DOI:10.12441/spyswjs.20240315002 [文章编号] 1673-1689(2024)11-0044-16

食源性致病菌 ssDNA 适配体的筛选及应用进展

张 明[1,2] 尹珍珍[1,2] 吴恒志[2]

(1. 广州南方学院云康医学与健康学院,广东 广州 510970; 2. 广州南方学院生物医学大数据中心,广东 广州 510970)

摘要:单链 DNA(single-stranded DNA,ssDNA)适配体是通过体外配体指数富集系统进化筛选获得的较短的单链脱氧核糖核苷酸序列。它们能够通过构象变化实现与靶标高亲和力和特异性结合,具有制备简单、成本低、稳定性高、易于修饰和免疫原性低等优点,因此被称为“化学抗体”。ssDNA 适配体已在食品安全检测领域显示出巨大潜力。作者综述了基于细胞指数富集配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment,SELEX)技术发展的 ssDNA 适配体筛选技术,以及 ssDNA 适配体在食源性致病菌检测领域中的应用,总结了目前研究的不足以及未来发展方向,旨在为提高食品安全监管与食源性疾病预防和控制效果提供理论依据。

关键词:ssDNA 适配体;食源性致病菌;筛选;应用

Progress on Screening and Application of ssDNA Aptamers for Foodborne Pathogens

ZHANG Ming[1,2*] *YIN Zhenzhen*[1,2] *WU Hengzhi*[2]

(1. School of Yunkang Medicine and Health, Nanfang College, Guangzhou 510970, China; 2. Biomedical Big Data Center, Nanfang College, Guangzhou 510970, China)

Abstract: Single-stranded DNA (ssDNA) aptamer is a short single-stranded deoxyribonucleotide sequence obtained by the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) *in vitro*. It can achieve high affinity and specific binding to targets through conformational changes and possesses the advantages of simple preparation, low cost, relative stability, ease of modification, and low immunogenicity, earning it the name “chemical antibodies”. ssDNA aptamers have shown great potential in the field of food safety detection. This paper reviewed the ssDNA aptamer screening technology based on SELEX, its application in the detection of foodborne pathogens, current research limitations and potential future development directions. The aim is to provide a theoretical basis for improving food safety supervision and the prevention and control of foodborne disease.

Keywords: ssDNA aptamer; foodborne pathogens; screening; application

近年来,致病菌污染导致的食品安全问题日益严峻[1]。食源性致病菌检测技术多样,包括培养法、生化鉴定法、聚合酶链式反应法,酶联免疫吸附法、色谱法和质谱法等[2]。虽然通过这些技术最终能达到检测目的,但在样品分析前都需要长时间的样品制备和提取过程,以及复杂的生化鉴定步骤。如培养法需要长达数日的增菌及培养过程。仪器法是通过检测特异基因、蛋白质或者代谢产物来达到快速检测的目的,但在实际操作过程中,目标物质的提取效率和稳定性受样品成分复杂性以及细菌生长状态等因素的干扰,已成为制约食源性致病菌快速检测的技术瓶颈[3]。适配体是通过 SELEX 获得的寡核苷酸序列,由 50~100 个碱基组成,长度为 1~2 nm,相对分子质量为

基金项目:广东省普通高校特色创新项目(2023KTSCX202);广东省教育科学规划课题(高等教育专项)(2024GXJK460)。

通信作者:张明(1981—),男,博士,副教授,高级工程师,主要从事食品质量安全检测研究。 E-mail: zhangm@nfu.edu.cn

收稿日期:2024-03-15 **修回日期:**2024-04-29

7 500~32 000，对靶分子具有高亲和力和特异性。其中 ssDNA 比 RNA 适配体结构更加稳定[4]。Tuerk 和 Gold[5]于 1990 年首次报道了 SELEX，在 65 536 个“物种池”中筛选获得与噬菌体的 T4 DNA 聚合酶具有高亲和力的 2 个 RNA 分子。同年，Ellington 和 Szostak[6]在体外也发现了能够特异性结合多种有机染料的 RNA 分子，称之为适配体。适配体非常适用于检测分析，既有类似抗体的特异性又具有自身的优势。其优势包括：适配体可以通过化学合成批量生产且稳定性高；结构灵活，能形成多种拓扑结构（包括环状、发夹和四重结构等）；结合过程可逆，条件改变时可恢复到原始状态；能适应温度、pH 和离子浓度的变化；方便进行分子修饰、标记和存储；靶标范围广泛，涵盖金属离子、多肽、聚糖、蛋白质、病毒、细菌、细胞，甚至组织和器官等[7]。目前，SELEX 技术日趋成熟，出现了多种提高效率的策略和方法，在食品、药品和医学等领域广泛应用[8]。作者综述了基于细胞 SELEX 的 ssDNA 适配体筛选技术及其在食源性致病菌检测领域中的应用。此外，还总结了目前研究中的不足以及未来的发展方向。

1　基于细胞 SELEX 的筛选方法

1.1　全细菌细胞 SELEX

全细菌细胞 SELEX 方法为常规方法，包括 5 个步骤[9]：第一，明确靶分子。与其他靶标不同，细菌筛选要充分考虑缓冲液成分、渗透压和 pH 等参数；第二，创建随机寡核苷酸序列文库。文库池核酸序列中心区域为随机序列，两边固定区域用于引物杂交；第三，靶分子与文库内随机寡核苷酸序列充分孵育；第四，分离未结合的寡核苷酸序列。离心法是最常用的分离方法，也可采用酶联免疫板或硝化纤维素膜提高分离效率。第五，经过 *n* 轮（一般 15~20 轮）筛选获得富集池，使用 PCR 扩增获得双链 DNA（double-stranded DNA，dsDNA），最后克隆并对适配体进行测序，基本流程见图 1。该方法稳定性较好，但时间较长，适配体的亲和性和特异性不强，效率较低。

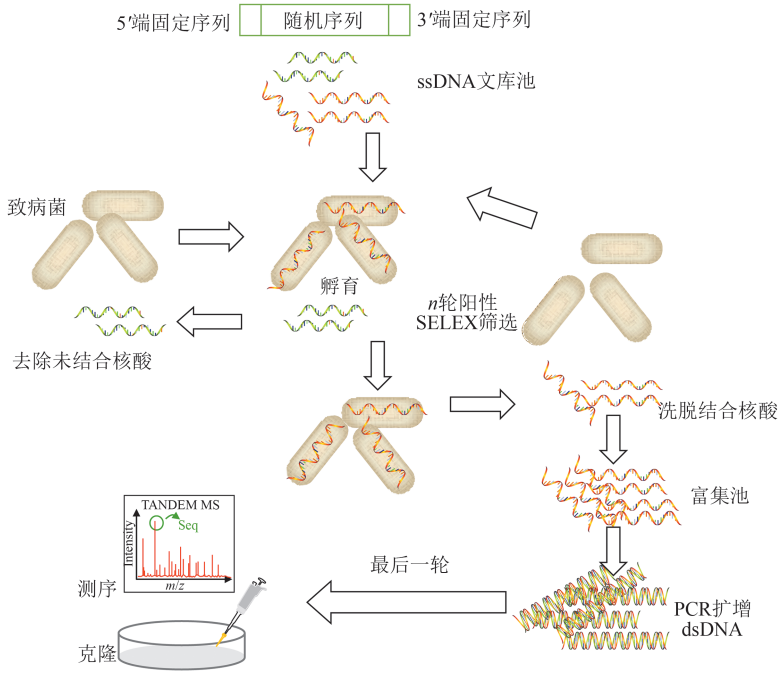


图 1　全细菌细胞 SELEX 的流程图

Fig. 1　Workflow of whole bacterium cell SELEX

1.2　精准 SELEX

精准 SELEX 由蛋白质 SELEX 和细菌 SELEX 筛选两部分组成，1~4 轮为目标蛋白质筛选，5~8 轮为细菌筛选[10]。具体步骤包括：第一，将目标蛋白质和非目标蛋白质点在芯片上；第二，对初始文库孵育并进行洗涤，去除未结合 ssDNA；第三，洗脱目标 ssDNA，用于 PCR 扩增；第四，捕获生物素化 dsDNA，解离为 ssDNA，经 4 轮蛋白质筛选后，对富集文库进行细菌筛选；第五，阴性细菌与富集文库孵育 3 次并获取上清液（含靶标 ssDNA）；

第六，对目标蛋白质的细菌进行孵育，去除未结合的ssDNA，再洗脱已结合ssDNA，用于PCR扩增；第七，分别克隆第4、8轮文库的PCR产物并测序，具体过程见图2。此法可特异性识别细菌表面的蛋白质，简化了过程并缩短了时间，但需要有明确的蛋白质信息以实现精准筛选。

