

基于氧化石墨烯的磺胺嘧啶核酸适配体的筛选与鉴定^{*}

吴娟, 吴平, 寇启明, 孙琦, 王亚荣, 严雪凌, 施海星, 乐涛

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331)

摘要:【目的】利用 GO-SELEX 方法对磺胺嘧啶(Sulfadiazine)核酸适配体进行筛选与鉴定。【方法】基于氧化石墨烯(Graphene oxide)与 ssDNA 的 π - π 堆积作用,将氧化石墨烯作为结合 ssDNA 与分离的介质,以磺胺嘧啶为靶标分子,利用指数富集的配体系统进化技术(SELEX)和磁分离技术建立了基于氧化石墨烯的核酸适配体筛选方法 GO-SELEX,对筛选产物测序所得的核酸序列进行了同源性分析和二级结构预测,亲和力和特异性分析以及方法学考察。【结果】经过 9 轮筛选,获得了对磺胺嘧啶具有较高亲和力($K_d=411 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的核酸适配体 Ap-41,且 Ap-41 对磺胺嘧啶的特异性良好;磺胺嘧啶质量浓度在 $1.0 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光强度的线性关系良好,检出限为 $0.029 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,水样中加标回收率范围为 $95.0\% \sim 104.0\%$,相对标准偏差不超过 6.1% 。【结论】基于核酸适配体 Ap-41 的检测方法灵敏度较高,可用于后续传感器的构建及实际样品中磺胺嘧啶的检测。

关键词:氧化石墨烯;磺胺嘧啶;核酸适配体;指数富集的配体系统进化技术(SELEX);筛选;鉴定

中图分类号:Q958.116

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2021)02-0112-09

磺胺嘧啶(Sulfadiazine)是常见的磺胺类(Sulfonamides)药物,是一种广谱抗菌剂^[1]。磺胺嘧啶的不合理使用会使之残留在动物源性食品中,并通过食物链进入人体,从而危害人类健康;它还会经过动物粪尿等途径排入外部环境,造成生态毒理污染^[2]。因此,建立一种灵敏、高效、精确的磺胺嘧啶检测方法,对保证人类饮食健康,减少生态污染具有重要意义。

欧盟、中国等规定了动物源性食品中磺胺嘧啶的最大残留限量为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。目前,磺胺嘧啶残留检测的主要方法有高效液相色谱法和间接竞争 ELISA 法,检测限分别为 80 和 $10.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[3-4]。然而上述方法操作烦琐,需要昂贵仪器和专业技术人员,且实验周期长,不能广泛应用于实际样品中磺胺嘧啶的检测^[5-6]。相比之下,基于核酸适配体(Aptamer)构建的生物传感器具有检测灵敏度高、操作简单、选择性强等优点,因而在磺胺类药物检测中具有良好的应用前景。核酸适配体是一类在体外通过指数富集的配体系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选出的能与各种目标分子高亲和、高特异结合的 ssDNA 或 RNA 片段^[7-9],它的筛选过程一般包括结合、分离、洗脱、放大等 4 个步骤^[10]。GO-SELEX 是近些年来新发展的一种筛选方法,该方法主要基于氧化石墨烯(Graphene oxide)能够与 ssDNA 的碱基发生 π - π 堆积作用而将 ssDNA 吸附在表面^[11-12],不需要固定文库或靶标,操作简便,筛选周期短且成本低廉,较适合小分子靶标核酸适配体的筛选^[13]。为此,本研究以磺胺嘧啶为靶标分子,基于氧化石墨烯对磺胺嘧啶核酸适配体进行了筛选,并对候选适配体进行了鉴定,可为今后传感器的构建与磺胺嘧啶的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

研究所用主要仪器为:A300 基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司);DYY-6D 电泳仪(北京六一生物科技股份有限公司);Bio-Rad 凝胶成像系统(美国伯乐公司);infinite M200 pro(Tecan 奥地利有限公司)。

研究所用主要试剂为:磺胺嘧啶、磺胺喹噁啉(Sulfaquinoxaline)、磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine)、磺胺二甲

^{*} 收稿日期:2020-07-10 修回日期:2020-10-09 网络出版时间:2021-04-08 10:01

资助项目:国家自然科学基金(No. 31671939)

第一作者简介:吴娟,女,研究方向为病原微生物与免疫学,E-mail:wj2019@cqnu.edu.cn;通信作者:乐涛,男,教授,博士,E-mail:letao@cqnu.edu.cn

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210408.0845.002.html

氧嘧啶(Sulfadimethoxine)、磺胺对甲氧嘧啶(Sulfamethoxydiazine)标准品(上海安谱实验科技股份有限公司);氧化石墨烯分散液(江苏先丰纳米材料科技有限公司); $2\times$ Taq PCR Master Mix(天根生化科技有限公司);Streptavidin magnisphere[®] paramagnetic particles(SA-MPs)(美国 Promega 公司);结合缓冲液(含 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris、 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl、 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KCl、 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 和 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 , pH 为 7.4)。研究所用核酸文库及前向引物、后向引物^[14]均由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 1)。

表 1 本研究所用 ssDNA 序列
Tab.1 The ssDNA sequences used in this study

ssDNA 名称	序列
N40 Lib	5'-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-N40-CTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3'
TAMRA-FP(前向引物)	5'-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-3'
Biotin-RP(后向引物)	5'-biotin-GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3'
FP(前向引物)	5'-GACAGGCAGGACACCGTAAC-3'
RP(前向引物)	5'-GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3'

1.2 实验方法

1.2.1 氧化石墨烯用量和孵育时间的优化 取 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 N40 Lib, 加入最终质量浓度分别为 1, 0.5, 0.25, 0.125 和 $0.0625\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氧化石墨烯, 并设置空白对照组, 避光置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床上孵育 30 min; $16\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用酶标仪测量上清荧光值(530 nm 处激发, $560\sim 700\text{ nm}$ 处发射, 下同), 计算猝灭率, 每个实验组重复 3 次。

