基于 DNA 酶的铀酰离子传感方法

姜交来[1],王 芸[1],肖吉群[1],云 雯[2],廖俊生[1,*]

1. 中国工程物理研究院 材料研究所,四川 绵阳 621907;
2. 重庆工商大学 环境与资源学院,重庆 400067

摘要:铀在核能发展中扮演着十分重要的角色,铀污染的防治是一个必须解决的问题,因此对铀酰离子(UO_2^{2+})的检测方法研究,成为了人们关注的热点。DNA 酶具有高度的特异性识别能力,是一种理想的生物探针。本文简要介绍了 DNA 酶的结构特征,概述了近期发展的基于 DNA 酶的 UO_2^{2+} 传感方法,包括比色法、荧光法、表面增强拉曼光谱法、共振光散射法和电化学法等,主要介绍了杂交链反应和目标催化发卡组装两种无酶放大技术。DNA 酶的使用使得传感器对 UO_2^{2+} 的检测能力基本上在纳摩尔量级,展现出很高的灵敏度,结合生物无酶放大技术后,传感器的性能得到数量级的提高。在未来传感技术简单、快速、灵敏和便携的趋势下,基于 DNA 酶的传感器具有非常广阔的应用前景。

关键词:铀酰离子;DNA 酶;生物传感器;荧光法;比色法;无酶放大
中图分类号:O657;TL211.7 **文献标志码**:A **文章编号**:0253-9950(2018)02-0089-11
doi:10.7538/hhx.2018.YX.2017006

Uranyl Ion Sensing Methods Based on DNAzyme

JIANG Jiao-lai[1], WANG Yun[1], XIAO Ji-qun[1], YUN Wen[2], LIAO Jun-sheng[1,*]

1. Institute of Materials, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621907, China;
2. College of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

Abstract: Uranium plays the key role during the development of nuclear energy. But an important issue that has to be solved is the preventability and controllability of uranium pollution. Thus to develop methodologies for uranyl ion detection has attracted much attention. DNAzyme shows great potential in sensors design because of its specific binding activity and exceptional high selectivity. Here, the structure and characters of DNAzyme were introduced briefly. The uranyl ion sensing methods based on DNAzyme developed recently were summarized, including colorimetry, fluorescence, surface-enhanced Raman scattering, resonance light scattering, electrochemistry, and so on. Two enzyme-free amplification tech-

收稿日期:2017-09-23;**修订日期**:2017-12-01
基金项目:中国工程物理研究院资助项目(TCSQ2016203, XK909-2)
作者简介:姜交来(1989—),男,湖南冷水江人,博士研究生,从事新型光、电学传感器的设计与性能研究,E-mail: jiangjiaolai@caep.cn
*通信联系人:廖俊生(1964—),男,四川德阳人,博士,研究员,核燃料循环与材料专业,从事环境的物理及化学分析技术研究,E-mail: jshliao711@163.com
网络出版时间:2018-03-16;**网络出版地址**:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2045.TL.20180315.1720.014.html

niques that exhibit ultrahigh sensitivity were also recommended. The sensitivity of those based-on DNAzyme methods for uranyl ion detection almost maintains nanomole magnitude. But the performance of the sensors is improved remarkably after combination with enzyme-free amplification techniques. With the developing tendency of sensors for easy fabrication, low cost and portability, it can be expected that DNAzyme-based sensors will have widely application prospect.

Key words: uranyl ion; DNAzyme; biosensors; fluorescence; colorimetry; enzyme-free amplification

铀是一种重要的核原料，被广泛用于核能、核电等领域，但在核燃料循环与乏燃料的后处理过程中，铀会不可避免地流入环境当中，引起地下水的污染[1]。铀在水溶液中主要以铀酰离子(UO_2^{2+})存在，铀的生物利用率很高，当人们暴露在较高的放射性铀环境中时，会给人的健康带来不良影响[2]。在核能发展过程中，铀污染的防治和控制是一个必须解决的问题，而环境中 UO_2^{2+} 浓度的检测与分析是防治铀污染的重要前提。因此对 UO_2^{2+} 的检测方法研究，成为了人们关注的热点。目前，国际上对铀元素的检测主要以传统的检测方法为主，包括 X 射线荧光光谱[3]、电感耦合等离子体原子发射光谱[4]、高效液相色谱[5]和质谱[6]。这些基于仪器的方法虽然灵敏度高和选择性好，但是一般分析成本高、需要昂贵的仪器、较复杂的前处理操作和不利于突发事件现场实时检测。因此开发一种简单、方便的铀分析方法的需求十分迫切[7]。近年来，随着各种检测技术的快速发展，很多新的检测技术被用于铀元素的检测，包括电化学法[8-9]、荧光法[10-11]以及表面增强拉曼光谱法[12-15]等。这些方法操作简便、快速、成本较低，但是抗干扰能力较差，灵敏度和稳定性有待提高，可以用作传统检测技术的补充，作为快速筛查的实时检测技术。

Liu 等[16]报道了一种特异性的 UO_2^{2+}-DNA 酶，该 DNA 酶对铀酰离子的选择性和识别绑定能力极高[17-18]。DNA 酶与其他检测技术具有很好的兼容性，作为一种特定的识别物，将 DNA 酶与各种信号转换策略结合可发展成各式各样的 UO_2^{2+} 传感器，如共振光散射法[19]、比色法[20]和荧光法[21]等。在未来传感技术简单化、便携化和高灵敏的趋势下，基于 DNA 酶的传感技术展现出很强的潜能。本文概述了近年来以 DNA 酶为基础发展起来的铀酰离子传感器的研究进展。

1 DNA 酶

DNA 酶(DNAzyme)是指具有催化功能的 DNA 片段，其本质上属于 DNA 分子。DNA 酶的发现突破了酶是蛋白质的传统观念，是人类对酶本质认识的飞跃[22-23]。DNA 酶一般可通过体外筛选或指数富集配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)得到。

1.1 DNA 酶的结构与作用机理

DNA 酶在结构上具有蛋白酶的一般特性，包括了结合部位和催化部位。下面以 UO_2^{2+}-DNA 酶为例，讲述 DNA 酶的结构特征(图 1[16])。DNA 酶由酶链和底物链两条 DNA 链通过碱基互补配对原则构成二级结构。DNA 酶链一般由左右两个侧链和一个环链两部分组成，左右两个侧链是底物识别和结合的部位，而环链为整个 DNA 酶的催化核心部位。DNA 酶单独存在时，几乎没有催化活性，只有在与相应的特异性辅助因子共存时，才表现出催化活性，如核苷酸、蛋白质、金属离子和小分子等。如有辅助因子 UO_2^{2+} 存在时，UO_2^{2+} 与酶链的中心环状部位结合，促使酶链对底物链的 rA 位置剪切，rA 不稳定而水解，使得底物链变成两条短链，从酶链上脱落下来[17, 24]。正因如此，DNA 酶作为一个理想的识别元素，广泛用

