

伏马毒素 B₁ 核酸适配体链置换探针的筛选及应用*

王红旗¹ 王俊艳¹ 洪慧杰² 尹海燕¹ Chris Maragos³ 张玲¹ 刘继红¹

(1. 河南省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 郑州 450002; 2. 河南省商业科学研究所有限公司, 郑州 450000) 3. 美国农业部(USDA)国家农业应用研究中心(NCAUR)食源性病原菌与真菌毒素研究分部, 伊利诺伊州皮奥里亚 61604)

摘要: 伏马毒素 B₁ 是串珠镰刀菌产生的毒性最强的真菌毒素, 主要存在于受污染的玉米及其制品中。本研究采用基于磁分离的固相表面链置换策略和荧光分析法筛选到了 FB₁ 核酸适配体的活性链置换探针, 在此基础上开发了玉米中 FB₁ 的荧光偏振检测法并用于实际样品的检测, 动态响应范围 10 nM ~ 200 nM。该方法为均相检测技术, 成本低廉, 重现性好, 操作简单方便且可实现大量样品的平行检测。

关键词: 真菌毒素; 伏马毒素 B₁; 核酸适配体; 链置换探针; 均相检测

伏马毒素 (Fumonisin) 主要是由串珠镰刀菌产生的一类真菌毒素, 其中伏马毒素 B₁ (Fumonisin B₁, FB₁) 是毒性最强的一种^[1]。伏马毒素除主要存在于玉米及其制品中, 在大米、小麦、啤酒、牛奶和饲料等农产品及其加工品中也有一定浓度的存在^[2]。世界卫生组织国际肿瘤研究中心 (IARC) 将其归类为可能的人类致癌物; 国际食品法典委员会 (CAC) 的 JECFA 指出其具有肾脏毒性^[3]。据调查, 世界上每年受 FB₁ 污染的玉米高达 60% 以上^[4]。因此, 为了确保农产品质量安全, 消除伏马毒素对农产品安全消费、国际贸易和现代农业产业发展的限制, 降低对人类健康和畜牧业发展的危害, 开发简单便携、准确可靠的伏马毒素检测或监控技术显得极为迫切和必要。

由于伏马毒素本身没有紫外吸收和荧光特性, 因此不能采用常规毒素的分析检测手段^[5]。关于伏马毒素的检测国内外已建立了多种方法, 目前大多数检测方法主要是针对 FB₁、FB₂ 这两种组分^[6-9]。这些大都是常规仪器法, 需要较为昂贵的配套设备且对操作人员的技能要求较高, 不适合现场的快速筛查分析。基于抗体的免疫检测技术是真菌毒素的主

流检测技术, 其中作为快速检测技术的荧光偏振检测技术在国外已经比较成熟, 但是其所用的 FB₁ 荧光标记物如 6-(4,6-二氯三嗪基) 氨基荧光素 (6-DTAF) 相当昂贵, 导致检测成本较高, 不利于该技术的大面积推广应用^[10]。伴随新技术、新材料的出现, 伏马毒素快速检测方法的开发成为一种必然。

核酸适配体作为一类单链寡核苷酸, 与靶分子发生特异性相互作用前后空间构象会发生相应的变化, 与抗体相比具有可体外筛选获得^[11-12]、热稳定性好、易于化学合成和修饰等优点, 甚至能区分单抗无法实现的单个取代基差别的靶分子^[13]。2010 年, Maureen 报道了伏马毒素 B₁ 的核酸适配体^[14], 但是针对该核酸适配体的相关应用报道较少。

本文针对已经报道的 FB₁ 核酸适配体进行了进一步的开发应用, 筛选 FB₁ 核酸适配体链置换探针, 并在此基础上开发基于该链置换探针的 FB₁ 荧光偏振检测技术, 同时进行实际样品的检测。该方法具有成本低廉、特异性高的特点, 且该技术为均相检测技术, 重现性好, 操作简单方便且可实现大量样品的平行检测, 有助于建立适合我国国情的农

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (21305031), 农业部“引进国际先进农业科学技术”重点项目 (2011-G5), 国家公益性行业 (农业) 项目 (201203094), 河南省农业科学院科技发展专项资金项目 (20157813)。

