

A Sensitive Colorimetric Biosensor Based on Intermolecular Split G-Quadruplex DNA Zymes and Magnetic Nanoparticles for the Detection of Hg²⁺

Wei Zhang, Yujiao Tang, Shuang Shao, Shiyan Dai, Guifang Cheng*, Pingang He, Yuzhi Fang

School of Chemistry and Molecular Engineering, East China Normal University, Shanghai
Email: *969958966@qq.com

Received: Feb. 8th, 2017; accepted: Feb. 24th, 2017; published: Feb. 27th, 2017

Abstract

In this paper, we report a novel and sensitive optical sensing protocol for the detection of mercury (II) ions based on colorimetry combined with intermolecular split G-quadruplex DNA zymes and the conjugation of thymine-Hg²⁺-thymine. A T-rich strand A was assembled onto the biomagnetic beads. Two other oligonucleotide strands (strands B and C) were employed, which are each composed of a capture segment (T-rich part) and a sensing segment (G-rich part). In the presence of Hg²⁺, the capture segments of both strands B and C can hybridise with biotin-strand A on magnetic beads to form the stable DNA duplexes through T-Hg²⁺-T linkages. The formation of the DNA duplex brings the sensing segments of both strands B and C close enough to construct an intermolecular split G-quadruplex. This split G-quadruplex is able to effectively catalyse the H₂O₂-mediated oxidation of ABTS in the presence of hemin, generating the blue-green product ABTS⁺ and increasing the absorption signal at 421 nm. Therefore, the change in the absorption signal can be used to monitor the concentration of Hg²⁺ with the detection limit of 0.8 nM. The other metal ions is 100 times and chloride ion is 10,000 times of mercury ion have slight effects on the UV-Vis absorption of the sensing system, indicating that the sensing assay described herein exhibits a high specificity for Hg²⁺. The practical results obtained imply that the proposed colorimetric biosensor can be extended for the detection of trace Hg²⁺ in environmental water and drinking water.

Keywords

Intermolecular Split G-Quadruplex DNA Zymes, Magnetic Nanoparticles, Biosensor, Mercury Ions, Colorimetric Detection

*通讯作者。

基于分子间分裂式DNA酶和磁纳米颗粒的生物传感器用于 Hg^{2+} 的比色检测

张 维, 汤玉娇, 邵 爽, 戴诗岩, 程圭芳*, 何品刚, 方禹之

华东师范大学 化学与分子工程学院, 上海

Email: *969958966@qq.com

收稿日期: 2017年2月8日; 录用日期: 2017年2月24日; 发布日期: 2017年2月27日

摘 要

本文设计了一种新的比色生物传感器检测 Hg^{2+} , 主要是基于建立分子间的分裂式DNA酶, 利用核酸序列中的胸腺嘧啶(T)能够特异性识别 Hg^{2+} , 形成特殊的T-Hg-T结构。SA是一段富含T碱基组装到磁纳米颗粒表面寡核苷酸的片段(MNPs/SA)。SB和SC是两段分离的核酸序列, 一端富含T碱基, 用来与 Hg^{2+} 形成T-Hg-T结构; 另一端富含G碱基, 用于组装G-四联体DNA酶。当体系中存在 Hg^{2+} 时, SA、SB和SC上的T碱基与 Hg^{2+} 结合形成T-Hg-T双链结构, SB和SC就组装到了磁颗粒上(MNPs/SA/SB/SC), 此时SB和SC上两段富含G的片段相互靠近, 在hemin的存在下, 形成hemin嵌入式G-四分体DNA酶可催化 H_2O_2 氧化ABTS使其在421 nm处的特征吸收峰值升高。因此, 可以通过比较特征吸收峰值来反映溶液中 Hg^{2+} 的浓度变化情况, 传感器对 Hg^{2+} 的检出限为0.8 nM。100倍的其他金属离子和10,000倍的Cl⁻共存时都不干扰 Hg^{2+} 的检测, 说明该传感器对汞离子具有高的灵敏度和特异性。基于此, 该比色生物传感器有望应用于饮用水和环境水中 Hg^{2+} 的检测。

关键词

分裂式G-四联体DNA酶, 磁颗粒, 生物传感器, Hg^{2+} , 比色检测

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

Hg^{2+} 污染已经严重威胁了人类健康, 中国是汞污染较严重的国家之一[1] [2]。汞具有很高的生物毒性, 会破坏中枢神经系统, 对口、粘膜和牙齿产生不良影响[3]。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。因此, 建立安全、准确、高效的 Hg^{2+} 检测机制, 是当今社会面临的重大挑战。

Hg^{2+} 的传统检验方法主要为 CV-AFS, CV-AAS, ICP-MS 等, 尽管这些方法具有较高的灵敏度, 稳定性和选择性, 但它们的实验设备复杂, 样品预处理麻烦且消耗人力。DNA 生物传感器的飞速发展, 为 Hg^{2+} 检测提供了新手段。 Hg^{2+} 生物传感器主要是基于 DNA 序列中的 T 碱基与 Hg^{2+} 形成特殊的 T-Hg-T 结构, 这种结构很稳定, 且对 Hg^{2+} 有特异性。Bai 等人[4]报道了一种基于 G-四联体构型改变的无标记的信号降低型的荧光探针检测 Hg^{2+} 。该方法的检出限达到了 25 nM。Zhang 课题组[5]提出了一种多功能的比色传感器检测金属离子(Pb^{2+} , Cu^{2+} 和 Hg^{2+}), 可同时检测三种金属离子。纳米材料具有特殊的光、电、磁、热、力学、机械等性能, 已经在生物传感器中得到了有效地应用。Sener 等人[6]设计了一种基于金胶的赖

