

# 基于聚腺嘌呤单链 DNA-金纳米簇的荧光法高灵敏快速检测汞离子

欧丽娟, 安学忠, 罗建新, 王凌云, 薄恒, 孙爱明, 陈兰兰

湖南工学院材料与化学工程学院, 湖南 衡阳 421002

**摘要** 聚腺嘌呤-金纳米簇(聚 A-AuNCs)制备简单, 快速, 且具有优良的荧光性能和光学稳定性。基于聚 A 单链 DNA 为模板合成的金纳米簇, 构建了一种灵敏、简单、快速的新传感方法用于检测汞离子。以柠檬酸钠为还原剂, 通过水浴加热法合成金纳米簇。用荧光光谱仪和透射电镜对金纳米簇的荧光性能和微观形貌进行了表征。结果表明: 合成的金纳米簇为球形, 分散性良好, 平均粒径约为 7 nm。金纳米簇在 280 nm 紫外光激发下, 于 471 nm 处发射出强烈的蓝色荧光, 且金纳米簇的光学稳定性良好。溶液在 4 °C 下避光保存 1 个月, 金纳米簇的荧光强度变化很小。当汞离子存在时, 汞离子与纳米金之间的高亲和力, 可以有效地猝灭金纳米簇的荧光。文中讨论了反应体系中缓冲溶液 pH 值和反应时间对传感器性能的影响, 发现缓冲溶液 pH 值对该方法的影响不大。汞离子对金纳米簇的荧光猝灭反应非常迅速, 1 min 之内就可以完成, 所以后续反应仅需简单的混合即可进行荧光的测定。在最优化实验条件下, 对一系列汞离子浓度进行了检测, 线性方程为:  $y = -335.57x + 541.35$ , 检测线性范围在  $0.01 \sim 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间, 相关系数为 0.992 6。根据空白的三倍标准偏差原则确定检测下限为  $3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该方法选择性好, 通过 9 种金属离子的加入对金纳米簇的荧光信号并无明显影响, 验证了金纳米簇对汞离子检测的特异性。用该方法检测了环境水样中的汞离子, 加标回收率在 95.33%~103.8% 之间, 相对标准偏差(RSD)不大于 4%, 可用于实际样品中  $\text{Hg}^{2+}$  的检测。该法仅需将溶液简单混合即可实现对汞离子的检测, 具有操作简便、快速、灵敏度高和选择性好等优点。

**关键词** 金纳米簇; 荧光法; 汞离子检测

**中图分类号:** O653

**文献标识码:** A

**DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)01-0164-04

## 引言

汞是一种具有生物累积、食物链放大和高毒性的重金属离子污染物, 不易降解, 且环境污染持久<sup>[1]</sup>。即便少量存在于环境中, 也会给环境和人类健康带来极大的威胁。研究表明, 少量的汞暴露会导致神经系统、肾脏、造血系统、肝脏等各方面的疾病<sup>[2]</sup>。研究发展高灵敏、高选择性的汞检测手段在环境监测和生命科学领域具有极为重要的意义。

传统的检测汞离子的方法有原子吸收光谱法、原子荧光光谱法、电感耦合等离子体质谱法等。这些方法大都依赖大型精密贵重仪器, 需专业人员操作, 且操作步骤繁琐费时。近年来, 发展了一系列新的荧光技术用于汞离子的检测, 如半导体量子点、有机荧光分子等<sup>[3-4]</sup>。这些方法可以实现对汞离子高灵敏度、高效率的检测。但是, 这些荧光分子合成步骤复杂耗时, 或使用到有毒物质。因此, 寻找一种快速、

