

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.12.031

基于核酸适配体检测动物性食品中 卡那霉素残留研究进展

Research progress in aptasensors for the detection of kanamycin
residues in animal-derived foods

马婧怡^{1,2} 田冰¹ 王鑫¹ 陶晓奇¹

MA Jing-yi^{1,2} TIAN Bing¹ WANG Xin¹ TAO Xiao-qi¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 国家级食品科学与工程实验教学示范中心(西南大学), 重庆 400715)
(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. National Demonstration Center
for Experimental Food Science and Technology Education, Southwest University, Chongqing 400715, China)

摘要:综述了动物性食品中卡那霉素适配体检测方法的研究进展,概述了比色法、荧光法、电化学法、表面增强拉曼散射法等检测方法的试验原理,总结分析了不同方法中所使用的适配体序列及不同检测方法的优缺点,并对卡那霉素适配体检测方法的未来发展方向进行了展望。

关键词:卡那霉素;核酸适配体;动物性食品

Abstract: The research progress in aptasensors for the detection of kanamycin residues in animal-derived foods was summarized. The principles of the colorimetric, fluorescent, electrochemical methods, and surface-enhanced raman scattering and so on were outlined. Then the advantages and drawbacks of the above detection methods, and aptamer sequences used were summarized. Moreover, the development of aptasensors for kanamycin detection was prospected.

Keywords: kanamycin; aptamer; animal-derived foods

卡那霉素(kanamycin)是从链霉菌或小单胞菌培养液中提取,或以天然品为原料半合成提取而获得的一种碱性氨基糖苷类抗生素^[1],主要通过抑制细菌的蛋白质合成而起到杀灭细菌的作用。其能够抑制葡萄球菌、巴氏杆菌、沙门氏菌等细菌的生长繁殖,常被用于治疗畜禽细菌感染^[2-4]。由于廉价且抗菌性好的特点,卡那霉素被作为兽药在畜禽养殖中广泛使用,但滥用会导致其在动物性食品中残留超标,长期摄入将对人体产生肾毒性、

造血系统毒性等毒副作用^[5-6],如2012年的“速成鸡”事件^[7]。中国、欧盟、日本以及美国均制定了动物性食品中卡那霉素的最高残留限量(MRLs),欧盟规定MRLs为:肉类100 μg/kg、肝脏600 μg/kg、肾脏2500 μg/kg、牛奶150 μg/kg^[8];中国的GB 31650—2019中规定MRLs为:肌肉100 μg/kg、皮脂100 μg/kg、肝脏600 μg/kg、肾脏2500 μg/kg、奶150 μg/kg。因此,为规范养殖业中卡那霉素的使用及维护食品安全,建立快速且准确的检测方法具有重要意义。

目前,卡那霉素残留的检测方法有仪器分析法和免疫分析法。仪器分析法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[9]、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)^[10]、超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)^[11]等,这类方法灵敏度高,但设备昂贵、检测程序复杂且对试验人员要求较高^[12]。基于特异性生物识别元件的免疫分析方法,因具有快速灵敏、操作简便等优点,被广泛应用于食品检测中,其常用的特异性生物探针有抗体和适配体。抗体作为一种传统的免疫分析方法识别元件,其生产成本高、周期长、免疫活性不稳定且修饰标记复杂^[13-14]。核酸适配体作为一种新型识别元件,是经体外筛选技术(SELEX)筛选出的具有目标物特异性识别功能的单链DNA或RNA,由于其生产成本低、合成快、亲和力强、稳定且易于修饰标记,近年来在食品检测领域中迅速发展^[15]。文章拟对动物性食品中卡那霉素残留的核酸适配体检测方法进行综述,总结其发展现状,并展望其未来发展方向,以期为保障食品安全,建立简便快速的检测方法提供依据。

1 核酸适配体

核酸适配体是一段能与靶标分子特异性结合的单链DNA或RNA序列,一般由10~100个核苷酸碱基组成,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31672605);重庆市自然科学基金(编号:cstc2018jcyjAX0242)

作者简介:马婧怡,女,西南大学在读本科生。

通信作者:陶晓奇(1986—),西南大学副教授,博士。

E-mail:taoxiaoqi@swu.edu.cn

收稿日期:2021-10-15

可以特异性结合酶、抗体、金属离子、生物毒素等的靶标分子。由于性能优越,其常被用于快速高效地检测动物性食品中抗生素残留^[16-17]。近年来,基于适配体检测动物性食品中卡那霉素残留所使用的适配体序列如表1所示。由表1可知,可用于检测的适配体种类较少,而且在大多数检测方法中都使用了5'-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'这一适配体序列,其亲和性被普遍认同,且此适配体用于卡那霉素检测中,大约有82%的文献使用了该序列。但有研究^[35]表明,5'-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'这一最常用的适配体序列似乎不能与卡那霉素发生特异性结合;同时,有关联合使用纳米金(AuNPs)与适配体用于卡那霉素的检测方法中,忽略了AuNPs与靶标分子间(卡那霉素)的相互作用,卡那霉素可强烈吸附在AuNPs上。基于核酸适配体检测卡那霉素残留时,常用标记适配体、核酸扩增、与纳米材料联合应用等方法提高其灵敏度,而对适配体的探索与改进却较少。而改良的SELEX可筛选出性能更好的适配体,并且更加经济高效^[36],为适配体的商业化应用提供了可能;Zhang等^[37]设计出提供多个结合位点的多价适配体,增强了对目标分子的亲和力,为适配体检测方法的改进提供了新策略。

2 检测方法

目前,基于核酸适配体检测动物性食品中卡那霉素残留的检测方法主要包括比色法、荧光法、电化学法、表

面增强拉曼散射法等。

2.1 比色法

比色法是通过比较或测量有色物质溶液颜色来分析待测物质含量的一种方法,该方法无需复杂昂贵的检测设备,只需利用分光光度计进行检测,具有操作简便、检测快速且检测结果肉眼可见等优点。常见的比色法有两类:利用AuNPs聚集显色和利用过氧化物酶活性催化显色。

2.1.1 基于纳米金聚集显色 核酸适配体易于修饰标记,这使得检测方法灵活多样,尤其是与AuNPs的联用最为广泛,适配体可通过碱基互补配对结合在AuNPs表面,当AuNPs被某种条件诱发时会产生聚集,此时由于表面等离子体共振吸收(SPR)的变化会呈现出与分散状态下不同的光学性质^[38],通过检测加入目标物质前后溶液颜色的变化,即可分析目标物质含量。

