



Detections of Mercury(II) and Lead(II) Ions Based on
Nucleic Acid Probes

by

GAO Xiaoxia

B.S. (Hunan Agricultural University) 2008

A thesis submitted in partial satisfaction of the

Requirements for the degree of

Master of Science

in

Analytical Chemistry

in

the Graduate School

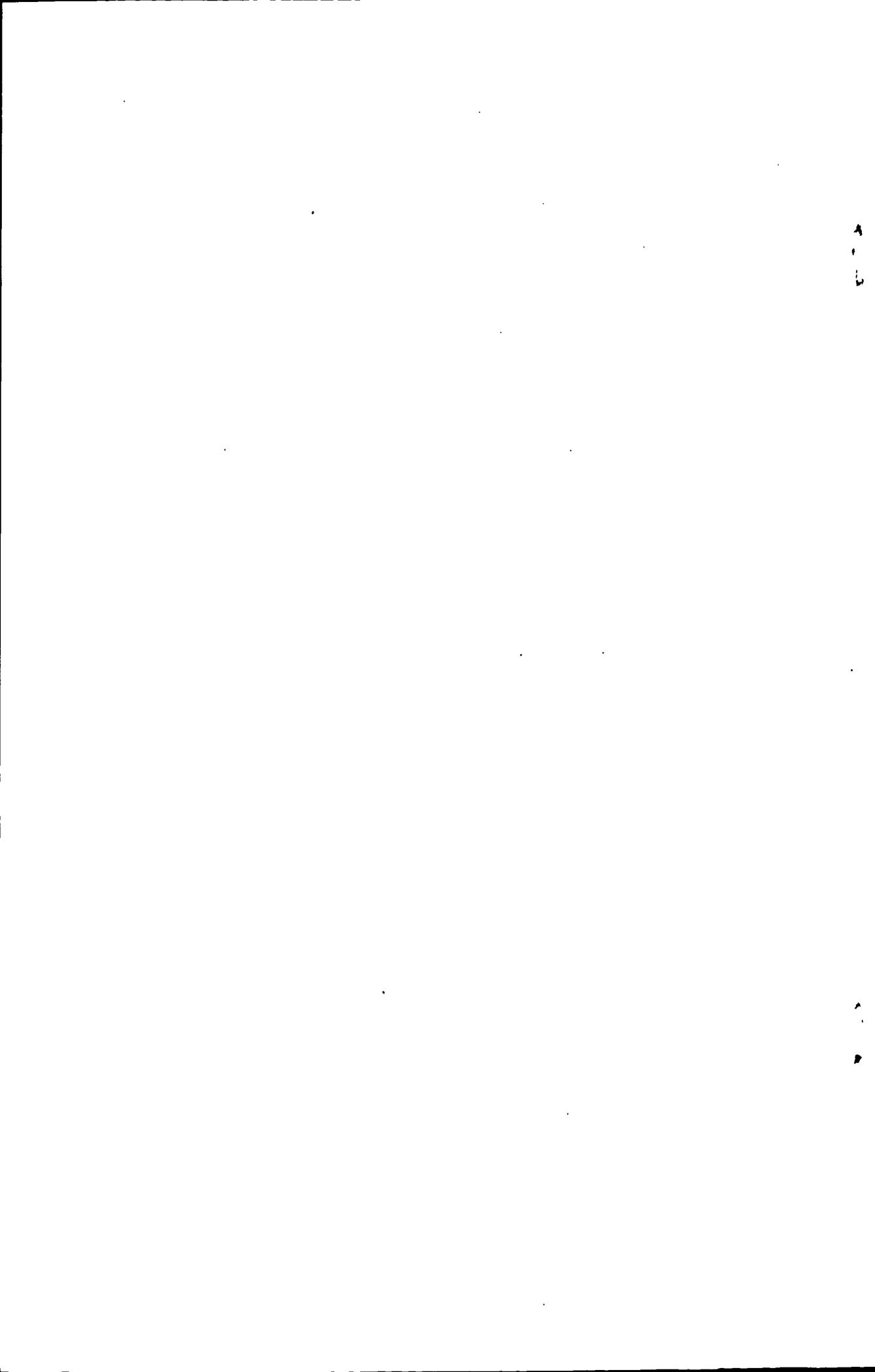
of

Hunan University

Supervisor

Professor Yang Ronghua

May, 2011



湖南大学

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名：高屹霖

日期：2011年6月2日

学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权湖南大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密口，在_____年解密后适用本授权书。

2、不保密。

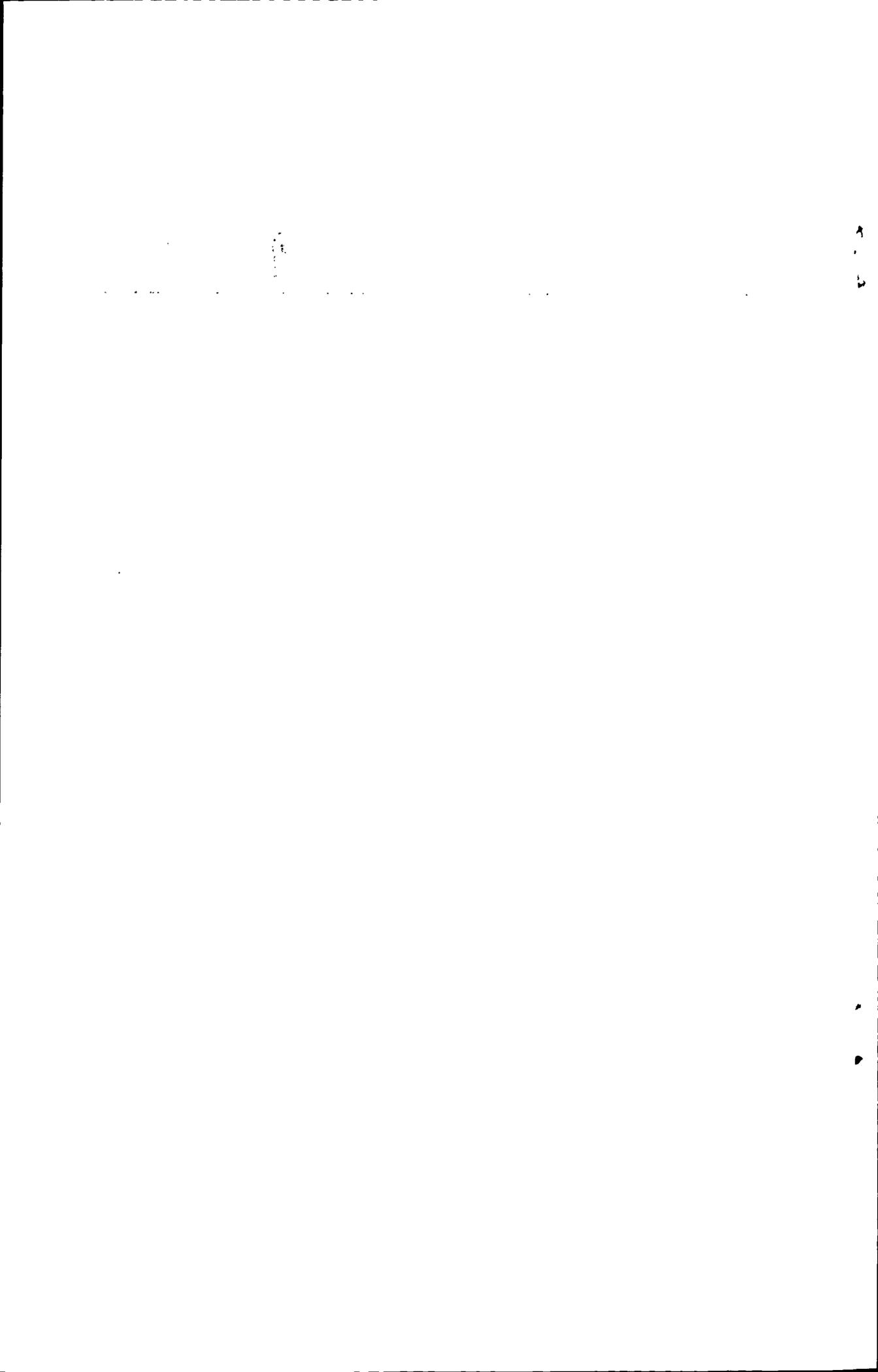
(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：高屹霖

日期：2011年6月2日

导师签名：杨祥

日期：2011年6月2日



摘 要

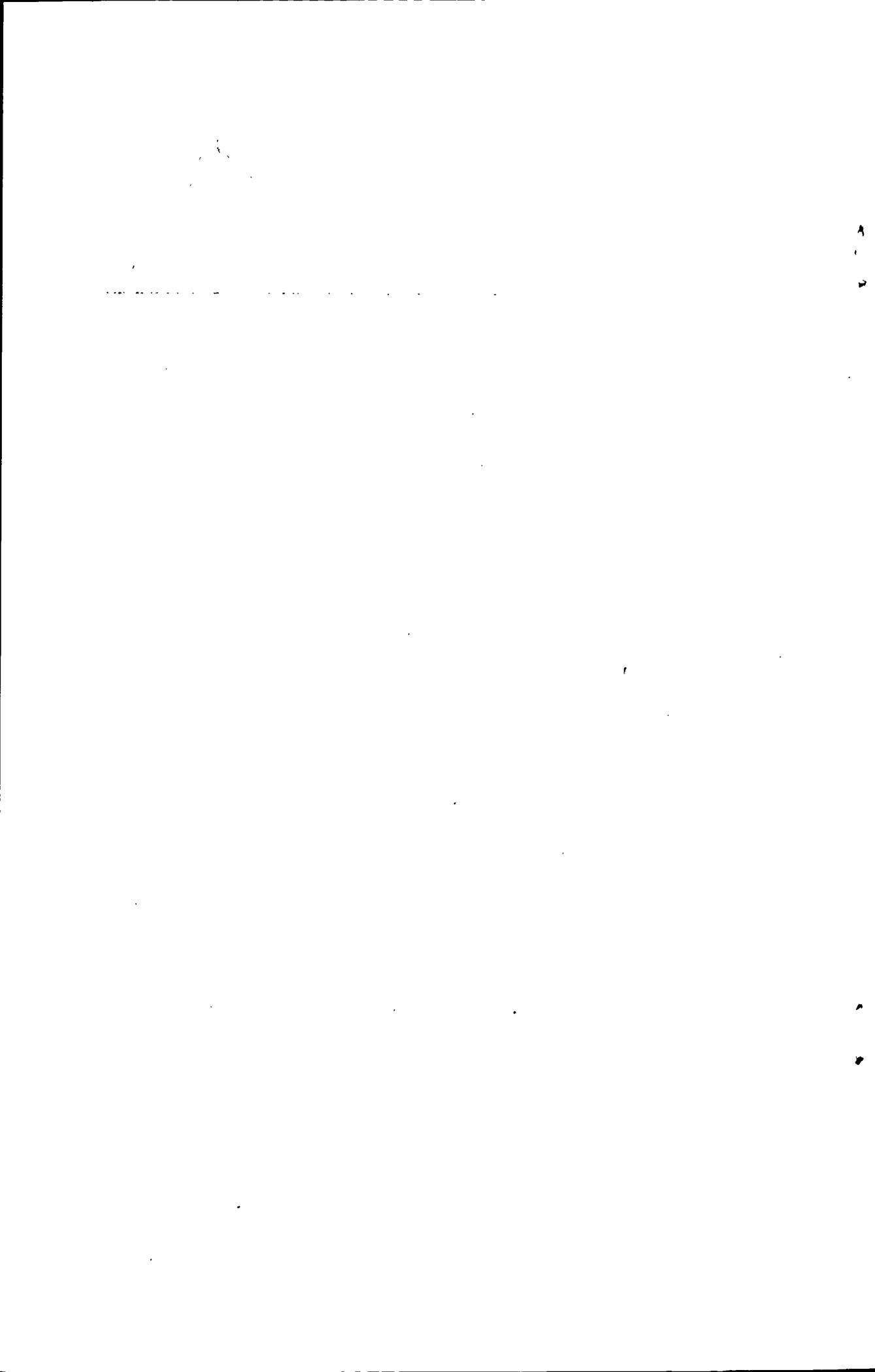
目前, 重金属离子污染已对人类生存环境造成了极大威胁。许多有毒重金属离子难以被微生物降解, 可以通过生物链的蓄积进入人体, 严重威胁着人类的身体健康及生命安全。因此, 发展简单、快捷、灵敏、实用的重金属离子检测方法对控制环境污染、保护人类健康都具有重要的意义。核酸探针具有实时、快捷、稳定、直观的超灵敏等分析检测的优点, 使其在医药、环境、食品等众多领域的重金属分析检测中, 具有极其广阔的发展空间和应用前景。因此, 在本论文的研究中, 我们构建了以下三种基于核酸探针的汞离子和铅离子的检测方法:

(1) 基于环糊精/芘协同作用荧光检测汞离子 (Hg^{2+})。实验设计了一条茎部含有错配胸腺嘧啶 (T) 碱基对, 两端分别标记芘分子的DNA探针。在 Hg^{2+} 存在下, 探针分子通过形成T- Hg^{2+} -T结构以及 γ -环糊精的协同作用, 产生芘分子的二聚体荧光信号。在优化的实验条件下, 传感体系的响应信号在 Hg^{2+} 浓度为 $0.5 \mu\text{M}$ 至 $3.0 \mu\text{M}$ 的范围内呈良好的线性关系, 检出限为 $0.3 \mu\text{M}$ 。此方法具有良好的选择性, 同时基于芘分子二聚体荧光长寿命的特点, 利用时间分辨技术, 有望应用于复杂生物样品 Hg^{2+} 检测。

(2) 基于脱氧核酶 (DNAzyme) 免标记比色检测铅离子 (Pb^{2+})。实验设计了一条包含DNAzyme以及富鸟嘌呤碱基(G)链的发夹型结构的核酸探针, 通过 Pb^{2+} 作用后, 将DNAzyme中底物链释放出来, 形成G-四链体引发显色反应, 通过吸收信号的响应来达到检测 Pb^{2+} 的目的。体系的响应信号在 Pb^{2+} 浓度为 5 nM 至 100 nM 的范围内呈良好的线性关系, 检出限可以达到 3 nM 。此外, 该方法还具有良好的选择性。

(3) 基于脱氧核酶免标记荧光检测铅离子。利用DNAzyme可以在 Pb^{2+} 的作用下, 发生特异性的断裂以及SYBR Green I (SG)与双链DNA杂交体间的嵌入作用, 使得互补配对的双链与单链DNA产生不同的荧光信号, 对 Pb^{2+} 进行检测。体系的响应信号在 Pb^{2+} 浓度为 $1 \mu\text{M}$ 至 $8 \mu\text{M}$ 的范围内呈良好的线性关系, 检出限可以达到 $0.6 \mu\text{M}$ 。

关键词: 核酸探针; 汞离子; 铅离子; 荧光; 吸收



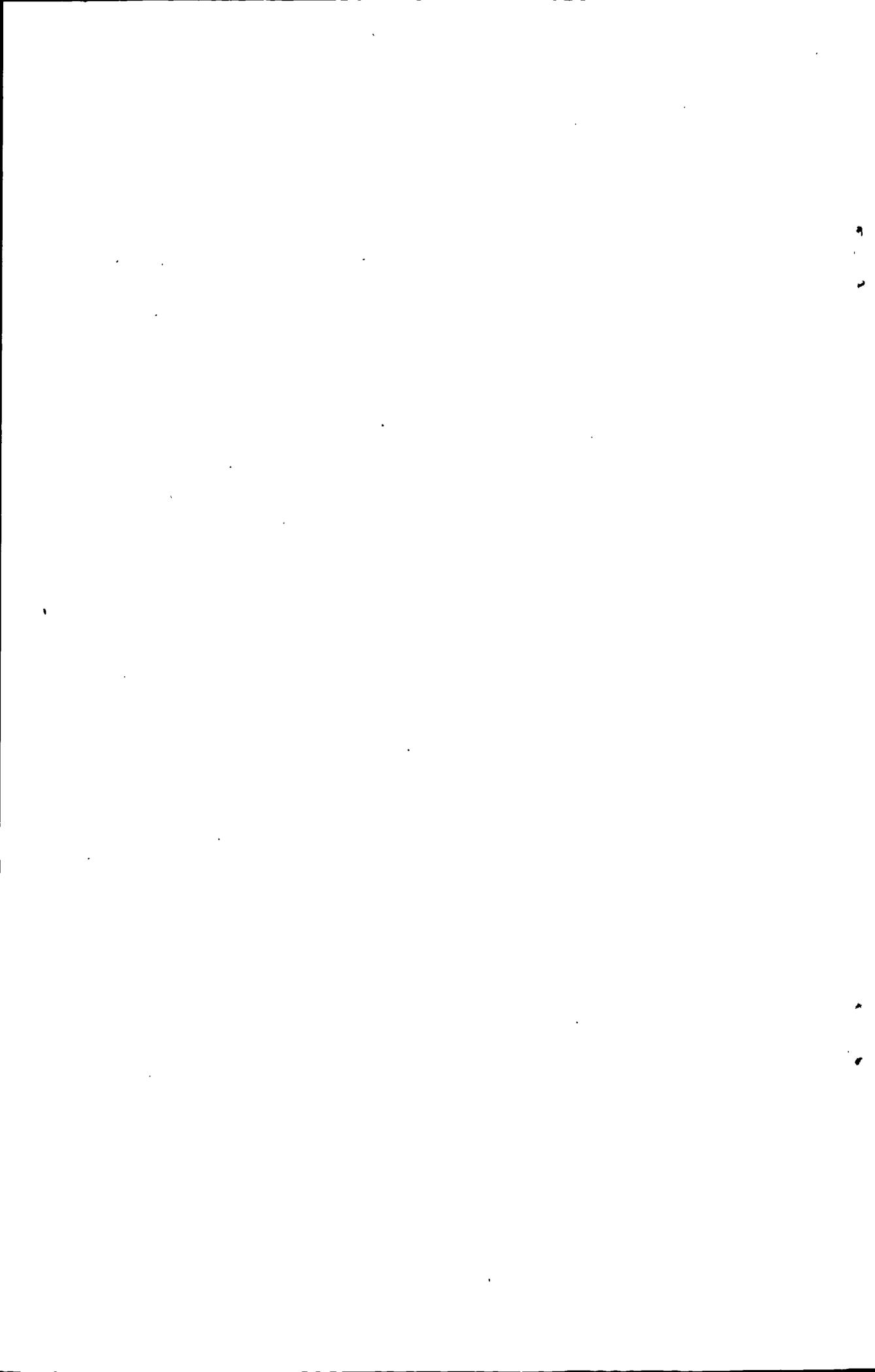
Abstract

Heavy metal ions are one kind of main pollutants in the environment, which have caused great threat to human living conditions. Heavy metal ions in the environment are difficult to degrade, which can be accumulated into the human body through the food chain, leading a serious threat to people's health and life. Therefore, it is of great significance to establish a simple, fast, sensitive method to detect them as to the control of environmental pollution and the protection of human health. Probes based on nucleic acids (DNA probe) with advantages of real-time, quick, stable, selective and visual inspection make its broad space to used in pharmaceutical, environment, food and metal areas. In this research paper, we construct three DNA probes to detect mercury and lead ions, the details are described as follows:

(1) A probe based on the thymine- Hg^{2+} -thymine (T- Hg^{2+} -T) coordination chemistry and the inclusion interaction of γ -cyclodextrin was developed. A bis-pyrene-labeled thymine-rich DNA strand was used as the detection probe. In the presence of Hg^{2+} , the stem-close-shaped DNA strand can be formed under the cooperation of γ -cyclodextrin and predominantly emit the excimer fluorescence ideally. With the optimum conditions, the system exhibits a dynamic response range for Hg^{2+} from 0.5 to 3 μM with a detection limit of 0.3 μM . This strategy afforded exquisite selectivity for Hg^{2+} against other environmentally related metal ions. At the same time, pyrene excimer has a longer fluorescence lifetime, combined with lifetime-based measurements, the probe hold potential applied in complex biological samples.

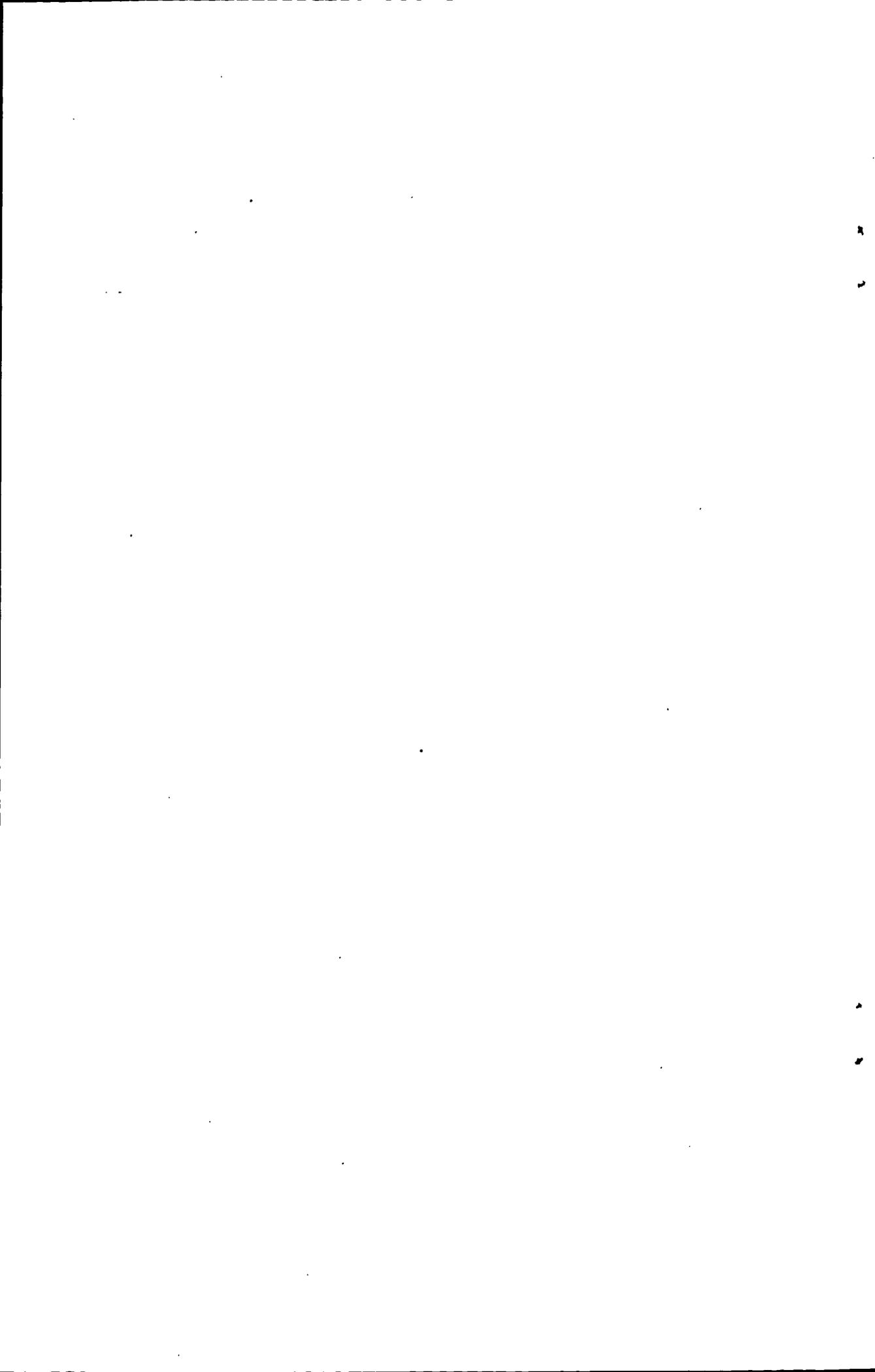
(2) A probe based on label-free DNzyme colorimetric molecular switch for detection of Pb^{2+} was developed. The system including DNzyme and guanine(G)-rich DNA strand. In the presence of Pb^{2+} , the substrate strands was released to solution and formed G-quadruplex, resulting absorbance change to detect Pb^{2+} . The system exhibits a dynamic response range for Pb^{2+} from 5 to 100 nM with a detection limit of 3 nM. In addition, the selectivity of the sensor for Pb^{2+} against other environmentally related metal ions is outstanding.

