

赭曲霉毒素 A 核酸适配体筛选

刘继红^{1,2,3}, 胡颖⁴, 洪慧杰^{1,2,3}, 张玲^{1,2,3}, 王红旗^{1,2,3*}

(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. 河南省粮食质量安全与检测重点实验室, 郑州 450002; 3. 农业部农产品质量安全风险评估实验室(郑州), 郑州 450002; 4. 河南农业大学, 郑州 450002)

摘要: **目的** 筛选小麦和其他相关食品中常见的赭曲霉毒素 A 真菌毒素核酸适配体。**方法** 采用固态靶标筛选策略和磁分离的筛选方法筛选赭曲霉毒素 A 的核酸适配体。**结果** 获得的赭曲霉毒素 A 核酸适配体亲和力较高, 解离常数为纳摩尔级; 特异性好, 与赭曲霉毒素 A 结构相似性化合物如赭曲霉毒素 B、N-乙酰苯丙氨酸或华法令不结合或结合力非常弱。**结论** 本文采用固态靶标筛选策略和磁分离的 SELEX 筛选方法获得了赭曲霉毒素 A 的高特异性、高亲和力核酸适配体, 有望在农产品质量安全领域替代传统抗体开发真菌毒素快速检测传感器或制备固相亲和柱。

关键词: 真菌毒素; 赭曲霉毒素; 核酸适配体; 指数富集的配基系统进化技术; 固相亲和柱

Screening of DNA aptamer of ochratoxin A

LIU Ji-Hong^{1,2,3}, HU Ying⁴, HONG Hui-Jie^{1,2,3}, ZHANG Ling^{1,2,3}, WANG Hong-Qi^{1,2,3*}

(1. *Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou 450002, China*; 2. *Henan Key Laboratory of Grain Quality and Safety and Testing, Zhengzhou 450002, China*; 3. *Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-Products (Zhengzhou), Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China*; 4. *Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China*)

ABSTRACT: **Objective** To screen aptamer of ochratoxin A (OTA) in wheat and other related food. **Methods** The solid-target selection strategy and magnetic-separation selection method were adopted to screen aptamer of ochratoxin A. **Results** The OTA aptamer had high affinity with nanomolar dissociation constants and good specificity non-recognizing, and it had weak affinity towards structure similarity compounds of OTA such as Ochratoxin B (OTB), N-acetyl-L-phenylalanine and warfarin. **Conclusion** The OTA aptamer that got from solid-target selection strategy and magnetic-separation selection method, has high affinity and good specificity. Instead of traditional antibody, the OTA aptamer may be used to develop sensor and affinity chromatography column for mycotoxins rapid detection in the field of agricultural products.

KEY WORDS: mycotoxin; ochratoxin; aptamers; systematic evolution of ligands by exponential enrichment; affinity column

基金项目: 国家公益性行业(农业)项目(201203094), 国家自然科学基金项目(21305031), 农业部重点项目(2011-G5)

Fund: Supported by Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201203094), the National Natural Science Foundation of China (21305031) and the Key Project of the Ministry of Agriculture (2011-G5).

*通讯作者: 王红旗, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术。

*Corresponding author: WANG Hong-Qi, Associate Researcher, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Henan Academy of Agricultural Science, No. 116, Huayuan Road, Jinshui District, Zhengzhou 450002, China.

1 引言

赭曲霉毒素 A(OTA)是由多种生长在粮食(小麦、玉米、大麦、燕麦、黑麦、大米和黍类等)、花生、蔬菜(豆类)等农作物上的曲霉(*Aspergillus*)和青霉(*Penicillium*)产生的一种真菌毒素^[1],研究表明,赭曲霉毒素会引起动物肝脏与肾脏损伤,对啮齿类动物有很强的致癌性,对人类也有致癌和免疫毒性^[2]。目前,世界上很多国家都制定了针对 OTA 的限量标准,针对 OTA 的检测主要基于实验室确证方法。为了确保农产品质量安全,简单、快捷的真菌毒素检测方法的开发是质量控制的技术基础。现在公认的真菌毒素检测方法主要基于免疫亲和柱的高效液相色谱法^[3]。

