

稀土铽离子介导的非标记适配体传感器评估食品中的重金属银污染

杨昊¹, 徐依琳¹, 孙思瀚², 高鸿¹, 邓锐杰^{1*}

(1. 四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065) (2. 抚顺市食品检验检测中心, 辽宁抚顺 113000)

摘要: 作为最具毒性的重金属之一, 银在食品和环境中的污染对人体健康会造成严重危害。该研究基于稀土铽离子 (Tb^{3+}) 能够结合单链 DNA 发出特征荧光的原理, 利用 Ag^+ 能与胞嘧啶 (C) 结合形成 C- Ag^+ -C 结构以组成双链 DNA 的特性, 构建了一种特异性识别 Ag^+ 的非标记核酸适配体荧光传感器。该传感器通过 Tb^{3+} 对单双链 DNA 结构变化灵敏的特征荧光响应, 能够实现对 Ag^+ 的高灵敏和快速的定量检测。该方法对 Ag^+ 的检测限为 391.50 nmol/L, 满足国家对于饮用水中 Ag^+ 限量检测的要求 (0.05 mg/L, 即 463.50 nmol/L)。该方法的回收率测定结果在 93.02%~102.72% 范围内, 其相对标准差范围为 1.27%~7.14%, 证明了它的应用有效性; 相较于其他的分子检测方法, 该方法具有无需进行化学标记以降低成本, 且操作简便, 检测响应速度快等优点, 为临场快速检测重金属银污染提供了一种可能的途径。

关键词: 重金属; 银; 稀土铽离子; 核酸适配体; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2023)06-284-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.1597

Assessment of Silver Contamination in Food Using Tb^{3+} -mediated Label-free Aptasensor

YANG Hao¹, XU Yilin¹, SUN Sihan², GAO Hong¹, DENG Ruijie^{1*}

(1.College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

(2.Fushun Food Inspection and testing Center, Fushun 113000, China)

Abstract: As one of the most toxic heavy metals, silver (Ag^+), when contaminating food or the environment, causes serious harm to human health. Based on the principle that terbium ions (Tb^{3+}) can combine with single-stranded DNA (ssDNA) to emit characteristic fluorescence, this study took advantage of the ability of Ag^+ to combine with cytosine (C) to form a C- Ag^+ -C structure that enables the formation of double-stranded DNA (dsDNA), and a label-free fluorescent nucleic acid aptasensor was constructed that specifically recognizes Ag^+ . This sensor achieved the highly sensitive and rapid quantitative detection of Ag^+ through the characteristic fluorescent response of Tb^{3+} , which is sensitive to the structural change of ssDNA to dsDNA. The detection limit of Ag^+ in the proposed method is 391.5 nmol/L, which meets the national requirement for the detection of Ag^+ in drinking water (0.05 mg/L, i.e., 463.5 nmol/L). The recovery rate of this method ranges of from 0.02% to 102.72%, and the relative standard deviation ranges from 1.27% to 7.14%, which proves the effectiveness of the method. Compared with other detection methods, the proposed method does not require chemical labeling to reduce costs, is easier to operate, and has a fast detection response, thereby providing method for the rapid on-site detection of silver contamination.

Key words: heavy metals; silver; Tb^{3+} ; aptamer; food safety

引文格式:

杨昊,徐依琳,孙思瀚,等.稀土铽离子介导的非标记适配体传感器评估食品中的重金属银污染[J].现代食品科技,2023,39(6):284-289.

YANG Hao, XU Yilin, SUN Sihan, et al. Assessment of silver contamination in food using Tb^{3+} -mediated label-free aptasensor [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 284-289.

