

综述

核酸探针在抗生素残留生物传感检测中的应用

颜玉婷, 王 乾, 周芳芳, 黄 悦*

(南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 抗生素作为动物治疗剂和生长促进剂广泛应用于农业、畜牧业、水产品养殖业, 导致动植物食品中抗生素残留量超标, 严重威胁人体健康。因此, 检测食品中抗生素残留具有重要意义。而现有的抗生素残留检测方法如微生物法、免疫学分析、液相色谱-质谱法、毛细管电泳等, 通常具有耗时长、操作复杂、成本高等缺点。生物传感器作为一种高新技术, 具有快速简单、灵敏度高、选择性好、成本低等特点, 在抗生素残留检测领域具有较大优势。核酸探针作为一种新型生物分析工具广泛应用于生物传感器的开发中, 将其引入抗生素残留的生物传感检测为实现抗生素残留的高效检测开辟了新途径。该文从电化学生物传感器、荧光生物传感器、比色生物传感器以及其他常见生物传感器方面综述了核酸探针在抗生素残留生物传感检测中的应用研究进展, 并展望了该领域未来的发展前景。

关键词: 抗生素; 残留; 核酸探针; 检测; 生物传感器

中图分类号: TS207.5; TP212.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 04-0783-08

Application of nucleic acid probes in biosensing detection of antibiotic residues

YAN Yuting, WANG Qian, ZHOU Fangfang, HUANG Yue*

(College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: Wide usage of antibiotics, as animal therapeutic agents and growth promoters, in agriculture, animal husbandry and aquatic product breeding lead to excessive antibiotic residues in animal and plant foods, which seriously threatens human health. Therefore, detection of antibiotic residues in food is of great significance. However, the existing detection methods, such as microbiological assay, enzyme-linked immunoassay, liquid chromatography-mass spectrometry, and capillary electrophoresis, usually have the disadvantages of time consuming, complex operation and high cost. Biosensors, a new technology with the advantages of being rapid and simple, high sensitivity, good selectivity and low cost, exhibit great potential for application in the field of antibiotic residue detection. Nucleic acid probe, a new tool for biological analysis, has been widely used in the biosensor development. Nucleic acid probe introduced for the biosensing detection of antibiotic residues opens up a new way for efficient detection. Herein, the application of nucleic acid probe in the biosensing detection of antibiotic residue is reviewed from the aspects of electrochemical biosensor, fluorescence biosensor, colorimetric biosensor and other common biosensors, and the future development directions are discussed.

Key words: antibiotic; residue; nucleic acid probe; detection; biosensor

抗生素是微生物在代谢活动中产生的次级代谢产物或者人工合成的类似物^[1], 因其具有抗菌活性强、抗菌谱广、作用迅速等优点^[2-3], 广泛应用于农业、畜牧业、水产养殖业等领域。但是由于抗生素

的滥用, 导致其在动植物性食品中残留超标, 进而通过食物链的富集效应危害人体健康^[3]。因此, 严格控制抗生素残留水平, 对保障人类身体健康和安全至关重要。常规的抗生素检测方法如高效液相色

收稿日期: 2022-05-09; 定用日期: 2022-08-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220448

基金项目: 国家自然科学基金 (31901771)

作者简介: 颜玉婷 (1998—), 女, 硕士生。联系人: 黄 悦 (1992—), 女, 讲师, E-mail: huangyue@njfu.edu.cn。

谱法、液相色谱-串联质谱法、免疫分析法,大多耗时长、设备昂贵、操作过程复杂^[4]。生物传感器作为一种新兴的检测分析方法,能够突破传统检测方法的局限性,在抗生素残留检测方面极具潜力。

生物传感器主要以生物活性物质为识别元件,并与物理化学检测元件或换能器相结合而制成^[5]。生物传感器主要由三部分组成:信号接收器、信号转导元件和信号输出装置^[6]。其中,信号接收器是指分子识别层与目标物相结合产生相应物理化学性质变化的一种功能元件;信号转导元件是指将信号接收器所产生的物理化学性质变化转换为电、光、力等可检测信号的一种换能器。这两个方面是生物传感器发展的重点,如何从这两个方面提高传感器的性能也是研究的热点。与传统方法相比,生物传感器具有使用简单、成本低廉、检测速度快、应用范围广泛等优势,将其引入抗生素残留检测具有广阔的发展空间^[5]。为了进一步提高生物传感器的性能,相关生物分析工具的开发与应用尤为重要。

长期以来,研究者致力于研究酶、细胞、抗体、分子印迹聚合物等生物分子对抗生素的特异性识别性质或快速响应能力。然而,上述生物分子通常具有生产成本高、易失活、难于修饰等缺点。作为一种新型生物分析工具,核酸探针吸引了越来越多研究者的兴趣。核酸探针是指以一段已知的 DNA 或 RNA 序列为基本单元构建的具有特殊功能的生物分析元件。按照其作用机理不同,可以将核酸探针分为核酸适配体探针、核酶探针、阴阳探针、分子信标、相邻探针、复合材料核酸探针等^[7]。近几年, TaqMan 探针^[8-9]、球形核酸探针^[10]、锁核酸探针^[11]等其他类型的探针在生物分子检测领域也有所应用。核酸探针在生物传感检测领域具有一些独特的优势^[12-13]。首先,核酸探针具有很好的设计灵活性,结构和功能多样化,可发挥分子识别、信号转导以及信号放大作用。其次,核酸探针易于合成、修饰和改造,为生物传感器的开发提供了有利条件。此外,核酸探针具有较好的生物相容性,适用于实际复杂样本的分析检测。鉴于以上优势,基于核酸探针的检测抗生素残留的生物传感器近年来得到了长足的发展,为抗生素残留的高效检测提供了新机遇。然而,目前基于核酸探针的生物传感器尚未成为抗生素残留检测的主流手段,限制因素主要是其在复杂实际食品样本中的稳定性和可重复性较差,这对核酸探针的功能化方案提出了更高的要求。本文主要从电化学生物传感器、荧光生物传感器、比色生物传感器 3 个方面综述了核酸探针在抗生素残留生物传感检测中的应用研究进展(图 1),并展望了该

