

功能材料

# 基于末端脱氧核苷酸转移酶协同 G-四链体核酶的恩诺沙星检测方法

王 乾, 颜玉婷, 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:** 基于末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 协同 G-四链体核酶设计信号放大策略, 建立了一种恩诺沙星电化学检测方法。目标物恩诺沙星与特异性核酸适配体的结合触发 TdT 在电极表面的扩增反应, 产生 G-四链体核酶纳米线结构, 进而发挥辣根过氧化物酶活性催化信号放大, 实现恩诺沙星的高灵敏和高特异性检测。该方法对恩诺沙星的线性检测范围为 0.5~50  $\mu\text{g/L}$ , 检测限低至 0.043  $\mu\text{g/L}$ 。此外, 该无标记电化学传感器简单快速, 成本低, 并成功应用于对实际食品样本的分析检测, 显示出较好的应用潜能。

**关键词:** 末端脱氧核苷酸转移酶; G-四链体核酶; 信号放大; 恩诺沙星; 灵敏检测; 功能材料

**中图分类号:** O657.1; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 12-2659-07

## A method for enrofloxacin detection based on collaborative signal amplification by terminal deoxynucleotidyl transferase with G-quadruplex ribozyme

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

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

**Abstract:** A electrochemical method for enrofloxacin detection was established based on the signal amplification strategy designed by collaborating terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) with G-quadruplex ribozyme. The binding of target enrofloxacin with specific aptamer triggered the extension reaction of TdT on the electrode surface, resulting in the formation of G-quadruplex ribozyme nanowires which mimicked horseradish peroxidase activity to catalyze signal amplification, and finally achieving highly sensitive and specific detection of enrofloxacin. The linear detection range of this method for enrofloxacin was 0.5~50  $\mu\text{g/L}$  with the detection limit as low as 0.043  $\mu\text{g/L}$ . In addition, the label free electrochemical biosensor is simple, fast and low cost, and has been successfully applied to the analysis of real food samples, showing good application potential.

**Key words:** terminal deoxynucleotidyl transferase; G-quadruplex ribozyme; signal amplification; enrofloxacin; sensitive detection; functional materials

恩诺沙星 (ENR) 作为一种人工化学合成的喹诺酮类抗菌药物, 因对革兰氏阳性及革兰氏阴性菌均具有良好的抑制作用而广泛应用于动植物疾病治疗<sup>[1-3]</sup>。但 ENR 的不恰当使用甚至滥用会导致其在动植物食品中残留量超标, 进而可通过食物链富集

效应对人体产生多种不良影响, 包括皮肤过敏、肠道菌群紊乱、致癌性突变等<sup>[4-5]</sup>。因此, 研究开发 ENR 检测方法对保障食品安全与人类健康具有重要意义。目前, 用于 ENR 残留检测的方法主要有高效液相色谱法<sup>[6]</sup>、免疫层析法<sup>[7]</sup>、石英晶体微天平法<sup>[8]</sup>、

收稿日期: 2023-05-23; 定用日期: 2023-07-25; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230416

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31901771)

作者简介: 王 乾 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: 1565033726@qq.com。联系人: 黄 悦 (1992—), 女, 讲师, E-mail: huangyue@njfu.edu.cn。

化学发光免疫测定法<sup>[9]</sup>、表面增强拉曼散射法<sup>[10]</sup>等。然而, 这些传统方法通常具有耗时长、成本高、操作过程复杂或灵敏度低等缺陷, 难以满足实际抗生素残留检测的高标准要求。因此, 迫切需要发展新型检测方法, 以实现 ENR 的高效检测分析。

作为一种新型的分析检测手段, 电化学生物传感器因具有响应速度快、成本低、灵敏度高、操作简单且易于微型化等优点而广受关注<sup>[11-12]</sup>, 在抗生素残留检测领域表现出较大潜力。GALLEGOS-TABANICO 等<sup>[13]</sup>以分子印迹聚合物为识别元件, 构建了一种便携式 ENR 电化学生物传感器; ZHANG 等<sup>[14]</sup>基于 DNA 核酶设计 DNA 步行器, 构建了一种新型 ENR 残留电化学适体传感器。然而, 现有 ENR 电化学生物传感器大多灵敏度较低或涉及复杂的 DNA 序列设计, 限制了其在实际食品样品检测中的应用。因此, 需建立新型电化学生物传感器以实现 ENR 的简单快速、高灵敏和高特异性检测。

末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 是一种无需模板的 DNA 聚合酶, 其催化寡聚核苷酸重复添加至单链 DNA 或双链 DNA 的 3'-OH 端, 且延伸产物序列高度依赖于寡聚核苷酸池的组成<sup>[15-17]</sup>。当寡聚核苷酸池中只有单种脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 时, TdT 催化 dNTP 重复添加至底物链末端, 并产生单一多聚核苷酸链<sup>[18-23]</sup>。当脱氧鸟苷三磷酸 (dGTP) 与脱氧腺苷三磷酸 (dATP) 的物质的量比为 3 : 2 时, TdT 催化产生连续的 G-四链体序列<sup>[24-26]</sup>。G-四链体是一种由富含鸟嘌呤的单链核酸通过氢键形成的, 具有结构和构象多样化的特殊二级结构以及多元结合活性, 常作为氯化血红素分子 (Hemin) 的稳定剂<sup>[27]</sup>。G-四链体与 Hemin 结合形成的 G-四链体核酶具有辣根过氧化物酶活性, 能够催化 3,3',5,5'-四甲基苯并咪唑 (TMB)、2,2'-偶氮双二铵盐 (ABTS)、鲁米诺等底物产生氧化还原反应<sup>[28]</sup>。与传统酶相比, G-四链体核酶因具有高热稳定性、易于合成与修饰等优势而常用于构建生物传感器<sup>[29-30]</sup>, 以实现各类目标物的分析检测<sup>[31-32]</sup>。

