

DNA 损伤传感器制备及其用于饲料中黄曲霉毒素 B1 的快速检测

方俊杰, 孙玉雪, 叶永康, 孙汉巨

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要: 本文利用巯基化单链 DNA (ssDNA) 自组装修饰在金电极表面, 制备了 ssDNA 修饰金电极 (ssDNA/Au); 在最优化条件下, 与互补片段杂交制备了相应的双链 DNA 修饰金电极 (dsDNA/Au), 构建了一种快速、简便、价廉的检测黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 的新型电化学 DNA 生物传感器。采用循环伏安法 (CV) 和示差脉冲伏安法 (DPV) 等电化学方法表征了电子媒介体铁氰化钾和亚甲基蓝 (MB) 在 ssDNA/Au 和 dsDNA/Au 界面上的电化学行为。一定浓度的黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 诱导 dsDNA/Au 造成 DNA 损伤, 使得 MB 电化学信号降低, 实现了快速检测 AFB1。在最优化条件 (在 4 °C 下, ssDNA 在金电极上自组装 14 h, 与 cDNA 在 37 °C 下杂交 2 h, 制备了 dsDNA/Au 电极; 37 °C 下, AFB1 溶液诱导损伤 DNA 22 min 后), 该方法对 AFB1 的线性检测范围为 10~500 ng/mL, 加标回收率在 95.99%~104.57%。建立的 AFB1 诱导 DNA 损伤方法可以实现对 AFB1 快速、简便、准确的定量检测。

关键词: DNA; 黄曲霉毒素 B1; 电化学; 生物传感器; 亚甲基蓝

文章编号: 1673-9078(2014)8-270-275

Preparation of a Biosensor for DNA Damage Detection and its Application in Rapid Detection of Aflatoxin B1 in Feed

FANG Jun-jie, SUN Yu-xue, YE Yong-kang, SUN Han-ju

(College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In this study, a single-stranded DNA/Au (ssDNA/Au) electrode was prepared by aligning a self-assembled monolayer of thiolated ssDNA onto an Au electrode surface. Under optimal conditions, ssDNA/Au hybridized with the complementary DNA (cDNA) fragment to produce a double-stranded DNA/Au (dsDNA/Au) electrode, which was a useful and cost-effective electrochemical DNA biosensor for the rapid detection of aflatoxin B1 (AFB1). Electrochemical methods such as cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were applied to characterize the electrochemical behavior of ferricyanide and methylene blue (MB) (as electron mediators) on the surface of ssDNA/Au and dsDNA/Au electrodes. A certain concentration of AFB1 reacted with dsDNA/Au to induce DNA damage, thereby reducing the electrochemical signals from MB and allowing for rapid detection of AFB1. Under optimized conditions (ssDNA was self-assembled on gold electrodes for 14 h at 4 °C and hybridized with cDNA at 37 °C for 2 h to produce the dsDNA/Au electrode; AFB1 solution induced DNA damage for 22 min at 37 °C), the linear detection range for AFB1 was 10~500 ng/mL, with a satisfactory recovery ranging from 95.99% to 104.57%. This method of AFB1-induced DNA damage detection could be explored as a useful, quantitative method for accurate and rapid detection of AFB1.

Key words: DNA; aflatoxin B1; electrochemistry; biosensor; methylene blue

黄曲霉毒素是由曲霉属中的黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 所产生的具有致畸、致癌性的二次代谢产物^[1], 迄今为止, 已经发现 B1、B2、G1、G2、M1、M2 等十几种, 其结构特征为含有一个双呋喃环和一个氧杂萘邻酮^[2]。其中,

收稿日期: 2014-03-21

作者简介: 方俊杰 (1988 -), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品质量与安全

通讯作者: 叶永康, 博士, 副教授, 研究方向为生物电化学分析及传感

黄曲霉毒素 B1 已被世界卫生组织列为 I 类致癌物^[3]。AFB1 的摄入与一些癌症存在着重要联系^[4]。

由于 AF 含量低, 这就要求检测方法灵敏度高, 特异性强, 集分离与检测为一体。一般检测 AFB1 的方法有: 薄层层析法 (TLC)^[5]、高效液相色谱法 (HPLC)^[6-9]、免疫分析方法, 生物传感器法等。其中免疫分析方法主要用的是酶联免疫吸附法^[10]。这些方法中, 薄层层析法特异性较差且操作繁琐, 有机溶剂等对操作人员的身体有害; 高效液相色谱法是目前

