

文章编号: 1674-5566(2020)06-0840-07

DOI:10.12024/j.sou.20190502664

基于脱氧核酶-等温级联放大耦合的传感体系高灵敏检测水样中铅离子

陆云飞¹, 贾敏¹, 吴继魁^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术中心, 上海 201306; 3. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306)

摘要: 结合等温链替代扩增 (ISDA) 和指数扩增 (EXPAR) 设计一种非标记、高灵敏的 Pb^{2+} 荧光生物传感体系。在 Pb^{2+} 存在情况下, 底物链被活化的 GR-5 DNAzyme 快速切割释放引物 1。引物 1 与模板 1 杂交, 并被 DNA 聚合酶 (BSM) 延伸形成带限制性内切酶 (Nt. BbvCI) 识别序列的双链核苷酸。BSM 从 Nt. BbvCI 切割产生的切口再次延伸形成双链核苷酸, 并释放信号 G4-DNA 片段。G4-DNA 片段同时又可以作为模板 2 的引物, 启动指数放大过程, 从而释放更多的信号 G4-DNA 片段。扩增产物 G4-DNA 与原卟啉锌 (ZnPPIX) 相互结合从而产生强烈的荧光信号。详细优化了多种因素对检测体系的影响, 在最优实验条件下, 此方法对 Pb^{2+} 的线性检测范围为 0.1 ~ 50.0 nmol/L, 检出限为 0.03 nmol/L ($S/N=3$), 回归方程为 $y=288.7x+744.7$ (y 为荧光强度, x 为 Pb^{2+} 浓度)。干扰实验表明, 该传感器对 Pb^{2+} 具有良好的特异性和选择性。该传感体系成功应用于环境水体中 Pb^{2+} 含量检测, 加标回收率为 94.0% ~ 103.0%。本方法操作简单、选择性好、灵敏度高、有较强的抗干扰性能, 可用于环境水样中 Pb^{2+} 的高灵敏检测。

关键词: Pb^{2+} ; 荧光传感器; 等温信号放大; G-四联体; 原卟啉锌; GR-5 DNAzyme;

中图分类号: O 644 **文献标志码:** A

Pb^{2+} 是一种稳定性强且不可降解的重金属污染物, 在环境中可长期累积, 对人体与环境有极强的危害性。据有关报道, 环境中的铅含量长期超标会导致人体产生各种疾病^[1-5]。因此, 开发高灵敏的铅离子检测方法对于食品安全、环境保护和人类健康具有重要的意义。目前常用检测铅离子的手段包括原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法、毛细管电泳法、阳极溶出伏安法以及 X-射线荧光光谱法等^[6]。它们具有准确度高、选择性好、干扰少等优点, 但是样品前处理复杂, 需要大型仪器辅助, 不适用于现场实时监控。

信号放大策略是当前提高铅离子荧光传感器灵敏度的重要手段。LI 等^[7] 基于荧光分析技术和等温信号放大策略成功设计了一种用于检测 Pb^{2+} 的荧光传感体系。ZHAO 等^[8] 报道了一种基于聚合酶内切酶与等温扩增相结合的新荧光检测系统, 该检测系统将等温链替代扩增

(ISDA) 和切割酶信号放大 (NESA) 模块相结合实现了对痕量 Pb^{2+} 的检测^[9-11]。本文将等温链替代扩增技术 (ISDA) 和指数放大反应 (EXPAR)^[12-14] 两种信号放大策略相耦合, 旨在构建一种新型的高灵敏、无标记的荧光传感体系, 并将其成功应用于实际水样品中痕量 Pb^{2+} 的检测。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

核酸购自美国 IDT 公司 (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES Coralville, IA), 并且通过高效液相色谱 (HPLC) 进行纯化, 核酸序列为 GR-5 底物链: 5'-CTCACTATrAGGAAGAGATGATT-3'; GR-5 酶链: 5'-AATCATCTCTGAAGTAGCGCCGCCGTATAGTGAG-3'; Template 1: 5'-ACCCACCCACCACCCAGGAGTCCAATCATCTCTTCC-3'; Template 2: 5'-ACCCACCCACCCACCCAGGAGTCGGGACCCACCCACCCACCCA-3'。4-羟乙基哌嗪乙磺酸

