

文章编号: 1674-5566(2017)02-0314-06

DOI:10.12024/jsou.20160401721

基于 DNA 双链电荷转移的 Hg^{2+} 电化学生物传感器的研究

禹亚莉¹, 李 燕¹, 张俊玲², 吴继魁¹

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 基于 DNA 双链电荷转移原理, 利用胸腺嘧啶(thymine)与 Hg^{2+} 的特异性识别和计时电量法构建了一种高灵敏检测水溶液中 Hg^{2+} 的电化学生物传感器。该传感器将含有 1 个 T-T 碱基错配对的 DNA 互补双链通过 Au-S 键自组装在金电极表面, 运用计时电量法在含有亚甲基蓝的铁氰化钾溶液中进行测定。T-T 错配阻断了 DNA 双链内部电荷转移, 而 Hg^{2+} 通过 T- Hg^{2+} -T 配位作用与双链 DNA 特异性结合并形成 DNA 双链内部电荷转移通路, 引起电极表面计时电量的变化。计时电量测定结果显示: 在亚甲基蓝的还原峰电位(-380 mV)附近, 计时电量随着溶液中的 Hg^{2+} 浓度的增大而增加, Hg^{2+} 浓度在 1.0 nmol/L ~ 10^4 nmol/L 范围内, 计时电量的变化量与 Hg^{2+} 浓度的对数呈良好的线性关系, 线性相关系数(R^2)为 0.997, 检测限为 0.5 nmol/L ($S/N=3$)。干扰实验表明, 该传感器对 Hg^{2+} 具有良好的特异性和选择性。

关键词: Hg^{2+} ; 生物传感器; DNA; 计时电量法; 电化学阻抗谱

中图分类号: O 646 **文献标志码:** A

Hg^{2+} 是一种有毒且难以生物降解的环境污染物。 Hg^{2+} 污染主要来自氯碱、塑料、电池、电子等工业排放的废水, 而排向大气和土壤的 Hg^{2+} 也将随着水循环回归入水体^[1-3]。水生生物摄入 Hg^{2+} 将其转化为毒性更高的有机汞, 并通过食物链不断富集, 危害人类健康^[4-8]。因此, 建立简便快速、高灵敏、高选择性的 Hg^{2+} 检测方法对于汞污染预防和治理具有重要的意义。

目前测定 Hg^{2+} 的方法主要有冷原子吸收法^[9-11]、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)^[12-14]及荧光探针法^[15-17]等。它们具有准确度高、选择性好、干扰少等优点, 但是一般需要复杂的样品前处理和大型仪器, 不适用于快速现场检测。电化学生物传感器因其成本低、简单快速及便携等优点, 成为非常有应用前景的重金属检测方法^[18-19]。

DNA 不仅是遗传信息的载体, 也可以电荷转移, 呈现出导体的电学性质。2004 年, One 小组发现 Hg^{2+} 能与双链 DNA 中胸腺嘧啶(T-T)错配通过 T- Hg^{2+} -T 配位作用形成稳定的双螺旋结构,

并且 T-T 碱基错配对 Hg^{2+} 具有高度特异识别和选择性^[20]。基于此种特异性识别, 国内外学者利用 T- Hg^{2+} -T 配位化学构建了一系列的 Hg^{2+} 荧光、比色及电化学生物传感器^[21-24]。2007 年, JOSEPH 等发现 T-T 会阻断 DNA 双链电荷转移, 而 T- Hg^{2+} -T 配合物形成后恢复了 DNA 双链电荷转移功能^[25]。在此原理基础上, 本文以含有胸腺嘧啶的 Hg^{2+} 特异性 DNA 链为识别元件, 以亚甲基蓝和铁氰化钾催化体系为信号放大系统, 结合计时电量法, 构建了一种高灵敏、高选择性和非标记的 Hg^{2+} 电化学生物传感器。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DNA 序列: 5'-HS-(CH_2)₆-ACTACAGTCATCGCG-3' 和 5'-CGCGATGTCTGTACT-3' 由上海生工生物技术有限公司合成与纯化。 Hg^{2+} 标准贮液购自德国默克公司, 亚甲基蓝(Methylene Blue, MB)、氯化钾、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、三(2-甲酰乙基)膦(TCEP, 纯度 99%) 购自

