

适配体修饰金硒纳米合金共振散射光谱法检测痕量 Hg^{2+}

蒋治良, 张 轶, 覃惠敏, 周莲平, 梁爱惠, 王鹏飞, 欧阳辉祥

广西师范大学环境与资源学院, 珍稀濒危动植物生态与环境保护部共建教育部重点实验室, 广西 桂林 541000

摘 要 用硼氢化钠还原法制备了金硒(AuSe)纳米合金。用单链核酸适配体(aptamer)修饰 AuSe 纳米合金制备了汞离子的核酸适配体纳米探针(Aptar AuSe)。在 pH 6.8 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲溶液中及 NaCl 存在下, Aptar AuSe 纳米探针亦不聚集; 当 Hg^{2+} 存在时, 它可以稳定 aptamer 序列中的 T-T 错配, 形成较稳定的双链 T- Hg^{2+} -T 错配物, 从而使释放出来的 AuSe 纳米合金聚集形成较大的微粒, 导致 590 nm 处共振散射峰增强。 Hg^{2+} 浓度在 $1.3 \sim 1.466 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与共振散射光强度呈良好线性关系, 其回归方程和检出限分别为 $\Delta I_{590 \text{ nm}} = 0.603c + 2.0$ 和 $0.74 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该方法用于水样中 Hg^{2+} 的检测, 结果满意。

关键词 汞离子; 核酸适配体; 金硒纳米合金; 共振散射光谱法

中图分类号: O657.6

文献标识码: A

DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)05-1371-04

引 言

汞是众所周知的环境污染物, 它的检测意义重大^[1,2]。汞的检测方法有原子吸收光谱、原子发射光谱、感应耦合等离子体质谱、冷蒸气原子荧光光谱, 以及光学^[3]、分子探针^[4]和电化学^[5]等方法。核酸适配体(aptamer)是通过指数富集配体系统进化技术, 从大容量的寡核苷酸库中筛选出对靶分子结合具有高特异性和结合性的核酸片段。一些基于 aptamer 反应的分析方法应运而生^[6,9]。共振散射光谱技术具有简便、灵敏的特点, 已用于蛋白质、核酸、无机离子等的分析^[10-14], 结合纳米金的特性, 在纳米分析领域也得到应用^[15,16]。由于金的价格较高, 因此很有必要制备和应用较价廉的纳米合金。硒是一种价廉的元素, 但液相的纳米硒不稳定。本文利用适配体修饰稳定的金硒纳米合金制备了检测 Hg^{2+} 的共振散射光谱探针, 并用于水样中 Hg^{2+} 的检测, 与纳米金比较, 线性范围较宽、灵敏度更高, 效果更好。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Cary Eclipse 型荧光分光光度计(美国 Varian 公司); 791 磁力加热搅拌器(江苏中大仪器厂); SYZ-550 型石英亚沸蒸馏水器(江苏晶玻仪器厂); 纳米粒度与 zeta 电位分析仪(nanoparticle & zeta potential analyzer)(英国 Malvern 公

司); FEI Quanta 200 FEG 型扫描电镜(荷兰)。HAuCl₄·4H₂O(国药集团化学试剂公司); 探针 DNA(aptamer)(北京三博远志生物技术有限责任公司), 其序列如下: 5'-TTTCTTCTTTCTTCCCCCTTGTTTGTGTGTTT-3'; 0.20 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 与 0.20 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄ 储备液用于配制不同 pH 值的缓冲溶液; 2.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液; 0.2 mol·L⁻¹ K₂CO₃; 1.00×10⁻⁴ 和 1.00×10⁻⁶ mol·L⁻¹ Hg^{2+} 溶液; 0.5 mg·mL⁻¹ NaBH₄ 溶液, 2.9×10⁻² mol·L⁻¹ 二氧化硒(SeO₂)溶液。所用试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 金硒纳米合金的制备

取 40 mL 水于 50 mL 锥形瓶, 搅拌的同时加入 0.50 mL 2.4×10⁻² mol·L⁻¹ 氯金酸溶液, 25 μL 2.9×10⁻² mol·L⁻¹ SeO₂ 溶液; 0.2 mL 0.2 mol·L⁻¹ K₂CO₃, 充分混合后, 缓慢滴加 3.0 mL 0.5 mg·mL⁻¹ NaBH₄ 溶液, 溶液颜色从暗褐色变为深紫色再变成红色, 之后颜色不再改变, 继续搅拌 10 min。定容到 50 mL, 得到浓度为 58.0 μg·mL⁻¹ (以 Au 计)的纳米 AuSe 合金(Au, Se 的摩尔比为 20:1), 4℃密封保存。同法制备纳米硒。

