



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107976427 A

(43)申请公布日 2018.05.01

(21)申请号 201711090704.2

(22)申请日 2017.11.08

(71)申请人 安徽师范大学

地址 241000 安徽省芜湖市弋江区花津南路安徽师范大学

(72)发明人 王广凤 陈纪华

(74)专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 任晨晨

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006.01)

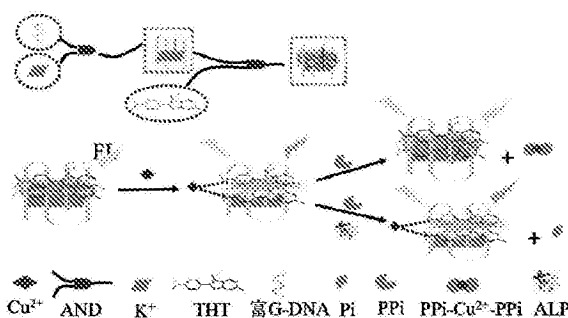
权利要求书1页 说明书5页 附图8页

(54)发明名称

一种荧光生物传感器、制备方法及其对铜离子、焦磷酸根和碱性磷酸酶的检测应用

(57)摘要

本发明提供了一种荧光生物传感器、制备方法及其对铜离子、焦磷酸根和碱性磷酸酶的检测应用。本发明基于铜离子与G-四连体-硫磺素上的胺基,形成铜胺络合物,淬灭体系的荧光,实现对铜离子检测;加入焦磷酸根,与铜离子形成配合物,剥夺出铜离子,使体系的荧光得以恢复,实现对焦磷酸根检测;再加入碱性磷酸酶,能够将焦磷酸根水解,使其失去络合能力,使得体系荧光淬灭,实现对碱性磷酸酶的灵敏检测。与现有技术相比,本发明提供的荧光传感器的制备方法,使用的是无标记的DNA,操作简单,成本很低,避免任何化学标记和修饰。



1. 一种荧光生物传感器的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

1) 将DNA序列溶解在Tris-HCl缓冲溶液中,得DNA缓冲溶液,备用;

2)、将步骤1) 制备的缓冲溶液与K⁺溶液混合培养,形成G-四连体;

3)、将步骤2) 得到的G-四连体与ThT混合反应,即得。

2. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,步骤2) 中所述的K⁺溶液浓度为10mM-50mM。

3. 根据权利要求1或2或所述的制备方法,其特征在于,步骤2) 中所述混合培养是指20℃-50℃下培养1h-3h。

4. 根据权利要求1或3所述的制备方法,其特征在于,步骤3) 中所述混合反应为20℃-50℃下反应1min-15min。

5. 一种采用权利要求1-4任一项所述的方法制备的荧光生物传感器。

6. 一种采用权利要求5所述的荧光生物传感器检测铜离子的应用;具体检测铜离子的方法为:

将荧光生物传感器与不同浓度的铜离子溶液于20℃-50℃培养1min-15min,测量荧光信号;构建铜离子与荧光强度的线性关系,实现对铜离子的检测。

7. 一种采用权利要求5所述的荧光生物传感器检测焦磷酸根的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,具体检测焦磷酸根的方法为:

将荧光生物传感器与铜离子溶液于20℃-50℃培养1min-15min后,加入不同浓度的焦磷酸根溶液于20℃-50℃培养10min-30min,测量荧光信号;构建焦磷酸根与荧光强度的线性关系,实现对焦磷酸根的检测。

9. 一种采用权利要求5所述的荧光生物传感器检测碱性磷酸酶的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,具体检测碱性磷酸酶的方法为:将荧光生物传感器与铜离子溶液于20℃-50℃培养1min-15min,加入焦磷酸根溶液于20℃-50℃培养10min-30min,然后再加入不同浓度的碱性磷酸酶溶液,20℃-50℃培养40min-80min,测量荧光信号;构建碱性磷酸酶与荧光强度的线性关系,实现对碱性磷酸酶的检测。

一种荧光生物传感器、制备方法及其对铜离子、焦磷酸根和碱性磷酸酶的检测应用

技术领域

[0001] 本发明属于荧光生物传感器技术领域,具体涉及一种荧光生物传感器、制备方法及其对铜离子、焦磷酸根和碱性磷酸酶的检测应用。基于DNA-G四连体荧光生物传感器,可以实现对铜离子、焦磷酸根、碱性磷酸酶的灵敏检测。

背景技术

[0002] 铜离子是人类和动物的必需微量元素,过量铜离子可诱导氧化应激并导致神经变性疾病,包括阿尔茨海默病,帕金森病和威尔逊病。焦磷酸根是各种生化过程中的关键代谢物。而且,很多研究表明焦磷酸根可以用作一些指标疾病,如关节炎和软脑膜炎。至于碱性磷酸酶,一种必需的水解酶磷酸盐代谢,负责蛋白质,核酸或生物学中的小分子的去磷酸化过程,另外ALP异常水平也可能与某些疾病有关,如动态骨病,肝脏等功能障碍,糖尿病,乳腺癌和前列腺癌。

[0003] 目前对于铜离子、焦磷酸根、碱性磷酸酶在实际样品中的检测多涉及复杂和耗时冗长的检测过程,多个分析物分离的传感策略往往需要繁琐的采样,耗时的预处理,并导致低的准确性。

[0004] 使用单个传感器进行连续检测具有潜在的低成本和更有效的分析等优点,因此开发高选择性、高灵敏性、简单无标记的荧光生物传感器检测铜离子、焦磷酸根、碱性磷酸酶至关重要。

