

基于人工模拟抗体的酶联检测技术在食品安全检测中的应用

何彦平^{1,2}, 金涌^{1,3}, 陈达², 邢仕歌¹, 王燕飞^{1,3}, 薛强^{1,3}, 齐小花^{1,3}, 邹明强^{1,3,*}

(1.中国检验检疫科学研究院, 北京 100123; 2.天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072;

3.中检国研(北京)科技有限公司, 北京 100123)

摘要: 广义人工模拟抗体包括适配体、重组受体、分子印迹聚合物及多肽。人工模拟抗体与传统抗体相比优势显著, 其具有易实现工业化生产、成本低、保存方便、可反复使用等特点。酶联检测技术是人工模拟抗体在食品安全检测中应用最为广泛的技术。本文综述了人工模拟抗体的特点以及基于人工模拟抗体的酶联检测技术在食品安全检测中的应用。

关键词: 适配体; 重组受体; 分子印迹聚合物; 多肽; 人工模拟抗体; 酶联检测技术; 食品安全检测

Application of Artificial Antibody in Enzyme-Linked Assay for Food Safety Detection

HE Yanping^{1,2}, JIN Yong^{1,3}, CHEN Da², XING Shige¹, WANG Yanfei^{1,3}, XUE Qiang^{1,3}, QI Xiaohua^{1,3}, ZOU Mingqiang^{1,3,*}

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China; 2. School of Precision Instrument and Optoelectronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Zhong Jian Guo Yan (Beijing) Technology Co. Ltd., Beijing 100123, China)

Abstract: Generalized artificial antibodies include aptamers, recombinant receptors, molecularly imprinted polymers and polypeptides. Artificial antibodies are significantly advantageous over conventional antibodies in terms of their ease of industrial production, low cost, ease of storage and reutilizability. In food safety detection, the most widely used technique is enzyme-linked assay based on artificial antibody. This paper reviews the benefits and drawbacks of applying aptamers, receptor, molecularly imprinted polymers and polypeptides in enzyme-linked assay, as well as the prospect of artificial antibody in enzyme-linked assay for food safety detection.

Key words: aptamer; recombinant receptor; molecularly imprinted polymer; polypeptide; artificial antibody; enzyme-linked assay; food safety detection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201723049

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 23-0313-05

引文格式:

何彦平, 金涌, 陈达, 等. 基于人工模拟抗体的酶联检测技术在食品安全检测中的应用[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 313-317. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201723049. <http://www.spkx.net.cn>

HE Yanping, JIN Yong, CHEN Da, et al. Application of artificial antibody in enzyme-linked assay for food safety detection[J]. Food Science, 2017, 38(23): 313-317. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201723049. <http://www.spkx.net.cn>

人工模拟抗体是广义上的抗体, 其模拟抗体-抗原专一性相互作用, 以分子识别为基础与目标物特异性结合, 包括适配体^[1-4]、重组受体^[5-6]、分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)^[7-10]和多肽^[11]。之前的研究中, 人工模拟抗体被定义为一种具有分子识别

能力的新型高分子材料(MIP)^[12]。随着新型检测元件的发展, 人工模拟抗体的范围越来越广, 其包括单链DNA或RNA分子、重组蛋白、新型高分子材料和多肽, 因具有分子识别能力而作为检测元件应用于多种检测技术。近年来, 人工模拟抗体的研究聚焦于替代传统抗体应用

收稿日期: 2016-09-05

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2016YFF0203802); “十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAK44B01);

国家自然科学基金青年科学基金项目(21305101); 国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ0901970501)