图 1 UO_2^{2+}-DNA 酶的二级结构及序列[16]

Fig. 1 Structure and sequences of UO_2^{2+}-DNAzyme[16]

于一系列金属离子的传感,包括:Pb^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Cd^{2+}、Hg^{2+}等多种金属离子[25-28]。

1.2　DNA 酶的特点

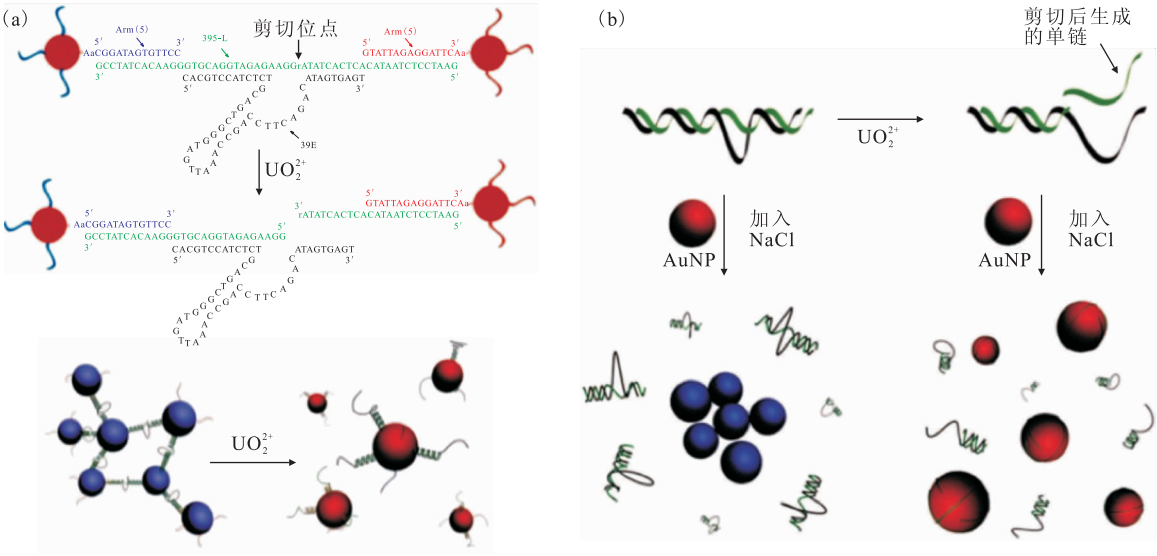
DNA 酶作为一种理想生物探针具有以下特点。(1) 序列容易确定。相比于蛋白酶,DNA 酶为简单的 DNA 序列,分子量小,且序列的确定不需要依赖于动物细胞,直接可以通过体外筛选或者 SELEX 技术得到,准确度高。除了二价金属离子 DNA 酶,近期三价镧系离子的 DNA 酶也已经筛选出来[29]。(2) 容易合成、成本低廉。DNA 酶的序列一旦确定,就可以通过化学方法合成,成本非常低廉,批间误差几乎为零。(3) 稳定性好。DNA 酶经过多次变性复性过程之后,仍然具有很强的活性,能够在非常苛刻的实验条件下使用。(4) 容易修饰和集成。DNA 酶的两端可以随意进行各种生物和化学修饰,因此可以作为传感器件的一个小单元与各种各样的载体单元、信号放大策略、信号响应技术等集成,构成了丰富多彩的传感器。所以,DNA 酶的开发及应用已经引起越来越多研究人员的关注,成为生物医学、分析化学、分子生物学研究的热门课题之一[30-31]。

2　基于 DNA 酶的 UO_2^{2+} 传感方法

将 DNA 酶与各种可便携使用的信号转换策略结合,如比色法、电化学法、荧光光谱法、增强拉曼光谱法、共振光散射法等,可设计出相应的便携式传感器,用于实际样品的现场实时检测。

2.1　比色法

比色法是基于分子识别探针与目标物作用前后体系颜色的变化来对目标物进行定量检测的,可用紫外-可见吸收光谱仪读出颜色变化程度。分散的金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)溶胶为酒红色,一旦外界条件改变使 AuNPs 聚集后,溶液就会由红色向蓝色改变。因此可以利用 AuNPs 溶胶颜色变化的特性来设计比色传感器。用 DNA 酶对 AuNPs 进行标记,使得 AuNPs 间通过 DNA 酶相互连接而聚集,溶液变为蓝色,当有 UO_2^{2+} 存在时,UO_2^{2+} 剪切 DNA 酶,AuNPs 则又会重新分散,溶液变为红色,由此可实现 UO_2^{2+} 的定量检测,如图 2(a)所示[32]。DNA 酶标记的 AuNPs 比色传感器稳定性比较好,受外界干扰较小,但由于 AuNPs 的释放是基于 UO_2^{2+} 诱导催化酶链断裂的反应,动力学上进行缓慢,所以需要较长的反应时间,灵敏度较低,检出下限为 50 nmol/L。无标记的 AuNPs 比色传感器需要的反应时间短、灵敏度较高,如图2(b)所示[32]。无标记的比色传感原理为单链 DNA 和双链 DNA 对 AuNPs 的不同吸附特性。单链 DNA 具有柔性,很容易吸附在 AuNPs 表面,DNA 中磷酸骨架的强负电特性使得 AuNPs 非常稳定,即使在2.5 mol/L的 NaCl 溶液中也能够稳定存在。而双链DNA的刚性特征无法吸附在AuNPs表



(a)——有标记,(b)——无标记

图 2　AuNPs 比色传感[32]

Fig. 2　Sensor based on AuNPs disassembly[32]

面，有盐存在时无法保护 AuNPs，导致 AuNPs 聚集，溶液颜色由红色变为蓝色。这种无标记的 AuNPs 比色传感器在 1～100 nmol/L 内具有很好的线性关系，检出下限为 1 nmol/L，低于美国国家环境保护局规定的环境中允许存在的 UO_2^{2+} 浓度最大值(130 nmol/L，http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm)。

