



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104360077 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201410685546. 5

(22) 申请日 2014. 11. 25

(71) 申请人 重庆市科学技术研究院

地址 401123 重庆市渝北区北部新区黄山大道中段杨柳路 2 号

(72) 发明人 乐涛 何红秋 王利锋

(74) 专利代理机构 重庆辉腾律师事务所 50215

代理人 王海军 武小赞

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

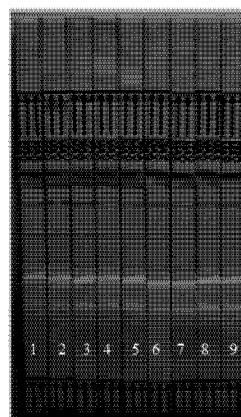
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒、制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒、制备方法及其应用,所述纳米磁球为内核,外表面键合有多西环素核酸适配体链;其中,所述多西环素核酸适配体链为: 5'-GCATGCCTTAAGCGATCG-N35-CCATATTATAAGGCATGC-3';通式中,所述N代表碱基A, T, C, G中任一个, N35代表随机片段长度为35个碱基;该探针适用于动物体内多西环素残留的检测。



1. 一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针,其特征在于:所述以纳米磁球为内核,外表面键合有多西环素核酸适配体链;

其中,所述多西环素核酸适配体链为:

5' - GCA TGC CTT AAG CGA TCG -N35-CCA TAT TAT AAG GCA TGC-3';

通式中,所述 N 代表碱基 A, T, C, G 中任一个, N35 代表随机片段长度为 35 个碱基。

2. 一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒,其特征在于:包括如下试剂:权利要求 1 所述的多西环素核酸适配体核酸探针、PBS 缓冲液、解离液。

3. 根据权利要求 2 所述的用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒,其特征在于:所述解离液为 900mL 水中, 8g NaCl, 0.37 g KCl, 0.135 g Na₂HPO₄·2H₂O, 1g 葡萄糖, 5g HEPES, 溶解, NaOH 调 PH 至 7.05, 定容至 1000 ml。

4. 一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒的制备方法,其特征在于:所述适配体核酸探针的制备方法为:采用化学共沉淀法制备 Fe₃O₄ 纳米颗粒,然后利用戊二醛法将氨基化的纳米材料与亲和素偶联;将多西环素适配体修饰于纳米磁珠表面,与多西环素适配体互补的杂交链在 5' 端分别标记了荧光基团,通过与适配体互补,构成荧光标记的适配体核酸探针。

5. 权利要求 2、3 所述的试剂盒在检测多西环素残留中的应用。

一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及对多西环素特异性识别 DNA 适配体的筛选方法及其应用,具体涉及生物技术和食品抗生素检测领域。

背景技术

[0002] 多西环素(Doxycycline,)为四环素类抗生素(Tetracyclines),通常用来治疗动物传染病,还被用作饲料添加剂,以预防疾病和促进动物生长。在实际工作中,由于随意加大使用剂量和不遵守休药期,造成药物在动物组织中残留。四环素类药物长期残留在动物组织中,导致耐药菌在人类之间传播,严重损害人体健康。很多国家和国际组织通过建立动物性食品中兽药残留的有效检测方法,来控制药物残留问题。如,我国和欧盟对 Dox 在动物组织中残留最高残留限量(MRL)作了明确规定:肌肉、肝脏和肾脏的 MRL 分别为 $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 、 $300\text{ }\mu\text{g/kg}$ 和 $600\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。为了控制兽药残留,保障人类健康,有必要建立一种快速、有效的残留检测方法对其残留进行监测。最近报道的检测多西环素(OTC)的方法主要包括高效液相色谱法、荧光法,质谱法和其它方法等。但是这些方法通常比较费时间并且价格相对昂贵,对实验人员也有较高的要求,对样品的预处理要求较高而不易推广。免疫分析法是利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质,在食品抗生素残留检测领域已较为广泛地应用。酶联免疫吸附测定(ELISA)将抗原和抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机结合,有效保证分析中的高选择性和高灵敏度,报道最多的是免疫分析方法。目前欧美已有一些公司生产针对抗生素残留检测的 ELISA 试剂盒产品,不过价格昂贵,酶标抗体的种类有限,只能检测少数种类常见的抗生素残留。由于多西环素是小分子化合物,本身不具有免疫原性,需将其与生物大分子如蛋白质连接后作为载体的抗原决定簇刺激动物才能产生特异性抗体,生产与应用存在较多的限制,包括:抗原偶联合成,高效价抗体的筛选;产生于鼠、兔等动物的异源抗体在使用中有可能产生非特异性反应;抗体的制备成本高,费时费力,单克隆细胞株不易保存;批内批间检测性能不稳定。这些都在很大程度上限制了免疫分析方法在多西环素检测中的应用。

