庆大霉素特异性单链DNA适配体的筛选、表征和应用

巫朦朦¹, 韩旭艳¹, 蔡蓉凤¹, 李茂林^{2*}, 田亚平¹, 周楠迪^{1*}

1. 江南大学生物工程学院, 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2. 宜兴市肿瘤医院检验科, 宜兴 214200

* 联系人, E-mail: 13961511114@163.com; zhounandi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-10-31; 接受日期: 2018-12-25; 网络版发表日期: 2019-02-18

国家自然科学基金(批准号: 31271860)、江苏省六大人才高峰(批准号: JY-078)和国家轻工技术与工程一流学科自主课题(批准号: LITE2018-07)资助

摘要 庆大霉素是一种常用的氨基糖苷类抗生素, 对细菌尤其是革兰氏阴性菌有显著的抑菌作用, 但其本身具有较强的毒副作用, 而不规范的使用会对环境和人体健康产生危害. 因此, 建立一种高灵敏的快速检测庆大霉素的方法对于加强食品市场监管和环境监控具有重要意义. 本文利用基于Sephacrose亲和层析的指数富集的配体系统进化技术, 经过九轮筛选和克隆测序, 从体外合成的全长为79个核苷酸的随机单链DNA文库中筛选得到34条与庆大霉素有亲和力的适配体序列. 通过同源性分析将这些序列分为6个家族, 利用Mfold软件分析这些序列的二级结构及其稳定性, 从中选出结构稳定性最高的序列进行解离常数(K_d)测定, 最后得到一条与庆大霉素具有极高亲和力的适配体Ap-26, 其解离常数(K_d)为 14.00 ± 3.34 nmol/L. 通过Autodock 4.0软件对Ap-26与庆大霉素进行分子对接模拟, 结果表明Ap-26与庆大霉素主要的结合位点是17~20, 54~56位核苷酸. 在此基础上, 利用适配体Ap-26为识别元件构建了基于金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)比色检测庆大霉素的方法, 验证了该适配体的应用潜力. 当庆大霉素的浓度在50~700 nmol/L范围内时, AuNPs溶液在520 nm处的吸光值与庆大霉素的浓度存在良好的线性关系, 检测限为11.50 nmol/L. 将该方法应用于牛奶样品中庆大霉素的检测时发现牛奶基质成分对检测结果的影响很小, 庆大霉素的回收率均超过90%. 以上结果表明本文筛选得到的庆大霉素适配体能有效应用于庆大霉素检测方法的构建.

关键词 庆大霉素, 指数富集的配体系统进化技术, 适配体, 亲和层析, 金纳米粒子

庆大霉素(gentamicin)是小单孢菌属(*Micromonospora* sp.)发酵产生的一组结构相近的多组分氨基糖苷类抗生素^[1]. 庆大霉素主要用于治疗细菌感染, 尤其是革兰氏阴性菌引起的感染^[2], 其作用机制是通过与细

菌核糖体30S小亚基上的16S rRNA结合, 引起遗传密码的误读, 阻断细菌蛋白质的合成, 并破坏细胞膜的完整性, 从而抑制细菌活性^[3]. 庆大霉素在我国曾因抗菌谱较广、抑菌效果好、价格低廉且易得的优点而被广

引用格式: 巫朦朦, 韩旭艳, 蔡蓉凤, 等. 庆大霉素特异性单链DNA适配体的筛选、表征和应用. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 637–648

Wu M M, Han X Y, Cai R F, et al. Selection, characterization and application of gentamicin-specific single-stranded DNA Aptamers (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 637–648, doi: 10.1360/N052018-00238

泛应用于临床, 后因其严重的毒副作用, 特别是耳毒性和肾毒性以及导致肠道菌群失调引发相关肠道类疾病而逐步被其他类型抗生素所取代^[4]. 但目前仍广泛用于动物呼吸道和消化道疾病的治疗, 对奶牛子宫内膜炎和乳房炎也有很好的治疗效果^[5-7]. 由于庆大霉素的不规范使用会带来动物源性食品和环境中的庆大霉素残留过量的问题, 目前我国对庆大霉素的残留进行了严格的限定, 规定内脏、牛奶和奶粉中的庆大霉素最大残留量为20 µg/kg, 肉类和水产品为10 µg/kg. 因此, 建立简便、快速、高灵敏度的庆大霉素检测方法对于食品安全监管和环境监测等有着重要意义. 目前, 与其他抗生素的检测类似, 常规的庆大霉素检测方法主要有微生物检测法、免疫检测法、仪器分析法等^[8-10], 这些方法存在操作复杂、成本高、耗时长、灵敏度低等缺点, 难以达到快速、准确地检测庆大霉素的要求, 亟需建立新型有效和经济的庆大霉素检测方法.

近年来, 以适配体(aptamer)为识别元件的生物传感检测法因特异性高、灵敏度高, 能有效克服常规检测方法的缺点而备受关注. 适配体又称为适配子, 是通过指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)从随机寡核苷酸文库中筛选得到的一类能够与靶分子高选择性、高特异性结合的单链DNA(ssDNA)或RNA. 自1990年Tuerk等人^[11]和Ellington等人^[12]首次提出适配体这一概念及筛选方法以来, 越来越多的适配体序列得到报道. 适配体在空间上具有一定的延展性, 当与靶标相互作用时, 其在静电引力、氢键、范德华力和碱基堆积等作用下能够自身折叠形成复杂的结构, 如G-四聚体、凸环、发夹、茎和环等, 从而形成与靶物质形状匹配、紧密契合的结构^[13]. 作为一种新型的分子识别元件, 适配体与抗体相比有其独特的优势^[14-17]: (i) 靶标范围更广, 包括离子、抗生素和毒素等小分子物质; (ii) 筛选周期短, 在较短时间内就能获得符合预期的适配体序列; (iii) 可在体外快速大量地合成且批次之间的差异较小, 制备过程更加简单; (iv) 易于修饰, 可与其他分子或功能基团连接; (v) 适配体分子量小、体积小, 组织渗透性更好; (vi) 与目标物具有与抗体相当或更高的亲和力和特异性. 目前靶向抗生素的适配体已经陆续有报道, 包括特异性识别链霉素^[18]、卡那霉素^[19]、妥布霉素^[20]、恩诺沙星^[21]、氯霉素^[22]、氧氟沙星^[23]等的适配体序列, 这些