作者简介: 王红旗 (1979—), 副研究员, 从事农产品质量安全检测技术研究。

刘继红 (1973—), 研究员, 从事农产品质量安全检测技术及风险评估研究。

产品伏马毒素监控技术体系，满足当前我国对农产品伏马毒素污染监控关键技术的迫切需要，应用前景广阔。

一、材料与方 法

(一) 实验材料 伏马毒素 B₁ (FB₁)，黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)，黄曲霉毒素 B₂ (AFB₂)，赭曲霉毒素 A (OTA) (美国 santa 公司)；亲和素标记的 MP-SA-10 磁珠 (郑州英诺生物科技有限公司)；其他所有分析纯化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。实验中所用的其他溶液均由高压灭菌处理过的超纯水 (电阻不小于 18.3 MΩ·cm) 配制而成。FB₁ 核酸适配体序列为 5'-ATACCAGCTTATCAATTAATCGCATTACCTTATACCAGCTT

ATTCAATTACGTCTGCACATACCAGCTTATTCAATTAGATAGTAAGTGAATCT-3'，以及设计的链置换探针见图 1，均购自上海生工生物工程有限公司和大连宝生物有限公司。所用探针的热力学参数和二级结构的计算借助于在线生物信息学软件 (<http://mfold.rna.albany.edu/>)，在 1×BB 条件下计算 T_m 值，温度参数设为 37℃，DNA 浓度设置为 0.1 μM。

(二) 仪器与设备 超纯水系统 (Milli-Q Synthesis, 美国密理博公司)；水浴恒温振荡器 (SHZ-22, 精达仪器制造厂)；恒温金属浴 (Comfort, 德国艾本德公司)；磁分离架 (NEP055-1, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)；荧光光谱仪 (F-7000, 日本日立公司)；荧光偏振读数仪 (Sentry 100, 美国 Diachemix 公司)。

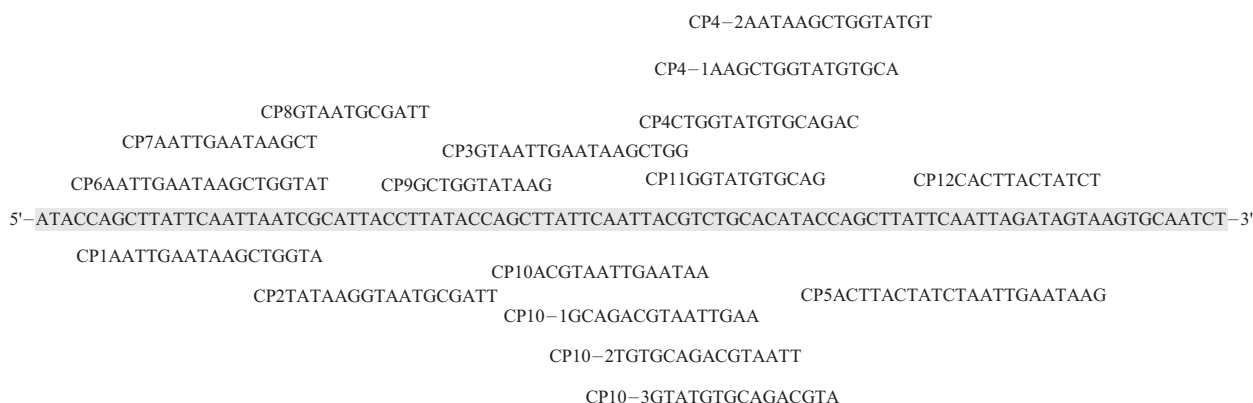


图 1 实验设计的链置换探针

(三) 试验方法

1. FB₁ 核酸适配体与链置换探针的杂交。FB₁ 核酸适配体储备液用之前经过 95℃ 5 min，冰水浴处理 5 min。然后将生物素标记的 FB₁ 核酸适配体和 FB₁ 链置换探针按照终浓度 1:1 的比例杂交：10 μM FB₁ 核酸适配体 2 μL，10 μM FB₁ 链置换探针 2 μL，20 μL 10×反应缓冲溶液 (200 mM Tris, 1MNaCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM CaCl₂, pH7.6)，加去离子水调整反应体系的总反应体积到 200 μL。将反应混合物于 37℃ 温度下杂交 1 h。

2. 磁珠上的链置换反应及荧光强度的测定。取 50 μLMP-SA-10 磁珠用 FB₁ 1×BB (20 mM Tris, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.6) 洗涤两次，500 μL/次，然后

