

磷酸盐调控的Luminol-Tb荧光探针对炭疽杆菌生物标志物的比率检测

孙浩哲, 张浩亮, 董苗辰, 汤艳峰, 武会芳*

南通大学化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2023年7月3日; 录用日期: 2023年7月24日; 发布日期: 2023年8月3日

摘要

实现对炭疽杆菌的灵敏选择性检测对预防炭疽病感染具有重要意义。本工作构建了基于磷酸根(Pi)调控的鲁米诺(Luminol)-Tb³⁺荧光配合物(Luminol-Tb-Pi)用于炭疽杆菌生物标志物(2,6-吡啶二羧酸, DPA)的快速、灵敏以及可视化检测。以Luminol为有机配体, Tb³⁺为中心离子, 在Pi的调控下, DPA可使Tb³⁺特征荧光显著增强, 同时引起Luminol荧光淬灭。DPA可作为Tb³⁺的天线配体敏化Tb³⁺发光, Pi通过缩小DPA与Tb³⁺之间的距离, 增强了DPA的敏化作用; 此外, Pi通过与Tb³⁺的配位可以减少水分子对Tb³⁺荧光的淬灭, 进一步增强Tb³⁺荧光。由于DPA与Tb³⁺的竞争性结合, 使Luminol与Tb³⁺的配位作用减弱, 部分Luminol成游离态, 导致其荧光淬灭。基于该双荧光信号变化, 实现了对DPA的比率荧光检测, 定量范围为0.2~45 μM。此外, 基于该传感体系的荧光颜色变化可实现对DPA的可视化检测。本工作开发的荧光传感方法操作简单、成本低, 具有良好的应用潜力。

关键词

磷酸盐, 鲁米诺, 稀土发光, 2,6-吡啶二羧酸, 荧光探针

Phosphate-Modulated Luminol-Tb Fluorescent Probe for the Ratiometric Detection of Anthrax Biomarker

Haozhe Sun, Haoliang Zhang, Miaochen Dong, Yanfeng Tang, Huifang Wu*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: Jul. 3rd, 2023; accepted: Jul. 24th, 2023; published: Aug. 3rd, 2023

*通讯作者。

文章引用: 孙浩哲, 张浩亮, 董苗辰, 汤艳峰, 武会芳. 磷酸盐调控的 Luminol-Tb 荧光探针对炭疽杆菌生物标志物的比率检测[J]. 分析化学进展, 2023, 13(3): 368-378. DOI: 10.12677/aac.2023.133040

Abstract

Achieving sensitive and selective detection of *Bacillus anthracis* is of great significance for preventing anthrax infection. This work constructs a Luminol-Tb fluorescent complex based on phosphate (Pi) regulation (Luminol-Tb-Pi) for the rapid, sensitive, and visual detection of anthrax biomarker (2,6-pyridyldicarboxylic acid, DPA). Under the regulation of Pi, with Luminol as the organic ligand and Tb^{3+} as the central ion, DPA can significantly enhance the characteristic fluorescence of Tb^{3+} and cause quenching of Luminol. DPA acts as the antenna ligand of Tb^{3+} to sensitize its luminescence, and Pi enhances the sensitization of DPA by reducing the distance between DPA and Tb^{3+} . In addition, the coordination of Pi with Tb^{3+} can reduce the quenching effect by water molecules, further enhancing Tb^{3+} fluorescence. Due to the competitive binding between DPA and Tb^{3+} , the coordination between Luminol and Tb^{3+} is weakened, and some Luminol become free, leading to their fluorescence quenching. Based on the dual fluorescence signal, the ratiometric detection of DPA is achieved with a quantitative range of 0.2~45 μM . In addition, the visual detection of DPA can be achieved based on the fluorescence color change of this sensing system. The sensing method developed is simple, low cost, and possesses potential in actual applications.

Keywords

Phosphate, Luminal, Rare Earth Luminescence, 2,6-Pyridine Dicarboxylic Acid, Fluorescent Probe

