

DNA酶生物传感器在食源性致病菌检测中的研究进展

闫夏萌¹, 张蕴哲¹, 卢鑫², 徐慧², 张伟^{1,3,4}, 袁耀武^{1*}

(1. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学 理工系, 河北 沧州 061100;
3. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001; 4. 河北省人畜共患病原微生物分析与防控重点
实验室, 河北 保定 071000)

摘要: 食源性致病菌是可以引起食物中毒或以食品为传播媒介的致病性细菌, 其广泛存在于各类食品基质中, 在食品加工运输过程中可以存活较长时间。人们摄入受污染食品会引发各种疾病, 严重威胁人体健康。近年来, 基于功能核酸的DNA酶生物传感器凭借其高稳定性、易于合成修饰、成本低廉等技术优势, 其在致病菌检测领域得到广泛应用, 并产生基于比色、荧光、电化学等致病菌检测技术。该文基于DNA酶生物传感器在食源性致病菌检测中的发展近况, 对2种DNAzyme检测机制进行综述, 并从分类及应用范围进行介绍, 为食源性致病菌检测提供参考。

关键词: 食源性致病菌; DNA酶; 生物传感器; 检测技术; 食品安全

Research Progress on DNAzyme Biosensor in the Detection of Foodborne Pathogens

YAN Xia-meng¹, ZHANG Yun-zhe¹, LU Xin², XU Hui², ZHANG Wei^{1,3,4}, YUAN Yao-wu^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China;
2. Department of Science and Engineering, Hebei Agricultural University, Cangzhou 061100, Hebei, China;
3. College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China; 4. Key Laboratory
of Analysis and Prevention and Control of Zoonosis in Hebei Province, Baoding 071000, Hebei, China)

Abstract: Foodborne pathogens are pathogenic bacteria that can cause food poisoning or take food as the transmission medium, which widely exist in all kinds of food substrates and can survive for a long time during food processing and transportation. The ingestion of contaminated food can cause various diseases and seriously threaten human health. In recent years, the DNAzyme biosensor based on functional nucleic acid has been widely used in the field of pathogen detection because of its high stability, easy synthesis and modification, low cost and other technical advantages, which facilitates the development of pathogen detection technologies based on colorimetry, fluorescence and electrochemistry. Based on the research progress on the DNAzyme biosensor in the detection of foodborne pathogens in recent years, the present study reviewed two detection mechanisms of DNAzyme and introduced the classification and application of DNAzyme, aiming to provide references for the detection of foodborne pathogens.

Key words: foodborne pathogens; DNAzyme; biosensor; detection technology; food safety

引文格式:

闫夏萌, 张蕴哲, 卢鑫, 等. DNA酶生物传感器在食源性致病菌检测中的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(5): 202-208.

YAN Xiameng, ZHANG Yunzhe, LU Xin, et al. Research Progress on DNAzyme Biosensor in the Detection of Foodborne Pathogens[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5): 202-208.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172288, 31371772); 河北省自然科学基金重点项目(C2019204342); 中央引导地方科技发展资金项目(216Z5501G); 河北省外专百人计划(360-0803-JSN-3YGS); 河北农业大学食品加工学科群经费资助(2021-06)

作者简介: 闫夏萌(1997—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品质量安全检测。

* 通信作者: 袁耀武(1970—), 男, 教授, 研究方向: 食品质量安全生物检测、食品营养与安全。

近年来,由食源性致病菌引起的食物中毒事件逐年增加,人类食用被致病菌污染的食品可能会引起胃肠炎、脑膜炎、败血症等疾病,严重时危及生命^[1]。目前常见的食源性致病菌有致病性大肠埃希氏菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌等,它们广泛存在于水产品、乳制品中,会引发各种严重疾病^[2]。2019年在南非由单核细胞增生李斯特菌感染暴发的食源性疾病,导致多人死亡^[3];2020年,宁夏报告了因食用被鼠伤寒沙门氏菌污染的牛肉造成多人发病^[4]。因此,实现快速、准确、灵敏的食源性致病菌检测,对预防公共卫生安全和食品安全至关重要。

各国针对各类食品基质中微生物最高含量制定了相应标准,我国则依据 GB 4789.1—2016《食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 总则》为食品安全提供参考标准^[5]。其中传统培养法检测周期长、程序繁琐,不适合快速筛查^[6]。基于抗原-抗体特异性相互作用的免疫学方法操作简单,但灵敏度和准确性不足^[7]。随着分子生物学技术发展,相继开发了多种基于核酸扩增的方法,在病原体检测中发挥了至关重要的作用。目前,常用的核酸扩增技术包括聚合酶链式扩增(polymerase chain reaction, PCR)技术、滚换扩增技术(rolling circle amplification, RCA)等。分子生物学技术凭借其检测灵敏、特异性强、灵敏度高优点而被广泛应用。

