

基于核酸适配体免标记光度法检测牛奶中的甲硝唑

张雪冰¹, 尹鹏屹², 刘璐瑶¹, 沈丽³, 彭梁云燕³, 杨赟¹, 陈丽丽^{1*}

(1. 南华大学衡阳医学院公共卫生学院, 衡阳 421001; 2. 湖南省湘潭市疾病预防控制中心, 湘潭 411100; 3. 南华大学船山学院, 衡阳 421001)

摘要: **目的** 建立核酸适配体免标记光度法检测牛奶中的甲硝唑的分析方法。**方法** 将含 DNA 酶序列的核酸探针与甲硝唑适配体混合反应, 引入目标检测物甲硝唑, 使其与甲硝唑适配体特异性结合, 再于体系中引入氧化还原试剂, 用紫外可见分光光度计检测溶液吸光度变化。优化各反应条件, 以达到最佳反应条件, 最后对所构建的方法进行方法学评价。**结果** 当甲硝唑质量浓度在 0.08~5.13 g/L 时, 体系的荧光强度差值(ΔA)与甲硝唑质量浓度(C)呈线性关系, $\Delta A=0.1542+0.1396C$ ($r=0.9968$), 检出限为 0.0358 g/L。在低、中、高 3 水平浓度的加标回收率为 85.91%~102.04%, 相对标准偏差分别为 1.95%、1.93%、1.36%。**结论** 本方法具有良好的精密度、选择性、回收率, 可用于实际样品牛奶中甲硝唑的检测。

关键词: 甲硝唑; 牛奶; 核酸适配体; DNA 酶; 紫外可见分光光度法

Determination of metronidazole in milk based on nucleic acid aptamer labeling free spectrophotometry

ZHANG Xue-Bing¹, YIN Peng-Yi², LIU Lu-Yao¹, SHEN Li³, PENG Liang-Yun-Yan³, YANG Yun¹, CHEN Li-Li^{1*}

(1. School of Public Health, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Xiangtan Center for Disease Control and Prevention, Xiangtan 411100, China; 3. Chuanshan College, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of metronidazole in milk by nucleic acid aptamer labeling free spectrophotometry. **Methods** The nucleic acid probe containing DNA enzyme sequence was mixed with the aptamer of metronidazole, and the target detection object metronidazole was introduced to make it specifically bind with the aptamer of metronidazole. Then the redox reagent was introduced into the system, and the change of absorbance of the solution was detected by ultraviolet visible spectrophotometer. Various conditions were optimize to achieve the best reaction conditions. Finally, methodological evaluation was conducted for the constructed methods. **Results** The difference in fluorescence intensity (ΔA) of the system showed a linear relationship with the metronidazole mass concentration (C) when the mass concentration of chloramphenicol were in the range of 0.08–5.13 g/L,

基金项目: 2021 年度湖南省大学生创新创业训练计划项目(4572)、湖南省教育厅一般项目(21C0307)

Fund: Supported by the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Hunan Province in 2021 (4572), and the General Project of Hunan Provincial Department of Education (21C0307)

*通信作者: 陈丽丽, 教授, 主要研究方向为卫生检验与检疫研究。E-mail: chlili720612@163.com

*Corresponding author: CHEN Li-Li, Professor, School of Public Health, Hengyang Medical School, University of South China, No.28, Changshengxi Road, Zhengxiangqu District, Hengyang 421001, China. E-mail: chlili720612@163.com

and the linear equation was $\Delta A=0.1542+0.1396C$ ($r=0.9968$). The limit of detection for the method were calculated as 0.0358 g/L. The recoveries of low, medium and high levels were 85.91%–102.04% with relative standard deviations of 1.95%, 1.93% and 1.36%, respectively. **Conclusion** The method has good precision, selectivity and recovery, and can be used for the determination of metronidazole in milk.

