

基于磁球的竞争适配体法检测中药中赭曲霉素 A

高仕超， 秦美君， 李 赞， 郭丽敏*
(山西中医药大学，山西 晋中 030619)

摘要：目的 基于磁球的竞争适配体法检测中药中赭曲霉素 A。方法 以赭曲霉素 A 的适配体为识别元件，荧光素 FAM 为荧光探针，磁球为载体，发展了一种竞争的适配体法检测赭曲霉素 A。FAM 标记的适配体 (F-Aptamer) 与修饰在磁球上的适配体互补链 (c-DNA) 杂交而结合在磁球上，并随着磁性分离离开溶液，溶液的荧光信号弱；在溶液中加入赭曲霉素 A 后，赭曲霉素 A 与 c-DNA 竞争性的与 F-Aptamer 结合，与赭曲霉素 A 结合的 F-Aptamer 留在溶液中，从而使溶液的荧光信号增强。结果 c12-DNA 做互补链，在 50 nmol/L 的 FAM-Aptamer、20 nmol/L 的 Ca²⁺ 和 pH8.0 的缓冲溶液下，方法检出限低至 0.2 nmol/L，展现出良好的选择性，同时只需对样品进行简单处理即可实现赭曲霉素 A 在中药中的检测。结论 本实验将适配体技术和纳米材料结合并应用于中药中真菌毒素的检测，为中药质量鉴定提供了新思路。

关键词：赭曲霉素 A；适配体；中药；荧光；磁球

中图分类号：R282 文献标志码：B 文章编号：1001-1528(2023)08-2764-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.08.054

赭曲霉素是一种真菌毒素，其中赭曲霉素 A 是最重要的霉菌代谢产物，可引起肝、肾坏死性病变，还具有致畸性，国际癌症研究机构将其定义为 2B 类致癌物^[1]。中国和欧盟对许多食品和饲料中赭曲霉素 A 进行了限定^[2-3]。2020 年版《中国药典》规定了可以使用 LC-MS 法和 HPLC 法测定中药中的赭曲霉素 A，弥补了我国对中药中赭曲霉素 A 的检测空白^[4]。

中药中赭曲霉素 A 的检测主要有色谱法、免疫分析法。色谱法检测灵敏度高，但样品前处理复杂^[5]；免疫分析法操作简单、快速，但抗体制备困难、成本高^[6]。适配体是体外筛选得到的 DNA 或 RNA 序列，易于体外大量合成，成本低，可以和光学、电化学等技术结合，广泛应用于细胞成像、生物检测等领域^[7-9]，且适配体易于标记荧光物质而活性不受影响^[10]。

本实验以磁球为载体，发展了一种竞争性适配体分析法检测赭曲霉素 A，见图 1。当溶液中不存在赭曲霉素 A 时，FAM 标记的适配体 (F-Aptamer) 与 c-DNA 通过碱基互补配对，形成双链并结合在磁球上，F-Aptamer 随磁性分离过程被磁球带走，荧光信号很低；当溶液中存在赭曲霉素 A 时，赭曲霉素 A 与 c-DNA 竞争性的结合 F-Aptamer，并将 F-Aptamer 留在溶液中，荧光信号得以保留。因此，通过检测荧光信号的变化实现对赭曲霉素 A 的定量检测。

