

文章编号: 1000-7032(2026)06-1090-10

水相中稳定上转换荧光纳米探针的构建及其对 硫醇分子的检测

邢 欢¹, 李新平¹, 张 召¹, 鲍国臣^{2*}, 罗玉霞^{1*}

(1. 陕西科技大学 轻工科学与工程学院, 陕西 西安 710021;

2. 悉尼科技大学 科学学院数学与物理科学系, 新南威尔士州 悉尼 2007)

摘要: 硫醇类化合物是生物体内稳态调控与环境监测中的关键目标分子, 开发快速、高灵敏的硫醇检测方法对疾病早期诊断与环境风险管控具有重要意义。荧光探针凭借高选择性、高灵敏度和非侵入性等特点, 已成为检测生物小分子、金属离子及阴离子的关键工具。本文以 IR806 敏化的上转换纳米粒子 (IR806-UCNP) 为核心荧光探针体系, 通过对 UCNP 表面进行聚乙烯亚胺 (PEI) 修饰, 有效改善了探针的分散性与生物相容性, 使其在含水环境中具备良好的亲水性与稳定性。在此基础上, 进一步利用硫醇类分子与 IR806 染料中特定活性基团之间可发生的亲核取代反应, 实现了探针荧光信号对硫醇分子的特异性响应。该 IR806-UCNP 上转换荧光探针由近红外光激发, 能够实现对硫醇化合物在复杂体系中的快速、高灵敏度检测, 对生物体内典型的硫醇分子谷胱甘肽 (GSH) 的检测限低至 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 为后续在生物分析或环境监测中的应用提供了可靠方法。

关键词: 上转换; 荧光探针; 近红外; 硫醇检测

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20260068

CSTR: 32170.14.CJL.20260068

Construction of Stable Upconversion Fluorescent Nanoprobes in Aqueous Phase and Their Detection of Thiol Molecules

XING Huan¹, LI Xinping¹, ZHANG Zhao¹, BAO Guochen^{2*}, LUO Yuxia^{1*}

(1. College of Bioresources Chemical and Materials Engineering,

Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China;

2. School of Mathematical and Physical Sciences, Faculty of Science,

University of Technology Sydney, Sydney 2007, Australia)

* Corresponding Authors, E-mail: guochen.bao@uts.edu.au; luoyuxia@sust.edu.cn

Abstract: Thiol compounds are key molecules for homeostatic regulation and environmental monitoring within biological systems. The development of rapid and highly sensitive thiol detection methods holds significant importance for early disease diagnosis and environmental risk management. Fluorescent probes, owing to their high selectivity, high sensitivity, and non-invasive nature, have emerged as critical tools for detecting bio-small molecules, metal ions, and anions. This study employs IR806-sensitized upconversion nanoparticles (IR806-UCNP) as the core fluorescent probe system. By modifying the UCNP surface with polyethyleneimine (PEI), the probe's dispersibility and biocompatibility were effectively enhanced, conferring good hydrophilicity and stability in aqueous environments. Building upon this, the specific nucleophilic substitution reaction between thiol molecules and particular active groups in the IR806 dye was utilized to achieve specific fluorescence signal response of the probe to thiol molecules. This IR806-UCNP upconversion fluorescent probe, excited by near-infrared light, enables rapid and highly sensitive detection of thiol compounds. It exhibits a low detection limit of 0.1 $\mu\text{mol/L}$ for glutathione (GSH), a typical thiol

收稿日期: 2026-03-06; 修订日期: 2026-03-15

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划一般项目 (2025JC-YBQN-060); 国家自然科学基金 (12004232)

Supported by General Project of the Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province (2025JC-YBQN-060); National Natural Science Foundation of China (12004232)

molecule in biological systems, providing a reliable method for subsequent applications in bioanalysis or environmental monitoring.

Keywords: upconversion; fluorescent probe; near-infrared; thiol detection

1 引言

硫醇类化合物是生物体内稳态调控与环境监测中的关键目标分子,其中含巯基(S-H)的生物硫醇(如半胱氨酸(Cys)、同型半胱氨酸(Hcy)、谷胱甘肽(GSH)、硫化氢(H₂S)等)是维持生命活动的核心物质^[1-2]。半胱氨酸参与氧化还原平衡、蛋白质构象调控及细胞信号传递,其浓度异常与生长迟缓、肝损伤、皮肤病变等疾病密切相关^[3-4];谷胱甘肽作为细胞内主要抗氧化剂,承担氧化应激缓解、解毒及肝功能维持功能,如果谷胱甘肽缺乏易诱发免疫抑制、癌症等病症^[5-6];同型半胱氨酸水平升高则是心血管疾病与阿尔茨海默病的重要风险标志物,且对败血症、高脂肪饮食引起的炎症和结肠炎有治疗作用^[7-8]。此外,高毒性芳香硫醇(如苯硫酚)广泛应用于工业生产,对人体健康和生态环境危害显著,需精准监测其浓度^[9-10]。因此,开发快速、高选择性、高灵敏的硫醇检测方法,对疾病早期诊断与环境风险管控具有重要意义。然而,现有的硫醇荧光检测方法大多依赖有机溶剂体系,难以直接应用于生理环境;同时,常用的紫外-可见光激发光源组织穿透能力有限,且易引起背景荧光干扰和光损伤,限制了其在复杂生物样本中的实际应用。

近年来,荧光探针凭借高选择性、高灵敏度和非侵入性等特点,已成为检测生物小分子、金属离子及阴离子的关键工具,在生物标记与成像领域应用前景广阔^[11-12]。在各类荧光探针中,染料敏化上转换纳米颗粒(UCNP)体系通过“有机-无机杂化”设计,引起了广泛关注。UCNP作为一种无机发光材料,具备优异的化学稳定性、良好的抗光漂白性和独特的大反斯托克斯位移发光特性,使其在复杂生物环境中能够有效避免背景荧光干扰,适用于深层组织的高分辨率成像与检测^[13-15]。而染料敏化技术通过引入具有高摩尔吸光系数的有机染料作为光捕获天线,能够显著增强对激发光的吸收,并将能量高效传递给UCNP,从而有效克服传统UCNP因吸收截面小导致的发光效率低的问题^[16-17]。以IR806染料为例,该体系可由808 nm