适配体也已被用于构建多种类型的抗生素检测方法, 包括电化学法^[24,25]、比色法^[26]、荧光法^[27]、化学发光法^[28]等. 与微生物检测和理化检测等常规方法相比, 基于适配体的检测方法具有更高的灵敏度; 而与基于抗体的免疫分析法相比, 适配体的特点赋予其检测方法构建的多样性和灵活性.

纳米粒子是指尺寸在纳米级别的超微粒子, 其具备一些特有性质, 如量子尺寸效应、表面效应和非线性光学效应等, 因此表现出与宏观物截然不同的磁学、电学、热学和化学物质等性质^[29-31]. 目前, 纳米粒子由于其极强的吸附力和较好的生物相容性而被广泛应用于适配体生物传感器的构建. 其中, 金纳米粒子(AuNPs)是迄今研究和应用最多的一种金属纳米粒子^[32,33], 其易于通过物理吸附、配位交联等方法形成金标记物, 在医学诊断、成像、生物传感器、催化和药物运输等方面得到了广泛的应用^[34-36]. AuNPs溶液也称胶体金溶液, 是一种带负电的胶体溶液, 在静电斥力作用下具有良好的稳定性. 但在高盐溶液中, AuNPs的稳定性会遭到破坏而发生聚集, 该过程中溶液也会由酒红色逐渐加深至蓝色或灰色, 从而被广泛用于建立基于AuNPs的比色分析方法. 该方法通过灵敏的颜色变化来检测靶分子, 具有可视化、简便快捷、灵敏度高等优点.

迄今为止, 尚无庆大霉素特异性ssDNA适配体的报道, 本文利用基于Sepharose亲和层析的SELEX法从初始随机文库中筛选出与庆大霉素有高亲和力的ssDNA适配体, 进一步对适配体的结构和结合特性进行表征, 并利用适配体为分子识别元件构建了快速检测庆大霉素的AuNPs比色法.

1 材料与方法

1.1 材料

随机ssDNA初始文库为: 5'-TAGGGAATTCGTC-GACGGATCC-N35-CTGCA GGTCGACG-CATGCGCCG-3', 两端为固定序列, 用于PCR扩增时与引物配对, 中间为35个碱基的随机序列; PCR扩增引物两对, 序列如下:

引物I-1: 5'-TAGGGAATTCGTCGACGGAT-3';

引物I-2: 5'-FAM-TAGGGAATTCGTCGACGG-AT-3';

引物II-1: 5'-CGGCGCATGCGTCGACCTG-3';

引物II-2: 5'-biotin-CGGCGCATGCGTCGACCTG-3'. 以上序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成. *N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)、活化的琼脂糖凝胶(NHS-activated Sepharose 4FF)购自GE公司(美国). 链霉亲和素磁珠(Dynabeads M-280)购自DynaI公司(美国).

1.2 亲和层析柱的准备

亲和层析介质的制备方法主要参考Song课题组^[37]的实验方法, 具体流程如下: 将15 mL NHS活化的琼脂糖凝胶和10 mL溶于偶联缓冲液(0.2 mol/L NaHCO₃, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0)的10 mmol/L庆大霉素混匀, 28℃轻微摇晃4 h. 然后, 将偶联后的琼脂糖凝胶用偶联缓冲液清洗5遍, 加入封闭缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.5), 37℃轻微摇晃封闭6 h. 封闭完成后, 用3倍柱体积的去离子水清洗琼脂糖凝胶, 再依次通过清洗液1(0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠, pH 4.0)、去离子水、清洗液2(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 4.0)和去离子水重复清洗两次. 最后将偶联了庆大霉素的琼脂糖凝胶重新悬浮于5 mL结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, pH 7.6), 装柱备用.

1.3 体外筛选

筛选流程主要包括4个步骤, 即孵育、分离、洗脱、扩增. 具体过程如下. (i) 孵育: 将1.5 nmol ssDNA文库溶于5 mL结合缓冲液中, 95℃变性10 min, 迅速冰浴5 min, 室温放置10 min; 再将其加入到经结合缓冲液预平衡过的亲和层析柱中, 室温孵育1 h. (ii) 分离: 孵育结束后, 利用结合缓冲液进行洗涤, 除去未与庆大霉素结合的ssDNA. (iii) 洗脱: 通过洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L庆大霉素, pH 7.6)将结合在凝胶上的ssDNA洗脱下来, 收集洗脱液获得与庆大霉素特异性结合的ssDNA; (iv) 扩增: 将上述特异性结合的ssDNA作为模板以引物 I -1和引物 II -2进行PCR扩增, 并用3%的琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果.