氨酸诱导的比色传感器检测 Hg^{2+} 。利用赖氨酸与 Hg^{2+} 的作用诱导金胶聚合，产生颜色变化，此方法可同时检测 Hg^{2+} 和赖氨酸，对 Hg^{2+} 的检出限可达 2.9 nM。

基于当前 Hg^{2+} 生物传感器存在的操作复杂，灵敏度较低等问题，我们将磁纳米颗粒引入到 Hg^{2+} 生物传感器中，设计了一种分子内分裂式 DNA 酶传感器检测 Hg^{2+} [7]，但由于 DNA 酶的 G 四联体结构由同一寡聚核苷酸链的二端构成，无目标存在时也可能与捕获链非特异性结合产生信号造成误差，所以本文在上述基础上提出采用分子间分裂式 DNA 酶为信号发生元件，以避免由此产生的假阳性，原理如图 1 所示。将富含 T 碱基的 SA 链通过生物素-亲和素的特异性结合连接到磁珠上(MNPs/SA)。SB 和 SC 均为一端富含 G 碱基，而另一端富含 T 碱基的序列；富含 T 碱基部分用于与 Hg^{2+} 特异性结合成 T-Hg-T 双链结构，富含 G 碱基部分用于组装成对称分裂式 G-四联体。当有 Hg^{2+} 存在时，SA 和 SB 与 SC 上的 T 碱基与 Hg^{2+} 结合形成 T-Hg-T 结构，SB 和 SC 就组装到了磁纳米颗粒上(MNPs/SA/SB/SC)，此时 SB 和 SC 上两段富含 G 碱基的片段相互靠近，培育后即形成 G-四联体构型。Hemin 是一种具有催化性能的卟啉化合物，当其 G-四联体共同培育后，就会形成类似辣根过氧化酶的特殊的 DNA 酶，即组装成 G-四联体 DNA 酶。这种酶可以催化 H_2O_2 氧化 ABTS 的反应，生成浅绿色的 ABTS^+ ，利用紫外-可见分光光度计进行紫外吸收表征。由于我们的体系引入了磁纳米颗粒，使实验体系的背景信号大大降低；与不分裂式 G-四联体体系相比，这种使用分裂式 G-四联体的体系具有更低的背景和更好的检测灵活性。

2. 实验

2.1. 试剂和仪器

实验使用的核苷酸均从上海生工生物工程技术有限公司购得，其序列如(表 1)所示。包裹链霉亲和素的磁珠(MNPs，直径为 100 nm，德国 Chemiceil 公司)。二甲亚砜(DMSO)，30% H_2O_2 ，曲拉通 X-100 和卟啉铁(hemin)均从国药集团化学试剂有限公司购得(中国，上海)。三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl)和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)，均从上海生工生物工程技术有限公司购得。4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES，加拿大 Bio Basic 公司)。牛血清蛋白(BSA，北京鼎国生物技术有限责任公司)。

Cary 50 紫外-可见分光光度计(美国瓦里安公司)，SHZ-C 水浴恒温振荡器(上海博讯实业有限公司)，

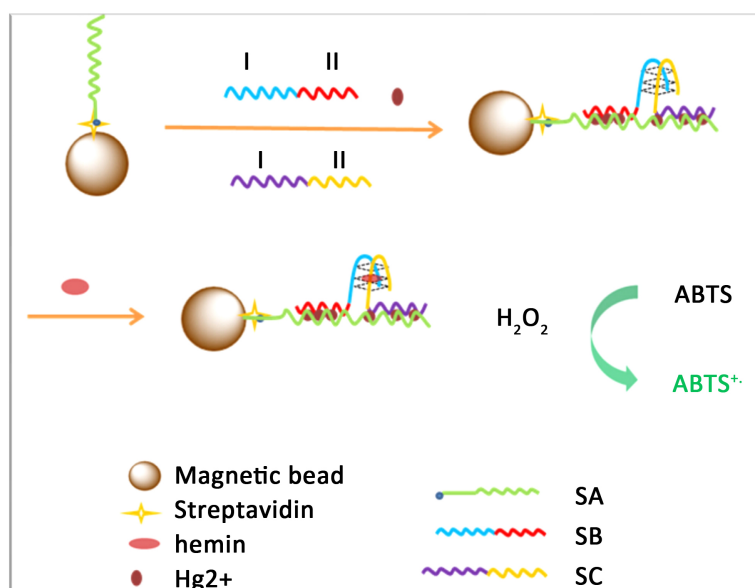


Figure 1. The schematic of the Hg^{2+} -sensing assay.

图 1. Hg^{2+} 传感器的设计原理图

Table 1. Nucleic acid sequences**表 1.** 核酸序列

Name	Sequences
SA1	5'-CTTGCTCGGTTTCGCTC-3'
SB1	5'-GGGTTGGGACCGTGCTTG-3'
SC1	5'-GTGCGTTCACGGGTAGGG-3'
SA2	5'-CTTGCTCTTCTCGTTC-3'
SB2	5'-GGGTTGGGACTGTGCTTG-3'
SC2	5'-GTTTCGTGTACGGGTAGGG-3'
SA3	5'-GTTGCTCCCTCCGCTCGTTCGTGG-3'
SB3	5'-GGGTTGGGACCGGTGGGTGCTTC-3'
SC3	5'-CCTCGTTCGTGCACGGGTAGGG-3'
SA4	5'-TCTGCTTGCTGTTTCGTGTTTC-3'
Biotin-SA4	5'-biotin-C20-TCTGCTTGCTGTTTCGTGTTTC-3' 5'-TCTGCTTGCTGTTTCGTGTTTC-3'
SB4	5'-GGGTTGGGACTGCTTGCTGTG-3'
SC4	5'-GTTCTCGTTCACGGGTAGGG-3'

