

基于 G-四链体/硫黄素 T 无标记荧光适配体传感器 快速检测氟苯尼考

史明慧, 刘若冰, 崔琦琦, 于文龙, 王向红*

(河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000)

摘要 硫黄素 T(ThT)通过非共价相互作用与 G-四链体结合,形成 G-四链体/ThT 复合物,呈现出较强荧光强度,而游离 ThT 荧光十分微弱。当存在氟苯尼考(FF)时,具有 G-四链体结构的适配体(Apt)对靶标的高亲和力,使得 Apt/FF 复合物形成并释放 ThT,荧光强度降低。基于这一特点,本研究设计一种灵敏快速的现场检测体系,用于检测氟苯尼考,即基于 G-四链体/硫黄素 T 的无标记荧光适配体传感器。该适配体传感器的检测范围为 0.0128~200 ng/mL,实际检出限 0.0128 ng/mL,检测总时长 10 min。同时,对实际加标样品(牛奶和鸡蛋)进行回收率计算,加标回收率在 91.2%~117.1%之间。所建立的无标记荧光适配体传感器具有高特异性、成本低、耗时短等优点,可用于实际样品的现场检测。

关键词 适配体; G-四链体; 硫黄素 T; 氟苯尼考; 荧光

文章编号 1009-7848(2024)03-0249-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.025

氟苯尼考(florfenicol, FF)又称氟甲砜霉素,是一种广谱类抗菌剂,因其具有成本低、给药后在体内分布广、吸收快等特点而被广泛应用于临床^[1]。在给药后动物体内 FF 的代谢物中,氟苯尼考胺(florfenicol amine, FFA)是最多和存在时间最长的代谢物,被定义为 FF 残留标记物之一^[2]。由于氟苯尼考具有胚胎毒性、发育毒性及生态毒性,使用不当会对食品安全造成威胁,因此多个国家对其进行限量控制^[3]。中国法规规定氟苯尼考在不同动物组织中的残留限量为 0.1~30.0 $\mu\text{g/g}$,禁止在鸡蛋、牛奶等产品中检出氟苯尼考^[4]。然而,氟苯尼考在畜禽养殖业中的滥用,导致其在畜禽体内蓄积,使药物残留通过食源性生物富集进入人体,对公共卫生及人类健康构成潜在危害。鉴于此,有必要对食品中的氟苯尼考抗生素残留水平进行量化检测。

目前,已为 FF 及其代谢物 FFA 的测定开发了许多分析方法,包括气相色谱法^[5-6]、免疫分析法^[7-8]、色谱-串联质谱法^[9-10]、高效液相色谱法^[11-12]等。这些方法具有较高的灵敏度和准确可靠的检测结果,然而前处理要求和操作专业知识不允许对其进行高通量现场筛选^[13]。研究一种使用方便、

快捷检测 FF 的新型技术意义重大。核酸适配体(aptamer, Apt)是通过指数富集的配体系统进化技术(SELEX)在随机核酸文库中选择的单链 DNA 或 RNA^[14]。适配体通过形成特定结构(如茎环、发夹和 G-四链体),从而与靶分子实现特异性结合^[15]。其作为一种新型识别元件,被应用于多种食品危害物的监测与研究中,如生物毒素^[16-17]、抗生素^[18-19]、致病菌^[20-21]等。

G-四链体(G-quadruplex, G4)是一种 DNA 二级结构,由一条或多条富含鸟嘌呤(G 碱基)的 DNA 序列链折叠而成,具有高度有序和多样化的特点^[22]。4 个 G 碱基以一定的排列形式构成 G-四分体,当四分体数量多于 2 个时,便会通过 π - π 相互作用产生 G-四链体^[23]。硫黄素 T(Thioflavin T, ThT)是一种水溶性苯并噻唑荧光染料,在游离状态下显示出微弱的荧光发射^[24]。然而,ThT 可以通过插入、凹槽结合和末端堆叠识别 G-四链体结构,形成 G-四链体/ThT 复合物,从而显著提高其荧光强度^[25]。基于适配体/荧光染料体系的荧光策略由于具有操作简单、高灵敏度和高选择性等优点而备受青睐^[26]。

本研究建立一种简单的无标记荧光适配体传感器,利用 ThT 和 FF 的高特异性适配体快速灵敏检测 FF。在与 G-四链体结构的适配体结合后,ThT 的荧光强度大大增强。然而,由于 FF 与适配