激光激发,该波长位于生物组织光学窗口,对血红蛋白和水的吸收较低,因而兼具较强的组织穿透能力和较低的光热损伤风险,有助于维持样本活性并提升深层检测的灵敏度与信噪比^[18-19]。此外,该体系的发光波长可通过调节掺杂离子或组合不同染料进行精准调控,有利于实现多色标记与多重检测。这些特点使其在深组织生物成像^[20-21]、高灵敏度生物检测^[22-23]、长期细胞追踪^[24-25]及多模式诊疗^[26-27]等领域具有重要应用价值,代表了高性能光学探针的未来发展方向。

本研究构建了一种基于IR806染料修饰的上转换纳米粒子荧光探针。该探针采用808 nm近红外光作为激发光源,利用上转换发光技术将低能光子转换为高能光子输出,有效避免了生物样本的自发荧光干扰,显著提升了检测的信噪比。首先通过引入聚乙烯亚胺(PEI)对纳米粒子表面进行功能化修饰,显著提升了上转换纳米粒子在水相中的稳定性,确保了其在水性环境下的稳定应用。在此基础上,利用硫醇分子与IR806染料上的特定活性基团间的亲核取代反应,成功建立了探针荧光信号与硫醇浓度的特异性关联,实现了对生物硫醇分子的低浓度检验,检测限低至0.1 μmol/L。该设计赋予了IR806-UCNP探针在复杂基质中快速、高灵敏度检测硫醇化合物的能力,在生物成像、检测以及疾病治疗等方面有巨大的应用潜力。

2 实验

2.1 样品制备

2.1.1 UCNPs核制备

将7.8 mL YCl₃、2 mL YbCl₃、0.2 mL ErCl₃(浓度均为0.2 mol/L)与8 mL油酸(OA)、15 mL 1-十八烯(ODE)混合,130 °C下加热60 min,冷却至室温后,加入5 mmol NaOH和8 mmol NH₄F的甲醇溶液(10 mL),搅拌30 min后升温至105 °C保持30 min除尽甲醇,冷却并脱气15 min。氮气保护下加热至280 °C反应90 min,冷却后经乙醇/环己烷(2:1)离心洗涤三次以去除未反应的离子及杂质,最终分散于10 mL环己烷中备用^[28]。

2.1.2 核壳结构 UCNP 制备

将 10 mL YCl_3 (用于 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}@\text{NaYF}_4$) 或 9 mL YCl_3 和 1 mL YbCl_3 (用于 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}@\text{NaYF}_4:10\%\text{Yb}^{3+}$) 与 8 mL OA、16 mL ODE 混合, 130 °C 加热后冷却。加入核纳米颗粒的环己烷溶液以及 5 mmol NaOH 和 8 mmol NH_4F 的甲醇溶液 (10 mL), 后续制备流程同核纳米颗粒制备。

2.1.3 OA 去除

采用 NOBF_4 去除 UCNP 表面 OA 配体^[29]。将 1 mg/mL NOBF_4 的 DMF 溶液与 UCNP 环己烷溶液等体积混合, 涡旋反应 15 min 后静置 20 min, UCNP 由环己烷相转移至 DMF 相, 移除上清液, 加入甲苯/环己烷 (1:1) 混合溶剂, 离心 15 min (10 000 r/min), 用乙醇洗涤离心三次, 分散于 DMF 中备用。

2.1.4 PEI 修饰的 UCNP

将 PEI 溶解于乙醇, 配成 10 mg/mL 储备液。将去除 OA 配体的 UCNP 分散于 DMF 中, 与 PEI 乙醇溶液按照不同质量比混合, 超声处理使其均匀, 室温下磁力搅拌 (400 r/min) 反应过夜。反应结束后, 离心 10 min 收集沉淀 (10 000 r/min), 用去离子水洗涤三次, 重新分散于水或缓冲液中备用。

2.2 样品表征

使用 HT7820 透射电子显微镜 (TEM) 对所合成 UCNP 的形貌、平均尺寸和尺寸分布进行表征; 采用傅里叶变换红外光谱仪 Vertex70 对样品基团进行分析; 通过 PerkinElmer Lambda 950 分光光度计测试吸收光谱; FLS 1000 荧光光谱仪 (英国爱丁堡仪器公司) 测试发射光谱和荧光寿命; 采用 808 nm 或 980 nm 脉冲激光 (脉宽 90 μs) 作为激发源, 由 PM-2 脉冲调制器控制。

3 结果与讨论

3.1 核壳 UCNP 合成和性能

将 UCNP 从有机相转移至水相, 是其迈向生物功能材料的关键一步, 但这一过程常面临荧光衰减的挑战。如补充文件图 S1(a) 所示, UCNP 在水中的荧光强度相较于在 DMF 中显著降低, 这主要归因于水分子高能 O—H 键的振动与稀土离子激发态能级的共振耦合, 导致了非辐射能量耗散^[30-31]。因此, 相较于 DMF 体系, UCNP 在水相中位于 541 nm 处的荧光寿命从 139.7 μs 明显缩短至 102.4 μs (图 S1(b)), 证实了水分子振动确实加速了激发态能量的耗散。

针对水分子与 UCNP 核相互作用导致的发光

猝灭问题, 通过构建核壳结构以实现核表面的有效钝化, 从而显著提升上转换发光强度。采用高温溶剂热法, 在已合成的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ 核层外生长两种不同类型的壳层: 其一为纯 NaYF_4 惰性壳层, 主要起物理隔绝与表面修饰作用; 其二为活性壳层, 即在 NaYF_4 基质中进一步掺杂 Yb^{3+} , 旨在增强壳层对近红外光子的捕获与能量传递效率, 进而协同提升整体发光性能。

如图 1(a) 所示, 所制备的核心粒子尺寸约为 27.6 nm, 壳层均匀包覆后, 最终得到尺寸约为 32.6 nm 的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}@\text{NaYF}_4$ 与 30.8 nm 的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}@\text{NaYF}_4:10\%\text{Yb}$ 两类核壳结构纳米粒子。采用 NOBF_4 进行配体交换, 以去除 UCNP 表面的油酸配体, 通过红外光谱对配体交换前后 UCNP 的表面化学性质进行对比分析 (图 S2)。结果显示, OA-UCNP 在 1 465 cm^{-1} 和 1 568 cm^{-1} 处出现羧酸基团的特征振动峰, 2 854 cm^{-1} 和 2 926 cm^{-1} 处为 C—H 的伸缩振动, 可归属于油酸基团长烷基链, 并随着油酸基团的减少, 其强度明显减小, 羧酸基团在 1 500~1 200 cm^{-1} 区间的振动峰也明显降低。同时, 在 1 084 cm^{-1} 处出现 NOBF_4 的 BF_4^- 特征振动峰, 并在约 1 658 cm^{-1} 处出现 DMF 分子中 C=O 伸缩振动所引起的新吸收峰。以上结果表明, NOBF_4 成功实现了与 UCNP 表面 OA 配体的交换。

