

DNA 电化学传感器 用于重金属离子检测的研究

赵丽芬, 焦晨旭*

(中北大学理学院, 山西 太原 030051)

摘要:综述了常用的 DNA 修饰电极的制备方法, 简单介绍了其测定金属离子的原理。详细阐述了阴、阳离子型氧化还原指示剂在测定过程中的信号变化, 从而实现重金属离子定量分析的机理。在此基础上, 重点介绍了 DNA 电化学传感器对 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 的检测, 并对其今后的发展方向进行了展望。

关键词: DNA 修饰电极; 传感器; 重金属离子; 检测

中图分类号: O657.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2017)05-0206-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2017.05.049

Study on application of DNA electrochemical sensor for detection of heavy metal ions

ZHAO Li-fen, JIAO Chen-xu*

(School of Science, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: This paper reviews the frequently used preparation methods of DNA modified electrode and briefly introduces the principle of determining metal ion by using it. The signal changes of the anion and cationic redox indicators in the determination process are described in detail, which realizes the mechanism of heavy metal ion quantitative analysis. Based on this, the detection of Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+} and Cd^{2+} by DNA electrochemical sensor is mainly introduced and the future development trend for DNA electrochemical sensor is prospected.

Key words: DNA modified electrode; sensor; heavy metal ions; detection

重金属离子在环境中广泛分布, 但长期累积对环境造成的污染越来越严重, 通过食物链的放大作用进入人体, 在体内长期累积对人体健康有一定的危害。因此, 研究一种高效、快速、灵敏、准确、高选择性的重金属离子检测方法一直是科研人员关注的焦点。与传统的重金属离子测定方法相比, 电化学方法具有操作简单, 分析速度快, 灵敏度高等优势, 是目前最具发展前景的重金属离子检测方法之一, 尤其是电化学 DNA 生物传感器的出现, 更是成为科研人员的研究焦点。

DNA 电化学传感器早期主要是用来测定特定的核酸序列, 广泛应用于某些基因、疾病以及转基因食品的检测^[1]。近几年, 单链的寡聚核苷酸序列与离子、小分子、低聚糖、核酸、蛋白质甚至整个细胞之间都存在一定的吸引力^[2], 因此, DNA 电化学传感器也能够用来测定这些物质, 其中对重金属离子的检测是目前研究的热点。

1 DNA 修饰电极的制备

研制 DNA 电化学生物传感器的第 1 步也是最关键的一步是 DNA 修饰电极的制备, 工作电极的种

类、性质不同, 所采取的制备方式往往也不同, 而且制备效果的好坏直接影响测定结果的准确性和灵敏度。常用的工作电极主要有碳糊电极、玻碳电极、金电极和其他电极材料。目前报道的方法具体如下:

1.1 吸附法

吸附法是最常用的固定方法, 碳糊电极、玻碳电极、金电极上 DNA 的固定都可以用该方法。具体有 2 种方式: 直接吸附法和电化学富集法^[3]。

直接吸附法就是将 DNA 溶液直接滴涂到电极表面或将电极直接浸入到含有 DNA 的溶液中而将其固定在电极上。Hu 等^[4]通过疏水吸附作用将十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 固定在碳糊电极表面, 制备了 CTAB 修饰碳糊电极, 将该电极浸没在 1 mg/mL 的 dsDNA 溶液中 10 min, 然后用水冲洗电极表面移去过量的溶剂在空气中干燥。研究发现, 随着 dsDNA 的修饰, 电极表面从弱的亲水能力转变为强的亲水能力, 说明 DNA 在电极表面固定的很紧密。周娜等^[5]制备了碳纳米管 (CNTS)/Ag-TiO₂ 修饰碳糊电极, 并将该电极浸入到 ssDNA 的缓冲溶液中, 吸附 2 h 后, 先后用十二烷基硫酸钠、超纯水清洗电极表面除去未固定的 ssDNA, 制备 ssDNA/

CNTS/Ag-TiO₂ 修饰碳糊电极。

电化学富集法则利用电荷之间的静电引力将 DNA 固定到电极表面,具体为在一定电位下将 DNA 富集到电极表面。Arzum 等^[6]将碳糊电极插入到磷酸缓冲溶液中静置,施加 1.7 V 电压活化 1 min,然后在含有 dsDNA 电解质溶液中施加 0.5 V 电压吸附 5 min,制备了 DNA 修饰碳糊电极。采用微分脉冲伏安法和循环伏安法研究了亚甲基蓝与 dsDNA 和 ssDNA 之间的相互作用,结果表明,亚甲基蓝可以作为杂交指示剂识别 DNA 的结构。

