

# 基于核酸外切酶 III 信号放大的比率型 荧光传感器检测致病菌基因

邓健康<sup>1</sup> 牛晓娟<sup>1</sup> 刘亚青<sup>\*1</sup> 王硕<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>(省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 教育部食品营养与安全重点实验室,  
天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)  
<sup>2</sup>(南开大学医学院, 天津 300071)

**摘要** 食源性致病菌严重威胁着公众健康。本研究基于荧光共振能量转移原理,以 Cy3 和 Cy5 作为荧光供体和受体基团,利用核酸外切酶 III (Exo III) 增强检测信号,构建了比率型荧光传感器,用于高灵敏度检测致病菌基因。分别标记有 Cy3 的 R1-DNA 和标记 Cy5 的 R2-DNA 形成双链 R1/R2,在 Cy3 的激发光波长激发下,由于发生荧光共振能量转移,Cy3 的荧光被猝灭而产生 Cy5 的荧光信号。致病菌靶基因(大肠杆菌 *Lac Z* 基因)的存在可将 R1/R2 双链解旋,使得 Cy3 远离 Cy5,导致 Cy3 的荧光恢复而 Cy5 的荧光信号降低。在 Exo III 作用下,Cy3 与 Cy5 的信号变化进一步增大。在优化的实验条件下,荧光信号变化与靶基因在 10 ~ 2000 pmol/L 浓度范围内呈现良好的线性关系,检出限为 5.29 pmol/L。所采用的比率型信号检测策略极大地降低了假阴性、假阳性检测结果的产生,增强了检测特异性。

**关键词** 大肠杆菌;致病菌基因;荧光共振能量转移;核酸外切酶 III;比率型荧光生物传感器

## 1 引言

食源性致病菌被公认为是影响全球食品安全的首要问题。食品中常见的致病菌有弯曲杆菌 (*Campylobacter spp.*)、单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌 (*Salmonella spp.*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 及大肠杆菌 (*Escherichia coli*)<sup>[1,2]</sup>。食用致病菌污染的食物可导致胃肠道疾病,严重的会损害脑及内脏器官,甚至引起死亡<sup>[3]</sup>,严重威胁着公众健康,并导致重大经济损失<sup>[4]</sup>。高灵敏检测致病菌已经成为确保食品安全和质量的重要手段。

目前常用的食源性致病菌检测方法有传统微生物检验法<sup>[5]</sup>、免疫学检测方法<sup>[6]</sup>和快速基因检测技术<sup>[7-9]</sup>等。传统的检测方法不仅操作复杂、耗时长,且灵敏度较低,不能满足目前食品安全快速检测的要求。检测致病菌的特定序列核酸具有重要意义,发展简单、快速、灵敏度高和准确性好的致病菌基因检测方法已成为研究热点<sup>[10]</sup>。等温扩增策略已广泛应用于核酸检测中<sup>[11]</sup>,其中核酸外切酶 III 信号放大是近年来采用较多的灵敏检测方法,此策略操作简便、易于设计,核酸外切酶 III 无需特定识别位点,作用于双链 DNA,沿 3'端逐步催化去除单核苷酸,对 3'突出末端双链 DNA 或单链 DNA 无活性<sup>[12]</sup>。

荧光检测方法具有灵敏度高、易操作等优势,在许多领域应用广泛。目前所发展的检测致病菌基因的荧光生物传感器通常只有单一信号输出,仅可基于检测信号增高 (Signal-on) 或者基于检测信号降低 (Signal-off),可能会出现假阳性或假阴性的检测结果<sup>[2,5,8,9,13,14]</sup>。而具有两种荧光检测信号的比率型生物传感器则可克服以上不足。靶分子的存在会引起一种荧光基团信号增强,而另一种荧光基团信号降低,该策略不仅可提高检测灵敏度,还可增强检测特异性<sup>[14-16]</sup>。荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理已广泛用于检测 DNA<sup>[8]</sup>、RNA<sup>[14,17]</sup>、金属离子<sup>[18]</sup>、双酚 A (Bisphenol A)<sup>[19]</sup>、细菌<sup>[20]</sup>等,在生物、食品和医学等领域具有重要的意义<sup>[20]</sup>。本研究发展了一种基于核酸外切酶 III 信号放大的比率型荧光生物传感器用于致病菌基因检测,比率型检测策略提高了检测灵敏度和选择性,建立的检测方法在食品安全监管等方面具有良好的应用前景。

2018-02-03 收稿;2018-03-13 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos. 21775108, 21575138) 资助

\* E-mail: yaqingliu@tust.edu.cn; wangshuo@nankai.edu.cn

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Lumina 荧光分光光度仪、EV300 紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);5804R 高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Bio-rad ChemDoc XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

