



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111610168 A

(43)申请公布日 2020.09.01

(21)申请号 202010098391.0

(22)申请日 2020.02.17

(30)优先权数据

62/919,075 2019.02.26 US

(71)申请人 香港科技大学

地址 中国香港九龙清水湾

申请人 香港城市大学

(72)发明人 唐本忠 王兆玉 叶汝全

(74)专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司 44217

代理人 郭伟刚

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图7页

(54)发明名称

一种用于检测潜在血迹的AIE分子及其应用

(57)摘要

本发明以马来酰亚胺官能化具有聚集诱导发光(AIE)性质的分子TPE-MI作为探针,通过与血浆中最主要的蛋白质-白蛋白进行无催化剂的点击反应,反应后在紫外灯下发出青蓝色荧光,实现对肉眼不可见的血迹的检测和显现。该方法具有操作简单、高灵敏度、无损DNA和适用性广的优点,目前最常用的血迹检测试剂鲁米诺发光时间仅几十秒,而基于AIE的方法表现出极强光稳定性,经处理的血迹样品在一年后仍具有较强荧光。此外该方法在模拟犯罪现场的血迹形态检测中表现出的高分辨优势,可显现清洗后的陈旧血迹形态以及血指纹。

1. 一种用于检测潜在血迹的AIE分子,其特征在于,所述AIE荧光分子为四苯乙烯马来酰亚胺,所述四苯乙烯马来酰亚胺与血液中的白蛋白反应后形成四苯乙烯琥珀酰亚胺而具有荧光性质。

2. 根据权利要求1所述的AIE分子,其特征在于,所述四苯乙烯马来酰亚胺与血液中的白蛋白反应后在紫外灯激发下发出青蓝色荧光。

3. 根据权利要求1所述的AIE分子,其特征在于,所述四苯乙烯马来酰亚胺与血液中的白蛋白反应后对血液中的DNA分子具有无损性。

4. 一种如权利要求1-3所述的AIE分子在检测潜在血迹中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述潜在血迹为犯罪现场遗留下来的肉眼不可直接观察到的血迹。

6. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,通过所述AIE分子来检测潜在血迹中的血迹形状形态和指纹。

7. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述潜在血迹为新鲜血迹或陈旧血迹。

8. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述潜在血迹提取自不同材料表面。

一种用于检测潜在血迹的AIE分子及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及材料复合及荧光探针技术交叉领域,具体涉及一种用于检测潜在血迹的AIE分子及其应用。

背景技术

[0002] 公共安全不仅是人们最基本的需求之一,也是社会经济稳定和发展的前提。刑事科学技术的发展极大的增强了社会安全,因为刑事科学技术通过提供可靠的检验证据成功地辅助了司法公正,例如,定位犯罪嫌疑人以及保护受害者,这些可以增加犯罪的成本和风险,对于犯罪防御也有重要意义。

[0003] 在许多暴力犯罪现场,都会出现血迹。通过有效的手段对犯罪现场血迹进行处理,可以得到大量关于犯罪现场尤其是潜在的犯罪现场的潜在物证信息,这为犯罪现场调查和重建提供了有力证据。但是,许多犯罪者为了逃避法律惩罚而清理或破坏犯罪现场和证据。即使现场未被破坏,直接提取现场血迹形态仍然难度很大。所以,发展刑事技术来显现不可见的血迹形态并从背景干扰中区分血迹形态。

[0004] 目前,已经开发了许多高分辨率和灵敏度的潜在血迹显现技术。早期基于颜色变化的染料包括酚酞、四苯基联苯胺、孔雀石绿都可以显现不可见的血迹(Luminescence 2006,21,214-220),但是仍然存在低灵敏度和低对比度的问题。基于发光的显现方法因为其高灵敏度得到了更广泛的应用。最近,基于荧光素(U.S.Patent 5,976,886A,1999.)和基于鲁米诺的发光显现方法已经商业化(Talanta 2007,72,896-913),这些技术都是通过血液中血红素催化氧化反应而发光的,反应机理分别是光致发光(PL)和化学发光(CL)。虽然以上这些显现技术都已经应用在实际的犯罪现场勘查中,但仍然存在很多问题:第一,荧光素具有光漂白现象(Biophys.J.1995,68,2588-2600.),而鲁米诺的发光时间极短(Luminescence 2001,16,295-298),不利于勘查人员提取血迹形态证据;第二,两种试剂都需要现配现用,例如基于荧光素的方法需要用锌粉活化,而鲁米诺因稳定性不佳需要长期在低温避光条件下保存;第三,其他物质也可以催化氧化反应造成假阳性发光;第四,两个体系的反应条件都具有破坏性,可能会对进一步提取证据造成影响,例如,荧光素方法用的锌粉可能会损坏DNA,鲁米诺产品需要使用有氧化性质的双氧水。因此,基于以上问题,血迹显现需要一种非破坏性的方法。

发明内容

[0005] 本发明提供一种用于检测潜在血迹的AIE分子,所述AIE荧光分子为四苯乙烯马来酰亚胺,所述四苯乙烯马来酰亚胺与血液中的白蛋白反应后形成四苯乙烯琥珀酰亚胺而具有荧光性质。

[0006] 在本发明提供的AIE分子中,所述四苯乙烯马来酰亚胺与血液中的白蛋白反应后在紫外灯激发下发出青蓝色荧光。

[0007] 在本发明提供的AIE分子中,所述四苯乙烯马来酰亚胺与血液中的白蛋白反应后

对血液中的DNA分子具有无损性。

[0008] 本发明还提供一种如上所述的AIE分子在检测潜在血迹中的应用。

[0009] 在本发明提供的应用中,所述潜在血迹为犯罪现场遗留下来的肉眼不可直接观察到的血迹。。

[0010] 在本发明提供的应用中,通过所述AIE分子来检测潜在血迹中的血迹形状形态和指纹。

[0011] 在本发明提供的应用中,所述潜在血迹为新鲜血迹或陈旧血迹。

[0012] 在本发明提供的应用中,所述潜在血迹提取自不同材料表面。

[0013] 实施本发明的用于检测潜在血迹的AIE分子及其应用,具有以下有益效果:本发明以马来酰亚胺官能化具有聚集诱导发光(AIE)性质的分子TPE-MI作为探针,通过与血浆中最主要的蛋白质-白蛋白进行无催化剂的点击反应,反应后在紫外灯下发出青蓝色荧光,实现对肉眼不可见的血迹的检测和显现;该方法具有操作简单、高灵敏度、无损DNA和适用性广的优点,目前最常用的血迹检测试剂鲁米诺发光时间仅几十秒,而基于AIE的方法表现出极强光稳定性,经处理的血迹样品在一年后仍具有较强荧光;此外,该方法在模拟犯罪现场的血迹形态检测中表现出的高分辨优势,可显现清洗后的陈旧血迹形态以及血指纹。

