

# 基于 $\text{Ag}^+$ 对 C - C 错配识别和 $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$ 的核酸分子“光开关”特性的银离子光学传感器

肖志友<sup>1,2\*</sup>, 郭晓婷<sup>2</sup>, 凌连生<sup>2</sup>

(1. 凯里学院 化学与材料工程学院, 贵州 凯里 556011; 2. 中山大学 化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 以含错配碱基胞嘧啶的自互补寡聚核苷酸序列(Oligo-1, 5'-TACATACTATACTATCTA-3')作为  $\text{Ag}^+$  识别序列, 以核酸分子“光开关”  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  ( $\text{phen} = 1, 10\text{-phenanthroline}$ ,  $\text{dppx} = 7, 8\text{-dimethyldipyridophenazine}$ ) 作发光探针, 建立了一种简单、灵敏的  $\text{Ag}^+$  定量分析方法。以 150 nmol/L Oligo-1, 2.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  及 120 mmol/L  $\text{NaNO}_3$  在 pH 7.5 的 PBS 缓冲溶液中反应 30 min 作为最佳实验条件,  $\text{Ag}^+$  在 10.0 ~ 120.0 nmol/L 范围内与溶液的发光强度呈良好的线性关系, 相关系数( $r$ ) 为 0.995 7, 检出限 ( $3\delta/\text{Slope}$ ) 为 8.1 nmol/L。方法具有较好的选择性, 用于实际样品测定, 结果满意。

**关键词:** DNA; 核酸分子“光开关”; 银离子; 光学传感器

**中图分类号:** O657.3; O612 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2013)09-1117-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1004-4957.2013.09.016

## An Optical Sensor for $\text{Ag}^+$ Based on Its Recognition of C - C Mismatched Base Pair and Nucleic Acid Molecule “Light Switch” Property of $\text{Ru}(\text{phen})_2(7, 8\text{-dimethyl-dipyridophenazine})^{2+}$

XIAO Zhi-you<sup>1,2\*</sup>, GUO Xiao-ting<sup>2</sup>, LING Lian-sheng<sup>2</sup>

(1. School of Chemistry and Materials Engineering, Kaili College, Kaili 556011, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** A simple and sensitive optical sensor for  $\text{Ag}^+$  was developed based on its recognition of C - C mismatched base pair and nucleic acid molecule “light switch” property of  $\text{Ru}(\text{phen})_2(7, 8\text{-dimethyldipyridophenazine})^{2+}$ . A self-complementary oligonucleotide containing cytosine - cytosine mismatched base pair, 5'-TACATACTATACTATCTA-3'(oligo-1), was designed as the sequence for sensing of silver ion. In the absence of silver ion, the hybridization between the oligo-1 strands would not occur because of the existence of cytosine- cytosine mismatched base pair. However, after adding the silver ion, hybridization occurred between the two oligo-1 strands because of the formation of cytosine -  $\text{Ag}^+$  - cytosine base pair, the formed double-helix DNA prevented the luminescence of nucleic acid molecule “light switch”  $\text{Ru}(\text{phen})_2(7, 8\text{-dimethyldipyridophenazine})^{2+}$  from the quenching of water. As a result, the luminescence of  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  increased dramatically. Based upon this mechanism, a simple and sensitive method for the detection of silver ion was established. Different factors including concentrations of oligo-1,  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$ ,  $\text{NaNO}_3$ , pH value and incubation time were investigated. The optimum conditions were as follows: Oligo-1: 150 nmol/L,  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$ : 2.0  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\text{NaNO}_3$ : 120 mmol/L, buffer: 20 mmol/L pH 7.5 PBS, incubation time: 30 min. Under the optimal conditions, the luminescence intensity was proportional to concentration of  $\text{Ag}^+$  over the range of 10.0 - 120.0 nmol/L, with a correlation coefficient( $r$ ) of 0.995 7. The limit of detection ( $3\delta/\text{Slope}$ ) was 8.1 nmol/L. With a good selectivity, the method was applied in the determination of  $\text{Ag}^+$  in practical samples with satisfactory results.