收稿日期: 2022-12-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (22074100)

作者简介: 杨昊 (1995-), 男, 研究生, 研究方向: 食品安全; E-mail: hyang_2018@163.com

通讯作者: 邓锐杰 (1990-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全, E-mail: drj17@scu.edu.cn

重金属富集于土壤、水等环境和食物中,因其持久的生物累积性和不可降解性,能通过食物链累积至人体,对人体健康造成严重损害^[1]。其中,银污染近年来受到广泛关注,由于其良好的光、电学特性,它被广泛应用于医疗成像、摄影、电子等各个行业^[2],且银也常用于生活饮水及洗漱用品的消毒杀菌^[3],这也导致了大量含有 Ag^+ 的废水被排放到环境中^[4]。研究表明,若人们长期暴露于高浓度的 Ag^+ 环境中,会导致大脑、神经和免疫系统方面的各类疾病^[5],因为它能与各类细胞代谢物结合并使巯基酶失活^[6]。因此,建立能够灵敏、快速检测环境与食品样品中 Ag^+ 浓度的方法是当下重金属污染控制领域的重要任务。

目前 Ag^+ 检测方法主要有电感耦合等离子体质谱法^[7]、荧光光谱法^[8]、电化学分析法^[9]和原子吸收光谱法^[10]等,它们准确性高,但都具有样本前处理复杂,检测耗时过长等局限。随着功能核酸在小分子靶标检测中的应用逐渐被开发,其中基于核酸适配体识别的新型检测方法引起了较大关注^[11,12]。二十世纪末, Ellington 等^[13]和 Tuerk^[14]等运用配体指数级富集系统进化技术 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, SELEX), 筛选出了一些随机寡核苷酸,它们能特异性结合某些小分子或大分子,比如金属离子、真菌毒素、蛋白质和细胞,此类具有靶分子特异识别性的特殊单链核酸片段被 Ellington 等命名为核酸适配体 (Aptamer)。Aptamer 具有可编程性、合成成本低、特异性高、结合力强、靶分子广等优点,非常适合于食品临场快速检测技术的开发^[15,16]。

本研究利用了 Aptamer 及稀土铽离子 (Tb^{3+}) 与单链核酸结合可发出特征荧光的原理设计了一种检测 Ag^+ 的非标记 Aptamer 探针^[17]。 Tb^{3+} 在溶液中与双链共存,或是独立存在于溶液中时不发光,当体系中存在单链核酸时, Tb^{3+} 可与之结合发出特征荧光^[18]。这是因为 Tb^{3+} 的吸收截面较小,其单独存在时较难观察到特征荧光,通常需要其与配体结合,发生能量转移来增敏荧光^[19]。 Tb^{3+} 在 DNA 上共有 2 个结合位点,分别是碱基上的电子给予体和磷酸骨架上的氧负离子^[20]。在双链 DNA 中, Tb^{3+} 主要与磷酸基团结合,特征荧光受到抑制;若 DNA 中碱基无法完全配对, Tb^{3+} 则同时与两个结合位点结合,使得特征荧光显著增强^[21]。本方案利用 Ag^+ 可以诱导“C- Ag^+ -C”结构的形成从而使得单链结构转变为双链这一特点^[22],在 Aptamer 溶液中加入 Ag^+ 后, Tb^{3+} 无法再结合电子给予体,荧光增强受到抑制。利用这一荧光强度变化建立了定量检测 Ag^+ 的分析方法,且本检测体系中只需用到一条无需荧光标记的 Aptamer,所需材料简单,大

大节约成本,且检测过程在均相溶液中即可完成,本方法给 Ag^+ 的临场快速检测设计提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

荧光多功能酶标仪 Synergy H1, 美国伯腾仪器有限公司。

DNA 核酸适配体序列购自生工生物工程(上海)股份有限公司, DNA 适配体的合成采用固相亚磷酰胺三酯法,该方法是在固相载体上,沿 3'→5' 的方向依次添加核苷酸完成 DNA 链的合成,合成后的 DNA 序列选择 PAGE 进行纯化。本实验所用到的 DNA 核酸序列见表 1。硝酸铽与硝酸钠购自上海源叶生物科技有限公司。实验用水为分子生物级用水,购自美国康宁 (Corning) 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制

将盛有核酸干粉的离心管置于离心机中,在 8 000 r/min 下离心 3 min 后,加入超纯水配置成 10 $\mu\text{mol/L}$ 的核酸溶液。

在 10 mL 超纯水中加入 2.175 1 g 五水硝酸铽并充分溶解,配置成 500 mmol/L 的铽离子溶液,实验前根据需要进行不同的浓度稀释。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下保存,缓冲溶液配制为 1 mol/L 的 NaNO_3 溶液。