作者简介: 何彦平(1985—), 男, 博士研究生, 研究方向为食品安全检测。E-mail: heyanning85521@163.com

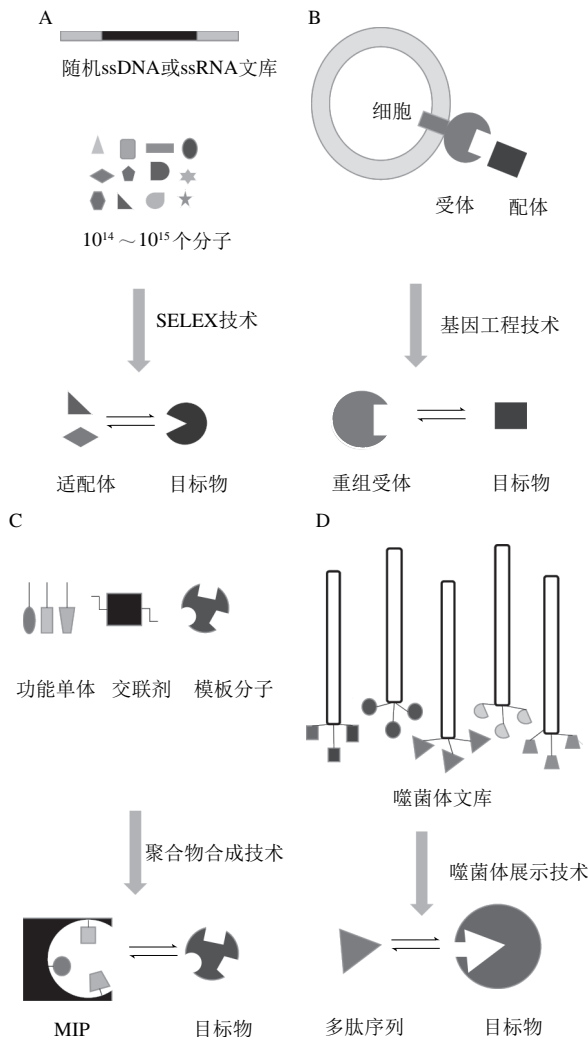
*通信作者: 邹明强(1964—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品安全检测。E-mail: mingqiangz@sina.com

于疾病诊断^[13-14]、食品安全检测等领域，以降低检测成本，提高检测的稳定性和灵敏度。在食品安全检测中，适配体、重组受体、MIP和多肽可以替代传统抗体作为检测元件，并在酶联检测方法中有较多应用。

酶联检测方法发展于20世纪70年代，具有高准确性和特异性。基于人工模拟抗体，酶联检测方法以人工模拟抗体作为检测元件，酶作为标记物，因成本低、检测元件来源广泛等优势在食品安全检测中应用日益广泛。本文将对人工模拟抗体以及基于人工模拟抗体酶联检测技术在食品安全检测中的应用展开论述。

1 基于人工模拟抗体的酶联检测技术在食品安全检测中的应用

1.1 基于适配体的酶联检测技术在食品安全检测中的应用



A. SELEX技术筛选获得适配体的分子识别能力; B.基因工程技术获得重组受体的分子识别能力; C.聚合物合成技术获得MIP的分子识别能力; D.噬菌体展示技术获得来源于噬菌体展示的多肽的分子识别能力。

图1 人工模拟抗体与目标物示意图

Fig.1 Schematic illustration of artificial antibodies and targets

寡核苷酸适配体，又称适配体^[1-2]，是通过指数富集的配体系统进化（systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX）技术筛选得到的能够与相应配体靶分子特异性紧密结合的单链DNA或RNA分子。单链寡核苷酸碱基之间的相互作用会形成许多空间构象（如发卡、假结、口袋或G-四碱基体等），基于这些独特的三维空间构象匹配、序列中碱基的堆积作用、带电基团之间的静电作用或氢键作用，适配体实现与靶分子的高亲和力高特异性结合^[1,15]（图1A）。与传统抗体相比^[16]，适配体的优点是靶分子范围广、筛选周期短等；但RNA适配体易被酶降解，多数适配体亲和力和略差于传统抗体（表1）。

