DOI:10.13652/j.issn.1003－5788.2018.06.008

基于核酸适配体的镉离子可视化检测方法

Aptamer-based colorimetric detection of Cd^{2+}

赵　旭[1,2]　吴世嘉[1,2]　乐　琳[1,2]　王周平[1,2,3]

ZHAO Xu[1,2]　*WU Shi-jia*[1,2]　*YUE Lin*[1,2]　*WANG Zhou-ping*[1,2,3]

(1. 江南大学食品国家重点实验室,江苏 无锡　214122;2. 江南大学食品学院,江苏 无锡　214122;
3. 江南大学国际食品安全联合实验室,江苏 无锡　214122)

(1. *State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu* 214122, *China*;
2. *School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu* 214122, *China*;
3. *International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu* 214122, *China*)

摘要:利用适配体对镉离子的特异性识别作用,以镉离子适配体及互补链为生物识别单元,建立基于核酸适配体的镉离子可视化检测方法,实现对自来水中镉离子痕量检测。该方法将镉离子适配体固定在微孔板上,再与适配体互补链及辣根过氧化物酶(HRP)复合物进行竞争性结合,通过 HRP 对底物的催化水解反应引起 450 nm 处特征峰的变化来定量检测镉离子。结果表明:该检测体系在 0.1～5.0 ng/mL 时具有线性关系(R^2=0.995 8),检测限低至0.5 ng/mL。该方法选择性良好、操作简单、灵敏度高,并且具有较好的实用性,可用于食品安全分析和环境监测中金属离子镉的检测。

关键词:适配体;辣根过氧化物酶;镉;可视化检测

Abstract: In this study, we presented a simple, rapid and sensitive colorimetric assay for the detection of cadmium (Cd) based on enzyme-linked oligonucleotides. The specific binding of aptamer to Cd^{2+} led to the decrease of horseradish peroxidase(HRP) on the microtiter plate, since HRP could not be bind onto through the hybridization of the aptamer and complementary DNA strand. It resulted in the change of characteristic peaks at 450 nm, helping to quantitatively detect Cd^{2+}. Under the optimal conditions, the detection limit could be as low as 0.05 ng/mL, and the linear response for Cd^{2+} in a concentration range from 0.1 to 5 ng/mL(S/N=3). This method was simple and rapid, resulting in high sensitivity and specificity, and could be used in food safety analysis and environment monitoring.

Keywords: aptamer; Horseradish Peroxidase; cadmium; colorimetric detection

镉(Cd)元素是一种生物蓄积性强、毒性持久、具有“三致”作用的剧毒元素,摄入过量的镉对生物体的危害极其严重,会导致肾脏、肝脏、肺部、骨骼、生殖器官损伤,对免疫系统、心血管系统等具有毒性效应,进而引发多种疾病[1]。镉移动性强,难以生物降解,极易通过食物链进入人体,引起人体机能衰退,长期接触会引起癌症。目前,中国镉污染形势严峻,镉污染事件频发,严重影响了居民的正常生活和身体健康[2-3]。做好食品中镉的分析检测工作,对保护人体健康具有重要意义。

目前,比较成熟的重金属离子检测方法主要有原子吸收法(AAS)[4]、双硫腙分光光度法[5]、催化示波极谱法[6-7]、原子荧光法(AFS)、电感耦合等离子体原子发射法(ICP-AES)[8]、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)[9]等。这些方法都能够提供较高的检测灵敏度、较好的选择性以及准确的检测结果,但是普遍缺点是仪器价格昂贵、体积大,检测时间长,并且样品预处理步骤复杂、时间长、易受污染。近年来,一些依赖于纳米材料或核酸适配体的新型检测技术也常被用于简单、快速地定量检测重金属离子,主要包括电化学分析法[10-11]、荧光法[12-13]、化学发光法[14]、比色分析法[15-16]等。

核酸适配体是一段具有三维空间结构的单链 DNA 或 RNA,它可以与靶标发生特异性结合。因此,在构建检测方法时,适配体可以被用作一种优良的分子识别元件[17]。由于适配体是在体外设计和筛选的,原则上任何靶标都可以有它对应的适配体,而且适配体在信号传导和化学修饰方面具有更加优良的特性[18-19],因此应用了适配体技术的检测方法往往具有更高的灵敏度。

基金项目:国家科技支撑计划项目(编号:2015BAD17B02);江苏省重点研发(社会发展)项目(编号:BE2017623)

