

A Novel Detection Method of Ochratoxin A with Evanescent Wave All-Fiber Aptamer Biosensor

Jun Wu, Wei Li, Feng Long*

School of Environment and Natural Resources, Renmin University of China, Beijing
Email: 2014101500@ruc.edu.cn, *longf04@ruc.edu.cn

Received: May 9th, 2017; accepted: June 9th, 2017; published: June 12th, 2017

Abstract

In this study, using the aptamer with excellent properties, the new and rapid detection methods of Ochratoxin A (OTA) has been developed with an evanescent wave all-fiber biosensor (EWAB). The method based on the high affinity and specificity between pollutants and aptamer, and both complementary strands and OTA completely bound with Cy5.5 labeled OTA aptamer in solution. The quantitative detection of OTA was achieved. The linear detection range of OTA was 0.13 $\mu\text{g/L}$ - 2.89 $\mu\text{g/L}$, and the detection limit was 0.063 $\mu\text{g/L}$. The recoveries of spiked samples were from 80% to 120%. This paper show a high sensitivity, simple and fast detection method.

Keywords

Ochratoxin A, Aptamer, Evanescent Wave All-Fiber Biosensor

基于倏逝波核酸适体生物传感器的赭曲霉毒素A的新型检测方法

吴君, 李伟, 龙峰*

中国人民大学环境学院, 北京
Email: 2014101500@ruc.edu.cn, *longf04@ruc.edu.cn

收稿日期: 2017年5月9日; 录用日期: 2017年6月9日; 发布日期: 2017年6月12日

*通讯作者。

文章引用: 吴君, 李伟, 龙峰. 基于倏逝波核酸适体生物传感器的赭曲霉毒素 A 的新型检测方法[J]. 环境保护前沿, 2017, 7(3): 18-25. <https://doi.org/10.12677/aep.2017.73B003>

摘要

本文结合核酸适体的优异性能,利用前期研发的倏逝波光纤生物传感器(Evanescent Wave All-fiber Biosensor, EWAB),发展了赭曲霉毒素A (OTA)的新型快速检测方法。检测方法基于核酸适体与污染物质的特异性结合能力,利用溶液中的OTA与光纤探头表面的核酸适体互补链共同竞争OTA核酸适体,建立了核酸适体结构竞争法检测OTA的标准曲线,线性检测区间为0.13 $\mu\text{g/L}$ ~2.89 $\mu\text{g/L}$,检测限为0.063 $\mu\text{g/L}$ 。并对实际样品进行了检测,标回收率在80%~120%之间。实验结果表明此方法检测OTA具有良好的灵敏度,检测方法简便快速,并可以较好的应用于实际样品检测中。

关键词

赭曲霉毒素A, 核酸适体, 倏逝波光纤生物传感器

1. 引言

环境监测是环境保护工作中重要的一环,随着环境污染问题的日益严重,环境监测工作者将面临更加严峻的挑战。为应对复杂的分析条件与多样的分析对象,环境监测仪器必须不断发展完善,才能满足日益增大的工作需求[1]。在近年来新兴的监测仪器中,生物传感器因具备简便快速、高灵敏、可实时连续检测的优点而备受瞩目[2]。本研究所使用的倏逝波核酸适体光纤生物传感检测平台(EWAB),利用了倏逝波的光学特性,使用核酸适体作为生物识别元件,以全光纤传感作为信号转换系统,建立了风险污染物的新型快速检测方法。这种检测平台结构简单,器件轻巧便于携带,可进行野外和现场实时监测;具备这些优点的倏逝波核酸适体传感器,为环境检测仪器的的发展提供了一种崭新的思路与方法,具有较好的研究价值。

