

核酸适配体技术在畜产品兽残检测中的应用

谢希杨, 孙万成, 罗毅皓*
(青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

摘要:畜产品是人们日常饮食中至关重要的一部分,畜产品中的兽残问题也吸引了越来越多的关注。核酸适配体技术包含筛选、特异性识别两个过程。核酸适配体是一段体外筛选获得的单链 RNA 或 DNA 序列,能与靶物质特异性结合,被称为“化学抗体”。与传统检测方法相比,具有检测周期短、成本低、不受环境制约等优点。该文围绕畜产品,在兽残传统检测方法的基础上,综述核酸适配体在各类兽药残留检测中的应用,并就核酸适配体在该领域的应用前景进行展望。

关键词:兽药残留;核酸适配体;体外筛选;抗生素检测;激素检测

Application of Nucleic Acid Aptamer Technology in Detection of Animal Products

XIE Xi-yang, SUN Wan-cheng, LUO Yi-hao*

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China)

Abstract: Animal products are a vital part of people's daily diet. The problem of veterinary drug residues in animal products has attracted more and more attention. Nucleic acid aptamer technology involves screening and specific recognition. The nucleic acid aptamer is a single-stranded RNA or DNA sequence, obtained by *in vitro* screening. Aptamer was referred to as a “chemical antibody”, which can specifically binds to a target substance. Compared with the traditional detection method, it has the advantages of short detection period, low cost, and no environmental constraints. This paper focused on animal products, based on the traditional detection methods of animal residues, reviewed the application of nucleic acid aptamers in the detection of various veterinary drug residues. At the end, the application prospects of nucleic acid aptamers in this field was prospected.

Key words: veterinary drug residues; aptamer; *in vitro* screening; antibiotic detection; hormone detection

作者简介:谢希杨(1993—),女(汉),硕士研究生,研究方向:食品加工与安全。

* 通信作者:罗毅皓(1976—),女,副教授,硕士,研究方向:功能食品。

- [53] 李玉鹏,王世清,肖军霞,等. 低温射频等离子体降解农产品中黄曲霉毒素 B₁ 效果的研究[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(5): 54-57
- [54] Ouf S A, Basher A H, Mohamed A H. Inhibitory effect of double atmospheric pressure argon cold plasma on spores and mycotoxin production of *Aspergillus niger* contaminating date palm fruits.[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2015, 95(15): 3204-3210
- [55] 刘真,王世清,肖军霞,等. 花生中的物质成分对低温射频等离子体降解黄曲霉毒素 B₁ 的影响[J]. 食品科学,2016,37(21): 219-223
- [56] 刘真,王世清,肖军霞,等. 等离子体降解花生中黄曲霉毒素的影响因素[J]. 粮油食品科技, 2016, 24(5): 44-48
- [57] Ouf S A, Mohamed A H, El-Sayed W S. Fungal Decontamination of Fleshy Fruit Water Washes by Double Atmospheric Pressure Cold Plasma[J]. CLEAN - Soil, Air, Water, 2016, 44(2): 134-142
- [58] 刘真,王世清,肖军霞,等. 等离子体处理对花生油品质的影响[J]. 现代食品科技, 2016(9): 203-208
- [59] 斯兴开,杨惠琳,韦翔,等. 低温等离子体对草鱼鱼肉品质的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(10): 185-190
- [60] 巴特,刘承初. 低温等离子灭菌新技术及其应用[J]. 生物技术通报, 2009(S1): 126-130
- [61] 赵玲玲,都启晶,王世清,等. 黄曲霉毒素 B₁ 的等离子体降解产物的急性毒性研究[J]. 食品科技, 2016(1): 325-330
- [62] Lars T B, Katharina P, Georg A, et al. Plasma-Based Degradation of Mycotoxins Produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria* Species[J]. Toxins, 2017, 9(3): 97-109

收稿日期:2019-07-26

引文格式:

谢希杨,孙万成,罗毅皓.核酸适配体技术在畜产品兽残检测中的应用[J].食品研究与开发,2020,41(14):218-224

XIE Xiyang, SUN Wancheng, LUO Yihao. Application of Nucleic Acid Aptamer Technology in Detection of Animal Products[J]. Food Research and Development, 2020, 41(14): 218-224

