

# 核酸适配体技术在食品重金属检测中的应用研究进展

于寒松<sup>1</sup>, 隋佳辰<sup>1</sup>, 代佳宇<sup>1</sup>, 宋战昀<sup>2,\*</sup>, 郑言<sup>1</sup>, 杨倩<sup>1</sup>, 王向辉<sup>1</sup>, 张健<sup>1</sup>, 李敏思<sup>3</sup>  
(1.吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2.吉林出入境检验检疫局, 吉林 长春 130062;  
3.甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**近年来食品中重金属超标对人们健康构成了威胁, 所以对食品中重金属检测技术的开发成为了重要研究内容。虽然传统的检测技术对重金属进行了高选择性和高灵敏度的检测, 但是仍需要一种简单、快速、有效、成本低廉的方法用于食品安全领域的快速检测。核酸适配体为一段单链DNA或者RNA序列, 是经体外筛选技术筛选出的能特异结合蛋白质或其他小分子物质的寡聚核苷酸片段。核酸适配体具有靶分子广、灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点, 因而被广泛用于食品安全检测领域。本文综述近年来核酸适配体技术对食品中 $Hg^{2+}$ 、 $As^{3+}$ 、 $Pb^{2+}$ 的检测, 并对核酸适配体技术在食品重金属检测领域的应用前景进行了展望。

**关键词:**重金属; 核酸适配体; 配体指数级富集系统进化技术; 检测

## Advances in the Application of Aptamers to Detect Heavy Metals in Foods

YU Hansong<sup>1</sup>, SUI Jiachen<sup>1</sup>, DAI Jiayu<sup>1</sup>, SONG Zhanyun<sup>2,\*</sup>, ZHENG Yan<sup>1</sup>, YANG Qian<sup>1</sup>, WANG Xianghui<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, LI Minsi<sup>3</sup>  
(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;  
2. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China;  
3. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In recent years, excessive heavy metals in foods pose a threat to human health, so the development of techniques to detect heavy metals in foods has become an important research task. Although traditional techniques for heavy metal detection have high selectivity and high sensitivity, a simple, fast, effective and inexpensive method for rapid detection of food safety is still highly desired. Aptamers (aptamer) is a piece of single-stranded DNA or RNA sequence or oligonucleotide fragments obtained by *in vitro* selection (SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment), which is specifically bound to protein or smaller molecules. As a target molecule with high sensitivity, high specificity and good stability, in recent years, it has been widely used in the field of food safety detection. This article reviews the progress made in recent years in applying aptamer technology for the detection of heavy metals such as  $Hg^{2+}$ ,  $As^{3+}$  and  $Pb^{2+}$  in foods and future prospects are discussed.

**Key words:** heavy metal; aptamer; systematic evolution of ligands by exponential enrichment; detection

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)15-0228-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201515042

食品安全问题是21世纪重大的民生问题, 它关系到人们的生活质量与卫生安全, 关系到社会的和谐与稳定。随着经济的快速发展, 现代工业化进程的加快, 重金属污染问题已经对生态环境、农业可持续发展等构成了严重的威胁, 尤其对食品安全的影响日益加剧<sup>[1]</sup>。重金属是指比重 $>5$ 的金属, 约有45种, 如汞、铜、铅、镉、铁、锌、锰、钙、铬等。从食品安全方面考虑, 目前最引人关注的是汞、镉、铅、铬, 以及类金属砷等有显著

生物毒性的重金属。 $Hg^{2+}$ 是一种可以在人体内蓄积的高毒性的重金属, 并以天然态广泛存在于自然界中, 在鱼类及贝类中常常以甲基汞的形式存在。 $Hg^{2+}$ 的危害主要是进入人体后, 在脑组织中逐渐积累, 达到一定量时就会对脑组织造成损害, 进而侵害神经系统, 尤其是中枢神经系统。其表现为说话不清、精神失常、运动失调, 甲基汞还可侵害胎儿, 使新生儿发生先天性疾病等。大型的汞中毒案例如“水俣病”事件严重影响人类的生命

收稿日期: 2014-10-15

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31001065)

作者简介: 于寒松(1979—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为豆制品加工。E-mail: yuhansong@jlhu.edu.cn

\*通信作者: 宋战昀(1976—), 男, 兽医师, 博士, 研究方向为核酸适配体。E-mail: zhanyun-song@163.com

安全。因此,对Hg<sup>2+</sup>进行特异性和高灵敏度检测具有重要意义。砷,别名“砒霜”,是危害人们身体健康最严重的污染物之一,广泛存在于自然界中。砷的摄入可能通过含砷的水直接摄入人体,或者通过含砷的农作物或水产品等间接摄入人体。砷中毒分为急性和慢性两种。急性砷中毒主要表现为胃肠炎症状,严重者可导致中枢神经系统麻痹而死亡,病人常有七窍流血的现象。慢性砷中毒症状除有一般的神经衰弱症候群外,还有皮肤色素沉着、过度角质化、末梢神经炎等。其中存在的4种价态以As<sup>3+</sup>和As<sup>5+</sup>最为常见,水体中的无机砷尤其以As<sup>3+</sup>的毒性最高,是其他砷化合物毒性的60倍。铅是一种毒性较强的灰白色金属,少量的铅就会对人体造成非常大的伤害。铅中毒是一种蓄积性中毒,具有持久性和高度积累性。铅中毒后往往表现为智力低下、反应迟钝、贫血等慢性中毒症状。铅对胎儿和幼儿生长发育影响最大,这些严重的后果使得人们对铅的检测十分关注。

