2017-12-25 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2017.01020 http://www.cibj.com/
应用与环境生物学报 Chin J Appl Environ Biol 2017, 23 (6): 1172-1177

基于生物分子识别的水环境Hg^{2+}快速检测新技术研究进展*

李 亚[1, 2, 3] 刘 楠[1, 2, 3**] 霍亚鹏[3] 李晓丽[3] 马新华[3] 唐淑阁[3] 汪彩琴[1, 3] 张印红[1**] 刘 辉[1] 王 玉[1]

[1]兰州大学公共卫生学院 兰州 730000
[2]广州医科大学公共卫生学院 广州 511436
[3]军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所 天津 300050

摘 要 生物分子作为化学污染物靶标特异识别和检测的重要元件和材料，在检测领域得到了广泛应用和长足发展. 本文总结了一系列基于生物分子识别或放大机制的水环境中Hg^{2+}快速检测新技术研究进展，新型Hg^{2+}检测方法以蛋白质、寡核苷酸、脱氧核酶等生物分子为基础，通过紫外、荧光、电化学、电化学发光或拉曼光谱等检测手段实现了环境水样中Hg^{2+}高灵敏甚至超灵敏检测，远远满足国家卫生标准或美国环境保护署的要求；同时还分析了相关检测原理和应用前景，生物分子经过修饰和改造后检测体系性能得以加强；生物分子与纳米材料，如贵金属纳米材料、氧化石墨烯、碳纳米管等相结合，并联合新型检测平台，大大推动了水环境中Hg^{2+}现场快速灵敏检测技术的发展，促进了多种Hg^{2+}检测传感新技术的建立. 建议今后加强检测元件之间相互作用机制的研究，同时要提高现场快速检测设备的开发，进一步增强其在实际应用中的可行性和实用性.（表1 参57）

关键词 生物分子；Hg^{2+}；蛋白质；寡核苷酸；脱氧核酶；纳米材料
CLC X83 : Q526.1

Review of novel technologies for rapid detection of Hg^{2+} in water environment via biological molecular recognition*

LI Ya[1, 2, 3], LIU Nan[1, 2, 3**], HUO Yapeng[3], LI Xiaoli[3], MA Xinhua[3], TANG Shuge[3], WANG Caiqin[1, 3], ZHANG Yinhong[1**], LIU Hui[1] & WANG Yu[1]

[1] *School of Public Health, Lanzhou University*, Lanzhou 730000, China
[2] *School of Public Health, Guangzhou Medical University*, Guangzhou 511436, China
[3] *Institute of Environmental & Operational Medicine*, *Academy of Military Medicine, Chinese Academy of Military Sciences*, Tianjin 300050, China

Abstract Biological molecules are the key components and materials for specific recognition and detection of chemical pollutants; they are widely used in the detection research and are rapidly improved. This review summarizes a series of rapid novel detection technologies for Hg^{2+} in environmental water samples via the identification and amplification mechanism of biological molecules, including protein, oligonucleotide, DNAzyme, etc. The quantitative detection of Hg^{2+} with high sensitivity and even ultra-sensitivity in environmental water samples has been achieved by ultraviolet spectrophotometry, fluorescence spectrophotometry, electrochemistry, electrochemiluminescence, Raman spectroscopy, etc. It adequately met the requirement of the national standard of China or that of the U.S. Environmental Protection Agency in drinking water. The principle and application prospects have been explored, and the performance of the detection system has been improved by modification and reform of biological molecules. The rapid development of sensitive and on-site test technologies and sensors was greatly promoted by the combination with a novel detection platform and nanomaterials, including noble metal nanoparticles, graphene oxide, carbon nanotubes, etc. In further studies, researchers should reveal the mechanism of interaction between detecting elements and develop field rapid-detection equipment. The feasibility of practical application is also further heightened.

Keywords biological molecule; Hg^{2+}; protein; oligonucleotide; DNAzyme; nanomaterial

收稿日期 Received: 2017-01-18 接受日期 Accepted: 2017-02-14
*国家自然科学基金项目（81472941和81273078）、国家863计划“青年科学家专题”（SS2015AA020940）和天津市自然科学基金重点项目（16JCZDJC39500）资助 Supported by the National Nature Science Foundation of China (81472941 and 81273078), the National 863 Young Scientist Program of China (SS2015AA020940) and the Natural Science Foundation of Tianjin, China (16JCZDJC39500)
**通讯作者 Corresponding authors (E-mail: LNQ555@126.com; zhangyh@lzu.edu.cn)

汞（Mercury, Hg）污染是一个全球性的环境问题，其来源及生物富集作用受到人们的广泛关注. 人类的Hg暴露主要来源于接触Hg污染的天然水和饮用水[1-3]. Hg的生物地球化学循环较为复杂，受诸多因素影响，包括人类活动、气候变化、地质因素和自然灾害. Hg^{2+}通过大气沉降作用富集在植物、表层土和水中，最后进入淡水和海洋生态系统，其中一部分在水下沉积物中富集，通过原核生物将其转换为甲基汞. 由于甲基汞具有亲脂性、易吸收、难排出，因此容易富集在食物链中较高级的生物体内，最终被人体摄入[2-5]. 富集的Hg还可以随着腐烂的植物以及鸟类和动物的排泄物重新进入土壤和水环境，再次进入食物链[4-7]. 此外，Hg暴露还来源于家庭[8]和工作场所[9]、宗教活动[10]、牙科用汞齐合金[11]、疫苗[12]等途径. Hg可以导致多系统器官的损伤，如肾功能衰竭、产前脑损伤、认知和运动障碍、视力和听力损失，甚至死亡[13-16]. 同时，它也是一种神经毒物，并可导致免疫系统功能障碍[8].

