三种不同元素掺杂的碳点与DNA相互作用及其机制研究

罗华健^{1†}, 李海梅^{1†}, 肖琦^{1,2}, 黄珊^{1,2*}, 刘义^{1,2*}

1. 南宁师范大学化学与材料学院, 广西天然高分子化学与物理重点实验室, 南宁 530001

2. 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072

†同等贡献

*通讯作者, E-mail: huangs@nnnu.edu.cn; yiliu@whu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-09; 接受日期: 2020-08-17; 网络版发表日期: 2020-12-23

国家自然科学基金(编号: 21873075, 21864006, 21763005)资助项目

摘要 碳点(carbon dots, CDs)在材料学及生物学相关领域的研究已引起科研人员的广泛关注. 本文采用一步水热法, 制备了三种具有不同元素掺杂的CDs、N-CDs、N,S-CDs, 并结合多种光谱法、熔链温度法和黏度法, 系统地研究了三种不同元素掺杂的碳点与ctDNA结合模式以及结合能力的差异. 荧光实验证明三种不同性质的碳点CDs、N-CDs、N,S-CDs与ctDNA的相互作用模式为沟槽结合, 结合力主要为氢键和范德华力, 并伴随着轻微的静电作用力. 在强电解质和变性剂的存在下, 会减弱碳点与ctDNA之间的沟槽结合. 圆二色光谱实验和红外光谱实验反映了碳点与ctDNA的沟槽结合作用并不会明显改变ctDNA的构象. 与未掺杂的碳点(CDs)相比, 氮硫元素的掺杂可使N,S-CDs与ctDNA的沟槽结合能力减弱, 但是加大碳点表面电荷, 可增强N-CDs与ctDNA的结合. 这一结论为碳点的设计及其在生物学领域中的应用提供了理论参考.

关键词 CDs, N-CDs, N,S-CDs, 小牛胸腺DNA, 作用机理, 热力学参数, 光谱法

1 引言

荧光染料或者主要由重金属组成的传统半导体量子点(quantum dots, QDs), 通常具有一定的细胞毒性, 因此在细胞和体内研究中存在一定的局限性. 作为新型碳基纳米材料, 荧光碳点(carbon dots, CDs)因具有优异的光致发光特性、光电性能和良好的生物相容性, 正逐渐成为纳米材料研究中的后起之秀^[1,2]. CDs表现出卓越而独特的性质, 包括易于制备和功能化、尺

寸小、生物相容性好、细胞毒性低以及良好的抗光漂白性能^[3]. 因其特殊的优势, 已被用于许多领域, 包括生物成像、生物学传递系统、荧光传感器、太阳能电池、催化剂、诊断、纳米医学^[4].

DNA是遗传信息的载体, 是体内大部分药物分子作用的靶标. DNA与小分子的相互作用模式是许多研究领域的重要课题, 包括在药物化学、生物学、临床医学等领域的应用^[5]. 许多研究报告指出, 量子点的毒性取决于其大小和表面电荷^[6,7]. Hayden等^[8]证明, 疏水

引用格式: Luo H, Li H, Xiao Q, Huang S, Liu Y. Interactions and mechanisms of three different element doped carbon dots with DNA. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 74–84, doi: 10.1360/SSC-2020-0126

性阳离子AuNPs在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌上形成空间聚集模式, 这种模式取决于细菌的性质和AuNPs的大小. Zheng等^[9]指出, 羧基修饰的单壁碳纳米管引起的生长抑制, 是由于细菌DNA损伤以及与葡萄糖和ATP代谢相关基因的表达受到了抑制. 因此, 通过表面功能化, 可以轻松地调整纳米粒子的性能. 由于CDs具有较高的活性表面, 可与生物物质相互作用. 引入生物系统后, 一些纳米粒子可以立即与各种生物物质发生相互作用, 这将极大地影响这些纳米粒子的实际生物医学应用. 因此, 近年来碳基纳米材料与DNA的相互作用引起了广泛的关注^[10,11]. Feng等^[12]报道, 即使在生理(低盐浓度)条件下, 带正电荷的精胺官能化碳点也可以诱导DNA构型从B型向Z型过渡. Hu等^[13]研究了CDs与小牛胸腺DNA (calf thymus DNA, ctDNA)的相互作用, 结果表明, CDs不会引起ctDNA生物学活性发生改变, 并且CDs与ctDNA之间的结合方式是嵌插结合, 通过静态猝灭机制, 猝灭ctDNA-EB体系的荧光.

如今, 用于研究ctDNA与药物相互作用的ctDNA荧光探针通常是有机染料. 因此, 对新型和无毒荧光探针的开发是至关重要的科学课题. 碳点作为一种新型的碳基纳米材料, 具有独特而优异的特性, 激发了研究者的广泛探索. 碳基荧光纳米材料的不同合成工艺、表面不同的化学修饰以及不同元素的掺杂都有可能致其结构和光致发光特性不同. 所以, 在设计出有前途的、能完美取代有机荧光染料的荧光探针并进行实际生物应用之前, 不同性质的碳点与DNA之间结合的热力学和动力学信息非常重要, 亟待阐明.