随着指数富集配体的系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)的发展,除了通过人工筛选发现的适体,还获得了具有催化功能的 DNA 序列,这些催化 DNA 分子通常被称为 DNA 酶(DNAzyme)^[8]。自1994年首次报道 DNA 酶以来,已从 DNA 文库中筛选和鉴定出数百个具有良好催化活性的 DNA 分子^[9]。DNA 酶凭借其易于合成修饰、成本低廉、良好的热稳定性和化学稳定性等优势,被广泛应用于致病菌检测。

本文综述近年来基于 DNA 酶技术开展食源性致病菌检测的研究进展和 2 种不同 DNA 酶机制,并从分类及应用范围进行介绍,旨在介绍 DNA 酶技术检测食源性致病菌研究的发展现状,为新型食源性致病菌检测技术开发提供参考。

1 DNA 酶机制分类

功能性核酸(functional nucleic acids, FNA)是通过 SELEX 技术从随机 DNA 或 RNA 序列文库中筛选得到的单链寡核苷酸序列,主要包括适配体和 DNA 酶两种^[10-11]。DNA 酶是一类具有酶特性的 FNA,主要表现为 RNA 切割活性、DNA 连接酶活性、DNA 水解活性和 DNA 激酶活性。其中,基于模拟辣根过氧化物酶活性(horseradish peroxidase, HRP)和核酸切割 DNA 酶活

性(RNA-cleaving DNAzyme, RCD)应用最为广泛^[12]。

1.1 基于模拟辣根过氧化物酶活性

作为一种分子报告元件,DNA 链凭借其独特的二级结构,在辅因子的协助下模拟天然酶催化各种氧化反应,产生可监测信号^[13]。目前,模拟 HRP 活性研究中 G-四链体(G-quadruplex)技术应用最为广泛。富含鸟嘌呤(G)的 DNA 序列通过形成分子内 G-四链体,可以与血红素(Hemin)紧密结合,形成 G-四链体-Hemin DNA 复合物(GQ-DNAzyme, GQ),表现出 HRP 活性^[13]。GQ-DNAzyme 与蛋白酶相比具有制造简单、成本低、储存方便、稳定性高等优点^[14]。

当血红素与 G-四链体结合,G-四链体能为血红素提供轴向配体和疏水环境,催化 O-O 不对称断裂,类似于 HRP 中远端组氨酸的功能^[15]。G-四链体还为血红素提供了一种平面结构,促进了氢的交换,提高其稳定性和催化活性^[16]。GQ-DNAzyme 与蛋白酶相比,成本低且容易获得^[17]。Luo 等^[18]开发了一种基于 PCR 和 DNAzyme 技术的幽门螺杆菌检测方法,利用特殊设计的引物使 PCR 产物的 3' 端含有形成 DNAzyme 的 G-四链体序列,血红素与 G-四链体结合后形成 GQ-DNAzyme,可催化 H₂O₂ 介导的 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸转化为绿色自由基阳离子,颜色会发生变化,该方法可通过肉眼检测低至 100 pg/μL 的基因组 DNA。基于 DNAzyme 开发的检测技术因其良好的特异性和灵敏度而被广泛用于病原微生物的检测。此外,G-四链体还可以同荧光染料结合,也显示出较大的发展潜力。

荧光染料是指吸收某一波长的光波后能发射出另一波长大于吸收光波的物质,它们大多是含有苯环或杂环并带有共轭双键的化合物^[19]。凭借优异的光物理性能、良好的生物相容性以及易于合成和修饰等优点广泛用于致病菌检测,但荧光染料的性能也受多种因素(如温度、pH 值、光照、核酸类型、分子性质)影响。研究发现,G-四链体与某些特异性结构阳离子荧光染料通过静电相互作用、 π 堆积或与 G-四链体结构的环、槽或磷酸骨架的氢键相互作用增强荧光信号^[20]。此外,G-四链体的高热稳定性能够避免染料间的批次差异^[21]。目前,同 G-四链体结合并产生荧光信号(主要是荧光增强)的荧光染料见表 1^[22]。其中,菁类染料及其衍生物硫磺素 T、吡啶类染料 N-甲基吡啶二丙酸 IX 等化合物应用最为广泛^[23]。Chen 等^[24]开发了一种基于碲化镉量子点和 N-甲基吡啶二丙酸 IX 的双荧光可视化方法用于检测致病性大肠埃希氏菌,该方法可检测低至 10 CFU/mL 的致病性大肠埃希氏菌,能实现致病菌的实时检测。