简单且安全的方法检测汞离子非常有意义。

贵金属纳米簇(金纳米簇、银纳米簇、铂纳米簇、铜纳米簇)由于具有优异的荧光性质、较低的毒性和良好的生物相容性等优点, 广泛应用于疾病诊断、细胞成像、环境监测和生物传感等领域<sup>[5-6]</sup>。其中, 金纳米簇因其优良的光学稳定性、光学催化性质备受科学家的青睐。有报道以牛血清蛋白(BSA)为稳定剂和还原剂<sup>[7]</sup>, 合成发红光的金纳米簇(BSA-AuNCs), 并用于汞离子的检测。有研究<sup>[8]</sup>合成了强荧光的谷胱甘肽(GSH)包覆的金纳米簇检测汞离子。蔡宇玲等<sup>[9]</sup>利用 GSH-AuNCs 构建纸质便携式器件实现对汞离子的可视化分析。最近, Wang 等<sup>[10]</sup>发现, 富含腺嘌呤(A)的单链 DNA 可以作为合成金纳米簇的模板(聚 A-金纳米簇)。相对于以生物大分子为模板合成的金纳米簇, 聚 A-金纳米簇制备过程简单, 快速, 仅需 30 min(BSA-AuNCs<sup>[7]</sup>: 12 h/GSH-AuNCs<sup>[8-9]</sup>: 24 h), 且荧光强度可以通过聚 A 链 DNA 的长度来调节。基于聚 A-金纳米簇的超小尺寸、优良的荧光性

收稿日期: 2019-12-02, 修订日期: 2020-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(21205035, 21802039), 湖南省自然科学基金项目(2018JJ2083, 2019JJ40061), 湖南省大学生创新项目([2019]219)资助

作者简介: 欧丽娟, 女, 1983 年生, 湖南工学院材料与化学工程学院教授 e-mail: 179355188@qq.com

能、良好的光学稳定性、合成简单,聚 A-金纳米簇成功应用于对蛋白质、小分子和核酸等物质的检测<sup>[10-12]</sup>。

本文提出了一种检测  $\text{Hg}^{2+}$  的新方法。利用富含腺嘌呤(A)的单链 DNA 为模板合成的金纳米簇作为荧光探针,由于  $\text{Hg}^{2+}$  和金强烈的亲和作用,导致金纳米簇荧光信号猝灭。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

A15 寡聚核苷酸链购自上海生工生物工程公司。硝酸汞购自上海百灵威科技有限公司。柠檬酸钠、氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )由北京鼎国生物技术公司提供。所有试剂均为分析纯,实验用超纯水(电阻大于 18.25 M $\Omega$ )。

Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国安捷伦公司),激发波长设定为 280 nm,激发狭缝和发射狭缝分别设定为 5.0 和 10.0 nm。

### 1.2 荧光金纳米簇的合成

聚腺嘌呤-金纳米簇的制备参照文献<sup>[10]</sup>略有修改:将 600 nmol $\cdot\text{L}^{-1}$  的 A15-ssDNA 溶液、2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸钠(pH 6.0)、50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{HAuCl}_4$  加入到离心管中,然后加

超纯水补充体积至 1 mL。室温下混匀后,将混合物置于 85  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min,即可得到荧光金纳米簇。制备好的金纳米簇置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中避光储存,以备实验使用。

### 1.3 汞离子的检测

在 200  $\mu\text{L}$  反应体系中,将不同浓度的硝酸汞溶液加入到 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)和 100  $\mu\text{L}$  制备好的金纳米簇溶液中,混匀后,即可测定荧光强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验原理

检测汞离子的实验原理如图 1 所示。根据文献<sup>[13]</sup>报道,金与腺嘌呤 N7 位上的氮原子具有强烈的亲和作用。本文选择聚 A 单链 DNA 作为模板,  $\text{HAuCl}_4$  为金源,以柠檬酸钠为还原剂。在 pH 为 6 的条件下,  $\text{Au}^{3+}$  被柠檬酸钠还原成  $\text{Au}^0$ , 并富集在 A15 单链 DNA 上,形成具有强荧光的单链金纳米簇。当汞离子存在时,可以有效地猝灭金纳米簇的荧光。这可能是由于以 Poly A 为模板合成金纳米簇的过程中,产生了中间体  $\text{Au}^+$ 。  $\text{Hg}^{2+}$  与  $\text{Au}^+$  之间强烈的噬金属作用,破坏了金纳米簇的结构,导致金纳米簇荧光强度降低。

