

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 21/31 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810234602.8

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101408509A

[22] 申请日 2008.10.27

[21] 申请号 200810234602.8

[71] 申请人 中国科学技术大学

地址 230026 安徽省合肥市金寨路96号

[72] 发明人 曾杰 吴呈昊 刘彬 于晓芳
王晓平

[74] 专利代理机构 安徽省合肥新安专利代理有限
责任公司
代理人 汪祥虬

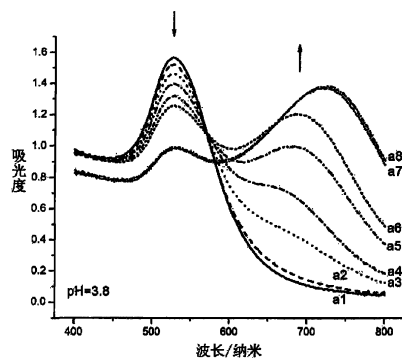
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

[54] 发明名称

一种基于金纳米颗粒溶胶吸收光谱的半胱氨酸快速检测法

[57] 摘要

本发明公开了一种基于金纳米颗粒溶胶吸收光谱的半胱氨酸快速检测法，特征是将去离子水和 pH 值在 3.8 至 5.7 的缓冲溶液以及金纳米颗粒溶胶原液混合配制成检测液，使得该检测液中的缓冲物质和金元素的浓度分别为 $10 \pm 1\text{mm}$ 和 $0.9 \pm 0.1\text{mm}$ ；将含半胱氨酸的待检测液加入到上述检测液中，使得形成的检测体系中半胱氨酸的浓度为 $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ ，将其混合均匀后在十分钟内测量其吸收光谱；根据检测体系的吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值 η 的不同，即定量检测出半胱氨酸的浓度。本发明方法大大缩减了检测半胱氨酸所需的时间，并同时具有设备简易、操作简单、且能批量检测的优点。



1、一种基于金纳米颗粒溶胶吸收光谱的半胱氨酸快速检测法，其特征在于：将去离子水和 pH 值在 3.8 至 5.7 的缓冲溶液以及金纳米颗粒溶胶原液混合配制成检测液，使得该检测液中的缓冲物质和金元素的浓度分别为 $10 \pm 1 \text{mM}$ 和 $0.9 \pm 0.1 \text{mM}$ ；将含半胱氨酸的待检测液加入到上述检测液中，使得形成的检测体系中半胱氨酸的浓度为 $0.5 \sim 10 \mu\text{M}$ ，将其混合均匀后在十分钟内测量其吸收光谱；根据检测体系的吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值 η 的不同，即定量检测出半胱氨酸的浓度。

一种基于金纳米颗粒溶胶吸收光谱的半胱氨酸快速检测法

技术领域

本发明属于半胱氨酸检测方法技术领域，特别涉及基于金纳米颗粒溶胶吸收光谱的半胱氨酸快速检测方法。

背景技术

据《氨基酸》(吴显荣编著,北京农业大学出版社,1988年出版,第3页)记载,半胱氨酸是一种含硫氨基酸,在有机体代谢的氧化还原过程中起着重要的作用。据《人体生物之源——氨基酸》(邹忠梅、喻长远主编,中国医药科技出版社,2000年出版,第63-67页)记载,半胱氨酸及其衍生物也是潜在的神经性毒素和多种生理学环境的生物标记,其在生物体中的含量直接关系着心血管功能。据美国《新英格兰医学杂志》(*The New England Journal of Medicine* 338:1042-1050,1998)报道,半胱氨酸及其同系物——同型半胱氨酸在临床应用上可以作为动脉粥样硬化等心脑血管疾病的独立危险指标,空腹情况下其在人体内的正常浓度为5-15 μM 。目前检测半胱氨酸及其衍生物的主要方法有荧光偏振免疫检测法、高效液相色谱法、电化学伏安法等,但是这些检测方法都依赖于复杂昂贵的仪器设备,且操作步骤繁琐、耗时长,又不能在临床上实现大流量自动化分析。近日,美国《纳米快报》(*Nano Letters*, 8(2): 529-533, 2008.)报道了用表面修饰有DNA分子的金纳米颗粒溶胶检测半胱氨酸的方法,该方法利用半胱氨酸与汞离子(Hg^{2+})结合能力强的特点,通过检测偶联金纳米颗粒溶胶的双链DNA分子解螺旋温度的变化来实现半胱氨酸定量检测的目的。然而,上述方法需要使用精确控温的仪器,操作仍比较繁琐,且耗时多于2小时,对于临床应用仍有较大限制。到目前为止,尚未见文献报道可以在十分钟以内检测半胱氨酸的方法。

发明内容

本发明的目的是提出一种基于金纳米颗粒溶胶吸收光谱的半胱氨酸的快速检测方法,以克服现有检测技术中仪器设备复杂昂贵、操作过程繁琐、耗时长的缺点。

本发明基于金纳米颗粒溶胶吸收光谱的半胱氨酸快速检测法,其特征在于:将去离子水和pH值在3.8至5.7的缓冲溶液以及金纳米颗粒溶胶原液混合配制成检测液,使得该检测液中的缓冲物质和金元素的浓度分别为 $10\pm 1\text{mM}$ 和 $0.9\pm 0.1\text{mM}$;将含半胱氨酸的待检测液加入到上述检测液中,使得形成的检测体系中半胱氨酸的浓度为 $0.5\sim 10\mu\text{M}$,将其混合均匀后在十分钟内测量其吸收光谱;根据检测体系的吸收光谱中波长为700纳米和525纳米的吸光度的比值 η 的不同,即定量检测出半胱氨酸的浓度。