KEY WORDS: metronidazole; milk; nucleic acid aptamer; DNAzyme; ultraviolet visible spectrophotometry

0 引言

甲硝唑(metronidazole)是一种人工合成的硝基咪唑类抗生素,具有抗菌效果好、安全性高、价格低廉等优点,曾广泛应用于畜牧养殖业中。但相关研究表明,过量摄入甲硝唑有致癌、致畸和致神经突变等潜在风险^[1-2],2017年世界卫生组织将甲硝唑归类于 2B 类致癌物。为了保障食品安全,许多国家禁止将其以抗应激、促进生长等目的用于食品性动物,并规定在动物源性食品中不得检出甲硝唑,根据我国 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定,甲硝唑被归类为“允许作治疗用,但不得在动物性食品中检出”的兽药。然而甲硝唑在实际应用中仍存在违规使用的现象,使其在动物体内的残留超标,以至于在食用动物组织中仍能检测到甲硝唑^[3-4]。甲硝唑的分析方法主要包括高效液相色谱法^[5-6]、气相色谱法^[7]、紫外分光光度法^[8]、液相色谱-质谱法^[9-10]、荧光法^[11]、酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[12]等。然而,目前的检测方法仍旧有其局限性,如样品前处理耗时、仪器复杂、成本高昂、特异性差等^[13]。

核酸适配体(aptamer)是长度在 10~100 个核苷酸范围内的单链 DNA 或 RNA 寡核苷酸序列,作为一种新型识别元件,具有合成简单快速、低成本、高亲和力^[14]、高选择性^[15-16]、高特异性^[17-20]等优点。另外,核酸适配体特定的三维结构可以更灵活参与体系反应^[21]。将核酸适配体用于检测往往需要额外添加荧光染料作为响应指标,但大部分的荧光染料本身的荧光很弱,为了解决这个问题,需要在体系中添加催化剂,使荧光染料的荧光增强。

DNA 酶(DNAzyme)是经过体外筛选而获得的特定序列的具有酶活性的单链 DNA 分子,可催化多种显色反应^[22]。当 DNA 酶与核酸适配体特异性结合时会改变 DNA 酶的三维构象,使得 DNA 酶的催化能力受到抑制^[23]。目前已有许多学者利用核酸适配体“封闭”DNA 酶的活性及核酸适配体与检测物特异性结合的特性建立了一系列物质的检测方法,如三磷酸腺苷(5'-adenylate triphosphate, ATP)^[24]、可卡因^[25]、铅离子^[26]、腺苷^[27]、赤霉烯酮^[28]、赭曲霉毒素^[29]和黄曲霉素^[30]。

目前尚未有将核酸适配体与 DNA 酶应用于检测甲硝唑的研究。因此,本研究拟利用适配体和 DNA 酶及两者结合物所具有的特性,将甲硝唑核酸适配体^[31]与含 DNA 酶序列的核酸探针加入缓冲体系中混合,使两者配对结合为

DNA 双链。当甲硝唑与 DNA 双链接触时,甲硝唑会竞争性地与甲硝唑核酸适配体特异性结合,使 DNA 双链解链,从而使得 DNA 酶序列从 DNA 双链中释放出来自发形成 G-四链体结构,该结构与氯化血红素结合后,可催化过氧化氢氧化四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)显色,产生肉眼可见的颜色变化。通过仪器测量数值来建立吸光度与甲硝唑浓度的曲线,从而实现甲硝唑的定量分析,同时为甲硝唑的检测提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

牛奶:市售。

甲硝唑、氯化血红素、TMB(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);氨基三醇、氯化钾、氯化镁、柠檬酸、盐酸、柠檬酸、二甲基亚砜、过氧化氢(分析纯,国药集团上海有限公司);氯化钠(分析纯,成都金山化学试剂有限公司);磷酸氢二钠(分析纯,广州华大化学试剂有限公司);聚乙二醇辛基苯基醚(分析纯,北京博奥拓达科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津公司); AB204-S 电子分析天平(220 g/0.1 mg, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); Eppendorf 5452 离心机(德国艾本德股份公司); Thermo Shaker 恒温金属浴(杭州瑞诚仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 链的合成

查阅文献^[28],设计相关核酸序列,并委托上海生物工程股份有限公司合成。碱基序列如下:

含 DNA 酶的核酸探针(S1): 5'-GGGTAGGGCGGGTTGGGACTGCCTACCAAACAGTTTT-3';

甲硝唑适配体(S2): 5'-CTGTTTGGTAGGCAG-3'。

1.3.2 缓冲溶液的配制

10 mmol/L pH 7.4 氨基三醇-盐酸缓冲液(Tris-HCl): 将 100 mmol/L 氯化钠、5 mmol/L 氯化镁和 5 mmol/L 氯化钾溶于超纯水中,并将 pH 调节为 7.4。

