

核酸适配体氯化血红素比色法检测牛奶中的氯霉素

孙怀霞, 王令臣, 林郑忠, 洪诚毅, 黄志勇

(集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 利用一种基于适配体氯化血红素(hemin)比色分析法快速检测牛奶中的氯霉素(chloramphenicol, CAP)含量。设计两条DNA链,其中一条为CAP的核酸适配体,在其3'端修饰氯化血红素;另一条为CAP核酸适配体的互补链(cDNA),在其5'端修饰hemin。当体系中无CAP时,两条DNA单链杂交形成DNA双链,两个hemin单体形成二聚体使其过氧化物酶活性降低,以致不能催化过氧化氢氧化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)产生蓝色产物。而体系中有CAP时,CAP与CAP适配体特异性结合,DNA双链解离,hemin单体的过氧化物酶活性恢复,并催化过氧化氢氧化TMB产生蓝色产物,加入反应终止液后,检测452 nm处的吸光度值。在优化条件下,该比色法检测CAP的线性范围为1~30 nmol·L⁻¹,以3倍标准偏差计算其检出限为0.315 nmol·L⁻¹。将该方法用于牛奶样品的检测,加标回收率为95.5%~116.0%,表明该方法能够快速、准确和灵敏地检测牛奶中CAP含量。

[关键词] 核酸适配体;氯化血红素;过氧化物酶活性;比色分析;氯霉素

[中图分类号] O 657.3

Colorimetric Method for the Detection of Chloramphenicol in Milk Based on Aptamer and Hemin

SUN Huaixia, WANG Lingchen, LIN Zhengzhong, HONG Chengyi, HUANG Zhiyong

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: A colorimetric method for rapid detection of chloramphenicol(CAP) in milk was developed based on hemin-modified aptamer. Two DNA strands, the aptamer of CAP and its complementary strand(cDNA), were introduced. The hemin molecules were modified at the 3' end of the aptamer and the 5' end of the cDNA, respectively. In the absence of CAP, two DNA single strands hybridized to form a double strand. Two hemin monomers formed dimers which reduced their peroxidase activities and was thus unable to catalyze the oxidization of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) by H₂O₂ to produce a blue colored product. In the presence of CAP, the CAP specifically hybridized with the aptamer. The DNA double strands were dissociated and the peroxidase activity of hemin monomers was restored which effectively catalyzed the oxidization of TMB by H₂O₂ to present blue colored product. The absorbance at 452 nm was recorded after adding of the stop solution. Under the optimal conditions, the colorimetric method showed a good linear response for CAP detection in the range of 1-30 nmol/L. The detection limit based on the 3 σ /k criterion reached 0.315 nmol/L. The recovery tested by the spiked CAP in milk samples was 95.5%-116.0%, showing that the method can be used to sen-

[收稿日期] 2019-12-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21804050);福建省引导性项目(2016Y0064);福建省自然科学基金项目(2018J01432)

[作者简介] 孙怀霞(1994—),女,硕士生,从事食品安全检测与控制方向研究。通信作者:黄志勇(1963—),男,教授,博士,从事食品安全检测技术方向研究。E-mail:zhyhuang@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

sitively and accurately detect CAP in milk.

Keywords: aptamer; hemin; peroxidase activity; colorimetric method; chloramphenicol

0 引言

氯霉素(chloramphenicol, CAP)属抑菌性广谱抗生素,曾被用于渔业和畜牧业^[1-2]。但是,长期摄入含CAP的食物会对人体产生骨髓抑制、再生性贫血及“灰色婴儿综合症”等危害^[3-4]。因此,欧盟规定,动物源食品中CAP不得检出。2007年,我国农业部也宣布在兽医学中禁止使用CAP^[5]。因此,对CAP残留的检测至关重要。目前,CAP检测方法有色谱法^[6-9]、表面增强拉曼散射法^[10]、分子印迹法^[11]、化学发光芯片免疫法^[12]、量子点修饰的电化学方法^[13]、直接竞争酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[14]等。但这些方法由于操作繁琐且耗时,仪器设备昂贵且还需要专业人员操作^[15]。因此,建立一种快速、简便的CAP检测方法具有实际意义。