将 200 μL上述杂交好的混合溶液于 1 ml 离心管中与洗涤干净的磁珠于室温下孵育 15 min，随后加入 FB₁ 标准溶液，终浓度为 50 nM，于室温下进行竞争反应 20 min。磁分离收集上清液，放入荧光光谱仪进行荧光强度的测定。FAM 荧光染料的最佳激发光波长为 488 nm 左右，最佳发射波长为 520 nm，窗口扫描宽度为 510~610 nm，激发和发射狭缝宽度为 5 nm。空白对照用同体积的 1×BB 代替。

3. 溶液中的链置换反应及荧光偏振值的测定。向“试验方法 1.”所述杂交混合溶液中加入一定浓度的 FB₁ 标准溶液，混合均匀，室温反应 20 min。取 10 μL反应液到 990 μL1×BB 中，混匀，放入荧光偏振读数仪，静止 1 min，测荧光偏振值。空白对照用同体积的 1×BB 代替。

二、结果与分析

(一) 链置换探针筛选 最佳链置换探针的判断标准为, 室温条件下该链置换探针与 FB_1 核酸适配体的杂交复合物不能解链; 室温条件下, FB_1 与核酸适配体竞争结合时, 能将链置换探针竞争下来。因此, 首先要计算每一条链置换探针与 FB_1 核酸适配体杂交复合物的解链温度 T_m , 要求 $T_m \geq 25^\circ C$, 从理论上满足第一个条件, 即室温条件下该链置换探针与 FB_1 核酸适配体的杂交复合物不能解链。5' 端均修饰有FAM 荧光基团, 是为了方便后续的荧光强度测定和荧光偏振值测定。

利用磁珠上的链置换反应, 在 FB_1 存在的情况下, FB_1 与链置换探针竞争与 FB_1 核酸适配体结合。如果杂交复合物中的链置换探针的结合力小于 FB_1 与其适配体的结合力, 该链置换探针将被竞争下来进入上清液。随后, 通过测定磁分离之后上清液的荧光强度即可了解链置换反应的情况, 结果如图 2 所示。

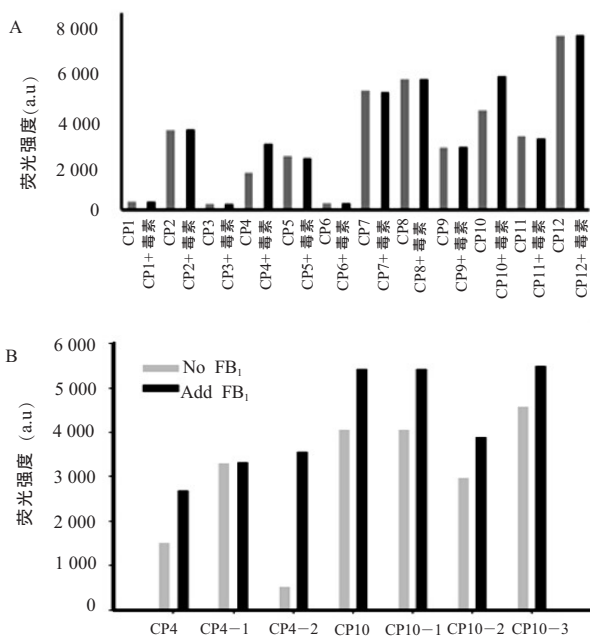


图 2 链置换探针筛选结果

第一轮筛选结果如图 2A 所示, 发现探针 CP-4 和 CP-10 效果比较明显。这就说明, 在 FB_1 存在的情况下, 荧光标记的 CP-4 和 CP-10 链置换探针能够被 FB_1 竞争下来, 从而进入上清液导致上清溶液的荧光强度增强。其他链置换探针, 有一部分结合力太强, FB_1 无法将其竞争下来, 结果表现为空白对照的上清与加了 FB_1 的上清荧光强度几乎相等, 均很弱, 如链置换探针 CP1、CP3、CP6; 有

