

基于无标记适配体-纳米金比色快速检测四环素类抗生素

刘长勇¹, 卢春霞^{2*}, 唐宗贵¹, 王远¹, 陈霞¹

(1. 新疆农垦科学院农业农村部食品质量监督检验测试中心(石河子), 新疆石河子 832000)

(2. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100)

摘要: 该研究以四环素类(Tetracyclines, TCs) 抗生素的适配体为识别探针, 以纳米金为信号传导元件, 构建了一种无标记、简便快速的 TCs 多残留比色检测方法。在优化条件下将其应用于食品中 TCs 多残留快速检测, 并与国标法(GB 31658.6-2021) 对比验证。结果显示, 样品经甲醇+乙腈(6:4, V/V) 提取后采用该方法进行检测, 在适配体浓度为 150 nmol/L、NaCl 浓度 40 mmol/L、反应时间 5 min 等检测条件下, 该比色方法对四种 TCs 的检测线性范围为 0.25~5.0 ng/mL ($R>0.981$), 可视化检测限为 0.5~1.0 ng/mL, 检测时间约 5 min。该方法对四环素、土霉素、金霉素和多西环素具有高的特异性, 与氯霉素和庆大霉素等无交叉反应。将方法应用于牛乳中 TCs 检测, 加标回收率为 63.52%~102.48%, 相对标准偏差 2.49%~6.81%。结果表明, 该方法具有简便、快速、成本低、灵敏度高等优点, 适用于批量样品中 TCs 的现场快速检测。

关键词: 四环素; 适配体; 纳米金; 比色分析

文章编号: 1673-9078(2023)07-327-335

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0896

Rapid Colorimetric Assay of Tetracycline Antibiotics based on Label-free Aptamer-gold Nanoparticle (AuNPs) Probes

LIU Changyong¹, LU Chunxia^{2*}, TANG Zonggui¹, WANG Yuan¹, CHEN Xia¹

(1. Supervision and Testing Center Food Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Shihezi), Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

(2. School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China)

Abstract: A label-less, simple, and rapid colorimetric assay for residual tetracyclines (TCs) was developed by combining aptamer probes with gold nanoparticles (AuNPs) as the signal transduction element. This method was used to rapidly detect residual TCs in food under optimal conditions. Additionally, this novel method was then compared to the national standard method for TC residue detection (GB 31658.6-2021). The samples were extracted by methanol and acetonitrile at a 6:4 ratio (V/V) before being assayed using the proposed colorimetric assay. Given an aptamer concentration of 150 nmol/L, NaCl concentration of 40 mmol/L, and reaction time of 5 min, the linear detection range of our colorimetric method for four types of TC was 0.25~5.0 ng/mL ($R>0.981$). The visual detection limit was 0.5~1.0 ng/mL, and the detection time was approximately 5 min. This method is specific for tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, and doxycycline, as it has no cross-reactivity for gentamicin and chloramphenicol. Spike recoveries of 63.52%~102.48% and relative standard deviations of 2.49%~6.81% were obtained when detecting TCs in cow's milk. Therefore, the proposed colorimetric assay is simple, fast, cost efficient, and highly sensitive, which makes it suitable for the rapid batch-screening of TCs in food.

引文格式:

刘长勇, 卢春霞, 唐宗贵, 等. 基于无标记适配体-纳米金比色快速检测四环素类抗生素[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 327-335.

LIU Changyong, LU Chunxia, TANG Zonggui, et al. Rapid colorimetric assay of tetracycline antibiotics based on label-free aptamer-gold nanoparticle (AuNPs) probes [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 327-335.

收稿日期: 2022-07-16

基金项目: 兵团农产品质量安全监管项目 (BTNA202203)

作者简介: 刘长勇 (1976-), 男, 本科, 高级实验师, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: 876857355@qq.com

通讯作者: 卢春霞 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: shzlcx2002@163.com

Key words: tetracyclines; aptamers; gold nanoparticles; colorimetric analysis

四环素类(Tetracyclines, TCs)抗生素是一类广谱抗菌药物,具有价格低廉、广谱抗菌性强等优点,被广泛应用于动物疾病预防和治疗。由于TCs在畜牧、水产养殖中的滥用,造成动物性食品中TCs残留严重,危害人体健康。另外,TCs在畜禽体内并不能被完全吸收,大部分则以原药或代谢物的形式随排泄物进入到环境中^[1],给生态环境安全也带来严重威胁^[2,3]。由于TCs滥用而引发的食品安全问题和环境污染问题日益突出,许多国家对TCs残留实行监控,我国国家标准GB 31650-2019《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》规定食品中四环素、土霉素、金霉素单个或组合限量值为100~1 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4]。

为了保障食品质量安全,对动物性食品中TCs残留的检测至关重要。目前,食品中TCs分析技术主要包括高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)、液相色谱-质谱/质谱(Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS)^[5,6]、免疫分析技术^[7,8]等。仪器分析方法检测结果准确可靠,但设备昂贵,操作步骤繁琐,难以在基层中推广应用。免疫分析技术虽然具有简便、快速、灵敏等优势,但存在抗体制备周期长、成本高等问题,在一定程度上限制了抗体的应用。

近些年,核酸适配体(Aptamer)作为一种新型识别分子日益成为人们关注的焦点。由于其具有亲和力高、筛选制备方便、成本低廉、易修饰、稳定性高等优点,被广泛并用于食品分析^[9]、环境监测^[10]和临床诊断^[11]等领域。针对四环素类抗生素,目前已筛选出识别四环素^[12]、土霉素^[13]和多西环素^[14]的核酸适配体,以及同时识别四环素、土霉素、多西环素和金霉素的广谱型适配体^[15]。随后,人们利用以上适配体建立了包括光学、电化学、表面等离子体共振、表面增强拉曼光谱等生物传感检测技术^[16,17]。但以上适配体传感器大都需要对适配体进行修饰标记,操作步骤较为复杂,或者需要专业仪器,限制了其在食品分析中进一步应用。

