

核酸适配体传感器应用于牛乳检测的研究进展

李文清¹, 刘慧敏¹, 张国只¹, 苏丽娟¹, 李万利^{2,*}

(1.河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2.河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 近些年食品安全问题频发, 牛乳质量安全及掺假问题备受关注。核酸适配体传感器是新兴的检测方法, 具有特异性强、灵敏度高、操作方便等优点。将核酸适配体传感器用于牛乳检测是将来的一个发展方向。本文主要对近年来应用核酸适配体传感器检测牛乳中致病菌、抗生素、生物毒素、重金属和其他微量有害物质进行综述, 并且对这种检测方法目前存在的问题和未来的发展前景进行分析, 以期这种新兴的技术更好地应用于牛乳检测提供参考。

关键词: 适配体; 传感器; 牛乳; 检测

Progress in the Application of Aptamer Sensors in Milk Detection

LI Wenqing¹, LIU Huimin¹, ZHANG Guozhi¹, SU Lijuan¹, LI Wanli^{2,*}

(1. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In recent years, with the frequent occurrence of food safety issues, the public have been highly concerned about milk adulteration, quality and safety. Aptamer sensor is a new detection method with the characteristics of high specificity and sensitivity and easy operation. The application of aptamer sensors for detecting milk is a future direction. In this paper, the recent applications of aptamer sensors for detecting pathogenic bacteria, antibiotics, biological toxins, heavy metals and other harmful trace substances in milk are reviewed. The current problems regarding the application of this detection method and its future prospects are analyzed, with the aim to provide some references for better utilization of this new technology in milk detection.

Key words: aptamer; sensor; milk; detection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201707043

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 07-0272-06

引文格式:

李文清, 刘慧敏, 张国只, 等. 核酸适配体传感器应用于牛乳检测的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 272-277.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201707043. <http://www.spkx.net.cn>

LI Wenqing, LIU Huimin, ZHANG Guozhi, et al. Progress in the application of aptamer sensors in milk detection[J]. Food Science, 2017, 38(7): 272-277. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201707043. <http://www.spkx.net.cn>

牛乳是人们餐桌上常见的食物, 富含大量的营养素。全球乳品安全事件时有发生, 如日本雪印牛乳的葡萄球菌肠毒素事件、我国2008年的三聚氰胺事件。乳品安全问题引起人们的极大关注。近年来我国兽药和饲料添加剂的滥用造成牛乳中的抗生素残留及有害化学物质的不断检出。为了重振消费者的信心, 为执法监督和企业自身监管提供有效武器, 有必要建立这些微量有害物质的灵敏、准确、快速的分析方法。传感器因其微型

化、数字化、智能化、网络化的特点已被应用于食品检测领域。本文主要就适配体传感器在牛乳检测中的应用, 以及目前存在的问题进行综述, 以期为我国乳品安全检测提供技术支持。

1 传感器的种类以及适配体传感器的优势

GB 7665—87《传感器通用术语》对传感器下的定义

收稿日期: 2016-04-06

基金项目: 郑州市普通科技攻关项目(153PKJGG105); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31501978);

河南省高等学校重点科研项目(16A230010)

作者简介: 李文清(1979—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为分子生物学。E-mail: liwenqing605@163.com

*通信作者: 李万利(1979—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为动物基因工程。E-mail: 51608423@qq.com

是：“能感受规定的被测量件并按照一定的规律（数学函数法则）转换成可用信号的器件或装置，通常由敏感元件和转换元件组成”。敏感元件主要分为物理类、化学类和生物类元件，物理类主要基于力、热、光、电、磁和声等物理效应，化学类基于化学反应的原理，生物类基于酶、抗体和激素等分子识别功能。采用生物传感器是发展生物技术必不可少的一种先进的检测方法与监控方法，也是物质分子水平的快速、微量分析方法。生物传感器的检测原理主要是将待测物质经扩散作用进入生物活性材料，经分子识别，发生生物学反应，产生的信息继而由相应的物理或化学换能器转变成可定量和可处理的电信号，再经二次仪表放大并输出，便可知道待测物浓度。近几年研究比较热门的生物传感器当属核酸适配体传感器。

