乳制品中功能性蛋白适配体传感器的构建及其 在检测中的应用

贺彦爽^{1,2},李腾飞^{1*},冯子如^{1,2},颜朦朦²,朱 超^{2*}

(1. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 邯郸 056038;2. 山东省农业科学院, 农业质量标准与检测技术研究所, 济南 250100)

摘 要: 乳制品中功能性蛋白包括乳铁蛋白、乳桥蛋白和 β-乳球蛋白等,具有抗微生物、抗菌和调节免疫系 统等生理功能;同时,β-乳球蛋白、α-乳清蛋白和酪蛋白等会引起部分人群发生过敏反应。因此,定量检测乳 制品中功能性蛋白对其品质评价至关重要。适配体传感器技术是一种高特异性、高灵敏度的快速检测方法,目 前研究者们通过多种筛选方法获得功能性蛋白的适配体,并构建了用于功能性蛋白检测的适配体传感器。本 文综述了近年来针对乳制品中功能性蛋白的适配体检测技术的研究进展,重点介绍了乳铁蛋白、乳桥蛋白、β-乳球蛋白、α-乳清蛋白和酪蛋白的适配体筛选技术及其适配体传感器的构建与应用,为进一步开发便捷、灵 敏、高效的生物传感器及分析方法提供参考。

关键词:适配体;乳制品;功能性蛋白;适配体传感器

Constructions and applications of aptasensors for functional proteins detection in dairy products

HE Yan-Shuang^{1,2}, LI Teng-Fei^{1*}, FENG Zi-Ru^{1,2}, YAN Meng-Meng², ZHU Chao^{2*}

(1. Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China; 2. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-products, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

ABSTRACT: Dairy products contain functional proteins, including lactoferrin, lactopontin, and β -lactoglobulin, that have various physiological functions such as antimicrobial, antibacterial, and immune system regulation. Notably, some individuals may experience allergic reactions to certain dairy proteins, such as β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and casein. Therefore, the quantitative detection of functional proteins in dairy products is essential for their quality evaluation. To achieve this, aptasensor technology has emerged as a rapid and highly specific method with superior sensitivity. Researchers have successfully obtained the aptamers of the functional proteins in dairy through various screening methods and utilized

*通信作者:李腾飞,博士,副教授,主要研究方向为食品安全检测与控制。E-mail: litengfei@hebeu.edu.cn

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2022QB207)、泰山学者计划资助项目(tsqnz20221157)、国家自然科学基金项目(32102088)、山东 省农业科学院科技创新项目(CXGC2021B14、CXGC2022E05、CXGC2023F05)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2022QB207), the Taishan Scholars Program (tsqnz20221157), the National Natural Science Foundation of China (32102088), and the Agricultural Sciencific and Technological Innovation Project of the Shandong Academy of Agricultural Sciences (CXGC2021B14, CXGC2022E05, CXGC2023F05)

朱 超,博士,副研究员,主要研究方向为核酸适配体筛选与食品质量安全。E-mail: ndytzhuchao@126.com

^{*}Corresponding author: LI Teng-Fei, Ph.D, Associate Professor, Hebei University of Engineering, No.19, Taiji Road, Congtai District, Handan 056038, China. E-mail: litengfei@hebeu.edu.cn

ZHU Chao, Ph.D, Associate Professor, Shandong Academy of Agricultural Sciences, No.202, North Gongye Road, Licheng District, Jinan 250100, China. E-mail: ndytzhuchao@126.com

them to construct aptasensors for the detection of these proteins. This paper provided a review of recent research progress on aptamer detection technology for functional proteins in dairy products. Specifically, this paper focused on the screening methods for aptamers targeting lactoferrin, lactoponin, β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and casein, as well as the construction and application of aptasensors. This review serves as a valuable reference for the continued development of convenient, sensitive, and efficient biosensors and analytical methods in this field.

KEY WORDS: aptamer; dairy product; functional protein; aptasensor

0 引 言

乳制品是人类饮食的重要组成部分,其中的蛋白种 类及含量是决定其品质的关键因素^[1]。乳桥蛋白、乳铁蛋 白、β-乳球蛋白、α-乳清蛋白和酪蛋白等功能性蛋白不仅 提供营养,同时在抗氧化、抗菌、免疫调节及肠道健康等 方面也发挥着重要作用^[2-7]。然而,β-乳球蛋白、α-乳清蛋 白和酪蛋白等可引起部分人群发生过敏反应,严重者可导 致过敏性休克甚至死亡,此外,乳桥蛋白、乳铁蛋白等天 然含量或添加量对于乳制品功效发挥具有重要作用^[8-10]。 LÖNNERDAL 等^[11]研究表明,添加乳桥蛋白的奶粉具有 调节婴儿免疫等功能。因此,开发乳制品中蛋白的定量分 析方法非常重要。

当前针对功能性蛋白的常规检测方法主要有凝胶电 泳法和液相-质谱串联法等,但其存在操作相对复杂、成本较 高及耗时较长等不足; 经典的快速检测方法酶联免疫法则受 抗体制备周期长、成本高的制约而无法大范围推广[12-14]。而 使用适配体作为识别元件不仅可特异性识别靶标, 协助传 感器对目标物的分析和检测还可弥补抗体在快速检测中的 成本问题,为检测功能性蛋白提供了新的思路^[15]。适配体 是通过指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)从随机文库中 筛选的单链寡核苷酸(ssDNA 或 RNA),具有稳定性高、易 修饰和成本低等优点^[16-17]。传统 SELEX 过程往往需要 10~20 轮筛选, 耗时较长, 且针对同一靶标使用不同筛选 方法获得的适配体在亲和力方面存在差异。研究者们在针 对乳制品中功能性蛋白适配体的筛选中,开发了多种筛选 方法并在筛选模式、周期和效率等方面展现出独到的优势, 为高性能适配体传感器的开发奠定了基础。目前已有针对 乳制品中蛋白检测的相关综述,但均侧重于总结传统检测 方向,缺少基于适配体检测方向的综合阐述。

