

# 纳米磁珠-电化学适配体传感技术检测牛奶中氨苄青霉素

朱俊亚<sup>1</sup>, 李芳<sup>1,2,\*</sup>, 赵兰馨<sup>1</sup>, 李席席<sup>1</sup>, 刘云宏<sup>1,2</sup>

(1.河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2.河南省食品原料工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

**摘要:**为满足牛奶中氨苄青霉素高效检测的需要,以纳米磁珠为载体,适配体与氨苄青霉素特异性结合为基础,构建氨苄青霉素电化学适配体传感器。采用碳二亚胺交联法制备修饰有氨苄青霉素的磁珠,该磁珠可与待测样中的氨苄青霉素共同竞争反应体系中的适配体和辣根过氧化物酶,随后利用磁性玻碳电极将上述磁珠吸附于电极检测表面进行电化学测定。最佳条件下,该传感器在 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-8}$  mol/L浓度范围内传感器响应电流与氨苄青霉素浓度呈现良好的线性关系,检测限可达 $1.0 \times 10^{-12}$  mol/L。采用该方法测定市售牛奶样品中的氨苄青霉素,精密度和回收率满意。

**关键词:**氨苄青霉素; 适配体; 磁珠; 适配体传感器

## Magnetic Beads-Based Electrochemical Aptasensor for the Detection of Ampicillin in Milk

ZHU Junya<sup>1</sup>, LI Fang<sup>1,2,\*</sup>, ZHAO Lanxin<sup>1</sup>, LI Xixi<sup>1</sup>, LIU Yunhong<sup>1,2</sup>

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;

2. Henan Engineering Technology Research Center of Food Materials, Luoyang 471023, China)

**Abstract:** A novel electrochemical aptasensor using magnetic beads, based on the specific binding of aptamer to ampicillin, was developed for the detection of ampicillin in milk. Ampicillin functionalized magnetic beads were prepared and used to compete with ampicillin in samples for binding to its aptamers and horseradish peroxidase. Then a magnetic electrode was used to capture and focus the resulting magnetic beads on its surface. Under the optimal conditions, the net current response was linear with ampicillin concentration in the range of  $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-8}$  mol/L, with a detection limit of  $1.0 \times 10^{-12}$  mol/L. The method was applied in the determination of ampicillin in milk samples with a satisfactory precision and acceptable recoveries.

**Keywords:** ampicillin; aptamer; magnetic beads; aptasensor

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180923-236

中图分类号: TS252.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2019)24-0294-06

引文格式:

朱俊亚, 李芳, 赵兰馨, 等. 纳米磁珠-电化学适配体传感技术检测牛奶中氨苄青霉素[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 294-299. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180923-236. <http://www.spkx.net.cn>

ZHU Junya, LI Fang, ZHAO Lanxin, et al. Magnetic beads-based electrochemical aptasensor for the detection of ampicillin in milk[J]. Food Science, 2019, 40(24): 294-299. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180923-236. <http://www.spkx.net.cn>

氨苄青霉素(ampicillin, AMP), 又称氨苄西林, 是一种 $\beta$ -内酰胺类抗生素, 因其耐酸耐霉、杀菌活性强、毒性低及广谱廉价等优点, 广泛应用于奶牛

养殖产业中<sup>[1]</sup>。经常食用AMP残留奶制品会增强机体耐药性, 造成肝肾功能损害, 严重的还会影响机体耐药基因的传递和患病医学治疗<sup>[2-3]</sup>。为保障人体健康,

收稿日期: 2018-09-23

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31501563); 河南省科技攻关项目(172102310617)

第一作者简介: 朱俊亚(1994—)(ORCID: 0000-0003-2583-1022), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与安全。

E-mail: 825081670@qq.com

\*通信作者简介: 李芳(1984—)(ORCID: 0000-0001-6481-7085), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物传感技术的开发与应用。E-mail: lifang182006@126.com

