

Research Progress of Biosensor in Food Analysis Based on Aptamer

Ping Jin*, Ying Chen, Hongliu Ding

Suzhou Products Quality Supervision and Inspection Institute, Suzhou Jiangsu
Email: 846493521@qq.com

Received: Dec. 26th, 2018; accepted: Jan. 8th, 2019; published: Jan. 15th, 2019

Abstract

In recent years, biosensors have been rapidly developed and widely used. Aptamers of nucleic acid are described as “chemical antibodies”, but they have higher chemical stability and can replace antibodies as a new signal recognition unit. Biosensors based on aptamers of nucleic acid have made good progress in the field of food analysis. This paper reviews its application in detection of mycotoxins, pathogenic microorganisms and metallica.

Keywords

Aptamer, Biosensor, Food Analysis, Mycotoxin, Pathogenic Microorganisms, Metallica

基于核酸适配体技术生物传感器在食品分析领域中的研究进展

金萍*, 陈英, 丁洪流

苏州市产品质量监督检验院, 江苏 苏州
Email: 846493521@qq.com

收稿日期: 2018年12月26日; 录用日期: 2019年1月8日; 发布日期: 2019年1月15日

摘要

近年来, 生物传感器获得迅速发展和广泛应用。核酸适配体被形容为“化学抗体”, 但拥有更高的化学稳定性, 可取代抗体作为新型信号识别单元, 基于核酸适配体技术的生物传感器在食品分析领域取得了不错的研究进展。本文综述其在真菌毒素、病原微生物以及重金属检测方面的应用。

*第一作者。

关键词

核酸适配体, 生物传感器, 食品分析, 真菌毒素, 病原微生物, 重金属

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

“民以食为天”，但世界上每年有近十分之一的人因为食用受污染的食物而生病甚至死亡，每年死亡人数多达 42 万[1]，因此“食以安为先”，食品安全是一个全球性的社会问题。近年来，中国的食品质量和安全问题越来越得到人们的关注，对食品的安全生产和检测技术提出了新的挑战。有些地区的检测资源(如仪器和设备)稀缺，对一些致病原不能准确及时发现，进而导致严重的食品安全事件，可见食品安全也是一个技术问题。食品安全快检技术一直是研究热点，而核酸适配体与生物传感器技术相结合，使食品安全快检技术开始了新的发展。

2. 传统的食品安全检测技术

食源性致病原包括生物病原体(如病毒、细菌、寄生虫等)、真菌毒素、有机化学污染物、重金属等[2]。依靠大型仪器，主要有高效液相色谱[3]、气相色谱[4]、质谱[5]、原子发射光谱[6] [7]等。这类仪器检测方法是目前食品安全检测的主流，具有检测数据准确、重现性好以及多物质同时检测等优势，但也存在弊端，如仪器、耗材以及维护费用昂贵，同时仪器法对操作人员技术要求较高，不适用现场快速检测。

3. 生物传感器检测技术

近年来，生物传感器的研究得到了迅速的发展，并在各领域实施应用。生物传感器(Biosensor)是生物元件(包括酶、抗体等)作为主要的功能元件感知特定的目标物质，并将这种感知转化为一种或多种按一定规则识别信号的装置[8]。生物传感器主要包括两部分：信号识别单元和信号转换单元。识别单元一般对测试对象具有较高的特异性和较强的亲和力，如酶、抗体等。信号转换单元将识别、结合等相互作用转化为各种物理和化学信号，如荧光、颜色、电化学信号等[9]。酶联免疫分析(ELISA)就是一个经典的传感器，以抗体作为识别单元，特异性结合目标物，可靠性高，检测过程相对简单，目前在食品检测领域应用广泛，如黄曲霉毒素 B1 的 ELISA 检测试剂盒。基于酶、抗体这些原件的生物传感器制备时间长，成本高，化学性质不够稳定，检测中还需要昂贵的化学修饰和标记，灵敏度也有待提高[10] [11]。