畜产品,如肉类、牛奶和鸡蛋等,是日常饮食的重要组成部分,由于它们是非常好的磷和蛋白质的来源,所以它们在世界范围内的消费量正在迅速增加。同时,我国每年都有大量畜禽牲畜死于寄生虫病或因病导致生长发育受阻,严重影响了相关畜产品的质量。在养殖牲畜时使用激素类、抗生素类和驱虫抗虫类兽药,已成为难以避免的环节。正确合理地使用兽药可以促进牲畜健康成长,提高畜产品整体质量。与此同时,对畜产品中的兽残进行检测是至关重要的。核酸适配体有“化学抗体”一称,是由指数富集的配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选出的一段寡核苷酸片段,可以识别并与靶分子特异性结合,作为一种分子识别元件,与传统抗体相比具有靶分子广、特异性高、亲和性高、灵敏度高的特点,在检测方面有广阔的前景。该文围绕畜产品,在兽残传统检测方法的基础上,综述核酸适配体在各类兽残检测中的应用,以期对兽药残留快速检测技术的深入研究提供理论参考。

1 兽药概述

1.1 畜产品中兽药残留的污染

畜产品是农产品中至关重要的组成部分,通常指动物产品或其二次加工产品,本文主要围绕可食用畜产品展开概述。兽药是指用于预防、治疗、诊断动物疾病或者有目的地调节动物生理机能的物质。牲畜接触药物的途径有经皮肤、经消化道、经静脉注射3种,药物进入机体后会因蓄积作用而残留在体内,对畜产品造成污染。污染程度受接触剂量、接触方式、给药时间、个体差异等因素的影响。因毒性大、疗效不确定、质量不稳定、不够环保等原因,已有大量兽药被禁用。同时,饲料在生产、加工、贮运过程中也有可能受到重金属、除草剂、霉菌毒素的污染,这些物质进入机体后同样会因蓄积作用而残留在体内,进而污染畜产品。

1.2 兽残的毒性作用

消费者误食受污染畜产品会对健康造成不利影响,例如,长期摄入磺胺类药物会引起肾损害,氨基糖苷类抗生素具有耳、肾毒性,误食氯霉素则会造成再生障碍性贫血,经常食用含有青霉素、四环素等抗菌

性药物残留的食品会造成过敏反应等。而 β -受体激动剂、 β -受体阻断剂、镇静剂、血管扩张剂等药物具有急性毒性,消费者误食后会对机体健康造成严重威胁。鉴于兽残的毒性和副作用,各国家监管机构对不同畜产品中的兽药规定了最大残留限量(maximum residue limit, MRL)。例如,欧盟在牛奶、肌肉和肝脏中建立的链霉素(streptomycin, STR)MRL为500 ng/g^[1]。

1.3 传统兽残检测方法的应用

兽药残留的检测技术起步较早,涉及色谱、质谱、光谱、微生物学、免疫学等多个方面,已建立的检测技术包括高效液相色谱、气相-质谱联用、液相-质谱联用、生物发光-细菌分析、酶联免疫吸附试验等。这些方法具有高灵敏度、高准确性、操作简便等优点,但也存在样品预处理复杂、仪器价格昂贵等问题。

1.3.1 电泳技术

2008年,高杨菲等^[2]利用毛细管区带电泳法(capillary zone electrophoresis, CZE)成功地从肉制品中检测出克伦特罗、沙丁胺醇、特布他林、莱克多巴胺等 β -肾上腺素受体激动剂,检出限为0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。孟欢欢等^[3]也从牛奶中检测出氨苄青霉素、阿莫西林,检出限分别为0.12 $\mu\text{g/mL}$ 和0.23 $\mu\text{g/mL}$ 。此外,2012年,邓光辉等^[4]采用胶束电泳体系从猪肉样品中检测出了3种 β -受体激动剂,经数据分析,该方法重现度、精确度良好。电泳技术与其他技术联用,在兽残检测方面也有较广泛的应用。Moreno-González等^[5]利用毛细管区带电泳与四极飞行时间质谱联用测定了牛奶样品中15种抗生素残留量(8种四环素和7种喹诺酮类),重复性良好。

1.3.2 免疫学方法

兽药残留免疫分析方法的建立包括待测物选择、半抗原及人工抗原的合成、抗体制备及测定方法建立等步骤。Kabrite等^[6]采用酶联免疫吸附法检测了黎巴嫩当地牛奶中四环素和青霉素的残留量,两项指标的平均值均低于酶联免疫试剂盒的检出限,最高标准浓度分别为1.80 $\mu\text{g/kg}$ 和4.00 $\mu\text{g/kg}$ 。Baghani等^[7]利用酶联免疫吸附技术分别对伊朗当地鸡肉和牛肉样品中的四环素和环丙沙星进行了检测,检出的环丙沙星所占百分比除一份样品外,均低于MRL,检出四环素含量极低。徐蓓等^[8]将新霉素连接辣根过氧化物酶作为