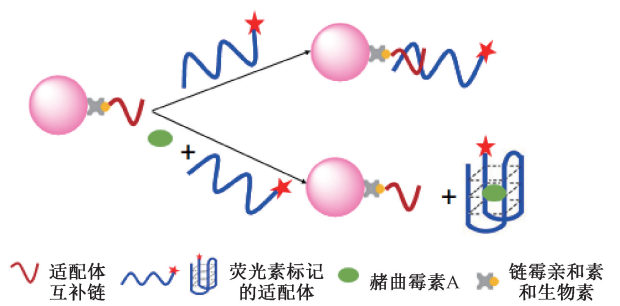


图 1 基于磁球的竞争适配体荧光法检测赭曲霉素 A 原理图

1 材料

赭曲霉素 A、氨基酸、华法林、香豆素、赭曲霉素 B、玉米赤霉烯酮均购自美国 Sigma 公司；MgCl₂·6H₂O (批号 A610328-0500)、NaCl (批号 EB28BA0014)、CaCl₂·H₂O (批号 EC05BA0010)、Tris-HCl (批号 EB14KA0184)、Tween20 (批号 EA21BA0030) 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司；链霉亲和素包被的磁球购自美国 Invitrogen 公司。其余试剂均为分析纯；水为超纯水。标记有 FAM 的赭曲霉素 A 适配体 (F-Aptamer) 与其互补序列 (c-DNA) 由上海生工生物工程股份有限公司提供，序列见表 1。

木槿皮 (批号 20210718)、桔梗 (批号 20210724)、槟榔 (批号 20210725) 均购自山西维康堂中药饮片有限

收稿日期：2022-11-22
基金项目：国家自然科学基金 (81803725)；山西省中医药管理局科研项目 (2022ZYCY107)；山西省高等学校教学改革创新项目 (J20220826)；山西中医药大学科技创新能力培育计划项目 (2022PY-TH-08)
作者简介：高仕超 (1998—)，男，硕士生，从事中药质量鉴定研究。E-mail: 1204779787@qq.com
* 通信作者：郭丽敏 (1979—)，女，副教授，硕士生导师，从事中药质量鉴定研究。Tel: (0351) 3179903, E-mail: glmgj2018@163.com

表 1 寡核苷酸序列列表

名称	序列
F-Aptamer	5'-FAM-GATCGGGTCTGGCTGGCGTAAAGGAGCATCGACA-3'
c8-DNA	5'-Biotin-TGTCCGAT-3'
c9-DNA	5'-Biotin-TGTCCGATG-3'
c11-DNA	5'-Biotin-TGTCCGATGCT-3'
c12-DNA	5'-Biotin-TGTCCGATGCTC-3'
c13-DNA	5'-Biotin-TGTCCGATGCTCC-3'

公司。

LS45 型荧光光度计（美国 PerkinElmer 公司）；MIX-28 型涡旋混匀器（杭州米欧仪器有限公司）；UPR-I I-20L 型超纯水机（四川优普超纯科技有限公司）；MicroSmart12 孔高速微量离心机〔鼎昊源（天津）生物科技有限公司〕。

2 方法

2.1 赭曲霉毒素 A 检测方法 取链酶亲和素包被的磁球 25 μL 于离心管中，磁性分离，吸取上清液，用缓冲液 A（Tris-HCl 溶液 20 mmol/L，含 5 mmol/L Mg²⁺，100 mmol/L Na⁺，pH 7.5）洗涤磁球 2 次，加入 200 μL 10 μmol/L 生物素标记的核酸适配体互补序列（c-DNA），室温下反应 1 h，将 c-DNA 修饰的磁球用缓冲溶液 A 洗涤后备用。将含有 60 μL 100 nmol/L F-Aptamer 缓冲液 B（Tris-HCl 溶液 10 mmol/L，含 120 mmol/L Na⁺，20 mmol/L Ca²⁺，0.02% Tween20，pH 8.0）与 60 μL 含有赭曲霉毒素 A 的缓冲溶液 B 在室温下反应 30 min，加入 5 μL c-DNA 修饰的磁球，两者混合后室温下反应 40 min，磁性分离后，在荧光分光光度计下测定荧光强度。根据本实验所选 50 nmol/L FAM 的荧光强度，设定激发和发射狭缝宽度为 10 nm，由实际测定 FAM 的最大激发波长为 496 nm，发射波长范围 512~600 nm，得到完整荧光光谱。

2.2 特异性试验 选择与赭曲霉毒素 A 结构相近的氨基酸、华法林、香豆素，以及赭曲霉毒素 A 的可能共存物赭曲霉毒素 B 和玉米赤霉烯酮作为干扰试剂，进行特异性试验，分别在 80、300、1 000 nmol/L 浓度下进行实验，方法同“2.1”项。

