

稀土上转换发光纳米探针用于潜指纹中可卡因的检测

李志豪¹, 刘建¹, 刘子恩^{1,2}, 袁荃^{*1}

(1. 武汉大学化学与分子科学学院, 生物医学分析化学教育部重点实验室, 湖北武汉 430072;
2. 中国矿业大学化工学院, 江苏徐州 221008)

摘要: 结合核酸适配体和稀土掺杂上转换纳米材料的优势, 建立了一种潜指纹中外源性物质检测的新方法。Zeta 电位、紫外吸收光谱和发光光谱表明核酸适配体成功修饰到上转换颗粒表面而且没有影响颗粒的发光性质。对含有不同量可卡因的指纹进行检测, 在指纹中可卡因含量为 0.5 μg 时仍能呈现出较强的发光强度。该方法能够通过潜指纹成像提供光学信号, 实现潜指纹中外源性物质的检测, 而且适用于不同人和不同基底上指纹的检测, 具有简便、检测灵敏度高、适用性广等优点, 对身份认证、刑事侦查和医疗诊断有重要意义。

关键词: 潜指纹; 上转换纳米颗粒; 核酸适配体; 可卡因; 刑事侦查

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-6144(2014)05-692-05

指纹对于每个人来说都是独一无二且终生不变的^[1], 它能够提供最准确的身份信息, 一直以来被广泛应用于权限控制、法医鉴定和医疗诊断等^[2] 诸多方面。当手指被血液或颜料污染后, 留下的指纹是肉眼可见并易于鉴定的, 但大多数指纹都是肉眼不可见的, 被称为潜指纹^[3]。潜指纹除了能提供身份信息之外, 其所包含的各种生物、化学物质, 如分泌物、代谢物和一些外源化学物质等还蕴藏着更多重要的信息^[3], 例如其中的可卡因、海洛因和炸药残留物等外源性物质可以用于刑事侦查和犯罪证据收集^[4-5]。Russell 教授将海洛因或可卡因代谢物的抗体与磁性纳米颗粒相结合, 发展了一种以免疫测定方法为基础的潜指纹中可卡因或海洛因代谢物鉴定的方法^[6]。樊春海教授和合作者利用贵金属的等离子体光学性质, 将纳米金颗粒与可卡因适配体结合用于潜指纹中可卡因的检测^[7]。这些方法对刑事侦查和犯罪证据收集都有重大意义。

稀土掺杂的上转换发光材料是一种新型的成像试剂^[8-10], 它具有许多独特的优势, 如较深的激发光组织穿透深度、无背景荧光干扰、光学稳定性好、生物毒性小和荧光寿命长等^[11-13]。这些特点使其在分析检测和生物医学领域有着广泛的应用。核酸适配体是通过系统进化指数富集法筛选得到的单链 DNA 或 RNA 序列, 该序列能够与各种靶标物, 如金属离子、小分子、蛋白、细胞等高效特异结合^[14-15]。与传统的抗体相比, 核酸适配体设计更加灵活、易于化学合成和修饰、成本低廉而且生物化学稳定性高, 在分析检测、靶向成像和医疗诊断等领域有着广泛的应用^[16-19]。我们将两种材料的优势结合, 将氨基修饰的可卡因适配体 (Cocaine Binding Aptamer, CBA) 连接到上转换纳米颗粒 (UCNPs) 表面, 形成核酸适配体功能化的稀土上转换纳米颗粒 (UCNPs-CBA)。如图 1 所示, UCNPs-CBA 通过核酸适配体高效地与指纹中的可卡因

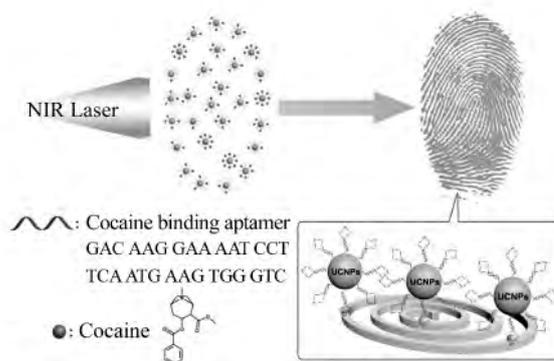


图 1 指纹成像和指纹中外源性物质鉴定的原理图
Fig. 1 Schematic representation of the strategy for the imaging of latent fingerprints (LFPs) and detection of the exogenous compounds in latent fingerprints

