



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102875623 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201210355615. 7

(22) 申请日 2012. 09. 19

(73) 专利权人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路 130 号

(72) 发明人 贺晓鹏 龙亿涛 陈国荣 李佳

臧奕 李蓁 邓思思 施德太

(74) 专利代理机构 上海顺华专利代理有限责任

公司 31203

代理人 薛美英

Yin-Jie Zhang, 等. Highly optically selective and electrochemically active chemosensor for copper (II) based on triazole-linked glucosyl anthraquinone. 《Dyes and Pigments》. 2011, 第 88 卷 (第 3 期), 第 391-395 页.

审查员 贾丹

(51) Int. Cl.

C07H 19/056(2006. 01)

C07H 1/00(2006. 01)

G01N 27/26(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5214136 A, 1993. 05. 25, 全文.

CN 1325490 A, 2001. 12. 05,

WO 9965992 A1, 1999. 12. 23, 全文.

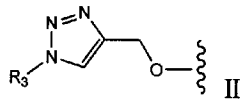
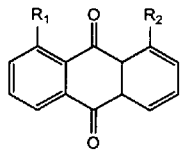
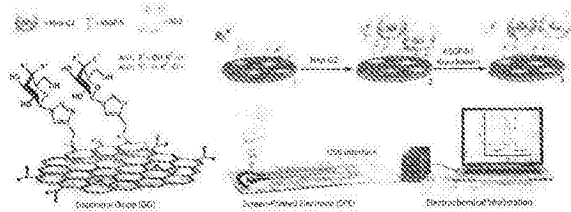
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

糖基蒽醌类化合物及其石墨烯传感器构建

(57) 摘要

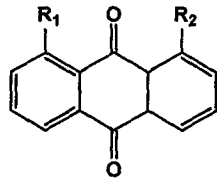
本发明涉及一种含三氮唑偶联糖基的蒽醌类化合物及其用途。所述的蒽醌类化合物具有式 I 所示结构。本发明所提供的糖基蒽醌类化合物可用于制备检测凝集素电化学传感器。



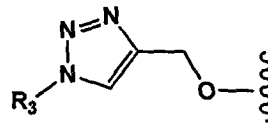
其中,

R₁和R₂分别独立选自氢或式 II 所示基团,且R₁和R₂不同时为H;R₃为有乙酰基保护或没有乙酰基保护的单糖基团。

1. 一种含三氮唑偶联糖基的蒽醌类化合物,所述的蒽醌类化合物具有式 I 所示结构:

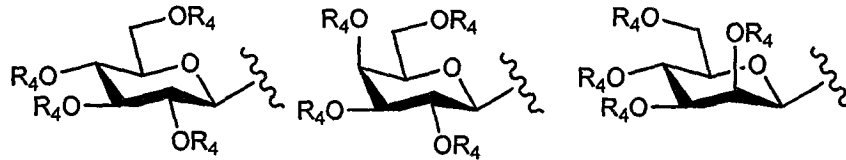


I



II

式中, R_1 和 R_2 分别独立选自:氢或式 II 所示基团中一种,且 R_1 和 R_2 不同时为 H; R_3 选自式 IIIa ~ IIIc 所示基团中一种:



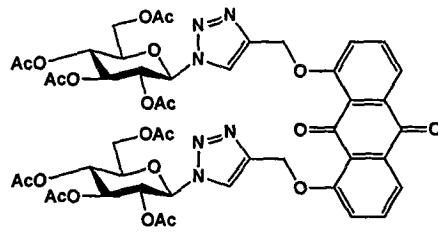
IIIa

IIIb

IIIc

式 IIIa ~ IIIc 中, R_4 为 H 或 Ac;

但不包括下列化合物:



2. 如权利要求 1 所述的蒽醌类化合物,其特征在于,其中 R_3 为式 IIIb 所示基团,其中 R_4 为 H。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的蒽醌类化合物与氧化态石墨烯的自组装物作为检测凝集素电化学传感器的应用。

糖基蒽醌类化合物及其石墨烯传感器构建

技术领域

[0001] 本发明涉及一种糖基蒽醌类化合物及其用途,具体地说,涉及一种含三氮唑偶联糖基的蒽醌类化合物及其石墨烯电化学传感器的构建。

背景技术

[0002] 糖-凝集素(即含有糖识别区域的蛋白质)间的相互识别作用被认为是众多细胞生理学及病理学过程的基础,如信号传导、细胞黏附、受精、增殖、分化、免疫应答、细菌入侵、病毒感染和肿瘤转移。对于这些动态历程的精确捕捉是现今“糖组学”研究的热点,而对于糖组学的解疑可大幅提升人类对于自然界以及自身的认知并促进如肿瘤、艾滋病疫苗和糖类先导药物的发展。

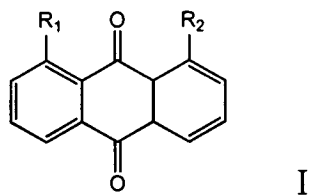
[0003] 现有对于糖-凝集素特异识别的手段主要基于对糖分子的化学修饰使其可被固载化至经特殊处理的固体表面、呈现拟细胞形态的“天线”簇集状分布形态,从而以高亲和力与特异的、经荧光标记的凝集素响应,并通过荧光光谱学手段表征其识别行为。然而,这些技术普遍具有合成及固载化修饰繁复、检测仪器设备昂贵等缺陷,且对于蛋白质分子的光标记这一额外工作也有可能致其本身生物功能特性的改变。

