

核酸适配体传感器在四环素类抗生素检测中的应用

杜彩溢, 杨川宇, 刘文慧, 杨湫麟, 于婉婷, 吕 婷, 刘 妮, 孙春燕*

(吉林大学食品科学与工程学院, 长春 130062)

摘 要: 四环素类抗生素作为一类广谱抗生素被广泛用于控制细菌感染, 由于其化学性质相对稳定, 超量使用和不当处理均会导致其在土壤、水体、食品中的残留严重, 给人类公共健康带来重大威胁。检测四环素类抗生素所采用的方法通常为高效液相色谱法、免疫分析法等, 这些方法具有耗时长、操作步骤复杂、成本高等局限性, 因而开发敏感、快捷、经济的检测方法尤为重要。核酸适配体作为一种新型生物识别分子, 具有亲和力高、稳定性强、制备成本低、特异性强等明显优势, 被广泛应用于食品安全、环境监测、生物医药等多个领域, 在四环素类抗生素的快速分析中占有重要地位。本文主要综述了用于四环素类抗生素检测的核酸适配体传感器, 主要包括荧光、比色、电化学、表面等离子体共振、表面增强拉曼光谱等适配体传感器, 并阐述了适配体传感器最新研究进展以及各种方法的优缺点。

关键词: 核酸适配体; 四环素类抗生素; 生物传感器; 食品安全

Application of nucleic acid aptamer sensor in tetracycline antibiotics detection

DU Cai-Yi, YANG Chuan-Yu, LIU Wen-Hui, YANG Hao-Lin, YU Wan-Ting,
LV Ting, LIU Ni, SUN Chun-Yan*

(College of Food Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130062, China)

ABSTRACT: As a class of broad-spectrum antibiotics, tetracycline antibiotics are widely used in the control of bacterial infections. Due to its relatively stable chemical properties, excessive use and improper treatment will lead to serious residues in soil, water and food, which will pose a major threat to human public health. Generally, the methods used to detect tetracycline antibiotics are high performance liquid chromatography (HPLC) and immunoassay, etc. These methods are time-consuming, complicated and costly, so it is particularly important to develop sensitive, fast and economical detection methods. As a new type of biometric molecule, nucleic acid aptamer has obvious advantages such as high affinity, strong stability, low preparation cost and strong specificity, which has been widely used in food safety, environmental monitoring, biomedicine and other fields, and plays an important role

基金项目: 吉林省科技发展计划项目自然科学基金项目(20180101246JC)、吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20190170KJ)、吉林大学“大学生创新创业训练计划”省级资助项目

Fund: Supported by the Jilin Province Science and Technology Development Plan Project Natural Science Foundation Project (20180101246JC), Jilin Province Education Department “the 13th Five-Year” Scientific and Technological Project (JJKH20190170KJ), Jilin University “Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program” Provincial Funded Project

*通信作者: 孙春燕, 博士, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: sunchuny@jlu.edu.cn

*Corresponding author: SUN Chun-Yan, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Jilin University, No.5333, Xian Road, Changchun 130062, China. E-mail: sunchuny@jlu.edu.cn

in the rapid analysis of tetracycline antibiotics. This paper summarized the aptamer sensors for detection of tetracycline antibiotics, including fluorescence, colorimetric, electrochemistry, surface plasmon resonance, surface-enhanced Raman spectroscopy, *etc*, and described the latest research progress of aptasensor and the advantages and disadvantages of various methods.

KEY WORDS: aptamer; tetracycline antibiotics; biosensor; food safety

0 引言

四环素类抗生素是一类广谱抗生素,在化学结构上属于多环并四苯羧基酰胺母核的衍生物,包括四环素(tetracycline, TC)、土霉素(oxytetracycline, OTC)和金霉素(aureomycin, AM)等。因四环素类抗生素具有良好的抗菌性能,且成本低廉、副作用小,被用于控制人类和动物的细菌感染^[1],但其广泛应用导致土壤、水、牲畜以及奶制品等积累的四环素类抗生素通过食物链传播到人体。四环素类抗生素在体内的积累可能削弱人体的免疫系统、引起抗生素耐药性等危害。对于过敏性体质,四环素类抗生素的积累会引起过敏或中毒反应,甚至抑制骨骼生长^[2]。为了减少其对人体健康造成危害,许多国家和团体设定了食品中四环素类抗生素的最大残留限量(maximum residue limits, MRL),中国国家标准规定牛奶中四环素、土霉素和金霉素的最大残留限量为 0.10 mg/kg^[3]。目前,常见的四环素类抗生素检测方法有免疫分析法^[4]、高效液相色谱法^[5]、毛细管电泳法^[6]、液相色谱-质谱联用法^[7],但这些方法操作复杂,需要训练有素的操作人员,且耗时长^[8]。因此,建立快速、准确、简单和灵敏的四环素类抗生素检测方法是必要的^[9]。

核酸适配体(aptamer, Apt)是通过指数富集配体系统进化技术(system aticevolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)从 DNA 或 RNA 随机序列文库中获得,