1.4 ssDNA次级文库的制备

取25 μL链霉亲和素修饰过的磁珠, 用结合与清洗(binding&washing, B&W)缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L NaCl, pH 7.5)清洗3遍, 再加入20 μL PCR产物(双链中一条含生物素修饰)和80 μL B&W缓冲液, 轻微振荡, 室温反应1 h. 然后, 将其置于磁性分离架上, 弃上清液. 用B&W缓冲液清洗3遍后, 加入30 μL的0.1 mol/L NaOH, 在37℃水浴锅中变性2 h, 洗脱从磁珠上释放的单链, 重复两次, 收集洗脱液即可用作次级文库进行下一轮筛选.

1.5 次级文库结合率的测定

筛选得到的ssDNA次级文库用引物 I -2和 II -2进行PCR扩增, 扩增产物通过链霉亲和素磁珠法获得FAM标记的ssDNA次级文库. 取4 pmol FAM标记的ssDNA次级文库, 加入100 μL结合缓冲液, 混合均匀于95℃变性10 min, 迅速冰浴5 min, 室温放置10 min. 实验组加入10 μL的10 μmol/L庆大霉素溶液, 对照组加入等体积的结合缓冲液, 并用结合缓冲液分别将体系补充至250 μL. 常温轻微摇晃1 h后, 向实验组和对照组分别加入5 μL氧化石墨烯溶液, 混匀后轻微摇晃2 h. 将混合液于4℃, 8000 r/min离心10 min, 取上清液200 μL, 利用多功能酶标仪测定荧光值(激发波长494 nm, 发射波长520 nm). 实验组与对照组荧光值的差值即为ssDNA次级文库与庆大霉素结合的荧光强度.

1.6 筛选产物的克隆、测序和序列分析

经9轮筛选得到的ssDNA文库用引物 I -1和引物 II -1进行PCR扩增, 产物胶回收纯化后连接到pMD-19T载体, 转化JM109感受态细胞, 挑取阳性转化子送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序.

对测序成功的适配体序列进行分析, 用DNAMAN软件分析其一级结构的同源性, 并用Mfold软件对其二级结构进行模拟, 最优适配体使用Autodock 4.0软件与庆大霉素分子进行对接模拟, 预测出适配体与庆大霉素作用的主要核苷酸位点.

1.7 适配体解离常数(K_d)的测定和特异性验证

取不同浓度梯度的FAM标记的适配体溶液(0~

500 nmol/L)与固定浓度的庆大霉素(400 nmol/L)室温孵育1 h后,加入氧化石墨烯(graphene oxide, GO)室温孵育2 h. GO能特异性地吸附游离的ssDNA,而不能吸附与庆大霉素结合的适配体DNA. 将上述混合物于4℃, 8000 r/min离心10 min, 取上清液. 然后,用200 μL结合缓冲液重悬沉淀,再以相同的条件取上清液. 最后将两次离心所得上清液置于96孔板中,用多功能酶标仪测其荧光强度. 根据测量得到的荧光值,利用Graph-Pad Prism5.0软件进行非线性回归分析,根据公式: $Y=B_{\max} \times X/(K_d+X)$ 计算出 K_d 值($B_{\max}$ 为最大结合位点的数目, X 为适配体浓度, Y 为荧光强度).

为了验证筛选获得的适配体与庆大霉素结合的特异性,分别用卡那霉素、新霉素、四环素、氨基青霉素、妥布霉素与过量的适配体进行孵育. 依次用多功能酶标仪测定其结合的ssDNA的荧光强度.

1.8 金纳米粒子比色法检测庆大霉素

采用柠檬酸三钠还原法制备AuNPs^[20]. 将100 μL的AuNPs溶液与100 μL的100 nmol/L庆大霉素适配体混匀, 室温避光反应1 h, 然后向上述混合物中加入50 μL不同浓度的庆大霉素标准溶液(0~700 nmol/L), 避光反应50 min. 最后向反应物中加入50 μL的200 mmol/L NaCl溶液, 并进行紫外-可见吸收光谱表

征, 利用520 nm处的吸光度与庆大霉素浓度之间的关系对庆大霉素进行检测.

为了证明该方法的实用性, 将其应用于人工污染的牛奶样品中庆大霉素的检测. 首先向市售牛奶中添加不同浓度的庆大霉素标准溶液(50, 100, 200, 500 nmol/L), 再滴加20%三氯乙酸调节pH至4.6, 然后45℃水浴10 min沉淀牛奶样品中的蛋白, 再以10000 r/min离心20 min除去凝结的蛋白质和脂肪, 即得到经预处理的含庆大霉素的牛奶样品. 将该样品作为检测液, 按上述方法进行检测.

2 结果

2.1 SELEX筛选

庆大霉素适配体筛选的流程如图1所示. 当ssDNA文库加样到层析柱中与庆大霉素修饰的琼脂糖凝胶孵育后, 没有与庆大霉素结合的大部分ssDNA随结合缓冲液流出, 只有与庆大霉素有亲和力的序列结合在柱子上. 将结合序列洗脱后, 以不带修饰的上游引物和生物素修饰的下游引物进行PCR扩增, 并通过生物素-链霉素和素的相互作用, 将扩增产物dsDNA结合到磁珠上, 加NaOH变性后释放出的ssDNA即可作为下一轮筛选的文库.

图1 基于亲和层析的庆大霉素适配体筛选原理图

Figure 1 A schematic procedure of the SELEX process using affinity chromatography

在SELEX筛选过程中, 每一轮的筛选产物通过荧光法测定ssDNA文库与庆大霉素的结合率. 结合率越高, 表明所得ssDNA与庆大霉素的亲和力越高, 筛选一直进行到结合率达到饱和为止. 如图2A所示, 随着筛选轮数的增加, ssDNA文库与庆大霉素的结合率越来越高, 当筛选到第九轮时, 结合率达到最大值且趋于平稳, 表明此时庆大霉素适配体的富集已经达到饱和. 因此, 将第九轮筛选所得的ssDNA文库克隆并测序. 图2B是第一轮和第九轮筛选得到的PCR产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图, 与第一轮相比, 第九轮筛选结束后PCR产物的电泳条带更加集中且明亮.