收稿日期: 2014-04-28

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 21201133, 51272186)

* 通讯作者: 袁荃, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为稀土功能材料的可控合成, 基于 DNA 的纳米生物材料的设计、组装和应用。

特异性结合并在近红外光的激发下发出可见光,指纹图像被清晰地呈现出来并被搭有微焦镜头的单反相机记录。该方法通过潜指纹成像实现了指纹中外源性物质的检测,具有高效、便捷、灵敏等优点。另外,通过对核酸适配体进行替换和调控,该方法还可能被应用于指纹中兴奋剂检测和疾病诊断等领域。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

JEM-2100 透射电子显微镜(日本,JEOL 公司);D8 高级 X 射线衍射仪(德国,Bruker 公司);UV-2500 紫外-可见分光光度计(日本,Shimadzu 公司);F-4600 荧光光谱仪(日本,Hitachi 公司);纳米粒度、Zeta 电位和绝对分子量分析仪(英国,Malvern 公司);980 nm 红外激光器(陕西凯斯特电子科技有限公司);D3000 单反数码相机(日本,Nikon 公司)。

Er_2O_3 (99.99%) 购自 Aladdin(中国); Y_2O_3 (99.99%), Yb_2O_3 (99.99%),三氟乙酸钠(98%),油酸(OA),十八烯(ODE),乙醇,环己烷,氯仿和二甘醇,均购自国药化学试剂有限公司;盐酸可卡因,聚丙烯酸,1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC),N-羟基丁二酰亚胺(NHS),均购自 Sigma Aldrich 公司;可卡因核酸适配体(CBA)由 ABI 3400 DNA/RNA 合成仪合成(美国 Applied Biosystems 公司),并用高效液相色谱仪纯化。

1.2 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 的制备

向 100 mL 的三口烧瓶中一次加入 0.3338 g $\text{Y}(\text{CF}_3\text{COO})_3$,0.1024 g $\text{Yb}(\text{CF}_3\text{COO})_3$,0.0101 g $\text{Er}(\text{CF}_3\text{COO})_3$,0.2720 g NaCF_3COO ,5.65 g OA 和 5.05 g 1-辛烯(ODE)。混合物在真空条件下搅拌并加热至温度 120~140 °C,反应 0.5 h。然后在氩气保护下加热到 340 °C,反应 0.5 h。反应结束后冷却至室温,乙醇和环己烷混合溶液(体积比 1:1)洗涤三次,离心分离。

1.3 聚丙烯酸-UCNPs 的制备

向三口烧瓶中加入 30 mL 二甘醇(DEG)和 300 mg 聚丙烯酸(PAA-1800),真空条件下加热至 110 °C 形成澄清透明的溶液。取上述反应产物 100 mg,用甲苯和氯仿的混合溶液(体积比 3:1)分散,在氩气保护下反应 1 h,然后加热至 240 °C 反应 1.5 h。反应结束后冷却至室温,用乙醇和水溶液(体积比 1:1)洗涤三次,离心分离,所得产品重新分散于 100 mL 水中。

1.4 PAA-UCNPs 的活化

取 100 μL PAA-UCNPs 溶液离心,将沉淀分散于 20 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸三钠缓冲溶液(PBS, 100 mmol/L NaCl, pH=7.4)中,再加入 4 μL 1.0 mol/L NHS 和 4 μL 0.1 mol/L EDC,混合液室温下震荡活化 30 min。

1.5 UCNPs-CBA 的制备

向活化后的 PAA-UCNPs 溶液中加入 1 μL 氨基修饰的可卡因适配体(CBA-NH₂)溶液,在摇床里震荡反应 12 h。离心分离得到产物,用 PBS 洗涤三次后,重新溶于 PBS 中。