许多国家和地区都对AMP在牛奶中的最大残留量进行了规定：欧盟标准为 $4\text{ }\mu\text{g/kg}$ （约 $1.0\times 10^{-8}\text{ mol/L}$ ）<sup>[4]</sup>，美国标准为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ （约 $2.5\times 10^{-8}\text{ mol/L}$ ）<sup>[5]</sup>，我国农业部最新修订颁布的《动物性食品中兽药最高残留限量》标准为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ （约 $2.5\times 10^{-8}\text{ mol/L}$ ）。国内外对牛奶中AMP最大残留量的强制规定推动了AMP检测方法的发展与创新。目前，常用的AMP检测方法有高效液相色谱法、气相色谱法、液相-质谱联用法等<sup>[6]</sup>，这些方法存在过程繁琐、仪器昂贵和操作复杂等缺点。近年来，免疫分析（immunoassay, IAs）法应用日趋广泛，但由于AMP是小分子化合物，存在抗体质量不稳定、方法特异性差等问题，限制了IAs法的普及<sup>[7]</sup>。适配体克服了传统抗体的缺点，具有筛选周期短、合成批次间差异小、亲和性和特异性高等特点<sup>[8-9]</sup>，为小分子化合物检测提供了一种可替代的识别元件。以适配体作为识别元件的传感检测技术开始崭露头角<sup>[10]</sup>。曾宪冬等<sup>[11]</sup>利用核酸适配体-金纳米颗粒比色传感技术实现了对赭曲霉毒素A的快速、高效检测。Ma Qiang等<sup>[12]</sup>利用金纳米颗粒和单链DNA构建比色适配体传感器，实现了牛奶和鸡蛋中妥布霉素的有效检测。已报道的适配体传感检测技术多采用金纳米显色技术<sup>[13-15]</sup>、荧光光谱分析<sup>[16-18]</sup>，对于将纳米磁珠与电化学技术相结合运用于食品中AMP检测的报道甚少，仍有待深入研究。

本研究以AMP为研究对象，选择纳米磁珠为载体，将两者共价偶联。在AMP-适配体特异性结合基础上，以偶联的AMP为识别探针，与待测样中的AMP共同竞争反应体系中的适配体和辣根过氧化物酶，并利用磁性玻碳电极将上述磁珠吸附于电极检测表面直接进行电化学测定，构建可用于牛奶中AMP高效检测的电化学适配体传感检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

羧基纳米磁珠 英芮诚生化科技（上海）有限公司；AMP（ $\geq 98.89\%$ ）德国Dr. Ehrenstorfer公司；AMP适配体（5'-biotin-GCG GGC GGT TGT ATA GCG G-3'）生工生物工程（上海）股份有限公司；链霉亲和素修饰的辣根过氧化物酶（streptavidin-horseradish peroxidase, SA-HRP）北京博奥森生物技术有限公司；其他试剂均为分析纯。

实验操作过程中所用溶液均为超纯水（电阻率 $\geq 18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）配制。

### 1.2 仪器与设备

TG16-WS型台式高速离心机 湘仪离心机仪器有限公司；KQ2200型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司；BE-1100型四维旋转混合仪 海门市其林贝尔仪器有限公司；CHI620E型电化学工作站 上海辰华仪器有限公司；HRCLJ-02型磁性分离架 河南惠尔纳米科技有限公司。

公司；BE-1100型四维旋转混合仪 海门市其林贝尔仪器有限公司；CHI620E型电化学工作站 上海辰华仪器有限公司；HRCLJ-02型磁性分离架 河南惠尔纳米科技有限公司。

电化学检测使用三电极体系：磁性玻碳电极为工作电极，Ag/AgCl电极为参比电极，铂丝电极为对电极，购自武汉高仕睿联科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 实验原理

基于电化学适配体传感器检测牛奶中AMP的原理如图1所示。采用碳二亚胺交联法制备了修饰有AMP的磁珠（磁性识别探针），其可与适配体特异性结合构成磁性AMP-适配体复合物，由于所合成适配体的5'端修饰有生物素，因此当加入SA-HRP后，在链霉亲和素-生物素作用下，又可将HRP偶联到磁珠表面，随后便可利用磁性玻碳电极，将上述磁珠（磁性信号探针）磁吸固定于电极的检测表面<sup>[19]</sup>，在HQ、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 条件下进行电化学检测。该检测体系是以AMP-适配体竞争模式为基础进行的，当检测体系中存在游离的（待测）AMP时，会和磁珠表面修饰的AMP竞争与适配体结合的机会，形成较多的游离（待测）AMP-适配体复合物，导致磁性AMP-适配体复合物数量的减少，使得能够结合到磁珠表面的HRP数量也随之减少，故获得较低的电化学检测信号。相反，当检测环境中不存在游离的（待测）AMP时，则不存在上述竞争过程，因而可获得较高的电化学检测信号。该适配体传感器通过竞争前后显著的电化学信号变化实现对牛奶中AMP的有效检测。