核酸适配体是通过体外配体指数级富集系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)从人工构建的寡核苷酸文库中筛选出来的单链寡核苷酸序列^[16],具有结合范围广、成本低、毒性小和易于合成修饰^[17]等优点,已应用于多种传感检测中,如电化学^[18]、金纳米粒子^[19]、石墨烯材料^[20-21]、荧光^[22]和电化学发光^[23]等。但是这些方法存在一些不足,例如荧光检测实际样品时背景荧光干扰严重,容易导致检测结果假阳性^[22];电化学及电化学发光法需要对电极进行设计,可能会降低识别能力,检测性能的稳定性难以保证^[24];石墨烯和金纳米粒子结合适配体检测方法制备可用的金纳米粒子处理较为繁琐,限制了其大规模应用^[21]。因此,需要开发一种灵敏、简便的适配体方法检测CAP。

氯化血红素(hemin)是许多天然酶重要的催化辅助因子,已被用于构建多种生物检测方法^[25],其中包括具有过氧化物酶性质的G-四链体/hemin酶^[26]和hemin-还原石墨烯-金复合材料的设计^[27]。此外,由于hemin在水溶液中溶解性较差,易聚集成低催化活性的hemin二聚体,将其修饰在DNA上可显著提高其溶解度,维持其单体结构以保持较高的催化活性^[28]。

本文设计了一种基于适配体和hemin的比色方法,可用于快速检测牛奶中的CAP含量。此方法以hemin为过氧化物模拟酶,通过调节其对四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)的氧化催化活性实现对CAP的定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Hemin-核酸适配体^[29]序列为5'-ACTTCAGTGAGTTGTCACGCTCGGCCAGTCGCTGCTAG-hemin-3', hemin-cDNA序列为5'-hemin-CTACCACCGACTCGC-3',购自上海生工生物技术有限公司;CAP、四环素(tetracycline, TC)、土霉素(oxytetracycline, OTC)、金霉素(chlorotetracycline, CTC)、磺胺(sulfonic acid, SA)和TMB均购自百灵威科技有限公司;过氧化氢和氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司;十二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和三水合乙酸钠($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)购自西陇化工股份有限公司。DNA储备液介质是磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.0, 100 mmol/L NaH_2PO_4 , 100 mmol/L Na_2HPO_4)。反应缓冲液为HAc-NaAc(pH=4.0, 50 mmol/L HAc-NaAc, 100 mmol/L NaCl)。反应终止液为2 mol H_2SO_4 。所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SpectraMax plus 384型酶标仪,美国Molecular Devices公司;PDA UV/VIS Lambda 265型紫外分光光度计,美国PerkinElmer公司;arium bagtank 50水纯化系统,德国赛多利斯公司。

1.3 样品预处理

牛奶样品购自当地超市,并在分析前进行预处理。称取牛奶试样约2 g于10 mL离心管中,加

4 mL 乙腈, 振荡充分, 13 000 r/min 离心 10 min, 提取液置于离心管中, 氮气吹干。再用 2 mL PBS 溶解, 加 2 mL 环己烷, 充分振荡后于 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上层 (即正己烷层) 以除去脂肪, 取下层水相过膜后进行分析^[30-31]。

1.4 CAP 检测

将两条 DNA 链在 90 °C 退火 10 min, 在 100 mmol/L PBS 缓冲液中将等体积 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 hemin-aptamer 和 hemin-cDNA 溶液于室温下混合反应 20 min, 获得 2 $\mu\text{mol/L}$ 的双链 DNA。取 20 μL 双链 DNA 与不同浓度 CAP 于 25 °C 孵育 1 h, 向其中加入 TMB、 H_2O_2 和缓冲液至总体积为 200 μL 。由于 TMB 氧化显色时间较长, 难以达到稳定, 因此, 将反应溶液于 25 °C 孵育 15 min 后立即加入 50 μL H_2SO_4 溶液 (2 mol/L) 以终止反应, 加入 H_2SO_4 后溶液颜色由蓝色转变为黄色, 最大吸收波长由 652 nm 转变为 452 nm, 记录 452 nm 处溶液的吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 实验原理