1.6 指纹采集

配制 0.5、1.0、5.0 和 10.0 g/L 可卡因溶液。在志愿者的手指上分别涂上 10 μL 不同浓度的可卡因溶液,风干后,在玻璃板上轻轻按下指纹。用 5 g/L 可卡因溶液涂于手指上,分别在玻璃板、硬币、塑料培养皿、铝片上按下指纹。用类似方法收集不同志愿者的指纹。之后用疏水性笔将指纹圈出,室温下老化 12 h。

1.7 指纹检测

在每个指纹上滴加 120 μL UCNPs-CBA 溶液,确保被均匀覆盖。反应 30 min 后,用 PBS 冲洗三次。将载有指纹的基质于暗室,用可调节功率的激光器照射,再用搭有微焦镜头的单反相机拍下指纹。

2 结果与讨论

2.1 上转换纳米颗粒 UCNPs 的合成与表征

掺杂 20% Yb 和 2% Er 的 NaYF_4 上转换纳米颗粒($\text{NaYF}_4:20\%\text{Yb},2\%\text{Er}$)是根据文献方法^[20]合成。图 2A 是上转换颗粒的透射电镜(TEM)图。可以看出,制备的 UCNPs 呈均匀的六角形,平均半径约为 130 nm 且具有良好的单分散性。图 2B 是 UCNPs 的 X 射线能谱(EDS),表明 Yb 和 Er 的成功掺杂。

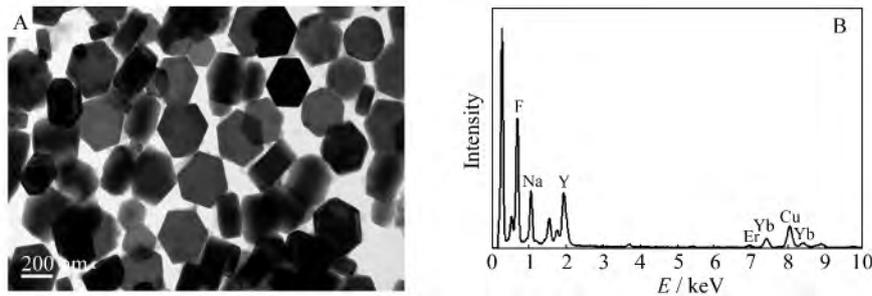


图 2 上转换纳米颗粒的透射电镜(TEM)图(A)和 X 射线能谱(EDS)(B)图
Fig. 2 TEM images(A) and Energy-dispersive X-ray(EDX) analysis(B) of upconversion nanoparticles(UCNPs)

2.2 UCNPs-CBA 的制备

图 3 是 UCNPs-CBA 的制备过程示意图。包裹在上转换颗粒(UCNPs)表面的油酸(OA), 不仅起到表面活性剂的作用, 而且能够通过配体交换过程^[21] 将聚丙烯酸(PAA)连接到 UCNPs 表面, 得到的 PAA-UCNPs 可溶于水相并能通过表面的羧基修饰上生物活性分子。然后氨基修饰的可卡因适配体(CBA-NH₂)与 PAA-UCNPs 通过脱水缩合反应得到有良好水溶性的 UCNPs-CBA。从图 4 可以看出, 合成后的 UCNPs-CBA 在 260 nm 处有一个 DNA 分子的特征吸收峰, 说明可卡因适配体成功连接到上转换颗粒上。

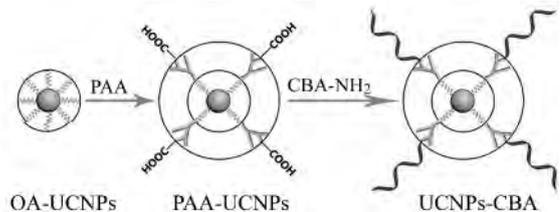


图 3 UCNPs-CBA 的制备过程示意图
Fig. 3 Schematic illustration of the functionalization steps to construct the cocaine binding aptamer functionalized UCNPs nanoconjugates (designated as UCNPs-CBA)

