

基于二氧化锰纳米片和核酸外切酶 I 构建 荧光适配体传感器检测氯霉素

Fluorescence aptasensor detection of chloramphenicol based on
MnO₂ nanosheet and Exo-I

马鹏飞^{1,2} 齐 硕^{1,2} 吕 艳^{1,2} 周 游^{1,2} 王周平^{1,2}

MA Peng-fei^{1,2} QI Shuo^{1,2} LU Yan^{1,2} ZHOU You^{1,2} WANG Zhou-ping^{1,2}

(1. 江南大学食品国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:为创建食品中氯霉素的新型快速检测方法,以二氧化锰纳米片淬灭适配体的荧光,核酸外切酶 I 酶切放大荧光信号,构建了检测氯霉素的适配体传感器。结果表明:在适配体浓度 50 nmol/L,二氧化锰质量浓度 0.05 mg/mL,核酸外切酶用量 0.4 U/ μ L,酶切时间 50 min 的最佳荧光检测条件下,线性范围为 0.1~80.0 nmol/L,检出限为 0.08 nmol/L。构建的检测方法具有操作简单,检测灵敏度高的优点,并实现了在食品样品中的准确检测。

关键词:适配体;氯霉素;二氧化锰纳米片;核酸外切酶 I;适配体传感器

Abstract: In order to develop rapid detection method for chloramphenicol in food, in this study, a novel chloramphenicol aptasensor was constructed based on fluorescence quenching ability of MnO₂ nanosheet and fluorescence amplification ability of Exo-I digestion. Results showed that under optimal fluorescence detection conditions of 50 nmol/L concentration of aptamer, 0.05 mg/mL concentration of MnO₂ nanosheet, 0.4 U/ μ L concentration of Exo-I and Exo-I digestion time of 50 minutes, and the fluorescence intensity had a good linear relationship with the concentration of chloramphenicol ($R^2=0.995$). The linear range of detection was 0.1~80.0 nmol/L with the detection limit of 0.08 nmol/L. The constructed detection approach had the advantages of simple operation and high sensitivity, and could realize accurate detection of chloramphenicol in food samples.

Keywords: aptamer; chloramphenicol; MnO₂ nanosheet; Exo-I;

基金项目:江苏省研究生科研与实践创新计划项目(编号: KYCX20_1867)

作者简介:马鹏飞,男,江南大学在读博士研究生。

通信作者:王周平(1974—),男,江南大学教授,博士。

E-mail: wangzp@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2020-12-13

aptasensor

氯霉素(Chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素,对革兰氏阳性和阴性菌均有抑制作用,曾被广泛地应用于感染性疾病治疗^[1-3]。然而氯霉素对人体有很大的毒副作用,可抑制人体骨髓造血功能而引起再生性障碍性贫血等^[4-5]。根据中华人民共和国农业农村部第 250 号公告,氯霉素禁止在食品和动物饲料中使用。由于氯霉素低廉的成本和优异的抑菌效果,目前仍然有一些氯霉素在蜂蜜、牛奶和水产品中违法使用的报道。因此,为了保障公众健康,需要建立一种准确灵敏的氯霉素检测方法。目前广泛使用的氯霉素检测方法有液相色谱-质谱法^[6]、酶联免疫法^[7]、超高效液相色谱法^[8]等,但是这些方法需要专业和经验丰富的技术人员,仪器价格昂贵且检测耗时较长。近年来,科研人员报道了一些基于纳米材料和核酸适配体的新型氯霉素检测方法,包括电化学法^[9]、荧光法^[10]和比色法^[11]等,为氯霉素的检测提供了新思路。

适配体(Aptamer)是通过指数富集配体进化(SELEX)技术筛选得到,长度在 10~100 个核苷酸范围内的单链 DNA 或 RNA。适配体能够通过结构转换、氢键和疏水相互作用等与生物小分子、金属离子、蛋白质、细胞以及细菌等高效的结合^[12-14]。适配体与抗体相比,具有制备简单,易于功能化修饰,稳定性好的优点^[15-18]。适配体的这些优点为研制应用于食品安全检测与控制中的传感器提供了基础。如赵旭等^[19]研制了一种基于核酸适配体的镉离子可视化检测方法,检测的线性范围为 0.1~5.0 ng/mL,检测为 0.5 ng/mL。许宙等^[20]基于磁性纳米材料,构建了一种酶联增敏适配体传感器检测双酚 A,检测限低至 0.5 pg/mL。

