基于磁纳米颗粒的二段对称分裂式 G-四分体 DNA 酶生物传感器用于 Hg^{2+} 的快速检测

张佳佳 代佩卿 李超 李南忘

程圭芳* 何品刚 方禹之

(华东师范大学化学系 上海 200241)

摘要 提出了一种可用于 Hg^{2+} 快速检测的基于磁纳米颗粒与二段对称分裂式 G-四分体 DNA 酶的生物传感器。分别用紫外-可见光谱法, 圆二色光谱法和荧光显微镜成像技术对实验设计的 DNA 酶传感器进行了表征。传感器中磁纳米颗粒的应用不仅可以直接从水样中通过磁分离方法分离和富集被测物 Hg^{2+} , 并且还能将游离的未与 Hg^{2+} 结合的 DNA 酶和 hemin 等除去, 有效地提高检测灵敏度和降低背景信号; 此外, 二段对称分裂式 G-四分体 DNA 酶的运用还可增强传感器的灵活性和选择性。传感器对 Hg^{2+} 检测的线性范围为 0.8~20 nmol/L, 检出限为 0.3 nmol/L。当水体中的共存离子大量存在时, 传感器对 Hg^{2+} 的检测仍具有高度特异性。对实际水样的检测回收率在 95.3%~104.4% 之间。实验设计的 DNA 酶传感器操作简便, 费用低廉, 具有良好的再生能力。可用于天然水体和饮用水样品中痕量 Hg^{2+} 的检测。

关键词 磁纳米颗粒; 二段对称分裂式 G-四分体; DNA 酶; 生物传感器; 比色法; Hg^{2+}

A Symmetrically Split G-quadruplex DNAzymes Biosensor Based on Magnetic Nanoparticles for the Rapid Detection of Hg^{2+}

Zhang, Jiajia Dai, Peiqing Li, Chao Li, Nanwang

Cheng, Guifang* He, Pingang Fang, Yuzhi

(Chemistry Department, East China Normal University, Shanghai 200241)

Abstract A biosensor composed of magnetic nanoparticles and symmetrically split G-quadruplex DNAzymes was proposed for the rapid and sensitive detection of Hg^{2+} . It was mainly based on the formation of a special thymine- Hg^{2+} -thymine (T-Hg-T) structure by T-riched nucleic acid sequences and Hg^{2+} , and then G-quadruplex DNAzymes catalyzed the oxidation of H_2O_2 and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS), so that the trace amount of Hg^{2+} in water can be successfully detected by colorimetry. The assembly of the biosensor was characterized by using of UV-Visible spectroscopy, CD spectroscopy and fluorescence microscopy imaging techniques respectively. The magnetic nanoparticles coated with T-riched short oligonucleotide (DNA1) via streptavidin-biotin interaction were employed as the capture elements. The long oligonucleotides (DNA2) consisting of the T-riched sequence in the middle and two G-riched fragments at the both ends were used as the sensing elements. The procedure of the protocol was divided into three steps. First: the magnetic nanoparticles covered with DNA1 (MNPs/DNA1) mixed with DNA2 were added into a water sample to capture the target Hg^{2+} by forming the special T-Hg-T structure. Incubating 2 h at 37 °C, two G-riched fragments at the ends of DNA2 were close to each other assembling the symmetrically G-quadruplex DNAzymes in the presence of hemin. Then, the supernatant was discarded by magnetic separation, and the residues were washed several times to resuspend in the mixture solution containing definite amount of H_2O_2 and ABTS. The catalytic signal of absorbance of ABTS^{+} was recorded by UV-Visible spectrophotometer. The utilization of MNPs can greatly reduce the background signal, and the employment of symmetrically split DNAzymes made the design of the experiment more flexible and selectable. The biosensor was sensitive, and the calibration curve was identified in the range from 0.8 nmol/L to 20 nmol/L with a detection limit of 0.3 nmol/L. And the biosensor can detect Hg^{2+} without interference in the presence of a large number of competing ions. This sensor was simple, inexpensive, and renewable. Satisfactory values between 95.3% and 104.4% were obtained for the recovery experiments, and it can meet the requirement of detection of trace Hg^{2+} in natural water especially in drinking water.

Keywords magnetic nanoparticles; symmetrically split G-quadruplex; DNAzymes; biosensors; colorimetry; mercury ions

* E-mail: gfccheng@chem.ecnu.edu.cn; Tel.: 021-54340047; Fax: 021-54340047

Received March 31, 2014; published July 11, 2014.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21175045) and National Key Foundation for Exploring Scientific Instrument (No. 2011YQ150078).

