

稀土掺杂上转换纳米材料在兽药残留检测领域的应用

孟颖¹ 殷慧¹ 彭微¹ 白安琪¹ 罗利霞^{1,2} 李淑荣^{1,2*} 孟佩俊^{1,2*}

(¹内蒙古科技大学包头医学院公共卫生学院; ²内蒙古自治区卫生检测与评价工程技术中心 包头 014040)

摘要 食品和环境中药残留问题时有发生,对人类健康构成很大的潜在威胁。随着人们对美好生活和同一健康的向往和不断追求,对微量甚至痕量兽药残留的分析检测已显得日益迫切和重要。因此,构建对兽药残留进行灵敏、准确、稳定、简便、快速检测的方法已成为一个热点研究领域。稀土掺杂上转换纳米材料(REEs-UCNPs)作为一种新兴的纳米荧光材料,具有独特的反斯托克斯发光性质,由于其具有荧光寿命长、光散射小、激发光生物组织穿透深度大且对组织损伤小等显著优点,在分析检测领域逐步凸显出巨大优势。本文重点介绍了基于 REEs-UCNPs 构建荧光共振能量转移核酸适配体传感器、磁性纳米颗粒结合核酸装配体传感器、荧光免疫探针以及现场快速检测等在兽药残留检测方面的研究进展,并对其应用前景进行了探讨和展望。

关键词 稀土掺杂上转换纳米材料 兽药残留 核酸适配体 荧光免疫法 快速检测

Application of Rare Earth Doped Upconversion Nanomaterials in Veterinary Drug Residue Detection

Meng Ying¹, Yin Hui¹, Peng Wei¹, Bai Anqi¹, Luo Lixia^{1,2},
Li Shurong^{1,2*}, Meng Peijun^{1,2*}

(¹ Public Health School, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology;

² Engineering Technology Center of Hygienic Inspection and Assessment of Inner Mongolia Autonomous Region, Baotou, 014040)

Abstract Veterinary drug residues in the food and the environment occur from time to time, posing a great potential threat to human health. With people's yearning for a better life and the One Health, the analysis and detection of trace veterinary drug residues has become increasingly urgent and important. Therefore, it has become a hot research field to construct a sensitive, accurate, stable, simple and rapid detection method for veterinary drug residues. As an emerging nano-fluorescent material, rare earth doped upconversion nanoparticles (REEs-UCNPs) have unique anti-Stokes luminescence properties, and because of their significant advantages such as long fluorescence life, small light scattering, large biological tissues penetration depth of excitation light and small damage to tissues, they have gradually highlighted great advantages in the field of analysis and detection. This paper focuses on the research progress in the detection of veterinary drug residues by constructing the fluorescence resonance energy transfer nucleic acid aptamer sensor, magnetic nanoparticles combined with nucleic acid assembly sensor, fluorescence immunoprobe and on-site rapid detection based on REEs-UCNPs, and discusses and prospects its application prospects.

Keywords Rare earth doped upconversion nanoparticles (REEs-UCNPs), Veterinary drug residues, Nucleic acid aptamers, Fluorescent immunoassay, Rapid detection

* 联系人,孟佩俊 男,博士,教授,主要从事卫生分析化学与稀土纳米材料分析毒理学研究,E-mail: mengpeijun79@163.com;

李淑荣 女,硕士,副教授,主要从事卫生分析化学研究,E-mail: 21399333@qq.com

国家自然科学基金项目(81960601)、内蒙古自治区自然科学基金项目(2021MS08055)和内蒙古自治区卫生健康委医疗卫生科技计划项目(202201383)资助

2022-08-27 收稿,2022-10-20 接受

兽药在禽畜饲养中常用来预防和治疗动物疾病。根据兽药用途不同可分为抗微生物药、抗寄生虫药、抗炎药、抗过敏药、解毒药和中枢神经及外周神经系统药物等,其中最常使用的兽药是抗微生物药。抗微生物药又可分为抗生素和合成抗菌药。常见的抗生素种类有 β -内酰胺类如青霉素、头孢哌酮等、四环素类(TCs)、大环内酯类及其他药物。合成抗菌药有喹诺酮类如诺氟沙星、恩诺沙星以及磺胺类等药物^[1]。兽药的长期不合理使用不仅会造成生物体细菌耐药性不断增强,进而导致药物干预效果越来越差,从而影响禽畜养殖的发展;同时,代谢未完全的药物通过尿液、粪便等被释放在环境中也会对水体、土壤、空气造成不同程度的污染。另外,人体如果长期食用含有兽药残留的动植物性食物,可能会引起致癌、致畸、致突变和免疫、发育等问题^[2]。因此,对兽药残留进行监督和检测已成为社会的迫切需求。2019年9月,农业农村部、卫生健康委和市场监管总局部门联合发布的食品安全国家标准《食品中兽药最大残留限量》(GB 31650-2019)为我国现行的兽药残留标准。目前,环境和食品中兽药残留物的检测方法有质谱分析^[3]、酶联免疫吸附试验^[4]和光谱分析法^[5]等,其中色谱-质谱联用技术应用广泛。然而,一方面,由于食品样品基质较为复杂,分析前复杂的样品前处理会造成待测物损失;另一方面,部分食品和环境样品中兽药残留量极微,对检测方法的灵敏度和准确度要求更高。并且采用大型仪器设备进行分析通常操作复杂,需要较高的技能,耗时且不经济。因此,近些年,研究者们致力于探索稳定性好、灵敏度高、准确度高、操作简便、成本低廉的检测方法来解决目前兽药残留检测面临的上述问题。