二氧化锰纳米片(Manganese dioxide nanosheet, MnO_2NS)是一种超薄的二维纳米材料,具有优良的荧光淬灭能力,在生物传感、细胞成像和药物输送领域具有广阔的应用前景^[21-23],如 Wang 等^[24]基于 MnO_2NS 淬灭有机染料荧光原理,构建了检测 microRNA 的传感平台,检测限为 0.8 nmol/L。核酸外切酶 I(Exonuclease I, Exo-I)能够以 3 末端到 5 末端方向降解单链 DNA,不依赖于特异的核苷酸序列,能够有效地扩增信号进而实现对靶标的检测。

研究拟利用 MnO_2NS 对核酸适配体的荧光淬灭能力,以及 Exo-I 的酶促靶标循环放大信号作用,构建一种灵敏的氯霉素荧光检测新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

牛血清白蛋白(BSA)、醋酸锰、氯化钠和氯化钾等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

FAM 标记的氯霉素适配体(5'-FAM-ACTTCAGT-GAGTTGTCCACGGTCGGCGAGTCGGTGGTAG)、核酸外切酶 I(Exo-I, 20 U/ μL):生工生物工程(上海)股份有限公司;

氯霉素、四环素、土霉素、卡那霉素和甲矾霉素:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

全黑 96 孔微孔板:美国康宁公司;

氯霉素酶联免疫检测试剂盒:百奥森食品安全科技有限公司;

超纯水:18.2 M Ω ,由 Millipore 净水系统制备。

1.1.2 主要仪器设备

酶标仪:BioTek SynergyH1 型,美国 BioTek 公司;

透射电镜:JEM-2100 型,日本电子株式会社;

原子力显微镜:Dimension ICON 型,德国布鲁克科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 MnO_2NS 的制备 二氧化锰的合成参照 Han 等^[25]的方法并作改进。取 1 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的 BSA 和 1 mL 质量浓度为 0.05 g/mL 的醋酸锰置于 250 mL 的烧杯中,并向烧杯中加入 98 mL 超纯水至烧杯内溶液总体积为 100 mL;将烧杯置于磁力搅拌器上,常温搅拌均匀;50 min 后,向溶液中加入浓度为 1 mol/L 的氢氧化钠溶液,将溶液的 pH 值调节到 8.0;将溶液置于磁力搅拌器上继续搅拌 6 h,得到浅黄色的溶液,溶液经离心沉淀后,所得材料沉淀用超纯水清洗两次,在 4 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 检测体系的构建 将适配体原液(1 $\mu\text{mol/L}$)在 95 °C 加热 5 min 后,置于室温静置 30 min,使适配体形

成稳定的空间构象。在 1.5 mL 的离心管中加入 10 μL 的适配体原液和 10 μL 的 MnO_2NS 原液(1 mg/mL),加入 180 μL 氯霉素结合缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl_2 , pH 7.4)使得溶液总体积为 200 μL 。为了使适配体完全被 MnO_2NS 吸附,适配体与 MnO_2NS 在室温避光条件下,孵育 30 min。将 5 μL 的氯霉素标准品加入到离心管中,同时加入 4 μL 的 Exo-I,37 °C 下避光孵育 50 min。最后将 100 μL 反应液体加入酶标板中,置于酶标仪中检测荧光强度,激发波长 485 nm,发射波长 528 nm。

1.2.3 MnO_2NS 质量浓度的优化 MnO_2NS 的质量浓度与适配体是否被完全吸附有关,如果溶液中有游离的适配体,会造成检测的荧光背景信号高,影响检测性能。在 50 nmol/L 适配体浓度下,加入不同体积的 MnO_2NS ,使其终质量浓度分别为 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 mg/mL,测定体系荧光强度。

1.2.4 适配体浓度的优化 固定 Exo-I 的用量和酶切时间不变,在 5 nmol/L 氯霉素浓度下,加入不同浓度的适配体,使其终浓度分别为 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 nmol/L,测定体系荧光强度。

1.2.5 Exo-I 用量的优化 固定适配体浓度, MnO_2NS 质量浓度和酶切时间不变,在 5 nmol/L 氯霉素浓度下,加入不同体积的 Exo-I,使其在检测体系中的用量分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 U/ μL ,测定体系荧光强度。