(3) A probe based on label-free DNzyme fluorescing molecular switch for detection of Pb^{2+} was developed. In the presence of Pb^{2+} , DNzyme was fracture, and the obvious fluorescent change of the Sybr Green I (SG), after binding to double strand or single strand DNA was observed. The system exhibits a dynamic response range for



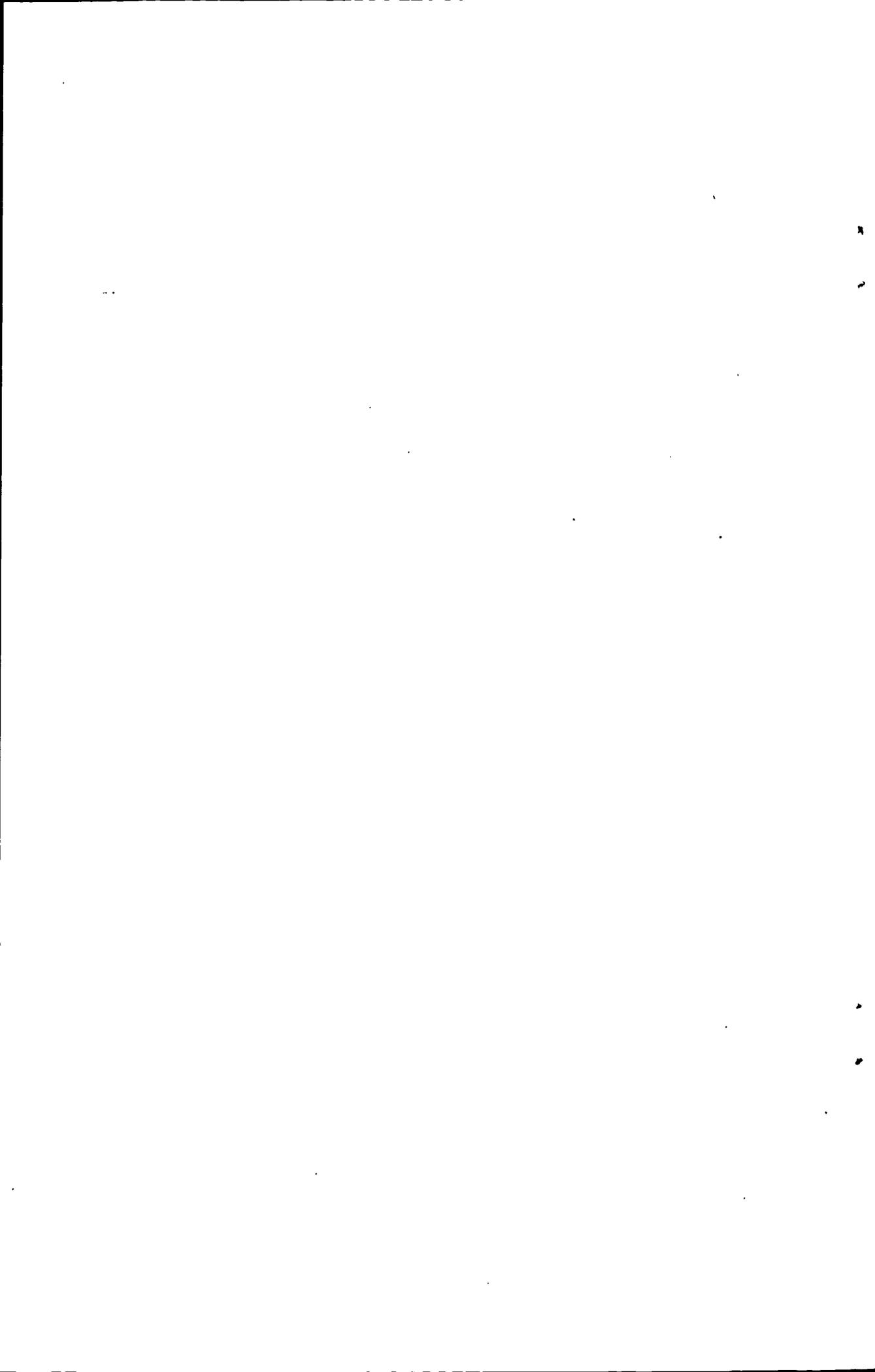
Pb²⁺ from 1 to 8 μM with a detection limit of 0.6 μM. this strategy afforded exquisite selectivity for Pb²⁺ against other environmentally related metal ions.

Keywords: Mercury ions; Lead ions; Functional nucleic acids; Fluorescence; Colorimetry

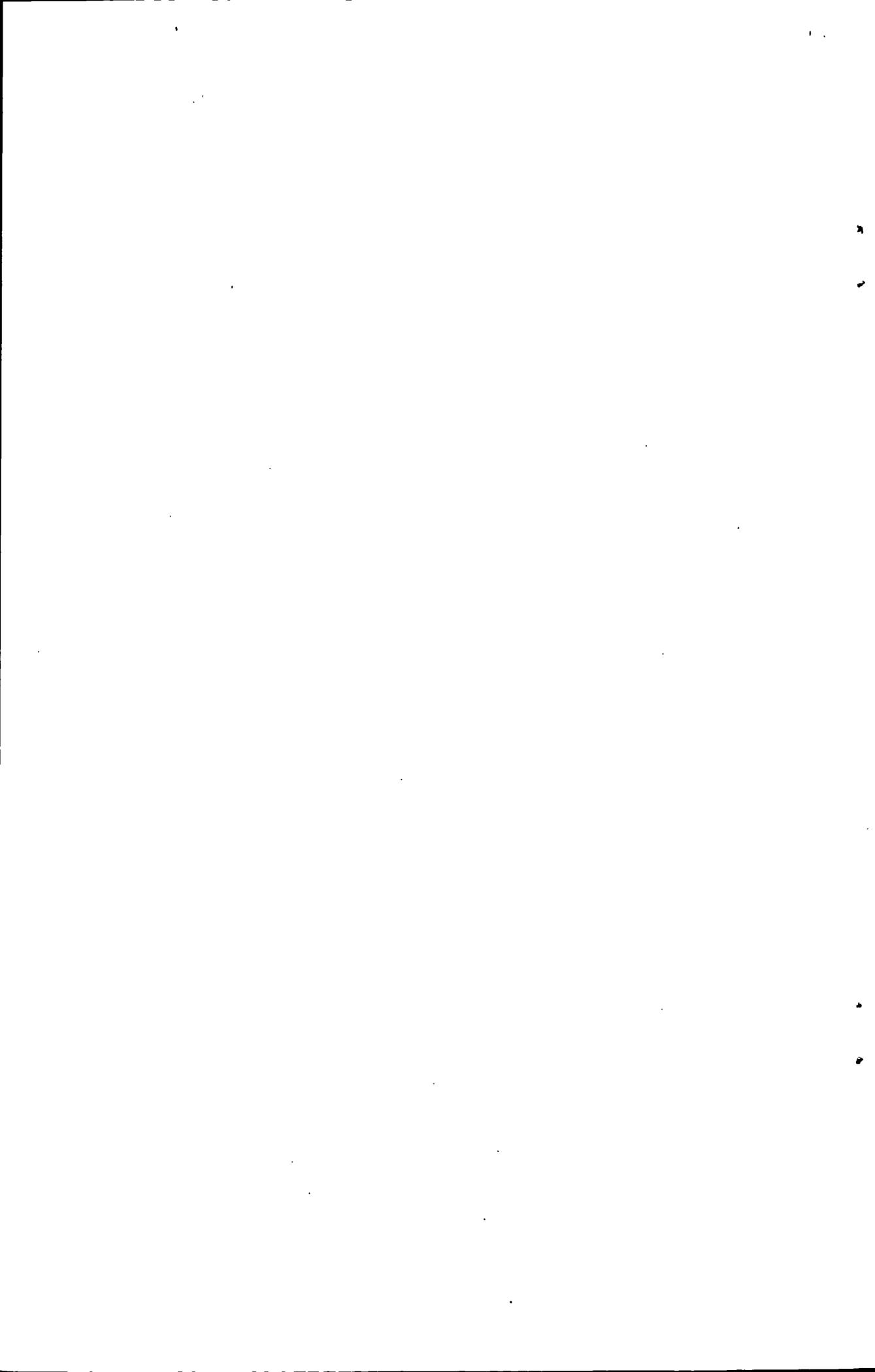


目 录

学位论文原创性声明和版权使用授权书	I
摘 要	II
Abstract	III
第 1 章 绪论	1
1.1 重金属离子污染	1
1.1.1 重金属离子污染分类	2
1.1.2 重金属离子污染现状	3
1.1.3 重金属离子检测的方法及意义	3
1.2 核酸探针简介	4
1.3 用于 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 检测的核酸探针设计	6
1.3.1 基于胸腺嘧啶/ Hg^{2+} 荧光核酸探针设计	6
1.3.2 基于 G-四链体比色核酸探针设计	9
1.3.3 基于金属离子特异性 DNAzyme 核酸探针设计	9
1.4 本论文的选题依据及研究内容	10
第 2 章 基于环糊精/苊协同作用荧光检测汞离子	11
2.1 引言	11
2.2 实验部分	12
2.2.1 主要试剂和仪器	12
2.2.2 溶液中 Hg^{2+} 检测	13
2.3 结果与讨论	13
2.3.1 汞离子对苊二聚体荧光影响	13
2.3.2 设计机理	14
2.3.3 实验条件优化	16
2.3.4 响应曲线	19
2.3.5 选择性	20
2.3.6 检测应用	20
2.4 小结	21
第 3 章 基于脱氧核酶免标记比色检测铅离子	22
3.1 引言	22
3.2 实验部分	23
3.2.1 主要试剂	23



3.2.2 主要仪器.....	24
3.2.3 光谱测量.....	24
3.3 结果与讨论.....	24
3.3.1 设计机理.....	24
3.3.2 盐浓度影响.....	25
3.3.3 酶/底物影响.....	26
3.3.4 酶切时间影响.....	27
3.3.5 pH 影响.....	28
3.3.6 响应曲线.....	29
3.3.7 选择性.....	30
3.4 小结.....	30
第 4 章 基于脱氧核酶免标记荧光检测铅离子.....	32
4.1 引言.....	32
4.2 实验部分.....	33
4.2.1 主要试剂.....	33
4.2.2 主要仪器.....	33
4.2.3 光谱测量.....	34
4.3 结果与讨论.....	34
4.3.1 设计机理.....	34
4.3.2 温度影响.....	35
4.3.3 盐浓度影响.....	36
4.3.4 响应曲线.....	37
4.3.5 选择性.....	38
4.4 小结.....	38
结 论.....	40
参 考 文 献.....	41
附 录 攻读学位期间发表的学术论文.....	49
致 谢.....	50



第1章 绪论

随着科学技术和经济发展,人们的生活水平有了很大的提高。与此同时,由于对自然资源的过度开发及利用,人类为此付出了惨重的代价。矿业的发展以及工业“三废”、机动车尾气的排放、污水灌溉和农药、除草剂等的使用,严重地污染了大气、土壤和水质。近年来,“砷毒”、“血铅”、“镉米”等事件的频频发生,也让重金属污染成为最受关注的公共事件之一。通常环境介质中的重金属离子有其自然存在的量或浓度,称为本底值,一般情况下本底值是比较低的,不会对人体及环境产生任何影响。但是近年来受人类活动影响,重金属在环境介质中的存在形式和浓度发生了很大变化,使其对人类生态环境的影响不断加剧。重金属污染的初期一般不易察觉,进入人体后,可在人体的某些器官积累,造成慢性中毒。因此,发展快速、准确灵敏的重金属检测技术,对于控制环境污染、保护人类健康,都具有十分重要的理论和现实意义。

1.1 重金属离子污染

化学上根据金属的密度,通常把密度大于 4.5 g/cm^3 的金属称为重金属^[1]。如金、银、铜、铅、锌、汞、镍、镉和锰等大约 45 种。从毒性角度一般把金属锡、砷和铝等也包括在内。尽管重金属锌、铜和锰等是生命活动所必需的微量元素,但是大部分重金属如铅、汞、镉等并非生命活动所必需,而且所有重金属超过一定浓度时都会对人体的某些机能造成损伤。这些重金属在环境中不能被降解,与其他毒素结合可以生成毒性更大的有机物或无机物,进入人体后毒性更大,它们被称为有害重金属。在环境污染中研究最多的一般是汞、镉、铅和类金属砷等。

重金属离子污染指由重金属或其化合物所造成的环境污染。主要来源是工业污染,其次是交通污染和生活垃圾污染。工业污染大多由废渣、废水、废气等排入环境,然后在人和动植物中富集,从而对环境和人类健康造成极大危害。

重金属离子污染与其他有机化合物的污染不同,许多有机化合物可以通过自然界本身的物理、化学或生物的降解,使有害性得以降低或消除。而重金属离子污染具有富集性,很难在环境中被微生物降解。重金属离子污染主要表现在水污染中,还有一部分是在大气以及固体废弃物中。水体中金属离子有利或有害不仅取决于金属的种类和性质,而且还取决于金属离子的浓度以及其存在形态及价态,即使是有益金属元素,当其浓度超过一定数值时也会具有很强的毒性,可以引起动植物中毒,甚至死亡。金属有机化合物(如有机汞、有机铅、有机锡、有机砷等)比相应的金属无机化合物毒性要强得多;可溶态的金属又比固体颗粒态金属的毒性要大;六价铬比三价铬毒性要大等。重金属在人体内能和蛋白质及各种酶发生强烈的相互作用,使它们失去活性,也可能在人体的某

些器官中富集, 如果超过人体所能承受的限度, 就会造成人体急性中毒、亚急性中毒以及慢性中毒等, 对人体造成极大的危害。

1.1.1 重金属离子污染分类

(1) 汞污染。汞及其化合物都属于剧毒物质, 可以在人体内蓄积。汞离子污染主要是来源于贵金属的冶炼、化妆品、照明用灯、齿科材料、水生生物等。血液中的汞离子进入脑组织后, 可以逐渐在脑组织中积累, 达到一定量时就会对脑组织造成损害, 另外一部分汞离子转移到肾脏, 引起肾脏一些机能的损伤; 进入水体的无机汞离子可转变为毒性更大的有机汞, 由食物链进入人体, 引起全身中毒, 如果是急性汞中毒, 会诱发肝炎和血尿; 易受汞污染危害的人群主要是女性, 尤其是准妈妈。天然水中一般含汞极少, 通常不超过 $0.1 \mu\text{g/L}$, 正常人血液中的汞浓度小于 $5-10 \mu\text{g/L}$, 尿液中的汞浓度小于 $20 \mu\text{g/L}$ 。

(2) 铅污染。铅是可在人体和动物组织中蓄积的有毒金属。主要来源于各种油漆、涂料、蓄电池、冶炼、机械、五金、化妆品、染发剂、电镀、自来水管等。通过皮肤、消化道、呼吸道等方式进入体内与多种器官有亲和作用, 主要毒性效应是贫血症、神经机能失调和肾损伤, 易受害的主要有儿童、老人、免疫低的人群。铅对水生生物的安全浓度为 0.16 mg/L , 人体内正常的铅含量应该低于 0.1 mg/L , 如果含量超标, 容易引起贫血, 损害神经系统。而幼儿大脑受铅的损害要比成人敏感得多。

(3) 镉污染。镉不是人体的必需元素。镉的毒性很大, 进入人体后可在人体内蓄积, 主要是在肾脏, 然后引起泌尿系统的功能失调; 镉污染主要来源有电镀、采矿、冶炼、燃料、电池和化学工业等排放的废水; 废旧电池中镉含量也比较高、在一些水果和蔬菜中, 尤其是蘑菇中也有一定量镉。镉能够取代骨头中的钙, 使骨骼严重软化, 骨头寸断, 如果长期摄入微量镉容易引起骨痛病, 也会引起胃脏功能紊乱, 干扰人体内的酶系统, 导致血压上升。易受害的人群主要是矿业工作者、免疫力低下人群。正常人血液中的镉浓度小于 $5 \mu\text{g/L}$, 尿中小于 $1 \mu\text{g/L}$ 。

(4) 砷污染。砷是人体的非必需元素, 元素砷的毒性极低, 而砷的化合物均有剧毒, 三价砷的化合物比其它价态的砷化合物毒性更强。砷可以通过呼吸道、消化道和皮肤接触进入人体, 如果摄入量超过排泄量, 会在人体的肝、肺、肾、骨骼、子宫、肌肉等部位蓄积, 然后与细胞中的酶结合, 使酶的生物活性受到抑制, 特别是在毛发、指甲中的蓄积, 容易引起慢性砷中毒。砷还有致癌作用, 能引起皮肤癌, 通常情况下, 土壤、水、空气、植物和人体中的砷都是微量的, 不足以对人体造成危害。

(5) 铬污染。主要来源于劣质化妆品原料、皮革制剂、金属部件镀铬部分。如误食饮用, 可致腹部不适及腹泻等中毒症状, 引起过敏性皮炎或湿疹。铬呼吸进入人体后, 对呼吸道有刺激和腐蚀作用, 容易引起咽炎、支气管炎等症状。水污染严重地区的居民, 经常接触或过量摄入铬, 易得结核病、腹泻、支气管炎、鼻炎、皮炎等。

1.1.2 重金属离子污染现状

重金属离子污染已经成为我国一个不可忽视的问题。随着我国工业的飞速发展,尤其是乡镇企业,大量未经处理的含有重金属离子的工业废水及废弃物直接排入水体,造成江、河、湖、海、地下水等水源的污染。其直接影响是:水产品的食用安全质量受到严重威胁,目前全国有 27 条主要河流已受到不同程度的含汞工业废水污染,其水产品也对人们的身体健康存在着潜在的威胁。同时,由于我国很多地区尤其是北方地区农业灌溉水资源紧张,存在着大片的污灌区,造成了重金属离子在一些污灌区的农田中长期积累,重金属离子污染事件频发。据不完全统计,由于镉的开采和冶炼排放的废水,我国目前遭受镉污染的农田大约有 18 万亩,很多地区出现“镉米”事件,这些受污染的农作物严重威胁到众多食用者的身体健康,也严重影响到我国农产品国内外市场未来发展前景。

所以,政府有关部门对重金属离子的污染防治也采取了一些措施。2011 年即将出台的《重金属污染综合防治“十二五”规划》显示,中国将对汞、铬、铅、镉等重金属进行重点防控。按照《规划》要求,到 2015 年,“重点区域”铅、汞、镉、铬和类金属砷等重金属污染物的排放,要比 2007 年削减 15%;“非重点区域”的重金属污染物排放量不超过 2007 年水平。目前重金属的污染已相当严重,对环境和生物造成了极大危害,同时,其易通过食物链而富集,因此,已经引起了世界各国科学家的高度重视,解决这个问题也迫在眉睫。

1.1.3 重金属离子检测的方法及意义

鉴于重金属离子在生物体内易积累、毒性大等特点,所以建立痕量、超痕量重金属离子分析检测技术极为重要。对于痕量重金属离子的检测,传统仪器分析方法有原子发射光谱法、原子吸收光谱法、等离子体质谱法、荧光光谱法和溶出伏安法等。

原子发射光谱分析法(Atomic Emission Spectroscopy, AES)是化学元素的原子和离子在热激发或电激发下,利用发射特征的光波辐射而进行定性以及定量分析的方法。该方法的特点是分析速度快、选择性好、灵敏度高和易操作等,可同时进行多元素的分析。但该方法所需的成套设备昂贵,分析非金属元素硒、硫和卤素等的灵敏度较低,它的准确度随待测元素含量的多少而有所不同,只限于元素分析,不能确定这些元素在样品中存在的化合物状态,且对于含量高的元素定量分析误差较大,对于超微量元素的定量分析灵敏度不够。

原子吸收光谱法(Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)又称为原子吸收分光光度,简称原子吸收法。是 20 世纪 50 年代发展起来一种基于待测元素的基态原子蒸汽对该元素的原子特征谱线的吸收程度进行定量分析的一种方法^[2]。也是目前应用最为广泛的对元素进行定性定量分析的方法,主要特点有:

(1) 能测定几乎所有的金属元素,是现代工业、农业、石油、化工、地质、大气和

环保等行业不可缺少的标准分析方法。

- (2) 选择性高，分析干扰少。
- (3) 检出限低，检测灵敏度高。
- (4) 仪器具有较高的精密度。
- (5) 分析速度快，对处理好的待测试样，每样次的测定只需数秒到数十秒。
- (6) 测定每种元素都需要相应的空心阴极灯，不能进行多元素同时分析。

原子荧光光谱分析法 (Atomic Fluorescence Spectroscopy, AFS) 又称原子光致光谱分析法，是一种通过待测元素的原子蒸气在辐射能激发下所产生的荧光强度来确定其含量的一种分析方法。该方法具有灵敏度高、线性工作范围宽和分析谱线简单等优点。光谱分析是一种相对分析方法，一般需要与标准样品作对照，由于样品的组成和结构变化对测定结果的影响较大，因此对标样的要求较为严格。

溶出伏安法是电化学方法中一种重要的痕量分析方法，包括电解富集和电解溶出两个过程。通过适当的阴极或阳极过程，恒电位预电解一定时间之后，使痕量被测组分在电极上沉积，即电极富集；再将富集后的溶液静置 0.5-1 分钟后，用与预电解相反的电极过程，使富集在电极上的被测物质在短时间内重新溶解下来，即电解溶出过程。通过溶出过程的极化曲线获得溶出峰，而溶出峰的电流大小与被测物质的浓度成正比关系。该方法对一些物质的测定有很高的灵敏度、准确度和精密度，仪器设备简单，操作费用远远低于光谱法，所以实用性较高。