收稿日期: 2016-04-01 修回日期: 2016-11-28

基金项目: 国家自然科学基金(41306128); 上海自然科学基金(11ZR1415400)

作者简介: 禹亚莉(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物传感器。E-mail: fishxiaohaima@163.com

通信作者: 吴继魁, E-mail: jkwu@shou.edu.cn

Sigma-Aldrich。乙醇、硫酸、氢氧化钠、亚铁氰化钾、铁氰化钾、 MgCl_2 购自上海国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯。实验用水为 MilliQ 超纯水(比电阻为 $18.2 \text{ M}\Omega$,美国密理博有限公司)。

CHI 832 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司);三电极系统:金盘电极(购自上海辰华仪器有限公司,直径为 2 mm)为工作电极、 Ag/AgCl (饱和 KCl) 电极为参比电极、铂丝电极为对电极;QC50 型超声波清洗仪(上海必能信超声波有限公司);85-1A 磁力搅拌器(上海辰华仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 电极预处理

将金电极用 Piranha 洗液(98% H_2SO_4 与 30% H_2O_2 的体积比 7:3)浸泡 5 min,再依次使用 $1.0/0.3/0.05 \mu\text{m}$ Al_2O_3 粉末抛光,并用无水乙醇和超纯水超声清洗各 3 min,使金电极表面呈光滑镜面。再将电极置于 1.0 mol/L NaOH 溶液和 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液中分别进行电化学处理,至金电极达到稳定的伏安图。超纯水冲洗,高纯氮气吹干电极表面。

1.2.2 DNA 在金电极表面的自组装固定

巯基修饰的 $100 \mu\text{mol/L}$ DNA 与其同等浓度的完全互补链在 50 mmol/L Tris-HAc (0.5 mol/L NaCl , pH 8.2) 缓冲液中, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴杂交 10 min,自然冷却至室温。然后预杂交的 DNA 双链与 $10 \mu\text{mol/L}$ TCEP 在 50 mmol/L Tris-HAc (0.5 mol/L NaCl , pH 7.4) 缓冲溶液中孵育 30 min,将双硫键切断。将处理的金电极浸入上述溶液中,同时在溶液中加入 100 mmol/L MgCl_2 ,使溶液中 DNA 形成更稳定的双链结构,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中避光自组装 16 h。分别用缓冲溶液和超纯水冲洗 3 次,以除去非特异性吸附在电极表面的双链 DNA,氮气迅速吹干电极表面备用。

1.2.3 Hg^{2+} 的电化学测定

DNA 修饰电极与不同浓度的 Hg^{2+} 溶液室温孵育 15 min,然后分别用 10 mmol/L Tris-HAc (0.5 mol/L NaCl , pH 7.4) 和超纯水反复洗涤电极表面,以除去未结合的 Hg^{2+} ,然后用计时电量

法测定。计时电量法实验条件:DNA 修饰电极为工作电极, $\text{Ag}-\text{AgCl}$ 为参比电极,铂丝为对电极;扫描电位范围: $0 \sim 380 \text{ mV}$;电解质溶液为含有 $2.0 \mu\text{mol/L}$ MB 的 2 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 溶液,支持电解质为 0.1 mol/L KCl 溶液。