本研究拟基于 TdT 协同 G-四链体核酶设计信号放大策略来构建一种高灵敏的 ENR 检测方法。在 ENR 存在的情况下, 适体序列特异性识别 ENR, 触发双探针分离, 使得电极表面产生带有 3'-OH 末端的 DNA 双链, 诱发 TdT 扩增反应, 并产生 G-四链体核酶纳米线, 进而催化 TMB 产生信号放大, 信号大小与 ENR 浓度成正相关, 可实现 ENR 的高灵敏和高特异性检测。构建的传感检测方法简单快速, 无需标签标记, 且不涉及复杂的 DNA 链设计或繁琐的纳米材料合成过程。将本方法用于实际食品样本

的分析检测, 旨在实现 ENR 的高效检测分析。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

三(2-羧乙基)膦酸盐 (TCEP, 质量分数 98%)、巯基己醇 (MCH, 体积分数 97%)、亚铁氰化钾 (质量分数 99%), 北京百灵威科技有限公司; ENR (标准品)、Hemin (质量分数 95%)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES, 质量分数 99.5%)、KCl (质量分数 99.5%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; TdT (20000 U/mL), 纽英伦生物技术(北京)有限公司; TMB 显色液, 上海碧云天生物技术有限公司; dATP (100 mmol/L)、dGTP (100 mmol/L)、Parafilm 膜, 上海生工生物工程股份有限公司; 1.0、0.3 μm 氧化铝粉, 武汉高仕睿联科技有限公司; 无水乙醇 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)、浓硫酸 (质量分数 98%)、ZnSO<sub>4</sub>, 分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司; 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 质量分数 30%), 分析纯, 南京化学试剂股份有限公司; 超纯水, Milli-Q 纯化系统 (Millipore 公司, 美国) 制备; 所有 DNA 探针, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, DNA 序列如下所示:

S-DNA: 5'-TTA GTG CCC TG-SH-3'

R-DNA: 5'-CAG GGC ACT AAG GTA-3'

Aptamer: 5'-GCT GTG TGA CTC CTG CAA GTC CGA CAT ACC TTA GTG CCC TGA TAT AAT GTA ACA CTA TTG AGC AGC TGT ATC TTG TCT CC-3'。

CHI 660E 电化学工作站, 上海辰华仪器有限公司; TGL-18MS 台式高速冷冻离心机, 上海卢湘仪实验室仪器有限公司; XWY 涡旋仪、MiniB-100 金属浴, 杭州米欧仪器有限公司; FC-12DTD-22.5L 超声波清洗机, 南京禾创科学仪器有限公司。

### 1.2 金电极的预处理

首先, 将金电极在磨砂纸上进行物理打磨; 然后, 将金电极在水虎鱼溶液 [V(浓硫酸): V(过氧化氢)=3 : 1)] 中浸泡 5 min, 以去除电极表面的有机物; 接着, 依次在 1.0、0.3 μm 氧化铝匀浆上进行抛光, 使金电极表面呈镜面状态; 随后, 分别用无水乙醇和超纯水对金电极进行超声波清洗 10 min 以去除黏附在电极表面的氧化铝匀浆溶液, 再用水虎鱼溶液浸泡 5 min; 最后, 在 0.5 mol/L 硫酸中进行电化学扫描清洗后, 再用超纯水彻底冲洗电极表面。

### 1.3 DNA 修饰与固定

将预处理好的金电极浸泡于 1 μmol/L 的 S-DNA 溶液中 (10 mmol/L HEPES 缓冲液, 含 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L TCEP, 用于防止 S-DNA 之间形成二硫键), 于 37 °C 下静置 1 h, 随后将电极浸泡在

0.1 mmol/L MCH 水溶液中, 同时用 Parafilm 膜密封后置于通风橱中静置 20 min, 使电极表面形成直立有序的 DNA 分子单层, 同时防止非特异性吸附。

#### 1.4 ENR 检测

在离心管中将 ENR 适体序列 (Aptamer, 0.2 mmol/L, 溶液为含 100 mmol/L KCl 的 10 mmol/L HEPES 缓冲液) 和 R-DNA 探针 (0.2 mmol/L, 溶液为含 100 mmol/L KCl 的 10 mmol/L HEPES 缓冲液) 各 20  $\mu$ L 混合, 于 95  $^{\circ}$ C 下恒温加热 5 min, 随后在室温下冷却 1 h。然后, 将 20  $\mu$ L 不同质量浓度 (0.5、1、2、5、10、20、50、200  $\mu$ g/L) 的 ENR 溶液 (溶液为含 100 mmol/L KCl 的 10 mmol/L HEPES 缓冲液) 加入离心管中, 于室温下静置 40 min。静置完成后, 将金电极浸泡于上述混合溶液中, 在室温下静置 30 min, 使释放出的 R-DNA 与 S-DNA 进行互补杂交。随后, 将金电极浸泡于 TdT 反应缓冲液 (含有  $2.0 \times 10^5$  U/L TdT、0.4 mmol/L dATP、0.6 mmol/L dGTP) 中, 于 37  $^{\circ}$ C 下反应 60 min 以扩增出连续的 G-四链体序列。最后将 Hemin 引入金电极表面, 并记录电化学信号。

