



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110057803 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201910436826.5

(22)申请日 2019.05.24

(71)申请人 青岛大学

地址 266071 山东省青岛市崂山区香港东路7号

(72)发明人 王宗花 史汜平

(74)专利代理机构 青岛高晓专利事务所(普通合伙) 37104

代理人 张世功

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006.01)

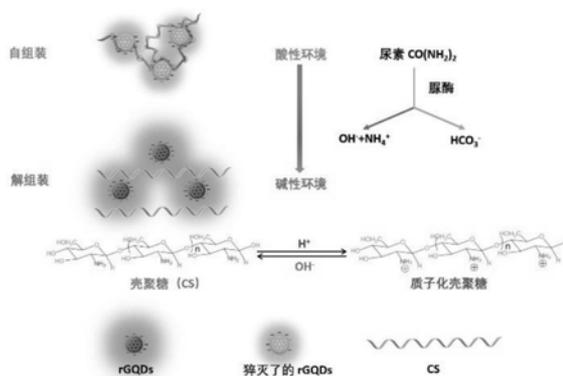
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种利用荧光材料和生物聚合物自组装体系检测脲酶的方法

(57)摘要

本发明具体涉及一种pH敏感的检测脲酶的荧光试剂及其合成方法,所述的试剂是:还原型石墨烯量子点和生物聚合物壳聚糖的自组装复合物。检测的方法是将一定量的还原型石墨烯量子点溶液和2%的乙酸溶液溶解的壳聚糖混合进行自组装,利用尿素和脲酶反应后释放的铵根离子改变溶液酸碱度,通过荧光分光光度计定量检测溶液pH值,从而间接检测脲酶浓度,检出限能够达到0.036U mL⁻¹。该检测过程灵敏度高,选择性好,检测过程方便快捷,结果准确。



1. 一种pH敏感响应的还原型石墨烯量子点rGQDs/壳聚糖CS自组装体系的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 以氧化石墨烯G0粉末和强酸混合物为原料,将二者混合后超声处理;混合物转移到高压反应釜中水热处理后冷却至室温;取出反应液,用去离子水稀释,加入碱性固体物质调节反应液pH为6~7;透析中和后的反应液,去除多余的盐离子,定容后即可制得石墨烯量子点GQDs;

(2) 室温下将NaBH₄固体加入到步骤(1)制备的GQDs溶液中剧烈搅拌,加入浓硝酸终止反应,将反应液透析以除去多余的盐离子,由此制得了表面富含羟基的还原型石墨烯量子点rGQDs;

(3) 将步骤(2)制备的rGQDs与三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸Tris-HCl缓冲溶液、2%的乙酸溶液溶解的壳聚糖溶液混合,得到rGQDs/壳聚糖CS自组装体系。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的氧化石墨烯为Hummer法制得,质量为0.05~0.1g。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的强酸混合物为浓硝酸和浓硫酸的混合物,两者的比例是1:3。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的水热处理的温度为80~100℃,反应时间为20~24h。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的碱性固体物质为Na₂CO₃、NaOH。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(3)中的rGQDs与壳聚糖的物质的量比为10:7。

7. 一种由权利要求1-6中任一项所述的制备方法得到的rGQDs/壳聚糖自组装体系。

8. 一种通过荧光分光光度法检测脲酶活性浓度的方法,其特征在于,所述方法中使用的溶剂由Tris-HCl缓冲溶液、脲酶-尿素酶反应产物和权利要求7所述的rGQDs/壳聚糖自组装体系混合而成。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,通过所述荧光分光光度法绘制的吸收光谱曲线方程为:恢复效率 $Eff_r = -0.0307 + 1.43x$, $U\text{mL}^{-1}$, x 为脲酶活性浓度,最低检测限 $LOD = 0.036U\text{mL}^{-1}$,溶剂中各组分的含量为:rGQDs最终浓度 0.05mgmL^{-1} ,壳聚糖最终浓度 35ngmL^{-1} ,尿素的浓度为 1.0mmolL^{-1} ,Tris-HCl缓冲溶液的浓度为 2.5molL^{-1} ,Tris-HCl缓冲溶液的pH为5.0。