纳米金(Gold Nanoparticles, AuNPs)具有制备简单、便于吸附生物分子和优异的粒子间距光学效应等优点,其在分散状态下呈红色,发生凝聚后变为蓝色。利用这个特点,人们建立了多种适配体-纳米金比色分析技术^[18]。由于该类分析方法具有简便、快速、肉眼可见分析结果等优势,使其在抗生素残留检测中得到快速发展,近几年已相继建立了链霉素^[19]、卡那霉素^[20]、氟苯尼考^[21]、土霉素^[22]、磺胺二甲氧嘧啶^[23]

的比色检测方法。但很少涉及样品前处理对检测性能的影响,且以上报道只针对单一靶标,鲜有基于适配体的抗生素多残留检测的研究报道。因此,本研究以TCs适配体为识别元件,以NaCl诱导聚集纳米金为传感信号,构建了一种简单、经济、灵敏、快速的TCs多残留比色检测方法,并对样品前处理和检测条件进行优化。该方法不需要特殊的仪器设备,具有操作简单、检测时间短等优点,为食品中TCs多残留现场快速检测提供新的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

土霉素(Oxytetracycline, OTC)、四环素(Tetracycline, TET)、多西环素(Doxycycline, DOX)和金霉素(Chlortetracycline, CHLOR)、卡那霉素、氯霉素、庆大霉素、磺胺嘧啶和恩诺沙星标准品纯度 $\geq 96.0\%$,上海安谱实验科技股份有限公司。氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),sigma公司。96-well酶标板,生物工程(上海)股份有限公司。乙二胺四乙酸(Ethylenedinitrilo) Tetraacetic Acid, EDTA)、三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。其余常规试剂和有机溶剂,国药集团化学试剂有限公司。实验用水为超纯水。乳制品和生鲜乳,本地超市和奶牛养殖场。

四环素类抗生素分别用甲醇配置成浓度为1.0 mg/mL的原液,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,使用时用甲醇稀释至所需的浓度。TCs核酸适配体^[15]由生物工程(上海)股份有限公司合成和纯化,适配体(A2)序列如下:5'-CGGTGGTG-3',使用时用纯水配制所需浓度。

1.2 仪器设备

FEI Tecnai G2 F20场发射透射电子显微镜,美国FEI公司;U-T3紫外可见分光光度计,屹谱仪器制造(上海)有限公司;Milli-Q Reference超纯水系统,美国Millipore公司;MS3 basic涡旋混合器,德国IKA公司;5424R台式冷冻离心机,德国艾本德公司;QB-8002 96孔微孔板混匀仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 纳米金的制备与表征

根据本团队报道的方法制备胶体金溶液^[24], 将 100 mL 0.01% (*m/m*) 氯金酸溶液置于磁力加热搅拌器上, 煮沸 2 min, 加入 1% (*m/m*) 的柠檬酸三钠水溶液 2 mL, 继续搅拌加热, 溶液变成酒红色后持续加热 10 min, 停止加热, 冷却至室温, 4 °C 保存备用。将胶体金溶液在 400~800 nm 波长范围进行扫描, 确定其最大吸收峰波长。同时采用透射电镜表征纳米金的形貌。

1.3.2 基于无标记适配体-纳米金比色检测 TCs

取 200 μ L 纳米金溶液加入 96 孔酶标板中, 加入适配体溶液 (使其终浓度为 150 nmol/L) 和 10 μ L 待测溶液, 室温反应 5 min, 然后加入 10 μ L NaCl 溶液 (使其终浓度为 40 mmol/L), 肉眼观测纳米金溶液颜色变化。定量检测时采用紫外-可见分光光度计在 400~800 nm 波长范围进行扫描, 并记录溶液在 530 nm 和 650 nm 处的吸光值。在 TCs 比色检测过程中, 采用单因素实验分别研究适配体浓度、NaCl 浓度、反应时间、样品基质对检测性能的影响, 获得最佳检测条件。

1.3.3 检测性能评价

灵敏度: 在优化条对下, 用空白牛乳样品的提取溶液将 TCs 标准溶液稀释成系列梯度浓度, 配置基质标准溶液。然后采用 1.3.2 节方法进行检测, 观察溶液颜色变化, 用紫外可见分光光度计测定溶液在 650 nm ($A_{650\text{nm}}$) 和 530 nm ($A_{530\text{nm}}$) 处吸光值, 以 $A_{650\text{nm}}/A_{530\text{nm}}$ 的比值为纵坐标, TCs 浓度作为横坐标, 绘制标准曲线。基于 $3\sigma/S$ (σ 为空白样品检测 10 次的标准偏差, S 为方法校准曲线斜率) 计算方法检测限 (Limits of Detection, LOD) ^[25]。

精密度分析: 将四环素、土霉素、金霉素、多西环素标准溶液用甲醇分别稀释至 1 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 三个质量浓度, 采用 1.3.2 节方法重复测定 6 次, 计算变异系数 (CV) ^[25]。

特异性分析: 制备相同浓度 (100 ng/mL) 的四环素、土霉素、金霉素、多西环素、卡那霉素、氯霉素、庆大霉素、磺胺嘧啶和恩诺沙星标准溶液, 同时设置不添加分析物作为空白对照。采用 1.3.2 节方法测定, 观察纳米金颜色变化, 测定 $A_{650\text{nm}}$ 和 $A_{530\text{nm}}$ 吸光值。实验设置 3 个重复。

1.3.4 样品检测

取 2 g 牛奶样品于离心管中, 分别添加 4 种 TCs 标准溶液, 使其添加终浓度分别为 10、50、100 ng/g, 加入 4 mL 乙腈+甲醇提取溶液 (6:4, *V/V*), 涡旋混匀, 0~4 °C 条件下, 9 000 r/min 离心 8 min, 取上清液。重复提取两次, 合并上清液, 用氮吹仪浓缩后, 用提取溶液定容至 2 mL, 采用 1.3.2 方法进行检测。计算加标回收率和相对标准偏差 (Relative Standard Deviation,

