

## 基于氧化石墨烯荧光适体传感器的胰岛素检测

姜利英\* 肖小楠 周鹏磊 张培 闫艳霞 姜素霞 陈青华

( 郑州轻工业学院 电气信息工程学院, 郑州 450002)

**摘 要** 采用荧光基团( FAM) 标记的核酸适体作为识别元件, 氧化石墨烯为淬灭剂, 建立了一种高选择性、高灵敏度的核酸适体传感器。核酸适体与氧化石墨烯结合后, 荧光淬灭, 此时溶液无荧光; 加入胰岛素后, 溶液中荧光得到恢复。利用荧光分析法检测加入胰岛素前后, 溶液中荧光强度的变化, 获取了荧光适体传感器的线性度和灵敏度, 实现对胰岛素浓度的测定。结果表明, 在  $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内, 胰岛素的浓度与溶液中荧光强度有良好的线性关系, 检出限为 10 nmol/L。采用此方法检测胰岛素, 操作简便, 检测速度快, 准确性高, 选择性好, 检出限低。

**关键词** 荧光基团; 核酸适体; 氧化石墨烯; 荧光适体传感器; 胰岛素

### 1 引 言

胰岛素( Insulin, INS) 是胰腺中胰岛 B(  $\beta$ ) 细胞分泌的一种蛋白质激素, 既能促进血液中的葡萄糖进入肝、肌肉和脂肪等组织细胞, 在细胞内合成糖元或转变成其它营养物质贮存起来; 又能促进葡萄糖氧化分解释放能量, 供机体利用, 是维持血糖在正常水平的主要激素。胰岛素分泌不足或缺乏时, 会引起高血糖, 甚至是糖尿病。因此, 能否准确测定血液中胰岛素的浓度, 对高血糖及糖尿病的早期诊断、临床和基础研究具有重要的价值<sup>[1, 2]</sup>。胰岛素的检测方法包括免疫分析法<sup>[3]</sup>、色谱法<sup>[4]</sup>, 这两种方法操作繁琐, 灵敏度低, 难以应用到现场即时检测。现在研究较多的检测方法是电化学分析法<sup>[5-13]</sup>和荧光分析法<sup>[14-16]</sup>。

由于核酸适体具有高亲和力和高特异性, 已成为制备生物传感器理想的识别元件<sup>[17-20]</sup>。Seyed 等<sup>[2]</sup>利用了核酸适体和三股螺旋分子开关的独特性质, 对胰岛素进行检测, 检出限为 9.97 nmol/L。Verdian 等<sup>[15]</sup>基于胰岛素适体折叠荧光淬灭, 实现了对 INS 的检测, 检测范围为 2~70 nmol/L。Ying 等<sup>[16]</sup>以氧化石墨烯( Graphene oxide, GO) 为淬灭剂, 基于核酸适体荧光检测法得到 INS 的检出限为 500 nmol/L, 检测范围 0.5~50  $\mu$ mol/L。氧化石墨烯可与 DNA 碱基发生强烈的  $\pi$ - $\pi$  相互作用, 稳定吸附单链 DNA, 使荧光淬灭, 它的淬灭效率远高于常见的有机淬灭剂, 且它的生产成本较低、制备简单, 是研究生物传感器的热点材料<sup>[21-24]</sup>。

本研究采用荧光基团标记的单链 DNA 作为探针, 以氧化石墨烯为淬灭剂, 构建了对 INS 有特异性的荧光适体传感器, 在检测范围与检出限方面获取了更好的结果。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

GL-16 II 型离心机( 上海安亭科学仪器厂); DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱( 上海精宏实验设备有限公司); 07HWS-2 数显恒温磁力搅拌器( 杭州仪表电机有限公司); 电子天平( 梅特勒-托利多仪器( 上海) 有限公司); F-7000 荧光光谱仪( 日本 HITACHI 公司) 获得。Tris-HCl 缓冲液为( pH 7.4, 50 mmol/L Tris-HCl, 30 mmol/L NaCl, 50 mmol/L KCl)。牛胰岛素( 北京索莱宝科技有限公司); 2 mg/mL 氧化石墨烯溶液( 苏州恒球科技有限公司)。实验所用的寡核苷酸序列均由上海生工生物技

