

功能性核酸增强 Hemin 催化活性用于乳制品中四环素检测研究

石彬¹, 王啸^{1,2}, 吴远根^{1,2}

(1. 贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州贵阳 550025)

(2. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州贵阳 550025)

摘要: 为了建立一种便捷有效的四环素残留比色检测方法, 本研究先用富含鸟嘌呤的单链脱氧核糖核酸(G-ssDNA)序列, 增强氯化血红素(Hemin)辣根过氧化物酶活性, 使其氧化底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)形成黄色产物。当体系中加入四环素后, 则 Hemin 的催化活性被抑制, 从而氧化底物形成蓝色产物。通过测定产物吸收光谱的变化, 可以测定四环素的含量。在最优检测条件下, 该方法测定四环素浓度在 10 nM~100 nM 范围内呈现良好的线性关系, 线性相关系数为 0.994, 最低检测限为 5.69 nM。特异性实验证实其它抗生素类似物对四环素检测无明显交叉反应。将该方法用于实际牛奶样品检测, 对四环素的检测回收率为 92%~99%。本研究所建立的方法具有特异性好、操作方便等优点, 不需要依赖大型仪器就可以对四环素进行快速检测, 因而可广泛应用于乳制品中四环素残留检测。

关键词: 四环素; 氯化血红素; 功能性核酸; 检测

文章编号: 1673-9078(2017)7-315-319

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.044

Tetracycline Detection in Dairy Products by Using Hemin with Functional Nucleic Acid-enhanced Catalytic Activity

SHI Bin¹, WANG Xiao^{1,2}, WU Yuan-gen^{1,2}

(1. Guizhou Provincial Key Lab of Fermentation Engineering and Biological Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China) (2. School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to establish a convenient and effective method for the colorimetric detection of tetracycline (TET) residues, guanine-rich single stranded deoxyribonucleic acid (G-ssDNA) was first used to enhance the horseradish peroxidase activity of hemin, which oxidized 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) to form a yellow product. With the addition of TET in the system, the catalytic activity of hemin was suppressed, and the substrate was oxidized to form a blue product. The TET content could be determined by measuring the change in the absorption spectra of the reaction products. Under optimal measurement conditions, the proposed method has a detection limit of 5.69 nM, and a linear range from 10 nM to 100 nM, with a correlation coefficient of 0.994. The specificity test confirmed that other related antibiotics did not show significant cross-reactivity with the TET measurement. This method was used to detect TET in milk samples, and the spiked recoveries for TET detection were in the range of 92% to 99%. The advantages of the method established in this work include high specificity and convenient operation. In addition, the method allows for rapid TET detection without relying on large instruments, and thus can be widely used for the detection of TET residues in dairy products.

Key words: tetracycline tablets; hemin; functional nucleic acids; detection

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(21565009); 贵州省科学技术基金项目(黔科合基础[2016]1403号); 贵州省科技厅科技合作计划(黔科合 LH 字[2015]7682号); 贵州省教育厅招标项目(黔教合 KY 字[2014]261号)

作者简介: 石彬(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能性核酸应用于食品中抗生素残留检测

通讯作者: 吴远根(1981-), 男, 工学博士, 教授, 研究方向: 农产品与食品质量安全检测

四环素(Tetracycline, TET)是一种从放线菌金色链丛菌(*Streptomyces aureofaciens*)的培养液等分离出来的抗菌物质^[1]。作为一种广谱抗生素, 四环素对革兰氏阳性菌、阴性菌、立克次体和螺旋体等都有良好的抑制作用^[2]。由于价格低廉, 良好的广谱抗菌作用, 四环素被广泛的应用于畜牧以及水产养殖行业^[3]。近年来, 由于受到商业化利益驱使, 四环素的不合理使用现象日益严重, 导致动物源性产品中四环素残留

出现过量。长期食用含四环素的食物会抑制骨骼生长,影响人体正常生理机能,对肝肾造成损害,严重威胁人体健康^[4-7]。当前,大部分国家都对四环素在动物源性食品中的残留进行了严格规定。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(MRL)为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 欧盟规定肌肉牛奶中四环素类化合物含量不能超过 100 ng/g ^[8]。