### 1 传统重金属检测方法

目前,食品检测中传统的重金属检测方法主要有原子吸收光谱法、原子荧光光度法、电感耦合等离子体原子发射光谱、流动注射原子吸收和电感耦合等离子体质谱等<sup>[2]</sup>。这些传统的重金属检测方法虽然应用比较成熟、灵敏度较高,但同时存在许多局限性,如:仪器价格昂贵、耗时长、样品处理复杂、携带不方便、无法连续监测及现场测定,需要专业人员进行操作等,难以满足简便、快速、实时检测重金属的实际需要<sup>[3]</sup>。表1列举了几种对重金属离子Hg<sup>2+</sup>、As<sup>3+</sup>、Pb<sup>2+</sup>的常见传统检测方法。近些年虽发展了一些快速检测重金属的方法,如:酶分析法、试纸法、免疫分析法等快速检测方法,但与传统的检测方法相比,大部分快速检测方法只能对被检物定性或半定量检测,灵敏度和准确性低于传统检测方法<sup>[4]</sup>。因此,寻求一种简单、快速、灵敏的重金属离子检测技术,仍然是人们不断追求的目标。

表1 传统重金属检测方法  
Table 1 Traditional detection methods for heavy metals

检测目标	检测方法	检出限
Hg <sup>2+</sup>	许月辉 <sup>[5]</sup> 采用高锰酸钾溶液吸收、富集、氧化汞,用原子荧光光度法测定	20 ng/L
Hg <sup>2+</sup>	秦云霞等 <sup>[6]</sup> 采用水浴浸提法处理样品,用双道原子荧光光度法测定	0.03 μg/L
Hg <sup>2+</sup>	Yang Yunhui等 <sup>[7]</sup> 基于自组装的金纳米颗粒可再生电位酶抑制生物传感器检测	10 μg/L
Hg <sup>2+</sup>	牛涛 <sup>[8]</sup> 利用二巯代氨基对Hg <sup>2+</sup> 具有较高亲和力和酶联免疫吸附剂信号放大原理测定	1 ng/L
As <sup>3+</sup>	El-Hadri等 <sup>[9]</sup> 通过连续氢化物发生-原子荧光光谱法建立了一种高灵敏度的简便方法来测定总砷含量	0.01~0.03 ng/L
As <sup>3+</sup>	王娜 <sup>[10]</sup> 将微波消解法前处理与电感耦合等离子体质谱法相联用进行检测	0.01 μg/L
As <sup>3+</sup>	郭同兵等 <sup>[11]</sup> 利用高压密闭微波消解氢化物原子荧光法检测大米、肉类罐头、矿泉水和水产品中的砷	0.030 6 μg/L
As <sup>3+</sup>	田永碧等 <sup>[12]</sup> 利用硼氢化物还原比色测定法检测食品中总砷	0.37~0.43 μg/L
Pb <sup>2+</sup>	翟毓秀等 <sup>[13]</sup> 应用AFS-2201型双道原子荧光光谱仪进行了氢化物发生原子荧光法测定食品和饲料中的铅	0.3 μg/L
Pb <sup>2+</sup>	黄东 <sup>[14]</sup> 采用微波消解绿茶样品,利用石墨炉原子吸收法测定市售几种知名绿茶中的铅含量	1.05 μg/L
Pb <sup>2+</sup>	周焕英等 <sup>[15]</sup> 用试纸与小型光电检测器联合用于测定铅含量,反应时间约为2 min	1 000 μg/L
Pb <sup>2+</sup>	苏成华 <sup>[16]</sup> 采用恒温消解法对试样进行消解,消解过的试样用火焰原子吸收法测定铅的含量	0.039 μg/mL

