

荧光核酸适配体功能化氧化石墨烯生物传感器用于快速检测氯霉素

卢静荷 谭淑珍* 朱雨清 李伟 陈天啸 王瑶 刘陈

(长沙理工大学 化学与生物工程学院 长沙 410114)

摘要 开发了一种无标记和快速的检测方法基于氧化石墨烯(GO)和荧光功能性 G-四聚体探针(FGP), 可用于定量检测氯霉素(CAP). FGP 由氯霉素核酸适配体和富含 G 碱基的核酸序列组成. 核酸适配体用于结合 CAP, 并且由富含 G 碱基的核酸序列在 K^+ , Na^+ 离子的作用下形成的 G-四聚体, 然后与硫磺素 T(ThT)结合后用作信号分子. 在没有 CAP 的情况下, FGP 通过 π - π 堆积相互作用被吸附到 GO 的表面上, 阻碍了 G-四聚体的形成导致溶液中的荧光强度低. 在加入 CAP 时, FGP 的核酸适配体部分可识别并结合 CAP 以形成复合物, 导致其从 GO 解吸. 因此, 游离的富含 G 的碱基序列可以形成 G-四聚体结构并与 ThT 结合, 导致溶液的荧光强度增加. 我们观察到荧光强度增加与 CAP 浓度在 2~20 nmol/L 范围内呈线性关系, 检测限为 1.45 nmol/L. 此外, 该检测系统用于检测加标牛奶中的 CAP, 回收率在 93.2%~103.3% 之间. 这些结果表明, 开发的方法可用于有效检测实际样品中的 CAP.

关键词 核酸适配体; 荧光; 氯霉素; G-四聚体; 氧化石墨烯

Fluorescent Aptamer-functionalized Graphene Oxide Biosensor for Rapid Detection of Chloramphenicol

Lu, Jinghe Tan, Shuzhen* Zhu, Yuqing Li, Wei Chen, Tianxiao
Wang, Yao Liu, Chen

(School of Chemical and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114)

Abstract A label free and rapid fluorescent method for quantitative detection of chloramphenicol (CAP) based on graphene oxide (GO) fluorescence functional G-quadruplex probe (FGP) was developed. The FGP consisted of a chloramphenicol aptamer and a G-rich sequence. The aptamer was used to bind CAP and the G-quadruplex formed by G-rich sequence was employed as a signal reporter after binding to Thioflavin T (ThT). In the absence of CAP, the FGP was absorbed onto the surface of GO through π - π stacking interactions, which restrained the G-rich sequence to form a G-quadruplex structure. Thus, the fluorescent intensity of background was low. In the addition of the CAP, the aptamer part of FGP could recognize and bind CAP to form a target-FGP complex, which led to the desorption of the complex from GO. Therefore, the free G-rich sequence could form G-quadruplex structure and bind to ThT, resulting a increase in the fluorescence intensity of the solution. We observed that the fluorescence increasement of the sensing platform had a linear relationship with the concentrations of CAP in the range of 2~20 nmol/L, and the limit of detection was 1.45 nmol/L. Besides, this detection system was applied for detecting CAP in the spiked milk, the recovery rate was between 93.2%~103.3%. These results indicated that this developed method can be used to efficiently recognize CAP in real samples.

Keywords aptamer; fluorescence; chloramphenicol; G-quadruplex; graphene oxide

1 引言

氯霉素(CAP)是一种有效的广泛应用的酰胺醇类抗生素, 已发现对人类具有致命的、潜在的副作用, 如白血病、再生障碍性贫血和灰色婴儿综合征^[1~3]. 这些潜在的危害导致禁止 CAP 在中国、日本、加拿大、美国、澳大利亚、欧盟(EU)和其他一些国家将其用于动物食物中^[4]. 但由于廉价和高效, CAP 仍被广泛用作治疗各种传染病的兽药. 为了保护人类健康免受抗生素残留的危害, 欧盟(EU)还确立了 CAP 的最低残留限度(MRPL)为