基于此, 本文系统研究了在近似生理条件下三种不同性质的荧光碳点与ctDNA之间的相互作用模式. 根据文献的报道, 采用一步水热碳化法, 制备了三种具有不同元素掺杂的CDs、N-CDs、N,S-CDs. 通过使用多光谱方法、黏度法以及DNA熔链温度测量, 探究了三种碳点与ctDNA之间的相互作用模式以及结合能力的差异. 这将有助于进一步揭示碳点与ctDNA之间的相互作用机制, 并为碳点作为一种新型的生物体内无毒荧光探针的设计开发提供有价值的信息.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

紫外-可见吸收光谱仪(TU-1901, 北京普金杰通用

仪器有限公司); 高灵敏度稳态/瞬态荧光光谱仪(QM-8075, 日本HORIBA); 荧光分光光度计(RF-5301, 日本Shimadzu); 傅里叶变换红外光谱仪(Nicoletti S10, 美国Thermo Fisher); 圆二色光谱仪(Chirascan, 英国Applied Photophysics); 电子天平(BSA124S-CW, 北京赛多利斯仪器系统有限公司); 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Bruker OmniFlex LT, 美国Bruker Daltonics); 纳米粒度分析仪(SZ-100, 日本HORIBA); pH计(PB-10, 德国Sartorius); 微量液体转移器(德国Transferpette 公司); 1.0 cm比色皿(美国Perkin Elmer公司); 恒温水槽(SDC-6, 宁波心智科技股份有限公司); 超纯水净化仪(Millipore-Q, 美国Millipore).

海藻酸钠、柠檬酸一水合物、L-谷胱甘肽(L-GSH)、多乙烯多胺(PEPA)、磷酸、对苯二胺均购自中国上海麦克林生物化学技术有限公司. 小牛胸腺DNA (ctDNA, $\geq 97\%$)购自Sigma (美国). ctDNA溶于Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)中并置于4℃的冰箱储存. 使用紫外可见分光光度法记录ctDNA在260 nm处的吸光度, 从而测定ctDNA的浓度, 其消光系数为 $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. 其他试剂若无特殊说明均为分析纯. 在整个实验中使用电阻率为 $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ 的超纯水.

2.2 实验方法

紫外-可见吸收光谱法: 扫描速度设置为高, 所有测量均使用石英比色皿(光程为1.0 cm). 测量波长为200~800 nm, 间隔为0.5 nm. ctDNA-CDs: ctDNA的浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; CD的浓度从0到 $7.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, 增量为 $0.74 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. ctDNA-N-CDs: ctDNA的浓度为 $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; N-CDs的浓度从0到 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, 增量为 $0.20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. ctDNA-N,S-CDs: ctDNA的浓度为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; N,S-CDs的浓度从0到 $4.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, 增量为 $0.44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

熔链温度法: 温度从20℃上升到100℃, 测定三种不同碳点加入前后的ctDNA在260 nm处的吸光度. ctDNA-CDs: ctDNA的浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; CD的浓度为 $7.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. ctDNA-N-CDs: ctDNA的浓度为 $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; N-CDs的浓度为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. ctDNA-N,S-CDs: ctDNA的浓度为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; N,S-CDs为 $4.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

黏度法: 在恒温水浴中, 保持 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 恒定温度,

采用黏度计测量不同浓度的溴化乙啶(ethidium bromide, EB)、三种不同掺杂碳点存在下ctDNA的黏度. ctDNA的浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; EB的浓度从0到 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; CDs的浓度从0到 $2.7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; N-CDs的浓度从0到 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; N,S-CDs的浓度从0到 $2.7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

荧光光谱法: 在 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 温度下, 激发波长设置为620 nm, 记录ctDNA-MG复合物在碳点存在时的荧光光谱, 并记录665 nm的荧光强度. ctDNA(MG)-CDs: 激发/发射狭缝为10.0/10.0 nm, ctDNA和MG的浓度分别为 5.0×10^{-5} 和 $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; CDs的浓度从0到 $7.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, 增量为 $0.74 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. ctDNA(MG)-N-CDs: 激发/发射狭缝为15.0/15.0 nm, ctDNA和MG的浓度分别为 8.0×10^{-5} 和 $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; N-CDs的浓度从0到 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, 增量为 $0.20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. ctDNA(MG)-N,S-CDs: 激发/发射狭缝为15.0/20.0 nm, ctDNA和MG的浓度分别为 2.0×10^{-5} 和 $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; N,S-CDs的浓度从0到 $4.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, 增量为 $0.44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

在298、304和310 K温度下, 记录CDs存在时ctDNA-CDs复合物的荧光光谱及在665 nm处的荧光强度. 实验浓度和参数保持不变.

在298 K下, 记录NaCl、 CaCl_2 、尿素(Urea)和盐酸胍(GuHCl)存在时, ctDNA(MG)-CDs体系的荧光光谱, 并记录665 nm的荧光强度. 实验浓度和参数保持不变.

