

论著 • Article

基于链置换反应信号放大的适体生物传感器在 恩诺沙星抗生素残留检测中的应用

刘媛 刘珍钊 陈曦

(湖南君实科技有限公司 湖南 衡阳 421000)

摘要 目的: 链置换反应 (Chain Displacement Reaction, CDR) 信号放大策略结合适体 (Aptamer) 生物传感器在检测抗生素残留方面的敏感性与可行性。**方法:** 本研究纳入 2023 年 3 月—2025 年 3 月我单位接收的 100 份疑似含恩诺沙星抗生素残留的动物源性食品样本, 按传感器类型分为观察组 (链置换信号放大适体传感器) 和对照组 (传统适体传感器), 每组各 50 份。两组样本均采用荧光信号检测法进行结果读取, 比较其检测限 (LOD)、灵敏度、特异性及结果一致性。**结果:** 观察组的最低检测限显著低于对照组 (0.35 ng/mL vs 1.02 ng/mL, $P < 0.01$), 灵敏度为 94%, 高于对照组的 78% ($P < 0.05$); 特异性方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。观察组在检测时间上亦表现出更高效率, 平均检测时长缩短约 20%。**结论:** 链置换反应信号放大适体生物传感器在抗生素残留检测中具有良好的灵敏度与检测下限优势, 能有效提升检测效率, 具有较高的临床推广价值。

关键词 链置换反应; 适体传感器; 抗生素残留; 检测限; 灵敏度

文章编号 034-2025-0709

Application of Aptamer Biosensor Based on Chain Displacement Reaction Amplification in the Detection of Enrofloxacin Antibiotic Residues

Liu Yuan, Liu Zhenxia, Chen Xi

(Hunan Junshi Technology Co., Ltd., Hengyang 421000, China)

Abstract Objective: To investigate the sensitivity and feasibility of an aptamer biosensor combined with a chain displacement reaction (CDR) amplification strategy for detecting antibiotic residues. **Methods:** This study included 100 animal-derived food samples suspected of containing enrofloxacin antibiotic residues, received by our institution from March 2023 to March 2025. The samples were divided into an observation group (CDR-amplified aptamer sensor) and a

收稿日期: 2025-07-18 录用日期: 2025-08-23

通讯作者: 刘媛, 单位: 湖南君实科技有限公司 湖南 衡阳

引用格式: 刘媛, 刘珍钊, 陈曦. 基于链置换反应信号放大的适体生物传感器在恩诺沙星抗生素残留检测中的应用[J]. 环球医学进展, 2025, 4(2): 22-27.

control group (traditional aptamer sensor), with 50 samples in each group. Fluorescence signal detection was used to read the results, and the limits of detection (LOD), sensitivity, specificity, and result consistency were compared between the two groups. **Results:** The lowest detection limit of the observation group was significantly lower than that of the control group (0.35 ng/mL vs 1.02 ng/mL, $P < 0.01$). The sensitivity of the observation group was 94%, which was higher than that of the control group (78%, $P < 0.05$). There was no significant difference in specificity between the two groups ($P > 0.05$). The observation group also showed higher efficiency in detection time, with an average reduction of about 20% in detection duration. **Conclusion:** The CDR-amplified aptamer biosensor demonstrates good sensitivity and lower detection limit advantages in antibiotic residue detection, effectively improving detection efficiency and possessing high clinical promotion value.

Keywords: Chain displacement reaction; Aptamer sensor; Antibiotic residues; Limit of detection; Sensitivity