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

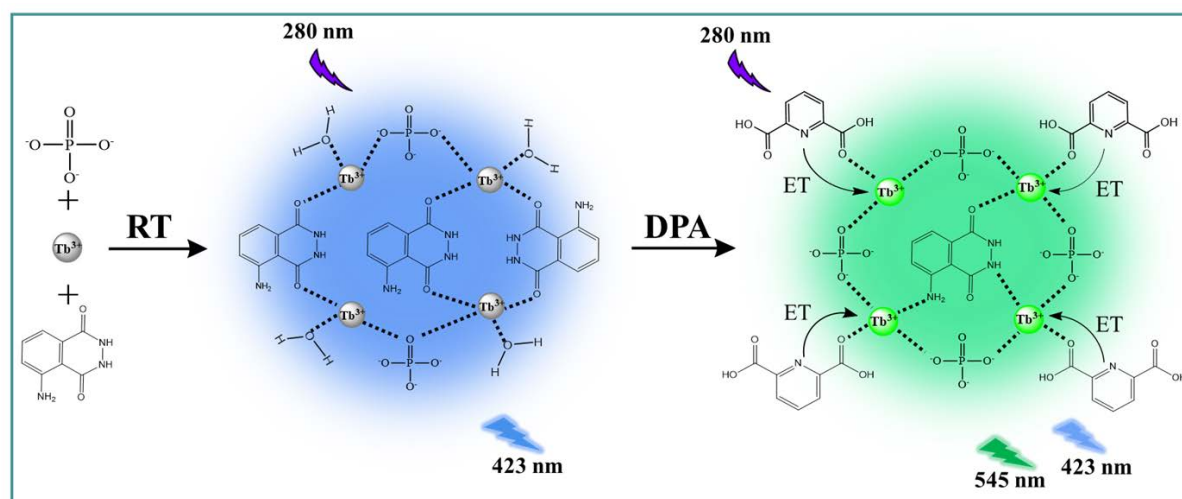
1. 引言

炭疽病是由炭疽芽孢杆菌引起的一种人畜共患的急性传染病, 由于其高传染性、高致病率、高死亡率, 严重威胁着人类生存以及畜牧业的健康发展[1] [2]。炭疽杆菌芽孢对环境具有极强耐受性, 能在高温、紫外线照射、冷冻、干燥和化学消毒等恶劣环境中存活, 即使炭疽杆菌被杀死, 其芽孢仍然可以在合适的条件下发芽[3] [4]。人体一般可通过进食、呼吸道或皮肤接触感染疾病, 当吸入孢子数量超过 104 个, 24~48 h 内不采取医药治疗, 可以导致死亡[5]。因此, 实现对炭疽杆菌芽孢及其浓度的简便、快速以及准确检测对于维护公共安全具有重要意义。2,6-吡啶二羧酸(DPA)是炭疽杆菌芽孢中的主要组分, 其质量占据芽孢干重的 5%~15%。目前 DPA 已被确认为鉴定炭疽病和识别炭疽杆菌的唯一生物标志物, 通过检测 DPA 可以对炭疽杆菌芽孢浓度进行评估[6] [7]。

目前已发展了多种方法用于 DPA 的检测, 例如表面增强拉曼光谱、高效液相色谱法和液质联用法, 但这类检测仪器体积较大、检测周期较长、仪器造价昂贵, 且无法满足现场快速检测需求[8] [9] [10]。后来逐渐发展的电化学检测、免疫分析法和荧光分析技术具有操作简单、灵敏度高和检测准确等优点[11]。而荧光传感检测技术以其检测快速、简便、可视化等特点为原位灵敏选择性检测 DPA 提供了理论基础。因此, 建立可实现灵敏选择性检测 DPA 的荧光检测方法具有重要意义。然而, 荧光探针的光稳定性以及复杂构建过程将极大限制其推广应用。基于镧系发光的光学探针由于具有长荧光寿命、较大的 Stokes 位移、光稳定性以及高发射光纯度等特点在传感分析、生物成像以及光电器件等领域广泛应用, 因而建立基于镧系元素发光的新颖荧光探针将极大的解决上述问题[12] [13]。其中, 相比于单发射探针, 比率荧光

探针可以通过自校准减小或排除背景荧光、仪器误差以及外界环境因素造成的干扰,进而实现对目标物的灵敏和准确检测。此外,双发射峰的相对变化可以引起探针显著地荧光颜色改变,有利于实现对目标物的肉眼可视化以及原位检测,显著提高样品检测效率,并降低检测成本[14] [15] [16]。

本论文工作拟构建基于磷酸根(Pi)调控的鲁米诺(Luminol)-Tb 荧光配合物(Luminol-Tb-Pi)用于炭疽杆菌生物标志物(2,6-吡啶二羧酸, DPA)的快速、灵敏以及可视化检测。如方案 1 所示,以 Luminol 为有机配体, Tb^{3+} 为金属中心体,在 Pi 的调控下, DPA 的加入可以使 Tb^{3+} 特征荧光显著增强,同时引起 Luminol 荧光淬灭。DPA 通过与 Tb^{3+} 配位结合,向 Tb^{3+} 进行能量转移敏化其发光; Pi 通过缩小 DPA 与 Tb^{3+} 之间的距离,增强 DPA 的敏化作用;此外, Pi 通过与 Tb^{3+} 的配位还可以减少水分子对 Tb^{3+} 的荧光淬灭作用,进一步增强 Tb^{3+} 荧光。由于 DPA 与 Tb^{3+} 的竞争性结合,使 Luminol 与 Tb^{3+} 的配位作用减弱,部分 Luminol 释放成游离态,其聚集诱导的荧光增强状态破坏,导致其荧光淬灭。因此,基于 Tb^{3+} 特征荧光增强和 Luminol 荧光淬灭的双信号变化,可实现对 DPA 的比率检测,且具有很好的特异性和抗干扰性。此外,随着 DPA 浓度的增加,该传感体系荧光逐渐由蓝色变为绿色,可实现对 DPA 的可视化检测。



Scheme 1. Schematic illustration of the strategy for the detection of DPA based on Pi modulated Luminol-Tb fluorescent probe

方案 1. 基于 Pi 调控的 Luminol-Tb 荧光探针用于 DPA 检测

2. 实验部分

2.1. 实验试剂与仪器

实验中使用的所有试剂至少是分析纯度。鲁米诺(Luminol)、六水合硝酸铽($Tb(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$)、2,6-吡啶二羧酸(DPA), 和磷酸钠(Na_3PO_4)购自上海阿拉丁化学有限公司。L-亮氨酸(L-leucine)、L-谷氨酸(L-glutamic acid)、L-半胱氨酸(L-cysteine)、D-丙氨酸(D-alanine)、鸟苷一磷酸(GMP)、腺苷一磷酸(AMP)、牛血清白蛋白(BSA)、葡萄糖(glucose)、柠檬酸(citric acid)、尿酸(uric acid)、烟酸(nicotinic acid)、土霉素(oxytetracycline)、氢氧化钠和三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自国药集团化学试剂有限公司。其他的无机金属盐类药品均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。实验中使用的去离子水($18.25 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)由 UPK/UPT 净水系统制备。

样品的荧光光谱由 F-7000 荧光光谱仪(日立, 日本)进行测定, 激发光源为氙灯, 激发和发射狭缝均为 5 nm, 激发波长为 280 nm, 光电倍增管电压为 400 V。所有 pH 测量均在 FE28 标准 pH 计(Mettler Toledo,

Switzerland)上进行。

2.2. 荧光传感构建及对 DPA 的检测

在 5.0 mL 的比色管中, 依次加入一定量的如下溶液: 500 μL 的 Tris-HCl 缓冲溶液($1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.5$)、160 μL 的 Luminol 溶液($1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、30 μL 的 Tb^{3+} 溶液($5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 100 μL 的 Pi 溶液($10.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 构筑 Luminol-Tb-Pi 配合物荧光探针。