2.2 测序结果分析

将第九轮筛选得到的适配体进行克隆、测序, 得到34条序列. 根据同源性和二级结构的相似性, 将这34条序列分为6个家族, 如表1所示. 从34条序列中选择序列较多的家族中结构最稳定(ΔG 值最低)的序列, 序列5, 8, 22和26作为庆大霉素最优适配体的候选序列, 进行FAM标记适配体的合成和解离常数的测定.

2.3 适配体的亲和力测定和特异性分析

采用荧光分析法测定候选适配体序列与庆大霉素的亲和力. 根据测定的荧光强度, 拟合饱和曲线并得出解离常数. 如图3A所示, 序列5, 8, 22和26的 K_d 值分别为

74.50 ± 9.77 , 80.25 ± 9.04 , 96.34 ± 18.96 和 14.00 ± 3.34 nmol/L. K_d 值的大小代表序列与靶标亲和力的高低, K_d 值越小, 表明该序列与靶标的亲和力越高. 因此, 序列26被选作最佳的庆大霉素适配体, 命名为Ap-26.

根据亲和力的考察结果, 对Ap-26的特异性进行验证. 将Ap-26分别与庆大霉素、卡那霉素、新霉素、四环素、氨苄青霉素和妥布霉素孵育, 用氧化石墨烯吸附未与抗生素结合的ssDNA序列, 离心取上清液进行荧光强度检测. Ap-26与不同抗生素结合的荧光强度如图3B所示, 与庆大霉素结合的适配体荧光强度显著高于其他抗生素. 因此, Ap-26是庆大霉素的高亲和力和高特异性适配体序列.

2.4 最佳适配体的结构分析

用Autodock 4.0软件对Ap-26与庆大霉素进行分子对接模拟, 确定出Ap-26与庆大霉素作用时的主要核苷酸位点. 如图4A所示, 庆大霉素与Ap-26作用的主要位点是17~20和54~56号核苷酸. 利用Mfold在线软件分析Ap-26的二级结构, 如图4B所示, 形成了3组茎环状结构, 红色矩形框内的核苷酸为预测的庆大霉素结合位点, 其中17~20号核苷酸位于其中一个茎环结构的双螺旋区内, 而54~56号核苷酸位于单链区内, 推测这两个区域在进一步形成空间结构时构成了庆大霉素的结合位点.

图2 庆大霉素适配体筛选轮数的确定. A: SELEX筛选过程中结合庆大霉素的ssDNA的荧光强度; B: 第一轮和第九轮筛选后PCR产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图(1: 第九轮筛选产物; 2: 第一轮筛选产物)

Figure 2 Determination of the selection rounds of gentamicin aptamer. A: Fluorescent intensity of gentamicin bound ssDNA after each SELEX round. B: Polyacrylamide gel electrophoresis image for PCR products after the first round and the ninth round of selection (1: The ninth round; 2: the first round)

表 1 庆大霉素适配体的随机序列和家族分类

Table 1 Random sequence and family classification of gentamicin aptamers

家族	中间35个随机序列	编号	ΔG (kcal/mol)
I	AATGAATAGCGGGCTGTACTGTGGGTCAGCCACCC	1	-9.34
	CGCATAAGTGGCGTTCGCAGCGAGATAGGAACCTC	2	-9.40
	CATCACCGGAAGGGTAGCCCTCGATTTCATCGT	3, 4	-9.71
	GTTCTGTACGCGAACCGGTCCTTGATCGTAATCG	5	-11.98
	GTAATTCGGACCGGAACATTTCGCGTTTGCATTAT	6	-11.23
II	GCACCGTGACTTTTG GTTCTCTTCGCGCCAAGTC	7	-6.83
	CGGGAACGGGGGCTAAGAACTTGGAACCTGCGCCT	8, 9	-11.66
	GCGTCCGTAATACATTTCTGTTCGGTTGTCCGACT	10	-9.34
	GGCTCTGTAAAATTATATCCGATCGTATTACCCCTC	11	-6.76
	CCCTTCTTAAATTGTCTAGGTTCCCTTCTTTCTAT	12	-6.46
	GCAAGTATATTGTGTTGGTCCTTCTCTGAGAGGTA	13	-7.74
	CGCCTATACCTAAGCGCCTTGATTCGACTTTCATC	14	-11.08
	ACCCTGGCGTAAAGGGTTTGCATAAGCTTACACA	15	-8.55
	CGCCATATTCCATTCTAGCTTCTAATTTGCGGACG	16	-7.88
	ACATTCGTTGAGGATTCTGGCTTCT TCCTTGTACC	17	-7.38
	GACTGGTACTTCCTTTGGTGTGTACGAATTGCGCG	18	-9.90
III	TGTTGGTGTGAGCGTGCCGTAATATGCGAGATTTT	19	-6.92
	TTTGCCAATCCCATGGTGTCTTCTAGTCCAGGTT	20	-5.65
	GTTCTATATCGATTGTCTCGGCATCAGTTCTCATC	21	-7.21
	TGTATATGCAACGTCTCCGCTCTGGTACTTTGTAT	22	-10.5
	CTGTTAGCCTAGTTTTCAGTCGCAGTTGCTTCCCT	23	-9.35
IV	AGGCTTTCAAACAGGTCCTACCGCTGAGTTTGACA	24	-8.45
	ACATTGGCATGTAAGTCGTATCGTACTCGCGGGT	25	-7.66
	CATCGTCTTCTGAAGTGTGTTCTCAATAGCGTGG	26	-9.08
	CGCATCCTTCTCTAGCGAGGTCTTGCCCAATCATG	27	-7.62
	TTAGCCGGTTAGTATTTGCTTGATGGTGGGCACGT	28	-6.61
V	AGGTCTCCGAATCCGCTAGTACTAATTCAGGTTC	29	-7.01
	AGTTGTCTAATGGTGATTGTACTAGTAAAGGGACA	30	-6.81
	GTCCAATCCTACTCAAGACGATACAGAGTACAATG	31	-7.08
	CTTGCCATACGATAAGCAGTTGTTACGTGTCTCT	32	-9.54
VI	CCGGCGGGGGGTTTAAATCCTTCCTGTGTATTAGG	33	-10.03
	GGTTGATGTCGACCCTATTTGACCTTCGTCTTGT	34	-9.60