国内绝大多数检测机构指定的检测黄曲霉毒素的方法,虽然灵敏度高,但样品的前处理复杂,检测周期长,程序复杂,所需试剂繁多;ELISA法操作简便快速,无污染,特异性强,适合批量样品的检测。但由于样品的复杂多样,以及酶的不稳定性,使得分析人员在检测样品中易出现假阳性或假阴性结果^[11]。由于现有方法的一些不足,对快速、设备便携、价格低廉的新检测方法的研究显得越来越重要。

电化学DNA传感器具有灵敏度高,选择性好,费用低,简易便携等诸多优点,势必也会在食品工程学以及环境监测等方面有重大贡献^[12]。本文先将5'端修饰有巯基(HS-)的单链脱氧核糖核酸(ssDNA)通过自组装法固定到金电极表面,再在一定条件下让互补链在电极上与电极表面固定的ssDNA杂交,形成的双链脱氧核糖核酸(dsDNA)作为响应界面。黄曲霉毒素会诱导dsDNA造成损伤^[13-14],利用MB作为电化学活性指示剂,dsDNA经AFB1处理后被损伤,结合的MB就会减少,相应的电化学信号降低,损伤前后的信号差值可以用来定性及定量的检测黄曲霉毒素B1,并通过电化学方法探讨了DNA与黄曲霉毒素的作用时间以及作用温度等影响因素并予以优化,建立测定AFB1的标准曲线。结果表明,所构建传感体系检测限低且以及特异性高。

1 材料与方 法

1.1 主要设备与仪器

电化学工作站(CHI660D),上海辰华仪器有限公司;石英亚沸高纯水蒸馏器(SYZ-550型),江苏金坛金城国胜实验仪器厂;涡旋混匀器(QT-1),上海琪特分析仪器有限公司;超声波清洗器(KQ118),昆山市超声仪器有限公司;电子天平(JA1003N),上海精密科学仪器有限公司;pH计(Delta320),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;可控加热磁力搅拌器(RH Basic1),德国IKA;移液枪,德国Eppendorf;三电极体系:Ag/AgCl参比电极和铂丝对电极,南京中科电极有限公司;金工作电极(CHI101),CH instruments, Inc., 美国。

1.2 材料与试剂

铁氰化钾(AR),上海山浦化工;浓硫酸,过氧化氢(AR),上海苏懿化学试剂;氯化钾,磷酸二氢钾,磷酸氢二钾,MB(AR),国药集团;黄曲霉毒素B1,美国Sigma-Aldrich;DNA:巯基修饰寡核苷酸的序列为:SH-5'-ACT GCT AGA GAT GAG CAG

ATGGCT AGA AGG-3'(记作HS-ssDNA),互补序列为:3'-TGA CGA TCT CTA CTC GTC TAC CGA TCT TCC-5'(记作cDNA),上海生工生物,中国;小鼠饲料,江苏协同医药生物工程;其他试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.2 M和5 mM);5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-}溶液(含0.1 M KCl, 0.2 M PBS溶液);MB(60 μM, 5 mM PBS溶液);水虎鱼溶液(98%的浓硫酸与30%的过氧化氢溶液,体积比3:1)。

1.3 实验方法

1.3.1 ssDNA/Au 电极的制备

金电极在新配制的水虎鱼溶液中浸泡30 min以除去不必要有机化合物,清洗后用0.05 μm的Al₂O₃粉末抛光至镜面^[15],分别用无水乙醇、二次水各超声清洗3 min, N₂吹干或晾干待用。将处理好的金电极覆盖4 μM HS-ssDNA的0.2 M PBS溶液,在4 °C温度下进行自组装14 h^[13]。之后用二次水淋洗10 s三次,除去未组装的ssDNA,即得到ssDNA/Au电极。

1.3.2 dsDNA/Au 电极的制备^[14]

将制备好的ssDNA/Au电极浸入4 μM cDNA的0.2 M PBS溶液中,37 °C水浴杂交120 min,取出电极,用0.2 M PBS冲洗3次以除去表面未杂交的cDNA,得到dsDNA/Au电极。

1.3.3 样品的处理

取正常饲料、两种不同霉变程度饲料各5 g,分别记样品1~3#,分别加入100 mL甲醇水溶液(体积比1:1),混匀超声萃取10 min后,快速抽滤、摇匀,取滤液旋转蒸发至5 mL左右,用甲醇水溶液定容至10 mL,最后经10000 r/min,4 °C离心15 min,取其上清液,至于4 °C保存。用甲醇水溶液稀释,即待检测样品溶液。