0.3×10^{-6} g/kg^[5]. 因此, 需要一种快速、准确、简单且廉价的检测方法用于检测 CAP. 近年来已经建立了许多用于测定动物源性食品中 CAP 的分析方法, 如气相色谱(GC)^[6]、液相色谱(LC)^[7,8]、液相色谱质谱(LC-MS)^[9,10]和酶联免疫吸附试验(ELISA)^[11,12]. 但是这些方法耗时且操作复杂. 因此, 开发一种对 CAP 残留物能够灵敏且快速的检测方法成为一项重要且实际的挑战.

另外, 由于核酸适配体的特异性、简单性以及高灵敏度, 基于核酸适配体的方法早已被用于检测 CAP^[13~16]. Miao 的小组研究并报道了一种基于核酸适

* E-mail: tsz519@163.com

Received October 17, 2018; published January 17, 2019.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (No. 17C0033).

项目受湖南省教育厅科研基金(No. 17C0033)资助.

配体的比色法来检测氯霉素(CAP). 通过与微量滴定板中的预先固定的捕获探针来固定 CAP 的核酸适配体. 辣根过氧化物酶(HRP)通过生物素与抗生物素蛋白系统通过共价连接到核酸适配体上来产生荧光信号. 成功实现 CAP 的定量测定, 检测范围为 0.001~1000 ng/mL, 检出限为 0.0031 ng/mL^[17]. Sharma 的研究小组^[18]报道了一种纳米-核酸适配体荧光法, 通过单链寡核苷酸分子特异性结合 CAP(核酸适配体), 用于保护合成的金纳米胶体免受盐诱导的聚集, 导致颜色变化. 制备的纳米胶体粒径为 7 nm, 浓度为 1.83×10^{-8} mol/L. 该系统可在缓冲液中检测到高达 0.55 pg/mL 的 CAP, 线性范围为 0.55 pg/mL 至 55 μ g/mL.

最近, 氧化石墨烯(GO), 一种单原子、水溶性和二维纳米材料^[19], 由于其独特的电子、机械和热性能, 在众多研究领域引起更多的关注^[20,21]. 有发现表明 GO 的六角石墨单元可以与核苷酸通过 π - π 堆积相互作用结合, 但单链 DNA 与互补链杂交后产生的双链就不能被吸附在 GO 表面^[22,23]. 由于吸附在 GO 上的荧光团通过电子转移或能量转移机制能够有效猝灭, 并实现 GO 单链/双链 DNA 的吸附/解吸特性, 荧光团标记的核酸和 GO 被用于开发不同的光学生物传感器^[24,25].

G-四聚体是富含 G 碱基对的序列通过 Hoogsteen 碱基互补配对原则而形成的空间立体核酸结构. 可以通过配位阳离子(例如 K^+ 和 Na^+)来稳定四聚体结构. 已经有很多课题组报道了由四聚体的结构而设计的诸多优良探针^[26~30]. 其中一些显示出对 G-四聚体有很高的特异性识别能力, 而不同于单链 DNA(ssDNA), 双链 DNA(dsDNA)和三链 DNA^[31]. 此外, G-四聚体结构可以与作为信号分子的 ThT 组合发出很强的荧光. 硫磺素 T/G-四聚体 DNA 系统已被广泛使用^[32,33].

在此, 我们提出了一种简单、快速、无标记且灵敏的荧光方法, 基于氧化石墨烯(GO)荧光开关的功能性 G-四聚体探针(FGP)来检测 CAP. FGP 由氯霉素核酸适配体和富含 G 碱基的核酸序列组成. 核酸适配体用于结合 CAP, 并且由富含 G 碱基的核酸序列在 K^+ , Na^+ 离子的作用下形成的 G-四聚体, 然后与硫磺素 T(ThT)结合后用作信号分子. 在没有 CAP 的情况下, FGP 通过 π - π

键堆积且相互作用被吸附到 GO 的表面上, 阻碍了 G-四聚体的形成导致溶液中的荧光强度低. 在加入 CAP 时, FGP 的核酸适配体部分可识别并结合 CAP 并形成具有一定空间结构的复合物. 因此, 游离的富含 G 的碱基序列可以形成 G-四聚体结构并与 ThT 结合, 导致溶液的荧光强度增加. 该方法简便易行, 具有较高的选择性和灵敏度, 并对实际样品进行了测试.

