

滚环扩增技术在食品安全检测中的研究进展

王冲¹, 宋亚宁¹, 梁煜¹, 朱云¹, 周润¹, 肖静¹, 马力¹, 陈祥贵^{1,2}, 黄玉坤^{1,2*}

(1. 西华大学食品与生物工程学院, 成都 610039;

2. 食品非热加工重点实验室, 食品非热加工工程技术研究中心, 宜宾西华大学研究院, 宜宾 644004)

摘要: 食品安全一直受到广泛关注, 在实现食品中污染物准确检出的前提下, 快速方便的检测方式对食品安全的维持具有重要现实意义。滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)发展于20世纪90年代中期, 是一种简单高效的体外核酸扩增技术, 可在等温的条件下快速扩增出由模板互补序列串联而得的长单链DNA。由于其引物易于标记固定和其模板设计多样性, RCA应用于生物传感器中以及在提高传感器的检测灵敏度方面具备显著优势, 因此被广泛应用于医疗诊断、环境监测以及食品安全等生物技术领域的研究中。本文综述了近几年RCA技术在食源性致病微生物、生物毒素、农药兽药残留、重金属等食品安全危害因子检测中的研究与应用进展, 并展望了该技术在食品安全检测领域的发展方向。

关键词: 滚环扩增技术; 食品安全检测; 生物传感器

Research progress in application of rolling circle amplification in food safety detection

WANG Chong¹, SONG Ya-Ning¹, LIANG Yu¹, ZHU Yun¹, ZHOU Run¹, XIAO Jing¹, MA Li¹,
CHEN Xiang-Gui^{1,2}, HUANG Yu-Kun^{1,2*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. Key Laboratory of Food Non Thermal Processing, Engineering Technology Research Center of Food Non Thermal Processing Yibin Xihua University Research Institute, Yibin 644404, China)

ABSTRACT: Extensive attention has been paid to food safety issue. On the premise of accurate detection of contaminants in food, a fast and convenient detection method is of great practical significance to ensure food safety. Rolling circle amplification (RCA), developed in the mid-1990s, is a simple and efficient amplification technique of nucleic acid *in vitro*. RCA can rapidly amplify long single-stranded DNA with a large number of template-complementary sequences under isothermal conditions. Due to the labelability and fixability of its primer and the diversity of template design, RCA has significant advantages in the application of biosensors and in improving the detection sensitivity of biosensors. Therefore, RCA technique has been widely applied in the research and detection of medical diagnosis, environmental monitoring and food safety. This article reviewed the research and application progress of RCA technique in the detection of foodborne pathogenic microorganisms, biotoxins, pesticide

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31801647)、四川省科技厅应用基础项目计划资助项目(2018JY0194)、西华大学研究生创新基金项目(YCJJ2020082)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31801647), the Sichuan Science and Technology Program (2018JY0194), and the Graduate Innovation Fund of Xihua University (YCJJ2020082)

*通信作者: 黄玉坤, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品营养与安全。E-mail: hyk_diana@163.com

*Corresponding author: HUANG Yu-Kun, Ph.D, Associate Professor, School of Food and Biological Engineering, Xihua University, Chengdu 610039, China. E-mail: hyk_diana@163.com

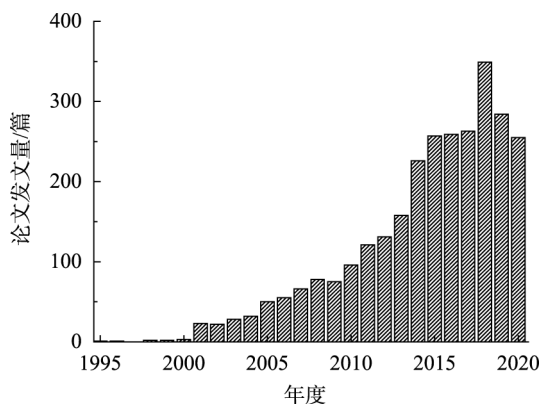
and veterinary drug residues, and prospected the development direction of this technology in the field of food safety inspection.