1.2.6 酶切时间的优化 固定适配体浓度, MnO_2NS 质量和 Exo-I 用量不变,在 5 nmol/L 氯霉素浓度下,酶切时间分别为 10, 30, 50, 70, 90, 110 min,测定荧光强度。

1.2.7 实际样品检测 从当地超市购买合格的蜂蜜,用氯霉素适配体结合缓冲液稀释 20 倍之后,用 0.22 μm 滤膜过滤稀释液体。将不同浓度的氯霉素标准品加入滤液,用试验构建的检测方法进行检测,计算实际样品检测加标回收率,并与商用酶联免疫法进行比较。

2 结果与讨论

2.1 检测原理

如图 1 所示,荧光基团 FAM 标记的氯霉素适配体首先被 MnO_2NS 吸附,基于荧光能量共振转移效应,适配体标记的荧光被淬灭。当溶液中无氯霉素时,即使加入 Exo-I,由于 MnO_2NS 会阻碍酶切,Exo-I 无法剪切被二氧化锰吸附的适配体,溶液无荧光恢复。当溶液中存在氯霉素时,适配体特异性地与氯霉素结合后,从 MnO_2NS 表面解离,溶液荧光恢复;在有 Exo-I 存在的条件下,Exo-I 剪切溶液中与氯霉素结合而脱离 MnO_2NS 的适配体。适配体由于被剪切,失去了结构的完整性进而无法与氯霉素结合,释放出来的氯霉素会再次与被 MnO_2NS 吸附的适配体结合,使适配体从 MnO_2NS 表面解离,溶液进

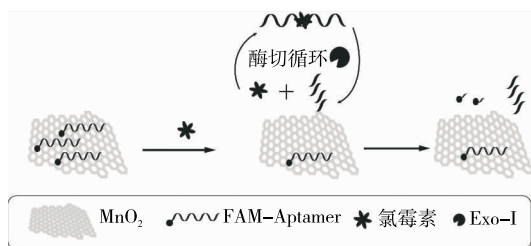


图1 氯霉素检测原理图

Figure 1 Schematic diagram of chloramphenicol detection

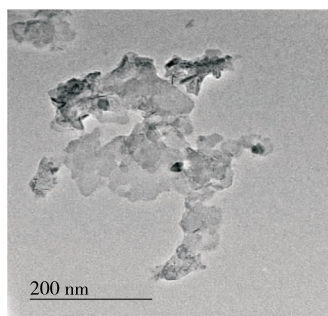
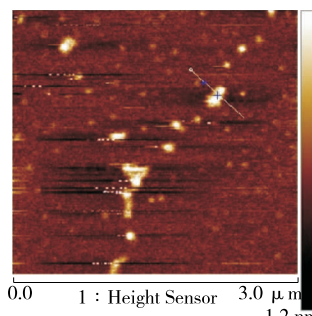
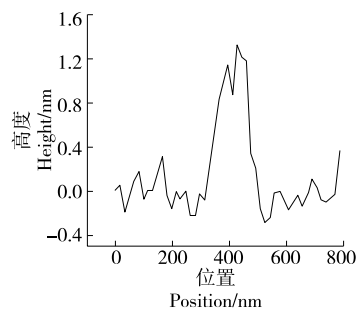
(a) MnO_2 NS透射电镜图(b) MnO_2 NS原子力显微镜图(c) MnO_2 NS原子力显微镜表征片层厚度图

图2 二氧化锰纳米片表征图

Figure 2 Characterization of MnO_2 nanosheet

MnO_2 NS 质量浓度 $\geq 0.05 \text{ mg/mL}$ 时,溶液中适配体的荧光被完全淬灭,表明适配体完全被 MnO_2 NS 吸附,无游离的,因此选择 0.05 mg/mL 为 MnO_2 NS 的最佳质量浓度。

2.3.2 适配体浓度的优化 由图 4 可知,随着适配体浓度的增加,溶液的荧光值增加,当适配体的浓度 $\geq 50 \text{ nmol/L}$ 时,溶液的荧光值基本达到饱和,说明此时适配体的量已经达到饱和,同时为了节约适配体的使用量,增加检测的经济性,选择 50 nmol/L 为适配体的最佳浓度。

