

手性石墨烯量子点与 DNA 相互作用及其机制研究

李海梅^a 罗华健^a 肖琦^a 杨立云^a 黄珊^{*,a,b} 刘义^{*,a,b}

(^a 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)

(^b 武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

摘要 手性作为自然界最重要的特性之一,与生命活动息息相关。因此,手性纳米材料在材料学及生物学相关领域的研究引起了极大的关注。本工作提出了一种采用一步水热法合成手性石墨烯量子点的新方法。该方法以柠檬酸和 *L*-色氨酸为原料进行手性石墨烯量子点的合成,通过圆二色光谱法证明了两种手性石墨烯量子点具有两个对称性高的手性信号,圆二色吸收峰分别位于 230 nm 和 305 nm。通过荧光光谱法获取了它们与 ctDNA 相互作用的系列热力学参数,采用粘度测量、DNA 熔链温度实验并结合多种谱学方法证明,手性石墨烯量子点与小牛胸腺 DNA (ctDNA) 之间的结合存在较大的手性差异。紫外-可见吸收光谱证明手性石墨烯量子点均能使 ctDNA 的吸收峰红移,并出现减色效应。手性石墨烯量子点提高了 ctDNA 的熔链温度,但降低了 ctDNA 的相对粘度。通过氢键和范德华力相互作用,手性石墨烯量子点均插入 ctDNA 的 G-C 碱基对中,这严重影响了 ctDNA 的右手 B 型螺旋结构。因空间位阻效应不同,右手性石墨烯量子点比左手性石墨烯量子点更容易与右手 B 型螺旋的 ctDNA 结合,且对 ctDNA 的右手 B 型螺旋结构产生显著的影响。这些结论阐明了手性石墨烯量子点与 ctDNA 之间嵌插结合作用的分子机制,为手性纳米材料在化学、生物学、医学等许多科学领域的发展提供有价值的信息。

关键词 手性石墨烯量子点; 小牛胸腺 DNA; 光谱法; 作用机理; 热力学参数; 空间位阻

Investigations of Interactions and Mechanisms of Chiral Graphene Quantum Dots with DNA

Li, Haimei^a Luo, Huajian^a Xiao, Qi^a Yang, Liyun^a
Huang, Shan^{*,a,b} Liu, Yi^{*,a,b}

(^a Guangxi Key Laboratory of Natural Polymer Chemistry and Physics, College of Chemistry and Materials, Nanning Normal University, Nanning 530001, China)

(^b College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract As one of the most important characteristics of nature, chirality is closely related to life activities. Therefore, chiral nanomaterials have caused great attention in material, biology and some related fields. In this paper, a new preparation method for chiral graphene quantum dots (*L*-GQDs and *D*-GQDs) was proposed via one-step hydrothermal method. This method used citric acid and *L*(or *D*)-tryptophan as raw materials to synthesize chiral graphene quantum dots. Circular dichroism spectroscopy proved that the two chiral graphene quantum dots had two chiral signals with high symmetry, and the absorption peaks were located at 230 nm and 305 nm, respectively. A lot of thermodynamic parameters have been obtained by using fluorescence. The results of viscosity measurement, DNA melting experiments and multi-spectroscopic methods indicated that there was a large chiral difference between the combination of chiral graphene quantum dots and ctDNA. UV-Vis absorption spectrometry proved that the two different chiral graphene quantum dots caused the slightly red shift of absorption peak and hypochromic effect of ctDNA. These quantum dots increased the melting temperature of DNA, but reduced the relative viscosity of ctDNA. Through hydrogen bonding and van der Waals interaction, both graphene quantum dots were inserted into the G-C base pair of ctDNA, which affected the right-handed B-form helicity of ctDNA significantly. The steric hindrance effects of *L*-GQDs and *D*-GQDs were different, resulting in the differences of them in their intercalation and binding with ctDNA. Comparably, *D*-GQDs with right-handedness exhibited the strongest intercalative binding ability with ctDNA, and were easier to intercalate into ctDNA with the right-handed B-helical structure, causing the significant influence on right-handed B-helical structure of ctDNA. These results revealed the molecular mechanisms of the intercalative binding interactions between chiral graphene quantum dots and DNA, which provided valuable information for the development of chiral nanomaterials in chemistry, biology, and medicine areas.