本发明方法中使用的检测液为水溶性金纳米颗粒溶胶,当溶胶的pH值处于3.8~5.7范围内时,检测液为红色;在加入含有半胱氨酸的待检测液后,半胱氨酸分子中的巯基(-SH)能迅速地连接在金纳米颗粒表面,半胱氨酸另一端的羧基(-COOH)和氨基(-NH₂)则向外伸展,而不同金纳米颗粒之间的羧基(-COOH)和氨基(-NH₂)相互作用较强,导致表面连接有半胱氨酸的金纳米颗粒聚集;由于金纳米颗粒表面等离子共振吸收特性受到聚集

程度的影响，整个体系的颜色随之发生改变并在吸收光谱中反映出定量关系，利用吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值 η 的不同，即可定量检测出半胱氨酸的浓度；由于除半胱氨酸以外的其他 19 种氨基酸分子中都不具有巯基(-SH)集团，因此都无法直接连接在金纳米颗粒溶胶表面，也无法借助上述的吸收光谱检测方法来定量检测其浓度。这种根据金纳米颗粒溶胶的吸收光谱对 20 种天然氨基酸的不同响应，区分半胱氨酸与其他氨基酸，并根据金纳米颗粒溶胶吸收光谱的变化来定量检测半胱氨酸浓度的方法，尚未见文献报道。有别于美国《纳米快报》(*Nano Letters*, 8(2): 529-533, 2008.)中报道的通过测量偶联金纳米颗粒溶胶的双链 DNA 分子解螺旋温度的变化实现半胱氨酸的定量检测方法，本发明方法是通过测量金纳米颗粒溶胶吸收光谱的变化实现半胱氨酸的定量检测目的。与现有技术相比，采用本发明方法可在十分钟之内检测出体系中半胱氨酸的浓度，大大缩减了检测半胱氨酸所需的时间，并具有设备简单、操作简易、且能批量检测的优点。

附图说明

图 1 是 pH 值为 3.8 的金纳米颗粒溶胶在加入不同浓度半胱氨酸后的吸收光谱图；

图 2 是由图 1 中 pH 值为 3.8 的吸收光谱得到的波长为 700 纳米和 525 纳米吸光度的比值 η 与半胱氨酸浓度之间的关系曲线图。

图 3 是 pH 值为 5.0 的金纳米颗粒溶胶在加入不同浓度半胱氨酸后的吸收光谱图；

图 4 是由图 3 中 pH 值为 5.0 的吸收光谱得到的波长为 700 纳米和 525 纳米吸光度的比值 η 与半胱氨酸浓度之间的关系曲线图。

图 5 是 pH 值为 5.7 的金纳米颗粒溶胶在加入不同浓度半胱氨酸后的吸收光谱图；

图 6 是由图 5 中 pH 值为 5.7 的吸收光谱得到的波长为 700 纳米和 525 纳米吸光度的比值 η 与半胱氨酸浓度之间的关系曲线图。

图 7 是当半胱氨酸浓度为 $3\mu\text{M}$ 时，不同 pH 值条件下，波长为 700 纳米和 525 纳米吸光度的比值 η 与体系 pH 值之间的关系曲线图。

图 8 是 pH 值为 8.0 的金纳米颗粒溶胶在加入不同浓度半胱氨酸后的吸收光谱图；

图 9 是由图 8 中 pH 值为 8.0 的吸收光谱得到的波长为 700 纳米和 525 纳米吸光度的比值 η 与半胱氨酸浓度之间的关系曲线图。

图 10 是 pH 值为 5.0 的金纳米颗粒溶胶中加入浓度均为 $3\mu\text{M}$ 的 20 种不同天然氨基酸后的吸光度比值变化即 $|\eta-\eta_0|$ 的柱形图。

具体实施方式

实施例 1: 用 pH 值为 3.8 的金纳米颗粒溶胶检测半胱氨酸浓度

步骤一、金纳米颗粒溶胶的准备:

金纳米颗粒溶胶可直接采用商用产品，也可以自制而得。

自制金纳米颗粒溶胶的具体步骤为: 在 100 mL 圆底烧瓶中加入 48 mL 去离子水和 2 mL 浓度为 25mM 的氯金酸溶液，置于 90-95°C 水浴中回流 5 分钟，然后迅速加入 5 mL 浓度为 38.8mM 的柠檬酸三钠溶液，并在剧烈搅拌下继续在上述水浴中回流 20 分钟，得到深红色溶胶液体。撤去水浴并继续搅拌，冷却到室温，即得到金纳米颗粒溶胶。

步骤二、pH 值为 3.8 的缓冲溶液 A 的准备：

pH 值为 3.8 的缓冲溶液可直接采用商用产品，也可以自制而得。

自制 pH 值为 3.8 的缓冲溶液的具体步骤为：称取 0.4102 克醋酸钠晶体，溶解在 20 mL 去离子水中，并在该浓醋酸钠溶液中准确加入 2576 μ L 冰醋酸，得到母液，将该母液转移到 100 mL 容量瓶中并用去离子水稀释到刻度，即得到 100 mL 500mM 缓冲溶液 A。