此方法引入两条 hemin 单体修饰的 DNA 链, 在检测体系中无 CAP 时, 两条 DNA 单链由于互补杂交形成 DNA 双链, 由于修饰在单链上的 hemin 单体相互靠近形成二聚体, 使其过氧化物酶活性降低。而当体系中有 CAP 时, 由于 CAP 与核酸适配体特异性结合, 导致 DNA 双链解离, hemin 二聚体解聚成单体, 过氧化物酶活性恢复, 可有效催化 H_2O_2 氧化 TMB, 生成蓝色氧化物, 由溶液颜色深浅的变化可判断 CAP 的含量, 通过记录 452 nm 处的吸光度值, 实现 CAP 定量分析。

2.2 实验可行性

如图 1 所示, hemin 单体 (曲线 a) 在 402 nm 处显示出吸收峰, 修饰 hemin 的单链 DNA (曲线 b) 在 260 nm 处显示出 DNA 吸收峰和 hemin 单体吸收峰; 而由适配体和互补链形成的 DNA 双链 (曲线 c) 在 378 nm 处出现一个新的吸收峰, 此吸收峰为 hemin 二聚体的吸收峰, 表明成功合成了 DNA 双链。如图 2 所示, 当体系中没有 CAP 存在时 (曲线 a) 的吸光度值比有 CAP 存在时的 (曲线 b、c) 低。同时, 高浓度 CAP (30 nmol/L) 所产生的吸光度值比低浓度 CAP (5 nmol/L) 所产生的吸光度值大, 表明所建立的方法可有效检测 CAP。

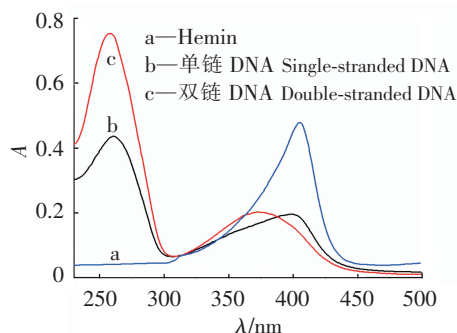


图 1 hemin、修饰 hemin 的单链 DNA 和双链 DNA 的吸收光谱

Fig.1 UV-vis absorbance of hemin, single-stranded DNA modified hemin and double-stranded DNA

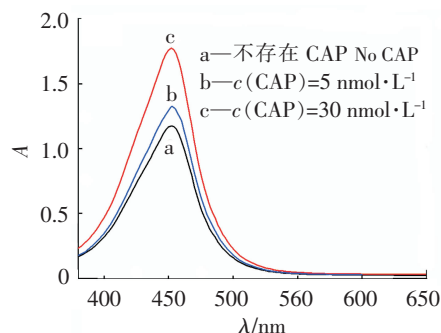


图 2 体系中不存在及存在 CAP 的吸光度值

Fig.2 UV-vis absorbance of single-stranded DNA in the absence and presence of CAP

2.3 条件优化

实验对 hemin 修饰的 DNA 浓度、缓冲体系的种类、缓冲液中 Na^+ 浓度、pH、TMB 和 H_2O_2 的浓度分别进行了优化。考察 1 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ hemin 修饰的 DNA 浓度对实验的影响, 发现 DNA 浓度越大, 信号的吸光度值越大, 但浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时信号的吸光度值就可满足检测要求。为了节约成本, 选择 hemin 修饰的 DNA 浓度皆为 2 $\mu\text{mol/L}$ 。实验还考察了 PBS、NaAc-HAc 和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲体系对实验的影响发现, 在 NaAc-HAc 缓冲液中, TMB 被氧化显色较理想, 因此选择

缓冲液为 NaAc-HAc。还对 NaAc-HAc 缓冲液中 Na^+ 浓度 (50 ~ 200 mmol/L) 进行了优化, 当 Na^+ 浓度小于 100 mmol/L 时, DNA 双链结构不稳定; 而 Na^+ 浓度太高时, 双链结合牢固, 使得 CAP 很难与适配体结合。因此选择 Na^+ 浓度为 100 mmol/L。