4. 基于核酸适配体的生物传感技术

核酸适配体(Aptamer)是一类具有特异性识别功能的单链 DNA 或者 RNA 核酸分子，其作用本质是核酸分子折叠形成特定三维结构而与目标分子高亲和力和高特异性结合，与单克隆抗体的亲和力和特异性相当，被形容为“化学抗体”。几乎所有涉及抗体的应用都可以被寡核苷酸适配体取代，核酸适配体的出现，生物传感器开始发展[12]。与传统抗体相比，该适配体具有以下显著优点[13] [14]：可在体外进行筛选，可通过化学合成制备、改造与标记，化学稳定性好，不易受 pH、温度等环境因素影响而变性等。鉴于这些优点，使其可以替代抗体作为新一代生物传感器的生物元件。目前，适

配体已与纳米技术、比色法、电化学方法、表面等离子体共振、色谱等多种技术相结合,快速检测食源性致病菌、真菌、农药残留、重金属等,对食品安全领域的研究具有重要意义。

4.1. 核酸适配体在真菌毒素检测方面的应用

根据联合国粮食及农业组织(FAO)的数据,世界上大约 25%的农作物受到真菌毒素的污染。在食品卫生污染因素中,黄曲霉毒素对人和动物肝脏组织的严重损害毒性居首位,被世界卫生组织(WHO)癌症研究所列为 I 类致癌物[15]。真菌毒素的快速检测方法主要是基于抗体的 ELISA 分析法。核酸适配体作为“化学抗体”在真菌毒素检测中也得到了广泛的关注。

顾灿灿等[16]提出了一种检测黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)的非标记均匀电化学方法,该方法根据长链 DNA 和短链 DNA 在 ITO 电极表面的扩散特性不同,结合外切酶在信号转换系统中的特性,不仅可以产生敏感的电化学信号,而且可以实现对毒素的高选择性检测。栾云霞[17]等人基于未标记的 AFB₁ 特异性结合适配体,利用纳米金在盐诱导下凝固引起的颜色变化,建立了一种灵敏、快速的 AFB₁ 视觉检测方法。线性范围和检出限分别为 0.025~10 ng/mL 和 0.025 ng/mL,实现了 AFB₁ 的可视检测,简单、高效、可行。李琴[18]利用 Au@Ag NRs 和 Au NPs 为 SERS 信号探针,分别结合磁分离技术和核酸外切酶 III 的循环放大功能,基于 AFB₁ 适配体设计构建了两种检测 AFB₁ 的 SERS 传感器。Jo 等[19]基于适配体,结合化学发光共振能量转移体系,可用于 OTA 的检测,信号值随着靶标质量浓度的增加而降低,线性范围为 0.1~100 μg/L,检出限为 0.22 μg/L。王允华[20]利用核酸适配体的强亲和力、高稳定性等特点,将其作为特异性识别元件固定在金电极(Au E)表面,利用新型纳米材料氮掺杂多孔碳的高比表面积固载互补链 DNA (cDNA),通过杂交制备氮掺杂多孔碳-cDNA/核酸适配体/AuE 传感器进行 OTA 的检测研究,OTA 质量浓度在 1.0×10^{-7} ~ 5.0×10^{-5} μg/mL 范围内具有良好的线性关系。陈秀娟[21]以玉米赤霉烯酮、伏马菌素 B₁、T-2 毒素为研究对象,运用改进的 SELEX 方法筛选得到镰刀菌毒素特异性结合核酸适配体,结合磁分离富集技术、电化学阻抗谱技术、纳米金比色分析技术,构建了一系列新颖、灵敏、便捷的真菌毒素检测新方法。

4.2. 核酸适配体在病原性微生物检测方面的应用

传统的微生物检测方法需要包括前增菌、分离、鉴定等。虽然操作简单、结果稳定,但检测需要很长时间,至少超过 48 小时,以及随后的鉴定步骤繁琐,因此急需快速准确的检测方法弥补其缺点。基于适配体的各种传感器作为一种新型的快速检测技术,在病原菌微生物检测领域得到了广泛的研究。

徐连应[22]构建了沙门氏菌电化学适配体传感器,所构建的沙门氏菌电化学适配体传感器具有很高的敏感性,对沙门氏菌检测的敏感性达 200 CFU/mL。其通过金硫键将沙门氏菌适配体互补链(S2)修饰在金电极表面,滴涂沙门氏菌适配体(Apt)于电极表面,使 Apt 与 S2 杂交结合。将修饰好的电极浸入含有沙门氏菌与核酸外切酶 I (Exo I)的混合液中,基于 Exo I 信号放大效应,利用适配体对沙门氏菌的特异性结合作用,循环剥离适配体。另运用混合还原氧化石墨烯(rGO)溶液与甲苯胺蓝(Tb)溶液制得 Tb-rGO 复合物,分散于纳米金(Au NPs)溶胶中得到 Au NPs-Tb-rGO 复合物将 Au NPs-Tb-rGO 复合物与带有氨基的 DNA 链(S1)孵育得 DNA-复合纳米材料(S1-Au NPs-Tb-rGO)。再通过 S1-Au NPs-Tb-rGO 中的 S1 与 S2 杂交将 S1-Au NPs-Tb-rGO 负载到电极表面,监测电极表面的电化学信号。