1.3.4 AFB1 诱导 DNA 损伤的电化学检测

将dsDNA/Au电极在37 °C下一定浓度的AFB1溶液中损伤22 min后,在0.2 M, pH 7.0的PBS底液,以MB(60 μM)为电活性指示剂,采用示差脉冲伏安法检测AFB1的浓度。

1.4 数据分析

实验中所获得数据均为CHI660D采集,转化格式后使用OriginPro 8 SR3软件进行数据分析。各优化条件与所测电流峰的平均值加标准偏差作图。通过对各数据图的分析,得出相应的结论。

2 结果与讨论

2.1 ssDNA 和 dsDNA 修饰电极的循环伏安响应

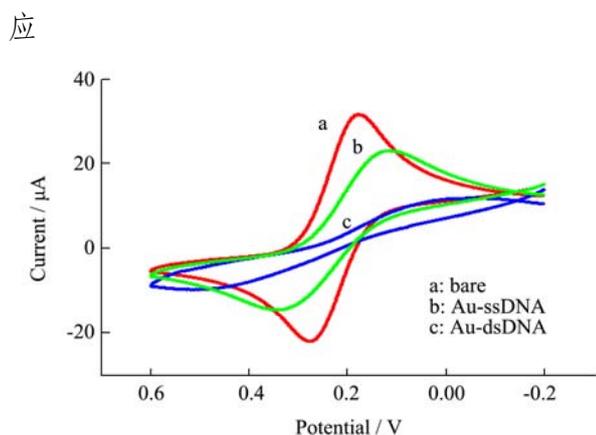


图1 裸金电极、ssDNA-Au 电极、dsDNA-Au 电极在铁氰化钾里的循环伏安响应图

Fig.1 CV curves of bare Au, ssDNA-Au and dsDNA-Au electrodes in $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ solution

注：底液：5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 溶液，扫速：100 mV/s。

实验以 5 mM 的 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 为电活性指示剂，0.2 M pH 7.0 PBS 溶液为检测底液，采用 CV 法考察了电活性指示剂在裸金电极、ssDNA-Au 电极以及 dsDNA/Au 电极上的电化学反应，结果如图 1 所示。组装 ssDNA/Au 电极的氧化-还原峰（曲线 b）明显要小于裸电极的氧化-还原峰（曲线 a），表明 ssDNA/Au 电极上的 $Fe^{3+/2+}$ 电子传递受阻，说明 HS-ssDNA 在金电极表面组装成功； $Fe^{3+/2+}$ 在 dsDNA/Au 电极表面上的响应信号（曲线 c）比在 ssDNA/Au 电极进一步减小，说明此时电子传递受到进一步阻碍，表明 cDNA 与 ssDNA 杂交完成。

2.2 MB 在 dsDNA/Au 电极表面上的循环伏安行为

行为

图 2 插图中，以 60 μ M 的 MB（0.2 M PBS 溶液）为电活性指示剂，将组装好的 dsDNA/Au 电极为工作电极，做 CV 扫描，出现了一对可逆的氧化-还原峰。当扫描速率在 10~250 mV/s 范围内变化时，氧化和还原峰电流（ i_{pa} 和 i_{pc} ）随扫描速率的增大而增大，且氧化和还原峰电位随扫描速率增加分别向正、负电位方向偏移，造成峰电位差值 ΔE_p 增大；图 2 表明， i_{pa} 与扫描速率平方根（ $v^{1/2}$ ）满足线性方程： $y=-1.15304x+0.49081$ ，线性相关系数 $R=0.9985$ ； i_{pc} 与 $v^{1/2}$ 则满足线性方程： $y=0.87819x-1.68524$ ， $R=0.9971$ 。结果表明 MB 在 dsDNA/Au 电极上的氧化-还原反应主要是受扩散过程控制。