2 结果与讨论

2.1 实验原理

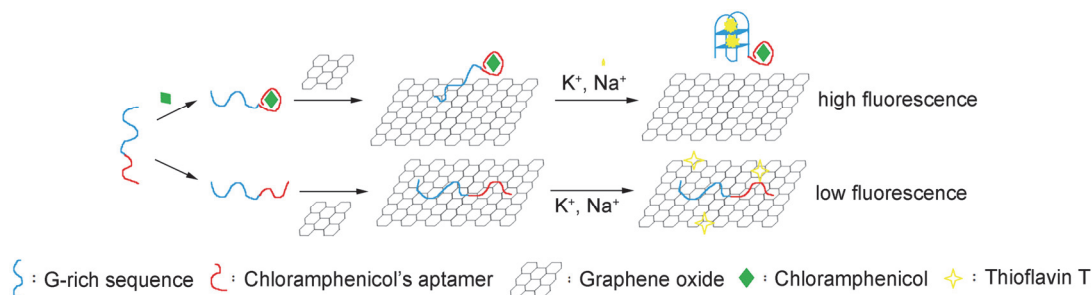
图式 1 展示了检测 CAP 的方法. 我们所设计的 FGP 探针包含了 CAP 适体和一部分富含 G 碱基的序列. CAP 的核酸适配体是用于结合 CAP, 然后由富含 G 碱基的序列形成的 G-四聚体再与硫磺素 T(ThT)结合后用作信号分子. 在不加入 CAP 的情况下, FGP 可以通过 π - π 键堆积作用被吸收到 GO 的表面上相互作用, 阻碍了富含 G 碱基的序列形成 G-四聚体结构. 因此, 背景的荧光强度很低. 在加入 CAP 之后, FGP 的核酸适配体部分可识别并结合 CAP 以形成靶标-FGP 复合结构, 导致 FGP 能够从 GO 中解吸. 使得富含 G 碱基的序列能够形成 G-四聚体从而结合 ThT 染料, 达到荧光强度增强的目的.

2.2 可行性分析

如图 1 所示. 在没有 GO 的情况下, 无论是否添加 CAP, 荧光光谱都显示出比较高的荧光强度, 但是两者的差异不是很大. 然而, 在添加 GO 后, 两者荧光强度都有大幅度降低且两者荧光强度差异较之前变化更大. 结果说明该方法可用于有效地检测 CAP.

在最佳实验条件下, 将不同浓度的 CAP(浓度范围在 0~200 nmol/L)与 FGP 分别进行反应, 来测试这个方法的灵敏度. 如图 2a 所示, 荧光强度随着 CAP 浓度的增加而增加. 图 2b 显示在 0~20 nmol/L 这个范围内, 荧光强度的上升与 CAP 浓度的增大成正比.

图 2 导出的线性回归方程是 $y = -0.065x + 0.9947$ ($R^2 = 0.9959$), 其检测限(LOD)为 1.45 nmol/L. 与最近报道的相比, 它的检测限相对较低(表 1).