2015-07-03 收稿; 2015-11-13 接受

本文系国家自然科学基金( No. 61002007)、河南省科技创新人才计划( No. 124100510001)、郑州轻工业学院 2014 年度研究生科技创新基金资助项目( No. 2014010)、郑州轻工业学院博士科研基金资助项目( No. 2014BSJJ041)

\* E-mail: jiangliyong@zzuli.edu.cn

术有限公司(中国)合成,其核苷酸序列如下: 5'-GGT GGT GGG GGG GGT TGG TAG GGT GTC TTC-FAM-3'。实验用水均为超纯水,实验温度为 25℃。

## 2.2 工作溶液的制备

将 100 μL 100 μmol/L 核酸适体加入到 100 mL Tris-HCl 缓冲液中,再加入 5 mL GO,室温下静置 10 min 后,加入 20 μL 100 μmol/L PBA 封闭未反应位点,即得到工作溶液。取 25 mg INS 加入 25 mL 工作溶液中,得到 INS 的浓度为 174.4 μmol/L,加入工作溶液稀释,分别得到 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50 和 100 μmol/L 的待测液各 5 mL。装入离心管内,离心 0.5 h,再静置 1 h,使其充分结合。

## 2.3 样品的分析

在激发波长为 480 nm,发射波长为 521 nm 的条件下,以不含 INS 的溶液作为空白对照组,用荧光光谱仪测定不同浓度的 INS 待测液的荧光强度。以荧光强度对相应浓度绘制标准曲线。

## 2.4 特异性检测

在标准曲线范围内选定浓度为 5 μmol/L,与检测 INS 相同的条件下,分别测定 BSA、生物素和链霉亲和素的荧光强度,与相同浓度的 INS 的荧光强度作比较,并绘制柱状图。

# 3 结果与讨论

## 3.1 检测原理、胰岛素的激发和发射波长

利用核酸适体与氧化石墨烯组成的检测 INS 荧光适体传感器,检测 INS 的基本原理如图 1 所示。当没有目标分子(INS)加入时,核酸适体表面的荧光基团被 GO 吸附,溶液中有极其微弱的荧光强度;加入 INS 后,适体不断从 GO 表面游离,溶液中的荧光强度得以恢复。随着 INS 浓度的增大,溶液中的荧光强度也不断增大。根据荧光强度的变化可以实现对 INS 的检测。

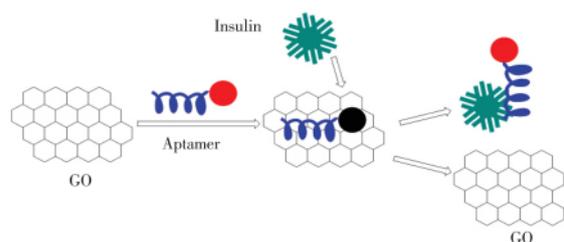


图1 检测胰岛素的原理示意图

Fig.1 Mechanism of insulin detection

胰岛素 (Insulin); 氧化石墨烯 (Graphene oxide; GO); 适体 (Aptamer)。

分别取 3 mL 工作溶液和待测液,在荧光光谱仪上先固定一个合适的激发波长,优化发射波长 (500~600 nm);确定发射波长,优化激发波长。最终确定胰岛素的激发波长为 480 nm,发射波长为 521 nm,激发和发射的狭缝宽度设置为 10 nm。