2.3.3 Exo-I 用量的优化 由图 5 可知,随着 Exo-I 用量的增加,更多的适配体从 MnO_2 NS 解离,溶液荧光强度增大,当酶在检测体系中的用量 $\geq 0.4 \text{ U}/\mu\text{L}$ 时,溶液荧光

强度基本保持不变,说明体系中酶的用量达到饱和,选择 $0.4 \text{ U}/\mu\text{L}$ 作为 Exo-I 的最佳用量。

2.2 二氧化锰纳米片的表征

图 2 为 MnO_2 NS 的表征图。由图 2(a)可知,制备的 MnO_2 NS 呈薄片状结构,具有较大的比表面积;由图 2(b)和图 2(c)可知,制备的 MnO_2 NS 厚度大约为 1.2 nm ,是单层 MnO_2 NS。

2.3 试验条件优化

2.3.1 MnO_2 NS 质量浓度的优化 由图 3 可知,随着 MnO_2 NS 质量浓度的增加,溶液的荧光值减小,当

强度基本保持不变,说明体系中酶的用量达到饱和,选择 $0.4 \text{ U}/\mu\text{L}$ 作为 Exo-I 的最佳用量。

2.3.4 酶切时间的优化 由图 6 可知,随着酶切时间的增加,溶液荧光强度迅速增大,当酶切时间 $\geq 40 \text{ min}$ 时,溶液的荧光值趋于平稳,说明酶切达到饱和;若酶切不充分,体系荧光弱,将影响检测性能;而酶切时间过长,将影响检测效率,因此选择 50 min 作为最佳酶切时间。

2.4 线性范围与检测限

在最佳的试验条件下,利用构建的检测方法,对不同浓度的氯霉素标准品进行检测,由图 7 可知,氯霉素的浓度为 $0.1 \sim 80.0 \text{ nmol/L}$ 时,氯霉素浓度与荧光强度呈良好的线性,校正曲线方程为 $y = 856 \lg x + 1459$ ($R^2 = 0.995$),检出限为 0.08 nmol/L ($S/N=3$)。

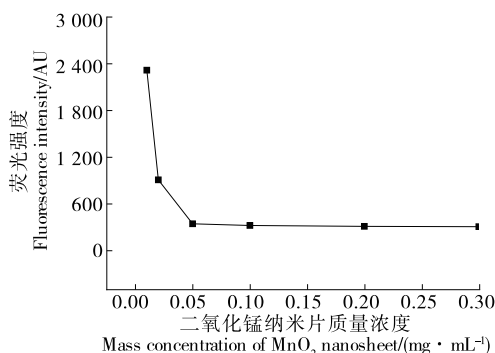


图3 二氧化锰纳米片质量浓度的优化

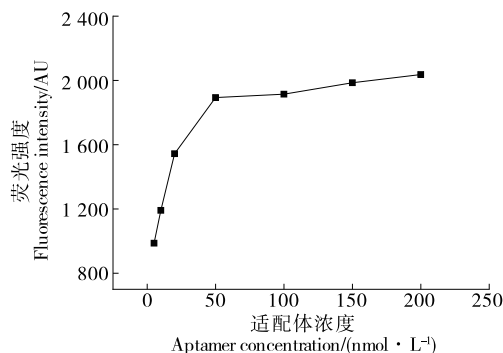
Figure 3 Optimization of the mass concentration of MnO_2 nanosheet