酶标抗原,建立了新霉素酶联免疫检测方法,确立了抗体最佳工作浓度,为免疫学在兽残检测中的应用奠定了基础。

1.3.3 色谱及色谱质谱联用

1960年~1969年,气相色谱的出现解决了先前化学分析检测中许多痕量物质难以检测分析的问题,检测限一般为 $\mu\text{g/kg}$ 级。但由于大多数兽药沸点偏高,很大程度上限制了气相色谱的应用。1970年之后,液相色谱和高效液相色谱的相继出现大大扩展了色谱法在兽残分析检测中的应用。张恒等^[9]利用气相色谱-质谱联用法对畜产品中的两种 β 激动剂进行了研究,建立了一种高效、快速、高回收率的检测方法。孙妹琦等^[10]通过应用超高效液相色谱-串联四极杆质谱联用仪,同时分析牛肉中环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星3种氟喹诺酮类兽药,回收率良好,检出限分别为5.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/kg}$ 。液相色谱-串联质谱法也是GB/T 20752-2006《猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》中规定检测畜产品中硝基呋喃类残留的标准方法。

1.3.4 微生物学方法

早在1963年,Kavangh等就以表皮葡萄球菌作为测试菌株测定了血清和组织中的新霉素含量,灵敏度分别为0.02 $\mu\text{g/mL}$ 和0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。1970年,Neff等^[11]报道了一套测定饲料中新霉素含量的微生物学方法,以表皮葡萄球菌作为测试菌,平均回收率达95.5%。随后,该方法被美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)认定为测定饲料中新霉素的标准方法。2004年,温芳等^[12]以支气管炎博代特氏菌作为检测菌株,建立了一种灵敏快捷便于使用的硫酸粘杆菌素残留检测微生物学方法,在肌肉组织、肝脏和肾脏组织中的检出限分别为0.15、0.20、0.20 $\mu\text{g/g}$,低于我国农业部和欧盟规定的最高残留限量。

1.3.5 光谱法

秦坚源等^[13]以畜产品药物残留中常见的4种四环素类抗生素作为检测对象,应用太赫兹时域光谱技术,建立四环素类抗生素的检测方法和定量分析模型,为兽残检测开辟了新的思路。2018年,Conceição等^[14]利用傅里叶变换近红外光谱法(Fourier transform near infrared spectroscopy, FTNIR)成功检测了牛奶中的抗菌药物残留,并结合化学计量方法快速检测了注射药物的奶牛牛奶中盐酸头孢噻福尔的含量,除了追踪检测,还能跟踪动物体内的代谢过程。

1.4 新型兽残检测技术的应用

1.4.1 纳米材料生物传感器在兽残检测中的应用

Ramezani等^[15]利用三螺旋分子开关(triple helix

molecular switch, THMs)和金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)制备了快速、选择性、灵敏的四环素比色测定仪,根据AuNPs的不同颜色,可进行四环素的测定,最低检出限为266 pmol/L 。此外,该传感器还能较好地检测血清和牛奶中的四环素。

在检测生长促进剂方面,Li等^[16]提出了一种检测17 β -雌二醇的分子印迹电化学传感器。在最佳条件下,该传感器具有较低的检出限(0.819 nmol/L)和较宽的线性范围(0.05 $\mu\text{mol/L}$ ~10 $\mu\text{mol/L}$)。

在检测抗寄生虫药时,Radi等^[17]用循环伏安法在一次性丝网印刷碳电极上制备了聚吡咯膜,并制备了电化学传感器,可用来测定氟哌啶醇的含量。

在检测非甾体类抗炎药时,Kianoush等^[18]采用多壁碳纳米管和离子液体修饰碳陶瓷电极,建立了能同时检测双氯芬酸(diclofenac, DFC)和吲哚美辛(indomethacin, IND)的传感器,DCF和IND测定的线性范围分别为0.05 μL ~50 μL 和1 μL ~50 μL 。

1.4.2 量子点在兽残检测中的应用

量子点(quantum dot, QD)是由无机核和有机分子组成的纳米晶,表面包覆在核表面,尺寸在1 nm 到10 nm 之间。在兽药残留检测中,量子点通常用作光源和化学发光增强剂。与量子点结合的材料包括抗体、酶、适配体(aptamer, APT)和分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIPs)等。

Chen等^[19]首次报道了间接竞争量子点荧光免疫分析法(quantum dot fluorescent immunoassay, QD-FLISA)法测定鸡体内恩诺沙星残留量。鸡体内恩诺沙星浓度越高,微板荧光强度越低,检出限为2.5 $\mu\text{g/L}$ 。

QD抗体生物传感器由电化学电极和固定在电极表面的量子点与抗体结合组成,而量子点和抗体通过活化酯或吸附法结合。Zhang等^[20]建立了用该传感器快速、灵敏地检测沙丁胺醇(salbutamol, SAL)的增强化学发光免疫分析法(enhanced chemiluminescence, ECL),灵敏度高,操作简便,适用于猪肉和肝脏样品的检测。