### 2 核酸适配体重金属检测方法

1990年, Ellington<sup>[17]</sup>和Tuerk<sup>[18]</sup>等用配体指数级富集系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术分别筛选出能与T4 DNA聚合酶和有机染料特异性结合的随机寡核苷酸,并由Ellington和Szostak命名为核酸适配体(aptamer)<sup>[19]</sup>,经过20年的研究,它已发展成为一类广受关注的新型识别分子。由于核酸适配体的高亲和力与高特异性,被喻为“化学抗体”。目前分子生物检测技术通常采用抗原与抗体相互作用的机理模式,但是源于蛋白受体的性质和蛋白受体的合成,在多组分检测和非常复杂的样品分析中限制了抗体检测技术的广泛应用。与之相比,核酸适配体检测方法不仅灵敏度高、检测性强,而且可以对样品进行实时快速检测,目前已经成为分子生物学、临床诊断、医学研究、环境监测、快速检疫等许多领域中的研究热点。因此,核酸适配体检测技术成为快速检测重金属的一种新的手段。核酸适配体是一类新的具有高选择性的功能识别分子,它是通过SELEX技术体外筛选出来的能特异结合特定靶分子的寡聚核苷酸片段,具有合成容易、靶分子广、特异性高、亲和力强、灵敏度高、检测成本低廉、耗时短、准确性高、易于现场检测、安全可靠等优点,与食品传统检测方法相比非常适用于食品安全的快速检测,在食品安全检测中有着良好的应用前景。表2列举了几种对重金属Hg<sup>2+</sup>、As<sup>3+</sup>、Pb<sup>2+</sup>利用核酸适配体技术检测的方法。随着近年来现代分子生物学技术的快速发展与SELEX技术的不断创新,核酸适配体已经得到了较为广泛的发展,且已经广泛地应用到各项研究领域中,并发挥着重要的作用。目前,研究者们已经对重金属Hg<sup>2+</sup>、As<sup>3+</sup>、Pb<sup>2+</sup>等筛选出相关适配体,并对此进行了进一步的研究检验。本文主要针对食品安全分析中核酸适配体技术对重金属离子Hg<sup>2+</sup>、As<sup>3+</sup>、Pb<sup>2+</sup>检测方面的最新研究进展进行综述,并对其在食品中重金属检测的研究前景进行展望。

表2 核酸适配体重金属检测方法  
Table 2 Aptamers detection methods for heavy metals

检测目标	检测方法	核酸适配体序列(5'→3')	检出限
Hg <sup>2+</sup>	Liu Chiwei等 <sup>[20]</sup> 根据富含胸腺嘧啶T的ssDNA可与Hg <sup>2+</sup> 特异性结合形成发卡结构这一特点构建了一种DNA-AuNPs探针的传感器	TTTTTACCTGGGGGAGTATGCCGAGGAAGGT	250 nmol/L
Hg <sup>2+</sup>	Wang Hao等 <sup>[21]</sup> 基于Hg <sup>2+</sup> 诱导富含ssDNA的胸腺嘧啶的构象变化和ssDNA、dsDNA之间的静电作用构建的FAM-DNA-AuNPs传感器	TTCTTTC TTCCCTTGTTTGT-FAM	0.4 nmol/L
Hg <sup>2+</sup>	Ono等 <sup>[22]</sup> 根据荧光淬灭原理,建立了利用核酸适配体检测Hg <sup>2+</sup> 的荧光传感器,根据荧光强度和Hg <sup>2+</sup> 浓度的变化实现了对Hg <sup>2+</sup> 的检测	TTCTTTC TTCCCTTGTTTGT	40 nmol/L

续表2

检测目标	检测方法	核酸适配体序列 (5'→3')	检出限
Hg <sup>2+</sup>	吴继魁 <sup>[21]</sup> 利用胸腺嘧啶与Hg <sup>2+</sup> 的高亲和作用和电化学溶出技术相结合设计了一种具有高选择性的Hg <sup>2+</sup> 生物传感器	HS-C <sub>10</sub> TCATGTTGGTTGGCCCCCTCTTCTTA	60 pmol/L
As <sup>3+</sup>	Kim等 <sup>[23]</sup> 利用核酸适配体通过构型转形成特定的二硫键结构As <sup>3+</sup> , 从而实现As <sup>3+</sup> 的检测	TTACAGAACCAACGTCGCTCCGGTACTTCTTCATCG	7 nmol/L
As <sup>3+</sup>	Wu Yuangen等 <sup>[24]</sup> 根据As <sup>3+</sup> 与砷适配体相互作用特异性结合, 形成一个As <sup>3+</sup> -核酸适配体复合物, 而带有正电荷的聚二烯丙基二甲基氯化铵会导致带负电荷的AuNPs的聚集, 并导致明显的颜色变化这一原理, 利用比色法实现检测	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTT ATTCAATTTTACAGAACCAACGTCGCTCCG GGTACTTCTTCATCGAGATAGTAAGTCAATCT	70 nmol/L
As <sup>3+</sup>	王法泽等 <sup>[25]</sup> 基于氯化血红素催化四甲基联苯胺显色的原理检测As <sup>3+</sup>	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTT ATTCAATTTTACAGAACCAACGTCGCTCCG GGTACTTCTTCATCGAGATAGTAAGTCAATCT	13.3 nmol/L
As <sup>3+</sup>	Wu Yuangen等 <sup>[26]</sup> 利用三苯甲烷类染料结晶紫建立了As <sup>3+</sup> 的共振光散射法检测体系实现水体中As <sup>3+</sup> 检测	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTT ATTCAATTTTACAGAACCAACGTCGCTCCG GGTACTTCTTCATCGAGATAGTAAGTCAATCT	2.7 nmol/L
Pb <sup>2+</sup>	Liu Juewen等 <sup>[27]</sup> 首次将核酶结合AuNPs应用于Pb <sup>2+</sup> 的检测	CACGAGTTGACA	0.1 μmol/L
Pb <sup>2+</sup>	Wei Hui等 <sup>[28]</sup> 报道了一个用无标记脱氧核酶传感器对Pb <sup>2+</sup> 检测的方法, 此方法简单且灵敏度高	CAT CTC TTC TCC GAG CCG GTC GAA ATA GTGAGT	500 nmol/L
Pb <sup>2+</sup>	凌绍明等 <sup>[29]</sup> 利用核酸适配体修饰纳米金共振散射光谱探针快速检测痕量Pb <sup>2+</sup>	GGTGGTGGTGGTGG	0.03 mol/L
Pb <sup>2+</sup>	莫志宏等 <sup>[31]</sup> 根据巯基能与金形成金-硫键原理, 利用G-四联体和纳米金比色法检测Pb <sup>2+</sup>	SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> A <sub>6</sub> GGGG	3.4 nmol/L

