基于酶联适配体的四环素检测方法研究

张璇[1]，刘信嘉[1]，雷红涛[1]，刘英菊[2]，王弘[1]，徐振林[1]，孙远明[1]
（1. 广东省食品质量安全重点实验室/农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评价实验室/华南农业大学食品学院，广东广州 510642）（2. 华南农业大学理学院生物材料研究所，广东广州 510642）

摘要：通过 Mannich 法偶联辣根过氧化物酶（HRP）和四环素（tetracycline，TC）分子制备酶标记物，采用棋盘滴定法确定链霉亲和素（streptavidin，SA）的包被浓度为 8 μg/mL，适配体稀释浓度为 20 nmol/L。通过单因素实验优化了检测条件，碳酸盐缓冲液（CB，0.05 mol/L，pH 9.6）为包被液，适配体稀释液选择含有 5 mmol/L Mg^{2+}的磷酸缓冲液 PBS，TC-HRP 稀释度为 1:50，标准品稀释液为 PBS 溶液，适配体孵育 1 h，最终建立了四环素酶联适配体检测（enzyme-linked aptamer assay，ELAA）方法。该法半抑制浓度（IC_{50}）为 0.705 μg/mL，检测限（LOD）为 2.5 ng/mL，与其结构类似物(多西环素、土霉素、金霉素)测试中，发现除与金霉素稍有交叉反应（25.9%）外，与其他药物基本没有明显交叉反应。本研究所建立的直接竞争酶联适配体检测方法特异性强、灵敏度高，能够满足四环素定量分析要求，适用于食品中四环素的快速检测。

关键词：单链 DNA；适配体；四环素；酶联适配体检测
文章篇号：1673-9078(2014)7-263-267

Development of an Enzyme-linked Aptamer-based Assay for the Detection of Tetracycline

ZHANG Xuan[1], LIU Xin-jia[1], LEI Hong-tao[1], LIU Ying-ju[2], WANG Hong[1], XU Zhen-lin[1], SUN Yuan-ming[1]
(1.Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety / Key Risk Assessment Laboratory of Agricultural Product Preservation, Ministry of Agriculture / College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2.Institute of Biomaterials, College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The Mannich method was employed to conjugate the tetracycline (TC) to horseradish peroxidase (HRP). The optimal coating concentration of streptavidin (SA) was 8 μg/mL and aptamer concentration was 20 nmol/L, which were determined by chequerboard titration. The optimized assay conditions were investigated by single-factor experiments. Coating buffer carbonate buffer (CB, 0.05 mol/L, pH 9.6), phosphatic buffer solution (PBS) plus 5 mmol/L $MgCl_2$ and PBS were chosen as coating buffer assay buffer, and standard dilution buffer, respectively.was, The best dilution ratio of TC-HRP and incubation time of aptamer were 1/50 and 1 hour, respectively. An enzyme-linked aptamer assay (ELAA) method was thus established for the determination of TC. The half inhibition concentration (IC_{50}) of the proposed method was 0.705 μg/mL, and the limit of detection (LOD) was 2.5 ng/mL. Compared with other structural analogues (eg. doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline) of TC, there were no conspicuous cross reactions except chlortetracycline (25.9%). This direct competitive ELAA method is specific and highly sensitive that could meet the requirements of quantitative analysis of TC, which is suitable for the rapid detection of TC in variable food samples.

Key words: ssDNA; aptamer; tetracycline; enzyme linked aptamer assay

四环素（tetracycline，TC）是一种从放线菌金色链丛菌（*Streptomyces aureofa-ciens*）培养液分离出来的抗菌物质，因具有优良的广谱抗菌性、稳定的药物活性及价格的低廉性，广泛用于动物疾病的治疗和预防[1]。但动物饲养中常发生不合理使用或滥用等情况，导致畜产品中四环素残留，引起人体内细菌的耐药性增加，危害消费者身体健康[2]。大部分国家对在食用动物用养殖中使用的四环素和其在食品中的残留进行了严格的监控，中国“动物性食品中兽药最高残留限量”规定，肌肉组织中四环素类的最高残留限量