#### 1.5 实际食品样本中 ENR 检测

牛奶中存在大量的脂肪和蛋白质, 对目标物检测干扰较大, 因此对牛奶样本进行预处理以去除蛋白质与脂肪。首先, 将 5 mL 牛奶在 10000 r/min (10  $^{\circ}$ C) 下离心 10 min 以去除上层脂肪; 随后, 加

入 150  $\mu$ L 亚铁氰化钾 (质量分数 17.2%) 和 150  $\mu$ L ZnSO<sub>4</sub> (质量分数 53.5%) 以沉淀蛋白质, 并在 10000 r/min (15  $^{\circ}$ C) 下离心 10 min, 收集上清液并稀释备用。将不同质量浓度 (0.5、1、5、10、50  $\mu$ g/L) 的 ENR 溶液加入处理好的牛奶样本中, 采用所建立的电化学检测方法对 ENR 进行测定, 并计算回收率。

#### 1.6 电化学测量

采用电化学工作站进行电化学测量, 三电极体系: 修饰的金电极为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂电极为对电极。所有电化学测量均在室温下进行。电化学分析方法有计时电流法 ( $I-t$ )、电化学阻抗法 (EIS) 与循环伏安法 (CV)。在 -0.4 V 下测定  $I-t$  曲线, 并在 G-四链体核酶催化氧化还原反应达到稳态后记录第 60 s 的电流值。EIS 测试是在含 0.1 mol/L KCl 的 5 mmol/L [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 溶液中进行, 相关参数为: 频率为 0.1~10 kHz, 偏置电位为 0.224 V, 幅值为 5 mV。CV 测试在含有 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 10 mmol/L HEPES 缓冲液中进行, 在扫描速率为 100 mV/s 下记录测定结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测原理

图 1 为基于 TdT 协同 G-四链体核酶信号放大的 ENR 电化学检测方法示意图。

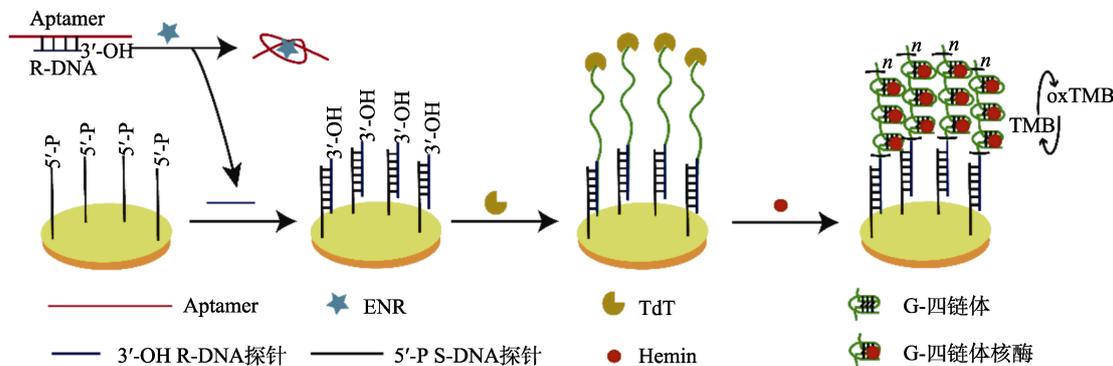


图 1 基于 TdT 协同 G-四链体核酶信号放大的 ENR 电化学检测方法示意图

Fig. 1 Schematic representation of electrochemical method for ENR detection based on collaborative signal amplification by TdT with G-quadruplex ribozyme

如图 1 所示, 设计带有游离 3'-OH 末端的 R-DNA 探针与 ENR 适体序列部分互补杂交形成一段 DNA 双链探针。当 ENR 存在时, ENR 适体特异性识别并结合 ENR, 导致 DNA 双链探针分离, 释放出单链 R-DNA 探针。释放出的 R-DNA 与预先修饰于电极表面的 S-DNA 探针互补杂交, 从而在电极表面引入游离的 3'-OH 末端。随后, 利用 TdT 在 3'-OH 末端扩增延伸, 产生连续的 G 四链体序列。最后, 引入 Hemin 与 G-四链体近位杂交形成 G-四链体核酶

纳米线, 进而催化 TMB 氧化生成 TMB 氧化产物 (oxTMB), 产生显著放大的与 ENR 浓度正相关的电化学信号, 从而实现对 ENR 的灵敏检测。

### 2.2 原理验证

采用 EIS、CV 和  $I-t$  考察检测方法的可行性。EIS 是一种用于表征电极经过逐步修饰后表面电子传递状况的电化学分析手段, 不同电极的 EIS 曲线见图 2A。如图 2A 所示, 裸电极的 EIS 谱图呈现出一条直线, 几乎没有半圆部分; S-DNA 修饰于金电