收稿日期: 2019-05-20 修回日期: 2020-03-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31972772); 上海自然科学基金 (11ZR415400)

作者简介: 陆云飞 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物传感。E-mail: 573598184@qq.com

通信作者: 吴继魁, E-mail: jkwu@shou.edu.cn

(HEPES)、氯化钠、尿素、冰乙酸、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、氯化镁、氯化锌、氯化铁、氯化锰、硫代硫酸钠和碳酸钠购自上海生物工程有限公司,均为分析纯;铅离子标准液、汞离子标准液、钴离子标准液、铜离子标准液、镍离子标准液购自国家标准物质中心;BSM、Nt. BbvCI 购自美国 NEB 公司;dNTPs 购自大连宝生物科技有限公司;锌原卟啉(ZnPPIX)购自 Sigma-Aldrich 公司。超纯水比电阻为 18.2 M Ω ,购自美国密理博有限公司。

主要仪器包括荧光光谱仪 Edinburgh FS5 (Edinburgh instruments, 英国)、紫外-可见分光光度计 UV-3900 (UNICO, 美国)、Delta 320 pH 计 (Mettler Toledo, 上海)、电子天平 (Mettler Toledo, 上海)、DYCP-311 电泳槽(北京六一仪器厂, 北京)、TS-100 脱色摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司, 江苏)、ES1000 热盖型样品恒温孵育器(上海珂准仪器有限公司, 上海)和 Microtek Bio-6000 平板式凝胶成像扫描仪(上海中晶科技有限公司, 上海)。

1.2 试验方法

1.2.1 传感体系制备

将 GR-5 DNAzyme 的酶链与底物链以摩尔比为 1.0 : 1.1 混合杂交后,于 75 $^{\circ}\text{C}$ 的 ES1000 热盖型样品恒温孵育器中恒温孵育 5 min,然后冷却至室温,并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内冷藏储存,所合成的脱氧核酶下文称 GR-5 DNAzyme。

于 PCR 管中将 GR-5 DNAzyme 在 1 \times Buffer B 中混合均匀使其终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$,然后加入 Template 1 和 Template 2,使其终浓度分别为 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.5 $\mu\text{mol/L}$,加入 1.5 U 的 DNA 聚合酶 BSM、2 U 的 DNA 剪切酶 Nt. BbvCI 以及 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 dNTPs,充分混合均匀后加入 Pb^{2+} 或其他常见金属离子至所需检测的浓度,混合溶液的总容积为 100 μL ,将 PCR 管放入恒温孵育器在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温孵育 90 min。完成孵育后将 PCR 管放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷却 3 min 即可进行荧光信号的检测。

实际样品的检测过程:仅将配置 1 \times Buffer B 的超纯水更换为过滤加标后的湖水,其他检测操作过程不变。

1.2.2 荧光信号检测

在恒温孵育后冷藏的反应液中加入 ZnPPIX

使其终浓度为 12 $\mu\text{mol/L}$,使用荧光分光光度计,检测并记录其荧光强度。激发波长为 520 nm,激发狭缝宽为 1 nm,发射波长为 592 nm,发射狭缝宽为 1 nm,检测范围为 540 ~ 700 nm。检测过程在室温下避光进行。

1.2.3 凝胶电泳

SDS-PAGE 胶的制备方法:20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,将 4.2 g 尿素,2.0 g 丙烯酰胺,1 mL 10XTBE 加入超纯水中,使得最终体积为 10 mL,然后加入 10 μL TEMED 以及 10 μL 10% 的 APS 溶液,快速混匀并把混匀的溶液匀速注入胶板中,注胶过程中不能有气泡产生。

电泳:25 $^{\circ}\text{C}$ 下,电泳凝胶约 1 h,上样浓度为 100 nmol/L,通过溴酚蓝着色作为电泳指示剂,样本体积为 8 μL 。接通电源,电泳在 1XTBE 缓冲液中进行,先在电压为 60 V 情况下对胶板进行预电泳,30 min 后,加注制备好的样本。然后再在恒电压 90 V 条件下,电泳约 2 h,待指示剂到达胶板底部便停止电泳,使用硝酸银染色液进行染色,用 Bio-Rad 紫外凝胶成像分析仪对 SDS-PAGE 结果进行成像分析。