核酸适体(Aptamer)是通过指数富集系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)人工合成的,高特异性高亲和性的寡核苷酸序列 [3] [4] [5] [6]。其具有不易变性、便于保存与运输、易于筛选合成、易于修饰靶物质范围广泛的优点,而成为新的研究热点 [7]。核酸适体可以通过静电作用力、氢键作用力、疏水堆积作用等,与靶物质特异性结合而形成特殊的空间结构,如 G 四聚体、发夹、茎环、口袋、假节、凸环等,从而形成稳定的复合物 [6]。赭曲霉毒素 A(OTA)是一种真菌毒素次生代谢产物,由真菌(包括曲霉属和青霉属)生长繁殖过程中产生,常见于谷类食品和农作物中,如小麦、玉米、咖啡豆、香料、葡萄酒中、白酒、啤酒豆制品、罐头食品、茶叶中 [8]。赭曲霉毒素 A 具有肾脏毒性、免疫毒性、肝脏毒性、致畸变性 [9] [10], OTA 被国际癌症研究机构(IARC)认为对人类有潜在的致癌性(组 2B)。我国国家食品安全标准中规定赭曲霉毒素 A 的检测标准为:谷类及其加工品、豆类及其加工品中 OTA 不得超过 5 $\mu\text{g/kg}$, 欧盟规定其在谷类中残留限量为 3 $\mu\text{g/kg}$, 辣椒中残留限量为 15 $\mu\text{g/kg}$, 小麦中残留限量为 8 $\mu\text{g/kg}$ [11]。

常见 OTA 的检测方法有:高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC),气相色谱法(Gas Chromatography, GC),毛细管电泳法(Capillary Electrophoresis, CE),薄层色谱法(Thin Layer Chromatography, TLC),光谱法(Spectroscopy Method),酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)等 [12] [13] [14] [15]。这些常见的监测仪器具有灵敏度高、性能稳定成熟等优点,但是当其在实际检测过程中具有一些局限性:如占地大,不能进行原位实时监测;操作繁琐,图谱复杂,需要专业人员进行操作与分析;样品需要前过程处理,分析耗时长;价格昂贵,分析成本高等 [16]。而本研

究利用的 EWAB 可进行快速、高效、简便、结果直观的实时原位检测，弥补了大型仪器在实际应用中的不足，具有广阔的应用前景。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

3-三乙氧基硅丙基琥珀酰胺(TEPSA)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、赭曲霉毒素 A(OTA)购自 Sigma 中国公司。浓硫酸、过氧化氢、甲苯、盐酸购自北京化学试剂公司，均为分析纯或更高。核酸序列购自上海生工集团，序列如下：

Cy5.5 荧光基团标记的 OTA 核酸适体：

5'-Cy5.5-AGATC GGGTG TGGGT GCGT AAAGG GAGCA TCGGA CA-3'

带氨基的 OTA 核酸适体互补链：

5'-NH₂-AAAAAAAAAAAAATGTCCGATGCTC-3'

核酸序列使用前利用离心机进行离心(10,000 rpm × 1 min)，随后用超纯水溶解，震荡混匀，放置在 -20℃ 的冰箱中储存备用。

0.5% SDS 溶液(pH = 1.9)，10 mM Tris-HCl 缓冲溶液(120 mM NaCl + 10 mM CaCl₂ + 5 mM KCl, pH = 6)，以上两种溶液由超纯水配制。

白酒(北京二锅头，清香型，酒精度 56%)瓶装饮用水(农夫山泉)。

多模石英光纤(芯径 600 μm，南京春辉)。

2.2. 实验仪器

本文所采用的仪器为课题组前期研发的便携式倏逝波全光纤生物传感器 [17]。该仪器主要包括器件有：激光器(波长为 635 nm、输出功率为 8 mW)，用于发射激光；单多模光纤耦合器(NA 为 0.22，芯径 600 μm)，用于传递激光、激发与收集荧光，这些过程都在光纤内完成，简化了传光学传感器中的光路系统；样品池，样品池内安装光纤探头，并在其表面固定生物识别元件；蠕动泵，用于自动化进样；滤光片；光电二极管，用于将收集到的荧光信号并进行电信号转换；锁相放大器，适宜放大信号；计算机，用于信号的处理及系统控制。

