

· 药学基础 ·

## 基于氧化石墨烯荧光传感技术对中药海马的鉴定

钟洪金, 任九卓林, 张灵迂, 侯飞侠\*

(成都中医药大学药学院西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:建立基于氧化石墨烯荧光传感技术鉴定中药海马的方法,为中药鉴定提供一个新的研究思路。方法:在小海马特异性上游引物 Ja-F 的 5'端标记荧光基团 FAM 作为核酸探针 FAM-单链 DNA(ssDNA),在下游引物 Ja-R 的 5'端加上 RNA 聚合酶 II 的识别位点记为 Ja-R1,用 Ja-F/Ja-R1 扩增海马样品,利用体外转录法对扩增产物进行反转录获得小海马 ssDNA。取  $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  FAM-ssDNA  $20 \mu\text{L}$ ,  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 5 min,逐渐冷却至室温,加入不同体积的氧化石墨烯溶液( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液(pH 7.6,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),使反应终体积为 1 mL,混匀,室温避光放置不同时间后测荧光强度,筛选制备传感器的最佳氧化石墨烯浓度和反应时间。再加入探针互补序列 FAM-ssDNA-match 溶液,室温放置不同时间后测荧光值,筛选荧光恢复的最适反应时间并检测传感器可行性。向核酸探针-氧化石墨烯溶液中分别加入  $\text{ddH}_2\text{O}$  和不同浓度的小海马 ssDNA 进行灵敏度检测,最后根据最佳实验条件对市售海马药材进行检测,验证该方法用于中药材基原鉴定的可行性。结果:构建鉴别小海马的核酸探针-氧化石墨烯生物传感器条件为 1 mL 反应体积中,  $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  FAM-ssDNA+ $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氧化石墨烯溶液,室温避光反应 20 min,可彻底淬灭探针荧光。传感器可行性检测显示,当向传感器溶液中加入探针互补序列溶液(终浓度  $90 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),室温反应 1 h 后,体系的荧光信号明显增强。灵敏度检测显示,该方法能够检测到的小海马 ssDNA 的最低质量浓度约为  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将该方法用于检测市售海马药材,发现只有小海马样品有明显的荧光信号。结论:该实验建立的氧化石墨烯荧光传感技术可用于中药海马的基原鉴定。

**[关键词]** 氧化石墨烯荧光传感技术; 核酸探针; 海马; 鉴定; 单链 DNA(ssDNA)

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)06-0185-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221512

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220907.1538.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-09-07 17:07:14

## Identification of Traditional Chinese Medicine Seahorses Using Graphene Oxide-based Fluorescent Sensing Technology

ZHONG Hongjin, REN Jiuzhuolin, ZHANG Lingyu, HOU Feixia\*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for seahorse identification based on graphene oxide fluorescence sensing technology, and to provide a new research idea for identification of traditional Chinese medicine. **Method:** The fluorophore FAM was labeled at the 5' end of the specificity upstream primer Ja-F of *Hippocampus japonicus* as the nucleic acid probe FAM-ssDNA (single strand DNA). The recognition site of RNA polymerase II was added to its specific downstream primer Ja-R as Ja-R1. The seahorse samples were amplified with Ja-F/Ja-R1 primers, and the ssDNA of *H. japonicus* was obtained by reverse transcription of the amplification products using vitro transcription method. The  $20 \mu\text{L}$  nucleic acid probe FAM-ssDNA

**[收稿日期]** 2022-04-06

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81903757)

**[第一作者]** 钟洪金,从事中药资源与鉴定研究,E-mail:18777445397@163.com

**[通信作者]** \*侯飞侠,博士,副教授,从事中药资源与鉴定研究,Tel: 028-61800231,E-mail:houfeixia123@163.com

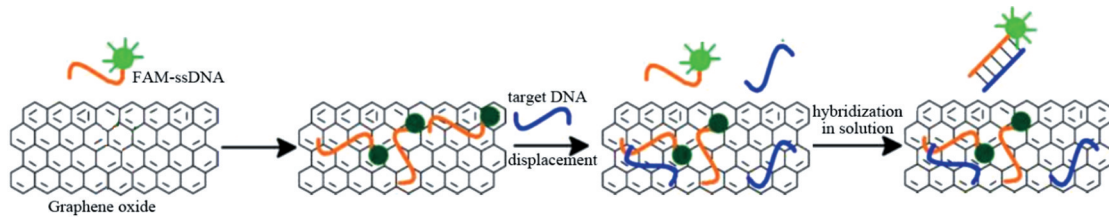
(500 nmol·L<sup>-1</sup>) was incubated at 90 °C for 5 min, and was gradually cooled to room temperature. Different volume of graphene oxide solution (100 mg·L<sup>-1</sup>) and Tris hydroxymethyl amino methane HCl (Tris-HCl) buffer (50 mmol·L<sup>-1</sup>) were added into each probe solution to make a final reaction volume of 1 mL. The fluorescence intensity of each sample was measured after mixing and placing different times at room temperature away from the light. So that the most appropriate graphene oxide concentration and reaction time were screened for constructing the best nucleic acid probe-graphene oxide biosensor. Adding probe complementary sequence FAM-ssDNA-match solution into the nucleic acid probe-graphene oxide solution, the fluorescence intensity of the reaction mixture was measured after being placed different times at room temperature. Therefore, the optimal reaction time of fluorescence recovery was screened and the feasibility of the sensor was tested. The sensitivity was detected via adding ddH<sub>2</sub>O as the blank control and different concentration *H. japonicus* ssDNA into each nucleic acid probe-graphene oxide solution, respectively. Finally, the commercial hippocampal were identified using the optimal experimental condition, and the feasibility of this method for the identification of Chinese medicinal materials was verified. **Result:** The fluorescence of 1 mL reaction mixture including 10 nmol·L<sup>-1</sup> nucleic acid probe FAM-ssDNA and 12 mg·L<sup>-1</sup> go solution for 20 min at room temperature away from the light could be completely quenched. Feasibility test of the biosensor showed that when probe complementary sequence FAM-ssDNA-match solution (final concentration 90 nmol·L<sup>-1</sup>) was added to the biosensor solution and reacted 1 h reaction at room temperature, the fluorescence signal was significantly enhanced. Sensitivity test showed that the minimum concentration of ssDNA detected by this method was about 10 mg·L<sup>-1</sup>. This method was used to detect commercial seahorses, and only *H. japonicus* samples had obvious fluorescence signal. **Conclusion:** The graphene oxide-based fluorescent sensing technology could be used for zoological origin survey of commercial hippocampus.