## 3.2 核酸适体与 GO 的量比对荧光强度的影响

若核酸适体的量过大,GO 不能将适体完全吸附,溶液中还存在大量荧光,当加入 INS 后,荧光强度的变化不够明显,对实验结果有较大影响。若 GO 量过大,核酸适体的荧光被 GO 完全吸附后,溶液中无荧光,但存在一部分未与核酸适体结合的 GO,加入 INS 时,从 GO 表面游离的核酸适体有可能再次被 GO 吸附,影响实验结果的准确性。核酸适体与 GO 不同的量比测得溶液中的荧光强度如图 2 所示。由图 2 可得,最终选择适体与 GO 的比例为 1 nmol : 1 mg(曲线 c),此时 GO 将完全吸附适体,荧光即将会完全淬灭。

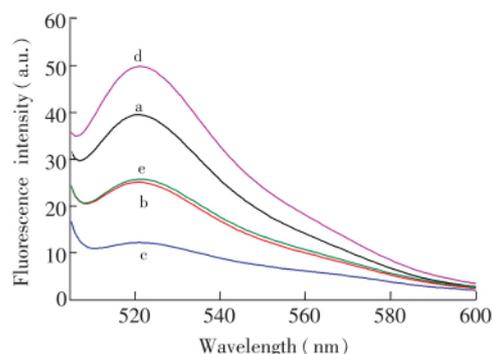


图2 不同 DNA 与 GO 的比率相对应的荧光强度

Fig.2 Fluorescence intensity corresponding to different ratios of DNA and GO

a: DNA : GO = 1 nmol : 0.6 mg; b: DNA : GO = 1 nmol : 0.8 mg;  
c: DNA : GO = 1 nmol : 1.0 mg; d: DNA : GO = 1 nmol : 1.2 mg;  
e: DNA : GO = 1 nmol : 1.4 mg.

## 3.3 缓冲液浓度对荧光强度的影响

缓冲溶液的浓度可以影响核酸适体的荧光强度,从而影响最终测得 INS 的荧光强度。本实验考察了不同浓度的缓冲液 (50 nmol/L, 50 μmol/L, 50 mmol/L) 对最终实验结果荧光强度的影响,发现缓冲液浓度为 50 mmol/L 时,测得荧光强度最强,实验效果最好。最终确定缓冲液为 Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 30 mmol/L, KCl 50 mmol/L。

### 3.4 工作溶液与胰岛素结合时间对荧光强度的影响

工作溶液与 INS 结合的时间太短(0~30 min),测得荧光强度较弱,延长结合时间(30~60 min),荧光强度不断增强。当结合时间大于 60 min,荧光强度趋于稳定。最终确定 INS 与工作溶液的最佳结合时间为 60 min。需要注意的是,INS 与工作溶液的结合时间不宜过长,否则会破坏核酸适体的结构,影响实验结果的准确性。

### 3.5 胰岛素的标准曲线及特异性实验结果

在上述实验条件下,INS 浓度与相应的荧光强度的关系如图 3 所示,随着 INS 浓度增大,荧光强度不断增强。目标 INS 的浓度在  $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内,适体的荧光强度( $y$ )和 INS 的浓度( $x$ )有良好的线性关系(图 4),线性回归方程为  $y = 84.83571 + 16.0724x$ ,相关系数  $R = 0.99913$ ,检出限为 10 nmol/L。

在图 3 的标准曲线上选择一个浓度(5  $\mu\text{mol/L}$ ),与检测 INS 的条件相同,得到的结果如图 5 所示。INS 的荧光强度与牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA),生物素(Biotin)和链霉亲和素(Streptavidin-biotin)明显不同,BSA、生物素、链霉亲和素与胰岛素的荧光强度比为 1.0:1.33:1.07:8.9。因此,本方法对胰岛素具有良好的选择特异性。

