

## 基于催化发夹自组装比率电化学双适配体传感器检测乳中四环素

侯晓庆<sup>1</sup>, 张蕴哲<sup>1</sup>, 李子坤<sup>2</sup>, 卢鑫<sup>3</sup>, 杨倩<sup>6</sup>, 张伟<sup>1,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

<sup>2</sup>河北农业大学 河北保定 071000

<sup>3</sup>河北农业大学理工系 河北沧州 061100

<sup>4</sup>河北农业大学生命科学学院 河北保定 071000

<sup>5</sup>河北省人畜共患病病原微生物分析与防控重点实验室 河北保定 071000

<sup>6</sup>河北大学公共卫生学院 河北保定 071000

**摘要** 目的:本研究旨在建立一种基于催化发夹自组装(CH A)的比率型电化学混合适配体传感器,用于灵敏、准确、稳定地检测四环素(TC)。方法:通过 2 种混合适配体捕获同一靶标来提高识别能力;通过 CH A 反应实现靶标的无酶信号放大;采用易于区分峰值的二茂铁(Fc)和亚甲基蓝(MB)作为信号开关分子,标记在 DNA 探针上,产生比率型的电化学响应信号。结果:该传感器检测 TC 的线性范围 50 fg/mL~100 ng/mL,比 2 种基于单一适配体的传感器的线性范围宽。检出限(LOD)为 77 fg/mL,比 2 种基于单一适配体的传感器的 LOD 分别低 8.6 倍和 6.1 倍。该传感器对 TC 具有特异性,重复性评估中的相对标准偏差(RSD)为 4.2%,构建的传感器保存 9 d 后信号响应仍能保持在初始值的 92%,并成功用于牛奶中 TC 的检测。人工加标样品检测结果的加标回收率(87.1%~107.2%)与高效液相色谱(HPLC)(92.1%~100.4%)较为一致。结论:本研究构建的比率型电化学混合适配体传感器可用于牛奶中 TC 的灵敏检测,该方法可为检测各种抗生素提供参考。

**关键词** 四环素;混合适配体;催化发夹自组装(CH A);比率策略;电化学适配体传感器

文章编号 1009-7848(2025)02-0423-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.037

四环素(Tetracycline, TC)的抗菌活性高且价格低,常被用于动物疾病的预防和治疗<sup>[1]</sup>。然而,动物体内只能代谢少量 TC,约 75%残留在肉类和牛奶等动物源性食品中<sup>[2]</sup>,长期食用会通过食物链在人体内积累,使人体产生耐药性,对骨骼、牙齿、肠胃和肝脏造成损伤<sup>[3]</sup>。此外,TC 被排泄到自然界中难以降解,会对生态环境构成潜在威胁<sup>[4]</sup>。欧盟和我国均规定牛奶中 TC 单个或组合的最大残留限量为 100 μg/kg<sup>[5]</sup>。因此,建立一种灵敏、准确、便捷

的 TC 残留检测方法至关重要。

目前,检测 TC 的方法包括微生物抑制法<sup>[6]</sup>、仪器分析法<sup>[7]</sup>、免疫分析法<sup>[8]</sup>和电化学适配体传感器等。其中,电化学适配体传感器的灵敏度高、特异性好,易于小型化<sup>[9]</sup>,能在复杂体系中快速检测小分子物质,因此在抗生素检测方面受到广泛关注<sup>[10]</sup>。

核酸适配体是经体外筛选得到的单链 DNA 或 RNA<sup>[11-12]</sup>,对靶标的特异性和亲和力较强,易于合成和修饰,热稳定性好且成本低,作为一种识别分子,被用于抗生素检测<sup>[13]</sup>。Huang 等<sup>[14]</sup>开发了用 2 种适配体共同检测 TC 的电化学适配体传感器,该方法的检出限(Limit of detection, LOD)为 0.0073 ng/mL,比基于单一适配体的传感器的 LOD 低约 15 倍。2 种适配体的碱基组成、链长和折叠结合位点都不同,混合使用能增大适配体与靶标的结合概率,提高识别能力。

基于酶介导的信号放大技术虽可提高电化学适配体传感器的灵敏度,但检测成本较高,需要对反应条件敏感的聚合酶<sup>[15]</sup>。目前无酶介导的信号放大技术得到广泛关注。催化发夹自组装(CH A)是

收稿日期:2024-02-23

基金项目:国家自然科学基金项目(32172288,31371772);河北省自然科学基金重点项目(C2019204342);中央引导地方科技发展资金项目(216Z5501G,226Z5503G,236Z5502G);河北省外专百人计划项目(360-0803-JSN-3YGS);河北省博士后科研项目(B2021005007);河北省重点研发计划项目(18275501D);河北省教育厅科研项目(QN2022073);河北省自然科学基金项目(C2019204284)

第一作者:侯晓庆,女,硕士生

通信作者:张伟 E-mail: zhangwei631126@163.com

一种基于立足点介导的链置换反应驱动的非酶恒温信号放大策略<sup>[16-17]</sup>,因检测成本低、操作简单且不需要酶<sup>[18]</sup>,CHA的触发链可循环利用,自发性更强,而被成功用于检测小片段DNA或RNA。

电化学适体传感器多数使用单一的电化学信号,易受环境干扰、仪器误差和电极表面处理差异的影响<sup>[19]</sup>。为提高检测的重复性和稳定性,可将2个独立的电化学信号的比值作为测量标准,通过内置校正避免单信号检测的信号波动<sup>[20]</sup>,降低背景信号的干扰<sup>[21]</sup>。

本研究利用混合适配体和CHA的优势,开发一种比率型的电化学混合适体传感器。使用DNA片段更短且更利于CHA反应进行的适配体1(A1)和有较宽线性范围的适配体2(A2)共同识别TC<sup>[22]</sup>。通过CHA反应进行信号放大,检测信号分子亚甲基蓝(Methylene blue, MB)的峰值信号( $I_{MB}$ )和信号分子Fc的峰值信号( $I_{Fc}$ ),将二者的比