收稿日期: 2023-03-27

第一作者: 史明慧,女,硕士生

通信作者: 王向红 E-mail: wangxianghong73@sina.com

体的高亲和力,当加入 FF 后形成 Apt/FF 复合物,释放出 ThT,体系的荧光强度降低。根据体系中加入靶标前、后的荧光强度变化完成对氟苯尼考含量的检测。将建立的适配体传感器平台用于测定实际样品——牛奶和鸡蛋中的氟苯尼考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氟苯尼考、氟苯尼考胺、甲磺霉素(thi-amphenicol, TAP)、氯霉素(chloramphenicol, CAP),上海源叶科技生物有限公司;适配体序列为:5'-ACGCCAGTGGGTGGGCGGGTGGCG-GCCGTTGTTTCTATGC-3'^[27],上海生物工程有限公司;ThT,上海麦克林生化科技有限公司;纯牛奶、鸡蛋实际样品,河北农业大学宜家旺超市。

1.2 仪器与设备

F-320 荧光分光光度计,港东科技公司(天津);IKA MS 3 digital 微孔板振荡器,广州艾卡仪器有限公司;96 孔酶标板(康宁 3925),北京博尔优生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 检测原理 基于 G-四链体/ThT 的无标记荧光适配体传感器检测氟苯尼考的原理如图 1 所示。

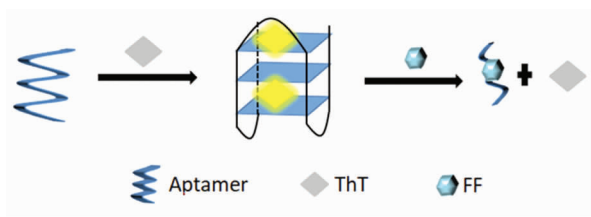


图 1 基于 G-四链体/硫黄素 T 的无标记荧光适配体传感器检测氟苯尼考原理图

Fig.1 Schematic diagram of a label-free fluorescent aptasensor for detection of florfenicol based on G-quadruplex/thioflavin T

游离的 ThT 表现出微弱荧光,而与 G-四链体结合后,荧光强度显著增加。本研究选用的 FF 适配体具有 G-四链体结构,在 FF 存在的情况下,适配体与 FF 特异性结合,构象由 G-四链体结构转变为无规线圈结构,释放出 ThT,体系中的荧光强度降低。由于荧光强度随着 FF 浓度的增加而降

低,因此可通过体系中的荧光淬灭率 $(F_0 - (F - F_{\text{ThT}}))/F_0$ 与目标物浓度的变化规律实现对样品中氟苯尼考的检测。其中 F_0 和 F 分别为在 500 nm 处不存在和存在 FF 时的荧光强度, F_{ThT} 为只存在 ThT 时的荧光强度。

1.3.2 检测条件确定 首先用超纯水溶解 ThT,将其配成 100 $\mu\text{mol/L}$ 溶液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。将 10 μL ThT (100 $\mu\text{mol/L}$) 与浓度梯度为 0,50,100,200,300,400,500 nmol/L 的适配体在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 15 min 后,加入 4 μL FF(100 $\mu\text{g/mL}$)继续反应 30 min,测定 $(F_0 - F)/F_0$,确定最佳适配体浓度(其中 F_0 和 F 分别为不存在和存在 FF 时的荧光强度),反应总体积为 200 μL 。300 nmol/L 适配体与浓度梯度为 0.125,0.5,1,5,10,15 $\mu\text{mol/L}$ 的 ThT 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 15 min,加入 4 μL FF(100 $\mu\text{g/mL}$)继续反应 30 min,测定体系的 $(F_0 - F)/F_0$,确定最佳 ThT 浓度。0.5 $\mu\text{mol/L}$ ThT 与 300 nmol/L 适配体分别在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,避光孵育 1,2,5,10,15,20 min,通过测定荧光强度确定与 ThT 的最佳适配体结合时间。300 nmol/L 适配体与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ThT 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10 min 后,加入 4 μL FF(100 $\mu\text{g/mL}$)分别孵育 1,5,10,20,30 min,测定荧光强度以确定与 FF 的最佳适配体孵育时间。

1.3.3 检测方法的灵敏度 将 300 nmol/L 适配体溶液与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ThT 溶液混合均匀后,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10 min,形成 Apt/ThT 复合物。再分别加 140 μL 不同浓度的 FF(0.0128,0.064,0.32,1.6,8,40,200 ng/mL),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 min 后,使用荧光分光光度计测其荧光强度,将激发波长设置为 425 nm,采集 450~600 nm 范围内的荧光光谱,并通过 3 次最大荧光发射分析来评价其性能。以氟苯尼考浓度为横坐标, $(F_0 - (F - F_{\text{ThT}}))/F_0$ 为纵坐标,绘制工作曲线,其中 F_0 和 F 分别为不存在和存在 FF 时的荧光强度, F_{ThT} 为只有 ThT 存在时的荧光强度。

