

基于 DNA 电化学生物传感技术的甘草 提取液中大肠杆菌快检方法研究

赵培文¹, 王海霞^{1,2*}, 别松涛^{1,2}, 邵茜¹, 王春华^{1,2}, 王东恒³, 李正^{1,2,4*}

(1. 天津中医药大学 中药制药工程学院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学 现代中药产业
技术研究院, 天津 300193; 3. 天津中一制药有限公司, 天津 300193;
4. 天津中医药大学 天津市现代中药省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要 该文建立了一种基于 DNA 电化学生物传感技术的甘草提取液中大肠杆菌测试新方法。该研究首先将硫醇基修饰的捕获探针固定在金电极上,之后核酸适配体与捕获探针杂交。当甘草提取液中存在大肠杆菌时,它与适配体结合后,信号探针又与捕获探针结合并在底物中产生电化学信号,运用差分脉冲伏安法对甘草提取液中的大肠杆菌进行测试。实验结果显示,该测定方法线性范围为 $2.7 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^8$ CFU·mL⁻¹,最低检出限为 50 CFU·mL⁻¹,且具有较高的特异性和较好的重现性。在实际样品甘草浸膏的测试中,该方法的测定结果与国标法的计数结果呈现较好的一致性。以上结果显示 DNA 电化学生物传感技术可以用于甘草提取液中大肠杆菌测试,为中药制品的快速菌检提供了新的方法。

关键词 适配体; 电化学传感器; 甘草; 大肠杆菌; 快速菌检

DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.2018.0047

Application of DNA-based electrochemical biosensor in rapid detection of *Escherichia coli* exist in licorice decoction

ZHAO Yu-wen¹, WANG Hai-xia^{1,2*}, BIE Song-tao^{1,2}, SHAO Qian¹, WANG Chun-hua^{1,2}, WANG Dong-heng³, LI Zheng^{1,2,4*}

(1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University

of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Modern Industrial Technology Research

Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

3. Tianjin Zhongyi Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300193, China;

4. Tianjin Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] A new method for detection of *Escherichia coli* exist in licorice decoction was developed by using DNA-based electrochemical biosensor. The thiolated capture probe was immobilized on a gold electrode at first. Then the aptamer for *Escherichia coli* was combined with the capture probe by hybridization. Due to the stronger interaction between the aptamer and the *E. coli*, the aptamer can dissociate from the capture probe in the presence of *E. coli* in licorice decoction. The biotinylated detection probe was hybridized with the single-strand capture probe. As a result, the electrochemical response to *Escherichia coli* can be measured by using differential pulse voltammetric in the presence of α -naphthyl phosphate. The plot of peak current vs. the logarithm of concentration in the range from 2.7×10^2 to 2.7×10^8 CFU·mL⁻¹ displayed a linear relationship with a detection limit of 50 CFU·mL⁻¹. The relative standard deviation of 3 successive scans was 2.5%, 2.1%, 4.6% for 2×10^2 , 2×10^4 , 2×10^6 CFU·mL⁻¹ *E. coli*, respectively. The proposed procedure showed better specificity to *E. coli* in comparison to *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. In the detection of the real extractum glycyrrhizae, the results between the proposed strategy and the GB assay showed high degree of agreement, demonstrating the designed biosensor could be utilized as a powerful tool for microbial examination for traditional Chinese medicine.

[Key words] aptamer; electrochemical biosensor; licorice; *Escherichia coli*; quick sterility test

收稿日期 2017-11-14

基金项目 天津市科委项目(15PTCYSY00030,16ZXHLGX00170);天津市教委科研计划项目(2017KJ133)

通信作者 * 王海霞,助理研究员,E-mail: whxtcm@tjutcm.edu.cn; * 李正,研究员,E-mail: lizheng@tjutcm.edu.cn

大肠杆菌是人和动物肠道中的常居菌,广泛传播于自然环境中,人体感染了可引起腹泻,胆囊炎,膀胱炎等,严重危害人类健康^[1]。因此,大肠杆菌是中药制品微生物限度检查中一种经常需要检测的控制菌。目前,大肠杆菌的检测方法主要有三大类:传统的培养计数法、免疫学检测方法和分子生物学检测方法^[2]。

