

此文已撤稿 (见: 化学学报 2013, 71, 1683)

碳量子点荧光成像法应用于聚丙烯酰胺凝胶电泳 检测人血清蛋白质的研究

刘亭廷^{*,a} 彭程^a 马云川^a 欧阳津^b

(^a首都医科大学宣武医院 北京 100053)

(^b北京师范大学化学学院 北京 100875)

摘要 建立了碳量子点荧光成像法检测聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质如人血清蛋白质的新方法. 通过一步绿色微波法合成的碳量子点并将其应用在聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质的检测中, 通过醋酸-醋酸钠调节孵育溶液, 优化 pH 值、碳量子点的用量及孵育溶液的浓度等条件, 使碳量子点和蛋白质相结合并在 365 nm 的紫外灯照射下得到了清晰的人血清蛋白电泳图, 该新方法具有原料便宜易得、无污染、简单、快速、高灵敏度、低背景及高分辨率的优点, 在生物技术方面和纳米技术方面具有巨大的应用前景.

关键词 碳量子点; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 蛋白质; 荧光成像

This paper was retracted (Acta Chim. Sinica 2013, 71,1683).

Application of Carbon Quantum Dots in Fluorescent Imaging of Human Serum Proteins after Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Liu, Tingting^{*,a} Peng, Cheng^a Ma, Yunchuan^a Ouyang, Jin^b

(^a Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053)

(^b Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract A new method of carbon quantum dots (CQDs) fluorescent imaging for human serum proteins detection after polyacrylamide gels electrophoresis (PAGE) is established. Polyacrylamide gel electrophoresis is one of the most general and powerful technique to separate complex biosamples, and it is widely used in molecular biology, biochemistry and medicine. With the evolution of clinical proteomics, the development of a novel method to detect serum proteins after PAGE with high resolution and high sensitivity is of great significant. As far as we know, the carbon quantum dots have not been applied in the detection of serum proteins after PAGE. The fluorescent carbon quantum dots were synthesized by a one-step microwave pyrolysis method: glycerol and phosphate buffer ($7.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) ($\phi=70\%$) was mixed evenly, and then put the solution into the advanced microwave digestion system and heated for 14 min (750 W), the colorless solution turned to yellow after reaction. The yellow solution was diluted into the incubation solution with HOAc-NaOAc buffer ($80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 2.7), and then used for staining serum proteins. The emission and excitation spectra of carbon quantum dots were measured, and the excitation wavelength allowed the use of an ultraviolet lamp at 365 nm for the fluorescent imaging. In order to investigate the performance of CQDs fluorescent imaging, the dilution of human serum samples separated by electrophoresis was used for detection, and was compared with traditional method of CBB-R250 staining and silver staining. The results suggested that CQDs based on fluorescent imaging could effectively detect human serum proteins with high sensitivity and resolution. The sensitivity of CQDs imaging was higher than CBB staining and comparable to silver staining. Therefore, the CQDs fluorescent imaging could be an inexpensive, time-saving, pollution-free and convenient method with high sensitivity and resolution for the detection of human serum proteins. It demonstrates the CQDs fluorescent imaging technology has great significant prospects in the development of biotechnology and nanotechnology.

Keywords carbon quantum dot; polyacrylamide gel electrophoresis; protein; fluorescent imaging

1 引言

作为蛋白质组学中的一员, 血清蛋白质组学的研究越来越受到重视. 血清蛋白质组学是以蛋白质为研究对象, 对血清中蛋白质进行检测, 相比于正常蛋白质表达图谱, 寻找其差异蛋白质点, 对疾病相关蛋白质进行鉴定, 并对其结构和功能进行研究, 从而为研究早期诊断的特异性标志物、重大疾病病理生理学机制、药物作用

靶点等奠定一定的理论基础^[1]. 蛋白总数大约有几万种, 但是含量却相差极大, 有的甚至相差上千个数量级以上. 比如丰度最高的白蛋白, 它在血清中的浓度可达 $35 \sim 40 \text{ g/L}$, 而一些低丰度蛋白的含量却甚微, 往往是低丰度蛋白包含着许多十分重要的疾病信息. 因此对血清中低丰度蛋白的分离和检测成为目前血清蛋白质组学研究的一个热点.

* E-mail: lmt_52@sina.com; Tel.: 010-83198262

Received December 19, 2012; published April 12, 2013.