图式 1 检测 CAP 的示意图

Scheme 1 Schematic drawing for the detection of CAP

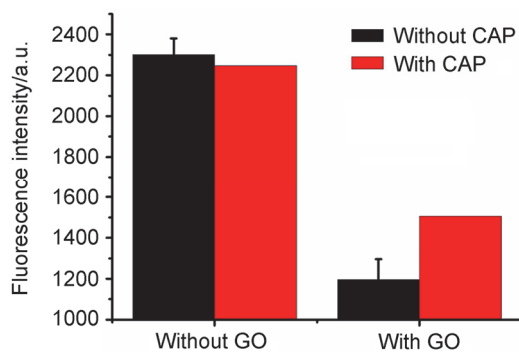


图1 图中黑色柱(不含 CAP)和红色柱(含有 CAP)在有无 GO 的情况下的荧光强度对比。添加 GO 之后荧光强度对比。浓度: FGP, 100 nmol/L; CAP, 200 nmol/L; GO, 0.03 mg/mL; ThT, 10 μ mol/L; K^+ , 40 mmol/L.

Figure 1 Fluorescence intensity in the absence (black columns) and presence (red columns) of CAP with/without the subsequent addition of GO. Concentrations: FGP, 100 nmol/L; CAP, 200 nmol/L; GO, 0.03 mg/mL; ThT, 10 μ mol/L; K^+ , 40 mmol/L. All data were collected from three measurements, and the error bars indicate the standard deviation.

表1 CAP 检测方法对比

Table 1 Comparison of analytical methods for the detection of CAP

Method	Limit of detection	Linear range	Reference
HPLC	0.25 mg/kg	—	[34]
Fluorescence sensor	1 pmol/L	0.003~10 nmol/L	[35]
Electrochemical detection	590 nmol/L	0.01~6 μ mol/L	[36]
Colorimetric	0.02 ng/mL	0.05~200 ng/mL	[37]
Fluorescence sensor	1.45 nmol/L	2~20 nmol/L	This work

3 结论

总之, 在这项研究中, 我们开发了一种基于氧化石墨烯(GO)简单的、快速的荧光方法来检测 CAP. 而且设计了一种荧光开关的功能性 G-四聚体探针(FGP), FGP 由 CAP 特异性核酸适配体和富含 G 碱基的序列组成. 在没有 CAP 的情况下, FGP 通过 π - π 键堆积作用被吸附在 GO 的表面. 在存在 CAP 的情况下, FGP 识别并绑定 CAP 以形成 CAP-FGP, 由于 FGP 上富含一段 G 碱基的序列, 可以形成 G-四聚体结构并且从 GO 表面解吸. 且形成的 G-四聚体结构之后结合 ThT 作为信号报道分子可以使得荧光强度明显增加. 设计的 FGP 检测 CAP 的灵敏度范围在 2 至 20 nmol/L, 检测限为 1.45 nmol/L. 该方法可用于检测食品中的 CAP.

4 实验部分

4.1 荧光分析

首先, 在 Tris-HCl 缓冲溶液(25 mmol/L, 400 mmol/L NaCl, 40 mmol/L KCl, pH 7.5)中加入 FGP, 加热至 88 $^{\circ}$ C 维持 10 min, 然后逐渐冷却至室温待用. 其次, 将 1 μ L 探针(最终浓度 100 nmol/L)和 1 μ L GO(最终浓度 0.03 mg/mL)加入 Tris-HCl 缓冲液, 让混合物在 37 $^{\circ}$ C 下