JASCO J-815 圆二色光谱仪(日本 JASCO 公司), 漩涡混合仪, 磁铁。

2.2. 磁纳米颗粒(MNPs)的修饰

取 100 μ L MNPs (10 mg/ml)放入离心管, 向 MNPs 中加入 100 μ L (5 uM/L) biotin-SA4 溶液, 再加入 100 μ L SSC (柠檬酸钠)缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 水浴振荡条件下培育 2 h, 以使 DNA 短链组装到磁颗粒上。将反应后的溶液磁分离, 使用清洗缓冲液(10 mM Tris-Hac, 100 mM NaNO₃, pH = 7.4)清洗三次除掉未连接的 biotin-SA4 后, 4 $^{\circ}$ 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/SA4 待用。

2.3. Hg²⁺传感器对 Hg²⁺的检测

取 15 μ L (5 umol/L)的 SB4, 15 μ L (5 umol/L)的 SC4, 30 μ L (5 mg/ml) MNPs-SA4, 100 μ L 的 Hg²⁺捕获缓冲液(20 mM Tris-Hac, 10 mM HEPES, 20 mM KAc, 10 mM Mg (NO₃)₂, pH = 8.0), 125 μ L (200 mmol/L) KAc 和不同浓度的 Hg²⁺混合, 再加入 2 \times HEPES 缓冲液使总的体积为 500 μ L。在 37 $^{\circ}$ C 水浴环境振荡反应 4 h, 反应时使磁珠始终保持悬浮状态, 反应后将组装后的磁颗粒复合物命名为 MNPs/SA4/SB4/SC4。向上述制备好的复合物 MNPs/SA4/SB4/SC4 体系中加入 5 μ L (5 umol/L)hemin 溶液, 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 40 分钟, 以形成 hemin 嵌入式 G-四联体 DNA 酶。磁分离上述混合液, 用 2 \times HEPES 缓冲液清洗 3 次, 最后用 2 \times HEPES 缓冲液定容至 440 μ L 待用。

2.4. Hg²⁺传感器的紫外 - 可见光谱和 CD 光谱检测

向制备好的 DNA 酶生物传感器所在溶液中加入 50 μ L (40 mmol/L) ABTS 溶液和 10 μ L (59 umol/L) H₂O₂ 后催化反应迅速进行。我们选取波长为 421 nm 处的吸光度值作为测量值, 且定义 $\Delta A_{421nm} = A_{421nm} - A_0$, 其中 A_{421nm} 为 421 nm 处的实验测量值, A₀ 为 Hg²⁺浓度为 0 时的背景吸收值。

将 10 μ L (0.12 mmol/L) SA、10 μ L (0.12 mmol/L) SB 和 10 μ L (0.12 mmol/L) SC 充分混匀, 再加入 80 μ L Hg²⁺捕获缓冲液, 然后置于 90 $^{\circ}$ C 水浴中加热 5 min 以使序列自由展开, 最后放在冰浴中慢慢冷却至室温。向该体系中加入 8 nmol 的 Hg²⁺, 25 μ L (200 mmol/L) Kac, 适量 2 \times HEPES 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 水浴条件下振荡反应 4 h。最后加入 hemin 溶液, 37 $^{\circ}$ C 水浴条件培育 2 h 以形成 hemin 嵌入式 G-四联体 DNA 酶, 培育后将该混合液定容至 400 μ L。CD 光谱检测前先以缓冲液作基底溶液, 光谱的波长范围是 230 nm~320

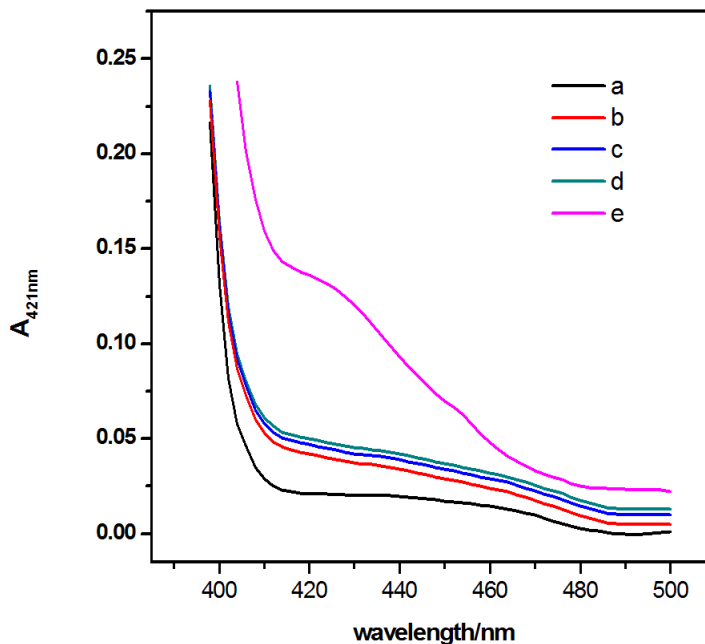
nm, 扫速为 100 nm/min, 频带宽度为 2 nm, 比色皿长度为 1 mm, 每个样品平行扫描 3 次求平均值。

