用于卡那霉素检测的竞争性比色传感策略研究

赵婷婷[1]，陈 谦[1]，卞晓军[1,2,3]，颜 娟[*1,2,3]

（1. 上海海洋大学 食品学院，上海 201306；2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心，上海 201306；3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室（上海），上海 201306）

摘要：由于畜牧业和渔业等食品相关领域抗生素的使用不当对环境和人体造成的严重影响已经引起了众多研究者的广泛关注。作者制备了磁珠-卡那霉素这一磁性复合物，通过磁珠表面的卡那霉素与待测样中的卡那霉素共同竞争识别体系中的适配体，开发了一种简单、快速、灵敏的竞争性比色适配体传感器。通过扫描电子显微镜和紫外-可见分光光度计对磁珠-卡那霉素的合成及适配体与靶标之间的生物识别进行表征。这两者的成功为该传感策略的实施提供了有力保障。该传感器在卡那霉素浓度为 0.05~500 nmol/L 的检测范围内有良好的比色效能，检测限为 0.21 nmol/L。另外，通过与其他氨基糖苷类抗生素的检测实验对比，可以得出该传感器对卡那霉素的选择性良好。总之，该比色适配体传感器操作简单，无需大型仪器，为其他抗生素以及影响食品安全的其他化学污染物的快速检测提供了良好思路。

关键词：适配体；生物传感器；磁性探针；抗生素；食品安全检测

中图分类号：TS 207.3　**文章编号：**1673-1689(2022)09-0011-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.09.002

Research on Competitive Colorimetric Sensing Strategy for Kanamycin Detection

ZHAO Tingting[1]，*CHEN Qian*[1]，*BIAN Xiaojun*[1,2,3]，*YAN Juan*[*1,2,3]

（1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Process & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products Storage and Preservation (Shanghai), Shanghai 201306, China）

Abstract: The serious impact of the improper use of antibiotics in food-related fields such as animal husbandry and fishery on the environment and human body has attracted widespread attention of many researchers. In this study, a magnetic beads-kanamycin complex was prepared, and a simple, rapid and sensitive competitive colorimetric aptamer sensing strategy was developed by competing for the aptamer in the system between kanamycin on the surface of magnetic beads and kanamycin in the sample. The synthesis of magnetic beads-kanamycin and the biological recognition between the aptamer and the target were characterized by scanning electron microscope and ultraviolet-visible spectrophotometer. The successful synthesis and recognition provide a strong guarantee for the sensing strategy construction. The sensor has good colorimetric performance in the detection range of

收稿日期：2021-04-19

基金项目：国家自然科学基金项目(21775102)；上海市自然科学基金项目(20ZR1424100)。

* **通信作者：**颜 娟(1982—)，女，博士，副研究员，硕士研究生导师，主要从事食品安全快速检测技术研究。E-mail：j-yan@shou.edu.cn

kanamycin molar concentration of 0.05~500 nmol/L, and the limit of detection is 0.21 nmol/L. In addition, by comparing with other aminoglycoside antibiotics detection experiment, it could be concluded that the sensor has a good selectivity to kanamycin. In short, the colorimetric aptasensor is easy to operate without large-scale instruments, providing a good idea for the rapid detection of other antibiotics and other chemical contaminants affecting food safety.

Keywords: aptamer, biosensor, magnetic probe, antibiotics, food safety detection

卡那霉素(kanamycin,KAN)是一种氨基糖苷类抗生素[1]。由于它具有阻断蛋白质合成的能力,因此可广泛用于治疗细菌等微生物引起的感染[2]。但是,过度、过量使用抗生素会导致其残留在肉、蛋、奶制品及其他动物源性食品中,并最终通过人体内循环系统累积到体内,造成一系列的危害,如:肾毒性、耳毒性以及过敏反应等[3]。许多国家、地区对 KAN 在牛奶中允许的最高残留限量做了规定,例如,欧盟将残留限量定为 150 μg/kg[4],中国则为 200 μg/kg[5]。因此,建立一种灵敏的 KAN 检测方法对食品、环境及人类健康都是至关重要的。

目前,常用的 KAN 检测方法有酶联免疫吸附实验[6]、高效液相色谱[7-8]、高效液相色谱-质谱联用[9-10]和毛细管电泳等,但其中有些方法依赖于抗原、抗体结合的稳定性,如酶联免疫吸附实验;有的方法需要依赖大型仪器,需要专业的人员和烦琐的操作,如高效液相色谱和高效液相色谱-质谱联用;有的方法本身响应时间较长,如表面等离子共振法;而毛细管电泳法则存在灵敏度较低的问题。鉴于这些传统的检测方法有各自的不足,因而开发一种简单、快速、灵敏度高的 KAN 检测方法迫在眉睫。