收稿日期：2014-03-04
基金项目：行业公益（农业）项目（201003008-08）；国家自然科学基金项目(U1301214，21105030)；广东省自然科学基金项目（S2013030013338）
作者简介：张璇（1989-），女，研究生，研究方向为生物分析化学
通讯作者：雷红涛（1973-），男，博士，教授，研究方向为生物分析化学与分子识别

（MRL）为100 μg/kg；欧盟规定肌肉、牛奶中的四环素类化合物的总量不得超过100 ng/g；日本要求在动物组织中MRL为200 ng/g[3~4]。

已报道的四环素类药物残留量的分析方法有微生物检测法、酶联免疫法、放射免疫测定法、胶体金免疫层析实验测定法、分子印记技术、薄层色谱法、毛细管电泳法，更多的是基于高效液相色谱－串联质谱法进行测定[5]。免疫分析法灵敏度高、特异性强，但抗体制备复杂，稳定性差；仪器方法准确可靠，但样品前处理繁琐，仪器昂贵。所以，建立快速、简便且灵敏的新方法在检测中具有十分重要意义[6]。

适配体（aptamer）是在体外通过指数富集配体系统进化技术（SELEX）筛选出来的一类 DNA 或 RNA 寡聚核苷酸[7]。较其他识别分子而言，核酸适配体不仅选择性专一，而且具有分子量小、性质稳定、易获得、易标记、无免疫原性和毒性，无需动物免疫等优势[8]。目前，基于适配体（aptamer）的分析方法是近年生物分析的研究热点之一，适配体主要被应用在检测、分离纯化和医疗三大领域。适配体分析方法研究多集中于生物传感器、荧光检测等领域，在食品检测中的报道较少[9-10]。本文通过链霉亲和素-生物素放大策略，采用辣根过氧化物酶（HRP）标记四环素，建立了一种基于高特异性的单链 DNA（single-stranded DNA, ssDNA）适配体检测四环素的新方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

生物素标记的四环素适配体（5'-biotin-TTTTTCGTACGGAATTCGCTAGCCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCACTGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG-3'）[7]，上海生工生物工程有限公司合成；链霉亲和素，Promega 公司；HRP、四环素，Sigma Aldrich 公司；分析级 NaH_2PO_4、NaCl、甲醇、柠檬酸、柠檬酸钠、KCl、$CaCl_2$、$MgCl_2$、浓硫酸、浓盐酸、等，广州化学试剂有限公司；HRP 显色用的 TMB 显色液，上海碧云天生物技术有限公司；实验用水均为 Milipore 超纯水。

Multiskan MK3 酶标仪，美国 Thermo 公司；Wellwash MK2 洗板机，美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 TC-HRP 标记竞争物的合成

采用 Mannich 法制备竞争标记物[11]，合成原理如图 1。取 HRP 2 mg 溶于 1 mL 醋酸钠缓冲液（0.1 mol/L，pH 3.8），取四环素 4 mg 溶于 200 μL 蒸馏水，然后逐滴加入到溶有 HRP 的醋酸缓冲液中，加入 14%甲醇溶液 4 μL，持续搅拌直至溶液出现浑浊，产物用 0.9%的生理盐水透析 3 d，加等体积甘油分装后-20 ℃冻存。

