基于发卡型 DNA 循环杂交放大技术检测海产品中的 Hg^{2+}含量

杜平

（滨州学院化学化工学院，山东滨州 256600）

摘要：利用发卡型 DNA 的循环杂交放大作用和碱基 T 与 Hg^{2+}之间的稳定结构，设计了一种高灵敏性的表面增强拉曼生物传感器用于海产品中痕量汞的检测。首先制备了携带有大量拉曼信号分子的纳米金生物条码作为拉曼信号探针。然后通过酰胺键将捕获 DNA 固载在磁珠表面上，利用 T-Hg^{2+}-T 形成的稳定结构和链式循环杂交反应放大技术，将含有大量拉曼信号 DNA 分子的纳米金颗粒通过生物素和链霉亲和素的特异性结合到磁珠上，最后通过 SERS 技术实现了溶液中 Hg^{2+}的检测。最佳实验条件下，当固定磁珠捕获 DNA 浓度为 1.0×10^{-7} mol/L，Tris-HCl 缓冲溶液为 pH 7.4，37 ℃下杂交反应 3 h 后，Hg^{2+}的浓度与拉曼信号强度呈良好的线性关系，测定线性范围为 1.0×10^{-7}~1.0×10^{-13} mol/L，检测限 1.0×10^{-13} mol/L（S/N=3）。该传感器用于海产品中 Hg^{2+}的测定，测定值与 ICP-AES 的测定值基本一致。

关键词：发卡 DNA；循环杂交放大；表面增强拉曼技术；Hg^{2+}

文章篇号：1673-9078(2017)9-238-242 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.035

Determination of Mercury (II) Content in Seafood by Cycle DNA Amplification Based on Hybridization Chain Reaction

DU Ping

(Chemical Engineering Department of Binzhou University, binzhou 256600, China)

Abstract: A highly sensitive biosensor based on surface enhanced Raman scattering (SERS) for detecting trace amounts of mercury (II) in seafood was designed by cycle amplification based on hybridization chain reaction of DNA hairpins and the stable structure formed between the nucleotide base thymine (T) and mercury (II). Firstly, the nano-Au bio-barcode with numerous Raman signal DNA molecules was prepared as the Raman signal probe, and then the captured DNA was immobilized on magnetic beads by amide bonds. The nano-Au particles containing numerous Raman signal DNA molecules were combined specifically on the magnetic beads by the stable structure formed by T-mercury (II)-T and the cycle amplification based on hybridization chain reaction. Finally, the detection of mercury (II) in the solution was achieved by the SERS technique. The optimum experimental conditions were also investigated. When the concentration of DNA captured by magnetic beads was 1.0×10^{-7} mol/L and the hybridization reaction proceeded for three hours at 37 ℃ in pH 7.4 Tris-HCl buffer solution, the mercury (II) concentration and the Raman signal intensity had good linear relationship, with a linear range of 1.0×10^{-7}~1.0×10^{-13} mol/L and a detection limit of 1.0×10^{-13} mol/L (S/N=3). The biosensor was applied to determine the mercury (II) content in the seafood samples, and the measured results were consistent with those obtained by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES).

Key words: DNA hairpin; cycle amplification based on hybridization chain reaction; surface enhanced Raman scattering; mercury

汞是危害人体健康和污染环境的重金属有毒物，在水体中以甲基汞的形式在鱼和贝壳等海产品中，人体食用后易被消化道吸收蓄积，从而侵蚀胃肠、肾脏和神经，具有致癌和致畸作用[1]。因此，食品和环境中汞的检测已经成为一个重要的监测指标，发展和建立一种准确、快速测定汞离子的方法对于保护人体健康和环境安全具有十分重要的意义。

目前，汞的测定方法有比色法[2]、电化学方法[3]、冷蒸气原子吸收光谱法[4]、电感耦合等离子体-质谱光谱法[5]、冷原子荧光光谱法[6]和表面增强拉曼光谱法[7]等。表面增强拉曼光谱法克服其他方法检测中消耗原料量大、检测时间长等不足[8]，因具有分辨率高、水干扰小、稳定选择性高、灵敏度高和检测快速准确等

