

基于金纳米颗粒聚集的高灵敏 Ag^+ 电致化学发光生物传感器

苗向阳^{1,2}, 王孝英¹, 朱钦舒¹

(1. 南京师范大学分析测试中心, 江苏 南京 210023)

(2. 苏州健雄职业技术学院医药科技学院, 江苏 太仓 215411)

[摘要] 银离子是一种环境污染物, 对其进行灵敏的检测非常重要. 本文构建了一种基于金纳米颗粒(AuNPs)聚集的高灵敏 Ag^+ 电致化学发光(ECL)生物传感器. 探针 DNA 依靠 Au-S 键连接到金电极(GE)表面, 用 6-巯基-1-己醇(6-Hydroxy-1-hexanethiol, 6-MCH)封闭未结合位点, 合成尺寸均一的 Au NPs, 将其与 Link DNA 连接, 通过与探针 DNA 杂交连接到电极表面. 在杂交过程中加入一定浓度的 Ag^+ 孵育后, 由于 C- Ag^+ -C 结构形成, 诱导 Au NPs 大量聚集, 提高电子传输效率. 最佳条件下, 传感器检测 Ag^+ 浓度线性范围为 0.5 nmol/L ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ ~ 500 $\mu\text{mol/L}$, 最低检出限 0.25 nmol/L, 显示出较好的特异性和稳定性.

[关键词] C- Ag^+ -C, 金纳米颗粒, ECL, Ag^+

[中图分类号] O657.1; TP212.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2020)03-0063-08

Highly Sensitive Ag^+ ECL Biosensor Based on Gold Nanoparticles Aggregation

Miao Xiangyang^{1,2}, Wang Xiaoying¹, Zhu Qinshu¹

(1. Analytical and Testing Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. Department of Medical Science and Technology, Suzhou Chien-shiung Institute of Technology, Taicang 215411, China)

Abstract: Silver ion is an environmental pollutant. It is very important to detect it sensitively. In this paper, a highly sensitive Ag^+ ECL biosensor based on gold nanoparticle aggregation is constructed. First, the probe DNA is connected to the surface of the gold electrode (GE) by Au-S bond, and the unbound site is blocked by MCH. Subsequently, size-uniform Au NPs are synthesized and connected to the link DNA and then tied to the electrode surface by hybridization with probe DNA. When a certain concentration of Ag^+ is added during the hybridization process, the stable C- Ag^+ -C structure is formed, which leads to aggregate Au NPs and accelerate the electron transport performance of the sensor. Under optimal conditions, the sensor is used as detector for the concentrations of Ag^+ . The linear ranges are obtained in the range of 0.5 nmol/L ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ ~ 500 $\mu\text{mol/L}$. The detection limit of the ECL DNA biosensor is 0.25 nmol/L. This biosensor has good specificity and stability.

Key words: C- Ag^+ -C, gold nanoparticle, ECL, Ag^+

近年来,随着电子工业、影像工业以及制药工业的迅速发展^[1],大量 Ag^+ 作为工业废物被排放到环境中^[2-3]. 近期研究表明,其对人类的健康安全产生了潜在危害. Ag^+ 会使巯基酶失活,与人体代谢物中的胺、咪唑和羧基结合,与必需营养成分(特别是硒、铜、维生素 E 和 B12 等)相互作用,从而对人体器官和免疫系统产生严重的损害^[4-5],其潜在毒性的研究已经逐渐引起人们关注. 因此, Ag^+ 被列为有毒的重金属离子之一. 开发水介质中痕量检测 Ag^+ 的灵敏特异性的方法对于人类健康和环境保护具有重要的意义. 过去几年中,已有一些方法如原子吸收光谱(AAS)^[6-7]、电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AES)^[8]、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)^[4,9]、电化学^[10-11]和荧光^[12-14]等用来检测 Ag^+ . 虽然这些方法具有很高的选择性和灵敏度,可以提供多元素分析^[15],但它们也具有操作难、成本高、耗时久等缺点. 因此,开发简单、快

收稿日期:2020-04-21.

基金项目:国家自然科学基金项目(21974070)、太仓市基础研究计划项目(2018JC04).

通讯作者:朱钦舒,博士,高级实验师,研究方向:分析化学. E-mail: zhuqinshu@njnu.edu.cn

速、高灵敏度的 Ag^+ 检测方法仍然是必要的。

近年来,DNA-金属碱基对在传感中的应用受到广泛关注. 一些金属离子可以选择性地与 DNA 双链体中的碱基结合形成金属介导的碱基对^[16],这使得 DNA 双链体的稳定性大大增加^[17-20]. 这种 DNA 金属介导的碱基对的结构变化通常可以用来检测金属离子,如 Hg^{2+} 和 Ag^+ 等^[21-23]. 研究发现 Hg^{2+} 与 DNA 双链体中的 T-T 碱基对产生特异性作用^[17],同样,DNA 双链体中的 C-C 碱基对能够专门捕获 Ag^+ 形成 C- Ag^+ -C 配位介导的稳定双链体^[24-25],这些已通过 DNA 解链研究得到证实. 目前已有许多基于此原理构建的检测生物分子或金属离子的传感器,如电化学^[26]、比色^[27]、荧光^[28] 等,但存在背景信号强、灵敏度不高等问题. ECL 技术通过电化学氧化还原反应产生化学发光,结合了化学发光和电化学的优良性质^[29-30]. 就灵敏度和特异性而言,该技术显示出独特的优势,例如,不需要光源就能得到信号,没有来自散射光和发光杂质的背景信号等^[31]. 将 C- Ag^+ -C 结合策略与 ECL 分析技术相结合,用于检测金属离子是一种构建传感器的新思路. 目前文献报道了基于 C- Ag^+ -C 策略的 ECL 传感器^[25,32-34],但这些传感器是将 DNA 单链与发光体如钌联吡啶、鲁米诺连接进行标记,利用 C- Ag^+ -C 双链体的形成使得信号减弱,从而构建“signal-off”的检测策略. 但是,“signal-off”的传感策略在检出限和检测范围方面受到较大限制,因此,本文致力于开发一种简单实用,而且具有高灵敏、高选择性的检测系统.

