• 研究论文 •

纳米金增强 SPR 检测产毒赭曲霉中 PKS 基因的特异性碱基

李 迎 林 钊 李蓉卓 刘 霞*

(湖南农业大学食品科技学院 食品科学与生物技术湖南省重点实验室 长沙 410128)

摘要 基于双通道表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)传感器, 分别采用直接法和金纳米粒子作为传感层的方法, 通过检测赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)合成初期阶段表达的聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS)基因的 25 个特异性碱基的寡核苷酸链, 建立了一种高灵敏、间接检测 OTA 的新方法. 同时考察了 6-巯基己醇(6-mercapto-1-hexanol, MCH)作为封闭液对 SPR 响应信号的影响. 结果表明, 直接法的检测限为 12.5 nmol/L, MCH 的加入可使响应信号有所增强, 使用金纳米粒子作为传感层的检测下限为 0.25 nmol/L, 与直接法相比较灵敏度提高了 50 倍, 与以往使用金纳米粒子标记抗体或抗原相比, 其作为传感层也能大大提高 SPR 检测灵敏度, 且操作简单易行.

关键词 表面等离子体共振; 金纳米粒子; 赭曲霉毒素 A; 聚酮合成酶基因

Detection for Polyketide Synthase Gene of *Aspergillus ochraceus* Based on Au Nanoparticles Enhancing SPR Biosensor

Li, Ying Lin, Zhao Li, Rongzhuo Liu, Xia*

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Hunan Province Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128)

Abstract The surface plasmon resonance (SPR) method is established for indirect detection of the ochratoxin A. The 25-base oligonucleotide sequence of polyketide synthase (PKS) gene which is expressed during early stage of ochratoxin A synthesis, was detected respectively using direct assay and Au nanoparticles as sensing membrane assay based on the two channels surface plasmon resonance (SPR) biosensor. At the same time, influence of 6-mercapto-1-hexanol (MCH) blocking on SPR signal was also studied. As a result, the limit of detection (LOD) of the direct assay was 12.5 nmol/L. And the SPR signal was enhanced with 6-mercapto-1-hexanol (MCH) blocking. With Au nanoparticles as a sensing membrane, LOD was 0.25 nmol/L, sensitivity was 50 times higher than that of direct detection. SPR signal could be dramatically enhanced with Au nanoparticles as sensing membrane instead of as label, and the operation was simple.

Keywords surface plasmon resonance (SPR); Au nanoparticles; ochratoxin A; polyketide synthase (PKS)

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)技术是一种新兴的快速、无标记、实时及高灵敏的技术, 已被广泛应用于生命科学、食品、环境、案件侦破、材料等领域.

赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)是一类由真菌产

生的有毒小分子化学物质(MW<700 Da), 主要是由曲霉和青霉属某些菌株产生, 动物实验证明, 其具有致癌、致畸、神经毒性及免疫毒性^[1,2], 摄入被其污染的食品会对人体产生危害. 近些年, 已相继报道了 SPR 检测 OTA 的研究^[3~5], 但目前国内还未见 SPR 应用于 OTA

* E-mail: liuxiaspr@gmail.com; Tel.: 0731-84673517

Received January 3, 2012; revised March 6, 2012; accepted March 9, 2012.

Project supported by the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (No. 10B050), Key Project of Science and Technology Plan of Changsha (No. K1005181-21) and Graduate Innovation Fund of Hunan Province (No. CX2010B281).

湖南省教育厅优秀青年项目(No. 10B050)、长沙市科技计划重点项目(No. K1005181-21)和湖南省研究生创新基金(No. CX2010B281)资助项目.

检测的报道. 这些研究均是基于免疫学方法, 需要使用剧毒的 OTA 标准品, 检测人员在操作时有一定危险. 近年来研究发现, OTA 是赭曲霉产生的一种聚酮衍生次级代谢产物, 虽然 OTA 的生物合成途径尚未完全确定^[6,7], 但是研究表明真菌中聚酮合成酶基因是合成 OTA 的条件之一, 并且聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS)基因只在 OTA 合成的初期阶段表达^[8~10]. 通过检测食物中的 PKS 基因特异性碱基序列, 则可实现食品安全的“预警作用”, 然而至今为止, 国内外还未见应用 SPR 检测 PKS 基因的报道.

