

分析测试

新型巯基化适配体修饰金纳米粒子比色检测饮用水中汞离子的研究

关桦楠*, 薛悦, 刘博, 宋岩, 彭勃, 吴巧艳, 徐丽萍, 璠阿敏
(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:采用葡萄皮浸泡液绿色还原法制备金纳米粒子。基于 Hg^{2+} 与胸腺嘧啶(T)中 T-T 错配部分可特异性结合的性质, 在核酸适配体两端引入巯基并修饰金纳米粒子表面, 进而构建出一种新型高效的快速比色检测 Hg^{2+} 的方法。结果表明, 以 20% 葡萄皮浸泡液为还原剂可以得到稳定性好且形状均一的平均粒径约为 8 nm 的金纳米粒子; 伴随 Hg^{2+} 浓度的提高, 体系颜色由红色转变为蓝紫色; 紫外-可见光光谱结果表明, 当汞离子浓度处于 0.01~10 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, R^2 值为 0.971 1, 工作曲线方程为 $y = -13.2463x + 0.1566$; 在去离子水和饮用水中最低检测限分别为 4.7、5.4 $\mu\text{mol/L}$; 检测体系对 5 种常见氨基酸和 3 种常见金属离子具有明显的抗干扰性能。

关键词:汞离子; 核酸适配体; 金纳米粒子; 比色法; 饮用水

中图分类号: TS254.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)02-0256-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.02.048

Colorimetric assay of mercury ions in drinking water by a novel thiolated aptamer modified gold nanoparticles

GUAN Hua-nan*, XUE Yue, LIU Bo, SONG Yan, PENG Bo, WU Qiao-yan,
XU Li-ping, NAO A-min

(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Gold nanoparticles are prepared by green reduction of grape skin soaking solution. Based on the specific binding of Hg^{2+} to T-T mismatch in thymine (T), a novel, efficient and rapid colorimetric method for the determination of Hg^{2+} is established through adding thiol groups into the two ends of aptamers to modify the surface of gold nanoparticles. It is demonstrated that gold nanoparticles with good stability and uniform particle size can be obtained with 20% grape skin soak solution as the reducing agent. A red-to-blue color change can be observed in the solution when Hg^{2+} concentration increases. The results by UV-Vis spectrum indicate that R^2 value is 0.971 1 and the working curve equation is $y = -13.2463x + 0.1566$ when Hg^{2+} concentration locates in the range of 0.01–10 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The detection limits of Hg^{2+} in deionized water and drinking water can reach as low as 4.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 5.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Additionally, this colorimetric assay method exhibits excellent anti-interference performance against 5 kinds of common amino acids and 3 kinds of common metal ions.

Key words: mercury ion; aptamer; gold nanoparticles; colorimetry; drinking water

近年来,我国的食品安全问题亟待解决,而其中重金属对食品及其制品的污染和残留成为公共关注的焦点^[1]。汞元素是重金属中毒性最强,且最具有代表性的污染物^[2]。汞污染物无处不在,会广泛分布于空气、土壤和水环境中^[3],可以通过生物的代谢系统转化成对人体有害的甲基汞形式,进而损害人体中枢神经系统,并导致运动障碍、瘫痪甚至死亡。现阶段,汞中毒所引起的水俣病案例数量仍在逐年递增^[4]。因此,重金属汞的有效监测对人类健康和生态系统来说具有十分重要的意义。目前,对

于痕量汞测定较为常规的方法主要有气相色谱-质谱(GC-MS)^[5]、X射线荧光光谱法^[6]、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)^[7]、表面增强拉曼散射^[8-9]、电化学法^[10-11]和原子光谱法^[12-14]等。但是,这些方法普遍存在着操作步骤烦琐,技术体系复杂和仪器价格昂贵的问题。这些缺陷使得诸如此类的技术手段难以应用于现场快速检测。因此,需要研究出低成本、操作简单、快速且便携的 Hg^{2+} 检测方法^[15]。

基于特殊纳米材料的比色法一直是本领域的研

收稿日期:2020-04-21;修回日期:2020-12-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31871747,31201376,31370649);黑龙江省自然科学基金项目(C2016034);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2016060);中国博士后基金项目(2014T70304,2013M531009);黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z13002);哈尔滨商业大学科研项目(17XN026);哈尔滨商业大学大学生创新创业训练计划项目(201810240080)