取 4 管质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氧化石墨烯, 分别加入 $500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 N40 Lib, 并设置空白对照组, 避光置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床分别孵育 20, 40, 60 min 后, $16\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用酶标仪测量上清荧光值, 计算猝灭率, 每个实验组重复 3 次。

1.2.2 GO-SELEX 过程 GO-SELEX 过程分为以下 4 步。

1) 文库复变性处理。取 500 pmol 初始文库置于金属浴 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加热 10 min 后立即置于冰上放置 5 min, 取出后避光于室温平衡 25 min。

2) 第 1 轮筛选。取与文库等摩尔数的磺胺嘧啶溶液(质量浓度为 $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与文库混合, 置于摇床上以 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 避光孵育 1.5 h, 加入一定比例的氧化石墨烯继续避光孵育, 随后 $16\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃掉沉淀, 回收上清液。用酶标仪测量上清荧光强度。每轮正筛选重复此过程。

3) 回收率计算。计算每一轮筛选后上清液的回收率, 将上清液的荧光值和筛选投入文库的荧光值分别记为 F_1 和 F_0 , 回收率计算公式为:

$$\text{回收率} = \frac{F_1}{F_0} \times 100\%。$$

4) 负筛选。当回收率趋于稳定后, 在正筛选之前进行一轮负筛选。上一轮所制备的单链次级文库经复变性处理后加入与文库等摩尔数的磺胺噻唑啉、磺胺二甲嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶, 置于摇床上以 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 避光孵育 1.5 h 后, 加入氧化石墨烯继续避光孵育。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 扩增具体操作步骤如下。

1) 预扩增。取 $92\text{ }\mu\text{L}$ 每轮筛选后上清液进行 10 轮 PCR 预扩增, PCR 循环条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 10 个循环的 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $60.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 和 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 5 min; 最后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 结束。PCR 反应体系为: Enriched library $92\text{ }\mu\text{L}$, $2\times$ Taq Master Mix $100\text{ }\mu\text{L}$, $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TAMRA-FP $4\text{ }\mu\text{L}$, $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Biotin-RP $4\text{ }\mu\text{L}$ 。

2) 扩增轮数优化。向预扩增产物中加入 $720\text{ }\mu\text{L}$ 的 ddH_2O , 将该产物稀释 10 倍, 取 $92\text{ }\mu\text{L}$ 稀释液按前述 PCR 循环条件分别扩增 3, 5, 7, 9 和 11 轮。PCR 反应体系为: 10 fold diluted Pre-PCR $92\text{ }\mu\text{L}$, $2\times$ SYBR Premix Ex Taq II $100\text{ }\mu\text{L}$, $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TAMRA-FP $4\text{ }\mu\text{L}$, $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Biotin-RP $4\text{ }\mu\text{L}$ 。用酶标仪测量 PCR 产物的荧光强度, 并结合聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物纯度, 确定 PCR 最佳扩增轮数。

3) 再扩增。在 PCR 最佳轮数下按前述 PCR 循环条件扩增剩余稀释液。PCR 反应体系为: 10-fold diluted

Pre-PCR 828 μL , $2\times\text{Taq Master Mix}$ 900 μL , $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TAMRA-FP 36 μL ; $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Biotin-RP 36 μL 。

1.2.4 次级文库的制备 取 2 管 600 μL 磁珠, 用 $1\times\text{PBS}$ (含 $0.1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 BSA) 清洗 3 次; 分别用 800 μL $1\times\text{PBS}$ (含 $0.1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 BSA 和 $0.2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl, pH 为 7.4) 重悬; 将 PCR 产物分别加到 800 μL 磁珠混悬液中, 以 $25\ ^\circ\text{C}$, $280\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 避光震荡 1 h; 用磁力架分离去除上清, 并用 1 mL $1\times\text{PBS}$ (pH 为 7.4) 清洗 3 次; 加入 50 μL $50\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH, 涡旋反应 3 min, 使正义链与反义链在碱性条件下分离, 随后加入 50 μL 的 ddH_2O 及 125 μL 的 $2\times\text{Tris-HCl}$ (pH 7.4) 继续涡旋振荡 1 min。经磁分离后小心收集上清液, 加入 25 μL $100\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 中和 NaOH, 得 250 μL 次级文库。用酶标仪测量次级文库的荧光强度, 将次级文库进行适当稀释后进入下一轮筛选。

1.2.5 克隆和测序 经终轮筛选后的 ssDNA 使用非标记前向引物、后向引物进行 PCR 扩增, 方法同 1.2.3 部分。克隆和测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。利用软件 DNAMAN 对测序序列进行同源性分析, 用 Mfold 软件预测序列的二级结构, 再根据二级结构对核酸序列进行截短优化。

1.2.6 候选适配体解离常数 (K_d) 的测定 将梯度浓度为 $0\sim 500\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5'-TAMRA 荧光标记的候选适配体分别与等摩尔数的磺胺嘧啶混合, 在摇床上以 $25\ ^\circ\text{C}$, $250\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 避光孵育 90 min。按照相同的 ssDNA 与氧化石墨烯的质量比加入氧化石墨烯, 继续孵育 50 min 后, $16\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用酶标仪测量上清液的荧光强度。最后用 Origin 9.0 软件拟合每条核酸序列的非线性曲线。

1.2.7 核酸适配体与磺胺嘧啶的特异性实验 将 $500\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核酸适配体分别与磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶和硝基呋喃置于摇床上以 $25\ ^\circ\text{C}$, $250\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 避光孵育 90 min; 加入氧化石墨烯继续避光孵育 50 min, $16\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 用酶标仪测量上清液的荧光强度, 通过计算回收率来分析核酸适配体对磺胺嘧啶结合的特异性。