稀土掺杂上转换纳米材料(REEs-UCNPs)作为新一代纳米荧光材料,具有将两个或两个以上的低能光子转化为一个高能光子的非线性光学现象,这种现象的典型特征是吸收近红外光(Near-infrared Light, NIR)后,通过一系列复杂的途径在近紫外区、可见区或近红外范围内辐射发光^[6]。因其具有反斯托克斯窄带发射效应,且荧光转换率高、寿命长、生物成像几乎无背景荧光等显著特点而被广泛应用于激光、太阳能电池、传感器、光学成像、光动力疗法等领域^[7];另外,在对金属离子、生物毒素、核酸蛋白质、兽药残留和农药残留等分析检测领域应用也日益广泛。本文综

述了基于REEs-UCNPs构建核酸适配体传感器、磁性纳米颗粒结合核酸装配体传感器、荧光免疫探针、快速检测等方法对食品和环境微量兽药残留进行检测的方法技术,为构建兽药残留检测新方法和拓展REEs-UCNPs应用提供了研究思路。

1 REEs-UCNPs 核酸适配体传感器

核酸适配体是单链寡核苷酸DNA或RNA序列,通常使用指数富集的配体系统进化技术(SELEX)从人工合成寡核苷酸库中分离出来^[8]。由于其具有稳定性高、维度低、对小分子亲和力强、可大规模生产等优点,已成为一种新型识别元件广泛应用于传感器领域。此外,它们还易于体外合成,修饰简便且序列设计灵活^[9]。寡核苷酸的这些固有优势不仅促进了靶标多样化,而且能通过有效的特异性结合常数提高检测效率。由于适配体自身不具有荧光性,需要将其进行修饰使其与外部荧光团结合,从而使适配体获得具有发射可见荧光的特性。近年来,许多研究者利用REEs-UCNPs的低自发荧光及其在生物样品中的高穿透性特点,将其与适配体结合构建基于简单荧光共振能量转移(FRET)的适配体传感器用于各类兽药残留检测。1948年,Förster^[10]首先提出了FRET理论,为后续发展提供了理论基础。FRET是当供体荧光分子的发射光谱和受体荧光分子的吸收光谱发生重叠且两个分子之间的距离小于等于10nm时产生的一种非放射性的能量转移现象^[11]。FRET发生的基本条件包括供体和受体之间的距离必须足够靠近(0.5~10nm);供体的发射光谱与受体的吸收光谱彼此之间有重叠;供体能量转移偶极子和受体能量转移偶极子的方向必须近似平行。当满足发生FRET效应的条件时,供体发射的荧光发生猝灭,受体发射的荧光会逐渐增强^[12],且待测物质的浓度和荧光增强或者猝灭的变化强度呈一定线性关系,基于这一原理实现对被测物的检测分析。

2013年,Li等^[13]利用己二酸修饰的NaYF₄:Yb,Er UCNPs作为能量供体,还原氧化石墨烯作为能量受体,研制了一种基于FRET理论的超灵敏适配体传感器,并初步应用于人血清样品中卡那霉素的定量检测,荧光强度与卡那霉素浓度的对数线性相关,线性范围为0.01~3nmol/L,检测限为18pmol/L,为后续相关实验研究奠定了

基础。

2015年,Zhang等^[14]基于发光共振能量转移(Luminescence Resonance Energy Transfer, LRET)原理,利用 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ UCNPs和SYBR Green-I核酸染料互为供体-受体对,将UCNPs和土霉素(OTC)核酸适配体结合,进而构建了对OTC进行特异性检测的生物传感器。在优化实验条件下,样品在530和477 nm处的荧光强度比值与OTC浓度呈线性关系,线性范围为0.1~10 ng/mL,检测限为0.054 ng/mL。该方法可应用于结构相似的土霉素、阿霉素和四环素等多种靶标的测定。另外,该研究使用的SYBR Green-I与传统荧光猝灭剂相比,荧光信号强,背景信号低,并且无需脱色或冲洗,使检测过程更为简单方便。

2020年,刘欣欣等^[15]构建了基于 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs和金纳米粒子(AuNPs)之间的FRET系统用来检测氯霉素的新方法,线性范围为0.01~10 ng/mL,检测限为5 pg/mL。对牛奶样品进行加标回收实验,加标回收率为93.5%~99.4%,相对标准偏差为1.18%~2.84%,进一步验证了该方法用于氯霉素检测的可行性。同年,Zhang等^[16]使用 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Gd}$ 核-壳结构上转换纳米颗粒(CSUNPs)作为能量供体,氧化石墨烯(GO)作为能量受体,建立了一种检测恩诺沙星(ENR)的特异性方法。适配体与氧化石墨烯之间的 $\pi-\pi$ 堆叠会将适配体修饰后的CSUNPs偶联到GO表面,形成CSUNP-GO复合物,使CSUNPs荧光发生猝灭;当样品中存在ENR时,荧光恢复。ENR浓度在0.976~62.5 ng/mL时,与

荧光强度呈良好的线性关系,该方法检测限为0.47 ng/mL。将该传感器用于检测商品奶粉中的ENR,检出限为1.59 ng/mL,远低于食品安全国家标准要求牛奶中ENR的最高残留限量值(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。该传感器的最大优势是对样品中其他抗生素无响应,对ENR检测表现出良好的特异性,进而提高了分析结果的准确性。同时将GO引入检测系统不仅增强了信号响应,还为后续实验方向扩展了传感应用。