发明内容

[0005] 本发明的目的在提供一种荧光生物传感器及其制备方法,基于G-四连体-硫磺素(简称ThT)荧光探针构建光化学生物传感器。

[0006] 本发明还提供了一种荧光生物传感器对铜离子、焦磷酸根和碱性磷酸酶的检测应用。利用铜离子淬灭G四连体-硫磺素的荧光信号,加入焦磷酸根恢复其荧光,再加入碱性磷酸酶淬灭体系的荧光信号,构建“off-on-off”传感平台,不同浓度的铜离子、焦磷酸根、碱性磷酸酶荧光强度不同,构建线性关系,实现了对铜离子、焦磷酸根、碱性磷酸酶的连续性、灵敏性和特异性的检测。

[0007] 本发明提供一种荧光生物传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0008] 1) 将DNA序列溶解在Tris-HCl缓冲溶液中,得DNA缓冲溶液,备用;

[0009] 2)、将步骤1)制备的缓冲溶液与 K^+ 溶液混合培养,形成G-四连体;

[0010] 3)、将步骤2)得到的G-四连体与ThT混合反应,即得。

[0011] 步骤1)中所述DNA序列为:AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG;

[0012] 步骤1)具体为:为将购买的2.50D的DNA序列溶解在Tris-HCl缓冲溶液中,得到浓度为 $100\mu\text{M}$ 的DNA缓冲溶液,在 4°C 下保存备用;

[0013] 步骤1)中所述Tris-HCl缓冲溶液pH为7.4,浓度为0.05M,含0.05M氯化镁。

- [0014] 步骤2) 中所述的 K^+ 溶液浓度为10mM-50mM。
- [0015] 步骤2) 具体为:将2 μ L 100 μ M DNA缓冲溶液和10 μ L 20mM钾离子混合,培养,形成G-四连体。
- [0016] 步骤2) 中所述混合培养是指20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C下培养1h-3h。
- [0017] 步骤3) 具体为:将步骤2) 得到的G-四连体与10 μ L 100mM ThT,混合反应。
- [0018] 步骤3) 中所述混合反应为20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C下反应1min-15min。
- [0019] 步骤3) 中所述G-四连体的浓度是1mM。
- [0020] 荧光生物传感器的制备方法具体为:
- [0021] 1) 将购买的DNA序列溶解在0.05M Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲溶液中,并在4 $^{\circ}$ C下保存备用;DNA:AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG;
- [0022] 2)、将2 μ L 100 μ M DNA缓冲溶液与10 μ L 20mM K^+ 溶液于37 $^{\circ}$ C下培养2h,形成G-四连体;
- [0023] 3)、将步骤(2) 得到的G-四连体与10 μ L6 μ MThT反应15min,即得。
- [0024] 本发明提供的一种荧光生物传感器,采用上述方法制备得到。
- [0025] 本发明提供的一种利用上述制备的荧光生物传感器检测铜离子的应用。
- [0026] 具体检测铜离子的方法为:
- [0027] 将荧光生物传感器与不同浓度的铜离子溶液于20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C培养1min-15min,测量荧光信号;构建铜离子与荧光强度的线性关系,实现对铜离子的检测。
- [0028] 检测铜离子的原理为:硫磺素染料与G-四连体结合,会发出强烈的荧光,加入铜离子,会淬灭其荧光,且加入铜离子的浓度不同,有不同程度的淬灭现象,测体系荧光强度值,构建浓度与荧光强度值的线性关系;
- [0029] 本发明提供的一种利用上述制备的荧光生物传感器检测焦磷酸根的应用。
- [0030] 具体检测焦磷酸根的方法为:
- [0031] 将荧光生物传感器与铜离子溶液于20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C培养1min-15min后,加入不同浓度的焦磷酸根溶液于20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C培养10min-30min,测量荧光信号;构建焦磷酸根与荧光强度的线性关系,实现对焦磷酸根的检测。
- [0032] 检测焦磷酸根的原理为:焦磷酸根与铜离子有强的配位能力,能将体系中的铜离子剥夺下来,从而恢复体系的荧光,准备一系列不同浓度的焦磷酸根,测体系荧光强度值,构建浓度与荧光强度值的线性关系;实现对焦磷酸根的检测。
- [0033] 本发明提供的一种利用上述制备的荧光生物传感器检测碱性磷酸酶的应用。
- [0034] 具体检测碱性磷酸酶的方法为:
- [0035] 将荧光生物传感器与铜离子溶液于20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C培养1min-15min,加入焦磷酸根溶液于20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C培养10min-30min,然后再加入不同浓度的碱性磷酸酶溶液,20 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C培养40min-80min,测量荧光信号;构建碱性磷酸酶与荧光强度的线性关系,实现对碱性磷酸酶的检测。
- [0036] 检测碱性磷酸酶的原理为:碱性磷酸酶能将体系中的焦磷酸根水解成磷酸根,使其失去与铜离子的配位能力,从而淬灭体系的荧光,准备一系列不同浓度的碱性磷酸酶,测体系荧光强度值,构建浓度与荧光强度值的线性关系;实现对碱性磷酸酶的检测。
- [0037] 本发明提供的一种荧光生物传感器及其应用,实现了对铜离子、焦磷酸根、碱性磷

酸酶灵敏性、特异性的检测。利用“off-on-off”生物荧光传感平台,应用于铜离子、焦磷酸根、碱性磷酸酶的检测,

[0038] 与现有技术相比,本发明提供的荧光传感器的制备方法,使用的是无标记的DNA,操作简单,成本很低,避免任何化学标记和修饰。通过G-四连体和硫磺素染料作为荧光探针,能够制备出检测铜离子、焦磷酸根、碱性磷酸酶传感器。结果显示此传感器对铜离子2-100nM有灵敏的检测,对焦磷酸根1-10 μ M有灵敏的检测,对碱性磷酸酶0-0.04U/mL有灵敏的检测,且具有体系简单,操作简单,灵敏度高,检测限低。

附图说明

[0039] 图1为基于G-四连体-硫磺素荧光传感平台建立“off-on-off”体系制备原理图;

