

基于多聚腺嘌呤的二嵌段寡核苷酸探针用于卡那霉素 可视化检测

席玥¹ 王欣雨¹ 王汇元¹ 颜娟^{*1,2,3}

¹(上海海洋大学食品学院, 上海 201306) ²(上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

³(农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306)

摘 要 单链 DNA(Single-stranded DNA, ssDNA)在未修饰的裸金纳米颗粒(AuNPs)上的吸附已成为基于核酸分子的比色分析的常用机制。本研究设计了一段包含多聚腺嘌呤(polyA₂₀)尾部序列的二嵌段寡核苷酸探针(dP),构建了一种免标记的 AuNPs 比色生物传感器用于检测卡那霉素(Kanamycin, Kana)。在卡那霉素存在的情况下,磁珠@双链 DNA(MBs@dsDNA)复合物上的卡那霉素适配体序列(Kana-Apt)与其特异性结合,导致 dP 从磁珠表面释放。由于 polyA₂₀ 与 AuNPs 之间有强吸附亲和力, dP 被吸附在 AuNPs 表面,从而在高盐环境中保护 AuNPs 不发生团聚。与具有相同碱基数量的随机序列(Random sequence, RS)相比,利用含有 polyA₂₀ 尾部序列的 AuNPs 比色策略对卡那霉素的检测灵敏度提高了 2 个数量级。此比色传感器对卡那霉素的线性检测范围为 0.01~1 nmol/L,检出限(LOD, S/N=3)为 0.01 nmol/L。本方法无需大型仪器及其它信号放大策略,具有较高的灵敏度和特异性,适用于现场大批量样品的快速、可视化和实时检测,为其它抗生素以及影响食品安全的化学污染物的可视化检测提供了新思路。

关键词 卡那霉素; 金纳米颗粒; 核酸适配体; 生物传感器; 食品安全

卡那霉素(Kanamycin, Kana)是一种用于预防和治疗微生物感染的广谱氨基糖苷类抗生素,被用作农业和畜牧业中的饲料添加剂和兽药^[1]。然而,滥用卡那霉素的现象屡见不鲜,导致其在动物源性食品中残留,进而经由食物链进入人体,通过积累效应危害公众健康^[2]。我国国家标准《食品安全国家标准食品中农药最大残留限量》(GB 31650—2019)^[3]规定了不同食品中卡那霉素的最大残留限量(Maximum residue limits, MRLs),如牛奶中的 MRL 为 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$,肌肉的 MRL 为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。卡那霉素的检测方法主要包括色谱法^[4]、酶联免疫吸附分析法^[5]和毛细管电泳法^[6]等。但是,大多数方法需要专业的操作人员和高精度仪器的支持,在现场实时检测和大批量筛查中的应用仍存在局限性。因此,建立简单、灵敏和低成本的卡那霉素检测方法对于保障食品安全和公众健康具有重要的现实意义。

目前,基于新型纳米材料构建的低成本、易小型化的生物传感器受到了广泛关注^[7-8]。其中,比色生物传感器因其具有操作简单、成本低和可视化识别等特性而备受关注,在大批量样品的筛查方面显示出良好的应用潜能。金纳米颗粒(Gold nanoparticles, AuNPs)的合成简单且易于生物功能化,常作为比色生物传感器的关键元件^[9-10]。此外, AuNPs 表现出与粒子间距相关的表面等离子体特性^[11-12],为比色法的现场应用提供了优良的纳米检测平台。值得注意的是,单链 DNA(Single-stranded DNA, ssDNA)和双链 DNA(Double-stranded DNA, dsDNA)在未经修饰的 AuNPs 上具有不同的吸附特性。由于 ssDNA 具有柔性,更易吸附在 AuNPs 上,而 dsDNA 的刚性双螺旋结构使其在 AuNPs 表面的吸附较差^[13]。基于此原理的 AuNPs 比色传感策略已被广泛应用于许多领域,特别是食品安全现场筛查和个人医疗保健中的即时检测(Point-of-care testing, POCT)^[14-15]。尽管该类免标记比色法简便快速,但其主要依赖于 ssDNA 对 AuNPs 的吸附亲和力,导致检测灵敏度受限。不同的 DNA 碱基与 AuNPs 表面相互作用的方式不同^[16]。已有研究证实,相比于随机序列的 DNA,多聚腺嘌呤(Poly-adenine, polyA)对 AuNPs 表现出更高的吸附

2023-05-06 收稿; 2023-05-27 接受

上海市自然科学基金(No. 20ZR1424100)和国家市场监管重点实验室(生物分析计量溯源领域)开放课题(No. KLSMR2022-01)资助。

* E-mail: j-yan@shou.edu.cn

亲和力^[17-18],这种独特性质使得 polyA 在生物分子编程、生物传感器和新型药物递送等研究领域得到了广泛应用^[19-21]。然而,基于 polyA 和 AuNPs 之间高吸附亲和力的比色分析研究仍然较少^[22]。

在传统 AuNPs 比色策略的基础上,本研究构建了一种基于二嵌段寡核苷酸探针(Diblock oligonucleotide probe, dP)的免标记比色适配体传感器用于卡那霉素的检测。与含相同碱基数量的随机序列(Random sequence, RS)相比,在不依赖任何信号放大技术的情况下,利用含有 polyA₂₀ 尾部序列的 AuNPs 比色策略对卡那霉素的检测灵敏度提高了 2 个数量级,线性检测范围为 0.01~1 nmol/L,检出限为 0.01 nmol/L,并可实现裸眼检测,具有良好的特异性。本方法克服了比色传感器检测灵敏度低的问题,实现了卡那霉素的可视化灵敏检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-2540 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); LQ-5103A 型电子天平(上海瑶新电子科技有限公司); Mixer 4K 微型涡旋混合仪(生工生物工程(上海)股份有限公司); HCM100-Pro 恒温振荡金属浴(大龙兴创实验仪器(北京)有限公司); D1008 掌上离心机(大龙兴创实验仪器(北京)有限公司); 琼脂糖凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); Bio-Mag MultiSep 磁性分离器(美国 Polysciences 公司); 9600 基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司); 78-1 磁力加热搅拌器(江苏科析仪器有限公司)。