作者简介:赵旭,女,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:王周平(1974—),男,江南大学教授,博士。
E-mail: wangzp@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2018-01-07

到目前为止相较于其他重金属,有关重金属镉基于适配体识别的检测方法的研究报道很少,仅有 3 篇[14,20-21],但这些检查方法对现场快速检测的实际应用价值不高。本研究拟利用适配体与目标物结合的高特异性,建立一种基于酶联适配体的镉离子可视化检测方法,以实现对镉离子的快速灵敏检测,提高方法的实用性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

氯化钠、牛血清白蛋白(BSA)、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

DNA:上海生工生物工程技术服务有限公司;

亲和素:化学纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;

链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶(HRP-Streptavidin):250 U/mg,美国 Sigma-Aldrich 公司;

3,3′,5,5′-四甲基联苯胺溶液(TMB):上海生工生物工程有限公司;

0.2 mm 注射器过滤器:天津东康科技有限公司;

镉离子标准液:100 μg/mL,1% HNO_3,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

透明 96 孔微孔板:每孔 300 μL,美国 Corning 公司;

超纯水:18.2 mΩ,由美国 Millipore 净水系统制备。

1.1.2 主要仪器设备

紫外-可见光(UV-vis)分光光度计:Shimadzu UV-2300 型,日本岛津公司;

酶标仪:BioTek Synergyh1 型,美国 BioTek 公司;

电热鼓风干燥箱:DHG-9145A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

微量分析天平:AR224CN 型,奥豪斯仪器中国有限公司;

实验室 pH 计:Starter 3C 型,奥豪斯仪器中国有限公司;

超纯水仪:Direct-Q3 型,密理博中国有限公司;

超声波清洗仪:KQ-800DE 型,无锡科洁仪器设备公司。

1.2 试验方法

1.2.1 微孔板包被亲和素 将亲和素用碳酸盐缓冲液(pH 9.0)稀释,每孔包被 200 μL,4 ℃反应 12 h 后,用pH 7.4 的洗涤缓冲液[1×磷酸盐缓冲液(PBS)+0.05 mL/100 mL 吐温 20]清洗 3 次,拍干。加入 200 μL 的 2 g/100 g BSA 溶液以封闭未完全被亲和素包被的微孔板,37 ℃下放置 30 min,拍干,用洗涤缓冲液洗涤 3 次,拍干。

1.2.2 HRP-互补链复合物的制备 将稀释 1 000 倍的 HRP-Streptavidin 与 20 nmol/L 的生物素化互补链[5'-biotin-CGC AAC GCT CGC TCA TAC TGC ACA ACC AAA-3'(DNA2)]混合,37 ℃孵育 30 min,然后置于-20 ℃冷冻保存,备用。

1.2.3 镉离子标准样品的定量检测 在微孔板中加入10 μL 的生物素化适配体[20][5'-biotin-ACC GAC CGT GCT GGA CTC TGG ACT GTT GTG GTA TTA TTT TTG GTT GTG CAG TAT GAG CGA GCG TTG CG-3'(DNA1)],37 ℃孵育 30 min 后,用 pH 7.4 的洗涤缓冲液清洗 3 次,拍干。将 100 μL 镉离子样品加到微孔板中,37 ℃孵育 30 min,用洗涤缓冲液清洗 3 次,拍干。然后将 HRP-互补链复合物加到微孔板中,37 ℃孵育 30 min,用洗涤缓冲液清洗 3 次,拍干。最后在每孔中加入 100 μL TMB 显色试剂,室温放置 20 min,加入 100 μL 的 2 mL/100 mL 硫酸溶液,用酶标仪在 450 nm 波长处测定其吸光度值。

1.2.4 实际样品的检测 利用本方法对自来水中重金属镉离子含量进行检测。用 0.2 mm 注射过滤器对实际样品进行过滤,随后在样品中添加 1,3 ng/mL 浓度的镉离子标品,用本试验中设计的方法对其进行检测,得到镉离子的浓度值并计算回收率,与石墨炉原子吸收光谱法进行比较。

2 结果与分析

2.1 重金属镉离子可视化检测设计原理

如图 1 所示:生物素标记的镉离子适配体能够特异性地识别和结合镉离子,从而实现对靶标的捕获。检测体系中的目标物镉离子通过亲和素与生物素的结合从而被固定到包被有亲和素的微孔板的底部,然后再向孔内加入生物素标记的适配体互补链和链霉亲和素-HRP 的复合物。此时,由于适配体与目标物质镉离子结合时构象会发生变化,导致适配体互补链不能与其杂交结合,HRP-互补链复合物只能通过结合未捕获靶标的适配体固定到板底。随后再加入 TMB 显色剂,在 HRP 的作用下,TMB 会被氧化,并且会产生蓝色的产物;加入酸后,产物的颜色会变为黄色可被肉眼观测,并且在 450 nm 处有最大吸收峰,从而实现镉离子的可视化检测。