“signal-on”是一种信号增大的传感策略,信号的富集有利于构建高灵敏的检测系统^[35]. 将 C- Ag^+ -C 结构的构建与 ECL “signal-on”分析方法相结合,利用 Au NPs 对信号放大的特点构建了灵敏简便无标记检测 Ag^+ 的 DNA 生物传感器(图 1). 首先,probe DNA 依靠 Au-S 键连接到金电极(GE)表面,用 MCH 封闭未结合位点,随后合成尺寸均一的 Au NPs 并将其与 Link DNA 连接,通过与 probe DNA 的杂交将 Au NPs 连接到电极表面. 在杂交过程中加入一定浓度的 Ag^+ 孵育后,由于 C- Ag^+ -C 结构的稳定形成,诱导 Au NPs 的大量聚集,提高电子传输效率. C- Ag^+ -C 由于具有 T- Hg^{2+} -T 相似的结构,表现出同样显著的电荷转移效率^[36],而 Au NPs 的富集进一步诱导形成了大量的 C- Ag^+ -C 结构,加快了电子传输. 聚集的 Au NPs 在激发态下与电解液中的共反应剂 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 发生化学反应,释放能量发光. 基于此,利用易合成的具有高电子传输速率的 Au NPs 和特定的富含碱基 C 的 ssDNA 设计了一种基于 C- Ag^+ -C 的 DNA ECL 生物传感器用于检测 Ag^+ . 该生物传感器的 ECL 强度随着 Ag^+ 浓度的增加而提高,具有高灵敏度.

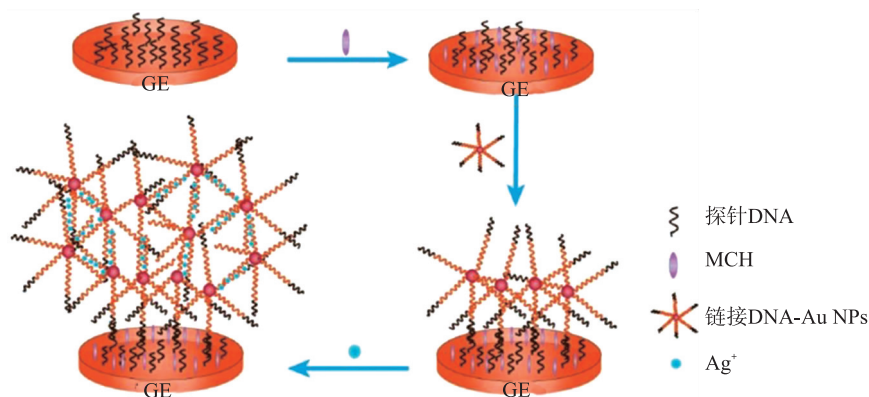


图 1 基于 C- Ag^+ -C 及 Au NPs 的信号放大作用构建灵敏的 Ag^+ ECL 生物传感器的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of constructing sensitive Ag^+ ECL biosensor based on signal amplification of C- Ag^+ -C and Au NPs

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ECL 的测定使用三电极体系完成,使用修饰的 GE(直径为 4 mm)作为工作电极,Pt 电极作为对电极,Ag/AgCl 电极作为参比电极. ECL 由 MPI-A 型 ECL 检测仪(西安瑞迈电子科技有限公司,西安,中国)测定. 将电解池放置在高压 800 V 的光电倍增管前,ECL 测试在室温下以 0.1 V/s 的扫描速率从 -2.0 V 到 0 V 进行循环扫描测试. 测试溶液是含有 20 mmol/L 过二硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)的 PBS 缓冲溶液(0.1 mol/L,

pH 7.4). 用 Cary 60 分光光度计 (Agilent, USA) 进行 UV-vis 吸收光谱的测试. TEM 图像使用 Hitachi H-7650 型透射电子显微镜 (Hitachi, 日本) 以 80 kV 加速电压测得. 所有测试均在室温下进行.