1.2 共价键合法

共价键合法就是先将电极进行活化,引入各种功能活性基团,基于 DNA 与这些功能基团的共价键合作用将 DNA 修饰在电极表面。也可以在 DNA 的末端引入活性基团然后共价键合到电极表面。焦奎等^[7]将十八酸(SA)修饰的碳糊电极活化,然后将热变性所得的 ssDNA 缓冲溶液滴在活化后的电极表面。经真空干燥制得 ssDNA/SA/CPE 电极。

1.3 自组装法

DNA 在金电极上的固定常用该方法,自组装法主要利用 Au-S 键之间的键合作用将 DNA 固定在金电极上。具体有 2 种方式:在 DNA 末端接上巯基或在金电极表面形成巯基自组装单分子层。周琴等^[8]将预处理的金电极浸泡在 5'端带有巯基乙醇标记的 ssDNA 探针溶液中,室温下固定 90 min,超纯水清洗掉电极表面未固定的探针,制得单链 DNA 修饰的金电极。

1.4 聚合物膜法

聚合物膜法是利用聚合物膜实现 DNA 分子在电极上的固定。利用电化学的方法聚合导电聚合物来固定 DNA 是该方法最常用的方式。常用的导电聚合物主要有聚苯胺、聚噻吩、聚吡咯。Alves-Balve 等^[9]以石墨电极为工作电极,在 4-氨基酚的 H₂ClO₄ 溶液中进行循环伏安扫描,得到了聚氨基酚薄膜修饰的石墨电极,通过滴涂的方式将 DNA 固定在该电极上。刘引等^[10]采用循环伏安法将 0.2 mol/L 的吡咯溶液分别电聚合在经砂纸打磨过的玻碳电极和碳纤维电极上,然后在其表面固载上纳米金颗粒,将这 2 种电极分别插入到鲑鱼精 DNA 溶液中,在 1.5 V 电压下富集 30 min,制备 DNA/nano-Au/PPyox/GCE 和 DNA/nano-Au/PPyox/CFE 修饰电极。通过扫描电镜图发现纳米金的固载可以增大修饰电极的表面积,有利于 DNA 在其上的固定。

1.5 混合法

Kai Gu 等^[11]将石墨粉和 dsDNA 溶液混合,在 4℃ 下保存 4 h 后,过滤,用二次蒸馏水冲洗,修饰后的粉末在红外灯照射下干燥,填充到电极管中,制备了 DNA 修饰的碳糊电极。

2 DNA 电化学传感器测定金属离子的原理

DNA 电化学传感器是将 DNA 分子作为敏感元件固定在换能器上组成的分析器件。单链的寡聚核苷酸序列因其具有灵活性好,检测对象广泛,稳定性好,分子质量小等优点是最常用的敏感元件^[12],而换能器主要以玻碳电极、金电极、碳糊电极为主。其测定重金属离子的原理为:将重金属离子与核酸之间的特异性识别作用通过换能器转化为可观测到的电信号,从而实现重金属离子的定量检测。总体来说,金属离子可以通过以下 2 种方式与 DNA 分子相结合:直接与磷酸上的氧原子、糖环上的氧原子,以及碱基杂环上的 C、N 和 O 作用;通过金属离子的配体间接与上述原子作用^[13]。DNA 修饰电极检测重金属离子的过程中,由于自身构象变化所引起的电信号的变化是微弱的,所以需要加入一些氧化还原指示剂或在探针上修饰电化学活性基团来指示信号。

指示剂根据其所带电荷的不同可分为 2 种:阳离子型氧化还原指示剂和阴离子型氧化还原指示剂。亚甲基蓝(MB)是最常用的阳离子型氧化还原指示剂,可以与单链的 DNA 分子通过静电吸附作用相结合^[14],在 DNA 修饰电极测定重金属离子过程中作为指示剂指示电信号的变化,从而实现重金属离子的定量检测。其所依据的机理为金属离子和 MB 与 DNA 分子的竞争反应,具体表现为:亚甲基蓝在 DNA 修饰的电极表面会产生电信号,加入重金属离子溶液后,金属离子与 DNA 分子发生特异性结合,DNA 分子表面所带的负电荷减少,从而其可以结合的亚甲基蓝分子会减少,所产生的电信号相应的会减弱。基于加入重金属离子前后电信号的变化量与金属离子浓度之间的关系实现对重金属离子的定量检测。然而,阳离子型指示剂所产生的电流信号的变化是有限的,所以测定的线性范围和灵敏度相对较低。对于阴离子型指示剂其机理为:阴离子型指示剂与 DNA 分子之间存在一定的静电排斥,所以其在 DNA 修饰的电极表面所产生氧化还原电流信号相对较弱,加入重金属离子溶液后,指示剂与 DNA 分子之间的静电排斥作用减弱,指示剂更容易