附图说明

[0014] 图1为本发明的反应机理和工作示意图;

[0015] 图2(A) TPE-MI与白蛋白(HSA)反应的荧光光谱;(B-C) TPE-MI与半胱氨酸反应物的AIE曲线;(D-F) 加TPE-MI前后血浆中不同成分(包括无机盐、有机小分子、蛋白质)的荧光光谱和柱状图;

[0016] 图3(A-D) 在日光灯下拍摄的血迹照片;用TPE-MI (2.5mM) 显现后,在(E-H) 254nm和(I-L) 365nm紫外灯激发下拍摄的血迹的荧光照片;(M-P) 用(0.4mM) 鲁米诺/过氧化氢工作溶液显现血迹的照片;

[0017] 图4. 鲁米诺会产生假阳性的血迹信号:(A-D) 鲁米诺处理之前和之后的(E-H) 血迹;比例尺:1厘米;

[0018] 图5光稳定性比较:(A) 鲁米诺/过氧化氢工作溶液在稀释血液中的动力学化学发光光谱;[鲁米诺]=400 μ M, [H₂O₂]=0.6%, 血液稀释系数=100倍;(B) 发光信号的比较:黑线:鲁米诺随时间变化的信号强度(%);红线:用405nm激光以0.10mW的功率激发的TPE-MI (2.5mM) 的光稳定性;37分钟以11.1s的增量获取数据;(C-H) 用TPE-MI显现的血迹:(C和G) 分别是在日光灯下1个月内和1年后用TPE-MI显现的潜在血迹;(D, E, F, H) 染色的血迹放置1天、7天、30天和1年后在365nm紫外线下照片;(I) 用1.3mM鲁米诺/过氧化氢工作溶液显现的血迹照片。比例尺:1厘米(C-H);5厘米(I);

[0019] 图6(A-C) TPE-MI与(D-F) 另一种HSA响应的聚集诱导发光分子(BSPOTPE) 之间的比较:将TPE-MI和BSPOTPE滴在空白载玻片上,在室温下放干后分别在明场和荧光场拍照:(C&F) TPE-MI和BSPOTPE的结构;比例尺=50 μ m;

[0020] 图7(A-C) TPE-MI与(D-F) ACQ染料(FITC-MI) 的比较:将血液滴在载玻片上,并放在室温下风干;染料使血迹显现,并在(A&D) 明场和(B&E) 紫外光激发下通过荧光显微镜拍摄照片;(C&F) TPE-MI和FITC-MI的结构;比例尺=50 μ m;

[0021] 图8为陈旧血迹的显现：将稀释的血液滴在载玻片上，并在室温下放置多日，用TPE-MI溶液显现血迹，并在日光灯下(A)和(B-H)紫外灯下拍摄照片；(B-H)分别是1、2、4、7、10、21、25天的陈旧血迹；比例尺：50毫米；

[0022] 图9为本发明适用于不同材料的表面：(A,E)塑料；(B,F)金属；(C,G)棉；(D,H)玻璃；在(A-D)365nm紫外灯照射和(E-H)日光灯下拍摄照片；(I,J)通过将稀释了100倍的血液喷溅到渗透性的醋酸纤维纸上而形成的喷溅血迹形态；然后用TPE-MI溶液喷在纸上；在(I)365nm紫外灯激发和(J)普通日光灯下拍摄照片；显现后，即使受到自发荧光的干扰，在紫外灯激发下也更容易观察到痕迹；

[0023] 图10为在模拟犯罪现场中血迹显现两个案例：显现洗过的血迹流动形态；将血喷洒在玻璃片上(A)，待干后，将用水冲洗并放置14天；然后用TPE-MI(2.5mM)喷涂玻璃表面，并在(B)日光灯和(C)365nm紫外灯下拍照；(D,E)分别在图11A和C中指示的放大区域；比例尺：5厘米(A,B,C)；2厘米(D和E)；

[0024] 图11为在两个模拟犯罪现场中血迹显现示范：显现血指纹。(A)在日光灯下拍摄的潜血指纹照片(B)在暗室中用鲁米诺工作液处理过的血指纹照片。(E&F)分别放大了图11B的白色和绿色虚线正方形区域。(E)通过共聚焦显微镜在405nm激光激发下拍摄的TPE-MI处理后的血指纹照片。(F)图11E中的放大区域以显示2级和3级指纹特征。比例尺：2.5毫米(A,B,E)；1毫米(C,D,F)。(G)图11C和11F中虚线的灰度值分析。(H)单链DNA的琼脂糖凝胶电泳。泳道1：不处理(对照)；泳道2：用鲁米诺(1mM)处理；泳道3：用TPE-MI(200 μ M)处理；泳道4：用TPE-MI(500 μ M)处理。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图和实施例，对本发明的基于聚集诱导发光特性的有机硼光敏剂及其制备方法和应用作进一步说明：

[0026] 本发明提供一种具有聚集诱导发光性质的分子来实现犯罪现场的潜在血迹显现。

[0027] 本发明中的血迹检测试剂是四苯乙烯马来酰亚胺(TPE-MI)，它可以在温和条件下与血清白蛋白中的巯基发生点击反应，反应后分子由于在蛋白空腔中被限制了运动进而在紫外灯激发下发出青蓝色荧光。