四氯金酸水合物(HAuCl₄·H₂O, 99%,上海泰坦科技股份有限公司); 二水柠檬酸三钠(Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 国药集团化学试剂有限公司); 戊二醛溶液(Glutaraldehyde)、磁珠吡啶洗涤液(Pyridine Wash Buffer, PWB, 1mol/L)、8600-10 氨基磁珠(Magnetic beads, MBs, 50 mg/mL)购自美国 Polysciences 公司; 20×磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4~7.6)、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、50×TAE 缓冲液(2 mol/L Tris-acetic acid, 100 mmol/L EDTA, pH 8.4)、琼脂糖 III(TM)、4S Red Plus 核酸凝胶染色剂(10000×水溶液, 0.1 mL)、10×DNA 上样缓冲液(DNA loading buffer)、NaCl、Kana、硫酸链霉素(Streptomycin sulfate, STR)、氧氟沙星(Ofloxacin, OFX)、恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)、盐酸林可霉素(Lincomycin hydrochloride, LIN)和诺氟沙星(Norfloxacin, NOR)购于生工生物工程(上海)股份有限公司。所用化学试剂均为分析纯; 实验用水为 Milli-Q 超纯水(美国 Barnstead 公司超纯水仪制备)。实验所用的 DNA 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,具体序列信息见表 1。DNA 干粉用超纯水配制成 100 μmol/L 的储备液,然后用 1×PBS (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, 10 mmol/L)稀释至实验所需浓度。

表1 实验中所用的 DNA 序列

Table 1 DNA sequences used in this study

名称 Name	碱基序列 Sequence (5'→3')
卡那霉素适配体 Kanamycin aptamer (Kana-Apt)	NH ₂ -AAAAAATGGGGTTGAGGCTAAGCCGAGTCAC
互补序列-polyA ₂₀ Hybridization block-polyA ₂₀ (HB-polyA ₂₀)	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTGACTCGGC
互补随机序列 Hybridization block-random sequence (HB-RS)	CTAGCATGTGCATAGCTACGGTGACTCGGC
互补序列-polyA ₅ Hybridization block-polyA ₅ (HB-polyA ₅)	AAAAAGTGACTCGGC
互补序列-polyA ₁₀ Hybridization block-polyA ₁₀ (HB-polyA ₁₀)	AAAAAAAAAGTGACTCGGC
互补序列-polyA ₃₀ Hybridization block-polyA ₃₀ (HB-polyA ₃₀)	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTGACTCGGC

注: 下划线部分是互补的碱基序列。

Note: The underlined parts are complementary sequences.

1.2 实验方法

1.2.1 AuNPs 的制备

通过柠檬酸三钠还原氯金酸的方法合成 AuNPs^[23]。将 50 mL 超纯水和 50 μL 1%氯金酸溶液于磁力搅拌下混合,并加热至沸腾,迅速加入 1.75 mL 1%现配的柠檬酸三钠溶液,继续搅拌加热反应 30 min 后,缓慢降至室温。产物于 4 ℃避光保存。

1.2.2 MBs@Kana-Apt 的制备

按照产品说明书对 50 mg/mL 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 的磁珠进行活化,将磁珠上的氨基转化为醛基。取 20 μL 醛基化磁珠,磁分离后加入 20 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 氨基修饰的 Kana-Apt(预先于 90 $^{\circ}\text{C}$ 变性处理 5 min), 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育过夜后进行磁分离,用 100 μL 1 $\times$ PBS 缓冲溶液充分洗涤磁珠,重悬于 20 μL 1 $\times$ PBS 中,得到的 MBs@Kana-Apt 体系于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 MBs@dsDNA 的制备

取 20 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ HB-polyA₂₀ 加入到 20 μL MBs@Kana-Apt 中,混匀,于 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性处理 5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 2 h。磁分离后,用 100 μL 1 $\times$ PBS 洗涤 5 次,重悬于 20 μL 1 $\times$ PBS 中,得到的 MBs@dsDNA 体系于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 盐浓度的优化

在 30 μL 超纯水中加入 60 μL AuNPs, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下避光孵育 2 h, 再加入不同浓度的 NaCl 溶液(0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mol/L), 静置 1 min, 肉眼观察溶液颜色变化,并测定体系在 520 和 620 nm 波长处的吸光度。

1.2.5 基于 polyA 的比色传感器用于卡那霉素检测

将 20 μL MBs@dsDNA 和 30 μL 不同浓度的卡那霉素(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100、500 nmol/L 及 15 $\mu\text{mol/L}$)充分混匀后,室温孵育过夜。磁分离,移取 30 μL 上清液,加入 60 μL AuNPs, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 h 后,加入 10 μL 0.3 mol/L NaCl 溶液。静置 1 min 后,肉眼观察颜色变化,并测定体系在 520 和 620 nm 波长处的吸光度。

1.2.6 特异性检测

20 μL MBs@dsDNA 与 30 μL 不同浓度的抗生素(卡那霉素、STR、OFX、LIN、ENR 和 NOR,卡那霉素的浓度为 10 nmol/L, 其它抗生素的浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$)充分混匀后,室温孵育过夜。后续操作与 1.2.5 节方法相同。

1.2.7 PolyA 长度的影响

设计不同长度的 A 碱基尾部序列探针(polyA₅、polyA₁₀、polyA₂₀ 和 polyA₃₀)。将 20 μL MBs@dsDNA 和 30 μL 不同浓度的卡那霉素(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 和 500 nmol/L)充分混匀后,室温孵育过夜,后续操作与 1.2.5 节方法相同。