2 结果与讨论

2.1 DNA 双链修饰电极电化学表征

循环伏安法和电化学阻抗是表征生物分子修饰电极界面结构的有力工具。我们以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{(3-/4-)}$ 为电化学探针,考察了金电极在 DNA 双链修饰前后的循环伏安行为和界面阻抗性质。如图 1a 所示,裸金电极(曲线 a)在 $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$ 范围内有一对稳定且可逆性良好的氧化还原峰;将含有 T-T 错配的双链 DNA 修饰在金电极,在金电极表面形成一层致密带负电荷的 DNA 组装层,在氧化还原过程中, DNA 探针磷酸盐骨架的负电荷阻止 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{(3-/4-)}$ 接近电极表面,导致其循环伏安曲线(曲线 b)没有出现氧化还原峰。图 1b 为金电极在 DNA 双链修饰前后交流阻抗的 Nyquist 图。裸金电极的阻抗值较小(约 420Ω ,曲线 a),DNA 修饰后,电极界面阻抗显著增加(约 12000Ω ,曲线 b),这与循环伏安法的结果一致。以上结果表明,双链 DNA 成功自组装在金电极表面。

2.2 检测原理

基于 DNA 双链电荷转移的 Hg^{2+} 生物传感器的工作原理(图 2),含有 1 个 T-T 错配的双链 DNA 探针致密的自组装在金电极表面。MB 吸附在 DNA 双链层表面,在 $0 \sim -380 \text{ mV}$ 范围扫描,电子从电极表面经 DNA 双链转移到 MB,MB 被还原为无色亚甲基蓝(Leucomethylene Blue, LB),LB 再被溶液中的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 氧化为 MB,持续循环还原-氧化产生可检测的计时电量信号。T-T 错配因阻碍 DNA 双链内部电子转移,使计时电量信号较小;当溶液中存在 Hg^{2+} 时,其与 T-T 错配通过配位作用形成 $\text{T-Hg}^{2+}-\text{T}$ 配合物,恢复了 DNA 完全互补双链的碱基堆积状态,使得计时电量信号显著增加。利用计时电量信号的改变即可实现对 Hg^{2+} 的检测。

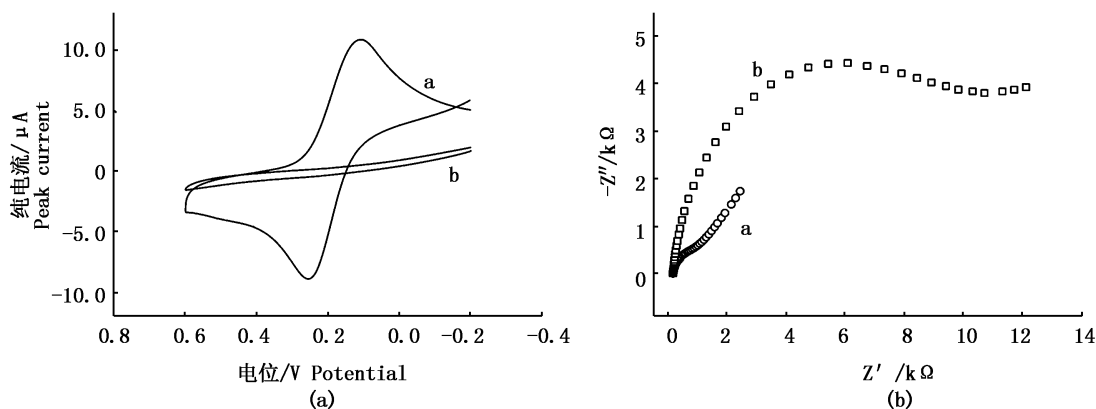


图1 金电极(曲线 a)和 DNA 修饰电极(曲线 b)在 2 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (0.1 mol/L KCl, pH7.4) 溶液中的循环伏安曲线 (a) 和电化学交流阻抗图 (b)

Fig.1 (a) Cyclic voltammograms and (b) Nyquist plots of bare gold electrode (curve a) and DNA-modified electrode (curve b) in 2 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (0.1 mol/L KCl, pH 7.4)