AuNPs的聚集可以由多种因素诱发,如利用AuNPs表面的修饰探针与适配体杂交,形成AuNPs/探针/适配体聚合物,导致AuNPs聚集。基于这一原理,Zhou等^[18]利用与适配体3'端和5'端分别互补的两种单链DNA(ssDNA1/ssDNA2)修饰AuNPs,适配体与这两种功能化AuNPs一起孵化时会形成聚合物(AuNPs/ssDNAs/适配体),当卡那霉素存在时,适配体会与卡那霉素结合从而竞争性解离AuNPs聚合物,并使溶液的紫外可见光谱发生改变。该方法具有良好的特异性与准确性,检测范围为1~500 nmol/L,检测限为1 nmol/L,可用于牛奶样品

表1 卡那霉素的适配体序列

Table 1 The aptamer sequence of kanamycin

适配体序列 5'-3'	参考文献
5-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[18]
5-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGAGTCAC-3'	[19]
5-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[20]
5-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[21]
5-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[22]
5-TGTCCAAGTGGTCTTGAGGTTTTTT-3'	[23]
5-AGATGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[24]
5-CGGAAGCGGCCACCCATCGGCGGGCGGAAGCTTGCG-3'	[25]
5-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[26]
5-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGACCATGTACTTTT-3'	[27]
5-CAGCCGAATCGGAGTTGGGGGT-3'-NH ₂	[28]
5-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'-NH ₂	[29]
5-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -TCTGGGGGTTGAGGCTAAGCCGACAG-3'	[30]
5-Biotin-AGATGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[31]
5-NH ₂ -C ₆ -AGATGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[32]
5-Cy3-GCTTCCAGCTTATGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	[33]
5-HS-(CH ₂) ₆ -TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-Biotin-3'	[34]

中卡那霉素残留物的检测,但该方法功能化 AuNPs 的表面修饰和分离过程复杂繁琐,检测效率低。

利用高浓度的盐诱导 AuNPs 聚集的检测方法则无需复杂的修饰分离过程,能有效提高检测效率。张彩艳等^[19]利用这一原理对牛奶中的卡那霉素残留进行了检测,试验原理如图 1(a)所示。当样品中无卡那霉素时,核酸适配体与其互补单链 DNA 形成稳定的双链结构,加入卡那霉素后,核酸适配体与卡那霉素结合,释放出互补单链 DNA 吸附于 AuNPs 表面,导致 AuNPs 在高盐条件下仍能保持稳定,颜色不会发生改变。该方法具有良好的选择性与灵敏度,线性范围为 0.02~0.30 μmol/L,检出限为 8 nmol/L,同样无需对 AuNPs 表面进行修饰,Li 等^[20]基于鱼精蛋白与 AuNPs 间存在很强的静电相互作用,设计了一款基于外切酶 I(Exo I)辅助信号放大和鱼精蛋白诱导 AuNPs 聚集的传感器,利用外切酶辅助有效放大了传感器产生的信号以实现超灵敏检测,该方法选择性极佳,线性范围为 0.000 1~10.000 0 nmol/L,检测限为 0.028 pmol/L,并且检测时只需将适配体/互补 DNA 双链探针、目标物、鱼精蛋白和 AuNPs 简单均匀混合到溶液中,操作步骤简单。

虽然依据 AuNPs 聚集与否的比色法具有很多优势,但当适配体不存在时,卡那霉素可直接吸附到未经修饰的 AuNPs 上,干扰其表面的电荷分布,产生假阳性比色信号^[39],且 AuNPs 易受复杂反应体系影响产生非特异性聚集变色^[40],这些干扰因素在设计检测方法时不可忽视。
2.1.2 基于过氧化物酶活性催化显色 此类显色反应常以酶催化氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色反应为基础^[41]。天然酶如辣根过氧化物酶(HRP)常被用于催化 H₂O₂-TMB 体系显色,其催化效率高、专一性强,但易受物理和化学因素影响而失活。鉴于此,利用纳米酶

或脱氧核酶(DNAzyme)模拟过氧化物酶活性催化 H₂O₂-TMB 体系显色的方法,在食品检测领域快速发展^[42]。

相比于天然酶,纳米酶具有高效、稳定、易获得等优势,是最具前景的天然酶替代材料之一。基于纳米酶的比色法具有稳定、方便的优点。Tang 等^[21]利用碳基纳米材料模拟过氧化物酶活性,设计了比色传感器用于检测卡那霉素残留,其试验原理如图 1(b)所示。该方法中游离卡那霉素适配体(Ky2 适配体)通过范德华力吸附在二硫化钨(WS₂)纳米片表面,提高纳米酶与 TMB 的亲合力,导致分层 WS₂纳米片的过氧化物酶模拟活性显著提升,催化 H₂O₂-TMB 体系转化为蓝色。加入卡那霉素后,Ky2 适配体与卡那霉素优先结合,进而从 WS₂上脱离下来,不再增强 WS₂纳米片的过氧化物酶模拟活性,溶液呈浅蓝色甚至无色。这种传感器平均回收率为 93.0%~110.0%,相对标准差为 3.5%~8.7%,线性范围为 0.1~0.5 μmol/L,检测限达 0.06 μmol/L,且 WS₂纳米片具有良好稳定性(贮藏 1~2 年催化活性几乎不受影响)及可重复使用性(6 个循环后保持约 85%的催化活性)。Liu 等^[22]利用贵金属纳米酶模拟过氧化物酶活性,设计了基于适配体的切口酶辅助信号放大的超灵敏比色传感器。该试验制备了一种含有 DNA 适配体的发夹探针,当卡那霉素存在时,探针中的靶 DNA 会游离出来与信号探针杂交,此时切口酶切割信号探针释放出铂纳米颗粒(PtNPs),靶 DNA 则进入下次循环,磁分离后积累的大量 PtNPs 将催化 H₂O₂-TMB 体系显示蓝色。此方法相对标准偏差约为 3.63%,灵敏度与选择性良好,检测极限为 0.000 2 μg/kg 远低于需检测水平 150 μg/kg。虽然纳米酶具有诸多优势,但是与天然酶相比其选择性方面仍有欠缺,且大多数纳米酶活性较低^[43],因此发展种类更为广泛且性能较好的纳米酶对检测技术的进步具有重要意义。