中国国家《生活饮用水卫生标准》（GB5749-2006）规定Hg^{2+}的限值为0.001 mg/L，美国环境保护署（The Environmental Protection Agency, EPA）规定饮用水中Hg^{2+}最高不应超过10 nmol/L（0.002 mg/L）. 定量检测水样中Hg^{2+}的传统方法包括电感耦合等离子体质谱法[17]、原子荧光光谱法[18]、原子吸收光谱法[19]、荧光分光光度法[20]以及X射线吸收光谱法[21]等. 这些传统方法作为实验室对Hg^{2+}的确证技术是较为经典的检测技术，其检测性能稳定可靠、灵敏度高，通常作为国家标准中规定的检测方法. 由于这些方法需要精密大型仪器、复杂的样品前处理、较大的样本量以及专业人员的操作，限制了其广泛应用，尤其是在现场快速检测领域. 鉴于环境中Hg^{2+}对人类健康的严重危害以及可持续发展的要求，亟需建立适用于自然环境和生物环境中经济高效、快速简便的Hg^{2+}检测技术.

生物分子已成为化学污染物靶标特异识别和检测的重要元件，被广泛应用于各类生物传感器和生物芯片中[22]. 通常这类小分子对目标物具有很高的特异性，且水溶性好，在生理条件和中性pH条件下即可实现对目标物的识别，特别是蛋白、寡核苷酸及脱氧核酶等已被应用于Hg^{2+}的快速检测，大大提高了检测性能，推动了水环境中Hg^{2+}现场快速灵敏检测技术的发展. 因此，本文以基于这3种生物分子识别的相关技术和方法为主，对水环境中Hg^{2+}快速检测新技术研究进行综述.

1 基于蛋白质的Hg^{2+}快速检测技术

蛋白质作为一类必不可少的生命活性物质，除了在生物体内发挥特定的生理功能外，在重金属检测方面，基于抗体的特异性识别、藻蓝蛋白的高效荧光作用以及某些蛋白酶的催化放大作用等，蛋白质也体现了其独特的优势.

Wang等基于Hg^{2+}与巯基的相互作用，选择含有羧基和巯基的6-巯基烟酸（6-mercaptonicotinic acid, MNA）作为新型双功能配体[23]. 牛血清白蛋白（Albumin from bovine serum, BSA）和卵清蛋白（Ovalbumin, OVA）作为常用的包被原，常用于免疫检测. 该文以CH_3Hg-MNA-BSA为抗原制备了对Hg^{2+}具有较高亲和力和较强特异性的单克隆抗体（Monoclonal antibody, mAb），以CH_3Hg-MNA-OVA为包被原建立的间接酶联免疫吸附法检测水样中Hg^{2+}的最低检出限（Lowest detection limit, LDL）为0.08 μg/L. Wang等基于这一特异性mAb，以MNA-OVA代替CH_3Hg-MNA-OVA作为包被原，开发了环境友好型Hg^{2+}检测免疫层析电化学生物传感器，包被原中不含有甲基汞，减少了制备和检测过程中操作人员的Hg暴露，且灵敏度高、特异性强，对水样中Hg^{2+}的LDL为30 ng/L，灵敏度提高了2.7倍[24]. Xu等基于羧基树脂微球和辣根过氧化物酶放大系统，通过流动注射化学发光免疫分析技术建立了一种简单灵敏的Hg^{2+}检测方法，羧基树脂微球通过酰胺键固定包被原，Hg^{2+}与固定在微球上的包被原竞争有限的mAb，该方法的LDL为0.015 μg/L[25].

除了针对Hg^{2+}的特异性抗体外，自然界中还存在一些蛋白同样可以对Hg^{2+}产生特异性识别作用. Zhang等以钝顶螺旋藻藻蓝蛋白为荧光探针，基于荧光猝灭机制建立了一种水溶液中Hg^{2+}的检测技术[26]. 该方法不仅特异度高，而且由于藻蓝蛋白是一种天然广泛存在于蓝藻和红藻细胞内的高效荧光蛋白，易大量获取、成本低且环境友好. 此外，基于BSA-Au原子团簇具有较高的氧化物酶仿生活性，可以催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺和H_2O_2发生显色反应的特性，在652 nm处可产生明显的吸光效果. Hg^{2+}可以特异性地抑制BSA-Au原子团簇的活性，进而减弱显色反应. Zhu等基于这一原理建立了Hg^{2+}半定量可视化检测，通过紫外–可见分光光度法实现Hg^{2+}定量检测，检测区间为10 nmol/L-10 μmol/L，LDL为3 nmol/L[27]. 芘作为一种研究介质极性的荧光探针，其激发单线态芘分子可与基态芘碰撞形成激发态二聚体，该二聚体在480 nm处有较强的荧光[28]. Wegner等基于一种转录调控因子MerR家族蛋白和嵌入芘二聚体的双链DNA（Double stranded DNA, dsDNA）建立了一种比率荧光传感器，当该蛋白与Hg^{2+}相互作用时可引起dsDNA构象发生变化，一个当量的Hg^{2+}可使芘单体在380 nm处荧光强度增加3.3倍，芘二聚体在480 nm处荧光强度减少5倍，进而使得检测体系的信号增强15倍，该传感器LDL为10 nmol/L[29].

