

基于脱氧核酶-荧光共振能量转移效应的食品中铅离子快速检测

刘玉梅, 史雅辰, 任尧, 邓锐杰, 赵志峰, 何强*

(四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065)

摘要: 为实现食品中铅(Pb^{2+})污染的快速检测, 该研究构建了一种基于 Pb^{2+} 依赖型脱氧核酶(DNAzyme)及荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)效应的“Turn on”型铅离子检测传感器。荧光猝灭基团 BHQ1 可以作为 FRET 受体猝灭 EvaGreen 的荧光。当 Pb^{2+} 存在时, 底物链的特异性切割反应可以减弱 BHQ1 对 EvaGreen 的猝灭效果, BHQ1 随底物链的断裂而释放, 远离供体 EvaGreen, 因此 FRET 效应减弱, 供体 EvaGreen 的荧光得以保留。该研究利用 Pb^{2+} 诱导的 FRET 效应的减弱及 EvaGreen 荧光信号的增强可以对铅离子进行定性、定量分析。当脱氧核酶臂长为 15 nt~5 nt、EvaGreen 浓度为 $1\times$ 、底物链与酶链的浓度分别为 400 nmol/L 与 100 nmol/L 时, 探究了该方法的检出限及线性范围。该反应可在室温条件下 3 min 内完成, 同时对铅离子具有高度的特异性, 可以区分不同的金属离子, 并且成功应用于新鲜鸡蛋及自来水中的铅离子定量分析, 加标回收率为 86.79%~113.32%。该研究设计的“Turn on”型铅离子检测传感器可于室温条件下进行一管混反应, 无需扩增, 反应迅速, 为检测食品中的铅污染提供了一些思路。

关键词: 食品安全; 铅离子; 脱氧核酶; 荧光共振能量转移

文章编号: 1673-9078(2022)05-313-319

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0857

DNAzyme-Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Based Rapid Detection of Lead Pollution in Food

LIU Yumei, SHI Yachen, REN Yao, DENG Ruijie, ZHAO Zhifeng, HE Qiang*

(College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: To achieve rapid detection of lead (Pb^{2+}) pollution in food samples, here, a simple “Turn on” Pb^{2+} sensor based on DNAzyme and Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) was established. The quencher BHQ1 worked as the FRET acceptor and quenched the fluorescence of EvaGreen. In the presence of Pb^{2+} , the specific cleavage of the substrates weakened the reaction between EvaGreen and BHQ1, the quencher BHQ1 released as the substrate cleaved and was far away from the FRET donor EvaGreen, so the FRET effect was weakened, the fluorescence of the donor EvaGreen was retained. The weakening of FRET effect and the enhancement of EvaGreen fluorescence signal induced by Pb^{2+} could be used for qualitative and quantitative analysis of Pb^{2+} pollution. When the armlength of the DNAzyme was 15 nt-5 nt, the concentration of EvaGreen, Substrate (GR-B) and DNAzyme were $1\times$, 400 nmol/L and 100 nmol/L, respectively, the limit of detection and linear range were explored. The reaction could be finished within 3 minutes at room temperature and had a high specificity for Pb^{2+} , which could distinguish different metal ions. And it has been successfully applied to the quantitative analysis of Pb^{2+} in fresh eggs and tap water samples, which showed a satisfactory recovery rate from 86.79 % to 113.32 %. In summary, the proposed “Turn on” sensor could be used for rapid one-tube test at room temperature, amplification was not required, which might provide some ideas for detecting Pb^{2+} pollution in food.

Key words: food safety; lead ions; DNAzyme; fluorescence resonance energy transfer

引文格式:

刘玉梅,史雅辰,任尧,等.基于脱氧核酶-荧光共振能量转移效应的食品中铅离子快速检测[J].现代食品科技,2022,38(5):313-319,+312

LIU Yumei, SHI Yachen, REN Yao, et al. DNAzyme-fluorescence resonance energy transfer (FRET) based rapid detection of lead pollution in food [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 313-319,+312

收稿日期: 2021-08-05

基金项目: 四川省科技厅支撑项目 (2020KJT0085-2020YFN0048)

作者简介: 刘玉梅 (1997-), 女, 研究生, 研究方向: 食品安全, E-mail: liuyumei@stu.scu.edu.cn

通讯作者: 何强 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: heq361@163.com

铅是人体非必需金属元素^[1], 人体微量暴露即具有潜在的生殖毒性^[2]、神经毒性^[3,4]和基因毒性^[5]。相较于其它金属离子, 铅离子具有较长的半衰期^[6]及一定的生物富集性^[7]。在人体富集后会诱发关节炎^[8]、肝肾损伤^[9], 甚至癌症^[10]。饮水^[11]、膳食^[12]、呼吸^[13]和皮肤接触^[14]是铅离子暴露的主要形式, 因此有必要对食品及环境中的铅离子进行监测。传统的铅离子检测方法^[15]如石墨炉原子吸收光谱法 (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, GFAAS), 电感耦合等离子体质谱法 (Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) 和火焰原子吸收光谱法 (Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS) 作为食品中铅测定的国标方法, 检测灵敏、结果准确。然而这些方法需要专业的技术人员操作、依赖昂贵的实验室设备, 同时存在样品前处理复杂、检测时间长等问题。