[0028] 本发明提出的分子TPE-MI本身不发光，但在与人血清白蛋白(HSA)反应上裸露的巯基反应后，形成了TPE-SI分子，具有了AIE性质，加上分子上的四个苯环转子由于卡在HSA的空腔之中，限制了转动，便在紫外灯的激发下，发出青蓝色的荧光(如图1)。将TPE-MI分子制成工作溶液，可以用来检测和显现犯罪现场被清洗或破坏过的潜在血迹，为现场勘查人员提供案件线索，帮助侦查人员提取犯罪证据。

[0029] 本发明提出的潜在血迹指的是犯罪现场遗留下被犯罪者清洗或破坏后的血迹，以及浅淡、褪色、霉变和遗留在颜色相近客体上的血迹。这些血迹不易被肉眼直接发现和鉴别，需要用试剂进一步检测才能确定。

[0030] 为了验证本发明的反应机理，我们首先通过测试DMSO/水混合溶剂中的一系列荧光光谱来研究荧光性质。在聚集状态(水含量为90%)下，纯TPE-MI的几乎不发光(如图2A，黑线)。与HSA和半胱氨酸反应后，在不同比例的DMSO/水混合物中分别在470nm处观察到一个强峰，如图2A和2B所示。半胱氨酸/TPE-MI反应产物具有典型的AIE特征，由于高水含量的

荧光团聚,其发射随着水分数的增加而变得更强。HSA中有35个半胱氨酸,其中34个形成二硫键,只有一个游离的。我们进一步评估了血液中其他成分使TPE-MI发光的可能性。各种无机盐(氯化钠,氯化钙,硫酸铁(II),硫酸钾),小分子(谷胱甘肽(GSH),半胱氨酸,果糖,蔗糖,葡萄糖,尿素)和蛋白质(血红蛋白,转铁蛋白,纤维蛋白原)的荧光在没有TPE-MI的情况下(图2D)和在有TPE-MI的情况下(图2E)测量的强度以及发光强度比(I/I_0)总结在图2F中。与其他成分相比,HSA在使TPE-MI发光中起关键作用。即使对于包含巯基的小分子,例如,GSH和半胱氨酸,由于缺乏空腔所致的限制分子内转动(RIM),荧光增强也不显著。

[0031] 本发明提出了一种基于聚集诱导发光分子的潜在血迹显现方法,利用TPE-MI的化学和光物理特性,可以高分辨率和高对比度显现潜在的血迹,且形态可持续长达一年之久。此外,反应原理的特异性不仅提高了可靠性,而且还允许收集其他证据,例如潜在的血迹形状形态和指纹,而这些证据无法使用基于血红蛋白催化氧化的主流方法来完成。其他优点包括操作简单,对广泛材料上新鲜和陈旧的血迹的适用性以及DNA的非破坏性,本发明还进一步验证了其在血迹检测中的实际应用。

[0032] 实施例1

[0033] 评估了TPE-MI的性能,并将其与鲁米诺进行了比较,鲁米诺是CSI最常用的方法,因为它比其他方法具有更高的灵敏度。将血液稀释1到1000倍,将其滴在载玻片上,并在空气中干燥,从而产生从可见到潜伏的血迹(图3A-D)。然后将TPE-MI溶液或鲁米诺工作溶液喷在血迹上,然后拍照。但是,由于鲁米诺不稳定且其工作溶液保存不到一天的时间就会失效,因此必须保护鲁米诺粉末免受光照和高温的影响,因此应重新制备其溶液。对于TPE-MI,它可以在室温条件下存储,其溶液的保质期超过6个月,这使该过程更加方便实用。

[0034] 与通过鲁米诺观察到的血迹相比,TPE-MI表现出高灵敏度(图3)。显然,当用254和365nm紫外灯激发时,TPE-MI能够特异性检测血液区域(图3E-H和图3I-L)。即使稀释倍数为1000几乎无法用肉眼识别出血迹,仍可以看到TPE-MI显现之后的青色光,以识别血液区域并以高分辨率和高对比度显现其形态。相反,尽管鲁米诺可以通过化学发光表明中存在血迹,但模糊的发光(尤其是对于稀释的血迹)显现的效果更差,有时可能会产生假信号,如图4所示,这可能是由于氧化催化剂的扩散所致。

[0035] 本发明使用TPE-MI的另一个优势是它在显现血迹方面的寿命很长。鲁米诺的使用可能会受到快速氧化过程的影响。图5A显示了5分钟内记录的CL光谱,峰强度总结在图5B中。CL强度呈指数衰减,在250秒便衰减到发光可忽略不计。相比之下,TPE-MI在连续强激光照射35分钟(图5B)后,荧光强度降低了不到30%(图5B),证明了其出色的光稳定性。当需要收集可靠的信息时,本发明的优势更加突出。如图5C-F所示,在30天内未观察到荧光强度的显着降低。即使对于用TPE-MI显现并在室温保存1年后仍可在有血迹的地方观察到荧光(图5G-H)。但是,在使用鲁米诺处理仅仅42秒后,蓝色发光迅速消失(图5I)。对于现场勘查人员来说,这么短的时间内可能会给识别和记录血迹形态带来困难,尤其是在比较大的区域内寻找血迹时。

[0036] 实施例2

[0037] 本发明除了比传统的鲁米诺方法具有更高的灵敏度和稳定性外,与其他荧光染料相比,它在血迹显现方面的优势也得到了进一步证明。例如,已经报道了的另一种AIE分子,1,2-双[4-(3-磺酰基丙氧基)苯基]-1,2-二苯乙炔钠(BSPOTPE),用于可视化HAS在溶液中

折叠和非折叠构象。但是,由于BSPOTPE在没有血迹的地方,在固态时仍会发光,因此无法检测血迹(图6)。另外,对于具有聚集导致猝灭(ACQ)的染料,例如荧光素5-马来酰亚胺,由于其在溶液中会发出强绿色荧光,因此也不适用于血迹的检测(图7)。