荧光光谱测试进一步表明 (图 1(b)), 与纯核结构相比, 核壳结构表现出显著增强的发光性能。当以 NaYF_4 为惰性壳层时, 上转换强度提升了 5.8 倍, 尤其当壳层采用 $\text{NaYF}_4:10\%\text{Yb}$ 作为活性壳层时, 其上转换发光强度均得到进一步显著提升, 提升倍数为 15.2 倍, 说明该壳层在促进能量传递与发光效率方面具有明确优势。

使用有机染料 IR806 作为光捕获天线, 可克服传统上转换纳米颗粒吸收截面小的局限, 进一步增强发光。如图 1(c) 所示, IR806 在 600~850 nm 范围内展现出宽吸收带, 最大吸收峰位于 820 nm, 其荧光发射范围覆盖 900~1 000 nm, 与 Yb^{3+} 离子的吸收光谱高度重叠。这一光谱匹配确保了 IR806 与 UCNP 之间能够实现高效的能量传递。在 808 nm 激光激发下, IR806 被激发至单重态激发态 (S_1), 随后通过系间窜越 (ISC) 到达三重态 (T_1), 能量可从 S_1 态和 T_1 态有效转移至 UCNP 中的 Yb^{3+} 离子, Yb^{3+} 进一步将能量传递给 Er^{3+} 离子, 从而产生上转换发光 (图 1(d))。然而, 尽管采用

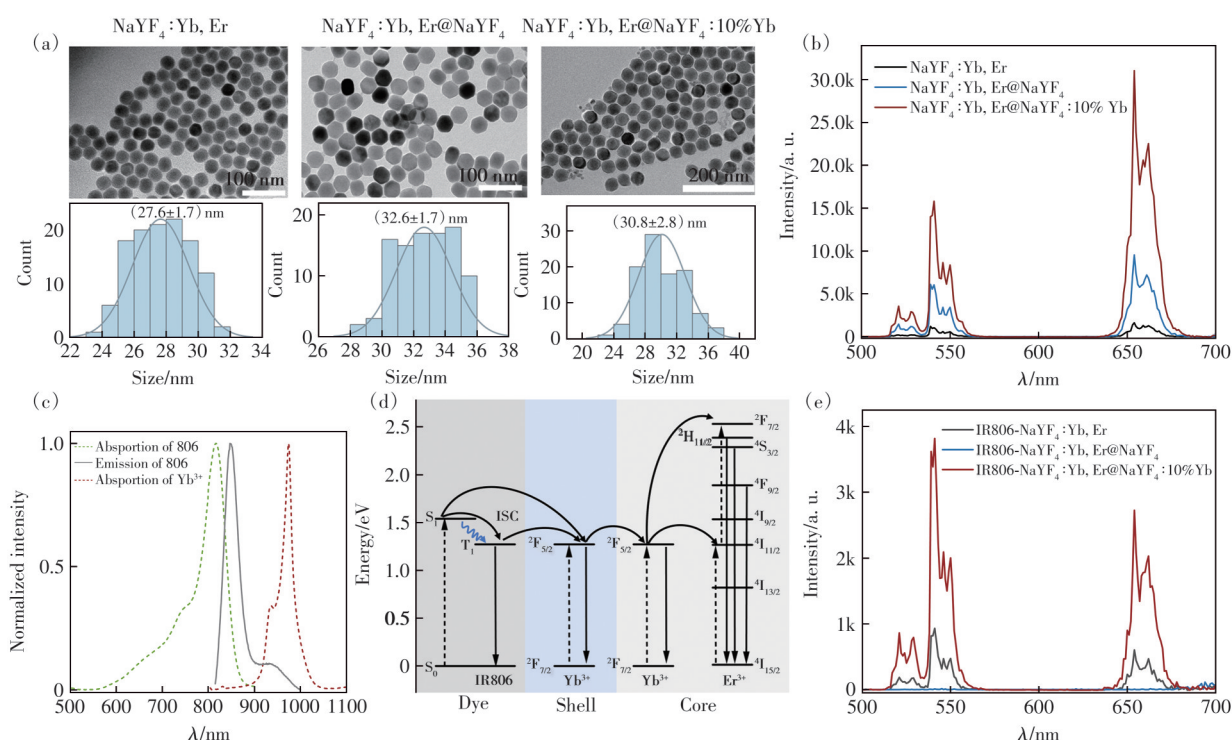


图1 (a)核、两种核壳 UCNP 的 TEM 图像及粒径分布图;(b)980 nm 激发下,核与两种核壳结构的 UCNP 在水中的荧光强度对比;(c)IR806、Yb³⁺的吸收和发射光谱;(d)IR806 染料与 UCNP 间的能量传递示意图;(e)808 nm 激发下,IR806 染料敏化核与两种核壳结构的 UCNP 在水中的荧光强度对比

Fig.1 (a) TEM images and particle size distribution of core and core-shell UCNP. (b) Fluorescence intensity comparison of core and core-shell structures in water under 980 nm excitation. (c) Absorption and emission spectra of IR806 and Yb³⁺. (d) Energy transfer between IR806 dye and UCNP. (e) Fluorescence intensity comparison of IR806 dye-sensitized core and core-shell structures in water under 808 nm excitation

NaYF₄:Yb,Er@NaYF₄ 核壳结构可增强上转换发射,但常规的惰性六方相 β -NaYF₄ 壳层却阻碍了 IR806 向 UCNP 的能量转移^[20]。当在壳层中引入 Yb³⁺ 后,染料敏化效果显著提升,提升倍数为 4.1 倍,表明活性壳层在促进染料与纳米颗粒之间的能量传递过程中发挥着关键作用(图 1(e))。因此,后续选用 NaYF₄:Yb,Er@NaYF₄:10%Yb 核壳结构的 UCNP 进行主要研究。