脱氧核酶 (DNAzymes) 是通过体外指数富集的配体系统进化筛选技术 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) 筛选出的单链 DNA 序列, 在溶液中可自我折叠形成复杂的三维结构, 具有可设计性、可组装性、可储存性及高效的催化活性^[16]。不同的脱氧核酶可被特定的金属离子激活, 如铅离子^[17]、铀酰离子^[18]、钠离子^[19]、银离子^[20]、铊离子^[21]等。脱氧核酶具有极高的特异性及稳定性, 因此是铅离子检测体系的常见构成单元。Li 等^[22]将脱氧核酶与 Cas12a 蛋白结合起来用于快速、高效地检测铅离子。该方法十分灵敏, 检出限仅为 0.053 nmol/L, 然而该反应依赖于昂贵的 Cas 蛋白及转录、磁分离技术, 操作较为复杂。

荧光共振能量转移 (Fluorescence Resonance

Energy Transfer, FRET) 是处于激发态的供体将能量转移给邻近处于基态的受体, 即是一种表征和探测相邻供体和受体之间相互作用的技术。供体与受体间距离不同, FRET 效率不同, 因此 FRET 效率可以反应供体与受体之间的距离。鉴于 FRET 效应的灵敏性及灵活性, FRET 已被应用于监测脱氧核酶的构型变化、核酸链之间的结合情况及金属离子介导的酶切过程等。He 等^[23]基于金纳米离子与 TAMRA 基团之间的 FRET 效应设计了一种灵敏、精确的铜离子检测荧光传感器。Chen 等^[24]将杂交链式反应 (Hybridization Chain Reaction, HCR) 与 FRET 结合起来用于铜离子的检测。Liu 等^[25]将碳点、金纳米棒与 FRET 效应结合起来设计了一种“Off-On”型的生物传感器。不仅如此, Yang 等^[26]设计了一种可以在单细胞内灵敏检测铅离子的传感器, 检出限仅为 10 nmol/L, 远低于世界卫生组织的相关标准。然而这些方法设计较为复杂、耗时长、需要扩增反应、成本较高。

本文基于脱氧核酶对铅离子的高度选择性及 FRET 效应对供体、受体间距离感知的灵敏性, 设计了一种操作简单、不依赖扩增的室温铅离子快速检测方法。当铅离子存在时, 脱氧核酶在特定位点切割底物链并释放修饰了 BHQ1 猝灭基团的断链, 因此供体分子的荧光得以保存。该方法成功应用于自来水及鸡蛋中铅离子的检测, 有望用于食品重金属污染的现场检测分析。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

表 1 核苷酸序列表

Table 1 Nucleotide sequences

脱氧核酶	名称	SEQ ID NO.	序列 (5'-3')
底物链	GR-B	1	BHQ1-CTCACTA <u>A</u> GGGAAGAGATGATGCTGT
	GR15-5	2	ACAGACATCATCTCTGAAGTAGCGCCGCCGTATAG
	GR15-6	3	ACAGACATCATCTCTGAAGTAGCGCCGCCGTATAGT
酶链	GR15-7	4	ACAGACATCATCTCTGAAGTAGCGCCGCCGTATAGTG
	GR15-8	5	ACAGACATCATCTCTGAAGTAGCGCCGCCGTATAGTGA
	GR15-9	6	ACAGACATCATCTCTGAAGTAGCGCCGCCGTATAGTGAG

注: 带下划线的加粗字母代表腺嘌呤核糖核苷酸, 加粗部分为脱氧核酶的杂交臂。

表 1 所示 DNA 序列均购于上海生工生物技术有限公司(中国上海), 其中底物链 GR-B 为 HPLC 纯化, 并在 5'端修饰了荧光猝灭基团 BHQ1, 其余序列均为 PAGE 纯化。EvaGreen (20×), 美国赛默飞公司; 醋酸铅标品, 美国默克公司。氯化钠、氯化镁和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES), 阿法埃莎 (中国) 化学有

限公司 (中国上海)。Tris-HCl, 成都金山化学试剂有限公司 (中国成都); 醋酸锰, 天津大茂化学试剂厂 (中国天津)。氯化钴、硝酸铬、硫酸铜、硝酸铝、氯化镍、氯化钾、硝酸和高氯酸, 成都科龙化学试剂厂 (中国成都)。50× TAE buffer、10000× Gel Red, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。6× Loading buffer, 北京擎