3. 结果与讨论

3.1. Hg^{2+} 传感器组装情况的表征

我们设计的 Hg^{2+} 生物传感器是基于该传感器能够形成 G-四联体 DNA 酶, 可以催化 H_2O_2 氧化 ABTS 的反应[8] [9]。为了验证该实验机理, 我们使用紫外-可见分光光度计测试了 hemin, MNPs-SA4 和 MNP-SA4/SB4/SC4/henin 复合物存在和不存在 Hg^{2+} 的情况下, ABTS- H_2O_2 体系的紫外吸收光谱, 结果如图 2 所示。曲线 a 为基底物质 ABTS 的吸收曲线。b 为 MNPs/SA4 复合物催化 ABTS 后的吸收曲线, 由图可知, MNPs/SA4 复合物对 ABTS 具有很低的催化活性, 几乎可以忽略。Hemin 的催化曲线如图 c 所示, 虽然 hemin 本身对 H_2O_2 氧化 ABTS 的反应具有一定的催化效应, 但是游离的 hemin 在洗涤的过程中被除去, 因此它的催化活性也非常的低。在 MNP-SA4/SB4/SC4/henin 复合物中, 当没有 Hg^{2+} 存在时, MNP-SA4 不能利用 Hg^{2+} 捕获 SB4 和 SC4, 它们以游离的形态存在溶液中, 不能形成 DNA 酶, hemin 会通过清洗过程被除去, 所以催化效果并不理想, 其催化曲线如图 d 所示。但当体系中存在 Hg^{2+} 时, MNPs/SA4 通过结合 Hg^{2+} 形成 T-Hg-T 结构成功捕获 SB4 和 SC4, 经过培育后 SB4 和 SC4 中富含 G 碱基部分将形成 G-四联体 DNA 酶, 催化 H_2O_2 氧化 ABTS 反应的进行, 催化结果如曲线 e 所示, 在 421nm 处吸收峰急剧增大。依据我们的设计思想, 只有当 Hg^{2+} 存在时, MNPs/SA4 才能成功捕获 SB4 和 SC4, G-四联体 DNA 酶才能形成, 随即发生 ABTS 的氧化反应, 从曲线 e 中 $\Delta A_{421\text{nm}}$ 值比较理想。可以推测, 该体系形成了 G-四联体 DNA 酶, 表明我们成功组装了 G-四联体 DNA 酶 Hg^{2+} 生物传感器。

为了进一步验证只有在 Hg^{2+} 存在时, 体系才能形成 G-四联体 DNA 酶, 在没有 Hg^{2+} 时, 游离形态的



其中(a) ABTS, (b) MNPs-SA4, (c) hemin, (d) MNPs-SA4、SB4、SC4 和 hemin 的混合物, (e) MNPs-SA4、SB4、SC4、hemin 和 Hg^{2+} 的混合物。实验条件: $[\text{ABTS}] = 4 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1.2 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{Hg}^{2+}] = 100 \text{ nM}$, $[\text{hemin}] = 50 \text{ nM}$, $[\text{MNPs-SA4}] = 150 \text{ }\mu\text{g}$, $[\text{SB4}] = 150 \text{ nM}$, and $[\text{SC4}] = 150 \text{ nM}$

Figure 2. Ultraviolet absorption curve of different components
图 2. 不同组分存在时 Hg^{2+} 传感器的紫外吸收曲线

SB 和 SC 不会形成 G-四联体, 否则这将导致高的背景和错误的响应。为此, 我们设计了四组不同序列和长度的 SA, SB, SC, 以确保只有当 Hg^{2+} 存在时, 才能形成 G-四联体 DNA 酶。设计的四组链中, 同组 SB 和 SC 链长度相等。其中 SA1 和 SA2 为 16 个碱基, 链最短, SA4 其次, 为 20 个碱基, SA3 链最长, 为 24 个碱基。而第 2 组和第 4 组中 SA 与 SB 和 SC 的 G-C 碱基互补率为 50%, 第 1 组和第 3 组分别为 62.5% 和 66.7%, 结果见图 3。由图可知, 1、2、3 组中无目标时的吸光度均大于有目标存在时的吸光度, 这是由于 SA 和 SB 及 SC 因互补的碱基数量较多(1、3 组)和链较短(1、2 组), 在 hemin 的存在下部分形成具有催化活性的酶, 使吸光度信号有所增加, 当有 Hg^{2+} 存在时, 这不稳定的 G-四联体结构发生改变, 导致吸光度下降。第 4 组中由于所选用的链长与 SA 和 SB 及 SC 中的 G-C 碱基互补程度合适, 获得了设计所需的结果。这说明所选的链长度与互补性在传感器的检测准确度与灵敏度方面均有重要的影响。因此, 试验中选用第 4 组的序列作为传感器的目标捕获和信号发生的寡聚核苷酸链。

为了更好地说明要成功构建 G-四联体 DNA 酶生物传感器取决于 SA, SB, SC 链的碱基序列和长度, 我们利用 CD 光谱法对分裂式 G-四联体的构型进行了表征(如图 4 所示)。如图 4(C)可知, SA, SB, SC 混合物在有无 Hg^{2+} 存在时, 在 260 nm 处出现正峰, 240 nm 处出现负峰, 说明体系中出现了平行的 G-四联体结构[10] [11]。第 1、2 和 4 组的 CD 光谱图与第 3 组完全不同, 它们分别在 260 nm 和 290 nm 处出现了两个正峰, 在 240 nm 出现负峰, 属于平行和反平行结构混合物[12]。第 1、2 组中当有 Hg^{2+} 存在时, 峰强度反而弱一些, 可能是因为 Hg^{2+} 的存在使 SA/SB/SC 聚合物分解了, 其催化活性更弱。仅第 4 组在有 Hg^{2+} 时, CD 光谱峰的强度明显增高, 说明形成了稳定的具有催化活性的 G-四联体 DNA 酶。CD 实验结果与前面的光度实验结果相吻合。