[0040] 图2为本发明可行性图,a表示G-四连体-硫磺素荧光图,d表示加入铜离子荧光淬灭图,b表示加入焦磷酸,荧光恢复图,c表示加入碱性磷酸酶,荧光淬灭图;

[0041] 图3A在G-四连体-硫磺素体系中加入铜离子测得的荧光光谱图,a到k铜离子的最终浓度分别为(0,2,4,6,8,10,50,100,200,500,1000nM);

[0042] 图3B为铜离子浓度与荧光强度的关系(0-1000nM);

[0043] 图3C为铜离子浓度与荧光强度的关系(2-100nM);

[0044] 图3D为铜离子选择性图;

[0045] 图4A为在G-四连体-硫磺素-铜离子体系中加入焦磷酸根测得的荧光光谱图,a到h浓度分别为0,1,2,3,4,6,8,10 μ M;

[0046] 图4B为铜离子浓度与荧光强度的线性拟合图;

[0047] 图4C为焦磷酸根选择性图;

[0048] 图5A在G-四连体-硫磺素-铜离子-焦磷酸根体系中加入碱性磷酸酶测得的荧光光谱图;a到j浓度分别为0,0.01,0.02,0.03,0.04,0.1,0.2,0.6,0.8,1U/mL;

[0049] 图5B为碱性磷酸酶浓度与荧光强度的线性拟合图(0-1U/mL);

[0050] 图5C为碱性磷酸酶浓度与荧光强度的线性拟合图(0-0.04U/mL);

[0051] 图5D为碱性磷酸酶选择性图;

[0052] 图6A为钾离子浓度优化图;

[0053] 图6B为硫磺素浓度优化图;

[0054] 图6C为pH优化图。

具体实施方式

[0055] 实施例1

[0056] 一种荧光生物传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0057] 1)、将购买的DNA序列溶解在0.05M Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲溶液中,DNA缓冲溶液,并在4 $^{\circ}$ C下保存备用;DNA:AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG;

[0058] 2)、将步骤1)制备的2 μ L 100 μ M DNA缓冲溶液与10 μ L 20mM K^+ 溶液于37 $^{\circ}$ C下培养2h,形成G-四连体;

[0059] 3)、将步骤2)得到的G-四连体与10 μ L 6 μ M ThT混合,在37 $^{\circ}$ C反应15min,测其荧光,得到荧光生物传感器;

[0060] 所述荧光生物传感器基于G-四连体-ThT构建。所用的缓冲溶液pH为7.4浓度为0.05M Tris-HCl (pH 7.4), 缓冲溶液中含0.05M氯化镁。

[0061] 实施例2

[0062] 一种荧光生物传感器, 采用上述方法制备得到。

[0063] 实施例3

[0064] 一种利用上述制备的荧光生物传感器检测铜离子应用。

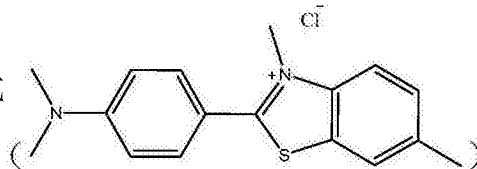
[0065] 具体检测方法为:

[0066] 将2 μ L 100 μ M的DNA缓冲溶液和10 μ L的20mM K⁺溶液加入到178 μ L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲溶液中, 于37 $^{\circ}$ C培养2h形成G-四连体, 然后分别加入10 μ L浓度梯度的铜离子溶液, 得到混合溶液, 37 $^{\circ}$ C培养5min, 然后测其荧光; 构建铜离子与荧光强度的线性关系, 实现对铜离子的检测。

[0067] 所述浓度梯度的铜离子溶液的制备方法为: 用水逐渐稀释配置的铜离子储备液(1000nM)。检测体系中铜离子终浓度分别为0, 2, 4, 6, 8, 10, 50, 100, 200, 500, 1000nM的溶液, 然后测其荧光;

[0068] 检测铜离子原理: 硫磺素本身没有荧光信号, 当其与G-四连体结合时, 会发出很强

的荧光信号, 硫磺素分子结构式



中有胺基, 能够与铜离

子结合, 形成铜氨络合物, 因此淬灭体系的荧光信号, 基于此, 可以实现铜离子的检测。

[0069] 实施例4

[0070] 一种利用上述制备的荧光生物传感器检测焦磷酸根应用。

[0071] 具体检测方法为:

[0072] 将2 μ L 100 μ M的DNA缓冲溶液和10 μ L的20mM K⁺溶液加入到168 μ L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲溶液中, 于37 $^{\circ}$ C培养2h形成G-四连体, 然后加入10 μ L 200 μ M的铜离子, 37 $^{\circ}$ C培养5min之后, 然后分别加入10 μ L浓度梯度的焦磷酸根溶液, 得到混合溶液, 于37 $^{\circ}$ C培养20min, 然后测其荧光; 构建焦磷酸根与荧光强度的线性关系, 实现对焦磷酸根的检测。

[0073] 所述浓度梯度的焦磷酸根溶液的制备方法为: 用水逐渐稀释配置的焦磷酸根储备液(10 μ M), 检测体系中焦磷酸根终浓度分别为0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 μ M的溶液。

[0074] 检测焦磷酸根的原理: 焦磷酸根与铜离子有很强的配位能力, 因此可以剥夺G-四连体-硫磺素-铜离子体系中的铜离子, 从而恢复体系的荧光, 基于此, 可以实现焦磷酸根的检测。

[0075] 实施例5

[0076] 一种利用上述制备的荧光生物传感器检测碱性磷酸酶应用。

[0077] 具体检测方法为:

[0078] 将2 μ L 100 μ M的DNA缓冲溶液和10 μ L的20mM K⁺溶液加入到163 μ L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲溶液中, 于37 $^{\circ}$ C培养2h形成G-四连体, 加入10 μ L 200nM的铜离子溶液, 于37 $^{\circ}$ C培养5min然后加入10 μ L 4 μ M焦磷酸根溶液, 37 $^{\circ}$ C培养20min, 然后分别加入5 μ L不同浓度梯度的碱性磷酸酶溶液, 得到混合溶液, 于37 $^{\circ}$ C培养50min, 然后测其荧光; 构建碱性磷酸酶与荧光

强度的线性关系,实现对碱性磷酸酶的检测。

[0079] 所述浓度梯度的碱性磷酸酶溶液的制备方法为:用水逐渐稀释配置的碱性磷酸酶储备液(1U/mL)。检测体系中碱性磷酸酶终浓度分别为0,0.01,0.02,0.03,0.04,0.1,0.2,0.6,0.8,1U/mL的溶液,然后测其荧光;

[0080] 检测碱性磷酸酶的原理:碱性磷酸酶能够将焦磷酸根水解,使焦磷酸根失去与铜离子的络合能力,因此,淬灭体系的荧光,基于此,可以实现碱性磷酸酶的检测;

[0081] 本发明基于铜离子与G-四连体-硫磺素上的氨基,形成铜胺络合物,淬灭体系的荧光,实现对铜离子检测;加入焦磷酸根,与铜离子形成配合物,剥夺出铜离子,使体系的荧光得以恢复,实现对焦磷酸根检测;再加入碱性磷酸酶,能够将焦磷酸根水解,使其失去络合能力,使得体系荧光淬灭,实现对碱性磷酸酶的灵敏检测。