2 核酸适配体研究概况

2.1 核酸适配体简介

Tuerk等^[21]于1990年首次提出并使用SELEX技术,他们从随机寡核苷酸文库中成功筛选出了可与噬菌体T4DNA聚合酶(gp43)特异性结合的RNA寡核苷酸。同年,Ellington等^[22]将这种筛选得到的寡核苷酸命名为aptamer,即核酸适配体,又被称为适配体、适体等。核酸适配体是经SELEX技术从随机单链寡核苷酸文库中筛选出的单链寡聚核苷酸片段,即一段长度为20 nt ~60 nt 的DNA或RNA序列。筛选得到的适配体

序列具有丰富的碱基组合和独特的三维结构,可利用不同的空间结构和折叠模式特异性结合靶物质,是高通量功能识别原件^[23],具有灵敏度高、靶物质广、亲和力强、易改造、易制备、运输储存成本低等优点。靶物质可以是蛋白质或者其它小分子物质,已研究报道的有细胞、病毒、金属离子等。

2.2 核酸适配体作用原理

当适配体与靶物质共存时,靶物质能够诱导适配体由自由构象折叠成假结、发卡、G-四分体、凸环等三维空间结构,并通过碱基对的堆积作用、静电作用、氢键作用等与靶物质特异性结合^[23]。

核酸适配体技术的核心在于如何获得高亲和性单一适配体序列。SELEX 技术是目前最常用的适配体筛选手段。通常是将靶物质与一个 $10^{12}\sim 10^{14}$ 库容量的随机寡核苷酸文库进行孵育,直至充分结合。然后利用亲和层析法、硝酸纤维素膜过滤法、高速离心法或磁珠分离法洗脱掉没结合的核苷酸序列,再利用聚合

酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)体外扩增技术对结合靶物质的核苷酸序列进行扩增,经 8~20 轮的筛选和扩增,即可能得到与靶物质特异性结合且高亲和力的适配体^[24]。

适配体能被荧光标记物、氨基、磷酸基等活性基团修饰而被开发成生物传感器,用于检测各种靶物质。

3 适配体技术在兽残检测方面的应用

3.1 兽药适配体的筛选

目前为止,传统兽残检测方法往往存在检测周期长、场地要求高、设备昂贵、流程繁琐等问题,相对而言,核酸适配体技术具有检测周期短、场所不受限、简便快捷等优势。虽然核酸适配体技术起步较晚,仍在不断地探索和研究当中,但已经有很多科研工作者筛选出了可用于检测兽药残留的适配体序列见表 1。其中,解离常数越小,代表适配体与靶物质的亲和力越大。

表 1 兽药残留适配体序列
Table 1 Veterinary drug residue aptamer sequence

化合物名称	核酸适配体序列(5'—3')	解离常数/ ($\mu\text{mol/L}$)
17- β 雌二醇	GCTTCCAGCTTATTGAATTACACGCAGAGGGTAGCGGCTCTGCGCAATCAATTGCTGCGGCTGAAGCGCGGAAGC	0.13 ^[25]
四环素类	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCACTGCGCGTGATCCGAGCTCCACGTG	0.063 ^[26]
卡那霉素	TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA	0.079 ^[27]
氯霉素	AGCAGCACAGAGGTCAGATGACTTCAGTGAGTTGTCCACGGTCGGCGAGTCGGTGCTAGCCTATGCGTGCTACCGTGAA	0.77 ^[28]
链霉素	TAGGGAATTCGTCGACGGATCCGGGCTCTGCTGTTCTGCTTTGTTCTGTCGGGTCGCTGCAGGTCCACGCATGCGCCG	0.199 ^[29]
新霉素 B	GGCCUGGGCGAGAAGUUUAGGCC	1.24 ^[30]
恩诺沙星	CCCATCAGGGGGCTAGGCTAACACGGTTCCGGCTCTCTGAGCCCGGGTTATTTACAGGGGA	0.188 ^[31]
磺胺二甲嘧啶	TTAGCTTATGCGTTGGCCGGGATAAGGATCCAGCCGTTGTAGAnTGCGTTCTAACTCTC	0.079 ^[31]

