

Cy3 标记农药核酸适配体表面增强拉曼光谱法特异性检测痕量啉虫脒

滕渊洁, 韦其真, 刘文涵, 刘江美, 聂永惠, 李盼

浙江工业大学化学工程学院, 绿色化学合成技术国家重点实验室培育基地, 浙江 杭州 310032

摘要 将具有拉曼信号的三氢-吡啶菁类(Cy3)染料分子标记农药核酸适配体(Aptamer)制备成拉曼检测试剂(Cy3-aptamer),对痕量啉虫脒进行了特异性的表面增强拉曼光谱法(SERS)检测研究。考虑到胶体的稳定和聚凝作用原理,采用聚丙烯酸钠作为分散剂,使作为 SERS 检测基底材料的银溶胶带负电荷,获得了良好的稳定性和分散性。由于聚丙烯酸钠分散的银溶胶为负电平衡体系,测试时需采用聚沉剂,使具有较高稳定性的银纳米颗粒团聚,形成 SERS 增强热点,从而提高 SERS 检测信号。以 SERS 信号较弱的啉虫脒为探针,考察了银溶胶中加入不同聚沉剂(NaCl, KCl, NaOH, HNO₃, H₃PO₄, H₂SO₄, HCl)对 SERS 信号的影响,实验结果表明, H⁺ 作为阳离子和 PO₄³⁻ 作为阴离子组成的电解质聚沉剂,对于带有一定负电荷 σ^- 基团分子,具有较好的拉曼增强效应。且通过紫外可见分光光谱,进一步说明了表面电荷性质对 SERS 的增强信号起决定作用。又由于 Cy3-aptamer 磷酸骨架上带有大量负电荷,其 SERS 信号较小。故选择带丰富正电荷的精胺分子以消除 Cy3-aptamer 磷酸骨架上的负电荷,使 Cy3-aptamer 更易吸附于银溶胶表面,使其产生较强的 SERS 光谱。此外,考察选择了精胺与 Cy3-aptamer 以及 Cy3-aptamer 与农药啉虫脒的最佳反应结合时间分别为 5 和 20 min。最后,建立了定量检测农药啉虫脒的方法,并对检测机理进行了探讨。研究表明,农药啉虫脒在适配体银溶胶特效探针上于 1 392 cm⁻¹ 处的 SERS 特征峰面积与水的 OH 伸缩振动峰面积组成相对拉曼峰面积强度,其相对强度与啉虫脒浓度的对数具有良好的负线性关系,浓度范围为 1 × 10⁻⁸ ~ 2.5 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹。将所建立的特效检测啉虫脒的方法用于实际水样的检测,回收率为 97.4% ~ 99.4%。结果表明,所提出的聚丙烯酸钠分散及精胺修饰的银溶胶有利于捕获 Cy3-aptamer 及其 Cy3-aptamer 与啉虫脒的反应物,提高了方法的灵敏度与可靠性。

关键词 表面增强拉曼光谱;核酸适配体;银溶胶;啉虫脒;聚丙烯酸钠;精胺

中图分类号: O657.37 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)08-2462-06

引言

农药及残留主要有有机磷、有机氯、菊酯和氨基甲酸酯四大类,同类分子在结构上具有一定的相似性,这给特定分析检测带来一定的困难。目前,国标^[1]规定的农药检测方法主要有气相色谱-质谱联用(GC-MS)和液相色谱-质谱联用(LC-MS)等。在色谱联用中,虽然 QuEChERS 法^[2]可简化前处理过程,30 min 约可处理 6 个样品,但色谱分离仍需较长时间,无法满足现场大批量检测需求。至于市场上农药残留的快速检测,虽然有酶标仪、显色卡、电化学速测仪等形式,但检测原理均基于乙酰胆碱酯酶抑制法^[3],即利用农药对乙

酰胆碱酯酶的活性抑制来间接判断是否存在农药,但几乎每种农药均对乙酰胆碱酯酶有抑制作用,因此存在专一性不高的问题。从而,有必要开发一种能够实现特异性的快速检测农药残留分子的方法。

适配体(Aptamer)^[4]是指一类经过筛选,能够特异性结合靶向物质的单链 DNA 或者 RNA。目前,aptamer 在分子检测领域已经发展形成了多种分析手段^[5],如比色法、荧光法、电化学法、拉曼光谱法等,主要用于检测蛋白、微生物、生物毒素、有机污染物、重金属离子。近年来,阳性克隆筛选方法(SLECTIVE)及活性改造^[6]越来越成熟,但利用 aptamer 方法进行农药特效性检测相对较少。目前,已报道具有 aptamer 特异性的农药分子有啉虫脒^[7]、莠去津、马拉