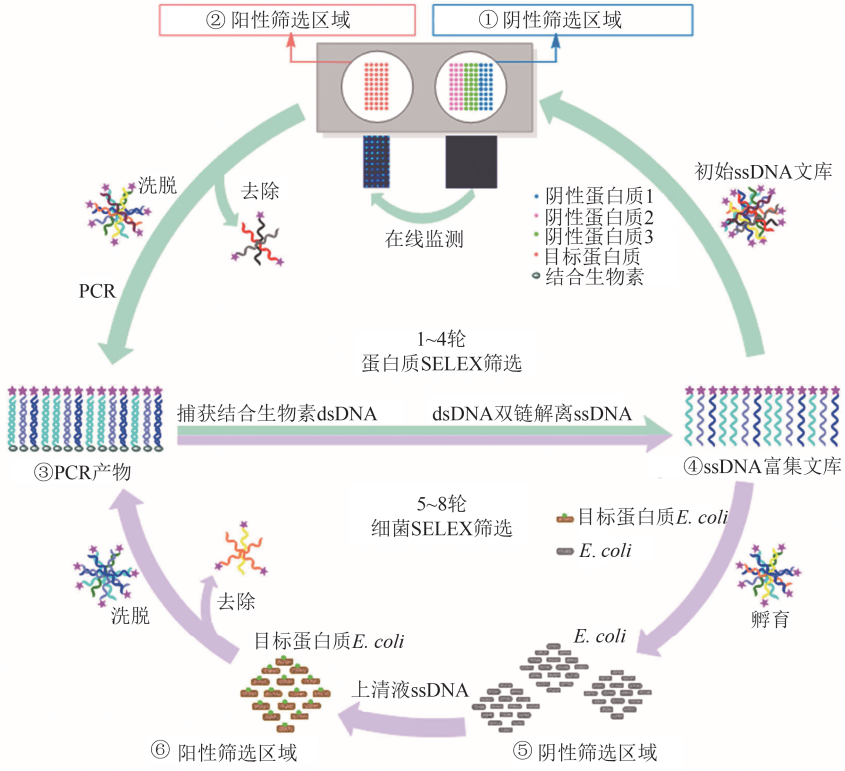


图 2　精准 SELEX 的流程图

Fig. 2　Workflow of precision SELEX

1.3　交叉 SELEX

交叉SELEX由7轮蛋白质SELEX和4轮细胞SELEX筛选组成[11]。具体步骤包括：第一，将磁珠与目标蛋白质连接成复合物，与随机文库孵育，去除未结合的寡核苷酸序列；第二，使用洗脱液加磁场效应，分离已结合的ssDNA并进行扩增；第三，在第3、5、7轮分别使用非目标细菌反向筛选，分离未结合的ssDNA，进行PCR扩增并解链得到ssDNA；第四，将靶细胞与富集池孵育，去除未结合的ssDNA，再洗脱已结合ssDNA；第五，经过4轮筛选，进行PCR扩增、克隆和测序，具体过程见图3。此法使用磁珠和膜蛋白与常规筛选交叉，提高了适配体的亲和性和特异性，但膜蛋白选择至关重要。

1.4　配体引导选择 SELEX

配体引导选择SELEX筛选分为4个步骤[12]：第一，靶细胞与随机文库进行11轮阳性筛选，第12轮非靶细胞阴性筛选去除非特异性ssDNA，PCR扩增形成富集池；第二，富集池分为2组，第1组使用靶细胞和已知抗体孵育，第2组使用原代细胞和已知抗体孵育；第三，对所有结合位点进行测序；第四，通过生物信息学比较亲和度并验证，基本流程见图4。此法不改变靶细胞的膜表面，需要原代细胞及膜表面已知抗体信息来获得多结合位点的高性能适配体。

1.5　切换细胞 SELEX

切换细胞SELEX在阳性筛选和阴性筛选间相互切换[13]。具体步骤为：第1轮由随机文库与靶细菌阳性筛选；第2轮由富集池与非靶细菌阴性筛选；第3、4、5轮切换为富集池依次与3种靶细菌进行阳性筛选；第6轮切换为富集池与非靶细菌阴性筛选；第7、8轮为富集池与靶细菌阳性筛选；PCR扩增、测序和验证，基本流程见图5。此方法增加了适配体的特异性并减少了扩增轮次，提高了筛选效率，但试验操作要求高，污染的风险较大。

1.6　基于石英晶体微天平 SELEX

基于石英晶体微天平SELEX可监测每轮富集池ssDNA的亲和力，通过8轮正向和2轮反向筛选，

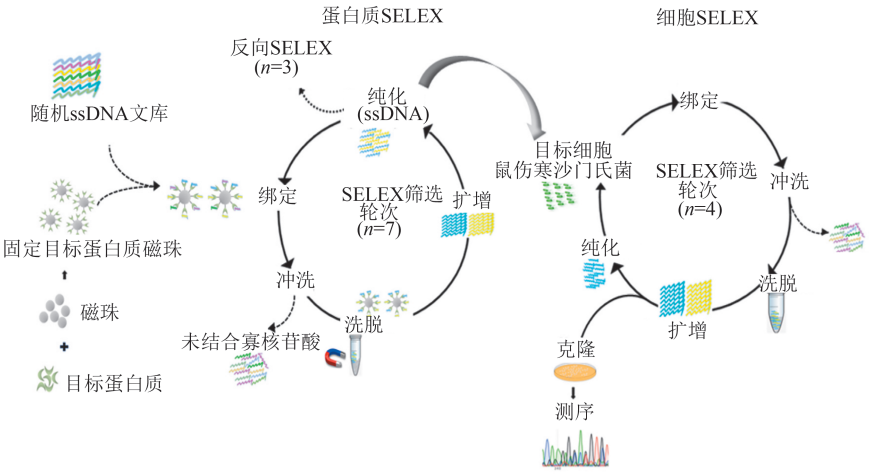


图 3　交叉 SELEX 的流程图

Fig. 3　Workflow of cross-over SELEX

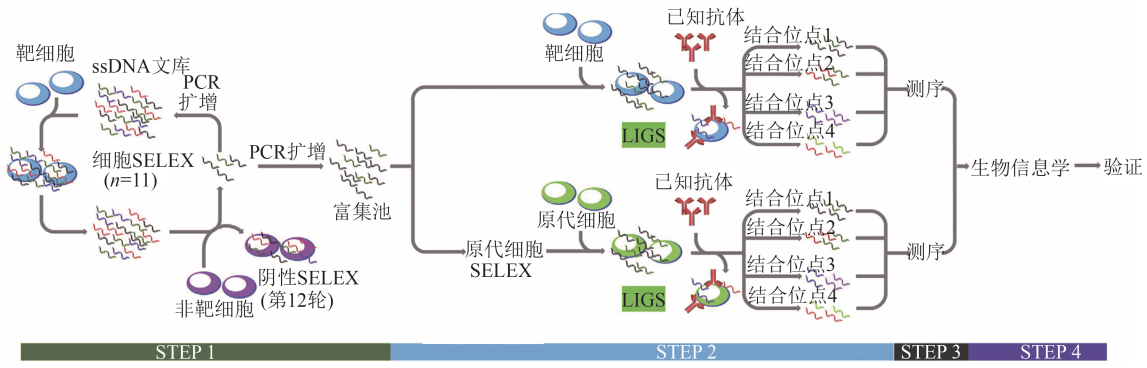


图 4　配体引导选择 SELEX 的流程图

Fig. 4　Workflow of ligand-guided selection SELEX

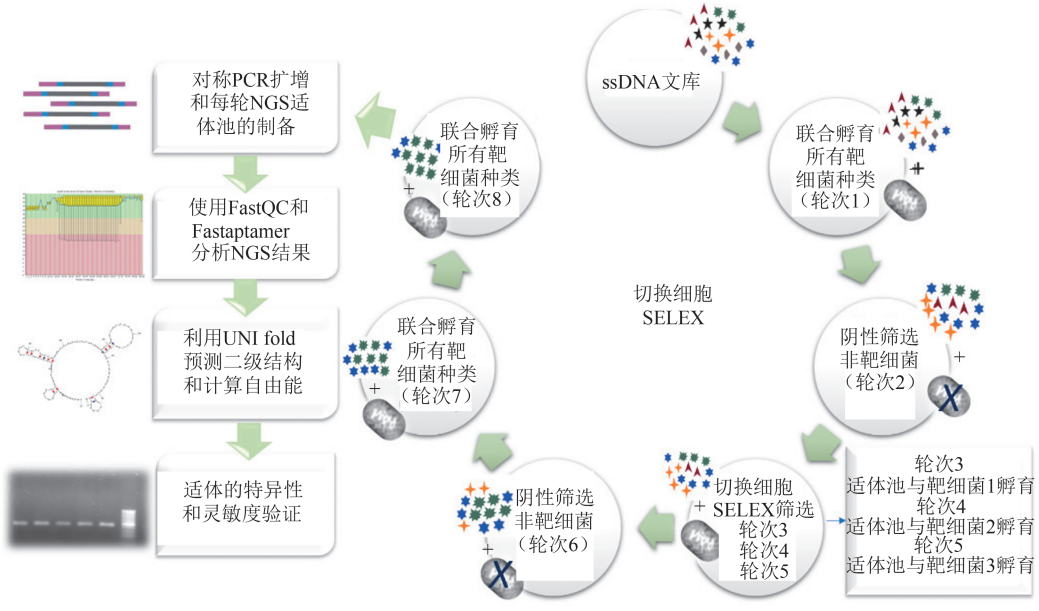


图 5　切换细胞 SELEX 的流程图

Fig. 5　Workflow of toggling cell SELEX

在质量变化值最大时克隆并测序[14]。具体步骤为：获得基线；感应材料覆盖表面；靶细菌固定表面，洗脱未结合细菌得到稳定基线（f_1）；随机文库孵育，去除未结合ssDNA得到稳定基线（f_2），测量信号 $\Delta f=f_2-f_1$；洗脱结合的ssDNA；PCR扩增，dsDNA酶解得到ssDNA；Δf值最大时克隆并测序，基本流程见图6。该方法可跟踪每轮富集池的亲和力变化，避免高质量适配体的损失，但该方法所需的仪器价格和维护成本较高。