传统的培养计数法主要有2种,大肠菌群 MPN (most probable number) 计数法和大肠菌群平板计数法^[3]。这2种方法都是将细菌经过分离培养后,在特定的培养基中观察细菌的菌落形态,颜色变化和生化反应。这种检测方法是鉴定和检测大肠杆菌的金标准,但是该方法操作复杂且耗时较长(3~5 d),不适合大批量中药制品的检测。免疫学检测方法中最常用的是酶联免疫吸附技术(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),它是利用抗原与抗体之间的特异性结合,使之产生颜色反应从而实现定性定量分析。这种方法相比较与传统的分离培养方法,简化了操作过程,检测时间缩短到24~48 h,但是这种方法对测试人员的操作水平要求较高,且检测限较高^[4],在含低浓度细菌样品检测中应用受限。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是典型的分子生物学检测方法,它是在体外酶促合成特异 DNA 片段后,经过电泳技术完成对特定序列进行检测的一种方法。这种方法灵敏度高,检测时间短,但是该方法极易出现假阳性结果^[5],也在一定程度上限制了它的应用。

电化学方法由于其灵敏度高、费用低廉、操作简单易行,在分析检测领域应用很广。但是传统的裸电极带来的电沉积现象和高的过电位是分析工作者尽量避免的,修饰电极的方法可以提高分析测定的灵敏度,从而扩大电化学检测的应用范围和提升应用效果。适配体是一类经过指数富集配体系统进化技术,从体外筛选得到的能与蛋白和其他小分子发生特异性结合的单链寡聚核苷酸。适配体具有易合成、易修饰、高稳定性、高亲和性和高特异性等优点,已经作为电极修饰材料在分析测试中获得了比较好的应用效果^[6]。

据文献报道,核酸适配体 L9F 能与大肠杆菌细胞壁上脂多糖发生高选择性结合。丁世家教授课题组利用这一特性,将该种适配体开发成电极

修饰材料,利用与大肠杆菌的特异性选择和高亲和性的结合从而对磷酸缓冲液中的大肠杆菌进行分析检测,获得了比较好的效果^[7]。受此启发,我们将该种电化学修饰技术首次应用于中药液中大肠杆菌的检测,并对该方法的特异性、重现性,实际样品检测进行了考察,均获得比较好的应用效果。

1 材料

1.1 细菌 大肠杆菌 CICC 21531 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;铜绿假单胞菌 BNCC 340634 购自北纳创联生物技术有限公司(BNCC);枯草芽孢杆菌亚种 1.108697.3 购自中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC);金黄色葡萄球菌从天津大学生物技术实验室获得。

1.2 药物与试剂 甘草饮片(批号 1403008),购自河北祁一堂药业有限公司;捕获探针 SH-(CH₂)₆-TTTTTTTTTTTATAGGGGAGCCAACACCA-CATAACT-TCCT,核酸适配体 ATCCGTCACACCT-GCTCTACTGGCCGGCTCAGCATGACTAAGAAGGA-AGTTATGTGG-TGTTGGCTCCCGTAT 和信号探针 Biotin-TTTTTTTTTTTAGGAAGTTATGTGCTGTTGGC TCCCG-TAT 3 条引物均由生工生物(上海)合成;巯基乙醇(MCH)购自天津希恩思生化科技有限公司;链霉菌抗生物素蛋白-碱性磷酸酶(ST-AP)购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;α-萘基磷酸盐(α-NP)由 TCI(上海)化成工业发展有限公司提供;牛血清蛋白(BSA)、Tris 和 LB 培养基由生工生物工程(上海)股份有限公司提供;鲑鱼精 DNA、煌绿乳糖胆盐肉汤(brilliant green lactose bile, BGLB)、无菌 PBS 缓冲液、结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar, VRBA)购自北京索莱宝科技有限公司。清洗剂主要由 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mol·L⁻¹ NaCl, 5.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.05% 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(Tween-20)(pH 7.4)配制。其他试剂均为分析纯,所有溶液均用超纯水配制。