科生物科技有限公司。琼脂糖及 25 bp-500 bp DNA marker, 生工生物工程(上海)股份有限公司。实验用水为分子级生物水, 美国康宁公司。实验所用仪器为多功能酶标仪 Biotek Synergy H1 (美国博腾)、电泳仪(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)、凝胶成像仪 Gel Doc XR+System (美国伯乐)。

1.2 铅离子检测体系

40 μL 铅离子检测体系包括 4 μL 10 \times buffer (buffer 组成为 50 mmol/L HEPES, 50 mmol/L 氯化钠, 5 mmol/L 氯化镁, pH 7.26)、3 μL 4 $\mu\text{mol/L}$ 底物链、1 μL 4 $\mu\text{mol/L}$ 不同臂长的酶链、2 μL 20 \times EvaGreen、26 μL 水及 4 μL 不同浓度的铅离子。混合均匀后立即吸取 35 μL 测定荧光值并计算信噪比。信噪比为实验组荧光信号值与空白组荧光信号值的比值。

1.3 光谱分析与凝胶电泳分析

EvaGreen 的激发波长为 480 nm, 发射波长范围为 510~650 nm, 步幅为 2 nm, 最大发射波长为 530 nm。

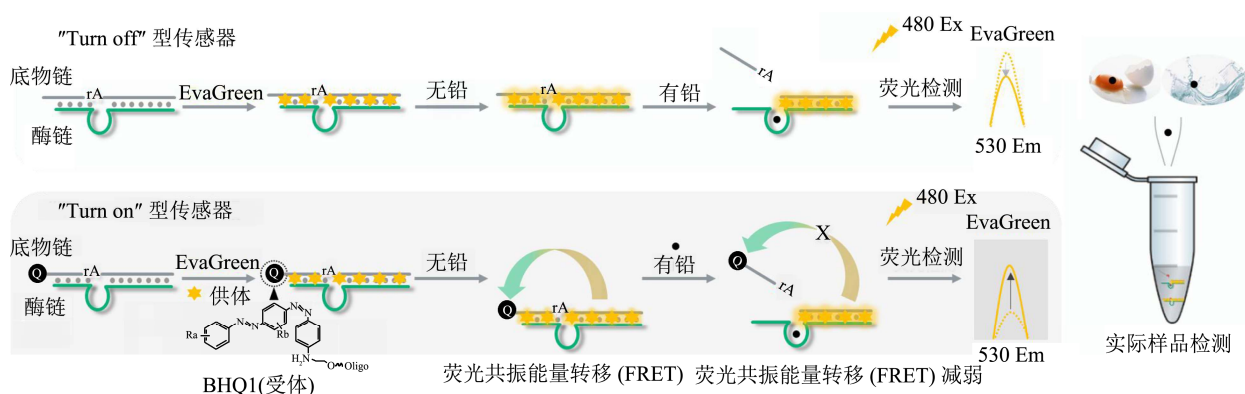


图 1 基于脱氧核酶-FRET 效应的铅离子检测传感器的检测原理

Fig.1 Principle of the DNAzyme-FRET based sensor for Pb^{2+} detection

本文设计了一种检测铅离子的“Turn on”型传感器, 其原理如图 1 所示。当底物链与酶链杂交时, 形成的复合物具有部分双链 DNA 的性质。EvaGreen 染料是一种非特异识别双链 DNA 的荧光分子, 因此可以识别底物链与酶链的杂交复合物。由于底物链的 5' 端修饰有 BHQ1 荧光猝灭基团, 当体系中没有铅离子时, BHQ1 与 EvaGreen 处于邻近状态, 此时在 480 nm 处激发时将产生 FRET 效应, 供体为 EvaGreen 分子, 受体为 BHQ1 基团。受 BHQ1 的影响, 供体 EvaGreen 的荧光会有明显的猝灭现象。当铅离子存在时, 酶链被激活, 底物链被切割, 降低了 5' 端底物链与酶链的杂交稳定性^[28], 并释放 5' 端底物链。此时 EvaGreen 与 BHQ1 之间的距离增大, 而 FRET 效应又与供体、受体分子之间的空间距离密切相关^[29], 因此 EvaGreen

电泳时上样 5 μL , 电泳电压为 90 V, 电泳时间为 1 h。

1.4 实际样品检测

新鲜鸡蛋及自来水样品用于检测该方法的可行性。新鲜鸡蛋购自超市(中国成都), 自来水样品取自实验室。鸡蛋提前进行消化处理, 取 0.5 mL 充分混匀的蛋液、10 mL 70%的硝酸和 0.5 mL 70%的高氯酸于消化管中, 置于消化炉上按以下程序进行消化: 120 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 180 $^{\circ}\text{C}$ 3 h, 200 $^{\circ}\text{C}$ 1 h。用 1 mol/L KOH 将剩余溶液的 pH 值调节至 7.0 左右, 最后用该溶液配制不同浓度的铅离子溶液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用^[27]。

