

功能核酸用于致病菌检测的研究进展

赵文卓, 李成勋, 胡作建, 余红秀*

复旦大学生物医学研究院&附属口腔医院, 上海 200032

摘要: 由食源性致病菌引发的疾病对人类健康构成巨大威胁。虽然一些致病菌如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌等在诊断和预防方面已经取得了重大进展,但开发快速、高效、低成本的检测方法仍然是一项挑战。功能核酸(functional nucleic acids, FNAs)是一类功能超出核酸常规遗传作用的核酸,主要包括天然的核酶(RNAzymes)、核糖开关(riboswitches)以及体外通过指数富集配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选的适配体(aptamers)、核酶(RNAzymes)和脱氧核酶(DNAzymes)。适配体和脱氧核酶因具有较高的稳定性、特异性和可设计性,使其成为病原微生物识别的理想工具,近年来在生物传感和医学诊断领域备受关注。综述了功能核酸的筛选原理和流程、适配体及具有 RNA 裂解活性的脱氧核酶(RNA cleavage deoxyribozymes, RCDs)在致病菌检测中的应用进展和面临的挑战,并对其未来的发展前景进行了展望。

关键词: 功能核酸; SELEX 技术; 致病菌; 生物传感器

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2022.0089

中图分类号: R440 文献标志码: A

Research Progress of Functional Nucleic Acid Used in Pathogenic Bacteria Detection

ZHAO Wenzhuo, LI Chengxun, HU Zuojian, YU Hongxiu*

Institutes of Biomedical Sciences & Shanghai Stomatological Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Diseases caused by food-borne pathogenic bacteria pose a great threat to human health. Although some pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* have made great progress in diagnosis and prevention, it is still a challenge to develop fast, efficient and low-cost detection methods. Functional nucleic acids (FNAs) are a kind of nucleic acids with functions beyond the conventional genetic function of nucleic acids, mainly including natural ribozymes, riboswitches, as well as aptamers, RNAzymes and deoxyribozymes screened by exponential enrichment ligand system evolution (SELEX) in vitro. Because of its high stability, specificity and designability, aptamers and DNAzymes have become an ideal tool for identifying pathogenic microorganisms, which has attracted much attention in the fields of biosensing and medical diagnosis in recent years. This paper reviewed the screening principle and process of functional nucleic acids, the application progress and challenges of aptamers and RNA cleavage deoxyribozymes (RCDs) in the detection of pathogenic bacteria, and prospected their future development prospects.

Key words: functional nucleic acids; SELEX technology; pathogenic bacteria; biosensor

由食源性致病菌如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门氏菌(*Salmonella enterica*)等引发的呕吐、腹泻等疾病对人类健康构成重大威胁^[1-2]。2013年,国

际食品法典委员会修订了《制定和应用食品微生物标准的原则和指南》(CAC/GL 21—1997)^[3],其中规定了微生物标准的适用范围、定义和要素,以及制定标准的目的、需要考虑的因素、采样方案和

收稿日期: 2022-05-26; 接受日期: 2022-08-18

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2701802); 上海市口腔医院科技创新人才培养计划(SSH-2022-KJCX-A01)。

联系方式: 赵文卓 E-mail: 21211510023@m.fudan.edu.cn; *通信作者 余红秀 E-mail: hongxiuyu@fudan.edu.cn

检验方法等内容,以指导各国微生物限量标准管理工作。我国《食品安全法》第26条明确规定,食品安全标准应当包括食品中致病性微生物的限量规定^[4]。2013年,我国制定和发布了《食品中致病菌限量》(GB 29921—2013),该标准的发布对于保障食品安全和控制食源性疾病的发生具有积极作用。开发快速且准确的检测和诊断技术不仅可以对食物中存在的致病菌进行预防,还可以帮助医生确定致病菌,从而实施快速干预和精准医疗,以改善患者的治疗效果。传统的细菌感染诊断方法包括细菌培养法^[5]、聚合酶链式反应检测遗传物质^[6]、免疫分析法检测细菌蛋白等。细菌培养法是一种成熟的检测方法,依赖于生物体的直接培养和铺设。但这种传统的检测方法只能有效地鉴定给定样品中的一小部分细菌且耗时较长。聚合酶链式反应不费时,可以快速获得结果,但仅可用于检测已知病原体且样品污染可能会产生误导性结果。虽然这些传统技术都为致病菌的检测作出巨大贡献,但也存在一定的缺陷,因此,建立一个可以快速简便检测病原微生物的分析方法至关重要。

功能核酸(functional nucleic acids, FNAs)是核酸和核酸类似分子的通称,包括天然 FNAs 和人造 FNAs 两种类型。其中,天然 FNAs 包括核酶(RNAzymes)和核糖开关(riboswitches)^[7],而人造 FNAs 包括通过体外筛选鉴定的适配体(aptamers)、核酶(RNAzymes)和脱氧核酶(DNAzymes)。FNAs 具有独立结构、执行催化和配体结合等功能,可以取代传统的蛋白酶和抗体,执行特定的生物学非遗传功能。近年来,大量的功能核酸在治疗、成像、筛选、药物开发、材料科学、纳米技术、有机合成和传感等各个领域显示出巨大的应用潜力^[8-9],其中以适配体和脱氧核酶为基础,结合现代生物技术和先进物理技术的生物传感器被开发出来,可在分子水平上快速、灵敏地检测金属离子、小分子、蛋白质和细菌等。王琦等^[10]对核酸适配体传感器检测食品致病菌的研究进展做了完整的总结和回顾,本文着重讨论了近年来功能核酸包括具有 RNA 裂解活性的 DNA 酶(RNA-cleaving DNAzymes, RCDs)在致病菌检测中的应用进展,以期为致病菌检测研发提供参考。