3.2. 实验条件的优化

为了获得最好的实验结果, 我们对实验的最佳条件进行了摸索。 Hg^{2+} 捕获时间是影响 Hg^{2+} 传感器性能

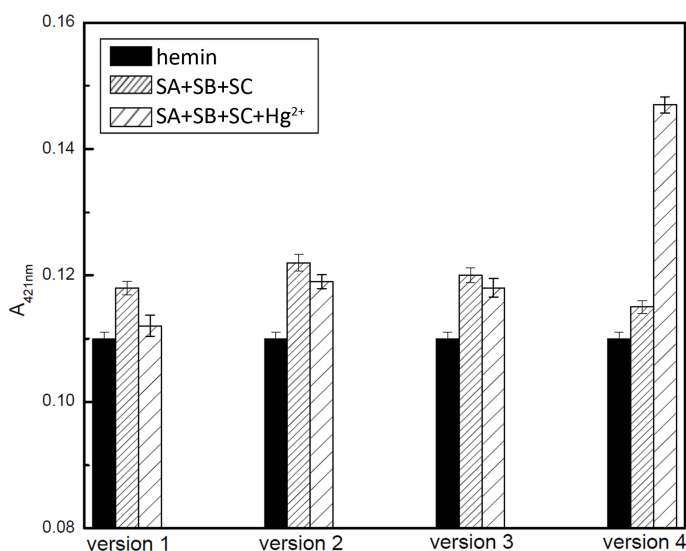


Figure 3. The ultraviolet absorption signals of hemin (black bars) and SA+SB+SC in the absence (dense bars) or presence (sparse bars) of Hg^{2+} with four groups of different sequences.

图 3. 四组不同序列组成的 SA、SB 和 SC 对 Hg^{2+} 检测的影响, 其紫外吸光度对比图: hemin (黑色), SA+SB+SC (浓密), SA+SB+SC+ Hg^{2+} (稀疏)。实验条件: [ABTS] = 4 mM, [H_2O_2] = 1.2 μM , [hemin] = 50 nM, [Hg^{2+}] = 100 nM, [SA] = 150 nM, [SB] = 150 nM, and [SC] = 150 nM

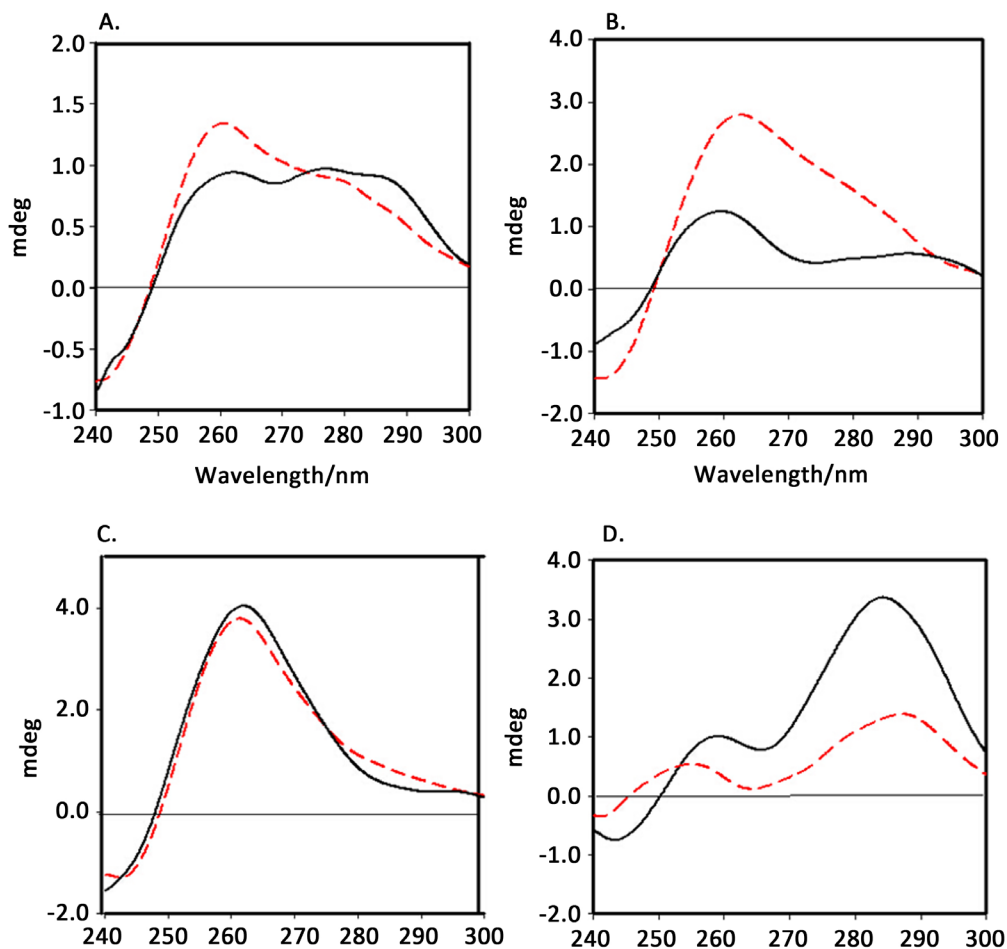


Figure 4. The CD spectra of system. SA1/SB1/SC1 (A), system SA2/SB2/SC2 (B), system SA3/SB3/SC3 (C) and system SA4/SB4/SC4 (D) in the absence (red dashed lines) and presence of Hg^{2+} ions (black solid curves)

图 4. 不同体系下的 CD 光谱图。SA1/SB1/SC1 (A), SA2/SB2/SC2 (B), SA3/SB3/SC3 (C) and SA4/SB4/SC4(D)体系在有 Hg^{2+} (黑色实线)和没有 Hg^{2+} (红色虚线)条件下的 CD 图。实验条件:[SA] = 3 μM , [SB] = 3 μM , [SC] = 3 μM and [Hg^{2+}] = 20 Mm