基于 DNAzyme 检测技术在致病菌检测方面已取

表1 常用于G-四链体染料按作用类型分类

Table 1 Classification of common G-quadruplex dyes according to action mechanism

作用类型	荧光染料
信号增强类染料	花菁类染料、三苯甲烷染料、吡啶、吡啶、天然和合成化合物、金属配合物
信号减弱类染料	吡啶染料(异黄酮和吡啶黄)、具有中性/阳离子的杂环配体、亚甲基蓝、葱环类
不显示荧光变化的染料	硼二吡咯亚甲基染料、吡哆醇的炔衍生物

得重大进展,但仍存在活性不足、输出信号不稳定等问题。目前常用的 DNAzyme 活性调节方法有:1)改变 G-四链体序列,使其拓扑结构变化^[25];2)筛选合适阳离子,使 G-四链体结构变化,影响其与血红素的结合^[26];3)在 G-四链体的 3' 端添加腺嘌呤脱氧核糖核苷酸,提高其催化活性^[27];4)添加三磷酸腺苷稳定催化过程中产生的自由基以提高 DNAzyme 催化活性^[28]。此外,研究还发现血红素本身具有类 HRP 活性,产生背景信号,降低方法灵敏度。Zhang 等^[29]通过筛选一系列染料后发现血红素抑制剂(SYBR Green I,一种 DNA 染色染料)可以抑制背景信号,只需添加 0.84 μmol/L SYBR Green I,50 nmol/L 血红素的背景就会被抑制 30 倍以上,为调节 DNAzyme 活性开辟了新思路。

1.2 基于核酸切割活性

核酸切割 DNA 酶活性(RNA-cleaving DNAzyme, RCD)是 mRNA 加工过程中发现的一种核酸切割 DNAzyme^[30]。当体系中存在靶物质时,RCD 可以催化 RNA 在 DNA 序列特定位点进行切割(如 3' 端磷酸二酯键),从而破坏 mRNA 转录过程。作为分子识别元件,RCD 具有识别细菌生物标记物、RNA 切割和荧光生成等功能,再结合各种信号转导方式,开发出多种检测方法^[31]。Zhang 等^[9]通过在体外选择,使用来自给定微生物的粗制细胞外基质作为复合靶标,绕过传统鉴别方法中目标菌株的分离和鉴定步骤。针对目标细菌粗制细胞外基质组分的庞大 DNA 文库来生成细菌特异性的 DNAzyme 传感器,开发出便捷的分析方法来直接检测目标微生物。Shen 等^[32]开发了一种具有荧光信号生成能力的 DNAzyme,即 RNA 切割荧光 DNA 酶。该研究将致病性大肠埃希氏菌培养物中的粗制细胞外基质作为复合靶标,通过切割靶物质特定位点,使荧光团与猝灭剂分离,产生荧光信号。该方法灵敏度较高,可检测低至 100 个致病性大肠埃希氏菌细胞。

2 基于 DNAzyme 在生物传感器中的分类与应用

生物传感器由识别元件、受体和传感层组成,识别元件特异性识别目标分析物(病原菌),在传感层传导体下产生可测量的生物识别信号。基于不同生物传感

构件构建的生物传感器能有效发挥其作用并在致病菌检测方面显示突出优势^[33]。

2.1 比色生物传感器

比色法是通过肉眼直接观察颜色深浅或测量有色物质溶液颜色深度来确定待测组分含量的一种定量检测方法,具有操作简单、成本低等优势^[34]。根据制备比色传感器的材料或试剂的类型不同,可分为以下 4 个:1)基于靶诱导的颗粒间距离、尺寸、形态或组成变化的等离子体纳米粒子(如银、金纳米粒子)的颜色变化^[35];2)光子晶体对目标的荧光调节或颜色变化^[36];3)天然酶、酶模拟物、人工酶或纳米酶催化的 3',3',5',5'-四甲基联苯胺(3',3',5',5'-tetramethylbenzidine, TMB)^[37];4)通过非酶反应直接或间接引起的着色产物的产生或显色剂的显色变化^[38]。