项目受国家自然科学基金(No. 21175045)和国家重大科学仪器设备开发专项(No. 2011YQ150078)资助。

1 引言

汞污染是我国水体污染的重要组成部分,已经严重威胁了人类健康^[1~4].汞具有很高的生物毒性,且具有高迁移性以及生物富集性,可破坏中枢神经系统,引发产前脑损伤、水俣病等多种疾病^[5].儿童长期暴露在汞环境下,会导致肾脏、肺毒性,皮疹和高血压.鉴于 Hg^{2+} 的高危害性,寻找安全、灵敏、高效的 Hg^{2+} 检测方法,从而有效缓解现今的 Hg^{2+} 污染问题,保障人民健康,具有重大的现实意义^[6].

检测 Hg^{2+} 的方法,除了传统的原子发射光谱法,原子吸收光谱法,原子荧光光谱法等以外,还可以构建DNA生物传感器^[7].利用DNA生物传感器检测 Hg^{2+} ,主要是依据核酸中的胸腺嘧啶(T)可以特异性识别 Hg^{2+} ,形成特殊的T-Hg-T结构^[8,9].Wang等^[10]报道了一种溶液中的“turn-on”型荧光DNA生物传感器用于 Hg^{2+} 的检测,主要是基于荧光基团和猝灭基团相互靠近后发生荧光共振能量转移.体系中无 Hg^{2+} 时,连接荧光基团和猝灭基团的两条核酸序列碱基配对形成双链,荧光基团和猝灭基团靠近,荧光猝灭;向体系中加入 Hg^{2+} 后,连有荧光基团的序列中富含T碱基部分形成T-Hg-T结构,将含有猝灭基团的序列释放出来,荧光基团和猝灭基团相互远离,荧光信号恢复.该方法具有较高的灵敏度和选择性,检出限达到了3.2 nmol/L. Li等利用特别设计的富含G和T碱基的核苷酸序列成功组装了DNA酶比色传感器.众所周知,G-四分体DNA酶具有很好的催化性能^[11~15],可催化 H_2O_2 氧化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的反应,通过比色法表征,可以达到检测水体中 Hg^{2+} 的目的^[16].纳米技术已经被广泛地应用于DNA生物传感器^[17~20].Zhao等^[21]设计了一种基于纳米颗粒的 Hg^{2+} 生物传感器.磁珠上组装一段富含T碱基的核酸序列,而金胶与修饰有 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的另一段富含T的序列连接,作为信号探针.当有 Hg^{2+} 存在时,磁颗粒和金纳米颗粒通过DNA中的T碱基形成T-Hg-T结构而结合,利用磁铁将该传感器富集在电极表面,通过电化学信号的变化情况来检测 Hg^{2+} .我们课题组^[22]也对 Hg^{2+} 传感器进行了深入研究,提出了一种基于核酸功能化的金纳米颗粒的 Hg^{2+} 比色传感器.我们设计了一条富含T碱基的能够特异性识别 Hg^{2+} 的DNA序列,并将其组装到金纳米颗粒表面作为比色探针.当体系中存在50 mmol/L Mg^{2+} 时,金纳米颗粒之间的排斥力减小,导致金胶发生团聚现象;而当体系中有 Hg^{2+} 时,富含T碱基的DNA序列特异性与 Hg^{2+} 结合,在金胶表面形成T-Hg-T双链结构,抑制了金纳米颗粒的团聚.这种方法设计简单,耗时短,检出限为60 nmol/L,且能应用于实际样品中 Hg^{2+} 的检测.

鉴于传统的 Hg^{2+} 生物传感器存在灵敏度低, Hg^{2+} 难分离处理等缺点,本文提出了一种将磁纳米颗粒和对称分裂式G-四分体DNA酶相结合检测 Hg^{2+} 的方法(如图

1所示).将一段富含T碱基的核酸序列(DNA1)通过生物素-亲和素的相互作用连接到磁颗粒表面(MNPs/DNA1).长链DNA2包含三大部分:两段富含G碱基的DNA片段(如图1中DNA2的红色部分),用于形成G-四分体DNA酶; Hg^{2+} 识别部分(如图1中DNA2的紫色部分),富含T碱基,用于特异性识别 Hg^{2+} ;自由弯曲的序列(如图1中DNA2的黑色部分),主要起连接作用.当体系中有 Hg^{2+} 时,DNA1和DNA2中的T碱基可以捕获 Hg^{2+} ,形成特殊的T-Hg-T结构,这样DNA2探针就成功组装到磁颗粒上,形成MNPs/DNA1/DNA2.在37 °C水浴条件下培育,DNA2两端富含G的片段相互靠近形成对称分裂式G-四分体,当hemin嵌入后,即形成hemin嵌入式G-四分体DNA酶,可催化 H_2O_2 氧化2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)生成浅绿色的 ABTS^+ ,利用紫外-可见分光光度计,就可以表征溶液颜色变化,从而达到检测水体中 Hg^{2+} 的目的.磁纳米颗粒具有很好的生物相容性,不仅可以直接从水样中通过磁分离方法分离和富集被测物 Hg^{2+} ,且将游离的未与 Hg^{2+} 结合的DNA酶磁分离后可大大降低背景信号.对称分裂式G-四分体DNA酶是由两段富含G碱基的DNA片段组成,与传统的DNA酶相比,具有更高的灵敏度和更好的选择性,还能使实验设计更加灵活^[23~28].