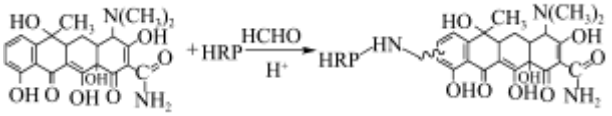


图 1 TC-HRP 合成原理

Fig.1 Principle of TC-HRP synthesis

1.2.2 酶联适配体检测基本操作

将 SA 吸附于微孔板上，生物素修饰适配体，再与吸附在微孔板上的 SA 连接实现固定化；HRP 标记四环素分子形成标记竞争物（TC-HRP），与样品中的四环素分子竞争结合固相适配体（图 2）。具体操作：（1）碳酸盐缓冲液（CB，0.01 mol/L，pH 9.6）稀释 SA 到一定浓度，100 μL/孔，包被过夜，甩去孔内液体，加入含有 0.5% Tween-20 的磷酸盐缓冲液（PBST，0.01 mol/L）洗涤 2 次。（2）加入封闭缓冲液（0.1%酪蛋白）150 μL/孔，37 ℃水浴封闭 3 h，甩去孔内液体，置 37 ℃干燥箱中烘干备用。（3）适配体用磷酸盐缓冲液（PBS，0.01 mol/L，pH 7.4）稀释，每孔加入 100 μL，37 ℃水浴孵育 1 h，洗板 5 次。（4）用 PBS 将四环素配置成 0~10^6 ng/mL 标准溶液加入微孔板，50 μL/孔，同时加入一定稀释度的 TC-HRP 50 μL/孔，37 ℃水浴反应 1 h，洗板 5 次。（5）加 TMB 显色液，反应 10 min。（6）终止反应，用酶标仪测定每孔 A_{450nm} 值。检测原理如图 2。

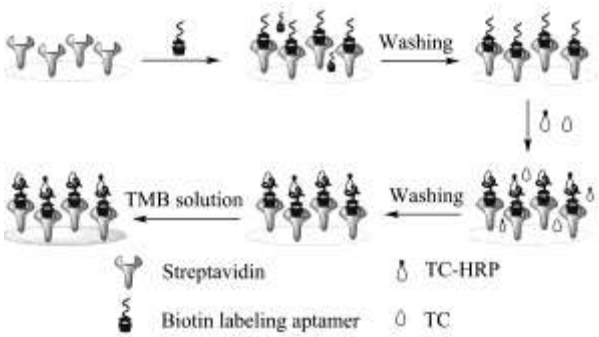


图 2 酶联适配体检测四环素的操作过程

Fig.2 Procedure of ELAA detection of TC

1.2.3 标准曲线

以 450 nm 处的吸光值为纵坐标，TC 浓度对数值为横坐标，采用 Origin 8.5 软件的四参数 Logistic 模型拟合，绘制剂量反应曲线，TC 的半抑制浓度定义为最大吸光值下降 50%时对应的标准品浓度（IC_{50}）、检测限（LOD）定义为最大吸光值下降 10%时对应的标

准品浓度（IC_{10}），交叉反应率（CR%）=IC_{50}(TC)/IC_{50}(交叉药物)×100%[12]。

1.2.4 条件优化

通过棋盘滴定法[12]确定 SA 的包被浓度和适配体稀释浓度。通过单因素实验，先后优化包被条件、包被稀释液、TC-HRP 稀释度、适配体稀释液及其孵育时间 5 种工作条件。采用 A_{max}、IC_{50}、A_{max}/IC_{50} 三参数进行评价，当 A_{max} 在 1.0 左右，同时 IC_{50} 越小，A_{max}/IC_{50} 越大时，表明越稳定、灵敏[12]。

2 结果与讨论

2.1 链霉亲和素和适配体浓度棋盘滴定

适配体通过 5’端标记的生物素与微孔板上 SA 结合，SA 包被量对检测信号及灵敏度有很大影响[13]。通过棋盘滴定法发现，SA 浓度为 8 μg/mL，适配体稀释浓度为 20 nmol/L 时，以及 SA 浓度为 12 μg/mL，适配体稀释浓度为 10 nmol/L 时，吸光值在 1.0 左右，但前者组合更节约 SA，因此最终确定 SA 浓度为 8 μg/mL，适配体稀释浓度为 20 nmol/L 用于后续试验（图 3）。