2.3 加样回收率试验 分别取 10 g 木槿皮、桔梗、槟榔，加入 100 mL 水，煮沸 10 min，12 000 r/min 离心 15 min，用缓冲溶液将上清液稀释 20 倍后，加入赭曲霉毒素 A，按“2.1”项下方法测定其荧光信号。

3 结果

3.1 可行性实验 由图 2 可知，当体系中不存在赭曲霉毒素 A 时，荧光信号弱，说明大部分的 F-Aptamer 都结合在了磁球上；当加入目标物赭曲霉毒素 A 后，体系的荧光信号明显增高，说明赭曲霉毒素 A 与 F-Aptamer 特异性结合，将 F-Aptamer 留在了溶液中，设计方案可行。

3.2 实验条件的优化

3.2.1 c-DNA 的选择 赭曲霉毒素 A 核酸适配体互补序列 c-DNA 的长度是影响荧光信号强度的一个重要因素，c-DNA 越短（碱基数越少），其与 F-Aptamer 的结合能力就弱，则在不存在赭曲霉毒素 A 的情况下，通过磁性分离带走的 F-

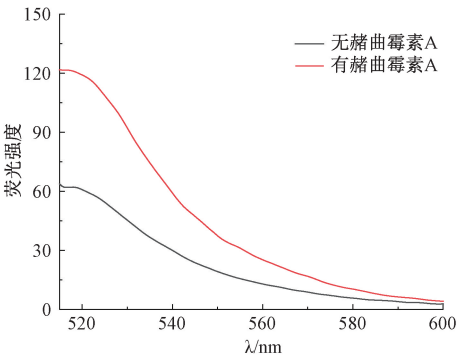


图 2 可行性分析

Aptamer 就越少，体系的荧光信号降低不明显，使得检测背景过高；如果 c-DNA 太长，其与 F-Aptamer 结合能力过强，又会增强 F-Aptamer 与赭曲霉毒素 A 结合的难度，使得体系在存在赭曲霉毒素 A 存在下荧光信号也不会太高，这 2 种情况都会影响检测的灵敏度。基于此，本实验设计了 5 条分别含有 8 个（c8-DNA）、9 个（c9-DNA）、11 个（c11-DNA）、12 个（c12-DNA）、13 个（c13-DNA）碱基数的赭曲霉毒素 A 适配体互补序列进行考察。棕色部分为不存在赭曲霉毒素 A 时的荧光信号值，绿色部分为加入赭曲霉毒素 A 时的信号值，由图 3A 可知，当碱基数为 12 时（c12-DNA），2 种体系的荧光信号差值最高，说明 c12-DNA 与 F-Aptamer 的结合能力适当，既能与 F-Aptamer 有效结合，又能在赭曲霉毒素 A 存在下与 F-Aptamer 及时解离，保障高灵敏度，故本实验选择 c12-DNA 为最佳互补链。

3.2.2 F-Aptamer 浓度 F-Aptamer 既是赭曲霉毒素 A 的识别元件，又是荧光探针，它的浓度对检测体系影响很大。如果 F-Aptamer 浓度过低，检测信号就低，如果 F-Aptamer 浓度过高，会使得体系背景信号高，两者都会降低检测灵敏度。F-Aptamer 浓度对体系的荧光信号比值 $\Delta F/F_0$ （ $\Delta F = F - F_0$ ，其中 F 为加入赭曲霉毒素 A 时的荧光信号， F_0 为没有加入赭曲霉毒素 A 时的荧光信号）的影响如图 3B 所示，当 F-Aptamer 浓度达到 50 nmol/L 时，荧光信号比值达到最高点。故本实验选择 F-Aptamer 浓度为 50 nmol/L 进行后续实验。