1.5 数据分析

每个样品设三个平行组, 测定结果以平均值 \pm 标准差表示。数据分析采用 Prism 8.0, 绘图采用 origin 8.0。

2 结果与讨论

2.1 检测原理

与 BHQ1 之间 FRET 效应减弱, EvaGreen 的荧光得以保留, 基于铅离子诱导的 FRET 效应减弱可以灵敏地检测体系中的铅离子。在“Turn off”型传感器中, 当铅离子存在时, EvaGreen 的荧光仅略微减弱, 且“Turn off”型传感器容易产生假阳性和检测灵敏度较低的问题。后续实验将探究这两种传感器对铅离子响应的灵敏程度。

2.2 原理验证

为了验证“Turn on”型传感器及“Turn off”型传感器对体系中铅离子的响应灵敏度。在相同实验条件下探究了其荧光变化程度。由图 2a 可知, 对“Turn off”型传感器而言, 当铅离子存在时, EvaGreen 的荧光略微下降, 原因是铅离子诱导了底物链的断链, 降低了

5'端底物链与酶链的杂交稳定性,而3'端底物链与酶链结合较为稳定,所以EvaGreen的荧光对底物链的断裂并不十分敏感,荧光值仅下降9.64%。对“Turn on”型传感器而言,当铅离子存在时,EvaGreen的荧光值有明显升高现象,相较于空白组升高了116.37%,这是因为FRET效应的受体BHQ1对供体EvaGreen的荧光有良好的吸收作用。图2b分别分析了“Turn on”型与“Turn off”型传感器对铅离子响应的显著程度。结果可知“Turn off”型对铅离子的响应并不灵敏,因此在同等条件下“Turn on”型传感器更具有优势。

图2c探究了铅离子及底物链(GR-B)本身对EvaGreen荧光值的影响,由图2a及图2c中①④可知铅离子可以诱导EvaGreen荧光值的显著上升。因此首先探究铅离子本身对EvaGreen荧光值的影响,如图2c中②③所示,铅离子本身并不能使EvaGreen的荧光值升高。同时探究了铅离子本身对猝灭基团的影响,由图2c中⑤⑥所示,GR-B的荧光很低,加入铅离子后也不会导致荧光的变化。同时对比图2c中②③与⑤⑥可以发现,BHQ1与EvaGreen之间的FRET效应可以显著降低实验背景,得到更准确的实验结果。图2d验证了铅离子对脱氧核酶的特异性识别及核酶对底物链的特异性切割作用,当底物链(泳道2)与酶链(泳道3)同时存在时,二者杂交产生了新的二聚物条带(泳道4),当铅离子存在时有了更短的片段产生(泳道5),说明铅离子可以作为辅酶对底物链进行切割,释放与酶链杂交不稳定的5'端底物链。

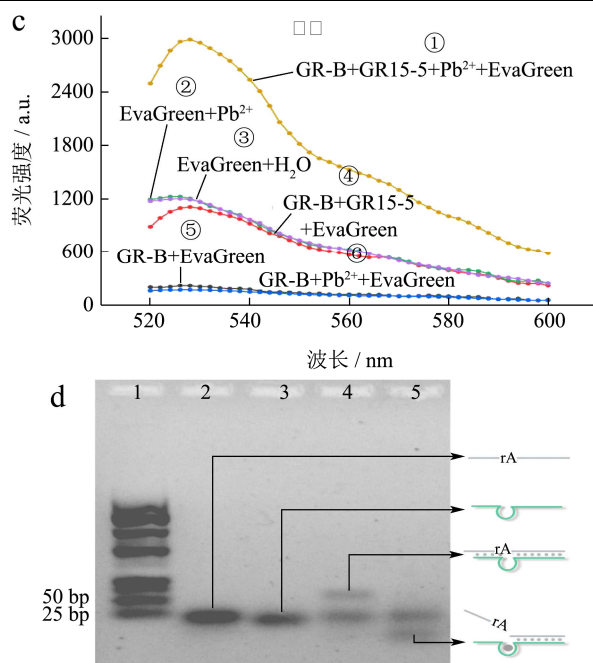
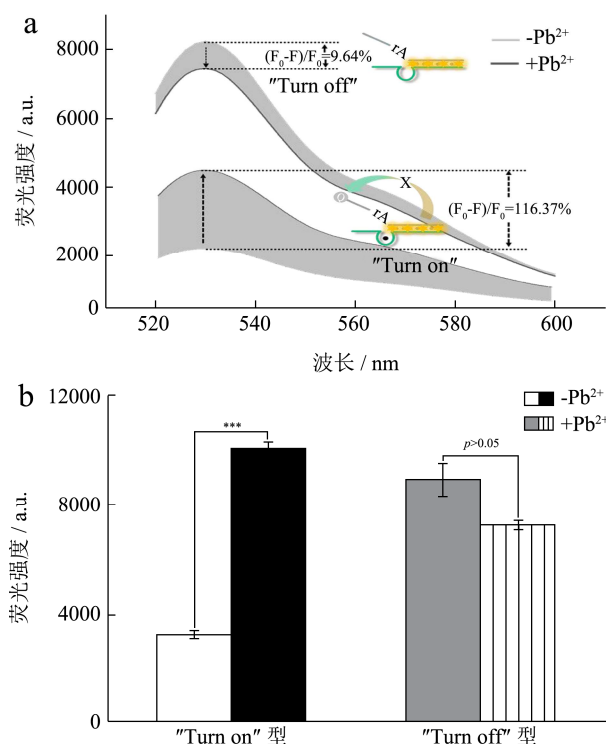


