

CHA 结合 DNAzyme 用于沙门氏菌核酸的可视化检测

卜胜君^{1,2}, 王奎宇^{1,2}, 宋广萍^{1,2}, 英娜², 齐炳尧^{1,2}, 李忠义², 汤鑫²,
万家余^{2*}, 张红梅^{1*}

(1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122)

摘要: 为建立简洁、灵敏、快速的食源性沙门氏菌核酸可视化检测方法, 试验采用靶标催化发夹装置(Catalyzed hairpin assembly, CHA)结合功能性核酸 DNAzyme 的方法, 设计沙门氏菌核酸发夹型抓取探针(Capture probe, CP), CP结合靶标并启动 H1、H2 引发 CHA 反应, 形成 DNAzyme 结构并发生显色反应。试验中对 CP、H1、H2 最佳浓度及缓冲液 pH 进行优化, 对灵敏度与特异性进行分析。结果表明: 该方法对沙门氏菌核酸片段的可视化检测具有高特异性, 灵敏度达到 3.9 pM, 且存在一定的线性关系。说明此方法的建立可为食源性病菌可视化检测奠定相应基础。

关键词: 沙门氏菌; 特异性; 16s rRNA; CHA; DNAzyme; 可视化检测

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)03-0044-06

Visual Detection of Salmonella DNA Fragments by CHA Combined DNAzyme

BU Shengjun^{1,2}, WANG Kuiyu^{1,2}, SONG Guangping^{1,2}, YING Na², QI Bingyao^{1,2}, LI Zhongyi², TANG Xin²,
WAN Jiayu^{2*}, ZHANG Hongmei^{1*}

(1. Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, Daqing 163319; 2. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, China)

Abstract: A target catalyzed hairpin assembly combined with DNAzyme was adopted to establish a simple and sensitive method for visual detection of salmonella specific DNA fragment. Capture probe was designed by specific salmonella DNA segments. When target was present, capture probe opened and started the CHA reaction. H1-H2 diploid DNAzyme structure was formed and caused chromogenic reaction. The experiment was carried out to select optimal content of CP, H1, H2, and pH of buffer solution, and analyze the sensitivity and specificity. The results showed that the system had a good generality and met the requirements of the naked eye visual detection. The detect limit of this method was 3.9 pM and there was a linear correlation. Setting up of this method laid basis for visual detection of food-borne bacteria.

Key words: Salmonella; Specificity; 16s rRNA; CHA; DNAzyme; Visual detection

沙门氏菌(Salmonella)是对人类健康构成危害的一类食源性致病菌,也是引起人类食物中毒最常见的病原菌之一。目前主要采取的检测方法为传统的标准检测方法、分子生物学方法等^[1]。尽管这些技术成熟富有优势,但沙门氏菌的经典传统培养方法耗时长,程序繁琐,大致需 4~7 d^[2]。RT-PCR(Real time-polymerase chain reaction)

com

检测技术需要酶及复杂昂贵的试验室仪器设备,这些检测方法不适用于沙门氏菌等食源性致病菌现场快速检测。所以,建立快速、准确、简便的检测方法一直是沙门氏菌等食源性致病菌研究的核心问题。

近期建立的基于核酸分子的新型检测方法可以实现对检测靶标菌种信号的快速放大,与其他检测平台相结合可以实现裸眼可视化检测。由于核酸分子具有信号机制传导灵活,便于设计,稳定性良好等特点^[3],已被广泛应用到生物医学、化学和生物分析等领域^[4],通过分子工程手段设计,合成不同核酸分子探针,广泛应用于生物分析等

收稿日期: 2017-03-13

基金项目: 吉林省科技发展计划(20150101105JC)

作者简介: 卜胜君(1991-),女,在读硕士,研究方向为微生物。

通讯作者: 万家余,男,博士,副研究员, E-mail: wanjiayu@hotmail.com

张红梅,女,博士,副教授, E-mail: zhhm333@126.