RSD)。同时采用国标法 (GB 31658.6-2021) ^[26] 对样品进行检测, 并对检测结果进行比较。

1.4 数据分析

实验数据用平均值 $\pm$ 标准偏差方式表示, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 方法分析实验数据, 显著性水准为 $\alpha=0.05$, 使用 Origin 7.5 软件制图。

2 结果与分析

2.1 基于适配体-纳米金比色检测 TCs 原理

高浓度盐溶液可屏蔽纳米金表面离子的静电排斥作用, 使纳米金发生不可逆沉聚。适配体可与纳米金发生静电作用而吸附到纳米金表面, 进而提高了纳米金的稳定性, 此时盐溶液无法致使纳米金聚集变色。当检测体系中含有 TCs 时, 适配体与 TCs 发生特异性结合, 此时加入盐溶液, 纳米金由于无适配体保护而沉聚变色, 纳米金沉聚程度与 TCs 浓度呈正相关。实验原理如图 1 所示。

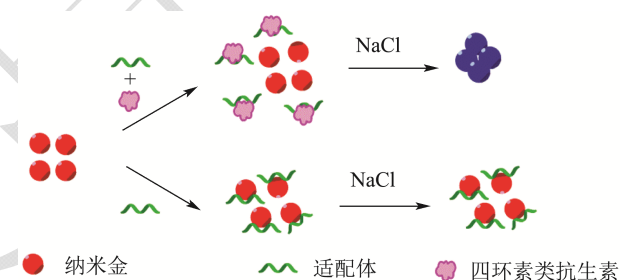
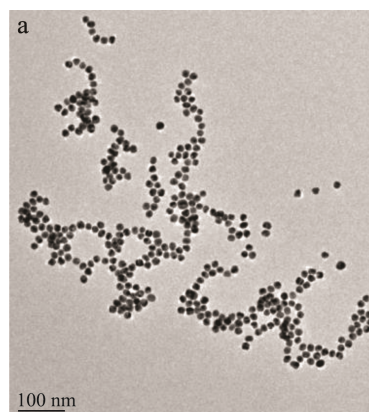


图 1 基于无标记适配体-纳米金比色检测 TCs 原理图

Fig.1 Schematic of colorimetric assay base on the aptame rand gold nanoparticles for detection of TCs

2.2 纳米金制备与表征

采用透射电子显微镜对制备纳米金的进行表征, 结果如图 1a 所示, 纳米金粒径均一 (约 20 nm), 且分散性良好。紫外可见分光光度计分析显示 (图 1b), 纳米金最大吸收峰波长在 530 nm 处。



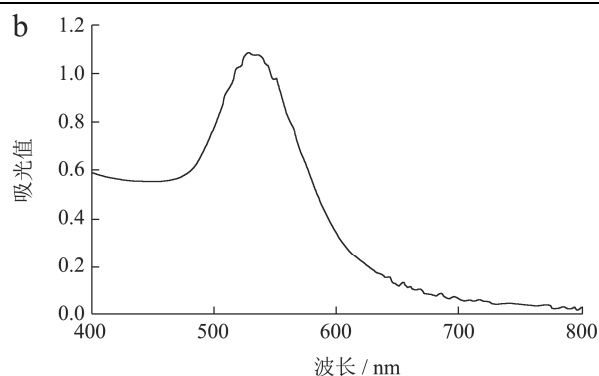


图2 纳米金透射电镜图 (a) 和紫外吸收光谱图 (b)

Fig.2 TEM images (a) and ultraviolet absorption spectra (b) of the gold nanoparticles

2.3 检测条件优化

2.3.1 NaCl 浓度

NaCl 浓度对检测灵敏度至关重要,灵敏度与盐溶液浓度成正比,但过高的盐浓度会降低纳米金的稳定性。本文将不同浓度的 NaCl 加入纳米金溶液,测定纳米金在无适配体保护下的盐耐受性。结果如图 3 所示,当适配体不存在时,纳米金的 $A_{530\text{ nm}}$ 值随着 NaCl 浓度从 10 mmol/L 增加至 60 mmol/L 时而逐渐降低,当 NaCl 浓度为 40 mmol/L 时,纳米金开始聚集变蓝。而检测体系中含有适配体(终浓度 200 nmol/L)时,纳米金在 NaCl 浓度增至 80 mmol/L 才完全沉聚变色。故后续实验选择 NaCl 浓度为 40 mmol/L。

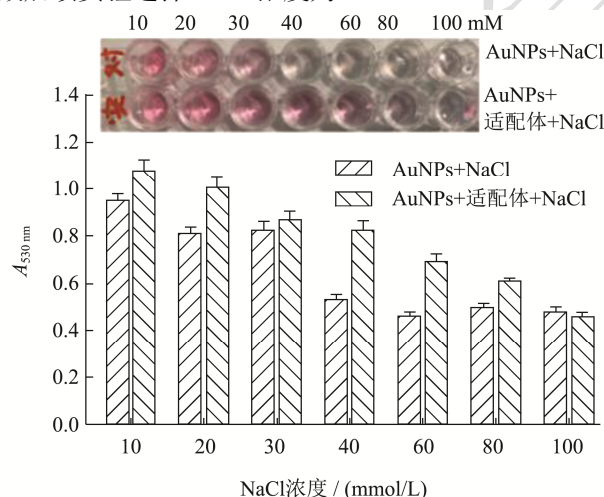


图3 NaCl 浓度优化

Fig.3 Optimization of NaCl concentration

2.3.2 无标记适配体浓度

适配体浓度过高会降低检测体系的灵敏度,浓度过低对 AuNPs 则起不到保护作用。本实验分别向纳米金溶液中加入不同浓度的适配体,使其终浓度分别为 50、100、150、200、300、400 nmol/L,室温孵育

