# 基于纳米金显色的非标记核酸适配体可视化检测 重金属镉的方法研究

栾云霞\*,张展宁,陈佳祎,徐 笠,陆安祥

(北京农业质量标准与检测技术研究中心,农业部农产品质量安全风险评估实验室(北京), 农产品产地环境监测北京市重点实验室,北京 100097)

**摘 要:目的** 建立以特异性非标记核酸适配体为识别探针的重金属镉可视化检测方法。**方法** 根据适配体与 镉的高亲和力结合特性,利用纳米金溶液在盐诱导下凝聚后引起的颜色变化反应,通过分光光度计检测溶液 的吸光度来检测镉离子浓度。通过优化适配体 DNA 浓度、盐离子浓度和纳米金溶液体积,确定最佳反应条件, 建立样品溶液中镉离子浓度与吸光度的线性关系。**结果** 该方法的线性范围和检测限分别是 0.14~10 ng/mL 和 0.14 ng/mL,可以满足痕量检测要求。通过对灌溉水样的加标回收实验证明,检测体系具有很好的实用性和复 杂基体适应性。**结论** 利用核酸适配体和纳米金显色实现了镉的痕量可视化检测,该方法是一种简单、快速、 灵敏的检测方法,在现场快速检测和高通量分析中都具有很好的应用前景。 关键词: 重金属镉; 适配体; 非标记; 纳米金; 可视化检测

# Visual detection of cadmium based on aggregation of aptamer-modified gold nanoparticles

LUAN Yun-Xia<sup>\*</sup>, ZHANG Zhan-Ning, CHEN Jia-Yi, XU Li, LU An-Xiang

(Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Risk Assessment Lab for Agro-products (Beijing), Ministry of Agriculture, Beijing Municipal Key Laboratory of Agriculture Environment Monitoring, Beijing 100097, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a visual, rapid, and sensitive method for the detection of Cd based on aptamer and gold nanoparticles. **Methods** The concentration of cadmium ion was detected indirect by the value of absorbance according to the color changes caused by salt-induced condensation of gold nanoparticles and the high affinity binding of aptamer with cadmium. By optimizing the concentration of aptamers DNA, salt and gold nanoparticles in solution, the optimal determine conditions and linear relationships between the sample absorbance and concentration of cadmium were established. **Results** This system achieved a superior linear dynamic range from 0.14 ng/mL to 10  $\mu$ g/mL and a detection limit as low as 0.14 ng/mL. The aptasensor practicability were tested by real sample of irrigating water spiked with a series of concentration of Cd and the

基金项目:国家自然科学基金项目(41301350),北京市农林科学院农产品质量与农田环境基础数据平台建设(KJCX20140302)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (41301350) and the Innovation and Capacity-building Projects by the Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences Project (KJCX20140302)

<sup>\*</sup>通讯作者: 栾云霞, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农产品及农田环境中污染物检测技术。E-mail: luanyunxia@163.com

<sup>\*</sup>Corresponding author: LUAN Yun-Xia, Associate Professor, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, No.9, Middle Road of Shuguang Huayuan, Haidian District, Beijing 100097, China. E-mail: luanyunxia@163.com

results showed a good tolerance to matrix effect. **Conclusion** The developed approach is a simple, quick and sensitive detection method for Cd monitoring and offers a great potential for on-site and high-throughput analysis in routine control.

**KEY WORDS:** cadmium; aptamer; label-free; gold nanoparticles; visual detection

# 1 引 言

"农产品是有生命的, 需要优质的水源、优质的 土壤和空气", 保障鲜活农产品的安全优质, 关键在 于安全的产地环境。由于工业废物排放、污水灌溉、 大气沉降和长期施用磷肥等原因, 镉已成为农田环 境中最严重且普查超标率最高的污染物。镉作为人体 非必要元素, 是毒性最强的重金属元素之一, 对人体 组织和大脑均有很强的毒性。因此, 国内外相关机构 均制定了严格的限量标准(表 1), 同时, 也对痕量镉 的检测提出了更高的要求, 亟需快速高效的重金属 监控技术<sup>[3]</sup>。研究快速、低成本、灵敏度高且特异性 好的重金属镉检测方法显得极为重要。

