

doi:10.3969/j.issn.1672-5425.2016.09.015

李敬慧,尹坦姬,秦伟.基于多孔石墨烯的电位型核酸适体传感器快速检测啶虫脒[J].化学与生物工程,2016,33(9):62-66.

基于多孔石墨烯的电位型核酸适体传感器快速检测啶虫脒

李敬慧^{1,2},尹坦姬¹,秦伟¹

(1.中国科学院烟台海岸带研究所 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室 山东省海岸带环境过程重点实验室,山东烟台 264003; 2.中国科学院大学,北京 100049)

摘要:以核酸适体为识别分子、以多孔石墨烯为传导层,发展了一种检测烟碱类杀虫剂啶虫脒的电位型核酸适体传感器。核酸适体与目标物之间的特异性识别作用诱导核酸适体的构象发生一定的变化,从而引起电极电位的改变。结果表明,所构建的电位型核酸适体传感器对啶虫脒检测的线性范围为 $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检出限为 $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明该传感器对啶虫脒具有很高的灵敏度,为其测试实际样品提供了可能。根据所用核酸适体的不同,本适体传感器亦可对其它有机农药进行检测。

关键词:核酸适体;啶虫脒;多孔石墨烯;电位测定;核酸适体传感器

中图分类号:O 657.15

文献标识码:A

文章编号:1672-5425(2016)09-0062-05

Porous Graphene-Based Potentiometric Aptasensors for Rapid Determination of Acetamiprid

LI Jing-hui^{1,2}, Yin Tan-ji¹, QIN Wei¹

(1. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences; Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Chinese Academy of Sciences; Shandong Provincial Key Laboratory of Coastal Environmental Processes, YICCAS, Yantai 264003, China;
2. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A potentiometric aptasensor for rapid detection of nicotinamide insecticide acetamiprid was developed using porous graphene as a transducer layer and aptamers as recognition molecules, respectively. The specific identification between the aptamer and the target induced a conformational change in the aptamer, resulting in a subsequent change of the electrode potential. Results showed that, the proposed aptasensor exhibited a good linear relationship to acetamiprid in the concentration range of $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the detection limit was $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. These results indicated that the developed aptasensor had a good sensitivity to acetamiprid, which provided a possibility for the determination of acetamiprid for real samples. This aptasensor can also be used to detect other organic pesticides based on different aptamers.

Keywords: aptamer; acetamiprid; porous graphene; potentiometry; aptasensor

啶虫脒(acetamiprid)作为氯化烟碱类杀虫剂,于1996年由日本曹达株式会社开发。啶虫脒具有高效、低毒等特点,除了具有触杀、胃毒、渗透和内吸等杀虫作用,还具有速效的杀虫能力,是防治蚜虫的较

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21475148),山东省泰山学者人才计划

收稿日期:2016-04-28

作者简介:李敬慧(1990—),女,山东济宁人,博士研究生,研究方向:环境监测, E-mail: jinghuili@yic.ac.cn; 通讯作者:秦伟,博士,研究员, E-mail: wqin@yic.ac.cn。

为理想的新型杀虫剂,广泛应用于黄瓜、油菜等蔬菜以及苹果、梨等水果上,残效期可达 20 d 之久。而当啉虫脒残留过量时,其进入体会对人体健康产生不利影响。因此,对其检测方法的研究具有重要的实际意义。

啉虫脒的检测方法主要包括气相色谱法(GC)^[1]、液相色谱法(LC)^[2]、高效液相色谱法(HPLC)^[3]以及固相萃取-气相色谱法(SPE-GC)^[4]等。但是这些检测方法存在仪器体积大、操作成本高、检测时间长等缺点。而电化学传感技术具有操作简单、携带方便、灵敏度高、检测快速、易于实现自动化和实时监测等一系列的显著优点,已在环境监测、临床诊断、食品分析等领域得到了广泛应用^[5-7]。核酸适体具有特异性高、亲和力强、性质稳定、易于修饰以及目标分子范围广等特点,受到研究者越来越多的关注。将核酸适体作为识别元件,与电化学传感技术相结合组建的电化学适体传感器由于结合了核酸适体和电化学传感技术两方面的优点,成为了近年来的研究热点^[8-11]。