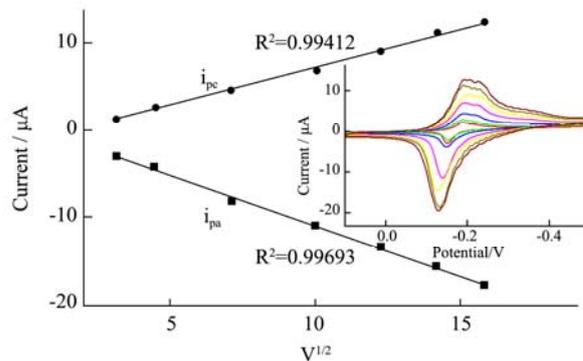


图 2 氧化峰电流值和还原峰电流值分别与扫描速率平方根的关系图

Fig.2 Plots of the cathodic (i_{pc}) and anodic (i_{pa}) peak currents vs. square root of scan rates

注：插图：dsDNA/Au 电极在不同扫描速率下的循环伏安图，扫速为 10~250 mV/s，检测底液为 60 μ M 的 MB 溶液。

2.3 dsDNA/Au 传感器制备的优化

2.3.1 HS-ssDNA 在 Au 电极上的自组装时间的影响

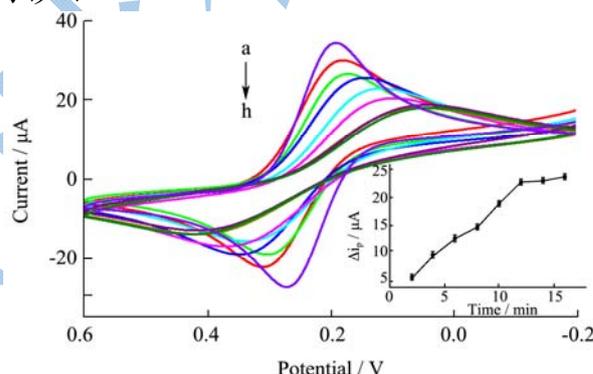


图 3 自组装时间对 ssDNA-Au 电极的循环伏安响应影响

Fig.3 Effect of self-assembling time on CV curves at ssDNA-Au electrode

注：插图：ssDNA-Au 电极与裸电极阳极峰电流差值与自组装时间的关系图，检测底液：60 μ M MB 溶液。

将不同自组装时间制备的 ssDNA/Au 在 5 mM 的 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 0.2 M pH 7.0 PBS 溶液中做 CV 扫描，结果如图 3 所示。随着自组装时间递增， $Fe^{3+/2+}$ 的氧化-还原峰电流逐渐降低，表明 HS-ssDNA 自组装在金电极表面程度增加。图 3 插图显示当自组装时间达到 12 h 时，氧化峰电流信号增大的趋势开始变得平缓，这说明 ssDNA 自组装程度接近饱和。为了保证自组装充分完成，故选择 14 h。

2.3.2 cDNA 与 HS-ssDNA 杂交时间的影响

将自组装完成的 ssDNA/Au 电极浸入 cDNA 中进行杂交反应，得到 dsDNA/Au 电极。并在 60 μ M MB（0.2 M PBS）溶液中进行 DPV 扫描，其与杂交前的

ssDNA/Au 电极的 DPV 信号峰的电流值相比较, 得差值 Δi_p 。杂交时间对 Δi_p 的影响如图 4 所示, 杂交时间达到 2 h 后达到平台, 说明此时杂交已接近完全进行, 故选择 2 h 作为杂交时间。

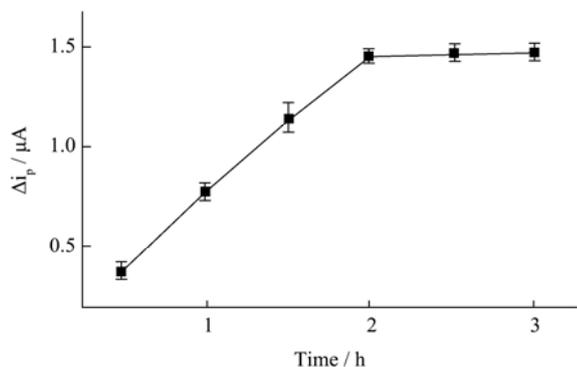


图 4 杂交时间对 ssDNA/Au 和 dsDNA/Au 的 DPV 峰电流差值 Δi_p 的影响

Fig.4 The relationship between Δi_p and hybridization time. Each Δi_p was the difference between before and after hybridization obtained from DPV signals. (in 60 μM MB PBS)