图1 Hg^{2+} 生物传感器的组装原理图

Figure 1 Diagram of the synthesis of Hg^{2+} biosensor

2 结果与讨论

2.1 Hg^{2+} 生物传感器的表征2.1.1 Hg^{2+} 传感器的紫外表征

图2为 Hg^{2+} 生物传感器的紫外表征图. ABTS本身的颜色很浅,所以该体系在400~500 nm范围内的吸收信号很低(见图2a).由于MNPs本身也具有一定的氧化

催化性能^[29-32], 我们用 2% BSA 溶液对 MNPs 表面做封闭处理后^[33]可避免 MNPs 本身催化的影响(见图 2b), 经 BSA 处理后的 MNPs 还可以有效降低 DNA 在磁颗粒表面的非特异吸附. 向 MNPs/DNA1 中分别加入 hemin(图 2c)和 hemin 与 DNA2 混合液(图 2d)时, 其各自的催化效率与 MNPs/DNA1 单独存在时相差不大. 这是因为体系中没有目标物 Hg^{2+} 存在, 游离 hemin 和可形成 G-四分体的 DNA2 不能被磁颗粒捕获所致. 向其中加入 Hg^{2+} 后, 在 421 nm 处的吸光度值大幅上升, 催化能力急剧增加(图 2e). 这说明当体系中存在 Hg^{2+} 时, 磁颗粒可以通过形成 T-Hg-T 结构成功捕获 DNA2 和 hemin, 形成 G-四分体状 DNA 酶, 使其催化 H_2O_2 存在下的 ABTS 氧化反应活性增强^[34-36]; 这也说明 421 nm 处吸光度值的升高与 Hg^{2+} 有关. 因磁颗粒的存在, 可以通过磁分离方法将游离的 hemin 和 DNA2 除去, 所以可以有效地降低传感器检测时的背景, 对提高传感器的检测灵敏度有很大帮助.

图 2 不同组分存在时 Hg^{2+} 传感器的紫外吸收曲线

Figure 2 UV absorption curves of the Hg^{2+} biosensor in the presence of different components
DNA1: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; DNA2: 1.5 $\mu\text{mol/L}$; Hg^{2+} : 100 nmol/L; hemin: 50 nmol/L; ABTS: 4 mmol/L; H_2O_2 : 4 mmol/L

2.1.2 Hg^{2+} 传感器的荧光显微镜表征

为了更进一步证实实验设计传感器的工作原理, 我们采用 5'端标记荧光基团的具有相同序列的 F-DNA 替代 DNA2 链, 通过荧光显微镜成像技术来研究传感器对 Hg^{2+} 的捕获情况, 实验中我们选择白光和蓝光(波长范围为 490~500 nm)两种光源, 结果见图 3. 图 3a 为 MNPs/DNA1 的照片, 因为磁颗粒本身无荧光, 所以在白光下磁珠颗粒较明显, 荧光照射下只能看到模糊的阴影. 在 MNPs/DNA1 中加入 F-DNA, 发现其颗粒大小(图 3b1)与原始颗粒相比有所增大, 这说明培育后磁颗粒有一定的团聚, 造成在白光下磁珠颗粒较大. 磁珠团聚的原因可能是由于磁颗粒所在的溶液介质发生改变, 导致其表面所带电荷发生变化使其发生团聚. 图 3b2 中磁珠上几乎没有荧光信号, 表明体系中无 Hg^{2+} 时, 磁珠不能捕获 F-DNA; 图 3c 为在 b 图体系的基础上加入 Hg^{2+} 后

的照片, 与白光下的照片 c1 对照, 荧光照射下的 c2 图中相应磁珠上都有荧光, 说明通过捕获 Hg^{2+} , 可以成功将 F-DNA 通过 T-Hg-T 杂交方式连接到磁珠上; 从磁珠上的荧光强度也可推测出采用实验设计的 DNA1 和 DNA2 序列可以有效地捕获目标 Hg^{2+} , 此结果与上节的紫外吸收曲线表征结果相符, 也更直观的说明传感器对 Hg^{2+} 响应的唯一性.