电位型核酸适体传感器是电化学适体传感器的一个重要分支,是通过将核酸适体作为分子识别元件固定于电极表面,通过核酸适体与目标物结合后引起构型转变,从而导致电位信号的变化来实现对目标物的检测^[10,12-14]。碳基纳米材料具有比表面积大、吸附能力强、生物相容性好等优点,可以与核酸适体通过共价键以及非共价键相结合的方式将其固定在电极表面并保持其生物活性。同时,将碳基纳米材料修饰到电极表面,可以有效地加快电子的传递,增强电极的导电性,从而提高响应速度,改善传感器的性能。碳纳米管是最早用于构建电位型核酸适体传感器的碳基纳米材料^[10],然而由于碳纳米管之间相互缠绕而形成的立体结构阻碍了电子的传输,限制了传感器灵敏度的提升。除碳纳米管外,石墨烯也被用于构建电位型核酸适体传感器^[12]。但是,由于石墨烯片层之间强的 $\pi-\pi$ 作用和范德华力,使石墨烯片层之间容易发生堆叠,造成比表面积减小,不利于核酸适体的固定,从而导致识别分子在电极表面固定量减少。此外,石墨烯片层之间的相互堆叠还会阻碍电子的传输与转移,延长传感器的响应时间。这些不足之处均对传感器灵敏度造成影响,限制其发展与应用。

为了进一步提高电位型核酸适体传感器的分析性能,作者将多孔石墨烯(PGR)用于传感器的构建,利用核酸适体作为识别分子,通过电位信号的变化来检测有机农药啉虫脒。

1 实验

1.1 试剂与仪器

啉虫脒、三羟甲基氨基甲烷(Tris),Sigma-Aldrich公司;浓盐酸、浓硝酸、氯化钠、高锰酸钾等,国药集团化学试剂有限公司;石墨烯(GR),南京先丰纳米材料科技有限公司。

核酸适体,其碱基序列如下:5'-TGTAATTTGTCTGCAGCGGTTCTTGATCGCTGACACCATA-TTATGAAGA-3';干扰DNA,其碱基序列如下:5'-TCTTCATAATATGGTGTTCAGCGATCAAGAAC-CGCTGCAGACAAATTACA-3',上海生工生物有限责任公司。

CHI 660C型电化学工作站,上海辰华;PHSJ-216型雷磁离子计,上海精科;CASCADE-BIO型超纯水系统,美国颇尔;XS105DU型精密电子天平,梅特勒-托利多;S-4800型冷场发射扫描电子显微镜,日本日立。

1.2 PGR修饰玻碳电极(GC/PGR电极)的制备

在100 mL石墨烯分散液中加入5 mL $16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ KMnO_4 溶液,搅拌1 h;得到的产物用60 °C的热盐酸处理30 min,随后用去离子水和乙醇冲洗,在真空干燥箱中干燥,得到PGR,备用^[15]。

将玻碳(GC)电极用抛光粉打磨,清洗后干燥。称取一定量的PGR溶于水中,配成 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水溶液,量取10 μL 的PGR水溶液滴于GC电极表面,待其完全干燥后,重复上述步骤2次,制得GC/PGR电极。

1.3 GC/PGR-Aptamer电极的制备

核酸适体使用前经95 °C加热5 min,然后量取10 μL $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核酸适体滴于GC/PGR电极表面,待其干燥后进行测试。测试前用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH值7.4的Tris-HCl缓冲溶液冲洗电极,以洗去未与GC/PGR结合的核酸适体。

对所制备的GC/PGR-Aptamer电极在 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl溶液中进行循环伏安和阻抗分析。

1.4 电位检测

以GC/PGR-Aptamer电极为指示电极、双液接Ag/AgCl($3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)为参比电极($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiOAc溶液为盐桥电解质),利用离子计记录加入不同浓度的啉虫脒溶液时电极电位的变化。