表1 人工模拟抗体与传统抗体比较					
Table 1 Comparison of artificial and conventional antibodies					
项目	传统抗体	分子印迹 ^[7]	适配体 ^[1-2,16]	受体	多肽 ^[11]
化学成分	蛋白质	高分子材料	DNA或RNA	蛋白质	多肽
目标物范围	抗原或是半抗原	小分子	任何目标物	特定的 一类目标物	广泛
生产	耗时，费用高， 涉及到动物实验	化学合成，成本 低，需要大量模板	化学合成，低成 本，高效率	多为大肠杆菌 表达与纯化	化学合成， 成本低，效率高
批次差异	有差异	相同	相同	相同	相同
稳定性	氧化还原敏感， 易于聚集，对pH 值与温度敏感	氧化还原不敏 感，对pH值和温 度不敏感，在水 溶液和有机溶剂 中都稳定	氧化还原不敏 感，不易聚集， 耐受pH值和高 温，RNA适配体 易降解	氧化还原敏感， 对pH值和温 度敏感	氧化还原敏感， 易水解、变性、 吸附和聚集
保存	保存寿命短，需 要在低温下保存 和运输	长期保存，可以 在室温下保存和 运输	保存寿命长，运 输和保存不需要 低温	保存寿命较短， 需要在低温下 保存和运输	适合冻干保存， 需要在低温下 保存和运输
亲和力	nmol/L~pmol/L	μmol/L~pmol/L	μmol/L~pmol/L	nmol/L~pmol/L	μmol/L~pmol/L
特异性	很强	强	很强	弱	强
修饰情况	难被修饰	易被修饰	易被修饰	难被修饰	易被修饰
重复使用情况	不易被重复使用	可以很好被重复 使用	可以很好被重复 使用	不易被重复使用	不易被重复使用
定向固定情况	较难	易被固定	通过各种修饰 易被固定	较难	易被固定

在食品安全检测中，由于适配体易于筛选和制备，基于适配体的酶联检测技术有着广泛的应用（表2）。Barthelmebs等^[17]建立了基于适配体酶联检测直接竞争模式，可以快速检测红酒中的赭曲霉毒素A。该方法是利用HRP作为标记酶，四甲基联苯胺（tetramethylbenzidine, TMB）作为底物的比色法。赭曲霉毒素A适配体的平衡解离常数（ K_D ）为130 nmol/L，与赭曲霉毒素B和苯基丙氨酸几乎无交叉反应。

Wang Sai等^[18]建立了基于适配体酶联检测的间接竞争方法快速检测蜂蜜里的四环素残留。四环素适配体的 K_D 是63.6 nmol/L，与四环素类似物几乎无交叉反应；与其他方法相比，该方法有更高的灵敏度（检测限是 9.6×10^{-3} ng/mL）、更宽的线性范围（0.01~100 ng/mL）和更高的回收率（蜂蜜中平均回收率为93.23%）。Wang Yuankai等^[19]筛选出玉米赤霉烯酮单抗的适配体，通过间接竞争酶联方法提高玉米赤霉烯酮检测限，拓宽了适配

体在酶联检测技术中的应用,将检测物单抗的适配体运用到检测方法中,提高了检测的特异性和灵敏度。

表 2 基于人工模拟抗体酶联检测技术在食品安全中的应用
Table 2 Applications of enzyme-linked assays based on artificial antibodies in food safety detection