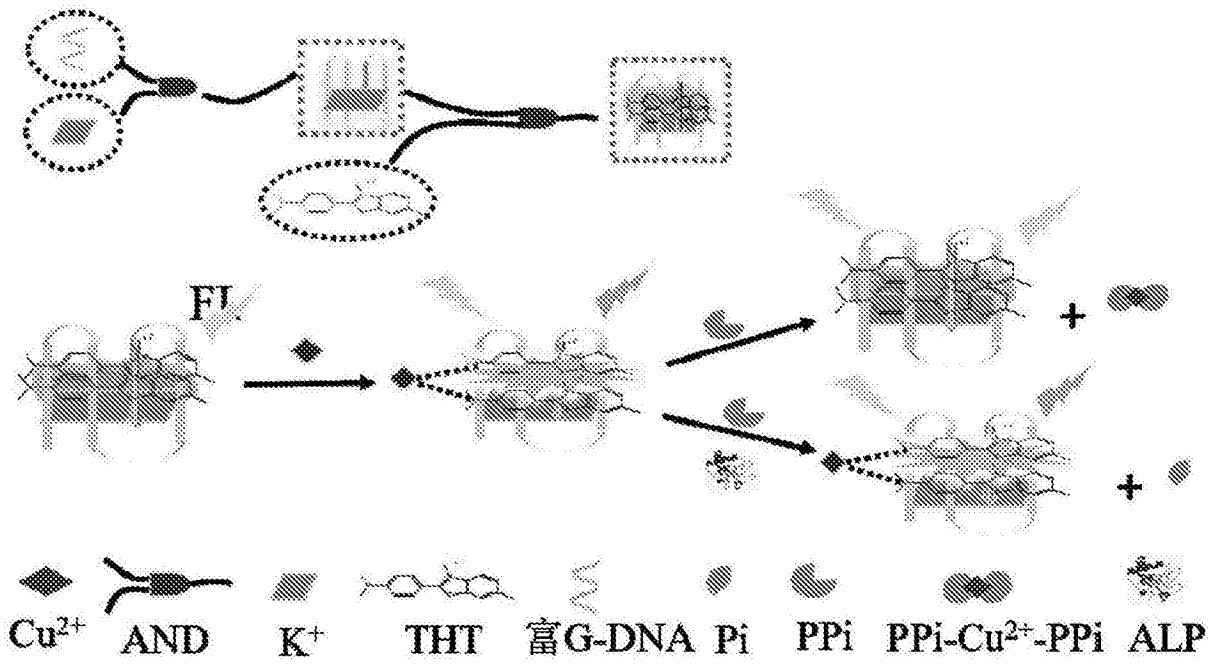


图1

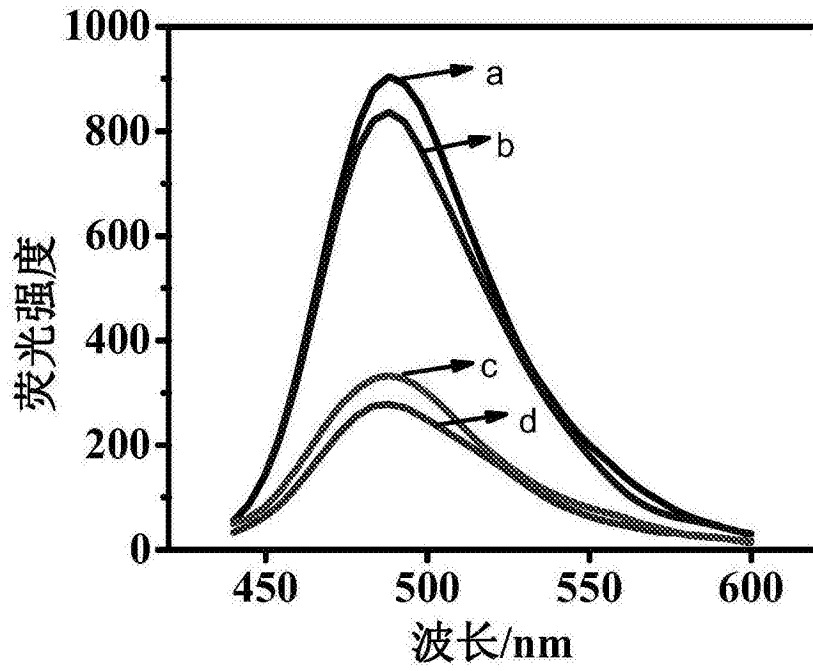


图2

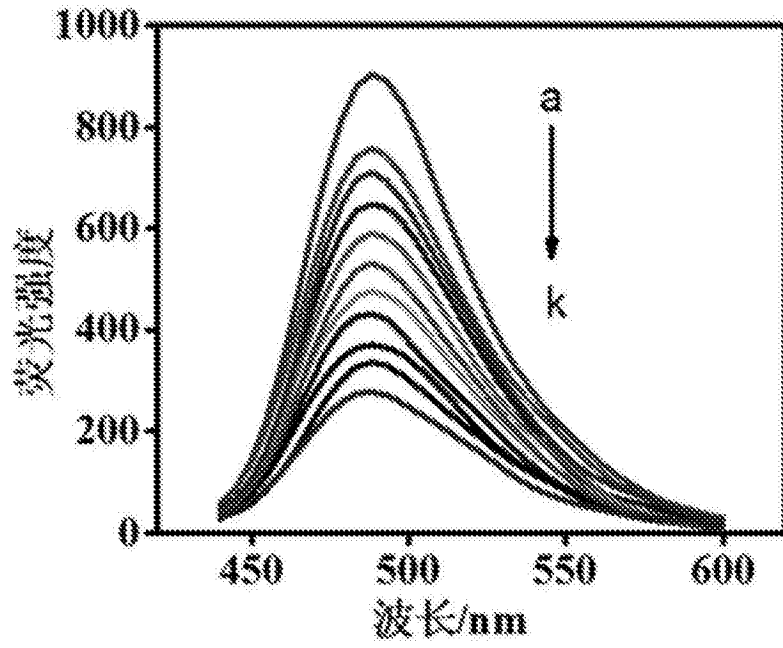


图3A

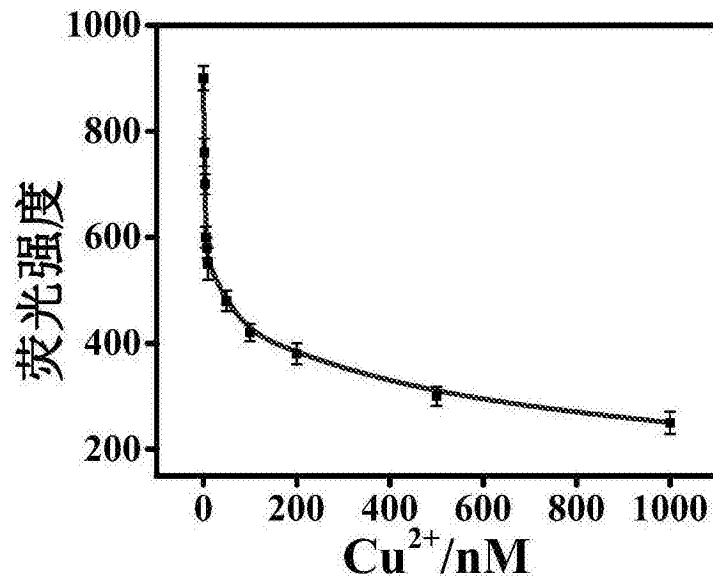


图3B