注: ssDNA. 单链 DNA (single stranded DNA); AuNPs. 纳米金粒子 (gold nanoparticles); dsDNA. 双链 DNA (double stranded DNA); FAM. 荧光素 (fluorescein)。

### 3 核酸适配体技术在食品重金属检测中的应用

核酸适配体具有诸多独特的优点吸引了众多领域的研究者。利用核酸适配体作为高选择性识别元件, 研究者在食品安全领域已经建立了许多检测重金属的方法。作为受体分子, 由于核酸适配体针对分析物是均等合成的产生过程, 使它们可以广泛应用于多样化的目标分析物阵列中。下面主要以Hg<sup>2+</sup>、As<sup>3+</sup>和Pb<sup>2+</sup>为例, 针对核酸适配体技术在食品中重金属检测的最新应用研究进展做如下综述。

#### 3.1 在Hg<sup>2+</sup>检测中的应用

随着人们对Hg<sup>2+</sup>的高度重视和不断研究, 以及SELEX筛选技术的不断发展。目前, 已经筛选出了与Hg<sup>2+</sup>具有高特异性、高亲合性结合的核酸适配体, 并展现了良好的应用前景。Liu Chiwei等<sup>[19]</sup>根据富含胸腺嘧啶(T)的ssDNA可与Hg<sup>2+</sup>特异性结合形成发卡结构这一特点, 构建了Hg<sup>2+</sup>的传感器。此传感器基于一种DNA-AuNPs作探针, 通过T-Hg<sup>2+</sup>-T结构的改变形成DNA-Hg<sup>2+</sup>的复合物从而改变ssDNA的状态, AuNPs发生聚集、颜色发生改变, 进而实现对Hg<sup>2+</sup>进行检测。当Hg<sup>2+</sup>浓度为0.5~5.0 μmol/L时, 对Hg<sup>2+</sup>的检出限为250 nmol/L。与之相比, Li Di等<sup>[32]</sup>根据同样的原理, 并在此基础上对其进

行优化, 构建的传感器具有更高的灵敏度, 对Hg<sup>2+</sup>的检出限为1 nmol/L。Xue Xuejia等<sup>[33]</sup>报道了一种用ssDNA修饰AuNPs, 利用比色法检测Hg<sup>2+</sup>的传感器。在室温条件下将Hg<sup>2+</sup>加入到含有寡核苷酸-AuNPs探针的水溶液中, 其中寡核苷酸与多个胸腺嘧啶(T-T)错配导致AuNPs聚集, 进而根据颜色变化检测Hg<sup>2+</sup>。Lee等<sup>[34]</sup>根据AuNPs的分散度容易受到环境的影响, 进而产生颜色转变的原理, 实现对Hg<sup>2+</sup>的检测。当溶液中存在ssDNA时, ssDNA会吸附在AuNPs表面阻止AuNPs的聚集。当Hg<sup>2+</sup>存在时, Hg<sup>2+</sup>与DNA-AuNPs探针形成T-Hg<sup>2+</sup>-T的配位络合物, 提高了杂交的DNA-AuNPs探针的解链温度, 引起了AuNPs的聚集, 溶液由红变蓝。该方法具有很高的灵敏度和选择性, 可通过比色快速读出。

