文章编号: 1007 - 4252(2020)04 - 0004 - 300

基于核酸适配体免标记荧光法检测卡那霉素的研究

王如如[1],马山[2],刘学瑞[1],刘宇[1],徐慧[1,*],张升晓[1]
(1. 鲁东大学化学与材料科学学院,烟台,山东, 264025; 2. 临朐县海岳中学,潍坊,山东,262619)

摘要: 基于卡那霉素核酸适配体(Apt-DNA)和 SYBR Green I(SG)建立了一种免标记荧光检测卡那霉素的方法。Apt-DNA 与其部分互补的寡核苷酸链(Pri-DNA)通过碱基配对形成双链 DNA(dsDNA)。游离态的 SG 发出微弱的荧光,嵌入 dsDNA 后 SG 的荧光大幅度增强。溶液中存在卡那霉素时,Apt-DNA 与卡那霉素特异性结合,dsDNA 浓度减少,荧光强度也随之下降。通过对比卡那霉素存在前后的荧光强度的变化,实现了卡那霉素的免标记检测。该方法具有设计原理简单,操作便捷,灵敏度高,成本较低等优点,并且成功应用于实际样品中卡那霉素的检测。

关键词: 卡那霉素; SYBR Green I; 免标记; 荧光检测
中图分类号: Q503 **文献标志码:** A

Label-free kanamycin detection based on nucleic acid aptamers

WANG Ru ru[1], MA Shan[2], LIU Xue rui[1], LIU Yu[1], XU Hui[1,*], ZHANG Sheng xiao[1]
(1. Ludong University, Chemistry and Material Science College, Yantai 264025, China;
2. The HaiYue Middle School, Weifang 262619, China)

Abstract: A fluorescent and label-free assay for the detection of kanamycin was developed based on kanamycin aptamer (Apt-DNA) and SYBR Green I (SG). Apt-DNA combines with complementary oligonucleotide chain (Pri-DNA) to form double stranded DNA (dsDNA). Although the free-state SG emits a weak fluorescence, the fluorescence intensity is significantly enhanced after attaching to dsDNA. When kanamycin was added into the solution, Apt-DNA specifically bind with kanamycin and the concentration of dsDNA is dramatically reduced, which obviously decrease the fluorescence intensity. By comparing the fluorescence intensity before and after adding kanamycin, the label-free detection of kanamycin is realized. Some advantages of this method are presented, such as simple principle, convenient operation, high sensitivity and low cost. What' more, the proposed method could be used to measure kanamycin in real samples.

Key words: Kanamycin; SYBR Green I; Label-free; Fluorescence Detection

收稿日期: 2020-05-21; **修订日期:** 2020-06-23
基金项目: 山东省重点研发计划项目(2019GSF111047)资助.
作者简介: 徐慧(1976-),女,博士,教授,主要研究方向为纳米生物传感器(E-mail: xuhui235@163.com).

0　引言

卡那霉素是从卡那霉素链霉菌中纯化的氨基糖苷类抗生素，广泛用于革兰氏细菌感染病[1]，支气管病，重症化的脓性感染和肺部感染等疾病的治疗[2]。值得注意的是，高剂量卡那霉素会导致耳毒性、肾毒性等药物过敏反应[3]。此外，卡那霉素在农作物方面也发挥着至关重要的作用。例如，通过卡那霉素处理棉花叶片等可实现对转基因抗虫棉的检测[4]。因此，建立灵敏、快速、低成本检测卡那霉素的方法对人体健康和农业发展均具有重要实际意义。

目前，卡那霉素的分析方法主要包括毛细管电泳法[5,6]，高效液相色谱法(HPLC)[7,8]，酶联免疫吸附试验法(ELISA)[9]，表面等离子共振法(SPR)[10,11]和电化学免疫传感器等方法[12]。然而，以上方法存在仪器设备昂贵，实验操作繁琐，样品用量大，技术要求高等缺点。而基于核酸适配体发展的分析方法可以满足简单快速，高灵敏度，高特异性的检测要求，这引起了研究者们的高度注意。

本实验提出了一种基于核酸适配体无标记荧光法检测卡那霉素的方法。卡那霉素核酸适配体(Apt-DNA)通过碱基互补配对与其部分互补的寡核苷酸链(Pri-DNA)形成双链DNA(dsDNA)，并加入荧光染料SYBR Green I(SG)。SG是一种结合于所有dsDNA双螺旋小沟区域的染料[13]，游离状态下的SG发出微弱的荧光，但当其嵌入dsDNA后，荧光强度大幅度增加[14]。溶液中不存在卡那霉素时，SG嵌入Apt-DNA与Pri-DNA形成的dsDNA中，产生强烈荧光。当溶液中存在卡那霉素时，卡那霉素与Apt-DNA高特异性结合，释放出互补单链DNA。dsDNA浓度减少，导致SG的荧光强度随之减弱。通过检测荧光强度的变化实现了卡那霉素的快速灵敏检测。