乙酸(HAc)、HCl、NaCl(国药集团化学试剂有限公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、丙烯酰胺、乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、硼酸(美国 Sigma-Aldrich 公司);过硫酸铵、SYBR Gold(北京索莱宝科技有限公司);核酸外切酶 III、NE Buffer 1(美国 New England Biolabs 公司)。试剂均为分析纯;实验用水为超纯水( $>18.25 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ );所有核酸序列均由上海生物生工有限公司合成,其序列见表 1。

表 1 本研究中使用的 DNA 序列

Table 1 DNA sequences used in this study

名称 Name	DNA 序列(5'→3') DNA sequences(5'→3')	名称 Name	DNA 序列(5'→3') DNA sequences(5'→3')
<i>Lac Z gene</i>	<i>TGCCGCTCATCCGCCACATATCCTG</i>	<i>inv A</i>	ATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGATTT GAAGGCCGGTATT
R1	5' C <sub>y</sub> 3 <b><i>ATGTGGCGGATGAGCGGCA</i></b>	<i>eae A</i>	GTCACAGTTGCAGGCCTGGTTACAACATTATG
R2	<b><i>TCATCCGCCACATTTTTTTTTTTT</i></b> 3' C <sub>y</sub> 5	<i>mec A</i>	ATTGGGATCATAGCGTCATT
T <sub>0</sub> R2	TCATCCGCCACAT3' C <sub>y</sub> 5	M1	<u>T</u> CCCGTTCATCCGCCACAT ATCCTG
T <sub>5</sub> R2	TCATCCGCCACATTTTTT3' C <sub>y</sub> 5	M2	<u>T</u> CTCGTTCATCCGCCACAT ATCCTG
T <sub>20</sub> R2	TCATCCGCCACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT3' C <sub>y</sub> 5	M3	<u>T</u> CTAGTTCATCCGCCACAT ATCCTG
<i>nuc A</i>	GGTGTAGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCA	M4	<u>T</u> CTATCTCATCCGCCACAT ATCCTG

注: *Lac Z* 基因中斜体部分为与 R1 互补的序列;斜体加粗部分为 R1 和 R2 部分;带下划线的碱基为错配碱基。

The italic portion in *Lac Z* gene is complementary to R1 DNA. The italic and bold portion of R1 DNA is complementary to R2 DNA. The underlined bases are mismatched bases.

### 2.2 实验方法

**2.2.1 DNA 浓度测定** DNA 浓度以单链浓度表示,利用紫外-可见分光光度计测定 DNA 在 260 nm 处的吸光度,根据朗伯比尔定律( $A = \epsilon bc$ )计算得 DNA 的浓度( $\epsilon_{260 \text{ nm}} [ \text{L}/(\text{mol cm}) ]$ ):  $A = 15400$ ,  $G = 11500$ ,  $C = 7400$ ,  $T = 8700$ )。最后配制成 10  $\mu\text{mol/L}$  的溶液,于  $-20^\circ\text{C}$  保存待用。

**2.2.2 20% 中性聚丙烯酰胺凝胶电泳** DNA 终浓度为 300 nmol/L,施加电压为 110 V,时间为 2 h。聚丙烯酰胺凝胶经 SYBR Gold 染色 30 min 后进行凝胶成像。

**2.2.3 样品检测** 10  $\mu\text{mol/L}$  R1 和 10  $\mu\text{mol/L}$  R2,由 NE Buffer 1 定容,置于 1.5 mL 棕色离心管中,  $95^\circ\text{C}$  下加热 5 min,缓慢降至室温(降温时间至少 3 h),使 R1 和 R2 序列充分杂交。将 R1/R2(终浓度 100 nmol/L)、不同浓度的待测样品(*Lac Z*)与 10 U Exo III 混合,加入 20  $\mu\text{L}$  10 $\times$ NE Buffer 1,加水定容至终体积为 200  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育,酶解反应 80 min 后,  $80^\circ\text{C}$  孵育 20 min,使酶失活,待混合液降至室温后在 512 nm 激发波长下测定其的荧光发射光谱,光谱测定范围为 532 ~ 750 nm,激发光和发射光狭缝宽度为 20 nm。待测样品重复测定 3 次。