极表面后, EIS 谱图呈现出明显的半圆弧, 表明 S-DNA 自组装于金电极表面, 使电极表面电子传递阻力增加; 当修饰电极经过含有 ENR 的混合反应液处理后, 半圆直径略有增加, 电极表面电子传递阻力有所增加; 经 TdT 催化延伸后, 半圆直径显著增加, 说明电极表面产生了连续的 G-四链体结构, 阻碍了电子传递。此外, 采用 CV 研究了传感器对 ENR 的电化学响应, 并验证了 TdT 酶催化扩增产生 G-四链体核酶的作用, 结果见图 2B。如图 2B 所示, 无 ENR 时, 电流峰值较小, 这是因为无目标物 ENR 的触发, 带有 3'-OH 末端的 R-DNA 无法与金电极表面的 S-DNA 杂交, 不能引发后续的 TdT 催化扩增产生 G-四链体的反应, 从而产生较低的电化学响应; 在目标物 ENR 存在的情况下, 其与适体特异性结合, 导致适体与 R-DNA 形成的双链 DNA 探针分离, 释放出游离的 R-DNA, 随后 R-DNA 探针与固定于金电极表面的 S-DNA 互补杂交, 此时在未引入 TdT 扩增反应的情况下测定 CV, 因无 G 四链体核酶产生, 电流峰值几乎不变; 在引入 TdT 催化延伸形成大量的 G-四链体核酶后, 电流峰值显著增加, 表明 TdT 协同 G-四链体核酶可以有效放大检测信号。最后, 采用  $I-t$  考察了电化学传感器的可行性, 结果见图 2C。如图 2C 所示, 当无 ENR 时, 电极表面无法产生 G-四链体核酶纳米线,  $I-t$  测定的电流值极微弱; 当 ENR 存在时, ENR 触发双链 DNA 探针分离, 进而诱发 TdT 扩增反应, 形成 G-四链体核酶纳米线结构, 实现信号放大, 产生较高的电流值。综上所述, 所构建的电化学检测体系不仅具有良好的目标响应性, 同时信号放大效果显著。

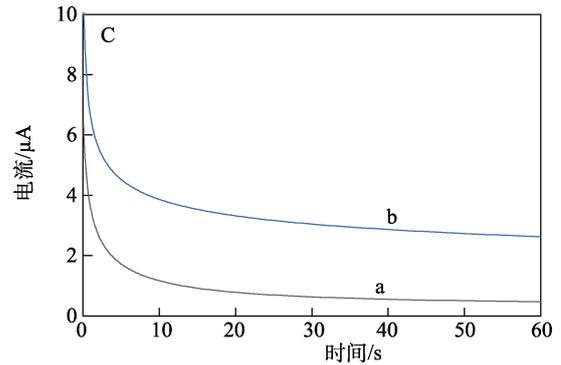
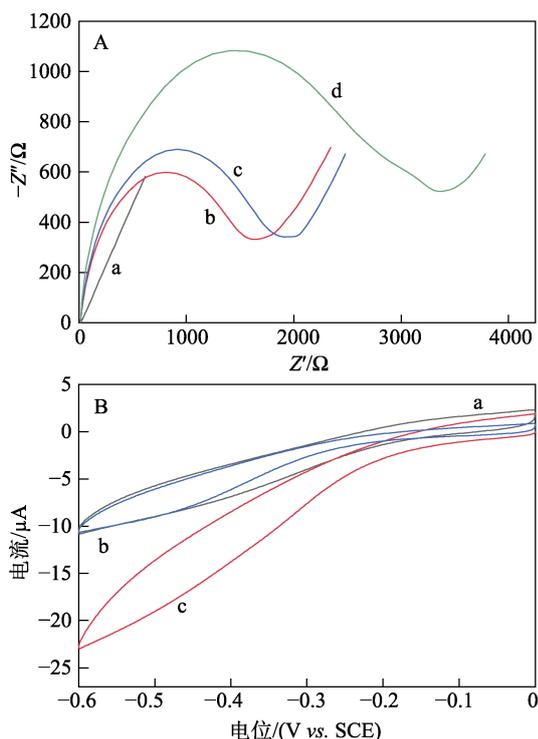


图 2 不同电极的 EIS 曲线(其中, a 为裸电极; b 为 S-DNA 修饰的金电极; c 为含有 ENR 的混合反应液孵育后的修饰电极; d 为 TdT 反应液孵育后的修饰电极) (A); 传感器对 ENR 的电化学响应(其中, a 为无 ENR; b 为含有质量浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  的 ENR、无 TdT 扩增反应; c 为含有质量浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  ENR、有 TdT 扩增反应) (B); 电化学传感器的  $I-t$  曲线(其中, a 为无 ENR; b 为含有质量浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  的 ENR) (C)