步骤三、半胱氨酸检测液的制备：

按照去离子水、缓冲溶液 A、金纳米颗粒溶胶原液的先后顺序，以及按去离子水：缓冲溶液 A：金纳米颗粒溶胶原液=39：1：10 的体积比，将上述三种液体混合以保持体系的 pH 值为 3.8，此时缓冲物质醋酸/醋酸钠的总浓度为 10mM，而金元素的浓度为 0.91mM，将该溶液记为 B。需要注意的是，当检测液中的缓冲物质和金元素的浓度分别为 10 \pm 1mM 和 0.9 \pm 0.1mM 时，其对半胱氨酸的检测效果最佳，灵敏度最高，在超出这个范围之后，受离子当量以及金纳米颗粒间相互作用的影响，该检测液对半胱氨酸的检测灵敏度会明显降低。

步骤四、准确称取 0.0121 克半胱氨酸晶体，用去离子水溶解并稀释到 100mL，得到浓度为 1mM 的半胱氨酸溶液 C。

步骤五、半胱氨酸浓度的检测：

分别按体积 0 μ L、1 μ L、2 μ L、3 μ L、3.5 μ L、4 μ L、5 μ L 和 6 μ L，取上述配制的浓度为 1mM 的半胱氨酸溶液 C 八份，分别溶于 2 mL 上述步骤三中制备的溶液 B 中，并迅速将其混合均匀，此时检测体系中半胱氨酸的浓度分别为 0 μ M、0.5 μ M、1 μ M、1.5 μ M、1.75 μ M、2 μ M、2.5 μ M 和 3 μ M，在混合后十分钟之内分别测量其吸收光谱，所得谱线 a1~a8 被依次绘制在图 1 中。此处需要注意的是：在检测液和半胱氨酸溶液混合十分钟以后，由于受半胱氨酸中活性官能团的影响，表面吸附了半胱氨酸的金纳米颗粒溶胶会部分吸附到玻璃或石英器皿内壁上，对光谱测量产生干扰，会造成测量结果的不准确，因此需要在十分钟之内测量其吸收光谱。随着半胱氨酸浓度的增加，检测体系的吸收光谱曲线从 a1 到 a8 发生显著变化：波长为 525 纳米的吸收峰强度下降，而波长在 650 纳米以上的部分吸光度上升。

步骤六、数据处理：

将吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值记为 η ，按 η 值随半胱氨酸浓度的变化作图，得到吸光度的比值 η 与半胱氨酸浓度之间的关系曲线如图 2 中所示，图中的曲线 b 表明检测体系的 η 值与半胱氨酸浓度呈单调关系，该曲线 b 即可作为借助 pH 值在 3.8 下的金纳米颗粒溶胶检测半胱氨酸浓度的标准曲线；可见在 pH 值为 3.8 时的检测体系能有效检测出半胱氨酸的浓度范围为 0.5~3 μ M。

实施例 2：用 pH 值为 5.0 的金纳米颗粒溶胶检测半胱氨酸浓度

步骤一、同实施例 1 中的步骤一。

步骤二、pH 值为 5.0 的缓冲溶液 D 的准备：

pH 值为 5.0 的缓冲溶液可直接采用商用产品，也可以自制而得。自制 pH 值为 5.0 的缓冲溶液的具体步骤为：称取 2.7343 克醋酸钠晶体溶解在 20 mL 去离子水中，并在该

浓醋酸钠溶液中加入 954 μL 冰醋酸得到母液。将母液转移到容量瓶中并用去离子水稀释到 100 mL, 得到 500 mM 缓冲溶液 D。

步骤三、半胱氨酸检测液的制备:

具体操作步骤同实施例 1 中的步骤三, 仅需用缓冲溶液 D 替代实施例 1 中的缓冲溶液 A, 使得三种液体混合后金纳米颗粒溶胶的 pH 值为 5.0。将该溶液记为 E。

步骤四、同实施例 1 中的步骤三, 配制浓度为 1mM 的半胱氨酸溶液 C。

步骤五、半胱氨酸浓度的检测:

分别按体积 0 μL 、2 μL 、4 μL 、4.5 μL 、5 μL 、5.5 μL 、6 μL 、7 μL 、8 μL 、10 μL 、14 μL 和 20 μL 取上述配制的浓度为 1mM 的半胱氨酸溶液 C 十二份, 分别溶于 2 mL 的溶液 E 中, 并迅速将其混合均匀, 使检测体系中半胱氨酸的浓度分别为 0 μM 、1 μM 、2 μM 、2.25 μM 、2.5 μM 、2.75 μM 、3 μM 、3.5 μM 、4 μM 、5 μM 、7 μM 和 10 μM , 在十分钟内分别测量吸收光谱, 所得谱线 **c1**~**c12** 依次绘制在图 3 中。随着半胱氨酸浓度的增加, 检测体系的吸收光谱曲线从 **c1** 到 **c12** 发生显著变化: 波长为 525 纳米的吸收峰强度下降, 而波长在 650 纳米以上的部分吸光度上升。

步骤六、数据处理:

将吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值记为 η , 按 η 值随半胱氨酸浓度的变化作图, 得到吸光度的比值 η 与半胱氨酸浓度之间的关系曲线如图 4 所示, 图中的曲线 d 表明检测体系的 η 值与半胱氨酸浓度呈单调关系, 该曲线 d 即可作为借助 pH 值在 5.0 下的金纳米颗粒溶胶检测半胱氨酸浓度的标准曲线; 可见在 pH 值为 5.0 时的检测体系能有效检测出半胱氨酸的浓度范围为 1~10 μM 。