人工模拟抗体	检测物	酶联实验类型	标记酶	检测限	成分	文献
适配体	赭曲霉毒素A	直接竞争法	HRP	1 ng/mL	5'-CTGGGTGTGGGTGATCAAGGGAGTAGACT-3'	[17]
适配体	四环素	间接竞争法	HRP	9.6×10^{-3} ng/mL	5'-CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG-3'-biotin	[18]
适配体	玉米赤霉烯酮	间接竞争法	HRP	0.01 ng/mL	5'-GGAATCTTGATGTTGCTGGGATTGTTGGGCTTGTGTTTCTTCGCTTCCAACTTAGTAGGATCCCGAA-3'	[19]
适配体	可卡因	夹心法	HRP	2.8 μmol/L	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -TTCGTCTTCAATGAAGTGGGACGACA-3'	[20]
受体	17 beta-雌二醇	直接竞争	POD	0.1 μg/L	5'-biotin-GGGAGTCAAGAAGCAA-3'	[5]
受体	磺胺类药物	直接竞争	HRP	<100 μg/kg	蛋白质(重组人类雌激素α受体)	[21]
受体	青霉素类和头孢菌素类抗生素	间接竞争	HRP	0.26~27.4 ng/mL	蛋白质(青霉素结合蛋白3)	[22]
受体	beta-激动剂	直接竞争	HRP	5.20 μg/L	蛋白质(仓鼠beta2-肾上腺素受体)	[23]
MIP	2,4-D	间接竞争	HRP	4.4 ng/mL比色法 1 ng/mL化学发光	以2,4-D为模板,4-乙炔基吡啶为功能单体,TRIM为交联剂	[24]
MIP	RAC	直接竞争	TOP	0.01 μg/L	以RAC为模板,MAA为功能单体,MPTMS为交联剂	[25]
MIP	TBM	直接竞争	HRP	0.30 μg/L	以TBM为模板,MAA为功能单体,EDMA为交联剂	[26]
多肽	孔雀石绿	夹心法	HRP	0.55 ng/mL	CLNHEFHLHC	[27]
多肽	草达灭	链霉素	链霉素	1.2 ng/mL	biotin-SGSGSLWDITGWC	[28]
多肽	广灭灵	过氧化酶	过氧化酶	1.2 ng/mL	biotin-SGSGCLEAPNIEGC	[28]

注:HRP.辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase);POD.过氧化物酶(oxidase);TOP.烟草过氧化物酶(tobacco peroxidase);2,4-D.2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-dichlorophenoxy acetic acid);RAC.莱克多巴胺(ractopamine);TBM.苯磺隆(tribenuron-methyl);MAA.甲基丙烯酸(methacrylic acid);EDMA.乙二醇二甲基丙烯酸酯(ethylene glycol dimethacrylate);MPTMS.甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷(methacryloxy propyl trimethoxyl silane);TRIM.三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(trimethylolpropane trimethacrylate)。

Nie Ji等^[20]首次建立了基于适配体的夹心法检测可卡因。该方法将可卡因的适配体剪成2个片段,一个片段固定到96孔板上,另一个片段标记生物素;当2个片段和目标物同时出现时,就会形成一个适配体片段/目标物的复合物,实现了夹心法检测目标物,提高可卡因检测的特异性和灵敏度。

综上所述,目前基于适配体酶联检测技术包括直接竞争法、间接竞争法和夹心法。夹心法创造性地将一个适配体剪成2段应用到分析技术中,可有效提高检测的灵敏度和特异性,是基于适配体酶联检测技术的一个重要发展方向。

1.2 基于重组受体的酶联检测技术在食品安全检测中的应用

受体(receptor)^[29-30]是一类存在于细胞膜或细胞内的特殊蛋白质,其能与细胞外专一信号分子结合进而激

活细胞内一系列生物化学反应,使细胞对外界刺激产生相应效应。重组受体^[21-23]可通过基因工程的方法在细胞中大量表达,利用受体可特异结合信号物质(配体)的特性,可将纯化的重组受体作为检测元件应用到分析技术中(图1B)。重组受体可以对一类药物进行多残留检测,如Liang Xiao等^[21]建立酶联磺胺受体(dihydropteroate synthase, DHPS)检测方法,可以检测9种磺胺类药物和对氨基苯甲酸,而抗体大多只能特异性的检测一种或少数几种物质(表1);但重组受体由于分子质量较大,在表达纯化过程中易由于不正确折叠而失去活性。