收稿日期：2017-03-20

基金项目：山东省高校科技发展计划项目（2014GGX10206）；滨州市科技发展计划项目（2013ZC1603）；滨州学院科研基金项目（BZXYG1515）

作者简介：杜平（1980-），女，博士，副教授，研究方向：电化学生物传感器

优点，在环境检测和生命科学等领域被广泛应用[9]。

周顺桂[10]等人利用核酸碱基T与Hg^{2+}的稳定结构设计，利用比色法实现了水溶液中的Hg^{2+}的检测。李志刚[11]等人通过T-Hg^{2+}-T的特异结合作用，利用荧光DNA电化学生物传感器的方法实现了对溶液中Hg^{2+}的检测。由此可见，基于Hg^{2+}能特异性结合两条DNA序列的胸腺嘧啶促进T-T错配碱基之间形成稳定结构的属性，已经成为设计传感器的热点。同时为了让核酸在重金属污染物监测方面发挥更重要的作用，发展具有更高灵敏度的生物传感信号放大技术，研制信号放大效率更高的新型DNA纳米机器，实现低浓度靶标的直接检测，更是近几年来科研工作者努力的研究方向。本文拟通过T-Hg^{2+}-T稳定结合作用和发卡型DNA循环杂交信号放大技术，利用表面增强拉曼检测技术实现水溶液中汞离子的高灵敏性、高选择性检测，并将其应用于海产品中汞离子的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

激光共聚焦拉曼光谱仪（英国Renisaw公司）；pH计（上海雷磁仪器厂）。

亲和素（上海生工生物工程技术服务有限公司）；DNA序列（大连宝生物工程技术有限公司）；捕获DNA：5-NH_2-AACACGGCCCGCGCCTTGGGGTTCTACA-3；$Hg(NO_3)_2$(上海国药集团生物试剂有限公司)；引发DNA：5-AGTCTAGGATTCGGCCCTCGCGGTGTAGTTCCCCTTGGCG-3；氯金酸(北京百灵威科技有限公司)；发卡H1:5-bintin-CCGGAGGGCCGAATCCTAGACTCGGCGTAGTCTAGGATTCGGC-3；发卡H2:5-AGTCTAGGATTCGGCCCTCGCGCCGAATCCTAGACTACGCCG-biotin-3；信号DNA：5-SH-TTTCC TACGGCA-ROX-3；实验中所用的试剂均为分析纯，所用水均为二次蒸馏水。

1.2 试验方法

1.2.1 制备纳米金颗粒

据文献[12]制备13 nm的纳米金，在圆底烧瓶中加入98 mL水和1 mL 2 mmol/L $HAuCl_4$，加热搅拌至溶液沸腾，迅速加入38.80 mmol/L柠檬酸10 mL继续搅拌，100 ℃保持加热回流约20 min，至溶液变为深红色，停止加热，边搅拌变冷却至室温，于4 ℃下储存。

1.2.2 标记有亲和素的纳米Au生物条形码制备

据文献[13~15]方法，于10 mmol/L 2.0 μL的TCEP溶液中加入10 μL 1.0×10^{-5} mol/L信号DNA活化，1 h后加入25 μL 1 mg/mL的链霉亲和素混合，之后加入1 mL纳米金溶液（pH=8.0），37 ℃下避光振荡24 h，加入200 μL、0.05 mol/L NaCl盐化6 h后，加入200 μL、0.1 mol/L的NaCl，二次盐化6 h。将上述混合液离心30 min得油状物，用Tris-HCl缓冲液重复冲洗三次，除去未结合的亲和素。将洗涤好的生物条码分散于50 μL、pH=7.4的Tris-HCl缓冲液，4 ℃下保存待用。