近年来,国内外镉的分析方法主要包括原子吸 收光谱法、电感耦合等离子体质谱法、电感耦合等离 子发射光谱法、阳极溶出伏安法、高效液相色谱法、 酶分析法、生物传感器、免疫分析法、核酸适配体法、 试纸法<sup>[4]</sup>。传统检测方法中原子吸收光谱法是目前重 金属元素镉测定最常用的方法之一,其中火焰法原 子吸收法较适宜应用于镉含量较高的样品 (如废水 和受污染的水样),而对于镉含量较低的样品,需增 加萃取预富集前处理;石墨炉法检出限低,灵敏度高, 但基体干扰严重、较适用于背景值低的样品分析、不 适用于难消解和基体背景值高的样品<sup>[5]</sup>。电感耦合等 离子发射光谱法具有分析速度快、灵敏度高、准确度 精密度高、测定范围广的优点、不足之处在于设备和 操作费用较高,易污染<sup>[6,7]</sup>。高效液相色谱法可实现多 元素同时测定,但是络合剂选择有限,给该方法带来 了局限性<sup>[8]</sup>。快速检测方法以酶分析法灵敏度最高, 但选择性较差,对单一重金属离子的检测存在一定 的困难,且检测限较高,不适于痕量镉的检测<sup>[9,10]</sup>。

生物传感器发展迅速,灵敏度、自动化程度高,可应 用于环境在线监测,但传感器制作工艺较难,成本相 对较高<sup>[11]</sup>。试纸法因其便宜、简便在现场快速检测中 应用较多,但试纸或其他载体都存在着承载反应试 剂量有限的问题,检出限相对较高<sup>[12]</sup>。

核酸适配体由于其选择性高、特异性好、分子量 较小、可化学合成、稳定性好、成本低廉、没有毒性 等优点,在分析检测领域受到广泛关注,利用核酸适 配体检测重金属是近年来研究的热点,而目前将核 酸适配体应用于重金属在 Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>和 K<sup>+</sup>的 检测已有文献报道<sup>[13-16]</sup>。本研究以纳米金材料作为介 质,以非标记的重金属镉特异性识别核酸为识别分 子,建立了基于比色原理检测重金属镉的新型高效 可视化检测方法。

# 2 材料与方法

#### 2.1 仪器与设备

TU-1950 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪 器有限责任公司); DF-101S 型集热式磁力加热搅拌 器(河南巩义市予华仪器厂); 台式高速冷冻离心机器 (美国 Sigma 公司); Millipor e 纯水机(美国 Bedford 公 司); EOS 6D 数码相机(佳能公司); 96 孔板(coring 公 司)。

### 2.2 试 剂

重金属镉的适配体寡聚核苷酸序列在"上海生 工"合成,5'-ACCGACCGTGCTGGACTCTGGACTG TTGTGGTATTATTTTTGGTTGTGCAGTATGAGCG AGCGTTGCG-3'<sup>[14]</sup>,用含1 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (pH 8.5) 的 10 mmol/L 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(pH 7.4)溶液来稀释, -20 ℃保存。

表 1 国内外对农产品中镉的限量标准 Table 1 Limit standard of cadmium in agricultural products at domestic and overseas

	鱼类(mg/kg)	大米(mg/kg)	蔬菜(mg/kg)	饮用水(mg/L)
GB 2762-2012 <sup>[1]</sup>	0.1	0.2	0.05	0.005
CAC:CODEX STAN193-1995 <sup>[2]</sup>	0.05	0.4	0.05	0.003

镉标准溶液、氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>)、柠檬酸三钠(美国 Sigma 公司); NaCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>(分析纯,上海化学试剂公司)。

# 2.3 纳米金的制备

试验采用 Frens<sup>[7]</sup>在 1973 年创立的柠檬酸三钠 还原法制备胶体金,在三口圆底烧瓶中加入 95.8 mL超纯水,再加入 4.2 mL 质量分数 1%的氯金酸溶 液,磁力回流加热搅拌,持续煮沸 10 min,然后迅 速加入 10 mL 质量分数 1%的柠檬酸三钠溶液,溶液 颜色在 1 min 内变红,继续沸腾 20 min,搅拌状态下 自然冷却至室温,得到的酒红色液体,即为纳米金。