适配体是指经过一种新的体外筛选技术即指数富集的配体进化（systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX）技术，从随机单链寡聚核苷酸文库中得到的能特异结合靶标的单链寡聚核苷酸，可以是RNA或DNA，长度约为25~60个核苷酸^[1-2]。作为新型分子识别元件，适配体既可以识别蛋白、核酸以及其他无机、有机分子^[3]，还可以识别复合靶标，比如跨膜蛋白、离子通道蛋白、细胞碎片、细胞膜、细菌、寄生虫、病毒、动物细胞等^[4-5]。理论上讲，通过SELEX技术可以筛选出任意一个靶分子的高亲和力和高特异性寡核苷酸适配体。适配体具有特异性强、亲和力高、靶标范围广等特点，能够分辨出靶物质结构上的细微差别，被称为“人工抗体”。与传统的抗体和酶相比，适配体作为新型的分子识别元件，具有热稳定性好、长期无限保存、无免疫原性、活性均一、变性后可复性、无需实验动物等优点^[3,5-6]。核酸适配体的绝对优势使许多学者相信它有可能成为抗体的替代物。

2 适配体传感器在牛乳检测中的应用

2.1 适配体传感器检测牛乳中致病菌

牛乳中的食源性致病菌主要包括沙门氏菌、致病性大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及毒素、弯曲杆菌、副溶血性弧菌、变形杆菌、李斯特菌、结肠炎耶尔森菌、志贺氏菌等，这些食源性致病菌的存在对公众健康构成巨大的威胁。食品微生物的检验，传统方法主要包括形态检查和生化方法，准确性和灵敏性较高，但涉及的实验较多，需要进行细菌分离、培养及一系列生化反应，操作繁琐、需要时间较长^[5]。因此有必要开发一些食品微生物的快速、敏感、特异的检测新技术，而核酸适配体传感器检测致病微生物具有分析速度快、灵敏度高、专一性强等特点^[6]。

沙门氏菌是引起食源性中毒的首位细菌，关于它的适配体已有报道^[7]。在牛乳检测方面，宋靓婧^[7]将沙门氏菌适配体吸附于纳米金表面，构建纳米金-适配体传感器，将梯度稀释的沙门氏菌加入纳米金-适配体复合物溶液中，再加入一定浓度NaCl溶液，通过观察纳米金颜色变化实现沙门氏菌的可视化检测，最低检测限为56 CFU/mL，检测原理如图1所示。

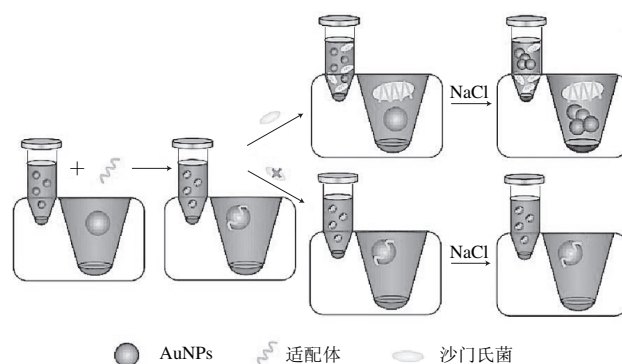


图1 基于纳米金-适配体传感器的沙门氏菌可视化检测原理图^[7]

Fig. 1 Principle of *Salmonella* detection based on nano Au-adaptor sensor^[7]

大肠杆菌是人肠道中数量最多的一种细菌，某些大肠杆菌对人有病原性，可引起严重腹泻，近年来对大肠杆菌适配体的报道较多^[8]。在牛乳检测方面，Zelada-Guillén等^[9]利用碳纳米管的强电荷传递能力，制作适配体传感器，用于检测牛乳中的大肠杆菌CECT675，检出限可以达到6 CFU/mL。蜡样芽孢杆菌是一种易引发食品毒性的革兰氏阳性菌，产生的毒素能引起人的腹泻和呕吐，因而牛乳中存在蜡样芽孢杆菌可导致极大的安全隐患。Fischer等^[10]在高亲和力适配体诱捕的基础上通过实时定量聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）技术成功地检测出牛乳中的蜡样芽孢杆菌。综上所述，适配体传感器检测致病菌的研究才刚刚开始，由于致病菌是一种复合靶，其适配体筛选难度更大一些。在牛乳检测方面，核酸适配体传感器应用主要受限于大量的致病菌适配体还未被筛选出。致病菌的适配体筛选主要采用3种方法：一种是以全细胞作为筛选靶物质，这种研究大多集中在适配体筛选的起步阶段；另一种是以表面组分作为靶物质，如脂多糖、蛋白等；还有就是以真菌的代谢产物毒素作为筛选靶。致病菌上特异性组分和毒素目前成为选择的热门，因为相对于整个细胞，后者具有实验周期短、明确结合位点等优势^[11]。适配体应用于食源性致病菌检测还处在起步阶段，目前国内报道的已筛选出适配体的食源性致病菌主要包括：大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌^[11]。