2 结果与讨论

2.1 PGR的扫描电镜照片(图1)

从图1可以看出,所合成的PGR具有很明显的多

孔结构,孔径大小约为 200 nm。

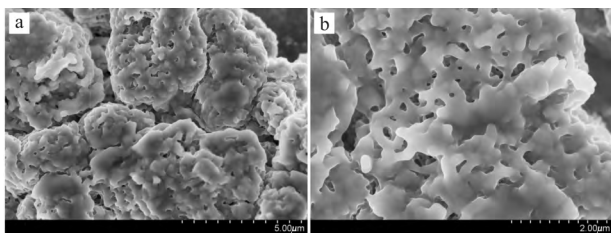


图1 PGR的扫描电镜照片
Fig. 1 SEM Images of PGR

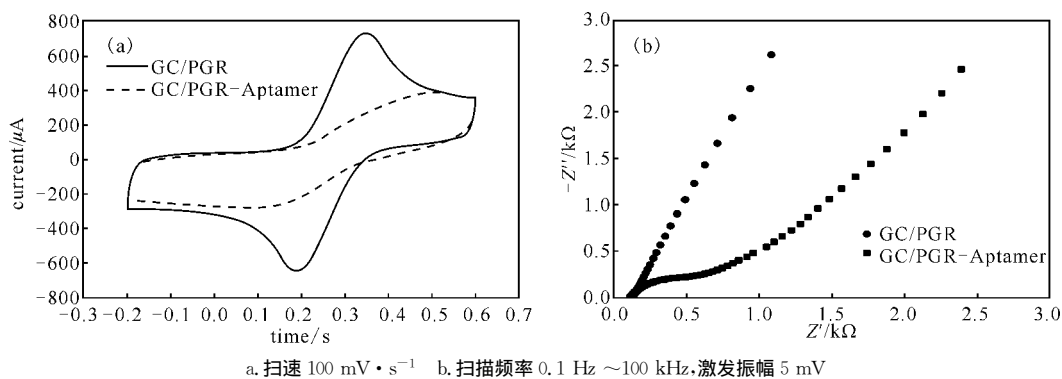


图2 GC/PGR电极和GC/PGR-Aptamer电极的循环伏安图(a)和阻抗图谱(b)

Fig. 2 Cyclic voltammograms(a) and electrochemical impedance spectra(b) of GC/PGR and GC/PGR-Aptamer electrodes

面时,氧化还原峰之间的电位差值明显增大且氧化还原峰电流也显著减小。这主要是因为核酸适体的不导电性,当核酸适体以非共价作用吸附在PGR表面时,阻碍了电解质和电极之间电子的转移。

电化学阻抗分析也是研究修饰后电极表面特性的一种有效方法。从图2b可以看出,当电极表面只存在PGR时,阻抗图谱的高频区域并没有出现半圆而是一条直线,表明 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 在GC/PGR电极表面发生了快速的电子转移。主要原因是PGR的多孔结构能够加快 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 的扩散速率,有助于电子转移过程的发生。而当核酸适体吸附在PGR表面时,在高频区域出现了明显的半圆型,表明此时GC/PGR-Aptamer电极表面对电子的转移有很明显的阻塞作用,降低了电子转移速率,增加了电子的流动阻力。这同样可以归因于核酸适体的不导电性,当其吸附在PGR表面时,堵塞了PGR的多孔结构,降低了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 的扩散速率,从而阻碍了电子的转移。表明,核酸适体可以通过非共价作用成功地吸附在PGR表面,为构建适配体传感器打下了基础。

2.3 检测条件的选择

在进行检测条件优化时,所用的核酸适体浓度均为 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 循环伏安及阻抗分析

为了考察核酸适体是否修饰到GC/PGR电极表面,分别进行了循环伏安及阻抗分析,结果如图2所示。

由图2a可以看出,当电极表面只存在PGR时, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 氧化还原峰明显,且两峰之间的电位差值较小,表明PGR的多孔结构有助于 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 的扩散,促进了电极表面氧化还原反应的发生,加速了电子的转移。而当核酸适体通过非共价作用吸附在PGR表