发明内容

[0004] 本发明的发明人经广泛及深入的研究,设计并合成了系列含三氮唑偶联糖基的蒽醌类化合物,且发现该系列含三氮唑偶联糖基的蒽醌类化合物中蒽醌基团不但作为标记糖的电化学报告基团,还可作为可与氧化石墨烯(GO)通过 $\pi-\pi$ 用进行堆叠的芳香稠环。即在氧化石墨烯 π -堆叠效应诱导下的丝网印刷电极(SPE)自组装,构建含电化学标记团的糖基化SPE,(用于以电化学传感方式检测凝集素)。

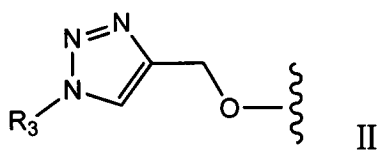
[0005] 本发明的一个目的在于,提供一种含三氮唑偶联糖基的蒽醌类化合物,所述的蒽醌类化合物具有式I所示结构:

[0006]



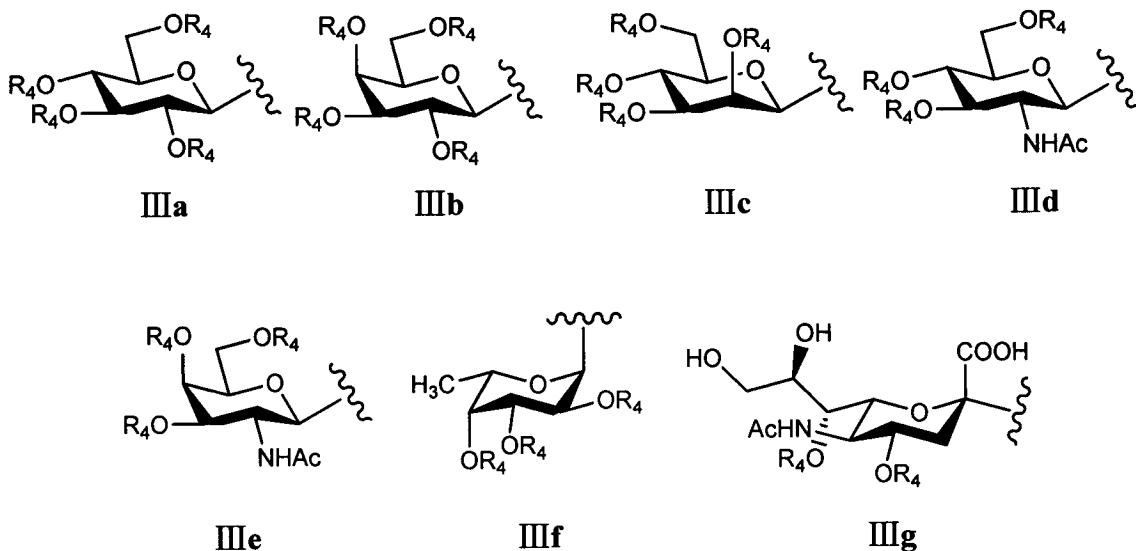
[0007] 式I中, R₁和 R₂分别独立选自氢(H)或式II所示基团中一种,且 R₁和 R₂不同时为H;

[0008]



[0009] 其中, R_3 为有乙酰基 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-$, 缩写为 Ac) 保护或没有乙酰基保护的单糖基团 (所述单糖基团包括: 葡萄糖基团 (Glc-)、半乳糖基团 (Gal-)、甘露糖基团 (Man-)、乙酰氨基葡萄糖基团 (GlcNAc-)、乙酰氨基半乳糖基团 (GalNAc-)、岩藻糖基团 (Fuc-) 或唾液酸基团 (Sia-)), 其结构如式 IIIa ~ IIIg 所示:

[0010]

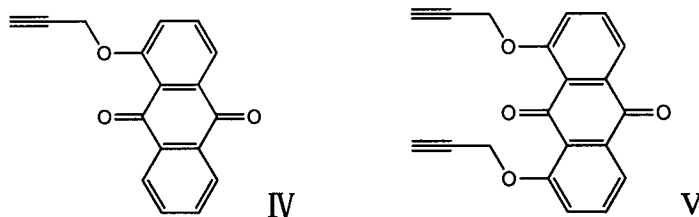


[0011] 式 IIIa ~ IIIg 中, R_4 为 H 或 Ac。

[0012] 本发明的另一个目的在于, 揭示上述葱醌类化合物 (式 I 所示化合物) 的一种用途, 即式 I 所示化合物在制备检测凝集素电化学传感器中的应用。

[0013] 此外, 本发明还提供一种制备式 I 所示化合物的方法, 所述方法的主要步骤是: 在有抗坏血酸钠和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 存在、及室温 ($15^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$, 下同) 和搅拌条件下, 首先由乙酰基保护的 1-叠氮 1-脱氧的上述各种单糖 (R_3-N_3) 与含单丙炔基 (式 IV 所示化合物) 或双丙炔基 (式 V 所示化合物) 的葱醌类化合物于干燥有机溶剂中反应, 得到三氮唑基偶联乙酰基糖-醌复合物的中间体; 然后将所得中间体溶解于有机溶剂中, 加入过量三乙胺, 70°C 搅拌至少 3 个小时, 经纯化得到目标产物 (式 I 所示化合物);

[0014]