向探针中 DPA 标准溶液($0.2\sim 45 \mu\text{M}$)或预处理样品, 最后用去离子水定容至 10.0 mL。样品混合均匀后在室温下放置 20 min, 最后使用荧光光谱仪在激发波长为 280 nm, 激发狭缝和发射狭缝为 5 nm 条件下, 依次测定各样品在 300~600 nm 内的荧光光谱。以 545 与 423 nm 处的荧光强度值作为 DPA 浓度的函数, 用于 DPA 的定量分析。在选择性试验中, 用其他可能的干扰物质代替 DPA, 采用相同的测定方法进行分析检测, 探究该荧光探针对 DPA 的选择性, 并探究可能共存物质对 DPA 检测的干扰性。

2.3. 实际采集与测定

水样采集: 水样分别采自当地自来水和湖水。

水样预处理: 取采集水样 25 mL 于 50 mL 烧杯中, 静置 2 h 后, 取上清液。将上清液用 0.22 μm 滤头过滤, 然后稀释 100 倍备用。

水样测定: 向预处理水样中加入一定浓度的 DPA (5、10、40 μM), 然后将加标样品加入荧光探针中, 采用与上述定量分析相同的测定过程, 分析样品中 DPA 含量。

3. 实验结果与讨论

3.1. 荧光探针的构建及对 DPA 的检测机制

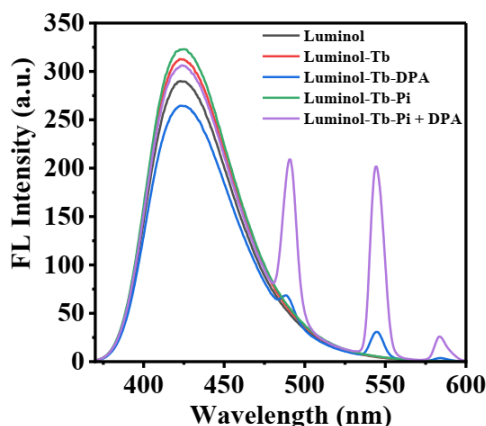


Figure 1. Fluorescence spectra of different systems. Luminol: 50 μM ; Tb^{3+} : 50 μM ; Pi: 50 μM ; DPA: 20 μM ; Tris-HCl buffer: 10 mM ($\text{pH} = 7.5$); $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

图 1. 不同配合体系的荧光光谱图, Luminol: 50 μM ; Tb^{3+} : 50 μM ; Pi: 50 μM ; DPA: 20 μM ; Tris-HCl buffer: 10 mM ($\text{pH} = 7.5$); $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

如图 1 所示, 在激发波长为 280 nm 条件下, 测定了 Luminol-Tb-Pi 体系加入 DPA 前后的荧光光谱变化。在加入 DPA 之前, Luminol-Tb-Pi 体系中只有 Luminol 的特征荧光; 加入 DPA 后, 在 489、545 和 584 nm 波长处出现三个荧光峰, 分别源于 Tb^{3+} 的跃迁(${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ ($J = 6, 5, 4$)), 表明 DPA 作为天线配体向 Tb^{3+} 进行了能量转移, 敏化其发光[17]; 此外, 加入 DPA 后, Luminol 荧光出现轻微淬灭。这是由于 DPA 与 Tb^{3+} 的竞争性结合, 使 Luminol 与 Tb^{3+} 的配位作用减弱, 部分 Luminol 释放成游离态, 其聚集诱导的

荧光增强状态破坏, 导致其荧光淬灭[18][19]。

此外, 为了说明 Pi 调控增强的荧光响应, 在激发波长为 280 nm 条件下, 同时测定了 Luminol-Tb 体系加入 DPA 前后的荧光光谱变化。结果表明, 相对于 Luminol-Tb 体系, Pi 调控的 Luminol-Tb 体系对 DPA 具有更显著的荧光响应, 这是由于 Pi 的加入使配合物体系配位作用增强, 有效缩小 DPA 与 Tb^{3+} 之间的距离, 增强了 DPA 的敏化作用[20]; 此外, Pi 通过与 Tb^{3+} 的配位还可以减少水分子对 Tb^{3+} 的荧光淬灭作用, 进一步增强 Tb^{3+} 荧光[21]。因此, 基于 Luminol-Tb-Pi 探针体系中 Luminol 和 Tb^{3+} 的双荧光信号响应, 可实现对 DPA 的比率荧光检测。

3.2. 荧光探针构建及传感条件优化

为构建对 DPA 具有灵敏性响应的 Luminol-Tb-Pi 荧光探针, 对探针体系中 Luminol 和 Pi 的浓度、溶液 pH 以及该探针对 DPA 的响应时间等实验条件进行了优化。

3.2.1. Luminol 浓度的优化

当 Tb^{3+} 浓度一定时(50 μM), 对 Luminol-Tb-Pi 体系中 Luminol 的浓度进行了优化, 结果如图 2 所示。结果表明, 当 Luminol 浓度较低时, 虽然 DPA 对 Tb^{3+} 荧光的敏化效率较高, 但是 Luminol 荧光信号较弱, 易导致实验误差较大, 并且体系的荧光颜色变化不明显。随着 Luminol 浓度的增加, DPA 对 Tb^{3+} 荧光的敏化效率也逐渐降低, 因此, 综合考虑到探针体系荧光强度和荧光可视化, 选择 Luminol 浓度为 50.0 μM 用于构建 Luminol-Tb-Pi 配合物探针。