NaAc-HAc 缓冲液的 pH 值优化结果如图 3a 所示, 缓冲液 pH 值越大, 反应溶液的吸光度值越小, 而在 pH = 4.0 时, 吸光度值最大。可能原因是在此条件下, TMB 被催化氧化更彻底。因此, 缓冲液的 pH 值选择 4.0。TMB 浓度对 CAP 检测的影响如图 3b 所示, TMB 浓度越大, 溶液吸光度值越大, 而当 TMB 浓度高于 0.9 mmol/L 时, 溶液的吸光度值开始减小, 这可能是 TMB 在水溶液中溶解度较低, 在一定范围内, 反应溶液的吸光度值随 TMB 浓度增大而增大, 而 TMB 过量时不能充分溶解, 导致其吸光度值减小。因此, 实验选择 TMB 的浓度为 0.9 mmol/L。图 3c 为 H_2O_2 浓度对 CAP 检测的影响, 随着 H_2O_2 浓度从 60 mmol/L 增加到 140 mmol/L, 溶液的吸光度值先增大后减小, 当 H_2O_2 浓度为 100 mmol/L 时, 溶液的吸光度值最大。因此, 选择 H_2O_2 浓度为 100 mmol/L。

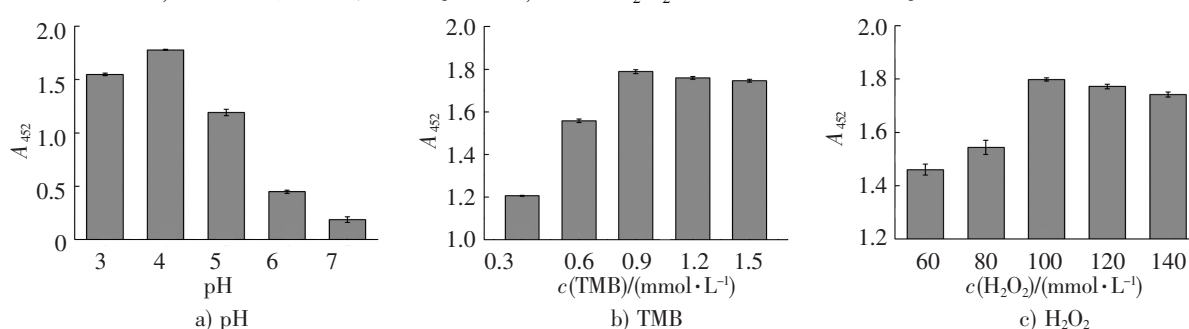


图3 检测溶液的 pH 值、TMB 和 H_2O_2 对信号强度的影响

Fig.3 Effects of pH and different concentrations of TMB and H_2O_2 on the detection

2.4 线性关系

实验考察了 1 ~ 30 nmol/L 范围内 CAP 浓度与溶液吸光度值的响应关系, 如图 4a 所示, 随着 CAP 浓度增加, 溶液在 452 nm 处的吸光度值也逐渐增加。图 4b 表明, CAP 在 1 ~ 30 nmol/L 范围内, 吸光度值与 CAP 浓度呈现良好的线性关系, 线性方程为 $y = 0.0199x + 1.223$, 相关系数 $R^2 = 0.976$, 检出限为 0.315 nmol/L (3σ , $n = 9$)。

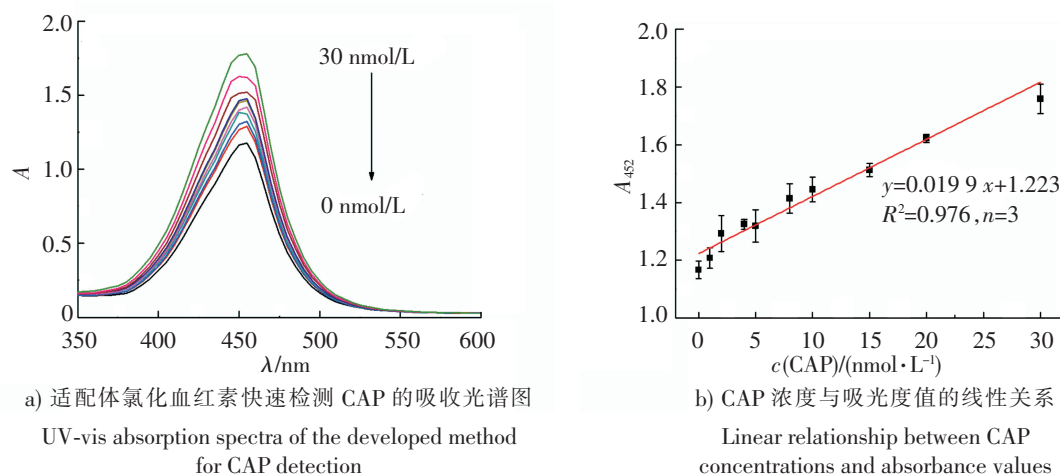


图4 1~30 nmol/L 范围内 CAP 浓度与溶液吸光度值的响应关系

Fig.4 Relationship between CAP concentrations and solution absorbance in the range of 1-30 nmol/L

