

基于单链 DNA 模板合成铜纳米簇的 四环素无标记检测

SsDNA-templated fluorescent copper nanoclusters for label
free detection of tetracyclines

杨丽霞 曾希珂 易 姿

YANG Li-xia ZENG Xi-ke YI Zi

(长沙市食品药品检验所, 湖南 长沙 410036)

(Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha, Hunan 410036, China)

摘要:以聚 T 单链 DNA 为模板合成的铜纳米簇作为荧光探针,建立了一种快速、非标记型的荧光生物传感检测新方法,并用于实际样品中四环素的检测。结果表明,该方法用于检测四环素残留的检出限为 $0.01 \mu\text{mol/L}$,用于实际样品四环素残留的测定低限为 $48 \mu\text{g/kg}$,而且无需要任何荧光染料标记或复杂的 DNA 序列设计,所有过程均在室温下 10 min 内完成。将该方法应用于牛奶、鸡肉样品中四环素含量的测定,相对标准偏差 $\leq 4.01\%$,加标回收率为 $97.67\% \sim 110.23\%$ 。

关键词:铜纳米簇;无标记;四环素类抗生素;检测

Abstract: In this paper, a novel and label-free fluorescence sensing strategy has been developed for tetracyclines (TCs) detection in food sample by using poly (thymine) (poly T)-templated copper nanoclusters (CuNCs) as fluorescent probes. Under optimized conditions, the label-free fluorescent sensor achieved highly sensitive and selective detection of TCs with a detection limit of $0.01 \mu\text{mol/L}$, and with a detection limit of $48 \mu\text{g/kg}$ in real samples. Furthermore, the method was successfully applied to the detection of TCs in milk and chicken samples. The relative standard deviation was less than 4.01% , and the recovery rate was between 97.67% and 110.23% . The strategy was free of any fluorescence dye label or complex DNA sequence design, and all the processes were performed within 10 minutes at room temperature. Therefore, it could offer a simple, rapid, and label-free sensing platform for fluorescence detection of TCs in food.

Keywords: copper nanoclusters; label free; tetracyclines; detection

基金项目:湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号:2020KJJH39)

作者简介:杨丽霞(1981—),女,长沙市食品药品检验所高级工程师,博士。E-mail: yanglixia612@163.com

收稿日期:2020-08-26

四环素类抗生素(tetracyclines, TCs)是一类重要的抗生素,因其具有抗菌谱广、药性稳定、低毒、价格低廉等特点,在治疗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌引起的人畜感染中得到了广泛的应用^[1-2]。目前,四环素在家畜和水产养殖中常被使用^[3-4],导致日常食品中存在四环素残留,特别多见于肉类、鱼、牛奶和蜂蜜等动物产品中^[5-7]。人通过食物长期低剂量摄入四环素并在体内蓄积,易引起人体内耐药菌株的产生和增加,导致胃肠道疾病、过敏、肾毒性,以及血液或中枢神经系统等疾病^[8]。因此,应该控制四环素等抗生素的使用,中国国家标准^[9]规定鸡蛋中四环素残留限量应 $\leq 400 \mu\text{g/kg}$,肌肉中 $\leq 200 \mu\text{g/kg}$,肝脏中 $\leq 600 \mu\text{g/kg}$,牛奶中 $\leq 100 \mu\text{g/kg}$ 。其他国家也制定了动物产品中四环素类药物的最大残留限量标准。例如,欧盟^[10]规定,鸡蛋中四环素残留的最大限量应 $\leq 200 \mu\text{g/kg}$,肌肉中 $\leq 100 \mu\text{g/kg}$,肝脏中 $\leq 300 \mu\text{g/kg}$,牛奶中 $\leq 100 \mu\text{g/kg}$ 。

目前,四环素的检测已成功建立了多种分析方法,包括高效液相色谱法^[11]、液相色谱—串联质谱法^[12]、微生物分析法^[13]、毛细管电泳法^[14-15]、酶免疫分析^[16]以及电化学免疫传感器^[17-19]等。尽管其中一些方法^[11-12]具有较高的选择性和足够的灵敏度,但大多数方法都或多或少地存在一些缺点,如仪器相对昂贵、样品制备过程复杂、预处理耗时等。