对特定靶标具有识别和结合特性的短链核酸,具有性质稳定、生物相容性好、易于修饰和合成等优点,且能够与离子、毒素、抗生素、蛋白质和病毒等众多靶分子结合^[10-13]。通过将适配体与靶分子之间的识别和结合作用转化为灵敏的光学、电化学等检测信号建立的生物传感技术在分析检测领域得到了广泛关注。本文综述了检测四环素类抗生素的适配体传感器及最新进展,以期期为适配体传感器的发展提供参考。

1 核酸适配体传感器在四环素类抗生素检测方面的应用

生物传感器一般以酶、抗体、生物组织、功能核酸等生物活性物质为识别元件,以与目标物间的特异性反应所产生的信号作为信号元件,实现对目标物的定性定量检测^[14]。根据不同的传感信号,生物传感器可分为比色、荧光和电化学传感器等。生物传感器因利用生物活性物质而具有特异性强、灵敏度高的特点,并且响应速度快、体积小、易于操作,具有非常广阔的应用前景。核酸适配体具有高度灵活且易于设计的结构,因此可用来建立多种多样的生物传感器。目前,四环素、土霉素、强力霉素的适配体均已被筛选出来,具体信息如表 1 所示。筛选出来的适配体被越来越多地用于建立四环素类抗生素的检测方法,目前已被建立的检测方法如表 2 所示,主要有荧光、比色、电化学、表面等离子体共振、表面增强拉曼光谱等适配体传感器。

表 1 四环素类抗生素核酸适配体
Table 1 Tetracycline antibiotics nucleic acid aptamer

目标物	核酸适配体序列(5'-3')	碱基数	类型	解离常数	参考文献
四环素	GTTTGTGATTACAGTTATGTTACCCTCATTTTTCTGAAC	40	DNA	2.94 μmol/L	[15]
	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTC CCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG	76	DNA	63.6 nmol/L	[16]
	CGGTGGTG	8	DNA	1.067 nmol/L	[17]
土霉素	GAGCCUAAAACAUACCAGAGAAAUCUGGAGAGGUGAAGAAUACG ACCACCUAGGCUC	57	RNA	770 pmol/L	[18]
	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGCGGGGGTGTGGGGGAATGGAGTGC TGCGTGTGTCGGGGATCCGAGCTCCACGTG	76	DNA	56.84 nmol/L	[16]
强力霉素	CGACGCACAGTCGCTGGTGCCTACCTGGTTGCCGTTGTGT	40	DNA	4.7 nmol/L	[19]
	GGGAGACCGCUUAAAGCUUAAAGGAGCGGUUACGAAUGCGAUGACU UAGGUACCAUUGCACUACGGUACCUAAACAGUUCUUUGGAUCCG AAUUCGCCGC	100	RNA	7 nmol/L	[20]

表 2 基于核酸适配体的四环素类抗生素检测方法
Table 2 Detection methods of tetracycline antibiotics based on aptamer

分析方法	目标物	检测限/(ng/mL)	识别元件	信号输出	检测样本	参考文献
荧光适配体传感器	土霉素	0.046	Apt-银纳米簇复合物	银纳米簇	Buffer	[21]
	四环素	0.02	三螺旋分子开关	G 四联体-硫黄素 T	牛奶	[22]
	四环素	0.014	磁性纳米粒子-Apt-上转换纳米粒子	镧元素掺杂的上转换纳米粒子	牛奶	[23]
比色适配体传感器	土霉素	25	Apt-氧化石墨烯水凝胶	5-羧基荧光素	河水/自来水	[24]
	四环素	29	G 四联体结构 Apt	噻唑橙	牛奶	[25]
电化学适配体传感器	土霉素	11.525	Apt	盐诱导金纳米粒子	Buffer	[26]
	四环素	39	Apt	巯基乙胺修饰的金纳米粒子	牛奶	[27]
	四环素	0.166	三螺旋分子开关	盐诱导金纳米粒子	血清/牛奶	[28]
	四环素	0.097	直接酶联适配体测定	3,3',5,5'-四甲基联苯胺	蜂蜜	[29]
	四环素	0.009	间接竞争酶联适配体测定	3,3',5,5'-四甲基联苯胺	蜂蜜	[30]
表面等离子体共振适配体传感器	四环素	1	Apt	电化学阻抗法	牛奶	[31]
	四环素	0.89	Apt 包被 96 孔板	电化学阻抗法	Buffer	[32]
	四环素	4.45	链霉亲和素金电极-Apt	方波伏安法	Buffer	[8]
	四环素	0.32	Apt-CSS-M 型复合物-金电极	循环伏安法	牛奶/血清	[33]
	四环素	0.26	还原氧化石墨烯和磁铁矿纳米粒子	差分脉冲伏安法	Buffer	[34]
	四环素	-	Apt/TC/anti TC 夹心	金芯片	河水	[35]
	四环素	6.9	Apt-四面体纳米结构	CM5 芯片	蜂蜜	[36]
	土霉素	4.35×10^{-9}	Au-S 固定 Apt	金纳米粒子	鱼粉	[37]
	四环素	0.001	Apt-共轭磁铁矿-胶体纳米晶体簇-聚甲基丙烯酸酯性纳米球	Au/4-氨基苯磺酰-SiO ₂ (APS)	牛奶	[38]