## 3 结果与讨论

### 3.1 检测原理

发生有效能量转移的供体-受体对之间,要求供体的发射光谱与受体的吸收光谱有重叠,其能量转移效率与供体和受体之间的距离密切相关,通常发生在 10 nm 的距离之内<sup>[22]</sup>。本研究选择 Cy3 和 Cy5 作为荧光共振能量转移的能量供体和受体,为了验证在本实验体系下是否能满足荧光共振能量转移,分别测定了 Cy3 和 Cy5 的吸收和发射波谱。如图 1 所示,Cy3 的最大激发波长为 512 nm,在此波长激发下,Cy3 的发射波长在 558 nm 处达到最大值,而 Cy5 的吸收波长范围则在 532 ~ 750 nm 之间,其最大发射波长为 671 nm。Cy3 发射光谱与 Cy5 的吸收光谱重叠。由此可知,荧光共振能量转移可发生在分别

作为供体和受体的 Cy3 与 Cy5 之间<sup>[23]</sup>。荧光共振能量转移效率与荧光供体受体间的距离紧密相关<sup>[24]</sup>。基于 DNA 的距离可控性,将 Cy3 和 Cy5 分别标记在不同的 DNA 序列,通过调控 DNA 序列的碱基数可以实现供体与受体间距离的调控。

本研究以大肠杆菌基因(*Lac Z* 基因)为模型靶分子,检测原理如图 2A 所示。与致病菌基因(*Lac Z*)完全互补的 DNA 序列(R1)5'端标记 Cy3 染料,R1 与其部分互补的 DNA 序列(R2)形成 DNA 双链(R1/R2),R2 序列 3'端标记有 Cy5 染料。R1/R2 双链形成使 Cy3 和 Cy5 距离靠近,形成有效的荧光共振能量转移体系。R1/R2 中的 3'端突出,有效防止被 Exo III 降解。在 Cy3 的激发波长激发下,由于 FRET 效应检测到 Cy5 的发射光谱。在 *Lac Z* 基因存在时,由于 R1 与 *Lac Z* 结合能力大于其与 R2 的结合能力,*Lac Z* 引发 Toehold 介导的链置换反应(Toehold-mediated strand displacement reaction)<sup>[25]</sup>,*Lac Z* 将 R1 从 R1/R2 双链中置换下来,从而形成 R1 的 3'端为平末端的 R1/*Lac Z* 双链结构,使得 Cy3 远离 Cy5,由于距离的增大消除了该荧光对之间的 FRET 效应,Cy5 的荧光信号强度降低,而 Cy3 的荧光信号则增强。另一方面所形成的 R1/*Lac Z* 双链中 R1 为 3'端为平末端,这种情况下 Exo III 可将 R1 降解,从而释放 *Lac Z*,释放出的 *Lac Z* 可再次与 R1/R2 发生链置换反应,由此引发循环反应,不断产生游离的 Cy3,使得 Cy3 的荧光信号增强得到进一步放大,而 Cy5 的荧光信号则进一步被降低。基于两种荧光信号强度的比值,最终实现对致病菌基因的高灵敏度比率检测。

为验证原理的可行性,测定了反应体系的荧光光谱。如图 2B 所示,在 R1 和 R2 分别存在情况下,以 Cy3 的激发波长 512 nm 对体系进行激发,含有 R1 (标记有 Cy3)的体系只检测到 Cy3 的荧光响应(最大发射波长位于 558 nm,图 2B, a),而含有 R2 的体系(标记有 Cy5)则无明显的荧光发射响应(图 2B, b),而在 558 nm 激发下,Cy5 在 671 nm 处有较强的荧光响应(图 2B, d)。在形成 R1/R2 双链后使得 Cy3 接近 Cy5,此时以 512 nm 的波长激发,Cy3 的发射光强度降低,而 Cy5 发射光强度增强(图 2B, c),证明 Cy3 和 Cy5 之间发生了荧光共振能量转移<sup>[24]</sup>。在加入致病菌 *Lac Z* 基因后,形成的 R1/*Lac Z* 中的 R1 被 Exo III 降解,使得 Cy3 的荧光发射强度恢复,而 Cy5 荧光发射强度降低(图 2B, e)。