2021年,Zhang等^[17]利用聚乙烯亚胺修饰的 $\text{PEI-NaYF}_4:\text{Yb,Er,Gd}$ 作为能量供体并通过戊二醛交联法连接适配体特异性结合卡那霉素(KAN),黑洞猝灭剂3(Black Hole Quencher-3, BHQ3)作为能量受体,研制了一种用于KAN检测的超灵敏FRET适配体传感器。在KAN缺失的情况下,UCNPs-适配体与BHQ3-cDNA杂交,由于BHQ3与UCNPs之间的FRET效应,荧光发生猝灭。当KAN存在时,会导致双链分离从而使荧光恢复,检测原理如图1所示。检测线性范围0.05~50 $\mu\text{mol}/\text{L}$,检测限为18.9 nmol/L,在牛奶样品中的加标回收率为87.0%~109.6%。另外,与高效液相色谱法进行比较验证,结果表明采用此REEs-UCNPs核酸适配体传感器检测KAN的准确度更高,且差异有统计学意义($P>0.05$)。同时,该研究使用PEI作为封盖剂,不仅改善了REEs-UCNPs的水溶性,而且为后续实验操作提供了所必需的氨基,为相关实验研究奠定了基础。上述分析不同兽药残留构建的传感器使用的核酸适配体及互补DNA的寡核苷酸序列见表1。

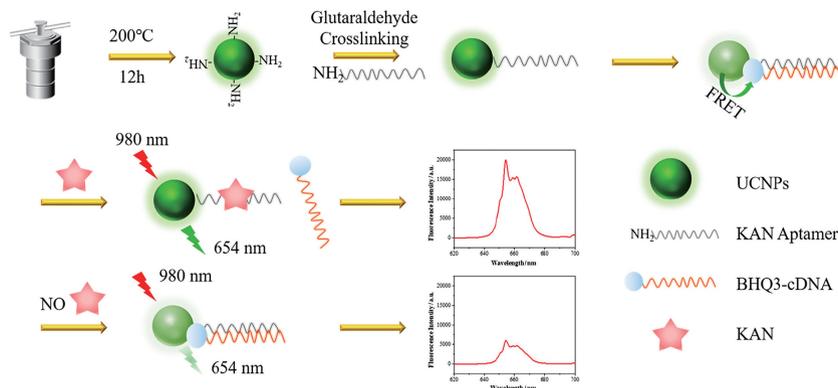


图1 UCNPs-适配体与BHQ3-cDNA探针及用于卡那霉素检测示意图^[17]

Fig. 1 Schematic diagram of hybridization of UCNP-aptamer and BHQ3-cDNA for kanamycin detection^[17]

综上所述,对比兽药残留常见的检测方法,如高效液相色谱法^[18]、酶联免疫吸附法^[19]、毛细管电泳法^[20]、气相色谱法^[21]、金纳米颗粒比色

法^[22]等,利用稀土掺杂上转换纳米荧光材料构建适配体传感器检测兽药残留不仅体现出高灵敏度、高选择性、省时省力、方便快捷等独特优势,

表 1 核酸适配体及其互补 DNA 链的寡核苷酸序列

Tab. 1 Oligonucleotide sequences and their complementary DNA strands of nucleic acid aptamers

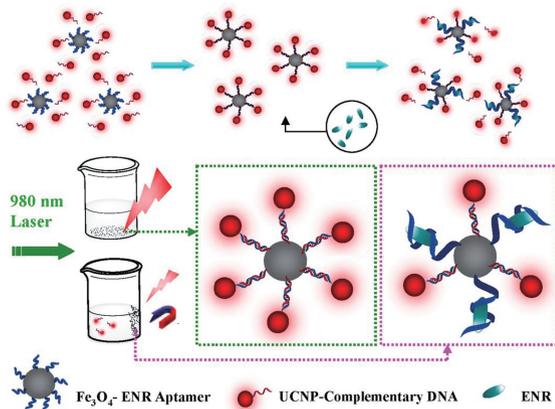
名称	核酸适配体序列	互补链	参考文献
卡那霉素	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -TGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	5'-TCGGCTTAGCCTCAACCCCA-BHQ3-3'	[13]
土霉素	5'-NH ₂ -GGAATTCGCTAGCACGTTGACGCTGGTGCCCGTTGT GGTGCAGTGTGTGTGATCCGAGCTCCACGTG-3'	5'-NH ₂ -CAACGTGCTAGCGAA-3'	[14]
氯霉素	5'-Biotin-ACTTCAGTGAATTGCCACGGTCGCGGAGTCGG TGGTAG-3'	5'-CTACCACCGACTCGCCGACC-SH-3'	[15]
恩诺沙星	5'-CCCATCAGGGG-GCTAGGCTAACACGGTTCGGCTCTCTGAG CCCCGGTTATTTC-AGGGGA-biotin-3'	5'-GTGTTAGCCTAGCCCCCTGAT-biotin-3'	[16]
卡那霉素	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -TGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'	5'-TCGGCTTAGCCTCAACCCCA-BHQ3-3'	[17]

而且在很大程度上克服了常规检测方法涉及的仪器设备昂贵、需要复杂的样品前处理、用时长等缺点,另外,此检测方法可以实现在普通实验室或现场环境中进行分析检测,大大拓展了其方法的适用性。

2 REEs-UCNPs 结合磁性纳米颗粒核酸装配体传感器

对食品和环境中药残留检测时,样品前处理对检测结果有着极大的影响。样品前处理一般包括样品中待测组分的提取、分离、净化等。合理的样品前处理方法不仅可以保证检验工作有序开展、降低失误,而且能有效提高工作效率,提高检验结果的准确性^[23]。常用的样品前处理方法有液液萃取^[24]、固相萃取^[25]、分子印迹^[26]、固相微萃取^[27]等。这些方法通常会造成不同程度的分析物损失,而且会使用大量的溶剂,操作步骤繁杂,耗时耗力。REEs-UCNPs 与磁性纳米颗粒(MNPs)的结合形成一种多模态荧光-磁性杂化纳米材料,同时具备荧光性和磁性吸附能力,很好地解决了上述问题。MNPs 可以通过外置磁铁从溶液中快速分离,并在去除磁铁后立即重新分散在样品中^[28]。同时,MNPs 具有较大的比表面积^[29]、超顺磁性和良好的生物相容性^[30],可用于开发快速荧光免疫检测食品中兽药残留物。MNPs 主要包括铁、锰、钴等金属氧化物及其复合材料^[31]。在诸多 MNPs 中,因为 Fe₃O₄ 具有较高的比表面积、相当小的颗粒、优异的顺磁性、水分散性、稳定性,而且生物毒性小,易于合成和功能化,所以最为常用。基于此,2016 年,Liu 等^[32]采用适配体功能化磁性 Fe₃O₄ 偶联 NaYF₄:Yb,Er UCNPs 构建了磁分离富集结合核酸适配体识别的传感系统,定量测定食品样品中痕量 ENR (图 2)。通过在探针中引入 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒

成功使用外部磁铁快速分离和纯化了杂交纳米探针,大大提高了分析效率和 ENR 检测的灵敏度。方法检测限为 0.06ng/mL,加标回收率为 85.1%~98.5%。

图 2 磁性 Fe₃O₄ 偶联 UCNPs 检测 ENR 残留示意图^[32]Fig. 2 Schematic diagram of magnetic Fe₃O₄ coupled UCNPs for detection of enrofloxacin residues^[32]

随后 2018 年,刘妍等^[33]以溶剂热法制备出 NaYF₄:Yb, Ho, Gd UCNPs,核酸适配体偶联到磁性纳米颗粒 Fe₃O₄ 表面,UCNPs 和适配体互补链结合形成复合体系成功检测 TCs。当 TCs 存在系统中时会优先和核酸适配体发生特异性结合,导致 UCNPs 偶联的互补链杂交双链解开,UCNPs 脱落,荧光强度减弱。应用荧光减弱程度和 TCs 浓度成反比原理实现了对 TCs 的检测。方法线性范围为 0.01~100 ng/mL,检测限为 0.0062ng/mL。然而,研究过程中发现 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子存在易氧化、易聚集、吸附选择性和亲和力低等缺点。为了解决这一问题,2021 年,Zhang 等^[34]基于磁分离和静电吸附原理构建了 NaYF₄:Gd, Yb, Er 上转换纳米传感器。在体系中引入了 TCs 适配体和 Eu³⁺,由于四环素含有 β-二酮基团,可与 Eu³⁺ 特异性结合形成稳定

的络合物从而实现了对 TCs 的快速检测。根据静电吸附原理,裸露出 Eu^{3+} 的核壳结构 UCNP 与负极 MNPs 和核酸适配体相偶合。在 TCs 存在的情况下, REEs-UCNPs 与 MNPs-适配体脱离,并在外加磁场的作用下分离 MNPs。上清液的荧光强度随着 TCs 浓度增强而增强,二者之间存在着良好的线性关系,可成功应用于 TCs 的定量检测。在优化条件下,其检测线性范围为 $0.5 \sim 1000 \text{ ng/mL}$,检测限为 0.17 ng/mL 。综上所述,与常规 UCNP 荧光分析法相比,引入 MNPs 充分简化了样品前处理分离步骤,并且没有内部扩散阻力,提高了工作效率和检测的灵敏度和准确度。

3 REEs-UCNPs 荧光免疫分析技术

免疫分析技术是充分利用抗体与相应抗原或半抗原之间自发的免疫学反应实现对各类食品污染物的快速、准确、简便和特异性的检测,弥补了传统检测技术操作步骤繁杂、成本高、样品前处理难度大等缺陷。常见的免疫分析技术有胶体金免疫层析技术 (Immune colloidal gold technique, GICT)^[35]、荧光免疫分析技术 (Fluorescence immunoassay, FIA)^[36]、放射免疫分析技术 (Radioimmunoassay, RIA)^[37]、酶联免疫吸附技术 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[38] 等。其中, FIA 以荧光物质标记抗体 (或抗原),基于抗原-抗体反应,利用待测物质在反应体系中特异结合位点荧光的强弱,达到定性或定量检测分析的目的。近年来,由于 FIA 具有极高的灵敏度和特异性在生物标志物、医药、小分子筛选、环境检测等领域得到广泛应用,在兽药残留检测领域发展尤为迅速。

2014年,常真等^[39]将表面功能化的 $\text{NaYF}_4:\text{Lu},\text{Yb},\text{Er},\text{Gd}$ UCNP 与氟喹诺酮抗体偶联作为能量供体,标记有氟喹诺酮抗原的 AuNPs 作为能量受体,基于 FRET 原理建立了一种简单、均相的水环境中氟喹诺酮类药物的 FIA 检测方法。线性浓度范围 $3 \sim 100 \text{ pg/L}$,线性相关系数为 0.9967 。对自来水和湖水实际样品进行加标回收率实验,回收率为 $83\% \sim 115\%$ 。然而 UCNP 与蛋白的偶联方法还存在一定局限性,为了提高标记效率,2016年 Hu 等^[40]利用 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ UCNP 与抗体结合作为荧光信号探针,使用经典活性酯法将包被抗原修饰在单分散磁性聚苯乙烯微球 (MMPMs) 表面作为免疫传感探针,用来捕获和分

离信号探针,建立出一种新型荧光免疫检测动物源性食品中磺胺喹噁啉 (SQX) 的方法。检测限在缓冲液中为 $0.1 \mu\text{g/L}$,在食品样品中为 $0.5 \mu\text{g/kg}$ 。SQX 的加标回收率为 $69.80\% \sim 133.0\%$,变异系数为 $0.24\% \sim 25.06\%$ 。此检测分析方法灵敏度高,提取工艺简单快速,同时还具有不需要有机溶剂对环境友好等优点。另外,研究发现与常用的磁性纳米颗粒相比, MMPMs 在溶液中的分散性更好,使用 MMPMs 可以在无需离心的情况下从混合系统中分离免疫复合物,从而大大简化了整个操作过程。

