论文

食品安全检测新技术与新方法专刊

基于适配体识别-可视化检测棒曲霉毒素的方法

段诺^①, 张维潇^①, 吴世嘉^{①②}, 王周平^{①*}^① 食品科学与技术国家重点实验室; 江南大学食品学院, 无锡 214122^② 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013

*通讯作者, E-mail: wangzp@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-10-05; 接受日期: 2015-11-13; 网络版发表日期: 2016-01-18

国家科技支撑计划(编号: 2015BAD17B02)、国家自然科学基金(编号: 21375049, 31401575, 31401576)和国家博士后科学基金(编号: 2015M580402)资助项目

摘要 棒曲霉毒素是由青霉属、曲霉属、丝衣霉属产生的真菌代谢毒素, 对人体有一系列急性毒性和致畸致癌等慢性毒性。本文以新筛选的棒曲霉毒素特异性适配体为分子识别元件, 利用纳米金的变色效应, 构建了一种基于适配体识别-可视化检测棒曲霉毒素的方法。在优化的检测条件下, 棒曲霉毒素浓度与 A_{650}/A_{521} 的比值具有良好的线性关系, 其回归方程为 $y=0.3021x+0.0713$ ($R^2=0.9910$), 线性范围为 0.1~10 ng/mL, 最低检测限为 0.1 ng/mL。将本方法用于苹果汁样品的加标回收, 加标回收率为 95.87%~106.20%, 证明本方法可用于实际样品的检测。

关键词 棒曲霉毒素, 适配体, 纳米金, 可视化

1 引言

棒曲霉毒素(Patulin, PAT)又称展青霉素, 是由青霉属(*Penicillium claviforme*)、曲霉属(*Aspergillus clavatus*)、丝衣霉属(*Byssosclamyces fulva*)产生的真菌代谢产物^[1]。棒曲霉毒素主要污染的对象有: 苹果、山楂、番茄、梨、葡萄、樱桃、香蕉、杏仁、榛子、花生及其制品等。众多研究表明, 棒曲霉毒素具有引起动物抽搐、肺、肝部出血、肾脏损害、肠道出血等急性毒性, 并具有神经毒性、免疫毒性、基因毒性、致畸、致癌等慢性毒性^[2]。目前, 全球 50%以上的国家建立了食品中真菌毒素的标准限量及检测方法, 覆盖了世界上 85%以上的居民^[3]。在欧盟, 果汁及含苹果汁

相关酒精饮料中棒曲霉毒素限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 固体苹果产品限量为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 婴儿食品限量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国国家标准中水果及其制品、饮料、酒类的棒曲霉毒素限量标准均为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 苹果汁果酱等制品限量标准为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4], 与世界卫生组织(WHO)建议的棒曲霉毒素残留量相同。

目前, 常用于检测棒曲霉毒素的方法主要有化学分析法如薄层层析法、高效液相色谱法、气相色谱法和色谱联用技术^[5~7]等。这些方法结果可靠、灵敏度高, 但是大多数仪器设备比较昂贵, 还要进行复杂的前处理, 多数只能在实验室中使用。如今应用比较广泛的免疫分析法包括基于荧光标记的免疫竞争法^[8]、化学发光免疫分析法^[9]、胶体金免疫层析技术^[10]等。

引用格式: 段诺, 张维潇, 吴世嘉, 王周平. 基于适配体识别-可视化检测棒曲霉毒素的方法. 中国科学: 化学, 2016, 46: 268–273
Duan N, Zhang WX, Wu SJ, Wang ZP. A colorimetric method for Patulin detection based on aptamer and gold nanoparticles. *Sci Sin Chem*, 2016, 46: 268–273, doi: 10.1360/N032015-00202