作者简介:关桦楠(1983-),男,博士,教授,研究方向为食品安全检测及生物催化分析,通讯联系人,0451-84844281,hsdghn3@163.com。

究热点^[16]。纳米材料因独特的量子尺寸效应和表面效应,从而具有与其他材料不同的光学性质,如具有宽的光吸收频带以及强的光吸收性能^[17]。在众多纳米材料中,金纳米粒子(AuNPs)具有更为独特的光学性能,可以通过诱导聚集促使体系由酒红色转变为蓝紫色,因此常被用作显色成像探针^[18-21]。核酸适配体识别特性类似于抗体,在保证识别特异性的同时具有更好的稳定性和更低的成本^[22],且适配体可以进行体外筛选、批量合成并且容易改造标记,因此在分析化学领域特别是在重金属检测领域应用前景十分广阔^[9]。诸多研究表明,重金属汞离子可与核酸序列中胸腺嘧啶错配部分(T-T)特异性结合,形成“T-Hg²⁺-T”(金汞齐)的结构。本研究基于金汞齐结构特点,首先制备两端带有巯基的且含有T-T特定序列的核苷酸片段(核酸适配体);采用绿色还原法制备金纳米粒子;因巯基与金纳米粒子具有亲和性,可以将核酸适配体牢固地结合在金纳米粒子表面,当体系中存在Hg²⁺时,所形成的金汞齐结构会促进金纳米粒子的快速聚集,使得体系颜色发生转变,进而可以高效定量检测体系中的Hg²⁺的浓度。本研究的开展将为重金属汞的检测方法改良提供基本资料。

1 材料与试剂

傅里叶变换红外光谱仪,上海诺顶仪器设备有限公司;透射电子显微镜,日本电子株式会社;磁力搅拌加热器,深圳市博大精神科技有限公司;紫外-可见光分光光度计,北京中西远大科技有限公司;电子天平,武汉敬信科技有限公司;pH计,上海亨东仪器有限公司;电热恒温水浴锅,邢台科拓机械制造有限公司。

新鲜巨峰葡萄,哈尔滨市金安超市;氯金酸,东莞市瓦西化工有限公司;巯基化核酸适配体,上海生工生物工程股份有限公司;氯化汞、氯化钠、硫酸钾、氯化镁、硝酸钙、硫酸锌,杭州晨路科技有限公司;苯丙氨酸、赖氨酸和酪氨酸,广东翁江化学试剂有限公司;脯氨酸、甘氨酸,北京泛博生物化学有限公司;饮用水的水样品,哈尔滨市自来水。

2 实验方法

2.1 合成特异性的寡核苷酸片段(新型巯基化适配体)

根据此体系中核酸适配体的工作原理(胸腺嘧

啶的分布区域以及序列构成的不同),设计出排列结构为5'-SH(CH₂)₄A₈TTCTTTCTCCCCTTGTTT-GTT(CH₂)₄SH-3'型的片段。加入适量的去离子水,溶解稀释后浓度为100 μmol/L,在实验操作中使用浓度为5 μmol/L的工作液。

2.2 金纳米粒子的制备

取新鲜葡萄皮,称量100 g置于烧杯中,加入200 mL去离子水(温度为80℃),将葡萄皮充分浸泡,并自然冷却至室温。再将浸泡液置于离心机中,于4 000 r/min的条件下,离心3 min后取上清液,将此上清液作为母液。加入适量的去离子水稀释,获得200 mL且体积分数为母液20%的葡萄皮工作液,于冰箱中保存(冰箱温度控制在4℃左右,保存时间不超过48 h)。常温下,准确量取氯金酸溶液(1%,W/V)20 mL,进行冷却(温度为4℃),冷却后放入反应皿,使用磁力搅拌器进行缓慢、温和搅动;2 min,立即倒入提前量取好的5 mL体积分数为20%的工作液,并观察体系颜色的变化(黄色-紫色-酒红色)。当变为酒红色时,加快搅拌速度,继续反应20 min后停止,将反应液放置在冰箱中冷藏(冰箱温度控制在4℃左右)。