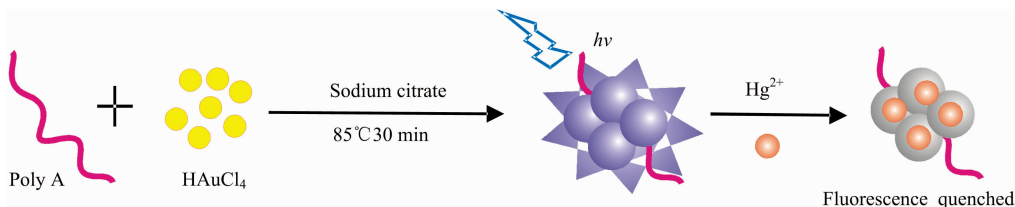


图 1 基于 A15-ssDNA 金纳米簇检测  $\text{Hg}^{2+}$  的原理图

Fig. 1 Schematic representation of a  $\text{Hg}^{2+}$  sensor based on A15-ssDNA AuNCs

### 2.2 金纳米簇的表征及荧光响应行为

图 2(a) 是 A15-ssDNA 金纳米簇的透射电子显微镜(TEM)照片合成的金纳米簇为球形,分散性良好,平均粒径大约为 7 nm。图 2(b) 是金纳米簇的荧光激发和发射光谱。如图 5 所示,金纳米簇在 280 nm 的紫外光激发下,在 471 nm 处出现强的荧光发射峰。图 2(c) 是汞离子存在与否的荧光发

射光谱图。曲线 a 是 A15-ssDNA 金纳米簇的荧光光谱,可以看出在 471 nm 有一强的荧光发射峰。加入 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Hg}^{2+}$  后,金纳米簇的荧光被有效猝灭(曲线 b),说明  $\text{Hg}^{2+}$  与金纳米簇存在强烈的相互作用,金纳米簇的荧光被猝灭。以上结果表明,利用金纳米簇荧光强度的变化检测汞离子的方法是可行的。

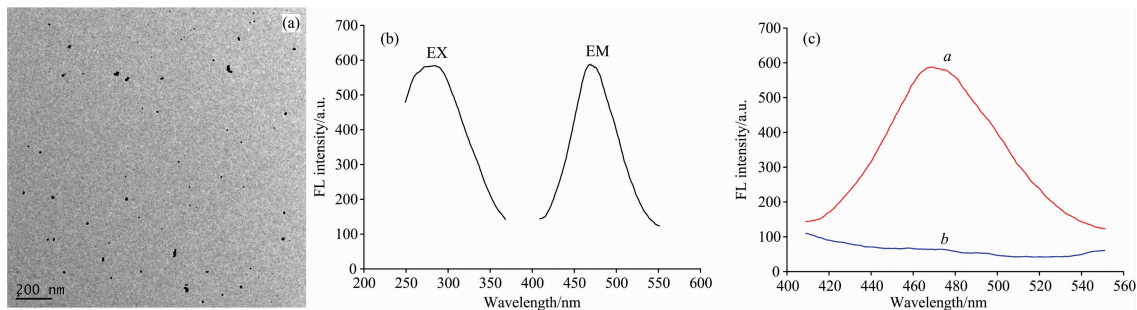


图 2 (a) DNA-AuNCs 的电镜照片; (b) DNA-AuNCs 的荧光激发和发射光谱; (c) DNA-AuNCs 的荧光光谱

a: AuNCs; b: AuNCs+ $\text{Hg}^{2+}$

Fig. 2 (a) TEM images of DNA-AuNCs; (b) The Fluorescence excitation and emission spectra of AuNCs; (c) Fluorescence emission spectra of AuNCs under different conditions

a: AuNCs; b: AuNCs+ $\text{Hg}^{2+}$

### 2.3 实验条件优化

图 3(a)反映了不同 pH 值的缓冲溶液对传感器性能的影响。由图可知,缓冲溶液的 pH 值对不加汞离子(a)与加汞离子(b)的金纳米簇的荧光强度影响不大。但是 pH 值为 7 时背景略低于其他的 pH 值。故选取 pH 值为 7 作为后续实验的缓冲体系。