Hu 等^[41]通过使用羧基功能化 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ UCNP 结合抗诺氟沙星 (NOR) 单克隆抗体作为信号探针标记,以包被抗原修饰的 MMPMs 为免疫探针,建立了 NOR 生物测定体系,检测原理如图 3 所示。靶向 NOR 和免疫探针与荧光信号探针的抗 NOR 抗体在竞争过程中同时反应,随着 NOR 浓度的增加,免疫复合物的数量减少,从而导致荧光信号逐渐减少。根据荧光强度与 NOR 浓度之间的相关性可以间接获得靶标 NOR 的浓度。方法检测限为 10 pg/mL 。在牛奶样品中 NOR 的检测限为 0.01 ng/mL ,其敏感性同市售酶联 ELISA 试剂盒去甲沙星检测限 (0.5 ng/mL) 相比,提高了 50 倍。该 FIA 方法对样品中 NOR 提取更为快速简便,尤其是对于牛奶样品,无需任何预处理可以直接分析,是定量检测动物源性食品中氟喹诺酮类残留的可靠方法。

2020年,Zhang 等^[42]开发了一种可以同时检测酪胺和组胺的 FIA 方法。抗酪胺抗体和抗组胺抗体分别连接到发射波长为 483 nm 的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 和发射波长为 550 nm 的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ 纳米颗粒作为多色信号探针。将酪胺包被抗原和组胺包被抗原分别连接到磁性微球上作为捕获探针。在 980 nm 激发光下, 483 和 550 nm 处的免疫复合物的荧光信号就可以形成竞争性,以此用来表明酪胺和组胺的浓度。酪胺检测线性范围为 $0.5 \sim 100 \text{ } \mu\text{g/L}$,检测限为 $0.1 \mu\text{g/L}$;组胺检测线性范围为 $0.1 \sim 100 \text{ } \mu\text{g/L}$,检测限为 $0.01 \mu\text{g/L}$ 。与 ELISA 相比,该复合 FIA 法检测酪胺和组胺的灵敏度分别提高了 260 倍和 280 倍。建立的 FIA 探针还可作为双标签应用,可同时检测两种目标物,极大提高了工作效率。2021年,张彪等^[43]基于间接竞争反应原理构建了用于食品中酪胺检测的荧光免疫

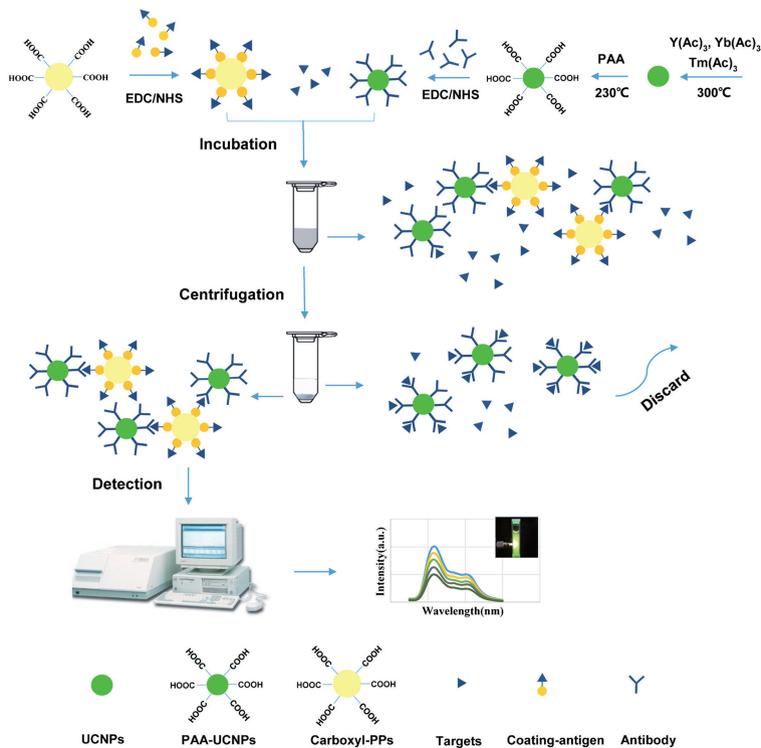


图 3 Carboxyl-PPS 与 PAA-UCNPs 荧光探针合成及用于诺氟沙星的荧光免疫测定^[41]

Fig. 3 Schematic diagram of the synthesis of Carboxyl-PPS and PAA-UCNPs fluorescent probes and their fluorescence immunoassay for norfloxacin^[41]

探针。将酪胺多克隆抗体标记 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}, \text{Tm}$ UCNPs 作为信号探针,包被抗原偶联 MMPMs 作为捕获探针,孵育 30min 后,利用外部磁源分离感应探针与捕获探针结合物,从而检测偶联物中 UCNPs 的荧光强度值。检测体系的荧光强度随着酪胺浓度的增加逐渐降低,检测线性范围为 $0.1 \sim 100.0 \mu\text{g/L}$,检测限为 $0.05 \mu\text{g/L}$ 。该抗原-抗体识别系统对酪胺具有特异性,提高了分析结果的准确度。REEs-UCNPs 荧光免疫探针法的样品前处理阶段无需操作复杂的衍生化步骤,与传统的检测方法(如高效液相色谱法等)相比,极大地提高了检测效率。

其他免疫分析技术相对于 FIA 技术,存在不同程度的不足,如胶体金免疫层析技术有被一些有色样品干扰到横向流带的局限性,检测灵敏度不高;酶联免疫吸附技术存在阻碍抗体-抗原相互作用的“干扰因素”,这种干扰因素在均质组织样本中更为常见,并且多数情况下难以鉴定^[44]。REEs-UCNPs 荧光免疫分析技术具有更高的信噪比和灵敏度,同时抗原-抗体的结合具有很好的特异性,准确度高。另外,REEs-UCNPs 荧光标记物与其他纳米荧光标记物(如量子点、AuNPs、罗丹

