

富含胞嘧啶单链 DNA-银纳米簇荧光探针 用于 S1 核酸酶的灵敏检测

王星星, 李盼盼, 何婧琳, 欧阳文, 肖慧, 杨婵, 曹忠
(长沙理工大学化学与生物工程学院, 电力与交通材料保护湖南省重点实验室,
微纳生物传感与食品安全检测协同创新中心, 长沙 410114)

摘要 以富含胞嘧啶(C)的单链 DNA 为模板合成银纳米簇, 将其作为功能化探针, 建立了一种无标记荧光检测 S1 核酸酶的方法. S1 核酸酶可以特异性识别单链 DNA, 在最适的酶催化反应条件下, 可将其降解为单核苷酸或寡核苷酸片段. 当 S1 核酸酶不存在时, 富含 C 的单链 DNA 可以有效地合成荧光银纳米簇; 当 S1 核酸酶存在时, 单链 DNA 模板被特异性识别并降解, 导致无法形成银纳米簇, 使体系荧光信号降低. 实验结果表明, 银纳米簇的荧光强度随着 S1 核酸酶浓度的增加而降低. 在优化的条件下, 体系荧光信号 (F/F_0) 与 S1 核酸酶的浓度在 $5.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3}$ U/ μ L 范围内呈线性关系, 检出限为 2.0×10^{-6} U/ μ L. 该荧光探针选择性好, 可用于 RPMI 1640 细胞培养基中 S1 核酸酶的检测, 回收率达到 91.8%~109.5%.

关键词 银纳米簇; 富含胞嘧啶单链 DNA; S1 核酸酶; 荧光探针

中图分类号 O657.3 **文献标志码** A

S1 核酸酶可以特异性识别单链 DNA (ssDNA) 或者 RNA, 在最适的酶催化反应条件下, 可降解 ssDNA 或 RNA 产生带 5'-磷酸的单核苷酸或寡核苷酸片段^[1,2]. 核酸酶作为生物体所需的酶类, 参与了一系列的细胞功能活动, 如脱氧核糖核酸的复制、改造、重组、修复和自我保护等^[3-5]. 核酸酶除了参与重要的细胞功能活动外, 也被广泛应用于核酸结构的测定、核酸杂交的定量分析及定点突变等领域^[6,7]. 由于核酸酶的广泛应用, 对其活性测定方法的研究在分子生物学、生物医学、纳米科学和生物传感等领域均具有重要意义.

传统的检测核酸酶的方法有聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[8]、高效液相色谱法^[9]、放射性标记法^[10]、酶联法及酶联免疫吸附法^[11]等多种, 这些方法存在对仪器要求较高, 操作程序复杂等缺点. 近年来, 基于光、电信号转换技术发展了一系列检测 S1 核酸酶的方法, 如比色法^[12]、电化学法^[13-15]和荧光法^[16-19]等. 此外, 一些新型材料如金纳米颗粒、碳纳米管^[20]及阳离子聚噻吩衍生物^[21]等, 已用于 S1 核酸酶检测方法的构建. 然而, 这些方法存在检测灵敏度低、原料昂贵及检测程序费时等缺点. 因此, 开发一种灵敏度高、操作简便的 S1 核酸酶检测方法是目前的研究趋势之一.

贵金属纳米簇 (NCs) 因其尺寸小、无毒性及生物相容性良好等优点而引起了广泛关注^[22], 已被应用于生物成像、生物传感和特异性蛋白检测等领域^[23-26]. 银纳米簇 (AgNCs) 作为一种贵金属纳米簇, 因具有高度极化的电子跃迁性能, 已成为一种极具潜力的荧光基团^[27-29]和生物成像材料^[30-32]. 合成 AgNCs 的模板有很多种, 主要包括高聚物^[33]、有机小分子^[34]、树枝状化合物^[35]、蛋白质^[36]、多肽^[37]和 DNA^[38]等. 其中, 利用 DNA 为模板合成的 AgNCs 具有良好的光谱和光物理性质, 在光学分析、单分子研究及纳米器件等方面有良好的应用前景. Tian 等^[30]利用 ssDNA-AgNCs 荧光增强法来检测 S1 核

收稿日期: 2017-02-25. 网络出版日期: 2017-07-05.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 31527803, 21545010, 21645009) 和中国科学院科技服务网络 (STS) 计划项目 (批准号: KFJ-SW-STS-173) 资助.

联系人简介: 曹忠, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米生物传感与食品安全检测方面的研究.

