

基于双荧光基团分子信标对水体中铅离子(II)的检测

熊威威, 张应坤, 鲁子敬, 汪鹏, 翟琨, 向东山

引用本文:

熊威威, 张应坤, 鲁子敬, 等. 基于双荧光基团分子信标对水体中铅离子(II)的检测[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(12): 2895-2902.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0581>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

华北地区不同规模畜禽养殖场粪便中抗生素抗性基因污染特征

邹威, 金彩霞, 魏闪, RamasamyRajeshKumar, 周启星

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2640-2652 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0403>

镉砷在线蚓中的毒物-毒效动力学过程及定量模拟

李敏, 龚冰, 黄雪莹, 肖雪, 何尔凯, 仇荣亮

农业环境科学学报. 2020, 39(7): 1451-1459 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0209>

镉耐性固定细菌的筛选及其对不同品种小麦镉吸收的阻控效应

孙乐妮, 郭迎雪, 侯雪婷, 庄杰, 杨章泽, 陈兆进, 田伟

农业环境科学学报. 2020, 39(9): 1878-1887 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0291>

叶面喷施两种典型纳米材料对苋菜积累多环芳烃的影响

袁彬彬, 周东美, 马晓玥, 方国东, 高娟

农业环境科学学报. 2020, 39(9): 1908-1915 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0160>

春季农田地表空气中PM₁₀浓度变化与环境因子关系

武亚堂, 吴建国, 王立

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1792-1802 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0339>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

熊威威, 张应坤, 鲁子敬, 等. 基于双荧光基团分子信标对水体中铅离子(II)的检测[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(12): 2895–2902.

XIONG Wei-wei, ZHANG Ying-kun, LU Zi-jing, et al. Detection of lead (II) in water using a dual-fluorophore molecular beacon[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(12): 2895–2902.



开放科学 OSID

基于双荧光基团分子信标对水体中铅离子(II)的检测

熊威威¹, 张应坤², 鲁子敬¹, 汪鹏¹, 翟琨^{1*}, 向东山^{1*}

(1. 湖北民族大学 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 化学与环境工程学院, 湖北 恩施 445000; 2. 恩施职业技术学院, 湖北 恩施 445000)

摘要: 为了建立一种快速、准确地测量水体中铅(Pb)离子含量的方法, 利用两个荧光基团 6-羧基荧光素(6-Carboxy fluorescein group, FAM)和 5-羧基四甲基罗丹明(5-Carboxytetramethylrhodamine, TAMRA), 结合 Pb 离子(II)的核酸适配体, 构建了一种特殊的能特异性识别 Pb²⁺ 的双荧光基团分子信标。根据分子信标与 Pb²⁺ 结合后 FAM 与 TAMRA 总荧光强度的变化, 建立了对水体中 Pb²⁺ 高灵敏的双色荧光定量检测方法。结果表明, 在优化的条件下, FAM 和 TAMRA 的总荧光强度(ΔI_f)与 Pb²⁺ 的浓度(C)在 $8 \times 10^{-10} \sim 4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈现良好的线性关系, 其拟合的回归方程为 $\Delta I_f = 3.052 C + 13.129$ ($R^2 = 0.9987$), 方法的检出限为 $1.5 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3\sigma, n=9$)。研究表明, 本实验利用 Pb²⁺ 的适配体及两个荧光基团 FAM 与 TAMRA 构建的双荧光基团分子信标能特异性地识别水体中的 Pb²⁺, 基于分子信标所建立的分析方法精密度高、准确度高, 能很好地应用于水样品中 Pb²⁺ 的定量检测。

关键词: 铅离子(II); 双荧光基团; 分子信标; 适配体; 定量检测

中图分类号: X832 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2020)12-2895-08 doi:10.11654/jaes.2020-0581

Detection of lead(II) in water using a dual-fluorophore molecular beacon

XIONG Wei-wei¹, ZHANG Ying-kun², LU Zi-jing¹, WANG Peng¹, ZHAI Kun^{1*}, XIANG Dong-shan^{1*}

(1. Hubei Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization, School of Chemical and Environmental Engineering, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China; 2. Enshi Polytechnic, Enshi 445000, China)

Abstract: To develop a rapid and accurate method of measuring Pb²⁺ in water sources, a Pb²⁺-specific dual-fluorophore molecular beacon (MB) was constructed using two fluorophores (FAM and TAMRA) and the nucleic acid aptamer of Pb²⁺. A highly sensitive dual-color fluorescence quantitative detection method for Pb²⁺ in water was developed based on changes in the total fluorescence intensity of FAM and TAMRA after the molecular beacon and Pb²⁺ were combined. The results showed that the total fluorescence intensity (ΔI_f) of FAM and TAMRA exhibited a good linear relationship with Pb²⁺ concentrations (C) ranging from 8×10^{-10} to $4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ under optimized conditions. The fitted regression equation was $\Delta I_f = 3.052C + 13.129$ ($R^2 = 0.9987$), and the detection limit of the method was $1.5 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3\sigma, n=9$). The results of this study indicate that the constructed dual-fluorophore molecular beacon can specifically recognize Pb²⁺ in water sources with high precision and accuracy and can therefore be applied in quantitative detection of Pb²⁺ in water.