领域。如今,已经探索出多种核酸探针类型,如基因组DNA探针^[5]、分子信标等^[6]。基于核酸探针手段,发展核酸探针与信号放大检测技术,实现高灵敏高特异性检测成为目前研究的主要方法,如链置换(Strand displacement amplification, SDA)放大技术^[7]、催化发夹装置(Catalyzed hairpin assembly, CHA)放大技术^[8]及DNAzyme可视化信号放大等。

链置换放大技术是一种恒温扩增方法,无需温度循环^[9]控制,但该技术的核心是DNA聚合酶,扩增过程需要酶的参与。而催化发夹装置(CHA)放大技术,可以在无酶室温的条件下,成倍扩增目的产物,放大检测信号。DNAzyme是一类引起人们很大兴趣的新型生物催化剂的人造酶^[10],是由G-四链体即脱氧核酶,由富鸟嘌呤(G碱基)寡核苷酸序列,相互堆叠形成,相互之间具有很强的氢键作用,这种作用使之形成四聚体结构,这种结构能够包裹住Hemin激活DNAzyme活性。使ABTS(乙酰苯基噻唑磺酸)在H₂O₂作用下变为绿色^[11],达到肉眼可视化的目的。目前国内外基于这些方法建立的检测机制如: Bingling Li等^[12]利用CHA结合荧光建立了检测单链核酸片段的方法。Tian等^[13]建立基于G-四链体肉眼可视化比色检测方法用于小RNA的分析检测。这些方法均能灵敏特异检测所需靶标核酸序列。

本试验选取两种信号放大技术CHA和DNAzyme信号放大相结合的方法建立沙门氏菌核酸可视化检测。靶标特异性序列的筛选是基于核酸

探针方法检测微生物中重要的部分。原核生物16s核糖体RNA(rRNA)全长大约有1500个核苷酸,提供了大量的高保守序列,为细菌特异性引物设计提供了基础^[14-15]。因此,本试验基于沙门氏菌16s rRNA设计引物靶标序列,结合核酸探针建立一种不需要酶及复杂的大型仪器设备,常温下可进行,方便快捷,肉眼可视的沙门氏菌核酸检测技术。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂

试验中所用到的DNA序列均由上海生工生物工程股份有限公司合成,纯化方式为聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),具体序列见表1。氯化钾(KCl)、氯化镁(MgCl₂)、氯化钠(NaCl)、氢氧化钠(NaOH)都为国产分析纯,均购自上海国药集团药业股份有限公司;HEPES(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)、ABTS(2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)、血晶素(Hemin)及二甲亚砜(DMSO)均购自美国Sigma公司;DNA样品用高温灭菌的高纯水溶解后得到母液,储存于-20℃备用。H₂O₂是由30%的原液稀释得到。ABTS和H₂O₂均是现配现用。Hemin溶于DMSO得到10 mmol/L母液,然后稀释备用。本试验所用到的缓冲溶液为20 mmol/L HEPES buffer solution (pH7.4, 8 mmol/L Mg²⁺, 10 mmol/L K⁺, 200 mmol/L Na⁺)。未特殊说明的情况下,所有试验均在室温下完成。

表1 所用序列

Name	Sequence(5'-3')
Capture probe(CP)	5'-CGACATCTAACCTGGGACACTGACTATTAACCACAACACCTTCCTCCCGTCAGTGTCC-3'
H1	5'-GTCAGTGTCAGGTTAGATGTGCGCCATGTGTAGACGACATCTAACCTGGGTAGGGCGGGTTGGG-3'
H2	5'-AGATGTCGTCTACACATGGCGACATCTAACCTCCCCATGTGTAGA-3'
Salmonella(Sal-M)	5'-CGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACC-3'
Yersinia(Yer)	5'-CGAGGAGGAAGGGGTTGAGTTAATACGCTCAATCATTGACGTTAC-3'
Escherichia(Esc)	5'-CGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC-3'
Citrobacter(Cit)	5'-CGAGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACT-3'
Klebsiella(Kle)	5'-CGGGGAGGAAGGGGATGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACC-3'

所用序列如下:

1.2 主要仪器

恒温水浴锅(型号为DK-80),购自中国金坛医疗仪器公司;紫外凝胶成像系统(型号为TFP-M/WL),购自法国VILBER公司。

1.3 试验方法

1.3.1 探针的设计

所有菌株16s rRNA序列均从NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中得到。菌株16s rRNA特异性序列均由DNAMAN进行分析比对,确定特异性核酸片段。

根据CHA反应原理^[8]设计发夹型探针CP、

H1、H2,其中CP为沙门氏菌核酸的俘获探针。发夹结构CP有10个碱基对互补形成茎部结构,环状结构碱基与沙门氏菌核酸序列互补。发夹结构H1茎部有16个碱基对互补,H2茎部有8个碱基对互补。H1在茎部固定DNAzyme序列,使得其类似过氧化物酶活性被抑制。当靶标DNA沙门氏菌核酸不存在时,所有发夹结构均能在溶液中稳定存在。