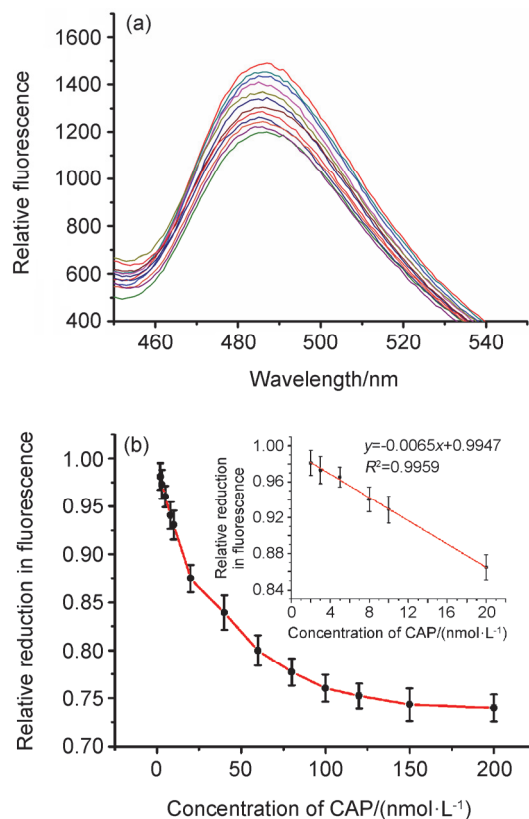


图2 (a)不同浓度 CAP 存在时检测体系的荧光发射光谱. 从底部到顶部四环素浓度依次为 0, 2, 4, 8, 10, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 120.0, 150.0, 200.0 nmol/L. (b)检测体系的相对荧光强度比与 CAP 浓度的关系曲线, 插图表示 CAP 浓度在 2 nmol/L 至 20 nmol/L 范围内, 荧光强度比与 CAP 浓度呈线性关系. 回归方程为 $y = -0.0065x + 0.9947$, 相关系数为 0.9959

Figure 2 (a) Fluorescence responses in the presence of different concentrations of CAP. From top to bottom: 0, 2, 4, 5, 8, 10, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 120.0, 150.0, 200.0 nmol/L CAP. (b) Relative fluorescence reduction ratio (F_0/F) of the method in the presence of different concentrations of CAP. The inset presents a linear relationship in the concentrations of CAP ranging from 2 nmol/L to 20 nmol/L. The regression equation was $y = -0.0065x + 0.9947$ with a correlation coefficient of 0.9959. Thioflavin T (10 μ mol/L final concentration), FGP (100 nmol/L) and different concentrations of CAP were sequentially added to buffer (25 mmol/L Tris-HCl, containing 400 mmol/L NaCl, 40 mmol/L KCl, pH 7.5), and the fluorescence measurements (emitted at 492 nm) were performed.

反应 1 h. 然后将 1 μ L ThT(最终浓度为 10 μ mol/L)加入体系并反应 15 min. 荧光光谱从 450 到 600 nm, 激发波长为 425 nm.

4.2 样品预处理

实验中使用的牛奶是从当地超市购买的, 在检测之前我们先将牛奶样品进行了处理. 首先, 将 7 mL 氢氧化钠溶液与 5 mL 牛奶混合, 然后超声处理 20 min. 其次, 将 pH 调至等电点以除去蛋白质. 再将溶液用转速为 20000 r/min 的离心机离心处理 15 min, 以除去不溶性化合物. 待离心完毕之后, 再收集上层清液将其 pH 值调节至 7.5. 最后将样品稀释 10 倍并测量 CAP 的浓度.