1.7　配对细胞SELEX

配对细胞SELEX共3轮筛选，第2、3轮与第1轮不同的是阴性筛选时间由20 min缩短到15 min，其他步骤一致[15]。每轮阴性筛选后，收集上清液到下一轮阴性筛选；完成6次阴性筛选，收集上清液到阳性筛选，孵育并洗脱已结合的ssDNA；第2、3轮筛选后进行PCR扩增；第3轮筛选后进行测序，基本流程见图7。此法通过充分的阴性筛选消除富集池中的非特异性序列，整体效率较高，但其对细胞筛选物和转染技术要求较高。

1.8　损益细胞SELEX

损益细胞SELEX是以过表达和不表达细胞系作为筛选靶标[16]。将随机文库与过表达细胞系孵育，经过2轮阳性筛选，通过PCR扩增出富集池；将不表达细胞系与富集池孵育，去除未结合ssDNA；再次使用过表达细胞系进行筛选，洗脱已结合的ssDNA并进行PCR扩增；经过3~20轮的损益细胞筛选后，进行PCR扩增并测序，基本流程见图8。为了提高适配体筛选的特异性，通过基因敲除得到了过表达和不表达细胞系，但过表达与不表达细胞系培养条件较高。

1.9　基因编辑介导同基因细胞SELEX

基因编辑介导同基因细胞SELEX是通过敲除膜上的靶蛋白产生等基因，从而达到对细胞进行筛选的目的。首先进行9轮阴性筛选去除非特异性结合ssDNA；再进行10轮阳性筛选增加特异性和亲和性ssDNA；然后洗脱结合的ssDNA并进行PCR扩增；酶法得到ssDNA适配体并进行测序[17]，基本流程见图9。由于等基因编辑产生的蛋白质结构域具有较高的一致性，因此筛选出的适配体在亲和性和特异性方面表现较优，需要足够精准的基因编辑技术获得等基因细胞。

2　食源性致病菌ssDNA适配体的筛选

2.1　金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*，*S. aureus*）

*S. aureus*是一种在自然界中广泛存在的食源

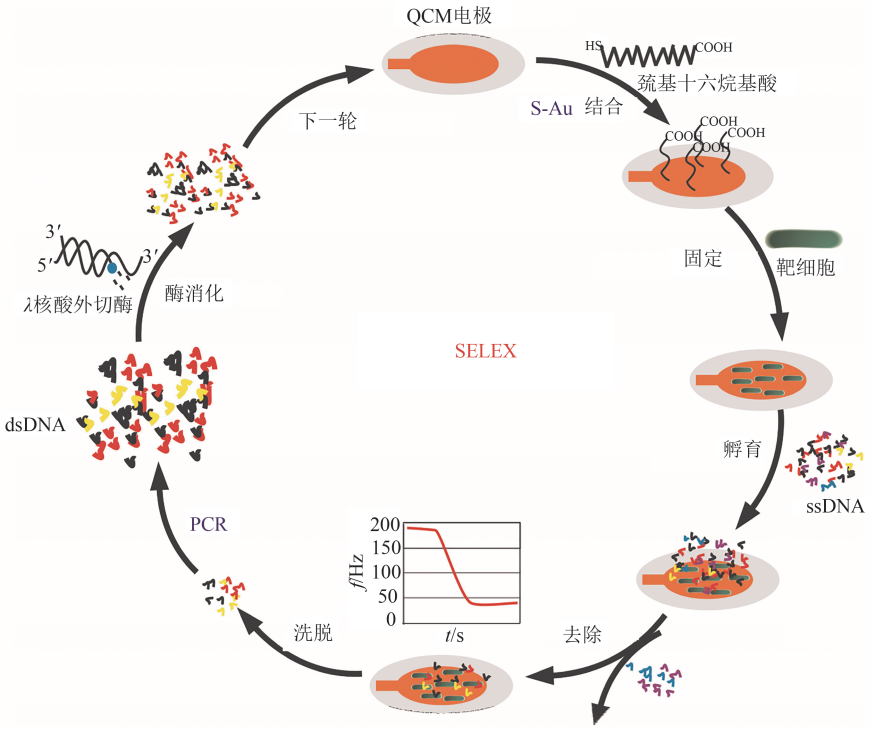


图6　石英晶体微天平SELEX的流程图

Fig. 6　Workflow of quartz crystal microbalance based SELEX

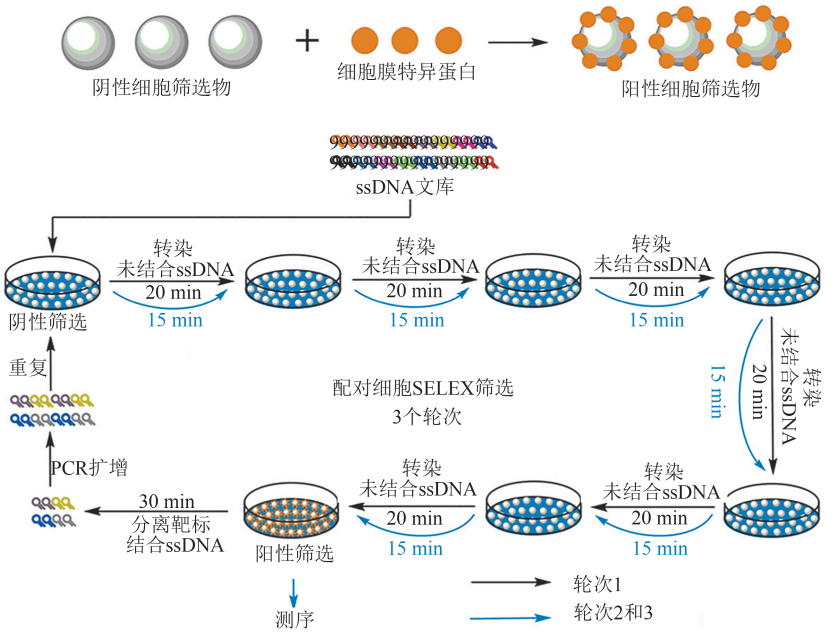


图 7　配对细胞 SELEX 的流程图

Fig. 7　Workflow of paired-cell SELEX

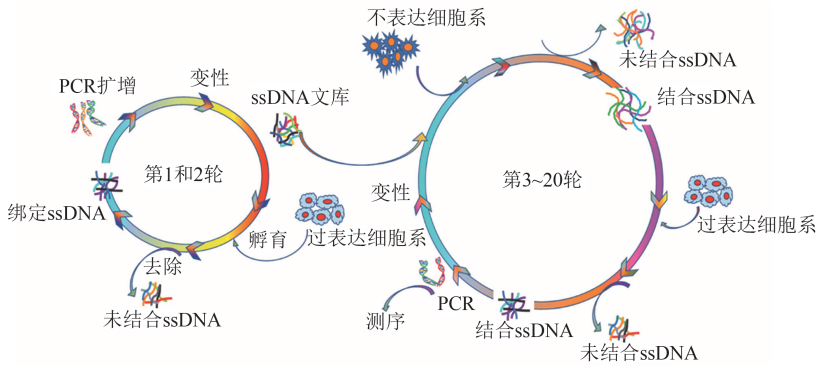


图 8　损益细胞 SELEX 的流程图

Fig. 8　Workflow of loss-gain cell SELEX

性致病菌。目前，通过 SELEX 筛选获得的适配体长度为 62~108 个核苷酸（nt），随机片段长度为 30~48 nt。Ramlal 等[18]通过 10 轮正向和 3 轮反向筛选获得 7 种适配体，解离常数（K_d）为 34~128 nmol/L。Moon 等[19]通过 10 轮正向和 6 轮反向筛选获得 A14 适配体（K_d=3.49 nmol/L）。Nguyen 等[20]通过 10 轮正向获得 SA81 适配体（K_d=14.47 nmol/L）。Cao 等[21]通过 2 轮正向和 5 轮反向获得 5 种适配体，K_d 为 61.50~210.70 nmol/L。Chang 等[22]通过 8 轮正、反向切换筛选，获得 SA17 适配体（K_d=35 nmol/L）和 SA61 适配体（K_d=129 nmol/L）。