#### 2.4 重金属镉的检测

取 50 μL 浓度为 2 μmol/L 的 Cd 适配体 DNA, 加入 96 孔板中, 加入 50 μL 不同浓度(0.000、0.025、0.100、0.200、0.500、1.000、2.000、4.000、10.000 ng/mL)的目标物, 混匀孵化 5 min, 加入 50 μL 的纳米金, 平衡 5 min, 加入 10 μL 浓度为 2 mol/L NaCl 溶液, 平衡 5 min 后 400~750 nm 以水做参照进行比色, 并拍照。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 重金属镉检测的原理

利用重金属镉的适配体和纳米金的可视化检测 方法是基于纳米金溶液在高浓度 NaCl 的作用下产生 的凝聚而造成的颜色变化。纳米金一般经由柠檬酸三 钠还原氯金酸制备而成, 生成的溶液是一种胶体溶 液,纳米金表面覆盖一层柠檬酸,颗粒之间通过静电 排斥作用保持胶体金溶液的稳定性,如果在溶液中 加入高浓度的盐,即可破坏胶体溶液的稳定性,纳米 金发生凝聚,溶液颜色由红色变为蓝色<sup>[17,18]</sup>。而单链 DNA 在自由状态下通过暴露的带正电的碱基和纳米 金表面的负电荷发生静电作用而直接吸附到金表面, 吸附有单链适配体 DNA 的纳米金在高盐浓度下仍可 以保持稳定,溶液为红色。如图 1 所示,当溶液中存 在靶分子镉离子时,适配体单链 DNA"stem-loop"区 域(如图 1 方框所示部位)形成特定的立体结构,特异 性高亲和力地与目标物结合,表面没有吸附 DNA 的 纳米金在加入高浓度盐后凝聚,溶液变为蓝色<sup>[19]</sup>。利 用分光光度计对溶液的进行吸光度测定,即可通过 目标物浓度和吸光度建立线性关系。

# 3.2 最佳反应条件的选择

由于适配体纳米金比色法检测目标物是基于目 标物和纳米金竞争结合适配体的原理,因此,合适的 DNA 适配体浓度和 NaCl 浓度是检测方法体系成功 的基础。首先要对 DNA 浓度进行优化,测定了 0.1、 1.0、2.0、3.0、5.0 μmol/L DNA 单链浓度下在 2 mol/L NaCl 浓度下的聚集情况。研究发现,当 DNA 浓度过 量时,即使加入 100 ng/mL Cd 目标物溶液仍然不变 为蓝色,当 DNA 浓度很小时,即使加入低浓度 Cd 目 标物溶液即为蓝色。经实验发现,当 DNA 单链浓度 为 2 μmol/L 且不加目标物时在 NaCl 加入后聚集,溶 液颜色在是否变为蓝色的结点,即当 DNA 单链浓度



图 1 基于非标记核酸适配体和纳米金检测镉的原理 Fig. 1 Schematic diagram depicting the proposed aptasensor for detection of Cd using AuNPs

大于 2 μmol/L 时溶液为蓝色, 当 DNA 单链浓度小于 2 μmol/L 时溶液为紫色, 因此选取最佳适配体浓度 为 2 μmol/L。同时, 也对 NaCl 浓度进行了优化, 研 究了加入不同浓度(1、2、3 mol/L)NaCl 纳米金凝聚 的情况, 最终选择 10 μL 2 mol/L NaCl 溶液对检测体 系最佳。采用上述条件, 在反应体系中加入纳米金、 适配体、盐和不同浓度镉离子后, 测定溶液的吸光度 变化, 结果显示, 在加入 2 mol/L NaCl 后, 在 520nm 波长的吸光度有明显降低, 两种不同浓度的镉溶液 的吸光值下降幅度也较理想(如图 2 所示), 以此作为 适配体检测体系的反应条件。





NaCl, 2 µmol/L aptamer, 10 nmol/L AuNPs, and T=25 °C)