1.2.8 方法学考察 通过以下两个实验进行方法学考察。

1) 磺胺嘧啶的检测。将 $500\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的核酸适配体分别与最终质量浓度范围为 $0.5\sim 500.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的磺胺嘧啶溶液置于摇床上以 $25\ ^\circ\text{C}$, $250\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 避光孵育 90 min; 加入氧化石墨烯继续避光孵育 50 min 后, $16\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用酶标仪测量上清液的荧光强度。

2) 水样中磺胺嘧啶加标回收实验。水样取自实验室自来水, 向自来水中分别加入不同质量浓度的磺胺嘧啶标准溶液, 配制成最终质量浓度分别为 $4, 6, 8, 10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的待测液, 核酸适配体浓度为 $500\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 置于摇床上以 $25\ ^\circ\text{C}$, $250\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 避光孵育 90 min; 加入氧化石墨烯继续避光孵育 50 min 后 $16\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用酶标仪测量上清液的荧光强度。

2 结果与分析

2.1 GO-SELEX 原理

利用氧化石墨烯筛选磺胺嘧啶特异性核酸适配体, 如图 1 所示: 磺胺嘧啶与初始文库混合孵育后, 部分 ssDNA 能与磺胺嘧啶结合后形成复合物; 随后加入氧化石墨烯继续孵育, 游离 ssDNA 通过 $\pi-\pi$ 堆积作用被氧化石墨烯吸附, 通过离心分离获得结合磺胺嘧啶的 ssDNA; 将 ssDNA 进行 PCR 扩增放大后, 加入链霉亲和素磁珠来制备单链次级文库并继续投入下一轮筛选。当筛选文库富集到适当程度且趋于稳定时, 加入与磺胺嘧啶同类的其他磺胺类药物进行负筛选; 随后加入氧化石墨烯吸附游离 ssDNA, 通过离心去除结合这类药物的 ssDNA; 最后加入正向靶标磺胺嘧啶, 得到从氧化石墨烯表面解吸附且能与磺胺嘧啶特异结合的 ssDNA。

2.2 氧化石墨烯的表征与条件优化

2.2.1 氧化石墨烯的表征 通过扫描电子显微镜对氧化石墨烯进行观察。如图 2a, b 所示, 氧化石墨烯表面较为粗糙, 已经失去石墨表面的金属光泽, 而且可以清晰看到边缘的阶梯状形貌以及因超声剥落而脱落下来的许多大小不一的氧化石墨烯片^[15-16]。观察结果表明氧化石墨烯质量合格。

2.2.2 氧化石墨烯的用量优化 图 3 显示, 当氧化石墨烯质量浓度大于 $0.25\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 猝灭率均大于 99%。为了保证 ssDNA 的充分分离, 选用 $0.25\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为氧化石墨烯与 ssDNA 的最佳分离质量浓度。

2.2.3 ssDNA 与氧化石墨烯的孵育时间优化 从图 4 可知: $0\sim 20\ \text{min}$ 内荧光强度迅速下降 (猝灭率为 99.60%); 之后随着孵育时间的增加, 荧光猝灭率波动较小, 在 40 和 60 min 时猝灭率分别为 99.78% 和