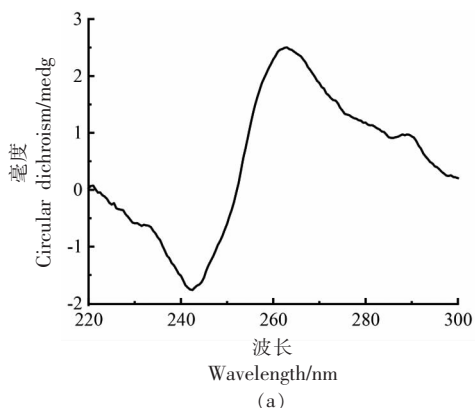
1.3.4 检测方法的特异性分析 以建立的方法分别对 FFA、TAP、CAP 体系进行检测,以不含目标物的体系为对照,计算 $(F_0 - (F - F_{\text{ThT}}))/F_0$,并与 FF 体系的检测结果进行比较。

1.3.5 实际样品检测 以牛奶和鸡蛋为实际检测样品对本试验进行方法验证,牛奶和鸡蛋样品中

FF 的添加浓度均为 1, 10, 20 ng/mL。参照文献[28]的方法对样品进行前处理。操作步骤如下: 取 1 mL 牛奶(鸡蛋)均质后, 置于聚丙烯离心管中, 加入 3 mL 乙酸乙酯混合均匀, 涡漩振荡 1 min, 超声 5 min, 在 8 000 r/min 条件下离心 10 min。离心后, 取 1 mL 上清液并在 60 °C 条件下氮吹浓缩, 将浓缩后的样品加入 1 mL 超纯水溶解, 混匀后超声 5 min, 接着加入 1 mL 正己烷, 涡漩混匀后超声 5 min, 然后在 8 000 r/min 的条件下离心 10 min, 移除上层正己烷相, 对得到的下层水相进行分析。样品经前处理提取并稀释到适宜倍数后, 利用新建的无标记荧光适配体传感器进行实验检测, 计算样品的加标回收率。

1.4 数据处理

使用 Excel 2010 及 Origin 2018 软件处理试验数据。



2 结果与分析

2.1 方法可行性验证

所选 FF 适配体通过圆二色光谱显示其具有 G-四链体结构, 结果如图 2a 所示。在圆二色谱图中, 适配体在 263 nm 处有一个正峰, 在 242 nm 有一个负峰, 这是典型的平行 G-四链体结构^[29]。因此适配体具有增强 ThT 荧光的能力, 可用于后续实验。用 4 个样品体系对该策略的可行性进行了分析。图 2b 表明, 游离 ThT 的荧光信号较弱, 即使在 FF 存在下, ThT 染料也表现出微弱的背景荧光。当与适配体序列结合时, G-四链体/ThT 复合物的形成诱导了高荧光强度, 这表明适配体是增强 ThT 荧光强度的原因, FF 不会对 ThT 的荧光强度产生影响。将体系中引入 FF 后, 由于适配体对 FF 的高亲和力, 形成 Apt/FF 复合物, 释放出 ThT, 从而观察到荧光强度的下降, 证实了所提出的方法可以检测 FF。

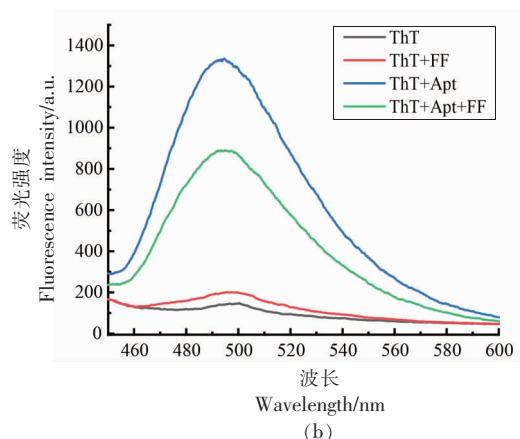


图 2 适配体的圆二色谱图(a)和不同体系的荧光发射光谱图(b)

Fig.2 Circular dichroism of aptamers (a) and fluorescence emission spectra of different systems (b)

2.2 检测条件优化

为了获得最佳的检测条件, 对体系中适配体浓度、ThT 浓度、适配体与 ThT 结合时间以及适配体与 FF 孵育时间进行优化。FF 适配体的浓度是保证检测灵敏度的重要因素。如果适配体浓度不足, 少量的 G-四链体/ThT 形成会导致低荧光强度。相反, 过量的适配体会降低检测的灵敏度。研究了 FF 适配体浓度对体系 $(F_0-F)/F_0$ 的影响。如图 3a 所示, 随着适配体浓度从 0 增加到 300 nmol/L 时, $(F_0-F)/F_0$ 的值逐渐增加。当适配体浓度