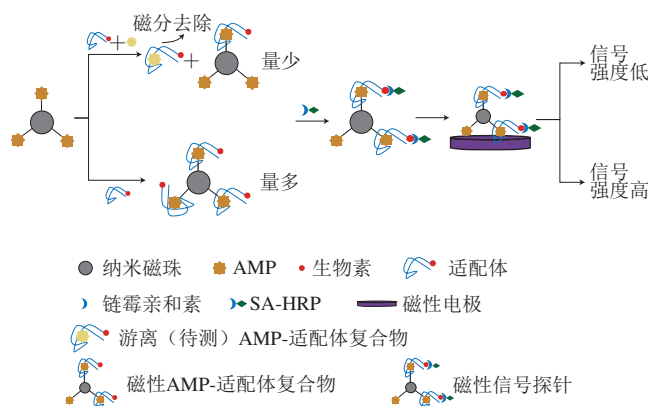


图1 适配体传感器检测AMP原理图

Fig. 1 Schematic illustration of the electrochemical aptasensor for the detection of ampicillin based on competitive format

### 1.3.2 适配体传感器的构建

#### 1.3.2.1 磁性AMP识别探针的制备

主要步骤参照文献<sup>[20]</sup>，采用碳二亚胺交联法制备磁性AMP识别探针。于 $1\text{ mg}$ 羧基纳米磁珠中加入 $1\text{ mL } 15\text{ mmol/L } 2\text{-}(N\text{-吗啉})\text{乙磺酸}$ （2-(N-morpholino)

ethanesulfonic acid, MES) 偶联液洗涤2次。加入100  $\mu\text{L}$  15 mmol/L MES偶联液和100  $\mu\text{L}$  EDC溶液重悬磁珠, 室温条件下于四维旋转混合仪上避光活化。磁分离, 用1 mL 15 mmol/L MES偶联液洗涤2次。加入500  $\mu\text{L}$  AMP溶液, 室温条件下于四维旋转混合仪上避光孵育。产物用PBST (0.01 mol/L PBS, 0.05% Tween-20, pH 7.4) 洗涤2次, 再加入1 mL PBS重悬, 4  $^{\circ}\text{C}$  贮存。

### 1.3.2.2 磁性AMP-适配体复合物的制备

磁分离去上清液, 加入适量待测AMP和适配体溶液, 混合均匀, 室温条件下于四维旋转混合仪上避光孵育一段时间。产物用PBST洗涤3次。

### 1.3.2.3 磁性信号探针的制备

向上述复合物中加入200  $\mu\text{L}$  SA-HRP稀释液 (1:1 000), 室温条件下于四维旋转混合仪上避光孵育一段时间。产物用PBST洗涤3次, 再加入200  $\mu\text{L}$  PBS重悬, 4  $^{\circ}\text{C}$  贮存备用。

### 1.3.2.4 适配体传感器的组装

利用磁性玻碳电极具有的磁性吸附作用, 将上述磁珠 (磁性AMP信号探针) 磁吸固定于磁性工作电极检测表面, 用于后续电化学检测。

### 1.3.3 工作电极的预处理

工作电极选择磁性玻碳电极, 依次用0.3、0.05  $\mu\text{m}$  的抛光粉 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 打磨抛光至镜面, 随后依次用超纯水、体积分数50%的乙醇溶液、超纯水超声清洗。最后置于0.5 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中用循环伏安法活化, 直至得到稳定的循环伏安曲线为止, 处理后的电极用氮气吹干备用。

### 1.3.4 电化学检测

适配体传感器的电化学表征通过循环伏安法在含1 mmol/L  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  和1 mmol/L  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  的0.1 mol/L KCl溶液中测定。循环伏安法检测参数如下: 初始电位-0.1 V、终止电位0.6 V、扫描速率0.05 V/s、扫描圈数2、取样间隔0.001 V、静置时间2 s。

氧化电流通过线性扫描伏安法在含HQ、 $\text{H}_2\text{O}_2$  的PBS中测定。检测参数如下: 初始电位0.1 V、终止电位-0.3 V、扫描速率0.1 V/s、取样间隔0.001 V、静置时间2 s。