2.2 荧光法

某些物质被激光照射激发后跃迁到激发态，在退激过程中发出比激发波长长的荧光，从而进行定性或定量分析，这种方法被称为荧光分析法。荧光分析法具有与质谱媲美的灵敏度高和选择性好的优点，且荧光光度计构造简单，使用方便，因此被广泛用于化学分析中[33-34]。用荧光物质对 DNA 酶进行标记，就能实现对 UO_2^{2+} 的定量检测。Liu 等[16]用荧光剂 FAM 和猝灭剂 Black Hole 分别对 DNA 酶底物链的 5′端和 3′端进行标记，再用猝灭剂标记酶链的 3′端，没有 UO_2^{2+} 时，由于 DNA 酶的双螺旋二级结构，FAM 被酶链上的猝灭剂猝灭，荧光信号很弱。一旦有 UO_2^{2+} 存在，UO_2^{2+} 剪切 DNA 酶的底物链，释放出末端带有 FAM 的单链 DNA，荧光信号得以恢复。根据 UO_2^{2+} 的浓度不同，释放出的单链 DNA 的量不同，荧光信号恢复程度不同，以实现 UO_2^{2+} 的定量检测。由于荧光分析法的高灵敏特性，这种基于 DNA 酶的荧光传感器的检测下限达到 45 pmol/L。但是 DNA 酶上底物链和酶链猝灭剂的修饰增加了实验成本，也增加了实验的复杂性。Xiao 等[35]利用连续四个鸟嘌呤(G)的猝灭荧光特性，在酶链的 5′端设计四个连续的 G，底物链的 3′端修饰荧光剂，构建了一个比较简单的荧光传感器，检出限为 0.41 nmol/L。这种传感方法能够比较精确地测定矿物和自来水中的铀含量，在环境监测、铀矿筛选中具有很好的应用前景。

除了环境中的检测，了解细胞内的 UO_2^{2+} 水平也是一样的重要，这有助于帮助人们获悉金属离子在细胞内的平衡分布和掌握有关疾病病因。然而由于技术水平的限制，细胞内的 UO_2^{2+} 检测一直面临很大挑战。最近，Zhou 等[36]提出了一种新颖的双显色方法，同时检测细胞内的 UO_2^{2+} 和 Pb^{2+}。用两种荧光剂和猝灭剂分别对两种 DNA 酶的四条单链进行修饰，在使用前，两种 DNA 酶通过热处理组装成一个四面体纳米结构，荧光猝灭。各自在 UO_2^{2+} 和 Pb^{2+} 的作用下，纳米结构恢复不同发射波长的荧光信号，检出限分别为 0.6 nmol/L 和 3.9 nmol/L。

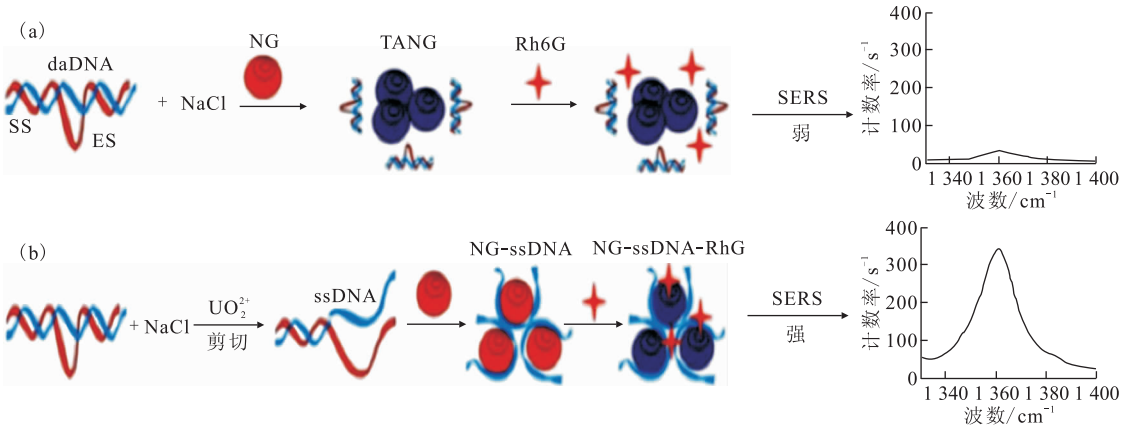
2.3 增强拉曼光谱法

随着纳米科学与技术的发展，表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy，SERS)技术近期发展十分迅速。粗糙化的贵金属纳米结构是产生 SERS 效应的必要条件，SERS 增强主要源自纳米结构表面等离子体发生共振产生的增强局域电磁场。增强因子与局域电场的 4 次方成正比，能达到 10^6～10^{10} 量级，与纳米结构有关[37-38]。由于 SERS 的高分辨和超灵敏特性，以及不需要对被分析样品进行任何复杂的预处理，SERS 技术在催化、光谱电化学、传感、单分子检测等领域均有广泛的应用[39-42]。

蒋治良等[43]用罗丹明 6G(Rhodamine 6G，R6G)作为探针分子，基于 DNA 酶构建了 UO_2^{2+} 的 SERS 生物传感器，线性范围为 5～125 nmol/L，示意图示于图 3。其传感原理为：无 UO_2^{2+} 时，AuNPs 在盐溶液中聚集，R6G 很难吸附在 AuNPs 表面，SERS 信号很弱；有 UO_2^{2+} 存在时，UO_2^{2+} 剪切 DNA 酶释放的单链 DNA(single strand DNA，ssDNA)吸附在 AuNPs 表面，与 R6G 形成 NPs-ssDNA-R6G 共轭体，产生 R6G 的 SERS 信号。但由于整个 Raman 测试过程是在溶液中进行，灵敏度较低，检出限为 0.1 nmol/L。

2.4 共振光散射法

共振光散射光谱(resonance light scattering，RLS)具有简单、快速和灵敏的优点，常用于痕量蛋白质、核苷酸和无机离子检测[44]。入射光激发散射粒子产生等波长的瑞利散射，当瑞利散射接近于分子吸光带时，电子因共振而强烈吸收光的能量而产生再次散射，这一过程被称为共振光散射(RLS)。RLS 属于同步光谱，具有极高的强度，因而不需要昂贵激光光源，只需在普通荧光分光光度计上选择合适的激发和发射通带宽度，采用相等的激发和发射波长同时扫描，即可得到散射粒子的共振光散射光谱。仪器条件一定时，共振散射光的强度与散射粒子的浓度成正比，这是 RLS 定量的基础。基于 AuNPs 聚集后 RLS 信号改变的事实，周斌等[19]构建了一种 UO_2^{2+} 的 RLS 传感方法。将 AuNPs 用 DNA 酶进行标记，磷酸骨架的负电特性使其稳定性增加，不容易聚集。当有 UO_2^{2+} 存在时，剪切 DNA 酶，降低了 AuNPs 的稳定性，使得 AuNPs 在盐诱导下发生聚集，从



(a)——无 UO_2^{2+},(b)——有 UO_2^{2+}

图 3　UO_2^{2+} SERS 传感示意图[43]

