

分类号

密级

江南大学

# 硕 士 学 位 论 文

题 目： 链球菌适配体制备及应用

英文并列题目： Selection and application of aptamers for  
*Streptococcus*

研 究 生： 王鑫

专 业： 营养与食品卫生学

研 究 方 向： 食品安全分析检测

导 师： 王周平 教授

指导小组成员：

学位授予日期：

答辩委员会主席：张灏 教授

江 南 大 学

地址：无锡市蠡湖大道 1800 号

二〇一三年四月

## 独 创 性 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得江南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

签 名：\_\_\_\_\_ 日 期：\_\_\_\_\_

## 关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解江南大学有关保留、使用学位论文的规定：江南大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签 名：\_\_\_\_\_ 导师签名：\_\_\_\_\_

日 期：\_\_\_\_\_

## 摘 要

指数富集配体的系统进化技术 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX), 是 90 年代初研制成功的一种新的组合化学技术。适配子 (aptamer 大写) 实质是利用 SELEX 技术, 从体外人工合成的随机寡核苷酸 (ssDNA) 文库中经过数轮反复筛选, 得到的与靶分子具有极高特异性和亲和力的一段寡核苷酸序列。目前, 已报道的食源性致病菌的检测方法多种多样, 但各有其优缺点。本研究通过细胞 SELEX 技术 (Cell-SELEX) 筛选, 得到了两种致病菌 (化脓链球菌和无乳链球菌) 的寡核苷酸适配子, 并且建立了基于寡核苷酸适配子识别的新型检测技术。

本文首先体外合成一个 80nt, 中间 40 个随机碱基序列的 ssDNA 文库, 以化脓链球菌为靶标, 通过 Cell-SELEX 技术及反筛 SELEX 技术 (counter SELEX) 进行 12 轮重复筛选, 将筛选得到的 DNA 序列进行克隆、测序。运用 DNAMAN 软件、RNAstructure 软件对其进行一级结构及二级结构分析; 通过羧基荧光素 (FAM) 标记筛选得到的 ssDNA 适配子, 运用流式细胞术考察了适配子与目标化脓链球菌适配子结合的亲和力和特异性, 筛选得到两条亲和力高、特异性强的适配子, 其解离常数分别为  $44.25 \pm 5.203$  nmol/L、 $53.89 \pm 7.586$  nmol/L, 与化脓链球菌的结合率为 77.05%、72.65%。

同时, 体外合成另一个相同长度、不同引物的寡核苷酸文库, 以无乳链球菌为靶标, 采用与化脓链球菌类似的方法得到了可以与无乳链球菌特异结合的 7 条寡核苷酸适配子, 对其进行 FAM 荧光标记, 通过流式细胞术从中筛选得到两条高亲和力、高特异性适配子, 与无乳链球菌的结合率分别为 77.33%、80.95%, 解离常数为  $78.27 \pm 12.85$  nmol/L,  $49.88 \pm 6.871$  nmol/L。

随后, 本研究以磁珠-适配子复合物为捕获探针, 以 FAM 荧光素标记的适配子为显示探针, 成功构建了灵敏、快捷的食源性致病菌荧光检测新方法。在实验优化条件下, 化脓链球菌菌落个数在 70-7100 cfu/mL 范围内时, 与荧光强度呈良好线性关系, 检出限为 70 cfu/mL, 牛奶样品中的加标回收率为 83.9%-103.3%; 无乳链球菌菌落个数在 50-5200 cfu/mL 范围内时, 与荧光强度呈良好线性关系, 检出限为 50 cfu/mL, 牛奶样品中的加标回收率为 95.2%-102.5%。

**关键词:** 指数富集配体的系统进化技术; 寡核苷酸适配子; 化脓链球菌; 无乳链球菌; 磁性纳米材料

## Abstract

SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), is a new combinatorial chemistry technique which was invented successfully in the 90s. Aptamers are single-stranded oligonucleotides that bind to target molecules with high affinity and specificity, which is selected by repeated rounds from a synthetic random ssDNA pool by SELEX. At present, it is reported that various detection methods have been developed for food-borne pathogens, but each has their own advantages and disadvantages. The study gained the aptamers of common pathogens (*Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*) by Cell-SELEX respectively, and developed novel methods for pathogens detection based on aptamer recognition.

Firstly, a 80-nt random single-stranded DNA pool containing 40 random sequences was subjected to repeated twelve rounds of selection against *Streptococcus pyogenes* by Cell-SELEX, negative SELEX and counter SELEX. Then, the selected oligonucleotides were cloned and sequenced. Analyzed the primary and secondary structures of the aptamers utilizing DNAMAN and RNA structure software. FAM-labeling aptamers were used for analyzing binding affinity and specificity between the aptamers and *Streptococcus pyogenes* by Flow Cytometry Facility. There are two high affinity, specificity of aptamers selected for *Streptococcus pyogenes*. The dissociation constant is  $44.25 \pm 5.203$  nmol/L,  $53.89 \pm 7.586$  nmol/L respectively, and the average percent gated fluorescence intensity is 77.05%, 72.65%.

Meanwhile, we also targeted *Streptococcus agalactiae* and synthesized a single-stranded DNA pool of the same length, different primers. Similar to selection and detection method of *Streptococcus pyogenes*, we gained seven aptamers binding to *Streptococcus agalactiae*. Labeling them with FAM, we obtained two high affinity, high specificity aptamers by flow cytometry. The average percent gated fluorescence intensity is 77.33%, 80.95% respectively, and the dissociation constant is  $78.27 \pm 12.85$  nmol/L,  $49.88 \pm 6.871$  nmol/L.

Then, a sensitive and rapid fluorescence method of detecting foodborne pathogens is set up, which is based upon magnetic beads-aptamers complex as capture probe, FAM-aptamers as fluorescence probe. The results showed that under the selected conditions, the colony forming units of *Streptococcus pyogenes* were linear to the fluorescent intensity ranged from 70 to 7100 cfu/mL with a detection limit 70 cfu/mL. The standard recoveries were 83.9%-103.3% for milk samples. The colony forming units of *Streptococcus agalactiae* were linear to the fluorescent intensity ranged from 50 to 5200 cfu/mL with a detection limit 50 cfu/mL. The standard recoveries were 91.1%-99.3% for milk samples.

**Keywords:** Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX); aptamer; *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus agalactiae*; magnetic nanoparticles

# 目 录

独 创 性 声 明 .....	II
摘 要 .....	III
目 录 .....	V
1 引言 .....	1
1.1 食源性致病菌检测技术的发展 .....	1
1.1.1 食源性疾病的流行现状及检测意义 .....	1
1.1.2 食源性致病菌检测技术的研究概况 .....	2
1.2 核酸适配子 SELEX 筛选技术研究进展 .....	6
1.2.1 SELEX 技术简介 .....	6
1.2.2 适配体的特点 .....	6
1.2.3 SELEX 技术研究进展 .....	7
1.3 课题的立题意义与内容 .....	9
1.3.1 本课题的立题意义 .....	9
1.3.2 本课题的研究内容 .....	10
2 实验材料与方法 .....	11
2.1 材料与主要试剂 .....	11
2.1.1 随机单链 DNA(ssDNA)文库及其引物 DNA 序列的设计与合成 .....	11
2.1.2 菌株与培养基 .....	11
2.1.3 主要试剂 .....	11
2.2 主要仪器 .....	12
2.3 实验原理 .....	12
2.3.1 SELEX 筛选原理 .....	12
2.3.2 生物素化适配子与氨基化磁珠连接原理 .....	13
2.3.3 基于适配子检测化脓链球菌、无乳链球菌方法的原理 .....	14
2.4 实验方法 .....	14

2.4.1 化脓链球菌、无乳链球菌的 SELEX 筛选.....	14
2.4.2 化脓链球菌及无乳链球菌寡核苷酸适配子的克隆测序及分析 .....	16
2.4.3 磁性纳米材料的制备与修饰 .....	17
2.4.4 基于磁珠核酸适配子的化脓链球菌、无乳链球菌的检测方法 .....	18
3 结果与讨论 .....	20
3.1 化脓链球菌、无乳链球菌寡核苷酸适配子的筛选研究 .....	20
3.1.1 随机单链 DNA Seq1 及 Seq2 的 PCR 扩增条件优化 .....	20
3.1.2 PCR 产物制备单链的条件优化.....	21
3.1.3 筛选轮数的优化 .....	23
3.1.4 化脓链球菌、无乳链球菌 SELEX 筛选每轮 PCR 产物电泳结果 .....	23
3.2 筛选得到化脓链球菌、无乳链球菌适配子的测序结果及分析 .....	24
3.2.1 化脓链球菌寡核苷酸适配子的一级结构分析及二级结构图 .....	24
3.2.2 无乳链球菌寡核苷酸适配子的一级结构分析及二级结构图 .....	25
3.2.3 化脓链球菌寡核苷酸适配子的特异性分析 .....	28
Fig. 3-13 Specificity of <i>Streptococcus pyogenes</i> aptamers .....	29
3.2.4 无乳链球菌寡核苷酸适配子的特异性分析 .....	29
Fig. 3-14 Specificity of <i>Streptococcus agalactiae</i> aptamers .....	30
3.2.5 化脓链球菌寡核苷酸适配子亲和力分析结果 .....	30
3.2.6 化脓链球菌寡核苷酸适配子亲和力分析结果 .....	31
3.2.7 筛选得出化脓链球菌、无乳链球菌适配子序列 .....	33
3.3 基于寡核苷酸适配子的化脓链球菌、无乳链球菌检测探针的制备 .....	34
3.3.1 氨基化磁珠的制备与表征 .....	34
3.3.2 磁珠与链霉亲和素的结合及表征 .....	35
3.3.3 包被亲和素浓度的优化 .....	36
3.3.4 亲和素包被磁珠时间的优化 .....	37
3.3.5 包被亲和素的磁珠同生物素化适配子的连接及表征 .....	37
3.3.6 生物素化适配子连接磁珠的条件优化 .....	38
3.4 化脓链球菌、无乳链球菌寡核苷酸适配子检测方法的建立 .....	39

3.4.1 检测化脓链球菌、无乳链球菌方法的线性范围和检出限 .....	39
3.4.2 牛奶样品中化脓链球菌、无乳链球菌的检测 .....	40
主要结论与展望 .....	42
致 谢 .....	43
参考文献 .....	44
附 录: 作者在攻读硕士学位期间发表的论文 .....	50





---

# 1 引言

## 1.1 食源性致病菌检测技术的发展

### 1.1.1 食源性疾病的流行现状及检测意义

食源性疾病，又称食物中毒，是指通过摄食而进入人体的有害有毒物质（包括生物性病原体）等引起的急性或亚急性的中毒性疾病或者感染性疾病<sup>[1]</sup>。其主要的病原因子包括：真菌毒素；寄生虫和原虫；细菌及其毒素；病毒和立克次体；有毒动植物；寄生虫和原虫；化学污染物以及某些尚未明确的病原因子<sup>[2]</sup>。各类疾病的总发病率中，食源性疾病的发病率居前列，是当前世界上最突出的卫生问题。

近几年，随着自然环境的变化，社会经济的发展，人民生活水平的提高以及食品贸易全球化进程的日益加快，食品安全健康问题越来越受到人们的广泛关注。食品安全方面的突发事件、恶性病例频频发生，而食源性疾病的发病率在最近 10 年来呈现上升的走势。据统计，发达国家中，每年约有 30% 的人患上食源性疾病，而发展中国家的发病情况更加严重<sup>[3]</sup>。1996 年于日本发生的由大肠杆菌 O157:H7 引发的食源性疾病，引起了世界上规模最大的食物中毒事件<sup>[4]</sup>。根据其疾病预防控制中心报道，作为食品供应最安全国家之一的美国，食源性疾病仍然是很严峻的健康问题，仅 1999 年的食源性疾病就有 7600 万例<sup>[5]</sup>。其中 50%-60% 是由微生物因素造成的，1%-2% 是由化学性物质引起的，而中国疾病预防控制中心统计，每年食源性发病中，45%-55% 是由微生物因素造成的，化学性因素为 30%-40%<sup>[6]</sup>。经统计，全球每年 5 岁以下的儿童，因腹泻引起的病例就高达 15 亿，死亡病例约为 300 万，由致病性微生物引发的饮用水和食品造成的病例占 70%<sup>[7]</sup>，可见，食物中毒的最主要诱因是微生物因素。

链球菌属 (*Streptococcus*) 属于厚壁菌门的一个属，其触酶试验阴性，呈链状排列，为革兰氏阳性球状菌。链球菌属种类繁多，当前临床上仍沿用 [兰斯菲尔德分类法](#) (Lancefield classification) 进行分群<sup>[8]</sup>，根据其抗原构造不同分为 A、B、C、D、F、G 等 18 个群，又因表面抗原的不同，分成若干亚群，对人类致病性最强的绝大多数属于 A 族链球菌，是人类微生物感染中最重要的致病菌之一。

A 族链球菌 (Group A *Streptococcus*, GAS)，又称化脓链球菌，是一种革兰氏阳性致病菌，根据外界环境可以产生多种毒素，能引发一系列疾病，包括急性风湿热、链球菌性咽炎、坏死性筋膜炎、猩红热、脓包病等，严重者可引起中毒性休克综合症 (STSS)、全身侵袭性感染和心内膜炎，对人类的健康存在重大威胁<sup>[9-10]</sup>。其中，化脓链球菌最常见于喉咙、皮肤拭子和伤口处，在儿童细菌性咽炎的病原菌中列首位，研究报道表明，在美国其感染率约为 15%-30%，成人咽炎感染率为 5%-10%<sup>[11]</sup>，而 Kim S 等人报道仅 2002 年韩国门诊患咽炎儿童中，化脓链球菌培养的阳性率高达 50.8%<sup>[12]</sup>。从上世纪 80 年代开始，在全球的范围内，化脓链球菌感染呈现大幅上升的趋势。

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)，又称 B 族链球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS) 是引发乳腺炎的病原菌，常存在于乳牛的皮肤、乳头及乳房内，通过挤乳机械、

挤乳人员的手或蝇类的机械携带而传播。无乳链球菌是引发新生儿细菌性脑膜炎和孕妇产褥期脓毒血症的重要原因。这种革兰氏阳性菌对成人也能造成影响，尤其是老人与抵抗力弱的个体<sup>[13]</sup>。无乳链球菌本身为一种条件性致病菌，寄生在 10%~30%健康成人的肠胃及泌尿生殖系统内<sup>[14]</sup>，可引起菌血症、皮肤和软组织感染、心内膜炎及骨髓炎等。每 1000 名新生儿中就有 0.2~4 例可能被无乳链球菌引发疾病，在医学界被认为是一种全球性的健康威胁<sup>[15]</sup>。当分娩时，新生儿易从母体内获得，尽管使用了分娩期预防性抗生素（Intrapartum Antimicrobial Prophylaxis, IAP）来预防传播，但 GBS 仍然会残留导致新生儿细菌性脑膜炎，常见于欧洲、亚洲和美国地区<sup>[16]</sup>。幸存的新生儿易发展为终身神经性后遗症，可能造成听力障碍和智力缺陷<sup>[17]</sup>。

食品是人类赖以生存的物质基础，而其安全性，更直接关系到环境安全和人类健康<sup>[18]</sup>。食品安全已成为当今世界性公共卫生热点，然而目前针对食源性致病菌的相关控制问题，我国由于还缺少先进有效的检测技术，更缺乏生物及化学性危害监测、暴露评估和定量危险性评估的有关数据，因此，对食源性致病菌的控制举步维艰。虽然大多数致病菌在食品中含量极少，但危害严重，所以在食品的生产、加工、销售包括储存等每一步都需要强有力的监控检查。从全世界及我国当前的食品安全情况和亟待解决的问题出发，针对食源性致病菌研究出简单快速、识别性强的检测方法，从而达到对食源性疾病的有效控制并防止其传播<sup>[19]</sup>。

### 1.1.2 食源性致病菌检测技术的研究概况

有效预防和控制食源性疾病的关键核心在于如何快速灵敏并兼具特异性检测食源性致病菌，当前临床用药治疗的突出难题是出现食物中毒反应时，怎样高效选择检测食源性致病菌的技术以达到对食源性致病菌的快速识别。对于传统的检测微生物方法而言，最大的不足之处在于耗时较长，难以满足食品生产厂家，尤其是出口厂家检测期较短的需求，同时常规检测的样品处理数量较少，不能同时检测多个样品。所以快速检测在食品安全监察保障工作中具有越来越重要的意义。随着科技的进步，各类先进的仪器与高效的试剂发展迅猛，在包括食品安全、临床医学、工业科技、环境控制等诸多领域中都发挥着举足轻重的作用，应用十分广泛<sup>[20]</sup>。目前，国内外学者已经进行了大量的研究，基于抗体和核酸的检测方法不断取得进展，但各种方法都有各自的优势和不足。目前，食品中致病菌的检测技术主要包含以下三大类：

#### （1）传统检测食源性致病菌的方法

常规检测方法是采用国标 GB/T 4789-2003 中的程序，根据微生物的不同的生理生化特征，经过培养、选择性平板分离、观察形态、生化鉴定以及血清学分型等一系列步骤来对样品中细菌的数量等进行定性、定量测定。该方法因其检测符合率及结果稳定率较高，而被认为是食品致病菌检测的官方方法。美国农业安全与检验部门就用这种方法来检测禽类、肉类产品中的单核细胞增生李斯特菌<sup>[21]</sup>。但这种常规的方法过程工作量大，检测周期长，一般需要 4-7 天，而且灵敏度偏低，特异性不高，较易发生错检和漏检，无法实现食品致病菌的现场快速检测<sup>[22]</sup>。

#### （2）以免疫学反应为基础的检测技术

---

利用免疫学进行检测的方法是通过高度专一的抗原-抗体反应，再通过免疫放大技术来鉴别细菌。根据检测技术的不同可分为酶联免疫吸附、荧光免疫反应、胶体金免疫技术、免疫磁性材料分离技术、免疫印迹技术及抗血清凝集反应等检测方法，基本都是针对致病菌所产生的特异性分泌物来进行抗原-抗体反应。免疫学方法属于超微量分析方法，虽然操作简单、特异性强、样品处理量大<sup>[23-25]</sup>，但制备抗体难度大、成本高、周期长，因而很难在短时间内得到检测结果。

#### ①酶联免疫法（ELISA）

酶联免疫法是将抗原或抗体与酶，通过交联剂相结合，利用显色进行定位和定量分析的方法，其检测灵敏度高、特异性较强、样品的处理量大。ELISA 方法的应用可追溯至上世纪 70 年代（1977 年），Kryinski、Heimsch 等人<sup>[19]</sup>首次应用此法对食品中的沙门氏菌进行检测，自此 ELISA 方法在食源性致病菌的检测技术中的广泛普及；随后在上世纪 80 年代，Paadhye 等人<sup>[19]</sup>将单克隆或多克隆抗体的 ELISA 方法应用于食品中大肠杆菌的检测并成功检测出大肠杆菌 O157:H7；后期，文其乙等人通过应用单克隆抗体 CB8 和 DE7 建立了直接 ELISA 方法检测沙门氏菌。不可否认，ELISA 方法也存在诸多不足，如对多种成分难以同时进行分析、对试剂的选择性较高、制备抗体用时较长，与结构类似的化合物极有可能发生交叉反应<sup>[26]</sup>。

#### ②免疫荧光技术（IFT）

免疫荧光技术是免疫标记技术中发展最早的一种。其主要工作原理是在抗原或抗体上标记荧光素，当特异性结合相对应的抗原或抗体后，利用荧光显微镜观察具有荧光反应的细胞，进行定位并利用定量技术来测定含量；此方法已对大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌等进行快速检测<sup>[27]</sup>；王军等人<sup>[28]</sup>利用间接抗体免疫技术成功检测了大黄鱼病原溶藻弧菌。免疫荧光法将血清学及荧光色素技术集为一体，具有特异性强、敏感性高等优点，但其也存在许多缺点，如结果假阳性高，操作起来步骤繁琐，可能无法客观评价实验结果等<sup>[29]</sup>。

#### ③免疫胶体金技术（Immune colloidal gold technique）

利用胶体金材料标记抗体，其核心技术在于将胶体金材料作为可视化探针，于胶体金颗粒的表面包被已知的抗原或者抗体。当样品加入到体系后，样品中的抗体或抗原通过毛细管作用或者渗滤作用，最终结合包被在膜表面的抗体或者抗原，利用胶体金纳米材料所具有的特性，来对目标进行检测，抗原含量与显色程度成正比。其特点是操作简单、快速、易于判读，而且灵敏度及特异性均较高。Faulk、Taytor 等人将胶体金引入免疫化学方法，将胶体金与沙门氏菌抗体相结合，使用直接免疫细胞化学技术成功检测沙门氏菌的表面抗原。进入上世界 90 年代，此法已在生物医学领域得到更加广泛的应用，如临床结核杆菌、沙门氏菌等。胶体金相比于其他标记物更灵敏，而且制备起来较容易，应用范围相当广泛，无需大型操作仪器，在许多高级操作的使用及分析都没有限制<sup>[30]</sup>。

#### ④免疫磁分离技术（Immunomagnetic beads technology, IMB）

新型检测方法中，将纳米级材料与免疫技术相结合已成为一种研究趋势，越来越广泛的渗透于各个技术层面。其本质是抗原-抗体的特异结合，主要利用了磁性材料这一

---

易于富集和分离的纳米级载体，他的纯化简单而迅速，只需通过外加磁场即可实现，并成功应用于实际样品的检测。此法代替了常规的选择性培养过程，已经成功应用于细菌和病毒的检测<sup>[31]</sup>，可以有效的从食品中分离目标物质。Favrina 等人使用免疫磁珠-噬菌体法分离检测脱脂乳、牛肉等样品中的大肠杆菌 O157:H7 和沙门氏菌，其检测结果快速并且最低检测限可达 2 cfu/g。免疫磁分离技术通常与 PCR 方法共同使用，首先对样品进行纯化洗涤操作，去掉其余影响因素，同时避免基质对结果的假阳性，以免造成实验误差。