1.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

配制好的18%聚丙烯酰胺凝胶在150V电压下跑胶1.5h,EB(Ethidium bromide)染色10min。分析条带结果。

1.3.3 显色检测反应

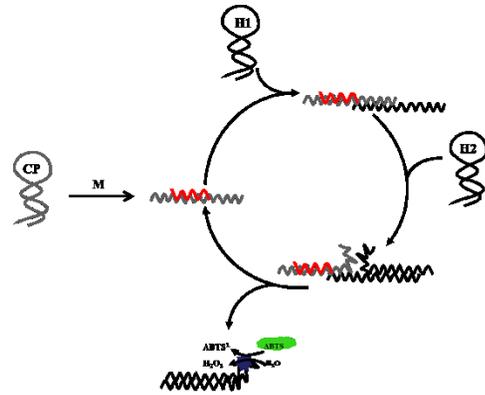
将抓取探针CP、H1、H2分别稀释成 $1\mu\text{mol/L}$ 、 $0.5\mu\text{mol/L}$ 、 $1\mu\text{mol/L}$, 95°C 加热5min室温放置2h以上,使其形成稳定的发夹环结构。靶标M按照所需浓度稀释,混合加入CP、H1和H2室温放置2h,充分反应后冰浴30min,加入Hemin放置1h,再加入用 ddH_2O 稀释好的ABTS和 H_2O_2 。最后肉眼直接观察颜色变化并测量415nm波长下的吸光值。ABTS的最大吸光率在415nm^[16-18]。此吸光率(摩尔吸光系数 $\varepsilon_{415\text{nm}}=3.6\times 10^4\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)作为检测DNAzyme的基本分析波长。

2 结果与分析

2.1 试验原理

本试验原理见图1。设计的捕获探针CP包含两个部分:第一部分碱基互补配对形成茎部结构,使CP稳定地存在于溶液中,第二部分为环状结构,两个部分整体组成完整的功能性发夹环结构。当加入沙门氏菌特异性序列靶标M时,M与CP环状结构碱基互补配对结合形成CP-M,并打开CP茎部结构,形成一段单链碱基,这段单链碱基启动CHA反应。发夹结构H1茎部稳定包被着DNAzyme。在热力学原理作用下,裸露的CP单链碱基打开发夹结构H1,打开的H1继续打开发夹结构H2,H1与H2结合形成H1-H2双链复合物,完整暴露出G-四链体结构并置换出CP-M单链碱基,继续进入下一个循环。每一个检测靶标都能反复启动H1与H2之间的CHA反应,形成大量的H1-H2双链复合物,实现信号放大的目的。H1-H2双链复合物形成的G-四链体,结合Hemin激活DNAzyme活性,在 H_2O_2 的作用下氧化ABTS使其发生颜色的变化,由淡绿色变为深绿色。在检测靶标M存在的条件下,发生颜色的变化,达到

肉眼可视化检测目的。当没有检测靶标M存在时,发夹结构均能在溶液中稳定存在,不能相互结合发生显色反应。这种简便的设计方式能够有



CP抓取探针 M沙门氏菌特异性序列 H1功能性发夹环 H2功能性发夹环

图1 CHA结合DNAzyme检测Salmonella核酸片段反应原理图

效防止未催化的杂交反应而引起假阳性现象。

2.2 可行性分析

2.2.1 检测结果的可行性分析,证明CHA反应成功进行

如图2所示,发夹结构H1、H2、抓取探针CP均可稳定存在于溶液中,H1、H2和抓取探针CP混合物仅存在单独三条条带,由于H1与抓取探针CP长度大致相同,图中只看到明显的两条带存在,并没有新的产物出现。当H1、H2、抓取探针CP和靶标M共同孵育后有一条新的条带产生,为CHA反应的最终产物H1-H2,证明CHA反应成功进行,

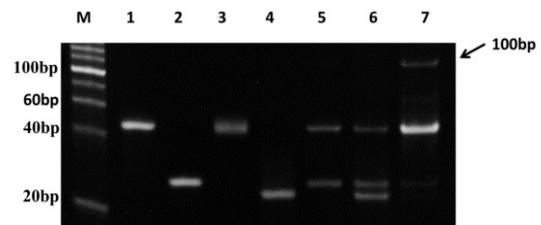


图2 18%聚丙烯酰胺凝胶电泳图

M: DNA maker (20 bp); 1: H1 ($1\mu\text{mol/L}$); 2: H2 ($1\mu\text{mol/L}$); 3: 抓取探针CP ($1\mu\text{mol/L}$); 4: 靶标M ($1\mu\text{mol/L}$); 5: H1、H2和抓取探针CP ($1\mu\text{mol/L}$); 6: H1、H2和靶标M ($1\mu\text{mol/L}$); 7: H1、H2、抓取探针CP和靶标M ($1\mu\text{mol/L}$)