图2 原理验证结果图

Fig.2 Principal verification of the DNAzyme-FRET based sensor

2.3 实验条件优化

为了得到更好的实验结果,分别对酶切反应时间、脱氧核酶的酶链臂长、EvaGreen浓度、底物链与酶链的比例进行了优化(图3)。反应时间直接决定了底物链与酶链之间形成的杂交复合物的量及EvaGreen嵌入双链的多少,间接决定了FRET效应的强弱,因此首先对酶切时间进行了优化。由图3a可知,随着反应时间的延长,实验组与空白组的荧光值都有一定程度的升高,然而信噪比在加入铅离子的一瞬间即达到最大值,这说明铅离子的切割是高效的,并能及时释放断裂的5'端底物链,减弱FRET效应。接下来对酶链臂长(15 nt-X nt)进行了优化,过长的臂长将影响断裂的底物链从酶链上分离,过短将影响核酶的切割活性。由图3b可知,随着酶链5'端的延长,实验组与背景组的荧光强度都有显著升高,当酶链臂长为15 nt~5 nt时,有最大信噪比。EvaGreen浓度优化的实验结果如图3c所示,随着EvaGreen浓度的增加,背景与信号的荧光值都有显著增加,当浓度为1×时,信噪比逐渐趋于稳定并达到最大值。最后对底物链及酶链的比例进行了优化,由图3d可知,当酶链浓度与底物链浓度分别为400 nmol/L与100 nmol/L时,有最大信噪比。因此后续实验将采用15 nt~5 nt的酶链(GR15-5)、1×的EvaGreen、400 nmol/L的酶链与100 nmol/L的底物链并在室温条件下混匀后立即进行荧光检测。