Keywords chiral graphene quantum dot; calf thymus DNA; spectroscopy; interaction mechanism; thermodynamic param-

* E-mail: huangs@nnnu.edu.cn; yiliu@whu.edu.cn

Received April 17, 2020; published June 1, 2020.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21873075, 21864006, 21763005, 21673166, 21563006).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21873075, 21864006, 21763005, 21673166, 21563006)资助。

eter; steric hindrance

1 引言

手性分子是在三维空间中不完全与镜像一致的分子,这两个镜像称为对映体^[1].作为自然界最重要的特性之一,手性在分子识别中起着关键作用^[2,3].因此,开发一种有效的手性材料的合成方法,使手性材料在手性检测^[4]、手性感测^[5]、手性识别^[6]等方面应用,具有重要的研究意义.石墨烯量子点(Graphene quantum dots, GQDs)是一种零维碳纳米材料,因其粒径小、水溶性好、化学惰性高、易于官能化、抗光漂白、毒性低、生物相容性好的优点^[7],而在生物传感^[8]、生物成像^[9]、催化^[10]等许多领域得到广泛的应用.随着纳米科技的发展,已经开发了许多人工手性纳米结构,包括手性配合物^[11]、手性半导体材料^[12]和手性金属纳米材料^[13]、手性金属氧化物^[14]并在纳米尺度上表现出旋光性.然而,关于石墨烯量子点的手性的研究很少.

众所周知,手性与生命有关,碳材料作为自然界中最丰富的元素之一,具有许多不可替代的优良性能,备受关注. Xu 等^[15]利用手性半胱氨酸制备了具备手性的 N-S 掺杂碳点.而且实验表明用 *L*-GQDs 处理的人膀胱癌 T24 细胞显示出糖酵解作用增强,而 *D*-GQDs 没有类似的作用.相比之下,两种手性 GQDs 均未引起 T24 细胞的线粒体基础有氧呼吸紊乱. Kotov 等^[16]研究表明,经 *L/D*-半胱氨酸修饰的手性石墨烯量子点,在 HepG2 细胞的生物相容性和立体异构方面具有显著差异.分子动力学模拟表明, *D*-GQDs 比 *L*-GQDs 具有更强的细胞内积累性. Xu 等^[17]报道了一种基于半胱氨酸(Cys)诱导的手性 AuNP 二聚体的生物传感器,该传感器使用对映体半胱氨酸(*L*-Cys 和 *D*-Cys)增强了对映体的等离子体手性,实现了手性识别和定量检测半胱氨酸的手性感测平台,检出限为 20 pmol/L.

在这里,我们提出了一种通过一步水热法合成手性石墨烯量子点(*L*-GQDs, *D*-GQDs)的新方法.通过多光谱技术、粘度测定和熔链温度法,比较了两种手性石墨烯量子点与 ctDNA 相互作用机理.合成的石墨烯量子点具有两个对称性高的手性信号,分别位于 230 nm 和 305 nm.手性石墨烯量子点与 ctDNA 之间的结合存在较大的手性差异.由于空间位阻效应的影响, *D*-GQDs 更容易与右手 B 型螺旋的 ctDNA 结合并引起 DNA 的结构变化.这项研究阐明了手性石墨烯量子点与 DNA 之间的详细相互作用机理,并进一步提供了有关手性纳米材料在生物大分子结合中的生物学信息.为研发出具备优异性能的新型手性荧光探针提供一定的理论参考.