[0003] 核酸适配体是近年来发展起来的一类经体外人工合成而筛选出的单链寡核苷酸,能高效、特异性地结合各种生物目标分子,核酸适配体的出现为化学生物学界和生物医学界提供了一种新的研究平台。核酸适配体具有自身稳定性好、制备合成相对简单、快速、易获得、易功能化修饰与标记等优点,因此,在生物传感器设计中应用灵活广泛。近几年,基于核酸适配体的生物传感器研究受到人们极大的关注。

[0004] 目前已有利用核酸适配子为识别分子应用于食品中抗生素检测的报道,检测方法多以电化学生物传感器为主。本发明针对传统大型仪器不能实现现场快速检测、前处理繁琐、以及免疫分析方法需要制备抗体的缺点,建立了基于磁珠分离-适配体识别的荧光检测方法,可用于食品中多西环素残留的快速、高灵敏度检测。

发明内容

[0005] 本发明筛选到可以与多西环素高亲和力结合的单链 DNA 适配体序列,建立了基于磁珠分离-适配体识别的荧光检测方法,可用于动物源性食品中多西环素残留的快速、高灵敏度检测。

[0006] 本发明目的:在于提供一种测定多西环素的适配体的构建方法,鉴于多西环素分子的结构特点,设计了改良的磁珠 SELEX 技术优选多西环素的方法,借助基于 SELEX 的组合化学技术,筛选得到能特异性结合多西环素的 DNA 适配体。将适配体通过生物素-亲和素系统固定于纳米磁珠表面,与 FAM 标记的适配体互补链杂交,在不同的激发和发射波长下检测互补链上荧光标记物。当加入靶分子时,核酸适配体与靶分子特异性结合,导致与其互补杂交的荧光标记 DNA 短链的解离,引起荧光强度的变化来定量分析样品中多西环素。

[0007] 本发明提供的一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针,所述纳米磁球为内核,外表面键合有多西环素核酸适配体链;

[0008] 其中,所述多西环素核酸适配体链为:

[0009] 5'-GCA TGC CTT AAG CGA TCG-N35-CCA TAT TAT AAG GCA TGC-3';

[0010] 通式中,所述 N 代表碱基 A,T,C,G 中任一个,N35 代表随机片段长度为 35 个碱基;具体见核苷酸序列表。

[0011] 本发明中所用的磁性纳米粒子和适配体是重庆生物医药与器械研究中心实验室合成。

[0012] 其中,上述探针是将多西环素适配体修饰于纳米磁珠表面,分别荧光标记的适配体互补链杂交,加入目标分子后,核酸适配体与靶分子特异性结合,导致与其互补杂交的荧光标记 DNA 短链的解离,引起荧光强度变化,依据标准曲线求得样品中多西环素的含量。

[0013] 上述的纳米磁珠是采用化学共沉淀法制备 Fe_3O_4 纳米颗粒,然后利用戊二醛法将氨基化的纳米材料与亲和素偶联。

[0014] 所述多西环素核酸适配体 apt 1 的 5'端均修饰了生物素,通过生物素-亲和素系统,同时固定于亲和素修饰的纳米磁珠表面。

[0015] 与多西环素适配体互补的杂交链在 5'端分别标记了荧光基团,通过与适配体互补,构成荧光标记核酸探针。

[0016] 一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒,包括如下试剂:权利要求 1 所述的多西环素核酸适配体核酸探针、PBS 缓冲液、解离液。

[0017] 上述所述的用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒,所述解离液为 900mL 水中,8g NaCl,0.37g KCl,0.135g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,1g 葡萄糖,5g HEPES,溶解,NaOH 调 PH 至 7.05,定容至 1000ml。