2 结果与讨论

2.1 实验原理

基于二嵌段寡核苷酸探针的比色适配体传感器用于检测卡那霉素的原理如图 1 所示,此探针由 polyA₂₀ 和 HB 序列组成。首先,氨基化修饰的卡那霉素适配体 Kana-Apt 与醛基化磁珠发生反应后,HB 序列与 Kana-Apt 互补配对,从而得到 MBs@dsDNA 复合物。MBs@dsDNA 复合物表面双链结构中的 Kana-Apt 与卡那霉素的亲和力更高,二者发生特异性结合,导致 dsDNA 解体,释放出 dP。磁分离提取上清液中游离的 dP 与未经修饰的 AuNPs 溶液孵育, polyA₂₀ 与 AuNPs 表面发生高亲和力吸附。AuNPs 在 polyA₂₀ 的保护下免受高盐浓度环境引发的聚集,溶液仍然保持红色。当体系中含有卡那霉素时, MBs@dsDNA 结构不发生变化,在高盐条件下, AuNPs 发生团聚,导致溶液体系由红色变为蓝灰色。

2.2 MBs@dsDNA 的制备和表征

将 Kana-Apt 溶液与磁珠孵育,磁分离后,测定 Kana-Apt 溶液在孵育前后的吸光度变化。如图 2A 所示,与磁珠孵育后, Kana-Apt 在 260 nm 处的吸光度明显降低,表明有一定数量的 Kana-Apt 成功组装在磁珠表面,获得 MBs@Kana-Apt 复合物。为了进一步证实 Kana-Apt 与 HB-polyA₂₀ 在磁珠表面进行的杂交反应,利用琼脂糖凝胶电泳与紫外-可见吸收光谱对 dsDNA 进行表征。如图 2B 所示,泳道 1 和泳道 2 分别是同体积的 5 $\mu\text{mol/L}$ Kana-Apt 与 5 $\mu\text{mol/L}$ HB-polyA₂₀,泳道 3 是二者的杂交产物(红色虚点圈)。条带 3 的迁移速度明显变慢,证实生成了更高分子量的杂交产物。如图 2C 所示, MBs@Kana-Apt 与 HB-polyA₂₀ 孵育后,上清液中 HB-polyA₂₀ 的吸光度显著降低,证实了 MBs@dsDNA 组装成功。

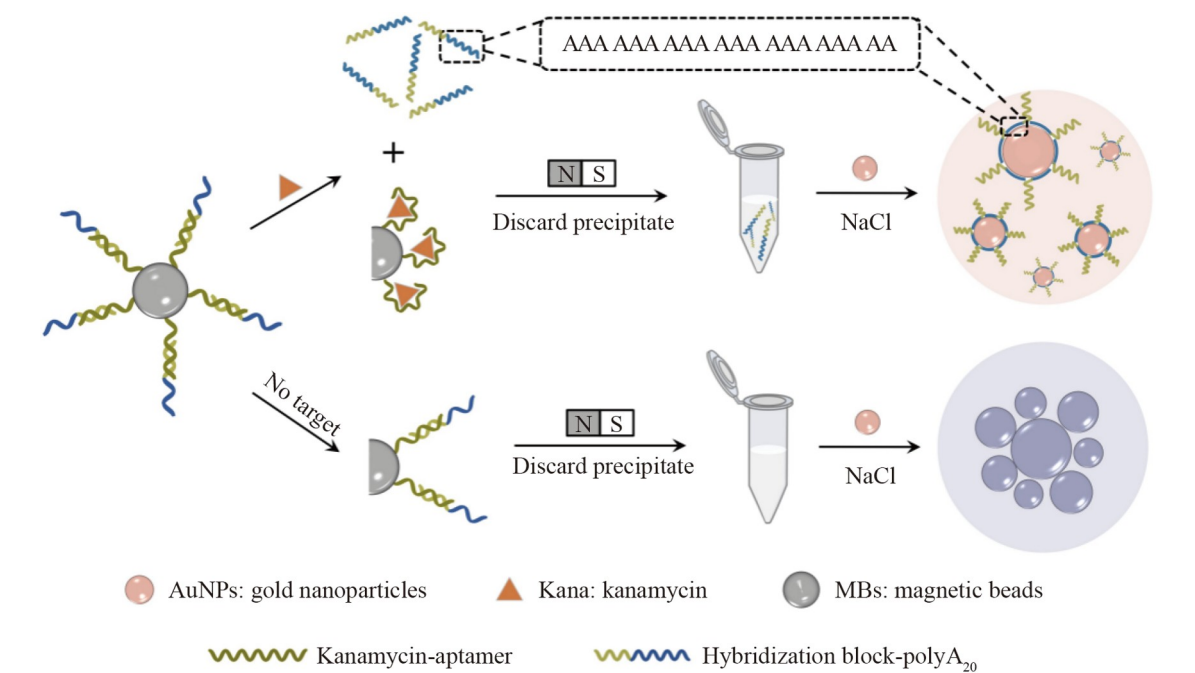


图1 基于多聚腺嘌呤的二嵌段寡核苷酸探针的纳米金比色传感器检测卡那霉素的示意图
Fig.1 Schematic illustration of diblock oligonucleotide probe (dP) with a poly-adenine (polyA) tail-based gold nanoparticles (AuNPs) colorimetric sensor for detection of kanamycin