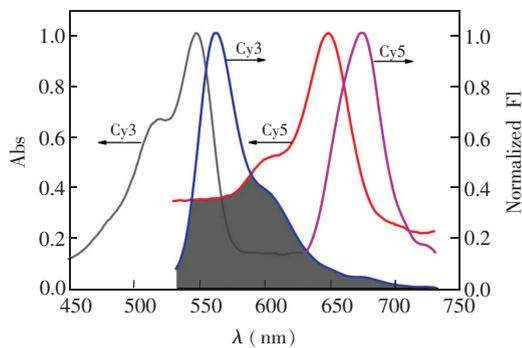


图 1 Cy3 和 Cy5 的紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱图

Fig. 1 Absorption spectra and fluorescence emission spectra of Cy3 and Cy5

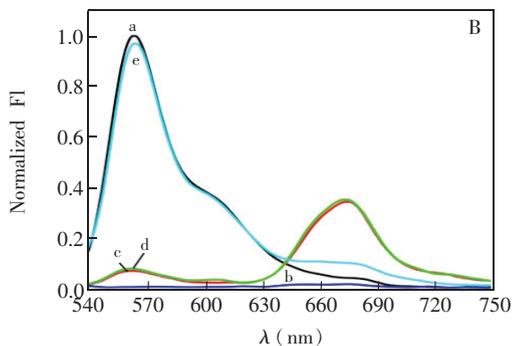
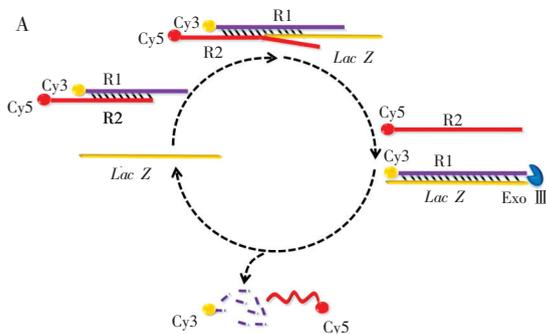


图 2 (A) 基于 Exo III 信号放大比率型生物传感器用于致病菌基因(*Lac Z* 基因)检测原理图;(B) 传感体系中存在 R1 (a, 512 nm 激发)、R2 (b, 512 nm 激发)、R1/R2 (c, 512 nm 激发)、R2 (d, 558 nm 激发)和 *Lac Z*-R1/R2 (e, 512 nm 激发)的荧光光谱图。

Fig. 2 (A) Schematic principle of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based ratiometric biosensor for *Lac Z* gene detection with Exo III amplification strategy. (B) fluorescence spectra of enzymatic reaction system in the presence of R1 (a, Excitation: 512 nm), R2 (b, Excitation: 512 nm), R1/R2 (c, Excitation: 512 nm), R2 (d, Excitation: 558 nm) and *Lac Z*-R1/R2 (e, Excitation: 512 nm)

以上实验结果证明所设计的检测策略是可行的。

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步证明了 DNA 序列间的相互反应。如图 3 所示,泳道 1-3 分别是 *Lac Z*、R1 和 R2, R2 条带染色浅,原因可能是二级构象导致 SYBR Gold 染色存在差异。R1 和 R2 形成双链 R1/R2 后出现一条新的条带(泳道 4),由于 R1/R2 结构不满足 Exo III 发挥酶切作用的条件,因此在加入 Exo III 后仍以双链形式存在(泳道 8)。将 *Lac Z* 加入至 R1/R2 反应(泳道 6), R1/R2 条带消失,一个条带出现在 R2 位置,另一条带则出现在新的位置,与 R1/*Lac Z* 双链位置相同(泳道 5),说明 *Lac Z* 成功地将 R1 从 R1/R2 中置换,形成了 R1/*Lac Z* 双链。在此基础上加入 Exo III,在酶的作用下,出现了一条较宽的条带(泳道 7),由于 *Lac Z* 和 R2 位置接近(泳道 1, 3),因此推断较宽的条带为 *Lac Z* 和 R2 重合的结果。上述实验结果证明, DNA 链间相互反应按照所预计方式发生,再次证明所设计实验的可行性。

### 3.2 实验条件优化

能量供体和受体间的距离对荧光共振能量转移效率起着至关重要的作用<sup>[26]</sup>。因此,通过改变 DNA 序列的碱基数量对 Cy3-Cy5 间的距离进行了优化。本实验设计了具有不同链长的 T<sub>0</sub>R2、T<sub>5</sub>R2、R2 和 T<sub>20</sub>R2(具体序列见表 1), R1-DNA 序列分别与上述 DNA 序列退火后充分杂交,对应形成双链 R1/T<sub>0</sub>R2、R1/T<sub>5</sub>R2、R1/R2 和 R1/T<sub>20</sub>R2, Cy3 和 Cy5 之间分别相距 0、5、10 和 20 个碱基。以 Cy3 的激发波长激发,以 Cy5 与 Cy3 的最大发射波长比值( $F_{671}/F_{558}$ )为检测信号,如图 4A 所示,由于间隔距离不同导致 Cy3 和 Cy5 的荧光强度比值  $F_{671}/F_{558}$  差异较大。碱基数为 10 时  $F_{671}/F_{558}$  达到最大值,即 Cy3 至 Cy5 荧光共振能量转移效率最佳,因此,选择 Cy3 和 Cy5 之间具有 10 个碱基的距离用于后续实验。进一步实验证明 Cy3-Cy5 荧光信号比较稳定,不易受缓冲溶液影响(图 4B)。因此,本研究选择适于 Exo III 发挥作用的 NE Buffer 1 (pH 7.0) 作为反应缓冲液。为获得最佳检测结果,对检测体系中 Exo III 用量及反应时间进行优化。结果表明,Exo III 用量对检测型号放大效果有明显影响<sup>[10,27-29]</sup>。随着 Exo III 用量增加,  $F_{558}/F_{671}$  呈增大的趋势(图 4C),酶用量为 10 U 时,  $F_{558}/F_{671}$  达到最大值,酶用量为 20 U 时,  $F_{558}/F_{671}$  不再增大,为节省成本且保证检测效果,后续实验选择 10 U 作为 Exo III 酶反应的最佳用量。反应时间是影响酶反应效果的重要参数之一。如图 4D 所示,随反应时间延长,  $F_{558}/F_{671}$  逐渐增大,反应时间在 80 min 时,  $F_{558}/F_{671}$  达到最大值,说明反应 80 min 后,反应已经达到平衡。为保证酶反应充分和检测效率,选取 80 min 作为 Exo III 酶反应的最佳反应时间。