2.3 金纳米粒子的表征

将1 mL金纳米粒子胶液和2 mL去离子水依次加入试管中,搅拌均匀后,为确定最大吸收峰波长,运用紫外-可见光分光光度计进行扫描,与不同梯度浸泡液所制得的金纳米粒子的可见光吸收光谱对比,从而初步判定金纳米粒子的粒径大小。为确定溶液中金纳米粒子的粒度分布情况,采用激光粒度分析仪进行研究。采用透射电子显微镜观察金纳米粒子表观形貌特征。

2.4 巯基化适配体修饰金纳米粒子比色检测汞离子体系的构建

取2 mL样品瓶,依次量取去离子水200 μL、核酸适配体水溶液100 μL(浓度为5 μmol/L)及金纳米粒子溶液1 000 μL倒入其中。充分混合样品瓶中的物质后在室温下静置一段时间(时间控制在10 min左右)。再依次加入汞标液(浓度分别为0.01、0.1、1、50、100、200、1 000、10 000、20 000 μmol/L)。在室温的条件下反应10 min。观察并拍照记录溶液颜色的变化。使用紫外-可见光分光光度计对整个体系的吸收光谱进行扫描,然后以汞离子的浓度为横坐标,以吸光度值为纵坐标,初步构建该检测体系的工作曲线,测定出不同汞离子浓度所对应的吸光

度比值 A_{620}/A_{520} , 于坐标图中绘制出吸光度比值 A_{620}/A_{520} 和汞离子浓度的线性关系, 并计算最低检出限。

2.5 比色检测体系的抗干扰性研究

以去离子水作为实验对照, 分别向最适体系中添加浓度为 0.5 mmol/L 的 5 种常见的氨基酸(苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、脯氨酸、酪氨酸)及 3 种常见的金属离子(K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 后观察溶液中颜色的变化并拍照记录下来, 采用紫外-可见光分光光度计将整个体系的吸收光谱进行扫描, 分析上述食品中常见的物质的加入对检测结果的影响程度。

2.6 实际样品的检测

为了探究本研究体系在实际样品检测中的加标回收率及精密度, 选择常见的饮用水作为实验模型。选择浓度为 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 汞离子样品液(用饮用水配置), 每种浓度 5 次重复实验。

3 结果与讨论

3.1 金纳米粒子的表征

在众多制备金纳米粒子的方法中, 化学还原制备法是最常用的方法之一。原理是将化学还原剂加入到事先确定好浓度的金离子溶液中, 使 3 价态的金离子被还原成零价态的金, 即为金纳米粒子。鉴于此, 本文中采用 20% 葡萄皮浸泡液(含有维生素 C 等多种还原性物质) 进行金纳米粒子的制备, 所得结果见图 1。由图 1 中金纳米粒子透射电子显微镜

图片可以看出, 采用此法所制得的金纳米粒子形状均一, 颗粒饱满, 大多呈球形。整理分散度较好, 基本无聚集现象。由激光粒度仪测定结果可知, 该方法制得的金纳米粒子平均粒径约为 8 nm。

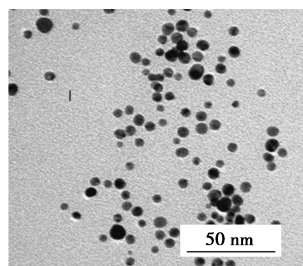


图 1 体积分数为 20% 的葡萄皮浸泡液所制备金纳米粒子的透射电子显微镜图片

3.2 基于巯基化适配体修饰金纳米粒子比色检测饮用水中汞离子的机理

3.2.1 比色检测体系的构建

本文中设计的两端带有巯基的镊子型 dsDNA: 一部分为双螺旋结构, 是通过互补碱基形成的; 另一部分为 T-T 错配的形状。错配的部位要保持单链的状态同时还可以通过巯基牢固附着在金纳米粒子的表面。当体系中存在 Hg^{2+} 时, 一部分核酸适配体序列便会形成“T- Hg^{2+} -T”结构, 两段牢固的巯基结合位点会促使金纳米粒子快速发生团聚, 从而提高反应的灵敏度和稳定性。利用金纳米粒子与巯基化适配体可高效结合的特性, 构建金纳米比色探针, 进行 Hg^{2+} 浓度的测定, 比色结果如图 2。