实施例 3: 用 pH 值为 5.7 的金纳米颗粒溶胶检测半胱氨酸浓度

步骤一、同实施例 1 中的步骤一。

步骤二、pH 值为 5.7 的缓冲溶液 F 的准备:

pH 值为 5.7 的缓冲溶液可直接采用商用产品, 也可以自制而得。自制 pH 值为 5.7 的缓冲溶液的具体步骤为: 称取 3.6914 克醋酸钠晶体溶解在 20 mL 去离子水中, 并在该浓醋酸钠溶液中加入 286 μL 冰醋酸得到母液。将母液转移到容量瓶中并用去离子水稀释到 100 mL, 得到 500 mM 缓冲溶液 F。

步骤三、半胱氨酸检测液的制备:

具体操作步骤同实施例 1 中的步骤三, 仅需用缓冲溶液 F 替代实施例 1 中的缓冲溶液 A, 使得三种液体混合后金纳米颗粒溶胶的 pH 值为 5.7。将该溶液记为 G。

步骤四、同实施例 1 中步骤三, 配制浓度为 1mM 的半胱氨酸溶液 C。

步骤五、半胱氨酸浓度的检测:

取半胱氨酸溶液 C 0 μL 、4 μL 、5 μL 、6 μL 、8 μL 、12 μL 、16 μL 、20 μL , 分别溶于 2 mL 的溶液 G, 并迅速将其混合均匀, 使检测体系中半胱氨酸的浓度分别为 0 μM 、2 μM 、2.5 μM 、3 μM 、5 μM 、6 μM 、8 μM 和 10 μM , 在十分钟内分别测吸收光谱, 所得谱线 **e1**~**e8** 依次绘制在图 5 中。随着半胱氨酸浓度的增加, 检测体系的吸收光谱曲线从 **e1** 到 **e8** 发生显著变化: 波长为 525 纳米的吸收峰强度下降, 而波长在 650 纳米以上的部分吸光度上升。

步骤六、数据处理：

将吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值记为 η ，按 η 值随半胱氨酸浓度的变化作图，得到吸光度的比值 η 与半胱氨酸浓度之间的关系曲线如图 6 所示，图中的曲线 f 表明检测体系的 η 值与半胱氨酸浓度呈单调关系，该曲线 f 即可作为借助 pH 值在 5.7 下的金纳米颗粒溶胶检测半胱氨酸浓度的标准曲线；可见在 pH 值为 5.7 时的检测体系能有效检测出半胱氨酸的浓度范围为 2~10 μ M。

综合本发明的以上三个实施例可以说明，pH 值在 3.8~5.7 范围内的金纳米颗粒溶胶能够定量检测半胱氨酸的浓度，且半胱氨酸能够被定量检测出的浓度范围为 0.5~10 μ M，检测过程耗时小于十分钟；检测的灵敏度随着 pH 的升高而下降。

下面通过一组比较例来说明，当金纳米颗粒溶胶的 pH 值超出上述范围而处于弱碱性条件下，本发明方法中的检测体系不再具有检测半胱氨酸浓度的能力。

比较例 1：pH 值为 8.0 的金纳米颗粒溶胶与半胱氨酸的作用

步骤一、同实施例 1 中的步骤一。

步骤二、将 pH 值为 8.0 的浓度为 1M 的三乙醇胺（Tris）缓冲溶液记为 J。按照去离子水、缓冲溶液 J、金纳米颗粒溶胶原液的先后顺序，以及去离子水：缓冲溶液 J：金纳米颗粒溶胶原液=79：1：20 的体积比将上述三种液体混合，并使金纳米颗粒溶胶的 pH 值为 8.0。此时缓冲物质的总浓度为 10mM。将该溶液记为 K。

步骤三、同实施例 1 中步骤三，配制浓度为 1mM 的半胱氨酸溶液 C。

步骤四、取半胱氨酸溶液 C 0 μ L、4 μ L、8 μ L、12 μ L、16 μ L 和 20 μ L，分别溶于 2 mL 的溶液 K，并迅速将其混合均匀，使检测体系中半胱氨酸的浓度分别为 0 μ M、2 μ M、4 μ M、6 μ M、8 μ M 和 10 μ M，在混合均匀后十分钟内分别测吸收光谱，所得谱线 g1~g6 依次绘制在图 7 中。在该 pH 条件下，随着半胱氨酸浓度的增加，检测体系的吸收光谱曲线 g1 到 g6 只有小幅度变化：波长为 525 纳米的吸收峰强度仅下降了 0.05，波长为 700 纳米的吸光度也仅上升了 0.03；且这种变化在半胱氨酸浓度为 2 μ M 的时候就已经达到饱和状态。

步骤五、数据处理：

将吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值记为 η ，按 η 值随半胱氨酸浓度的变化作图，如图 8 所示。图 8 中的曲线 h 表明：在 pH=8.0 条件下，通过测量检测体系的 η 值，无法精确地得到体系中半胱氨酸的浓度信息。

下面通过另一组比较例说明：本发明方法对半胱氨酸的检测具有高度选择性，即在能够有效检测出半胱氨酸浓度的条件下，金纳米颗粒溶胶对于其他 19 种天然氨基酸的光谱响应极低，因此可排除其他氨基酸的干扰而有效区分出半胱氨酸。