5 min 后加入 NaCl 溶液(终浓度 40 mmol/L),选择金溶液仍保持红色的实验组为最佳适配体浓度。结果显示(图 4),当适配体浓度低至 50 nmol/L 后,纳米金颗粒聚集变蓝。当适配体浓度 ≥ 100 nmol/L 时,纳米金溶液的 $A_{530\text{ nm}}$ 值增加,当浓度高于 150 nmol/L 后, $A_{530\text{ nm}}$ 值变化处于平稳。因此,适配体浓度选择 150 nmol/L。

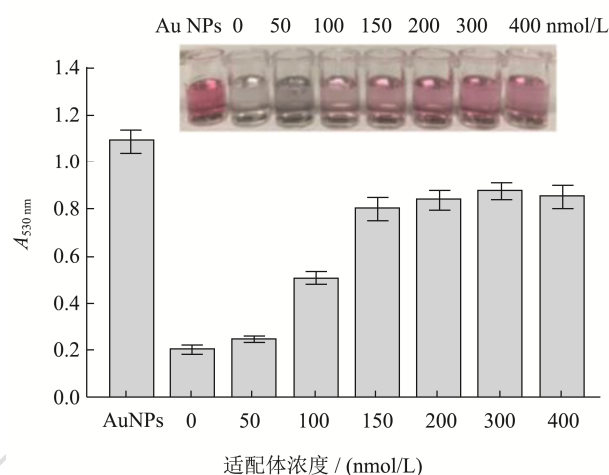


图4 适配体浓度优化

Fig.4 The optimum of aptamer concentration

2.3.3 反应时间

固定以上实验条件,加入 TCs 混标溶液(终浓度 100 ng/mL),观察适配体与 TCs 作用时间对检测性能的影响。从结果(图 5)中可以看出,TCs 与适配体反应 5 min 后加入 NaCl,纳米金沉聚变色,表明两者充分结合,故选择适配体与 TCs 的反应时间为 5 min。

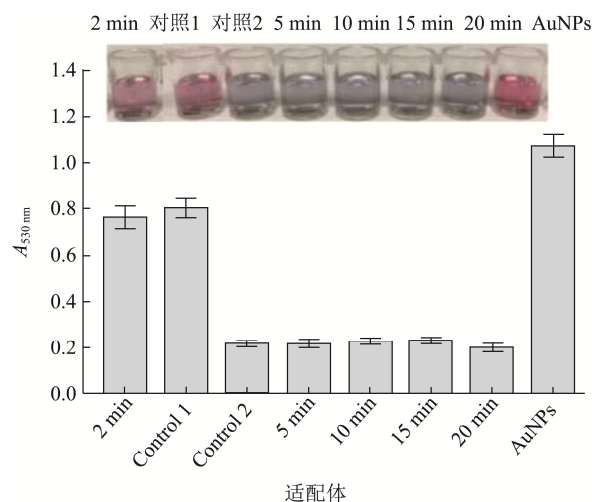


图5 TCs 与适配体反应时间优化

Fig.5 The optimization of reaction time between TCs and aptamer

注:对照 1 为 AuNPs+适配体 150 nmol/L+NaCl 40 mmol/L; 对照 2 为 AuNPs+NaCl 40 mmol/L。

2.3.4 样品基质及前处理方法对检测性能的影响

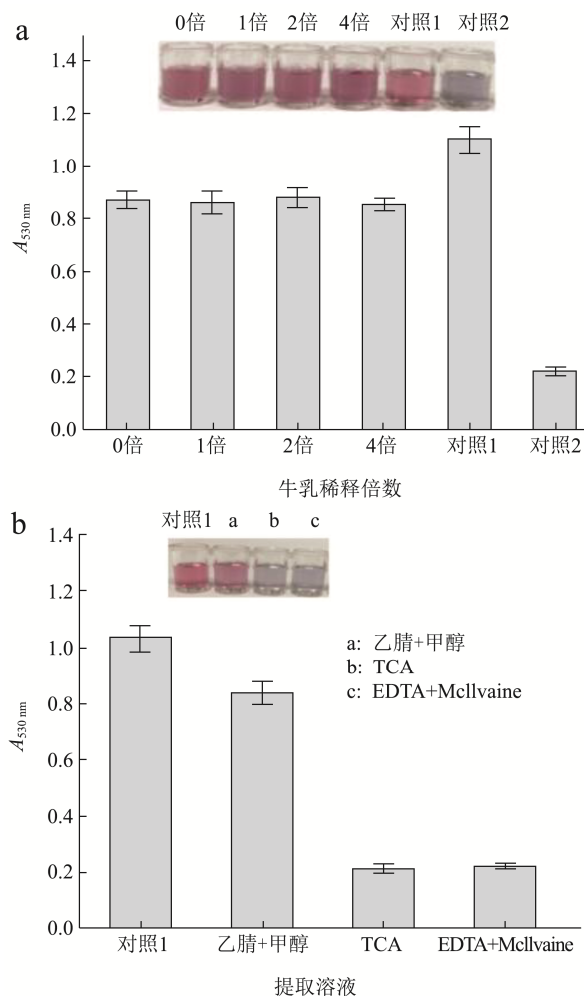


图6 样品基质及前处理方法对检测性能的影响

Fig.6 Influence of sample matrix and pretreatment methods on detection performance