目前已报道的四环素类药物残留量分析方法主要有微生物检测法、放射免疫测定法、胶体金免疫层析实验测定法、酶联免疫法、薄层色谱法、分子印记技术、毛细管电泳法和高效液相色谱—串联质谱法^[9]等。色谱方法准确性好,分辨率和灵敏度较高,但其仪器昂贵、前处理复杂、导致检测成本高、周期长,无法适应快速大批量检测需要。免疫学方法虽然能够实现快速检测,其灵敏性高,特异性强,但其抗体制备复杂,检测重现性较差。毛细管电泳法、微生物学方法等方法方便快捷,但准确性差,无法对样品进行精确分析^[10]。因此,建立一种快速准确的四环素便捷检测方法具有重要意义。

有研究表明氯化血红素(Hemin)具有辣根过氧化物酶活性^[11]。本课题组前期利用 Hemin 催化活性成功建立了一种水体三价砷的比色检测方法^[12],该方法灵敏度高,最低检测限可达 1×10^{-9} 。有研究发现一些富含鸟嘌呤(G)的核苷酸序列,可以形成 G-四联体结构,可增强 Hemin 过氧化物酶活性。孔明德^[13]等利用 G-四联体-Hemin 的过氧化物酶特点,成功建立了一种 Ag^+ 定量检测的方法。然而,目前还未有利用 G-四联体-Hemin 体系检测四环素的报道。本研究利用富含鸟嘌呤的单链脱氧核糖核酸(G-ssDNA)序列,增强氯化血红素(Hemin)的辣根过氧化物酶活性,使其氧化底物 TMB 形成黄色产物。当体系中加入四环素后,则 Hemin 的催化活性被抑制,从而氧化底物形成蓝色产物。通过测定产物吸收光谱的变化,建立了一种四环素检测的新方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

G-ssDNA 序列(5'-ATCGGGTGTGGGTGGCGTA AAGGGAGCATCGGACA-3'), 其它序列 ssDNA(5'-TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3')由上海生物工程有限公司合成;四环素(TET)、二甲基亚砜(DMSO)、氯化血红素(Hemin)、双氧水(H_2O_2)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、硫酸链霉素(Streptomycin sulfate, STR)、双氯芬酸钠(Diclofenac sodium, DIC)、卡马西

平(Carbamazepine, CBZ)、阿莫西林(Amoxicillin, AMX)、硫酸卡那霉素(Kanamycin sulfate, KAN)和青霉素钾(Benzylpenicillin potassium, PEN)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;牛奶样品购自当地超市,其它所有试剂均为市售分析纯试剂。孵育器为 TUS-200P 振荡型恒温金属浴型(上海一恒科技有限公司);吸光度测定仪为 Multiskan GO 酶标仪 MK3(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 实验方法

取 5 μL 浓度为 10 μM 的 G-ssDNA 和 5 μL 的待测样品于离心管中混合均匀,置于恒温金属浴中 40 $^\circ\text{C}$ 孵育 60 min。随后向离心管中加入 1 mM 的 Hemin 溶液 10 μL , 混匀,在 40 $^\circ\text{C}$ 的恒温金属浴中继续孵育 30 min。随后向体系中加入 10 μL 、2 M H_2O_2 与 10 μL 、5 mM TMB 溶液,混匀。取 200 μL 溶液置于 96 孔酶标板中,用酶标仪进行波长扫描,扫描范围为 300~800 nm,测定 450 nm 处的吸光值,获得其吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 检测原理

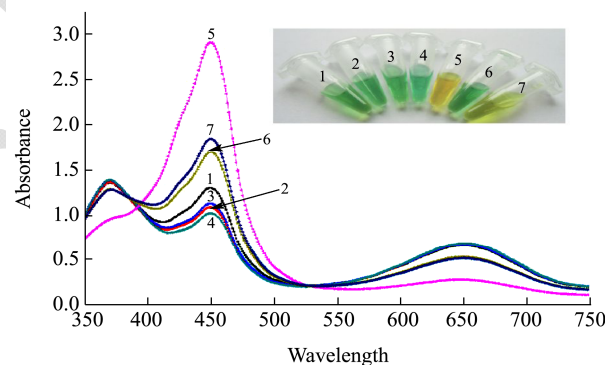


图1 不同条件对 Hemin 催化活性的影响

Fig.1 Influence of different conditions on the catalytic activity of hemin

注: 1, Hemin; 2, Hemin+200 nM TET; 3, Hemin+其它 ssDNA; 4, Hemin+其它 ssDNA+200 nM TET; 5, Hemin+G-ssDNA; 6, Hemin+G-ssDNA+200 nM TET; 7, Hemin+G-ssDNA+50 nM TET。

