



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106147761 A

(43)申请公布日 2016.11.23

(21)申请号 201610112048.0

(22)申请日 2016.02.29

(71)申请人 安徽工业大学

地址 243002 安徽省马鞍山市湖东中路59号

(72)发明人 刘祥 张厂厂 刘朋朋

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 蒋海军

(51)Int.Cl.

C09K 11/65(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

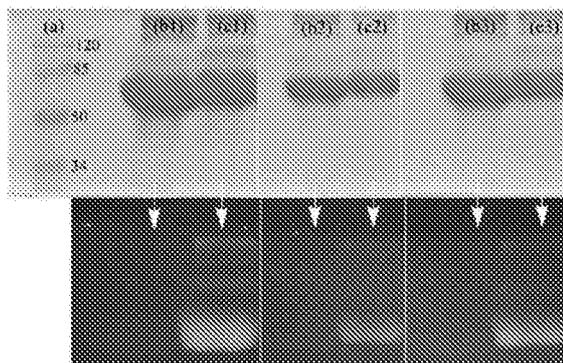
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种碳量子点的活化、分离及对牛血清蛋白分子进行荧光标记的方法

(57)摘要

本发明公开了一种碳量子点的活化、分离及对牛血清蛋白分子的荧光标记方法,属于生物技术领域。该方法采用柠檬酸为原料,通过直接热解的方法获得碳量子点;再对该碳量子点进行化学修饰,在其表面生成活泼的N-羟基丁二酰亚胺(NHS)酯;这种NHS酯可与含伯胺基的牛血清蛋白反应,从而实现对牛血清蛋白分子的荧光标记。本发明所采用的原料易得、廉价,且反应操作简便,易于控制。由于碳量子点本身的无毒性和抗光漂白性,使得这种对含伯胺基生物分子的荧光标记方法具有更广泛的应用前景。



1. 一种碳量子点的活化、分离及对牛血清蛋白分子的荧光标记方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)称取1.0~3.0g的柠檬酸,在烘箱中180℃下进行热解反应,获得碳量子点,产物用四氢呋喃溶解;往碳量子点的四氢呋喃溶液中加入0.8~1.6g N-羟基丁二酰亚胺、1.2~2.0g二环己基碳二亚胺和8~25mL四氢呋喃溶剂,控制温度为55~65℃,磁力搅拌下反应3~6h,生成N-羟基丁二酰亚胺活化的碳量子点;

(2)将步骤(1)的反应产物放入冰箱的冷冻室持续1h以上,再过滤除去固体,取出上清液;将上清液再放入冰箱冷冻室,重复上次的操作,直至溶液中无固体析出;

(3)取出步骤(2)获得的上清液,蒸馏除去溶液中的四氢呋喃,加入冷水,充分振荡,立即加入乙酸乙酯,继续充分振荡,分出酯层;

(4)取2~5mL步骤(3)获得的酯层,蒸除其中的乙酸乙酯溶剂,加入12mL磷酸盐缓冲溶液溶解;取4mL该溶液,加入6mL牛血清蛋白的磷酸盐缓冲溶液,25℃下反应8h,获得碳量子点标记的牛血清蛋白溶液,实现牛血清蛋白分子的荧光标记。

2. 如权利要求1所述的一种碳量子点的活化、分离及对牛血清蛋白分子的荧光标记方法在其它含伯胺基生物分子荧光标记中的应用。

一种碳量子点的活化、分离及对牛血清蛋白分子进行荧光标记的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种经化学修饰的碳量子点的制备方法,可用于对牛血清蛋白的荧光标记,也可用于对于其它含伯胺基的生物分子的荧光标记。