**Key words:** DNA; nucleic acid molecular “light switch”;  $\text{Ag}^+$ ; optical sensors

收稿日期: 2013-07-02; 修回日期: 2013-07-20

基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目(黔科合J字[2013]2263号); 国家自然科学基金资助项目(20975116)

\* 通讯作者: 肖志友, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 纳米生物分析、光谱分析, Tel: 0855-8558093, E-mail: gzzyiyoux@163.com

银离子( $\text{Ag}^+$ )在摄影、制镜、电子工业中有着重要的应用,其在水环境中以各种无机和有机化合物形式存在,能被水生生物所富集,同时它对环境的污染和对人体健康的危害也逐渐引起人们的重视<sup>[1-6]</sup>。因此发展快速、高灵敏度、高选择性的银离子检测方法具有重要意义。

2008年,Ono课题组<sup>[7]</sup>将 $\text{Ag}^+$ 与胞嘧啶碱基(Cytosine)作用,通过Cytosine- $\text{Ag}^+$ -Cytosine配位特异性地稳定含C-C错配的双螺旋DNA结构,基于这一原理,学者们建立了一系列银离子传感器<sup>[8-11]</sup>,但这些方法大多需要对寡聚核苷酸进行成本较高的荧光染料修饰或需要借助其他纳米材料作为辅助传感平台。

钌(II)-DPPZ类配合物,如 $\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{dppz})^{2+}$ 、 $\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{dppx})^{2+}$ 、 $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})^{2+}$ 和 $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$ ( $\text{bipy} = 2$ , 2-bipyridine;  $\text{phen} = 1$ , 10-phenanthroline;  $\text{dppz} =$  dipyridophenazine;  $\text{dppx} = 7$ , 8-dimethyldipyridophenazine)等在水溶液中的荧光被猝灭,而当溶液中存在双链DNA时,荧光增强达 $10^4$ 倍,具有核酸分子“光开关”效应<sup>[12-13]</sup>。这一特点被广泛应用于双链DNA的定量分析<sup>[14]</sup>,DNA的杂交<sup>[15]</sup>,金纳米表面DNA密度的探测<sup>[16-17]</sup>,ATP的检测<sup>[18]</sup>等。本文拟将 $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$ 的“核酸分子光开关”特性和 $\text{Ag}^+$ 能特异性识别Cytosine-Cytosine错配的特点相结合,探讨建立银离子光学传感器的可能性。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),pHS-3E pH计(上海雷磁仪器厂),

硝酸银(上海国药集团化学试剂有限公司),磷酸氢二钠、硝酸钠(天津市福晨化学试剂厂),磷酸二氢钠(天津市津沽工商实业公司),所有试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。寡聚脱氧核苷酸序列(Oligo-1, 5'-TACATACTATACTATCTA-3')购于上海生工生物工程有限公司,分子“光开关” $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})(\text{BF}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( $\text{phen} = 1$ , 10-菲罗啉,  $\text{dppx} = 7$ , 8-二甲基-吡啶并[3, 2-a: 2', 3'-c]吩嗪)由本实验室根据文献<sup>[14]</sup>合成。

### 1.2 荧光光谱的测定

在500  $\mu\text{L}$ 含150.0 nmol/L Oligo-1、2.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$ 、120.0 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ 的20 mmol/L PBS(7.5)缓冲溶液中加入不同量 $\text{Ag}^+$ ,保留30 min,于荧光分光光度计上测定溶液610 nm处的荧光强度。荧光光谱扫描参数设置:激发波长为460 nm,发射波长扫描范围为500~700 nm,激发和发射狭缝宽度均为5 nm。

### 1.3 融链曲线的测定

将两支加 $\text{Ag}^+$ 与不加 $\text{Ag}^+$ 的Oligo-1溶液的离心管水浴加热至92  $^{\circ}\text{C}$ ,保持5 min,然后缓慢冷却至室温,于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存2 h。将溶液加入0.7 mL(光径为1 cm)的比色皿,于紫外可见分光光度计上测量不同温度时溶液在260 nm处的吸光度,测量温度范围为10~60  $^{\circ}\text{C}$ ,每升温2  $^{\circ}\text{C}$ 测1次吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验可行性分析

为了验证方法的可行性,实验将Oligo-1和 $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$ 混合溶液加银离子与不加银离子的荧光光谱进行对比。如图1所示,未加银离子的荧光光谱存在一定荧光背景(图1曲线a),这是由于Oligo-1序列含有部分自互补碱基,从而导致链之间轻微结合,但荧光强度较弱;而加入120.0 nmol/L银离子后,Oligo-1的荧光光谱强度(图1曲线b)明显高于未加银离子的荧光强度,说明该方法用于测定银离子是可行的。