20 世纪 80 年代以来，电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) [3] 逐渐成为元素分析中最重要的技术之一，它以 ICP 炬作为原子化器和离子化器。与传统的电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-AES) 相比，ICP-MS 得到的谱线非常简单，仅由各个元素的同位素组成。该技术对绝大多数元素都具有较高的灵敏度、准确度以及选择性。另外，此方法还具有线性范围宽、可进行多元素同时检测等优点，已广泛用于环境、石油、冶金以及生物学等领域。上述这些传统技术虽然灵敏度高、特异性强，但同时也存在着样品预处理过程复杂、操作耗时、仪器昂贵和运行费用高等缺点，且不能提供连续的分析，难以满足实际环境中方便快捷、实时检测的需要。

1.2 核酸探针简介

核酸是染色体的主要化学成分，是遗传信息的主要载体，是生物物种延续、物种进化的决定因素；有时被称为“遗传微粒”。核苷酸是核酸的基本结构重复单元，核苷酸又是由碱基 (base)，磷酸和戊糖组成，其中碱基和戊糖的结合产物称为核苷。根据核酸所含戊糖种类的不同而分为脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 和核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 两大类。DNA 是生物体内一种由很多单体组成的线性大分子 (长链聚合物)，它的基本结构重复单元是脱氧核苷酸，而糖类与磷酸分子借由酯键相连，组成其长链骨架。核酸序列的异常，可以引起各种疾病以及生命活动异常，所以分析核

酸序列, 探测核酸结构与功能具有非常重大的意义。早在 1988 年, Bains 等人就将短的 DNA 片段固定到支持物上, 以反向杂交的方式对核酸序列进行测定。如今, 随着生命科学与众多相关学科(如材料科学、计算机科学、微加工技术、有机合成技术等)的迅猛发展, 为核酸探针的实现提供了可能。

生物体都含有相对稳定的 DNA 序列, 不易受外界环境因素的影响而改变。一般来说, 同种生物体具有相同的 DNA 序列, 不同种生物体的不同, 每个生物个体都有自己独特的 DNA 序列。根据中心法则, DNA 双链的核苷酸分子是通过碱基之间的氢键作用专一性互补配对而结合在一起的, 每个基因的 RNA 和对应的模板 DNA 链也可以通过碱基配对而结合在一起。核酸探针就是根据核酸分子之间的互补配对原则设计的一种检测目标 DNA 序列的一段核酸序列。一般先将探针核酸分子用某种可检测信号的物质标记, 然后用探针去和待检测的序列杂交。如果探针与被检测的核酸分子之间存在互补性, 则探针就会与目标序列形成杂交分子, 通过检测标记物信号表达就可以检测目标序列。

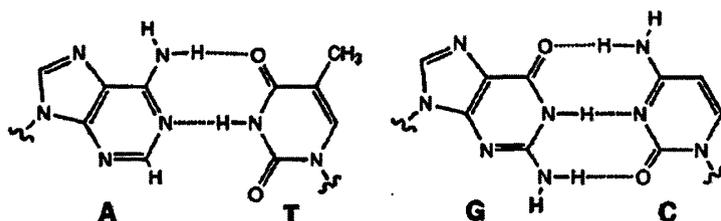


图 1.1 腺嘌呤 (A) 和胸腺嘧啶 (T) 以及胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G) 之间通过 Watson-Crick 氢键杂交配对^[4]

上世纪 50 年代 Watson 和 Crick 阐明了脱氧核糖核酸的双链结构^[4], 核酸碱基的互补配对作用 (如图 1.1 所示) 开始为人们所熟知。随着人们对核酸结构和功能的深入研究以及组合化学的发展, 出现了许多新的功能化核酸分子, 如分子信标 (molecular beacons, MBs)、脱氧核酶 (DNAzyme)、核酸适体 (aptamer) 等, 使利用核酸探针的检测分析拓展到了更为广泛的领域^[5-8]。并以此设计了许多新型的核酸探针体系 (图 1.2)。

分子信标是人为设计的一段具有茎-环 (stem-loop) 结构的发夹型 DNA 探针, 茎部一般由 5-6 对互补碱基形成, 而环部则与目标核酸序列互补。在核酸分子末端分别标记荧光基团和猝灭基团。当茎部序列杂交时, 由于共振能量转移作用, 荧光分子的荧光被猝灭; 如果存在目标 DNA 链与环部杂交, 则茎部被打开, 荧光基团与猝灭基团远离, 荧光恢复。核酸适体是通过指数富集配体的系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术, 经体外筛选出的对于配体具有特异性结合作用的寡聚核苷酸片段^[9]。DNAzyme 也是一类通过 SELEX 技术筛选出来的具有催化活性的核酸序列^[10]。作为酶和抗体的核酸等价物, 功能化的 DNAzyme 和核酸适体, 除了对配体有相当的亲和作用外, 还表现出比蛋白等传统识别单元更多的优越性: 由于功能化核

酸分子良好的通用性和适用性、对目标分子高度的亲和性、专一性以及核酸分子结构的可预测性和设计性，使新型的功能化核酸分子得到了极为广泛的应用。总之，核酸探针作为一种序列同源性的检测技术已经成为植物基因组学和分类学研究的重要手段。目前，核酸探针在植物基因克隆、种质资源鉴定、植物分类学研究中都有重要的应用。

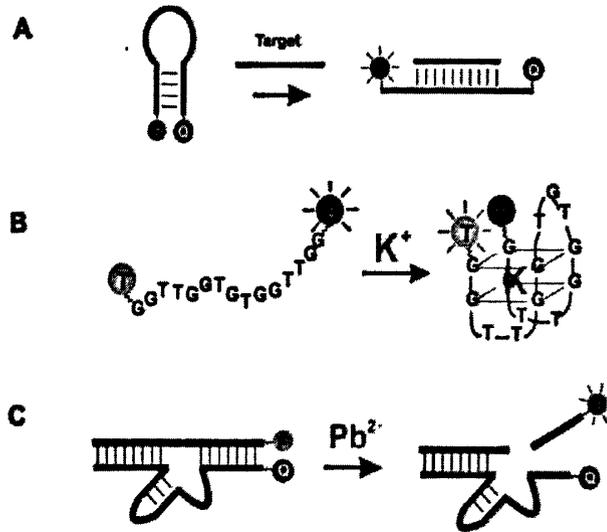


图1.2 功能化核酸分子应用于荧光核酸探针^[11]：A，分子信标应用于核酸序列的检测；B，荧光双标记的核酸适体应用于K⁺的检测；C，荧光标记的DNAzyme应用于Pb²⁺的荧光增强检测

1.3 用于Pb²⁺、Hg²⁺检测的核酸探针设计

近年来，对于金属离子和 DNA 的相互作用已经引起了化学生物学等研究领域的极大兴趣^[12-16]。本论文也是在基于 DNA 与金属离子相互作用的基础上发展了一些对重金属离子 Hg²⁺、Pb²⁺的检测手段，由于本论文主要涉及的是荧光以及比色核酸探针体系，所以对其他信号传导方法的核酸探针未做深入介绍。

1.3.1 基于胸腺嘧啶/Hg²⁺荧光核酸探针设计

据文献^[17-19]报道：错配的胸腺嘧啶碱基对 (T-T) 能与 Hg²⁺特异性地结合，形成稳定的 T-Hg²⁺-T 结构，所以将胸腺嘧啶碱基作为识别基团，通过一定的连接体将其与信号转导基团连接起来就可以构建基于分子化学的 Hg²⁺荧光核酸探针体系。Ono 等^[20]在一条茎部富胸腺嘧啶碱基的单链寡核苷酸 (oligodeoxyribonucleotide, ODN) 链两端分别标记 4-(4-二甲基氨基苯偶氮基)苯甲酸 (4-((4'-(dimethylamino) phenyl) azo) benzoic acid, Dabcyl) 和荧光素 (fluorescein, FAM)，作为猝灭基团以及荧光基团，基于荧光共振能量转移，设计了一种新型 Hg²⁺荧光核酸探针，其响应机理见图 1.3。当 Hg²⁺不存在时，该寡聚核苷酸链为一线性单链结构，所以 Dabcyl 和 FAM 相距较远，不能发生有效的荧

光共振能量转移 (FRET), 在激发光激发下, 体系有很强荧光; 当 Hg^{2+} 存在时, 由于 T 碱基对与 Hg^{2+} 的特异性结合形成稳定的 T-Hg²⁺-T 结构, 该单链寡核苷酸链折叠成类似发夹型 (hairpin) 结构的杂合体, 使其两端标记的 Dabcyl 和 FAM 距离靠近, 发生有效地荧光共振能量转移, FAM 的荧光被 Dabcyl 猝灭, 根据此信号变化来测定溶液中的 Hg^{2+} , 检出限可以达到 40 nM, 并且有很好的选择性。

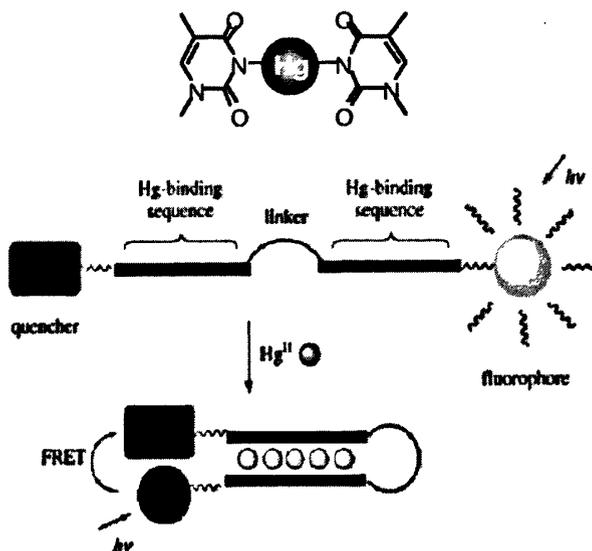


图 1.3 Hg^{2+} 与 T 碱基配位示意图及 Hg^{2+} 荧光核酸探针的响应机理^[20]

金纳米颗粒作为一种新材料, 在单链 DNA 溶液中分散性好, 溶液呈红色, 而在双链 DNA 溶液中分散性较差, 发生聚集现象, 溶液呈蓝色, 引起吸收信号的变化。科学家根据此也设计了很多 DNA 探针用于目标物检测。Yang^[21]等利用金纳米颗粒对 FAM 的猝灭效应及富 T 单链 DNA (T-rich DNA) 对 Hg^{2+} 的识别作用, 设计了一种比色和荧光增强法检测 Hg^{2+} , 响应机理见图 1.4。不存在 Hg^{2+} 时, 金纳米颗粒分散较好, 溶液呈红色, 同时由于 FAM 标记的单链 DNA 吸附在金纳米颗粒表面, 使两者距离靠近造成 FAM 的荧光猝灭, 当 Hg^{2+} 存在的时候, 由于错配 T 碱基对 Hg^{2+} 的特异性亲和作用形成

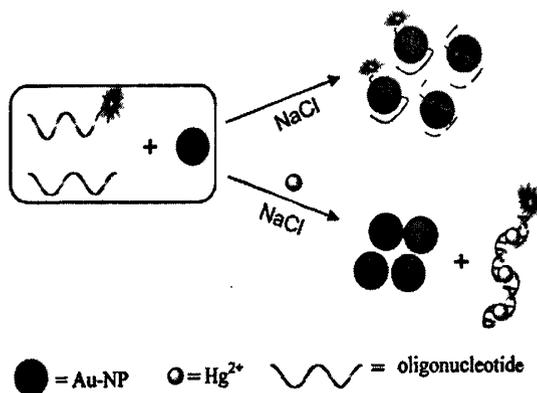


图 1.4 基于金纳米颗粒的 Hg^{2+} 传感体系的响应机理^[21]

稳定的 T-Hg²⁺-T 结构, FAM 标记单链 DNA 与另一条链杂交形成类似双链结构的杂合体, 造成金纳米颗粒聚集而使溶液呈蓝色, 同时由于双链 DNA 不能吸附在金纳米颗粒表面, 使 FAM 荧光恢复。Wang^[22]等开发了一种基于荧光共轭聚合物 (conjugated fluorescent polymer) 和非标记寡核苷酸链 (oligonucleotide) 的简单的“混合检测 (mix-and-detect)”型 Hg²⁺光化学传感体系, 其响应机理见图 1.5。该 Hg²⁺体系由水溶性的阳离子荧光共轭

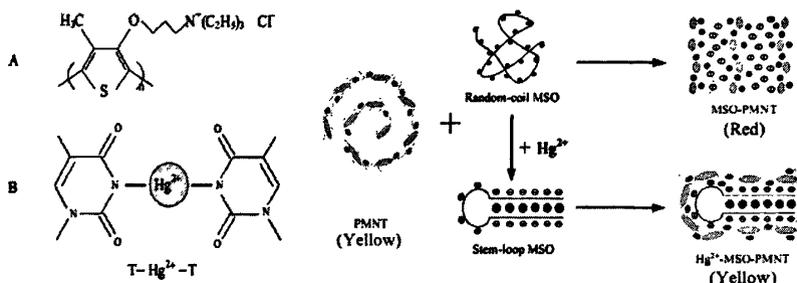


图 1.5 混合检测 (mix-and-detect) 型 Hg²⁺光化学传感体系的响应机理^[22]

聚合物 (PMNT) 和一条非标记的 Hg²⁺特异性 DNA 链 (MSO) 构成, 单独存在的 PMNT 水溶液呈黄色, 加入 MSO 后两者依靠静电作用形成红色的 PMNT-MSO 复合物, PMNT 的荧光被猝灭, 加入 Hg²⁺后, 由于 Hg²⁺与 T 特异性形成 T-Hg²⁺-T 结构使 MSO 链折叠成茎-环结构, 破坏了 PMNT-MSO 复合物结构使其掉下来, 溶液变成黄色, PMNT 荧光恢复。由于体系颜色的变化用肉眼可以检测到 12.5 μM Hg²⁺, 而利用荧光信号可以检测到 42 nM Hg²⁺。另外, Lu^[23]等利用 T-Hg²⁺-T 的稳定常数大于常规的 A-T 的稳定常数设计了基于结构开关 DNA (structure-switching DNA) 的荧光增强法检测 Hg²⁺的核酸探针。其设计机理是: 在一条长的 DNA 单链 (33-mer) 的 5'-端标记荧光基团 FAM, 在另一条与其 5'-端部分互补的短链 DNA (10-mer DNA) 的 3'-端标记荧光猝灭基团 Black Hole Quencher-1, 在加入 Hg²⁺之前, 两条链杂交使 FAM 和 Black Hole Quencher-1 距离靠近, 引起荧光猝灭; 当 Hg²⁺存在时, 由于形成 T-Hg²⁺-T 结构, 使长链 DNA 的 3'-端折叠形成类似发夹型结构, 这样可以使短链 DNA 解离下来, 即标记 Black Hole Quencher-1 链掉下来, 与 FAM 距离较远, 无法发生荧光共振能量转移, FAM 荧光恢复, 而且其荧光强度与 Hg²⁺浓度在一定范围内呈线性关系, 据此测定溶液中的 Hg²⁺。Shangguan^[24]等报道了一种金属酞菁为信号转导基团, T 碱基为识别基团的可逆性的 Hg²⁺荧光核酸探针 (4T-ZnPc), 该探针结合了酞菁优良的光学性能和 T 碱基对 Hg²⁺的特异性地识别作用。不存在 Hg²⁺时, 表现出游离态的 4T-ZnPc 的荧光性质; 当 Hg²⁺存在时, 由于 T 碱基与 Hg²⁺的特异性作用引起分子 4T-ZnPc 发生聚集, 从而导致其荧光猝灭, 而且其荧光猝灭程度与 Hg²⁺浓度在一定范围内呈线性关系, 据此测定溶液中的 Hg²⁺。Zhang^[25]等以四苯乙烯 (TPE) 为信号报告单元, T 碱基为识别基团设计了新型 Hg²⁺荧光核酸探针, 在加入 Hg²⁺之前, 游离态的 TPE 荧光很弱; 加入 Hg²⁺之后, 由于 T 碱基与 Hg²⁺的作用引

起分子 TPE 聚集, 从而导致 TPE 分子的荧光增强, 而且其荧光增强程度与 Hg^{2+} 浓度在一定范围内呈线性关系, 据此测定溶液中的 Hg^{2+} 。到目前为止, 利用 T 碱基对与 Hg^{2+} 特异性结合作用已经发展设计了许多新型的核酸探针体系, 并各有其优势。

1.3.2 基于 G-四链体比色核酸探针设计

具有特殊序列的单链 DNA 可以在金属离子诱导下折叠成 G-四链体 (G-quadruplex) 结构^[26], 许多科学工作者基于这一原理设计了性能优良的核酸探针体系。Wang^[27]等利用一条特殊的同时富含 G 碱基及 T 碱基的单链 DNA (ARGO100), 利用比色信号变化来检测溶液中的 Hg^{2+} 。当不存在 Hg^{2+} 时, ARGO100 折叠形成 G-四链体, 与血晶素结合后具有过氧化物酶催化活性引起吸收信号的表达; 当有 Hg^{2+} 存在时, ARGO100 中 T 碱基与 Hg^{2+} 的特异性结合形成稳定的 T- Hg^{2+} -T 结构, 阻止了 G-四链体形成, 吸收信号很弱。同时, 该研究小组研究了一条富 G 链 (PS2.M) 分别在 K^+ 及 Pb^{2+} 存在下形成 G-四链体后的过氧化物酶活性^[28]。该链在 K^+ 存在时形成 G-四链体, 具有过氧化物酶活性, 加入 Pb^{2+} 后, Pb^{2+} 可以将 G-四链体中的 K^+ 竞争下来, 使 G-四链体失去过氧化物酶活性。基于此原理, 该研究小组发展了一种利用比色以及化学发光同时检测 Pb^{2+} 的方法^[29]。

1.3.3 基于金属离子特异性 DNAzyme 核酸探针设计

核酶是一类具有催化功能的核酸分子。早在 20 世纪 80 年代, 科学家们就发现 RNA 催化酶反应, 将其命名为核酶^[30-31], 之后又发现 DNA 也具有酶的特性, 称为脱氧核酶 (deoxyribozyme 或 DNAzyme)^[32-36], 其发现是人类对于酶认识的又一次飞跃。DNAzyme 的活性与某些金属离子密切相关, 通过体外筛选技术可以得到对一些金属离子有特异性结合的 DNA/RNA 核酸适体或核酶, 所以可以利用这些酶来构建金属离子荧光核酸探针, 用于环境中金属离子的检测。Tan^[37]等也利用 Pb^{2+} 依赖性的 DNAzyme 设计了 Pb^{2+}

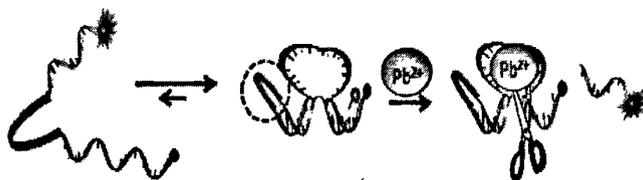


图 1.6 基于 DNAzyme 设计的 Pb^{2+} 荧光传感体系的机理^[37]

荧光传感体系, 传感机理见图 1.6。通过在 DNAzyme 两端分别标记猝灭基团和荧光基团, 其部分互补的 DNA 链通过多个 T 碱基 (polyT) 连接起来, 两端发生分子内杂交将荧光基团和猝灭基团拉近, 由于 FRET 使荧光基团荧光被猝灭。当 Pb^{2+} 存在时, DNAzyme 中荧光标记的 DNA 链被切断, 使其远离猝灭基团, 造成荧光恢复。

1.4 本论文的选题依据及研究内容

随着重金属离子及其化合物的广泛应用，其对环境的污染也越来越严重，研究环境中重金属离子的含量就显得尤为重要，目前已经报道了许多高灵敏、快速、准确、低成本并能选择性地分析检测重金属离子的方法。但是在研究和实际应用中还存在着一些不足：首先，信号表达问题。由于重金属离子对一些常见荧光体的猝灭作用，容易“产生假阳性信号”；其次，需要标记。许多核酸探针都需要标记来产生信号表达，不仅费时费力，还可能会对探针的活性造成一定程度的损害。本论文在上述的一些重金属离子检测方法的基础上，对于重金属离子 Hg^{2+} 以及 Pb^{2+} 的检测方法做了一些探索和尝试，希望对以后的研究提供一些参考及借鉴。本论文的主要研究内容如下：

(1) 基于错配的胸腺嘧啶碱基对 (T) 与 Hg^{2+} 的特异性亲和作用所形成的稳定的 T- Hg^{2+} -T 结构以及 γ -环糊精与苝分子的包络作用，两者协同使探针链折叠成类似发夹型 (hairpin) 结构的杂合体，造成探针两端标记的苝分子距离靠近，产生二聚体的荧光，设计了基于荧光增强型 Hg^{2+} 核酸探针。

(2) 基于 DNAzyme 与 G-四链体设计了一种发夹型结构的核酸探针，当不存在 Pb^{2+} 时，富 G 链通过与碱基互补配对被封闭，不能形成 G-四链体结构发生显色反应，吸收信号较低；通过 Pb^{2+} 作用后，将底物链上连接的富 G 链释放出来，形成 G-四链体引发显色反应，通过吸收信号的响应来达到检测 Pb^{2+} 的目的。

(3) 基于 DNAzyme 可以在 Pb^{2+} 的作用下，能够发生特异性的断裂以及 SYBR Green I (SG) 与单双链 DNA 作用不同，设计了一种 Pb^{2+} 荧光核酸探针。体系中不存在 Pb^{2+} 时，DNAzyme 更多的以双链形式存在，SG 嵌入双链 DNA 中，荧光信号很强；当体系加入 Pb^{2+} 时，DNAzyme 中的双链结构被切断后释放，引起溶液中单链浓度增加使 SG 荧光降低，以此信号变化来检测 Pb^{2+} 。