3.2 PEI 修饰的 UCNP 表征及分析

当直接将上转换纳米颗粒转移至水环境中时,颗粒会逐渐溶解,稀土离子从基质中流失,导致其上转换发光强度减弱。同时,溶解过程中释放的 F⁻、Ln³⁺ 和 Y³⁺ 等离子具有一定的生物毒性(尤其是氟离子),从而带来潜在的安全风险^[32-33]。因此,在 UCNP 表面构建稳定的“隔水保护层”,有效抑制其在水性环境中的溶解,是推动该类纳米材料在生物医学等领域实际应用的关键。

聚合物包覆是改善上转换纳米粒子水溶性和生物相容性最常用且有效的方法之一。因此,相

较于裸无机壳层,在 UCNP 外进一步包覆 PEI(聚乙烯亚胺)将实现材料体系从疏水到亲水、从单一功能到多功能的根本转变。如图 S3 所示,PEI 通过其链上大量带正电荷的胺基,不仅能通过静电排斥作用使 UCNP 在水中稳定分散,更关键的是,这种亲水性与后续的生物功能化(如连接靶向分子、负载基因药物)直接兼容,使得 PEI 包覆在生物医学应用上更具效率与集成性优势。

如图 2(a)所示,被 PEI 修饰的 NaYF₄:Yb,Er@NaYF₄:10%Yb 核壳结构上转换纳米颗粒(PEI-UCNPs)与未修饰的颗粒(NOBF₄-UCNPs)相比,样品在 3 438 cm⁻¹ 处出现明显增强的宽化吸收谱带,这归属于 PEI 中 N—H 键的伸缩振动,表明氨基基团已被成功引入纳米颗粒表面。此外,在 2 958 cm⁻¹ 和 2 846 cm⁻¹ 处出现的两个特征吸收峰,可分别指认为亚甲基(—CH₂—)的不对称和对称伸缩振动,进一步证实了 PEI 链段的存在。同时,在 1 110 cm⁻¹ 附近观察到一处清晰的尖锐吸收带,该信号来源于 C—N 键的伸缩振动,为 PEI 与 UCNP 表面之间的化学

连接提供了直接证据。接下来,对不同浓度 PEI 修饰的 UCNP 的荧光性能进行了研究。如图 2(b) 所示,荧光光谱测试结果表明,随着 PEI 浓度的增加,UCNP 在水中的荧光强度逐渐增强。这是因为 PEI 通过配体交换使 UCNP 由疏水转为亲水,同

时其携带的正电荷在颗粒间产生静电排斥,提高了纳米颗粒的分散性,从而有效抑制了聚集诱导的荧光猝灭;另一方面,PEI 包覆能在一定程度上隔离水分子与 UCNP 表面的直接接触,削弱了水分子高频振动对激发态能量的猝灭作用^[34-35]。

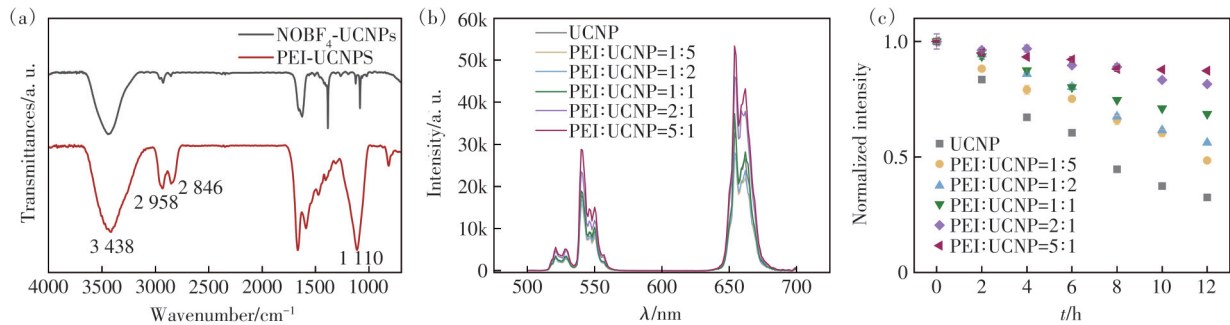


图 2 (a)NOBF₄-UCNPs 和 PEI-UCNPs 的傅里叶红外光谱;(b)不同质量比 PEI 修饰的 UCNP 在水中的荧光光谱;(c)不同浓度 PEI 修饰的 UCNP 在水中的稳定性

Fig.2 (a) Fourier infrared spectroscopy of NOBF₄-UCNPs and PEI-UCNPs. (b) Fluorescence spectra of UCNP modified with PEI at different ratios in water. (c) Stability of UCNP modified with PEI at different concentrations in water

然而,高浓度 PEI 形成的较厚的包覆层在增强 UCNP 在水中的荧光强度同时,也会对染料敏化上转换纳米粒子的发光效果产生不利影响(图 S4)。随着 PEI 修饰质量的上升,染料敏化上转换荧光强度逐渐下降。这是由于 PEI 作为高分子聚合物层,在空间上显著阻隔了染料分子与 UCNP 核心中镧系离子的接近,增大了供体-受体之间的物理距离,而能量转移效率对距离高度敏感,从而导致能量转移效率下降;此外,PEI 富含氨基,其表面携带的高密度正电荷虽有利于初始静电吸附,但过量时会导致染料分子发生过度、非特异性的静电吸附,使染料在 UCNP 表面密集堆积、分子间距过小,引发浓度猝灭效应^[36-37]。

进一步考察了裸露 UCNP 及不同比例 PEI 修饰的 UCNP 在水中的稳定性。结果表明,裸露 UCNP 在水中的稳定性显著低于经 PEI 修饰的样品。未经修饰的 UCNP 在水中分散 12 h 后,其荧光强度下降至初始值的 32.5%;而经 PEI 修饰(PEI 与 UCNP 质量比分别为 1:5、1:2、1:1、2:1 和 5:1)的样品在相同条件下荧光强度保持为初始强度的 48.5%、56.1%、68.6%、81.5% 和 87.3%(图 2(c))。综合考虑稳定性及其在染料敏化上转换中的表现,后续实验选用 PEI 与 UCNP 质量比为 2:1 的上转换纳米颗粒进行研究。

3.3 硫醇的检测

检测生物体内硫醇化合物有助于评估细胞的

氧化还原状态,因为它们作为关键的抗氧化剂,能清除自由基并维持细胞内环境的稳定。此外,硫醇水平的异常变化是多种疾病(如癌症、心血管疾病和神经退行性疾病)的重要生物标志物,对其进行检测可为疾病诊断、病程监控及药物研发提供关键依据。 β -巯基乙醇(β -ME)凭借其高效还原蛋白质二硫键的能力、良好的水溶性以及较低的成本,已成为生物化学领域应用最广泛、最具代表性的经典硫醇试剂之一^[38-39]。