### 1.3.5 特异性实验

参照实验步骤1.3.2节, 分别加入 $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L AMP和 $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L的阿莫西林、四环素、卡那霉素、红霉素进行特异性检验, 检测条件同1.3.4节氧化电流检测方法所述。

### 1.3.6 实际样品处理

为验证本适配体传感器的实用性, 采用标准加入法来检测牛奶中的AMP。参照文献[21]对市售牛奶进行预处理, 首先以牛奶为本底配制一定浓度梯度的AMP牛奶样品, 接着加入20%三氯乙酸溶液调节pH值至4.6,

于45  $^{\circ}\text{C}$  条件下沉淀15 min, 然后在10 000 r/min离心25 min, 最后将得到的上清液用0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤备用。

### 1.4 数据处理

实验数据均采集于CHI620E型电化学工作站, 以各优化条件对AMP-适配体竞争反应发生前后适配体传感器净电流值 $\Delta I$ 的变化量为依据进行数据分析, 公式如下:

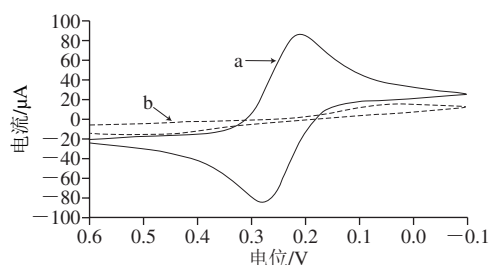
$$\Delta I = I_0 - I_x$$

式中:  $I_0$  为适配体传感器在反应体系中不存在待测AMP参与竞争反应时所测电流值;  $I_x$  为适配体传感器在反应体系中存在待测AMP参与竞争反应时所测电流值。

## 2 结果与分析

### 2.1 电极修饰表征

采用循环伏安法表征磁性AMP信号探针在电极表面的修饰。图2为不同电极在0.1 mol/L KCl+1 mmol/L  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  溶液中的循环伏安曲线。如图2所示, 曲线a为裸磁性玻碳电极的CV曲线, 呈现明显的氧化还原特征,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  表现出可逆的氧化还原行为。曲线b为修饰了磁性AMP信号探针后的电极循环伏安曲线, 在磁性作用下, 所构成的磁性AMP信号探针被修饰到磁性玻碳电极的检测表面, 形成一层不导电的绝缘核酸、蛋白层, 阻碍了电子的传输, 从而导致氧化还原电流值降低。此现象表明磁性AMP信号探针已成功固定到电极的表面上。



a. 裸磁性玻碳电极; b. 修饰磁性AMP信号探针。

图2 磁性玻碳电极修饰磁性AMP信号探针前后电化学表征

Fig. 2 Electrochemical signal of magnetic glass carbon electrode before and after capturing magnetic AMP signal probe

### 2.2 反应条件的优化

为提高适配体传感器的性能, 同时达到节约成本、节省时间的目的, 对磁性AMP-适配体复合物形成过程中的反应时间、反应pH值、检测过程中磁性信号探针的使用量、测试过程中底液 $\text{H}_2\text{O}_2$ 及HQ浓度等进行优化。

#### 2.2.1 反应时间的优化

为保证反应体系中的AMP充分竞争获得AMP适配体形成相应状态的AMP-适配体复合物, 对反应时间为10、

20、30、40、50 min和60 min的样品进行电化学分析,由图3可知,反应进行前30 min,净电流值随时间延长快速增加,于第30分钟处达到最大值,反应进行30 min后,净电流值随时间延长开始呈现缓慢下降趋势。这表明反应进行第30分钟时,游离的(待测)AMP可充分竞争获得反应体系中的适配体,形成较多的游离(待测)AMP-适配体复合物,那么磁性AMP-适配体复合物的数量就会同步减少,影响磁性AMP信号探针形成量,从而获得较高的净电流值。因此,选定最优反应时间为30 min。