1　实验部分

1.1　实验试剂以及实验仪器

1.1.1 实验试剂

SG(10000 ×，浓度为19.6 mM[15])购于Invitrogen生命技术公司；3-(羟甲基)-氨基甲烷(Tris)购于Aladdin化学试剂有限公司；Apt-DNA(5'-AGATGGGGGTTGAGGCTAAGCCGAATCTCC-3')和Pri-DNA(5'-AGAGTCATGGAGATTCGGCTTAGC-3')均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。实验中其他未提及的抗生素和试剂均为分析纯。

1.1.2 主要实验仪器

荧光分光光度计(Perkins Elmer，LS-55)的参数设置如下：激发波长设置为495 nm，激发和发射狭缝宽度分别为8 nm和10 nm，扫描速度为500 nm/min。

1.2　卡那霉素的检测

在480 μL Tris-HCl(10 mM，pH = 7.4，0.2 M NaCl)中加入5 μL 50 μM的Apt-DNA和5 μL 50 μM的Pri-DNA，混合均匀后在37 ℃条件下孵育10 min。向上述溶液中分别加入5 μL终浓度为0 nM、100 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM的卡那霉素，混合均匀后在27 ℃条件下孵浴20 min，最后加入5 μL 50 μM的SG，混合均匀，在室温下反应3 min后测定其荧光光谱。此外，在选择性实验中，以终浓度500 nM的其他抗生素替代卡那霉素，其他实验条件均不改变，并平行测定三次。

1.3　实际样品中卡那霉素的检测

以实验室中的自来水(烟台，中国)和超市购买的脉动饮料(烟台，中国)作为实际样品，通过加标回收法探究了该传感器在实际应用中的性能。实验中自来水和脉动饮料的含量均为百分之一，其他实验条件均保持不变，并平行测定三次。

2　实验结果分析与讨论

2.1　实验原理

卡那霉素检测的原理如图1所示，Apt-DNA和Pri-DNA通过碱基互补配对形成dsDNA。当溶液不存在卡那霉素时，SG嵌入dsDNA可以产生强烈荧光(曲线b，图2)。当溶液中存在卡那霉素时，卡那霉素与Apt-DNA高度特异性结合，Pri-DNA从dsDNA中释放出来，溶液中dsDNA浓度减少，体系荧光强度明显减弱(曲线a，图2)。因此，根据加入卡那霉素前后体系荧光强度的变化可以实现卡那霉素的定性/定量检测。

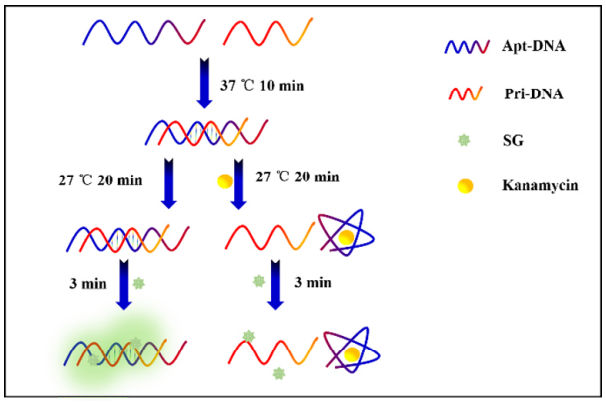

图 1　卡那霉素检测原理图

Fig. 1 Schematic of kanamycin detection

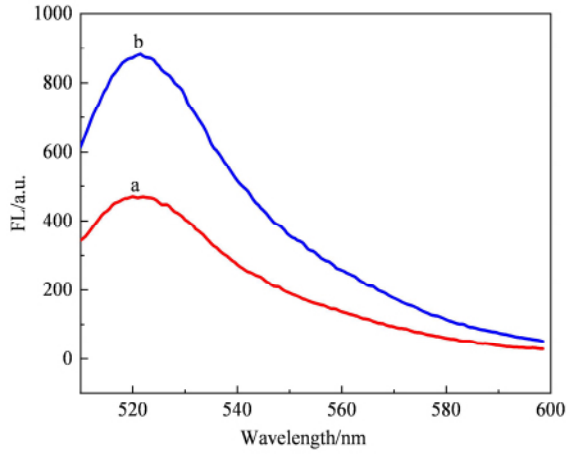

图 2　存在(a)或不存在(b)卡那霉素时溶液的荧光光谱图。Apt-DNA,Pri-DNA,卡那霉素和 SG 的终浓度分别为 50 nM,50 nM,500 nM 和 500 nM。

Fig. 2 Fluorescence spectra of the solution with (a) or without (b) kanamycin. The final concentration of Apt-DNA, Pri-DNA, kanamycin and SG were 50 nM, 50 nM, 500 nM and 500 nM, respectively.