如表 1 所示, 与色谱法、表面增强拉曼散射法、直接竞争 ELISA 法、分子印迹法、化学发光免疫以及其他基于适配体的检测方法相比, 本方法具有较低的检测限, 线性范围较宽, 实验过程也较为简便快速, 可用于痕量 CAP 的检测。

表 1 本方法与其他 CAP 检测方法的比较
Tab.1 Comparison of the methods for CAP detection

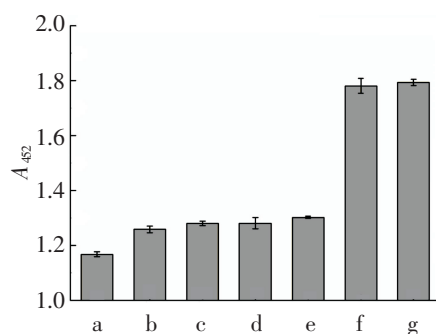
检测方法 Detection method	线性范围 Linear ranges/(nmol · L ⁻¹)	检出限 Detection limit/(nmol · L ⁻¹)	样品 Samples	参考文献 Reference
高效液相色谱法 HPLC	9 ~ 6 000	1.800	蜂蜜 Honey	[6]
气质联用法 GC-MS	3 ~ 600	0.150	水产品 Aquatic products	[7]
液质联用法 LC-MS	0.6 ~ 30	0.120	牛奶 Milk	[8]
液相色谱-串联质谱法 UPLC-MS/MS	0.6 ~ 30	0.300	鸡肉和鱼肉 Chicken and fish	[9]
表面增强拉曼散射法 Surface enhanced Raman scattering	0 ~ 768	7.800	蜂蜜 Honey	[10]
直接竞争 ELISA 法 Direct competition ELISA	0.3 ~ 12.5	0.450	蜂蜜 Honey	[11]
分子印迹法 Molecular imprinting	0 ~ 3 000	9.000	猪肉和蜂蜜 Pork and honey	[12]
化学发光芯片免疫法 Chemiluminescence chip immunoassay	3 ~ 15 000	3.000	牛奶 Milk	[13]
量子点修饰的电化学方法 Quantum dot modified electrochemical method	500 ~ 25 000 000	167.000	饮用水 Drinking water	[14]
适配体的无标记传感器 Label-free-aptasensor	30 ~ 7 000	4.000	人血清 Human blood serum	[19]
适配体功能化的四氧化三铁/氧化石墨烯固相萃取吸附法 Aptamer-functionalized Fe ₃ O ₄ /graphene oxide solid phase extraction adsorption method	21 ~ 3 000	0.720	蜂蜜和牛奶 Honey and Milk	[20]
适配体氧化石墨烯生物传感器 Aptamer graphene oxide biosensor	2 ~ 20	1.450	牛奶 Milk	[21]
基于适配体的化学发光法 Chemiluminescent aptasensor	0.03 ~ 0.6	3.000	牛奶 Milk	[23]
核酸适配体结构开关 Aptamer structure switch	3 ~ 300	2.250	牛奶 Milk	[32]
基于适配体氯化血红素快速检测 Rapid detection based on aptamer and hemin	1 ~ 30	0.315	牛奶 Milk	文中方法 This method

2.5 选择性和干扰

为了分析所建立的方法对 CAP 的选择性,实验选取 TC、OTC、CTC 和 SA 等常见抗生素,考察其对探针的响应程度。将 CAP 浓度设为 30 nmol/L,而其他抗生素的浓度均为 60 nmol/L。图 5 的结果表明,除了 CAP,其他抗生素的信号响应都较低。而当加入 CAP 时,吸光度值增大,说明此方法对 CAP 检测有良好的选择性。将其他抗生素与 CAP 混合且浓度均设为 30 nmol/L,混合液的吸光度值与单独检测 CAP 的吸光度值相近,表明其他物质对 CAP 的检测没有产生明显的干扰。

2.6 实际样品检测

为了考察此方法在实际样品中检测 CAP 的性能,实验选取了市售牛奶样品进行试验,结果未检出。对该样品进行加标回收试验,选取 4 个加标水



说明:a—空白;b—四环素;c—土霉素;d—金霉素;e—磺胺;f—氯霉素;g—混合液。

Note:a—blank;b—TC;c—OTC;d—CTC;e—SA;f—CAP;g—mixture.