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)是一种近年来常用的生物分离技术,是一种以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的区带电泳方法,它具有较高的分辨力和灵活性.检测电泳分离后的生物大分子(主要是蛋白质)对电泳方法的应用起着至关重要的作用,凝胶电泳后蛋白质的检测方法有很多种.考马斯亮蓝染色法简单、方便,是目前检测蛋白质中一种应用最为广泛的方法^[2],但是灵敏度低,选择性差,不易检测到低丰度蛋白质.银染法灵敏度高,但是它是最复杂的蛋白质染色方法,步骤繁琐且反应过程不易控制^[3].免疫方法是利用抗原抗体之间的特异性结合,专一地检测某一种特定蛋白质的方法,但由于所用物质昂贵,也不适合实验室的广泛使用^[4,5].因此发展一种简便、成本低、高灵敏度、高分辨率的,同时又对环境无污染的检测方法对电泳技术的发展相当重要.

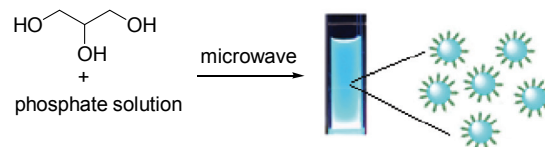
碳量子点^[6-8]从一出现就引起了相当大的关注,跟传统的半导体荧光纳米材料(如 CdTe, CdSe 和 PbTe 等)相比,碳量子点具有明显的优势,其不含重金属及硫族元素,无毒性,对环境无污染,具有极好的生物兼容性^[9].由于碳量子点独特的性质,其可以广泛应用于生物分子的运输、诊断及生物标记^[10].碳量子点的发光行为依赖于粒径的分布以及它的激发波长,由于其有均匀的粒径大小,而且在生物标记方法上应用范围广以及合成费用低廉等性质使得各领域越来越重视这种新型量子点的研究^[11-13].本工作采用微波合成法合成了一种荧光强度稳定的碳量子点^[9].这是一种完全绿色并且一步合成的方法,该方法的原料是甘油和磷酸缓冲液,原料便宜易得,而且无毒性,一步合成,速度快,操作简单,并且不需要任何表面修饰就能对蛋白质进行检测.碳量子点具有荧光强度高、极好的水溶性及良好的光稳定性等特点,这些特点成为了检测聚丙烯酰胺凝胶电泳后蛋白质的有利条件.本工作中我们优化了碳量子点荧光成像的实验条件,例如不同种类的孵育溶液的选择、碳量子点溶液 pH 值的优化、孵育液浓度和碳量子点的用量的优化.选择了最佳的染色条件进行对人血清蛋白质的检测,与传统的考马斯亮蓝染色法相比,本方法简单快速、灵敏度高及分辨率好.因此,本工作不仅建立了一种聚丙烯酰胺凝胶电泳检测的新方法,还拓宽了碳量子点在生物分析中的应用,对生物技术方面和纳米技术方面的应用具有巨大的应用前景.

2 结果与讨论

2.1 碳量子点的合成及表征

本工作采用微波合成法合成了一种荧光强度稳定的碳量子点^[6].这是一种完全绿色并且一步合成的方法,该方法的原料是甘油和磷酸缓冲液,将这两种溶液混合均匀形成无色透明的溶液后,放入微波消解仪中进行微波反应.随着微波时间的增加,溶液由无色透明变成浅

棕色溶液时,碳量子点溶液就合成完成.在 365 nm 紫外灯下此碳量子点可发出天蓝色的光,图式 1 是合成碳量子点的示意图.



图式 1 碳量子点合成路线示意图

Scheme 1 Synthesis route approach to CQDs

我们运用了高分辨的透射电镜和荧光光谱对合成好的碳量子点进行表征.首先利用高分辨透射电镜检测了碳量子点的粒径分布情况(图 1a).从结果中可看出,碳量子点粒径分布均匀,分散性好,粒径大小主要分布在 1~4 nm 之间.在紫外灯激发光激发之前,即日光灯下碳量子点原液为浅黄色透明溶液(图 1b),在紫外灯照射下为天蓝色(图 1c).利用荧光光谱对碳量子点的荧光性质进行表征的结果如图 1d 所示,其最大激发波长在 340 nm,在此激发波长下激发碳量子点得到最大的发射波长在 450 nm.