Tris(羟甲基)-氨基甲烷(Tris)购自阿法埃莎公司. 三(2-羧乙基)磷酸盐(TCEP)、6-巯基-1-己醇(MCH)购自 Sigma-Aldrich 公司. 四氯金酸(Ⅲ)三水合物($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)购自 Biosharp 公司. 硝酸银(AgNO_3)、乙酸(CH_3COOH)、盐酸(HCl)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、柠檬酸钠、过二硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)购自国药集团化学试剂有限公司. 所有试剂均为分析纯试剂. 使用含有 0.1 mol/L KCl 的 Tris-HCl 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)作为试验冲洗液. 所有的溶液均用由 Millipore 纯化系统(18.25 M Ω cm, Millipore SAS Corporation)获得. 高效液相色谱法纯化的 DNA 购自上海生工有限公司(上海, 中国). 本工作中使用的 DNA 序列如下:

Probe DNA: 5'-SH-C6-TACGACTCACAT-3';

M DNA: 5'-SH-C6-AAAAAAAAAAAAA-3';

Link DNA 1: 5'-SH-C6-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCATGTGAGTCGTA-3';

Link DNA 2: 5'-SH-C6-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATGTGAGTCGTA-3';

Link DNA 3: 5'-SH-C6-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGTGAGTCGTA-3';

Link DNA 4: 5'-SH-C6-GGGGGGTGGGGGTGGGGGTGGGATGTGAGTCGTA-3'.

1.2 实验方法

1.2.1 AuNPs 及 DNA-AuNPs 的合成

将 198 mL 去离子水加入双颈烧瓶中, 加入 2 mL 1% (质量分数) HAuCl_4 使最终的浓度是 1 mmol/L. 当溶液开始回流时, 迅速加入柠檬酸钠溶液(10 mL, 38.8 mmol/L). 溶液颜色在 1 min 后从浅黄色变为深红色, 继续回流 20 min. 停止加热冷却至室温(23~25 $^{\circ}\text{C}$). 溶液颜色呈深红色, 具有较高的稳定性, 储存在干净的容器中.

将 DNA(100 $\mu\text{mol/L}$, 3 μL) 与柠檬酸盐-Au NPs(10 nmol/L, 100 μL) 均匀混合. 将混合液放置在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 2 h, 室温下解冻.

1.2.2 ECL 传感器的构建

向 99 μL probe DNA (0.2 mmol/L) 中加入 1 μL 的 TCEP (1 mmol/L), 还原巯基并激活硫醇化的 DNA. 混合液在室温孵育 30 min, 取 4 μL 溶液滴加在倒置的 GE 表面, 用塑料电极帽盖住电极继续孵育 1 h. 用去离子水冲洗 DNA 修饰的 GE, 氮气吹干. 将 DNA 修饰的电极浸入含有 MCH 溶液的离心管中, 室温孵育 2 h. MCH 封闭后, 用去离子水彻底冲洗电极, 氮气吹干. 电极在使用前可以储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 Tris 缓冲液中, 保持稳定至少一周.

将合成的 DNA-Au NPs 在室温下(23~25 $^{\circ}\text{C}$) 以 14 000 rpm 的转速离心 15 min, 倒掉上清液. 将所得纳米颗粒分散在 pH 8.2 并含有 100 mmol/L NaCl 的 25 mmol/L Tris-乙酸盐缓冲液中. 在室温下以 14 000 rpm 再次离心 10 min. 去除上清液, 再次将纳米颗粒分散在 pH 8.2 并含有 300 mmol/L NaCl 的 25 mmol/L Tris-乙酸盐缓冲液中. 将不同浓度的 Ag^+ 溶液与 DNA-Au NPs 溶液混合, 滴在电极表面在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h.

2 结果与讨论

2.1 Au NPs 及 DNA-Au NPs 的表征

如透射电镜图(图 2A)所示, Au NPs 为平均直径约 15 nm 的纳米粒子, 颗粒大小比较均一, 能够很好地分散在水溶液中. 如 UV-vis 吸收曲线所示, Au NPs 在 520 nm 处有一个明显的特征吸收峰(图 2B, 黑色实线). 当与 DNA 相连时, DNA-Au NPs 的 UV-vis 吸收曲线相比于 Au NPs 出现了一个位于 260 nm 左右处的新峰, 对应的是 DNA 的吸收峰, 这证明了 Au NPs 与 Link DNA 单链的成功连接(图 2B, 黑色虚线).

2.2 ECL 生物传感器的构建

ECL 生物传感器的构建过程可以根据 ECL 信号强度的变化呈现出来. 裸 GE 的信号较小(图 3A, 曲线 a), 而当 probe DNA 固定在 GE 表面上并用 MCH 封闭后, 由于核酸对电子转移的阻碍作用, ECL 信号强度略有减小(图 3A, 曲线 b). 当 Link DNA-Au NPs 通过与 probe DNA 的杂交作用连接到电极表面时, ECL 强度增大, 证明 Au NPs 增强的电子转移能力对 ECL 的反应具有促进作用(图 3A, 曲线 c). 当加入了 Ag^+

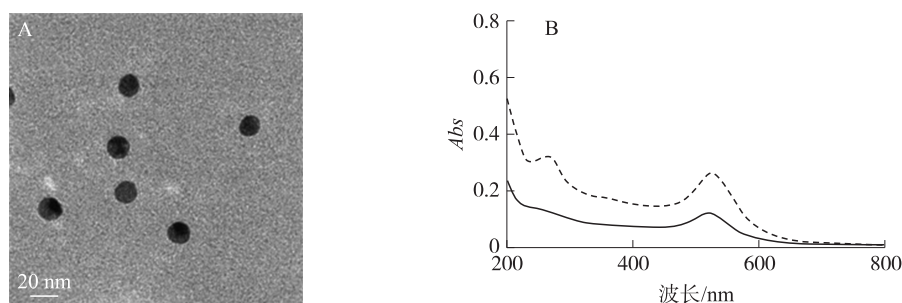


图 2 (A) Au NPs 的 TEM 图像(B) Au NPs(黑色实线)和 DNA-Au NPs(黑色虚线)的 UV-vis 吸收曲线

Fig. 2 (A) TEM image of Au NPs(B) UV-vis absorption curves of Au NPs(black solid line) and DNA-Au NPs(black dotted line)