背景技术

[0002] 荧光标记方法是指通过化学反应将具有荧光特性的基团或分子与生物分子联接起来,使得生物分子具有荧光特性,从而便于人们跟踪生物分子的行为。目前广为使用的荧光基团是Cy3、Cy5等,它们都是有机荧光素,可用于标记生物分子(Hagner-McWhirter Å., Laurin Y., Larsson A., Bjerneld E.J., Rönnö. Cy5 total protein normalization in Western blot analysis(蛋白质印迹分析中Cy5标记的总蛋白标准化). *Analytical Biochemistry* 2015;486:54-61.)。但是它们存在一定的缺点,例如它们的抗光漂白性能很差,不能经受较长时间的紫外照射,这对某些研究工作非常不利(Wang L., Fan J., Qiao X., Peng X., Dai B., Wang B. et al. Novel asymmetric Cy5 dyes: Synthesis, photostabilities and high sensitivity in protein fluorescence labeling(蛋白荧光标记中新颖的反对称Cy5染料的合成、光稳定性和高灵敏性). *Journal Of Photochemistry And Photobiology A-Chemistry* 2010;210:168-172.)。该文中使用的有机荧光素1h内光降解在10%左右。而近年来发展起来的重金属量子点(CdS、CdSe等)技术,也使得荧光标记领域又增加一名新成员(蒋茶,徐淑坤,杨冬芝,等,CdS量子点的制备及细胞膜初步荧光标记. 2007.26(5):1-4.)。但是它的最大缺点是毒性较高,对生物组织的破坏性较大。

[0003] 碳量子点作为一种新型的碳纳米材料,具有显著的表面效应、量子尺寸效应,呈现出很多新奇的理化性质,例如在紫外灯的照射下能够发出一定波长的荧光。同时由于这种量子点无毒、廉价、制备简单、环境友好,成为近年来研究的热点。目前对碳量子点的研究中多数限于其制备方法(Bhunja S.K., Saha A., Maity A.R., Ray S.C., Jana N.R. Carbon Nanoparticle-based Fluorescent Bioimaging Probes(以碳纳米点为基础的荧光生物成像探针). *Scientific Reports* 2013;3:1473; Dong Y., Shao J., Chen C., Li H., Wang R., Chi Y. et al. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid(通过调节柠檬酸的碳化程度制备蓝色荧光石墨烯量子点和氧化石墨烯). *Carbon* 2012;50:4738-4743.)。而对于其实际应用的报道很少,特别是将其应用于对生物分子的荧光标记的报道更少。

发明内容

[0004] 为克服克服现有技术中含有活性基团的有机荧光素价格非常昂贵、且抗光漂白性能较差,不能经受紫外线长时间的照射,紫外线长时间的照射会使得有机荧光素发生光解,技术人员在进行长时间荧光成像观察的时候,荧光图像的稳定性的得不到保证等问题,本发

明提供了一种碳量子点的活化、分离及对牛血清蛋白分子的荧光标记方法,该方法以廉价的柠檬酸为原料,首先制备具有荧光特性的碳量子点,再进行化学活化、分离,并最终应用于对牛血清蛋白的荧光标记。

[0005] 本发明涉及一种碳量子点的活化、分离及对牛血清蛋白分子的荧光标记方法,具体步骤如下:

[0006] (1)称取1.0~3.0g的柠檬酸,在烘箱中180℃下进行热解反应,获得碳量子点,产物用四氢呋喃溶解;往碳量子点的四氢呋喃溶液中加入0.8~1.6g N-羟基丁二酰亚胺、1.2~2.0g二环己基碳二亚胺和8~25mL四氢呋喃溶剂,控制温度为55~65℃,磁力搅拌下反应3~6h,生成N-羟基丁二酰亚胺活化的碳量子点;

[0007] (2)将步骤(1)的反应产物放入冰箱的冷冻室持续1h以上,再过滤除去固体,取出上清液;将上清液再放入冰箱冷冻室,重复上次的操作,直至溶液中无固体析出;

[0008] (3)取出步骤(2)获得的上清液,蒸馏除去溶液中的四氢呋喃,加入冷水,充分振荡,立即加入乙酸乙酯,继续充分振荡,分出酯层;

[0009] (4)取2~5mL步骤(3)获得的酯层,蒸除其中的乙酸乙酯溶剂,加入12mL磷酸盐缓冲溶液溶解;取4mL该溶液,加入6mL牛血清蛋白的磷酸盐缓冲溶液,25℃下反应8h,获得碳量子点标记的牛血清蛋白溶液,实现牛血清蛋白分子的荧光标记。

[0010] 进一步的,本发明可以应用到其它含伯胺基生物分子的荧光标记中。

[0011] 与现有技术相比,本发明具有以下技术效果:

[0012] 1、本发明经NHS活化的碳量子点的价格比现有的含活性基团的有机荧光素要廉价得多。

[0013] 2、本发明经NHS活化的碳量子点抗光漂白性要优于有机荧光素。

[0014] 3、本发明提供了一种对碳量子点的活化、分离方法,并由此实现对牛血清蛋白分子的荧光标记。这种方法可以推广至对所有含伯胺基的生物分子的荧光标记,因而具有广泛的应用前景。

附图说明

[0015] 图1是本发明中的碳量子点透射电镜图;由图可知,碳量子点的尺寸为3nm左右。

[0016] 图2是碳量子点和NHS修饰的碳量子点在乙酸乙酯中溶解度比较的照片及酯层和水层的荧光光谱;其中:(a)为碳量子点的照片;(b)为NHS修饰碳量子点的照片,显然本发明中的碳量子点不溶于乙酸乙酯(上层为酯层),酯层清晰透明;(c)为酯层的荧光光谱,显然酯层的荧光很弱,说明本发明所制备的碳量子点难溶于乙酸乙酯;而经NHS修饰的碳量子点在乙酸乙酯中具有良好的溶解度(上层为酯层),酯层中含有大量碳量子点;(d)为酯层和水层的荧光光谱,显然NHS修饰的碳量子点在乙酸乙酯中溶解度良好。

[0017] 图3是本发明中碳量子点及NHS修饰的碳量子点的红外光谱图。

[0018] 图4是本发明中NHS修饰的碳量子点水溶液在比色皿中经手提式紫外灯(8W)照射一定的时间以后的荧光光谱图;其中:右上角的插图显示峰值荧光强度与照射时间的关系;由图可知,在紫外灯连续照射60min以后,本发明中的NHS修饰碳量子点的荧光强度下降仅为5%左右。

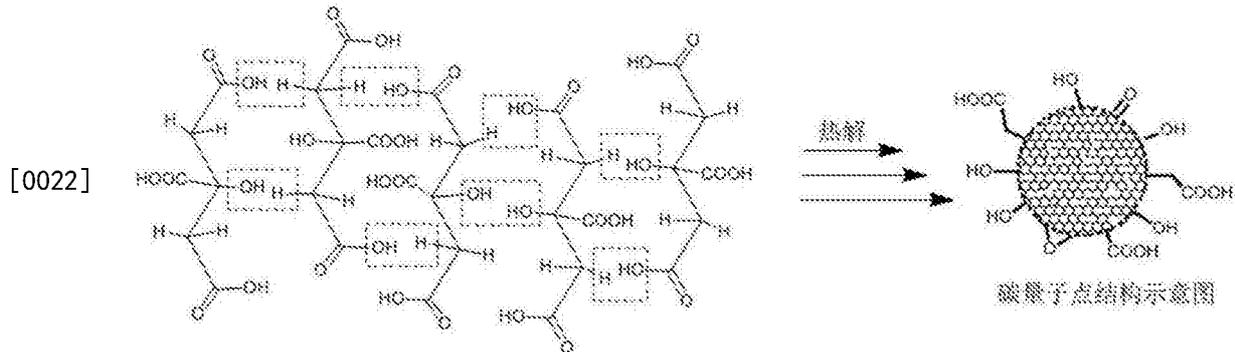
[0019] 图5为实施例1中碳量子点标记的牛血清蛋白溶液凝胶电泳照片(上)和相应的荧

光照片(下);其中:(a)为Marker的条带,说明所使用的蛋白分子量在66kD左右;(b1~b3)为未标记的牛血清蛋白条带,荧光照片显示其没有荧光;(c1~c3)分别为加入20,5和10 μ L碳量子点标记的牛血清蛋白溶液的条带;荧光照片显示它们都具有荧光,且荧光基团与蛋白结合良好,并未发生分离现象,说明它们是共价键联接。

具体实施方式

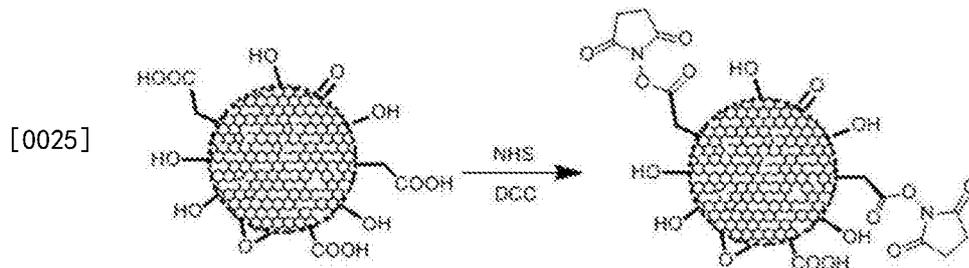
[0020] 以下结合附图和科学原理对本发明作进一步的解释。

[0021] 以单一的柠檬酸为原料,180 $^{\circ}$ C下,经熔融、热解、反应,最终生成碳量子点。热解、反应过程中,柠檬酸分子之间发生脱水反应,过程如下图所示:



[0023] 可能的脱水方式有:羧基之间的脱水、羟基与亚甲基氢之间的脱水、羟基之间的脱水等,分子间脱水是一个完全随机的过程,分子之间脱水以后,可能形成环烃结构,其表面含有羟基、羧基等基团,水溶液呈现酸性,利用这些表面羧基的化学活性,可以实现对碳量子点的化学修饰。所生成的碳量子点的形貌像如附图1所示,透射电子显微镜图像其大小在3nm左右,晶面间距为0.22nm。

[0024] 由于碳量子点表面含有大量极性基团,因此碳量子点具有较强的极性,能与水完全互溶,在四氢呋喃中也具有较好的溶解度,但是在乙酸乙酯中溶解度很差,如附图2(a)所示。其表面的羧基可以与N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和二环己基碳二亚胺(DCC)反应:

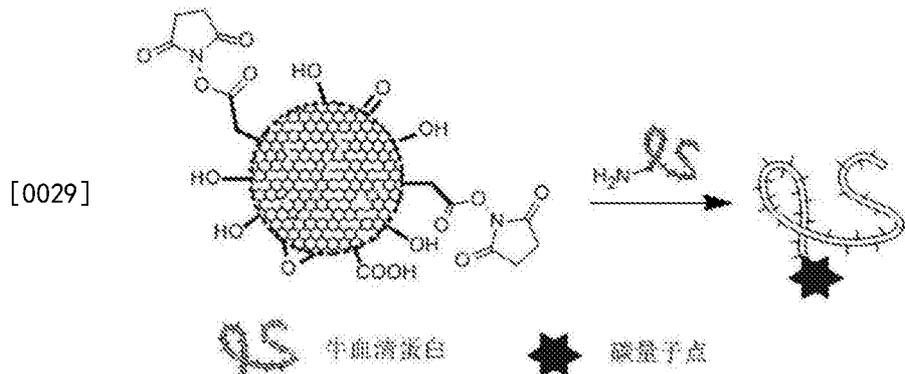


[0026] 生成活泼的NHS酯。由于碳量子点表面生成酯的结构,于是其在乙酸乙酯中的溶解度增大,如附图2(b)所示。附图2(a)为碳量子点在乙酸乙酯中的溶解情况,附图2(b)为NHS酯修饰的碳量子点在乙酸乙酯中的溶解情况。可以看出:修饰反应之前,碳量子点几乎不溶于乙酸乙酯,而经NHS修饰以后,其在乙酸乙酯中的溶解度明显增大,附图2(c)和(d)证明了这一事实。附图2(c)显示:乙酸乙酯层的荧光非常弱,在450~500nm附近几乎没有荧光发射;而附图2(d)显示:经NHS修饰的碳量子点在酯层中的含量明显增加,酯层显示出较强的荧光发射,在450nm附近有较强的荧光发射,不过水层仍然具有一定的荧光,这说明并不是所有的碳量子点都与NHS发生了反应。根据这种性质,利用萃取的方法可以将修饰产物从反

应体系中分离出来,实现NHS酯修饰的碳量子点的分离和纯化。其酯化反应可由红外光谱证明,如附图3所示。附图3(a)为碳量子点的红外光谱图,碳量子点在 3449cm^{-1} 处有一强宽峰,为羧基中的羟基和醇羟基的伸缩振动峰;碳量子点的羰基(羧基羰基,酮羰基)和 $\text{C}=\text{C}$ 吸收的叠加产生一个宽吸收峰。附图3(b)为NHS修饰的碳量子点的红外光谱图,显然,在 1700cm^{-1} 附近两者有很大的区别,1863和 1732cm^{-1} 处为NHS的特征峰。