第2章 基于环糊精/苾协同作用荧光检测汞离子

2.1 引言

汞是常温下唯一以液态存在的金属,通常呈银白色。在自然界中,汞以无机汞、有机汞等多种形式存在。汞的用途较广,在冶金工业中常用汞齐法(汞能溶解于其它金属形成汞齐)提取金、银和铊等金属;化学工业上用汞作阴极以电解食盐溶液制取烧碱和氯气;汞的一些化合物在医药上有消毒、利尿和镇痛作用;汞银合金是良好的牙科材料;在中医学上,汞用作治疗恶疮、疥癣药物的原料。同时汞也被认为是自然界中对人类最具危害的有毒元素之一。汞的毒性取决于它的状态,一般说来,金属汞对人不会产生毒性,有机汞化合物的毒性比无机汞化合物的毒性要大得多。一旦汞进入食物链被人误食,会对人的健康造成极大危害,如大脑和神经系统损伤等^[38-39]。世界环境保护组织规定人类饮用水含汞量最高为 2 ppb。所以发展灵敏度以及选择性更高的汞离子检测方法是非常有必要的。至此,对汞离子检测,人们已经发展出很多方法包括原子发射光谱、原子吸收光谱^[2]和等离子体质谱^[3]等,然而这些方法仍存在着一些缺点,例如样品需要预处理、需要一些昂贵的仪器、操作手续复杂以及检测灵敏度不够等,因此,随着越来越多汞化合物的应用以及汞的环境污染,人们希望研究出高灵敏、准确、快速、低成本并能选择性地分析检测 Hg^{2+} 的方法。近年来,科学家们也发展了许多基于电化学信号、荧光信号^[40-48] 以及利用一些新材料如金纳米颗粒等^[49-51] 的 Hg^{2+} 核酸探针。在这些检测方法中,基于 DNA 以及荧光信号表达的分子探针由于其检测灵敏度高、易于操作以及信号容易检测^[44-45] 等受到了人们越来越多的关注。但是这些方法在实际应用中仍然存在一定的缺陷,同时由于 Hg^{2+} 的重原子效应可以猝灭常见的荧光体,所以如何将识别信息转化为荧光增强型的输出信号也是一个挑战。总之,发展灵敏度高,选择性好以及易于检测的 Hg^{2+} 体系一直是许多研究者追求的目标。

苾是一种淡黄色晶体的有机化合物,在许多化学分子修饰中存在很大优势^[52-53]。苾单体在吸收光子后,激发态的苾单体能够与基态的苾单体形成激基缔合物,水溶液中高浓度的苾分子还可以形成二聚物,产生二聚体的荧光,所以苾分子具有单体以及二聚体两种荧光发射,同时苾分子的荧光化合物有很大的消光系数、高的量子产率、长荧光寿命等^[54] 优势。利用苾分子的这种性质,将苾分子标记在核酸分子两端就可以很方便的表征 DNA 单双链的形成以及 RNA 折叠^[55-60],同时利用这两种荧光信号可以设计一些比率型荧光分子探针,降低背景信号来提高检测灵敏度。然而苾二聚体的荧光很容易受到微环境的影响:一些重金属离子 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 等对苾的二聚体荧光有很强的猝灭作用,所以利用苾分子的荧光信号来检测这些离子就受到了一定的限制。所以,寻求一种有效

的手段来保护芘的荧光不被重金属离子猝灭是非常有必要的。本章中,我们尝试利用环糊精(cyclodextrin, CD)的包络作用来达到这一目的。环糊精是直链淀粉在环糊精葡萄糖基转移酶作用下生成的一系列环状低聚糖的总称,通常含有6-12个D-吡喃葡萄糖单元。其中研究得较多并且具有实际意义的主要是含有6、7、8个葡萄糖单元分子,分别称为 α -、 β -、 γ -环糊精。环糊精不是圆筒状分子而是略呈锥形的圆环,由于环糊精的外缘亲水而内腔疏水,因此它能够像酶一样提供一个疏水的结合部位,作为主体(host)包络各种适当的客体(guest),如气体分子、有机分子以及无机离子等^[55-60]。也使其可依据范德华力、疏水作用力、主客体分子间的包络作用等与许多有机和无机分子形成包合物及分子组装体系,成为化学和化工研究领域的热点之一。这种选择性的包络作用即通常所说的分子识别,其结果是形成主客体包络物(host-guest complex)。而芘分子与 γ -环糊精的包络作用也已经研究的越来越成熟,这种包络物被证明是形成1:2亦或2:2的分子^[61-63],所以我们利用 γ -环糊精的这种性质以及含有错配的胸腺嘧啶(thymine, T)碱基对(T-T)能与汞离子发生特异性地结合,形成稳定的T-Hg²⁺-T结构,发展了一种新型的检测Hg²⁺方法:在Hg²⁺或者 γ -环糊精存在时,由于探针分子环部特殊的DNA双链结构,分子两端的芘分子不能相互靠近而产生芘的二聚体荧光;只有当两种物质共同存在时,基于T-Hg²⁺-T以及 γ -环糊精包络这两者的协同作用,芘分子的二聚体荧光才会出现,以此来检测Hg²⁺。

2.2 实验部分

2.2.1 主要试剂和仪器

硝酸汞、硝酸镁、硝酸钠及其他的金属离子的固体试剂购于国药集团药业股份有限公司(中国·上海), γ -环糊精、三羟甲基氨基甲烷(Tris (Hydroxymethyl) aminomethane, Tris)购于Sigma(美国·St. Louis, MO)公司。Hg²⁺(10 mM)以及 γ -环糊精(100 mM)母液分别由Hg(NO₃)₂、 γ -环糊精溶于高纯水(sterile Minipore water, 18.3 M Ω)中得到,实验所用的缓冲溶液为10 mM Tris-HNO₃(pH 7.6, 300 mM NaNO₃, 5 mM Mg²⁺),然后根据实验需要加入不同浓度的金属离子测试。未经说明,实验中所有使用的化学试剂都为分析纯,并且未经进一步的处理。除非特殊说明,所有实验都是在室温下完成的。日立U3010 UV/Vis光谱仪(Hitachi U-3010 UV/Vis spectrophotometer, Kyoto, Japan)用于紫外-可见吸收光谱的测量。PHS-3C型pH计(上海雷磁仪器厂,中国·上海),用于缓冲溶液pH值的校正。实验中所用的DNA由大连宝生物工程有限公司(Dalian TaKaRa Biological Engineering Technology and Services Co., Ltd, Dalian)合成,高效液相色谱(HPLC)纯化,DNA样品用高纯水溶解后得到母液,储存于4℃备用。本章所使用DNA具体序列见表2.1:

表 2.1 本章所使用 DNA 的名称及序列 (5'-3')

名称	碱基序列
P1	Pyrene-TTTTTT CCTGACTTCTATGCCCA TTTTTT-Pyrene
P2	Pyrene-CGTAGGCCTGACTTCTATGCCCACTACG-Pyrene
B1	ATAGAAGT
B2	ATAGAAGTC
B3	GCATAGAAGTC
B4	GCATAGAAGTCA
B5	GGCATAGAAGTCA
B6	GGGCATAGAAGTCAG

2.2.2 溶液中 Hg^{2+} 检测

将 P1 和 B4 链加入至 10 mM Tris- HNO_3 缓冲液中, 最终浓度分别为 100 nM 和 200 nM。加热至 85 °C 5 分钟, 然后缓慢冷却至室温, 约 2 小时后, 加入 5 mM γ -环糊精, 反应 1 h 后, 准备测量。

将所需浓度的 Hg^{2+} 加入至前面准备的样品中, 室温下放置 5 分钟后, 将溶液转移入石英池, 用荧光仪 PTI QM4 (Photo Technology International, Birmingham, NJ) 进行光谱的测量, 激发波长为 345 nm。

2.3 结果与讨论

2.3.1 汞离子对苾二聚体荧光影响

本实验设计是基于 Hg^{2+} 存在下, 两端标记的苾分子由于 T- Hg^{2+} -T 作用靠近, 产生二聚体的荧光, 但是, 在实验过程中发现, 苾分子的二聚体的荧光并未出现。从图 2.1A 可以看出, 随着不同浓度的 Hg^{2+} 加入, 苾分子的二聚体荧光并没有出现以及发生很大的变化, 出现这种现象可能的原因是苾分子的二聚体荧光被 Hg^{2+} 猝灭或者是并没有形成苾分子的二聚体, 所以利用另外一条 DNA 链 P2 来验证。P2 链环部碱基与 P1 完全相同, 不同的是茎部有六个可以互补配对碱基。当不存在 Hg^{2+} 时, 茎部就可以通过碱基互补配对使链末端标记的苾分子靠近, 产生苾分子的二聚体荧光。实验结果表明: 在 P2 溶液中加入不同浓度的 Hg^{2+} 之后, 苾分子的二聚体荧光逐渐降低, 说明苾分子的二聚体荧光逐渐被猝灭 (图 2.1B), 证明 Hg^{2+} 对苾分子的二聚体荧光有很强的猝灭作用, 所以利用苾分子的二聚体荧光信号作为信号输出来检测 Hg^{2+} , 首先必须解决 Hg^{2+} 对苾分子荧光猝灭这一问题。

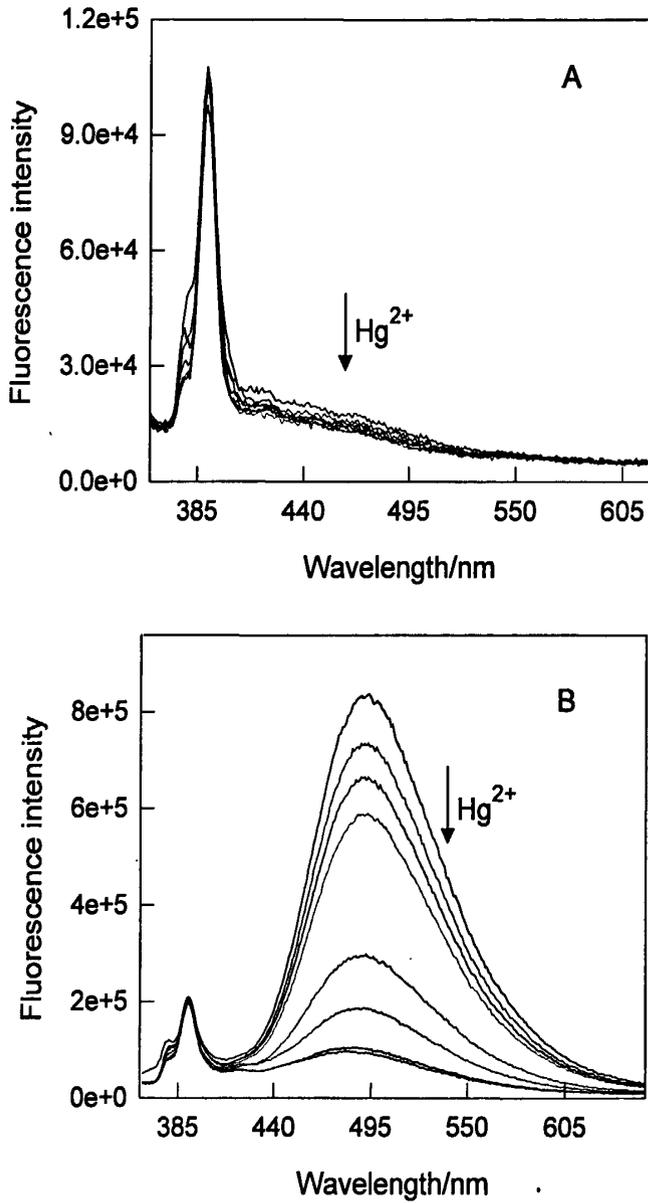


图 2.1 A: 探针 P1 在不同 Hg^{2+} 浓度下的荧光发射光谱; B: P2 在不同 Hg^{2+} 浓度下的荧光发射光谱。

图 B 中箭头指随着 Hg^{2+} 浓度的增加, P2 的二聚体荧光逐渐降低

2.3.2 设计机理

本实验小组在前面的研究中,也探讨了苝分子与 γ -环糊精的包络作用,通过实验发现,双苝分子进入到 γ -环糊精的空腔可以很大程度的增强苝分子的二聚体荧光信号^[64],在本实验体系中,为了考察 γ -环糊精对苝分子二聚体荧光有保护作用而不被 Hg^{2+} 猝灭,在 γ -环糊精存在的情况下,研究了 Hg^{2+} 对 P2 链的二聚体荧光的影响。从图 2.2 可以看出:在 γ -环糊精存在时,加入 Hg^{2+} 后,苝分子的二聚体荧光几乎不变或变化很小,说明 Hg^{2+} 对苝分子二聚体荧光猝灭很小,可以将其忽略。所以为了达到本实验设计目的,体系必须加入 γ -环糊精。

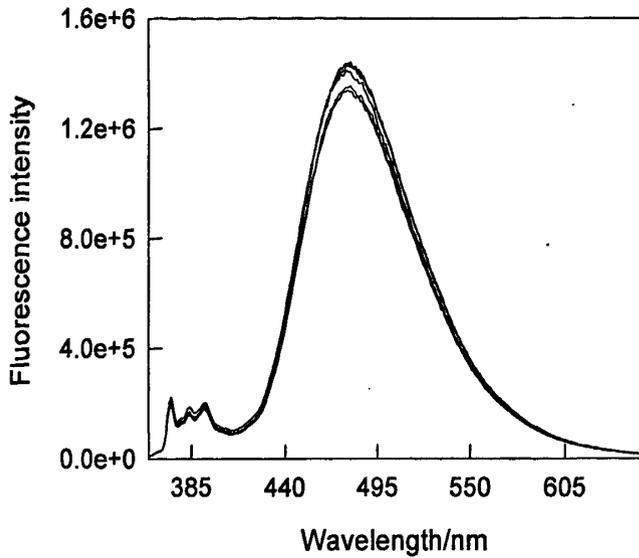


图 2.2 在 γ -环糊精存在时, Hg^{2+} 对 P2 的二聚体荧光影响

具体的实验设计为：在体系中存在 γ -环糊精的情况下， Hg^{2+} 加入之前，由于 P1 链环部一部分双链位阻影响，P1 末端标记的花分子不能有效的靠近，此时在激发光激发下，二聚体荧光很弱，当体系加入 Hg^{2+} 后，由于 T-T 与 Hg^{2+} 的特异性亲和作用可以形成稳定的 T- Hg^{2+} -T 结构以及 γ -环糊精与花分子的包络作用，两者协同作用，使 P1 折叠成类似发夹型 (hairpin) 结构的杂合体，造成 P1 两端标记的花分子距离靠近，产生二聚体的荧光信号，而且花分子的荧光增强与 Hg^{2+} 浓度在一定范围内呈线性关系，据此测定溶液中的 Hg^{2+} ，如图 2.3 所示。

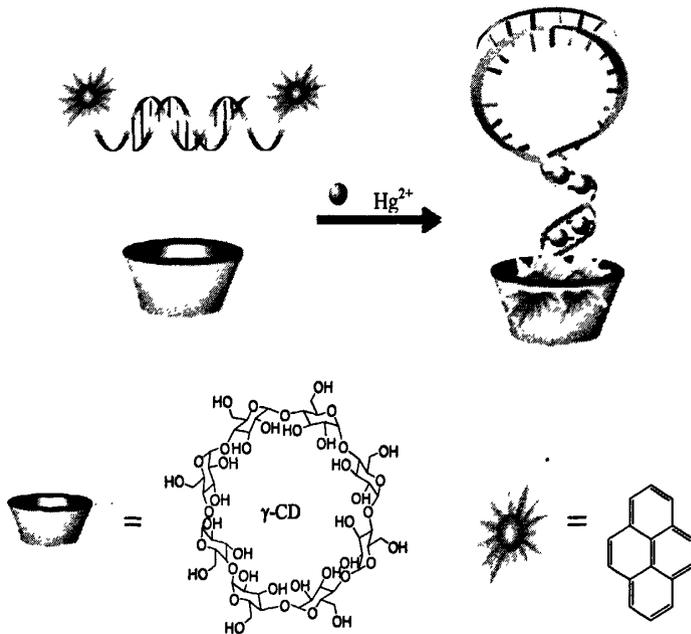


图 2.3 体系对 Hg^{2+} 的响应机理图

另外,本实验还研究了探针 P1 在没有 Hg^{2+} 存在的情况下,加入 γ -环糊精时,由于 γ -环糊精对芘分子的包络作用而产生芘的二聚体的荧光的变化。为了达到检测 Hg^{2+} 的目的,我们利用一条与探针 P1 链环部有部分碱基互补配对的 DNA 链 (B4) 杂交形成 DNA 双链来降低背景信号,即在无 Hg^{2+} 存在的情况下, γ -环糊精对芘分子作用力大大降低从而产生比较低的二聚体荧光信号,只有在 γ -环糊精与 Hg^{2+} 共同存在下,两者的共同作用才产生较强的信号,从而保证了本实验体系的可靠性 (图 2.4)。

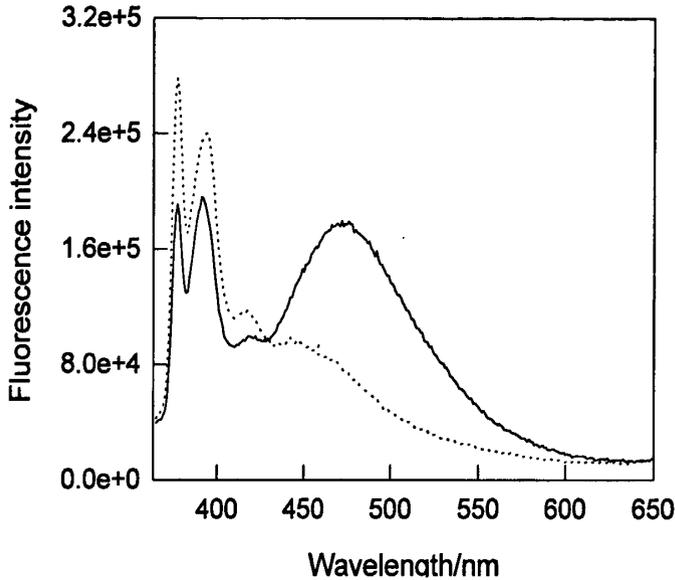


图 2.4 本体系对 Hg^{2+} 的荧光响应光谱图。虚线为加入 Hg^{2+} 之前的探针的荧光发射;实线为加入 $5 \mu\text{M}$ Hg^{2+} 之后探针的荧光发射

2.3.3 实验条件优化

从实验的设计机理可以看出,实验中有三个很关键部分:两端分别标记芘分子的探针 P1 链、与探针 P1 环部碱基有部分互补配对的 DNA 链以及 γ -环糊精,所以,在检测 Hg^{2+} 之前,对实验中关键的影响因素进行了优化。

首先,对与探针 P1 环部碱基有部分互补配对的 DNA 链的长度进行优化选择。通常情况下,形成稳定的 DNA 双链互补碱基的数目不能少于 8 个,所以,对与探针 P1 环部互补配对的 DNA 链的碱基数目从 8 至 17 进行了优化。从图 2.5A 可以看出:在一定浓度的 γ -环糊精存在下,体系的检测信号随着链碱基数目的增加而逐渐增加后又有所降低。如果该链过长,体系的背景信号会大大降低,但同时检测信号也会降低,原因是:过长的 DNA 链会与探针链形成比较稳定的双链,由于其位阻作用,即使加入高浓度的 Hg^{2+} ,探针两端的芘分子也不能靠近而产生响应信号。但是如果链太短,产生的背景信号相对会比较高,体系的灵敏度也会下降。从实验结果可以看出,当碱基数目为 12 个时,体系的响应灵敏度最高,所以实验中选用 12 个碱基的 DNA 链来检测 Hg^{2+} 。同时,我们

也对该链的浓度进行了优化。我们知道，如果该链的浓度比较高，就有比较多的链与探针 DNA 链杂交，产生较强的位阻作用，背景信号会被大大的降低，从图 2.5B 得到，当该链的浓度达到探针链的两倍时，体系的响应信号达到最大，说明在该实验中，两倍于探针链的浓度已经足够，所以试验中需要的该链的浓度为 200 nM。

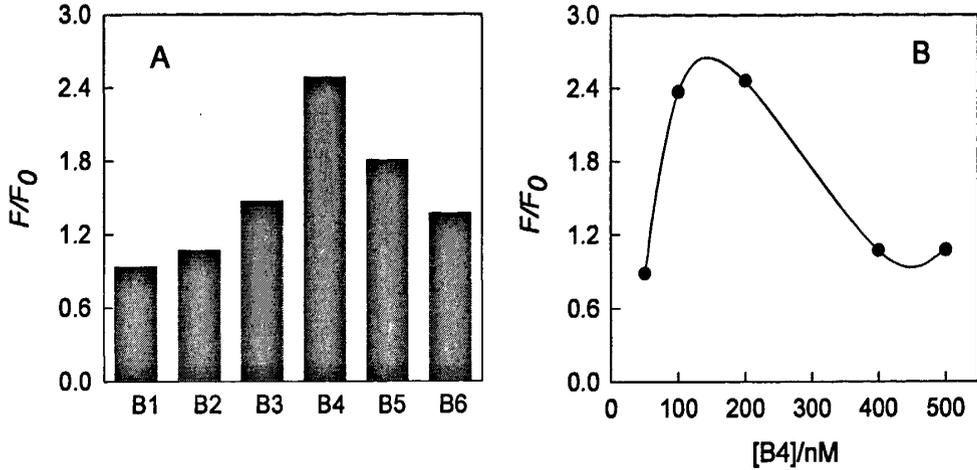


图 2.5 对与探针环部互补的 DNA 链的长度 (A) 及浓度 (B) 优化

F_0 与 F 分别指体系加入 $5 \mu\text{M Hg}^{2+}$ 前后的荧光强度

在本实验体系的设计中， γ -环糊精也是一个很重要的影响因素。当存在 γ -环糊精时，可以达到对苝分子二聚体荧光信号的保护作用，同时，由于 γ -环糊精与苝分子的包络作用在加入 Hg^{2+} 前会产生二聚体荧光即背景信号。体系所以考察了不同浓度的 γ -环糊精，对苝分子二聚体荧光信号的影响。如图 2.6 所示：图中箭头指随着 γ -环糊精浓度的增加，二聚体荧光强度的变化趋势。体系中不存在 Hg^{2+} 时，随着 γ -环糊精浓度的不断增大，苝

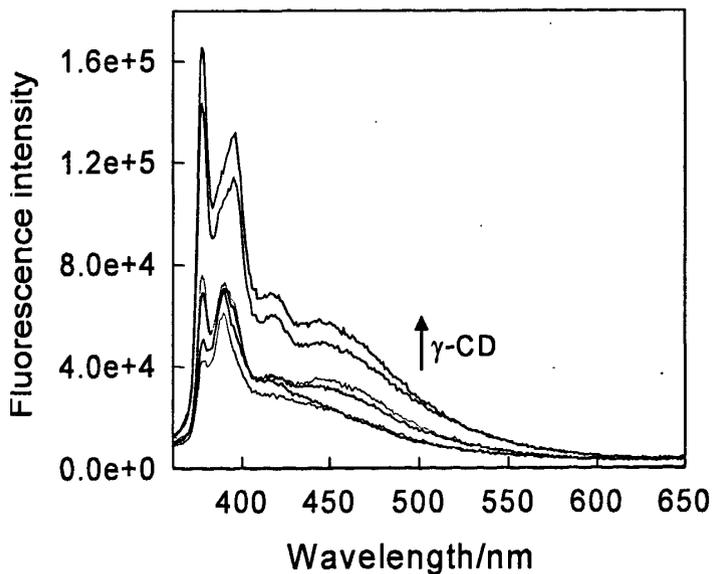


图 2.6 γ -环糊精浓度对 P1 二聚体荧光信号的影响

分子的二聚体荧光变化不大,说明增加 γ -环糊精的浓度,有更多的芘分子进入到 γ -环糊精的空腔。也说明了在该体系中,存在一定浓度的 γ -环糊精,既可以达到保护芘分子的二聚体的荧光的作用,同时由于环部 DNA 双链的结构,又不会产生很强的背景信号,补充说明了该体系检测 Hg^{2+} 的可靠性。