在食品安全检测中,基于受体的酶联检测技术因能实现多残留检测从而应用日益广泛(表2)。Seifert等^[5]以POD为标记酶,建立基于人类雌激素α受体酶联检测方法,高通量低成本地筛查水样品中的17 beta-雌二醇。当配体是17 beta-雌二醇时,该受体的 K_D 是 2.33×10^{-10} mol/L,与17 beta-雌二醇类似物有较强交叉反应,与其他物质无交叉反应。Cheng Guyue等^[23]建立了一个基于叙利亚仓鼠beta2-肾上腺素受体酶联检测方法,该方法可以筛查动物饲料中的3个beta-激动剂(RAC、克伦特罗和沙丁胺醇),对RAC的灵敏度是5.20 μg/L,对克伦特罗和沙丁胺醇的交叉反应分别是87.7%和58.5%;与传统方法比,该方法整个过程只需要45 min(更快速)且可同时检测一组beta-激动剂(高通量)。Zhang Jing等^[22]运用可溶的青霉素结合蛋白3(soluble form of penicillin-binding protein 3, sPBP3)建立了酶联检测方法检测牛乳中的青霉素类和头孢菌素类抗生素。该受体与27种beta-内酰胺类药物有很强交叉反应;建立的方法可以检测11种青霉素类和16种头孢菌素类抗生素,且检测限都在欧盟设定的最大残留限定(maximum residue levels, MRLs)之下。

基于受体酶联检测技术检测目标物数量最高可达27种,可以有效地提高检测效率,降低检测成本,最大限度满足食品安全检测中多残留检测的要求。由于重组受体的特异性弱,该技术无法区分有交叉反应的目标物,不适合食品安全中特定目标物的检测。

1.3 基于MIP酶联检测技术在食品安全检测中的应用

MIP^[31]是一种具有分子识别能力的新型高分子材料。在模板分子存在的情况下,功能单体和交联剂由引发剂引发而发生共聚合。由于模板分子和功能单体之间存在共价或非共价的作用,功能单体按照一定的顺序排列在模板分子的周围。洗去模板分子后,这样在聚合物中就留下与模板分子大小、形状、功能团互补的孔穴,表现出分子配位识别效应(图1C)。MIP与传统抗体相比^[7,31-32],对制备技术要求不高,并且具有良好的耐酸、碱、高温等性质,合成成本低,保存时间长等优点;但MIP的亲力和特异性要略差于传统抗体(表1)。

在食品安全检测中,因MIP成本低且制备简便,基于MIP的酶联检测技术具有广泛应用(表2)。Surugiu等^[24]使用TOP作为标记物建立了基于MIP酶联检测方法用于检测2,4-D。该方法比酶联免疫吸附测定法成本低且稳定性更好。Fang Guozhen等^[25]制备分子印迹膜作为人工模拟抗体,建立直接竞争的基于分子印迹膜酶联检测方法检测尿液和猪肉样品中的RAC。该方法灵敏度高(半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为 $15.77\text{ }\mu\text{g/L}$)、检测限低(IC_{15} 为 $0.01\text{ }\mu\text{g/L}$),与高效液相色谱的结果相关系数大于0.99。Liu Huilin等^[26]建立了一个直接竞争的基于分子印迹膜酶联检测方法检测水和土壤中的TBM,该检测方法灵敏度高(IC_{50} 为 $19.73\text{ }\mu\text{g/L}$)且检测限低(IC_{15} 为 $0.30\text{ }\mu\text{g/L}$)。与TBM抗体相比,TBM分子印迹膜成本更低、稳定性更好且制备周期更短。

基于MIP酶联检测技术能达到较低的检测限和较高的回收率;其最大的优势是可以直接在96孔板中合成,合成过程简单、周期短、成本低。由于MIP的目标物是小分子,该技术对食品安全中的大分子有毒有害物质无法检测。