图 3 Hg^{2+} 传感器的荧光显微镜照片

Figure 3 The fluorescence microscope pictures of the Hg^{2+} biosensors
(a) MNPs/DNA1; (b) MNPs/DNA1, F-DNA: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; (c) MNPs/DNA1, F-DNA: 2.5 $\mu\text{mol/L}$, Hg^{2+} : 20 $\mu\text{mol/L}$

2.1.3 Hg^{2+} 传感器的圆二色光谱表征

圆二色图谱能较为灵敏地观察 DNA 链二级结构的变化, 所以传感器中对称分裂式 G-四分体 DNA 酶的构建情况可以通过 CD 光谱法来表征. DNA1 和 DNA2 混合后的 CD 图谱分别有位于 279 nm 左右的正峰和 247 nm 左右的负峰(图 4a); 当体系中加入一定量的 Hg^{2+} 后, CD 图谱的吸收峰均有红移, 分别是 261 nm 处负科顿效应和 292 nm 处正科顿效应(如图 4b 曲线所示), 相比 a 曲线而言, b 曲线的正负峰除了红移之外, 正峰峰值变小, 负峰峰值增大. 这说明随着 Hg^{2+} 的加入, 富含 T 碱基的两条单链 DNA1 和 DNA2 可以捕获 Hg^{2+} 形成 T-Hg-T 的双链结构^[37]. 实验证明, Hg^{2+} 的浓度越大, 红移越严重, 且负峰峰值越来越大, 正峰几乎消失不见. 将 DNA2 替代 DNA4 加入到含有一定量 DNA3 和 Hg^{2+} 的体系中, 从测得的 CD 图谱发现其在 272 nm 处的正科顿效应和位于 245 nm 处的较小的负科顿效应(见图 4c, 检测时扣除了双链 DNA 的吸收影响)与常见的单、双链 DNA 有较大的差别, 这说明在此体系下两端富含 G 碱基的 DNA2 链发生了构像改变, 在 K^{+} 的诱导下形成 G-四分体. 在 CD 谱图中, 非分裂式平行结构的 G-四分体

通常在 265 nm 附近出现正峰, 240 nm 附近出现负峰^[38,39]; 曲线c的正峰的出峰位置与此相比约有 7 nm 的红移, 其可能的原因是这种分裂式的 G-四分体是由 DNA2 两端富含 G 碱基的片段共同组成; 此外, 反平行结构 G-四分体的正峰出现在 295 nm 附近, 负峰出现在 265 nm 附近; 若在 265 nm 和 295 nm 二处均有强的正峰出现时, 说明平行结构和反平行结构的 G-四分体同时存在^[40]. 由此可以推测, 此体系中的对称分裂式 G-四分体以平行结构形式存在. 当有 hemin 嵌入后, hemin 嵌入式 G-四分体的 CD 谱图(如曲线 d 所示)几乎不变, 表明 hemin 的嵌入, 不会导致 G-四分体平行结构的改变.

图 4 不同体系下的 CD 图谱

Figure 4 CD spectra under different systems

(a) DNA3: 2 $\mu\text{mol/L}$; DNA2: 2 $\mu\text{mol/L}$; (b) DNA3: 2 $\mu\text{mol/L}$; DNA4: 2 $\mu\text{mol/L}$; Hg^{2+} : 20 $\mu\text{mol/L}$; (c) DNA3: 2 $\mu\text{mol/L}$; DNA2: 2 $\mu\text{mol/L}$; Hg^{2+} : 20 $\mu\text{mol/L}$; (d) DNA3: 20 $\mu\text{mol/L}$; DNA2: 20 $\mu\text{mol/L}$; Hg^{2+} : 20 $\mu\text{mol/L}$; hemin: 20 $\mu\text{mol/L}$.

从 CD 图谱对传感器的表征中可知, 由多个 T 碱基和两端富含 G 碱基的 DNA2 在有效捕捉目标(Hg^{2+})形成具有刚性的双链之后, 其两端游离的单链还可自由弯曲在 K^+ 诱导下形成具有催化氧化能力的分裂式 G-四分体 DNA 酶.

2.2 条件的优化

为获得最好的实验结果, 我们对实验的最佳条件进行了摸索. 核酸序列中的 T 碱基能够特异性识别 Hg^{2+} , 当溶液中 Hg^{2+} 浓度一定时, DNA 酶生物传感器的形成情况与 Hg^{2+} 捕获时间有关, 如图 5A 所示. 当捕获时间从 30 min 增加到 150 min 时, 反应体系的 $\Delta A_{421\text{ nm}}$ 增加, 说明随着时间的延长, DNA 酶的组装量增多, 催化能力逐渐增强. 反应时间提高到 180 min 后, $\Delta A_{421\text{ nm}}$ 几乎不再变化, 说明此时 Hg^{2+} 捕获基本完成, 所以我们选择 3 h 作为 Hg^{2+} 捕获时间. 本实验与其他检测 Hg^{2+} 实验^[41,42]相比, 捕获时间较长, 可能是因为磁颗粒表面存在空间位阻, 导致 Hg^{2+} 对 DNA2 的捕捉时间延长.

此外, 我们还对反应温度进行了优化, 选择了 6 个不同的温度: 13 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$ 和 45 $^{\circ}\text{C}$.