本文综述了基于功能性蛋白适配体传感器的构建及 其在乳制品中应用的研究进展,从结构与功能、适配体筛 选和传感器构建与应用等 3 个方面进行总结,旨在形成一 个对乳制品功能性蛋白的适配体筛选及检测技术的全面认 识,从而促进其在乳制品中功能蛋白检测等领域的应用。

1 乳铁蛋白

1.1 结构与功能

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种功能性糖蛋白,含约

690 个氨基酸残基,分子量约 80 kDa,其生物活性包括促进 肠道发育、抗细菌以及抗肿瘤活性等^[18-19]。同时作为转铁 家族成员,还可调节人体铁离子平衡^[20]。LF 作为营养强化 剂被广泛添加到婴幼儿配方奶粉、发酵乳等乳制品中^[21]。 我国 GB 14880—2012《食品安全国家标准 食品营养强化剂 使用标准》规定婴幼儿配方奶粉中乳铁蛋白的最大允许使用 量为 100 mg/100 g。因此,对乳制品中 LF 的检测非常必要。

1.2 适配体筛选

利用微流体技术, LIU 等^[22]开发了蛋白质-微阵列的 微流控芯片 SELEX (protein microarray microfluidic-SELEX, PMM-SELEX)方法,通过光刻和湿式化学蚀刻技术制备微 流控通道,将LF固定在微流控通道中,"蛇形"通道使蛋白 以微阵列形式展现,从而具有高重复性和高通量,通过7轮 获得具有较高亲和力的 LF 适配体, 其平衡解离常数 (equilibrium dissociation constants, K_d)为(1.04±0.50) nmol/L_o 为提高筛选效率,同团队的YU等^[23]采用了一种相对静 态的相互作用形式,其中靶标和 ssDNA 不需要液体通 道,省略了微流控芯片的制备,采用微阵列 SELEX (Microarray-SELEX)方法, 经 6 轮获得 LF 适配体[K_d= (0.95±0.11) nmol/L]。为更快更方便监测每一轮筛选的富集 情况,该团队又开发了 AgFACS-SELEX (AgNP assisted FACS SELEX)方法^[24],无需预富集处理,减少了筛选轮 次。该方法将 LF 固定在聚苯乙烯微球(PS^{LF})表面, 先后通 过与文库(library, Lib)孵育,与Cy5修饰的十面体银纳米粒 子(Cy5 silver decahedral nanoparticles, AgNP^{Cy5})杂交形 成 PS^{LF}/Lib/AgNP^{Cy5} 缀合物。利用荧光激活细胞分选 (fluorescence activated cell sorting, FACS)技术从复杂的反应 体系中分离和收集缀合物,并在线监测亲和力,经过5轮筛 选,获得6条候选适配体序列,其K₄均在1~4.7 nmol/L范围 内。为解决靶标固定后的空间位阻效应, ZHU 等^[25]设计了一 种单步毛细管电泳(single-step capillary electrophoresis, ssCE)-SELEX, 该模式通过单次毛细管电泳过程完成混合、 孵育、反应、分离、检测和收集6个步骤,提升了筛选效率, 仅通过2轮获得具有高亲和力[K_d=(20.74±6.89) nmol/L]和特 异性的适配体。表1总结了 LF 适配体及其他功能性蛋白适 配体的筛选方法及其性能。

1.3 适配体传感器构建及其在 LF 检测中的应用

1.3.1 光学法

光学法可将分析物的生物识别信息转化为折射率、荧

光或颜色等光学信号^[32]。其中荧光法具有灵敏度高、无放射性及特异性强等特点^[33]。CHEN等^[34]开发了基于银十面体纳米粒子(Ag₁₀NPs)的荧光适配体传感器,用于奶粉中LF 检测。将两种LF 适配体分别与信号分子异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)和增强剂 Ag₁₀NPs 连接。两种适配体可经不同位点结合靶标,形成复合体,从而拉近 Ag₁₀NPs 与 FITC 的距离,使荧光信号增强,实现对奶粉中 LF 的检测,检出限为 1.25 pmol/L。该方法在检测过程中需使用两种不同结合位点的适配体,且均需对适配体进行修饰并测定荧光偏振信号,其操作烦琐、复杂,成本较高。这些不足之处会影响该方法在实际应用中的推广。LIU 等^[35]建立了一种基于结构选择性的 PicoGreen 染料嵌入

型自组装无标记适配体荧光传感器,其中适配体既是靶标的 特异性识别元件,又是与结构选择性染料结合的荧光信号报 告分子,通过荧光强弱实现定量检测。该方法对奶粉中 LF 进 行检测,检出限为3 nmol/L,线性范围为20~500 nmol/L,这 种自组装适配体传感器无需对适配体进行修饰或标记,避 免了修饰物质对适配体折叠过程的影响,同时该方法仅需 测定荧光信号,对检测仪器的要求低,为乳制品中 LF 的检 测提供了一种通用而简洁的策略。表 2 对功能性蛋白适配 体传感器的检测性能进行了总结。