圆二色光谱法: 扫描范围为200~260 nm, 扫描速度为 500 nm min^{-1} , 响应时间为0.5 s. ctDNA的浓度为 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. [CDs]/[ctDNA]的摩尔比为0.3:1、0.6:1和1:1. [N-CDs]/[ctDNA]的摩尔比为0.6:1、1.2:1和2:1. [N,S-CDs]/[ctDNA]的摩尔比为0.25:1、0.5:1、1:1和2:1.

红外吸收光谱法: 记录了ctDNA的红外(FTIR)光谱, 以及不同摩尔比[CDs]/[ctDNA]的ctDNA-CDs、ctDNA-N-CDs、ctDNA-N,S-CDs的差异光谱, 记录范围为 $1800 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$, ctDNA的浓度为 $3.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. [CDs]/[ctDNA]的摩尔比为0.07:1、0.14:1、0.21:1. [N-CDs]/[ctDNA]的摩尔比为0.01:1、0.02:1、0.03:1. [N,S-CDs]/[ctDNA]的摩尔比为0.01:1、0.02:1、0.03:1.

ζ -电势测量: 分散介质为水, 测量间隔为10 s. 扫描参数均设置为自动, 并且每个数据均为连续扫

描三次的平均值. 电极池(石墨, 6 mm)用作样品池. CDs的浓度为 $7.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; N-CDs的浓度为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; N,S-CDs的浓度为 $4.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

2.3 碳点的制备

CDs: 根据报道的合成方法制备主要元素为C、H、O的CDs^[14]. 摩尔浓度是根据MALDI-TOF-MS测定的平均相对分子量($1072.6 \text{ g mol}^{-1}$)进行计算的. 将0.25 g海藻酸钠、2.5 mL 3%过氧化氢和10 mL超纯水置于100 mL聚四氟乙烯密封高压釜中, 超声处理以形成均匀溶液. 密封高压釜, 并加热至 200°C , 保持12 h. 然后, 在室温下冷却, 并将所得溶液用1000 Da透析袋(上海绿鸟科技发展有限公司, 中国)进行透析48 h. 透析后, 将样品通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤, 接着进行冷冻干燥, 将所得固体重新溶于超纯水中, 制备成储备液, 以备后用.

N-CDs: 根据报道的合成方法并进行修改, 合成主要元素为C、H、O、N的N-CDs^[15], 摩尔浓度是根据MALDI-TOF-MS测定的平均相对分子量($1234.7 \text{ g mol}^{-1}$)进行计算的. 将0.1 g对苯二胺和0.2 mL磷酸(85 wt%)溶于40 mL水中, 并将所得溶液密封在衬有聚四氟乙烯的高压釜中, 加热到 180°C , 反应24 h. 冷却至室温后, 将深红色溶液通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤, 然后用氢氧化钠调节pH. 之后, 将获得的悬浮液用1000 Da透析袋透析48 h以纯化碳点. 最后, 将该溶液冷冻干燥, 以获得N-CDs粉末, 并再次溶于超纯水中, 以备下一步实验使用.

N,S-CDs: 所制备的含C、H、O、N、S元素的CDs通过所报道的文献进行合成^[16]. 摩尔浓度是根据MALDI-TOF-MS测定的平均相对分子量($1361.9 \text{ g mol}^{-1}$)进行计算的. 将2.0 g柠檬酸一水合物与0.6 g L-谷胱甘肽(GSH)混合放入50 mL圆底烧瓶. 在此, 柠檬酸和GSH分别用作碳源和掺杂元素源. 将烧瓶中的混合物在油浴中从室温加热至 180°C 后, 将10 mL多烯多胺(PEPA)添加到烧瓶中, 并在 180°C 下再保持1 h. 之后, 将反应烧瓶移出, 并自然冷却至室温. 然后, 将肉桂色糖浆状产物用丙酮溶解, 离心以获得黄色沉淀物. 用1000 Da透析袋透析2 d以纯化产物. 透析后, 通过冷冻干燥法获得黄色棉花糖状的N,S-CDs. 将N,S-CDs重新分散到超纯水中, 以备进一步使用.

3 结果与讨论

3.1 碳点的表征

3.1.1 紫外-可见吸收光谱和荧光激发/发射光谱

图1显示了三个碳点归一化的紫外-可见(UV-vis)吸收和归一化荧光光谱. 与大多数碳基荧光纳米材料相同, 这三个碳点在250 nm附近存在一个UV-vis吸收峰, 这可以归因于芳族 sp^2 键的 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁. 其中, CDs在355 nm的激发下的荧光发射峰位置为450 nm, 斯托克斯位移为95 nm. N-CDs在470 nm激发下的发射峰为613 nm, 斯托克斯位移为143 nm. N,S-CDs在345 nm激发条件下发射峰为435 nm, 斯托克斯位移为90 nm.