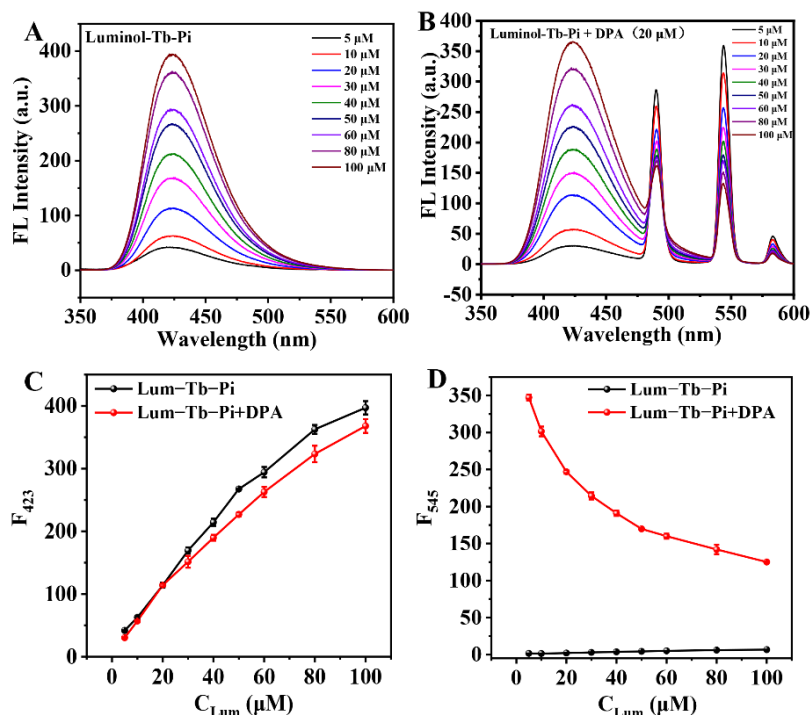


Figure 2. Effect of Luminol concentration (C_{Lum}) on fluorescence spectra of Luminol-Tb³⁺-Pi complex system before (A) and after (B) addition of DPA. Effect of C_{Lum} on fluorescence intensity at 423 nm (C) and 545 nm (D) of Luminol-Tb-Pi complex system before and after adding DPA. Pi: 50.0 μM ; Tb^{3+} : 50.0 μM ; DPA: 20.0 μM ; Tris-HCl buffer: 10 mM (pH = 7.5); λ_{ex} = 280nm

图 2. Luminol 浓度(C_{Lum})对 Luminol-Tb³⁺-Pi 配合物体系加入 DPA 之前(A)和之后(B)荧光光谱的影响; C_{Lum} 对 Luminol-Tb-Pi 配合物体系加入 DPA 前后在 423 nm (C)和 545 nm (D)波长处荧光强度的影响; Pi: 50 μM ; Tb^{3+} : 50 μM ; DPA: 20 μM ; Tris-HCl buffer: 10 mM (pH = 7.5); λ_{ex} = 280 nm

3.2.2. Pi 浓度的优化

Pi 浓度可显著 Luminol-Tb-Pi 配位物体系对 DPA 的荧光响应结果, 因此本工作探究了在不同的 Pi 浓度条件下该荧光探针对 DPA 的响应结果。如图 3(A)、图 3(B)所示, 在加入 DPA 前后, Pi 浓度对 Luminol 荧光没有明显影响; 而在 DPA 加入后, Pi 浓度可显著影响 Tb^{3+} 特征荧光强度。Pi 浓度对 Luminol-Tb-Pi 体系在 423 和 545 nm 波长处荧光强度的影响结果如图 3(C)、图 3(D)所示。结果表明, 随着 Pi 浓度的增大, DPA 对 Tb^{3+} 的荧光敏化作用逐渐增强, 并且当 Pi 浓度大于 50 μM 时, DPA 对 Tb^{3+} 的敏化作用趋于稳定, 即随着 Pi 浓度的继续增大, Tb^{3+} 特征荧光未出现明显的荧光增强。这是由于随着 Pi 浓度的增大, Pi 与 Tb^{3+} 的更多配位有效减少了水分子对 Tb^{3+} 荧光的淬灭作用。因此, 选择 50 μM 的 Pi 用于构建 Luminol-Tb-Pi 配合物探针。

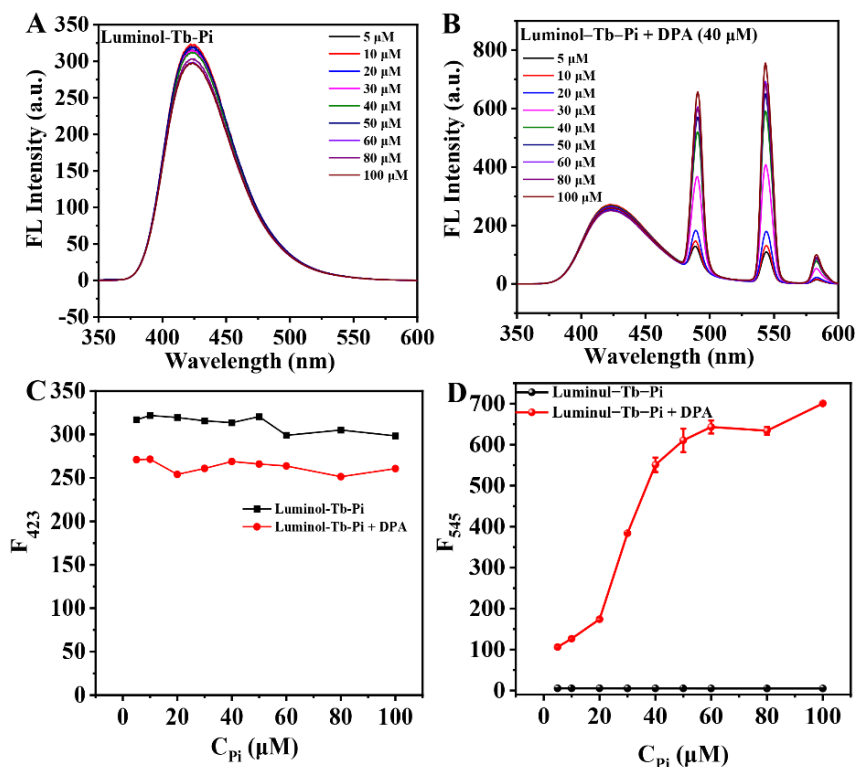


Figure 3. Effect of Pi concentration on fluorescence spectra of Luminol-Tb-Pi complex system before (A) and after (B) addition of DPA. Effect of Pi concentration on fluorescence intensity of Luminol-Tb-Pi complex system at 423 (C) and 545 nm (D) before and after the addition of DPA. Luminol: 50 μM ; Tb^{3+} : 50 μM ; DPA: 50 μM ; Tris-HCl buffer: 10 mM (pH = 7.5); λ_{ex} = 280 nm