Hemin 在磷酸二氢钠缓冲溶液中具有辣根过氧化物酶活性,在 H_2O_2 存在下可催化一定量 TMB 失去 1 个电子,生成蓝色产物在 650 nm 左右展现出显著特征吸收峰。当 Hemin 与 G-ssDNA 序列发生作用后,其辣根过氧化物酶活性显著增强,可以使底物 TMB 失去 2 个电子,生成黄色产物在 450 nm 处展现特征吸收峰。当体系中存在四环素(TET),则 Hemin 催化

活性受到抑制, 导致反应产物在 450 nm 处吸光值显著降低。由于四环素浓度与产物吸光值下降的幅度 (ΔA)成正比, 所以通过测定产物吸光值变化或通过观察颜色变化, 可以判定四环素的含量。

研究了不同条件对 Hemin 催化活性的影响, 结果如图 1 所示。当体系中存在 G-ssDNA 时, 反应产物在 450 nm 处的吸光值 A_{450} 显著增强, 生成产物黄色产物, 其它序列 ssDNA 则无明显增强效果。体系中存在四环素时, A_{450} 显著降低, 生成蓝绿色产物。200 nM 四环素 A_{450} 的下降幅度明显大于 50 nM 四环素, 反应产物颜色较后者偏蓝。结果表明 G-ssDNA 序列能增强 Hemin 的催化活性, 而四环素的存在能有效降低 Hemin 催化活性, 且 Hemin 催化活性下降幅度与四环素浓度成正比, 因而可以利用 G-ssDNA 特性对四环素进行检测。

2.2 氯化血红素浓度优化

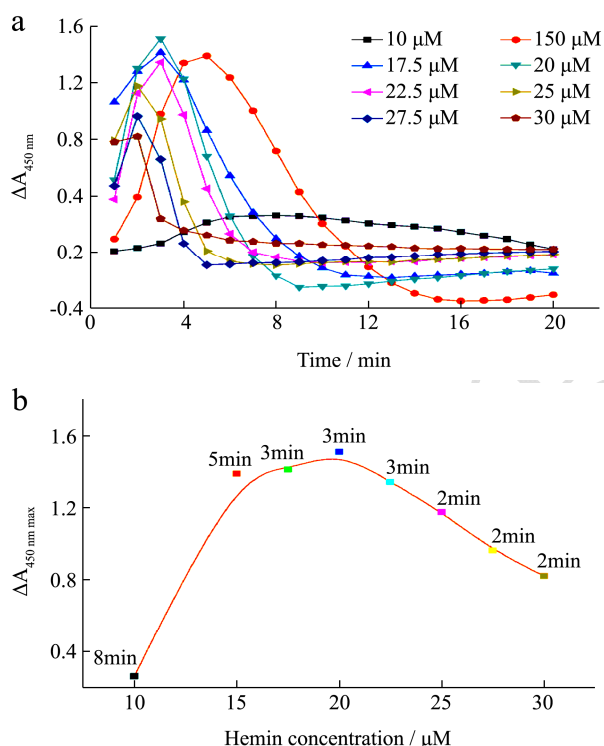


图 2 不同浓度的 Hemin 对催化反应的影响

Fig.2 Influence of different concentrations of hemin on the catalytic reaction

Hemin 的浓度对催化反应具有很大的影响, 本研究考查了 Hemin 浓度对催化反应的影响。固定其他条件不变, 选择不同浓度梯度的 Hemin 溶液进行优化。每个浓度设置实验组和对照组, 实验组加入 5 μ L 浓度为 200 nM 的四环素, 对照组加入 5 μ L 三蒸水代替。对照组与实验组 450 nm 处吸光值差值为 ΔA_{450} , 结果如图 2 所示。随着时间的增加, ΔA_{450} 逐渐上升, 达

到峰值后开始降低, 在 Hemin 浓度 20 μ M 时达 ΔA_{450} 到最大值。峰值出现时间为 2~4 min。 ΔA_{450} 最大值 (ΔA_{450max})随着 Hemin 浓度增加呈抛物线变化, 当 Hemin 浓度低于 20 μ M 时, 随着 Hemin 浓度的上升, ΔA_{450max} 逐渐增大; Hemin 浓度高于 20 μ M 时, ΔA_{450max} 开始降低, 在 Hemin 浓度为 20 μ M 时达 ΔA_{450max} 达到峰值。结果表明, Hemin 浓度在 20 μ M 时, 浓度达到饱和状态, 能和 G-ssDNA 完全作用, ΔA_{450} 最大, 表现出检测差异最大; 当 Hemin 浓度低于 20 μ M 时, G-ssDNA 过量, 不能完全发挥作用, 导致检测差异减小; 当 Hemin 浓度高于 20 μ M 时, Hemin 过量, 一部分 Hemin 不能与 G-ssDNA 作用, 检测差异性减小。选用 20 μ M 为实验最优 Hemin 浓度。