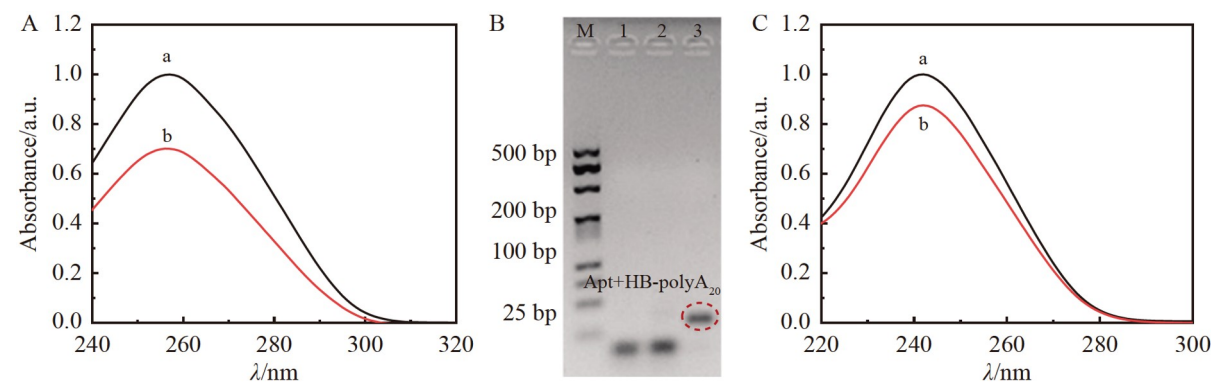


图2 (A) Kana-Apt 与磁珠孵育前(a)和孵育后(b)的紫外-可见吸收光谱; (B) 琼脂糖凝胶电泳表征: 泳道 M 为 25~500 bp Marker, 泳道 1 为 Kana-Apt, 泳道 2 为 HB-polyA₂₀, 泳道 3 为 Kana-Apt+HB-polyA₂₀; (C) HB-polyA₂₀ 与磁珠表面的 Kana-Apt 杂交前(a)和杂交后(b)的紫外-可见吸收光谱
Fig.2 (A) Ultraviolet-visible (UV-vis) absorption spectra of Kana-Apt before (a) and after (b) incubation with MBs; (B) Agarose gel electrophoresis characterization of different samples: 25–500 bp DNA ladder marker (lane M), Kana-Apt (lane 1), HB-polyA₂₀ (lane 2), Kana-Apt+HB-polyA₂₀ (lane 3); (C) UV-vis absorption spectra of HB-polyA₂₀ before (a) and after (b) hybridization with Kana-Apt attached to MBs

2.3 比色传感器的检测研究

在高盐环境中, AuNPs 表面稳定的双电层结构被电解质破坏, 引发团聚变色现象, 这是基于 AuNPs 比色策略的基础。考察了盐浓度对 AuNPs 体系稳定性的影响, 结果如图 3A 所示。加入 0.3 mol/L NaCl 后, 溶液发生显著变色, 并且 AuNPs 在 520 nm 处的特征吸收峰强度降低, 表明 AuNPs 出现明显的团聚现象。因此, 选择 0.3 mol/L NaCl 溶液进行后续实验。

采用空白样品和 15 μmol/L 卡那霉素考察 MBs@dsDNA 复合物对靶标的响应性。比较两管的颜色变化和相应的紫外-可见吸收光谱(图 3B)可知, 当检测体系中存在卡那霉素时, AuNPs 溶液呈现红色, 在

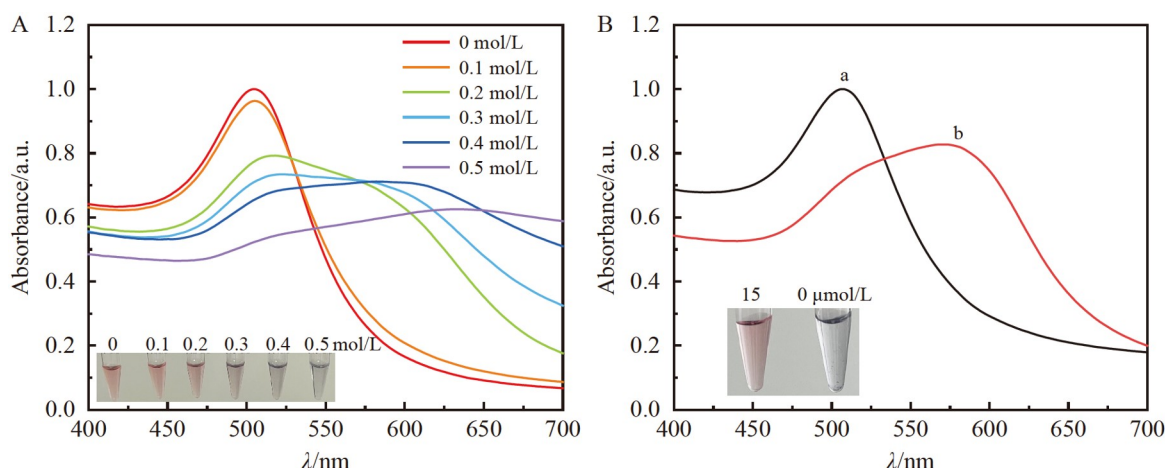


图3 (A) 加入不同浓度的 NaCl 溶液(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L)后传感体系的紫外-可见吸收光谱; (B) 卡那霉素浓度分别为(a) 15 $\mu\text{mol/L}$ 和(b) 0 $\mu\text{mol/L}$ 时基于 polyA₂₀ 的 AuNPs 比色适配体传感体系的紫外-可见吸收光谱。插图为相应样品的光学照片

Fig.3 (A) UV-vis absorption spectra of the sensing system upon the addition of different concentrations of NaCl solutions (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mol/L); (B) UV-vis absorption spectra of polyA₂₀ tail-based AuNPs colorimetric sensor in the presence (a) and absence (b) of 15 $\mu\text{mol/L}$ Kana. Insets are photograph of samples

520 nm 出现明显的特征吸收峰。这证实了卡那霉素可在 MBs@dsDNA 复合物上竞争结合适配体,释放的 dP 与 AuNPs 发生高亲和吸附,使 AuNPs 在高盐环境中保持稳定状态,表明基于 dP 的免标记比色策略对卡那霉素具有良好的响应性能。

