



基于CRISPR-DNase I双重信号放大的水产品中抗生素残留快速检测方法研究

沈亚芳, 唐兴悦, 汪江琦, 崔雁娜, 胡秋月, 武雨鑫, 郝贵杰*

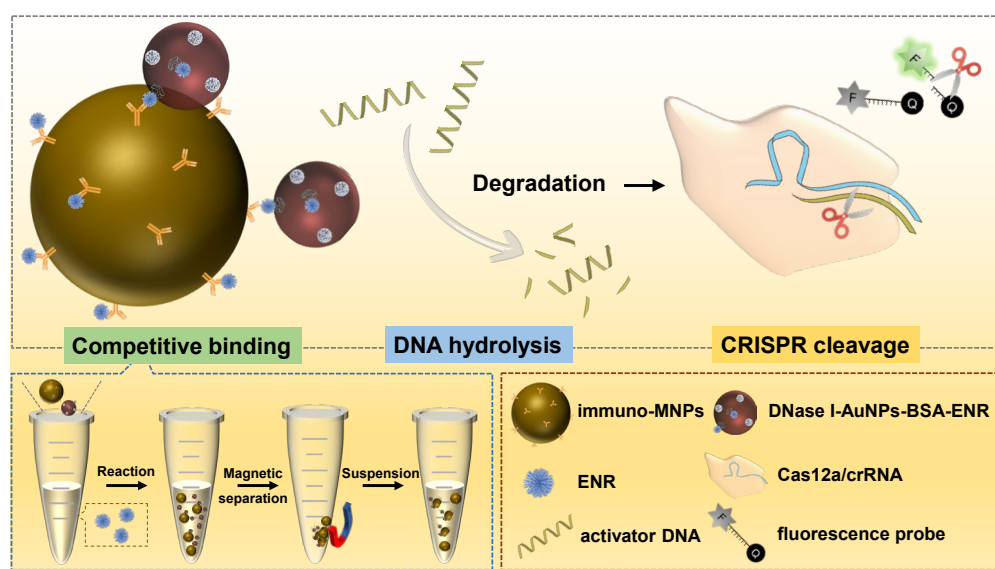
农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 湖州市水产品品质提升与加工技术重点实验室,
浙江省淡水水产研究所, 浙江, 湖州, 313001

Contact: haoguijie79@126.com

摘要

本研究建立了一种基于CRISPR-DNase I双重信号放大的生物传感器检测恩诺沙星 (ENR) 残留。该方法利用DNase I和牛血清白蛋白-恩诺沙星标记的金纳米颗粒 (AuNPs-DNase I-ENR) 与目标物ENR竞争性结合免疫磁性纳米颗粒表面的抗体结合位点, 并通过AuNPs-DNase I-ENR探针降解激活DNA, 将ENR识别事件转化为CRISPR/Cas12a系统的切割活性, 最终通过测量CRISPR/Cas12a介导的反式切割所释放的荧光信号实现对ENR残留的定量检测。结果显示, 在0.1-100 ng mL⁻¹ 范围内, 荧光信号强度与ENR浓度对数值之间呈现良好的线性关系, 检测限为0.04 ng mL⁻¹。该方法简单、灵敏, 有望成为一种现场快速检测水产品中抗生素残留的有效手段。

检测原理



结果与讨论

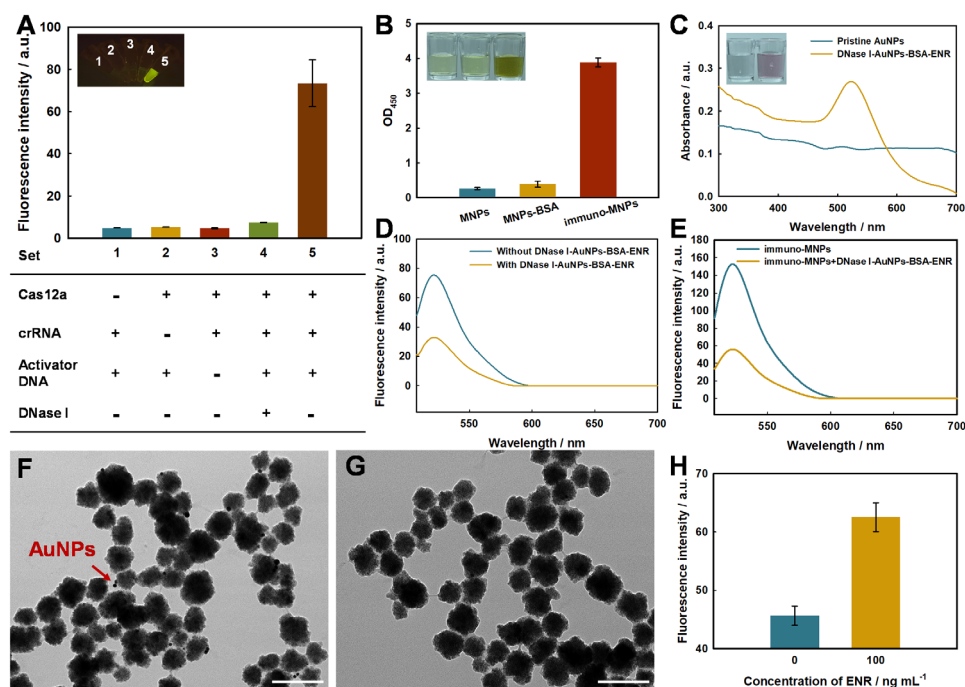


图2. (A) 不同Cas12a蛋白、crRNA, activator DNA和DNase I组合下的荧光强度 (插图为相应的荧光照片); (B) immuno-MNPs和 (C) AuNPs-DNase I-ENR探针制备的验证图; (D) 游离AuNPs-DNase I-ENR和 (E) 捕获在immuno-MNPs表面AuNPs-DNase I-ENR存在下的荧光响应; (F) 不存在ENR和 (G) 存在ENR时immuno-MNPs纳米结构的TEM图 (比例尺=200 nm); (H) 存在100 ng mL⁻¹ ENR时的荧光响应