荧光金属纳米分析方法具有操作简单、速度快、灵敏度高、选择性好等优点,已经引起了研究人员的广泛关注。铜纳米簇作为一种新型的功能性纳米颗粒,由于合成简单、光稳定性好以及在水溶液中具有分散性,使其作为荧光探针在生物传感领域具有广阔的应用前景。近年来,基于双链 DNA 和单链 DNA 模板合成的铜纳米簇的报道很多。例如, Wang 等^[20]基于聚 T 模板合成铜纳米簇,建立了一种曲酸的无标记检测方法。Ou

等^[21]以聚 T 为模板的铜纳米粒子作为荧光探针灵敏测定胰蛋白酶。Song 等^[22]利用双链 DNA 模板合成铜纳米离子,结合核酸外切酶催化的目标循环扩增能力,建立了一种检测赭曲霉毒素 A 的荧光方法。Zhang 等^[23]运用双链 DNA 模板铜纳米粒子作为荧光指示剂,建立了一种无标记荧光方法检测多核苷酸激酶活性。Hu 等^[24]基于双链 DNA 模板合成铜纳米粒子,用于核酸酶的检测。Song 等^[25]利用杂交链式反应和双链 DNA 模板合成的铜纳米粒子,建立了一种无标记、非酶促扩增的 DNA 检测方法。据以上文献报道,以聚 T 为模板合成的铜纳米簇,具有荧光强度高的特点,尺寸和荧光强度可以通过聚 T 单链 DNA 的长度来调节;另外,相比 dsDNA-铜纳米簇的合成,为了保证 dsDNA 模板的有效杂交,通常需要耗时 1 h 以上,而聚 T 铜纳米簇的合成只需要几分钟即可完成。

在上述基础上,试验拟以聚 T 模板合成的铜纳米簇作为荧光探针,构建一种新的荧光生物传感方法用于检测实际样品中的四环素类抗生素,以期食品中四环素类抗生素的快速检测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

含 30 个碱基的聚胸腺嘧啶寡聚核苷酸链(T30):生工生物工程(上海)股份有限公司;

盐酸四环素、盐酸土霉素、盐酸金霉素、青霉素、氨苄西林、头孢氨苄、盐酸林可霉素、链霉素、卡那霉素、氯霉素:USP 级,生工生物工程(上海)股份有限公司;

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、抗坏血酸、甘氨酸、精氨酸、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、氯化钙、氯化镁:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS):分子生物学级,BBI 生命科学有限公司;

缓冲体系:20 mmol/L 3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲溶液(pH=7.5);

试验用水:超纯水(电阻率 $>18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$),超纯水系统 SMARTPLUS-N;

荧光分光光度计:LS-55 型,珀金埃尔默股份有限公司;

电子天平:ME204 型,瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.2 荧光铜纳米簇的制备

荧光铜纳米簇的合成是以 T30-DNA 链为模板在文献^[26]的合成方法上稍作修改。将 5 mmol/L 抗坏血酸溶液 10 μL 加入到 70 μL 含有 2 $\mu\text{mol/L}$ T30-DNA 的 MOPS 缓冲溶液(20 mmol/L MOPS,300 mmol/L NaCl, pH=7.5)中混合均匀,再加入 10 μL 300 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 溶液,室温下避光孵育 5 min,得到荧光铜纳米簇。

1.3 检测条件的优化

由于 Cu^{2+} 浓度、抗坏血酸浓度、铜纳米簇合成时间、

加入四环素的孵育时间是影响四环素检测的重要参数,采用单一变量的原则,对 4 个参数进行优化。

1.3.1 Cu^{2+} 浓度的优化 在 T30-DNA 浓度 2 $\mu\text{mol/L}$, 抗坏血酸浓度 5 mmol/L,铜纳米簇合成时间 5 min,考察 Cu^{2+} 浓度(100,200,300,400,500,600 $\mu\text{mol/L}$)对体系荧光强度的影响。