KEY WORDS: rolling circle amplification; food safety detection; biosensor

0 引言

食品在生产加工的各个环节中都可能受到污染物的影响,长期摄入有安全隐患的食物会对人体健康产生不利影响^[1]。将食品中有毒有害污染物准确、快速、便捷地检出是科学有效地处理被污染食品的必要前提。核酸的体外扩增经过 30 多年的发展,已成为生命科学发展中一种不可或缺的重要技术^[2]。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是目前广泛应用的核酸体外扩增方法,但有依赖热循环步骤,可能会对某些重要生物分子产生破坏并且不利于实验室外实施^[3]。发展于 20 世纪 90 年代初的等温扩增技术可有效地实现核酸序列的快速积累^[4],这类扩增技术根据第一步反应的特征,可被分为两大类:一类依赖于特异性引物延伸,包括环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、依赖核酸序列扩增技术(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)和依赖解旋酶扩增技术(helicase-dependent amplification, HAD)等;另一类是依赖于限制性内切酶,包括链置换扩增技术(strand displacement amplification, SDA)、切口酶扩增反应(nicking enzyme amplification, NEAR)以及切口内切酶介导扩增技术(nicking enzyme mediated amplification, NEMA)等^[5-6]。其中 RCA 具有多项实用性能。首先, RCA 产物由大量的具有高度可操作性的重复序列组成,扩增模板的多样设计可以实现多种应用目的,例如扩增核酸适配体、DNA 模拟酶等功能核酸以及信号探针互补位点、限制性酶位点等^[7]。另外,通过引物序列的修饰或者设计,可将 RCA 扩增产物直接固定于试条纸^[8]、微孔板^[9]、微流控芯片^[10]以及纳米颗粒^[11]等载体上,或者连接在核酸适配体、蛋白质等生物大分子上,这使 RCA 可灵活地与其他分离检测技术相结合。RCA 技术原位检测、微量物质测定、核酸诊断、单碱基多态性和药物研发等研究和分子诊断中有大量的相关研究报道^[12]并已有商业化产品出现。例如,上海易色医疗生产的“一步法恒温支原体检测试剂盒”其灵敏度高于普通 PCR(30 cycles)80 倍;华大基因通过使用美国 Complete Genomics 公司基于 RCA 开发的 DNA 纳米球基因测序技术,发布了桌面化测序系统 BGISEQ-500,其基因组检测精度可达 99.99%。图 1 对 1995 年以来每年发表的 RCA 相关文献数量进行了统计,2014 年以来, RCA 相关文献总量以每年 200 余篇的数量增加,表明了 RCA 技术的应用研究潜力和科学界对其的持续关注。目前,已有文献对 RCA 在医疗

诊断^[7]、生物检测^[13]等领域进行了回顾,但未见其在食品安全方面应用的综述。因此,本文从 RCA 技术的原理和特点出发,重点归纳总结了近年来 RCA 技术在食品安全检测中的应用,系统梳理了其研究应用阶段性成果,以期拓宽该技术在食品安全隐患的快速筛查的应用发展。



注:数据来自于 web of science,截止于 2020 年 10 月 8 日。

图 1 历年 RCA 相关文献数量

Fig.1 Number of literatures related to RCA technology each year

1 RCA 技术简介

1.1 RCA 技术原理

RCA 技术是对自然界中的某些转座子、质粒和病毒基因组的滚环复制的模拟而提出的^[14]。20 世纪 90 年代中期,美国卡内基研究所的 FIRE 团队^[15]以及斯坦福大学的 Kool 团队先后描述了 RCA^[16]。一般地, RCA 可分为模板的连接成环和滚环扩增两部分^[2]。以常用的锁式探针模板(padlock probe, PLP)为例, PLP 长度在 100 bp 以内,主要由两部分组成:(1)与引物反向互补的 5'-磷酸化检测臂(T1)和 3'-检测臂(T2);(2)功能区域 Zip,位于 T1 和 T2 之间,为 RCA 产物中的功能性序列提供模板。如图 2a 所示,在连接成环时,退火后的 PLP 与初始引物杂交, T1 与 T2 相邻而形成的裂口在 DNA 连接酶的作用下闭合生成环状 DNA 模板^[8]。扩增步骤由具有链置换性的 DNA 聚合酶介导,图 2b 展示了经典的线性 RCA(linear rolling circle amplification, LRCA)的扩增过程,在恒定温度下, DNA 聚合酶将 dNTPs 添加到扩增引物 5'端。当产物链在模板上延伸一周后,由于酶的链置换性,已扩增产物的脱氧核糖核苷酸依次从模板上被置换,以进行下一个核苷酸的延伸。RCA 的扩增过程如同拉出一卷卷

尺, 因此最终的 RCA 扩增产物是一个由含数百至数千个重复序列单体串联而组成的长 ssDNA。

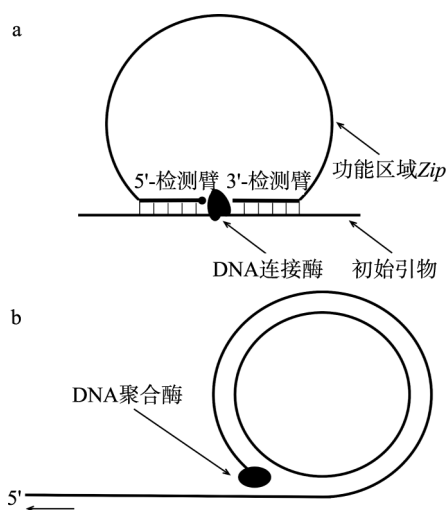


图 2 锁式探针的成环步骤(a)与 LRCA 的扩增步骤(b)