[0015] 其中, 所述由乙酰基保护的 1-叠氮 1-脱氧的各种单糖化合物 (R_3-N_3) 可经由各种乙酰化单糖的经典端基溴化及叠氮取代制得, 具体步骤参见 Alvarez S.G. & Alvarez, M. T. *Synthesis*, 1997, 413-414; 式 IV 或式 V 所示化合物由 1-羟基葱醌或 1,8-二羟基葱醌与溴丙炔在碱性条件下的 Williamson O-烷基化反应制备, 具体 Williamson 法参见 He, X.-P. et al. *New J. Chem.*, 2011, 35, 622-631。

附图说明

[0016] 图 1 为 G0 及化合物 I A 和 I B 与 G0 堆叠后的原子力显微镜图像

[0017] 其中 a 为 G0 的原子力显微镜图像 ;b 为 G0 与化合物 I A 堆叠后的原子力显微镜图像 ;c 为 G0 与化合物 I B 堆叠后的原子力显微镜图像

[0018] 图 2 为 G0 及化合物 I A 和 I B 与 G0 堆叠后的拉曼光谱与红外光谱

[0019] 其中 a1 为 G0 的拉曼光谱 ;a2 为 G0 与化合物 I A 堆叠后的拉曼光谱 ;a3 为 G0 与化合物 I B 叠后的拉曼光谱 ;b1 为 G0 的红外光谱 ;b2 为 G0 与化合物 I A 堆叠后的红外光谱 ;b3 为 G0 与化合物 I B 堆叠后的红外光谱。

[0020] 图 3 为化合物 I A 和 I B 在不同扫速下的循环伏安图

[0021] 其中 a 为化合物 I A 的循环伏安图 ;b 为化合物 I A 的循环伏安图

[0022] 图 4 为应用示差脉冲伏安 (DPV) 检测化合物 I A 和 I B 经由 G0 堆叠搭建的 SPE 对于特异或非特异凝集素的电化学传感

[0023] 其中 a 为不同浓度花生凝集素存在时含化合物 I A 传感器的 DPV 电流改变 ;b 为不同浓度花生凝集素存在时含化合物 I B 传感器的 DPV 电流改变 ;c 不同特异或非特异凝集素存在时含化合物 I A 和化合物 I B 传感器的 DPV 电流淬灭效率

[0024] 图 5 为应用 DPV 检测化合物 I A 经由 G0 堆叠搭建的 SPE 对于 Hep-G2 肝癌细胞系的电化学传感

[0025] 其中 a 为不同浓度野生 Hep-G2 细胞存在时含化合物 I A 传感器的 DPV 电流改变 ;b 为 Hep-G2 表面 ASGP-R1 受体的敲除效率 ;c 为不同浓度对照组 Hep-G2 细胞存在时含化合物 I A 传感器的 DPV 电流改变 ;d 为不同浓度 ASGP-R1 受体部分敲除 Hep-G2 细胞存在时含化合物 I A 传感器的 DPV 电流改变

[0026] 图 6 为使用所制备糖基蒽醌化合物经由氧化石墨烯的 π -堆叠效应在 SPE 上构建生物传感器,并应用 DPV 检测野生型 (表面 ASGP-R 受体不敲除) 或部分敲除 ASGP-R 受体的 Hep-G2 肝癌细胞的示意图。

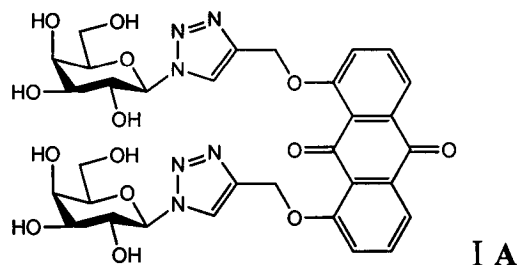
具体实施方式

[0027] 下面通过实施例及说明书附图对本发明作进一步阐述,其目的仅在于更好理解本发明的内容。因此,所举之例不限制本发明的保护范围。

[0028] 实施例 1

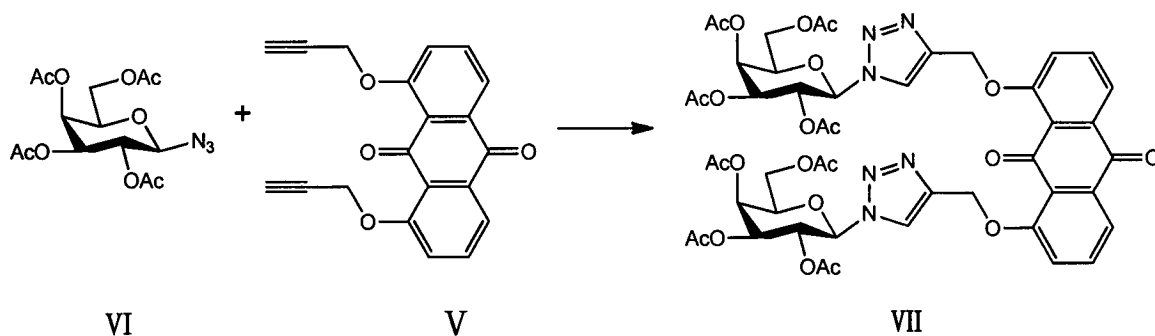
[0029] 式 I A 所示化合物 (简记为化合物 I A,下同) 的制备:

[0030]



[0031] (1) 化合物 VII 的制备:

[0032]



[0033] 将化合物 VI (253mg, 0.68mmol) 和化合物 V (94.2mg, 0.34mmol) 溶于 10mL CH_2Cl_2 中, 依次加入水 (10mL)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 当量) 和 L-抗坏血酸钠盐 (6 当量), 室温下搅拌过夜。TLC 显示初始物基本消失, 且反应液上层呈绿色, 下层呈棕黄色, 混合液用 CH_2Cl_2 稀释, 水洗, 无水 MgSO_4 干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经硅胶柱层析分离提纯 (乙酸乙酯: 石油醚 = 3 : 1, V/V), 得到淡黄色针状晶体 (化合物 VII, 193mg, 52%), $R_f = 0.27$ (乙酸乙酯: 石油醚 = 3 : 1, V/V)。