#### ⑤免疫印迹技术(Western blotting)

免疫印迹法具有分析容量大、特异性强、灵敏度高的优点，较常应用于对蛋白质表达与分布的检测过程。通过抗原-抗体特异性结合来检测食品样品中的目标蛋白的方法，将高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳及高灵敏和高特异性的 ELISA 方法相结合，来对多肽分子的质量、组织抗原的定性定量或者病毒的抗体抗原进行检测，既可分析抗原的组分以及免疫活性，也可用来诊断疾病<sup>[32]</sup>。

#### ⑥乳胶凝集技术 (Reversed passive latex agglutination, RPLA)

反向被动乳胶凝集法主要通过凝集形成可视化的聚团物质来进行检测。利用乳胶颗粒的特性，在其外层包裹细胞等具有一定体积构型的抗原物质，当发生免疫反应时，通过可视化效果来定性常见的致病菌。Obata 等人<sup>[33]</sup>通过利用 RPLA 检测，成功从病人的排泄物中分离得到副溶血性弧菌 400 多株，有 370 株呈现 KP 阳性，另外 108 株则呈现弱阳性或阴性；与此同时，进一步验证实验的准确性，将利用 PCR 检测 TDH 或者 TRH 基因的结果与之相对应，发现特异性高达 95%。

#### (3) 以核酸为基础的分子生物学检测技术

分子生物学是最新发展起来的最重要的新学科，集多种学科于一体，为实现快速检测微生物，提供了更高的理论支持，并带动了其它领域相关研究的进步。聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 的基本原理在于，首先根据检测目标中的基因，针对性设计选择用来进行片段扩增的引物序列，通过 DNA 聚合酶来放大目标序列，通过凝胶电泳和凝胶成像仪来观察扩增结果<sup>[34]</sup>。PCR 技术灵敏、快捷、特异性强，与传统培养方法相比，阳性检出率更高，而且检测周期大大缩短<sup>[35]</sup>，现已作为临床检测的研究热点、发展方向<sup>[36-37]</sup>。目前基于 PCR 方法，很多新技术问世，例如：实时荧光 PCR 检测技术、多重 PCR 检测技术 (m-PCR)、基因芯片技术、依赖 PCR 的 DNA 指纹图谱技术等，这些新型方法成功应用于对实际样品的检测过程，以达到快速、灵敏检测的目的<sup>[38]</sup>。

#### ①实时荧光 PCR 技术 (Real-time quantitative PCR, qPCR)

首先于引物上标记荧光显色物质，对 PCR 进行实时监控，当进行 PCR 时，会对体系中所存在的荧光信号产生一个积累的过程，由此定量检测产物并绘制未知目标片段的标曲，通过这种原理来进行荧光定量 PCR<sup>[31]</sup>。DNA 结合染料、分子信标、杂交探针、荧光基团标记引物、水解探针是最近发展起来的主要的荧光标记方法，用于实时 PCR 的检测<sup>[31, 39-40]</sup>，而取代了技术发展初期所使用的唯一一种标记物，这将实时 PCR 技术

---

推向了高灵敏度，高识别力的方向。彭雁忠等人<sup>[41]</sup>于 2005 年建立了一种可以同时检测大肠杆菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特菌、副溶血性弧菌和空肠弯曲杆菌的多联实时荧光定量 PCR 方法。虽然，实时荧光 PCR 在微生物灵敏性检测方面相较传统的方法有所提高，然而由于核酸、微环境的影响，会导致 PCR 结果产生假阳性，灵敏度降低、特异性变差；同时 PCR 仪器昂贵，需要特定的技术人员进行操作，无法实现广泛的推广，不能应用于现场的快速检测，无法满足现场检测的要求。

## ②多重 PCR 检测技术（Multiplex PCR）

PCR 技术以其高灵敏度、特异性等特点在食品微生物的检验检疫中得到了广泛的应用。事实上存在于食品中的病原菌并不是单一种类，因此通过多重 PCR 检测可以实现对食品中多种病原菌的同步检测。多重 PCR 检测方法是指在常规 PCR 的基础上，加入多对引物，与特异性的模板相结合后，经过 PCR 扩增得到多条目的 DNA 片段<sup>[42]</sup>。Frankel 等人<sup>[43]</sup>首次将多重 PCR 方法用来检测大肠杆菌基因，而现今多重 PCR 方法已被应用于同步检测沙门氏菌、大肠杆菌、致病性弧菌等<sup>[44]</sup>以及鉴定与肠毒素相关的金黄色葡萄球菌<sup>[45]</sup>。但其应用中可出现了某些不足，如当食品中菌体含量较低时，可能导致直接检测出现漏检，扩增效率不高、扩增条件需要摸索协调、引物干扰，就大大增加了检测用时<sup>[46]</sup>。

## ③基因芯片技术（Gene chip technology）

上世纪 80 年代中期提出了基因芯片技术。这种方法的基本原理为基因杂交，其特点是能够对生物信息进行快速分析且灵敏度高。操作流程为：首先对样品中的特定序列片段进行标记，同时制作基因芯片，有序的将基因探针结合在基片载体上，以阵列的方式通过重组配对来完成检测，而这种技术也称为 DNA 芯片技术或生物芯片技术，采用碱基互补原则，定性定量检测体系中存在目标基因，当样品中存在目标基因时，就会有相应的信号输出，以此观察检测结果。基因芯片技术在临床疾病控制方面及食品卫生检验方面都具有广阔的开发和应用前景<sup>[47-48]</sup>。Carl 等人<sup>[49]</sup>同时对大肠杆菌、伤寒杆菌、空肠弯曲菌和痢疾杆菌使用了基因芯片的检测方法，此方法不仅灵敏度高于传统方法，而且短时、高效、重复性好，提高了四种细菌的检测效率。聂萌等人<sup>[50]</sup>分别检测了沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、A 型产气荚膜菌等八种常见食源性致病菌，利用这种技术方法得到的检测结果，大大提高了灵敏度，相比于传统的 PCR，有了突破性进展。然而，制备样品过程较繁琐、高昂的检测成本、低特异性等因素，均不利于基因芯片检测技术的发展，如何解决这些问题成了日后研究的关键。

## ④DNA 指纹图谱技术（DNA finger print）

DNA 指纹图谱，又称遗传指纹图谱（genetic finger print），是指能够鉴别各个生物个体之间的差异的 DNA 的电泳图谱，目标微生物的 DNA 经过 PCR 扩增后产生多条扩增片段。这种电泳图谱具有高度的个体特异性、环境稳定性和丰富多态性。有的国内机构采用多态性 DNA 分析对沙门氏菌进行分子分型，利用引物 5'-CCGCAGCCAA-3'对菌株进行了多态性 DNA 扩增反应，通过凝胶成像系统得到分析图像，并用软件计算了扩增片段的分子量以及聚类分析。但其不足之处，是需要对大量的随机引物进行筛选<sup>[51]</sup>。

---

## 1.2 核酸适配子SELEX筛选技术研究进展

### 1.2.1 SELEX 技术简介

指数富集配体的系统进化技术 (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 是 20 世纪 90 年代建立的一种新的筛选技术, 是指体外随机合成大容量的寡核苷酸文库, 结合体外 PCR 扩增技术, 指数级富集能与目标分子特异性结合的寡核苷酸序列, 通过多轮的筛选来获取亲和力高、特异性强的寡核苷酸序列<sup>[52-53]</sup>。其基本思想是首先体外化学合成一个单链寡核苷酸库, 与目标分子混合, 形成靶标-寡核苷酸复合物, 去掉未结合到靶标的寡核苷酸, 洗脱收集与靶标结合的寡核苷酸并以此为模板进行 PCR 扩增; 重复上述步骤, 进行下轮循环筛选, 去掉亲和力低的寡核苷酸, 根据需要, 适当增加反筛、复筛等步骤来去掉低特异性的寡核苷酸序列。特异性好、亲和力高的寡核苷酸随着 SELEX 筛选, 纯度不断增高, 从 pmol 到 nmol, 甚至到 mol, 最终筛选出所需寡核苷酸适配子序列。主要步骤包括: 1. 确立筛选方法: 针对研究对象, 明确所需适配体的特性, 据此设计筛选方法; 2. 建立筛选文库: 根据筛选方法设计合成足够数量和适宜长度的 DNA 或者 RNA 组合文库; 3. 实施具体筛选策略: 依据筛选方法, 投入固定化或者自由态的目标物质, 从组合文库中筛选出高亲和力、高特异性适配体。

### 1.2.2 适配体的特点

适配体 (aptamer), 又称化学抗体, 即通过 SELEX 技术体外筛选获得的能与靶标特异性结合的寡核苷酸序列 (单链 DNA 或 RNA), 一般由几十个核苷酸 (20-60 nt) 组成。两端为固定碱基序列, 中间为随机碱基序列, 正是由于这种随机性使得寡核苷酸片段的结构灵活多变, 可通过链内某些互补的碱基相互配对以及静电或氢键等作用使自身发生适应性折叠, 形成稳定而复杂的三维构象, 如假结 (pseudoknot)、发卡 (hairpin)、G-四分体 (G-quanet)、凸环 (stem loop) 等。自 Tuerk 等人于 1990 年首先成功筛选到 T4 噬菌体 DNA 聚合酶的 RNA-aptamer 以来, 适配体的研究技术不断被研究更新, 打破了传统的核苷酸碱基配对的思路, 塑造了核酸研究技术的里程碑。

适配体优点众多, 与目标分子之间的识别功能与抗体十分相似, 但其作用的靶物质范围极广, 除了蛋白质类的目标物质、毒素、酶、抗体、生长因子、细胞粘附分子等, 其他金属离子、有机染料、细胞因子、氨基糖苷、碱基类似物、核苷酸等免疫原性弱或不具有免疫原性的物质也可作为靶分子进行 SELEX 的适配体筛选<sup>[54-55]</sup>; 适配体亲和力高, 与配体间的亲和力往往要强于抗体抗原之间的亲和力, 解离常数为 pmol-nmol, 有些甚至超过了天然配体; 特异性强, 适配体经过多次的筛选, 只能识别与其互补的空间结构, 保证了其配体间的强特异性结合, 基本上可以避免非特异性结合, 适配子可以识别一个甲基或羟基的微小变化, 区分旋光异构对映体, 并且没有抗体 Fc 受体的非特异性结合问题; 适配体容易制备及修饰, 成功筛选适配子只需 2-3 个月时间, 成功筛选到适配子后, 可以通过 PCR 进行大量扩增, 而抗体的筛选和制备一般需 3-6 个月, 筛选和制备的过程也比较繁琐, 而且适配子可以进行化学修饰, 修饰后稳定性大大提高且不影响与配体连接的亲和力<sup>[56]</sup>; 稳定性好, DNA 适配体十分稳定, RNA 适配体在嘧啶戊糖

2' 位引入氟或氨基后,也能抵抗酶降解<sup>[57]</sup>,适配体可快速变性复性,而抗体对温度敏感,易发生不可逆变性;适配体与目标分子的结合条件可调控,由于筛选适配体是体外进行的,所以可以根据实验需要来设定筛选条件,而抗体筛选一般为体内筛选,很难调控抗体与目标分子之间的结合条件<sup>[58]</sup>;适配体应用灵活,分子较小,容易通过细胞膜进入细胞内检测靶分子,因此在基础研究、临床诊断、疾病治疗等方面得到越来越多的应用<sup>[59]</sup>。

### 1.2.3 SELEX 技术研究进展

从 1990 年建立 SELEX 技术至今,对于 SELEX 技术和 aptamer 的研究越来越广泛,不断得到更新与改进,实现了筛选的形式多样化、流程自动化、结果快速化。

#### (1) 基于提高适配体选择性的筛选方法

##### ①负筛 (Negative SELEX)

负筛指排除目标物质所使用的固定化基质对适配体筛选的干扰,最终得到只针对目标分子的适配体。Ellington 等人<sup>[60]</sup>在 1992 年最先提出,在第三次循环筛选后,将不与基质相作用的寡核苷酸适配子的部分与靶标相混合,进行常规筛选,第四次获得寡核苷酸的亲和力提高了近 10 倍。这一结果证明了负筛的实际应用意义,尤其针对有固定化基质的目标分子的筛选。

##### ②反筛 (Counter SELEX)

反筛的目的是获取专一性更强的适配体,通过排除可以同时与靶标类似物相作用的寡核苷酸适配子来完成的。Jenison 等人<sup>[61]</sup>在筛选茶碱适配体的过程中,以其结果类似物,仅相差一个甲基的咖啡因因为反向靶标,最终获得只结合茶碱但对咖啡因没有作用的适配子。这一筛选方法对小分子的筛选极为有利,更易筛选高特异性的适配子。

##### ③消减筛选 (Subtractive SELEX)

消减筛选的目的与反筛一致,但其主要针对复合靶,扣减对复合靶中的非目标物质有吸附作用的寡核苷酸适配体。Wang 等人<sup>[62]</sup>利用此方法以未分化的 PC12 细胞作为消减细胞,筛选得到分化 PC12 细胞的适配体,此方法已广泛应用于癌细胞适配子的筛选,可用于肿瘤的检测与治疗。

##### ④光交联筛选 (Photo SELEX)

光交联筛选主要是利用光敏感核苷酸适配体在一定波长的光照下,可以同其他分子产生共价交联而实现的一种筛选方法。由于这种方法是利用共价键进行筛选的,所以最终获得适配体亲和力更高,但假阳性也较高,所以需要对交联的条件进行优化。1995 年, Jensen 等人<sup>[63]</sup>使用此方法,掺入 5-IU 筛选出针对 HIV-1 上 Rev 蛋白的适配子。

#### (2) 基于提高适配子普适性的筛选方法

##### ①复合靶标的筛选 (Complex targets SELEX)

复合靶标筛选与常规筛选方法的差别仅在于目标靶物质的构成,早期适配子研究多以纯化蛋白为靶物质,但有时纯蛋白不易获得,所以需要一种针对复合靶标的方法进行筛选。Shamah 等人<sup>[64]</sup>总结了以细胞膜、细胞碎片、寄生虫等为目标物的筛选过程,详述了各类实例。在肿瘤抑制剂及相关药物等领域,复合靶标筛选有着不可替代的优势作



---

用。

## ②切换筛选 (Toggle SELEX)

切换筛选是针对多种目标物质进行筛选的一种方法，即在不用的目标物质间进行切换筛选。White 等人<sup>[65]</sup>利用切换筛选技术得到了同时对人凝血酶和猪凝血酶具有亲合作用的适配子，成功解决了针对人源靶标设计的适配子药物无法建立动物试验模型的问题。

## ③混合筛选 (Blended SELEX)

在组合库中加入其它分子，是寡核苷酸适配子定向与目标靶物质的某些“表位”结合，从而获得具有针对性适配子的方法，即混合筛选。自 Smith 等人<sup>[66]</sup>最早提出这个方法以来，不断被应用于药物筛选；Hamm 等人<sup>[67]</sup>也将这种方法与抗个体基因 (anti-idiotypic) 方法相结合，筛选得到一种磷酸化酶的适配子。混合筛选技术的成功为基因治疗奠定了基础。

## ④镜像筛选 (Spiegelmer technology SELEX)

对已获得的适配子进行化学修饰，以此来提高适配体的稳定性，解决医疗中适配子体内半衰期短的问题，也成了研究的热点。而镜像筛选就是利用了手性分子的旋光特性，使用右旋适配子文库进行筛选，应用时则合成相应的左旋适配子，因其左旋结构不易被核糖核酸酶识别，而具有结构稳定性，这样获得的适配子称为 Spiegelmers<sup>[68]</sup>。

### (3) 基于不同组合库的筛选方法

#### ①基因组筛选 (Genomic SELEX)

基因组筛选是以生物体的整个基因组作为文库，生物活性分子作为靶目标，筛选目标分子的天然识别序列。此方法对于研究核酸与生物活性分子的相互作用有极大的帮助，Shimada 等人<sup>[69]</sup>将 Cra 蛋白设为靶标，成功发现基因组中对此蛋白有亲合作用的片段，含有六个启动子，能够被 Cra 蛋白所抑制。

#### ②多库筛选

多库筛选是指将不同组合库筛选得到的适配子，按照一定的方式进行组合，对组合后的产物进行二次筛选，来获得具有多重功能的适配子。主要有两种方式：嵌合筛选 (Chimeric SELEX)、多步筛选 (Multi stage SELEX)。

#### ③加尾筛选 (Tailored SELEX)

经典 SELEX 筛选中，测序后要阶段两端的引物，这种方法会影响适配子的选择性，尤其当随机序列较短时，而加尾筛选则解决了这个问题<sup>[70]</sup>。加尾筛选通过分子生物学来减少适配子两端作为引物的碱基数目，固定序列远小于通常文库的碱基数，当需要扩增时，使用架桥序列完成筛选序列与引物的连接并进行分子实验。投入下一轮循环之前，将引物通过碱裂解除去。Wen<sup>[71]</sup>、Pan<sup>[72]</sup>等人都报道了实验所建立的短引物或者无引物筛选技术。

### (4) 高效 SELEX 筛选方法

#### ①不放大筛选 (Non-SELEX)

不放大筛选的关键点是省略了常规筛选的 PCR 扩增环节，而将上一轮分离得到的寡



---

核苷酸序列直接用于下一轮筛选。这种方法要求分离效率更高，其中毛细管分离较好，目前，采用这种方法获得适配体的相关报道还很少。

## ②自动筛选（Automated SELEX）

传统的 SELEX 筛选方法操作过程繁琐、工作大量重复，既耗时又耗力，而自动筛选系统的建立，利用现代机械设备在一定程度上实现了高通量平行筛选。Cox 等人<sup>[73]</sup>2001 年通过将生物素化目标蛋白固定在磁珠上，分离特异序列，设定自动化程序完成 RT-PCR 扩增和转录，只用了不到两天时间完成了 12 轮筛选，但此方法的靶标仅限于纯化的蛋白质，2005 年 Stoltenburg 等人<sup>[74]</sup>引入了荧光标记 DNA 进行定量，即 FluMag-SELEX 方法，可以快速筛选不同大小的靶分子，避免同位素检测，方便制备生物传感器。

## ③毛细管电泳筛选（CE-SELEX）

配基与游离配基的分离是 SELEX 技术的难点，Mendonsa 等人<sup>[75]</sup>根据配基结合适配体前后，两者在毛细管柱中的迁移率发生变化而实现分离的，整个方法仅需 2-4 轮。毛细管的方法本身具有高效性，而且靶标不受基质的干扰<sup>[76]</sup>，减少了因非特异性结合而引起的繁琐的操作步骤。但当靶标为小分子时，结合上靶标的寡核苷酸与游离的寡核苷酸迁移率接近，则很难进行分离。

# 1.3 课题的立题意义与内容

## 1.3.1 本课题的立题意义

近年来，食源性致病菌成为引发食物中毒的首要危害，如何建立有效的检测方法越来越受到临床及食品产业的重视。现存的食源性致病菌的检测方法虽应用广泛，但各有其优缺点，如传统微生物检测法前期处理繁琐且耗时较长；免疫学方法中抗体制备难度大、成本高、用时长且不易保存；分子生物学方法操作繁琐、成本高、设备昂贵等。因此，目前研究的首要任务就是建立一种快速、灵敏、简便的检测方法。

基于 SELEX 技术在各个方面都显示出较于传统方法的优势，筛选出的寡核苷酸适配子不仅具有更高的亲和力和特异性，而且能区分结构类似物。本研究通过 SELEX 技术分别筛选了化脓链球菌、无乳链球菌的寡核苷酸适配子，为快速检测两种致病菌提供了研究基础和科学依据；并且建立了利用适配子检测化脓链球菌、无乳链球菌的检测方法，其灵敏度高、准确性好，节省了检测时间和检测成本，实现了食源性致病菌的痕量检测。

## 1.3.2 本课题的研究内容

### （1）化脓链球菌、无乳链球菌适配子的筛选

本研究采用细胞-SELEX 筛选技术（Cell-SELEX）和反筛-SELEX，将化脓链球菌、无乳链球菌分别与体外化学合成的长度为 80bp 的随机单链 DNA（ssDNA）文库进行孵育，形成靶标-寡核苷酸复合物，通过离心沉淀法分离未与靶标结合的 ssDNA，高温解离与靶标连接的寡核苷酸分子，并以此为模板进行 PCR 扩增，经纯化、Lambda 核酸外

---

切酶制备单链、纯化后，作为下一轮次库投入循环筛选。最终，经过 12 轮的重复筛选与扩增，富集纯化得到了能与靶标——化脓链球菌、无乳链球菌，高亲和力、高特异性结合的单链 DNA 适配子序列。

### （2）筛选得到的化脓链球菌、无乳链球菌适配子的分析

将第 12 轮筛选得到的 ssDNA 进行 PCR 扩增后，送至上海生工生物工程技术有限公司进行克隆、测序，对测序得到的序列进行同源性一级结构同源性分析及保守序列分析，并据此进行分组，根据预测二级结构最小自由能挑选出每组的代表性序列，合成其 5'端羧基荧光素（FAM）标记的适配子序列。利用 FACSC alibur 流式细胞分析仪对其进行特异性分析、亲和力分析，并计算各个适配子的解离常数。从中挑选出亲和力高、特异性强的适配子序列作为识别化脓链球菌、无乳链球菌的寡核苷酸适配子。

### （3）基于寡核苷酸适配子建立化脓链球菌、无乳链球菌的检测方法

将筛选得到的适配子分别作 5'-端生物素标记（Biotin-）和 FAM 荧光素标记；制备氨基化的磁珠，使用戊二醛法连接亲和素、生物素化适配子（Bio-aptamer），制备捕获探针。当体系中加入目标菌时，捕获探针中生物素化适配子分别与化脓链球菌、无乳链球菌结合，当加入 FAM 荧光标记的显示探针适配子时，也会和体系中存在的目标菌发生结合，利用外加磁场吸附磁珠，弃掉未结合的 FAM 荧光标记的适配子显示探针，体系的荧光强度会发生变化。根据荧光强度变化与目标菌浓度之间的关系来实现化脓链球菌、无乳链球菌的定量检测，并利用上述方法对食用牛奶样品进行了目标菌加标回收测定。