后, ECL 信号强度得到了显著提高, 这是由于大量的 Au NPs 连接到了电极表面, 并且 C-Ag⁺-C 结构的形成大大提高了电荷转移速率(图 3A, 曲线 d). 交流阻抗曲线进一步证实了 ECL 传感器的构建过程. 裸 GE 表现出较小的半圆(图 3B, 曲线 a), 表明此时裸 GE 表面氧化还原电对具有最低的电子转移电阻(Ret). 当 probe DNA 被修饰到 GE 上时, 由于核酸对电子转移具有一定的阻碍作用, Ret 略有增大(图 3B, 曲线 b). 加入 MCH 后, Ret 进一步放大(图 3B, 曲线 c), 表明 MCH 被固定在 GE 表面上, 对电子转移有较大影响, 排斥了带负电的氧化还原探针(Fe(CN)₆^{3-/4-}) 在电极表面的电子转移. 在 Link DNA 修饰到电极表面和 probe DNA 杂交后, 由于核酸对电子转移具有一定的阻碍作用, 而连接上的 Au NPs 促进电子传导, Ret 没有产生太大变化(图 3B, 曲线 d). 最后, 由于 Ag⁺ 的诱导, 大量的 Au NPs 的聚集和 C-Ag⁺-C 的形成, 导致电子传递效率大大提高, Ret 急剧减小(图 3B, 曲线 e). Ret 的变化验证了 ECL DNA 生物传感器的层层组装过程.

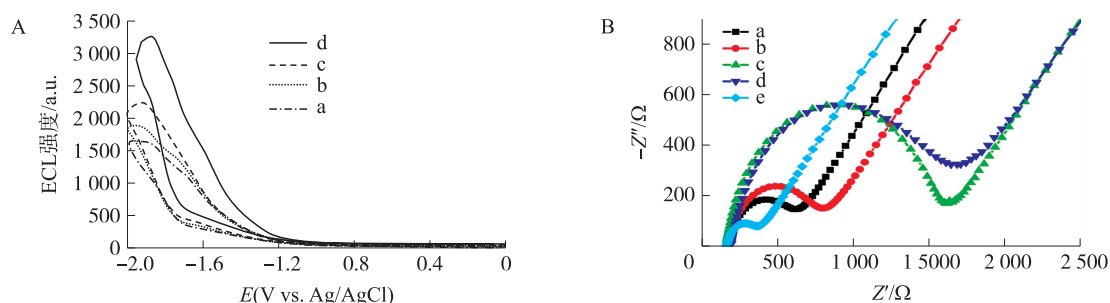


图 3 (A) (a) 裸 GE、(b) DNA-MCH/GE、(c) AuNPs-DNA-MCH/GE、(d) Ag⁺-AuNPs-DNA-MCH/GE 的 ECL 曲线(Ag⁺ 浓度为 0.5 μmol/L),

(B) (a) 裸 GE、(b) DNA-MCH/GE、(c) DNA/GE、(d) AuNPs-DNA-MCH/GE、(e) Ag⁺-AuNPs-DNA-MCH/GE 的交流阻抗谱图

Fig. 3 (A) (a) Bare GE, (b) DNA-MCH/GE, (c) AuNPs-DNA-MCH/GE and (d) ECL curve of Ag⁺-AuNPs-DNA-MCH/GE (Ag⁺ concentration 0.5 μmol/L),

(B) (a) Bare GE, (b) DNA-MCH/GE, (c) DNA/GE, (d) AuNPs-DNA-MCH/GE (e) EIS spectrum of Ag⁺-AuNPs-DNA-MCH/GE

图 4A 比较了富含 4 种不同碱基的 DNA 序列修饰的 Au NPs 连接到电极表面构建的生物传感器对 Ag⁺ 的响应情况, Link DNA 1、Link DNA 2、Link DNA 3 和 Link DNA 4 分别对应的是富含 C、T、A、G 4 种碱基的 DNA 序列. 可以看出, Ag⁺ 只对富含 C 碱基的 DNA 序列构建的传感器有响应, 证明了 ECL 信号的显著提高与 C-Ag⁺-C 的形成有着不可或缺的关系. 如图 4B 所示, 我们尝试了使用 M DNA 代替 probe DNA 来进行对照实验, M DNA 为富含 A 碱基的 DNA 单链, 不能与 Link DNA 互补配对. 图 4B 中 (a) 分别代表 Link DNA 1 和 Link DNA 2 修饰的 Au NPs 与 probe DNA 杂交构建的传感器对 0 μmol/L Ag⁺ 的响应; (b) 为两者对 0.5 μmol/L Ag⁺ 的响应, 可以看出用 Link DNA1 构建的传感器对 Ag⁺ 有明显的响应; 如 (c) 所示, 当用碱基错配的 M DNA 代替 probe DNA 之后, Au NPs 无法连接到电极表面, 两种传感器对 Ag⁺ 均没有响应, 说明了 Au NPs 的引入对于 ECL 信号的提高也有着重要的作用.