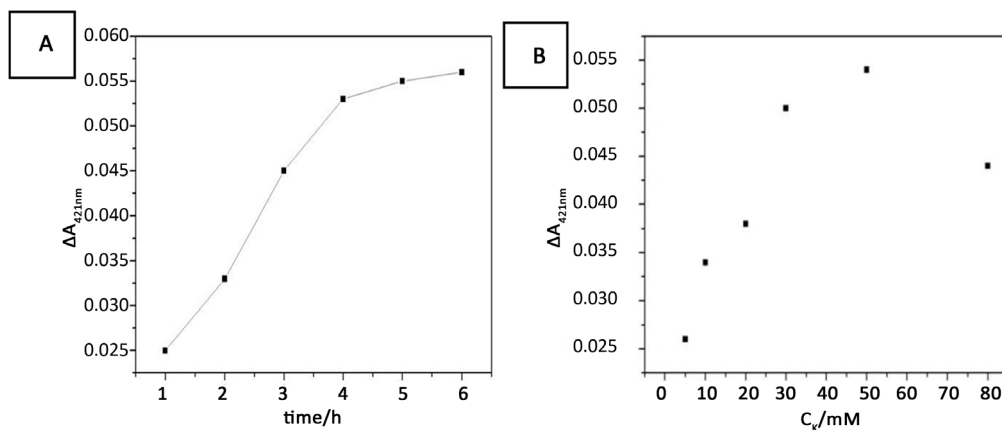


Figure 5. (A) Influence of the Hg^{2+} capture time on the $\Delta A_{421\text{nm}}$ of the sensing system in the presence of Hg^{2+} . (B) Influence of the concentration of K^+ on the $\Delta A_{421\text{nm}}$ of the sensing system

图 5. (A) Hg^{2+} 捕获时间对 $\Delta A_{421\text{nm}}$ 值的影响, (B) K^+ 浓度对 $\Delta A_{421\text{nm}}$ 值的影响。实验条件:[SB4] = 150 nM, [SC4] = 150 nM, [Hg^{2+}] = 100 nM, [hemin] = 50 nM, [ABTS] = 4 mM; and [H_2O_2] = 1.2 μM

的重要因素之一, 实验得到的 Hg^{2+} 捕获时间结果如图 5(A) 所示。随着捕获时间的延长(从 1 h 至 4 h), $\Delta A_{421\text{nm}}$ 值是逐渐增大的, 4 h 后反应时间再延长, $\Delta A_{421\text{nm}}$ 值的增大趋势极缓慢, 故我们选择 4 h 作为该 Hg^{2+} 传感器的捕获时间。本实验与其他检测 Hg^{2+} 实验相比[13], 捕获时间较长, 可能是因为用磁颗粒作载体时存在一定的空间位阻, 导致反应时间的延长。

K^+ 是构成稳定的 G-四联体 DNA 酶的重要条件[14], 适当的 K^+ 浓度是 Hg^{2+} 传感器构建的基础。我们依据构建的 Hg^{2+} 传感器的催化性能对 K^+ 浓度进行了选择优化, 结果如图 5(B) 所示。当体系中的 K^+ 浓度从 5 mM 增加到 50 mM 时, 该体系的 $\Delta A_{421\text{nm}}$ 值逐渐增大并达到最大值, 后再增加 K^+ , 其吸光度值反而急剧下降。说明 K^+ 浓度较低时, SB4 和 SC4 形成的 G-四联体结构不稳定, 随着 K^+ 的不断加入, 极大地提高了 G-四联体的稳定性; 当体系中的 K^+ 浓度过高时, 溶液中较强的离子强度可能使 DNA 的活性受到了影响, 导致 DNA 酶的活性有所降低。所以该传感器的最佳 K^+ 浓度为 50 mM。

3.3. Hg^{2+} 选择性实验

Hg^{2+} 传感器对共存金属离子的抗干扰能力也是该体系研究的重要内容。由于实际水样的成分极其复杂, 往往是多种金属离子同时存在, Hg^{2+} 的检测可能会受到如 Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} 或 Pb^{2+} 的干扰, 但是我们的传感器是由分子间分裂式 G-四联体 DNA 酶构成的[15], 只有当 Hg^{2+} 存在时, 才能形成 T-Hg-T 结构, 使 SB 和 SC 中富含 G 碱基部分相互靠近形成 DNA 酶, 从而减弱了 Pb^{2+} 带来的干扰, 提高了 Hg^{2+} 的选择性。我们选择了 12 种共存离子进行研究, 其紫外吸收强度如图 6 所示。向 Hg^{2+} (25nM) 所在体系加入 2.5 μM 共存离子后, 测得的 $\Delta A_{421\text{nm}}$ 值与 Hg^{2+} 单独存在时相差不大。这说明即使共存离子浓度与 Hg^{2+} 浓度的比值为 100:1 时, 我们设计的传感器对 Hg^{2+} 的检测仍旧灵敏, 证明了该方案可以特异性的检测目标物 Hg^{2+} 。

3.4. Hg^{2+} 的定量检测

我们还就传感器对不同浓度的 Hg^{2+} 响应情况进行了研究, 结果如图 7 所示。随着 Hg^{2+} 浓度的增加, $\Delta A_{421\text{nm}}$ 值逐渐增大, 在 2 nM~50 nM 之间呈现良好的线性, 线性方程为 $\Delta A_{421\text{nm}} = 9.17 \times 10^{-3} + 6.26 \times 10^{-4} c_{\text{Hg}^{2+}}$ (nM), 相关系数 R^2 为 0.9890, 检测限为 0.8 nM, 说明这种分裂式 G-四联体 DNA 酶传感器能够

