

功能化核酸适体检测氯霉素可行性研究

陈盼¹, 禹思宇², 胡忆文², 唐连飞², 谭建锡^{2*}

(1. 长沙县食品安全检测中心, 长沙 410010; 2. 长沙海关技术中心, 长沙 410004)

摘要: 目的 探讨荧光适体探针用于氯霉素快速检测的可行性。**方法** 设计了一种荧光适体探针, 主要包括一段与氯霉素特异性识别的 DNA 序列, 其 3'端标记 FAM 荧光, 且有一小段核酸随机结构。当适体探针单独存在时, 被氧化石墨烯(graphene oxide, Go)吸附到表面, 由于能量共振转移作用使得 FAM 荧光淬灭; 当加入靶标时, 由于靶标与适配体探针具有高亲和力, 配对形成双链复合物, 从 Go 表面脱离, 使 FAM 的荧光信号得到恢复。**结果** 当 25 nmol/L 荧光标记适配体探针与 1.2 μL 浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Go 溶液共同孵育后, 超过 95% 的荧光信号被 Go 淬灭。当再加入氯霉素溶液经孵育后, 荧光信号得到显著恢复。**结论** 该荧光适体探针能被用于氯霉素样品的快速检测, 且对其他小分子检测也具有很大的应用潜力。

关键词: 氯霉素; 核酸适体; 氧化石墨烯; 能量共振转移

Feasibility study of functional aptamer for chloramphenicol detection

CHEN Pan¹, YU Si-Yu², HU Yi-Wen², TANG Lian-Fei², TAN Jian-Xi^{2*}

(1. Changsha County Food Safety Testing Center, Changsha 410010, China; 2. Changsha Customs Technology Center, Changsha 410004, China)

ABSTRACT: Objective To explore the feasibility of rapid detection of chloramphenicol with fluorescent aptamer probe. **Methods** A fluorescent aptamer probe was designed, consisting of a DNA sequence specifically identified with chloramphenicol, with 3'-end fam-labeled fluorescence, and a small random nucleic acid structure. When the aptamer probe exists alone, it is adsorbed to the surface by graphene oxide(Go), while FAM fluorescence quenched by fluorescence resonance energy transfer. When the target was added, as the target had a high affinity with the aptamer probe, the target was paired to form a double-stranded complex, which was separated from the Go surface and the fluorescence signal of FAM was recovered. **Results** When the 25 nmol/L fluorescent labeled aptamer probe was incubated with 1.2 μL of 1 mg/mL Go solution, more than 95% of the fluorescence signal was quenched by Go. After chloramphenicol solution was added and incubated, the fluorescence signal was obviously recovered. **Conclusion** The fluorescence aptamer probe can be used for rapid detection of chloramphenicol samples and has great potential for other small molecule detection.

KEY WORDS: chloramphenicol; aptamer; graphene oxide; fluorescence resonance energy transfer

基金项目: 质检总局科技计划项目(2017IK063)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of AQSIQ (2017IK063)

*通讯作者: 谭建锡, 高级工程师, 主要研究方向为风险控制及新方法应用。E-mail: 155091611@qq.com

*Corresponding author: TAN Jian-Xi, Senior Engineer, Changsha Customs Technology Center, Changsha 410004, China. E-mail: 155091611@qq.com

1 引言

兽药残留问题是影响动物源食品安全的重要因素之一。氯霉素(chloramphenicol, CAP)最早是从委内瑞拉土壤中分离的链丝菌(*Streptothrix*)中提取获得,后经人工合成而大量生产^[1]。因其对革兰氏阴性及阳性细菌均有抑制作用,被广泛用于动物性传染疾病的治疗,成为廉价高效的广谱抗生素。但毒理学研究表明,长期摄入会诱发致病菌耐药性^[2]。更严重的是,其化学残留物可抑制骨髓细胞内线粒体蛋白质的合成,并伴有白细胞和血小板减少现象,导致灰婴综合征、再生障碍性贫血和粒状白细胞缺乏症等疾病,威胁人类健康^[3]。目前,欧盟、我国及多数国家都严禁这类药物的使用^[4]。但因其价格低廉、抑菌效果好,仍有不法商贩违法使用。为维护广大消费者的健康及保护我国动物性食品的出口贸易,不断改进和开发新的相关检测方法依然是关注热点。CAP 残留检测主要分为仪器分析法和免疫分析法等^[5-7]。仪器检测法具有灵敏度高、定量准确等优点,但操作需要较高的专业水平,且设备维护成本较高,难以在现场快速检测中广泛推广。免疫分析法,虽操作简便、应用较广,但较易受环境因素,如离子强度、pH 等干扰影响,在现场快速检测中存在局限性。

核酸适体(aptamer)是通过体外筛选技术-指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)获得的单链寡核苷酸片段。其功能与抗体很相似,但对靶标有更高的亲和力和特异性,并具有稳定性好、易修饰、成本低等优点,在生物传感器构建中的应用十分广阔^[8-10]。氧化石墨烯(graphene oxide, Go)具有较大的比表面积,可通过化学耦合或物理作用吸附蛋白质、核酸等^[11],其宽波长吸收光谱和高效的猝灭效率,常被用作荧光猝灭剂,尤其在检测生物小分子、生物及环境分析中性能极其优异^[12]。