1 功能核酸的体外筛选

1.1 指数富集配体系统进化技术

体外人工合成的功能核酸主要分成两大类:一部分是能够高特异性识别并结合靶分子的 DNA 或 RNA 分子,称为核酸适配体(apramer)^[11]。另一部分是依赖特定分子进行催化反应的具有酶活性的 DNA 分子,称为脱氧核酶(DNAzyme)^[12]。

1990年, Ellington^[13]和 Tuerk 等^[14]通过指数富集配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选获得了核酸适配体。随后,通过该方法筛选出了数千种针对氨基酸、蛋白质、小金属离子、有机分子、细菌、病毒和整个细胞的功能核酸。除了传统的 SELEX 技术外,还包括基于磁珠的 SELEX(magnetic bead-based SELEX)^[15]、毛细管电泳 SELEX(capillary electrophoresis SELEX)^[16-17] 和全细胞 SELEX(whole cell-SELEX)^[18]等。根据筛选过程中是否进行序列的扩增富集,又将现有的筛选技术分为 SELEX 和 Non-SELEX。其中 Non-SELEX 不需要进行 PCR 等核酸序列扩增步骤,经过 2~3 次分离直接得到筛选结果。与 SELEX 技术相比,Non-SELEX 技术可在几天甚至几小时内完成筛选过程,但其局限性在于对毛细管电泳的要求较高,所以只适用于大分子物质的筛选^[19-20]。

SELEX 技术为功能核酸在生命科学领域的拓展和应用提供了巨大潜力。一旦确定了功能核酸的序列,就可以开发出多种生物传感器来检测目标分子。以功能核酸为基础的生物传感器可分为荧光传感器、比色法传感器和电化学传感器等,它们在临床致病菌的检测中都显示出了巨大的应用潜力。

1.2 适配体及其筛选原理

核酸适配体通常为单链 DNA 或 RNA 短序列,通过碱基互补配对原则或静电作用等原因发生折叠,从而形成更为稳定的空间结构,这些特别的空

表 1 基于功能核酸检测致病菌的生物传感器性能比较

Table 1 Performance comparison of biosensors for detecting pathogenic bacteria based on functional nucleic acids

检测方法	适用场所	优缺点	检测对象	检测元件	检测限/ (CFU·mL ⁻¹)	参考文献
荧光法	实验室、 机构检测	检出限较低,但 需要相关仪器 设备,成本高	苏云金芽孢杆菌(<i>Bacillus thuringiensis</i>)	适配体	10 ³	[23]
			副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌(<i>Vibrio para-haemolyticus</i> and <i>Salmonella typhimurium</i>)	适配体	5×10 ³	[24]
			大肠杆菌 ATCC 8739(<i>Escherichia coli</i>)	适配体	3	[25]
			鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	适配体	50	[26]
			大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	RCDs	10 ³	[27]
			肺炎克雷伯菌(<i>Klebsiella Pneumoniae</i>)	RCDs	10 ⁵	[28]
			鳃弧菌(<i>Vibrio anguillarum</i>)	RCDs	4×10 ³	[29]
比色法	现场检 测、实验 室、机构 检测	直观快速,不 需要仪器支 撑,成本低,但 结果不易量化	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	适配体	10 ⁸	[30]
			阪崎肠杆菌(<i>Cronobacter sakazakii</i>)	适配体	7.1×10 ³	[31]
			幽门螺旋杆菌(<i>Helicobacter pylori</i>)	RCDs	10 ⁴	[32]
			金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	RCDs	10 ⁵	[33]
电化学法	现场检 测、实验 室、机构 检测	灵敏度高,结 果直观,但需 要相关电子设 备,成本较高	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	适配体	41	[34]
			金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	适配体	39(缓冲液) 414(自来水)	[35]
			大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	RCDs	10 ³	[36]

针对致病菌适配体的筛选方面,目标分子可以分为全细胞、脂多糖、蛋白质和芽孢等,其中以全细胞作为筛选的目标分子不需要事先明确生物标志物。随着研究的深入,致病菌的表面组分以及细菌休眠体已成为研究热点。相比于全细胞,以表面组分和芽孢作为目标分子具有缩短实验周期、降低实验安全隐患等独特优势。适配体的 SELEX 筛

选包括 7 个步骤(图 1):①确定目标分子;②创建高容量的随机 DNA 或 RNA 文库;③将 DNA 或 RNA 文库暴露于目标分子;④采用特定方法分离弱结合或未结合的寡核苷酸;⑤分离目标分子;⑥对结合的核苷酸序列进行 PCR 扩增并进入下一轮筛选;⑦通过反复的多轮筛选、分离和扩增,生成与靶分子高特异性结合的功能核酸。

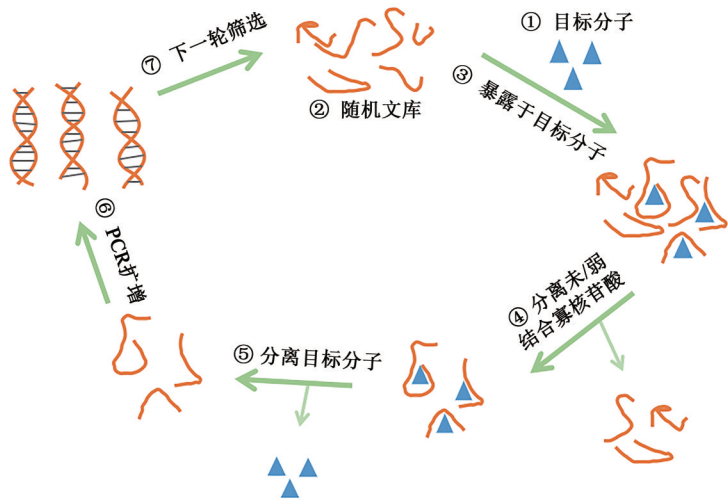


图 1 适配体筛选原理^[37]