2.2 适配体传感器检测牛乳中抗生素残留

在畜牧业生产中，抗生素常用来预防和治疗奶牛的细菌感染疾病如乳腺炎等，也被用作饲料添加剂促进奶牛的生长。除此之外，抗生素还被直接添加到牛乳中延长它的保质期。长期服用含有抗生素残留的牛乳会造成体内细菌产生抗药性，降低人体免疫力。目前抗生素的检测方法主要有微生物法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、酶联免疫分析法、薄层色谱法、分光光度法和电化学法等^[12-14]，由于这些方法或是操作繁琐，或是需要配合使用大型仪器，很难用于现场快速检测。因此，建立高效、灵敏的检测方法监控牛乳中的抗生素残留，对于保障牛乳质量，确保消费者的食用安全是非常重要的。

一般情况下，抗生素在牛乳中含量很少，有些可能是 10^{-12} 数量级，需要非常灵敏的检测手段，核酸适配体传感器在这方面具有优势。de-los-Santos-Álvarez等^[15]构建了一种竞争型适配体传感器检测新霉素B，其中适配体是通过与电极表面修饰的新霉素B相互作用而被固定的，它可以检出牛乳中25~2 500 mmol/L新霉素B。之后，他们又将该固定方式应用在表面等离子体共振传感器的构建中，并大大提高了新霉素B的检测灵敏度，可以检出牛乳中10~100 mmol/L新霉素B^[16]。倪姮佳^[17]以恩诺沙星和磺胺二甲嘧啶为靶分子，首次筛选出能特异性识别这两种抗菌药的核酸适配体，通过直接竞争化学发光分析的方法检测牛乳中恩诺沙星和磺胺二甲嘧啶的残留，检出限分别达到2.26 ng/mL和0.92 ng/mL。罗叶丽^[18]应用纳米金比色法，通过监测溶液颜色变化来检测四环素，检测限达到0.039 μ g/mL，低于欧盟及我国制定的牛乳中四环素的最高残留限量值。Chen Jing等^[19]使用金纳米颗粒，应用荧光比色法实现了卡那霉素A的高敏感性检测。其原理是把纳米金作为DNA的载体和有效的荧光猝灭剂，当卡那霉素A缺乏时，染料标签适配体能够吸附在纳米金的表面，荧光信号被猝灭；当卡那霉素A存在时，靶标与适配体的结合会导致适配体刚性结构的改变，使标签适配体释放到溶液中，荧光信号增强，此方法的检测限达到0.3 nmol/L，对牛乳样品的检测取得令人满意的结果。在链霉素的检测方面，Taqhdisi等^[20]应用核酸外切酶III、荧光染料（synergy brands, SYBR）和适配体互补链构建了一种选择性的、敏感的荧光适配体传感器。当链霉素缺乏时，荧光强度很弱；随着链霉素的添加，适配体和它的靶标结合，导致适配体互补链的释放，更多保护性地对抗核酸外切酶III的功能，随着SYBR金的加入，可观察到强烈的荧光信号，在牛乳加标实验中不受样品基质的影响，检测下限能达到54.5 nmol/L（图2）。Yan Zhongdan等^[21]研制了同时检测多种抗生素的电化学适配体传感器，可同时检测氯霉素、氧四环素，采用高容量磁性中空多孔纳米槽结合核酸外切酶辅助靶循环装置，检测下限分别达到

0.15 ng/mL和0.10 ng/mL，并且这种适配体传感器只要改变对应的适配体就能应用于其他抗生素的检测。这一研究表明我国在高通量传感器研制方面走在了国际前沿。一些抗生素的适配体序列如下表1所示。