2.4 AFB1 诱导 DNA 损伤的示差脉冲伏安响应

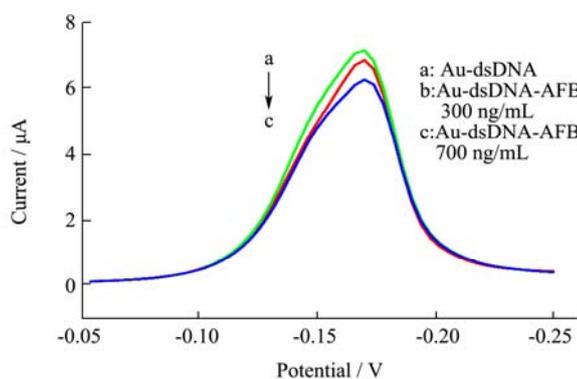


图 5 MB 在不同浓度的 AFB1 诱导损伤后的 dsDNA/Au 电极上 DPV 响应

Fig.5 DPV behaviors of MB on dsDNA/Au electrode after AFB1 induced-DNA damage

注: a、b、c 分别表示 0、300 ng/mL、700 ng/mL AFB1 溶液损伤后 MB 的 DPV 曲线; 检测底液: 60 μM 的亚甲基蓝溶液。

MB 在未经 AFB1 溶液损伤时、经 300 ng/mL 和 700 ng/mL AFB1 溶液诱导 DNA 损伤后的 dsDNA/Au 电极上示差脉冲伏安响应, 结果如图 5 所示。浓度高的 AFB1 溶液诱导 DNA 损伤后的 MB 还原峰电流值明显降低。可能是由于 AFB1 加成到 DNA 的双链结构的鸟嘌呤上, 造成 DNA 的损伤^[14]; 在本实验中, dsDNA 受 AFB1 损伤后, 双链结构被一定程度地破坏,