值( $I_{MB}/I_{Fc}$ )作为检测值,得到比率型的电化学响应信号,实现对牛奶中TC的灵敏、准确、便捷检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

氯化钾(KCl)、氯金酸( $AuCl_3 \cdot HCl \cdot 4H_2O$ ),国药集团化学试剂有限公司(上海);1 mol/L Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液(PBS),北京索莱宝科技有限公司;三(2-羧基乙基)磷化氢(TCEP-HCl),合肥博美生物科技有限责任公司;6-巯基-1-己醇(MCH),上海麦克林生化科技有限公司;TC、土霉素(Oxytetracycline, OXY)、金霉素(Chlortetracycline, CTC)、多西环素(Doxycycline, DOX)、卡那霉素(Kanamycin, Kan)、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp),上海颖心实验室设备有限公司。本研究所用的核酸序列由生工生物技术有限公司(上海)提供,如表1所示。

表1 寡核苷酸序列的信息

Table 1 Information on oligonucleotide sequences

DNA 名称	DNA 序列(5'-3')
A1	GTTTGTGTATT <u>ACAGTTATGTTACCC</u> TCATTTTTCTGAAC
A2	CGTACGGAAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCCTGCGCGTGGATCCGA GCTCCACGTG
t1	AGCGATGCTCTTTACACCCGATC
t2	GGAGCTCGGATCCCAGTGGGACCAACCCAAGCCGGGCTAGCGAATTCGGGGCG
Fc-H1	SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -GCCTGTGTATTGTTATGTTACCCTCACATGTGTAGAGTAACATAACAATACA-Fc
Fc-H2	SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CGCCCCGAAATTCGCTAGCCCCGGCTTGCATGTGTAGACGGGGCTAGCGAATTC-Fc
MB-H3	TATGTTACTCTACACATGTGAGGGTAACATAACAATACACCTCACATGTGTAGA-MB
MB-H4	CTAGCCCGTCTACACATGCAAGCCGGGCTAGCGAATTCGGCTTGCATGTGTAGA-MB

注:碱基下横线表示该部分碱基参与形成结合位点的可能性最高。

### 1.2 仪器与设备

捷克TESCAN MIRA LMS扫描电子显微镜、CS350H电化学工作站,武汉科思特仪器股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 对TC敏感的双链DNA和发夹探针的制备

DNA粉末离心后用无菌超纯水溶解为10  $\mu$ mol/L。8  $\mu$ L A1和8  $\mu$ L t1混匀,4  $\mu$ L A2和4  $\mu$ L t2混匀,2种溶液分别在95  $^{\circ}$ C下反应5 min,再于37  $^{\circ}$ C反应1 h,得到A1-t1和A2-t2。Fc-H1、

Fc-H2、MB-H3和MB-H4分别在95  $^{\circ}$ C下反应5 min后缓慢降至室温,形成发卡结构。然后Fc-H1和Fc-H2分别与等体积的TCEP(10 mmol/L)在37  $^{\circ}$ C下反应1 h,以解离二硫键。

1.3.2 电极传感界面的制备 玻碳电极(GCE)用氧化铝抛光粉抛光并冲洗。分别用超纯水、等体积的超纯水和乙醇、超纯水超声清洗5 min<sup>[23]</sup>。再将GCE放入含0.1 mol/L KNO<sub>3</sub>和1.0 mmol/L HAuCl<sub>4</sub>的溶液中,-0.2 V的恒电位下反应80 s,完成金纳米粒子(AuNPs)沉积。将用TCEP处理

后的 Fc-H1 (5  $\mu\text{L}$ , 1.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 Fc-H2 (5  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ ) 混匀滴在电极表面, 37  $^{\circ}\text{C}$  下避光孵育 4 h。再将电极在 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下在 2 mmol/L MCH 中浸泡 10 min。

1.3.3 CHA 反应溶液的制备 将 16  $\mu\text{L}$  A1-t1、8  $\mu\text{L}$  A2-t2、12  $\mu\text{L}$  MB-H3、8  $\mu\text{L}$  MB-H4、10  $\mu\text{L}$  TC 标准溶液和 26  $\mu\text{L}$  杂交缓冲液, 充分混合, 得到 CHA 反应溶液。将 1.3.2 节中制备好的电极浸入反应液中, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光反应 120 min, 清洗和干燥后可作为工作电极进行电化学检测。

1.3.4 电化学测量参数 检测由工作电极、Ag/AgCl 参比电极和铂丝辅助电极组成<sup>[24]</sup>。线性循环伏安法 (Cyclic voltammetry, CV) 和电化学阻抗谱 (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) 在含 5 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  和 0.1 mol/L KCl 的测试液中进行<sup>[25]</sup>。CV 的电压为 -0.2~0.6 V, 扫描速率为 100 mV/s。EIS 的频率为  $10^{-2}$ ~ $10^5$  Hz, 振幅宽度为 5.0 mV<sup>[26]</sup>。方波伏安法 (Square wave voltammetry, SWV) 在 0.01 mol/L PBS 缓冲液中进行, 电压为 -0.6~0.6 V, 频率为 25 Hz, 振幅为 25 mV。

1.3.5 传感器可行性和性能分析 扫描电子显微镜 (SEM) 表征抛光后的玻碳电极以及修饰上的 AuNPs 的形态; CV 和 EIS 监测传感器的制备过程; SWV 验证传感器检测 TC 的可行性; 在最适条件下用 SWV 分析传感器的灵敏度、特异性、重复和稳定性。

1.3.6 人工加标样品检测 分别用该方法和《食品安全国家标准 动物性食品中四环素类药物残

留量的测定 高效液相色谱法》(GB-31658.6-2021) 中的高效液相色谱 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 检测添加 TC 的牛奶样品, 比较 2 种方法的加标回收率以评价该方法的可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 比率型电化学混合适体传感器的设计原理