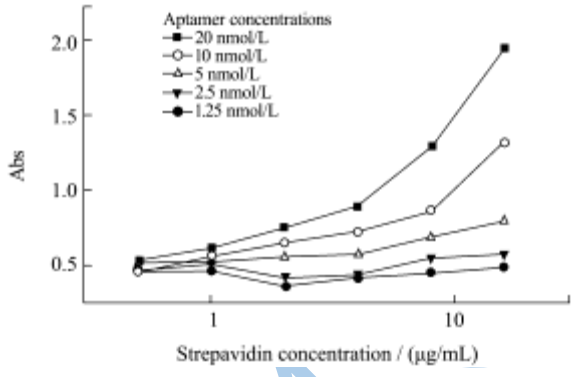


图 3 链霉亲和素和适配体浓度棋盘滴定

Fig.3 Concentrations of SA and aptamer by chequerboard titration

2.2 链霉亲和素包被稀释液优化

研究了四种包被液柠檬酸-磷酸缓冲液（CPB，0.05 mol/L，pH 5.0）、磷酸盐缓冲液（PB，0.05 mol/L，PH 7.0）、Tris-HCl（0.05 mol/L，pH 7.6）、碳酸盐缓冲液（CB，0.05 mol/L，pH 9.6）对检测性能的影响。结果发现不同的包被液对 SA 的包被效果差异较大（图 4）。CB 缓冲液的 A_{max} 值稍高于 1.0，IC_{50} 值明显低于其他三种缓冲体系，A_{max}/IC_{50} 值也高于其他三种缓冲体系。PB、Tris-HCl 和 CPB 三种缓冲液的包被效果影响并不明显，而 CB 缓冲液和其他三种缓冲液相比，信号增强显著，这可能是由于 CB 为偏碱性的缓冲液，链霉亲和素的包被在偏碱性环境更有利于与微孔板结合。综合考虑，最终选择 CB 缓冲液作为包被稀释液进行后续工作。

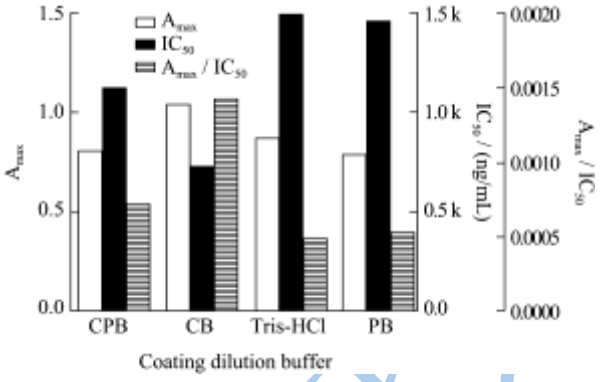


图 4 包被稀释液优化

Fig.4 Optimization of coating buffer influence

注：链霉亲和素浓度 8 μg/mL，适配体浓度 20 nmol/L (n=3)。

2.3 TC-HRP 稀释度优化

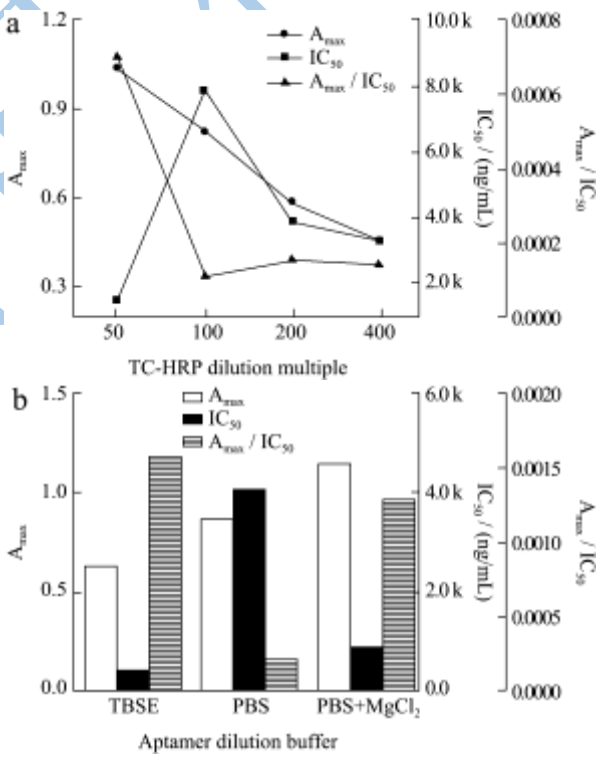


图 5 不同稀释液对 ELAA 检测性能的影响：

Fig.5 Effect of different buffers on ELAA performance

注：(a)链霉亲和素浓度 8 μg/mL，适配体浓度 20 nmol/L，包被液 CB，适配体稀释液 PBS+5 mmol/L $MgCl_2$(n=3) (b)TC-HRP 稀释度 1/50，其他工作条件同上。