特异性结合在 dsDNA/Au 电极表面的 MB 量减少, 使得还原峰电流相应减小, 且 DNA 损伤程度与 AFB1 的浓度有一定关系。

2.5 AFB1 诱导 DNA 损伤的影响因素

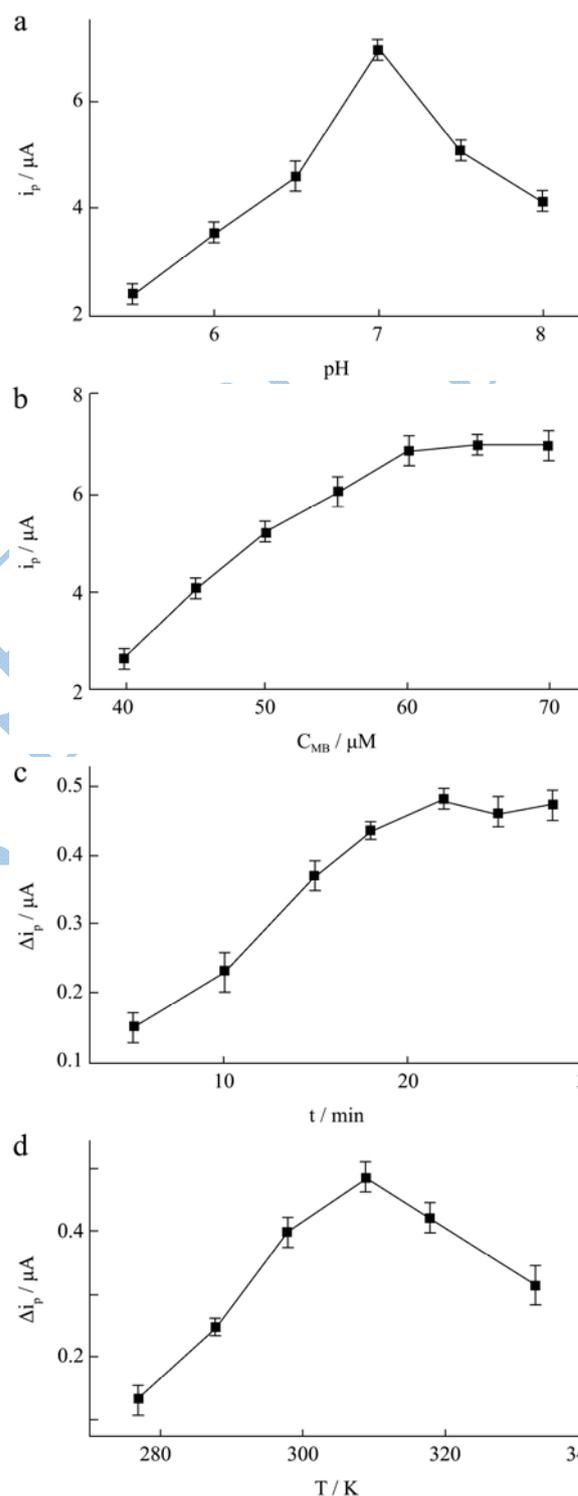


图 6 AFB1 诱导 DNA 损伤影响

Fig.6 Effects of AFB1 induce-DNA damage

注: A: 检测底液 pH 的影响; B: MB 浓度的影响; C: AFB1 损伤 DNA 时间的影响; D: AFB1 损伤 DNA 温度的影

响。

以 MB 在相同浓度 AFB1 诱导 DNA 损伤后的 dsDNA/Au 电极上的 DPV 与未损伤 DPV 还原峰高之差 Δi_p 为指标,分别考察了检测底液的酸度、MB 浓度、AFB1 损伤 DNA 时间和损伤 DNA 温度的影响。如图 6a~d 所示,当检测底液的 pH 为 7.0, MB 浓度为 60 μ M, AFB1 损伤 DNA 时间 22 min 后, AFB1 损伤 DNA 温度为 310 K (37 $^{\circ}$ C) 时,为 AFB1 诱导 DNA 损伤用 DPV 方法检测最优化检测条件。

2.6 检测 AFB1 标准曲线的建立

在最优化实验条件,以损伤前后 DPV 方法的 i_p 差值 Δi_p 为纵坐标,以 AFB1 溶液浓度对数值 $\lg(C_{AFB1})$ 为横坐标得到检测 AFB1 的工作曲线(如图 7)。线性范围为 10~500 ng/mL, Δi_p 与 $\lg(C_{AFB1})$ 之间的关系满足线性关系方程:

$$\Delta i_p = (-0.11982 \pm 0.01476) + (0.24917 \pm 0.00693) \lg(C_{AFB1}), R = 0.9970$$

最低检测限为 10 ng/mL (3 σ)。

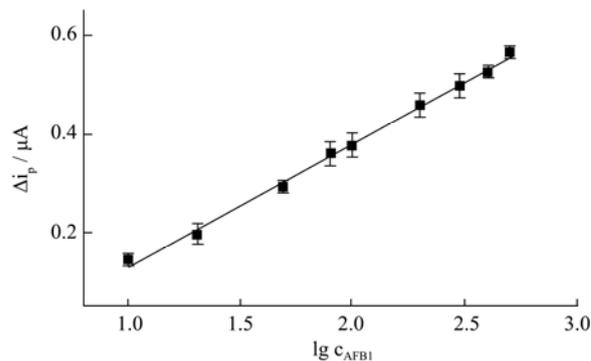


图 7 DNA 损伤法检测 AFB1 的标准曲线

Fig.7 The standard curve of AFB1 concentration by DNA-damage method

2.7 小鼠饲料样品的检测及加标回收实验

取发霉产生黄曲霉毒素程度不同的小鼠饲料样品两份及未发霉的饲料样品一份,记为样品 1、样品 2 和样品 3 (空白),按文献报道的方法^[17]处理,得到提取液,在优化的实验条件下,以 DPV 法为检测方法检测样品 1、样品 2 及样品 3 (空白)中的 AFB1 的含量,并进行加标回收试验,结果如表 1 所示。

表 1 小鼠饲料样品中的 AFB1 含量及加标回收结果

Table 1 AFB1 contents in mice feed samples and their standard addition recovery results

样品	样品背景值 / (ng/mL)	加标量 / (400 ng/mL)	测定值 / (ng/mL)	理论值 / (ng/mL)	回收率 R/%
1	89.73	10 mL	236.94±0.92	244.87	96.04±0.46
2	378.58	10 mL	397.56±0.85	389.29	104.14±0.43
3	0 (未检出)	10 mL	196.72±0.58	200.00	96.64±0.31

由表 1 可知,实际样品中 AFB1 可被检测,且实验中加标回收率都在 100±5% 范围内,说明实验室建立的检测 AFB1 的传感器能快速、准确地检测实际样品中的 AFB1。

3 AFB1 传感器的重现性及使用寿命

按实验优化条件制备 8 支 dsDNA/Au 电极,分别对 100 ng/mL AFB1 溶液进行检测,相对标准差为 5.60%; 其中,同一支电极连续测定 10 次相对标准差小于 4.96%,说明电极的重现性较好。dsDNA/Au 电极在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存,7 d 后 AFB1 响应信号约为第 1 天的 84%,可以表明 AFB1 传感器可以维持一定的使用周期。