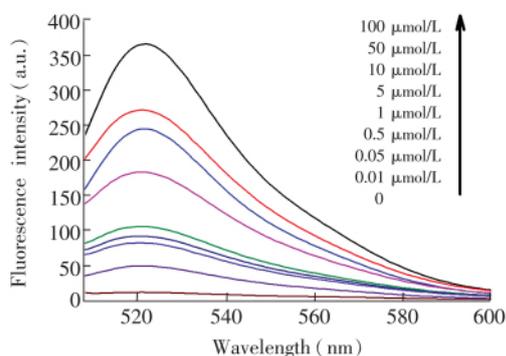


图 3 胰岛素的荧光信号曲线

Fig.3 Fluorescent signal curve of insulin

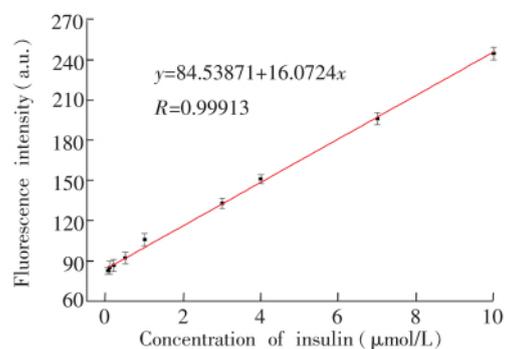


图 4 胰岛素的浓度与荧光强度的关系曲线

Fig.4 Calibration curve of insulin concentration and fluorescence intensity

### 3.6 实际样品的分析

INS 加入到正常人的血清中,再加工作液,配制成为不同浓度的待测液,采用本方法测其荧光强度(表 1)。结果表明,本方法的测定结果与实际样品误差很小,每个浓度的样品平行测定 5 次,相对标准偏差小于 5%,说明本方法具有良好的准确度和精密度。

表 1 实际样品中胰岛素的测定结果

Table 1 Determination results of insulin in real samples

浓度 Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	荧光强度平均值 Average value of fluorescence intensity (a.u.)	与标准曲线的偏差 Deviations with standard curve ( $n=5$ )
10	240.8	4.4
5	163.9	1.0
1	98.71	1.9
0.5	97.12	4.5
0.2	87.19	0.6
0.1	87.15	1.0

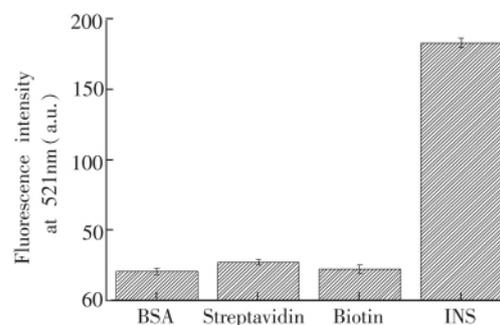


图 5 胰岛素对照组的荧光信号强度(5  $\mu\text{mol/L}$ )

Fig.5 Fluorescent signal intensity of insulin in control group

牛血清蛋白(BSA),链霉亲和素(Streptavidin),生物素(Biotin) 检测发射波长(Detected wavelength) 521 nm。

## 4 结论

将能够与 INS 特异性结合的单链 DNA 与 GO 结合 构建了对 INS 有特异性的荧光适体传感器。根据缓冲液中 INS 加入前后荧光强度的变化 测定 INS 浓度 建立了一种快速检测 INS 的方法。本方法具有选择性好、方法简单、检测速度快、检出限低等优点。在此实验基础上 通过对实验条件的优化或更换淬灭效果更好的淬灭剂 能获取更好的实验结果。若条件允许 预测此方法在检测其它蛋白质分子方面具有良好的应用前景。