2.3 反应体系 pH 优化

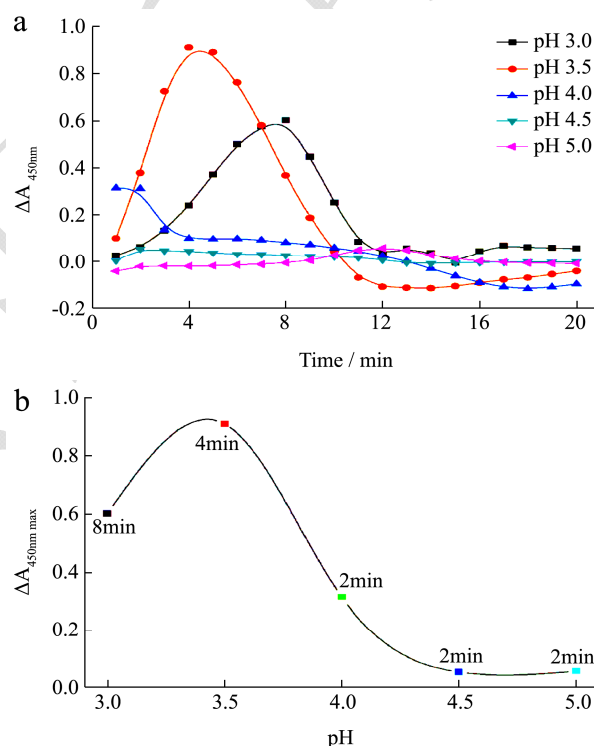


图 3 不同 pH 对催化反应的影响

Fig.3 Influence of different pH values on the catalytic reaction

反应体系对 pH 的变化十分敏感, pH 变化对反应有着很大的影响。对体系 pH 进行单因素优化, 结果如图 3 所示。在 pH 3.5 时, 体系在 450 nm 处的吸光值差值 ΔA_{450} 大于其他 pH 值, ΔA_{450} 随时间增加而上升, 在 4 min 左右达到峰值, 随后开始下降, 12 min 后趋于平稳。 ΔA_{450max} 在 pH 3.5 处达到峰值, 达到最大值时间在 4 min 左右。随着 pH 增大, ΔA_{450} 达到最大值的时间逐渐减少。结果表明, pH 为 3.5 时, Hemin 催化差异达到最大, 当 pH 过高或过低时, 分子基团的电离发生变化, 使 Hemin 的催化活性发生改变, 导