本研究构建的比率型电化学混合适体传感器的原理如图 1 所示。Fc-H1 和 Fc-H2 通过 Au-S 键固定在金电极表面后浸泡 MCH 溶液。TC 不存在时, t1 和 t2 无法被释放, Fc 接近电极表面,  $I_{\text{Fc}}$  最小, MB-H3 和 MB-H4 游离在溶液中,  $I_{\text{MB}}$  最大, 此时  $I_{\text{MB}}/I_{\text{Fc}}$  最小。TC 存在时, TC 优先与 A1、A2 特异性结合, 释放出 t1 和 t2, 根据碱基互补配对原则, t1 和 t2 分别与 Fc-H1 和 Fc-H2 杂交, 形成部分互补的双链 (t1-H1 和 t2-H2), 导致 Fc 远离电极表面, 电子转移速率减小,  $I_{\text{Fc}}$  减弱。此时, Fc-H1 与 MB-H3 互补的部分序列暴露出来, Fc-H2 与 MB-H4 互补的部分序列暴露出来, 发生杂交反应, 形成 t1-H1-H3 的复合物和 t2-H2-H4 的复合物。然后, 在链置换自由能的驱动下, t1 被 H3 置换下来并释放, t2 被 H4 置换下来并释放, t1 和 t2 作为触发探针再次分别与 Fc-H1 和 Fc-H2 杂交, 从而启动 CHA 循环<sup>[10]</sup>, 最终产生大量的 H1-H3 和 H2-H4, MB 靠近电极表面, 电子转移速率增加,  $I_{\text{MB}}$  增强。此时的  $I_{\text{Fc}}$  最小,  $I_{\text{MB}}$  最大,  $I_{\text{MB}}/I_{\text{Fc}}$  最大。

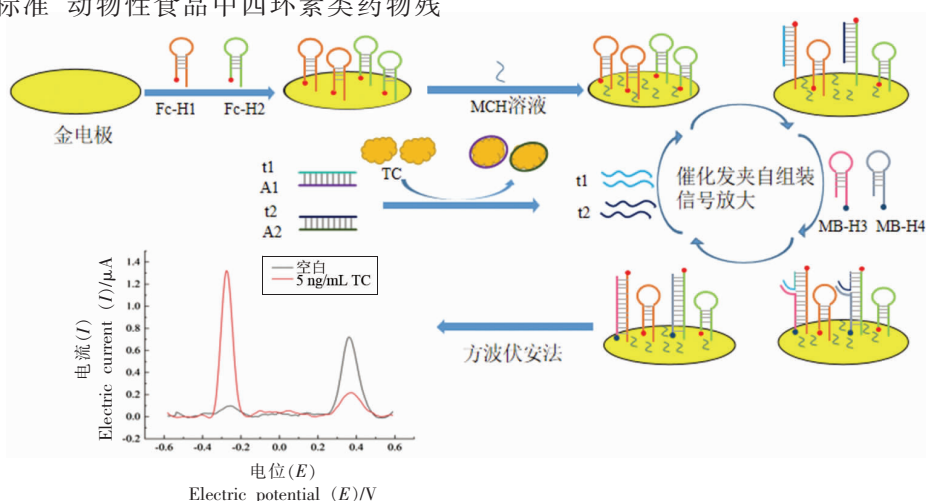


图 1 基于 CHA 的比率型电化学混合适体传感器检测 TC

Fig.1 Ratiometric electrochemical mixed aptamers sensor based on CHA detect TC

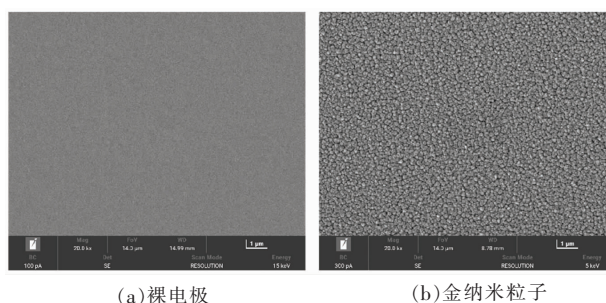
## 2.2 电化学混合适体传感器的可行性

采用 SEM 对 GCE 和 AuNPs 的修饰进行表征。如图 2a 所示, GCE 表面干净明亮、无明显杂质, 表明 GCE 被成功抛光。如图 2b 所示, AuNPs 均匀地分布在裸 GCE 表面, 为下一步发卡探针的固定提供条件。

采用 CV 监测传感器的制备过程。如图 3 所示, AuNPs 修饰后的 GCE (曲线 b, AuNPs/GCE) 与裸 GCE (曲线 a) 相比导电性更好, 峰值电流更高。为避免标记 Fc 和 MB 对电流和电阻的影响, 采用未标记的 H1、H2、H3、H4。H1 和 H2 固定在 AuNP/GCE 表面 (曲线 c, H1&H2/AuNPs/GCE), DNA 探针上的磷酸基团与测试液中的  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-4-}$  产生静电斥力, 峰值电流明显降低<sup>[27-28]</sup>。浸泡 MCH 溶液 (曲线 d, MCH/H1&H2/AuNPs/GCE) 后, 剩余的活性位点被封闭, 使峰值电流进一步降低。电极在含 TC 的反应溶液中孵育后, 峰值电流明显降低 (曲线 e, H3&H4/MCH/H1&H2/AuNPs/GCE), 表明触发了 CHA 反应, 电极表明形成大量的 H1-H3 和 H2-H4, 使电子转移速率降低。CV 结果显示传感器的制备过程与预期一致, 可用于检测 TC。