图 3. Pi 浓度对 Luminol-Tb-Pi 配合物体系加入 DPA 之前(A)和之后(B)荧光光谱的影响; Pi 浓度对 Luminol-Tb-Pi 配合物体系加入 DPA 前后在 423 nm (C)和 545 nm (D)波长处处荧光强度的影响; Luminol: 50 μM ; Tb^{3+} : 50 μM ; DPA: 50 μM ; Tris-HCl buffer: 10 mM (pH = 7.5); λ_{ex} = 280 nm

3.2.3. pH 优化

对于含有酸性或碱性基团的荧光体系, 溶液 pH 值的变化对体系荧光的影响显著。因此, 此工作探究了不同 pH 值(6.0~10.0)对 Luminol-Tb-Pi 荧光强度的影响。如图 4(A)所示, pH 对 Luminol 的荧光强度具有显著明显影响, 而在 DPA 前后, Luminol 荧光并未出现明显变化。有趣的是, pH 对 Tb^{3+} 的荧光强度没有显著影响, 而向探针体系加入 DPA 后, Tb^{3+} 的荧光强度随着 pH 值的增大而增强(图 4(B))。这是由于在酸性条件下, PO_4^{3-} 易发生水解产生 HPO_4^{2-} 和 $H_2PO_4^-$, 导致其与 Tb^{3+} 的配合作用较弱, 不能有效

增强 DPA 向 Tb^{3+} 的能量转移, 并且不能有效减少水分子对 Tb^{3+} 的荧光淬灭作用; 而在碱性条件下, PO_4^{3-} 与 Tb^{3+} 的强烈配位结合通过减少分子间距有效增强了 DPA 对 Tb^{3+} 的敏化作用, 并有效排除了水分子的淬灭作用。因此, 综合考虑溶液 pH 的影响以及实际样品的酸碱性, 选择 pH7.5 用于 Luminol-Tb-Pi 探针针对 DPA 的检测分析。

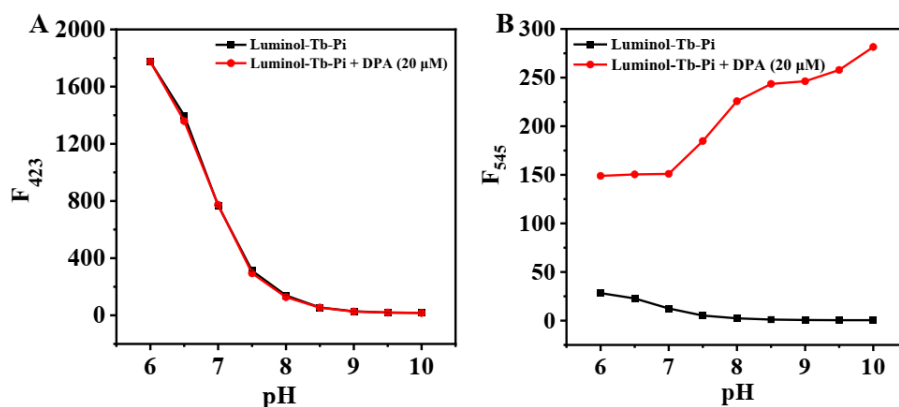


Figure 4. (A) Effect of pH on the fluorescence intensity of Luminol at 423 nm in Luminol-Tb-Pi complex system before and after addition of DPA. (B) Effect of pH on the fluorescence intensity of Luminol at 545 nm in Luminol-Tb-Pi complex system before and after addition of DPA. Luminol: 50 μ M; Tb^{3+} : 50 μ M; DPA: 20 μ M; Pi: 50 μ M; λ_{ex} = 280 nm

图 4. (A) pH 对 Luminol-Tb-Pi 配合物体系中 Luminol 在 423 nm 处的荧光强度的影响; (B) pH 对 Luminol-Tb-Pi 配合物体系中 Tb^{3+} 在 545 nm 处的荧光强度的影响; Luminol: 50.0 μ M; Tb^{3+} : 50.0 μ M; DPA: 20.0 μ M; Pi: 50.0 μ M; λ_{ex} = 280 nm

3.2.4. 响应时间优化

荧光稳定性和响应时间也是评估荧光传感性能的重要参数, 因此, 探究了加入一定量 DPA 后, Luminol-Tb-Pi 探针体系的荧光强度随时间的变化情况, 如图 5 所示。结果表明, Luminol-Tb-Pi 体系在 2 min 内即可实现对 DPA 的完全响应, 并其荧光强度在 60 min 内保持稳定, 因此选择 2 min 作为 DPA 检测的响应时间。