3.2 抗生素残留

卡那霉素是一种氨基糖苷类抗生素,用于治疗沙门氏菌感染、肺结核等,过量摄入机体会产生耳毒性或肾毒性。常见的氨基糖苷类抗生素有卡那霉素、链霉素、新霉素等。廖且根等^[32]以卡那霉素适配体修饰纳米银粒子作为探针,用共振光散射技术检测鸡肉样品中的卡那霉素,检测线为 $1.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。冯荣荣等^[33]分别利用纳米金(gold nanoparticles,GNPs)/石墨烯(graphene,GR)复合纳米材料和巯基自组装作用针对氨基糖苷类抗生素研制了两种电化学传感器,成功检出了卡那霉素和链霉素,检出限分别为 0.03 、 0.3 pmol/L 。Alvarez 等^[30]通过将适配体与电极表面新霉素 B 相互作用固定,检出了牛奶中 $25\text{ mmol/L}\sim 2\text{ }500\text{ mmol/L}$ 的新霉素 B。

四环素是四环素族抗生素中的一种,因价格低、抗菌性好而被广泛用于畜禽养殖,导致其在可食用畜

产品中残留普遍,给环境带来了潜在的风险。许景月等^[34]以核酸适配体作为识别元件、以插入型染料噻唑橙作为信号元件构建了一种非标记核酸适配体传感器,根据噻唑橙的荧光强度变化进行判断识别,对四环素进行检测,检出限为 $0.022\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。王赛等^[35]针对蜂蜜中的四环素,分别创建了酶联核酸适配体生物传感器、纳米金-核酸适配体生物传感器、表面等离子共振-核酸适配体生物传感器、电化学核酸适配体生物传感器等 4 种用于快速检测的生物传感器,加标回收率均在 $85\%\sim 120\%$ 之间,有较高的准确性。罗叶丽^[31]利用巯基乙胺修饰纳米金粒子,根据粒子溶液的颜色和色谱,检测牛奶中的四环素,检出限为 $0.039\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

在 QD-APT 传感器中,APT 通过活化酯、吸附或杂交方法与 QD(或 AuNPs)结合。用于农药和兽药残留检测的 QD-APT 传感器的信号类型主要有:荧光共

振能量转移、荧光猝灭、电化学发光检测法、光电化学分析法等。Alibolandi 等^[36]用活化酯法将巯基乙酸修饰的 CdTe 量子点与氯霉素 APT 的氨基端结合,制备氯霉素的 APT-QD。然后,在 APT-QD 溶液中加入氧化石墨烯(graphite oxide, GO), APT-QD 与 GO 的 Sp² 杂化轨道之间通过 π - π 键结合。当 GO/APT-QD 溶液中的量子点被激发时,在由 QD 和 GO 组成的 FRET 体系中,激发能被氧化石墨烯吸收,在 630 nm 处量子点的荧光将被猝灭。当样品加入该溶液时,氯霉素将与 APT 结合,与氯霉素结合的 APT 也会从石墨烯上脱落。由于荧光共振能量体系的解体,量子点的荧光将恢复。在 0.1 nm~10 nm 范围内,荧光强度与氯霉素浓度成正比,检出限为 9.8×10^{-11} mol/L。

除了对单一抗生素的检测方法的研究,许多科研人员研发出了可以检测多种抗生素的检测器。乔立新等^[37]利用海藻酸钠-淀粉凝胶将瑞士乳酸菌固定到两片核微孔膜中间制成传感膜,并将其固定于玻碳电极上制成生物传感电极,分别对青霉素、链霉素、四环素进行检测,最低检测限分别为 1×10^{-10} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-9} g/mL,检出时间为 4 min,明显优于国内外对抗生素残留量的要求。周灵樱等^[38]在微芯片电泳检测分离技术的基础上创建了一种高通量、无标记的适体传感器,可用于不同食品中氯霉素的检测,具有良好的回收率。随后,又开发了一种可同时检测卡那霉素和氯霉素的适体传感器,检出限分别为 0.002 5、0.006 0 nmol/L,该方法检测快速,可在 1 h 内检测 48 个样品,在抗生素检测方面有很好的应用前景。

3.3 激素残留

残留在食品中的激素多以性激素为主,有雌激素和雄激素,常见的雌激素有雌二醇等。付田等^[39]以雌二醇核酸适配体的长度作为变量,以胶体金的颜色变化作为判断依据,构建了一种基于核酸适配体序列的超灵敏比色法,对雌二醇的检出限为 2.7 pg/mL,可用于牛奶中雌二醇的检测。17 β -雌二醇是雌二醇反式构型,是一种重要的环境雌激素,进入人体后会干扰体内原有激素作用,于笑泮等^[40]利用柠檬酸钠和氯金酸制备出柠檬酸根包被的负电金纳米粒子,通过监测识别金纳米粒子的聚散状态、相应的紫外吸收光谱的变化以及体系颜色的改变,建立了一种可用于快速检测 17 β -雌二醇的方法,检出限为 3 ng/mL,该方法成本低廉、方便快捷,为小分子现场快速检测提供了新的技术支持。