20 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液: 将 100 mmol/L 氯化钠、2 mmol/L 氯化镁和 5 mmol/L 氯化钾溶于超纯水中,并加入 0.05% 的聚乙二醇辛基苯基醚,并将溶液 pH 调节为 7.4。

pH 5.0 柠檬酸盐缓冲液: 将 52.1 mmol/L 柠檬酸、95.8 mmol/L 磷酸氢二钠、40 mmol/L 氯化钾溶于超纯水中,

并将溶液 pH 调节为 5.0。

1.3.3 甲硝唑的检测

将 970 μL 10 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液加入到 2 mL 离心管中; 再向离心管中分别加入 15 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的含 DNA 酶的核酸探针 S1 和 15 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的甲硝唑适配体 S2。混合物在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温涡旋反应 45 min 后, 形成杂交的 DNA 双链待用。取上述双链 DNA 复合物 80 μL , 加入 50 μL 含不同浓度的甲硝唑标准溶液的 20 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 和 5 μL 1 $\mu\text{mol/L}$ 氯化血红素溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行恒温涡旋反应 70 min。

在反应后的溶液中加入 70 μL 显色溶液(10 mmol/L 过氧化氢和 10 mmol/L TMB 1:1 混合)25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min。再加入 30 μL 2 mol/L 硫酸终止显色反应。最后用紫外分光光度计在 450 nm 波长处测量所得溶液的吸光度, 以构建吸光度和甲硝唑浓度之间的线性关系, 用于甲硝唑浓度的定量分析。

1.4 实验原理

本研究的原理(图 1)是核酸适配体与 DNA 酶结合可以抑制 G-四链体结构的形成, 导致 DNA 酶催化活性低下, 核酸适配体具有高亲和力特异性结合甲硝唑的特性, 将含 DNA 酶序列核酸探针与魏昊^[31]设计的甲硝唑核酸适配体在缓冲体系中混合, 使两者结合为 DNA 双链。当甲硝唑与双链接触时, 甲硝唑将与甲硝唑核酸适配体竞争结合, 从而使 DNA 酶序列从 DNA 双链中释放出来形成 G-四链体结构, 该结构与氯化血红素结合后, 可催化过氧化氢氧化 TMB 反应显色, 产生肉眼可见的颜色变化。通过仪器测量吸光度值来建立吸光度与甲硝唑浓度的曲线, 从而实现对甲硝唑的定量分析。

1.5 数据处理

实验所得数据经数据处理软件 GraphPad Prism version 8.0 和 Origin 2019 进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 反应条件的优化

2.1.1 TMB 和过氧化氢浓度优化

TMB 和过氧化氢作为被 DNA 酶催化的底物, 其用量可影响所得吸光度值的大小。因此, 需要探究最佳的 TMB 与过氧化氢混合物用量。如图 2a 所示, 显色剂浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 吸光度值与背景值之差 ΔA 值最大。当显色剂体积低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时吸光度值较小; 当显色剂体积高于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 会因甲基联苯胺与过氧化氢两者自发的反应使背景值增加, 从而使得 ΔA 值减小。因此, 本研究选取 20 $\mu\text{mol/L}$ 作为最佳显色剂浓度。

2.1.2 缓冲液 pH 优化

核酸适配体与甲硝唑结合需要缓冲液中所含的金属离子如 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 等的共同作用, pH 可以影响缓冲液中无机盐的电离, 使缓冲液中金属离子的量发生变化, 从而影响甲硝唑与适配体结合这一过程, 并影响最终所得吸光度值。本研究探究了缓冲液 pH 对 DNA 酶序列与氯化血红素结合的影响, 如图 2b 所示, 当缓冲液 pH 为 7 时 ΔA 值达到最大, 随着 pH 继续增加到 10, ΔA 值迅速下降。因此, 选取 7.0 的 pH 作为本研究的最佳缓冲液 pH。

2.1.3 氯化血红素与 DNA 酶反应温度优化

反应温度可以影响氯化血红素与 DNA 酶组装成具有高酶促活性的 G-四链体结构这一过程, 当温度过低时, 反应所需的自由能变 ΔG 升高, 使 DNA 酶与氯化血红素的反应困难, 具有高酶促活性的 DNA 酶量生成减少; 而当温度过高时, DNA 酶发生变性, 使其催化活性降低。综上所述, 温度过高或过低会影响 G-四链体结构的形成, 从而对反应最终所得的吸光度值产生影响。