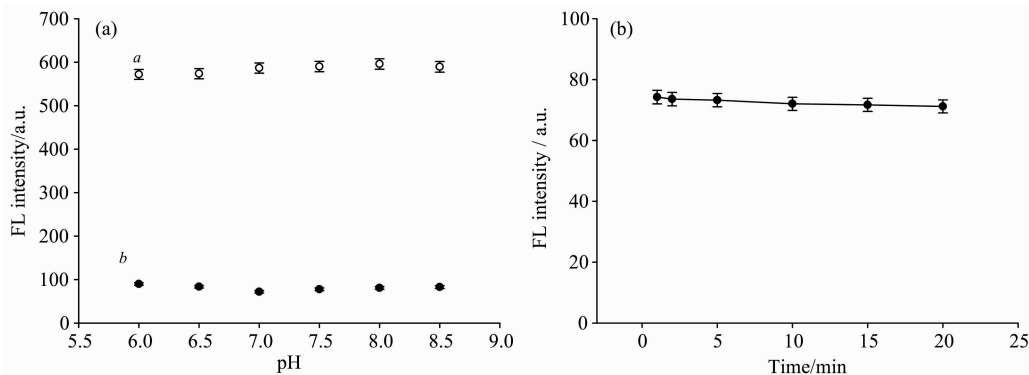


图 3 (a) 缓冲溶液 pH 的优化: (a) AuNCs; (b) AuNCs+Hg<sup>2+</sup>; (b) 反应时间的优化

Fig. 3 (a) Effects of the pH in the absence (a) and presence of Hg<sup>2+</sup> (b); (b) Effects of the reaction time

### 2.4 传感器的分析性能

在优化的实验条件下,对 0.01~50 μmol·L<sup>-1</sup> 范围内的 Hg<sup>2+</sup> 进行了检测,结果如图 4(a) 所示。由图可知,随着 Hg<sup>2+</sup> 浓度的增大,金纳米簇的荧光强度逐渐降低。图 4(b) 为 471 nm 处荧光强度与 Hg<sup>2+</sup> 浓度的校正曲线图( $F_0$  与  $F$  分

别为不加汞离子与加汞离子的金纳米簇的荧光强度)。由图可知,荧光强度和 Hg<sup>2+</sup> 浓度在 0.01~1 μmol·L<sup>-1</sup> 范围内呈良好的线性关系,用空白的三倍标准偏差原则确定检测下限为 3 nmol·L<sup>-1</sup>。该方法检测 Hg<sup>2+</sup> 的灵敏度比之前文献[14-16]报道的荧光传感器的灵敏度高。

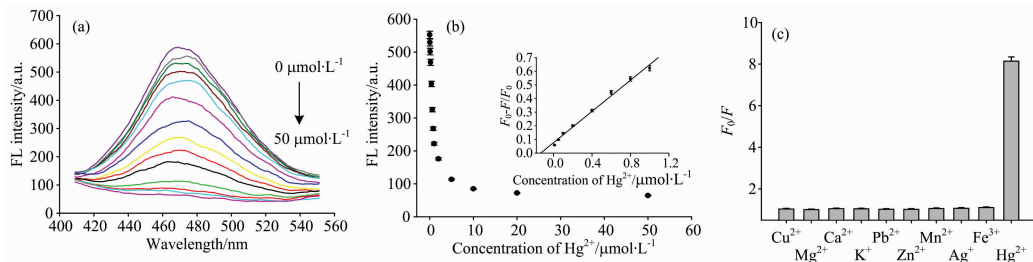


图 4 (a) 不同 Hg<sup>2+</sup> 浓度对应的荧光发射光谱图(从上至下: 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 5, 10, 20, 50 μmol·L<sup>-1</sup>); (b) 荧光强度与 Hg<sup>2+</sup> 浓度的线性关系,插图:校正曲线; (c) 选择性考察, Hg<sup>2+</sup>: 20 μmol·L<sup>-1</sup>; 其他金属离子: 50 μmol·L<sup>-1</sup>