表1 几种抗生素的DNA核酸适配体序列
Table 1 Nucleotide aptamers binding to several antibiotics

抗生素	核酸适配体序列 (5'-3')	解离常数 K_d (μ mol/L)
新霉素B neomycin B	GGCCUGGGCGAGAAGUUAGGCC	1.24 ^[16]
恩诺沙星 enrofloxacin	CCCATCAGGGGCTAGGCTAACACGGTTCGGCTCTCTGA GCCCGGTTATTTACAGGGGA	0.188 ^[18]
磺胺二甲嘧啶 sulfadimidine	TTAGCTTATGCGTTGGCCGGGATAAGGATCCACGCCGTG TAGAnTGC GTTCTAACTCTC	0.079 ^[18]
四环素类 tetracyclines	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCGAGCCACGGCTTG GGTTGGTCCCACTGCGGTGGATCCGAGCTCCACGTG	0.063 ^[22]
土霉素 oxytetracycline	CGTACGGAATTCGCTAGCACGTTGACGCTGGTGCCCGGT TGTGGTGCAGTGTGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG	0.012 ^[23]
链霉素 streptomycin	TAGGGAATTCGTCGACGGATCCGGGTCTGGTGTCTGTCT TTGTCTGTCTGGTCTGTCTGACGTCGACGATGCGCCG	0.199 ^[24]
卡那霉素 kanamycin	TGGGGTTGAGGCTAAGCCGA	0.079 ^[25]

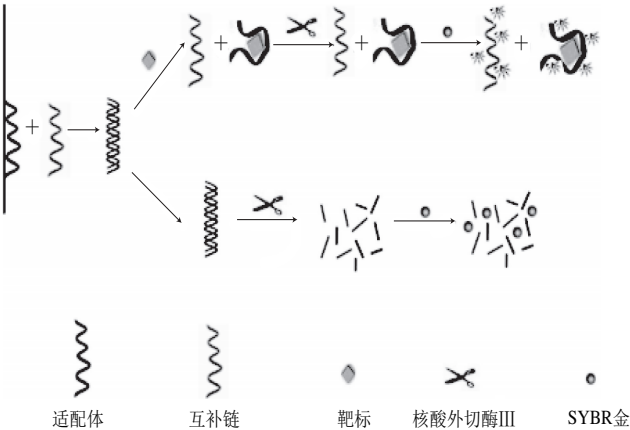


图2 依赖于荧光分析基础上的链霉素检测原理图^[20]
Fig. 2 Schematic description of streptomycin detection based on fluorescence assay^[20]

2.3 适配体传感器检测牛乳中生物毒素

牛乳中的生物毒素主要来源于奶牛采食污染的谷物、花生、玉米、油籽等饲料。存在于饲料中的生物毒素主要有黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素、伏马菌素等^[26]。生物毒素与上述的抗生素相似，只以微量或痕量存在于牛乳中。世界很多国都对食品和饲料中生物毒素含量提出了严格的限量标准，尤以欧盟提出的标准最为苛刻，以减少生物毒素对人类健康的危害。传统的检测方法只能依靠大型仪器设备，操作复杂，而适配体传感器在痕量物质检测方面具有优势。受霉菌毒素可用适配体的限制，目前只有少数生物毒素适配体应用

于牛乳检测^[27-28], 表2列出几种常见的霉菌毒素核酸适配体序列。黄曲霉毒素B₁是已知的化学物质中致癌性最强的一种, 主要存在于霉变饲料和食物中。Guo Xiaodong等^[29]应用Real time-PCR结合适配体识别的方法实现了黄曲霉毒素B₁在婴幼儿米粉和羊草中的痕量检测, 黄曲霉毒素B₁的适配体作为分子识别探针, 而与其互补的DNA链通过PCR扩增的方式作为信号放大器, 检测下限能达到25 fg/mL, 原理如图3所示。奶牛吃了含黄曲霉毒素B₁的饲料后能在体内将其分解代谢为黄曲霉毒素M₁, 分泌到牛乳中, 所以还未有适配体检测牛乳中的黄曲霉毒素B₁的报道, 可能是牛乳中黄曲霉毒素B₁的含量特别低, 没有检测意义。我国只允许黄曲霉毒素M₁以非常低的含量存在于牛乳中, 其超痕量检测在维护食品安全中显得极为重要。Nguyen等^[30]利用Fe₃O₄/聚苯胺的电化学适配体传感器能敏感检测牛乳中的黄曲霉毒素M₁, 检测下限达到1.98 ng/L。

表2 几种毒素的DNA核酸适配体序列
Table 2 DNA aptamers binding to several toxins

毒素	核酸适配体序列 (5'-3')	解离常数K _d (μmol/L)
黄曲霉毒素B ₁ aflatoxin B ₁	GTTGGGCACGTGTGTCTCTCTGTGTCCTCGTGCCTTCGCTAGGCC	0.011 ^[31]
赭曲霉毒素A ochratoxin A	GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATC GGACA	0.2 ^[32]
伏马菌素 fumonisins	AATCGCATTACCTTATACAGCTTATTC AATT ACGTCTGCACATACCAGCTTATTC AATT	0.1 ^[33]