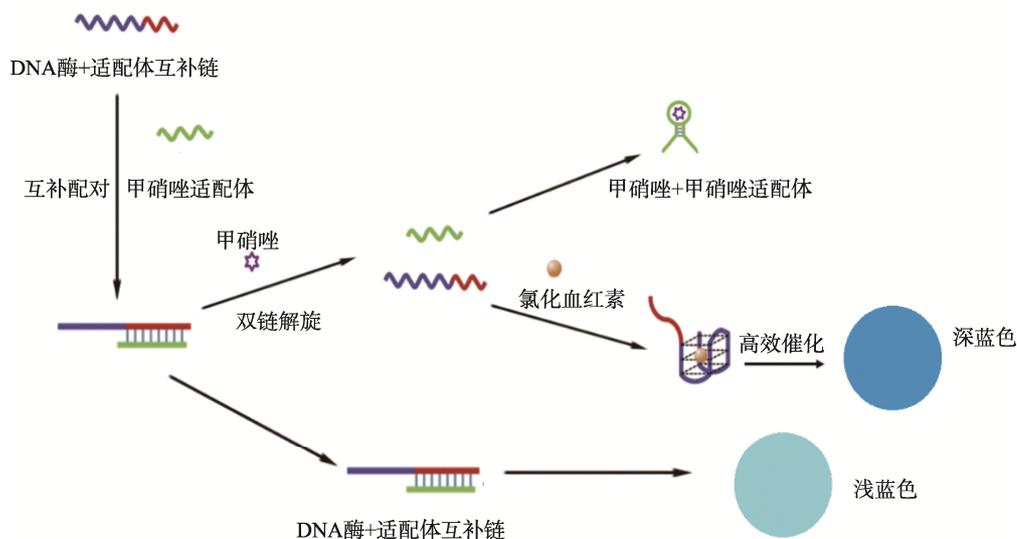


图 1 实验原理图

Fig.1 Experimental schematic diagram

本研究考察了 25~60°C 的温度对实验体系的影响。如图 2c 所示, 当温度达到 35°C 时, ΔA 值最大。这表明了 35°C 最有利于本研究中 DNA 酶序列与氯化血红素结合, 并组装为具有强催化活性的 G-四链体结构, 温度太低不利于 G-四链体结构形成, 温度太高则会使 G-四链体结构活性降低。因此, 本研究选取 35°C 作为最佳实验温度。

2.1.4 反应时间优化

甲硝唑与双链 DNA 竞争结合, 双链 DNA 解螺旋并释放出 DNA 酶, DNA 酶与氯化血红素结合组装成具有强酶促活性的 G-四链体结构, 这一过程将影响过氧化氢和 TMB 被催化显色, 且该过程所需时间的长短是影响吸光度值的关键。

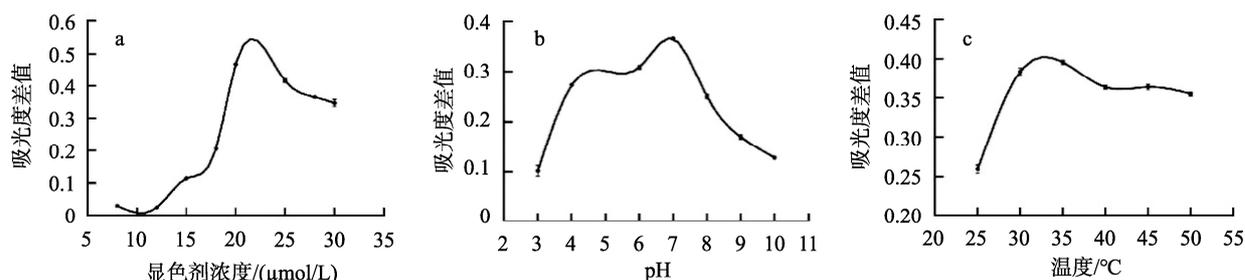
图 3a 显示了双链 DNA 与氯化血红素反应时间优化结果, 将双链 DNA 与氯化血红素混合后反应 70 min, ΔA 值逐渐增加, 并在 70 min 后基本保持不变, 出于实验效率与时间的综合考虑, 本研究选用 70 min 作为最佳反应时间。

在 DNA 酶与氯化血红素结合形成有强催化作用的结构后, 加入过氧化氢和 TMB, DNA 酶催化反应高效进行,

使之产生肉眼可见的颜色变化。该步骤反应时间的长短会影响两者反应产物的多少, 从而影响吸光度的大小。如图 3b 所示, 随显色时间增加, ΔA 值逐渐增加, 并在 5 min 左右达到峰值, 这说明显色反应至少需要 5 min, 但随显色时间继续加长, 过氧化氢与 TMB 会在自发反应和氯化血红素的弱催化反应下, 使背景值增加, ΔA 值减小, 综上所述, 本研究选用 5 min 作为最佳显色时间。