Fig.2 Looping step of PLP (a) and amplification step (b) of LRCA

1.2 RCA 技术特点

RCA 具有高度灵敏性和特异性^[17]。在一个靶标分子对应一个引物的 RCA 生物传感器中, 理论上可以实现 1 个拷贝的灵敏度^[18]。RCA 反应条件温和, 仪器简单, 在常见的恒温仪器(如水浴、恒温培养箱)中即可进行扩增。RCA 扩增的最适温度接近生理温度, 温和的反应条件使 RCA 甚至可以在生物体中进行^[19]。RCA 具有高效的扩增能力和信号放大能力。研究发现, Phi29 DNA 聚合酶参与的 LRCA 能够产生长达 10^5 个碱基长度的扩增产物^[20]; 使用 2 个扩增引物的超支化滚环扩增(hyperbranched rolling circle amplification, HRC)可在 90 min 内产生 10^9 的信号放大效果^[21]。为进一步实现 RCA 的信号放大, 使用多个扩增引物的多引物 RCA(multiple primers rolling circle amplification, MRCA)已在近年被应用^[22]。而在已报道的应用中, 基于 RCA 信号放大的生物传感器通常可对 pmol/L 乃至 amol/L^[23]级浓度的靶标物进行检测。另一方面, 不同于 PCR 对低丰度被检核酸的扩增, RCA 扩增的是靶向设计的核酸序列, 设计的模板多样性决定了扩增模式和扩增产物的多样性, 因此, RCA 应用于传感器中可实现多种信号形式的放大。

2 RCA 技术在食品安全检测中的应用

把靶标物数量的信号转换成核酸模式信号, 再用 RCA 将核酸信号放大并转化为检测信号, 从而达到构建 RCA 生物传感器的目的。本文分别围绕食品中食源性致病

微生物、生物毒素、重金属和农兽药残留等危害因子的筛选或定量分析工作, 重点概述近几年 RCA 技术在食品安全检测的应用发展。

2.1 食源性致病微生物

食源性致病微生物, 主要是大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌等, 极易污染引起食源性疾病, 是世界范围内严重的食品安全问题之一^[24]。RCA 用于微生物的定量检测, 可通过定量微生物的特定标志性核酸的方式进行。例如, WANG 等^[25]和 ZHANG 等^[26]先后建立了基于跨越式滚环扩增(saltatory rolling circle amplification, SRCA)的蔬菜沙拉中志贺氏菌、婴儿配方奶粉中克罗诺杆菌检测平台, 当以荧光信号检测时, SRCA 方法比 PCR 方法灵敏度提高 100 倍以上。ZHAN 等^[27]先利用不对称 PCR(asymmetric polymerase chain reaction, asPCR)扩增单核细胞增生性李斯特菌的标志性核酸序列, 再将 asPCR 扩增产物作为 RCA 扩增的引物, 实现了核酸信号的双步放大, 该方法在莴苣匀浆中实现了检出限(limit of detection, LOD)为 4.0×10^2 CFU/g 的灵敏检测。为避免核酸的提取纯化过程而更利于现场检验的开展, 越来越多的研究团队使用核酸适配体特异性识别食源性致病微生物^[28-29]。GUO 等^[30]使用抗体-细胞-核酸适配体夹心结构, 首次将 RCA 扩增 DNA 模拟酶引入到食源性致病微生物的电化学检测中。此方法对大肠杆菌表现出超高灵敏度与特异性, LOD 达到 8 CFU/mL。XU 等^[31]首次在核酸适配体传感器中采用双步放大策略, 建立了一种检测金黄色葡萄球菌的 NEAR-RCA 机制, 可检测到低至 5 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌。

RCA 结合纳米材料技术, 可得到优异的检测效果。GAO 等^[23]利用副溶血性弧菌在载体上触发 RCA, RCA 产物富集游离的 Au@Ag 探针以增强载体表面拉曼散射信号, 建立了 LOD 低至 1 CFU/mL 的微生物检测方法。芯片化、高通量化是快检技术发展的方向之一, RCA 在微流控芯片上也发挥了显著作用。JIANG 等^[32]开发出一种针对大肠杆菌 O157:H7 的 RCA 放大微流控芯片, 与未进行 RCA 的对照组相比, 其信号强度提高了 50 倍以上。ZHAN 等^[33]建立的基于 RCA 信号放大的间接竞争性酶联适配体法对莴苣样品中的单核细胞增生性李斯特菌也取得了良好的检测结果。

食源性致病微生物是 RCA 在食品安全应用的热点, 利用微生物特征核酸构建检测具有较好的特异性, 但增加了前处理过程, 而通过抗体、核酸适配体识别微生物更利于现场检测的展开。RCA 方法构建灵活, 与新型纳米材料、微流控等多学科技术的结合使用助力 RCA 技术体系的不断完善, 其在食源性致病微生物检测中的应用前景也将会更加广阔。