一部分结合力太弱, 杂交复合物不稳定, 在没有 FB_1 的情况, 自身解链引起上清的荧光强度增强, 结果表现为空白对照的上清与加了 FB_1 的上清荧光强度几乎相等, 荧光强度均较强, 如链置换探针 CP2、CP5、CP7、CP8、CP9、CP11、CP12。链置换探针 CP4 和 CP10 均具有一定的链置换活性, 但是为了获取最佳链置换探针, 分别对 CP4 和 CP10 链置换探针进行了进一步优化。研究表明, DNA 杂交双链中 G-C 碱基对的作用力较 T-A 碱基对的作用力要强^[15], 所以通过改变原有序列中的部分碱基序列可以调整杂交复合物的稳定性。据此, 重新设计了两组探针, 实验结果如图 2B 所示, 探针 CP4-2 效果最佳。 FB_1 反应前后, 上清溶液的荧光强度变化非常明显, 信背比由原来的 1.8 提高到 7.0, 探针活性明显增强, 为后续的链置换探针开发利用提供了依据。

(二) 链置换探针活性表征 为了进一步验证链置换探针 CP4-2 的活性, 同时探索开发基于该探针的 FB_1 荧光偏振检测法, 选择荧光偏振法对该探针的活性深入的验证。

1920 年, 荧光偏振分析技术由 Perrin 建立。荧光偏振光强度 (P) 定义为:

$$P = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + I_{\parallel})$$

其中, I_{\perp} 和 I_{\parallel} 分别为荧光光子被激发后, 发射光在垂直和水平方向上的强度。当溶液的温度和粘度都固定时, P 值主要取决于荧光分子的分子体积。由于荧光偏振光强度与荧光物质受激发时分子转动速度成反比, 所以分子量较小的荧光物质在溶液中旋转速度快, P 值较小; 与相应的配体结合后, 分子量变大, 该荧光物质在溶液中旋转速度较慢, P 值增大。如图 3 所示, CP4-2 链置换探针一端标记上 FAM 荧光基团并与 FB_1 核酸适配体杂交, 分子量较大, 荧光基团在溶液中的旋转速度较慢, 因此体系的荧光偏振值较大; 当 FB_1 与核酸适配体结合后, CP4-2 链置换探针被置换下来, 分子量减小, 此时荧光基团在溶液中的旋转速度较快, 因此体系的荧光偏振值较小。据此可实现 FB_1 的荧光偏振测量, 实验结果如图 4 所示。 FB_1 不存在的情况下, 反应前后, 体系的荧光偏振值变化比较小或者没有变化, 证明 CP4-2 与核酸适配体形成的杂交复合物没有解离; FB_1 存在的情况下, 反应前后, 体系的荧光偏振值变化比较大, 证明 FB_1 的出现导致 CP4-2 从杂交复合物中解离出来, 分子量变小, 此时荧光基团在溶液中的旋转速度较快, 体系的荧光偏振值变小, 因此产生较大的荧光偏振值变化。

