



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103980883 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201410214548. 6

(22) 申请日 2014. 05. 20

(73) 专利权人 中国科学技术大学

地址 230026 安徽省合肥市包河区金寨路
96 号

(72) 发明人 刘世勇 汪泉睿

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C07D 249/04(2006. 01)

C09K 11/06(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103529017 A, 2014. 01. 22, 说明书第 4 页
0032 段, 附图 1.

夏晶等. 具有聚集诱导发光特性的四苯基乙

烯研究进展. 《影像科学与光化学》. 2012, 第 30
卷 (第 1 期), 9-25.

吴燕梅等. 水溶性荧光增强共轭聚合物的
合成及性能研究. 《高分子学报》. 2012, (第 4
期), 453-461.

审查员 李佳博

权利要求书1页 说明书11页 附图8页

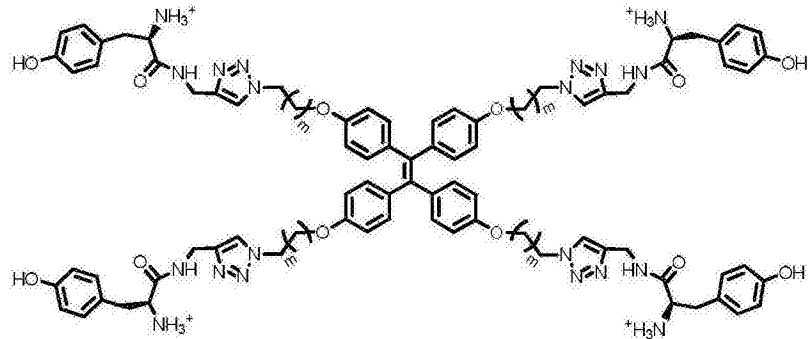
(54) 发明名称

一种基于酶催化偶联反应与聚集诱导发射的
生物传感器新方法

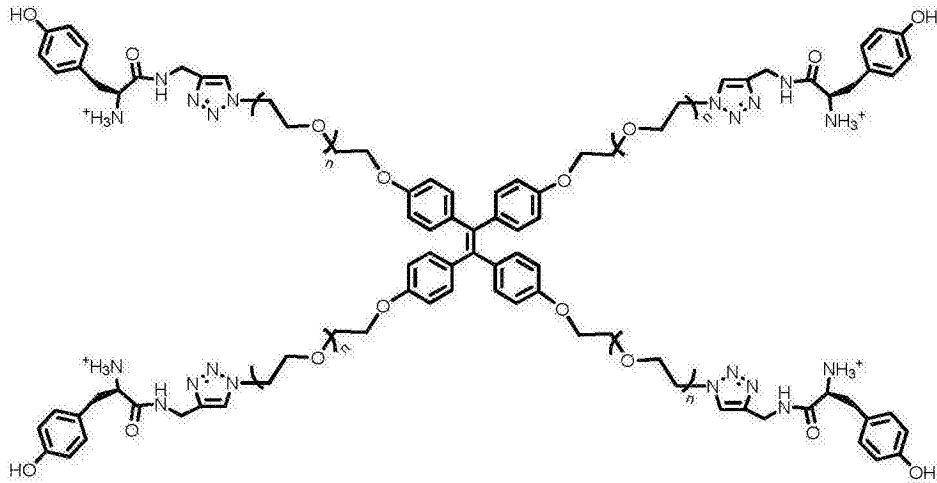
(57) 摘要

本发明涉及一种用于实现对多种化学、生物
相关分析物的高效灵敏检测的化学传感器方法。
具体设计并合成了一类由过氧化物酶的底物官能
化的水溶性四苯基乙烯衍生物分子。在水溶液
中加入待检测物后, 这些小分子可以被过氧化物
酶催化氧化, 发生分子间的偶联聚集, 从而产生
荧光发射, 根据荧光发射的强度可以来定量底物
的浓度。通过与酶串联反应及酶联免疫吸附检测
手段结合, 实现了对多种生物小分子及抗原、抗
体的高效检测。

1. 一种具有聚集诱导发光 (AIE) 性质的荧光探针, 其特征在于: 所述荧光探针是由过氧化物酶的底物官能化的四苯基乙烯衍生物, 所述过氧化物酶的底物为亲水性的酪氨酸, 所述过氧化物酶的底物与四苯基乙烯之间通过烷基链或甘醇链连接, 所述荧光探针的组成为下式所示,



其中, $m = 1 \sim 11$,
或为下式所示,



其中, $n = 1 \sim 8$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光探针用于制备高灵敏选择性检测生物和 / 或化学分析物的试剂盒的用途。

3. 根据权利要求 2 所述的用途, 所述生物和 / 或化学分析物为过氧化氢、葡萄糖、抗原、抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的荧光探针用于制备高灵敏选择性检测酶联免疫吸附中抗原的试剂盒的用途。

一种基于酶催化偶联反应与聚集诱导发射的生物传感器新方法

技术领域

[0001] 本发明属于材料领域,具体涉及一种基于酶催化偶联反应与聚集诱导发射的生物传感器新方法,并进一步涉及这一新技术在多种化学、生物相关分析物的高效灵敏检测方面的潜在应用。

背景技术

[0002] 现代传感技术包括信息变换、信息处理及接口技术等三部分。其中以信息变换为最主要部分,也被称为说的“传感器(sensor)”。作为信息变换的主要手段之一的化学传感器(chemical sensor)是应用化学反应产生的各种信息变化,如光效应、热效应、场效应及电磁效应等来设计的各种精密而灵敏的探测装置。近年来,光化学传感器由于其本身的各种优势而被广泛研究。相对于化学传感器家族中的其它类型,光化学传感器具有许多特殊的优点:易于加工成小巧、轻便和空间适应性好的探头;具有很强的抗电磁干扰能力;所涉及的许多光学信号测量可以通过自身参比方式获得,无需如电化学传感器中需要另外的参比装置。随着光纤通信技术的高速发展,由于光化学传感器获取的光学信号传输损耗低、容量大,因此分析科学家们对光化学传感器的研究越来越感兴趣(功能高分子学报, 23(4), 413-422)。

[0003] 在生物检测领域,光化学传感器也已经被广泛应用于各种生物、化学相关分析物的高灵敏度的检测,如各种金属离子污染物(Hg^{2+} 、 Pb^{2+})、对生物体有毒害的气体(CO 、 SO_2)、生物体内代谢相关物质(多巴胺、过氧化氢、糖类)、生物大分子(多肽、DNA、RNA)及特殊细胞(肿瘤细胞)的检测(J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(23), 7700-7700)。这些检测手段的开发为与人类生活、生存息息相关的环境保护、疾病预防与治疗等提供了有效的帮助。但随着研究的不断深入,检测要求也不断提高,如何更加高精度、高选择性及低成本的检测待分析物仍然是当前的重要挑战。

[0004] 近些年来,荧光化学传感器由于其易于制备、高灵敏度、低噪音和高选择性等众多优点而被广泛开发和研究(Anal. Chem., 2000, 72(12), 197-210, Anal. Chem., 2014, 86(1), 119-129)。但是,以前的荧光探针在实际应用中往往存在着各种缺点,比如说它们的荧光强度线性变化范围往往受到探针浓度限制,在聚集时发生严重的聚集荧光猝灭现象而影响其检测过程,这些缺点的存在大大限制了荧光探针的实际应用范围。幸运的是,最近,唐本宗院士发现了一种聚集诱导发光(Aggregation-Induced Emission, AIE)的特殊光学现象,这一发现为解决上述问题提供了一条崭新的途径(Chem. Commun., 2001, 1740-1741; Chem. Soc. Rev., 2011, 40, 5361-5388)。具体来说,具有AIE性能的探针分子在单分子分散状态条件下荧光很弱,其荧光发射过程被分子内运动能量耗散而禁阻;但在聚集状态下,分子内运动受到限制而使得荧光发射过程被激活,即荧光发射增强;而且荧光发射增强的程度是与探针分子聚集程度线性相关的。显然,这一类型的探针分子能够为荧光检测提供更大的环境耐受性和检测动态范围。因此,新型AIE荧光探针的合

成以及将其用于化学传感与检测中具有重要的科学意义和重大的实用价值。

发明内容

[0005] 本发明中,我们发明了一种全新的化学传感器方法来实现对多种化学、生物相关分析物的高效灵敏检测。设计并合成了一类由过氧化物酶的底物官能化的水溶性四苯基乙烯衍生物分子。在水溶液中加入待检测物后,这些小分子可以被过氧化物酶催化氧化,发生分子间的偶联聚集,从而产生荧光发射,根据荧光发射的强度可以来定量底物的浓度。通过与酶串联反应及酶联免疫吸附检测手段结合,实现了对多种生物小分子及抗原、抗体的高效检测。

[0006] 具体地,本发明涉及以下各项:

[0007] 1. 一种具有聚集诱导发光(AIE)性质的荧光探针,其特征在于:所述荧光探针是由过氧化物酶的底物官能化的四苯基乙烯衍生物。

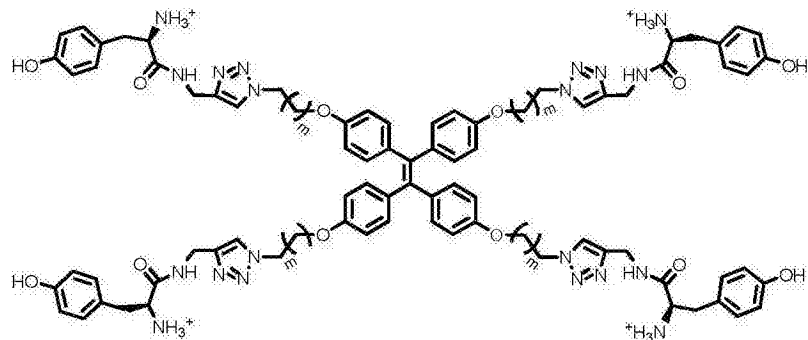
[0008] 2. 根据1所述的荧光探针,所述过氧化物酶的底物为亲水性基团。

[0009] 3. 根据2所述的荧光探针,所述亲水性基团为亲水性的酪氨酸。

[0010] 4. 根据1-3任一项所述的荧光探针,所述过氧化物酶与四苯基乙烯之间通过烷基链或甘醇链连接。

[0011] 5. 根据4所述的荧光探针,其组成为下式所示,

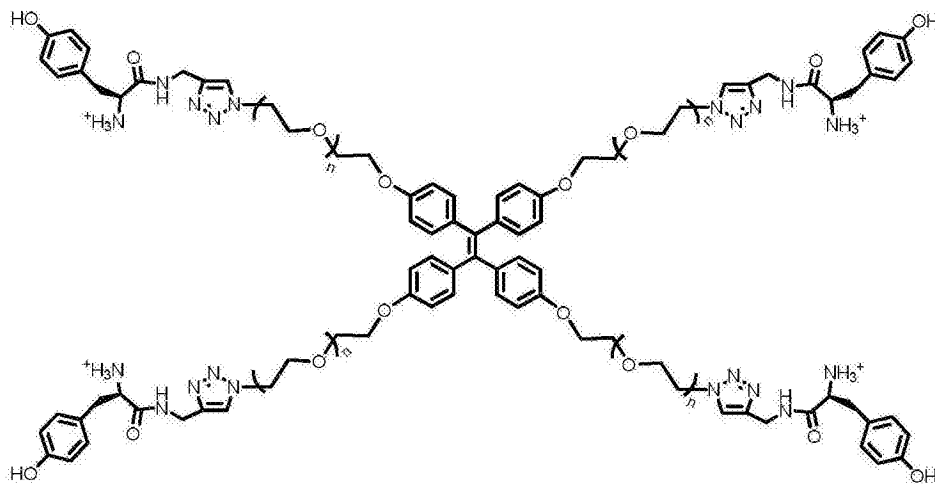
[0012]



[0013] 其中, $m = 1 \sim 11$ 。

[0014] 6. 根据4所述的荧光探针,其组成为下式所示,

[0015]



[0016] 其中, $n = 1 \sim 8$ 。

[0017] 7. 根据 1-6 任一项所述的荧光探针用于生物和 / 或化学分析物的高灵敏选择性检测的用途。

[0018] 8. 根据 7 所述的用途, 所述生物和 / 或化学分析物优选过氧化氢、葡萄糖、抗原、抗体。

[0019] 9. 根据 1-6 任一项所述的荧光探针用于酶联免疫吸附中抗原的高灵敏选择性检测的用途。

[0020] 发明详述

[0021] 以下对本发明的技术方案做进一步详细阐述。应当指出, 本发明的各实施方案可以根据需要以任何方式组合。

[0022] 以前的荧光探针在实际应用中往往存在着各种缺点, 比如说它们的荧光强度线性变化范围往往受到探针浓度限制, 在聚集时发生严重的聚集荧光猝灭现象而影响其检测过程, 这些缺点的存在大大限制了荧光探针的实际应用范围。而具有 AIE 性能的探针分子在单分子分散状态条件下荧光很弱, 其荧光发射过程被分子内运动能量耗散而禁阻; 但在聚集状态下, 分子内运动受到限制而使得荧光发射过程被激活, 即荧光发射增强; 而且荧光发射增强的程度是与探针分子聚集程度线性相关的。显然, 这一类型的探针分子能够为荧光检测提供更大的环境耐受性和检测动态范围。因此, 新型 AIE 荧光探针的合成以及将其用于化学传感与检测中具有重要的科学意义和重大的实用价值。

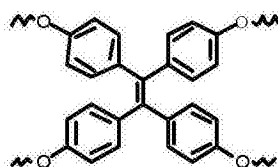
[0023] 本发明中, 提供一种全新的化学传感器方法来实现对多种化学、生物相关分析物的高效灵敏检测。设计并合成了一类由过氧化物酶的底物官能化的水溶性四苯基乙烯衍生物分子。在水溶液中加入待检测物后, 这些小分子可以被过氧化物酶催化氧化, 发生分子间的偶联聚集, 从而产生荧光发射, 根据荧光发射的强度可以来定量底物的浓度。通过与酶串联反应及酶联免疫吸附检测手段结合, 实现了对多种生物小分子及抗原、抗体的高效检测。

[0024] 在一个方面, 本发明提供了一种新型的具有 AIE 性质的荧光探针, 其特征在于, 所述探针包括: 四苯基乙烯作为内核, 过氧化物酶的底物的外部基团。

[0025] 在一个优选的实施方案中, 所述外部基团为亲水性质的酪氨酸 (如下式 b), 其与疏水性质的四苯基乙烯 (如下式 a) 通过 m- 烷基链或 n- 甘醇链 (如下式 c) 提供两者的链接基元。

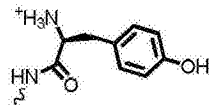
[0026]

a)

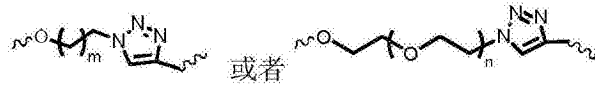


[0027]

b)



c)

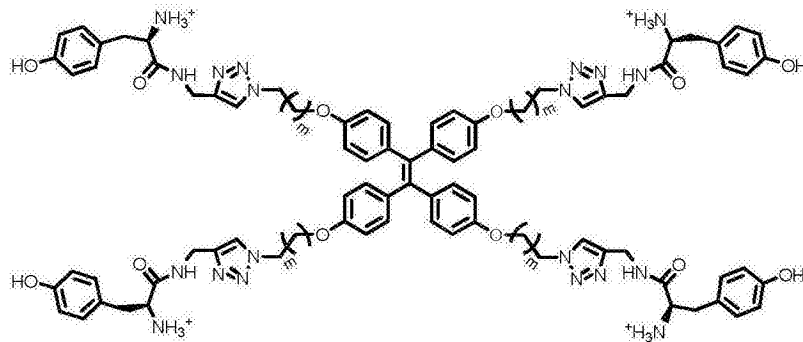


[0028] 其中, $m = 1 \sim 12$, $n = 1 \sim 8$ 。

[0029] 在一个特别优选的实施方案中,所述荧光探针分子的结构式可表示为如下式 A) 或 B),

[0030]

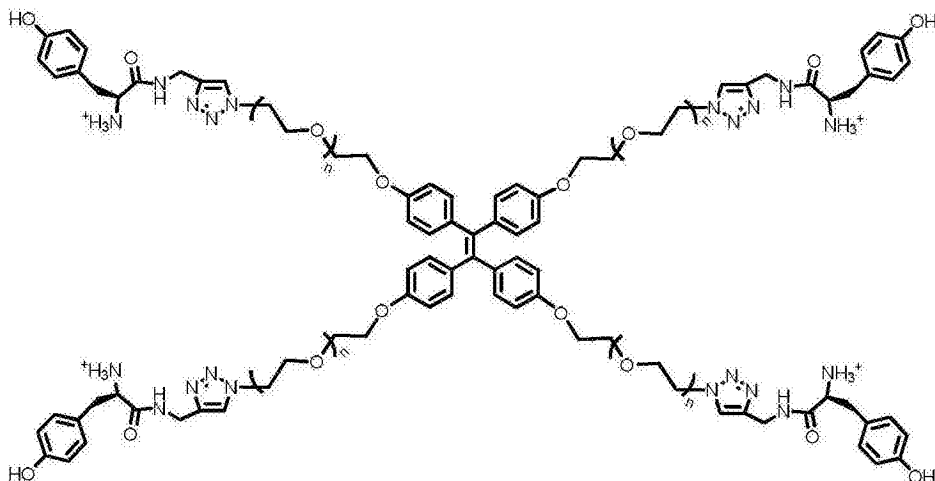
A)



[0031] 其中, $m = 1 \sim 11$,

[0032]

B)