Fig. 3　Scheme of label-free SERS detection of UO_2^{2+} [43]

而产生增强的共振散射光。这种方法在 UO_2^{2+} 浓度为 13.6～150 nmol/L 内呈线性关系,检出限为 4.09 nmol/L。有标记的 AuNPs 存在反应时间长、过程复杂的不足,他们[45]又设计了一种基于无标记 AuNPs 的 RLS 方法,利用 UO_2^{2+} 剪切能抗核酶的适配体,释放柔性单链 DNA 来保护 AuNPs,使得 RLS 信号减弱,检出下限为 6.7 nmol/L。通过 UO_2^{2+} 剪切 DNA 酶同样也可实现 UO_2^{2+} 的 RLS 检测[46]。但这两者均是基于关闭模式的检测方式,因而灵敏度会受到一定限制。

2.5　电化学法

电化学仪器具有便携性好、灵敏度高、响应速度快以及成本低廉的优点,为实现基于 DNA 酶的传感器的实际应用提供了很大可能[47-48]。荧光检测方法一般在溶液中进行,而电化学传感器可将 DNA 酶固定在电极表面,有效地消除了溶液检测中的背景信号,使检测结果更为可靠。Tang 等[49]利用 UO_2^{2+} 剪切 DNA 酶前后,二茂铁电信号的变化实现对 UO_2^{2+} 的检测。将二茂铁修饰的 DNA 酶固定在金电极上,UO_2^{2+} 作用后,二茂铁从电极上脱落,使得电信号减弱,但同样的这种关闭的方式使得传感器的灵敏度受到了限制。Ma 等[50]也通过类似的方法引入电化学信号物质 $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ 来定量检测 UO_2^{2+}。

2.6　其他方法

任何一种可捕捉到的信号变化都可以用来设计传感器,这给传感领域带来了很大的发展契机,传感器器件的种类也是丰富多彩。如 Yin 等[51]利用负载在磁弹性带状传感器表面的氧化石墨烯系统在 UO_2^{2+} 作用前后共振频率的变化,构建了超灵敏的无线磁弹性传感器。Gwak 等[52]设计了一种等离子体纳米线空隙传感器,有效减少了基于 SERS 的传感方法受纳米材料粒径分布和聚集不可控的影响,提高了传感器的灵敏度和重复性能。

3　DNA 酶与放大技术的结合

基于 DNA 酶的传感器的检测性能往往与相应的信号转化方法有关,但可供便携使用的分析设备的灵敏度存在一定限值,因此很难再提升传感器的检测灵敏度,这些传感器的检测水平一般处于纳摩尔量级。但是高灵敏度的检测技术一直是分析技术发展的方向,为了实现对超低浓度含量的测定,常常与一些信号放大手段相结合。例如生物医学领域中常常需要结合各种酶进行直接或间接的信号扩增来实现对痕量 DNA 片段的检测,如核酸内切酶、聚合酶和核酸外切酶等。

3.1　化学放大技术

利用纯化学的方法将传感信号进行再放大,以获得更高的检测灵敏度,将这种技术称之为化学放大技术。化学放大技术具有简单、便宜和容易操作的优点,能有效地将传感器的灵敏度提升至两个数量级以上。例如,蒋治良等[53]利用单个 AuNP 和 AuNPs 聚集体的催化活性不同这一特性,引入氯金酸($HAuCl_4$)-抗坏血酸(ascorbic acid, AA)-十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)催化放大反应体系,用 AuNPs 催化该体系 $HAuCl_4$ 的还原反应,

通过还原产生的 AuNPs 的共振散射光信号的变化，来实现 UO_2^{2+} 的 RLS 定量检测。同时他们还利用这一特性又引入碘化银(AgI)-没食子酸催化放大反应体系，用 AuNPs 催化该体系 Ag^+ 的还原，根据还原后的银溶胶的颜色变化来达到 UO_2^{2+} 的比色检测[54]。虽然化学放大方法的灵敏度很高，但是反应体系很容易受到外界干扰，导致重复性有所降低，且普适性较差。

3.2 基于酶的放大技术

辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)是使用最为广泛的一种标记酶，它具有催化 H_2O_2 氧化四甲基联苯胺(3,5,3′,5′-tetramethylbenzidine, TMB)的功能，使 TMB 溶液由无色变为蓝色[55]。用 HRP 来标记抗体、蛋白质或其他物质，即可用于定位分析和定量检测当中。Zhang 等[56]通过使用 DNA 酶功能化的磁珠(magnetic beads, MB)和基于 AuNPs 的 HRP 催化氧化 TMB 放大作为信号产生物，实现水溶液中痕量 UO_2^{2+} 的高灵敏、高特异性检测。图 4 为痕量 UO_2^{2+} 比色检测的示意图。这里使用 MB 的优点有三个：一是 MB 容易被修饰，能够从复杂的样品中提取被分析物信息；二是 MB 能够很容易被磁铁富集，增强了信号强度；三是 MB 的使用减少了分析样品的预处理和纯化步骤，使因为清洗和分离步骤所产生的基体效应减少到最小[57]。

首先将 MB 用链霉亲和素功能化，那么生物素修饰的 DNA 酶就能通过生物素-链霉亲和素特异性相互作用绑定在 MB 表面。在 UO_2^{2+} 的作用下，DNA 酶被剪切，释放出单链 DNA 片段。然后在 AuNPs 表面通过 Au-S 键固定与释放的单链 DNA 互补的 DNA(Lp-SH)，使得 AuNPs 富集在 MB 表面，同时在 AuNPs 表面固定大量的其他链 DNA(生物素-Sp-SH)以通过生物素-链霉亲和素相互作用捕获 HRP，来实现 HRP 的富集放大。再利用 HRP 催化 H_2O_2 氧化 TMB 产生比色传感信号，从而间接检测 UO_2^{2+}。通过这样一个层层递进的设计，达到三重放大效果，一是 AuNPs 表面的 HRP 富集放大，二是 MB 表面的 AuNPs 富集放大，三是磁铁对 MB 的富集放大，因而展现超高的检测灵敏度，检出下限达 7 pmol/L。

3.3 生物无酶放大技术

基于酶的放大方法往往需要复杂的实验步骤和高昂的检测成本。此外，在信号放大过程中可能出现假阳性。因此发展简单、高效和成本低廉的无酶放大技术显得尤为重要。最近已有多种无酶放大技术被开发出来，如杂交链式反应技术和目标催化放大技术等。

杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)是一种新型的无酶放大技术，2004 年首先由加州理工大学的Pierce小组报道[58]。HCR的