明及其衍生物等)相比具有抗干扰能力强、不易发生团聚、简便快速、成本低等优点。因此,REEs-UCNPs 荧光免疫分析技术已成为兽药残留分析方面非常重要的检测技术之一。

4 基于 REEs-UCNPs 的现场快速检测技术

随着检测技术的快速发展以及对样品进行实时检测分析需求的日益增加,开发敏感、简单、快速、方便且具有良好的选择特异性的检测方法对兽药残留检测具有重要意义。REEs-UCNPs 在兽药残留现场快速检测方面也发挥着重要作用。2017 年, Hu 等^[45]设计了基于 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}, \text{Er}$ UCNPs 的新型荧光猝灭免疫层析条带(FQICS)用于检测动物源性食品中的 SQX。荧光供体 UCNPs 和荧光受体 AuNPs 之间发生 FRET,抗体包被的 AuNPs 会使免疫层析条带试验线 T 线处的荧光完全猝灭。当加入带有 SQX 的阳性样品时, T 线上的荧光不能被完全猝灭而成为可见的。T 线上的荧光信号强度与 SQX 的浓度呈正相关。该方法用于标准溶液分析,检测限为 1ng/mL ,用于测定含有 SQX 的鸡和虾的样品时检测限为 $8 \mu\text{g/kg}$,而使用

传统胶体金免疫层析条对 SQX 进行检测,标准溶液检测限为 10ng/mL,样品分析检测限为 80 μ g/kg。此结果表明,基于 UCNP_s 构建的 FQICS 快速检测技术对动物源性食品中 SQX 的检测具有更高的灵敏度,可用于现场检测。

2020年,Xu等^[46]基于 NaYF₄:Yb,Er UCNP_s 的超高灵敏度建立了侧流免疫层析分析方法(Lateral Flow Immunochromatography Assay, LFIA),实现了对牛奶中 TC_s 的检测。研究将 TC_s 与载体蛋白偶联作为人工抗原获得特异性单克隆抗体,附着在 REEs-UCNP_s 上形成信号探针,在 10min 内使用侧流免疫层析条灵敏地检测四环素、土霉素、金霉素和强力霉素。该测定方法为多靶点兽药残留检测提供了参考。同年,Chen等^[47]以酪胺为模板分子、甲基丙烯酸为功能单体、乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,在 NaYF₄:Yb,Er 表面通过原位聚合法制备分子印迹聚合物(MIPs),进而开发了 NaYF₄:Yb,Er 分子印迹上转换荧光检测条测定酪胺含量的新方法。酪胺浓度在 1.0~100.0 mg/L 范围内与荧光强度呈良好的线性关系,方法检测限为 0.2ng/mL。荧光检测条具有便携、成本低和快速响应的特点,因此该方法具有广阔的应用前景。然而由于 MIPs 层亲水性差,目前在水相介质中的应用还有一定的局限性,需要进一步研究。

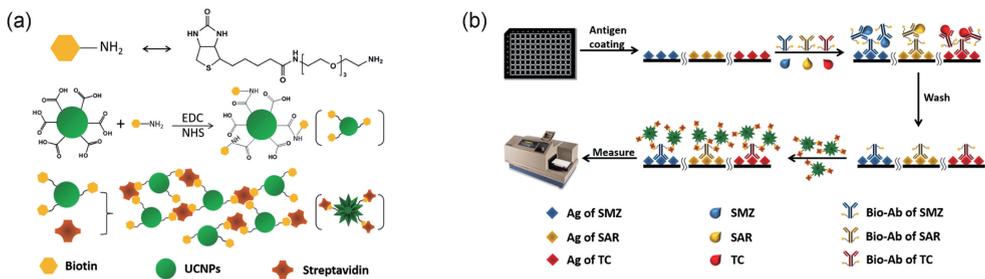


图 4 (a) 亲和素-生物素上转换复合物(ABU)合成原理图;(b)基于 UCNP_s 可控组装(ABC-ULISA)的亲和素-生物素复合物免疫吸附测定方案用于检测三种抗生素的操作原理^[48]

Fig. 4 (a) Schematic diagram of the synthesis of avidin-biotin upconversion complexes composed of UCNP_s; (b) Avidin-biotin complex immunosorbent assay based on upconversion nanoparticles controllable assembly (ABC-ULISA) scheme illustration for detecting three antibiotics of SMZ/SAR/TC^[48]

5 结语与展望

REEs-UCNP_s 与传统的荧光信号输出元件如量子点^[49]、AuNP_s^[50]、荧光染料^[51]等相比,具有光化学稳定性好、荧光强度高、背景值低和荧光寿命长等优点,在卫生检测分析领域发挥着重要作用。诸多研究表明,REEs-UCNP_s 在多种兽药残

2021年,Wang等^[48]建立了一种基于 NaYF₄:Nd,Yb,Er UCNP_s 与链霉亲和素-生物素复合物结合的可控组装体(ABC-ULISA)的高通量、高灵敏免疫吸附法,用来检测磺胺甲噁唑、萨拉沙星和四环素三种抗生素兽药残留。链霉亲和素与生物素标记的 REE-UCNP_s 形成亲和素-生物素上转换复合物(ABU),当与生物素化抗体接触时,由于抗原-抗体反应系统与 ABU 整合,从而使 REE-UCNP_s 发生聚集,实现了信号双放大,大大提高了荧光强度,进而提高了检测灵敏度。原理如图 4 所示。采用 ABC-ULISA 法同时检测磺胺甲噁唑、萨拉沙星和四环素三种抗生素的检出限分别为 0.15、0.03 和 0.05 ng/mL。该研究的主要优势表现在以下几个方面:(1)制备的激发波长为 808nm 的 REEs-UCNP_s 克服了激发波长为 980nm 材料的缺点,避免了水分子吸收的热效应,具有更好的组织穿透能力;(2)该检测仪器不需要外部泵浦激光器,方便携带;(3)成熟的链霉亲和素-生物素技术可以提高检测的稳定性,在一定程度上降低检测成本;(4)ABC-ULISA 检测系统用于兽药残留检测的检测限远低于传统 ELISA 法;(5)ABC-ULISA 系统可通过改变不同的抗体达到检测不同靶点的目的;(6)结果稳定可靠,设备小型化。因此,该研究对实现兽药残留快速检验和仪器设备商业化具有极大的推动作用。