2.2 特异性

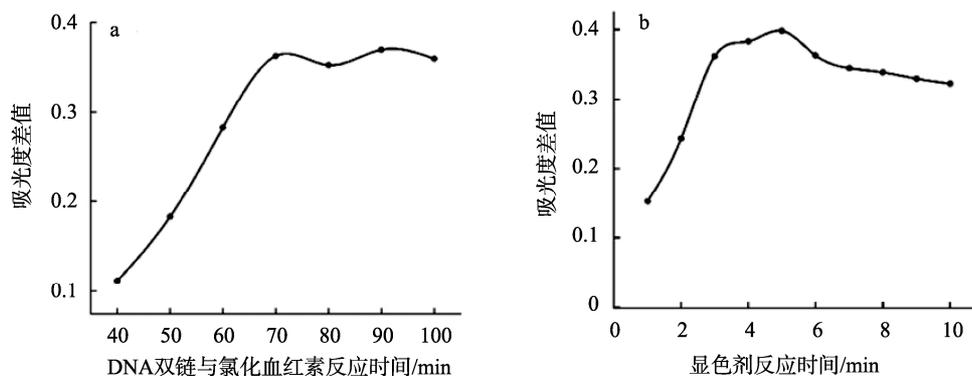
挑选与甲硝唑相类似的抗生素进行实验, 比较其对体系响应的影响。如图 4 所示, 在 1.17 g/L 质量浓度条件下, 与空白、卡那霉素、四环素、氧氟沙星、妥布霉素、奥硝唑相比, 只有甲硝唑产生了显著的吸光度。经统计学分析, 甲硝唑分别与其他各组有极显著差异 ($P < 0.01$)。甲硝唑适配体与甲硝唑高特异性结合, 而对甲硝唑以外的物质响应性不高; 因此, 本方法有较强的选择性, 可在实际检测中与上述相似抗生素明显区分, 不对其产生明显响应。



注: a: 显色剂的浓度对实验的影响; b: pH 对实验的影响; c: 温度对实验的影响。

图 2 显色剂的浓度、pH 和温度的优化 ($n=3$)

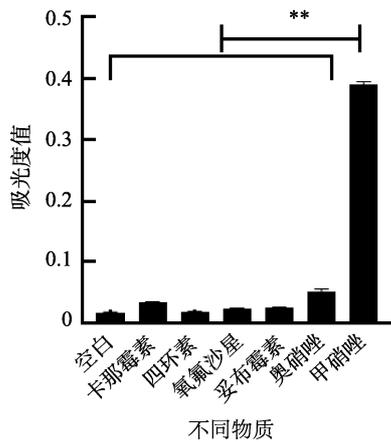
Fig.2 Optimization of chromogenic agent concentration, pH and temperature ($n=3$)



注: a: DNA 双链与氯化血红素反应时间对实验的影响; b: 显色剂反应时间对实验的影响。

图 3 反应时间的优化 ($n=3$)

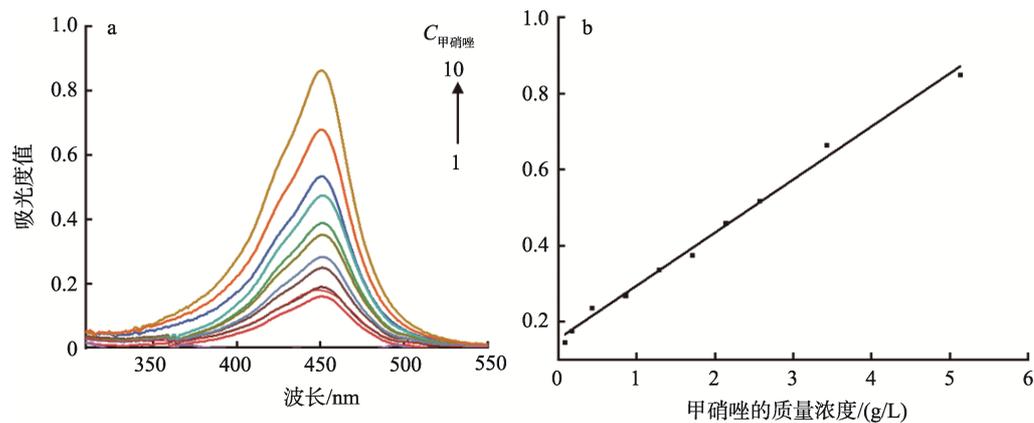
Fig.3 Optimization of reaction time ($n=3$)