注: 对照1为AuNPs; 对照2为AuNPs+NaCl 40 mmol/L。

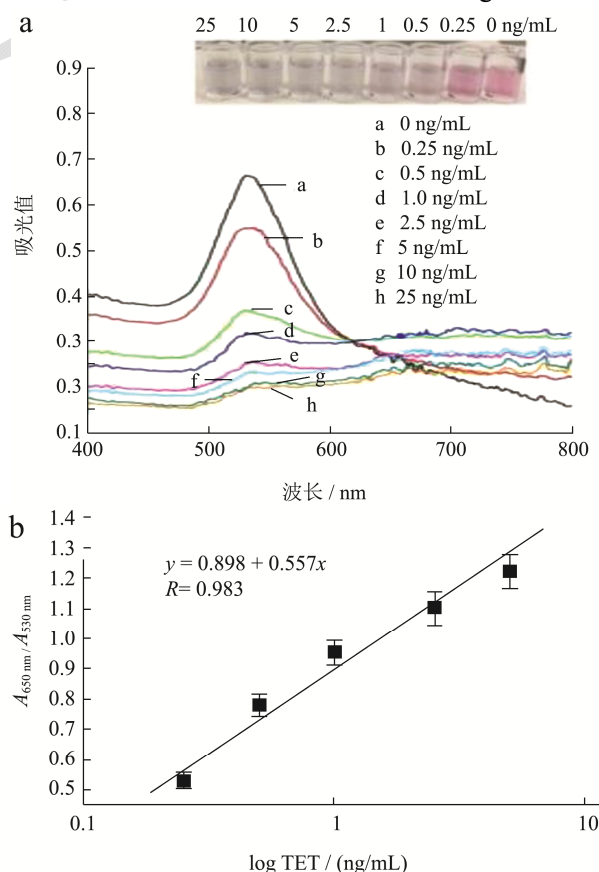
牛奶样品中含有大量的蛋白质、脂肪、维生素和矿物质等, 基质成分复杂, 这些基质成分可能干扰适配体与靶标的结合, 或者影响纳米金的稳定性。为研究样品基质对检测性能的影响, 本实验取空白牛乳样品, 用超纯水稀释0、1、2、和4倍后, 分别取5 μL 添加到金纳米溶液中, 然后加入NaCl溶液(终浓度40 mmol/L)。结果如图6a所示, 所有实验组在添加NaCl后, 纳米金未聚集变色, 而对照组2沉聚变蓝, 原因可能是牛乳中蛋白质吸附在纳米金表面, 进而影响了检测体系。为了消除基质干扰, 分别采用EDTA-Mcllvaine缓冲液^[26]和TCA缓冲液^[27]作为提取溶液对牛乳样品进行前处理, 超声提取10 min, 10 000 r/min离心5 min, 除去蛋白和脂肪。分别取10 μL 上清液加入纳米金溶液, 纳米金聚集变色(图6b), 表明提取溶液对纳米金稳定性影响较大, 以上提取溶液不适合使用。前期实验表明, 乙腈和甲醇对纳米金稳定性影

响较小。为达到既除去蛋白干扰且可有效提取样品中四环素残留的目的, 本研究采用乙腈+甲醇为提取溶剂, 并优化了两者体积比对样品前处理的影响。结果显示, 当乙腈体积比低于30%时, 牛乳中蛋白无法有效去除。因此, 选择体积比6:4的甲醇+乙腈为提取溶液, 9 000 r/min离心8 min后, 取上10 μL 上清液加入纳米金溶液, 纳米金仍保持红色(图6b)。因此, 样品提取溶液选择甲醇+乙腈混合溶剂(6:4, V/V)。

2.4 检测性能评价

2.4.1 灵敏度分析

在优化条件下, 采用本方法分别测定不同浓度的TET、DOX、OTC和CHLOR标准溶液, 观察纳米金颜色变化, 并测其吸光值。结果如图7a、7c、7e、7g所示, 随着TCs浓度的增加, 纳米金颜色由红变蓝, 当TET、DOX、OTC和CHLOR质量浓度分别为0.5、1.0、1.0、1.0 ng/mL时, 肉眼可见纳米金有明显的团聚变色, 因此该方法对TCs的可视化检测限为0.5~1.0 ng/mL。紫外光谱分析显示(图7b、7d、7f、7h), $A_{650\text{ nm}}/A_{530\text{ nm}}$ 比值随着TCs浓度的增加而增加, 四种TCs的线性检测范围为0.25~5.0 ng/mL, 相关系数(R)>0.983, 符合国家标准(GB/T 27404-2008)中的技术要求(筛选方法 R 不低于0.98)^[25], TET、DOX、OTC和CHLOR的检测限分别为0.08、0.06、0.09、0.12 ng/mL。