已有研究表明,相对于其它单链 DNA, polyA 可优先结合在 AuNPs 表面^[16,24]。本研究使用一段具有相同碱基数量的随机序列代替 dP 中的 polyA₂₀ 尾部序列。根据琼脂糖凝胶电泳(图 4A,黄色虚点圈)结果,该段序列的替换不影响 HB 与 Kana-Apt 之间的识别。如图 4B 所示,上清液中残留的 HB-RS 的吸光度也发生了降低,说明 MBs@dsDNA 组装成功。以 HB-RS 为对照组,进一步证实了 polyA₂₀ 对 AuNPs 具有良好的吸附能力。

采用制备的 AuNPs 比色适配体传感器检测不同浓度的卡那霉素(图 5A)。当待测体系中不存在卡

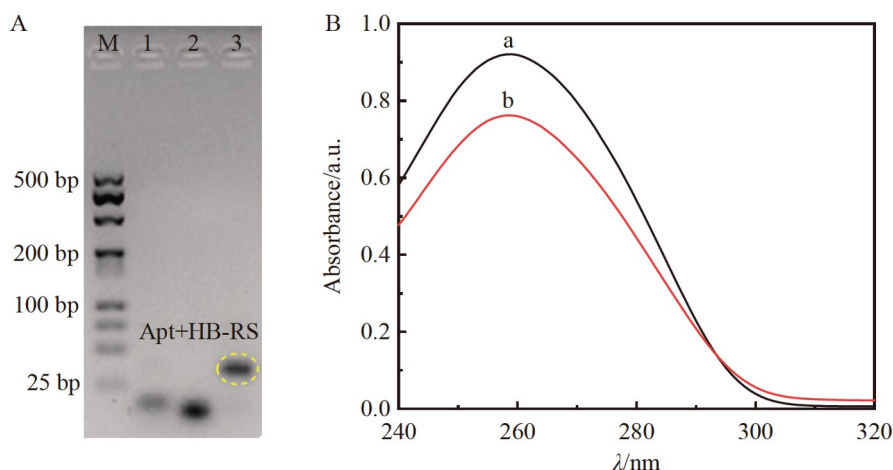


图4 (A) 琼脂糖凝胶电泳表征: 泳道 M 为 25~500 bp Marker, 泳道 1 为 Kana-Apt, 泳道 2 为 HB-RS, 泳道 3 为 Kana-Apt+HB-RS; (B) HB-RS 与磁珠上的 Kana-Apt 杂交前(a)和杂交后(b)的紫外-可见吸收光谱

Fig.4 (A) Agarose gel electrophoresis characterization of different samples: 25~500 bp DNA ladder marker (lane M), Kana-Apt (lane 1), HB-RS (lane 2), Kana-Apt+HB-RS (lane 3); (B) UV-vis absorption spectra of HB-RS before (a) and after (b) hybridization with Kana-Apt attached to MBs

那霉素时,由于高盐的存在,溶液发生团聚以及变色现象,这是由于磁珠上的双链结构未发生变化,AuNPs 在高盐环境中发生聚集所致。随着卡那霉素浓度增加,溶液颜色从蓝灰色逐渐变为红色,说明释放的 dP 增多, polyA₂₀ 对 AuNPs 的保护能力也随之增加。在低至 1 nmol/L 的浓度下,可以清楚地分辨出 AuNPs 颜色变为紫红色(图 5A, 红色虚线框, HB-polyA₂₀)。相比之下,使用 HB-RS 的对照组在卡那霉素浓度为 500 nmol/L 时即发生了显著的变色现象(图 5A, 绿色虚线框)。上述结果证明了 polyA₂₀ 对 AuNPs 的高亲和吸附。与随机序列 ssDNA 相比(相同数量),含有 polyA₂₀ 尾部序列的探针对 AuNPs 比色策略的检测灵敏度提高了 2 个数量级。在相应的紫外-可见吸收光谱图(图 5B 和 5C)中,在 620 nm 处出现了一个新峰,是聚集态 AuNPs 的特征吸收峰,并且随着卡那霉素浓度增加而逐渐降低,位于 520 nm 处分散态 AuNPs 的特征吸收峰也随着卡那霉素浓度的提高而逐渐增高,表明 AuNPs 的团聚程度逐渐减低。这些结果与图 5A 中肉眼观测的颜色变化一致。如图 5D 所示,体系分散态峰(520 nm)与聚集态峰(620 nm)的吸收光度比值(A_{520}/A_{620})与卡那霉素浓度在 0.01~1 nmol/L 范围内呈线性关系,线性方程为 $y=0.5049x+0.7453$