**[Keywords]** graphene oxide-based fluorescent sensing technology; nucleic acid probe; seahorse; identification; single-stranded DNA

石墨烯是由碳原子以 sp<sup>2</sup>杂化形成六边型蜂巢晶格的平面薄膜,是目前世上最薄的纳米材料<sup>[1]</sup>。氧化石墨烯(GO)是通过石墨烯氧化加工而成,具有水溶性好、表面易于修饰等特性,常被用作生物传感研究中识别元件的载体。更为重要的是,GO具有远程纳米能量转移淬灭荧光及能够通过π键堆叠作用共价吸附核酸碱基的特性<sup>[2]</sup>。相比于其他的有机淬灭剂,GO有较高的淬灭效率和信噪比,使得其在纳米光学传感领域显示出了极大的应用潜能。近年来,结合相关生物分析技术,基于GO设计的荧光传感系统已成功实现了对核酸、蛋白质及其他生物小分子的检测<sup>[3-9]</sup>。GO用于检测核酸的原理,荧光标记的单链DNA(ssDNA)作为分子探针,当DNA探针单独存在于缓冲液中,由于染料的荧光特性,在激发光作用下有很强的荧光发射信号;加入GO后,由于其六元环结构与核苷酸碱基的环状结构之间π-π相互堆积作用,使两者强烈的共价吸附在一起,这种构象的改变,使DNA探针上标记的荧光染料与GO之间发生高效的荧光共振能量转移,导致荧光迅速淬灭;当向混合液中加入靶DNA后,

靶DNA将与吸附的探针DNA非特异性地竞争GO表面结合位点,部分探针DNA被靶DNA置换到溶液相,游离的靶DNA和被置换出的探针序列互补结合形成刚性的双链结构,碱基之间氢键相互作用使双链DNA(dsDNA)无法再与GO作用,使被淬灭的荧光信号得到恢复<sup>[10]</sup>,见图1。通过检测反应前后荧光强度的变化,从而实现靶DNA定性和定量检测。

目前,GO以独特的理化性质被应用于各个领域。在分子诊断领域核酸检测方面,LU等<sup>[11]</sup>首次设计了以GO为平台,以荧光染料FAM标记的ssDNA为探针分子的传感方法,通过测量反应前后荧光强度的变化成功实现了对DNA的检测。在此基础上,HE等<sup>[12]</sup>设计了3种荧光探针,利用荧光发射波长的差异,同时检测3种目标DNA,实现了GO在同一溶液中对多种DNA靶序列的混合检测。鉴于GO的荧光淬灭效应和对单链/双链核酸吸附强度的差异性,也一一实现了对微小RNA(miRNA)<sup>[13]</sup>、dsDNA<sup>[14]</sup>等核酸分子的检测。在蛋白质检测方面,LU等<sup>[15]</sup>利用苝标记的多肽/GO复合物



注:FAM表示羧基荧光素

图1 核酸探针-GO生物传感器检测DNA的原理示意

Fig. 1 Schematic diagram of nucleic acid probe grapheme oxide biosensor for DNA detectio

实现了多肽-蛋白质相互作用的实时检测。HE等<sup>[16]</sup>利用小分子蛋白质结合DNA组成嵌合体时,可保护共轭结合的DNA免受3'端单链特异性核酸外切酶的酶切作用这一特性,在GO纳米平台上实现了对蛋白质的高灵敏检测。姜利英等<sup>[17]</sup>将能够与胰岛素特异性结合的ssDNA用荧光基团FAM进行标记作为探针,以GO为淬灭剂,构建了一种可对胰岛素进行特异性检测的荧光适配体传感器。除了以上领域,GO在环境污染<sup>[18]</sup>、药物载体<sup>[19]</sup>和筛选<sup>[20]</sup>、生物成像<sup>[21]</sup>等方面都有所应用。目前,GO荧光传感技术在中药鉴定领域尚未加以应用。

中药品种鉴定是中药质量控制的首要环节,是中药定性定量标准的前提,是中药作用物质基础研究的保证,是中药炮制品及中成药的质量保证<sup>[22]</sup>。品种一错,全盘皆否。如何确认品种和辨明正品,一直是中药研究领域的重要内容。GO荧光传感技术成熟,应用广泛,本研究根据GO对单链/双链DNA吸附能力的差异及其优异的荧光淬灭效率首次将该技术借鉴到名贵中药海马的鉴定研究中来,为中药鉴定开启一个新的研究思路。

## 1 材料

**1.1 样品** 本研究以市售的13种海马、24批样品为实验材料,所用样品首先由成都中医药大学侯飞侠副教授利用形态学方法进行鉴定,然后再使用DNA条形码技术进行验证,见表1。凭证样品保存于成都中医药大学西南特色中药资源国家重点实验室。

**1.2 试剂** GO粉购于源叶生物(批号T13O11F127288);琼脂糖购于北京擎科生物科技有限公司(批号14140107);2×Taq聚合酶链式反应(PCR) master mix和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒均购于北京天根生物科技有限公司(批号分别为W9115、89109379);体外转录试剂盒MEGAscript™ T7 Transcription Kit购买于上海徕创生物科技有限公司(批号AM1333);三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)(上海泽叶生物科技有限公司,批号