19-去甲基睾酮是一种雄激素,白文荟等^[41]在研究适配体长度对适配体纳米金比色法灵敏度影响时,意

外发现原长度 76 个碱基的 17 β -雌二醇适配体在片段化后对 19-去甲基睾酮具有很强的亲和性,在此基础上,他们建立了一种基于荧光共振能量转移原理的夹心荧光检测法,并实现了对 19-去甲基睾酮的有效检测,有良好的重复性和稳定性。

3.4 合成抑菌剂

抑菌剂可分为磺胺类和氟奎诺酮类,恩诺沙星是一种奎诺酮类抑菌剂,磺胺二甲嘧啶则是磺胺类抑菌剂的一种,长期摄入此类物质会导致耐药性的产生。倪姮佳等^[42]以恩诺沙星和磺胺二甲嘧啶为靶分子,首次筛选出能特异性识别这两种抗菌药的核酸适配体,相应建立了直接竞争化学发光分析方法,检出限分别为 2.26 ng/mL 和 0.92 ng/mL。建立针对磺胺二甲嘧啶的核酸适配体生物传感器也是近几年的热点。杜家音等^[43]利用液晶(liquid crystals, LCs)这种具有优异理化特性的软物质材料,开发了一种基于三乙氧基丁醛硅烷/N,N-二甲基-N-十八烷基-3-氨丙基三甲氧基氯化物混合自组装膜的液晶型生物传感器并用于磺胺二甲氧嘧啶的检测,该方法对磺胺二甲氧嘧啶检测下限可低至 10 μ g/L,并具有非常好的选择性。他们还在之前研究的基础上构建了核酸适配体同时作为液晶的垂直取向分子和磺胺二甲氧嘧啶识别分子的液晶型生物传感器,该方法检测磺胺二甲氧嘧啶的浓度可进一步下降至 0.9 μ g/L。

3.5 β -肾上腺受体激动剂

β -肾上腺受体激动剂是一类具有肾上腺素功能的苯乙醇胺类人工合成化合物,因其促进营养再分配等功效,常被用于非法养殖。莱克多巴胺是一种人工合成的 β -肾上腺受体激动剂,有增长肌肉、减少脂肪蓄积的功效,是一种新型瘦肉精。许景月等^[34]在核酸适配体与目标物的特异性结合以及罗丹明 B 和金纳米粒子间的荧光共振能量转移的基础上,建立了一种检测莱克多巴胺的非标记型核酸适配体传感器,已成功应用于鸡肝中莱克多巴胺残留的测定。罗叶丽^[31]利用柠檬酸根修饰纳米金粒子,检测猪尿样中的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺,检出限分别为 0.015 8 μ g/mL 和 0.029 9 μ g/mL。

Lin 等^[44]通过在石墨烯全氟磺酸修饰的玻碳电极上电聚合铬蓝 K,研制了一种可检测 8 种不同 β -激动剂的电化学传感器,检测限为 0.58 ng/mL~1.6 ng/mL。Wang 等^[45]通过用纳米银钯合金抗体修饰适配体,建立了一种电化学生物传感器检测方法,可以同时检测莱克多巴胺、克伦特罗和沙丁胺醇,检测限分别为 1.52、1.44、1.38 pg/mL。杨敏等^[46]通过等温滴定量热技术筛选

出一条可特异性结合 β -激动剂的单链 DNA,相应地建立了一个电化学核酸适配体生物传感器,可检测莱克多巴胺、克伦特罗、沙丁胺醇、苯乙醇胺和丙卡特罗等多种 β -激动剂,检测限分别为 0.04、0.35、0.53、1.0、1.73 pg/mL。

3.6 真菌毒素

赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)是一类分布较广的真菌毒素,主要由曲霉菌属和青霉菌属代谢生成。OTA 可以直接污染谷类,极易被动物间接摄入体内,并因蓄积作用进一步残留在动物体内,最终作为畜产品影响人类的健康。根据现有研究可知,OTA 对肾脏、肝脏和免疫毒性有较强的毒性。2017 年,陈丹等^[47]基于纳米银与碳量子点之间的荧光共振能量转移作用,设计了一种快速检测 OTA 的方法。该研究分别对纳米银和碳量子点进行功能化修饰,利用碱基互补配对作用,缩短两者距离,以便于荧光能量共振的发生,导致荧光强度降低。加入目标物 OTA 后,由于 OTA 与纳米银上修饰物之间的特异性结合,使纳米银和碳量子点的距离增大,从而使碳量子点的荧光强度恢复,以此定量检测 OTA。在实验最佳条件下,OTA 最低检出限为 8.7 nmol/L,线性范围为 0~5 000 nmol/L。2019 年,张立转等^[48]构建了一种基于聚多巴胺纳米颗粒(polydopamine nanospheres, PDANPs)的荧光生物传感器,标记有荧光团的核酸适配体可通过 π - π 堆积作用吸附于 PDANPs 表面,使适配体上荧光团的荧光猝灭。加入 OTA 后,OTA 与核酸适配体特异性结合,使核酸适配体从单链状态折叠为稳定的 G-四链体结构。由于 G-四链体与 PDANPs 之间的结合能力弱,导致传感体系的荧光信号增强,从而实现了 OTA 的定量测定,检出限为 20 nmol/L。