[0033] 其中, $n = 1 \sim 8$ 。

[0034] 在另一方面,本发明提供利用上述荧光探针检测生物和 / 或化学分析物的方法。其检测原理是 HRP 酶催化过氧化氢与探针分子发生氧化还原反应,导致探针分子外围亲水的酪氨酸基元相互偶联形成交联网络结构,从而激发了整个探针分子的 AIE 荧光发射,实

现检测。

[0035] 在一个优选的实施方案中,所述生物和 / 或化学分析物可以是过氧化氢、葡萄糖、抗原、抗体。

[0036] 以下以过氧化氢、葡萄糖、抗原为例阐明所述检测方法。

[0037] 在一个优选的实施方案中,本发明提供一种利用上述合成的荧光探针来检测水溶液中的痕量过氧化氢(零到几十微摩尔范围)。其特征在于,由所合成的荧光探针和辣根过氧化物酶(HRP)溶于水溶液中构成检测体系,在室温条件下,当检测体系中存在过氧化氢时,HRP 酶催化过氧化氢与探针分子发生氧化还原反应,导致探针分子外围亲水的酪氨酸基元相互偶联形成交联网络结构,从而激发了整个探针分子的 AIE 荧光发射,并根据荧光发射强度可定量过氧化氢浓度。

[0038] 在一个更优选实施方式中,过氧化氢的检测范围为 0 ~ 50 微摩尔 / 升,并可改变检测体系的条件来调节该检测范围。

[0039] 在另一个优选的实施方案中,本发明提供了一种通过酶串联反应来荧光检测水溶液中葡萄糖的方法。其特征在于,由所合成的荧光探针、葡萄糖氧化酶(GOx)和辣根过氧化物酶(HRP)溶于水溶液中构成检测体系,在室温条件下,当检测体系中存在葡萄糖时,首先是在 GOx 酶催化作用下氧化葡萄糖并生成当量的过氧化氢,然后在 HRP 酶催化作用下,过氧化氢与探针分子发生氧化还原反应,导致探针分子外围亲水的酪氨酸基元相互偶联形成交联网络结构,从而激发了整个探针分子的 AIE 荧光发射,并根据荧光发射强度可定量葡萄糖浓度。

[0040] 在一个更优选实施方式中,葡萄糖的检测范围为 0 ~ 1000 微摩尔 / 升,并可改变检测体系的条件来调节该检测范围。

[0041] 在另一个优选的实施方案中,本发明提供了一种应用于酶联免疫吸附分析(ELISA)的荧光检测抗原的方法。其特征在于,由所合成的荧光探针和市面可购买的酶标了 HRP 的 ELISA 抗原检测试剂盒构成检测体系,在室温条件下,当检测体系中存在抗原时,多孔板基底上就会相应的固定上了 HRP,然后在 HRP 酶催化作用下,过氧化氢与探针分子发生氧化还原反应,导致探针分子外围亲水的酪氨酸基元相互偶联形成交联网络结构,从而激发了整个探针分子的 AIE 荧光发射,并根据荧光发射强度可定量待检测样品中抗原的浓度。

[0042] 在一个更优选实施方式中,待检测抗原的检测范围为 0 ~ 48 纳克 / 毫升,并可改变检测体系的条件来调节该检测范围。

[0043] 基于所应用的酶反应和酶串联反应的高效性和专一性,以上所有检测体系均表现出了很好的高灵敏和高特异选择性。值得提出的是,在过氧化氢和葡萄糖检测的体系中,检测信号是与待分析物浓度呈优异的线性关系,而在 ELISA 检测抗原的体系中表现出了检测信号与抗原浓度的对数呈优异的线性关系,这也为更高灵敏度的检测抗原分析物提供了很好的途径。

附图说明

[0044] 图 1 示出了 Boc- 保护酪氨酸中间体的核磁氢谱。

[0045] 图 2 示出了炔基化的酪氨酸(a)、四叠氮的四苯基乙烯(b)、保护酪氨酸的四苯基

乙烯 (c) 及脱保护后的酪氨酸四苯基乙烯 (d) 的核磁氢谱。

[0046] 图 3 示出了本发明所设计的荧光探针的高效液相色谱和电喷雾质谱。

[0047] 图 4 示出了本发明所设计的荧光探针的电位滴定曲线。

[0048] 图 5 示出了本发明所设计的荧光探针的 pH 跟踪的荧光和透过率测试结果。

[0049] 图 6 示出了本发明所设计的荧光探针检测过氧化氢的结果。

[0050] 图 7 示出了本发明所设计的荧光探针特异选择性检测过氧化氢的结果。

[0051] 图 8 示出了本发明所设计的荧光探针检测葡萄糖的结果。

[0052] 图 9 示出了本发明所设计的荧光探针特异选择性检测葡萄糖的结果。

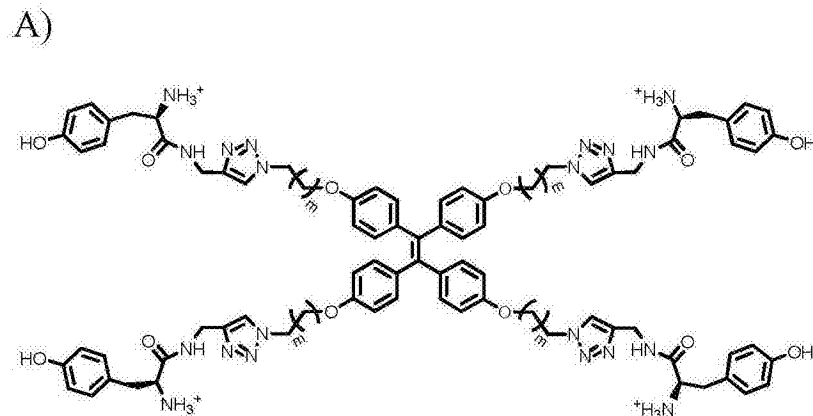
[0053] 图 10 示出了本发明所设计的荧光探针检测人癌胚抗原的结果。

具体实施方式

[0054] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现：

[0055] 首先是通过有机化学反应中高效的 Click reaction 制备了一种新型的具有 AIE 性质的荧光探针。所述探针由三部分构成：a) 疏水性质的四苯基乙烯作为内核，b) 亲水性质的酪氨酸构成外部基团，c) 再由 m- 烷基链或 n- 甘醇链提供两者的链接基元。其特征在于，具有以下结构：式 A)、B)，

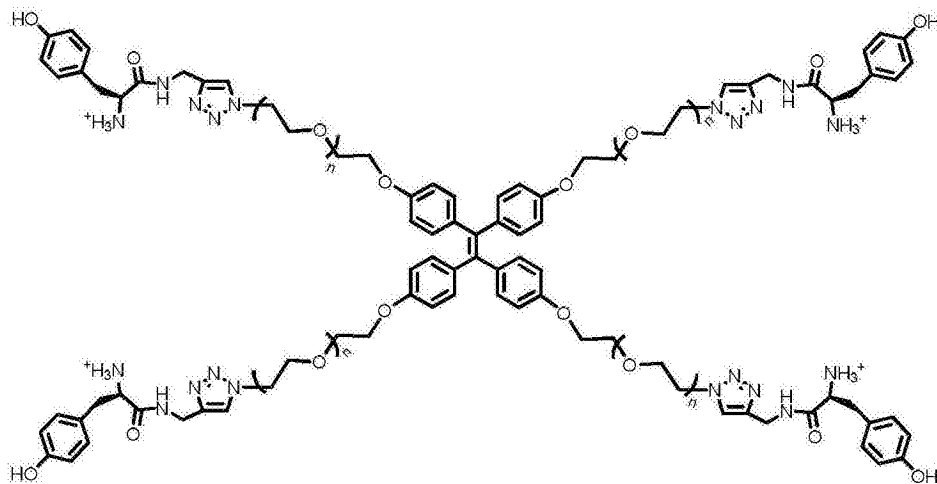
[0056]



[0057] 其中， $m = 1 \sim 11$ ，

[0058]

B)



[0059] 其中, $n = 1 \sim 8$ 。

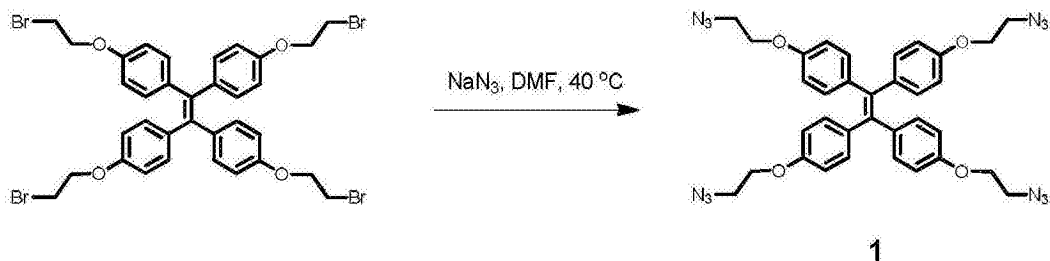
[0060] 优选后得到的含合适疏水烷基链或合适亲水甘醇链的荧光探针分子,能够很好的溶解于水溶液中,并且在检测待分析物时能够发生有效的荧光信号增强。