适配体(aptamer,Apt)是一种从体外核酸分子文库中通过指数富集配体系统进化技术获得的单链寡核苷酸序列[11-12],它能够与靶分子发生高特异性、高亲和力结合[13-14]。与抗体相比,适配体具有热稳定性高、生产成本低、便于生产和修饰等诸多优点[15],因此基于适配体的生物传感器得到了研究人员的广泛重视[16-17]。自从 Song 等利用亲和层析技术筛选出对 KAN 具有高特异性的适配体以来[18],用于检测 KAN 的适配体传感器,如比色[19-20]、荧光[21-22]和电化学[23]传感器等相继涌出。在这些方法中,比色适配体传感器因成本低、简单实用、无需任何精密仪器,肉眼就能够观察其颜色变化而得到广泛应用[24]。

近年来,基于磁性颗粒和碳纳米管等磁性材料特性设计的纳米结构,用来分析抗生素残留已经得到了诸多研究[25-27]。磁性颗粒是一类可负载多种表面官能团的粒子[28],因其具有表面结合小分子稳定性好、测定动力学强、固定小分子定向改善等优点,可以利用磁分离技术实现流体中靶标分子的分离和富集,故在生物传感器方面得到了广泛应用[29-31]。作者制备了磁珠-卡那霉素(magnetic beads-kanamycin,MBs-KAN)复合物,通过该复合物表面的 KAN 与溶液中待测 KAN 共同竞争性地识别生物素修饰的适配体(biotin modified aptamer,Biotin-Apt),开发了一种检测 KAN 的竞争性比色适配体传感器。随着待测 KAN 含量增加,溶液中的适配体倾向于与其结合,所以磁珠表面的 KAN 竞争性识别适配体的量减少,进而导致链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶(streptavidin-labeled horseradish peroxidase,SA-HRP)的量减少,从而影响 HRP 催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine,TMB)的显色反应,使蓝色发色物质的量减少。基于该比色适配体传感器的紫外-可见吸收光谱值与待测 KAN 的浓度呈负相关关系,从而可以对 KAN 进行定量检测。该传感器操作简单、灵敏度高、选择性好,可以通过替换相应的磁性复合物和适配体来实现不同种类抗生素的检测,具有良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DNA 序列(5′-Biotin -TTT TTT TTT TTG GGG GTT GAG GCT AAG CCG AGT CAC-3′),纯度为 HPLC 级别:由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并纯化;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS,20×,pH 7.4)、Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L,pH 7.0)、Biotin-11-dUTP(1 mmol/L)、KAN、阿布拉霉素(apramycin,APM)、巴龙霉素(paromomycin,PAR)、

链霉素(streptomycin,STR)、庆大霉素(gentamicin,GEN)和新霉素(neomycin,NEO):生工生物工程(上海)股份有限公司产品;BioMag® Plus 修饰的磁珠、磁分离器:美国 Polysciences Inc 公司产品;牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA):美国 Amresco 公司产品;TMB(含 H_2O_2):美国 Neogen 公司产品;SA-HRP:赛默飞科技有限公司(上海)产品;1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide,EDC)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate,MES):阿拉丁试剂有限公司(上海)产品;Millipore 净化系统的超纯水:美国密理博公司产品。

1.2 仪器与设备

HCM100-Pro 恒温振荡金属浴、D1008 手持式离心机:大龙兴创实验仪器(北京)有限公司产品;UV-2540 紫外-可见分光光度计:日本岛津公司产品;Hitachi S-3400N 扫描电子显微镜:日本株式会社日立制作所产品;移液枪:德国 Brand 公司产品;Synergy2 SLFPTAD 多功能酶标仪:美国伯腾仪器有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 MBs 的活化 磁珠的活化即对氨基磁珠进行醛基化,具体步骤如下:用移液枪移取 BioMag® Plus 修饰的磁珠 3 mL(150 mg)到 50 mL 离心管,加 24 mL 吡啶缓冲液(0.01 mol/L),在室温下剧烈振荡混合均匀后,进行磁分离,弃去上清液,该过程重复 3 次;之后加入 12 mL 体积分数 5%的戊二醛溶液(用 0.01 mol/L 吡啶缓冲液稀释配制),在非磁性混合设备即恒温摇床振荡器中 25 ℃避光振荡 3 h,以保证磁珠和戊二醛溶液充分混合;然后进行磁分离去除未反应完的戊二醛溶液,用 24 mL 吡啶缓冲液(0.01 mol/L)反复清洗 3 次,直至溶液澄清后进行磁分离操作,移除上清液;最终,将磁珠加入 15 mL 的 1×PBS 中重悬,4 ℃储存备用。