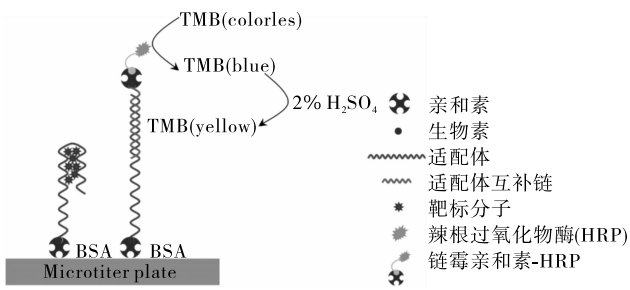

图 1 镉离子可视化检测原理图

Figure 1 Schematic illustration for colorimetric detection of Cd^{2+}

2.2 微孔板包被亲和素浓度优化

适配体是通过生物素和亲和素的连接作用固定于微孔板上的,微孔板上的亲和素包被量会直接影响适配体在板底的结合量,因此合适的亲和素包被浓度是试验成功的基础,于是对亲和素的包被浓度进行了优化,结果见图 2。由图 2 可知,当亲和素浓度达到 20~22 μg/mL 时,A_{450}差值基本达到饱和,此时检测效果最佳,为了节省亲和素用量,本试验中亲和素包被浓度采用 20 μg/mL。

2.3 生物素化镉离子适配体浓度优化

生物素标记的适配体浓度将直接影响板底连接的适配

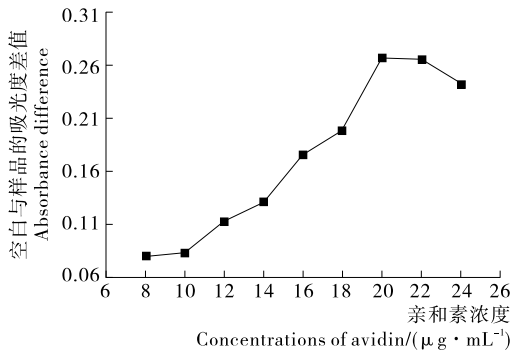

图 2　亲和素浓度的优化

Figure 2　Optimization for the concentration of streptavidin

体量,为了探究适配体浓度对试验结果产生的影响,对适配体浓度进行了优化,得到试验结果见图 3。由图 3 可知,随着适配体浓度增大,固定到酶标板底部的互补链和引入检测体系中的 HRP 量也会不断增加,从而使 A_{450} 值也不断增加。但是当适配体浓度达到 200 nmol/L 时,A_{450} 值基本达到饱和,证明此时适配体的量已经达到饱和,因此试验中选取 200 nmol/L 为适配体加入浓度。

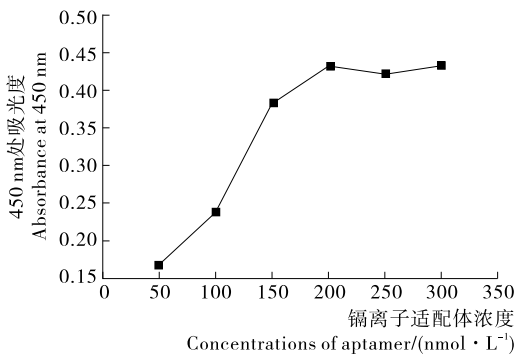

图 3　生物素标记的镉离子适配体浓度优化

Figure 3　Optimization for the concentration of aptamer

2.4　HRP 修饰互补链序列浓度优化

互补链浓度会影响最终连接到板底的 HRP 酶的量,为了探究适配体互补链浓度对试验结果产生的影响,对互补链浓度进行了优化,得到试验结果见图 4。由图 4 可知,随着互补链浓度的增加,A_{450} 值也随之逐渐增大,当互补链浓度达到 20 nmol/L 时,A_{450} 值基本达到饱和,证明此时互补链刚好饱和,因此选取互补链浓度为 20 nmol/L。