---

## 2 实验材料与方法

### 2.1 材料与主要试剂

#### 2.1.1 随机单链 DNA(ssDNA)文库及其引物 DNA 序列的设计与合成

化脓链球菌适配子筛选所用随机单链 DNA(ssDNA)文库 I，Seq1:

5'-AGCAGCACAGAGGTCAGATG (40N) CCTATGCGTGCTACCGTGAA-3',

引物 I: 5'-AGCAGCACAGAGGTCAGATG-3',

引物 II: 5'-P-TTCACGGTAGCACGCATAGG-3';

无乳链球菌适配子筛选所用随机单链 DNA(ssDNA)文库 II，Seq2:

5'-ATAGGAGTCACGACGACCAG (40N) TATGTGCGTCTACCTCTTGA-3',

引物 III: 5'-ATAGGAGTCACGACGACCAG-3',

引物 IV: 5'-P-TCAAGAGGTAGACGCACATA-3';

引物 II 和引物 IV 均为 5'端磷酸化的下游引物; 将随机 ssDNA 文库和引物均用 TE 缓冲液配制成 100  $\mu$ M 贮存液于 -20℃ 贮存备用, 每轮筛选前, 文库及次库都进行 94℃ 加热变性 10 min 立即冰浴 5 min 处理; 以上所有寡核苷酸序列均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

#### 2.1.2 菌株与培养基

化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) ATCC14289、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) ATCC12386 株用于全菌 SELEX 筛选靶目标, 于 5% 无菌绵羊血的哥伦比亚血琼脂 (Teknova, Hollister, CA), 37℃ 过夜培养。本实验中其他菌株包括: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC29213, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC25922, 菌株均来自美国模式培养物保藏中心 (ATCC); 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) 均为本实验室保藏菌种。所有微生物均在脑心浸液中培养, 培养温度为 37℃, 液体培养物于 150 rpm 摇床培养。

#### 2.1.3 主要试剂

牛血清白蛋白 (BSA) 购买于北京鼎国生物工程有限公司; 脑心浸液购买于上海梅联生物科技有限公司; 亲和素购买于美国 Amersco 公司; 酵母 tRNA、聚丙烯酰胺、四甲基乙二胺 (TEMED) 购买于 Sigma 公司; 酚、氯仿、异戊醇混合物购买于上海杰瑞公司; Lambda 核酸外切酶, 10×Lambda 核酸外切酶反应缓冲液购买于吉泰生物科技有限公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 1,6-己二胺, 乙二醇, 乙醇, 尿素, 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA), 醋酸钠, 氯化铁, 碳酸钠, 碳酸氢钠, 磷酸二氢钠, 氢氧化钠, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钾, 氯化钾, 氯化镁, 氯化钠, 硼酸, 吐温 20, 盐酸等购买于中国医药上海化学试剂公司。dNTP 混合物, Taq Plus DNA Polymerase, 10×PCR 扩增缓冲液, GeneRuler Ultra Low Range Ladder 均购买于上海生工生物工程技术服务有限公司。

---

## 2.2 主要仪器

Centrifuge 5424R 台式高速冷冻离心机, 艾本德 (Eppendorf) 中国有限公司; HH-4 数显恒温水浴, 常州荣冠实验分析仪器厂; Bio-rad 电泳仪, Bio-rad 凝胶成像仪, 美国 Bio-rad 伯乐公司; C1000 Thermal Cycler PCR 仪, 美国伯乐 (Bio-Rad) 公司; SYQ-DSX-280B 不锈钢高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; DHP-420 电热恒温培养箱, 金坛市新航仪器厂; UV-Vis(-NIR)UVProbe 2.33 版分光光度计, 日本岛津; JEM-2100HR 透射电镜 (Transmission electron microscope, TEM), 日本 JEOL 公司; Direct-Q3 超纯水系统, 美国 (Millipore) 公司; SW-CJ-1FD 洁净工作台, 苏州尚田洁净技术有限公司; ZD-85 气浴恒温振荡器, 常州恒隆仪器有限公司; GL-88B 旋涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Starter 3C 实验室 pH 计, 奥豪斯仪器 (中国) 有限公司;  $\Phi$ 2200Sanpure Ultrasonic Cleaner, 无锡市科洁超声电子设备有限公司; NICOLET NEXUS 470 FTIR, 赛默飞世尔 (Thermo) 公司; M5 酶标仪, Molecular Devices 公司; FACSC alibur 流式细胞分析仪, 美国 BD 公司; Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计, 上海采邑生物科技有限公司; 电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

## 2.3 实验原理

### 2.3.1 SELEX 筛选原理

本实验通过 Cell-SELEX 筛选, 即以完整的细胞作为靶标, 通过离心沉淀法得到能与靶细胞特异性结合的寡核苷酸适配子。这种方法可以在未知目标性质的情况下筛选出与其相对应的适配子序列<sup>[77-80]</sup>, 最终得到能够有效识别化脓链球菌、无乳链球菌的寡核苷酸适配子, 其原理见图 2-1。首先, 体外构建  $10^{14}$ - $10^{15}$  个随机 ssDNA 文库, 其长度为 80nt, 两端为固定引物序列, 中间为 40 个碱基的随机序列, 文库容量大是成功筛选适配子的基础; 然后, 将随机序列与目标菌进行孵育, ssDNA 会折叠形成口袋、假结、G-四聚体、发卡等三维结构与目标物质进行特异性结合; 将菌体离心, 弃掉未与菌体结合的 ssDNA, 将与目标菌结合的序列高温解离下来, 进行 PCR 扩增, 对每一轮正确的 PCR 扩增产物进行纯化处理, 利用 Lambda 核酸外切酶将扩增结果准确的双链 DNA 制备成 ssDNA, 进行纯化操作后, 作为下一轮文库进行实验循环。经过 12 轮筛选, 获得高特异性、高亲和力的寡核苷酸适配子序列。对最后一轮正确的 PCR 产物进行克隆并测序, 从测序结果中挑出可以应用于后续检测实验的寡核苷酸适配子。

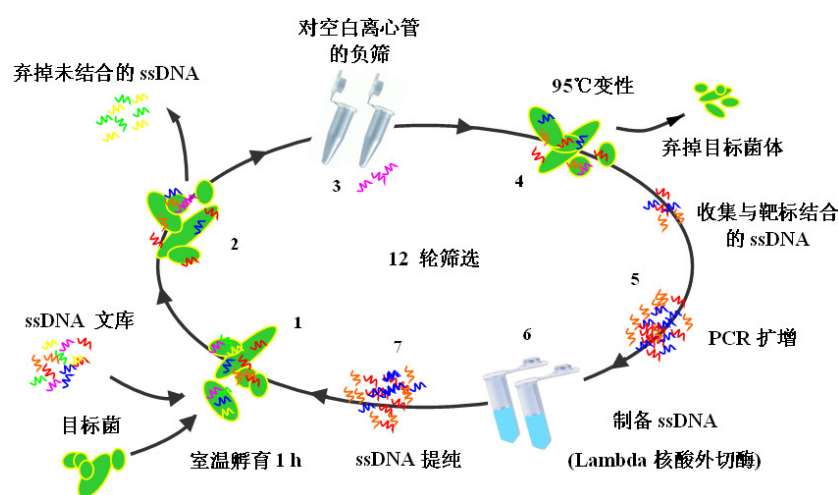


图 2-1 SELEX 原理图

Fig. 2-1 Principle of SELEX

### 2.3.2 生物素化适配子与氨基化磁珠连接原理

磁性纳米粒子（magnetic nanoparticles, MNP）是一种新型的磁性纳米材料，其粒径小、偶联容量高、比表面积大，又具有超顺磁性，可以在外加磁场的作用下聚集和定位，因而可以在其表面偶联特定的基团来用于物质的筛选和分离<sup>[81]</sup>。

本研究探索在磁珠表面固定生物素修饰的适配子序列，形成针对目标菌的捕获探针复合物。原理见图 2-2，为了使生物素化的适配子能够紧密、稳固地固定在磁珠表面，实验通过戊二醛将带有氨基的链霉亲和素（streptoavidin, SA）偶联在磁珠表面，利用亲和素和生物素的高特异性结合，间接的将生物素标记的适配子连接在磁珠表面<sup>[82]</sup>；每个亲和素分子都含有四个生物素结合位点，可同时以多价形式来结合生物素化的适配子，因此以磁珠-亲和素构建的适配子捕获探针，具有多级放大的作用，可以更牢固的结合更多的目标菌，大大提高检测灵敏度。通过这种磁珠-亲和素-生物素系统形成可以特异性结合目标菌的磁珠-适配子复合物探针，为下一步构建检测化脓链球菌、无乳链球菌的方法提供技术支持。

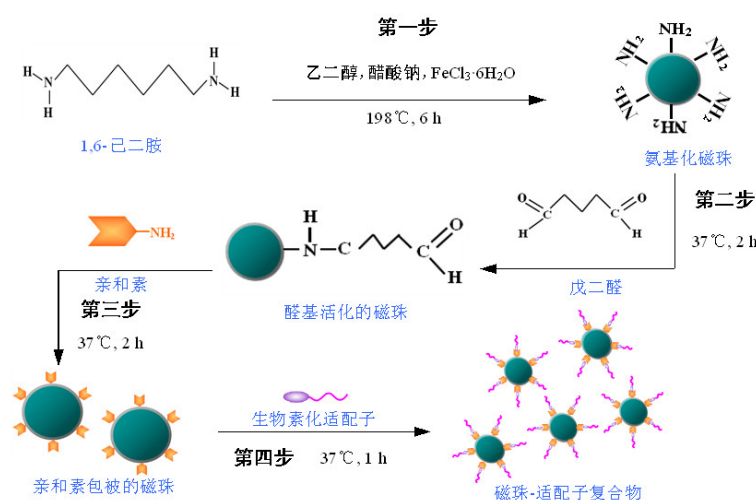


图 2-2 磁珠-适配子复合物连接原理图

Fig. 2-2 Connection schematic diagram of magnextic beads-aptamer

### 2.3.3 基于适配子检测化脓链球菌、无乳链球菌方法的原理

筛选得到化脓链球菌、无乳链球菌亲和力和特异性最优的寡核苷酸适配子各两条，将其中一条连接到磁珠表面，构建捕获探针；另一条适配子进行 FAM 荧光标记，作为显示探针。当体系中存在目标致病菌时，与磁珠相连的捕获适配子优先与目标菌结合，加入 FAM 荧光标记的另一条适配子时，则会连接到体系中已存在的靶细菌上，导致溶液中的荧光强度发生改变，以此来实现对目标菌的定性检测。当加入的目标菌数量不同时，则连接上的 FAM 标记的适配子的量也随之发生变化，通过探索目标菌的数量与荧光强度之间的关系来实现对化脓链球菌、无乳链球菌的定量检测，其原理如图 2-3 所示。

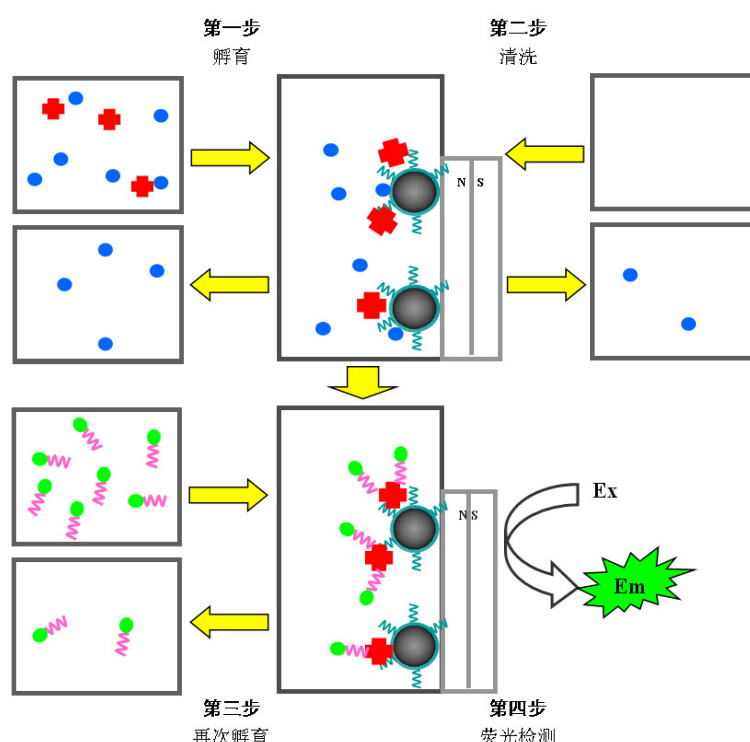


图 2-3 磁珠-适配子检测目标菌原理图









() 磁珠-适配子复合物, () 目标菌, () FAM-适配子, () 杂质

Fig. 2-3 Schematic presentation of the detection of bacteria by magnetic nanoparticles-aptamer:

() magnetic beads-aptamer, () target bacteria, () FAM-aptamer, () impurities

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 化脓链球菌、无乳链球菌的 SELEX 筛选

试验中, Cell-SELEX 的方法步骤主要参考 Hamula 等人<sup>[83]</sup>的实验方法。首轮筛选时, 反应总体积为 600  $\mu\text{L}$ , 取 2 nmol 随机 ssDNA 文库于适量的结合缓冲液 (1 $\times$ BB: 50 mM Tris-HCl pH7.4, 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 加入处理好的菌体细胞 ( $1 \times 10^8$  个), 再加入过量的 0.05% BSA (首轮为文库加入量的 20 倍, 以后逐轮递增 10 倍) 和

酵母 tRNA 50 nmol/L，室温振荡孵育 1 h；孵育后需更换离心管，以去除与离心管壁相结合的 ssDNA，将新离心管于 5000 rpm，4℃离心 5 min；收集菌体，去除未结合或结合不紧密的 ssDNA，用含 0.05% BSA 的 1×BB 重悬、离心清洗 2 次，最后溶于 100 μL 1×PCR 缓冲液，于 94℃变性 10 min，立即冰浴 10 min，以使与细胞连接的 ssDNA 得以变性和洗离；经 5000 rpm，4℃离心 10 min，吸取上清移至另一洁净的离心管中，即为第一轮筛选所得的寡核苷酸适配子，作为 PCR 扩增的模板 DNA。

PCR 扩增体系为：ssDNA 解离液 5 μL，10×PCR 缓冲液 5 μL，上、下游引物 (20 μM) 各 1 μL，含  $Mg^{2+}$  dNTP<sub>mix</sub> (25 mM) 1 μL，Taq 聚合酶 (5 U/μL) 1 μL，加入灭菌超纯水至 50 μL。PCR 扩增程序为：95℃预变性 5 min；95℃变性 30 s；58℃退火 30 s；72℃延伸 30 s；循环 20 次；最后 72℃延伸 10 min。每轮 PCR 扩增产物进行 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，观察电泳条带是否单一、位置是否正确，以保证下一轮筛选能准确进行。

第二轮至第十二轮筛选反应体系为 350 μL，每轮进行孵育的 ssDNA 加入量为 100 pmol。此外，实验分别在第三轮、第六轮、第九轮、第十二轮利用两种菌相互进行反筛，以提高各种菌适配子的亲和力和特异性。

将 PCR 扩增产物汇集在 2 mL 离心管中，加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（体积比为 25:24:1）混合溶液，旋涡振荡混至乳状液后，8000 rpm，4℃离心 5 min，吸取上清至另一离心管，重复以上操作一次；向含样品的离心管中加入 1/10 体积的醋酸钠溶液 (3 mol/L, pH5.2) 及 2 倍体积的无水乙醇，充分混匀后放 -20℃冰箱内过夜；然后 12000 rpm，4℃离心 15 min，吸弃上清，用预冷的 70%乙醇 0.5 mL 上下颠倒洗涤白色固体沉淀，12000 rpm，4℃离心 5 min；吸弃上清，打开盖子将沉淀晾干后，重溶于适当体积的灭菌超纯水中，通过 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定双链 DNA (dsDNA) 浓度。

制备 ssDNA 操作时，取确定浓度的纯化 PCR 扩增产物溶液，根据 Lambda 核酸外切酶的单位定义（1 单位指在 50 μL 的反应体系中 37℃反应 30 min，能从双链 DNA 底物上催化生产 10 nmol 酶可溶性脱氧核糖核苷酸所要求的酶量）计算加酶量和反应缓冲液（10×Lambda 核酸外切酶反应缓冲液，体系中终浓度为 1×Lambda 核酸外切酶反应缓冲液）的加入量，37℃水浴反应至酶切完全，75℃水浴 10 min 灭酶；通过 7 M 尿素 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，验证酶切反应是否完全，确定最佳酶切条件后再进行放大酶切。利用酚氯仿乙醇沉降法对酶切产物进行提纯，将 ssDNA 沉淀物重悬于适当体积的缓冲液中，通过 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定 ssDNA 浓度，作为 SELEX 筛选次库投入下一轮循环。

#### 2.4.1.1 筛选所用靶标细菌的制备

获取靶标细菌的具体方法，主要参考文献<sup>[84]</sup>稍作改动，即：使用脑心浸液培养化脓链球菌、无乳链球菌，37℃活化过夜至对数生长期 ( $OD_{600}=0.3$ )；5000 rpm，4℃离心 5 min，弃除培养基，再用 1×BB 清洗两次，置 4℃环境储存备用。

#### 2.4.1.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)



---

8%非变性聚丙烯酰胺凝胶：10×Tris-硼酸（TBE：54 g Tris、27.5 g 硼酸、3.72 g 乙二胺四乙酸二钠、pH8.0）600 μL，1.6 mL 聚丙烯酰胺（质量分数 30%），36 μL 过硫酸铵溶液（质量分数 10%），9 μL TEMED，3.6 mL 超纯水混匀。

7 M 尿素 8%变性聚丙烯酰胺凝胶：尿素 2.52 g，加水量为 1.7 mL，其余同 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶配方。

产物加样量为 5 μL，电泳设定电压 250 V，时间为 20 min，使用 Bio-rad 凝胶成像仪进行拍照观察。

#### 2.4.1.3 随机单链进行 PCR 扩增的条件优化

主要对退火温度及循环次数进行了优化，其他条件与上述方法保持一致。循环次数为 25，退火温度依次为 54、56、58、60℃（摄氏度都应写出来）；根据结果设定最优的退火温度，循环次数依次为 20、25、30，分别对扩增结果进行 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳验证。

#### 2.4.1.4 Lambda 核酸外切酶制备 ssDNA 的条件优化

根据酶活计算酶的添加量，对加酶量、酶切时间及底物浓度进行了优化。加酶量为计算值的 1.0、1.5、2.0、2.5 倍，酶切时间为 2 h；根据结果设定最佳酶切量，酶切时间依次为 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h；同时对底物浓度进行探索，分别添加 PCR 纯化产物 300、500、700、900、1100 ng/μL，在最适宜的酶切时间和加酶量条件下，对底物添加量进行探索，分别对酶切结果进行 7 M 尿素 8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳验证。

#### 2.4.1.5 筛选轮数的优化

每轮孵育后，洗脱与目标菌结合的 ssDNA 适配体，并利用 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计对洗脱液进行 260 nm 处的紫外吸光值测定，通过洗脱液中 ssDNA 的含量，对轮数进行优化。（筛选轮数是不是仅仅取决于得到的 DNA 量？）

### 2.4.2 化脓链球菌及无乳链球菌寡核苷酸适配子的克隆测序及分析

#### 2.4.2.1 化脓链球菌及无乳链球菌寡核苷酸适配子的克隆测序

将第 12 轮筛选得到的寡核苷酸适配子进行 PCR 扩增，通过 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳验证结果正确后，送至上海博尚生物技术有限公司进行 DNA 序列测定。

#### 2.4.2.2 化脓链球菌及无乳链球菌寡核苷酸适配子的克隆测序结果分析

采用 DNAMAN 软件对测序得到的寡核苷酸适配子序列进行保守序列及其一级结构同源性分析；采用 RNA Structure 4.2 软件对寡核苷酸适配子序列的二级预测结构进行分析<sup>[85]</sup>。根据化脓链球菌、无乳链球菌的保守序列分组并计算其同源性及其二级结构图谱，对测序得到的所有序列进行分组，并从每组中选出能级较低、结构较为稳定的代表性序列<sup>[86]</sup>由上海生工生物工程技术有限公司合成 5'端羧基荧光素（FAM）标记的序列，以作进一步的特异性和亲和力分析。

综合特异性和亲和力实验，最终筛选出两条分别针对化脓链球菌、无乳链球菌的寡



---

核苷酸序列，送至上海生工生物工程技术有限公司合成 5'端生物素化（Biotin）标记的 ssDNA 序列，以进行后续的检测应用实验。

#### 2.4.2.3 化脓链球菌及无乳链球菌寡核苷酸适配子的特异性实验

采用流式细胞术对测序合成的每一条寡核苷酸适配子序列进行特异性分析，依据文献<sup>[87]</sup>具体方法如下：将 100 pmol 荧光标记的寡核苷酸适配子与金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌及志贺氏菌五种对照菌，室温孵育 45 min，更换离心管，于 4℃，5000 rpm 离心 5 min，弃上清，用 1×BB 反复离心冲洗 2 次，去除未与对照菌种相结合的寡核苷酸适配子，将菌体重悬于 1 mL 1×BB，用 BD FACSC alibur 流式细胞分析仪检测结合上 FAM 标记适配子的菌体阳性率，与相同条件下化脓链球菌、无乳链球菌的阳性率相比较，挑选出特异性强的寡核苷酸适配子。