References

- [1] Wang, L.; Zhang, Y.; Gao, X.; Duan, Z.; Wang, S. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3265.
- [2] Wang, H.; Zhou, X.; Liu, Y.; Yang, H.; Guo, Q. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3532.
- [3] Webb, S.; Ternes, T.; Gibert, M.; Olejniczak, K. *Toxicol. Lett.* **2003**, *142*, 157.
- [4] Duan, Y.; Wang, L.; Gao, Z. *Talanta* **2017**, *165*, 671.
- [5] Tan, Z.; Xu, H.; Li, G. *Spectrochim. Acta A* **2015**, *149*, 615.
- [6] Pfenning, A. P.; Roybal, J. E.; Rupp, H. S.; Turnipseed, S. B.; Gonzales, S. A.; Hurlbut, J. A. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 26.
- [7] Wang, L.; Hai, Y.; Zhang, C. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *619*, 54.
- [8] Kawalski, D.; Poboży, E.; Trojanowicz, M. *J. Autom. Methods Manag. Chem.* **2011**, *8565*, 143416.
- [9] Ramos, M.; Muñoz, P.; Aranda, A.; Rodriguez, I.; Diaz, R.; Blanca, J. *J. Chromatogr. B* **2003**, *791*, 31.
- [10] Tian, H. *Chemosphere* **2011**, *83*, 349.
- [11] Kolosova, A. Y.; Samsonova, J. V.; Egorova, M. *Food Agr. Immunol.* **2000**, *12*, 115.
- [12] Byzova, N. A.; Zvereva, E. A.; Zherdev, A. V.; Eremin, S. A.; Dzantiev, B. B. *Talanta* **2010**, *81*, 843.
- [13] He, J. L.; Zhu, S. L.; Wu, P.; Li, P. P.; Li, T.; Cao, Z. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 112.
- [14] Chen, M.; Gan, N.; Zhang, H. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 1099.
- [15] Gao, H.; Pan, D.; Gan, N. *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 2551.
- [16] Miao, Y. B.; Ren, H. X.; Gan, N. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *929*, 49.
- [17] Miao, Y. B.; Gan, N.; Li, T. H.; Zhang, H. R.; Cao, Y. T.; Jiang, Q. L. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **2015**, *220*, 679.
- [18] Sharma, R.; Ragavan, K. V.; Raghavarao, K. S. M. S. *Biotechnology and Biochemical Engineering*, Springer, Singapore, **2016**.
- [19] Zhao, K.; Hao, Y.; Zhu, M.; Cheng, G. *Acta Chim. Sinica* **2018**, *76*, 168 (in Chinese). (赵克利, 郝莹, 朱墨, 程国胜, 化学学报, **2018**, *76*, 168.)
- [20] Sun, H.; He, Q.; Yin, S.; Xu, K. *Chin. J. Chem.* **2017**, *35*, 1627.
- [21] Yang, X.; Cai, H.; Bao, M.; Yu, J.; Lu, J.; Li, Y. *Chin. J. Chem.* **2017**, *35*, 1549.
- [22] Chen, X. J.; Wang, Y. Z.; Zhang, Y. Y.; Chen, Z. H.; Liu, Y.; Li, Z. L.; Li, J. H. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4278.
- [23] Liu, X.; Wang, F.; Aizen, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11832.
- [24] Yi, M.; Yang, S.; Peng, Z. Y.; Liu, C. H.; Li, J. S.; Zhong, W. W.; Yang, R. H.; Tan, W. H. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3548.
- [25] Zhang, P.; Gong, J. L.; Zeng, G. M.; Deng, C. H.; Yang, H. C.; Liu, H. Y.; Huan, S. Y. *Chem. Eng. J.* **2017**, *322*, 657.
- [26] Luu, K. N.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9963.
- [27] Guo, Y.; Sun, Y.; Shen, X.; Chen, X.; Yao, Y. R.; Xie, Y. F.; Hu, J. M.; Pei, R. J. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 9615.
- [28] Vummidi, B. R.; Alzeer, J.; Luedtke, N. W. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 540.
- [29] Zhu, L. N.; Wu, B.; Kong, D. M. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 4324.
- [30] Huang, X. X.; Zhu, L. N.; Wu, B. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 8719.
- [31] Zhang, Q.; Liu, Y. C.; Kong, D. M. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 13253.
- [32] Jiang, H. X.; Liang, Z. Z.; Ma, Y. H. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *943*, 114.
- [33] Mohanty, J.; Barooah, N.; Dhamodharan, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *135*, 367.
- [34] Zhang, Q. J.; Peng, T.; Chen, D. D. *J. Aoac. Int.* **2013**, *96*, 897.
- [35] Miao, Y. B.; Ren, H. X.; Gan, N.; Cao, Y. T.; Li, T. H.; Chen, Y. J. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *81*, 454.
- [36] Fei, X.; Zhao, F.; Li, J. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *596*, 79.
- [37] Gao, H.; Gan, N.; Pan, D. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 6528.

(Cheng, B.; Fan, Y.)