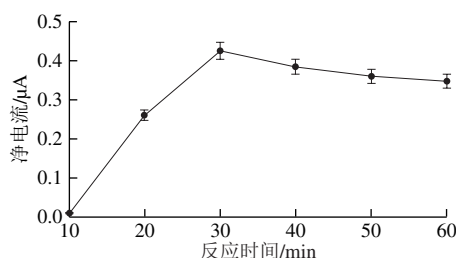


图3 反应时间对净电流的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on  $\Delta I$

## 2.2.2 反应pH值的优化

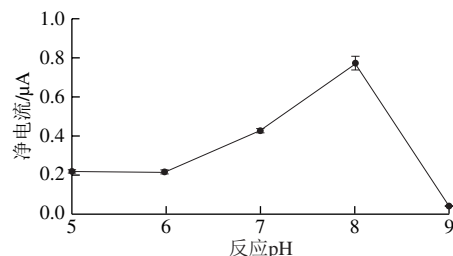


图4 反应pH值对净电流的影响

Fig. 4 Effect of pH value on  $\Delta I$

测定不同pH值条件下样品的电化学信号,由图4可知,随着pH值的升高,适配体传感器检测的净电流值也在增加,在pH 8.0时净电流值最大。继续升高pH值时,净电流值反而急速下降。这表明pH值对不同状态AMP-适配体复合物的形成影响较大,当pH 8.0时,适配体结构中的活性结合位点增加<sup>[22]</sup>,有助于游离(待测)AMP-适配体复合物形成,产生较高的净电流值。而pH值过大或者过小都会影响适配体结构中结合位点的活性,导致游离(待测)AMP-适配体复合物数量的减少,产生较低的净电流值。因此,选定AMP-适配体竞争反应的最优pH值为8.0。

## 2.2.3 磁性信号探针使用量的优化

电化学检测过程中,适量磁性信号探针的使用可以提高适配体传感器的灵敏度,同时还能保证其不造成浪费。因此,需要对检测过程中磁性信号探针的使用量进行优化。实验中依次将10、30、50、100 μg和150 μg磁

性信号探针磁吸固定于处理过的工作电极检测表面,通过电化学工作站对净电流值进行检测分析。由图5可知,随着磁性信号探针使用量的增加,净电流值快速增大,在50 μg处达到最大值。当继续增加磁性信号探针使用量时,净电流值反而呈现逐步下降趋势。这表明随着磁性信号探针使用量的增加,磁性电极表面的有效吸附区域正被逐步覆盖,在50 μg使用量时达到饱和,之后继续增加磁性信号使用量反而使探针相互堆积,电子传输速率受到影响,导致净电流值减弱。因此,磁性信号探针的最优使用量为50 μg。

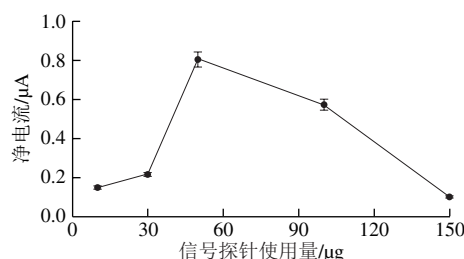


图5 磁性信号探针使用量对净电流的影响

Fig. 5 Effect of the amount of magnetic signal probe on  $\Delta I$

## 2.2.4 检测条件的优化

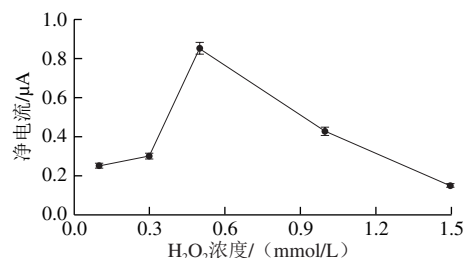


图6 检测体系中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度对净电流的影响

Fig. 6 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on  $\Delta I$

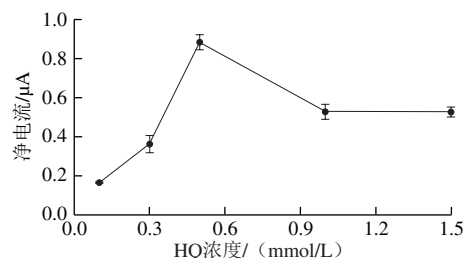


图7 检测体系中HQ浓度对净电流的影响

Fig. 7 Effect of HQ concentration on  $\Delta I$

检测H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度对净电流值的影响,如图6所示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度在0.5 mmol/L时,净电流值达到最大值,所以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>最优浓度为0.5 mmol/L。同时,以相同的实验方法,检测HQ浓度对净电流值的影响。如图7所示,HQ浓度在0.5 mmol/L时,净电流值最大,其余浓度条件下的净电流