[0061] 以下实施例将对本发明作进一步说明,其目的仅在于更好地理解本发明的目的,而不是限制本发明的保护范围。

[0062] 制备例 1

[0063] 第一步,制备如下四苯基乙烯衍生物 1 (即以 $m = 1$ 为例) :

[0064]

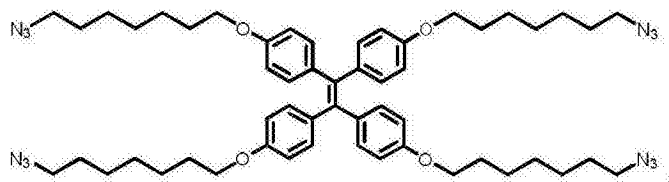


[0065] 其特征为:四苯基乙烯四个苯环的对位由含有叠氮基团的 m - 烷基链或 n - 甘醇取代。

[0066] 制备方法:将 3.0g (3.64mmol) 四溴取代的四苯基乙烯 (参考文献 DOI:10.1039/c2jm16510d 中合成) 溶于 40mL DMF 中,室温搅拌溶解后,加入 0.75g NaN_3 (10.92mmol),后升温至 40°C 反应 24 小时, TLC 表明反应完全后,停止反应。恢复至室温,减压旋转蒸发除去 DMF,然后过硅胶柱收集产物。凝缩后真空干燥箱干燥过夜,得到白色粉末状固体产物 1.96g (2, 25g, 92%)。其结构通过核磁氢谱表征,结果显示于图 2(b),证明了所合成的 1 结构。

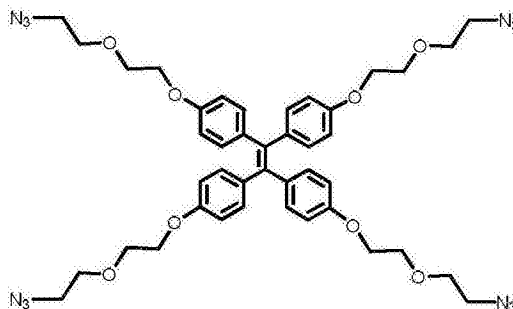
[0067] 另一方面,通过类似的方式和相同的反应步骤,其它同类型结构的四个叠氮取代的四苯基乙烯也被合成了,例如:烷基链链接方式的 $m = 6$,

[0068]



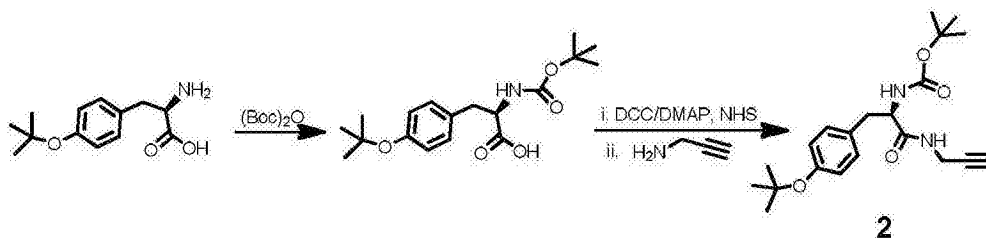
[0069] 甘醇链接方式的 $n = 1$,

[0070]



[0071] 第二步,合成带有炔基官能团且酚羟基与伯胺基团均被保护的酪氨酸衍生物 2,具体合成途径如下:

[0072]



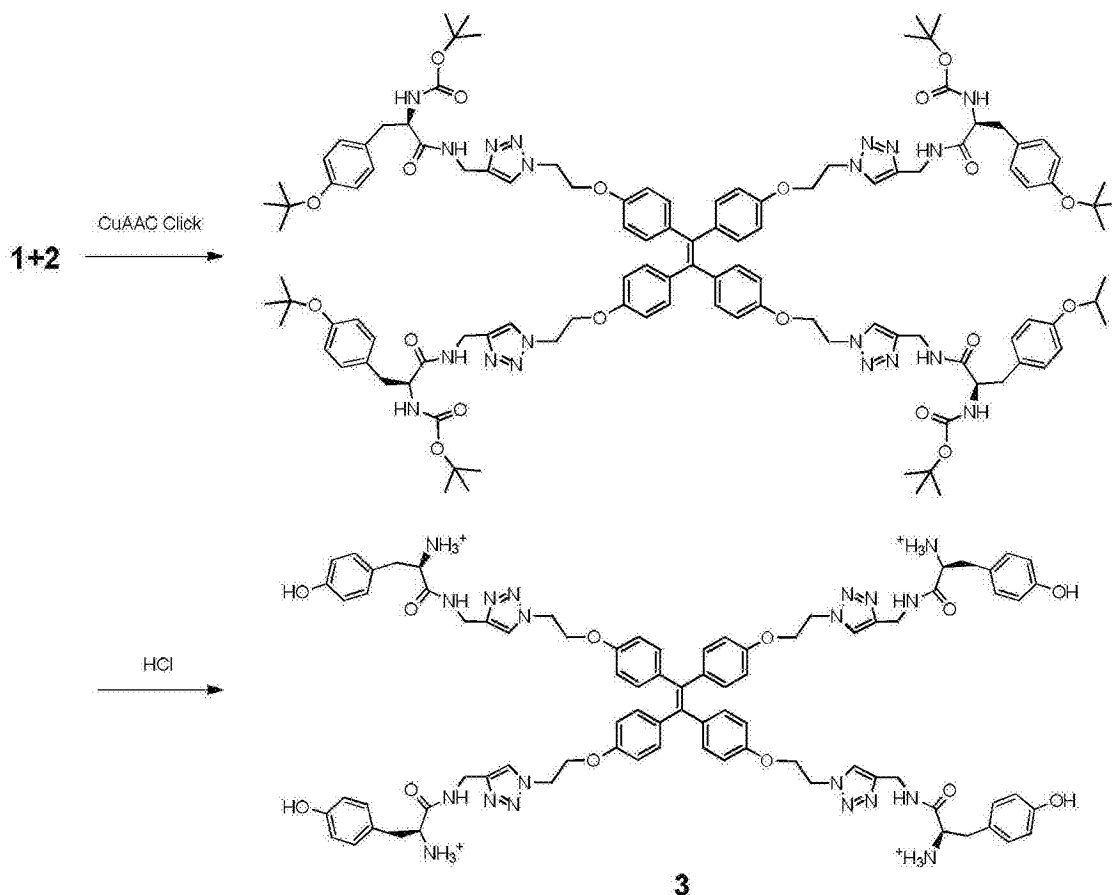
[0073] 其特征为:经过两步反应得到酪氨酸的酚羟基和伯胺基团分别被叔丁基和叔丁氧羰基保护,而且酪氨酸的羧基变成炔丙酰胺基,及引入炔基官能团。

[0074] 制备方法:1)叔丁基保护了酚羟基的酪氨酸(购于上海原叶生物科技有限公司)2.0g(8.42mmol)和二碳酸二叔丁酯(购于阿拉丁试剂公司)2.2g(10.1mmol)溶于THF(15mL)/NaOH(1N,30mL)的混合溶剂中,室温下搅拌。反应10小时后,减压旋转蒸发除去THF,用稀盐酸调节pH至3.0,然后用乙酸乙酯萃取出产物,再用pH=3.0的饱和氯化钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,最后减压旋转蒸发除去有机溶剂,真空干燥箱干燥过夜。得到浅黄色固体2.64g(93%)。其结构通过核磁氢谱表征,结果显示于图1,证明了所合成的中间体结构。

[0075] 2)上一步的合成的中间体1.50g(4.45mmol)、DCC1.0g(5.34mmol)和DMAP54mg(0.44mmol)溶于干燥的THF(40mL)中,室温搅拌。二十分钟后加入NHS0.61g(5.34mmol),并用TLC跟踪反应。反应完全后加入炔丙胺0.61g(5.34mmol),室温搅拌反应过夜。粗产物过滤除去不溶物,滤液经过减压旋转蒸发浓缩,再溶于乙酸乙酯并过滤除去不溶物。滤液用饱和食盐水洗涤,无水硫酸镁干燥,减压旋转蒸发除去有机溶剂,真空干燥箱干燥过夜。得到含有炔基官能团的产物1.45g(87%)。其结构通过核磁氢谱表征,结果显示于图2(a),证明了所合成的中间体结构。

[0076] 第三步:一价铜催化的Click反应方法合成含有酪氨酸官能团的四苯基乙烯衍生物3(即以 $m = 1$ 为例),其具体反应式如下:

[0077]



