [16] LIU YG, CHEN Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. Biotechniques, 2007, 43(5): 649–656.
- [17] TAN J, GONG Q, YU S, *et al.* A modified high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR method for amplifying long unknown flanking sequences [J]. J Genet Genomics, 2019, 46(7): 363–366.
- [18] CHEN X, HUANG Y, DUAN N, *et al.* Screening and identification of DNA aptamers against T-2 toxin assisted by grapheneoxide [J]. J Agr Food Chem, 2014, 62(42): 10368–10374.
- [19] ESPELUND M, STACY RA, JAKOBSEN KS. A simple method for generating single-stranded DNA probes labeled to high activities [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(20): 6157–6158.
- [20] PARK JW, TATAVARTY R, KIM DW, *et al.* Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide [J]. Chem Commun, 2012, 48(15): 2071–2073.
- [21] CAO F, LU X, HU X, *et al.* *In vitro* selection of DNA aptamers binding pesticide fluoroacetamide [J]. Biosci Biotech Bioch, 2016, 80(5): 823–832.
- [22] EIISA S, ZOUROB M. Selection and characterization of DNA aptamers for electrochemical biosensing of carbendazim [J]. Anal Chem, 2017, 89(5): 3138–3145.
- [23] WILLIAMS RM, KULICK AR, YEDLAPALLI S, *et al.* *In vitro* selection of a single-stranded DNA molecular recognition element specific for bromacil [J]. J Nucleic Acids, 2014, 2014: 102968.
- [24] WILLIAMS RM, CRIHFIELD CL, GATTU S, *et al.* *In vitro* selection of a single-stranded DNA molecular recognition element against atrazine [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(8): 14332–14347.
- [25] HONG KL, SOOTER LJ. *In vitro* selection of a single-stranded DNA molecular recognition element against the pesticide fipronil and sensitive detection in river water [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): 85.
- [26] 李吉. 基于磁珠-SELEX 技术的新型有机磷农药 OP3 的适配体筛选[D]. 北京: 北京化工大学, 2018.  
LI J. Selection of aptamers for new organophosphorus pesticide OP3 based on magnetic beads-SELEX [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2018.
- [27] 秦鸣蔚, 张晓萌, 靖乐, 等. 与草甘膦特异结合的核酸适配体筛选及应用[J]. 分析科学学报, 2020, 36(1): 57–62.  
QIN MW, ZHANG XM, JING L, *et al.* Screening and application of aptamer specifically bound to glyphosate [J]. J Anal Sci, 2020, 36(1): 57–62.
- [28] 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 Throughput Screen, 2014, 17(8): 694–702.
- [29] HE J, LIU Y, FAN M, *et al.* Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid [J]. J Agr Food Chem, 2011, 59(5): 1582–1586.
- [30] 雷兆静, 张存政, 刘媛, 等. SELEX 技术筛选毒死蜱单链 DNA 适体[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1): 198–203.  
LEI ZJ, ZHANG CZ, LIU Y, *et al.* Selection of chlorpyrifos-binding ssDNA aptamer by SELEX [J]. Jiangsu J Agr Sci, 2012, 28(1): 198–203.
- [31] 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.
- [32] ABRAHAM KM, ROUEINFAR M, PONCE AT, *et al.* *In vitro* selection and characterization of a single-stranded DNA aptamer against the herbicide atrazine [J]. ACS Omega, 2018, 3(10): 13576–13583.
- [33] RAN XD, WU YG. Screening aptamers and development of colorimetric detection method of paraquat pesticide [J]. Chin J Anal Chem, 2019, 47(4):