表1 海马及伪品样品信息

Table 1 Information of samples

物种名	收集地	单倍型序 列号	样品 编号
小海马 <i>Hippocampus japonicus</i>	成都荷花池中药材市场	MT558638	HJ1
小海马 <i>H. japonicus</i>	安徽亳州中药材市场	MT558639	HJ2
大海马 <i>H. kuda</i>	河北安国中药材市场	MT558614	HK1
大海马 <i>H. kuda</i>	成都荷花池中药材市场	MT558615	HK2
线纹海马 <i>H. kelloggi</i>	成都荷花池中药材市场	MT558632	HL1
线纹海马 <i>H. kelloggi</i>	广西玉林中药材市场	MT558633	HL2
三斑海马 <i>H. trimaculatus</i>	安徽亳州中药材市场	MT558626	HT1
三斑海马 <i>H. trimaculatus</i>	河北安国中药材市场	MT558627	HT2
刺海马 <i>H. histrix</i>	广西玉林中药材市场	MT558623	HH1
刺海马 <i>H. histrix</i>	成都荷花池中药材市场	MT558624	HH2
棘海马 <i>H. spinosissimus</i>	河北安国中药材市场	MT558609	HS
昆士兰海马 <i>H. queenslandicus</i>	成都荷花池中药材市场	MT558604	HQ1
昆士兰海马 <i>H. queenslandicus</i>	成都荷花池中药材市场	MT558605	HQ2
太平洋海马 <i>H. ingens</i>	广西玉林中药材市场	MT558636	HI1
太平洋海马 <i>H. ingens</i>	成都荷花池中药材市场	MT558637	HI2
虎尾海马 <i>H. comes</i>	河北安国中药材市场	MT558619	HC1
虎尾海马 <i>H. comes</i>	安徽亳州中药材市场	MT558622	HC2
直立海马 <i>H. erectus</i>	安徽亳州中药材市场	MT558640	HE1
直立海马 <i>H. erectus</i>	成都荷花池中药材市场	MT558641	HE2
鲍氏海马 <i>H. barbouri</i>	河北安国中药材市场	MT558611	HB1
鲍氏海马 <i>H. barbouri</i>	河北安国中药材市场	MT558612	HB2
南非海马 <i>H. capensis</i>	安徽亳州中药材市场	MT558642	HA1
南非海马 <i>H. capensis</i>	成都荷花池中药材市场	MT558643	HA2
贾氏海马 <i>H. jayakari</i>	成都荷花池中药材市场	MT558646	HY

RH306638); Tris饱和酚-三氯甲烷、三氯甲烷、无水乙醇(成都科龙化工试剂厂,批号分别为100805B、20110113、2022032102)。

本实验用到的引物序列包括小海马 *Hippocampus japonicus* 的特异性引物<sup>[23]</sup>Ja-F 5'-ACCCTCATTCTTCTCTCCTC-3'/Ja-R 5'-GG

TGTTTGGTATTGCGTGATTGAC-3', 该引物扩增的目的片段长度为 228 bp; 在小海马的特异性上游引物的 5' 端标记荧光基团 FAM 作为核酸探针 FAM-ssDNA 5' (FAM)-ACCCTCATTCTTCTTCTCTCTC-3'; 与核酸探针 FAM-ssDNA 互补配对的序列 FAM-ssDNA-match 5'-GAGGAGAAGAAGGAAUGAGGGU-3'。以上引物及核酸探针均由浙江有康生物科技有限公司合成。

**1.3 仪器** F-4500 Hitachi 型荧光分光光度计(上海普迪生物技术有限公司), MK2000-2 型恒温金属浴(杭州奥盛仪器有限公司), T100™ Thermal Cycler 型 PCR 扩增仪、Universal Hood II 型凝胶成像系统、PowerPac™ Basic 型核酸电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), NanoDrop 2000 型超微量分光光度计(上海艾研生物科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 小海马 ssDNA 的制备** 在小海马的特异性下游引物 Ja-R 5' 端加上 RNA 聚合酶 II 的识别位点 TAATACGACTCACTATAGGG 记作 Ja-R1 (5'-TAA TACGACTCACTATAGGGGGTGTGGTATTGCG TGATTGAC-3')。利用 Ja-F/Ja-R1 对所有海马样品进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系 100  $\mu\text{L}$ , 包含 2 $\times$ Taq PCR master mix 90  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 100  $\mu\text{L}$ ; 扩增程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收。使用体外转录试剂盒 MEGAscript™ T7 Transcription Kit 获得小海马的 ssDNA, 体外转录体系为 10  $\mu\text{L}$ , 包含回收产物 4  $\mu\text{L}$ , ATP solution、CTP solution、GTP solution、TTP solution 各 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  reaction buffer 1  $\mu\text{L}$ , T7 enzyme mix 1  $\mu\text{L}$ , 将以上混合液置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 8 h。然后加入 RNA 聚合酶抑制剂(Turbo) 1  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  静置 15 min 终止转录, 再加入 Strep 7.5  $\mu\text{L}$  和 ddH<sub>2</sub>O 57.5  $\mu\text{L}$  以降解双链 DNA 并稳定单链 DNA, 然后再加入 Tris 饱和酚-三氯甲烷(1:1) 75  $\mu\text{L}$  和三氯甲烷 150  $\mu\text{L}$ , 上下颠倒充分混匀, 静置 10 min 后, 吸上清, 在上清中加入两倍体积的无水乙醇, 混匀, 置 -20  $^{\circ}\text{C}$  至少 8 h, 13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心半径 8 cm 离心 15 min, 弃上清, 加入 75% 乙醇洗涤沉淀, 待乙醇完全挥发后, 将 ssDNA 沉淀溶解于 ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{L}$  中, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 利用超微量分光光度计 NanoDrop 2000 测定浓度后将其置于液氮中保存备用。