#### 2.4.2.4 化脓链球菌及无乳链球菌寡核苷酸适配子的亲和性实验

对化脓链球菌及无乳链球菌寡核苷酸适配子进行亲和力分析，采用文献<sup>[88]</sup>如下方法：将合成的 5'端 FAM 标记的寡核苷酸适配子分别用 1×BB 稀释为不同的浓度梯度（10，20，50，100，200，500 nM），分别与  $1 \times 10^8$  个化脓链球菌、无乳链球菌室温孵育 45 min，更换离心管，于 4℃，5000 rpm 离心 5 min，弃上清，用 1×BB 反复离心冲洗 2 次后，将菌体重悬于 1 mL 1×BB，用 BD FACSC alibur 流式细胞分析仪检测结合上 FAM 标记适配子的菌体阳性率，利用 GraphPad Prism 5.0 软件计算各寡核苷酸适配子的解离常数 Kd 值，绘制化脓链球菌、无乳链球菌的各个适配子饱和结合曲线图。

### 2.4.3 磁性纳米材料的制备与修饰

#### 2.4.3.1 氨基化 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米粒子的制备与表征

采用水热-溶剂热方法，以 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 作为铁源，1,6-己二胺作为氨基功能化试剂<sup>[89]</sup>，在乙二醇和无水醋酸钠的作用下，参考文献<sup>[90]</sup>的方法，具体实施如下：称取 6.5 g 的 1,6-己二胺、2.0 g 的无水醋酸钠、1.0 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 于 100 mL 圆底烧瓶加入 30 mL 乙二醇中，50℃剧烈搅拌至溶液澄清；将溶液移至带四氟乙烯内衬的高压反应釜中，于 198℃高温反应 6 h，结束后自然冷却至室温；将高压反应釜中的液体移至烧杯，用无水乙醇、超纯水交替冲洗 3-5 次后，进行干燥操作（烘箱 50℃），最终得到包被氨基基团的磁珠颗粒，存于 4℃备用。

利用 JEM-2100HR 透射电镜（Transmission electron microscope, TEM）对制备得到的磁珠进行表征。

#### 2.4.3.2 链霉亲和素包被磁珠的制备与表征

称取氨基化的磁珠 2 mg，将其超声分散在含 5%戊二醛的磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4：NaCl 137 mmol/L，KCl 2.7 mmol/L，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mmol/L）中，于 37℃、200 rpm 摇床反应 2 h，加磁场利用 PBS 反复进行超声洗涤 5 次以除去未结合的戊二醛；将浓度为 1 mg/mL 的亲合素 200 μL 加入到已连接戊二醛的氨基化磁珠

---

中,于 37℃、200 rpm 摇床反应 2 h,再次加磁场利用 PBS 反复进行洗涤,最终以 1 mg/mL 的磁珠含量保存于 4℃ 含 0.05%吐温-20 的 PBS (PBS-T) 溶液中备用,利用红外光谱仪 (Infrared Spectroscopy, IR) 及紫外分光光度计对其进行表征。

#### 2.4.3.3 链霉亲和素加入量的优化

配制浓度为 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 $\mu$ g/mL 的链霉亲和素溶液并测量其紫外吸收值,分别加入终浓度为 1 mg/mL 已连接戊二醛的磁珠体系中,于 37℃、200 rpm 摇床反应 2 h,外加磁场,反复用 PBS 超声清洗 3-5 次,利用 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计分别测量其上清液的紫外吸收值,通过紫外吸收值的变化量来计算包被在磁珠上的亲和素的量。

#### 2.4.3.4 链霉亲和素反应时间的优化

选取最佳的亲和素浓度加入量,与终浓度 1 mg/mL 已连接戊二醛的磁珠于 37℃、200 rpm 摇床反应,分别选取反应时间在 20、40、60、80、100、120 min 时,外加磁场收集磁珠,利用 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计,对上清液进行 280 nm 处的紫外测量,通过紫外吸收值的变化量来确定亲和素包被磁珠的最佳结合时间。

#### 2.4.3.5 生物素化适配子连接到磁珠的制备与表征

将生物素标记的适配子溶解于 PBS 溶液,浓度为 20  $\mu$ M,加入到终浓度为 1 mg/mL 的包被好亲和素的磁珠体系中,于 37℃、200 rpm 摇床反应 1 h,加磁场利用 PBS 反复进行超声清洗 3-5 次;收集上清,在 260 nm 处测其 DNA 的紫外吸收并将连接适配子的磁珠体系作为模板,利用 PCR 扩增及凝胶成像技术,进行生物素化适配子连接到磁珠的验证。

#### 2.4.3.6 生物素化适配子加入量的优化

配制浓度为 4, 8, 12, 16, 20, 24  $\mu$ g/mL 的链霉亲和素溶液,分别加入终浓度为 1 mg/mL 已包被亲和素的磁珠体系中,于 37℃、200 rpm 摇床反应 1 h,加磁场用 PBS 反复超声清洗 3-5 次,利用 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计分别测量其上清液的紫外吸收值,通过紫外吸收值的变化量来计算连接上的生物素化适配子的量。

#### 2.4.3.7 生物素化适配子反应时间的优化

对生物素化适配子与亲和素包被磁珠的结合时间进行了考察,加入最适量生物素化适配子浓度,设置 10、20、30、40、50、60 min 作为时间梯度,于 37℃、200 rpm 摇床反应,外加磁场取上清液,利用 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计测量其中存在的 ssDNA,通过紫外变化量来确定最佳的反应时间。

### 2.4.4 基于磁珠核酸适配子的化脓链球菌、无乳链球菌的检测方法

取上述连接有寡核苷酸适配子的磁珠溶液加入到可拆酶标板孔中,加入梯度稀释的化脓链球菌、无乳链球菌,分别于室温孵育 45 min,加磁场用 PBS 反复洗涤 3-5 次;然

---

后对应加入 FAM 标记的寡核苷酸适配子，再次经室温孵育 45 min 后，加磁场用 PBS 反复洗涤 3-5 次，加入 300  $\mu$ L PBS，于 M5 荧光酶标仪测定各孔的荧光强度，探索荧光强度与化脓链球菌、无乳链球菌菌落个数之间的关系，并绘制标准校正曲线。

#### 2.4.4.1 化脓链球菌、无乳链球菌检测方法标准曲线和检出限

取过夜培养的细菌进行梯度稀释，各取 100  $\mu$ L 不同浓度的菌液进行平板计数；将上述连接有生物素化适配子的磁珠（1 mg/mL）200  $\mu$ L 加入到不同浓度梯度纯净的化脓链球菌、无乳链球菌菌液 800  $\mu$ L，反正终体积为 1 mL。于 37℃ 反应 1 h；加磁场用 PBS 反复洗涤 3-5 次，再加入 FAM 荧光素标记的适配子显示探针，37℃ 反应 1 h；加磁场用 PBS 反复洗涤 3-5 次，加入可拆酶标板孔中，使用 M5 荧光酶标仪，在激发波长 492 nm，发射波长 525 nm 条件下，测其荧光强度，得出荧光强度变化与体系中目标物质的量之间的关系。

#### 2.4.4.2 牛奶中化脓链球菌、无乳链球菌加标回收测定

移取市售的无菌牛奶 100  $\mu$ L 通过平板验证其是否含有化脓链球菌、无乳链球菌；分别于市售牛奶中加入不同浓度梯度的化脓链球菌、无乳链球菌，同时进行平板计数，构建 2.4.4 中的检测方法，对体系进行荧光检测；同时，根据 2.4.4.1 中菌落与荧光强度关系，来推出对应的菌落个数，与平板计数结果比对，计算此方法的加标回收率。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 化脓链球菌、无乳链球菌寡核苷酸适配子的筛选研究

通过 Barry Want-Hull 等的理论研究及实验证明, 一个有效的体外化学合成的 DNA 文库, 通过 SELEX 过程, 可以同时筛选出不同目标物质的高亲和力适配子序列, 这些适配子的获得是依据每一条适配子与相对应的目标物质的结构和亲和力的不同而筛选得到的<sup>[91]</sup>, 因此, 相当数量的 ssDNA 的存在是目标物质成功筛选适配子的基础。筛选过程中, ssDNA 中潜在着所需目标物质的适配子序列, 随着筛选轮数的增加, 目标物质上的 DNA 或 RNA 片段得到富集, 直至亲和力饱和, 即 DNA 或 RNA 片段占据了目标物质上所有的“表位”, 产生了高亲和力的适配子<sup>[92]</sup>。而单链 RNA 比 DNA 在二级空间构象上更为丰富, 更易与目标物质形成靶标-适配子结合物, 较易筛选得到亲和力高、特异性强的寡核苷酸适配子。但在 SELEX 过程中, 体系中存在的核糖酶容易分解 RNA, 筛选得到的 RNA 适配体不容易保存。相比于 RNA 适配子, ssDNA 适配子的碱基序列不易降解、结构更加稳定、便于长期保存<sup>[93]</sup>。

因此本实验设计了体外合成大容量的  $10^{14}$ ~ $10^{15}$  个随机 ssDNA 文库, 其长度为 80nt, 两端为固定引物序列, 中间为 40 个碱基的随机序列; SELEX 实验中, 逐轮增大 BSA 的加入量, 使得靶细胞与 BSA 分子之间对适配子的竞争增大; 每轮加入 tRNA, 也使得其与适配子对“表位”的竞争增大, 更易得到特异性强的 ssDNA 适配体。而 12 轮筛选均使用生长状态相同的纯净的细菌细胞, 以减少细菌表面形态及培养基成分对寡核苷酸适配子文库筛选的影响。为了得到亲和力和特异性更优的适配子, 后六轮减少了目标菌与 ssDNA 孵育的时间, 分别为 45 min。

##### 3.1.1 随机单链 DNA Seq1 及 Seq2 的 PCR 扩增条件优化

在 SELEX 筛选过程中, PCR 的扩增条件影响能否有效扩增, 从而得到正确的序列。首要因素是变性温度, 变性温度决定 PCR 反应中双链 DNA 解链的温度, 达不到变性温度就不会产生 ssDNA 模板, PCR 也就不会启动。变性温度低则变性不完全, DNA 双链会很快复性, 因而减少产量。由于温度越高, 变性越完全。而在变性的温度范围 (一般取 90℃-95℃) 内, Taq-plus DNA 聚合酶的反应温度不宜超过 95℃, 所以将 PCR 反应的变性温度设置为 95℃。

其次, 对 PCR 产物影响较大的就是退火温度。当退火温度增高时, 由于引物的特异性增强, 导致 PCR 产率提高, 但若温度过高时, 引物不能牢固结合模板单链, 最终导致扩增产率下降; 若降低退火温度, 则易错配引物与模板, 从而产生非特异性扩增产物。对此, 本实验设定 54、56、58、60℃四个梯度, 来优化 PCR 退火温度, 图 3-1 (a) 显示针对化脓链球菌的文库 I, 当退火温度为 60℃时, 产物条带单一且清晰, 温度过高或过低都不能得到目标清晰的条带; 而图 3-1 (b) 为无乳链球菌的文库 II, 由图可见, 58℃、60℃均可以产生明亮条带, 但 60℃时会产生非特异性条带, 可能对后续的筛选造

成影响，故选择可以得到均一稳定产物的 58℃作为退火温度。

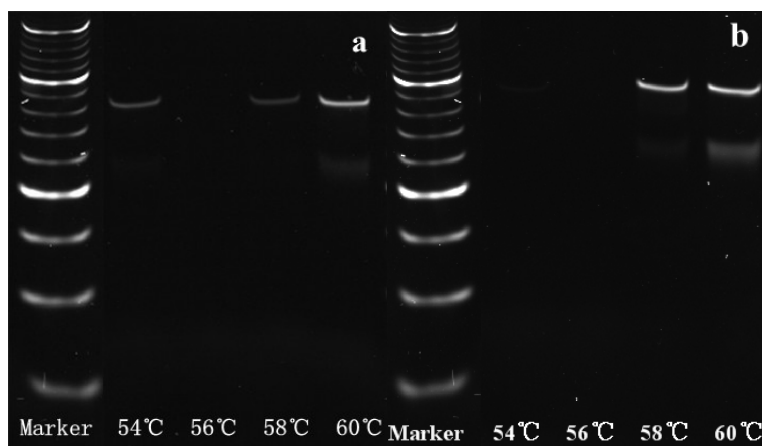


图 3-1 退火温度的优化：(a) 文库 I、(b) 文库 II

Fig. 3-1 Optimization of Annealing Temperature: (a) library I、(b) library II

实验发现，循环次数也是 PCR 能否扩增成功的重要因素。一般是循环次数过多，非特异性背景严重，复杂度增加。但循环反应的次数太少，则产率偏低。在保证产物得率前提下，应尽量减少循环次数。实验分别设定最佳退火温度为 58℃、60℃，循环次数依此为 20、25、30，由图 3-2 可知，当 PCR 循环次数为 25 时，条带单一且明亮，循环次数为 30 时，虽然条带明亮，但有非特异性产物产生，考虑到随着筛选次数的增加，可能导致非特异性产物的累积量增多，对实验造成误差，因此考虑 25 轮次为最佳的 PCR 循环周期。

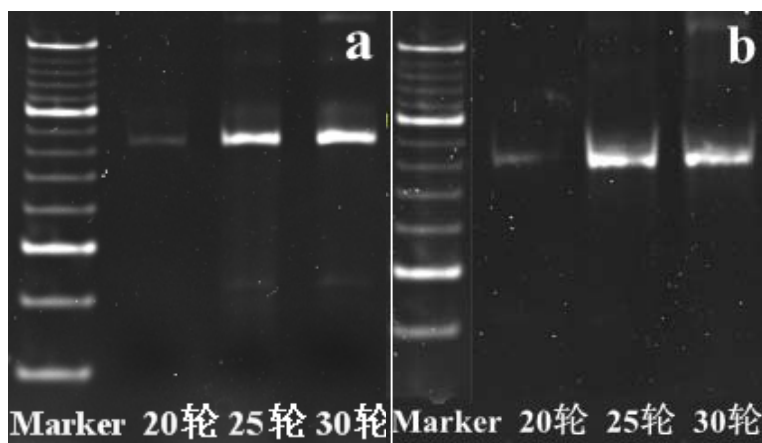


图 3-2 PCR 循环次数的优化：(a) 文库 I、(b) 文库 II

Fig. 3-1 Optimization of PCR cycles: (a) library I、(b) library II

### 3.1.2 PCR 产物制备单链的条件优化

ssDNA 适配子具有高特异性，基于其本身的二级结构，能识别目标物质上的特异结构，如：目标物质表面存在或缺失一个氢氧基团、一个甲基等<sup>[94]</sup>。较常见的制备 ssDNA 的方法是 95℃水浴加热 10 min，立即冰浴 10 min，但此方法的不足是 ssDNA 在室温下容易部分复性，又或是形成部分双链的叉状结构，无法形成有效的 ssDNA 空间结构，最终会影响筛选的进行，所以 ssDNA 的制备对后续的筛选十分重要。Lambda 核酸外切

酶是一种高持续性核酸外切酶，其首先作用于 5'-磷酸化的双链 DNA，沿 5'→3'方向逐步切去 5'单核苷酸。PCR 扩增结束后，对其产物进行提纯 DNA 处理，以去除可能影响酶切的因素，得到纯净的双链 DNA 目标物质进行酶切。每轮筛选 PCR 产物进行酶切后，得到与原文库大小相同并且条带清晰的酶切产物是下一轮成功筛选的前提，能否酶切完全受其酶切条件的影响，通过 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计测量 PCR 提纯产物中存在的双链 DNA 的量，按照加酶量的计算方法，以此推测加酶量及酶切时间。

实验分别对加酶量和酶切时间进行了条件优化，加酶量为计算值的 1.0、1.5、2.0、2.5 倍，酶切时间为 2 h；由图 3-3 加酶量的增多对酶切的效果没有明显的影响，都可以得到单一清晰的条带，证明已酶切完全。当加酶量为 1 倍时，酶切时间依此为 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h，根据结果图 3-4 可以看出，酶切时间为 0.5 h 时，酶切不完全，依然有部分双链 DNA 未被完全切开，而当酶切时间长于 1 h，则已酶切完全，因此最终酶切时间定为 1 h。

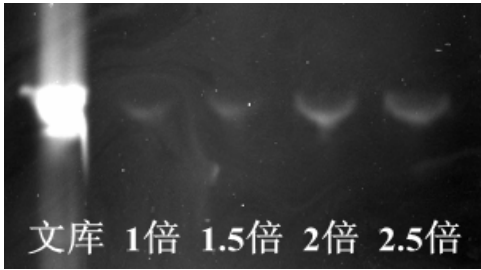


图 3-3 加酶量的优化

Fig. 3-3 Optimization of adding amount of enzyme

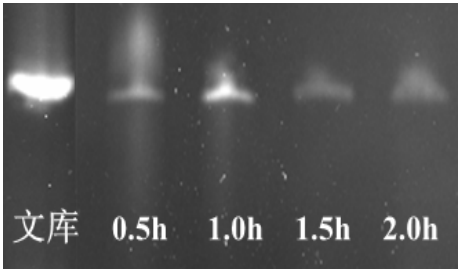


图 3-4 酶切时间的优化

Fig. 3-4 Optimization of reaction time

当酶切底物浓度发生变化时，其酶切结果会发生变化。分别设置底物浓度为 300、500、700、900、1100 ng/μL，1 倍的加酶量、1 h 的酶切时间，其实验结果如图 3-5，可以看出，当底物浓度低于 500 ng/μL 是，酶切完全，可以得到单一清晰的条带；但当底物浓度在 700 ng/μL 以上时，结果同时显示了双链 DNA 的条带，证明酶切不完全，体系中并未完全以 ssDNA 形式存在。因此在筛选目标菌适配子时，只有将底物浓度保持在 500 ng/μL 以下时，才能充分酶切，进行下一步循环筛选。综合以上因素，考虑到实验效率及经济因素，选择 1 倍的加酶量、1 h 的酶切时间、500 ng/μL 的底物浓度进行制备 ssDNA 实验。

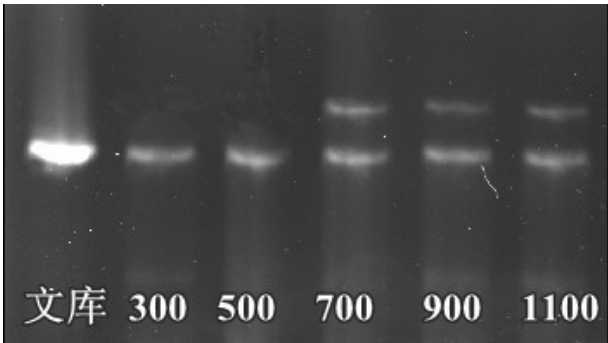


图 3-5 双链 DNA 浓度的优化

Fig. 3-5 Optimization of concentration of dsDNA

### 3.1.3 筛选轮数的优化

每轮与目标菌结合的适配子的含量都不同,但是随着筛选轮数的增加,特异性适配子的含量越来越多,其与目标菌的连接量也随之增大,因此,根据每轮孵育后与靶标结合的适配子的量来检测是否已达到特异性吸附饱和,从而确定最优的适配子筛选轮数。由于从第二轮开始,每轮投入 ssDNA 孵育的量均为 100 pmol,因此可以通过对洗脱液中 ssDNA 浓度的检测实现对结合量的探索。结果如图 3-6, ssDNA 进行 260 nm 处的紫外吸收值测定,图 3-6 (a) 显示当化脓链球菌筛选轮数超过 12 轮后,结合的 ssDNA 的量有所下降,为了得到多样性更高的特异性适配体进行后续分析,选取 12 轮作为化脓链球菌的最优筛选轮数;图 3-6 (b) 结果可以看出,当轮数为 12、13、14 轮时,结合已经达到饱和,因此无乳链球菌筛选轮数选为 12 轮。

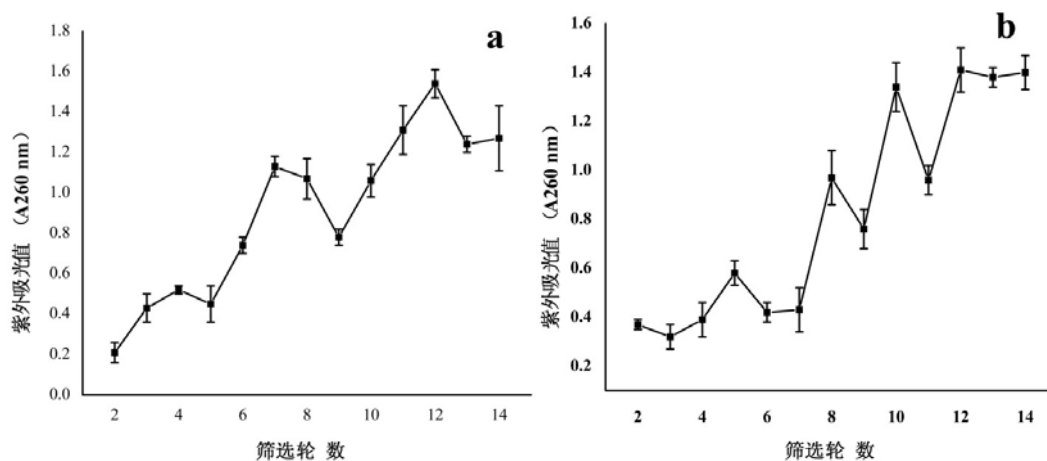


图 3-6 ssDNA 与化脓链球菌 (a)、无乳链球菌 (b) 每轮筛选结合的测定

Fig. 3-6 Detection of ssDNA binding to *Streptococcus pyogenes* (a)、*Streptococcus agalactiae* (b)

### 3.1.4 化脓链球菌、无乳链球菌 SELEX 筛选每轮 PCR 产物电泳结果

图 3-7、3-8 分别为化脓链球菌、无乳链球菌的 4~12 轮筛选得到的 PCR 扩增产物图,由图中清晰明亮的条带表明了每轮筛选的可靠性,为成功筛选到化脓链球菌、无乳链球菌寡核苷酸适配子提供了技术保证。第十二轮筛选结果得到验证后,将样品送至上海博尚生物技术有限公司克隆测序,以进行下一步应用分析。



图 3-7 化脓链球菌适配子 4-12 轮 PCR 电泳图

Fig. 3-7 PAGE of PCR products from 4 to 12 round of aptamer for *Streptococcus pyogenes*