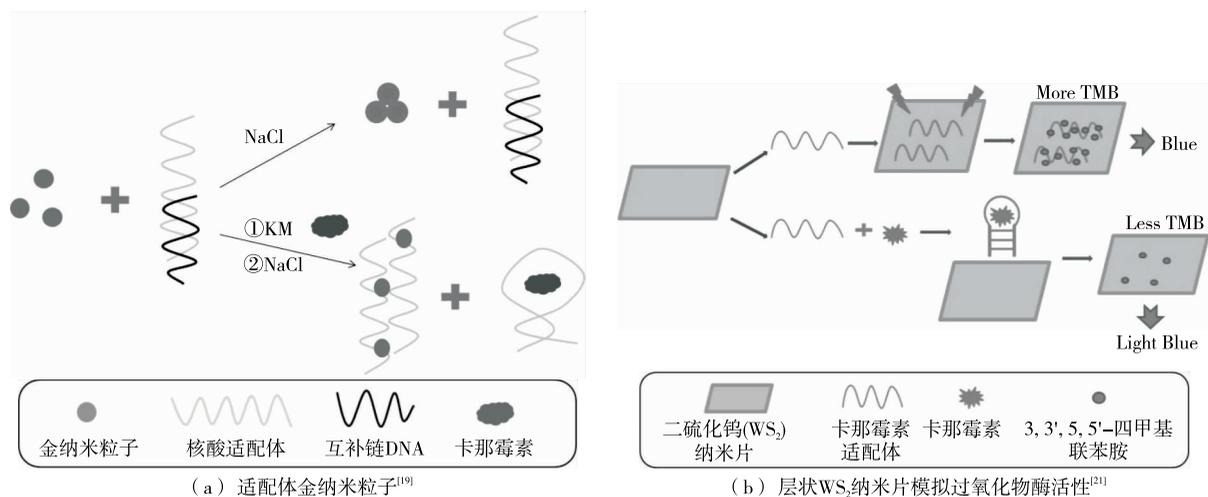


图 1 基于卡那霉素适配体的比色法检测卡那霉素

Figure 1 Determination of the aptasensor for detection of kanamycin based on colorimetric methods

利用具有催化功能的 DNAzyme 模拟过氧化物酶活性同样可以催化 H_2O_2 -TMB 体系显色,Chen 等^[23]将具催化功能的 DNAzyme(S1)与卡那霉素适配体(S2)杂交来抑制 S1 过氧化物酶催化活性,当加入卡那霉素时,适配体与卡那霉素特异性结合,释放出 S1 催化 H_2O_2 -TMB 体系变色,同时由于 S2 与卡那霉素结合形成发夹结构,其发夹尾部可以与单链核苷酸(S3)进行互补配对,触发外切酶 III(Exo III)切割 S2,释放卡那霉素进行目标物回收使 S1 数量增多,从而起到放大信号的作用。最佳条件下,该方法回收率为 91.1%~109.0%,相对标准差低于 9.3%,吸光度和卡那霉素质量浓度对数值在 0.000 1~10.000 0 $\mu\text{g/L}$ 内有良好的线性关系,检测极限约为 0.045 pg/mL ,具有很好的可重复性,并且该方法中所有反应都在均匀系统中一步进行,无需费时费力的表面修饰、孵化及复杂纳米材料的合成等过程,具有成本较低且无需复杂标记的突出优势。

比色法简便快速、成本较低,且具有检测结果可直接用肉眼进行观察的优势,但是存在检测中干扰严重、灵敏度低、需要复杂的样品预处理过程等缺点。其常常利用 AuNPs 聚集与过氧化物酶活性催化显色,但 AuNPs 的聚集易受干扰^[39-40],且纳米酶与 DNAzyme 存在活性与特异性欠佳等问题^[43],因此局限了比色法在卡那霉素检测中的应用。

2.2 荧光法

荧光法是基于一些荧光物质能够在一定激发波长下发出荧光的原理,通过检测荧光强度的变化来对物质进行定性或定量分析的方法^[15],对试验仪器要求低、灵敏度高且受外界影响小^[44]。核酸适配体具有易被修饰标记的优良特性,常对核酸适配体或其互补链进行荧光标记,因此往往可以根据是否进行荧光标记将荧光法分为荧光标记型和荧光非标记型。

2.2.1 荧光法标记型

荧光标记型检测方法需要对探针进行荧光标记。常用的核酸适配体荧光标记材料有荧光染料、量子点和贵金属纳米簇等^[15]。Deng 等^[24]利用荧光染料 Cy3、Cy5 标记的核酸链对卡那霉素进行检测,其中聚合酶催化扩增(PCA)和催化发夹自组装(CHA)两个循环信号放大过程大大提高了灵敏度及选择性,检测原理如图 2(a)所示。第 1 个过程中适配体与其部分互补 DNA 链(cDNA)杂交,当加入卡那霉素后释放出 cDNA 与模板 DNA 链(pDNA)杂交,并在聚合酶作用下从 cDNA 的 3'端以 pDNA 为模板进行聚合,新生成的序列可通过内切酶切割而释放出复制 DNA 链(H0)。第 2 个过程由 H0 触发,发夹结构 DNA 链 H1 的 3'端被 Cy3 标记而发夹结构 DNA 链 H2 的 5'端被 Cy5 标记,H0 存在时可打开 H1、H2 链发夹结构形成 H1/H2 双链,并释放 H0

继续进行信号循环放大,H1/H2 的双链结构使 Cy3、Cy5 互相接近,产生基于荧光共振能量转移(FRET)原理的荧光信号。该传感器回收率为 88.1%~100.2%,在 1.0~80.0 nmol/L 内具有良好的线性相关关系($R^2=0.990 1$),检测限低至 0.29 nmol/L ,在牛奶样品中取得了良好的检测结果。同样基于 FRET 检测原理,Ha 等^[25]将荧光基团 6-羧基荧光素(FAM)作为供体,还原氧化石墨烯(rGO)作为受体,设计了一种荧光传感器。将适配体的 5'端用 FAM 标记,其可以通过 $\pi-\pi$ 键吸附于 rGO 表面而导致 FAM 荧光淬灭,当卡那霉素存在时则会诱导 FAM 标记的适配体从 rGO 表面脱落,导致荧光增强。这种检测方法快速、灵敏,线性范围为 1.0~20.0 pmol/L ,检测极限为 1 pmol/L ,并且所有试验过程不超过 1 h,可用于快速检测卡那霉素残留。标记型的荧光法需要对探针进行荧光标记,虽然这种检测方法更为灵敏,却存在标记过程复杂费时、不同批次的探针间可能存在差异等弊端。

