



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110736724 B

(45)授权公告日 2020.07.31

(21)申请号 201910905841.X

(22)申请日 2019.09.24

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110736724 A

(43)申请公布日 2020.01.31

(73)专利权人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路422号

(72)发明人 赵玉芬 王敏凝 蔡华欢 李福来

(74)专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

(普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

审查员 李占

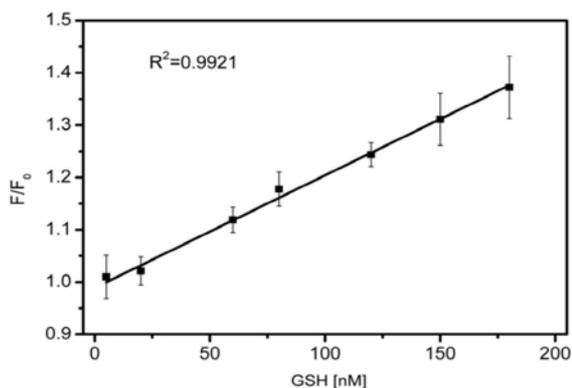
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种还原型谷胱甘肽的检测方法

(57)摘要

一种还原型谷胱甘肽的检测方法,涉及谷胱甘肽。提供简单有效、检测灵敏度高的—种还原型谷胱甘肽的检测方法。以合成的含二硫键的双官能团有机小分子作为连接分子,构建了表面修饰荧光分子的纳米金探针。结合荧光共振能量转移FRET技术和还原型谷胱甘肽能够还原二硫键的性质,实现对还原型谷胱甘肽的检测。与现有方法相比,检测方法简单有效,对还原型谷胱甘肽的检测灵敏度高,所用的试剂都廉价易得,且绿色环保。



1. 一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于包括以下步骤:

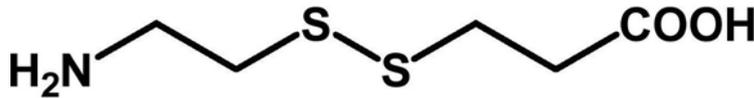
1) 以2-氨基乙硫醇和3-巯基丙酸为原料,在 H_2O_2 和氨水的参与下,合成两端分别为氨基和羧基的含二硫键的双官能团有机小分子,然后异硫氰酸荧光素和双官能团有机小分子在有机溶剂中反应,生成Linker-FITC,通过离心浓缩,去除多余的反应溶剂;

2) 制备纳米金颗粒,加入聚赖氨酸(ϵ -Polylysine, PLL)静置过夜反应,通过离心除去游离的聚赖氨酸后,加入水重悬,得到表面修饰聚赖氨酸的纳米金(Au@PLL);

3) 通过1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺反应活化Linker-FITC上的羧基,进而与Au@PLL上的氨基发生缩合反应,经过离心除去体系中未反应的Linker-FITC,将沉淀用超纯水重新分散,得到最终用于检测纳米金探针(Au@PLL/Linker-FITC);

4) 不同浓度梯度的GSH与纳米金探针恒温水浴中反应后,取100mL反应体系加入96孔酶标板进行荧光光谱检测,测定得到GSH标准曲线,检出限为1nM。

2. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤1)中,所述含二硫键的双官能团有机小分子的结构式如下:



3. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤1)中,所述2-氨基乙硫醇和3-巯基丙酸的当量比为1:1;

所述异硫氰酸荧光素和双官能团有机小分子的当量比为1.2:1。

4. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤1)中,所述有机溶剂采用甲醇和三乙胺混合溶液,甲醇和三乙胺的当量比为100:1;

所述反应的反应温度为35~40°C,反应时间为6~8h,离心浓缩条件为40°C,2h。

5. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤2)中,所述制备纳米金颗粒采用柠檬酸盐还原法,具体步骤为:向圆底烧瓶中加入100mL的超纯水和磁子,油浴加热至120°C,微沸状态下加入1mL 1%的氯金酸溶液,打开磁力搅拌,搅拌均匀,至溶液微沸后迅速加入750 μ L 57mg/mL的柠檬酸钠溶液;维持温度在120°C左右反应20min,观察到溶液颜色慢慢变成深酒红色,停止加热,即完成了纳米金颗粒的合成。

6. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤2)中,所述纳米金颗粒的粒径为17~18nm;所述加入聚赖氨酸采用体积百分浓度为0.1%的聚赖氨酸;所述水采用超纯水。

7. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤2)中,所述纳米金颗粒和聚赖氨酸的反应体积比为1:(3~5);离心条件为5000~6000rpm,20min。

8. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤3)中,所述反应中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺当量比为1:1,活化条件为室温下旋转反应15~30min;所述缩合反应温度为4°C,反应时间为1~2h。

9. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤4)中,所述不同浓度梯度的GSH浓度范围为10mM~50nM;所述不同浓度梯度GSH与纳米金探针溶液的体积比为1:50,使得最终反应体系中GSH浓度范围为0.2mM~1nM。

10. 如权利要求1所述一种还原型谷胱甘肽的检测方法,其特征在于在步骤4)中,所述恒温水浴的温度为37℃,反应时间为2h。

一种还原型谷胱甘肽的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及谷胱甘肽,尤其是涉及一种还原型谷胱甘肽的检测方法。

背景技术

[0002] 谷胱甘肽(glutathione,r-glutamyl cysteine+glycine,GSH)作为细胞内含量最丰富的非蛋白硫醇,是目前研究最广泛的小分子硫醇。细胞内大部分(>95%)的谷胱甘肽以还原型GSH存在,而少部分为氧化型GSSG。生物体内还原型谷胱甘肽含量的异常变化,与阿尔茨海默症、囊性纤维化、肝脏损伤等多种疾病的发生有着密切的关系。因此,研究对还原型谷胱甘肽的检测方法,对疾病诊断、药物治疗等方面有着重要的意义。

[0003] 目前已经开发的对还原型谷胱甘肽的检测方法有高效液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE)、表面增强拉曼(SERS)法和比色法等。高效液相色谱法(HPLC)和毛细管电泳(CE)对GSH检测的灵敏度高,但耗时长且对仪器有一定的要求。表面增强拉曼(SERS)法和比色法检测时间较短,但是对GSH检测的灵敏度低,检出限一般在 μM 级别。因此开发一种简单有效、检测灵敏度高的还原型谷胱甘肽检测方法,具有重要的科学意义和临床应用价值。

[0004] 中国专利CN201610764935.6公开一种基于电化学探针高灵敏度检测还原型谷胱甘肽的方法,利用稀土铈(IV)作为电化学探针,基于Ce(IV)和GSH进行氧化还原反应,Ce(IV)转化为Ce(III)时有电化学信号的变化,建立一种电化学传感器技术检测还原型谷胱甘肽的方法。在CHI660D电化学工作站完成,工作电极为金电极,对电极为铂电极,参比电极为银/氯化银电极,电化学测试为示差脉冲法,实验条件是支持电解质为 $1.0\text{mol/L Na}_2\text{SO}_4$,溶液pH值为6,测试温度为 25°C ;使用DPV法分别测定其电流值的变化。电流值与所加GSH浓度成线性关系,通过计算得出GSH的检测浓度,检测限为 $0.05\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

[0005] 中国专利CN201310449795.X公开一种还原型谷胱甘肽的检测方法,包括以下步骤:将含纳米金颗粒的溶液和氯金酸溶液分别用缓冲溶液稀释后再混合,然后加入表面活性剂溶液混匀,向所得混合溶液中加入待测溶液,静置 $5\text{min}\sim 10\text{min}$ 后,再加入 H_2O_2 水溶液形成反应体系并启动反应,反应完成后,对所得产物体系的紫外可见吸收光谱进行检测,根据检测所得产物体系的紫外可见吸收光谱中 520nm 处的吸光度变化定性判断待测溶液中是否含有还原型谷胱甘肽,通过已测定的线性回归方程定量检测待测溶液中还原型谷胱甘肽的含量。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供简单有效、检测灵敏度的一种还原型谷胱甘肽的检测方法。