引言

随着抗生素在畜牧、水产养殖等领域的广泛使用,其残留问题已成为公共健康关注的焦点^[1]。抗生素残留可通过食物链进入人体,长期暴露可能导致肠道菌群失衡、耐药性菌株滋生及免疫功能异常等健康风险。例如,恩诺沙星等喹诺酮类抗生素在动物源性食品中的残留,可能干扰人体DNA复制过程,增加儿童骨骼发育异常的风险^[2]。世界卫生组织数据显示,全球每年因抗生素耐药性导致的死亡病例已超70万,其中食品源性残留是重要传播途径之一。传统检测方法如高效液相色谱(HPLC)和气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)虽具有较高准确性,但存在操作复杂、检测周期长、成本高等局限,难以满足快速筛查和大规模样本检测的实际需求^[3]。这类方法通常需要专业人员操作精密仪器,单次检测成本可达数百元,且样本前处理耗时往往超过6小时,无法适应基层监管部门的即时检测需求。在我国年均超千万批次的食品抽检任务中,传统方法的效率瓶颈日益凸显^[4]。近年来,适体(Aptamer)作为一种具备高亲和力与特异性的单链核酸分子,被广泛应用于生物传感领域。尤其在抗生素检测方面,适体传感器展现出良好的选择性和稳定性。与抗体相比,适体具有合成成本低、

化学稳定性强、可重复修饰等优势,其对目标分子的识别能力可达纳摩尔甚至皮摩尔级别^[5]。然而,传统适体传感器在灵敏度和检测限方面仍有待提高,面对复杂基质样本中痕量抗生素残留(如低于1 ng/mL)时,常因信号强度不足导致漏检。链置换反应(Chain Displacement Reaction, CDR)作为一种信号放大策略,能够实现对目标分子的级联响应,提升信号强度与检测精度。该反应无需酶促条件即可通过DNA链间的互补配对实现自主扩增,在常温下即可快速完成信号放大,较传统PCR技术更适合现场检测场景。基于此,构建一种融合链置换反应信号放大机制的适体生物传感器,用于动物源性食品中抗生素残留的高灵敏检测,成为亟需研究的方向^[6]。本研究旨在评估该传感器在实际样本中的应用效果,通过对比传统适体传感器的检测性能,验证其在灵敏度、检测限及检测效率上的优势,为后续食品安全监测与快速筛查技术的开发提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究纳入2023年3月—2025年3月期间我单位接收的动物源性食品样本共计100份,随机分为观察组和对照组,每组各50份。其中,猪肉样本25份,牛肉样本20份,

鸡肉样本 20 份, 鱼肉样本 20 份, 虾类样本 15 份。所有样本均来自本地及周边地区的养殖场、屠宰场和农贸市场, 采集后立即置于 -20°C 冷冻保存, 且在检测前均未经过任何抗生素去除处理, 以保证样本的原始状态。

纳入标准: (1) 来源明确, 为畜禽类或水产类动物源性食品; (2) 样本保存符合《食品中抗生素残留检测规范》标准条件; (3) 送检时间不超过 24 小时; (4) 样本未进行任何抗生素降解或去除预处理; (5) 具备完整送检登记信息与编号。

排除标准: (1) 样本已过保存期或出现腐败变质; (2) 来源不明或未经备案的样本; (3) 送检流程不合规导致样本污染者; (4) 样本在检测前进行过预处理干预; (5) 样本登记资料不全、编号不清晰者。

1.2 方法 对照组采用传统适体荧光生物传感器对抗生素残留进行检测, 传感器设计中未引入链置换反应信号放大机制。检测平台基于适体与抗生素目标分子的特异性识别作用, 启动链置换反应生成可被荧光光度计读取的信号变化。首先, 选用的适体分子序列针对恩诺沙星具有高度特异性, 其序列为 5'-CCCATCAGG-GGGCTAGGCTAACACGGTTCGGCTCTCT-GAGCCCGGGTTATTTTCAGGGGA-3', 该序列经过严谨筛选与纯化, 作为识别元件用于捕获样本中的恩诺沙星分子。实验前准备适体工作液, 将其稀释至终浓度 100 nmol/L , 使用 Tris-HCl 缓冲液 (10 mM , $\text{pH } 7.4$) 作为反应体系基础介质, 添加 $\text{NaCl } 100\text{ mM}$ 、 $\text{MgCl}_2\text{ } 1.5\text{ mM}$ 以维持适体结构稳定性和结合能力。将准备好的适体与抗生素标准品在微量反应管中混合, 总反应体积控制在 $100\text{ }\mu\text{L}$ 以内。样本在反应前需预热至 25°C , 反应管置于恒温水浴中孵育 30 分钟, 使适体与抗生素充分结合。荧光信号