1.3.2 电化学

电化学适配体传感器将适配体固定在电极表面,通 过引起电极上的电阻、电势或电流等变化,进而检测靶标-

脚蛋白	筛选方法	运 利(5/3)	亲和力	亲和力 K _d /	参考
邗里口		(1791(3-5))	测定方法	(nmol/L)	文献
LF	PMM-SELEX	CGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCTATACTAC	表面等离 子共振法	1.04±0.50	[22]
	Microarray-SELEX	ACGGGCTGATGCTCTCTTTATTTTACCTAAATAAAGTGTC	荧光法	0.95 ± 0.11	[23]
	AgFACS-SELEX	CGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCTATACTAC	荧光法	$2.2{\pm}0.22$	[24]
	ssCE-SELEX	TGGTGCTGCCCCTAGTCTCCGGCTGATAGCTGCTTCTTGG	CE 法	$20.74{\pm}6.89$	[25]
OPN	硝化纤维膜 -SELEX	CGGCCACAGAAUGAAUCAUCGAUGUUGCAUAGUUG	-	18±0.2	[26]
	硝化纤维膜 -SELEX	TGTGTGCGGCACTCCAGTCTGTTACGCCGC	荧光法	1.1	[27]
β-LG	磁珠-SELEX	TTTTTTTTCGACGATCGGACCGCAGTACCCACCAGC CCCAACATCATGCCCATCCGTGTGTG	荧光法	82.0±30 (β-LG-A) 80.0±26 (β-LG-B)	[28]
	Capture-SELEX AGCAGCACAGAGGTCAGATGTTCGGCCTTTGCGTTAACGA ACTTCTAGCTATGCGGCGTACCTATGCGTGCTACCGTGAA		荧光法	65.0±27.42	[29]
	Capture-SELEX	AGCAGCACAGAGGTCAGATGTCGTTTGTGGCTGTCAATTGG TGTGTTTACCTGTTTTGGCCTATGCGTGCTACCGTGAA	荧光法	65.85±15.16	[29]
α-La	Capture-SELEX	AGCAGCACAGAGGTCAGATGGTGCTGCGAA	荧光法	14.05 ± 4.15	[30]
Cas	核糖体展示	MTTCRFRCGBRPHAVCSW	荧光法	$5.5 \times 10^{3} \pm 1 \times 10^{3}$	[31]
		MTTCPQNANBDRGRACSW	荧光法	$23.5 \times 10^{3} \pm 10.1 \times 10^{3}$	[31]

Tabla 1	衣 I Antamer scree	我前面中怕大虫口的但能冲师起及住能
	表 1	到制品由相关蛋白的适配休筛选及性能

注:-表示无相关信息,下同。

表	ŧ 2	适配体	5传感器的	检测剤	表现	
Table 2	Det	ection	performan	ce of	aptasens	or

蛋白	方法类型	检出限	线性范围	检测的实际样品	参考文献
	荧光法	0.1 ng/mL	195 ng/mL~25 µg/mL	奶粉	[34]
LF	荧光法	3 nmol/L	20~500 nmol/L	奶粉	[35]
	电化学发光法	42 fg/mL	1×10 ⁻⁴ ~850 ng/mL	人工泪液	[36]
ODM	比色法	5 ng/mL	5~1000 ng/mL	血清	[37]
OPN	SERS-LFA	0.86 pg/mL	1 pg/mL~1 µg/mL	血清	[38]
	荧光法	0.05 ng/mL	10~5000 ng/mL	婴幼儿氨基酸配方粉	[29]
	比色法	50 nmol/L	32~500 nmol/L	牛奶、奶粉	[39]
	比色法	0.19 µg/mL	$1 \sim 4 \times 10^3 \ \mu g/mL$	牛奶、牛奶粉	[40]
β-LG	荧光法	1.32、2.41、13.99 mg/L	0.39~1000 mg/L	婴儿的配方奶粉、饼干和米粥	[41]
	SERS	0.07 ng/mL	10~1000 ng/mL	牛奶	[42]
	阻抗法	0.007 ng/mL	0.01~1000 ng/mL	婴儿食品配方奶粉	[43]
	电化学发光法	1.36 µg/L	1.36~4.55 μg/L	脱脂牛奶、燕麦饮品	[44]
α-La	比色法	3.32 ng/mL	5~4000 ng/mL		[20]
	荧光法	0.71 ng/mL		4.93	[30]
Cas1	荧光法	0.04 µmol/L	-	牛奶	[31]

适配体结合情况,电化学适配体传感器具有灵敏度高、特异 性强和检测时间短等优点^[45]。但存在重复性不好和易受物 质干扰等局限性^[46]。LU等^[36]建立了一种比率电化学发光共 振能量转移(ratiometric electrochemiluminescence resonance energy transfer, ECL-RET)平台,该 ECL-RET 平台由适配 体修饰的氟硼二吡咯(fluoroboron dipyrrole, BODIPY)复合 材料和经磷酸盐缓冲溶液反复洗涤的富勒烯(C₆₀)组成,其 中 BODIPY 衍生物是电化学发光的探针,可与过硫酸钾产 生显著的共振能量转移。其对 LF 的检测线性范围为 $1 \times 10^{-4} \sim 850$ ng/mL,检出限为 42 fg/mL。比率传感器和电化 学发光系统相结合可通过双信号自校准过程消除背景信号 和异常变化信号,最大程度地避免假阳性结果。

目前针对乳铁蛋白的适配体传感技术中,报道的电化 学检测比光学检测具有更宽的线性检测范围和更低的检出 限,但稳定性相对较差。而光学检测在成本和操作上具有一 定优势,因此要根据实际需求来选择合适的检测技术。