核酸适配体的本质是由一段单链寡核苷酸(20~60 个碱基),通过折叠形成特有的三维结构,从而与靶分子高亲和力、高特异性结合^[4,5]。核酸适配体的识别特性与抗体相似,但与抗体相比具有很多独特的优势:可在体外筛选(不依赖生物体)^[6],靶分子范围广(从金属离子^[7]、毒素^[8,9]等小分子到酶、蛋白等生物大分子^[10],甚至病毒^[11]、细菌和细胞^[12]等生物体),分子量小(无免疫原性)^[13],容易进行化学合成、改造与标记,批间差异小^[14],生物化学稳定性好,能可逆地进行变性与复性,还能利用酶进行扩增、剪切等后续处理^[12]。各种基于核酸适配体的分析、检测方法与技术已呈现出快速、灵敏、方便、低成本等优点^[15-17],在生物医学应用中已经显示出广阔的应用前景,但在真菌毒素检测方面的应用却相对较少,主要是因为真菌毒素属于小分子。

目前小分子靶标核酸适配体的数量非常少,主要是因为小分子靶标核酸适配体的筛选目前面临着一定的技术难题和理论难题。技术上的难题主要是小分子靶标核酸适配体的亲和力测定。亲和力的测定是制约小分子靶标核酸适配体快速发展的重要因素。传统的 K_d 值测定方法必须固定核酸适配体或者靶标,通过不断增加另一组分的浓度进行滴定从而产生结合曲线。常用的 K_d 值测定方法并不适合小分子靶标核酸适配体 K_d 值的测定。如基于靶标-核酸适配体复合物尺寸动态变化的分离模式检测技术和基于表面质量敏感型的检测方法,一般需要将靶标或者核酸适配体固定在表面上。在用于小分子靶标时,如果是

将核酸适配体在表面固定进行测定,那么这类方法的灵敏度将面临考验,因为小分子靶标结合引起的总体质量变化比较小;如果将小分子靶标固定在表面上进行测定,将会面临化学修饰影响亲和力的问题。基于构象变换原理的检测方法虽然可以用于小分子,但不是一种通用的检测方法,因为并非所有的核酸适配体在与小分子靶标结合时都能发生可量测的构象变换^[18]。其他的 K_d 值测定方法通常要求靶标自身具有荧光或紫外吸收特性,然而实际应用中许多小分子靶标不具备这个特性。新近开发的一些检测方法如自动化微芯片电泳技术和原子力光谱技术能够部分克服以上所述难题,但依然缺乏一种通用的小分子靶标核酸适配体亲和力测定技术。理论上,普遍认为小分子靶标核酸适配体的亲和力较弱,位于低微摩尔到中微摩尔之间,难于满足大多数传感器应用的要求。Carothers 等^[19]研究表明靶标的分子量与核酸适配体的亲和力成正比例关系,该研究结果与其他小组的研究结果一致。然而,情况并非均是如此,如茶碱(相对分子量 180)的核酸适配体的解离常数为纳摩尔级别^[20]。最近新筛选到的一些小分子靶标核酸适配体的 K_d 值也低至纳摩尔,如双酚 A^[21]和土霉素^[22]。据此推断:如果小分子靶标含有的可旋转化学键越少,那么其相应的核酸适配体的亲和力就会越高。另外,20 世纪 90 年代研究者们提出的 SELEX 筛选技术操作起来其实相当费时费力,成功率不足 30%^[23]。此外,几乎每一个核酸适配体的实际应用都申请了专利,一定程度上限制了核酸适配体筛选的创新。目前,很少有课题组在开发新型小分子靶标核酸适配体上投入过多的时间和资金,特别是考虑到在筛选过程中可能要面临的技术挑战。

本研究应用固态靶标的筛选策略和磁分离的筛选方法的指数富集的配基系统进化(SELEX)技术筛选能够特异性结合 OTA 的核酸适配体。获得的核酸适配体亲和力高,解离常数在纳摩尔级;特异性高,对 OTA 的识别能力强于赭曲霉毒素 B(OTB)约 100 倍,由此证明,该适配体在农产品质量安全领域具有一定的应用前景,目前有关该适配体的进一步应用研究正在进行,包括研制基于核酸适配体的生物传感器、制备固相亲和柱以及其他用于现场及实验室快速检测的分析方法等。

2 材料与方法

2.1 实验材料

OTA、OTB 标准品(美国 santa 公司); 氮乙酰基苯丙氨酸、华法令(分析纯, 西格玛奥德里奇中国公司)。Taq 聚合酶, 4 种单碱基的混合溶液(dNTPs, 宝生物工程(大连)有限公司); 氨基标记的磁珠、亲和素标记的磁珠(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。寡核苷酸 DNA 链以及其他相应探针均从上海生工生物工程有限公司订购合成。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/>)。

2.2 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公司); 台式微量高速离心机(H1650-W, 湘仪离心机仪器有限公司); 核酸扩增仪-PCR 仪(MJ Mini, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司); 电泳仪(122-3136, 北京六一生物科技有限公司); 凝胶成像系统(JS-380B, 上海达平仪器有限公司); 荧光光谱仪(F-7000, 日本日立公司)。