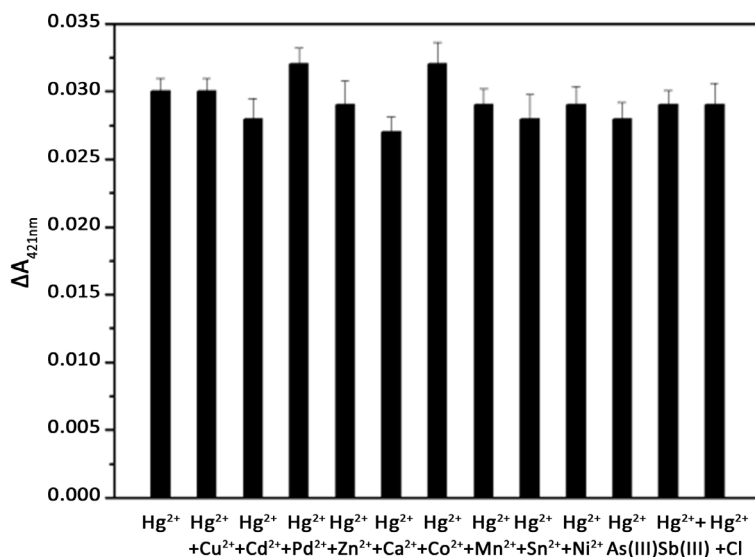


Figure 6. The selectivity of the Hg^{2+} -sensing assay in the presence of 25 nM Hg^{2+} and 2.5 μM other ions, while the concentration of Cl^- is 0.25 mM

图 6. Hg^{2+} 传感器的选择性, 柱状图表示 25 nM Hg^{2+} 和 2.5 μM 其他共存离子(Cl^- 浓度为 0.25 mM)同时存在的紫外吸光度值

定量检测 Hg^{2+} 。该体系 Hg^{2+} 的检出限为 0.8 nM, 说明我们设计的传感器能够识别低浓度的 Hg^{2+} , 远远低于标准饮用水中对 Hg^{2+} 含量的限制(10 nM)。

3.5. 传感器对实际样品的检测

为了证明该 Hg^{2+} 传感器能够应用于实际样品的检测, 我们选择了三种水样(自来水, 河水和工业废水)进行了评价, 结果如表 2 所示。经过实验分析, 自来水和河水中没有发现 Hg^{2+} , 说明可能 Hg^{2+} 含量很低, 而工业废水中约有 4.6 nM Hg^{2+} 。为了进一步证实该方法的可靠性, 我们引入加标回收实验法[16]。通过加标回收得到的回收率范围为 95.0%~106.0%, 回收率在可靠范围内, 说明我们设计的传感器可以检测实际水体样品中的 Hg^{2+} 。

4. 结论

文章报道了一种分子间分裂式的 G-四联体 DNA 酶生物传感器用于 Hg^{2+} 的比色检测。该方法简便易行, 合成周期短。磁纳米颗粒的使用, 使得酶体系可以更好的分离, 有利于降低背景信号, 且磁分离后捕获的 Hg^{2+} 可以收集处理, 避免了二次污染。本文由两段分离的富含 G 碱基的序列组成分裂式 G-四联体 DNA 酶, 在文中, 我们讨论了链的长度及碱基序列等影响 DNA 酶活性的关键因素, 由此可知, 分子间

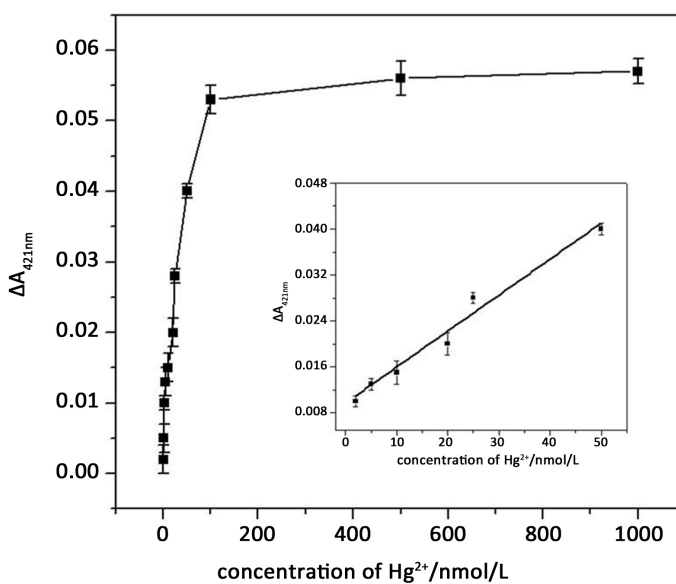


Figure 7. The calibration curve corresponding to the $\Delta A_{421\text{nm}}$ of the Hg^{2+} sensing assay with different Hg^{2+} concentrations, inset shows the linear responses of Hg^{2+} concentration from 2 - 50 nM.