1.2.2 靶标 Ag^+ 的检测

在离心管中个加入终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ 核酸适配体、150 mmol/L NaNO_3 缓冲液和不同浓度的 Ag^+ 标准溶液 (0、1、2、6、8、10、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$), 定容至 36 μL , 混匀静置 10 min 后加入 4 μL 500 mmol/L Tb^{3+} 溶液,静置反应 5 min 后放入多功能微孔板检测仪中测定荧光强度,激发波长设置为 290 nm,发射波长范围设置为 450~650 nm。

1.2.3 选择性测试

为了验证该方法对于 Ag^+ 的检测特异性,选择了 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 作为干扰离子与 Ag^+ 的输出荧光进行对比测试。选择性测试共选择了 3 个浓度,分别为 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 。荧光检测参照 1.2.2 步骤。

1.2.4 食品样品中 Ag^+ 的检测

(1) 样品制备: 用自来水直接配制不同浓度的 Ag^+ 溶液 (30、60、90 $\mu\text{mol/L}$)。

(2) 荧光测定: 4 μL 样品溶液、6 μL NaNO_3 buffer (1 mol/L)、4 μL Ag^+ 核酸适配体 (20 $\mu\text{mol/L}$), 混匀,室温反应 10 min 后加入 4 μL Tb^{3+} 溶液 (500 mmol/L),

5 条富含不同胞嘧啶个数 (8、10、12、14、16) 的核酸适配体进行荧光分析(如表 1),结果显示(如图 2a), 3'末端含有 14 个胞嘧啶的适配体 (Atp3) 得到的噪信比最高, 达到了 6.65。其次, 关于核酸适配体浓度, 分析了 0.1、1、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光结果, 表明(如图 2b), 终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时可获得最高的噪信比 (11.18)。另外, Tb^{3+} 的特征荧光也是影响实验结果的关键因素, 对比 5 个 Tb^{3+} 终浓度 (1、5、10、25、50 mmol/L) 后发现, 5 mmol/L 的 Tb^{3+} 能够导致最高的信号响应, 噪信比可达 23.64 (如图 2c)。

表 1 Ag^+ 核酸适配体序列

Table 1 Sequences of aptamers for Ag^+

适配体名称	序列 (5'→3')
Atp1	AAAGGGAAAGGGAAACCCCCCCC
Atp2	AAAGGGAAAGGGAAACCCCCCCCCC
Atp3	AAAGGGAAAGGGAAACCCCCCCCCCCC
Atp4	AAAGGGAAAGGGAAACCCCCCCCCCCCCC
Atp5	AAAGGGAAAGGGAAACCCCCCCCCCCCCCCC

2.3 Ag^+ 的定量检测

在最优的实验条件下, 使用已准备好的不同摩尔浓度梯度的 Ag^+ 标准溶液 (0、1、2、6、8、10、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$) 进行了用于 Ag^+ 定量分析的标准曲线。如图 3 所示, 随着 Ag^+ 浓度的增加, 荧光强度逐渐减弱, 且 Ag^+ 浓度在 0~8 nmol/L 的范围内, Tb^{3+} 的特征荧光强度与靶标 Ag^+ 浓度呈较好的线性关系, 标

准曲线方程拟合为 $Y=-325.47X+3\ 702.8$, $R^2=0.988\ 3$, 其中 X 和 Y 分别表示 Ag^+ 浓度和 Tb^{3+} 的特征荧光强度, 检测限计算出为 391.50 nmol/L 。随着 Ag^+ 浓度增加而导致荧光强度的减弱是由于银离子存在时会促使形成大量 C- Ag^+ -C 复合物, 使得供给给 Tb^{3+} 结合单链核酸适配体发光的位点随之减少, 特征荧光强度降低。《生活饮用水卫生标准》(GB 5749-2022) 限定饮用水中银离子最高浓度为 0.05 mg/L (463.50 nmol/L), 即本方法的检出限满足国家市场监督管理总局和国家标准化管理委员会对于饮用水中 Ag^+ 限量检测的要求, 同时对比了不同的银离子检测方法, 本文所述方法具有较好的检出限(如表 2 所示)。这些结果表明, 本方法有望作为一种快速定量 Ag^+ 的有效工具。