由左至右依次为: 对照、0.01、0.1、1.0、50、100、200、1 000、10 000、20 000 $\mu\text{mol/L}$

图 2 新型巯基化适配体修饰金纳米粒子比色检测不同浓度汞离子

从图 2 中可以看出, 伴随着样品中 Hg^{2+} 浓度的增加, 检测体系颜色也随之发生变化(由酒红色逐渐转变为蓝紫色)。在 Hg^{2+} 的浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 检测体系与对照组的颜色基本无差异; 而当汞离子浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 颜色开始发生显著变化; 当汞离子浓度为 200~2 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 溶液颜色继续加深直至转变为蓝紫色。

由图 3 可看出, 该体系中汞离子的浓度与吸光度峰值线性关系较为明显, 吸光度峰值随着汞离子

浓度的增大而线性升高。以上结果表明, 在该体系中, 汞离子对金纳米粒子的聚集具有诱导作用, 同时发生了表面等离子体增强效应, 造成了吸收峰波长的移动。当汞离子在体系中的浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 检测体系的吸收峰峰值和波长(520 nm) 与对照样品基本一致, 说明低浓度的汞离子没有显著影响金纳米粒子的聚集, 没有造成体系的颜色变化。而当汞离子在体系中的浓度大于 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 原本波长 520 nm 处的吸光度数值开始下降, 且吸收峰波

长发生移动,表明金纳米粒子开始大量聚集。该结果与图 2 中的颜色变化规律基本吻合。

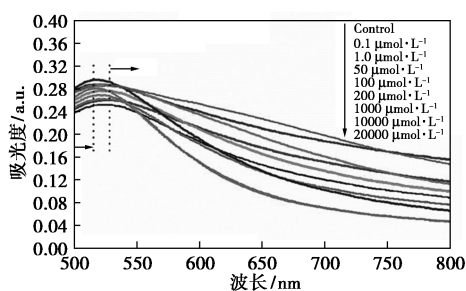


图 3 基于巯基化核酸适配体修饰金纳米粒子检测饮用水中汞离子的紫外-可见光光谱

鉴于吸收峰波长发生移动,参考相关研究^[13],选择波长 520 nm 与 620 nm 处的吸光度进行对比,测定不同浓度下汞离子的吸光度比值 A_{620}/A_{520} ,进行 3 次重复实验,确定最低检出限 ($3s/b$)。由紫外-可见光光谱的结果显示,基于巯基化适配体修饰金纳米粒子比色检测汞离子体系中,当汞离子浓度处于 0.01 ~ 10 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, R^2 值为 0.971 1,说明该比值 (A_{620}/A_{520}) 与汞离子浓度具有较为明显的线性关系,工作曲线方程为 $y = -13.246 3x + 0.156 6$ 。最低检测限为 4.7 $\mu\text{mol/L}$ (国家标准为 1×10^{-6} , 即 9 $\mu\text{mol/L}$),此结果低于国家标准。上述结果表明,含有巯基的适配体可明显提升该检测体系的灵敏度。

3.2.2 检测体系抗干扰性研究

抗干扰性能是整个比色检测体系中一项重要的指标。在实际检测中,食品样品成分复杂,本研究仅选取食品中对金纳米粒子具有潜在诱导聚集作用的常见氨基酸和常见金属离子作为干扰物质,评估检测体系的抗干扰性能。本实验以 500 $\mu\text{mol/L}$ 汞离子浓度作为参照标准,选取 5 种常见的氨基酸(苯丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、脯氨酸、酪氨酸)和 3 种常见的金属离子 (K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 干扰性物质,每种氨基酸和金属离子的浓度均为汞离子浓度的 50 倍)。