2 结果与讨论

2.1 手性石墨烯量子点的表征

手性石墨烯量子点的表征如图 1 所示,由于 *L*-GQDs 和 *D*-GQDs 具有相似的结构和性质,因此本文主要讨论 *L*-GQDs 的信息. *D*-GQDs 的表征数据详见图 S1(Supporting Information).通过圆二色光谱(CD)可进行 GQDs 手性研究.如图 1a,手性 GQDs 的 CD 信号位于 240 和 306 nm,而 *L(or D)*-Trp 的 CD 信号位于 230 nm. *L(or D)*-GQDs 在 240 nm 处的 CD 信号可能归因于 *L*-Trp 和 *D*-Trp 的 CD 信号,其中 CD 信号的红移可能是碳骨架与 *L(or D)*-Trp 相互作用后基团的变化.而另一个在 306 nm 处出现的 CD 信号是 *L(or D)*-GQDs 的新手性中心.这证明了手性量子点的成功制备^[16].如图 1b 所示 GQDs 的 UV-vis 光谱显示了在 280 和 220 nm 处的两个吸收峰,这分别归因于 C=O 的 $n-\pi^*$ 跃迁和芳环结构中 C=C 的 $\pi-\pi^*$ 跃迁^[7].此外,这些 GQDs 在 370 nm 的激发波长下具有明显的、狭窄的、几乎对称的荧光光谱,其峰值位置为 444 nm,斯托克斯位移为 74 nm.从图 1b 插图可以看出, *L(or D)*-GQDs 溶液在日光下几乎是无色的,在紫外光(365 nm)下表现出明亮的蓝色荧光,且绝对荧光量子产率分别为 10.28% 和 9.91%.证明了制备的手性石墨烯量子点具有较好的水溶性和荧光性能.如图 1c 进一步表征所示, GQDs 的最大激发/发射波长为 370 nm/444 nm. GQDs 这种与激发波长相关的发射特性主要是由于 GQDs 的不同尺寸大小和表面状态影响了量子点的带隙.表面状态类似于分子状态,但是尺寸影响是量子限域效应的结果,这两者都归因于 GQDs 激发态的复杂性^[18]. *L(or D)*-GQDs 的表面官能团可通过傅立叶变换红外光谱(FT-IR)来进行表征.如图 1d 所示, *L*-GQDs 表面存在多个极性基团(如: -OH 和 -NH₂ 分别在 3410 和 3079 cm⁻¹ 处的伸缩振动),从而确保了 *L*-GQDs 在水中具有优异的分散性和稳定性^[19].此外, 1593、1670、2565 cm⁻¹ 分别是 C=C、C=O 和 C—H 的伸缩振动. 1231 cm⁻¹ 处为 C—N 键的振动, C—O—C 的对称伸缩振动峰在 1098 cm⁻¹ 处、1000 cm⁻¹ 以下为芳环的指纹区. 1405 cm⁻¹ 归因于 -OH(在 -COOH 中)的弯曲振动^[20]. *L*-GQDs 的 FT-IR 光谱表明, *L*-GQDs 的表面保留了碳源中色氨酸的原始氨基和羧基^[21].如图 1e、1f 所示, X 射线光电子能谱(XPS)结果表明, *L*-GQDs 主要由 C、O 和 N 元素组成,与红外光谱分析结果一致. N 1s 的高分辨率图中 399.80、401.12 和 401.91 eV 处的三个峰分别对应于吡啶-N、石墨-N 和 N—H 键^[22].这证明了手性石墨烯量子点的成功制备以及氮元素在 *L*-GQDs 中的成功掺杂.如图 1g 所示, *L(or D)*-GQDs 的形态接近球形,粒