为探究上转换荧光探针体系对硫醇是否具有响应特性,本研究首先检测了 β -ME 在 250~900 nm 波长范围内的紫外-可见吸收光谱,结果如图 3(a) 所示。 β -ME 仅在 260 nm 附近有一特征吸收峰,而在 500~900 nm 的可见至近红外区间无明显吸收,表明在该波长范围内不存在由 β -ME 引起的重吸收干扰。将不同浓度的 β -ME 直接加入 PEI 修饰的 UCNP 溶液中,并在 980 nm 激发下测试其荧光光谱,结果如图 3(b)、图 S5 所示。 β -ME 对 PEI 修饰的 UCNP 的发光性能无明显影响,以 UCNP 在 541 nm 处的特征峰为例,在相同激发条件下,加入不同浓度 β -ME 后,其荧光强度始终维持在约 9×10^4 左右,表明 β -ME 不会干扰 PEI-UCNP 的发光性质。

接着对不同浓度 β -ME 对 IR806 吸光度的影响进行了系统研究。如图 3(c) 所示,随着 β -ME 浓度的增加,IR806 在特征吸收波长处的吸光度

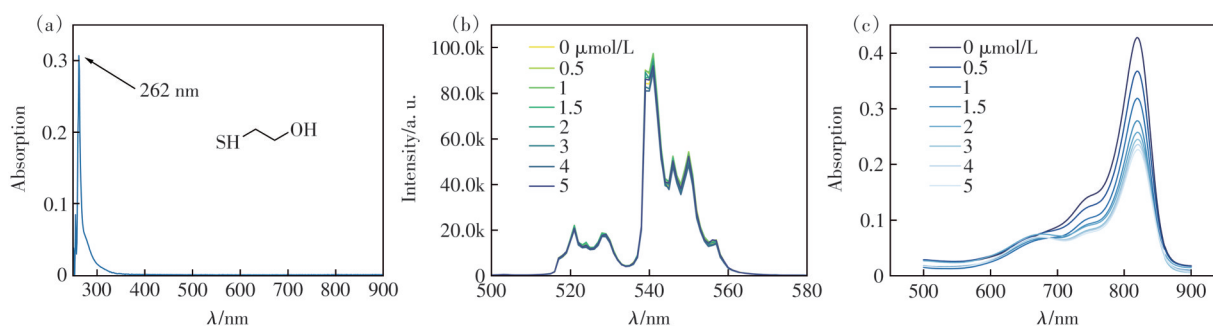


图3 (a) β -ME的结构式及吸收光谱;(b)980 nm激发下,不同浓度 β -ME对PEI-UCNP荧光强度的影响;(c) β -ME对IR806染料(2 μ mol/L)吸收光谱的影响

Fig.3 (a)The structural formula and absorption spectrum of β -ME. (b)The effect of different concentrations of β -ME on the fluorescence intensity of PEI-UCNP under 980 nm excitation. (c)The effect of β -ME on the absorption spectra of IR806 dye (2 μ mol/L)

呈现逐渐下降的趋势。为探究该现象是否源于 β -ME诱导的IR806分子聚集状态改变,进一步设置了不同初始浓度的IR806溶液(包括低浓度1 μ mol/L与较高浓度3 μ mol/L,图S6)进行对比验证。结果表明,在不同IR806浓度下, β -ME引起的吸光度下降趋势均保持一致,且未观察到聚集相关光谱特征的显著变化。因此,可排除 β -ME通过影响IR806分子聚集程度而导致吸光度变化的可能性,提示其作用机制更可能与分子间的化学相互作用或电子结构变化有关。

β -ME及IR806结构显示(图4(a)), β -ME分子中含有典型的-SH键(巯基),该基团表现出显著的亲核特性:硫原子富含电子,易于作为亲核试剂进攻染料发色团(如聚甲炔链)中带有部分正电荷的碳原子^[40-41]。这一亲核加成反应不可逆地形成碳-硫共价键,直接断裂原有的 π 双键结构,导致染料 π 电子共轭体系遭到破坏。随着共轭结构的中断,电子离域范围显著缩小,分子能级差也随

之改变,从而使染料在特征波长处的吸光能力丧失,并伴随荧光猝灭现象。

因此,如图4(b)所示,基于IR806染料分子与 β -ME之间可发生高效亲核加成反应的特性,研究设计并构建了一种新型功能化上转换纳米探针IR806-PEI-UCNP。该探针以PEI修饰的上转换纳米颗粒为载体,IR806染料通过其两个磺酸侧链锚定于颗粒表面,在808 nm近红外激光激发下,该探针发射出可见光范围内的荧光信号;而当体系中加入 β -ME时,IR806染料与之发生亲核反应导致其结构破坏,丧失对激发能量的敏化能力,使得上转换发光强度显著减弱。基于上述荧光猝灭效应,该体系实现了对 β -ME的高灵敏度、快速响应检测。

为模拟实际生物检测环境,将所制备的IR806-PEI-UCNP纳米探针分散在pH=7.4的Tris缓冲液体系中,用于准确检测 β -ME。通过上转换荧光光谱可系统研究该探针对 β -ME的响应能力。实验中采用的PEI-UCNPs浓度为1 mg/mL,IR806浓度为2 μ mol/L,因为该浓度条件下敏化效果最佳(图S7)。

引入不同浓度 β -ME后,IR806-PEI-UCNP纳米探针体系的上转换发光强度呈现逐渐降低的趋势(图5(a))。基于该现象,建立了如图5(b)所示的定量检测工作曲线。选择541 nm处的上转换发光信号作为检测指标, β -ME的浓度与其所引起的发光猝灭强度之间表现出良好的线性关系。在0.2~1.4 μ mol/L浓度范围内,线性相关系数 $R^2=0.9872$,线性回归方程为 $I_0-I=287.38+1408.35C$ (其中 I_0 和 I 分别代表未添加与添加 β -ME时体系的发光强度, C 为待测物的浓度),在pH=7.4的Tris缓冲液环境中,该纳米探针检测限为0.17 μ mol/L。