对 γ -环糊精的浓度进行了优化,从图 2.7 可以看出,当 γ -环糊精的浓度达到 5 mM 时,体系的响应最高。这可以解释为,当 γ -环糊精的浓度过低时,存在 Hg^{2+} 时,不能产生对芘分子的保护作用,也没有很多的芘分子的二聚体形成;随着 γ -环糊精浓度的升高,有越来越多的芘分子进入到 γ -环糊精的空腔中,达到保护芘分子荧光的目的,同时有更多的芘的二聚体形成。如果 γ -环糊精浓度过高,背景信号也会相应的升高,所以在本体系中, γ -环糊精的浓度选择为 5 mM。

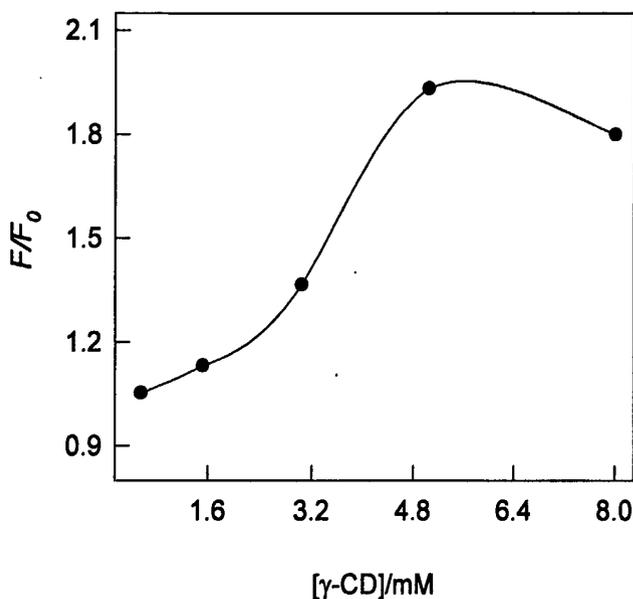


图 2.7 γ -环糊精浓度对体系灵敏度的影响

F_0 与 F 分别指体系加入 $5 \mu\text{M}$ Hg^{2+} 前后的荧光强度

通常认为, DNA 双链的形成及稳定性与溶液中的离子强度有一定的关系,随着离子强度增加,双链的形成更稳定。据报道,基于 Hg^{2+} 的富胸腺嘧啶链形成 T- Hg^{2+} -T 结构是在高盐的浓度下进行的,所以在本实验体系中,研究了离子强度的影响。实验结果如图 2.8 所示: F 与 F_0 分别指体系加入 Hg^{2+} 之前以及加入 $5 \mu\text{M}$ Hg^{2+} 后的荧光强度。当盐离子浓度从 0 mM 增加至 300 mM 时,芘分子的二聚体荧光信号会随着盐离子浓度的升高而增加,当盐离子浓度增加至 300 mM 时,体系的响应灵敏度达到最大值,继续增加盐离子浓度时,体系的响应灵敏度会有所下降,说明合适的盐浓度可以提供本实验体系一个最佳的协同反应环境。所以在本实验体系中,我们选择盐氯化钠的浓度为 300 mM。

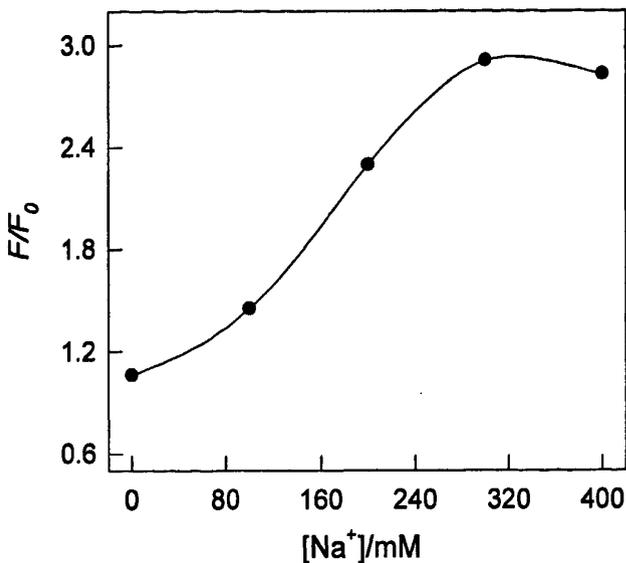


图 2.8 盐离子浓度对本体系灵敏度的影响

F_0 与 F 分别指体系加入 $5 \mu\text{M Hg}^{2+}$ 前后的荧光强度

2.3.4 响应曲线

在优化的实验条件下，我们研究了本体系对 Hg^{2+} 的响应曲线。从前面的实验结果可以知道，只有在 Hg^{2+} 存在下，苝的二聚体荧光信号才能有很好的表达，所以可以根据苝分子的二聚体荧光信号对 Hg^{2+} 进行定性以及定量分析检测。结果如图 2.9 所示：随着体系加入 Hg^{2+} 浓度的增加，苝分子的二聚体荧光信号也逐渐增加。在 Hg^{2+} 浓度从 $0.5 \mu\text{M}$

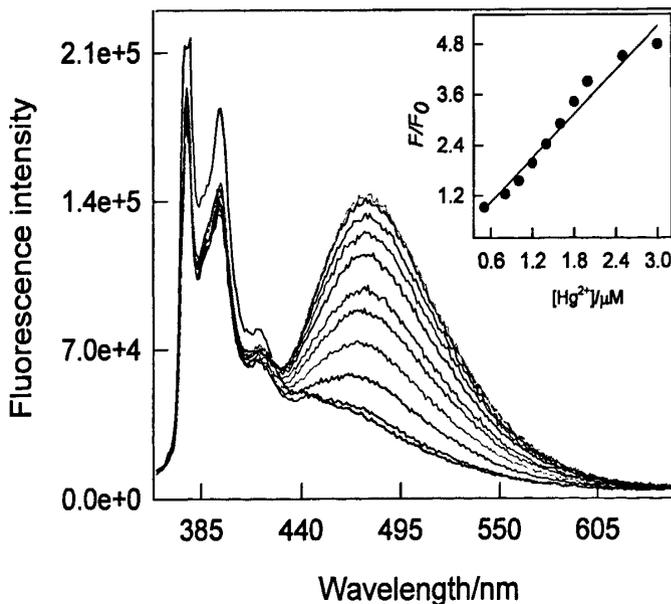


图 2.9 体系对 Hg^{2+} 的荧光响应。浓度依次为 $0, 0.5, 0.65, 0.8, 1.0, 1.6, 3.0, 5.0, 10, 20, 40 \mu\text{M}$;

内插图： Hg^{2+} 的校正曲线 (F_0 与 F 分别指体系加入 Hg^{2+} 前后的荧光强度)

到 $3.5 \mu\text{M}$ 的范围内，本体系的响应信号与 Hg^{2+} 浓度呈良好的线性关系 ($R^2=0.927$)，如

内插图所示, F_0 与 F 分别表示体系加入 Hg^{2+} 前后的荧光响应。通过空白样品溶液的三倍标准偏差计算检出限为 $0.3 \mu M$ 。从图 2.9 也可以看出, 当 Hg^{2+} 的浓度达到 $20 \mu M$ 时, 芘的二聚体荧光不会再增加, 继续增加 Hg^{2+} 的浓度, 荧光反而会降低, 说明在较高的 Hg^{2+} 浓度下仍然会对芘分子的二聚体荧光造成猝灭。

2.3.5 选择性

选择性是衡量荧光传感体系性能的一个重要指标。通过加入一些常见阳离子, 比如 Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 等, 考察对本体系测定 Hg^{2+} 的干扰情况, 上述每一种离子的测定条件都和 Hg^{2+} 的测定条件一致。实验结果如图 2.10 所示: 本传感体系对 Hg^{2+} 的响应最大, 说明本传感体系对 Hg^{2+} 测定有极好的选择性, 常见阳离子对 Hg^{2+} 测定无干扰, 可用于实际样品中 Hg^{2+} 的测定。

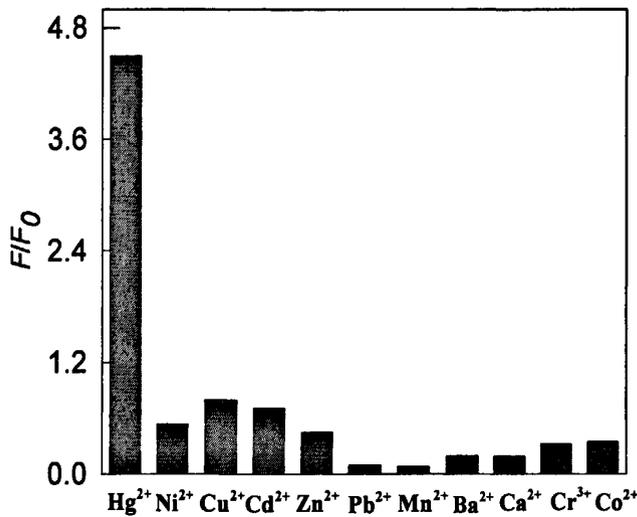


图 2.10 传感体系的选择性

2.3.6 检测应用

用本章所建立的方法和电感耦合等离子体质谱法 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 对自来水以及湘江水样中的 Hg^{2+} 进行了检测分析, 如表 2.2 所示。自来水及湘江水样的处理: 等水龙头的水流约 20 分钟后取样, 加热煮沸 5 分钟以除去

表 2.2 水样中 Hg^{2+} 检测

Water sample	Added (μM)	Proposed method (μM)	ICP-MS method (μM)
Tap water	0.80	0.79 ± 0.02	0.80 ± 0.01
Tap water	1.60	1.60 ± 0.01	1.61 ± 0.02
Xiang water	no	0.72 ± 0.05	0.74 ± 0.03
Xiang water	2.00	2.72 ± 0.08	2.80 ± 0.02

水中的氯备用,湘江水经过滤除去水中的一些大的漂浮物以及泥土等备用。实验结果如表 2.2 所示:本实验体系对 Hg^{2+} 的响应范围为 5.0×10^{-7} - 3.0×10^{-5} M, 还不能达到对于饮用水样 10^{-8} - 10^{-9} M 的要求。

2.4 小结

设计合成了一种基于 T- Hg^{2+} -T 以及 γ -环糊精协同作用,以苾分子二聚体荧光信号增强为检测信号的 Hg^{2+} 核酸探针,对于实验体系用到 γ -环糊精,不仅提供了一种保护苾分子二聚体荧光的手段,还与 Hg^{2+} 协同作用,增强了苾分子的二聚体荧光信号,提高了检测灵敏度。另外,本传感体系的识别作用是基于 T 碱基与 Hg^{2+} 形成稳定的 T- Hg^{2+} -T 结构,所以具有很高的选择性,同时,以苾分子的二聚体荧光信号作为信号报告基团,基于苾分子二聚体荧光长寿命的特点,本方法在复杂样品以及生物样品检测中有很大的潜在的应用价值。

第3章 基于脱氧核酶免标记比色检测铅离子

3.1 引言

设计新型的探针分子来检测一些金属离子以及有机小分子一直是分析化学研究领域的一个热点^[65-68]。相对于蛋白质以及核酸检测的许多方法,金属离子以及有机小分子的检测方法却有限。目前,用于金属离子检测的方法主要有同位素稀释质谱法(IDMS),原子吸收光谱,感应耦合等离子体/质谱法^[2-3],荧光计法^[69]等。然而,由于用到的仪器均属于大型精密仪器,需要专业的技术人员才能完成测试,且仪器的费用相对较高,另外样品必须经过高温硝化或萃取,操作过程繁琐,无法实现实时检测,因此很难满足基层单位及环境样品的快速检测。在重金属的离子检测中,由于铅(Pb^{2+})对人体健康的极大危害,人们不断开发新的金属离子感应措施来检测环境中的铅。铅中毒最大的特点是非特异性,不容易引起人们的重视,人体在吸入或者食入后,铅会在骨骼、毛发、牙齿等处积累,当积累达到一定量后,就会引起人身体上的一些不舒服如头疼、睡眠障碍、腹痛等症状,还会导致血和尿中尿酸浓度增加,引起关节和肾的损害。铅还具有致癌性,无机铅已被国际癌研究协会(IARC)列为人类的致癌物之一。另外,铅对儿童的危害要比成人更为敏感,因为儿童的神经系统处于快速的生成和成熟时期,铅对其毒性作用,不仅表现在高浓度时接触的状况下,在低剂量水平下,也会影响到儿童的神经行为发育。所有这些危害,都促使人们去研究和开发一些先进的技术手段来检测铅离子,这样人们就可以有意识的去预防,减少铅对人类健康的危害。核酸探针由于具有选择性好、灵敏度高、分析速度快、低成本、无污染等特点而被人们所重视。如:利用酶活性的DNA/RNA、核酸适体(aptamers),适体酶(aptazymes)这些功能化的核酸分子研制检测金属离子传感器。利用DNA构建传感体系还具有以下优点:(1)DNA合成较方便便宜。一般来说,基于分子化学设计合成的探针都需要比较繁琐的化学合成路线及步骤,合成过程费时费力,价格较贵,相对于基于分子化学设计合成的探针来说,DNA的合成则简单得多,也比较便宜;(2)DNA的水溶性好。一般基于分子化学设计合成的探针水溶性都较差,只有极少数可以实现在纯水中检测被测物,而DNA则可以完全溶解在水溶液中,因此可以增加探针的水溶性;(3)稳定性较好,DNA溶液在室温和水溶液中可以稳定存在7天左右,可以满足一般检测的使用要求,在4℃时,保存的时间可以更长。

提高检测灵敏度的一个重要的方法就是信号放大,利用蛋白酶如辣根过氧化物酶进行电化学和比色信号放大检测已经得到了很好的检测效果^[70-72]。近年来,利用脱氧核酶(DNAzyme)进行信号放大检测也得到了很好的发展^[73-78]。DNAzyme是一种由体外筛

选技术得到的具有催化功能的 DNA 片段, DNAzyme 具有比较稳定的化学性能, 容易合成且能随机筛选等优点, 使其适合于生物技术和药物使用。DNAzyme 在金属离子如 Pb^{2+} [79-80]、 Mg^{2+} [81]、 Zn^{2+} [82]、 Co^{2+} [83-84]、 UO^{2+} [85]等作用下, 能够发生特异性的断裂, 吸引人们来设计新型的金属离子的传感体系。目前为止, 利用 DNAzyme 已经建立了基于荧光、比色、电化学以及电化学发光的高灵敏度, 高选择性的金属离子传感器。但是这些传感器的检出限还达不到美国环境保护局 (EPA) 的要求, 并且在实际的复杂环境中的检测灵敏度不高也使其应用受到一定的限制。

在本章中, 我们建立了一种基于 G-四链体 (G-quadruplex) 以及 DNAzyme 相结合的检测 Pb^{2+} 的体系。DNA 一般是以双链形式存在, 同时也存在三链、四链的结构, G-四链体是四链结构中的一种, 该结构是由富含鸟嘌呤 (G 碱基) 的序列在 Na^+ 或 K^+ 溶液中形成, 其中每一层是由 G 与 G 之间通过氢键作用形成 G-tetrads 结构。此结构可以由 4 条, 2 条或者 1 条核酸构成。该结构与血晶素 (Hemin) 一起, 具有很强的过氧化物酶活性, 可以催化 2, 2-联氮-二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS)-双氧水 (H_2O_2) 发生显色反应, 所以常被用来作为一种检测手段去检测一些目标物。在本实验体系中, 结合 DNAzyme 与 G-四链体设计了一种发夹型结构的核酸探针, 当不存在 Pb^{2+} 时, 富 G 链通过与碱基互补配对被封闭, 不能形成 G-四链体结构发生显色反应, 吸收信号较低; 通过 Pb^{2+} 作用后, 将底物链上连接的 G 链释放出来, 引发显色反应, 通过吸收信号的响应来达到检测 Pb^{2+} 的目的。在体系中通过加入稍微过量的底物链, 可以利用循环信号放大得到更高的检测灵敏度。

3.2 实验部分

3.2.1 主要试剂

实验中所用的 DNA 序列由大连宝生物工程有限公司 (Dalian TaKaRa Biological Engineering Technology and Services Co., Ltd, Dalian) 合成, 经高效液相色谱 (HPLC) 纯化, 具体序列见表 3.1。氯化镁、氯化钠、硝酸铅与其它金属离子的固体样品购于国药集团药业股份有限公司 (中国·上海), HEPES, ABTS, Hemin 购于 Sigma (美国·St. Louis, MO) 公司。DNA 样品用高纯水 (sterile Minipore water, 18.2 MΩ) 溶解后得到母液, 储存于 4 °C 备用。氯化镁、氯化钠、硝酸铅及其它金属离子的储备液是将其溶解在高纯水

表 3.1 本章所使用的 DNA 名称及序列 (5'-3')

名称	碱基序列
17-DS	CCCGCCCTTGAGACTAACTATrAGGAAGAG ATGGGGTAGGGCGGGTTGGGT
17-E	CATCTCTTCTCCGAGCCGGTCGAAATAGTTAGT

中配制而成, 未经特殊说明, 其它无机或有机试剂均为分析纯。ABTS 溶液是在测量前称取一定量的固体样品, 溶于高纯水配制而成, H_2O_2 是在测量前将 30% 的双氧水母液经高纯水稀释得到。Hemin (10 mM) 母液是将一定量的 Hemin 溶于 DMSO 制得。实验时所用的缓冲溶液为 25 mM HEPES (pH 7.0), 其中含有 100 mM Na^+ , 5 mM K^+ 。未经特殊说明, 所有实验都是在室温下完成的。

3.2.2 主要仪器

日立 U3010 UV/Vis 光谱仪 (Hitachi U-3010 UV/Vis spectrophotometer, Kyoto, Japan) 用于吸收光谱的测量, PHS-3C 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂, 中国·上海), 用于缓冲溶液 pH 值的校正。

3.2.3 光谱测量

吸收光谱的测定, 将 1 μ L 17E (50 μ M) 以及 1.6 μ L 17DS (50 μ M) 的 DNA 链溶于 400 μ L 25 mM HEPES 缓冲液, 充分混合后, 经退火后, 加入 Pb^{2+} 反应 30 分钟, 再加入 1 μ M Hemin 反应 1 小时, 然后进行吸收光谱测量。测量前加入 1 mM ABTS 及 2 mM H_2O_2 , 在 420 nm 处做吸收时间扫描。

3.3 结果与讨论

3.3.1 设计机理

本实验体系的设计机理是基于 DNAzyme 的活性依赖 Pb^{2+} 发生结构断裂以及 G-四链体为信号表达。如图 3.1 所示, 体系由三部分构成: (1) 根据 Pb^{2+} 的 DNAzyme 作为新型 Pb^{2+} 比色传感体系的分子识别受体 (2) 底物链上延伸的部分即富 G 链作为信号报告基团, (3) 用来封闭富 G 链部分。体系中所用的 DNAzyme 为经典的“8-17”脱氧核酶结构, 在 Pb^{2+} 的存在下显示出很高的活性。“8-17”脱氧核酶主要由一条底物链 (17DS) 和一条酶链 (17E) 组成。底物链是一个 DNA 与 RNA 嵌合体, 剪切位点有一个腺嘌呤核苷酸 (rA), 其余碱基全部为脱氧核糖核苷酸。

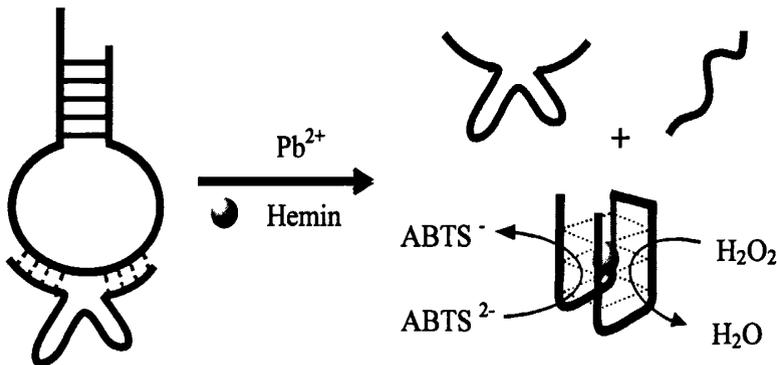


图 3.1 体系对 Pb^{2+} 的响应机理图

在 Pb^{2+} 存在下, 底物链被酶剪切为两段。所以本体系实现信号表达是基于以下两个关键的部分: 首先 DNAzyme 在 Pb^{2+} 作用下底物链被切断, 其次底物链可以释放下来形成 G-四链体。另外, 对本体系来说, 低的背景信号也是首先必须考虑的一个因素, 如图 3.1 中所示, 首先对底物链中的信号表达中的 G 碱基进行封闭, 即设计互补碱基配对: 设计链 III 的碱基与链 I 互补配对, 形成较稳定的发夹型结构, 从而在 Pb^{2+} 加入前抑制了 G-四链体的形成, 使该体系具有比较低的背景信号, 当体系中加入 Pb^{2+} 之后, 底物链可以被切断成两截, 从酶链上释放下来形成 G-四链体, 在加入 Hemin 与其结合, 具有很强的过氧化物酶活性, 催化 $ABTS-H_2O_2$ 发生显色反应, 有较强的吸收信号表达 (图 3.2)。并且吸收信号的增强与 Pb^{2+} 浓度在一定范围内呈线性关系, 据此测定溶液中的 Pb^{2+} 。