1.3 仪器 CHI660E 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司);电化学实验用三电极系统:φ=3 mm 的金电极为工作电极,铂丝为对电极,银/氯化银电极为参比电极;LR-450F 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);ZWY-240 恒温培养振荡器

(上海智城分析仪器股份有限公司); M37610-33CN 涡旋混合器(Thermo); SW-CJ-HF 超净工作台(苏州净化厂); LS-B 50 L 立式压力蒸汽灭菌器(上海医用核子仪器厂); SB-5200 DTDN 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); H1650R 台式高速冷冻离心机(湘仪); 超纯水仪(PALL, 美国)。

2 方法

2.1 菌种培养与平板计数 取大肠杆菌单个菌落于灭菌后的 LB 液体培养基中, 于 $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的摇床中摇菌 $14\sim 16\text{ h}$, 得细菌混悬液。将细菌混悬液离心 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min) 去除上清液后用无菌水清洗 2 次, 加入适量的无菌 PBS 重新清洗细菌, 然后用无菌 PBS 将细菌梯度稀释到 1×10^{-12} 浓度, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} 浓度的菌液分别涂抹 3 个 VRBA 平板后(每个浓度 3 个, 共 9 个), 静止 20 min 待菌液渗入培养基后倒置放置在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 $22\sim 24\text{ h}$ 。同时, 将涂抹完平板后剩余的菌液样品于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中煮沸 15 min , 自然冷却后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 作为电化学测试样品。之后从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型和菌落, 分别移种于 BGLB 肉汤管内, 培养 $24\sim 48\text{ h}$, 观察产气情况, 凡 BGLB 产气者, 即为大肠杆菌阳性, 对大肠杆菌进行平板计数^[3]。

2.2 甘草水提物制备与含菌甘草水提物样品制备 称取甘草药材 20 g , 加入 8 倍量的纯净水进行回流提取, 2 h 后将甘草的煎煮液用 200 目滤网过滤。滤液再重复煎煮 2 次, 合并 3 次煎煮液, 冷却后离心 ($6\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min) 取上清液, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温高压灭菌 20 min , 冷却后作为实验样品, 经测量其固含量为 4% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

将一定浓度大肠杆菌加入甘草提取液中并用甘草水提液将细菌连续稀释到 1×10^{-8} 浓度, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 适宜梯度的含菌甘草提取液分别涂抹 3 个平板, 将平板放置 $20\sim 30\text{ min}$, 待菌液完全渗透于培养基中再将平板倒置, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后计数, 同时将不同含菌量的甘草提取液在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的沸水中煮沸 10 min , 冷却后保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 待测。

2.3 甘草抑菌作用实验 本部分运用纸片法^[4]进行甘草提取液的抑菌实验。首先将 2.2 项中得到的

固含量为 4% 的甘草提取液进行适度稀释与浓缩, 制成固含量为 2% , 8% , 20% 的甘草水提液。再将定性滤纸用打孔器制成直径为 6 mm 的圆形纸片, 放入干燥的玻璃空瓶中灭菌。分别吸取 2 mL 上述 4 种浓度的甘草水提液、青霉素与链霉素混合液(阳性对照)^[5] 和无菌生理盐水(阴性对照) 置于灭菌的 EP 管中, 再向每个 EP 管中加入 5 片灭菌的干燥滤纸片, 浸泡 30 min 后将滤纸片取出于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中干燥, 得含药纸片。取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 一定浓度的菌悬液于营养琼脂平面培养基上涂布均匀, 室温放置 15 min , 使培养基充分吸收菌液, 每个培养基内等距贴 6 个含药滤纸片(包括阴、阳性对照), 重复 3 个平板, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后观察抑菌圈大小, 取平均值。