[0034] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) $\delta = 8.20$ (s, 2H), 7.90 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 7.64 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 7.46 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 6.04 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 2H), 5.67 (t, $J = 9.6\text{Hz}$, 2H), 5.56 (d, $J = 3.2\text{Hz}$, 2H), 5.45 (m, 4H), 5.36 (dd, $J = 3.6, 10.4\text{Hz}$, 2H), 3.45 (t, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 4.22-4.13 (m, 4H), 2.22, 2.03, 2.01, 1.82 (4s, 24H) ;

[0035] $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3) : $\delta = 183.5, 182.4, 170.3, 170.1, 170.0, 168.8, 157.8, 144.3, 134.8, 134.0, 124.8, 122.9, 121.3, 120.2, 86.0, 73.8, 70.8, 67.9, 67.0, 63.8, 61.2, 20.7, 20.6, 20.5, 20.2$;

[0036] HR-ESI-MS : calcd. for $[\text{C}_{48}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{22} + \text{Na}]^+$ 1085.2867, found 1085.2864.

[0037] (2) 目标化合物 (化合物 I A) 的制备 :

[0038] 将化合物 VII (100mg, 0.09mmol) 溶于甲醇 (10mL) 中, 加热至 80°C , 待化合物溶解后加入水和过量三乙胺并于 80°C 下回流反应 3 小时。TLC 检测反应结束, 液减压蒸馏除去溶剂, 硅胶柱层析分离 (乙酸乙酯: 乙醇 = 5 : 1, V/V), 得到淡黄色针状晶体 (化合物 I A, 33mg, 49%)。 $R_f = 0.32$ (乙酸乙酯: 乙醇 = 5 : 1, V/V)。

[0039] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, D_2O , 90°C) : $\delta = 8.74$ (s, 1H), 8.13-8.06 (m, 4H), 7.96 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 6.07 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 2H), 5.82 (br s, 4H), 4.74-4.59 (m, 2H), 4.49 (d, $J = 3.2\text{Hz}$, 2H), 4.37 (t, $J = 6.4\text{Hz}$, 2H), 4.27 (dd, $J = 3.6, 9.6\text{Hz}$, 2H), 4.15 (d, $J = 5.6\text{Hz}$, 4H) ;

[0040] FTIR (KBr) : $\tilde{\nu} = 3387, 2922, 2854, 1669, 1586, 1455, 1382, 1320, 1283, 1242, 1096, 1044, 988, 893, 872, 744$ (cm^{-1}) ;

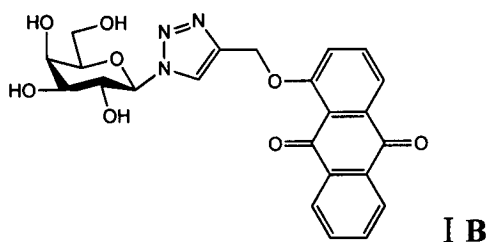
[0041] HR-ESI-MS : calcd. for $[\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_{14} + \text{Na}]^+$ 749.2031, found 749.2027 ;

[0042] HPLC ($t_R = 9.9\text{min}$ over 25min of eluent (acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O} = 5\% : 95\%$ to $95\% : 5\%$, purity 96.9%))。

[0043] 实施例 2

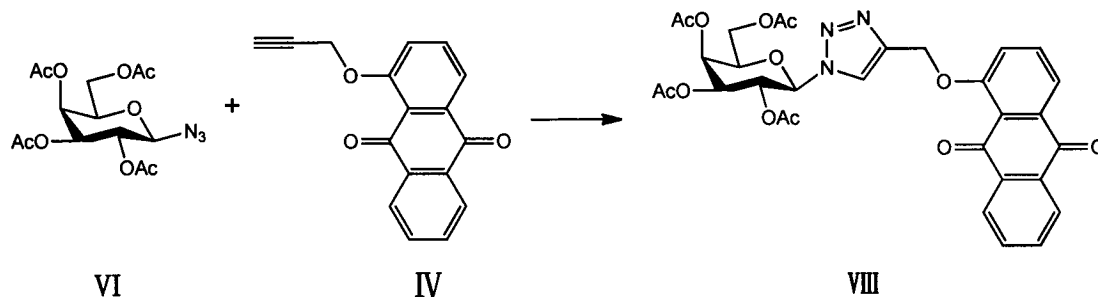
[0044] 化合物 I B 的制备 :

[0045]



[0046] (1) 化合物 VIII 的制备：

[0047]



[0048] 将化合物 VI (224mg, 0.6mmol) 和化合物 IV (100mg, 0.4mmol) 溶于 10mL CH_2Cl_2 , 依次加入水 (10mL)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 当量) 和 L-抗坏血酸钠盐 (6 当量), 室温下搅拌过夜。TLC 显示初始物基本消失, 且反应液上层呈绿色, 下层呈棕黄色, 混合液用 CH_2Cl_2 稀释, 水洗, 无水 MgSO_4 干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经硅胶柱层析分离提纯 (乙酸乙酯: 石油醚 = 4 : 1, V/V), 得到淡黄色针状晶体 (化合物 VIII, 218mg, 88%)。 $R_f = 0.23$ (乙酸乙酯: 石油醚 = 1 : 2, V/V)。