新型巯基化适配体金纳米粒子比色传感体系抗

干扰性的紫外-可见光光谱见图 4。

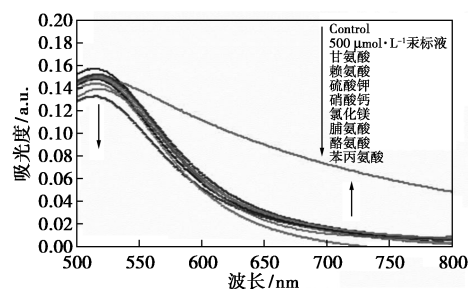


图 4 新型巯基化适配体金纳米粒子比色传感体系抗干扰性的紫外-可见光光谱

研究结果显示,除添加 Hg^{2+} 的溶液以外,其他干扰物质的溶液仍保持酒红色,与空白组颜色几乎没有差异。而加入了 Hg^{2+} (500 $\mu\text{mol/L}$) 的溶液颜色发生了肉眼可见的变化(由酒红色变为蓝紫色)。证明加入 Hg^{2+} (500 $\mu\text{mol/L}$) 后,促使了溶液中 AuNPs 的快速聚集,UV-Vis 光谱显示出红移。这也证明了该体系的重复性较好。相应地,由图 4 显示,加入含有 Hg^{2+} 的 AuNPs 溶液的表面等离子体共振吸收带出现红移并变宽,而空白组以及其他干扰组的光谱几乎没有变化。进一步说明在向该体系中添加高 50 倍干扰物质的条件下也不干扰其实验。综上所述,新型巯基化核酸适配体修饰的金纳米粒子在检测 Hg^{2+} 的方面具有良好的抗干扰性。

3.2.3 新型巯基化检测方法在自来水中汞离子测定的应用

为了评估开发的比色传感器的实用性,将巯基化适配体修饰的金纳米粒子比色方法用于检测实际水中的 Hg^{2+} 。本文中选取自来水为实验样本,运用比色法检测其含汞量。将已配好浓度的汞离子溶液添加到用巯基化适配体修饰的金纳米粒子溶液中, AuNPs 发生聚集,随汞离子浓度的增加,溶液的颜色会发生变化(由红色逐渐转变为蓝紫色,如图 5 所示)。并对 AuNPs 溶液进行紫外-可见吸光光谱的分析,得到本方法对不同浓度梯度 Hg^{2+} (0 ~ 20 000 $\mu\text{mol/L}$) 的反馈。



由左至右依次为:对照、0.01、0.1、1.0、50、100、200、1 000、1 0000、20 000 $\mu\text{mol/L}$

图 5 饮用水样本中汞离子的比色检测体系

与上述去离子水的实验条件下相比,在日常实物的水样本的检测中,相同浓度处呈现完全不同的颜色梯度,原因可能是自来水中含有些许化学杂质,例如消毒剂、吸附剂等,这些化学杂质影响了寡核苷酸片段上的巯基与金纳米粒子的结合程度。重复多次实验,测得此体系精密度 RSD 范围处于 7.32%~9.56%,并且能够很好地稳定在 8.18%~8.74%,可见该检测体系的精密度符合要求。清楚地证实,该比色纳米传感器可适用于准确测定实际水样中的 Hg^{2+} 。

4 结论

本研究在核酸适配体两端引入巯基,通过巯基与金纳米粒子的超强亲和力,使两者能够稳定结合。通过汞离子与适配体特殊序列的错配,可使整个检测体系中颜色发生显著变化。通过观察颜色变化实现了待检测样品中汞离子的比色分析。新型巯基化适配体修饰金纳米粒子比色检测饮用水中汞离子体系有较低的检测限,且该检测体系具有良好的抗干扰性、稳定性以及特异性。此方法操控简单、实时性好、针对性较高,可成功地用于分析饮用水中 Hg^{2+} 含量的测定,也为目前的质量检测工作提供了一种高效便捷的途径。