高于 300 nmol/L 时, 该比值下降。因此, 用于该测定的适当量的适配体浓度固定为 300 nmol/L。ThT 的浓度影响 G-四链体/ThT 复合物的量, 从而影响该策略的灵敏度。研究了 ThT 浓度对体系 $(F_0-F)/F_0$ 的影响。如图 3b 所示, $(F_0-F)/F_0$ 的值在 ThT 浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最高, 因此, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ThT 应用于后续试验。为了研究 ThT 与具有 G-四链体结构的适配体的最佳结合时间, 测定了 ThT 与适配体混合后不同时间的荧光强度。从图 3c 可以看出, ThT 与适配体融合后荧光强度迅速增加,

5 min 后荧光强度趋于稳定,这是由于 ThT 与适配体存在较强的非共价相互作用^[30],两者之间反应速度较快。最终确定 ThT 与适配体的结合时间 5 min 时最佳。此外,FF 与适配体的反应时间决定了检测体系的稳定性。通常,较长的反应时间有利于形成高度稳定的复合物,以获得较大的荧光变化

效应。然而,较长的反应时间也会降低适配体传感器的应用前景。为了平衡这种影响,评估 1~30 min 的反应时间。如图 3d 所示,荧光强度随 FF 孵育时间的增加而降低,在 5 min 时达到平衡。因此,在接下来的试验中选择 5 min 为适配体与 FF 的最佳反应时间。

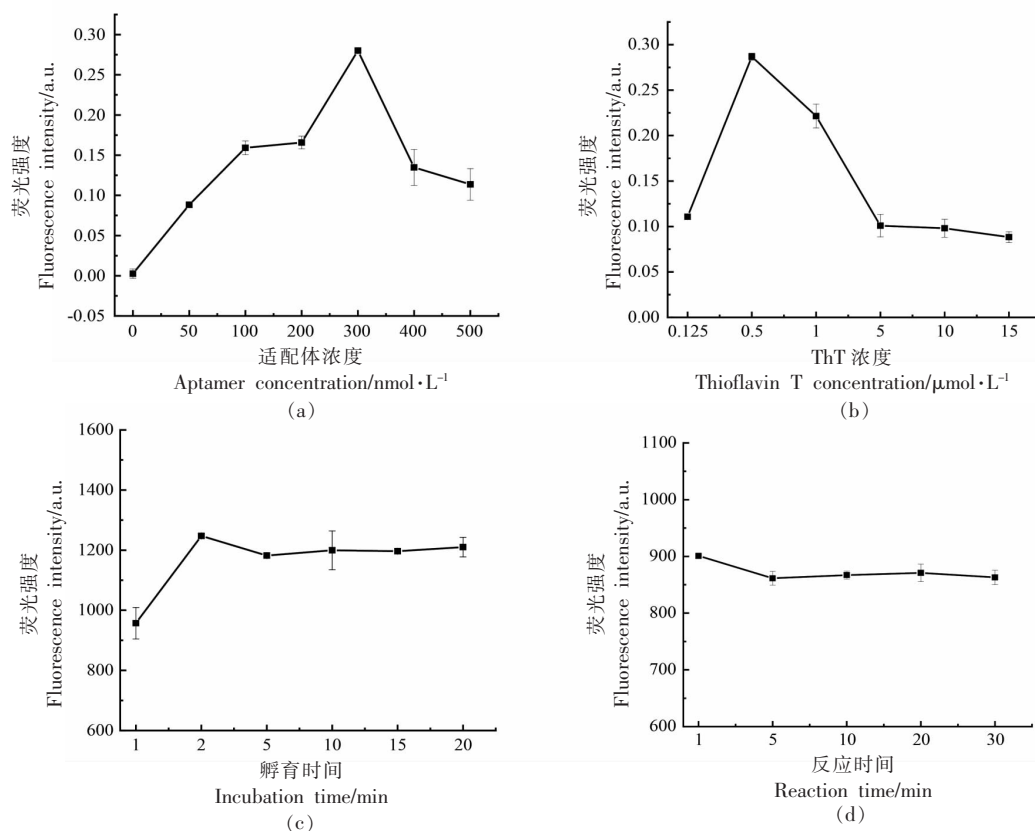


图3 适配体浓度优化(a)、ThT浓度优化(b)、适配体与ThT结合时间优化(c)以及适配体与FF孵育时间优化(d)
Fig.3 Optimization of aptamer concentration (a), optimization of ThT concentration (b), optimization of aptamer and ThT binding time (c), and optimization of aptamer and FF incubation time (d)