### 3.3 基于比率型生物传感器高灵敏检测致病菌基因

在上述优化的实验条件下,以 *Lac Z* 基因(大肠杆菌基因)为靶基因进行定量检测。在构建的传感体系中加入不同浓度的靶基因 *Lac Z*,随着 *Lac Z* 浓度的增大, *Lac Z* 与更多的 R1 结合形成 3'-平末端的 *Lac Z*/R1 双链,使 R1 被 Exo III 酶降解,对应的 Cy3 荧光信号强度增强而 Cy5 荧光信号强度降低,释放的 *Lac Z* 可再次取代 R 形成双链 *Lac Z*/R1,从而实现信号变化放大(图 5A)。以  $F_{558}/F_{671}$  为纵坐标, *Lac Z* 浓度为横坐标做散点图并进行线性拟合,  $F_{558}/F_{671}$  与 *Lac Z* 浓度在 10 ~ 2000 pmol/L 范围内呈线性关系(图 5B),回归方程为  $Y=0.00428X+0.76486$ ,相关系数  $R^2=0.9991$ ,按  $S/N=3$  计算得本方法的检出限(LOD)为 5.29 pmol/L。与文献[8,30-32]相比,本方法具有更好的检测灵敏度。

### 3.4 采用构建的比率型生物传感器特异性检测致病菌基因

为验证本检测方法的特异性,选取其它致病菌基因序列(*nuc A* 基因(金黄色葡萄球菌)<sup>[33]</sup>、*inv A* 基因(沙门氏菌)<sup>[9]</sup>、*eae A* 基因(大肠杆菌 O157:H7)<sup>[13]</sup> 和 *mec A* 基因(金黄色葡萄球菌)<sup>[8]</sup>)进行验证。如图 6A 所示,只有靶基因 *Lac Z* 可引起明显的信号变化,而所构建传感体系对其它致病菌基因没响应,

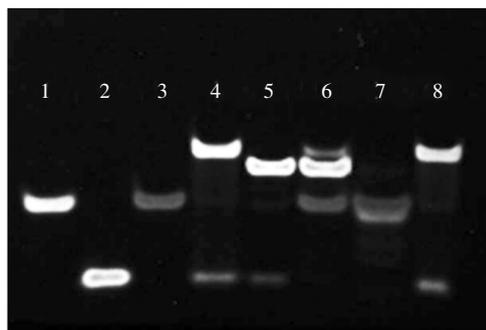


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳证明 DNA 间反应

Fig. 3 Gel electrophoresis verification of DNA interaction

Lane 1-8; 1. *Lac Z*; 2. R1; 3. R2; 4. R1/R2; 5. R1/*Lac Z*; 6. *Lac Z*-R1/R2 without Exo III; 7. *Lac Z*-R1/R2 with Exo III; 8. R1/R2 with Exo III.