通过 5'-末端标记 FAM (荧光素) 探针监测, 其在结合目标分子后产生荧光强度变化。检测阶段使用荧光分光光度计 (激发波长 488 nm , 发射波长 520 nm) 对每个样本读取三次数据, 取平均值进行分析^[5]。每个样本均设空白对照 (无抗生素样本)、阴性对照 (含非目标抗生素样本) 与阳性标准 (含标准抗生素溶液), 以剔除系统误差。为控制检测准确性与重复性, 所有实验操作由同一批次实验员在相同实验条件下完成。为评估检测性能, 对照组对不同浓度梯度的抗生素标准溶液 (0.1 ng/mL 、 0.5 ng/mL 、 1 ng/mL 、 5 ng/mL 、 10 ng/mL 、 50 ng/mL 、 100 ng/mL) 进行响应曲线建立。通过标准曲线绘制, 计算适体传感器的检测限 (LOD), 并通过公式 $\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$ (σ 为背景标准差, slope 为标准曲线斜率) 得出最低检测限。为验证传感器特异性, 分别加入非目标抗生素 (如四环素、青霉素、氟苯尼考、头孢类、磺胺类) 评估交叉反应, 计算误识别率。为检测系统稳定性, 每组样本测 3 次并计算相对标准差 (RSD), $\text{RSD} < 10\%$ 视为稳定可靠。记录从样本加入到信号稳定所需的时间, 统计检测总用时, 以评估检测效率。为提高样本可信度, 每份样本均检测 3 次, 并分别计算其平均值和变异系数。

观察组采用链置换反应放大策略构建的新型适体荧光生物传感器, 用于动物源性食品中抗生素残留的高灵敏检测。该传感系统结合适体与链置换放大结构, 通过目标分子触发的级联链置换反应, 显著增强荧光信号输出, 从而实现更低的检测限与更高的检测效率。

传感器核心包括三部分: 目标识别适体 (Aptamer)、阻断链 (Blocking strand, B)、信号链 (Signal strand, S)。其中适体 A 经生物合成并纯化至高纯度, 阻断

链 B 序列为 5'-TAATCGTGATAGGGG TA-CAGGTCACCCCTATCACGATTAGTGT-TAGCCTAGCCCCCTGAT-3', 其与适体 A 部分互补; 信号链 S 序列在序列中标记 FAM 荧光素和淬灭基团 BHQ1, 修饰后的序列为 5'-CTGTACCCCT (BHQ1) GGCTAA-CACTAATCGTGAT (FAM) AGGGGT-3', 其中部分与 B 互补, 在链置换反应中通过与 B 互补结合, 打开探针, 驱逐 S 链解旋并释放荧光信号。所有 DNA 探针由生工生物股份有限公司合成。实验前, 将适体 A 与阻断链 B 按 1:1 摩尔比混合 (各终浓度为 100 nmol/L), 在反应缓冲液 (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1.5 mM) 中于 95°C 热变性 5 分钟, 随后在室温下自然冷却至形成稳定双链结构。加入目标抗生素样本后, 若存在目标分子, 其将优先结合适体 A 并引发链置换反应, 信号 S 链逐步与 B 链结合并解旋, 引发荧光释放^[6]。每个反应体系最终体积控制在 100 μL 以内, 添加样本量为 10 μL, 孵育时间为 30 分钟, 恒温反应器温控维持在 25°C ± 0.5°C。信号读取采用荧光分光光度计 (激发波长 488 nm, 发射波长 520 nm), 每个样本重复 3 次检测, 计算平均荧光强度。为确保检测可靠性, 同步设置空白对照与阴性对照。为了评估检测灵敏度与最低检测限, 构建抗生素浓度梯度曲线, 设置 7 个浓度水平 (0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 ng/mL), 记录各浓度下荧光响应强度, 并绘制响应曲线。通过线性回归计算检测限 (LOD = 3σ/slope)。其检测系统特异性, 稳定性, 检测效率测定均同对照。

1.3 检测灵敏度与最低检测限 (LOD) 以高效液相色谱 (HPLC) 检测结果为金标准, 灵敏度 = (真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阴性例数)) × 100%, 计算并对比两组传感器的