Keywords: lead ion(II); dual-fluorophore; molecular beacon; aptamers; quantitative detection

收稿日期: 2020-05-24 录用日期: 2020-08-14

作者简介: 熊威威(1997—), 男, 湖北孝感人, 硕士研究生, 主要研究方向为环境分析化学。E-mail: 935251089@qq.com

*通信作者: 翟琨 E-mail: zk3100@sina.com; 向东山 E-mail: zk3100@sohu.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(21465010); 生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金项目(PT012012, PT012020); 湖北省“双一流”建设专项; 湖北民族大学研究生创新教育专项

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(21465010); The Open Fund for Hubei Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization(PT012012, PT012020); Special Funds for “Double First-Class” Construction in Hubei Province; Innovative Education Special Fund Project for Graduate Students in Hubei Minzu University

铅(Pb)是一种严重危害人体健康的重金属元素,是三大重金属污染物之一^[1]。Pb具有良好的延展性、柔软性和耐腐蚀性等特性,因而被广泛地应用于冶金、蓄电池、印刷、颜料、油漆等工业与生活用品中^[2]。但随着含Pb物质使用的逐渐增加,大量的含Pb化合物随着生活污水、工业废水、工业废料及生活垃圾进入大自然中。由于含Pb化合物在自然条件下不能被降解^[3],并可在生物体中进行富集,因此Pb可直接或间接地进入人体,对人体健康造成危害。据报道,Pb进入人体可损伤神经系统及大脑,还可引起婴幼儿脏器发育不全及贫血等疾病,严重威胁人类健康^[4]。因此,对于Pb的检测具有十分重要的意义。

目前对Pb²⁺的常用检测方法有比色法^[5-6]、紫外-可见分光光度法^[7]、电化学分析法^[8]、火焰原子吸收光谱法^[9]和电感耦合等离子体质谱法^[10]等。但这些方法有的检测灵敏度较低,有的重复性不好,有的需要昂贵的仪器,因此,建立一种简单快速、特异性好、灵敏度高、适用于常规检测Pb²⁺的方法具有较强的现实意义。

分子信标(Molecular beacon)是一种具有茎-环结构的双标记的寡核苷酸荧光探针,它具有很强的特异性和较高的灵敏度,现已广泛应用于生物学、医学、环境科学及食品科学等领域^[11-13]。核酸适配体(Aptamer)是一种经体外筛选得到的、对相应靶标分子(如蛋白质、核酸、病毒、药物分子、重金属离子等)有严格识别能力和高度亲和力的寡核苷酸序列。据报道,Pb²⁺的核酸适配体已被筛选出来(核酸中的G碱基能与Pb²⁺形成稳定的G-四联体空间结构)并应用到Pb²⁺高选择性的检测中^[14-16]。目前基于Pb²⁺核酸适配体及分子信标对Pb²⁺的定量检测已有一些应用,但检测过程较为复杂,不适合快速的常规检测^[17-18]。

为了简化Pb²⁺定量检测的步骤,加快其检测速度,同时提高检测的灵敏度,本实验基于Pb²⁺的核酸适配体^[19],设计了一个能特异性识别Pb²⁺的双荧光基团分子信标,利用分子信标直接对Pb²⁺进行检测,建立了一个Pb²⁺的快速常规检测方法。该分子信标由能发生荧光共振能量转移的两个荧光基团(FAM和TAMRA)代替经典分子信标中的一个荧光基团和一个猝灭基团,与FAM相连接的3个核苷酸中都含有鸟嘌呤(G碱基),分子信标的环及茎的一部分设计为Pb²⁺的核酸适配体。在这个分子信标中,TAMRA既是一个荧光基团,又是一个猝灭基团,它本身能发射荧光,同时又可以对一些荧光基团的荧光进行猝灭。

FAM的发射光谱与TAMRA的吸收光谱有重叠,所以当荧光基团FAM和TAMRA靠近时,FAM的荧光能被TAMRA所吸收。另外,G碱基在荧光共振能量转移中可以通过光诱导电子转移的方式猝灭TAMRA所发射的荧光,且具有很好的猝灭效果^[20]。因此,在该分子信标中,FAM的荧光能被TAMRA所猝灭,TAMRA的荧光能被G碱基所猝灭,在没有Pb²⁺存在时,FAM和TAMRA的荧光信号都很弱。当分子信标与Pb²⁺反应后,分子信标的茎-环结构被破坏,FAM与TAMRA、TAMRA与G碱基彼此分开,距离增加,荧光共振能量转移及光诱导的电子转移消失,FAM与TAMRA的荧光同时得到恢复。根据FAM与TAMRA荧光恢复的程度即可实现对Pb²⁺的定量检测。

与目前已有的基于分子信标及核酸适配体对Pb²⁺的定量检测方法相比,本方法利用分子信标直接与Pb²⁺反应实现对Pb²⁺的检测,简化了Pb²⁺定量检测的步骤,加快了检测速度。另外,本方法所构建的分子信标在对Pb²⁺进行定量检测时能产生两个不同的荧光响应信号,利用TAMRA与FAM的总荧光强度对Pb²⁺进行定量分析,可显著提高检测的灵敏度。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

实验所用仪器包括RF-5301PC型荧光光谱仪(日本Shimadzu公司),PHS-3C pH计(中国上海仪电科学仪器股份有限公司)。Pb(NO₃)₂试剂为优级纯(型号:GR500G),其他所有化学试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司(中国);实验所用的缓冲溶液为0.1 mol·L⁻¹的Tris-HNO₃缓冲溶液;分子信标由上海生工生物技术有限公司(中国)合成并用高效液相色谱法进行纯化,其碱基序列为:5'-FAM-(CH₂)₆-GGG AAA CCA CTG GAA GGT GTG GAA GGT TTC CC-(CH₂)₆-TAMRA-3'(斜体部分为Pb²⁺核酸适配体的碱基序列)。