Qin 等^[39]开发了一种基于 DNAzyme 和不对称重组酶聚合酶扩增的可视化检测方法,在正向引物(F)的 5' 末端修饰 G-四链体互补序列,当体系中存在靶标时,引物特异性识别并结合靶标,在 DNA 聚合酶作用下形成双链 DNA。当低浓度的反向引物(R)耗尽,将以指数方式生成大量含有 G-四链体序列的单链 DNA。此时体系中加入血红素与含有 G4 序列的产物结合,产生的 G-四链体-Hemin DNAzyme 可高效催化 H₂O₂ 与 TMB 反应,使溶液呈蓝色。该方法在较短时间内,通过溶液颜色变化实现对克罗诺杆菌的特异性检测,检出限低至 2.2 CFU/mL。Yin 等^[40]基于基因组编辑工具 CRISPR-Cas12a 的反式切割活性,实现了对沙门氏菌特异性 *invA* 基因的高灵敏检测,结果可通过肉眼或手机定性定量检测。比色传感器因其操作方便、可视化检测而受到人们的青睐,在医疗诊断、蛋白质检测、毒素和食源性病原体检测方面提供了一个简单、快速、灵敏的检测方法。然而与荧光、化学发光等其他检测方法相比,比色传感器灵敏度和特异性较低,检出限相对较高,仅适用于现场快速检测。

2.2 荧光生物传感器

近年来,荧光传感器技术凭借其优异的检测性能得到快速发展。分析无需昂贵的设备和仪器即可实现原始样品或预浓缩样品中的靶物质的测定,从而被广泛应用于细胞成像、金属、有机物、酶、细菌等物质的分析检测中^[41-42]。

根据分子的荧光特性,许多具有固有荧光特性的生物分子与配体结合,利用分子荧光行为的变化实现检测。依据检测要求不同,需使用不同的荧光标记或探针,追求信号的进一步放大。DNAzyme 作为一种信号转换放大技术,可将检测信号转换为荧光信号并实现进一步放大。如 Zhou 等^[43]将 DNAzyme 介导的 RNA 切割(DNAzyme-mediated RNA cleavage, DRC)、组装

介导的链释放(assembly-mediated strand release, ASR)、催化发夹组装(catalytic hairpin assembly, CHA)与分子间G-四链体相结合建立了一种双DNAzyme检测方法。将先前报道的RCD的DRC反应,命名为EC1。在致病性大肠埃希氏菌存在的情况下,RNA切割荧光DNAzyme与EC1结合形成RFD-EC1复合物,该复合物能特异性识别并结合致病性大肠埃希氏菌,RCD裂解其底物DNA3,产生P1和P2两个DNA片段。当DNA4/DNA5复合物与DNA1-3结合时,形成四路连接,DNA5从DNA4/5复合物中游离出来,触发CHA反应,使发夹结构H1、H2相互杂交,形成分子间G-四链体,与原卟啉IX结合,激发荧光。不存在靶标时,DNA3保持完整,不与DNA分子1、2和4/5相互作用,不发生后续反应,无荧光响应。该方法可检测低至50 cells/mL致病性大肠埃希氏菌,且无需蛋白酶参与。

Zhou等^[44]建立了一种简单、高效的DNAzyme荧光磁珠生物传感器,基于磁珠、DNA酶和光学发光3种信号放大策略用于致病性大肠埃希氏菌O157:H7的检测。致病性大肠埃希氏菌特异性RCD可以特异性识别粗细胞内混合物中的靶蛋白,从而引起其构象变化,并诱导滚环扩增产生铜纳米团簇并使之发光。这种级联放大设计可以捕获样本中的微弱信号,巧妙解决了食源性致病菌检测中信号弱、灵敏度低的问题,该生物传感器在10 CFU/mL~1 000 CFU/mL呈现良好的线性范围,检测限为1.57 CFU/mL,为生物传感器的发展提供了新思路。

2.3 电化学生物传感器

电化学检测依靠化学物质与固定探针(例如DNA)在电极间的相互作用来达到检测目的,因其较高的灵敏度与尺寸小等优势广泛用于致病菌检测。电化学生物传感器主要包含3个类型:依赖于电极修饰、固液相反应放大阻抗信号进行检测的阻抗生物传感器^[45]、依靠在电极上发生氧化还原反应产生电流、电压变化的电流/伏安生物传感器以及其他类型的电化学生物传感器^[46-47]。在检测方面,3种类型的电化学生物传感器对于致病菌检测并无不同,只是信号转换和放大方面存在差异。

典型的电化学生物传感器由特异性结合目标的生物受体、换能器元件和数据分析器组成。在生物受体和目标物相互作用时,信号以电子的形式产生,利用数据分析的传感器对该信号进行电子测量^[48]。Guo等^[49]开发了一种基于RCA和模拟辣根过氧化物酶活性的DNA酶的致病性大肠埃希氏菌检测技术,首先将致病性大肠埃希氏菌多克隆抗体固定在电极表面,在靶物质(致病性大肠埃希氏菌)存在下,致病性大肠埃希氏