[0038] 实施例3

[0039] TPE-MI在刑事科学技术应用中的可行性还可以通过显现玻璃表面上陈旧的血迹来证明。例如,对于暴露在室外25天的血迹,使用TPE-MI处理仍然可以成功显现其血迹形态(图8)。对于各种不同材料表面的血迹,包括玻璃,金属和塑料等非渗透性表面,以及棉纸和纤维素纸等渗透性表面,即使存在自发荧光干扰,血迹的形态仍可与背景区分开(图9)。

[0040] 实施例4

[0041] 在模拟犯罪现场中血迹显现案例一:血迹轨迹和形态对于犯罪现场重建至关重要。图10A显示了一个模拟的犯罪现场,首先将血液喷射在20x 20厘米的玻璃板上,待风干后,用水冲洗,直到原始血迹形态被肉眼看不见为止。将玻璃板进一步在室温下放置14天,以模仿犯罪现场往往不能被及时发现的真实情况。然后,在表面喷TPE-MI溶液(图10B)。在紫外灯照射下,与原始血迹相比,潜在血迹形态被完全恢复(图10A和C)。图10D和E对比了原始血迹和经TPE-MI显现的潜在血迹的相同放大区域。显然,血迹的流动痕迹和飞溅的形态都可以在高分辨率下成功恢复。这些信息不仅表明在认定犯罪现场中血迹起到的重要作用,而且对犯罪现场勘查有参考价值,因为它可以通过分析血迹形态来帮助区分他杀案和自杀案。

[0042] 在模拟犯罪现场中血迹显现案例二:TPE-MI的更重要应用是显现犯罪现场中接触血迹以直接定位犯罪者。接触血迹在犯罪现场调查中起着重要作用,因为它是由与犯罪者接触的现有血液造成的,留下了诸如鞋印和指纹之类的痕迹。指纹检索在追踪犯罪者时非常有用,因为它提供了犯罪嫌疑人是否涉案的直接证据。图11A是由蘸有稀释血液的拇指捺印的潜在指纹,指纹在日光灯下肉眼不可见。经过TPE-MI处理后,可以清晰地显示出指纹。如图11E所示,可以容易地区分乳突花纹纹型,即1级指纹特征。对乳突花纹的局部分析(图11F放大区域中所示的2级指纹特征)表现了指纹的特征分叉,交叉和终止特征。更引人注目的是,图11F中的圆圈清楚地反映了3级特征,它表示指纹乳突花纹的汗孔精细结构。3级特征可以为定位犯罪者提供重要的信息,但却很少有文献或专利在此前报道过可以显现血指纹3级特征的方法。我们进一步比较了鲁米诺方法显现血指纹,不过显现的指纹非常模糊不清(图11B)。由于双氧水反应过程中产生了许多气泡,所以大部分指纹纹线都被破坏了(图11C),即使对于出现某些指纹特征的有限区域(图11D),分辨率也很差,并且乳突花纹特征是源于气泡还是指纹本身尚无定论。最后,将如图11C和11F中的虚线位置进行灰度值分析,相比之下,用TPE-MI方法显现血指纹的信噪比(图11G)优于使用鲁米诺方法。

[0043] 除了从流动血迹和接触血迹获得有用的信息外,TPE-MI对DNA的无损性质进一步证实了其在刑事技术中的适用性,因为在定位血迹后可以收集DNA样本。如图11H所示,琼脂糖凝胶电泳结果表明,即使在高浓度下,TPE-MI也不会降解DNA并且不会干扰随后的DNA分析,这与鲁米诺相似。但是,其他基于荧光素配方的方法TMB和LMG会干扰后续的DNA检测。

[0044] 本发明所包含的信息,在未脱离下述权利要求的精神和保护范围下,本发明各种偏离精确的描述,对于与本发明相关的本领域技术人员来说是显而易见的。本发明并不认为限制在所定义的程序、性质或组成的范围内,因为优选的实施例和其他描述只用于说明

目前提供发明的特定方面。对于在化学、生物化学或相关领域的技术人员来说,实现本发明于各种修改的描述模式,都应属于本发明所附权利要求的保护范围内。

[0045] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进或变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围之内。