1.1 荧光适配体传感器

荧光适配体传感器主要是根据适配体与目标物结合引起体系荧光性能的变化而建立起来的传感器。荧光变化值与目标物浓度呈现一定的关系,从而实现目标分子的定量检测。根据荧光基团和适配体的作用方式,可分为标记型和非标记型荧光适配体传感器。

荧光分析法具有较高的灵敏度,但自身具有荧光的生物分子在自然界中并不常见,因此,适配体通常被标记荧光基团以产生可测量的信号。近几年,基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的传感器被广泛应用于四环素类抗生素的检测^[39-41]。适配体在与目标物结合前后构象发生变化,影响荧光供体和受体之间能量转移效率,从而产生荧光信号变化。将荧光方法的高灵敏度与适配体的高选择性结合,利用传统有机荧光染料以及碳点、量子点、上转换发光材料等纳米荧光材料,建立荧光传感器。5-羧基荧光素(fluorescein amidite, FAM)^[42]、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)^[43]、Cy3^[44]、Cy5^[45]等荧光基团常用于标记型适配体传感器,以实现荧光信号的输出。基于荧光基团标记和淬灭功能纳米材料的荧光适配体传感器原理如图 1 所示,在适配体的一端标记荧光基团,加入具有荧光淬灭能力的纳米材料如氧化石墨烯、碳纳米管等能够淬灭其荧光;而当有目标物存在时,其与适配体相结合,导致适配体与纳米材料的距离发生改变,从而阻止 FRET 过程,引起荧光恢复。TAN 等^[24]设计一种基于氧化石墨烯(grapheneoxide, GO)水凝胶的标记型荧光传感器检测土霉素。腺苷和适配体作为交联剂以连接 GO 片,形成三维宏观结构。适配体与目标物结合后改变标记在适配体上的 FAM 和 GO 片之间的距离,导致荧光恢复。在最佳条件下,土霉素的线性响应

范围为 25~1000 $\mu\text{g/L}$, 定量限为 25 $\mu\text{g/L}$ 。

在实际应用中,荧光染料存在抗光漂白性差、荧光性能易受外界因素影响等缺点,因此一些性能更为优异的荧光纳米材料被应用于荧光传感器的构建。OUYANG 等^[23]开发了一种基于稀土掺杂的上转换纳米粒子(upconversion nanoparticles, UCNPs)的适配体传感器检测食品中四环素,连接适配体的磁性纳米颗粒(aptamer-magnetic nanoparticles, aptamer-MNPs)和连接互补序列的 UCNPs(cDNA-UCNPs)分别用作捕获探针和信号探针。加入四环素后,适配体优先与四环素结合并引起一些 cDNA-UCNPs 的释放,导致磁性纳米颗粒表面上的荧光信号降低。在最佳条件下,四环素的检测线性范围为 0.01~100 ng/mL , 检出限(limit of detection, LOD)为 0.0062 ng/mL 。

标记型适配体传感器往往需要复杂的共价修饰或化学标记,与非标记型适配体传感器相比成本更高,批间差异更大,并且适配体的亲和性与选择性可能受到影响。近几年,越来越多的非标记型核酸适配体传感器被建立,其主要利用 DNA 插入型染料、碱基位点结合染料、金属纳米材料等。由于四环素适配体及土霉素适配体为 G-四联体结构^[16],所以基于图 2 的原理被设计应用,当没有目标物时,对 G-四联体结构敏感的荧光探针的荧光强度较高,加入目标物导致 G-四联体结构被破坏,体系荧光降低。SUN 等^[25]建立一种基于荧光探针噻唑橙(thiazole orange, TO)的非标记适配体传感器用于检测四环素。TO 是一种插入型荧光染料,在水溶液中基本无荧光,插入具有 G-四联体结构的四环素适配体时,荧光发射强度显著增强。当目标物存在时,适配体与目标物的特异性结合,导致 G-四联体结构被破坏,TO 被释放出来,荧光强度显著降低。在最佳条件下,其线性检测范围为 0.05~100 $\mu\text{g/mL}$, LOD 低至 0.029 $\mu\text{g/mL}$ 。用该方法测定加标样品牛奶中的四环素时,