一种利用荧光材料和生物聚合物自组装体系检测脲酶的方法

技术领域：

[0001] 本发明属于荧光材料制备与生物检测技术领域，具体涉及一种对溶液pH变化敏感的碳荧光材料和生物聚合物自组装体系的构建方法，及其在检测脲酶方面的应用。

背景技术：

[0002] 脲酶是一种可以催化尿素水解为二氧化碳和氨的酶，在环境样品及排泄样品中均可检测到其活性。临床上通常通过胃部活检测定组织中的尿素酶活性确定是否存在幽门螺杆菌感染；土壤中高尿素酶活性通常会严重的环境和经济问题。目前，定量检测脲酶活性的方法主要有电化学分析法，酸碱滴定法，酚红指示剂法等。这些方法在实际应用中都有一些缺点，比如对反应条件要求苛刻，制备过程复杂，检测准确性差等。因此，利用荧光分析法发展更高效简便的脲酶检测平台具有深远的社会意义。

[0003] 与传统分析方法相比，荧光分析法对目标分子具有更高的灵敏度。其成本低，响应快，检测方便，这使得它在生化分析，食品检验，环境监测等多元分析研究中具有广阔的应用前景。例如刘金华等构建了基于铜纳米簇聚集增强荧光检测铝离子的检测方法(刘金华，慈乔乔，常进，张承武，李林，张倩晨，邹昌鹏.一种基于铝离子诱导磷光铜纳米簇聚集增强荧光检测铝离子的方法及其应用.中国发明专利.公开号CN109724957A)；崔京南等报道了快速测定甲醛的荧光探针制备及分析方法(崔京南，高漫，何鑫，王铮，薛正元，田镇豪，刘涛.中国发明专利.公开号CN109535147A)。

[0004] 作为新兴的荧光纳米材料，石墨烯量子点(GQDs)光学性质优良，具有易被修饰的材料表面和边缘，已经作为新型生物分子识别元件被广泛用于荧光纳米传感器中。通过与某些生物聚合物组成的新型生物纳米复合物，可以综合二者光学特性和生物相容性的优势，更好的应用于材料和生物医学领域。利用荧光信号的变化和目标物浓度的关系，可以构建具有特异性识别检测功能的荧光检测平台，丰富纳米材料在生物传感器中的应用，以此达到检测尽可能多的分析物的目的。

发明内容：

[0005] 本发明的目的在于提供一种还原型石墨烯量子点/壳聚糖自组装体系的制备方法，并利用该体系荧光强度能够被pH调控这一特性构建新型荧光pH指示剂，扩展它在检测脲酶活性的应用。为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

[0006] 本发明的第一方面，提供了一种还原型石墨烯量子点rGQDs/壳聚糖CS自组装体系的制备方法，包括以下步骤：

[0007] (1) 以氧化石墨烯粉末G0和强酸混合物为原料，将二者混合后超声处理；混合物转移到高压反应釜中水热处理后冷却至室温；取出反应液，用去离子水稀释，加入碱性固体物质调节反应液pH为6~7；透析中和后的反应液，去除多余的盐离子，定容后即可制得石墨烯量子点GQDs；

[0008] (2) 室温下将NaBH₄固体加入到步骤(1)制备的GQDs溶液中剧烈搅拌，加入浓硝酸

终止反应,将反应液透析以除去多余的盐离子,由此制得了表面富含羟基的还原型石墨烯量子点rGQDs;

[0009] (3)将步骤(2)制备的rGQDs、三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸Tris-HCl缓冲溶液、2%的乙酸溶液溶解的壳聚糖溶液混合,得到rGQDs/壳聚糖自组装体系。

[0010] 步骤(1)中的氧化石墨烯为Hummer法制得,质量为0.05~0.1g。

[0011] 步骤(1)中的强酸混合物为浓硝酸和浓硫酸的混合物,两者的比例是1:3。

[0012] 步骤(1)中的水热处理的温度为80~100℃,反应时间为20~24h。

[0013] 步骤(1)中的碱性固体物质为Na₂CO₃、NaOH。

[0014] 步骤(3)中的rGQDs与壳聚糖的物质的量比为10:7。

[0015] 本发明的第二个方面,提供了上述rGQDs/壳聚糖CS自组装体系在脲酶活性检测方面的应用:利用pH可以调控rGQDs/壳聚糖自组装体系的作用改变荧光强度的特性,以及脲酶水解尿素的过程发生时,溶液pH由酸性变为碱性的特性,通过测定波长在360~600nm处荧光强度值的改变,即可对脲酶的活性进行检测。标准曲线的制备包括以下步骤:

[0016] (8)用二次水配制一系列含有不同浓度的脲酶标准溶液样本。在pH=7.4的Tris-HCl缓冲溶液下,将不同浓度的脲酶溶液与固定浓度的尿素溶液混合,充分摇匀。

[0017] (9)依次将步骤(7)中的自组装体系加入到2mL的标准试管中,再分别向不同编号的试管中加入步骤(8)中反应充分的尿素酶标准溶液样本,充分混合待样品反应完毕后在室温下进行荧光测量。

[0018] 步骤(8)所述的脲酶的最终浓度为0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5U mL⁻¹。所述的尿素浓度为1mmol L⁻¹,反应温度为37℃,酶解时间为20min。

[0019] 步骤(9)所述的自组装体系中各物质浓度同步骤(7),反应时间为5min。

[0020] CS通过静电吸引作用与表面带负电的纳米材料单元rGQDs发生自组装,形成生物纳米复合体系rGQDs/CS,猝灭rGQDs的荧光。当脲酶水解尿素的过程发生时,溶液pH由酸性变为碱性时,壳聚糖发生去质子化,表面电性发生改变,rGQDs/CS纳米复合体系发生解离,使rGQDs荧光恢复。脲酶的浓度和复合体系的荧光强度存在一定的比例关系,由此实现对实际样品中脲酶的检测。

[0021] 本发明与现有技术相比,该方法与传统方法相比具有操作简单,pH检测范围宽,成本低,对仪器要求不高等诸多优势。

附图说明:

[0022] 图1为本发明涉及的rGQDs/壳聚糖自组装体系原理示意图;

[0023] 图2为发明涉及的rGQDs合成路径示意图;

[0024] 图3a为发明涉及的rGQDs的透射电镜图和粒径分布图;

[0025] 图3b为发明涉及的GQDs和rGQDs的红外曲线对比图;

[0026] 图3c为发明涉及的GQDs和rGQDs的荧光激发、发射曲线对比图及GQDs和rGQDs溶液在365nm紫外光照射下的照片;

[0027] 图3d为发明涉及的不同荧光波长激发下rGQDs的发射光谱位移变化。

[0028] 图4a为发明涉及的.rGQDs和壳聚糖组装前后量子点的荧光强度变化;

[0029] 图4b为发明涉及的不同溶液pH下rGQDs/CS体系的荧光变化。

[0030] 图5a为发明涉及的不同脲酶存在的rGQDs/CS体系的荧光发射光谱图；

[0031] 图5b为发明涉及的脲酶检测的标准曲线。

具体实施方式：

[0032] 为了更好的理解本发明，通过实例进一步说明，但是本发明不仅限于此。

[0033] 实施例1：

[0034] 本发明涉及的一种rGQDs/CS自组装体系的制备方法，包括以下步骤：

[0035] (1) 具有负电性rGQDs的制备：将1g NaBH_4 固体加入到30mL GQDs溶液中，在磁力搅拌的条件下室温反应4小时。后加入浓硝酸终止反应，并将该反应溶液转移到透析袋中透析三天以除去多余的盐离子（透析袋的截留分子量为3500Da）。由此制得了表面富含羟基的rGQDs。

[0036] (2) rGQDs/CS自组装体系的制备：将步骤(1)中合成的带负电的rGQDs与一定量的壳聚糖混合，使发生静电调控的自组装反应，引起rGQDs荧光强度的猝灭。将200 μL rGQDs溶液 (0.05mg mL^{-1}) 和140 μL 壳聚糖溶液 (35ng mL^{-1} , 0.02%) 加入到2mL的离心管中，再加入去离子水定容至刻度线处，将内容物充分混匀后静置5min。接着将离心管中溶液转移至荧光池中进行荧光光谱测量。

[0037] 脲酶的检测包括以下步骤：

[0038] (1) 将200 μL 的rGQDs溶液，20 μL 的Tris-HCl缓冲溶液 ($\text{pH } 7.4$, 2.5mmol L^{-1})，140 μL 壳聚糖溶液 (35ng mL^{-1}) 加入到2mL的离心管中，用去离子水定容至刻度线，再加入不同浓度的OH⁻溶液，静置5min后，将离心管中溶液转移至荧光池中进行荧光光谱测量。得到有效pH的响应范围。