1.3.2 抗坏血酸浓度的优化 在 T30-DNA 浓度 2 $\mu\text{mol/L}$, Cu^{2+} 浓度 300 $\mu\text{mol/L}$,铜纳米簇合成时间 5 min,考察抗坏血酸浓度(1,2,3,4,5,6,7 mmol/L)对体系荧光强度的影响。

1.3.3 铜纳米簇合成时间的优化 在 T30-DNA 浓度 2 $\mu\text{mol/L}$, Cu^{2+} 浓度 300 $\mu\text{mol/L}$,抗坏血酸浓度 5 mmol/L,考察铜纳米簇合成时间(1,2,3,4,5,6,7,8 min)对体系荧光强度的影响。

1.3.4 加入四环素的孵育时间的优化 在 T30-DNA 浓度 2 $\mu\text{mol/L}$, Cu^{2+} 浓度 300 $\mu\text{mol/L}$,抗坏血酸浓度 5 mmol/L,铜纳米簇合成时间 5 min,考察加入四环素的孵育时间(1,2,3,4,5,6,7 min)对体系荧光强度的影响。

1.4 四环素的检测

按照 1.3 的最优条件合成荧光铜纳米颗粒。将 10 μL 不同浓度的四环素溶液(浓度分别为 0.5,5.0,10.0,20.0,40.0,60.0,80.0,100.0,150.0,200.0,300.0 $\mu\text{mol/L}$)与 90 μL 荧光铜纳米簇溶液混合均匀,保证总体积为 100 μL ,室温下避光孵育 5 min,将溶液移入石英比色皿,使用荧光分光光度计测量荧光,激发波长 340 nm,发射光谱波长扫描范围 500~660 nm。

1.5 四环素检测的特异性

为了验证方法的特异性,将浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸四环素(TC)、盐酸土霉素(OTC)、盐酸金霉素(AM)、青霉素(PC)、氨苄西林(SAM)、头孢氨苄(CLX)、盐酸林可霉素(LM)、链霉素(SM)、卡那霉素(KAN)、氯霉素(CM)以及浓度为 1 mmol/L 的甘氨酸(Gly)、精氨酸(Arg)、葡萄糖(Glc)、麦芽糖、蔗糖、氯化钙、氯化镁等多种目标物,按照 1.4 的步骤加入到荧光铜纳米簇溶液中混合均匀,室温下避光孵育 5 min,使用荧光分光光度计测量荧光。

1.6 牛奶样品的准备

纯牛奶样品购于当地超市。吸取 5 g 牛奶样品用 5 mL 1% 的三氯乙酸超声提取 20 min,然后在 15 000 r/min 转速下离心 5 min,取上清液用滤纸过滤,将收集的滤液用水定容至 5 mL,最后将通过 0.22 μm 的滤膜后的清液用于样品分析^[27]。采用标准加入法进行牛奶样品中四环素的分析。

1.7 鸡肉样品的准备

1.7.1 提取 鸡胸肉样品购于当地超市。样品中四环素的提取步骤按照中国现行国家标准^[28]检测方法中的提

取步骤进行。

1.7.2 净化 鸡肉样品中四环素的净化步骤参考中国现行国家标准^{[28]3}检测方法中的净化步骤并略有修改。准确吸取 10 mL 提取液以 1 滴/s 的速度过 HLB 固相萃取柱,待样液完全流出后,依次用 5 mL 水和 5 mL 甲醇—水 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:19$) 淋洗,弃去全部流出液。2.0 kPa 以下减压抽干 5 min,最后用 10 mL 甲醇—乙酸乙酯 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:9$) 洗脱。将洗脱液氮吹浓缩至干(温度低于 40 °C),用 1.0 mL 超纯水溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,收集清液用于样品分析,采用标准加入法进行实际样品中四环素的分析。