菌特异性识别被捕获在电极表面。加入适配体-引物探针,探针与表面捕获的致病性大肠埃希氏菌结合。随后探针引物游离序列部分参与后续的RCA反应,产生了大量含G-四链体结构的长DNA分子。体系中游离的血红素与G-四链体分子结合折叠形成DNAzyme结构,催化H₂O₂产生电化学响应。该方法与传统电化学方法相比,大大提高了生物传感器的灵敏度,检测限低至8 CFU/mL。此外,Bai等^[50]还将RCA与茧状DNA纳米结构相结合,开发了一种致病性大肠埃希氏菌O157:H7的特异性检测方法。通过RCA产生大量的G-四链体序列,利用血红素进行信号放大。该方法在10 CFU/mL~10⁶ CFU/mL呈现良好的线性范围,检测限为10 CFU/mL。

2.4 表面等离子体共振

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)是表面增强拉曼的重要增强机理之一,由于金属纳米粒子的尺寸效应及量子效应通过激发光照射能引起表面等离子体共振,从而大大增强拉曼散射信号,达到痕量检测的目的^[51]。SPR技术以其所需样本容量小、检测快速以及低成本而备受关注。到目前为止,SPR已成功用于多种生物分子(核酸、小分子、蛋白质等)的检测。SPR传感器利用纳米材料和生物材料实现对金属膜上各种物质的检测^[52]。然而,传统的SPR样品通道间由于排列紧密,存在相互干扰的情况,无法检测到折射率的微小变化,限制了SPR的进一步应用,尤其是对复杂基质中痕量靶标的检测^[53]。因此,许多研究人员一直致力于采用新型传感器结构来提高SPR传感器的灵敏度。如Yu等^[54]开发了一种名为“DNAzyme集等离子体纳米传感器”用于检测致病性大肠埃希氏菌,该方法将致病性大肠埃希氏菌特异性RCD作为分子识别元件,酶响应等离子体纳米粒子的局部表面等离子体共振作为信号读数,通过杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)的级联信号放大过程和磁珠上的酶催化2个传感元件,实现肉眼检测小于50 CFU/mL的致病性大肠埃希氏菌。

Xia等^[55]利用自催化多组分脱氧核酶(multi-component DNAzyme, MNAzyme)切割和HCR开发了一种新型SPR生物传感器实现金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和致病性大肠埃希氏菌的快速灵敏检测。该方法将修饰在磁珠上的MNAzyme作为分子识别和信号放大元件,与SPR传感膜上HCR介导的纳米线自组装相结合将信号进一步放大,检测限分别低至67.57 CFU/mL和61 CFU/mL,表现出优异的性能和高灵敏度。

2.5 其他

除了上述基于DNAzyme在致病菌检测的应用,

DNAzyme 也可同纳米材料、微流控技术和免疫学技术等相结合,应用于致病菌检测。当纳米材料(石墨烯、氧化石墨烯、磁性纳米材料等)和 DNAzyme 联用,将 DNAzyme 特异性识别的优势同纳米材料的信号转导能力相结合,可进一步提高检测灵敏度,拓宽 DNAzyme 生物传感技术应用范围。Zheng 等^[56]开发了一种基于 DNA 与银纳米团簇(DNA-AgNCs)相结合的荧光检测技术。其中 DNAzyme 作为识别元件,DNA-AgNCs 复合物作为荧光信号元件,实现了致病性大肠埃希氏菌的超灵敏检测。微流控技术因其体积小、分析速度快以及低样品、试剂消耗等优点而广泛用于多重样品的同时分析。如 Yu 等^[57]将含靶标特异性适体的 Fe_3O_4 纳米金磁珠($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$)同磁性 DNA 编码探针相结合,利用微流控技术建立了一种新型适体传感器,该检测可在 50 min 内定量检测 2 种靶标物质,提高检测效率。Chen 等^[58]将多分支 DNA 纳米结构修饰的探针与微流控芯片相结合,仅需微量样品,经 3 min 分离即可实现多靶标同时检测。目前,各种新兴技术的开发正处于蓬勃发展的阶段,与 DNAzyme 生物传感器的联用将进一步推动检测技术的应用与发展。

3 结语

本文综述了目前常用于致病菌检测的 2 种不同 DNAzyme 技术,并从分类、技术特点及应用范围 3 个方面进行介绍。与其他生物传感器相比,基于 DNAzyme 设计的传感器灵敏度高、特异性强,在致病菌检测领域具有突出优势和广泛的应用前景。但 DNAzyme 的应用仍有一定的局限性,总结为以下几个方面:1) DNAzyme 催化活性不足。尽管有相关研究可以提高由 G-四链体组成的 DNAzyme 的活性,但与蛋白酶的活性相比,其稳定性和催化效率还是有很大的差距;2) 特异性识别 G-四链体的染料筛选。染料可以特异性结合 G-四链体,具有高组织穿透能力和高发射率。但存在着高背景信号和光漂白等限制,降低检测灵敏度;3) 现场操作困难。目前研究大多在实验室内进行,如何使 DNAzyme 在现场检测(如开发试纸条)和体内测试等临床应用中发挥稳定作用是当前面临的主要挑战。