1.2.3 DNA在磁珠上的修饰及循环放大杂交反应

于离心管中准确移取10 μL磁球，用0.1 mol/L、pH 6.8的咪唑-盐酸缓冲液洗涤后加入0.1 mol/L的EDC活化30 min，加入0.3 mol/L的NHS混合均匀后，再次加入10 μL、1.0×10^{-7} mol/L的捕获DNA，37 ℃振荡16 h。用磁力架分离，用Tris-HCl缓冲液清洗以除去未修饰的DNA。最后加入50 μL、1% BSA溶液30 min用于封闭磁珠上未反应的活性位点，再次分离洗涤后分散于50 μL、pH=7.4的Tris-HCl缓冲液中制得修饰捕获DNA的磁珠。在上述修饰捕获DNA的磁珠中加入10 μL、1.0×10^{-7} mol/L的引发DNA和10 μL不同浓度的Hg^{2+}溶液，轻微震荡2 h，用Tris-HCl缓冲液反复冲洗三次，并重新分散在Tris-HCl缓冲液中制得修饰靶标Hg^{2+}的双链DNA磁珠。

将修饰用生物素的发卡H1和H2各取10 μL混合均匀，加入到上述双链DNA磁珠中，37 ℃微震3 h，使杂交反应充分进行。引发DNA打开发卡H1，发卡H1的末端与发卡H2部分互补而打开H2，因H2具有跟引发DNA相同的一段DNA序列，故可与发卡H1再次杂交配对，依次H2、H1、H2…循环以放大信号，用Tris-HCl缓冲液反复冲洗三次，并重新分散在Tris-HCl缓冲液中制得循环放大杂交反应产物。

1.2.4 SERS信号的检测

H1、H2末端修饰有生物素，故循环放大杂交链连接多个生物素，此时生物素可以与标记有亲和素的纳米Au生物条形码进行特异结合，之后磁分离磁珠和未结合的亲和素条码，用Tris-HCl缓冲液中冲洗磁珠数次后，将其分散在20 μL的Tris-HCl缓冲液中。准确移取磁珠分散在清洗干净的金片表面，液滴蒸发后置于激光共聚焦拉曼显微镜下，波长633 nm，积分时间10 s，曝光时间10 s，功率5 mW。利用测定的拉曼信号绘制Hg^{2+}与拉曼强度工作曲线。

1.2.5 数据统计分析

相同实验条件下制备传感器，平行测定某浓度的含Hg^{2+}溶液（n≥3），利用拉曼信号与浓度方程，求得Hg^{2+}的测定浓度C_i，利用公式1的溶液浓度C。与等

离子体原子发射光谱法测定结果 C_{IA} 进行比较，利用公式 2 计算相对标准偏差。

$$C = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i}{n} \quad (1)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(C - C_{IA})^2}{n-1}} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 检测可行性验证

当有 Hg^{2+}出现时，捕获 DNA 和引发 DNA 能够通过形成 T-Hg^{2+}-T 结构而发生碱基配对，磁珠上进而标记大量的拉曼信号分子，故通过 SERS 检测到的拉曼信号较强（如图 1b）；当溶液中无 Hg^{2+}时，仅有少量的信号分子通过物理吸附结合在捕获链上[17,18]，故几乎没有拉曼信号（如图 1a）。

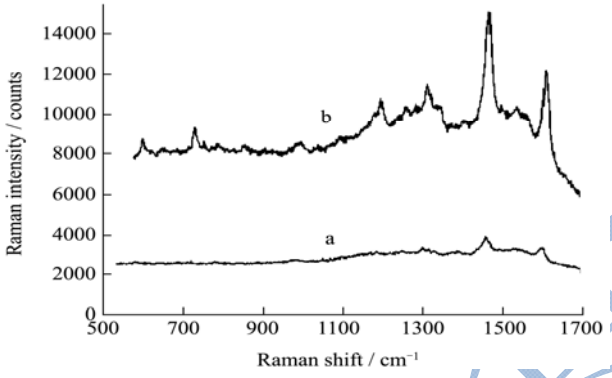
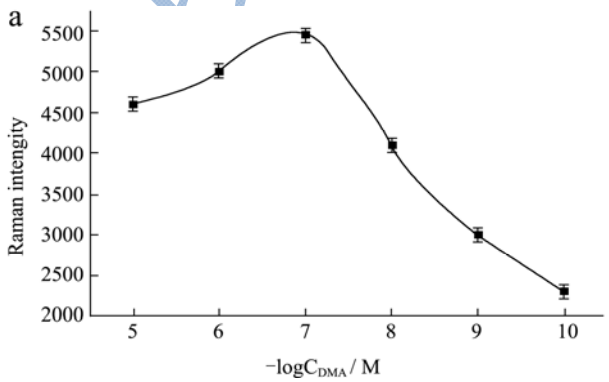