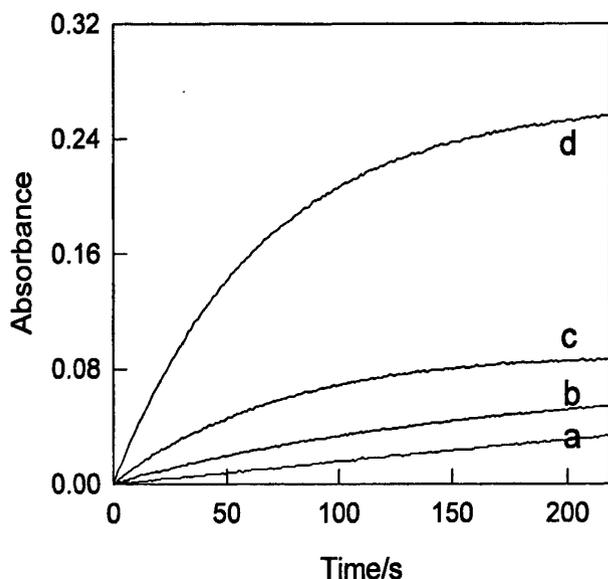


图 3.2 体系对 Pb^{2+} 的响应现象

a、b、c、d 曲线分别代表体系中加入 hemin、

hemin+17-DS、hemin+17-DS+17-E、hemin+17-DS+17-E+ Pb^{2+} 的吸收信号

3.3.2 盐浓度影响

据文献报道, 具有特殊序列的单链 DNA 可以在金属离子如 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 K^+ 等诱导下折叠成 G-四链体结构, 尤其是钾离子 (K^+) 作用更为明显。这是因为 K^+ 的尺寸大小合适, 可以进入 G-四链体中相邻的两个 G-tetrads 的空腔中, 与其结构中的 8 个羰基上的氧原子结合^[86], 如图 3.3 所示。这样就使一些 G-四链体的结构对 K^+ 有一定的选择性, 根据此原理也可以来设计一些新型的 K^+ 的核酸探针。例如: Dong^[87] 等利用 K^+ 可以稳定 G-四链体结构, 与血晶素结合后具有过氧化物酶催化活性, 引起吸收信号的变化设计了 K^+ 比色核酸探针。Kim^[88] 等也利用 K^+ 诱导富 G 单链 DNA 形成 G-四链体的结构以及结合聚丁二炔的变色效应设计了 K^+ 比色核酸探针。在本实验体系中, 利用 G-四链体作为

信号识别基团来检测 Pb^{2+} ，所以首先对 K^+ 的浓度进行优化，使体系的响应灵敏度达到最高。

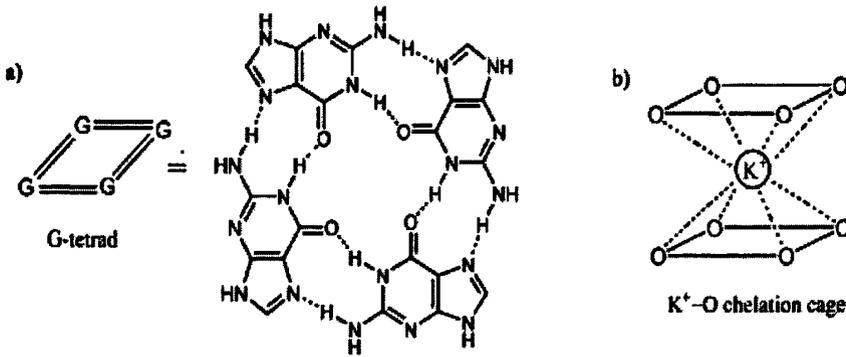


图 3.3 G-tetrad 结构^[89] (a) 及 K^+ 与 G-四链体的作用机理 (b)

K^+ 对本实验体系的影响结果如图 3.4 所示：当体系中不存在 K^+ 时，体系几乎没有响应信号，加入 K^+ 后，有吸收信号的表达。说明体系中需要有一定的 K^+ 存在，才可以促使溶液中 G 链形成 G-四链体结构。逐渐增加 K^+ 的浓度，体系的检测灵敏度逐渐增加，当 K^+ 的浓度增加至 5 mM 时，体系的灵敏度达到最大，如果继续增加体系中的 K^+ 浓度，由于背景信号的升高，体系的灵敏度反而会有所下降。所以，基于这一点，实验中所用 K^+ 浓度为 5 mM。

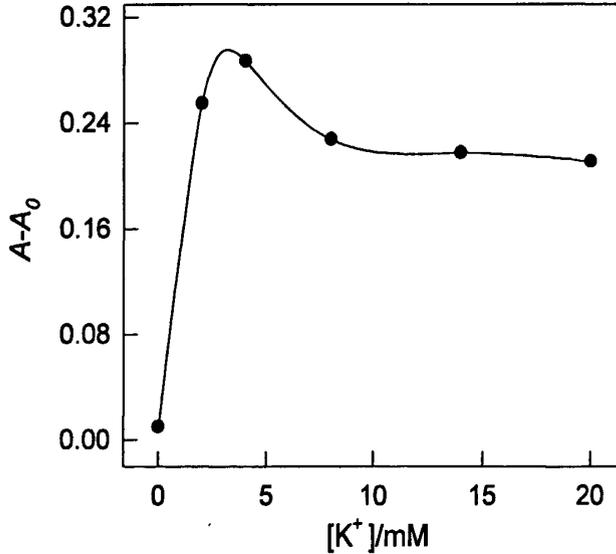


图 3.4 K^+ 对本实验体系的影响

A_0 与 A 分别指体系加入 $1 \mu M Pb^{2+}$ 前后的吸收信号的变化

3.3.3 酶/底物影响

从实验的设计机理我们可以看到：图中所示的结构在 Pb^{2+} 加入前稳定存在是实验设计的一个关键部分，所以 DNAzyme 结构中的酶链 (17-E) 以及底物链 (17-DS) 的浓度也是影响体系灵敏度的关键因素，为了得到最好的检测 Pb^{2+} 的效果，我们对底物链以及酶

链的浓度进行了优化,以响应灵敏度 ($A-A_0$) 作为考察因子,研究了酶链与底物链的浓度对本实验体系的影响。底物链浓度固定为 200 nM,改变酶链的浓度从 0 到 400 nM,然后以酶链与底物链的浓度之比考察其对体系响应灵敏度的影响。图 3.5 中曲线指体系中加入 $1 \mu\text{M Pb}^{2+}$ 之后对体系灵敏度的影响,同时在实验中也考察了未加入 Pb^{2+} 之前的信号响应,主要是考虑到酶链与底物链浓度的变化是否会影响体系的背景信号,所得到的实验结果是改变酶链与底物链的浓度,以及在底物链稍过量的情况下,不会造成体系的背景信号的升高,这样首先保证了体系在不同的酶链与底物链的浓度时,有较低的背景信号。当体系中加入 Pb^{2+} 后,如图 3.5 中所示,当酶链的浓度为 160 nM 时,即酶链与底物链的浓度之比为 0.8 时,体系的响应灵敏度达到最大,说明在底物链稍微过量的情况下,体系会有较好的响应信号。这可以解释为:在本体系中,底物链由于形成 G-四链体而被消耗,但是酶链在 Pb^{2+} 作用后,继续存在于溶液中,所以加入过量的底物链可以继续与酶链形成发夹结构,继续与 Pb^{2+} 作用,通过这样一个循环,得到了很好的信号放大的效果。所以在本实验中我们选择酶链与底物链的浓度分别为 160 nM、200 nM。

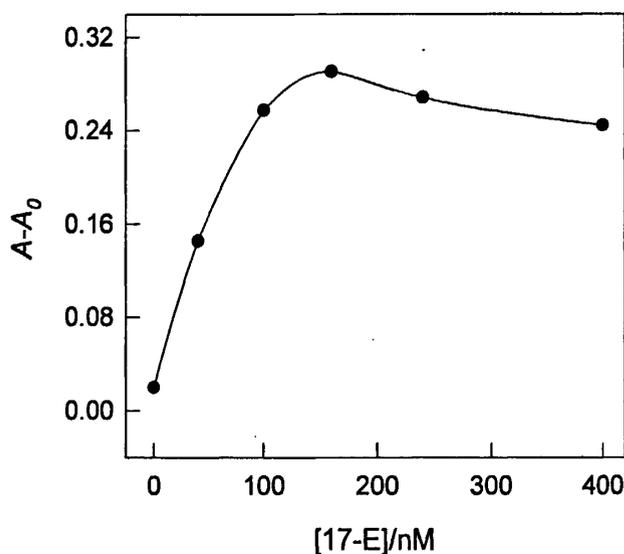


图 3.5 酶浓度的影响

A_0 与 A 分别指体系加入 $1 \mu\text{M Pb}^{2+}$ 前后的吸收信号的变化

3.3.4 酶切时间影响

本实验的信号响应是基于结构中的底物链被 Pb^{2+} 切割后,释放出来形成 G-四链体结构,所以加入 Pb^{2+} 后的反应时间,也是影响体系灵敏度的一个重要条件。如果反应时间过短,底物链不能被完全切断,不能有更多的底物链释放到溶液中形成更多的 G-四链体结构,影响体系的检测灵敏度;如果反应时间过长,反应达到完全后,继续增加反应的时间也会造成浪费。在本实验中,对 Pb^{2+} 的反应时间也进行考察。如图 3.6 所示:当 Pb^{2+} 的反应时间在约 30 分钟后,体系的相应灵敏度达到最大,说明体系中加入 Pb^{2+}

反应 30 分钟后，底物链被切完全，并且有最多的底物链从酶链上释放下来，在溶液中形成 G-四链体结构，体系的响应灵敏度最大。所以在本实验中，我们控制 Pb^{2+} 的反应时间为 30 分钟。

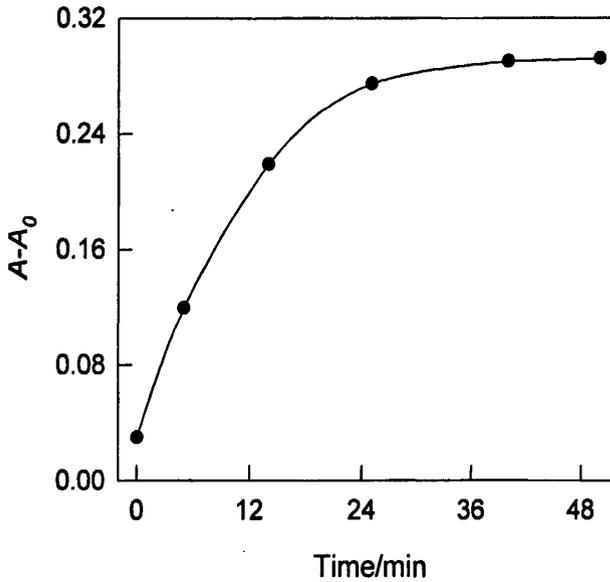


图 3.6 酶切时间影响

A_0 与 A 分别指体系加入 $1 \mu M Pb^{2+}$ 前后的吸收信号的变化

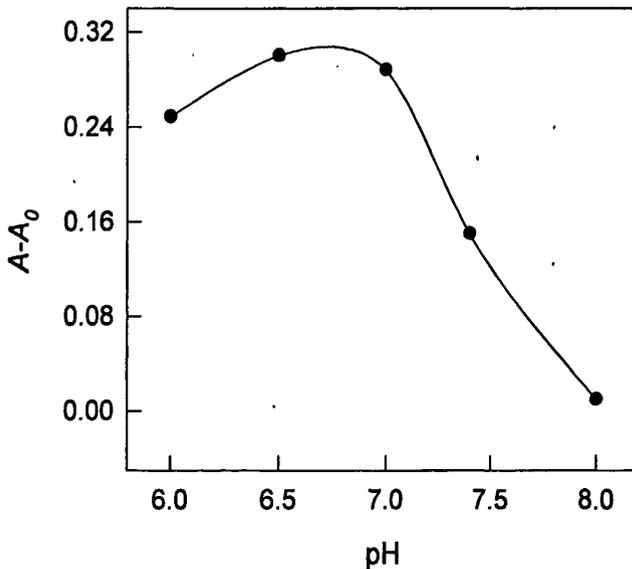


图 3.7 pH 对本实验体系灵敏度的影响

A_0 与 A 分别指体系加入 $1 \mu M Pb^{2+}$ 前后的吸收信号的变化

3.3.5 pH 影响

在形成 G-四链体过程中，层间的 G 碱基之间是通过氢键的作用连接在一起的，由于 pH 值对氢键有一定的影响，所以在本实验体系中，考察了 pH 影响，如图 3.7 所示。实

验结果表明：随着 pH 的升高，体系的灵敏度逐渐降低，当在碱性环境 pH 为 8.0 时，体系的响应灵敏度几乎为零。在 pH 为 6.5-7.0 时，体系的响应灵敏度变化不大，所以在本实验体系中，选择对 pH 为 7.0 对 Pb^{2+} 进行检测。

3.3.6 响应曲线

图 3.8 是在优化的实验条件下，体系在 25 mM HEPES 缓冲溶液 (pH 7.0) 中，对不同浓度的 Pb^{2+} 吸收信号响应的的时间扫描，由图 3.8A 可知：图中各曲线分别代表加入不同浓度 Pb^{2+} 之后，体系的响应信号。随着 Pb^{2+} 浓度的增加，其响应信号也逐渐增加。

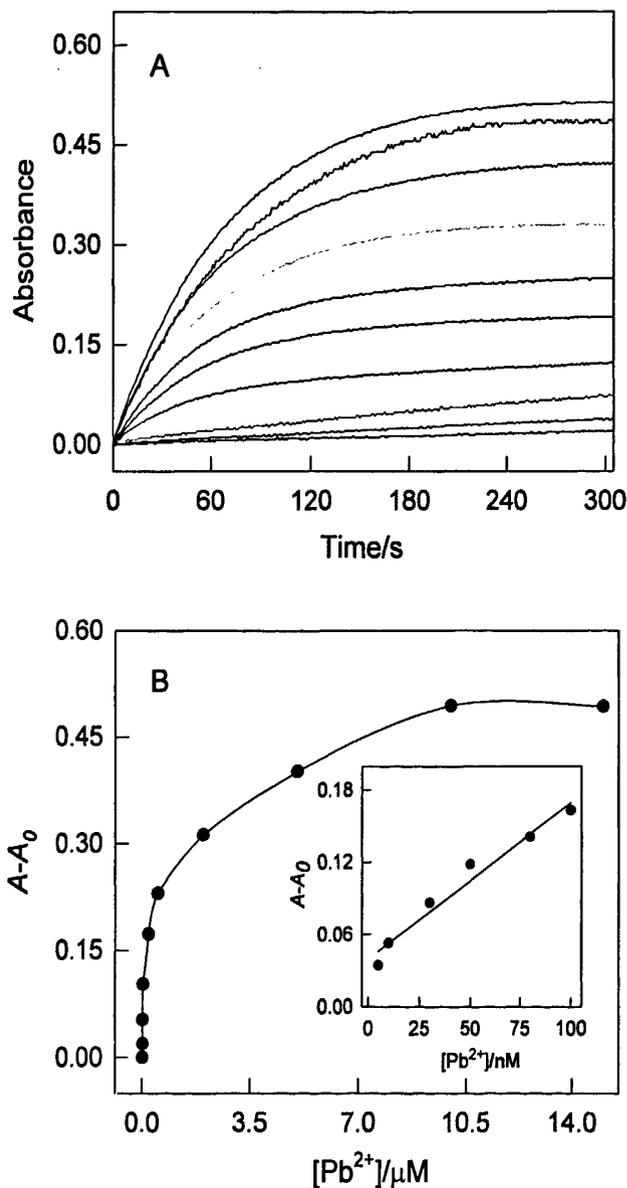


图 3.8 体系对 Pb^{2+} 的响应曲线 (A) 及校正曲线 (B)
 A_0 与 A 分别指体系加入 $1 \mu M Pb^{2+}$ 前后的吸收信号的变化

说明随着 Pb^{2+} 的加入, DNAzyme 中底物链逐渐被切断, 释放形成 G-四链体结构, 引起检测信号增加。图 3.8B 为 Pb^{2+} 的校正曲线, 以响应灵敏度 ($A-A_0$) 为考察因子, A_0 与 A 分别指体系加入 Pb^{2+} 之前以及加入后的信号强度。在 Pb^{2+} 浓度从 5 到 100 nM 的范围内, 该体系的响应信号与 Pb^{2+} 浓度呈良好的线性关系, 通过空白样品溶液的三倍标准偏差计算检出限达到 3 nM, 如图 3.8B 内插图所示。

3.3.7 选择性

对于离子检测体系来说, 选择性是衡量其性能的一个重要指标。所以对本章设计的 Pb^{2+} 体系的选择性也进行了考察。通过加入一些常见干扰阳离子, 比如 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ba^{2+} 等, 考察了其对本章设计的 Pb^{2+} 体系的响应情况, 上述各种离子的测定条件都和 Pb^{2+} 的测定条件一致。图 3.9 是本体系对几种不同阳离子的响应情况, 以响应灵敏度 ($A-A_0$) 为考察因子, A_0 为传感体系未加入金属离子时的吸收强度, A 为传感体系与不同阳离子作用后的信号强度。从图 3.9 可以看出, 本传感体系对 Pb^{2+} 的响应最大, 对其它金属离子, 体系的响应灵敏度很低, 相对于 Pb^{2+} 的检测可以忽略, 所以本体系对 Pb^{2+} 测定有很好的选择性, 常见阳离子对 Pb^{2+} 测定无干扰, 可用于实际样品中的测定。

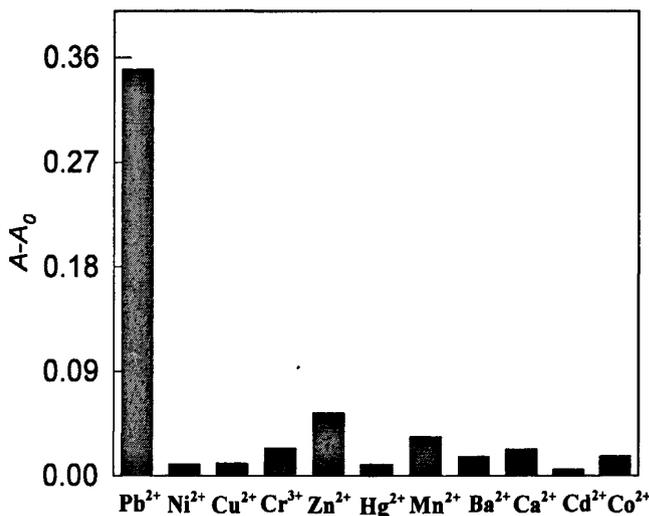


图 3.9 体系的选择性

3.4 小结

设计合成了一种基于 G-四链体吸收信号响应以及 DNAzyme 免标记的 Pb^{2+} 检测体系, 实现了对水溶液中 Pb^{2+} 的高选择性和高灵敏地检测。本传感体系的识别作用是基于 DNAzyme 在 Pb^{2+} 作用下, 底物链发生特异性的断裂, 信号检测是基于释放后的底物链形成 G-四链体结构引起吸收信号的变化, 以此来发展的检测 Pb^{2+} 的手段。与其他金属离子相比, 传感体系对于 Pb^{2+} 的响应具有较高的选择性及较低的检出限。同时, 本体系

具有免标记以及检测快速方便等优点，并且能在水溶液介质中用于环境样品中 Pb^{2+} 检测。同时，依赖于其他一些金属离子活性的 DNAzyme 也可以发生特异性的结构断裂，所以可以通过人工合成特异性结合其它金属离子的 DNAzyme 来设计新型核酸探针体系，研究结果有助于开发更多的、性能优越的传感体系来检测过渡金属离子。

第4章 基于脱氧核酶免标记荧光检测铅离子

4.1 引言

对生物体中以及环境中一些金属离子和有机分子等进行检测以及定量分析一直是科学家们关注的焦点,不管这些物质对人类健康有益或者有害。生态系统中的一些重金属离子会对环境造成极大地污染,甚至会严重的危害到人类健康,这些问题促使越来越多的科学家去发展灵敏度更高,选择性更好的重金属离子检测手段。在这些重金属离子中,铅是在自然界分布很广的一种微量元素,也是地壳元素的成分之一,主要存在于岩石圈和土壤圈。铅被人们关注是由于铅化合物的高度毒性,并容易在各种生物体中积累。铅通常以饮水、食物、吸入汽车尾气等方式进入人体的消化道和呼吸道。铅在人体内会长期积累而不容易排出,从而造成神经系统和造血系统损伤。当血铅含量超过 $2.7 \mu\text{M/L}$ 时,即可发生铅中毒。铅中毒可直接损伤人的甲状腺功能,降低甲状腺摄取碘及血浆蛋白结合碘的能力,降低肾上腺皮质的机能及垂体激素的分泌,还可损伤生殖细胞。因此严格控制铅的排放是减少铅污染源必要的方法,这也可以有效的减少人类通过饮水、食物等方式摄入铅量,同时发展高灵敏的检测 Pb^{2+} 的方法也是非常重要的。我国国家技术监督局和有关部门也制订了有关样品或产品铅分析的国家标准或行业标准方法,目前已报道了许多 Pb^{2+} 的检测方法并日趋成熟,例如:电感耦合等离子体质谱^[90-91]、原子吸收/发射光谱、电化学分析方法^[92]、光子晶体技术^[93]等。

近年来,利用脱氧核酶(deoxyribozyme, DNAzyme)来检测重金属离子以此显著的优势引起人们越来越多的关注。DNAzyme 是利用体外分子进化技术获得的一种具有催化功能的单链 DNA 片段,具有很高的催化活性以及结构识别能力^[94]。自 1994 年首次发现 DNAzyme 以来,迄今已发现了如数十种 DNAzyme。这些 DNAzyme 可以设计成具有识别和断裂特定 RNA 位点(如病毒 mRNAs)的探针,这在研究化学治疗方面具有潜在意义^[95]。同时,许多 DNAzyme 显示出依赖于金属离子的活性^[96-98],即 DNAzyme 可以在金属离子的作用下,发生特异性的断裂。利用 DNAzyme 的这种特殊的性质,华裔科学家 Lu^[99-100]设计出了许多对 Pb^{2+} 具有高度敏感性、专一性的荧光、比色传感器,用于环境中的重金属离子 Pb^{2+} 的检测。传感器中所用的脱氧核酶为“8-17”脱氧核酶,在 Pb^{2+} 的存在下显示出很高的活性。“8-17”脱氧核酶由一条底物链(17DS)和一条酶链(17E)组成。底物链是一个 DNA/RNA 嵌合体,只有其剪切位点为腺嘌呤核酸核苷(rA),其余全部为脱氧核糖核苷酸。在 Pb^{2+} 存在下,底物链被酶剪切为两段,利用荧光团标记、新材料如金纳米颗粒等将脱氧核酶对金属离子专一性转变为物理上可以检测到的信号。尽管这些方法在 Pb^{2+} 检测方面做出了巨大的贡献,但是这些方法大多都基于对

DNAzyme 的标记修饰, 不仅实验成本高, 实验操作复杂, 标记还可能会对 DNAzyme 的活性造成一定程度的损害^[101], 因此发展不需要荧光基团标记的检测方法, 达到无须分离洗脱样品、快速实时检测等逐渐成为分析化学研究方向的一个热点。

在本章中, 设计发展了一种基于 SYBR Green I (SG) 以及 DNAzyme 免标记的快速简单的检测 Pb^{2+} 的方法。SG 是目前较为灵敏的 DNA 双链荧光染料之一, 用 SG 染色的凝胶样品荧光信号强, 背景信号低, 所以常被用于凝胶电泳以及实时 PCR^[102] 中 DNA 的定量及定性分析。游离的 SG 本身没有荧光, 与单链 DNA 结合会有微弱的荧光, 但是与双链 DNA 结合后荧光增强几十倍。本章利用 DNAzyme 可以在 Pb^{2+} 的作用下, 能够发生特异性的断裂以及 SG 与双链 DNA 杂交体间的嵌入作用, 使得互补配对的双链以及单链 DNA 所产生的荧光信号有明显的不同作为信号检测方法, 设计了新型 Pb^{2+} 荧光核酸探针。这种检测方法不需要对 DNAzyme 进行标记, 简单快速, 有望用于实际环境中 Pb^{2+} 的检测。