为了进一步验证 UCNPs-CBA 的成功制备, 分别测定了 PAA-UCNPs 和 UCNPs-CBA 的 Zeta 电位, PAA-UCNPs 的 Zeta 电位值为 -17.3 mV, 明显高于 UCNPs-CBA 的电位值 -32.6 mV。两者之间的差异表明可卡因核酸适配体被成功连接到 PAA-UCNPs 上。

2.3 UCNPs-CBA 的光学性质检测

为证明实验设计的可行性, 进一步检测 UCNPs-CBA 的光学性质, 测定了其在 980 nm 激光照射下的发光光谱。图 5A 为 UCNPs-CBA 的上转换发光光谱, 可以看出与 OA-UCNPs、PAA-UCNPs 的基本一致(图 5B)。这说明 UCNPs 表面修饰上 PAA 和 CBA 不会改变 UCNPs 原有的发光性质, 在 980 nm 红外光的照射下, UCNPs 仍以发绿光为主。

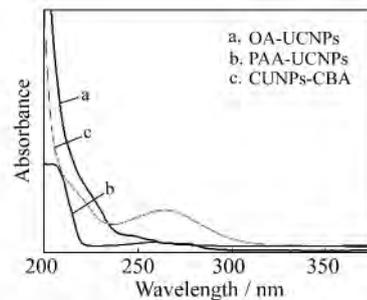


图 4 OA-UCNPs、PAA-UCNPs 和 UCNPs-CBA 的紫外光谱
Fig. 4 The UV absorption spectra of OA-UCNPs, PAA-UCNPs and UCNPs-CBA

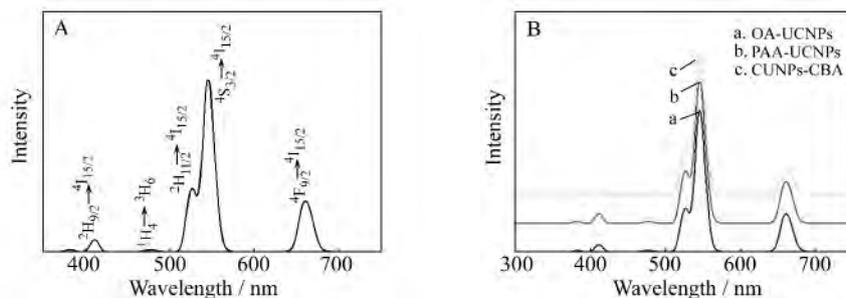


图 5 (A)UCNPs-CBA 的上转换发光光谱; (B)OA-UCNPs、PAA-UCNPs、UCNPs-CBA 的上转换发光光谱
Fig. 5 (A)Upconversion luminescence spectra of UCNPs-CBA; (B) Upconversion luminescence spectra of OA-UCNPs, PAA-UCNPs and UCNPs-CBA

2.4 不同可卡因含量的潜指纹检测

如图 6 所示, 含有 0、0.5、1.0、5.0 和 10.0 μg 可卡因的指纹在载玻片上所得到的发光图像。图 6A 中

没有任何光点,而图 6B 到 6E 中都能看到清晰的指纹图像,这表明了该方法是通过 UCNPs-CBA 对指纹中可卡因的选择性识别而实现指纹成像的。从 6B 到 6E,图像亮度随可卡因含量的增加而加强,含有 10.0 μg 可卡因的指纹图像亮度最强,表明连接上去的 UCNPs-CBA 量最多,这与其可卡因含量最高的事实相吻合。含有 0.5 μg 可卡因的指纹的图像亮度仍然较强,说明该鉴定方法具有较高的灵敏度。

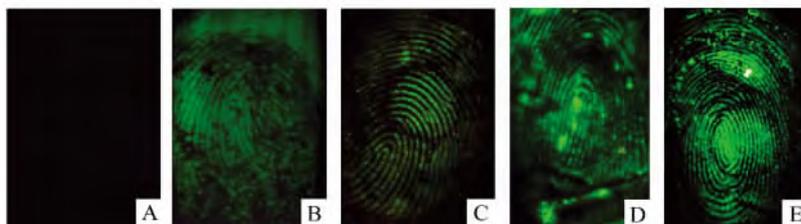


图 6 不同可卡因含量的潜指纹图像

Fig. 6 Images of latent fingerprints(LFPs) containing different loadings of cocaine

A: 0 μg ; B: 0.5 μg ; C: 1.0 μg ; D: 5.0 μg ; E: 10.0 μg .