2 基于寡核苷酸的Hg^{2+}检测技术

基于寡核苷酸的Hg^{2+}检测技术大多是利用Hg^{2+}与核酸T-T碱基对特异性结合形成T-Hg^{2+}-T的机制[30]，较Watson-Crick的A-T碱基对更加稳定[31]，其优势如下：① 可进行大批量商业化合成，较抗体稳定性好，周期短，纯度高，而且保存时间长、不易失活；② 降低了对反应条件的要求，在20-50 ℃环境下基本上可以保持活性；③ 有机试剂使用少，污染小；④ 可在核酸碱基上修饰不同的活性基团和荧光基团，拓宽了应用范围. 由此构建的传感器更为安全高效、环境友好，便于实现现场对环境水中Hg^{2+}的快速检测. 具有茎环结构的分子信标（Molecular beacon, MB）[32-33]和通过这一机制设计的适配体（Aptamer, Apt）和DNA探针[34]在Hg^{2+}的快速检测中得到了广泛的应用. Teh等通过调节MB与互补链的T-T错配个数来建立Hg^{2+}的高灵敏荧光传感技术，T-T错配数为3、5、7的MB按1:1:10混合时，可同时满足水样中Hg^{2+}检测对灵敏度

（9.5 nmol/L）和检测区间（32-1 800 nmol/L）的需求[35]. 另外，我们课题组还设计了富含7个T-T错配的Hg^{2+}特异性单链DNA（Single-stranded DNA，ssDNA），并基于荧光染料SYBR Green I独特的荧光开关机制建立了一种一步式免标记快速检测饮用水中Hg^{2+}的检测方法，LDL为3 nmol/L [36]，该检测技术有望产业化，具有一定的发展前景.

近年来，随着材料科学的飞速发展，多位学者还采用纳米材料如贵金属纳米材料、氧化石墨烯（Graphene oxide，GO）、碳纳米管（Carbon nanotube，CNT）等和超材料，通过与多种传感技术结合实现对水环境中Hg^{2+}的快速检测. 由于多学科、多技术的交叉融合，产生了多种Hg^{2+}新型检测技术，以下进行重点阐述.

2.1 基于寡核苷酸和单种纳米材料结合的Hg^{2+}检测

纳米材料由于结构的特殊性，使其具有一系列特异效应和独特的物理化学性能，在生物和环境检测领域具有广阔的应用前景.

2.1.1 基于寡核苷酸和贵金属纳米材料相结合的Hg^{2+}检测

贵金属纳米粒子具有较小的粒径、较高的表面活性和较大的比表面积，在检测领域常被用作载体和固定工具，极大地推动了检测技术的发展. Zhou等基于金属增强荧光效应设计了一种Ag纳米颗粒（Nanoparticles，NPs）标记的“turn-on”型MB探针，通过优化荧光分子与AgNPs表面的距离，可实现Hg^{2+}超灵敏检测，LDL低至1 nmol/L，并有望作为一种通用技术用于更多目标物的检测[37]. Zhang等将Apt固定在AuNPs表面，建立了Hg^{2+}快速检测的表面增强共振拉曼散射（Surface enhanced resonance Raman scattering，SERRS）体系，重复性好、灵敏度高，LDL达1 pmol/L，可应用于河水和地下水中Hg^{2+}检测[38]. 此外，Zhang等结合3D纸基微流控芯片技术、电化学发光和Ru@AuNPs纳米材料，建立了一种可检测湖水中Hg^{2+}和Pb^{2+}的装置，对Hg^{2+}的LDL为0.2 nmol/L [39]，为该技术走向实用性迈出了关键的一步. Cui等基于MoS_2纳米层、AuNPs和Hg^{2+}特异性ssDNA建立了一种场效应晶体管传感器，实现了水环境中Hg^{2+}快速超灵敏检测. MoS_2纳米层表面具有良好的导电性能，而AuNPs可为ssDNA提供大量的锚定位点，ssDNA可特异性识别和捕获Hg^{2+}，进而改变MoS_2纳米层的导电性能，实现Hg^{2+}的快速（1-2 s）超灵敏检测（LDL 0.1 nmol/L），远远低于EPA的限值[40]. Zeng等基于T-Hg^{2+}-T配位化学和纳米多孔金（Nanoporous gold，NPG）的信号放大作用建立了一种简单、实用、可重复利用的电化学传感器，巯基修饰的发夹结构捕获探针自组装到NPG修饰的电极表面，当Hg^{2+}存在时，二茂铁标记的探针通过T-Hg^{2+}-T与捕获探针杂交，发夹结构被打开，拉近了二茂铁与NPG电极的距离，导致信号增强，实现了Hg^{2+}的检测. 此外，通过加入半胱胺酸和Mg^{2+}还可以使Hg^{2+}从上面脱落下来，从而实现了传感器的重复利用. 该方法的灵敏度可达3.6 pmol/L [41]. Yang等还设计了一种“turn-off”型Hg^{2+}检测传感器，当加入Hg^{2+}时，由于T-Hg^{2+}-T结构的形成导致Au纳米团簇修饰的ssDNA发生聚集而荧光强度下降，实现水环境中Hg^{2+}检测，LDL为0.083 μmol/L[42].