E-mail: zhongcao2004@163.com

酸酶,当 S1 核酸酶存在时可以降解与富含鸟嘌呤 G 的 DNA 序列(G-DNA)互补的抑制 DNA 序列,释放出 G-DNA 序列,拉近 ssDNA-AgNCs 和 G-DNA 序列之间的距离,促使 ssDNA-AgNCs 的荧光显著增强,从而实现对 S1 核酸酶的定量检测,检出限达 1.0×10^{-5} U/ μ L.但是,该方法需引入抑制 DNA 序列、富含 G 的 DNA 序列及合成 AgNCs 的 DNA 序列,成本较高,反应体系较为复杂.此外,基于双链^[39,40]或单链 DNA^[41]为模板合成的铜纳米簇(CuNCs)已用于核酸酶的检测.然而,以双链 DNA 为模板合成的 CuNCs 检测 S1 核酸酶的检出限为 3.0×10^{-4} U/ μ L^[39],其灵敏度有待进一步提高.以 ssDNA 为模板合成的 CuNCs 的荧光量子产率相对较低,如以 T30 为模板合成的铜纳米簇的量子产率为 0.068^[41].因此,设计一种体系简单、灵敏便捷的 S1 核酸酶检测方法值得进一步探讨.

基于此,本文以富含胞嘧啶 C 的单链 DNA 作为模板合成高荧光量子产率的 AgNCs,当 S1 核酸酶存在时,S1 核酸酶可把 ssDNA 降解为单核苷酸或寡核苷酸片段,使其无法进行构型转变形成 AgNCs,导致体系荧光信号显著降低.该荧光探针方法灵敏度高、操作简单且无需标记,可用于 S1 核酸酶的快速灵敏检测,在光学分析领域具有良好的应用价值.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

富 C-ssDNA 探针序列如表 1 所示,为自行设计并由宝生物工程(大连)有限公司合成纯化;S1 核酸酶和外切酶(III)购于宝生物工程有限公司(大连);*E. coli* 连接酶、Bst 聚合酶和 BSA 购于新英格兰生物实验室公司(美国);RPMI 1640 细胞培养基购于生工生物工程股份有限公司(上海);硝酸银、硼氢化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、醋酸镁和硝酸锌均购于国药集团化学试剂有限公司(北京);DNA 溶液使用磷酸盐缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠+1.0 mmol/L 醋酸镁, pH=7.0)配制并稀释.实验所用水均为超纯水(电阻率 18.25 M Ω);所用实验器皿、移液枪枪头均经过高温高压灭菌.

Table 1 Sequence of the cytosine-rich oligonucleotides

Probe	Sequence(5'—3')
DNA1	CCCTTAATCCCC
DNA2	CCCCCCCCCCCCCCC
DNA3	AATTCCCCCCCCCAATT
DNA4	CCCCCCCCCCCCCGCCG
DNA5	GCATATCGCCCCCCCCCGATATGC
DNA6	ATCCTCCACCGGGCTCCACCATAAAAACCTTAATCCCC

F-7000 型荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司);PHSJ-3F 型 pH 计(上海雷磁仪器厂);KQ3200B 型超声波清洗器(昆山超声仪器公司);XFS-280A 型手提式压力蒸汽灭菌锅(浙江新丰医疗器械有限公司);恒温金属浴(杭州博日科技有限公司).

1.2 DNA 探针的配制

先配制包含 20 mmol/L Na₂HPO₄, 20 mmol/L NaH₂PO₄和 1.0 mmol/L Mg(CH₃COO)₂的磷酸盐缓冲液,调节 pH=7.0,将此溶液作为单链 DNA 探针的缓冲液.取适量该缓冲液将 1.0 OD DNA1 溶解,配制浓度为 2.0 μ mol/L 的 DNA1 溶液.采用相同方法配制 DNA2, DNA3, DNA4, DNA5 和 DNA6 溶液.将配制好的单链 DNA 溶液置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存.

1.3 以 ssDNA 为模板的 AgNCs 的合成

参照文献[42]方法,以富含胞嘧啶 C 的 ssDNA 为模板合成 AgNCs,设定 $n(\text{DNA}) : n(\text{AgNO}_3) : n(\text{NaBH}_4) = 1 : 6 : 6$.将 75 μ L 2.0 μ mol/L ssDNA 溶液与 9 μ L 0.1 mmol/L AgNO₃溶液于室温下充分混合,于暗处培育 15 min,然后迅速加入新鲜配制的 4.5 μ L 0.2 mmol/L NaBH₄溶液,充分搅拌混合后,于暗处室温下反应 60 min,得到无色溶液 A.