2.3 试验方法

2.3.1 OTA 的固定

称取 1.1 mg N-羟基琥珀酰亚胺(Sulf-NHS), 2 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶于 96 μL 1×PBS (10 mmol/L PBS, 150 mmol/L NaCl, pH 7.2)缓冲溶液中, 然后加入 4 μL OTA 储备液(123.8 mmol/L), 室温下反应 15 min。氨基磁珠取 123.7 μL, 用 1×PBS 洗涤 3 次, 600 μL PBS/次。将上述反应混合液加入 PBS 洗涤过的氨基磁珠中, 室温震荡反应 2 h。然后将震荡反应后的氨基磁珠再用 1×PBS 洗涤 3 次, 600 μL PBS/次, 之后置于 4 °C 备用。

2.3.2 筛选

将筛选所用的 DNA 文库(CAGCTCAGAAGCTTGATCCTGTG---N30---GACTCG AAGTCGTGCATC

TGCA)用 1×PBS-Mg 缓冲液(10 mmol/L PBS, 150 mmol/L NaCl, 2.6 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, pH 7.2)溶解后, 于 95 °C 变性 5 min 后, 迅速置于冰上冷却 5 min。然后, 将预处理过的文库加入 PBS 洗涤过的氨基磁珠(用量与 OTA 固定时的用量保持一致), 37 °C 震荡孵育 30 min, 随后磁分离收集上清液, 将其加入含有固定了 OTA 的磁珠的离心管, 37 °C 震荡孵育一定时间, 之后根据筛选的需要适时采取含有一定浓度的氮乙酰基苯丙氨酸和华法令的 1×PBS Mg 缓冲液洗涤一定次数, 600 μL/次; 最后再用 1×PBS 洗涤一定次数, 600 μL PBS/次。往上述洗涤过的含有磁珠的离心管中加 150 μL ddH₂O, 混匀后将该混合溶液转移至另一新的离心管中, 在用 150 μL ddH₂O 润洗原管 1 次, 将 2 次溶液合并到同一新管中, 共计 300 μL(含磁珠)。随后, 将此离心管置于恒温金属浴上 95 °C 加热 10 min, -20 °C 冷却 5 min, 磁分离收集上清液, 备用。

2.3.3 PCR 扩增

PCR 扩增所用引物序列为 Primer1: 5'-CAGCTCAGAAGCTTGATCCTGTG(5'端标记有 Cy3), Primer2: 5'-TGCAGATGCACGACTTCGAGTC(5'端标记有 biotin)。最后克隆测序前的扩增所用引物为 Primer1': 5'-CAGCTCAGAAGCTTGATCCTGTG, Primer2': 5'-TGCAGATGCACGACTTCGAGTC。

PCR 反应条件为: TaKaRa Ex Taq(5 mol/μL), 0.25 μL; 10×Ex Taq Buffer(Mg²⁺ Plus), 5 μL; dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L), 4 μL; 文库 DNA, 5 μL; 引物 1(10 μmol/L), 1 μL; 引物 2(10 μmol/L), 1 μL; 添加适量灭菌蒸馏水达到总反应体积 50 μL。

PCR 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 62.6 °C 30 s, 72 °C 1 min, 扩增圈数根据实验情况设定。

2.3.4 PCR 扩增产物凝胶电泳鉴定

扩增后的文库用 4%的琼脂糖凝胶电泳进行扩增特异性鉴定。判定标准: 条带对应的 PCR 产物的长度符合预定文库长度(75 bp), 且条带清晰。凝胶制备及电泳条件: 1×TBE buffer 配成的 4%凝胶于微波炉中加热 3 min, 冷却到 60 °C 左右加溴化乙锭(EB)(添加标准按照 5 μL/100 mL); 电泳电压 120 V, 电泳时间 40~50 min; 上样体积 10 μL(6×载样液 2 μL+PCR 扩增样品 10 μL)。

2.3.5 扩增文库的回收与纯化

取 200 μL 亲和素标记的磁珠平均分 2 份分别加

入到 2 个离心管中磁分离去掉分散液,再用 1×PBS 洗涤 3 次,600 μL PBS/次。然后将每轮筛选、扩增后的 DNA 文库平均分成 2 份,分别加入上述离心管中,于恒温金属浴上室温震荡孵育 15 min。随后,磁分离去除上清液,再用 1×PBS 洗涤 3 次,600 μL PBS/次。往上述洗涤过的离心管中添加 0.2 mol/L NaOH 500 μL ,震荡反应 3~5 min,磁分离收集上清液。随后加入 500 μL 0.2 mol/L HCl 中和溶液中的 NaOH。最后对所得文库进行乙醇沉淀,冻干纯化。