1.3.2 MBs-KAN 的制备 MBs-KAN 采用碳二亚胺交联法制备[32],详细的制备步骤如下:取 2 mL(20 mg)醛基化磁珠于 15 mL 离心管中,离心丢弃上清液,加入 2 mL 20 mmol/L MES 偶联液洗涤 3 次;之后分别加入 2 mL 20 mmol/L MES 偶联液和 20 g/L EDC 溶液重悬磁珠,于恒温摇床振荡器 25 ℃下避光活化 3 h;磁分离后,用 2 mL 20 mmol/L MES 偶联液洗涤 3 次;加入 100 g/L 的硫酸卡那霉素,在 25 ℃下放于恒温摇床振荡器中避光孵育振荡 6 h,之后进行磁分离,弃去上清液;最后将产物用 4 mL 的清洗缓冲液(1×PBS,1 mmol/L $MgCl_2$,体积分数 0.05% Tween-20,PH 7.4)洗涤 3 次以除去未反应的硫酸卡那霉素,将沉淀重悬于 2 mL 的 1×PBS 溶液中,4 ℃储存备用。

1.3.3 竞争性适配体传感器的构建 取 5 μL 制备好的 MBs-KAN 复合物,磁分离去除上清液,加入 50 μL 体积分数为 2%的 BSA 溶液室温下封闭 40 min。封闭结束后,磁分离去除上清液,加入 500 nmol/L 的 Biotin-Apt 以及 20 μL 不同浓度的 KAN 溶液(0、0.05、0.5、5、50、500 nmol/L),将离心管放于旋涡振荡器上振荡混匀,之后放入金属浴于 37 ℃孵育 1 h。孵育结束后,磁分离去除上清液,将产物用清洗缓冲液冲洗 3 次。

1.3.4 比色适配体传感器的构建 将上述获得的磁性复合物用 50 μL 体积分数 4%的 BSA 溶液进行封闭,封闭时间 40 min,结束后进行磁分离操作以除去多余的 BSA 溶液。之后在离心管中加入 2 μL 稀释 1 000 倍的 SA-HRP,避光反应 20 min 后进行磁分离。将磁分离后的沉淀部分加入 50 μL 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液清洗 6 次,直至溶液澄清,后进行磁分离操作弃去上清液。在上述产物中加入 50 μL TMB 溶液(含 H_2O_2),在避光状态下反应 5 min,磁分离后,上清液被吸取到 96 孔板中,在酶标仪中波长 652 nm 处测量吸光度。

1.3.5 牛奶实际样品中检测 KAN 牛奶样品购自上海罗森超市,具体的处理步骤如下:2 mL 牛奶样品用 PBS 缓冲液稀释 10 倍。将牛奶样品在 4 ℃以 11 000 r/min 离心 25 min,除去沉淀后,用 0.22 μm 的滤膜过滤上清液,收集得到的滤液。将一系列不同浓度的 KAN 标准溶液加到牛奶滤液中,配成终浓度为 0.5、1、5 nmol/L 的 KAN 溶液用于检测。另外将一组不加 KAN 的经过预处理的牛奶样品作为对照组。将加标的样品和对照组都进行上述操作,测定 652 nm 处的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 竞争性比色适配体传感器的检测原理

基于磁珠表面竞争性生物识别的比色适配体传感器用于检测 KAN 的原理见图 1。该竞争性适配

体传感器的构建核心在于 MBs-KAN 与待测样中的 KAN 共同竞争识别 Biotin-Apt。当溶液中不存在游离的 KAN 时，由于适配体与靶标会发生特异性识别，所以磁珠上共价交联的 KAN 就会捕获 Biotin-Apt，从而使 Biotin 结合在磁性复合物的表面。当体系中加入 SA-HRP 后，生物素与链霉亲和素识别连接，辣根过氧化物酶(HRP)被间接连接到磁珠复合物的表面。加入 TMB 时，HRP 催化 H_2O_2 介导的 TMB 发生还原反应，生成蓝色的氧化型 TMB，从而在 652 nm 处出现强吸收峰。而当溶液中存在过量的待测 KAN 时，由于游离的 KAN 相较于磁珠上交联的 KAN 有着更小的空间位阻，适配体会优先结合待测样中的 KAN，这使得磁珠上结合的适配体以及 HRP 的量大大减少甚至没有，因此催化 TMB 后溶液的吸光度降低。随着待测样中 KAN 浓度升高，该传感器在 652 nm 处的吸光度降低，根据吸光度的差值对 KAN 进行定量检测。