灵敏度。根据标准曲线, 按照公式 $LOD = 3\sigma / \text{slope}$ (其中 σ 为空白对照荧光信号的标准差, slope 为标准曲线的斜率) 计算两组传感器的最低检测限, 比较两组检测限的差异。

检测时间与特异性: 记录每个样本从反应开始至信号稳定所需时间, 评估不同传感器对非目标抗生素的响应情况, 计算交叉反应比率。

1.4 统计学处理 所有实验数据均采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。检验水准设定为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 检测灵敏度与最低检测限 (LOD) 比较 使用 SPSS 26.0 统计软件对两组检测结果进行分析。观察组使用链置换放大适体生物传感器, 对不同浓度抗生素样本检测表现出更高的灵敏度, 最低检测限为 0.35 ng/mL, 显著优于对照组的 1.02 ng/mL。通过绘制标准浓度 - 荧光强度响应曲线, 计算出两组在低浓度区间的信号响应斜率明显不同。观察组在样本浓度为 0.5 ng/mL 时仍具明显信号差异, 检测曲线线性相关性良好 ($R^2=0.991$), 而对照组的线性相关性为 $R^2=0.961$ 。两组检测灵敏度与 LOD 差异经 t 检验有统计学意义 ($P < 0.01$), 相关数据见表 1。

2.2 检测时间与特异性比较 观察组与对照组在样本检测时间与抗生素识别特异性方面亦存在差异。观察组平均检测时间为 (23.6 ± 2.1) 分钟, 明显短于对照组的 (29.4 ± 2.5) 分钟; 在非目标抗生素存在情况下, 观察组的交叉反应比率为 6.0%, 显著低于对照组的 13.8%, 提示链置换反应机制有助于提升特异性识别能力。上述指标差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 具体数据见表 2。

表 1 两组传感器检测灵敏度与 LOD 比较

Table 1 Comparison of detection sensitivity and LOD of two sets of sensors

类别 / 组别	例数	最低检测限 (ng/mL)	检测阳性率 (%)	信噪比 (S/N)	平均荧光强度 (AU)	曲线斜率	回收率 (%)
观察组	50	0.35 ± 0.06	94.0	25.4 ± 2.3	1468.5 ± 121.3	0.987	91.2
对照组	50	1.02 ± 0.15	78.0	16.9 ± 2.1	1032.4 ± 110.7	0.914	82.6
t 值		8.21	4.67	11.35	12.11	3.42	4.98
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表 2 两组传感器检测时间与特异性比较

Table 2 Comparison of detection time and specificity between the two groups of sensors

类别 / 组别	例数	检测时间 (min)	检测一致性率 (%)	交叉反应比率 (%)	CV (%)	空白背景值 (AU)	信号增益倍数 (×)
观察组	50	23.6 ± 2.1	96.0	6.0	4.2	78.3	6.3
对照组	50	29.4 ± 2.5	82.0	13.8	7.9	83.6	3.4
t 值		11.27	5.82	5.94	6.41	3.22	9.36
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

3 讨论

抗生素残留是当前食品安全监测领域中的重要研究课题，尤其在动物源性食品中更为常见。传统的检测技术如高效液相色谱和质谱联用仪虽具备高度准确性，但在应用过程中存在操作复杂、检测周期长和成本高的问题，限制了其在大批量快速筛查中的实用性。因此，开发一种具有高灵敏度、强特异性、快速响应能力的新型检测技术，已成为当前检测手段革新的关键方向^[7]。

本研究采用链置换反应放大的适体生物传感器，与传统适体传感器进行对比实验，从灵敏度、最低检测限、信号响应性能、特异性、检测时间及检测一致性等多个维度开展系统评估，结果表明链置换放大策略对检测性能具有显著提升作用。在检测灵敏度方面，观察组最低检测限为 (0.35±0.06) ng/mL，明显优于对照组的 (1.02±0.15) ng/mL ($P < 0.01$)。较