3.2.3 Ca²⁺ 浓度 离子浓度对赭曲霉毒素 A 和其适配体的结合有明显影响。本实验测量了不同浓度 Ca²⁺ 对体系的荧光信号的影响，见图 3C，当体系中没有 Ca²⁺ 时，荧光信号非常弱，随着 Ca²⁺ 浓度逐渐增加，体系荧光比值逐渐升高，在 Ca²⁺ 浓度为 10~20 mmol/L 时，荧光信号比值达到最高点，继续增加浓度，荧光信号比值降低，说明一定浓度的 Ca²⁺ 有助于适配体特定结构的形成，但是浓度太高反而影响适配体与赭曲霉毒素 A 的结合，这与文献〔11〕报道一致，故本实验选择 Ca²⁺ 浓度为 20 mmol/L 进行后续实验。

3.2.4 pH 值 pH 值是影响检测体系荧光信号又一重要因素，由于酸性条件会降低赭曲霉毒素 A 和其适配体的亲和力〔12〕，本实验中 pH 值的考察选用中性缓冲溶液和碱性缓冲溶液。实验发现，当 pH 值为 8.0 时，实验体系的荧光比

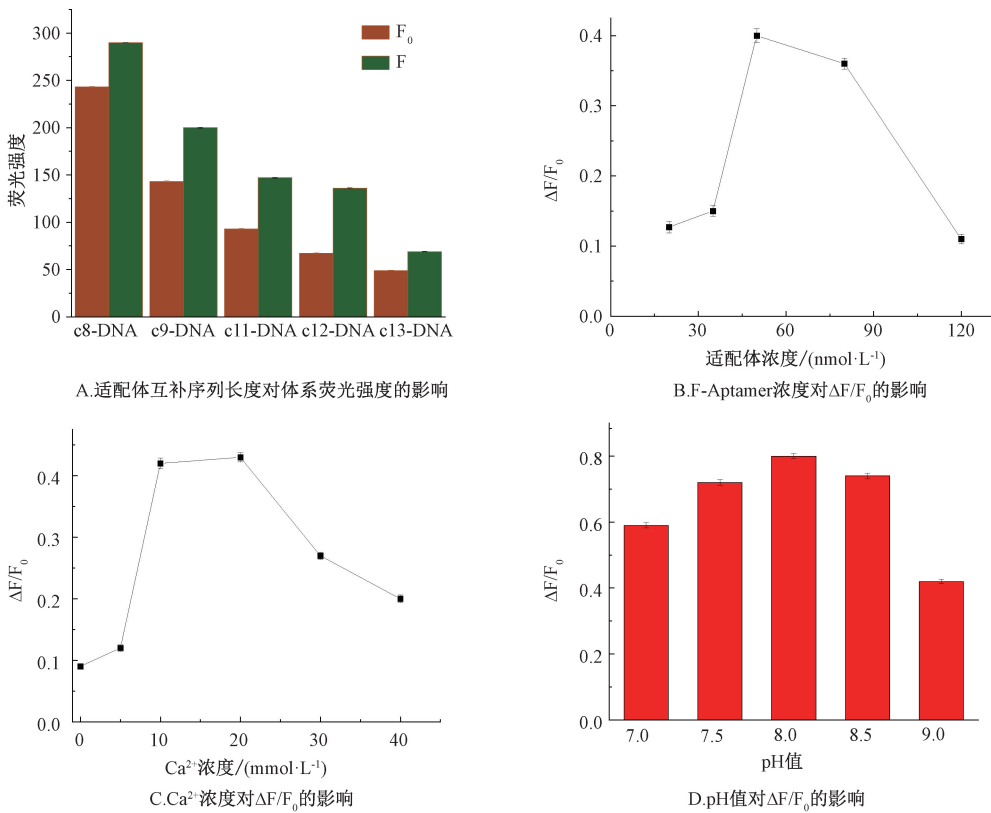


图 3 实验条件的优化

值 $\Delta F/F_0$ 最大，见图 3D，这与文献 [13] 报道的 FAM 的荧光量子产率在弱碱性条件下最高相吻合，故本实验选择在 pH 值为 8.0 的缓冲溶液进行后续实验。