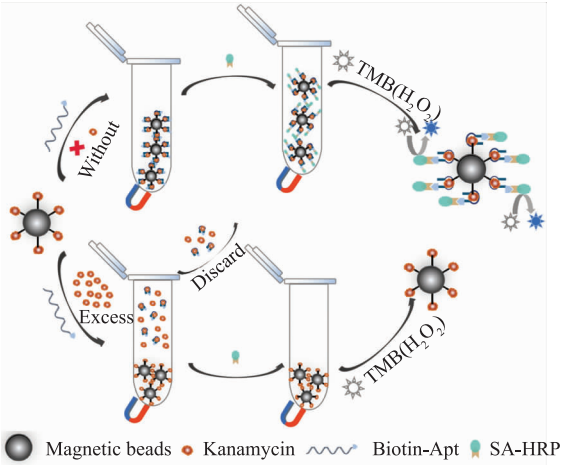
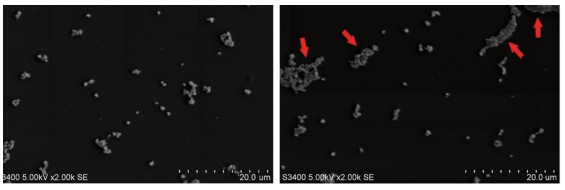


图 1　基于磁珠表面竞争性生物识别的比色适配体传感器用于检测 KAN 的示意图

Fig. 1　Schematic illustration of a colorimetric aptasensor based on the competitive biological recognition on the surface of magnetic beads for detecting KAN

2.2　MBs-KAN 的表征

首先采用扫描电子显微镜对预制备的 MBs-KAN 磁性复合物进行表征(见图 2)。由于超顺磁性结构微域的存在，导致 MBs 会发生一定的团聚[33]，因此图 2(a)中出现一些磁珠聚集体；然而当其表面连接 KAN 之后，由于 KAN 的介导作用，使得更多磁珠聚集成团，相比图 2(a)而言，图 2(b)中磁性聚集体的粒径进一步增大(红色箭头)。聚集体尺寸的变化一方面可反映 KAN 在磁珠表面的成功连接。并且，MBs-KAN 复合物的制备也将进一步通过 KAN 与适配体之间的识别进行验证。另外，据文献报道，磁珠表面具有多孔结构，经过蛋白质(如抗体)修饰及填充，磁珠的多孔表面变得顺滑[34]，这也说明具备该结构的磁珠具有更大的比表面积，更有利于如 KAN 等小分子的组装。



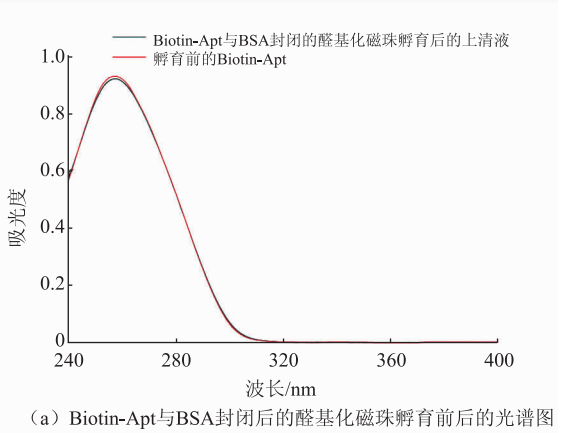
(a) 醛基化磁珠　　(b) 磁珠-卡那霉素复合物

图 2　扫描电子显微镜图像

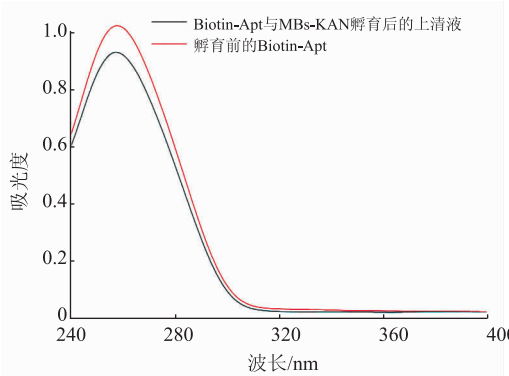
Fig. 2　Scanning electron microscope image

2.3　MBs-KAN 识别 Biotin-Apt 的验证

该竞争性适配体传感器制备成功与否的关键在于适配体能否识别 KAN。基于此，进一步验证了 Biotin-Apt 与 KAN 的生物识别。首先，将 BSA 封闭后的醛基化磁珠与 Biotin-Apt 孵育后收集上清液，测试孵育前后 DNA 的吸光度。结果如图 3(a)所示，DNA 的吸光度无明显变化；而当 Biotin-Apt 与 MBs-KAN 相互作用后，结果如图 3(b)所示，其上清液中游离的 Biotin-Apt 即黑线所示的吸光度，较孵育前 Biotin-Apt 的吸光度明显降低，表明一定量的适配体与 KAN 识别后结合在 MBs-KAN 复合物表面。该结果不但进一步表明了 MBs-KAN 的成功制备也验证了适配体与 KAN 的特异性识别。