注: **表示具有极显著性差异, $P < 0.01$ 。

图 4 不同物质对体系响应的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of different substances on system response ($n=3$)



注: 图 a 中 $C_{\text{甲硝唑}}$: 0.08, 0.17, 0.43, 0.86, 1.28, 1.71, 2.13, 2.57, 3.42, 5.13 g/L。

图 5 甲硝唑的紫外光谱图(a)和标准曲线图(b)

Fig.5 Ultraviolet spectrometry (a) and standard curve (b) of metronidazole

2.4 加标回收实验

为探究本方法检测实际样品中甲硝唑的可行性, 取市售牛奶, 按实验方法对其中的甲硝唑进行检测。检测结果如表 1 所示, 其中所含甲硝唑的浓度低于方法检出限, 因此对其进行了加标回收率实验, 平行测定 5 次, 结果如表 2 所示, 甲硝唑的加标回收率为 85.91%~102.04%, 与目

表 1 实际样品中甲硝唑检测结果($n=5$)

Table 1 Metronidazole determination results in actual samples ($n=5$)

样品	方法测定值 /(g/L)	加标量 /(g/L)	测定值 /(g/L)	平均回收 率 /%
-	-	0.085	0.082	96.47
牛奶	-	1.711	1.470	85.91
-	-	5.135	5.240	102.04

注: -表示未检出。

2.3 线性范围、标准曲线与精密度

为验证本方法对甲硝唑的检测能力, 配制一系列浓度甲硝唑标准溶液, 并在已优化的最佳实验条件下, 扫描测定其在 300~600 nm 范围内的吸光度值, 同时测定这一系列甲硝唑的光谱和在 450 nm 处的吸光度值。如图 5a 所示, 吸光度值随着甲硝唑浓度的增加而增加。根据所测得的吸光度值与甲硝唑浓度绘制标准曲线(图 5b), 当甲硝唑质量浓度为 0.08~5.13 g/L 时, 吸光度值与甲硝唑浓度有良好的线性关系。线性回归方程是 $\Delta A = 0.1542 + 0.1396C$, $r = 0.9968$ 。本方法的检出限(limit of detection, LOD)为 0.0358 g/L。本研究分别对 0.08、1.71、5.13 g/L 3 种质量浓度的甲硝唑标准溶液进行 11 次平行测量, 其相对标准差分别为 1.95%、1.93%、1.36%, 均小于 2%, 因此可认为本方法精密度良好。

前甲硝唑检测的国家标准方法 GB/T 22982—2008《牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》所得的回收率(85%~110%)相近, 可认为本方法的加标回收率符合标准, 这表明本方法在测定实际样品时具有较强的可行性。

3 结论

本研究基于核酸适配体与 DNA 酶的结合可影响 DNA 酶的催化活性这一原理, 设计了一种高特异性和高灵敏度的检测甲硝唑的光度测量方法, 本研究所需步骤少、操作简便, 当甲硝唑质量浓度为 0.08~5.13 g/L 时, 吸光度值与甲硝唑质量浓度具有良好的线性关系。在特异性实验中测得 1.17 g/L 甲硝唑的吸光度为 0.396, 远大于其他物质的吸光度, 这说明本方法有较强的特异性。且在实际样品的测定得出本方法在实际样品中的回收率为 85.91%~102.04%, 说明本方法在测定实际样品时具有较强的可行性; 因此,