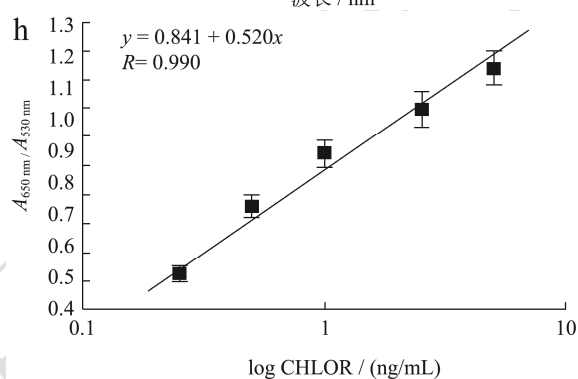
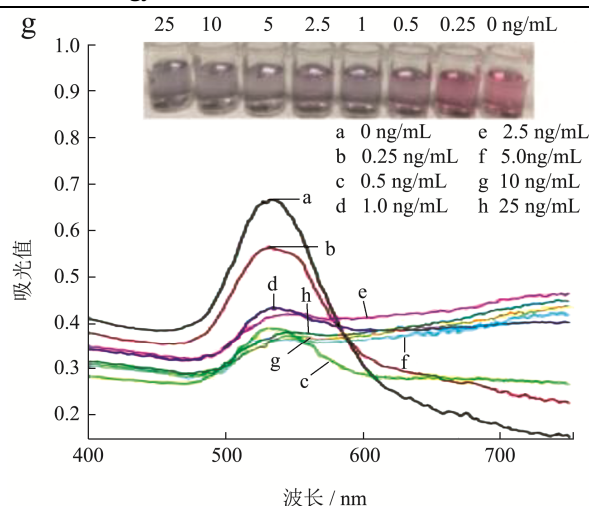
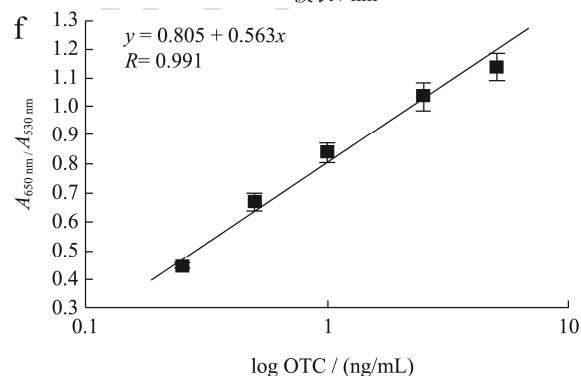
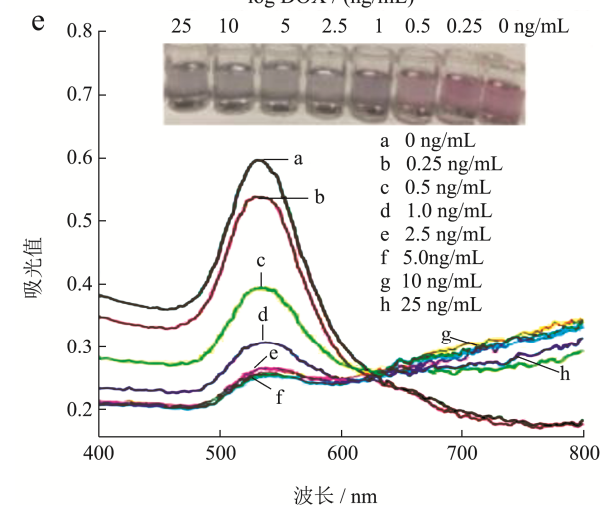
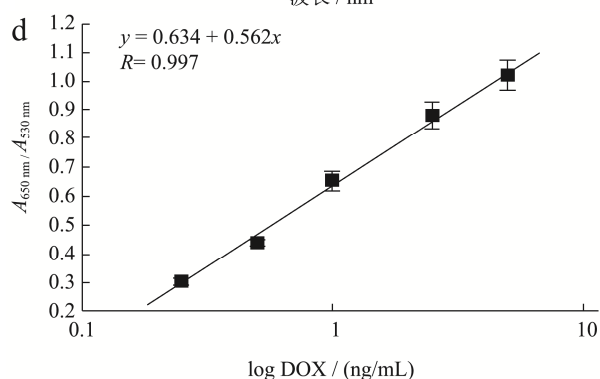
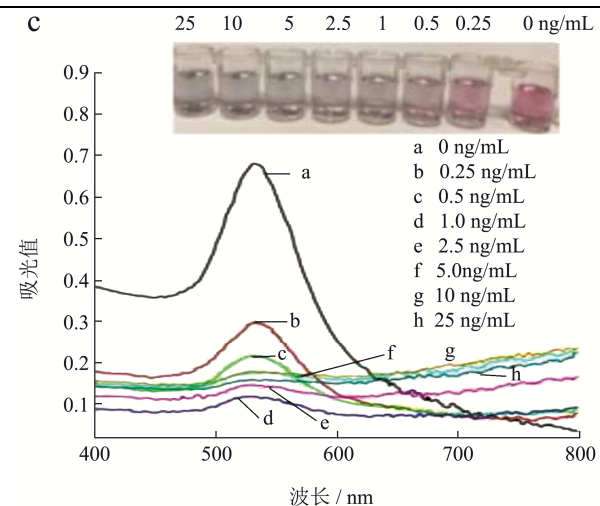


图7 不同浓度 TET、DOX、OTC、CHLOR 条件下检测体系的紫外图谱和标准曲线图

Fig.7 UV-vis spectrum of aptasensor at different concentrations of TET, DOX, OTC, CHLOR, the calibration plot of the absorbance versus concentration of TET, DOX, OTC, CHLOR

注: a、b: TET; c、d: DOX; e、f: OTC; g、h: CHLOR。

a、c、e、g: 紫外图谱; b、d、f、h: 标准曲线图。

2.4.2 精密度分析

精密度分析结果显示(表1), TET、DOX、OTC 和 CHLOR 的变异系数范围分别为 4.1%~5.4%、3.4%~6.5%、2.9%~5.5%、4.3%~5.8%, 满足国标 GB/T 27404-2008 中的技术要求^[25]。

2.4.3 特异性分析

采用本方法分别检测 TCs、卡那霉素、氯霉素、庆大霉素、磺胺嘧啶和恩诺沙星, 以评估本方法的特异性, 结果如图8所示, 适配体与 TCs 特异性结合, 纳米金聚集变色; 相应地, 检测体系在 530 nm 处吸光值显著降低。但检测溶液中含有其他抗生素时, 纳米金溶液仍保持红色, 吸光值($A_{530\text{ nm}}$)也无明显变化。表明该适配体对 TCs 具有类选择性, 是一种广谱型适配体^[15]。

表 1 精密度分析结果

Table 1 Results of precision analysis (n=6)		
被测组分	被测组分含量/(ng/mL)	变异系数/%
TET	1	5.4
	10	4.8
	100	4.1
DOX	1	6.5
	10	3.4
	100	4.3
OTC	1	3.9
	10	5.5
	100	2.9
CHLOR	1	4.7
	10	4.3
	100	5.8