2.3.1 缓冲溶液对电位响应的影响

将制备的核酸适体传感器放入 $2 \text{ mL } 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH值7.4的Tris-HCl缓冲溶液中,待电位稳定后开始计时。在200 s时,往缓冲溶液中分别加入 $20 \mu\text{L } 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 缓冲溶液和 $20 \mu\text{L } 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 啉虫脒溶液,考察缓冲溶液对电位响应的影响,结果如图3所示。

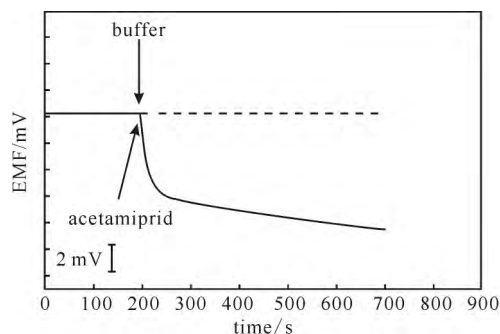


图3 缓冲溶液对电位响应的影响

Fig. 3 Effect of buffer solution on the potential response

从图3可以看出,当加入缓冲溶液时,电位值并没有发生变化;相反,当加入啉虫脒溶液时电极电位则明显降低。这是由于核酸适体与配体啉虫脒之间发生特异性结合,引起核酸适体的构型发生变化,导致了明显的电位变化。表明,缓冲溶液不会对电极电位造成影

响,引起电位变化的原因是核酸适体与吡虫脒的特异性结合作用。

2.3.2 基底材料对电位响应的影响

制备基于不同基底材料的核酸适体传感器,一种以 GR 为基底,一种以 PGR 为基底,测试条件同 2.3.1,待电位稳定后,往缓冲溶液中加入 $20 \mu\text{L}$ $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 吡虫脒溶液,考察基底材料对电位响应的影响,结果如图 4 所示。

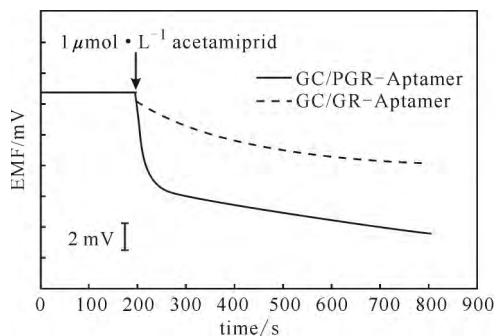


图 4 基底材料对电位响应的影响

Fig. 4 Effect of substrate material on the potential response

由图 4 可以看出,加入吡虫脒溶液后,两种不同基底的电极电位都发生了变化,其中以 PGR 为基底的电极电位变化大于以 GR 为基底的电极。主要原因是 PGR 相比于 GR 具有多孔结构,能够增大其比表面积,使吸附在其表面的核酸适体增多,从而能够与更多的吡虫脒相结合,使电极电位发生更明显的变化,有助于提高电极的灵敏度。

2.3.3 干扰 DNA 对电位响应的影响

为了探究电极电位发生变化是由核酸适体与目标物的特异性结合所引起,考察了干扰 DNA 对电位响应的影响,结果如图 5 所示。

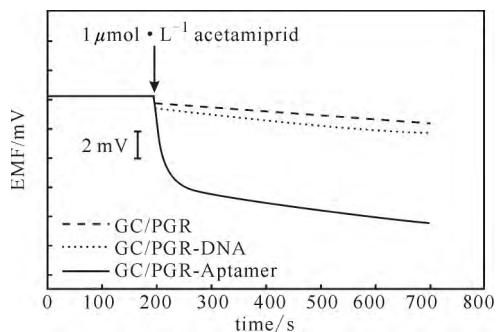


图 5 干扰 DNA 对电位响应的影响

Fig. 5 Effect of interfering DNA on the potential response

由图 5 可知,加入吡虫脒溶液后,GC/PGR 电极电位没有发生明显变化,表明 PGR 与吡虫脒不能发生

结合,排除 PGR 的影响。GC/PGR-DNA 电极电位则有稍微的变化,可能是由于吡虫脒的加入引起了电极与溶液界面微环境的改变,造成电极表面电位的微小变化。相比于 GC/PGR-DNA 电极,GC/PGR-Aptamer 电极电位则表现出大幅度的变化,这可以归因于核酸适体与配体吡虫脒之间的特异性结合作用。表明,核酸适体与吡虫脒之间的特异性结合作用是造成电位发生变化的原因。