目前, SPR 检测 DNA 的方法已经较为成熟. 肖守斌^[11]将带巯基头的 35s 启动子寡聚核苷酸探针修饰到 SPR 芯片表面, 成功检测了转基因玉米样品. Joung 等^[12]采用肽氨酸提高灵敏度的方法检测了大肠杆菌 O157:H7 的 16s rRNA, 从而检测了大肠杆菌 O157:H7. Jordan 等^[13]用 SPR 表征了金膜表面 DNA 的杂交吸附及 DNA 表面上链亲和素的固定, 并监测了金膜表面单链 DNA 和生物素标记的寡核苷酸互补序列的杂交反应.

纳米技术与 SPR 结合可大幅度提高 SPR 传感器的检测灵敏度^[14], 其中, 金纳米粒子由于可以和多种生物分子相结合, 易于标记、被标记物的生物功能基本不发生改变、且在检测样品中用量很少等优点而被广泛应用于生物检测. 在以往 SPR 检测中, 大多是将金纳米粒子标记抗体或抗原来提高检测灵敏度^[15], 本文则将金纳米粒子固定在 SPR 传感器表面作为传感层, 再将寡核苷酸探针固定在金纳米颗粒表面, 利用寡核苷酸探针与溶液中互补序列之间的特异性杂交, 进行高灵敏检测, 同时考察了 6-巯基己醇(6-mercapto-1-hexanol, MCH)作为封闭液对 SPR 响应信号的影响.

本文使用的寡核苷酸链, 是通过提取产 OTA 的赭曲霉 DNA, 设计引物对 PKS 基因进行扩增, 并将测序结果与 GenBank 中已有的赭曲霉序列进行比对, 选取其中特异性的 25 个碱基序列. 故本文通过纳米金增强检测赭曲霉中 OTA 合成初期阶段表达的 PKS 基因的特异性碱基序列, 建立了一种具有实际应用价值的高灵敏、快速、简便的间接检测 OTA 的 SPR 方法.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

N-羟基琥珀酰亚胺(*N*-Hydroxysuccinimide, NHS), 乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺(*N*-(3-Dimethylamino-propyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC), 6-巯基己醇(6-mercapto-1-hexanol, MCH), 3-巯基丙酸(3-Mercaptopropionic acid, MPA)购于 Sigma-Aldrich 上海分公

司. 无水乙醇, 四氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 盐酸, 柠檬酸三钠, 巯基乙胺(2-mercaptoethylamine, MEA), 磷酸二氢钾(1 mol/L, pH 3.8, DNA 探针固定溶液)和其他化学试剂购于国药集团; 实验所用试剂均为分析纯, 磷酸盐缓冲液 (Phosphate-buffered saline buffer, PBS, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.4). 寡核苷酸探针及其互补链由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成(见表 1). 金纳米粒子为本实验室合成. 完全互补链和错配链均用 PBS 配制, 实验用水为去离子水.

表 1 寡核苷酸探针及其互补链(5'→3')^a

Table 1 Oligonucleotide sequences for probe and complementary DNA (5'→3')

寡核苷酸探针	HS-GTTACGGGACGACATGCACTCGCAG
完全互补链	CTGCGAGTGCATGTCGTCCCGTAAC
错配链 1	CTGCTAGTGGACGTAAGTCCCATAAC
错配链 2	CGGCATATCCGACAGTTCCCATGCC

^a 下划线为错配碱基.

HJ-1 型恒温磁力搅拌器(江苏医疗仪器厂); UV-2450 紫外可见分光光度计(购于日本岛津公司); 双通道 2000 SPR 传感器和芯片(购于美国 Biosensing Instrument 公司); JSM-6380LV 型透射电子显微镜(购于日本电子株式会社).