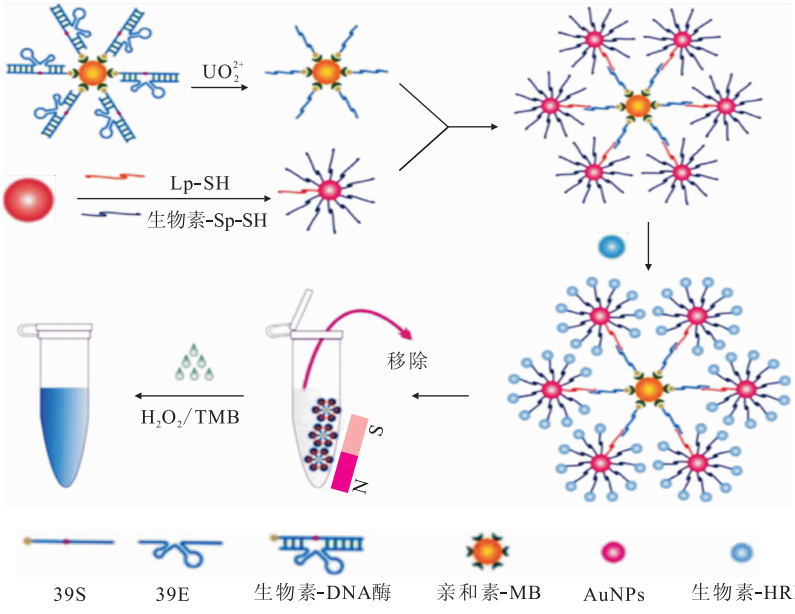


图 4 基于 MB 和 AuNPs 的酶催化放大 TMB 显色传感[56]

Fig. 4 Schematic illustration for visual detection of UO_2^{2+} by using DNAzyme-functionalized MBs and AuNPs-based enzymatic catalysis of TMB[56]

优点是利用核酸之间的竞争杂交作为能量来源实现信号放大,在室温下进行,不需要酶的辅助和其他复杂条件。整个放大体系由两种分子发卡组成,每种分子发卡包括茎部、环部和单链末端三部分。在一条单链靶 DNA 的引发下,两种分子发卡相互作用,生成长链的双链 DNA,通过在 DNA 上修饰或者嵌入信号物来实现信号放大的目的。本课题组[59]基于 DNA 酶和 HCR 放大技术,构建了超灵敏的 UO_2^{2+} 电化学生物传感器,其制备过程示于图 5。首先将巯基修饰的 DNA 酶结构通过 Au-S 键作用固定到金电极表面,并通过 6-巯基正己醇(6-mercapto-1-hexanol, MCH)进行占位修饰,MCH 单层能有效提高 DNA 酶活性。UO_2^{2+} 存在时,DNA 酶会被激活对 S-DNA 进行剪切生成单链 S-DNA 片段。生成的单链 DNA 片段与发卡 1(Hairpin 1, H1)的 1-2 段互补配对,打开 H1 的发卡结构,暴露出的 3-2* 段 DNA 又与发卡 2(Hairpin 1, H2)的 3*-2 段互补配对,打开 H2 的发卡结构,又暴露出 1*-2* 段 DNA。暴露出的 1*-2* 段序列与 UO_2^{2+} 剪切 DNA 酶生成的单链 S-DNA 片段序列相同,又会继续催化 H1 和 H2 杂交,如此往复循环,生成长的双链 DNA。将电化学信号物质亚甲基蓝(methylene blue, MB)嵌入到双链 DNA 之间,通过检测 MB 的信号就能反映出 UO_2^{2+} 浓度。而没有 UO_2^{2+} 时,H1 和 H2 能够通过分子发卡茎部的 14 个碱基对稳定存在,MB 嵌入金电极的量很少,电信号很弱。这种将DNA酶与HCR相结合的传感方法,展现出超高的灵敏度,线性范围跨越两个数量级,检测下限达到 20 pmol/L。

目标催化发卡组装(target catalyzed hairpin assembly, TCA)技术,也是首先由 Pierce 小组发现并报道[60]。整个体系由两种或者两种以上的分子发卡组成,分子发卡结构与 HCR 反应中的发卡一样,由茎部、环部和末端单链组成。没有目标 DNA 时,分子发卡通过茎部的碱基对而稳定存在于水溶液中。但是当目标 DNA 存在时,目标 DNA 会与 H1 杂交从而打开 H1,释放出单链片段,再与 H2 杂交,诱导 H2 发卡结构打开。打开的 H2 的碱基序列与目标 DNA 相同,所以打开的 H2 与 H1 互相杂交,生成双链 DNA 从而将目标 DNA 替换下来,从而使目标 DNA 继续去触发下一循环 H1 与 H2 的杂交反应。通过这种催化反应模型,少量的目标 DNA 就可以催化大量的 H1 和 H2 相互杂交,生成双链 DNA 产物,从而达到信号放大的效果。TCA 与 HCR 最大的差别在于 TCA 反应中目标 DNA 参与催化整个反应的进行,而不包含在催化产物中,只是起到类似"催化剂"的作用。而在 HCR 反应中,目标 DNA 触发分子发卡之间的杂交反应,同时包含在所生成的长链 DNA 中。另外 TCA 具有更高的放大效率,通常 HCR 的放大效果为 2～5 倍/h,而 TCA 的放大效果可以达到20～50 倍/h,因而可以实现更高的灵敏度[61]。

基于 TCA 更高放大效率的优点,本课题组[62]结合AuNPs比色传感和TCA技术构造了

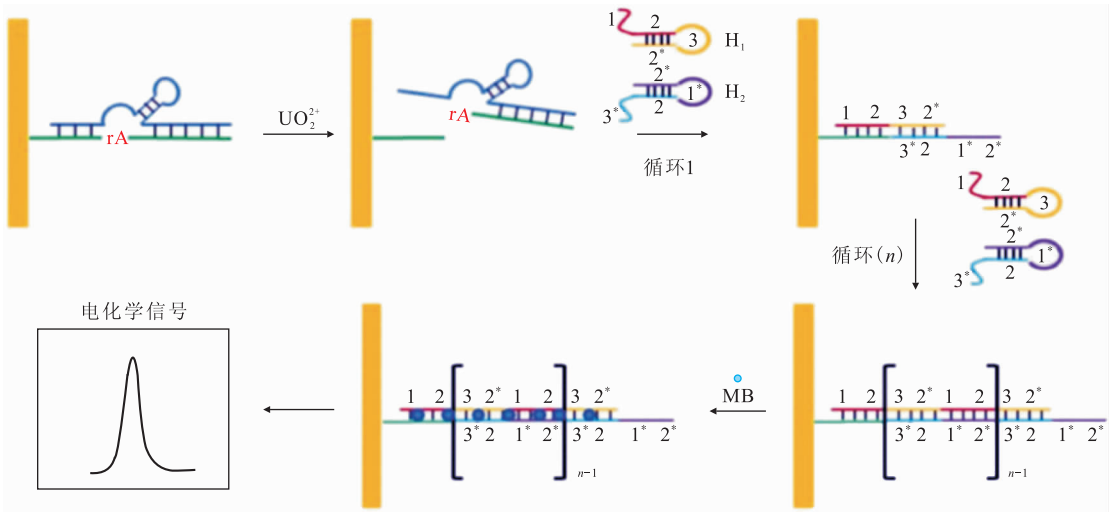


图 5　基于 DNA 酶和 HCR 的电化学生物传感[59]