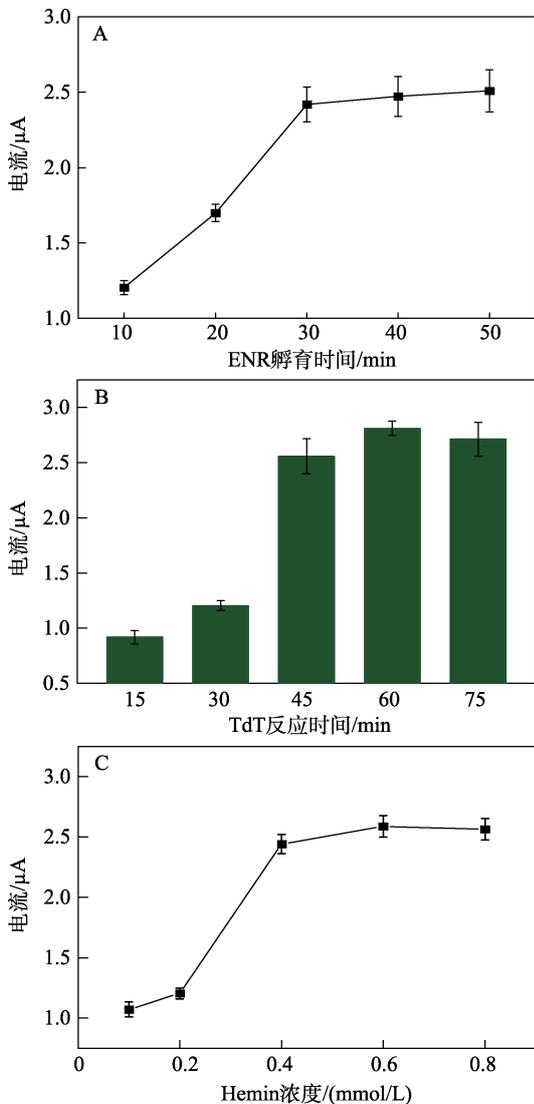
Fig. 2 EIS curves of different electrodes (here in, a is the bare electrode; b is S-DNA modified gold electrode; c is modified electrode after incubation with a mixture containing ENR; d is modified electrode after incubation with TdT reaction solution) (A); Electrochemical response of sensor to ENR (here in, a represents in the absence of ENR; b represents in the presence of mass concentration of 50  $\mu\text{g/L}$  ENR, without TdT amplification reaction; c represents in the presence of mass concentration of 50  $\mu\text{g/L}$  ENR, with TdT amplification reaction) (B);  $I-t$  curves of electrochemical sensor (a is in the absence of ENR; b is in the presence of mass concentration of 50  $\mu\text{g/L}$  ENR) (C)

### 2.3 条件优化

为了获得最佳检测性能, 对实验中的关键条件进行了优化。首先, 在 TdT 反应时间为 30 min、Hemin 浓度为 0.2 mmol/L 的条件下, 考察了 ENR 孵育时间 (10、20、30、40、50 min) 对电化学输出信号的影响, 结果见图 3A。如图 3A 所示, 随着靶标 ENR 孵育时间逐渐延长, 检测质量浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  的 ENR 所得到的电流逐渐增加; 当孵育时间 > 40 min 后, 电流趋于平稳。因此, 选取 40 min 为最佳靶标孵育时间。其次, 在 ENR 孵育时间为 40 min、Hemin 浓度为 0.2 mmol/L 的条件下, 考察了 TdT 反应时间 (15、30、45、60、75 min) 对电流的影响, 结果见图 3B。如图 3B 所示, 随着 TdT 反应时间从 15 min 延长至 75 min, 电流不断增大, 并在 60 min 达到最大, 所以 60 min 为充分反应的最佳时间。最后, 在 ENR 孵育时间为 40 min、TdT 反应时间为 60 min 的条件下, 测量了不同 Hemin 浓度 (0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L) 下产生的电流, 结果见图 3C。如图 3C 所示, 电信号随着 Hemin 浓度的增加而逐渐增加, 在浓

度为 0.6 mmol/L 时达到最大值, 因此选取 0.6 mmol/L 为 Hemin 的最佳浓度。

综上, ENR 的最佳孵育时间为 40 min, TdT 的最佳反应时间为 60 min, Hemin 的最优浓度为 0.6 mmol/L。



注: 误差棒是 3 次平行实验的标准差, 下同  
图 3 电流随 ENR 孵育时间 (A)、TdT 反应时间 (B) 及 Hemin 浓度的变化 (C)  
Fig. 3 Change of current with incubation time of ENR (A), TdT reaction time (B) and Hemin concentration (C)

2.4 检测性能研究

采用计时电流法对 ENR 进行了定量检测。在最佳实验条件下, 对不同质量浓度的 ENR 进行了检测, 结果见图 4A。如图 4A 所示, 随着 ENR 质量浓度的增加, 电流逐渐增大。60 s 时电流随 ENR 质量浓度的变化见图 4B。从图 4B 内插图可见, 在 0.5~50  $\mu\text{g/L}$  范围内, 电流 ( $I$ ,  $\mu\text{A}$ ) 随着 ENR 质量浓度 ( $\rho$ ,  $\mu\text{g/L}$ ) 对数的增加而增大, 线性回归方程为  $y=0.82x+1.18$ ,  $R^2=0.99$ 。根据信噪比=3:1 准

则, 计算出检测限 (LOD) 为 0.043  $\mu\text{g/L}$ 。与已报道的一些 ENR 传感检测方法<sup>[33-37]</sup>相比, 本方法具有更低的检测限或更宽的线性范围 (表 1), 显示出一定的检测性能优越性。