为进一步探讨银离子的存在导致荧光增强的机理,本实验用紫外可见分光光度计测定了加银离子和不加银离子的Oligo-1融链曲线。如图2所示,未加银离子时,Oligo-1无明显的融链温度(曲线a),说明Oligo-1未形成稳定的双螺旋结构;而相同条件下,加了银离子后则明显存在1个23  $^{\circ}\text{C}$ 左右的融链温度(曲线b),说明存在银离子时含Cytosine-Cytosine错配的自互补Oligo-1链之间形成了稳定的双

螺旋结构, 这与文献报道银离子能特异性地稳定存在 Cytosine - Cytosine 错配的双链 DNA 结构中相一致<sup>[7,11]</sup>。当溶液有双螺旋 DNA 形成时, 插入的  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  因受到保护而荧光增强, 这与存在银离子时 Oligo-1 溶液的荧光强度明显高于不含银离子的结果相吻合。

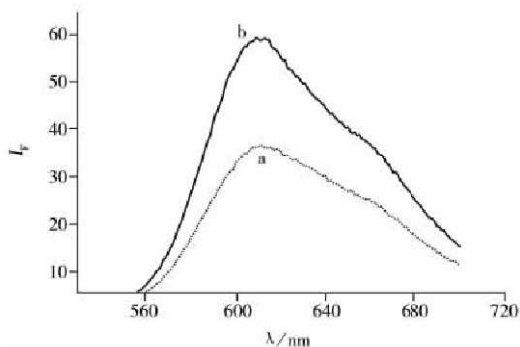


图1 加银离子前(a)后(b) Oligo-1 和  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  混合溶液的荧光光谱

Fig.1 Fluorescence spectra of Oligo-1 and  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  solutions in the absence(a) and presence(b) of 120.0 nmol/L  $\text{Ag}^+$

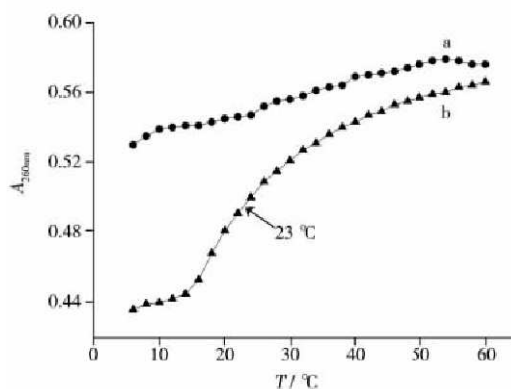


图2 加银离子前(a)后(b) Oligo-1 的融链曲线

Fig.2 Melting curves of 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Oligo-1 solutions in the absence(a) and presence(b) of 9.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ag}^+$

## 2.2 实验条件的优化

实验测定原理基于单链 Oligo-1 在银离子存在时形成双螺旋 DNA 结构, 保护  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  的荧光免受猝灭且荧光信号增强, 根据溶液的荧光强度确定银离子浓度的大小。由于荧光信号受多种因素的影响, 本实验对荧光强度的影响条件进行优化, 以获取最大的荧光信号变化值 $[\Delta I = I_{\text{F}(\text{有Ag}^+)} - I_{\text{F}(\text{无Ag}^+)}]$ 。