**2.2 核酸探针-GO 生物传感器的制备** 将 GO 粉超声溶解于 ddH<sub>2</sub>O 中制成质量浓度为 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 GO 溶液。用蒸馏水溶解三羟甲基氨基甲烷盐酸盐制成浓度为 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)并高温灭菌。用 ddH<sub>2</sub>O 将核酸探针 FAM-ssDNA 溶解成浓度为 500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的探针溶液。取探针溶液(500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 20  $\mu\text{L}$  置于 PCR 仪中 90  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min 后, 逐渐冷却到室温, 转移至离心管, 向其中加入不同体积 GO 溶液(100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和不同体积 Tris-HCl 缓冲液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 使反应终体积为 1 mL, 混匀, 室温避光放置 20 min。利用荧光分光光度计分别测量每个样品的荧光强度, 筛选最合适的 GO 浓度, 制备最佳的核酸探针-GO 生物传感器。荧光测定条件, 激发波长 490 nm, 扫描波长 510~700 nm, 激发和发射的夹缝宽度均为 10 nm, 负高压 700 V。

**2.3 核酸探针-GO 生物传感器的可行性检测** 为了检测构建的核酸探针-GO 生物传感器的可行性, 合成了与核酸探针 FAM-ssDNA 互补配对的序列 FAM-ssDNA-match。本实验利用荧光分光光度计分别测量了以下 3 个样品的荧光光谱, ① FAM-ssDNA 溶液(500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 20  $\mu\text{L}$  置于 PCR 仪 90  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min, 逐渐冷却至室温后加入 Tris-HCl 缓冲液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 980  $\mu\text{L}$ , 混匀, 测荧光; ② FAM-ssDNA 溶液(500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 20  $\mu\text{L}$  置于 PCR 仪 90  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min, 逐渐冷却至室温后依次加入 Tris-HCl 缓冲液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 860  $\mu\text{L}$  和 GO 溶液(100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 120  $\mu\text{L}$ , 混匀, 室温放置 20 min 后, 测荧光; ③ FAM-ssDNA 溶液(500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 20  $\mu\text{L}$  置于 PCR 仪 90  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min, 逐渐冷却至室温后依次加入 Tris-HCl 缓冲液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 860  $\mu\text{L}$  和 GO 溶液(100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 120  $\mu\text{L}$ , 混匀, 室温放置 20 min 后, 再向混合液中加入探针互补序列 FAM-ssDNA-match 溶液(5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 混匀, 室温放置 1 h, 测荧光。以上操作均在避光条件下进行。以上样品中核酸探针 FAM-ssDNA 溶液的终浓度均为 10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , GO 溶液终质量浓度均为 12  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , FAM-ssDNA-match 溶液终浓度约为 50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

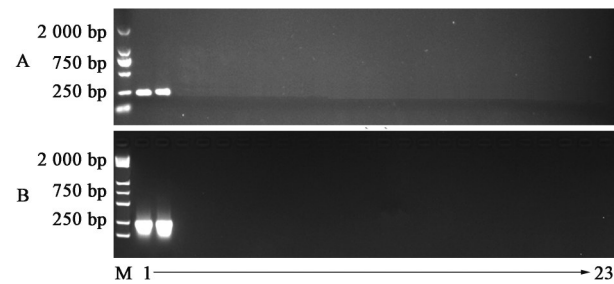
**2.4 小海马 ssDNA 的检测** 将 FAM-ssDNA 溶液(500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 20  $\mu\text{L}$  置于 PCR 仪 90  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min, 逐渐冷却至室温后, 向其中加入 GO 溶液(100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 120  $\mu\text{L}$  和 Tris-HCl 缓冲液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 860  $\mu\text{L}$ , 混匀, 室温避光放置 20 min, 制成核酸探针-GO 生物传感器。再向传感器溶液中分别加入 ddH<sub>2</sub>O(空白对照) 20  $\mu\text{L}$  和不同浓度的小

海马(HJ1)ssDNA 20  $\mu\text{L}$ ,混匀,室温反应1 h后,利用荧光分光光度计分别测量每个样品的荧光强度。

**2.5 市售海马药材的检测** 根据本实验建立的方法,首先利用引物 Ja-F/Ja-R1 对市场收集到的 13 种共 24 份海马样品进行 PCR 扩增,使用体外转录法获得小海马 ssDNA。将体积均为 50  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O 和海马反转录产物分别加到 1 mL 核酸探针-GO 溶液(500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  FAM-ssDNA 溶液 20  $\mu\text{L}$ +50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液 860  $\mu\text{L}$ +100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GO 溶液 120  $\mu\text{L}$ )中,混匀,避光室温反应 1 h。利用荧光分光光度计测量每个样品的荧光强度。

### 3 结果

**3.1 ssDNA 的制备** 小海马特异性引物 Ja-F/Ja-R 的扩增片段为 228 bp。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对所有海马反转录产物进行检测,结果发现只有小海马有目的条带,表明 ssDNA 制备成功。利用超微量分光光度计测定获得的小海马样品的 ssDNA 质量浓度约为 2 600  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见图 2。



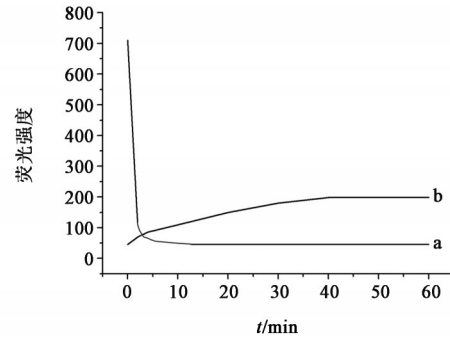
注: M. Marker; 1、2. HJ1、HJ2; 3、4. HK1、HK2; 5、6. HL1、HL2; 7、8. HT1、HT2; 9、10. HH1、HH2; 11. HS; 12、13. HQ1、HQ2; 14、15. HI1、HI2; 16、17. HC1、HC2; 18、19. HE1、HE2; 20、21. HB1、HB2; 22、23. HA1、HA2; 24. HY