1.4 S1 核酸酶的检测

将用磷酸盐缓冲液配制好的 75 μ L 浓度为 2.0 μ mol/L 的 DNA 探针与不同浓度的 S1 核酸酶置于离心管中,在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 25 min,加入 9 μ L 浓度为 0.1 mmol/L 硝酸银溶液,用移液枪充分混合,避

光静置 15 min, 然后迅速加入 4.5 μL 浓度为 0.2 mmol/L 的硼氢化钠溶液, 充分搅拌后于暗处静置 60 min, 得到无色溶液 B. 分别取反应完毕的溶液 A 和含不同浓度 S1 核酸酶的溶液 B 测定其荧光光谱, 设置激发波长为 560 nm, 扫描 560~680 nm 波长范围内的光谱, 扫描速率为 240 nm/min, 激发和发射狭缝宽度均设为 10 nm.

2 结果与讨论

2.1 检测原理

实验原理如图 1 所示, AgNCs 可作为一个识别信号发射器用于 S1 核酸酶的检测. 实验选用富含胞嘧啶(C)的寡核苷酸单链(ssDNA)合成 AgNCs, 由于碱基 C 与银离子(Ag^+)之间存在高亲和力特异性相互作用, 富 C 单链 DNA 在 Ag^+ 存在下能够进行构型转变, 形成稳定的 C- Ag^+ -C 发夹结构, 加入 NaBH_4 溶液后, 聚集在富 C-ssDNA 附近的 Ag^+ 被还原成 Ag, 从而在均相中形成 AgNCs, 且在发射波长 610 nm 处有较强且较稳定的荧光. 当存在 S1 核酸酶时, S1 核酸酶可将单链 DNA 降解为酸可溶性的核苷酸, 从而使单链 DNA 降解为小的 DNA 片段, 当加入 Ag^+ 时不能进行构型转变, 从而难以形成 AgNCs, 使荧光强度显著下降, 据此可进行 S1 核酸酶的定量检测.

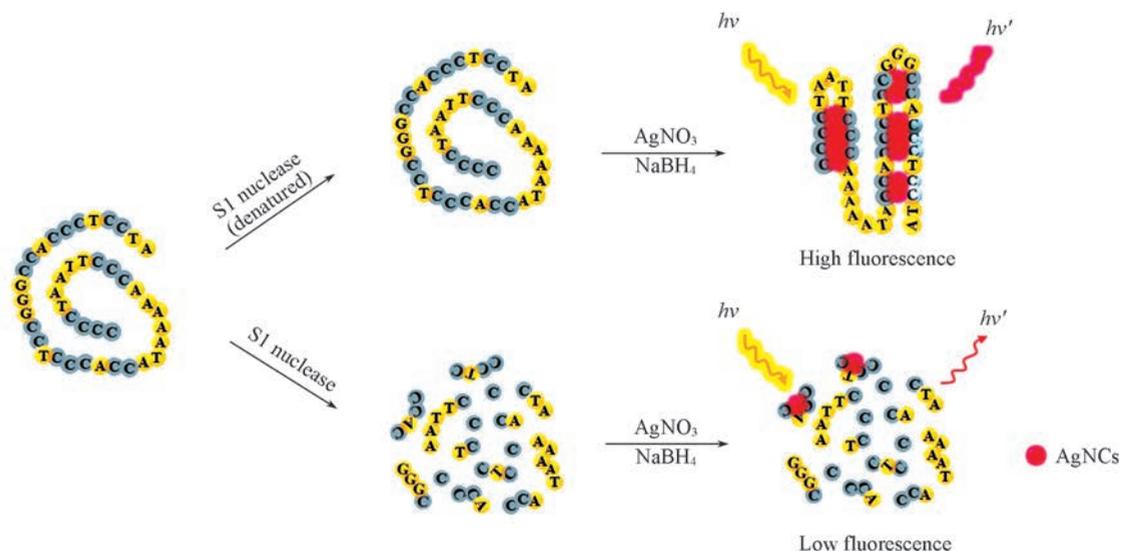


Fig.1 Schematic diagram of cytosine-rich single strand DNA scaffolded silver nanoclusters for S1 nuclease detection