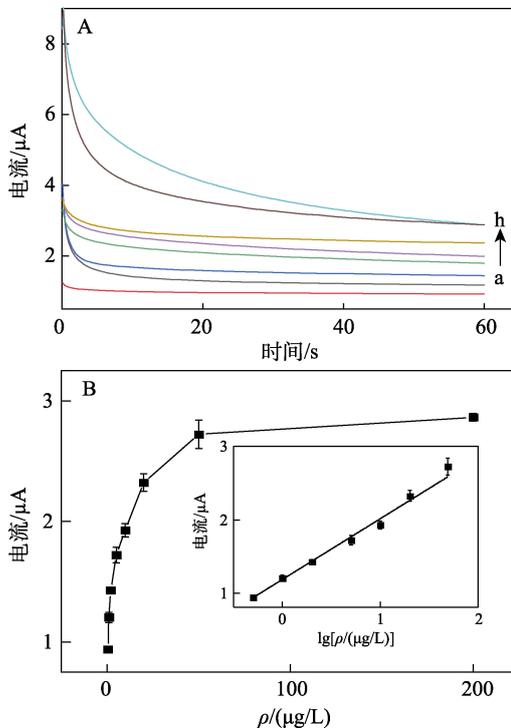


图 4 不同质量浓度 ENR (a~h 分别为 0.5、1、2、5、10、20、50、200  $\mu\text{g/L}$ ) 对应的  $I-t$  曲线 (A); 电流随 ENR 质量浓度的变化 (B), 插图为电流与 ENR 质量浓度对数之间的线性关系  
Fig. 4  $I-t$  curves of ENR with different mass concentrations (a~h represent 0.5、1、2、5、10、20、50、200  $\mu\text{g/L}$ ) (A); variation of current with ENR mass concentration (B), insert shows the linear relationship between current and logarithm of ENR mass concentration

表 1 电化学传感器与已报道的 ENR 传感器的检测性能比较

Table 1 Comparison of electrochemical sensor and other reported sensors for ENR detection

方法	线性范围/ $(\mu\text{g/L})$	LOD/ $(\mu\text{g/L})$
比色适体传感器 <sup>[33]</sup>	1.80 ~ 35.94	0.68
荧光适体传感器 <sup>[34]</sup>	1.80 ~ 89.85	1.33
电化学纳米传感器 <sup>[35]</sup>	17.97 ~ 3594	14.74
表面拉曼散射纳米传感器 <sup>[36]</sup>	1 ~ 100	0.25
荧光纳米传感器 <sup>[37]</sup>	$1 \times 10^3 \sim 15 \times 10^3$	160
本文	0.5 ~ 50	0.043

采用计时电流法对牛奶中的 ENR 进行了定量检测, 电流随 ENR 质量浓度 (0.5、2、5、10、50、100  $\mu\text{g/L}$ ) 的变化见图 5, 插图为电流与 ENR 质量浓度 ( $\rho$ ) 对数值之间的线性关系图。如图 5 所示, 本方法在牛奶中的线性检测范围为 0.5~50  $\mu\text{g/L}$ , 计

算得出检测限为 0.070 μg/L。

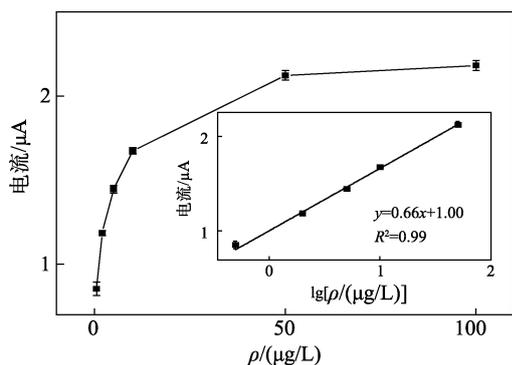


图 5 计时电流法对牛奶中的 ENR 的定量检测

Fig. 5 Quantitative determination of ENR in milk by chronoamperometry

为了考察本方法的特异性，选取 10 mmol/L HEPES (pH 8.0) 为空白对照，对不同抗生素氯霉素 (CM)、卡那霉素 (KANA)、氧氟沙星 (OFX)、四环素 (TET)、环丙沙星 (CIP) 及 CM、KANA、OFX、TET、CIP 和 ENR 的混合物 (所有抗生素的质量浓度均为 50 μg/L) 进行了对照实验，结果如图 6 所示。

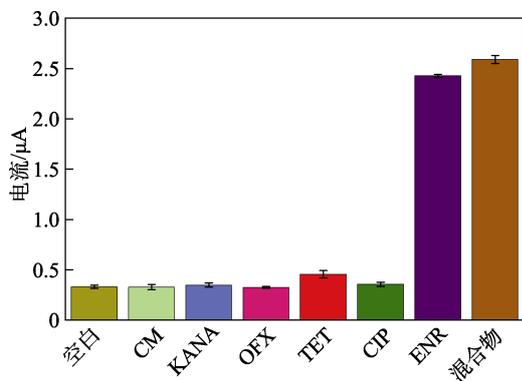


图 6 电化学检测方法的特异性验证

Fig. 6 Specificity verification of the electrochemical method for ENR detection

由图 6 可知，本方法检测 ENR 得到的电流远高于检测其他抗生素得到的电流，且在混合样本中可以准确识别出目标 ENR，表明本方法对于 ENR 检测具有良好的选择性。