1.2 实验方法

1.2.1 金纳米粒子的合成与检测

参考文献^[16,17]的方法, 采用柠檬酸三钠还原法制备金纳米粒子: 取 2 mL 1%氯金酸水溶液于圆底烧瓶中, 加入 48 mL 去离子水, 用恒温磁力搅拌器 200 r/min 搅拌加热至沸, 沸腾后立即加入 3 mL 新配制的柠檬酸三钠溶液(0.05 g 溶于 3 mL 去离子水), 反应 8 min 后停止搅拌, 颜色由灰色变成黑色, 当溶液变为葡萄酒红色时停止加热. 待溶液室温冷却后, 分装到离心管中, 于 4 °C 冰箱中保存.

1.2.2 寡核苷酸探针的固定

(I) 直接法: 滴加 1 μmol/L 寡核苷酸探针溶液于 SPR 芯片表面, 室温孵育过夜.

(II) 采用 MCH 作为封闭液直接法: 滴加 1 μmol/L 寡核苷酸探针溶液于 SPR 芯片表面, 室温孵育过夜. 然后再滴加 1 μmol/L MCH 室温避光孵育 1 h.

(III) 纳米金增强法: 将 SPR 芯片于 10 mmol/L MPA 乙醇溶液中浸泡过夜, 冲洗并用氮气吹干后装入 SPR 仪器. 基线走平后通入 EDC/NHS (0.4 mol/L/0.1 mol/L, 流速 40 μL/min)溶液激活芯片表面, 分别以 5

$\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速向芯片表面通入 $0.4\text{ mg}/\text{mL}$ MEA 溶液、 $0.646\text{ nmol}/\text{L}$ Au NPs 和 $1\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$ 寡核苷酸探针溶液, 通入探针溶液后停止注射泵, 室温孵育过夜. 恢复注射泵用 PBS 冲洗流通池后, 以 $5\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速通入 $1\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$ MCH, 停止注射泵室温避光孵育 1 h (见图 1). 上述每一步修饰后均用 PBS 缓冲液冲洗流通池, 至基线走平后进行下一步修饰.

图 1 纳米金增强法实验示意图

Figure 1 Schematic illustration of Au nanoparticles enhancing assay

1.2.3 SPR 检测

通入 PBS 缓冲液反复冲洗待基线稳定后, 以 $20\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速通入一定浓度的互补链, 反应 300 s , 观察 SPR 响应信号. 反应完毕后用 $2.5\text{ mmol}/\text{L}$ HCl 溶液^[18]、PBS 缓冲液冲洗至基线稳定, 加入其它浓度的互补链重复上述步骤.

2 结果与讨论

2.1 金纳米粒子的表征

应用柠檬酸钠还原法成功制备了金纳米粒子. 图 2 为金纳米粒子的透射电镜图, 如图所示, 粒子呈现较为规则的球形, 平均粒径为 15 nm . 图 3 为金纳米粒子的紫外可见吸收光谱, 如图所示, 在 520 nm 处出现了金纳米粒子的特征吸收峰.

2.2 SPR 实验

2.2.1 直接法

寡核苷酸探针 5'端修饰的巯基与金有着很强的结合力, 可使探针自行组装在芯片表面, 形成单分子膜. 同时 PBS 缓冲液也为碱基配对提供了稳定的杂交环境. 研究发现, 即使错配链只有一个碱基错配、错配位置不同, 均能引起 SPR 信号的改变^[19]. 为了考察本实验中 DNA 杂交的特异性, 本试验分别检测了一条完全互补链和两条错配链与探针的杂交效果(见表 2). 由表 2 可明显看

图 2 金纳米粒子的透射电镜图

Figure 2 Transmission electron micrograph of Au nanoparticles

图 3 金纳米粒子的紫外-可见吸收光谱: (A) $0.129\text{ nmol}/\text{L}$; (B) $0.258\text{ nmol}/\text{L}$

Figure 3 UV-vis spectra of Au nanoparticles: (A) $0.129\text{ nmol}/\text{L}$; (B) $0.258\text{ nmol}/\text{L}$