2 乳桥蛋白

2.1 结构与功能

乳桥蛋白(lactopontin, LPN),又称乳源性骨桥蛋白 (osteopontin, OPN),是一种来源于乳汁的高度磷酸化的 O-糖 蛋白,具有谷氨酸-甘氨酸-天冬氨酸的特殊结构序列,该序 列具有促进细胞黏附蛋白质的特殊功能^[47]。研究表明, LPN 的合理添加对婴儿早期生命发育中免疫调节、肠道发育、 神经系统发育等具有促进作用^[48-49]。因此,开发婴幼儿配方 食品中的 LPN 检测技术具有重要意义。

2.2 适配体的筛选

MI 等^[26]首次通过硝化纤维膜 SELEX 获得 OPN 的 RNA 适配体(OPN-R3), OPN 与文库孵育后, 经硝化纤维膜 抽滤, 靶标-核酸复合物截留在膜上。硝化纤维膜碎化 后, 经苯酚-氯仿回收 RNA, 经 8 轮筛选获得 OPN-R3 [*K*_d=(18±0.2) nmol/L]。但硝化纤维素膜可对一些游离的核 苷酸产生吸附作用, 从而导致筛选适配体存在亲和力、特 异性低等问题。MEIRINHO 等^[27]通过靶标固定型 SELEX, 将 OPN 和硅藻土固定后与文库孵育, 通过离心去除未结 合序列。10 轮筛选后获得 19 条候选适配体序列, 经软件 分析适配体二级结构, 选择低吉布斯自由能和稳定二级结 构的序列 C10K2 (*K*_d=1.1 nmol/L)。

目前乳桥蛋白适配体筛选研究相对较少主要面向医 学领域。随着乳桥蛋白在生命早期的作用被逐渐重视,近 期已颁布基于高效液相色谱的相关检测标准(T/TDSTIA 028-2022),因此,针对乳桥蛋白进行高性能适配体筛选并 开发快速定量分析方法将具有较好发展前景。

2.3 适配体传感器构建及其在 OPN 检测中的应用

已报道 OPN 适配体的检测方法,如比色法、表面增强拉曼光谱法(surface enhancement of Raman scattering, SERS)等。比色法是一种通过颜色及吸光度变化检测目标的方法。基于比色法的适配体传感器可无需复杂仪器进行快速

现场诊断。然而,比色适配体传感器也存在颜色变化易受复 杂样品基质干扰等不足^[50]。而 SERS 是一种能够反映分子特 征结构的分子振动光谱的方法,具有指纹信息丰富、响应速 度快、稳定性强等优点,从而被用于食品检测^[51]。

PEREIRA 等^[37]将纤维素纸进行化学改性,并结合巯 基化适配体,通过傅里叶变换红外光谱和热重分析检查表 面改性,实现对血清中 OPN 的检测,检出限为 5 ng/mL, 线性范围为 5~1000 ng/mL (r>0.998)。LI 等^[38]设计了一种 基于 SERS 和侧向流动测定(lateral flow assay, LFA)的适配 体传感器。检测过程中,适配体修饰的氧化亚铜纳米立方体 (Cu₂O NCs)识别并捕获 OPN, Cu₂O NCs 大量聚集形成的"热 点"并显著增强 SERS 信号。15 min 内即可实现血清中 OPN 检测,检出限为 0.86 pg/mL。目前对于 OPN 检测主要集中 于医学领域,且检测样本为全血、血清及血浆,未见有以人 乳、牛乳及其乳制品为样本的适配体检测方法的相关文献研 究。乳制品与血样品的环境构成不同,会存在基质效应,因 此这些基于血样品的 OPN 方法不能直接应用于乳制品中, 所以对乳制品中的 OPN 检测方法的开发十分有必要。

3 β-乳球蛋白

3.1 结构与功能

β-乳球蛋白(β-lactoglobulin, β-LG), 是一种球状蛋白 质,约占乳清蛋白含量的 20%,分子量约为 18.4 kDa^[52]。 β-LG 具有多个结合位点,可促进脂溶性维生素、脂肪酸及 多酚类等生物活性物质在体内的转运效率^[53]。但 β-LG 是 牛奶中的主要过敏原,占牛奶总蛋白的 10%^[54]。研究表明, 82%的牛乳过敏患者对 β-LG 过敏^[55]。因此,乳制品中 β-LG 的检测非常重要。

3.2 适配体的筛选

EISSA 等^[28]使用磁珠-SELEX 法经 10 轮筛选获得 β-LG 的适配体 BLG14,其对 β-LG A 和 B 蛋白变体的亲和 力分别为 82 nmol/L 和 80 nmol/L。但该方法需要将靶标固 定在介质上,导致靶标暴露位点减少从而影响筛选。而 Capture-SELEX 是将 DNA 文库而不是靶标固定在固相介 质上,能够针对无法固定的小分子靶标的适配体筛选,保 持了靶标的原始结构。QI 等^[29]使用 Capture-SELEX, 经 13 轮筛选获得 10 条候选适配体序列, 通过等温滴定热量法 分析确定5条候选适配体序列(Lg-9、Lg-16、Lg-18、Lg-19 和 Lg-30), 并经荧光法分析选择了一条 β-LG 的高亲和力 适配体 Lg-18 [K_d=(65.00±27.42) nmol/L]。目前关于 β-LG 适 配体的筛选方法,无论是固定靶标还是固定文库都存在着一 些局限性,固定的操作、效率都难以控制,以及洗脱时会降低 筛选效率、增加筛选轮次等问题。因此,采用更加高效快的 筛选方法, 如: PMM-SELEX、ssCE-SELEX 和 FACS-SELEX 等方法,从而获得高特异性、高亲和力的适配体。