#### 3.3 梯度实验及线性

在保证适配体、纳米金和盐离子浓度一致的情况 下,通过向反应体系中加入不同浓度的镉,使溶液最 终浓度为 0.000、0.025、0.100 、0.200、0.500、1.000、 2.000、4.000、10.000 ng/mL,平衡后,观察其在高盐 条件下纳米金的凝聚情况和溶液颜色的变化,并用 分光光度计测定溶液的吸光度(如图 3 和图 4)。正如 所预期的结果,随着镉浓度的增加,加入 NaCl 后, 溶液的颜色从红色变为紫红色,在 520 nm 处的吸收 峰也随镉浓度的增加而逐渐变小。当目标物浓度达到 4 ng/mL 时,溶液由酒红色变为深蓝色,表明纳米金 几乎完全凝聚,但目标物浓度大于 10 ng/mL 时,线 性不够理想。通过对溶液中镉浓度和吸光度的线性关 系分析发现,溶液在 520 nm 的吸光度与镉的浓度呈 较好的线性关系, *r*<sup>2</sup>达到 0.9890(图 4), 这为通过标准 曲线分析实际样品奠定了良好的理论基础。通过 3 倍空白的 SD 再除以曲线斜率, 计算得到本方法的检 出限为 0.14 ng/mL, 检测的线性范围在 0.14~10 ng/mL 之间, 灵敏度和精密度较好。



图 3 检测体系吸光度随镉浓度增加的变化情况

Fig. 3 Decrease of absorption at 520 nm with increase of Cd concentration





#### **3.4** 实际样品检测

为了检验该检测方法的实用性, 取农业灌溉水 作为实际样品进行加标回收实验。已知该农业灌溉水 水样经石墨炉原子吸收法测定 Cd 的含量未检出, 取 农业灌溉水分别加标至 Cd 浓度为 0.5 ng/mL 和 1 ng/mL,并分别作平行。最终通过标准曲线方程计算 加标灌溉水样中的Cd含量,结果如表2,得到了较好 的回收率,说明本方法对于灌溉水样品基质具有很 好的适应性,具有较好的现场批量检测应用前景。

表 2 灌溉水样品中镉的检测 Table 2 Detection of the irrigating water spiked with different concentration of Cd

	Cd 加标量 (ng/mL)	<b>实测值</b> (ng/mL )	回收率 (%)	RSD(%)
1	0.5	0.448 <sub>a</sub>	89.50	2.74
2	1	0.863 <sub>a</sub>	86.25	1.72

a 三次重复的平均值

## 4 讨 论

本研究建立了一种基于纳米金和镉特异性适配 体检测 Cd<sup>2+</sup>的检测方法, 该方法无需对 DNA 分子和 纳米金进行设计和修饰、把合成好的单链寡聚核苷 酸直接与未修饰的纳米金吸附结合后、加入高浓度 的盐和目标物 15 min 后即可显色。尤其方便的是纳 米金聚合后引起的红色到紫色再到蓝色的颜色变化 很容易用肉眼观察或用 UV-vis 光谱仪检测、溶液在 520 nm 吸光度与镉浓度具有较好的线性, 检测限可 以达到 0.14 ng/mL、低于美国环境保护署制定的强制 的饮用水标准为 5 ng/mL 和世界卫生组织在饮用水 中定义的 3 ng/mL 的毒性限量<sup>[20]</sup>。另外, 该方法不使 用有机溶剂、重金属离子、酶试剂、光敏染料和大型 精密仪器、具有操作简单、灵敏度高、特异性好的优 势,在现场快速检测方面有良好的应用前景。但本研 究对实际样品的检测仅限于灌溉水以及类似的简单 基质,而对于镉适配体如何跟目标物结合的具体机 制和构象还不完全清楚, 未来需要多种表征和检测 手段对其进行深入研究<sup>[10,21]</sup>。今后、需要进一步改进 方法实现对复杂样品的检测。

#### 参考文献

- GB 2762-2012 食品安全国家标准 食品中污染物限量[S].
   GB 2762-2012 National food safety standards Maximum levels of contaminants in foods [S].
- [2] Codex Alimentarius Commission, Codex Standard 193-1995, Codex general standard for contaminants and toxins in food and

feed [S].