致 Hemin 催化差异减小。体系在 450 nm 处的吸光值差值最大, 反应差异最明显, 故选用 pH 3.5 为体系最优 pH 值。

2.4 G-ssDNA 浓度优化

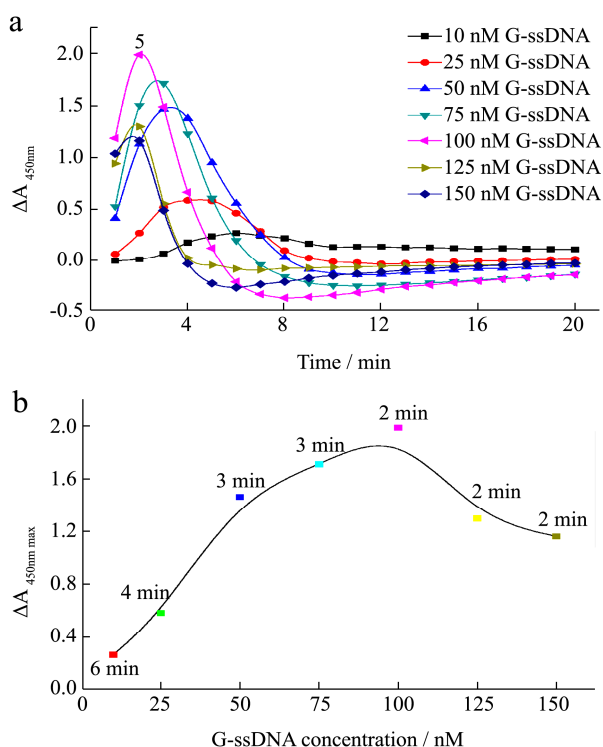


图4 不同浓度的 G-ssDNA 对四环素检测的影响

Fig.4 Effects of different G-ssDNA concentrations on TET detection

考查了 G-ssDNA 浓度对催化反应的影响。向体系中加入 10~150 nM 的 G-ssDNA, 测定其在 450 nm 处的吸光值, 并计算其与空白样品的差值 ΔA_{450} , 结果如图 4 所示。 ΔA_{450} 随时间增加而上升, 在 2 min 左右达到峰值, 随后开始下降; 当 G-ssDNA 浓度由 10 nM 上升到 100 nM 时, ΔA_{450} 的值逐渐增大; G-ssDNA 浓度为 100 nM 时, ΔA_{450} 达到峰值; 当 G-ssDNA 浓度继续增大时, ΔA_{450} 的值开始降低。结果表明 G-ssDNA 浓度在 100 nM 处达到饱和状态, 与 Hemin 完全作用, 检测差异达到最大; 当 G-ssDNA 浓度小于 100 nM 时, Hemin 处于过量状态, 一部分 Hemin 不能与 G-ssDNA 作用, 检测差异较小; 当 G-ssDNA 浓度大于 100 nM 时, G-ssDNA 过量, 不能完全与 Hemin 发生作用, 检测差异性较小。选用 100 nM 为实验最优 G-ssDNA 浓度。

2.5 工作曲线

在最优实验条件下, 测定不同四环素浓度下 A_{450} 的值, 以不同浓度四环素 A_{450} 与不含四环素的对照组

A_{450} 的差值为 ΔA_{450} 。测定的结果如图 5 所示。四环素的浓度 $c(\text{nM})$ 为横坐标, ΔA_{450} 为纵坐标, 作体系的检测限度标准曲线。如图所示, ΔA_{450} 的值随浓度增加而升高, 当浓度超过 160 nM 时, ΔA_{450} 的值趋于稳定。根据实验结果, 在四环素浓度 10 nM~100 nM 处进行线性拟合, 所得回归方程为 $y=4 \times 10^{-3}C+0.105$, 然后通过公式 $3\sigma/s$, 计算出本实验最低检测限度(LOD)为 5.69 nM。式中 σ 代表空白样的标准偏差, s 代表拟合直线的斜率。用本方法最低检测限 5.69 nM, 远远低于国家标准 225 nM。相比其它方法, 该方法具有检测灵敏度较好, 操作简单便捷的优点。

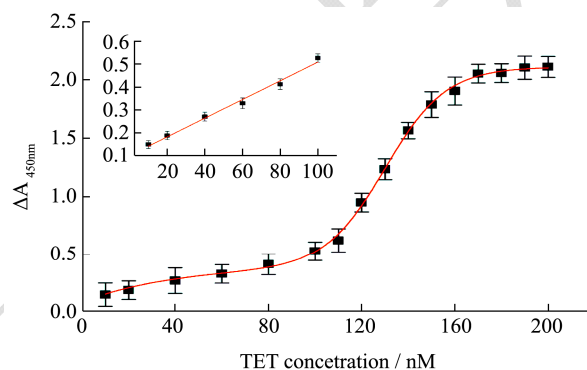


图5 比色法检测四环素灵敏度分析

Fig.5 Sensitivity analysis of colorimetric detection of TET

2.6 特异性研究

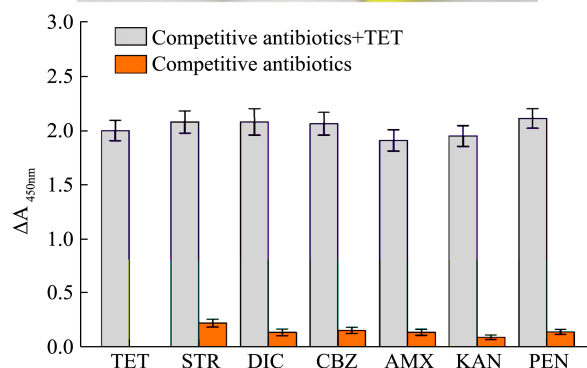


图6 不同种类抗生素对四环素检测的影响

Fig.6 Influence of different types of antibiotics on TET detection

考查了该方法对四环素检测的特异性。分别向检测体系中加入 200 nM 的硫酸链霉素(STR)、双氯芬酸钠(DIC)、卡马西平(CBZ)、阿莫西林(AMX)、硫酸卡那霉素(KAN)、青霉素钾(PEN)和四环素(TET), 测定