99.79%。因此,反应时间选择 40~60 min 为最佳。为保证氧化石墨烯对 ssDNA 的完全吸附,选用 50 min 作为最佳孵育分离时间^[17]。

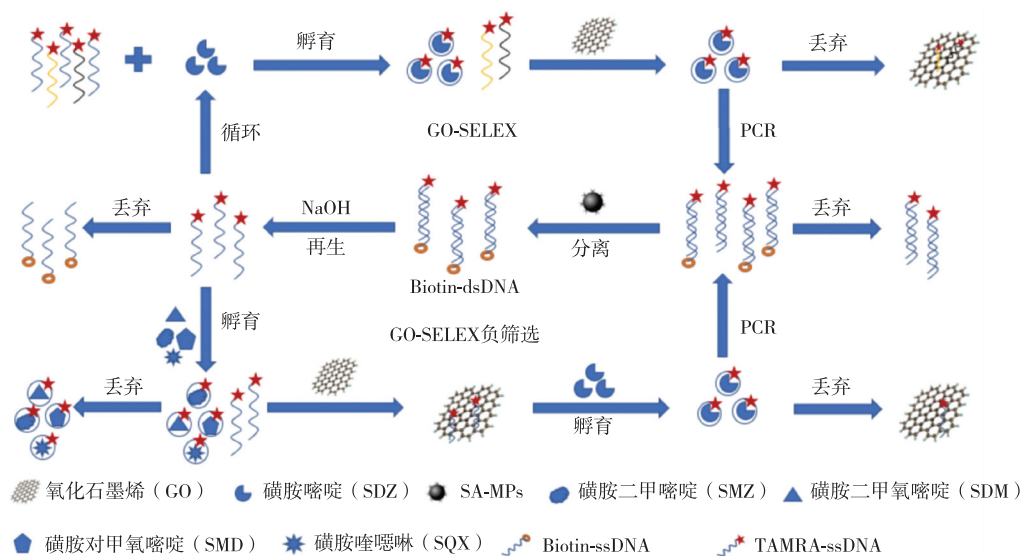


Fig. 1 Process of GO-SELEX

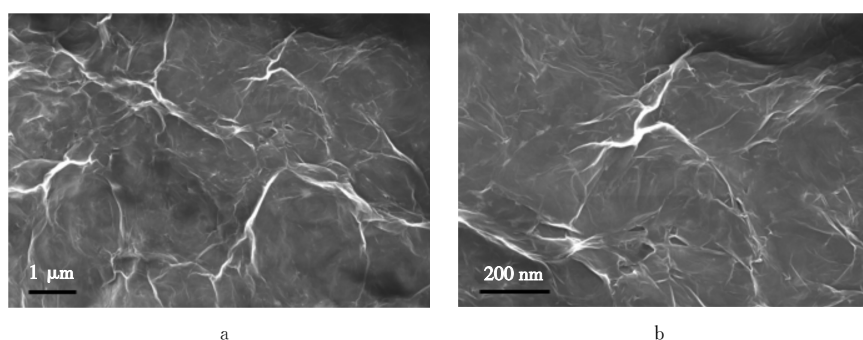


Fig. 2 SEM image of graphene oxide

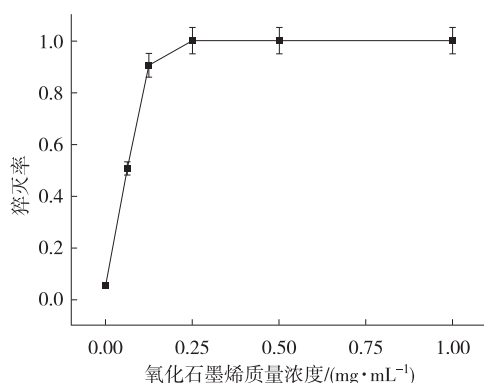


图 3 氧化石墨烯浓度与 ssDNA 猝灭率关系

Fig. 3 The relationship between the concentration of graphene oxide with quenching efficiency of ssDNA

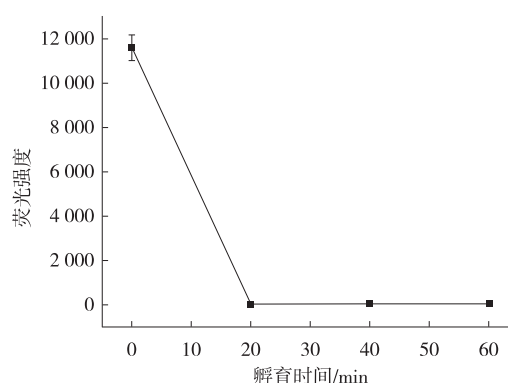


图 4 孵育时间和 ssDNA 荧光强度关系

Fig. 4 The relationship between incubation time with fluorescence intensity of ssDNA

2.3 体外筛选过程

采用荧光强度法对每轮筛选后文库与磺胺嘧啶的结合情况进行监控。如图 5 所示,前几轮筛选上清荧光没有明显变化;第 3 轮筛选后,随筛选轮数增加,荧光强度逐渐升高,表明能与磺胺嘧啶结合的 ssDNA 得到富集;

至第 5 轮、第 6 轮筛选时,回收率趋于稳定,表明能与磺胺嘧啶结合的 ssDNA 趋于饱和。在第 7 轮正筛选开始前增加了负筛选步骤,因而第 7 轮筛选的回收率明显下降,表明第 6 轮的次级文库中含有浓度较高的非特异性结合序列,特异结合磺胺嘧啶的 ssDNA 浓度较低。随后再进行两轮正筛选,第 8 轮、第 9 轮筛选的回收率明显升高,这可能与第 7 轮的负筛选过程的有效性有关。第 9 轮筛选后,从投入库中能回收 65% 以上的 ssDNA,表明经过 9 轮筛选可能已经得到具有高亲和力、高特异性的核酸序列。因此,经 9 轮筛选后停止筛选过程,将第 9 轮的筛选文库用无标记的前向引物,后向引物进行 10 轮的 PCR 预扩增后进行 3,5,7,9 和 11 轮的 PCR 轮数优化,且结合聚丙烯酰胺凝胶电泳确定最佳扩增轮数,最后 PCR 再扩增后进行克隆测序。如图 6 所示,图中 M 代表 DNA 分子量标尺(Marker),可以看出,第 9 轮筛选文库的 PCR 最佳扩增轮数为 5 轮,此条件下凝胶电泳条带单一明亮,基本无高分子量的副产物出现。

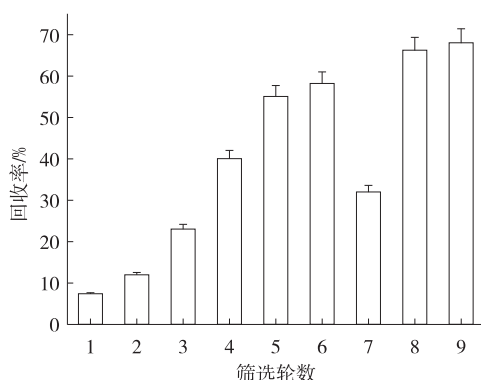


图 5 每轮筛选结合磺胺嘧啶的 ssDNA 的回收率

Fig. 5 SELEX monitoring by recovery ratio

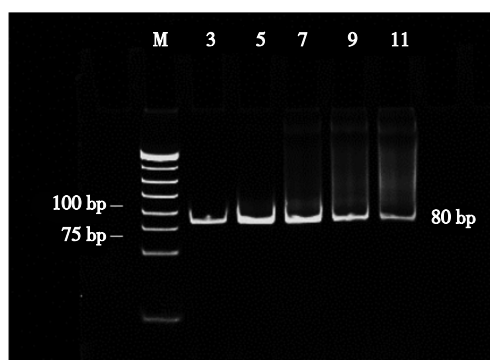


图 6 PCR 轮数优化产物凝胶电泳图谱

Fig. 6 Gel electrophoregram of PCR optimized products

2.4 序列分析与优化

第 9 轮筛选产物经克隆测序后,根据同源性将 46 条序列分为 4 个大家族。选择序列较多的家族中结构最稳定和同源性高的序列作为磺胺嘧啶的候选适配体。图 7 为 4 条候选适配体 Ap-7, Ap-9, Ap-16 和 Ap-41 的二级结构模拟图,可以看出这 4 条序列至少含有 2 个以上的茎环结构,推测环部很可能为磺胺嘧啶与核酸适配体的结合位点。基于这一推测,对茎部序列进行截短^[16],分别得到了序列 Ap-7-1, Ap-9-1, Ap-16-1 和 Ap-41-1 (图 8)。