- [3] Stepien M, Sokol-Leszczynska B, Luczak M. Mycotoxins, food products and human health [J]. Postepy Mikrobiol, 2007, 46: 167–177.
- [4] Zhao SL, Chen FS, Zhang J, et al. On-line flame AAS determination of traces Cd(II) and Pb(II) in water samples using thiol-functionalized SBA-15 as solid phase extractant [J]. J Ind Eng Chem, 2015, 27: 362–367.
- [5] Borges SSD, Beinner MA, Silva, JBB. Direct method for determination of Al, Cd, Cu, and Pb in beers in situ digested by GF AAS using permanent modifiers [J]. Biol Trace Elem Res, 2011, 167: 155–163.
- [6] Karami H, Mousavi MF, Yamini Y, et al. On-line preconcentration and simultaneous determination of heavy metal ions by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2004, 509(1): 89–94.
- [7] Chen F, Zhang XL, Yue F, et al. The determination of Fe, Cu, As, Zn, Cd, Hg in Pb-Zn ore with ICP-AES method [J]. Sci Technol BBS. 2015, 11: 124–127.
- [8] Tai X, Li HT, Li DL, *et al.* Determination of heavy metal element in water samples by solid phase extraction concentration high efficiency liquid phase chromatography [J]. Arid Environ Monit, 2004, 18(2): 65–68.
- [9] Liu CX, Liang X, He JX. Determination of cadmium (II) by enzymatic kinetic spectrophotometry [J]. Chem Online, 2008, 5: 398–400.
- [10] 刘京萍,李金,葛兴.葡萄糖氧化酶抑制法检测食品中镉、锡、铅的残留[J].北京农学院学报,2007,22(4):59-62.
  Liu JP, Li J, Ge X. Detection of Cd, Sn and Pb ions residuals in foods by enzyme-inhibited reaction [J]. J Beijing Univ Agric, 2007, 22(4):59-62.
- [11] Liao VHC, Chein MT, Tseng YY, et al. Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein based bacterial biosensors [J]. Environ Pollut, 2006, 142(1): 7–23.
- [12] 王民, 糜漫天, 高志. 食品中镉的快速检测方法研究[J]. 第三
   军医大学学报, 2004, 26 (7): 640–642.
   Wang M, Mi MT, Gao Z. A fast method for detecting cadmium in foods [J]. Acta Acad Med Milit Tert, 2004, 26(7): 640–642.
- [13] Vaibhavkumar N, Mehta, Hirakendu Basu, *et al.* Simple and sensitive colorimetric sensing of Cd<sup>2+</sup> ion using chitosan dithiocarbamate functionalized gold nanoparticles as a probe [J]. Sensors Act B Chem, 2015, 220: 850–858.
- [14] Yi MS, Shu PW. Colorimetric detection of Cd(II) ions based on di-(1H-pyrrol-2-yl) methanethione functionalized gold nanoparticles [J]. Sensors Act B: Chem, 2014, 201: 86–91.
- [15] Xue Y, Zhao H, Wu ZJ, et al. Colorimetric detection of Cd<sup>2+</sup>

using gold nanoparticles confunctionalized with 6-mercaptonicotinic acid and *L*-cysteine [J]. Analyst, 2011, 136: 3725–3730.

- [16] Huang CC, Yang Z, Lee KH, et al. Synthesis of highly fluorescent gold nanoparticles for sensing mercury(II) [J]. Angew Chem Int Ed, 2007, 46: 6824–6828.
- [17] Li T, Dong S, Wang E . A lead (II) driven DNA molecular device for turn-on fluorescence detection of lead(II) ion with high selectivity and sensitivity [J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(38): 13156–13157.
- [18] Shen Q, Zhou L, Yuan Y, et al. Intra-molecular G-quadruplex structure generated by DNA-templated click chemistry: "Turn-on"fluorescent probe for copper ions [J]. Bios Bioelec, 2014, 55: 187–194.
- [19] Huang CC, Chang HT. Aptamer-based fluorescence sensor for

rapid detection of potassium ions in urine [J]. Chem Commun 2008, 12:1461-1463.

- [20] Guidelines for drinking-water quality, fourth edition [Z].
- [21] Wu YG, Zhan SS, Lu M, Wan G et al. Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles [J]. Analyst, 2014, 139: 1550.

(责任编辑:杨翠娜)





栾云霞,博士,副研究员,主要研究方 向为农产品及农田环境中污染物检测技术。 E-mail: luanyunxia@163.com