[0018] 上述所述的用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒的制备方法,

[0019] 采用化学共沉淀法制备 Fe_3O_4 纳米颗粒,然后利用戊二醛法将氨基化的纳米材料与亲和素偶联。将多西环素适配体修饰于纳米磁珠表面,与多西环素适配体互补的杂交链在 5'端分别标记了荧光基团,通过与适配体互补,构成荧光标记的适配体核酸探针。

[0020] 具体为:1) 在 60mL 乙二醇中加入 13g 的 1,6-己二胺,4.0g 无水醋酸钠和 2.0g 六水合三氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),50℃ 搅拌,得胶体溶液,将溶液转移到 100mL 带聚四氟乙烯内衬的反应釜中,198℃ 反应 6h;室温冷却,弃上层液体,去离子水冲出下层固体物质,磁分离

收集 ; 分别用去离子水和乙醇洗涤 2 次, 50℃干燥 5-10h ;

[0021] 2) 定量称取纳米材料悬浮于 10mM PBS 中, 超声分散 15min, 加入戊二醛溶液, 使其终浓度为体积比 5% ; 然后室温振荡 2h, 磁分离, 弃上清, 10mM PBS 洗涤三次, 除去多余的戊二醛 ; 然后加入 10mM PBS, 超声分散, 加入一定量的亲和素, 室温振荡 12h, 磁分离, 弃上清, 10mM PBS 清洗三次 ;

[0022] 3) 将亲和素修饰的纳米材料悬浮于 10mM PBS 中超声分散, 加入一定浓度的核酸适配体溶液, 室温振荡 4h, 磁分离, 弃上清, 10mM PBS 清洗三次以除去未结合的适配体, 重悬于 PBS 缓冲液中。

[0023] 上述所述的试剂盒在检测多西环素残留中的应用 ; 为加入目标分子后, 核酸适配体与靶分子特异性结合, 导致与其互补杂交的荧光标记 DNA 短链的解离, 引起荧光强度变化, 依据标准曲线求得样品中多西环素的含量。该方法可检测动物源性食品中多西环素残留。

[0024] 本发明的有益技术效果是 : 所述试剂盒适配体探针是多西环素的新型识别元件, 具有稳定性良好、灵敏度高、成本低、易制备、易修饰和标记的高特异性的优势。

附图说明

[0025] 图 1 纳米磁性粒子扫描图 ;

[0026] 图 2 荧光定量 PCR ; 其中, 1-9 分别表示测试样品中含有 QCA 样品标准浓度分别为 0、0.5、1、2.5、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/L}$ 。

具体实施方式

[0027] 实施例 1 用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒的制备

[0028] 1. 氨基化纳米磁珠的制备 : 在 60mL 乙二醇中加入 13g 的 1,6-己二胺, 4.0g 无水醋酸钠 (CH_3COONa) 和 2.0g 六水合三氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 50℃搅拌, 得胶体溶液, 将溶液转移到 100mL 带聚四氟乙烯内衬的反应釜中, 198℃反应 6h。室温冷却, 弃上层液体, 去离子水冲出下层固体物质, 磁分离收集。分别用去离子水和乙醇洗涤 2 次, 50℃干燥 5-10h。

[0029] 2. 亲和素偶联氨基化的纳米磁珠 : 定量称取纳米材料悬浮于 PBS (10mM) 中, 超声分散 15min, 加入戊二醛溶液, 使其终浓度为 5% (v/v)。然后室温振荡 2h, 磁分离, 弃上清, 10mM PBS 洗涤三次, 除去多余的戊二醛。然后加入 10mM 的 PBS, 超声分散, 加入一定量的亲和素, 室温振荡 12h, 磁分离, 弃上清, 10mM PBS 清洗三次。采用紫外分光光度计于 280nm 处测亲和素结合磁性纳米颗粒前后的吸光值。纳米磁性粒子如图 1 所示。

[0030] 3. 生物素修饰的适配体连接亲和素修饰的纳米磁珠 : 将亲和素修饰的纳米材料悬浮于 10mM PBS 中超声分散, 加入一定浓度的核酸适配体溶液, 室温振荡 4h, 磁分离, 弃上清, 10mM PBS 清洗三次以除去未结合的适配体, 重悬于 PBS 缓冲液中。