2 结果与分析

2.1 检测方法原理

试验方法的检测原理如图 1 所示。在不添加四环素的条件下,制备了以 T30-ssDNA 为模板的铜纳米簇,并表现出了优异的性能。T30-ssDNA 模板铜纳米簇的形成通常包括两个步骤:胸腺嘧啶和 Cu^{2+} 之间的结合作用,促进了“胸腺嘧啶- Cu^{2+} ”复合物的形成;抗坏血酸沿 poly-T 模板骨架将胸腺嘧啶结合的 Cu^{2+} 还原为 Cu^0 ,形成了铜纳米簇,在 340 nm 激发波长的激发条件下,具有较强的荧光信号。当传感体系中存在目标物四环素时,铜纳米簇的荧光强度显著降低。这可能是由于四环素与 poly-T 模板铜纳米簇表面的基团发生相互作用,猝灭了铜纳米簇的荧光,导致荧光信号的降低。试验通过研究四环素存在与否对荧光响应的差异,设计了一种无标记、选择性的四环素荧光生物传感器。

2.2 荧光传感检测方法的可行性

为了检验该荧光传感方法用于四环素检测的可行性,即四环素的存在与否对铜纳米簇荧光强度的影响,测定了四环素存在与不存在时铜纳米簇的荧光值。如图 2 所示,当铜纳米簇体系中加入 10 μL 超纯水时,检测到强荧光值,当加入 10 μL 的 300 $\mu\text{mol/L}$ 的四环素时,荧光值显著降低。以上结果表明该荧光传感检测方法用于四

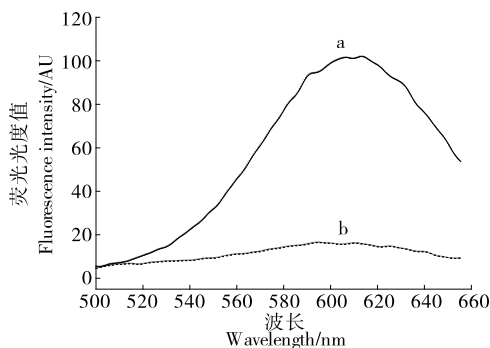
素的检测是可行的。

2.3 试验条件优化

2.3.1 Cu^{2+} 浓度的优化 根据检测原理,所开发传感器的检测性能在很大程度上取决于铜纳米簇的荧光强度。因此,考察了合成条件对反应的影响。如图 3 所示,铜纳米簇的荧光强度随 Cu^{2+} 浓度的增加而迅速升高,当 Cu^{2+} 浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 时,荧光强度达到最高,当 Cu^{2+} 浓度 $>300 \mu\text{mol/L}$ 时,荧光强度随之降低。这可能是由于较高浓度的 Cu^{2+} 经还原剂活化后,通过氧基自由基降解聚 T 模板。结果表明, Cu^{2+} 的最佳浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3.2 抗坏血酸浓度的优化 从图 4 可以看出,随着抗坏血酸浓度的增加,荧光强度显著增加,当抗坏血酸浓度为 5 mmol/L 时荧光强度达到最高。因此,选择 5 mmol/L 为抗坏血酸最佳浓度。

2.3.3 铜纳米簇合成时间优化 如图 5 所示,当 T30-ssDNA 中加入 Cu^{2+} 和抗坏血酸后,随着孵育时间的增加,荧光强度迅速增加,当时间为 5 min 时荧光强度达到最高并趋于平稳,因此,5 min 被选为铜纳米簇的最佳合成时间。



a. 不存在四环素 b. 存在 300 $\mu\text{mol/L}$ 四环素

图 2 不同条件下的 T30-ssDNA 模板铜纳米簇的荧光发射光谱图

Figure 2 Fluorescence emission spectra of T30-ssDNA templated CuNCs in the absence and presence of 300 $\mu\text{mol/L}$ tetracycline, respectively

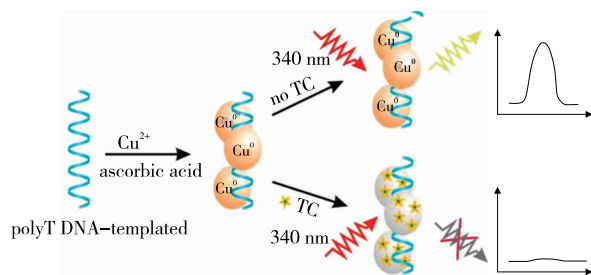


图 1 基于非标记聚 T 单链 DNA 模板铜纳米簇的四环素传感检测原理

Figure 1 Schematic illustration of the label-free fluorescence sensing strategy for TC detection based on T30-ssDNA templated CuNCs