2.1.2 基于寡核苷酸和GO相结合的Hg^{2+}检测

GO是一种重要的石墨烯衍生物，表面含有丰富的亲水性基团（如羟基、环氧基、羧基等），具有很好的生物相容性和稳定性，并可通过荧光共振能量转移（Fluorescence resonance energy transfer，FRET）有效猝灭染料分子的荧光. 基于GO这一高效的荧光信号猝灭作用，近年来发表了一系列检测Hg^{2+}的文献. 如Li等将Apt偶联到GO表面，当Hg^{2+}存在时，由于双链的形成使得Hg^{2+}非常接近GO表面，GO的电子即可沿着双链DNA转移至Hg^{2+}，导致荧光猝灭，该检测体系灵敏度可达0.92 nmol/L，实现了无标记荧光检测Hg^{2+}[43]. Zhang等基于GO建立了一种电化学传感器，当加入不同浓度的Hg^{2+}时，固定在GO的ssDNA可与存在4个T-T 错配的ssDNA杂交形成不同数量的双链，进而通过记录电流峰值的变化达到检测目的，可达5.0 nmol/L [44]. Liu等在Hg^{2+}特异性探针的序列中部修饰了荧光分子，分别建立了探针和GO共价结合和物理性吸附两种机制的检测体系，当加入Hg^{2+}时，该特异性探针折叠成发夹结构，荧光分子正好处于发夹结构的环部，荧光信号增强. 两种检测体系对水环境中Hg^{2+}的LDL分别为16.3和20.6 nmol/L [45].

2.1.3 基于寡核苷酸和CNT相结合的Hg^{2+}检测

CNT由C-C共价键沿管轴方向有序排列形成，具有较高的机械强度、良好的导电性、化学稳定性和热力学性能. Wang基于多壁碳纳米管（Multi-walled CNTs，MWCNTs）远程能量转移对ssDNA分子的吸附作用以及对其所标记荧光分子的淬灭作用，在Apt上标记荧光，通过T-Hg^{2+}-T作用使Apt折叠形成双链结构，进而实现水样中重金属（Hg^{2+}、Ag^{+}和Pb^{2+}）的多元检测，但对Hg^{2+}检测的灵敏度（15 nmol/L）并不高[34]. Li等人同样基于上述原理建立了一种Hg^{2+}检测传感器. 当没有Hg^{2+}时，荧光标记的ssDNA缠绕在单壁碳纳米管（Singled-wall CNTs，SWNTs）上导致荧光猝灭；而当Hg^{2+}存在时，存在11个T-T错配的ssDNA即可与荧光标记的ssDNA发生杂交，大大降低了与碳纳米管的结合率，荧光显著增强，实现了水环境中Hg^{2+}的检测，LDL为10 nmol/L [46]. Xue等利用MWCNTs标记寡核苷酸建立了一种一次性侧流试纸条法检测水环境中Hg^{2+}新技术，该捕获探针被固定于检测带，当加入Hg^{2+}时，存在T-T错配的两条ssDNA发生杂交，MWCNTs在检测带发生聚集，显示黑色条带，实现Hg^{2+}可视化检测. 同时作者还探讨了通过测量不同浓度Hg^{2+}加入时检测条带的光密度，可对水环境中Hg^{2+}进行快速定量检测，LDL为0.05 μg/L [47].

2.1.4 基于寡核苷酸和其他纳米材料相结合的Hg^{2+}检测

除此以上介绍的纳米材料以外，Li等基于尺度为（2.7 ± 1.4）nm的氮掺杂碳点和DNA荧光探针建立的Hg^{2+} 检测新技术，结果显示其LDL可达1.26 nmol/L，满足水样检测需求[48]. Liu等基于还原氧化石墨烯（Reduced graphene oxide，rGO）以及富含T的汞特异性探针建立了水环境中Hg^{2+}的检测和分离的技术. 将标记有-NH_2的探针偶联到羧基化的rGO-Fe_3O_4，当加入Hg^{2+}时，自由卷曲状态的ssDNA形成发卡结构，荧光染料SYBR Green I嵌入其中呈现出较强的荧光信号，实现水环境中Hg^{2+}的检测，灵敏度为0.82 μg/L. 此外，该体系还对Hg^{2+}展现出稳定特异、环境友好的吸附能力，吸附率为180.8 mg/g [49]. Fang等基于Cu_2O和纳米壳聚糖（Nano-chitosan particles，NCs）复合材料建立了一种水溶液中Hg^{2+}高灵敏检测电化学DNA传感器. Cu_2O有助于提高纳米复合材料的电化

学性能，Cu_2O纳米微球的空心结构具有较大的比表面积，为DNA吸附提供了更多有效位点；而复合材料的外壳NCs表面活性位点多、性质稳定，更适用于生物活性分子DNA的固定，进而通过形成T-Hg^{2+}-T结构实现水溶液中Hg^{2+}的检测，LDL为0.15 nmol/L [50].