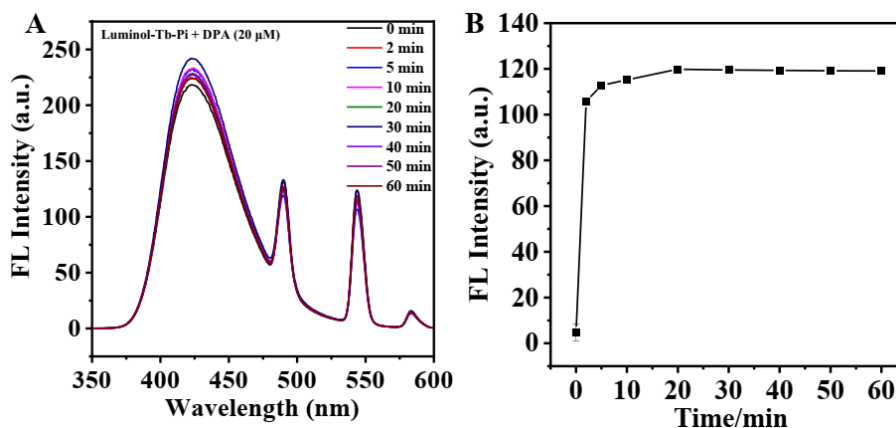


Figure 5. (A) Fluorescence spectra of the Luminol-Tb-Pi system at different times after the addition of DPA; (B) Fluorescence intensity of the Luminol-Tb-Pi complex system at different times after the addition of DPA; Luminol: 50 μ M; Tb^{3+} : 50 μ M; DPA: 20 μ M; Pi: 50.0 μ M; Tris-HCl buffer: 10 mM (pH = 7.5); λ_{ex} = 280 nm

图 5. (A) Luminol-Tb-Pi 配合物体系加入 DPA 之后在不同时间点的荧光光谱图; (B) Luminol-Tb-Pi 配合物体系加入 DPA 后在不同时间点的荧光强度变化; Luminol: 50 μ M; Tb^{3+} : 50 μ M; DPA: 20 μ M; Pi: 50 μ M; Tris-HCl buffer: 10 mM (pH = 7.5); λ_{ex} = 280 nm

3.3. 荧光探针对 DPA 的定量分析

在上述优化条件下, 我们探究了 Luminol-Tb-Pi 荧光探针对 DPA 的检测性能。如图 6(A)所示, 随着探针体系中 DPA 浓度的逐渐增加(0.2~45 μM), Tb^{3+} 的特征荧光逐渐增强, 而体系中 Luminol 的荧光逐渐减弱。并且 DPA 在 0.2~45 μM 的浓度范围内, 通过绘制剂量效应曲线发现探针的荧光强度比值 F_{545}/F_{423} 和 DPA 浓度之间存在良好的线性关系, 线性回归方程式为 $y = 0.04893x - 0.21202$, $R^2 = 0.9891$ (图 6(B))。此外, 基于 $\text{LOD} = 3\sigma/k$ (σ 是指 11 个空白样品信号值的标准偏差, k 是线性回归方程式的斜率, 即 0.04893), 计算得到该荧光探针对 DPA 的检测限为 0.051 μM , 该方法的 LOD 远低于炭疽杆菌孢子对人类的传染剂量(60 μM), 表明该传感方法对 DPA 的灵敏检测性能。

此外, 我们对比考察了不存在 Pi 调控的 Luminol-Tb 配合物体系对 DPA 响应性能, 结果如图 6(C), 图 6(D)所示。与 Luminol-Tb-Pi 荧光探针相比, Luminol-Tb 配合物体系对 DPA 的响应相对较弱, 即 DPA 对 Tb^{3+} 的特征荧光敏化作用明显较弱, 并且荧光强度比值 F_{545}/F_{423} 和 DPA 浓度之间线性关系较差, 该对比结果说明基于 Pi 调控的 Luminol-Tb-Pi 探针对 DPA 具有更高的检测灵敏性。

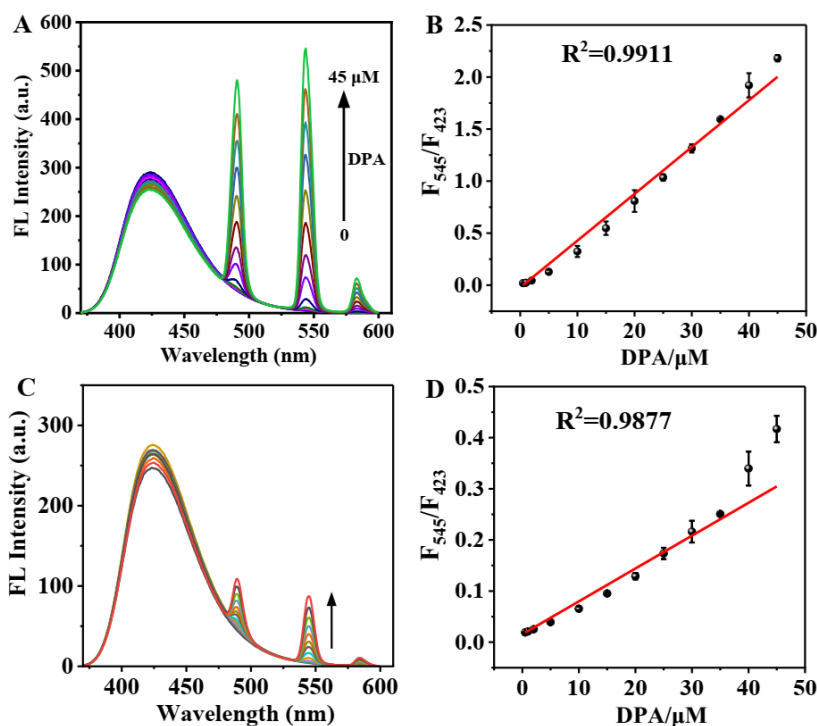


Figure 6. Fluorescence spectra of the Luminol-Tb-Pi complex system after addition of different concentrations of DPA (A) and the linear relationship between F_{545}/F_{423} and C_{DPA} (B); Fluorescence spectra of the Luminol-Tb complex system after addition of different concentrations of DPA (C) and the linear relationship between F_{545}/F_{423} and C_{DPA} (D)

图 6. Luminol-Tb-Pi 配合物体系在加入不同浓度 DPA 后的荧光光谱图 (A)以及该探针体系中 F_{545}/F_{423} 与 DPA 浓度之间的线性关系 (B); Luminol-Tb 配合物体系在加入不同浓度 DPA 后的荧光光谱图 (C)以及该探针体系中 F_{545}/F_{423} 与 DPA 浓度之间的线性关系 (D)