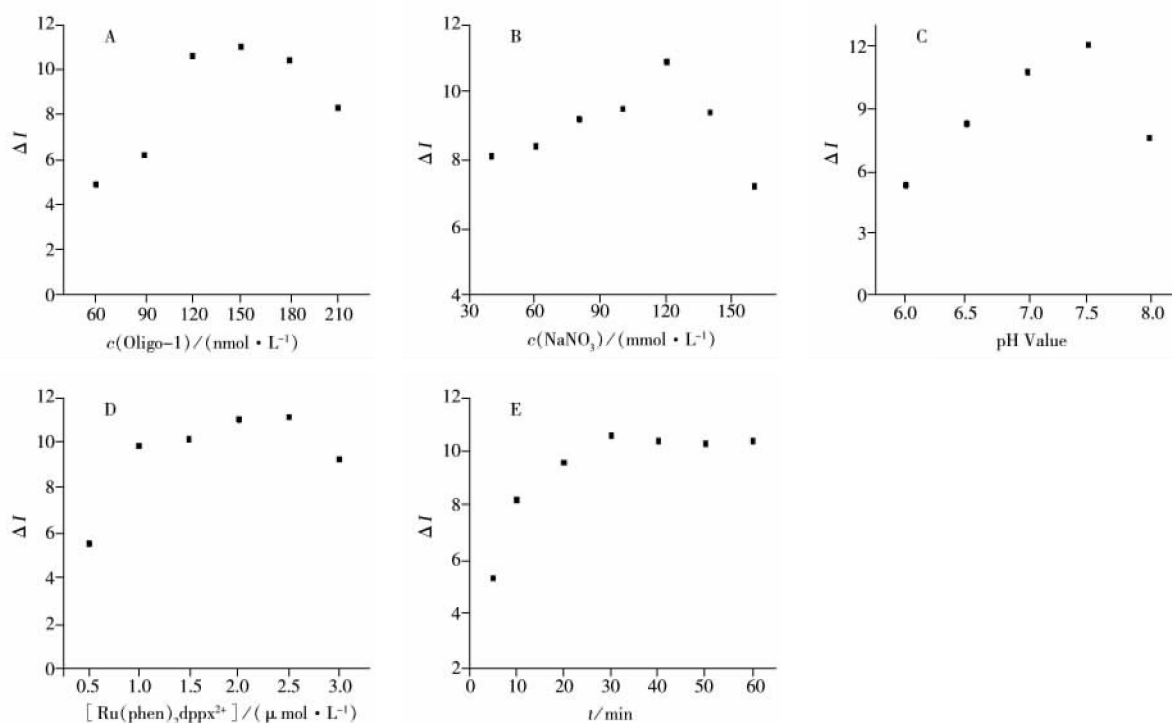
**2.2.1 Oligo-1 浓度对  $\Delta I$  的影响** 溶液荧光强度受形成双螺旋结构的 Oligo-1 浓度的影响。如图 3A 所示, 在 60 ~ 150 nmol/L 范围内,  $\Delta I$  随着 Oligo-1 浓度的增加而增加, 并在 150 nmol/L 时达到最大值, 继续增加 Oligo-1 浓度则会导致  $\Delta I$  逐渐下降。这是由于 Oligo-1 浓度过低时, 加银离子不能形成足够多的双链 DNA 保护  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  荧光免受猝灭, 而 Oligo-1 浓度过高会分散银离子稳定 Oligo-1 形成双螺旋结构的作用。因此, 实验选取 150 nmol/L Oligo-1 作为最佳浓度。

**2.2.2  $\text{NaNO}_3$  浓度对  $\Delta I$  的影响** 离子强度影响加银离子后自互补 Oligo-1 双螺旋结构的形成。如图 3B 所示, 硝酸钠浓度在 40 ~ 160 mmol/L 范围时,  $\Delta I$  随硝酸钠浓度先增加后减少, 并在 120 mmol/L  $\text{NaNO}_3$  时  $\Delta I$  达到最大值。这是因为盐浓度过低时, 无足够的  $\text{Na}^+$  屏蔽带负电的单链 Oligo-1 磷酸骨架之间的静电排斥力, 不利于加银离子后错配的 Oligo-1 之间形成双螺旋结构。而盐浓度过高时, 不加银离子也会有少部分双链结构形成, 导致加银离子引起的荧光变化值( $\Delta I$ )变小。因此, 本实验选取 120 mmol/L 作为最佳盐浓度。

**2.2.3 pH 值对  $\Delta I$  的影响** pH 值会影响 Oligo-1 杂交, 为此, 实验优化了 pH 值对  $\Delta I$  的影响。如图 3C 所示, 在 pH 7.5 时,  $\Delta I$  达到最大值, 这是因为较低的 pH 值不利于溶液中单链 DNA 杂交形成双链 DNA 结构<sup>[16]</sup>, 同样也不利于加  $\text{Ag}^+$  稳定错配的 Oligo-1 形成双链 DNA 结构, 而 pH 值过高时, 不利于 DNA 杂交且会导致  $\text{Ag}^+$  部分沉淀。本实验选择缓冲溶液的最佳 pH 值为 7.5。

**2.2.4  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  浓度对  $\Delta I$  的影响** 实验还考察了分子光开关  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  浓度对荧光强度的影响(如图 3D)。结果显示,  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  浓度过低, 则灵敏度不够, 加银离子后不能产生足够的荧光变化值, 而浓度过高, 可能会产生自猝灭, 从而降低加银离子后引起的荧光强度变化值。因此实验选择 2.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  作为荧光探针浓度。