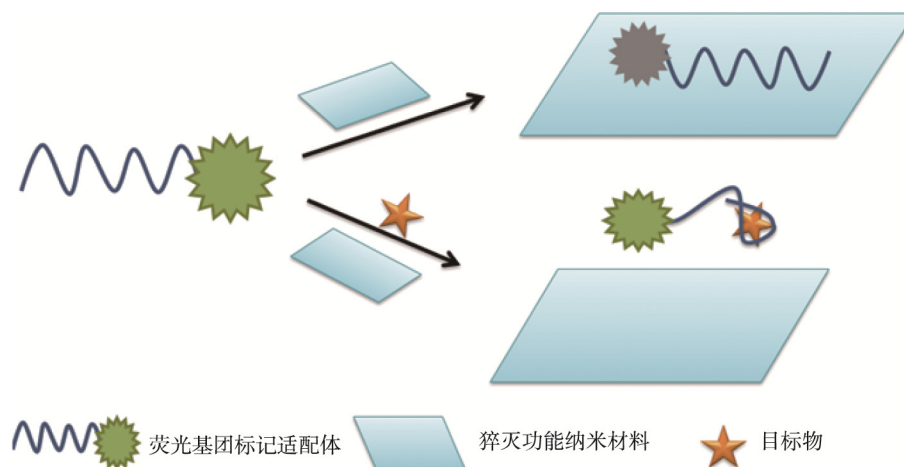


图 1 基于荧光基团标记和淬灭功能纳米材料的荧光适配体传感器原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of fluorescence aptasensor based on fluorophore labeling and quenching function nanomaterials

回收率为 90.0%~108.0%, 与高效液相色谱法所得结果基本一致, 证实了该方法的可靠性和准确性。非标记型的荧光适配体传感器设计独特, 需要了解适配体的二级结构及其与目标物的结合位点, 应用的普遍性收到限制。

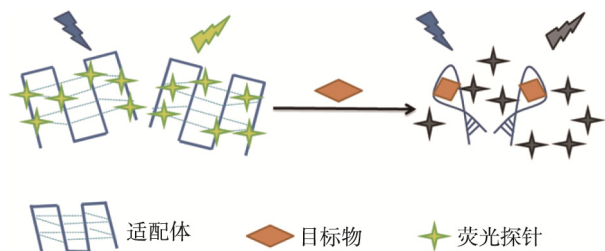


图 2 基于 G 四联体结构和荧光探针的荧光适配体传感器原理示意图

Fig.2 Schematic diagram of fluorescence aptasensor based on G-quadruplex structure and fluorescent probe

1.2 比色适配体传感器

比色适配体传感器利用具有高消光系数的显色基团实现对目标物的有效检测, 其最大的优势是能够通过肉眼观察, 且易于操作、成本较低^[46]。

金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)常被用于比色适配体传感器的构建, 其消光系数远高于有机染料, 为比色测定提供了高灵敏度的保障^[47]。带负电的 AuNPs 可以将适配体吸附在其表面, 使适配体在高盐条件下保护 AuNPs, 被广泛地应用于比色适配体传感器的建立。KIM 等^[26]建立了一种基于盐诱导负电荷 AuNPs 聚集的比色适配体传感器检测土霉素。适配体对 AuNPs 具有保护作用, 所以加入土霉素后其会与适配体结合, 导致保护作用减少, AuNPs 从红色变为紫色, 其颜色变化很容易用肉眼观察或通过紫外/可见光谱仪测量, 最终得到了 25 nmol/L 的 LOD。RAMEZANI 等^[28]开发了基于三螺旋分子开关(triple-helix molecular switch, THMS)检测四环素的比色传感器, 具有较高的稳定性、灵敏度和选择性。WU 等^[48]设计了一种基于 AuNPs 可控聚集的无标记比色适配体传感器, 用于抗生素多重检测。选择氯霉素和四环素作为目标物, 设计多功能适配体, 当添加一种抗生素时, 特异性识别的适配体片段会结合并解离, 而非特异性的则在高盐条件下协调控制 AuNPs 的聚集。检测四环素时, 该方法具有 0.05~3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的线性范围, LOD 低至 32.9 nmol/L。该传感器可通过肉眼直接分辨多种抗生素, 可以利用智能手机分析。除带负电的 AuNPs, 带正电的 AuNPs 也可以用于比色传感器的建立。LUO 等^[27]以巯基乙胺修饰的金纳米粒子(cysteamine-stabilized gold nanoparticles, CS-AuNPs)为探针建立了一种比色适配体传感器用于牛奶中四环素残留的检测。实验原理如图 3 所示, 当没有四环素时, 带正电的金纳米粒子与带负电的适配体因静电引力而沉聚; 当有四环

素存在时, 其与适配体结合, 且两者之间的相互作用强于适配体和 CS-AuNPs 之间的静电相互作用, 导致 CS-AuNPs 分散, 颜色仍保持为红色。该方法检出限为 0.039 $\mu\text{g/mL}$, 线性范围为 0.2~2.0 $\mu\text{g/mL}$, 操作简单, 检测时间短, 特异性强。但是, 在复杂的基质中, 金纳米粒子容易受到盐粒子的影响, 出现非特异性聚集变色现象, 制约了其实际应用。