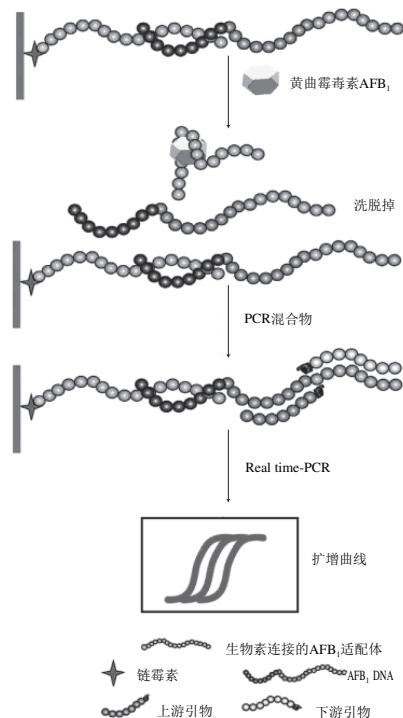


图3 黄曲霉毒素B₁的适配体检测展示图^[29]

Fig. 3 Demonstration of aptamer-based detection of aflatoxin B₁^[29]

2.4 适配体传感器检测牛乳中重金属残留

重金属的传统检测方法主要有原子吸收光谱、电感耦合等离子体发射光谱、阳极溶出伏安等^[32], 这些方法前处理复杂, 仪器昂贵并且需要专业人员操作, 难以满足实际需要。目前已筛选出适配体, 并且传感器已应用于食品检测的重金属离子主要局限于Hg²⁺、Pb²⁺、Cd²⁺、As³⁺^[34-35]。平建峰等^[36]应用氧化铈纳米功能材料的新型电化学传感技术实现了乳品中痕量重金属铅离子和镉离子的定量检测, 检测下限分别达到0.21 μg/L和0.15 μg/L, 其中铅的检测下限远低于我国婴幼儿奶粉的检测下限20 μg/L, 而婴幼儿奶粉是我国乳品标准中铅含量规定最为严格的。这是将适配体、纳米技术及电化学技术结合起来应用于乳品检测的良好例证。

2.5 适配体传感器检测牛乳中三聚氰胺的含量

三聚氰胺在牛乳中的添加能引起严重的肾脏损伤, Gu Chunmei等^[37]利用便携式葡萄糖仪及结构选择开关适配体来检测牛乳中的三聚氰胺含量, 检测原理如图4所示, 将三聚氰胺的浓度转变为可以测量的葡萄糖的含量, 三聚氰胺结合到适配体上促发了DNA转化酶偶联物的释放, 它能够水解蔗糖成为葡萄糖。在未经任何前处理的牛乳中最低检测限能达到67.5 ng/kg, 低于美国食品与药物管理委员会制定的婴幼儿牛乳中三聚氰胺含量1 pg/kg检测限, 并且该检测方法可用于任何条件下三聚氰胺的便携式检测。鉴于三聚氰胺在牛乳检测中的重要性, Gu Chunmei等^[38]又在前期研究基础上, 将三聚氰胺适配体Rd29C33由88个核苷酸缩短为34个, 此适配体显示出对三聚氰胺更好的结合特性和亲合力, 利用这个缩短的三聚氰胺适配体实现了无标签的三聚氰胺荧光检测, 这种生物学分析方法在食品中三聚氰胺检测上显示出很好的应用前景。

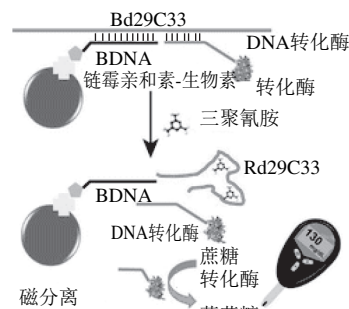


图4 便携式葡萄糖仪检测三聚氰胺原理图^[37]

Fig. 4 Principle diagram of melamine detection using portable glucose meter^[37]

2.6 适配体传感器检测牛乳中其他物质含量

尿素也是一种受经济利益驱动违规添加到牛乳中的含氮化合物, 不同于常规的商业脲酶检测方法, Kumar等^[39]研究学者通过SELEX技术筛选到尿素的特异性DNA适配体, 利用非修饰的金纳米颗粒转导信号, 既可以通