Wu 等[23]将核酸适配体与金纳米颗粒结合,功能化的金纳米颗粒既保留了原有的光散射的光学性质,又具备了特异性的免疫学性质,借此检测大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌,当样品中有靶向目标物存在时,适配体与目标结合,失去适配体保护的纳米金在高盐浓度下发生团聚,溶液颜色由红色变为紫色,当样品中没有靶向目标物时,溶液颜色不发生变化,仍为红色。基于适配体的可视化检测方法可通

过肉眼观察颜色变化分析样品, 实现可视化检测, 用于现场快速检测。

4.3. 核酸适配体在重金属检测方面的应用

目前, 食品安全最关注的是镉、汞、铬、铅以及类金属砷等生物毒性显著的重金属[24]。王兴龙[25]等人利用石英晶体微天平(QCM)的高灵敏度、适配器的特异捕获能力以及金纳米粒子的信号放大效应, 构建了 Hg^{2+} 的 QCM 生物传感器。 Hg^{2+} 适配体作为捕获探针自组装在镀金晶圆片表面, 在金纳米粒子表面修饰 Hg^{2+} 接头作为连接探针。当 Hg^{2+} 存在时, 捕获的探针与连接的探针之间形成“T- Hg^{2+} -T”夹层, 使晶圆片质量增大, 从而引起频率变化, 从而达到检测 Hg^{2+} 的目的。

黄亚飞[26]利用无标记适配体和特异性双链荧光染料 PicoGreen, 依据 Pb^{2+} 和适配体互补链竞争结合适配体的原理, 建立了 Pb^{2+} 的适配体传感器检测方法。在此体系中, 体系的荧光强度与 Pb^{2+} 的浓度成反比, 且在 1 ng~1 mg 范围内成线性关系, 并展示了良好的特异性和回收率, 完成对简单水样中 Pb^{2+} 加标测定。

赵旭等[27]将镉离子适配体固定在微孔板上, 再与适配体互补链-辣根过氧化物酶(HRP)复合物进行竞争性结合, 通过 HRP 对底物的催化水解反应引起 450 nm 处特征峰的变化来定量检测镉离子。

5. 结论与展望

核酸适配体是近几年发展起来的, 与生物传感器技术相结合在一定程度上改善了抗体不稳定、制备昂贵等不足, 具有特异性强、灵敏度高、性能稳定等优势, 众多研究人员从不同角度进行了大量的探索和应用, 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。但已报道的基于适配体的生物传感器在一定程度上仍受限于昂贵的化学修饰和标记、繁琐的纳米材料的合成提纯和修饰、或使用有致癌风险的荧光染料, 有待于寻找更有效的低成本信号输出方式, 核酸适配体生物传感器还有广阔的研究空间。此外, 目前的研究大多局限于单一物质的检测, 多组分同时检测也将是未来的研究方向和趋势。

致 谢

首先, 感谢江苏省科技厅以及江苏省市场监督管理局给予的经费支持, 保障了课题的顺利开展; 其次, 在本科课题研究过程中得到了苏州市产品质量监督检验院各位领导和同志们的大力支持和关怀。课题组全体人员分工合作, 认真查阅文献和资料, 潜心进行科学研究, 为完成课题付出了很大的工作, 在此表示衷心的感谢。

基金项目

江苏省重点研发计划(BE2016664); 江苏省质监系统“352”人才项目。

参考文献

- [1] WHO (2015) WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases.
- [2] 钱和, 姚卫蓉, 张添. 食品卫生学-原理与实践[M]. 第二版. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [3] 陈剑刚, 朱炳辉, 梁素丹, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定贝类产品中麻痹性贝类毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2016(1): 4-8.
- [4] 贾涛. 应用气质联用法检测饲料中盐酸克伦特罗的探讨[J]. 饲料与畜牧, 2016(1): 40-46.
- [5] 欧阳珮珮, 黄诚, 丘福保. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法同时测定水产品中的无机汞、甲基汞和乙基汞[J]. 中国卫生检验杂志, 2016(1): 50-53.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T20380.2-2006 淀粉及其制品重