图 2 小海马特异性引物扩增产物(A)及其 ssDNA(B)琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of *H. japonicas* specific primers amplification products (A) and ssDNA (B)

**3.2 核酸探针荧光淬灭及恢复时间的测定** 将核酸探针 FAM-ssDNA 的浓度固定为 10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。GO 对核酸探针的荧光淬灭效率较高,当 GO 被加入到 FAM-ssDNA 溶液后,反应体系的荧光强度急剧降低,随着时间的增加,淬灭速率趋于稳定,并在 10 min 后荧光强度不再发生变化。为了保证荧光淬灭完全,减少背景干扰,本实验将 GO 的淬灭时间定为 20 min。当加入核酸探针互补序列 FAM-ssDNA-match 后,随着反应时间的延长,体系的荧光信号不断增强,反应 40 min 后,荧光信号趋于稳定。为了使反应彻底,本实验将小海马 ssDNA 与核酸探针反

应的反应时间定为 1 h。见图 3。



注: a. 荧光淬灭反应的时间监测; b. 荧光恢复反应的时间监测

图 3 核酸探针荧光淬灭及恢复时间监测

Fig. 3 Time monitoring of nucleic acid probe fluorescence quenching and recovery

**3.3 GO 浓度的确定** GO 浓度的确定对核酸探针-GO 生物传感器制备能否成功起决定性作用:GO 浓度过低将无法完全淬灭荧光信号;GO 浓度过高会使置换出的核酸探针与多余的 GO 结合,导致荧光信号恢复不明显。本实验将核酸探针 FAM-ssDNA 的浓度固定为 10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,向其中加入不同体积 GO 溶液(100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和不同体积 Tris-HCl 缓冲液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )使反应体系的终体积为 1 mL,室温避光放置 20 min 后,测荧光发现,随着 GO 浓度的增加,核酸探针的荧光强度不断降低。当 GO 浓度达到 12  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,荧光信号被完全淬灭。故本实验制备核酸探针-GO 生物传感器时将 GO 的浓度确定为 12  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见图 4。

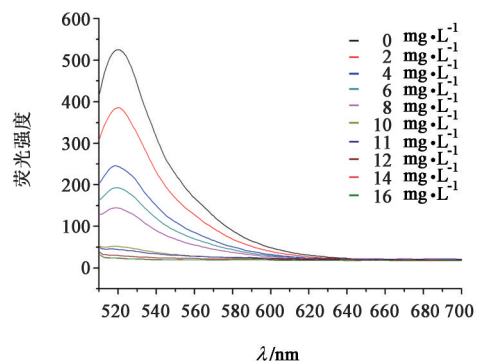


图 4 核酸探针 FAM-ssDNA 与不同浓度 GO 反应的荧光光谱

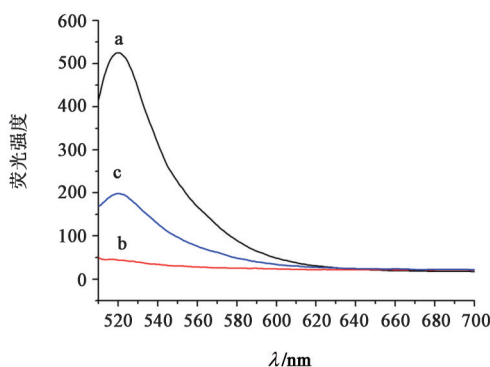
Fig. 4 Fluorescence spectra of nucleic acid probe FAM-ssDNA reacting with different concentration of GO

**3.4 核酸探针-GO 生物传感器的制备条件** 根据核酸探针 FAM-ssDNA 荧光淬灭时间及 GO 浓度测定的结果,本实验构建核酸探针-GO 生物传感器的方法如下,取 FAM-ssDNA 溶液(500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 20  $\mu\text{L}$  置于 PCR 仪 90  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min,逐渐冷却至室

温,向其中加入的 Tris-HCl 缓冲液( $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $850\ \mu\text{L}$ 和 GO 溶液( $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $120\ \mu\text{L}$ ,混匀,放置 20 min。

**3.5 核酸探针-GO 生物传感器可行性检测** 可行性检测原理是当核酸探针 FAM-ssDNA 单独存在于缓冲液中时,反应体系将发射出很强的荧光信号。加入适量 GO 溶液后,核酸探针 FAM-ssDNA 与 GO 之间通过  $\pi$ - $\pi$  堆积效应, FAM-ssDNA 探针被迅速吸附在 GO 表面,形成 GO 和核酸探针 FAM-ssDNA 的能量转移体系,使核酸探针 FAM-ssDNA 的荧光信号被淬灭。再加入探针互补序列 FAM-ssDNA-match 后, FAM-ssDNA-match 与核酸探针 FAM-ssDNA 非特异性地竞争 GO 表面结合位点,部分核酸探针 FAM-ssDNA 被 FAM-ssDNA-match 置换出来,游离的 FAM-ssDNA-match 序列和被置换出的探针序列通过碱基互补配对原则形成稳定的核酸双链结构,核酸双链结构与 GO 的结合能力显著减弱,反应体系的荧光信号将明显增强。

本实验可行性检测结果发现,当核酸探针单独存在于 Tris-HCl 缓冲液中时,体系发射出很强的荧光信号,加入 GO 溶液后,探针被吸附在 GO 表面且发生了荧光共振能量转移效应,荧光被淬灭,故检测到体系几乎无荧光信号,再加入探针互补序列 FAM-ssDNA-match 后, FAM-ssDNA-match 与探针结合形成稳定的核酸双链结构,无法被 GO 吸附,使反应体系的荧光信号明显增强。实验结果证明了本文实验设计的可行性,表明本实验制备的核酸探针-GO 生物传感器可用于目标 ssDNA 的检测。见图 5。



注: a. FAM-ssDNA 溶液+Tris-HCl 缓冲液; b. FAM-ssDNA 溶液+Tris-HCl 缓冲液+GO 溶液; c. FAM-ssDNA 溶液+Tris-HCl 缓冲液+GO 溶液+FAM-ssDNA-match 溶液