值虽有变化,但都远小于0.5 mmol/L时的净电流值。因此,HQ最优浓度为0.5 mmol/L。

2.3 AMP的定量检测结果

在最优实验条件下,采用本传感检测方法对不同AMP浓度梯度为的样品进行测定。如图8所示,其氧化电流值随着待测样品中AMP浓度的降低而升高。以样品浓度的对数为横坐标,竞争前后的净电流值为纵坐标作图,结果显示该适配体传感器在AMP含量为 $1.0\times 10^{-12}\sim 1.0\times 10^{-8}$  mol/L的浓度梯度范围内存在良好的线性关系,线性回归方程为: $\Delta I/\mu A=2.239 8+0.171 9 \lg C_{AMP}$ ,  $R^2=0.995 4$ ,检出限为 $1.0\times 10^{-12}$  mol/L。该适配体传感器检测法与文献报道的AMP检测法相比,有较低的检测限和较宽的检测范围(表1)。此外,将制备好的适配体传感器置于4℃条件下避光保存,在最优实验条件下,每隔1 d对浓度为 $1.0\times 10^{-9}$  mol/L的AMP进行电化学检测,以检测该适配体传感器的稳定性。在 $1.0\times 10^{-9}$  mol/L AMP条件下,线性扫描伏安法测定结果的日内精密密度为1.51%,日间精密密度为3.30%。上述结果表明,放置一段时间的适配体传感器检测效果与最初制备的适配体传感器检测效果差异不大,具有良好的稳定性(7 d)。

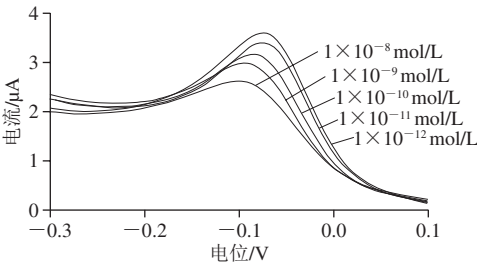


图8 适配体传感器在不同AMP浓度下的线性扫描伏安法扫描图  
Fig. 8 Linear sweep voltammetry analysis of the aptasensor with different AMP concentrations

表1 本实验适配体传感器与其他检测方法比较  
Table 1 Comparison of the developed method with other detection methods

检测方法	检出限/(mol/L)	线性范围/(mol/L)	参考文献
高效液相色谱	$2.5\times 10^{-9}$	$5.0\times 10^{-9}\sim 2.5\times 10^{-7}$	[23]
高效毛细管电泳	$3.0\times 10^{-7}$	$2.5\times 10^{-5}\sim 2.5\times 10^{-4}$	[24]
色谱-电喷雾四极杆串联质谱	$2.5\times 10^{-9}$	$2.5\times 10^{-9}\sim 2.5\times 10^{-7}$	[25]
荧光比色法	$0.5\times 10^{-9}$	$0.5\times 10^{-9}\sim 2.0\times 10^{-6}$	[26]
胶体金免疫层析	$2.5\times 10^{-7}$	$0\sim 2.5\times 10^{-6}$	[27]
SPR生物传感器	$3.9\times 10^{-9}$	$3.9\times 10^{-9}\sim 3.1\times 10^{-8}$	[28]
适配体传感器	$1.0\times 10^{-12}$	$1.0\times 10^{-12}\sim 1.0\times 10^{-8}$	本研究

2.4 方法特异性

为验证该适配体传感器的特异性,排除实际样品检测中可能遇到的其他族类或结构类似抗生素的干扰,分别加入 $1.0\times 10^{-8}$  mol/L AMP,  $1.0\times 10^{-6}$  mol/L的阿莫西

林、四环素、卡那霉素和红霉素反应进行电化学信号测定。如图9所示,当检测体系中存在 $1.0\times 10^{-8}$  mol/L的AMP时,净电流值明显最高,但是当检测体系中的AMP由 $1.0\times 10^{-6}$  mol/L的其他抗生素替代时,净电流值都明显偏低。由此表明,本实验构建的适配体传感器对AMP具有较高的特异性。