比较例 2：用 pH 值为 5.0 的金纳米颗粒溶胶检测 20 种天然氨基酸的比较

步骤一、同实施例 1 中的步骤一。

步骤二、同实施例 2 中的步骤二。

步骤三、同实施例 2 中的步骤三。

步骤四、取 2 mL 溶液 E 测量其吸收光谱，将其吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值记为 η_0 。

步骤五、分别称取丙氨酸 (Ala) 89 毫克、精氨酸 (Arg) 174 毫克、天冬酰胺 (Asn) 150 毫克、天冬氨酸 (Asp) 133 毫克、半胱氨酸 (Cys) 121 毫克、谷氨酰胺 (Gln) 146 毫克、谷氨酸 (Glu) 147 毫克、甘氨酸 (Gly) 75 毫克、组氨酸 (His) 155 毫克、异亮氨酸 (Ile) 131 毫克、亮氨酸 (Leu) 131 毫克、赖氨酸 (Lys) 146 毫克、蛋氨酸 (Met) 149 毫克、苯丙氨酸 (Phe) 165 毫克、脯氨酸 (Pro) 115 毫克、丝氨酸 (Ser) 105 毫克、苏氨酸 (Thr) 119 毫克、色氨酸 (Try) 204 毫克、酪氨酸 (Tyr) 181 毫克和缬氨酸 (Val) 117 毫克, 依次溶于 100 mL 的去离子水中, 得到浓度均为 1mM 的 20 种氨基酸的溶液, 记为溶液 L1~L20。

步骤六、溶液 L1~L20 各取 6 μ L 分别溶于 2 mL 溶液 E, 并迅速将其混合均匀, 使每种氨基酸在检测体系中的浓度均为 3 μ M。在混合后十分钟内分别测量其吸收光谱。

步骤七、数据处理:

将吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值记为 η ; 加入氨基酸前后, 检测体系的吸光度比值 η 的变化即 $|\eta-\eta_0|$ 对应不同的氨基酸作柱形图, 如图9所示。由图9可见: 在氨基酸浓度同为 3 μ M 的情况下, 只有含半胱氨酸的检测体系 $|\eta-\eta_0|$ 值发生明显改变, 而 19 种其他氨基酸的 $|\eta-\eta_0|$ 值相对半胱氨酸均小于 2%。据此本发明方法可以有效地区分半胱氨酸和其它 19 种氨基酸。

综合分析说明:

本发明方法基于金纳米颗粒溶胶吸收光谱来实现半胱氨酸定量检测的目的。根据金纳米颗粒溶胶对 20 种天然氨基酸的不同响应, 可有效区分半胱氨酸与其他氨基酸; 根据金纳米颗粒溶胶在不同浓度的半胱氨酸的作用下, 其吸收光谱中波长为 700 纳米和 525 纳米的吸光度的比值 η 的不同, 可定量检测出半胱氨酸的浓度; 其中金纳米颗粒溶胶的 pH 值适用范围为 3.8~5.7。本发明的定量检测半胱氨酸浓度的方法具有快速、设备简易、操作简单、且能批量检测的优点。