图 1 循环放大信号的拉曼检测(a)无 Hg^{2+}存在时；(b)有 Hg^{2+}浓度为 1.0×10^{-12} mol/L

Fig.1 SERS detection of the cycle amplification signals (a)without Hg^{2+}; (b)with Hg^{2+} (1.0×10^{-12} mol/L)

2.2 杂交实验条件的优化

为提高传感器对 Hg^{2+}检测的灵敏度，达到杂交链式反应 HCR 最大程度的放大效果，研究对磁珠上捕获 DNA 的固定量，杂交 HCR 实验中的 pH、杂交温度和反应时间进行了探讨。



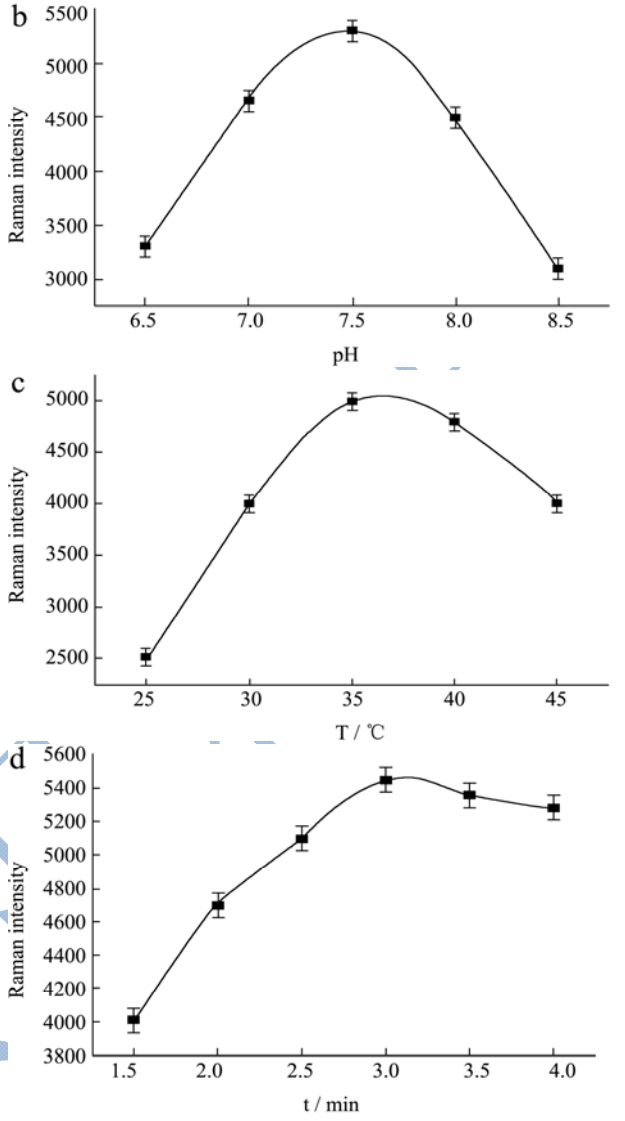


图 2 实验条件的优化，实验中 Hg^{2+}的浓度为 1.0×10^{-12} M

Fig. 2 Optimization of experimental conditions with a Hg^{2+} concentration of 1.0×10^{-12} mol/L