我们从图 5B 中可以发现, 随着反应温度的提高, DNA 酶催化反应的 $\Delta A_{421\text{ nm}}$ 增加, 当温度达到 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, 该酶的催化活性最高, 而后温度再提高, 酶的催化性能反而下降, 这是因为 DNA 酶是由 DNA 序列组成的, DNA 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 有较高的生物活性, 所以我们组装 Hg^{2+} 生物传感器时的最佳反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$.

图 5 (A) Hg^{2+} 捕获时间对 $\Delta A_{421\text{ nm}}$ 的影响; (B) 反应温度对 $\Delta A_{421\text{ nm}}$ 的影响

Figure 5 (A) Influence of the Hg^{2+} capture time on $\Delta A_{421\text{ nm}}$; (B) Influence of the temperature on $\Delta A_{421\text{ nm}}$

2.3 Hg^{2+} 传感器的选择性

为了证明本传感器可以选择性地检测 Hg^{2+} 而不受到共存离子的干扰, 我们对其 Hg^{2+} 检测的特异性进行了研究. 选取水体中常见的 10 种离子(即 Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 和 Cl^-) 为共存离子, 其中共存金属离子与 Hg^{2+} 的浓度之比为 100:1, 而 Cl^- 与 Hg^{2+} 的浓度之比为 10^4 :1. 当 Hg^{2+} 与其他金属离子共存时, 其 $\Delta A_{421\text{ nm}}$ 值与相同浓度的 Hg^{2+} 单独存在时相比, 相对误差在 -7.1%~2.4% 之间; 而加入的 Cl^- 浓度与 Hg^{2+} 浓度比为 10^4 :1 时, $\Delta A_{421\text{ nm}}$ 值也仅有 4.7% 的降低. 说明即使水体中的共存离子特别是大量氯离子的存在都不影响传感器对 Hg^{2+} 的高度特异性检测.

图6 Hg^{2+} 传感器的选择性, 柱状图表示20 nmol/L Hg^{2+} 与2 $\mu\text{mol/L}$ 其他离子共存时的 $\Delta A_{421 \text{ nm}}$ 值, 其中 Cl^- 浓度为0.2 mmol/L

Figure 6 Selectivity of the Hg^{2+} biosensor, black bars represent the $\Delta A_{421 \text{ nm}}$ signal in presence of 20 nmol/L Hg^{2+} and 2 $\mu\text{mol/L}$ other ions, while the concentration of Cl^- is 0.2 mmol/L

2.4 Hg^{2+} 的定量检测

2.4.1 校准曲线

为了能够定量检测水体中的 Hg^{2+} , 我们对不同浓度的 Hg^{2+} (0.8 nmol/L~1 $\mu\text{mol/L}$)进行了分析. 按照相同的条件培育后, 我们将酶催化后的溶液进行紫外分析 (如图7所示). 当 Hg^{2+} 浓度在100 nmol/L以下时, 随着 Hg^{2+} 浓度的增加, $\Delta A_{421 \text{ nm}}$ 值也随之增加, 但增至100 nmol/L以上后, $\Delta A_{421 \text{ nm}}$ 值几乎不再变化. 根据插图可以看出, 在0.8 nmol/L到20 nmol/L之间, 呈现良好的线性

图7 Hg^{2+} 浓度在0.8 nmol/L~1 $\mu\text{mol/L}$ 范围内的校准曲线, 插图为放大的线性图

Figure 7 Calibration curve of $C_{\text{Hg}^{2+}}$ from 0.8 nmol/L to 1 $\mu\text{mol/L}$, inset is the amplification of the linear range

表1 实际样品检测结果^a

Table 1 Results of the actual samples

样品名称	传感器检测的 Hg^{2+} 含量/ (nmol·L ⁻¹)	加入标样量/ (nmol·L ⁻¹)	加入标样后传感器检测的 Hg^{2+} 含量/(nmol·L ⁻¹)	回收率 /%	冷原子吸收分光光度法检测 的 Hg^{2+} 含量/(nmol·L ⁻¹)	传感器与冷原子吸收分光光度法 检测的 Hg^{2+} 含量的相对误差/%
自来水	未发现	15.0	14.3	95.3	14.7	2.8
湖水	未发现	15.0	15.6	104.0	14.8	-5.1
河水	未发现	15.0	14.6	97.3	15.3	4.8
工业废水	5.7	10.0	16.4	104.4	15.5	-5.5

^aAll data in the table were the average of three independent experiments.

性, 线性方程为 $\Delta A_{421 \text{ nm}} = 0.017 + 0.001 C_{\text{Hg}^{2+}}$, 相关系数 R^2 为0.994. 按3倍标准偏差 (以含 Hg^{2+} 量为10 nmol/L的标准水样11次测定值计) 计算出传感器的检出限为0.3 nmol/L, 与以往的检测方法^[43,44]相比, 该体系检出限低, 说明我们组装的分裂式G-四分体DNA酶传感器能够有效地检测低浓度 Hg^{2+} , 满足对饮用水中痕量汞的检测要求.