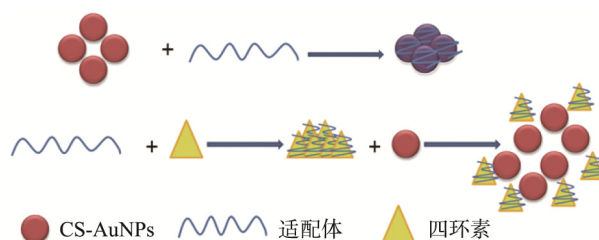


图 3 基于巯基乙胺修饰的金纳米粒子的比色适配体传感器原理示意图

Fig.3 Schematic diagram of colorimetric aptasensor based on CS-AuNPs

基于酶或模拟酶的催化显色反应常被应用于比色适配体传感器的建立, 此类传感器不仅具备肉眼可见的检测结果, 而且可通过酶促催化的信号放大效应获得更高的灵敏度。KIM 等^[19]使用生物素标记的适配体间接竞争性酶联适配体测定牛奶中的土霉素, LOD 为 27 nmol/L, 具有高特异性和稳定性, 且不涉及复杂的样品提取步骤。ZHANG 等^[49]基于金纳米簇(gold nanoclusters, AuNCs)固有的类过氧化物酶活性建立了比色适配体传感器, 利用适配体提高 AuNCs 在 H_2O_2 的作用下催化氧化底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)的活性。检测四环素的浓度范围为 1~16 $\mu\text{mol/L}$, LOD 低至 46 nmol/L, 该方法的肉眼检测能力估计为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。该比色传感平台具有良好的准确性、特异性和可重复性, 但酶或模拟酶对检测条件要求较高, 因此也存在一定的局限性。

1.3 电化学适配体传感器

电化学传感器是将生物分子和靶分子的相互作用转变成电流或电位的形式表现出来的一类传感器^[50]。常用的电化学分析技术有差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)、电化学阻抗法(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)、方波伏安法(square wave voltammetry, SWV)、循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)等。将核酸适配体与电化学相结合, 在加入靶标之后, 适配体的构型发生改变, 进而引起电极表面修饰物的结构发生变化, 影响电化学信号输出, 从而建立灵敏、快捷、简单的生物传感器^[51]。按照是否应用标记物, 电化学适配体传感器可分为标记型和非标记型 2 类。

应用于标记型适配体传感器的标记物质主要有 2 种, 一种具有电活性, 如亚甲基蓝、二茂铁等; 一种具有催化活性, 如葡萄糖脱氢酶、辣根过氧化物酶、金属纳米材料、碳纳米管等。标记物质可通过化学修饰、物理吸附等方法标记在适配体上, 当适配体与目标物结合后, 标记物质因适配体构型改变而发生位置变化, 从而引起电化学信号的变化。XU 等^[52]设计灵敏高效的比率型电化学传感器用于牛奶中四环素的检测。该方法整合了 2 个适配体传感器, 其一基于二茂铁和 AuNPs 纳米复合材料, 其二基于碳纳米纤维和 AuNPs 纳米复合材料的适配体传感器。通过 AuNPs 与适配体 5' 端的硫醇之间形成 Au-S 键, 将适配体有效地固定在丝网印刷的碳电极表面, 最后通过比率计算其检测结果, 解决了批次之间差异大的问题, LOD 为 3.3×10^{-7} g/L。LIU 等^[53]设计了一种新型的夹心型电化学适配体传感器, 该传感器基于三维结构的石墨烯纳米金复合物和适配体-AuNPs-辣根过氧化物酶纳米探针实现土霉素的检测, 纳米金和辣根过氧化物酶修饰的适配体提高了亲和力并实现了超灵敏检测。

非标记型电化学适配体传感器与标记型相比, 操作更简单、对目标物影响小, 在实际应用方面优势更加突出。CHEN 等^[31]开发了一种检测四环素的无标记电化学适配体传感器。根据电化学阻抗谱分析, 当四环素浓度在 $5.0 \sim 5.0 \times 10^3$ 之间时, 四环素的对数浓度与电荷转移电阻在之间存在线性关系。该传感器的 LOD 为 1 ng/mL, 检测时间为 15 min。在 4 °C 下保存 15 d 后, 电流变化在 8.5% 以内, 证明该传感器具有良好的重现性和可接受的稳定性。WANG 等^[54]结合三螺旋适配体探针、催化发夹自组装 (catalyzed hairpin assembly, CHA) 信号放大和主客识别等技术, 设计出一种用于四环素定量检测的电化学新型传感策略。当目标物与适配体结合后, 发生构象变化的三螺旋适配体探针引发 CHA 扩增反应, 加入的核酸外切酶 III 会破坏 2 个 DNA 发夹形成的大量双螺旋结构, 释放大量的电活性分子, 这些分子由于主客识别而在 β -环糊精的帮助下扩散到电极表面, 从而产生信号。在最佳条件下, 该策略线性范围为 0.2~100 nmol/L, LOD 低至 0.13 nmol/L。但是电化学适配体传感器尤其是非标记型的抗干扰能力还有待加强, 对适配体与目标物的结合效率要求较高。