1.4 基于多肽的酶联检测技术在食品安全检测中的应用

人工模拟抗体多肽^[11]由2~50个氨基酸组成,具有分子识别能力,可以与目标物特异性结合。近年来,人工模拟抗体多肽由于结构简单、易实现非竞争法检测小分子物质,在检测领域有了长足的发展,其主要包括来源于噬菌体展示的多肽^[33-34](图1D)、设计合成的多肽^[35]、小型化受体的多肽^[36]和配体来源的多肽^[37]。人工模拟抗体多肽易于化学合成、成本低廉;但其亲和力和略差于传统抗体。

在食品安全检测中,因多肽筛选与鉴定效率高并可以建立非竞争的检测模式,基于多肽酶联检测技术包括噬菌体抗免疫复合物分析法(phage anti-immunocomplex assay, PHAIA)受到越来越多的重视。Dong Jiexian等^[27]建立基于多肽的非竞争的噬菌体抗免疫复合物分析法检测鱼样品中的孔雀石绿和无色孔雀石绿。该方法的灵敏度是抗体竞争法的16倍。Vanrell等^[28]通过化学法合成了来源于噬菌体展示的多肽,并使用该多肽建立了非竞争酶联检测方法用于检测草达灭和广灭灵,与抗体竞争法相比灵敏度分别提高了18倍和3.3倍。

基于多肽酶联分析方法可以建立非竞争方法检测食品中有毒有害的物质,提高了方法的灵敏度和阳性检出率。作为新型检测元件,多肽在食品安全检测中的应用将是一个重要方向。

2 结 语

人工模拟抗体非来源于传统抗体,模仿传统抗体作为分子识别元件应用于分析检测。由于食品安全检测中

目标物(大多是半抗原小分子物质)的传统抗体较难获得,人工模拟抗体将替代传统抗体在分析检测中发挥更大的作用。在未来的食品安全检测中,人工模拟抗体将会在以下两方面得到更进一步的发展。

首先,更多的新型检测材料将作为人工模拟抗体应用于检测中。人工模拟抗体的来源广泛,可以是DNA或RNA(适配体)、重组蛋白(重组受体)、多肽、小分子聚合材料(MIP)或是其他来源的物质。只要该物质具有检测元件所必须的特异性和敏感性,并具有比传统抗体更优越的性能,能够作为其补充和延伸,替代传统抗体作为分析技术中的检测元件,它就可以被定义为人工模拟抗体。目前学者研究较多的人工模拟抗体包括适配体、重组受体、MIP和多肽。新型检测材料作为人工模拟抗体需要很长的探索阶段和更多的实验考证。随着技术的发展,相信会有更多的人工模拟抗体替代传统抗体在食品安全分析技术中广泛使用。

其次,人工模拟抗体将会应用到各种新兴的分析技术中。免疫学检测技术有放射免疫法、酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法等。其中,酶联分析方法因灵敏度高、操作简便、成本低而发展得最为成熟。基于人工模拟抗体的酶联检测技术是人工模拟抗体替代传统抗体在食品安全检测中应用最广泛的技术,主要应用于真菌毒素残留、农兽药残留等。人工模拟抗体在其他食品安全免疫学检测技术中的应用也有报道,如胶体金层析法^[38-39]、电化学传感器技术^[40]等。随着食品安全检测技术的发展,人工模拟抗体将会和一些新兴的分析技术相结合,如时间分辨荧光免疫分析法、均相免疫分析技术、微流控技术等,以提高检测灵敏度及降低检测成本。

参考文献:

- [1] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346: 818-822. DOI:10.1038/346818a0.
- [2] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. *Science*, 1990, 249: 505-510. DOI:10.1126/science.2200121.
- [3] ZHOU W H, DING J S, LIU J W. A highly specific sodium aptamer probed by 2-aminopurine for robust Na^+ sensing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(21): 10377-10385. DOI:10.1093/nar/gkw845.
- [4] ZHOU W H, DING J S, LIU J W. A Selective Na^+ aptamer dissected by sensitized Tb^{3+} luminescence[J]. *Chembiochem*, 2016, 17: 1563-1570. DOI:10.1002/cbic.201600174.
- [5] SEIFERT M, HAINDL S, HOCK B. Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 386(3): 191-199. DOI:10.1016/S0003-2670(99)00044-6.
- [6] LIU L H, ZHOU X H, LU Y. Facile screening of potential xenoestrogens by an estrogen receptor-based reusable optical biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 97: 16-20. DOI:10.1016/j.bios.2017.05.026.