图 5 TC、OTC、CTC、SA 和 CAP 对 CAP 检测的影响与干扰

Fig.5 Interference of TC,OTC,CTC,SA and CAP on CAP detection

平,每个水平平行3份,结果如表2所示,牛奶样品中CAP的加标回收率为95.5%~116.0%,表明该方法可用于牛奶样品中CAP的检测。

表2 牛奶样品中CAP的回收率

Tab.2 Recoveries of CAP in milk detected with the developed method

空白 Blank	加入浓度 Added concentration /(nmol · L ⁻¹)	检出 Found /(nmol · L ⁻¹)	回收率 Recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
未检出 ND	5	5.80 ± 0.06	116.0	1.0
未检出 ND	10	10.40 ± 0.36	104.0	3.5
未检出 ND	15	16.10 ± 0.40	107.0	2.5
未检出 ND	20	19.10 ± 0.45	95.5	2.4

3 结论

通过加入CAP可调节修饰在DNA链中的氯化血红素的过氧化物酶活性,进而通过酶催化TMB与H₂O₂的氧化反应快速检测CAP。在优化条件下,CAP检测的线性范围为1~30 nmol/L,检测限为0.315 nmol/L,在牛奶样品中的加标回收率为95.5%~116.0%,表明所建立的方法快速、准确。

[参考文献]

- [1] XU J, YIN W W, ZHANG Y Y, et al. Establishment of magnetic beads-based enzyme immunoassay for detection of chloramphenicol in milk [J]. Food Chem, 2012, 134(4): 2526-2531. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.04.083.
- [2] TAN Z J, XU H, LI G, et al. Fluorescence quenching for chloramphenicol detection in milk based on protein-stabilized Au nanoclusters [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2015, 149: 615-620. DOI:10.1016/j.saa.2015.04.109.
- [3] LIU Y, YAN K, OKOTH O K, et al. A label-free photoelectrochemical aptasensor based on nitrogen-doped graphene quantum dots for chloramphenicol determination [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 74: 1016-1021. DOI:10.1016/j.bios.2015.07.067.
- [4] WU S J, ZHANG H, SHI Z, et al. Aptamer-based fluorescence biosensor for chloramphenicol determination using upconversion nanoparticles [J]. Food Control, 2015, 50: 597-604. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.10.003.
- [5] MEHTA J, DORST B V, ROUAH-MARTIN E, et al. In vitro selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol [J]. J Biotechnol, 2011, 155(4): 361-369. DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.06.043.
- [6] CHEN H X, CHEN H, YING J, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey [J]. Anal Chim Acta, 2009, 632(1): 80-85. DOI:10.1016/j.aca.2008.10.068.
- [7] LI P, QIU Y M, CAI H X, et al. Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2006, 24(1): 14-18. DOI: 10.1016/S1872-2059(06)60002-3.
- [8] HUANG J F, ZHANG H J, FENG Y Q, et al. Chloramphenicol extraction from honey, milk, and eggs using polymer monolith microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry determination [J]. J Agr Food Chem, 2006, 54(25): 9279-9286. DOI:10.1021/jf062246e.
- [9] 杨梅, 孙思, 王安波, 等. 基于UPLC-MS/MS方法的家禽水产品中氯霉素残留检测 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(6): 128-132.
- [10] 费定文. 基于表面增强拉曼散射的氯霉素类抗生素快速检测方法的研究 [D]. 上海: 上海师范大学, 2018.
- [11] 刘姚, 韦倩妮, 王弘, 等. 直接竞争ELISA法检测蜂蜜中氯霉素残留 [J]. 食品科学, 2018, 39(16): 336-342.
- [12] 李增威, 王娜, 雷婵, 等. 磁性分子印迹聚合物的制备及对食品中氯霉素残留的检测 [J]. 浙江农业学报, 2018, 30(6): 1063-1072.