Fig. 1 Screening principles of aptamer^[37]

1.3 脱氧核酶及其筛选原理

脱氧核酶是具有催化功能的人工单链 DNA 分子,这些分子可以通过体外筛选从随机序列 DNA 库中分离出来,并作为分子工具被广泛应用。由于脱氧核酶依赖于催化反应,与核酸适配体相比,它们不太容易受到非特异性结合的影响。脱氧核酶包括 RNA 连接酶、RNA 切割酶、DNA 连接酶和 DNA 切割酶等。1994 年,Breaker 等^[38]首次报道了具有 RNA 裂解活性的脱氧核酶 GR-5,因其良好的生物相容性、高亲和结合力以及灵敏度等特点,在开发生物分子检测和成像传感器方面备受关注。近年来,以 RCDs 作为识别原件检测多种目标分子的生物传感器得以广泛应用(表1)。

RCDs 的靶标可以是 RNA^[39]、细菌混合物^[40]、潜在的细胞靶标混合物^[41]和细菌粗细胞外基质(crude extra-cellular mixture, CEM)^[42]。RCDs 的 SELEX 筛选原理包括 6 步(图 2):①制备含有随机序列区、引物结合区及一个核糖核苷酸(rA)为假定切割位点的初始文库,文库 5'端修饰生物素标签,锚定在固定相上;②目标分子与文库共孵育;③部分 DNA 序列与目标分子相互作用折叠成活性结构切割 rA 位点,并从固定相中脱落释放;④PCR 扩增切割释放的这部分 DNA 序列;⑤引入 rA 切割位点和生物素标签,生成次级文库;⑥进行下一轮筛选。该方法不需要预先确定生物标志物,且选定的 RCDs 对细菌高度敏感,可以对样品基质中的潜在靶标作出反应。

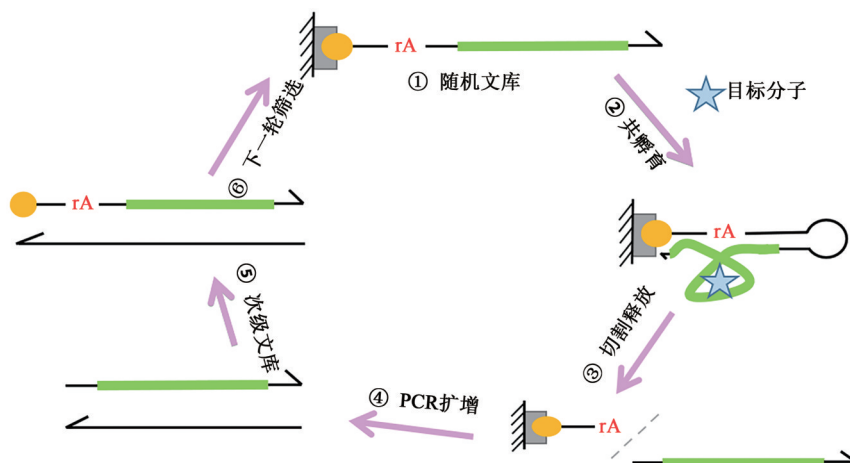


图2 RCDs的筛选原理

Fig. 2 Screening principle of RCDs

2 基于功能核酸的致病菌检测

2.1 荧光检测

荧光检测具有较高的灵敏度,是一种应用前景广阔的生物样品分析技术。荧光团与核苷酸的大小通常一致,主要用于探测功能核酸与目标物的结合。荧光团具有许多特性,包括消光系数、激发/发射波长、寿命和能量转移等。已有多种不同的纳米荧光材料被用在基于核酸适配体的生物传感器设计中,直接用于病原微生物的检测^[43-48]。常见的纳米荧光材料有金纳米颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)、量子点(quantum dots, QDs)、上转换纳米粒子(up-conversion nanoparticles, UCNPs)、碳点

(carbon dots, CDs)和硅纳米颗粒(silica nanoparticles)等。金纳米颗粒具有高消光系数和依赖距离的光学特性,是一种通过肉眼可见的颜色变化进行生物传感的优良材料^[49-50]。量子点是硒化镉表面涂有硫化锌的纳米晶体,在低能光激发下发出荧光。量子点具有较宽的激发光谱和较窄的发射光谱,因此使多色量子点系统对多个目标进行多重检测成为可能^[51-52]。碳点是最近发展起来的荧光准球形纳米颗粒,主要由 3~10 nm 的 sp² 和 sp³ 杂化碳原子组成。两性亲碳点对细菌细胞膜具有较高亲和性,因此可以作为细菌细胞的有效荧光标记物^[53]。基于荧光法的生物传感器主要适用于实验室、医院和相关机构的检测,灵敏度较