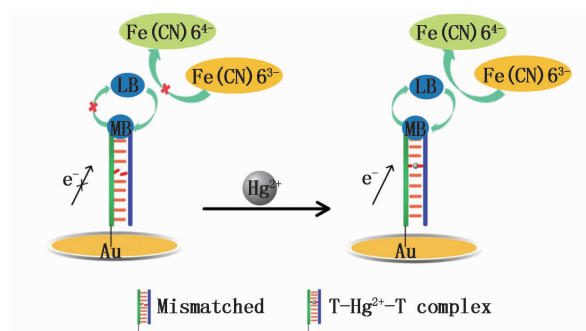


图2 基于 DNA 电子传递的电化学生物传感器检测 Hg^{2+} 的原理图

Fig.2 Schematic illustration of electrochemical biosensor based on charge transport of DNA for the detection of Hg^{2+}

为验证上述 Hg^{2+} 生物传感器的可行性(图 3),我们采用计时电量法来考察 DNA 修饰电极与 Hg^{2+} 识别前后的计时电量。计时电量实验结果如图 3 所示,曲线 a 为金电极修饰了含有 T-T 错配 DNA 双链后的计时电量曲线;由曲线 b 可以看出,识别 Hg^{2+} 后计时电量信号明显增强,这是由于 T-T 错配与 Hg^{2+} 配位形成 T- Hg^{2+} -T 配合物,恢复 DNA 双链内部电子转移所致。实验结果证明上述 Hg^{2+} 生物传感器的可行性。

2.3 Hg^{2+} 的定量测定

将 DNA 双链修饰电极与不同浓度的 Hg^{2+} 孵育 15 min,充分洗涤后,检测修饰电极的计时电量

(5 s) 变化,如图 4 所示。 Hg^{2+} 在 $1.0 \sim 10^4$ nmol/L 浓度范围内都有电化学信号的变化,计时电量(5 s)随着 Hg^{2+} 浓度的增加相应地增大。以计时电量的变化量 $\Delta C = C - C_0$ (C_0 为无 Hg^{2+} 时的计时电量,而 C 为识别 Hg^{2+} 后的计时电量)对 Hg^{2+} 浓度对数作图, ΔC 与 $\lg c_{\text{Hg}^{2+}}$ 在该浓度范围内呈良好的线性关系(图 4b),线性相关系数为 0.997,线性相关方程为: $\Delta C = 10.23X - 0.047$ (X 为 Hg^{2+} 浓度对数),该 Hg^{2+} 生物传感器对 Hg^{2+} 的检测限为 0.5 nmol/L ($S/N=3$)。

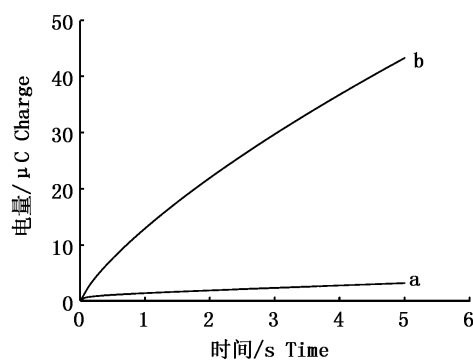


图3 DNA 双链修饰电极与 $10 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 识别前(曲线 a)和后(曲线 b)的计时电量曲线
Fig.3 Chronocoulometry at -380 mV of 2.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ plus $2 \mu\text{mol/L}$ MB (pH 7) at a gold electrode modified with DNA duplexes containing T-T mismatches before (curve a) and after the recognition with $10 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} (curve b)