4 展望

为解决以上问题,未来 DNAzyme 的探索应致力于以下几点。首先,需要对目前选择的 DNAzyme 进行更加详细的研究,尤其是金属离子与目标分析物的之间作用,利用其变构作用激活 DNAzyme,而此过程需要金属离子参与,应更深入探索它们的目标识别机制;其次,目前用于检测致病菌的 DNAzyme 仅用作识别靶

物质特异性位点,但理论上可以使用任何靶物质来分离适配体,因此可以进行体外选择以衍生出更多的致病菌特异性 RCD 过程。需要对 DNAzyme 进一步表征,确认结合、截断和突变位点,未来有望分离和表征出更好的 DNAzyme;最后,基于核酸与纳米材料的相容性,DNAzyme 在生物成像和纳米材料方面也具有广阔的应用前景。结合纳米技术和 DNA 纳米材料可以进一步浓缩目标分析物并扩大信号,可以设计利用 DNAzyme 来识别目标,与纳米材料结合进行信号转导,进一步提高病原菌的检测灵敏度。随着科学研究和技术的不断创新和发展,DNAzyme 将以更为简单、便捷的方式广泛应用于食品中的致病菌检测和环境监测领域,对保障公共卫生安全具有重要的现实意义和参考价值。

参考文献:

- [1] LI Y, YAN C Y, CHEN J, et al. An all-in-one nucleic acid enrichment and isothermal amplification platform for rapid detection of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2022, 139: 109096.
- [2] MAJIDINASAB M, HAYAT A, MARTY J L. Aptamer-based assays and aptasensors for detection of pathogenic bacteria in food samples[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018, 107: 60-77.
- [3] SOON J M, BRAZIER A K M, WALLACE C A. Determining common contributory factors in food safety incidents-A review of global outbreaks and recalls 2008-2018[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 97: 76-87.
- [4] 张燕飞,郭邦成,刘翔,等.宁夏某市一起食物中毒事件的调查及溯源分析[J].疾病预防控制通报,2021,36(6):30-33,73. ZHANG Yanfei, GUO Bangcheng, LIU Xiang, et al. Surveillance and traceability analysis of a food poisoning event in a city of Ningxia[J]. Bulletin of Disease Control & Prevention (China), 2021, 36(6): 30-33, 73.
- [5] MA L Z, LIU J W. Catalytic nucleic acids: Biochemistry, chemical biology, biosensors, and nanotechnology[J]. iScience, 2020, 23(1): 100815.
- [6] ZHANG W Q, FENG Q, CHANG D R, et al. *In vitro* selection of RNA-cleaving DNAzymes for bacterial detection[J]. Methods, 2016, 106: 66-75.
- [7] BAČDA E, BAČDA E, KOCAK A, et al. Investigation of Binding behaviour of a water-soluble gallium (III) phthalocyanine with double-stranded and G-quadruplex DNA via experimental and computational methods[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1240: 130536.
- [8] MA X Y, DING W, WANG C, et al. DNAzyme biosensors for the detection of pathogenic bacteria[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 331: 129422.
- [9] NISHIO M, TSUKAKOSHI K, IKEBUKURO K. G-quadruplex: Flexible conformational changes by cations, pH, crowding and its applications to biosensing[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021, 178: 113030.
- [10] FEI Y, FANG R, XIAO L N, et al. The development of a colorimetric biosensing assay for the detection of *Helicobacter pylori* in feces[J]. Analytical Biochemistry, 2022, 651: 114737.