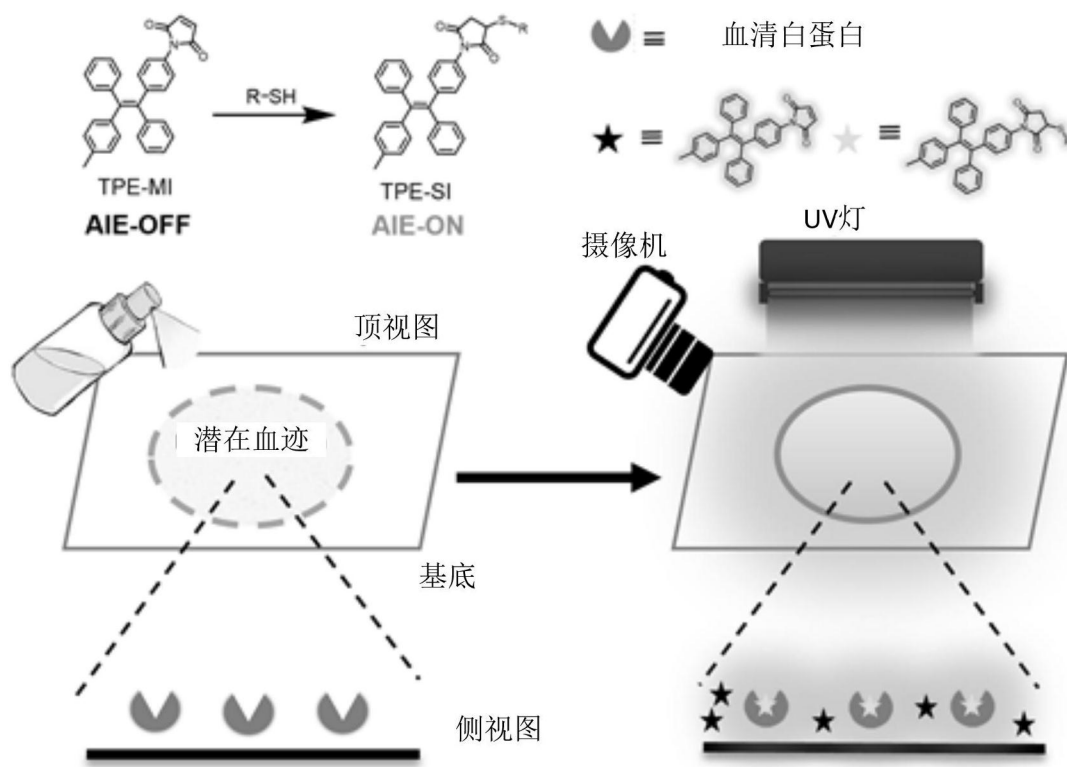


图1

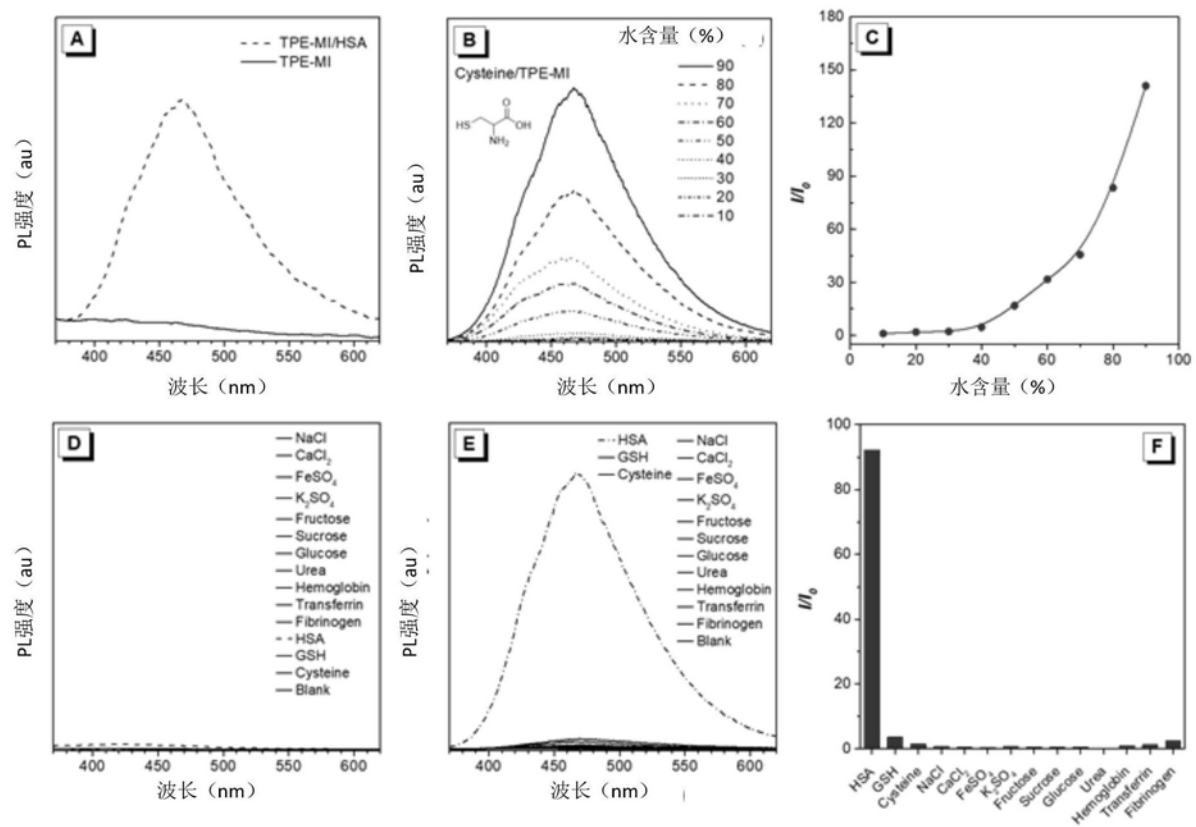


图2

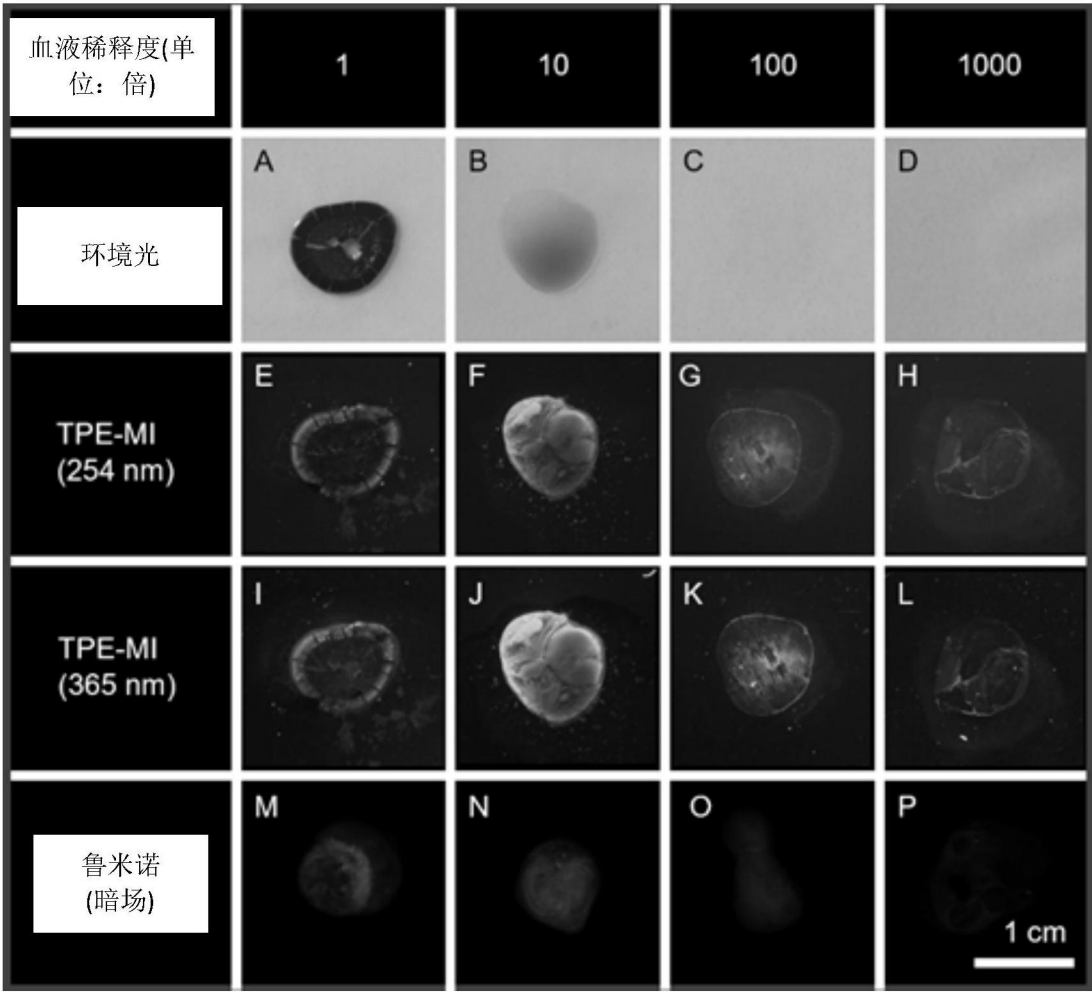