高,但具有依赖相关荧光检测仪器和成本较高等缺点(表1)。

2.1.1 基于核酸适配体的荧光检测 Ikanovic等^[23]利用量子点与核酸适配体相结合,直接对苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)孢子进行检测,检出最低限为 $1\ 000\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Nuo等^[24]利用量子点标记的核酸适配体建立了一种流式细胞术,可以同时检测副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)。除此之外,Jin等^[25]开发了一种基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的新型检测平台,用于快速、特异性的细菌检测。首先将金纳米颗粒与核酸适配体结合,上转换纳米粒子与核酸适配体互补的cDNA缀合;然后当核酸适配体和cDNA杂交时,上转换纳米粒子荧光发射和金纳米颗粒吸收之间的光谱重叠,发生荧光共振能量转移,导致上转换荧光猝灭。而在靶细菌存在的情况下,核酸适配体优先与细菌结合形成一个三维结构,将上转换纳米粒子-cDNA从金纳米颗粒-核酸适配体上解离,从而恢复上转换荧光。该团队成功地利用该传感器对大肠杆菌 ATCC 8739 进行了检测,检测范围为 $5\sim10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,检出限为 $3\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,此方法也可用于食物和水样中大肠杆菌的检测。同时,该研究应用980 nm近红外激光激发产生荧光信号,避免了由于复杂的真实食物和水样中含有的生物分子而可能产生的自发荧光,保证了适配体在复杂样品中特异性。Wang等^[26]提出核酸适配体结合碳点对鼠伤寒沙门氏菌进行定量检测,检测范围为 $10^3\sim10^5\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,在2 h内的最低检测限为 $50\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.1.2 基于RCDs的荧光检测 RCDs具有RNA切割活性,利用此特性可设计特殊的诱导性探针开关,触发荧光信号变化^[27, 54]。近年来,人们开发了荧光标记的RCDs(RNA-cleaving fluorogenic DNAs, RFDs),用于体外检测多种细菌。这些RFDs可以在嵌入荧光的DNA-RNA嵌合底物的单个核糖核苷酸位点上进行切割。核糖核苷酸的两侧分别带有荧光基团和猝灭剂,因此在完整的底物被剪切之前,荧光值非常低,而在目标细菌存在时,底物被RFDs切割,导致荧光基团与猝灭剂标记的序列分离,从而产生荧光信号(图3)^[55-56]。基于该原理,已经实现了对大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[57]、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)^[32]、肺

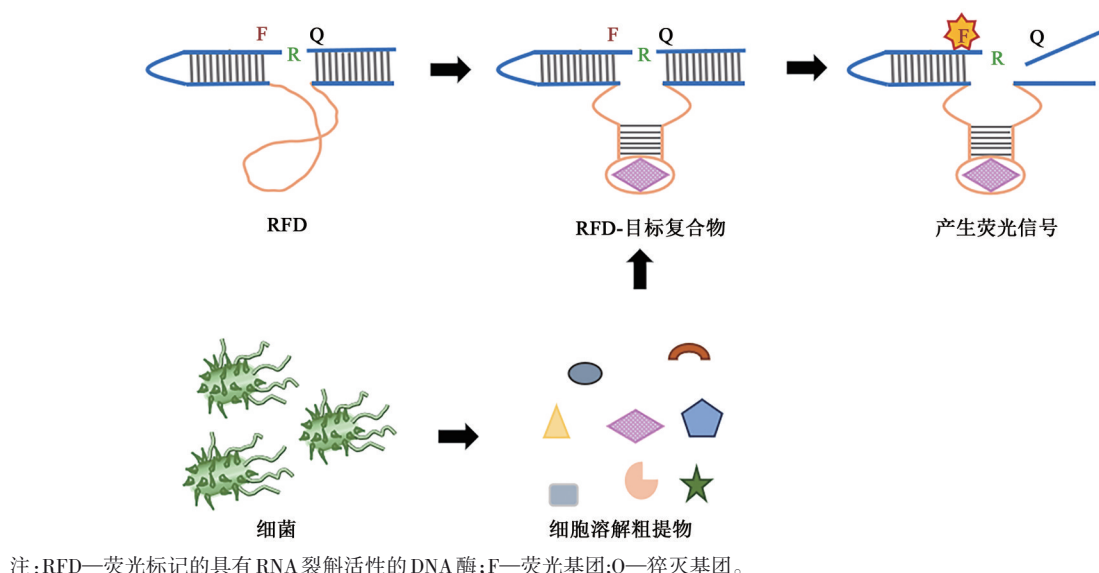
炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[28]和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)^[29]等的高特异性检测。例如,Yousefi等^[27]开发了一种食品包装传感器,可以实时监测特定细菌对食品的污染。大肠杆菌激活的RFDs被共价连接在低荧光背景、高柔韧性和低成本的环烯烃聚合物膜上,当膜与污染肉类接触时,会产生一种独特的荧光信号,而未污染的肉类上检测不到这种荧光信号,且信号可以在至少两周内保持稳定,这项工作很好地地将脱氧核酶传感器技术转化为创新应用。Ali等^[28]提出了一种基于RFDs的肺炎克雷伯菌荧光纸传感器,该RFDs在肺炎克雷伯菌存在的情况下通过体外选择技术切割荧光DNA-RNA嵌合底物生成,RFDs以96孔格式打印在纸基质上,其检测限为 $10^5\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。研究者对20株临床分离的细菌进行评估,发现无论其来源或耐药性如何,RFDs都能在含有肺炎克雷伯菌样本中产生荧光信号。该方法操作简单、快速、廉价,且避免了复杂的设备和样品制备程序,但缺点是无法区分易感分离株与碳青霉烯类耐药分离株,因此,RCD的特异性仍有进一步的提高空间。