2.5 AuNPs比色法检测庆大霉素

为了考察筛选得到的Ap-26在庆大霉素残留检测中的应用性能, 构建了基于适配体Ap-26的AuNPs比色法检测庆大霉素. 研究表明, ssDNA可以在静电引力等的作用下, 包裹在AuNPs的表面, 使得AuNPs在高浓度

盐离子(如钠离子、钾离子等)的溶液中保持稳定而不会发生聚集反应^[37]. 在此条件下, AuNPs溶液由于表面等离子共振作用而呈现为酒红色, 且在520 nm处有最大吸收. 而裸露的AuNPs在较高浓度的盐离子存在下会发生聚集, 溶液颜色由原来的酒红色变为紫色或蓝色甚至是蓝灰色. 当Ap-26与AuNPs孵育后, 其均匀覆

图 3 庆大霉素适配体的亲和力和特异性分析. A: ssDNA与庆大霉素的饱和曲线; B: Ap-26的特异性表征

Figure 3 Analysis of the affinity and specificity of gentamicin aptamers. A: The saturation curves for the dissociation constants of ssDNA towards gentamicin. B: Characterization of specificity of Ap-26

图 4 适配体Ap-26的结构分析. A: 庆大霉素与Ap-26分子对接模拟图; B: Ap-26的二级结构预测

Figure 4 Structural analysis of Ap-26. A: Molecular docking of AP-26 with gentamicin. B: Secondary structure of Ap-26

盖在AuNPs表面, 使AuNPs在一定的盐浓度下仍然保持分散状态而颜色不会发生变化. 但当庆大霉素存在时, 其能够竞争性地与AuNPs表面的Ap-26结合, 使得适配体从AuNPs表面脱离, AuNPs表面形成裸露状态, 在高盐溶液中会发生聚集, 颜色也会发生变化. 并且随着庆大霉素浓度的升高, 其可以特异性地与更多AuNPs表面的适配体结合, 从而使AuNPs表面暴露程度更高, 在高浓度NaCl作用下, 溶液颜色逐步由原来的酒红色变为紫色、蓝色甚至蓝灰色, 如图5A所示. 因而通过肉眼观察, 即可实现庆大霉素的定性和半定量测定. 为了实现庆大霉素的定量检测, 对AuNPs溶液的UV-Vis光谱进行了分析, 如图5B所示, AuNPs在

520 nm处的吸光度值也随着庆大霉素浓度的不断增加而逐步下降. 进一步考察了AuNPs溶液在520 nm处的吸光度与庆大霉素浓度的关系, 如图5C所示, 当庆大霉素的浓度在50~700 nmol/L范围内时, AuNPs溶液在520 nm处的吸光值随着庆大霉素浓度的增大而逐渐减小, 呈现良好的线性关系, 线性方程为: $y = -2.849e-4x + 0.8528$ ($R^2 = 0.9897$), 该方法的检测限达到11.50 nmol/L, 低于国家标准中最低残留量要求. 为了验证AuNPs比色法检测庆大霉素的特异性, 依次向Ap-26修饰的AuNPs中加入600 nmol/L的庆大霉素、卡那霉素、新霉素、四环素、氨苄青霉素以及妥布霉素溶液, 再加入高浓度的NaCl溶液, 如图5D所示, 加入庆大

图 5 AuNPs比色法检测庆大霉素. A: 在不同浓度庆大霉素存在下, AuNPs的聚集和颜色变化情况 (1: 0 nmol/L; 2: 50 nmol/L; 3: 100 nmol/L; 4: 200 nmol/L; 5: 300 nmol/L; 6: 400 nmol/L; 7: 500 nmol/L; 8: 600 nmol/L; 9: 700 nmol/L); B: 在不同浓度庆大霉素存在下, AuNPs溶液在NaCl溶液中的UV-Vis光谱图; C: AuNPs溶液在520 nm处的吸光值与庆大霉素浓度的线性关系图; D: AuNPs比色法检测庆大霉素的特异性验证(1: 庆大霉素; 2: 卡那霉素; 3: 新霉素; 4: 四环素; 5: 氨苄青霉素; 6: 妥布霉素)

Figure 5 AuNPs-based colorimetric assay of gentamicin. A: The aggregation of AuNPs and corresponding color change in the presence of different concentrations of gentamicin (1: 0 nmol/L; 2: 50 nmol/L; 3: 100 nmol/L; 4: 200 nmol/L; 5: 300 nmol/L; 6: 400 nmol/L; 7: 500 nmol/L; 8: 600 nmol/L; 9: 700 nmol/L). B: The UV-vis spectra of AuNPs in NaCl solution in the presence of different concentrations of gentamicin. C: The linear relationship between the absorbance of AuNPs at 520 nm and the concentration of gentamicin. D: Specificity verification of AuNPs colorimetric method for detection of tobramycin (1: gentamicin; 2: kanamycin; 3: neomycin; 4: tetracycline; 5: ampicillin; 6: tobramycin)