2.2.2 荧光法非标记型

非标记型的荧光法无需进行荧光标记,不仅简化了试验还避免了探针间可能存在的差异。Yang 等^[26]基于 N-甲基卟啉二丙酸 IX(NMM)与 G-四链体结构结合后其荧光强度显著增强这一现象,设计了一种简单的无标记荧光检测法用于检测卡那霉素,试验原理如图 2(b)所示。其设计了 P1 与 P2 两条单链 DNA,P1 末端包含一个 G-四链体 DNA 序列,P1 中段与 P2 互补,P2 为卡那霉素的 DNA 适配体。当卡那霉素不存在时,P1 与 P2 相互杂交,P1 无法形成 G-四链体结构,添加 NMM 后,荧光强度不会增强。当卡那霉素存在时,其与 P2 结合,导致 P1 释放,加入 NMM 后,P1 与 NMM 结合自折叠形成 G-四链体结构,此时荧光强度明显增强。该方法选择性与灵敏度较好,线性范围为 0.5~100.0 nmol/L ,检测限为 0.5 nmol/L ,并且无需荧光基团的修饰,操作简便。Zhou 等^[27]将适配体与发夹模板部分杂交,当卡那霉素存在时,适配体脱离发夹模板并启动 Mg^{2+} 依赖性 DNA 酶的自主合成,合成的 DNA 酶切割信号发夹底物,释放出可以与荧光染料硫黄素 T(ThT)结合的 G-四链体使荧光显著增强,利用荧光强度的变化可对卡那霉素含量进行测定。基于引物交换反应(PER),该荧光非标记方法具有无标签、高灵敏度等优点,在 1~500 nmol/L 内线性关系良好($R^2=0.994 1$),检测限达 0.36 nmol/L 。

荧光法灵敏稳定、检测设备简单,可以定量检测动物性食品中卡那霉素残留,但其使用需依赖物质特定的荧光结构。荧光法中标记型探针标记复杂且不同批次探针间可能有差异;非标记型荧光法虽然无需标记,但灵敏度不如前者,因而在检测中常利用 PER 等信号放大手段有效提高检测效率^[27],但同时也对试验条件有更严格的要求。

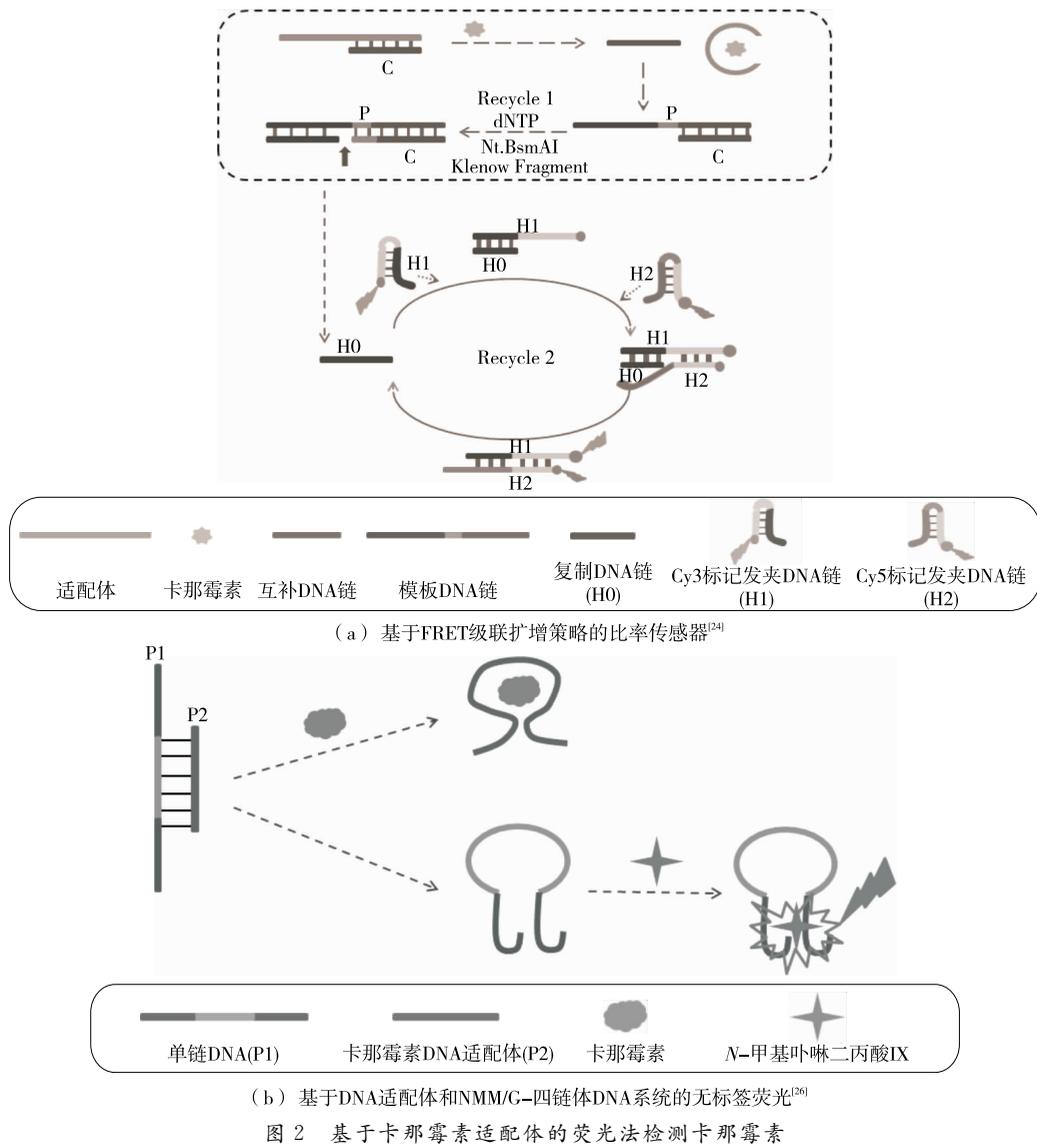


Figure 2 Determination of the aptasensor for detection of kanamycin based on fluorescent methods

2.3 电化学分析法

电化学分析法是根据待测物质的电化学性质,将化学量转化为电学量而进行定量分析的一种检测方法,具有简单快速、检测灵敏等特点^[45]。电化学传感器主要由敏感分子识别元件和转换器组成,敏感分子识别元件可与目标物质发生作用,转换器则负责输出检测信号。转换器包含修饰层与电学系统两部分,其中修饰层起到了将适配体与电极基底连接的作用,电学系统则将化学量放大转换为电学量并显示出来^[46]。由传感器设备输出参数的不同,可将电化学分析法分为电化学阻抗谱和伏安法^[41]。