收稿日期: 2019-07-17, 修订日期: 2019-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(21804119),浙江省自然科学基金项目(LQ17B050002)和浙江省公益性技术应用研究(分析测试)计划项目(2015C37068)资助

作者简介: 滕渊洁, 1983 年生, 浙江工业大学化学工程学院讲师 e-mail: yuanjieteng@zjut.edu.cn

硫磷, 丙溴磷^[8]及同时检测甲拌磷、丙溴磷、水胺硫磷和氧(化)乐果的 aptamer^[9]等; 但利用 aptamer 建立的特效性分析方法报道较少, 仅见比色法^[10-11]、电化学阻抗法^[12]、表面增强拉曼光谱法(surface-enhanced Raman scattering, SERS)等。

选择带负电荷的聚丙烯酸钠作为表面带负电荷的银溶胶的分散剂, 制备了具有良好稳定性和分散性的 SERS 基底材料。再通过选择带有正电荷的精胺分子先行中和含磷酸骨架的 aptamer 上的负电荷, 三氢-吡啶菁类(Cy3)染料分子标记的 aptamer (Cy3-aptamer)更易吸附于带负电荷的银溶胶表面, 而产生较强的 SERS 光谱。且 Cy3-aptamer 产生的拉曼强度的变化与啉虫脒浓度存在一定的关系, 从而实现了特异性检测啉虫脒分子的目的。同时为 SERS 法利用 aptamer 特异性快速检测农药分子提供了强有力的实验基础和理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LabRAM HR UV 800 激光显微拉曼光谱仪(法国 HORIBA JOBIN YVON 公司), 激发光源: 632.81 nm He-Ne 激光器; 共焦孔径 300 μm , 光栅线刻数为 600 line $\cdot\text{mm}^{-1}$, 物镜: 50 倍长焦距镜头。

啉虫脒(分析标准品, aladdin); aptamer_{啉虫脒}: 5'-TGTAATTTGTCTGCAGCGGTTCTTGATCGCTGACACCA-TATTATGAAGA-3' (生工生物工程(上海)股份有限公司, 平均分子量 15 170.81); Cy3-aptamer: 5'-Cy₃-TGTAATTTGTCTGCAGCGGTTCTTGATCGCTGACACCATA-TTATGAAGA-3' (生工生物工程(上海)股份有限公司, 平均分子量 15 598.34)。聚丙烯酸钠(平均分子量 5 100)、精胺(98%)、AgNO₃ 为化学纯。HNO₃、NaCl、Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O、KCl、NaH₂PO₄ · 2H₂O、NaOH、无水 Na₂SO₄、Na₂HPO₄ · 12H₂O 等均为分析纯。HCl 和 H₂SO₄ 为优级纯。pH 7.4 磷酸缓冲溶液(0.2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$)由 NaH₂PO₄ · 2H₂O 和 Na₂HPO₄ · 12H₂O 混合配制而成, 并含有 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KCl。水为 18.3 M Ω $\cdot\text{cm}$ 超纯水, 由 UP900 型超纯水器(韩国 HUMAN 公司)制得。

Aptamer_{啉虫脒} 使用液的配制: 移取 21 μL 磷酸缓冲溶液, 加入到含 31.7 μg Aptamer_{啉虫脒} 的试剂盒中, 摇匀得 0.1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Aptamer_{啉虫脒} 储备液, 再将其逐级稀释成 1 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$ 的标准工作溶液。同法配制 Cy3-aptamer 的使用液。

1.2 银溶胶合成及保存

根据 Lee 和 Meisel 的方法^[13], 称取 18 mg AgNO₃, 溶解于 100 mL 水中。加热至沸, 缓慢加入新配制的 1% 柠檬酸钠 3.0 mL。剧烈搅拌下继续沸腾 10 min, 直到溶液颜色变为灰色。冷却至室温, 取 15 mL 银溶胶, 分别加入 0.3 mL 不同浓度的聚丙烯酸钠溶液, 使合成的银纳米粒子分散在聚丙烯酸钠中以进行稳定性试验选择。聚丙烯酸钠的浓度为 0.05% 保存效果最佳, 装入棕色瓶于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 至少可以保存 60 d。