2.2 生物毒素

目前, 基于 RCA 的生物毒素污染检测多集中于谷物中的霉菌毒素。以粮食在贮藏过程中由赭曲霉产生的强毒性真菌毒素污染物赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)^[34]为例, 来自福州大学的 Lin 课题组基于 RCA 技术, 在 2015 年开发出了竞争性荧光核酸适配体传感器^[35]和电化学发光适配体传感器^[36]; 2018 年, 该课题组将 HRCA 发生在电加热氧化铜锡电极上, 开发出用于检测 OTA 的原位温度控制电化学发光传感器, 其 LOD 低至 8 fg/mL^[37]。结合纳米技术可降低样品基质的影响, ZHANG 等^[38]基于纳米金和磁性纳米粒子的生物条形码技术, 建立了对燕麦、小米、面粉等食品中 T-2 毒素的 RCA 检测系统, 其 LOD 低至 0.26 pg/mL。在动物性食品中毒素检测中, PANG 等^[39]利用 RCA 扩增出大量 G-四联体/hemin DNA 模拟酶并对乳样中的黄曲霉毒素 M₁(alfatoxin M₁, AFM₁)进行了灵敏测定, 其 LOD 为 0.15 ng/mL。为了检测蛤蜊肉中的大田软海绵酸毒素(okadaic acid, OA), GU 等^[9]依靠 RCA 设计了一种灵敏的直接性竞争核酸适配体荧光分析方法, 该方法在 1 pg/mL~100 ng/mL 的线性范围上, LOD 达到了 1 pg/mL。

核酸适配体是食品安全快速检测常用的靶标识别元件, 相对于蛋白质抗体, 核酸适配体能直接介导 RCA 反应的进行。然而相较于 AFM₁、OTA 等真菌毒素, 动物毒素、植物毒素的核酸适配体的文献少有报道^[40]。因此, RCA 技术在生物毒素检测中的应用主要集中于微生物毒素之中, 其中又以真菌毒素为主。随着越来越多种类生物毒素核酸适配体或抗体的筛选, RCA 技术在生物毒素检测中将有更广泛的应用。

2.3 农、兽药残留

近几年食用农产品中农、兽药残留的快速检测方法的发展市场需求量急剧上升, 然而却多受基质的影响导致方法检测效果不稳定。因此, RCA 信号放大技术的应用, 对于提高农兽药残留检测性能起到积极的作用^[41]。LIU 等^[42]将乙酰胆碱酯酶催化介导的 DNA 构象变化与 RCA 的信号放大结合起来, 提出了一种均相电化学分析平台, 用于果蔬中有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的灵敏检测。该平台对乐果在 10~10000 μg/L 的线性范围中的 LOD 低至 2.1 μg/L。HE 等^[43]以牛奶和鱼肉中卡那霉素为模型分析物, 开发了一种用于食品中抗生素检测的纳米金改性搅拌子辅助吸附提取-RCA 信号放大微流控芯片, 通过比例策略与搅拌棒提取相结合显著降低基质干扰, 具有极好的灵敏度, 其检出限低至 0.3 pg/mL。本课题组^[44]首次在 RCA 扩增产物上杂交时间分辨荧光探针, 开发了一种食品中氧氟沙星灵敏的竞争性检测方法。该方法使用磁性纳米粒子实现复杂食品基质中靶标成分快速分离富集, 结合时间分辨荧光探针进一步消除

基质荧光对信号的影响, LOD 低至 32.1 pmol/L。食品的复杂基质是影响食品快检检测性能的重要因素, 上述研究通过多种途径降低了基质的干扰, 达到了对农兽药理想的检测效果, 可为复杂样品中小分子有毒有害物质的检测提供参考。

2.4 重金属

重金属是持续存在的环境污染物, 严重威胁公共卫生和食品安全, 建立高灵敏的检测方法, 对以铅、汞为主的重金属污染检测具有重要的现实意义^[45]。目前基于 RCA 的重金属检测研究以水样为主, 水是食品的重要原料, 因此对水中重金属含量的监控是减少食品中重金属污染的重要途径^[46]。表 1 例举了部分近年来 RCA 在铅、汞检测中的应用报道, 与非 RCA 的快速检测法相比, 基于 RCA 的检测技术更保证了方法的灵敏度。Hg²⁺生物传感器以胸腺嘧啶 12 聚体[thymine 12-mer, (T)12]探针为识别元件, 这是由于特殊的 T-Hg²⁺-T 配位化学系统对 Hg²⁺具有高选择性和亲和力; 而在 Pb²⁺的检测中应用广泛的是依赖 Pb²⁺的 DNA 模拟酶, 此类核酸模拟酶在 Pb²⁺存在的情况下对底物链有特异性识别和切割活性, 并且切割效率与 Pb²⁺浓度密切相关^[46], 可将 Pb²⁺浓度转化为可测量的核酸信号。基于以上原理, CAI 等^[47]巧妙地设计了一种利用双 DNA 模拟酶反馈扩增(dual-DNAzyme feedback amplification, DDFA)-双重 RCA 信号放大的电化学 Pb²⁺检测系统。此系统对水中 Pb²⁺表现出高选择性和检测灵敏度, LOD 为 0.048 pmol/L 且样品用量减少到 10 μL。