2.2 富 C-ssDNA-AgNCs 的合成及各组分荧光响应行为

为了考察各组分对富 C-ssDNA-AgNCs 合成的影响以及 S1 核酸酶与 ssDNA 的相互作用, 以富 C-ssDNA 为载体, 利用 AgNO_3 对核酸探针的折叠作用, 以 NaBH_4 为强还原剂合成了具有较强荧光的 AgNCs. 图 2 为所合成富 C-ssDNA-AgNCs 的透射电子显微镜(TEM)照片, 可见, 饱满的黑色实心圆点分散性好, 其半径为 (2.8 ± 0.8) nm, 且仅存在于灰色阴影区域. 黑色实心圆点是以 ssDNA 为模板合成的 AgNCs, 而灰色阴影区域为 ssDNA 模板, 因其线性结构而呈现丝带状. 由图 2 还可以看出, 银纳米簇均匀地附着在灰色阴影的深色丝带区域上, 并且仅在深色丝带区域上才有实心圆点出现. 由此可知, AgNCs 是以 ssDNA 为模板合成的, 且与 ssDNA 有良好的结合力, 故仅存在于 ssDNA 骨架结构中.

通过对 9 种不同组分体系 [NaBH_4 , AgNO_3 , DNA6, $\text{AgNO}_3/\text{NaBH}_4$, DNA6/ NaBH_4 , DNA6/ AgNO_3 ,

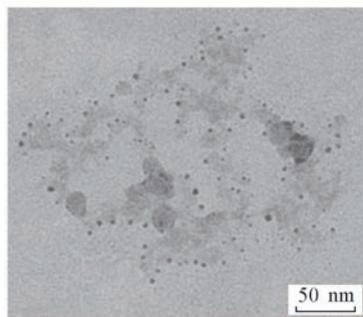


Fig.2 TEM image of cytosine-rich single strand DNA scaffolded silver nanoclusters

DNA6/AgNO₃/NaBH₄, DNA6/S1 核酸酶/AgNO₃/NaBH₄, DNA6/S1 核酸酶(denatured)/AgNO₃/NaBH₄] 的荧光性能进行比较(图 3)发现,核酸探针 DNA6, AgNO₃ 和 NaBH₄ 3 种物质单独存在时均无荧光信号,因为这 3 种物质均无荧光发光基团.而 DNA6/AgNO₃, DNA6/NaBH₄ 和 NaBH₄/AgNO₃ 两物质混合体系同样无荧光信号,是由于 2 种物质之间反应后无法改变反应物分子结构和发光特性,亦不能生成新的具有荧光特性的物质.当溶液中依次加入 DNA6, AgNO₃ 和 NaBH₄ 3 种物质反应后,溶液产生较强的荧光信号,这是由于 DNA6, AgNO₃ 和 NaBH₄ 3 种物质共存时, ss-DNA-AgCNs 才能被合成,且在发射波长 610 nm 处有强且稳定的荧光信号.当 DNA6 溶液和 S1 核酸酶混合液加入 AgNO₃ 和 NaBH₄, 体系的荧光强度明显降低,表明 S1 核酸酶可将 ssDNA 降解为小的 DNA 片段,生成 AgCNs 的量骤减,致使荧光强度显著下降.同样地,当在 DNA6 溶液和 S1 核酸酶(变性)混合液加入 AgNO₃ 和 NaBH₄ 时,则在 610 nm 处产生强且稳定的荧光.由此可见,当 DNA6, AgNO₃ 和 NaBH₄ 同时存在时可形成具有稳定荧光信号的体系,当加入 S1 核酸酶后,体系荧光强度明显降低,因此本实验设计具有良好的可行性.

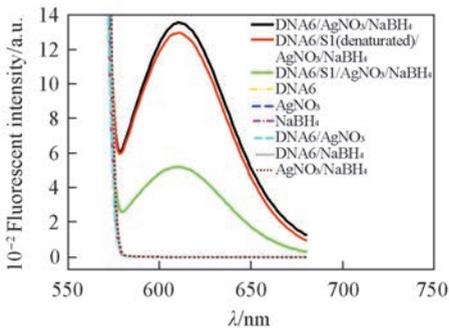


Fig.3 Fluorescence spectra of different systems

Concentration of S1 nuclease: 3.0×10^{-3} U/ μ L,
 $\lambda_{\text{ex}} = 560$ nm.