1.3 聚沉剂影响考察

取 500 μL 0.01% 聚丙烯酸钠的银溶胶, 500 μL 80 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 不同的聚沉剂 (NaCl, KCl, NaOH, HNO₃, H₃PO₄, H₂SO₄, HCl) 和 500 μL 4.886 $\times 10^{-4}$ mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 啉虫脒溶液混合均匀, 室温下静置 10 min, 比较不同聚沉剂条件下啉虫脒的拉曼增强信号。

1.4 方法

Cy3-aptamer 与精胺“显色”反应: 取 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 精胺 5 μL , 1 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$ Cy3-aptamer 100 μL , 分别反应 5, 10 和 15 min, 再加 100 μL 银溶胶和 5 μL 0.16 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 聚沉剂, 混匀后测定拉曼信号, 选择精胺与 Cy3-aptamer 反应的最佳时间。

Cy3-aptamer 检测啉虫脒并用精胺“显色”反应: 取 100 μL 1 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$ Cy3-aptamer, 100 μL 0.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 啉虫脒溶液, 分别反应 5, 10, 20 和 30 min, 再加入 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 精胺 5 μL , 反应 5 min, 再加入 100 μL 银溶胶、5 μL 0.16 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 聚沉剂, 混匀, 分别测定其拉曼信号并比较, 确定 Cy3-aptamer 和啉虫脒反应的最佳时间。

测定方法: 取 100 μL 1 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$ Cy3-aptamer, 100 μL 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.01 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$ 啉虫脒溶液, 反应 20 min, 再加入 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 精胺 5 μL , 反应 5 min, 随后加入 100 μL 银溶胶、5 μL 0.16 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 聚沉剂, 混匀。样品置于显微激光拉曼光谱仪的物镜视野下, 调焦后进行增强拉曼光谱测试, 焦点聚焦于溶液表面。扫描范围 200~3 800 cm^{-1} , 光谱采集时间 60 s, 积分 2 次平均。

2 结果与讨论

2.1 Cy3-aptamer-农药/精胺-银溶胶 SERS 特异性检测农药原理设计

利用 aptamer 对特定农药的特异性作用, 以达到分离富集和特效选择的目的。经多次试验探索建立了测试方法: 由于 aptamer 本身只有较弱的 SERS 信号, 特将拉曼信号探针 Cy3 先与 aptamer 结合生成 Cy3-aptamer, 在精胺存在的情况下能在银溶胶表面产生很好的 SERS 信号。当测定农药时, 先将 Cy3-aptamer 与测试液反应, 此时亦不能产生 SERS 信号, 只有加入辅助剂精胺后才能测得较强的 SERS 信号; 当有特定农药存在时, SERS 信号会发生减弱。可以利用不同的 aptamer 制备不同的 Cy3-aptamer, 同时利用不同的农药具有不同的拉曼谱峰可以达到进一步选择性测定的目的; 采用不同的 aptamer 可以达到有针对性的测定特定的农药, 最终达到针对性强的农药测定方法。

采用对农药啉虫脒具有一定特异性的 aptamer, 并通过特殊制备将 Cy3 标记进入 aptamer, 其 SERS 检测原理如图 1。

Cy3-aptamer 与精胺分子作用, 并吸附于银溶胶表面产生较大的 SERS 信号; 当溶液中存在啉虫脒时, Cy3-aptamer 先与啉虫脒反应, 再加入精胺形成 SERS 的“显色”反应, 探针分子 Cy3-aptamer 与精胺结合的分子吸附于银溶胶表面, 由于部分探针分子 Cy3-aptamer 与啉虫脒结合而使得 SERS 信号减弱。

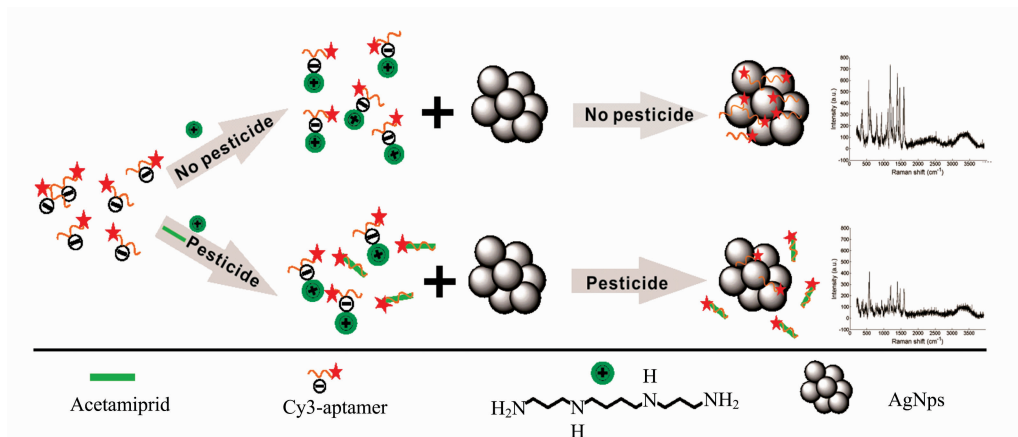


图 1 Cy3-aptamer 用于 SERS 检测农药啉虫脒示意图

Fig. 1 Schematic diagram of Cy3-aptamer applied in the specific SERS detection of acetamiprid