1.3 Aptar AuSe 探针的制备

通过优化条件, 探针的制备步骤为: 在 50 mL 锥形瓶中, 加入 3.0 mL 0.17 μmol·L⁻¹ aptamer, 35.0 mL 58.0 μg·mL⁻¹ AuSe 纳米合金, 混合均匀, 室温静置 5 min, 使 aptamer 与 AuSe 微粒充分形成 Aptar AuSe, 备用。以 Au 计算, 其浓度为 53.4 μg·mL⁻¹ Aptar AuSe。

收稿日期: 2010-05-21, 修订日期: 2010-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(21075023, 20865002, 20965002), 广西自然科学基金项目(09910212)和广西水利厅项目资助

作者简介: 蒋治良, 1965 年生, 广西师范大学环境与资源学院教授, e-mail: zliang@mailbox.gxnu.edu.cn

1.4 实验方法

在 5 mL 刻度试管中, 依次加入 350 μL pH 6.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液, 350 μL 53.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Apt α AuSe, 混合均匀, 室温静置 5 min, 加入一定量 Hg^{2+} 溶液, 再加入 25 μL 2.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 定容到 1.5 mL。用荧光分光光度计 $\text{volt} = 500 \text{ V}$, $\text{excited slit} = \text{emission slit} = 5 \text{ nm}$, $\text{emission filter} = 1\% \text{ T attenuator}$, 激发波长等于发射波长 ($\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}} = \Delta\lambda = 0$) 条件下同步扫描获得共振散射光谱。测量溶液 590 nm 波长处的共振散射光强度 $I_{590 \text{ nm}}$, 以不加 Hg^{2+} 的溶液做试剂空白, 并测定共振散射峰值 ($I_{590 \text{ nm}})_0$, 计算 $\Delta I = I_{590 \text{ nm}} - (I_{590 \text{ nm}})_0$ 值。

2 结果与讨论

金硒纳米合金与适体结合形成 Apt α AuSe 探针后, NaCl 不能使之聚集[图 1(a)], 平均粒径为 20 nm; 当加入 Hg^{2+} 时, 汞离子与探针中的适体形成双链结构, 释放出 AuSe 纳米合金, 在 NaCl 存在时发生聚集[图 1(b)] 形成粒径较大的颗粒, 导致共振散射信号增强。随着汞离子浓度增大, 共振散射信号线性增大, 据此可测定汞离子的含量。

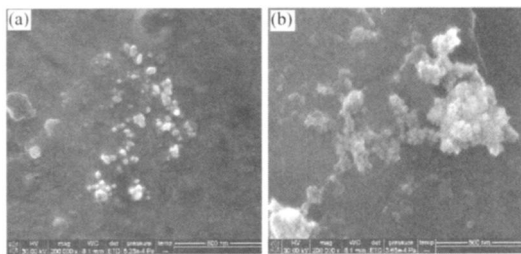


Fig 1 SEM of AuSeDNA particles

2.1 共振散射光谱

在 pH 6.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中和 0.033 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 存在时, aptamer 能与 AuSe 纳米微粒结合形成较稳定的 Apt α AuSe 复合物, 其散射信号较弱(图 2a)。当溶液中存在 Hg^{2+} 时, Hg^{2+} 与 aptamer 形成非常稳定的双链 T-T 错配复合物, 从而使 Apt α AuSe 中的纳米 AuSe 析出并聚集形成较大微粒, 溶液颜色由红变蓝, 使体系共振散射强度增大。图 2b—图 2f 表明, Apt α AuSe Hg^{2+} 体系在 590 nm 处有一最强的散射峰, 在 440 和 730 nm 处均有一个不明显的散射峰。由于金纳米微粒及其聚集体在 550 nm 处有一个共振散射光峰, 与其相似, 590 nm 处的散射峰是由金硒纳米合金微粒及其聚集体产生的共振散射峰。 Hg^{2+} 浓度越高, AuSe 纳米微粒聚集越多, 该共振散射峰线性增强。本文选择 590 nm 检测 Hg^{2+} 。