采用 EIS 通过电极表面的电荷转移电阻 ( $R_{ct}$ ) 的变化进一步验证传感器的制备过程, 曲线中的半圆直径能够反映  $R_{ct}$ <sup>[29]</sup>。如图 4 所示, AuNP/GCE (曲线 b) 与 GCE (曲线 a) 相比导电性更好, 半圆直径更小,  $R_{ct}$  减小。接下来, 随着电极修饰和 CHA 反应的进行, H1&H2/AuNPs/GCE (曲线 c)、MCH/H1&H2/AuNPs/GCE (曲线 d)、H3&H4/MCH/H1&H2/AuNPs/GCE (曲线 e) 的半圆直径逐渐增大,  $R_{ct}$  逐渐增大。EIS 结果与 CV 结果一致, 表明构建的传感器用于检测 TC 是可行的。

用 SWV 验证比率型电化学混合适体传感器检测 TC 的可行性。如图 5 所示, TC 不存在时, 出现了较高的  $I_{Fc}$  和可忽略不计的  $I_{MB}$ , 表明 Fc 接近电极表面, MB-H3 和 MB-H4 游离在溶液中, 此时  $I_{MB}/I_{Fc}$  值最小。TC 存在时, 出现了较低的  $I_{Fc}$  和较高的  $I_{MB}$ , 表明发生 CHA 反应, Fc 远离电极表面, 产生大量的 H1-H3 和 H2-H4, MB 靠近电极表面, 此时  $I_{MB}/I_{Fc}$  值增大。因此, 证明了该方法用于检测 TC 具有良好的可行性。



(a) 裸电极 (b) 金纳米粒子

图 2 扫描电子显微镜图像

Fig.2 Scanning electron microscopy images

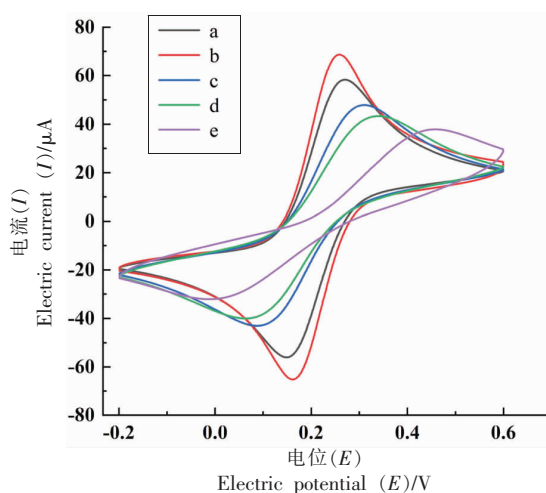


图 3 电极修饰过程的 CV 表征图

Fig.3 CV characterization of electrode modification process

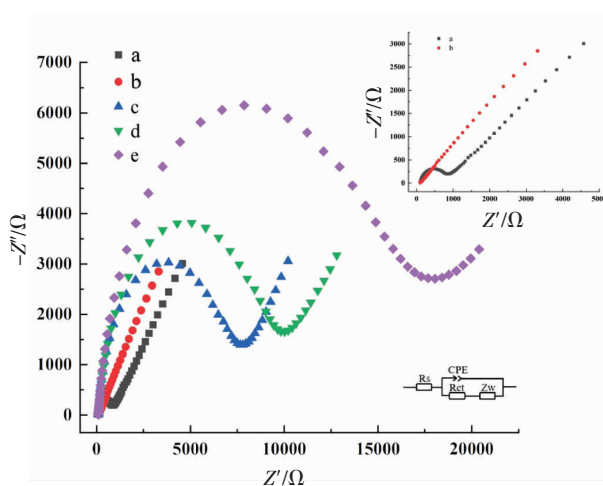


图 4 电极修饰过程的 EIS 表征图

Fig.4 EIS characterization of electrode modification process

## 2.3 传感器灵敏度分析

在最适条件下, 用该比率型电化学混合适体传感器检测不同质量浓度的 TC。如图 6a 所示, 随

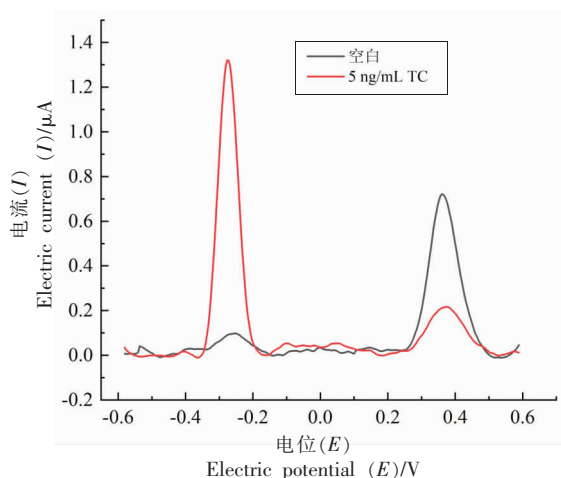
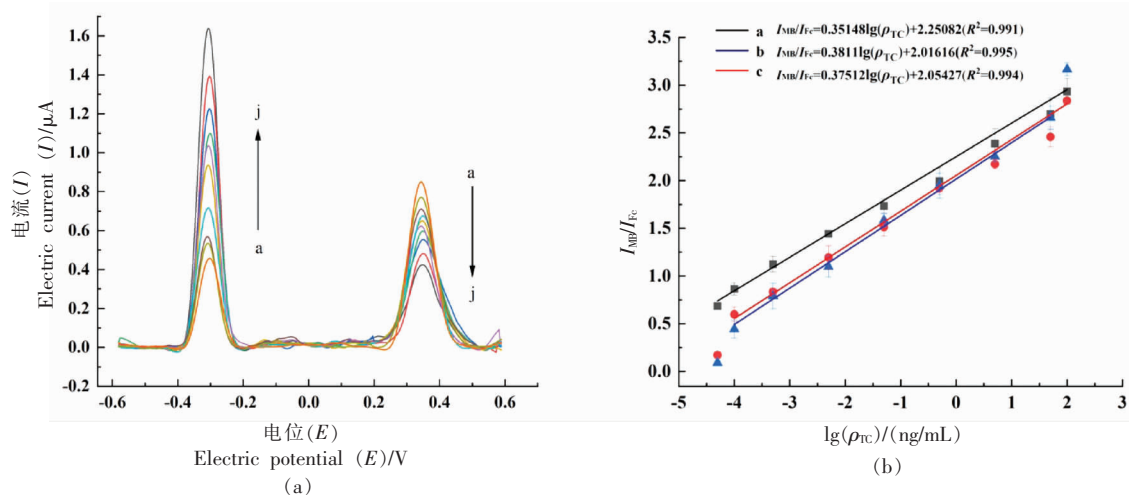