[0078] 制备方法:1) 以上方法制备的 1 中间体 0.1g (0.59mmol azide moieties) 和 2 中间体 0.33g (0.89mmol alkynyl moieties) 和 PMDETA 26mg (0.15mmol) 溶于 DMF (5mL), 放置于封管中, 用双排管冷冻 - 抽真空 - 解冻循环三次后, 加入 CuBr 22mg (0.15mmol), 封管并置于 35℃ 油浴中搅拌反应 24 小时。反应完全后置于液氮中冷冻, 破管后暴露于空气, 用二氯甲烷稀释。然后粗产物用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 减压旋转蒸发浓缩后, 与正己烷中重结晶, 真空干燥箱干燥过夜。得到白色粉末状固体 0.24g (76%)。其结构通过核磁氢谱表征, 结果显示于图 2(c), 证明了所合成的中间体结构。

[0079] 2) 上一步得到的中间体 100mg 溶于甲醇 (15mL), 室温条件下氮气保护搅拌。然后加入 1.5mL 浓盐酸, 室温搅拌反应 24 小时。后减压旋转蒸发浓缩后在丙酮中重结晶, 真空干燥箱干燥过夜。得到白色粉末状固体 3 终产物 58mg (81%)。其结构通过核磁氢谱表征, 结果显示于图 2(d), 证明了所合成的中间体结构。另外也用高效液相色谱 (HPLC) 和高分辨率质谱 (ESI-Mass) 同样证明了其结构, 结果显示于图 3。

[0080] 应用例 1: 酪氨酸官能化的四苯基乙烯衍生物 AIE 活性研究

[0081] 如上所示, 所合成的目标分子是由酪氨酸的伯胺基团来提供整个分子的水溶性, 实验发现只有在伯胺发生质子化后其亲水性才能保证整个分子在溶液中单分子分散。为此利用电位滴定的方法确定了目标分子的 pKa。其结果如图 4 所示, 说明该四苯基乙烯衍生物的 pKa 约等于 6.4, 即在 pH 小于 6.4 的水溶液中, 该分子可很好的溶解, 而在 pH 高于 6.4 时, 分子在水溶液中会发生聚集。由于分子内核的四苯基乙烯基团在聚集时 AIE 激活, 荧光增强, 溶解时则 AIE 受阻, 没有荧光发射。因此, 研究了溶液 pH 对目标分子的聚集及荧光发

射的影响,其结果显示于图 5。表明,在 pH 低于 6.0 的条件下,荧光测试表明水溶液的荧光很弱,体系的透过率也在 100%,说明这时分子 3 是单分子溶解的,因而没有荧光发射;而当 pH 超过 pKa 后,体系的荧光发射明显增强,体系的透过率也明显下降;在 pH 高于 8 时,体系的荧光发射强度达到最高值并维持稳定,而其透过率也达到最低值维持稳定,说明这一条件下几乎所有的分子 3 都处在聚集状态。以上结果表明所合成的四苯基乙烯衍生物具有明确的 AIE 活性,并在 pH 低于 6.0 的条件酸性溶液中可以单分子溶解。

[0082] 应用例 2:酶催化反应荧光增强检测过氧化氢

[0083] 由应用例 1 中的研究结果表明,可以在 pH = 6.0 的条件下用于检测过氧化氢。具体来说,将 HRP 酶(购于上海原叶生物科技有限公司)与分子 3 溶于 pH = 6.0 的磷酸盐缓冲液中,HRP 和分子 3 的浓度分别为 0.01 克/升和 25 微摩尔/升,室温条件下,加入待检测的过氧化氢,跟踪体系的荧光强度。结果显示于图 6,表明,过氧化氢的存在下,HRP 酶可以催化其氧化分子 3 而相互聚集 AIE 激活,使得体系荧光增强。在选定条件下,加入 50 微摩尔/升的过氧化氢,体系的荧光增强过程在五分钟内达到平衡,反映出酶催化反应能够快速进行并直至完全。通过测试其它不同浓度条件下的过氧化氢检测结果表明,过氧化氢的线性检测范围为 0 ~ 50 微摩尔/升,并可改变检测体系的条件来调节该检测范围。另一方面,也研究了体系对过氧化氢检测的特异选择性,其结果显示于图 7,表明其它常见的氧化物及氧化自由基并不能干扰体系对过氧化氢的检测,因此这一体系对过氧化氢的检测是特异选择性的。

[0084] 应用例 3:酶串联催化反应荧光增强检测葡萄糖

[0085] 由应用例 1 中的研究结果表明,可以在 pH = 6.0 的条件下用于检测葡萄糖。具体来说,将 GOx 酶(购于上海原叶生物科技有限公司)、HRP 酶和分子 3 溶于 pH = 6.0 的磷酸盐缓冲液中,GOx、HRP 和分子 3 的浓度分别为 0.01 克/升、0.01 克/升和 25 微摩尔/升,室温条件下,加入待检测的葡萄糖,跟踪体系的荧光强度。结果显示于图 8,表明,葡萄糖的存在下,GOx 酶首先氧化葡萄糖生成过氧化氢,然后 HRP 酶再催化其氧化分子 3 而相互聚集 AIE 激活,使得体系荧光增强。在选定条件下,加入 1000 微摩尔/升的葡萄糖,体系的荧光增强过程在五分钟内达到平衡,反映出酶催化反应能够快速进行并直至完全。通过测试其它不同浓度条件下的葡萄糖检测结果表明,葡萄糖的线性检测范围为 0 ~ 1000 微摩尔/升,并可改变检测体系的条件来调节该检测范围。另一方面,也研究了体系对葡萄糖检测的特异选择性,其结果显示于图 9,表明其它常见的糖类分子(如甘露糖、果糖、半乳糖)并不能干扰体系对葡萄糖的检测,因此这一体系对葡萄糖的检测是特异选择性的。

[0086] 应用例 4:酶联免疫吸附荧光增强检测抗原

[0087] 由于常见的 ELISA 试剂盒都是利用 HRP 作为酶标,即利用 HRP 的酶催化放大来检测对应特定设计的试剂盒的抗体或抗原。因此,本发明中研究了对于商用的抗原检测试剂盒(如人癌胚抗原)(购于上海原叶生物科技有限公司),所设计的检测体系能否更好的应用。在室温条件下,当检测体系中存在抗原时,多孔板基底上就会相应的固定上了 HRP,然后在 HRP 酶催化作用下,过氧化氢与探针分子发生氧化还原反应,导致探针分子外围亲水的酪氨酸基元相互偶联形成交联网络结构,从而激发了整个探针分子的 AIE 荧光发射,并根据荧光发射强度可定量待检测样品中抗原的浓度。结果如图 10 所示,待检测抗原的检测范围为 0 ~ 48 纳克/毫升,并可改变检测体系的条件来调节该检测范围。

[0088] 在另一方面,在 ELISA 检测抗原的体系中表现出了检测信号与抗原浓度的对数呈优异的线性关系,这也为更高灵敏度的检测抗原分析物提供了很好的途径。以上结果表明,分子 3 不但可以很好的应用于商用试剂盒检测人癌胚抗原,相比传统方法还具有更高的线性检测灵敏度。

[0089] 以上已对本发明进行了详细描述,但本发明并不局限于本文所描述具体实施方式。本领域技术人员理解,在不背离本发明范围的情况下,可以作出其他更改和变形。本发明的范围由所附权利要求限定。