免疫分析法与化学分析法比较, 特异性强、前处理简单、样品用量少, 可同时检测多个样品, 但制备抗体时间较长, 成本较高, 且不稳定。

因此发展一种适合现场快速检测、操作简单、成本低廉且稳定的棒曲霉素检测方法成为亟待突破的重要课题。适配体(aptamer)是一种相对于抗体特异性更强、稳定性更高、更易于合成和修饰的低成本新型分子识别元件, 其本质是一段 DNA 或 RNA 链, 可通过 SELEX 技术体外筛选获得^[11,12]。因其高亲和性、高特异性、制备方便等显著特性在基础研究、医疗诊断以及分析检测方面有着广泛的应用^[13~15]。但利用适配体对棒曲霉素进行分析检测目前还未见报道。

因此, 本研究以适配体为识别分子, 基于适配体可以通过静电作用吸附到纳米金表面, 并且根据吸附使纳米金在高盐环境下不易聚沉变色的原理, 构建了一种适配体识别-可视化检测棒曲霉素的方法。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

棒曲霉素(纯度 $\geq 99\%$)购自普瑞邦公司(中国); 氯金酸(纯度 99%), 2-吗啉乙磺酸(MES, $\geq 99\%$)购自 Sigma 公司(美国); 柠檬酸三钠、氯化钠等购自医药上海化学试剂公司(中国), 均为分析纯。棒曲霉素适配体由本实验室筛选所得, 其序列为 5'-CAGCTCAGA-AGCTTGATCCCGGCCCGCCAACCCGCATCATCTA-CACTGATATTTTACCTTGACTATCAGTCGTGCAT-CTG-3', 由生工生物工程(上海)有限公司(中国)合成。

JEM-2100HR 透射电子显微镜(JEOL 公司, 日本), Centrifuge 5424R 台式高速冷冻离心机(Eppendorf 中国有限公司, 中国), ND2000 Nano-Drop 微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific 仪器有限公司, 美国)。

2.2 实验方法

2.2.1 纳米金的制备

首先, 将实验相关的所有玻璃仪器用王水(浓盐酸/浓硝酸, 3:1, v/v)浸泡过夜, 用超纯水清洗干净, 烘干。纳米金的制备根据 Liu 等^[16]的方法略加改进。将 95.8 mL 超纯水加入三口圆底烧瓶中, 再加入 4.2 mL 1%氯金酸溶液, 均匀搅拌加热至 120℃, 煮沸 10 min 后, 迅速加入 10 mL 1%柠檬酸三钠溶液, 再煮沸

10 min。移去热源, 继续搅拌 25 min, 冷却至室温, 形成的酒红色溶液即为纳米金溶液。将此溶液置于棕色试剂瓶中, 于 4℃避光保存。通过紫外-可见吸收光谱和透射电子显微镜进行表征。

2.2.2 适配体吸附纳米金孵育时间的优化

移取 1 mL 纳米金溶液于 1.5 mL 离心管中, 4℃、12000 r/min 离心 10 min, 弃上层清液 0.7 mL, 加入 300 μ L MES 重悬。向上述纳米金溶液加入 50 nmol/L 的棒曲霉素适配体 100 μ L, 混匀, 置于 37℃摇床中孵育。孵育时间设置为 0.5、1、2、3、5 h。孵育后, 4℃、12000 r/min 离心 20 min, 用 Nano-drop 分光光度计测定上层清液中 ssDNA 浓度, 并与初始加入的 ssDNA 浓度对比, 计算结合率。

2.2.3 NaCl 浓度的优化

向 0.6 mL MES 重悬的纳米金溶液中加入 50 nmol/L 的棒曲霉素适配体 100 μ L, 37℃孵育 3 h。再向溶液中缓慢加入 10、20、40、50、60、80、90、100 mmol/L 浓度的 NaCl 溶液, 观察其颜色变化, 并通过紫外-可见吸收光谱进行表征。