2.5 不同人和不同基底上的潜指纹检测

我们在玻璃板上采集了 6 位志愿者的指纹,每个指纹中可卡因含量为 5.0 μg ,在近红外光的照射下所得到的指纹图像如图 7A-7F 所示。所有图像均呈现出了较强的发光亮度。这表明该方法对于不同人指纹的适用性。图 8 为不同基底上的指纹图像(图 8A-8D)及相应的实物图(图 8E-8H),每个指纹上的可卡因含量均为 5.0 μg 。图 8A-8D 四个指纹图像均呈现出了很强的发光信号,表明了对指纹中可卡因的成功检测。结果再一次很好地证明了该鉴定方法的高适用性。

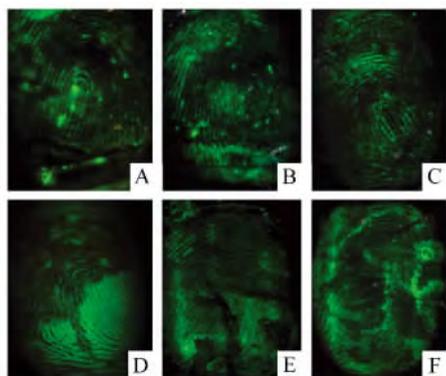


图 7 不同人的指纹图像

Fig. 7 Images of LFPs obtained from different people

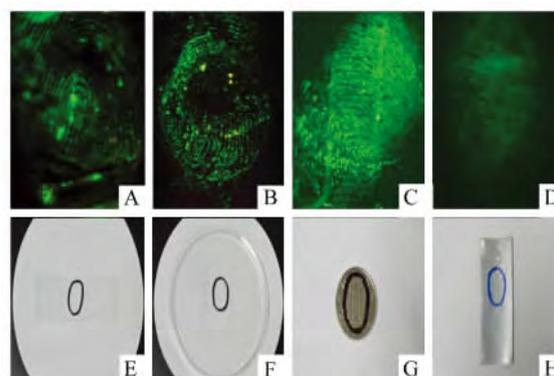


图 8 不同基底上的实物图及潜指纹图像

Fig. 8 Images (A-D) of LFPs on different surfaces and photos(E-H) of different substrates

A and E: glass microscope slides; B and F: plastic Petri dishes; C and G: patterned coins; D and H: aluminum sheets.

3 结论

本实验通过用核酸适配体功能化稀土上转换纳米颗粒,制备出一种全新的、用于潜指纹中外源性物质检测的探针,具有简便、高效、成本效益高的特点。该方法的可卡因含量检测限度可达 0.5 μg ,灵敏度较高。不同人和不同基底的检测结果说明了该方法的普遍适用性,对于今后的刑事侦查、医疗诊断、兴奋剂检测等工作有重要的意义。

参考文献:

- [1] Saferstein R. Criminalistics; An Introduction to Forensic Science, 9th ed[M]. Prentice Hall, New Jersey, 2006.
- [2] Wood M, Maynard P, Spindler X, Roux C, Lennard C, Aust J. Forensic Sci[J], 2013, **45**: 211.
- [3] Hazarika P, Russell D A. Angew Chem[J], 2012, **124**: 3582.
- [4] Shan X N, Patel U, Wang S P, Iglesias R, Tao N. J Science[J], 2010, **327**: 1363.
- [5] Hazarika P, Jickells S M, Wolff K, Russell D A. Angew Chem[J], 2008, **120**: 10321.