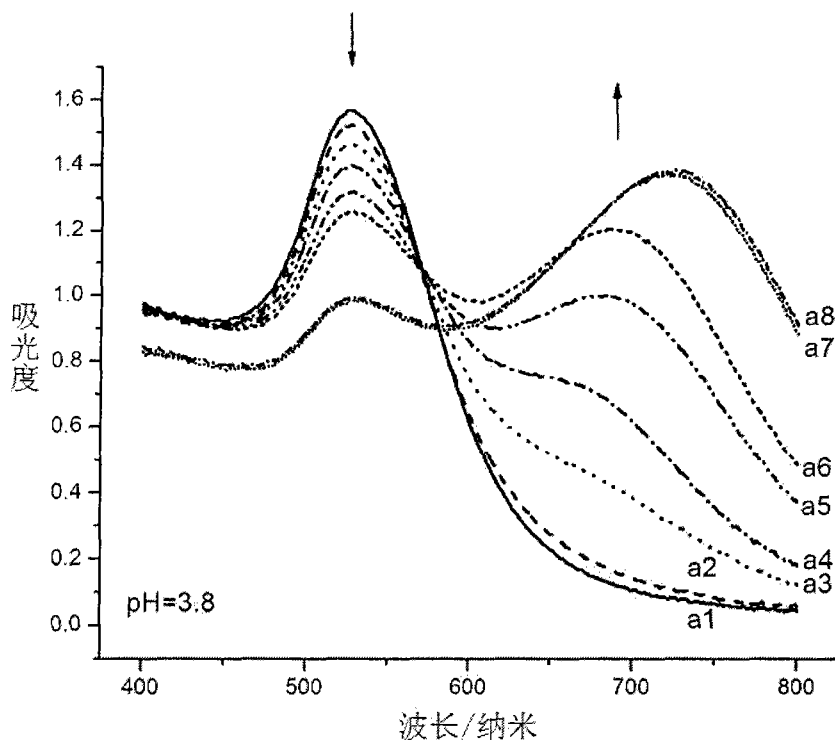


图 1

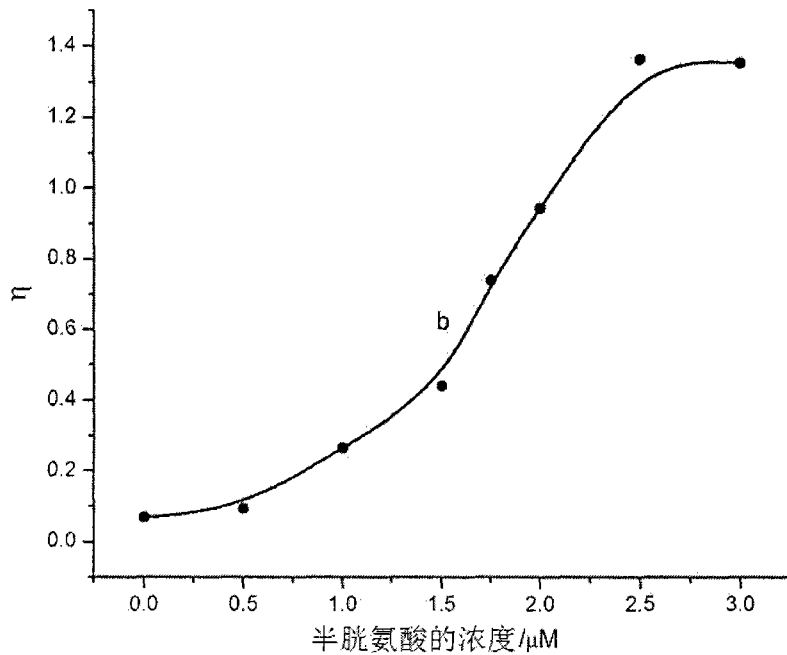


图 2

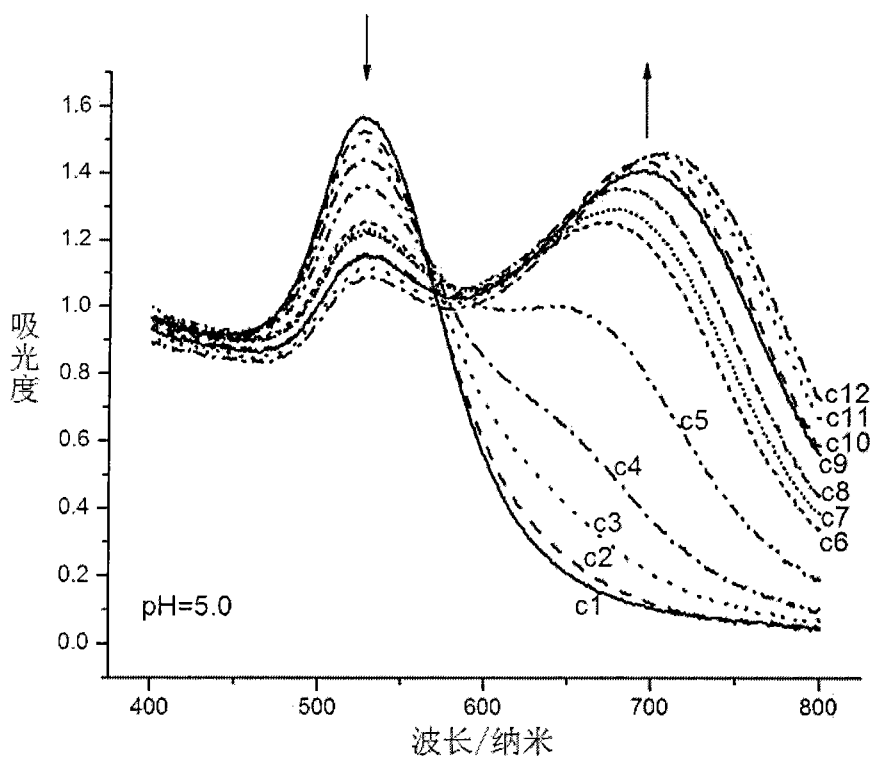


图 3