2.2 基于寡核苷酸和两种纳米材料结合的Hg^{2+}检测

除GO一种纳米材料以外，再引入第二个特殊的纳米材料起到了意想不到的检测效果. Yang等基于碳点（Carbon dots，CDs）标记的富含T 的Hg^{2+}特异性探针和GO建立了一种用来检测Hg^{2+}的荧光传感器. 当没有Hg^{2+}存在时，该探针通过氢键作用和π-π堆叠作用吸附在GO上，CDs和GO发生FRET，荧光猝灭；当Hg^{2+}存在时，探针由于T-Hg^{2+}-T作用形成发夹结构，脱离GO的吸附，荧光恢复. 该传感器操作简单，成本较低，检测灵敏度可达2.6 nmol/L [51]. Niu等基于Mn掺杂的CdS/ZnS量子点与GO的FRET机制建立了水环境中Hg^{2+}的荧光传感器. 当加入Hg^{2+}时，两条富含T的ssDNA通过T-Hg^{2+}-T杂交形成稳定的双链结构，Mn掺杂的CdS/ZnS量子点远离GO的表面，荧光强度增强，LDL为0.11 nmol/L [52].

2.3 基于寡核苷酸和等离子体超材料相结合的Hg2+检测

超材料（Metamaterial）是指一些具有自然界的天然材料所不具备的超常物理性质的人工复合结构或复合材料，其反常性质由结构单元而非材料成分引起，这些结构单元是由人工设计所得. 近年来，超材料已成为材料科学、物理、化学等学科的前沿发展方向，并逐步被应用于检测领域. 等离子体超材料是一种基于金属–电介质微纳结构的人工电磁材料，对SERS具有较强的电磁增强效果. Cao等就基于这一超材料建立了SERS逻辑门检测Hg^{2+}新技术. 在K^+离子存在时，富含G的寡核苷酸通过Hoogsteen氢键被折叠成一个独特而稳定的三维形状，即G-四链体，经拉曼散射光谱测量峰值约为（1 485 ± 3）cm^{-1}. Hg^{2+}形成T-Hg^{2+}-T的结合常数（≈ 8.9×10^{17} M^{-1}）远高于K^+堆叠成G四链体结构的结合常数（≈ 5×10^6 M^{-1}）. 因此，当Hg^{2+} 存在时，可以抑制G四链体结构的形成，降低峰值. 而Hg^{2+}与I^-的结合常数相近，加入I^-可竞争性地抑制T-Hg^{2+}-T的形成，Hoogsteen氢键可逆性地再次形成. 该体系为可逆的AND、INHIBIT和OR组合的逻辑门. 该方法的LDL可达到2×10^{-4} μg/L（1 pmol/L）[53]，比EPA的限值低10^4倍.

3 基于脱氧核酶的Hg^{2+}检测

脱氧核酶（DNAzyme）是由体外筛选技术获得，并通过体外分子进化技术合成的一种具有高效的催化活性和结构识别功能的ssDNA片段. 其中一些DNAzyme，对某些金属离子展现出高度特异性，在金属离子检测中发挥着重要作用.

Zhang等基于Cu^{2+} DNAzyme 设计了一种Hg^{2+}比色传感器，通过在底物链的一端引入富含G的序列，在底物链与酶链结合形成的二倍体区域添加T-T错配. 当只有Cu^{2+}存在时，由于T-T错配的存在，酶链不能与底物链发生有效地结合，底物链不能被分割成两段；而当Hg^{2+}和Cu^{2+}同时存在时，由于T-Hg^{2+}-T结构的形成，酶链与底物链结合，底物链被分割成两段，使底物链上富含G的部分折叠形成G-四链体，进行Hg^{2+}的定量检测，LDL为 4 nmol/L [54]. Tian等基于核酸外切酶III和DNAzyme设计了一个Hg^{2+}特异性MB，该探针包括G-四链体DNAzyme序列、自动封闭序列和特异性识别序列3个部分，通过上述循环放大系统可实现Hg^{2+}的比色法检测，LDL为10 pmol/L，肉眼LDL可达1 nmol/L [55]. Li等基于DNAzyme修饰的AuNPs，磁珠和核酸内切酶EcoRV建立了一种饮用水中Hg^{2+}的超灵敏检测系统，在EcoRV的催化作用下，AuNPs上的DNA可以通过T-Hg^{2+}-T与磁性纳米粒子的DNA发生杂交反应，LDL可达0.8 nmol/L，同时还可以降低背景信号[56]. 与天然酶相比，DNAzyme具有以下优点：（1）针对不同的底物可筛选出相应的DNAzyme，由于微流控芯片的快速发展，筛选周期也将大大缩短[57]；（2）筛选出的DNAzyme可进行商业化大量合成；（3）根据需要对DNAzyme进行修饰，拓宽了应用范围；（4）DNAzyme性质稳定、易于储存，可用于某些极端反应体系.