3.4. 荧光探针对 DPA 的选择性分析

为了评估该荧光探针对 DPA 检测的实际应用潜力, 考察了 Luminol-Tb-Pi 体系对 DPA 检测的特异性, 如图 7 所示。只有 DPA 使探针体系的荧光强度比值 F_{545}/F_{423} 迅速增大, 而在加入其他有机化合物(L-亮氨酸(L-leucine)、L-谷氨酸(L-glutamic acid)、L-半胱氨酸(L-cysteine)、D-丙氨酸(D-alanine)、鸟苷一磷酸

(GMP)、腺苷一磷酸(AMP)、牛血清白蛋白(BSA)、葡萄糖(glucose)、柠檬酸(citric acid)、尿酸(uric acid)、烟酸(nicotinic acid)、土霉素(oxytetracycline)或者多种无机离子(K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 CO_3^{2-} 、 SO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 Br^-)后, 荧光强度比值未出现明显变化, 说明该荧光探针对于 DPA 检测具有良好的选择性。

此外, 抗干扰是评价荧光探针应用性能的重要条件之一, 在多种可能共存干扰物存在条件下, 考察了该荧光探针对于 Luminol-Tb-Pi 探针的抗干扰性。结果表明, 有机物质几乎不会干扰 DPA 的测定, 其它可能共存的常见离子也几乎都不干扰测定。对于细菌孢子等生物有机体, 这些金属离子在有机体中的浓度非常低, 因此对 DPA 检测的干扰可以忽略不计。以上结果表明该荧光探针对于 DPA 的测定具有较好的选择性, 在实际样品检测中具有一定的应用潜力。

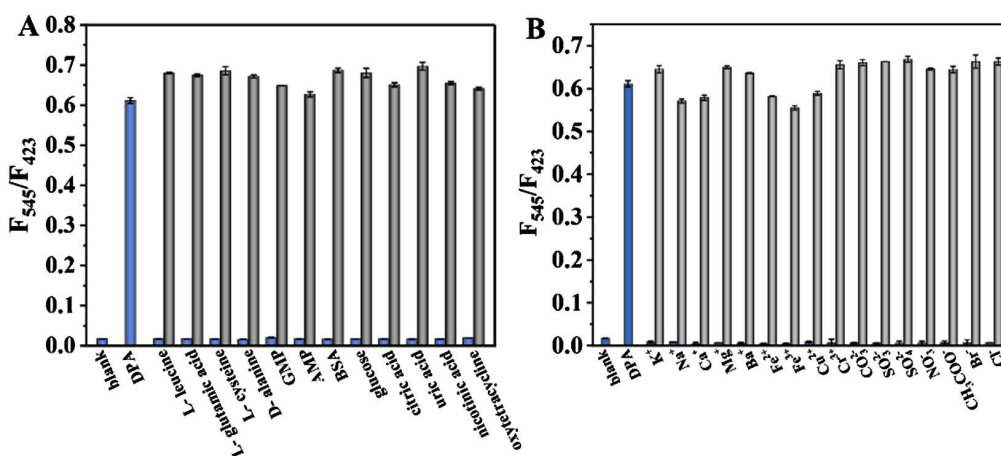


Figure 7. The selectivity and anti-interference of Luminol-Tb-Pi fluorescent probe for DPA detection. The concentration of DPA and all inorganic ions and organic molecules is 20 μ M, $\lambda_{ex} = 280$ nm

图 7. Luminol-Tb-Pi 探针体系对 DPA 的选择性与抗干扰性检测, DPA: 20 μ M; 有机化合物和无机离子均为 20 μ M; $\lambda_{ex} = 280$ nm

3.5. 样品中 DPA 的测定

Table 1. Detection of DPA in real samples

表 1. 实际样品中 DPA 的检测

水样	加标浓度(μ M)	测定值(μ M)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
Lake water	5	6.42	108.35	4.9
	10	9.31	93.07	5.0
	40	36.39	90.98	2.2
Tap water	5	6.38	107.59	0.8
	10	8.99	91.89	3.3
	40	34.60	96.49	5.7

为进一步考察所提方法的实用性, 通过标准加入法考察了该方法对样品中 DPA 的回收率情况, 测定结果如表 1 所示。荧光探针对于样品中 DPA 的检测回收率在 90.98%~108.35%之间, 标准偏差值不超过 0.5%, 说明本方法可用于对样品中 DPA 的可靠检测。因此, 本工作开发的荧光探针在评估环境样品中炭疽杆菌浓度方面具有一定的应用前景。

4. 结论

本工作构建了一种可用于灵敏选择性检测炭疽杆菌生物标志物 DPA 的稀土配合物荧光探针(luminol-Tb-Pi)。该探针以 luminol 为有机配体, Tb³⁺为中心离子, 在 Pi 的调控下, DPA 的加入可以使 Tb³⁺特征荧光显著增强, 同时引起 luminol 荧光淬灭。因此, 基于 DPA 敏化的 Tb³⁺特征荧光增强和 luminol 荧光淬灭的双信号变化, 实现了对 0~45 μM DPA 的定量检测, 且该探针可实现对 DPA 的高特异性和抗干扰性检测。此外, 基于 DPA 引起的探针体系荧光颜色变化可实现对 DPA 的可视化检测。本工作开发的荧光传感方法操作简单、成本低, 在检测炭疽生物标志物方面具有良好的应用潜力。