3.3 赭曲霉毒素 A 检测 以 c12-DNA 为互补链，在 50 nmol/L FAM-Aptamer、20 nmol/L Ca²⁺、pH 8.0 的缓冲溶液下，对赭曲霉毒素 A 进行检测，结果见图 4A。随着赭曲霉毒素 A 浓度的

增加，体系的荧光信号升高，说明赭曲霉毒素 A 浓度越大，在与 c-DNA 的竞争中越有优势。由图 4B 可知，在 0.2 ~ 300 nmol/L 范围内，赭曲霉毒素 A 浓度与 $\Delta F/F_0$ 呈线性相关，线性关系为 $Y=0.00336X+0.092$ ($R^2=0.991$) (X 为赭曲霉毒素 A 的浓度， Y 为 $\Delta F/F_0$)，检出限 ($S/N=3$) 为 0.2 nmol/L (约 0.08 μg/kg)。

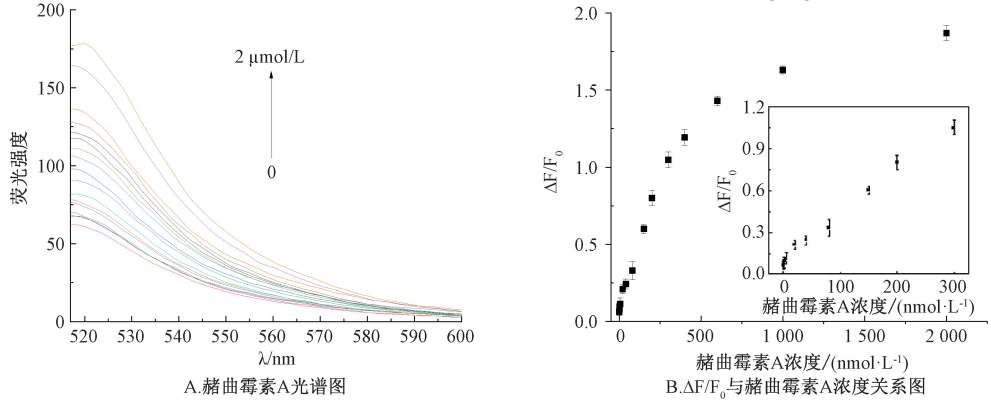


图 4 赭曲霉毒素 A 检测结果

3.4 特异性实验 由图 5 可知，干扰物质只产生微弱的信号，而且当它们的浓度大幅增加时 (从 80 nmol/L 增加 1 000 nmol/L)，其信号没有明显增长；但不管是在相同浓度下，还是在干扰物质浓度远高于赭曲霉毒素 A 浓度的情况下，赭曲霉毒素 A 都会引起体系荧光信号显著增强，而且信号明显高于干扰物质产生的信号，同时赭曲霉毒素 A 的信号会随浓度的增加而明显增长。这些现象不仅进一步说明荧

光信号和赭曲霉毒素 A 浓度成正相关，再次表明了该方法的可行性，而且展现了方法对赭曲霉毒素 A 良好的选择性，这使得将该方法应用于实际样品中成为可能。

3.5 重复性试验 取 300 nmol/L 赭曲霉毒素 A，按“2.1”项下方法平行测定 6 次荧光信号，并计算 $\Delta F/F_0$ ，测得 RSD 为 10%，表明该方法重复性良好。

3.6 稳定性试验 按“2.3”项下方法制备木槿皮、桔梗、

参考文献:

[1] Liu J, Wu S, Shen H T, *et al.* Ochratoxin A induces DNA damage and G2 phase arrest in human esophageal epithelium Het-1A cells *in vitro* [J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40 (5): 657-665.

[2] Meucci V, Armani A, Tinacci L, *et al.* Natural occurrence of ochratoxin A (OTA) in edible and not edible tissue of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) sold on the Italian market [J]. *Food Control*, 2021, 120: 107537.