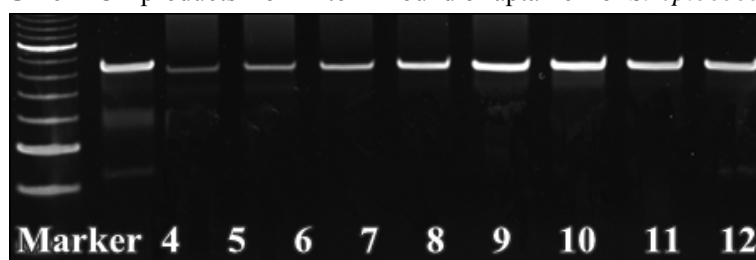


图 3-8 无乳链球菌适配子 4-12 轮 PCR 电泳图

Fig. 3-8 PAGE of PCR products from 4 to 12 round of aptamer for *Streptococcus agalactiae*

## 3.2 筛选得到化脓链球菌、无乳链球菌适配子的测序结果及分析

### 3.2.1 化脓链球菌寡核苷酸适配子的一级结构分析及二级结构图

测序得到 11 条化脓链球菌适配子序列，见表 3-1，通过 DNAMAN 软件分析比对其一级结构。根据同源性可以分为 5 个家族，图 3-9 显示其家族同源性最高可达 75%，高同源性说明筛选得到的适配子相似性高。家族 1 含有保守片段 GGG·GG，家族 3 含有保守片段 GGG，家族 4 含有保守序列 ATAC、CTTC，家族 5 含有保守片段 TGAAA，家族 2 只有一条序列，而每个家族中的保守片段在适配子筛选过程中可能起关键作用。(同源性高于多少可以算是一个家族，应该说明一下。)

表 3-1 化脓链球菌寡核苷酸适配子不同家族随机区序列

Table 3-1 Random sequence of aptamers of *Streptococcus pyogenes*

编号	适配子随机区序列
A-2	TAATACTACCAACTTCTTTGCCTGGCGTAAGTAACAGTCA
A-5	GTTCGGGGTTCGGGGTGAGTGGGGCCTAGGAGTGGGGGCGC
A-26	ATGGGGGGCGGGGAGGTGGGTACAGGGTCGGGGATGGCAG
A-27	CGGGCGGGGCGTGGGGTGTGGAGTGGAGGGCGGGGCGGC
A-27-2	AAGATGAATTTGAAAATAACGGATCATTCCGCGCGATATA
A-35	GGGGGAGGCGCCGGGCAGGGGGCTCGGGGGAGGCGGGCGG
A-38	TACACAATGCTTCGATAATTGACGCTACTTCATTTTATTA
A-51	ATCTTATTTATGAAACATTCATATGGGACGTAAAACCAGC
A-53	CAGGGTGCGGGAGGGCCAAAGGGGGGAGGGCCCGGGGGGA
A-58	TTCAGGGCGGGGTAAACGGGAGGTGGGGGGGGCTTGGGAC
A-68	GCGGGCGGGGGGAGGGCGGCCGTGGGCTGCGAGTGGGAGG



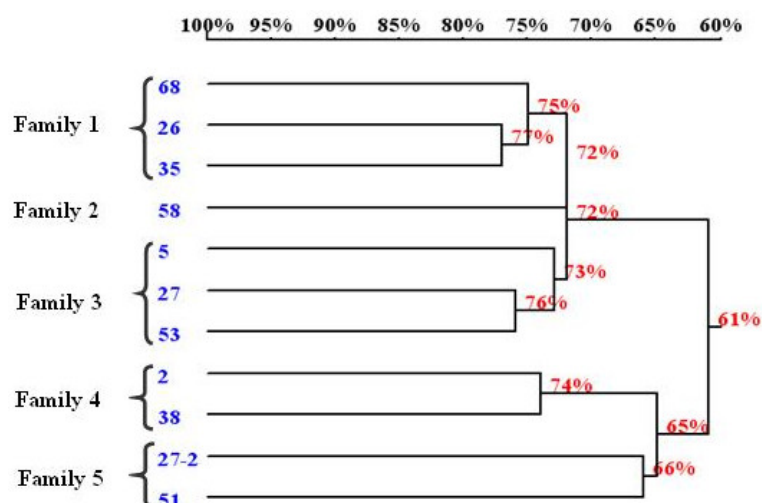
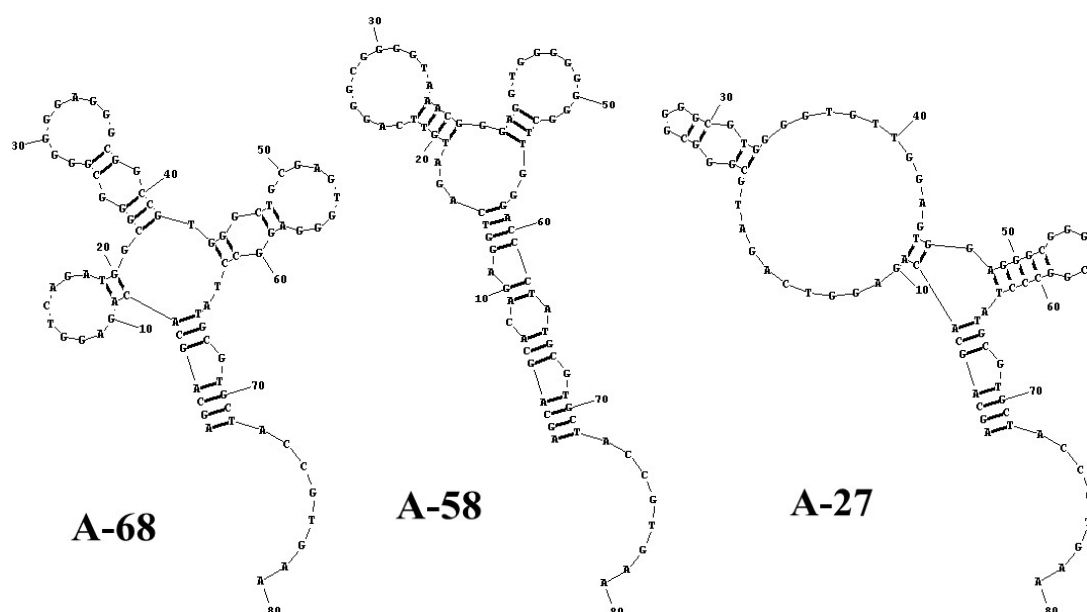


图 3-9 化脓链球菌适配子同源性树状图

Fig. 3-9 Homology tree of *Streptococcus pyogenes* aptamers

影响 ssDNA 二级结构稳定性的因素有很多，通常用自由能来衡量。自由能对了解配基与蛋白质等特异性表位的结合，空间结构的稳定性等都十分重要。通常情况下，自由能越小，结构越稳定<sup>[95]</sup>。于是，我们对测序并分组得到的序列利用软件 RNA Structure 4.2 进行了二级结构预测及最小自由能分析。从每组中挑选了自由能最低，结构最稳定的代表序列，分别为 A-68、A-58、A-27、A-2、A-51 送至上海生工生物工程技术有限公司进行 5'端 FAM 标记序列合成。由图 3-10 二级结构可以看出，化脓链球菌寡核苷酸适配子折叠形成了茎环、口袋、发卡等结构，这些特殊的结构可能引起其对靶标物质的高亲和力和特异性结合，其结构最小自由能依次为 -11.9 kcal/mol、-6.6 kcal/mol、-8.7 kcal/mol、-8.0 kcal/mol、-11.6 kcal/mol。



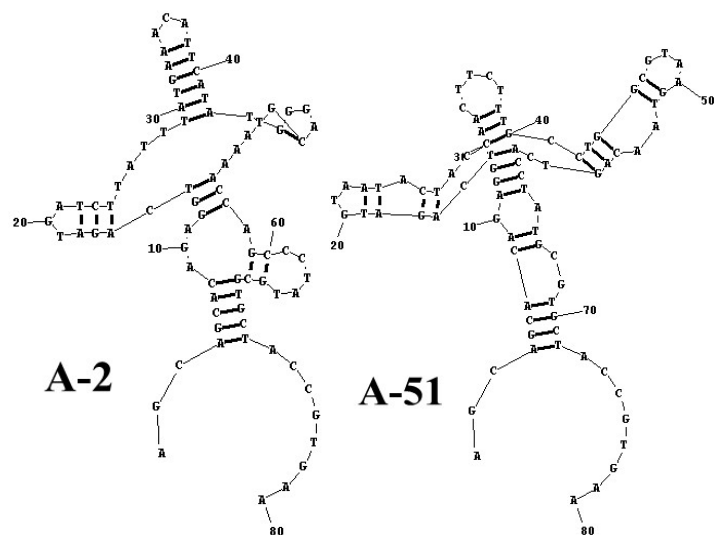


图 3-10 化脓链球菌适配子二级结构图

Fig. 3-10 secondary structures of *Streptococcus pyogenes* aptamers

### 3.2.2 无乳链球菌寡核苷酸适配子的一级结构分析及二级结构图

测序得到 17 条无乳链球菌适配子序列，见表 3-2，通过 DNAMAN 软件分析比对其一级结构。根据其同源性可以分为 7 个家族，家族同源性最高可达 99%。而家族 1、家族 3 和家族 7 分别只有一条序列，家族 2、家族 4、家族 5 和家族 6 整体序列相似度非常高，如图 3-11。

表 3-2 无乳链球菌寡核苷酸适配子不同家族随机区序列

Table 3-2 Random sequence of aptamers of *Streptococcus agalactiae*

编号	适配子随机区序列
B-1	GAGCAGAGCGAAGGGTGGGGGGCGGGTCCGAGTCGGTGA
B-2	GGGTGGGGGGTGGTGGGTGGACTCGGGTGGATGTCATCGC
B-5	GGGTGGGGGGTGGTGGGTGGTCTCGGGTGGATGTCATCGC
B-11	GAGCAGCTTGAAGGGTGGGGGGCGGGTCCGAGTCGGTGA
B-14	CTCGGGATCGATGGGGGGGGCGGACTTGTGGTGGGGGGCGG
B-20	GGTGGGGGAGGCCCGGGGCTACGCGATGTGGGGGGGGTAC
B-21	GGGGGCGGCGGGTGGCGGGCCGGGCGGATGCACCGCGGGG
B-26	GAGCGGAGCGAAGGGTGGGGGGCGGGTCCGAGTCGGTGA
B-35	GAGTGCAGGAAGCGGGGGGGGCACGGGCGGGGGGCTCATCGG
B-41	GGGTGGGGGGTGGTGGGTGGACTCGGGTGGATGTCACCGC
B-43	GAGCAGAGCGAAGGGTGGGGGGCGGGCTCCGAGTCGGTGA
B-48	GGGTGGGGGGTGGTGGGTGGACTCGGGTGGATGTCATCGC
B-57	GGGTGGGGGATGGTGGGTGGACTCGGGTGGATGTCATCGC
B-59	GGGGGCGGCGGGTGGCGGGCCGGGCGGATGCACCGCGGGA
B-62	GGGTGGGGGGCGGTGGGTGGACTCGGGTGGATGTCATCGC
B-64	CGCTATCTCAACTCTTTTATCCGTAAAGTAGTTCTCATTT
B-68	CGGTGGGGGAGGCCCGGGGCACGCGATGCCCGGGGGGGTA

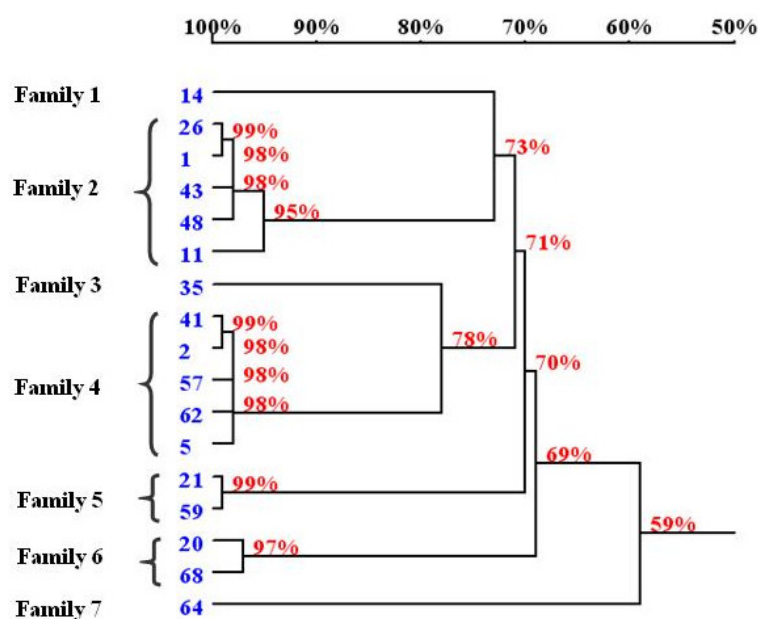
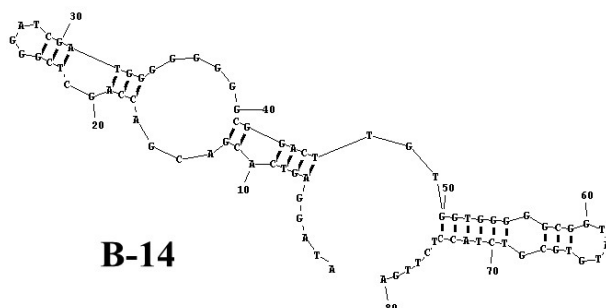


图 3-11 无乳链球菌适配子同源性树状图

Fig. 3-11 Homology tree of *Streptococcus agalactiae* aptamers

同样，我们对测序并分组得到的序列利用软件 RNA Structure 4.2 进行了二级结构预测及最小自由能分析。从每组中挑选了自由能最低，结构最稳定的代表序列，分别为 B-14、B-26、B-35、B-41、B-21、B-68、B-64 送至上海生工生物工程技术有限公司进行 5'端 FAM 标记序列合成。其二级结构如图 3-12，从图中可以看出适配子展现了其空间多样性，结构最小自由能依次为-6.3 kcal/mol、-11.8 kcal/mol、-12.3 kcal/mol、-10.6 kcal/mol、-12.4 kcal/mol、-14.3 kcal/mol、-2.1 kcal/mol。



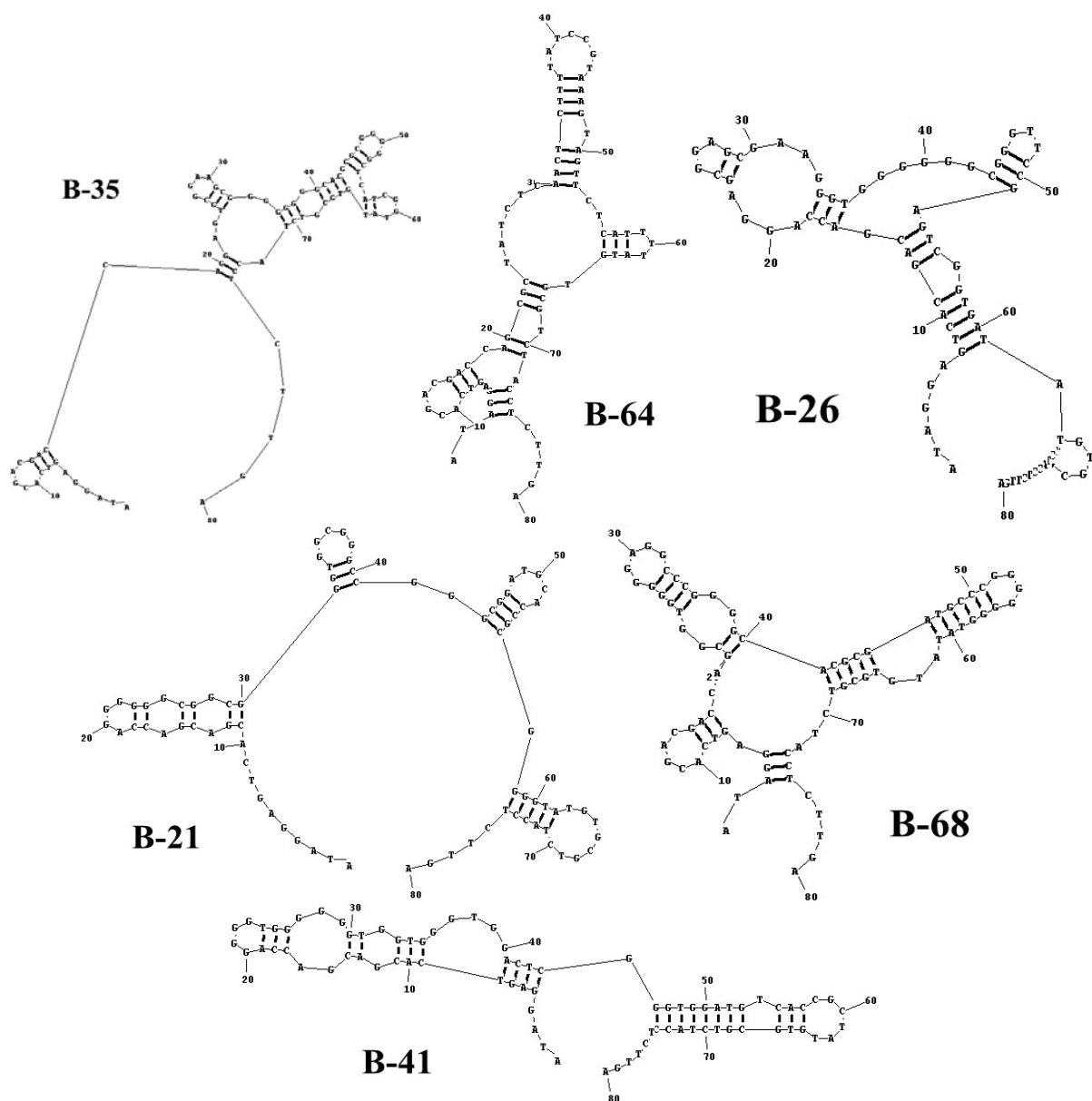


图 3-12 无乳链球菌适配子二级结构图

Fig. 3-12 Secondary structures of *Streptococcus agalactiae* aptamers

### 3.2.3 化脓链球菌寡核苷酸适配子的特异性分析

流式细胞术（Flow Cytometry, FCM）即使用流式细胞仪，当微粒或者细胞在液流中流动，通过入射光束照射，使用高灵敏度检测器接收各种荧光及散射光信号，对液流中的微粒或者细胞进行快速分选及测量的新型分析技术<sup>[96-97]</sup>。本研究中，将 FAM 荧光素标记的适配子与目标菌进行孵育结合后，使用 BD FACSC alibur 流式细胞分析仪对孵育结合物进行检测。当 FAM 荧光素标记的 ssDNA 适配子连接到菌体表面，逐一流经流动室时，被激光束所照射，产生激发荧光，经计算机分析系统得到连接上寡核苷酸适配子的细胞比率，以此结果来检测筛选获得的 ssDNA 适配子的特异性和亲和力。

图 3-13 为 FAM 荧光标记的化脓链球菌寡核苷酸适配子分别与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、志贺氏菌及沙门氏菌进行孵育后的特异性检测结果，

其中，各种适配子对化脓链球菌的阳性率分别为 A-68：77.05±3.557%，A-58：63.29±4.012%，A-27：72.65±3.273%，A-2：57.83±4.209%，A-51：78.87±3.518%；适配子 A-68、A-27、A-51 与化脓链球菌结合的阳性率均达到 70%以上，适配子 A-68 与其他常见致病菌结合的阳性率不超过 15%，特异性较优；适配子 A-58 与化脓链球菌结合的阳性率为 63.02%，而与金黄色葡萄球菌结合的阳性率高达 21.71%，不适宜作为化脓链球菌候选适配子的参考序列；适配子 A-27 与其他菌的结合率均不超过 20%；适配子 A-2 与其他致病菌的结合率均较低，但与化脓链球菌结合的阳性率仅为 55.35%；适配子 A-51 的特异性较差，虽与目标菌的结合率较高，但与其他致病菌结合的阳性率均高于 10%，不易作为候选化脓链球菌适配子的参考序列。由结果可以看出，五条适配子与金黄色葡萄球菌的结合率均较高，可能为金黄色葡萄球菌与化脓链球菌表面结构同源性高，特异性结合位点相似度高所致。

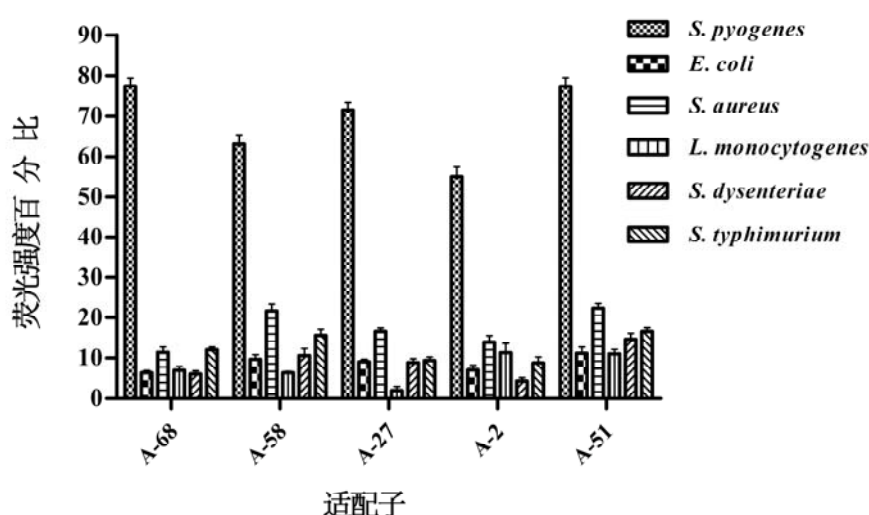


图 3-13 化脓链球菌适配子特异性

Fig. 3-13 Specificity of *Streptococcus pyogenes* aptamers

### 3.2.4 无乳链球菌寡核苷酸适配子的特异性分析

图 3-14 为 FAM 标记的无乳链球菌寡核苷酸适配子分别与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、志贺氏菌及沙门氏菌进行孵育后的特异性检测结果，其中，各种适配子对无乳链球菌的阳性率分别为 B-14：43.28±2.522%，B-26：75.31±1.118%，B-35：70.03±0.569%，B-41：63.81±0.731%，B-21：77.33±1.527%，B-68：80.95±2.477%，B-64：82.70±1.719%；适配子 B-26、B-21、B-68、B-64 与无乳链球菌结合的阳性率均达到 70%以上，适配子 B-14 与目标菌的结合性较差，阳性率不足 50%，并且特异性较差，不考虑其成为针对筛选无乳链球菌的适配子序列；适配子 B-26 与无乳链球菌结合率较高，但与其他常见致病菌结合的阳性率整体较高，不作为无乳链球菌的候选适配子序列；适配子 B-35 与无乳链球菌结合的阳性率为 66.71%，与其他致病菌结合的阳性率不到 20%；适配子 B-41、B-21、B-68 的特异性较好，并且与目标菌的结合率较高；适