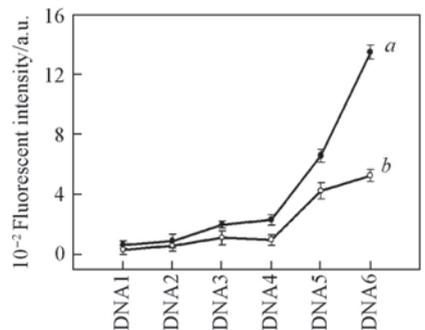


Fig.4 Fluorescent response of cytosine-rich ssDNA-AgCNs depended on different DNA sequences in the absence(a) or presence(b) of 3.0×10^{-3} U/ μ L S1 nuclease

2.3 实验条件的优化

不同富 C-ssDNA 探针对于 Ag⁺ 的结合能力不同,为了优化传感体系性能,选择 6 种富 C-核酸探针 DNA1~DNA6(见表 1)用于富 C-ssDNA-AgCNs 的合成,并用于 S1 核酸酶的检测.如图 4 所示, DNA6/AgNO₃/NaBH₄ 体系与 DNA6/S1 Nuclease/AgNO₃/NaBH₄ 体系相比,荧光强度由原体系的 1351 降为 526.9,其信背比(F/F_0)=0.39.从结构上来看, DNA6 为 1 条碱基数为 42 的脱氧核糖核苷酸链,其与 AgNO₃ 反应后自身折叠程度较高,加入还原剂 NaBH₄ 将 Ag⁺ 还原成 Ag 原子,致使荧光强度很高.当 DNA6 与 S1 核酸酶混合后,由于 S1 核酸酶可将单链的 DNA6 降解为小的 DNA 片段,再加入 AgNO₃ 与 NaBH₄ 后,无法形成 AgCNs,致使荧光强度明显下降.而其它 5 条 DNA 链与 S1 核酸酶反应的信背比远高于 DNA6,故 DNA6 为最佳核酸探针.

为了合成出最稳定状态的 ssDNA-AgCNs,考察了合成过程中加入 NaBH₄ 溶液后反应时间对其稳定性的影响. NaBH₄ 具有较强的还原性,能将 AgNO₃ 中的 Ag⁺ 还原为 Ag 原子,并与胞嘧啶紧密地结合.在一定时间内, AgCNs 的化学性质在磷酸缓冲液中慢慢稳定下来,并表现出非常好的荧光特性,具有强的发射光谱.如图 5 所示,在 50 和 55 min 时 NaBH₄ 还原反应不够完全,无法将全部的 Ag⁺ 充分还原,这使得荧光强度随着时间的增加而增大,而 60 min 后荧光强度随时间的增加慢慢减缓,此时 NaBH₄ 还原持续增大,失去荧光效应.因此,实验选择 60 min 为 NaBH₄ 最佳反应时间.

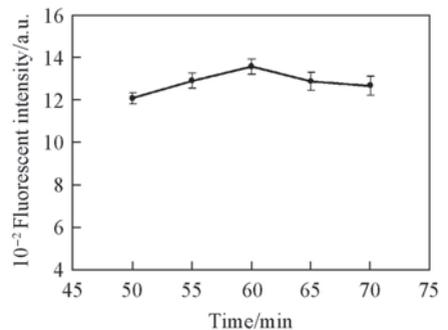


Fig.5 Effect of reduction time of NaBH₄

[Ag⁺] = 0.01 mmol/L.

考察了 S1 核酸酶与核酸探针的反应时间对检测结果的影响. 图 6 示出了 S1 核酸酶孵育时间 (15, 20, 25, 30, 35 和 40 min) 与荧光强度的关系图. 在无 S1 核酸酶存在时, AgNCs 荧光强度随着时间的增加先升高后稍微下降并缓慢趋于稳定; 而 S1 核酸酶存在时, 体系的荧光强度随着时间的增加先下降后略微升高继而趋于稳定. 综合考察空白样品和目标样品的荧光强度值, 在 25 min 处具有较好的信背比, 故选择 25 min 为 S1 核酸酶与核酸探针的最佳反应时间.

2.4 S1 核酸酶的定量检测

为了测试该传感探针对于 S1 核酸酶的灵敏度, 逐渐改变传感体系中 S1 核酸酶的加入量, 在优化的实验条件下扫描其荧光光谱 [图 7(A)], 绘制了荧光信号 F/F_0 与 S1 核酸酶浓度的关系图 [图 7(B)]. 可见, 该传感体系荧光强度随着 S1 核酸酶浓度的增加而依次递减. 这种现象表明, 随着 S1 核酸酶浓度的增加, 富含胞嘧啶 (C) 的 ssDNA 更多地被降解为小的 DNA 片段, 使其无法形成 AgNCs, 从而导致荧光强度下降. 在 $5.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$ 范围内, 体系荧光信号 (F/F_0) 与 S1 核酸酶浓度呈线性关系, 线性方程可拟合为 $F/F_0 = -179.1c + 0.9235$, $R=0.9904$ (c 为 S1 核酸酶的浓度). 根据 3 倍信噪比原则 ($S/N \geq 3$), 可计算出检测 S1 核酸酶的最低浓度为 $2.0 \times 10^{-6} \text{ U}/\mu\text{L}$. 可见, 该传感探针对于 S1 核酸酶的检测具有高灵敏性.