领域未来的发展前景,以期对相关研究提供一定的借鉴。

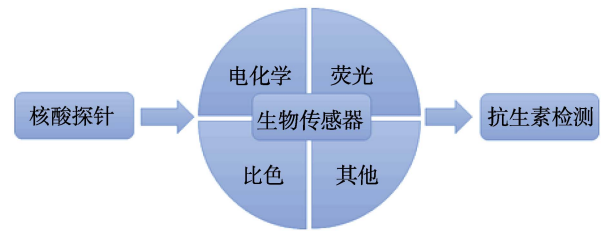


图 1 基于核酸探针的抗生素残留生物传感器

Fig. 1 Biosensors for the detection of antibiotic residues based on nucleic acid probe

1 基于核酸探针的检测抗生素残留电化学生物传感器

电化学生物传感器是指将分子识别层与靶标结合之后所发生的物化性质变化转化为电信号的一种生物传感器。其以电极作为转导基质,利用两电极或者三电极系统(工作电极、参比电极、对电极),通过电化学工作站输出相应的电位、电流、阻抗等信号。电化学传感器因其具有高选择性、高灵敏度、分析速度快、成本低廉、易于微型化等优势成为了近年来的研究热点^[14-15]。将核酸探针和电化学传感器的优异性能相结合,构建基于核酸探针的电化学生物传感器,为抗生素的高效检测提供了一个新平台。

电化学分析方法是电信号输出的重要手段,能有效反映电极表面的物理化学变化(图 2)。伏安法(如方波伏安法、差分脉冲伏安法、循环伏安法、线性扫描伏安法等)是用于检测食品中的多种污染物比较常见的电化学分析方法^[16]。近年来,方波伏安法和差分脉冲伏安法广泛应用于基于核酸探针的抗生素电化学检测中。HUANG 等^[17]利用多核酸探针协同作用构建电化学生物传感器,采用方波伏安法作为电化学分析方法,实现了对氯霉素的高效检测。如图 3A 所示(CAP 氯霉素; eT 为电子传递),目标物氯霉素触发核酸适配体探针发生构象变化,进而引发金属离子介导的 DNA 核酶探针循环切割修饰于电极表面的发夹探针,产生信号放大,实现了对氯霉素的高特异性和高灵敏性检测,并在实际牛奶样本中考察了传感器的分析性能。BAI 等^[18]设计与目标物核酸适配体序列互补的 DNA 探针并将其修饰于金电极表面,目标抗生素与核酸适配体的特异性结合触发核酸酶 P1 切割电极表面单链 DNA 探针产生电信号响应,开发了一种检测磺胺二甲氧嘧啶的电化学传感器。采用差分脉冲伏安法作为电化学分析方法,该电化学传感器对磺胺二甲氧嘧啶的线性检测范围为 0.1~500 nmol/L,检测限低至 0.038 nmol/L,

并在实际兽药和牛奶样本分析中得到了验证。除此以外, 基于核酸探针的抗生素电化学传感器常用的电化学分析方法还有电化学阻抗法^[19]。JAHANBANI 等^[20]通过对四环素单链核酸适配体进行改性设计核酸探针, 改性后的核酸适配体探针与目标物四环素特异性结合后发生相应的结构变化, 阻碍了电子的转移, 从而产生电阻信号变化以实现四环素的检测, 传感器的检测限低至 3.8×10^{-15} mol/L。在基于上述各电化学分析方法构建的电化学传感器中, 核酸适配体探针作为识别元件发挥了重要作用。核酸适配体探针与目标抗生素之间的特异性识别作用将触发核酸适配体探针分子构型发生变化或导致双探针分离, 进而简单地通过引入电化学分析技术进行表征, 以实现目标物的检测。但这种单纯的构型变化或双探针分离产生的检测灵敏度往往有限, 需引入信号放大技术, 如基于核酸的信号放大、酶催化信号放大或纳米材料信号放大, 从而达到高效、高灵敏检测的目的。另一方面, 人工体外筛选技术获得的核酸适配体可能存在亲和力低的缺陷, 还需改进体外筛选技术, 提高核酸适配体对目标抗生素的亲和力。近年来, 国内外研究者致力于改进传统指数富集的配体系统进化 (SELEX) 技术, 如采用阴性 SELEX、反向 SELEX 等技术, 引入专业分离技术 (流式细胞术、微流控技术、双核等离子表面共振技术等)、使用先进聚合酶链式反应 (PCR) 技术 (乳液 PCR、液滴式数字 PCR)、结合高通量测序过程, 大大改善了核酸适配体性能。此外, 竞争选择的配体系统进化技术已经被成功开发。大量研究表明, 这种筛选技术获得的核酸适配体与靶标的亲和力高于传统 SELEX 筛选技术, 并在实际应用中得到验证。但是上述技术应用范围较窄, 如何有效应用于抗生素等小分子领域仍需进一步研究。在改进体外筛选技术的同时, 可通过对核酸适配体序列进行改性以设计多个结合位点的多价核酸适配体探针, 提高其对目标抗生素的特异性和亲和力。

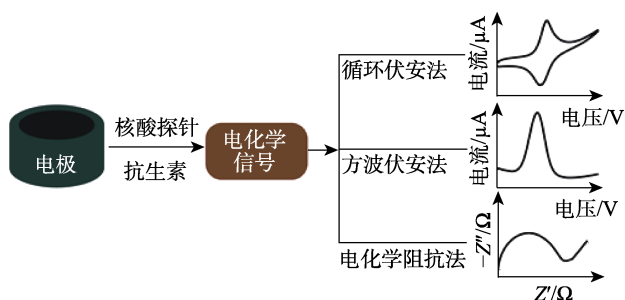


图 2 基于不同电化学分析方法的检测抗生素残留的生物传感器示意图

Fig. 2 Schematic diagram of biosensors for the detection of antibiotic residues based on different electrochemical analysis methods