图4 适配体浓度的优化

Figure 4 Optimization of aptamer concentration

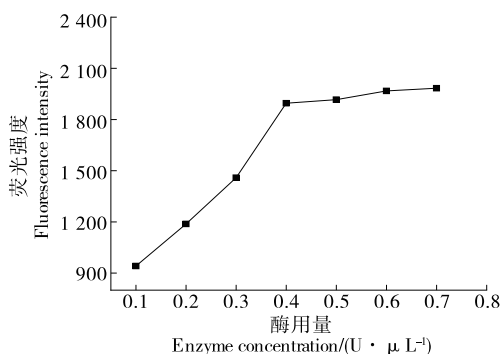


图 5 核酸外切酶 I 用量的优化

Figure 5 Optimization of Exo-I concentration

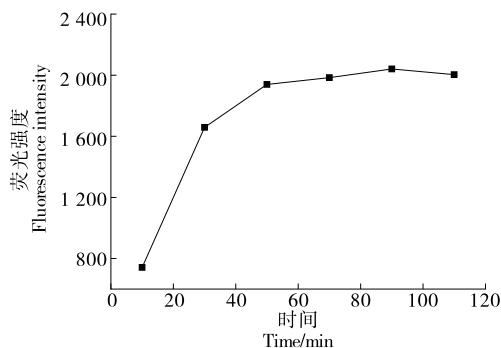


图 6 酶切时间的优化

Figure 6 Optimization of enzyme digestion time

2.5 特异性

为了验证检测方法的特异性,在最优试验条件下,选择甲砒霉素、四环素、土霉素、卡那霉素进行分析检测,浓度均为 1 nmol/L。由图 8 可知,氯霉素与其他抗生素的荧光强度差距明显,表明该适配体传感器具有良好的特异性。

2.6 实际样品加标回收试验

为了验证所构建的适配体传感器在实际样品检测中的准确性,用蜂蜜样品进行加标回收试验,并将检测结果与酶联免疫法进行对比,结果见表 1。由表 1 可知,加标

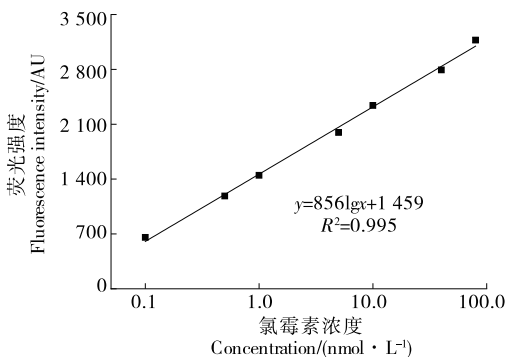


图 7 荧光强度与氯霉素的线性关系

Figure 7 Linear relationship between fluorescence intensity and chloramphenicol

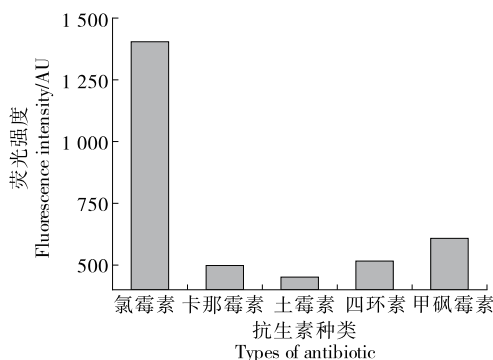


图 8 特异性分析

Figure 8 Selectivity analysis of the constructed aptasensor

表 1 氯霉素加标回收率

Table 1 Recovery results of chloramphenicol detection

样品	添加浓度/ (nmol · L ⁻¹)	检测浓度/ (nmol · L ⁻¹)	加标回 收率/%	酶联免疫法 回收率/%
蜂蜜 1	0.5	0.46	92	91
蜂蜜 2	1.0	0.99	99	103
蜂蜜 3	2.0	1.93	97	94

试验回收率为 92%~99%,酶联免疫法的回收率为 91%~103%,表明方法具有良好的准确性,可用于实际样品检测。

3 结论

研究构建了一种基于 MnO₂ NS 和 Exo-I 酶切扩增的方法检测氯霉素,在最优条件下,检测限达 0.08 nmol/L。检测方法操作简单,特异性好,灵敏度高,在实际样品检测中加标回收率与商用酶联免疫试剂盒保持一致,具有较强的实用性,但酶的活性会受到温度的影响,后续研究可通过加入一定量的多糖等增强酶的稳定性。

参考文献

- [1] AMIR S, SHAWM M, ROBERT L, et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities[J]. Environment International, 2008, 34: 1 215-1 226.
- [2] DU Xin-jun, ZHOU Xiao-nan, WANG Shuo, et al. Development of an immunoassay for chloramphenicol based on the preparation of a specific single-chain variable fragment antibody[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2016, 64: 2 971-2 979.
- [3] ZHU Yu-han, LIU Xin, ZHANG Jing-dong, et al. A cathodic photovoltammetric sensor for chloramphenicol based on BiOI and graphene nanocomposites[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 284: 505-513.