2.3.6 荧光强度的测定

文库结合力测试:取一定量的 OTA 修饰的磁珠与每轮所得文库于室温下进行孵育,磁分离去除上清液;然后将此离心管置于恒温金属浴上 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 5 min,磁分离收集上清液进行荧光强度测定, Cy3 荧光染料的最佳激发光波长为 540 nm, 最佳发射波长为 560 nm, 窗口扫描宽度为 550~650 nm, 激发和发射狭缝宽度为 5 nm。

Kd 值计算:取含有 200 nmol/L OTA 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 新筛选 aptamer 的结合缓冲溶液 400 μL 于微平衡透析的红色孔中,然后添加等体积的结合缓冲液到白色孔中,震荡孵育一定时间,然后分别测定 2 个孔中溶液的荧光强度。OTA 在 310 nm 紫外光照射下能发出波长为 422 nm 的荧光。窗口扫描宽度为 400~550 nm, 激发和发射狭缝宽度为 5 nm。

3 结果与分析

3.1 筛选过程简介

OTA 分子结构如图 1 所示。从结构式上可以看出, OTA 分子上有一个可以利用的羧基活性基团,从而方便对 OTA 进行固定化修饰。据此针对 OTA 的核酸适配体筛选拟采用固定化靶标筛选策略,如图 2 所示。整个筛选策略大致概括为以下几个步骤: a)靶分子的固定:利用 EDC、Sulf-NHS 将 OTA 固定到氨基磁珠上; b)筛选:文库的预处理、负筛、反筛、正筛,排除非特异性结合核酸序列; c)PCR 扩增:将分离出的只与靶分子结合的适配体进行 PCR 扩增,形成一次富集文库; d)扩增文库的回收:扩增文库的固定、变性、脱盐和冻干; e)重复 b、c、d 步骤:逐步提高筛选条件,如通过缩短孵育时间、增加洗涤次数、延长洗涤时间等方式调整筛选压力,直到筛选到特异性和亲和力符合要求的适配体; f)对所获得的适配体进行

测序,对亲和力和特异性进行鉴定,对核酸适配体的空间结构及可能的靶分子结合位点进行分析。

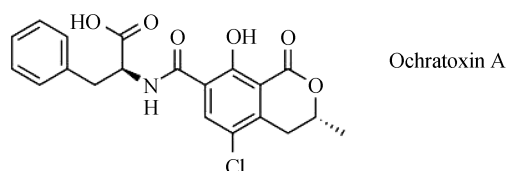


图 1 OTA 分子结构式

Fig. 1 Molecular structural formula of OTA

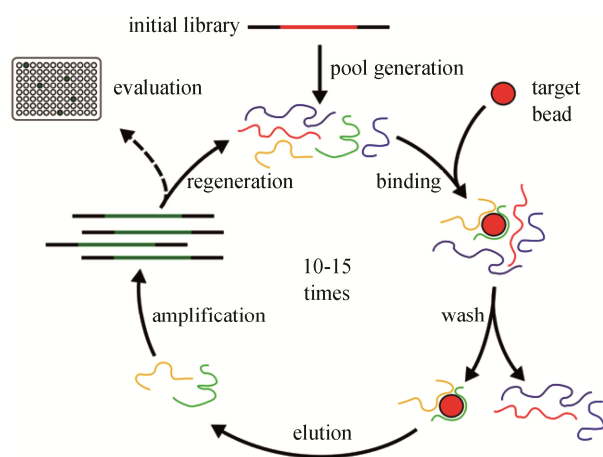


图 2 固定化靶标筛选策略

Fig. 2 Screening strategy of immobilized target

3.2 靶标固定效果的表征

为了实现孵育后结合和没结合的 DNA 的分离,特意将 OTA 分子固定在磁珠上,以便于实现上述目的。因 OTA 分子上有可以利用的羧基活性基团,实验采用氨基修饰的磁珠,利用 EDC 和 Sulf-NHS 作为活化剂将二者通过酰胺键共价相连,实现 OTA 分子的磁珠表面固定化修饰。OTA 在紫外线照射下呈绿色荧光。为了验证 OTA 是否修饰到磁珠上,采用荧光成像实验加以验证,结果如图 3 所示。OTA 修饰前,磁珠仅仅显示很弱的本底荧光。而在 OTA 修饰后,因磁珠表面结合有大量的 OTA,因此,在紫外光照射的情况下,OTA 发出很强的荧光。由此可见,磁珠上 OTA 的修饰是成功的。