2.5 其他食品安全危害因子检测

基于 RCA 生物传感器检测食品中非法添加剂^[57]、转基因农作物^[58]以及食物掺伪^[59]等食品安全危害物的分析方法也有所报道。例如, WANG 等^[60]开发的多重不对称 PCR 与不对称 HRCA 联用的反向点杂交系统来检测转基因农作物, 对转基因大豆 DNA 检出限低至 0.5 ng/L, 并表明 RCA 技术应用于转基因农作物的多重靶基因测定可提高检测速度、降低检测成本。XU 等^[61]构建了新的乳制品中三聚氰胺掺假检测方法: 利用三聚氰胺可以与 2 个胸腺嘧啶配合形成稳定的 T-三聚氰胺-T 结构的特性, 开发出的 T-三聚氰胺-T 碱基错配介导的 RCA 信号增强荧光方法对牛奶中的三聚氰胺检出限达 2.5 nmol/L, 证明了 RCA 在食品掺伪监控中的应用潜力。HE 等^[62]建立了以菌类中 α -amanitin 基因为检测靶标的检测方法, 作为筛选食品中致死性 amanitas 菌类的工具。该方法在烘干后的多种蘑菇混合物中可检测到低至 0.2% 的致死性 amanitas 菌类组分, 为 RCA 在有毒菌类与食用菌类鉴别中的应用提供了参考。对于包装中化学物质在食品中的迁入, LI 等^[63]构建了基于 RCA-Exo III 的信号循环放大荧光分析法, 该方法对瓶装水中迁入的有害物质双酚 A 显示出优秀的灵敏度, LOD 为 5.4×10^{-17} mol/L。

表 1 RCA 在 Hg²⁺、Pb²⁺检测中的应用
Table 1 Applications of RCA in Hg²⁺ and Pb²⁺ detection

靶标物	方法	LOD	线性范围	参考文献
Pb ²⁺	双重 RCA-DDFA-电化学法	0.048 pmol/L	0.2~100 nmol/L	[47]
	RCA-多位链置换-荧光法	0.03 nmol/L	0.1~50 nmol/L	[48]
	RCA-葡糖氧化酶介导酸度测定法	0.91 nmol/L	1.0~100 nmol/L	[49]
	RCA-磁分离-荧光法	/	1~20 nmol/L	[50]
	β -环糊精功能化金纳米粒子比色法	8.98 μ mol/L	0.01~2000 μ mol/L	[51]
	RCA-竞争性比色法	1.6 nmol/L	2.5~100 nmol/L	[52]
Hg ²⁺	RCA-3D 打印一次性比色芯片	3.6 μ g/L	0~14 μ g/L	[53]
	RCA-比色纸芯片	22.4 nmol/L	0~1500 nmol/L	[54]
	RCA-3D 打印多阵列芯片	4.1 μ g/L	0~20 μ g/L	[55]
	DNA 模拟酶-比色法	4.3 nmol/L	80~800 nmol/L	[56]

3 总结与展望

本文集中介绍了 RCA 技术在食品安全中的应用, 重点概述了近几年其在食源性致病微生物、生物毒素、农药兽药残留、重金属中的应用进展。在这些危害因子中, 食源性致病微生物的检测是 RCA 技术在食品安全中应用的热点; 而 RCA 对食品中转基因组分、过敏源的研究报道较少, 但 RCA 在对微核酸、蛋白质等疾病标志物的检测应用可为其提供相应的参考; RCA 在生物毒素检测中的应用以粮食中的真菌毒素为主, 农药兽药残留和重金属多为小分子, 多基于功能核酸的识别, 并且为减小复杂基质的影响, RCA 技术应用于此类的检测结合分离富集或者其他信号放大技术, 降低背景信号, 提高信噪比。虽然众多的研究论文已经证明了利用 RCA 技术开发检测方法的优点, 并且一些设备/分析已经商业化, 但它们的广泛应用尚未得到充分实现。RCA 的应用和产品化仍需要注意解决几个方面的实际问题。(1)假阳性问题: 非特异性成环是 RCA 出现假阳性的重要原因, 解决方案包括进行阴性对照、使用核酸外切酶对未结合探针降解以及设计更具特异性的引物或模板。(2)食品复杂基质的影响: 样品复杂成分对酶促反应、以及核酸的稳定有较大影响, 并且易造成纳米颗粒的聚集。这时可以引入稳定的分离、放大技术或者进行严格的样品前处理步骤。然而同一检测体系中多种技术的使用, 检测成本难免提高。(3)仪器的制约: 缺少紧凑、重量轻、体积小在非实验室环境使用的核酸等温扩增仪器来辅助 RCA 反应的进行或信号的检测。国外如英国 Optigene 公司的 Genie®系列可用于 RCA 的荧光信号的检测, 但价格昂贵。因此, 基于 RCA 的便携式、简单快速、灵敏稳定的生物分析系统的实现, 不仅是一个分子生物学问题, 也是一个复杂的多学科的甚至

工程学的问题。然而, RCA 技术在提升生物传感器检测性能上有着固有的优势, 我们相信通过其机理研究的深入和与其他技术交叉互补, 该技术将得到进一步发展和完善, 在食品安全检测方面将会有更大的应用潜力。