2.5 候选适配体 K_d 值的测定和特异性分析

对 8 条候选序列 Ap-7, Ap-9, Ap-16, Ap-41, Ap-7-1, Ap-9-1, Ap-16-1 和 Ap-41-1 进行 TAMRA 荧光标记(表 2),进行亲和性实验以分析上述核酸序列与磺胺嘧啶的结合力。

候选适配体与磺胺嘧啶孵育后,加入氧化石墨烯吸附并淬灭游离的 ssDNA,测定能与磺胺嘧啶结合的 ssDNA 的荧光强度。将对照组上清液的荧光值记为 F ,实验组上清液的荧光值记为 F' ,样品实际荧光强度变化值则为 $\Delta F = F' - F$ 。以 ssDNA 浓度(X)为横坐标,样品实际荧光强度(Y)为纵坐标,通过公式 $Y = B_{\max} \times \frac{X}{K_d + X}$ ($B_{\max}$ 为磺胺嘧啶的最大结合率)进行非线性拟合,得到各条候选适配体与磺胺嘧啶结合的饱和曲线,并计算出它们的 K_d 值。

在上述 8 条候选适配体序列中,序列 Ap-7, Ap-7-1, Ap-9 和 Ap-9-1 数据点紊乱,曲线拟合效果不佳,其余 4 条候选适配体序列与磺胺嘧啶结合的饱和曲线如图 9 所示。同原始候选序列相比,截短优化后的 Ap-41-1 的亲和力虽然有所降低,而 Ap-16-1 的亲和力却有了一定提高,且 K_d 值均为 nmol 级别,表明经过 9 轮筛选后已富集到亲和力较好的适配体,同时经过截短优化没有明显影响核酸适配体与磺胺嘧啶的有效识别。其中候选适配体 Ap-41 的 K_d 值最小,表明 Ap-41 对磺胺嘧啶的亲和力最好。

根据亲和力测定结果,选取 K_d 值较小的核酸适配体 Ap-41 和 Ap-16-1 进行特异性实验。如图 10 所示,Ap-41, Ap-16-1 对磺胺嘧啶的回收率分别为 68.7%, 59.1%, 对磺胺二甲嘧啶的回收率相对较高,可能源于磺胺嘧啶和磺胺二甲嘧啶的化学结构相近,但远远低于对磺胺嘧啶的回收率,并且对其他几种药物的回收率都较低。结果表明 Ap-41, Ap-16-1 对磺胺嘧啶的特异性较好,优化候选适配体 Ap-16-1 比原始候选适配体 Ap-41 回收率