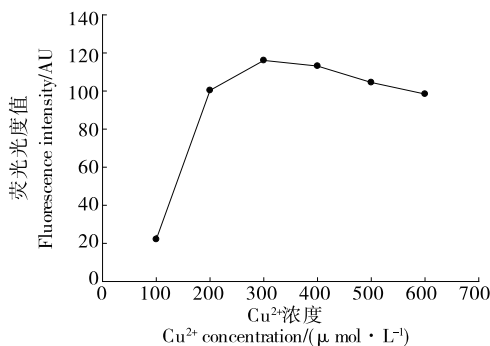


图 3 Cu^{2+} 浓度对铜纳米簇荧光强度的影响

Figure 3 The effects of Cu^{2+} concentration on the fluorescence intensity of poly-T templated CuNCs

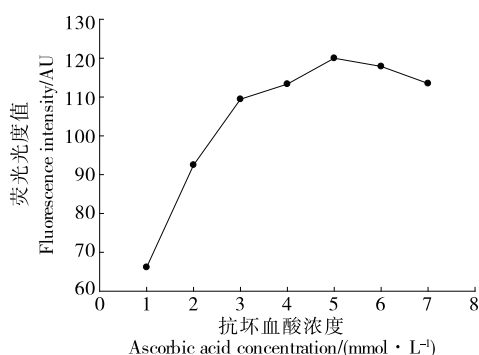


图4 抗坏血酸浓度对铜纳米簇荧光强度的影响

Figure 4 The effects of ascorbic acid concentration on the fluorescence intensity of T30-ssDNA templated CuNCs

2.3.4 四环素孵育时间优化 如图6所示,四环素加入后,随着孵育时间的延长荧光强度逐渐降低,孵育时间超过5 min后荧光强度趋于平稳。在最初的3 min内,荧光强度迅速下降(下降了89%)。因此,为了获得较短的反应时间,选择5 min为四环素最佳孵育时间。荧光法对四环素的定量分析性能,在优化的试验条件下

2.4 检测方法的性能

为了进一步研究基于T30-ssDNA模板的铜纳米簇

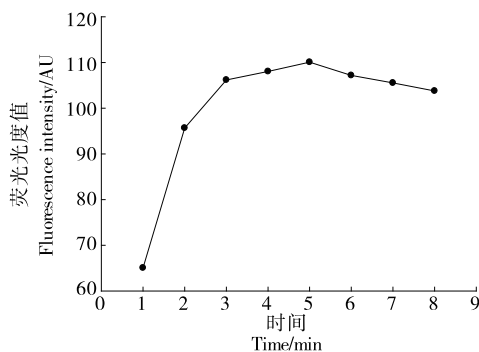


图5 铜纳米簇合成时间对荧光强度的影响

Figure 5 The effects of time of CuNCs synthesis

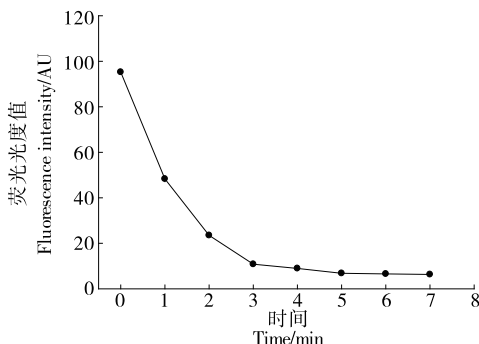
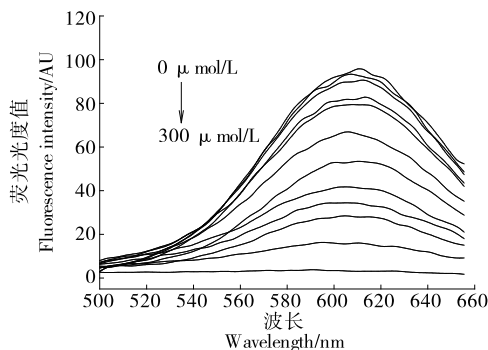