[0027] 本发明所获得NHS修饰的碳量子点,具有很好的抗光漂白性能,如附图4所示。在紫外灯的持续照射下,1h内其荧光强度下降为5%左右。

[0028] 由于碳量子点表面的NHS酯较为活泼,能在极温和的条件下与含伯胺基的分子反应。例如:NHS修饰的碳量子点可与牛血清蛋白反应:



[0030] 牛血清蛋白多肽链中的伯胺基与碳量子点表面的NHS酯反应,最终获得具有荧光性质的碳量子点标记的牛血清蛋白分子。附图5的凝胶电泳图像证明了其与牛血清蛋白的反应,凝胶电泳实验证明:碳量子点与牛血清蛋白分子通过化学键联接,说明它们之间确实发生了化学反应。从附图5还可以看出,牛血清蛋白与碳量子点反应之后,其分子量略有增大(牛血清蛋白的分子量为66kD);另外,由于牛血清蛋白与蛋白分子的化学键联接,使得牛血清蛋白分子具有荧光特性。这种方法可以推广至与更多的含伯胺基生物分子反应,用于对生物分子的荧光标记。由于碳量子点具有无毒性和抗光漂白性,使得NHS酯活化的碳量子点在生物荧光标记领域具有非常良好的应用前景。

[0031] 以下通过具体实施例对本发明作进一步的描述。但本发明不局限于下述实施例。

[0032] 实施例1

[0033] (1)将1.0g柠檬酸加入到不锈钢制的容器中,并摊平,放入烘箱中加热至 180°C ,持续反应60min后,室温下冷却。加入10mL四氢呋喃,充分溶解5h以上,获得碳量子点的四氢呋喃溶液。

[0034] (2)将步骤(1)产物中加入0.8g N-羟基丁二酰亚胺、1.2g二环己基碳二亚胺和8mL四氢呋喃溶剂,控制温度为 65°C ,磁力搅拌下反应3h。产物放入冰箱的冷冻室,让未反应的N-羟基丁二酰亚胺及二环己基碳二亚胺析出,取出上清液。将上清液再放入冰箱冷冻室,重复上次的操作,直至溶液中无固体析出。

[0035] (3)蒸馏除去溶液中的四氢呋喃,再加入15mL冷水,充分振荡;立即加入乙酸乙酯15mL,以萃取生成的产物,同时除去未反应的碳量子点。于是获得N-羟基丁二酰亚胺修饰碳量子点的乙酸乙酯溶液。

[0036] (4)取5mL步骤(3)的产物,蒸除其中的乙酸乙酯溶剂,加入12mL PBS($\text{pH}=7.4$)溶解。取4mL该溶液,加入6mL牛血清蛋白的PBS溶液(4mg mL^{-1}), 25°C 下反应8h,获得碳量子点

标记的牛血清蛋白溶液。

[0037] 实施例2

[0038] (1)将2.0g柠檬酸加入到不锈钢制的容器中,并摊平,放入烘箱中加热至180℃,持续反应60min后,室温下冷却。加入15mL四氢呋喃,充分溶解5h以上,获得碳量子点的四氢呋喃溶液。

[0039] (2)将步骤(1)产物中加入1.2g N-羟基丁二酰亚胺、1.8g二环己基碳二亚胺和15mL四氢呋喃溶剂,控制温度为60℃,磁力搅拌下反应4h。产物放入冰箱的冷冻室,让未反应的N-羟基丁二酰亚胺及二环己基碳二亚胺析出,取出上清液。将上清液再放入冰箱冷冻室,重复上次的操作,直至溶液中无固体析出。

[0040] (3)蒸馏除去溶液中的四氢呋喃,再加入15mL冷水,充分振荡;立即加入乙酸乙酯15mL,以萃取生成的产物,同时除去未反应的碳量子点。于是获得N-羟基丁二酰亚胺修饰碳量子点的乙酸乙酯溶液。

[0041] (4)取3mL步骤(3)的产物,蒸除其中的乙酸乙酯溶剂,加入12mL PBS(pH=7.4)溶解。取4mL该溶液,加入6mL牛血清蛋白的PBS溶液(4mg mL⁻¹),25℃下反应8h,获得碳量子点标记的牛血清蛋白溶液。