2.2　沙门氏菌（*Salmonella*）

Salmonella 类型多样，被认为是危险的食源性病原体之一。对于肠炎沙门氏菌（*S. enteritidis*），适配体长度为 54~80 nt，随机片段为 30~42 nt。Bayraç 等[23]通过 11 轮正向和 1 轮反向获得 Crn-1 适配体（K_d=971 nmol/L）和 Crn-2 适配体（K_d=309 nmol/L）。Kolovskaya 等[24]通过 12 轮正、反向切换筛选，获得 9 种适配体，K_d 为 5.3~56.0 nmol/L。Park 等[25]通过 10 轮正向和 1 轮反向筛选获得 Se1 适配体（K_d=4 660 nmol/L）和 Se2 适配体（K_d=3 830 nmol/L）。Zhang 等[26]通过 10 轮正向和 3 轮反向获得 Apt8 适配体（K_d=43.80 nmol/L）和 Apt23 适配体（K_d=56.16 nmol/L）。

对于鼠伤寒沙门氏菌（*S. typhimurium*），适配体长度为 40~105 nt，随机片段为 29~45 nt。Kolovskaya 等[24]通过 12 轮正、反向切换筛选，获得 8

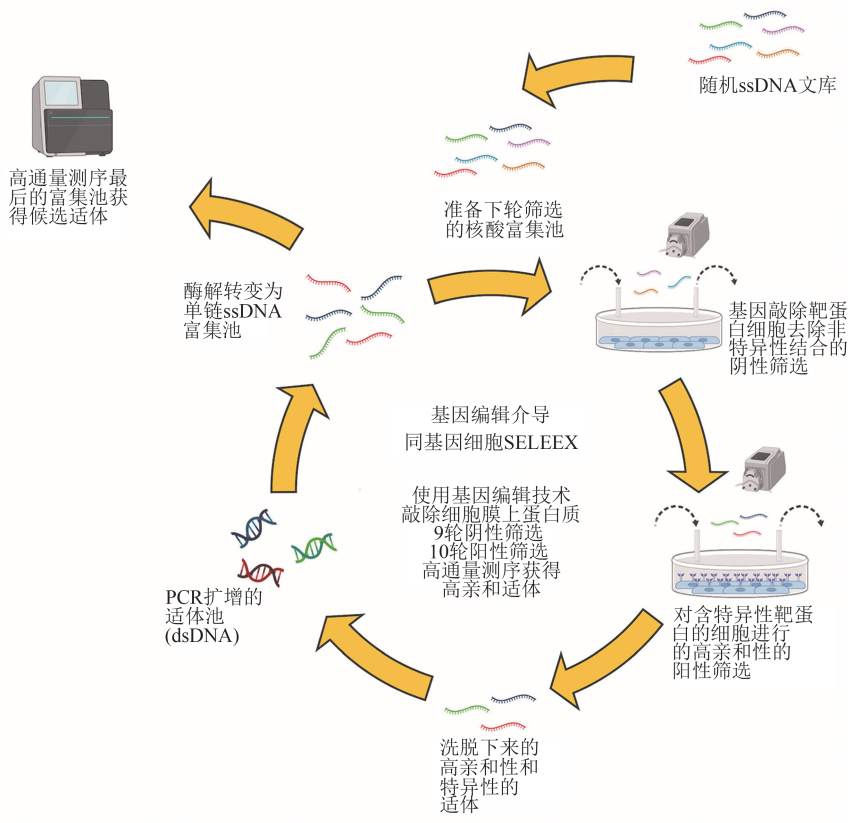


图 9　基因编辑介导同基因细胞 SELEX 的流程图

Fig 9　Workflow of CRISPR-mediated isogenic cell SELEX

种适配体（K_d为 4.5~51.0 nmol/L）。Lavu 等[27]通过 7 轮正向和 3 轮反向获得 SAL11（K_d=184 nmol/L）、SAL26（K_d=123 nmol/L）、SAL28 适配体（K_d=195 nmol/L）。Shin 等[28]通过 8 轮正向和 2 轮反向获得 S11 适配体（K_d=4.41×10^{-3} nmol/L）和 S24 适配体（K_d=3.75×10^{-2} nmol/L）。Duan 等[29]通过 7 轮正向和 2 轮反向获得 ST2P 适配体（K_d=6.33 nmol/L）。Park 等[25]通过 10 轮正向和 1 轮反向获得 St1 适配体（K_d=530 nmol/L）。Moon 等[30]通过 5 轮正、反向切换筛选，获得 C4 适配体。Dwivedi 等[31]通过 8 轮正向和 2 轮反向获得 S8-7 适配体（K_d=1 730 nmol/L）。Wang 等[14]利用 QCM based-SELEX 筛选，通过 5 轮正向获得 B5（K_d=58.50 nmol/L）、A24（K_d=19.63 nmol/L）和 B30 适配体（K_d=51.02 nmol/L）。

对于沙门氏菌 O8 型（*Salmonella* O8）和甲型副伤寒沙门氏菌（*Salmonella paratyphi* A，*S. paratyphi* A），Liu 等[32]通过 9 轮正向和 2 轮反向获得 *Salmonella* O8 型的 B10 适配体（K_d=32.04 nmol/L），长度为 77 nt，随机片段为 35 nt。Renuka 等[33]通过 7 轮正向和 4 轮反向筛选，获得 *S. paratyphi* A 型的 Sal 1 适配体，长度为 87 nt，随机片段为 40 nt。

2.3　致病性大肠埃希氏菌（Pathogenic *E. coli*）

大肠杆菌（*E. coli*）是重要的生物指示菌，其中 Pathogenic *E. coli* 是能够引起疾病的条件致病菌。其适配体长度为 66~117 nt，随机片段为 24~86 nt。Amraee 等[34]通过 9 轮正向和 1 轮反向获得 *E. coli* O157：H7 型的 AM-6 适配体（K_d=0.107 6 nmol/L）。Zou 等[35]通过 11 轮正向和 3 轮反向获得 Apt-5 适配体（K_d=9.04 nmol/L）。Yu 等[36]使用 QCM based-SELEX 方法，通过 19 轮正向和 6 轮反向获得 S1 适配体（K_d=10.30 nmol/L）。Marton 等[37]通过 12 轮正向获得 *E. coli* ATCC25922 的 4 种适配体（K_d为 11.97~161.00 nmol/L）。Li 等[38]使用 Precision-SELEX 方法，通过 11 轮正向获得 *E. coli* K88 的 4 种适配体（K_d为 25～44 nmol/L）。Peng 等[39]通过 6 轮正向和 3 轮反向获得 Apt B12 适配体（K_d=15 nmol/L）。Savory 等[40]通过 5 轮正向获得 *E. coli* NSM59 的 EcA5-27 适配体（K_d=110 nmol/L）。Kim 等[41]通过 7 轮正向和 3 轮反向获得 *E. coli* KCTC2571 的 4 种适配体（K_d为 12.4～25.2 nmol/L）。

2.4　志贺氏菌（*Shigella*）、单核细胞增生李斯特菌（*L. monocytogenes*）和副溶血性弧菌（*V. parahaemolyticus*）

*Shigella*是常见的食源性病原体之一，适配体长度为76~87 nt，随机片段为31~40 nt。Song等[42]通过9轮正向和1轮反向获得索氏志贺氏菌（*S. sonnei*）的SS-3适配体（K_d=39.32 nmol/L）和SS-4适配体（K_d=15.89 nmol/L）。Duan等[43]通过8轮正向获得痢疾志贺氏菌（*S. dysenteriae*）的S1适配体（K_d=23.47 nmol/L）。Lavu等[44]通过7轮正向和3轮反向获得弗氏志贺氏菌（*S. flexneri*）的SHI23（K_d=231 nmol/L）、SHI37（K_d=186 nmol/L）和SHI42适配体（K_d=173 nmol/L）。

*L. monocytogenes*是一种极易污染冷链食品的病原体。适配体长度为76~81 nt，随机片段为35~40 nt。Suh等[45-46]通过6轮正向和2轮反向获得Lbi-17（K_d=3.57×10^4 nmol/L）、LM6-116（K_d=74.4 nmol/L）和LM12-6适配体（K_d=106.4 nmol/L）。Lee等[47]通过10轮正向和2轮反向获得LMCA2（K_d=2.01×10^{-3} nmol/L）和LMCA26适配体（K_d=0.156 nmol/L）。Liu等[48]通过9轮正向获得e01适配体（K_d=60.01 nmol/L）。

*V. parahaemolyticus*是一种极易污染水产品的病原体，适配体长度为77~87 nt，随机片段为40~60 nt。Duan等[49]通过9轮正向获得A1P适配体（K_d=21.45 nmol/L）和A3P适配体（K_d=16.88 nmol/L）。Ahn等[50]通过9轮正向和2轮负向获得Apta#1适配体（K_d=2.04 nmol/L）。Song等[51]利用滚动圈技术加强筛选，获得4个适配体（K_d为10.3～25.2 nmol/L）。