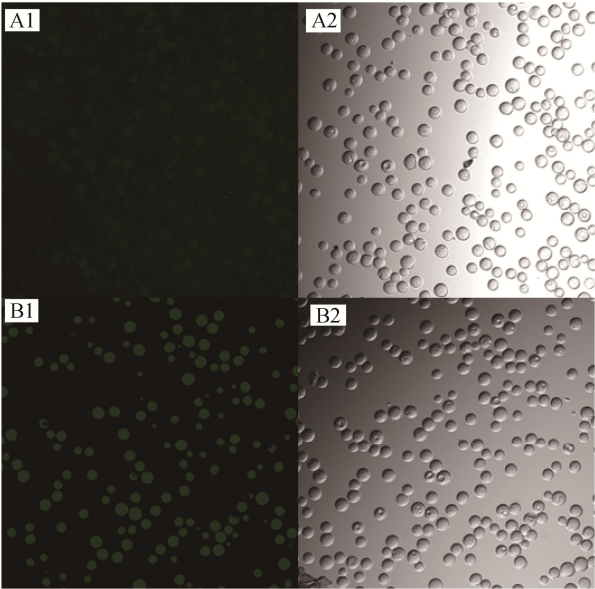


图 3 OTA 修饰前和修饰后的磁珠共聚焦荧光成像图
Fig. 3 Fluorescence confocal image of magnetic beads before and after OTA modification
其中 A 修饰前, B 为修饰后; 1 为荧光场图, 2 为明场图。

3.3 筛选方案介绍

为了获得特异性的核酸适配体, 需要采取适当的措施以消除非特异性 DNA 文库的干扰。非特异性干扰一方面主要来自于磁珠基底的非特异性吸附所带来的 DNA; 另一方面来自于仅仅识别部分 OTA 分子结构的 DNA, 这部分 DNA 识别的不是 OTA 分子

本身, 而是分子结构上的个别基团或者某个部位。为此, 采用没有修饰 OTA 的磁珠作靶标进行负筛选来消除磁珠基底引起的非特异性干扰。同时, 引入与 OTA 结构相似性化合物氮乙酰基苯丙氨酸和华尔法令 (结构式见图 4) 进行反筛选, 来排除仅仅识别 OTA 分子部分结构的 DNA。之所以选择这两种分子做靶标进行反筛选, 是因为氮乙酰基苯丙氨酸分子结构本身是 OTA 分子结构的一部分, 而结构相似性分子华尔法令和 OTA 在人血清白蛋白上具有相同的结合位点。

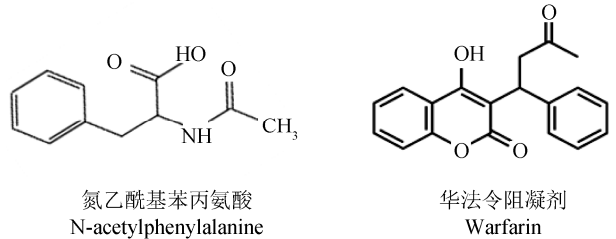


图 4 氮乙酰基苯丙氨酸和华尔法令结构式
Fig. 4 Structural formula of N-acetylphenylalanine and warfarin

整个筛选方案概述见表 1。刚开始 3 轮的筛选没有采取负筛选和反筛选, 在第 4 轮以后的筛选中都引入负筛选和反筛选, 以便排除磁珠基底和仅仅识别部分 OTA 分子结构的 DNA 引起的非特异性。文库与靶标的孵育时间由原来的 30 min 逐渐减少到 5 min, 以及孵育后的洗涤次数不断增加, 这也是为消除因作用力较弱的 DNA 引起的非特异性筛选。

表 1 筛选方案概述
Table 1 Overview of screening program

圈数	负筛选	孵育时间 (min)	竞争分子*	洗脱时间 (min)
1	no	30	no	3
2	no	30	no	3
3	no	30	no	3
4	yes	30	yes	3
5	no	30	yes	3
6	no	20	yes	3
7	yes	20	yes	4
8	no	20	yes	4
9	no	20	yes	4
10	yes	20	yes	5
11	no	10	yes	5
12	no	10	yes	5
13	yes	10	yes	6
14	yes	5	yes	6
15	yes	5	yes	6