[3] Gu K J, Ryu D J, Lee H J. Ochratoxin A and its reaction products affected by sugars during heat processing [J]. *Food Chem*, 2021, 348(5): 129038.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[5] 蔡伟谊, 毛新武, 林子豪, 等. 在线免疫亲和固相萃取-高效液相色谱法快速测定食品中赭曲霉毒素 A [J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(12): 3100-3106.

[6] 秦 露, 张 磊, 蒋佳伊, 等. 基于酶联免疫分析法高通量筛查中药材中赭曲霉毒素 A 的污染研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(23): 5072-5077.

[7] Lin Y, Ying Y L, Shi X, *et al.* Direct sensing of cancer biomarkers in clinical samples with a designed nanopore [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(84): 11564-11567.

[8] Feng J H, Li Y Y, Gao Z Q, *et al.* Visible-light driven label-free photoelectrochemical immunosensor based on TiO₂/S-BiVO₄ @ Ag₂S nanocomposites for sensitive detection OTA [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 99: 14-20.

[9] Zhao J C, Zhu Q Y, Zhao L Y, *et al.* Preparation of an aptamer based organic-inorganic hybrid monolithic column with gold nanoparticles as an intermediary for the enrichment of proteins [J]. *Analyst*, 2016, 141(16): 4961-4967.

[10] Xiao X, Li Y F, Huang C Z, *et al.* A novel graphene oxide amplified fluorescence anisotropy assay with improved accuracy and sensitivity [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2015, 51(89): 16080-16083.

[11] Cho E J, Collett J R, Szafranska A E, *et al.* Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 564(1): 82-90.

[12] Cruz-Aguado J A, Penner G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(22): 10456-10461.

[13] Huang P J J, Kempaiah R, Liu J W. Synergistic pH effect for reversible shuttling aptamer-based biosensors between graphene oxide and target molecules [J]. *J Mater Chem*, 2011, 21 (25): 8991-8993.

[14] 叶林链, 王少敏, 周 恒, 等. 高效液相荧光光谱法测定坤宝丸中赭曲霉毒素 A [J]. *中成药*, 2022, 44 (4): 1264-1266.

[15] 李风华, 李作华, 杨 丽, 等. 药食同源中药材中 16 种真菌毒素的测定与分析 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(9): 268-275.

[16] 胡哲哲, 陈 俏, 曹雅静, 等. 首批立法保护岭南中药材中真菌毒素的 LC-MS/MS 法检测 [J]. *药物分析杂志*, 2020, 40(3): 477-482.

[17] 刘 丽. 基于纳米材料荧光传感器检测赭曲霉毒素 A 的方法研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020.

[18] 康 宇, 秦 兰, 羊杜涛, 等. 用于 OTA 检测的氧化石墨烯/适配体传感器的构建 [J]. *中国科技论文*, 2019, 14 (4): 373-377.

[19] Jia M X, Jia B Y, Liao X F. A CdSe@ CdS quantum dots based electrochemiluminescence aptasensor for sensitive detection of ochratoxin A [J]. *Chemosphere*, 2022, 287 (Pt 1): 131994.

[20] 曲 瑶, 张亚旗, 肖 光, 等. 基于核酸碱基猝灭荧光团的核酸适配体传感器检测赭曲霉毒素 A [J]. *分析化学*, 2020, 48(10): 1409-1415.

[21] 刘炉英, 刘锦辉, 胡小刚. 基于核酸适配体修饰复合纳米纤维的分散固相萃取技术在赭曲霉毒素 A 检测中的应用 [J]. *分析化学*, 2021, 49(12): 2096-2105.

[22] 白 天, 岳 爽, 赵路阳, 等. 基于金纳米星和生物质多孔碳信号放大策略的新型电化学核酸适配体传感器 [J]. *河南工业大学学报 (自然科学版)*, 2021, 42(5): 85-91.