2 结果与讨论

2.1 检测原理

本实验将等温链替代扩增技术和指数放大反应相结合,通过级联放大实现对 Pb^{2+} 的高灵敏检测。实验原理如图 1 所示, Pb^{2+} 与 GR-5 DNAzyme 的特异性识别会激活 GR-5 DNAzyme 的催化活性从而快速切割底物链,释放的引物 1 与 Template 1 根据碱基互补配对原则相结合,在 DNA 聚合酶 BSM 和 dNTPs 的存在下沿着 Template 1 开始 DNA 核酸链的延伸。延伸出的 DNA 链中包含限制性内切酶 Nt. BbvCI 的识别序列,因此,Nt. BbvCI 会在延伸出的 DNA 链中切割新合成的 DNA 链,从而释放信号 G4-DNA 分子。在 DNA 聚合酶 BSM, DNA 剪切酶 Nt. BbvCI, dNTPs 的共同作用下实现对信号分子的大量扩增,部分信号分子作为引物 2 参与第 2 步指数放大反应。引物 2 与 Template 2 根据碱基互补配对原则再次进行等温扩增形成信号 G4-DNA 分子,产生的信号 G4-DNA 分子作为引物 2 参与二次扩增从而实现信号 DNA 链的指数扩增。信号 G4-DNA 分子发生空间折叠形成结构稳定的 G-四联

体,当在检测体系中加入 ZnPPIX 时,G-四联体与 ZnPPIX 发生相互作用,G-四联体会以 ZnPPIX 为模板发生空间构型的改变,从而产生内嵌 ZnPPIX 的 G-四联体作为荧光信号源^[15],并产生与 Pb^{2+} 浓度相关的荧光信号,因此可以通过荧光强度的

变化来检测体系中 Pb^{2+} 的含量。

为验证上述传感体系的可行性,我们分别采用荧光光谱法与凝胶电泳考察添加 Pb^{2+} 前后荧光传感体系的改变。如图 2 所示,在没有 Pb^{2+} 存在条件下,传感体系的荧光强度很小(曲线 1),

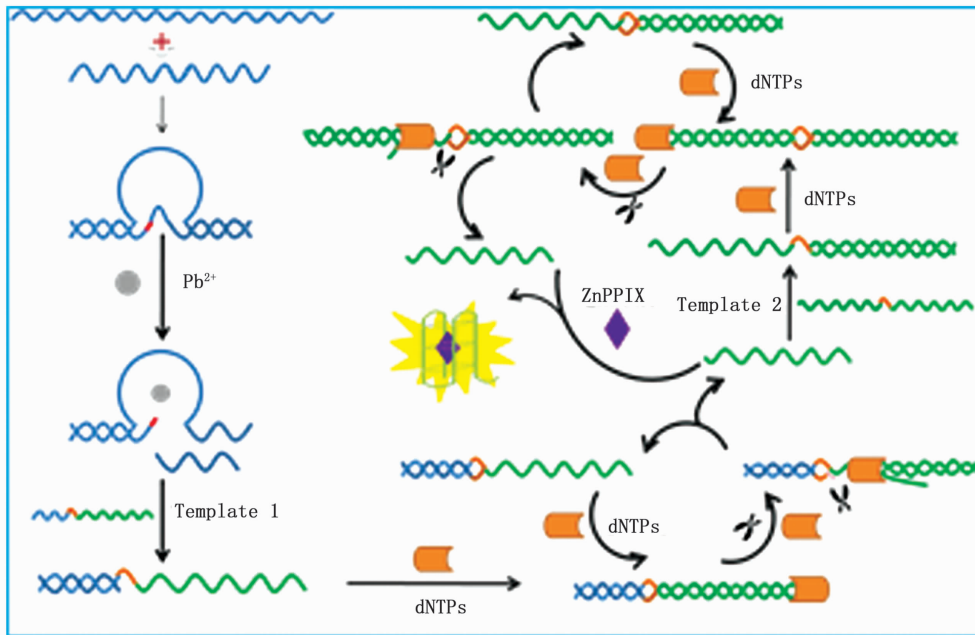
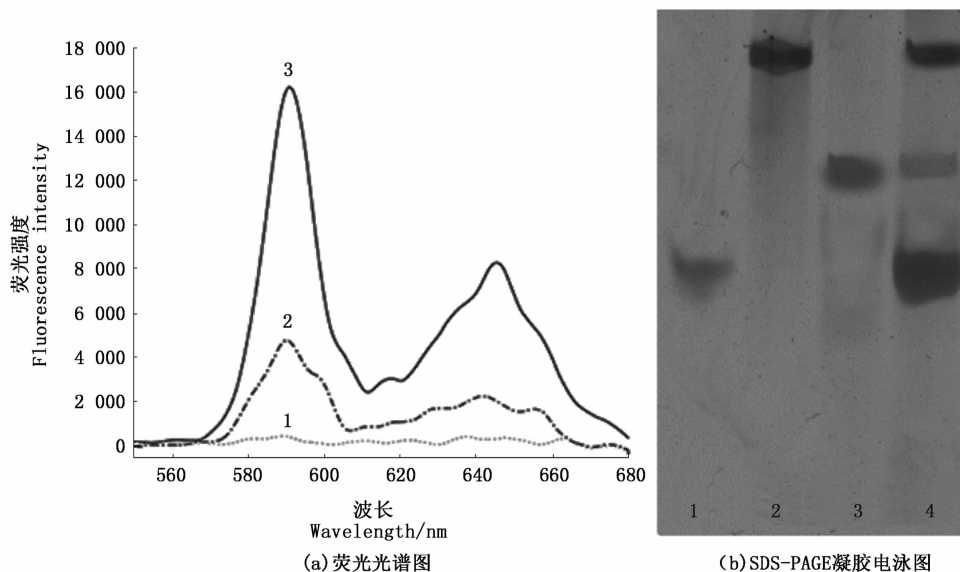