[0007] 本发明包括以下步骤:

[0008] 1)以2-氨基乙硫醇($\text{C}_2\text{H}_7\text{NS}$)和3-巯基丙酸($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$)为原料,在 H_2O_2 和氨水的参与下,合成两端分别为氨基和羧基的含二硫键的双官能团有机小分子(Linker),然后异硫氰酸荧光素(FITC)和双官能团有机小分子(Linker)在有机溶剂中反应,生成Linker-FITC,通

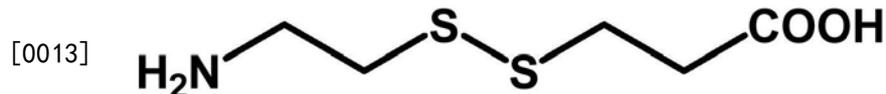
过离心浓缩,去除多余的反应溶剂;

[0009] 2) 制备纳米金颗粒,加入聚赖氨酸(ϵ -Polylysine, PLL)静置过夜反应,通过离心除去游离的聚赖氨酸后,加入水重悬,得到表面修饰聚赖氨酸的纳米金(Au@PLL);

[0010] 3) 通过1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)反应活化Linker-FITC上的羧基,进而与Au@PLL上的氨基发生缩合反应,经过离心除去体系中未反应的(Linker-FITC),将沉淀用超纯水重新分散,得到最终用于检测纳米金探针(Au@PLL/Linker-FITC);

[0011] 4) 不同浓度梯度的GSH与纳米金探针恒温水浴中反应后,取100mL反应体系加入96孔酶标板进行荧光光谱检测,测定得到GSH标准曲线,检出限为1nM。

[0012] 在步骤1)中,所述含二硫键的双官能团有机小分子(Linker)的结构式如下:



[0014] 所述2-氨基乙硫醇(C_2H_7NS)和3-巯基丙酸($C_3H_6O_2S$)的当量比为1:1;

[0015] 所述异硫氰酸荧光素(FITC)和双官能团有机小分子(Linker)的当量比为1.2:1;

[0016] 所述有机溶剂可采用甲醇和三乙胺混合溶液,甲醇和三乙胺的当量比为100:1;

[0017] 所述反应的反应温度可为35~40℃,反应时间可为6~8h,离心浓缩条件为40℃,2h。

[0018] 在步骤2)中,所述制备纳米金颗粒可采用柠檬酸盐还原法,具体步骤可为:向圆底烧瓶中加入100mL的超纯水和磁子,油浴加热至120℃,微沸状态下加入1mL 1%的氯金酸溶液,打开磁力搅拌。搅拌均匀,至溶液微沸后迅速加入750 μ L 57mg/mL的柠檬酸钠溶液;维持温度在120℃左右反应20min,观察到溶液颜色慢慢变成深酒红色,停止加热,即完成了纳米金颗粒的合成;

[0019] 所述纳米金颗粒的粒径可为17~18nm;所述加入聚赖氨酸可采用体积百分浓度为0.1%的聚赖氨酸;所述水可采用超纯水;所述纳米金颗粒和聚赖氨酸的反应体积比可为1:(3~5)。离心条件可为5000~6000rpm,20min。

[0020] 在步骤3)中,所述反应中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)当量比可为1:1,活化条件为室温下旋转反应15~30min。所述缩合反应温度可为4℃,反应时间可为1~2h。

[0021] 在步骤4)中,所述不同浓度梯度的GSH浓度范围为10mM~50nM;

[0022] 所述不同浓度梯度GSH与纳米金探针溶液的体积比为1:50,使得最终反应体系中GSH浓度范围为200mM~1nM;

[0023] 所述恒温水浴的温度可为37℃,反应时间可为2h。

[0024] 本发明涉及一种基于双官能团有机小分子修饰的纳米金探针用于检测还原型谷胱甘肽(GSH)的新方法。即以合成的含二硫键的双官能团有机小分子作为连接分子,构建了表面修饰荧光分子的纳米金探针。结合荧光共振能量转移(FRET)技术和还原型谷胱甘肽能够还原二硫键的性质,实现对还原型谷胱甘肽的检测。