4.2 实验部分

4.2.1 主要试剂

试验中所用的 DNA 序列由大连宝生物工程有限公司 (Dalian TaKaRa Biological Engineering Technology and Services Co., Ltd, Dalian) 合成, 高效液相色谱 (HPLC) 纯化, 具体序列见表 4.1, DNA 样品用高纯水 (sterile Minipore water, 18.2 M Ω) 溶解后得到母液, 储存于 4 $^{\circ}C$ 备用。硝酸铅与其它金属离子的固体样品购于国药集团药业股份有限公司 (中国·上海), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris (Hydroxymethyl) amin omethane, Tris) 及 SYBR Green I (SG) 购于 Sigma 公司 (美国·St. Louis, MO)。硝酸铅及其它金属离子的储备液是将其固体盐溶解在高纯水中配制而成, 工作液由母液经灭菌的高纯水稀释得到。未经特殊说明其它无机或有机试剂均为分析纯。缓冲溶液为 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 除非特殊说明, 所有实验都是在室温下完成。

表 4.1 本章所使用 DNA 名称及序列 (5'-3')

名称	碱基序列
17-DS	ACTCACTATrAGGAAGAGATG
17-D	ACTCACTATGGAAGAGATG
17-E	CATCTCTTCTCCGAGCCGGTCGAAATAGTGAGT

4.2.2 主要仪器

U3010 UV/Vis 光谱仪 (Hitachi U-3010 UV/Vis spectrophotometer, Kyoto, Japan), 用于吸收光谱测定, 荧光光谱仪 PTI QM4 (Photo Technology International, Birmingham, NJ) 及 F-7000 (Hitachi F-7000 spectrophotometer, Kyoto, Japan) 用于荧光光谱及荧光强度的

测定, PHS-3C 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂, 中国·上海), 用于缓冲溶液 pH 值校正。

4.2.3 光谱测量

荧光光谱的测定, 将 2 μL 17DS (100 μM) 以及 2 μL 17E (100 μM) 的 DNA 链溶于 400 μL 50 mM Tris-HCl 缓冲液, 充分混合后, 经退火后, 缓慢冷却至室温进行荧光光谱测量, 在 498 nm 处激发, 测 506-600 nm 的荧光发射。

4.3 结果与讨论

4.3.1 设计机理

在本章中, 设计一种基于 SG 以及 DNAzyme 免标记的快速简单的检测 Pb^{2+} 的方法, 其响应机理如图 4.1 所示:

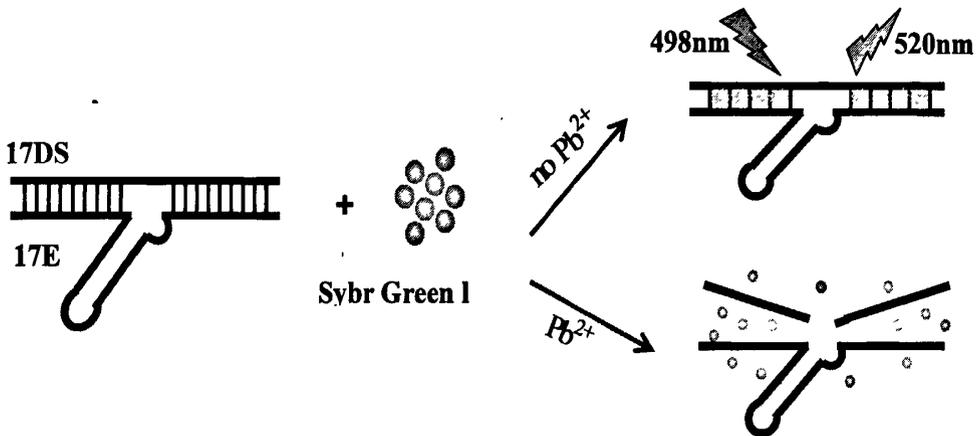


图 4.1 体系对 Pb^{2+} 的响应机理图

本实验体系由两部分构成: (1) 根据经典的 Pb^{2+} DNAzyme 作为新型 Pb^{2+} 荧光传感体系的分子识别受体, (2) 选择 SG 作为新型 Pb^{2+} 荧光传感体系的信号报告单元 (荧光体)。SG 是一种灵敏的 DNA 双链荧光染料, 在水溶液中时几乎没有荧光, 在单链 DNA 在时, 由于 SG 和单链 DNA 之间的静电作用与疏水作用, SG 会产生微弱的荧光; 但溶液中若有双链 DNA 存在时, 则由于 SG 和双链 DNA 之间的嵌入作用, 其平面基团与螺旋的轴线垂直并通过范德华力与上下碱基相互作用, 这个基团的固定位置及其与碱基的密切接近, 导致与双链 DNA 结合后的染料发射出强荧光, 其荧光量子产率会比溶液中游离染料显著增加。选择 SG 作为信号报告基团的另一个原因是其水溶性较好, 可以在水溶液中完全溶解, 而且其作为常规化学/生物试剂, 在一般实验室易得到。体系中所用的 DNAzyme 为“8-17”脱氧核酶, 在 Pb^{2+} 的存在下显示出很高的活性。“8-17”脱氧核酶主要由一条底物链 (17DS) 和一条酶链 (17E) 组成。底物链是由一个 DNA 与 RNA 嵌合体, 剪切位点有一个腺嘌呤核苷酸 (rA), 其余碱基全部为脱氧核糖核苷酸。在 Pb^{2+} 存在下, 底物链被酶剪切为两段, DNAzyme 中的双链部分变成单链, 基于 SG 嵌入双链 DNA 后的荧光强度与单链 DNA 结合后的荧光强度有明显变化作为信号输出设计了

分子识别和信号检测相分离的荧光 Pb^{2+} 检测体系。

4.3.2 温度影响

在 DNAzyme 的结构中，底物链含有一个腺嘌呤核酸核苷 (rA)，在 $4^{\circ}C$ 时，该结构能够稳定存在，当处于室温时，DNAzyme 的结构中的一部分底物链会从酶链掉下来，所以在 Lu 实验小组设计的利用 DNAzym 标记荧光基团检测 Pb^{2+} 的方法中，考虑了该问题引起的背景信号，并且在此基础上进行了改进。所以在本实验开始之前，首先研究了温度对本体系的影响。当用不含 rA 碱基，其他部分底物链完全相同的 DNA 链 (表 4.1, 17D) 与酶链杂交，加入 SG 检测荧光信号时，其荧光强度不会随着温度以及时间的变化而变化，但同时，加入 Pb^{2+} 后，荧光强度也不会发生改变，这说明 DNAzyme 结构的不稳定主要是由底物链中 rA 碱基引起的，同时，底物链没有 rA 时，DNAzyme 也会失去酶活性。我们用 17S 与 17E 链杂交形成 DNAzyme 结构，在加入 SG，未加入 Pb^{2+} 时研究了温度对其 DNAzyme 稳定性影响，实验结果如图 4.2 所示：箭头指体系开始加入 SG，其荧光随时间的变化。图中荧光依次减弱的各曲线分别是指温度为 $5^{\circ}C$ 、 $10^{\circ}C$ 、 $15^{\circ}C$ 、 $20^{\circ}C$ 、 $25^{\circ}C$ 时对体系响应信号的时间扫描。可以看出：随着温度的升高，SG 荧光信号随着时间变化逐渐降低，并且随着温度的升高，荧光信号降低的程度也逐渐变大，说明随着温度的升高时，DNAzyme 中双链结构不稳定，一部分的 17S 链掉下来，引起双链的减少从而使 SG 荧光信号降低。

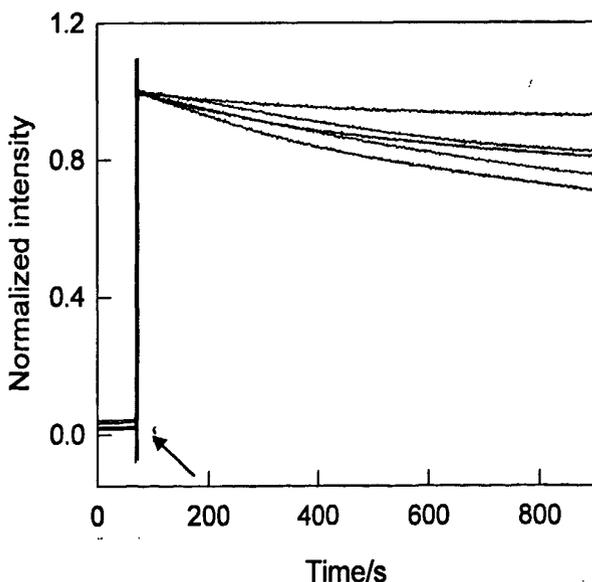


图 4.2 温度对 DNAzyme 结构的影响。红色、蓝色、黑色、粉红以及绿色各曲线分别代表温度在 $5^{\circ}C$ 、 $10^{\circ}C$ 、 $15^{\circ}C$ 、 $20^{\circ}C$ 、 $25^{\circ}C$ 时体系的响应信号

在本实验体系中，为了避免由于反应时间过长，DNAzyme 自身不稳定，部分底物链从酶链上掉下来，溶液中底物单链越来越多引起的“假阳性信号”，对酶切反应的时间

也进行了考察。结果如图 4.3 所示：蓝色和红色的曲线分别指在室温下未加入 Pb^{2+} 以及加入 Pb^{2+} 之后体系的响应信号。从图中可以看出，加入 Pb^{2+} 约 6 分钟后，酶切反应几乎完全，之后的荧光信号降低可能是由于 DNAzyme 自身的结构不稳定引起的，所以在本实验中，为了保证实验的准确可靠性以及灵敏度，我们控制 Pb^{2+} 酶切反应的时间为 6 分钟。

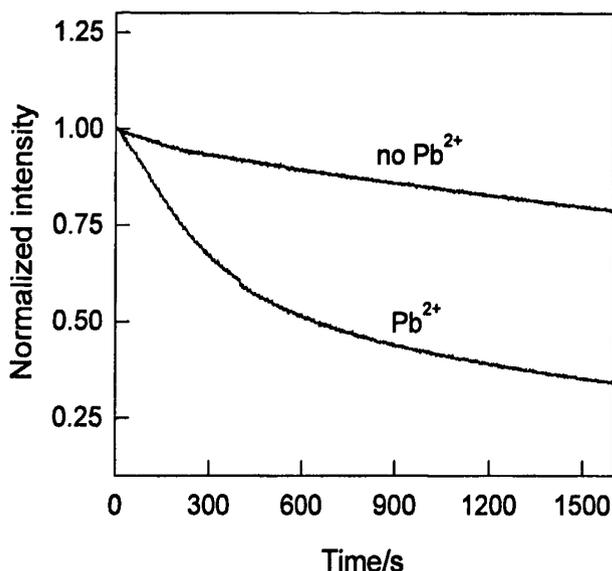


图 4.3 酶切时间对本体系的影响

蓝色与红色的先分别代表体系加入 Pb^{2+} 前后的荧光强度

4.3.3 盐浓度影响

在本实验体系中，信号的产生是基于 DNAzyme 结构的断裂引起单双连数目的变化从而使 SG 产生不同的荧光信号。据报道许多因素，如温度、盐氯化钠的浓度、臂部互补碱基的个数以及酶链中环部所含有的 GC 互补碱基个数等都可以影响 DNAzyme 结构的稳定性从而影响体系的检测灵敏度。如果提高氯化钠的浓度、增加臂部互补碱基的个数以及增加酶链中环部互补碱基 GC 的个数都可以提高 DNAzyme 的稳定性。所以在本实验中，考察了不同浓度的氯化钠对体系检测灵敏度的影响，实验结果如图 4.4 所示：当氯化钠的浓度从 50 mM 增加至 200 mM 时，体系的响应信号变化不大，当氯化钠的浓度增加超过 200 mM 时，体系的响应信号会有所降低，这可以解释为：随着氯化钠浓度的升高，DNAzyme 的稳定性也逐渐增加，降低了由于 DNAzyme 本身结构不稳定引起的信号降低，等同于降低了体系“假阳性信号”，提高了体系的检测灵敏度。当氯化钠的浓度继续增加时，DNAzyme 更为稳定，当加入 Pb^{2+} 后，底物链被切断但是不能从 DNAzyme 中释放下来，与 SG 作用的单链数目减少从而降低了体系的检测信号，基于以上考虑，为了达到最高的检测灵敏度，我们选择氯化钠的浓度为 200 mM。

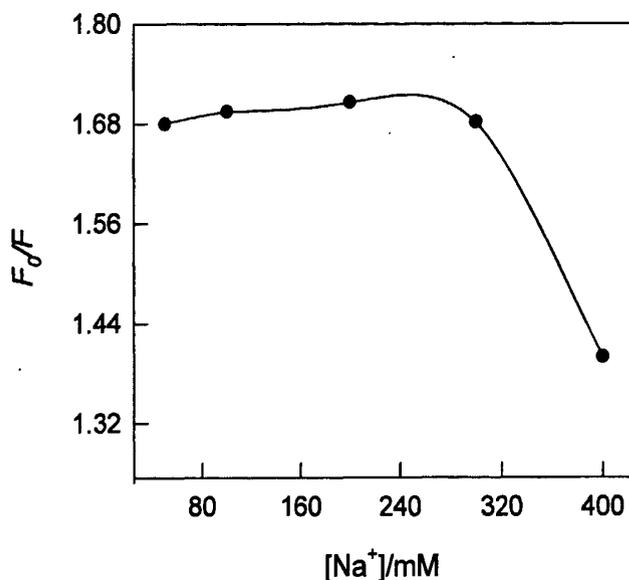


图 4.4 盐浓度对本体系的影响

F_0 与 F 分别指体系加入 Pb^{2+} 前后的荧光强度

4.3.4 响应曲线

对于本实验体系，对其灵敏度进行了研究。图 4.5 是在优化的实验条件下，体系在 50 mM Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4)，在加入不同浓度的 Pb^{2+} 后，体系的荧光发射光谱，最大激发波长为 498 nm，最大发射波长为 520 nm。由图 4.5 可知，随着 Pb^{2+} 浓度的增加，其荧光逐渐减弱。说明随着 Pb^{2+} 的增加，DNAzyme 中底物链被切断，有更多的 DNA 单链进入溶液中，引起 SG 荧光降低，当 Pb^{2+} 的浓度达到 8 μM 时，SG 的荧光不会再降

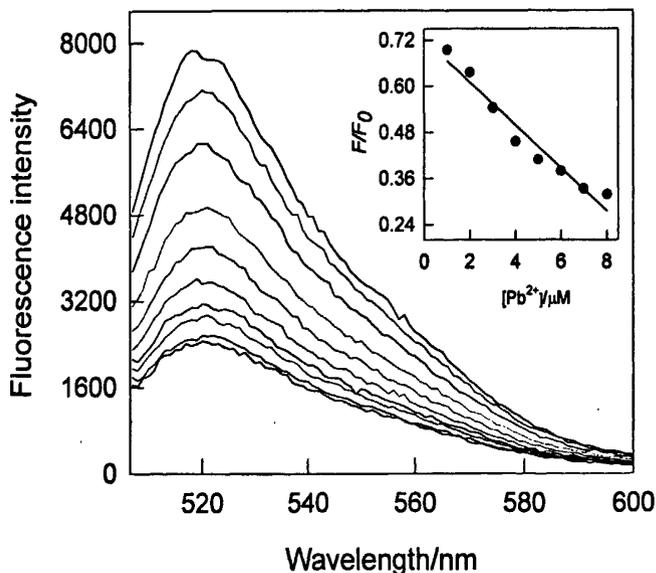


图 4.5 体系对 Pb^{2+} 的响应曲线 (内插图: Pb^{2+} 的校正曲线)

F_0 与 F 分别指体系加入 Pb^{2+} 前后的荧光强度

低, 反应达到完全。所以可以根据此信号来检测 Pb^{2+} 。内插图为 Pb^{2+} 的校正曲线, 以响应灵敏度 (F/F_0) 为考察因子, F_0 为传感体系的未加入 Pb^{2+} 时的荧光强度, F 为传感体系与 Pb^{2+} 作用后的荧光强度。在 Pb^{2+} 浓度从 $1 \mu\text{M}$ 到 $8 \mu\text{M}$ 的范围内, 该体系的响应信号与 Pb^{2+} 浓度呈良好的线性关系, 通过空白样品溶液的三倍标准偏差计算得到本体系的检出限达到 600 nM , 如内插图所示。

4.3.5 选择性

选择性是衡量离子检测性能的一个重要指标。所以对本章所设计的荧光 Pb^{2+} 检测体系的选择性也进行了考察。通过加入一些常见的干扰阳离子, 考察了其对本章设计的荧光 Pb^{2+} 检测体系的响应情况, 各种干扰离子的测定条件都和 Pb^{2+} 的测定条件一致。图 4.6 是体系对几种不同阳离子的响应情况, 以体系响应灵敏度为考察因子, F_0 为体系的未加入离子时的荧光强度, F 为体系与不同的阳离子作用后的荧光强度。从图 4.6 可以看出, 本体系对 Pb^{2+} 响应最大。加入除 Cr^{3+} 以外的其它金属离子, 体系的响应灵敏度很低, 相对于 Pb^{2+} 的检测可以忽略, 但是 Cr^{3+} 对本体系有一定的影响, 原因证明是 Cr^{3+} 对 SG 的荧光有一定的猝灭作用。所以本体系对 Pb^{2+} 测定有很好的选择性, 常见阳离子除 Cr^{3+} 外对 Pb^{2+} 测定无干扰, 可用于实际样品中 Pb^{2+} 的测定。

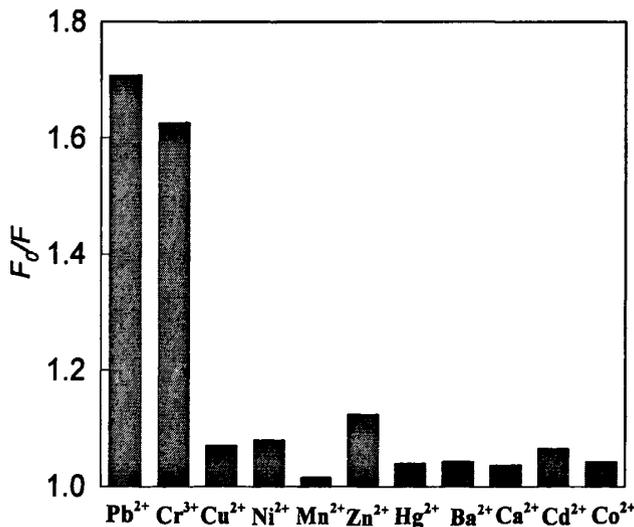


图 4.6 体系的选择性

4.4 小结

本章设计合成了一种基于 SG 荧光信号传导以及 DNAzyme 免标记的 Pb^{2+} 传感体系, 实现了对水溶液中 Pb^{2+} 快速方便地检测。本传感体系的识别作用是基于 DNAzyme 在 Pb^{2+} 作用下, 底物链发生特异性的断裂, 信号检测是基于 SG 嵌入双链 DNA 后的荧光强度与单链 DNA 结合后的荧光强度有显著差异, 因此, 当 DNAzyme 中底物链断裂后, 溶液中单链与双链的浓度发生改变引起 SG 的荧光信号发生改变, 基于此来发展了一种

检测 Pb^{2+} 的手段。与其他金属离子相比,传感体系对于 Pb^{2+} 的响应具有较高的选择性及较低检测限。同时,本传感体系具有免标记,合成简便以及检测快速方便的优点,并且能在水溶液介质中用于环境样品中 Pb^{2+} 检测。依赖于其他一些金属离子活性的 DNAzyme 也可以发生特异性的结构断裂,可以通过人工合成特异性结合其它金属离子的 DNAzyme 来设计新型荧光传感体系,研究结果有助于开发更多的、性能优越的新型荧光传感体系来检测过渡金属离子。

结 论

在本论文中,基于DNA与金属离子的相互作用设计了三种不同的核酸探针用于重金属汞离子和铅离子的检测,这些探针实现了对目标物的快速、便捷、高灵敏和高选择性的检测,并初步验证了这些探针实际应用的可行性。主要内容总结如下:

首先,基于错配的胸腺嘧啶碱基对(T-T)与 Hg^{2+} 间特异性地高亲和作用形成稳定的T- Hg^{2+} -T结构,以及 γ -环糊精环的包络作用设计合成了一种新型的检测 Hg^{2+} 的探针。体系中加入 γ -环糊精不仅可以增加花分子二聚体荧光信号,还可以保护花分子的荧光不被 Hg^{2+} 猝灭。当在 Hg^{2+} 或者 γ -环糊精存在下,由于探针分子环部特殊的DNA双链结构,分子两端的花分子都不能相互靠近而产生花的二聚体荧光;只有当两种物质共同存在时,基于T- Hg^{2+} -T以及 γ -环糊精包络这两者的协同作用,花分子的二聚体荧光才会出现,以此来检测溶液中的 Hg^{2+} 。

其次,基于G-四链体(G-quadruplex)以及DNAzyme免标记相结合的检测 Pb^{2+} 体系。当不存在 Pb^{2+} 时,富G的DNA链通过与碱基互补配对被封闭,不能形成G-四链体结构,无显色反应,吸收信号较低;通过 Pb^{2+} 作用后,将底物链上连接的富G的DNA链释放出来,形成G-四链体,引发显色反应,通过吸收信号的响应来达到检测 Pb^{2+} 的目的。在体系中通过加入稍微过量的底物链,可以利用循环信号放大得到更高的检测灵敏度。

最后,基于SYBR Green I(SG)以及DNAzyme免标记建立了一种快速简单的检测 Pb^{2+} 体系。利用DNAzyme可以在 Pb^{2+} 的作用下,能够发生特异性的断裂以及SG与双链DNA杂交体间的嵌入作用,使得互补配对的双链以及单链DNA所产生的荧光信号有明显的不同作为信号输出,设计了一种 Pb^{2+} 荧光传感体系。这种检测方法不需要对DNAzyme进行标记,简单快速,有望在实际环境 Pb^{2+} 检测中得到应用。

总之,基于DNA与金属离子的相互作用设计新型核酸探针一直是近几年分析研究领域的一个热点。希望本论文所设计的核酸探针及其设计理念和设计机理能为该领域的研究提供一些有意义的经验或有价值的参考。未来由于化学生物学以及基因组学的发展,促使科学家们发展一些快速,准确,低成本的分析检测核酸,蛋白质和代谢产物的技术,并将这些技术运用于实际检测中。另外,随着纳米技术的集成实验室级芯片器件的发展以及可用性,可以将这些技术与核酸探针结合,作为传感器用于基因研究与诊断的新的研究方向,实现实际复杂样品检测。