2.2　SG 浓度的优化

SG 嵌入 dsDNA 后才能产生明显的荧光强度。利用存在和不存在卡那霉素时体系荧光强度的差值(ΔF)探究了 SG 最适宜的用量。如图 3 所示,随着 SG 浓度的增加,ΔF 明显呈现先增加后减小的趋势,当 SG 浓度为 500 nM 时,ΔF 为最大值。以上结果说明,过少的 SG 不能完全嵌入 dsDNA,使得体系荧光强度过低。而过量的 SG 增强了体系的背景荧光,从而导致 ΔF 过小。因此 500 nM 为 SG 最佳的浓度。

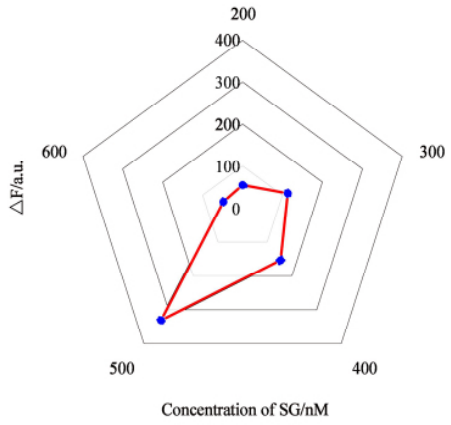

图 3　不同浓度的 SG(200-600 nM)对 ΔF 的影响。Apt-DNA,Pri-DNA,卡那霉素和 SG 的终浓度分别为 50 nM,50 nM,500 nM 和 500 nM。

Fig. 3 Effects of SG concentrations (200-600 nM) on ΔF. The final concentration of Apt-DNA, Pri-DNA, kanamycin and SG were 50 nM, 50 nM, 500 nM and 500 nM, respectively.

2.3　反应温度的优化

众所周知,温度作为影响化学反应的主要影响因素之一,对反应的速度起着至关重要的作用。如图 4 所示,温度从 17 ℃升至 57 ℃,ΔF 出现了明显的变化,并且在 27 ℃时,达到最大值。低温使得反应进行十分缓慢,而高温则会破坏 dsDNA 的结构,二者均对反应不利。结果表明,27 ℃即为反应适宜的温度。

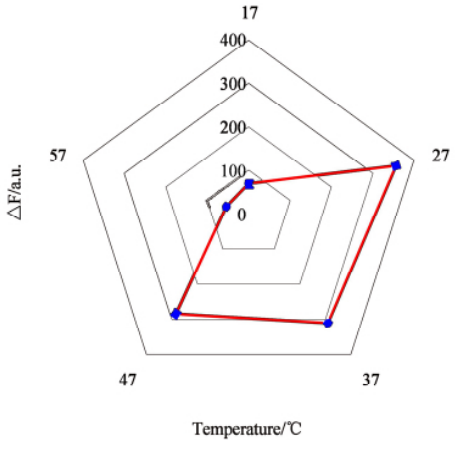

图 4　不同的反应温度(17-57℃)对 ΔF 的影响,Apt-DNA,Pri-DNA,卡那霉素和 SG 的终浓度分别为 50 nM,50 nM,500 nM 和 500 nM。

Fig. 4 Effects of different temperature (17-57℃) on ΔF. The final concentration of Apt-DNA, Pri-DNA, kanamycin and SG were 50 nM, 50 nM, 500 nM and 500 nM, respectively.

2.4　反应时间的优化

通常情况下，反应都需要一定的时间，时间决定着体系中反应进行的程度。如图 5 所示，ΔF 随反应时间的增长也呈现先增加后减小的趋势，在 20 min 时达到最大值。过短的反应时间不足以使得卡那霉素充分结合 Apt-DNA，使得体系荧光依旧保持较高的强度。反应时间过长，会产生其它不利的因素。综合考虑，20 min 即为最优的反应时间。