且只有检测靶标M存在时成功启动CHA反应。

2.2.2 可视化检测显色可行性分析

为证明可视化显色反应,只在检测靶标M存在的情况下,启动CHA反应形成DNAzyme结构,从而发生颜色的变化。结果如图3,只有当检测

靶标 M 存在时才能启动 CHA, 形成 G-四链体结构并包裹住 Hemin, 激活 DNAzyme 活性, 使 ABTS 发生显色反应。以上试验结果表明, 只有在靶标 M 存在下, 与探针结合打开探针 H1 和 H2 的发卡结构, 富 G 部分在 K^+ 存在下折叠成 G-四链体, 然后与血红素结合形成复合物, 从而表现出明显的过

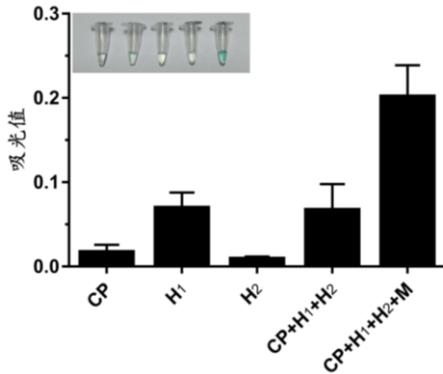


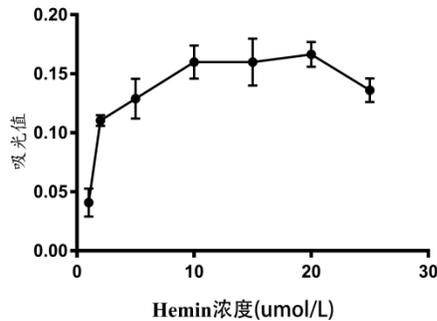
图3 可视化显色结果

氧化物酶活性^[19], 发生显色反应。

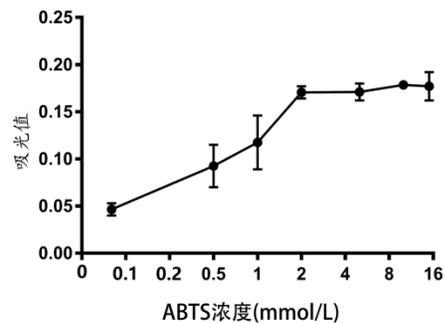
2.3 试验条件的优化

为获得最佳的试验结果, 对 Hemin 浓度、ABTS 浓度、 H_2O_2 含量、缓冲液 pH 等进行优化。分别按浓度梯度 $0 \sim 25 \mu\text{mol/L}$ 稀释 Hemin, $0 \sim 10 \text{mM}$ 稀释 ABTS, 10 倍梯度稀释 H_2O_2 原液, HEPES buffer pH 梯度范围为 $5 \sim 9$ 。显色测量吸光值后记录信号强弱并判断最佳反应条件。如图 4 所示, Hemin 和 ABTS 的浓度分别选择为 $10 \mu\text{mol}$ 和 2mmol/L , H_2O_2 在 10mmol/L 时反应显色最佳。pH 在形成 G-四链体过程具有很大的影响, 这是由于 G-四链体层间的鸟嘌呤之间形成氢键, 从而连接在一起。pH 对氢键有一定的影响。由图 4 可以看出, 当酸性环境 pH 为 5.0 时, 碱性环境 pH 为 8.0 时, 415nm 处的吸收值很弱; pH 为 7.0 时 415nm 处吸收达到最大值, 这可能是由于溶液 pH 影响 H_2O_2 , 所以本试