综上所述，作者对主要食源性致病菌ssDNA适配体的筛选情况进行了汇总，结果见表1。

表1　主要食源性致病菌ssDNA适配体的筛选情况汇总表

Table 1　Overview of ssDNA aptamer selection for major foodborne pathogens

靶标菌种	名称	总长/nt	内长/nt	K_d/（nmol/L）	参考文献
S. aureus	RAB1	76	40	56±87	[18-22]
	RAB3	76	40	37±112	
	RAB5	83	47	58±14	
	RAB10	76	40	46±24	
	RAB20	76	40	128±45	
	RAB28	76	40	49±39	
	RAB35	76	40	34±5	
	A14	108	48	3.49±1.43	
	SA81	77	41	14.47±8.18	
	SA23	88	45	61.50±22.43	
	SA20	88	45	70.86±39.22	
	SA31	88	45	82.86±33.20	
	SA34	88	45	72.42±35.23	
	SA43	88	45	210.70±139.91	
	SA17	62	30	35	
	SA61	62	30	129	
S. enteritidis	Crn-1	80	42	971	[23-26]
	Crn-2	80	42	309	
	SE-3（60）	60	40	7.8±6.1	
	SE-6（80）	79	39	53±7	
	SE-6（60）	54	34	6.30±0.58	
	SE-20（80）	80	40	28.0±3.8	
	SE-20（60）	60	40	7.10±0.62	
	SE-11（60）	60	40	6.9±0.4	
	SE-22（80）	80	40	30.0±4.1	
	SE-22（60）	60	40	5.3±0.7	

续表

靶标菌种	名称	总长/nt	内长/nt	K_d/（nmol/L）	参考文献
S. enteritidis	SE-34（80）	80	40	56.0±7.1	［23-26］
	Se1	60	30	（4.66±0.35）×10^3	
	Se2	60	30	（3.83±0.10）×10^3	
	Apt8	80	40	43.81±5.02	
	Apt23	80	40	56.16±5.87	
S. typhimurium	ST-1（80）	80	40	37.0±2.7	［14，24-25，27-31］
	ST-1（40）	40	40	5.3±0.4	
	ST-6（60）	61	41	13.0±1.1	
	ST-12（80）	80	40	15.4±1.8	
	ST-12（60）	59	39	4.5±0.4	
	ST-33（60）	60	40	51.0±4.3	
	ST-20（80）	80	40	22.0±3.1	
	ST-20（40）	40	40	4.70±0.31	
	SAL28	76	41	195±46	
	SAL11	76	41	184±43	
	SAL26	76	41	123±23	
	S11	100	40	4.41×10^{-3}	
	S24	100	40	3.75×10^{-2}	
	ST2P	87	40	6.33±0.58	
	St1	59	29	（0.53±0.01）×10^3	
	C4	105	45	—	
	S8-7	80	40	（1.73±0.54）×10^3	
	B5	90	45	58.50	
	A24	90	45	19.63	
	B30	90	45	51.02	
Salmonella O8	B10	77	35	32.04	［32］
S. paratyphi A	Sal 1	87	40	—	［33］
E. coli O157∶H7	AM-6	117	86	（107.6±67.8）×10^{-3}	［34-36］
	Apt-5	80	40	9.04±2.80	
	S1	90	45	10.30	
E. coli ATCC25922	P12-17	88	40	56.33±15.87	［37］
	P12-31	89	41	87.03±17.32	
	P12-52	88	40	11.97±2.94	
	P12-55	88	40	161.00±34.74	
E. coli K88	19	96	60	44±7	［38-39］
	31	96	60	36±8	
	7	96	60	43±6	
	37	96	60	25±4	
	Apt B12	80	35	15±4	
E. coli NSM59	EcA5-27	66	24	110	［40］
E. coli KCTC2571	E1	88	44	12.4	［41］
	E2	88	45	25.2	
	E10	88	46	14.2	
	E12	88	45	16.8	
S. sonnei	SS-3	76	40	39.32±5.02	［42］

续表

靶标菌种	名称	总长/nt	内长/nt	K_d/（nmol/L）	参考文献
S. sonnei	SS-4	77	40	15.89±1.77	［42］
S. dysenteriae	S1	87	40	23.47±2.48	［43］
S. flexneri	SHI23	76	40	231	［44］
	SHI37	76	31	186	
	SHI42	76	40	173	
L. monocytogenes	Lbi-17	81	40	（3.57±0.80）×10^4	［45-48］
	LM6-116	81	40	74.40±52.69	
	LM12-6	81	40	106.40±43.91	
	LMCA2	76	40	2.01×10^{-3}	
	LMCA26	76	40	0.156	
	e01	76	35	60.01	
V. parahaemolyticus	A1P	87	40	21.45±2.62	［49-51］
	Apta#1	77	40	2.04±0.12	
	Apt-1	84	60	19.2±2.8	
	Apt-2	84	60	10.3±2.5	
	Apt-3	84	60	25.2±3.1	
	Apt-4	84	60	17.2±5.1	
	A3P	87	40	16.88±1.92	

3　食源性致病菌ssDNA适配体的检测应用

3.1　光学适配体传感器

利用适配体作为识别元件与靶标进行特异性结合，传感器将生化信号转化为可检测的光学信号。常用方法有比色法（colorimetry）、化学发光法（chemiluminescence，CL）、荧光法（fluorescence，FL）和表面增强拉曼散射法（surface-enhanced Raman scattering，SERS）等[52]。

1）比色法检测应用：Yuan等[53]开发了金纳米粒子比色传感器，在550 nm处检测牛奶中的*S. aureus*，线性范围（linear range，LR）为1×10^1~1×10^6 CFU/mL，检测限（limit of detection，LOD）为9 CFU/mL。Zhang等[26]检测水中的*S. enteritidis*，发现610 nm与520 nm处的光密度（optical density，OD）比值（OD_{610}/OD_{520}）在1×10^4~1×10^5 CFU/mL时有良好的线性关系。Wu等[54]通过测定在620 nm与520 nm处的吸光度比值（A_{620}/A_{520}）来检测水中的*S. typhimurium*和*E. coli* O157：H7（LOD为1×10^5 CFU/mL）。Chen等[55]使用金纳米团结合2种适配体，在652 nm处检测蛋制品中的*S. typhimurium*（LR为1×10^1~1×10^6 CFU/mL，LOD为1 CFU/mL）。目前，比色法结合信号放大与适配体增强技术展现出良好的应用潜力。

2）CL检测应用：Wu等[56]采用多色转换纳米粒子作为发光标记，使用980 nm红外光激发，分别在477、542、660 nm处检测牛奶和虾制品中的*S. aureus*（LOD为25 CFU/mL）、*S. typhimurium*（LOD为15 CFU/mL）和*V. parahaemolyticus*（LOD为10 CFU/mL），LR为5×10^1~1×10^6 CFU/mL。Hao等[57]使用滚动圈扩增和磁性纳米颗粒增强检测猪肉中的*S. typhimurium*（LR为3.2×10^1~3.2×10^6 CFU/mL，LOD为10 CFU/mL）。Hao等[58]通过化学发光猝灭检测肉制品中的*S. aureus*（LR为5.0×10^1~1.5×10^5 CFU/mL，LOD为15 CFU/mL）。CL法的稳定性较好，基线范围较宽（5~6个数量级）且检测限较低（10~25 CFU/mL）。

3）FL检测应用：有些研究者使用荧光标记ssDNA适配体进行检测，如Lavu等[44]使用流式细胞仪检测纯水中的*S. typhimurium*（LOD为1×10^2 CFU/mL）。He等[59]检测牛奶中的*S. aureus*（LOD为7.6×10^2 CFU/mL）。Joshi等[60]使用实时聚合酶链式反应检测生鸡胴体中的*S. typhimurium*（LOD为10~100 CFU/mL）。Dwivedi等[31]使用定量聚合酶链式反应检测水中的*S. typhimurium*（LOD为3.45×10^2~3.45×10^3 CFU/mL）。Duan等[43]使用荧光显微成像检测水中的*S. dysenteriae*（LR为