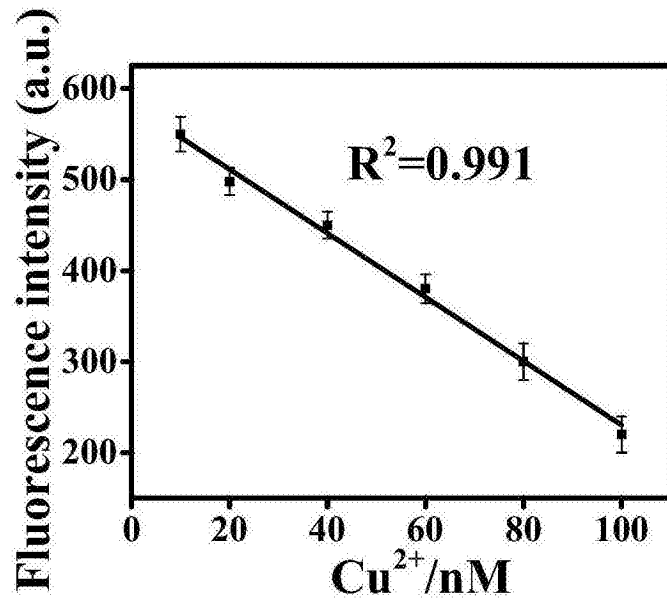


图3C

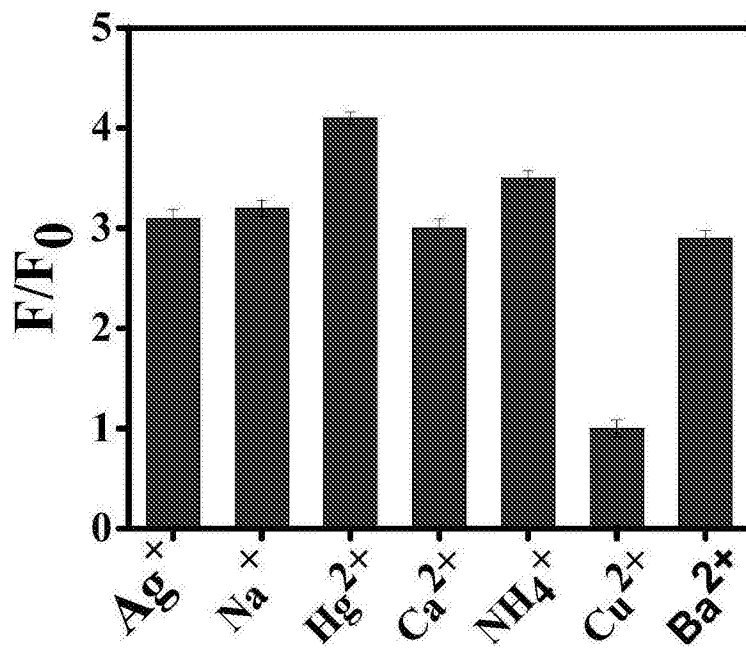


图3D

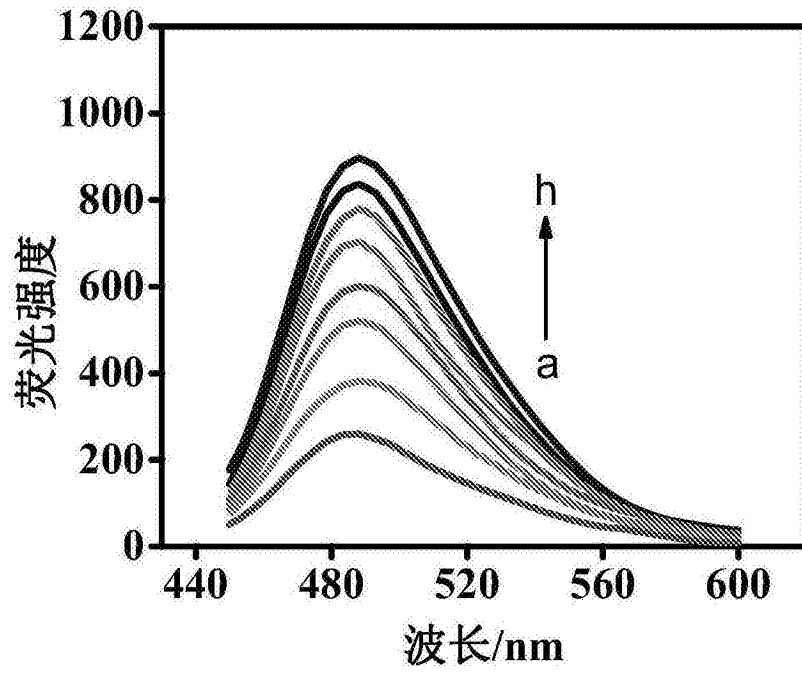


图4A

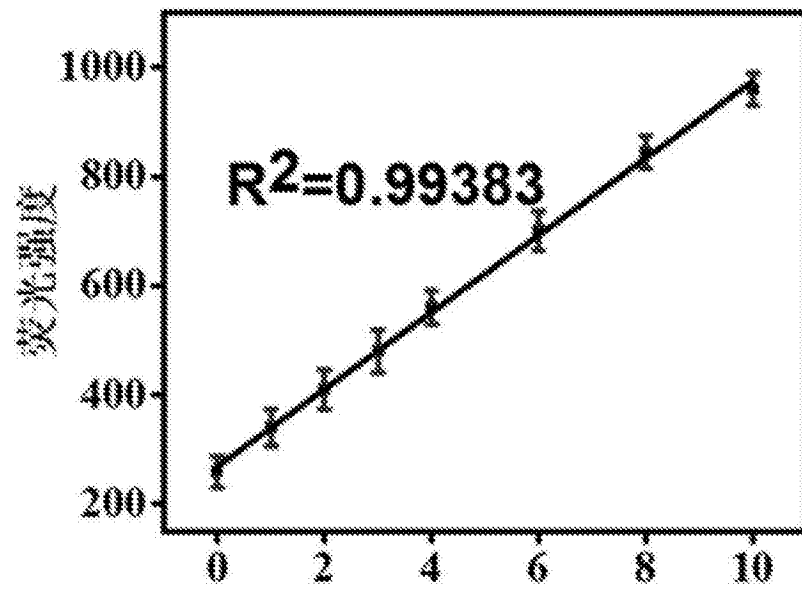


图4B