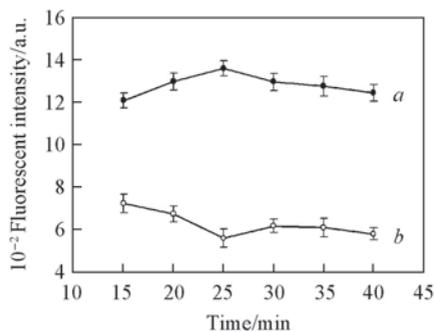
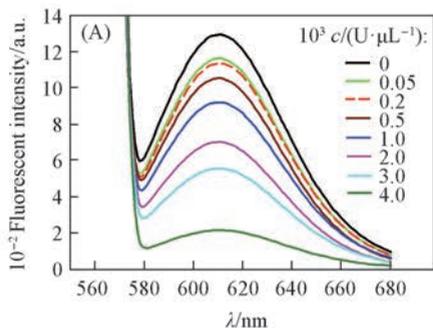


Fig.6 Effect of digesting time in the absence (a) and presence (b) of $3.0 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$ S1 nuclease

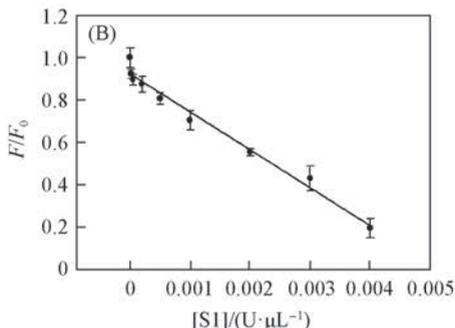


Fig.7 Fluorescence spectra of the proposed assay in various concentrations of S1 nuclease (A) and plot of fluorescence ratio (F/F_0) of the proposed sensor with a series of S1 nuclease concentrations (B)

(B) F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and the presence of S1 nuclease inputs, respectively.

2.5 选择性考察

在优化的实验条件下, 考察了 $4.0 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$ S1 核酸酶以及 $4.0 \times 10^{-2} \text{ U}/\mu\text{L}$ Bst 聚合酶、凝血酶、外切酶 III、*E. coli* 连接酶和 $4.0 \text{ mg}/\text{mL}$ BSA 对合成 AgNCs 的 DNA 单链的影响. 如图 8 所示, 各干扰物质对合成 AgNCs 的 DNA 单链的影响不明显, 表明该荧光探针体系对于 S1 核酸酶具有良好的选择性.

2.6 回收率的测定

为了验证该方法对实际样品中 S1 核酸酶检测的可行性, 选择 RPMI 1640 细胞培养基样品作为实际样品, 在最佳的实验条件下, 采用加标回收法测定加入标准浓度 S1 核酸酶溶液

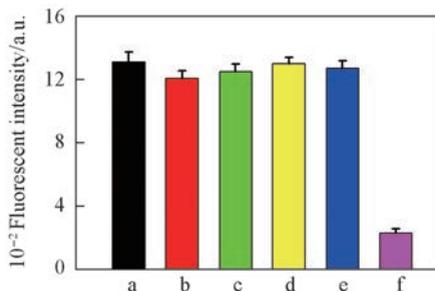


Fig.8 Bar chart of the fluorescence responses of Thrombin (a), *E. coli* ligase (b), Exo III (c), BSA (d), Bst polymerase (e) and S1 nuclease (f) using the probe system

a. $4.0 \times 10^{-2} \text{ U}/\mu\text{L}$; b. $4.0 \times 10^{-2} \text{ U}/\mu\text{L}$; c. $4.0 \times 10^{-2} \text{ U}/\mu\text{L}$; d. $4.0 \text{ mg}/\text{mL}$; e. $4.0 \times 10^{-2} \text{ U}/\mu\text{L}$; f. $4.0 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{L}$.