[0031] 4. 适配体与互补链杂交 : 将一定浓度的 FAM 标记的互补链, 加入上述悬浮液中, 37℃避光孵育 1h, 磁分离, 弃上清, PBS 洗涤三次以除去游离的互补链, 重悬于 PBS 缓冲液, 利用荧光分光光度计, 分别于 495nm、588nm 激发波长和 520nm、608nm 发射波长下, 测其荧光值。

[0032] 5. 加样与检测 : 将步骤 3 的纳米材料复合物溶解于解离液中 (900mL 水中, 8g

NaCl, 0.37g KCl, 0.135g Na₂HPO₄·2H₂O, 1g 葡萄糖, 5g HEPES, 溶解, NaOH 调 PH 至 7.05, 定容至 1000mL), 加入待测样品或标品溶液, 45℃ 孵育避光反应 40-60min, 磁分离, 弃上清, PBS 洗涤三次除去解离下的互补链, 重悬于 PBS 中, 在同样条件下检测荧光值。

[0033] 6. 标准曲线的绘制: 按上述操作步骤对多西环素标准品进行检测, 建立标准曲线。标准品浓度依次为 0、2.5、5、10、20、40、80 μg/L, 置于石英比色皿中, 在 Ex495nm 激发波长和 Em520nm 发射波长下, 每个实验重复 5 次, 测其荧光值。标准品浓度为 0ng/mL 所对应荧光值为 B₀, 不同浓度标准品对应的荧光值为 B, 所获得的标准品荧光值的平均值除以 B₀ 标准的吸光值 (抑制率)。以不同标准品浓度为横坐标, 以抑制率 B/B₀ 为纵坐标作图, 绘制标准曲线。

[0034] 7. 临床样品测定: 选取任何不含抗菌药物的健康动物组织, 将经筛选后的空白组织剪碎, 用匀浆机 4000r/min 均质 5min, 称取组织均质物 1.0g 于 50mL 离心管中, 加入 3% 三氯乙酸 (肉 4mL, 肝 9mL), 旋涡混匀, 颠倒振荡 20min, 室温 10000r/min 离心 10min。取上清液 200 μL 于 1.5mL 离心管中, 加入 1mol/L 氢氧化钠溶液 20 μL, 旋涡混匀, 加入样品缓冲液 (肉 180 μL, 肝 380 μL) 混匀, 以 10000r/min 离心 5min, 上清液作为试样溶液。肌肉稀释因子为 10, 肝脏稀释因子为 30。准确量取多西环素适量标准品储备液, 将多西环素标准品储备液分别溶于 PBS、猪肌肉、猪肝 3 种基质中, 终浓度为 0、2.5、5、10、20、40、80 μg/L, 按照步骤 6 的操作方法绘制曲线, 进行实验结果的比较分析。

[0035] 实施例 2 用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒的应用

[0036] 标准曲线的建立

[0037] 应用发明内容中的方法测定多西环素标准品, 建立标准曲线。分别配置多西环素的系列标准浓度为 0、0.2、0.5、1、2、5、10、20、40、80 μg/L, 以不同标准品浓度为横坐标, 以抑制率 B/B₀ 为纵坐标, 绘制标准曲线, 建立回归方程。标准曲线呈典型的 S 型, 曲线回归方程为 $y = -43.76x + 94.95$, $R^2 = 0.99$, 其 IC₅₀ 为 10.7 μg/L, 最低检测线为 1.79 μg/L, 检测方法标准曲线的检测范围为 1.8 ~ 80 μg/L。

[0038] 组织样品基质效应试验

[0039] 将多西环素标准工作液分别用 PBS、猪肝脏样品处理液、肌肉组织处理液等 3 种样品基质进行系列浓度稀释, 在最佳反应条件下, 所测得标准品在各基质中的效应实验数值。该方法对基质样品中一系列浓度多西环素进行测试, 所得结果绘制标准曲线, 其线性关系均大于 97%, 所得基质 PBS、猪肌肉、肝脏的 IC₅₀ 分别为 11.7 μg/L、14.5 μg/kg、16.3 μg/kg。结果说明虽然生物基质不同对标准品的吸光值有一定影响, 但其 IC₅₀ 变化不大, 说明不同样品处理液对方法的敏感性和检测结果影响不大, 样品的处理方法可行的。