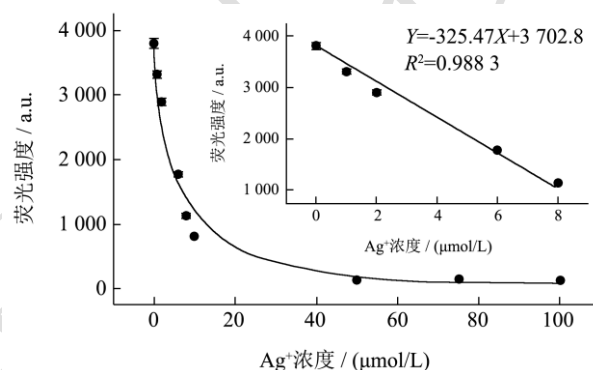


图 3 不同浓度 Ag^+ 标准溶液条件下体系的荧光响应

Fig.3 Fluorescence intensity of the system in the response to Ag^+ at various concentrations

注: Ag^+ 浓度分别为 0、1、2、6、8、10、50、75 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 2 不同 Ag^+ 检测方法的比较

Table 2 Comparison of different detection methods for Ag^+

检测方法	识别元件	检出限/(nmol/L)	实际样品检测	参考文献
荧光检测	核酸适配体	391.50	自来水	本文
吸光度检测	核酸适配体	350.00	银制纳米材料	[23]
荧光检测	核酸适配体	2.00	自来水	[24]
荧光检测	脱氧核酶	25.00	湖水	[25]
吸光度检测	脱氧核酶	453.70	湖水	[26]
荧光检测	核酸适配体	4.50	-	[27]

2.4 选择性

为了考察该方法对于检测 Ag^+ 的特异选择性, 测试了 5 种其他常见金属离子 (Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mg^{2+}) 在三种浓度下 (1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光响应, 结果如图 4 所示, 在相同浓度下, Ag^+ 导致的 Tb^{3+} 特征荧光响应差值至少高于其他干扰金属离子所导致荧光响应差值的 3.00 倍。由此可见, 该检测方法对 Ag^+ 具有显著的选择特异性, 表明其在分析复杂的实际样品时具有巨大的潜在可行性。

2.5 自来水样分析

为了评估用本方法在实际环境中检测 Ag^+ 的可行性, 综合考虑下, 水环境中的 Ag^+ 污染较其他方面的污染更为严重^[21], 选择在人为加有 Ag^+ 的自来水作为测试对象进行实际样品的回收率实验。分别添加 Ag^+ 于自来水中至终浓度为 3、6、9 $\mu\text{mol/L}$, 结果如表 3 和图 5 所示, 检测回收率总体在 93.02%~102.72% 之间, 验证了本方法检测银离子的可行性。并且该检测方法具有设计简单、非化学标记、反应迅速等特点,

因此该方法为 Ag^+ 的临场快速检测提供了一条可行的途径。

表 3 自来水中 Ag^+ 加标回收检测结果

样品	添加/ $(\mu\text{mol/L})$	检测/ $(\mu\text{mol/L})$	回收率/%	相对标准差($n=3$)/%
自来水	3	2.79	93.02	7.14
	6	6.16	102.72	1.27
	9	8.94	99.34	5.22