2.3.1 电化学阻抗谱 电化学阻抗谱(EIS)是通过测量阻抗随正弦波频率的变化来对卡那霉素进行测定的方法,其特异性与灵敏度良好、检测速度快且无需标记。如

何高效率地将适配体结合在电极上是 EIS 面临的关键问题之一,Kulikova 等^[28]在适配体传感器表面层引入炭黑(CB),利用 CB、壳聚糖、硫杂杯芳烃复合物作为载体来固定适配体,这种表面层结构使适配体传感器对被测样品的基质化合物敏感性降低,该方法的线性范围为 0.7~50.0 nmol/L,检测限为 0.3 nmol/L,检测牛奶和酸奶时,回收率为 95%~115%。Sharma 等^[29]利用被修饰过的印刷碳电极(4-CP/SPCE)固定卡那霉素单链 DNA 适配体,再通过 EIS 进行定量分析。这种固定形式极大提高了反应平台的稳定性和灵敏度,该方法的线性范围为 1.20~600.00 ng/mL,检测限为 0.11 ng/mL,并且在结构类似物链霉素(SRT)和庆大霉素(GENTA)存在时仍具有良好的选择性,其无需标记与可直接检测的优势为现场检测动物性食品中卡那霉素的残留提出了一种新

方案。

2.3.2 伏安法 伏安法是以电流变化作为输出信号来对卡那霉素进行测定。由于这类方法可以有效消除背景电流、获得良好的灵敏度与较低检测限,因而被广泛使用。Yao 等^[30]合成了包含胺基功能化的金属有机框架(UiO-66-NH₂)、多壁碳纳米管@还原氧化石墨烯纳米带(MWCNT@rGONR),利用三聚氰胺和三聚氰胺单体缩聚(MCA 表示)合成的共价有机框架。并将 UiO-66-NH₂/MCA/MWCNT@rGONR 纳米复合材料作为电极,使用方波伏安法(SWV)检测了牛奶和鱼肉中的卡那霉素残留。首先将适配体互补 DNA(cDNA)固定于纳米复合材料电极表面,当卡那霉素不存在时,适配体与电极表面的 cDNA 互补配对,亚甲蓝(MB)被插入到适配体与其互补链形成的双链结构中产生电流信号;添加卡那霉素后,适配体与卡那霉素特异性结合,这时双链 DNA 中的 MB 被释放导致电流减少,根据电流变化即可对卡那霉素进行定量分析。该方法稳定、灵敏、选择性较高,线性范围为 25~900 nmol/L,检测限为 13 nmol/L。为实现卡那霉素的超灵敏检测,许多信号放大策略应运而生,常用的信号放大策略有杂交链式反应(HCR)、催化发夹结构自组装(CHA)以及各种工具酶等。Tian 等^[31]将二硫化钒/纳米金(VS₂/AuNPs)纳米复合材料作为电极表面支撑材料,利用差动伏安法(DPV)进行检测,并通过合理设计信号放大策略使检测限大大降低,其中亚甲蓝标记的与适配体互补杂交的发夹 DNA(MB-hDNA)和钴铁氧体(CoFe₂O₄)纳米酶具有很好的信号放大作用。该传感器检测限低至 0.5 pmol/L,线性范围为 0.001~1 000.000 nmol/L,用于牛奶样品的回收率为 91.24%~112.59%,相对标准差低于 5.26%。此外这两种检测方法都具有可以通过改变适配体而对不同抗生素进行检测的优点。

2.3.3 电化学发光法 将电化学分析法与化学发光法的优势相结合的电化学发光法(ECL),由于具有发光反应易控制、选择性与灵敏性好的优点而被用于食品检测中^[47]。Cheng 等^[32]设计了利用纳米银粒子(AgNPs)催化鲁米诺—过氧化氢化学发光体系以提高检测灵敏度的适配体传感器,AgNPs 与鲁米诺和适配体以银—氨键结合,使得 ECL 的稳定性和敏感性增强,再根据 ECL 的强度即可确定卡那霉素浓度。该传感器准确性与稳定性好,线性范围为 0.5~100.0 ng/mL,检测限为 0.06 ng/mL,并且同样可以通过改变适配体而用于不同目标物质的检测。这种将多种方法结合应用以提高效率的检测方法,为食品检测提供了新方向。

与其他检测方法相比,电化学分析法检测成本低、反应速度快,并且具有易微型化、易实现在线监测的突出优势,因此在现场快速检测中具有其他方法难以实现的应

用潜力^[46]。但是基于电化学分析法的检测方法仍面临许多问题,如何固定适配体以提高检测效率、如何避免非特异性吸附、如何设计制造简便且成本低廉的电极材料以实现现场快速检测,这些问题都使电化学分析方法在基质复杂的食品检测中的使用受限^[48]。

2.4 表面增强拉曼散射法

表面增强拉曼散射(SERS)的检测原理为将待测物分子吸附于粗糙纳米金属材料表面,使待测物的拉曼信号增强 10⁴~10⁷倍,因其灵敏、简便、响应快、无需进行复杂的样品预处理等优点,被广泛应用于食品检测领域。其同样可以有效检测动物性食品中卡那霉素残留。随着激光及纳米技术的快速发展,SERS 的灵敏度、稳定性、重现性都获得了很大提升。

SERS 检测法获得信号的质量与活性基底的选择关系密切,Jiang 等^[33]以结合了 AgNPs 与 AuNPs 各自的性能优点的复合金@银核壳(Au@Ag)结构作为活性基底,利用 SERS 原理实现了卡那霉素的超灵敏检测,其试验原理如图 3 所示。将探针 DNA 结合到 AuNPs 表面,包裹银壳后添加被荧光染料 Cy3 标记的适配体,此时被标记的适配体与探针 DNA 碱基互补配对。当加入卡那霉素后,这种互补配对发生解离,此时 Cy3 远离银壳导致 SERS 信号减弱。这种方法线性范围为 10⁻⁷~10⁻¹¹ g/mL,检测限低至 0.90 pg/mL,在牛奶样品中回收率达 90.4%~112.0%,并且总试验时间低于 1 h。田润^[49]将 DNA 滚环扩增(RCA)技术与 SERS 联用,开发了一种简便、灵敏检测卡那霉素的适配体传感器。核酸适配体被组装到磁珠上,并与其互补链杂交形成生物探针。当卡那霉素存在时,互补链被释放并利用 RCA 技术形成网状结构捕获封闭磁珠和无标记封闭 Au@Au 核壳,经