参考文献

- [1] 金书秦, 方菁. 农药的环境影响和健康危害: 科学证据和减量控害建议[J]. 环境保护, 2016, 44(24): 34-38.
JIN SQ, FANG J. Environmental impact and health hazards of pesticide—scientific evidence and reduction control suggestions [J]. Environ Prot, 2016, 44(24): 34-38.
- [2] MOHSEN MG, KOOL ET. The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription [J]. J Am Chem Soc, 2016, 49(11): 2540-2550.
- [3] 王大洲, 郭天笑, 郑实, 等. 核酸等温扩增技术在微生物快速检测中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(7): 49-61.
WANG DZ, GUO XT, ZHENG S, *et al.* Research progress on the isothermal nucleic acid amplification techniques in rapid detection of microorganisms [J]. Biotechnol Bull, 2017, 33(7): 49-61.
- [4] 葛航, 吴朦晨, 张明洲, 等. 食源性致病菌等温扩增检测技术的研究进展[J]. 分析测试学报, 2019, 38(7): 874-881.
GE H, WU MC, ZHANG MZ, *et al.* Research progress of isothermal amplification techniques for detection of food-borne bacteria [J]. J Instrum Anal, 2019, 38(7): 874-881.
- [5] LI J, MACDONALD J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 64: 196-211.
- [6] 许文涛. 功能核酸生物传感器. 理论篇[M]. 北京: 科学出版社, 2020.
XU WT. Functional nucleic acid biosensor. Theory [M]. Beijing: Science Press, 2020.
- [7] GU LD, YAN WL, LIU L, *et al.* Research progress on rolling circle amplification (RCA)-based biomedical sensing [J]. Pharmaceuticals, 2018, 11(2): 35.
- [8] ZHANG CY, CHEN GF, WANG YY, *et al.* Establishment and application