3.3 适配体传感器构建及其在 β-LG 检测中的应用

3.3.1 光学法

ZHONG 等^[39]通过试纸条实现对 β-LG 的定量检

测。该方法将人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hGG)与适配体(aptamer, apt)结合(hCG-apt)作 为探针并通过 π-π 作用吸附在磁性氧化石墨烯(Fe₃O₄@GO) 上。hCG-apt 与 β-LG 特异性结合时,构象改变导致其从 Fe₃O₄@GO表面脱落,随后用试纸条测定溶液中hCG-apt/B-LG 复合物,完成定量检测。该方法检出限为 50 nmol/L,检测范 围为 32~500 nmol/L。虽然该方法的灵敏度与其他生物传感器 具有一定不足,但其简单的设计和通用性的检测模式在多目 标检测中有良好的应用前景。WANG 等^[40]通过适配体剪裁, 将适配体 β-LG23 从不灵活的反平行拓扑结构转变为灵活的 反平行/平行混合拓扑结构。该结构不仅可通过反平行构象与 β-LG 结合, 还可通过平行构象输出信号。从而构建了一种无 标记、无酶、双功能的适配体传感器用于 β-LG 检测, 检出 限为 0.19 µg/mL, 检测范围为 1~4×10³ µg/mL, 检测时间为 40 min。以上两种方法都是通过改变适配体构象, 扩展了 适配体的功能并提高了亲和力,表明优化适配体序列与结 构对提高其检测性能具有重要意义。

YANG 等^[41]基于量子点-适配体-氧化石墨烯(quantum dot-aptamer-graphene oxide, QD-Apt-GO)的荧光猝灭原理,开发了纸质传感器与手机软件相结合的方法。在 β-LG 存在下, β-LG 与 QD-Apt 特异性结合,形成 QD-Apt-β-LG 复合物导致 荧光信号增加,混合溶液中 QD-Apt 和 QD-Apt-β-LG 形成可见 荧光咖啡环。通过手机软件分析荧光咖啡环的大小进行定量, 实现对婴儿的配方奶粉、饼干和米粥中的 β-LG 检测,检出限 分别为 1.32、2.41 和 13.99 mg/L,线性范围为 0.39~1000 mg/L。 虽然该方法简单、经济和易于操作,但在纸张制作过程少添加 一些荧光剂,可能会降低对结果产生的影响。

DUAN 等^[42]设计了一种适配体修饰的双金属 Au-Ag 纳米 微球为捕获底物的 SERS 方法。该方法将拉曼报告分子 (6-carboxyl-X-rhodamine, ROX)标记的 cDNA 与适配体杂交, 形 成 SERS 纳米探针,由于适配体与 β-LG 的相互作用导致 ROX-cDNAs从 SERS 探针上解离,进而产生了 SERS 信号的变 化,该方法检出限为 0.07 ng/mL,检测范围为 10~1000 ng/mL。 为了同时检测到荧光和拉曼信号,并获得更宽的线性检测 范围, QI 等^[29]利用具有发夹结构的分子信标(molecule beacon, MB)和核酸外切酶(Exo III)的酶切循环放大技术建 立了一种荧光-SERS 双模式传感器用于 β -LG 的检测。识别 元件由适配体 Lg-18 与触发探针(trigger probe, TB)杂交形 成。β-LG存在时, TB将与Lg-18分离并与MB形成双链从 而恢复荧光,同时在 Exo III 酶切作用下, TB 被释放并与其 他 MB 杂交。上述反应后,产生 5′末端标记有 ROX 的单链 信号片段(signal fragment, SF), 并循环放大荧光强度实现荧 光检测,同时通过 SERS 基底 Fe₃O₄@Au 捕获 SF 使拉曼信 号被显著增强。其检出限为 0.05 ng/mL, 具有更宽的线性范 围(10~5000 ng/mL), 实现对婴幼儿氨基酸配方粉中的高信 噪比检测。虽然方法可同时使用荧光与 SERS 两种途径作为 检测方法,但所需材料制备过程复杂和操作烦琐,因此要根 据实际需求来选择合适的检测方法。

3.3.2 电化学法

XU等^[43]首次将花状钒酸铋(BiVO₄)微球用于 β-LG 检 测。该方法将捕获探针修饰电极上并与适配体结合,当存 在β-LG 时,适配体从捕获探针上脱落与β-LG 结合,BiVO₄ 修饰的检测探针与捕获探针结合,造成电化学信号改变。 同时由于 BiVO₄具有类似过氧化物酶活性,可放大电化学 信号,实现对婴幼儿配方食品中β-LG 的高灵敏检测,检测 范围为 0.01~1000 ng/mL,检出限为 0.007 ng/mL。虽然该 方法操作复杂,但采用 DNA 双链探针能有效降低背景值, 从而提高了检测灵敏度。ROSSELLA 等^[44]开发了一种电化 学发光的夹心检测法,该法将适配体 1 沉积在一次性石墨 丝网印刷电极上,再加入含有靶标的样品溶液,随后将生 物素修饰的适配体 2 加入体系并孵育,形成适配体-β-LG-适配体的三明治结构。经与链霉亲和素标记的辣根过氧化 物酶连接后,进行鲁米诺底物测量,其检出限为 1.36 μg/L, 定量限为 4.55 μg/L。

相比于结合比色、荧光和电化学的检测方法,适配体 与 SERS 技术结合检测 β-LG 具有更低的检出限。但目前 基于 β-LG 适配体结合 SERS 的检测方法相对较少,这主要 由于以往 SERS 检测需要大型仪器不易携带且成本较高。 而随着手持型、便携式的 SERS 设备逐渐受到认可并开始 应用, SERS 与适配体结合检测技术将会在高灵敏的基础 上进一步拓宽其应用能力。