表 2 AuNPs比色法检测牛奶样品中庆大霉素的结果及回收率

Table 2 The results and recovery of gentamicin detection in milk samples by using AuNPs-based colorimetric assay

加入庆大霉素浓度 (nmol/L)	牛奶样品 (n=3)	
	检测浓度 (nmol/L)	回收率 (%)
50	43.27±3.37	86.54
100	92.38±8.26	92.38
200	187.1±13.41	93.56
500	455.3±16.14	91.06

霉素的离心管中AuNPs溶液变为蓝灰色, 而加入其他抗生素的离心管中AuNPs溶液颜色未发生明显变化. 由此可见, 该方法检测庆大霉素具有良好的特异性.

为了进一步验证AuNPs比色法在检测实际样品中庆大霉素时的实用性, 将该方法应用于对人工污染庆

大霉素的牛奶的检测. 如表2所示, 当牛奶中添加的庆大霉素浓度为50, 100, 200和500 nmol/L时, 检测结果与庆大霉素标准品的实验结果基本一致, 说明牛奶样品基质成分对检测结果影响较小, 即该方法可以用于实际牛奶样品中庆大霉素的检测.

3 讨论

庆大霉素是应用较为广泛的一种氨基糖苷类抗生素, 除应用于临床治疗外, 还常被用作兽用饲料的添加物. 但是, 随着庆大霉素毒副作用的阐明, 在临床方面已逐步被其他抗生素所取代, 而在其他领域则仍有使用, 而不规范使用最终会将庆大霉素残留带到食品和环境, 对人体健康产生严重危害. 因此, 建立高灵敏度、高特异性、简便的庆大霉素检测方法十分必要.

目前以仪器分析为核心手段的方法虽然具有稳定性好、特异性高等优点,但无法解决市场监管等场合现场快速检测的需求.以适配体为核心元件的生物传感器为快速简便、高灵敏度、高特异性检测庆大霉素提供了可能.

SELEX技术是应用库容量达到 $10^{12} \sim 10^{15}$ 的随机寡核苷酸文库,结合PCR扩增技术,以指数的方式富集与靶分子高特异性结合的寡核苷酸,最终经过多轮体外筛选获得高特异性、高亲和力的适配体.目前,针对小分子靶标的筛选方法主要有磁珠SELEX、氧化石墨烯SELEX (GO-SELEX)及亲和层析SELEX等.相比其他几种SELEX技术,亲和层析SELEX在操作上虽略复杂,但在高效分离与靶标结合的ssDNA和游离ssDNA方面具有明显的优势,为筛选出高亲和力的适配体提供了更大的可能.本文以庆大霉素为靶标,利用亲和层析SELEX方法,通过九轮筛选,获得了34条与庆大霉素有亲和力的适配体.利用DNAMAN和Mfold软件分别对其同源性和二级结构进行分析,将其分为六大家族,并选择序列较大家族中结构最稳定的序列作为庆大霉素适配体的候选序列.这种方式可以大大降低实验工作量,有利于快速筛选出最优适配体序列,但也有可能遗漏部分具有优良特性的适配体序列.通过荧光分析法测定了5, 8, 22, 26号适配体序列的解离常数,其中26号适配体 K_d 值达到 14.00 ± 3.34 nmol/L,亲和力最大.本文采用亲和层析-SELEX筛选获得的适配体亲和力高于之前用磁珠-SELEX和GO-SELEX所得到的适配体,验证了亲和层析SELEX

的优势.同时,特异性实验表明,26号适配体不仅对庆大霉素具有高亲和力,还具有很高的特异性.因此将26号适配体选作最佳的庆大霉素适配体,命名为Ap-26.以Ap-26为识别元件构建的AuNPs比色法为庆大霉素提供了一种快速、简便和低成本检测方法.当庆大霉素的浓度在50~700 nmol/L范围内时,在520 nm处的吸光值与庆大霉素浓度之间存在线性关系,检测限为11.50 nmol/L.将该方法应用于牛奶样品中庆大霉素的检测,结果表明该方法能够成功实现实际样品的检测.与已报道的其他方法相比,该方法具有简便、快捷、灵敏度高优势(表3).基于Ap-26的AuNPs比色法是一种可以在1 h内完成的凭肉眼观测即可进行半定量分析庆大霉素的方法,为食品安全市场监管和环境监测等提供了有效的手段.

通常由SELEX筛选获得的适配体长度为70~130个核苷酸,其两端为用于PCR扩增时与引物结合的固定序列,中间为随机序列.固定序列和随机序列均有可能在形成核酸空间结构时参与靶标的结合位点.该长度的ssDNA合成成本还相对比较高,同时单链核酸的空间构象具有较大的可变性,在不同pH和离子条件下有可能发生改变,从而影响到适配体与靶标的结合力.由于与靶标结合及稳定结合位点的核苷酸只是适配体序列中的一小部分,对适配体进行截短,不仅可以减少在应用过程中的成本,还能提高靶标与适配体之间的结合效率,降低溶液条件对结合的干扰.预期在Ap-26的基础上利用分子对接预测的结合位点结果可为Ap-26的截短和优化提供理论基础.