1.2 样品制备

分子信标用0.1 mol·L⁻¹的Tris-HNO₃缓冲溶液(pH 8.3,含60 mmol·L⁻¹的NaNO₃)稀释成浓度为3×10⁻⁷ mol·L⁻¹的储备液,Pb(NO₃)₂用蒸馏水配制成不同浓度的溶液备用。将50 μL不同浓度的Pb(NO₃)₂溶液加入到50 μL 3×10⁻⁷ mol·L⁻¹的分子信标溶液中混合均匀,在45℃的水浴锅中加热12 min,冷却至常温后,加入Tris-HNO₃缓冲溶液至终体积达到500 μL,在室温下反应35 min,然后对体系中FAM及TAMRA

的荧光信号进行检测。除非文中特别指明,本研究中所有样品的测定条件均与以上条件保持一致。

1.3 水样的取样与消化

自来水取自湖北民族大学基础化学实验教学示范中心实验室,天然矿泉水取自湖北恩施龙洞河源头,河水取自湖北恩施龙洞河三孔桥处(离源头3 km处,途经一个医院和一所高校),取样时间均为2020年7月5日中午。采水过程中所用的简易采水器和盛水容器均为聚乙烯材质,采集自来水时先放水5 min再进行取样,天然矿泉水和河水的取样均使用洗净的简易采水器,润洗3次后在水深20 cm处采集水样,水样带回实验室后冷藏保存,并于当日完成测定。所取水样清澈透明,无色、无悬浮杂质和沉淀。消化时,移取水样100 mL于消化罐中,加入5 mL浓 HNO_3 溶液,然后置于温控板上加热,温度设为90℃。待样品蒸发至体积约为10 mL时,再加入5 mL浓 HNO_3 与2 mL浓 HClO_4 溶液,再次加热至体积为1 mL左右。重复上述步骤,直至溶液澄清透明为止。将最终样品冷却至室温后,用0.45 μm 滤膜过滤,然后转移至100 mL容量瓶中,用2%的硝酸溶液定容。

1.4 Pb^{2+} 的检测

Pb^{2+} 的检测通过对反应后体系中FAM及TAMRA的荧光信号进行检测来实现,本实验采用同步荧光分析法对FAM及TAMRA的荧光信号进行检测。荧光基团FAM最大激发波长为494 nm,最大发射波长为520 nm,荧光基团TAMRA的最大激发波长为559 nm,最大发射波长为582 nm,它们的斯托克斯位移(Stokes shift)分别为26 nm与23 nm,为了同时满足

FAM及TAMRA荧光信号的测定,同步扫描的波长间隔($\Delta\lambda$)设置为25 nm,荧光分光光度计的激发及发射狭缝宽度均设置为10 nm。所有荧光强度的数值均在FAM或TAMRA的最大发射波长处测得。

2 结果与讨论

2.1 实验原理

检测 Pb^{2+} 的原理如图1所示,荧光基团FAM连接在分子信标的5'端,与FAM相连接的3个核苷酸中的碱基均为G碱基,另一个荧光基团TAMRA连接在分子信标的3'端,分子信标的环及茎的一部分设计为 Pb^{2+} 的适配体(*GGA AGG TGT GGA AGG*)。没有 Pb^{2+} 存在时,分子信标为茎-环结构,FAM与TAMRA的荧光信号都很弱。当有 Pb^{2+} 存在时,分子信标与 Pb^{2+} 反应形成稳定的G-四联体结构,分子信标的茎-环结构被破坏,FAM与TAMRA的荧光同时得到恢复。在分子信标过量的前提下, Pb^{2+} 的浓度越大,与 Pb^{2+} 结合的分子信标就越多,FAM与TAMRA的荧光信号就越强。根据FAM与TAMRA荧光增加的程度,即可实现对 Pb^{2+} 的双色荧光定量检测。

2.2 方法可行性分析

图2为分子信标与不同浓度的 Pb^{2+} 反应后,体系中荧光基团TAMRA与FAM所对应的荧光光谱图。从图2可以看出,当没有 Pb^{2+} 存在时,TAMRA与FAM的荧光信号都很弱(图2a),但加入不同浓度的 Pb^{2+} 后,TAMRA与FAM的荧光信号都显著增强,且 Pb^{2+} 的浓度越大,它们的荧光信号也越强。这说明利用该方法对 Pb^{2+} 进行定量检测是可行的。