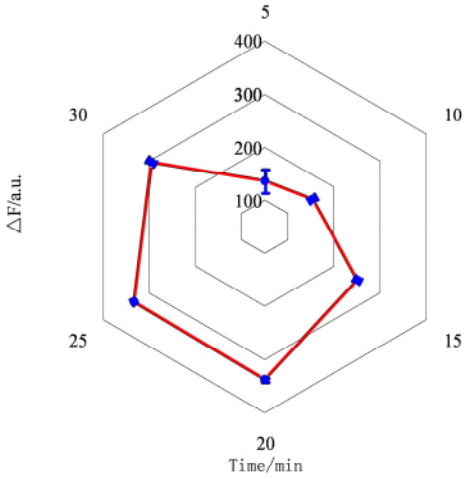

图 5　不同的反应时间对 ΔF 的影响。Apt-DNA，Pri-DNA，卡那霉素和 SG 的终浓度分别为 50 nM，50 nM，500 nM 和 500 nM。

Fig. 5 Effects of different reaction time on ΔF. The final concentration of Apt-DNA, Pri-DNA, kanamycin and SG were 50 nM, 50 nM, 500 nM and 500 nM, respectively.

2.5　卡那霉素的检测

在最适宜的实验条件下，探究了体系荧光强度和卡那霉素浓度之间的关系。如图 6 所示，随着卡那霉素浓度的增加，体系的荧光强度逐渐降低。这是由于卡那霉素与 Apt-DNA 逐渐结合，减少了体系中 dsDNA 的浓度，使得 SG 呈游离状态或与单链 DNA 结合。如图 7 所示，以 521 nm 处荧光强度为依据，卡那霉素在 0-500 nM 的浓度范围内与荧光强度呈现较好的线性关系，线性方程可以表示为 FL (a.u.) = -0.8574C+ 882.5484，R^2 = 0.9962，方程中 FL 表示体系的荧光强度，C 表示卡那霉素的终浓度。根据 S/N=3，计算出检出限为 4.2 nM。

2.6　方法的选择性

高度的特异性是评价传感器性能的条件之一。

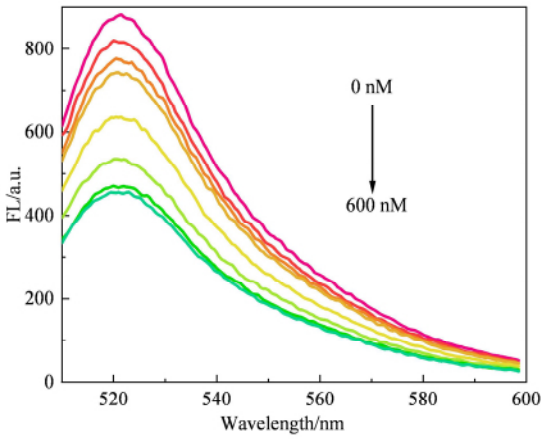

图 6　加入不同浓度的卡那霉素(0-600 nM)后溶液的荧光光谱。Apt-DNA，Pri-DNA 和 SG 的终浓度分别为 50 nM，50 nM 和 500 nM。

Fig. 6 The fluorescence spectra of the soultions after adding different concentrations (0-600 nM) of kanamycin. The final concentration of Apt-DNA, Pri-DNA and SG were 50 nM, 50 nM and 500 nM, respectively.

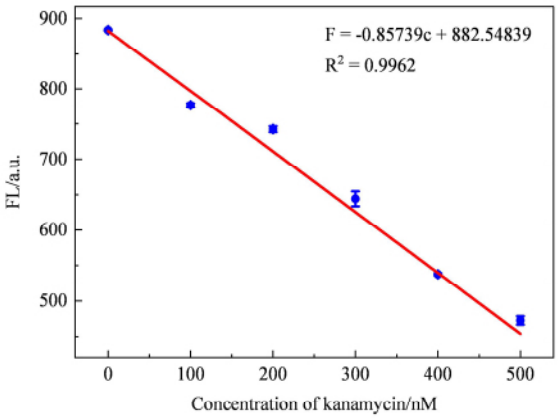

图 7　卡那霉素浓度(0-500 nM)与荧光强度的线性关系图。Apt-DNA，Pri-DNA 和 SG 的终浓度分别为 50 nM，50 nM 和 500 nM。

Fig. 7 Linear relationship between kanamycin concentrations (0-500 nM) and fluorescence intensity. The final concentration of Apt-DNA, Pri-DNA and SG were 50 nM, 50 nM and 500 nM, respectively.