[0025] 与现有方法相比,本发明的检测方法简单有效,对还原型谷胱甘肽的检测灵敏度高,本发明中所用的试剂都廉价易得,且绿色环保。

附图说明

[0026] 图1为检测还原型谷胱甘肽GSH的标准曲线。

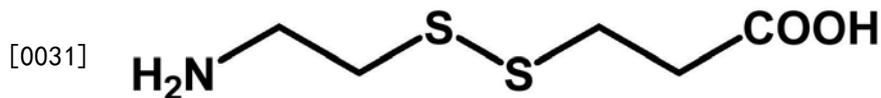
具体实施方式

[0027] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0028] 本发明包括以下步骤：

[0029] 1) 以2-氨基乙硫醇 (C_2H_7NS) 和3-巯基丙酸 ($C_3H_6O_2S$) 为原料, 在 H_2O_2 和氨水的参与下, 合成两端分别为氨基和羧基的含二硫键的双官能团有机小分子 (Linker), 然后异硫氰酸荧光素 (FITC) 和双官能团有机小分子 (Linker) 在有机溶剂中反应, 生成Linker-FITC, 通过离心浓缩, 去除多余的反应溶剂;

[0030] 所述含二硫键的双官能团有机小分子 (Linker) 的结构式如下:



[0032] 所述2-氨基乙硫醇 (C_2H_7NS) 和3-巯基丙酸 ($C_3H_6O_2S$) 的当量比为1:1; 所述异硫氰酸荧光素 (FITC) 和双官能团有机小分子 (Linker) 的当量比为1.2:1; 所述有机溶剂可采用甲醇和三乙胺混合溶液, 甲醇和三乙胺的当量比为100:1; 所述反应的反应温度可为35~40 $^{\circ}C$, 反应时间可为6~8h, 离心浓缩条件为40 $^{\circ}C$, 2h。

[0033] 2) 制备纳米金颗粒, 加入聚赖氨酸 (ϵ -Polylysine, PLL) 静置过夜反应, 通过离心除去游离的聚赖氨酸后, 加入水重悬, 得到表面修饰聚赖氨酸的纳米金 (Au@PLL); 所述制备纳米金颗粒可采用柠檬酸盐还原法, 具体步骤可为: 向圆底烧瓶中加入100mL的超纯水和磁子, 油浴加热至120 $^{\circ}C$, 微沸状态下加入1mL 1%的氯金酸溶液, 打开磁力搅拌。搅拌均匀, 至溶液微沸后迅速加入750 μ L 57mg/mL的柠檬酸钠溶液; 维持温度在120 $^{\circ}C$ 左右反应20min, 观察到溶液颜色慢慢变成深酒红色, 停止加热, 即完成了纳米金颗粒的合成; 所述纳米金颗粒的粒径可为17~18nm; 所述加入聚赖氨酸可采用体积百分浓度为0.1%的聚赖氨酸; 所述水可采用超纯水; 所述纳米金颗粒和聚赖氨酸的反应体积比可为1:(3~5)。离心条件可为5000~6000rpm, 20min。

[0034] 3) 通过1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 反应活化Linker-FITC上的羧基, 进而与Au@PLL上的氨基发生缩合反应, 经过离心除去体系中未反应的 (Linker-FITC), 将沉淀用超纯水重新分散, 得到最终用于检测纳米金探针 (Au@PLL/Linker-FITC); 所述反应中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 当量比可为1:1, 活化条件为室温下旋转反应15~30min。

[0035] 所述缩合反应温度可为4 $^{\circ}C$, 反应时间可为1~2h。

[0036] 4) 不同浓度梯度的GSH与纳米金探针恒温水浴中反应后, 取100mL反应体系加入96孔酶标板进行荧光光谱检测, 测定得到GSH标准曲线, 检出限为1nM。所述不同浓度梯度的GSH浓度范围为10mM~50nM; 所述不同浓度梯度GSH与纳米金探针溶液的体积比为1:50, 使得最终反应体系中GSH浓度范围为200mM~1nM; 所述恒温水浴的温度可为37 $^{\circ}C$, 反应时间可为2h。