综上所述,筛选方法中RNA剪切点两边分别标记一个荧光基团和一个淬灭剂,虽然可以产生灵敏和即时的信号,但是这种修饰昂贵且选择程序较复杂,同时,这些标签成为RFDs的一部分使RFDs难以用于检测其他类型的信号。Gu等^[29]设计了一种未修饰的文库,并筛选到能对鳃弧菌进行特异性检测的RCDs。以此为基础,设计了FAM标记的生物传感器,成功用于鱼类组织和饲料水样中的细菌检测,检测限可降至 $4\ 000\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。此外,研究也表明未修饰DNA也可用于细菌的靶向检测,这使RCDs的筛选文库进一步扩大,不仅降低了成本,也为最佳RCD的筛选提供了基础。

2.2 比色法检测

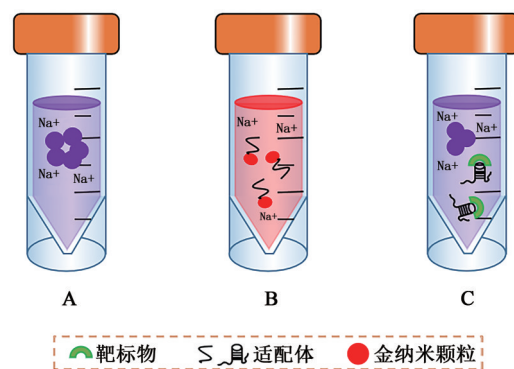
比色法检测是基于某一化合物的变色反应从而导致整个系统颜色的改变,通过视觉观察或使用分光光度计获得结果的检测方法^[58]。与其他检测方法相比,比色法检测可以最大限度地减少甚至消除对分析仪器的依赖,这使现场快速检测成为可能,但结果难以量化(表1)。比色法检测的构建需要引入颜色报告基团,如有机染料、共轭聚合物和金属纳米颗粒。

2.2.1 基于核酸适配体的比色检测 金纳米颗粒是一种常见的纳米材料,呈红色,适配体可以在盐

图3 基于RFDs的荧光检测原理图^[33]Fig. 3 Schematic diagram of fluorescence detection based on RFDs^[33]

溶液中与金纳米颗粒结合并使其分散,然而当靶标物存在时,适配体就会和金纳米颗粒分离与靶标物结合,导致金纳米颗粒聚集,溶液颜色从红色变成紫色。由于其独特的性质,金纳米颗粒已被广泛用于比色检测(图4)^[59]。Chang等^[30]报道了一种基于核酸适配体SA23-金纳米颗粒检测金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的方法,发现柠檬酸包被的金纳米颗粒与金黄色葡萄球菌的结合能力很强,而与肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)的结合能力较弱,导致盐溶液中金纳米颗粒的颜色发生了不同变化,这种比色反应能够将金黄色葡萄球菌与其他细菌分开。Kim等^[31]应用金纳米颗粒发现了一种灵敏且方便的免标记核酸适配体平台,用于婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*)的比色检测。

2.2.2 基于RCDs的比色检测 由于RCDs具有RNA切割活性且易于修饰,因此可利用信号转换分子将催化反应转化成视觉信号。Ali等^[32]报道了一种幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)特异性脱氧核酶,并设计了一种便携式纸基传感器,可以有效地在1 h内实现对幽门螺旋杆菌的半定量检测。该传感器将尿素连接的底物链与RCDs进行杂交,幽门螺旋杆菌蛋白激活RCDs,裂解底物链,使脲酶释放到体系中。随后脲酶进入含有尿素和酚红的检测区域,将尿素水解成氨,促使检测区域



A: 盐溶液中金纳米颗粒聚集,溶液呈紫色 B: 盐溶液中适配体与金纳米颗粒结合并使其分散,溶液呈红色 C: 靶标物存在时,适配体和金纳米颗粒分离并与靶标物结合,金纳米颗粒聚集,溶液呈紫色。

图4 基于核酸适配体-金纳米颗粒的比色检测原理图^[30]Fig. 4 Schematic diagram of colorimetric detection based on aptamer-AuNPs^[30]

pH改变,从而导致颜色变化。Ali等^[33]还分离出了一种新型的由金黄色葡萄球菌激活的RCDs,基于此设计了一种简单的侧流式装置(lateral flow device, LFD),用于快速检测鼻腔粘液中的金黄色葡萄球菌,此方法可在无任何设备的条件下,在30 min内通过比色读数方式提供测试结果。这种纸基传感器无需精密设备即可进行分析,且能够直观显示结果,且在室温下能够稳定至少4个月。这些发现使生物传感器更加便携,且开发成本低,对于资源有限的地区非常有意义。

2.3 电化学检测

除荧光检测和比色检测以外,电化学方法也可用来进行病原微生物检测。与其他检测方法相比,电化学检测是一个具有吸引力的平台,其检测原理是根据功能核酸与靶标物结合时电学性质的变化进行结果判断。在实际应用方面,与荧光检测不同,电化学检测相关的仪器成本要低很多,电子设备通常可以小型化,同时超高的灵敏度、良好的再现性和快速的响应使检测结果可以非常直观地观察到(表1)^[60-62]。