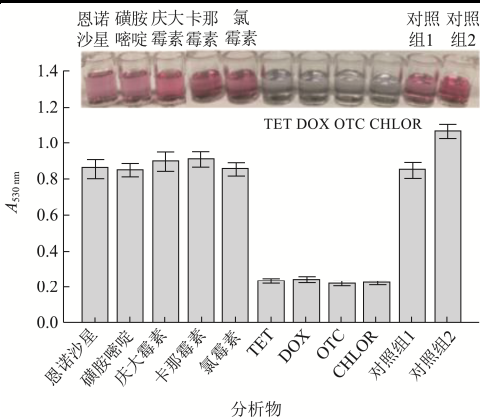


图 8 特异性分析

Fig.8 Specificity analysis

注：对照 1 为 AuNPs+适配体 150 nmol/L+NaCl 40 mmol/L；
对照 2 为 AuNPs。

2.5 检测方法的应用

为验证本方法的准确性，采用本方法和国标法^[26]进行空白样品加标实验。检测结果显示表 2，四种 TCs 在牛乳中加标回收率为 63.53%~102.48%，相对标准偏差 2.49%~6.81%。与国标方法相比，部分加标回收率有显著差异 ($P<0.05$)，由于本方法检测体系受诸多因素的影响 (pH 值、盐离子浓度等)，致使选择样品提取溶剂时受多种因素限制，可能导致提取效果低于国标方法。但本方法加标回收率符合国家标准 (GB/T 27404-2008) 中的技术要求 (组分含量 <0.1 mg/kg，加标回收率 60%~120%)^[25]，而且样品前处理简单，不需固相萃取小柱净化处理，有机溶剂消耗少。因此，本方法可满足快速筛查方法的检测需求。

2.6 与现有检测技术比较

本方法与国标方法和文献报道的方法比较结果如表 3 所示。与 HPLC、HPLC-MS/MS 等仪器分析方法比较，本方法样品前处理简单，仅需对样品进行简单的提取、浓缩，不需要净化处理，降低了溶剂消耗和检测成本。而仪器分析方法样品前处理较为复杂，样品历经提取、浓缩、净化、过滤膜等多个步骤。与免疫分析技术比较，本方法不需要制备抗体，所用适配体可人工合成，大大降低了检测成本。与基于适配体的荧光、电化学传感检测方法比较，本方法不需要对适配体过多修饰，不需要特殊仪器，无洗脱过程，大大简化了检测步骤，检测时间仅为 5 min，易于实现现场检测。

表 2 牛乳中 TCs 加标回收

Table 2 Recovery rates of TCs in milk (n=3)					
分析物	添加量/(ng/g)	本方法		国标法	
		回收率/(%, mean±SD)	RSD/%	回收率/(%, mean±SD)	RSD/%
TET	10	68.72±4.68	6.81	-	-
	50	73.23±2.92 ^a	3.99	76.33±3.72 ^a	4.87
	100	72.38±3.47 ^a	4.79	88.91±5.01 ^b	5.63
OTC	10	75.61±3.08	4.07	-	-
	50	80.37±2.55 ^a	3.17	89.38±5.33 ^b	5.96
	100	84.14±5.16 ^a	6.13	95.29±3.67 ^b	3.85
DOX	10	90.24±3.66	4.06	-	-
	50	91.31±2.27 ^a	2.49	92.33±5.11 ^a	5.54
	100	102.48±5.74 ^a	5.60	105.57±7.74 ^a	7.33
CHLOR	10	63.53±2.94	4.63	-	-
	50	64.06±2.86 ^a	4.46	81.24±3.48 ^b	4.28
	100	68.84±4.21 ^a	6.12	83.42±5.01 ^b	6.01

注：-表示该方法检测限低于添加量；同行相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

表 3 TCs 检测方法比较

Table 3 Comparison of methods reported for detection of TCs

分析方法	分析物	识别分子	检测限	线性范围	回收率/%	检测时间/min	文献
HPLC	TET, OTC, DOX, CHLOR	-	20~100 ng/g	-	60~120	~17	[26]
HPLC-MS/MS	TET, OTC, DOX, CHLOR	-	50 ng/g	-	70.4~109	~25	[28]
HPLC-MS/MS	TET, OTC, DOX, CHLOR	-	5 ng/g	50~100 ng/mL	95.4~111.2	-	[29]
试纸条	TET	抗体	-	2 ng/mL	98.6~100.2	~15	[8]
ELISA	TET, OTC, DOX, CHLOR	抗体	10 ng/mL, 15~30 ng/g	-	40~120	~105	[30]
比色	TET, OTC, DOX, CHLOR	适配体	0.1 nmol/L (0.046 ng/mL) ^a	-	-	~50	[15]
荧光	TET	适配体	96 pmol/L (0.042 ng/mL) ^a	10 nmol/L~1 μmol/L (4.44~444.4 ng/mL) ^a	-	~20	[31]
荧光	TET	适配体	0.006 ng/mL	0.01~100 ng/mL	87.7~109.8	~150	[32]
荧光	OTC	适配体	25 ng/mL	25~1 000 ng/mL	96~117	-	[33]
电化学	TET	适配体	0.45 nmol/L (0.216 ng/mL) ^a	1.5 nmol/L~3.5 μmol/L (0.667~1 555.5 ng/mL) ^a	93.1~103.8	~125	[34]
电化学	OTC	适配体	0.229 ng/mL	1~100 000 ng/mL	87~99.3	-	[35]
比色	TET, OTC, DOX, CHLOR	适配体	0.08~0.12 ng/mL	0.25~5 ng/mL	63.53~102.48	~5	本方法

注：“-”表示该文献中没有明确数字；ELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay，酶联免疫吸附剂测定）；^a为换算后的质量浓度。

3 结论

本研究以无标记 TCs 适配体为识别分子，无修饰的纳米金为比色信号，构建了一种简便灵敏的 TCs 多残留比色检测方法，在优化条件下，该比色方法对 TCs 的可视化检测限为 0.5~1.0 ng/mL，加标回收率为 63.53%~102.48%，检测时间为 5 min。与现有的检测技术相比，本方法具有样品前处理简单、不需要大型仪器、检测时间短、成本低廉等优势。本研究为 TCs 现场快速检测提供了新的技术支撑。

参考文献

[1] Xu L, Zhang H, Xiong P, et al. Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review [J]. Science of the Total Environment, 2020, 753: 141975.