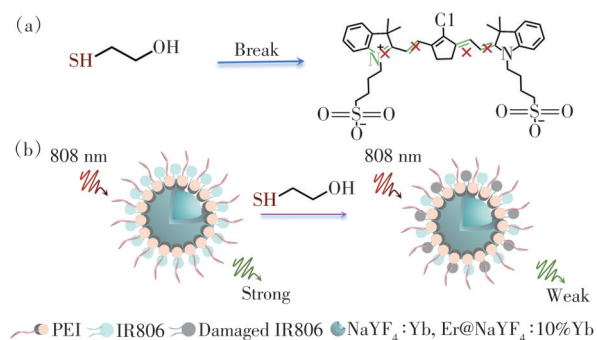


图4 (a) β -ME及IR806之间的作用机制;(b)IR806-PEI-UCNP检测 β -ME示意图

Fig.4 (a)The interaction between β -ME and IR806. (b)Schematic diagram of IR806-PEI-UCNP for detecting β -ME

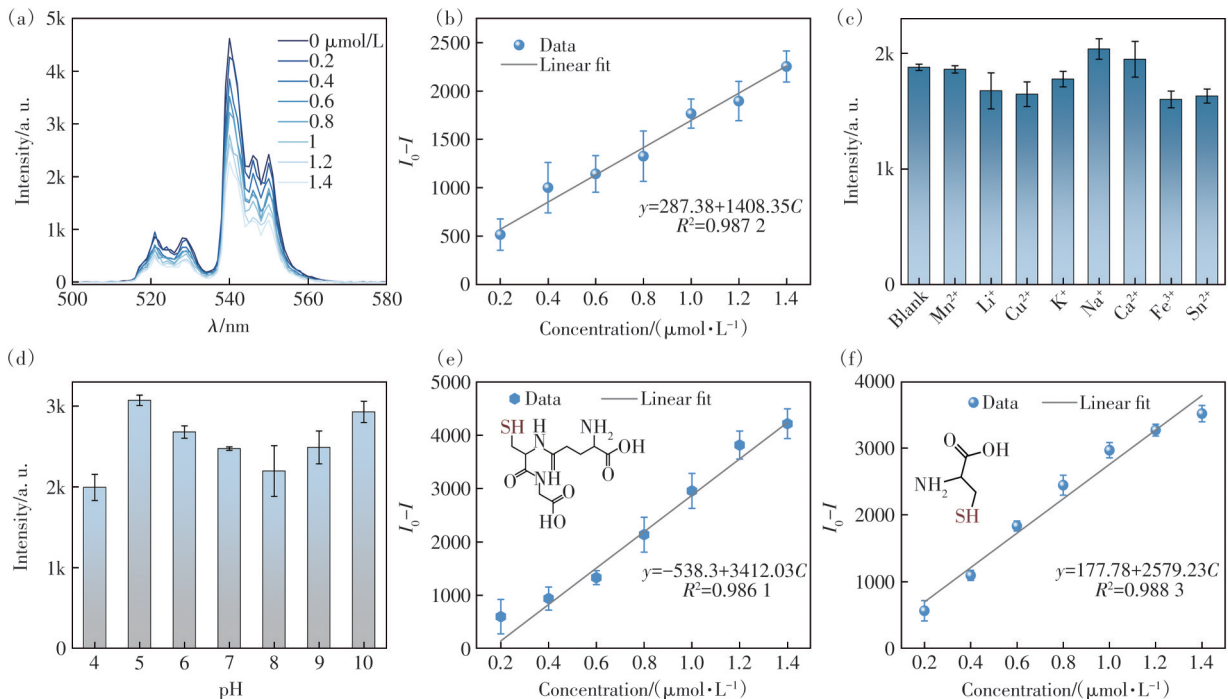


图5 (a)在 pH=7.4 的 Tris 缓冲液中,不同含量 β -ME 对应 PEI-IR806-UCNP 体系的荧光光谱;(b)荧光探针用于检测 β -ME 的工作曲线;(c)PEI-IR806-UCNP 的抗离子干扰性能;(d)PEI-IR806-UCNP 在不同 pH Tris 缓冲液下的荧光强度;(e)探针用于检测 GSH 的工作曲线;(f)探针用于检测 Cys 的工作曲线

Fig.5 (a)Fluorescence spectra of the PEI-IR806-UCNP system with different β -ME contents in Tris buffer at pH 7.4. (b)Working curve of the fluorescent probe for β -ME detection. (c)Anti-interference performance of PEI-IR806-UCNP against ions. (d)Fluorescence intensity of PEI-IR806-UCNP in Tris buffers at different pH values. (e)Working curve of the probe for GSH detection. (f)Working curve of the probe for Cys detection

在实际检测过程中,体系常面临多种共存离子的干扰问题。为全面评估所开发探针的选择性与抗干扰能力,在已确定的最佳实验条件下,向检测体系中分别引入一系列常见干扰离子(包括 Mn^{2+} 、 Li^{+} 、 Cu^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Sn^{2+}),各离子浓度均控制在 $20 \mu\text{mol/L}$ 。利用荧光光谱仪采集相应体系的荧光发射数据,并通过对比发光强度值的变化来评估干扰效应。根据实验所得荧光强度结果绘制柱状图(图 5(c))。由图中可知,在加入上述不同干扰离子后,体系的荧光发射强度均未发生显著改变,其数值与空白对照组基本保持一致。该结果表明,在实验所设浓度条件下,这些常见干扰离子对探针的识别性能及荧光信号输出均未产生明显影响,进一步证实了该探针在复杂环境中具有良好的抗干扰性与检测可靠性。

为了评估 IR806-PEI-UCNP 探针在复杂生物样本中的分析灵敏度,考虑到肿瘤微环境通常呈酸性(细胞外 pH 约 6.5~7.2),而其他生理或病理环境(如肠道)可能呈碱性^[42-43],因此系统考察了 pH 值对探针发光性能的影响。实验在 pH=4~10

的 Tris 缓冲液体系中测量了该探针在 541 nm 处的上转换发光强度,结果如图 5(d)所示。在该 pH 范围内,发光信号相对稳定,未出现显著波动,表明探针在酸性和碱性条件下均具有良好的发光稳定性。