参考文献

- [1] 国家环境保护局. 环境背景值和环境容量研究. 北京: 中国科学出版社, 1993, 5-6
- [2] Han F X, Dean Patterson W, Xia Y J, et al. Rapid determination of mercury in plant and soil samples using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, a comparative study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2006, 170(1): 161-171
- [3] Fong B, Sai K, Tam S, et al. Determination of mercury in whole blood and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 2007, 31(5): 281-287
- [4] Watson J D, Crick F H C. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171(4356): 737-738
- [5] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510
- [6] Ellington A D, Szostak J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346(6287): 818-822
- [7] Famulok M, Hartig J S, Mayer G, et al. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chemical Reviews*, 2007, 107(9): 3715-3743
- [8] Willner I, Shlyahovsky B, Willner B, et al. DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(6): 1153-1165
- [9] Famulok M, Mayer G, Blind M. Nucleic acid aptamers from selection in vitro to applications in vivo. *Accounts of Chemical Research*, 2000, 33(9): 591-599
- [10] Silverman S K. Deoxyribozymes: selection design and serendipity in the development of DNA catalysts. *Accounts of Chemical Research*, 2009, 42(10): 1521-1531
- [11] Liu J, Cao Z, Lu Y. Functional nucleic acid sensors. *Chemical Reviews*, 2009, 109(5): 1948-1998
- [12] Clever G H, Kaul C, Carell T. DNA-metal base pairs. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(33): 6226-6236
- [13] Müller J. Metal-ion-mediated base pairs in nucleic acids. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2008, 2008(24): 3749-3763
- [14] Hannon M J. Nucleic acid-metal ion interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(15): 2636
- [15] Müller J. Metal complex-DNA interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(5): 844-845

- [16] Bin X, Kraatz H B. Interaction of metal ions and DNA films on gold surfaces: an electrochemical impedance study. *Analyst*, 2009, 134(7): 1309-1313
- [17] Mansy S, Wood T E, Tobias R S, et al. Heavy metal-nucleotide interactions. binding of methylmercury(II) to pyrimidine nucleosides and nucleotides. studies by Raman difference spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 1974, 96(6): 1762-1770
- [18] Miyake Y, Togashi H, Ono A, et al. MercuryII-mediated formation of thymine-HgII-thymine base pairs in DNA duplexes. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(7): 2172-2173
- [19] Tang Y L, He F, Zhu D B, et al. A reversible and highly selective fluorescent sensor for mercury(II) using poly(thiophene)s that contain thymine moieties. *Macromolecular Rapid Communications*, 2006, 27(6): 389-392
- [20] Ono A, Togashi H. Highly selective oligonucleotide-based sensor for mercury(II) in aqueous solutions. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(33): 4300-4302
- [21] Wang H, Wang Y X, Yang R H. Gold nanoparticle-based colorimetric and "turn-on" fluorescent probe for mercury(II) ions in aqueous solution. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(23): 9021-9028
- [22] Liu X F, Fan C H, Wang S, et al. Optical detection of mercury(II) in aqueous solutions by using conjugated polymers and label-free oligonucleotides. *Advanced Materials*, 2007, 19(11): 1471-1474
- [23] Wang Z, Lee J H, Lu Y. Highly sensitive 'turn-on' fluorescent sensor for Hg^{2+} in aqueous solution based on structure-switching DNA. *Chemical Communications*, 2008, (45): 6005-6007
- [24] Liu X, Qi C, Shangguan D, et al. Highly selective phthalocyanine-thymine conjugate sensor for Hg^{2+} based on target induced aggregation. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(9): 3699-3704
- [25] Liu L, Zhang G X, Zhang D Q, et al. Fluorescence turn on chemosensors for Ag^+ and Hg^{2+} based on tetraphenylethylene motif featuring adenine and thymine moieties. *Organic Letters*, 2008, 10(20): 4581-4584
- [26] Nikan M, Sherman J C. Cation-complexation behavior of template-assembled synthetic G-quartets. *The Journal of Organic Chemistry*, 2009, 74(15): 5211-5218
- [27] Li T, Dong S J, Wang E K. Label-free colorimetric detection of aqueous mercury ion (Hg^{2+}) using Hg^{2+} -modulated G-Quadruplex-based DNAzymes. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(6): 2144-2149
- [28] Li T, Wang E K, Dong S J. Potassium lead-switched G-Quadruplexes: a new class of

- DNA logic gates. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(42): 15082-15083
- [29] Li T, Wang E K, Dong S J. Lead(II)-induced allosteric G-Quadruplex DNAzyme as a colorimetric and chemiluminescence sensor for highly sensitive and selective Pb^{2+} detection. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(4): 1515-1520
- [30] Kruger K, Grabowski P J, Cech T R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*, 1982, 31(1): 147-157
- [31] Guerrier T C, Gardiner K, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 1983, 35(3): 849-857
- [32] Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chemistry & Biology*, 1994, 1(4): 223-229
- [33] Sen D, Geyer C R. DNA enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, 2(6): 680-687
- [34] Li Y, Breaker R R. Deoxyribozymes: new players in the ancient game of biocatalysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999, 9(3): 315-323
- [35] Zorn J A, Wells J A. Turning enzymes on with small molecules. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(3): 179-188
- [36] Lu Y. New transition-metal-dependent DNAzymes as efficient endonucleases and as selective metal biosensors. *Chemistry-A European Journal*, 2002, 8(20): 4588-4596
- [37] Wang H, Bamrungsap S, Tan W H, et al. Engineering a unimolecular DNA-catalytic probe for single lead ion monitoring. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(23): 8221-8226
- [38] Harris H H, Pickering I J, George G N. The chemical form of mercury in fish. *Science*, 2003, 301(5637): 1203
- [39] Kaiser J. Toxicology: mercury report backs strict rules. *Science*, 2000, 289(5478): 371-372
- [40] Liu S J, Jiang J H, Yu R Q. Electrochemical sensor for mercury(II) based on conformational switch mediated by interstrand cooperative coordination. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(14): 5724-5730
- [41] Virta M, Lampinen J, Karp M. A luminescence-based mercury biosensor. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(3): 667-669
- [42] Matsushita M, Meijler M M, Janda K D, et al. A blue fluorescent antibody-cofactor sensor for mercury. *Organic Letters*, 2005, 7(22): 4943-4946
- [43] Chen P, He C. A general strategy to convert the MerR family proteins into highly

- sensitive and selective fluorescent biosensors for metal ions. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(3): 728-729
- [44] Wegner S V, Okesli A, He C, et al. Design of an emission ratiometric biosensor from MerR family proteins: a sensitive and selective sensor for Hg^{2+} . *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(12): 3474-3475
- [45] Zhao Y, Zhong Z. Tuning the sensitivity of a foldamer-based mercury sensor by its folding energy. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(31): 9988-9989
- [46] Liu J W, Lu Y. Rational design of "turn-on" allosteric DNAzyme catalytic beacons for aqueous mercury ions with ultrahigh sensitivity and selectivity. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(22): 7587-7590
- [47] Willner I, Gilad M P, Elbaz J. Nanoengineered electrically contacted enzymes on DNA scaffolds: functional assemblies for the selective analysis of Hg^{2+} ions. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(20): 6878-6879
- [48] Miyake Y, Togashi H, Ono A. Mercury-mediated formation of Thymine- Hg^{II} -Thymine base pairs in DNA duplexes. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(7): 2172-2173
- [49] Lee J S, Han M S, Mirkin C A. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg^{2+}) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(22): 4093-4096
- [50] Zhu Z, Li G, Fan C H, et al. Highly sensitive electrochemical sensor for mercury(II) ions by using a mercury-specific oligonucleotide probe and gold nanoparticle-based amplification. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(18): 7660-7666
- [51] Xue X J, Wang F, Liu X G. One-step, room temperature, colorimetric detection of mercury (Hg^{2+}) using DNA/nanoparticle conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(11): 3244-3245
- [52] Nohta H, Satozono H, Yamaguchi M, et al. Highly selective fluorometric determination of polyamines based on intramolecular excimer-forming derivatization with a pyrene-labeling reagent. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(17): 4199-4204.
- [53] Snare M J, Thistlethwaite P J, Ghiggino K P. Kinetic studies of intramolecular excimer formation in dipyrenylalkanes. *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105(10): 3328-3332
- [54] Oh K J, Cash K J, Plaxco K W. Excimer-based peptide beacons: a convenient experimental approach for monitoring polypeptide-protein interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(43): 14018-14019
- [55] Pairs P L, Langenhan J M, Kool E T. Probing DNA sequences in solution with a

- monomer-excimer fluorescence color change. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(16): 3789-3793
- [56] Kostenko E, Dobrikov M, Zenkova M, et al. 5'-bis-pyrenylated oligonucleotides displaying excimer fluorescence provide sensitive probes of RNA sequence and structure. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(17): 3611-3620
- [57] Lewis F D, Zhang Y, Letsinger R L. Bispyrenyl excimer fluorescence: a sensitive oligonucleotide probe. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119(23): 5451-5452
- [58] Yamana K, Iwai T, Nakano H, et al. Bis-pyrene-labeled oligonucleotides: sequence specificity of excimer and monomer fluorescence changes upon hybridization with DNA. *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13(6): 1266-1273
- [59] Yamana K, Fukunaga Y, Maruyama A, et al. DNA mismatch detection using a pyrene-excimer-forming probe. *Chemical Communications*, 2005, (19): 2509-2511
- [60] Marti' A A, Ju J Y, Turro N J, et al. Pyrene binary probes for unambiguous detection of mRNA using time-resolved fluorescence spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(10): 3161-3168
- [61] Szejtli J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. *Akademia Kiado: Budapest, Hungary*, 1982, 78(47): 277-289
- [62] Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 1998, 98(5): 1743-1753
- [63] Liu Y, Yu L, Yang R H, et al. Construction and DNA condensation of cyclodextrin based polypseudorotaxanes with anthryl grafts. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(35): 10656-10657
- [64] Zheng J, Li J S, Yang R H, et al. Modulating molecular level space proximity: a simple and efficient strategy to design structured DNA probes. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(9): 3914-3921
- [65] Borisova O F, Timofeev E N, Florentiev V L, et al. Evidence for the tetraplex structure of the d(GT)_n repetitive sequences in solution. *Biochemistry*, 1992, 306(2): 140-142
- [66] Hugues M, O'Hanley P, Waldman S A, et al. Affinity purification of functional receptors for escherichia coli heat-stable enterotoxin from rat intestine. *Biochemistry*, 1992, 31(1): 12-16
- [67] Maxim F K. The quadruplex and the vase. *Nature*, 1992, 356(6365): 154-156
- [68] Wang Y, Patel D J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG₃(T₂AG₃)₃] G-tetraplex. *Structure*, 1993, 1(4): 263-282
- [69] Lista A G, Palomeque M E, Fernandez B S. Flow-injection fluorimetric determination

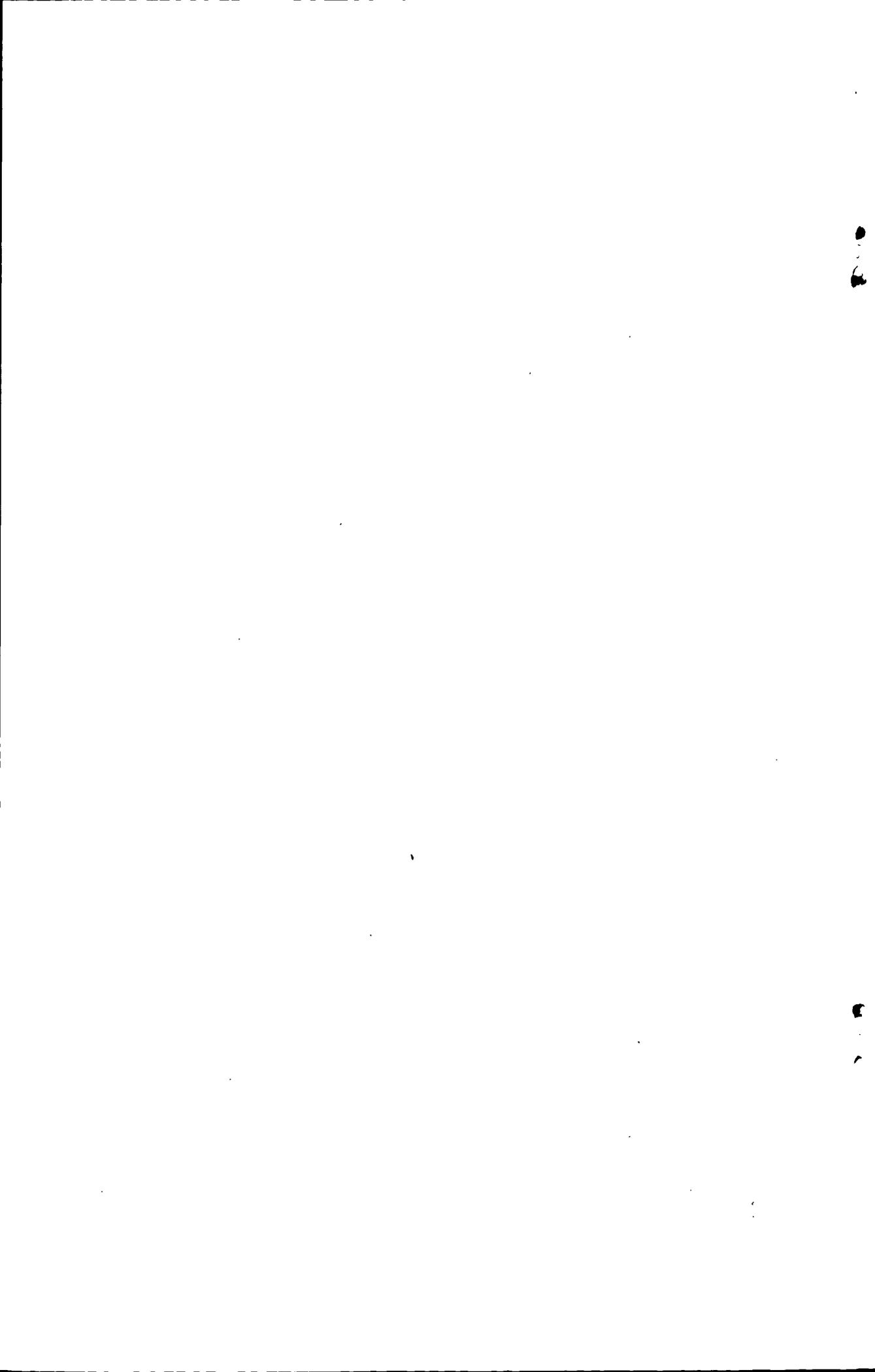
- of mercury(II) with calcein. *Talanta*, 1999, 50(4): 881-885
- [70] Lumley W T, Caruana D J, Heller A, et al. Reactive electrophoretic activation of a microelectrode for enzyme-amplified recognition and for melting-temperature determination of 10^5 copies of a simple oligonucleotide. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(2): 394-398
- [71] Liu G, Song S P, Fan C H, et al. An enzyme-based E-DNA sensor for sequence-specific detection of femtomolar DNA targets. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(21): 6820-6825
- [72] Rodenko B, Schumacher T N M, Ovaa H, et al. Class I major histocompatibility complexes loaded by a periodate trigger. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(34): 12305-12313
- [73] Li T, Dong S J, Wang E K. Enhanced catalytic DNAzyme for label-free colorimetric detection of DNA. *Chemical Communications*, 2007, (41): 4209-4211
- [74] Kolpashchikov D M. Split DNA enzyme for visual single nucleotide polymorphism typing. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(10): 2934-2935
- [75] Elbaz J, Shlyahovsky B, Willner I, et al. Cooperative multicomponent self-assembly of nucleic acid structures for the activation of DNAzyme cascades: a paradigm for DNA sensors and aptasensors. *Chemistry-A European Journal*, 2009, 15(14): 3411-3418
- [76] Deng M, Zhang D, Zhou X, et al. Highly effective colorimetric and visual detection of nucleic acids using an asymmetrically split peroxidase DNAzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(39): 13095-13102
- [77] Nakayama S, Sintim H O. Colorimetric split G-quadruplex probes for nucleic acid sensing: improving reconstituted DNAzyme catalytic efficiency via probe remodeling. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(29): 10320-10333
- [78] Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chemistry & Biology*, 1994, 1(4): 223-229
- [79] Li J W, Lu Y. A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(42): 10466-10467
- [80] Xiang Y, Tong A J, Lu Y. A basic site-containing DNAzyme and aptamer for label-free fluorescent detection of Pb^{2+} and adenosine with high sensitivity, selectivity, and tunable dynamic range. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(42): 15352-15357
- [81] Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme with Mg^{2+} -dependent RNA phosphoesterase activity. *Chemistry & Biology*, 1995, 2(10): 655-660
- [82] Santoro S W, Gramatikova S, Barbas C F, et al. RNA cleavage by a DNA enzyme with

- extended chemical functionality. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(11): 2433-2439
- [83] Mei S H J, Brennan J D, Li Y, et al. An efficient RNA-cleaving DNA enzyme that synchronizes catalysis with fluorescence signaling. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(2): 412-420
- [84] Bruesehoff P J, Augustine A J, Lu Y, et al. Improving metal ion specificity during in vitro selection of catalytic DNA. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2002, 5(4): 327-335
- [85] Liu J W, Watson D B, Lu Y, et al. A catalytic beacon sensor for uranium with parts-per-trillion sensitivity and millionfold selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(7): 2056-2061
- [86] Sen D, Gilbert W. A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature*, 1990, 344(6265): 410-414
- [87] Yang X, Dong S J, Wang E K, et al. Potassium-sensitive G-quadruplex DNA for sensitive visible potassium detection. *Analyst*, 2010, 135(1): 71-75
- [88] Lee J, Kim H J, Kim J. Polydiacetylene liposome arrays for selective potassium detection. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(15): 5010-5011
- [89] Dong S J, Li T, Wang E K. G-Quadruplex aptamers with peroxidase-like DNAzyme functions: which is the best and how does it work. *Chemistry-An Asian Journal*, 2009, 4(6): 918-922
- [90] Yang H J, Jiang S J. Hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometric detection of lead compounds separated by liquid chromatography. *Journal of Analytical Atomic Spectrom*, 1995, 10(11): 963-967
- [91] Temprano M, Delacampa M R F, Sanzmedel A. Sensitive method for determination of lead by potassium dichromate-lactic acid hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrom*, 1993, 8(6): 821-825
- [92] Babyak C, Smart R R. Electrochemical detection of trace concentrations of cadmium and lead with a boron-doped diamond electrode: effect of KCl and KNO₃ electrolytes, interferences and measurement in river water. *Electroanalysis*, 2004, 16(3): 175-182
- [93] Reese C E, Asher S A. Photonic crystal optrode sensor for detection of Pb²⁺ in high ionic strength environments. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(15): 3915-3918
- [94] Ellington A D, Szostak J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346(6287): 818-822
- [95] Bonaccio M, Credali A, Pcracchi A. Kinetic and thermodynamic characterization of the

- RNA-cleaving 8-17 deoxyribozyme. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(3): 916-925
- [96] Santoro S W, Joyce G F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(9): 4262-4266
- [97] Carmi N, Balkhi S R, Breaker R R. Cleaving DNA with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(5): 2233-2237
- [98] Nelson K E, Brueseho P J, Lu Y. In Vitro Selection of high temperature Zn^{2+} -dependent DNAzymes. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(1): 216-225
- [99] Liu J W, Lu Y. FRET study of a trifluorophore-labeled DNAzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(51): 15208-15216
- [100] Liu J W, Lu Y. Improving fluorescent DNAzyme biosensors by combining inter-and intramolecular quenchers. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(23): 6666-6672
- [101] Wang J, Zhou C S, Fang X H, et al. Aptamer-based ATP assay using a luminescent light switching complex. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(11): 3542-3546
- [102] Vitzthum F, Geiger G, Bernhagen J, et al. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Analytical Biochemistry*, 1999, 276(1): 59-64

附 录 攻读学位期间发表的学术论文

- [1] Jing Zheng, Jishan Li, Xiaoxia Gao, Jianyu Jin, Keming Wang, Weihong Tan, Ronghua Yang*. Modulating Molecular Level Space Proximity: A Simple and Efficient Strategy to Design Structured DNA Probes. *Anal. Chem.*, 2010, 82(9): 3914-3921
- [2] Xiaoxia Gao, Jing Zheng, Jinhua Liu, Jishan Li*, Ronghua Yang*. New Probe Design Strategy by Cooperation of Metal/DNA-Ligation and Supermolecule Inclusion Interaction: Application to Detection of Mercury Ions(II). to be submitted



致 谢

时光如梭，入学时的情景仍犹在目，离校的脚步已悄然而至。回首这三年，也许有很多曲折，但更多的是喜悦。在这里，我想感谢那些曾经给予我帮助的人，在他们看来可能只是举手之劳，但如果没有你们的帮助和关心，就没有今天的我，谢谢你们！明天，我将告别这个温暖的大家庭，告别挚爱的老师和三年里相伴走过的朋友，踏上新的人生征程。

衷心的感谢导师杨荣华教授在这几年来在学习和科研上对我的帮助和指导。本论文是在杨老师的精心指导下完成的。从论文的选题、设计方案到最后定稿，字里行间都凝聚着杨老师的心血。杨老师严谨的治学态度、渊博的学识和精益求精的工作作风，对待科研实事求是以及独特的学术思维都使我受益匪浅。另外，要特别感谢李继山老师对我在科研上的指导以及生活上的帮助。每次遇到难题向李老师寻求帮助时，不管忙或闲，李老师总是给与我耐心的讲解与分析，然后一起商量解决的办法。我毕业论文能得以顺利完成，离不开李老师的帮助，在此，我表示由衷的感谢。

感谢化工学院这三年来为我提供先进的的科研和学习条件，使我接受到一流的学术教育和培养，为我奠定了坚实的科研基础；衷心感谢实验室的各位兄弟姐妹在学习和生活上给予的帮助与关心，感谢他们在这里与我共同生活、学习和奋斗；感谢王永祥师兄、王昊师兄、金建余师兄、李银辉师兄、刘金华师兄、郑晶师姐、闫慧娟师姐、周姣、余欢、于钊江、周文玉、段玉、杨盛、蒋莹、王波林和傅婷对我的帮助；我还要特别感谢周姣和余欢，一路走来，谢谢你们陪我！

最后，本论文的完成离不开我的家人和亲朋好友，是他们在默默地支持与鼓励我，与我分享酸甜苦辣，他们不仅在物质上满足我，而且在精神上不断地鼓舞和激励着我，让我安心的学习，顺利的完成学业。

高晓霞

2011年5月于湖南大学