研究了 TC-HRP 稀释度对检测性能的影响，在所测试水平内，1/50 的稀释度 A_{max} 达到 1.04，且 IC_{50} 最小，A_{max}/IC_{50} 值最大（图 5a），因此随后试验选择稀释度 1/50 作为 TC-HRP 的工作浓度。

2.4 适配体稀释液种类优化

随后研究了三种适配体稀释缓冲液 TBSE、PBS、PBS+5 mmol/L $MgCl_2$ 对检测性能的影响（图 5b）。稀释液为 PBS+$MgCl_2$ 时 A_{max} 最大，TBSE 缓冲液最低，PBS+$MgCl_2$ 缓冲液的 A_{max}/IC_{50} 远高于 PBS，表明加入 Mg^{2+} 能够明显的提高检测效果。机理可能是因为一些适配体需要折叠成特定的二级结构才能特异性结合靶目标，而这些二级结构的形成往往受到 Mg^{2+} 的调控[14]。虽然在 TBSE 缓冲液体系下的 IC_{50} 值最低，但 A_{max} 只有 0.61，过低；而 PBS+$MgCl_2$ 缓冲体系下的 A_{max} 达到 1.16，具有更好的信号强度，且灵敏度与 TBSE 体系接近。综合考虑，随后实验选取含有 5 mM Mg^{2+} 的 0.01 mol/L 的 PBS 作为四环素适配体的稀释缓冲液。

2.5 适配体孵育时间优化

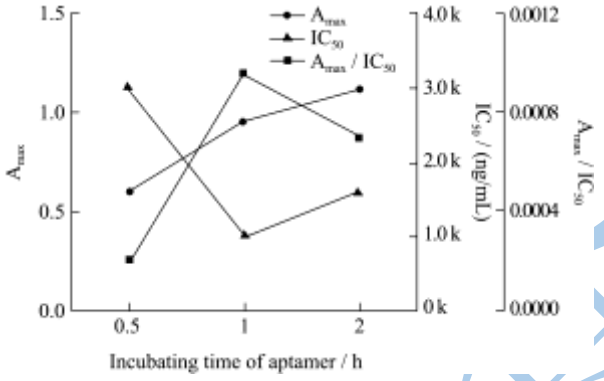


图 6 适配体不同孵育时间对 ELAA 检测性能的影响

Fig.6 Influence of different incubating time of aptamer on ELAA performance

随着适配体孵育时间的增加，A_{max} 不断增大，IC_{50} 开始较大，随后减小，随着时间延长，又增大(图 6)，1 h 后，A_{max} 为 0.97，接近于 1.0，IC_{50} 最小，A_{max}/IC_{50} 值最大。因此，选择 1 h 为最佳反应时间。

注：链霉亲和素浓度 8 μg/mL，适配体浓度 20 nmol/L，包被液 CB，适配体稀释液 PBS+5 mmol/L $MgCl_2$，TC-HRP 稀释度 1/50(n=3)。

2.6 标准曲线

经优化各理化因素后，确定最优工作条件为：碳酸盐缓冲液 CB 为包被液，SA 包被浓度为 8 μg/mL，适配体浓度 20 nmol/L，适配体稀释液选择含有 5 mmol/L Mg^{2+} 的磷酸缓冲液 PBS，TC-HRP 稀释度为 1:50，标准品稀释液为 PBS 溶液，适配体孵育 1 h。四环素酶联适配体检测典型的标准曲线如图 7 所示，IC_{50} 为 0.705 μg/mL，LOD 值为 2.5 ng/mL。与欧盟、日本及我国卫生部规定的样品最大残留限量（100 ng/g、200 ng/g、100 ng/g）相比[3~4]，本研究所建立的 ELAA 方法能够满足四环素定量分析要求。

2.7 特异性

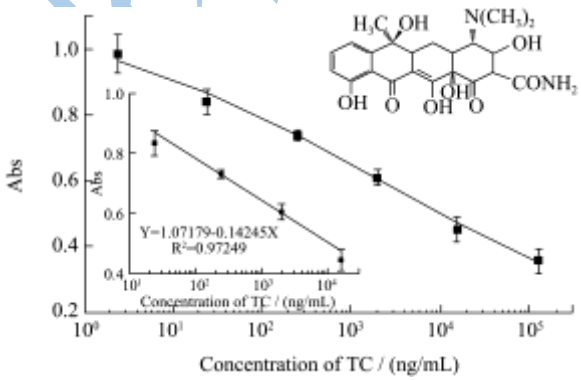
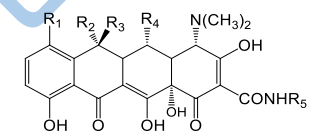