Fig. 4 (a) Fluorescence spectra with different concentration of Hg<sup>2+</sup> (the concentration from up to down were 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 5, 10, 20, 50 μmol·L<sup>-1</sup>); (b) Plot of fluorescence intensity of the AuNCs versus Hg<sup>2+</sup> concentration. Inset: relative fluorescence intensity versus Hg<sup>2+</sup> concentration; (c) Selectivity analysis of the sensor for Hg<sup>2+</sup>. The concentration of Hg<sup>2+</sup> and other interferences are 20 and 50 μmol·L<sup>-1</sup>, respectively

表 1 自来水中 Hg<sup>2+</sup> 检测的加标回收率

Table 1 Recovery of the biosensor for determination of Hg<sup>2+</sup> in tap water samples

自来水样品	加入值 / (μmol·L <sup>-1</sup> )	检测值 / (μmol·L <sup>-1</sup> )	回收率 / %	RSD / %
1	0.3	0.307	102.3	3.6
2	0.6	0.572	95.33	3.1
3	0.9	0.934	103.8	3.4

可能产生干扰的金属离子进行了考察,如 Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup>。从图 4(c) 中可以明显看出,只有 Hg<sup>2+</sup> 的加入导致金纳米簇的荧光信号显著降低,其他金属离子的加入对金纳米簇的荧光信号并无明显影响。说明该方法对 Hg<sup>2+</sup> 的检测具有高选择性。

采用标准加入法测定了自来水样中加入的 Hg<sup>2+</sup>。由表 1 可知, Hg<sup>2+</sup> 的加标回收率在 95.33%~103.8% 之间,相对标准偏差(RSD)不大于 4%。表明该方法具有很好的可靠性和准确性,可用于实际样品中 Hg<sup>2+</sup> 的检测。

为了证明该方法对 Hg<sup>2+</sup> 检测的特异性,实验选用其他

### 3 结 论

以 A15-ssDNA 金纳米簇为荧光探针, 基于  $\text{Hg}^{2+}$  与纳米金强烈的亲和作用, 从而猝灭金纳米簇荧光, 设计了一种新型的、快速的、非标记的传感策略用于汞离子的高灵敏性和

高选择性检测。作为荧光探针, A15-ssDNA 金纳米簇拥有良好的生物相容性、优异的荧光性能和光学稳定性。同时, 该方法仅需将溶液简单的混合, 操作简单、快速。此外, 该方法在  $0.01 \sim 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间可以高灵敏的检测汞离子, 检测下限达到  $3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且方法的选择性好, 可以满足对实际样品中  $\text{Hg}^{2+}$  的检测需求。