2.3 检测方法灵敏性评估

为了评估所提出方法的灵敏度,在最佳条件下检测FF。加入不同浓度的FF标准品(0,0.0128,0.064,0.32,1.6,8,40,200 ng/mL),图4a显示了荧光强度与FF浓度之间的关系,在图中500 nm处的荧光强度随着FF浓度的增加而降低。图4b显示了荧光强度与FF浓度之间的关系,可以发现荧光强度 $[F_0-(F-F_{ThT})]/F_0$ 与FF浓度的对数呈良好的线性关系,线性方程为 $y=0.0304\ln(x)+0.2795$ ($R^2=0.9841$),实际检出限为0.0128 ng/mL(将FF

继续稀释,直至检测无差异,取最小浓度)。

2.4 特异性分析

为了评估所提出的无标记荧光适配体传感器对于检测氟苯尼考的特异性,通过使用该方法检测氟苯尼考胺、氯霉素、甲磺霉素来监测其与氟苯尼考的最终结果。如图5所示,以氟苯尼考和氟苯尼考胺为分析物观察到显著的荧光猝灭效率,这是由于氟苯尼考胺是氟苯尼考的代谢物,适配体对氟苯尼考胺也有高亲和力,在G-四链体/ThT复合物中加入氟苯尼考胺后,适配体与氟苯尼考胺

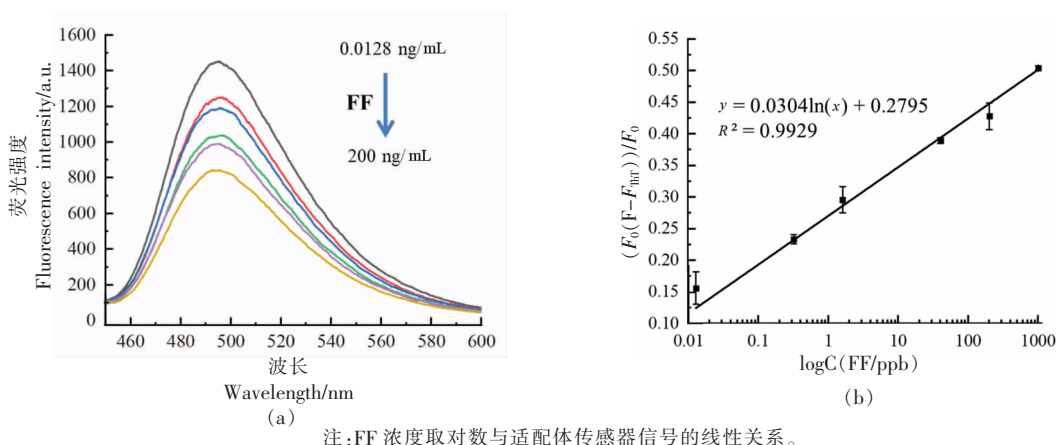


图 4 不同浓度 FF 检测系统的荧光光谱(a)以及标准曲线(b)

Fig.4 Fluorescence spectra of different concentrations of FF detection system (a) and standard curve (b)

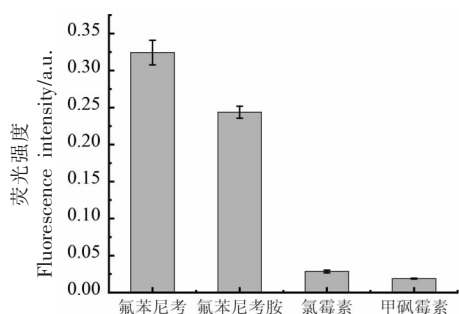


图 5 无标记荧光适配体传感器检测氟苯尼考及氟苯尼考胺的特异性分析

Fig.5 Specificity analysis of label-free fluorescent aptamer sensor for the detection of florfenicol and florfenicolide

结合, 释放出 ThT, 从而观察到荧光强度的下降。在加入其它家族的抗生素后, 荧光猝灭效率可以

忽略不计, 这表明所建立的适配体传感器具有很高的特异性, 清楚地验证了该测定对氟苯尼考及氟苯尼考胺具有良好的选择性。

2.5 实际样品检测

将该无标记荧光适配体传感器用于实际样品中氟苯尼考的检测, 样品的提取过程可能会影响适配体与氟苯尼考的识别和结合过程, 进而影响检测性能。为了研究基质效应, 将该方法应用到实际样品牛奶和鸡蛋的提取液中, 建立提取液(提取液为牛奶和鸡蛋样品经过前处理后稀释 2 倍)校准的检测曲线。如图 6a 所示, 牛奶提取液得到的标准曲线呈现出良好的线性关系, 线性方程为 $y = 0.0193\ln(x) + 0.4827$, 相关系数 $R^2 = 0.9936$, 实际检出限为 0.064 ng/mL。在图 6b 中, 鸡蛋提取液得到