图 5 核酸探针 FAM-ssDNA ( $10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 在不同条件下的荧光发射光谱

Fig. 5 Fluorescence emission spectra of nucleic acid probe FAM-ssDNA ( $10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) under different conditions

**3.6 小海马 ssDNA 的检测** 利用荧光分光光度计对加入了不同浓度的小海马(HJ1)ssDNA 的混匀液进行检测,随着小海马 ssDNA 浓度的升高,反应体系的荧光信号逐渐增强,表明基于 GO 和核酸探针 FAM-ssDNA 能量共振转移体系,能够对目标分子进行检测。该方法能够检测到的小海马 ssDNA 的最低质量浓度约为  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,见图 6。

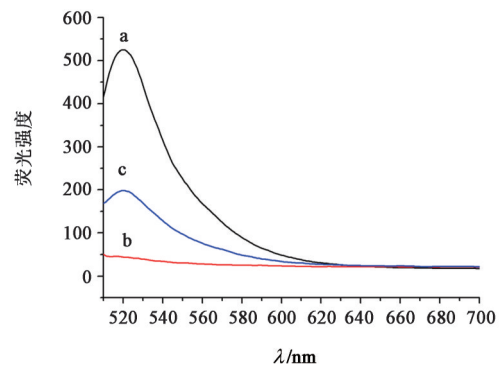


图 6 GO 生物传感器检测不同浓度小海马 ssDNA 的荧光光谱

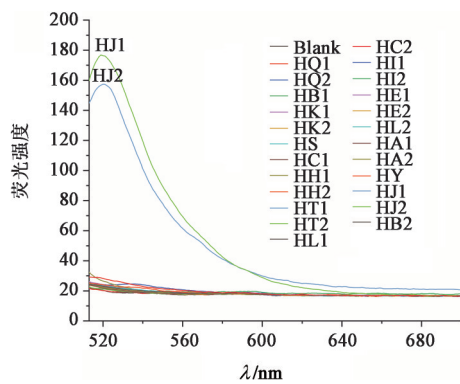
Fig. 6 Fluorescence spectra of different concentrations of *H. japonicus* ssDNA detected by GO biosensors

### 3.7 GO 荧光传感技术鉴别海马药材的实践应用

向 GO 荧光传感器溶液中分别加入 ddH<sub>2</sub>O  $50\ \mu\text{L}$  和不同海马样品的反转录产物,其中 2 个小海马样品在反应体系中的终质量浓度均约为  $48\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。利用荧光分光光度计测量每个样品的荧光强度,结果显示,只有小海马样品有明显的荧光信号,其他海马样品与空白对照一致,荧光信号没有明显恢复,表明该方法可用于市售海马药材的真伪检测。见图 7。

## 4 讨论

中药材是中医防病治病的物质基础,是中医临床疗效的根本保障,对中药材真伪优劣的准确鉴定是保证药物品质与治疗效果的先决条件。中药准确的基原鉴定是中药质量控制中至关重要的环节。对中药材进行鉴定有四大基本方法,即基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定。这些鉴定方法主要依赖于形态特征和化学特征,然而,形态特征及化学特征都具有表型可塑性,受生物生长发育和环境条件的影响,变异较大。同时,在形态学方面,很多药材部位特征简单,准确鉴定比较困难,或者需要较高的专业水平和积累多年的经验,近缘种常常没有明显区别;在化学特征方面,因各个药材特异性不同,研究中建立的方法往往无法通用,且一些药材的化学特征提取难度较大<sup>[24]</sup>。中药材 DNA 分子鉴定是利用中药中的 DNA 进行中药鉴定的方法。



注: HJ1、HJ2. 小海马 *H. japonicas*; HK1、HK2. 大海马 *H. kuda*; HL1、HL2. 线纹海马 *H. kelloggi*; HT1、HT2. 三斑海马 *H. trimaculatus*; HH1、HH2. 刺海马 *H. histrix*; HS. 棘海马 *H. spinosissimus*; HQ1、HQ2. 昆士兰海马 *H. queenslandicus*; HI1、HI2. 太平洋海马 *H. ingens*; HC1、HC2. 虎尾海马 *H. comes*; HE1、HE2. 直立海马 *H. erectus*; HB1、HB2. 鲍氏海马 *H. barbouri*; HA1、HA2. 南非海马 *H. capensis*; HY. 贾氏海马 *H. jayakari*

图7 GO生物传感器检测市售海马的荧光光谱

Fig. 7 Fluorescent spectra of commercially available seahorses detected by GO biosensors

DNA作为遗传信息的载体,不受外界环境、生长发育阶段、取样部位、采收加工、贮藏等条件的影响,可以抛开形态相似的假象和过于多变的化学特征,从基因水平提供一种鉴别依据,是非常可靠的鉴定标记,不仅用于中药不同物种的鉴别<sup>[25-27]</sup>,也广泛用于种下不同居群<sup>[28-30]</sup>、不同种质资源<sup>[31-33]</sup>和道地药材<sup>[34-36]</sup>的研究,为中药鉴定提供了遗传学证据;特别是在名贵药材、道地药材、动物类药材、珍稀濒危动植物真伪鉴定等方面具有独特优势。但目前的分子鉴定方法也存在一些问题,限制了其在中药鉴定中的应用和推广。首先,目前在中药分子鉴定中广泛应用的为DNA条形码技术,该方法不受研究者的专业水平限制,可完成常规鉴定方法无法完成的工作,但需要测序,实验成本高,周期长,且其准确性严重依赖序列数据库。其次,物种特异性PCR技术,无需测序,只需根据电泳条带的大小及有无判断正伪品,故此技术在中药鉴定领域也有大量应用<sup>[37-42]</sup>。该方法还需要电泳,无法实现中药鉴定的快捷性和简便性。为了避免电泳,有研究者将物种特异性PCR技术与荧光检测技术结合在一起<sup>[43-45]</sup>,即直接在PCR产物中加入荧光染料,根据混合物在紫外照射下是否发荧光来鉴别正伪品。该方法仅需PCR仪、操作简单,有利于中药材分子鉴别技术的推广和应用。该方法也有弊端,即对引物的特异性要求较高,且不可形成引物二聚体,否则会出现假阳性。GO荧光传感技术不受引物二聚体的影