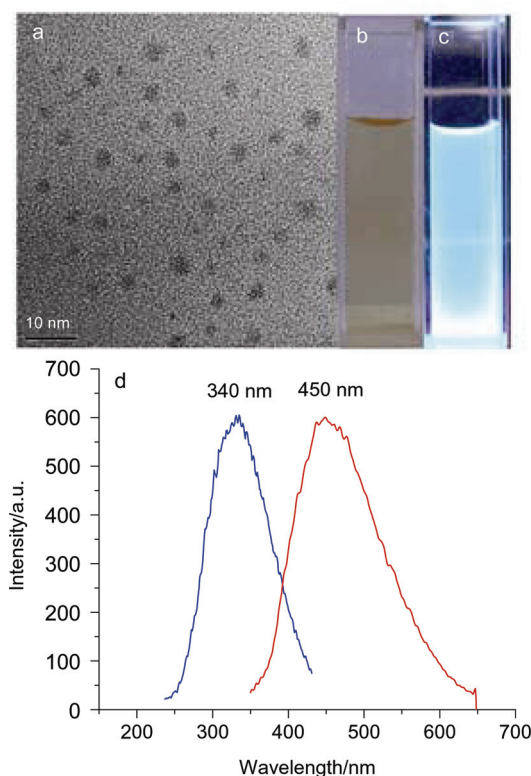


图 1 碳量子点的表征

Figure 1 Characterization of carbon quantum dots

(a) High resolution transmission electron microscopy (HRTEM) image of the CQDs. Fluorescence images of CQDs obtained by ultraviolet lamp illumination at 365 nm (b) before the illumination and (c) after the illumination. (d) Fluorescence spectrum of CQDs sample excited at 340 nm (blue line) and the excitation spectrum (red line).

2.2 碳量子点荧光成像法的实验条件优化

2.2.1 选择不同种类的溶液调节碳量子点染胶液的 pH 值

为了获得清晰的荧光成像图, 我们进行了各种优化实验, 首先是不同种类的孵育溶液的选择. 分别用 95% 的冰醋酸、浓盐酸和 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液调碳量子点溶液的 pH 值分别为 3.0, 3.0, 9.0. 将经过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后的人血清蛋白质用三种不同溶液调制的碳量子点孵育溶液染胶 3 h 后成像, 结果如图 2 所示. 我们可看出在相同 pH 条件下, 冰醋酸调碳量子点溶液的荧光成像结果比用浓盐酸调的成像结果好, 而碱溶液作为孵育液时, 完全看不出荧光信号, 因此实验中都选用冰醋酸调 pH 值.

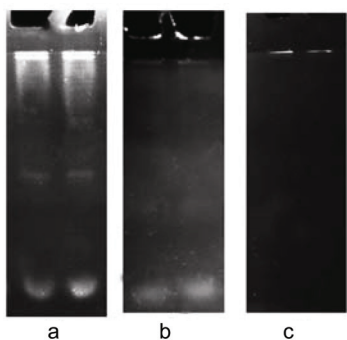


图 2 碳量子点孵育试剂选择的电泳图

Figure 2 CQDs-based fluorescent images of PAGE with different reagent (a) CQDs solution was regulated by acetic acid to pH=3. (b) CQDs solution was regulated by hydrochloric acid to pH=3. (c) CQDs solution was regulated by sodium hydroxide to pH=9

2.2.2 碳量子点溶液 pH 值的优化

碳量子点孵育溶液被冰醋酸分别调 pH 为 1.2, 2.0, 2.7, 3.9, 5.1, 8.3, 用这些不同 pH 的碳量子点孵育溶液检测单向非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后人血清蛋白结果如图 3 所示. 从图中可明显看出, 当碳量子点孵育溶液的 pH 调制 2.7 时, 荧光成像结果图较清晰, 得到的蛋白条带也比较多, 图 3g 是相对荧光强度关系图. 所以我们选择的最佳染胶条件为碳量子点孵育溶液的 pH 等于 2.7.

2.2.3 孵育溶液浓度的选择及碳量子点用量的选择

此外, 我们还对孵育溶液的浓度进行了选择. 运用 HOAc-NaOAc 混合溶液为孵育溶液, 对其浓度进行了选择. 浓度在 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 如图 4a, 4b 所示, 孵育溶液的浓度为 $0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最优条件, 得到的条带亮度最强. 我们还试验了碳量子点的用量对成像的影响, 在 $50 \mu\text{L}$ 至 2 mL 范围内, 当碳量子点用量为 $400 \mu\text{L}$ (成像孵育溶液体积为 20 mL) 时, 成像效果最好. 所以我们最终选择的成像孵育液为 HOAc-NaOAc 溶液, pH 值为 2.7, 浓度为 $0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在每 20 mL 的孵育液中加入 $400 \mu\text{L}$ 碳量子点原液.