3.1.2 荧光发射光谱

如图S1 (网络版补充材料)所示, CDs的最大激发/发射波长为355/450 nm/nm. N-CDs的最佳激发/发射波长为470/613 nm/nm. N,S-CDs最大激发波长为345 nm, 最佳发射波长为435 nm. 荧光发射光谱反映了所制备的CDs和N,S-CDs具备蓝色荧光, 在355和345 nm激发条件下, 测定CDs和N,S-CDs的绝对荧光量子产率分别为1.36%和15.48%. N-CDs具备优异的红色荧光性能, 且在470 nm激发下的绝对荧光量子产率为3.36%. 和N,S-CDs相比, 较长的发射波长能使N-CDs与CDs具有更好的体内细胞成像应用.

3.1.3 红外吸收光谱

通过红外吸收光谱, 可以对三种碳点的表面官能团进行表征, 结果如图S2所示. CDs在 3390 cm^{-1} (由 $-\text{OH}$ 振动引起)、 1608 cm^{-1} (归因于 $-\text{C}=\text{O}$)、 1405 cm^{-1} (由 $-\text{COOH}$ 中的 $-\text{OH}$ 弯曲振动引起)和

1100 cm^{-1} (归因于 $-\text{C}-\text{O}$)处均有吸收峰^[14], 表明CDs表面具有丰富的 $-\text{OH}$ 和 $-\text{COOH}$ 基团, 主要元素为C、H、O. N-CDs的FTIR光谱显示, $\text{O}-\text{H}$ 或 $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动在 3380 cm^{-1} , $\text{C}=\text{C}$ 或 $\text{C}=\text{N}$ 振动在 1620 cm^{-1} 处, 在 1374 、 1293 cm^{-1} 处代表 $-\text{OH}$ 和 $\text{C}-\text{O}$ 的振动, 在 1500 cm^{-1} 处的尖峰由 $-\text{NH}_3^+$ 产生, 表明N-CDs易于在酸性溶液中接受 H^+ 离子, 以形成带正电荷的纳米颗粒^[14], 这也进一步验证了N-CDs所包含的主要元素为C、H、O、N. N,S-CDs表面存在多个极性基团(如 $-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}_2$ 在 3424 和 3275 cm^{-1} 处的伸缩振动). 1364 cm^{-1} 处的吸收峰归因于 $\text{C}-\text{S}$ 的拉伸振动, 此外, $\text{C}=\text{O}$ (1651 cm^{-1})的拉伸振动, $\text{N}-\text{H}$ (1566 cm^{-1})的弯曲振动和不对称伸缩振动, $\text{C}-\text{NH}-\text{C}$ (1121 cm^{-1})的变化, 表明N,S-CDs中氮硫元素的成功掺杂, 且在碳点表面具有丰富的 $-\text{NH}_2$ 官能团^[16].

最后对所合成的三种不同元素掺杂的碳点进行一个对比分析. 首先CDs根据报道的合成方法制备^[14], 主要元素为C、H、O的CDs, 而N-CDs^[15]和N,S-CDs^[16]则在不掺杂元素的碳点的基础上分别增加了氮元素和氮、硫元素. 通过荧光激发发射光谱可知CDs的最大激发/发射波长为355/450 nm/nm, N-CDs的最佳激发/发射波长为470/613 nm/nm. N,S-CDs最大激发波长为345 nm, 最佳发射波长为435 nm. 荧光发射光谱反映了所制备的CDs和N,S-CDs具备蓝色荧光, 在355和345 nm激发条件下, 测定CDs和N,S-CDs的绝对荧光量子产率分别为1.36%和15.48%. N-CDs具备优异的红色荧光性能, 且在470 nm激发下的绝对荧光量子产率为3.36%. 和N,S-CDs相比, 较长的发射波长能使N-CDs与CDs具有更好的体内细胞成像应用. 此外, 红外光谱表明CDs表面具有丰富的 $-\text{OH}$ 和 $-\text{COOH}$ 基团; N-CDs在 1500 cm^{-1} 处的尖峰由 $-\text{NH}_3^+$ 产生, 表明N-CDs易

图1 三种碳点CDs (a), N-CDs (b), N,S-CDs (c)的UV-vis吸收光谱和荧光激发/发射光谱(网络版彩图)

Figure 1 UV-vis absorption spectra and fluorescence emission/excitation spectra of ctDNA with CDs (a), N-CDs (b) and N,S-CDs (c) (color online).

于在酸性溶液中接受 H^+ 离子, 以形成带正电荷的纳米颗粒^[14]; 而进一步对CDs进行氮硫元素的掺杂, 会使其碳点表面具有丰富的 $-NH_2$ 官能团^[16].

通过 ζ -电势测量可知(图S3), CDs、N-CDs、N,S-CDs这三个碳点均带正电荷, 分别为+16.1、+22.3、+14.4 mV. N-CDs由于表面丰富的 $-NH_2$ 官能团的存在, 使N-CDs带有更多的正电荷, 这一特性使N-CDs与ctDNA的结合能力与不掺杂的CDs相比, 有较大区别. 以下通过多种光谱法对三种不同掺杂碳点与ctDNA的相互作用机制进行详细的对比分析.