图 7 四环素酶联适配体检测的标准曲线

Fig.7 Calibration curve for TC aptamer (n=3)

表 1 ELAA 对四环素类药物的交叉反应率

Table 1 Cross-reactivity of various tetracyclines detected by ELAA

Tetracyclines	Structure	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	IC_{50}/(ng/mL)	Cross Reactivity/%
Tetracycline		H	CH_3	OH	H	H	704.9	100
Doxycycline		H	CH_3	H	OH	H	-	<0.1
Oxytetracycline		H	CH_3	OH	OH	H	-	<0.1
Chlortetracycline		Cl	CH_3	OH	H	H	2538.6	25.9

经过测试四环素与结构类似药物（多西环素、土霉素、金霉素）的交叉反应率，发现除与金霉素稍有交叉反应（25.9%）外，与其他药物基本没有明显交叉反应（表 1），特异性良好。从结构上看，金霉素与四环素区别仅在于 R_1 位，以 Cl 取代了 H，显然金霉素上的氯原子对适配体和金霉素的结合产生了较大影响。土霉素比四环素 R_4 位上多一-OH，而土霉素与四环素适配体的交叉反应率低于 0.1%，显然 R_4 上-OH 极大影响了适配体的结合。强力霉素和多西环素与四环素的结构区别在于 R_3 位上比四环素多了一个-OH，识别力也因此而大大降低。综上分析，在四环素适配体与各种四环素类药物的识别中，药物分子中 R_1、R_3

和 R_4 可能是重要的识别位点。

3 结论

本文成功建立了一种基于单链 ssDNA 适配体检测四环素的新方法，具有良好的特异性和准确性。该法操作简便，可用于不同食品样品中四环素的快速检测。

参考文献

[1] Senturk S, Temizel M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep [J]. Veterinary Record, 2006, 159(7): 216-217

[2] Molina A, Molina M P, Althaus R L, et al. Residue persistence in sheep milk following antibiotic therapy [J]. The Veterinary Journal, 2003, 165(1): 84-89

[3] Cherlet M, Schelkens M, Croubels S, et al. Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 492(1-2): 199-213

[4] Schneider M J, Darwish A M, Freeman D W. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1-2): 269-274

[5] Pastor-Navarro N, Morais S, Maquieira Á, et al. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 594(2): 211-218

[6] Jeon M, Paeng I R. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 626(2): 180-185

[7] Wang S, Yong W, Liu J H, et al. Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 57(15):192-198

[8] Zhang D W, Sun C J, Zhang F T,et al. An electrochemical aptasensor based on enzyme linked aptamer assay [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 31(1):363-368

[9] Mairal T, Özalp V C, Sánchez P L, et al. Aptamers: molecular tools for analytical applications [J]. Analytical and Bioanalytical Chemisrty , 2008, 390(4): 989-1007

[10] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis [J]. Biomolecular Engineering, 2007, 24 (2): 191-200

[11] Pastor-Navarro N, Maquieira Á, Puchades R.Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products [J]. Analytical and Bioanalytical chemistry, 2009, 394(5): 907-920

[12] Lei H T, Xue G, Yu C F, et al. Fluorescence polarization as a tool for the detection of a widely used herbicide,butachlor,in polluted waters [J]. Analytical Methods, 2011, 3(10): 2334-2340

[13] 段诺,吴世嘉,王周平,等.核酸适配体识别-荧光法检测赭曲霉素A[J].分析化学,2011,39(3):300-304
DUAN Nuo, WU Shi-jia, WAng Zhou-ping, et al. An aptamer-based fluorescence assay for ochratoxin A [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(3): 300-304

[14] Park H, Paeng I R. Development of direct competitive enzyme-linked aptamer assay for determination of dopamine in erum [J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 685(1): 65-73