4 结论与展望

本文总结了近年来基于生物分子的水环境中Hg^{2+}快速检测技术新进展. 如蛋白质、DNA等生物分子，有的有商业化产品，有的可进行修饰或改造，通过紫外、荧光、电化学、电化学发光或拉曼光谱等检测手段实现对水环境Hg^{2+}的高灵敏甚至超灵敏检测，远远满足国家卫生标准或者EPA的要求. 这些检测技术又可以通过与纳米材料或超材料相结合，不仅对检测体系起到了一定放大作用，同时还推动了Hg^{2+}可视化检测的发展. 然而，基于生物分子的现场快速检测装置和设备还不够成熟，且反应条件通常比化学方法要求高，产业化还需时日，在实用性方面还有较大的限制，阻碍了其在现场检测中的广泛应用；并且由于检测体系涉及的反应和信号传递、增强元件较多，有的基于化学键作用，有的基于分子间相互作用力，物理、化学作用交互影响，这无疑加大了科学

表1 近年基于生物分子识别的Hg^{2+}快速检测新技术文献列表

Table 1 References on the rapid novel detection technologies of Hg^{2+} based on biological molecular recognition in recent years

生物分子 Biomolecule	检测信号 Detection signal	最低检出限 LDL	年份 Year	参考文献 References
单克隆抗体 Monoclonal antibody (mAb)	化学发光 Chemoluminescence	0.015 ng/mL	2015	[25]
MerR蛋白 MerR protein	荧光 Fluorescence	10 nmol/L	2007	[29]
分子信标 Molecular beacon (MB)	荧光 Fluorescence	1 nmol/L	2014	[37]
富含G的DNA探针 Rich-guanine (G) DNA probe	表面增强拉曼光谱 Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)	2×10^{-4} μg/L	2014	[53]
DNA探针 DNA probe	电化学 Electrochemistry	0.2 nmol/L	2013	[39]
DNA探针 DNA probe	源极–漏极电流 Source-drain current	0.1 nmol/L	2016	[40]
DNA探针 DNA probe	荧光 Fluorescence	0.11 nmol/L	2014	[52]
脱氧核酶 DNAzyme	吸光度 Absorbance	0.8 nmol/L	2015	[56]

设计的难度.

基于上述科学问题的存在，进一步加强现场快速检测Hg^{2+}设备的开发显得尤为迫切，而关于检测元件之间的相互作用机制也需进一步探索. 另外，新材料的研发以及新型检测平台的发展为水环境中Hg^{2+} 超高灵敏、低成本现场快速检测提供了良好的技术支撑，拓宽了应用前景.

参考文献 [References]

1 Boening DW. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review [J]. *Chemosphere*, 2000, **40** (12): 1335-1351

2 Nendza M, Herbst T, Kussatz C, Gies A. Potential for secondary poisoning and biomagnification in marine organisms [J]. *Chemosphere*, 1997, **35** (9): 1875-1885

3 Renzoni A, Zino F, Franchi E. Mercury levels along the food chain and risk for exposed populations [J]. *Environ Res*, 1998, **77** (2): 68-72

4 Harris HH, George GN. The chemical form of mercury in fish-response [J]. *Science*, 2003, **301** (5637): 1203-1203

5 Kuwabara JS, Arai Y, Topping BR, Pickering IJ, George GN. Mercury speciation in piscivorous fish from mining-impacted reservoirs [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, **41** (8): 2745-2749

6 Mason RP, Morel FMM, Hemond HF. The role of microorganisms in elemental mercury formation in natural waters [J]. *Water Air Soil Pollut*, 1995, **80** (1): 775-787

7 Celo V, Lean DRS, Scott SL. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment [J]. *Sci Total Environ*, 2006, **368** (1): 126-137

8 Silbergeld EK, Silva IA, Nyland JF. Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, **207** (2): 282-292

9 Forman J, Moline J, Cernichiari E, Sayegh S, Torres JC, Landrigan MM, Hudson J, Adel HN, Landrigan PJ. A cluster of pediatric metallic mercury exposure cases treated with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, **108** (6): 575-577

10 Newby CA, Riley D, Lealalmeraz TO. Mercury use and exposure among santeria practitioners: religious versus folk practice in Northern New Jersey, USA [J]. *Ethn Health*, 2006, **11** (3): 287-306

11 Factorlitvak P, Hasselgren G, Jacobs D, Begg MD, Kline J, Geier J, Mervish N, Schoenholtz S, Graziano JH. Mercury derived from dental amalgams and neuropsychologic function [J]. *Environ Health Perspect*, 2003, **111** (5): 719-723

12 Pichichero ME, Cernichiari E, Lopreiato J, Treanor JJ. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study [J]. *The Lancet*, 2002, **360** (9347): 1737-1741

13 Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, **198** (2): 209-230

14 Kaur P, Aschner M, Syversen T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes [J]. *Neurotoxicology*, 2006, **27** (4): 492-500

15 Milaeva ER. The role of radical reactions in organomercurials impact on lipid peroxidation [J]. *J Inorg Biochem*, 2006, **100** (5): 905-915

16 Zalups RK, Lash LH. Cystine alters the renal and hepatic disposition of inorganic mercury and plasma thiol status [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, **214** (1): 88-97