**2.2.5 反应时间对  $\Delta I$  的影响** 由于银离子与 Oligo-1 胞嘧啶碱基作用以及 Oligo-1 链之间的杂交均受到反应时间的影响, 实验考察了反应时间对  $\Delta I$  的影响。如图 3E 所示,  $\Delta I$  随着时间的增加而增加, 30 min 后达到最大值, 继续增加反应时间,  $\Delta I$  无明显变化。因此选择 30 min 作为体系的反应时间。

图 3 不同实验因素对反应体系  $\Delta I$  的影响Fig. 3 Effects of different experimental factors on  $\Delta I$  of the system

A. Oligo-1 concentration; B.  $\text{NaNO}_3$  concentration; C. pH value; D.  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  concentration; E. reaction time

### 2.3 线性范围与选择性

在上述优化实验条件下,测定了不同浓度银离子时体系的荧光强度。如图 4 所示,溶液的荧光强度随着银离子浓度的增加而增加,在 10.0~120.0 nmol/L 范围内,银离子浓度与荧光强度呈良好的线性关系(图 4 插图),线性方程为:  $I_F = 0.166c(\text{nmol/L}) + 37.3$ , 相关系数( $r$ )为 0.995 7, 检出限( $3\delta/\text{Slope}$ )为 8.1 nmol/L。

为了进一步考察该方法的选择性,实验对 100 nmol/L 银离子和 12 种浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$  的常见金属离子( $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ )引起 Oligo-1 溶液的荧光强度变化( $\Delta I$ )进行对比(见图 5)。结果显示,同样条件下银离子引起的荧光变化值远大于 10 倍于其浓度的其他金属离子,说明该方法对银离子具有良好的选择性,其它常见金属离子对其测定不产生干扰。

### 2.4 水样中银离子的检测

在优化实验条件下,采用本方法对珠江水和中大校园池塘水中的银离子含量进行测定,均未检测到  $\text{Ag}^+$ ,对样品进行低、中、高 3 个浓度的加标回收试验,结果如表 1 所示,样品的加标回收率为 94.3%~105.2%, 相对标准偏差为 0.7%~1.9%, 说明该方法具有良好的精密度和重现性,能够应用于实际样品的测定。

表 1 水样中银离子的测定

Table 1 Determination of  $\text{Ag}^+$  in water samples

| Sample      | Added(nmol/L)         | Found(nmol/L)       | Recovery(% , n=6)     | RSD(% , n=6)     |
|-------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| Pond        | 0.0, 20.0, 40.0, 80.0 | -, 18.1, 40.1, 78.5 | -, 94.3, 100.2, 98.1  | -, 0.7, 1.1, 1.6 |
| Pearl river | 0.0, 20.0, 40.0, 80.0 | -, 19.4, 42.1, 82.3 | -, 96.9, 105.2, 102.8 | -, 0.9, 1.2, 1.9 |

“-” denoted that  $\text{Ag}^+$  was not detected by using this method

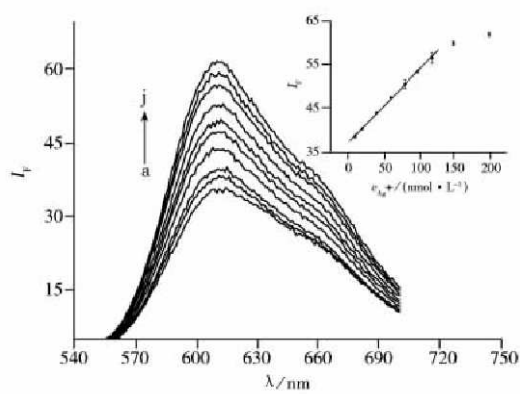


图4 体系在不同浓度  $\text{Ag}^+$  存在下的荧光光谱  
Fig. 4 Fluorescence spectra of Oligo-1 and  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  mixture in the presence of different concentrations of  $\text{Ag}^+$   
concentration of  $\text{Ag}^+$  (a-j): 0.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 120.0, 150.0, 200.0 nmol/L; insert: plot of the assay