- of hyperbranched rolling circle amplification coupled with lateral flow dipstick for the sensitive detection of *Karenia mikimotoi* [J]. *Harmful Algae*, 2019, 84: 151–160.
- [9] GU HJ, HAO LL, DUAN N, *et al.* A competitive fluorescent aptasensor for okadaic acid detection assisted by rolling circle amplification [J]. *Microchim Acta*, 2017, 184(8): 2893–2899.
- [10] SOARES RRG, NEUMANN F, CANEIRA CRF, *et al.* Silica bead-based microfluidic device with integrated photodiodes for the rapid capture and detection of rolling circle amplification products in the femtomolar range [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 128: 68–75.
- [11] TIAN B, QIU Z, MA J, *et al.* On-particle rolling circle amplification-based core-satellite magnetic superstructures for microRNA detection [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2018, 10(3): 2957–2964.
- [12] OU LJ, SZ AM, LIU KJ. Rolling circle amplification-based biosensors [J]. *Anal Lett*, 2015, 48(8): 1199–1216.
- [13] 占忠旭, 刘巨, 陈博璐, 等. 滚环扩增信号放大技术在生物检测中的应用的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1206–1213.
- ZHAN ZX, LIU J, CHEN BL, *et al.* Progress in rolling circle amplification in biological detection [J]. *Chin J Biotechnol*, 2019, 35(7): 1206–1213.
- [14] NILSSON M, DAHL F, LARSSON C, *et al.* Analyzing genes using closing and replicating circles [J]. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(2): 83–88.
- [15] FIRE A, XU SQ. Rolling replication of short DNA circles [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92(10): 4641–4645.
- [16] LIU DY, DAUBENDIEK SL, ZILLMAN MA, *et al.* Rolling circle DNA synthesis: Small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(7): 1587–1594.
- [17] CHEN YX, HUANG KJ, NIU KX. Recent advances in signal amplification strategy based on oligonucleotide and nanomaterials for microRNA detection—a review [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 99: 612–624.
- [18] LIU XF, ZHANG XW. Aptamer-based technology for food analysis [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 175(1): 603–624.
- [19] KONRY T, SMOLINA I, YARMUSH JM, *et al.* Ultrasensitive detection of low-abundance surface-marker protein using isothermal rolling circle amplification in a microfluidic nanoliter platform [J]. *Small*, 2011, 7(3): 395–400.
- [20] DENG HM, GAO ZQ. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 853: 30–45.
- [21] LIZARDI PM, HUANG XH, ZHU ZR, *et al.* Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification [J]. *Nat Genetics*, 1998, 19(3): 225–232.
- [22] HUANG J, LI XY, DU YC, *et al.* Sensitive fluorescent detection of DNA methyltransferase using nicking endonuclease-mediated multiple primers-like rolling circle amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 417–423.
- [23] GAO FL, DU Y, YAO JW, *et al.* A novel electrochemical biosensor for DNA detection based on exonuclease III-assisted target recycling and rolling circle amplification [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(12): 9123–9129.
- [24] YAO L, YE YW, TENG J, *et al.* *In vitro* isothermal nucleic acid amplification assisted surface-enhanced Raman spectroscopic for ultrasensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(18): 9775–9780.
- [25] WANG ZY, YANG Q, ZHANG YZ, *et al.* Saltatory rolling circle amplification (SRCA): A novel nucleic acid isothermal amplification technique applied for rapid detection of *Shigella spp.* in vegetable salad [J]. *Food Anal Methods*, 2017, 11(2): 504–513.
- [26] ZHANG YZ, YANG Q, LI C, *et al.* Sensitive and visual detection of *Cronobacter spp.* in powdered infant formula by saltatory rolling circle amplification method [J]. *LWT—Food Sci Technol*, 2019, 107: 41–48.
- [27] ZHAN ZX, LIU J, YAN LN, *et al.* Sensitive fluorescent detection of *Listeria monocytogenes* by combining a universal asymmetric polymerase chain reaction with rolling circle amplification [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 169: 181–187.
- [28] YANG X, YANG K, ZHAO X, *et al.* Terahertz spectroscopy for the isothermal detection of bacterial DNA by magnetic bead-based rolling circle amplification [J]. *Analyst*, 2017, 142(24): 4661–4669.
- [29] YANG XF, LI J, PEI H, *et al.* DNA-gold nanoparticle conjugates-based nanoplasmonic probe for specific differentiation of cell types [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(6): 3227–3231.
- [30] GUO YA, WANG Y, LIU S, *et al.* Label-free and highly sensitive electrochemical detection of *E. coli* based on rolling circle amplifications coupled peroxidase-mimicking DNase amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75: 315–319.
- [31] XU JG, GUO J, MAINA SW, *et al.* An aptasensor for *staphylococcus aureus* based on nicking enzyme amplification reaction and rolling circle amplification [J]. *Anal Biochem*, 2018, 549: 136–142.
- [32] JIANG YQ, ZOU S, CAO XD. A simple dendrimer-aptamer based microfluidic platform for *E. coli* O157: H7 detection and signal intensification by rolling circle amplification [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2017, 251: 976–984.
- [33] ZHAN ZX, LI H, LIU J, *et al.* A competitive enzyme linked aptasensor with rolling circle amplification (ELARCA) assay for colorimetric detection of *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Control*, 2020, 107: 106806.
- [34] ZINEDINE A, MAÑES J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from morocco [J]. *Food Control*, 2009, 20(4): 334–344.
- [35] ZHANG Y, YANG LL, LIN CY, *et al.* Fluorescence aptasensor for ochratoxin A in food samples based on hyperbranched rolling circle amplification [J]. *Anal Methods*, 2015, 7(15): 6109–6113.
- [36] YANG LL, ZHANG Y, LI RB, *et al.* Electrochemiluminescence biosensor for ultrasensitive determination of ochratoxin A in corn samples based on aptamer and hyperbranched rolling circle amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 70: 268–274.
- [37] ZHANG HF, ZHUO ZS, CHEN LJ, *et al.* Enhanced performance of a hyperbranched rolling circle amplification based electrochemiluminescence aptasensor for ochratoxin A using an electrically heated indium tin oxide electrode [J]. *Electrochem Commun*, 2018, 88: 75–78.
- [38] ZHANG M, HUO BY, YUAN S, *et al.* Ultrasensitive detection of T-2 toxin in food based on bio-barcode and rolling circle amplification [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1043: 98–106.
- [39] PANG Y, GUO L, SHEN X, *et al.* Rolling circle amplified DNase followed with covalent organic frameworks: Cascade signal amplification of electrochemical ELISA for aflatoxin M1 sensing [J]. *Electrochim Acta*, 2020, 341: 136055.
- [40] 乔勤勤, 文芳, 郑楠, 等. 核酸适配体生物传感器在食品霉菌毒素检测中的应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(16): 294–303.