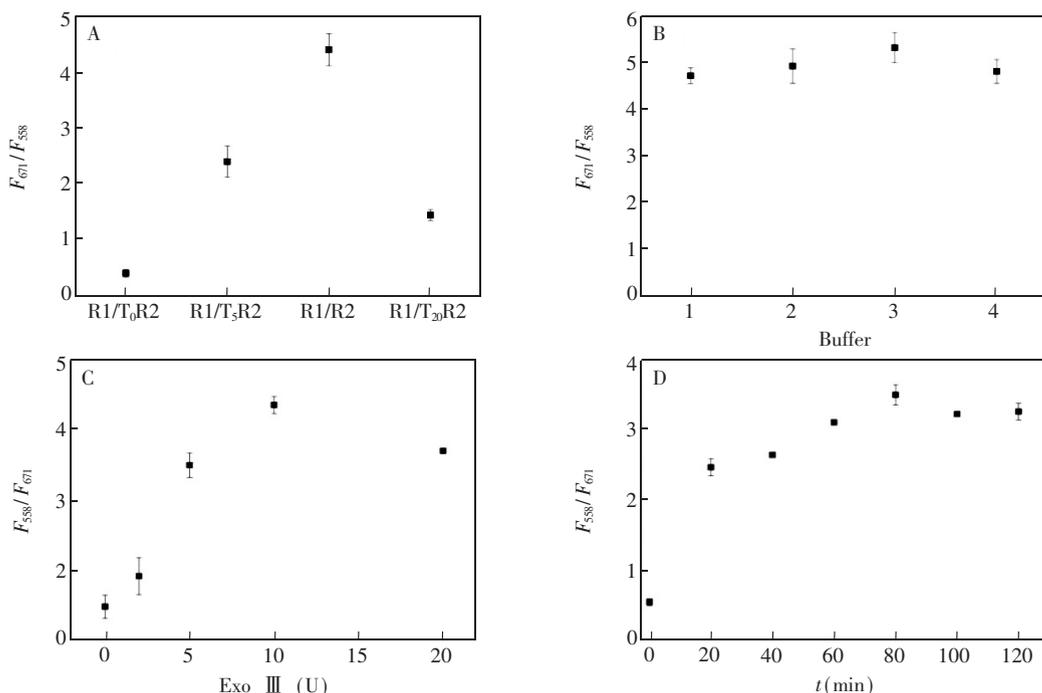


图 4 (A) 调控 Cy3-Cy5 供体和受体的距离 (R1/T<sub>0</sub>R2, 距离:0 个碱基; R1/T<sub>5</sub>R2, 距离:5 个碱基; R1/R2, 距离:10 个碱基; R1/T<sub>20</sub>R2, 距离:20 个碱基)。 (B) 不同缓冲液对 Cy3-Cy5 荧光共振能量转移效率的影响, 1~4: PBS (pH 7.4); 20 mmol/L Tris-HAc, 100 mmol/L NaCl (pH 7.4); 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl (pH 7.4); NE Buffer 1 (pH 7.0)。 Exo III 酶添加量 (C) 和反应时间 (D) 对传感器检测性能的影响。

Fig. 4 (A) Optimization of Cy3-Cy5 distance by modulating number of DNA bases (R1/T<sub>0</sub>R2, 0 base; R1/T<sub>5</sub>R2, 5 bases, R1/R2, 10 bases and R1/T<sub>20</sub>R2, 20 bases); (B) Effects of different buffer solution on FRET efficiency between Cy3 and Cy5. 1 to 4: PBS (pH 7.4); 20 mmol/L Tris-HAc, 100 mmol/L NaCl, (pH 7.4); 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl (pH 7.4); NE Buffer 1 (pH 7.0).  $F_{588}/F_{671}$  ratio of sensing system as a function of concentraion of Exo III (C) and reaction time (D).

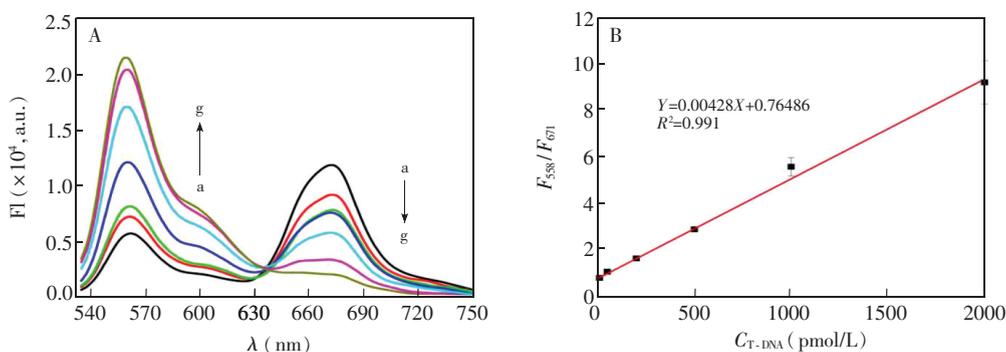


图 5 (A) 不同浓度 *Lac Z* 基因对所构建生物传感体系荧光强度的响应变化 (a~g 依次为 0、10、50、200、500、1000 和 2000 pmol/L)。 (B)  $F_{588}/F_{671}$  与 *Lac Z* 基因浓度的线性关系。

Fig. 5 (A) Fluorescence spectra of sensing system for detection of *Lac Z* gene; 0, 10, 50, 200, 500, 1000 and 2000 pmol/L (a-g). (B) Relationship between  $F_{588}/F_{671}$  and concentrations of *Lac Z* gene.