基金项目

本项目由国家自然科学基金(No. 22106076)和江苏省大学生创新创业训练计划项目(No. 202310304102Y)支持。

参考文献

- [1] Enserink, M. (2001) This Time It Was Real: Knowledge of Anthrax Put to the Test. *Science*, **294**, 490-491. <https://doi.org/10.1126/science.294.5542.490>
- [2] Read, T.D., Peterson, S.N., Tourasse, N., *et al.* (2003) The Genome Sequence of *Bacillus anthracis* Ames and Comparison to Closely Related Bacteria. *Nature*, **423**, 81-86. <https://doi.org/10.1038/nature01586>
- [3] Zhang, X., Young, M.A., Lyandres, O. and Van Duyne, R.P. (2005) Rapid Detection of an Anthrax Biomarker by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 4484-4489. <https://doi.org/10.1021/ja043623b>
- [4] Cowcher, D.P., Xu, Y. and Goodacre, R. (2013) Portable, Quantitative Detection of *Bacillus bacterial* Spores Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Analytical Chemistry*, **85**, 3297-3302. <https://doi.org/10.1021/ac303657k>
- [5] Luo, Y.Q., Zhang, L., Zhang, L.Y., *et al.* (2019) Multiporous Terbium Phosphonate Coordination Polymer Microspheres as Fluorescent Probes for Trace Anthrax Biomarker Detection. *ACS Applied Material Interfaces*, **11**, 15998-16005. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b01123>
- [6] Li, X., Luo, J., Deng, L., Ma, F.H. and Yang, M.H. (2020) *In situ* Incorporation of Fluorophores in Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF-8) for Ratio-Dependent Detecting a Biomarker of Anthrax Spores. *Analytical Chemistry*, **92**, 7114-7122. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00499>
- [7] Huang, C., Ma, R., Luo, Y., *et al.* (2020) The Stimulus Response of TPE-TS@Eu/GMP ICPs: Toward Colorimetric Sensing of an Anthrax Biomarker with Double Ratiometric Fluorescence and Its Coffee Ring Test Kit for Point-of-Use Application. *Analytical Chemistry*, **92**, 12934-12942. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01570>
- [8] Goodacre, R., Shann, B., Gilbert, R.J., *et al.* (2000) Detection of the Dipicolinic Acid Biomarker in *Bacillus* Spores Using Curie-Point Pyrolysis Mass Spectrometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, **72**, 119-127. <https://doi.org/10.1021/ac990661i>
- [9] Ratiu, I.A., Bocos-Bintintan, V., Patrut, A., *et al.* (2017) Discrimination of Bacteria by Rapid Sensing Their Metabolic Volatiles Using an Aspiration-Type Ion Mobility Spectrometer (a-IMS) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry GC-MS. *Analytica Chimica Acta*, **982**, 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.031>
- [10] Li, D., Truong, T.V., Bills, T.M., *et al.* (2012) GC/MS Method for Positive Detection of *Bacillus anthracis* Endospores. *Analytical Chemistry*, **84**, 1637-1644. <https://doi.org/10.1021/ac202606x>
- [11] Tan, C.L., Wang, Q.M. and Zhang, C.C. (2011) Optical and Electrochemical Responses of Ananthrax Biomarker Based on Single-Walled Carbon Nanotubes Covalently Loaded Withterbium Complexes. *Chemical Communications*, **47**, 12521-12523. <https://doi.org/10.1039/c1cc15857k>
- [12] Yan, B. (2017) Lanthanide-Functionalized Metal-Organic Framework Hybrid Systems to Create Multiple Luminescent Centers for Chemical Sensing. *Accounts of Chemical Research*, **50**, 2789-2798. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00387>
- [13] Xu, L., Li, Y., Pan, Q.J., *et al.* (2020) Dual-Mode Light-Emitting Lanthanide Metal-Organic Frameworks with High Water and Thermal Stability and Its Application in White LEDs. *ACS Applied Material Interfaces*, **12**, 18934-18943. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c02999>
- [14] Gui, R.J., Jin, H., Bu, X.N., *et al.* (2019) Recent Advances in Dual-Emission Ratiometric Fluorescence Probes for Chemo/Biosensing and Bioimaging of Biomarkers. *Coordination Chemistry Reviews*, **383**, 82-103.

- <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.01.004>
- [15] Na, M., Zhang, S.P., Liu, J.J., *et al.* (2020) Determination of Pathogenic Bacteria—*Bacillus anthrax* Spores in Environmental Samples by Ratiometric Fluorescence and Test Paper Based on Dual-Emission Fluorescent Silicon Nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, **386**, Article ID: 121956. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121956>
- [16] Zhang, X.X., Zhang, W.J., Li, G., *et al.* (2020) A Ratiometric Fluorescent Probe for Determination of the Anthrax Biomarker 2, 6-Pyridinedicarboxylic Acid Based on a Terbium(III)-Functionalized UIO-67 Metal-Organic Framework. *Microchimica Acta*, **187**, Article No. 122. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4113-2>
- [17] Davis, D., Carrod, A.J., Guo, Z., *et al.* (2019) Imidodiphosphonate Ligands for Enhanced Sensitization and Shielding of Visible and Near-Infrared Lanthanides. *Inorganic Chemistry*, **58**, 13268-13275. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02090>
- [18] Yao, R., Li, Z., Liu, G., Fan, C.B. and Pu, S.Z. (2021) Luminol-Eu-Based Ratiometric Fluorescence Probe for Highly Selective and Visual Determination of Tetracycline. *Talanta*, **234**, Article ID: 122612. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122612>
- [19] Tong, Y., Qi, J., Song, A., *et al.* (2020) Electronic Synergy between Ligands of Luminol and Isophthalic Acid for Fluorescence Ratiometric Detection of Hg²⁺. *Analytica Chimica Acta*, **1128**, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.047>
- [20] Cui, Y., Yue, Y., Qian, G.D. and Chen, B.L. (2012) Luminescent Functional Metal-Organic Frameworks. *Chemical Reviews*, **112**, 1126-1162. <https://doi.org/10.1021/cr200101d>
- [21] Zhao, C., Zhang, X., Shu, Y. and Wang, J.H. (2020) Europium-Pyridinedicarboxylate-Adenine Light-up Fluorescence Nanoprobes for Selective Detection of Phosphate in Biological Fluids. *ACS Applied Material Interfaces*, **12**, 22593-22600. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c04318>