Fig. 5　Schematic illustration of sensor for UO_2^{2+} detection based on DNAzyme and HCR amplification[59]

超灵敏的 DNA 传感平台，DNA 的检出限低至 0.01 pmol/L。此外，基于 DNA 酶和 TCA 放大技术，又在金电极上设计了一种电化学传感器用于 UO_2^{2+} 传感（图 6[63]）。H1 的 5′端用-SH 修饰，固定于电极表面。H1 茎部的碱基数量相对于其他传感器较长，这样可以更好保持其稳定性[64]。DNA 酶在 UO_2^{2+} 的作用下生成单链 DNA 片段，与固定在电极表面的 H1 杂交，打开 H1，形成部分双链结构。打开的 H1 与 H2 互补杂交，打开 H2。打开的 H2 又反过来与 H1 杂交，将 DNA 片段替换下来，使 DNA 片段触发下一个循环杂交过程。这种设计中，只需要少量的 DNA 片段就可以催化 H1 和 H2 之间的分子发卡自组装，生成大量双链 DNA。这种传感器在 UO_2^{2+} 浓度为 0.01～1 nmol/L 时具有很好的线性关系，检出限低至 2 pmol/L。

表 1 列出了上述具有代表性的基于 DNA 酶的 UO_2^{2+} 传感方法。由表 1 可知，传感器的性能受到信号转化策略的限制。在传感器设计中，AuNPs 和 TBM 显色、荧光剂和猝灭剂、金电极、SERS 结构、磁珠等是最为常用的物质，链霉亲和素-生物素相互作用、共轭作用、Au-S 键等为常见的相互作用方式。DNA 酶的使用使得传感器对 UO_2^{2+} 的检测能力基本上在纳摩尔量级，展现出很高的灵敏度。再结合一些化学和生物放大技术，又能使传感器的灵敏度提高 2 个数量级以上。

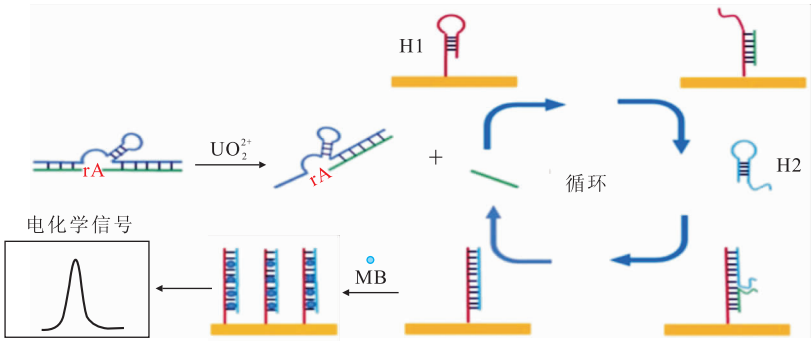


图 6 基于 DNA 酶和 TCA 放大的电化学传感方法[63]

Fig. 6 Schematic illustration for UO_2^{2+} detection based on DNAzyme and TCA amplification[63]

表 1 基于 DNA 酶的 UO_2^{2+} 传感方法

Table 1 UO_2^{2+} sensing methods based-on DNAzyme

方法	线性范围	检出限(LOD)	信号模式	特点
有标记的 AuNPs 比色法[32]	50～500 nmol/L	50 nmol/L	打开	AuNPs 聚集变色
无标记的 AuNPs 比色法[32]	1～100 nmol/L	1 nmol/L	关闭	AuNPs 聚集变色
荧光法[16]	0.1～20 nmol/L	45 pmol/L	打开	猝灭剂猝灭荧光
荧光法[35]	1.121～112.1 nmol/L	0.41 nmol/L	打开	四个连续 G 猝灭荧光
荧光法[36]	1～60 nmol/L	0.6 nmol/L	打开	同时检测 UO_2^{2+}和 Pb^{2+}
SERS 法[43]	5～125 nmol/L	1.6 nmol/L	打开	NPs-ssDNA-R6G 共轭
共振光散射法[19]	13.6～150 nmol/L	4.09 nmol/L	打开	AuNPs 聚集
共振光散射法[46]	2.08～20 nmol/L	0.62 nmol/L	关闭	阻止 AuNPs 聚集
电化学法[47]	2～14 nmol/L	1 nmol/L	关闭	二茂铁脱落
基于化学放大共振光散射法[53]	0.67～60.3 nmol/L	50 pmol/L	关闭	AuNPs 催化氯金酸还原
基于化学放大的比色法[54]	0.083～0.67 nmol/L	15 pmol/L	打开	AuNPs 催化碘化银还原
酶催化放大比色法[56]	0.074～56 nmol/L	7 pmol/L	打开	酶催化 TMB 氧化变色
基于 DNA 酶和 HCR 的电化学法[59]	0.05～4 nmol/L	20 pmol/L	打开	两个分子发卡的 HCR
基于 DNA 酶和 TCA 的电化学法[63]	0.01～1 nmol/L	2 pmol/L	打开	两个分子发卡的 TCA

4　结论与展望

作为一种识别元素,DNA 酶具有选择性好、合成简单、易于储存和集成的优点。以 DNA 酶为基础,结合一些信号转换和放大策略,发展了大量的 UO_2^{2+} 传感方法,这些方法同样也可用于其他金属离子、小分子和核苷酸的检测。在未来传感技术简单、快速、灵敏和便携的趋势下,基于 DNA 酶的传感器具有非常广阔的应用前景。虽然基于 DNA 酶的传感方法发展迅速,但仍有很多问题仍待解决,如信号的重复性、传感器的稳定性、真正的便携性、环境介质的干扰等。因此,研究应该关注的重点是:着力提高传感器的实用性能;发展多种金属离子同时检测的传感器;设计可重复使用的便携式传感器件;在纳米科技发展的大浪潮下,结合一些新的纳米功能团,引入新的思想,发展超灵敏、高选择性和高重复性的传感方法,如无酶放大技术等。相信在众多科研人员的努力下,基于 DNA 酶的传感器必将取得极大的发展。

参考文献:

[1] Nelson A W. Understanding the radioactive ingrowth and decay of naturally occurring radioactive materials in the environment: an analysis of produced fluids from the marcellus shale[J]. Environ Health Perspect, 2015, 123(7): 689-696.