图 5 比率型电化学混合适配体传感器检测 TC 的 SWV 验证  
Fig.5 The investigation of SWV for ratiometric electrochemical mixed aptamers sensor to detect TC



注: a 图中 a~j 分别表示 0, 50 fg/mL, 100 fg/mL, 500 fg/mL, 5 pg/mL, 50 pg/mL, 500 pg/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL。

图 6 比率型电化学混合适配体传感器对不同质量浓度 TC 的 SWV 响应(a)以及  $\lg\rho_{TC}$  与  $I_{MB}/I_{Fc}$  的线性关系(b)  
Fig.6 SWV responses of the ratiometric electrochemical mixed aptamers sensor to different mass concentrations of TC (a) and the linear relationship of  $\lg\rho_{TC}$  and  $I_{MB}/I_{Fc}$  (b)

与其它 TC 检测方法进行了比较, 如表 2 所示。本研究的 LOD 更低, 在低质量浓度范围内的线性范围更宽。与不使用 DNA 扩增技术的检测方法相比, 本研究所用的检测时间长, 与使用 CHA 反应的检测方法相比检测时间较短。

#### 2.4 传感器特异性、重复性和稳定性分析

选择 OXY、CTC、DOX、Kan 和 Amp 作为干扰物质。相同条件下, 用 SWV 对各组物质进行检测。TC 质量浓度为 5 ng/mL, 各干扰物质质量浓度为

着 TC 质量浓度逐渐增加,  $I_{MB}$  值逐渐增大,  $I_{Fc}$  值逐渐减小, 信号变化与预期结果一致, 再次验证该方法可用于检测不同质量浓度的 TC。如图 6b 所示, 在 50 fg/mL 到 100 ng/mL 的线性范围内, 基于混合适配体的传感器(曲线 a)的  $I_{MB}/I_{Fc}$  值与  $\lg\rho_{TC}$  线性关系良好, 线性回归方程为  $I_{MB}/I_{Fc}=0.35148\lg\rho_{TC}+2.25082$  ( $R^2=0.991$ ), 经计算得出 LOD 为 77 fg/mL。基于 A1 的传感器(曲线 b)的线性范围为 100 fg/mL 到 50 ng/mL, 线性回归方程为  $I_{MB}/I_{Fc}=0.3811\lg\rho_{TC}+2.01616$  ( $R^2=0.995$ ), LOD 为 0.666 pg/mL。基于 A2 的传感器(曲线 c)的线性范围为 100 fg/mL 到 100 ng/mL, 线性回归方程为  $I_{MB}/I_{Fc}=0.37512\lg\rho_{TC}+2.05427$  ( $R^2=0.994$ ), LOD 为 0.469 pg/mL。以上结果表明, 基于混合适配体的传感器的 LOD 比 2 种基于单一适配体的传感器的 LOD 分别低 8.6 倍和 6.1 倍, 灵敏度更高, 且线性范围更宽。

50 ng/mL。如图 7 所示, 即使干扰物质的质量浓度比 TC 质量浓度大 10 倍, OXY、CTC、DOX、Kan、Amp 和干扰物质混合组的  $I_{MB}/I_{Fc}$  值仍与空白对照组较为一致, 而 TC 阳性组和含 TC 的混合组的  $I_{MB}/I_{Fc}$  值都处于较高水平, 表明该传感器能特异性识别 TC, 对其它抗生素有良好的抗干扰能力。

在相同条件下, 制备了 6 个平行的双信号 ( $I_{MB}/I_{Fc}$ ) 电化学混合适配体传感器和 6 个平行的单信号 ( $I_{MB}$ ) 电化学混合适配体传感器, 均用于检测 5 ng/

表2 TC检测方法的性能比较

Table 2 Comparison of the performance for methods of TC detection

序号	分析方法	DNA 扩增 方法	检测范围/(ng/mL)	检出限/(ng/mL)	检测时间/ min	参考文献
1	HPLC	—	$5.0 \times 10^0 \sim 5.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^0$	43	[30]
2	磁免疫测定法	—	$1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^2$	20	[31]
3	比色适配体传感器	—	$2.0 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^3$	$3.9 \times 10^1$	36	[32]
4	荧光适配体传感器	—	$5.0 \times 10^1 \sim 4.4 \times 10^2$	$1.64 \times 10^1$	10	[33]
5	试纸生物传感器	—	$5.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^0$	35	[34]
6	电化学适配体传感器	—	$1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^3$	$7.3 \times 10^{-3}$	30	[14]
7	电化学适配体传感器	CHA	$2.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^5$	$1.3 \times 10^2$	210	[35]
8	比率型电化学混合适配体传感器	CHA	$5.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^2$	$7.7 \times 10^{-5}$	120	本研究

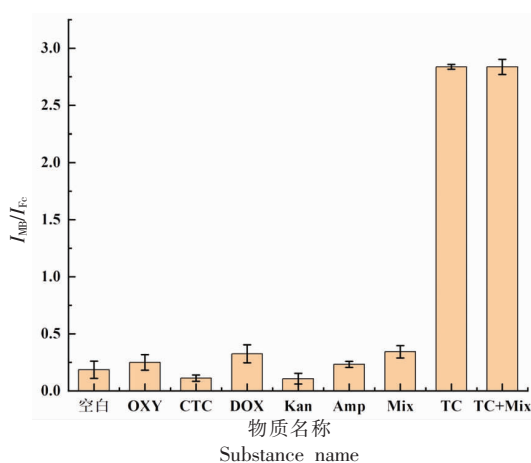


图7 比率型电化学混合适配体传感器对TC检测的特异性评估

Fig.7 Specificity analysis of ratio-type electrochemical mixed aptamers sensor for TC detection

mL的TC。如图8a所示,黑色部分为6次独立试验的均值,误差棒为标准差,双信号电化学混合适配体传感器的相对标准偏差(RSD)为4.203%。如图8b所示,单信号电化学混合适配体传感器只在H3