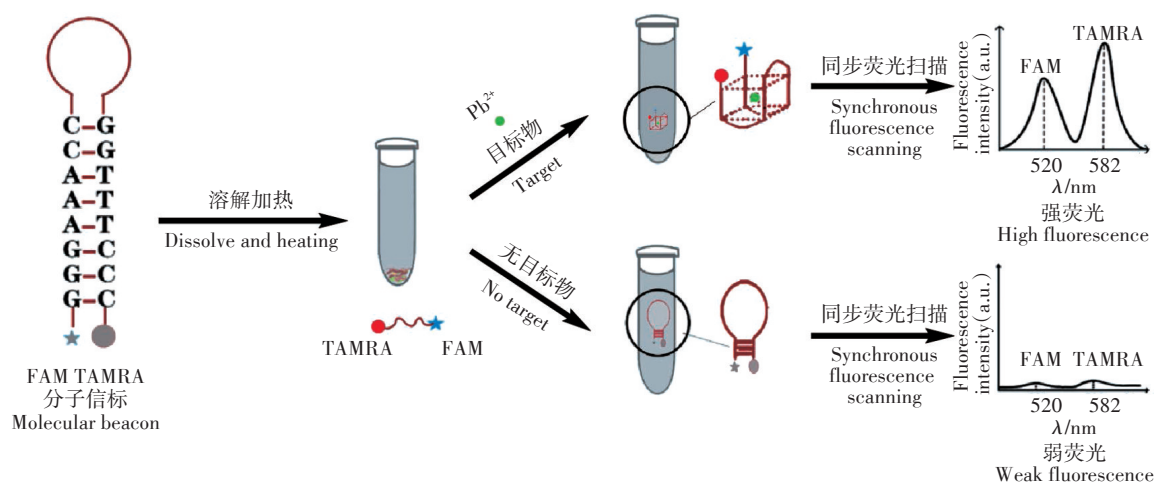
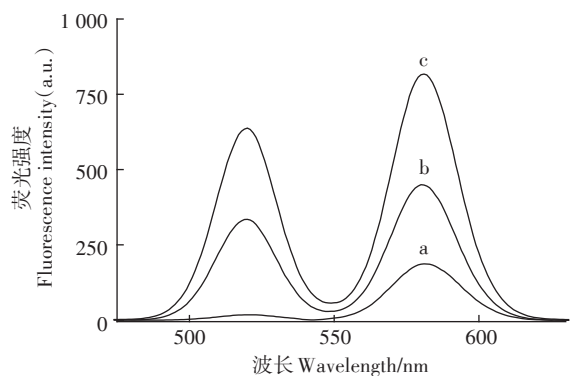


图1 基于双荧光基团分子信标检测 Pb^{2+} 的基本原理

Figure 1 Principle of detection for Pb^{2+} based on dual-fluorophore molecular beacon



(a) $3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分子信标; (b) $a+2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+} ;
(c) $a+4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+}
(a) $3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ molecular beacons; (b) $a+2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pb^{2+} ;
(c) $a+4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pb^{2+}

图2 不同浓度的 Pb^{2+} 体系所对应的同步荧光光谱图

Figure 2 The synchronous fluorescence spectra of system at different concentrations of Pb^{2+}

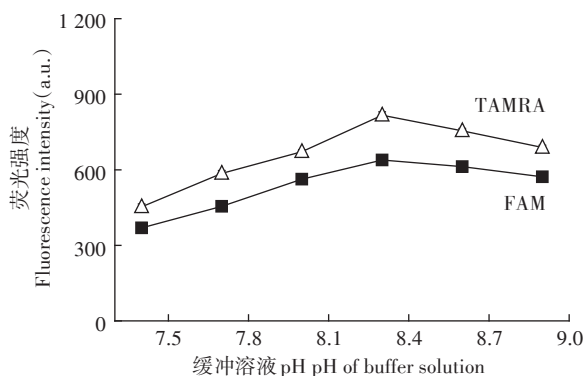
2.3 实验条件优化

2.3.1 缓冲溶液 pH 对测定结果的影响

本实验以 Tris-HNO_3 为缓冲体系,探究了缓冲体系的 pH 对测定结果的影响(图3)。结果表明,缓冲体系的 pH 在 7.4~8.3 的范围内时,荧光基团 FAM 及 TAMRA 的荧光强度均随着 pH 的增加而增加;当 pH 大于 8.3 时, FAM 及 TAMRA 的荧光强度均随着 pH 的增加逐渐降低。这说明当缓冲体系的 pH 较低时(<8.3),分子信标与 Pb^{2+} 形成 G-四联体结构的稳定性随 pH 的升高而加强;当 pH 较高时(>8.3),分子信标与 Pb^{2+} 形成 G-四联体结构的稳定性随 pH 的升高而逐渐减弱。因此,本实验选择 pH 为 8.3 的 Tris-HNO_3 缓冲体系。

2.3.2 加热时间和温度对测定结果的影响

为了使分子信标与 Pb^{2+} 更好更快地结合形成 G-



分子信标的浓度为 $3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Pb^{2+} 的浓度 $4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。下同
Concentration of molecular beacons is $3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the concentration of Pb^{2+} is $4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The same below

图3 pH 对荧光强度的影响

Figure 3 Effect of pH on fluorescence intensity

四联体结构,反应体系进行了加热处理,目的是在加热时使分子信标的茎部打开,在冷却过程中,分子信标更容易与 Pb^{2+} 特异性结合,形成稳定的 G-四联体结构。为了得到合适的加热时间和温度,本实验对加热时间和温度对测定结果的影响进行了考察。

当温度为 45°C 、加热时间为 3~12 min 时, FAM 及 TAMRA 的荧光强度均随加热时间增加而增大,当加热时间超过 12 min 后,其荧光强度基本不变,说明在 12 min 之内分子信标的茎部即可完全打开(图4),因此本实验孵育时间选择为 12 min。

当加热时间为 12 min 时,考察了温度对测定结果的影响。结果(图5)表明,当温度在 $35\sim 45^\circ\text{C}$ 时, FAM 及 TAMRA 的荧光强度均随温度的升高而增大,当温度高于 45°C 时,其荧光强度几乎不再变化。因此本实验的加热温度选择为 45°C 。

2.3.3 分子信标与目标物 Pb^{2+} 反应时间对测定结果的影响

将分子信标与 Pb^{2+} 的混合物加热之后,取出冷却至室温,此时分子信标与 Pb^{2+} 特异性结合形成 G-四联体。本实验对分子信标与 Pb^{2+} 的结合时间进行了考察。结果(图6)表明,在 20~35 min 内, FAM 及 TAMRA 的荧光强度均随着反应时间的增加而增大,随后趋于稳定。这说明分子信标与 Pb^{2+} 在 35 min 内即可反应完成。根据文献^[17-18]报道,已有的基于分子信标对 Pb^{2+} 的检测方法,反应时间都需要 60 min 以上,因此本方法极大缩短了反应时间,可显著加快 Pb^{2+} 的检测速度。