Wang Hao等<sup>[20]</sup>基于Hg<sup>2+</sup>诱导富含胸腺嘧啶且用FAM标记的ssDNA的构象变化, ssDNA和dsDNA与AuNPs之间的静电亲和力的差异, 再结合AuNPs建立的荧光机制Hg<sup>2+</sup>传感器。其基本原理是: 当Hg<sup>2+</sup>不存在时, ssDNA通过静电力吸附AuNPs表面, 阻止其在高盐浓度下的聚集。AuNPs对荧光染料有荧光淬灭作用, 从而ssDNA中的荧光被淬灭。当加入Hg<sup>2+</sup>时, Hg<sup>2+</sup>与ssDNA中的碱基(T)特异结合, 从而使ssDNA变成dsDNA。因dsDNA与AuNPs结合力较弱, 因而可以从AuNPs表面脱落下来, 荧光得到恢复。该系统表现出的Hg<sup>2+</sup>动态响应范围为9.6×10<sup>-8</sup>~6.4×10<sup>-6</sup> mol/L, 此FAM-DNA-AuNPs传感器对Hg<sup>2+</sup>检出限为0.4 nmol/L。Ono等<sup>[21]</sup>根据“荧光基团和淬灭基团彼此的距离小于一定范围后, 会发生荧光能量转移, 荧光物质被淬灭”这一原理, 建立了利用核酸适配体检测Hg<sup>2+</sup>的荧光传感器, 其中把荧光基团和淬灭基团分别修饰到核酸适配体(富含胸腺嘧啶)的3'端和5'端。根据荧光强度和Hg<sup>2+</sup>浓度的变化实现了对Hg<sup>2+</sup>的检测, 检测限到40 nmol/L。Jiang Zhiliang等<sup>[35]</sup>用ssDNA修饰10 nm的AuNPs, 以获得核酸适配体修饰纳米金共振散射光谱探针(AuNPs-ssDNA), 用于检测Hg<sup>2+</sup>。在NaCl存在条件下, Hg<sup>2+</sup>与AuNPs-ssDNA相互作用T-Hg<sup>2+</sup>-T错配形成非常稳定的双链和释放纳米颗粒聚集到大纳米金簇, 引起共振散射强度在540 nm波长处呈线性增强。根据以上原理, 可以通过核酸适配体修饰纳米金共振散射法实现对Hg<sup>2+</sup>的快速检测, 检出限为0.7 nmol/L。吴继魁等<sup>[22]</sup>利用胸腺嘧啶与Hg<sup>2+</sup>的高亲合作和电化学溶出技术相结合设计了一种具有高选择性的Hg<sup>2+</sup>生物传感器。将一段巯基(-SH)修饰的多胸腺嘧啶寡核苷酸(5'-SH-T<sub>15</sub>-3')核酸序列(核酸适配体)通过Au-S键作用, 组装到金电极表面。然后用巯基乙醇封闭电极表面即得到多胸腺嘧啶寡核苷酸(polythymine oligonucleotide, PTO)/Au电极。利用电极上核酸适配体中的碱基T与Hg<sup>2+</sup>特异性结合, 从而把Hg<sup>2+</sup>富集到电极

表面,经缓冲液洗涤后,在10 mmol/L氯酸钠(pH 7.2, 1 mol/L NaClO<sub>4</sub>)溶液中将Hg<sup>2+</sup>电化学还原成Hg,然后利用阳极溶出伏安扫描测定汞的氧化电流信号。以此实现对Hg<sup>2+</sup>的检测,检测限达60 pmol/L。Liu Chiwei等<sup>[36]</sup>利用凝血酶结合核酸适配体作探针,供体的5'和3'末端分别用荧光素和淬灭剂做标记。核酸适配体与铅和汞分别形成G-四分体结构和发卡结构,通过荧光团和淬灭剂之间的荧光共振能量转移导致该荧光强度减小,从而实现了同时对铅和汞的同时测定。据了解,这是一个以单一的核酸适配体为基础的传感器,可以同时检测Hg<sup>2+</sup>和Pb<sup>2+</sup>的第一实例。Chung等<sup>[37]</sup>研发了一种表面增强拉曼光谱微滴传感器。此方法基于微流体传感器,利用表面增强拉曼散射光谱迅速且高灵敏度微量分析溶液中Hg<sup>2+</sup>。核酸适配体-改性的纳米颗粒作为高功能的感测探针,Hg<sup>2+</sup>和核酸适配体-改性的纳米颗粒之间所有反应的过程是在一专门设计的微滴信道中进行。小水滴,包括样品试剂被油相彼此分离并连续地沿着通道流入。此两相液-液分割流动系统由于包封液滴内的局部试剂防止聚合胶体吸附到通道壁上,结果减少了停留时间分布。通过此方法实现了对Hg<sup>2+</sup>的检测,检测限可达10 pmol/L。

### 3.2 在As<sup>3+</sup>检测中的应用

近年来核酸适配体在分析化学领域中备受研究者的关注,并被认为是一种重要的重金属检测工具,目前已经针对As<sup>3+</sup>筛选出了相应的核酸适配体,但以核酸适配体技术检测砷的文献是罕见的。Kim等<sup>[23]</sup>筛选出一种核酸适配体,通过构型转换形成特定的二级结构用于绑定地下水中As<sup>3+</sup>和As<sup>5+</sup>,结合常数分别可达7 nmol/L和5 nmol/L。其中核酸适配体是由砷核酸适配体亲和柱(把砷固定在亲和性-凝胶树脂上创建的亲和柱)在体外筛选得到的。核酸适配体ARS-1到ARS-8通过表面等离子共振的定量分析,揭示了ARS-3核酸适配体具有最高的亲和力,ARS-3与质量浓度范围为28.1~739.2 mg/L的As<sup>3+</sup>溶液温育5 min之后可完全除去溶液中的As<sup>3+</sup>。Wu Yuangen等<sup>[24]</sup>通过核酸适配体和AuNPs作用,利用比色法实现对As<sup>3+</sup>的快速检测。As<sup>3+</sup>与砷核酸适配体相互作用特异性结合,形成一个As<sup>3+</sup>-核酸适配体复合物,而带有正电荷的聚二烯基丙二甲基氯化铵会导致带负电荷的AuNPs的聚集,并导致明显的颜色变化,这使得比色法检测As<sup>3+</sup>具有较高的选择性,检测限为70 nmol/L。