稍低,这是因为优化过程中,多余碱基的去除可能影响核酸适配体的空间结构,在一定程度上会影响它的特异性^[18]。

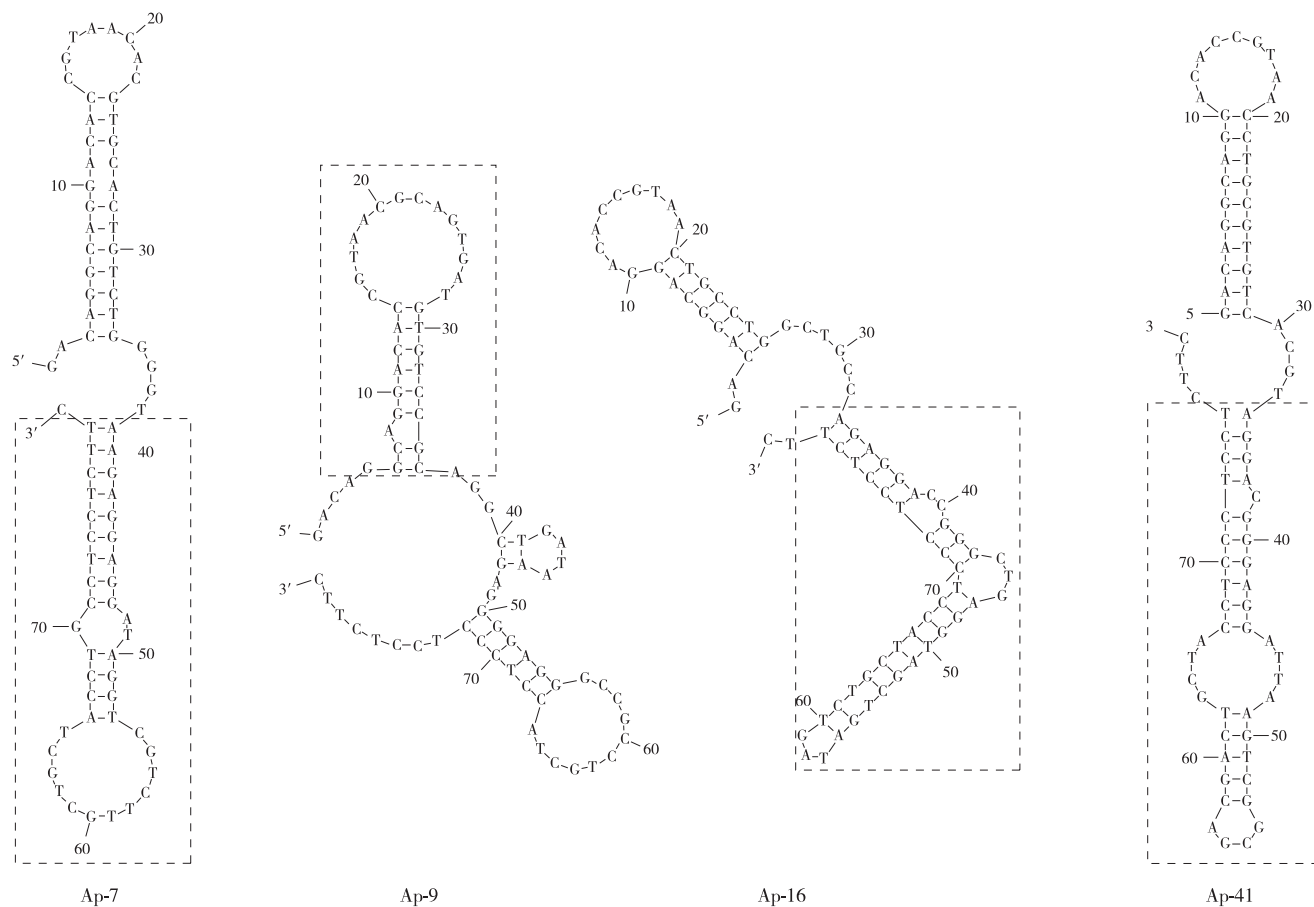


图 7 原始候选适配体二级结构

Fig.7 The secondary structure of original candidate aptamers

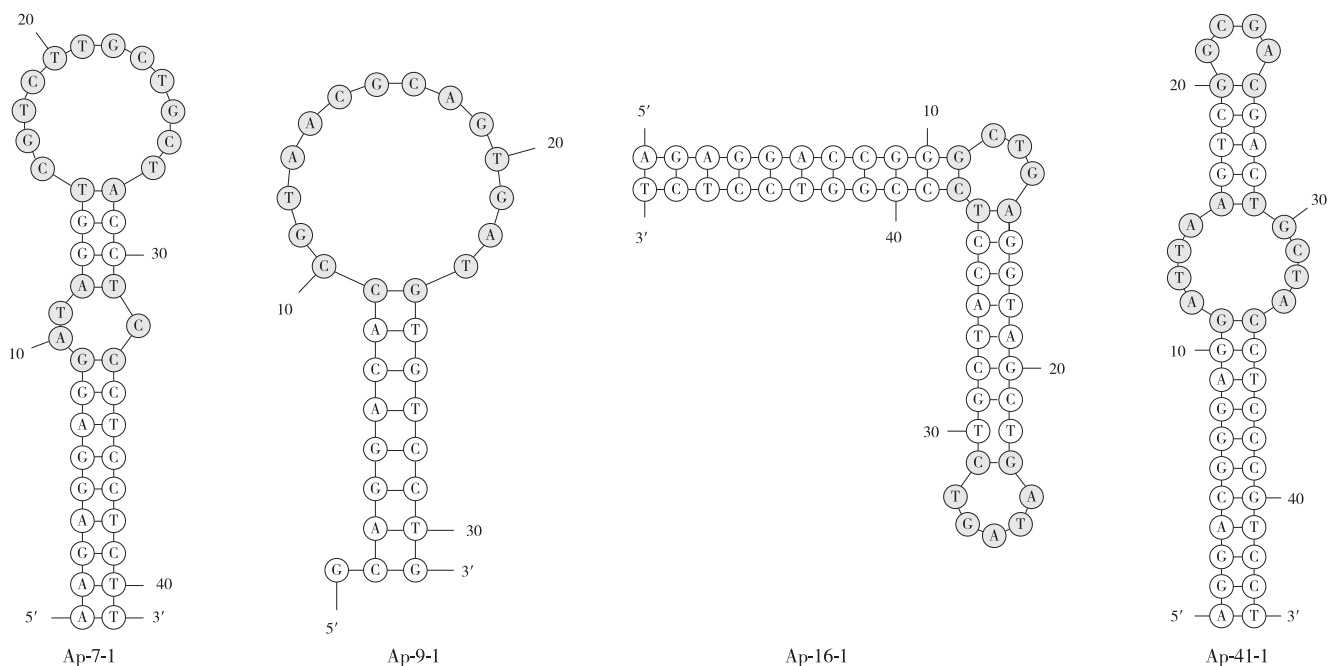


图 8 优化候选适配体二级结构

Fig.8 The secondary structure of optimized candidate aptamers

核酸适配体 Ap-41 和 Ap-16-1 的最小自由能(ΔG)分别为 -97.77 , $-88.70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,而自由能越低,越能稳定存在于环境之中。综合考虑后,可优先选 K_d 值更小、特异性更高、稳定性更好的 Ap-41 作为磺胺嘧啶核酸适配体用于后续的研究工作中。

表 2 候选适配体序列表
Tab.2 The list of candidate aptamers

编号	核酸序列	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
Ap-7	5'-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAACACGTGCACTGTCTGGGG TAAGAGGAGGATAGGTCGTCTTGCTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3'	-73.82
Ap-9	5'-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAACGCAGTGATGTGTCCGCA GGCTGATAAGAGGGGAGGGCCGCTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3'	-63.75
Ap-16	5'-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAACCTGCCTGGCTGCCAGAGG ACCGGGCTGAGGTAGCTGATAGTCTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3'	-89.24
Ap-41	5'-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAACCTGCGTGTCACGTAGGA CGGGAGGATTAAGTCGGCGACGACTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3'	-97.77
Ap-7-1	5'-TAMRA-AAGAGGAGGATAGGTCGTCTTGCTGCTACCTCCCTCCTCTT-3'	-45.77
Ap-9-1	5'-TAMRA-GCAGGACACCGTAACGCAGTGATGTGTCTCTGC-3'	-34.03
Ap-16-1	5'-TAMRA-AGAGGACCGGGCTGAGGTAGCTGATAGTCTGCTA CCTCCCGGTCCTCT -3'	-88.70
Ap-41-1	5'-TAMRA-AGGACGGGAGGATTAAGTCGGCGACGACTGCTACCTCCCGTCCT-3'	-79.75