1.4 表面等离子体共振适配体传感器

表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 技术利用全反射时入射光可以和金属表面的等离子体发生共振的原理, 探测生物分子之间是否发生作用, 将 SPR 芯片表面上固定适配体, 可以实现 SPR 适配体传感平台的建立, 具有无需标记、灵敏度高、操作简单等优点^[55]。近几年, WANG 等^[36]结合 DNA 纳米结构和商用 Biacore T200 SPR 仪器开发出一种简单的 SPR 适配体传感器用于四环素的

检测。该传感器为了减少空间位阻, 提高固定化适配体对四环素的捕获效率, 引入 DNA 四面体以纳米级距离定向固定适配体, 从而将适配体的特异性、DNA 纳米结构的易于制造、SPR 仪器的灵敏性和自动化的优势结合起来, 实现快速、灵敏检测蜂蜜中的四环素。SPR 传感器需要与纳米技术的联用以满足对小分子物质检测的灵敏度要求, 另外, SPR 芯片需要被进一步优化, 以降低实验成本。

1.5 表面增强拉曼光谱适配体传感器

表面增强拉曼光谱 (surface enhanced Raman spectroscopy, SERS) 技术是一种基于光的非弹性散射的光谱技术, 被广泛应用于食品安全和生物分析领域^[56]。与常规的拉曼光谱相比, SERS 光谱强度能高出 4~6 个数量级左右。近几年, MENG 等^[37]基于 DNA 序列连接金纳米粒子间的拉曼热点构建了一种表面增强拉曼光谱适配体检测水产品中土霉素。该方法将拉曼信号分子修饰在 AuNPs 的表面, 当有目标物 OTC 存在时, 适配体序列优先与 OTC 结合, 导致 13 nm 的 AuNPs 更接近 80 nm 的 AuNPs, 拉曼强度因生成的热点增强而增加。在最佳条件下, 该方法具有 $4.60 \times 10^{-2} \sim 4.60 \times 10^2$ fg/mL 的线性范围, LOD 低至 4.35×10^{-3} fg/mL。LI 等^[38]研究出一种基于磁性纳米球靶向功能的 SPR 适配体传感器检测四环素。该传感器将适配体修饰在共轭磁铁矿胶体纳米晶体簇-聚甲基丙烯酸磁性纳米球上, 将适配体互补序列 (cDNA) 修饰在 Au/PATP/SiO₂(APS) 上, 适配体与目标物的结合导致 cDNA-APS 游离于上清液中, 产生较强的拉曼信号。在最佳条件下, 该方法具有 0.001~100 ng/mL 的线性范围, LOD 低至 0.001 ng/mL。尽管这 2 个适配体传感器可以提供灵敏的检测, 但整体成本很高, 限制了其实际应用。

2 结束语

由于四环素类抗生素的广泛使用直接或间接危害到人们的身体健康, 因此建立简单、灵敏且快速的四环素类抗生素检测方法尤为重要。核酸适配体具有高灵敏度、高选择性、易于合成、批次差异小等优点, 被广泛用于构建光学、电化学等各类生物传感器检测四环素类抗生素, 但是核酸适配体的应用方面也面临着一些问题。复杂的基质可能会影响适配体与目标物的结合效率, 故而样品前处理是核酸适配体传感器发展需要注意的重要问题。为提高方法的灵敏度, 引入催化发夹自组装反应、杂交链式反应、滚环扩增反应等核酸扩增技术以实现信号放大, 对适配体应用的发展具有重要意义。同时, 将适配体应用于试剂盒、试纸条、智能手机等便携式快速检测产品的开发是适配体未来的发展趋势。提高适配体的筛选水平, 建立高通量、多目标物检测方法, 仍是科研工作者未来需努力的方向。