[0037] 实施例1空白对照荧光强度 F_0 的测定

[0038] 在1.5mL EP管中加入392 μ L的纳米金探针溶液后,加入8 μ L的纯水,混合均匀,置于37 $^{\circ}$ C恒温水浴中避光反应2h。用移液枪吸取100 μ L的反应体系加入96孔酶标板中,平行3组。酶标仪设置参数为:Mode:FL Spectrum;Wavelength:510~600nm;PMT:Auto;选取波长522nm处的荧光强度值,3组荧光强度值取平均即得到空白对照荧光强度 F_0 。

[0039] 实施例2 GSH体系终浓度180nM的荧光强度 $F_{c(GSH)=180nM}$ 的测定

[0040] 在1.5mL EP管中加入392 μ L的纳米金探针溶液后,加入8 μ L浓度为9 μ M的GSH溶液,混合均匀,置于37 $^{\circ}$ C恒温水浴中避光反应2h。用移液枪吸取100 μ L的反应体系加入96孔酶标板中,平行3组。酶标仪设置参数为:Mode:Spectrum;Wavelength:470~600nm;PMT:Auto;选取波长522nm处的荧光强度值,3组荧光强度值取平均即得到GSH体系终浓度180nM的荧光强度 $F_{c(GSH)=180nM}$ 。

[0041] 实施例3 GSH体系终浓度10nM的荧光强度 $F_{c(GSH)=10nM}$ 的测定

[0042] 在1.5mL EP管中加入392 μ L的纳米金探针溶液后,加入8 μ L浓度为0.5 μ M的GSH溶液,混合均匀,置于37 $^{\circ}$ C恒温水浴中避光反应2h。用移液枪吸取100 μ L的反应体系加入96孔酶标板中,平行3组。酶标仪设置参数为:Mode:Spectrum;Wavelength:470~600nm;PMT:Auto;选取波长522nm处的荧光强度值,3组荧光强度值取平均即得到GSH体系终浓度10nM的荧光强度 $F_{c(GSH)=10nM}$ 。

[0043] 本发明测定得到GSH与纳米金探针反应的标准曲线参见图1。从图1中可以看出对GSH检测的线性范围为10~180nM。

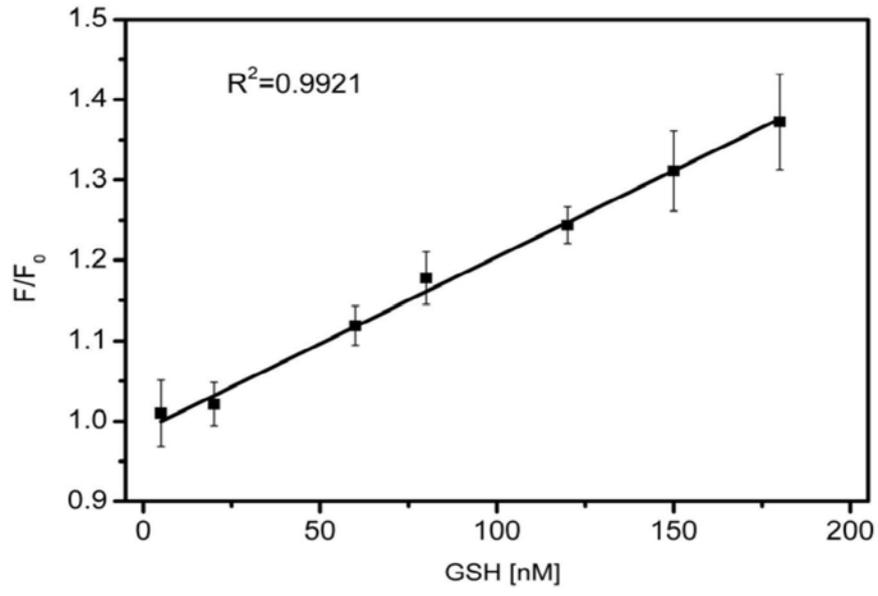


图1