表 2 三条互补链的 SPR 响应值

浓度/ $(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$	SPR 响应平均值($\Delta\theta/\text{mDeg}$)		
	完全互补链	错配链 1	错配链 2
100	1.6677	0.8997	0.4207
200	1.8290	1.0533	0.6393
400	2.1773	1.3103	1.1243

出, 由于错配链与探针只进行了部分杂交, 错配链的 SPR 响应值明显低于完全互补链的 SPR 响应值, 且碱基错配个数越多, SPR 响应值越低. 图 4A 表示的是直接法检测的寡核苷酸完全互补链在 $12.5\sim 400\text{ nmol}/\text{L}$ 范围内的工作曲线, 最低检测限为 $12.5\text{ nmol}/\text{L}$.

2.2.2 采用 MCH 作为封闭液的直接法

用传感器进行检测时, 需使用封闭剂进行封闭, 以

消除非特异性吸附. 图4B表示的是加入MCH封闭芯片表面的空位点后, 检测的寡核苷酸完全互补链在 12.5~400 nmol/L 范围内的工作曲线. 从图 4B 可看出, 利用 MCH 作为封闭液, 虽然最低检测限仍为 12.5 nmol/L, 但检测信号较直接法有所提高, 且随着完全互补链浓度的增大, 信号增强的也越大. 同时由于 MCH 作为封闭液可使 DNA 探针的取向更加相对有序^[20], 有利于 DNA 杂交, 同时又减小了非特异性吸附的原因.

图4 SPR 检测寡核苷酸完全互补链的工作曲线: (A) 直接检测; (B) 采用 MCH 作为封闭液的直接检测; (C) 金纳米粒子增强法

Figure 4 The SPR biosensor response of three assays: (A) direct assay; (B) direct assay with MCH blocking; (C) Au nanoparticles enhancing assay

2.2.3 纳米金增强法

初始时向芯片表面引入 MPA, 其分子一端的巯基与金有着很强的结合力, 另一端的羧基可作为活性基团, 与生物分子结合, 从而构成稳定的单分子传感膜. 然后将 EDC 和 NHS 的混合液流经传感器表面, 反应约 150 s, 使 MPA 末端的羧基活化. 再将 MEA 注入流通池后, MEA 的氨基迅速与 MPA 活化的羧基反应, 从而使 MEA 固定在传感器表面, 最后以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速, 将 0.646 nmol/L 金纳米溶液通入流通池, 反应 20 min. 当金纳米粒子的传感层固定好后, 通入寡核苷酸探针溶液, 待其达到平衡时, 让溶液停留在传感器表面孵育过夜, 然后通入 MCH 溶液封闭未被探针占据的位点, 防止非特异性吸附.

图 5 为金纳米粒子自组装的动力学曲线. 由图 5 可明显看出, 金纳米粒子在 MEA 表面有较强的结合且结合速率很快, 400 s 基本达到平衡, 且组装到芯片表面时, SPR 角度发生了极大的改变.

与直接法相比, 运用金纳米粒子作为芯片传感层, SPR 响应信号远高于直接法(图 4C), 检测下限也由 12.5

nmol/L 降至 0.25 nmol/L, 这主要是由于金纳米粒子本身的折射率大以及金纳米粒子表面的等离子体子与金膜本身的表面等离子体子发生了耦合^[21]. 此外, DNA 本身带负电荷, 经柠檬酸钠还原法制备的金纳米粒子表面也带负电, 当 DNA 探针连接到金纳米粒子上时, DNA 探针由于电荷互斥呈直立状而远离金纳米粒子表面^[22], 且本实验使用的 25 个碱基序列, DNA 链比较短, 也会使其组装致密, 有利于 DNA 保持直立状态^[18], 以上原因也可使 DNA 探针与溶液中 DNA 互补链充分接触, 提高 DNA 杂交效率. 上述结果表明将金纳米粒子作为传感层, 可使检测灵敏度明显提高, 且比使用金纳米粒子标记抗体或抗原的方法更简便易行.