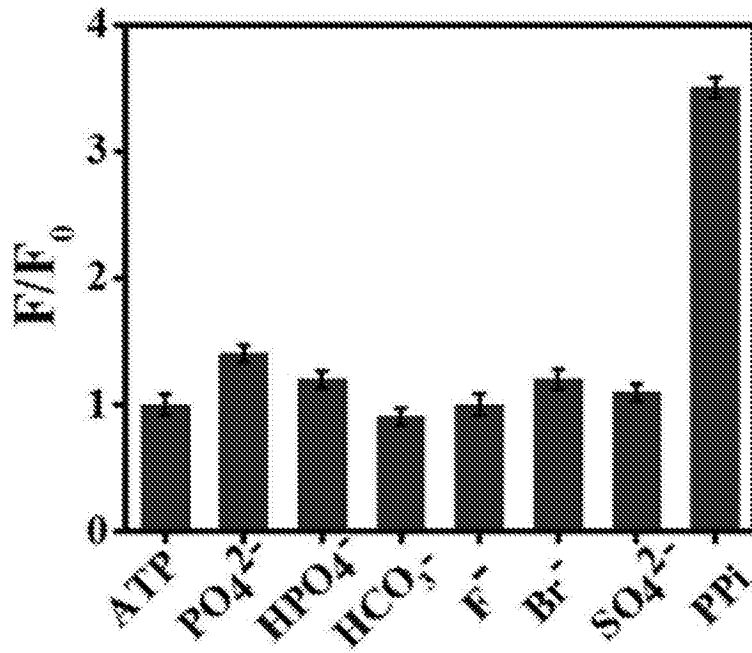


图4C

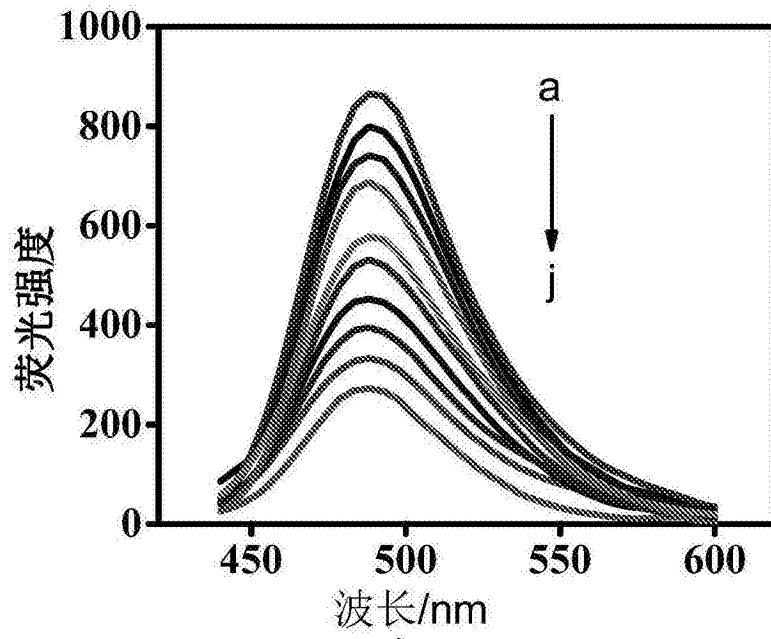


图5A

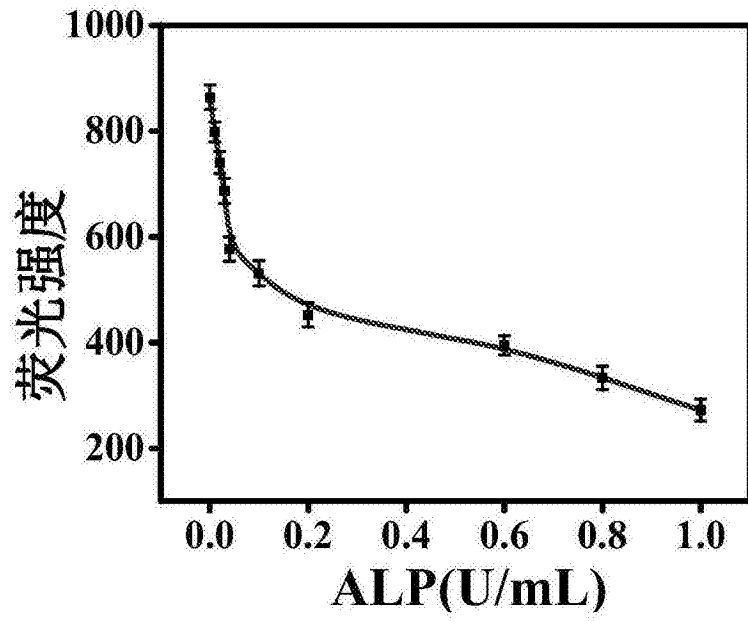


图5B

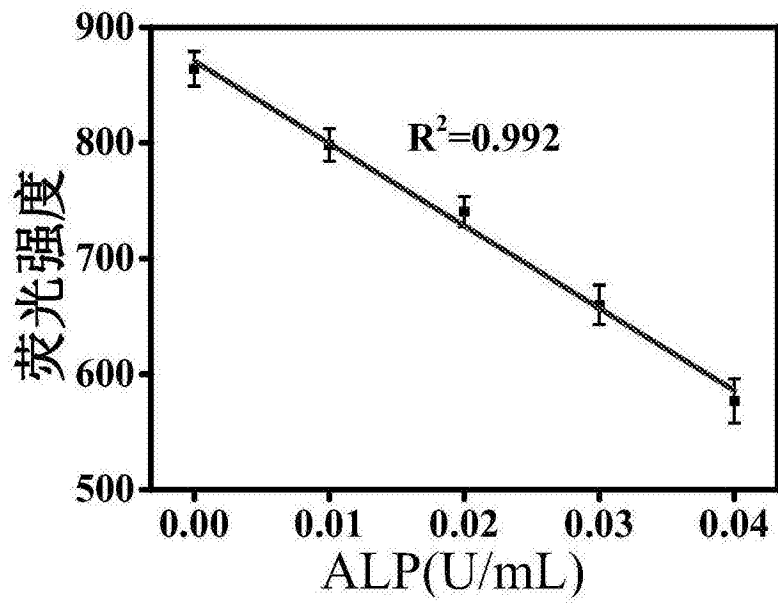


图5C