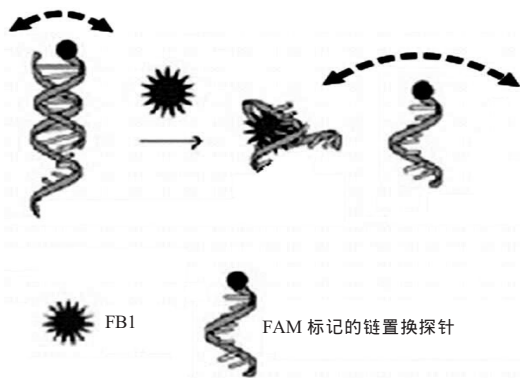


图3 荧光偏振法检测 FB₁ 的实验原理示意图

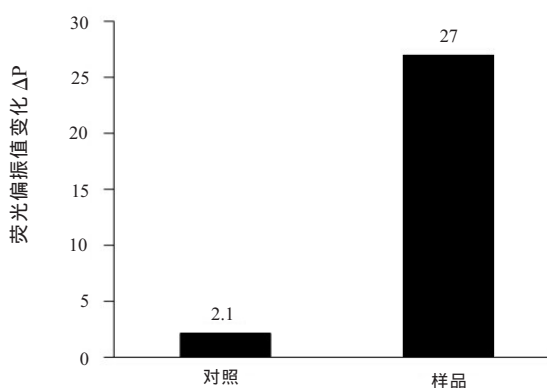


图4 荧光偏振法评价 CP4-2 链置换探针的活性

(三) 荧光偏振分析体系中 CP4-2 探针浓度优化 为选择荧光偏振反应体系的最佳 CP4-2 探针浓度，即体系的荧光偏振值变化范围最大时的 CP4-2 浓度，此时方法的灵敏度也最高。因为荧光偏振强度变化范围关系到测定结果的准确性，荧光偏振强度变化范围越大，测定误差相对越小。将 CP4-2 链置换探针在反应体系中的终浓度分别设定为 100 nM、10 nM、1 nM，分别用于测定 FB₁，监测反应前后体系的荧光偏振强度变化范围 (ΔP) 的变化，试验结果见表 1。随着 CP4-2 探针浓度的降低，ΔP(FB₁ 浓度为 0 和 200 nM 时的荧光偏振强度的差值) 逐渐增大随后又开始变小。高浓度 CP4-2 探针 (100 nM) 的荧光强度 (平行方向，~2×10⁶ a.u.) 远远超过荧光偏振读数仪检测器的检测上限 (~2×10⁵ a.u.)，此时仪器的检测结果并不能如实反应体系的真实情况，故反应体系的 ΔP 值变化较小。随着 CP4-2 探针浓度的稀释，体系的荧光强度逐渐减弱，直到满足实验仪器的检测要求，相应的 ΔP 值变化越来越大。随着 CP4-2 探针浓度的进一步稀释，体系的荧光强度进一步减弱，与背景荧光强度逐渐接近，故体系的 ΔP 值变

化越来越小。综合考虑检测准确度和灵敏度，选择 CP4-2 探针浓度为 1 nM 时作为最佳检测浓度。

表 1 不同浓度链置换探针浓度优化

CP4-2 最终浓度	100 nM	10nM	1 nM	0.1 nM
空白对照荧光强度 (a.u.)(平行)	3 460	3 433	3 466	3 453
反应体系荧光强度 (a.u.)(平行)	2 043 649	198 245	17 828	5 828
体系荧光偏振变化范围 (ΔP)	10.3	38.4	49.1	18.4

(四) 分析方法的特异性考察 为了进一步验证该方法的特异性，选择污染玉米中常见的共生毒素 AFB₁、AFB₂、OTA 和 FB₂ 作为对比，结果如图 5 所示，该方法对所选的 AFB₁、AFB₂、OTA 3 种干扰毒素几乎没有响应。FB₂ 有明显的响应，因为 FB₂ 与 FB₁ 结构极其接近，且二者经常共同存在于受污染的玉米中。本文所选的 FB₁ 核酸适配体在筛选的过程中没有用 FB₂ 做负筛选^[14]，所以存在明显的 FB₂ 交叉反应。但是，目前针对玉米制品的限量标准通常指的是总的伏马毒素含量，所以该方法依然可以用来检测伏马毒素。

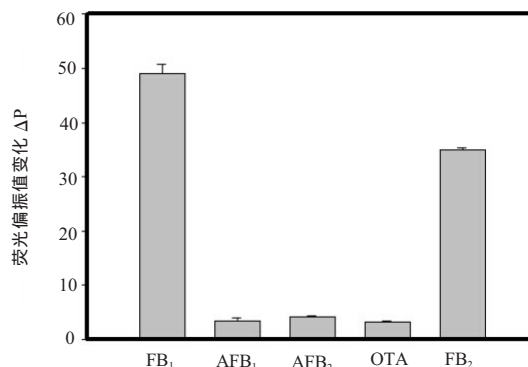


图5 荧光偏振法特异性考察 (FB₁、FB₂ 的浓度为 200 nM，其他 AFB₁、AFB₂ 和 OTA 毒素的浓度为 1 μM)

(五) FB₁ 的定量分析 图 6 描述了该荧光偏振检测方法针对 FB₁ 的动态浓度响应范围，10 nM ~ 200 nM。由此可见，基质加标结果和缓冲溶液中的结果略有差异，基质加标反应体系的终点荧光偏振值稍微偏高，特别是高浓度的样品，有可能是高浓度基质样品中含有的蛋白、脂肪、糖类等杂质能够与 CP4-2 DNA 探针结合，导致解离后的荧光标记 CP4-2 探针的分子量略微增加，从而引起游离状态的 CP4-2 的荧光偏振值增加，最终导致基质加标反应体系的终点荧光偏振值稍微偏高。