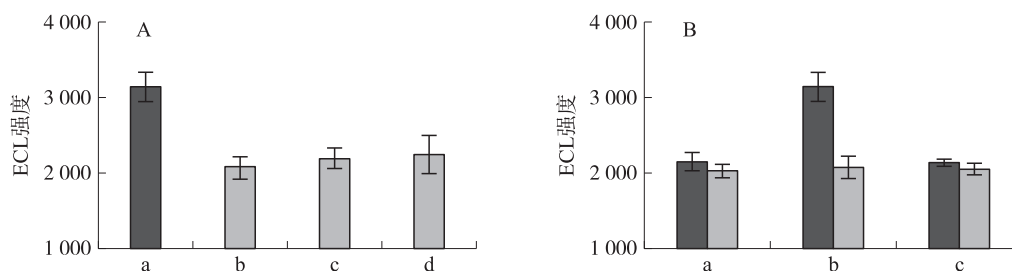
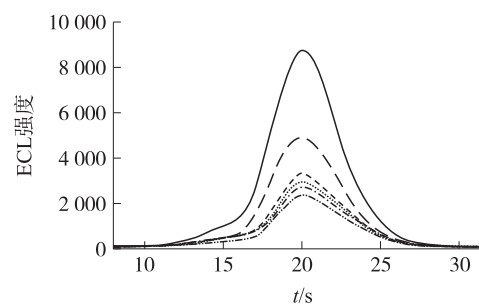


图4 (A) Link DNA 分别为 (a) Link DNA 1, (b) Link DNA 2, (c) Link DNA 3 和 (d) Link DNA 4 时生物传感器对 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ 的 ECL 响应, (B) (a) Link DNA 分别为 Link DNA 1(黑)和 Link DNA 2(灰)时生物传感器对 0 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ 的 ECL 响应, (b) Link DNA 分别为 Link DNA 1(黑)和 Link DNA 2(灰)时生物传感器对 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ 的 ECL 响应, (c) probe DNA 为 M DNA, Link DNA 分别为 Link DNA 1(黑)和 Link DNA 2(灰)时生物传感器对 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ 的 ECL 响应

Fig. 4 (A) The ECL response of the biosensor to 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ when the Link DNA was (a) Link DNA 1, (b) Link DNA 2, (c) Link DNA 3 and (d) Link DNA 4, respectively. (B) (a) The ECL response of the biosensor to 0 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ when the Link DNA is Link DNA 1 (black) and Link DNA 2 (gray), respectively. (b) The ECL response of the biosensor to 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ when Link DNA is Link DNA 1 (black) and Link DNA 2 (gray), respectively. (c) ECL response of biosensor to 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ag^+ when probe DNA is M DNA and Link DNA is Link DNA 1 (black) and Link DNA 2 (gray)

2.3 ECL 生物传感器的检测性能

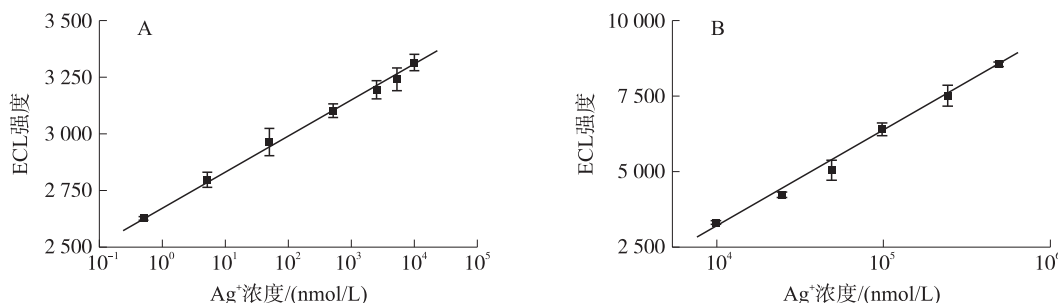
在最佳测试条件下,用构建的 ECL 生物传感器对不同浓度的 Ag^+ 进行了检测. 如图 5 所示,该生物传感器的 ECL 响应随着 $C_{(\text{Ag}^+)}$ 的增加而增强,并且分别与从 0.5 nmol/L 到 10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内和 10 $\mu\text{mol/L}$ 到 500 $\mu\text{mol/L}$ 范围内的 $C_{(\text{Ag}^+)}$ 的对数 $\lg C_{(\text{Ag}^+)}$ 呈线性关系(图 6A, B). 以 ECL 信号的强度 I 和 $\lg C_{(\text{Ag}^+)}$ 做线性图,在 0.5 nmol/L 到 10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内得到的拟合线性方程为 $I = 2671 + 157 \lg C_{(\text{Ag}^+)} \text{ (nmol/L)}$, 相关系数为 0.999 0, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 到 500 $\mu\text{mol/L}$ 范围内得到的拟合线性方程为 $I = -9152 + 3104 \lg C_{(\text{Ag}^+)} \text{ (nmol/L)}$, 相关系数为 0.997 8. 在 3 倍信噪比下计算,得到该 ECL DNA 生物传感器的检测限浓度为 0.25 nmol/L. 与其他检测方法或者其他的 ECL 传感器相比,该 ECL DNA 生物传感器的线性范围较宽,检测限优于或至少与之前报道的文献相当(表 1, 表 2).