2013年王法泽<sup>[25]</sup>基于氯化血红素催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB),根据显色比色法的原理检测As<sup>3+</sup>。当溶液中不含As<sup>3+</sup>时,核酸适配体通过堆积作用可以抑制氯化血红素的催化活性,对底物TMB的催化能力减弱,溶液呈现蓝色。当溶液中含有As<sup>3+</sup>时,As<sup>3+</sup>可以与ssDNA特异性结合形成复合结构,这种复合结构会阻碍氯化血红素与ssDNA的堆积作

用,因此氯化血红素催化活性得到恢复并逐渐增强,进一步氧化TMB,溶液由蓝色逐渐变为黄色,以此建立了核酸适配体比色法检测As<sup>3+</sup>。Wu Yuangen等<sup>[26-27]</sup>基于一种共振瑞利散射(resonance Rayleigh scattering, RRS)光谱法建立的一个核酸适配体生物传感器,用于As<sup>3+</sup>的检测。在As<sup>3+</sup>检测之前,首先在结晶紫溶液中通过控制砷结合核酸适配体浓度,出现具有不同大小的纳米颗粒,经光子相关光谱法和扫描探针显微镜证实此结果。As<sup>3+</sup>的引入确实改变纳米粒子的大小,且引起了310 nm波长处的散射强度很大的变化。因此利用适当大小的纳米颗粒作为目标识别元件,结合RRS光谱测定分析,一种有效的As<sup>3+</sup>检测生物传感器被开发出来。此生物传感器的动态范围为0.1~200 μg/L,检测限低至2.7 nmol/L。

### 3.3 在Pb<sup>2+</sup>检测中的应用

近年来,基于核酸适配体技术的迅速发展,核酸适配体技术对Pb<sup>2+</sup>检测方法的研究也引起人们极大的兴趣。目前,核酸适配体已经同许多技术和方法相结合以扩展分析范围或提高分析效果,如:比色法、荧光法、电化学法、共振散射光谱等方法。Liu Juewen等<sup>[28]</sup>基于脱氧核酶指导AuNPs的聚集设计了一种高灵敏度和高选择性比色法检测Pb<sup>2+</sup>的生物传感器,这个概念可以成熟的应用到设计核酸酶/纳米传感器。其中,关键的步骤是体外筛选,可以显著扩大纳米材料的应用范围。此法比色法生物传感器简单准确,灵敏度高达0.1 μmol/L。Wang Zidong等<sup>[38]</sup>利用DNA核酶调节未经修饰AuNPs的聚集度,采用dsDNA对某些二价金属离子具有催化活性,从而设计了比色法检测Pb<sup>2+</sup>的生物传感器,此类传感器主要由AuNPs和核酸适配体组成。当体系中不存在Pb<sup>2+</sup>时,随着高浓度NaCl的加入使AuNPs溶液颜色由红变蓝。当体系中引入Pb<sup>2+</sup>时,使已聚集的AuNPs重新分散,颜色由蓝变回红,以此建立比色法实现对Pb<sup>2+</sup>的检测。Wei Hui等<sup>[29]</sup>报道了一个用无标记17E脱氧核酶传感器对Pb<sup>2+</sup>检测的方法,此方法简单且灵敏度高。实验中使用未修饰的AuNPs,展开的ssDNA可以吸附在柠檬酸盐上从而保护AuNPs,而dsDNA不能。通过此方法,在Pb<sup>2+</sup>存在条件下,由脱氧核酶的底物裂解可以通过AuNPs的颜色变化进行监测,从而实现Pb<sup>2+</sup>检测。此方法可以在20 min内实现对Pb<sup>2+</sup>的检测,检测限为500 nmol/L。

凌绍明等<sup>[30]</sup>利用核酸适配体修饰纳米金作探针,利用共振散射光谱法快速检测痕量Pb<sup>2+</sup>。在pH 7.0的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲溶液中和30 mmol/L NaCl存在下,核酸适配体-AuNPs稳定而不聚集,其散射信号较弱。Pb<sup>2+</sup>与该探针中的核酸适配体形成非常稳定的G-四分体结构,并释放出AuNPs。在NaCl作用下,AuNPs聚集形成较大的微粒,在552 nm波长处的共振散射峰增强。Pb<sup>2+</sup>

浓度越高, AuNPs微粒聚集体越多, 共振散射峰强度越大, 据此建立了核酸适配体纳米金共振散射光谱法, 实现了对 $Pb^{2+}$ 的灵敏检测, 检出限为 $0.03\text{ nmol/L Pb}^{2+}$ 。莫志宏等<sup>[31]</sup>首先根据巯基能与金形成Au—S键原理, 利用纳米探针和G-四联体比色法简便快速检测 $Pb^{2+}$ 。他们选用的寡核苷酸3'端含有4个连续的鸟嘌呤, 用于与 $Pb^{2+}$ 形成G-四联体结构, 同时在核酸的5'端修饰巯基, 可以将核酸修饰在AuNPs表面, 这样既可以提高AuNPs性能, 又增强其抗干扰能力。当溶液中添加 $Pb^{2+}$ 之后, 修饰在AuNPs探针上的G寡核苷酸就会与 $Pb^{2+}$ 结合, 形成稳定的G-四联体结构, 从而导致AuNPs探针凝聚变色, 使溶液从红色变成蓝紫色, 继而建立了利用比色法来检测 $Pb^{2+}$ 。这种方法展现了良好的选择性, 获得了 $3.4\text{ nmol/L}$ 的检测限。