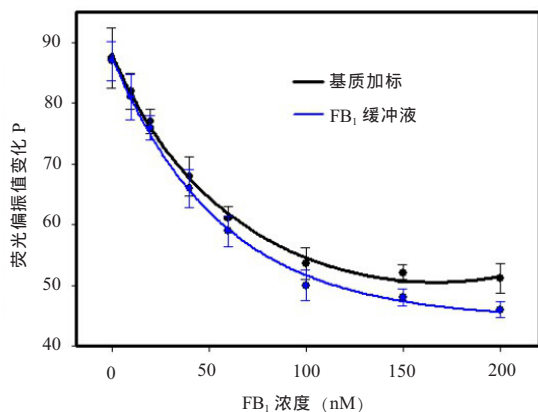


图6 荧光偏振分析法的标准曲线

三、结论

本研究采用基于磁分离的固相表面链置换策略和荧光分析法筛选到了FB₁核酸适配体的活性链置换探针,利用荧光偏振法评价了该探针的活性,并在此基础上开发了FB₁荧光偏振检测方法。该方法对FB₁的动态响应范围为10 nM~200 nM,经玉米加标测试,高浓度的样品结果略微偏高。另外,该方法对玉米中常见共生毒素AFB₁、AFB₂和OTA具有很高的选择性,对FB₂具有一定的响应。目前针对玉米制品的限量标准通常指的是总的伏马毒素含量,所以该方法依然可以用来检测伏马毒素。同时,该方法为均相检测技术,成本低廉,重现性好,操作简单方便且可实现大量样品的平行检测。

本文引用格式:王红旗,王俊艳,洪慧杰,等.伏马毒素B₁核酸适配体链置换探针的筛选及应用[J].农产品质量与安全,2017(1):44-48.

WANG Hongqi, WANG Junyan, HONG Huijie, et al. Selection and application of strand displacement probe for fumonisin B₁ aptamer [J]. Quality and Safety of Agro-products, 2017 (1): 44-48.

参考文献

[1] Guo Y C, Liu X M, Liu J. Preparation and identification of anti-fumonisin B₁ monoclonal antibody [J]. Journal of hygiene research, 1999, 28: 297.
 [2] Marasas W F O, Jackson L S, DeVries J W, et al. Fumonisin: history, worldwide occurrence and impact [M]. In Fumonisin in Food; Plenum Press: New York, 1996, 1-17.
 [3] Bolger M, Coker RD, DiNovi, M, et al. Fumonisin.

WHO/IPCS safety evaluation of certain mycotoxins in food [J].WHO Food Addit Ser, 2001, 47: 557-680.

[4] 杨李梅, 苏建明, 雷红宇, 等. 伏马毒素研究进展 [J]. 动物医学进展, 2014, 35: 97-100.
 [5] Chris M M, Michael E J, Ronald D P, et al. Fluorescence polarization as a means for determination of fumonisins in maize [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, 49: 596-602.
 [6] Maragos C M. Analysis of mycotoxins with capillary electrophoresis [J]. Seminars in Food Analysis, 1998 (3): 353-373.
 [7] 郑荣, 毛丹, 王少敏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定桃仁中10种真菌毒素 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014 (5): 824-832.
 [8] 范文桐, 项自来, 徐辉, 等. 伏马毒素B₁单克隆抗体的研制及ELISA检测方法的建立 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 13: 5-8, 12.
 [9] 周贻兵, 吴坤, 李磊, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定啤酒中伏马毒素的含量 [J]. 中国酿造, 2016 (1): 152-155.
 [10] 刘继红, 王敏, 尹海燕, 等. 伏马毒素新型荧光标记物制备及其在荧光偏振分析技术中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 6 (12): 4810-4815.
 [11] Ellington A D, Szostak J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346: 818-822.
 [12] 刘继红, 胡颖, 洪慧杰, 等. 赭曲霉毒素A核酸适配体筛选 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015 (9): 3543-3550.
 [13] 王红旗, 张玲, 刘冬梅, 等. 小分子靶标核酸适配体研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2015 (8): 2.
 [14] McKeague M, Bradley C R, Girolamo A D, et al. Screening and initial binding assessment of fumonisin B₁ aptamers [J]. International journal of molecular sciences, 2010, 11 (12): 4864-4881.
 [15] Guerra C F, Bickelhaupt F M, Snijders J G, et al. The nature of the hydrogen bond in DNA base pairs: the role of charge transfer and resonance assistance [J]. Chemistry-A European Journal, 1999 (5): 3581.