Ag^+ 的浓度 ($C_{(\text{Ag}^+)}$) 范围为: 0 nmol/L ~ 500 $\mu\text{mol/L}$

从下到上分别为: 0 nmol/L, 0.5 nmol/L, 50 nmol/L, 5 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$

图5 生物传感器与不同浓度的 Ag^+ 孵育后产生的 ECL 曲线
Fig. 5 The ECL curve produced by incubation of biosensors with different concentrations of Ag^+



(A) $C_{(\text{Ag}^+)}$ 范围: 0.5 nmol/L ~ 10 $\mu\text{mol/L}$, (B) $C_{(\text{Ag}^+)}$ 范围: 10 $\mu\text{mol/L}$ ~ 500 $\mu\text{mol/L}$

图6 ECL 生物传感器的强度与 $C_{(\text{Ag}^+)}$ 的对数之间的线性关系

Fig. 6 The linear relationship between the intensity of the ECL biosensor and the logarithm of $C_{(\text{Ag}^+)}$

表 1 检测 Ag⁺的几种生物传感器的性能比较
Table 1 Comparison of performance of several biosensors
for detecting Ag⁺

方法	检出限	线性范围	参考文献
比色法	7.4 nmol/L	10 nmol/L~1000 nmol/L	[37]
荧光	9.1 nmol/L	30 nmol/L~240 nmol/L	[12]
荧光	10 nmol/L	50 nmol/L~500 nmol/L	[38]
电化学	10 nmol/L	100 nmol/L~800 nmol/L	[39]
电化学	0.1 nmol/L	0.5 nmol/L~100 nmol/L	[40]
ECL	0.25 nmol/L	0.5 nmol/L~500 μmol/L	本工作

表 2 检测 Ag⁺的 ECL 传感器的性能比较
Table 2 Comparison of performance of ECL sensors
for detecting Ag⁺

检出限	线性范围	参考文献
0.67 pmol/L	2 pmol/L~20 μmol/L	[41]
0.1 nmol/L	0.1 nmol/L~100 nmol/L	[33]
2.5 nmol/L	4 nmol/L~500 nmol/L	[42]
9.03 nmol/L	25 nmol/L~3 μmol/L	[43]
0.25 nmol/L	0.5 nmol/L~500 μmol/L	本工作

2.4 生物传感器的特异性和稳定性

为了评估所构建的生物传感器的稳定性,如图 7 A 所示,当 Ag⁺浓度为 0.5 nmol/L 时,循环电位在 0 到-2 V 电位下连续扫描 8 个循环后,该生物传感器的 ECL 强度几乎保持不变,表明该传感器具有令人满意的稳定性. 构建的生物传感器对浓度均为 1 μmol/L 的 Ag⁺、Fe³⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Cd²⁺、Mg²⁺ 的 ECL 信号的响应变化如图 7 B 所示,只有 Ag⁺展现出了对 ECL 信号的显著响应,说明了该生物传感器对 Ag⁺有较高的选择性.

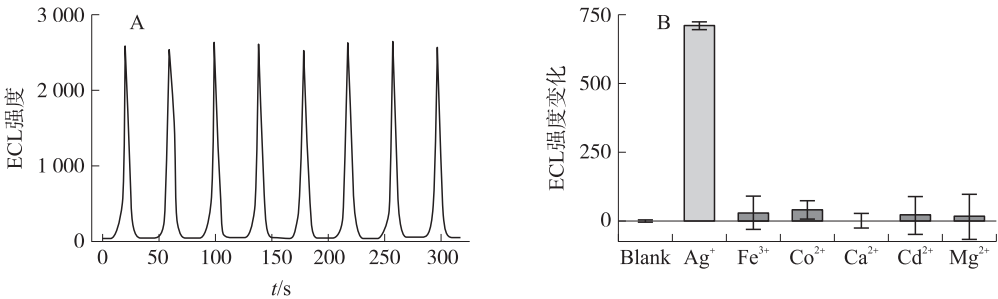


图 7 (A)当 Ag⁺浓度为 0.5 nmol/L 时,循环电位在 0 到-2 V 电位下连续扫描 8 圈得到的 ECL 响应,(B)构建的生物传感器对浓度均为 1 μmol/L 的

Ag⁺,Fe³⁺,Co²⁺,Ca²⁺,Cd²⁺,Mg²⁺ 的 ECL 信号的响应变化

Fig. 7 (A) When the Ag⁺ concentration is 0.5 nmol/L, the cyclic potential is continuously scanned for 8 cycles of the ECL response at a potential of 0 to -2 V.(B) Response of biosensors to ECL signals of Ag⁺,Fe³⁺,Co²⁺,Ca²⁺,Cd²⁺,Mg²⁺ with a concentration of 1 μmol/L

3 结论

基于 Au NPs 高电荷转移效率能够实现信号放大和 C-Ag⁺-C 结构对 Ag⁺的选择性,构建了灵敏、简便、无标记的 Ag⁺生物传感器. 杂交过程中加入一定浓度的 Ag⁺孵育后,由于 C-Ag⁺-C 结构的形成,诱导 Au NPs 大量聚集,提高电子传输效率. 基于此,利用易于合成的具有高电子传输速率的 Au NPs 和特定的富含碱基 C 的 ssDNA 设计了一种基于 C-Ag⁺-C 高强度电荷转移的 DNA ECL 生物传感器用于检测 Ag⁺. 该生物传感器的 ECL 强度随着 Ag⁺浓度的增加而提高,并且分别在 0.5 nmol/L 到 10 μmol/L 范围内和 10 μmol/L 到 500 μmol/L 范围内的 C_(Ag⁺) 的对数 lg C_(Ag⁺) 呈线性关系,具有高的灵敏度、较好的选择性和稳定性. 该生物传感器的构建对环境水介质中 Ag⁺的检测具有潜在的应用意义.