本研究设计了一种基于 GO 和荧光标记核酸适体的荧光检测平台,探讨功能化核酸适体构建荧光适体探针的可行性及应用于氯霉素检测的可行性,标记有羧基荧光素(carboxyfluorescein, FAM)的氯霉素适体与氯霉素特异性结合后,形成双链复合物,产生可检测的荧光信号变化,从而达到检测的目的。该荧光适体探针构建步骤简便、检测灵敏度高,受环境因素干扰少,可用于执法现场快速检测,为食品中 CAP 残留的简便、快速、准确的检测提供了全新的思路,也为新型纳米检测技术的开发提供了平台,适应了市场监管需要,构建了食品安全保障的一道重要防线。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

核酸适体序列参考已发表的文献^[13],由大连宝生物股份有限公司合成。

Tris-HCl 缓冲溶液(分析纯,索莱宝科技有限公司);氧化石墨烯(先锋材料科技有限公司);氯霉素 ELISA 检测试剂盒(英国朗道公司)。

2.2 仪器与设备

LS-45 荧光分光光度计(英国 PerkinElmer 公司);JY 92-IIN 超声细胞破碎仪(宁波新芝生物科技公司);DTX-800 多功能酶标仪(美国贝克曼库尔特公司)。

2.3 GO 溶液制备方法

称取 Go 固体粉末 0.05 g,将其溶解于 50 mL 去离子水中,用超声细胞破碎仪,在冰浴下 300 W 功率超声 2.5 h,制得均匀溶液,保存在常温下备用。

2.4 荧光适体探针构建

将核酸适体用 Tris-HCl 缓冲液进行稀释,并将标记有 FAM 荧光的适体探针稀释液与 1.2 μL 的 Go 溶液混合均匀,用 Tris-HCl 补足至 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下孵育 20 min 后,保存在常温下备用。荧光适体探针终浓度为 25 nmol/L。

2.5 荧光适体探针检测条件可行性

- 空白组,只加入 Tris-HCl 缓冲液。
- 加入 25 nmol/L 标记有 FAM 荧光的适体探针。
- 加入 25 nmol/L 标记有 FAM 荧光的适体探针和 1.2 μL Go 溶液,混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。
- 加入 25 nmol/L 标记有 FAM 荧光的适体探针和 1.2 μL Go 溶液,混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min,再加入 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氯霉素溶液,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。

2.6 ELISA 检测验证

将 2.5 中 a-d 各组溶液分别用氯霉素 ELISA 检测试剂盒检测,进行方法学结果验证。

2.7 检测条件

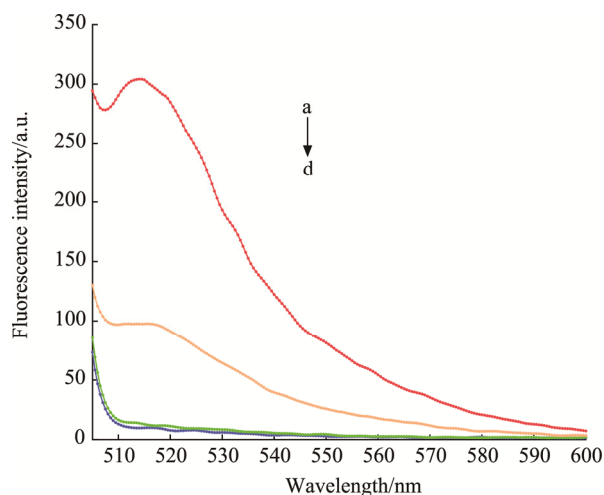
上述各组溶液均用 Tris-HCl 补足至 100 μL ,分别移入石英比色皿,使用荧光分光光度计测量荧光值,激发波长 490 nm,发射波长 514 nm,在室温下进行荧光值的测定。ELISA 检测条件按照试剂盒说明书操作。

3 结果与分析

3.1 设计原理

Go 表面有许多含氧官能团(包括羧基、羟基等),高表面积比、二维芳香表面结构使其成为吸附某些生物分子

和 Go 之间的相互作用, 形成类似 dsDNA 的构象, 导致 ssDNA 的释放和荧光信号的恢复^[16]。



注: a, 加入 25 nmol/L 信号探针; b, 加入 25 nmol/L 信号探针, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CAP, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Go; c, 加入 25 nmol/L 信号探针, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Go; d: Tris-HCl 缓冲溶液。

图 4 荧光适体探针检测 CAP 可行性分析

Fig.4 Feasibility analysis of fluorescence aptamer for the CAP detection

本研究中, 当标记有 FAM 荧光的单链适体探针单独存在时, 其被吸附到 Go 表面, 荧光信号通过能量共振转移方式被淬灭; 当氯霉素存在时, 与适体探针特异性结合形成复合物, 将适体探针从 Go 表面拉离, 使荧光信号得到恢复, 从而实现了对靶标的检测。实验结果证明, 该方法具有操作简单、信号强度高、背景噪声低等优点, 能被应用于氯霉素样品的快速、高特异性检测。通过对本体系引入智能设计策略, 还可以实现多重和更复杂的检测, 为其他生物小分子的检测方法的建立提供参考。