## References

- 1 Scully T. *Nature* , **2012** , 485( 5) : S2-S3
- 2 Taghdisiab S M , Daneshd N M. *Anal. Lett.* , **2015** , 48: 672-681
- 3 Serafín V , Agüí , P L. Yáñez-Sedeño. *Biosens. Bioelectron.* , **2014** , ( 52) : 98-104
- 4 Yilmaz B , Kadioglu Y , Capoglu I. *J. Chromatogr. Sci.* , **2012** , 00: 1-5
- 5 Jaafarisl M , Shams E , Amini M K. *Electrochim. Acta* , **2011** , 56 , 4390-4395
- 6 Amini N , Gholivand M B , Shamsipur M. *J. Electroanal. Chem.* , **2014** , 714-715: 70-75
- 7 Rafiee B , Fakhari A R. *Biosens. Bioelectron.* , **2013** , ( 46) : 130-135
- 8 Ensafi A A , Khoddami E , Rezaei B , Jafari-Asl M. *Microchimica Acta* , **2015** , 182: 1599-1607
- 9 ZHANG Yun-Huai , DONG Xi-Zhe , XIAO Peng. *Chinese Journal of Applied Chemistry* , **2012** , 29( 8) : 948-953  
张云怀 ,董西哲 ,肖鹏. *应用化学* , **2012** , 29( 8) : 948-953
- 10 YuY N , Guo M S Yuan M , Liu W T , Hu J B. *Biosens. Bioelectron.* , **2016** , 77: 215-219
- 11 Xu M Y , Luo X L , Davis J J. *Biosens. Bioelectron.* , **2013** , 39: 21-25
- 12 Luo X L , Xu M Y , Freeman C. *Anal. Chem.* , **2013** , 85: 4129-4134
- 13 Gerasimov J Y , Schaefer C S. *Biosens. Bioelectron.* , **2013** , 42: 62-68
- 14 WangY H , Gao D Y , Zhang P F , Gong P , Chen C. *Chem. Commun.* , **2014** , 50: 811-813
- 15 Verdian-Doghaei A , Housaindokht M R. *J. Lumin.* , **2015** , ( 159) : 1-8
- 16 Pu Y , Zhu Z , Han D , Liu H X , Liu J , Liao J. *Analyst* , **2011** , 136: 4138-4140
- 17 WANG Kun , TAO Zhan-Hui , XU Lei , LIU Ya-Qing. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2013** , 42( 2) : 298-304  
王昆 ,陶占辉 ,徐蕾 ,刘亚青. *分析化学* , **2014** , 42( 2) : 298-304
- 18 YANG Shao-Ming , LI Rui-Qin , LI Hong , CHEN Yan-Sheng , DING Su-You. *Journal of Instrumental Analysis* , **2015** , 34( 4) : 395-400  
杨绍明 ,李瑞琴 ,李红 ,陈延胜 ,丁素游. *分析测试学报* , 2015 , 34( 4) : 395-400
- 19 YUAN Tao , LIU Zhong-Yuan , HU Lian-Zhe , Xu Bao-Guo. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2011** , 39( 7) : 972-977  
袁涛 ,刘中原 ,胡连哲 ,徐国宝. *分析化学* , **2011** , 39( 7) : 972-977
- 20 Yoshidaa W , Mochizukia E , Takasea M. *Biosens. Bioelectron.* , **2009** , ( 24) : 1116-1120
- 21 Xu K , Meshik X , Nichols B M , Zakar E , Dutta M. *Nanotechnology.* , **2014** , 25: 1-8
- 22 GAO Yuan , LI Yan , SU Xing-Guang. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2013** , 41( 2) : 174-180  
高原 ,李艳 ,苏星光. *分析化学* , **2013** , 41( 2) : 174-180
- 23 HUANG He-Zhou , HE Yun-Qiu , LI Wen-You , CHU Xiao-Fei , LI Yi-Ming , CHEN Hui-Min , LIU De-Yu. *Chinese Journal of Luminescence* , **2014** , 35( 2) : 142-148  
黄河洲 ,贺蕴秋 ,李文有 ,储晓菲 ,李一鸣 ,陈慧敏 ,刘德宇. *发光学报* , **2014** , 35( 2) : 142-148
- 24 DONG Hao , ZHAO Xiao-Hui , QU Liang-Dong , CHI Xue-Fen. *Chinese Journal of Luminescence* , **2014** , 35( 7) : 767-771  
董浩 ,赵晓晖 ,曲良东 ,迟学芬. *发光学报* , **2014** , 35( 7) : 767-771