2.3.4 缓冲溶液中 NaNO_3 的浓度对测定结果的影响

溶液中的阳离子可以中和分子信标的负电荷,使分子信标与 Pb^{2+} 结合更加稳定^[21],因此溶液中电解质的浓度对测定结果会有影响。本实验通过改变缓冲

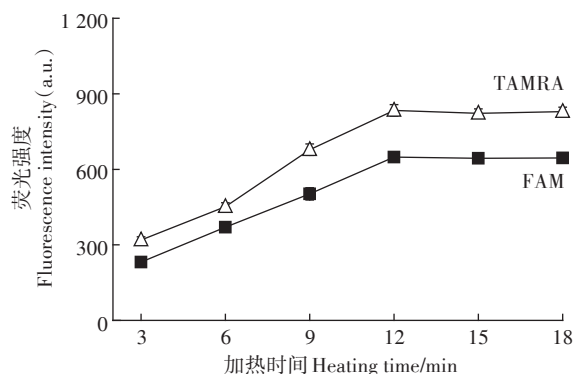


图4 加热时间对荧光强度的影响

Figure 4 Effect of heating time on fluorescence intensity

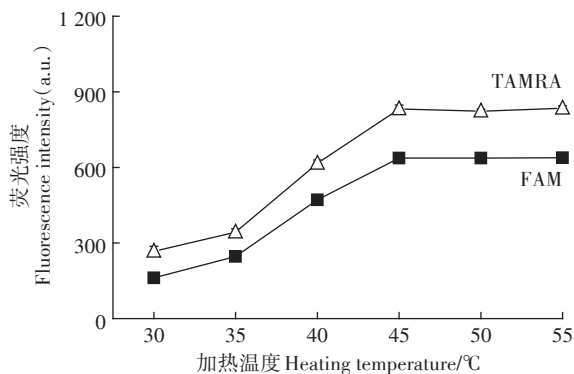


图5 加热温度对荧光强度的影响

Figure 5 Effect of temperature on the fluorescence intensity

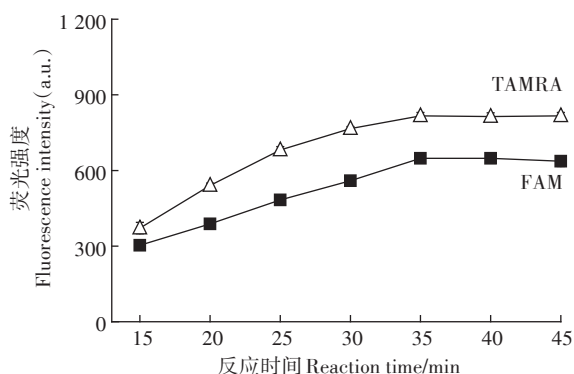


图6 反应时间对荧光强度的影响

Figure 6 Effect of reaction time on fluorescence intensity

溶液中 NaNO_3 的浓度,来探讨电解质的浓度对反应体系的影响。结果(图7)表明,当 NaNO_3 浓度在 $0\sim 60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,FAM及TAMRA的荧光强度均随着 NaNO_3 浓度的增大而逐渐增大,当 NaNO_3 的浓度超过 $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,FAM及TAMRA的荧光强度趋于稳定。因此本实验选择含 $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaNO_3 缓冲溶液。

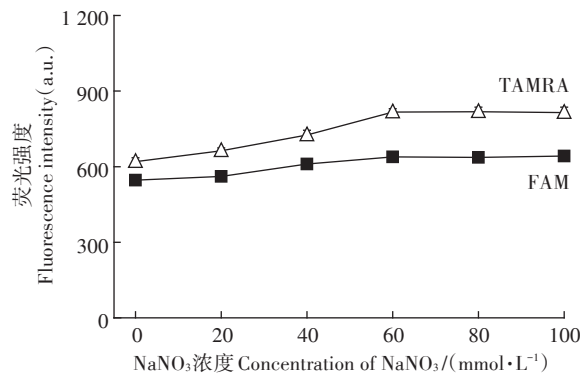
2.4 工作曲线及检出限

在优化条件下,对不同浓度 Pb^{2+} 所对应的 FAM 及 TAMRA 的荧光强度进行了考察。图 8a 为不同浓度 Pb^{2+} 所对应的 FAM 及 TAMRA 的同步扫描的荧光光谱图。图 8b 和图 8c 分别为 FAM 及 TAMRA 在其最大波长处的荧光强度与 Pb^{2+} 浓度之间的线性关系,图 8d 为 FAM 及 TAMRA 在其最大波长处的荧光强度之和与 Pb^{2+} 浓度之间的线性关系。结果表明, Pb^{2+} 浓度在 $8\times 10^{-10}\sim 4\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,FAM、TAMRA 的荧光强度 ($\Delta I, \Delta I = I - I_0, I_0$ 为体系中没有 Pb^{2+} 时荧光强度, I 为体系中存在 Pb^{2+} 时的荧光强度) 分别与 Pb^{2+} 的浓度 (C) 呈现出良好的线性关系,其拟合的回归方程分别为 $\Delta I_1 = 1.543C + 8.953 (R^2 = 0.9928)$, $\Delta I_2 = 1.532C + 9.678$