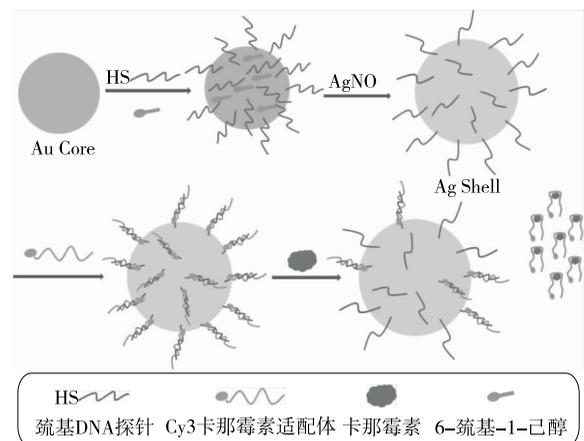


图 3 基于复合金@银核壳的 SERS 法检测卡那霉素原理示意图^[33]

Figure 3 Schematic diagram of the SERS-based method for kanamycin detection by using double strand DNA aptamer-bonding Au@Ag NP

磁分离得到磁珠—核壳—扩增产物复合物用于检测 SERS 信号。随着卡那霉素浓度的增加,传感器信号随之增长,线性相关系数 R^2 为 0.994 8,检出限达 0.867 pg/mL,样品回收率为 96%~118%。该适配体传感器中无需对金@金核壳(Au@Au)进行标记,且制备出的 Au@Au 核壳稳定性好,信号持久,可用于即时检测。

SERS 检测法灵敏快速且无需样品预处理,但在基于 SERS 检测法快速发展的同时,也逐渐发现性能好的活性基底较难获得、复杂的食品基质对分析结果影响较大等问题,且目前基于 SERS 分析方法的评价标准尚未明确^[50],仍需不断探索以发现最优检测方案。

2.5 侧流层析试纸条法

开发可用于现场检测的方法对食品市场监管具有重要意义,层析试纸条法可直接利用肉眼观察、成本低、操作简便、无需专业培养即可进行测定。Liu 等^[34]设计了一种可用于现场快速检测的侧流层析试纸条,其以适配体修饰的 AuNPs 作为探针。当未加入卡那霉素时,T 区与 C 区都显示明显红色,随着卡那霉素浓度变大,C 区颜色基本不变而 T 区红色逐渐变浅,浓度为 35 nmol/L 时颜色完全消失。这种侧流层析试纸条法检出限为 0.077 8 nmol/L,可以在 10 min 内完成检测,通过肉眼观察颜色变化可进行定性分析,利用扫描器可在 1~30 nmol/L 内进行定量分析。虽然该侧流层析试纸条具有低成本、快速简便等优点,但是其检测限较高,且复杂的食品基质和样品前处理都会对检测结果造成干扰。

3 总结与展望

随着人们生活水平的提高,食品安全问题逐渐走入公众视野并受到了极大的重视。抗生素在动物性食品中的残留给食品安全造成了极大的威胁,因此对其进行检测具有十分重要的意义。卡那霉素被广泛用于治疗动物疾病,在畜禽养殖中滥用会导致其在动物性食品中残留超标。检测中常将核酸适配体与纳米材料如 AuNPs、Pt-NPs、层状 WS₂ 纳米片等结合使用,使得检测方法灵活多样、检测能力不断提高,总而言之检测动物性食品中卡那霉素残留的方法将不断向着方便、快速、灵敏的方向发展。核酸适配体作为一种性能优良的抗体替代识别探针,其前景广阔,但仍面临许多挑战,如复杂食品基质中的有些物质会干扰适配体的特异性识别,导致检测结果不准确^[51]。因此发展特异性强、方便快速的检测方法,并将适配体检测方法与各种信号放大手段相结合,通过合理构建信号放大策略可以极大提高检测灵敏度,以实现卡那霉素残留的超灵敏检测。目前可用于检测卡那霉素的核酸适配体种类较少,使其在食品检测中的使用受限,后续研究可筛选出更多高质量的适配体。同时,在构建核酸适配体检测卡那霉素时,需要验证核酸适配体是否

能与卡那霉素特异性结合,这是建立检测方法的基础^[35]。

参考文献

- [1] 许媛媛. 一种基于分析物保护的银纳米颗粒和核酸适配体选择机制的卡那霉素比色检测方法[C]// 中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会第六次学术研讨会论文集. 乌鲁木齐: 中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会, 2018: 188.
- [2] XU Yuan-yuan. A colorimetric method for kanamycin detection based on an analyte-protected silver nanoparticle and nucleic acid aptamer selection mechanism[C]// Proceedings of the Sixth Symposium of the Veterinary Public Health Branch of the Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine. Urumqi: Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Veterinary Public Health Branch, 2018: 188.
- [3] 关奎奎, 谭敏, 汪露, 等. 患病牦牛和藏猪源沙门氏菌对氨基糖苷类、喹诺酮类和 β -内酰胺类药物敏感性试验[J/OL]. 中国动物传染病学报. (2021-04-27) [2021-08-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20210427.1038.020.html>.
- [4] GUAN Kui-kui, TAN Min, WANG Lu, et al. Antimicrobial sensitivity test to aminoglycosides, quinolones and β -lactams antibiotics of salmonella isolated from diseased yaks and tibetan pigs[J/OL]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases. (2021-04-27) [2021-08-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20210427.1038.020.html>.
- [5] KUMARI Neelam, SINGH Snehlata, KUMARI Vandana, et al. Ouabain potentiates the antimicrobial activity of aminoglycosides against staphylococcus aureus[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2019, 19(1): 119.
- [6] SATHYA Sadhasivam, LIM Yong-taik, PARTHASARATHI Shanmugam. Fabrication of drug-loaded calcium phosphate nanoparticles: An investigation of microbial toxicity[J/OL]. Journal of Cluster Science. (2021-07-06) [2021-08-10]. doi: 10.1007/S10876-021-02104-6.
- [7] 屠春燕. 基于适配体的食品中抗生素残留分析[D]. 金华: 浙江师范大学, 2019: 2-3.
- [8] TU Cun-yan. The analysis of antibiotic residues in foods based on aptamers[D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2019: 2-3.
- [9] KOVACIK Anton, TVRDA Eva, JAMBOR Tomas, et al. Cytotoxic effect of aminoglycoside antibiotics on the mammalian cell lines[J]. Journal of Environmental Science and Health (Part A), 2020, 56(1): 1-8.
- [10] 李锦利. “速成鸡”与食品安全[J]. 河南科技, 2014(24): 186-187.
- [11] LI Jin-li. "Instant chicken" and food safety[J]. Journal of Henan Science and Technology, 2014(24): 186-187.
- [12] MUSTAFA O C. Aptamer-based ellipsometric sensor for ultrasensitive determination of aminoglycoside group antibiotics from dairy products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(8): 3 386-3 393.
- [13] ZHANG Xing-ping, WANG Jiu-jun, WU Qing-hua, et al. Determination of kanamycin by high performance liquid chromatography[J]. Molecules, 2019, 24(10): 1 902.