[0039] (2) 将100 μL 20mmol L^{-1} 的尿素与20 μL 的Tris-HCl缓冲溶液 ($\text{pH } 7.4$, 2.5mmol L^{-1}) 混合，并在混合物中加入不同浓度的脲酶溶液持续震荡20min。接着将混合物转移至含有200 μL 的rGQDs溶液，20 μL 的Tris-HCl缓冲溶液 ($\text{pH } 7.4$, 2.5mmol L^{-1})，140 μL 壳聚糖溶液 (35ng mL^{-1} , 0.02%) 的离心管中并用去离子水定容至2mL后静置5min后，将离心管中溶液转移至荧光池中进行荧光检测，得到脲酶检测的标准曲线。

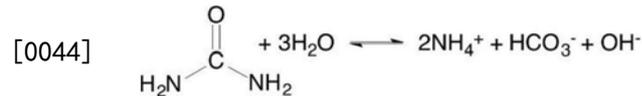
[0040] 试验结果与讨论：

[0041] 图3是关于rGQDs形貌和光学性质的表征。图3a为rGQDs的透射电镜图，可以看出rGQDs具有良好的单分散性，粒径基本均匀。图3b是关于G0、GQDs和rGQDs的FT-IR分析，验证在rGQDs制备过程中的结构变化。石墨烯在还原过程中仍存在碳骨架，硼氢化钠可以选择性地将羰基和环氧基团还原为羟基，可以看出-OH的弯曲振动带 (1376cm^{-1}) 在rGQDs谱中变得更强。图3c给出了还原前后石墨烯量子点的荧光激发和发射峰位变化。可以看出发射光谱的最大峰位从530nm了460nm，蓝移了70nm，量子点的荧光也从绿色变为蓝色。图3d是不同荧光激发下荧光发射光谱的变化情况。可以看出当激发波长从280nm到400nm变化时，最大发射波长的峰位几乎没有变化，而荧光强度从310nm之后便有所下降。由此确定了荧光激发波长为310nm。

[0042] 图4是关于rGQDs在加入壳聚糖后发生的荧光光谱强度变化，以及不同pH下rGQDs/CS自组装体系的荧光强度变化。图4a可以看出当在rGQDs溶液中加入35 ng mL^{-1} 的CS溶液时，带负电的rGQDs与带正电的CS之间产生非常强的静电相互作用，石墨烯量子点荧光强度降

低到原始强度的32%。当OH⁻加入到体系中后,rGQDs/CS自组装体系因为壳聚糖去质子化后电负性变化而是静电作用减弱,体系发生解组装,在图4b中可以看出随着pH值的增加,rGQDs/CS自组装体系的荧光强度逐渐增加,猝灭效率由原来的60%降低到几乎不猝灭。在pH=5.0~9.0的范围内,rGQDs/CS自组装体系的荧光强度与pH存在良好的线性关系。这表明rGQDs/CS自组装体系具有对pH敏感的特性。碱性条件下壳聚糖猝灭能力下降,使rGQDs荧光恢复。

[0043] 在最佳的pH和反应温度下,我们向rGQDs/CS体系中加入了一定浓度的尿素和不同浓度的脲酶。



[0045] 图5a给出了rGQDs/CS体系与酶解产物共存时,脲酶含量增加引发的rGQDs/CS体系的荧光光谱强度的变化情况。随着脲酶含量的不断增加,尿素的酶解产物中,铵根离子也含量不断增多,酶反应产物加入到rGQDs/CS体系中后,体系的pH升高,OH⁻破坏了rGQDs/CS体系的自组装状态,使通过静电吸附作用聚集的rGQDs与壳聚糖发生分离,重新将rGQDs释放,荧光强度恢复。可以看出,当脲酶浓度从0增加到1.5U mL⁻¹时,rGQDs/CS体系的荧光强度明显增强。图5b显示,在0.05~0.75U mL⁻¹范围内,恢复效率(Eff_r)与脲酶浓度呈良好的线性关系。回归方程为

[0046]
$$\text{Eff}_r = -0.0307 + 1.43[\text{脲酶}], \text{U mL}^{-1}$$

[0047] 脲酶LOD为0.036U mL⁻¹。其中,

[0048]
$$\text{Eff}_r (\%) = (I - I_q) / (I_0 - I_q),$$

[0049] 其中I_q和I₀分别为有CS和无CS时rGQDs的荧光强度,I为rGQDs/CS体系与不同浓度尿素的脲酶混合物共存时的荧光强度。

[0050] 上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对发明保护范围的限制,所属领域技术人员应该明白,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围内。

