



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108181276 A

(43)申请公布日 2018.06.19

(21)申请号 201711402757.3

(22)申请日 2017.12.22

(71)申请人 安徽工业大学

地址 243002 安徽省马鞍山市花山区湖东  
中路59号

(72)发明人 何利芳 张奎

(74)专利代理机构 安徽知问律师事务所 34134

代理人 杜袁成

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

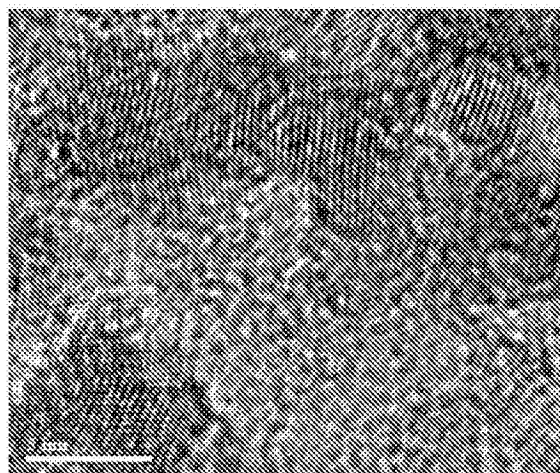
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

基于掺杂硫化锌纳米晶探针的双发射荧光检测巯基生物分子的方法

(57)摘要

本发明公开一种基于掺杂硫化锌纳米晶探针的双发射荧光检测巯基生物分子的方法,属于化学测量技术领域。该方法包括掺杂硫化锌纳米晶的制备及其双发射荧光信号调制、标准曲线的建立和巯基生物分子的检测,标准曲线是在紫外光激发下确立的双发射荧光信号强度比值变化与待测物质浓度之间对应关系的曲线,即在紫外光激发下向浓度为1-100微克每毫升经光谱调制的掺杂硫化锌纳米晶探针分散液中依次加入梯度浓度待测物质样品溶液并逐次测定荧光强度比值而建立的标准曲线。本发明方法能有效避免样品中其他杂质的干扰,选择性好,同时省略了预处理过程,达到对包括谷胱甘肽、半胱氨酸、高半胱氨酸等含巯基生物活性分子的敏感检测。



1. 一种基于掺杂硫化锌纳米晶探针的双发射荧光检测巯基生物分子的方法,其特征在于该方法具体步骤如下:

(1) 制备掺杂硫化锌纳米晶:

将5~50mmol的锌源与0.5~7.5mmol的一种或二种掺杂水溶性盐溶解于一定量的水溶液中,所述锌源为氯化锌、硫酸锌、硝酸锌或醋酸锌中的任意一种,所述掺杂水溶性盐为锰盐、铜盐、钴盐,所述锰盐为氯化锰、硫酸锰、硝酸锰或醋酸锰中的任意一种;所述铜盐为氯化铜、硫酸铜、硝酸铜或醋酸铜中的任意一种;所述钴盐为氯化钴、硫酸钴、硝酸钴或醋酸钴中的任意一种;然后继续加入所述锌源1.2-4倍当量的巯基乙酸或巯基丙酸,调节pH值在9-11之间并搅拌,所述锌源与掺杂元素的摩尔比为100:1~100:20,当掺杂元素为两种时,掺杂元素的摩尔比为1:1;温度控制在室温至回流温度,采用水热法或微波辅助法,加入与锌源等摩尔量的硫化钠,反应0.1~48小时,离心洗涤得到具有双发射带的掺杂硫化锌纳米晶,备用。

(2) 掺杂硫化锌纳米晶双发射荧光的调制:

取适量掺杂硫化锌纳米晶分散于水中,然后加入猝灭剂双环己酮草酰双脘、1-(4-吡啶基)吡啶氢盐酸盐或双硫脘任意一种,直到双发射荧光的强度比值不变为止,将经猝灭剂调制后的掺杂硫化锌纳米晶分离洗涤后,得到的掺杂纳米晶探针避光储存备用;

(3) 绘制标准曲线:

将得到的所述掺杂纳米晶探针分散于水中制成浓度1-100微克每毫升的掺杂纳米晶探针分散液,在紫外光激发下依次加入梯度浓度的标样溶液并逐次测定双发射荧光强度比值变化,以标样浓度为横坐标,荧光比率为纵坐标绘制得到标准曲线;

(4) 荧光检测:

将待测巯基生物分子样品溶液加入到所述掺杂纳米晶探针分散液中,在紫外光激发下测定双发射荧光的强度比值变化,根据标准曲线求得待测样品浓度。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述掺杂硫化锌纳米晶选自Mn、Cu或Co掺杂进ZnS纳米晶宿主,或Mn、Cu、Co任意两种共同掺杂进ZnS纳米晶;纳米晶与掺杂元素的摩尔比为100:1~100:20,当掺杂元素为两种时,掺杂元素摩尔比为1:1。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述的猝灭剂选自双环己酮草酰双脘、1-(4-吡啶基)吡啶氢盐酸盐及双硫脘中的任一种。

4. 根据权利要求1所述的双发射荧光检测巯基生物分子的方法,其特征在于所述巯基生物分子包括谷胱甘肽、半胱氨酸、高半胱氨酸含巯基生物标记分子。

## 基于掺杂硫化锌纳米晶探针的双发射荧光检测巯基生物分子的方法

### 技术领域：

[0001] 本发明属于化学测量技术领域，涉及一种巯基生物分子的分析方法，特别涉及一种痕量巯基生物分子的荧光分析检测方法，具体地说是一种基于掺杂硫化锌纳米晶探针的双发射荧光检测巯基生物分子的方法。

### 背景技术：

[0002] 生物体内许多活性巯基小分子(包括谷胱甘肽、半胱氨酸、高半胱氨酸等)在生物体生理和病理过程中发挥着重要作用,其存在以及数量通常在维持细胞正常功能上起着关键作用,同时也是许多疾病和癌症直接相关的重要标志分子。因此,低成本地鉴定和检测这些巯基生物分子对于疾病的诊断和医学研究来说是非常重要的,已经成为当前化学、医学和生命科学等学科领域的研究热点。目前针对这些痕量活性分子检测的方法主要有酶联免疫分析法、光学分析法、电化学分析法、化学与生物传感方法等。但是有些方法有时并不十分有效,例如基于大型仪器的检测方法尽管有很高的敏感性,但是需要专门培训技术人员、检测费用昂贵、且只能离线检测不易进行实时检测。因此,仍然有必要寻求一种能够快速和便捷的、可以实时检测生物活性分子的分析方法。

[0003] 近些年来,纳米材料良好的物理性质和化学传感的灵活性为构建针对这些含巯基生物活性分子的化学传感器带来了新机遇。尤其是基于纳米材料的可调的光学特性,例如利用纳米材料的荧光或吸收光谱的变化,构建化学传感器已经实现了对生物分子高选择性灵敏检测。同时这些方法具有操作方便、过程简单、稳定性好等优点,在生物活性分子检测方面已经显露出巨大的潜力。利用纳米材料的发光特性(如掺杂半导体纳米晶的优越光学特性)构筑化学传感器,不仅能够提供高比表面积以更好的接触和捕获识别目标分析物,而且能够提供丰富的光学信号以实现准确定性定量分析。例如,李妍等制备了巯基丙酸功能化的锰掺杂硫化锌纳米晶(Sensors and Actuators B:Chemical,2016,227,108-116),用猝灭剂高锰酸钾猝灭纳米晶的磷光发光,当谷胱甘肽存在时,磷光增强,实现了对谷胱甘肽的敏感检测。然而,这种单一发光强度的变化,容易受到外界环境因素的干扰,利用掺杂纳米晶的双发射荧光性质检测生物分子还未见文献报道。

### 发明内容：

[0004] 本发明所要解决的技术问题提供一种基于掺杂硫化锌纳米晶探针的双发射荧光检测巯基生物分子的方法,该方法利用掺杂硫化锌纳米晶的双发射荧光性质设计实现敏感检测巯基生物分子的途径,提供一种实时的快速简便检测痕量生物分子(包括谷胱甘肽、半胱氨酸、高半胱氨酸等)的分析方法。

[0005] 本发明所提供的一种基于掺杂硫化锌纳米晶探针的双发射荧光检测巯基生物分子的方法,该方法具体步骤如下：

[0006] (1) 制备掺杂硫化锌纳米晶：

[0007] 将5~50mmol的锌源与0.5~7.5mmol的一种或二种掺杂水溶性盐溶解于一定量的水溶液中,所述锌源为氯化锌、硫酸锌、硝酸锌或醋酸锌中的任意一种,所述掺杂水溶性盐为锰盐、铜盐、钴盐,所述锰盐为氯化锰、硫酸锰、硝酸锰或醋酸锰中的任意一种;所述铜盐为氯化铜、硫酸铜、硝酸铜或醋酸铜中的任意一种;所述钴盐为氯化钴、硫酸钴、硝酸钴或醋酸钴中的任意一种;然后继续加入所述锌源1.2-4倍当量的巯基乙酸或巯基丙酸,调节pH值在9-11之间并搅拌,所述锌源与掺杂元素的摩尔比为100:1~100:20,当掺杂元素为两种时,掺杂元素的摩尔比为1:1;温度控制在室温至回流温度,采用水热法或微波辅助法,加入与锌源等摩尔量的硫化钠,反应0.1~48小时,离心洗涤得到具有双发射带的掺杂硫化锌纳米晶,备用。