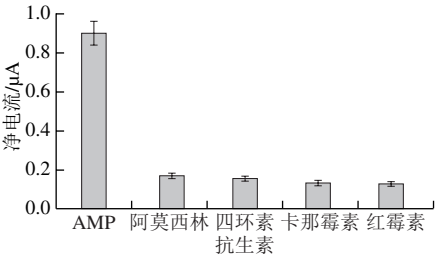


图9 适配体传感器特异性分析  
Fig. 9 Specificity analysis of the aptasensor

2.5 牛奶样品检测结果

取购自超市的新鲜纯牛奶,按照1.3.6节方法进行预处理后,对其进行加标回收实验,加标回收率为95.24%~101.30%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)不大于4.38%( $n=5$ )。结果表明:该电化学适配体传感检测方法准确可靠,可用于实际牛奶样品中AMP含量的测定(表2)。

表2 牛奶样品中AMP的检测结果  
Table 2 Recoveries and precision for ampicillin in spiked milk sample

编号	加标量/(nmol/L)	测定值/(nmol/L)	RSD/%	回收率/%
1	2.500 0	2.395 1	3.11	95.80
2	2.000 0	1.950 6	2.81	97.53
3	1.500 0	1.477 1	2.03	98.47
4	1.000 0	0.988 4	2.11	98.84
5	0.500 0	0.503 8	2.97	100.76
6	0.250 0	0.238 1	3.17	95.24
7	0.200 0	0.191 5	3.90	95.75
8	0.150 0	0.150 7	2.79	100.47
9	0.100 0	0.101 3	3.39	101.30
10	0.050 0	0.049 8	4.38	99.60

3 结 论

以羧基纳米磁珠为载体,适配体与AMP特异性结合为基础,构建AMP电化学适配体传感器。采用碳二亚胺交联法制备了修饰有AMP的磁珠,并以其为磁性识别探针,与待测样中AMP共同竞争反应体系中的适配体和辣根过氧化物酶,随后利用磁性电极将上述磁珠(磁性信号探针)吸附于电极检测表面进行电化学测定。对影响适配体传感器性能的参数,如竞争反应时间和反应pH

值、磁性信号探针使用量、测试底液中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和HQ浓度等进行了优化。确定最佳竞争反应时间为30 min, 反应pH值为8.0, 磁性信号探针使用量为50  $\mu\text{g}$ , 测试底液中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和HQ浓度均为0.5 mmol/L。在最佳条件下, 该适配体传感器在AMP浓度为 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-8}$  mol/L梯度范围内存在良好的线性关系, 检测限可达 $1.0 \times 10^{-12}$  mol/L, 具有较低的检测限和较宽的检测范围。通过加标回收实验检测牛奶样品中的AMP, 证明该适配体传感器可用于牛奶中AMP的高效检测。