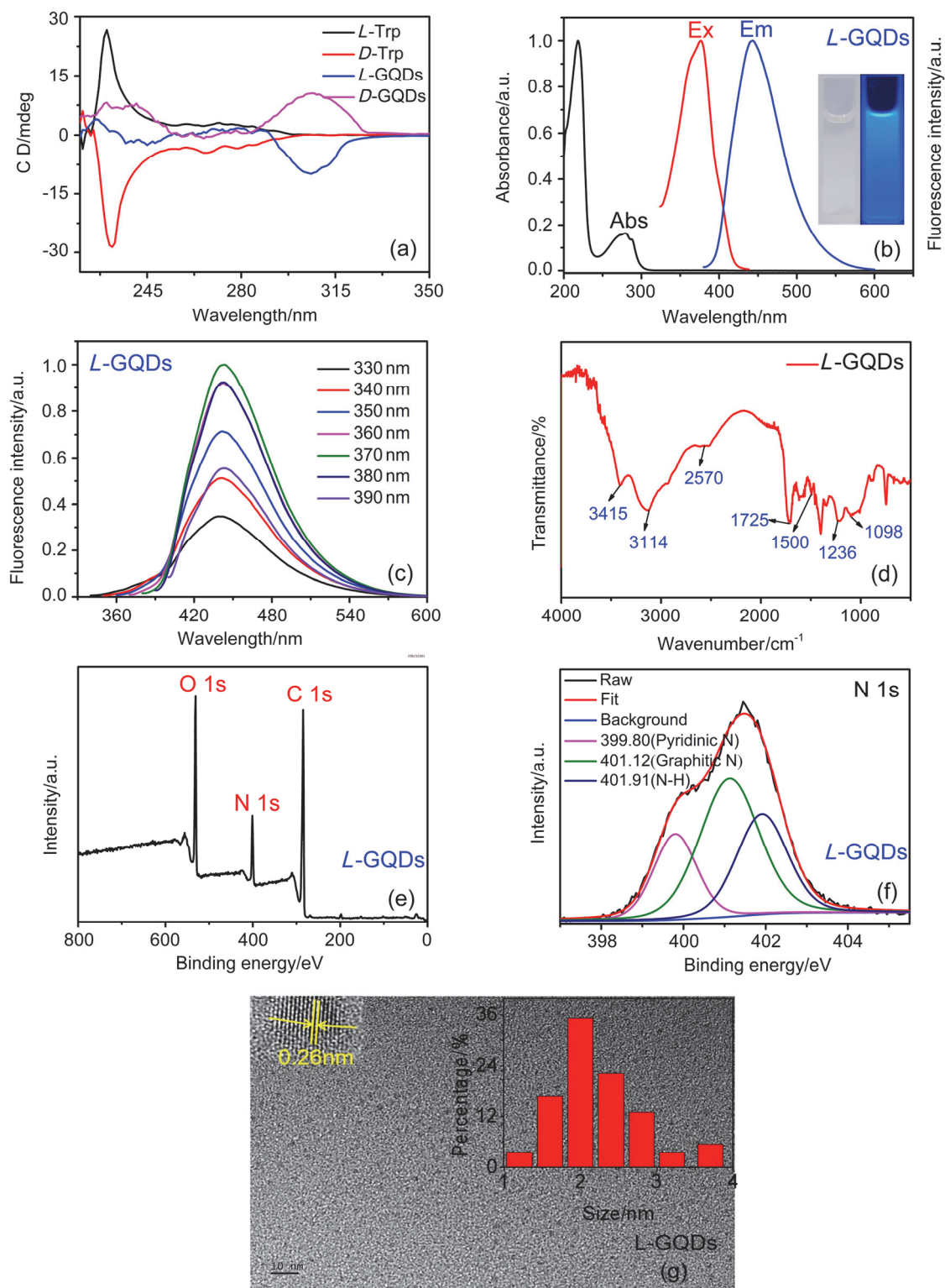


图 1 *L*(or *D*)-GQDs 表征: (a) *L*(or *D*)-GQDs 和 *L*(or *D*)-Trp 的圆二色光谱, $c(L(or D)\text{-GQDs})=2.5\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) 归一化的 *L*-GQDs 的 UV-vis 吸收光谱和荧光光谱. 插图: 在白光(右)和 365 nm 紫外灯(左)辐射下的 GQDs 照片; (c) *L*-GQDs 在不同激发波长下的荧光发射光谱; (d) *L*-GQDs 的红外吸收光谱图; (e), (f) *L*-GQDs 的 XPS 图; (g) *L*-GQDs 的 TEM 和 HRTEM 图像

Figure 1 Characterization of *L*(or *D*)-GQDs: (a) Circular dichroism spectra of *L*(or *D*)-GQDs and *L*(or *D*)-Trp, $c(L(or D)\text{-GQDs})=2.5\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) Normalized UV-vis absorption spectrum of GQDs, Insert: Photograph of GQDs under the radiation of white light (Right) and 365 nm UV lamp (Left); (c) Fluorescence emission spectra of *L*-GQDs at different excitation wavelengths; (d) FTIR spectrum of *L*-GQDs; (e), (f) XPS survey spectrum of *L*-GQDs; (g) TEM and HRTEM images of *L*-GQDs

径主要分布在 1~4 nm 之间, 平均粒径分别为 (2.07 ± 0.02) nm 和 (2.01 ± 0.01) nm. 高分辨率 TEM (HRTEM) 图像(图 1g 插图)反映了 *L*(or *D*)-GQDs 具有较高的结晶度. 且表现出 0.26 nm 的晶格间距, 类似于(1120)石墨烯的晶格条纹^[23]. 这进一步证明了手性石墨烯量子点的成功制备.