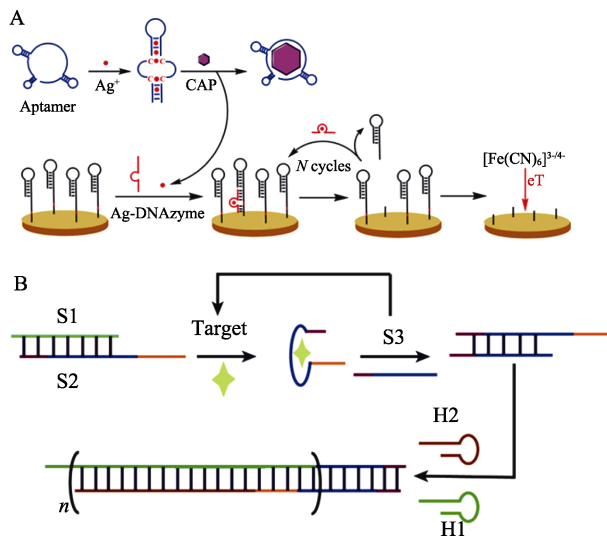


图 3 基于多核酸探针协同作用的氯霉素电化学生物传感器示意图 (A)^[17]; 目标抗生素触发核酸探针链式杂交反应示意图 (B)^[32]

Fig. 3 Schematic diagram of electrochemical biosensor for the detection of chloramphenicol based on synergistic action of nucleic acid probe (A)^[17]; Schematic diagram of target antibiotic-triggered chain hybridization reaction of nucleic acid probe (B)^[32]

为了进一步提高抗生素电化学传感器的分析性能, 通常采用的方法有以下两种。一种是引入具有独特光学、电磁学和化学反应性能的纳米材料, 如金属及金属氧化物纳米材料、碳及氮掺杂碳纳米材料、导电聚合物纳米材料等^[21-24]。复合纳米材料制备的功能化核酸探针生物相容性高、稳定性好, 有利于提高电化学生物传感器的稳定性、可重复性及准确性, 并有望应用于复杂实际样品检测。金属有机框架 (MOF) 作为一种具有独特物理化学性质的新型纳米材料^[25-26], 为抗生素残留电化学传感器的构建提供了有力支持。CHEN 等^[27]基于 Y 型 DNA 探针联合 MOF 作为纳米信号标记, 构建了一种新型多种抗生素同时检测的电化学传感器, 实现了对氯霉素和土霉素的高效检测, 检测限分别为 33 和 48 fmol/L。此外, 引入信号放大技术可以有效提高电化学传感器的分析性能。WANG 等^[28]设计多种 DNA 发夹探针及单链辅助探针, 联合 Phi29 聚合酶辅助的靶标循环扩增和核酸外切酶 III (ExoIII) 辅助的次生靶标循环策略, 构建了检测卡那霉素的电化学传感器。该方法巧妙设计核酸探针结合酶辅助的多重循环信号放大, 利用 Phi29 聚合酶、限制性内切酶 Nt.A1wI、ExoIII 酶的特性, 实现了靶标和次生靶标的循环利用, 从而达到了多重信号放大的效果, 提高了检测的灵敏度, 同时更简便快速。由于酶的价格比较昂贵, 制备过程复杂, 且活性易受环境的影响, 限制了基于酶辅助信号放大的电化学传感器在

实际样品检测中的应用。因此,基于功能化核酸探针的无酶辅助信号放大技术受到了广泛关注^[29-31],为构建稳定、抗干扰的抗生素残留电化学传感器提供了极大的便利。HONG 等^[32]巧妙设计识别探针,并在辅助探针的作用下实现靶标循环利用,同时设计发夹探针 H1 与 H2 在靶标触发下进行链杂交反应产生信号放大(图 3B,其中, S1、S2、S3 均为单链核酸探针, H1、H2 为两种发夹结构的核酸探针),构建了一种无酶无标记的电化学传感器。该电化学传感器在对卡那霉素的检测中表现出了高灵敏性和特异性,检测限为 16 fmol/L。在上述电化学传感器中, Y 型 DNA 探针和发夹探针因具有结构灵活性和构象稳定性,在目标物识别、信号触发和扩增方面具有重要作用。但以上探针序列设计较复杂,可能产生背景信号高、假阳性等问题。为此,研究者们致力于优化设计核酸探针序列、开发比率型电化学传感器,或在电化学传感器中引入多重核酶或无酶辅助信号放大策略、构建磁性核酸探针并结合磁珠分离策略,以降低背景信号干扰和减少假阳性信号。

2 基于核酸探针的检测抗生素残留荧光生物传感器

荧光生物传感器是指将具有荧光效应的标记物通过静电吸附作用、共价作用以及亲和素-生物素等系统作用偶联于分子识别层上,并且根据所发生的荧光强度变化对靶标进行定性定量检测的生物传感器^[33]。荧光传感器具有不受温度、气体等因素影响,使用寿命长,性价比高等优势^[34-35]。将具有特殊功能的核酸探针融入荧光生物传感器的设计中,可开发抗生素残留高效检测新方法。

基于核酸探针构建抗生素残留荧光传感器,可以利用靶标触发的探针结构转变引发荧光强度的变化,从而对目标抗生素进行检测分析。DEGHANI 等^[36]基于双链 DNA 探针对接孔二氧化硅纳米颗粒的封端作用,构建了一种无标记的荧光传感器,用于检测卡那霉素。目标物卡那霉素的存在导致双链 DNA 探针分离为单链,使得填充二氧化硅微孔的荧光基团(罗丹明 B)得到释放,从而使荧光强度发生变化。在最适条件下,该传感器对卡那霉素的线性检测范围为 24.75~137.73 nmol/L,检测限为 7.5 nmol/L。SUN 等^[37]以 G-四链体结构核酸适配体为识别探针,以噻唑橙为荧光染料,构建了一种无标记的荧光传感器(图 4A),实现了对四环素的高效检测。识别探针与靶标四环素之间的特异性识别与结合使得探针的 G-四链体结构发生变化,导致荧光染料噻唑橙