[0042] 实施例3

[0043] (1)将3.0g柠檬酸加入到不锈钢制的容器中,并摊平,放入烘箱中加热至180℃,持续反应60min后,室温下冷却。加入20mL四氢呋喃,充分溶解5h以上,获得碳量子点的四氢呋喃溶液。

[0044] (2)将步骤(1)产物中加入1.6g N-羟基丁二酰亚胺、2.0g二环己基碳二亚胺和25mL四氢呋喃溶剂,控制温度为55℃,磁力搅拌下反应6h。产物放入冰箱的冷冻室,让未反应的N-羟基丁二酰亚胺及二环己基碳二亚胺析出,取出上清液。将上清液再放入冰箱冷冻室,重复上次的操作,直至溶液中无固体析出。

[0045] (3)蒸馏除去溶液中的四氢呋喃,再加入15mL冷水,充分振荡;立即加入乙酸乙酯15mL,以萃取生成的产物,同时除去未反应的碳量子点。于是获得N-羟基丁二酰亚胺修饰碳量子点的乙酸乙酯溶液。

[0046] (4)取2mL步骤(3)的产物,蒸除其中的乙酸乙酯溶剂,加入12mL PBS(pH=7.4)溶解。取4mL该溶液,加入6mL牛血清蛋白的PBS溶液(4mg mL⁻¹),25℃下反应8h,获得碳量子点标记的牛血清蛋白溶液。