2.4 DNA 电化学生物传感器的制备及测试应用

将金电极依次用 0.3 mm 与 0.05 mm 的铝粉抛光后, 用超纯水超声处理 5 min 后再用食人鱼溶液 ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{ }3:1$) 超声处理 5 min , 最后再用超纯水超声处理 5 min , 室温下干燥。处理干净的金电极参照文献^[6] 中的方法进行电化学修饰, 得到 DNA 电化学生物传感器。同时, 在无菌条件下将含一定浓度大肠杆菌的甘草溶液进行 10 倍梯度稀释 ($2.7\times 10^2\sim 2.7\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$), 运用制备得到的电化学传感器对含不同浓度大肠杆菌的甘草溶液中的大肠杆菌进行差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV) 测试, 同时对各个梯度的含菌甘草液进行平板计数法计数。

2.5 特异性及重现性考察实验 为了考察本实验方法的特异性, 在相同的测试条件下, 选取含有与大肠杆菌等量菌浓的铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的甘草提取液作为对照, 进行电化学检测, 以来考察该 DNA 电化学修饰电极的特异性。

为了评估本方法的重现性, 选取 3 种含有 2×10^2 , 2×10^4 , $2\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的大肠杆菌的甘草提取液, 每组分别测定 3 次, 以来考察本方法的重现性。

2.6 实际样本检测 为了检验本方法的实用性, 我们选取了 3 份已经染菌的甘草浸膏, 将其稀释至固含量为 4% , 并于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温高压灭菌 20 min 后, 应用本文的方法对其中的大肠杆菌进行检测。与此同

时,将此样本应用传统的平板计数法进行检测,并与电化学测定结果进行比较。

3 结果与讨论

3.1 测试原理 本文的测试原理基于大肠杆菌适配体对大肠杆菌细胞壁上脂多糖的特异性选择和高亲和性的结合^[7]。首先,硫醇基修饰的捕获探针通过金-硫共价键固定在金电极表面,然后,与捕获探针具有互补结构的核酸适配体通过杂交作用和捕获探针形成双链结构,但当大肠杆菌存在时,由于大肠杆菌与核酸适配体高的结合能力强于与捕获探针的结合力,所以大肠杆菌会把核酸适配体从修饰电极上争夺下来,之后再加入生物素化的信号探针,此信号探针又会与单链的捕获探针结合进而引入到修饰电极上,当加入 ST-AP 时,生物素化的信号探针识别到 ST-AP 并催化底物 α -NP 的水解,进而产生电化学信号。反之,当没有大肠杆菌存在时,生物素化的信号探针不能被引入到修饰电极表面,所以也产生不了电化学信号。

3.2 甘草抑菌作用实验结果 固含量为 2% (4 号), 4% (3 号), 8% (5 号), 20% (2 号) 的甘草水提液,青霉素与链霉素混合液(阳性对照,6 号)与无菌生理盐水(空白阴性对照,1 号)的抑菌效果见图 1。从图中可以看出,只有抗生素组(6 号)有抑菌活性,抑菌圈直径为 (12.4 ± 0.3) mm,而不同浓度的甘草提取液均无抑菌活性,说明甘草提取液不会对大肠杆菌测试造成干扰。

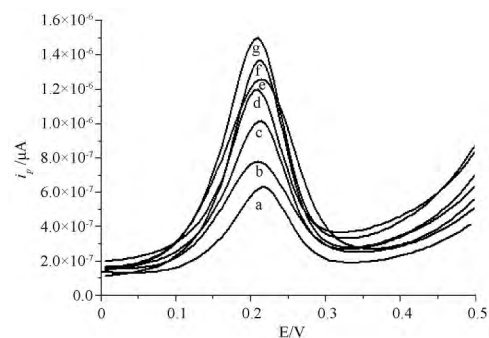


1. 空白; 2. 固含量为 20% 的甘草水提液; 3. 固含量为 4% 的甘草水提液; 4. 固含量为 2% 的甘草水提液; 5. 固含量为 8% 的甘草水提液; 6. 阳性对照。