($R^2 = 0.9946$)。利用 FAM、TAMRA 的荧光强度对 Pb^{2+} 进行定量分析时的检出限分别为 $2.5\times 10^{-10}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $3.0\times 10^{-10}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。另外,TAMRA 与 FAM 的总荧光强度与 Pb^{2+} 的浓度 (C) 在 $8\times 10^{-10}\sim 4\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内同样呈现出良好线性关系,其拟合的回归方程为 $\Delta I_T = 3.052C + 13.129 (R^2 = 0.9987)$,检出限为 $1.5\times 10^{-10}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这说明利用 TAMRA 与 FAM 的总荧光强度对 Pb^{2+} 进行定量分析时,其灵敏度更高(斜率更大)。对 9 个浓度均为 $7\times 10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的平行样品进行测定,其相对标准偏差(RSD)为 3.8%,说明该方法具有较好的精密度。

2.5 方法特异性分析

为了考察方法的特异性,将水体中常见的阳离子及能与 Pb^{2+} 发生配位或沉淀反应的阴离子分别加入到含 Pb^{2+} 浓度相同的溶液中,并与只含 Pb^{2+} 的溶液进行对比实验。在各个浓度均为 $4\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+} 溶液中分别加入浓度为 $1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Hg^{2+} (Hg)、 K^+ (K)、 Na^+ (Na)、 Ca^{2+} (Ca)、 Mg^{2+} (Mg)、 Mn^{2+} (Mn)、 Ni^{2+} (Ni)、 Cd^{2+} (Cd)、 Cu^{2+} (Cu)、 Fe^{3+} (Fe)、 Al^{3+} (Al)、 Cr^{3+} (Cr)、 Cl^- (Cl)、 Br^- (Br)、 Ac^- (Ac)、 SO_4^{2-} (S) 的溶液,在相同的条件下与 $4\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+} (Pb) 进行对比实验。结果(图9)表明,即使在含 Pb^{2+} 的溶液中加入浓度远大于 Pb^{2+} 浓度的其他离子,各样品所对应的荧光强度也几乎没有变化,这表明上述离子的存在对 Pb^{2+} 的检测没有干扰,即该方法对 Pb^{2+} 具有很高的选择性。尽管有一些阳离子(如 K^+) 也能与含 G 碱基的分子信标形成 G-四联体结构,但据文献^[10]报道,当 Pb^{2+} 与 K^+ 同时存在时, Pb^{2+} 与 G 碱基结合形成 G-四联体结构比 K^+ 与 G 碱基结合形成 G-四联体结构要更稳定,因此 K^+ 的存在不会对 Pb^{2+} 的检测产生干扰,本实验的结果也证明了这一点。另外,尽管水样中还存在

图7 NaNO_3 浓度对荧光强度的影响Figure 7 Effect of NaNO_3 concentration on fluorescence intensity

其他不同的阴离子,但考虑到分子信标是带负电的,水样中带负电的阴离子与分子信标存在排斥作用^[22-23],不会发生反应,因此本实验只考察能与 Pb^{2+} 发生配位或沉淀反应的阴离子。

2.6 实际样品检测与加标回收实验

为了验证方法的实用性,本实验对实际水样中的 Pb^{2+} 进行了检测,并进行加标回收实验。在自来水、天然矿泉水及河水3种不同类型的水样中,分别取4

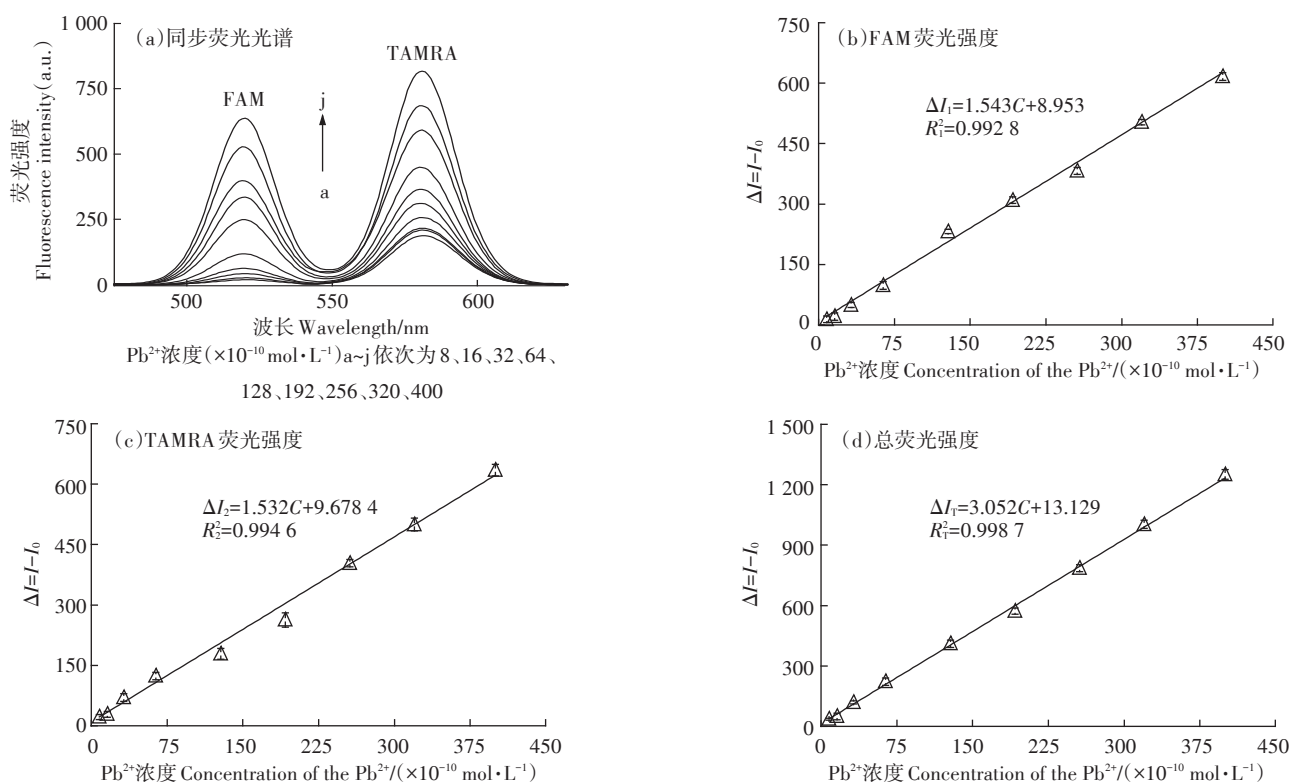
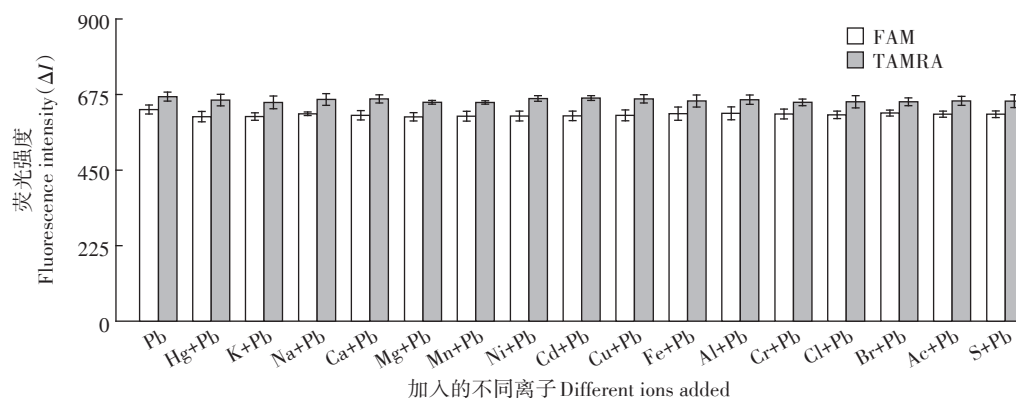