- QIAO QQ, WEN F, ZHENG N, *et al.* Research progress of nucleic acid aptamer biosensors on application of mycotoxin detection in food [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(16): 294–303.
- [41] 周洋洋, 钟建, 卞晓军, 等. 信号放大技术在食品安全检测领域的应用[J]. *化学进展*, 2018, 30(Z1): 206–224.
- ZHOU YY, ZHONG J, BIAN XJ, *et al.* Application of signal amplification technology in the area of food safety detection [J]. *Prog Chem*, 2018, 30(Z1): 206–224.
- [42] LIU XJ, SONG MM, HOU T, *et al.* Label-free homogeneous electroanalytical platform for pesticide detection based on Acetylcholinesterase-mediated DNA conformational switch integrated with rolling circle amplification [J]. *ACS Sens*, 2017, 2(4): 562–568.
- [43] HE LY, SHEN ZP, CAO YT, *et al.* A microfluidic chip based ratiometric aptasensor for antibiotic detection in foods using stir bar assisted sorptive extraction and rolling circle amplification [J]. *Analyst*, 2019, 144(8): 2755–2764.
- [44] HUANG Y, WANG C, HUO Q, *et al.* A time-resolved luminescence aptasensor of ofloxacin based on rolling circle amplification and magnetic separation [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(19): 4555–4563.
- [45] 周颖雪, 杨雅雅. 基于食品中重金属元素检测方法研究进展[J]. *现代食品*, 2019, (11): 3–5.
- ZHOU YX, YANG YY. Research progress in the detection of heavy metals in food [J]. *Mod Food*, 2019, (11): 3–5.
- [46] YANG DX, LIU XC, ZHOU YY, *et al.* Aptamer-based biosensors for detection of lead(ii) ion: A review [J]. *Anal Methods*, 2017, 9(13): 1976–1990.
- [47] CAI W, XIE SB, ZHANG J, *et al.* Immobilized-free miniaturized electrochemical sensing system for Pb(2+) detection based on dual Pb(2+)-DNAzyme assistant feedback amplification strategy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 117: 312–318.
- [48] PENG X, LIANG WB, WEN ZB, *et al.* Ultrasensitive fluorescent assay based on a rolling-circle-amplification-assisted multisite-strand-displacement-reaction signal-amplification strategy [J]. *Anal Chim*, 2018, 90(12): 7474–7479.
- [49] TANG DP, XIA BY, TANG Y, *et al.* Metal-ion-induced DNAzyme on magnetic beads for detection of lead(II) by using rolling circle amplification, glucose oxidase, and readout of pH changes [J]. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(5): 318.
- [50] LU W, LIN CQ, YANG J, *et al.* A DNAzyme assay coupled with effective magnetic separation and rolling circle amplification for detection of lead cations with a smartphone camera [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(21): 5383–5391.
- [51] 关桦楠, 薛悦, 刘博, 等. 基于 β -环糊精功能化金纳米粒子检测铅离子的研究[J]. *现代化工*, 2020, 40(10): 235–238.
- GUAN HN, XUE Y, LIU B, *et al.* Detection of lead ions based on β -cyclodextrin functionalized gold nanoparticles [J]. *Mod Chem Ind*, 2020, 40(10): 235–238
- [52] WU SJ, YU QR, HE CX, *et al.* Colorimetric aptasensor for the detection of mercury based on signal intensification by rolling circle amplification [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, 224: 117387.
- [53] LIM JW, KIM TY, CHOI SW, *et al.* 3D-printed rolling circle amplification chip for on-site colorimetric detection of inorganic mercury in drinking water [J]. *Food Chem*, 2019, 300: 125177.
- [54] KIM TY, LIM MC, WOO MA, *et al.* Radial flow assay using gold nanoparticles and rolling circle amplification to detect mercuric ions [J]. *Nanomater (Basel)*, 2018, 8(2): 81.
- [55] LIM JW, KIM TY, LIM MC, *et al.* Portable pumpless 3d-printed chip for on-site colorimetric screening of Hg²⁺ in Lake Water [J]. *Biochip J*, 2020, 14(12): 169–178.
- [56] 肖志友, 司恒丹, 邓兰清, 等. 基于G-四链体-氯化血红素DNA酶比色法测定银离子和汞离子传感器的构筑[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(7): 840–844.
- XIAO ZY, SI HD, DENG LQ, *et al.* Fabrication of a sensor for colorimetric determination of silver and mercury ions based on g-quadruplex-hemin dnazymes [J]. *J Instrum Anal*, 2019, 38(7): 840–844.
- [57] SHEN B, LI JB, CHENG W, *et al.* Electrochemical aptasensor for highly sensitive determination of cocaine using a supramolecular aptamer and rolling circle amplification [J]. *Mikrochim Acta*, 2014, 182(1–2): 361–367.
- [58] 孙亚军, 王亮, 蔡俊. 滚环扩增技术最新研究动态及展望[J]. *生物技术进展*, 2016, 6(2): 130–136.
- SUN YJ, WANG L, CAI J. Progress and prospects of rolling circle amplification [J]. *Curr Biotechnol*, 2016, 6(2): 130–136.
- [59] SHEN B, LI JB, CHENG W, *et al.* Universal identification of lethal Amanitas by using hyperbranched rolling circle amplification based on α -amanitin gene sequences [J]. *Food Chem*, 2019, 298: 125031.
- [60] WANG XM, TENG DA, GUAN QF, *et al.* Detection of genetically modified crops using multiplex asymmetric polymerase chain reaction and asymmetric hyperbranched rolling circle amplification coupled with reverse dot blot [J]. *Food Chem*, 2015, 173: 1022–1029.
- [61] XU L, LI D, JIANG B, *et al.* Melamine-mediated base mismatch for label-free and amplified sensitive fluorescent detection of melamine in milk [J]. *Food Anal Methods*, 2019, 12(5): 1255–1261.
- [62] HE ZM, LUO T, FAN FX, *et al.* Universal identification of lethal amanitas by using Hyperbranched rolling circle amplification based on alpha-amanitin gene sequences [J]. *Food Chem*, 2019, 298: 125031.
- [63] LI X, SONG J, XUE QW, *et al.* A label-free and sensitive fluorescent qualitative assay for bisphenol a based on rolling circle amplification /exonuclease iii-combined cascade amplification [J]. *Nanomater*, 2016, 6(10): 190.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



王冲, 硕士, 主要研究方向为食品安全与质量控制。
E-mail: 1462681590@qq.com



黄玉坤, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品营养与安全。
E-mail: hyk_diana@163.com