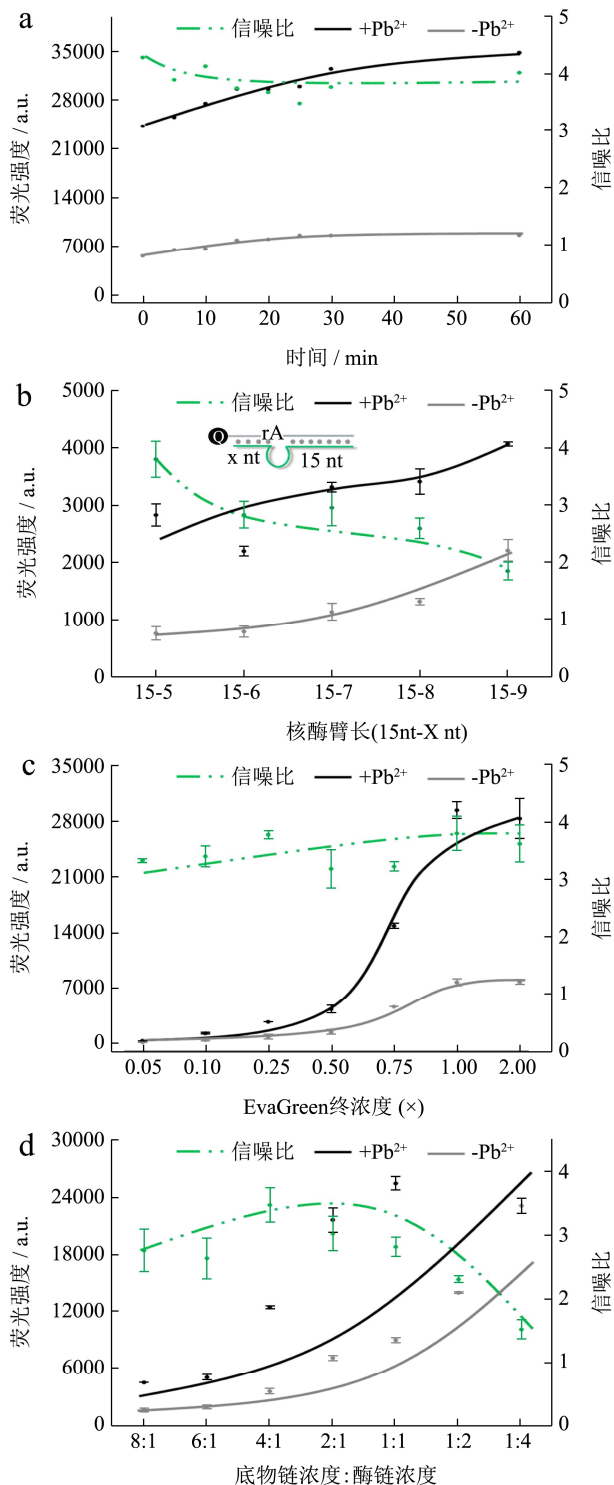


图3 实验条件优化

Fig.3 Optimization of the experimental conditions

注: a: 酶切反应(核酶链在铅离子存在条件下对底物链的特异性切割反应)时间的优化。分别在酶切进行到第0、5、10、15、20、30、40、50、60 min 时加入 EvaGreen 并立即进行荧光值的测定。b: 酶链臂长的优化。酶链臂长分别为 15 nt~5 nt、15 nt~6 nt、15 nt~7 nt、15 nt~8 nt、15 nt~9 nt。c: EvaGreen 浓度优化。EvaGreen 浓度为 0.05×、0.1×、0.25×、0.5×、0.75×、1×、2×。d: 底物链及酶链比例的优化。所用底物链与酶链的

浓度依次为 800、100 nmol/L; 600、100 nmol/L; 400、100 nmol/L; 200、100 nmol/L; 100、100 nmol/L; 100、200 nmol/L; 100、400 nmol/L。

2.4 铅离子定量分析

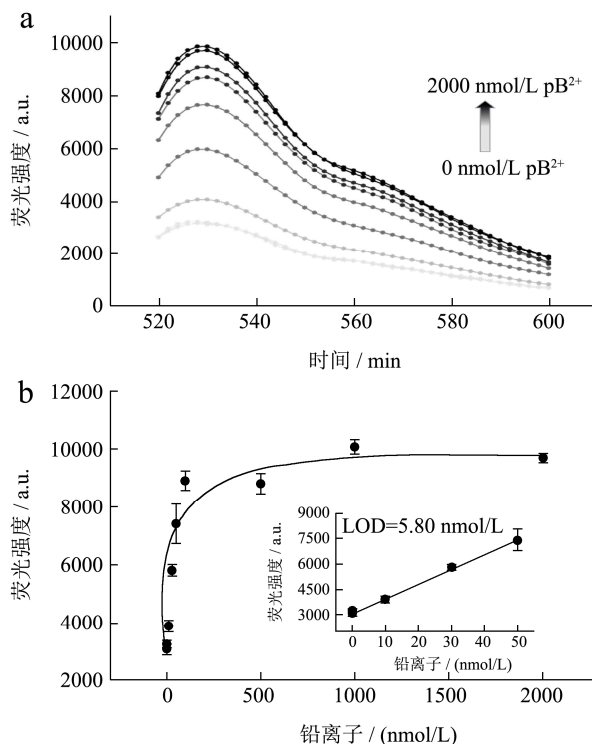


图4 铅离子浓度与荧光信号之间的线性关系

Fig.4 Linear relationship between Pb^{2+} concentration and fluorescent signal

在优化的实验条件基础上,探究铅离子浓度与荧光信号之间的关系。由图 4a 可知,随着铅离子的增加(0、0.1、1、10、30、50、100、500、1000、2000 nmol/L),EvaGreen 的荧光值逐渐升高,这是因为铅离子的增加加速了底物链的切割。铅离子与荧光信号之间的线性关系如图 4b 所示,在 0 nmol/L 到 50 nmol/L 铅离子浓度范围内,铅离子浓度与荧光强度之间拟合得到标准曲线为 $y=86.98x+3097.90$ ($R^2=0.997$),其中 y 代表加入铅离子后 EvaGreen 的荧光强度, x 代表对应的铅离子浓度。根据 3 σ 原则计算得到检出限(LOD)为 5.80 nmol/L。同时,在相同实验条件下,对“Turn off”型传感器的灵敏度进行了探究,结果表明在没有足够的酶切时间条件下,几乎没有荧光变化,因此在与“Turn on”型同等实验条件下无法做出有效的关系曲线(数据并没有展示)。食品的原产地不同,不同食品原料中的铅离子含量大有不同,不同的食品原料在生长过程中对铅离子的富集能力不同。因此该方法有望用于多种不同产地的不同食品中的铅离子污染检测。