1×10^2~1×10^7 CFU/mL，LOD 为 50 CFU/mL）。Lee 等[47]和 Song 等[42]分别使用酶联免疫微孔板法，在 650 nm 处检测水中的 *L. monocytogenes*（LR 为 2×10^1 ~ 2×10^6 CFU/mL，LOD 为 20 CFU/mL）和 *S. sonnei*（LR 为 1×10^3~1×10^7 CFU/mL）。Shin 等[28]分别检测牛奶和 3 种肉制品中的 *S. typhimurium*（LR 为 2×10^1~2×10^5 CFU/mL，LOD 为 20 CFU/mL）。Ohk 等[61]检测水中的 *L. monocytogenes*（LOD 为 4 CFU/mL）。Duan 等[62]分别检测鸡肉中的 *S. typhimurium*（LOD 为 25 CFU/mL）和虾肉中的 *V. parahaemolyticus*（LOD 为 35 CFU/mL，LR 为 5×10^1~1×10^6 CFU/mL）。利用磁珠吸附原理，Cheng 等[63]检测牛奶制品中的 *S. aureus*（LR 为 3.2×10^1~1.0×10^8 CFU/mL，LOD 为 16 CFU/mL）。Duan 等[29]和 Peng 等[39]分别检测水中的 *S. typhimurium*（LR 为 5×10^1~1×10^6 CFU/mL，LOD 为 25 CFU/mL）和 *E. coli* K88（LOD 为 1.1×10^3 CFU/mL）。Li 等[64]检测猪肉中的 *E. coli*（LR 为 5.8×10^1~5.8×10^7 CFU/mL，LOD 为 10 CFU/mL）。利用荧光素标记适配体的荧光猝灭与恢复原理，有研究者分别检测了牛奶中的 *S. enteritidis*（LR 为 1×10^2 ~1×10^7 CFU/mL，LOD 为 25 CFU/mL）、*S. typhimurium*（LR 为 1×10^3~1×10^8 CFU/mL，LOD 为 100 CFU/mL）和 *E.coli* O157：H7（LR 为 1×10^4~1×10^7 CFU/mL，LOD 为 4.5×10^3 CFU/mL）[65-67]。Renuka 等[33]分别检测了牛奶和猪肉中的 *S. paratyphi* A（LR 为 1×10^1~1×10^7 CFU/mL，LOD 为 10 CFU/mL）。Jin 等[68]分别检测了牛奶和水中的 *E.coli* ATCC8739（LR 为 0.5×10^1~1.0×10^6 CFU/mL，LOD 为 3 CFU/mL）。由于 FL 检测方法能够结合显微成像、抗体、PCR 和磁珠法等多种技术，因此该法应用最为广泛。

4）SERS 检测应用：Ma 等[69]使用棘金纳米颗粒连接巯基苯甲酸和硫醇化的适配体作为识别探针，检测猪肉中的 *S. typhimurium*（LR 为 1×10^1~1×10^5 CFU/mL，LOD 为 4 CFU/mL）。Duan 等[70]使用金/银纳米颗粒连接适配体 1 作为捕获分子，X-罗丹明修饰的适配体 2 用作识别元件报告因子，检测牛奶中的 *S. typhimurium*（LR 为 1.5×10^1~1.5×10^6 CFU/mL，LOD 为 15 CFU/mL）。

SERS 检测食源性致病菌线性范围和检测限均较好，但目前靶标单一，应用范围较小。

3.2 电化学适配体传感器

适配体作为生物识别元件，电化学传感器将生化信号转换为阻抗、电位和电流等电化学信号[71]。分为电化学阻抗谱法（electrochemical impedance spectroscopy，EIS）、循环伏安法（cyclic voltammetry，CV）、电化学发光法（electrochemiluminescence，ECL）和光电化学法（photoelectrochemical，PEC）等[52]。

1）EIS 检测应用：使用适配体连接还原氧化石墨烯和金纳米颗粒作为识别元件，Jia 等[72]和 Ma 等[73]分别检测了水中的 *S. aureus*（LR 为 1×10^1 ~ 1×10^6 CFU/mL，LOD 为 10 CFU/mL）和猪肉中的 *Salmonella*（LR 为 2.4×10^0~2.4×10^3 CFU/mL，LOD 为 3 CFU/mL）。

2）CV 检测应用：Zhou 等[74]利用多孔阳极氧化铝膜纳米孔传感器检测了水中的 *L. monocytogenes*（LR 为 100~1 250 CFU/mL，LOD 为 100 CFU/mL）。

3）CV 与 EIS 联用检测应用：Ranjbar 等[75]使用纳米孔金膜连接巯基化的适配体作为识别元件，检测了鸡蛋中的 *S. typhimurium*（LR 为 6.5×10^2~6.5×10^8 CFU/mL，LOD 为 1 CFU/mL）。Jia 等[76]使用碳纳米石墨烯连接氨基化适配体作为识别元件，检测了鸡肉中的 *Salmonella*（LR 为 7.5×10^1~7.5×10^5 CFU/mL，LOD 为 25 CFU/mL）。

4）ECL 检测应用：Hao 等[77]研制了发光氨/溴化银纳米颗粒/三维含氮石墨烯水凝胶的纳米复合材料，检测了餐食中 *E.coli*（LR 为 5×10^{-1}~5×10^2 CFU/mL，LOD 为 0.17 CFU/mL）。

5）PEC 检测应用：Dong 等[78]使用金纳米粒子和硫化镉量子点修饰氧化锌纳米阵列构建光电化学电极，检测了水中的 *E.coli* O157：H7（LR 为 1×10^1~1×10^7 CFU/mL，LOD 为 1.125 CFU/mL）。

EIS、CV 与 EIS 联用检测法线性范围较宽，ECL 的检测限较低（0.17 CFU/mL），PEC 的综合表现更好。

3.3 压电适配体传感器

压电适配体传感器是由具有共振频率的特性材料制成的，典型代表是石英晶体微天平传感器（quartz crystal microbalance sensor，QCMS），以及利用电磁波变化的电磁压电声传感器（electromagnetic piezoelectric acoustic sensor，EMPAS）。

1）QCMS 检测应用：Wang 等[14]和 Yu 等[36]分别检测了水中的 *S. typhimurium*（LR 为 7.9×10^2~

7.9×10^6 CFU/mL，LOD为1×10^3 CFU/mL）和*E. coli* O157：H7（LR为1×10^2~1×10^5 CFU/mL和1×10^5~1×10^7 CFU/mL，LOD为1.46×10^3 CFU/mL）。

2）EMPAS检测应用：Spagnolo等[79]检测了牛奶中的*E. coli* ATCC8379（LR为1×10^1~1×10^7 CFU/mL，LOD为8 CFU/mL）。

可以看出，QCMS和EMPAS检测的线性范围和检测限尚不能满足实际应用需求。

综上所述，作者对ssDNA适配体传感器检测食源性致病菌的应用进行了汇总，结果见表2。

表2　ssDNA适配体传感器检测食源性致病菌的应用

Table 2　Applications of ssDNA aptamer sensors for the detection of foodborne pathogens

传感器	技术方法	靶标菌种	样品	LOD/（CFU/mL）	LR/（CFU/mL）	参考文献
光学	比色法	*S. aureus*	牛奶	9	1×10^1~1×10^6	［53］
		S. enteritidis	水		1×10^4~1×10^5	［26］
		S. typhimurium	水	1×10^5		［54］
		E. coli O157：H7		1×10^5		
		S. typhimurium	蛋制品	1	1×10^1~1×10^6	［55］
	CL	*S. aureus*	牛奶和虾制品	25	5×10^1~1×10^6	［56］
		S. typhimurium		15	5×10^1~1×10^6	
		V. parahaemolyticus		10	5×10^1~1×10^6	
		S. typhimurium	猪肉	10	3.2×10^1~3.2×10^6	［57］
		S. aureus	肉制品	15	5.0×10^1~1.5×10^5	［58］
	FL	*S. flexneri*	水	1×10^2		［44］
		S. aureus	牛奶	7.6×10^2		［59］
		S. typhimurium	生鸡胴体	1×10~1×10^2		［60］
		S. typhimurium	水	3.45×10^2~3.45×10^3		［31］
		S. dysenteriae	水	50	1×10^2~1×10^7	［43］
		L. monocytogenes	水	20	2×10^1~2×10^6	［47］
		S. sonnei	水		1×10^3~1×10^7	［42］
		S. typhimurium	牛奶和肉	20	2×10^1~2×10^5	［28］
		L. monocytogenes	肉制品	4		［61］
		S. typhimurium	鸡肉	25	5×10^1~1×10^6	［62］
		V. parahaemolyticus	虾肉	35	5×10^1~1×10^6	
		S. aureus	牛奶	16	3.2×10^1~1.0×10^8	［63］
		S. typhimurium	水	25	5×10^1~1×10^6	［29］
		E. coli K88	水	1.1×10^3		［39］
		E. coli	猪肉	10	5.8×10^1~5.8×10^7	［64］
		S. enteritidis	牛奶	25	1×10^2~1×10^7	［65］
		S. typhimurium	牛奶	100	1×10^3~1×10^8	［66］
		E. coli O157：H7	牛奶	4.5×10^3	1×10^4~1×10^7	［67］
		S. paratyphi A	牛奶和肉	10	1×10^1~1×10^7	［33］
		E. coli ATCC8739	牛奶和水	3	0.5×10^1~1.0×10^6	［68］
	SERS	*S. typhimurium*	猪肉	4	1×10^1~1×10^5	［69］
		S. typhimurium	牛奶	15	1.5×10^1~1.5×10^6	［70］
电化学	EIS	*S. aureus*	水	10	1×10^1~1×10^6	［72］
		Salmonella	猪肉	3	2.4×10^0~2.4×10^3	［73］
	CV	*L. monocytogenes*	水	100	100~1 250	［74］
	EIS与CV联用	*S. typhimurium*	鸡蛋	1	6.5×10^2~6.5×10^8	［75］
		Salmonella	鸡肉	25	7.5×10^1~7.5×10^5	［76］