其工作原理是将生物识别元件固定在光纤探头上，由固定波长的脉冲激光器发射激光，单多模光纤耦合器能够将激光传递至样品池中的光纤探头上，在光纤探头表面将会产生倏逝波，并激发其表面附近生物识别元件的荧光物质，荧光被激发后部分荧光耦合回光纤探头，单多模光纤耦合器将对荧光进行收集，荧光信号将被光电二极管接受并转换为电信号，经锁相放大器将放大信号，通过信号处理系统收集并处理电信号，完成样品的检测。倏逝波的入射距离为几十到几百纳米，因此溶液中游离的荧光分子的干扰较小。本仪器具有轻便、高效、灵敏、操作简便、无需样品前处理、结果表现直观等优点。仪器内部结构示意图与外观图如图 1 所示。

离心机、恒温干燥箱、电子显微镜、氮吹仪。

2.3. 实验方法

2.3.1. 光纤探头的修饰

将 6 cm 长，芯径 600 μm 的石英光纤削去约 3 cm 长的涂覆层，使用 30% 氢氟酸浸泡光纤无涂覆层覆盖部分和部分涂覆层覆盖部位 3 h，氢氟酸液会通过毛细作用腐蚀涂覆层覆盖部分的石英纤芯，与未被涂覆层覆盖的部分形成一定的锥角，得到组合锥形光纤探头。配制 piraha 溶液(v H₂SO₄: v H₂O₂ = 3: 1)，将

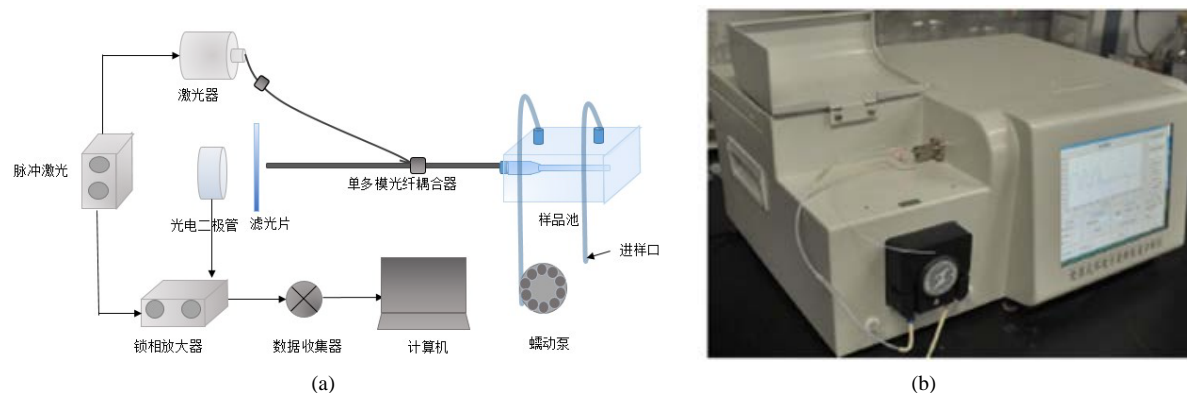


Figure 1. Schematic of evanescent wave all-fiber optic biosensor: (a) Internal structure of EWAB; (b) Appearance of EWAB
图 1. 倏逝波全光纤生物传感器示意图: (a) 内部结构图; (b) 外观图