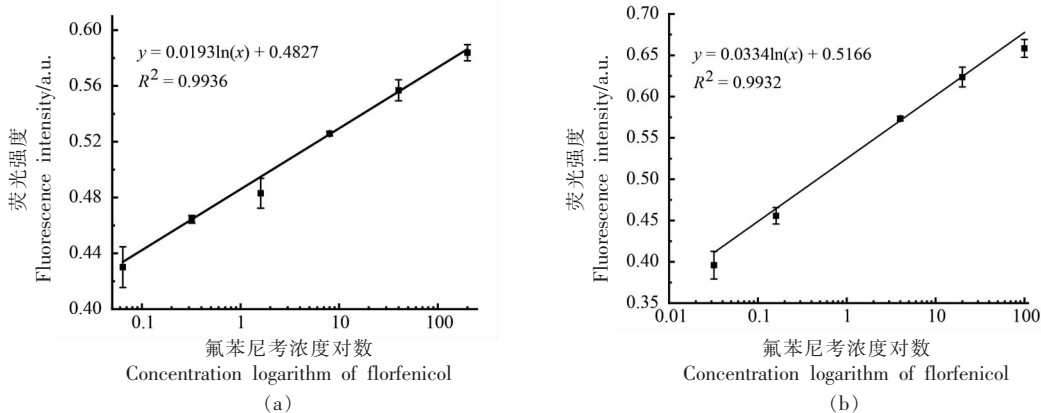


图 6 牛奶样品提取液校准的标准曲线(a)与鸡蛋样品提取液校准的标准曲线(b)

Fig.6 Standard curve for calibration of milk sample extract (a) and standard curve for calibration of egg sample extract (b)

的标准曲线也呈现出良好的线性关系,线性方程为 $y=0.0334\ln(x)+0.5166$,相关系数 $R^2=0.9932$,实际检出限为 0.032 ng/mL 。为了评价该方法的实际应用价值,对牛奶和鸡蛋样品进行加标回收计算。分别在牛奶和鸡蛋样品中添加 $1, 10, 20\text{ ng/mL}$ FF,分析结果如表 1 所示。该方法的平均回收率为 $91.2\%\sim 117.1\%$,相对标准偏差(RSD)为 $1.07\%\sim 7.58\%$ 。结果表明,该荧光适配体传感器在牛奶和鸡蛋样品中的检测具有准确性与稳定性,可以很好地应用于实际样品的现场检测。

2.6 本研究与其它文献比较

表 2 列出了目前部分氟苯尼考检测方法的检测范围和检出限。与已报道的其它检测技术相比,本研究具有更低的检测下限,此外,我们测定的总反应时间为 10 min ,比大多数检测氟苯尼考的方法短得多,这种新构建的适配体传感器更经济、快速,并且对实际样品中 FF 的检测具有良好的可行性。

表 1 牛奶及鸡蛋样品中添加氟苯尼考的回收率

样品	FF 添加量/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均	平均	RSD/%
		回收质量 浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/ %	
牛奶	1	1.17	117.1	1.07
	10	9.88	98.8	2.83
	20	20.08	100.3	3.82
鸡蛋	1	0.91	91.2	5.43
	10	9.66	96.6	6.52
	20	20.26	101.3	7.58

法短得多,这种新构建的适配体传感器更经济、快速,并且对实际样品中 FF 的检测具有良好的可行性。

表 2 氟苯尼考检测方法的对比

Table 2 Comparison of detection methods for florfenicol

检测方法	检测范围/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	检测限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	参考文献
酶联免疫法	0.31~5.61	0.12	[31]
胶体金测流免疫法	0.1~1.5	0.08	[32]
高效液相色谱	12.5~1000	12	[33]
无标记荧光适配体传感器	0.0128~200	0.0128	本研究

3 结论

本研究利用 G-四链体和荧光染料硫黄素的特点,建立了无标记荧光适配体传感器,用于检测动物源性食品中的氟苯尼考。在该方法中,根据体系中加入 FF 前后的荧光强度变化完成对 FF 的高灵敏度和特异性检测。荧光适配体传感器的优化条件如下:ThT 浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$,适配体浓度为 300 nmol/L ,适配体与 ThT 结合时间为 5 min ,适配体与 FF 孵育时间为 5 min 。在此条件下,荧光淬灭率 $(F_0-(F-F_{\text{int}}))/F_0$ 与 FF 浓度的对数呈良好的线性关系,实际检出限为 0.0128 ng/mL ,测定的总反应时间为 10 min 。该方法成功应用于实际样品(牛奶和鸡蛋)中 FF 的检测,在牛奶和鸡蛋中氟苯尼考的加标回收率分别为 $98.8\%\sim 117.1\%$ 和 $91.2\%\sim 101.3\%$,相对标准偏差小于 7.58% 。与化学合成的纳米材料荧光探针和化学标记的荧光探针相比,免标记的硫黄素 T 适配体荧光探针简单、经济、环保,可用于实际样品中 FF 的现场检测。