在相同实验条件下，分别加入 500 nM 的卡那霉素，链霉素，土霉素，氯霉素，环丙沙星，四环素。结果表明，卡那霉素明显降低了体系荧光强度，而其他抗生素的加入对体系的荧光强度几乎没有影响，结果表明 Apt-DNA 对卡那霉素具有高度的特异性，所提出

的卡那霉素检测方法具有良好的选择性。

2.7 实际样品检测

为了探究所提出的传感器的实用性能，选取了实验室中的自来水(烟台，中国)和超市中购买的脉动饮料(烟台，中国)作为实际样品进行了进一步的分析。加标回收试验结果如表 1 所示，卡那霉素的回收率在 92.95 - 107.68 % 之间，相对标准偏差(RSD，n=3)小于 4.00%。在实际样品的加标回收实验中该方法取得了令人满意的结果，表明该传感器具有较为广泛的应用前景。

表 1 实际样品检测

Table1 Actual sample detection

Sample	Add/nM	Found/nM	Recovery/%	RSD/%
Tap water	100	107.68	107.68	2.00
	300	313.16	104.39	0.21
	500	520.85	104.17	0.65
Beverage	100	97.61	97.61	4.00
	300	278.85	92.95	0.38
	500	465.20	93.04	0.76

3 结论

本实验基于 Apt-DNA 和 SG 设计了一种无标记荧光检测卡那霉素的方法。该方法优点众多：首先，设计原理十分简单，成本较低。其次，无需复杂操作，通过简单的“混合-反应-检测”过程即可实现。再次，该方法具有较高的灵敏度和较低的检出限，在最佳实验条件下，实现了 0-500 nM 的线性范围以及低至 4.2 nM 的检出限。最后，该传感器特异性高，可以抵抗其他抗生素的干扰，并且在实际样品检测中也达到了理想的效果。

参考文献：

[1] Qu Xiaonan, Wang Jingfeng, Zhang Rufeng, et al. Highly efficient fluorescence sensing of kanamycin using Endo IV-powered DNA walker and hybridization chain reaction Amplification [J]. Microchimica Acta, 2020, 187: 193.

[2] Mohammad R, Noor M D, Parirokh L, et al. A selective and sensitive fluorescent aptasensor for detection of kanamycin based on catalytic recycling activity of exonuclease III and gold nanoparticles [J]. Sensors and Actuators B, 2016, 222: 1 - 7.

[3] Ou Ying, Jin Xin, Liu Jing, et al. Visual detection of kanamycin with DNA - functionalized gold nanoparticles probe in aptamer-based strip biosensor [J]. Analytical Biochemistry, 2019, 587: 113432.

[4] 冯振秀，朱波，曹阳. 医用卡那霉素在转基因抗虫棉鉴定中的应用 [J]. 现代农业科技，2013，20: 451-459.

[5] Eliangiringa K, Ann V S, Eugène R, et al. Determination of kanamycin by electrophoretically mediated microanalysis with in-capillary derivatization and UV detection [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 1119-1125.

[6] Mohamed N. E A, Erwin A, Jos H, et al. Capacitively coupled contactless conductivity detection as an alternative detection mode in CE for the analysis of kanamycin sulphate and its related substances [J]. Journal of Separation Science, 2011, 34: 2448-2454.

[7] Sun Yan, Li Deguang, He Shun, et al. Determination and dynamics of kanamycin A residue in soil by HPLC with SPE and precolumn derivatization [J]. International journal of environmental analytical chemistry, 2013, 93(1-5): 472-481.

[8] Blanchaert B, Jorge E P, Jankovics P, et al. Assay of kanamycin A by HPLC with direct UV detection [J]. Chromatographia, 2017, 76: 1505-1512.

[9] Chen Yiqiang, Wang Zhiqin, Wang Zhanhui, et al. Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Colloidal Gold Immunoassay for Kanamycin and Tobramycin in Swine Tissues [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56(9): 2944-52.

[10] Sabina R R, Maria G E G B, Willem H, et al. Label-Free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance - based immunosensor [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81: 7743-7749.

[11] Marco F, Ran T-V, Michael R, et al. Surface plasmon resonance analysis of antibiotics using imprinted boronic acid-functionalized Au nanoparticle composites [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82: 2512-2519.

[12] Wei Qin, ZhaoYanfang, Du Bin, et al. Ultrasensitive detection of kanamycin in animal derived foods by label-free electrochemical immunosensor [J]. Food Chemistry, 2015, 134: 1601-1606.

[13] Vladimir N M, Maria A K, Olga V D, et al. Fluorescence superquenching of SYBR Green I in crowded DNA by

gold nanoparticles [J]. Journal of Luminescence, 2020, 219: 116898.

[14] Dragan A I, Pavlovic R, McGivney J B, et al. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA [J]. Journal of Fluorescence, 2012, 22(4): 1189-1199.

[15] Zipper H. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32: e103.