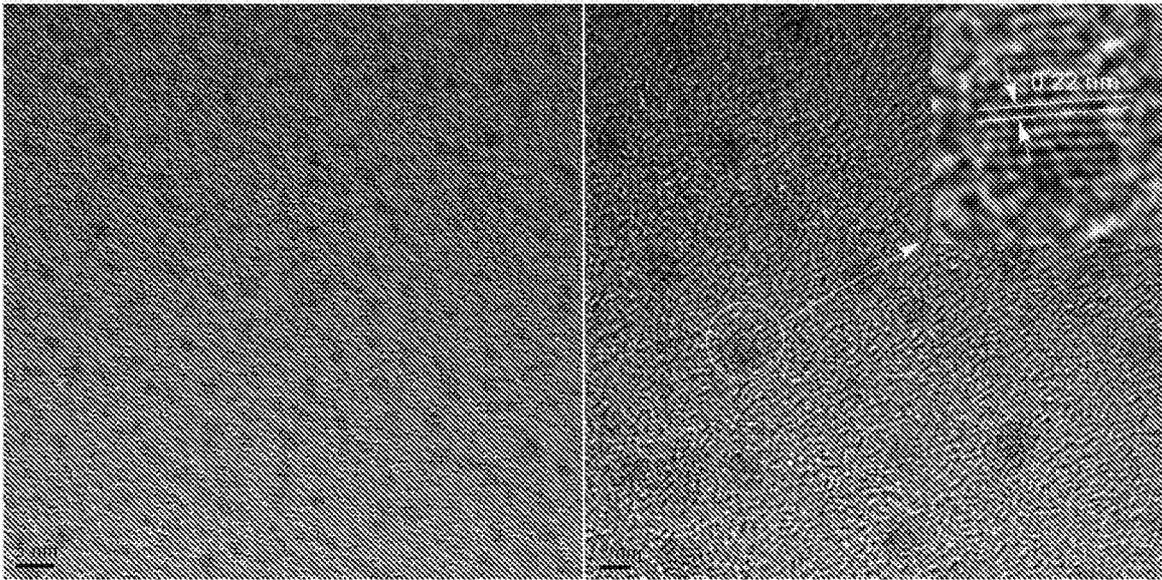


图1

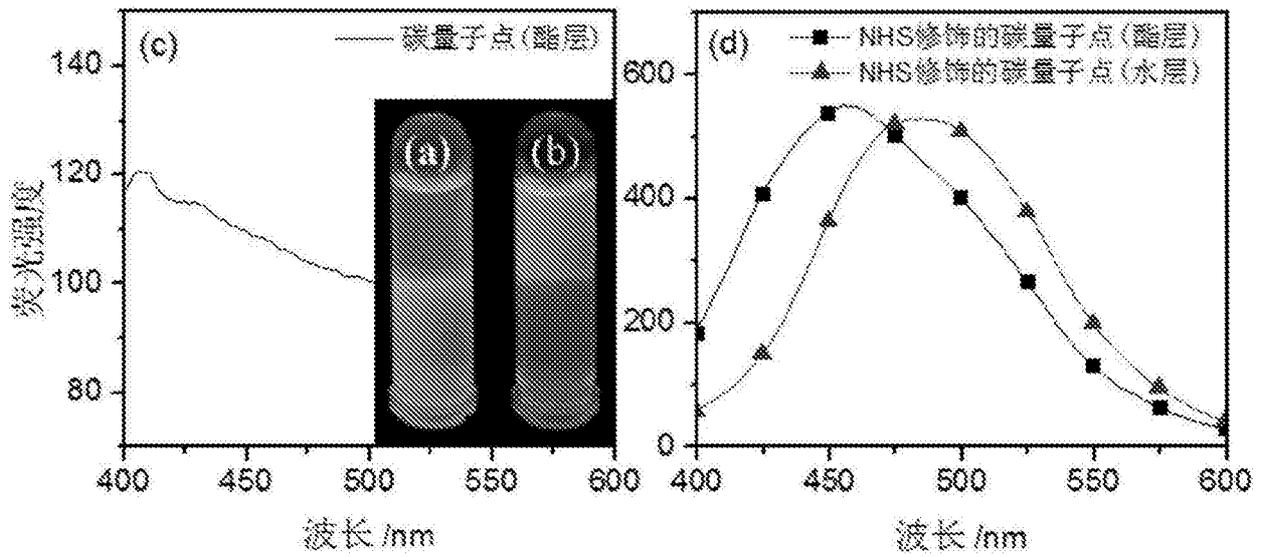


图2

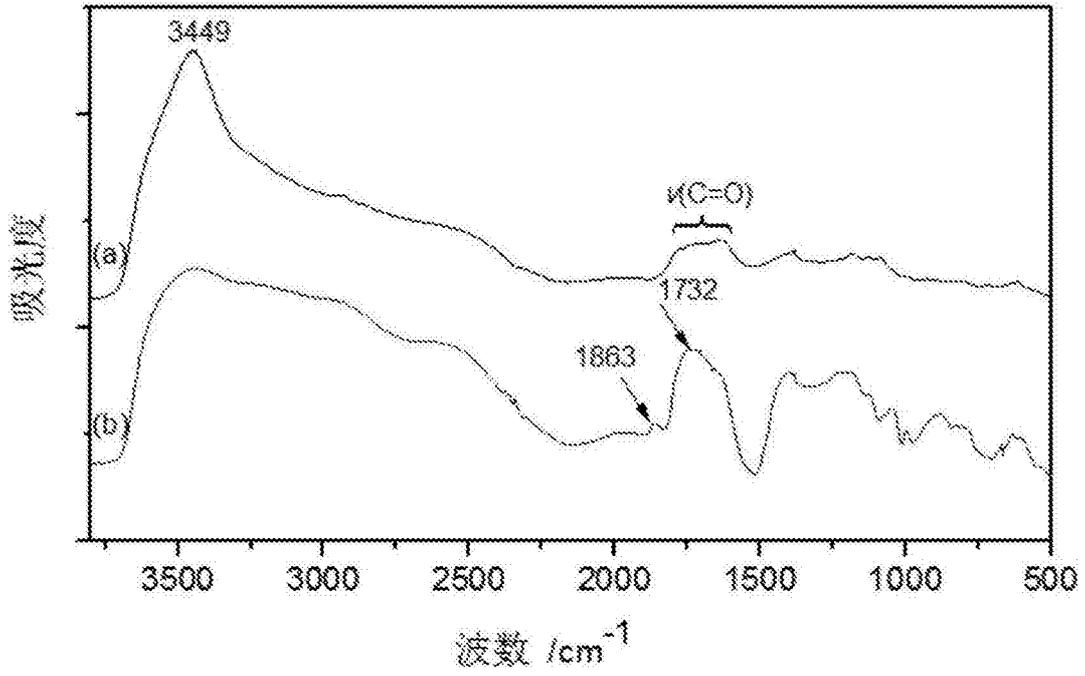