2.2 银溶胶稳定性的改善

作为 SERS 的基底材料银溶胶的稳定性至关重要, 为了提高银溶胶的长期稳定做了一些探索和改善。Lee 法制备的银溶胶表面因为 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /柠檬酸过量, 受其酸根包覆而带负电荷。考虑到胶体的稳定和聚凝作用原理, 在体系中加入带负电的物质可以使胶体稳定。经多次试验, 加入聚丙烯酸钠作为银溶胶的分散剂, 可以有效的保持所合成的银纳米粒子均匀分散在溶液中, 并保持银溶胶的稳定。实验表明: 制备的银溶胶液中加入聚丙烯酸钠浓度为 0.05% 时, 于 4 °C 棕色瓶中可以稳定保存至少 60 d。

2.3 不同聚沉剂对银溶胶表面增强拉曼光谱的影响

测试时银溶胶中加入电解质, 可使纳米溶胶表面的电荷平衡改变而发生团聚, 局部表面等离子体共振发生叠加, 从而形成 SERS 活性热点, 引起拉曼增强。不同类型的电解质, 对 SERS 信号有不同的影响。为了考察不同聚沉剂对银溶胶 SERS 的影响, 以 SERS 信号较弱的啉虫脒分子为探针, 对其在不同聚沉剂条件下的 SERS 进行了测试, 结果如图 2。

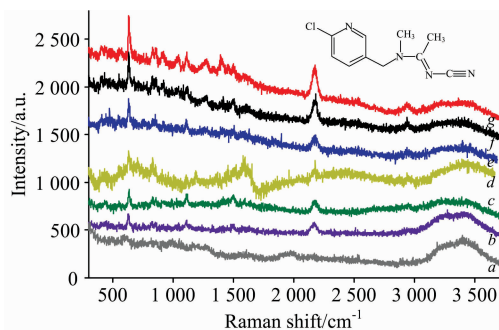


图 2 不同聚沉剂对 SERS 光谱的影响

a: NaOH; b: NaCl; c: KCl; d: HCl; e: H_2SO_4 ; f: HNO_3 ; g: H_3PO_4 ; 聚沉剂浓度均为 $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 啉虫脒浓度 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 2 Effect of different aggregates on SERS spectra

a: NaOH; b: NaCl; c: KCl; d: HCl; e: H_2SO_4 ; f: HNO_3 ; g: H_3PO_4 ; the concentration of aggregates: $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; the concentration of acetamiprid: $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

从图 2 可以看出不同的聚沉剂对啉虫脒的 SERS 图有不同的影响。由于啉虫脒表面带有 Cl 和 $\text{C}\equiv\text{N}$, Cl 原子易产生拉电子效应, 而 $\text{C}\equiv\text{N}$ 与 $\text{C}=\text{N}$ 产生共轭及诱导效应, 故均带有一定的负电荷 σ^- , 使其较难以靠近表面带负电的银溶胶, 而检测不到 SERS 信号。当加入聚沉剂 NaOH (图 2a) 时, 亦无 SERS 信号。常用的聚沉剂 NaCl (图 2b) 和 KCl (图 2c), 其增强效应较弱; 而相同阴离子的 HCl (图 2d) 产生的增强效果要大于 NaCl 和 KCl。因价数相同的带相反电荷离子的水合半径越小, 聚沉能力越强, 在此, 一价正离子的聚沉能力排列为 $\text{H}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$, 从而可以推测聚沉能力的强弱顺序将直接影响 SERS 的增强效应和检测信号的强弱。