[2] 陈丽红,李强,肖欣欣,等.典型四环素类抗生素的预测无效应浓度和风险评估[J].生态毒理学报,2021,16(5):334-346.

[3] 陈小平,王萌,杨长明,等.四环素类抗生素在我国水环境污染现状及其对水生生物的毒性研究进展[J].应用化工,2021, 50(10):2780-2785.

[4] GB 31650-2019,食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量[S].

[5] 卜晓娜,刘楚君,郭亚文,等.动物源性食品中四环素类药物

残留的色谱和质谱检测技术的研究进展[J].中国兽医科学, 2018,48(11):1464-1474.

[6] Patyra E, Kwiatek K. Comparison of HPLC-DAD and LC-MS techniques for the determination of tetracyclines in medicated feeds using one extraction protocol [J]. Chromatographia, 2021, 84: 741-749.

[7] Wang G, Zhang C Z, Liu J. A receptor-based chemiluminescence enzyme linked immunosorbent assay for determination of tetracyclines in milk [J]. Analytical Biochemistry, 2019, 564-565: 40-46.

[8] 吴玉晗,陈伟.侧向免疫层析快速检测牛乳中四环素和青霉素[J].食品科学,2020,41(24):281-286.

[9] 甄建辉,孙鹏远,巩文雯,等.核酸适配体生物传感器应用于食品抗生素残留检测的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(14):5577-5585.

[10] 霍祥宇,邵炜惠,王梁华,等.检测环境污染物的适配体生物传感器研究进展[J].生命的化学.2019,39(1):171-176.

[11] 郭圆斌,栗坤.核酸适配体在癌症诊断中的研究进展[J].化学通报,2021,84(1):40-46.

[12] Niazi J H, Lee S J, Kim Y S, et al. Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16: 7245-7253.

[13] Niazi J H, Lee S J, Kim Y S, et al. ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline [J]. Bioorganic & Medicinal

- Chemistry, 2008, 16: 1254-1261.
- [14] Tickner Z J, Zhong G C, Sheptack K R, et al. Selection of high-affinity RNA aptamers that distinguish between doxycycline and tetracycline [J]. *Biochemistry*, 2020, 59(37): 3473-3486.
- [15] Kwon Y S, Raston N H A, Gu M B. An ultra-sensitive colorimetric detection of tetracyclines using the shortest aptamer with highly enhanced affinity [J]. *Chem. Commun*, 2014, 50: 40.
- [16] 杜彩溢,杨川宇,刘文慧,等.核酸适配体传感器在四环素类抗生素检测中的应用[J].*食品安全质量检测学报*,2021,12(2):439-446.
- [17] Lu C X, Tang Z G, Liu B, et al. Magnetic-nanobead-based competitive enzyme-linked aptamer assay for the analysis of oxytetracycline in food [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(14): 4155-4163.
- [18] 刘金钊,吕珍珍,陈爱亮.适配体纳米金比色分析技术研究进展[J].*光谱学与光谱分析*,2014,34(8):2040-2046.
- [19] Zhou N D, Wang J Y, Zhang J, et al. Selection and identification of streptomycin-specific single-stranded DNA aptamers and the application in the detection of streptomycin in honey [J]. *Talanta*, 2013, 108: 109-116.
- [20] Song K M, Cho M, Jo H, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer [J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 415: 175-181.
- [21] 王琪,王欣.基于纳米金比色法可视化检测鸡蛋中的氟苯尼考[J].*食品与发酵工业*,2022,48(2):238-247.
- [22] Kim Y S, Kim J H, Kim I A, et al. A novel colorimetric aptasensor using gold nanoparticle for a highly sensitive and specific detection of oxytetracycline [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26: 1644-1649.
- [23] Chen A L, Jiang X B, Zhang W W, et al. High sensitive rapid visual detection of sulfadimethoxine by label-free aptasensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 42: 419-425.
- [24] 卢春霞,李红敏,孙凤霞,等.基于适配体识别的侧向层析法快速检测单核细胞增生李斯特氏菌[J].*食品与生物技术学报*,2020,4:85-92.
- [25] GB/T 27404-2008,实验室质量控制规范食品理化检验[S].
- [26] GB 31658.6-2021,食品安全国家标准动物性食品中四环素类药物残留量的测定高效液相色谱法[S].
- [27] Ping H, Zhang M W, Li H K, et al. Visual detection of melamine in raw milk by label-free silver nanoparticles [J]. *Food Control*, 2012, 23: 191-197.
- [28] GB/T 21317-2007,动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法[S].
- [29] 刘善菁,陆桂萍,刘雨昕,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肝中 4 种四环素类药物残留[J].*食品安全质量检测学报*,2021,12(11):4379-4387.
- [30] 农业部 1025 号公告-20-2008,动物性食品中四环素类药物残留检测酶联免疫吸附法[S].
- [31] 兰欣悦,刘宁宁,朱龙佼,等.四环素双价适配体非酶免标记传感器[J].*生物技术通报*,2022,38(3):276-284.
- [32] 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.
- [33] Tan B, Zhao H, Du L, et al. A versatile fluorescent biosensor based on target-responsive graphene oxide hydrogel for antibiotic detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 83(1): 267-273.
- [34] Taghdisi S M, Danesh N M, Ramezani M, et al. A novel M-shape electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of tetracyclines [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 85(1): 509-514.
- [35] Yang Y K, Yan W Y, Guo Y Y, et al. Sensitive and selective electrochemical aptasensor via diazonium-coupling reaction for label-free determination of oxytetracycline in milk samples [J]. *Sensors and Actuators Reports*, 2020, 2(1): 100009.