配子 B-64 虽与目标菌的结合率较好，但其同时易与其他致病菌细胞结合，不适合作为筛选无乳链球菌的候选适配子序列。

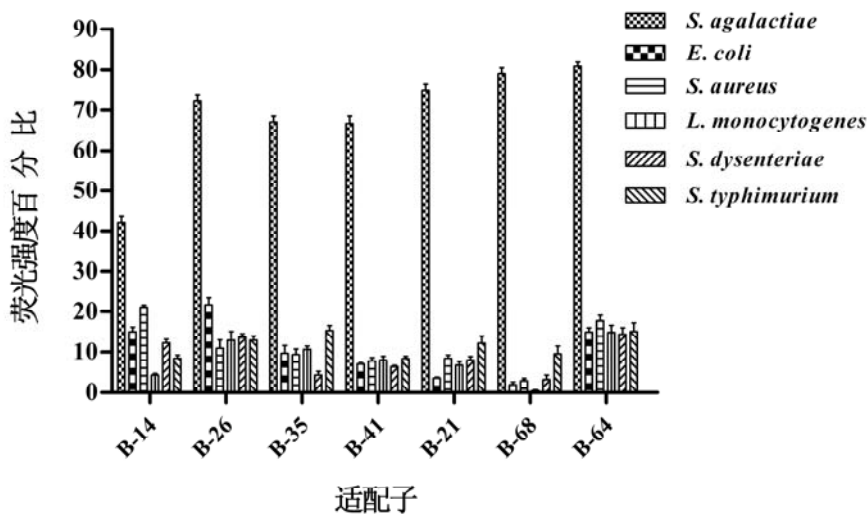


图 3-14 无乳链球菌适配子特异性

Fig. 3-14 Specificity of *Streptococcus agalactiae* aptamers

3.2.5 化脓链球菌寡核苷酸适配子亲和力分析结果

寡核苷酸适配子与配体的亲和力，常用解离常数  $K_d$  来表示，代表了两者之间特异结合的紧密程度，是确定寡核苷酸适配子性质的重要指标之一<sup>[98]</sup>。 $K_d$  值越小，适配子与配体的亲和力越强。实验中将 5'端 FAM 标记的 ssDNA 适配子稀释成不同的浓度梯度 10, 20, 50, 100, 200, 500 nM，相同条件下与  $1 \times 10^8$  个化脓链球菌进行孵育，使用流式细胞仪对荧光强度进行测定，通过 GraphPad Prism 5.0 软件计算各个寡核苷酸适配子的解离常数  $K_d$  值（表 3-3），并绘制其亲和力的非线性回归曲线（图 3-15）。 $K_d$  值越小，亲和力越高，随着适配子浓度的增加，结合的化脓链球菌细胞的荧光强度增强，最终达到饱和，曲线逐渐趋于平缓。在进行亲和力测定的五条序列中，适配子 A-68 与化脓链球菌的亲和力最高， $K_d$  值达  $44.25 \pm 5.203$  nmol/L；其他亲和力较好的适配子序列分别为 A-27、A-51，对应的  $K_d$  值分别为  $53.89 \pm 7.586$  nmol/L、 $49.67 \pm 7.598$  nmol/L。

表 3-3 化脓链球菌适配子序列的解离常数

Table 3-3 The dissociation constants ( $K_d$ ) of aptamers of *Streptococcus pyogenes*

适配子	解离常数 $K_d$ (nmol/L)
A-68	$44.25 \pm 5.203$
A-58	$130.0 \pm 23.59$
A-27	$53.89 \pm 7.586$
A-2	$131.8 \pm 18.25$
A-51	$49.67 \pm 7.598$

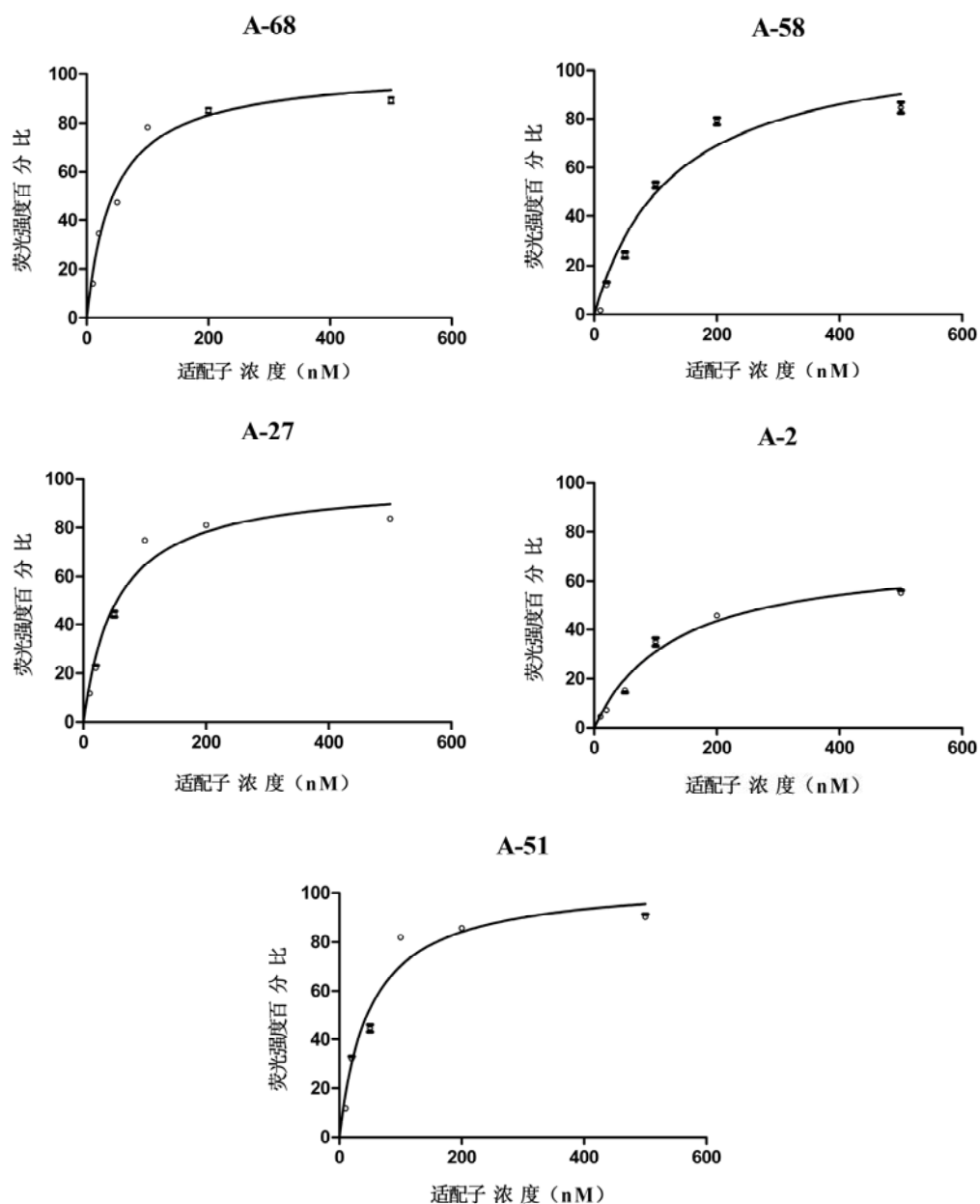


图 3-15 化脓链球菌适配子饱和结合曲线

Fig. 3-15 The saturated binding curve of *Streptococcus pyogenes* aptamers

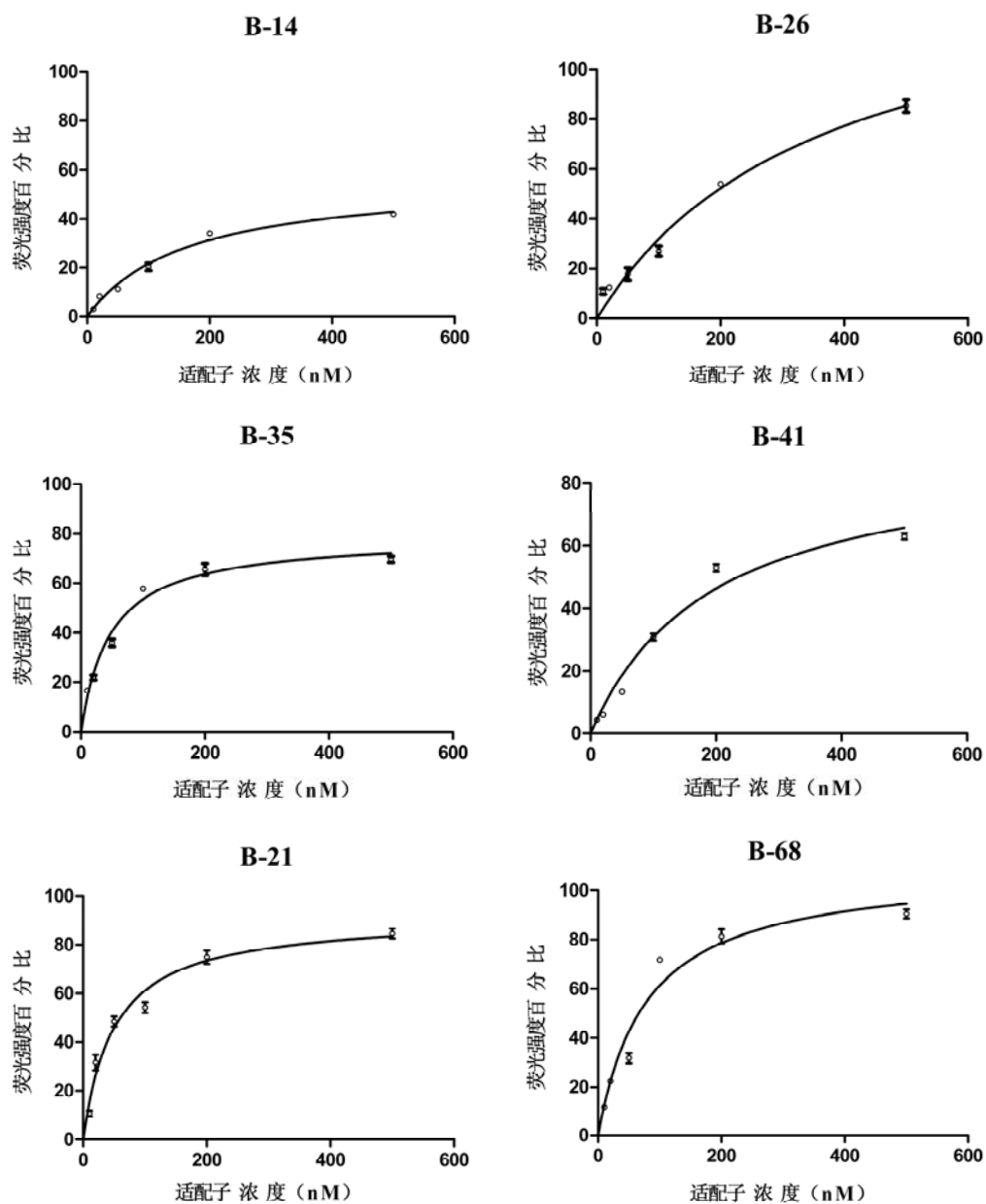
### 3.2.6 化脓链球菌寡核苷酸适配子亲和力分析结果

在进行亲和力测定的七条序列中,适配子 B-64 与无乳链球菌的亲和力最高(表 3-4),  $K_d$  值达  $39.05 \pm 5.760$  nmol/L; 其他亲和力较好的适配子序列分别为 B-35、B-21、B-68, 对应的  $K_d$  值分别为  $47.22 \pm 5.043$  nmol/L、 $49.88 \pm 6.871$  nmol/L、 $78.27 \pm 12.85$  nmol/L。

表 3-4 无乳链球菌适配子序列的解离常数

Table 3-4 The dissociation constants (Kd) of aptamers of *Streptococcus agalactiae*

适配子	解离常数 Kd (nmol/L)
B-14	$163.5 \pm 20.74$
B-26	$362.1 \pm 68.46$
B-35	$47.22 \pm 5.043$
B-41	$194.9 \pm 31.76$
B-21	$49.88 \pm 6.871$
B-68	$78.27 \pm 12.85$
B-64	$39.05 \pm 5.760$





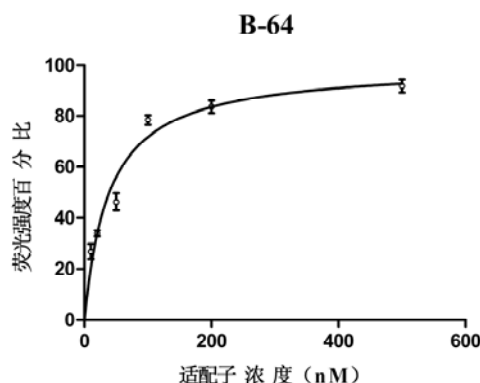


图 3-16 无乳链球菌适配子饱和结合曲线

Fig. 3-16 The saturated binding curve of *Streptococcus agalactiae* aptamers

### 3.2.7 筛选得出化脓链球菌、无乳链球菌适配子序列

针对化脓链球菌筛选的适配子序列, A-68、A-27、A-2 的特异性强, 而适配子 A-68、A-27、A-51 的亲合力水平高, 综合特异性与亲合力分析, 挑选出寡核苷酸适配子 A-68、A-27 作为化脓链球菌的最优适配子进行后续检测应用; 在无乳链球菌适配子的特异性实验中, 适配子 B-35、B-41、B-21、B-68 的特异性较理想, 在亲合力实验中, 适配子 B-64、B-35、B-21、B-68 的亲合力较高, 考虑到适配子 B-35 与无乳链球菌的结合阳性率为 66.71%, 低于适配子 B-21、B-68 (均为 74%以上) 的结合率, 因此挑选寡核苷酸适配子 B-21、B-68 作为针对无乳链球菌的最优适配子进行后续的检测应用。

将适配子 A-68、B-21 送至上海生工生物工程公司合成 5'端生物素化的序列, 适配子 A-27、B-68 合成 5'端 FAM 荧光素标记的序列, 分别用以化脓链球菌、无乳链球菌的检测方法筛选, 合成序列结果见表 3-5。

表 3-5 用于检测方法的适配子

Table 3-5 Aptamers for detection

目标菌	编号	适配子序列
化脓链球菌	I	5'-Bio- <u>AGCAGCACAGAGGTCAGATGCGGGCGGGGGAGGGCGG</u> <u>CCGTGGGCTGCGAGTGGGAGGCCTATGCGTGCTACCGTGAA</u> -3'
	II	5'-FAM- <u>AGCAGCACAGAGGTCAGATGCGGGCGGGGCGGTGGGGTGT</u> <u>TGGAGTGGAGGGCGGGGCGGCCCTATGCGTGCTACCGTGAA</u> -3'
无乳链球菌	III	5'-Bio- <u>ATAGGAGTCACGACGACCAGGGGGGCGGCGGGTGGCGGGC</u> <u>CGGGCGGATGCACCGCGGGGTATGTGCGTCTACCTCTTGA</u> -3'
	IV	5'-FAM- <u>ATAGGAGTCACGACGACCAGCGGTGGGGGAGGCCCGGGG</u> <u>CACGCGATGCCCCGGGGGGGTATATGTGCGTCTACCTCTTGA</u> -3'

注: 下划线为引物序列。

图 3-17 为综合挑选出的四条序列分别与六种致病菌结合的流式细胞比对结果图。由图可以看出, FAM 标记的适配子 A-68、A-27 与化脓链球菌的结合量大, 其结果所体现的荧光偏移较强, 而其他几种致病菌与 FAM 荧光标记的适配子的结合能力弱且荧光

偏移小；同样，FAM 荧光标记的适配子 B-21、B-68 与无乳链球菌结合后，荧光发生较强偏移，而相对其他五种常见致病菌，结合率低，荧光偏移较小。

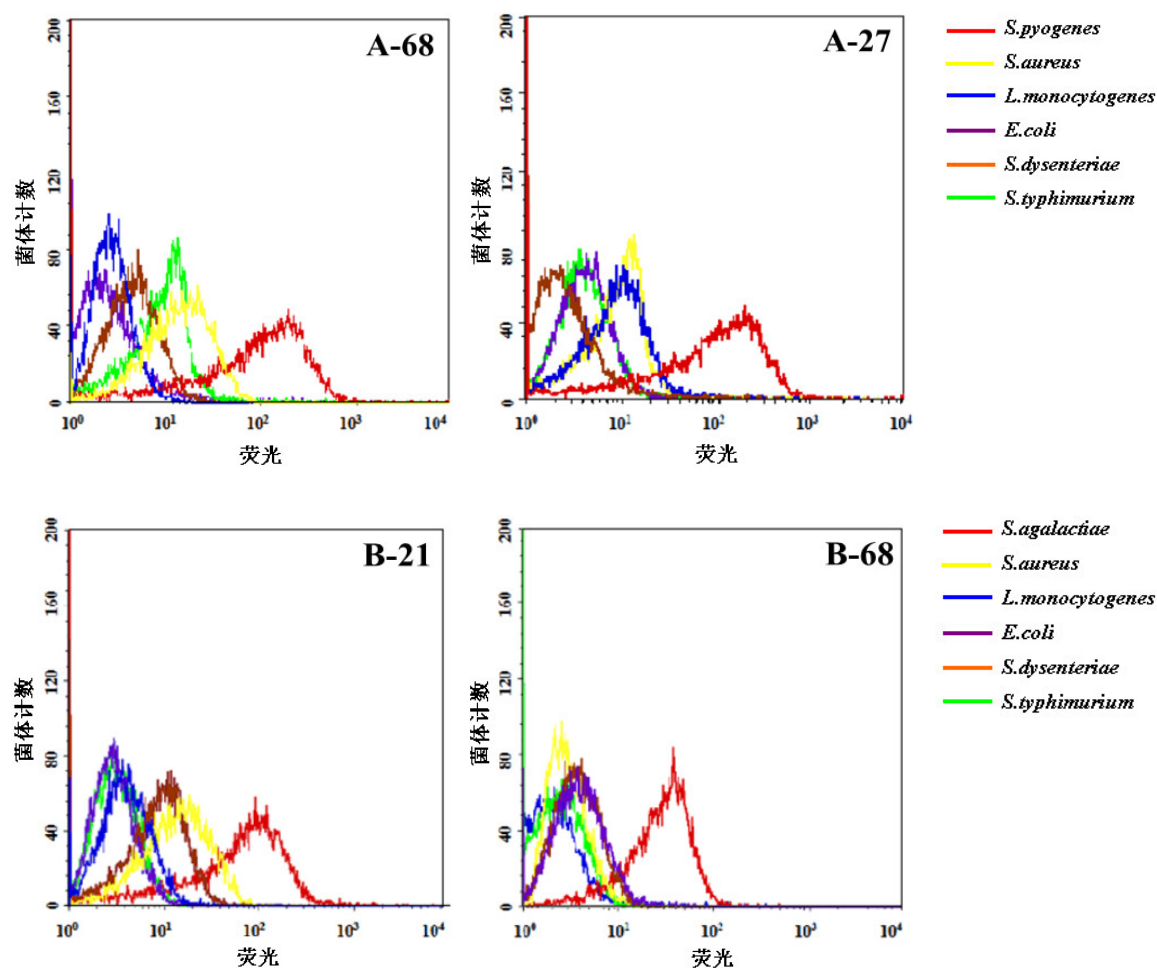


图 3-17 适配子 A-68、A-27、B-21、B-68 与微生物细胞结合后的流式细胞图

Fig. 3-17 Flow cytometric analysis of aptamer A-68、A-27、B-21、B-68 binding to bacteria

### 3.3 基于寡核苷酸适配子的化脓链球菌、无乳链球菌检测探针的制备

#### 3.3.1 氨基化磁珠的制备与表征

磁性纳米材料优点众多，首先是易于分离，只需通过外加磁场的作用便可分离富集样品，现已实现了病毒 RNA 的分离<sup>[99]</sup>和纯化<sup>[100]</sup>，在免疫学上，也被用作抗原抗体的分离<sup>[101]</sup>；磁性纳米粒子具有超顺磁性质<sup>[102]</sup>，其粒径仅为几十纳米，小于大多数重要的生物分子，可在其表面修饰特殊基团，来达到较好的生物相容性；本研究是在无数个磁珠表面固定核酸探针，增大反应面积，提高检测灵敏度<sup>[103]</sup>。实验通过乙二醇对  $\text{FeCl}_3$  的还原作用，1,6-己二胺提供氨基，在弱碱条件下，成功制备了氨基化的磁性纳米粒子。采用制备得到的氨基化的磁性纳米粒子作为筛选得到的化脓链球菌、无乳链球菌生物素化适配子的载体，构建捕获探针。利用 TEM 对氨基化磁性纳米粒子进行表征，由图 3-18 可以看出，氨基化的单晶  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米材料为球状结构，粒径大约为 35-50 nm，分散