参考文献

- [1] Chen Z, Zhang C, Tan Y, *et al.* Chitosan-functionalized gold nanoparticles for colorimetric detection of mercury ions based on chelation-induced aggregation [J]. *Microchimica Acta*, 2015, 182(3/4): 611-616.
- [2] Swain K K, Bhand S. A dual-readout magnetic nanoparticle-based enzyme assay for the sensitive detection of $Hg(II)$ ions in drinking water [J]. *ACS Earth and Space Chemistry*, 2018, 2(12): 1312-1322.
- [3] Gong T, Liu J, Liu X, *et al.* A sensitive and selective sensing platform based on CdTe QDs in the presence of L-cysteine for detection of silver, mercury and copper ions in water and various drinks [J]. *Food Chemistry*, 2016, 213: 306-312.
- [4] Costas-Mora I, Romero V, Lavilla I, *et al.* In situ building of a nanoprobe based on fluorescent carbon dots for methylmercury detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(9): 536-4543.
- [5] Lee D, Lee K G. Mercury and methylmercury in Korean herbal medicines and functional health foods [J]. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2013, 6(4): 79-284.
- [6] Sitko R, Janik P, Zawisza B, *et al.* Green approach for ultratrace determination of divalent metal ions and arsenic species using total-reflection X-ray fluorescence spectrometry and mercapto-modified graphene oxide nanosheets as a novel adsorbent [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(6): 3535-3542.
- [7] Wang H, Wu Z, Chen B, *et al.* Chip-based array magnetic solid phase microextraction on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace heavy metals in cells [J]. *Analyst*, 2015, 140(16): 5619-5626.
- [8] Daware K, Shinde R, Kalubarme R S, *et al.* Development of optical sensing probe for $Hg(II)$ ions detection in ground water using Au, Hexanedithiol and Rhodamine B nanocomposite system [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 265: 547-555.
- [9] Alvarez-Puebla R A, Liz-Marzán L M. SERS detection of small inorganic molecules and ions [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(45): 11214-11223.
- [10] Liu Y M, Zhang F P, Jiao B Y, *et al.* Automated dispersive liquid-liquid microextraction coupled to high performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectroscopy for the determination of mercury species in natural water samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1493: 1-9.
- [11] Gao W, Zhang A, Chen Y, *et al.* A novel probe density controllable electrochemiluminescence biosensor for ultra-sensitive detection of Hg^{2+} based on DNA hybridization optimization with gold nanoparticles array patterned self-assembly platform [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49: 139-145.
- [12] Tseng C W, Chang H Y, Chang J Y, *et al.* Detection of mercury ions based on mercury-induced switching of enzyme-like activity of platinum/gold nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2012, 4(21): 6823-6830.
- [13] Wang B, Zhuo S, Chen L, *et al.* Fluorescent graphene quantum dot nanoprobe for the sensitive and selective detection of mercury ions [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 131: 384-387.
- [14] Özyurt C, Üstükarı H, Evran S, *et al.* MerR-fluorescent protein chimera biosensor for fast and sensitive detection of Hg^{2+} in drinking water [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(5): 731-737.
- [15] Li L, Gui L, Li W. A colorimetric silver nanoparticle-based assay for $Hg(II)$ using lysine as a particle-linking reagent [J]. *Microchimica Acta*, 2015, 182(11/12): 1977-1981.
- [16] Bansod B K, Kumar T, Thakur R, *et al.* A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 94: 443-455.
- [17] Fu X, Chen L, Choo J. Optical nanoprobe for ultrasensitive immunoassay [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 89(1): 124-137.
- [18] 李爽, 代昭, 韩阳. 金纳米粒子的合成方法及应用进展 [J]. *精细石油化工*, 2019, 36(1): 70-74.
- [19] Huang J, Sun J, Warden A R, *et al.* Colorimetric and photographic detection of bacteria in drinking water by using 4-mercaptophenylboronic acid functionalized AuNPs [J]. *Food Control*, 2020, 108: 106885.
- [20] Li W, Li Y, Qian H L, *et al.* Fabrication of a covalent organic framework and its gold nanoparticle hybrids as stable mimetic peroxidase for sensitive and selective colorimetric detection of mercury in water samples [J]. *Talanta*, 2019, 204: 224-228.
- [21] Kaur G, Verma N. Colorimetric determination of Cu^{2+} ions in water and milk by apo-tyrosinase disc [J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2018, 263: 524-532.
- [22] Zhu C, Zhao Y, Yan M, *et al.* A sandwich dipstick assay for ATP detection based on split aptamer fragments [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(15): 4151-4158. ■