2.2.4 适配体吸附纳米金浓度的优化

取 1 mL 纳米金溶液于 1.5 mL 离心管中, 4℃、12000 r/min 离心 10 min, 弃上层清液 0.7 mL, 加入 300 μ L MES 重悬。将 100 μ L 浓度分别为 100、125、150、175、200、300、400、500 nmol/L 的棒曲霉素适配体分别加入上述纳米金溶液中, 混匀, 37℃孵育 3 h 后, 缓慢加入 100 μ L 40 mmol/L 浓度的 NaCl 溶液, 观察颜色变化, 并通过紫外-可见吸收光谱表征。

2.2.5 棒曲霉素的检测

向 0.6 mL MES 重悬的纳米金溶液中加入 125 nmol/L 浓度棒曲霉素适配体 100 μ L, 37℃孵育 3 h。加入不同浓度的棒曲霉素标准样品孵育 1 h, 再向其中加入 100 μ L 40 mmol/L 浓度的 NaCl 溶液, 观察溶液颜色变化, 并记录紫外吸收值。实验中设空白对照实验(A_{521})和实验组(A_{650}), 以 A_{650}/A_{521} 的比值为纵坐标, 棒曲霉素的浓度作为横坐标, 绘制标准曲线。

2.2.6 苹果汁中棒曲霉素的加标回收测定

将市售苹果汁用棒曲霉素制备成浓度为 0.15、

0.40、0.90 ng/mL 的苹果汁水溶液, 加入等体积乙酸乙酯混匀 2 min, 超声 2 min, 5000 r/min 离心 5 min. 取上层清液用氮气吹干, 用磷酸盐缓冲液溶解, 按本实验构建的方法(见 2.2.5 小节)进行检测. 同时, 取上层清液溶于甲醇, 用 0.22 μm 有机滤膜过滤, 与高效液相色谱-串联质谱法比较结果.

(1) 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 $\times$ 50 mm, 1.8 μm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 5 μL ; 流动相: A-甲醇, B-水, (95:5, v/v); 流速: 0.2 mL/min.

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI), 负离子模式; 干燥器: N_2 ; 干燥器气温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流速: 10 L/min; 喷雾器压力: 30 psi; 毛细管电压: 4000 V; 检测方式: MRM 多反应监测; 驻留时间: 200 ms. 母离子(m/z) 152.9, 碎裂电压 40 V, 子离子(m/z) 108.7、80.4.

3 结果与讨论

3.1 检测原理

适配体可以通过静电作用吸附到纳米金表面, 这种吸附使纳米金在高盐环境下不易聚沉变色^[17]. 将靶标加入此纳米金溶液后, 特异识别靶标的适配体形成特殊构象与靶标结合从纳米金上脱落下来, 导致纳米金失去适配体保护而团聚变色. 随着靶标加入量增加, 脱落下来的适配体越来越多, 纳米金对高盐环境的耐受能力减弱, 则团聚变色的程度增大. 实验原理如图 1 所示.

图 2 纳米金透射电镜图(a)和紫外吸收图谱(b)

图 1 基于适配体识别-可视化检测棒曲霉毒素示意图(网络版彩图)

3.2 纳米金的表征

采用透射电子显微镜对本实验所制备的纳米金进行了表征. 如图 2(a)所示, 所制备纳米金颗粒均匀, 形态为球状, 粒径为 12~16 nm. 由紫外可见吸收光谱(图 2(b))可知, 521 nm 处出现最大吸收峰.

3.3 纳米金适配体孵育时间的优化

本实验考察了不同时间对适配体与纳米金结合率的影响. 结果如图 3(a)所示, 反应时间在 3 h 左右时, 适配体与纳米金的结合基本达到饱和, 证明该条件下吸附进行完全, 故本实验选择 3 h 作为后续反应时间.

3.4 NaCl 溶液浓度的优化

未经修饰的纳米金对 NaCl 浓度特别敏感, 低至

5 mmol/L 的 NaCl 足以使其团聚, 由酒红色转变为紫蓝色^[18]. 使适配体通过静电作用吸附于纳米金表面, 纳米金在一定程度上不受 NaCl 的影响而变色. 因此, 控制 NaCl 浓度将变色控制在一定范围内是此实验得以成为良好可视化检测方法的关键.