接近电极表面,从而所产生的电信号会随着金属离子浓度的增大而增大。利用阴离子型指示剂,其指示信号变化空间会更大一些,所以,在检测过程中有望获得更宽的线性范围、更高的灵敏度和更低的检出限。

除此之外,一些信号放大技术也有报道,如杂交链式反应、酶催化放大信号、聚合酶链式反应、滚环扩增、重组酶聚合酶扩增、碳纳米管隧道电流效应^[15-20]等。

3 DNA 电化学传感器在重金属离子检测中的应用

DNA 修饰电极选择性地测定重金属离子主要是基于不同重金属离子与特定的核酸序列之间作用方式的不同,根据所测定的重金属离子的种类可以设计合适的 DNA 探针。目前检测过的重金属离子主要有以下几种:

3.1 DNA 修饰电极测定 Pb^{2+} 的研究进展

DNA 修饰电极测定 Pb^{2+} 主要是基于 G-四联体与 Pb^{2+} 特异性的结合作用。Marta Jarczewska 等^[21]以亚甲基蓝为指示剂,采用富含鸟嘌呤的 ssDNA 修饰的金电极为工作电极,通过方波极谱法检测了溶液中 Pb^{2+} 。检出限达到了 34.7 nmol/L。并将该方法用于真实水样中 Pb^{2+} 的检测。同时,考察了 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 等离子对测定结果的干扰,结果发现,除了 Hg^{2+} 以外,其他离子对测定结果基本没有影响。而且电化学阻抗法中, Pb^{2+} 与探针之间的作用主要是基于 G-四联体稳定结构的形成。一旦这种结构形成,探针 DNA 分子在电极表面发生折叠,从而 DNA 分子链更加靠近电极表面,电子在亚甲基蓝分子与电极表面的转移更加容易。Agnieszka Bala 等^[22]分别以 3 种不同 ssDNA 修饰的金电极为工作电极,采用差分脉冲伏安法测定了 Pb^{2+} 浓度。分别以 MB、蒽醌-2-硫酸钠盐(AQMS)为指示剂指示电流信号的变化。结果发现,利用阴离子型指示剂 AQMS 得到的检测结果更加令人满意,检出限和线性范围较阳离子型指示剂 MB 而言都有所改善,尤其是线性范围扩大了一个数量级,检出限达到了 10^{-8} mol/L。研究结果也表明,碱基序列的长度和结构对测定结果也有很大的影响,能够形成 2 个 G-四联体的核酸序列 2 得到的结果最为理想,线性范围在 $5.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 之间。

3.2 DNA 修饰电极测定 Cu^{2+} 的研究进展

铜离子与 DNA 分子之间的作用比较复杂,他既

能与 DNA 分子上的磷酸基团发生非特异性的结合,也可以与 DNA 分子中的碱基直接键合。尤其是当 DNA 链中有连续的鸟嘌呤时, Cu^{2+} 会与同一链上 2 个相邻的鸟嘌呤的 N7 和 O6 原子结合,形成 G- Cu^{2+} -G 复合物。李敏等^[23]以 Au-ssDNA-MCH(六巯基乙醇)电极为工作电极,采用差分脉冲伏安法对溶液中 Cu^{2+} 进行测定,当溶液的 pH 为 7.4, Cu^{2+} 在电极上吸附 60 min 时得到的检测结果较好。该条件下检出限为 6.4×10^{-7} mol/L。且该电极经 EDTA 溶液处理后可以循环使用。