嵌入 G-四链体所产生的荧光信号降低,从而建立荧光强度与四环素浓度之间的关系。该方法简便快速,检测限为 0.029 $\mu\text{g/mL}$,且与其他常见抗生素的交叉反应可忽略不计,证明其对四环素检测具有较好的灵敏性和选择性。在基于核酸探针的抗生素残留荧光传感检测中,核酸探针不仅可以作为识别元件,还可以作为信号转换和放大元件,提高传感器的分析性能。LUO 等^[38]以核酸适配体作为识别探针,设计互补 DNA 探针作为信号转导元件,设计 Taqman 探针为信号探针,目标物与识别探针的特异性结合导致互补 DNA 探针与信号探针形成杂交双链,进而引发切口酶辅助的信号放大反应,实现对氨苄西林的高特异性和高灵敏性检测。

传统荧光基因标记通常存在稳定性差、灵敏度低、检测背景复杂等缺点^[39],利用纳米材料独特的荧光性质构建复合材料核酸探针可以有效克服传统荧光传感器的缺点,从而提高传感器在含复杂基质样品中的稳定性和可重复性。在基于核酸探针的抗生素荧光生物传感检测中,量子点、上转换纳米颗粒等无毒、稳定、生物相容性好的纳米材料被广泛应用^[40-41]。HE 等^[42]以核酸适配体作为识别探针,结合石墨烯量子点和氧化石墨烯的独特性质,构建了一种关-开荧光法检测磺胺二甲嘧啶的荧光生物传感器(图 4B)。该方法利用了石墨烯量子点突出的荧光特性,同时以氧化石墨烯作为荧光猝灭剂,降低了实验背景信号,提高了传感器的灵敏度。LIU 等^[43]设计核酸探针并与上转换纳米颗粒的发光特性相结合,构建了一种荧光生物传感器用于磺胺二甲氧嘧啶的检测,该传感器对磺胺二甲氧嘧啶的检测限低至 0.11 ng/mL,并成功应用于实际鱼样本的检测中。

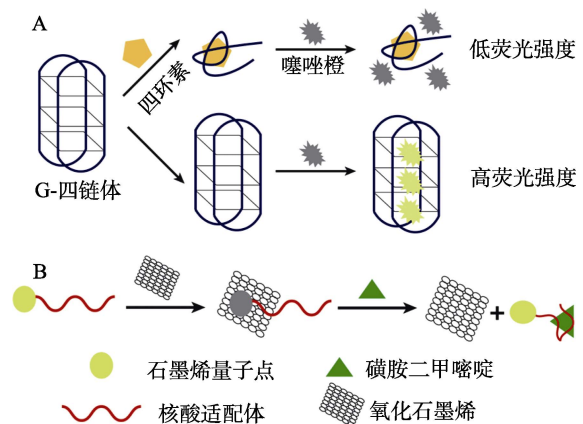


图 4 基于 G-四链体核酸探针的四环素荧光生物传感器示意图(A)^[37];基于核酸探针偶联石墨烯纳米材料的磺胺二甲嘧啶荧光生物传感器示意图(B)^[42]

Fig. 4 Schematic diagrams of fluorescence biosensors for the detection of tetracycline based on G-quadruplex probe (A)^[37] and sulfamethazine based on nucleic acid probe coupled with graphene nanomaterial (B)^[42]

核酸探针因具有易于修饰与功能化的特点, 在构建标记型抗生素残留荧光传感器中具有一定的优势。但荧光标记型核酸探针通常存在成本高、合成过程复杂、灵敏度低等缺陷, 因此, 构建非标记型荧光传感器是一种较好的选择, 如引入具有突出荧光特性和信号放大功能的纳米材料与核酸探针协同作用, 进一步提高抗生素荧光生物传感器的检测性能。在过去的几十年里, 各具荧光特性的复合材料核酸探针不断涌现, 但其荧光性能有待进一步提高, 未来需开发高光稳定性、高光致发光效率、可调控的荧光纳米材料并研究其发光机制, 为建立基于核酸探针的检测抗生素残留荧光生物传感器提供新思路。

3 基于核酸探针的检测抗生素残留比色生物传感器

比色生物传感器是指以生色试剂的显色反应为基础, 将系统中的物化性质转换成可视化颜色的变化, 并通过比较或者测量颜色变化的程度来确定目标物的量的一种生物传感器。比色传感器所发生的颜色变化用肉眼即可判断^[44], 具有简单、易操作、分析速度快、成本低等优势^[45-47]。基于核酸探针的特异性识别、信号转换与放大功能, 可构建比色生物传感器用于抗生素残留的检测分析。LUAN 等^[48]构建了一种 m-L-DNA 探针, 此探针由修饰于磁纳米颗粒上的发夹探针 H1 和修饰于金属有机框架-铂纳米颗粒复合材料 (NMOF-Pt) 上的信号 DNA 探针杂交而成 (图 5A, 其中, NMOF 为氨基功能化金属有机框架; TMB 为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺)。目标物卡那霉素触发 m-L-DNA 探针与辅助探针 H2 产生催化发夹组装辅助的靶标循环信号放大, 提高了传感器的灵敏度, 检测限为 0.2 pg/mL。此外, 该传感器对卡那霉素表现出极高的选择性, 并可于 30 min 内准确地检测出牛奶中卡那霉素的含量。CUI 等^[49]设计了两个发夹探针 (HP1 和 HP2)、适配体-引物杂交双链探针 (Ap-Pr) 以及辅助探针, 在目标物卡那霉素的触发下, 核酸探针发生结构变化及相互作用, 随后引入限制性内切酶 Nt.A1wI 产生双重信号放大。该传感器背景信号低, 简单、快速且成本低, 对卡那霉素检测具有突出的特异性和灵敏性, 检测限低至 14.7 pmol/L。