本方法可用于牛奶中甲硝唑的检测。解决样品前处理问题后, 本方法有望用于其他动物源性食品的检测。

参考文献

- [1] CHOUKSEY D, SINGH A, GOYAL N, *et al.* Nitroimidazole-induced reversible neurotoxicity [J]. *Ind J Med Spec*, 2020, 11(4): 220–222.
- [2] SHOVA S, ALISKA N, RINA P, *et al.* Metronidazole induced cerebellar toxicity: A case report [J]. *J Nepal Med Assoc*, 2021, 59(241): 922–924.
- [3] 纪律, 万正杨, 杨小波, 等. 湖北省市售鸡蛋鸡肉中甲硝唑及禁用药物残留监测分析[J]. *公共卫生与预防医学*, 2020, 31(5): 143–145.
JIN L, WAN ZY, YANG XB, *et al.* Analysis of metronidazole and prohibited drug residues in chicken and eggs sold in Hubei Province [J]. *J Public Health Prev Med*, 2020, 31(5): 143–145.
- [4] 马晓年, 张秀清, 陈俊秀, 等. 云南省市售蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留检测结果分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(14): 3665–3669.
MA XN, ZHANG XQ, CHEN JX, *et al.* Analysis of chloramphenicol and metronidazole residues in honey of Yunnan Province [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(14): 3665–3669.
- [5] 韩晓萍, 李亚楠. 高效液相色谱法检测化妆品中的 6 种抗生素和甲硝唑[J]. *香料香精化妆品*, 2019, 6: 43–46.
HAN XP, LI YN. Simultaneous determination of six kinds of antibiotics and metronidazole in cosmetics by high performance liquid chromatography [J]. *Flav Frag Cosmet*, 2019, 6: 43–46.
- [6] 霍旺, 赵振兴, 赵磊, 等. 复方甲诺尿素乳膏中甲硝唑和尿素含量的测定[J]. *中国医药导刊*, 2021, 23 (11): 857–860.
HUO W, ZHAO ZX, ZHAO L, *et al.* The determination of metronidazole and urea in compound metronidazole urea cream [J]. *Chin J Med Guid*, 2021, 23 (11): 857–860.
- [7] MAGREULT S, LEROUS S, TOUATI J, *et al.* UPLC/MS/MS assay for the simultaneous determination of seven antibiotics in human serum-application to pediatric studies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 174: 256–262.
- [8] 王淑萍, 王金岭, 朱铁梁, 等. 血液中甲硝唑测定的紫外分光光度法[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2013, 31(9): 707–708.
WANG SP, WANG JL, ZHU TL, *et al.* Determination of metronidazole in blood by UV spectrophotometry [J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2013, 31(9): 707–708.
- [9] 罗兰, 王甫, 黄承鹏, 等. 液质联用法同时检测动物源性食品中氯霉素和甲硝唑[J]. *现代预防医学*, 2019, 46(21): 3956–3959, 3976.
LUO L, WANG P, HUANG CP, *et al.* Determination of chloramphenicol and metronidazole in animal-origin foods by LC-MS/MS [J]. *Mod Prev Med*, 2019, 46(21): 3956–3959, 3976.
- [10] 施妍, 卜俊, 沈敏. 超高效液相色谱串联质谱法检测血液中的氨基南及甲硝唑[J]. *复旦学报(医学版)*, 2017, 44(Z1): 11–15.
SHI Y, PU J, SHEN M. Analysis of aztreonam and metronidazole in blood by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2017, 44(Z1): 11–15.
- [11] 刘宇霞, 诸葛文凤, 彭金云. Eu-MOF 荧光猝灭法检测甲硝唑[J]. *广州化工*, 2020, 48(11): 106–108.
LIU YX, ZHUGE WF, PENG JY. A simple fluorescence quenching method for metronidazole determination using Eu-MOF as probes [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2020, 48(11): 106–108.
- [12] 何扩, 张秀媛, 王云峰, 等. 抗甲硝唑单抗抗体融合蛋白的表达及其 ELISA 检测方法建立[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(9): 46–50.
HE K, ZHANG XY, WANG YF, *et al.* Fusion protein expression and ELISA detection method construction of single Chain Fv against metronidazole [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(9): 46–50.
- [13] JALLAL Z, NADIA B, CHAIMAE R, *et al.* Elaboration of a novel nanosensor using nanoparticles of α -Fe₂O₃ magnetic cores for the detection of metronidazole drug. Urine human and tap water [J]. *Sens Int*, 2020, 10(1): 100160–100171.
- [14] XU RT, ABUNE L, DAVIS B, *et al.* Ultrasensitive detection of small biomolecules using aptamer-based molecular recognition and nanoparticle counting [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 203: 114023–114030.
- [15] SHI L, CAO J, YANG CY, *et al.* Hierarchical magnetic nanoparticles for highly effective capture of small extracellular vesicles [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2022, 615: 408–416.
- [16] SAITO T, SHIMIZU Y, TSUKAKOSHI K, *et al.* Development of a DNA aptamer that binds to the complementarity-determining region of therapeutic monoclonal antibody and affinity improvement induced by pH-change for sensitive detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 203: 114027.
- [17] 何珊, 陈卓亨, 赵静怡, 等. 基于核酸适配体的荧光传感器用于检测双酚 A[J]. *赣南师范大学学报*, 2019, 40(3): 65–68.
HE S, CHEN ZH, ZHAO JY, *et al.* A convenient fluorescence aptasensor for BPA detection [J]. *J Gannan Norm Univ*, 2019, 40(3): 65–68.
- [18] 陆婷婷, 王金龙, 詹相强, 等. 基于碳点的适配体荧光传感器检测农药乐果[J]. *分析化学*, 2020, 48(1): 74–82.
LU TT, WANG JL, ZHAN XQ, *et al.* Carbon dots-based fluorescent aptasensor for detection of dimethoate pesticide [J]. *Chin J Anal Chem*, 2020, 48(1): 74–82.
- [19] 毕晓雅. 玉米及大麦中真菌毒素检测的荧光适配体传感器研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020.
BI XY. Research on fluorescence aptasensor for detection of mycotoxins in maize and barley [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.
- [20] 张志伟, 叶秦, 徐斐, 等. 核酸修饰的金纳米粒子用于分光光度法检测卡那霉素[J]. *分析实验室*, 2020, 39(1): 44–47.
ZHANG ZW, YE T, XU F, *et al.* Nucleic acid modified gold nanoparticles for spectrophotometric detection of kanamycin [J]. *Chin J Anal Lab*, 2020, 39(1): 44–47.
- [21] MOHAMMAD-RAZDARI A, GHASEMI-VARNAMKHAISTI M, ROSTAMI S, *et al.* Development of an electrochemical biosensor for impedimetric detection of tetracycline in milk [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 57(12): 4697–4706.
- [22] SETLEM K, MONDAL B, SHYLAIA R, *et al.* Dual aptamer-DNAzyme based colorimetric assay for the detection of AFB₁ from food and environmental samples [J]. *Anal Biochem*, 2020, 608: 113874.
- [23] WU SJ, CHEN QM, FU LQ, *et al.* A visual on-site biosensor for low-cost detection of chloramphenicol based on aptamer and split DNAzyme [J]. *Anal Sci*, 2022, 38(2): 369–375.
- [24] ZHOU YZ, ZOU L, LI GP, *et al.* A cooperatively activatable DNA nanoprobe for cancer cell-selective imaging of ATP [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(41): 13960–13966.
- [25] GAO HL, ZHAO JX, HUANG Y, *et al.* Universal design of structure-switching aptamers with signal reporting functionality [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(22): 14514–14521.
- [26] WANG Y, ZHAO G, ZHANG G, *et al.* An electrochemical aptasensor based on gold-modified MoS₂/rGO nanocomposite and gold-palladium-