续表

传感器	技术方法	靶标菌种	样品	LOD/（CFU/mL）	LR/（CFU/mL）	参考文献
电化学	ECL	*E. coli*	餐食	0.17	5×10^{-1}~5×10^{2}	［77］
	PEC	*E. coli* O157∶H7	水	1.125	1×10^{1}~1×10^{7}	［78］
压电	QCMS	*S. typhimurium*	水	1×10^{3}	7.9×10^{2}~7.9×10^{6}	［14］
		E. coli O157∶H7	水	1.46×10^{3}	1×10^{2}~1×10^{5}，1×10^{5}~1×10^{7}	［36］
	EMPAS	*E. coli* ATCC8379	牛奶	8	1×10^{1}~1×10^{7}	［79］

4 展望

近年来，ssDNA适配体的SELEX筛选技术已经取得了显著进步，但目前ssDNA适配体总体数量仍然不足，实际检测应用数量较少，所获得适配体的应用潜力尚未得到充分开发。主要原因有：库容量限制，不可能覆盖全部的序列；筛选效率较低，需要占用大量的时间和资源；非特异性结合导致筛选结果存在误差；结构的复杂性增加了筛选的难度，特别是多结合位点的情况。作者总结了食源性致病菌ssDNA适配体筛选的最新方法、策略和步骤，旨在启发研究者提出新的筛选思路，以提高筛选效率和性能。未来SELEX技术的主要发展方向包括：结合自动化试验系统和大容量样品处理能力的高通量平台；利用微流控芯片技术实现筛选过程的微型化和自动化；利用人工智能算法对筛选试验的设计进行优化；利用生物信息学方法识别出高亲和力和特异性的核酸分子序列。

在检测应用方面，光学、电化学和压电技术都扮演着重要的角色。在光学技术中，比色法、化学发光法、荧光法和表面增强拉曼散射法已经在食品安全领域得到广泛应用，关键在于要提高检测特异性和灵敏度。电化学方法中的电化学发光法、电化学发光法与循环伏安法联用、光电化学法灵敏性均达到要求，但需要提高它们的稳定性和应用范围。此外，还需要对压电技术进行深入的研究和探索，以提高检测的准确性和可靠性。

综上所述，作者介绍了9种ssDNA适配体的筛选方法，归纳了6种食源性致病菌ssDNA适配体的筛选进展，并基于光学、电化学和压电技术探讨了其在ssDNA适配体传感器的检测应用。目前，只有全面提高SELEX筛选效率，获得更多高性能的ssDNA适配体，再结合多种生物传感器技术检测能力，才能提高我国食品安全监管与食源性疾病预防和控制的整体水平。

参考文献

［1］GIZAW Z. Public health risks related to food safety issues in the food market：a systematic literature review［J］. Environmental Health and Preventive Medicine，2019，24：68.

［2］SAADAT S，PANDYA H，DEY A，et al. Food forensics：techniques for authenticity determination of food products［J］. Forensic Science International，2022，333：111243.

［3］MOHAMAD N，AZIZAN N I，MOKHTAR N F K，et al. Future perspectives on aptamer for application in food authentication［J］. Analytical Biochemistry，2022，656：114861.

［4］SCHMITZ F R W，VALÉRIO A，OLIVEIRA D，et al. An overview and future prospects on aptamers for food safety［J］. Applied Microbiology and Biotechnology，2020，104：6929-6939.

［5］TUERK C，GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment：RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase［J］. Science，1990，249（4968）：505-510.

［6］ELLINGTON A D，SZOSTAK J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands［J］. Nature，1990，346：818-822.

［7］林祥群，杨国江，卢春霞，等. 基于酶联适配体快速检测食品中葡萄球菌肠毒素A［J］. 现代食品科技，2022，38（2）：305-312.
LIN X Q，YANG G J，LU C X，et al. Colorimetric enzyme-linked aptamer assay for determination of staphylococcal enterotoxin A in foods［J］. Modern Food Science and Technology，2022，38（2）：305-312.（in Chinese）

［8］ASKARI A，KOTA S，FERRELL H，et al. UTexas aptamer dataset：the collection and long-term preservation of aptamer sequence information［J］. Nucleic Acids Research，2023，52（1）：351-359.

［9］WANG L J，WANG R H，WEI H，et al. Selection of aptamers against pathogenic bacteria and their diagnostics application［J］. World Journal of Microbiology & Biotechnology，2018，34：149.

［10］YU F，CHEN J，WANG Z C，et al. Screening aptamers for serine β-lactamase-expressing bacteria with Precision-SELEX［J］. Talanta，2021，224：121750.

［11］NIKAM P S，PALACHANDRA S，KINGSTON J J. *In vitro* selection and characterization of ssDNA aptamers by cross-over

SELEX and its application for detection of *S. typhimurium*[J]. Analytical Biochemistry, 2022, 656:114884.

[12] ZUMRUT H E, BATOOL S, ARGYROPOULOS K V, et al. Integrating ligand-receptor interactions and *in vitro* evolution for streamlined discovery of artificial nucleic acid ligands [J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2019, 17:150-163.

[13] EL-HUSSEINI D M, SAYOUR A E, MELZER F, et al. Generation and selection of specific aptamers targeting *Brucella* species through an enhanced cell-SELEX methodology [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(11):6131.

[14] WANG L J, WANG R H, CHEN F, et al. QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella typhimurium* [J]. Food Chemistry, 2017, 221:776-782.

[15] YANG C, WANG Y, GE M H, et al. Rapid identification of specific DNA aptamers precisely targeting CD33 positive leukemia cells through a paired cell-based approach[J]. Biomaterials Science, 2019, 7(3):938-950.

[16] WU X Q, LI F F, LI Y S, et al. A PD-L1 aptamer selected by loss-gain cell-SELEX conjugated with paclitaxel for treating triple-negative breast cancer[J]. Medical Science Monitor, 2020, 26:e925583.

[17] ROSCH J C, NEAL E H, BALIKOV D A, et al. CRISPR-mediated isogenic cell-SELEX approach for generating highly specific aptamers against native membrane proteins [J]. Cellular and Molecular Bioengineering, 2020, 13:559-574.

[18] RAMLAL S, MONDAL B, LAVU P S, et al. Capture and detection of *Staphylococcus aureus* with dual labeled aptamers to cell surface components[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 265:74-83.

[19] MOON J, KIM G, PARK S B, et al. Comparison of whole-cell SELEX methods for the identification of *Staphylococcus aureus*-specific DNA aptamers [J]. Sensors, 2015, 15(4):8884-8897.

[20] NGUYEN T T Q, KIM E R, GU M B. A new cognate aptamer pair-based sandwich-type electrochemical biosensor for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 198:113835.

[21] CAO X X, LI S H, CHEN L C, et al. Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(14):4621-4628.

[22] CHANG Y C, YANG C Y, SUN R L, et al. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles[J]. Scientific Reports, 2013, 3:1863.

[23] BAYRAÇ C, EYIDOĞAN F, ÖKTEM A H. DNA aptamer-based colorimetric detection platform for *Salmonella enteritidis*[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 98:22-28.

[24] KOLOVSKAYA O S, SAVITSKAYA A G, ZAMAY T N, et al. Development of bacteriostatic DNA aptamers for *Salmonella*[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 56(4):1564-1572.

[25] PARK H C, BAIG I A, LEE S C, et al. Development of ssDNA aptamers for the sensitive detection of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174:793-802.

[26] ZHANG Z L, LIU D L, BAI Y L, et al. Identification and characterization of two high affinity aptamers specific for *Salmonella enteritidis*[J]. Food Control, 2019, 106:106719.

[27] LAVU P S R, MONDAL B, RAMLAL S, et al. Selection and characterization of aptamers using a modified whole cell bacterium SELEX for the detection of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* [J]. ACS Combinatorial Science, 2016, 18(6):292-301.

[28] SHIN W R, SEKHON S S, KIM S G, et al. Aptamer-based bathogen monitoring for *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium* [J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2018, 14(11):1992-2002.

[29] DUAN N, WU S J, CHEN X J, et al. Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using whole-bacterium systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(13):3229-3234.

[30] MOON J, KIM G, LEE S, et al. Identification of *Salmonella typhimurium*-specific DNA aptamers developed using whole-cell SELEX and FACS analysis [J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(2):162-166.

[31] DWIVEDI H P, SMILEY R D, JAYKUS L A. Selection of DNA aptamers for capture and detection of *Salmonella typhimurium* using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(8):3677-3686.

[32] LIU G Q, YU X F, XUE F, et al. Screening and preliminary application of a DNA aptamer for rapid detection of *Salmonella* O8 [J]. Microchimica Acta, 2012, 178:237-244.

[33] RENUKA R, NIKHIL M, ACHUTH J, et al. Highly adaptable and sensitive FRET-based aptamer assay for the detection of *Salmonella paratyphi* A[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 243:118662.

[34] AMRAEE M, OLOOMI M, YAVARI A, et al. DNA

aptamer identification and characterization for *E. coli* O157 detection using cell based SELEX method [J]. Analytical Biochemistry, 2017, 536: 36-44.