- [10] ACARUZ U, INCE S, ARSLAN-ACARUZ D, et al. Determination of kanamycin residue in anatolian buffalo milk by LC-MS/MS[J]. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2020, 26(1): 97-102.
- [11] 马凯, 蔡芳叶, 黄永桥, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜜中九种氨基糖苷类药物残留[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 203-208.
MA Kai, CAI Fang-ye, HUANG Yong-qiao, et al. Detection of nine aminoglycosides residues in honey by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(18): 203-208.
- [12] 张娟. 基于适配体的卡那霉素检测方法研究及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 2-3.
ZHANG Juan. Study on the construction of an aptamer-based kanamycin assay and its application[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014: 2-3.
- [13] 王爱萍, 孙换平, 刘燕凯, 等. 卡那霉素单克隆抗体的研制及ELISA检测方法的建立[J]. 郑州大学学报(理学版), 2019, 51(3): 109-114.
WANG Ai-ping, SUN Huan-ping, LIU Yan-kai, et al. Development of anti-kan monoclonal antibody and establishment of ELISA detection method[J]. Journal of Zhengzhou University (Natural Science Edition), 2019, 51(3): 109-114.
- [14] 陈婷婷, 王鑫, 陶晓奇. 基于特异性识别生物探针检测食品中雌激素残留研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 221-225.
CHEN Ting-ting, WANG Xin, TAO Xiao-qi. Research progress in detection of estrogen residues in food by biological probes based on specific molecular recognition[J]. Food & Machinery, 2020, 36(4): 221-225.
- [15] 王鑫, 刘河冰, 陶晓奇. 基于核酸适配体检测动物性食品中氯霉素残留的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(18): 254-262.
WANG Xin, LIU He-bing, TAO Xiao-qi. Advances in detection of chloramphenicol residues with aptamers in animal-derived foods [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(18): 254-262.
- [16] 张亚丽, 牛立沙, 赵丽敏, 等. 核酸适配体在乳及乳制品检测中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(5): 43-48.
ZHANG Ya-li, NIU Li-sha, ZHAO Li-min, et al. A review on recent advances in application of aptamers in the detection of milk and dairy products[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2020, 43(5): 43-48.
- [17] 高林晨萌, 叶华, 黄圣博, 等. 核酸适配体在食品危害物多靶标检测中的应用进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(4): 217-225.
GAO Lin-chen-meng, YE Hua, HUANG Sheng-bo, et al. Recent advances in simultaneous detection of food hazards based on aptasensor[J]. Food & Machinery, 2021, 37(4): 217-225.
- [18] ZHOU Nan-di, ZHANG Juan, TIAN Ya-ping. Aptamer-based spectrophotometric detection of kanamycin in milk [J]. Analytical Methods, 2014, 6(5): 1 569-1 574.
- [19] 张彩艳, 冯荣荣, 李晓霞. 金纳米粒子比色法检测卡那霉素的
- 研究[J]. 分析科学学报, 2018, 34(3): 372-376.
ZHANG Cai-yan, FENG Rong-rong, LI Xiao-xia. Colorimetric sensing for the determination kanamycin based on gold nanoparticles[J]. Journal of Analytical Science, 2018, 34(3): 372-376.
- [20] LI Jing-wen, LIU Yong-ming, LIN Hao, et al. Label-free exonuclease I-assisted signal amplification colorimetric sensor for highly sensitive detection of kanamycin [J]. Food Chemistry, 2021, 347: 128988.
- [21] TANG Yue, HU Yang, ZHOU Pei, et al. Colorimetric detection of kanamycin residue in foods based on the aptamer-enhanced peroxidase-mimicking activity of layered WS2 nanosheets[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(9): 2 884-2 893.
- [22] LIU Mei, YANG Zong-qi, LI Bao-xin, et al. Aptamer biorecognition-triggered hairpin switch and nicking enzyme assisted signal amplification for ultrasensitive colorimetric bioassay of kanamycin in milk[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128059.
- [23] CHEN Zhi-chao, XIONG Feng, YU Ai-min, et al. Aptamer biorecognition-triggered DNazyme liberation and Exo III-assisted target recycling for ultrasensitive homogeneous colorimetric bioassay of kanamycin antibiotic[J]. Chemical Communications, 2019, 55(27): 3 959-3 962.
- [24] DENG Jian-kang, LIU Ya-qing, LIN Xiao-dong, et al. A ratiometric fluorescent biosensor based on cascaded amplification strategy for ultrasensitive detection of kanamycin[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2018, 273: 1 495-1 500.
- [25] HA Na-reum, JUNG In-pil, LA Im-joung, et al. Ultra-sensitive detection of kanamycin for food safety using a reduced graphene oxide-based fluorescent aptasensor [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 40305.
- [26] YANG Hua-lin, WU Qing-hua, SU Dong-xiao, et al. A label-free and turn-on fluorescence strategy for kanamycin detection based on the NMM/G-quadruplex structure[J]. Analytical Sciences, 2017, 33(2): 133-135.
- [27] ZHOU Wen-jiao, XU Lin, JIANG Bing-ying. Target-initiated autonomous synthesis of metal-ion dependent DNazymes for label-free and amplified fluorescence detection of kanamycin in milk samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1148: 238195.
- [28] KULIKOVA T, GORBATCHUK V, STOIKOV I, et al. Impedimetric determination of kanamycin in milk with aptasensor based on carbon black-oligolactide composite[J]. Sensors, 2020, 20(17): 4 738.
- [29] SHARMA A, ISTAMBOULIE G, HAYAT A, et al. Disposable and portable aptamer functionalized impedimetric sensor for detection of kanamycin residue in milk sample[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2017, 245: 507-515.
- [30] YAO Xin, SHEN Jin-hui, LIU Qing-yan, et al. A novel electrochemical aptasensor for the sensitive detection of kanamycin based on UiO-66-NH₂/MCA/MWCNT@rGONR nanocomposites[J]. Analytical Methods, 2020, 12(41): 4 967-4 976.
- [31] TIAN Liang, ZHANG Yi, WANG Liu-bo, et al. Ratiometric dual