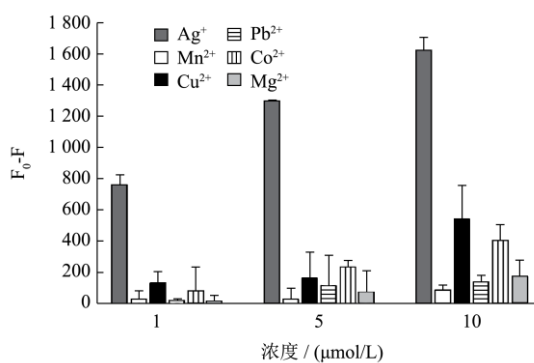


图 4 不同金属离子对该检测体系的荧光响应

Fig.4 Fluorescence intensity of the system under different metal ions

注: F_0 和 F 分别是有金属离子和无金属离子下体系的荧光强度。

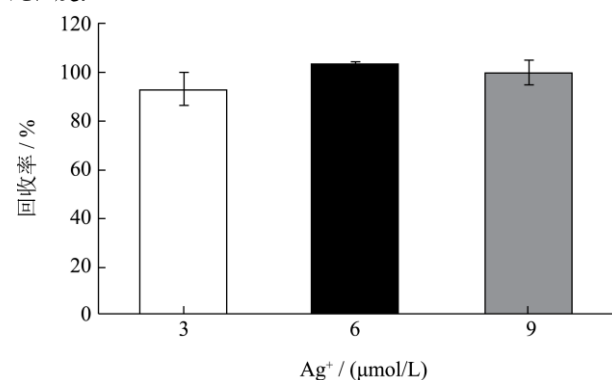


图 5 自来水中 Ag^+ 加标回收检测结果

Fig.5 Detection of Ag^+ in tap water

3 结论

综上所述, 本研究基于稀土元素 Tb^{3+} 的特征荧光反应和 C- Ag^+ -C 特有复合结构设计了一种非标记核酸适配体传感器, 其可特异性识别并结合靶分子引起适配体构象变化, 该变化导致核酸适配体固有单链结构变少, 从而使 Tb^{3+} 的特征荧光发生显著减弱。本实验设计有以下优点: I) 在检测全程中只需 1 条单链核酸适配体的参与, 避免了多核酸参与的复杂探针结构设计; II) 采用 Tb^{3+} 的特征荧光作为输出信号, 因而无需进行核酸的化学标记, 也不需要各类核酸酶的参与, 所用仪器简单且运行费用低廉, 大大节约了成本; III) 本方法对于 Ag^+ 的响应速度较快, 反应 1 min 即可获

得检测结果, 具有较高的检测灵敏度 (391.50 nmol/L), 满足国家市场监督管理总局和国家标准化委员会对于我国饮用水中 Ag^+ 限量 (0.05 mg/L , 即 463.50 nmol/L) 的检测要求。本方法对 Ag^+ 的选择性良好, 不易受到其他金属离子的干扰, 且在以自来水为检测对象的回收率实验中得到 $93.02\% \sim 102.72\%$ 的回收率, 结果良好。本方法具有非化学标记、原理简单、反应迅速、灵敏度高等特点, 其设计思路可对食品中其他具有 C- Ag^+ -C 类似结构响应的重金属离子的检测提供一些启发, 本方法为食品中 Ag^+ 的临场快速检测都提供了一个可能的途径, 为食品安全提供了进一步保障, 具有一定的应用潜力和市场前景。

参考文献

- [1] Ding S Y, Dong M, Wang Y W, et al. Thioether-based fluorescent covalent organic framework for selective detection and facile removal of mercury (II) [J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(9): 3031-3037.
- [2] Zhao C, Qu K G, Song Y J, et al. A reusable DNA single-walled carbon-nanotube-based fluorescent sensor for highly sensitive and selective detection of Ag^+ and cysteine in aqueous solutions [J]. Chemistry - A European Journal, 2010, 16(27): 8147-8154.
- [3] Huy G D, Zhang M, Zuo P, et al. Multiplexed analysis of silver (I) and mercury (II) ions using oligonucleotide-metal nanoparticle conjugates [J]. Analyst, 2011, 136(16): 3289-3294.
- [4] Barriada J L, Tappin A D, Evans E H, et al. Dissolved silver measurements in seawater [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26(8): 809-817.
- [5] Yin X C, Shao P H, Ding L, et al. Protonation of rhodanine polymers for enhancing the capture and recovery of Ag^+ from highly acidic wastewater [J]. Environmental Science: Nano, 2019, 6(11): 3307-3315.
- [6] Yan G, Wang Y, He X, et al. A highly sensitive electrochemical assay for silver ion detection based on un-labeled C-rich ssDNA probe and controlled assembly of MWCNTs [J]. Talanta, 2012, 94: 178-183.