2.3.4 核酸适体用量对电位响应的影响(图 6)

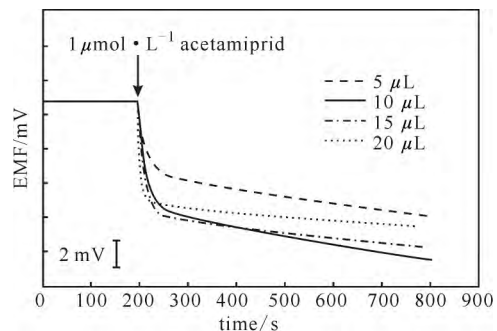


图 6 核酸适体用量对电位响应的影响

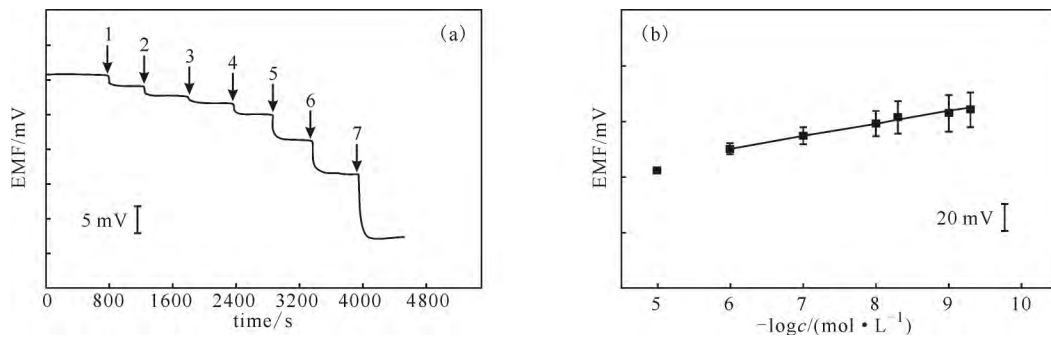
Fig. 6 Effect of aptamer dosage on the potential response

由图 6 可知,随着核酸适体用量的增加,GC/PGR-Aptamer 电极电位发生了明显的降低;当核酸适体用量为 $10 \mu\text{L}$ 时,电极电位变化最大;用量为 $15 \mu\text{L}$ 时,电极电位变化和 $10 \mu\text{L}$ 时相差无几;而当核酸适体用量为 $5 \mu\text{L}$ 和 $20 \mu\text{L}$ 时,电极电位变化相对较小。结果表明,核酸适体的用量过少 ($5 \mu\text{L}$) 或者过多 ($20 \mu\text{L}$) 时,均不利于 GC/PGR-Aptamer 电极电位发生变化。主要原因可能是核酸适体用量过少时,没有足够的核酸适体与目标物相结合,从而造成电极电位变化不明显;而当核酸适体用量过多时,因核酸适体的不导电性,过多的核酸适体缠绕在电极表面会阻碍电子的转移,从而减小电极电位的变化。综合考虑,对目标物进行检测时选择核酸适体用量为 $10 \mu\text{L}$ 。

2.4 电极检测吡虫脒的工作曲线

以 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核酸适体为指示分子,对不同浓度的吡虫脒进行检测,结果见图 7。

由图 7a 可知,当加入 $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的吡虫脒溶液时,所构建的核酸适体电位传感器电位响应立即发生变化,响应时间约为 50 s ,表明核酸适体和吡虫脒之间存在一个快速的亲和力平衡且传导层能够有效地传递电子。主要原因是 PGR 表面缺陷较少、导电性强、能够促进电子转移,有利于传导层非对称性类电容行为,进一步全面增强传导层的效率。由图 7b 可知,电极电位与吡虫脒浓度的对数呈良好的



1~7, 啶虫脒浓度: $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图7 不同浓度的啶虫脒的电位响应