图3

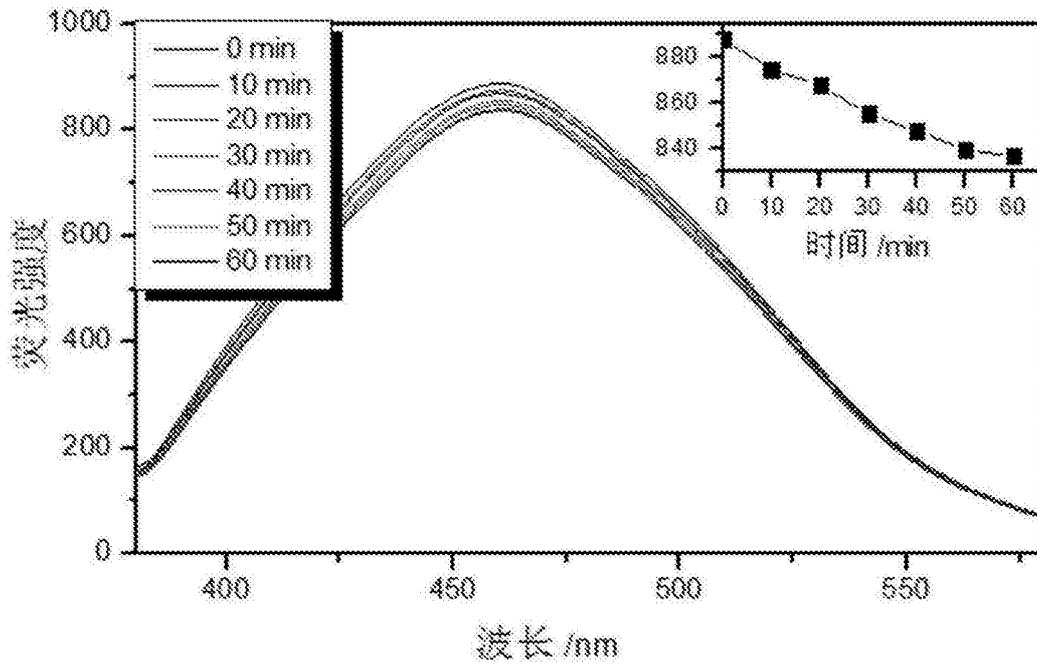


图4

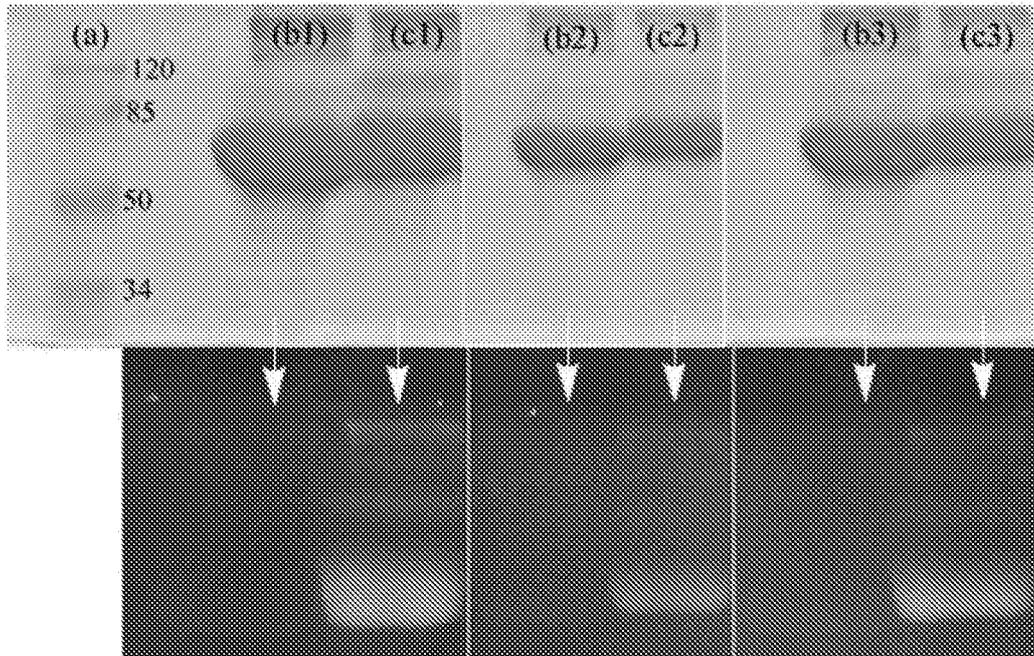


图5