450 nm 处的吸光值 A_{450} ，与加入三蒸水代替的对照组 A_{450} 作差值 ΔA_{450} 。实验进一步考查了各种竞争性抗生素对四环素检测的影响，向四环素体系中加入上述不同抗生素，计算 ΔA_{450} 。作结果如图 6 所示，体系中加入四环素时，反应生成蓝绿色产物，而其它竞争性抗生素产物呈黄色。四环素产物的 ΔA_{450} 值明显高于其它抗生素，竞争性抗生素对四环素检测无明显影响。结果表明该方法对其它抗生素类似物无明显交叉反应，四环素的检测具有较好的选择性，可用于四环素的特异检测。

2.7 实际样品检测

采用牛奶样品进行实际样品检测。牛奶样品进行预处理：取 5 mL 牛奶样品加入 10 mL 离心管中，加入 2% 的三氯乙酸以消除钙离子的影响^[4]。6000 r/min、4 °C 离心 15 min。取上清液，4 °C 保存备用。本实验在优化的最佳条件下，将 3 组浓度分别为 100 nM、150 nM 和 200 nM 的四环素标品加入牛奶上清样品中，每组实验重复 3 次，测 450 nm 处吸光值。根据标准曲线计算出回收率，结果如表 1 所示，回收率为 92%~99%，相对标准偏差为 1.7%~5.5%。实验表明本方法具有较好的重复性和准确度，可以用于乳制品中四环素残留的检测。

表 1 牛奶样品中四环素残留检测结果

Table 1 Test results of the TET residues in milk samples

标准添加量/(nmol/L)	实际检出量/(nmol/L)			平均回收量±标准差/(nmol/L)	平均回收率±相对标准差/%
200.00	185.16	189.70	182.30	185.70±3.70	92.86±1.90
150.00	149.59	156.45	140.00	148.70±8.30	99.12±5.50
100.00	100.16	98.05	96.80	98.30±1.70	98.34±1.70

3 结论

本文利用高特异性单链DNA(G-ssDNA)能够增强 Hemin 催化活性的特点，建立了一种快速检测食品中四环素的方法。该方法最低检测限度(LOD)为 5.69 nM，与硫酸链霉素、双氯芬酸钠、卡马西平、阿莫西林、硫酸卡那霉素和青霉素钾等类似物反应测试，无明显交叉反应，牛奶样品检测回收率为 92%~99%，具有良好的准确性和特异性。该操作方便快捷，不依赖大型仪器设备，有望在食品中四环素残留检测中得到广泛运用。

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] 匡光伟,孙志良,陈小军,等.四环素类抗菌药物在鸡粪中的降解研究[J].农业环境科学学报,2007,26(5):1784-1788
KUANG Guang-wei, SUN Zhi-liang, CHEN Xiao-jun, et al. Degradation of tetracyclines in chicken feces [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007, 26(5): 1784-1788
- [3] 国占宝,武玉香,田文礼,等.食品中四环素类残留的酶联免疫检测试剂盒的研制[J].食品科学,2011,32(2):333
GUO Zhan-bao, WU Yu-xiang, TIAN Wen-li, et al. Development of a new ELISA kit for tetracycline residue detection in foods [J]. Food Sci., 2011, 32(2): 333
- [4] Zheng-lu Deng, Si-yu Yan, Hui Hu, et al. Proteomic profile of carbonylated proteins in rat liver: Discovering possible mechanisms for tetracycline-induced steatosis [J]. Proteomics, 2015, 15(1): 148-159
- [5] Nunes B, Antunes S C, Gomes R, et al. Acute effects of tetracycline exposure in the freshwater fish gambusia holbrooki: antioxidant effects, neurotoxicity and histological alterations [J]. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 2015, 68(2): 371-81
- [6] Vennila V, Madhu V, Rajesh R, et al. Tetracycline-induced discoloration of deciduous teeth: case series [J]. Journal of International Oral Health Jioh, 2014, 6(3): 115-119
- [7] Karaahmet F, Coskun Y, Erarslan E, et al. Extensive esophageal damage resembling carcinoma due to tetracycline intake [J]. Endoscopy, 2013, 45 (Suppl 2) UCTN(4): E258-E258
- [8] 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

(下转第 279 页)