Fig. 7 Potential responses to acetamiprid at different concentrations

线性关系, 线性方程为: $E = 323.76 + 4.42(-\log c)$, 相关系数 $R^2 = 0.9941$, 线性范围为 $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 电极的检出限为 $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。电极具有低检出限是由于 PGR 具有多孔结构, 增大了其比表面积, 通过 $\pi\pi$ 作用能够固定更多的核酸适体, 从而增加结合位点的数量, 促进核酸适体与啶虫脒的相互结合。

3 结论

构建了一种以 PGR 为传导层、以核酸适体作为识别分子的具有低检出限的电位型核酸适体传感器, 并用于检测啶虫脒。PGR 的多孔结构使其具有大的比表面积, 能够固定更多的核酸适体, 进而提供更多的结合位点, 便于对目标物进行检测。核酸适体与目标物的特异性结合能够改变核酸适体的构象, 引起电位变化。该传感器对啶虫脒检测的线性范围为 $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检出限为 $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 响应快速, 响应时间约为 50 s。此外, 电位型核酸适体传感器根据所使用核酸适体的不同, 可以实现对不同目标物的检测。

参考文献:

- [1] 孙楠, 薛健. 气相色谱法测定金银花中残留的啶虫脒[J]. 农药, 2007, 46(4): 256-257.
- [2] 侯如燕, 蔡荟梅, 张正竹, 等. 液相色谱法检测水果蔬菜中的烟碱类农药残留[J]. 分析实验室, 2010, 29(2): 59-63.
- [3] 蔡恩兴. 毛豆中啶虫脒的残留分析方法[J]. 农药科学与管理, 2007, 28(6): 13-18.
- [4] 李建华, 何强, 孔祥虹, 等. 固相萃取-气相色谱法检测枸杞子中啶虫脒的残留量[J]. 化学分析计量, 2007, 16(6): 17-19.
- [5] NAGAOKA T, TOKONAMI S, SHIIGI H, et al. Development of an electrochemical cholesterol sensor system for food analysis[J]. Analytical Sciences, 2012, 28(2): 187-191.
- [6] SINGH V, KRISHNAN S. Voltammetric immunosensor assem-

bled on carbon-pyrenyl nanostructures for clinical diagnosis of type of diabetes[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(5): 2648-2654.

- [7] 高奇, 梁荣宁, 秦伟. 秀去津分子印迹聚合物的合成及其在低检出限离子选择性电极中的应用研究[J]. 化学与生物工程, 2014, 31(6): 45-49.
- [8] ALVAREZ-MARTOS I, CAMPOS R, FERAPONTOVA E E. Surface state of the dopamine RNA aptamer affects specific recognition and binding of dopamine by the aptamer-modified electrodes[J]. Analyst, 2015, 140(12): 4089-4096.
- [9] DING J, GU Y, LI F, et al. DNA Nanostructure-based magnetic beads for potentiometric aptasensing[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(13): 6465-6469.
- [10] ZELADA-GUILLEN G A, RIU J, DUZGUN A, et al. Immediate detection of living bacteria at ultralow concentrations using a carbon nanotube based potentiometric aptasensor[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2009, 48(40): 7334-7337.
- [11] 雷佳宏, 丁家旺, 秦伟. 流动注射聚离子敏感膜电极检测三磷酸腺苷[J]. 化学与生物工程, 2014, 31(9): 71-75.
- [12] HERNANDEZ R, VALLES C, BENITO A M, et al. Graphene-based potentiometric biosensor for the immediate detection of living bacteria[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 54(8): 553-557.
- [13] ZELADA-GUILLEN G A, SEBASTIAN-AVILA J L, BLONDEAU P, et al. Label-free detection of *Staphylococcus aureus* in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 31(1): 226-232.
- [14] ZELADA-GUILLEN G A, TWEED-KENT A, NIEMANN M, et al. Ultrasensitive and real-time detection of proteins in blood using a potentiometric carbon-nanotube aptasensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 41: 366-371.
- [15] CHEN S, DUAN J, JARONIEC M, et al. Hierarchically porous graphene-based hybrid electrodes with excellent electrochemical performance[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2013, 33(1): 9409-9413.