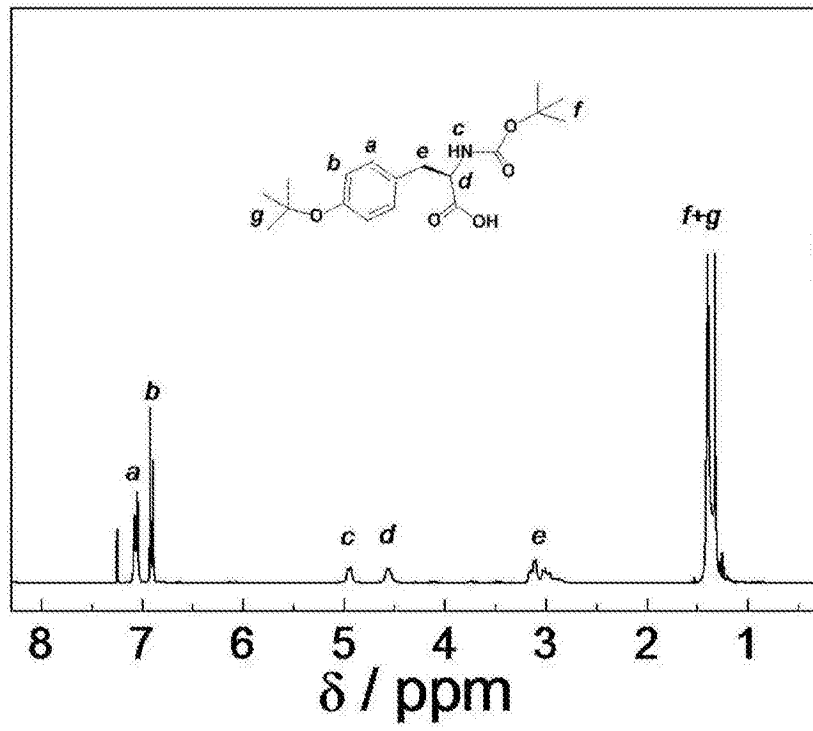


图 1

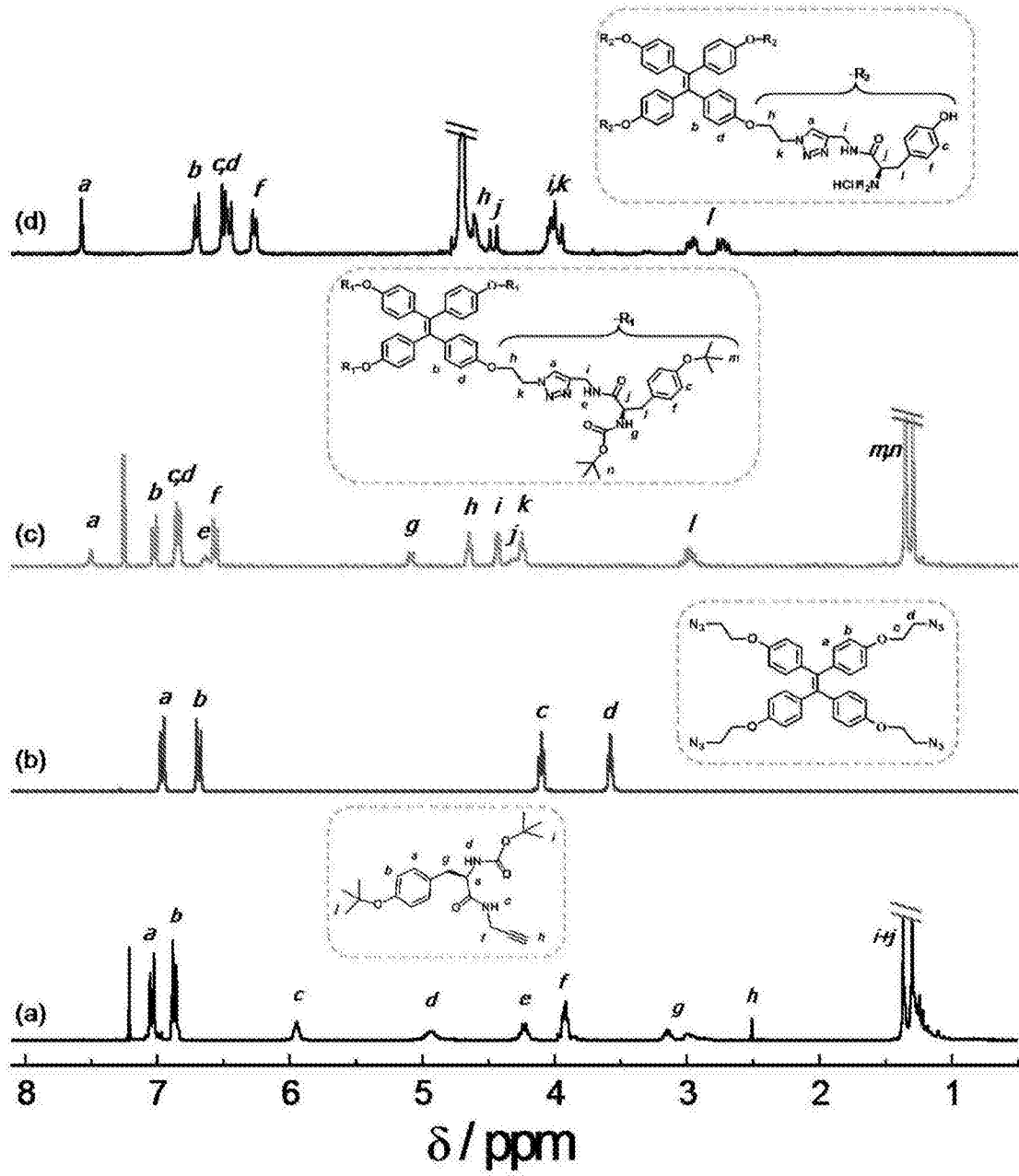


图 2

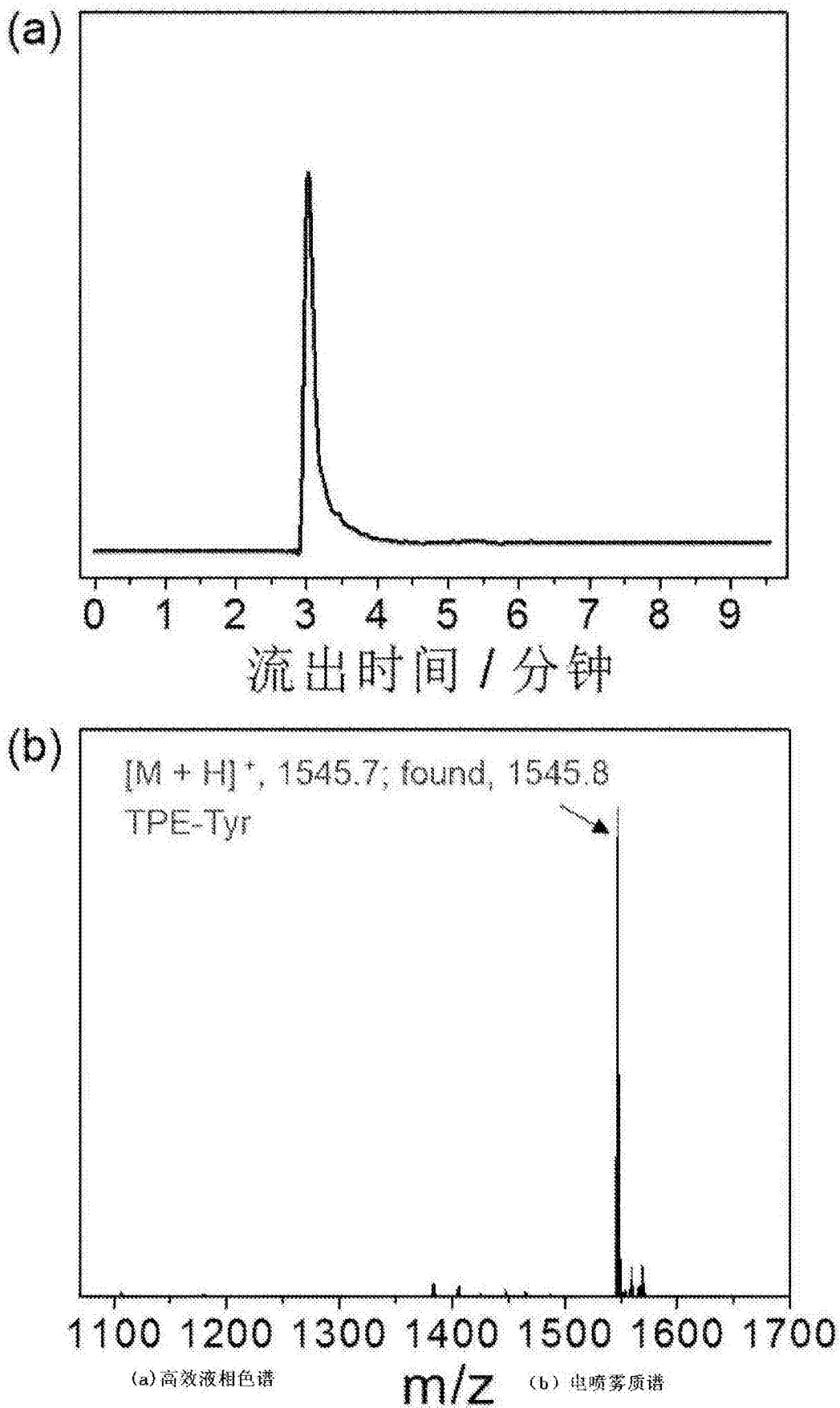


图 3

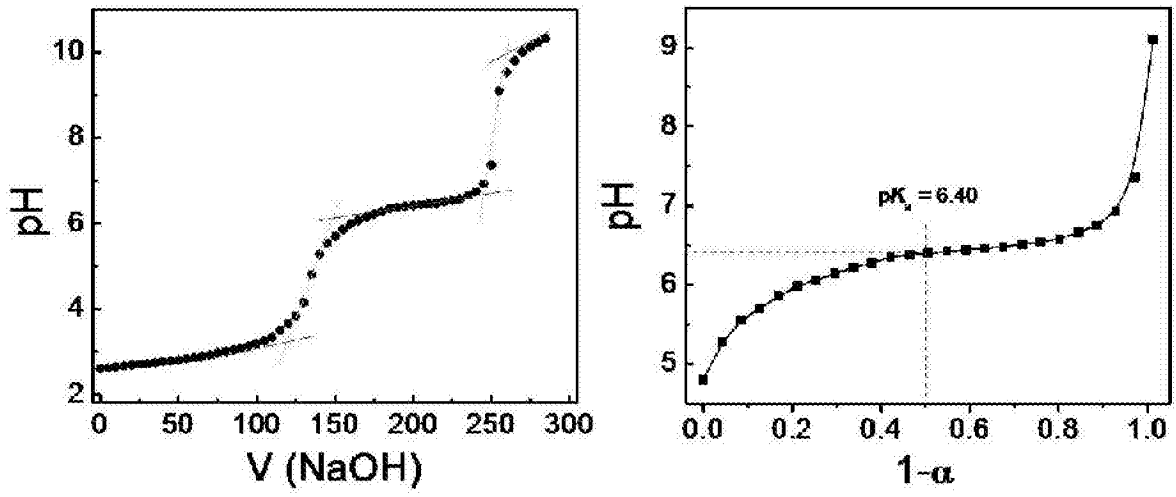


图 4

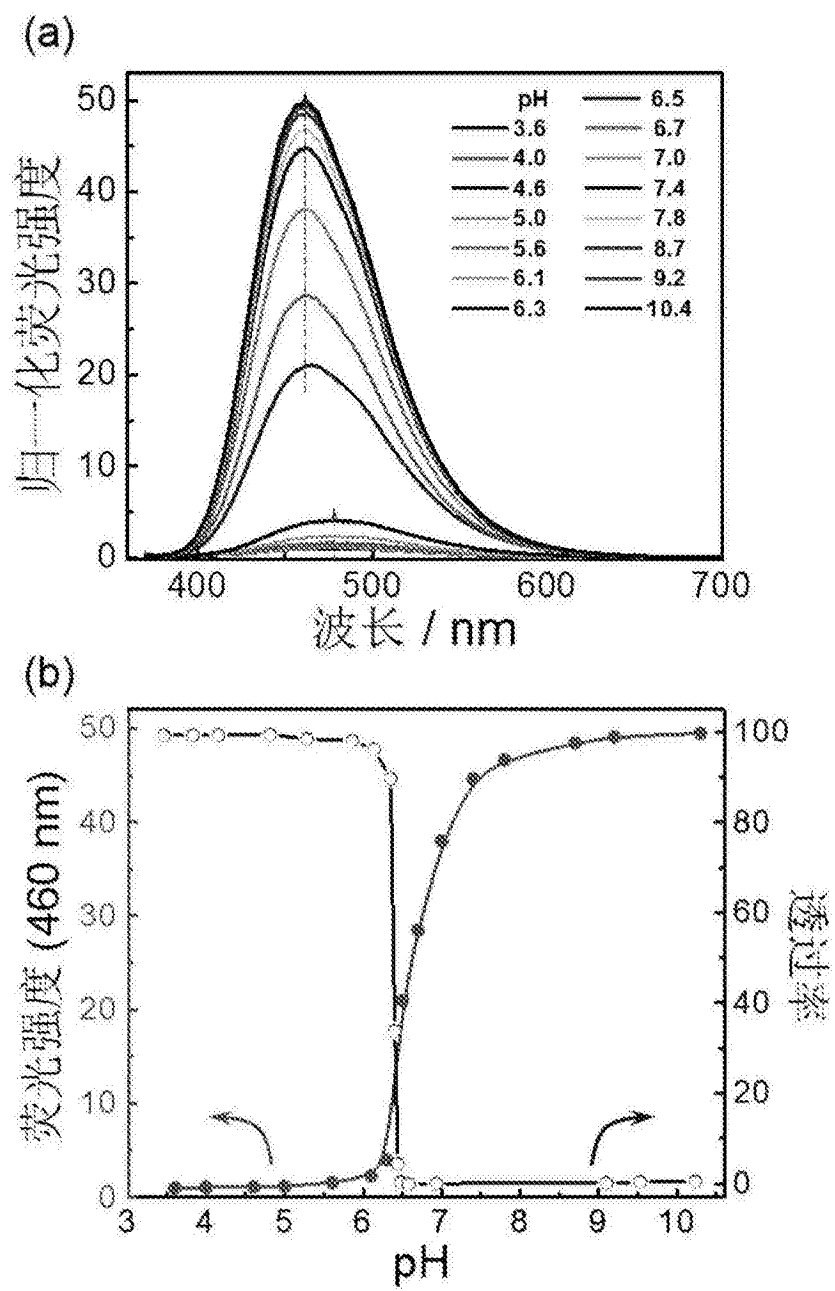


图 5

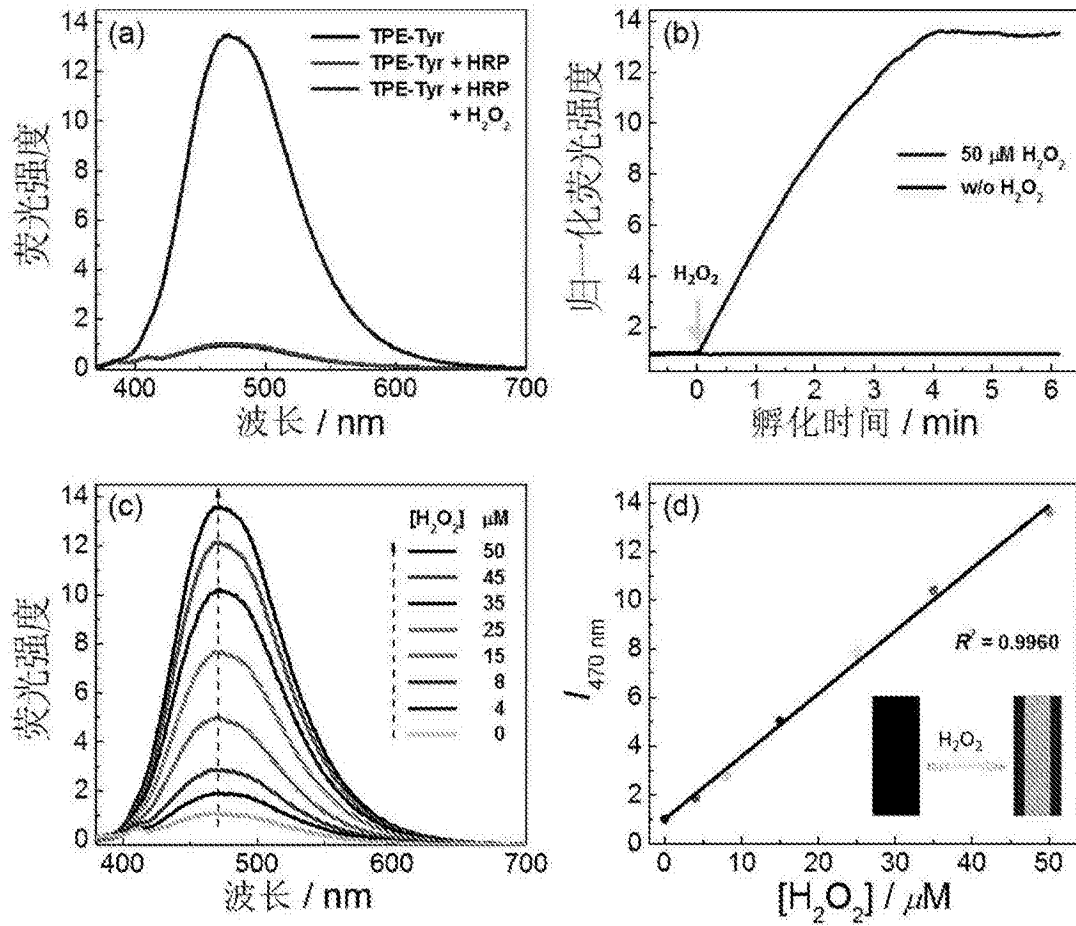


图 6

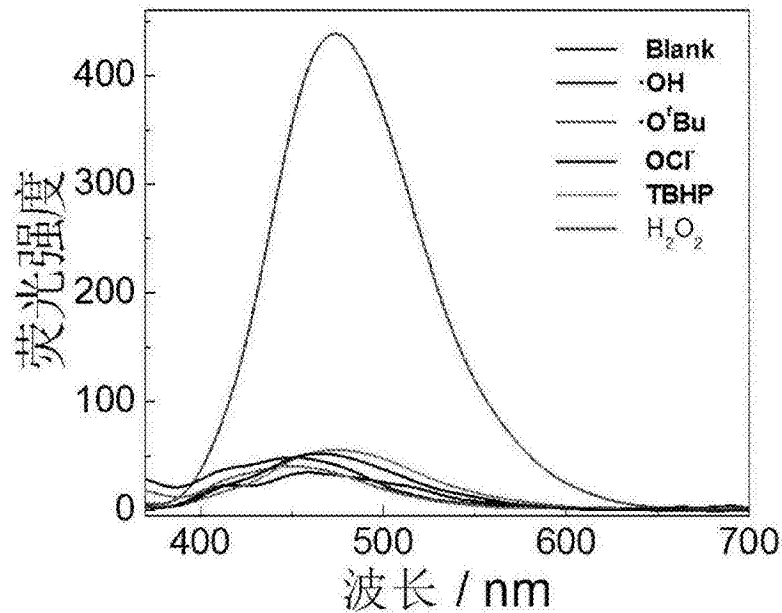


图 7