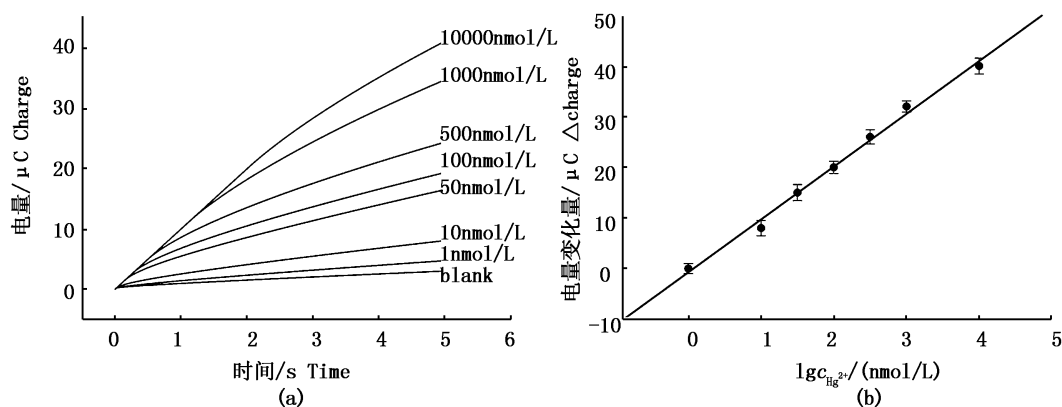


图 4 Hg^{2+} 生物传感器对不同浓度 Hg^{2+} 的测定 (a) 计时电量曲线; (b) 计时电量变化量与 Hg^{2+} 浓度对数之间的线性关系图

Fig. 4 The detection of different concentrations of Hg^{2+} (a) Chronoulometric curves; (b) The relationship between the logarithmic of Hg^{2+} concentrations and ΔC

2.4 Hg^{2+} 生物传感器的选择性

为考察该传感器对 Hg^{2+} 的特异性,分别选取 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 作为干扰离子在同等条件下进行计时电量测定。由图 5 可见,各种干扰离子计时电量变化量远小于 Hg^{2+} ,说明电极表面修饰 DNA 中 T-T 与 Hg^{2+} 的结合具有较高的特异性。即使这些金属离子与 Hg^{2+} 共存时,对 Hg^{2+} 的检测几乎没有影响,因此,该生物传感器对 Hg^{2+} 具有很好的选择性。

2.5 实际样品的检测

本文研究的 Hg^{2+} 生物传感器希望应用到多种领域,然而当今的食品污染存在多种问题,因此我们做了鱼样中贡离子含量检测。将样品鱼预

处理后,通过湿消解法得到样品液,采用加标回收法,用本实验方法检测 Hg^{2+} 浓度,结果如表 1 所示。

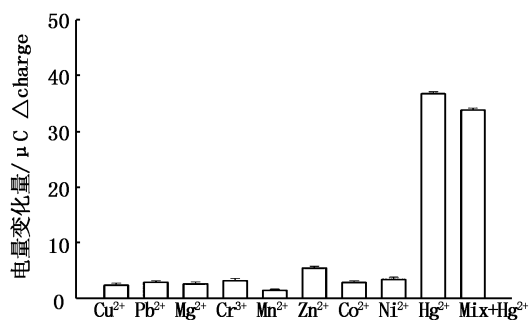


图 5 电化学生物传感器检测 Hg^{2+} 的特异性和选择性
Fig. 5 specificity and selectivity of electrochemical biosensor for the detection of Hg^{2+}

表 1 生物传感器对实际样品中 Hg^{2+} 的检测

Tab. 1 The determination of Hg^{2+} ions in real samples by using the proposed method

鱼类样品 Sample	浓度 Concentration		RSD	回收率 Recovery
	加入 Hg^{2+} 的量/(nmol/L)	检测出 Hg^{2+} 的量/(nmol/L)		
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	10	9.9	1.3	99
	100	98	0.43	98
	1000	1005	0.61	101
罗非鱼 Tilapia	50	52	1.4	102
	500	490	1.42	98
	5 000	4 990	0.27	99.8