[2] Jones A D, Miller B G, Walker S, et al. A normative value pilot study: levels of uranium in urine samples from UK civilians[J]. Environ Res, 2007, 104(2): 216-223.

[3] Rathore D. Advances in technologies for the measurement of uranium in diverse matrices[J]. Talanta, 2008, 77(1): 9-20.

[4] Dejeant A, Bourva L, Sia R, et al. Field analyses of ^{238}U and ^{226}Ra in two uranium mill tailings piles from Niger using portable HPGe detector[J]. J Environ Radioact, 2014, 137: 105-112.

[5] Jaison P, Telmore V M, Kumar P, et al. Determination of uranium in seawater samples by liquid chromatography using mandelic acid as a complexing agent[J]. J Chromatogr Sci, 2011, 49(9): 657-664.

[6] Xu M, Frelon S, Simon O, et al. Development of a non-denaturing 2D gel electrophoresis protocol for screening *in vivo* uranium-protein targets in procambarus clarkii with laser ablation ICP-MS followed by protein identification by HPLC-Orbitrap MS[J]. Talanta, 2014, 128(1): 187-195.

[7] Zhang X Y, Hu A, Zhang T, et al. Self-assembly of large-scale and ultrathin silver nanoplate films with tunable plasmon resonance properties[J]. Acs Nano, 2011, 5(11): 9082-9092.

[8] Badr I H, Zidan W, Akl Z. Cyanex based uranyl sensitive polymeric membrane electrodes[J]. Talanta, 2014, 118: 147-155.

[9] Becker A, Tobias H, Mandler D. Electrochemical determination of uranyl ions using a self-assembled monolayer[J]. Anal Chem, 2009, 81(20): 8627-8631.

[10] Lehmann S, Geipel G, Grambole G, et al. A novel time-resolved laser fluorescence spectroscopy system for research on complexation of uranium(Ⅳ)[J]. Spectrochim Acta A, 2009, 73(73): 902-908.

[11] Moema D, Nindi M M, Dube S. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography[J]. Anal Chim Acta, 2012, 730(11): 80-86.

[12] Dai S, Lee Y H, Yong J P. Observation of the surface-enhanced Raman scattering spectrum of uranyl ion[J]. Appl Spectrosc, 1996, 50(4): 536-537.

[13] Ruan C, Luo W, Wang W, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for uranium detection and analysis in environmental samples[J]. Anal Chim Acta, 2007, 605(1): 80-86.

[14] Bhandari D, Wells S M, Retterer S T, et al. Characterization and detection of uranyl ion sorption on silver surfaces using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Anal Chem, 2009, 81(19): 8061-8067.

[15] Dutta S, Ray C, Sarkar S, et al. Silver nanoparticle decorated reduced graphene oxide (rGO) nanosheet: a platform for SERS based low-level detection of uranyl ion[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5(17): 8724-8732.

[16] Liu J, Brown A K, Meng X, et al. A catalytic beacon sensor for uranium with parts-per-trillion sensitivity and millionfold selectivity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(7): 2056-2061.

[17] Brown A K, Liu J, He Y, et al. Biochemical characterization of a uranyl ion-specific DNAzyme[J]. Chembiochem, 2009, 10(3): 486-492.

[18] He Y, Lu Y. Metal-ion-dependent folding of a uranyl-specific DNAzyme: insight into function from

fluorescence resonance energy transfer studies[J]. Chemistry, 2011, 17(49): 13732-13742.

[19] Zhou B, Shi L F, Wang Y S, et al. Resonance light scattering determination of uranyl based on labeled DNAzyme-gold nanoparticle system[J]. Spectrochim Acta, Part A, 2013, 110: 419-424.

[20] Luo Y, Zhang Y, Xu L, et al. Colorimetric sensing of trace UO_2^{2+} by using nanogold-seeded nucleation amplification and label-free DNAzyme cleavage reaction[J]. Analyst, 2012, 137(8): 1866-1871.

[21] Wu P, Hwang K, Lan T, et al. A DNAzyme-gold nanoparticle probe for uranyl ion in living cells[J]. J Am Chem Soc, 2013, 135(14): 5254-5257.

[22] Breaker R R. DNA enzymes[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(5): 427-431.

[23] Liu J W, Lu Y. A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles[J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(22): 6642-6643.

[24] Cepedaplaza M, Null E L, Lu Y. Metal ion as both a cofactor and a probe of metal-binding sites in a uranyl-specific DNAzyme: a uranyl photocleavage study[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(20): 9361-9370.

[25] Liu M, Zhao H, Chen S, et al. A "turn-on" fluorescent copper biosensor based on DNA cleavage-dependent graphene-quenched DNAzyme[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(10): 4111-4116.

[26] Huang Y, Ma Y, Chen Y, et al. Target-responsive DNAzyme cross-linked hydrogel for visual quantitative detection of lead[J]. Anal Chem, 2014, 86(22): 11434-11439.

[27] Huang P J J, Liu J. Sensing parts-per-trillion Cd^{2+}, Hg^{2+}, and Pb^{2+} collectively and individually using phosphorothioate DNAzymes[J]. Anal Chem, 2014, 86(12): 5999-6005.

[28] Cheng Y, Huang Y, Lei J, et al. Design and biosensing of Mg^{2+}-dependent DNAzyme-triggered ratiometric electrochemiluminescence[J]. Anal Chem, 2014, 86(10): 5158-5163.

[29] Huang P J J, Lin J, Cao J, et al. Ultrasensitive DNAzyme beacon for lanthanides and metal speciation[J]. Anal Chem, 2014, 86(3): 1816-1821.

[30] Xue S, Jing P, Xu W. Hemin on graphene nanosheets functionalized with flower-like MnO_2 and hollow AuPd for the electrochemical sensing lead ion based on the specific DNAzyme[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 86: 958-965.

[31] Liu Y, Xiong E, Li X, et al. Sensitive electrochemical assay of alkaline phosphatase activity based on TdT-mediated hemin/G-quadruplex DNAzyme nanowires for signal amplification[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87: 970-975.

[32] Lee J H, Wang Z, Liu J, et al. Highly sensitive and selective colorimetric sensors for uranyl (UO_2^{2+}): development and comparison of labeled and label-free DNAzyme-gold nanoparticle systems[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(43): 14217-14226.