和H4上标记MB,H1和H2未标记,RSD为8.838%。结果表明,双信号的电化学混合适配体传感器比单信号的电化学混合适配体传感器的重复性更好,检测结果更可靠。

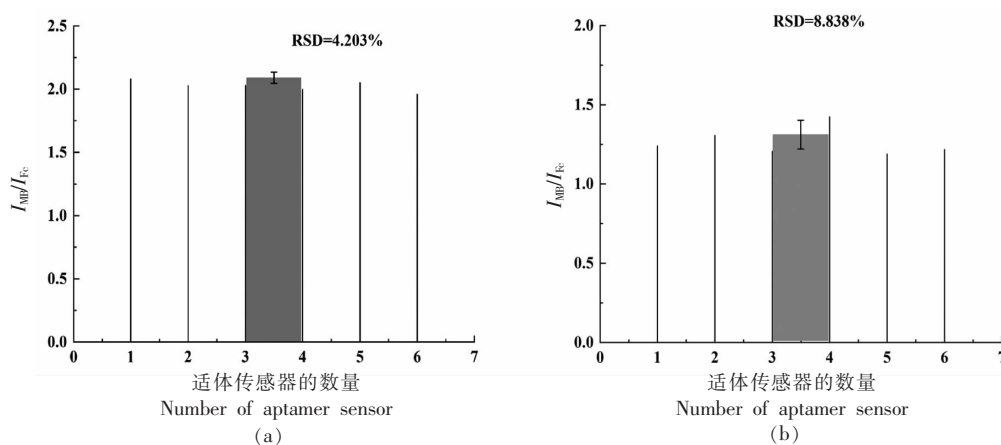


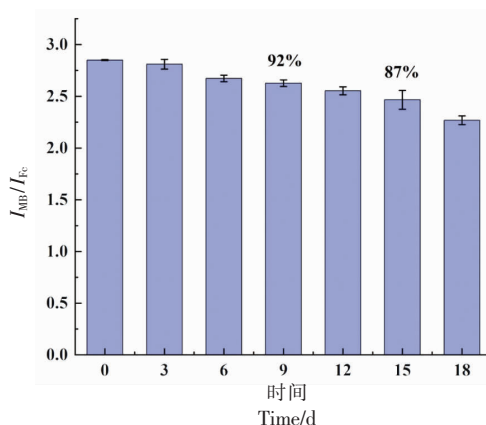
图8 双信号电化学混合适配体传感器对TC检测的重复性评估(a)和单信号电化学混合适配体传感器对TC检测的重复性评估(b)

Fig.8 Repeatability analysis of double-signal electrochemical mixed aptamers sensor for TC detection (a), and repeatability analysis of single-signal electrochemical mixed aptamers sensor for TC detection (b)

为评价该方法的稳定性,在 4 ℃ 下保存数根制备好的电极,分别在第 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 天时取出,检测含 5 ng/mL TC 的反应溶液。如图 9 所示,第 9 天时,  $I_{MB}/I_{Fc}$  值保持在初始值的 92%。第 15 天时,  $I_{MB}/I_{Fc}$  值仍能保持在初始值的 87%。在 15 d 后响应信号明显降低,可能是金纳米粒子老化或 DNA 链不稳定造成的,该情况在可接受范围内。

## 2.5 人工加标样品检测

牛奶预处理后加入不同质量浓度的 TC,分别用该方法和 HPLC 检测。如表 3 所示,该方法的加标回收率为 87.1%~107.2%,HPLC 的加标回收率为 92.1%~100.4%,2 种方法结果较为一致,表明该方法在实际应用中具有较高的可靠性。



注:图中标注的 92%表示第 9 天时  $I_{MB}/I_{Fc}$  值保持在初始值的 92%,87%表示第 15 天时  $I_{MB}/I_{Fc}$  值仍能保持在初始值的 87%。

图 9 比率型电化学混合适配体传感器对 TC 检测的稳定性评估

Fig.9 Stability analysis of ratiometric electrochemical mixed aptamers sensor for TC detection

表 3 人工加标样品中 TC 的检测

Table 3 Detection of TC in the spiked samples

样品	原始/ (ng/mL)	TC/ (ng/mL)	本方法		HPLC	
			检测结果/(ng/mL)	回收率/%	检测结果/(ng/mL)	回收率/%
牛奶	0	10	10.72	107.20	阴性	—
		50	51.29	102.58	50.20	100.40
		100	87.10	87.10	92.10	92.10

注:图中“—”表示 HPLC 检测不到 10 ng/mL 的 TC,因此无回收率。

## 3 结论

1) 本研究构建了一种基于 CHA 的比率型电化学混合适配体传感器。最适条件下,该传感器检测 TC 的线性范围为 50 fg/mL 到 100 ng/mL,比 2 种基于单一适配体的传感器的线性范围更宽。LOD 为 77 fg/mL,比 2 种基于单一适配体的传感器的 LOD 分别低 8.6 倍和 6.1 倍。

2) 对该方法的检测性能进行了研究,结果表明该方法对其它抗生素有良好的抗干扰能力,对 TC 具有特异性。双信号的电化学混合适配体传感器的 RSD 为 4.203%,单信号的电化学混合适配体传感器的 RSD 为 8.838%,表明比率型电化学混合适配体传感器提高了检测的重复性。构建的传感器在保存 9 d 后信号响应仍能保持在初始值的 92%。