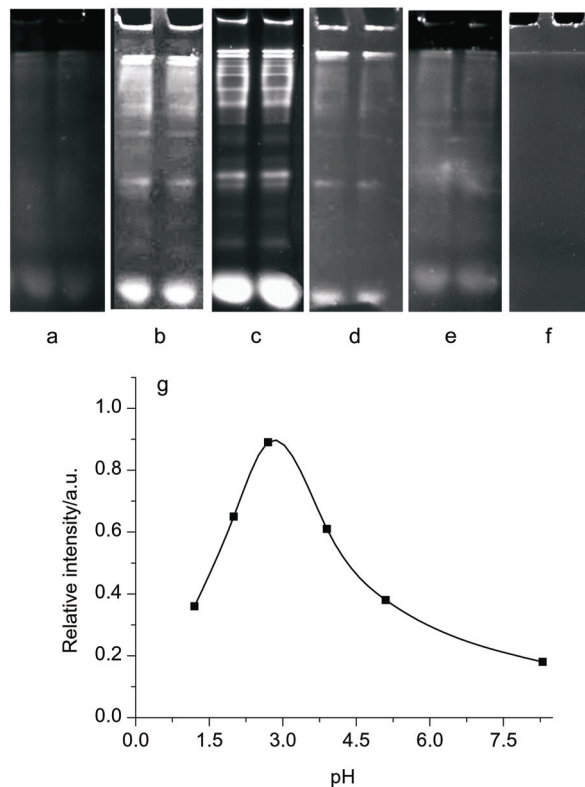


图 3 碳量子点溶液 pH 值优化的电泳图(a~f)及相对荧光强度与 pH 的关系图(g)

Figure 3 Images achieved in the CQDs solutions with different pH value (a~f) and the relative fluorescence intensities of the images with different pH value (g)

(a) pH=1.2, (b) pH=2.0, (c) pH=2.7, (d) pH=3.9, (e) pH=5.1, (f) pH=8.3.

2.3 碳量子点荧光成像法在 1D-PAGE 后检测人血清蛋白质

为了扩大这种碳量子点的应用价值, 我们对人血清蛋白质这种复杂的实际样品进行检测. 将人血清蛋白质稀释到一定的浓度后, 进行非变性胶的单向聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳后用碳量子点染胶溶液进行染色, 其荧光成像的结果与传统的 CBB-R250 染色法和银染法进行对比, 实验结果如图 5 所示. 电泳后分别用碳量子点荧光成像法(图 5a)、传统的 CBB-250 染色法(图 5b)和银染法(图 5c)检测人血清蛋白. 从图中结果可以看出, 碳量子点荧光成像法不仅能和传统的 CBB-250 染色法、银染法一样可以检测人血清蛋白, 并且蛋白质条带要更清晰, 分辨率更高, 背景更低. 在 I 区域内可以明显的看出, 碳量子点荧光成像法可以清晰的观察到更多的蛋白条带信息, 相比于传统的方法, 碳量子点荧光成像法具有一定的优势.

3 结论

将一种荧光强度稳定、水溶性好的碳量子点成功应用于 1-D 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后的蛋白质的检