2.2 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 结合作用

2.2.1 结合模式

图 2 显示了 ctDNA 在 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)中随着手性石墨烯量子点浓度增加的 ctDNA 的紫外-可见吸收光谱. 由于嘌呤碱基和嘧啶碱基的特异性吸收能力, ctDNA 在 260 nm 附近存在一个独特的吸收峰^[24]. 添加 *L*(or *D*)-GQDs 后, ctDNA-GQDs 复合物的吸光度明显增加, 且吸收峰出现轻微的红移. 通常, 考虑到配体分子与 ctDNA 相互作用后的吸收波长移动作为其嵌插结合模式的光谱特征^[25]. 因此, *L*(or *D*)-GQDs 可以插入 ctDNA 的双链中. 此外, ctDNA-GQDs 复合物体系在 260 nm 处的吸光度值比 ctDNA 和 *L*(or *D*)-GQDs 在 260 nm 处的总吸光度值均略有下降(图 2), 且 GQDs 的浓度越高, 与 ctDNA 作用后产生的减色效应越明显. 由于减色效应通常源自 DNA 双链体在其与药物的嵌插结合或静电作用后的稳定作用^[24], 因此 ctDNA 与 *L*(or *D*)-GQDs 之间的相互作用模式可能是嵌入结合模式或静电吸引. *D*-GQDs 存在下的减色效应最明显, 表明 *D*-GQDs 与

ctDNA 的结合能力强. 当加入 *L*-GQDs 时, 减色效应较 *D*-GQDs 弱, 这表明 *L*-GQDs 与 ctDNA 的结合能力弱. 这两种石墨烯量子点之间的区别是具有不同的手性. 具有右手性的 *D*-GQDs 与具有左手性的 *L*-GQDs 相比, 与右手 B 型螺旋的 ctDNA 之间结合存在较小的空间位阻效应, 因此 *D*-GQDs 倾向于靠近 ctDNA 并与其紧密结合. 因此, 可以推测, 具有右手性的 *D*-GQDs 具有更小的空间位阻效应, 表现出与 ctDNA 强的嵌插结合能力.

在高温下加热后, DNA 的双链将解开成两条单链. 如果将药物插入 DNA 的双链中, 则天然的 DNA 双链结构将更加稳定, T_m 值将明显增加. 当药物通过沟槽结合或静电吸引与 DNA 相互作用时, DNA 的天然双链保持恒定, 并且 T_m 值保持不变^[26]. 在添加 *L*(or *D*)-GQDs 前后, 加热温度对 260 nm 处 ctDNA 的相对吸光度的影响如图 3a 所示. 从熔解曲线的中点算出添加 *L*(or *D*)-GQDs 前后的 T_m 值. ctDNA 的 T_m 值为 75.48 °C, ctDNA-*L*-GQDs 和 ctDNA-*D*-GQDs 体系的 T_m 值分别为 77.27 °C 和 78.50 °C. T_m 值的增加表明 ctDNA 和两种手性石墨烯量子点之间为嵌插结合模式. 这种嵌插结合模式明显增强了 ctDNA 的双螺旋结构的稳定性. *D*-GQDs 引起的 T_m 值的增加多, 这表明 *D*-GQDs 与 ctDNA 的结合能力强, 而 *L*-GQDs 与 ctDNA 的结合能力弱.