[0049] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : $\delta = 8.31-8.26$ (m, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.84-7.75 (m, 2H), 7.74 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 7.53 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 5.88 (t, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 5.65 (t, $J = 10.0\text{Hz}$, 1H), 5.58 (d, $J = 3.2\text{Hz}$, 1H), 5.49 (s, 2H), 5.27 (dd, $J = 3.2, 10.0\text{Hz}$, 1H), 4.28-4.15 (m, 3H), 2.27, 2.07, 2.03, 1.88 (4s, 12H) ;

[0050] $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3) : $\delta = 183.2, 182.3, 170.4, 170.1, 169.9, 168.9, 158.7, 144.5, 135.7, 135.0, 134.9, 134.2, 133.4, 132.5, 127.1, 126.7, 122.3, 122.2, 120.7, 120.3, 86.3, 74.0, 70.8, 67.9, 66.9, 63.7, 61.3, 20.7, 20.6, 20.5, 20.2$;

[0051] HR-ESI-MS : calcd. for $[\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{13} + \text{H}]^+$ 651.1779, found 651.1775。

[0052] (2) 目标化合物 (化合物 I B) 的制备：

[0053] 将化合物 VIII (120mg, 0.19mmol) 溶于甲醇 (10mL) 中, 加热至 80°C , 待化合物溶解后加入水和过量三乙胺并于 80°C 下回流反应 3 小时。TLC 检测反应结束, 液减压蒸馏除去溶剂, 硅胶柱层析分离 (乙酸乙酯: 甲醇 = 4 : 1, V/V), 得到淡黄色针状晶体 (化合物 I B, 80mg, 91%)。 $R_f = 0.45$ (乙酸乙酯: 甲醇 = 4 : 1, V/V)。

[0054] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : $\delta = 8.46$ (s, 1H), 8.15-8.12 (m, 2H), 7.93-7.84 (m, 5H), 5.57 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 5.44-5.38 (m, 2H), 5.31 (d, $J = 6.0\text{Hz}$, 1H), 5.09 (d, $J = 5.6\text{Hz}$, 1H), 4.78 (t, $J = 5.6\text{Hz}$, 1H), 4.72 (d, $J = 5.2\text{Hz}$, 1H), 4.14-4.07 (m, 1H), 3.79-3.74 (m, 2H), 3.60-3.52 (m, 3H) ;

[0055] $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : $\delta = 182.7, 181.1, 158.6, 142.4, 135.4, 135.0, 134.6, 134.4, 133.5, 131.9, 126.6, 126.1, 123.6, 120.9, 120.4, 119.4, 88.1, 78.5, 73.7, 69.3, 68.5, 62.5, 60.5$; FTIR (KBr) : $\tilde{\nu} = 3400, 2924, 2878, 1670, 1587, 1457, 1384, 1319, 1270,$

1239, 1096, 1065, 1050, 974, 872, 803, 710 (cm^{-1})

[0056] HR-ESI-MS :calcd. for $[\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_8+\text{H}]^+$ 468. 1407, found 468. 1406 ;

[0057] HPLC($t_r=11.7\text{min}$ over 25min of eluent(acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}=5\%:95\%$ to $95\%:5\%$), purity99%)。

[0058] 实施例 3

[0059] 电极的自组装制备及表征

[0060] (1) 将丝网印刷电极 (SPE) 在 0. 1M 的 PBS 溶液中进行活化, 电压为 2. 0V, 活化时间为 200s。电极在室温下晾干, 放在冰箱中待用。将 4mL 的化合物 I A 或 I B 的水溶液 (1mg/ml) 与氧化态石墨烯 (GO, 其采用两步氧化法制备, 具体参见 Kovtyukhova, N. I., et al. Chem. Mater. 1999, 11, 771-778) 的水溶液 (0. 1mg/L) 混合, 室温下搅拌 4 小时。形成均一体系后取 GO 与化合物 I A 或 I B 的混合液 0. 2 μL 滴于 SPE 的工作电极上 (由石墨组成), 室温下晾干。

[0061] (2) 由图 1 可知, 应用原子力显微镜观测制备好的 GO 厚度为 1 到 1. 2nm (图 a), 与文献报道相符 (Song, W., et al. Biosens. Bioelectron. 2011, 26, 3181-3186), 而经 π -堆叠作用后的石墨烯-糖醌 (化合物 I A (图 b) 或 I B (图 c)) 复合纳米材料厚度上升为 1. 6 ~ 1. 7nm, 证明两者间已紧密结合。

[0062] (3) 由图 2 可知, 应用 Raman 光谱和红外表征复合纳米材料的形成。GO 的 Raman 谱中 (图 2-a1) 在 1354 和 1604 cm^{-1} 处出现石墨烯的标准 D 与 G 谱带, 其强度比 I_D/I_G 为 0. 82。对于修饰过的 GO (图 2-a2 (与化合物 I A 结合) 和图 2-a3 (与化合物 I B 结合) 显示其 I_D/I_G 比率分别上升至 0. 98 和 0. 99, 说明相比未修饰的 GO 这些复合物的碳 sp^2 -杂化程度由于化合物的存在而增强。

[0063] 同样由图 2 可知, 应用傅立叶变换红外对复合材料进行进一步表征, 经化合物 I A 修饰的 GO (图 2-b2)、经化合物 I B 修饰的 GO (图 2-b3) 和未修饰 GO (图 2-b1) 比较, 明显多出了化合物葱醌与三氮唑连接键、半乳糖环以及三氮唑环上键的红外特征峰。这些数据进一步说明 GO 与葱醌糖可经由 π -作用诱导成功进行堆叠。