- [4] SANAZ P, JAYTRY M, FREDDY D, et al. Aptasensing of chloramphenicol in the presence of its analogues; Reaching the maximum residue limit[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84: 6 753-6 758.
- [5] JAYTRY M, WOUTER H, JOHAN R, et al. In vitro selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155: 361-369.
- [6] FADI A, GHISLAIN G, WALTER H, et al. Accurate quantitation and analysis of nitrofurantol metabolites, chloramphenicol, and florfenicol in seafood by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Method validation and regulatory samples[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2018, 66: 5 018-5 030.
- [7] BYZOVA N, ZVEREVA E, EREMIN S, et al. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk[J]. *Talanta*, 2010, 81: 843-848.
- [8] VICTORIA S, ABUZAR K, KENNETH G, et al. Fast extraction of amphenicols residues from raw milk using novel fabric phase sorptive extraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 855: 41-50.
- [9] YAN Li, MAO Wei, DING Shi-jia, et al. A simple and sensitive electrochemical aptasensor for determination of Chloramphenicol in honey based on target-induced strand release [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012, 687: 89-94.
- [10] YANG Qian, ZHOU You, GAN Ning, et al. A two dimensional metaleorganic framework nanosheets-based fluorescence resonance energy transfer aptasensor with circular strand-replacement DNA polymerization target-triggered amplification strategy for homogenous detection of antibiotics[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1 020: 1-8.
- [11] YAN Chao, ZHANG Jing, CHEN Wei, et al. Aptamer-mediated colorimetric method for rapid and sensitive detection of chloramphenicol in food[J]. *Food Chemistry*, 2018, 260: 208-212.
- [12] CHEN Ai-liang, YANG Shu-ming. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 71: 230-242.
- [13] YU Zi-qiang, ZHAO Xiao-hong, WANG Zhi, et al. Aptamers in hematological malignancies and their potential therapeutic implications[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016, 106: 108-117.
- [14] TOH S, CITARTAN M, SUBAH C, et al. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 64: 392-403.
- [15] MERAL Y, NAIMAT U, HIKMET B. Trends in aptamer selection methods and Applications [J]. *Analyst*, 2015, 140: 5 379-5 399.
- [16] ZHANG Zi-jie, LIU Jue-wen. New insights into a classic aptamer: Binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45 (13): 7 593-7 601.
- [17] MATIC K, PETER P, HISAE T, et al. Thrombin binding aptamer G-quadruplex stabilized by pyrene-modified nucleotides[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48 (7): 3 975-3 986.
- [18] ZHU Chao, YANG Ge, QU Feng, et al. Evolution of multi-functional capillary electrophoresis for high-efficiency selection of aptamers[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37: 107232.
- [19] 赵旭, 乐琳, 王周平, 等. 基于核酸适配体的镉离子可视化检测方法[J]. *食品与机械*, 2018, 34(6): 35-38.
- [20] 许宙, 唐瑶, 程云辉, 等. 基于磁性纳米材料构建酶联增敏生物传感器检测双酚 A[J]. *食品与机械*, 2017, 33(10): 47-51.
- [21] LI Na, DIAO Wei, ZHANG Ting-ting, et al. MnO₂-modified persistent luminescence nanoparticles for detection and imaging of glutathione in living cells and in vivo[J]. *Chemistry A European Journal*, 2014, 20: 16 488-16 491.
- [22] MENG Hong-min, JIN Zhen, YU Ru-qin, et al. Activatable two-photon fluorescence nanoprobe for bioimaging of glutathione in living cells and tissues[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(24): 12 321-12 326.
- [23] MENG Hong-min, LU Li-ming, TAN Wei-hong, et al. Multiple functional nanoprobe for contrast-enhanced bimodal cellular imaging and targeted therapy [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(8): 4 448-4 454.
- [24] WANG Chun-xia, YU Ping, MAO Lan-qun, et al. MnO₂ nanosheets based fluorescent sensing platform with organic dyes as a probe with excellent analytical properties[J]. *Analyst*, 140: 4 021-4 029.
- [25] HAN Lie, ZHANG Hai-jiao, LI feng, et al. Protein-directed metal oxide nanoflakes with tandem enzyme-like characteristics; Colorimetric glucose sensing based on one-pot enzyme-free cascade catalysis[J]. *Advanced Functional Materia*, 2018, 28: 1800018.