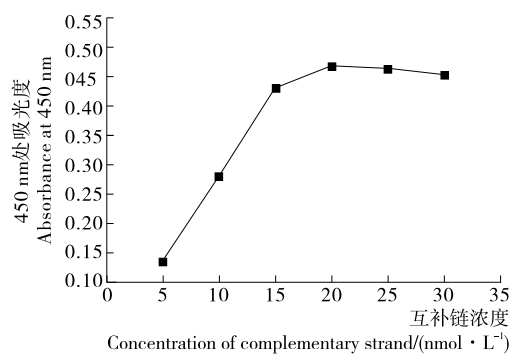

图 4　互补链浓度优化

Figure 4　Optimization for the concentration of complementary DNA

2.5　线性范围与检测限

在最佳的试验条件下,用本研究的检测方法检测不同浓度、同体积的镉离子标准液,结果发现镉离子浓度与 A_{450} 在 0.1～5.0 ng/mL 时呈良好线性,校正曲线方程为 $y=-0.048\ 3x+0.439\ 6$,检出限为 0.05 ng/mL($S/N=3$)。对浓度为 2.0 ng/mL 的镉离子样品液平行测定 3 次,最后求得相对标准差为 5.2%。

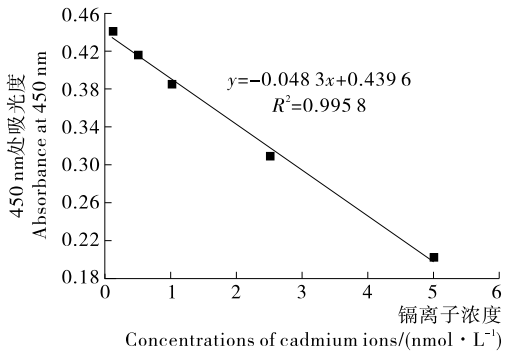

图 5　镉离子浓度与 A_{450} 的关系曲线

Figure 5　Correlation between A_{450} and concentrations of Cd^{2+}

2.6　特异性

为了验证此检测方法的特异性,选择了 10 种金属离子(Hg^{2+}, Pb^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Al^{3+}, Zn^{2+})与镉离子在最优条件下进行试验。镉离子与其他对照组样品浓度均为 5 ng/mL。将空白孔与各个金属离子检测后所得到的 A_{450} 差值进行比较,结果见图 6。由图 6 可知,镉离子与其他金属离子的差值差距明显,且试验现象可用肉眼观测到,表明本方法具有良好的特异性。

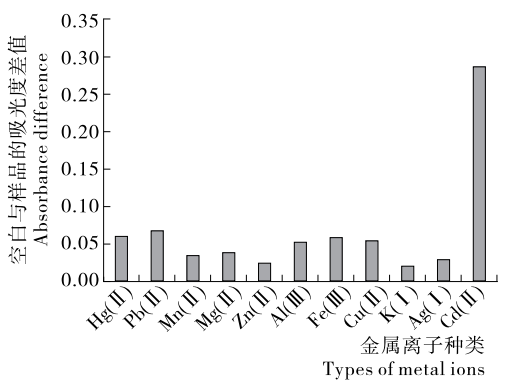

图 6　检测方法特异性考察

Figure 6　Selectivity of the detection method

2.7　实际样品加标回收试验

为了对试验结果的准确性进行验证,用试验中构建的方法对自来水样品进行加标回收试验,并将试验结果与国标方法——石墨炉原子吸收光谱法进行对比。测得未加标自来水样品中含有镉离子,本底值为 1.316 ng/mL,将检测结果扣除本底值后得到结果见表 1。从表 1 可以看出,综合本方

法检测实际样品所得结果与原子吸收光谱法相比差异小，获得了良好的回收率，表明本方法具有较好的准确性和稳定性，可用于镉离子的实际样品检测。

表 1 镉离子加标回收率

Table 1 Recovery results for Cd^{2+} detection

样品	添加浓度/($ng \cdot mL^{-1}$)	检测浓度±SD(n=3)/($ng \cdot mL^{-1}$)	加标回收率/%	原子吸收光谱法加标回收率/%
自来水 1	1	0.95±0.046	95	99.5
自来水 2	3	3.12±0.052	104	100.8

3 结论

本研究成功建立了一种基于单链 ssDNA 适配体检测重金属镉离子的可视化方法。方法的最低检测限为 0.05 ng/mL，且在自来水实际样品的检测中所得结果与传统的原子吸收光谱法高度一致，表明本方法可以用于实际样品检测。本方法具有操作简便、灵敏度高、特异性好的优点，可为重金属分析检测研究提供一种全新的可行途径。

参考文献

[1] ERCAL N, GURERORHAN H, AYKINBURNS N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001, 1(6): 529-539.