- 567–575.
- [34] NGUYEN VT, KWON YS, KIM JH, *et al.* Multiple GO-SELEX for efficient screening of flexible aptamers [J]. *Chem Commun*, 2014, 50(72): 10513–10516.
- [35] KWON YS, NGUYEN VT, PARK JG, *et al.* Detection of iprobenfos and edifenphos using a new multi-aptasensor [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 868: 60–66.
- [36] BOR G, MAN E, UGURLU O, *et al.* *In vitro* selection of aptamer for imidacloprid recognition as model analyte and construction of a water analysis platform [J]. *Electroanalysis*, 2020, 32(9): 1922–1929.
- [37] PABIO ES. DNA aptamer development for detection of atrazine and protective antigen toxin using fluorescence polarization [D]. Los Angeles: University of California Riverside, 2019.
- [38] 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.
- [39] BELINSKAIA DA, AVDONIN PV, AVDONIN PP, *et al.* Rational in silico design of aptamers for organophosphates based on the example of paraoxon [J]. *Comput Bio Chem*, 2019, 80: 452–462.
- [40] JOKAR M, SAFARALIZADEH MH, HADIZADEH F, *et al.* Apta-nanosensor preparation and *in vitro* assay for rapid diazinon detection using a computational molecular approach [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2017, 35(2): 343–353.
- [41] TUMA SJ, ZULKIFLI RM, SHAHIR S, *et al.* In vitro selection and characterization of single stranded DNA aptamers for luteolin: A possible recognition tool [J]. *Anal Biochem*, 2018, 549: 72–79.
- [42] PFEIFFER F, MAYER G. Selection and biosensor application of aptamers for small molecules [J]. *Front Chem*, 2016, 4: 25.
- [43] LIM ES, LIM MC, PARK K, *et al.* Selective binding and elution of aptamers for pesticides based on sol-gel-coated nanoporous anodized aluminum oxide membrane [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(8): 1533.
- [44] RAZVAN N, LI YF. *In vitro* selection of structure-switching signaling aptamers [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(7): 1061–1065.
- [45] SPIGA FM, MAIETTA P, GUIDUCCI C. More DNA-aptamers for small drugs: A capture-SELEX coupled with surface plasmon resonance and high-throughput sequencing [J]. *Acs Comb Sci*, 2015, 17(5): 326–333.
- [46] STOLTENBURG R, NIKOLAUS N, STREHLITZ B. Capture-SELEX: Selection of DNA aptamers for aminoglycoside antibiotics [J]. *J Anal Met Chem*, 2012, 2012: 415697.
- [47] BOUSSEBAYLE A, GROHER F, SUESS B. RNA-based capture-SELEX for the selection of small molecule-binding aptamers [J]. *Methods*, 2019, 161: 10–15.
- [48] 王勇, 赵新颖, 石冬冬, 等. 小分子靶标的核酸适配体筛选的研究进展[J]. *色谱*, 2016, 34(4): 361–369.
- WANG Y, ZHAO XY, SHI DD, *et al.* Research advances of aptamers selection for small molecule targets [J]. *Chin J Chromatogr*, 2016, 34(4): 361–369.
- [49] MENDONSA SD, BOWSER MT. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(1): 20–21.
- [50] NIE H, CHEN Y, LU C, *et al.* Efficient selection of glycoprotein-binding DNA aptamers via boronate affinity monolithic capillary [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(17): 8277–8283.
- [51] DARMOSTUK M, RIMPELOVA S, GBELCOVA H, *et al.* Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33: 1141–1161.
- [52] JIANG P, MEYER S, HOU Z, *et al.* Mpbind: A meta-motif-based statistical framework and pipeline to predict binding potential of SELEX-derived aptamers [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(18): 2665–2667.
- [53] HOINKA J, ZOTENKO E, FRIEDMAN A, *et al.* Identification of sequence-structure RNA binding motifs for SELEX-derived aptamers [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(12): 215–223.
- [54] 张辉, 叶华, 吴世嘉, 等. 核酸适配体及其在食品安全领域中的应用研究进展[J]. *食品与机械*, 2016, 32(10): 194–199.
- ZHANG H, YE H, WU SJ, *et al.* Progress on application of aptamers on food safety detection [J]. *Food Mach*, 2016, 32(10): 194–199.
- [55] HERMANN T, PATEL DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers [J]. *Science*, 2000, 287(5454): 820.
- [56] 彭媛媛, 肖星凝, 朱龙仗, 等. 小分子物质与适配体的相互作用规律[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(8): 201–209.
- PENG YY, XIAO XN, ZHU LJ, *et al.* The interaction law between small molecular substances and aptamers [J]. *Biotech Bull*, 2020, 36(8): 201–209.
- [57] CAI S, YAN J, XIONG H, *et al.* Investigations on the interface of nucleic acid aptamers and binding targets [J]. *Analyst*, 2018, 143(22): 5317–5338.
- [58] SHI H, ZHAO G, LIU M, *et al.* Aptamer-based colorimetric sensing of acetamidiprid in soil samples: Sensitivity, selectivity and mechanism [J]. *J Hazard Mater*, 2013, 260: 754–761.
- [59] JOKAR M, SAFARALIZADEH MH, HADIZADEH F, *et al.* Design and evaluation of an apta-nano-sensor to detect acetamidiprid in vitro and in silico [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2016, 34(11): 2505–2517.
- [60] RAPINI R, CINCINELLI A, MARRAZZA G. Acetamidiprid multidetection by disposable electrochemical DNA aptasensor [J]. *Talanta*, 2016, 161: 15–21.
- [61] 王丽, 张存政, 刘媛, 等. 基于分子信标的有机磷农药适配体活性位点分析及改造[J]. *分析化学*, 2012, 40(6): 940–944.
- WANG L, ZHANG CZ, LIU Y, *et al.* Active site analysis and modification of organophosphorus pesticides aptamers based on molecular beacon [J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(6): 940–944.
- [62] 王丽, 桑宏庆. 基于有机磷农药与碱基作用的核酸适配体活性位点研究[J]. *分析实验室*, 2014, 33(4): 395–398.
- WANG L, SANG HQ. Studies on active sites of the aptamers based on the interaction between organophosphorus pesticides and bases [J]. *Chin J Anal Lab*, 2014, 33(4): 395–398.
- [63] SHI XI, SUN JF, YAO Y, *et al.* Novel electrochemical aptasensor with dual signal amplification strategy for detection of acetamidiprid [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 705: 135905.
- [64] HASSANI S, AKMAL MR, SALEK-MAGHSOUDI A, *et al.* Novel label-free electrochemical aptasensor for determination of diazinon using gold nanoparticles-modified screen-printed gold electrode [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 120: 122–128.
- [65] XU G, HUO D, HOU C, *et al.* A regenerative and selective electrochemical aptasensor based on copper oxide nanoflowers-single walled carbon nanotubes nanocomposite for chlorpyrifos detection [J]. *Talanta*, 2018, 178: 1046–1052.
- [66] FU J, AN X, YAO Y, *et al.* Electrochemical aptasensor based on one step co-electrodeposition of aptamer and GO-CuNPs nanocomposite for