- [7] LAVIGNAC N, ALLENDER C J, BRAIN K R. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 510(2): 139-145. DOI:10.1016/j.aca.2003.12.066.
- [8] BUENO L, EL-SHARIF H F, SALLES M O, et al. MIP-based electrochemical protein profiling[J]. *Sensors and Actuators B*, 2014, 204: 88-95. DOI:10.1016/j.snb.2014.07.100.
- [9] SHRIVASTAV A M, MISHRA S K, GUPTA B D. Fiber optic SPR sensor for the detection of melamine using molecular imprinting[J]. *Sensors and Actuators B*, 2015, 212: 404-410. DOI:10.1016/j.snb.2015.02.028.
- [10] GAM-DEROUICH S, BOURDILLON C, CHAOUICHE S L, et al. Imprinted photonic hydrogels for the size- and shell-selective recognition of nanoparticles[J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 56: 9710-9714. DOI:10.1002/anie.201702540.
- [11] PAVAN S, BERTI F. Short peptides as biosensor transducers[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402(10): 3055-3070. DOI:10.1007/s00216-011-5589-8.
- [12] 陈庆富. 人工模拟抗体在食品快速检测中的应用及目前存在的问题[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(2): 117-120. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2006.02.040.
- [13] WENDLER J, HOFFMANN A, GROSS G, et al. Development of an enzyme-linked immunoreceptor assay (ELIRA) for quantification of the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 119(4): 425-435. DOI:10.1016/j.jbiotec.2005.04.021.
- [14] LI H, HUANG Y, YU Y, et al. Peptide-based method for detection of metastatic transformation in primary tumors of breast cancer[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(18): 9251-9256. DOI:10.1021/acs.analchem.5b01750.
- [15] 邵宁生, 李少华, 黄燕苹. SELEX技术及Aptamer研究的新进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(4): 329-335.
- [16] TOH S Y, CITARTAN M, GOPINATH S C, et al. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 64: 392-403. DOI:10.1016/j.bios.2014.09.026.
- [17] BARTHELMEBS L, JONCA J, HAYAT A, et al. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of ochratoxin A in wine[J]. *Food Control*, 2011, 22(5): 737-743. DOI:10.1016/j.foodcont.2010.11.005.
- [18] WANG Sai, YONG Wei, LIU Jiahui, et al. Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 57: 192-198. DOI:10.1016/j.bios.2014.02.032.
- [19] WANG Yuankai, ZOU Qi, SUN Jianhe, et al. Screening of single-stranded DNA (ssDNA) aptamers against a zearalenone monoclonal antibody and development of a ssDNA-based enzyme-linked oligonucleotide assay for determination of zearalenone in corn[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(1): 136-141. DOI:10.1021/jf503733g.
- [20] NIE Ji, DENG Yan, DENG Qinpei, et al. A self-assemble aptamer fragment/target complex based high-throughput colorimetric aptasensor using enzyme linked aptamer assay[J]. *Talanta*, 2013, 106: 309-314. DOI:10.1016/j.talanta.2012.11.018.
- [21] LIANG Xiao, WANG Zhanhui, WANG Chunmei, et al. A proof-of-concept receptor-based assay for sulfonamides[J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 438(2): 110-116. DOI:10.1016/j.ab.2013.03.028.
- [22] ZHANG Jing, WANG Zhanhui, WEN Kai, et al. Penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* and its application in screening of beta-lactams in milk[J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 442(2): 158-165. DOI:10.1016/j.ab.2013.07.042.
- [23] CHENG Guyue, LI Fei, PENG Dapeng, et al. Development of an enzyme-linked-receptor assay based on Syrian hamster beta2-adrenergic receptor for detection of beta-agonists[J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 459: 18-23. DOI:10.1016/j.ab.2014.05.005.