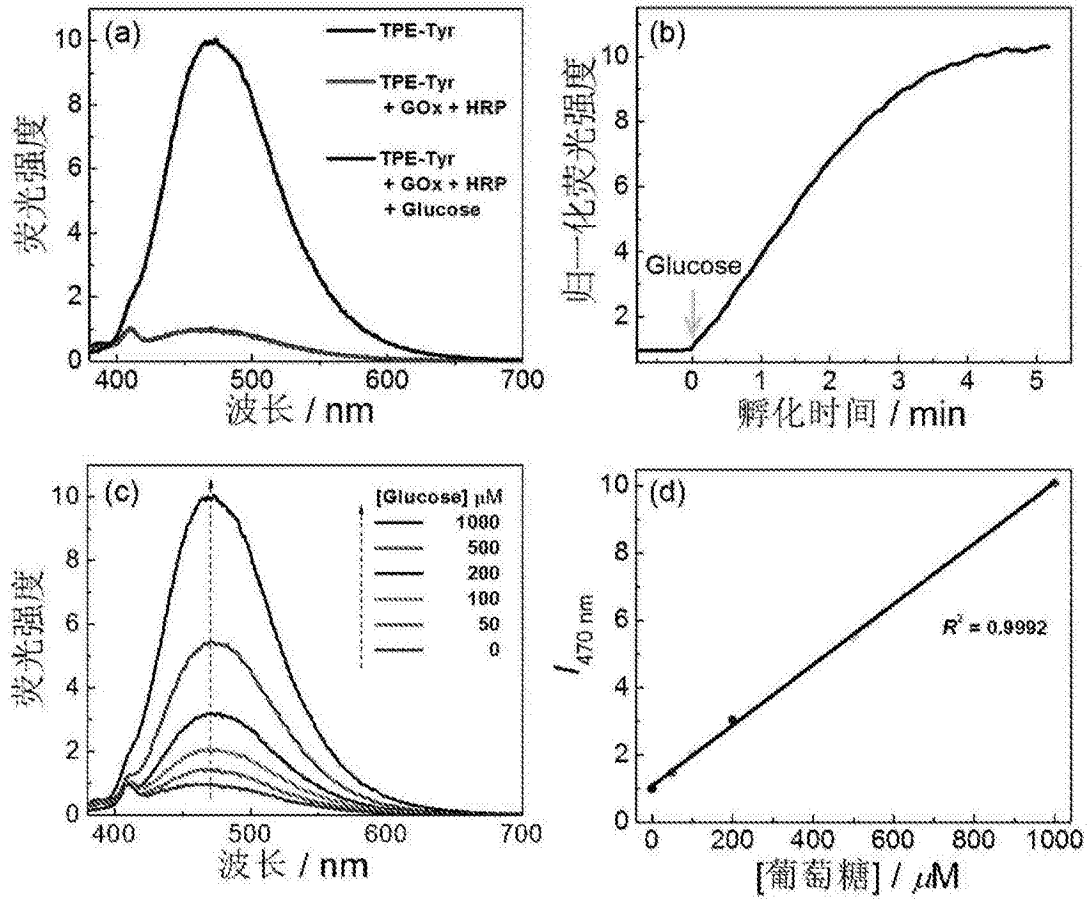


图 8

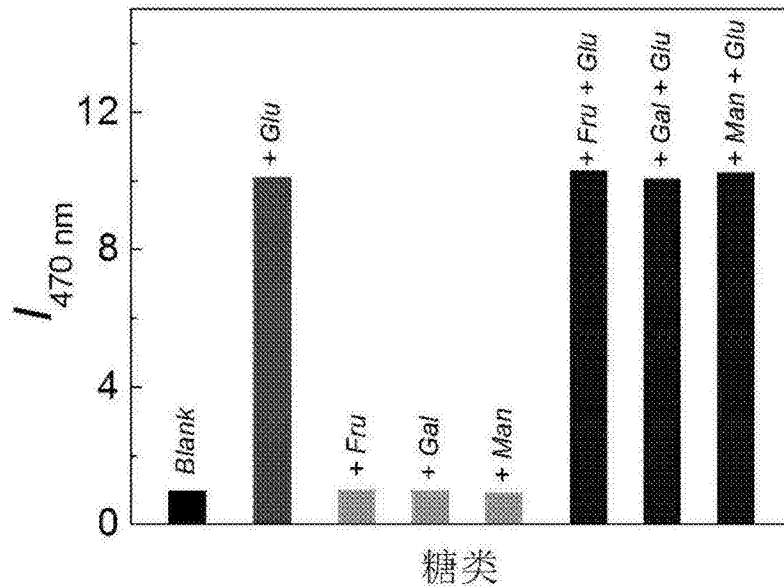


图 9

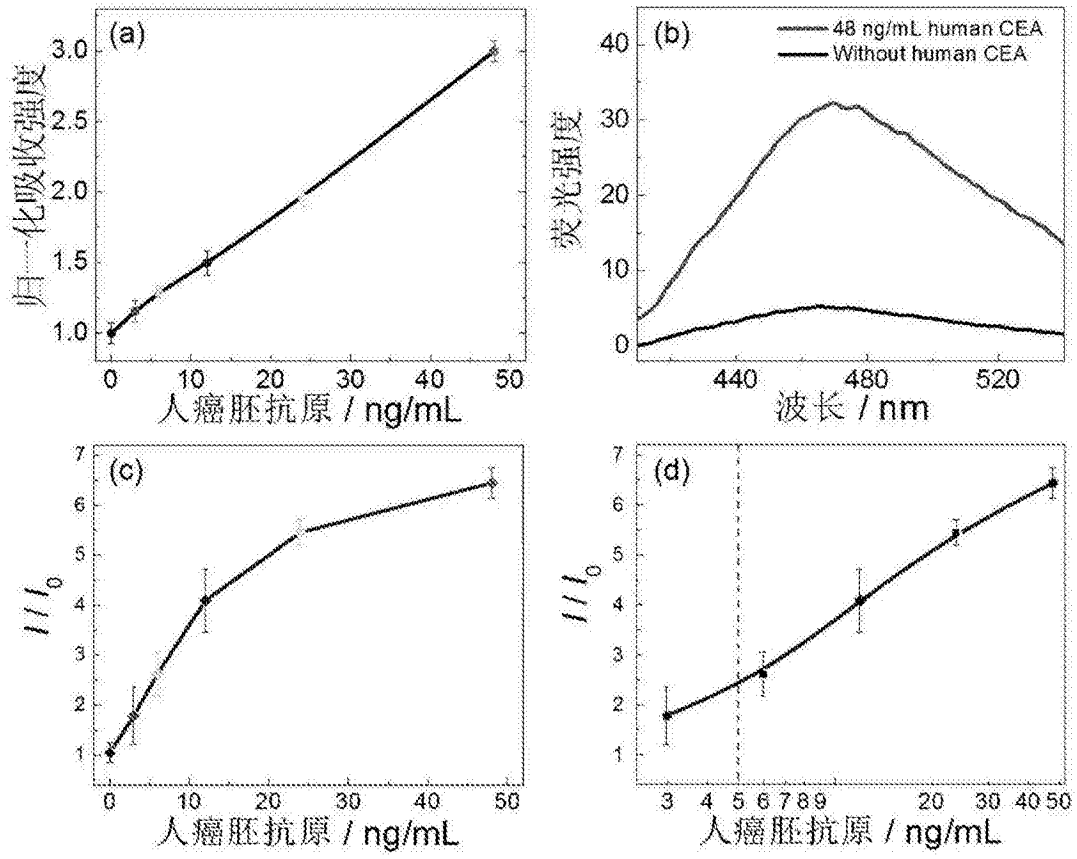


图 10

专利名称(译)	一种基于酶催化偶联反应与聚集诱导发射的生物传感器新方法		
公开(公告)号	CN103980883B	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201410214548.6	申请日	2014-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
[标]发明人	刘世勇 汪泉睿		
发明人	刘世勇 汪泉睿		
IPC分类号	C07D249/04 C09K11/06 G01N21/64 G01N33/53		
代理人(译)	王旭		
审查员(译)	李佳博		
其他公开文献	CN103980883A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于实现对多种化学、生物相关分析物的高效灵敏检测的化学传感器方法。具体设计并合成了一类由过氧化物酶的底物官能化的水溶性四苯基乙烯衍生物分子。在水溶液中加入待检测物后，这些小分子可以被过氧化物酶催化氧化，发生分子间的偶联聚集，从而产生荧光发射，根据荧光发射的强度可以来定量底物的浓度。通过与酶串联反应及酶联免疫吸附检测手段结合，实现了对多种生物小分子及抗原、抗体的高效检测。