3 结论

本文基于 T-T 与 Hg^{2+} 的特异性识别,结合亚

甲基蓝和铁氰化钾的催化放大检测信号,构建了灵敏度高、选择性好的可用于检测 Hg^{2+} 的电化学生物传感器,该生物传感器简单快速、检测线性

范围宽,有望应用于食品、水体中 Hg^{2+} 的快速检测。

参考文献:

- [1] 冯新斌,仇广乐,付学吾,等. 环境汞污染[J]. 化学进展, 2009, 21(2/3): 436-457.
FENG X B, QIU G L, FU X W, et al. Mercury pollution in the environment[J]. Progress in Chemistry, 2009, 21(2/3): 436-457.
- [2] DRISCOLL C T, HAN Y J, CHEN C Y, et al. Mercury contamination in forest and freshwater ecosystems in the Northeastern United States[J]. Bioscience, 2007, 57(1): 17-28.
- [3] ZHANG L, WONG M H. Environmental mercury contamination in China: sources and impacts [J]. Environment International, 2007, 33(1): 108-121.
- [4] PATTERSON B, RYAN J, DICKEY J H. The toxicology of mercury[J]. The New England Journal of Medicine, 2004, 350(9): 945-947.
- [5] LLÍĆ L, BOGDANOVIĆ D, ŽIVKOVIĆ D, et al. Optimization of heavy metals total emission, case study: Bor (Serbia) [J]. Atmospheric Research, 2011, 101(1/2): 450-459.
- [6] GROBE D, MANORE M M, STILL E. Trading off fish health and safety: female decision-making processes toward the risk of methylmercury in fish[J]. Journal of Consumer Affairs, 2007, 41(2): 250-264.
- [7] HALL B D, BODALY R A, FUDGE R J P, et al. Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish[J]. Water, Air, and Soil Pollution, 1997, 100(1/2): 13-24.
- [8] STEWART A R, SAIKI M K, KUWABARA J S, et al. Influence of plankton mercury dynamics and trophic pathways on mercury concentrations of top predator fish of a mining-impacted reservoir[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2008, 65(11): 2351-2366.
- [9] LEMOS V A, SANTOS L O D. A new method for preconcentration and determination of mercury in fish, shellfish and saliva by cold vapour atomic absorption spectrometry [J]. Food Chemistry, 2014, 149: 203-207.
- [10] SHAH A Q, KAZI T G, BAIG J A, et al. Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry [J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2345-2349.
- [11] TONG S L. Stationary cold-vapor atomic absorption spectrometric method for mercury determination[J]. Analytical Chemistry, 1978, 50(3): 412-414.
- [12] ARMSTRONG H E L, CORNS W T, STOCKWELL P B, et al. Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas chromatography for the determination of methylmercury in marine samples[J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 390(1/3): 245-253.
- [13] BATISTA B L, RODRIGUES J L, SOUZA S S D, et al. Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples [J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 2000-2004.
- [14] JACKSON B, TAYLOR V, BAKER R A, et al. Low-level mercury speciation in freshwaters by isotope dilution GC-ICP-MS[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(7): 2463-2469.
- [15] LEE S, RAO B A, SON Y A. Colorimetric and "turn-on" fluorescent determination of Hg^{2+} ions based on a rhodamine-pyridine derivative[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 196: 388-397.
- [16] KUMAR K S, RAMAKRISHNAPPA T, BALAKRISHNA R G, et al. A Fluorescent chemodosimeter for Hg^{2+} based on a spirolactam ring-opening strategy and its application towards mercury determination in aqueous and cellular media [J]. Journal of Fluorescence, 2014, 24(1): 67-74.
- [17] SHAFAWI A, EBDON L, FOULKES M, et al. Determination of total mercury in hydrocarbons and natural gas condensate by atomic fluorescence spectrometry [J]. Analyst, 1999, 124(2): 185-189.
- [18] BERCHMANS S, ARIVUKKODI S, YEGNARAMAN V. Self-assembled monolayers of 2-mercaptobenzimidazole on gold: stripping voltammetric determination of $\text{Hg}(\text{II})$ [J]. Electrochemistry Communications, 2000, 2(4): 226-229.
- [19] GUSTAVSSON I. Determination of mercury in sea water by stripping voltammetry [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1986, 214(1/2): 31-36.
- [20] ONO A, TOGASHI H. Highly selective oligonucleotide-based sensor for mercury (II) in aqueous solutions [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2004, 43(33): 4300-4302.
- [21] 吴继魁. 基于新型分子信标和胸腺嘧啶-汞(II)配位作用的 DNA 和 Hg^{2+} 检测技术研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2010.
WU J K. Studies on the detection of DNA and Hg^{2+} based on novel molecular beacon and thymine-mercury (II) coordination[D]. Shanghai: East China Normal University, 2010.
- [22] 李兰英, 吴继魁, 崔静, 等. 利用多胸腺嘧啶 DNA 修饰金电极伏安法测定水溶液中的 Hg^{2+} [J]. 分析化学, 2009, 37(S1): 36.
LI L Y, WU J K, CUI J, et al. Determination of Hg^{2+} in aqueous solution by using voltammetry of gold electrode modified thymine DNA [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(S1): 36.
- [23] 吴继魁, 卫碧文, 林莉, 等. 一种基于汞特异性 DNA 和 SYBR GREEN I 荧光检测 Hg^{2+} 方法的建立 [J]. 生物技术通报, 2013(4): 221-224.
WU J K, WEI B W, LIN L, et al. Highly sensitive and