过固有荧光差异也可以通过可见颜色改变进行检测,牛乳中尿素掺假的检测下限可达到20 mmol/L。双酚A牛乳中本身不含有,但是一种可以通过设备和包装材料进入牛乳中的危害人体健康的物质,欧美国家已经出现相关禁令,我国不久也会出台限量法规。在金纳米颗粒修饰的石墨烯改良的玻璃碳电极的基础上,Zhou Ling等^[40]研制出一种电化学适配体传感器来检测牛乳中的双酚A的含量,检测下限达到5 nmol/L。

2.7 牛乳中农药残留的适配体筛选和电化学传感器研制

牛乳中农药残留是影响乳制品安全的重要因素,主要来源于植物性饲料原料,如玉米、糠麸、饼粕、青绿饲料等。奶牛摄入污染的饲料后,农药在奶牛体内积累,随泌乳分泌到牛乳中,对人体造成长时期、微剂量、慢性细微毒性效应^[41]。因此,控制牛乳中的农药残留日益受到人们的关注。传统方法检测农药残留主要采用高效液相色谱-质谱串联法、气相色谱法、固相萃取技术等,操作繁琐,需要仪器昂贵,因此发展快速的农药残留检测技术尤为重要。核酸适配体传感器在这方面具有优势,是近年来的研究热点,但关于农药核酸适配体的筛选和应用还鲜见报道。王丽^[42]利用SELEX技术对甲拌磷、丙溴磷、水胺硫磷、氧化乐果4种有机磷农药的DNA适配体进行了筛选,经过12轮筛选,得到15个阳性克隆,并比较了这些适配体的活性和特异性,发现有2个序列能够特异地同时结合这4种有机磷农药,一组适配体序列是:AAGCTTGCTTTATAGCCTGCAGCGATTCTTGATCGGAAAAGGCTGAGAGCTACGC;另一组适配体序列是:AAGCTTTTTTGACTGACTGCAGCGATTCTTGATCGCCACGGTCTGGAAAAAGAG。刘倩^[43]研制了一种可用于有机氯农药五氯苯酚检测的电化学传感器,电化学信号强度与五氯苯酚质量浓度的对数呈良好的线性关系,检测下限为3 pg/mL,可应用于实际样品中五氯苯酚的痕量测定。但是目前国内外鲜见核酸适配体传感器应用于牛乳农药残留检测的报道,凭借核酸适配体传感器的优势,这种技术手段将会成为牛乳农药残留检测的一个发展方向。

3 核酸适配体传感器在牛乳检测中的主要问题及发展前景

核酸适配体检测技术是一种比较新的技术,目前还处在尝试阶段,使用过程中要不断进行改进才能进行商业化的使用。在牛乳检测领域目前存在的主要问题有两方面:其一,牛乳基质复杂,富含蛋白质及一些二价和三价阳离子,检测靶标很容易和它们连接到一起形成

聚合物影响检测结果;其二,大量的靶标还未筛选到合适的适配体,例如牛乳中各种残留农药的适配体鲜见报道,这些都会限制核酸适配体检测技术的使用。今后的研究方向将会拓展到高通量检测,即研究同时检测多个靶标的核酸适配体探针阵列,例如同时检测多个食源性致病菌,或者同时检测多种抗生素及多种农药残留,适配体高通量检测将在未来的生产实践中具有更广阔的价值。当然,核酸适配体传感器除了应用于牛乳中微量有害物质的检测,还可应用于牛乳中正常营养成分的检测,例如检测牛乳中氨基酸、矿物元素、不饱和脂肪酸等,除了关于核酸适配体传感器检测牛乳中的色氨酸^[44]的报道外,这方面的研究还是鲜有呈现。虽然核酸适配体检测技术在牛乳检测上还处在起步阶段,但是随着适配体筛选方法的提高以及传感器的设计完善,适配体将在牛乳检测领域发挥更大的作用,实现传感器的微型化、集成化,大大提高检测的便捷性、灵敏性和精确性,为我国乳品业的发展保驾护航。

参考文献:

- [1] BAI X J, HOU H, ZHANG B L, et al. Label-free detection of kanamycin using aptamer-based cantilever array sensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 56: 112-116. DOI:10.1016/j.bios.2013.12.068.
- [2] CHEN Z B, TAN Y, ZHANG C M, et al. A colorimetric aptamer biosensor based on cationic polymer and gold nanoparticles for the ultrasensitive detection of thrombin[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 56: 46-50. DOI:10.1016/j.bios.2014.01.012.
- [3] BAI H Y, CAMPO F J, TSAI Y C. Sensitive electrochemical thrombin aptasensor based on gold disk microelectrode arrays[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 42(1): 17-22. DOI:10.1016/j.bios.2012.10.063.
- [4] GOPINATH S C B, LAKSHMIPRIYA T, AWAZU K. Colorimetric detection of controlled assembly and disassembly of aptamers on unmodified gold nanoparticles[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 51: 115-123. DOI:10.1016/j.bios.2013.07.037.
- [5] LUO P, LIU Y, XIA Y, et al. Aptamer biosensor for sensitive detection of toxin A of *Clostridium difficile* using gold nanoparticles synthesized by *Bacillus stearothermophilus*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 54: 217-221. DOI:10.1016/j.bios.2013.11.013.
- [6] 文晓棠, 李华, 邓乐. 适配体传感器在微生物检测中的应用[J]. *生命科学研究*, 2011, 15(5): 455-459. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2011.05.014.
- [7] 宋靓婧. 基于纳米金标记的沙门氏菌检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 3.
- [8] LI H, DING X H, PENG Z H, et al. Aptamer selection for the detection of *Escherichia coli* K88[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(6): 453-459. DOI:10.1139/w11-030.
- [9] ZELADA-GUILLÉN G A, BHOSALE S V, RIU J, et al. Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(22): 9254-9260. DOI:10.1021/ac101739b.
- [10] FISCHER C, HÜNNIGER T, JARCK J H, et al. Food sensing: aptamer-based trapping of *Bacillus cereus* spores with specific detection via real time PCR in milk[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(36): 8050-8057. DOI:10.1021/acs.jafc.5b03738.