2.4.2 实际水样分析

为了证实所研制传感器的实用性, 我们选择了四种实际水体样品进行分析, 分别是自来水、湖水、河水和工业废水, 结果见表1. 由表1可以发现, 自来水、湖水和河水的 Hg^{2+} 含量很低, 超出了我们的线性范围, 而工业废水中含有 Hg^{2+} , 且由线性方程可知 Hg^{2+} 浓度约为5.7 nmol/L. 用加标回收法^[45]测得的回收率在95.3%~104.4%之间, 误差在允许范围之内. 我们使用冷原子吸收分光光度法对实际水样进行了进一步评估, 由表1中数据可知, 本实验提出的传感器与冷原子吸收分光光度法检测的 Hg^{2+} 含量的相对误差在-5.5%~4.8%之间. 综上所述, 我们设计的传感器可用于天然水体或污水中 Hg^{2+} 的检测, 具有很好的准确度.

2.5 Hg^{2+} 传感器的再生研究

我们分别用紫外-可见光谱法和荧光显微镜成像法考察了传感器再生的情况. 本文使用的磁纳米颗粒是从德国Chemicell公司购买的成品, 因此考察传感器的再生情况, 对降低使用成本意义重大. 众所周知, 相比T碱基与 Hg^{2+} 形成的T-Hg-T结构, Hg^{2+} 与半胱氨酸(cysteine)中的巯基(-SH)形成的R-S-Hg-S-R结构更稳定^[46,47]. 因此, 文中以半胱氨酸作为传感器的再生试剂, 研究了传感器的再生情况, 结果如图8所示. 向已捕获 Hg^{2+} 后的传感器悬浮液中加入少量的半胱氨酸后, 因 Hg^{2+} 与-SH作用, G-四分体DNA酶从传感器上解离下来, 其催化效果与背景信号相差无几 (图8c), 这与荧光显微镜实验中所得结果相符 (图9a和9b). 说明半胱氨酸的使用可以有效地破坏T-Hg-T结构, 传感器失去催化能力. 而再生后重新使用的传感器其催化能力得到恢复 (图8d), 达到原始的传感器催化能力 (图8b) 的92%, 这表明传感器具有良好的再生能力, 可以有效地降低使用成本; 由此可见, 本实验所设计的传感器经济、简便, 具有良好的实用性.

图8 Hg^{2+} 传感器的再生情况(a) ABTS; (b)传感器的吸收曲线; (c)半胱氨酸处理后传感器的吸收曲线; (d)传感器再生后的吸收曲线

Figure 8 Regeneration of the Hg^{2+} biosensor (a) ABTS; (b) absorption curve of the biosensor; (c) absorption curve of the biosensor after the treatment by cysteine; (d) absorption curve of the biosensor after regeneration

DNA1: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; DNA2: 1.5 $\mu\text{mol/L}$; Hg^{2+} : 100 nmol/L; hemin: 50 nmol/L; ABTS: 4 mmol/L; H_2O_2 : 4 mmol/L; cysteine: 0.5 $\mu\text{mol/L}$

图9 传感器再生的显微镜(a)和荧光显微镜(b)照片

Figure 9 The microscope picture (a) and fluorescence microscope picture (b) after regeneration of the biosensor

DNA1: 3.0 $\mu\text{mol/L}$; F-DNA: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; Hg^{2+} : 20 $\mu\text{mol/L}$; cysteine: 50 $\mu\text{mol/L}$

3 结论

综上所述, 本论文提出了一种基于磁纳米颗粒的对称分裂式G-四分体DNA酶生物传感器用于 Hg^{2+} 的快速检测。我们的实验方法简单, 磁纳米颗粒的引入, 降低了背景信号, 易于收集处理捕获的 Hg^{2+} ; 传感器的再生处理, 有效降低了成本。该方法使用了对称分裂式G-四分体DNA酶组装传感器, 这种传感器的信号放大效果好, 检出限达到了0.3 nmol/L, 我们的传感器保留了比色法的简单、安全、重现性好等优点, 同时降低了检出限, 使 Hg^{2+} 传感器的灵敏度得以提高。即使共存离子在水体中大量存在时, 这种传感器仍旧能够特异性检测 Hg^{2+} 而不受到干扰。更重要的是, 本传感器可以检测天然水体和污水中痕量的 Hg^{2+} , 加标回收率误差在允许范围之内。因此, 该方法有望在今后的环境监测中发挥作用, 有广阔的应用前景。