2.3.1 基于核酸适配体的电化学检测 Lian等^[34]利用金黄色葡萄球菌核酸适配体作为生物识别原件,构建了一种新型核酸适配体——石墨烯交叉指状金电极压电式传感器,用于金黄色葡萄球菌的快速检测。石墨烯通过化学反应固定在交叉指状金电极表面,在没有金黄色葡萄球菌的情况下,核酸适配体吸附在石墨烯上,反之,适配体优先与金黄色葡萄球菌结合,并从石墨烯上分离,使电极表面的电参数发生变化,导致串联电极压电石英晶体的振荡频率发生变化。该传感器的检测限为 $41 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,可用于临床诊断和食品检测。在此基础上,Thi等^[35]开发了一对同时结合金黄色葡萄球菌的同源适配体,并将这对适配体成功地用于开发三明治型电化学生物传感器,其在缓冲液和自来水样中的检测限分别为 $39 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $414 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这种电化学适配传感器简单、灵敏且对昂贵的仪器无任何要求。这些优点使新型三明治型电化学生物传感器可以很好地应用于金黄色葡萄球菌检测,同时在食品工业和其他领域有广阔的应用前景。

2.3.2 基于RCDs的电化学检测 基于RCDs的电化学检测是将脱氧核酶作为靶标物的识别探针应用于电极上。Pandey等^[36]通过筛选获得高特异性识别大肠杆菌的RCDs,并将电话活性RCDs集成到具有纳米结构电极的双通道电子芯片中,当大肠杆菌存在时,RCDs识别大肠杆菌,发生切割并释放DNA条形码,随后双星形通道的差分电化学芯片捕获电话活性DNA条形码,实现信号传导(图5)。该方法灵敏度高、特异性强且可手持使用,能够从包含多种非特异性细菌中选择性地检测 $1\,000 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大肠杆菌,实现在1 h内分析临床尿液样本,其灵敏度和特异性与需要数日完成的临床尿液培养相近。随着DNAzymes技术和电子芯片制造技术的进步,该系统可以设计成一

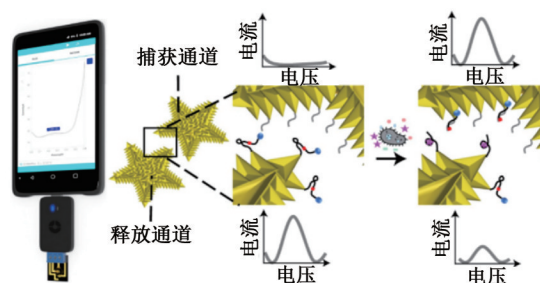


图5 基于RCDs的电化学检测原理图^[36]

Fig. 5 Schematic diagram of electrochemical detection based on RCDs^[36]

体的POC测试盒,并且可以进行多行靶向和鉴定多种病原体,使检测无试剂、更快速和多样化。

3 展望

由致病性细菌引发的疾病对人类健康构成了巨大威胁。现有研究虽然在传染病的诊断和治疗方面取得了重大进展,但开发快速、经济的检测方法,克服治疗试剂的副作用和病原体耐药性仍然是巨大的挑战。功能核酸由于具有亲和力高、免疫原性低和易于修饰等特点,为开发新型诊断试剂和治疗药物提供了有力工具。本文综述了适配体和RCDs在致病菌检测中的应用进展。

尽管功能核酸在致病菌检测方面已经取得了令人兴奋的进展,但在真正的实际应用中仍然存在巨大挑战,克服这些挑战是推动该领域向前发展的关键。例如,功能核酸在复杂样本(如食物、血液或粪便)中是否仍然发挥作用?复杂样品中包含其他微生物种类以及化学或生物污染,功能核酸作为识别元件,是否仍然具有高度特异性和稳定性?此外,生物传感器的成本和用户友好性也十分关键,特别是用于环境检测和家庭、社区、医院等现场应用的传感器,需要操作简单、快速且结果易于解读。这些挑战需要更多的创新思路,同时也可以为该研究领域迎来新的机遇。随着纳米技术和化学生物学快速发展,研究者不断对功能核酸分子进行化学修饰,以提高其在临床标本中的稳定性,甚至延长其体内存活率并降低其清除率。越来越多基于生物纳米分子和纳米材料组合的生物传感器被开发,为致病菌检测与临床诊断方面的挑战提供解决方案。未来,在功能核酸的筛选过程中,研究者需要通过更优的筛选文库、更便捷高效的筛选条件等,获得更高特异