向按上述最佳条件孵育所得被适配体吸附的纳米金溶液中缓慢加入 100 μ L 高浓度的 NaCl 溶液, 此处设置 NaCl 浓度为 10、20、40、50、60、80、100 mmol/L. 如图 3(b)所示, 当 NaCl 溶液浓度从 10 增加至 40 mmol/L 时, 纳米金溶液开始变紫, 通过紫外可见吸收光谱可看出 521 nm 处吸光度下降, 最高峰位置发生红移, 650 nm 处吸光度升高, 表示纳米金颗粒发生团聚. 随 NaCl 溶液浓度的继续增加, 纳米金溶液由紫色变蓝色, 说明团聚完全, 这些浓度都已远远超出适配体保护纳米金不聚沉的能力范围. 因此, 本实验选择 40 mmol/L 进行后续实验.

3.5 适配体修饰纳米金孵育浓度的优化

经过实验得知, 在 100~500 nmol/L 适配体浓度

范围内, 适配体吸附纳米金程度达到最大. 为了探索加入高浓度 NaCl 后, 被适配体保护的纳米金在合适范围内聚沉变色, 将适配体浓度进行进一步优化. 将适配体设置为浓度 100、125、150、175、200、300、400、500 nmol/L, 孵育 3 h 之后, 加入 40 mmol/L NaCl 溶液 100 μ L. 肉眼观察 150 nmol/L 适配体浓度时, 溶液开始变紫, 继续升高适配体浓度, 纳米金溶液继续变蓝. 紫外-可见吸收光谱显示(图 3(c)), 521 nm 处吸光度下降, 650 nm 处吸光度上升. 说明在 125 nmol/L 适配体浓度时, 纳米金体系能相对稳定存在于溶液中. 故选择 125 nmol/L 作为最终实验的适配体浓度.

3.6 性能分析

制备 0.1、0.2、0.5、1、2、5、7.5 和 10 ng/mL 浓度的棒曲霉素溶液, 再将适配体吸附的纳米金分别加入, 随后加入高浓度 NaCl 溶液, 观察颜色变化, 并用紫外-可见吸收光谱进行表征. 如图 4 所示, 从上至下分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、7.5、10 ng/mL

图 3 (a) 适配体与纳米金孵育时间优化图; (b) NaCl 浓度优化图, 其中 0~7 分别表示 NaCl 浓度为 0、10、20、40、50、60、80、100 mmol/L; (c) 适配体浓度的优化, 其中 0~8 分别表示适配体浓度为 0、100、125、150、175、200、300、400、500 nmol/L (网络版彩图)

图 4 不同棒曲霉毒素浓度条件下体系的紫外图谱. 插图为不同浓度棒曲霉毒素浓度与体系吸光度 A_{650}/A_{521} 的标准曲线(网络版彩图)

浓度的棒曲霉毒素检测紫外可见吸收光谱. 再通过 A_{650}/A_{521} 的比值绘制棒曲霉毒素标准曲线, 线性回归方程为 $y=0.22026x+0.13648$ ($R^2=0.99085$), 线性范围为 0.1~10 ng/mL, 最低检测限为 0.1 ng/mL.

3.7 苹果汁中棒曲霉毒素加标回收实验

构建上述实验方法, 对浓度为 0.15、0.40、0.90 ng/mL 的棒曲霉毒素苹果汁溶液进行孵育, 得到的 A_{650}/A_{521} 与标准曲线数据对比, 计算加标回收率, 每

表 1 苹果汁中棒曲霉毒素的检测回收率

编号	初始浓度 (ng/mL)	加入浓度 (ng/mL)	本检测法 回收率(%)	高效液相色谱法 检测回收率(%)
1	0	0	0	0
2	0	0.15	106.20	98.11
3	0	0.40	88.12	95.35
4	0	0.90	95.87	105.15

浓度设置平行 3 次, 并设置不加入毒素的空白样品作为对照. 同时用高效液相色谱法对相同样品进行检测. 如表 1 所示, 本实验构建的棒曲霉毒素检测方法, 与传统的高效液相色谱检测法相比, 结果相差不大, 表明了本检测方法的可行性.