- [11] KUMAR S, JAIN S, DILBAGHI N, et al. Advanced selection methodologies for DNazymes in sensing and healthcare applications[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2019, 44(3): 190–213.
- [12] WANG Y Y, YANG Q Q, GAO Z Q, et al. Recent advance of RNA aptamers and DNazymes for microRNA detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 212: 114423.
- [13] COZMA I, MCCONNELL E M, BRENNAN J D, et al. DNazymes as key components of biosensing systems for the detection of biological targets[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 177: 112972.
- [14] TRAM K, KANDA P, SALENA B J, et al. Translating bacterial detection by DNazymes into a litmus test[J]. Angewandte Chemie (International Ed in English), 2014, 53(47): 12799–12802.
- [15] MCCONNELL E M, MORRISON D, ALEJANDRA REY RINCON M, et al. Selection and applications of synthetic functional DNAs for bacterial detection[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 124: 115785.
- [16] DENG P X, ZHENG S, YUN W, et al. A visual and sensitive Hg^{2+} detection strategy based on split DNzyme amplification and peroxidase-like activity of hemin-graphene composites[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 210: 335–340.
- [17] YANG H L, ZHOU Y, LIU J W. G-quadruplex DNA for construction of biosensors[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 132: 116060.
- [18] LUO D Q, CHEN H Y, ZHOU P, et al. Oligonucleotides and pesticide regulated peroxidase catalytic activity of hemin for colorimetric detection of isocarbophos in vegetables by naked eyes[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411(29): 7857–7868.
- [19] LIU Z M, YAO C H, WANG Y M, et al. Visual diagnostic of *Helicobacter pylori* based on a cascade amplification of PCR and G-quadruplex DNzyme as a color label[J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 146: 46–50.
- [20] 杨艳, 王桂姬, 周广运, 等. 多种绿色 DNA 嵌入染料实时荧光 PCR 检测猪 DNA 效果比较[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 283–289.
- YANG Yan, WANG Guiji, ZHOU Guangyun, et al. Comparison of multiple green fluorescence DNA intercalating dyes for identify pork DNA using real-time PCR[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 283–289.
- [21] WANG X X, ZHU L J, LI S T, et al. Fluorescent functional nucleic acid: Principles, properties and applications in bioanalyzing[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021, 141: 116292.
- [22] DI LEVA F S, NOVELLINO E, CAVALLI A, et al. Mechanistic insight into ligand binding to G-quadruplex DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(9): 5447–5455.
- [23] YEASMIN KHUSBU F, ZHOU X, CHEN H C, et al. Thioflavin T as a fluorescence probe for biosensing applications[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018, 109: 1–18.
- [24] CHEN P P, WANG Y, MENG Y M, et al. Color and distance two-dimensional visual and homogeneous dual fluorescence analysis of pathogenic bacteria in clinical samples[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 357: 131422.
- [25] PLATELLA C, RICCARDI C, MONTESARCHIO D, et al. G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects, 2017, 1861(5): 1429–1447.
- [26] KWOK C K, MERRICK C J. G-quadruplexes: Prediction, characterization, and biological application[J]. Trends in Biotechnology, 2017, 35(10): 997–1013.
- [27] CAO Y W, LI W J, PEI R J. Exploring the catalytic mechanism of multivalent G-quadruplex/hemin DNazymes by modulating the position and spatial orientation of connected G-quadruplexes[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1221: 340105.
- [28] KONG D M. Factors influencing the performance of G-quadruplex DNzyme-based sensors[J]. Methods, 2013, 64(3): 199–204.
- [29] ZHANG C, ZHANG H C, WU P, et al. Suppressing the background activity of hemin for boosting the sensitivity of DNzyme-based biosensors by SYBR Green I[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 169: 112603.
- [30] ZIMMERMANN A C, WHITE I M, KAHN J D. Nucleic acid-cleaving catalytic DNA for sensing and therapeutics[J]. Talanta, 2020, 211: 120709.
- [31] LU S S, WANG S, ZHAO J H, et al. A pH-regulated stimuli-responsive strategy for RNA-cleaving DNzyme[J]. Science China Chemistry, 2020, 63(3): 404–410.
- [32] SHEN Z F, WU Z S, CHANG D R, et al. A catalytic DNA activated by a specific strain of bacterial pathogen[J]. Angewandte Chemie (International Ed in English), 2016, 55(7): 2431–2434.
- [33] PEBDENI A B, ROSHANI A, MIRSADOUGHI E, et al. Recent advances in optical biosensors for specific detection of *E. coli* bacteria in food and water[J]. Food Control, 2022, 135: 108822.
- [34] KHANSILI N, RATTU G, KRISHNA P M. Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 265: 35–49.
- [35] CHATTERJEE S, LOU X Y, LIANG F, et al. Surface-functionalized gold and silver nanoparticles for colorimetric and fluorescent sensing of metal ions and biomolecules[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2022, 459: 214461.
- [36] LI L, LI J R, XU J J, et al. Recent advances of polymeric photonic crystals in molecular recognition[J]. Dyes and Pigments, 2022, 205: 110544.
- [37] 卢春霞, 闫圣坤, 刘成江, 等. 构建氯化血红素/G-四链体 DNA 酶比色生物传感器检测食品中苏丹红[J]. 食品科学, 2022, 43(22): 346–352.
- LU Chunxia, YAN Shengkun, LIU Chengjiang, et al. A colorimetric biosensor based on hemin/G-quadruplex DNazymes for the detection of Sudan dyes in foods[J]. Food Science, 2022, 43(22): 346–352.
- [38] PIRSA S, SANI I K, MIRTALEBI S S. Nano-biocomposite based color sensors: Investigation of structure, function, and applications in intelligent food packaging[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2022, 31: 100789.
- [39] QIN X, WANG Y T, LI H X, et al. A sensitive visual DNzyme-based strategy for *Cronobacter sakazakii* in PIF by aRPA[J]. Food Control, 2022, 138: 109035.
- [40] YIN L J, DUAN N H, CHEN S, et al. Ultrasensitive pathogenic bacteria detection by a smartphone-read G-quadruplex-based CRISPR-Cas12a bioassay[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 347: 130586.
- [41] ZHOU Y F, HUANG X L, HU X Y, et al. Recent advances in colorimetry/fluorimetry-based dual-modal sensing technologies[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 190: 113386.
- [42] CHEN Y B, LI K, ZHANG S S, et al. Turn-on fluorescence probe for BSA detection and selective cell imaging[J]. Dyes and Pigments, 2022, 202: 110267.
- [43] ZHOU Z X, BRENNAN J D, LI Y F. A multi-component all-DNA biosensing system controlled by a DNzyme[J]. Angewandte Chemie (International Ed in English), 2020, 59(26): 10401–10405.
- [44] ZHOU Z Q, ZHANG Y Z, GUO M Z, et al. Ultrasensitive magnetic