光学表征结果验证了immuno-MNPs和AuNPs-DNase I-ENR复合物的成功制备; 荧光光谱和TEM表征证明了AuNPs-DNase I-ENR和目标物ENR可竞争性结合immuno-MNPs表面的抗体结合位点; 预实验结果证实了该方法检测ENR残留的可行性。

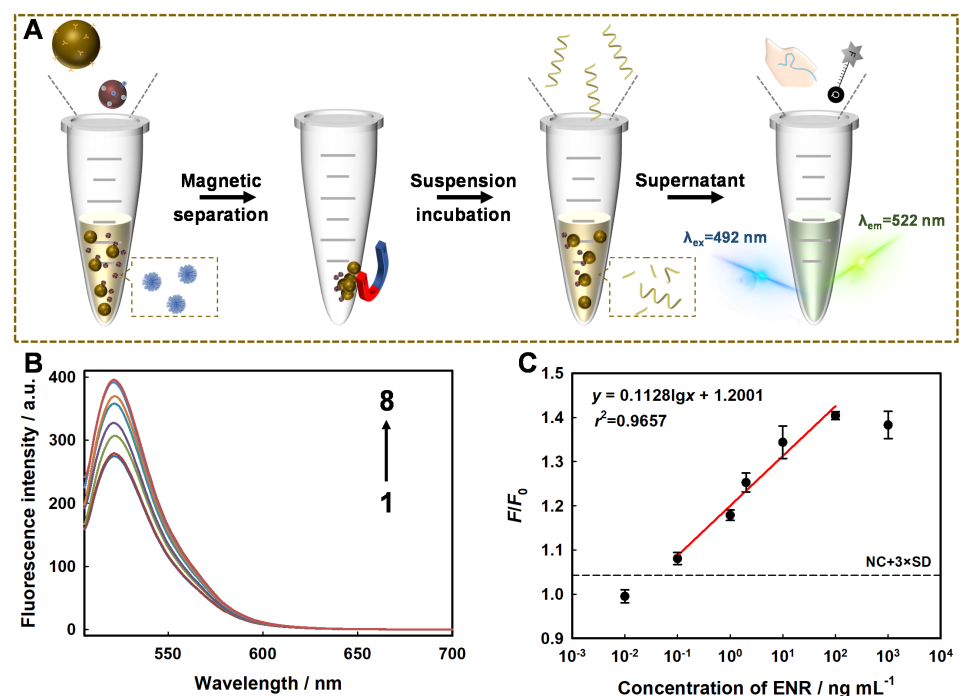


图3. (A) 该方法检测ENR的流程; (B) 对不同浓度ENR的荧光响应 (1~8代表ENR浓度为0, 0.01, 0.1, 1, 2, 10, 100和1000 ng mL⁻¹); (C) 该方法检测ENR的线性回归曲线图

该方法检测ENR残留的线性范围为0.1—100 ng mL⁻¹; 检出限为0.04 ng mL⁻¹。

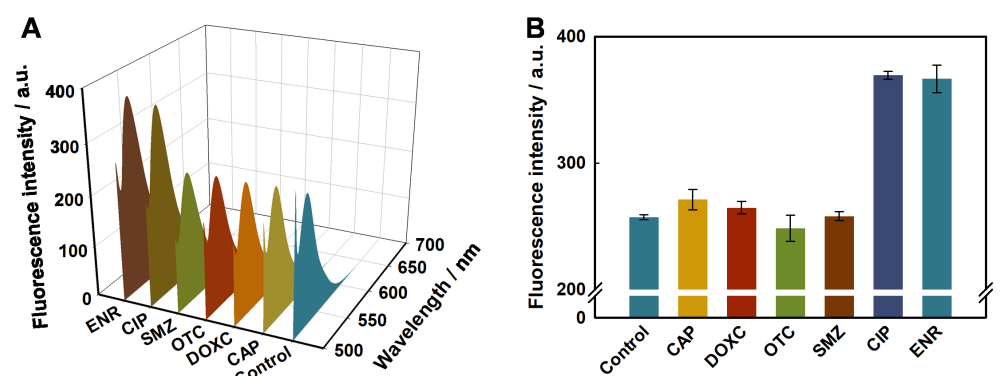


图4. 该方法对不同种类抗生素的 (A) 荧光响应和 (B) 522 nm处的荧光值

特异性试验结果表明, 该方法对氯霉素、多西环素、土霉素、磺胺甲恶唑等常见抗生素无明显交叉反应; 对环丙沙星存在一定交叉反应, 这可能是环丙沙星与ENR的结构具有高度相似性。

结论

- 本研究成功构建了一种基于CRISPR-DNase I双重信号放大的新型生物传感器实现了对ENR残留的快速检测。
- 后期有望通过结合便携式荧光仪实现水产品中ENR残留的现场检测。

致谢

本工作得到湖州市公益性应用研究项目 (2022GZ25)、浙江省基础公益研究计划项目 (LTGN23C200019) 的支持。