表 2 基于核酶的铅离子检测方法

Table 2 DNAzyme-based Pb²⁺ detection methods

检测方法	检出限/(nmol/L)	反应时间/min	实际样品检测	回收率/%	参考文献
荧光检测	5.80	3	鸡蛋、自来水	86.79~113.32	本文
荧光检测	5.00	20	自来水、湖水	96.10~102.60	[30]
吸光度检测	7.00	8	河水	98.00~104.00	[31]
荧光检测	10.00	-	湖水	-	[32]
荧光检测	16.70	60	-	-	[33]

2.5 选择性实验

食品原料组成复杂,有的本身就富含金属离子。为了验证本方法对铅离子的选择性,分别取 10、50、500 nmol/L 的铅离子、镉离子、镍离子、钴离子、铝离子、锰离子和铜离子用于分析选择性。由图 5 可知,除了铅离子有明显信号响应之外,其它金属离子的荧光信号在不同浓度梯度的范围内变化不大,这是由于只有铅离子能作为酶链的辅酶因子激活其活性,其它的金属离子并无此作用。脱氧核酶对铅离子的高度选择性保证了本实验设计的高度特异性。因此本方法有望用于复杂的食品样品中的铅离子检测,并得到较为准确的结果。

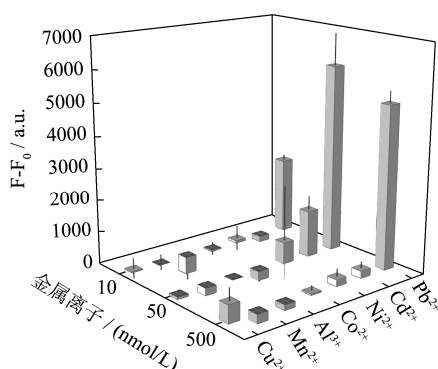


图 5 选择性分析实验结果

Fig.5 The result of specificity test

注: F、F₀ 分别表示加、不加各种浓度金属离子时的 EvaGreen 荧光信号响应。

2.6 实际样品检测

鸡蛋是常见的食品原料,环境中的铅离子容易以禽类为媒介富集到鸡蛋中。同时饮水也是人体摄入铅离子的主要形式之一。为了验证本设计有一定的应用可能性,选择新鲜鸡蛋及自来水为样品,分别配置 30、40、50 nmol/L 的实际样品待检液用于检测,结果如图 6 所示。可以发现该方法有良好的回收率(86.79%~113.32%),其中鸡蛋与自来水检测结果的差异可能是由于它们本身的特性决定的,因此该方法有望用于实际样品的现场检测。同时本文比较了不同基于核酶的

铅离子检测方法,结果如表 2 所示。

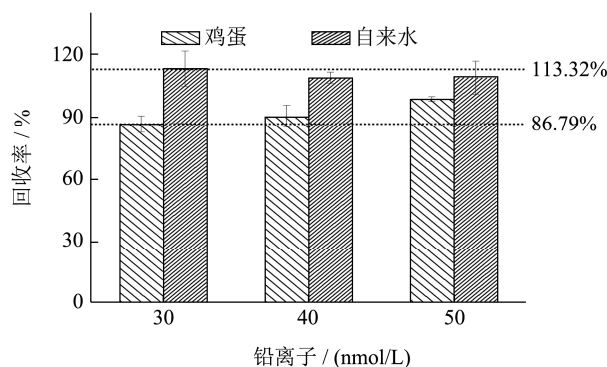


图 6 实际样品检测实验结果

Fig.6 The result of real samples' detection

3 结论

本文构建了一种基于脱氧核酶和 FRET 效应的铅离子快速检测方法,该方法操作简单,具有高度的选择性并成功应用于复杂的实际样品检测。相比之前的核酸探针检测方法,该方法原理简单,反应灵敏,与便携式荧光计结合有望用于现场监测不同复杂样品中的铅污染,同时该方法也为设计其它金属离子检测传感器提供了思路。

参考文献

- [1] El-Kady A A, Abdel-Wahhab M A. Occurrence of trace metals in foodstuffs and their health impact [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 75: 36-45
- [2] Balachandar R, Bagepally B S, Kalahasthi R, et al. Blood lead levels and male reproductive hormones: asystematic review and meta-analysis [J]. Toxicology, 2020, 443: 152574
- [3] Chandio T A, Khan M N, Muhammad M T, et al. Co-exposure of neurotoxic contaminants (Pb and Mn) in drinking water of Zhob district, Baluchistan Pakistan [J]. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2020, 14: 100328
- [4] Ishitsuka K, Yamamoto-Hanada K, Yang L, et al. Association between blood lead exposure and mental health in pregnant women: results from the Japan environment and children's