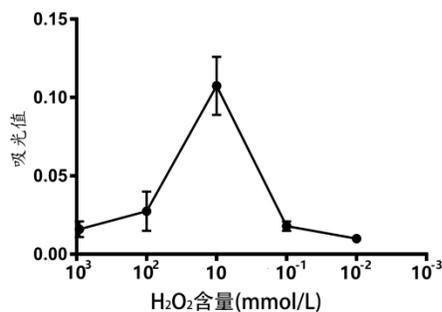
A



B



C



D

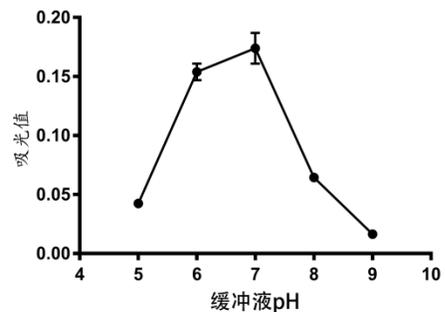


图4 反应条件的优化

验体系选择 pH 为 7.0。

2.4 灵敏性分析

在以上试验筛选出最佳条件下, 对本试验检测方法灵敏度进行分析。配制浓度梯度 $1 \text{pmol/L} \sim 10 \text{nmol/L}$ 靶标 M, 将其与反应系统杂交显色, 最终

获得数据进行分析。所示随着靶标 M 浓度的升高, 吸光值在逐渐加强。结果如图 5 所示, 该方法在检测范围 $10 \text{pmol/L} \sim 100 \text{pmol/L}$ 呈较好的线性关系。 $y=0.03508+0.7922x$, ($r^2=0.923$), 其中 y 表示吸光值, x 表示靶标浓度, r^2 为相关系数。最低检测

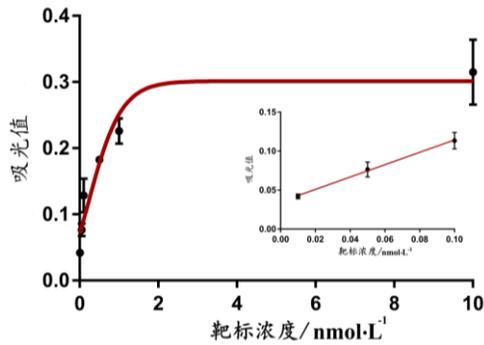


图5 灵敏性的分析

限为 3.9pmol/L。

2.5 特异性分析

对本试验检测方法特异性进行分析,笔者分别考察了不同菌种对沙门氏菌检测的干扰情况。选取与沙门氏菌序列 M 相似度高的菌种序列作为对照组:耶尔森氏鼠疫杆菌(*Yersinia*)、埃希式杆菌(*Escherichia*)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)和克雷白氏杆菌(*Klebsiella*)来检测本试验方法的特异性。如图 6 所示,在相同条件下,只有沙门氏菌 M 能够呈现出明显的颜色变化。说明只有沙门氏菌 M 能够引起探针发夹结构的构型变化,而其他菌种的特异性序列并不能打开发夹结构,发夹结构依然稳定存

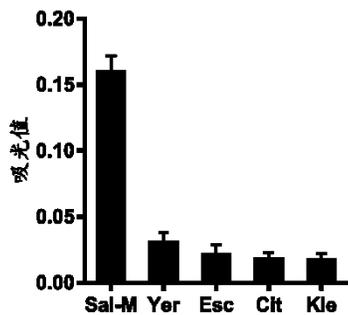


图6 特异性的分析

在,说明本体系具有非常好的特异性。

2.6 模拟样品的检测

表2 PCR与CHA检测结果比对

样品	模拟样品 含菌量 (fmol/L)	PCR 检 出份数	本方法检 出份数
牛奶	10^7	3	3
	10^6	3	3
	10^5	3	3
	10^4	3	3
	10^3	3	3
	10^2	0	3
	10^1	0	2

对人工加入沙门氏菌的标准序列的 24 份牛奶样品进行模拟样本检测,应用本试验建立的检测方法检测人工污染的牛奶中的沙门氏菌核酸,结果显示,采用本检测方法检测牛奶中的沙门氏菌核酸下限要优于 PCR 检测,详见表 2。

3 讨论

本研究成功建立了基于沙门氏菌 16s rRNA 核酸可视化反应,利用 CP 共轭沙门氏菌核酸序列,启动 CHA 反应,激活 DNAzyme 使 ABTS 显色。通过条件的优化和探索,发现 Hemin 和 ABTS 的浓度分别选择为 $10\mu\text{mol/L}$ 和 2mmol/L , H_2O_2 在 10mmol/L 时反应最佳。当 Hemin 和 ABTS 浓度过高时,会增加反应的背景信号,影响准确性。显色结果可以看出,本试验对沙门氏菌具有较好的特异性,只能检测出沙门氏菌的核酸序列,与其他菌种序列没有交叉反应。