(a) Biotin-Apt与BSA封闭后的醛基化磁珠孵育前后的光谱图



（b）Biotin-Apt与MBs-KAN孵育前后的光谱图

图 3　紫外吸收光谱图

Fig. 3　Ultraviolet absorption spectrum

2.4　适配体传感器用于检测 KAN 的可行性验证

为了验证该竞争性适配体传感器的竞争效应，设计了两组实验：第一组实验是将 MBs-KAN 与 Biotin-Apt 孵育(不加入待测物 KAN)作为对照组，另一组则通过预实验发现 5 μmol/L 及更高浓度 KAN 加入此竞争体系时，吸光度保持在一个很低的数值并且不会随着浓度升高而有所下降，因此将 MBs-KAN 与 Biotin-Apt 孵育后加入过量的 KAN(5 μmol/L)作为实验组。两组实验在相同条件下进行。结果如图 4 所示，实验组(过量的 KAN)的吸光度明显低于对照组(无 KAN)。这很可能是因为实验组中过量的游离 KAN 具备更小空间位阻，因而更易与 Biotin-Apt 结合。MBs-KAN 复合物竞争结合的适配体的量较对照组大大减少，进而后续 HRP 催化 TMB 的呈色效应大大降低。通过两组吸光度的差值，可以清楚看到磁珠表面 KAN 与样品中 KAN 对适配体的竞争识别能力差异明显，因此该竞争性适配体传感策略具有实施的可能性。

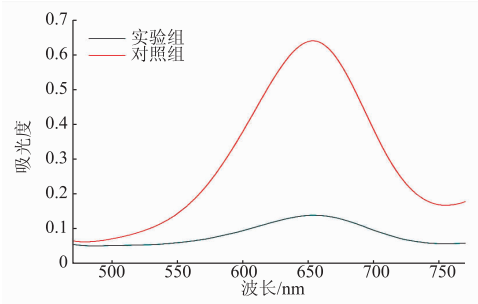


图 4　验证可行性的紫外-可见吸收光谱图

Fig. 4　UV-vis absorption spectrum for the feasibility verification

2.5　性能分析

2.5.1 适配体传感器灵敏度测试　为了研究该竞争性比色传感体系的检测灵敏度，将一系列不同浓度的 KAN 加入该传感器体系中，可以发现：随着 KAN 浓度的增加(0~500 nmol/L)，自然光下可清晰观察到显色程度不同的蓝色发色产物，这表明该适配体传感器可用于裸眼检测 KAN(见图 5(a))。同时，随着 KAN 浓度的增加，在 652 nm 处的吸光度逐渐降低(见图 5(b))。此外，$\Delta A_{652\ nm}$ 与 KAN 浓度的对数值在 0.05~500 nmol/L 之间存在良好的线性关系($\Delta A_{652\ nm}$=0.042 7 lg c_{KAN}+0.055 7，R^2=0.987 1)(见图 5(c))。其中 652 nm 处的吸光度变化值 $\Delta A_{652\ nm}$ 的计算公式如下：

$$\Delta A_{652\ nm}=A_c-A_e \tag{1}$$

式中：A_c 为对照组，即在无游离 KAN 的情况下，该适配体传感器在 652 nm 处的吸光度；A_e 为实验组，即待测样的吸光度。

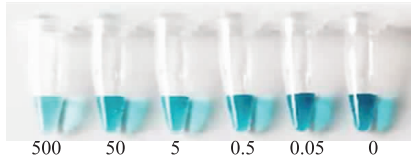
通过使用 LOD =3σ/S 公式估算，该传感器的检出限为 0.21 nmol/L，其中空白溶液的相对标准偏差为 σ，S 是校正曲线的斜率。

依据浓度计算公式：

$$c=\frac{n}{V}=\frac{m}{M\times V} \tag{2}$$

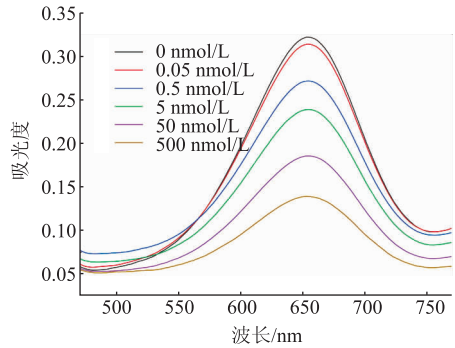
式中：c 为浓度，mol/L；n 为物质的量，mol；V 为体积，L；m 为质量，g；M 为 KAN 的摩尔质量，g/mol。