性较好。

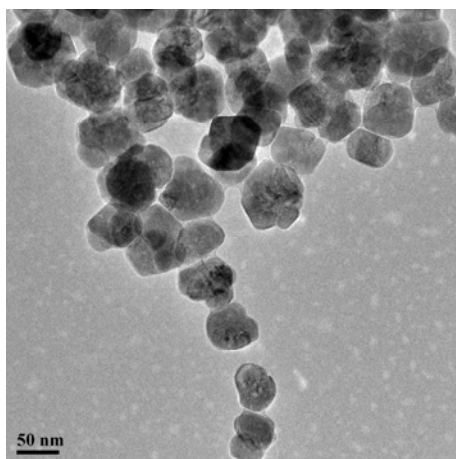


图 3-18 氨基化  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的 TEM 图

Fig. 3-18 Amine-functionalized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetite nanoparticles

### 3.3.2 磁珠与链霉亲和素的结合及表征

磁性纳米粒子通过戊二醛与链霉亲和素连接，采用红外光谱图对二者的结合情况进行表征。图 3-19 中 a 为氨基化的单晶  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子的红外光谱， $3419\text{ cm}^{-1}$  出现的强吸收峰属于 N-H 的伸缩振动吸收峰，在  $1630\text{ cm}^{-1}$  和  $1408\text{ cm}^{-1}$  处的振动吸收峰分别为一级胺的 N-H 剪式振动吸收峰、碳链中  $-\text{CH}_2-$  上的 C-H 不对称振动吸收峰，表明在制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  地过程中，颗粒表面已经成功包覆了氨基；而从图 3-19 中 b 的特征峰可以看出，由于链霉亲和素与氨基化磁珠的结合，使得羧基中 O-H 在  $3000\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰明显增宽； $1643\text{ cm}^{-1}$  和  $1577\text{ cm}^{-1}$  两处吸收峰是羧基中  $\text{C}=\text{O}$  的振动吸收峰； $1052\text{ cm}^{-1}$  是羧基中 C-O 的振动吸收峰。这些吸收峰为亲和素的特征吸收峰，表明磁珠与链霉亲和素成功交联。

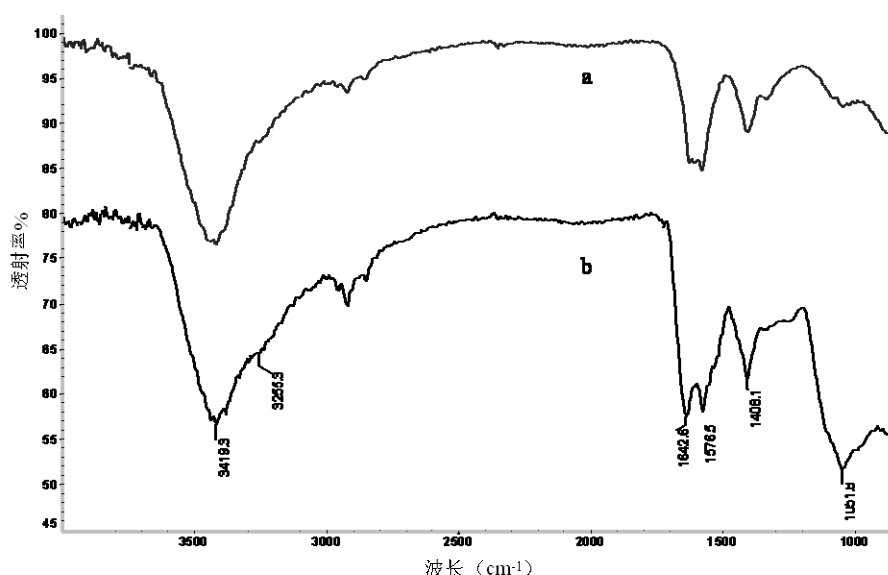


图 3-19 氨基化磁性纳米粒子 (a) 及其与亲和素结合后 (b) 的红外图谱

Fig. 3-19 IR spectra of the amine-functionalized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetite nanoparticles (a) and magnetite nanoparticle conjugated avidin (b)

链霉亲和素属于蛋白类物质，在紫外 280 nm 处存在特征吸收峰，而戊二醛与磁珠在紫外光区没有吸收，因此实验同时利用紫外分光光度计来检测链霉亲和素是否成功包被磁性纳米颗粒。图 3-20 所示，在 280 nm 波长处，未连接磁珠的链霉亲和素溶液的吸收峰较强，当与磁珠结合反应后，通过外加磁场进行磁分离，所得上清液中的链霉亲和素紫外吸收值有所下降，说明链霉亲和素已成功连接到磁珠上，同时间接说明磁珠表面氨基化的成功。

图 3-20 亲和素连接磁珠反应前后上清液的紫外可见吸收图谱

Fig. 3-20 Absorption spectra of supernate before and after reacting of avidin conjugated magnetite beads

### 3.3.3 包被亲和素浓度的优化

本研究所构建的捕获探针，是将生物素化适配子连接到氨基化磁珠表面形成的。其原理是利用亲和素-生物素结合作用，而磁性粒子捕获探针的制备基础是适宜浓度的亲和素包被液。因此，实验首先优化了链霉亲和素的包被液浓度，分别设置了 50、100、150、200、250、300、350、400  $\mu\text{g/mL}$  八种浓度梯度，利用外加磁场分离磁珠，测取上清液 280 nm 处的紫外吸收值，通过紫外吸收值的变化量来得出加入的链霉亲和素的最优浓度。图 3-21 为紫外吸光值的变化量与亲和素加入浓度之间的关系，从图中可以看出，当链霉亲和素加入浓度为 250  $\mu\text{g/mL}$  时，上清中紫外吸收值基本达到饱和，其变化量趋于稳定，由此得出亲和素最佳包被浓度为 250  $\mu\text{g/mL}$ 。

图 3-21 亲和素包被液浓度与吸光度的关系

Fig. 3-21 Correlation between absorbance and different concentrations of avidin

### 3.3.4 亲和素包被磁珠时间的优化

选取亲和素最佳包被浓度 250  $\mu\text{g/mL}$ ，其余条件不变，对亲和素与磁珠结合的时间进行探索。分别选择反应时间为 20、40、60、80、100、120 min，通过对上清液进行 280 nm 处的紫外测量来确定亲和素包被磁珠的最佳结合时间。结果如图 3-22，最终显示当亲和素与磁珠结合时间为 40 min 时，紫外吸收的变化量趋于平缓，因此最佳结合时间为 40 min。

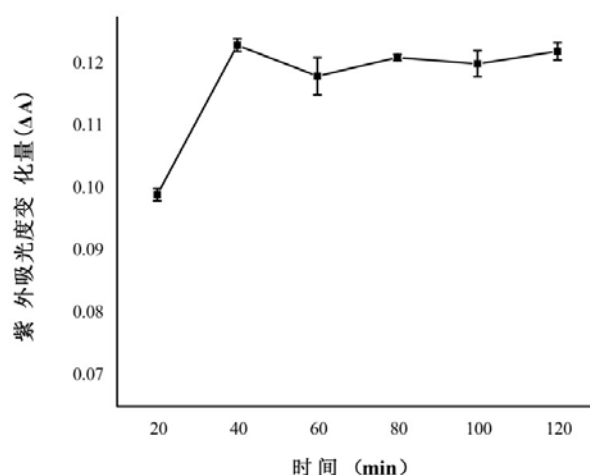


图 3-22 亲和素包被时间与吸光度的关系

Fig. 3-22 Correlation between absorbance and reacting time of avidin

### 3.3.5 包被亲和素的磁珠同生物素化适配子的连接及表征

取包被好亲和素的磁珠，分别分管加入生物素标记的适配子 I、III，于 37℃ 孵育 1 h。磁珠的表面是否已经结合上生物素化的适配子，标志着构建捕获探针是否成功，直接影响着本实验检测方法的可行性。因此实验对结合生物素化适配子的磁性纳米颗粒进行了间接表征，对孵育后的磁珠进行了充分的洗涤后，将其作为模板，进行了 PCR 扩增，所得结果如图 3-23，结果显示适配子 I 及适配子 III 已连接到磁珠表面并作为模板，能够进行 PCR 扩增。

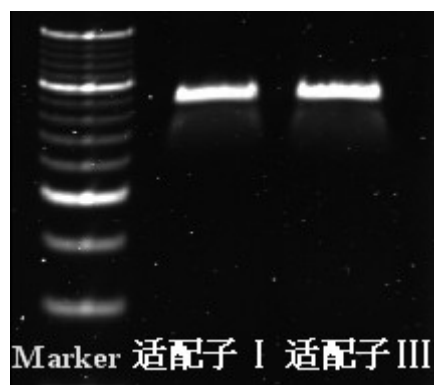


图 3-23 适配子包被磁珠表征

Fig. 3-23 Characterization of aptamers-coated magnetic beads

### 3.3.6 生物素化适配子连接磁珠的条件优化

实验对适配子 I、适配子 III 的用量进行了优化，设定其浓度分别为 4、8、12、16、20、24 ng/μl，体系磁珠量为 1 mg/mL，通过上清 260 nm 处紫外吸收值的变化量来得出加入的生物素化适配子的最优浓度。如图 3-24 (a)，当加入生物素标记的适配子 I 的浓度超过 16 ng/μl 时，亲和素结合适配子的量达到饱和；图 3-24 (b) 显示适配子 III 的加入量为 20 ng/μl 时，紫外吸光度的变化量才趋于平稳，为最优适配子浓度。

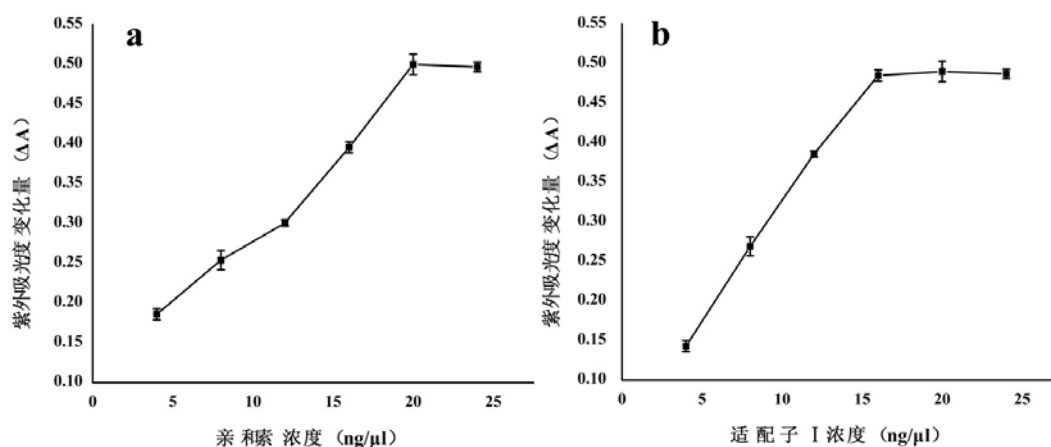


图 3-24 生物素标记的适配子-I (a) 和适配子-III (b) 结合液浓度的优化

Fig. 3-24 The optimization of concentrations of aptamer- I (a) and aptamer-III (b) tagged biotin

同时对适配子 I、适配子III的结合时间进行了考察,加入量最适生物素化适配子浓度,设置 10、20、30、40、50、60 min 作为时间梯度,其余条件不变。反应结束后,使用 Thermo NanoDrop 2000 超微量分光光度计,对上清中存在的 ssDNA 进行紫外检测,结果如图 3-25 所示,可以看出最佳反应时间均在 30 min 左右,随着时间的增长,上清中 ssDNA 的量没有发生变化或变化很小,因此选择 30 min 左右两种适配子连接磁珠的最佳反应时间。

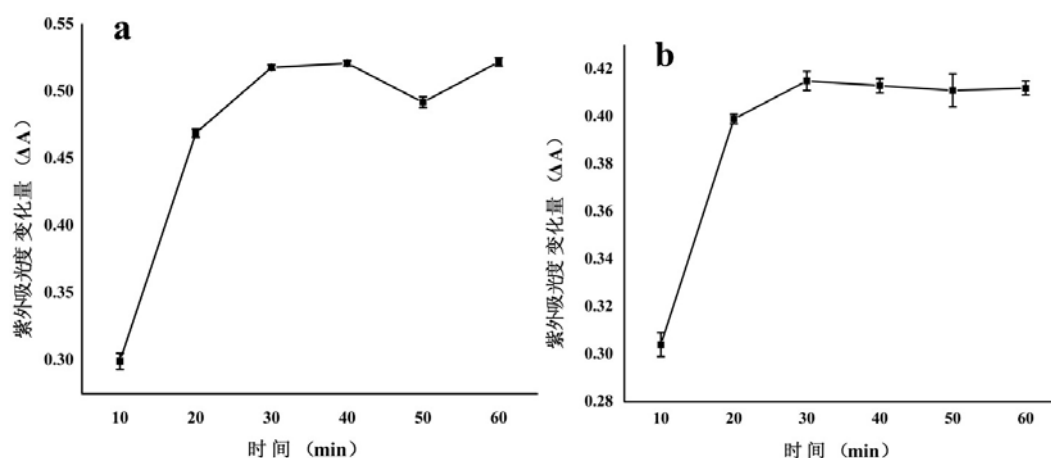


图 3-25 生物素标记的适配子 I (a) 和适配子III (b) 反应时间的优化

Fig. 3-25 The optimization of reacting time of aptamer- I (a) and aptamer-III (b) tagged biotin

### 3.4 化脓链球菌、无乳链球菌寡核苷酸适配子检测方法的建立

本研究构建的检测方法为组装好的磁珠-适配子 I、磁珠-适配子III为捕获探针,FAM 荧光素标记的适配子 II、适配子IV为显示探针,当体系中存在目标菌时,三者形成三明治夹心结构;每个亲和素分子都含有四个生物素结合位点,可同时以多价形式来结合生物素化的适配子,因此以磁珠-亲和素构建的适配子捕获探针,具有多级放大的作用,可以更牢固的结合更多的目标菌;利用 FAM 荧光素标记的适配子在 492 nm 激发波下,

可以产生 525 nm 的发射波长，通过荧光强度检测体系中是否存在目标性致病菌。

### 3.4.1 检测化脓链球菌、无乳链球菌方法的线性范围和检出限

在最佳的实验条件下，分别对两种目标菌进行线性检测，由图 3-26、3-27 可以看出本实验构建的检测方法，其荧光强度与不同浓度同体积的化脓链球菌、无乳链球菌菌液平板计数结果具有良好的线性关系。其中，化脓链球菌的线性回归方程为  $I_F = 0.36751[\text{cfu}](\text{cfu}/100\mu\text{L}) + 78.805$  ( $R^2=0.9946$ )，线性范围为 70-7100 cfu/mL，检出限为 70 cfu/mL；无乳链球菌的线性回归方程为  $I_F = 0.80808[\text{cfu}](\text{cfu}/100\mu\text{L}) + 147.10$  ( $R^2=0.9937$ )，在 50-5200 cfu/mL 范围内，呈现良好线性，最低检出限为 50 cfu/mL。

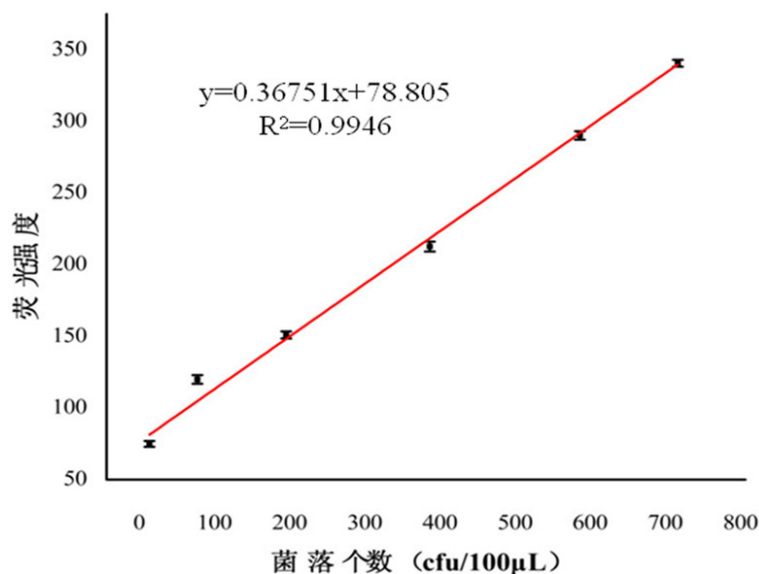


图 3-26 化脓链球菌检测线性回归曲线

Fig. 3-26 The curve of linear regression of *Streptococcus pyogenes* detection

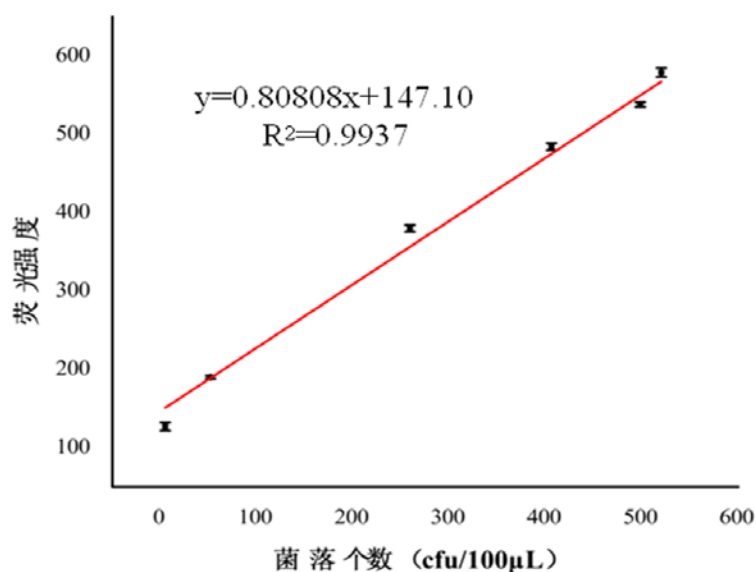


图 3-27 无乳链球菌检测线性回归曲线

Fig. 3-27 The curve of linear regression of *Streptococcus agalactiae* detection

### 3.4.2 牛奶样品中化脓链球菌、无乳链球菌的检测

稀释不同浓度的化脓链球菌、无乳链球菌，分别利用本实验构建的检测方法及平板计数法进行检测，将结果进行比对得出回收率。结果如表 3-6、3-7，可以看出本方法得到的菌落个数与传统的平板计数结果基本相统一。表 3-6 显示化脓链球菌的检测回收率在 83.9%-103.3%之间，回收率良好；表 3-7 结果显示无乳链球菌的检测回收率在 95.2%-102.5%之间，说明本研究所构建的新型分子生物学检测方法比传统的平板计数法准确度更高、检测更灵敏，可应用于实际样品中的化脓链球菌、无乳链球菌的检测。

表 3-6 牛奶样品中化脓链球菌的检测回收率

Table 3-6 Recovery results of detection <i>Streptococcus pyogenes</i> in spiked milk samples				
编号 Number	1 Initial (cfu/mL)	初始浓度 Added (cfu/mL)	加入浓度 Measured (cfu/mL)	检出浓度 Recovery (%)
1	0	23	ND	ND
2	0	137	115	83.9
3	0	490	459	93.7
4	0	1240	1061	85.6
5	0	2600	2484	95.5
6	0	3500	3617	103.3

3-7 牛奶样品中无乳链球菌的检测回收率

Table 3-7 Recovery results of detection <i>Streptococcus agalactiae</i> in spiked milk samples				
编号 Number	初始浓度 Initial (cfu/mL)	加入浓度 Added (cfu/mL)	检出浓度 Measured (cfu/mL)	回收率 Recovery (%)
1	0	17	ND	ND
2	0	62	59	95.2
3	0	510	492	96.5
4	0	760	779	102.5
5	0	1420	1454	102.3
6	0	2300	2286	99.4



---

---

## 主要结论与展望

1. 本研究构建了长度为 80 nt 的随机 ssDNA 文库, 通过 Cell-SELEX 技术及 counter SELEX 技术, 对化脓链球菌进行了 12 轮的适配子筛选; 对筛选得到适配体进行了一级结构同源性分析、模拟预测二级结构及最小自由能分析, 综合选取 5 条 ssDNA 适配体进行实验分析; 对 5 条 ssDNA 进行特异性及亲和性实验, 其中, 适配体 A-68 与化脓链球菌的结合率高达 77.05%, 而与其他食源性致病菌的结合率均低于 15%, 适配体 A-27 与化脓链球菌的结合率为 72.65%, 同另外五种食品中常见对照菌的阳性结合率不超过 20%, 均具有良好的特异性; 同时也具有较高的亲和力, 其解离常数分别为  $44.25 \pm 5.203$  nmol/L、 $53.89 \pm 7.586$  nmol/L, 因此选取了 A-68、A-27 两条适配体作为针对化脓链球菌的特异性适配体。

2. 使用与化脓链球菌相似的方法筛选得到 7 条无乳链球菌适配体, 通过特异性实验及亲和力分析, 其中, 适配体 B-21 与无乳链球菌的结合率为 77.33%, 与其余对照菌的结合率低于 15%, 适配体 B-68 与目标菌的结合率高达 80.95%, 其特异性较优, 与其他五种食源性致病菌的结合率均低于 10%; 这两条适配体与无乳链球菌连接的亲和力较高, 其解离常数分别为  $78.27 \pm 12.85$  nmol/L,  $49.88 \pm 6.871$  nmol/L, 因此选取 B-68、B-21 作为无乳链球菌的高特异性适配体。

3. 本实验制备了氨基化的磁性纳米粒子并进行了表征, 以其作为构建捕获探针的载体。通过戊二醛来表面偶联链霉亲和素, 利用生物素-亲和素系统, 在磁性纳米粒子表面包被生物素化适配子, 成功制备了磁珠-适配体复合物, 来作为目标菌的捕获探针。