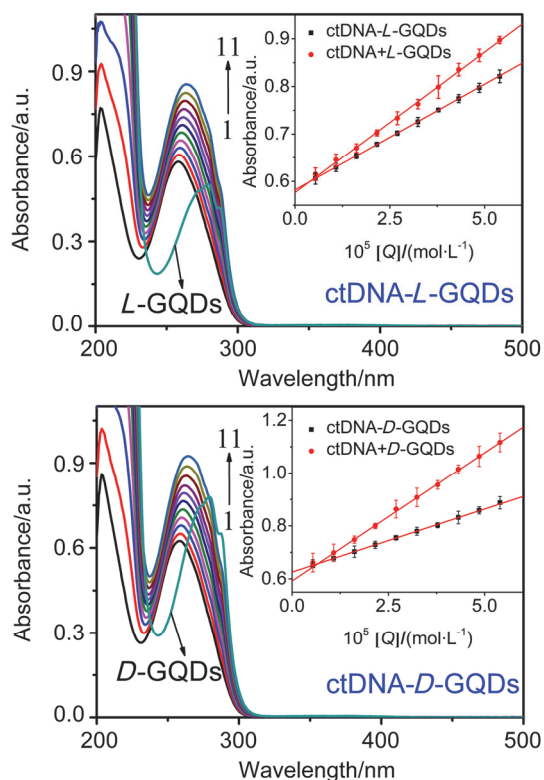


图 2 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 作用的紫外-可见吸收光谱图
Figure 2 UV-vis absorption spectra of ctDNA with *L*(or *D*)-GQDs

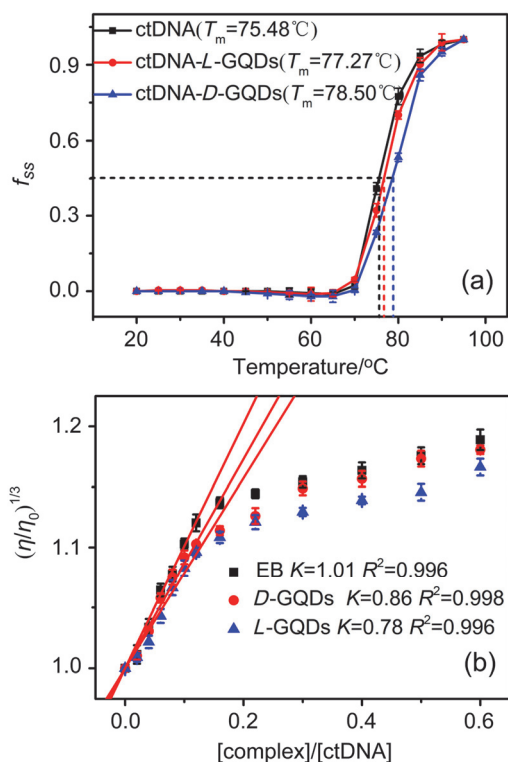


图 3 (a) *L*(or *D*)-GQDs 加入前后 ctDNA 的熔链温度图; (b) EB、*L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 作用的粘度图

Figure 3 (a) Melting curves of ctDNA in the absence and presence of *L*(or *D*)-GQDs; (b) Viscosity of the interaction between EB, *L*(or *D*)-GQDs and ctDNA

粘度法被广泛用于阐明 DNA 与物质分子之间的结合机制。众所周知, DNA 与外源性物质分子之间的嵌插结合方式不仅延长了 DNA 的双链, 而且增加了 DNA 溶液的粘度, 但非嵌插结合相互作用对 DNA 溶液的粘度影响较小^[27]。因此, 进行粘度实验以研究 ctDNA 与 *L*(or *D*)-GQDs 的结合模式。如图 3b 所示, 在连续添加 EB 和两种手性石墨烯量子点后, ctDNA 的相对粘度逐渐增加。研究了 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 与较低的 $[\text{complex}]/[\text{ctDNA}]$ 值(从 0 到 0.12)之间的关系, 并列出了三个线性回归方程的计算斜率值。ctDNA-EB 的斜率值约为 1.00, 再次证明了 EB 与 DNA 之间具有强大的嵌插结合能力^[28]。ctDNA-*L*-GQDs 和 ctDNA-*D*-GQDs 体系的斜率值分别为 0.78 和 0.86。两个 ctDNA-GQDs 体系的斜率值很高, 但均低于 ctDNA-EB 的斜率值, 这表明 *L*(or *D*)-GQDs 确实插入 ctDNA 的双链并延长了 ctDNA 的螺旋结构。这些结果还反映了 ctDNA 与 *L*(or *D*)-GQDs 之间的嵌插结合模式, 这很好地证实了紫外可见光谱法的结果。在两个 ctDNA-GQDs 体系中, ctDNA-*D*-GQDs 的斜率值最高, 而 ctDNA-*L*-GQDs 的斜率值最低, 这表明 *D*-GQDs 表现出与 ctDNA 强的嵌插结合能力, 这与熔链温度实验结论一致。