[2] 张宏康，王中瑗，许佳璇，等. 食品中重金属检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2016，7(5)：1 844-1 850.

[3] 张长平，张彤，王子月. 镉污染水处理技术及展望[J]. 化工技术与开发，2016，45(11)：47-50.

[4] LIU Rui, LIANG Pei. Determination of trace lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration with nanometer titanium dioxide immobilized on silica gel[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 152(1): 166-171.

[5] HU Qiu-fen, YANG Guang-yu, ZHAO Yi-yun, et al. Determination of copper, nickel, cobalt, silver, lead, cadmium, and mercury ions in water by solid-phase extraction and the RP-HPLC with UV-vis detection[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 375(6): 831-815.

[6] GOYAL R N, GUPTA V K, BACHHETI N. Fullerene-c60-modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone: An anabolic steroid used in doping[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597(1): 82-89.

[7] KRYSTOFOVA O, TRNKOVA L, ADAM V, et al. Electrochemical microsensors for the detection of cadmium(II) and lead (II) ions in plants[J]. Sensors, 2010, 10(6): 5 308-5 328.

[8] ABBASSE G, OUDDANE B, FISCHER J C. Determination of total and labile fraction of metals in seawater using solid phase extraction and inductivelycoupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002, 17(10): 1 354-1 358.

[9] BILLER D V, BRULAND K W. Analysis of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in seawater using the nobias-chelate pa1 resin and magnetic sector inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)[J]. Marine Chemistry, 2012, 130-131: 12-20.

[10] LIN Zhen-zhen, CHEN Yue, LI Xiao-hong, et al. Pb^{2+} induced DNA conformational switch from hairpin to G-quadruplex: Electrochemical detection of Pb^{2+}[J]. Analyst, 2011, 136(11): 2 367-2 372.

[11] XU Hui-feng, YE Hong-zhi, ZHU Xi, et al. Enzyme-free and label-free electrochemical biosensor for lead ion based on DNA concatamers and hexaammineruthenium[J]. Analytical Methods, 2014, 6(13): 4 512-4 515.

[12] LI Chi-lin, HUANG Chih-ching, CHEN Wei-hsi, et al. Peroxidase mimicking DNA-gold nanoparticles for fluorescence detection of the lead ions in blood[J]. Analyst, 2012, 137(22): 5 222-5 228.

[13] ZHAN Shen-shan, WU Yuan-gen, LUO Yan-fang, et al. Label-free fluorescent sensor for lead ion detection based on lead(II)-stabilized G-quadruplex formation[J]. Analytical Biochemistry, 2014, 462: 19-25.

[14] ZHU Yu-feng, WANG Yong-sheng, ZHOU Bin, et al. A multifunctional fluorescent aptamer probe for highly sensitive and selective detection of cadmium (II) [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(21): 4 951-4 958.

[15] GUO Yong-ming, ZHANG Yi, SHAO Hua-wu, et al. Label-free colorimetric detection of cadmium ions in rice samples using gold nanoparticles[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(17): 8 530-8 534.

[16] KONG Ya-fang, SHEN Jian-guo, FAN Ai-ping. Colorimetric Method for the Detection of Mercury Ions Based on Gold Nanoparticles and Mercaptophenyl Boronic Acid[J]. Analytical Sciences the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry, 2017, 33(8): 925.

[17] TOMBELLI S, MINUNNI M, MASCINI M. Analytical applications of aptamers[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2005, 20(12): 2 424-2 434.

[18] YUAN Jing-lei, TAO Zui, YU Ye, et al. A visual detection method for Salmonella, Typhimurium based on aptamer recognition and nanogold labeling[J]. Food Control, 2014, 37(1): 188-192.

[19] HAO Li-ling, GU Hua-jie, DUAN Nuo, et al. A chemiluminescent aptasensor based on rolling circle amplification and Co^{2+}/*N*-(aminobutyl)-*N*-(ethylisoluminol) functional flowerlike gold nanoparticles for Salmonella typhimurium detection[J]. Talanta, 2016, 164: 275-282.

[20] WU Yuan-gen, ZHAN Shen-shan, WANG Lu-mei, et al. Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles[J]. Analyst, 2014, 139(6): 1 550-1 561.

[21] WANG Hong-yan, CHENG Hui, WANG jine, et al. Selection and characterization of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Cd(II)[J]. Talanta, 2016, 154: 498-503.