此外, $3000 \sim 3700 \text{ cm}^{-1}$ 处为水的 OH 伸缩振动, 当 NaOH, NaCl, KCl 作为聚沉剂时, 峰强较强, 可以看出, NaOH, NaCl, KCl 作为聚沉剂时银溶胶表面被大量水分子占据。也说明 NaCl, KCl 作为聚沉剂可以产生一定的聚沉效果, 但啉虫脒分子较难吸附到银溶胶表面。进一步考察不同阴离子的酸, 其中, H_3PO_4 (图 2g) 的 SERS 信号最强, HNO_3 (图 2f) 的 SERS 信号紧随其后, 随之为 H_2SO_4 (图 2e) 和 HCl (图 2d)。其对啉虫脒的 SERS 检测信号强弱排列为 $\text{PO}_4^{3-} > \text{NO}_3^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^-$ 。

因此, H^+ 作为阳离子和 PO_4^{3-} 作为阴离子组成的电解质聚沉剂, 对表面带负电的银溶胶体系具有较好拉曼增强效应, 对于带有一定负电荷 σ^- 基团分子, 可以有效的提高其 SERS 光谱响应。

2.4 不同聚沉剂对银溶胶紫外-可见光谱的影响及表征

为了进一步研究聚沉剂对银溶胶的聚沉作用和影响, 考察了加入 $160 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同的聚沉剂 11 min 后对银溶胶的紫外可见吸收光谱的变化 [图 3(a)]。由图 3(a) 可知, 银溶胶空白溶液 (本底含 0.01% 聚丙烯酸钠) [图 3(a), a] 的吸收峰位置在 421.10 nm, 加入聚沉剂后, 聚沉剂都会使银溶胶的吸光度减小。NaCl [图 3(a), b], HCl [图 3(a), c] 和 KCl [图 3(a), d] 的最大吸收峰分别在 420.78, 420.78 和 417.32 nm 处, 产生略微蓝移。而加入碱和酸均会使吸收峰产生略微红移。NaOH [图 3(a), h] 移至 421.65 nm。 H_3PO_4 [图 3

(a), e], HNO_3 [图 3(a), f], H_2SO_4 [图 3(a), g] 分别移至 421.65, 421.65 和 422.51 nm。说明 Cl^- 离子加入, 可能与表面附着的 Ag^+ 离子结合, 产生氯化银, 增大了电子的跃迁能级。而 H^+ , OH^- 离子作用于银溶胶表面, 由于电荷效应, 使电子的跃迁能级减小。

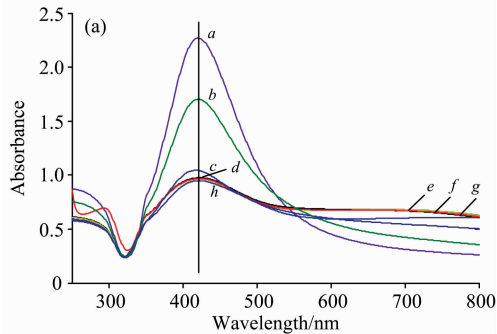


图 3(a) 不同聚沉剂对银溶胶紫外-可见吸收光谱的影响

a: 空白; b: NaCl ; c: HCl ; d: KCl ; e: H_3PO_4 ; f: HNO_3 ;
g: H_2SO_4 ; h: NaOH ; 本底为 0.01% 聚丙烯酸钠

Fig. 3(a) UV-Vis spectra of silver colloid affected by different aggregates

a: Blank; b: NaCl ; c: HCl ; d: KCl ; e: H_3PO_4 ; f: HNO_3 ;
g: H_2SO_4 ; h: NaOH ; blank is 0.01% sodium polyacrylate

图 3(b) 为银溶胶吸光度随时间的变化图, 实验表明加入 NaCl [图 3(a), b], HCl [图 3(a), c], KCl [图 3(a), d] 对银溶胶的吸光度的变化值影响相对较小, 而加入 H_3PO_4 [图 3(a), e], HNO_3 [图 3(a), f] 和 H_2SO_4 [图 3(a), g] 具有类似的吸光度变化, 而 NaOH [图 3(a), h] 吸光度变化最大。结果说明, 聚沉速度在一定程度上影响了 SERS 检测信号, 但 NaOH 和 H_3PO_4 , HNO_3 和 H_2SO_4 的吸光度变化速度相似, SERS 信号差异明显, 说明表面电荷性质对 SERS 的增强信号起决定作用。因此, 可以通过加入聚沉剂来改善银溶胶表