3.2 碳点与ctDNA的相互作用

3.2.1 结合模式

紫外-可见吸收光谱法是研究小分子与DNA相互作用的最重要方法之一. 图2(a~c)显示了在增加碳点浓度情况下ctDNA的吸收光谱和差光谱. 由图可知, 随着碳点的不断添加, CDs、N-CDs与ctDNA在258 nm处的吸光度值之和略大于碳点和ctDNA复合物体系的吸光度值, 并且峰位置无明显变化. 这说明了CDs、N-CDs与ctDNA之间的相互作用产生了轻微的减色效应, 而N,S-CDs与ctDNA的作用则产生了相反的现象, 即出现了增色效应. 这可能是由于 $-NH_2$ 作为氢

键供体与ctDNA嘌呤和嘧啶的氢键受体之间的非共价相互作用^[17]. 轻微的减色效应和明显的增色效应都证明了物质分子与ctDNA之间为非嵌插作用结合. 因此可推测这三个碳点与ctDNA之间的作用方式可能是沟槽作用或静电作用力结合^[18].

一般而言, 小分子嵌插到DNA的双螺旋结构中, 可稳定DNA的天然结构, 并提高DNA螺旋结构的熔链温度, 从而导致DNA的 T_m 升高约5~8℃, 而非嵌插结合则不会使 T_m 有明显变化^[19]. 因此, 该方法可用作物质分子与DNA结合特性的指标. 在不存在和存在三种碳点的情况下, ctDNA的熔链温度如图3(a)所示. 可以看出, 与CDs、N-CDs、N,S-CDs结合前后, DNA的 T_m 分别为76.60、75.79、75.46和76.78℃. ctDNA的 T_m 值变化不明显, 证实了三种碳点与ctDNA之间结合模式为沟槽结合.

黏度实验可作为进一步探索碳点与ctDNA结合方式的方法. 本文通过改变添加的碳点与ctDNA溶液的浓度来进行黏度测量. 从图3(b)可以看出, ctDNA的相对黏度随溴化乙锭(ethidium bromide, EB)浓度的增加而显著增加. 通过作图, 求出ctDNA-EB体系的斜率近似于1, 反映了探针EB与ctDNA之间强烈的嵌插结合. ctDNA与碳点作用后黏度的微小变化, 表明这三种碳

图2 三种碳点与ctDNA作用的紫外-可见吸收光谱图(a~c)与荧光光谱图(d~f)(网络版彩图)

Figure 2 UV-vis absorption spectra (a~c) and fluorescence spectra (d~f) of three CDs with ctDNA (color online).

图3 三种碳点与ctDNA作用熔链温度图(a)和黏度图(b)(网络版彩图)

Figure 3 The temperature (a) and viscosity (b) diagrams of the three CDs interacting with ctDNA (color online).

点与ctDNA之间为沟槽结合或静电结合模式^[20], 这与熔链温度实验结果高度一致。

为了深入了解碳点与ctDNA的结合模式, 我们使用甲基绿(MG)作为荧光探针, 研究了碳点与ctDNA-MG体系的竞争结合。MG是典型的DNA沟槽结合探针, 可用作光谱探针来研究物质分子与DNA的结合方式^[21]。如果物质分子与DNA的沟槽区结合, 则碳点可以竞争MG与DNA的沟槽结合位点, 使ctDNA-MG复合物的荧光强度大大降低。如图2(d~f)所示, 与DNA结合后, MG的荧光强度显著增加。然而, 添加碳点后, ctDNA-MG复合物的荧光强度随碳点浓度的增加而逐渐降低, 这表明碳点取代了部分MG分子, 并将MG分子从ctDNA-MG体系中解离出来。这些结果再次证实了三种碳点与ctDNA之间的结合方式是沟槽结合^[22]。

3.2.2 荧光猝灭类型

荧光猝灭类型主要分为静态猝灭和动态猝灭。为了探究碳点对ctDNA-MG体系荧光的猝灭类型, 可以通过Stern-Volmer方程(1)进行阐述:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

其中, F_0 和 F 表示添加碳点前后的ctDNA-MG体系的荧光强度, K_{sv} 为Stern-Volmer猝灭常数, $[Q]$ 为碳点的浓度。实验测定了298、304和310 K三个不同温度下的荧光猝灭图, 并将所得数据通过Stern-Volmer方程式进行线性拟合, 结果如图4(a1~c1)所示, 所求出的猝灭常数 K_{sv} 列于表1中。很明显, 温度升高使 K_{sv} 值降低。静态猝灭的猝灭常数随温度的升高而降低, 而动态猝灭的情况则相反, 因此可证明这三种碳点与ctDNA-MG之间的猝灭类型均为静态猝灭机制^[23]。