图3

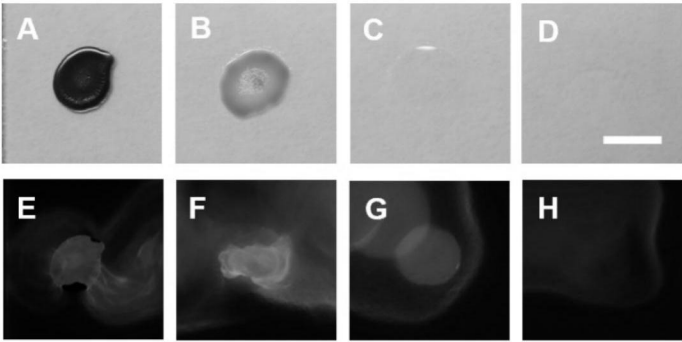


图4

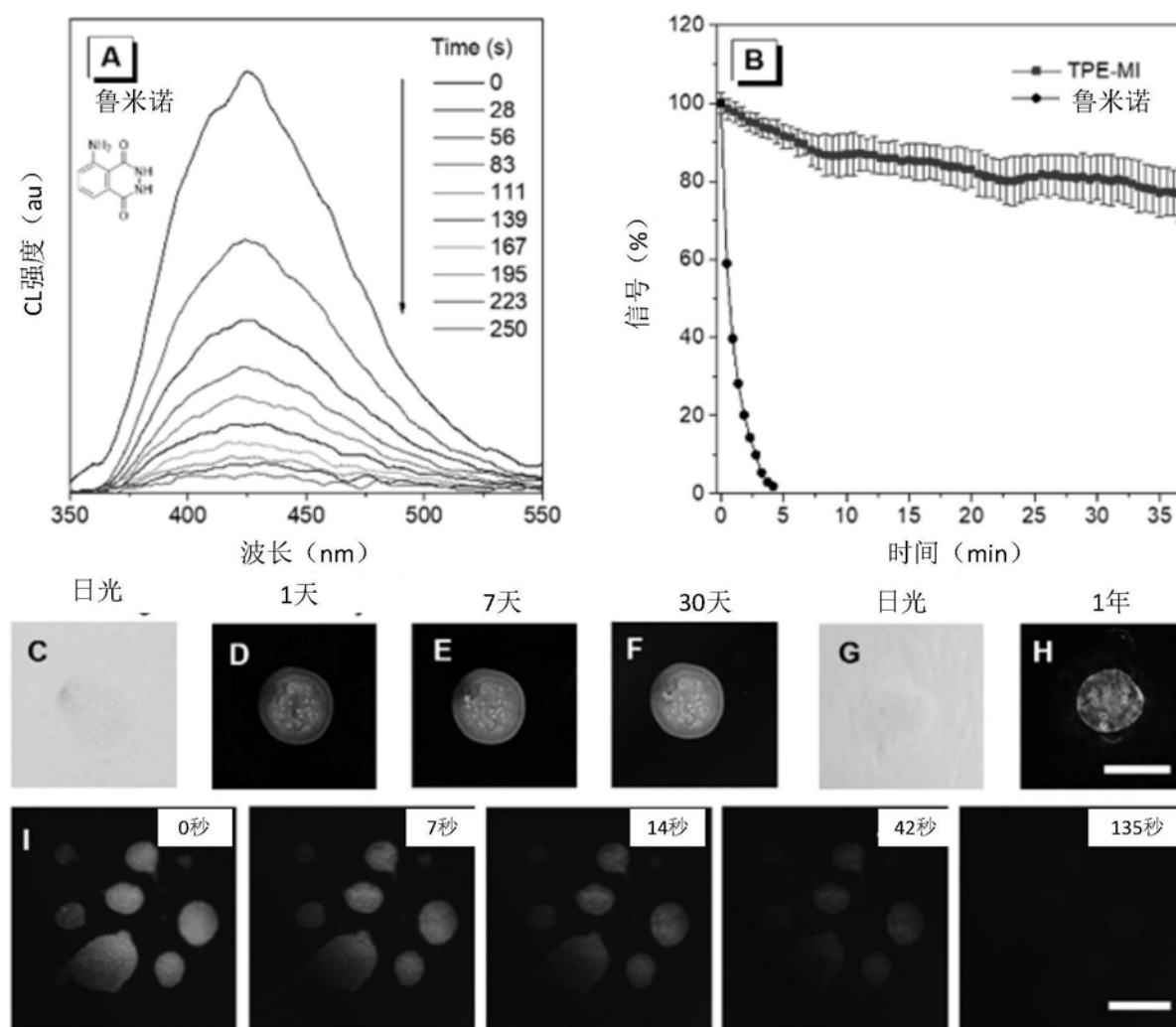


图5

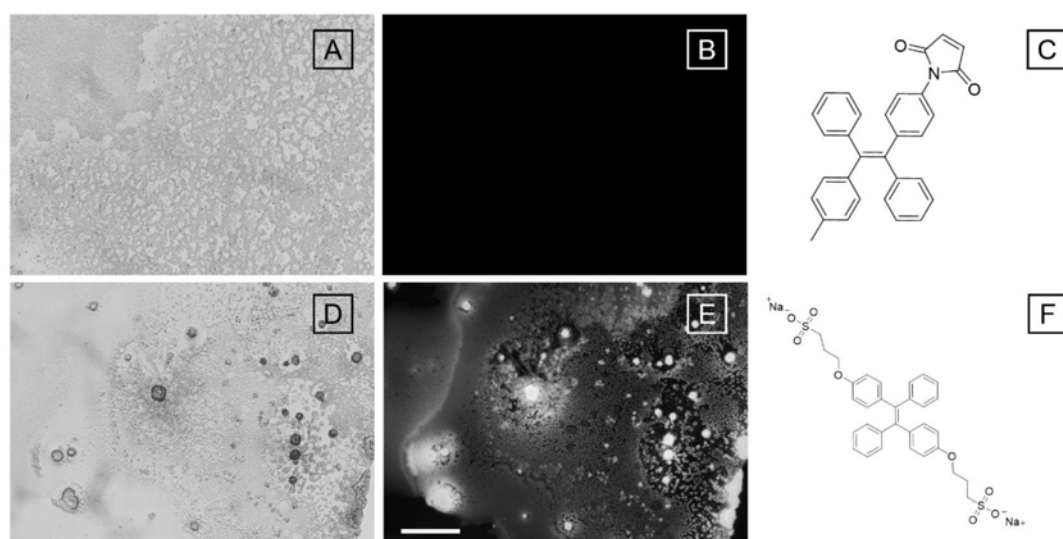