3) 采用该方法和 HPLC 检测人工加标的牛奶样品中的 TC,检测结果的加标回收率(87.1%~107.2%)与 HPLC(92.1%~100.4%)较为一致,该方

法可实现对牛奶中 TC 的灵敏和准确检测。

本研究构建的电化学混合适配体传感器可用于牛奶中 TC 的灵敏检测,该方法可为检测各种抗生素提供参考。

## 参 考 文 献

- [1] FAN Y J, WANG Z G, SU M, et al. A dual-signal fluorescent colorimetric tetracyclines sensor based on multicolor carbon dots as probes and smartphone-assisted visual assay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1247: 340843.
- [2] LI C H, XU X, JI Y X, et al. Amino-functionalized Al-MOF modulated TpTt-COF with dual-emission for fluorescent and optosmart detecting tetracycline in food samples [J]. *Food Chemistry*, 2023, 425(1): 136476.
- [3] 刘宁宁, 王鑫昕, 兰欣悦, 等. G-三链体可视化核

- 酸传感器用于四环素的检测[J]. 生物技术通报, 2022, 38(10): 106-114.
- LIU N N, WANG X X, LAN X Y, et al. G-triplex visualization nucleic acid sensor for the detection of tetracycline [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(10): 106-114.
- [4] CUI M L, LIN Z X, XIE Q F, et al. Recent advances in luminescence and aptamer sensors based analytical determination, adsorptive removal, degradation of the tetracycline antibiotics, an overview and outlook[J]. *Food Chemistry*, 2023, 412: 135554.
- [5] 杨杰, 杨学山, 马晓彤. 微波法制备荧光碳量子点及其对牛奶中四环素的快速检测[J]. *食品与发酵科技*, 2022, 58(5): 111-117, 141.
- YANG J, YANG X S, MA X T. Microwave method for the preparation of fluorescent carbon quantum dots and their rapid detection of tetracycline in milk [J]. *Food and Fermentation Technology*, 2022, 58(5): 111-117, 141.
- [6] 李席席, 李芳, 康怀彬. 动物源性食品中氨苄青霉素残留检测研究进展[J]. *食品工业*, 2021, 42(2): 259-264.
- LI X X, LI F, KANG H B. Research progress on detection of ampicillin residues in animal-derived foods[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(2): 259-264.
- [7] 白菲儿. 食品中四环素的高灵敏免疫层析检测方法研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- BAI F E. Study on a high sensitive immunological detection method of tetracycline in food [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.
- [8] XIA W Q, LIU J, WANG J P. Evolution of a natural TetR protein and development of a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> assisted semi-homogeneous fluorescent method for determination of tetracyclines in milk [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1276: 341609.
- [9] JIANG M Z, WANG M, LAI W J, et al. Construction of electrochemical and electrochemiluminescent dual-mode aptamer sensors based on ferrocene dual-functional signal probes for the sensitive detection of Alternariol[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1272: 341476.
- [10] YIN S, HOSSAIN M N, LI Y, et al. Development of a novel electrochemical aptasensor based on catalytic hairpin assembly and DNA tetrahedron for the detection of 25-hydroxyvitamin D3 [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 354: 131217.
- [11] 刘俊桃, 刘志景, 李晓江, 等. 基于铂@金纳米线作为信号放大物的电化学适配体传感器检测黄曲霉毒素[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(24): 1-9.
- LIU J T, LIU Z J, LI X J, et al. An electrochemical aptasensor based on platinum @ gold nanowires as signal amplifier for aflatoxin B<sub>1</sub> detection [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(24): 1-9.
- [12] LI L, MA R, WANG W, et al. Group-targeting aptamers and aptasensors for simultaneous identification of multiple targets in foods[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 166: 117169.
- [13] WEI X, MA P, IMRAN MAHMOOD K, et al. A review: Construction of aptamer screening methods based on improving the screening rate of key steps [J]. *Talanta*, 2023, 253: 124003.
- [14] HUANG Y F, YAN X C, ZHAO L H, et al. An aptamer cocktail-based electrochemical aptasensor for direct capture and rapid detection of tetracycline in honey[J]. *Microchemical Journal*, 2019, 150: 104179.
- [15] 刘芳. 新型信号放大技术的建立及其应用研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2014.
- LIU F. Establishment and application of novel signal amplification technology[D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2014.
- [16] 谢顺军, 周宏, 刘树峰. 无酶信号放大技术在MicroRNA检测中的应用进展[J]. *山东化工*, 2022, 51(16): 121-124.
- XIE S J, ZHOU H, LIU S F. Application progress of enzyme-free signal amplification technology in microRNA detection[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2022, 51(16): 121-124.
- [17] YANG C L, ZHANG Y Q, DENG H L, et al. Base mismatching-fueled highly efficient catalytic hairpin assembly to regulate Ag nanoclusters brightness for amplifiable fluorescence biosensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 393(2): 134300.
- [18] 柴青丽. 等温循环反应介导荧光信号扩增及其高灵敏生化传感应用[D]. 黄石: 湖北师范大学, 2023.
- CHAI Q L. Isothermal cycle reaction mediated fluorescent signal amplification and highly sensitive biochemical sensing applications[D]. Huangshi: Hubei Normal University, 2023.
- [19] LI Y, LIU D, ZHU C, et al. Sensitivity programmable ratiometric electrochemical aptasensor