前后的荧光强度.同时,在加入 S1 核酸酶时,加入 1.0 mmol/L 硝酸锌来保护核酸酶活性,结果列于表 2.可见,该荧光探针检测 RPMI 1640 细胞培养基中 S1 核酸酶的回收率达到 91.8%~109.5%,且每个样品的相对标准偏差(RSD)<10%,说明该方法对样品中 S1 核酸酶的检测具有可行性.

Table 2 Recoveries of S1 nuclease in RPMI 1640 cell medium

Sample	10^3 Added/(U · μL^{-1})	10^3 Found/(U · μL^{-1})	Recovery(%)	RSD(%)
1	0.2000	0.1849	92.5	8.7
2	0.4000	0.3671	91.8	9.1
3	2.000	2.189	109.5	7.7
4	4.000	3.782	94.6	8.7

3 结 论

利用由富 C-ssDNA 合成的 AgNCs 作为功能化探针,发展了一种简便、高效、灵敏地检测 S1 核酸酶的方法.该荧光探针对于 S1 核酸酶在 $5.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3}$ U/ μL 范围内表现出良好的线性响应关系,检出限达 2.0×10^{-6} U/ μL .该方法具有良好的选择性,可用于实际样品 RPMI 1640 细胞培养基中 S1 核酸酶的检测,在生命分析领域具有良好的应用价值.

参 考 文 献

- [1] Xu X. Y., Han M. S., Mirkin C. A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2007**, *46*, 3468—3470
- [2] Tang Y. L., Feng F. D., He F., Wang S., Li Y. L., Zhu D. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 14972—14976
- [3] Nishino T., Morikawa K., *Oncogene*, **2002**, *21*, 9022—9032
- [4] Ceska T. A., Sayers J. R., *Trends Biochem. Sci.*, **1998**, *23*, 331—336
- [5] West S. C., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2003**, *4*, 435—446
- [6] Wiegand R. C., Godson G. N., Radding C. M., *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 8848—8855
- [7] Desai N. A., Shankar V., *FEMS Microbiol. Rev.*, **2003**, *26*, 457—491
- [8] Halford S. E., Goodall A. J., *Biochem.*, **1988**, *27*, 1771—1777
- [9] Mouratou B., Rouyre S., Pauillac S., Guesdon J. L., *Anal. Biochem.*, **2002**, *309*, 40—47
- [10] Fliess A., Wolfes H., Rosenthal A., Schwellnus K., Blöcker H., Frank R., Pingoud A., *Nucleic Acids Res.*, **1986**, *14*, 3463—3474
- [11] Mclaughlin L. W., Benseler F., Graeser E., Piel N., Scholtissek S., *Biochem.*, **1987**, *23*, 7238—7245
- [12] Cao R., Li B. X., *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 2865—2867
- [13] Ding J. W., Qin W., *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, *47*, 559—565
- [14] Wang Z. Y., Zhao J., Bao J. C., Dai Z. H., *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2016**, *8*, 827—833
- [15] Hillier S. C., Frost C. G., Jenkins A. T., Raven H. T., Keay R. W., Flower S. E., Clarkson J. M., *Bioelectrochem.*, **2004**, *63*, 307—310
- [16] Zhou Z. X., Zhu J. B., Zhang L. B., Du Y., Dong S. J., Wang E. K., *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 2431—2435
- [17] He Y., Jiao B. N., Tang H. W., *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 18294—18300
- [18] Li J. T., Zhao Q., Tang Y. L., *Sensors*, **2016**, *16*, 865—868
- [19] Xu W., Peng L., Li B., Xie Z. H., Tong C. Y., Liu B., *Behav. Genet.*, **2016**, *7*, 42—47
- [20] Liu Z. D., Hu P. P., Zhao H. X., Li Y. F., Huang C. Z., *Anal. Chim. Acta*, **2011**, *706*, 171—175
- [21] Swihart M. T., Girshick S. L., *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 64—76
- [22] Liu L. L., Tai X. S., Yu G. L., Guo H. M., Meng Q. G., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2016**, *32*(3), 443—450
- [23] Yuan Y., He X. X., Shi H., Wang K. M., Wu X., Huo X. Q., *Chem. J. Chinese Universities*, **2010**, *31*(11), 2167—2172(袁媛, 何晓晓, 石慧, 王柯敏, 伍旭, 霍希琴. 高等学校化学学报, **2010**, *31*(11), 2167—2172)
- [24] Lee J. Y., Park J. H., Lee H. H., Kim H. I., Kim W. J., *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*, 2616—2621
- [25] Zhang M., Liu Y. Q., Yu C. Y., Yin B. C., Ye B. C., *Analyst*, **2013**, *138*, 4812—4817
- [26] Qian Y. X., Zhang Y. D., Lu L., Cai Y. A., *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, *51*, 408—412
- [27] Latorre A., Somoza A., *ChemBioChem.*, **2012**, *13*, 951—958
- [28] Judy M. O., Liu C., Yeh H. C., *Nanoscale*, **2013**, *5*, 8443—8461
- [29] Petty J. T., Story S. P., Hsiang J. C., Dickson R. M., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2013**, *4*, 1148—1155
- [30] Tian X., Kong X. J., Zhu Z. M., Chen T. T., Chu X., *Talanta*, **2015**, *131*, 116—120
- [31] Yuan Y. J., Li W. H., Liu Z. L., Nie Z., Huang Y., Yao S. Z., *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, *61*, 321—327