17 Louie H, Wong C, Huang YJ, Fredrickson S. A study of techniques for the preservation of mercury and other trace elements in water for analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [J]. *Anal Methods,* 2012, **4** (2): 522-529

18 Reis A, Lopes CB, Davidson CM, Duarte AC, Pereira E. Extraction of mercury water-soluble fraction from soils: an optimization study [J]. *Geoderma*, 2014, **213**: 255-260

19 Escudero LB, Olsina RA, Wuilloud RG. Polymer-supported ionic liquid solid phase extraction for trace inorganic and organic mercury determination in water samples by flow injection-cold vapor atomic absorption spectrometry [J]. *Talanta*, 2013, **116** (22): 133-140

20 Tan H, Zhang Y, Chen Y. Detection of mercury ions (Hg^{2+}) in urine using a terbium chelate fluorescent probe [J]. *Sens Actuators B*, 2011, **156** (1): 120-125

21 George GN, Singh SP, Myers GJ, Watson GE, Pickering IJ. The chemical forms of mercury in human hair: a study using X-ray absorption spectroscopy [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2010, **15** (5): 709-715

22 Zhan S, Wu Y, Wang L, Zhan X, Pei Z. A mini-review on functional nucleic acids-based heavy metal ion detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, **86**: 353-368

23 Wang Y, Yang H, Pschenitza M, Niessner R, Li Y, Knopp D, Deng A. Highly sensitive and specific determination of mercury(II) ion in water, food and cosmetic samples with an ELISA based on a novel monoclonal antibody [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, **403** (9): 2519-2528

24 Wang Y, Wang L, Wang S, Yang M, Cai J, Liu F. 'Green' immunochromatographic electrochemical biosensor for mercury(II) [J]. *Mikrochim Acta,* 2016, **183** (9): 2509-2516

25 Xu M, Chen M, Dong T, Zhao K, Deng A, Li J. Flow injection chemiluminescence immunoassay based on resin beads, enzymatic amplification and a novel monoclonal antibody for determination of Hg^{2+} [J]. *Analyst*, 2015, **140** (18): 6373-6378

26 张何, 胡家义, 傅昕. 一种基于钝顶螺旋藻藻蓝蛋白荧光猝灭法的汞离子传感新方法[J]. 分析测试学报, 2012, **31** (8): 897-902 [Zhang H, Hu JY, Fu X. A new method for determination of mercury ions based on the fluorescence quenching of phycocyanin from spirulina platensis [J]. *J Instrum Anal*, 2012, **31** (8): 897-902]

27 Zhu R, Zhou Y, Wang XL, Liang LP, Long YJ, Wang QL, Zhang HJ, Huang XX, Zheng HZ. Detection of Hg^{2+} based on the selective inhibition of peroxidase mimetic activity of BSA-Au clusters [J]. *Talanta*, 2013, **117** (22): 127-132

28 Kanekiyo Y, Naganawa R, Tao H. Fluorescence detection of ATP based on the ATP-mediated aggregation of pyrene-appended boronic acid on a polycation [J]. *Chem Commun*, 2004, (8): 1006-1007

29 Wegner SV, Okesli A, Chen P, He C. Design of an emission ratiometric biosensor from MerR family proteins: a sensitive and selective sensor for Hg^{2+} [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, **129** (12): 3474-3475

30 马佳, 刘楠, 马新华, 李晓丽, 刘亚楠, 李亚, 梁伟杰, 周志江. 双链DNA中汞/银离子-嘧啶碱基对间结合作用及其在检测技术方面的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (5): 848-853 [Ma J, Liu N, Ma XH, Li XL, Liu YN, Li Y, Liang WJ, Zhou ZJ . Review on the study of mercury/silver ions-pyrimidine base pairs in DNA duplexes and their application in detection technology [J]. *Chin J Appl Environ*

Biol, 2015, **21** (5): 848-853]

31 Guo LQ, Yin N, Chen GN. Photoinduced electron transfer mediated by pi-stacked thymine-Hg^{2+}-thymine base pairs [J]. *J Phys Chem C,* 2011, **115** (11): 4837-4842

32 Ono A, Togashi H. Highly selective oligonucleotide-based sensor for mercury(II) in aqueous solutions [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2004, **43** (33): 4300-4302

33 Ma J, Liu N, Li L, Ma X, Li X, Liu Y, Li Y, Zhou Z, Gao Z. An evaluation assay for thymine–mercuric–thymine coordination in the molecular beacon-binding system based on microscale thermophoresis [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2017, **252**: 680-688

34 Wang S, Si S. Aptamer biosensing platform based on carbon nanotube long-range energy transfer for sensitive, selective and multicolor fluorescent heavy metal ion analysis [J]. *Anal Methods,* 2013, **5** (12): 2947-2953

35 Teh HB, Wu H, Zuo X, Li SFY. Detection of Hg^{2+} using molecular beacon-based fluorescent sensor with high sensitivity and tunable dynamic range [J]. *Sens Actuators B*, 2014, **195**: 623-629

36 Li Y, Liu N, Liu H, Wang Y, Hao Y, Ma X, Li X, Huo Y, Lu J, Tang S. A novel label-free fluorescence assay for one-step sensitive detection of Hg^{2+} in environmental drinking water samples[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**: 45974