参考文献

- [1] SAPADIN AN, FLEISCHMAJER R. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2006, 54(2): 258–265.
- [2] MARTINEZ JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants [J]. *Environ Poll*, 2009, 157(11): 2893–2902.
- [3] GB 31650—2019 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量[S]. GB 31650—2019 National food safety standard-Maximum residue limits for veterinary drugs in food [S].
- [4] JEON M, RHEE PI. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 626(2): 180–185.
- [5] XU H, MI HY, GUAN MM, *et al.* Residue analysis of tetracyclines in milk by HPLC coupled with hollow fiber membranes-based dynamic liquid-liquid micro-extraction [J]. *Food Chem*, 2017, 232(1): 198–202.
- [6] TONG J, RAO Q, ZHU K, *et al.* Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(23–24): 4254–4260.
- [7] SANTOS L, RAMOS F. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 52(1): 16–30.
- [8] KIM YJ, KIM YS, NIAZI JH, *et al.* Electrochemical aptasensor for tetracycline detection [J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2010, 33(1): 31–37.
- [9] SYEDMORADI L, DANESHPOUR M, ALVANDIPOUR M, *et al.* Point of care testing: The impact of nanotechnology [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87(1): 373–387.
- [10] MAYER G. The chemical biology of aptamers [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2009, 48(15): 2672–2689.
- [11] NA W, LIU X, WANG L, *et al.* Label-free aptamer biosensor for selective detection of thrombin [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 899(1): 85–90.
- [12] PRABHAKAR N, THAKUR H, BHARTI A, *et al.* Chitosan-iron oxide nanocomposite based electrochemical aptasensor for determination of malathion [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 939(1): 108–116.
- [13] SEOK KY, AHMAD RNH, BOCK GM. Aptamer-based nanobiosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 76(1): 2–19.
- [14] 李双, 韩殿鹏, 彭媛, 等. 食品安全快速检测技术研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(17): 5575–5581.
LI S, HAN DP, PENG Y, *et al.* Research progress of food safety rapid detection technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(17): 5575–5581.
- [15] WANG S, LIU J, DONG Y, *et al.* Conformational structure-dependent molecular recognition of two aptamers for tetracycline [J]. *Rsc Adv*, 2015, 5(66): 53796–53801.
- [16] NIAZI JH, LEE SJ, GU MB. Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2008, 16(15): 7245–7253.
- [17] KWON YS, RASTON NHA, GU MB. An ultra-sensitive colorimetric detection of tetracyclines using the shortest aptamer with highly enhanced affinity [J]. *Chem Commun*, 2014, 50(1): 40–42.
- [18] MULLER M, WEIGAND JE, WEICHENRIEDER O, *et al.* Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(9): 2607–2617.
- [19] KIM CH, LEE LP, M JR, *et al.* An indirect competitive assay-based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 51(1): 426–430.
- [20] TICKNER ZJ, ZHONG GC, SHEPTACK KR, *et al.* Selection of High-Affinity RNA aptamers that distinguish between doxycycline and tetracycline [J]. *Biochemistry*, 2020, 59(37): 3473–3486.
- [21] HOSSEINI M, MEHRABI F, GANJALI MR, *et al.* A fluorescent aptasensor for sensitive analysis of tetracycline based on silver nanoclusters [J]. *Luminescence*, 2016, 31(7): 1339–1343.
- [22] CHEN TX, NING F, LIU HS, *et al.* Label-free fluorescent strategy for sensitive detection of tetracycline based on triple-helix molecular switch and G-quadruplex [J]. *Chin Chem Lett*, 2017, 28(7): 1380–1384.
- [23] OUYANG Q, LIU Y, CHEN Q, *et al.* Rapid and specific sensing of tetracycline in food using a novel upconversion aptasensor [J]. *Food Control*, 2017, 81(1): 156–163.
- [24] TAN B, ZHAO H, DU L, *et al.* A versatile fluorescent biosensor based on target-responsive graphene oxide hydrogel for antibiotic detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 83(1): 267–273.
- [25] SUN CY, SU RF, BIE JX, *et al.* Label-free fluorescent sensor based on aptamer and thiazole orange for the detection of tetracycline [J]. *Dyes Pigments*, 2018, 149(1): 867–875.
- [26] KIM YS, KIM JH, KIM IA, *et al.* A novel colorimetric aptasensor using gold nanoparticle for a highly sensitive and specific detection of oxytetracycline [J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(4): 1644–1649.
- [27] LUO Y, XU J, LI Y, *et al.* A novel colorimetric aptasensor using cysteamine-stabilized gold nanoparticles as probe for rapid and specific detection of tetracycline in raw milk [J]. *Food Control*, 2015, 54(1): 7–15.
- [28] RAMEZANI M, MOHAMMAD DN, LAVAEI P, *et al.* A novel colorimetric triple-helix molecular switch aptasensor for ultrasensitive detection of tetracycline [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 70(1): 181–187.
- [29] WANG S, LIU J, YONG W, *et al.* A direct competitive assay-based aptasensor for sensitive determination of tetracycline residue in honey [J]. *Talanta*, 2015, 131(1): 562–569.
- [30] WANG S, YONG W, LIU J, *et al.* Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 57(1): 192–198.
- [31] CHEN D, YAO D, XIE C, *et al.* Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline [J]. *Food Control*, 2014, 42(1): 109–115.
- [32] ZHANG J, WU Y, ZHANG B, *et al.* Label-free electrochemical detection of tetracycline by an aptamer nano-biosensor [J]. *Anal Lett*, 2012, 45(9): 986–992.
- [33] TAGHDISI SM, DANESH NM, RAMEZANI M, *et al.* A novel M-shape electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of tetracyclines [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85(1): 509–514.
- [34] ZHAN X, HU G, WAGBERG T, *et al.* Electrochemical aptasensor for tetracycline using a screen-printed carbon electrode modified with an alginate film containing reduced graphene oxide and magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles [J]. *Microchim Acta*, 2016, 183(2): 723–729.
- [35] KIM S, LEE HJ. Gold nanostar enhanced surface plasmon resonance detection of an antibiotic at attomolar concentrations via an aptamer-antibody sandwich assay [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(12): 6624–6630.
- [36] WANG S, DONG YY, LIANG XG. Development of a SPR aptasensor containing oriented aptamer for direct capture and detection of tetracycline in multiple honey samples [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 109(1): 1–7.
- [37] MENG F, MA X, DUAN N, *et al.* Ultrasensitive SERS aptasensor for the detection of oxytetracycline based on a gold-enhanced nano-assembly [J]. *Talanta*, 2017, 165(1): 412–418.