2.2 条件优化

实验考察了 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液对体系 ΔI 的影响。当 pH 为 6.8 时及缓冲溶液用量为 350 μL (5.33 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, ΔI 达到最大值, 本文选择加入 350 μL pH 6.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液。探针浓度对 ΔI 值的影响表明, 当 Apt α AuSe 浓度为 13.528 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, ΔI 有最大值, 本文选择 13.528 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Apt α AuSe。NaCl 是金纳米

微粒的良好聚集剂, 亦是金硒纳米合金的较好聚集剂。实验表明, 在 0~0.033 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, ΔI 随 NaCl 浓度的增大而增大, 当体系中 NaCl 溶液浓度为 0.033 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系 ΔI 最大, 本文选用 0.033 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl。

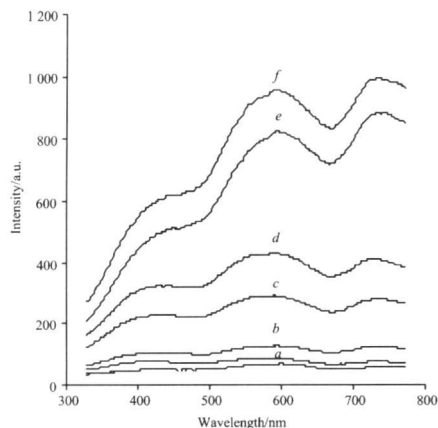


Fig 2 Resonance scattering spectra of Apt α AuSe Hg^{2+}

a: 13.528 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Apt α AuSe pH 6.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 0.033 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; b: α 40 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg^{2+} ; c: α 333 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg^{2+} ; d: α 666 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg^{2+} ; e: α 1200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg^{2+} ; f: α 1466 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg^{2+}

2.3 共存离子的影响

考察了共存离子对测定 333 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg^{2+} 的干扰情况, 当相对误差在 $\pm 7\%$ 以内, 11.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mn^{2+} , 23 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Li^+ , 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ni^{2+} , 3.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Al^{3+} , 2.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pb^{2+} , 2.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} , Cu^{2+} , 2.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Co^{2+} , 1.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe^{2+} , 0.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sn^{2+} 常见的重金属离子不干扰测定。该法具有较好的选择性, 这是由于核酸适配体反应具有较高的选择性所致。

2.4 工作曲线

考察了金纳米粒子以及三种不同摩尔比的金、硒纳米合金 (20:4, 20:1, 20:0.4) 体系测定 Hg^{2+} 的分析特性。由表 1 可看出, 金硒摩尔比为 20:1 体系的测定范围较宽, 灵敏度也较高。该体系 Hg^{2+} 浓度在 1.3~1466 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与共振散射光强度呈良好的线性关系, 其回归方程为 $\Delta I_{590 \text{ nm}} = 0.603c + 2.0$, 相关系数为 0.9958, 检出限为 0.74 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与已报道汞离子分析方法比较^[9, 17, 18], 本法的灵敏度较高, 线性范围较宽, 简便快速, 成本低廉。

2.5 水样的测定

取一定体积水样, 过滤处理后, 取适量再加入一定量的 Hg^{2+} , 按实验方法测定汞离子含量(表 2), 相对标准偏差 (RSD) 在 5% 左右。

3 结 语

Hg^{2+} 可稳定 ssDNA 序列中的 T-T 错配结构, 使探针中的金硒纳米合金释放出来, 在 NaCl 作用下聚集形成较大粒径的纳米合金簇, 此后将特异性高的适体反应与 Apt α AuSe 探针催化反应和共振散射光谱技术结合, 建立适体修饰纳米

合金催化共振散射光谱法测定 Hg^{2+} 的新方法。该法具有较 高的灵敏度、高选择性、方法简 便快速等优点。

Table 1 Analytical features for the gold nanoparticles and AuSe systems

System s	Regress equation	Linear range /(nmol•L ⁻¹)	Coefficient	Detection limit /(nmol•L ⁻¹)
Au	$\Delta I_{590\text{ nm}}=0.504c+6.7$	33.3~1333	0.9911	3.8
AuSe(20:4)	$\Delta I_{590\text{ nm}}=0.584c-6.0$	33.3~1333	0.9915	1.6
AuSe(20:1)	$\Delta I_{590\text{ nm}}=0.603c+2.0$	1.3~1466	0.9958	0.74
AuSe(20:0.4)	$\Delta I_{590\text{ nm}}=0.582c-4.1$	33.3~1000	0.9908	0.56