组合型光纤探头浸入其中 30 min, 随后放入超声波清洗机中洗涤, 并使用超纯水进行清洗, 直至清洗液的 pH 值为中性。使用氮吹仪吹干光纤, 向 15 mL 的比色管中加入 10 mL 2% 的 3-Triethoxysilylpropyl succinic anhydride (TEPSA)/无水甲苯溶液, 将处理好的光纤加入其中反应 2 h, 而后用无水甲苯洗三遍, 用水冲洗三遍, 然后放入纯水中放置 2 h, 此时光纤上修饰了氨基基团; 将羧基化的光纤放入含 50 mM NHS 和 200 mM EDC 的溶液中, 反应 4 h 活化羧基基团; 直接取出活化后的光纤, 放入 500 μ L of 0.5 μ M 带氨基的 OTA 核酸适体互补链溶液(5'-NH₂-AAAAAAAAAAAAATGTCGGATGCTC-3'), 反应过夜, 取出光纤, 用 PBS 缓冲溶液冲洗, 再用 0.5 mg/mL 氨基乙醇封闭光纤, 取出, 放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用(制备过程如图 2)。

2.3.2. 建立检测方法

将修饰完成的光纤探头安装在 EWAB 样品池中, 使用 10 mM Tris 缓冲溶液配制 100 nM Cy5.5 荧光基团标记的 OTA 核酸适体, 将 OTA 核酸适体与缓冲溶液等比例混合, 取 300 μ L 混合液利用蠕动泵通入 EWAB 样品池, 与光纤探头表面的互补链杂交 300 s, EWAB 能够检测到结合在光纤表面的核酸适体的荧光信号, 此时响应的信号值为空白对照值。将 OTA 核酸适体与不同浓度 OTA 标准品等比例混合后, 静置(预反应)适宜时间, OTA 核酸适体与 OTA 将进行特异性结合, 核酸适体发生适应性折叠, 结合位点被占据, 随后取 300 μ L 混合液通入 EWAB 样品池, 与光纤上的杂交链结合 300 s, 记录 EWAB 检测到的荧光信号值, 并与空白对照值进行比较。每组样品重复 3 次, 取平均值。这种方法中光纤探头上的互补链和溶液中 OTA 将同时竞争结合 Cy5.5 标记的 OTA 核酸适体, 因此称这种方法为核酸适体结构竞争法, 原理图如图 3。

2.3.3. 制作标准曲线

按照上述检测方法对 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50 μ g/L 不同浓度梯度的 OTA 标准品进行检测, 平行样品间重复 3 次, 并将 EWAB 检测的荧光信号归一化处理, 使用 origin 软件进行 Logistic 四参数模型(常用生物方法中标准曲线的拟合模型)进行拟合, 获得核酸适体非特异性吸附法检测 OTA 的标准曲线。

2.3.4. 实际样品的检测

本研究选取白酒作为实际样品, 进行两个浓度的 OTA 加标-回收试验。取白酒适量, 使用 10 mM Tris 缓冲溶液稀释 10 倍, 添加 OTA 标准品至稀释后的样品中, 使其浓度为 0.2 μ g/L, 0.75 μ g/L。按照上述实验方法对样品进行检测, 记录荧光信号值。将测得的信号值带入标准曲线拟合所获得方程式中, 进行