注：a，捕获 DNA 浓度；b，pH；c，杂化温度；d，杂化时间。

由于捕获 DNA 在磁球上的固定量，决定了引发后拉曼信号 DNA 的固载量，研究磁珠上捕获 DNA 的固定量，如图 2a。当 DNA 浓度在 1.0×10^{-10}~1.0×10^{-5} mol/L 范围内，SERS 信号随着捕获 DNA 浓度的增加，通过引发会形成较多的 T-Hg^{2+}-T 结构和信号 DNA 分子，当超过 1.0×10^{-7} M 时，随着捕获 DNA 空间位阻和分子排斥力的增强，反而限制了信号 DNA 的结合，导致 SERS 强度降低。故选择 1.0×10^{-7} mol/L 为捕获 DNA 的最佳固载浓度。

改变 Tris-HCl 缓冲溶液的 pH，考察其对拉曼信号强度的影响。结果如图 2b 所示，随着 pH 的增大，信号强度先增大后减小，在 pH=7.4 时达到最大值，故选择 pH 为 7.4 做为最佳反应 pH。图 2c 显示改变杂

交链式反应温度，当 37 ℃时，SERS 信号强度最强。可能是由于低温时，DNA 的杂交效率和反应活性受到限制，而高于 37 ℃时，DNA 的自由能又降低，故选择于 37 ℃为最佳温度。

图 2d 所示，为改变杂交链式反应时间对 SERS 信号的影响。随着反应时间的增加，杂交链式反应链增长，拉曼信号分子逐渐增多，信号强度逐渐增强，到 3 h 后达最大，之后 DNA 链的空间位阻和碱基排斥力增大，限制了 HCR 反应的进行，故信号强度基本不变。

2.3 传感器的灵敏度测定

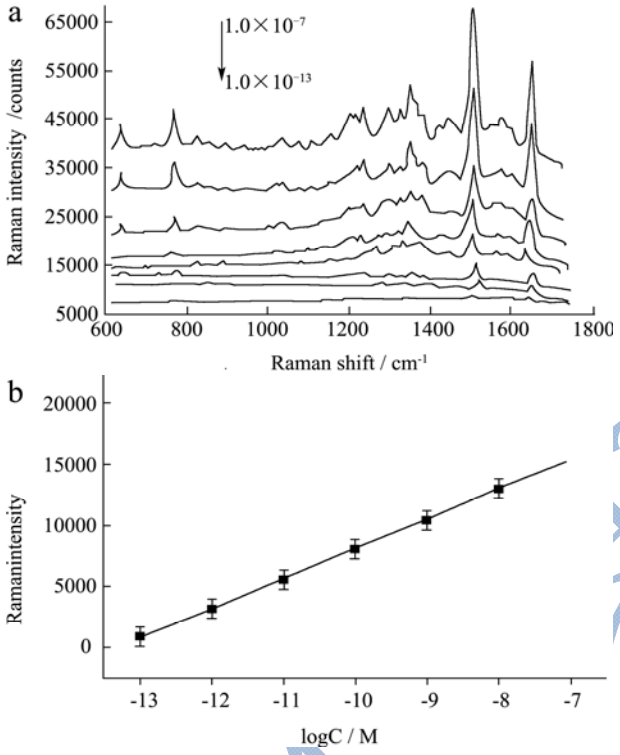


图 3 谱图和工作曲线

Fig. 3 Spectra and working curve

注：a，不同浓度 Hg^{2+}的拉曼谱图；b，测定线性工作标准曲线。

最佳实验条件下，改变 Hg^{2+}的浓度获得的拉曼信号谱图如图 3a 所示。研究以 1499 cm^{-1} 处规则的特征吸收峰[19]衡量实验的信号大小。当 C_{Hg2+} 在 1.0×10^{-7}~1.0×10^{-13} mol/L 范围时，SERS 信号随着浓度增加而增大。图 3b 是测定信号强度和 C_{Hg2+}工作曲线，线性回归方程为 ΔI=427.3 lg$C$+10300.4（ΔI 是减去空白值后的拉曼峰差，C 是 Hg^{2+}的浓度，S/N=3，R^2=0.9987），检测限为 1.0×10^{-13} M。