留检测方面显示出巨大优势,但仍然有一些不足需要进一步完善。首先,REEs-UCNP_s 可控化合成分成需要进一步研究。有研究表明,随着纳米晶粒径的减小,REEs-UCNP_s 的量子产率会显著降低。尽管核壳结构是一种提高 REEs-UCNP_s 上转换发光效率的有效方式,但这种策略可能会限制 REEs-UCNP_s 在基于 Förster FRET 原理进行检测

的应用。因此,如何合成尺寸小(直径<10nm)且分布窄、在生物相关介质和缓冲系统中稳定性好、上转换荧光强且应用广泛的 REEs-UCNPs 仍需要不断探索。第二,REEs-UCNPs 的生物安全性仍缺乏深入研究,一些细胞实验和动物实验研究表明其具有低毒性,但慢性毒性和长期毒性证据不足。第三,由于 REEs-UCNPs 结合的核酸适配体种类有限,适配体的筛选也面临着耗时、耗力及成功率低等诸多困难。这极大限制了适配体传感器在兽药残留检测中的应用。随着 SELEX 技术的不断进步和发展,筛选出更丰富,更具亲和力和特异性强的适配体在卫生检测分析领域起着重要作用。将 REEs-UCNPs 荧光共振能量转移生物传感技术与基因芯片技术和蛋白质组学技术进行深度融合,建立兽药残留多组分、快速、实时、特异性和准确度高,既能进行定量也能实现定性的分析方法,并开发小型、便于进行现场快速检验的专门仪器设备是未来的发展趋势。

参 考 文 献

[1] 梁紫璐. 基于上转换发光技术快速检测动物性食品中磺胺类和四环素类兽药残留. 广东药科大学硕士学位论文, 2018.

[2] 张光辉, 解金辉, 张宜娜, 等. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 484~485.

[3] Van Wijk X M R, Goodnough R, Colby J M. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 2019, 56(4): 225~238.

[4] Shrivastav T G, Chaube S K, Charu, et al. Immunoassay Immunochem. 2010, 31(4): 301~313.

[5] Dwivedi Y, Zilio S C. J. Nanosci. Nanotechnol., 2014, 14(2): 1578~1596.

[6] Hudry D, Howard I A, Popescu R, et al. Adv. Mater., 2019, 31(26): e1900623.

[7] Chen J, Zhao J X. Sensors, 2012, 12(3): 2414~2435.

[8] Marrazza G. Biosensors, 2017, 7(1): 5.

[9] Ali M H, Elsherbiny M E, Emar M. Int. J. Mol. Sci., 2019, 20(10): 2511.

[10] Förster T. Annphys, 1948, 2: 55.

[11] 张志毅, 周涛, 巩伟丽, 等. 电子显微学报, 2007(06): 620~624.

[12] 梁雪望. 基于适配体-荧光共振能量转移的微生物检测方法研究. 北京理工大学硕士学位论文, 2016.

[13] Li H, Sun D E, Liu Y, et al. Biosens. Bioelectron., 2014, 55: 149~156.

[14] Zhang H, Fang C, Wu S, et al. Anal. Biochem., 2015, 489: 44~49.

[15] 刘欣欣. 基于荧光共振能量转移的上转换适配体传感器检测氯霉素的方法研究. 山东农业大学硕士学位论文, 2020.

[16] Zhang Y, Duan B, Bao Q, et al. Mater. Chem. B, 2020, 8(37): 8607~8613.

[17] Zhang Y, Liu R, Hassan M M, et al. Spectrochim. Acta A, 2021, 262: 120147.

[18] Sontag G, Pinto M I, Noronha J P, et al. J. Agr. Food Chem., 2019, 67(15): 4113~4144.

[19] Knight A R, Taylor E L, Lukaszewski R, et al. Free Radic. Biol. Med., 2018, 120: 246~254.

[20] Nevádalová H, Michalčová L, Glatz Z. Electrophoresis, 2019, 40(5): 625~642.

[21] Dymerski T. Crit. Rev. Anal. Chem., 2018, 48(4): 252~278.

[22] Liu G, Lu M, Huang X, et al. Sensors, 2018, 18(12): 4166.

[23] 宋敏, 李蓓. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(5): 1045~1049.

[24] Gouveia T I A, Silva A M T, Ribeiro A R, et al. Sci. Total Environ., 2020, 740: 139995.

[25] Khan W A, Arain M B, Soylak M. Food Chem. Toxicol., 2020, 145: 111704.

[26] Lobato A, Pereira E A, Gonçalves L M. Talanta, 2021, 221: 121546.

[27] Zacharis C K, Tzanavaras P D. Molecules, 2020, 25(2): 379.

[28] Dong B, Li H, Sun J, et al. Hazard. Mater., 2021, 402: 123942.

[29] Cai W, Guo M, Weng X, et al. Mater. Sci. Eng. C, 2019, 98: 65~73.

[30] Lin H, Deng C. Talanta, 2016, 149: 91~97.

[31] Elahi N, Kamali M, Baghersad M H, et al. Mater. Sci. Eng. C, 2019, 105: 110113.