- based on signal engineering for the detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 387(5): 122001.
- [20] WANG Y, YU F, LIU Q H, et al. A novel and sensitive dual signaling ratiometric electrochemical aptasensor based on nanoporous gold for determination of ochratoxin A[J]. *Food Chemistry*, 2024, 432(30): 137192.
- [21] 李玉龙, 谢发婷, 管燕, 等. 基于银离子与 DNA 相互作用的比率型电化学传感器用于银离子的检测[J]. *高等学校化学学报*, 2022, 43(8): 79–89.
- LI Y L, XIE F T, GUAN Y, et al. A ratiometric electrochemical sensor based on silver ion interaction with DNA for the detection of silver ion[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2022, 43(8): 79–89.
- [22] 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.
- WANG S. Development of aptasensors for rapid detection of tetracycline residue in honey[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2017.
- [23] LIU Y X, GUO W, ZHANG Y Z, et al. An accurate and ultrasensitive ratiometric electrochemical aptasensor for determination of ochratoxin A based on catalytic hairpin assembly[J]. *Food Chemistry*, 2023, 423(15): 136301.
- [24] 马怡, 黄江健, 杨人香, 等. 电化学适配体传感器用于乳酸快速检测的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(9): 2185–2194.
- MA Y, HUANG J J, YANG R X, et al. Electrochemical aptasensor for rapid lactate detection[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2023, 50(9): 2185–2194.
- [25] 范申, 黄榕芬, 毛伟伟, 等. 构建电化学适配体传感器快速检测中药材中的赭曲霉毒素 A[J]. *分析试验室*, 2024, 43(1): 18–23.
- FAN S, HUANG R F, MAO W W, et al. Construction of electrochemical aptamer sensor for rapid detection of OTA in Chinese herbal medicine[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2024, 43(1): 18–23.
- [26] 刘伟. 基于链置换扩增的电化学适配体生物传感器检测食品中赭曲霉毒素 A 的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2022.
- LIU W. Electrochemical aptamer biosensor based on strand displacement amplification for the detection of ochratoxin A in food[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2022.
- [27] 吴昊. 基于链置换扩增的荧光适体传感器检测谷物中赭曲霉毒素 A 研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2021.
- WU H. Study on the detection of ochratoxin A in cereals by fluorescent aptasensor based on strand displacement amplification[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2021.
- [28] LIU L, WU D H, ZHEN S, et al. Electrochemical detection of telomerase in cancer cells based on the in-situ formation of streptavidin–biotin–DNA–biotin networks for signal amplification[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 334: 129659.
- [29] HUI Y Y, WANG B N, REN R, et al. An electrochemical aptasensor based on DNA–AuNPs–HRP nanoprobes and exonuclease–assisted signal amplification for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. *Food Control*, 2020, 109: 106902.
- [30] ZERGIEBEL S, UEBERSCHAAR N, SEELING A. Development and optimization of an ultra-fast microextraction followed by HPLC–UV of tetracycline residues in milk products[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402(15): 134270.
- [31] HARRISON O J, MONNIER B, REGAN E, et al. Rapid detection of tetracycline residues at clinically relevant levels via a novel, inexpensive and analytically-sensitive magneto-immunoassay – A feasibility study[J]. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2023, 41: 100566.
- [32] LUO Y L, XU J Y, LI Y, et al. A novel colorimetric aptasensor using cysteamine-stabilized gold nanoparticles as probe for rapid and specific detection of tetracycline in raw milk[J]. *Food Control*, 2015, 54: 7–15.
- [33] FAN Y, SHEN L, LIU Y Q, et al. A sensitized ratiometric fluorescence probe based on N/S doped carbon dots and mercaptoacetic acid capped CdTe quantum dots for the highly selective detection of multiple tetracycline antibiotics in food[J]. *Food Chemistry*, 2023, 421(30): 136105.
- [34] LINK N, WEBER W, FUSSENEGGER M. A novel generic dipstick-based technology for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(3): 668–680.

- [35] WANG Y H, YAO L, NING G, et al. An electrochemical strategy for tetracycline detection coupled triple helix aptamer probe with catalyzed hairpin assembly signal amplification[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 143: 111613.

### Ratiometric Electrochemical Mixed Aptamers Sensor Based on Catalytic Hairpin Assembly Detect Tetracycline in Milk

HOU Xiaoqing<sup>1</sup>, ZHANG Yunzhe<sup>1</sup>, LI Zikun<sup>2</sup>, LU Xin<sup>3</sup>, YANG Qian<sup>6</sup>, ZHANG Wei<sup>1,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>2</sup>Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>3</sup>Institute of Technology, Hebei Agricultural University, Cangzhou 061100, Hebei

<sup>4</sup>College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>5</sup>Hebei Provincial Key Laboratory of Analysis and Control for Zoonoses Microbial, Baoding 071000, Hebei

<sup>6</sup>School of Public Health, Hebei University, Baoding 071000, Hebei

**Abstract** Purpose: This study aimed to establish a ratiometric electrochemical mixed aptamers sensor based on catalytic hairpin assembly (CHA) for sensitive, accurate, and stable detection of tetracycline (TC). Method: This method improved recognition ability by capturing the same target through two mixed aptamers. Realize enzyme free signal amplification of the target through CHA reaction, using ferrocene (Fc) and methylene blue (MB), which were easily distinguishable from peak values, as signal switch molecules, labeled on DNA probes to generate proportional electrochemical response signals. Result: The linear range of TC detection by this sensor was from 50 fg/mL to 100 ng/mL, which was wider than the linear range of two single aptamer based sensors. The limit of detection (LOD) was 77 fg/mL, which was 8.6 times and 6.1 times lower than the LOD of two single aptamer based sensors, respectively. This sensor had specificity for TC, with a relative standard deviation (RSD) of 4.2% in repeatability evaluation. After 9 days of storage, the signal response of the constructed sensor could still maintain at 92% of the initial value, and it had been successfully used for the detection of TC in milk. The actual sample detection results had a spiked recovery rate (87.1%–107.2%) that was consistent with high performance liquid chromatography (HPLC) (92.1%–100.4%). Conclusion: The ratiometric electrochemical mixed aptamers sensor constructed in this study could be used for sensitive detection of TC in milk, and this method could provide reference for the detection of various antibiotics.

**Keywords** tetracycline; mixed aptamers; catalytic hairpin assembly (CHA); ratiometric strategy; electrochemical aptamer sensor