[0040] 检测方法在组织中最低检测限

[0041] 用该检测方法, 制作标准曲线。分别测定 20 份空白组织 (猪肌肉和肝脏) 的荧光值, 进行抑制率计算, 代入回归方程, 计算组织样品检测线, 通过测试多西环素在猪肌肉和猪肝脏样品中的检测线分别为 2.7 μg/kg、2.8 μg/kg。

[0042] 组织添加回收率

[0043] 测试动物组织, 肝脏样的回收率在 78.6% ~ 96.5% 之间, 平均 85.3%; 肌肉样品的回收率在 78.3% ~ 95.7% 之间, 平均 88.6%。猪肝脏和猪肌肉组织样的平均批内变异系数分别为 7.5%、6.4%; 猪肝脏和猪肌肉组织样的平均批间变异系数分别为 7.8%、9.3%。

平均批内批间变异系数均小于 15%。由批内批间变异系数和回收率的结果看,实验结果表明该方法的重复性、精确度、准确度比较好,可以满足临床检测需要。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 重庆市科学技术研究院

<120> 一种用于检测多西环素残留的适配体核酸探针试剂盒、制备方法及其应用

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 71

<212> DNA

<213> 多西环素核酸适配体序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(53)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 1

gcatgcctta agcgatcgnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnccatatt 60

ataaggcatg c 71

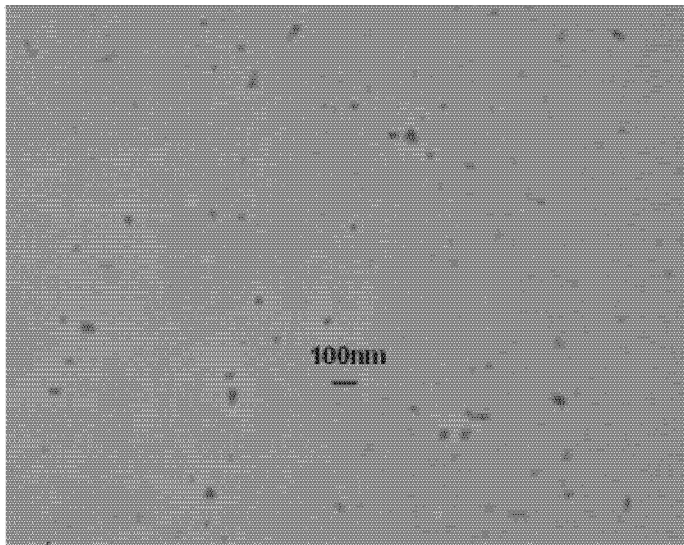


图 1

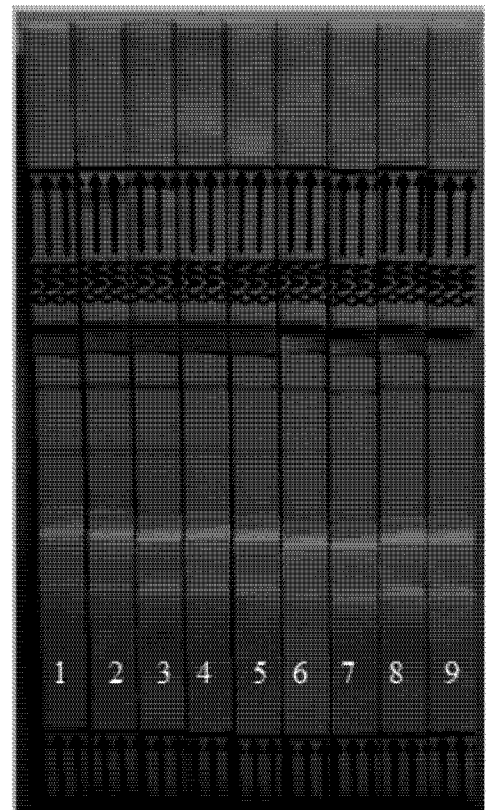


图 2