图6

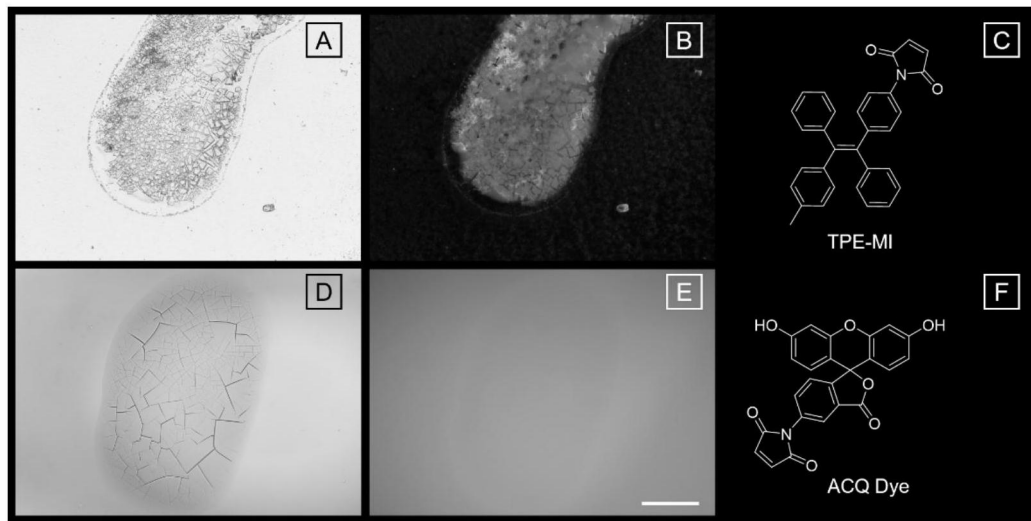


图7

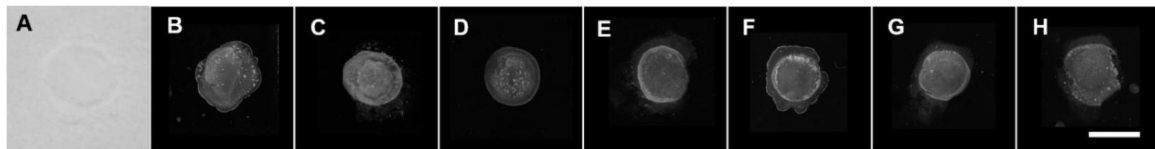


图8