4 总结

整体而言,核酸适配体技术在畜产品兽残检测方面的应用仍处于起步阶段,各类兽残的研究发展不够平衡,现有研究多以抗生素、 β -肾上腺受体激动剂等成分的检测和传感器研发为主,而少有在激素、驱虫剂中的应用,大多数兽残成分的检测依旧以高效液相色谱等主流方式为主。根据查阅的文献可以了解到,兽残检测对象主要是牛肉、猪肉、鸡肉等畜产品,在羊肉中的应用几乎为空白。核酸适配体在检测方面具有明显的优势,但目前为止,包括兽残检测在内,核酸适配体及其生物传感器现有的应用多针对食品中的有害成分,包括霉菌毒素、重金属、农药残留等,少有在有益成分或者常规成分检测中的应用。核酸适配体技

术作为一种新型检测方式,具有相当广阔的发展前景,相信在不久的将来,在广大科研工作者的共同努力下,这项技术能够更加普及,更加实用。

参考文献:

- [1] Wang J P, Zhang H Y, Sheng W, et al. Determination of streptomycin residues in animal-derived foods by a reliable and accurate enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5(17): 4430
- [2] 高杨菲, 许学书. 毛细管电泳同步分离检测“瘦肉精”及其替代物[J]. *食品工业*, 2008, 29(3): 71-74
- [3] 孟欢欢, 陈玓珂, 祁克宗. 高效毛细管电泳检测牛奶中氨苄青霉素和阿莫西林残留方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2008, 29(1): 32-35
- [4] 邓光辉, 陈盛余, 高静, 等. 毛细管电泳电化学法分离检测盐酸克伦特罗、特布他林和沙丁胺醇[J]. *分析试验室*, 2012, 31(2): 25-28
- [5] Moreno-González D, Hamed A M, Gilbert-López B, et al. Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1510: 100-107
- [6] Kabrite S, Bou-Mitri C, El Hayek Fares J, et al. Identification and dietary exposure assessment of tetracycline and penicillin residues in fluid milk, yogurt, and labneh: a cross-sectional study in Lebanon[J]. *Veterinary World*, 2019, 12(4): 527-534
- [7] Baghani A, Mesdaghinia A, Rafieiyan M, et al. Tetracycline and ciprofloxacin multiresidues in beef and chicken meat samples using indirect competitive ELISA[J]. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2019, 40(3): 328-342
- [8] 徐蓓. 食品中新霉素兽药残留酶联免疫检测方法研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2008
- [9] 张恒. 气相色谱-质谱法在农残、兽残检测中的应用[D]. 北京: 首都师范大学, 2008
- [10] 孙姝琦. 食品中兽药残留及苏丹红的液-质联用分析方法的建立[D]. 北京: 北京化工大学, 2008
- [11] Neff AW, Miller CC, Barbiers AR. Microbiological assay of neomycin in feed: collaborative study[J]. *ass offic anal chem j*, 1970, 56(4): 834
- [12] 温芳. 鸡体内硫酸粘杆菌素残留检测微生物学方法和消除规律研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [13] 秦坚源. 四环素类抗生素的太赫兹光谱检测技术研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016
- [14] da Conceição Luiz L, Bell M J V, da Rocha R A, et al. Detection of veterinary antimicrobial residues in milk through near-infrared absorption spectroscopy[J]. *Journal of Spectroscopy*, 2018, 2018: 1-6
- [15] Ramezani M, Mohammad Danesh N, 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