- [13] 任帅, 丁乔棋, 李丽, 等. 新型氯霉素化学发光芯片免疫检测方法的建立及应用 [J]. 分析化学, 2018, 46(10): 1581-1587.
- [14] 许贺, 潘哲伦, 谢昱, 等. Nafion/石墨烯量子点修饰电极对重金属和氯霉素的电化学检测 [J]. 分析科学学报, 2019, 35(3): 270-276.
- [15] MIAO Y B, GAN N, LI T H, et al. A colorimetric aptasensor for chloramphenicol in fish based on double-stranded DNA antibody labeled enzyme-linked polymer nanotracers for signal amplification [J]. Sensors Actuators B Chem, 2015, 220: 679-687. DOI:10.1016/j.snb.2015.05.106.
- [16] DUAN Y, GAO Z Q, WANG L H, et al. Selection and identification of chloramphenicol-specific DNA aptamers by Mag-SELEX [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 180(8): 1644-1656.
- [17] WANG G L, HU X L, WU X M, et al. Fluorescent aptamer-based assay for thrombin with large signal amplification using peroxidase mimetics [J]. Microchim Acta, 2016, 183(2): 765-771. DOI:10.1007/s00604-015-1703-5.
- [18] HAMIDI-ASL E, DARDENNE F, BLUST R, et al. An improved electrochemical aptasensor for chloramphenicol detection based on aptamer incorporated gelatine [J]. Sensors, 2015, 15(4): 7605-7618.
- [19] HASHKAVAYIA B, RAOOF J B, AZIMI R, et al. Label-free and sensitive aptasensor based on dendritic gold nanostructures on functionalized SBA-15 for determination of chloramphenicol [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(10): 2557-2565. DOI:10.1007/s00216-016-9358-6.
- [20] 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.
- [21] LU J H, TAN S Z, ZHU Y Q, et al. Fluorescent aptamer-functionalized graphene oxide biosensor for rapid detection of chloramphenicol [J]. Acta Chimica Sinica, 2019, 77(3): 253-256.
- [22] 彭艳, 叶泰, 曹慧, 等. 适配体传感器检测抗生素的研究进展 [J]. 工业微生物, 2019, 49(1): 55-60.
- [23] FENG X, GAN N, LIN S, et al. Ratiometric electrochemiluminescent aptasensor array for antibiotic based on internal standard method and spatial-resolved technique [J]. Sensors Actuators B Chem, 2016, 226: 305-311. DOI:10.1016/j.snb.2015.11.131.
- [24] 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.
- [25] WANG Q B, XU N, GUI Z, et al. Strand displacement activated peroxidase activity of hemin for fluorescent DNA sensing [J]. Analyst, 2015, 140: 6532-6537. DOI:10.1039/C5AN01206F.
- [26] LI J, YUAN T X, YANG T T, et al. DNA-grafted hemin with preferable catalytic properties than G-quadruplex/hemin for fluorescent miRNA biosensing [J]. Sensor Actuators B Chem, 2018, 271: 239-246. DOI:10.1016/j.snb.2018.05.045.
- [27] XUE T, JIANG S, QU Y Q, et al. Graphene-supported hemin as a highly active biomimetic oxidation catalyst [J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2012, 51(16): 3822-3825.
- [28] WANG Q B, XU N, CUI Z, et al. Catalytic activity of dual-hemin labelled oligonucleotide: conformational dependence and fluorescent DNA sensing [J]. Chem Commun, 2014, 50: 15362-15365. DOI:10.1039/C4CC07298G.
- [29] KIM M, BAE H, KIM E, et al. Selection of aptamers that bind to Chloramphenicol using SELEX [J]. Molecular & Cellular Toxicology, 2009, 5(3): 86-86.
- [30] 李琴, 王宇坤, 仵军红. 牛奶中氯霉素残留量 LC-MS/MS 快速测定方法 [J]. 食品工程, 2019(4): 60-62.
- [31] 仲伶俐, 郭灵安, 毛建霏, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定牛奶中替米考星、地塞米松、氟苯尼考和氯霉素残留 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(9): 2645-2652.
- [32] 乔尚娜. 基于核酸适配体结构开关的卡那霉素和氯霉素残留分析研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)