[35] ZOU Y, DUAN N, WU S J, et al. Selection, identification, and binding mechanism studies of an ssDNA aptamer targeted to different stages of *E. coli* O157: H7 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(22): 5677-5682.

[36] YU X F, CHEN F, WANG R H, et al. Whole-bacterium SELEX of DNA aptamers for rapid detection of *E. coli* O157: H7 using a QCM sensor [J]. Journal of Biotechnology, 2018, 266: 39-49.

[37] MARTON S, CLETO F, KRIEGER M A, et al. Isolation of an aptamer that binds specifically to *E. coli*[J]. PLoS One, 2016, 11: e0153637.

[38] 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.

[39] PENG Z H, LING M, NING Y, et al. Rapid fluorescent detection of *Escherichia coli* K88 based on DNA aptamer library as direct and specific reporter combined with immuno-magnetic separation[J]. Journal of Fluorescence, 2014, 24: 1159-1168.

[40] SAVORY N, NZAKIZWANAYO J, ABE K, et al. Selection of DNA aptamers against uropathogenic *Escherichia coli* NSM59 by quantitative PCR controlled Cell-SELEX[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 104: 94-100.

[41] KIM Y S, SONG M Y, JURNG J, et al. Isolation and characterization of DNA aptamers against *Escherichia coli* using a bacterial cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach [J]. Analytical Biochemistry, 2013, 436(1): 22-28.

[42] SONG M S, SEKHON S S, SHIN W R, et al. Detecting and discriminating *Shigella sonnei* using an aptamer-based fluorescent biosensor platform[J]. Molecules, 2017, 22(5): 825.

[43] DUAN N, DING X Y, WU S J, et al. *In vitro* selection of a DNA aptamer targeted against *Shigella dysenteriae*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 94(3): 170-174.

[44] LAVU P S, MONDAL B, RAMLAL S. Selection and characterization of cell surface specific aptamer and development of fluorescence assay for detection of *Shigella flexneri* from water samples [J]. Journal of Fluorescence, 2021, 31(3): 685-693.

[45] SUH S H, JAYKUS L A. Nucleic acid aptamers for capture and detection of *Listeria* spp.[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(4): 454-461.

[46] SUH S H, DWIVEDI H P, CHOI S J, et al. Selection and characterization of DNA aptamers specific for *Listeria* species[J]. Analytical Biochemistry, 2014, 459: 39-45.

[47] LEE S H, AHN J Y, LEE K A, et al. Analytical bioconjugates, aptamers, enable specific quantitative detection of *Listeria monocytogenes*[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 68: 272-280.

[48] LIU G Q, LIAN Y Q, GAO C, et al. *In vitro* selection of DNA aptamers and Fluorescence-based recognition for rapid detection *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(5): 1121-1129.

[49] DUAN N, WU S J, CHEN X J, et al. Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio parahemolyticus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(16): 4034-4038.

[50] AHN J Y, LEE K A, LEE M J, et al. Surface plasmon resonance aptamer biosensor for discriminating pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2018, 18(3): 1599-1605.

[51] SONG S X, WANG X Y, XU K, et al. Selection of highly specific aptamers to *Vibrio parahaemolyticus* using cell-SELEX powered by functionalized graphene oxide and rolling circle amplification[J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1052: 153-162.

[52] LIU M Y, YUE F L, KONG Q Q, et al. Aptamers against pathogenic bacteria: selection strategies and apta-assay/aptasensor application for food safety[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(18): 5477-5498.

[53] YUAN J L, WU S J, DUAN N, et al. A sensitive gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor for *Staphylococcus aureus*[J]. Talanta, 2014, 127: 163-168.

[54] WU W H, LI M, WANG Y, et al. Aptasensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium*[J]. Nanoscale Research Letters, 2012, 7(1): 658.

[55] CHEN Q M, GAO R, JIA L. Enhancement of the peroxidase-like activity of aptamers modified gold nanoclusters by bacteria for colorimetric detection of *Salmonella typhimurium*[J]. Talanta, 2021, 221: 121476.

[56] WU S J, DUAN N, SHI Z, et al. Simultaneous aptasensor for multiplex pathogenic bacteria detection based on multicolor upconversion nanoparticles labels[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(6): 3100-3107.

[57] HAO L L, GU H J, DUAN N, et al. A chemiluminescent aptasensor based on rolling circle amplification and Co^{2+}/N-(aminobutyl)-N-(ethylisoluminol) functional flowerlike gold nanoparticles for *Salmonella typhimurium* detection [J]. Talanta, 2017, 164: 275-282.

[58] HAO L L, GU H J, DUAN N, et al. An enhanced

chemiluminescence resonance energy transfer aptasensor based on rolling circle amplification and WS_2 nanosheet for *Staphylococcus aureus* detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 959: 83-90.

[59] HE X X, LI Y H, HE D G, et al. Aptamer-fluorescent silica nanoparticles bioconjugates based dual-color flow cytometry for specific detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2014, 10(7): 1359-1368.

[60] JOSHI R, JANAGAMA H, DWIVEDI H P, et al. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars [J]. Molecular and Cellular Probes, 2009, 23(1): 20-28.

[61] OHK S H, KOO O K, SEN T, et al. Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(3): 808-817.

[62] DUAN N, WU S J, MA X Y, et al. A universal fluorescent aptasensor based on AccuBlue dye for the detection of pathogenic bacteria[J]. Analytical Biochemistry, 2014, 454: 1-6.

[63] CHENG D, YU M Q, FU F, et al. Dual recognition strategy for specific and sensitive detection of bacteria using aptamer-coated magnetic beads and antibiotic-capped gold nanoclusters [J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(1): 820-825.

[64] LI H H, AHMAD W, RONG Y W, et al. Designing an aptamer based magnetic and upconversion nanoparticles conjugated fluorescence sensor for screening *Escherichia coli* in food[J]. Food Control, 2020, 107: 106761.

[65] CHINNAPPAN R, ALAMER S, EISSA S, et al. Fluorometric graphene oxide-based detection of *Salmonella enteritis* using a truncated DNA aptamer [J]. Mikrochimica Acta, 2017, 185(1): 61.

[66] DUAN Y F, NING Y, SONG Y, et al. Fluorescent aptasensor for the determination of *Salmonella typhimurium* based on a graphene oxide platform [J]. Microchimica Acta, 2014, 181: 647-653.

[67] KHANG J, KIM D, CHUNG K W, et al. Chemiluminescent aptasensor capable of rapidly quantifying *Escherichia coli* O157:H7[J]. Talanta, 2016, 147: 177-183.

[68] JIN B R, WANG S R, LIN M, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasenstive bacteria detection [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 90: 525-533.

[69] MA X Y, XU X M, XIA Y, et al. SERS aptasensor for *Salmonella typhimurium* detection based on spiny gold nanoparticles[J]. Food Control, 2018, 84: 232-237.

[70] DUAN N, CHANG B Y, ZHANG H, et al. *Salmonella typhimurium* detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 218: 38-43.

[71] 王龙，葛武鹏，张艳，等. 电化学适配体传感器传感策略在食品检测领域的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2023，14(17)：196-206.
WANG L, GE W P, ZHANG Y, et al. Research progress in electrochemical aptasensor sensing strategies in food detection fields[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(17): 196-206.(in Chinese)

[72] JIA F, DUAN N, WU S J, et al. Impedimetric aptasensor for *Staphylococcus aureus* based on nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles [J]. Microchimica Acta, 2014, 181: 967-974.

[73] MA X Y, JIANG Y H, JIA F, et al. An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of *Salmonella*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 98: 94-98.

[74] ZHOU C X, MO R J, CHEN Z M, et al. Quantitative label-free *Listeria* analysis based on aptamer modified nanoporous sensor[J]. ACS Sensors, 2016, 1(8): 965-969.

[75] RANJBAR S, SHAHROKHIAN S, NURMOHAMMADI F. Nanoporous gold as a suitable substrate for preparation of a new sensitive electrochemical aptasensor for detection of *Salmonella typhimurium*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255(2): 1536-1544.

[76] JIA F, DUAN N, WU S J, et al. Impedimetric *Salmonella* aptasensor using a glassy carbon electrode modified with an electrodeposited composite consisting of reduced graphene oxide and carbon nanotubes[J]. Microchimica Acta, 2016, 183: 337-344.

[77] HAO N, ZHANG X, ZHOU Z, et al. AgBr nanoparticles/3D nitrogen-doped graphene hydrogel for fabricating all-solid-state luminol-electrochemiluminescence *Escherichia coli* aptasensors [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 97: 377-383.

[78] DONG X X, SHI Z L, XU C X, et al. CdS quantum dots/Au nanoparticles/ZnO nanowire array for self-powered photoelectrochemical detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2020, 149: 111843.

[79] SPAGNOLO S, FRANIER B D L, DAVOUDIAN K, et al. Detection of *E. coli* bacteria in milk by an acoustic wave aptasensor with an anti-fouling coating[J]. Sensors (Basel, Switzerland), 2022, 22(5): 1853.

（责任编辑：刘冬梅）