- [38] LI H, CHEN Q, MEHEDI HM, *et al.* A magnetite/PMAA nanospheres-targeting SERS aptasensor for tetracycline sensing using mercapto molecules embedded core/shell nanoparticles for signal amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 92(1): 192–199.
- [39] FENG C, DAI S, WANG L. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: A review [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 59(1): 64–74.
- [40] LIU Y, TULEOUVA N, RAMANCULOV E, *et al.* Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(19): 8131–8136.
- [41] MASSEY M, ALGAR WR, KRULL UJ. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) for DNA biosensors: FRET pairs and Förster distances for various dye-DNA conjugates [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 568(1–2): 181–189.
- [42] 曲瑶, 张亚旗, 肖光, 等. 基于核酸碱基猝灭荧光团的核酸适配体传感器检测赭曲霉毒素 A[J]. *分析化学*, 2020, 48(10): 1409–1415.
QU Y, ZANG YQ, XIAO G, *et al.* Aptasensor based on nucleic acid base quenching fluorophore for detection of ochratoxin A [J]. *Chin J Anal Chem*, 2020, 48(10): 1409–1415.
- [43] HU K, YANG H, ZHOU J, *et al.* Aptasensor for amplified IgE sensing based on fluorescence quenching by graphene oxide [J]. *Luminescence*, 2013, 28(5): 662–666.
- [44] HAO LL, WANG W, SHEN XQ, *et al.* A fluorescent DNA hydrogel aptasensor based on the self-assembly of rolling circle amplification products for sensitive detection of ochratoxin A [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(1): 369–375.
- [45] LIU SG, ZANG D, HE Y, *et al.* A split aptamer sensing platform for highly sensitive detection of theophylline based on dual-color fluorescence colocalization and single molecule photobleaching [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 166(1): 112461.
- [46] 栾倩. 适用于食品中抗生素残留快速筛查的比色适配体传感器研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2018.
LUAN Q. The study on colorimetric aptasensor for rapid screen antibiotics residue in foods [D]. Ningbo: Ningbo University, 2018.
- [47] 李言言. 纳米比色生物传感器的构建及应用研究[D]. 福州: 福州大学, 2016.
LI YY. Construction and application of nanometer colorimetric biosensor [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2016.
- [48] WU YY, HUANG PC, WU FY. A label-free colorimetric aptasensor based on controllable aggregation of AuNPs for the detection of multiplex antibiotics [J]. *Food Chem*, 2020, 304(1): 125377.
- [49] ZHANG ZP, TIAN Y, HUANG PC, *et al.* Using target-specific aptamers to enhance the peroxidase-like activity of gold nanoclusters for colorimetric detection of tetracycline antibiotics [J]. *Talanta*, 2020, 208(1): 120342.
- [50] GERARD M, CHAUBEY A, MALHOTRA BD. Application of conducting polymers to biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2002, 17(5): 345–359.
- [51] WILLNER I, ZAYATS M. Electronic aptamer-based sensors [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2007, 46(34): 6408–6418.
- [52] XU QC, LIU ZN, FU JY, *et al.* Ratiometric electrochemical aptasensor based on ferrocene and carbon nanofibers for highly specific detection of tetracycline residues [J]. *Sci Rep-Uk*, 2017, 7(1): 14729.
- [53] LIU S, WANG Y, XU W, *et al.* A novel sandwich-type electrochemical aptasensor based on GR-3D Au and aptamer-AuNPs-HRP for sensitive detection of oxytetracycline [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 88(1): 181–187.
- [54] WANG YH, YAO L, NING G, *et al.* An electrochemical strategy for tetracycline detection coupled triple helix aptamer probe with catalyzed hairpin assembly signal amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 143(1): 111613.
- [55] 王玲, 柯浩堃, 吕赛男, 等. 核酸适配体和表面等离子体检测技术用于毒品检验的研究进展[J]. *分析实验室*, 2020, 39(10): 1233–1240.
WANG L, KE HK, LV SN, *et al.* Recent progress towards the application of aptamer and surface plasmon technique in drug detection [J]. *Anal Lab*, 2020, 39(10): 1233–1240.
- [56] 陈金磊, 宋莹, 张德, 等. 表面增强拉曼光谱在茶叶质量安全检测和品质分析中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(13): 4304–4309.
CHEN JL, SONG Y, ZHANG D, *et al.* Application of surface enhanced Raman spectroscopy in tea safety inspection and quality analysis [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(13): 4304–4309.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



杜彩溢, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: ducy9918@mails.jlu.edu.cn



孙春燕, 博士, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: sunchuny@jlu.edu.cn