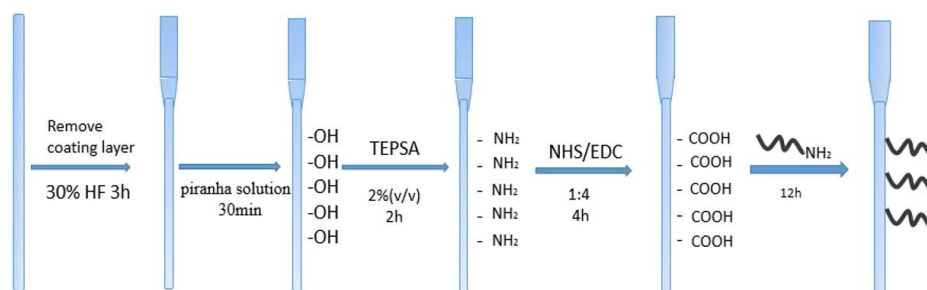


Figure 2. Procedure of optical fiber probe preparation
图 2. 光纤探头的制备步骤示意图

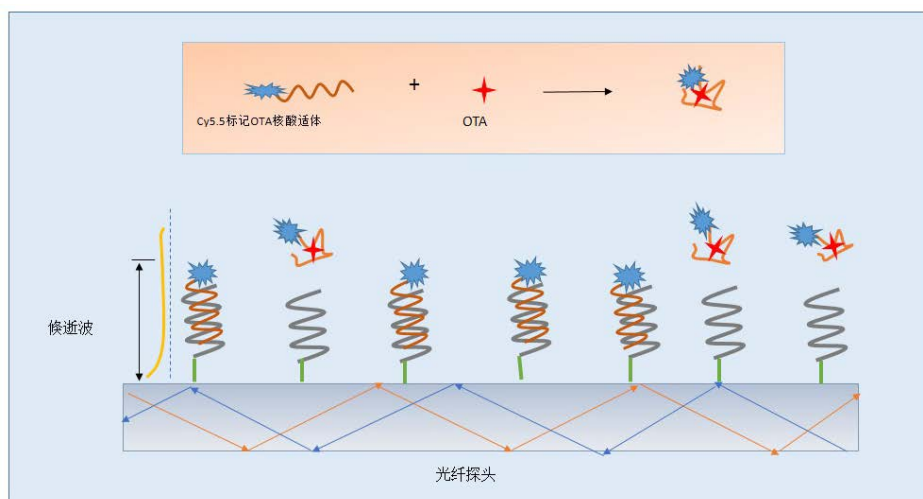


Figure 3. Detection principle diagram of OTA detection based on aptamer structure competition
图 3. 核酸适体结构竞争法检测 OTA 原理示意图

定量计算。对每组平行样品重复 3 次，结果取平均值。

3. 实验结果与讨论

3.1. 建立检测方法与绘制标准曲线

利用 OTA 核酸适体结构竞争法进行 OTA 的检测，EWAB 检测的实时检测曲线如图 4。由图可知，OTA 核酸适体分别与 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA 标准品反应后，EWAB 检测到的荧光信号值发生了不同程度的下降，OTA 标准品的浓度与荧光信号值呈反比关系。这是因为 Cy5.5 标记的核酸适体与 OTA 结合后，结合位点被占据，结构发生了适应性折叠，因此与光纤上的互补链结合量减小，导致 EWAB 检测到的荧光值下降。

随后将检测各浓度 OTA 标准品的荧光信号经归一化处理，通过 origin 软件中 Logistic 四参数模型对曲线进行拟合，模型如下

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (X/X_0)} + A_2 \quad (1)$$

其中 X、是待测物(标准品)的浓度，Y 是 X 对应的信号值； A_1 、 A_2 为常数，分别对应曲线上端渐近线($X = 0$)和下端渐近线($X \rightarrow \infty$)； X_0 是常数，为曲线中点，又称拐点；P 是曲线拐点处斜率，为拟合常数。定

义最大信号的 80%到 20%时的区域为检测区间，最大信号的 90%时浓度值为检测限。

在半对数体系下作出检测 OTA 标准样品的反 S 曲线，如图 5，即为核酸适体结构竞争法使用 100 nM OTA 核酸适体检测 OTA 的标准曲线，线性检测区间为 0.13 $\mu\text{g/L}$ ~2.89 $\mu\text{g/L}$ ，检测限为 0.063 $\mu\text{g/L}$ 。