注: *自由竞争分子为氮乙酰基苯丙氨酸和华尔法令。

3.4 筛选条件的优化及筛选过程的监控

因核酸文库在不适宜的 PCR 扩增条件下会产生少量的非特异性扩增产物, 所以需要通过凝胶电泳实验对所得的 PCR 扩增文库进行扩增特异性鉴定, 以便选择最佳 PCR 扩增条件从而消除非特异性扩增结果的出现。首先对扩增引物退火温度进行优化, 实验结果如图 5 所示。退火温度高, 非特异性扩增产物的量相对就会减少, 但是特异性的扩增产物的量也会减少, 综合考虑扩增效率和非特异性扩增的影响, 选择最佳扩增退火温度为 62.6 °C。同时, 对筛选文库扩增圈数进行优化, 结果如图 6 所示。扩增圈数越多, 特异性扩增产物的量也就越多, 然而非特异性扩增产物也会随着扩增圈数的增加随之出现, 所以, 综合考虑扩增效率和非特异性扩增的影响, 选择最佳扩增圈数为 20 圈, 既保证了下轮筛选所需的文库的量, 同时又减少了非特异性扩增产物的产生。

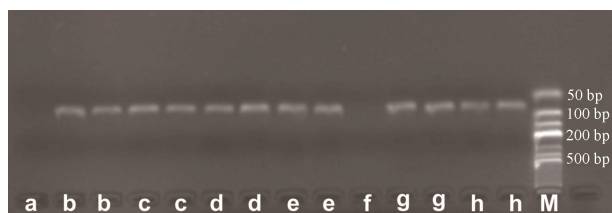


图 5 扩增引物退火温度优化。

Fig. 5 Annealing temperature optimization of amplification primer

a: 57.5 °C 引物对照; b: 57.5 °C 扩增产物; c: 58.5 °C 扩增产物; d: 59.8 °C 扩增产物; e: 61.4 °C 扩增产物; f: 62.6 °C 引物对照; g: 62.6 °C 扩增产物; h: 63.5 °C 扩增产物; M: DM500 DNA 分子量标尺。

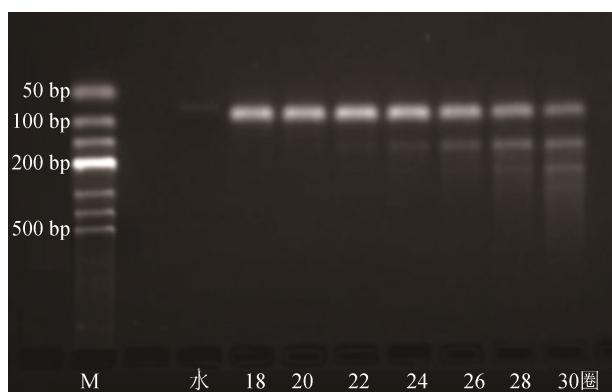


图 6 筛选文库扩增圈数的优化

Fig. 6 Amplification circle optimization of screening library
水: 扩增 30 圈的引物对照; M: DM500 DNA 分子量标尺。

在确定以上最佳实验条件的前提下, 进行多轮次的筛选→分离→PCR→ssDNA 制备等过程, 即可获得目的核酸适配体。通常筛选一个高亲和力、高特异性的核酸适配体需要进行 5~15 轮的筛选, 筛选轮次是不确定的, 要根据配基的富集情况、实验者的目的而定, 筛选时的条件、筛选的严谨度也会影响最终获得高亲和力、高特异性的核酸适配体的筛选轮数。为了确定终止筛选轮数, 在筛选的同时, 设立平行的结合力检测试验, 每 3 轮测试 1 次, 以便监控筛选过程中文库的亲和力情况。随着筛选轮次的增加, 文库的结合力逐渐增加, 即亲和力逐渐增强, 当亲和力提高不再明显增强的时候, 即可停止筛选, 从而确定最终的筛选轮数。每筛选 3 轮将新纯化的文库用筛选缓冲液溶解, 然后与 OTA 修饰的磁珠一起孵育, 随后对磁珠进行洗涤, 最后将磁珠上结合的文库解离下来去测荧光, 因文库的 5'端带有 Cy3 荧光染料。如果文库的结合力比较强, 那么结合到磁珠上 OTA 的文库的量就比较多, 自然从磁珠上解离下来的文库的量也比较多, 所以进行荧光测定时获得的荧光强度较强。文库亲和力检测结果如图 7 所示。由图 7 可知, 随着筛选轮次的增加, 文库的荧光强度逐渐增强, 即文库的结合力逐渐增加。第 12 轮文库的荧光强度与第 15 轮的比, 荧光强度增加不那么明显, 即亲和力增加不如前面几圈明显, 由此可见, 至此即可停止筛选, 故此我们一共进行了 15 圈筛选。