4 结论

根据适配体可以通过静电作用吸附到纳米金表面, 这种吸附使纳米金在高盐环境下不易聚沉变色; 而当靶标存在时, 特异识别靶标的适配体形成特殊构象与靶标结合从纳米金上脱落下来, 导致纳米金失去适配体保护而团聚变色这一机理, 构建了一种基于适配体识别-可视化检测棒曲霉毒素的方法. 该方法操作简单、灵敏度高, 且选用的适配体特异性强、稳定性好、易于合成, 可以作为检测棒曲霉毒素的备选方法.

参考文献

1 Bennett JW, Mycotoxins KM. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 3: 497-516
2 Moake MM, Padilla-Zakour OI, Worobo RW. *Compr Rev Food Sci F*, 2005, 4: 8-21
3 van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389: 147-157
4 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量. GB2761-2011. 北京, 2011-04-20
5 Scott PM, Lawrence JW, van Walbeek W. *Appl Microbiol*, 1970, 20: 839-842
6 Shephard GS, Leggott NL. *J Chromatogr A*, 2000, 882: 17-22
7 Ito R, Yamazaki H, Inoue K, Yoshimura Y, Kawaguchi M, Nakazawa H. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 7464-7468
8 De Champdoré M, Bazzicalupo P, De Napoli L, Montesarchio D, Di Fabio G, Cocozza I, Parracino A, Rossi M, D'Auria S. *Anal Chem*, 2007, 79: 751-757
9 马强, 朱定波, 杨杏芳, 刘爽, 唐书泽. 食品工业科技, 2013, 15: 306-308
10 李康, 应美蓉, 盛慧萍, 桑丽雅. 食品安全质量检测学报, 2013, 1: 201-206
11 Ellington AD, Szostak JW. *Nature*, 1990, 346: 818-822
12 Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249: 505-510
13 Blank M, Blind M. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, 9: 336-342
14 孔荣梅, 陈卓, 叶茂, 张晓兵, 谭蔚泓. 中国科学: 化学, 2011, 41: 1659
15 Tombelli S, Minunni A, Mascini A. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 2424-2434
16 Chen Z, Huang Y, Li X, Zhou T, Qiang H, Liu Y. *Anal Chim Acta*, 2013, 787: 189-192

17 Liu J, Lu Y. *Nat Protoc*, 2006, 1: 246–252

18 Xu M, He Y, Gao Z, Chen G, Tang D. *Microchim Acta*, 2015, 182: 449–454

A colorimetric method for Patulin detection based on aptamer and gold nanoparticles

Nuo Duan¹, Weixiao Zhang¹, Shijia Wu^{1,2}, Zhouping Wang^{1*}

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

² School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

*Corresponding author (email: wangzp@jiangnan.edu.cn)

Abstract: Patulin is a mycotoxin produced by *Penicillium claviforme*, *Aspergillus clavatus*, *Byssoschlamys fulva*, which reported to have acute toxicity and chronic toxicity to human body. In this work, a colorimetric method was established for patulin determination based on aptamer and gold nanoparticles. Under the optimal conditions, the correlation between concentration of target and A_{650}/A_{521} was observed to be linear within the range of 0.1 to 10 ng/mL. The linear regression equation was $y=0.3021x+0.0713$ ($R^2=0.9910$), and the detection limit of the proposed method was 0.1 ng/mL. The detection of the apple juice samples showed that this developed method could be used for detection of the real sample, recovery of standard was 95.87%–106.20%.

Keywords: patulin, aptamer, gold nanoparticles, colorimetric

doi: 10.1360/N032015-00202