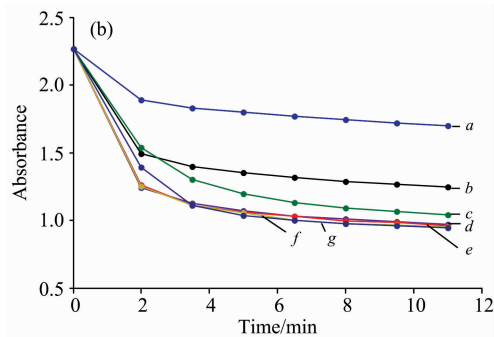


图 3(b) 不同聚沉剂加入时间对银溶胶紫外-可见吸收光谱的影响

a: NaCl ; b: HCl ; c: KCl ; d: H_3PO_4 ;
e: HNO_3 ; f: H_2SO_4 ; g: NaOH

Fig. 3(b) UV-Vis spectra of silver colloid affected by the adding time of different aggregates

a: NaCl ; b: HCl ; c: KCl ; d: H_3PO_4 ;
e: HNO_3 ; f: H_2SO_4 ; g: NaOH

面的电荷状况和提高表面增强拉曼光谱的信号, 以达到高灵敏分析检测分子的目的。

2.5 Cy3-aptamer 与精胺反应时间的 SERS 最佳条件选择

由于 Cy3-aptamer 磷酸骨架上带有较多负电荷, 经试验加入带有正电荷的辅助“显色剂”精胺使其产生较强的 SERS 信号, 并考察了反应时间为 5, 10, 15 min 时的 SERS 图(图 4)。在未加精胺的 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cy3-aptamer SERS 图 4d 中, 可以看出 Cy3 指纹信息较少。推测主要是由于 DNA 骨架上的磷酸基团所带的负电荷强于其碱基上所带的正电荷, 而呈现酸性, 即 Cy3-aptamer 带负电, 而聚丙烯酸钠分散银溶胶体系也带负电, 以致于 Cy3-aptamer 不能很好的吸附到银溶胶表面。在加入带正电荷的精胺(图 4a, b, c)后, 可以观察到明显的 Cy3 指纹信息。表明, 带正电荷的精胺分子与 DNA 作用后, 改变了 DNA 骨架上的带电状态, 使其与银溶胶能够产生更好的结合, 同时产生 SERS 效应, 并检测出 Cy3-aptamer 的信号^[14]。考察图 4 精胺与 aptamer 的 SERS 信号与反应时间关系, 反应时间对 SERS 影响不大, 为了缩短实验时间选择 5 min 为宜。

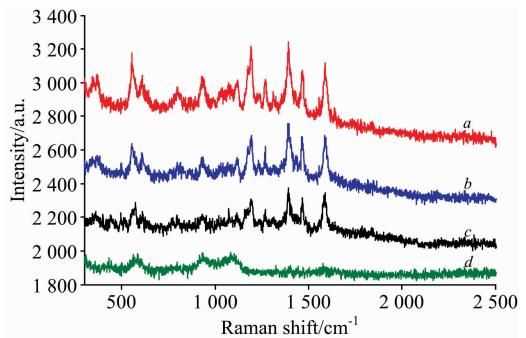


图 4 精胺和 Cy3-aptamer 不同反应时间的 SERS 谱图

a: 5 min; b: 10 min; c: 15 min;

d: 未加精胺 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cy3-aptamer 本底

Fig. 4 SERS spectra of different reaction time of spermine with Cy3-aptamer

a: 5 min; b: 10 min; c: 15 min; d: Background of $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cy3-aptamer without spermine

2.6 Cy3-aptamer 与农药啶虫脒反应 SERS 最佳条件选择

由于啶虫脒与其 aptamer 有较强的亲和作用, 会与精胺在 aptamer 上形成竞争反应, 影响“显色剂”精胺对 Cy3 的“显色效应”。考察了 Cy3-aptamer 与啶虫脒不同反应时间(5, 10, 20, 30 min)后, 进一步加入辅助“显色剂”精胺反应 5 min 时 Cy3 在银溶胶表面产生 SERS 光谱的影响(图 5)。实验表明, 啶虫脒与其 aptamer 反应 20 min 时 Cy3 的 SERS 信号最大, 推测啶虫脒、Cy3-aptamer 及其配合物 Cy3-aptamer-啶虫脒存在一定的平衡解离关系, 且在银溶胶表面的吸附速率不同。由于啶虫脒的浓度过量, 小分子啶虫脒首先占据银表面, Cy3 信号较弱, 随着时间推移, 带有精胺的 Cy3-aptamer 逐渐靠近银表面, 使得 Cy3 信号增强。超过 20 min 信号下降, 推测主要是由于分子在银表面的堆积, 使得光散射信号传递受阻, 因此选择 20 min 为最佳反应时间。

