DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.150534

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 5×10⁻⁸~1×10⁻⁵ 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) 是胰脏中胰岛 B(β) 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^[12]。胰岛素的检测方法包括免疫分析法^[3]、色谱法^[4],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^[5-13]和荧光分 析法^[14-16]。

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^[17~20]。Seyed 等^[2]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^[15]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^[16]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 μmol/L。氧化石墨烯可与 DNA 碱基发生强烈的 π-π 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^[21-24]。

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: jiangliying@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,



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)。

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。

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。 60r

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。

缓冲溶液的浓度可以影响核酸适体的荧光强

3.3 缓冲液浓度对荧光强度的影响







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.

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 + 16.0724*x*,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 μmol/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

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 ,配制成不同浓度的待测液 ,采用本方法测其荧光强度

图 4

fluorescence intensity

(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 (µmol/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 μmol/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。



胰岛素的浓度与荧光强度的关系曲线

Fig.4 Calibration curve of insulin concentration and

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 , Daneshed N M. Anal. Lett. , 2015 , 48: 672-681
- 3 Serafín V, Agüí, PL. Yáñez-Sedeño. Biosens. Bioelectron., 2014, (52): 98-104
- 4 Yilmaz B , Kadioglu Y , Capoglu I. J. Chromatogr. Sci. , 2012 , 00: 1-5
- 5 Jaafariasl 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
- 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

An Aptamer-based Fluorescence Biosensor for Insulin Detection Based on Graphene Oxide

JIANG Li-Ying^{*}, XIAO Xiao-Nan, ZHOU Peng-Lei, ZHANG Pei, YAN Yan-Xia, JIANG Su-Xia, CHEN Qing-Hua (*Zhengzhou University of Light Industry*, *Institute of Electrical and Information Engineering*, *Zhengzhou* 450002 China)

Abstract By using fluorophore (FAM) labeled aptamers as recognition elements and graphene oxide as a quencher , a highly selective and sensitive sensor was constructed for the fast and accurate detection of insulin. After the aptamer binding with graphene oxide , fluorescence will be quenched and fluorescence intensity disappeared; after addition of insulin , the solution fluorescence was restored. Based on the fact , we established a method for the determination of insulin concentration by measuring the fluorescence intensity. The results showed that the concentration of insulin in the range of $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-5}$ mol/L had a good linear relationship with the fluorescence intensity. The detection limit was 10 nmol/L. This method of detecting insulin had obvious advantages of fast detection speed , high selectivity and low detection limit.

Keywords Fluorophore; Aptamer; Graphene oxide; Fluorescence aptamer biosensor; Insulin

(Received 3 July 2015; accepted 13 November 2015) This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 61002007)

2012~2013年度《分析化学》优秀论文奖公布

为了推动我国科技事业的发展,展现当前我国分析化学的研究成果,《分析化学》根据 SCI 收录情况及被引情况,评选出 2012~2013 年度优秀论文 5 篇 年度最佳综述 1 篇。

本刊将优秀论文的评选作为例行工作,已连续开展了9年。旨在鼓励学者在本刊发表创新性强的研究成果,推动中 文科技期刊的快速健康发展。

优秀论文:

单位:光电信息与传感技术广东普通高校重点实验室(暨南大学)

潘 涛,吴振涛,陈华舟.土壤总氮近红外光谱分析的波段优选.分析化学,2012,40(6):920-924 单位:中国科学院烟台海岸带研究所

梁荣宁,高奇,秦伟.分子印迹电位型传感器快速检测猪尿液中的克伦特罗.分析化学,**2012**,40(3):354-358 单位:东华大学环境科学与工程学院

谭小旺,魏瑞萍,宋燕西,易谷洋.三相中空纤维膜液相微萃取-高效液相色谱法测定水中痕量双酚 A. 分析化学, 2012,40(9):1409-1414

单位: 南京大学环境学院

严小菊,何欢,彭英,王晓萌,高占啟,杨绍贵,孙成.固相萃取-气相色谱质谱法检测水体中典型有机磷酸酯阻燃剂.分析化学,2012,40(11):1693-1697

单位: 中山大学化学与化学工程学院

许志刚,杜卓,胡玉玲,胡玉斐,潘英朋,李攻科.甲氧苄啶分子印迹涂层搅拌棒在复杂样品痕量甲氧苄啶和磺胺 药物分析中的应用.分析化学,2012,40(7):1002-1010

年度最佳综述:

单位: 浙江大学生物系统工程与食品科学学院

王一娴,叶尊忠,斯城燕,应义斌.适配体生物传感器在病原微生物检测中的应用.分析化学,2012,40(4): 634-642