将该传感器的检测限按公式换算可得 0.122 μg/kg，远低于中国标准对牛奶中 KAN 规定的最高残留限量 200 μg/kg。

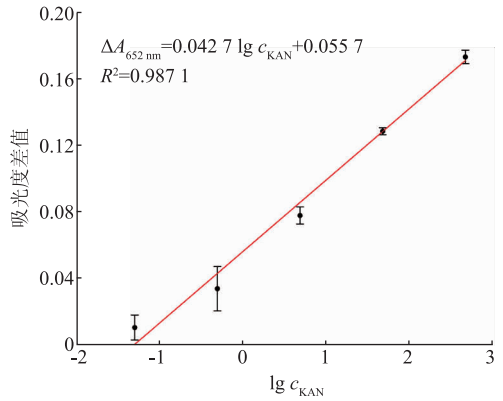


图中数据的单位为nmol/L。

（a）灵敏度测试比色照片



（b）灵敏度测试的紫外-可见吸收光谱图



（c）652 nm处的吸光度变化值与KAN浓度的对数值之间的线性关系

图 5　灵敏度检测结果

Fig. 5　Results of sensitivity detection

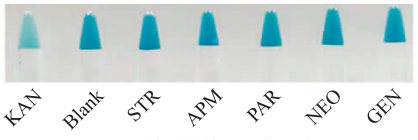
将该竞争性比色适配体传感器与其他检测KAN的方法相比较，如表1所示，该方法不需要大型仪器，具有更宽的检测范围和更低的检测限，优势明显，可以应用于食品安全检测领域KAN的痕量分析。

2.5.2　特异性检测　为了探究该适配体传感器对KAN的选择性，选取与KAN结构相似的氨基糖苷类抗生素进行比较验证。KAN浓度为500 nmol/L，其他氨基糖苷类抗生素浓度是5 μmol/L，均为KAN的10倍。对照组（Blank组）为不加KAN组，按照上述1.3.4的步骤应用该适配体传感器检测，结果如图6所示。首先裸眼即可观察到，实验组（KAN组）溶液颜色明显浅于对照组与其余组溶液颜色；而柱形图结果进一步证实，只有实验组具有明显的吸光度变化，而其他氨基糖苷类抗生素的吸光度变化与实验组相比，几乎可忽略。该结果表明，该竞争性生物识别的比色适配体传感器对KAN具有良好的选择性。

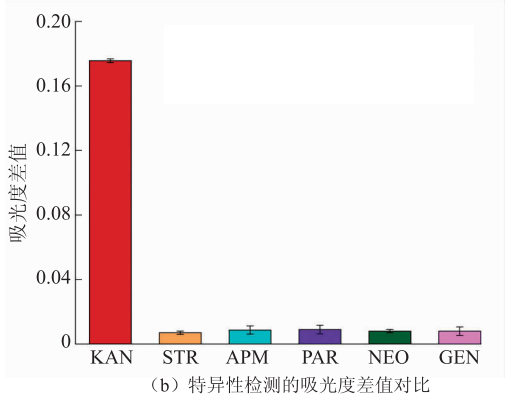
表 1　现有检测 KAN 的传感器检测性能比较

Table 1　Detection performance comparison of existing KAN detecting sensors

检测方法	检测范围/(nmol/L)	检测限/(nmol/L)	是否使用大型仪器	参考文献
酶联免疫吸附	6.88~46.8	1.72	否	[6]
高效液相色谱-质谱联用	8.6~430	1.72	是	[35]
荧光法	40~240	18	是	[36]
电化学法	10~500	1.87	否	[37]
比色法	0.05~500	0.21	否	该研究方法



（a）特异性检测比色照片



（b）特异性检测的吸光度差值对比

图 6　竞争性比色适配体传感器对 KAN 的选择性

Fig. 6　Selectivity of competitive colorimetric aptamer sensors for KAN

2.5.3　实际样品检测　为了进一步验证该检测方法在实际样品分析中的适用性，将不同浓度的KAN加到牛奶样品中，如表2所示，回收率为93.8%~102.0%，相对标准偏差为3.1%~6.3%，可以看出该策略在牛奶实际样品中有较好的精确性和重现性，说明该比色适配体传感器可用于实际样品的检测。

表 2　牛奶样品中加标的 KAN 检测

Table 2　Detection of KAN spiked in milk samples

添加浓度/(nmol/L)	检出浓度/(nmol/L)	回收率/%	相对标准偏差/%
0.5	0.47	94.0	6.3
1	1.02	102.0	5.4
5	4.69	93.8	3.1

3　结　语

作者开发了一种基于磁珠表面竞争性生物识

别的比色适配体传感器,通过磁珠表面连接的 KAN 以及检测样本中的 KAN 与适配体的竞争性生物识别性能的差异来构建应用于检测 KAN 的比色传感策略。该生物传感器的设计核心在于利用磁珠、KAN 与适配体进行竞争体系的构建。首先磁珠和 KAN 的共价交联,保证了竞争体系的稳定性;另外由于磁珠的存在,大大简化了实验操作的同时也有利于降低实验背景,提高检测灵敏度;最后 KAN 与适配体的生物识别也确保了该方法的特异性检测。总之,该方法操作简便、快速,拥有较宽的检测范围和较低的检测限,在抗生素检测方面具备良好的应用前景,同时也为食品安全领域其他污染物的快速检测提供了良好思路。

参考文献:

[1] PIGNATELLO R,SIMERSKA P,LEONARDI A,et al. Synthesis,characterization and *in vitro* evaluation of amphiphilic ion pairs of erythromycin and kanamycin antibiotics with liposaccharides[J]. **European Journal of Medicinal Chemistry**,2016,120:329-337.