3.3 DNA 修饰电极测定 Hg^{2+} 的研究进展

DNA 修饰电极测定 Hg^{2+} 主要是基于 Hg^{2+} 能够与 DNA 分子中的 T 碱基发生较强的特异性结合,形成 T- Hg^{2+} -T 发卡结构。这种作用比 A 碱基与 T 碱基之间的氢键作用力还要强,基于此,可以高选择性、高灵敏性地测定 Hg^{2+} 。戈芳等^[24]将修饰有二茂铁基团且富含 T 碱基的 DNA 序列通过自组装法固定在金电极表面,制备了 DNA 修饰的金电极。采用示差脉冲伏安法检测了溶液中 Hg^{2+} 的浓度,该方法对 Hg^{2+} 的检出限为 0.1 nmol/L,线性范围在 0.1 ~ 1 nmol/L。除了 Cu^{2+} ,其他的金属离子 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 等对 Hg^{2+} 的测定没有干扰。Liu 等^[25]制备了氧化石墨烯修饰金电极,将亚甲基蓝标记的聚胸腺嘧啶单链 DNA 滴涂在功能化的金电极上,制备了一种新型的 DNA 修饰电极。将该电极插入到含核酸内切酶的 Hg^{2+} 缓冲溶液中,采用差分脉冲伏安法成功检测了样液中 Hg^{2+} 的浓度。实验过程中,基于核酸内切酶能够使 Hg^{2+} 从 Hg^{2+} 与探针链形成的配合物 T- Hg^{2+} -T 中释放出来,再次与固定在氧化石墨烯纳米薄膜上的聚胸腺嘧啶单链 DNA 分子结合,诱发 Hg^{2+} 的循环利用,实现响应电流信号的放大。基于此,该方法获得了较低的检出限,达到了 0.12 nmol/L。此外,进一步探索了亚甲基蓝修饰 DNA 链的浓度、反应时间、pH 等对测定结果的影响,并确定了最佳实验条件。

3.4 DNA 修饰电极测定 Ag^{+} 的研究进展

DNA 修饰电极测定 Ag^{+} 主要是基于 Ag^{+} 可以与寡聚核苷酸序列中的 C 碱基发生特异性结合,形成 C- Ag^{+} -C 配合物。刘光鹏等^[26]制备了一种阻抗型的 DNA 传感器,采用杂交链式反应技术形成卟啉铁/G-四分体纳米线来放大反应信号,成功检测了环境水样中的 Ag^{+} ,回收率在 90.1% ~ 108.0% 之间。制备的该传感器稳定性好,抗干扰能力强,对 Ag^{+} 的检出限达到了 0.05 nmol/L。具体过程为:

溶液中的目标物 Ag^+ 会与固载在纳米金薄膜修饰玻碳电极上的捕获 DNA 链和溶液中的引物 DNA 产生碱基错配形成 $\text{C-Ag}^+-\text{C}$ 复合物,从而将引物 DNA 成功地修饰在电极表面。随后将富含鸟嘌呤的 2 条辅助单链和卟啉铁同时滴涂到上述电极表面进行杂交链式反应,形成卟啉铁/G-四分体纳米线,阻碍电子的传递,从而获得了较强的电化学信号,实现对 Ag^+ 的定量分析。

3.5 DNA 修饰电极测定 Cd^{2+} 的研究进展

DNA 修饰电极测定 Cd^{2+} 主要是基于 Cd^{2+} 与 DNA 分子中的嘌呤碱基之间的螯合作用^[27]。Jialin Qu 等^[28] 研制了一种新型的 DNA 电化学传感器,该传感器能够快速、选择性地检测混合液中的 Cd^{2+} 。最佳条件下检出限达到了 0.3 ng/L。

4 展望

DNA 电化学生物传感器是分析化学与分子生物学相结合的产物,其在重金属离子检测方面展现出许多优势,特别是其高的灵敏度、强的选择性、好的抗干扰能力方面。然而,基于现在的技术水平能够检测的重金属离子的种类是有限的,因此,在今后的研究过程中,要不断开发新的技术来揭示金属离子与核酸分子之间相互作用的本质,不断扩宽其测定范围。实现多金属离子的同时检测也是今后努力的目标。除此之外,要不断开发新的指示剂,提高检测的灵敏度,获得更低的检出限;要优化传感器的设计,开发新的电极材料,增加电极的使用寿命,实现电极的重复利用;开发更加简单的方法来构建 DNA 电化学传感器,实现其微型化与自动化,使之更好地用于实际样品的检测。

参考文献

[1] Sassolas A, Leca-Bouvier B D, Blum L J. DNA biosensors and microarrays[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(1): 109 - 139.

[2] Song S, Wang L, Li J, *et al.* Aptamer-based biosensors[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(2): 108 - 117.

[3] 常竹. 基于纳米材料和新型 DNA 电化学生物传感器的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008.

[4] Hu C, Hu S. Electrochemical characterization of cetyltrimethyl ammonium bromide modified carbon paste electrode and the application in the immobilization of DNA[J]. *Electrochimica Acta*, 2004, 49(3): 405 - 412.