3.2. 实际样品的检测

根据所绘制的标准曲线，使用核酸适体结构竞争法对白酒中的 OTA 进行加标回收实验，并将所获得的荧光信号值带入绘制标准曲线所得到的公式中进行定量分析。并对样品的加标回收率进行计算，计算方法如下：

$$P(\%) = (C_2 - C_1) / C_3 \times 100\% \quad (2)$$

其中 P 为样品加标回收率； C_1 为样品原始浓度的均值； C_2 为加标后样品浓度的均值； C_3 为实际的加标浓度。

获得检测实际样品中 OTA 的实验结果如表 1。在实际样品检测中，白酒中的加标回收率在 80%~120%

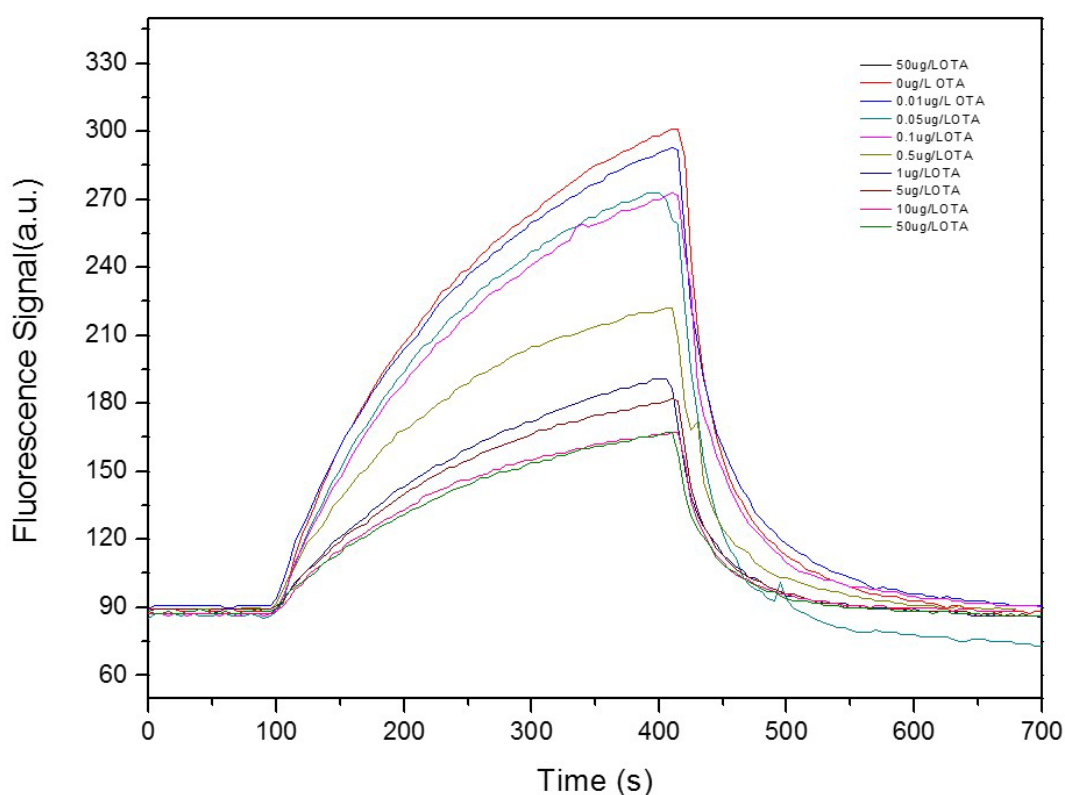


Figure 4. Dose-response curves of OTA under different concentrations by EWAB

图 4. EWAB 响应的不同浓度 OTA 的荧光信号值

Table 1. Result of OTA detection in real drinks sample based on aptamer structure competition

表 1. 核酸适体结构竞争法进行 OTA 实际样品加标-回收实验结果

样品名称	原始浓度($\mu\text{g/L}$)	加标水平($\mu\text{g/L}$)	平均检出水平($\mu\text{g/L}$)	平均回收率(%)
白酒	<0.01	0.2	0.17	80
		0.75	0.84	110.67