图 1 基于核酸等温扩增和链替代反应检测铅离子的原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of detection of Pb^{2+} based on nucleic acid isothermal amplification and strand displacement reaction



(a) 曲线 1. 不含铅离子; 曲线 2. 加入 100 nmol/L 铅离子仅有 Template 1; 曲线 3. 加入 100 nmol/L 铅离子体系包含有 Template 1 和 Template 2(激发波长 520 nm); (b) 1. 人工合成的 G4-DNA 片段作为对照; 2. 酶链; 3. 底物链; 4. 加入 Pb^{2+} 扩增后的 G4-DNA 产物
(a) Fluorescence spectra of sensing system in the absence (curve 1) and presence (curve 2 with Template 1, curve 3 with Template 1 and Template 2) of 100 nmol/L Pb^{2+} (Excitation: 520 nm); (b) lane 1. positive control; lane 2. the enzyme strand; lane 3. the substrate chain; and lane 4. the amplified G4-DNA product

图 2 传感体系检测铅离子的原理验证图

Fig. 2 Principle verification of sensing system for Pb^{2+} detection

识别 Pb^{2+} 之后,传感体系的荧光强度显著增强,增加到原来的近 16 倍(曲线 3),然而 1 次扩增的信号强度仅增加 4.8 倍(曲线 2)。如图 2 所示,SDS-PAGE 进一步证实了添加 Pb^{2+} 之后,体系中产生了大量 G4-DNA 信号分子。上述实验结果表明该传感体系是可行的。

2.2 实验条件的优化

为获得传感器的最佳灵敏度,对实验中所用到的 Template 1、Template 2、DNA 聚合酶 BSM、

DNA 剪切酶 Nt. BbvCI、ZnPPIX 等试剂的用量以及等温扩增反应时间分别进行系统的优化实验,优化实验中用到的 GR-5 DNAzyme 的浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 。由图 3 可知,本实验的最优条件如下:Template 1 的浓度为 $2.0 \mu\text{mol/L}$,Template 2 的浓度为 $2.5 \mu\text{mol/L}$,DNA 聚合酶 BSM 的用量为 2.5 U,DNA 剪切酶 Nt. BbvCI 的用量为 1.5 U,ZnPPIX 的用量为 $12 \mu\text{mol/L}$,等温扩增反应时间为 90 min。