- [11] 解沛燕, 朱龙佼, 许文涛. 适配体在食源性致病菌检测中的应用进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 48-62. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.04.006.
- [12] 郝巧艳, 王金中. 共振光散射法测定丁胺卡那霉素[J]. 化学研究, 2008, 19(3): 87-90. DOI:10.14002/j.hxya.2008.03.026.
- [13] 冯学忠, 吴广辉, 方炳虎, 等. 紫外分光光度法测定硫酸卡那霉素注射液含量方法的建立[J]. 动物医学进展, 2010, 31(7): 110-113. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2010.07.020.
- [14] 董社英, 邢远清, 罗琼, 等. 高效液相色谱法-蒸发光散射检测器结合化学计量学方法测定硫酸卡那霉素注射液中卡那霉素A[J]. 分析仪器, 2009, 12(1): 29-31.
- [15] de-los-SANTOS-ÁLVAREZ N, LOBO-CASTAÑÓN M J, MIRANDA-ORDIERES A J, et al. Modified-RNA aptamer-based sensor for competitive impedimetric assay of neomycin B[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(13): 3808-3809. DOI:10.1021/ja0689482.
- [16] de-los-SANTOS-ÁLVAREZ N, LOBO-CASTAÑÓN M J, MIRANDA-ORDIERES A J, et al. SPR sensing of small molecules with modified RNA aptamers: detection of neomycin B[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 24(8): 2547-2550. DOI:10.1016/j.bios.2009.01.011.
- [17] 倪姮佳. 恩诺沙星和磺胺二甲嘧啶核酸适配体的筛选及化学发光检测方法的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014: 5.
- [18] 罗叶丽. 金纳米粒子比色传感器检测瘦肉精和抗生素的研究与应用[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 4-5.
- [19] CHEN J, LI Z H, GE J, et al. An aptamer-based signal-on bio-assay for sensitive and selective detection of Kanamycin A by using gold nanoparticles[J]. Talanta, 2015, 139: 226-232. DOI:10.1016/j.talanta.2015.07.011.
- [20] TAGHDISI S M, DANESH N M, NAMEGHI M A, et al. A label-free fluorescent aptasensor for selective and sensitive detection of streptomycin in milk and blood serum[J]. Food Chemistry, 2016, 203: 145-149. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.02.017.
- [21] YAN Z D, GAN N, LI T H, et al. A sensitive electrochemical aptasensor for multiplex antibiotics detection based on high-capacity magnetic hollow porous nanotracer coupling exonuclease-assisted cascade target recycling[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 78: 51-57. DOI:10.1016/j.bios.2015.11.019.
- [22] NIAZI J H, LEE S J, GU M B. Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16(15): 7245-7253. DOI:10.1016/j.bmc.2008.06.033.
- [23] NIAZI J H, LEE S J, KIM Y S, et al. ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16(3): 1254-1261. DOI:10.1016/j.bmc.2007.10.073.
- [24] ZHOU N D, WANG J Y, ZHANG J, et al. Selection and identification of streptomycin-specific single-stranded DNA aptamers and the application in the detection of streptomycin in honey[J]. Talanta, 2013, 108: 109-116. DOI:10.1016/j.talanta.2013.01.064.
- [25] SONG K M, CHO M, JO H, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 415(2): 175-181. DOI:10.1016/j.ab.2011.04.007.
- [26] 李培武, 张奇, 丁小霞. 白芷珍食用植物性农产品质量安全研究进展[J]. 中国农业科学, 2014, 47(18): 3618-3632.
- [27] ZHANG D P, SHEN H J, LI G H, et al. Specific and sensitive fluorescence anisotropy sensing of guanine-quadruplex structures via a photoinduced electron transfer mechanism[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(18): 8088-8094. DOI:10.1021/ac302320x.
- [28] HAYAT A, SASSOLAS A, MARTY J L, et al. Highly sensitive ochratoxin A impedimetric aptasensor based on the immobilization of azido-aptamer onto electrografted binary film via click chemistry[J]. Talanta, 2013, 103: 14-19. DOI:10.1016/j.talanta.2012.09.048.
- [29] GUO X D, WEN F, ZHENG N, et al. Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B₁[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 56: 340-344. DOI:10.1016/j.bios.2014.01.045.
- [30] NGUYEN B H, TRAN L D, DO Q P, et al. Label-free detection of aflatoxin M₁ with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor[J]. Materials Science and Engineering C, 2013, 33(4): 2229-2234. DOI:10.1016/j.msec.2013.01.044.
- [31] Neoventures Biotechnology Inc. DNA ligands for aflatoxin and zearalenone: PCT/CA2010/001292[P]. 2014-5-16.
- [32] CRUZ-AGUADO J A, PENNER G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(22): 10456-10461. DOI:10.1021/jf801957h.
- [33] MCKEAGUE M, BRADLEY C R, GIROLAMO A D, et al. Screening and initial binding assessment of fumonisin B₁ aptamers[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(12): 4864-4881. DOI:10.3390/ijms11124864.
- [34] 于寒松, 代佳宇, 宋战昀, 等. 核酸适配体技术在食品重金属检测中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 228-231.
- [35] 詹深山, 吴远根, 邱树毅, 等. 基于纳米金和核酸配体的重金属离子传感器研究进展[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2012, 30(2): 1-7.
- [36] 平建峰. 基于纳米功能材料的乳品安全和品质快速检测方法 with 仪器研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 7-11.
- [37] GU C M, LAN T, SHI H C, et al. Portable detection of melamine in milk using a personal glucose meter based on an *in vitro* selected structure-switching aptamer[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(15): 7676-7682. DOI:10.1021/acs.analchem.5b01085.
- [38] GU C M, XIANG Y, GUO H L, et al. Label-free fluorescence detection of melamine with a truncated aptamer[J]. Analyst, 2016, 141(14): 4511-4517. DOI:10.1039/C6AN00537C.
- [39] KUMAR P, LAMBADI P R, NAVANI N K. Non-enzymatic detection of urea using unmodified gold nanoparticles based aptasensor[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 72: 340-347. DOI:10.1016/j.bios.2015.05.029.
- [40] ZHOU L, WANG J P, LI D J, et al. An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles dotted graphene modified glassy carbon electrode for label-free detection of bisphenol A in milk samples[J]. Food Chemistry, 2014, 162: 34-40. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.04.058.
- [41] 李小红. 分子印迹-固相萃取牛奶中有机磷农药残留[D]. 无锡: 江南大学, 2008: 17-19.
- [42] 王丽. 四种有机磷农药核酸适体的筛选、鉴定及其活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 14-16.
- [43] 刘倩. 石墨烯基电化学传感平台的构建及其农药残留检测应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2014: 5-6.
- [44] MAJIDI M R, OMIDI Y, KARAMI P, et al. Reusable potentiometric screen-printed sensor and label-free aptasensor with pseudo-reference electrode for determination of tryptophan in the presence of tyrosine[J]. Talanta, 2016, 150: 425-433. DOI:10.1016/j.talanta.2015.12.064.