证明其对 *Lac Z* 基因具有良好的选择性。另外, 所构建生物传感器具有良好的区分碱基错配的能力。如图 6B 所示, 单碱基错配的 DNA (M1) 序列引起的传感体系信号的变化明显低于靶基因引起的信号变化, 而双碱基错配 (M2)、三碱基错配 (M3) 及四碱基错配 (M4) 的 DNA 序列引起的荧光信号变化更低。

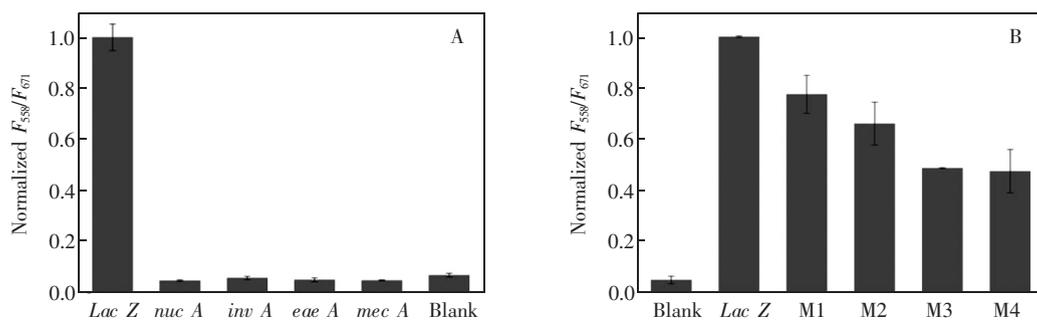


图 6 (A) 对不同致病菌基因序列的荧光响应(浓度均为 2 nmol/L); (B) 对不同碱基错配 DNA 序列的荧光响应(浓度均为 2 nmol/L), 从左至右: 空白, *Lac Z* gene, 1~4 个碱基错配序列(M1, M2, M3, M4)

Fig. 6 Fluorescent responses of (A) *Lac Z* gene and other pathogen genes (2 nmol/L each) and (B) various DNA sequences (2 nmol/L each), from left to right: blank, *Lac Z* gene, M1, M2, M3 and M4

## 4 结论

建立了一种基于核酸外切酶 III 信号放大的比率型荧光传感器, 可用于高灵敏度、高特异性检测致病菌基因。通过调控 DNA 序列, 对荧光受体-给体对 (Cy3-Cy5) 之间的距离进行了可控调节, 确定了最优距离, 提高了共振能量转移效率, 有利于检测灵敏度的提高, 对荧光共振能量转移生物传感器的构建具有一定的参考意义。与酶切信号循环放大策略相结合, 进一步提高了检测灵敏度, LOD 值为 5.29 pmol/L。所构建生物传感器表现出良好的特异性, 可对不同致病菌基因及碱基错配序列进行区分。比率型生物传感器的构建还有利于降低外界环境对检测体系的影响, 从而提高检测准确性。本方法为食源性致病菌高灵敏度、高特异性检测提供了有益参考。

## References

- Wang Y, Salazar J K. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, **2016**, 15(1): 183-205
- Liao Y H., Zhou X M, Xing D. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, 6(13): 9988-9996
- Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, Tauxe R V, Widdowson M A, Roy S L, Jones J L, Griffin P M. *Emerg. Infect. Dis.*, **2011**, 17(1): 7-15
- Martinez-Espinoza A. *Georgia Plant Disease Loss Estimates 2013*. University of Georgia, **2015**: 102-103
- Zunabovic M, Domig K J, Kneifel W. *LWT Food Sci. Technol.*, **2011**, 44(2): 351-362
- Cho I H, Irudayaraj J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, 405(10): 3313-3319
- Li F Q, Yu Z G, Qu H C, Zhang G L, Yan H, Liu X, He X J. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 68: 78-82
- Shi J Y, Chan C Y, Pang Y, Ye W W, Tian F, Lyu J, Zhang Y, Yang M. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 67: 595-600
- Yan Y R, Ding S J, Dan Z, Yuan R, Zhang Y H, Cheng W. *Sci. Rep.*, **2016**, 6: 18810
- LIU Yu-Fei, XUE Jin-Tao, YAN Hui-Juan, YANG Li-Juan, LIU Wei, SUN Xiang-De. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2017**, 45(3): 303-308
- 刘宇飞, 薛金涛, 闫慧娟, 杨丽娟, 刘巍, 孙祥德. *分析化学*, **2017**, 45(3): 303-308
- Souii A, M'hadheb-Gharbi M B, Gharbi J. *Food Sci. Biotechnol.*, **2016**, 25(1): 11-20
- Sun Y D, Peng P, Guo R Y, Wang H H, Li T. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 104: 32-38
- Chen S H, Wu V C H, Chuang Y C, Lin C S. *J. Microbiol. Methods*, **2008**, 73(1): 7-17
- Cheglakov Z, Cronin T M, He C, Weizmann Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(19): 6116-6119
- Lu H Z, Xu S F. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 92: 147-153
- Quan K, Huang J, Yang X H, Yang Y J, Ying L, Wang H, Xie N L, Ou M, Wang K M. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(11): 5857-5864
- Yang Y J, Huang J, Yang X H, Quan K, Wang H, Ying L, Xie N L, Ou M, Wang K M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(26): 8340-8343