性的功能核酸,从而提高生物传感器的灵敏度和精确度。同时,也需要根据不同的使用环境和操作人员,设计更为合理、方便的生物传感器,使其更好的服务于家庭、社区、医院等。相信在不久的将来,基于功能核酸的致病菌检测技术会进一步在食品、环境和医疗等方面获得更广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] 白小莲,爱军.生物传感器在食源性致病菌大肠杆菌 O157: H7 检测中的应用进展[J]. 生物技术进展, 2021, 11(3): 269-278.
- [2] WILCOCK A, PUN M, KHANONA J, et al. Consumer attitudes, knowledge and behaviour: a review of food safety issues[J]. Trends Food Sci. Tech., 2004, 15(2): 56-66.
- [3] 常仁亮. 制定及应用食品微生物标准的原则 CAC/GL21-1997[J]. 现代渔业信息, 1999(7): 17-19.
- [4] 中华人民共和国食品安全法(节选)[J]. 粮食科技与经济, 2022, 47(S1): 10-15.
- [5] TAIT E, PERRY J D, STANFORTH S P, et al. Use of volatile compounds as a diagnostic tool for the detection of pathogenic bacteria[J]. Trac-Trend Anal. Chem., 2014, 53: 117-125.
- [6] BHARDWAJ N, BHARDWAJ S K, NAYAK M K, et al. Fluorescent nanobiosensors for the targeted detection of foodborne bacteria[J]. Trac-Trend Anal. Chem., 2017, 97: 120-135.
- [7] 吴一凡,林晟豪,许文涛. 小分子靶标的核糖开关生物传感器研究进展[J]. 生物技术进展, 2022, 12(2): 168-175.
- [8] LI Y, LU Y. Functional nucleic acids for analytical applications[M]. New York: Springer, 2009.
- [9] 许文涛,杨敏,朱龙佼,等. 功能核酸概念的内涵与外延[J]. 生物技术进展, 2021, 11(4): 446-454.
- [10] 王琦,颜春蕾,高洪伟,等. 基于核酸适配体传感器检测食品致病菌的研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(11): 245-258.
- [11] YOU K M, LEE S H, IM A, et al. Aptamers as functional nucleic acids: in vitro selection and biotechnological applications[J]. Biotechnol. Bioproc. E., 2003, 8(2): 64-75.
- [12] MIYAKE Y, TOGASHI H, TASHIRO M, et al. Mercury(II)-mediated formation of thymine-Hg-II-thymine base pairs in DNA duplexes[J]. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(7): 2172-2173.
- [13] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346(6287): 818-822.
- [14] TUEK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment-RNA ligands to bacteriophage-T4 DNA-polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.
- [15] BRUNO J G. In vitro selection of DNA to chloroaromatics using magnetic microbead-based affinity separation and fluorescence detection[J]. Biochem. Bioph. Res. Co., 1997, 234(1): 117-120.
- [16] MENDONSA S D, BOWSER M T. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis[J]. J. Am. Chem. Soc., 2004, 126(1): 20-21.
- [17] MENDONSA S D, BOWSER M T. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis[J]. Anal. Chem., 2004, 76(18): 5387-5392.
- [18] DANIELS D A, CHEN H, HICKE B J, et al. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100(26): 15416-15421.
- [19] BEREZOVSKI M, MUSHEEV M, DRABOVICH A, et al. Non-SELEX selection of aptamers[J]. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(5): 1410-1411.
- [20] BEREZOVSKI M V, MUSHEEV M U, DRABOVICH A P, et al. Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides[J]. Nat. Protoc., 2006, 1(3): 1359-1369.
- [21] CHEN Z H, ZENG Z H, WAN Q Y, et al. Targeted immunotherapy of triple-negative breast cancer by aptamer-engineered NK cells[J/OL]. Biomaterials, 2022, 280: 121259[2021-11-15]. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121259>
- [22] KEIJZER J F, FIRET J, ALBADA B. Site-selective and inducible acylation of thrombin using aptamer-catalyst conjugates[J]. Chem. Commun., 2021, 57(96): 12960-12963.
- [23] IKANOVIC M, RUDZINSKI W E, BRUNO J G, et al. Fluorescence assay based on aptamer-quantum dot binding to *Bacillus thuringiensis* spores[J]. J. Fluoresc., 2007, 17(2): 193-199.
- [24] DUAN N, WU S, YU Y, et al. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels[J]. Anal. Chim. Acta, 2013, 804: 151-158.
- [25] JIN B, WANG S, LIN M, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection[J]. Biosens. Bioelectron., 2017, 90: 525-533.
- [26] WANG R J, XU Y, ZHANG T, et al. Rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using aptamer-conjugated carbon dots as fluorescence probe[J]. Anal. Methods, 2015, 7(5): 1701-1706.
- [27] YOUSEFI H, ALI M M, SU H M, et al. Sentinel wraps: real-time monitoring of food contamination by printing DNAAzyme probes on food packaging[J]. ACS Nano, 2018, 12(4): 3287-3294.
- [28] ALI M M, SLEPENKIN A, PETERSON E, et al. A simple DNAAzyme-based fluorescent assay for *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chembiochem, 2019, 20(7): 906-910.
- [29] GU L, YAN W, WU H, et al. Selection of DNAAzymes for sensing aquatic bacteria: *Vibrio anguillarum*[J]. Anal. Chem., 2019, 91(12): 7887-7893.
- [30] CHANG T, WANG L, ZHAO K, et al. Duplex identification of *Staphylococcus aureus* by aptamer and gold nanoparticles[J]. J. Nanosci. Nanotechnol., 2016, 16(6): 5513-5519.
- [31] KIM H S, KIM Y J, CHON J W, et al. Two-stage label-free aptasensing platform for rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula[J]. Sensor. Actuat. B-Chem., 2017, 239: 94-99.
- [32] ALI M M, WOLFE M, TRAM K, et al. DNAAzyme-based colorimetric paper sensor for *Helicobacter pylori*[J]. Angew. Chem. Int. Edit., 2019, 58(29): 9907-9911.
- [33] ALI M M, SILVA R, WHITE D, et al. A lateral flow test for *Staphylococcus aureus* in nasal mucus using a new DNAAzyme as the recognition element[J/OL]. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,