图6 四环素孵育时间对铜纳米簇荧光强度的影响

Figure 6 The effects of incubation time of tetracycline on the fluorescence intensity of T30-ssDNA templated CuNCs

检测了加入不同浓度四环素的荧光强度。图7描绘了在不同浓度的四环素存在下,T30-ssDNA为模板的铜纳米簇的典型荧光光谱。从图7可以看出,在0~300 $\mu\text{mol/L}$ 的四环素浓度范围内,荧光强度随浓度的增加逐渐降低。图8示出了四环素浓度与610 nm处的荧光强度之间的关系。在0~80 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内,荧光强度和四环素浓度之间获得了良好的线性关系,线性回归方程为 $y = -0.6879C_{TC} + 96.122$,线性回归系数 $R^2 = 0.9961$ 。根据空白响应的3倍标准偏差,检测限为0.01 $\mu\text{mol/L}$,按式(1)进行换算后可得到:用于四环素残留量的检测范围为0~384 720 $\mu\text{g/kg}$,且测定低限为48 $\mu\text{g/kg}$,略低于国家标准^[28]检测方法(液相色谱质谱法)的检测限50 $\mu\text{g/kg}$ 。根据中国现行判定标准^[9]的规定,牛奶样品中的四环素残留限量为100 $\mu\text{g/kg}$,肌肉样品中的四环素残留限量为200 $\mu\text{g/kg}$,该标准中四环素残留限量均在试验方法四环素残留量的检测范围内,这些结果进一步证明,试验提出的无标记荧光生物传感器可以应用于目标



荧光曲线从上至下四环素浓度分别是0.0,0.5,5.0,10.0,20.0,40.0,60.0,80.0,100.0,150.0,200.0,300.0 $\mu\text{mol/L}$

图7 不同浓度四环素的荧光发射光谱图

Figure 7 Fluorescence emission spectra of CuNCs in the presence of increasing tetracycline concentrations the curves from top to bottom

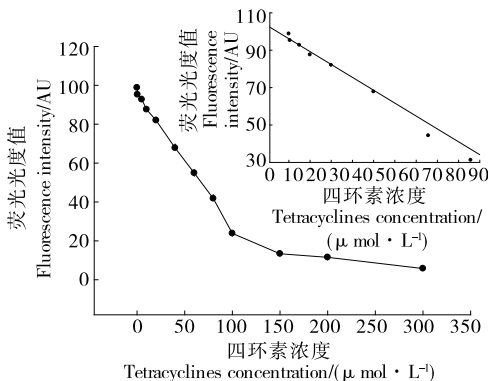


图8 浓度校准曲线

Figure 8 The relationship between the fluorescence intensity and the concentration of tetracycline

四环素的定量分析,性能良好,且该方法能对实际样品四环素残留量是否合格进行判定。

$$X = \frac{c \times v \times 500 \times 480.9}{m}, \tag{1}$$

式中:

- X——样品中待测组分的含量,μg/kg;
- c——测定液中待测组分的浓度,μmol/L;
- v——测定液的体积,0.1 mL;
- m——待测样品的质量,g;
- 500——稀释倍数;
- 480.9——四环素的摩尔分子量。

2.5 检测方法的特异性

为了验证检测方法的特异性,测试了其他抗生素、金属离子、氨基酸、糖类对铜纳米簇的荧光影响,结果见图 9。由图 9 可知,只有四环素类抗生素(盐酸四环素、土霉素、金霉素)能显著降低铜纳米簇的荧光强度,其他干扰物对荧光强度无影响,以上结果表明四环素类抗生素对铜纳米簇的荧光猝灭作用具有特异性。