2.4 测定离子的特异选择性和准确性研究

为了证明 T-Hg^{2+}-T 结构的选择特异性和稳定性，实验选择了几种常见污染性金属离子（Cd^{2+}、Mg^{2+}、Cu^{2+}和 Ca^{2+}），相同实验条件下，对比它们的拉曼信号强度，实验如图 4 所示，结果发现，其他离子的信号强度仅因为物理吸附作用而产生较弱的信号，Hg^{2+}的信号强度远远高于其他离子，Hg^{2+}具有特异选择性。3 次相同实验条件下制备传感器，用于测定相同浓度的含 Hg^{2+}溶液，测定结果与等离子体原子发射光谱法测定结果进行比较，相对标准偏差为 0.42%。

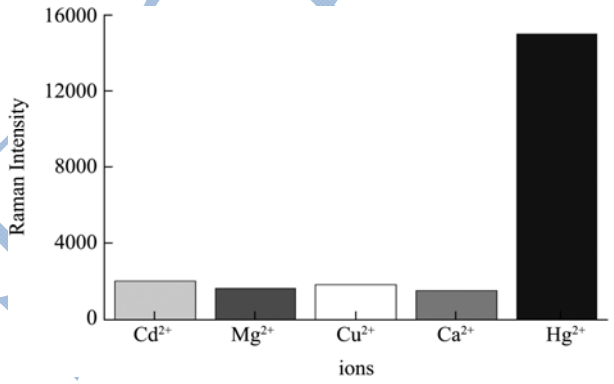


图 4 不同离子的拉曼信号强度

Fig. 4 Comparison of Raman intensity of different ions

注：Hg^{2+}浓度为 1.0×10^{-10} M，其他离子为 1.0×10^{-8} mol/L。

2.5 实际样品的分析

有市场上购得海产品，去壳洗净，用去离子水洗净，75 ℃下烘干后，用玛瑙研钵研磨，过 10 目筛。准确称量样品 0.2390 g，置于硝化罐中，加入 11 mL 的体积比为 1:6 的高氯酸和硝酸，110 ℃下消解 2 h，去除硝化罐，待温度降到室温，把硝化罐中的溶液全部转移至 50 mL 的容量瓶中定容待测，同时做空白实验。将测定结果与等离子体原子发射光谱法进行对照，结果见表 1。

表 1 海产品中 Hg^{2+}的测定结果与等离子体原子发射光谱法测定结果对照

Table 1 Comparison of the detection results of Hg^{2+} in seafood using a biosensor and ICP-AES

样品	质量/g	实验测定结果			等离子体原子发射光谱法测定结果	
		(测定值-空白值)/(μg/g)	RSD/%	测定回收率/%	(测定值-空白值)/(μg/g)	RSD/%
蛤蜊	0.2390	0.23	3.31	95.83	0.24	2.25
鱼	0.2390	0.34	2.73	106.25	0.32	1.93
虾	0.2390	0.28	3.25	103.70	0.27	2.74

3 结论

研究结合 T-Hg-T 的结构的稳定性和发卡型 DNA 循环杂交放大 HCR 技术，设计了信号放大的生物传感器，并利用表面增强拉曼检测技术成功用于 Hg^{2+}的测定，灵敏度高，线性范围宽，适合海产品中痕量汞的测定。

参考文献

[1] Nalan E M, Lippard S J. Tools and tactics for the optical detection of mercuric ion [J]. Chem. Rev., 2008, 108(9): 3443-3480

[2] Hao Y L, Guo Q Q, Wu H Y, et al. Amplified colorimetric detection of mercuricions through autonomous assembly of G-quadruplex DNAzyme nanowires [J]. Biosens. Bioelectron., 2014, 52(4): 261-264

[3] Wang D, Liu X M, Fang Z X, et al. Preparation of sulfur-doped PANI/TiO2 nanowires and its sensing properties to mercury [J]. Chem. Res. Chinese Universities, 2015, 31(4), 581-584