- [24] SURUGIU I, YE L, YILMAZ E, et al. An enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay[J]. *Analyst*, 2000, 125(1): 13-16. DOI:10.1039/A908871G.
- [25] FANG Guozhen, LU Jinping, PAN Mingfei, et al. Substitution of antibody with molecularly imprinted film in enzyme-linked immunosorbent assay for determination of trace ractopamine in urine and pork samples[J]. *Food Analytical Methods*, 2011, 4(4): 590-597. DOI:10.1007/s12161-011-9206-4.
- [26] LIU Huilin, REN Lei, FANG Guozhen, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of tribenuron-methyl in water and soil using a molecularly imprinted film as an artificial antibody[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5(20): 5677-5683. DOI:10.1039/c3ay40880a.
- [27] DONG Jiexian, XU Chao, WANG Hong, et al. Enhanced sensitive immunoassay: noncompetitive phage anti-immune complex assay for the determination of malachite green and leucomalachite green[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(34): 8752-8758. DOI:10.1021/jf5019824.
- [28] VANRELL L, GONZALEZ-TECHERA A, HAMMOCK B D, et al. Nanopeptamers for the development of small-analyte lateral flow tests with a positive readout[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(2): 1177-1182. DOI:10.1021/ac3031114.
- [29] 高茜, 朱洲海, 曾婉俐, 等. G蛋白偶联受体家族味觉受体的信号转导及应用研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(3): 286-291. DOI:10.7506/spkx1002-10.7506.
- [30] 钱云霞, 钱凯先. 雌激素相关受体ERR的功能及其调控[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(6): 495-500.
- [31] YE L, MOSBACH K. Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics[J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2001, 48(1/2/3): 149-157. DOI:10.1016/S1381-5148(01)00050-5.
- [32] PILETSKY S A, PILETSKA E V, BOSSI A, et al. Substitution of antibodies and receptors with molecularly imprinted polymers in enzyme-linked and fluorescent assays[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16(9/10/11/12): 701-707. DOI:10.1016/S0956-5663(01)00234-2.
- [33] 屈玮, 袁静静, 朱威东, 等. 噬菌体展示技术筛选可特异结合阪崎肠杆菌的多肽[J]. *食品科学*, 2013, 34(21): 217-220. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201321044.
- [34] 胡雨欣, 何早, 陈力力, 等. 噬菌体展示技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. *食品科学*, 2015, 36(11): 236-239. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201511044.
- [35] CHOW E, GOODING J J. Peptide modified electrodes as electrochemical metal ion sensors[J]. *Electroanalysis*, 2006, 18(15): 1437-1448. DOI:10.1002/elan.200603558.
- [36] ALBRECHT C, FECHNER P, HONCHARENKO D, et al. A new assay design for clinical diagnostics based on alternative recognition elements[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(10): 2302-2308. DOI:10.1016/j.bios.2010.03.022.
- [37] ADJEMIAN J, ANNE A, CAUET G, et al. Cleavage-sensing redox peptide monolayers for the rapid measurement of the proteolytic activity of trypsin and alpha-thrombin enzymes[J]. *Langmuir*, 2010, 26(12): 10347-10356. DOI:10.1021/la100397g.
- [38] SHIM W B, KIM M J, MUN H, et al. An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B1[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 62: 288-294. DOI:10.1016/j.bios.2014.06.059.
- [39] CHEN A L, YANG S M. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 71: 230-242. DOI:10.1016/j.bios.2015.04.041.
- [40] YANG X H, KONG W J, YANG M H, et al. Application of aptamer identification technology in rapid analysis of mycotoxins[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(2): 297-306. DOI:10.1016/s1872-2040(13)60630-1.