[2] FENG D,TAN X,WU Y,et al. Electrochemiluminecence nanogears aptasensor based on MIL-53(Fe)@CdS for multiplexed detection of kanamycin and neomycin[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2019,129:100-106.

[3] BAI Z,CHEN Y,LI F,et al. Electrochemical aptasensor for sulfadimethoxine detection based on the triggered cleavage activity of nuclease P1 by aptamer-target complex[J]. **Talanta**,2019,204:409-414.

[4] COMMISSION E. Commission regulation (EU) No. 37/2010 of 22 december 2009:on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin[J]. **Official Journal of the European Union**,2010,1(1):1-72.

[5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法:GB/T 22969—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2009.

[6] LI C,ZHANG Y,EREMIN S A,et al. Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA[J]. **Food Chemistry**,2017,227:48-54.

[7] BLANCHAERT B,PODER?SJORGE E,JANKOVICS P,et al. Assay of kanamycin A by HPLC with direct UV detection[J]. **Chromatographia**,2013,76(21):1505-1512.

[8] ZHANG X,WANG J,WU Q,et al. Determination of kanamycin by high performance liquid chromatography[J]. **Molecules**,2019,24(10):1902-1925.

[9] PEREZ J J,CHEN C Y. Detection of acetyltransferase modification of kanamycin,an aminoglycoside antibiotic,in bacteria using ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**,2018,32(17):1549-1556.

[10] PEREZ J J,CHEN C Y. Rapid detection and quantification of aminoglycoside phosphorylation products using direct-infusion high-resolution and ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry[J]. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**,2018,32(20):1822-1828.

[11] 杜玉梅,周洋洋,卞晓军,等. 基于末端脱氧核糖核酸转移酶的纳米界面上 DNA 的生长策略及用于恩诺沙星的适配体传感器构建研究[J]. 分析测试学报,2019,38(7):784-791.

[12] 王周平,张维潇. 适配体及其研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(9):897-906.

[13] ZHOU Y,FANG W,LAI K,et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-catalyzed homo-nucleotides-constituted ssDNA:inducing tunable-size nanogap for core-shell plasmonic metal nanostructure and acting as Raman reporters for detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2019,141:111419-111425.

[14] ZHU F,BIAN X,ZHANG H,et al. Controllable design of a nano-bio aptasensing interface based on tetrahedral framework nucleic acids in an integrated microfluidic platform[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2021,176:112943-112952.

[15] 王红旗,张玲,刘冬梅,等. 小分子靶标核酸适配体研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(8):790-798.
[16] TIAN R,JI J,ZHOU Y,et al. Terminal-conjugated non-aggregated constraints of gold nanoparticles on lateral flow strips for mobile phone readouts of enrofloxacin[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2020,160:112218-112226.
[17] DU Y,ZHOU Y,WEN Y,et al. Multiplexed aptasensing of food contaminants by using terminal deoxynucleotidyl transferase-produced primer-triggered rolling circle amplification:application to the colorimetric determination of enrofloxacin,lead (II),*Escherichia coli* O157:H7 and tropomyosin[J]. **Microchimica Acta**,2019,186(12):840-849.
[18] 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.
[19] LIU M,YANG Z,LI B,et al. Aptamer biorecognition-triggered hairpin switch and nicking enzyme assisted signal amplification for ultrasensitive colorimetric bioassay of kanamycin in milk[J]. **Food Chemistry**,2021,339:128059-128064.
[20] XU Y,HAN T,LI X,et al. Colorimetric detection of kanamycin based on analyte-protected silver nanoparticles and aptamer-selective sensing mechanism[J]. **Analytica Chimica Acta**,2015,891:298-303.
[21] LYU M,LIU Y,GENG J,et al. Engineering nanomaterials-based biosensors for food safety detection[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2018,106:122-128.
[22] RAMEZANI M,DANESH N M,LAVAEE P,et al. A selective and sensitive fluorescent aptasensor for detection of kanamycin based on catalytic recycling activity of exonuclease III and gold nanoparticles[J]. **Sensors and Actuators B:Chemical**,2016,222:1-7.
[23] ZHOU Y,LI F,WU H,et al. Electrochemical aptasensing strategy for kanamycin detection based on target-triggered single-strand DNA adsorption on MoS_2 nanosheets and enzymatic signal amplification[J]. **Sensors and Actuators B:Chemical**,2019,296:126664-126670.
[24] 田润,陶晴,卞晓军,等. 基于杂交链式反应的适配体传感器用于卡那霉素的比色检测[J]. 分析化学,2020,48(5):608-614.
[25] JIA L,CHEN R,XU J,et al. A stick-like intelligent multicolor nano-sensor for the detection of tetracycline:the integration of nano-clay and carbon dots[J]. **Journal of Hazardous Materials**,2021,413:125296-125308.
[26] TORKASHVAND M,GHOLIVAND M B,MALEKZADEH G. Construction of a new electrochemical sensor based on molecular imprinting recognition sites on multiwall carbon nanotube surface for analysis of ceftazidime in real samples [J]. **Sensors and Actuators B:Chemical**,2016,231:759-767.
[27] HE H,WANG S Q,HAN Z Y,et al. Construction of electrochemical aptasensors with Ag (I) metal-organic frameworks toward high-efficient detection of ultra-trace penicillin[J]. **Applied Surface Science**,2020,531:147342-147349.
[28] 石良,王锡昌,刘源,等. 羧基化磁性纳米微球的表面生物修饰方法[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(1):71-77.
[29] YANG W,ZHANG G,NI J,et al. From signal amplification to restrained background:magnetic graphene oxide assisted homogeneous electrochemiluminescence aptasensor for highly sensitive detection of okadaic acid[J]. **Sensors and Actuators B:Chemical**,2021,327:128872-128878.
[30] YU J,WU H,HE L,et al. The universal dual-mode aptasensor for simultaneous determination of different bacteria based on naked eyes and microfluidic-chip together with magnetic DNA encoded probes[J]. **Talanta**,2021,225:122062-122072.
[31] BAHREYNI A,LUO H,RAMEZANI M,et al. A fluorescent sensing strategy for ultrasensitive detection of oxytetracycline in milk based on aptamer-magnetic bead conjugate,complementary strand of aptamer and PicoGreen[J]. **Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy**,2021,246:119009-119015.
[32] 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.
[33] SADASIVAM M,SAKTHIVEL A,NAGESH N,et al. Magnetic bead-amplified voltammetric detection for carbohydrate antigen 125 with enzyme labels using aptamer-antigen-antibody sandwiched assay[J]. **Sensors and Actuators B:Chemical**,2020,312:127985-127993.