最后，考察所建立的电化学检测方法对实际牛奶样本中 ENR 的分析性能，以验证其实用性。将不同质量浓度的 ENR 标准物加入经过预处理的牛奶样本中，用所构建的电化学检测方法测定回收率，结果如表 2 所示。

由表 2 可知，在允许的相对误差范围内，回收率在 98%~110%之间，表明本文所建立的电化学检测方法可应用于检测牛奶样本中的 ENR 残留。

表 2 所建立的电化学检测方法对牛奶样本中的 ENR 检测结果

Table 2 Results of the developed electrochemical method for ENR detection in milk samples

添加量 / (μg/L)	检测量 / (μg/L)	回收率/%	标准偏差/%
0.5	0.52	104	9.5
1	0.98	98	7.5
5	5.17	103	5.6
10	10.50	105	7.1
50	54.78	110	6.3

### 3 结论

建立了一种基于 TdT 协同 G-四链体核酶信号放大的 ENR 残留电化学检测方法。该方法采用 ENR 触发双探针分离识别转换策略，以带有 3'-OH 末端的单链 DNA 为信号转换探针，在电极表面引入 TdT 催化扩增产生 G-四链体序列，并形成 G-四链体核酶纳米线，最终产生信号放大，实现 ENR 的高灵敏和高特异性检测。该方法已初步应用于对实际牛奶样本中抗生素的检测分析，显示出较好的应用潜力。此传感检测体系不涉及复杂的 DNA 链设计，简单快速，经济效益高。此外，该方法具有较好的普适性，只需改变相应的核酸适体序列，即可实现其他多种目标物的检测分析。

#### 参考文献:

- [1] WANG D W, JIANG S H, LIANG Y Y, *et al.* Selective detection of enrofloxacin in biological and environmental samples using a molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor based on functionalized copper nanoclusters[J]. *Talanta*, 2022, 236: 122835.
- [2] SHEN Y F, JIA F, LIANG A, *et al.* Monovalent antigen-induced aggregation (MAA) biosensors using immunomagnetic beads in both sample separation and signal generation for label-free detection of enrofloxacin[J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2022, 14(7): 8816-8823.
- [3] XU Y H, JIANG D, ZHANG M, *et al.* High-performance photoelectrochemical aptasensor for enrofloxacin based on Bi-doped ultrathin polymeric carbon nitride nanocomposites with SPR effect and carbon vacancies[J]. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2020, 316: 128142.
- [4] TIAN R, JI J Y, ZHOU Y Y, *et al.* Terminal-conjugated non-aggregated constraints of gold nanoparticles on lateral flow strips for mobile phone readouts of enrofloxacin[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 160: 112218.
- [5] SONG Y P, XU M R, LIU X, *et al.* A label-free enrofloxacin electrochemical aptasensor constructed by a semiconducting CoNi-based meta-organic framework (MOF)[J]. *Electrochimica Acta*, 2021, 368: 137609.
- [6] SURESHKUMAR V, SARATHCHANDRA G. A HPTLC-fluorescent densitometry assay for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin in broiler chicken tissues[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 11(4): 1076-1085.
- [7] LI S J, ZHANG Y, WEN W J, *et al.* A high-sensitivity thermal analysis immunochromatographic sensor based on Au nanoparticle-