- [16] Li Y, Zhao X, Li P, et al. Highly sensitive Fe_3O_4 nanobeads/graphene-based molecularly imprinted electrochemical sensor for 17β -estradiol in water[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 884: 106–113
- [17] Radi A E, El-Naggar A E, Nassef H M. Determination of coccidiostat clopidol on an electropolymerized -molecularly imprinted polypyrrole polymer modified screen printed carbon electrode[J]. *Anal Methods*, 2014, 6(19): 7967–7972
- [18] Sarhangzadeh K, Khatami A A, Jabbari M, et al. Simultaneous determination of diclofenac and indomethacin using a sensitive electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and ionic liquid nanocomposite[J]. *Journal of Applied Electrochemistry*, 2013, 43(12): 1217–1224
- [19] Chen J, Xu F, Jiang H, et al. A novel quantum dot-based fluoroimmunoassay method for detection of Enrofloxacin residue in chicken muscle tissue[J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 1197–1201
- [20] Zhang J, Cai F, Deng A, et al. CdSe Quantum Dots Based Electrochemiluminescence Immunosensor with Simple Structure for Ultrasensitive Detection of Salbutamol[J]. *Electroanalysis*, 2014, 26(4): 873–881
- [21] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505–510
- [22] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(6287): 818–822
- [23] 王博, 柳国艳, 张黎明. 核酸适配体技术在海洋生物毒素检测中的应用[J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44(7): 687–692
- [24] 汪靖, 王进, 曾家豫, 等. 核酸适配体及其亲和力的表征方法[J]. *生物学通报*, 2018, 53(6): 9–12
- [25] Kim Y S, Jung H S, Matsuura T, et al. Electrochemical detection of 17β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(11): 2525–2531
- [26] Niazi J H, Lee S J, Gu M B. Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 16(15): 7245–7253
- [27] Song K M, Cho M, Jo H, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 415(2): 175–181
- [28] Mehta J, van Dorst B, Rouah-Martin E, et al. *In vitro* selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155(4): 361–369
- [29] Zhou N D, Wang J Y, Zhang J, et al. Selection and identification of streptomycin-specific single-stranded DNA aptamers and the application in the detection of streptomycin in honey[J]. *Talanta*, 2013, 108: 109–116
- [30] De-Los-santos-álvarez N, Lobo-Castañón M J, Miranda-Ordieres A J, et al. SPR sensing of small molecules with modified RNA aptamers: Detection of neomycin B[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(8): 2547–2553
- [31] 罗叶丽. 金纳米粒子比色传感器检测瘦肉精和抗生素的研究与应用[D]. 长春: 吉林大学, 2015
- [32] 廖且根, 李伟红, 张金艳, 等. 基于核酸适配体与银纳米粒子探针共振光散射技术检测卡那霉素[J]. *农产品质量与安全*, 2012(S1): 17–20
- [33] 冯荣荣. 氨基抗生素核酸适配体电化学生物传感器的研究[D]. 延安: 延安大学, 2017
- [34] 许景月. 非标记核酸适配体传感器检测动物源性食品中四环素和多巴胺残留[D]. 长春: 吉林大学, 2016
- [35] 王赛. 基于核酸适配体传感器的蜂蜜中四环素残留快速检测方法研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2017
- [36] Alibolandi M, Hadizadeh F, Vajhedini F, et al. Design and fabrication of an aptasensor for chloramphenicol based on energy transfer of CdTe quantum dots to graphene oxide sheet[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, 48: 611–619
- [37] 乔立新, 吴苏生, 庞广昌. 固定化乳酸菌制备生物传感器测定抗生素[J]. *食品科学*, 2015, 36(16): 261–265
- [38] 周灵樱. 核酸适配体编码探针结合微芯片电泳用于食品和生物样品中兽药残留检测的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2018
- [39] 付田, 曹锦轩, 潘道东, 等. 基于 DNA 核酸适配体序列的超灵敏比色法检测牛乳中的雌二醇[J]. *食品科学*, 2017, 38(8): 264–270
- [40] 于笑泓. 基于适配体的金纳米粒子比色法检测毒死蜱和 17β -雌二醇的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017
- [41] 白文芸. 基于适配体的农兽药残留快速检测技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016
- [42] 倪姮佳. 恩诺沙星和磺胺二甲嘧啶核酸适配体的筛选及化学发光检测方法的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014
- [43] 杜佳音. 用于检测磺胺二甲氧嘧啶的液晶型适配体生物传感器[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019
- [44] Lin X Y, Ni Y N, Kokot S. A novel electrochemical sensor for the analysis of β -agonists: The poly (acid chrome blue K)/graphene oxide-nafion/glassy carbon electrode[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 260: 508–517
- [45] Wang H, Zhang Y, Li H, et al. A silver-palladium alloy nanoparticle-based electrochemical biosensor for simultaneous detection of ractopamine, clenbuterol and salbutamol[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49: 14–19
- [46] 杨敏, 陈丹, 姚冬生, 等. β -激动剂核酸适配体电化学生物传感器的研制[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(11): 52–60
- [47] 陈丹. 基于功能化纳米金银探针检测农兽药及真菌毒素残留的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017
- [48] 张立转, 赵旭华, 梁晶晶, 等. 基于核酸适配体-聚多巴胺纳米复合物的荧光生物传感器检测赭曲霉毒素 A[J]. *分析科学学报*, 2019, 35(3): 342–346

收稿日期: 2019-05-31