3.2.3 结合常数

由于三个碳点与ctDNA-MG之间为静态猝灭机制, 即碳点与ctDNA之间形成了基态复合物, 从而猝灭了DNA与探针的荧光, 因此, 碳点与DNA之间的结合常数可以通过修正的Stern-Volmer方程(2)进行计算:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2)$$

其中 K_a 是结合常数, f_a 是溶剂可及的荧光团的摩尔分数。如图4中(a2~c2)为三个碳点与ctDNA-MG作用后运用修正的Stern-Volmer方程所计算出的Stern-Volmer图, 将所得数据进行线性拟合, 求出的结合常数列于表S1中。由表S1可知, 随着温度的升高, 体系的结合常数减小, 这进一步证明了碳点与ctDNA之间为静态猝灭机制。值得注意的是, N-CDs与ctDNA的结合常数为 $4.45 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, 说明N-CDs与ctDNA的结合能力最强。N,S-CDs与ctDNA的结合能力较弱, 两者之间的结合常数为 $1.52 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, 而不具有元素掺杂的CDs与ctDNA之间的结合常数为 $3.04 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ 。这主要是因为氮硫元素的掺杂削弱了碳点与ctDNA之间的结合能力, 使N,S-CDs与ctDNA的结合能力减弱。通过 ζ -电势测量可知(图S3), CDs、N-CDs、N,S-CDs这三个碳点均带正电荷, 分别为+16.1、+22.3、+14.4 mV。N-CDs由于表面丰富的 $-\text{NH}_2$ 官能团的存在, 使N-CDs带有更多的正电荷, 这一特性使N-CDs与ctDNA的结合能力较强。

3.2.4 结合力

物质分子与DNA的结合通常包括多种作用力, 如氢键作用力、静电作用力、疏水作用、范德华力等。通常, 可以通过Van't Hoff方程(式(3)、(4))

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

来计算热力学参数, 从而阐明主要结合力类型^[23]。如图5所示, 所计算得出的热力学参数包括焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和自由能变化(ΔG) (列于表S1中)。 ΔG 的负值表明三个碳点与ctDNA-MG复合物的结合过程是自发的, 而 ΔH 和 ΔS 均为负值表明氢键和范德华相互作用在该结合反应中起主要作用。

图 4 三种碳点与ctDNA作用的Stern-Volmer图(a1~c1)和修正的Stern-Volmer图(a2~c2)(网络版彩图)
Figure 4 Stern-Volmer plots (a1~c1) and modified Stern-Volmer plots (a2~c2) of three carbon dots interacting with ctDNA (color online).

表 1 不同温度下三个碳点与ctDNA-MG体系的Stern-Volmer猝灭常数

Table 1 Stern-Volmer quenching constants of three CDs and ctDNA-MG system at different temperatures

体系	T (K)	K_{sv} (10^4 L mol $^{-1}$)	R^2 ^{a)}	S.D. ^{b)}
ctDNA(MG)-CDs	298	6.91	0.997	0.002
	304	6.17	0.998	0.014
	310	5.54	0.998	0.014
ctDNA(MG)-N-CDs	298	2.20	0.999	0.003
	304	1.89	0.999	0.002
	310	1.65	0.999	0.002
ctDNA(MG)-N,S-CDs	298	1.05	0.999	0.003
	304	0.96	0.999	0.004
	310	0.83	0.999	0.004

a) 相关系数; b) 标准差

3.2.5 结合相互作用的影响

如图S3所示, 三个碳点均携带正电荷, 而DNA是一种携带负电荷的生物大分子, 所以碳点与DNA之间可能会存在静电作用力, 并且可能会受到溶液中的强电解质(如NaCl、CaCl₂)的影响. 因此, 本文探究了强

图 5 三种碳点与DNA作用的Van't Hoff图(网络版彩图)
Figure 5 Van't Hoff plots of three CDs interacting with DNA (color online).

电解质对三种碳点与DNA结合的影响, 运用修正的Stern-Volmer方程(式(2))进行线性拟合. 如图6(a~c)所示, 将所求出的结合常数 K_a 列于表S2中. 由表S2可知, 电解质NaCl的存在, 会引起三种碳点与ctDNA-MG体系的结合能力减小, 在CaCl₂影响下, 体系的结合常数下降更明显, 证明三种碳点与ctDNA之间存在轻微的静电结合力^[24].

变性剂(如Urea、GuHCl)的存在会破坏DNA的螺旋结构, 从而影响物质分子与DNA之间的结合, 因此

图 6 不同离子强度(a~c)以及不同变性剂(d~f)下三个碳点与ctDNA作用的修正Stern-Volmer图(网络版彩图)

Figure 6 Modified Stern-Volmer plots of ctDNA interacting with three CDs under different ionic strength (a~c) and different denaturants (d~f) (color online).

通过修正的Stern-Volmer方程(式(2))可以分析添加变性剂Urea、GuHCl的情况下三个碳点与ctDNA之间结合作用的影响如图6(d~f), 所求出的结合常数 K_a 列于表S3中. 在Urea、GuHCl的存在下, 三个体系的 K_a 值明显降低, 反映了变性剂存在下三个碳点与ctDNA之间的结合能力均较弱, 表明变性剂的存在能使ctDNA的双螺旋结构解开, 从而影响碳点与ctDNA的沟槽结合作用^[25].