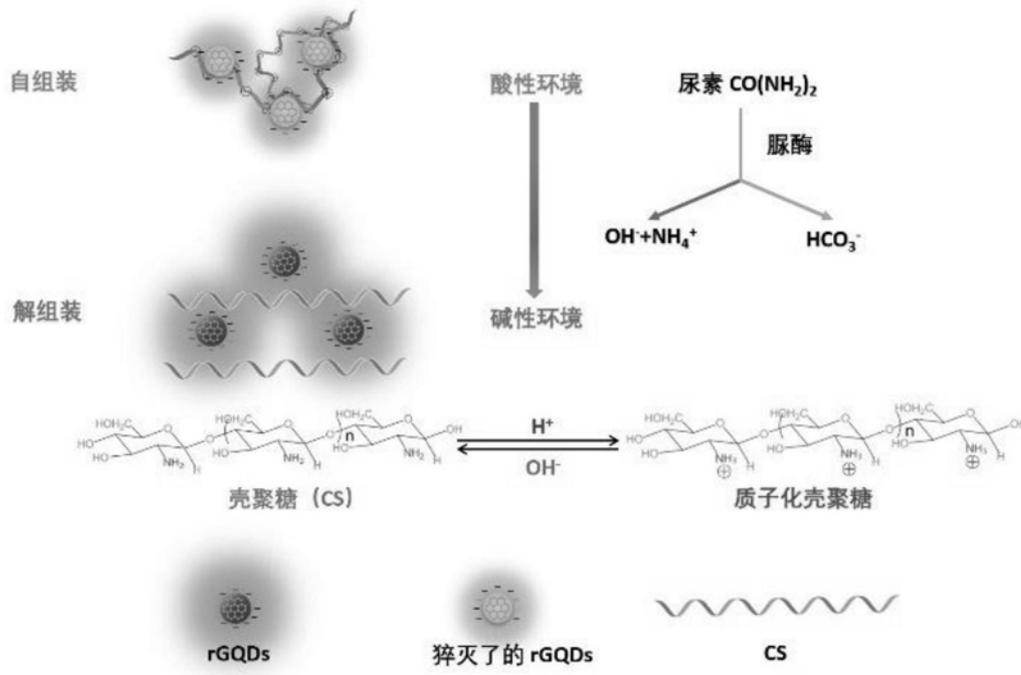


图1

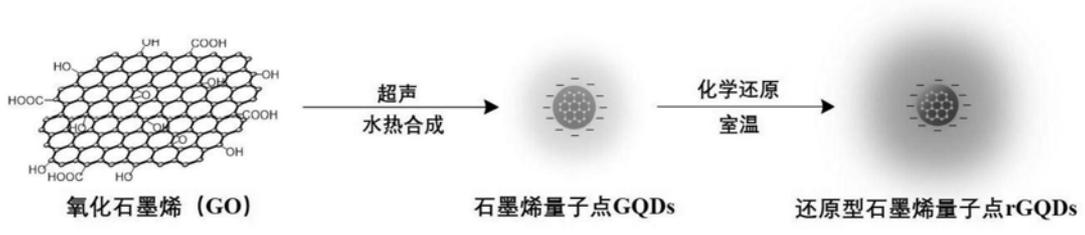


图2

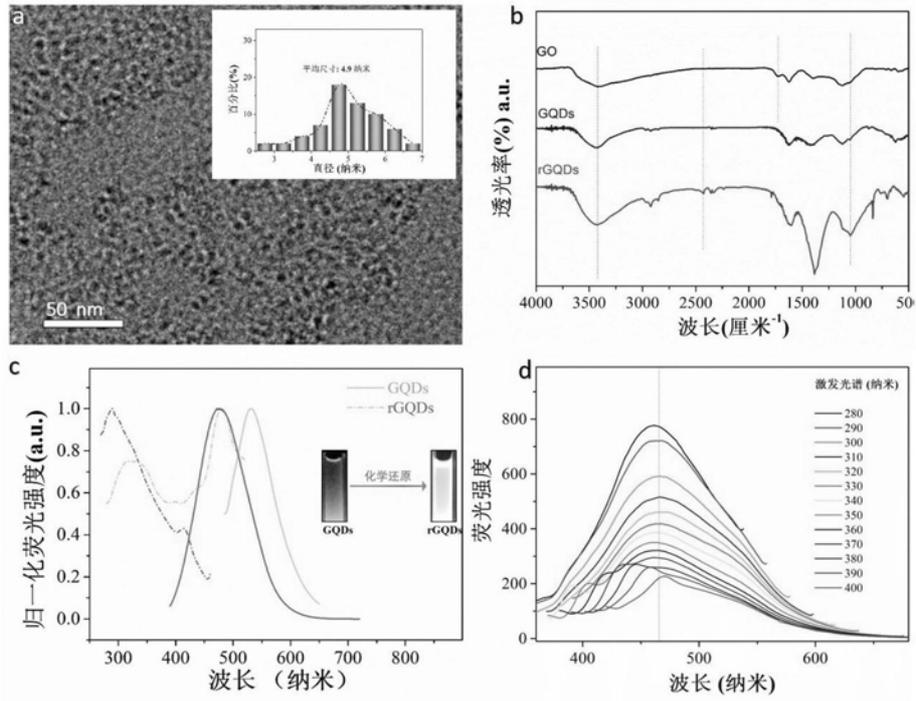