[5] 周娜, 杨涛, 焦奎, 等. 多壁碳纳米管/纳米 Ag-TiO_2 膜 DNA 电化学生物传感器[J]. *分析化学研究报告*, 2010, 38(3): 301 - 306.

[6] Erdem A, Kerman K, Meric B, *et al.* Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator[J]. *Electroanalysis*, 2001, 13(3): 219 - 223.

[7] 焦奎, 张旭志, 徐桂云, 等. ssDNA/十八酸修饰碳糊电极的制备及伏安法表征[J]. *化学学报*, 2005, 63(12): 1100 - 1104.

[8] 周琴, 滕涑洁, 赵红莉, 等. 微囊藻属 DNA 电化学传感器的研制[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(11): 1229 - 1233.

[9] Alves-Balvedi R P, Caetano L P, Maduro J M, *et al.* Use of 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 85: 226 - 231.

[10] 刘引. 拟除虫菊酯农药与 DNA 作用及其电化学传感器研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2010.

[11] Gu K, Zhu J, Zhu Y, *et al.* Voltammetric determination of mifepristone at a DNA-modified carbon paste electrode[J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 368(8): 832 - 835.

[12] Kim Y S, Lee S J, Gu M B. Electrochemical aptamer-based biosensors[J]. *Biochip Journal*, 2008, 2(3): 175 - 182.

[13] 王新莹, 纪鸣, 李志果, 等. 金属离子与 DNA 相互作用的研究进展[J]. *分析科学学报*, 2005, 21(5): 557 - 562.

[14] 雷丽红, 傅迎春, 徐霞红, 等. 基于核酸适体的电化学生物传感器[J]. *化学进展*, 2009, 21(4): 724 - 731.

[15] Liu P, Yang X, Sun S, *et al.* Enzyme-free colorimetric detection of DNA by using gold nanoparticles and hybridization chain reaction amplification[J]. *Analytical*, 2013, 85(16): 7689 - 7695.

[16] 白丽娟, 袁若. 信号放大策略在电化学适体传感器中的应用进展[J]. *化学传感器*, 2004, 34(3): 1 - 12.

[17] Lin X, Sun X, Luo S, *et al.* Development of DNA-based signal amplification and microfluidic technology for protein assay: A review[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 80: 132 - 148.

[18] Stougaard M, Juul S, Andersen F F, *et al.* Strategies for highly sensitive biomarker detection by rolling circle amplification of signals from nucleic acid composed sensors[J]. *Integrative Biology*, 2011, 3(10): 982 - 992.

[19] Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro L A, Morais S, *et al.* One-pot isothermal DNA amplification-hybridisation and detection by a disc-based method[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 204: 273 - 281.

[20] 唐阿曼. 新型 DNA 修饰电极用于重金属离子的电化学检测[D]. 长沙: 湖南大学, 2011.

[21] Jarczewska M, Kierzkowska E, Ziolkowski R, *et al.* Electrochemical oligonucleotide-based biosensor for the determination of lead ion[J]. *Bioelectrochemistry*, 2015, 101: 35 - 41.

[22] Bala A, Pietrzak M, Górski Ł, *et al.* Electrochemical determination of lead ion with DNA oligonucleotide-based biosensor using anionic redox marker[J]. *Electrochimica Acta*, 2015, 180: 763 - 769.

[23] 李敏, 孔慧芳, 郭智慧. 基于铜离子与 DNA 相互作用的铜离子检测[J]. *高等学校化学学报*, 2016, 37(7): 1269 - 1275.

[24] 戈芳, 曹瑞国, 朱斌, 等. 检测痕量 Hg^{2+} 的 DNA 电化学生物传感器[J]. *物理化学学报*, 2010, 26(7): 1779 - 1783.

[25] Lu M, Xiao R, Zhang X, *et al.* Novel electrochemical sensing platform for quantitative monitoring of Hg(II) on DNA-assembled graphene oxide with target recycling[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 85: 267 - 271.

[26] 刘光鹏. 基于 DNA 扩增信号放大检测环境重金属离子适体生物传感器研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.

[27] Qu J, Wu L, Liu H, *et al.* A novel electrochemical biosensor based on DNA for rapid and selective detection of cadmium[J]. *Int J Electrochem Sci*, 2015, 10: 4020 - 4028.

[28] Wong E L S, Chow E, Gooding J J. The electrochemical detection of cadmium using surface-immobilized DNA[J]. *Electrochemistry Communications*, 2007, 9(4): 845 - 849. ■