传统的生色试剂通常存在不可重复使用、易受背景因素影响等缺点, 为了进一步提高比色传感器的分析性能, 能够产生颜色变化的纳米材料广受关注。其中, 金纳米颗粒因其优异的局部表面等离子体共振和高消光系数, 及其从分散到聚集状态所产生的相应颜色 (从酒红到紫色) 和吸光度变化^[50-51],

在比色传感器构建中应用广泛, 推动了基于核酸探针的检测抗生素残留比色传感器的发展。LI 等^[52]利用卡那霉素核酸适配体与其互补序列构建双链 DNA 探针, 引入核酸外切酶 I 降解单链 DNA 的同时产生靶标循环信号放大, 最终利用金纳米颗粒和单链 DNA 对鱼精蛋白的竞争性结合对靶标卡那霉素产生颜色响应 (图 5B)。所构建的比色传感器对卡那霉素表现出较宽的线性检测范围, 同时表现出出色的选择性和灵敏性, 检测限低至 2.8×10^{-14} mol/L。RAMEZANI 等^[53]设计 DNA 三螺旋分子开关为识别探针, 以金纳米颗粒为生色元件, 构建了一种灵敏、快速的比色传感器, 用于检测四环素, 并成功应用于牛奶样品的检测。

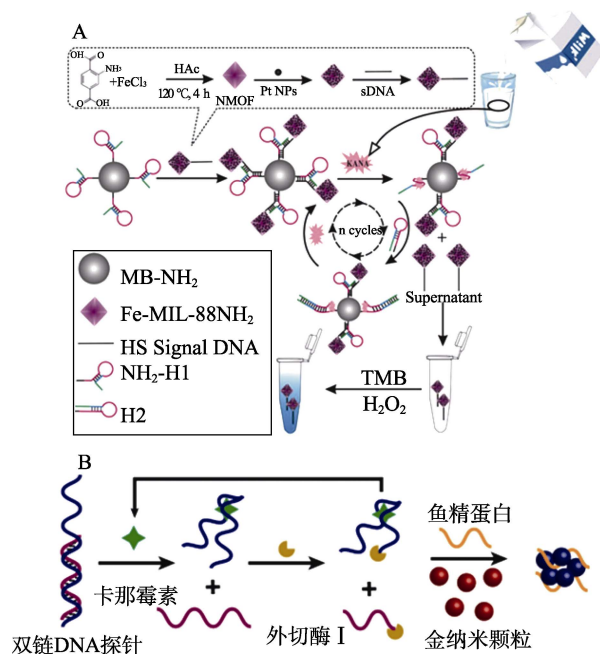


图 5 基于 m-L-DNA 探针的卡那霉素比色生物传感器示意图 (A)^[48]; 基于 DNA 探针偶联金纳米颗粒的卡那霉素比色生物传感器 (B)^[52]

Fig. 5 Schematic diagram of colorimetric biosensor for the detection of kanamycin based on m-L-DNA probe (A)^[48]; Schematic diagram of colorimetric biosensor for the detection of kanamycin based on DNA probe coupled with gold nanoparticles (B)^[52]

比色生物传感器对抗生素残留的响应便捷、直观, 但灵敏度是基于核酸探针的抗生素比色传感器发展的关键。引入核酸探针自组装信号放大策略以及纳米探针是提高灵敏度的有效方式。考虑到实际食品样本的颜色多样性, 为避免干扰, 需根据具体情况设计相适应的核酸探针及比色传感检测方案, 同时采用快捷、有效的样品预处理方法。此外, 为避免主观偏差, 比色传感体系中产生的颜色变化需联用精确智能电子设备, 以提高其准确性和可靠性。

4 核酸探针在其他常见检测抗生素残留生物传感器中的应用

悬臂式传感器是利用目标物与识别分子结合后,功能化的与非功能化的悬臂之间产生的表面应力差异使得悬臂弯曲,并通过监测从悬臂梁反射到位置敏感探测器上的激光束的位置来确定悬臂梁的变形量。作为一种无标记的传感器,悬臂式传感器具有检测限低、成本低、分析速度快、易于操作等优势^[54]。将功能和结构性质丰富多样的核酸探针与悬臂式传感器相结合,可以提高悬臂式传感器的选择性、灵敏度等分析性能。因此,基于核酸探针的悬臂式传感器在抗生素检测领域有很大的发展潜力。HOU 等^[55]构建了一种以核酸适配体 DNA 为识别探针的微型悬臂阵列,用于定量分析土霉素(图 6,其中,OTC 为土霉素)。识别探针与土霉素特异性结合后,功能化悬臂因为表面应力的变化而发生弯曲,悬臂的偏转幅度与土霉素浓度在 1.0~100 nmol/L 范围内存在良好的线性关系,且该传感器的检测限为 0.2 nmol/L。BAI 等^[56]以核酸适配体设计识别探针构建了微型悬臂阵列传感器,实现了对卡那霉素的高灵敏性和高特异性检测。

表面增强拉曼散射传感器是将待测分子吸附于金属表面产生局部表面等离子共振效应并促使拉曼散射信号增强的一种分析技术,其因具有灵敏度高、特异性高、样品制备简单等优势而受到广泛关注^[57-58]。JIANG 等^[59]利用核酸适配体与其互补序列设计 DNA 双链识别探针,结合 Au@AgNPs 构建了一种

表面增强拉曼散射传感器,用于卡那霉素的高灵敏性和高特异性检测。修饰于纳米颗粒上的 DNA 双链探针特异性识别卡那霉素后,带有拉曼散射信号分子 Cy3 的适配体互补探针被释放,从而根据输出的拉曼散射响应对卡那霉素进行定量分析。所构建的传感器对卡那霉素在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-11}$ g/mL 的线性范围内表现出良好的线性关系,克服了传统检测方法操作繁琐、耗时长等优点,并可应用于实际牛奶样本中卡那霉素的检测分析。