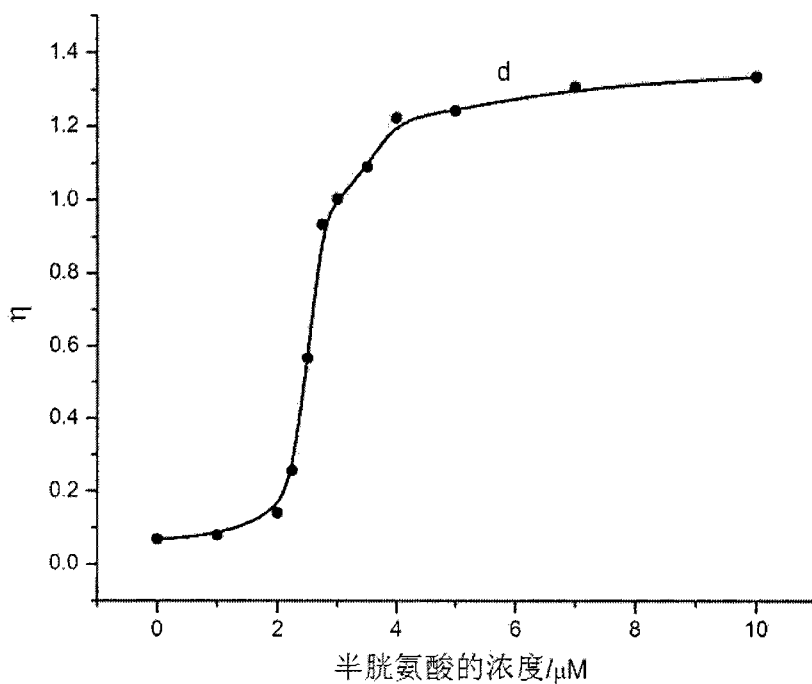


图 4

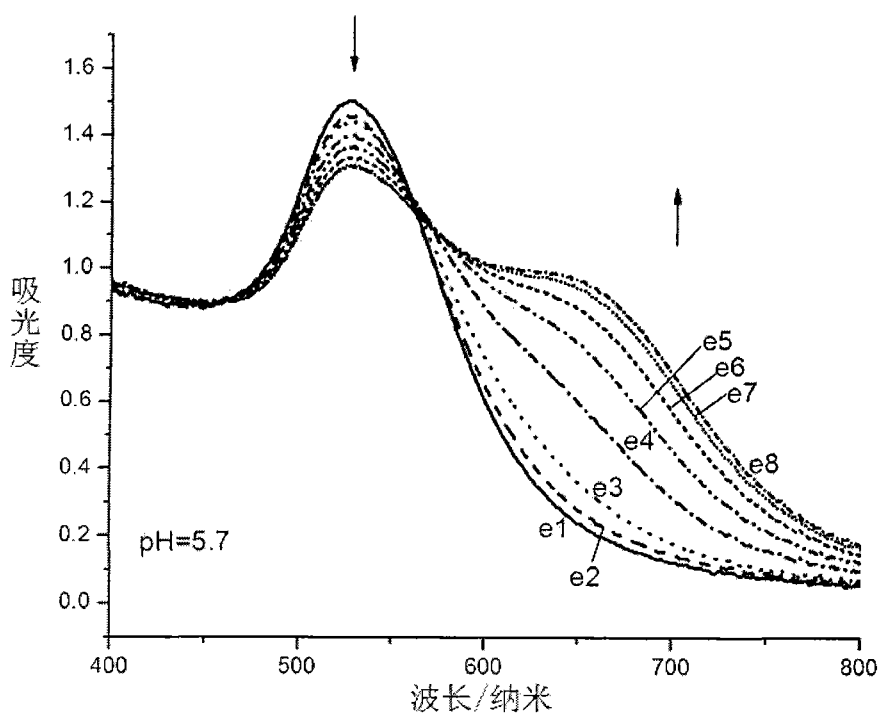


图 5

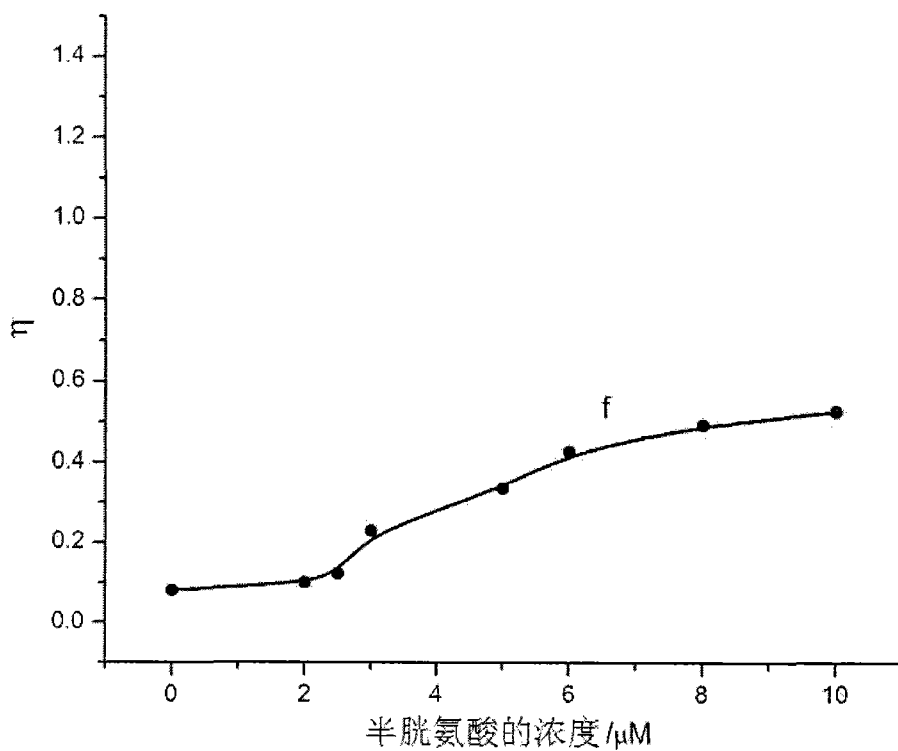


图 6