2.6 实际样品分析

为探讨食品中四环素测定方法的可行性,分别在牛奶和鸡肉样品中加入标准品进行分析,采用标准加入法

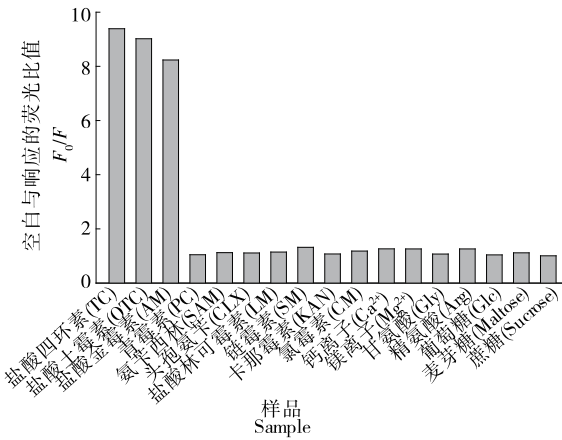


图 9 传感器的特异性考察

Figure 9 Specificity analysis of the sensor for tetracyclines

评价了该方法的实用性。结果见表 1。牛奶样品中,3 个加标水平的平均回收率在 98.72%~108.30%,相对标准偏差(RSD,n=6)为 2.36%~4.01%,鸡肉样品中,3 个加标水平的平均回收率在 97.67%~110.23%,相对标准偏差(RSD,n=6)为 2.98%~3.84%,表明该检测方法准确性较好,能够被用于实际样品检测。

表 1 实际样品中四环素的加标回收率
Table 1 Recovery of tetracycline in real samples

样品	样品编号	加标水平/(μg · kg ⁻¹)	测定值/(μg · kg ⁻¹)	RSD/%	回收率/%
牛奶	1	96	103.968	3.86	108.30
	2	192	189.542	4.01	98.72
	3	960	1 011.456	2.36	105.36
鸡肉	4	96	104.429	3.04	108.78
	5	192	211.641	3.84	110.23
	6	960	937.632	2.98	97.67

3 结论

利用聚 T 单链为模板制备铜纳米簇作为荧光探针构建了一种荧光生物传感方法用于四环素的检测。结果显示,该方法对四环素具有灵敏度高、选择性强的检测能力,检测限为 0.01 μmol/L。与其他方法相比,该检测方法具有以下优点:① 这种新型传感器无需共轭或标记过程,所有的反应过程都在 10 min 内室温避光下完成;② 对四环素类抗生素具有较高的特异性。此外该方法可用于牛奶、鸡肉等实际样品中四环素的测定,因此作为一种无标记、快速、高选择性、高灵敏度的四环素类的检测平台,在食品分析等领域的小分子检测中具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] UTTAM A, CHANDRIMA J, RAVI KIRAN B, et al. Ex-

ploring the mechanism of fluorescence quenching in proteins induced by tetracycline [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2011, 115(19): 6 312-6 320.
[2] MORGAN S, AUDREY R L, SÉBASTIEN S. Quantitative performance of liquid chromatography coupled to Q-Exactive high resolution mass spectrometry (HRMS) for the analysis of tetracyclines in a complex matrix[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 853: 415-424.
[3] 张慧敏, 章明奎, 顾国平. 浙北地区畜禽粪便和田间土壤中四环素类抗生素残留[J]. 生态与农村环境学报, 2008, 24 (3): 69-73.
[4] 王云鹏, 马越. 养殖业抗生素的使用及其潜在危害[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(9): 519-523.
[5] LI Xiao-wan, LI Chen-yu, CHEN Li-gang. Preparation of multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for analysis of tetracycline hydrochloride [J]. New Journal of