#### 4 结 语

在食品安全领域中, 传统重金属检测方法虽然展现出了灵敏度高、准确性好等诸多优点, 但其同时存在许多不足, 主要有以下4点: 第一, 前处理耗时费力; 第二, 仪器设备较大、较笨重, 不利于现场实时快速检测; 第三, 操作较困难, 需专业技术人员培训; 第四, 成本较高。核酸适配体作为一种特异性强、稳定性好和靶分子广的分子识别探针, 广泛备受研究者们的关注。与传统重金属检测方法相比较, 主要有以下几点优势: 第一, 靶分子广、无免疫原性; 第二, 操作简单、耗时短; 第三, 检测成本低廉; 第四, 体积小, 易于现场快速检测; 第五, 精确识别、易体外合成与修饰; 第六, 被喻为“第四代化学抗体”, 特异性高和亲和力强, 可替代单克隆抗体等。由于核酸适配体的诸多优势, 在各检测领域具有很强的发展潜力, 同时非常适合于食品应急事件中的快速检测。目前, 虽然筛选出核酸适配体的重金属离子只局限于 $Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $As^{3+}$ 等少数几个, 但已实现核酸适配体对其简单、快速的检测。

核酸适配体技术在食品安全领域也面临着一些问题与挑战。例如: 食品中有毒有害物质繁多, 除了重金属以外还有许多有害因子, 这会大大影响核酸适配体对重金属检测的简便性和灵敏性。如何简单化食品中的前处理问题, 也是核酸适配体技术对食品中重金属检测所要面临的重大难题。本文主要对核酸适配体技术在食品中重金属检测的应用研究进展进行了综述。从上述文献的调研情况来看, 虽然核酸适配体技术近几年取得了瞩目的成果, 但对于目前来讲, 核酸适配体技术的发展还处于初级阶段, 还有许多有待于开发和研究的内容。今后应在以下两点做进一步的深入研究: 第一, 核酸适配体的筛选过程比较繁琐, 且重复性高, 费时费力。因此,

如何简单、快速、高效筛选获得需要的核酸适配体是我们研究的热点, 也是我们需要面临的一项巨大挑战。第二, 多数研究的核酸适配体只是针对一个目标靶进行检测, 如何一次性对多个分析物进行同时高效、快速、准确的检测也是我们未来需要面对的一个重大挑战。总之, 在食品安全领域中核酸适配体技术对于重金属的检测还有待于进一步的研究与深化。随着科技的不断发展与完善, 必将有更多的技术和方法与核酸适配体相结合, 核酸适配体技术也会越来越完善。相信不久的将来, 核酸适配体必将在食品检测领域发挥越来越重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 余若祯, 王红梅, 方征, 等. 重金属离子快速检测技术研究与应用进展[J]. 环境工程技术学报, 2011, 1(5): 438-442.
- [2] 江天久, 牛涛. 重金属污染物的免疫学检测技术研究进展[J]. 生态环境, 2005, 14(4): 590-595.
- [3] 寇冬梅, 张进忠, 杨兵, 等. 检测重金属离子的酶膜生物传感器的构建[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(9): 24-28.
- [4] 翟慧泉, 金星龙, 岳俊杰, 等. 重金属快速检测方法的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(8): 1995-1998.
- [5] 许月辉. 原子荧光光度法测定空气中的汞[J]. 中国卫生工程学, 2008, 7(1): 30-33.
- [6] 栾云霞, 李伟国, 陆安详, 等. 原子荧光光谱法同时测定土壤中的砷和汞[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5344-5346.
- [7] YANG Yunhui, WANG Zhijie, YANG Minhui, et al. Inhibitive determination of mercury ion using a renewable urea biosensor based on self-assembled gold nanoparticle[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 114(1): 1-8.
- [8] 牛涛. 重金属 $Pb^{2+}$ 单克隆抗体的制备及 $Hg^{2+}$ 的DTC螯合ELISA检测方法研究[D]. 广州: 暨南大学, 2006: 48-58.
- [9] EL-HADRI F, MORALES-RUBIO A, de la GUARDIA M. Determination of total arsenic in soft drinks by hydride generation atomic fluorescence spectrometry[J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 1195-1200.
- [10] 王娜. 电感耦合等离子体质谱法测定土壤中砷的含量[J]. 当代化工, 2010, 39(1): 100-104.
- [11] 郭同兵, 黄谦, 刘剑波. 微波消解氢化物原子荧光法测定食品中的砷和汞[J]. 食品与机械, 2001, 27(4): 87-89.
- [12] 田永碧, 王光建, 王淮洲. 硼氢化物还原比色法测定食品中总砷[J]. 华西医科大学学报, 1994(2): 233-235.
- [13] 翟毓秀, 郝林华. 氢化物发生原子荧光光谱法测定食品和饲料中的铅[J]. 分析化学, 2000, 28(2): 176-179.
- [14] 黄东. 石墨炉原子吸收光谱法测定绿茶中的镉、铅[J]. 中国新技术新产品, 2011(8): 1-2.
- [15] 周焕英, 高志贤, 房彦军, 等. 试纸-光电检测快速定量测定铅[J]. 分析化学, 2005, 33(1): 141.
- [16] 苏成华. 恒温消解-火焰原子吸收法测定露酒中的铅[J]. 中国卫生检验杂志, 2010(11): 2782-2783.
- [17] ELLINGLON A D, SZOSTAK J W. *in vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346: 818-822.
- [18] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249: 505-510.
- [19] LIU Chiwei, HSIEH Y T, HUANG C C, et al. Detection of