响,根据荧光强度的变化即可区分正伪品,为中药鉴定提供了一个新的思路。

已有大量研究文献证明了利用GO荧光传感器检测特定DNA序列的有效性和可行性。本研究根据小海马与其他海马物种的线粒体细胞色素C氧化酶亚基I(CO I),基因碱基序列不同,首先在小海马的特异性下游引物Ja-R5'端加上RNA聚合酶II的识别位点记作Ja-R1,利用Ja-F/Ja-R1扩增实验收集的海马样品,再使用体外转录法对特异性扩增产物进行转录获得小海马ssDNA作为待测的靶标DNA。在小海马特异性上游引物的5'端加上FAM荧光基团作为核酸探针,核酸探针序列与小海马ssDNA序列碱基互补配对。当核酸探针FAM-ssDNA单独存在时,将发射出较强的荧光,加入GO溶液后,由于GO能够吸附探针ssDNA且具有高效的荧光淬灭效率,反应体系的荧光信号将消失,加入小海马ssDNA后,由于核酸探针与小海马ssDNA碱基互补配对进而结合在一起形成dsDNA,而GO对dsDNA的吸附能力较弱,故反应体系的荧光信号将得到恢复。整个实验过程涉及ssDNA的制备和核酸探针-GO生物传感器的构建、GO浓度的确定、荧光猝灭时间和恢复时间的检测,传感器的可行性检测等步骤。其中,GO浓度的确定对是否能成功构建核酸探针-GO传感器起决定性作用,若GO量过大,核酸探针被GO完全吸附后,溶液中无荧光,但存在一部分未与核酸探针结合的GO,导致加入靶目标DNA后,从GO表面游离的核酸探针有可能再次被吸附,影响实验结果的准确性;若GO量过小,又会使实验面临以下两个问题之一,①GO不能将核酸探针完全吸附,溶液中还存在大量荧光,导致加入靶目标DNA后荧光强度变化不够明显;②会有过多的核酸探针与GO结合,导致传感器过载甚至中毒,进而影响传感器的灵敏性。本实验发现核酸探针终浓度为10 nmol·L<sup>-1</sup>的反应体系中,GO质量浓度达到12 mg·L<sup>-1</sup>时可完全淬灭荧光信号,故本实验构建传感器时将GO终质量浓度固定为12 mg·L<sup>-1</sup>。另外,实验发现荧光恢复所需时间比荧光淬灭所需时间长,原因可能是由于荧光恢复过程包含靶标DNA从GO上置换出探针及探针与靶标DNA结合形成双链2个阶段。

本实验将物种特异性PCR技术与GO荧光传感技术相结合,不仅发挥了物种特异性PCR技术在中药材鉴定方面的优势,还发挥了GO荧光传感技术准确、可视化的特点。该方法与DNA条形码、物种

特异性鉴定的荧光PCR等鉴别方法相比,不需凝胶电泳,不受引物二聚体的影响,但该方法需要制备ssDNA,体外转录制备ssDNA步骤较为繁琐,故如何简便地获得ssDNA是将该技术广泛用于中药鉴定需要攻克的一个问题。

本研究鉴于GO高效的荧光淬灭效率和对单链/双链DNA吸附能力的不同,将GO荧光传感技术借鉴到了中药材的真伪鉴别中,验证了该技术用于中药鉴定的可行性,为中药鉴定研究提供了一个可借鉴的新方法。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 韩新忠. 波兰发现低成本生产最薄最坚硬纳米材料石墨烯方法[J]. 功能材料信息, 2013, 10(5): 105-106.

[2] JUNG J, MACDONALD, ALLAN H. Tight-binding model for grapheme  $\pi$ -bands from maximally localized wannier functions[J]. Phys Rev B, 2013, 87(19):195450-1-195450-10.

[3] RASHEED P A, SANDHYARANI N. Graphene-DNA electrochemical sensor for the sensitive detection of BRCA1 gene[J]. Sensor Actuat B-Chem, 2014, 204: 777-782.

[4] LU J G, SUN Y M, WEN D Z. Effect of grapheme composite on biological egg protein resistance switching memory properties[J]. Nano, 2021, 16(11): 2150134.

[5] WEN J, LI W S, LI J Q, et al. Study on rolling circle amplification of Ebola virus and fluorescence detection based on grapheme oxide[J]. Sensor Actuat B-Chem, 2016, 227:655-659.

[6] LIU Y, DONG X, CHEN P. Biological and chemical sensors based on graphene materials [J]. Chem Soc Rev, 2012, 41(6):2283-2307.

[7] MORALES-NARVÁEZ E, MERKOÇI A. Graphene oxide as an optical biosensing platform[J]. Adv Mater, 2012, 24(25):3298-3308.

[8] WANG C F, WANG Z G, SUN X Y, et al. An ultrasensitive fluorescent aptasensor for detection of cancer marker proteins based on graphene oxide-ssDNA[J]. RSC Adv, 2018, 8(72):41143-41149.

[9] TANG Y F, LIU M X, XU L C, et al. A simple and rapid dual-cycle amplification strategy for microRNA based on grapheme oxide and exonuclease III-assisted fluorescence recovery [J]. Anal Methods, 2018, doi: 10.1039.C8AY01106K.

[10] LIY B W, SUN Z Y, ZHANG X, et al. Mechanisms of DNA sensing on grapheme oxide [J]. Anal Chem, 2013, 85(16):7987-7993.