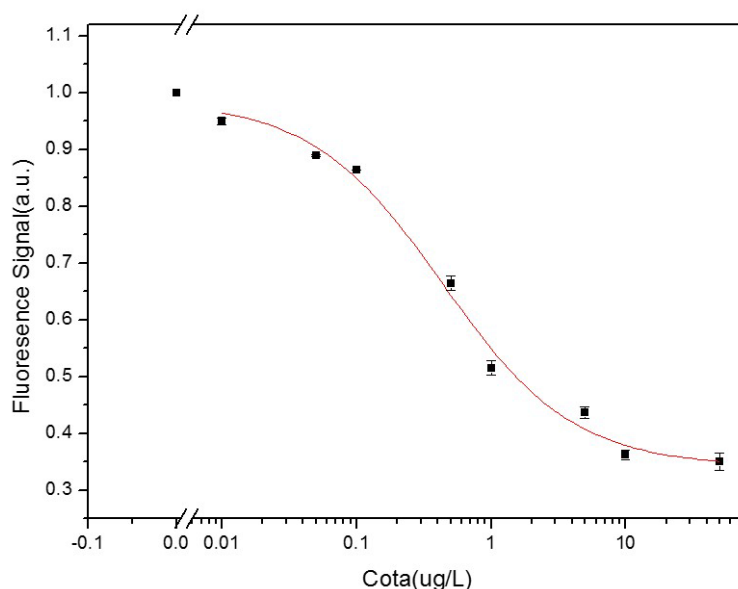


Figure 5. Standard curve of OTA detection based on aptamer structure competition
图 5. 核酸适体结构竞争法检测 OTA 的标准曲线

之间，表明此方法能够较好的应用到实际样品的检测中。

参考文献 (References)

- [1] 罗剑锋. 环境监测与监测技术的发展[J]. 环境与发展, 2014, 26(3): 183-184.
- [2] 马莉萍, 毛斌, 刘斌, 李工农, 韩根亮, 刘国汉. 生物传感器的应用现状与发展趋势[J]. 传感器与微系统, 2009(4): 1-4.
- [3] Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) *In Vitro* Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature*, **346**, 818-822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- [4] Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment. *Science*, **249**, 505-510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>
- [5] Hermann, T. and Patel. D.J. (2000) Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science*, **287**, 820. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.820>
- [6] Liu, X., Li, C.Y. and Chen, Y.D. (2002) Aptamers of Identification and Application in Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Process. *ProgBiochemBiophys*, **29**,855.
- [7] Niazi, J.H., Lee, S.J. and Gu, B. (2008) Single-Stranded DNA Aptamers Specific for Antibiotics Tetracyclines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 7245- 7253. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.06.033>
- [8] 李凤琴, 计融. 赭曲霉毒素 A 与人类健康关系研究进展[J]. 卫生研究, 2003, 32(2): 172-175.
- [9] Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.J., et al. (2006) Toxicokinetics and Toxicodynamics of Ochratoxin A, An Update. *Chemico-Biological Interactions*, **159**, 18. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.106>
- [10] International Agency for Research on Cancer (1993) Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. WHO/IARC, Lyons, 489-521.
- [11] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T B11-2003 谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [12] 陈大义, 余蓉. HPLC 法快速检测咖啡及粮食中赭曲霉毒素 A [J]. 卫生研究, 1999, 27(增刊): 143-145.
- [13] 曾红燕, 黎源倩, 晋军, 等. 毛细管电泳法测定玉米赤霉烯酮及其代谢物[J]. 四川大学学报医学版, 2003, 34(2): 333-336.
- [14] 罗松明, 肖付刚. 粮油食品中真菌毒素的 LC-MS 法检测[J]. 粮食加工, 2007, 32 (3): 95- 99.

-
- [15] 陈雪岚, 许杨, 吴成钢. 赭曲霉毒素 A 的酶联免疫吸附法检测[J]. 卫生研究, 2006, 29(6): 390- 392.
- [16] 竹俊如. 水体中有机污染物的快速检测方法和仪器的研究[D]. 华东师范大学, 2008.
- [17] 龙峰, 施汉昌, 何苗, 朱安娜. 倏逝波荧光免疫传感器在环境检测中的研究进展[J]. 环境科学, 2008(3): 545-550.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: aep@hanspub.org