- signal-enhancing-based electrochemical biosensor for ultrasensitive kanamycin detection[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(47): 52 713-52 720.
- [32] CHENG Shu-ting, ZHANG Hui, HUANG Jing-cheng, et al. Highly sensitive electrochemiluminescence aptasensor based on dual-signal amplification strategy for kanamycin detection[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 737: 139785.
- [33] JIANG Ying-fen, SUN Da-wen, PU Hong-bin, et al. Ultrasensitive analysis of kanamycin residue in milk by SERS-based aptasensor[J]. *Talanta*, 2019, 197: 151-158.
- [34] LIU Jing, ZENG Jing-yi, TIAN Ya-ping, et al. An aptamer and functionalized nanoparticle-based strip biosensor for on-site detection of kanamycin in food samples[J]. *Analyst*, 2018, 143(1): 182-189.
- [35] ZHOU Jiao-jiao, LI Yu-qing, WANG Wen-jing, et al. Kanamycin adsorption on gold nanoparticles dominates its label-free colorimetric sensing with its aptamer [J]. *Langmuir*, 2020, 36(39): 11 490-11 498.
- [36] 邹雪梅, 周佳伟, 宋尚红, 等. 寡核苷酸适配体的筛选及在兽药残留检测中的应用[J]. *分析化学*, 2019, 47(4): 488-499.
- ZOU Xue-mei, ZHOU Jia-wei, SONG Shang-hong, et al. Screening of oligonucleotide aptamers and application in detection of pesticide and veterinary drug residues[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 47(4): 488-499.
- [37] ZHANG Yong, HU Yun, DENG Sha, et al. Engineering multivalence aptamer probes for amplified and label-free detection of antibiotics in aquatic products[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2 554-2 561.
- [38] 楚华琴, 卢云峰. 功能化纳米材料的制备及在食品安全检测中的应用研究进展[J]. *分析化学*, 2010, 38(3): 442-448.
- CHU Hua-qin, LU Yun-feng. Application of functional nanomaterials in food safety[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(3): 442-448.
- [39] 张志伟, 叶泰, 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 Zhi-wei, YE Tai, XU Fei, et al. Nucleic acid modified gold nanoparticles for spectrophotometric detection of kanamycin[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2020, 39(1): 44-47.
- [40] 吴亚, 徐智辉, 张彪, 等. 核酸适配体光学生物传感器在卡那霉素检测中的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(1): 193-201.
- WU Ya, XU Zhi-hui, ZHANG Biao, et al. Research progress of nucleic acid aptamer optical biosensor in kanamycin detection[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(1): 193-201.
- [41] LUAN Yun-xia, WANG Nan, LI Cheng, et al. Advances in the application of aptamer biosensors to the detection of aminoglycoside antibiotics[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(11): 787.
- [42] 李芙蓉, 向发椿, 曹丽萍, 等. 纳米酶在食品检测中的应用研究进展[J/OL]. *食品科学*. (2021-02-05) [2021-07-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210205.1437.008.html>.
- LI Fu-rong, XIANG Fa-chun, CAO Li-ping, et al. Recent advances and applications of nanozymes in food assay[J/OL]. *Food Science*. (2021-02-05) [2021-07-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210205.1437.008.html>.
- [43] TAO Xiao-qi, WANG Xin, LIU Bi-wu, et al. Conjugation of antibodies and aptamers on nanozymes for developing biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 168: 112537.
- [44] 吴迪, 高伟哲. 食品安全检测中化学检测技术的应用探究[J]. *食品安全导刊*, 2020(36): 184, 186.
- WU Di, GAO Wei-zhe. Exploring the application of chemical detection technology in food safety testing[J]. *China Food Safety Magazine*, 2020(36): 184, 186.
- [45] 段雨晴. 基于电化学传感的卡那霉素及 microRNA 痕量检测新方法研究[D]. 成都: 成都大学, 2020: 4-6.
- DUAN Yu-qing. The research of new method for kanamycin and microRNA trace detection based on the electrochemical sensing[D]. Chengdu: Chengdu University, 2020: 4-6.
- [46] 李凤琴, 俞志刚, 韩贤达, 等. 检测牛奶和水中卡那霉素残留物的电化学适配体传感器研究进展[J]. *分析科学学报*, 2019, 35(4): 514-520.
- LI Feng-qin, YU Zhi-gang, HAN Xian-da, et al. Advances on electrochemical aptamer-based sensors for detection of kanamycin residue in milk and water[J]. *Journal of Analytical Science*, 2019, 35(4): 514-520.
- [47] 郑瑞娟, 钟坚海, 郎小玲, 等. 过硫酸根电致化学发光及用于抗坏血酸的检测[J]. *化学研究与应用*, 2016, 28(10): 1 405-1 409.
- ZHENG Rui-juan, ZHONG Jian-hai, LANG Xiao-ling, et al. An electrochemiluminescent sensor for ascorbic acid based on the inhibition of peroxydisulfate electrochemiluminescence[J]. *Chemical Research and Application*, 2016, 28(10): 1 405-1 409.
- [48] 朱丹, 李强强, 逢秀梅, 等. 阻抗光谱在电化学生物传感器中的应用[J]. *化学传感器*, 2016, 36(1): 42-47.
- ZHU Dan, LI Qiang-qiang, PANG Xiu-mei, et al. Application of the impedance spectrum in the electrochemical sensor research[J]. *Chemical Sensors*, 2016, 36(1): 42-47.
- [49] 田润. 基于 DNA 信号放大技术的适配体传感器用于抗生素检测研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 30-42.
- TIAN Run. Application of aptamer sensor based on DNA signal amplification technology in antibiotic detection [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 30-42.
- [50] 杨德红, 张雷蕾, 卢诗扬, 等. 拉曼光谱技术在农产品药物残留检测中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(23): 8 836-8 843.
- YANG De-hong, ZHANG Lei-lei, LU Shi-yang, et al. Application of raman spectroscopy technology in detection of pesticide residues in agricultural products[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(23): 8 836-8 843.
- [51] SUN Yue, LU Jian-zhong. Chemiluminescence-based aptasensors for various target analytes[J]. *Luminescence*, 2018, 33(18): 1 298-1 305.