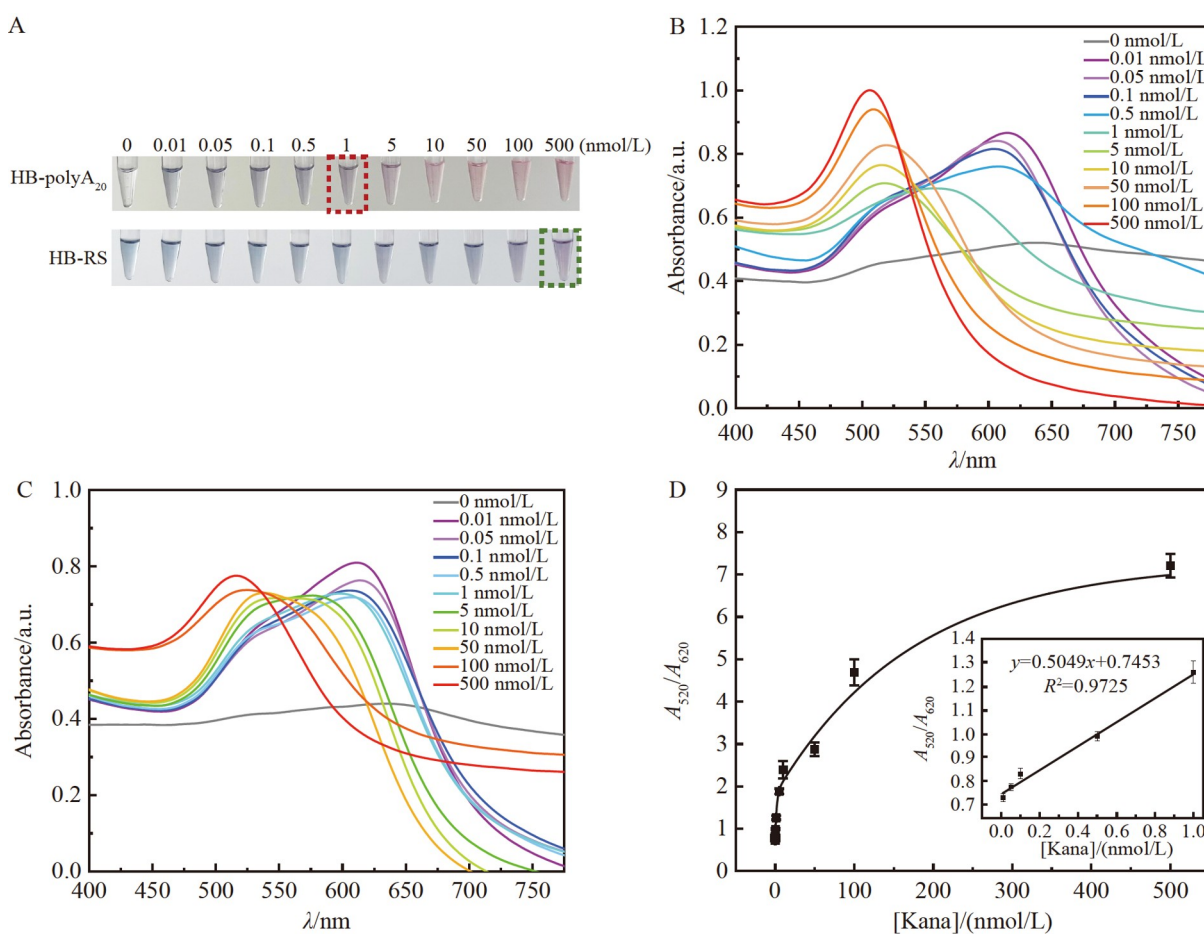


图5 (A) 不同浓度卡那霉素存在时比色传感体系的光学照片: 第1行为基于 polyA₂₀ 的 AuNPs 比色传感体系,第2行为基于 RS 的 AuNPs 比色传感体系; (B) 基于 polyA₂₀ 的 AuNPs 比色传感器对不同浓度卡那霉素的紫外-可见吸收光谱图; (C) 基于 RS 的 AuNPs 比色传感器对不同浓度卡那霉素的紫外-可见吸收光谱图; (D) 卡那霉素浓度与 A_{520}/A_{620} 的关系, 插图为在 0.01~1 nmol/L 范围内卡那霉素浓度与 A_{520}/A_{620} 的线性关系($n=3$)

Fig.5 (A) Photograph of the colorimetric sensor in the presence of various concentrations of Kana (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 nmol/L): row 1 is polyA₂₀-based AuNPs colorimetric sensor, row 2 is RS based AuNPs colorimetric sensor; (B) UV-vis absorption spectra of polyA₂₀-based AuNPs colorimetric sensor in the presence of different concentrations of Kana; (C) UV-vis absorption spectra of RS-based AuNPs colorimetric sensor in the presence of different concentrations of Kana; (D) Correlation between Kana concentration and absorbance ratio of A_{520}/A_{620} , inset is linear relationship of A_{520}/A_{620} and Kana concentration in the range of 0.01 to 1 nmol/L ($n=3$)

($R^2=0.9725$),检出限(LOD, $S/N=3$)为 0.01 nmol/L。比文献报道的基于 ssDNA 和 dsDNA 对 AuNPs 吸附亲和力和力差异的比色策略的检出限低两个数量级^[25]。与其它卡那霉素检测方法相比(表 2),本方法检出限低,检测范围更宽,可用于大批量样品的实时可视化检测。

表2 不同卡那霉素检测方法的分析性能的比较

Table 2 Comparison of analytical performance of different methods for detection of Kana

方法 Method	线性范围 Linear range/ (nmol/L)	检出限 Limit of detection/ (nmol/L)	文献 Ref.
荧光法 Fluorescence	100~2.5×10 ³	22.6	[26]
荧光法 Fluorescence	0~50	0.304	[27]
电化学发光法 Electrochemiluminescence	5.826~5.826×10 ⁸	1.748	[28]
电化学 Electrochemical	1~1×10 ³	0.36	[29]
拉曼光谱法 Surface-enhanced Raman scattering	1~100	0.75	[30]
比色法 Colorimetric	10~4×10 ³	4	[31]
比色法 Colorimetric	0.01~1	0.01	本方法 This work

选择不同的抗生素考察了此传感器检测卡那霉素的特异性。如图 6A 所示,只有实验组的卡那霉素仍保持明显的分散态和红色, A_{520}/A_{620} 也明显高于其它对照组,表明此传感器对卡那霉素具有良好的特异性。