参考文献

- [1] Sai N, Chen Y, Liu N, *et al.* A sensitive immunoassay based on direct hapten coated format and biotin-streptavidin system for the detection of chloramphenicol [J]. *Talanta*, 2010, 82(4): 1113–1121.
- [2] Holt P, Harvey D, Harley R, *et al.* Chloramphenicol toxicity [J]. *Adv Drug React Toxicol*, 1993, 12: 83–89.
- [3] Saba AB, Ola-Davies MO, Ajala O, *et al.* The toxic effects of prolonged administration of chloramphenicol on the liver and kidney of rats [J]. *Af J Biomed Res*, 2000, 3: 133–137.
- [4] Bangemann M. Commission regulation (EC) No 1430/94 [Z].
- [5] Liu T, Xie J, Zhao J, *et al.* Magnetic chitosan nanocomposite used as cleanup material to detect chloramphenicol in milk by GC–MS [J]. *Food Anal Methods*, 2014, 7(4): 814–819.
- [6] Veach BT, Anglin R, Mudalige TK, *et al.* Quantitation and confirmation of chloramphenicol, florfenicol, and nitrofurantol metabolites in honey using LC-MS/MS [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(3): 897–904.
- [7] Md GS, Md M, Hasan R, *et al.* ELISA validation and determination of cut-off level for chloramphenicol (CAP) residues in shrimp and fish [J]. *Our Nat*, 2017, 15: 13–18.
- [8] Taghdisi SM, Danesh NM, Nameghi MA, *et al.* A label-free fluorescent aptasensor for selective and sensitive detection of streptomycin in milk and blood serum [J]. *Food Chem*, 2016, 203: 145–149.
- [9] 谭建锡, 陈盼, 莫瑾, 等. 指数富集的配体系统进化技术研究进展及在食品检测中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(1): 80–84.
- [10] Tan JX, Chen P, Mo J, *et al.* Research progress and application of systematic evolution of ligands by exponential enrichment technology in food detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(1): 80–84.
- [11] Sharma A, Catanante G, Hayat A, *et al.* Development of structure switching aptamer assay for detection of aflatoxin M1 in milk sample [J]. *Talanta*, 2016, 158: 35–41.
- [12] Liu K, Yan X, Mao B, *et al.* Aptamer-based detection of Salmonella enteritidis using double signal amplification by Klenow fragment and dual fluorescence [J]. *Microchimica Acta*, 2015, 183(2): 643–649.
- [13] Wen W, Hu R, Bao T, *et al.* An insertion approach electrochemical aptasensor for mucin1 detection based on exonuclease-assisted target recycling [J]. *Biosensors Bioelectron*, 2015, 71: 13–17.
- [14] Mehta J, Van Dorst B, Rouah-Martin E, *et al.* *In vitro* selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol [J]. *J Biotechnol*, 2011, 155: 361–369.
- [15] Le D, Kara A, Schroder E, *et al.* Physisorption of nucleobases on graphene: a comparative van der Waals study [J]. *J Phys: Condensed Matter*, 2012,

24(42): 424210.

- [15] He S, Song B, Li D, *et al.* A graphene nanoprobe for rapid, sensitive, and multicolor fluorescent DNA analysis [J]. *Adv Funct Mater*, 2010, 20(3): 453–459.

- [16] Hunt A, Dikin DA, Kurmaev EZ, *et al.* Epoxide speciation and functional group distribution in graphene oxide paper-like materials [J]. *Adv Funct Mater*, 2012, 22(18): 3950–3957.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



陈 盼, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学和实验室管理。
E-mail: 4551698@qq.com



谭建锡, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为风险控制及新方法应用。
E-mail: 155091611@qq.com

“水产品加工与检测分析”专题征稿函

水产品是海洋、江河、湖泊里出产的动物或藻类的总称, 是人们日常生活中重要的食物。为了保障人们的消费质量与食用安全, 水产品的质量安全与贮藏保鲜显得尤为重要。水产品的精深加工和安全研究有利于发展渔业经济, 促进我国水产食品质量安全水平, 降低食品安全风险, 保障消费者权益。

本刊特别策划了“水产品加工与检测分析”专题, 主要围绕水产品加工与研发、水产品贮藏与保鲜、水产品药物残留检测、水产品安全控制、水产品营养研究、海洋生物活性物质开发和利用、新型海洋食品与海洋功能食品开发技术、水产品的质量与标准等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可, 本专题计划在 2020 年 4 月出版。

本专题由国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员担任专题主编。特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 2020 年 3 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: 水产品加工与检测分析”)

邮箱投稿: E-mail: jfoods@126.com(备注水产品加工与检测分析专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部