图5 金纳米粒子组装的动力学曲线图

Figure 5 The kinetic adsorption curves of immobilization of Au nanoparticles

3 结论

本实验利用双通道 SPR 传感器, 采用单分子自组装技术将金纳米粒子固定在芯片表面作为传感层, 成功检测了产毒赭曲霉中 OTA 合成初期阶段表达的 PKS 基因的特异性碱基序列, 检测下限为 0.25 nmol/L, 与直接法相比较灵敏度提高了 50 倍. 将金纳米粒子作为传感层, 可使检测灵敏度明显提高, 且比使用金纳米粒子做标记的方法更简便易行. 本实验建立了一种具有实际应用价值的高灵敏、快速、简便的间接检测 OTA 的 SPR 新方法, 可为食品安全起到“预警作用”.

References

- 1 Betina, V. *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*, Elsevier, Amsterdam, **1989**, 438.
- 2 Turner, N. W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 632, 168.
- 3 Yu, J. C. C.; Lai, E. P. C. *Synth. Met.* **2004**, 143, 253.
- 4 Fu, X. H. *Anal. Lett.* **2007**, 40, 2641.
- 5 Yuan, J.; Deng, D.; Lauren, D. R.; Aguilar, M.; Wu, Y.

- Anal. Chim. Acta* **2009**, 656, 63.
- 6 Moss, M. O. *Food Addit. Contam. (Suppl.)* **1996**, 13, 5.
- 7 Moss, M. O. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **1998**, 27, 62S.
- 8 O'Callaghan, J.; Caddick, M. X.; Dobson, A. D. W. *Microbiology* **2003**, 149, 3485.
- 9 Atoui, A.; Dao, H. P.; Mathieu, F.; Lebrihi, A. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, 50, 488.
- 10 Culebras, P. V. M.; Crespo-Sempere, A.; Gil, J. V.; Ramon, D. *Food Sci. Technol. Int.* **2009**, 15, 97.
- 11 Xiao, S.-B. *J. Maize Sci.* **2009**, 17(2), 38 (in Chinese).
(肖守斌, 玉米科学, **2009**, 17(2), 38.)
- 12 Joung, H.-A.; Lee, N.-R.; Lee, S. K.; Ahn, J. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 63, 168.
- 13 Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. J.; Cron, R. M. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4939.
- 14 Taylor, A. D.; Ladd, J.; Yu, Q. M.; Chen, S. F.; Homola, J.; Jiang, S. Y. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 22, 752.
- 15 Golden, M. S.; Bjornes, A. C.; Georgiadis, R. M. *J. Phys. Chem.* **2010**, 114, 8837.
- 16 Hu, R.-S.; Liu, S.-T.; Zhu, T.; Liu, Z.-F.; Huang, X.-H.; Huang, H.-Z. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **1999**, 15(11), 961 (in Chinese).
(胡瑞省, 刘善堂, 朱涛, 刘忠范, 黄小华, 黄惠忠, 物理化学学报, **1999**, 15(11), 961.)
- 17 Wu, J.; Liu, Y.-G.; Jia, Q.; Zhang, J.-L.; Jiang, Y. *J. Southwest Univ. Nationalities (Humanities Soc. Sci.)* **2005**, 46(4), 46 (in Chinese).
(吴皎, 刘亚刚, 贾清, 张金灵, 姜宇, 西南民族大学学报, **2005**, 46(4), 46.)
- 18 Wang, R.; Tombelli, S.; Minunni, M.; Spiriti, M. M.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 967.
- 19 Milkani, E.; Morais, S.; Lambert, C. R.; McGimpsey, W. G. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 1217.
- 20 Levicky, R.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J.; Satija, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120(38), 9787.
- 21 Kim, S.-H.; Lee, J.-Y.; Lee, S.-J.; Lee, H.-J. *Talanta* **2010**, 81, 1755.
- 22 Wang, Q. *Ph.D. Dissertation*, Hunan University, Changsha, **2007**, pp. 62~67 (in Chinese).
(王青, 博士论文, 湖南大学, 长沙, **2007**, pp. 62~67.)

(A1201033 Cheng, F.)