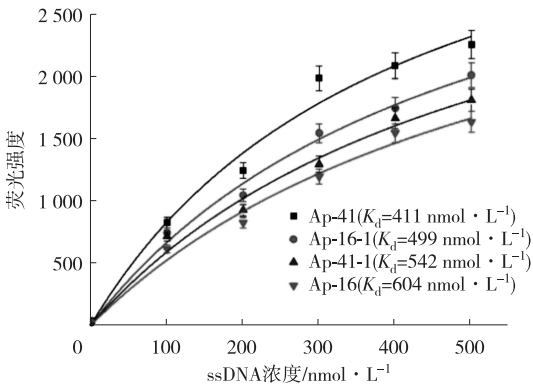


图 9 候选适配体与磺胺嘧啶结合的饱和曲线

Fig. 9 The saturation curve of candidate aptamers and sulfadiazine

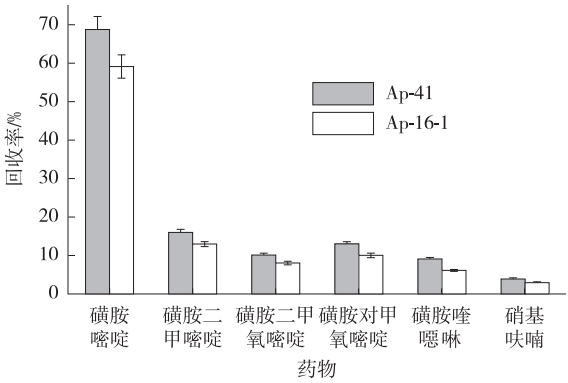


图 10 磺胺嘧啶核酸适配体的特异性分析

Fig. 10 The specificity analysis of aptamers for sulfadiazine

2.6 基于氧化石墨烯的传感器检测磺胺嘧啶

核酸适配体 Ap-41 的 5'端标记有荧光基团 TAMRA,加入磺胺嘧啶后,部分 ssDNA 能与磺胺嘧啶结合后形成复合物,从而产生可以量化的荧光信号。随后加入氧化石墨烯继续孵育,氧化石墨烯不仅能够与 ssDNA 的碱基发生 π - π 堆积作用而将游离 ssDNA 吸附在表面,而且还可以淬灭标记在 ssDNA 的 TAMRA 的荧光信号。以磺胺嘧啶质量浓度(x)为横坐标,上清液荧光强度(y)为纵坐标作图可得二者线性关系,如图 11 所示。以信噪比为 3 : 1 确定磺胺嘧啶的检出限。结果表明,磺胺嘧啶质量浓度在 $1.0 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光强度呈线性关系,回归方程为 $y=55.755x+178.873$ ($R^2=0.9879$, $n=5$),线性关系良好,检出限为 $0.029 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,灵敏度较高。

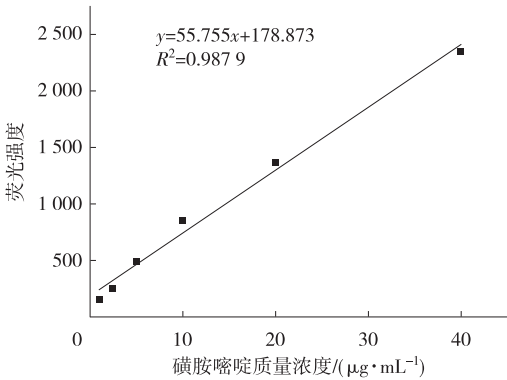


图 11 磺胺嘧啶浓度与荧光强度关系

Fig. 11 The relationship between sulfadiazine concentration and fluorescence intensity

2.7 回收率与精密度

加标水样经酶标仪荧光检测后通过图 11 中的标准曲线进行计算,结果如表 3 所示。加标质量浓度范围为 4~10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,水样中磺胺嘧啶的加标回收率范围为 95.0%~104.0%,相对标准偏差范围为 2.7%~6.1% ($n=5$)。结果表明该方法的准确度和精密度良好,可用于自来水中磺胺嘧啶的检测^[19]。

表 3 水样加标回收率和精密度
Tab. 3 Recovery and precision of sulfadiazine in water samples

样品 编号	加标质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检出值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加标回收率/ %	相对标准 偏差/%	样品 编号	加标质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检出值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加标回收率/ %	相对标准 偏差/%
1	0	0.0	0.0	0.0	4	8	8.3	103.8	3.3
2	4	3.8	95.0	5.1	5	10	10.4	104.0	2.7
3	6	6.1	101.7	6.1					

3 结论与展望

本研究经过 9 轮筛选得到特异结合磺胺嘧啶的核酸适配体 Ap-41,它的解离常数 K_d 值为 $411 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$;磺胺嘧啶质量浓度在 $1.0 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光强度的线性关系良好,磺胺嘧啶检出限为 $0.029 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,水样中磺胺嘧啶加标回收率范围为 95.0%~104.0%,相对标准偏差不超过 6.1%。该结果表明基于核酸适配体 Ap-41 检测磺胺嘧啶方法的灵敏度较高,可用于后续传感器的构建及实际样品中磺胺嘧啶的检测。

在本研究基础上,今后还可以对孵育温度、缓冲液 pH、离子浓度等多种筛选条件进行优化改进,尤其是要精准控制氧化石墨烯的用量,从而缩短筛选周期以获得亲和力更好、特异性更强的核酸适配体。通过分子模拟,预测核酸适配体 Ap-41 与磺胺嘧啶的结合位点,将序列进一步截短或修饰,有望构建灵敏度更高的生物传感器并应用于磺胺嘧啶的样品检测中。

参考文献:

[1] WANG X, LI K, SHI D, et al. Development of an immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2072-2078.