参 考 文 献

- [1] WANG X, HAN C, CUI Y Q, et al. Florfenicol causes excessive lipid peroxidation and apoptosis induced renal injury in broilers [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 207: 111282.
- [2] XIE K Z, JIA L F, YAO Y L, et al. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, 879(23): 2351-2354.
- [3] YANG J J, SUN G Z, QIAN M R, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of florfenicol in animal feedstuffs[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2017, 1068: 19-14.

- [4] FODEY T L, GEORGE S E, TRAYNOR I M, et al. Approaches for the simultaneous detection of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine using immunochemical techniques[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2013, 393(1/2): 30–37.
- [5] 胡红美, 郭远明, 雷科, 等. 分散固相萃取净化-气相色谱法测定水产品中氯霉素和氟苯尼考[J]. *食品科学*, 2014, 35(8): 231–235.
- HU H M, GUO Y M, LEI K, et al. Determination of chloramphenicol and florfenicol in fishery products by using dispersive solid phase extraction and gas chromatography[J]. *Food Science*, 2014, 35(8): 231–235.
- [6] 乔青青, 郝莉花, 巩凡, 等. 气相色谱质谱法检测鸡蛋中氟苯尼考及氟苯尼考胺[J]. *食品工业*, 2021, 42(1): 324–327.
- QIAO Q Q, HAO L H, GONG F, et al. Determination of FF and FFa residue in eggs by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry[J]. *Food Industry*, 2021, 42(1): 324–327.
- [7] LEI X L, XU L G, SONG S S, et al. Development of an ultrasensitive ic-ELISA and immunochromatographic strip assay for the simultaneous detection of florfenicol and thiamphenicol in eggs[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 254–266.
- [8] WANG Z F, LUO J Q, ZHAO Y F, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of florfenicol and florfenicol amine in eggs[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2020, 31(1): 864–875.
- [9] 王彤, 王琛, 周雄. 维生素 K₃ 促肝癌细胞凋亡的实验研究[J]. *中华普通外科杂志*, 2005(6): 365–367.
- WANG T, WANG C, ZHOU X. An experimental study on vitam in K₃ induced HEPG2 cell line apoptosis[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2005(6): 365–367.
- [10] GAST G C M, DE ROOS N M, SLUIJS I, et al. A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease [J]. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2009, 19(7): 504–510.
- [11] 汤春莲, 李琿, 王雨霜, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 9 种禁用药物残留方法的建立[J]. *中国家禽*, 2020, 42(8): 65–71.
- TANG C L, LI H, WANG Y S, et al. Establishment of a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 9 prohibited drugs in eggs[J]. *China Poultry*, 2020, 42(8): 65–71.
- [12] HORMAZABAL V, STEFFENAK I, YNDESTAD M. Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 724 (1/2): 364–366.
- [13] WANG K, TAO Z H, XU L, et al. Investigation and development of functionalized aptamer-based biosensor[J]. *Chin J Anal Chem*, 2014, 42(2): 298–304.
- [14] RADOM F, JUREK P M, MAZUREK M P, et al. Aptamers: Molecules of great potential[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1260–1274.
- [15] LIU R B, ZHANG F Y, SANG Y X, et al. Screening, identification, and application of nucleic acid aptamers applied in food safety biosensing[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 123: 355–375.
- [16] BRUNO J G, KIEL J L. Use of magnetic beads in selection and detection of biotoxin aptamers by electrochemiluminescence and enzymatic methods [J]. *Biotechniques*, 2002, 32(1): 178–183.
- [17] 韩冰, 贾永梅, 李志果, 等. 核酸适配体传感器在黄曲霉毒素 B₁ 检测中应用研究进展[J]. *分析科学学报*, 2022(3): 371–376.
- HAN B, JIA Y M, LI Z G, et al. Research progress of aptasensors in detecting aflatoxin B₁[J]. *Journal of Analytical Science*, 2022(3): 371–376.
- [18] LEE A Y, HA N R, JUNG I P, et al. Development of a ssDNA aptamer for detection of residual benzylpenicillin[J]. *Anal Biochem*, 2017, 531: 1–7.
- [19] MEHLHORN A, RAHIMI P, JOSEPH Y. Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: a review[J]. *Biosensors-Basel*, 2018, 8(2): 62.
- [20] MAJDINASAB M, HAYAT A, MARTY J L. Aptamer-based assays and aptasensors for detection of pathogenic bacteria in food samples[J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 107: 60–77.
- [21] WANG L J, WANG R H, WEI H, et al. Selection of aptamers against pathogenic bacteria and their diagnostics application[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34(10): 11.
- [22] LIN C, YANG D. Human telomeric G-quadruplex