[32] Liu X, Su L, Zhu L, et al. Sens. Actuat. B, 2016, 233: 394~401.

[33] 刘妍. 牛奶中微量有害物残留的上转换荧光检测方法研究. 江苏大学硕士学位论文, 2018.

[34] Zhang Y, Mehedi Hassan M, Rong Y, et al. Food Chem., 2021, 373(10): 131497.

[35] Shim W B, Yang Z Y, Kim J Y, et al. J. Agr. Food Chem., 2006, 54(26): 9728~9734.

[36] Nakayama H, Kenjjou N, Shigetoh N, et al. Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., 2016, 35(2): 83~85.

[37] Sallam K M. J Immunoassay Immunochem., 2017, 38(5): 471~486.

[38] Kohl T O, Ascoli C A. Cold Spring Harb. Protoc., 2017, 2017(5): 093708.

[39] 常真. 环境水体中氟喹诺酮与氯霉素的上转换荧光免疫分析方法研究. 江苏大学硕士学位论文, 2014.

[40] Hu G, Sheng W, Zhang Y, et al. J. Agr. Food Chem., 2016, 64(19): 3908~3915.

[41] Hu G, Sheng W, Zhang Y, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2015, 407(28): 8487~8496.

- 20 (33): 4804~4809.
- [50] Wang X, Zhou W, Wu Y-P, et al. *J. Alloys Compd.*, 2018, 753: 228~233.
- [51] Tian J-W, Fu M-X, Huang D-D, et al. *Inorg. Chem. Commun.*, 2018, 95: 73~77.
- [52] Zhu D, Liu J, Zhao Y, et al. *Small*, 2019, 15 (14): e1805511.
- [53] Ji Z, Trickett C, Pei X, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, 140 (42): 13618~13622.
- [54] Rui K, Zhao G, Lao M, et al. *Nano Lett.*, 2019, 19 (12): 8447~8453.
- [55] Huang D D, Li S, Wu Y P, et al. *Chem. Commun.*, 2019, 55 (31): 4570~4573.
- [56] Jahan M, Liu Z, Loh K P. *Adv. Funct. Mater.*, 2013, 23 (43): 5363~5372.
- [57] Liu T, Li P, Yao N, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58 (14): 4679~4684.
- [58] Liu J L, Zhu D D, Guo C X, et al. *Adv. Energy Mater.*, 2017, 7 (23): 1700518.
- [59] Lei Y, Wei L, Zhai S, et al. *Mater. Chem. Front.*, 2018, 2 (1): 102~111.
- [60] Du Y, Li Z, Liu Y, et al. *Appl. Surf. Sci.*, 2018, 457: 1081~1086.
- [61] Jiao Y, Hong W, Li P, et al. *Appl. Catal. B*, 2019, 244: 732~739.
- [62] Fan L, Liu P F, Yan X, et al. *Nat. Commun.*, 2016, 7: 10667.
- [63] Qiu T, Liang Z, Guo W, et al. *Nano Energy*, 2019, 58: 1~10.
- [64] Chen Z, Wu R, Liu Y, et al. *Adv. Mater.*, 2018, 30 (30): 1802011.
- [65] Ge Y, Dong P, Craig S R, et al. *Adv. Energy Mater.*, 2018, 8 (21): 1800484.
- [66] Lu X F, Yu L, Zhang J, et al. *Adv. Mater.*, 2019, 31 (30): 1900699.
- [67] Wang R, Dong X-Y, Du J, et al. *Adv. Mater.*, 2018, 30 (6): 1703711.
- [68] Lu X F, Yu L, Lou X W. *Sci. Adv.*, 2019, 5 (2): eaav6009.
- [69] Liu X, Li W, Zhao X, et al. *Adv. Funct. Mater.*, 2019, 29 (35): 1901510.
- [70] Zhuang Z, Wang Y, Xu C-Q, et al. *Nat. Commun.*, 2019, 10: 4875.
- [71] Xu H, Fei B, Cai G, et al. *Adv. Energy Mater.*, 2020, 10 (3): 1902714.
- [72] Chen W, Pei J, He C-T, et al. *Adv. Mater.*, 2018, 30 (30): 1800396.
- [73] Wang Z, Shen K, Chen L, et al. *Sci. China Chem.*, 2022, 65 (3): 619~629.
- [74] Wan J, Zhao Z, Shang H, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, 142 (18): 8431~8439.
- [75] Zhao W, Wan G, Peng C, et al. *ChemSusChem*, 2018, 11 (19): 3473~3479.
- [76] Xu Y, Wang C, Huang Y, et al. *Nano Energy*, 2021, 80: 105545.
- [77] Yu F, Yu L, Mishra I K, et al. *Mater. Today Phys.*, 2018, 7: 121~138.

(上接第 558 页)

- [42] Zhang B, Sheng W, Liu Y, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1130: 117~125.
- [43] 张彪, 黄娜, 张万利, 等. *食品科学*, 2021, 42(14): 270~275.
- [44] Lai Y, Feldman K L, Clark R S. *Crit. Care Med.*, 2005, 33: S433~S434.
- [45] Hu G, Sheng W, Li J, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2017, 982: 185~192.
- [46] Xu Y, Ma B, Chen E, et al. *Front Chem.*, 2020, 8: 759.
- [47] Chen Y, Fan F, Fang G, et al. *Mikrochim. Acta*, 2020, 187(10): 573.
- [48] Wang Y, Zhao X, Zhang M, et al. *J. Hazard. Mater.*, 2021, 406: 124703.
- [49] Liang Y, Huang X, Yu R, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2016, 936: 195~201.
- [50] Wu Y, Guo W, Peng W, et al. *ACS Appl. Mater. Interf.*, 2017, 9(11): 9369~9377.
- [51] Ju C, Tang Y, Fan H, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2008, 621 (2): 200~206.