[0008] (2) 掺杂硫化锌纳米晶双发射荧光的调制:

[0009] 取适量掺杂硫化锌纳米晶分散于水中,然后加入猝灭剂双环己酮草酰双脘、1-(4-吡啶基)吡啶氯盐酸盐或双硫脘任意一种,直到双发射荧光的强度比值不变为止,将经猝灭剂调制后的掺杂硫化锌纳米晶分离洗涤后,得到的掺杂纳米晶探针避光储存备用;

[0010] (3) 绘制标准曲线:

[0011] 将得到的所述掺杂纳米晶探针分散于水中制成浓度1-100微克每毫升的掺杂纳米晶探针分散液,在紫外光激发下依次加入梯度浓度的标样溶液并逐次测定双发射荧光强度比值变化,以标样浓度为横坐标,荧光比率为纵坐标绘制得到标准曲线;

[0012] (4) 荧光检测:

[0013] 将待测巯基生物分子样品溶液加入到所述掺杂纳米晶探针分散液中,在紫外光激发下测定双发射荧光的强度比值变化,根据标准曲线求得待测样品中浓度。

[0014] 所述掺杂硫化锌纳米晶选自Mn、Cu或Co掺杂进ZnS纳米晶宿体,或Mn、Cu、Co任意两种共同掺杂进ZnS纳米晶;纳米晶与掺杂元素的摩尔比为100:1~100:20,当掺杂元素为两种时,掺杂元素摩尔比为1:1。

[0015] 所述的猝灭剂选自双环己酮草酰双脘、1-(4-吡啶基)吡啶氯盐酸盐及双硫脘中的任意一种。

[0016] 所述的巯基生物分子包括谷胱甘肽、半胱氨酸、高半胱氨酸含巯基生物标记分子。当巯基生物分子存在时,双发射荧光信号的比值发生变化,据此确定双发射荧光信号强度比值变化与待测样品浓度之间的对应关系,建立标准曲线,确定检测方法。

[0017] 本发明的优点和积极效果:

[0018] 本发明首次利用掺杂硫化锌纳米晶的双发射荧光性质实现检测巯基生物活性分子的分析方法。对谷胱甘肽、半胱氨酸、高半胱氨酸分析检测的线性范围为1~30 $\mu\text{mol/L}$ ,检出限为0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。本发明方法方便快捷、操作简单、敏感性高、效果显著;能有效避免样品中其他杂质的干扰,选择性好,同时省略了预处理过程,达到对包括谷胱甘肽、半胱氨酸、高半胱氨酸等含巯基生物活性分子的敏感检测。

**附图说明:**

[0019] 图1是Cu掺杂ZnS纳米晶的形貌照片(高分辨透射电子显微镜观察)。

[0020] 图2是不同浓度双环己酮草酰双脘对Cu掺杂ZnS纳米晶的双发射荧光强度变化图。

[0021] 图3是谷胱甘肽浓度与双发射荧光强度比值之间的线性关系图(即标准曲线)。

[0022] 图4是Cu掺杂ZnS纳米晶对半胱氨酸检测的荧光光谱图。

[0023] 图5是半胱氨酸浓度与双发射荧光强度比值之间的线性关系图(即标准曲线)。

#### 具体实施方式:

[0024] 下述实施例是对于本发明内容的进一步说明以作为对本发明技术内容的阐释,但本发明的实质内容并不仅限于下述实施例所述,本领域的普通技术人员可以且应当知晓任何基于本发明实质精神的简单变化或替换均应属于本发明所要求的保护范围。

[0025] 实施例1:

[0026] 1) 制备Cu掺杂ZnS纳米晶

[0027] 取二水合乙酸锌878mg、五水合硫酸铜10mg和87 $\mu$ L巯基丙酸分散于200mL超纯水中配成溶液,搅拌均匀。然后氢氧化钠溶液调节溶液pH值为9,得到前驱液。用微波反应管取15mL前驱液置于微波反应器中,设定反应温度为120 $^{\circ}$ C,反应进行约50min后停止实验,即得到Cu掺杂ZnS纳米晶溶液。离心洗涤即可得到具有双发射带的Cu掺杂ZnS纳米晶,相貌见图1,避光保存备用。

[0028] 2) 掺杂纳米晶双发射荧光的调制

[0029] 取适量Cu掺杂ZnS纳米晶分散于水中,然后逐次加入双环己酮草酰双脲调制双发射荧光的强度比值(见图2)。将经猝灭剂调制后的掺杂纳米晶分离洗涤后,得到的纳米晶探针避光储存备用。

[0030] 3) 绘制标准曲线及荧光检测

[0031] 将得到的掺杂纳米晶探针分散于水中制成浓度微克每毫升的分散液,在紫外光激发下依次加入梯度浓度的谷胱甘肽标样溶液并逐次测定双发射荧光强度比值变化,以标样浓度为横坐标,双发射荧光比率为纵坐标绘制得到标准曲线(图3)。将待测谷胱甘肽样品溶液加入到纳米晶探针分散液中,在紫外光激发下测定双发射荧光的强度比值变化,根据标准曲线求得待测谷胱甘肽样品中浓度(图4)。

[0032] 实施例2:

[0033] 1) 制备Co掺杂ZnS纳米晶

[0034] 取二水合乙酸锌878mg、五水合硫酸钴12mg和87 $\mu$ L巯基丙酸分散于180mL超纯水中配成溶液,搅拌均匀。然后氢氧化钠溶液调节溶液pH值为9,得到前驱液。用微波反应管取20mL前驱液置于微波反应器中,设定反应温度为120 $^{\circ}$ C,反应进行约60min后停止实验,即得到Co掺杂ZnS纳米晶溶液。离心洗涤即可得到具有双发射带的Co掺杂ZnS纳米晶,避光保存备用。

[0035] 2) 掺杂纳米晶双发射荧光的调制

[0036] 取适量Co掺杂ZnS纳米晶分散于水中,然后逐次加入双环己酮草酰双脲调制双发射荧光的强度比值。将经调制后的Co掺杂ZnS纳米晶分离洗涤后,得到的纳米晶探针避光储存备用。

[0037] 3) 绘制标准曲线及荧光检测

[0038] 将得到的Co掺杂ZnS纳米晶探针分散于水中制成浓度微克每毫升的分散液,在紫外光激发下依次加入梯度浓度的半胱氨酸标样溶液并逐次测定双发射荧光强度比值变化,以标样浓度为横坐标,双发射荧光比率为纵坐标绘制得到标准曲线(图5)。将待测半胱氨酸