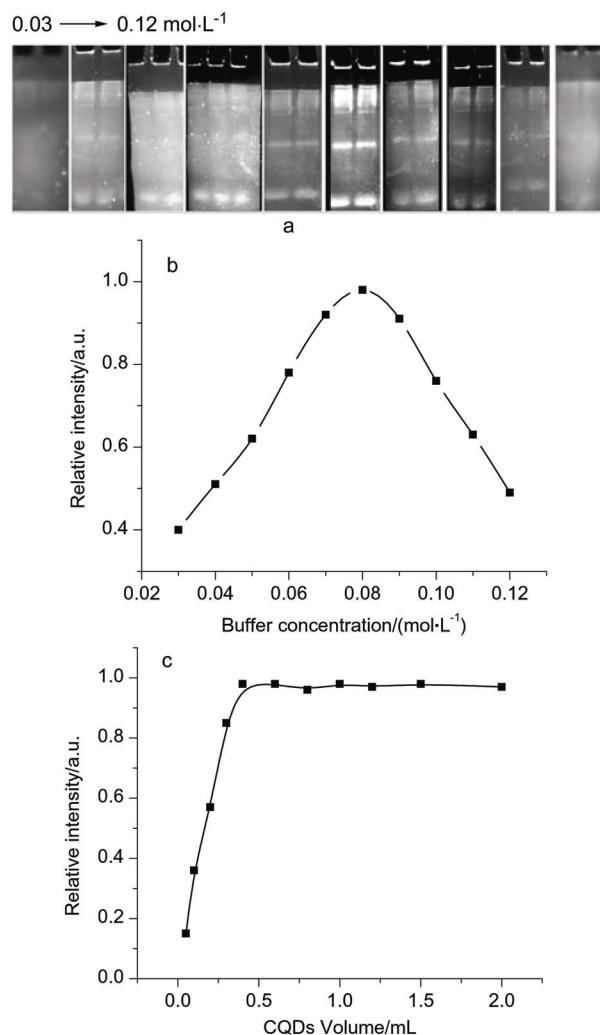


图4 碳量子点溶液的不同浓度和用量对碳量子点荧光成像法的影响
Figure 4 Influence of CQDs concentration and volume on CQDs fluorescent imaging
 (a) The images with different concentration of incubation solution (0.03~0.12 mol·L⁻¹). (b) Relative fluorescence intensities of the images with different concentration of incubation solution (0.03~0.12 mol·L⁻¹). (c) Relative fluorescence intensities of the images with different volume of carbon quantum dots (50 μ L~2 mL)

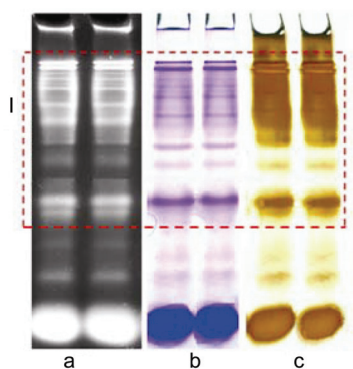


图5 碳量子点荧光成像法(a)、CBB-250 染色法(b)和银染色(c)在单向非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后检测人血清蛋白的对比
Figure 5 Detection of human serum proteins after 1-D native PAGE by (a) CQDs-based fluorescent imaging, (b) CBB-R250 staining and (c) silver staining
 Human serum was diluted to 1 : 10 with the buffer in native PAGE method

测, 建立了一种新型的检测蛋白质方法, 该新方法具有原料便宜易得、无污染、简单、直接、快速、微量、高灵敏度、低背景及高分辨率的优点. 与传统的考马斯亮蓝染色法相比, 碳量子点荧光成像法灵敏度高、分辨率好. 同时也拓宽了碳量子点新的应用领域, 对生物技术方面和纳米技术方面的应用具有巨大的应用前景.

4 实验部分

4.1 试剂与仪器

DYY-6B 型稳压稳流电泳仪和 DYY-6C 型稳压稳流电泳仪, DYCZ-24D 型垂直电泳槽和 DYCZ-21 型垂直电泳槽产自六一仪器厂(中国北京); Py-120 水平脱色摇床购自北京鼎国生物技术发展中心(中国北京); 74B-4000 型电动离心机产自龙冈医疗器械厂; PHS-3C 数字酸度计产自杭州东星仪器设备厂; KQ-50DE 超声波清洗器产自昆山市超声波仪器厂; QL-866 旋涡混合器产自海门市其林贝尔仪器制造有限公司(中国江苏); LS-55 型荧光分光光度计购自珀金埃尔默仪器有限公司(中国上海); Millipore SimplicityTM 超纯水发生器购自 Millipore 公司(美国); EC3 凝胶成像系统购自 UVP 公司(美国); JEM-2010 型高分辨率透射电子显微镜购自 JEOL 公司(日本); 10, 50, 200, 1000 μ L 移液器(Nichiryo, 立洋, 日本).

丙烯酰胺(Acry)、*N,N'*-甲叉双丙烯酰胺(Bis)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸(Glycerin)及四甲基乙二胺(TEMED)购自北京鼎国生物技术发展中心(中国北京); 溴酚蓝、氢氧化钠(NaOH)、乙酸钠、硫代硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠、甘油(丙三醇)、醋酸、甲醇及乙醇购自北京化学试剂公司(中国北京).

人血清样品由北京师范大学附属医院提供; 考马斯亮蓝 R250 购自 CBB-R250, Fluka (Switzerland).

所用试剂如未专门说明均为分析纯试剂, 实验过程所用 H₂O 均为超纯水(Millipore, Bedford, MA).