图 1 不同含药滤纸片的抑菌效果

Fig. 1 The antibacterial effect of filter paper immersed in different liquid

3.3 甘草提取液中大肠杆菌测试 参考文献^[7]的方法,对浓度范围为 $2.7 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^8$ CFU·mL⁻¹ 的含大肠杆菌的甘草提取液进行检测,DPV 测定结果和线性对照图见图 2,3。从图 2 可以看出,电流信号随着大肠杆菌浓度的增大而逐渐升高。电流信号在 $2.7 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^8$ CFU·mL⁻¹ 范围内线性关系良好,线性回归方程为 $i_p (\mu A) = 1.25 \times 10^{-7} n + 2.26 \times 10^{-7}$ ($R^2 = 0.99$, 图 3),最低检出限为 50 CFU·mL⁻¹。相比较传统耗时的平板计数法,本方法的测试时间仅为 3.5 h,大大缩减了检测时间,提高了检测效率。



a. 2.7×10^2 CFU·mL⁻¹; b. 2.7×10^3 CFU·mL⁻¹; c. 2.7×10^4 CFU·mL⁻¹; d. 2.7×10^5 CFU·mL⁻¹; e. 2.7×10^6 CFU·mL⁻¹; f. 2.7×10^7 CFU·mL⁻¹; g. 2.7×10^8 CFU·mL⁻¹。

图 2 不同浓度的大肠杆菌的 DPV 曲线

Fig. 2 DPV responses of *Escherichia coli* at different concentrations

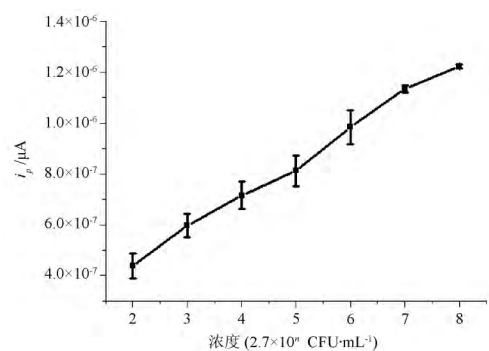


图 3 峰电流与大肠杆菌浓度对数关系

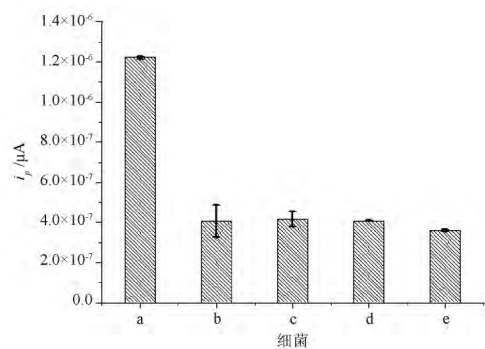
Fig. 3 Plot of peak current vs the log value of *Escherichia coli* concentration

此外,为了比较本实验方法与传统平板计数法的统计学差异,运用独立样本 t 检验法对 3 种浓度梯度的大肠杆菌进行比较,测试结果见表 1。从表 1 可以看出,3 种浓度梯度组中的 P 均远远大于 0.1,说明本方法与平板计数法测试结果无显著性差异。

表 1 2 种测定方法的统计学结果($n=5$)
Table 1 The statistic analysis measured by two methods ($n=5$)

大肠杆菌浓度梯度 /CFU·mL ⁻¹	P
10 ²	0.218
10 ⁴	0.562
10 ⁶	0.457

3.4 特异性及重复性试验 为了考察该方法测试甘草提取液中大肠杆菌的特异性,在相同的实验条件下还对含铜绿假单胞菌(b)、金黄色葡萄球菌(c)和枯草芽孢杆菌(d)的甘草提取液进行了测试,测试结果见图 4。从图中可以看出,这 3 种菌的电化学响应信号与空白组(e)信号基本一致,且都小于大肠杆菌(a)的电化学响应信号。据此可以说明本方法可以特异性的识别及检测甘草提取液中的大肠杆菌,具有一定的应用价值。