[2] 李秀文,何益得,张巍,等. 磺胺类抗生素对水环境的污染及生态毒理效应[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(S1): 68-73.

LI X W, HE Y D, ZHANG W, et al. Pollution status of sulfonamides in aquatic environment and its ecotoxicological effects on aquatic organisms[J]. Environmental Science and Technology, 2018, 41(S1): 68-73.

[3] SPIELMEYER A, AHLBORN J, HAMSCHER G. Simultaneous determination of 14 sulfonamides and tetracyclines in biogas plants by liquid-liquid-extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(11): 2513-2524.

[4] 王刘花,许杨,郭杰标,等. 磺胺嘧啶单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 192-196.

WANG L H, XU Y, GUO J B, et al. Preparation and identification of anti-sulfadiazine monoclonal antibody[J]. Food Science, 2010, 31(11): 192-196.

[5] TURCO A, CORVAGLIA S, MAZZOTTA E. Electrochemical sensor for sulfadimethoxine based on molecularly imprinted polypyrrole: study of imprinting parameters[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 63: 240-247.

[6] 赵玲钰,秦思楠,高林,等. 磺胺嘧啶分子印迹电化学传感器的制备及其快速检测食品中磺胺嘧啶药物残留[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 326-334.

ZHAO L Y, QIN S N, GAO L, et al. Preparation and application of molecularly imprinted electrochemical sensor for rapid detection of sulfadiazine residues in foods[J]. Food Science, 2018, 39(22): 326-334.

[7] SEFAH K, PHILLIPS J A, XIONG X L, et al. Nucleic acid aptamers for biosensors and bio-analytical applications[J]. The Analyst, 2009, 134(9): 1765-1775.

[8] SEFAH K, SHANGGUAN D H, XIONG X L, et al. Development of DNA aptamers using CELL-SELEX[J]. Nature Protocols, 2010, 5(6): 1169-1185.

[9] LI W M, BING T, WEI J Y, et al. Cell-SELEX-based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal

- cancer cells[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(25): 6998-7007.
- [10] PARK J W, TATAVARTY R, KIM D W, et al. Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(15): 2071-2073.
- [11] NGUYEN V T, KWON Y S, KIM J H, et al. Multiple GO-SELEX for efficient screening of flexible aptamers[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(72): 10513-10516.
- [12] YOUN H, LEE K, HER J, et al. Aptasensor for multiplex detection of antibiotics based on FRET strategy combined with aptamer/graphene oxide complex[EB/OL]. (2019-05-21)[2020-07-10]. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-44051-3>.
- [13] LEE B H, NGUYEN V T, GU M B. Highly sensitive detection of 25-hydroxyvitamin D3 by using a target-induced displacement of aptamer[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 88: 174-180.
- [14] LIU X H, LI H, JIA W C, et al. Selection of aptamers based on a protein microarray integrated with a microfluidic chip[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 17(1): 178-185.
- [15] SRIVASTAVA S, ALI M A, UMRAO S, et al. Grapheneoxide-based biosensor for food toxin detection [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(3): 960-970.
- [16] DAVE S H, GONG C, ROBERTSON A W, et al. Chemistry and structure of graphene oxide via direct imaging[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7515-7522.
- [17] 刘晓辉, 王则呈, 张晓兵, 等. 基于聚多巴胺磁性纳米微球的洛美沙星适配体筛选研究[J]. *分析化学*, 2017, 45(12): 1971-1979.
- LIU X H, WANG Z C, ZHANG X B, et al. Screening of lomefloxacin aptamers based on polydopamine nanospheres[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 45(12): 1971-1979.
- [18] HA N, JUNG I, LA I, et al. Ultra-sensitive detection of kanamycin for food safety using a reduced graphene oxide-based fluorescent aptasensor[EB/OL]. (2017-01-05)[2020-07-10]. <https://www.nature.com/articles/srep40305>.
- [19] ZHU N F, ZHU Y Q, WANG J, et al. A novel fluorescence immunoassay based on AgNCs and ALP for ultrasensitive detection of sulfamethazine (SMZ) in environmental and biological samples[J]. *Talanta*, 2019, 199: 72-79.

Screening and Identification of Sulfadiazine Aptamer Based on Graphene Oxide

WU Juan, WU Ping, KOU Qiming, SUN Qi, WANG Yarong, YAN Xueling, SHI Haixing, LE Tao

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] It aims to screen and identify the aptamer of sulfadiazine by GO-SELEX method. [Methods] Based on the π - π stacking of graphene oxide (GO) and ssDNA, using GO as the medium to combine ssDNA and separation. Using sulfadiazine as the target molecule, a new method of aptamer selection based on graphene oxide (GO-SELEX) was established by using the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) and magnetic separation technology. Homology analysis, secondary structure prediction, affinity and specificity analysis as well as methodology investigation were carried out for the nucleic acid sequences obtained from the sequencing of the screened products. [Findings] Ap-41 with high affinity for sulfadiazine ($K_d = 411 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) was obtained through nine rounds of screening, and the specificity of Ap-41 for sulfadiazine was good. The linear relationship between sulfadiazine concentration in the range of $1.0 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and fluorescence intensity was good, the detection limit was $0.029 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the recovery of sulfadiazine in water samples was $95.0\% \sim 104.0\%$, and the relative standard deviation was not more than 6.1% . [Conclusions] The detection method based on aptamer Ap-41 has high sensitivity and can be used for the construction of subsequent sensors and the detection of sulfadiazine in actual samples.

Keywords: graphene oxide; sulfadiazine; aptamer; systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX); screening; identification

(责任编辑 方 兴)