为验证所设计纳米探针的实际适用性,进一步选取人体内两种重要的内源性硫醇化合物——GSH 与 Cys 作为分析对象,进行了系统的性能测试。实验过程中,使用 Tris-盐酸缓冲液对样品进行适当稀释,确保硫醇浓度处于检测线性区间内。实验结果证实,如图 5(e)、(f)所示,当谷胱甘肽或半胱氨酸浓度在 $0.2\sim 1.4 \mu\text{mol/L}$ 范围内逐步增加时,纳米探针的响应信号均呈现良好的线性变化趋势,谷胱甘肽检测限为 $0.10 \mu\text{mol/L}$,半胱氨酸检测限为 $0.12 \mu\text{mol/L}$,与前期使用 β -ME 作为模型硫醇的测试结果一致,说明其在实际生物硫醇体系中具备可靠的适用性。与之前的研究相比(表 S1),本研究所开发的探针不仅检测限更低且可在水相中工作,更具创新性的是其采用近红外光激发的设计。这一设计带来了多重优势:通过

有效规避生物样本的自发荧光干扰,显著提升了检测的灵敏度与准确性;同时,近红外光更强的组织穿透能力也为活体深层组织的成像分析提供了关键技术手段,展现出优异的生物医学应用前景。

4 结 论

本研究通过构建核壳结构并引入两亲性分子PEI进行表面修饰,显著提升了上转换纳米颗粒在水相中的发光性能及长期稳定性。当PEI与UCNP的质量比为5:1时,修饰后的UCNP在12 h后仍能保持初始发光强度的87.3%。进一步将近红外染料IR806与PEI-UCNP复合,利用其高效的能量转移特性,成功构建了染料敏化上转换纳米探针。该探针基于IR806与硫醇之间的特异性亲

核反应,采用近红外光激发,实现了对生物体内硫醇化合物高灵敏检测,检测限低至0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。本工作为高性能纳米探针的设计与构建提供了新思路,不仅在分子识别与传感领域展现出方法学上的普适性,更在生物医学成像与疾病早期诊断中展现出广阔的跨学科应用前景。值得注意的是,目前该探针的研究主要集中于体外检测,未来将进一步探索其在活体复杂生理环境中的动态监测能力,并致力于开发多模态成像功能,以满足精准医学对多元化信息获取的更高需求。

本文补充文件和专家审稿意见及作者回复内容的下载地址:<http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/CJL.20260068>

参 考 文 献:

- [1] YANG S J, JIANG W P, REN L L, *et al.* Biothiol xenon MRI sensor based on thiol-addition reaction [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(11): 5835-5840.
- [2] AKHONDI G, OROUJI A, HORMOZI-NEZHAD M R, *et al.* Gold nanorod amalgamation: machine learning empowered discrimination of biothiol and thiol ratios [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2024, 16(39): 52080-52091.
- [3] YU H Z, LIU C Y, LI Y H, *et al.* Functionalized metal-organic framework UiO-66-NH-BQB for selective detection of hydrogen sulfide and cysteine [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, 11(45): 41972-41978.
- [4] FANG H B, CHEN Y C, WANG Y J, *et al.* A dual-modal probe for NIR fluorogenic and ratiometric photoacoustic imaging of Cys/Hcy *in vivo* [J]. *Sci. China Chem.*, 2020, 63(5): 699-706.
- [5] WANG L X, AHN Y J, ASMIS R. Sexual dimorphism in glutathione metabolism and glutathione-dependent responses [J]. *Redox Biol.*, 2020, 31: 101410.
- [6] GIUSTARINI D, COLOMBO G, GARAVAGLIA M L, *et al.* Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells [J]. *Free Radical Biol. Med.*, 2017, 112: 360-375.
- [7] LIN M B, WANG J, CHAI Y S, *et al.* Homocystaonate controls inflammation through reshaping methionine metabolism and N-homocysteinylation [J]. *Cell Metab.*, 2025, 37(10): 1980-1997. e8.
- [8] KANEMARU K, KANEMARU A, MURAYAMA S. Relationship between cerebral amyloid angiopathy and plasma homocysteine levels in Alzheimer's disease [J]. *Alzh. Dement.*, 2020, 16(S4): e042109.
- [9] XIONG W J, SHI M Z, ZHANG X M, *et al.* The efficient conversion of H₂S into mercaptan alcohols mediated in protic ionic liquids under mild conditions [J]. *Green Chem.*, 2021, 23(20): 7969-7975.
- [10] ZHANG C Y, GAO H Y, HAI G T, *et al.* Base-free catalytic aerobic oxidation of mercaptans over MOF-derived Co/CN catalyst with controllable composition and structure [J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2022, 607: 1836-1848.
- [11] ZHU M Q, LI W Z, SUN L, *et al.* Advances in fluorescent probes for targeting organelles: design strategies, applications and perspectives [J]. *Coord. Chem. Rev.*, 2024, 512: 215893.
- [12] LI X Y, WANG J P, HUO F J, *et al.* Organic small molecule fluorescent probes based cascade reaction: design strategies, biomedical applications and prospects [J]. *Coord. Chem. Rev.*, 2024, 506: 215713.
- [13] PAN S Y, HONG Y G, JIAN Y H, *et al.* A luminescence resonance energy transfer (LRET)-based nanoprobe for ascorbic acid detection in living cells and real samples [J]. *Chem. -An Asian J.*, 2025, 20(17): e00124.
- [14] ZHA S, YANG F, MA Z L, *et al.* Multifunctional upconversion nanocomposite for multi-purpose cancer theranostics [J]. *Mater. Des.*, 2023, 226: 111682.