[0064] (4) 由图 3 可知, 应用循环伏安法 (CV) 对含 GO-I A 和 GO-I B 的 SPE 进行电化学表征, 使用设备为 CHI660 电化学工作站, 扫速为 0 到 0. 12V/s, 扫描范围为 0 到 -0. 8V, 由化合物 I A (图 3a) 和化合物 I B (图 3b) 的循环伏安图可知: 其还原峰为 0. 5V 左右, 氧化峰为 0. 45V 左右, 两峰对称且峰间距较小, 说明电子传递过程较快。图 3a 中双糖-醌复合物的峰间距 (96mV) 比图 3b 中单糖-醌复合物间距 (56mV) 大, 说明说明前者由于更多糖残基的存在而在更大程度上阻碍了醌的电子传递。在不同扫速的情况下, 其电流与扫速成正比关系, 证明化学行为是由界面控制的 (内插图), 从而推测 GO-糖醌复合物在 SPE 上形成了良好、稳固的修饰层。

[0065] 实施例 4

[0066] 糖-凝集素的电化学生物传感

[0067] (1) 应用灵敏的电化学检测手段示差脉冲伏安法 (DPV) 对糖-凝集素识别进行检测 (凝集素为市售品)。将 3 μL 溶于 PBS 缓冲液 (pH 值为 7. 0) 的凝集素滴于含 GO-I A 和 GO-I B 的 SPE 工作电极, 室温下孵育 30 分钟后用 PBS 及去离子反复水冲洗 3 次以除去非特异吸附。将电极置入预先除氧的 PBS 溶液中, 设置扫描范围 -0. 7 到 -0. 2V, 静置时间 2s, 扫

描幅度 5V 进行 DPV 数据采集,具体见图 4。

[0068] 图 4 中,图 4a 和 4b 分别代表含化合物 I A 和化合物 I B 的 SPE 体系中加入由上到下 0,0.05,0.1,0.2,0.3,0.4 和 0.5mM 可特异识别半乳糖的花生凝集素 (PNA) 后其 DPV 的改变,可见两个电极在浓度渐增凝集素的存在下均显示了逐渐淬灭的电流,这是由于 PNA 与半乳糖结合从而使电极表面形成了凝集素涂层以阻碍蒽醌基团的电子传递。此外,在所有浓度条件下,含 2 个糖基的双齿化合物 I A 的电流淬灭程度始终高于含一个糖基的化合物 I B,且在最高浓度下前者最大淬灭效率较后者高出 41%,可归结于前者的一种“多簇状效应”(Peters, R. J. *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 2013-2025)。

[0069] 随后对两个电极加入 0.3mM 的各种特异或非特异凝集素,考量其生物特异性(结果见图 4c)。我们发现在 PNA 的存在下,化合物 I A 和化合物 I B 同样显示了程度不同的电流淬灭率(I_0 为初始电流, I 为加入凝集素后的电流变化),而在其余非特异凝集素伴刀豆球蛋白 (ConA)、荆豆凝集素 (UEA-I)、麦胚凝集素 (WGA) 和豌豆凝集素 (PSA) 的存在下,其电流基本不产生变化。有趣的是,加如大豆凝集素 (SBA) 后含化合物 I A 的 SPE 同样产生了一个较小的电流淬灭,这是由于此类凝集素可弱特异地识别半乳糖。于是,通过上述实例我们证明了所搭建的简易电化学传感器具备良好的生物特异性,可灵敏区分特异、非特异以及弱特异凝集素的存在。

[0070] (2) 应用 DPV 检测覆盖 GO-I A 的 SPE 对于表面含有半乳糖特异识别受体蛋白 ASGP-R 肝癌细胞 Hep-G2 (细胞由中科院上海药物研究所新药筛选中心提供),结果见图 5。

[0071] 图 5 中,图 5a 所示,当对电极加入 5000,10000,100000,200000 和 500000 个 /mL 的野生型 Hep-G2 后,其电流呈浓度依赖式下降。为验证这一现象是由 ASGP-R 受体与半乳糖的特异识别结合诱导的,对细胞进行了 ASGP-R1 的敲除实验 (Yang, J., et al. *J. Viral Hepatitis* 2006, 13, 158-165);图 5b 显示参照组细胞含有完整的受体(左)而敲除组的受体含有量降为约 30% (右)。随后的 DPV 实验证明,在相同细胞浓度的情况下,化合物 I A 对于参照组细胞的响应完全与野生型组相同(图 5c)而对于敲除组显示了显著弱化的电流淬灭(图 5d),说明这一结合是由细胞表面糖识别受体与电极覆盖糖的特异作用介导的。这些数据验证我们构建的体系适用于探测细胞间的糖-凝集素识别。