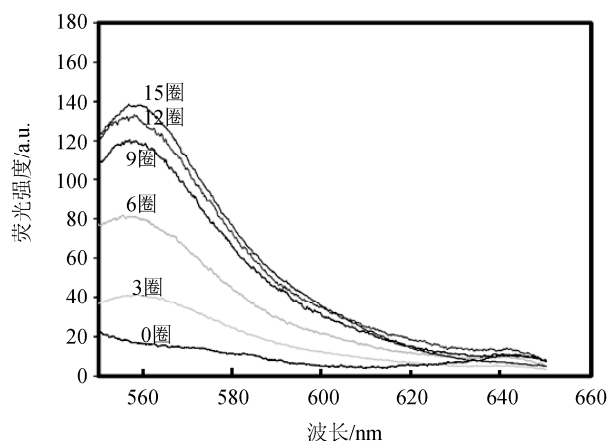


图 7 筛选文库亲和力考察

Fig. 7 Affinity characterization of screening libraries

3.5 亲和力的测定及特异性考察

将第 15 轮的筛选产物送去克隆测序并进行亲和力测试。表 2 是具有亲和力的核酸适配体的序列及相应的微平衡透析亲和力测试结果。 K_d (解离常数)值的计算参考如下公式(1)和(2):

$$f = \frac{F_1 - F_r}{F_1} \tag{1}$$

$$K_d = \frac{[A_0]}{f} - [A_0] \tag{2}$$

其中, f 为 OTA 的结合百分比, F_1 为红色孔的荧光强度(初始 OTA 的荧光强度), F_r 为白色空的荧光强度(平衡条件下游离 OTA 的荧光强度), $[A_0]$ 为核酸适配体的初始浓度。在计算 K_d 值的时候, 基于以下假设: 在进行微平衡透析实验时, 选择核酸适配体的初始浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, OTA 的初始浓度为 200 nmol/L , 结合前后适配体的浓度变化不大。

为了进一步考察所得核酸适配体的特异性, 我们选择 K_d 值最小(结合力最强)的 No.6 核酸适配体, 在 OTB、氮乙酰基苯丙氨酸、华法令存在的情况下, 考察其对 OTA 的识别能力, 结果如图 8 所示。结果表明, 荧光基团标记的 No.6 核酸适配体在与 OTA 修饰的磁珠孵育后, 用分别含有 OTB、氮乙酰基苯丙氨

酸、华法令的缓冲液洗涤, 已经与 OTA 结合的适配体并不会与这些竞争性分子作用而解离下来, 由此证明该核酸适配体的特异性非常高。特别是用含有 OTB 的洗脱液洗涤后, 荧光强度减弱大约 5 个单位, 由此可见, No.6 核酸适配体与 OTA 的结合力强于 OTB 超过 100 倍。

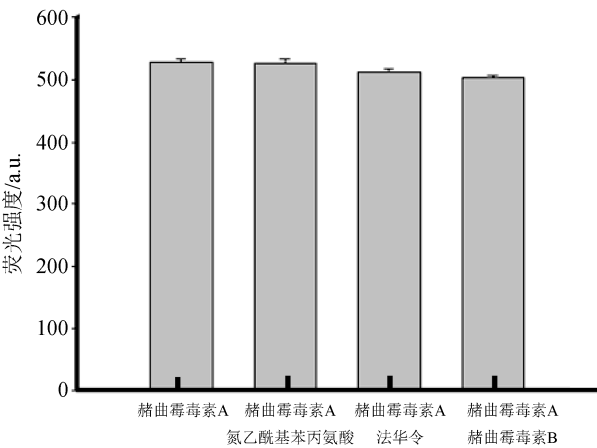


图 8 No. 6 核酸适配体识别特异性分析

Fig. 8 Specificity analysis of No.6 aptamer

表 2 适配体序列及 K_d 值
Table 2 Aptamer sequence and K_d

序号	序列 ^a	$K_d(\mu\text{mol/L})^b$
1	GTTTCTGGGGCTTTGGGCTGCTGTGGTTTA	10.2
2	CGGCTTCGGTCGTTAGCCGCTGTTTGTTAA	0.32
3	TGGCTTCCTGGTATTGTGGGCTGGGGGAGT	14.3
4	TTGTGGGTGTGGGTTGATCTTTCTCTTCT	1.2
5	TTGGTTTTCCTTGTGGTTGGTGTCTGTGTG	1.5
6	CCGAGGTGGTCAGTGGTCCTTTGATTGTTG	0.21
7	TTCCGTTGTTTTTGTGTGTTCGAGTTTG	2.9
8	CTCTCGTTGTGCGTTTTTTACCTGTTTTTG	0.57
9	GTGGTGTCTTCTTTTGTTCGTTTGCTACG	2.3
10	CCCGTCGGTTCGTCAGTTTTTTTGCTTTTC	3.2