4 其他蛋白

α-乳清蛋白(α-lactalbumin, α-La)是一种由 123 个氨基 酸残基组成的单体球状蛋白,分子量为 14.4 kDa,含有 4 个 二硫键^[56]。α-La 富含色氨酸,具有调节睡眠、缓解焦虑等功 能^[57]。但 α-La 存在大量表位会选择性结合 IgE,从而产生致 敏潜力^[58]。LIU 等^[30]首次通过 Capture-SELEX,经过 15 轮 筛选获得 LA-1t 适配体,其 K_d 为(14.05±4.15) mol/L。该方法 首先将荧光标记(fluorescence, FAM)的适配体固定在氮化硼 量子点锚定多孔 CeO₂纳米棒(BNQDs/CeO₂)上,FAM 由于与 CeO₂的荧光共振能量转移而被猝灭。当 α-La 存在时,LA-1t 与其结合并从 BNQDs/CeO₂ 解离,导致颜色信号下降和荧 光恢复,形成比色与荧光的双检测模式。实现在牛奶中 α-La 的检测,检出限分别为 3.32 ng/mL 和 0.71 ng/mL,检测范围 为 5~4000 ng/mL。

酪蛋白属于一大类钙结合磷蛋白,由 *a*_{s1}-、*a*_{s2}-、β-和 κ-4 种类型组成^[59]。酪蛋白能够被蛋白酶分解为多种小分 子生物活性肽,具有抗癌、抗氧化和降低胆固醇等功能^[60]。 但据调查显示约 65%的人对酪蛋白过敏,原因与α-La类似, 酪蛋白也存在大量表位选择性结合 IgE,从而产生致敏潜 力^[61-62]。PHADKE 等^[31]通过核糖体展示技术选择了两种荧 光肽适配体。当酪蛋白与聚乙二醇修饰的荧光肽适配体结 合时会形成疏水的微环境,利用荧光团 7-硝基苯并呋喃在 疏水环境产生荧光,亲水环境下荧光猝灭的现象从而实现 对牛奶中酪蛋白的检测,该方法检出限为 0.04 μmol/L,检 测时间为 20~25 s。

5 结束语

本文总结了近年来适配体传感器用于检测乳制品中乳 桥蛋白、乳铁蛋白和 β-乳球蛋白等功能性蛋白研究进展。 在筛选方面, 研究者通过 PMM-SELEX、ssCE-SELEX 和磁 珠-SELEX 等方法筛选功能性蛋白适配体,并在筛选周期、 特异性以及实时监测等方面进行了改善。在实际样品检测方 面,研究者将适配体传感器与光学和电化学等技术结合,建 立了诸多高灵敏、高特异性的检测方法。但目前适配体传感 器方法仍存在挑战: (1)适配体与其目标分子特异性识别的 精确结合位点以及构象变化机制不是十分清楚,相应适配 体亲和力的稳定性有待继续研究。(2)样本基质效应大,目前 适配体的筛选大多使用缓冲液体系,与实际检测环境相差 较大,部分筛选适配体在实际样品基质中不灵敏[63]。如何使 适配体传感器具有更强的抗基质干扰效应,直接在样品环 境中检测是适配体传感器更加贴近实际应用的挑战之一。(3) 目前仍缺乏特异性识别功能性蛋白的适配体,且筛选模式 单一,为了提高筛洗适配体效率,优化 SELEX 筛洗程序或 结合新型筛洗方法(如 FACS-SELEX、CE-SELEX 和微阵列 -SELEX 等),从而获得稳定性好、亲和力高的功能性蛋白特 异性适配体。未来应致力于针对多种功能性蛋白适配体同时 测定的传感方法应用开发,满足其现场实地检测的实际需 求。此外,构建高灵敏传感方法及体系、研发小型多重便携 式快检设备将是功能性蛋白适配体检测的发展趋势。

参考文献

- TIMON C M, O'CONNOR A, BHARGAVA N, et al. Dairy consumption and metabolic health [J]. Nutrients, 2020, 12(10): 3040.
- [2] SHINI VS, UDAYARAJAN CT, NISHA P. A comprehensive review on lactoferrin: A natural multifunctional glycoprotein [J]. Food Funct, 2022, 13(23): 11954–11972.
- [3] ICER MA, GEZMEN-KARADAG M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin [J]. Clin Biochem, 2018, 59: 17–24.
- [4] JIA Q, WANG Y, ZHU J, et al. A literature review on lactopontin and its roles in early life [J]. Transl Pediatr, 2021, 10(7): 1924.
- [5] THAMPY A, PALANI-KUMAR MK, SERVA-PEDDHA M, et al. The effectiveness of whey proteins in prevention and treatment of cancer: A review [J]. Crit Rev Food Sci, 2022, 15: 1–17.
- [6] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, RECIO I, AMIGO L. β-lactoglobulin as source of bioactive peptides [J]. Amino Acids, 2008, 35: 257–265.
- [7] CASANOVA F, NASCIMENTO LGL, SILVA NFN, et al. Interactions between caseins and food-derived bioactive molecules: A review [J]. Food Chem, 2021, 359: 129820.
- [8] DEKKER PM, BOEREN S, WIJGA AH, et al. Maternal allergy and the presence of nonhuman proteinaceous molecules in human milk [J]. Nutrients, 2020, 12(4): 1169.
- [9] GIANNETTI A, TOSCHI-VESPASIANI G, RICCI G, et al. Cow's milk protein allergy as a model of food allergies [J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1525.
- [10] 燕燕, 董亚平, 龙彩云, 等. 牛乳过敏原β-乳球蛋白核酸适配体在食品 检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(18): 5831–5841. YAN Y, DONG YP, LONG CY, et al. Application of milk allergen β-lactoglobulin aptamer in food detection [J]. J Food Saf Qual, 2022,

13(18): 5831-5841.