a. 大肠杆菌; b. 铜绿假单胞菌; c. 金黄色葡萄球菌; d. 枯草芽孢杆菌; e. 空白。

图 4 不同菌种的电化学信号响应图

Fig. 4 Electrochemical responses of different bacteria

选取 3 种分别含有 2×10^2 , 2×10^4 , 2×10^6 CFU · mL⁻¹ 的大肠杆菌的甘草提取液进行重复性考察,

每组分别测定 3 次, RSD 分别为 2.5%, 2.1%, 4.6%, 表明此方法具有良好的重复性。

3.5 实际样本检测 运用本方法和平板计数法测定得到的 3 个染菌甘草浸膏的大肠杆菌浓度值,见表 2。在每种浓度梯度下,2 种测试方法结果都高度吻合,但相比于平板计数法,本方法的测定时间仅为 3.5 h,不仅大大缩短了分析检测时间,且保证了较高的灵敏度和较低的检出限,极大地提高了实际应用率。

表 2 2 种方法测定结果对比
Table 2 The comparison results measured by two methods
CFU·mL⁻¹

No.	平板计数法	本方法
1	1.55×10^3	1.35×10^3
2	1.55×10^4	1.35×10^4
3	1.55×10^5	1.07×10^5

4 结论

本实验将 DNA 电化学生物传感技术成功用于中药提取液中大肠杆菌的检测。实验结果表明本方法具有较高的灵敏度和特异性,且检测限较低,重现性良好,同时,本方法可以用于实际甘草浸膏中大肠杆菌的检测,检测结果与国标法测定值高度吻合,并且极大地缩短了检测时间,方便了中药制品的菌种检测。本文探索了适配体-电化学生物传感技术在中药提取液中微生物快速检测方面的应用,取得了较为满意的结果。由于适配体具有靶标分子广、亲和性高的特点,适配体-电化学生物传感技术在中药制品安全性检测领域具有广泛适用性。只要选取与目标微生物有高特异性结合能力的适配体探针,再结合恰当的目标电信号分子,就可以运用电化学检测技术对中药制品中的微生物进行快速检测。当然,目前该方法仍有许多不足,如适配体-电化学传感器制作工艺复杂,如何进一步简化实验操作且实现高度自动化是亟待解决的;另外,由于中药制品中微生物成分复杂,且药典中要求的微生物限度检查往往不是针对单一菌种,因此,要想将此类快检技术应用于中药制品安全性控制中,必须开发能同时检测多种微生物的适配体传感器,本课题组正在就这些问题进一步研究探索。

参考文献

- [1] 王燕,谢贵林,杜琳. 大肠杆菌 O157: H7 感染流行概况 [J]. 微生物学免疫学进展,2008,36 (1):51.
- [2] 卫昱君,王紫婷,徐媛聪,等. 致病性大肠杆菌现状分析及检测技术研究进展 [J]. 生物技术通报,2016,32 (11):80.
- [3] 食品安全国家标准食品微生物学检验大肠杆菌菌群计数 [S]. GB 4789. 2010.
- [4] Ghadeer ARY Suaifan, Sahar Alhogail, Mohammed Zourob. Paper-based magnetic nanoparticle-peptide probe for rapid and quantitative colorimetric detection of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Biosens Bioelectron,2017,92 (15):702.
- [5] Johnson J R. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection [J]. J Microbiol Methods,2000,41 (3):201.
- [6] 程欲晓. 大肠杆菌快速检测的电化学传感技术及仪器研究 [D]. 上海: 华东师范大学,2009.
- [7] Luo Caihui, Lei Yaning, Yan Li, et al. A rapid and sensitive aptamer-based electrochemical biosensor for direct detection of *Escherichia coli* O111 [J]. Electroanalysis,2012,24 (5):1186.
- [8] 张平平,刘金福,王昌禄,等. 苦瓜提取物的抑菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发,2008,20 (4):721.
- [9] 范光伟,徐建国. 黄连素和 6 种抗生素对大肠杆菌 O157: H7 中国分离株产生志贺毒素的影响 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2002,22 (2):102.

责任编辑 丁广治