注: a: 两端引物序列省略; b: K_d 值测定依据微平衡透析实验, 取 2 次平行实验结果的平均值。核酸适配体的初始浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, OTA 的初始浓度为 200 nmol/L 。

4 结 论

本文通过体外 SELEX 筛选获得了赭曲霉毒素 A 的特异性核酸适配体, 该适配体具有纳摩尔级解离常数, 并且选择性很好, 不与赭曲霉毒素 A 结构相似性化合物如 N-乙酰苯丙氨酸或华法令结合。该适配体与赭曲霉毒素 B 的结合力是其与赭曲霉毒素 A 结合力的百分之一。由此可见, 可以考虑在农产品质量安全领域利用该核酸适配体替代传统抗体开发并用于真菌毒素快速检测的生物传感器; 或者研制制备固相亲和柱并与其他已有的高精度仪器如液质、气质联用仪等相结合, 开展真菌毒素的高精准确证检测。

参考文献

- [1] Stepień M, Sokol-Leszczyńska B, Luczak M. Mycotoxins, food products and human health [J]. *Postępy Mikrobiol*, 2007, 46: 167–177.
- [2] Köppen R, Koch M, Siegel D, *et al.* Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86: 1595–1612.
- [3] Tuerk C, Gold L. Systemic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249: 505–510.
- [4] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. *Nature*, 1990, 346: 818–822.
- [5] Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics [J]. *Ann Rev Med*, 2005, 56: 555–583.
- [6] Jhaveri S, Ellington A. Current protocols in nucleic acid chemistry [M]. United Kingdom: Wiley Online Library, 2002.
- [7] Cruz-Aguado JA, Penner G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 10456–10461.
- [8] McKeague M, Bradley CR, De Girolamo A, *et al.* Screening and initial binding assessment of fumonisin B₁ aptamers [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11: 4864–4881.
- [9] Bardocz V, Meszaros T. Aptamer selection for macromolecular (Protein) and for small molecule targets, in *Proceedings of the Periodica Polytechnica Abstracts of PhD Conference* [C]. 2006.
- [10] Balogh Z, Lautner G, Bardocz V, *et al.* Selection and versatile application of virus-specific aptamers [J]. *FASEB*, 2010, 24: 4187–4195.
- [11] Sefah K, Shangguan D, Xiong X, *et al.* Development of DNA aptamers using Cell-SELEX [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5: 1169–1185.
- [12] Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics [J]. *Clin Chem*, 1999, 45: 1628–1650.
- [13] Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 537–550.
- [14] Beaucage SL, Iyer RP. The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives [J]. *Tetrahedron*, 1993, 49: 1925–1963.
- [15] Nutiu R, Li Y. Structure-switching signaling aptamers [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 4771–4778.
- [16] Stojanovic MN, Kolpashchikov D. Modular aptameric sensors [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 9266–9270.
- [17] Maureen MK, Maria CD. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development [J]. *J Nucl Acid*, 2012, 2012: 748913–748932.
- [18] White RJ, Rowe AA, Plaxco KW, *et al.* Re-engineering aptamers to support reagentless, self-reporting electrochemical sensors [J]. *Analyst*, 2010, 135(3): 589–594.
- [19] Carothers JM, Goler JA, Kapoor Y, *et al.* Selecting RNA aptamers for synthetic biology: investigating magnesium dependence and predicting binding affinity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(8): 2736–2747.
- [20] Jenison RD, Gill SC, Pardi A, *et al.* High-resolution molecular discrimination by RNA [J]. *Science*, 1994, 263(5152): 1425–1429.
- [21] M Jo, Ahn J Y, Lee J, *et al.* Development of singlestranded DNA aptamers for specific bisphenol A detection [J]. *Oligonucleotides*, 2011, 21(2): 85–91.
- [22] Niazi JH, Lee SJ, Kim YS, *et al.* Development of Single-Stranded DNA Aptamers for Specific Bisphenol A Detection [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 1254–1261.
- [23] Gold L, Ayers D, Bertino J, *et al.* Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): 15004.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



刘继红, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术研究及农产品质量安全风险评估。

E-mail: ljha3100@163.com



王红旗, 副研究员, 理学博士, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术研究。

E-mail: huda2000@126.com