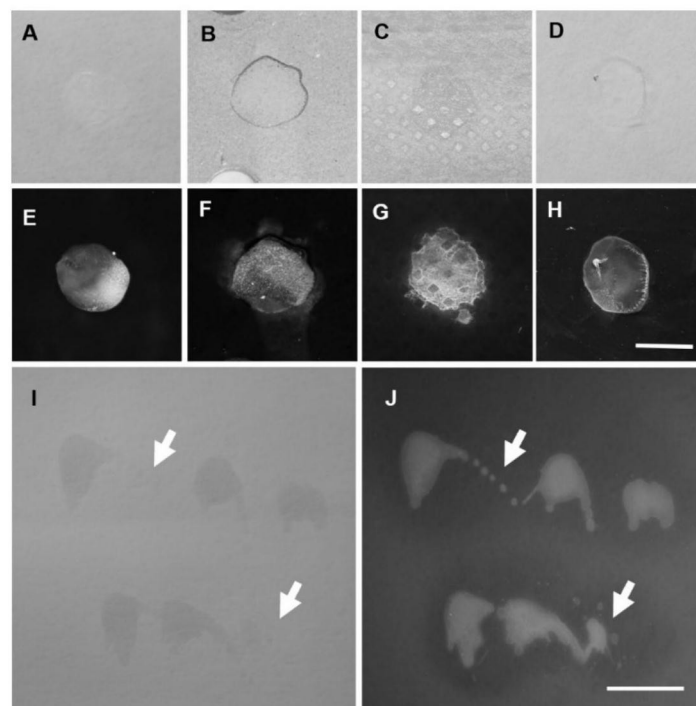


图9

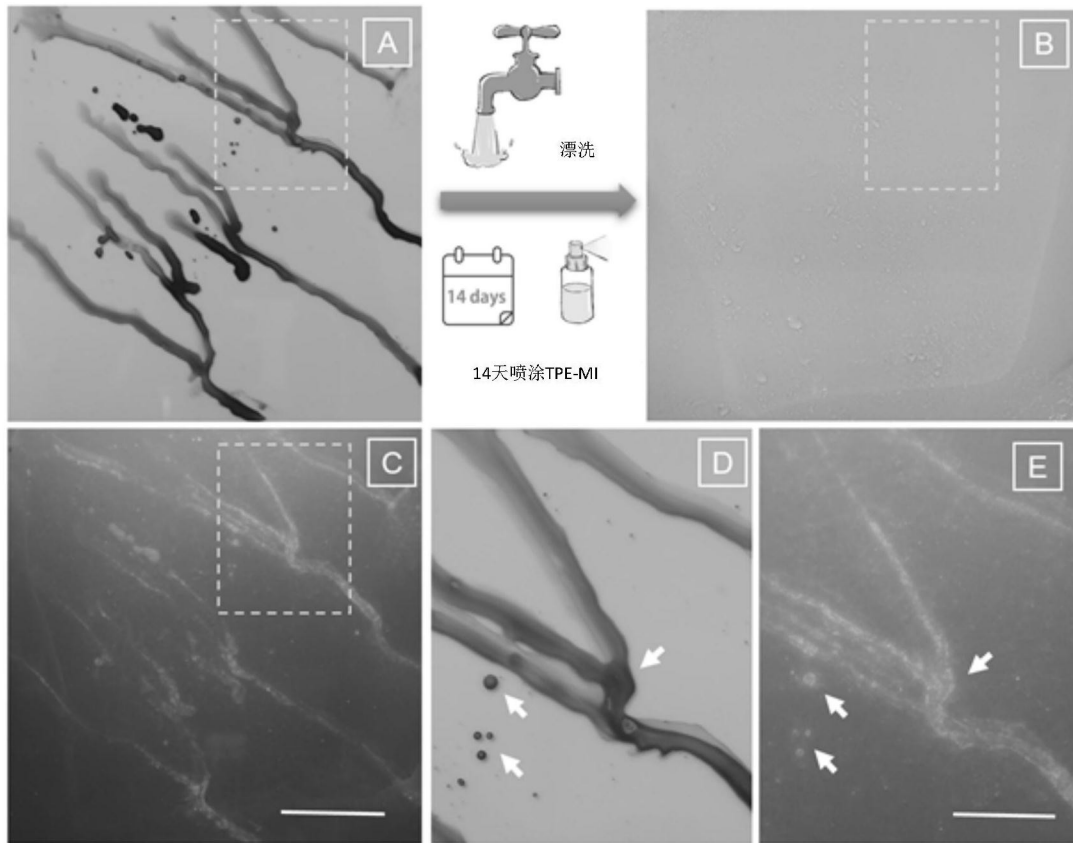


图10

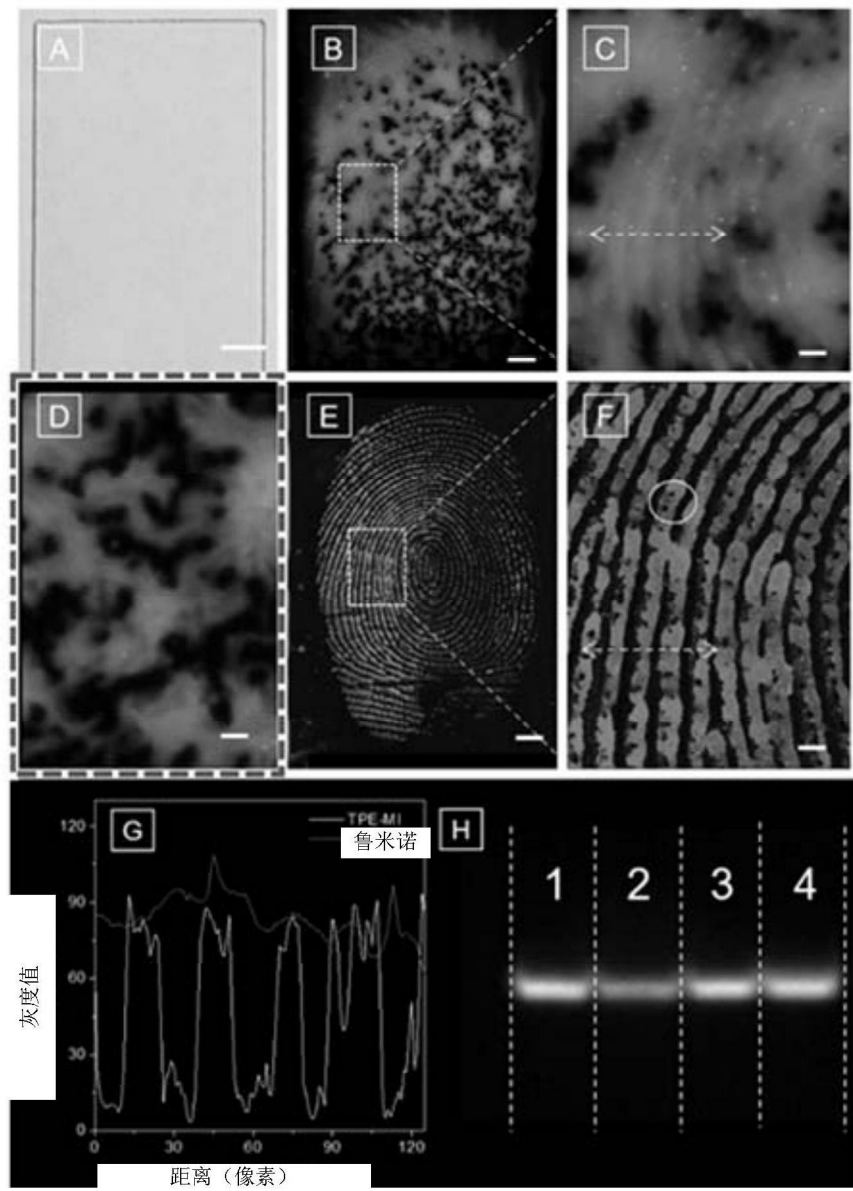


图11