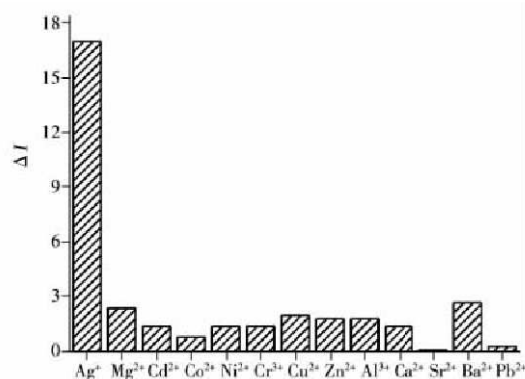


图5 方法的选择性  
Fig. 5 Selectivity of the assay  
 $\Delta I$  was the luminescence change of the mixture of 150 nmol/L Oligo-1 and  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  after the addition of 100 nmol/L  $\text{Ag}^+$  or other metal ions with concentration of 1.0  $\mu\text{mol/L}$

### 3 结论

本文设计了一条含错配胞嘧啶碱基的自互补寡聚核苷酸序列(Oligo-1, 5'-TACATACTATACTATCTA-3'), 链之间由于存在错配碱基而不能形成双螺旋结构, 当溶液中存在银离子时, 由于 Cytosine -  $\text{Ag}^+$  - Cytosine 配位作用能形成稳定的双螺旋结构, 使得溶液中插入的核酸分子“光开关”  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})^{2+}$  的荧光受到保护, 荧光强度增强。基于此原理, 建立了特异性识别银离子的光学传感器。该方法仅需要一条序列, 无需对 DNA 进行修饰, 成本低, 同时以分子光开关作为荧光探针, 方法操作简单、灵敏(检出限可达 8.1 nmol/L), 具有较好的选择性, 应用于实际样品的测定, 结果满意。

#### 参考文献:

- [1] Hogstrand C, Wood C M. *Environ. Toxicol. Chem.*, **1998**, 17(4): 547 - 561.
- [2] Ratte H T. *Environ. Toxicol. Chem.*, **1999**, 18(1): 89 - 108.
- [3] Nichols J W, Brown S, Wood C M, Walsh P J, Playle R C. *Aquat. Toxicol.*, **2006**, 78(3): 253 - 261.
- [4] Barriada J L, Tappin A D, Evans E H, Achterberg E P. *Trac - Trend Anal. Chem.*, **2007**, 26(8): 809 - 817.
- [5] Kim S, Choi J E, Choi J, Chung K H, Park K, Yi J, Ryu D Y. *Toxicol. in Vitro*, **2009**, 23(6): 1076 - 1084.
- [6] Ma D L, Chan D S H, Man B Y W, Leung C H. *Chem - Asian J.*, **2011**, 6(4): 986 - 1003.
- [7] Ono A, Cao S, Togashi H, Tashiro M, Fujimoto T, Machinami T, Oda S, Miyake Y, Okamoto I, Tanaka Y. *Chem. Commun.*, **2008**, 39: 4825 - 4827.
- [8] Xie W Y, Huang W T, Li N B, Luo H Q. *Analyst*, **2011**, 136(20): 4130 - 4133.
- [9] Zhao C, Qu K G, Song Y J, Xu C, Ren J S, Qu X G. *Chem - Eur. J.*, **2010**, 16(27): 8147 - 8154.
- [10] Li H L, Zhai J F, Sun X P. *Langmuir*, **2011**, 27(8): 4305 - 4308.
- [11] Wu C K, Xiong C, Wang L J, Lan C C, Ling L S. *Analyst*, **2010**, 135(10): 2682 - 2687.
- [12] Ling L S, He Z K, Wu F W, Luo Q R, Zeng Y E. *Chem. Res. Chin. Univ.* (凌连生, 何治柯, 吴凤武, 罗庆尧, 曾云鹗. 高等学校化学学报), **2000**, 21(4): 527 - 531.
- [13] Zhang X R, Li Y, Su H R, Zhang S S. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 25(6): 1338 - 1343.
- [14] Ling L S, He Z K, Song G W, Zeng Y E, Wang C, Bai C L, Chen X D, Shen P. *Anal. Chim. Acta.*, **2001**, 436(2): 207 - 214.
- [15] Lim M H, Song H, Olmon E D, Dervan E E, Barton J K. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48(12): 5392 - 5397.
- [16] Miao X M, Ling L S, Shuai X T. *Chem. Commun.*, **2011**, 47(14): 4192 - 4194.
- [17] Yan H L, Xiong C, Yuan H, Zeng Z X, Ling L S. *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113(40): 17326 - 17331.
- [18] Hu L, Bian Z, Li H, Han S, Yuan Y, Gao L, Xu G. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(23): 9807 - 9811.