3.3 ctDNA的构象研究

3.3.1 圆二色光谱法

圆二色光谱法是测定物质分子作用时DNA构象变化的一种技术. DNA的圆二色光谱在245和275 nm处分别存在一个明显的负峰和一个正峰信号. 245 nm处的负峰归因于DNA双螺旋结构的特征峰, 275 nm处的峰为碱基堆积的峰. CD光谱表明, 在沟槽结合和静电结合的情况下, DNA的正负峰变化不明显, 而嵌插结合则会引起DNA的正峰和负峰位置或强度发生较大的改变^[26]. 如图7所示, 添加碳点后ctDNA的圆二色光谱没有明显变化. 因此, 可以推断出, 由于三个碳点与ctDNA的沟槽结合, 并没有造成ctDNA结构的右手B型螺旋和碱基堆积显著变化^[27].

3.3.2 红外吸收光谱法

为了进一步确定碳点与ctDNA的特异性结合位点以及ctDNA的结构变化, 我们研究了碳点作用前后ctDNA的FTIR光谱差异. ctDNA在1800~800 cm^{-1} 区域内的红外吸收峰如图8所示. ctDNA磷酸盐的不对称和对称振动峰位置在1222和1090 cm^{-1} 处. 四个碱基G、T、A、C的红外吸收峰分别为1716、1653、1609和1506 cm^{-1} . 在968和835 cm^{-1} 处的峰位置归因于脱氧核糖C-C和C-O伸缩振动和磷酸二酯键. 随着[CDs]/[ctDNA]摩尔比的增加, 968和835 cm^{-1} 处的红外吸收峰没有发生移动, 这表明与碳点作用后, ctDNA的右手B型螺旋构象仍然保持稳定, 与圆二色光谱法结果高度一致. ctDNA的A和T碱基伸缩振动峰的位置不发生明显改变, 但是G和C碱基的伸缩振动带明显红移, 证明这三个碳点和ctDNA的G-C碱基对之间有较强的相互作用^[27].

4 结论

本文系统地研究了三种不同元素掺杂的碳点与ctDNA的结合模式以及结合能力的差异. 荧光实验证明了三种不同性质的碳点CDs、N-CDs、N,S-

图7 三种碳点CDs (a), N-CDs (b), N,S-CDs (c)与ctDNA作用的圆二色光谱图(网络版彩图)

Figure 7 CD spectra of CDs (a), N-CDs (b) and N,S-CDs (c) interacting with ctDNA (color online).

图8 三种碳点与ctDNA作用的红外光谱图(网络版彩图)

Figure 8 FTIR spectrum of the interaction between three CDs and ctDNA (color online).

CDs与ctDNA的相互作用模式为沟槽结合, 结合力主要为氢键和范德华力, 并伴随着轻微的静电作用力. 强电解质和变性剂的存在会减弱碳点与ctDNA之间的沟槽结合. 圆二色光谱实验和红外光谱实验反映了碳点与ctDNA的沟槽结合作用并不会明显改变ctDNA的构象. 值得注意的是, 与不掺杂元素的碳点

(CDs)相比, 氮硫元素的共掺杂可使碳点(N,S-CDs)与ctDNA的沟槽结合能力减弱, 但是增大碳点表面电荷, 可增强碳点(N-CDs)与ctDNA的结合. 这一结论将为其在生物医学领域设计出具有针对性的碳点以及开发新型的生物体内无毒荧光探针提供理论参考.

补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- Li F, Li T, Sun C, Xia J, Jiao Y, Xu H. *Angew Chem*, 2017, 129: 10042–10046