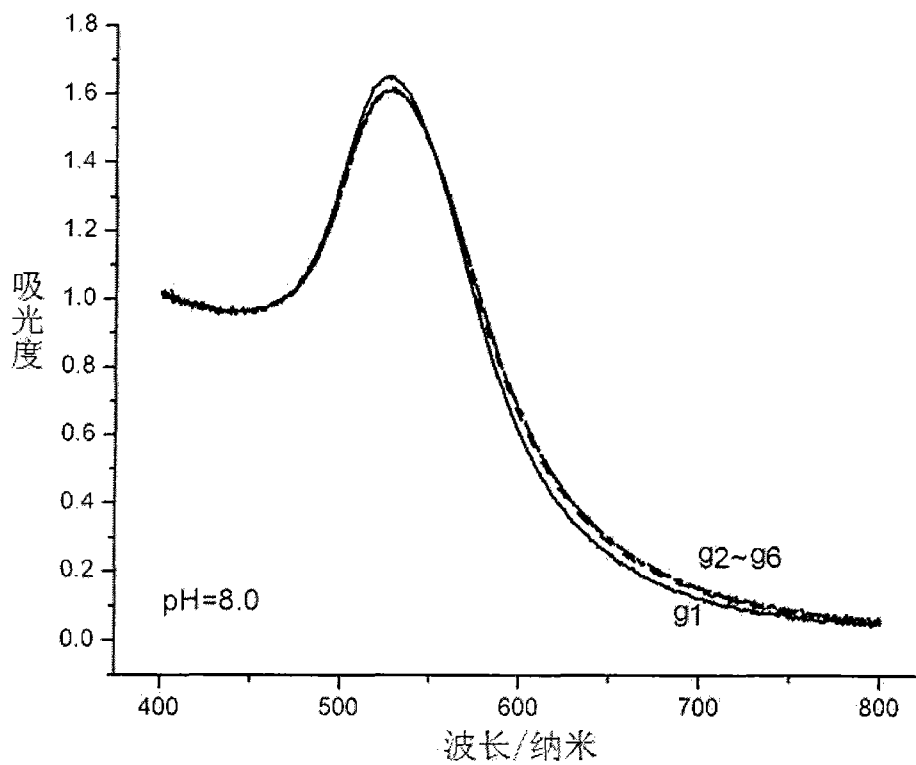


图 7

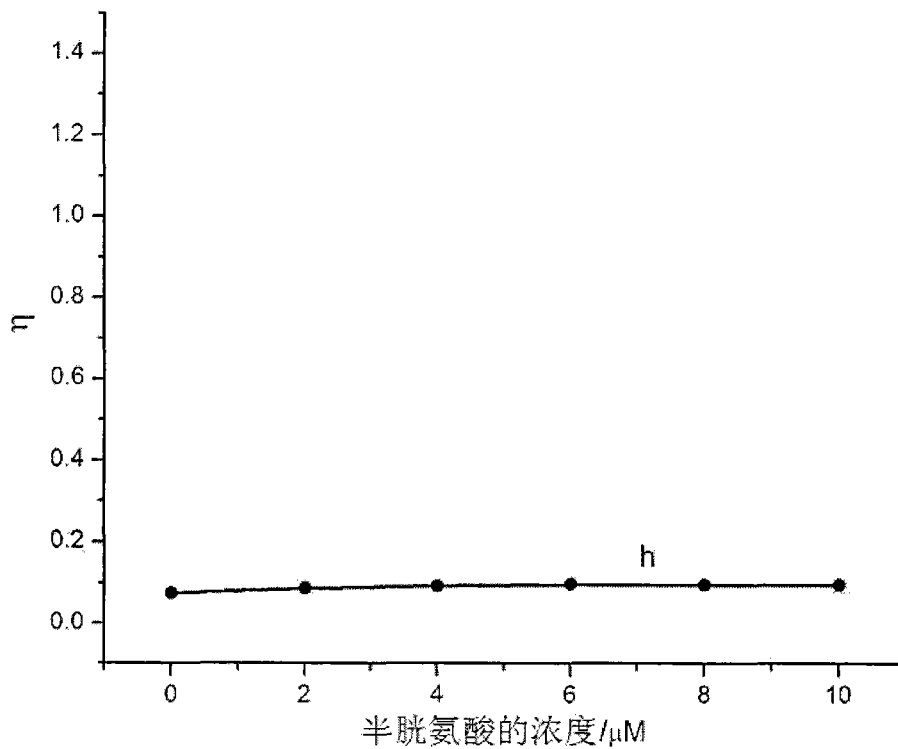


图 8

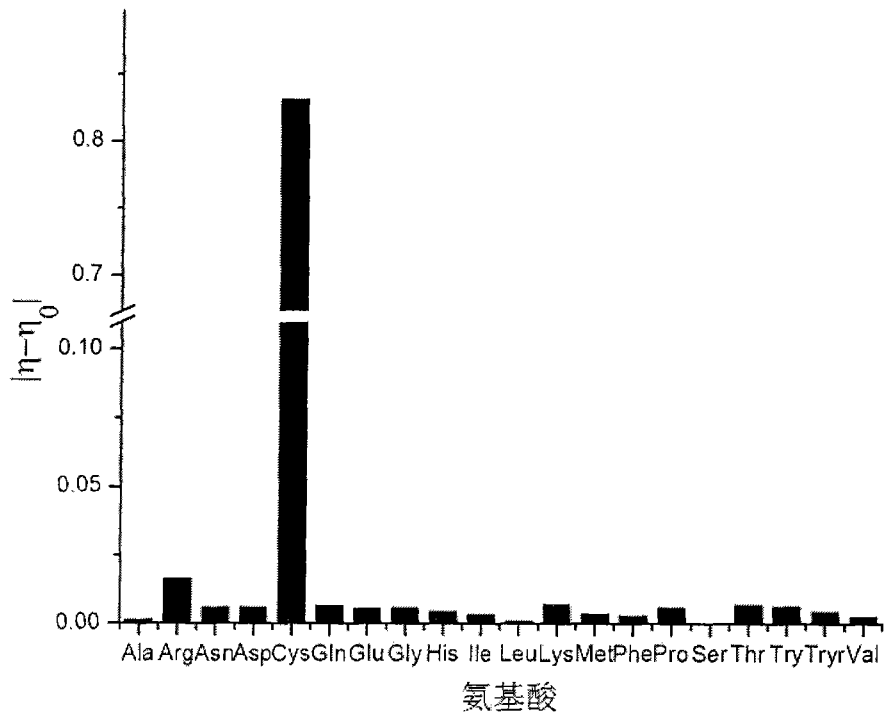


图 9