- [32] Qiu X., Wang P., Cao Z. J., *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, *60*, 351—357
- [33] Xu H. X., Suslick K. S., *ACS Nano*, **2010**, *4*, 3209—3214
- [34] Cathcart N., Kitaev V., *J. Phys. Chem. C*, **2010**, *114*, 16010—16017
- [35] Sun X. P., Dong S. J., Wang E. K., *Macromolecules*, **2004**, *37*, 7105—7108
- [36] Dickerson M. B., Sandhage K. H., Naik R. R., *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 4935—4978
- [37] Yu J. H., Patel S. A., Dickson R. M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2028—2030
- [38] Huang Z. Z., Pu F., Hu D., Wang C. Y., Ren J. S., Qu X. G., *Chemistry*, **2011**, *17*, 3774—3780
- [39] Hu R., Liu Y. R., Kong R. M., Donovan M. J., Zhang X. B., Tan W. H., Shen G. L., Yu R. Q., *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, *42*, 31—35
- [40] Zhang H., Lin Z., Su X., *Talanta*, **2015**, *131*, 59—63
- [41] Petty J. T., Zheng J., Hud N. V., Dickson R. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5207—5212
- [42] Qing Z. H., He X. X., Qing T. P., Wang K. M., Shi H., He D. G., Zou Z., Yan L. A., Xu F. Z., Ye X. S., Mao Z. G., *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 12138

Cytosine-rich Oligonucleotide-templated Fluorescent Silver Nanoclusters for Sensitive Assay of S1 Nuclease[†]

WANG Xingxing, LI Panpan, HE Jinglin, OUYANG Wen, XIAO Hui, YANG Chan, CAO Zhong*

(Collaborative Innovation Center of Micro/nano Bio-sensing and Food Safety Inspection,

Hunan Provincial Key Laboratory of Materials Protection for Electric Power and Transportation,

School of Chemistry and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China)

Abstract A label-free fluorescence method for detection of S1 nuclease was developed using oligonucleotide-templated silver nanoclusters (AgNCs). Cytosine-rich single strand DNA (C-rich ssDNA) scaffolded silver nanoclusters were devised and synthesized as a functional probe. S1 nuclease can specifically recognize ssDNA, which is degraded into mononucleotide and oligonucleotide fragment under the optimum enzyme-catalyzed reaction condition. In the absence of S1 nuclease, the silver nanoclusters could be effectively synthesized by C-rich ssDNA, which produced obvious fluorescence intensity. In the presence of S1 nuclease, C-rich ssDNA probes were specifically recognized and effectively digested into small fragments. As a result, the silver nanoclusters synthesis was suspended leading a fluorescence reduction. A good linear correlation was obtained between fluorescence change and the logarithm of the Cu^{2+} ions concentration over the range from 5.0×10^{-5} U/ μL to 4.0×10^{-3} U/ μL . The detection limit was estimated as 2.0×10^{-6} U/ μL . The proposed method was highly selective and there were no obvious interfering effects on the determination from Bst polymerase, Thrombin, Exo III, *E. coli* ligase and BSA. The proposed sensor reveals good recovery rates from 91.8% to 109.5% in RPMI 1640 cell medium, indicating that the sensing system was feasible for the detection of S1 nuclease in practical samples. This label-free, simple and cost-effective strategy has a potential application in biomedical research and clinical early diagnosis.

Keywords Silver nanoclusters; Cytosine-rich ssDNA; S1 nuclease; Fluorescent probe

(Ed.: N, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31527803, 21545010, 21645009) and the Science and Technology Service Network (STS) Program of the Chinese Academy of Sciences, China (No. KFJ-SW-STS-173).