通过改变 polyA 的长度可以调控 AuNPs 表面 DNA 分子的密度与取向^[32-33]。为了进一步探究 polyA 长度对传感器检测性能的影响,设计不同长度的 A 碱基尾部序列探针(polyA₅、polyA₁₀、polyA₂₀ 和 polyA₃₀)检测不同浓度的卡那霉素(图 6B)。在基于 polyA 的电化学检测策略中,由于在金电极表面 polyA 长度的增加会使得 DNA 探针之间距离增大,导致探针组装密度降低,从而影响了检测信号^[34]。但是,在本研究中,随着 polyA 尾部序列长度增加,探针可以在很大程度上包裹住 AuNPs,从而在高盐环境下提供更好的保护, AuNPs 的稳定性得到提高。值得注意的是, polyA₂₀ 对 AuNPs 的保护作用反而优于 polyA₃₀,表明 DNA 过长会影响杂交效率,从而影响靶目标和适配体的识别效率,此结果与文献^[24,35]结果一致。

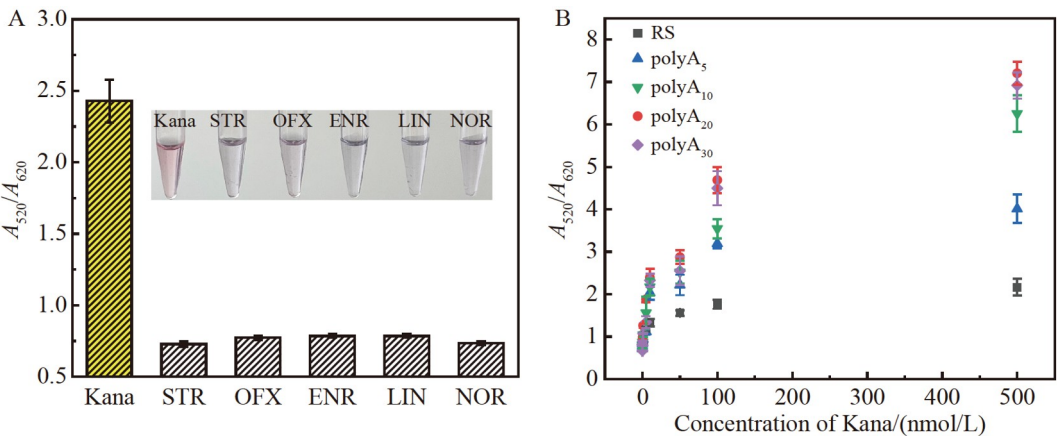


图6 (A) 比色适配体传感器对卡那霉素的选择性, 从左至右依次为 10 nmol/L 卡那霉素以及 1 μmol/L 硫酸链霉素(STR)、氧氟沙星(OFX)、恩诺沙星(ENR)、盐酸林可霉素(LIN)和诺氟沙星(NOR); (B) PolyA 长度对比色传感器检测性能的影响($n=3$)

Fig.6 (A) Selectivity of colorimetric aptamer sensor for Kana. From left to right are 10 nmol/L of Kana and 1 μmol/L of streptomycin sulfate (STR), ofloxacin (OFX), enrofloxacin (ENR), lincomycin hydrochloride (LIN) and norfloxacin (NOR). (B) Effect of polyA length on detection performance of contrast color sensor. The error bars represent the standard deviation ($n=3$)

3 结论

基于含有 polyA₂₀ 尾部序列的二嵌段寡核苷酸探针构建了可视化检测卡那霉素的免标记 AuNPs 比色传感器。在传统 AuNPs 比色策略的基础上, 此比色传感器不依赖信号放大技术, 基于 polyA 优先与 AuNPs 结合的原理, 实现了裸眼观测卡那霉素, 并有效克服了比色传感器检测灵敏度通常较低的问题。此传感体系具有良好的通用性和实用价值, 只需改变相应的适配体序列, 即可实现其它抗生素以及食品安全污染物的检测, 为现场大批量样品可视化、实时检测提供了良好的检测方法。