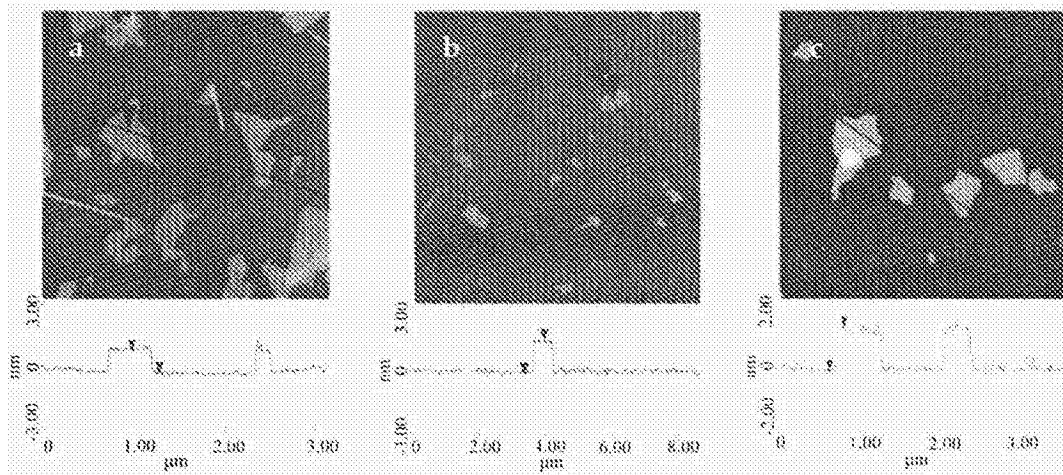


图 1

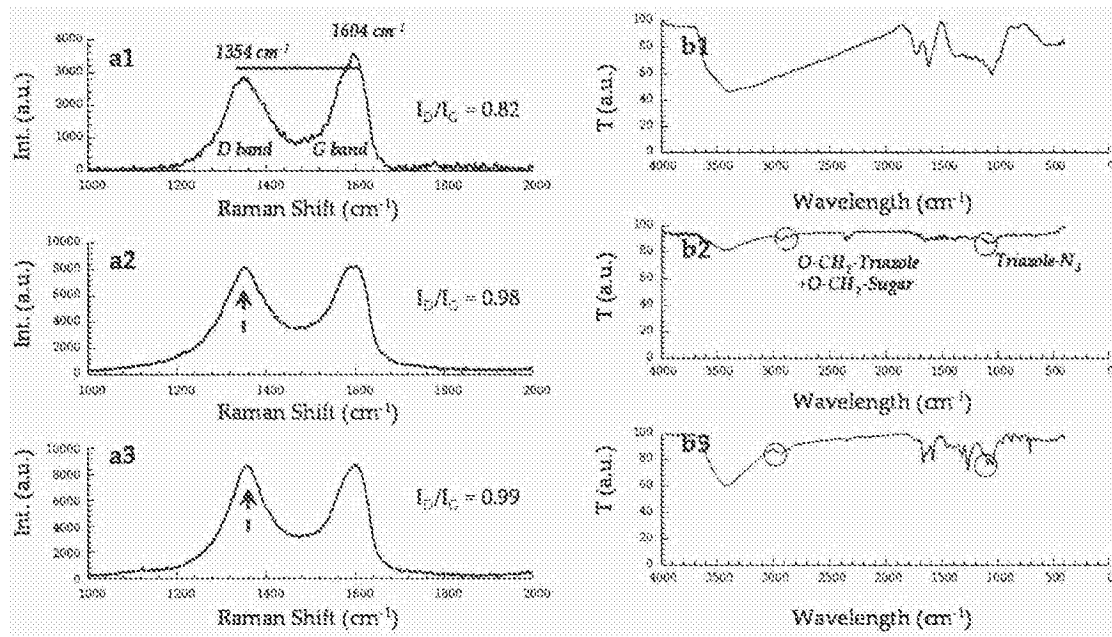


图 2

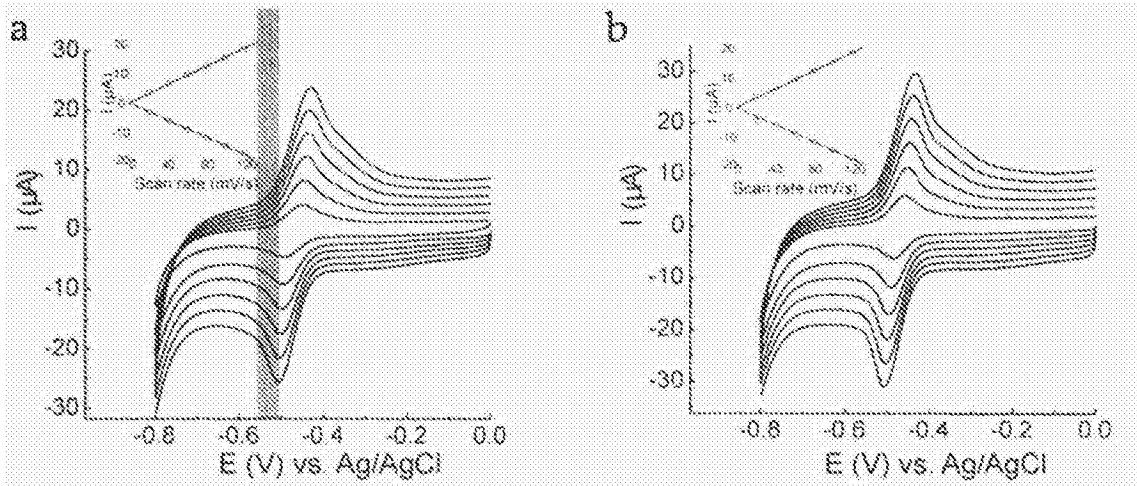


图 3