[4] 陈学泽,沈银梅,杨献珍.预富集-冷蒸气原子吸收光谱法测定饮料中的痕量汞[J].分析科学学报,2007,23(3):364-366
CHEN Xue-ze, SHEN Yin-mei, YANG Xian-zhen. Determination of mercury in beverages by cold vapour-atomic absorption spectrometry after enrichment [J]. Journal of Analytical Science, 2007, 23(3): 364-366

[5] 陈贺海,鲍惠君,付冉冉,等.微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定铁矿石中铬砷镉汞铅[J].岩矿测试,2012, 31(2):234-241
CHEN He-hai, BAO Hui-jun, FU Ran-ran, et al. Determination of Cr, As, Cd, Hg and Pb in iron ores using inductively coupled plasma-mass spectrometry with microwave digestion [J]. Rock and Mineral Analysis, 2012, 31(2): 234-241

[6] 杜米芳,聂富强,杜丽丽,等.电感耦合等离子体原子发射光谱法测定船用钢中砷锡锑[J].冶金分析,2017,37(2):70-75
DU Mi-fang, NIE Fu-qiang, DU Li-li, et al. Determination of arenic, tin, antimonyin steel for ship by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry [J]. Metallurgical Analysis, 2017, 37(2): 70-75

[7] Ye S J, Yang X X, Xiao J, et al. Surface enhanced Raman scattering assay combined with autonomous DNA machine isothermal amplification for detection of specific DNA and ramos cells [J]. Chem. Commun., 2012, 48(68): 8535-8537

[8] J Noble, S Attree, A Knight, et al. Optical scattering artifacts observed in the development of multiplexed surface enhaned raman spectroscopy nanotag immunoassays [J]. Anal. Chem., 2012, 84(19): 8246-8252

[9] Kyuwan L, Vladimir P D, Joseph I. DNA-gold nanoparticle reversible networks grown on cell surface marker sites: application in diagnostica [J]. ACS Nano, 2011, 5(3): 2109-2117

[10] Chen J H, Zhou S G, Wen J L. Disposable strip biosensor for visual detection of Hg^{2+} based on Hg^{2+}-triggered toehold binding and exonuclease III-assisted signal amplification [J]. Anal. Chem., 2014, 86(6): 3108-3114

[11] Huang J H, Gao X, Jia J J, et al. Graphene Oxide-based amplified fluorescent biosensor Hg^{2+} detection through hybridization chain reactions [J]. Anal Chem., 2014, 86(6): 3209-3215

[12] Grabar K C, Freeman R G, Hommer M B, et al. Preparation and characterization of Au coooid monolayers [J]. Anal. Chem., 1995, 67(4): 735-743

[13] Hu K C, Lan D X, Li X M. Electrochemical DNA Biosensor based on nanoporous gold electrode and multifunctional encoded DNA Au bio bar code [J]. Anal. Chem., 2008, 80(23): 9124-9130

[14] Storhoff J J, Elghanian R, Mucic C R, et al. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes [J]. J Am. Chem. Soc., 1998, 120(9): 1959-1964

[15] Rosi N L, Giljohann D A, Thaxton C S, et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation [J]. Science, 2006, 312: 1027-1030

[16] Nguyen T, Francis M B. Practical synthetic route to functionalized rhodamine dyes [J]. Organic Letters, 2003, 5(18): 3245-3248

[17] Zhang H, Fang C C, Zhang S S. Ultrasensitive electrochemical analysis of two analytes by using an autonomous DNA machine that works in a two-cycle model [J]. Chem. Eur. J., 2011, 17(27): 7531-7537

[18] Zhang H, Fang C C, Zhang S S. An autonomous bio-barcode DNA machine for experimental DNA amplification and its application to the electrochemical determination of adenosine triphosphate [J]. Chem. Eur. J., 2010, 16: 12434-12439

[19] Lu Y, Liu G L, Lee L P. High-density silver nanoparticle film with temperature-controllable interparticle spacing for a tunable surface enhanced Raman scattering substrate [J]. Nano Lett., 2005, 5: 5-9