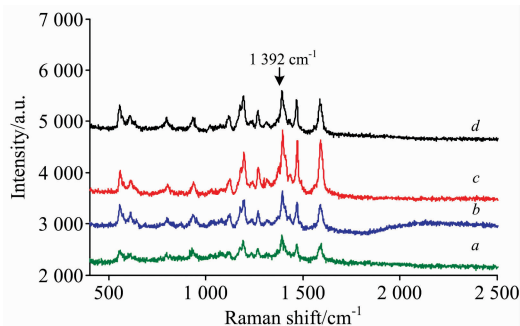


图 5 Cy3-aptamer 和 啞虫脞 不同反应时间的 SERS 光谱图

a: 5 min; *b*: 10 min; *c*: 20 min; *d*: 30 min

Fig. 5 SERS spectra of different reaction time of Cy3-aptamer with acetaminophen

a: 5 min; *b*: 10 min; *c*: 20 min; *d*: 30 min

2.7 农药啞虫脞与拉曼峰面积比值的关系

在所选条件下,测定了不同浓度的啞虫脞溶液(0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)在 Cy3-aptamer 捕获下的 SERS 图[图 6(a)].由图 6(a)可知随着啞虫脞浓度的增加,信标分子 Cy3 的 SERS 峰强度随之下降。为了提高测定的可靠性,选择了本底水分子作为内标^[15]组成相对强度。以 1392 cm^{-1} 处特征峰的拉曼峰面积与 3000~3700 cm^{-1} 处水的 OH 伸缩振动峰的面积与啞虫脞浓度对数作关系图[图 6(b)].经测定,银溶胶 Cy3-aptamer 方法检测啞虫脞的浓度线性范围为 $1 \times 10^{-8} \sim 2.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 线性回归方程为 $A_{\text{cy3}}/A_{\text{water}} = -0.3065 \text{Log}C - 1.876$, 相关系数 $r = 0.9716$ 。

2.8 实际样品检测

用采样器采集杭州市上塘河水样,在测试之前,样品先用 0.45 μm 微滤膜过滤,以去除颗粒性悬浮物。实际水样经本法检测未检出。将 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的啞虫脞标准样品加入到水样中,重复测量三次,相对标准偏差 RSD = 9.99%,回收率为 97.4%,97.5%,99.4%。

3 结 论

采用农药啞虫脞 aptamer 并标记拉曼光谱信号分子 Cy3

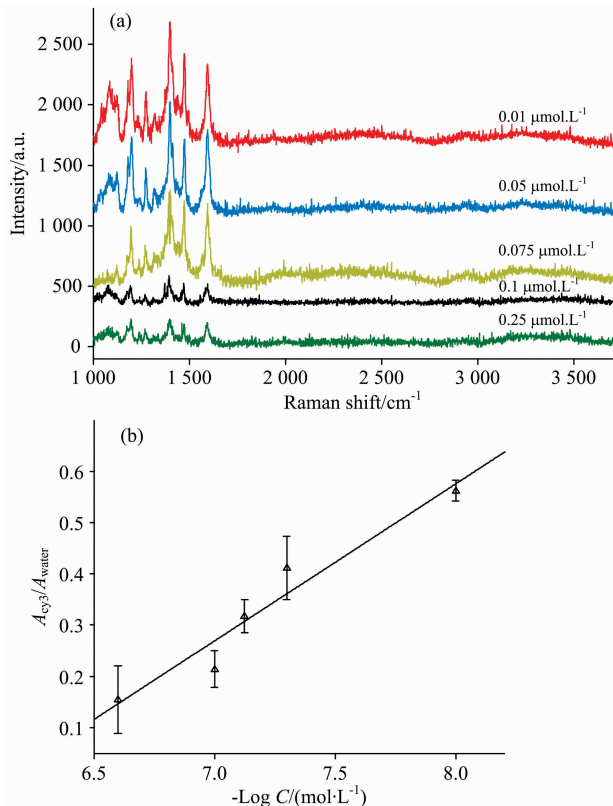


图 6 不同浓度的啞虫脞对 SERS 光谱的影响及相对强度的关系图

条件: 啞虫脞浓度 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 6 SERS spectra of acetaminophen, 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, insert: linearship between logarithm of concentrations and the ratio of acetaminophen (1392 cm^{-1}) and water, A: area

制备的 Cy3-aptamer 探针分子,能够很好的与精胺作用在银溶胶表面吸附而产生基准 SERS 光谱信号。啞虫脞与 Cy3-aptamer 探针分子能够形成特异性反应,减少了 Cy3-aptamer 与精胺的作用,而减弱了 SERS 的信号,从而实现了特异性分析测定农药啞虫脞分子的目的。利用此方法可以实现其他农药或其他化合物的特异性分析检测,具有一定的应用前景和研究意义。