样品溶液加入到纳米晶探针分散液中,在紫外光激发下测定双发射荧光的强度比值变化,根据标准曲线求得待测半胱氨酸样品中浓度。

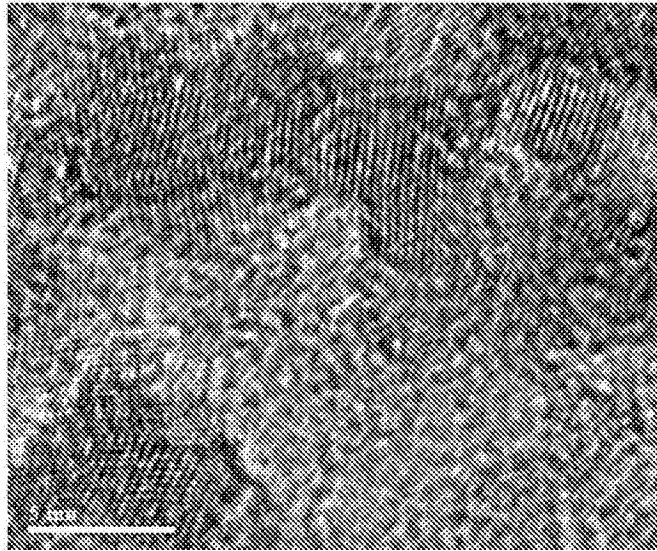


图1

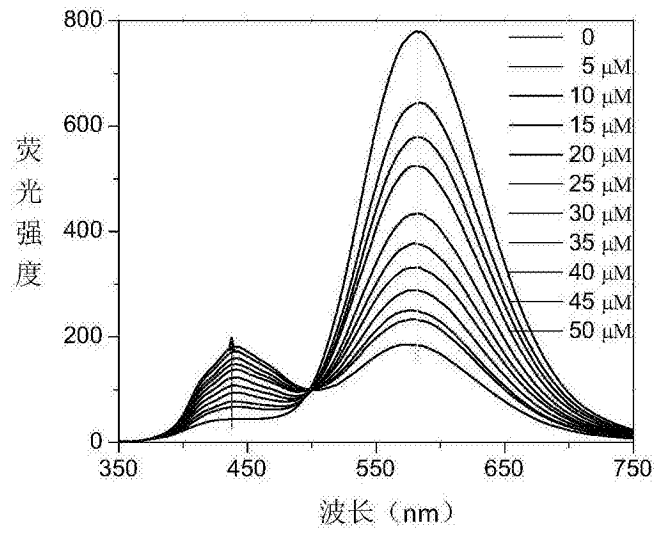


图2

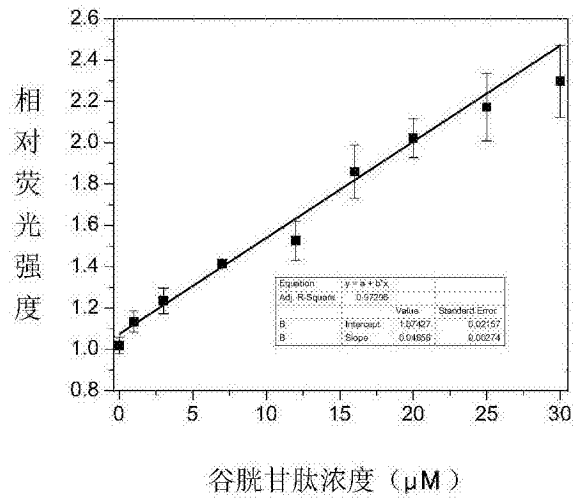


图3

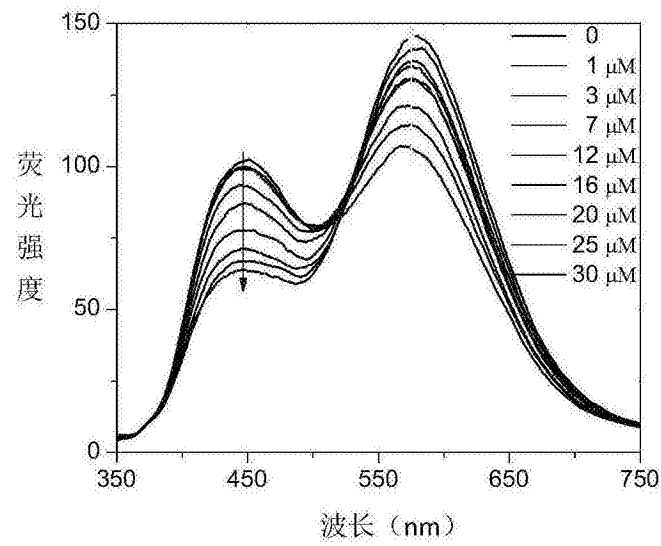


图4



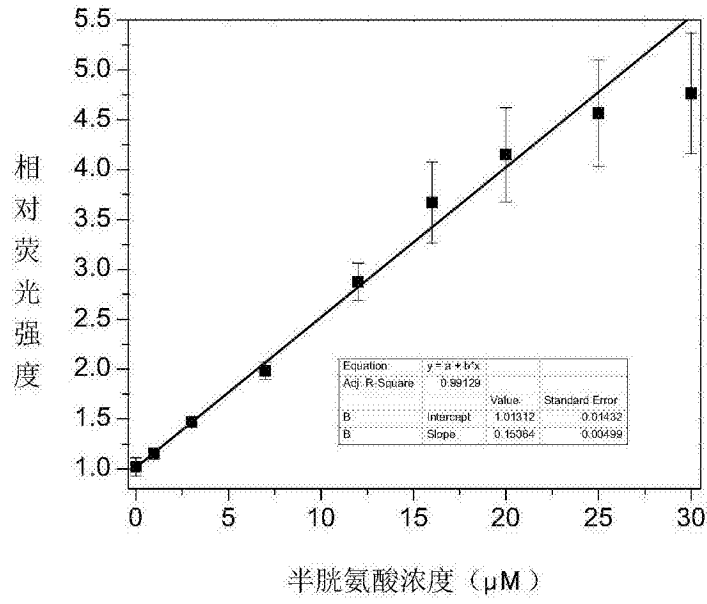


图5