表 3 本文建立的庆大霉素检测方法与其他已报道方法的比较

Table 3 Comparison of the proposed method with other reported methods for gentamicin detection

方法	原理	样品	检测限	参考文献
微生物检测法	根据庆大霉素对短小芽孢杆菌生命活动的抑制来定量检测庆大霉素的残留	兔血清	0.02 $\mu\text{g/mL}$	[8]
免疫检测法	利用庆大霉素抗体为识别元件,分别通过荧光偏振分析法、酶联免疫吸附法来测定庆大霉素	动物源性样品	0.17 $\mu\text{g/mL}$ 、 0.001 $\mu\text{g/mL}$	[9]
理化分析法	利用高效液相色谱蒸发光散射检测器对庆大霉素进行检测	鱼腥草	150 $\mu\text{g/mL}$	[10]
比色法	建立基于半胱胺修饰的金纳米粒子比色法检测庆大霉素	水	7.17×10 ng/mL	[1]
比色法	利用适配体对金纳米粒子的保护和庆大霉素的竞争置换作用	牛奶	11.50 nmol/L (6.62 ng/mL)	本文

参考文献

- 1 Gukowsky J C, Tan C, Han Z, et al. Cysteamine-modified gold nanoparticles as a colorimetric sensor for the rapid detection of gentamicin. *J Food Sci*, 2018, 83: 1631–1638
- 2 Liu Q, Mu H, Sun C, et al. Highly specific determination of gentamicin by induced collapse of Au-lipid capsules. *RSC Adv*, 2016, 6: 14483–14489
- 3 Jian X Y, Deng Z X, Sun Y H. Aminoglycoside gentamicin research: fundamental progress and new application prospects (in Chinese). *Chin J Biotech*, 2015, 31: 829–844 [简心韵, 邓子新, 孙宇辉. 氨基糖苷抗生素庆大霉素: 基础研究的新进展及应用研究的新潜力. *生物工程学报*, 2015, 31: 829–844]
- 4 Hu J G, Fu Y, Xu J J, et al. Altered gene expression profile in a rat model of gentamicin-induced ototoxicity and nephrotoxicity, and the potential role of upregulated Ifi44 expression. *Mol Med Rep*, 2017, 16: 4650–4658
- 5 Zhao J, Liu T, Cai B Y, et al. Determination of gentamicin in raw milk by high-performance liquid chromatography (in Chinese). *Food Res Dev*, 2015, 36: 94–97 [赵静, 刘婷, 蔡柏岩, 等. HPLC法测定原料乳中庆大霉素残留的研究. *食品研究与开发*, 2015, 36: 94–97]
- 6 Wang L Z, Li L L, Zhao Y, et al. Development of gentamicin semi quantitative colloidal gold test strip (in Chinese). *China Feed*, 2013, 20: 16–18 [王丽哲, 王丽丽, 赵瑜, 等. 牛奶中庆大霉素半定量胶体金试纸条的研制. *中国饲料*, 2013, 20: 16–18]
- 7 Ruan Z Y, Chen X, Sun W, et al. Isolation and identification of cow mastitis pathogenic bacteria and disk diffusion test (in Chinese). *Anim Husb Veter Med*, 2018, 50: 105–109 [阮智杨, 陈新, 孙雯, 等. 奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药物敏感试验. *畜牧与兽医*, 2018, 50: 105–109]
- 8 Yin Q S, Ren C L, Chen D L, et al. Determination of low concentration gentamycin in rabbit's serum by microbiological method (in Chinese). *Chin J Pharm Anal*, 2006, 26: 1811–1813 [尹情胜, 任翠丽, 陈殿良, 等. 微生物法测定兔血清中低浓度的庆大霉素. *药物分析杂志*, 2006, 26: 1811–1813]
- 9 Li C, Zhang Y, Eremin S A, et al. Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA. *Food Chem*, 2017, 227: 48–54
- 10 Wang J W, Gong X H, Fan Q, et al. Determination of gentamicin illegally added in houttuynia injection by HPLC-ELSD and UPLC-MS/MS (in Chinese). *Chin J Veter Drug*, 2018, 52: 45–51 [王静文, 龚旭昊, 范强, 等. HPLC-ELSD法联合UPLC-MS/MS法检测鱼腥草注射液中非法添加的庆大霉素. *中国兽药杂志*, 2018, 52: 45–51]
- 11 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249: 505–510
- 12 Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346: 818–822
- 13 Wang Y, Li S Z, You Y, et al. Application progress of aptamer in biotoxin detection (in Chinese). *J Henan Agricult Sci*, 2018, 47: 1–6 [王耀, 李少珍, 游一, 等. 适配体在生物毒素检测中的应用进展. *河南农业科学*, 2018, 47: 1–6]
- 14 Bauer M, Macdonald J, Henri J, et al. The application of aptamers for immunohistochemistry. *Nucl Acid Therap*, 2016, 26: 120–126
- 15 Han K, Liang Z, Zhou N. Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors*, 2010, 10: 4541–4557
- 16 Jauset-Rubio M, El-Shahawi M S, Bashammakh A S, et al. Advances in aptamers-based lateral flow assays. *TrAC Trends Anal Chem*, 2017, 97: 385–398
- 17 Sun H, Tan W, Zu Y. Aptamers: versatile molecular recognition probes for cancer detection. *Analyst*, 2015, 141: 403–415
- 18 Zhou N, Wang J, Zhang J, et al. Selection and identification of streptomycin-specific single-stranded DNA aptamers and the application in the detection of streptomycin in honey. *Talanta*, 2013, 108: 109–116
- 19 Song K M, Cho M, Jo H, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer. *Anal Biochem*, 2011, 415: 175–181
- 20 Han X, Zhang Y, Nie J, et al. Gold nanoparticle based photometric determination of tobramycin by using new specific DNA aptamers. *Microchim Acta*, 2018, 185: 4
- 21 Dolati S, Ramezani M, Nabavinia M S, et al. Selection of specific aptamer against enrofloxacin and fabrication of graphene oxide based label-free fluorescent assay. *Anal Biochem*, 2018, 549: 124–129
- 22 Mehta J, Rouah-Martin E, Van Dorst B, et al. Selection and characterization of PCB-binding DNA aptamers. *Anal Chem*, 2012, 84: 1669–1676