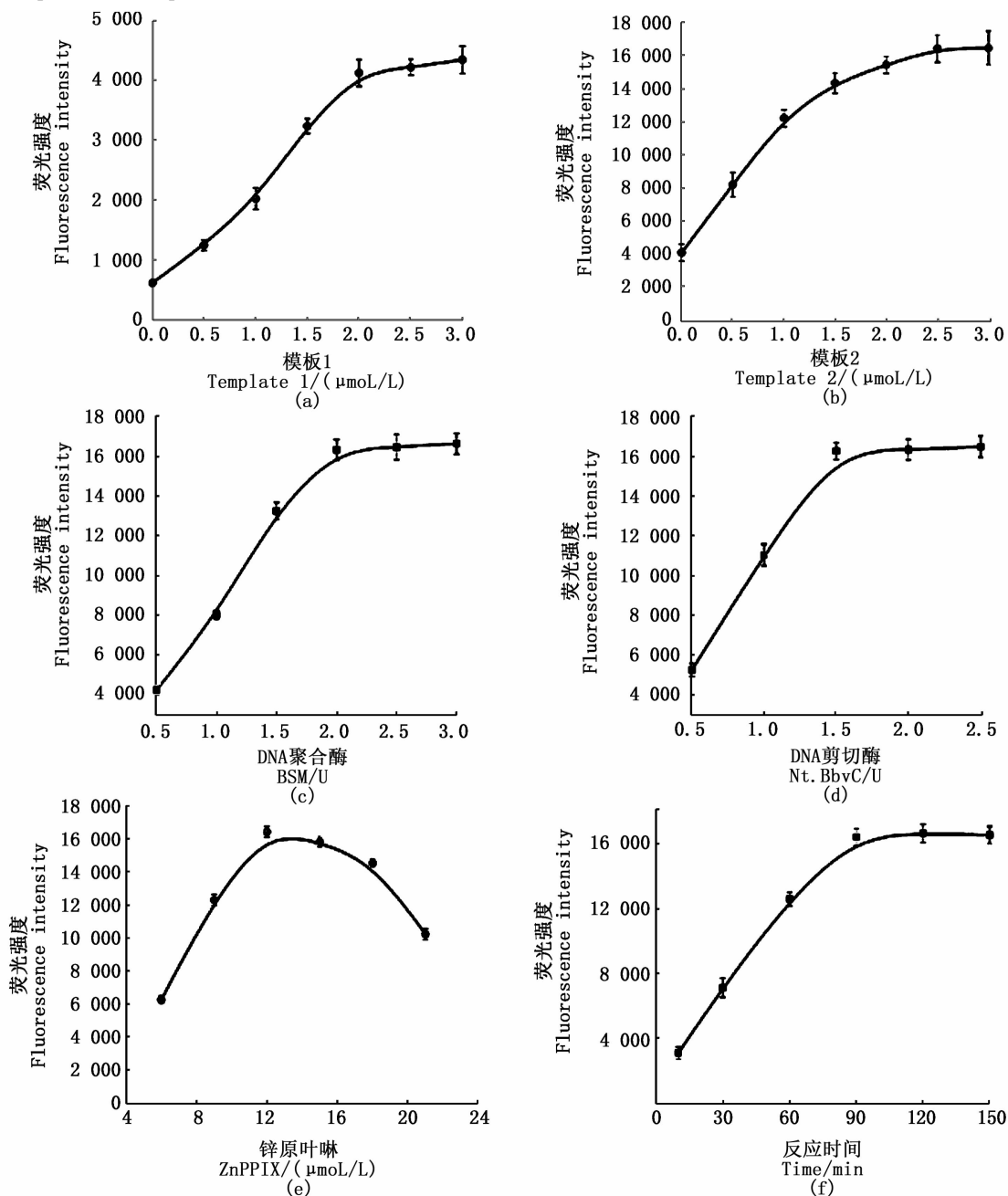


图 3 实验条件优化图

Fig. 3 Optimization of experimental conditions

2.3 传感体系的选择性评价

选用环境水样中常见二价金属阳离子 (Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 等) 作为干扰离子来评价荧光传感体系的选择性。由图 4 可知, 在同等浓度的传感体系中分别加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 的铅离子和其他金属离子, 干扰离子的加入没有导致传感体系荧光强度的明显变化, 而在同等条件下, $100 \text{ nmol/L Pb}^{2+}$ 能够使传感体系的荧光强度增长为空白背景荧光的 26 倍, 这表明该荧光传感体系对 Pb^{2+} 具有很好的选择性, 这可能源于 GR-5 DNAzyme 对 Pb^{2+} 特异性识别。