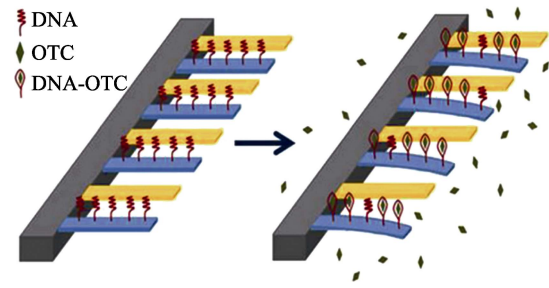


图 6 基于核酸探针的土霉素悬臂式传感器示意图^[55]
Fig. 6 Schematic diagram of cantilever array sensor for the detection of oxytetracycline based on nucleic acid probe^[55]

在上述两类抗生素残留生物传感器中,所运用的核酸探针局限于核酸适配体,其他类型核酸探针涉及较少,检测灵敏度较低。优化设计多功能集成型核酸探针是可进一步探索的方向,在提高检测性能的同时减少检测时间和成本。不同抗生素残留检测方法比较见表 1。

表 1 不同抗生素残留检测方法比较
Table 1 Comparison of different methods for antibiotics detection

方法	目标物	检测范围	检测限
电化学传感器(适配体探针) ^[20]	四环素	$1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L	3.8×10^{-15} mol/L
电化学传感器(发夹探针) ^[28]	卡那霉素	0.005~100 pmol/L	1.3 fmol/L
荧光传感器(双链 DNA 探针) ^[36]	卡那霉素	24.75~137.73 nmol/L	7.5 nmol/L
荧光传感器(G-四链体探针) ^[37]	四环素	0.05~100 μ g/mL	0.029 μ g/mL
比色传感器(m-L-DNA 探针) ^[48]	卡那霉素	0.0005~30 ng/mL	0.2 pg/mL
比色传感器(三螺旋分子开关探针) ^[53]	四环素	0.3~10 nmol/L	266 pmol/L
高效液相色谱法 ^[60]	氯霉素、四环素	10~600 nmol/L	3.02、3.52 nmol/L
液相色谱-串联质谱法 ^[61]	36 种不同抗生素	0.3~27.6 μ g/kg	0.1~9.2 μ g/kg
免疫分析法 ^[62]	磺胺二甲嘧啶	0.033~33 ng/mL	0.026 ng/mL

5 结束语与展望

检测食品中抗生素残留水平对保障人类健康和安

全具有重要意义,生物传感器与传统分析方法相比在抗生素残留检测领域具有较大优势和潜力。核酸探针作为一种新型生物分析工具,具有结构和功

器、比色生物传感器 3 个方面综述了核酸探针在抗生素残留生物传感检测中的应用研究进展。

虽然核酸探针在抗生素检测方面显示出了较大潜力,但目前基于核酸探针的生物传感器尚未成为抗生素残留检测的主流手段。技术层面的一个关键问题是核酸探针的设计及功能化。鉴于实际食品样本比较复杂,需要在应用过程中保证较好的稳定性和准确性,这对核酸探针的功能化方案提出了更高的要求。针对食品样本的多样化,需要设计相适应的功能化核酸探针及传感检测方案,如何在发挥核酸探针优势的同时降低检测成本、实现快速实时检测是需要考虑的问题。另一方面,针对食品安全检测的需求,基于核酸探针的生物传感器需满足商业层面标准化流程生产的要求,这对于传感器的实际应用具有重要意义。此外,单读数信号传感分析结果可能受到背景信号的干扰,需结合多种生物检测技术并进一步优化信号输出方案。未来,将生物传感技术与纳米技术、3D 打印技术、分子工程等相关技术手段进行联合,开发真正意义上的一步分析平台,得益于电子器件的微型化与试纸的便携性,基于核酸探针的生物传感器发展趋势可能呈现微型化与便携化趋势,从而有利于抗生素残留的实时检测;其次,设计高性能的位点特异性、功能多样化的核酸探针,构建微阵列或芯片传感器,将有望实现多种抗生素残留的同时检测或高通量检测,从而降低检测成本,同时满足实际食品检测对于准确性与稳定性的需求;此外,将核酸探针巧妙结合多种现代分离与检测技术,设计多重信号输出方案,构建多重读数信号传感器,可满足实际抗生素检测应用过程中对于传感器精确性与可靠性的要求;最后,将基于核酸探针的生物传感技术与智能型设备或自动化仪器联用,将使得抗生素残留生物传感器向智能型、自动化方向发展,为食品安全检测提供可靠的支持和服务。

参考文献:

- [1] ZHENG J J (郑景娇). Analysis on the application of common detection techniques for antibiotic residues in food[J]. Journal of Food Safety and Quality (食品安全质量检测学报), 2020, 11(21): 7884-7889.
- [2] MENKEM Z E, NGANGOM B L, TAMUNJOH S S A, *et al.* Antibiotic residues in food animals: Public health concern[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(5): 411-415.
- [3] LIU Y Z (刘彦钊), ZHANG L L (张丽丽), XU T (徐挺), *et al.* Application progress of modern biotechnology in the detection of antibiotic residues in animal-derived foods[J]. China Food Additives (中国食品添加剂), 2020, 31(12): 122-130.
- [4] WANG Q, ZHAO W M. Optical methods of antibiotic residues detections: A comprehensive review[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 269: 238-256.
- [5] MAJIDINASAB M, MISHRA R K, TANG X Q, *et al.* Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 127: 115883.
- [6] GOODE J A, RUSHWORTH J V H, MILLNER P A. Biosensor regeneration: A review of common techniques and outcomes[J]. Langmuir, 2015, 31(23): 6267-6276.
- [7] ZHANG Y (张园), ZHANG H X (张海霞). Nucleic acid probe and its application in biological analysis[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory (分析实验室), 2020, 39(9): 1002-1012.
- [8] LIU Y M, QIU L, SHENG A Z, *et al.* Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using TaqMan probe real-time PCR[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 151: 191-196.
- [9] YU Y B, LI R, MA Z H, *et al.* Development and evaluation of a novel loop mediated isothermal amplification coupled with TaqMan probe assay for detection of genetically modified organism with NOS terminator[J]. Food Chemistry, 2021, 356: 129684.
- [10] GAO P, LIU B, PAN W, *et al.* A spherical nucleic acid probe based on the Au-Se bond[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(12): 8459-8463.
- [11] PUENTE-LELIEVRE C, EISCHEID A C. Development and validation of a duplex real-time PCR assay with locked nucleic acid (LNA) probes for the specific detection of allergenic walnut in complex food matrices[J]. Food Control, 2021, 121: 107644.
- [12] WANG D X, WANG J, WANG Y X, *et al.* DNA nanostructure-based nucleic acid probes: Construction and biological applications[J]. Chemical Science, 2021, 12: 7602-7622.
- [13] ZHAO F R, XIE S Y, LI B Z, *et al.* Functional nucleic acids in glycobiology: A versatile tool in the analysis of disease-related carbohydrates and glycoconjugates[J]. International Journal of Biological Macromol, 2022, 201: 592-606.
- [14] HRIQUA A, LOUDIKI A, FARAH A, *et al.* Recent advances in electrochemical sensors for amoxicillin detection in biological and environmental samples[J]. Bioelectrochemistry, 2021, 137: 107687.
- [15] LIANG T T, QIN X L, XIANG Y H, *et al.* Advances in nucleic acids-scaffolded electrical sensing of extracellular vesicle biomarkers[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022, 148: 116532.
- [16] ZHANG K, LI H Y, WANG W J, *et al.* Application of multiplexed aptasensors in food contaminants detection[J]. ACS Sensors, 2020, 5(12): 3721-3738.
- [17] HUANG Y, ZHENG J, WANG L, *et al.* Sensitive detection of chloramphenicol based on Ag-DNAzyme-mediated signal amplification modulated by DNA/metal ion interaction[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 127: 45-49.
- [18] BAI Z H, CHEN Y, LI F, *et al.* Electrochemical aptasensor for sulfadimethoxine detection based on the triggered cleavage activity of nuclease P1 by aptamer-target complex[J]. Talanta, 2019, 204: 409-414.
- [19] LIU X G, HUANG D L, LAI C, *et al.* Recent advances in sensors for tetracycline antibiotics and their applications[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018, 109: 260-274.
- [20] JAHANBANI S, BENVIDI A. Comparison of two fabricated aptasensors based on modified carbon paste/oleic acid and magnetic bar carbon paste/Fe₃O₄@oleic acid nanoparticle electrodes for tetracycline detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 85: 553-562.
- [21] WONGKAEW N, SIMSEK M, GRIESCHE C, *et al.* Functional nanomaterials and nanostructures enhancing electrochemical biosensors and Lab-on-a-Chip performances: Recent progress, applications, and future perspective[J]. Chemical Reviews, 2019, 119(1): 120-194.
- [22] CHEN Y, LIU B, CHEN Z B, *et al.* Innovative electrochemical sensor using TiO₂ nanomaterials to detect phosphopeptides[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(30): 10635-10643.
- [23] SANKO V, SENOCAK A, TUMAY S O, *et al.* An electrochemical sensor for detection of trace-level endocrine disruptor bisphenol A using Mo₂Ti₂AlC₃ MAX phase/MWCNT composite modified electrode[J]. Environmental Research, 2022, 212: 113071.
- [24] HIRA S A, YUSUF M, ANNAS D, *et al.* Recent advances on conducting polymer-supported nanocomposites for nonenzymatic electrochemical sensing[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2021, 60(37): 13425-13437.