4.2 实验方法

4.2.1 血清蛋白样品处理

血样来源于北京师范大学附属医院. 将血样静置 5 h, 用移液器小心取出上层清液, 再将提取得到的上层清液经三次高速离心(10000 r/min, 每次 5 min), 提取上层清液即为血清. 血清在 4 $^{\circ}$ C 情况下保存 3 d, 3 d 内不使用的血清在 -20 $^{\circ}$ C 中保存 60 d 备用. 所有相关实验都是严格遵守相关法律及制度规定, 并且获得北京大学生物医学伦理道德委员会认可.

4.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳条件

采用不连续缓冲体系的聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳, 分离胶浓度 7.5%, 用 pH=8.8 的 Tris-HCl 缓冲液配制, 浓缩胶浓度 3.5%, 用 pH=6.8 的 Tris-HCl 缓冲液配制. 电泳缓冲液为 pH=8.3 的 Tris-Gly 缓冲体系. 浓

缩胶中电压 130 V, 分离胶中电压 98 V, 电泳时间为 5 h.

4.2.3 碳量子点的制备

将 35 mL 的丙三醇与 15 mL $7.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液($V:V=7:3$)($\text{pH}=7.4$)混合均匀, 形成无色透明的溶液, 每个聚四氟乙烯反应釜中加入 5~10 mL 此溶液, 将反应釜放入微波消解仪中, 调节功率为 750 W, 进行微波反应, 加热 14 min, 最后得到浅棕色的溶液, 即碳量子点原始溶液. 常温下保存.

4.2.4 碳量子点荧光成像法

将 $0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸钠溶液用冰醋酸调 pH 为 2.7 得到混合溶液, 将此溶液与 400 μL 碳量子点原液均匀混合, 得到碳量子点染胶溶液. 电泳结束后将凝胶自胶板上取下, 用去离子水冲洗干净表面残存的电极缓冲溶液, 将胶浸入碳量子点胶溶液, 在摇床上以低速振荡 3 h 后于凝胶成像系统中成像.

References

- [1] Liao, Q.-L.; Chen, X.-D.; Ding, Y.-Q. *Chin. J. Pathophysiol.* **2008**, 24, 402. (廖秋林, 陈晓东, 丁彦青, 中国病理生理杂志, **2008**, 24, 402.)
- [2] Scott, T. A. *Biochem. Educ.* **1988**, 16, 208.
- [3] Slusznay, C.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1359.
- [4] Degawa-Yamauchi, M.; Bovenkerk, J. E.; Juliar, B. E.; Watson, W.; Kerr, K.; Jones, R. M.; Zhu, Q.; Considine, R. V. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, 88, 5452.
- [5] Buss, H.; Chan, T. P.; Sluis, K. B. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, 23, 361.
- [6] Huang, W.; Fernando, S.; Allard, L. F.; Sun, Y.-P. *Nano Lett.* **2003**, 3, 565.
- [7] Cook, S. M.; Aker, W. G.; Rasulev, B. F.; Hwang, H. M.; Leszczynski, J.; Jenkins, J. J.; Shockley, V. *J. Hazard. Mater.* **2010**, 176, 367.
- [8] Kamanina, N. V.; Serov, S. V.; Savinov, V. P. *Tech. Phys. Lett.* **2010**, 36, 40.
- [9] Wang, X.-H.; Qu, K.-G.; Xu, B.-L.; Ren, J.-S.; Qu, X.-G. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 2445.
- [10] Cao, L.; Wang, X.; Meziani, M. J.; Lu, F. S.; Wang, H. F.; Luo, P. J. G.; Lin, Y.; Harruff, B. A.; Veca, L. M.; Murray, D.; Xie, S. Y.; Sun, Y. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11318.
- [11] Baker, S. N.; Baker, G. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 6726.
- [12] Yang, F.; Wang, L.-L.; Guo, Z.-H. *Acta Chim. Sinica* **2012**, 70, 1283. (杨帆, 王伶俐, 郭志慧, 化学学报, **2012**, 70, 1283.)
- [13] Gong, H.-P.; Liu, S.-P.; Yin, P.-F.; Yan, S.-G.; Fan, X.-Q.; He, Y.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2011**, 69, 2843. (龚会平, 刘绍璞, 殷鹏飞, 闫曙光, 范小青, 何佑秋, 化学学报, **2011**, 69, 2843.)

(Zhao, C.)