图8 不同 Pb^{2+} 浓度所对应的FAM及TAMRA的同步荧光光谱图、FAM及TAMRA的荧光强度、FAM和TAMRA的总荧光强度与 Pb^{2+} 浓度的线性关系图

Figure 8 Synchronous fluorescence spectra of FAM and TAMRA at different concentrations of Pb^{2+} , the linear relationships between the fluorescence intensity of FAM, the fluorescence intensity of TAMRA, and the total fluorescence intensity of FAM and TAMRA and the Pb^{2+} concentration, respectively



分子信标浓度为 $3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Pb^{2+} 浓度为 $4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其他离子浓度均为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Concentration of molecular beacon is $3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, concentration of Pb^{2+} is $4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and concentration of other ions is $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图9 方法特异性分析

Figure 9 Specificity analysis of methods

份相同的水样,加入不同浓度的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液(表1),消解后各取 50 μL 按本方法对各样品中的 Pb^{2+} 浓度进行测定。表1的结果显示,河水、自来水及天然矿泉水水样中 Pb 的含量分别为 $2.85 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.49 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $2.24 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,均低于国家规定的饮用水 Pb^{2+} 含量标准。在这3种实际水样中进行加标回收实验,其回收率在 96.7%~104.3%,且所取水样测定结果的相对标准偏差都小于5%,这说明本方法在实际样品的检测中具有较高的准确度。

表1 采用本方法分别测定河水水样(R_i)、自来水水样(T_i)与矿泉水水样(S_i)中的 Pb^{2+} ($n=3$)

Table 1 Determination of Pb^{2+} in river water samples(R_i), tap water samples(T_i) and spring water sample(S_i) by this method($n=3$)

样品编号 Sample number	Pb^{2+} 加入量 Added/ ($10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	测得值 Found/ ($10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对标准偏差 RSD/%	回收率 Recovery/%
R_1	0	28.5	2.3	—
R_2	3	31.4	4.3	96.7
R_3	30	59.8	3.6	104.3
R_4	300	331.6	1.4	101.0
T_1	0	24.9	2.5	—
T_2	3	28.0	4.0	103.3
T_3	30	56.1	4.6	104.0
T_4	300	321.6	2.1	98.9
S_1	0	22.4	2.0	—
S_2	3	25.3	3.9	96.7
S_3	30	53.0	4.4	102.0
S_4	300	316.8	2.5	98.1

3 结论

(1)本实验利用 Pb^{2+} 的适配体及两个荧光基团 FAM 与 TAMRA 构建了一种能特异性地识别 Pb^{2+} 的特殊的双荧光基团分子信标,并利用该分子信标建立了一种高灵敏的 Pb 离子双色荧光定量检测方法。

(2)利用所建立的分析方法实现了不同类型水样品中 Pb^{2+} 的定量检测,其加标回收率在 96.7%~104.3%,且所取水样测定结果的相对标准偏差都小于5%。

(3)该方法操作简单、特异性好、灵敏度高,是一种适用于水体中 Pb^{2+} 常规快速的定量检测方法。

参考文献:

[1] Wang C Y, Fang B Y, Yao M H, et al. Visualization detection of ultra-trace lead and cadmium ions using cellulose acetate membrane based

on silver stain[J]. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 2016, 228:643-648.