2.4 Pb^{2+} 的定量检测

在最优实验条件下, 采用本方法定量测定不同浓度的 Pb^{2+} 。由图 5a 可知, 随着 Pb^{2+} 浓度的增加, 592 nm 处的荧光强度逐渐增强, Pb^{2+} 浓度在 $0.1 \sim 50.0 \text{ nmol/L}$ 时存在较好的线性关系 (图 5b), 线性回归方程为 $y = 288.7x + 744.7$ (y 为荧光强度, x 为 Pb^{2+} 浓度), $R^2 = 0.995$, 最低检出限

为 0.03 nmol/L ($S/N = 3$), 远低于世界卫生组织规定的饮用水中 Pb^{2+} 最大允许量 (72 nmol/L)。与文献 [16-21] 报道的同类传感体系相比 (表 1), 该方法对 Pb^{2+} 的定量分析具有较高的灵敏度和较宽的线性检测范围。

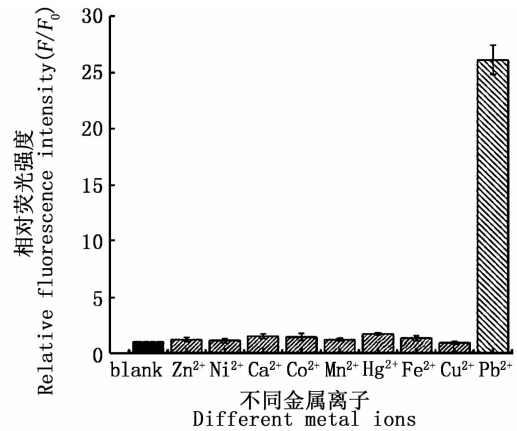


图 4 Pb^{2+} 荧光传感体系的选择性评价

Fig. 4 Selectivity of the sensing system for Pb^{2+} over other divalent metal ions

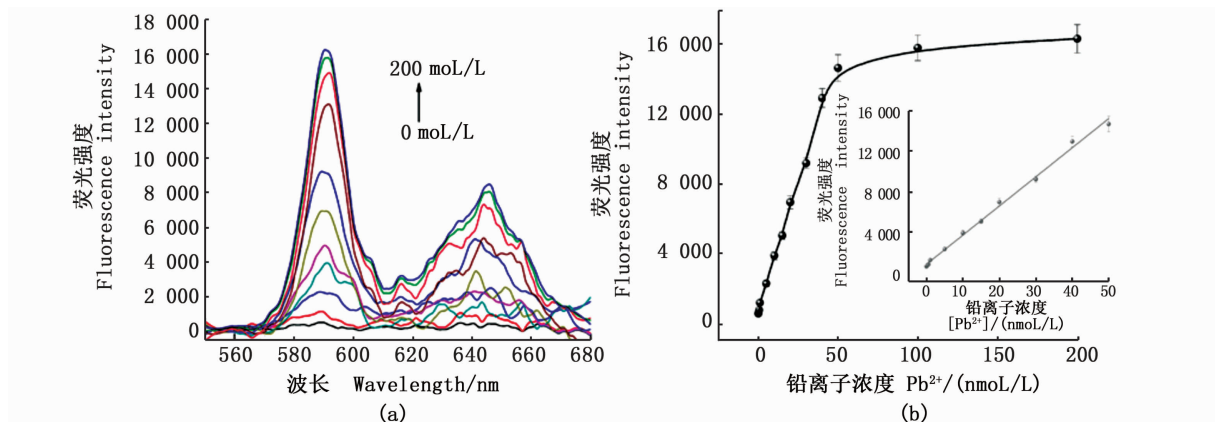


图 5 荧光传感体系的线性范围及灵敏度

Fig. 5 Linear range and sensitivity of fluorescence sensing system

表 1 同类型荧光传感体系与该荧光传感体系的性能比较

Tab. 1 Comparison of DNAzyme-based fluorescent sensing system for the detection of Pb^{2+}