- Chemistry, 2015, 39(12): 9 976-9 982.
- [6] CAROLINA N, MÓNICA G, FERNANDO S, et al. Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS[J]. FoodControl, 2014, 46: 495-501.
 - [7] PERES G T, RATH S, REYES F G R. A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey[J]. Food Control, 2010, 21: 620-625.
 - [8] 陈静. 青霉素与氯霉素、四环素类药物联合使用的不良反应分析[J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(19): 141-142.
 - [9] 中华人民共和国农业农村部, 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量: GB 31650—2019[S]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 28.
 - [10] European Union (EU). On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin: Commission regulation no. 37/2010[S]. [S.L.]: Official Journal of the European Union, 2010: 64.
 - [11] MOUDGIL P, BEDI J S, AULAKH R S, et al. Validation of HPLC multi-residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milk[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12: 338-346.
 - [12] BLASCO C, CORCIA A D, PICO Y. Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2009, 116: 1 005-1 012.
 - [13] PIKKEMAAT M G. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2009, 395: 893-905.
 - [14] GABRIELA I, RODRIGUEZ J A, IRMA P S, et al. Solid-phase extraction and large-volume sample stacking-capillary electrophoresis for determination of tetracycline residues in milk[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2018, 2 018: 1-7.
 - [15] WU Xing-yi, XU Zhong-qi, HUANG Zhuo, et al. Large volume sample stacking of cationic tetracycline antibiotics toward 10 ppb level analysis by capillary electrophoresis with UV detection[J]. Electrophoresis, 2016, 37(22): 2 963-2 969.
 - [16] JEON M, KIM J, PAENG K J, et al. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk[J]. Microchemical Journal, 2008, 88: 26-31.
 - [17] IMANI-NABIYYI A, SOROURADDIN M H, AMJADI M, et al. Luminol/CdTe quantum dots/sodium periodate system in conjunction with response-surface methodology for chemiluminometric determination of some tetracyclines [J]. Journal of Luminescence, 2014, 151: 57-65.
 - [18] CONZUELO F, CAMPUZANO S, GAMELLA M, et al. Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 50: 100-105.
 - [19] GUO Feng, ZHU Zi-han, ZHENG Zhang-qin, et al. Facile synthesis of highly efficient fluorescent carbon dots for tetracycline detection[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27: 4 520-4 527.
 - [20] WANG Hai-bo, CHEN Ying, LI Yang, et al. Blocking the formation of fluorescent poly(thymine)-templated copper nanoparticles for label-free and sensitive detection of kojic acid in foodstuffs[J]. Analytical Methods, 2016, 8: 8 322-8 328.
 - [21] OU Li-juan, LI Xiao-yan, LI Li-juan, et al. A sensitive assay for trypsin using poly(thymine)-templated copper nanoparticles as fluorescent probes[J]. Analyst, 2015, 140: 1 871-1 875.
 - [22] SONG Chun-xia, HONG Wen-wen, ZHANG Xiao-yu, et al. Label-free and sensitive detection of Ochratoxin A based on dsDNA-templated copper nanoparticles and exonuclease-catalyzed target recycling amplification[J]. Analyst, 2018, 143(8): 1 829-1 834.
 - [23] ZHANG Liang-liang, ZHAO Jing-jin, ZHANG Hua, et al. Double strand DNA-templated copper nanoparticle as a novel fluorescence indicator for label-free detection of polynucleotide kinase activity [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 44: 6-9.
 - [24] HU Rong, LIU Ya-ru, KONG Rong-mei, et al. Double-strand DNA-templated formation of copper nanoparticles as fluorescent probe for label free nuclease enzyme detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 42: 31-35.
 - [25] SONG Chun-xia, YANG Xiao-hai, WANG Ke-min, et al. Label-free and non-enzymatic detection of DNA based on hybridization chain reaction amplification and dsDNA-templated copper nanoparticles[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 827: 74-79.
 - [26] CHEN Ji-hua, HAN Ting, FENG Xiu-yun, et al. Poly(Thymine)-templated fluorescent copper nanoparticles hydrogel based visual and portable strategy for organophosphorus pesticides assay[J]. Analyst, 2019, 144: 2 423-2 429.
 - [27] WANG Hai-bo, LI Yang, BAI Hong-yu, et al. Development of rapid and label-free fluorescence sensing of tetracyclines in milk based on poly(adenine) DNA-templated Au nanoclusters[J]. Food Analytical Methods, 2018, 11: 3 095-3 102.
 - [28] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 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: GB/T 21317—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.