Table 2 Results of water samples

Sample	Found/(nmol•L ⁻¹)	Average /(nmol•L ⁻¹)	Added Hg^{2+} /(nmol•L ⁻¹)	Recovety/%	RSD/%
1	931, 944, 953, 989, 994	962.2	1000	95	2.9
2	40.2, 42.3, 43.4, 40.6, 39.6	41.2	40	93	3.6

References

[1] Sekowski J W, Malkas L H, Wei Y T, et al. Toxicol. Appl. Pharm., 1997, 145: 268.
[2] Coester C J. Anal. Chem., 2005, 77: 3807.
[3] Yang Y K, Yook K J, Tae J. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127: 16760.
[4] Huang C C, Yang Z, Lee K H, et al. Angew Chem Int Ed., 2007, 46: 6824.
[5] Xu X H, Thundat T G, Brown G M, et al. Anal. Chem., 2002, 74: 3611.
[6] Cheng A K, Ge B, Yu H Z. Anal. Chem., 2007, 79: 5158.
[7] Centi S, Messina G, Tombelli S, et al. Biosens. Bioelectron., 2008, 23: 1602.
[8] Jiang Z L, Fan Y Y, Chen M L, et al. Anal. Chem., 2009, 81: 5439.
[9] Wu L P, Li Y F, Huang C Z, et al. Anal. Chem., 2006, 78: 5570.
[10] Jiang Z L, Sun S J, Liang A H, et al. Clin. Chem., 2006, 52: 1389.
[11] Long Y F, Huang C Z, Li Y F. J. Phys. Chem. B, 2007, 111: 4535.
[12] Zhan G, Zhang L, Li C. Colloid. Surface B, 2009, 71: 84.
[13] Cai H H, Yang P H, Feng J, et al. Sensor. Actuat B, 2008, 135: 603.
[14] Xu X Y, Georganopoulou D G, Hill H D, et al. Anal. Chem., 2007, 79: 6650.
[15] Jiang Z L, Liao X J, Deng A P, et al. Anal. Chem., 2008, 80: 8681.
[16] Wei X L, Zou M J, Jiang Z L, et al. Plasmonics, 2008, 3: 73.
[17] Li D, Wieckowska A, Willner I. Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47: 3927.
[18] Huang C C, Yang Z, Lee K H. Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46: 6824.

Resonance Scattering Detection of Trace Hg^{2+} Using Aptamer Modified AuSe Nanoalloy

JIANG Zhǐ liang, ZHANG Yi, QIN Huǐ min, ZHOU Liǎn ping, LIANG Aǐ hui, WANG Peng fei, OUYANG Huǐ xiǎng

Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Ministry of Education, School of Environment and Resource, Guangxi Normal University, Guilin 541000, China

Abstract Under the condition of sodium citrate as stabilizer, the gold-selenium (AuSe) nanoalloy was prepared by sodium borohydride reduction procedure, and was modified by single strand aptamer to obtain an aptamer nanoalloy probe (apt-AuSe) for $\text{Hg}(\text{II})$. In pH 6.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ buffer solution and in the presence of NaCl of $33\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, the Apt-AuSe probe is not aggregation. The apt-AuSe interacts with Hg^{2+} to form stable double strand T-Hg(II)-T mismatches and to release AuSe nanoalloy particles from the probe. The released AuSe nanoalloy particles (20:1) aggregated to form bigger clusters that resulted in the resonance scattering (RS) intensity ($I_{590\text{ nm}}$) increasing at 590 nm. The increased intensity $\Delta I_{590\text{ nm}}$ was proportional to the Hg^{2+} concentration from 1.3 to 1.466 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, with a detection limit of 0.74 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. The regression equation was $\Delta I_{590\text{ nm}} = 0.603c + 2.0$. Thus, a new resonance scattering (RS) spectroscopy of apt-AuSe was applied to the analysis of trace mercury ion. This simple, rapid, selective and sensitive aptamer AuSe nanoalloy RS assay was applied to the determination of Hg^{2+} in wastewater, with satisfactory results.

Keywords Mercury ion; Aptamer; AuSe nanoalloy; Resonance scattering spectral assay

(Received May 21, 2010; accepted Aug. 20, 2010)