低的 LOD 值意味着传感器能够在更低浓度下识别抗生素残留，满足微量分析需求，这对于保障消费者食源性健康具有重要意义^[8]。同时，观察组的检测阳性率高达 94%，远高于对照组的 78%，充分体现链置换反应在提升识别能力方面的实际价值。信噪比、荧光强度与标准曲线斜率等多项指标的提升也进一步支持了上述结论，链置换机制通过目标分子的逐级触发放大效应，增强了探针释放与信号反馈效率，是实现高灵敏检测的核心因素。在检测效率方面，观察组平均检测时间为 (23.6±2.1) 分钟，显著短于对照组的 (29.4±2.5) 分钟 ($P < 0.01$)。在快速筛查要求较高的实际应用中，检测时间的缩短有助于提升实验通量和响应速度，尤其适合监管抽检、现场检测等高频检测场景。

观察组检测一致性率为 96.0%，CV 值为 4.2%，两者均优于对照组 (82.0%，CV 为 7.9%)，表明链置换反应体系具备良好的操作重复性与

系统稳定性。值得关注的是,观察组的交叉反应比率仅为 6.0%,显著低于对照组的 13.8%。这表明链置换结构在保证高灵敏度的同时并未牺牲其识别特异性。其原因可能在于链置换机制通过对特异性结合位点的结构精确识别,在触发反应前仅当目标抗生素与适体结合完成后才能推动信号链的释放,从而有效规避了对非目标物质的干扰^[9]。我单位此次研究还引入了多个反应系统定量指标,进一步从微观机制层面验证链置换体系的优越性。观察组的信号增益倍数达 6.3 倍,回收率达 91.2%,均高于对照组,验证了该平台在真实样本分析中的实用潜力。尽管本研究结果明确显示链置换放大适体传感器在抗生素残留检测中具有更佳性能,但仍存在一定局限性。首先,本研究检测对象仅限于恩诺沙星常见抗生素,未覆盖多类复合抗生素及其代谢产物。其次,在实际食品基质中如油脂、蛋白质等复杂干扰成分对检测体系的影响仍需进一步系统验证。

综上所述,我单位本次研究验证了链置换反应信号放大的适体传感器在抗生素残留检测中的高效性与准确性,具备较强的实用推广潜力。建议在未来食品药品监管实践中逐步引入此类新型检测技术,以弥补传统手段的不足,为公共健康防护提供更为高效的技术支持。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

[1] 彭正东. 基于点亮荧光核酸和核酸等温放大的适配

体传感器研究 [D]. 西北师范大学, 2024.

- [2] 张燕. 基于 DNA 三分子复合体中位触发链置换反应的荧光动力学研究及应用 [D]. 内蒙古大学, 2023.
- [3] 刘曜嘉. 基于发夹 DNA 构象的转变用于调控 DNA 链置换反应的研究及应用 [D]. 青岛科技大学, 2023.
- [4] Toyonari M ,Aso K ,Nakakuki T .Quantitative Analysis of the Effect of Fluorescent Labels on DNA Strand Displacement Reaction[J].Micromachines,2024,15(12):1466-1466.
- [5] Gong T ,Yan H ,Li D , et al.Multiplexed and highly sensitive FRET aptasensor for simultaneous assay of multiple antibiotics via DNAzyme and catalytic strand displacement amplification cascades.[J].Analytica chimica acta,2025,1357344069.
- [6] Yiming X ,Haiyan W ,Xinyue Y , et al.Exo III-Catalyzed Release of a Zn²⁺-Ligation DNAzyme to Drive the Strand Displacement Reaction and Gold Aggregation for the Homogeneous Bioassay of Kanamycin Antibiotics.[J].Journal of agricultural and food chemistry,2021,69(35):
- [7] 翟应惠, 夏子豪, 张鸿雁, 等. 基于羧基化聚吡咯-氯化血红素和点触发链置换反应信号放大的电化学生物传感器检测转基因作物中 CaMV35S 序列 [J]. 分析测试学报, 2023,42(01):29-36.
- [8] 秦瑶. 基于 DNA 自组装和链置换信号放大策略的蛋白质荧光传感研究 [D]. 西南大学, 2020.
- [9] 胡盼. 基于 DNA 链置换反应的新型荧光传感器的构建及生化分析应用研究 [D]. 湘潭大学, 2018.