- study [J]. *Neuro Toxicology*, 2020, 79: 191-199
- [5] Yohannes Y B, Nakayama S, Yabe J, et al. Blood lead levels and aberrant DNA methylation of the ALAD and P16 gene promoters in children exposed to environmental-lead [J]. *Environmental Research*, 2020, 188: 109759
- [6] Raghunath R, Tripathi R M, Khandekar R N, et al. Retention times of Pb, Cd, Cu and Zn in children's blood [J]. *The Science of the Total Environment*, 1997, 207: 133-139
- [7] Bordon I C, Emerenciano A K, Melo J R C, et al. Implications on the Pb bioaccumulation and metallothionein levels due to dietary and waterborne exposures: the callinectesdanae case [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 162: 415-422
- [8] Park S, Choi N K. The relationships of blood lead level, body mass index, and osteoarthritis in postmenopausal women [J]. *Maturitas*, 2019, 125: 85-90
- [9] Togao M, Nakayama S M M, Ikenaka Y, et al. Bioimaging of Pb and STIM1 in mice liver, kidney and brain using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and immunohistochemistry [J]. *Chemosphere*, 2020, 238: 124581
- [10] Meng Y, Tang C, Yu J, et al. Exposure to lead increases the risk of meningioma and brain cancer: ameta-analysis [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2020, 60: 126474
- [11] Stanek L W, Xue J, Lay C R, et al. Modeled impacts of drinking water Pb reduction scenarios on children's exposures and blood lead levels [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54: 9474-9482
- [12] Malavolti M, Fairweather Tai S J, Malagoli C, et al. Lead exposure in an Italian population: food content, dietary intake and risk assessment [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109370
- [13] Yao W, Gallagher D L, Gohlke J M, et al. Children and adults are exposed to dual risks from ingestion of water and inhalation of ultrasonic humidifier particles from Pb-containing water [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 791: 148248
- [14] Chaparro Leal L T, Guney M, Zagury G J. *In vitro* dermal bioaccessibility of selected metals in contaminated soil and mine tailings and human health risk characterization [J]. *Chemosphere*, 2018, 197: 42-49
- [15] GB 5009.12-2017, 食品安全国家标准食品中铅的测定[S]
- [16] Gong L, Zhao Z, Lv Y F, et al. DNAzyme-based biosensors and nanodevices [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51: 979-995
- [17] Nie D, Wu H, Zheng Q, et al. A sensitive and selective DNAzyme-based flow cytometric method for detecting Pb²⁺ ions [J]. *Chemical Communications*, 2012, 48: 1150-1152
- [18] Yang Y, Yang H, Wan Y, et al. Temperature-robust and ratiometric G-quadruplex proximate DNAzyme assay for robustly monitoring of uranium pollution and its microbial biosorbents screening [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 413: 125383
- [19] Xiong Y, Zhang J, Yang Z, et al. Functional DNA regulated CRISPR-Cas12a sensors for point-of-care diagnostics of non-nucleic-acid targets [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142: 207-213
- [20] Saran R, Liu J. A silver DNAzyme [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88: 4014-4020
- [21] Huang P-J J, Vazin M, Liu J. Desulfurization activated phosphorothioate DNAzyme for the detection of thallium [J]. *Analytical Chemistry*, 2015
- [22] Li J, Yang S, Zuo C, et al. Applying CRISPR-Cas12a as a signal amplifier to construct biosensors for non-DNA targets in ultralow concentrations [J]. *ACS Sensors*, 2020, 5: 970-977
- [23] He Y, Tian J, Zhang J, et al. DNAzyme self-assembled gold nanorods-based FRET or polarization assay for ultrasensitive and selective detection of copper (II) ion [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 55: 285-288
- [24] Chen Y, Chen L, Ou Y, et al. DNAzyme-based biosensor for Cu²⁺ ion by combining hybridization chain reaction with fluorescence resonance energy transfer technique [J]. *Talanta*, 2016, 155: 245-249
- [25] Liu G, Feng D Q, Qian Y, et al. Construction of FRET biosensor for off-on detection of lead ions based on carbon dots and gold nanorods [J]. *Talanta*, 2019, 201: 90-95
- [26] Yang D M, Fu T F, Lin C S, et al. High-performance FRET biosensors for single-cell and *in vivo* lead detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 168: 112571
- [27] Wu Y, Shi Y, Deng S, et al. Metal-induced G-quadruplex polymorphism for ratiometric and label-free detection of lead pollution in tea [J]. *Food Chemistry*, 2020, 343(16): 128425

(下转第 312 页)