37 Zhou Z, Huang H, Chen Y, Liu F, Huang CZ, Li N. A distance-dependent metal-enhanced fluorescence sensing platform based on molecular beacon design [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, **52**: 367-373

38 Zhang L, Chang H, Hirata A, Wu H, Xue Q, Chen M. Nanoporous gold based optical sensor for sub-ppt detection of mercury ions [J]. *ACS Nano*, 2013, **7** (5): 4595-4600

39 Zhang M, Ge L, Ge SG, Yan M, Yu JH, Huang JD, Liu S. Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence device for simultaneous detection of Pb^{2+} and Hg^{2+} based on potential-control technique [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, **41**(6): 544-550

40 Zhou GH, Chang JB, Pu HH, Shi KY, Mao S, Sui XY, Ren R, Cui SM, Chen JH. Ultrasensitive mercury ion detection using DNA-functionalized molybdenum disulfide nanosheet/gold nanoparticle hybrid field effect transistor device [J]. *ACS Sens*, 2016, **1** (3): 295-302

41 Zeng GM, Zhang C, Huang DL, Lai C, Tang L, Zhou YY, Xu PA, Wang H, Qin L, Cheng M. Practical and regenerable electrochemical aptasensor based on nanoporous gold and thymine-Hg^{2+}-thymine base pairs for Hg^{2+} detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, **90**: 542-548

42 Zhu SS, Zhuo Y, Miao H, Zhong D, Yang XM. Detection of mercury(II) by DNA templated gold nanoclusters based on forming thymidine-Hg^{2+}-thymidine duplexes [J]. *Luminescence*, 2015, **30** (5): 631-636

43 Li M, Zhou X, Ding W, Guo S, Wu N. Fluorescent aptamer-functionalized graphene oxide biosensor for label-free detection of mercury(II) [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, **41** (4): 889-893

44 Zhang Y, Zhao H, Wu Z, Xue Y, Zhang X, He Y, Li X, Yuan Z. A novel graphene-DNA biosensor for selective detection of mercury ions [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, **48** (2): 180-187

45 Lu C, Huang PJJ, Ying YB, Liu JW. Covalent linking DNA to graphene oxide and its comparison with physisorbed probes for Hg^{2+} detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, **79**: 244-250

46 Niu SY, Li QY, Ren R, Hu KC. DNA/single-walled carbon nanotubes based fluorescence detection of Hg^{2+} [J]. *Anal Lett*, 2010, **43** (15): 2432-2439

47 Yao L, Teng J, Zhu MY, Zheng L, Zhong YH, Liu GD, Xue F, Chen W. MWCNTs based high sensitive lateral flow strip biosensor for rapid determination of aqueous mercury ions [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, **85**: 331-336

48 Li Z, Ni Y, Kokot S. A new fluorescent nitrogen-doped carbon dot system modified by the fluorophore-labeled ssDNA for the analysis of 6-mercaptopurine and Hg (II) [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, **74**: 91-97

49 Liu YC, Wang XQ, Wu H. Reusable DNA-functionalized-graphene for ultrasensitive mercury (II) detection and removal [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, **87**: 129-135

50 Liu SL, Kang MM, Yan FF, Peng DL, Yang YQ, He LH, Wang MH, Fang SM, Zhang ZH. Electrochemical DNA biosensor based on microspheres of cuprous oxide and nano-chitosan for Hg(II) detection [J]. *Electrochim Acta,* 2015, **160**: 64-73

51 Cui X, Zhu L, Wu J, Hou Y, Wang PY, Wang ZN, Yang M. A fluorescent biosensor based on carbon dots-labeled oligodeoxyribonucleotide and graphene oxide for mercury (II) detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, **63**: 506-512

52 Huang DW, Niu CG, Zeng GM, Wang XY, Lü XX. A highly sensitive protocol for the determination of Hg^{2+} in environmental water using time-gated mode [J]. *Talanta*, 2015, **132**: 606-612

53 Cao C, Zhang J, Li S, Xiong Q. Intelligent and ultrasensitive analysis of mercury trace contaminants via plasmonic metamaterial-based surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Small*, 2014, **10** (16): 3252-3256

54 Zhang Q, Cai Y, Li H, Kong D, Shen H. Sensitive dual DNAzymes-based sensors designed by grafting self-blocked G-quadruplex DNAzymes to the substrates of metal ion-triggered DNA/RNA-cleaving DNAzymes [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, **38** (1): 331-336

55 Tian Y, Wang Y, Xu Y, Liu Y, Li D, Fan CH. A highly sensitive chemiluminescence sensor for detecting mercury (II) ions: a combination of Exonuclease III-aided signal amplification and graphene oxide-assisted background reduction [J]. *Sci China Chem*, 2015, **58** (3): 514-518

56 Li C, Dai P, Rao X, Shao L, Cheng G, He P, Fang Y. An ultra-sensitive colorimetric Hg^{2+}-sensing assay based on DNAzyme-modified Au NP aggregation, MNPs and an endonuclease [J]. *Talanta*, 2015, **132**: 463-468

57 Park JW, Lee SJ, Ren S, Lee S, Kim S, Laurell T. Acousto-microfluidics for screening of ssDNA aptamer [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 1-9