#### 参考文献:

- [1] 刘硕, 王胜洁, 贾丽娜. 乳及乳制品中抗生素检测方法研究进展[J]. 农产品加工, 2018(8): 70-72. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2018.04.050.
- [2] GAUDIN V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin: a comprehensive review[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 90: 363-377. DOI:10.1016/j.bios.2016.12.005.
- [3] 孙永海, 张杰, 韩勇, 等. 牛乳中氨苄青霉素残留的受体分析法测定[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 255-258.
- [4] 孙颖宜, 成姗, 林琳, 等. 国内外乳及乳制品中兽药残留限量标准比较分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 378-382.
- [5] 李小丽, 蔡纯, 陈胤瑜, 等. 国内外动物源性食品兽药残留法规标准研究[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(8): 37-39. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2011.08.011.
- [6] WANG H Z, WANG Y, LIU S, et al. Target-aptamer binding triggered quadratic recycling amplification for highly specific and ultrasensitive detection of antibiotics at the attomole level[J]. Chemical Communications, 2015, 51(39): 8377-8380. DOI:10.1039/c5cc01473e.
- [7] 谢顺碧, 袁若. 电化学生物传感器中的信号放大技术的研究进展[J]. 化学传感器, 2016, 36(2): 11-25. DOI:10.3969/j.issn.1008-2298.2016.02.002.
- [8] MEHLHORN A, RAHIMI P, JOSEPH Y. Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: a review[J]. Biosensors, 2018, 8(2): 54-118. DOI:10.3390/bios8020054.
- [9] GROFF K, BROWN J, CLIPPINGER A J. Modern affinity reagents: recombinant antibodies and aptamers[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(8): 1787-1798. DOI:10.1016/j.biotechadv.2015.10.004.
- [10] KHANSILI N, RATTU G, KRISHNA P M. Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2018, 265: 35-49. DOI:10.1016/j.snb.2018.03.004.
- [11] 曾宪冬, 曾灼祥, 陈兴会. 基于核酸适配体-金纳米粒子比色传感器快速检测食品中赭曲霉毒素A[J]. 食品安全导刊, 2018(7): 72-75. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2018.07.019.
- [12] MA Q, WANG Y X, JIA J, et al. Colorimetric aptasensors for determination of tobramycin in milk and chicken eggs based on DNA and gold nanoparticles[J]. Food Chemistry, 2018, 249: 98-103. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.01.022.
- [13] RANJBAR S, SHAHROKHIAN S. Design and fabrication of an electrochemical aptasensor using Au nanoparticles/carbon nanoparticles/cellulose nanofibers nanocomposite for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Bioelectrochemistry, 2018, 123: 70-76. DOI:10.1016/j.bioelechem.2018.04.018.
- [14] ZHANG L P, LI L. Colorimetric thrombin assay using aptamer-functionalized gold nanoparticles acting as a peroxidase mimetic[J]. Microchimica Acta, 2016, 183(1): 485-490. DOI:10.1007/s00604-015-1674-6.
- [15] WANG B, CHEN Y F, WU Y Y, et al. Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB<sub>1</sub>[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 78(3): 23-30. DOI:10.1016/j.bios.2015.11.015.
- [16] LI Y P, SUN L L, ZHAO Q. Development of aptamer fluorescent switch assay for aflatoxin B<sub>1</sub> by using fluorescein-labeled aptamer and black hole quencher 1-labeled complementary DNA[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(24): 6269-6277. DOI:10.1007/s00216-018-1237-x.
- [17] LI Y, XU J Y, WANG L K, et al. Aptamer-based fluorescent detection of bisphenol A using nonconjugated gold nanoparticles and CdTe quantum dots[J]. Sensors and Actuators B Chemical, 2016, 222: 815-822. DOI:10.13140/RG.2.1.1674.8885.
- [18] SHOARA A A, SLAVKOVIC S, DONALDSON L W, et al. Analysis of the interaction between the cocaine-binding aptamer and its ligands using fluorescence spectroscopy[J]. Canadian Journal of Chemistry, 2017, 95(12): 1253-1260. DOI:10.1139/cjc-2017-0380.
- [19] ZHU L L, CAO Y H, CAO G Q. Electrochemical sensor based on magnetic molecularly imprinted nanoparticles at surfactant modified magnetic electrode for determination of bisphenol A[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 54(8): 258-261. DOI:10.1016/j.bios.2013.10.072.
- [20] PARK C, VO C L, KANG T, et al. New method and characterization of self-assembled gelatin-oleic nanoparticles using a desolvation method via carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) reaction[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015, 89: 365-373. DOI:10.1016/j.ejpb.2014.12.002.
- [21] ZHOU N D, ZHANG J, TIAN Y P. Aptamer-based spectrophotometric detection of kanamycin in milk[J]. Analytical Methods, 2014, 6(5): 1569-1574. DOI:10.1039/C3AY41816B.
- [22] ZHANG Z J, ONI O, LIU J W. New insights into a classic aptamer: binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(13): 7593-7601. DOI:10.1093/nar/gkx517.
- [23] 罗道翔, 邓国东, 肖田安, 等. 牛奶中氨苄青霉素残留测定方法研究[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(12): 21-23. DOI:10.3969/j.issn.1002-1280.2002.12.011.
- [24] 孟欢欢, 陈珂珂, 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. DOI:10.3969/j.issn.1007-5038.2008.01.009.
- [25] 陈伟, 闫宁环, 母智深. 利用UPLC-MS/MS测定牛奶中2种青霉素类药物的残留量[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(3): 53-56. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2009.03.014.
- [26] 吕晶, 徐鲁荣, 杜高尚, 等. 基于核酸适配体的纳米金淬灭罗丹明B荧光法检测氨苄青霉素[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2017, 35(1): 34-41. DOI:10.3969/j.issn.1671-9964.2017.01.006.
- [27] 张鸿. 抗Amp单抗的制备及牛奶中Amp残留胶体免疫层析检测方法的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008: 64. DOI:10.7666/d.y1540050.
- [28] 石婷. 基于表面等离子共振生物传感器的牛奶中抗生素残留检测[D]. 天津: 天津大学, 2009: 53-56. DOI:10.7666/d.y1676225.