[11] LU C H, YANG H H, ZHU C L, et al. A graphene platform for sensing biomolecules [J]. Angew Chem Int Ed, 2009, 121(26):4879-4881.

[12] HE S J, SONG B, LI D, et al. A graphene nanoprobe for rapid, sensitive, and multicolor fluorescent DNA analysis [J]. Advanced Functional Materials, 2010, 20(3):453-459.

[13] LU Z, ZHANG L, DENG Y, et al. Graphene oxide for rapid microRNA detection [J]. Nanoscale, 2012, 4(19):5840-5842.

[14] LEE J, PARK I S, JUNG E, et al. Direct, sequence-specific detection of dsDNA based on peptide nucleic acid and graphene oxide without requiring denaturation [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 62:140-144.

[15] LU C H, LI J, ZHANG X L, et al. General approach for monitoring peptide-protein interactions based on graphene-peptide complex [J]. Anal Chem, 2011, 83(19):7276-7282.

[16] HE Y, XING X, TANG H, et al. Graphene oxide-based fluorescent biosensor for protein detection via terminal protection of small-molecule-linked DNA [J]. Small, 2013, 9(12):2097-2101.

[17] 姜利英,肖小楠,周鹏磊,等. 基于氧化石墨烯荧光适配体传感器的胰岛素检测[J]. 分析化学, 2016, 44(2): 310-314.

[18] 杜佳媛,魏永鹏,刘菲菲,等. 氧化石墨烯对环境污染物的吸附行为及吸附机理[J]. 地球科学进展, 2016, 31(11):1125-1136.

[19] 张中勋,刘霞,刘杨,等. 氧化石墨烯修饰壳聚糖药物载体的构建[J]. 高分子材料科学与工程, 2019, 35(8):137-143.

[20] 彭兰. 氧化石墨烯荧光探针用于核酸酶的热力学分析和药物筛选[D]. 长沙:湖南大学, 2016.

[21] 徐成. 氧化石墨烯复合纳米材料的制备及其在药物递送和生物成像上的应用[D]. 长沙:湖南大学, 2016.

[22] 万德光,裴瑾. 论中药品种鉴定在中药质量控制中的地位 and 作用 [J]. 药学实践杂志, 2000, 18(5): 260-262.

[23] HOU F X, CAO J, WANG X, et al. Specific authentication of *Hippocampus* based on SNP markers [J]. Biochem Syst Ecol, 2017, (71):131-136.

[24] 王川易,郭宝林,肖培根. 中药分子鉴定方法评述 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3):237-242.

[25] 周敏,樊兰兰,高慧新,等. 白花蛇舌草的DNA条形

- 码研究[J]. 时珍国医国药,2018,29(1):103-106.
- [26] 徐传林,李会军,李萍,等. 川贝母药材分子鉴定方法研究[J]. 中国药科大学学报,2010,41(3):226-230.
- [27] 黄娟,李西文,徐文,等. 耳草属岭南药材DNA分子鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2016,(8):1401-1407.
- [28] 徐纲,于超,阳勇,等. 不同居群栽培牡丹rDNA ITS区序列分析及鉴别[J]. 天然产物研究与开发,2009,21(2):225-230,266.
- [29] 蒋鹏,张瑞,张祚,等. 基于SNP的多重位点特异性PCR鉴别不同居群竹节参[J]. 武汉轻工大学学报,2020,39(4):15-19,31.
- [30] 张甜甜. 正品丹参及山东丹参不同地理居群的DNA分子标记的开发及鉴定[D]. 烟台:烟台大学,2016.
- [31] 代红艳. 山楂种质资源的分子鉴定及创新研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2007.
- [32] 彭飒. 红花种质资源的SRAP分子鉴定及其与品质相关的分子标记研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2006.
- [33] 付涛,胡仲义,何月秋,等. 基于cpDNA条形码鉴定铁皮石斛种质资源[J]. 核农学报,2017,31(2):255-262.
- [34] 黄璐琦,郭兰萍,胡娟,等. 道地药材形成的分子机制及其遗传基础[J]. 中国中药杂志,2008,33(20):2303-2308.
- [35] 邓锋,莫结丽,陈浩桢. 采用ISSR分子标记法鉴别道地药材化橘红[J]. 广东药学院学报,2009,25(5):455-458.
- [36] 李钟. 用RAPD技术鉴别湖南道地药材玉竹[D]. 长沙:湖南中医学院,2003.
- [37] 唐晓晶,冯成强,黄璐琦,等. 蕲蛇及其混淆品高特异性PCR鉴别[J]. 药物分析杂志,2006,26(2):152-155.
- [38] 赵静雪,崔光红,辛敏通,等. 金钱白花蛇快速PCR鉴别方法的建立[J]. 药学学报,2010,45(10):1327-1332.
- [39] 陈维明,马梅,龚玲,等. 基于物种特异性PCR方法的鸡内金真伪鉴别[J]. 广州中医药大学学报,2015(3):499-503.
- [40] 刘亚男,华中一,赵玉洋,等. 基于DSS标记特异性PCR鉴别冷背药材木槿皮基原植物及其混伪品[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):133-139.
- [41] 陈玉春. 基于位点特异性PCR技术对中国黄果人参品种的分子鉴定[D]. 烟台:烟台大学,2021.
- [42] 李柯帆,索晓雄,李晓兰,等. 多重位点特异性PCR同时鉴别酸枣仁及其掺伪品[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(2):141-148.
- [43] 方绍庆,尹伟力,耿金培,等. 中国蚤物种特异性鉴定的荧光PCR方法研究[J]. 动物医学进展,2011,32(11):25-30.
- [44] 李静宇,孙铭阳,徐世强,等. 穿心莲茉莉酸甲酯及非生物胁迫下Real-time PCR内参基因的筛选[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(5):133-140.
- [45] 蒋超,侯静怡,黄璐琦,等. 快速PCR方法在金银花真伪鉴别中的应用[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3668-3672.

[责任编辑 顾雪竹]