- organophosphorus pesticide detectio [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2019, 287: 503–509.
- [67] LIU H, CHENG S, SHI X, *et al.* Electrochemiluminescence aptasensor for profenofos detection based on silver nanoparticles enhanced luminol luminescence system [J]. *J Electrochem Soc*, 2019, 166(15): 1562–1566.
- [68] GUO Y, YANG F, YAO Y, *et al.* Novel Au-tetrahedral aptamer nanostructure for the electrochemiluminescence detection of acetamiprid [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 401: 123794.
- [69] WU S, LI D, WANG J, *et al.* Gold nanoparticles dissolution based colorimetric method for highly sensitive detection of organophosphate pesticides [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2017, 238: 427–433.
- [70] YANG T, LUO Z, TIAN Y, *et al.* Design strategies of aunps-based nucleic acid colorimetric biosensors [J]. *Trends Anal Chem*, 2020, 124: 115795.
- [71] QI Y, CHEN Y, XIU FR, *et al.* An aptamer-based colorimetric sensing of acetamiprid in environmental samples: Convenience, sensitivity and practicability [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2020, 304: 127359.
- [72] WANG S, SU L, WANG L, *et al.* Colorimetric determination of carbendazim based on the specific recognition of aptamer and the poly-diallyldimethylammonium chloride aggregation of gold nanoparticles [J]. *Spectrochim Acta A*, 2020, 228: 117809.
- [73] BALA R, KUMAR M, BANSAL K, *et al.* Ultrasensitive aptamer biosensor for malathion detection based on cationic polymer and gold nanoparticles [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85: 445–449.
- [74] JIANG M, CHEN C, HE J, *et al.* Fluorescence assay for three organophosphorus pesticides in agricultural products based on magnetic-assisted fluorescence labeling aptamer probe [J]. *Food Chem*, 2020, 307: 125534.
- [75] HU W, CHEN Q, LI H, *et al.* Fabricating a novel label-free aptasensor for acetamiprid by fluorescence resonance energy transfer between  $\text{NH}_2\text{-NaYF}_4\text{: Yb, Ho@SiO}_2$  and Au nanoparticles [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 398–404.
- [76] LIN B, YU Y, LI R, *et al.* Turn-on sensor for quantification and imaging of acetamiprid residues based on quantum dots functionalized with aptamer [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2016, 229: 100–109.
- [77] SU L, WANG S, WANG L, *et al.* Fluorescent aptasensor for carbendazim detection in aqueous samples based on gold nanoparticles quenching rhodamine B [J]. *Spectrochim Acta A*, 2020, 225: 117511.
- [78] LUO Q, LAI J, QIU P, *et al.* An ultrasensitive fluorescent sensor for organophosphorus pesticides detection based on RB-Ag/Au bimetallic nanoparticles [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2018, 263: 517–523.
- [79] FAN K, YANG R, ZHAO Y, *et al.* A fluorescent aptasensor for sensitive detection of isocarbophos based on at-rich three-way junctions DNA templated copper nanoparticles and  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{/GO}$  [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2020, 321: 128515.
- [80] CHEN Q, SHENG R, WANG P, *et al.* Ultra-sensitive detection of malathion residues using fret-based up conversion fluorescence sensor in food [J]. *Spectrochim Acta A*, 2020, 241: 118654.
- [81] WU X, SONG Y, YAN X, *et al.* Carbon quantum dots as fluorescence resonance energy transfer sensors for organophosphate pesticides determination [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 292–297.

(责任编辑: 于梦娇)

### 作者简介



孔倩倩, 硕士, 主要研究方向为食品安全快速检测技术。

E-mail: 2257762774@qq.com



孙霞, 教授, 博士, 主要研究方向为农业信息及农产品安全检测技术。

E-mail: sunxia2151@sina.com