DNA 和不同物质分子之间的确切相互作用模式, 可以通过荧光光谱法阐明。ctDNA 的固有荧光很弱, 但是 ctDNA 可以通过结合经典的嵌插荧光探针如溴化乙啶(EB), 从而增强探针的荧光强度^[29]。如果物质分子可以有效地猝灭 ctDNA-EB 体系的荧光, 则这些物质分子可能会与 EB 竞争, 并插入 ctDNA 的双链中。因此, *L*(or *D*)-GQDs 对 ctDNA-EB 体系的荧光猝灭程度, 成为研究量子点与 ctDNA 之间结合相互作用的可靠方法。如图 4 所示, EB($\lambda_{\text{ex/em}}=537 \text{ nm}/591 \text{ nm}$)的荧光强度很低, 但在与 ctDNA 发生插入结合相互作用后, 荧光强度显著增加。随着 *L*(or *D*)-GQDs 浓度的增加, ctDNA-EB 体系的荧光强度逐渐降低, 表明 *L*(or *D*)-GQDs 可以插入 ctDNA 的双链中, 并与 EB 竞争 ctDNA 的插入位点, 从而导致 ctDNA-EB 体系的荧光猝灭。此外, 浓度为 $9.18 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *L*(or *D*)-GQDs 对 ctDNA-EB 体系表现出不同的荧光猝灭作用, *L*-GQDs 为 48.25%, *D*-GQDs 为 52.20%, 这些结果表明, *L*(or *D*)-GQDs 取代了荧光探针 EB, 使部分荧光探针从 ctDNA-EB 体系中解离成溶液。进一步验证了 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 之间的典型嵌插结合模式。此外, *L*(or *D*)-GQDs 通过浓度依赖的方式猝灭 ctDNA-EB 体系的荧光, 因此, ctDNA(EB)-GQDs 体系的荧光猝灭行为可以通过 Stern-Volmer 方程(式 1)进行阐述:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{\text{SV}}[Q] \quad (1)$$

在此, I_0 和 I 表示添加 *L*(or *D*)-GQDs 前后的 ctDNA-EB 体系的荧光强度, K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常

数, $[Q]$ 为 *L*(or *D*)-GQDs 的浓度。如图 4 的插图, 计算出 ctDNA(EB)-*L*-GQDs 体系和 ctDNA(EB)-*D*-GQDs 体系的猝灭常数 K_{SV} 分别为 $0.84 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $1.35 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这表明 *L*(or *D*)-GQDs 对 ctDNA-EB 体系的荧光具有很强的猝灭效率。

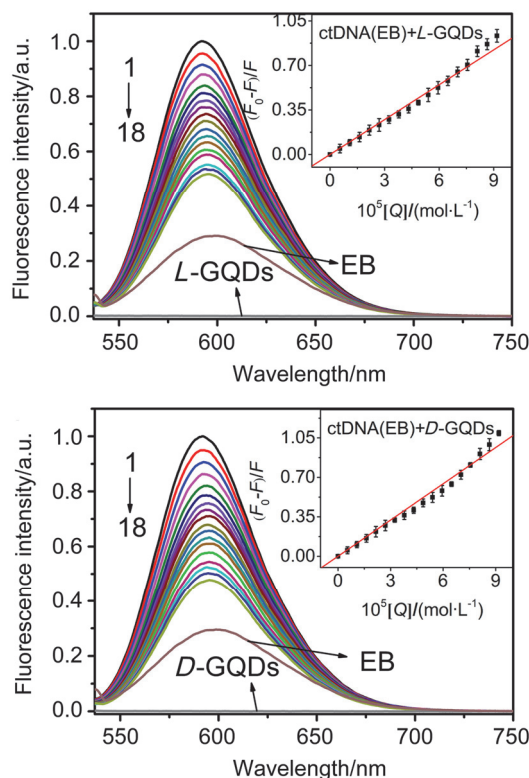


图 4 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA-EB 复合物作用的荧光光谱图

Figure 4 Fluorescence spectra of ctDNA-EB complex with various concentrations of *L*(or *D*)-GQDs.