4 结论

本方法以 AFB1 诱导 DNA 损伤,基于 MB 与损伤后 dsDNA 结合量降低,使得 MB 在 dsDNA/Au 电极上 DPV 还原峰电流降低,实现了对 AFB1 的快速定

量检测。通过优化实验条件,建立的检测方法线性范围较宽,并对实际小鼠饲料样品中 AFB1 含量进行检测,通过加标回收实验表明所建立的方法可靠,可以快速、准确地检测 AFB1。

参考文献

[1] Ammida N H S, Micheli L, Palleschi G. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B1 in barley [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 520(1): 159-164

[2] Wang J S, Groopman J D. DNA damage by mycotoxins [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1999, 424(1): 167-181

[3] 柳洁,何碧英.黄曲霉毒素高效液相色谱检测方法研究进展 [J].中国卫生检验杂志,2005,15(7):891-896

LIU Jie, HE Bi-ying. A review of HPLC method for aflatoxins in food products [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(7): 891-896

[4] Stroka J, Otterdijk R, Anklam E. Immunoaffinity column

- clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 904(2): 251-256
- [5] 李力,曹以诚,区镜深,等.黄曲霉毒素B1致癌毒性相关基因的生物信息学分析[J].*现代食品科技*,2013,29(8):1994-1998
LI Li, CAO Yi-cheng, QU Jing-shen, et al. Bioinformatic analysis of genes relative to the carcinogenic toxicity of aflatoxin B1 [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(8): 1994-1998
- [6] Jaimez J, Fente C A, Vazquez B I, et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 882(1): 1-10
- [7] Papp E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins [J]. *Microchemical Journal*, 2002, 73(1): 39-46
- [8] Escobar A, Regueiro O S. Determination of aflatoxin B1 in food and feedstuffs in Cuba (1990 through 1996) using an immunoenzymatic reagent kit (Aflacen) [J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(1): 219-221
- [9] Park J W, Kim E K, Kim Y B. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B1 through food consumption [J]. *Food Additives and Contaminants*, 2004, 21(1): 70-75
- [10] Lee N A, Wang S, Allan R D, et al. A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(10): 2746-2755
- [11] 余以刚,邱杨,吴晖,等.几种传统食品中黄曲霉毒素B1的检测与安全评价[J].*食品与机械*,2007,23(4):110-111
YU Yi-gang, QIU Yang, WU Hui, et al. Determination of aflatoxin B1 and safety evaluation of some traditional foods [J]. *Food and Machinery*, 2007, 23(4): 110-111
- [12] 张炯,万莹,王丽华,等.电化学DNA生物传感器[J].*化学进展*,2007,19(10):1556-1557
ZHANG Jiong, WAN Ying, WANG Li-hua, et al. The electrochemical DNA biosensor [J]. *Progress in Chemistry*, 2007, 19(10): 1556-1557
- [13] Groopman J D, Croy R G, Wogan G N. In vitro reactions of aflatoxin B1-adducted DNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981, 78(9): 5445-5449
- [14] 许世超,张纪梅,姚翠翠,等.以亚甲基蓝为杂交指示剂的DNA电化学传感器[J].*精细化工*,2008,25(12):1183-1186
XU Shi-chao, ZHANG Ji-mei, YAO Cui-cui, et al. DNA electrochemical biosensor with methylene blue as hybridization indicator [J]. *Fine Chemicals*, 2008, 25(12): 1183-1186
- [15] 吴海霞,康敬万,李志峰,等.亚甲基蓝与DNA相互作用的电化学研究[J].*分析测试学报*,2006,25(4):1-5
WU Hai-xia, KANG Jing-wan, LI Zhi-feng, et al. Electrochemical investigation on interaction between DNA with methylene blue [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2006, 25(4): 1-5
- [16] 庄振宏,郑传琦,汪世华.黄曲霉培养条件的优化及黄曲霉毒素B1的提取 [J].*应用与环境生物学报*,2010,16(5):724-729
ZHUANG Zhen-hong, ZHENG Chuan-qi, WANG Shi-hua. Optimization of *Aspergillus flavus* culture conditions and extraction of aflatoxin B1 [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16(5): 724-729