- 2022, 61(3): e202112346[2021-11-23]. <https://doi.org/10.1002/anie.202112346>.
- [34] LIAN Y, HE F, WANG H, *et al.* A new aptamer/graphene interdigitated gold electrode piezoelectric sensor for rapid and specific detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Biosens. Bioelectron., 2015, 65: 314-319.
- [35] NGUYEN T T, KIM E R, GU M B. A new cognate aptamer pair-based sandwich-type electrochemical biosensor for sensitive detection of *Staphylococcus aureus*[J/OL]. Biosens. Bioelectron., 2022, 198: 113835[2021-11-24]. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113835>.
- [36] PANDEY R, CHANG D R, SMIEJA M, *et al.* Integrating programmable DNazymes with electrical readout for rapid and culture-free bacterial detection using a handheld platform[J]. Nat. Chem., 2021, 13(9): 895-901.
- [37] LIU J, CAO Z, LU Y. Functional nucleic acid sensors[J]. Chem. Rev., 2009, 109(5): 1948-1998.
- [38] BREAKER R R, JOYCE G F. A DNA enzyme that cleaves RNA[J]. Chem. Biol., 1994, 1(4): 223-229.
- [39] KIM K S, HCHOI W, GONG S J, *et al.* Efficient target site selection for an RNA-cleaving DNzyme through combinatorial library screening[J]. B. Korean Chem. Soc., 2006, 27(5): 657-662.
- [40] SHEN Z, WU Z, CHANG D, *et al.* A catalytic DNA activated by a specific strain of bacterial pathogen[J]. Angew. Chem. Int. Edit., 2016, 55(7): 2431-2434.
- [41] ZHANG W, FENG Q, CHANG D, *et al.* In vitro selection of RNA-cleaving DNazymes for bacterial detection[J]. Methods, 2016, 106: 66-75.
- [42] GU L, YAN W, WU H, *et al.* Selection of DNazymes for sensing aquatic bacteria: vibrio anguillarum[J]. Anal. Chem., 2019, 91(12): 7887-7893.
- [43] SHANGGUAN J F, LI Y H, HE D G, *et al.* A combination of positive dielectrophoresis driven on-line enrichment and aptamer-fluorescent silica nanoparticle label for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Analyst, 2015, 140(13): 4489-4497.
- [44] WANG Q Y, KANG Y J. Bioprobes based on aptamer and silica fluorescent nanoparticles for bacteria *Salmonella typhimurium* detection[J]. Nanoscale Res. Lett., 2016, 11(1): 1-9.
- [45] DUAN N, WU S J, ZHU C Q, *et al.* Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*[J]. Anal. Chim. Acta, 2012, 723: 1-6.
- [46] WU S J, DUAN N, SHI Z, *et al.* Simultaneous aptasensor for multiplex pathogenic bacteria detection based on multicolor upconversion nanoparticles labels[J]. Anal. Chem., 2014, 86(6): 3100-3107.
- [47] KURT H, YUCE M, HUSSAIN B, *et al.* Dual-excitation up-converting nanoparticle and quantum dot aptasensor for multiplexed food pathogen detection[J]. Biosens. Bioelectron., 2016, 81: 280-286.
- [48] QIAN Z S, SHAN X Y, CHAI L J, *et al.* A universal fluorescence sensing strategy based on biocompatible graphene quantum dots and graphene oxide for the detection of DNA[J]. Nanoscale, 2014, 6(11): 5671-5674.
- [49] ZHANG C, LAI C, ZENG G M, *et al.* Nanoporous Au-based chronocoulometric aptasensor for amplified detection of Pb²⁺ using DNzyme modified with Au nanoparticles[J]. Biosens. Bioelectron., 2016, 81: 61-67.
- [50] LIU D B, WANG Z, JIANG X Y. Gold nanoparticles for the colorimetric and fluorescent detection of ions and small organic molecules[J]. Nanoscale, 2011, 3(4): 1421-1433.
- [51] CHAN W C W, NIE S M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. Science, 1998, 281(5385): 2016-2018.
- [52] BILAN R, FLEURY F, NABIEY I, *et al.* Quantum dot surface chemistry and functionalization for cell targeting and imaging[J]. Bioconjugate Chem., 2015, 26(4): 609-624.
- [53] NANDI S, RITENBERG M, JELINEK R. Bacterial detection with amphiphilic carbon dots[J]. Analyst, 2015, 140(12): 4232-4237.
- [54] ALI M M, AGUIRRE S D, LAZIM H, *et al.* Fluorogenic DNzyme probes as bacterial indicators[J]. Angew. Chem. Int. Edit., 2011, 50(16): 3751-3754.
- [55] MEI S H J, LIU Z J, BRENNAN J D, *et al.* An efficient RNA-cleaving DNA enzyme that synchronizes catalysis with fluorescence signaling[J]. J. Am. Chem. Soc., 2003, 125(2): 412-420.
- [56] LIU Z J, MEI S H J, BRENNAN J D, *et al.* Assemblage of signaling DNA enzymes with intriguing metal-ion specificities and pH dependences[J]. J. Am. Chem. Soc., 2003, 125(25): 7539-7545.
- [57] ALI M M, AGUIRRE S D, LAZIM H, *et al.* Fluorogenic DNzyme probes as bacterial indicators[J]. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2011, 50(16): 3751-3754.
- [58] ZHU D, LIU B, WEI G. Two-dimensional material-based colorimetric biosensors: a review[J]. Biosensors-Basel, 2021, 11(8): 259.
- [59] VERMA M S, ROGOWSKI J L, JONES L, *et al.* Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles[J]. Biotechnol. Adv., 2015, 33(6): 666-680.
- [60] LI X M, JU H Q, DING C F, *et al.* Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator[J]. Anal. Chim. Acta, 2007, 582(1): 158-163.
- [61] WANG C F, SUN X Y, SU M, *et al.* Electrochemical biosensors based on antibody, nucleic acid and enzyme functionalized graphene for the detection of disease-related biomolecules[J]. Analyst, 2020, 145(5): 1550-1562.
- [62] 张爱萍,唐佳妮,孟瑞峰,等.电化学法快速检测微生物的发展现状及趋势[J]. 生物技术进展, 2011, 1(5): 342-346.