图 7. Hg^{2+} 浓度在 0.8 nmol/L~1 $\mu\text{mol/L}$ 范围内的校准曲线, 插图为汞离子浓度在 2~50nM 之间的线性图

Table 2. Results of the actual samples*

表 2. 实际水样的检测结果*

样品名称	实验检测的 Hg^{2+} 含量(nM)	加入标样量(nM)	加入标样后的 Hg^{2+} 含量(nM)	回收率(%)
自来水	未发现	20.0	19.0	95.0
河水	未发现	20.0	20.7	103.5
工业废水	4.6	15.4	21.2	106.0

*表中数据为 3 次平行测定结果的平均值。

G-四联体酶的活性受其 DNA 链序列的严重影响, 若 SA 与 SB 和 SC 碱基互补过多, 则不能形成生物传感器。此分子间的 G-四联体 DNA 酶生物传感器其灵敏度更高, 检出限达到了 0.8 nM, 而且即使其他金属共存离子浓度和氯离子浓度是 Hg^{2+} 浓度的 100 倍或 10,000 倍, 该传感器对 Hg^{2+} 仍有很好的响应。基于此, 我们的 Hg^{2+} 检测传感器有望在今后的水环境监测体系中得到有效地应用。与我们实验室以前设计的 Hg^{2+} 传感器相比较[17], 具有背景信号低、 Hg^{2+} 易收集处理、特异性好、可再生等共同的优点以外, Hg^{2+} 检出限达到 0.8 nM, 灵敏度有明显提高。

参考文献 (References)

- [1] Zhang, W., Wei, W., Hu, D., Zhu, Y. and Wang, X. (2013) Emission of Speciated Mercury from Residential Biomass Fuel Combustion in China. *Energy Fuels*, **27**, 6792-6800. <https://doi.org/10.1021/ef401564r>
- [2] Lavoie, R.A., Jardine, T.D., Chumchal, M.M., Kidd, K.A. and Campbell, L.M. (2013) Biomagnification of Mercury in Aquatic Food Webs: A Worldwide Meta-Analysis. *Environmental Science & Technology*, **47**, 13385-13394. <https://doi.org/10.1021/es403103t>
- [3] Lin, Y., Vogt, R. and Larssen, T. (2012) Environmental Mercury in China: A Review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **31**, 2431-2444.
- [4] Bai, Y.F., Feng, F., Zhao, L., Chen, Z.Z., Wang, H.Y. and Duan, Y.L. (2014) A Label-Free Fluorescent Sensor for Hg^{2+} Based on Target-Induced Structure-Switching of G-Quadruplex. *Analytical Methods*, **6**, 662-665. <https://doi.org/10.1039/C3AY42023J>
- [5] Zhang, L., Zhang, Y.M., Liang, R.P. and Qiu, J.D. (2013) Colorimetric Logic Gates Based on Ion-Dependent DNAszymes. *The Journal of Physical Chemistry C*, **117**, 12352-12357. <https://doi.org/10.1021/jp4027892>
- [6] Sener, G., Uzun, L. and Denizli, A. (2014) Lysine-Promoted Colorimetric Response of Gold Nanoparticles: A Simple Assay for Ultrasensitive Mercury(II) Detection. *Analytical Chemistry*, **86**, 514-520. <https://doi.org/10.1021/ac403447a>
- [7] 张佳佳, 代佩卿, 李超, 程圭芳. 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[J]. 化学学报, 2014, 72 (9): 1029-1035.
- [8] Zhu, X., Gao, X.Y., Liu, Q.D., Lin, Z.Y., Qiu, B. and Chen, G.N. (2011) Pb^{2+} -Introduced Activation of Horseradish Peroxidase (HRP)-Mimicking DNAzyme. *Chemical Communications*, **47**, 7437-7439. <https://doi.org/10.1039/c1cc11349f>
- [9] Bi, S., Cui, Y.Y. and Li, L. (2013) Ultrasensitive Detection of mRNA Extracted from Cancerous Cells Achieved by DNA Rotaxane-Based Cross-Rolling Circle Amplification. *Analyst*, **138**, 197-203. <https://doi.org/10.1039/C2AN36118C>
- [10] Majhi, P.R. and Shafer, R.H. (2006) Characterization of an Unusual Folding Pattern in a Catalytically Active Guanine Quadruplex Structure. *Biopolymers*, **82**, 558-569. <https://doi.org/10.1002/bip.20507>
- [11] Rezler, E.M., Seenisamy, J., Bashyam, S., Kim, M.Y., White, E., Wilson, W.D. and Hurley, L.H. (2005) Telomestatin and Diseleno Sapphyrin Bind Selectively to Two Different Forms of the Human Telomeric G-Quadruplex Structure. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 9439-9447. <https://doi.org/10.1021/ja0505088>
- [12] Renciuk, D., Kejnovská, I., Skoláková, P., Bednářová, K., Motlová, J. and Vorlíčková, M. (2009) Arrangements of Human Telomere DNA Quadruplex in Physiologically Relevant K^+ Solutions. *Nucleic Acids Research*, **37**, 6625-6634.
- [13] Li, T., Dong, S.J. and Wang, E.K. (2009) G-Quadruplex Aptamers with Peroxidase-Like DNAzyme Functions: Which Is the Best and How Does It Work? *Chemistry—An Asian Journal*, **4**, 918. <https://doi.org/10.1002/asia.200900019>
- [14] Nakayama, S., Wang, J.X. and Sintim, H.O. (2011) DNA-Based Peroxidation Catalyst—What Is the Exact Role of Topology on Catalysis and Is There a Special Binding Site for Catalysis? *Chemistry—A European Journal*, **17**, 5691-5698. <https://doi.org/10.1002/chem.201002349>
- [15] 徐静, 孔德明. 分子内裂分 G-四链体脱氧核糖核酸酶用于 Hg^{2+} 的特异性定量检测[J]. 分析化学, 2012, 3(40): 347-353.
- [16] 张虹. 加标回收率的测定和结果判断[J]. 石油与天然气化工, 2000, 1(29): 50-52.
- [17] Wu, J., Li, L., Zhu, D. and Cheng, G. (2011) Colorimetric Assay for Mercury (II) Based on Mercury-Specific Deoxyribonucleic Acid-Functionalized Gold Nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, **694**, 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.045>

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：aac@hanspub.org