[参考文献]

[1] DAN D K,SUNDARAM C,NGO Y L T,et al. One pot solid-state synthesis of highly fluorescent N and S co-doped carbon dots and its use as fluorescent probe for Ag⁺ detection in aqueous solution[J]. Sensors and actuators B: chemical,2018,255: 3284-3291.

[2] XIU Z M,ZHANG Q B,PUPPALA H L,et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles[J]. Nano letters,2012,12(8):4271-4275.

- [3] YIN Y G, SHEN M H, ZHOU X X, et al. Photoreduction and stabilization capability of molecular weight fractionated natural organic matter in transformation of silver ion to metallic nanoparticle[J]. *Environmental science & technology*, 2014, 48(16): 9366–9373.
- [4] GONDIKAS A P, MORRIS A, REINSCH B C, et al. Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation[J]. *Environmental science and technology*, 2012, 46: 7037–7045.
- [5] ZHANG J F, ZHOU Y, YOON J, et al. Recent progress in fluorescent and colorimetric chemosensors for detection of precious metal ions(silver, gold and platinum ions)[J]. *Chemical society reviews*, 2011, 40(7): 3416–3429.
- [6] Gonzalez a R J, Bellido M D, Pinto J J, et al. Determination of silver in seawater by the direct analysis of solvent bars by high resolution continuum source solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry[J]. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 2018, 33: 1925–1931.
- [7] HIROKAWA Y, SHIBATA Y, KONYA T, et al. X-ray fluorescence analysis of Co, Ni, Pd, Ag, and Au in the scrapped printed-circuit-board ash[J]. *X-ray spectrometry*, 2013, 42(3): 134–140.
- [8] RAHMAN A, KUMAR S, BAFANA A, et al. Biosynthetic conversion of Ag^+ to highly stable AgO nanoparticles by wild type and cell wall deficient strains of *chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Molecules*, 2019, 24(1): doi:10.3390/molecules24010098.
- [9] SIKDER M, LEAD J R, THOMAS C G, et al. A rapid approach for measuring silver nanoparticle concentration and dissolution in seawater by UV - Vis[J]. *Science of the total environment*, 2018, 618: 597–607.
- [10] MOHADESI A, TAHER M A. Stripping voltammetric determination of silver(I) at carbon paste electrode modified with 3-amino-2-mercapto quinazolin-4(3H)-one[J]. *Talanta*, 2007, 71(2): 615–619.
- [11] TEO W Z, PUMERA M. Fate of silver nanoparticles in natural waters; integrative use of conventional and electrochemical analytical techniques[J]. *RSC advances*, 2014, 4: 5006–5011.
- [12] QI L, YAN Z, HUO Y, et al. MnO_2 nanosheet-assisted ligand-DNA interaction-based fluorescence polarization biosensor for the detection of Ag^+ ions[J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2017, 87: 566–571.
- [13] LIU G L, XUAN C L, FENG D Q, et al. Dual-modal fluorescence and light-scattering sensor based on water-soluble carbon dots for silver ions detection[J]. *Analytical methods*, 2017, 9(38): 5611–5617.
- [14] CHEN S, WANG W J, YAN M M, et al. 2-Hydroxy benzothiazole modified rhodol: aggregation-induced emission and dual-channel fluorescence sensing of Hg^{2+} and Ag^+ ions[J]. *Sensors and actuators B: chemical*, 2018, 255: 2086–2094.
- [15] LIU L, LIN H W. Paper-based colorimetric array test strip for selective and semiquantitative multi-ion analysis; simultaneous detection of Hg^{2+} , Ag^+ , and Cu^{2+} [J]. *Analytical chemistry*, 2014, 86(17): 8829–8834.
- [16] SEUBERT K, GUERRA C F, BICKELHAUPT F M, et al. Chimeric GNA/DNA metal-mediated base pairs[J]. *Chemical communications*, 2011, 47: 11041–11043.
- [17] PARAMANIK B, BAIN D, PATRA A. Making and breaking of DNA-metal base pairs: Hg^{2+} and Au nanocluster based off/on probe[J]. *The journal of physical chemistry C*, 2016, 120: 17127–17135.
- [18] MEI H, Röhl I, Seela F. Ag^+ -mediated DNA base pairing: extraordinarily stable pyrrolo-dC-pyrrolo-dC pairs binding two silver ions[J]. *The journal of organic chemistry*, 2013, 78: 9457–9463.
- [19] TAN X X, LITAU S, ZHANG X, et al. Single-molecule force spectroscopy of an artificial DNA duplex comprising a silver(I)-mediated base pair[J]. *Langmuir*, 2015, 31: 11305–11310.
- [20] TAKEZAWA Y, SHIONOYA M. Metal-mediated DNA base pairing: alternatives to hydrogen-bonded watson-crick base pairs[J]. *Accounts of chemical research*, 2012, 45(12): 2066–2076.
- [21] DENG L, OUYANG X Y, JIN J Y, et al. Exploiting the higher specificity of silver amalgamation; selective detection of mercury (II) by forming Ag/Hg amalgam[J]. *Analytical chemistry*, 2013, 85: 8594–8600.
- [22] CHUN H J, KIM S, HAN Y D, et al. Water-soluble mercury ion sensing based on the thymine- Hg^{2+} -thymine base pair using retroreflective Janus particle as an optical signaling probe[J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2018, 104: 138–144.
- [23] XU J P, SONG Z G, FANG Y, et al. Label-free fluorescence detection of mercury (II) and glutathione based on Hg^{2+} -DNA complexes stimulating aggregation-induced emission of a tetraphenylethene derivative[J]. *Analyst*, 2010, 135: 3002–3007.
- [24] VECCHIONI S, CAPECE M C, TOOMEY E, et al. Construction and characterization of metal ion-containing DNA nanowires for synthetic biology and nanotechnology[J]. *Scientific reports*, 2019, 9: doi:10.1038/s41598-019-43316-1.
- [25] LIU G P, YUAN Y L, WANG J L. Hemin/G-quadruplex DNAzyme nanowires amplified luminol electrochemiluminescence system and its application in sensing silver ions[J]. *RSC advances*, 2016, 6(43): 37221–37225.