- DNAzyme-copper nanoclusters fluorescent biosensor with triple amplification for the visual detection of *E. coli* O157: H7[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 167: 112475.
- [45] RIU J, GIUSSANI B. Electrochemical biosensors for the detection of pathogenic bacteria in food[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 126: 115863.
- [46] LIU Y J, JIANG D, WANG S Y, et al. A microfluidic biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium* based on magnetic separation, enzymatic catalysis and electrochemical impedance analysis[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2022, 33(6): 3156-3160.
- [47] QIAN X C, QU Q, LI L, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of *Clostridium perfringens* DNA based morphology-dependent DNA adsorption properties of CeO₂ nanorods in dairy products[J]. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2018, 18(6): 1878.
- [48] CAPOBIANCO J A, ARMSTRONG C M, LEE J, et al. Detection of pathogenic bacteria in large volume food samples using an enzyme-linked immunoelectrochemical biosensor[J]. *Food Control*, 2021, 119: 107456.
- [49] GUO Y N, WANG Y, LIU S, et al. Label-free and highly sensitive electrochemical detection of *E. coli* based on rolling circle amplifications coupled peroxidase-mimicking DNAzyme amplification[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 75: 315-319.
- [50] BAI H S, BU S J, LIU W S, et al. An electrochemical aptasensor based on cocoon-like DNA nanostructure signal amplification for the detection of *Escherichia coli* O157: H7[J]. *The Analyst*, 2020, 145(22): 7340-7348.
- [51] PHILIP A, KUMAR A R. The performance enhancement of surface plasmon resonance optical sensors using nanomaterials: A review[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 458: 214424.
- [52] HAMEED S, XIE L J, YING Y B. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 81: 61-73.
- [53] DING X J, CHENG W, LI Y J, et al. An enzyme-free surface plasmon resonance biosensing strategy for detection of DNA and small molecule based on nonlinear hybridization chain reaction[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 87: 345-351.
- [54] YU F, LI Y, LI M Y, et al. DNAzyme-integrated plasmonic nanosensor for bacterial sample-to-answer detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 89: 880-885.
- [55] XIA H, HUANG J Q, LU X X, et al. Autocatalytic MNAzyme-integrated surface plasmon resonance biosensor for simultaneous detection of bacteria from nosocomial bloodstream infection specimens[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 330: 129255.
- [56] ZHENG L B, QI P, ZHANG D. DNA-templated fluorescent silver nanoclusters for sensitive detection of pathogenic bacteria based on MNP-DNAzyme-AChE complex[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 276: 42-47.
- [57] YU J L, WU H H, HE L Y, et al. The universal dual-mode aptasensor for simultaneous determination of different bacteria based on naked eyes and microfluidic-chip together with magnetic DNA encoded probes[J]. *Talanta*, 2021, 225: 122062.
- [58] CHEN X X, WANG J Q, SHEN H Y, et al. Microfluidic chip for multiplex detection of trace chemical contaminants based on magnetic encoded aptamer probes and multibranching DNA nanostructures as signal tags[J]. *ACS Sensors*, 2019, 4(8): 2131-2139.

加工编辑:刘艳美
收稿日期:2022-10-08