- mercury(II) based on Hg<sup>2+</sup>-DNA complexes inducing the aggregation of gold nanoparticles[J]. *Chemical Communications*, 2008, 21(19): 2242-2244.
- [20] WANG Hao, WANG Yongxiang, JIN Jianyu, et al. Gold nanoparticle based colorimetric and "turn-on" fluorescent probe for mercury(II) ions in aqueous solution[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(23): 9021-9028.
- [21] ONO A, TOGASHI H. Highly selective oligonucleotide-based sensor for mercury(II) in aqueous solutions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(33): 4300-4302.
- [22] 吴继魁. 基于新型分子信标和胸腺嘧啶-汞(II)配位作用的DNA和Hg<sup>2+</sup>检测技术研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2010: 59-74.
- [23] KIM M, UM H J, BANG S, et al. Arsenic removal from Vietnamese groundwater using the arsenic-binding DNA aptamer[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(24): 9335-9340.
- [24] WU Yuangen, ZHAN Shenshan, WANG Faze, et al. Cationic polymers and aptamers mediated aggregation of gold nanoparticles for the colorimetric detection of arsenic(III) in aqueous solution[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(37): 4459-4461.
- [25] 王法泽. 核酸探针应用于重金属的快速检测方法研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2013: 46-59.
- [26] WU Yuangen, ZHAN Shenshan, XING Haibo, et al. Nanoparticles assembled by aptamers and crystal violet for arsenic(III) detection in aqueous solution based on a resonance Rayleigh scattering spectral assay[J]. *Nanoscale*, 2012, 4(21): 6841-6849.
- [27] WU Yuangen, ZHAN Shenshan, XU Lurong, et al. A simple and label-free sensor for mercury(II) detection in aqueous solution by malachite green based on a resonance scattering spectral assay[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(21): 6027-6029.
- [28] LIU Juewen, LU Yi. A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(22): 6642-6643.
- [29] WEI Hui, LI Bingling, LI Jing, et al. DNAzyme-based colorimetric sensing of lead Pb<sup>2+</sup> using unmodified gold nanoparticle probes[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(9): 095501. doi: 10.1088/0957-4484/19/9/095501.
- [30] 凌绍明, 范燕燕, 蒋治良, 等. 核酸适体修饰纳米金共振散射光谱探针快速检测痕量Pb<sup>2+</sup>[J]. *化学学报*, 2010, 68(4): 339-344.
- [31] 莫志宏, 高应梅, 温志渝, 等. 基于G-四联体的纳米探针比色检测铅离子[J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(11): 2181-2183.
- [32] LI Di, WIECKOWSKA A, WILLNER I. Optical analysis of Hg<sup>2+</sup> ions by oligonucleotide-gold-nanoparticle hybrids and DNA-based machines[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(21): 3927-3931.
- [33] XUE Xuejia, WANG Feng, LIU Xiaogang. One-step, room temperature, colorimetric detection of mercury (Hg<sup>2+</sup>) using DNA/nanoparticle conjugates[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(11): 3244-3245.
- [34] LEE J S, HART M S, MIRKIN C A. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg<sup>2+</sup>) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(22): 4093-4096.
- [35] JIANG Zhiliang, FAN Yanyan, CHEN Menglin, et al. Resonance scattering spectral detection of trace Hg<sup>2+</sup> using aptamer-modified nanogold as probe and nanocatalyst[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(13): 5439-5445.
- [36] LIU Chiwei, HUANG C C, CHANG H T. Highly selective DNA-based sensor for lead(II) and mercury(II) ions[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(6): 2383-2387.
- [37] CHUNG E S, GAO Rongke, KO J H, et al. Trace analysis of mercury(II) ions using aptamer-modified Au/Ag core-shell nanoparticles and SERS spectroscopy and SERS spectroscopy in a microdroplet channel[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(2): 260-266.
- [38] WANG Zidong, LEE J H, LU Yi. Label-free colorimetric detection of lead ions with a nanomolar detection limit and tunable dynamic range by using gold nanoparticles and DNAzyme[J]. *Advanced Materials*, 2008, 20(17): 3263-3267.