- structures and G-quadruplex-interactive compounds [J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ), 2017, 1587: 171-196.
- [23] 刘健慧, 孙炜, 封龙宽, 等. G-四链体特性及其基于核酸辅助检测方法的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(2): 415-422.
- LIU J H, SUN W, FENG L K, et al. Review of characteristics of G-quadruplex and development of its nucleic acid assisted detection method[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(2): 415-422.
- [24] LI Y A, WANG J Y, ZHANG B, et al. A rapid fluorometric method for determination of aflatoxin B1 in plant-derived food by using a thioflavin T-based aptasensor[J]. *Microchim Acta*, 2019, 186(4): 7.
- [25] MOHANTY J, BAROOAH N, DHAMODHARAN V, et al. Thioflavin T as an efficient inducer and selective fluorescent sensor for the human telomeric G-quadruplex DNA [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(1): 367-376.
- [26] 刘若冰, 郝怡环, 杨茜, 等. 基于核酸适配体的AccuBlue荧光法检测动物食品中的恩诺沙星[J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 310-315.
- LIU R B, HAO Y H, YANG X, et al. A fluorescence method based on accubue and nucleic acid aptamer for detection of enrofloxacin in animal-derived foods[J]. *Food Science*, 2020, 41(24): 310-315.
- [27] 王向红, 刘若冰, 史明慧, 等. 可特异性识别氟苯尼考及氟苯尼考胺的核酸适配体及其应用, CN114231534A[P]. 2022-03-25.
- WANG X H, LIU R B, SHI M H, et al. Nucleic acid aptamers that can specifically recognize florfenicol and florfenicolide and their applications, CN114231534A[P]. 2022-03-25.
- [28] XIE X, WANG B, PANG M D, et al. Quantitative analysis of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs via liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2018, 269: 542-548.
- [29] 莫金钢, 周俊. G-四链体结构及其应用的光谱学研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(S1): 383-384.
- MO J G, ZHOU J. Spectroscopic study on G-Quadruplex structure and its application[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2018, 38(S1): 383-384.
- [30] LIU L L, SHAO Y, PENG J, et al. Molecular rotor-based fluorescent probe for selective recognition of hybrid G-quadruplex and as a K⁺ sensor[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(3): 1622-1631.
- [31] 李然, 林泽佳, 杨金易, 等. 酶联免疫法检测动物组织及尿液中氟苯尼考与甲砒霉素的残留[J]. *分析化学*, 2018, 46(8): 1321-1328.
- LI R, LIN Z J, YANG J Y, et al. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for simultaneous determination of florfenicol and thiamphenicol in animal meat and urine[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 46(8): 1321-1328.
- [32] HAN J J, HU L M, YI Y, et al. Development of colloidal gold lateral flow immunoassay for quantitative detection of florfenicol[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(8): 1188-1194.
- [33] CHAE W S, CHANG-YEUL Y, TUTKUN L, et al. Determination of florfenicol residues in swine tissues using high-performance liquid chromatography with ultraviolet photometric detector[J]. *Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 42(4): 171-176.

G-quadruplex Specific Thioflavin T-based Label-free Fluorescence Aptasensor for Rapid Detection of Florfenicol

Shi Minghui, Liu Ruobing, Cui Qiqi, Yu Wenlong, Wang Xianghong*

(College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei)

Abstract Thioflavin T (ThT) can bind to G-quadruplex through non-covalent interaction to form G-quadruplex/ThT complex, showing strong fluorescence intensity, while free ThT fluorescence is very weak. In the presence of florfenicol (FF), the high affinity of the aptamer (Apt) with a G-quadruplex structure to the target enables the formation of the Apt/FF complex and the release of ThT, resulting in a decrease in fluorescence intensity. Based on this feature, this

study designed a sensitive and rapid on-site detection system for the detection of florfenicol, a label-free fluorescent aptasensor based on G-quadruplex/thioflavin T. The detection range of this aptamer sensor was 0.0128–200 ng/mL, the actual detection limit was 0.0128 ng/mL, and the total detection time was 10 min. At the same time, the recovery rate of the actual spiked samples (milk and eggs) was calculated, and the spiked recovery rate was between 91.2% and 117.1%. The established label-free fluorescent aptasensor has the advantages of high specificity, low cost, and short time-consuming, and can be used for on-site detection of actual samples.

Keywords aptamer; G-quadruplex; thioflavin T; florfenicol; fluorescence