- selective detection of Hg^{2+} in aqueous solution with mercury-specific DNA and SYBR GREEN I [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(4): 221-224.
- [24] SHENG Z H, HAN J H, ZHANG J P, et al. Method for detection of Hg^{2+} based on the specific thymine- Hg^{2+} -thymine interaction in the DNA hybridization on the surface of quartz crystal microbalance [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 87(2): 289-292.
- [25] JOSEPH J, SCHUSTER G B. Long-distance radical cation hopping in DNA; the effect of thymine- $\text{Hg}(\text{II})$ -thymine base pairs [J]. *Organic Letters*, 2007, 9(10): 1843-1846.

Electrochemical biosensor based on charge transfer of DNA duplex for the detection of Hg^{2+}

YU Yali¹, LI Yan¹, ZHANG Junling², WU Jikui¹

(1. *College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

Abstract: In this paper, combined Hg^{2+} specific recognition of thymine with chronocoulometry, we constructed a highly sensitive electrochemical biosensor based on DNA-mediated charge transport for the detection of Hg^{2+} in aqueous solution. DNA duplexes with one T-T base mismatch were assembled onto a gold electrode surface through Au-S bond. Chronocoulometry was used to detect Hg^{2+} in 2 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (0.1 M KCl, pH 7.4) containing 2.0 $\mu\text{mol/L}$ MB. T-T mismatch blocked the internal charge transfer of the DNA duplexes. In the presence of Hg^{2+} , the DNA on the electrode surface specifically recognized Hg^{2+} and formed thymine- Hg^{2+} -thymine complexes. Thus, internal charge transfer path in dsDNA was formed, significantly improving charge transport onto the gold electrode surface. The results showed the chronocoulometry of DNA-modified gold electrode increased with the increase of Hg^{2+} concentration at the reduction peak of methylene blue (−380 mV). The change of chronocoulometry was linear with regard to $\lg c_{\text{Hg}^{2+}}$ over a concentration range from 1.0 n to 10^4 nmol/L ($R^2 = 0.997$) and with a detection limit of 0.5 nmol/L ($S/N = 3$). A test for a series of interference metal ions showed that this biosensor based on DNA-mediated charge transport is highly specific and selective toward Hg^{2+} .

Key words: Hg^{2+} ; biosensor; DNA; chronocoulometry; electrochemical impedance spectroscopy