4. 利用组装的捕获探针, 以及 FAM 荧光素标记的适配体显示探针, 通过捕获探针-靶标-显示探针的三明治结构来构建化脓链球菌、无乳链球菌检测方法。在实验优化条件下, 检测其荧光强度及菌落个数, 其中, 化脓链球菌在 70-7100 cfu/mL 范围内, 荧光强度与菌落个数呈现良好的线性关系, 线性回归方程为  $I_F = 0.36751[\text{cfu}] (\text{cfu}/100\mu\text{L}) + 78.805$  ( $R^2=0.9946$ ), 检出限为 70 cfu/mL, 牛奶样品中的加标回收率为 83.9%-103.3%; 而当无乳链球菌在 50-5200 cfu/mL 范围内变化时, 得到的荧光强度与菌落个数呈现良好的线性关系, 线性回归方程为  $I_F = 0.80808[\text{cfu}] (\text{cfu}/100\mu\text{L}) + 147.10$  ( $R^2=0.9937$ ), 检出限为 50 cfu/mL, 牛奶样品中的加标回收率为 95.2%-102.5%。

基于 SELEX 筛选技术, 其适配体的靶标范围非常广泛, 理论上多数物质都有可以与之特异性结合的序列, 而如何针对不同种类的病原微生物, 发展更加高效的筛选方法, 来筛选得到高亲和性和高特异性的适配体还需要深入研究。近年来, 随着纳米材料、纳米器件等的飞速发展, 更多生物相容性好的纳米材料可以与适配体相结合, 有望进一步提高适配体传感器的实用性能。本研究利用 Cell-SELEX 技术筛选出相应适配体, 并成功构建了适配体-纳米粒子复合物, 为适配体传感分析技术提供了研究基础, 后续工作是寻求更多优势技术与适配体传感器相结合, 开发可以更加方便、快捷应用于实际样品的适配体传感分析技术, 以便在食品卫生、安全监测等方面得以广泛应用。

---

## 致 谢

时光荏苒如白驹过隙，三年的研究生岁月转瞬即逝，在这里，我不仅完善了知识体系，思想得到了升华，更有幸认识了许多给予我帮助和支持的老师、同学，在此，我由衷感谢每一位在我身边关心、鼓励、指导我，与我真诚相交的人。

首先，真心感谢我的导师王周平教授，对于我的课题，王老师倾注了大量的心血，课题研究过程中一次次出现的问题能够得以顺利解决都离不开王老师的悉心指导与教诲，王老师广博的专业知识，严谨的治学态度，勤奋的工作作风，乐观的生活态度以及正直、坦荡、朴实的人格魅力都深深影响了我，相信在未来这些优秀的品质都会成为我前进路上的航标灯，为我指明人生的方向。同时感谢师母王列娟老师，王老师平易近人、温柔亲切，永远笑眯眯地同我交谈，让我感受到春天般地温暖，再次衷心祝福王老师与师母身体健康，阖家欢乐。

感谢实验室的夏雨老师、马小媛老师、乐国伟老师、施用晖老师以及测试中心的王领军老师，老师们的言传身教令我受益终身。感谢江苏省出入境检验检疫局的祝长青老师对我的帮助，对我实验的指导，使得本课题可以顺利展开，在此致以由衷的谢意。

其次，我要特别感谢我的师姐师兄，你们的支持和帮助给予了我最大的动力。他们是：段诺、吴世嘉、陈秀娟、黄玉坤、弓紫峰、王文凤、陶醉、李响、缪婷婷、丁晓莹、李双等。尤其要感谢段诺师姐、陈秀娟师姐、黄玉坤师姐，你的鼓励与关心给了我极大的精神力量，让我有勇气面对一次次挫折，使我顺利完成研究生课题。

我还要感谢与我并肩作战的我的同伴们，王燕、韩晓晓、王芳、张伟龙等，我们一同走过三年的青春岁月，共同经历过无数的欢乐与忧伤，有了你们的陪伴，我的科研之路不再孤单。感谢我的好朋友刘芳、张倩瑶、杨晓婧、林全全等，感谢你们的支持与关心，谢谢刘芳一路的陪伴，因为有了你的鼓励，我才能一次次跌倒后重头再来，朋友是快乐的源泉，因为你们，我的生活更加充实、精彩。

感谢所有的师弟师妹，他们是：袁京磊、倪郦丽、史召、郝丽玲、李琦、宋靓婧、聂雨、贾飞等，师弟师妹们的欢声笑语为实验室增添了生气与活力。

感谢参与论文评审和答辩的各位专家和教授，在百忙之中对我的学位论文进行评阅和审议。谢谢各位老师。

最后要感谢一直默默关心和爱护我的家人，谢谢你们一直包容任性的我，支持我的每一个抉择，因为有了你们，我不再畏惧、彷徨，我知道我的家永远为我敞开怀抱，当我累了、倦了、害怕了，家永远是我的避风港。

即将要离开了，我将承载着对过去的依恋以及对未来的憧憬踏上明日的征程，我知道前路漫漫，但我始终相信长风破浪会有时，直挂云帆济沧海，我相信我已经准备好在社会的大舞台上开启新的人生之梦。

王鑫  
2013.4 于江大涓苑

---

## 参考文献

- [1] Wang S, Duan H, Zhang W, et al. Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in China between 1994 and 2005[J]. FEMS IMMUNOL MED MIC, 2007, 51(1): 8-13.
- [2] 李泰然. 中国食源性疾病现状及管理建议[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(8): 651-653.
- [3] Stamoulis K G, Zezza A. A conceptual framework for national agricultural, rural development, and food security strategies and policies[M]. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Agricultural and Development Economics Division, 2003. 87-88.
- [4] 何欣荣. 食品安全与食源性疾病控制研究进展[J]. 安徽预防医学杂志, 2002, 8(6): 384-387.
- [5] Vugia D, Cronquist A, Hadler J. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2007[J]. MORB MORTAL WKLY REP, 2007, 56(2): 336-339.
- [6] Stacy J, Favrina S A, Jassimal Mansel W. Application of a novel immunomagnetic separation bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food[J]. INT J FOOD MICROBIOL, 2003, 5(85): 63-71.
- [7] 崔晓燕, 陈峰, 谭湘凌等. 食源性致病菌多重聚合酶链反应快速检测[J]. 现代预防医学, 2010, 37(3): 519-520.
- [8] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007. 89-90.
- [9] CDC 2007. Group A *Streptococcal* Disease[EB/OL]. [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinf-o/groupastreptococcal\\_g.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinf-o/groupastreptococcal_g.html), 2011-03-30.
- [10] Barinov A, Loux V, Hammani A, et al. Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria[J]. PROTEOMICS, 2009, 9(1): 61-73.
- [11] Bourbeau P P. Role of the microbiology laboratory in diagnosis and management of pharyngitis[J]. J CLIN MICROBIOL, 2003, 41(8): 3467-3472.
- [12] Kim S, Yong L N. Antibiotic resistance and genotypic characteristics of group A *Streptococci* associated with acute pharyngitis in Korea[J]. MICROB DRUG RESIST, 2004, 10(4): 300-305.
- [13] Skoff T H, Farley. Increasing burden of invasive group B *streptococcal* disease in nonpregnant adults, 1990-2007[J]. CLIN INFECT DIS, 2009, 49 (1): 85-92.
- [14] Johri A K, Paoletti. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development[J]. NAT REV MICROBIOL, 2006, 4(12): 932-942.
- [15] Edmond K M, Kortsalioudaki. Group B *streptococcal* disease in infants aged younger than 3 months: 260 systematic review and meta-analysis[J]. LANCET, 2012, 379(9815): 547-556.
- [16] Chang Y C, Wang Z. Glycosaminoglycan binding facilitates entry of a bacterial pathogen into central nervous systems[J]. PLOS PATHOGENS, 2011, 7(6): e1002082.
- [17] Senn B M, Visram. Monoclonal antibodies targeting different cell wall antigens of group B *streptococcus* mediate protection in both Fc-dependent and independent manner[J]. VACCINE, 2011, 29(24): 4116-4124.
- [18] 鲁满新. 现代检测技术在食品安全中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(21): 6589-6590.
- [19] 赵春艳. 影响食品安全的食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 西藏科技, 2010, 7(2): 36-38.
- [20] Fung D Y C. Historical development of rapid methods and automation in microbiology[J]. J RAPID METH AUT MIC, 1992, 1(1): 1-15.
- [21] Taormina P, Dorsa W. Short-term bactericidal efficacy of lauric arginate against *Listeria*

- 
- monocytogenes* present on the surface of frankfurters[J]. J FOOD PROTECT, 2009, 72(6): 1216-1224.
- [22] 牟凯. 同时检测四种病原菌的PCR方法研究[J]. 山东农业大学学报, 2010, 41(2): 253-257.
- [23] Turner K M. Efficacy of chromocult coliform agar for *coliform* and *Escherichia coli* detection in foods[J]. J FOOD PROTECT, 2002, 63(4): 539-547.
- [24] 陈爱华, 杨坚. 酶联免疫吸附(ELISA)法在食品微生物检测中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2004, 4(2): 109-111.
- [25] 陆茂林, 蔡建荣. 标记免疫分析技术在食品分析中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(2): 60-62.
- [26] Zhao Z J, Liu X M. Preparation of monoclonal antibody and development of enzyme linked immunosorbent assay specific for *Escherichia coli* O157 in foods[J]. BIOMED ENVIRON SCI, 2005, 18(5): 254-259.
- [27] 王小红, 谢笔钧, 史贤明. 食品中金黄色葡萄球菌肠毒素检测方法的研究进展[J]. 山西食品工业, 2003, 5(3): 39-43.
- [28] 王军. 溶藻弧菌弧菌的间接荧光抗体快速检测[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 1-4.
- [29] 杨小龙, 陈朝琼. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. 河北农业科学, 2008, 12(12): 51-53.
- [30] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学[M]. 吉林: 吉林科技出版社, 1996. 1-3.
- [31] 周明东. 食源性致病菌快速检测方法的建立及其试剂盒的研制与应用[D]: [硕士学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [32] 杨国兴. 多重PCR检测肉及肉制品中四种食源性致病菌的研究[D]: [硕士学位论文]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [33] Obata H, Kai A, Sekiguchi K, et al. Detection of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from overseas travellers' diarrhea and their biochemical characteristics[J]. JPN J INFECT DIS, 1996, 70(8): 815-820.
- [34] Monis P T, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification[J]. INFECT GENET EVOL, 2006, 6(1): 2-12.
- [35] Aabo S, Andersen J K, Olsen J E. Research note: detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method[J]. LETT APPL MICROBIOL, 1995, 5(21): 180-182.
- [36] 华伟, 郭蔼光, 马立农等. PCR技术在沙门氏菌快速检测中的应用[J]. 动物医学进展, 2004, 25(6): 55-58.
- [37] 戴睿, 夏四清. PCR技术在水体微生物检测中的应用[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(9): 103-105.
- [38] 吴清平, 范洪英. 食源性致病菌免疫及分子检测新技术研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 269-273.
- [39] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard[J]. APPL ENVIRON MICROB, 2003, 69(3): 290-296.
- [40] Liu J B, Zhang Z. Development of SYBR Green-based real-time PCR assay for detection of drug resistance mutations in cytomegaloviruses[J]. J VIROL METHODS, 2008, 149(26): 129-135.
- [41] 彭雁忠, 贾宏, 邹虹等. 多联实时荧光PCR定量方法检测四种肠道细菌的研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(5): 943-947.
- [42] 吴影, 陆徐忠, 赵伟等. 多重PCR分析方法应用于转基因农作物的检测[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(7): 1297-1299.
- [43] Frankel G, Giron J A, Valmassoi J, et al. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool[J]. MOL MICROBIOL, 1989, 5(3): 1729-1734.
- [44] Brasher C W, Depaola A, Jones D D, et al. Detection of microbial pathogens in shellfish with

---

multiplex PCR[J]. CURR MICROBIOL, 1998, 3(37): 101-107.

[45] Becker K, Roth R, Peter S G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin gene[J]. CLIN MICROBIOL INFECTION, 1998, 36(9): 2548-2553.

[46] 许龙岩, 李志勇. PCR方法检测志贺氏菌的研究[J]. 检验检疫科学, 2003, 13(5): 28-29.

[47] Ramsay G. DNA chips: state-of-the art[J]. NAT BIOTECHNOL, 1998, 16(2): 40-44.

[48] Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of *streptococcus pneumoniae*[J]. J CLIN MICROBIOL, 2005, 43(4): 1581-1586.

[49] Carl F, Adman. Pathogen analysis and isothermal amplification[J]. J INVEST MED, 2000, 12(2): 93-101.

[50] 聂萌. 通用芯片技术检测和鉴定食源致病菌方法的研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北大学, 2006.

[51] 韩春来. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 家禽科学, 2009, 1(16): 43-46.

[52] Robertson D L, Joyce G F. Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA[J]. NATURE, 1990, 344(6265): 467-468.

[53] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. SCIENCE, 1990, 249(4968): 505-510.

[54] Brody E N, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents[J]. J BIOTECHNOL, 2000, 74(1): 5-13.

[55] White R R, Sullenger B A, Rusconi C P. Developing aptamers into therapeutics[J]. J CLIN INVEST, 2000, 106(8): 929-934.

[56] Destefano J J, Cristofaro J V. Selection of primer template sequences that bind human immunodeficiency virus reverse transcriptase With high affinity[J]. NUCLEIC ACIDS RES, 2006, 34(1): 130-139.

[57] Arshall K A, Ellington A D. *In vitro* selection of RNA aptamers[J]. METHOD ENZYMOL, 2000, 318(2): 193-214.

[58] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers[J]. BIOSENS BIOELECTRON, 2005, 20(12): 2424-2434.

[59] Brody E N, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents[J]. J BIOTECHNOL, 2000, 74(1): 5-13.

[60] Ellington A D, Szostak J W. Selection *in vitro* of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures[J]. NATURE, 1992, 355(6363): 850-852.

[61] Jenison R D, Gill S C, Pardi A, et al. High-resolution molecular discrimination by RNA[J]. SCIENCE, 1994, 263(5152): 1425-1429.

[62] Wang C L, Zhang M, Yang G, et al. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment[J]. J BIOTECHNOL, 2003, 102(1): 15-22.

[63] Jensen K B, Atkinson B L, Willis M C, et al. Using *in vitro* selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands[J]. NATL ACAD SCI LETT, 1995, 92(26): 12220-12224.

[64] Shamah S M, Healy J M, Cload S T. Complex target SELEX[J]. ACE CHEM RES, 2008, 41(1): 130-138.

[65] White R, Rusconi C, Scardino E, et al. Generation of species cross-reactive aptamers using “toggle”

---

SELEX[J]. MOL THER, 2001, 6(4): 567-573.

[66] Smith D, Kirschenheuter G P, Charhon J, et al. *In vitro* selection of RNA-based irreversible inhibitors of human neutrophil elastase[J]. CHEM BIOL, 1995, 2(11): 741-750.

[67] Hamm J, Alessi D R, Biondi R M. Bi-functional, substrate mimicking RNA inhibits MSK1-mediated cAMP-response element-binding protein phosphorylation and reveals magnesium ion-dependent conformational changes of the kinase[J]. BIOL CHEM, 2002, 277(48): 45793-45802.

[68] Eulberg D, Klusmann S. Spiegelmers: Biostable Aptamers[J]. CHEM BIO CHEM, 2003, 4(10): 979-983.

[69] Shimada T, Fujita N, Maeda M, et al. Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX system[J]. GENES CELLS, 2005, 10(9): 907-918.

[70] Vater A, Jarosch F, Buehner K, et al. Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: Tailored-SELEX[J]. NUCLEIC ACIDS RES, 2003, 31(21): e130.

[71] Wen J D, Gray D M. Selection of genomic sequences that bind tightly to Ff gene 5 protein: primer-free genomic SELEX[J]. NUCLEIC ACIDS RES, 2004, 32(22): e182.

[72] Pan W H, Xin P, Clawson G A. Gittlen Cancer Research Foundation, Hershey Medical Center, Departments of Pathology, Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Pennsylvania State University, Hershey, PA, USA[J]. BIOTECHNIQUES, 2008, 44(3): 351-360.

[73] Cox J C, Ellington A D. Automated selection of anti-protein aptamers[J]. BIOORG MED CHEM, 2001, 9(10): 2525-2531.

[74] Stoltenburg R C, Strehlita B. HuMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection[J]. ANAL BIOANAL CHEM, 2005, 383(1): 83-91.

[75] Mendonsa S D, Bowser M T. *In vitro* evolution of functional DNA using capillary electrophoresis[J]. J AM CHEM SOC, 2004, 126(1): 20-21.

[76] Mosing R K, Mendonsa S D, Bowser M T. Capillary Electrophoresis-SELEX Selection of Aptamers with Affinity for HIV-1 Reverse Transcriptase[J]. ANAL CHEM, 2005, 77(19): 6107-6112.

[77] White R R, Shan S Q, Rusconi C P, et al. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2[J]. P NATL ACAD SCI USA, 2003, 100(9): 5028-5033.

[78] Lassen L H, Haderslev P A, Jacobsen V B, et al. CGRP may play a causative role in migraine[J]. CEPHALALGIA, 2002, 22(3): 54-61.

[79] Carrasquillo K G, Ricker J A, Rigas I K, et al. Controlled Delivery of the Anti-VEGF Aptamer EYE001 with Poly (lactic-co-glycolic) Acid Microspheres[J]. INVEST OPHTH VIS SCI, 2003, 44(2): 290-299.

[80] Shamah S M, Healy J M, Cload S T. Complex Target SELEX[J]. ACC CHEM RES, 2008, 41(1): 130-138.

[81] Levison P, Radger S E, Dennis J, et al. Recent Developments of Magnetic Beads for Use in Nucleic Acid Purification[J]. J CHROMATOGR A, 1998, 816(55): 107-111.

[82] 管文军. 电致化学发光生物检测技术的新进展[J]. 分析化学, 2004, 32(3): 402-406.

[83] Hamula C L A, Zhang H, Guan L L, et al. Selection of aptamers against live bacterial cells[J]. J ANAL CHEM, 2008, 80(20): 7812-7819.

[84] Fan C, Jing Z, Fengling L, et al. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*[J]. BIOCHEM BIOPH RES CO, 2007, 357(4): 743-748.

[85] Tang Z W, Shangguan D, Wang K, et al. Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells[J]. ANAL CHEM, 2007, 79(2): 4900-4907.

- 
- [86] 李卫滨, 兰小鹏, 杨湘越等. 用SELEX技术筛选环孢霉素A适体[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(5): 778-780.
- [87] Camille L A, Hamula X, Chris L, et al. DNA Aptamers Binding to Multiple Prevalent M-Types of *Streptococcus pyogenes*[J]. ANAL CHEM, 2011, 83(10): 3640-3647.
- [88] Nuo D, Shijia W, Xiujuan Chen, et al. Selection and Identification of a DNA Aptamer Targeted to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. J AGR FOOD CHEM, 2012, 4(60): 4034-4038.
- [89] Deng H, Li X L, Peng Q, et al. Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres[J]. ANGEW CHEM INT EDIT, 2005, 44(18): 2782-2785.
- [90] Wang L Y, Bao J, Wang L, et al. One pot synthesis and bioapplication of amine-functionalized magnetite nanoparticles and hollow nanospheres[J]. CHEM-EUR J, 2006, 12(24): 6341-6347.
- [91] Barry W H, Antonio P B, Robert H D, et al. The mathematics of SELEX against complex targets[J]. J MOL BIOL, 1998, 278(6): 579-597.
- [92] Jenion R D, Gill S C, Pardi A, et al. High-resolution molecular discrimination by RNA[J]. SCIENCE, 1994, 263(3): 1425-1429.
- [93] Heidenreich O, Eckstein F. Hammerhead ribozyme mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1[J]. J BIO CHEM, 1992, 267(5): 1904-1909.
- [94] Morris K N, Jensen K B, Julin C M, et al. High affinity ligands from *in vitro* selection: complex targets[J]. P NATL ACAD SCI USA, 1998, 95(12): 2902-2907.
- [95] 廖波, 王天明. RNA 二级结构的最小自由能算法[J]. 生物数学学报, 2003, 18(3): 364-368.
- [96] 李靖, 李成斌, 顿文涛等. 流式细胞术 (FCM) 在生物学研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2008, 6(24): 107-111.
- [97] 王宁, 刘宁. 流式细胞术快速检测生乳中细菌总数[J]. 食品工业科技, 2007, 9(4): 197-200.
- [98] Dezhi K, Jiangjie W, Weiyun Z, et al. Selection of DNA aptamers against glioblastoma cells with high affinity and specificity[J]. PLOS ONE, 2012, 7(10): e42731.
- [99] Miyachi H, Masukawa A, Ohshima T, et al. Automated specific capture of hepatitis C virus RNA with probes and paramagnetic particle separation[J]. J CLIN MICROBIOL, 2000, 38(1): 18-21.
- [100] Winer J, Jung C K, Shackel I, et al. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*[J]. ANAL BIOCHEM, 1999, 270(1): 41-49.
- [101] 杨清娟, 许丹科, 姜雄平等. 磁珠表面核酸探针的固定及电化学方法检测[J]. 分析化学研究简报, 2002, 1(30): 56-58.
- [102] Jeong U, Teng X, Wang Y, et al. Superparamagnetic colloids: controlled synthesis and niche applications[J]. ADV MATER, 2007, 5(19): 33-60.
- [103] Xu C J, Sun S H. Monodisperse magnetic nanoparticles for bio-medical applications[J]. POLYM INT, 2007, 5(56): 821-826.



---

## 附 录：作者在攻读硕士学位期间发表的论文

1. 王鑫,夏雨,王周平. 一种针对无乳链球菌的 DNA 适配子的筛选和鉴定[OL]. 中国科技论文在线 (<http://www.paper.edu.cn>) . 2013-02-25.
2. 王周平,王鑫,段诺,吴世嘉,夏雨,马小媛. 一组特异性识别化脓性链球菌的寡核苷酸适配子. 国家发明专利. 申请号: 201210570205.4
3. 王周平,王鑫,段诺,吴世嘉,夏雨,马小媛. 一组特异性识别无乳链球菌的寡核苷酸适配子. 国家发明专利. 申请号: 201210570202.0