### References

- [ 1 ] Yorifuji T, Tsuda T, Kashima S, et al. *Environ. Res.*, 2010, 110: 40.
- [ 2 ] Clarkson T W, Magos L. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2006, 36: 609.
- [ 3 ] Duan J L, Song L X, Zhan J H. *Nano Res.*, 2009, 2: 61.
- [ 4 ] Goncalves M S T. *Chem. Rev.*, 2008, 109: 190.
- [ 5 ] Zhang L, Wang E. *Nano Today*, 2014, 9: 132.
- [ 6 ] Li L L, Liu H Y, Shen Y Y, et al. *Anal. Chem.*, 2011, 83: 661.
- [ 7 ] PENG Tao, WANG Jian-yi, XIE San-lei, et al(彭 涛, 王见一, 谢三磊, 等). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2018, 46: 373.
- [ 8 ] ZHANG Guo, FENG Jian-jun, CHAI Rui-tao, et al(张 国, 冯建军, 柴瑞涛, 等). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2019, 47: 583.
- [ 9 ] CAI Yu-ling, ZHANG Ji-mei(蔡宇玲, 张纪梅). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2018, 46: 952.
- [10] Wang H B, Bai H Y, Dong G L, et al. *Nanoscale Adv.*, 2019, 1: 1482.
- [11] Wang H B, Li Y, Bai H Y, et al. *Sens. Actuators, B*, 2018, 259: 204.
- [12] Wang H B, Li Y, Bai H Y, et al. *Food Anal. Method.*, 2018, 11: 3095.
- [13] Kennedy T A C, Maclean J L, Liu J W. *Chem. Commun.*, 2012, 48: 6845.
- [14] Niu C X, Liu Q L, Shang Z H, et al. *Nanoscale*, 2015, 7: 8457.
- [15] Zang J C, Li C A, Zhou K, et al. *Anal. Chem.*, 2016, 88: 10275.
- [16] Huang L J, Zhu Q R, Zhu J, et al. *Inorg. Chem.*, 2019, 58: 1638.

## High-Sensitive and Rapid Fluorescence Detection of $\text{Hg}^{2+}$ Based on Poly (adenine)-Templated Gold Nanoclusters

OU Li-juan, AN Xue-zhong, LUO Jian-xin, WANG Ling-yun, BO Heng, SUN Ai-ming, CHEN Lan-lan

College of Material and Chemical Engineering, Hunan Institute of Technology, Hengyang 421002, China

**Abstract** Poly adenine (Poly A)-templated gold nanoclusters (Poly A-AuNCs) have many advantages, such as facile and fast synthesis, excellent fluorescence intensity and good photostability. Based on Poly A-AuNCs, a sensitive, simple, rapid and novel fluorescent strategy was developed for the detection of  $\text{Hg}^{2+}$ . AuNCs were prepared by heating-assisted methods with sodium citrate as a reductant. The AuNCs have been revealed by fluorescence spectra and transmission electron microscopy (TEM). TEM showed that the AuNCs were spherical in shape and well dispersed. The average size of AuNCs is approximately 7 nm. The fluorescence spectra showed that AuNCs emitted strong blue fluorescence with maxima fluorescence emission wavelengths at 471 nm upon excitation at 280 nm. Additionally, the AuNCs were highly stable and little fluorescence change was observed after storing at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 month. In the presence of  $\text{Hg}^{2+}$ , the fluorescence of AuNCs was quenched effectively due to the high affinity between  $\text{Hg}^{2+}$  and gold. The pH and reaction time was investigated. The fluorescence of AuNCs were insensitive to pH. The quenching reaction between  $\text{Hg}^{2+}$  and AuNCs was very fast and was completed within the first 1 min. Thus, the fluorescence was recorded after the simple mixture of  $\text{Hg}^{2+}$  and AuNCs. Under optimum conditions, a series concentration of  $\text{Hg}^{2+}$  was detected. The linear equation is  $y = -335.57x + 541.35$ . The relative fluorescence intensity displayed a good linear relationship with  $\text{Hg}^{2+}$  concentration in the range from 0.01 to  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  with the detection limit of  $3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Nine metal ions were added in the system to assess the sensing selectivity. Furthermore, the assay was successfully applied for the detection of  $\text{Hg}^{2+}$  in environmental water samples with good recoveries from 95.33%~103.8%, and the relative standard deviation was lower than 4%. Thus, this novel strategy was rapid, simple and have high sensitivity and good selectivity for  $\text{Hg}^{2+}$ .

**Keywords** Gold nanoclusters; Fluorescence; Detection of  $\text{Hg}^{2+}$

(Received Dec. 2, 2019; accepted Apr. 15, 2020)