[2] Tong P, Zhao R, Zhang R, et al. Characterization of lead(Ⅱ)-containing activated carbon and its excellent performance of extending lead-acid battery cycle life for high-rate partial-state-of-charge operation[J]. *Journal of Power Sources*, 2015, 286:91-102.

[3] Ma L H, Wang H B, Fang B Y, et al. Visual detection of trace lead ion based on aptamer and silver staining nano-metal composite[J]. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 2018, 162:415-419.

[4] Kosnett M J. Chelation for heavy metals(arsenic, lead, and mercury): Protective or perilous? [J]. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2010, 88(3):412-415.

[5] Chaiyo S, Apiluk A, Siangproh W, et al. High sensitivity and specificity simultaneous determination of lead, cadmium and copper using μPAD with dual electrochemical and colorimetric detection[J]. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 2016, 233:540-549.

[6] Rong M, Li J, Hu J, et al. A highly sensitive and colorimetric biosensor based on magnetic nano-DNAzyme for detection of lead(Ⅱ) ion in real water samples[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2018, 93(11):3254-3263.

[7] Faraji H, Helalizadeh M. Lead quantification in urine samples of athletes by coupling DLLME with UV-Vis spectrophotometry[J]. *Biological Trace Element Research*, 2016, 176(2):258-269.

[8] Huang X, Li J, Zhang Q, et al. A protease-free and signal-on electrochemical biosensor for ultrasensitive detection of lead ion based on GR-5 DNAzyme and catalytic hairpin assembly[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry(Lausanne, Switzerland)*, 2018, 816:75-82.

[9] Tavallali H, Lalehparvar S, Nekoei A R, et al. Ion-flotation separation of Cd(Ⅱ), Co(Ⅱ) and Pb(Ⅱ) traces using a new ligand before their flame atomic absorption spectrometric determinations in colored hair and dryer agents of paint[J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2011, 58(2):199-206.

[10] Yilmaz V, Arslan Z, Rose L. Determination of lead by hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry (HG-ICP-MS): On-line generation of plumbane using potassium hexacyanomanganate(Ⅲ)[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 761:18-26.

[11] Su R, Zheng H, Dong S, et al. Facile detection of melamine by a FAM-aptamer-G-quadruplex construct[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(12):2521-2530.

[12] Farzin L, Shamsipur M, Sheibani S. A review: Aptamer-based analytical strategies using the nanomaterials for environmental and human monitoring of toxic heavy metals[J]. *Talanta*, 2017, 174:619-627.

[13] 鲁子敬,熊威威,翟琨,等.基于双重猝灭分子信标及核酸染料 Hoechst 33258 对单链核酸的双色定量检测[J]. *分析化学*, 2019, 47(7):1014-1020.

LU Zi-jing, XIONG Wei-wei, ZHAI Kun, et al. Dual color fluorescence quantitative detection of DNA sequences with double-quenching molecular beacons and nucleic acid Hoechst 33258[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 47(7):1014-1020.

[14] Wei X P, Yang F, Ding F, et al. An electrochemiluminescence biosensor for determination of Pb^{2+} based on G-Quadruplex of aptamer probe

- [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(7):942-947.
- [15] 刘兴奋, 王亚腾, 华笑笑, 等. 基于阳离子型共轭聚合物和核酸适配体的高灵敏铅离子快速检测[J]. *分析化学*, 2016, 44(7):1092-1098.
- LIU Xing-fen, WANG Ya-teng, HUA Xiao-xiao, et al. Rapid detection of lead ion(II) based on cationic conjugated polymer and aptamer[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(7):1092-1098.
- [16] 吕菊波, 张亚会, 孟凡斌, 等. 基于DNA双链取代策略免标记检测铅离子的研究[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(1):92-97.
- LÜ Ju-bo, ZHANG Ya-hui, MENG Fan-bin, et al. Detection of lead ion based on DNA double-strand replacement and label-free method [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2018, 37(1):92-97.
- [17] 刘涛, 李丹, 梁杰, 等. 基于核酸外切酶Ⅲ及DNAzyme的铅离子荧光传感器的研究[J]. *分析化学*, 2020, 48(2):248-254.
- LIU Tao, LI Dan, LIANG Jie, et al. A fluorescence biosensor for lead ion detection based on DNAzyme and exonuclease Ⅲ [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(2):248-254.
- [18] Liu H W, Chen Y T, Song C L, et al. Novel and label-free colorimetric detection of radon using AuNPs and lead(II)-induced GR5 DNAzyme-based amplification strategy[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(17):4227-4234.
- [19] Lu Y, Li X, Wang G, et al. A highly sensitive and selective optical sensor for Pb^{2+} by using conjugated polymers and label-free oligonucleotides[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 39(1):231-235.
- [20] Xiang D S, Li F Q, Wu C Y, et al. The G-BHQ synergistic effect: Improved double quenching molecular beacons based on guanine and black hole quencher for sensitive simultaneous detection of two DNAs [J]. *Talanta*, 2017, 174:289-294.
- [21] Yu Z, Zhou W, Han J, et al. Na^+ induced conformational change of Pb^{2+} stabilized G-quadruplex and its influence on Pb^{2+} detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(19):9375-9380.
- [22] Sigel R K O, Sigel H. A stability concept for metal ion coordination to single-stranded nucleic acids and affinities of individual sites[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2010, 43(7):974-984.
- [23] Turdean, Graziella L. Design and development of biosensors for the detection of heavy metal toxicity[J]. *International Journal of Electrochemistry*, 2011. doi: 10.4061/2011/343125.