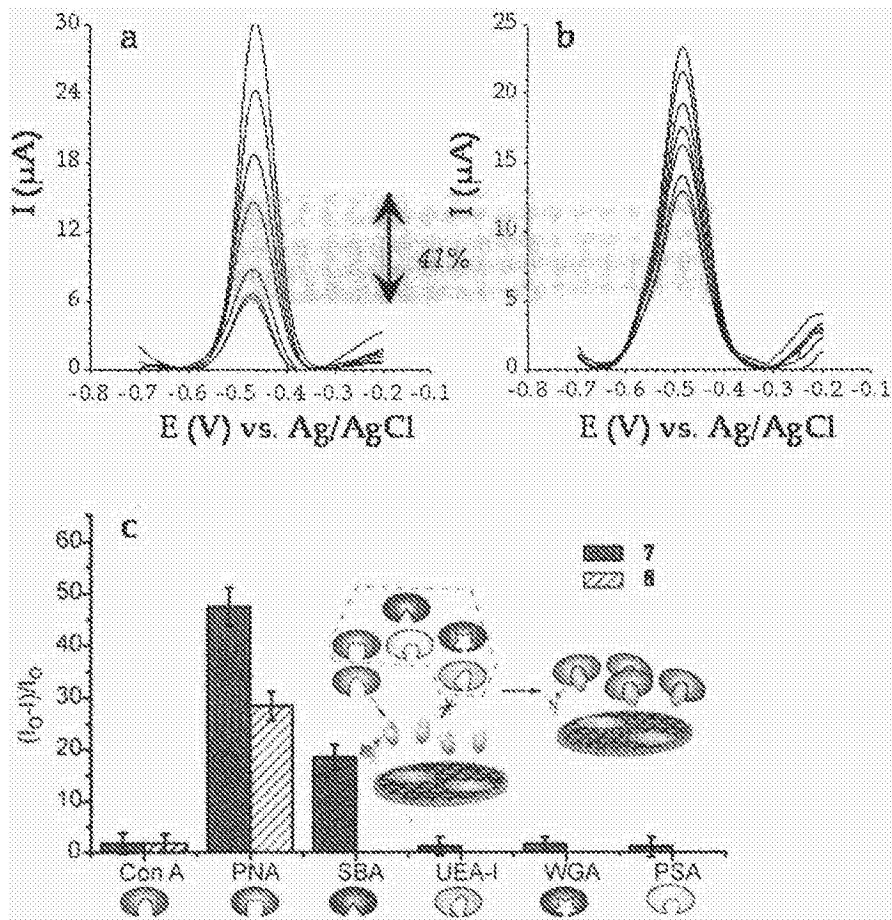


图 4

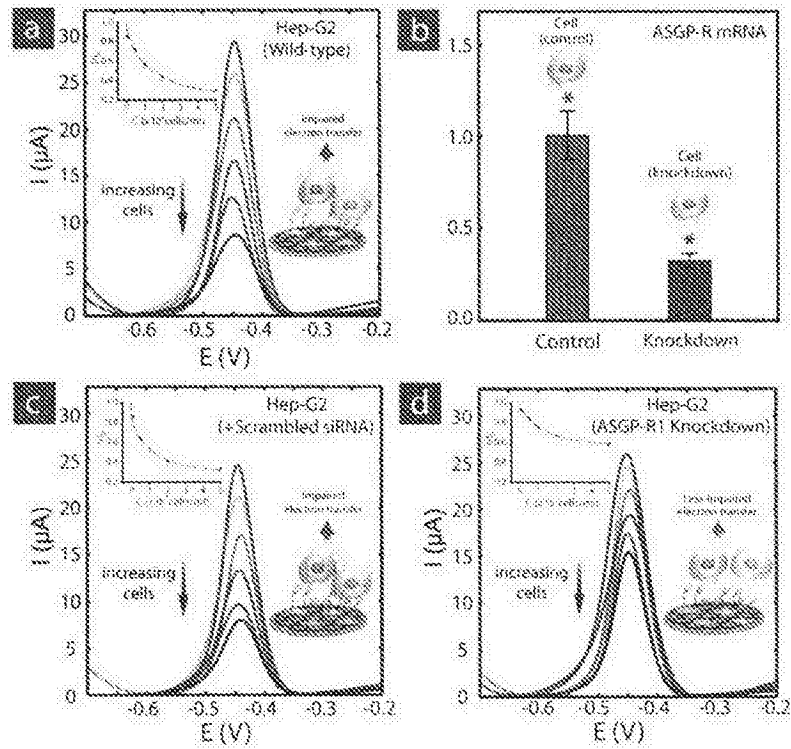


图 5

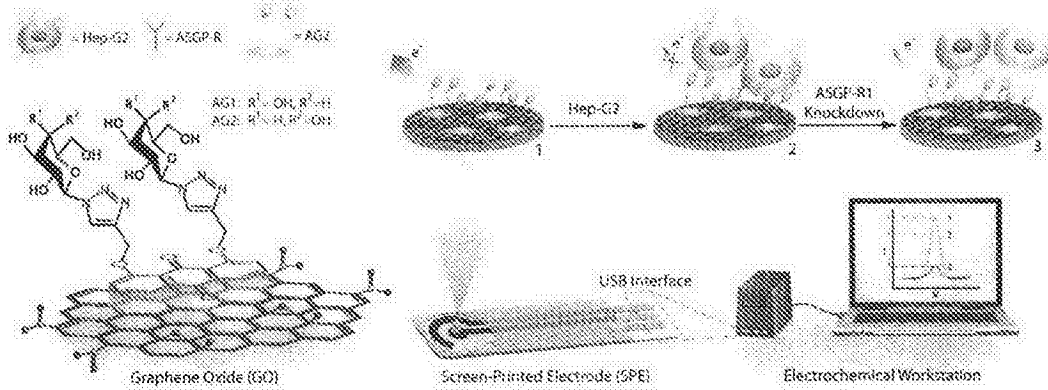


图 6