- [6] Hazarika P, Jickells S M, Wolff K, Russell D A. *Anal Chem*[J], 2010, **82**:9150.
- [7] Li K, Qin W W, Li F, Zhao X C, Jiang B W, Wang K, Deng S H, Fan C H, Li D. *Angew Chem*[J], 2013, **125**:11756.
- [8] Mader H S, Kele P, Saleh S M, Wolfbeis O S. *Curr Opin Chem Biol*[J], 2010, **14**:582.
- [9] Cheng L, Wang C, Liu Z. *Nanoscale*[J], 2013, **5**:23.
- [10] Shen J, Zhao L, Han G. *Adv Drug Deliv Rev*[J], 2013, **65**:744.
- [11] Ju Q, Tu D, Liu Y, Li R, Zhu H, Chen J, Chen Z, Huang M, Chen X. *J Am Chem Soc*[J], 2012, **134**:1323.
- [12] Li L L, Wu P W, Hwang K, Lu Y. *J Am Chem Soc*[J], 2013, **135**:2411.
- [13] Yu H, Huang Q M, Cao W B, Zhang X Q, Yu J C. *Acta Chimica Sinica*[J], 2013, **71**:1639.
- [14] Tan W H, Donovan M J, Jiang J H. *Chem Rev*[J], 2013, **113**:2842.
- [15] Xing H, Wong N Y, Xiang Y, Lu Y. *Curr Opin Chem Biol*[J], 2012, **16**:429.
- [16] Rosi N L, Giljohann D A, Thaxton C S, Lytton-Jean A K R, Han M S, Mirkin C A. *Science*[J], 2006, **312**:1027.
- [17] Gu F, Zhang L, Tepy B A, Mann N, Wang A, Moreno A F R, Langer R, Farokhzad O C. *Proc Natl Acad Sci USA*[J], 2008, **105**:2586.
- [18] Liu H, Xiang Y, Lu Y, Crooks R M. *Angew Chem*[J], 2012, **124**:7031.
- [19] Wu C, Yang S Y, Wu Z Y, Shen G L, Yu R Q. *Acta Chimica Sinica*[J], 2013, **71**:367.
- [20] Mai H X, Zhang Y W, Si R, Yan Z G, Sun L D, You L P, Yan C H. *J Am Chem Soc*[J], 2006, **128**:6426.
- [21] Zhang T R, Ge J P, Hu Y X, Yin Y D. *Nano Lett*[J], 2007, **7**:3203.

Detection of Exogenous Compounds in Latent Fingerprints Based on Aptamers-functionalized Upconversion Nanoparticles

LI Zhi-hao¹, LIU Jian¹, LIU Zi-en^{1,2}, YUAN Quan^{*1}

(1. *Key Laboratory of Analytical Chemistry for Biology and Medicine (Ministry of Education), College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072;*
2. *College of Chemistry and Engineering Technology, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008*)

Abstract: A novel imaging strategy for the detection of exogenous compounds in latent fingerprints (LFPs) was developed based on aptamers-functionalized upconversion nanoparticles (UCNPs). In this work, UCNPs were first capped with polyacrylic acid (PAA) (designated as PAA-UCNPs) to make it water-soluble and functional groups were introduced to its surface for further conjugation with biomolecules. Then, PAA-UCNPs was functionalized with cocaine binding aptamer (designated as UCNPs-CBA) to form the final imaging probe via amide bond. The zeta potentials, UV-Vis absorption spectra and upconversion luminescence spectra were used to confirm the above functionalization steps. LFPs with different loadings of cocaine were collected on glass slides and incubated with UCNPs-CBA. Under NIR light excitation, LFPs with cocaine showed strong luminescence while LFPs without cocaine showed nothing, indicating it was the recognition of cocaine by UCNPs-CBA that led to the imaging of LFPs. In addition, the detection limit of cocaine in LFPs was determined to be as low as 0.5 μg . Furthermore, LFPs from different people and on different surfaces were both developed successfully with UCNPs-CBA nanoconjugate, which showed the great generality of this imaging strategy. It is noteworthy that this strategy can also be applied to other exogenous compounds detection in LFPs by simply using other types of aptamers. Additionally, no expensive or complicated instrumentations were used in this experiment and all the operations are easy to handle, thus demonstrating the great practical prospects of this method. This novel imaging strategy for the detection of exogenous compounds in LFPs is expected to find applications in individual identification, forensic investigation, and medical diagnosis.

Keywords: Latent fingerprints; Aptamers; Upconversion nanoparticles; Cocaine; Forensic investigation