[33] Ou X, Hong F, Zhang Z, et al. A highly sensitive and facile graphene oxide-based nucleic acid probe: label-free detection of telomerase activity in cancer patient's urine using AIEgens[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 89(Pt 1): 417-421.

[34] Gallo P, Pisciottano I D M, Esposito F, et al. Determination of BPA, BPB, BPF, BADGE and BFDGE in canned energy drinks by molecularly imprinted polymer cleaning up and UPLC with fluorescence detection[J]. Food Chem, 2017, 220: 406-412.

[35] Xiao S J, Zuo J, Zhu Z Q, et al. Highly sensitive DNAzyme sensor for selective detection of trace uranium in ore and natural water samples[J]. Sens Actuators, B, 2015, 210: 656-660.

[36] Zhou W, Liang W, Li D, et al. Dual-color encoded DNAzyme nanostructures for multiplexed detection of intracellular metal ions in living cells[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 85: 573-579.

[37] Schlucker S. Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2014, 53(19): 4756-4795.

[38] Moskovits M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective[J]. J Raman Spectrosc, 2005, 36(6-7): 485-496.

[39] Jiang J, Wang S, Wu H, et al. Facile and rapid fabrication of large-scale silver nanoparticles arrays with high SERS performance[J]. RSC Adv, 2015, 5: 105820-105824.

[40] Xu M, Zhang Y. Hierarchical Ag mesostructures for single particle SERS substrate[J]. Appl Surf Sci, 2017, 393: 197-203.

[41] Kong X, Xi Y, Le Duff P, et al. Detecting explosive molecules from nanoliter solution: a new paradigm of SERS sensing on hydrophilic photonic crystal biosilica[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 88: 63-70.

[42] Zheng H, Ni D, Yu Z, et al. Preparation of SERS-active substrates based on graphene oxide/silver nano-

composites for rapid zdetection of L-Theanine[J]. Food Chem, 2017, 217: 511-516.

[43] Jiang Z, Yao D, Wen G, et al. A label-free nanogold DNAzyme-cleaved surface-enhanced resonance raman scattering method for trace UO_2^{2+} using rhodamine 6G as probe[J]. Plasmonics, 2012, 8(2): 803-810.

[44] Fan Y, Long Y F, Li Y F. A sensitive resonance light scattering spectrometry of trace Hg^{2+} with sulfur ion modified gold nanoparticles[J]. Anal Chim Acta, 2009, 653(2): 207-211.

[45] Zhou B, Wang Y S, Yang H X, et al. A sensitive resonance light scattering assay for uranyl ion based on the conformational change of a nuclease-resistant aptamer and gold nanoparticles acting as signal reporters[J]. Microchim Acta, 2014, 181: 1353-1360.

[46] 周斌,胡淦彬,杨慧仙,等.基于DNAzyme与铀特异性反应的共振光散射法检测铀[J].分析实验室, 2016(1):12-16.

[47] Lin Z, Li X, Kraatz H B. Impedimetric immobilized DNA-based sensor for simultaneous detection of Pb^{2+}, Ag^{+}, and Hg^{2+}[J]. Anal Chem, 2011, 83(17): 6896-6901.

[48] Xiao Y, Rowe A A, Plaxco K W. Electrochemical detection of parts-per-billion lead via an electrode-bound DNAzyme assembly[J]. J Am Chem Soc, 2007, 129(2): 262-263.

[49] Tang Q, Yuan Y, Xiao X, et al. DNAzyme based electrochemical sensors for trace uranium[J]. Microchim Acta, 2013, 180(11-12): 1059-1064.

[50] Ma D, Yuan Y, Xiao X, et al. A label-free electrochemical biosensor for trace uranium based on DNAzymes and gold nanoparticles[J]. J Radioanal Nucl Chem, 2014, 299(3): 1911-1919.

[51] Yin J C, Wang Y S, Zhou B, et al. A wireless magnetoelastic sensor for uranyl using DNAzyme-graphene oxide and gold nanoparticles-based amplification[J]. Sens Actuators, B, 2013, 188: 147-155.

[52] Gwak R, Kim H, Yoo S M, et al. Precisely determining ultralow level UO_2^{2+} in natural water with plasmonic nanowire interstice sensor[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 1-7.

[53] Jiang Z, Zhang Y, Liang A, et al. Free-labeled nanogold catalytic detection of trace UO_2^{2+} based on the aptamer reaction and gold particle resonance scattering effect[M]. City: Plasmonics, 2012, 7(2): 185-190.

[54] Luo Y, Zhang Y, Xu L, et al. Colorimetric sensing of trace UO_2^{2+} by using nanogold-seeded nucleation amplification and label-free DNAzyme cleavage reaction[J]. Analyst, 2012, 137(8): 1866-1871.

[55] Zhang J, Gao Q, Chen P, et al. A novel Tb^{3+}-promoted G-quadruplex-hemin DNAzyme for the development of label-free visual biosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(10): 4053-4057.

[56] Zhang H, Lin L, Zeng X, et al. Magnetic beads-based DNAzyme recognition and AuNPs-based enzymatic catalysis amplification for visual detection of trace uranyl ion in aqueous environment[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 78: 73-79.

[57] Zacco E, Pividori M I, Alegret S. Electrochemical magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues[J]. Anal Chem, 2006, 78(6): 1780-1788.

[58] Dirks R M, Pierce N A. Triggered amplification by hybridization chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(43): 15275-15278.

[59] Yun W, Jiang J, Cai D, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of UO_2^{2+} based on DNAzyme and isothermal enzyme-free amplification[J]. RSC Adv, 2016, 6(5): 3960-3966.

[60] Yin P, Choi H M, Calvert C R, et al. Programming biomolecular self-assembly pathways[J]. Nature, 2008, 451(7176): 318-322.

[61] Jung C, Ellington A D. Diagnostic applications of nucleic acid circuits[J]. Acc Chem Res, 2014, 47(6): 1825-1835.

[62] Yun W, Jiang J, Cai D, et al. Ultrasensitive visual detection of DNA with tunable dynamic range by using unmodified gold nanoparticles and target catalyzed hairpin assembly amplification[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 77: 421-427.

[63] Yun W, Cai D, Jiang J, et al. An ultrasensitive electrochemical biosensor for uranyl detection based on DNAzyme and target-catalyzed hairpin assembly[J]. Microchim Acta, 2016, 183(4): 1425-1432.

[64] Huang J, Su X, Li Z. Enzyme-free and amplified fluorescence DNA detection using bimolecular beacons[J]. Anal Chem, 2012, 84(14): 5939-5943.