References

- [1] OERTEL R, NEUMEISTER V, KIRCH W. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1058(1-2): 197-201.
- [2] WANG Y S, MA T C, MA S Y, LIU Y J, TIAN Y P, WANG R N, JIANG Y B, HOU D J, WANG J L. *Microchim. Acta*, 2016, 184(1): 203-210.
- [3] GB/T 31650—2019. National Food Safety Standard-Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. National Standards of the People's Republic of China.
食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准. GB/T 31650—2019.
- [4] ZHANG X, WANG J, WU Q, LI L, WANG Y, YANG H. *Molecules*, 2019, 24(10): 1902.
- [5] LI C, ZHANG Y Y, EREMIN S A, YAKUP O, YAO G, ZHANG X Y. *Food Chem.*, 2017, 227: 48-54.
- [6] KAALE E, VAN SCHEPDAEL A, ROETS E, HOOGMARTENS J. *J. Chromatogr. A*, 2001, 924(1-2): 451-458.
- [7] QIAN L, DURAIRAJ S, PRINS S, CHEN A. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 175: 112836.
- [8] ZHU C, YANG G, LI H, DU D, LIN Y. *Anal. Chem.*, 2015, 87(1): 230-249.
- [9] HUA Z, YU T, LIU D, XIANYU Y. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 179: 113076.
- [10] SU S, ZUO X L, PAN D, PEI H, WANG L H, FAN C H, HUANG W. *Nanoscale*, 2013, 5(7): 2589-2599.
- [11] STORHOFF J J, LAZARIDES A A, MUCIC R C, MIRKIN C A, LETSINGER R L, SCHATZ G C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(19): 4640-4650.
- [12] ELGHANIAN R, STORHOFF J J, MUCIC R C, LETSINGER R L, MIRKIN C A. *Science*, 1997, 277(5329): 1078-1081.
- [13] LI H, ROTHBERG L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101(39): 14036-14039.
- [14] ZHANG J, WANG L, PAN D, SONG S, BOEY F Y C, ZHANG H, FAN C. *Small*, 2008, 4(8): 1196-1200.
- [15] LI H X, ROTHBERG L J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126(35): 10958-10961.
- [16] KIMURA-SUDA H, PETROVYKH D Y, TARLOV M J, WHITMAN L J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(30): 9014-9015.
- [17] YAO G, PEI H, LI J, ZHAO Y, ZHU D, ZHANG Y, LIN Y, HUANG Q, FAN C. *NPG Asia Mater*, 2015, 7(1): e159.
- [18] PEI H, ZUO X, ZHU D, HUANG Q, FAN C. *Acc. Chem. Res.*, 2014, 47(2): 550-559.
- [19] YAO G, LI J, LI Q, CHEN X, LIU X, WANG F, QU Z, GE Z, NARAYANAN R P, WILLIAMS D, PEI H, ZUO X, WANG L, YAN H, FERGINGA B L, FAN C. *Nat. Mater.*, 2020, 19(7): 781-788.
- [20] ZHU D, ZHAO D, HUANG J, ZHU Y, CHAO J, SU S, LI J, WANG L, SHI J, ZUO X, WENG L, LI Q, WANG L. *Nanomedicine*, 2018, 14(6): 1797-1807.
- [21] PEI H, LI F, WAN Y, WEI M, LIU H, SU Y, CHEN N, HUANG Q, FAN C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134(29): 11876-11879.
- [22] PIRIYA V S A, JOSEPH P, DANIEL S C G K, LAKSHMANAN S, KINOSHITA T, MUTHUSAMY S. *Mater. Sci. Eng., C*, 2017, 78: 1231-1245.
- [23] FRENS G. *Nat. Phys. Sci.*, 1973, 241(105): 20-22.
- [24] ZHU D, SONG P, SHEN J, SU S, CHAO J, ALDALBAHI A, ZHOU Z, SONG S, FAN C, ZUO X, TIAN Y, WANG L, PEI H. *Anal. Chem.*, 2016, 88(9): 4949-4954.
- [25] MA Y, SHEN G, LI R, WANG C, YANG F, WANG F, YE H, ZHANG H, TANG Y. *Analyst*, 2023, 148(2): 255-261.
- [26] WANG X Y, ZHANG W Q, GAO X L, SUN Z C, SUN X, GUO Y M, LI F L, BOBORIKO N E. *Sens. Actuators, B*, 2022, 360(1): 131665.
- [27] RAVIKUMAR A, PANNEERSELVAM P. *Analyst*, 2019, 144(7): 2337-2344.
- [28] DUAN X Y, ZHANG N, HUANG J C, XU R, ZHAO Z, YANG L, LIU H, WANG Y B, GUO Y M, SUN X. *Sens. Actuators, B*, 2023, 379(1): 133259.
- [29] GAO T Y, SUN C, ZHANG N N, HUANG Y, ZHU H X, WANG C M, CAO J X, WANG D Y. *RSC Adv.*, 2021, 11(26): 15817-15824.
- [30] NGUYEN A H, MA X, PARK H G, SIM S J. *Sens. Actuators, B*, 2019, 282(5): 765-773.
- [31] XU R, CHENG Y, QI X, LI X, ZHANG Z, CHEN L, SUN T, GAO Z, ZHU M. *Anal. Chim. Acta*, 2022, 1230: 340377.

- [32] YANG K, WANG H, MA N, ZENG M, LUO H, HE D. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, 10(51): 44546-44553.
- [33] LI L, WANG L, XU Q, XU L, LIANG W, LI Y, DING M, ALDALBAHI A, GE Z, WANG L, YAN J, LU N, LI J, WEN Y, LIU G. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, 10(8): 6895-6903.
- [34] ZHU D, LI J, WANG L H, LI Q, WANG L H, SONG B, ZHOU R H, FAN C H. *Chem. Commun.*, 2021, 57(31): 3801-3804.
- [35] XU L, QI J W, WEN Y L, LIANG W, WANG L L, YANG Z Z, YANG X, QI Y, DUAN M L, ZHAO K K, GU J, SHEN Y J, RAO P H, DING M, REN S Z, LI L, LIU G. *Analyst*, 2021, 146(11): 3526-3533.

Visual Detection of Kanamycin by Poly-Adenine-based Diblock Oligonucleotide Probe

XI Yue¹, WANG Xin-Yu¹, WANG Hui-Yuan¹, YAN Juan^{*1,2,3}

¹(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

²(Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

³(Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract Adsorption of single-stranded DNA (ssDNA) onto unmodified gold nanoparticles (AuNPs) has been utilized as a common strategy for colorimetric assays, enabling facile detection of target analytes. In this study, a label-free, sensitive AuNP-based colorimetric biosensor was developed for visual detection of kanamycin (Kana) using a diblock oligonucleotide probe (dP) that included a poly-adenine (polyA₂₀) tail. In the presence of Kana, the aptamer on the MBs@double-stranded DNA (dsDNA) complex specifically bound to Kana, leading to dissociation of dPs from complementary aptamer strands. The dP sequences were anchored to the surface of AuNPs due to the strong affinity between polyA₂₀ tail and AuNPs, thus stabilizing the colloidal AuNPs against aggregation when high concentration level salt (NaCl) was introduced. Compared with random sequence (RS) with the same number of bases, AuNPs colorimetric strategy with polyA₂₀ tail sequence significantly improved the detection sensitivity of Kana by two orders of magnitude. The results showed that the colorimetric sensor had good colorimetric performance when the concentration of Kana ranged from 0.01 to 1 nmol/L, and the detection limit ($S/N=3$) was 0.01 nmol/L. This sensing system did not require large instruments and other signal amplification technique, and was suitable for visualization and real-time detection of large quantities of samples with high sensitivity and specificity. This study provided a good idea for visual detection of other antibiotic drugs and chemical pollutants affecting food safety.

Keywords Kanamycin; Gold nanoparticles; Aptamer; Biosensor; Food safety

(Received 2023-05-06; accepted 2023-05-27)

Supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 20ZR1424100) and the Key Laboratory of State Administration of Market Regulation of China (No. KLSMR2022-01).