4 实验部分

4.1 磁纳米颗粒(MNPs)的修饰

取15 μL 包裹链酶亲和素的MNPs(直径为100 nm, 10 mg/mL)放入离心管(事先用1%的BSA溶液润洗)中, 加入100 μL SSC缓冲液, 漩涡搅拌, 磁分离后弃去上层液, 以除去磁珠溶液中的叠氮化钠, 重复清洗3次。向MNPs中加入15 μL SSC缓冲液和15 μL DNA1 (0.075 nmol), 混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴振荡反应1 h, 反应中使磁纳米颗粒始终处于悬浮状态。反应后用150 μL 清洗缓冲液清洗3次, 以洗净多余的DNA1。在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下, 用2% BSA溶液封闭1 h, 以减少非特异性吸附, 命名为MNPs/DNA1。

4.2 Hg^{2+} 传感器对 Hg^{2+} 的捕获

用汞离子捕获缓冲液溶解上述封闭后的MNPs/DNA1, 加入DNA2 (0.075 nmol, 实验前先置于90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热5 min, 再放置于冰浴中冷却, 使DNA2自由展开), 再加一定量的 Hg^{2+} , 漩涡搅拌均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡反应3 h, 实验中保证磁珠一直处于悬浮状态。将反应后的溶液磁分离, 收集磁珠重新溶解于20 μL 汞离子捕获缓冲液中, 加入100 μL 2 $\times$ HEPES缓冲液, 再用超纯水将该体系定容至150 μL , 继续水浴振荡1 h, 以使DNA2链中两段富含G碱基的片段靠近形成G-四分体构型。然后向该体系中加入95 μL HEPES缓冲液, 振荡均匀后再加入5 μL hemin溶液, 黑色塑料避光, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h以形成MNP/DNA1- Hg^{2+} -DNA2-G四分体酶, 再用HEPES缓冲液洗涤以除去未反应的hemin和DNA2, 然后进行紫外-可见和CD检测。

4.3 紫外-可见和CD光谱测定

4.3.1 紫外-可见光谱测定

将上述MNP/DNA1- Hg^{2+} -DNA2-G四分体酶重新悬浮在450 μL HEPES缓冲液中, 再加入48 μL LABTS溶液和2 μL 3% H_2O_2 催化反应快速进行。反应进行8 min后, 将磁珠沉降直接对上层清液进行紫外吸收检测。我们选择421 nm处的吸光度作为实验测量值, 定义 $\Delta A_{421\text{ nm}} = A_{421\text{ nm}} - A_0$, 其中 $A_{421\text{ nm}}$ 为实验测量值, A_0 为 Hg^{2+} 浓度为0时的背景吸收值。

4.3.2 CD光谱测定

将10 μL DNA1和20 μL DNA2混匀, 加入30 μL 汞离子捕获缓冲液后, 放入90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热5 min, 最后置于冰浴中冷却。向处理后的溶液中加入适量的 Hg^{2+} , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中振荡反应3 h, 然后向体系中加入120 μL 2 $\times$ HEPES缓冲液和40 μL KAc溶液, 在相同水浴条件下培育1 h。最后5 μL hemin溶液被加入上述混合液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中继续振荡反应2 h。CD测定以连接缓冲液作背景溶液, CD光谱的波长范围是230~320 nm, 扫速为100 nm/min, 频带宽度为2 nm, 比色皿长度为1 mm, 每