- [25] TAJIK S, BEITOLLAHI H, NEJAD F G, *et al.* Recent electrochemical applications of metal-organic framework-based materials[J]. *Crystal Growth & Design*, 2020, 20(10): 7034-7064.
- [26] SUN Z W, PENG Y, WANG M H, *et al.* Electrochemical deposition of Cu metal-organic framework films for the dual analysis of pathogens[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(25): 8994-9001.
- [27] CHEN M, GAN N, LI T H, *et al.* An electrochemical aptasensor for multiplex antibiotics detection using Y-shaped DNA-based metal ions encoded probes with NMOF substrate and CSRP target-triggered amplification strategy[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 968: 30-39.
- [28] WANG H Z, WANG Y, LIU S, *et al.* Signal-on electrochemical detection of antibiotics at zeptomole level based on target-aptamer binding triggered multiple recycling amplification[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80: 471-476.
- [29] WANG X K, SHANG H Z, MA C P, *et al.* A fluorescence assay for exosome detection based on bivalent cholesterol anchor triggered target conversion and enzyme-free signal amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(24): 8493-8500.
- [30] LING P H, WANG L Y, CHENG S, *et al.* Ultrasensitive electrochemical biosensor for protein detection based on target-triggering cascade enzyme-free signal amplification strategy[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1202: 339675.
- [31] LV Y X, SUN Y Y, LIU W J, *et al.* Enzyme-free dual-amplification assay for colorimetric detection of tetracycline based on Mg²⁺-dependent DNAzyme assisted catalytic hairpin assembly[J]. *Talanta*, 2022, 241: 123214.
- [32] HONG F, CHEN X X, CAO Y T, *et al.* Enzyme- and label-free electrochemical aptasensor for kanamycin detection based on double stir bar-assisted toehold-mediated strand displacement reaction for dual-signal amplification[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 112: 202-208.
- [33] YUAN X C (袁晓春). Advances in optical biosensors for detection of antibiotics[J]. *Feed Review (饲料博览)*, 2018, (11): 43-46.
- [34] YANG Y X, GHALANDARI B, LIN L Y, *et al.* A turn-on fluorescence sensor based on Cu²⁺ modulated DNA-templated silver nanoclusters for glyphosate detection and mechanism investigation[J]. *Food Chemistry*, 2022, 367: 130617.
- [35] WANG S, CHEN H Y, XIE H L, *et al.* A novel thioctic acid-carbon dots fluorescence sensor for the detection of Hg²⁺ and thiophanate methyl *via* S-Hg affinity[J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128923.
- [36] DEHGHANI S, DANESH N M, RAMEZANI M, *et al.* A label-free fluorescent aptasensor for detection of kanamycin based on dsDNA-capped mesoporous silica nanoparticles and Rhodamine B[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1030: 142-147.
- [37] SUN C Y, SU R F, BIE J X, *et al.* Label-free fluorescent sensor based on aptamer and thiazole orange for the detection of tetracycline[J]. *Dyes and Pigments*, 2018, 149: 867-875.
- [38] LUO Z W, WANG Y M, LU X Y, *et al.* Fluorescent aptasensor for antibiotic detection using magnetic bead composites coated with gold nanoparticles and a nicking enzyme[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 984: 177-184.
- [39] FENG T T (冯婷婷). Research progress and application of nanometer fluorescence biosensor[J]. *Biological Chemical Engineering (生物化工)*, 2017, 3(6): 78-81.
- [40] ZHANG W S, ZHONG H D, ZHAO P P, *et al.* Carbon quantum dot fluorescent probes for food safety detection: Progress, opportunities and challenges[J]. *Food Control*, 2022, 133: 108591.
- [41] XU J, LI H H, ARUMUGAM S S, *et al.* A turn-on fluorescence sensor for rapid sensing of ATP based on luminescence resonance energy transfer between upconversion nanoparticles and Cy3 *in vivo* or *in vitro*[J]. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 265: 120341.
- [42] HE Y H, ZHANG B Y, FAN Z F. Aptamer based fluorometric sulfamethazine assay based on the use of graphene oxide quantum dots[J]. *Mikrochim Acta*, 2018, 185(3): 163-171.
- [43] LIU X Y, GAO T F, GAO X, *et al.* An aptamer based sulfadimethoxine assay that uses magnetized upconversion nanoparticles[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(9): 3557-3563.
- [44] ABEDALWAF A M, LI Y, NI C F, *et al.* Colorimetric sensor arrays for the detection and identification of antibiotics[J]. *Analytical Methods*, 2019, 11: 2829-2844.
- [45] SUN L, ROTARU A, ROBEYNS K, *et al.* A colorimetric sensor for the highly selective, ultra-sensitive, and rapid detection of volatile organic compounds and hazardous gases[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2021, 60(24): 8788-8798.
- [46] KHANSILI N, KRISHNA M P. Sensitive metal oxide-clay nanocomposite colorimetric sensor development for aflatoxin detection in foods: Corn and almond[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(23): 14911-14925.
- [47] DONG Y, WAN L, LV S, *et al.* Construction of a molybdenum disulfide-based colorimetric sensor for label-free infectious disease analysis coupled with a catalyzed hairpin assembly reaction[J]. *Langmuir*, 2022, 38(5): 1791-1796.
- [48] LUAN Q, GAN N, CAO Y T, *et al.* Mimicking an enzyme-based colorimetric aptasensor for antibiotic residue detection in milk combining magnetic loop-DNA probes and CHA-assisted target recycling amplification[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(28): 5731-5740.
- [49] CUI X J, LI R G, LIU X F, *et al.* Low-background and visual detection of antibiotic based on target-activated colorimetric split peroxidase DNAzyme coupled with dual nicking enzyme signal amplification[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 997: 1-8.
- [50] ETEDALI P, BEHBAHANI M, MOHABATKAR H, *et al.* Field-usable aptamer-gold nanoparticles-based colorimetric sensor for rapid detection of white spot syndrome virus in shrimp[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737628.
- [51] CHEN G Y, ZHANG C Y, YIN S J, *et al.* Highly sensitive visual colorimetric sensor for trichlorfon detection based on the inhibition of metallization of gold nanorods[J]. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 270: 120850.
- [52] LI J W, LIU Y M, LIN H, *et al.* Label-free exonuclease I-assisted signal amplification colorimetric sensor for highly sensitive detection of kanamycin[J]. *Food Chemistry*, 2021, 347: 128988.
- [53] RAMEZANI M, DANESH N M, LAVAEE P, *et al.* A novel colorimetric triple-helix molecular switch aptasensor for ultrasensitive detection of tetracycline[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 70: 181-187.
- [54] GAUDIN V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin-A comprehensive review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 90: 363-377.
- [55] HOU H, BAI X J, XING C Y, *et al.* Aptamer-based cantilever array sensors for oxytetracycline detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(4): 2010-2014.
- [56] BAI X J, HOU H, ZHAN B L, *et al.* Label-free detection of kanamycin using aptamer-based cantilever array sensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 56: 112-116.
- [57] YUE F L, LI F L, KONG Q Q, *et al.* Recent advances in aptamer-based sensors for aminoglycoside antibiotics detection and their applications[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 762: 143129.
- [58] RICHTER L, ALBRYCHT P, KSIEZOPOLSKA-GOCALSKA M, *et al.* Fast and efficient deposition of broad range of analytes on substrates for surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 156: 112124.
- [59] JIANG Y F, SUN D W, PU H B, *et al.* Ultrasensitive analysis of kanamycin residue in milk by SERS-based aptasensor[J]. *Talanta*, 2019, 197: 151-158.
- [60] VURAN B, ULUSOY H I, SARP G, *et al.* Determination of chloramphenicol and tetracycline residues in milk samples by means of nanofiber coated magnetic particles prior to high-performance liquid chromatography-diode array detection[J]. *Talanta*, 2021, 230: 122307.
- [61] LOUPPIS A P, KONTOMINAS M G, PAPASTEPHANOU C. Determination of antibiotic residues in honey by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(10): 3385-3397.
- [62] FANG B L, HU S, WANG C, *et al.* Lateral flow immunoassays combining enrichment and colorimetry-fluorescence quantitative detection of sulfamethazine in milk based on trifunctional magnetic nanobeads[J]. *Food Control*, 2019, 98: 268-273.