- [15] ZHA S, CHAU H F, CHAU W Y, *et al.* Dual-targeting peptide-guided approach for precision delivery and cancer monitoring by using a safe upconversion nanoplatfrom [J]. *Adv. Sci.*, 2021, 8(5): 2002919.
- [16] ZHAO X Y, WANG M F, CAI Z W, *et al.* Optimizing the performance of dye-sensitized upconversion nanoparticles [J]. *Dyes Pigm.*, 2021, 192: 109428.
- [17] LU S, KE J X, LI X J, *et al.* Luminescent nano-bioprobes based on NIR dye/lanthanide nanoparticle composites [J]. *Aggregate*, 2021, 2(5): e59.
- [18] WIESHOLLER L M, FRENZEL F, GRAUEL B, *et al.* Yb,Nd,Er-doped upconversion nanoparticles: 980 nm *versus* 808 nm excitation [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(28): 13440-13449.
- [19] LIU B, LI C X, YANG P P, *et al.* 808-nm-light-excited lanthanide-doped nanoparticles: rational design, luminescence control and theranostic applications [J]. *Adv. Mater.*, 2017, 29(18): 1605434.
- [20] WU X, ZHANG Y W, TAKLE K, *et al.* Dye-sensitized core/active shell upconversion nanoparticles for optogenetics and bioimaging applications [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(1): 1060-1066.
- [21] JIANG C, LI Y, JIA T, *et al.* Stabilizing dye-sensitized upconversion nanosystems *via* singlet oxygen spin flipping [J]. *Small*, 2025, 21(38): e06685.
- [22] ZHANG Z H, LIANG Z Q, TANG J H, *et al.* Cu²⁺-activated dye-sensitized upconversion nanoprobe: overcoming pigment interference for ultrasensitive glyphosate detection in plant-derived foods and live-cell imaging [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2025, 497: 139590.
- [23] KE J X, LU S, LI Z, *et al.* Multiplexed intracellular detection based on dual-excitation/dual-emission upconversion nanoprobe [J]. *Nano Res.*, 2020, 13(7): 1955-1961.
- [24] LI H D, LIU H T, WONG K L, *et al.* Dye-sensitized upconversion nanoparticles with enhanced aqueous luminescence for neuronal imaging [J]. *Nanoscale*, 2025, 17(46): 26982-26991.
- [25] XU J T, YANG P P, SUN M D, *et al.* Highly emissive dye-sensitized upconversion nanostructure for dual-photosensitizer photodynamic therapy and bioimaging [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(4): 4133-4144.
- [26] XU J T, GULZAR A, LIU Y H, *et al.* Integration of IR-808 sensitized upconversion nanostructure and MoS₂ nanosheet for 808 nm NIR light triggered phototherapy and bioimaging [J]. *Small*, 2017, 13(36): 1701841.
- [27] TAN C, LI X J, LI Z, *et al.* Near-infrared-responsive nanoplatforms integrating dye-sensitized upconversion and heavy-atom effect for enhanced photodynamic therapy efficacy [J]. *Nano Today*, 2024, 54: 102089.
- [28] LIU Y X, NING L L, LUO Y J, *et al.* Stabilizing dye-sensitized upconversion hybrids by cyclooctatetraene [J]. *Nano Lett.*, 2024, 24(40): 12486-12492.
- [29] LING H, GUAN D M, WEN R R, *et al.* Effect of surface modification on the luminescence of individual upconversion nanoparticles [J]. *Small*, 2024, 20(26): 2309035.
- [30] WILHELM S, KAISER M, WÜRTH C, *et al.* Water dispersible upconverting nanoparticles: effects of surface modification on their luminescence and colloidal stability [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(4): 1403-1410.
- [31] FENG Y S, LI Z, LI Q Q, *et al.* Internal OH⁻ induced cascade quenching of upconversion luminescence in NaYF₄:Yb/Er nanocrystals [J]. *Light Sci. Appl.*, 2021, 10(1): 105.
- [32] LIU Y X, JIANG A Q, JIA Q, *et al.* Rationally designed upconversion nanoprobe for simultaneous highly sensitive ratio-metric detection of fluoride ions and fluorosis theranostics [J]. *Chem. Sci.*, 2018, 9(23): 5242-5251.
- [33] KHAN I A, YU T, YANG M, *et al.* A systematic review of toxicity, biodistribution, and biosafety in upconversion nanomaterials: critical insights into toxicity mitigation strategies and future directions for safe applications [J]. *BME Front.*, 2025, 6: 0120.
- [34] HAZRA C, ULLAH S, SERGE CORREALES Y E, *et al.* Enhanced NIR- I emission from water-dispersible NIR- II dye-sensitized core/active shell upconverting nanoparticles [J]. *J. Mater. Chem. C*, 2018, 6(17): 4777-4785.
- [35] ZHONG L G, LI J G, ZU B Y, *et al.* Highly retentive, anti-interference, and covert individual marking taggant with exceptional skin penetration [J]. *Adv. Sci.*, 2022, 9(25): 2201497.
- [36] MCCULLAGH C, ROBERTSON P K J. Effect of polyethylenimine, a cell permeabilizer, on the photosensitized destruction of algae by methylene blue and nuclear fast red [J]. *Photochem. Photobiol.*, 2006, 82(6): 1662-1667.
- [37] ROS E, TOM T, ORTEGA P, *et al.* Elimination of interface energy barriers using dendrimer polyelectrolytes with fractal geometry [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2023, 15(23): 28705-28715.

- [38] BEHBOUDI H, POURMADADI M, OMIDI M, *et al.* Cu-CDs as dual optical and electrochemical nanosensor for β ME detection [J]. *Surf. Interfaces*, 2022, 29: 101710.
- [39] YIN C X, HUO F J, ZHANG J J, *et al.* Thiol-addition reactions and their applications in thiol recognition [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42(14): 6032-6059.
- [40] LIU T, HUO F G, YIN C X, *et al.* A highly selective fluorescence sensor for cysteine/homocysteine and its application in bioimaging [J]. *RSC Adv.*, 2015, 5(36): 28713-28716.
- [41] 岳永康, 霍方俊, 阴彩霞. 硫醇亲核反应及其荧光识别研究 [J]. *中国科学: 化学*, 2017, 47(2): 249-257.
YUE Y K, HUO F J, YIN C X. Thiol nucleophilic reactions and their applications in thiol fluorescent recognition [J]. *Sci. Sinica Chim.*, 2017, 47(2): 249-257. (in Chinese)
- [42] PERSI E, DURAN-FRIGOLA M, DAMAGHI M, *et al.* Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy [J]. *Nat. Commun.*, 2018, 9(1): 2997.
- [43] GHAEMI B, JAVAD HAJIPOUR M. Tumor acidic environment directs nanoparticle impacts on cancer cells [J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2023, 634: 684-692.



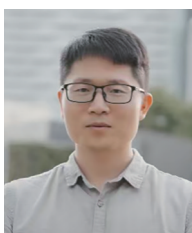
邢欢(2001-),女,陕西商洛人,硕士研究生,2023年于陕西科技大学获得学士学位,主要从事染料敏化上转换与稀土发光材料相关研究。

E-mail: 230112173@sust.edu.cn



罗玉霞(1988-),女,山西五台人,博士,副教授,硕士生导师,2019年于中国香港浸会大学获得博士学位,主要从事稀土发光材料研究。

E-mail: luoyuxia@sust.edu.cn



鲍国臣(1988-),男,吉林梅河口人,博士,研究员,博士生导师,2020年于中国香港浸会大学获得博士学位,2021年于悉尼科技大学获得博士学位,主要从事稀土发光材料研究。

E-mail: guochen.bao@uts.edu.au