本试验将 G-四链体序列固定在发夹结构 H1 茎部,显著降低体系背景信号,同时应用 CP 环将引发链固定在茎部的发夹结构,增加体系的通用性,只需改变此 CP 发夹结构的部分序列就可以实现对不同的目标物质的检测。与其他利用 DNAzyme 的比色方法相比^[20],本体系具有更好通用性,与传统方法 PCR 等相比本体系具有更好的稳定性,无需复杂大型仪器,实现了裸眼可视化直观检测,在食源性致病菌检测方面具有很大的前景。

尽管本试验可视化检测食源性沙门氏菌核酸取得一定的进展,但在研究过程中发现检测中遇到的问题:该检测方法目前只用于沙门氏菌模拟样品的检测,与实际样品的检测还存在一定的距离,需要继续优化试验条件,优化检测参数,争取可以实现沙门氏菌的检测。该检测方法简便、成本低廉、选择性高且无需染料标记,以 DNAzyme 作为信号输出,提供稳定低廉的信号平台,消除对昂贵染料标记的需求。基于以上特点,相信为临床诊断沙门氏菌疾病的常规、快速检测方法提供很大的潜能。

参考文献:

- [1] 王 鑫,闫 磊,曾庆祝.沙门氏菌的检测技术与方法[J].现代食品科技,2007(5):82-85,75.
- [2] 鄢志刚,徐 锋,王 建,等.食源性沙门氏菌快速检测技术的应用研究[J].上海畜牧兽医通讯,2008(1):19-20.
- [3] 李葱葱,王青山,李飞武,等.用实时荧光 PCR 方法定量检测 Bt176 转基因玉米[J].吉林农业科学,2007(5):24-27.

- [4] Brody E N, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents[J]. *J Biotechnol*, 2000, 74(1): 5-13.
- [5] Hardenbol P, Baner J, Jain M, et al. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 673-678.
- [6] Ban C, Chung S, Park D S, et al. Detection of protein-DNA interaction with a DNA probe: distinction between single-strand and double-strand DNA-protein interaction[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(13): e110.
- [7] Wang K, Tang Z, Yang C J, et al. Molecular engineering of DNA: molecular beacons[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(5): 856-870.
- [8] Walker G T, Fraiser M S, Schram J L, et al. Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(7): 1691-1696.
- [9] Yin P, Choi H M, Calvert C R, et al. Programming biomolecular self-assembly pathways[J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 318-322.
- [10] Walker G T, Little M C, Nadeau J G, et al. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(1): 392-396.
- [11] Breaker R R. DNA enzymes[J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(5): 427-431.
- [12] Travascio P, Witting P K, Mauk A G, et al. The peroxidase activity of a heme-DNA oligonucleotide complex: free radical damage to specific guanine bases of the DNA[J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(7): 1337-1348.
- [13] Li B, Ellington A D, Chen X. Rational, modular adaptation of enzyme-free DNA circuits to multiple detection methods[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): e110.
- [14] Tian T, Xiao H, Zhang Z, et al. Sensitive and convenient detection of microRNAs based on cascade amplification by catalytic DNAzymes[J]. *Chemistry*, 2013, 19(1): 92-95.
- [15] Clarridge J E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(4): 840-862.
- [16] Woo P C Y, Lau S K P, Teng J L L, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, 14(10): 908-934.
- [17] Li T, Dong S, Wang E. Enhanced catalytic DNAzyme for label-free colorimetric detection of DNA[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2007, (41): 4209-4211.
- [18] Li T, Li B, Wang E, et al. G-quadruplex-based DNAzyme for sensitive mercury detection with the naked eye[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2009, (24): 3551-3553.
- [19] Li T, Shi L, Wang E, et al. Silver-ion-mediated DNAzyme switch for the ultrasensitive and selective colorimetric detection of aqueous Ag^+ and cysteine[J]. *Chemistry*, 2009, 15(14): 3347-3350.
- [20] Golub E, Freeman R, Niazov A, et al. Hemin/G-quadruplexes as DNAzymes for the fluorescent detection of DNA, aptamer-thrombin complexes, and probing the activity of glucose oxidase [J]. *Analyst*, 2011, 136(21): 4397-4401.
- [21] 胡亚平. 基于 DNAzyme 及 HCR 信号放大的新方法研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2013.

(责任编辑:王 昱)