- 2 Li F, Li Y, Yang X, Han X, Jiao Y, Wei T, Yang D, Xu H, Nie G. *Angew Chem*, 2018, 130: 2401–2406
- 3 Li F, Li S, Guo X, Dong Y, Yao C, Liu Y, Song Y, Tan X, Gao L, Yang D. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 11087–11092
- 4 Peng Z, Han X, Li S, Al-Youbi AO, Bashammakh AS, El-Shahawi MS, Leblanc RM. *Coord Chem Rev*, 2017, 343: 256–277
- 5 Lazić J, Ajdačić V, Vojnović S, Zlatović M, Pekmezović M, Mogavero S, Opsenica I, Nikodinović-Runic J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 1889–1901
- 6 Zhao Y, Chen Z, Chen Y, Xu J, Li J, Jiang X. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 12940–12943
- 7 Bing W, Sun H, Yan Z, Ren J, Qu X. *Small*, 2016, 12: 4713–4718
- 8 Hayden SC, Zhao G, Saha K, Phillips RL, Li X, Miranda OR, Rotello VM, El-Sayed MA, Schmidt-Krey I, Bunz UHF. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 6920–6923
- 9 Zheng X, Su Y, Chen Y, Wan R, Li M, Wei Y, Huang H. *Sci Rep*, 2014, 133: 5653–5660
- 10 Lu G, Maragakis P, Kaxiras E. *Nano Lett*, 2005, 5: 897–900
- 11 Huang J, Li F, Guo R, Chen Y, Wang Z, Zhao C, Zheng Y, Weng S, Lin X. *Microchim Acta*, 2018, 185: 260–269
- 12 Feng L, Zhao A, Ren J, Qu X. *Nucl Acids Res*, 2013, 41: 7987–7996
- 13 Liang CY, Xia W, Yang CZ, Liu YC, Bai AM, Hu YJ. *Carbon*, 2018, 130: 257–266
- 14 Zhou J, Deng W, Wang Y, Cao X, Chen J, Wang Q, Xu W, Du P, Yu Q, Chen J, Spector M, Yu J, Xu X. *Acta Biomater*, 2016, 42: 209–219
- 15 Chen J, Wei JS, Zhang P, Niu XQ, Zhao W, Zhu ZY, Ding H, Xiong HM. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 18429–18433
- 16 Guo R, Chen B, Li F, Weng S, Zheng Z, Chen M, Wu W, Lin X, Yang C. *Sens Actuatur B-Chem*, 2018, 264: 193–201
- 17 Baltazar CJ, Mun R, Tajmir-Riahi HA, Bariyanga J. *J Mol Struct*, 2018, 1161: 273–278
- 18 Marques RA, Gomes AOCV, de Brito MV, dos Santos ALP, da Silva GS, de Lima LB, Nunes FM, de Mattos MC, de Oliveira FCE, do Ó Pessoa C, de Moraes MO, de Fátima Â, Franco LL, Silva MM, Dantas MDA, Santos JCC, Figueiredo IM, da Silva-Júnior EF, de Aquino TM, de Araújo-Júnior JX, de Oliveira MCF, Leslie Gunatilaka AA. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2018, 179: 156–166
- 19 Kumar CV, Turner RS, Asuncion EH. *J Photochem Photobiol A-Chem*, 1993, 74: 231–238
- 20 Moghadam NH, Salehzadeh S, Shahabadi N. *Nucleosides Nucleotides Nucl Acids*, 2017, 36: 1–18
- 21 Kim SK, Nordén B. *FEBS Lett*, 1993, 315: 61–64
- 22 Sha Y, Chen X, Niu B, Chen Q. *Chem Biodiversity*, 2017, 14: e1700133
- 23 Yang CZ, Li LY, Wang XH, Yu SQ, Hu YJ. *J Mol Recogn*, 2018, 31: e2691
- 24 Huang S, Liang Y, Huang C, Su W, Lei X, Liu Y, Xiao Q. *Luminescence*, 2016, 31: 1384–1394
- 25 Saha I, Kumar GS. *Dyes Pigments*, 2013, 96: 81–91
- 26 Rescifina A, Zagni C, Varrica MG, Pistrà V, Corsaro A. *Eur J Med Chem*, 2014, 74: 95–115
- 27 Hanczyc P, Lincoln P, Norden B. *J Phys Chem B*, 2013, 117: 2947–2954

Interactions and mechanisms of three different element doped carbon dots with DNA

Huajian Luo^{1†}, Haimei Li^{1†}, Qi Xiao^{1,2}, Shan Huang^{1,2*}, Yi Liu^{1,2*}

¹ Guangxi Key Laboratory of Natural Polymer Chemistry and Physics, College of Chemistry and Materials, Nanning Normal University, Nanning 530001, China

² College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

†These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors (email: huangs@nnnu.edu.cn; yiliuchem@whu.edu.cn)

Abstract: Carbon dots (CDs) have attracted great attention in the field of materials science and biology. In this paper, three kinds of CDs with different doping elements were synthesized by one-step hydrothermal method. The binding modes and binding capacities of ctDNA and carbon dots doped with three different elements were systematically studied by means of multispectral method, melt chain temperature method and viscosity method. Fluorescence experiments have proved that the interaction modes of CDs, N-CDs and N,S-CDs with ctDNA were groove binding, and the binding force was mainly hydrogen bond and van der Waals interaction, accompanied by slight electrostatic force. In the presence of strong electrolytes and denaturants, the groove binding between carbon dots and DNA was weakened. Circular dichroic spectroscopy and FTIR spectroscopy showed that the groove binding of carbon dots and DNA did not significantly change the conformation of DNA. It was worth noting that compared with undoped carbon dots (CDs), doping with nitrogen and sulfur could weaken the groove binding ability of N,S-CDs and ctDNA. However, increasing the surface charge of carbon points could enhance the binding of N-CDs to ctDNA. This conclusion is expected to provide a theoretical reference for the design of targeted carbon dots in the biomedical field in the future.

Keywords: CDs, N-CDs, N,S-CDs, calf thymus DNA, interaction mechanism, thermodynamic parameters, spectrometry

doi: [10.1360/SSC-2020-0126](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0126)