- [11] LÖNNERDAL B, KVISTGAARD AS, PEERSON JM, et al. Growth, nutrition, and cytokine response of breast-fed infants and infants fed formula with added bovine osteopontin [J]. J Pediatr Gastr Nutr, 2016, 62(4): 650–657.
- [12] IMPERIALE S, MOROZOVA K, FERRENTINO G, et al. Analysis of milk with liquid chromatography–mass spectrometry: A review [J]. Eur Food Res Technol, 2023. DOI: 10.1007/s00217-022-04197-3
- [13] MOHAMED HG, AL-GHOBASHY MA, FOUAD MA, et al. Quality assessment of lactoferrin in some marketed nutraceuticals derived from milk using validated analytical methods [J]. ChemistrySelect, 2020, 5(46): 14816–14825.
- [14] CHEN PW, MAO FC. Detection of lactoferrin in bovine and goat milk by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Food Drug Anal, 2004, 12(2): 9.
- [15] SHABAN SM, KIM DH. Recent advances in aptamer sensors [J]. Sensors, 2021, 21(3): 979.
- [16] 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.
- [17] DARMOSTUK M, RIMPELOVA S, GBELCOVA H, et al. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology [J]. Biotechnol Adv, 2015, 33(6): 1141–1161.
- [18] HAO L, SHAN Q, WEI J, et al. Lactoferrin: Major physiological functions and applications [J]. Curr Protein and Pept Sc, 2019, 20(2): 139–144.
- [19] ZHANG Y, LU C, ZHANG J. Lactoferrin and its detection methods: A review [J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2492.
- [20] LI W, LIU B, LIN Y, et al. The application of lactoferrin in infant formula: The past, present and future [J]. Crit Rev Food Sci, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2022.2157792
- [21] BAKER EN, BAKER HM. Lactoferrin: Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62: 2531–2539.
- [22] LIU X, LI H, JIA W, et al. Selection of aptamers based on a protein microarray integrated with a microfluidic chip [J]. Lab Chip, 2017, 17(1): 178–185.
- [23] YU F, LI H, SUN W, et al. Rapid selection of aptamers based on protein microarray [J]. RSC Adv, 2019, 9(17): 9762–9768.
- [24] YU F, LI H, SUN W, et al. Selection of aptamers against lactoferrin based on silver enhanced and fluorescence-activated cell sorting [J]. Talanta, 2019, 193: 110–117.
- [25] ZHU C, LI L, YANG G, et al. High-efficiency selection of aptamers for bovine lactoferrin by capillary electrophoresis and its aptasensor application in milk powder [J]. Talanta, 2019, 205: 120088.
- [26] MI Z, GUO H, RUSSELL MB, et al. RNA aptamer blockade of osteopontin inhibits growth and metastasis of MDA-MB231 breast cancer cells [J]. Mol Ther, 2009, 17(1): 153–161.
- [27] MEIRINHO SG, DIAS LG, PERES AM, et al. Electrochemical aptasensor for human osteopontin detection using a DNA aptamer selected by SELEX [J]. Anal Chim Acta, 2017, 987: 25–37.
- [28] EISSA S, ZOUROB M. In vitro selection of DNA aptamers targeting β-lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 91: 169–174.
- [29] QI S, DUAN N, SUN Y, *et al.* High-affinity aptamer of allergen β-lactoglobulin: Selection, recognition mechanism and application [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2021, 340: 129956.
- [30] LIU R, ZHANG F, SHI M, et al. In vitro selection and optimization of high-affinity aptamer for milk allergen α-lactalbumin and its application in dual-mode detection [J]. Front Nutr, 2022, 9: 1005230.
- [31] PHADKE C, TADA S, KONO I, et al. Instantaneous detection of α s-casein in cow's milk using fluorogenic peptide aptamers [J]. Anal

Methods-UK, 2020, 12(10): 1368-1373.