- [26] GONG H, LI X H. Y-type, C-rich DNA probe for electrochemical detection of silver ion and cysteine[J]. *Analyst*, 2011, 136(11): 2242–2246.
- [27] XI H Y, CUI M J, LI W, et al. Colorimetric detection of Ag^+ based on C- Ag^+ -C binding as a bridge between gold nanoparticles[J]. *Sensors and actuators B: chemical*, 2017, 250: 641–646.
- [28] LI Y B, YUAN J M, XU Z X. A sensitive fluorescence biosensor for silver ions (Ag^+) detection based on C- Ag^+ -C structure and exonuclease III-assisted dual-recycling amplification[J]. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2019, doi:10.1155/2019/3712032.
- [29] KLYMENKO O V, SVIR I, AMATORE C. A new approach for the simulation of electrochemiluminescence (ECL) [J]. *Chem phys chem*, 2013, 14: 2237–2250.
- [30] HE S J, DING Z F. Review article progress in electrochemistry and electrochemiluminescence of metal clusters[J]. *Current opinion in electrochemistry*, 2018, 7: 109–117.
- [31] WU P, HOU X D, XU J J, et al. Electrochemically generated versus photoexcited luminescence from semiconductor nanomaterials: bridging the valley between two worlds[J]. *Chemical reviews*, 2014, 114: 11027–11059.
- [32] LI X M, SUN L, DING T R. Multiplexed sensing of mercury (II) and silver (I) ions: a new class of DNA electrochemiluminescent-molecular logic gates[J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2011, 26: 3570–3576.
- [33] LIU H Y, ZHANG L N, LI M, et al. Electrochemiluminescent molecular logic gates based on MCNTs for the multiplexed analysis of mercury (II) and silver (I) ions[J]. *RSC advances*, 2016, 6: 26147–26154.
- [34] ZHU G C, ZHANG C Y. Functional nucleic acid-based sensors for heavy metal ion assays[J]. *Analyst*, 2014, 139: 6326–6342.
- [35] ZHUO Y, WANG H J, LEI Y M, et al. Electrochemiluminescence biosensing based on different modes of switching signals[J]. *Analyst*, 2018, 143: 3230–3248.
- [36] LI J, LU L P, KANG T F, et al. Intense charge transfer surface based on graphene and thymine-Hg(II)-thymine base pairs for detection of Hg^{2+} [J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2016, 77: 740–745.
- [37] LI X Y, WU Z T, ZHOU X D, et al. Colorimetric response of peptide modified gold nanoparticles: an original assay for ultra-sensitive silver detection[J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2017, 92: 496–501.
- [38] LEE J, PARK J, LEE H H, et al. Fluorescence switch for silver ion detection utilizing dimerization of DNA-Ag nanoclusters[J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2015, 68: 642–647.
- [39] LIN Z Z, LI X H, KRAATZ H B. Impedimetric immobilized DNA-based sensor for simultaneous detection of Pb^{2+} , Ag^+ , and Hg^{2+} [J]. *Analytical chemistry*, 2011, 83: 6896–6901.
- [40] MIAO P, HAN K, WANG B D, et al. Electrochemical detection of aqueous Ag^+ based on Ag^+ -assisted ligation reaction[J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 9161–9165.
- [41] LIU G P, YUAN Y L, WANG J L. Hemin/G-quadruplex DNAzyme nanowires amplified luminol electrochemiluminescence system and its application in sensing silver ions[J]. *RSC advances*, 2016, 6: 37221–37225.
- [42] WANG H Y, FAN X X, WANG Y. Determination of silver ions based on the electrogenerated chemiluminescence of silver ions/peroxydisulfate[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, 408: 7113–7119.
- [43] YAN M X, YE J, ZHU Q J, et al. Self-enhanced chemiluminescence of tris(bipyridine) ruthenium(II) derivative nanohybrids: mechanism insight and application for sensitive silver ions detection[J]. *Analytical chemistry*, 2020, 92: 7265–7272.

[责任编辑:顾晓天]