图3

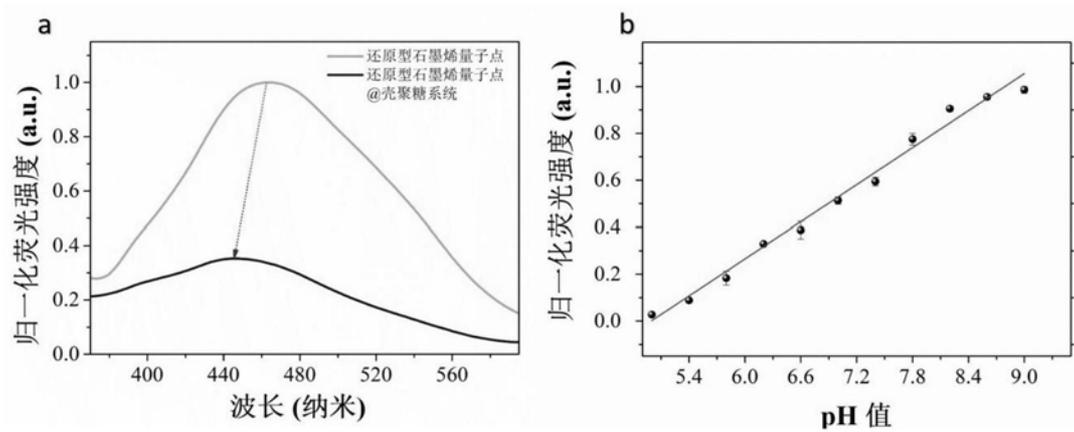


图4

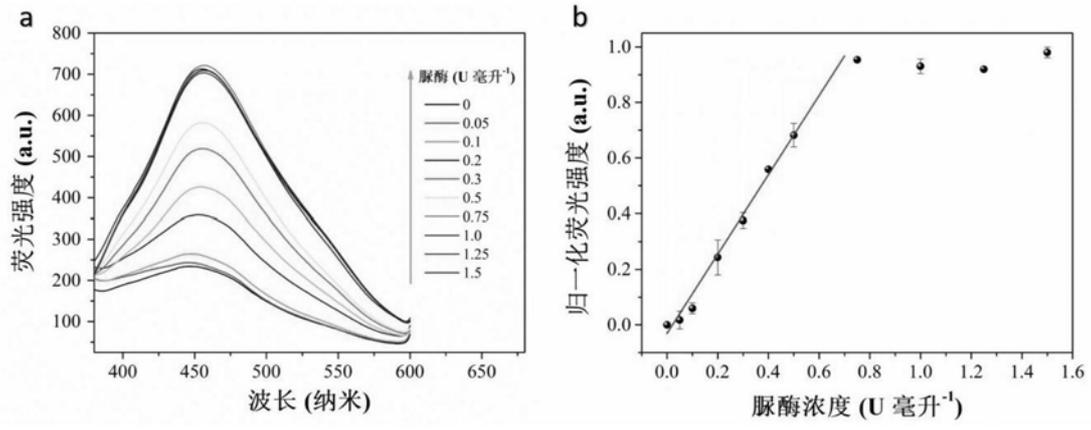


图5