- modified Fe-MOFs for sensitive detection of lead ions [J]. *Sens Actuat B: Chem*, 2020, 319: 128313.
- [27] ZHAO GY, LIU YM, DU J, *et al.* Application of tetrahedral-deoxyribonucleic acid electrochemistry platform coupling aptazymes and hybridized hairpin reactions for the measurement of extracellular adenosine triphosphate in plants [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1172: 338681–338691.
- [28] SUN Y, LV Y, QI S, *et al.* Sensitive colorimetric aptasensor based on stimuli-responsive metal-organic framework nano-container and trivalent DNAzyme for zearalenone determination in food samples [J]. *Food Chem*, 2022, 371: 131145.
- [29] WEI M, YUE S, LIU Y. An amplified electrochemical aptasensor for ochratoxin A based on DNAzyme-mediated DNA walker [J]. *J Elect Chem*, 2021, 891(115269): 1–6.
- [30] JAFARI M, REZAEI M, KALANTARI H, *et al.* DNAzyme-aptamer or aptamer-DNAzyme paradigm: Biochemical approach for aflatoxin analysis [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65(2): 274–280.
- [31] 魏昊. 甲硝唑特异性适配体的筛选和应用[D]. 无锡: 江南大学, 2020.

WEI H. Screening and application of metronidazole specific aptamers [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



张雪冰, 硕士研究生, 主要研究方向为卫生检验与检疫研究。

E-mail: zhangxb0805@163.com



陈丽丽, 教授, 主要研究方向为卫生检验与检疫研究。

E-mail: chlili720612@163.com