- [7] 黄慧敏,胡芳,侯玉兰.电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法测定废水中有害元素银的含量[J].中国无机分析化学,2020,10(6):14-17.
- [8] Chatterjee A, Santra M, Won N, et al. Selective fluorogenic and chromogenic probe for detection of silver ions and silver nanoparticles in aqueous media [J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(6): 2040-2041.
- [9] Liu Q Y, Liu B D, Yuan F, et al. Anodic stripping voltammetry of silver (I) using unmodified GaN film and nanostructure electrodes [J]. Applied Surface Science, 2015, 356: 1058-1063.
- [10] Greaves M C. Determination of gold and of silver in solution by atomic absorption spectroscopy [J]. Nature, 1963, 199(4893): 552-553.
- [11] 邓莎,董怡,任尧,等.基于功能核酸的食品重金属污染快速检测进展[J].现代食品科技,2021,37(7):335-343,320.
- [12] Wu Y P, Yue Y X, Deng S, et al. Ratiometric-enhanced G-quadruplex probes for amplified and mix-to-read detection of mercury pollution in aquatic products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(43): 12124-12131.
- [13] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346(6287): 818-822.
- [14] Tuerk C. Using the SELEX combinatorial chemistry process to find high affinity nucleic acid ligands to target molecules [M]// PCR Cloning Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, 1997: 219-230.
- [15] Liu R, Zhang F, Sang Y, et al. Screening, identification, and application of nucleic acid aptamers applied in food safety biosensing [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 123: 355-375.
- [16] Zhao Y C, Yavari K, Liu J W. Critical evaluation of aptamer binding for biosensor designs [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022, 146: 116480.
- [17] 何强,夏许寒,邓锐杰.基于铽离子的非标记核酸适配体传感器检测黄曲霉毒素 B₁[J].西华大学学报(自然科学版), 2020,39(5):49-56.
- [18] Yang C Y, Du C Y, Su R F, et al. A signal-on fluorescent aptasensor by sensitized Tb³⁺ luminescence for detection of melamine in milk [J]. Talanta, 2022, 236: 122842.
- [19] 崔清华,邵勇,马坤,等.基于核酸脱碱基位点的铽离子荧光增强型单核苷酸多态性识别研究[J].化学学报,2011,69(18): 2137-2142.
- [20] Zhang J, Zhang X, Yang G D, et al. A signal-on fluorescent aptasensor based on Tb³⁺ and structure-switching aptamer for label-free detection of ochratoxin A in wheat [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 41: 704-709.
- [21] Kleinke K, Saran R, Liu J. Label-free Ag⁺ detection by enhancing DNA sensitized Tb³⁺ luminescence [J]. Sensors, 2016, 16(9): 1370.
- [22] 李玉龙,谢发婷,管燕,等.基于银离子与DNA相互作用的比率型电化学传感器用于银离子的检测[J].高等学校化学学报,2022,43(8):79-89.
- [23] Wang Z, Zhao J, Li Z, et al. Sequence and structure dual-dependent interaction between small molecules and DNA for the detection of residual silver ions in as-prepared silver nanomaterials [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(12): 6815-6820.
- [24] 汪鹏,熊威威,李文恒,等.基于两种荧光染料的内标比率型荧光探针检测水体中银离子[J].武汉大学学报(理学版), 2022,68(4):413-419.
- [25] Saran R, Liu J. A silver DNAzyme [J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(7): 4014-4020.
- [26] Wu S, Wu M, Wang G, et al. Visual quantitation of silver contamination in fresh water via accumulative length of microparticles in capillary-driven microfluidic devices [J]. Talanta, 2021, 235: 122707.
- [27] Pu W, Zhao H, Huang C, et al. Fluorescent detection of silver (I) and cysteine using SYBR Green I and a silver (I)-specific oligonucleotide [J]. Microchimica Acta, 2012, 177(1): 137-144.