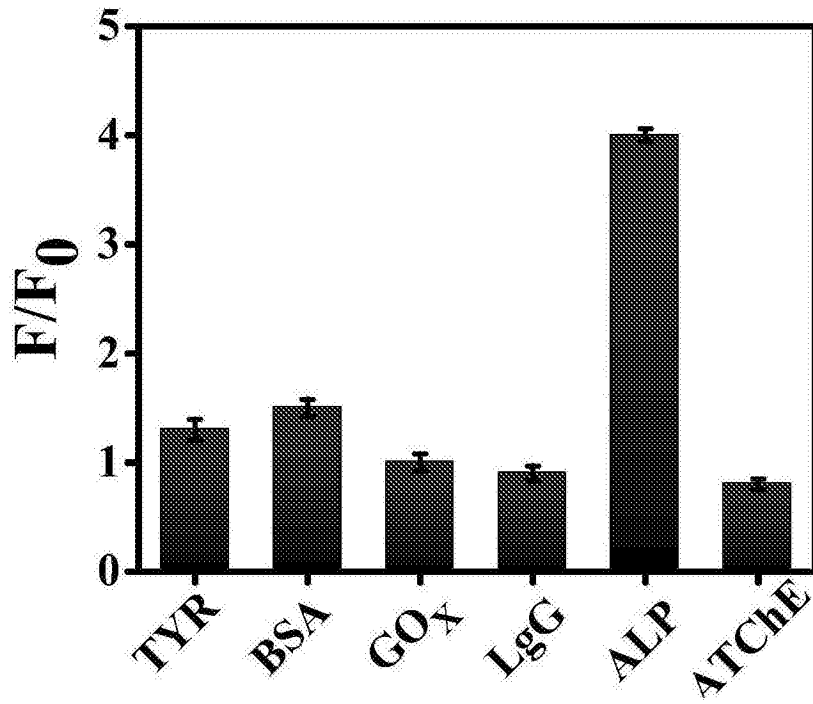


图5D

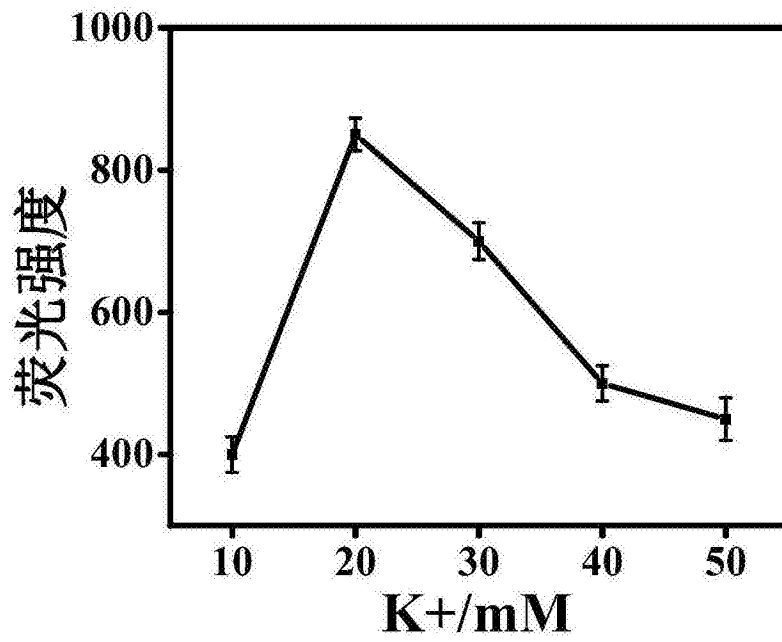


图6A

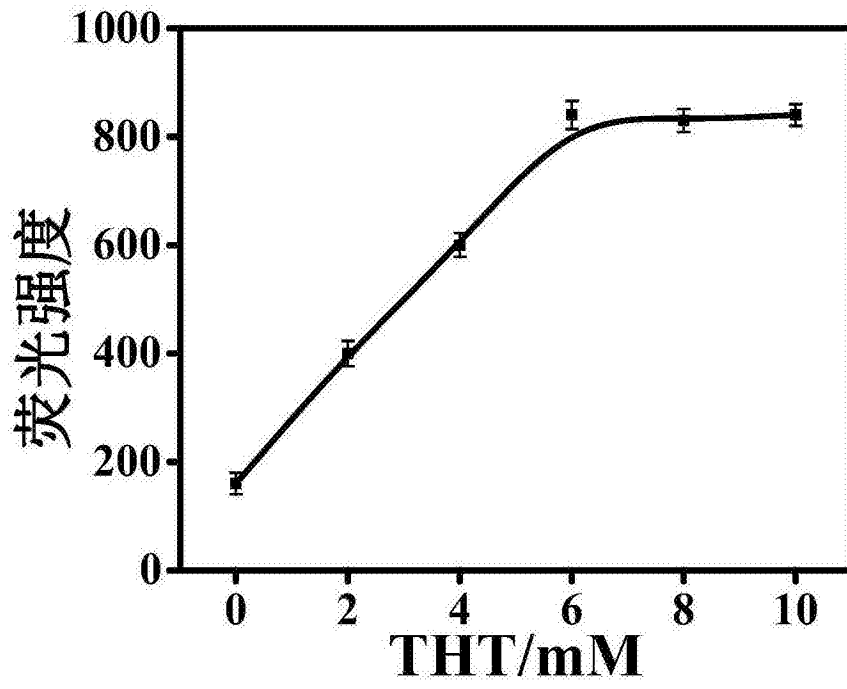


图6B

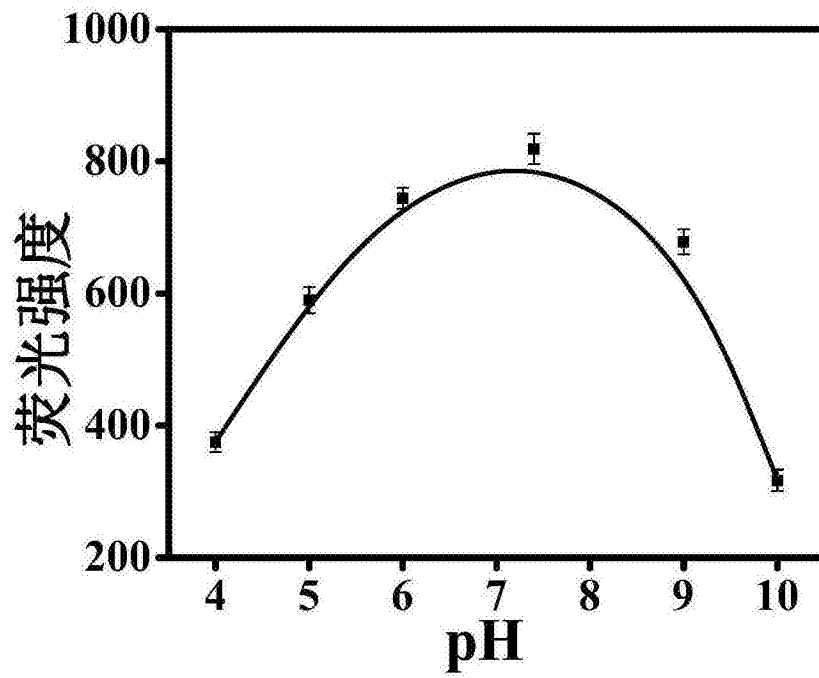


图6C