- 金属含量, 第二部分: 原子吸收光谱法测定汞含量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [7] 栗利曼, 刘菊梅, 沈渭寿, 等. 包头工业区蔬菜重金属富集及人群健康评价[J]. 中国蔬菜, 2016(1): 54-59.
- [8] Kirsch, J., Siltanen, C., Zhou, Q., Revzin, A. and Simonian, A. (2013) Biosensor Technology: Recent Advances in Threat Agent Detection and Medicine. *Chemical Society Reviews*, **42**, 8733-8768. <https://doi.org/10.1039/c3cs60141b>
- [9] Liu, J., Cao, Z. and Lu, Y. (2009) Functional Nucleic Acid Sensors. *Chemical Reviews*, **109**, 1948-1998. <https://doi.org/10.1021/cr030183j>
- [10] 周景明, 李春革, 祁艳华, 等. 赭曲霉毒素 A 完全抗原的制备及鉴定[J]. 动物医学进展, 2016(1): 38-42.
- [11] 范国英, 王自良, 姜金庆, 等. 重金属铅离子单抗的制备及其免疫学特性研究[J]. 西北农业学报, 2015(4): 1-5.
- [12] Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) *In Vitro* Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature*, **346**, 818-822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- [13] Kim, Y.S., Raston, N.H. and Gu, M.B. (2016) Aptamer-Based Nanobiosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **76**, 2-19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.040>
- [14] Rozenblum, G.T., Lopez, V.G., Vitullo, A.D. and Radrizzani, M. (2016) Aptamers: Current Challenges and Future Prospects. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **11**, 127-135. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1126244>
- [15] Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., *et al.* (2007) Simultaneous Determination of Multi-Component Ycotoxin Contaminants in Foods and Feeds by Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1143**, 48-64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.064>
- [16] 顾灿灿, 郭大营. 新型均相电化学适配体传感器对黄曲霉毒素 B1 检测的研究[J]. 化工技术与开发, 2017, 46(5): 38-42
- [17] 栾云霞, 陈佳伟, 陆安祥. 基于非标记核酸适配体可视化检测黄曲霉毒素 B1 的方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(3): 736-741.
- [18] 李琴. SERS 传感器构建及其用于黄曲霉毒素 B1 检测[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [19] Jo, E.J., Mun, H., Kim, S.J., *et al.* (2016) Detection of Ochratoxin A (OTA) in Coffee Using Chemiluminescence Resonance Energy Transfer (CRET) Aptasensor. *Food Chemistry*, **194**, 1102-1107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.152>
- [20] 王允华, 孟献瑞, 刘勇. 基于氮掺杂多孔碳的核酸适配体传感器检测赭曲霉毒素 A[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2018, 39(4): 97-101.
- [21] 陈秀娟. 镰刀菌毒素核酸适配体的筛选及分析应用研究[D]: [博士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [22] 徐连应, 王毕妮, 张富新. 基于复合纳米材料和酶切信号放大电化学适配体传感器检测沙门氏菌[J]. 中国农业科学, 2017, 50(21): 4186-4195.
- [23] Wu, W., Li, M., Wang, Y., *et al.* (2012) Aptasensors for Rapid Detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium*. *Nanoscale Research Letters*, **7**, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-658>
- [24] 谭贵良, 赵旭, 刘妍, 等. 核酸适配体在食品安全可视化检测中的应用研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(8): 2100-2108.
- [25] 王兴龙, 袁敏, 徐斐. 基于适配体和纳米金的石英晶体微天平传感器检测汞[J]. 分析试验室, 2016, 35(3): 258-262.
- [26] 黄亚飞. 基于适配体技术的重金属快速检测方法的研究[D]: [硕士学位论文]. 海口: 海南大学, 2017.
- [27] 赵旭, 吴世嘉, 乐琳. 基于核酸适配体的镉离子可视化检测方法[J]. 食品与机械, 2018, 34(6): 35-38.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-8844，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjcet@hanspub.org