个样品平行扫描 3 次求平均值。

References

- [1] Wang, H. L.; Tian, C. Y.; Jiang, L.; Wang, L. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 21.
- [2] Power, M.; Klein, G. M.; Guiguer, K. R. R. A.; Kwan, M. K. H. *J. Appl. Ecol.* **2002**, *39*, 819.
- [3] Lavoie, R. A.; Jardine, T. D.; Chumchal, M. M.; Kidd, K. A.; Campbell, L. M. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 13385.
- [4] Hu, Y. H. *Environ. Protec. Sci.* **2008**, *34*, 38. (胡月红, 环境保护科学, **2008**, *34*, 38.)
- [5] Lin, Y.; Vogt, R.; Larssen, T. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 2431.
- [6] García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T. J.; Gómez-Ariza, L. *Metallomics*. **2014**, *6*, 237.
- [7] Wen, G. Q.; Li, J. F.; Liang, A. H.; Jiang, Z. L.; He, X. C. *Acta Chim. Sinica* **2010**, *68*, 83. (温桂清, 李建福, 梁爱惠, 蒋治良, 何星存, 化学学报, **2010**, *68*, 83.)
- [8] Bai, Y. F.; Feng, F.; Zhao, L.; Chen, Z. Z.; Wang, H. Y.; Duan, Y. L. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 662.
- [9] Yang, S. Y.; Wu, C.; Tan, H.; Wu, Y.; Liao, S. Z.; Wu, Z. Y.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 14.
- [10] Wang, Z. D.; Lee, J. H.; Lu, Y. *Chem. Commun.* **2008**, 6005.
- [11] Wang, S. R.; Fu, B. S.; Peng, S.; Zhang, X. E.; Tian, T.; Zhou, X. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7920.
- [12] Zhang, L. B.; Zhu, J. B.; Li, T.; Wang, E. K. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8871.
- [13] Du, Y.; Li, B. L.; Guo, S. J.; Zhou, Z. X.; Zhou, M.; Wang, E. K.; Dong, S. J. *Analyst* **2011**, *136*, 493.
- [14] Zhou, X. H.; Kong, D. M.; Shen, H. X. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 789.
- [15] Lin, Y. H.; Tseng, W. L. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6262.
- [16] Li, T.; Li, B. L.; Wang, E. K.; Dong, S. J. *Chem. Commun.* **2009**, 3551.
- [17] Santos, A.; Kumeria, T.; Losic, D. *Materials* **2014**, *7*, 4297.
- [18] Lee, J. S.; Ulmann, P. A.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 529.
- [19] Li, J. P.; Yang, S.; Zhou, W. Y.; Liu, C. H.; Jia, Y. H.; Zheng, J.; Li, Y. H.; Li, J. S.; Yang, R. H. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7932.
- [20] Zheng, J.; Nie, Y. H.; Hu, Y. P.; Li, J. S.; Li, Y. H.; Jiang, Y.; Yang, R. H. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6915.
- [21] Zhao, Z.; Zhou, X. M. *Sens. Actuators B* **2012**, *171*, 860.
- [22] Wu, J. K.; Li, L. Y.; Zhu, D.; He, P. G.; Fang, Y. Z.; Cheng, G. F. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *694*, 115.
- [23] Kong, D. M.; Wang, N.; Guo, X. X.; Shen, H. X. *Analyst* **2010**, *135*, 545.
- [24] Zhu, D.; Luo, J. J.; Rao, X. Y.; Zhang, J. J.; Cheng, G. F.; He, P. G.; Fang, Y. Z. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *711*, 91.
- [25] Li, J. S.; Yao, J. J.; Zhong, W. W. *Chem. Commun.* **2009**, 4962.
- [26] Lu, N.; Shao, C. Y.; Deng, Z. X. *Analyst* **2009**, 1822.
- [27] Lu, N.; Shao, C. Y.; Deng, Z. X. *Chem. Commun.* **2008**, 6161.
- [28] Shao, C. Y.; Lu, N.; Sun, D. M. *Chin. J. Chem.* **2012**, *30*, 1575.
- [29] Gao, L. Z.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J. B.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T. H.; Feng, J.; Yang, D. L.; Perrett, S.; Yan, X. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 577.
- [30] Kim, Y. S.; Jurng, J. *Sens. Actuators B* **2013**, *176*, 253.
- [31] Wei, H.; Wang, E. K. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2250.
- [32] Zhuang, J.; Zhang, J. B.; Gao, L. Z.; Zhang, Y.; Gu, N.; Feng, J.; Yang, D. L.; Yan, X. Y. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 3972.
- [33] Fu, R. Z.; Li, T. H.; Park, H. G. *Chem. Commun.* **2009**, 5838.
- [34] Zhang, L.; Zhang, Y. M.; Liang, R. P.; Qiu, J. D. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 12352.
- [35] Hou, T.; Li, C. X.; Wang, X. Z.; Zhao, C.; Li, F. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 4671.
- [36] Leung, K. H.; He, H. Z.; Pui, V.; Ma, Y.; Shiu, D.; Chan, H.; Leung, C. H.; Ma, D. L. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 771.
- [37] Yue, Q. L.; Shen, T. F.; Wang, J. T.; Wang, L.; Xu, S. L.; Li, H. B.; Liu, J. F. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1750.
- [38] Huang, W. T.; Shi, Y.; Xie, W. Y.; Luo, H. Q.; Li, N. B. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7800.
- [39] Li, T.; Liang, G.; Li, X. H. *Analyst* **2013**, *138*, 1898.
- [40] Nakayama, S.; Sintim, H. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10320.
- [41] Li, T.; Dong, S. J.; Wang, E. K. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 918.
- [42] Cheng, X. H.; Liu, X. J.; Bing, T.; Cao, Z. H.; Shangguan, D. H. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7817.
- [43] Xu, J.; Cai, L. L.; Kong, D. M.; Shen, H. X. *Anal. Lett.* **2011**, *44*, 2582.
- [44] Zhu, X.; Gao, X. Y.; Liu, Q.; Lin, Z. Y.; Qiu, B.; Chen, G. N. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7437.
- [45] Zhang, H. *Chem. Eng. Oil Gas* **2000**, (1), 50. (张虹, 石油与天然气化工, **2000**, (1), 50.)
- [46] Zhang, Y. Q.; Gao, L. J.; Wen, L. P.; Heng, L. P.; Song, Y. L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 11943.
- [47] Lu, W. B.; Qin, X. Y.; Liu, S.; Chang, G. H.; Zhang, Y. W.; Luo, Y. L.; Asiri, A. M.; Alyoubi, A. O.; Sun, X. P. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5351.

(Cheng, F.)