- 23 Zhang Y, You Y, Xia Z, et al. Graphene oxide-based selection and identification of ofloxacin-specific single-stranded DNA aptamers. *RSC Adv*, 2016, 6: 99540–99545
- 24 Xu Y, Sun L, Huang X, et al. A label-free and signal-on electrochemical aptasensor for ultrasensitive kanamycin detection based on exonuclease recycling cleavage. *Anal Methods*, 2016, 8: 726–730
- 25 Zheng D, Zhu X, Zhu X, et al. An electrochemical biosensor for the direct detection of oxytetracycline in mouse blood serum and urine. *Analyst*, 2013, 138: 1886–1990
- 26 Xu Y, Han T, Li X, et al. Colorimetric detection of kanamycin based on analyte-protected silver nanoparticles and aptamer-selective sensing mechanism. *Anal Chim Acta*, 2015, 891: 298–303
- 27 Ramezani M, Danesh N M, Lavaee P, et al. A selective and sensitive fluorescent aptasensor for detection of kanamycin based on catalytic recycling activity of exonuclease III and gold nanoparticles. *Sens Actuat B-Chem*, 2016, 222: 1–7
- 28 Leung K H, He H Z, Chan D S H, et al. An oligonucleotide-based switch-on luminescent probe for the detection of kanamycin in aqueous solution. *Sens Actuat B-Chem*, 2013, 177: 487–492
- 29 Nasir A, Kausar A. A review on materials derived from polystyrene and different types of nanoparticles. *Polymer-Plastics Tech Eng*, 2015, 54: 1819–1849
- 30 Chen M J, Yang W T, Yin M Z. Synthesis and applications of nanoparticles in biology (in Chinese). *Prog Chem*, 2012, 24: 2403–2414 [陈梦君, 杨万泰, 尹梅贞. 纳米粒子的分类合成及其在生物领域的应用. *化学进展*, 2012, 24: 2403–2414]
- 31 Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 2010, 6: 12–21
- 32 Atmane Y A, Sicard L, Lamouri A, et al. Functionalization of aluminum nanoparticles using a combination of aryl diazonium salt chemistry and iniferter method. *J Phys Chem C*, 2017, 117: 26000–26006
- 33 Häkkinen H. The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nat Chem*, 2012, 4: 443–455
- 34 Mirahadi M, Ghanbarzadeh S, Ghorbani M, et al. A review on the role of lipid-based nanoparticles in medical diagnosis and imaging. *Therap Deliver*, 2018, 9: 557–569
- 35 Bagheri H, Shirzadmehr A, Rezaei M, et al. Determination of tramadol in pharmaceutical products and biological samples using a new nanocomposite carbon paste sensor based on decorated nanographene/tramadol-imprinted polymer nanoparticles/ionic liquid. *Ionics*, 2018, 24: 833–843
- 36 Jørgensen M, Grönbeck H. The site-assembly determines catalytic activity of nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 5086–5089
- 37 Hu X, Chang K, Wang S, et al. Aptamer-functionalized AuNPs for the high-sensitivity colorimetric detection of melamine in milk samples. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0201626

Selection, characterization and application of gentamicin-specific single-stranded DNA Aptamers

WU MengMeng¹, HAN XuYan¹, CAI RongFeng¹, LI MaoLin², TIAN YaPing¹ & ZHOU NanDi¹

¹ Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

² Department of Clinical Laboratory, Yixing Cancer Hospital, Yixing 214200, China

Abstract Gentamicin is a widely used aminoglycoside antibiotic which acts effectively against a wide spectrum of bacteria, especially Gram-negative bacteria. Due to its serious side effect, the abuse of gentamicin will be harmful to the environment and human health. Therefore, it is important to establish a highly sensitive assay of gentamicin for the supervision of food market and environment monitoring. Herein, Sepharose affinity chromatography-based systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) was carried out to screen gentamicin-specific aptamers. Through nine rounds of selection and subsequent cloning and sequencing, 34 aptamer sequences were screened from a 79-nucleotides initial ssDNA library. These sequences were classified into 6 families according to homology analysis. Then Mfold software was employed to predict the secondary structures and the stability of these aptamers. Aptamers with a high stability were chosen to determine the dissociate constants (K_d). An aptamer named Ap-26 was finally screened, whose K_d was determined to be only 14.00 ± 3.34 nmol/L, indicating very high affinity for gentamicin. Molecular docking was carried out by Autodock 4.0 software. The result shows that nucleotides No. 17–20 and 54–56 of the aptamer were the binding sites towards gentamicin. Finally, Ap-26 was used as recognition element to construct gold nanoparticles (AuNPs)-based colorimetric assay for gentamicin, which further verified the practicability of the aptamer. Within the range of 50–700 nmol/L, a linear relationship was derived between the absorbance of AuNPs solution at 520 nm and the concentration of gentamicin. The detection limit was estimated to be 11.50 nmol/L. The assay was then applied to detect gentamicin in milk samples. The results show that the matrix of milk hardly affects the detection, and the recovery of gentamicin is higher than 90%. Therefore, the screened aptamer and the established assay may have great prospect in the detection of gentamicin.

gentamicin, SELEX, aptamer, affinity chromatography, gold nanoparticles

doi: [10.1360/N052018-00238](https://doi.org/10.1360/N052018-00238)