- [32] NEHRA M, LETTIERI M, DILBAGHI N, et al. Nano-biosensing platforms for detection of cow's milk allergens: An overview [J]. Sensors, 2019, 20(1): 32.
- [33] XIE M, ZHAO F, ZHANG Y, et al. Recent advances in aptamer-based optical and electrochemical biosensors for detection of pesticides and veterinary drugs [J]. Food Control, 2022, 131: 108399.
- [34] CHEN Z, LI H, JIA W, et al. Bivalent aptasensor based on silver-enhanced fluorescence polarization for rapid detection of lactoferrin in milk [J]. Anal Chem, 2017, 89(11): 5900–5908.
- [35] LIU J, LI T, QIN H, et al. Self-assembly and label-free fluorescent aptasensor based on deoxyribonucleic acid intercalated dyes for detecting lactoferrin in milk powder [J]. Front Nutr, 2022, 9: 992188.
- [36] LU Y, KE H, WANG Y, et al. A ratiometric electrochemiluminescence resonance energy transfer platform based on novel dye BODIPY derivatives for sensitive detection of lactoferrin [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 170: 112664.
- [37] PEREIRA AC, MOREIRA FTC, RODRIGUES LR, et al. based aptasensor for colorimetric detection of osteopontin [J]. Anal Chim Acta, 2022, 1198: 339557.
- [38] LI Z, GU Y, GE S, et al. An aptamer-based SERS–LFA biosensor with multiple channels for the ultrasensitive simultaneous detection of serum VEGF and osteopontin in cervical cancer patients [J]. New J Chem, 2022, 43: 20629–20642.
- [39] ZHONG ZT, WANG HB, ZHANG T, et al. Quantitative analysis of various targets based on aptamer and functionalized Fe₃O₄@ graphene oxide in dairy products using pregnancy test strip and smartphone [J]. Food Chem, 2021, 352: 129330.
- [40] WANG X, CHU H, XU X, et al. Rapid label-free colorimetric dual-functional aptasensor for β-lactoglobulin detection based on a rational tailoring strategy [J]. Biosens Bioelectron, 2022, 208: 114223.
- [41] YANG J, ZHANG Y, WU L, et al. A coffee-ring effect-based paper sensor chip for the determination of beta-lactoglobulin in foods via a smartphone [J]. Sens Actuators B-Chem, 2023, 374: 132807.
- [42] DUAN N, YAO T, LI C, *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy relying on bimetallic Au–Ag nanourchins for the detection of the food allergen β-lactoglobulin [J]. Talanta, 2022, 245: 123445.
- [43] XU S, DAI B, ZHAO W, et al. Electrochemical detection of β-lactoglobulin based on a highly selective DNA aptamer and flower-like Au@BiVO₄ microspheres [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1120: 1–10.
- [44] ROSSELLA S, IVAN Z, NICOLÒ D, et al. A portable electrochemiluminescence aptasensor for β-lactoglobulin detection [J]. Anal Bioanal Chem, 2022, 414: 7935–7941.
- [45] LI Z, MOHAMED MA, VINU-MOHAN AM, et al. Application of electrochemical aptasensors toward clinical diagnostics, food, and environmental monitoring [J]. Sensors, 2019, 19(24): 5435.
- [46] HONG L, PAN M, XIE X, et al. Aptamer-based fluorescent biosensor for the rapid and sensitive detection of allergens in food matrices [J]. Foods, 2021, 10(11): 2598.
- [47] ZHU J, YU X, WANG Y, et al. Longitudinal changes of lactopontin (milk osteopontin) in term and preterm human milk [J]. Front Nutr, 2022, 9: 962806.
- [48] JIANG R, LÖNNERDAL B. Osteopontin in human milk and infant formula affects infant plasma osteopontin concentrations [J]. Pediatr Res, 2019, 85: 502–505.
- [49] JIANG R, LÖNNERDAL B. Effects of milk osteopontin on intestine, neurodevelopment, and immunity [J]. Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 2020, 94: 152–157.
- [50] YUE F, LI F, KONG Q, et al. Recent advances in aptamer-based sensors for aminoglycoside antibiotics detection and their applications [J]. Sci

Total Environ, 2021, 762: 143129.

- [51] YAN M, LI H, LI M, et al. Advances in surface-enhanced Raman scattering-based aptasensors for food safety detection [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(47): 14049–14064.
- [52] WU X, LU Y, XU H, *et al.* Reducing the allergenic capacity of β-lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols [J]. Food Chem, 2018, 256: 427–434.
- [53] YANG MC, GUAN HH, LIU MY, *et al.* Crystal structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk β-lacto globulin [J]. Proteins, 2008, 71(3): 1197–1210.
- [54] WANG B, HONG J, LIU C, et al. An electrochemical molecularly imprinted polymer sensor for rapid β-lactoglobulin detection [J]. Sensors, 2021, 21(24): 8240.
- [55] YANG W, CHEN H, SHU GW, et al. Function and application of bioactivesubstances in dairy products [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2014.
- [56] WANG X, TU Z, YE Y, *et al.* Isolation and allergenicity evaluation of glycated α-lactalbumin digestive products and identification of allergenic peptides [J]. Food Chem, 2022, 390: 133185.
- [57] LAYMAN DK, LÖNNERDAL B, FERNSTROM JD. Applications for α-lactalbumin in human nutrition [J]. Nutr Rev, 2018, 76(6): 444–460.
- [58] MATSUO H, YOKOOJI T, TAOGOSHI T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes [J]. Allergol Int. 2015, 64: 332–343.
- [59] HAN T, WANG M, WANG Y, et al. Effects of high-pressure homogenization and ultrasonic treatment on the structure and characteristics of casein [J]. LWT, 2020, 130: 109560.
- [60] HOLT C. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species [J]. Int Dairy J, 2016, 60: 2–13.
- [61] XU N, WANG Y, PAN L, et al. Dual-labelled immunoassay with goldmag nanoparticles and quantum dots for quantification of casein in milk [J]. Food Agric Immunol, 2017, 28(6): 1105–1115.
- [62] YANG F, MA X, HU W, et al. Identification of immunoglobulin E epitopes on major allergens from dairy products after digestion and transportation *in vitro* [J]. J Dairy Sci, 2022, 105(12): 9476–9487.
- [63] DING Y, GAO Z, LI H. Real milk sample assisted selection of specific aptamer towards sarafloxacin and its application in establishment of an effective aptasensor [J]. Sens Actuators B-Chem, 2021, 343: 130113.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



贺彦爽,硕士研究生,主要研究方向 为食品安全检测。 E-mail: heyanshuang927@163.com



李腾飞,博士,副教授,主要研究方向 为食品安全检测与控制。 E-mail:litengfei@hebeu.edu.cn



朱 超,博士,副研究员,主要研究方 向为核酸适配体筛选与食品质量安全。 E-mail:ndytzhuchao@126.com