References

- [1] GB 2763—2012 National Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国国家标准). National Food Safety Standard—Maximum Residue Limits for Pesticides in Food(食品中农药最大残留限量).
- [2] Lawal A, Wong R, Tan G H, et al. J Chromatogr. Sci., 2018, 56(7): 656.
- [3] Shi Q, Teng Y, Zhang Y, et al. Chinese Chem. Lett., 2018, 62(4): 750.
- [4] Zhou W, Huang P J, Ding J, et al. Analyst, 2014, 139(11): 2627.
- [5] Kim Y, Raston N, Gu M. Biosen. Bioelectron., 2016, 76: 2.
- [6] WANG Li, ZHANG Cun-zheng, LIU Yuan, et al(王 丽, 张存政, 刘 媛, 等). Chin. J. Anal. Chem. (分析化学), 2012, 40(6): 940.
- [7] He J, Liu Y, Fan M, et al. J. Agric. Food Chem., 2011, 59(5): 1582.

- [8] Li C, Zhang G, Wu S, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2018, 1020: 116.
- [9] Wang L, Liu X, Zhang Q, et al. *Biotech. Lett.*, 2012, 34(5): 869.
- [10] Tian Y, Wang Y, Sheng Z, et al. *Anal. Biochem.*, 2016, 513: 87.
- [11] Weerathunge P, Ramanathan R, Shukla R, et al. *Anal. Chem.*, 2014, 86(24): 11937.
- [12] Fan L, Zhao G, Shi H, et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 43: 12.
- [13] Lee P C, Meisel D. *Journal of Phys. Chem.*, 1982, 86(17): 3391.
- [14] Van Lierop D, Krpetic Z, Guerrini L, et al. *Chem. Commun.*, 2012, 48(66): 8192.
- [15] Sun Q, Qin C. *Chem. Geol.*, 2011, 283(3-4): 274.

Cy3-Labeled Aptamer Combined with Surface-Enhanced Raman Scattering Using for Specific Detection of Trace Acetamiprid

TENG Yuan-jie, WEI Qi-zhen, LIU Wen-han, LIU Jiang-mei, NIE Yong-hui, LI Pan

State Key Laboratory Breeding Base of Green Chemistry-Synthesis Technology, College of Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

Abstract In this work, aptamer modified by Cy3 (1,1'-bis(3-hydroxypropyl)-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine) dye which has a strong Raman signal, was applied for sensitive and specific detection of trace acetamiprid by Surface-enhanced Raman Scattering (SERS). The good stability and dispersity of negative silver colloid were obtained by adding the proper concentration of sodium polyacrylate according to the principle of colloid stabilization and coagulation. During the detection process, these high stable silver nanoparticles were needed to be agglomerated by using the agglomerating agent to form more SERS enhancement hotspots to improve the SERS intensity. The effects of different agglomerating agents (NaCl, KCl, NaOH, HNO₃, H₃PO₄, H₂SO₄, HCl) were investigated using acetamiprid as a probe. The results showed that the good SERS effect was showed when the electrolyte precipitator contains H⁺ and PO₄³⁻. Furthermore, UV-Vis spectra show that the surface charge properties play a decisive role in the SERS effect. Furthermore, spermine with positive charges was selected to neutralize the negative charges on the phosphoric acid skeleton of Cy3-aptamer which could shorten the distance between Cy3-aptamer and silver colloid to enhance the Raman signal. The optimum reaction times of spermine with Cy3-aptamer and Cy3-aptamer with acetamiprid were 5 and 20 min, respectively. At last, quantitative detection of the acetamiprid method was established and the linearship was established between the logarithm concentration of acetamiprid and the relative intensity of the characteristic peak area at 1 392 cm⁻¹ divided by the OH stretching vibration of water. The linear range is from 1×10⁻⁸ to 2.5×10⁻⁷ mol·L⁻¹. The proposed method was applied to the determination of the spiked acetamiprid in water samples with the recovery of 97.4%~99.4%. The results show that the silver colloid dispersed by sodium polyacrylate and modified by spermine were helpful to capture the Cy3-aptamer and the reactants of Cy3-aptamer with acetamiprid, that the sensitivity and reliability of the method were improved.

Keywords Surface-enhanced Raman scattering; Aptamer; Silver colloid; Acetamiprid; Sodium polyacrylate; Spermine

(Received Jul. 17, 2019; accepted Nov. 28, 2019)