DNAzyme 类型 The type of DNAzyme	检测限 LOD/(nmol/L)	标记方法 Label	参考文献 Ref.
8-17 DNAzyme	10.00	荧光标记	[16]
8-17 DNAzyme	0.60	荧光标记	[17]
8-17 DNAzyme	4.00	非标记法	[18]
GR-5 DNAzyme	3.70	荧光标记	[19]
GR-5 DNAzyme	0.20	荧光标记	[20]
GR-5 DNAzyme	3.00	非标记法	[21]
GR-5 DNAzyme	0.03	非标记法	本方法

2.5 实际样品分析

采集上海海洋大学镜湖湖水样本。使用前离心过滤除去样本中的悬浮物及杂质,然后在水样中添加 Pb^{2+} 标准液,至终浓度分别为 1 nmol/L、5 nmol/L 和 25 nmol/L。用该荧光传感体系进行检测,每个样本平行测定 3 次。根据标准曲线

计算出 3 种样本对应的含铅浓度,计算加标回收率。检测结果如表 2 所示,3 个湖水样本的加标回收率为 94.00% ~ 103.16%,以上检测结果的组内变异系数较小,说明该荧光传感体系具有较好的精密度和可靠性,可用于复杂水样中铅离子的痕量检测。

表 2 环境水体样品加标回收实验结果

Tab.2 Recovery experiment results using environmental water samples

$n = 3$

样本 Sample	Pb^{2+} 添加量 Pb^{2+} spiked / (nmol/L)	测量值 \pm 偏差 Detected Mean \pm SD / (nmol/L)	回收率 Recovery / %
1	1.00	0.94 \pm 0.11	94.00
2	5.00	5.12 \pm 0.23	102.40
3	25.00	25.79 \pm 0.42	103.16

3 结论

以对 Pb^{2+} 具有特异性识别能力的 GR-5 DNAzyme 为识别元件,耦合等温链替代扩增技术和指数放大反应两种信号放大策略,构建了一种高灵敏检测铅离子的荧光传感体系。该传感体系能在 0.1 ~ 50.0 nmol/L 浓度内定量检测 Pb^{2+} , 其检测限为 0.03 nmol/L ($S/N = 3$)。与同类型的荧光传感体系相比,其灵敏度高,线性检测范围较宽,综合性能优于同类型荧光传感体系,并成功应用于实际水样的检测。

参考文献:

- [1] VERSTRAETEN S V, AIMO L, OTEIZA P I. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity [J]. Archives of Toxicology, 2008, 82(11): 789-802.
- [2] CHEN X, ZHOU S K, ZHANG L M, et al. Adsorption of heavy metals by graphene oxide/cellulose hydrogel prepared from NaOH/Urea aqueous solution [J]. Materials, 2016, 9(7): 582.
- [3] LI C H, LIANG H D, LIANG M, et al. Soil surface Hg emission flux in coalfield in Wuda, inner Mongolia, China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(17): 16652-16663.
- [4] ZHANG J, TANG Y, TENG L M, et al. Low-cost and highly efficient DNA biosensor for heavy metal ion using specific DNAzyme-modified microplate and portable glucometer-based detection mode [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 68: 232-238.
- [5] COTTER F E. Antisense therapy for cancer [J]. European Journal of Cancer Supplements, 2003, 1(2): 19-27.
- [6] 张凤英. 电感耦合等离子体发射光谱仪测定重钙中铅、砷、铬、镉含量探析 [J]. 世界有色金属, 2018(2): 275, 277.
- [7] ZHANG F Y. Determination of lead, arsenic, chromium, cadmium content in TSP inductively coupled plasma emission spectrometer [J]. World Nonferrous Metals, 2018(2): 275, 277.
- [8] LI W Y, YANG Y, CHEN J, et al. Detection of lead(II) ions with a DNAzyme and isothermal strand displacement signal amplification [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 53: 245-249.
- [9] ZHAO Y X, CHEN F, ZHANG Q, et al. Polymerase/nicking enzyme synergetic isothermal quadratic DNA machine and its application for one-step amplified biosensing of lead (II) ions at femtomole level and DNA methyltransferase [J]. NPG Asia Materials, 2014, 6(9): e131.
- [10] LEE S J, CHO Y H, KIM C S, et al. Screening for chlamydia and gonorrhea by strand displacement amplification in homeless adolescents attending youth shelters in Korea [J]. Journal of Korean Medical Science, 2004, 19(4): 495-500.
- [11] 徐瑶. Toehold 调节的链置换反应在核酸检测中的应用 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [12] XU Y. High throughput mutation screening based on metal-enhanced fluorescence and toehold-mediated strand displacement reaction [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014.
- [13] 杨斌. 基于 DNA 链置换反应的新型核酸适配体荧光探针的构建及应用研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2014.
- [14] YANG B. Studies on design and application of novel aptamer fluorescent probes based on DNA strands displacement strategy [D]. Changsha: Hunan University, 2014.
- [15] VAN NESS J, VAN NESS L K, GALAS D J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(8): 4504-4509.
- [16] REID M S, PALIWODA R E, ZHANG H Q, et al. Reduction of background generated from template-template