- enhanced two-dimensional black phosphorus photothermal-sensing materials[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 133: 223-229.
- [8] PAN M F, GU Y, ZHANG M Y, *et al.* Reproducible molecularly imprinted QCM sensor for accurate, stable, and sensitive detection of enrofloxacin residue in animal-derived foods[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 11(2): 495-503.
- [9] CHAI F L, WANG D, ZHU L N, *et al.* Dual gold nanoparticle/chemiluminescent immunoassay for sensitive detection of multiple analytes[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(17): 6628-6634.
- [10] LI H J, WANG M C, SHEN X X, *et al.* Rapid and sensitive detection of enrofloxacin hydrochloride based on surface enhanced raman scattering-active flexible membrane assemblies of Ag nanoparticles [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 249: 109387.
- [11] WANG M, CUI H F, HONG N, *et al.* A reagentless triplex DNA junctions-based electrochemical DNA sensor using signal amplification strategy of CHA and tetraferrocene[J]. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2022, 358: 131496.
- [12] LIU S F, LIN Y, WANG L, *et al.* Exonuclease III-aided autocatalytic DNA biosensing platform for immobilization-free and ultrasensitive electrochemical detection of nucleic acid and protein[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86: 4008-4015.
- [13] GALLEGOS-TABANICO A, JIMENEZ-CANALE J, HERNANDEZ-LEON S G, *et al.* Development of an electrochemical sensor conjugated with molecularly imprinted polymers for the detection of enrofloxacin[J]. *Chemosensors*, 2022, 10(11): 448-458.
- [14] ZHANG B Z, LV L N, MA X Y, *et al.* Au@ZnNi-MOF labeled electrochemical aptasensor for detection of enrofloxacin based on AuPt@h-CeO<sub>2</sub>/MoS<sub>2</sub> and DNAzyme-driven DNA walker triple amplification signal strategy[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 210: 114296.
- [15] ZHAO T T, CHEN Q, WEN Y L, *et al.* A competitive colorimetric aptasensor for simple and sensitive detection of kanamycin based on terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated signal amplification strategy[J]. *Food Chemistry*, 2022, 377: 132072.
- [16] DENG Y, PENG Y, WANG L, *et al.* Target-triggered cascade signal amplification for sensitive electrochemical detection of SARS-CoV-2 with clinical application[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1208: 339846.
- [17] WANG L, PAN Y H, LIU Y F, *et al.* Fabrication of an aptamer-coated liposome complex for the detection and profiling of exosomes based on terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated signal amplification [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(1): 322-329.
- [18] LI Y T, TANG D H, ZHU L, *et al.* Label-free detection of miRNA cancer markers based on terminal deoxynucleotidyl transferase-induced copper nanoclusters[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 585: 113346.
- [19] ABNOUS K, DANESH N M, NAMEGHI M A, *et al.* An ultrasensitive electrochemical sensing method for detection of microcystin-LR based on infinity-shaped DNA structure using double aptamer and terminal deoxynucleotidyl transferase[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 144: 111674.
- [20] CHEN J L, XU J R, WAN T, *et al.* High-sensitive detection of small-cell lung cancer cells based on terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated extension polymerization aptamer probe[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2021, 7(3): 1169-1180.
- [21] ZHANG X L, ZHENG C, DING L, *et al.* CRISPR-Cas12a coupled with terminal deoxynucleotidyl transferase mediated isothermal amplification for sensitive detection of polynucleotide kinase activity[J]. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2021, 330: 129317.
- [22] DU Y C, CUI Y X, LI X Y, *et al.* Terminal deoxynucleotidyl transferase and T7 exonuclease-aided amplification strategy for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(14): 8629-8634.
- [23] WANG L, DENG Y, HUANG Y, *et al.* Template-free multiple signal amplification for highly sensitive detection of cancer cell-derived exosomes[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(68): 8508-8511.
- [24] MA X M, SHI L, XIE H J, *et al.* Sensitive detection of fat mass and obesity-associated protein based on terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated signal amplification[J]. *Microchemical Journal*, 2022, 183: 108131.
- [25] WANG H X, WANG M Y, LIU J Z, *et al.* An ultrasensitive label-free photoelectrochemical aptasensor based on terminal deoxynucleotidyl transferase amplification and catalytic reaction of G-quadruplex/hemin[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1211: 339912.
- [26] SHI K, DOU B T, YANG J M, *et al.* Target-triggered catalytic hairpin assembly and TdT-catalyzed DNA polymerization for amplified electronic detection of thrombin in human serums[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 87: 495-500.
- [27] LIU Z L, LUO X Y, LI Z, *et al.* Enzyme-activated G-quadruplex synthesis for *in situ* label-free detection and bioimaging of cell apoptosis[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(3): 1892-1899.
- [28] CAO Y W, LI W J, PEI R J. Exploring the catalytic mechanism of multivalent G-quadruplex/hemin DNAzymes by modulating the position and spatial orientation of connected G-quadruplexes[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1221: 340105.
- [29] MA J P, CHEN G Z, BAI W S, *et al.* Amplified electrochemical hydrogen peroxide sensing based on Cu-porphyrin metal-organic framework nanofilm and G-quadruplex-hemin DNAzyme[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(52): 58105-58112.
- [30] WU H, WU J, WANG H Y, *et al.* Sensitive and label-free chemiluminescence detection of malathion using exonuclease-assisted dual signal amplification and G-quadruplex/hemin DNAzyme [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 411: 124784.
- [31] LIU S W, DING J W, QIN W. Dual-analyte chronopotentiometric aptasensing platform based on a G-quadruplex/hemin DNAzyme and logic gate operations[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(4): 3170-3176.
- [32] MI L, SUN Y D, SHI L, *et al.* Hemin-bridged MOF interface with double amplification of G-quadruplex payload and DNAzyme catalysis: Ultrasensitive lasting chemiluminescence MicroRNA imaging[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(7): 7879-7887.
- [33] SHA J Y, LIN H, TIMIRA V, *et al.* The construction and application of aptamer to simultaneous identification of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in fish[J]. *Food Analytical Methods*, 2021, 14(5): 957-967.
- [34] DOLATI S, RAMEZANI M, NABAVINIA M S, *et al.* Selection of specific aptamer against enrofloxacin and fabrication of graphene oxide based label-free fluorescent assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 549: 124-129.
- [35] LU S Y, WANG S L, WU P, *et al.* A composite prepared from covalent organic framework and gold nanoparticles for the electrochemical determination of enrofloxacin[J]. *Advanced Powder Technology*, 2021, 32(6): 2106-2115.
- [36] NENG J, WANG Y Z, ZHANG Y L, *et al.* MIPs-SERS sensor based on Ag NPs film for selective detection of enrofloxacin in food[J]. *Biosensors*, 2023, 13(3): 330-345.
- [37] GUO X J, ZHANG L Z, WANG Z W, *et al.* Fluorescent carbon dots based sensing system for detection of enrofloxacin in water solutions [J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 219: 15-22.