[34] MALECKA K,PANKRATOV D,FERAPONTOVA E E. Femtomolar electroanalysis of a breast cancer biomarker HER-2/neu protein in human serum by the cellulase-linked sandwich assay on magnetic beads[J]. **Analytica Chimica Acta**,2019,1077:140-149.

[35] HAMIDI H,ZARRINEH M,ES-HAGHI A,et al. Rapid and sensitive determination of neomycin and kanamycin in measles, mumps,and rubella vaccine via high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using modified superparamagnetic Fe_3O_4 nanospheres[J]. **Journal of Chromatography A**,2020,1625:461343-461354.

[36] WANG J,LU T,HU Y,et al. A label-free and carbon dots based fluorescent aptasensor for the detection of kanamycin in milk[J]. **Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy**,2020,226:117651-117657.

[37] BI H,WU Y,WANG Y,et al. A molecularly imprinted polymer combined with dual functional Au@Fe_3O_4 nanocomposites for sensitive detection of kanamycin[J]. **Journal of Electroanalytical Chemistry**,2020,870:114216-114223.

科　技　信　息

韩国拟修订健康功能食品标准及规格

2022 年 8 月 16 日,韩国食品药品安全部(MFDS)发布关于健康功能食品的标准及规格修订案的行政预告,修订内容为增加对含有叶绿素的植物、螺旋藻、蜂胶提取物、含 γ-亚麻酸的油脂、车前子膳食纤维、聚环氧乙烷、红菊等 7 种功能性原料的“摄取时注意事项”有关内容,扩大功能性原料的范围。主要包括:1)对 7 种原料标注增加“发生异常病例时停止摄取,与专家咨询”;2)修改螺旋藻、蜂胶提取物、车前子膳食纤维每日摄取量;3)删除螺旋藻“可以帮助皮肤健康”的功能性;4)修改龙舌兰提取物作为原料的健康功能食品审批范围;5)增加大蒜“有助于调节血压”的功能性。

[信息来源]海关总署.韩国拟修订健康功能食品标准及规格[EB/OL]. (2022-8-18). http://www.tbt.org.cn/warningDetail.html?id=UhIzc4w87DhOSRA7hhukdOXEhis7togF0ntftu4.

加拿大提议将葡萄籽提取物用于膳食补充剂

2022 年 8 月 16 日,加拿大发布 NOP/ADPSI-002 参考文件,提议将葡萄籽提取物(低聚原花青素)用于膳食补充剂,使用限量为 100 mg,并纳入“允许的膳食补充剂成分清单”。该文件意见反馈期截至 2022 年 10 月 29 日。

[信息来源] 海关总署. 加拿大提议将葡萄籽提取物用于膳食补充剂 [EB/OL]. (2022-8-18). http://www.tbt.org.cn/warningDetail.html?id=kFrNylndlIfQxtnVONaqWdTGNdR13E5HuGqt8MO.