- hybridizations in the exponential amplification reaction [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(18): 11033-11039.
- [14] WANG D, CHAI Y Q, YUAN Y L, et al. A peptide cleavage-based ultrasensitive electrochemical biosensor with an ingenious two-stage DNA template for highly efficient DNA exponential amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(17): 8951-8956.
- [15] LI T, DONG S J, WANG E K. A lead(II)-driven DNA molecular device for turn-on fluorescence detection of lead(II) ion with high selectivity and sensitivity [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(38): 13156-13157.
- [16] LI J, LU Y. A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(42): 10466-10467.
- [17] ZHANG X B, WANG Z D, XING H, et al. Catalytic and molecular beacons for amplified detection of metal ions and organic molecules with high sensitivity [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(12): 5005-5011.
- [18] XIANG Y, TONG A, LU Y. Abasic site-containing DNzyme and aptamer for label-free fluorescent detection of Pb^{2+} and adenosine with high sensitivity, selectivity, and tunable dynamic range [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(42): 15352-15357.
- [19] LAN T, FURUYA K, LU Y. A highly selective lead sensor based on a classic lead DNzyme [J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(22): 3896-3898.
- [20] ZHAO X H, KONG R M, ZHANG X B, et al. Graphene-DNzyme based biosensor for amplified fluorescence "turn-on" detection of Pb^{2+} with a high selectivity [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(13): 5062-5066.
- [21] FU T, REN S L, GONG L, et al. A label-free DNzyme fluorescence biosensor for amplified detection of Pb^{2+} -based on cleavage-induced G-quadruplex formation [J]. *Talanta*, 2016, 147: 302-306.

A DNzyme-isothermal cascade amplification sensing system for ultrasensitive detection of Pb^{2+} in water samples

LU Yunfei¹, JIA Min¹, WU Jikui^{1,2,3}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China)

Abstract: We exploited strand displacement amplification (ISDA) and exponential amplification (EXPAR) to design a label-free, ultrasensitive fluorescence sensing system for the detection of Pb^{2+} . In the presence of Pb^{2+} , the substrate strand is rapidly cleft by the activated GR-5 DNzyme to release Primer 1. Primer 1 hybridizes to template 1 and is extended by DNA polymerase (BSM) to form a double-stranded nucleotide with a recognition sequence for restriction endonuclease (Nt. BbvCI). The nicks generated by BSM cleavage from Nt. BbvCI re-extended to form double-stranded nucleotides and release the signal G4-DNA fragment. The G4-DNA fragment can also be used as a primer for template 2 to initiate a series of amplification process, thereby releasing more signal G4-DNA fragments. G4-DNA binds to protoporphyrin zinc (ZnPPIX) to produce a strong fluorescent signal. The effects of various factors on the sensing system were investigated. Under the optimal experimental conditions, the linear detection range of Pb^{2+} was 0.1 – 50 nmol/L, and the LOD was 0.03 nmol/L ($S/N=3$). The regression equation is $y=288.7x+744.7$ (y is the fluorescence intensity and x is the Pb^{2+} concentration). Interference experiments show that the sensing system has good selectivity for Pb^{2+} against other metal ions. This method was applied to the detection of Pb^{2+} in environmental water, and the recoveries were obtained from 94.0% to 103.0%. The proposed sensing system has the advantages of simple operation, good selectivity, high sensitivity and strong anti-interference performance, and can be used for high-sensitivity detection of Pb^{2+} in environmental water samples.

Key words: Pb^{2+} ; fluorescence sensor; isothermal signal amplification; G-quadruplex; ZnpIX; GR-5 DNzyme