- 18 Yang Y J, Huang J, Yang X H, Quan K, Xie N L, Ou M, Tang J L, Wang K M. *Chem. Commun.*, **2016**, 52(76): 11386–11389
- 19 Zhu Y Y, Cai Y L, Xu L G, Zheng L X, Wang L M, Qi B, Xu C L. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7(14): 7492–7496
- 20 Jin B R, Wang S R, Lin M, Jin Y, Zhang S J, Cui X Y, Gong Y, Li A, Xu F, Lu T J. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 90: 525–533
- 21 Santos M C D, Hildebrandt N. *TrAC-Trend Anal. Chem.*, **2016**, 84: 60–71
- 22 Shi J Y, Tian F, Lyu J, Yang M. *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3(35): 6989–7005
- 23 Jia X T, Chen Q Q, Yang Y F, Tang Y, Wang R, Xu Y F, Zhu W P, Qian X H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138(34): 10778–10781
- 24 Cunningham P D, Khachatryan A, Buckhout-White S, Deschamps J R, Goldman E R, Medintz I L, Melinger J S. *J. Phys. Chem. B*, **2014**, 118(50): 14555–14565
- 25 Xu Y Y, Zhou W J, Zhou M, Xiang Y, Yuan R, Chai Y Q. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 64: 306–310
- 26 Ma C P, Zhang M H, Chen S, Liang C, Shi C. *Analyst*, **2016**, 141(10): 2883–2886
- 27 Nie H J, Huang H F, Li W, Yang T. *Anal. Sci.*, **2016**, 32(11): 1245–1250
- 28 Zhao X H, Ma Q J, Wu X X, Zhu X. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 727(10): 67–70
- 29 Liu Z C, Zhang L, Zhang Y M, Liang R P, Qiu J D. *Sens. Actuators B*, **2014**, 205(205): 219–226
- 30 Loaiza ó A, Campuzano S, Pedrero M, Pingarrón J M. *Talanta*, **2007**, 73(5): 838–844
- 31 Liu X Q, Wang F, Aizen F, Yehezkeili O, Willner I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(32): 11832–11839
- 32 Aoki H, Tao H. *Analyst*, **2007**, 132(8), 784–791
- 33 Costa A M, Kay I, Palladino S. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **2005**, 51(1): 13–17

## A Ratiometric Fluorescent Biosensor Based on Exonuclease III Amplification Strategy for Pathogenic Bacterial Gene Detection

DENG Jian-Kang<sup>1</sup>, NIU Xiao-Juan<sup>1</sup>, LIU Ya-Qing<sup>\*1</sup>, WANG Shuo<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Key laboratory of Food Nutrition and Safety (Ministry of Education), College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

<sup>2</sup>(School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300457, China)

**Abstract** Food-borne pathogenic bacteria seriously threaten public health. Based on the mechanism of fluorescence resonance energy transfer (FRET), a ratiometric fluorescence biosensor was constructed by integration of Exo III-based signal amplification strategy. The Cy3 labeled R1-DNA firstly hybridized with Cy5 labeled R2-DNA to form duplex of R1/R2. Cy3 showed a low fluorescence response while Cy5 showed a high fluorescence response. The addition of target pathogenic bacterial gene (*Lac Z* gene) could de-hybridize the R1/R2, resulting in the fluorescence decreasing of Cy5 and the fluorescence recovering of Cy3. Under the assistance of Exo III, the signal change was further amplified. The detection of limit reached as low as 5.29 pmol/L. The linear detection range was from 10 pmol/L to 2000 pmol/L. The developed ratiometric detection strategy significantly reduced the possibility of false-positive and false-negative detection results.

**Keywords** *Escherichia coli*; Pathogenic bacterial gene; Fluorescence resonance energy transfer; Exonuclease III; Ratiometric fluorescence biosensor

(Received 3 February 2018; accepted 13 March 2018)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21775108, 21575138).