2.2.2 猝灭类型

通过上述荧光猝灭实验可知, *L*(or *D*)-GQDs 能够有效地猝灭 ctDNA-EB 体系的荧光, 因此通过记录在三种不同温度(298、304 和 310 K)下浓度增加的两种手性石墨烯量子点对 ctDNA-EB 体系的荧光猝灭程度, 并利用 Stern-Volmer 方程(式 1)可推测出体系的猝灭类型。如图 5 所示, 利用式 1 将所得的数据进行线性拟合, 并求出猝灭常数 K_{SV} 列于表 1。由于两个 ctDNA(EB)-GQDs 复合物体系中的 K_{SV} 值均随温度升高而降低, 因此 ctDNA-EB 体系与 *L*(or *D*)-GQDs 之间的荧光猝灭机理均为静态猝灭^[30]。

2.2.3 结合常数

在荧光静态猝灭过程中, 猝灭剂可以与荧光团结合形成基态复合物。因此, 可以利用修正的 Stern-Volmer 方程(式 2):

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{f_a K_a} \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2)$$

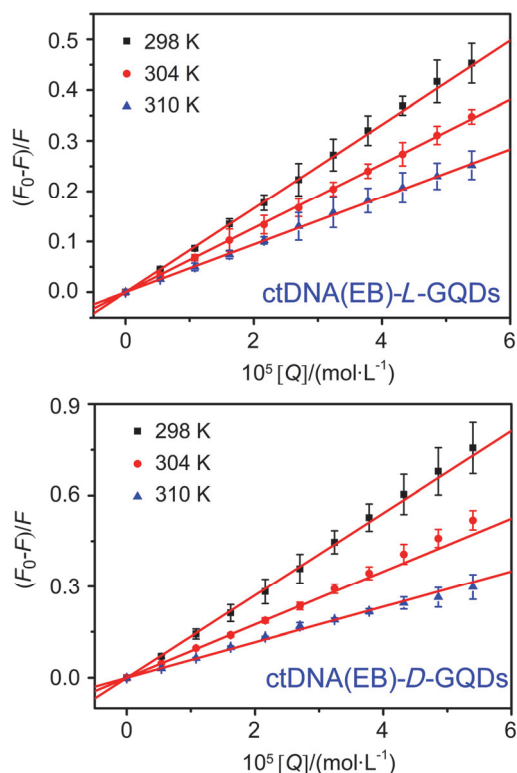


图5 ctDNA(EB)-GQDs 体系的 Stern-Volmer 图

Figure 5 Stern-Volmer plots of ctDNA(EB)-GQDs system.

表1 ctDNA(EB)-GQDs 体系在不同温度下的 Stern-Volmer 猝灭常数
Table 1 Stern-Volmer quenching constants of ctDNA(EB)-GQDs system at various temperatures

System	<i>T</i> /K	$K_{sv}/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	R^2 ^a	<i>S.D.</i> ^b
ctDNA(EB)-L-GQDs	298	0.84	0.999	0.003
	304	0.63	0.999	0.002
	310	0.47	0.999	0.002
ctDNA(EB)-D-GQDs	298	1.35	0.999	0.009
	304	0.87	0.999	0.010
	310	0.58	0.999	0.008

^a R^2 is the correlation coefficient; ^b *S.D.* is standard deviation.

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^[30]. 通过荧光猝灭数据计算这些复合物的结合常数 (K_a), 图6为三个不同温度下 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 作用后修正的 Stern-Volmer 图. 如表 S1 所示, 随着温度的升高, 体系的结合常数 K_a 逐渐降低, 而且在相同的温度 (298 K) 下, *D*-GQDs 与 ctDNA 的结合常数大, 为 $1.12 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, *L*-GQDs 与 ctDNA 的结合常数较小, 为 $0.73 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这主要是因为右手性的 *D*-GQDs 和左手性的 *L*-GQDs 相比, 与 ctDNA 之间的结合具有较小的空间位阻, 因此, *D*-GQDs 与 ctDNA-EB 体系的结合能力高, *L*-GQDs 与 ctDNA-EB 体系的结合能力低. 这与前面紫外实验结果高度一致.

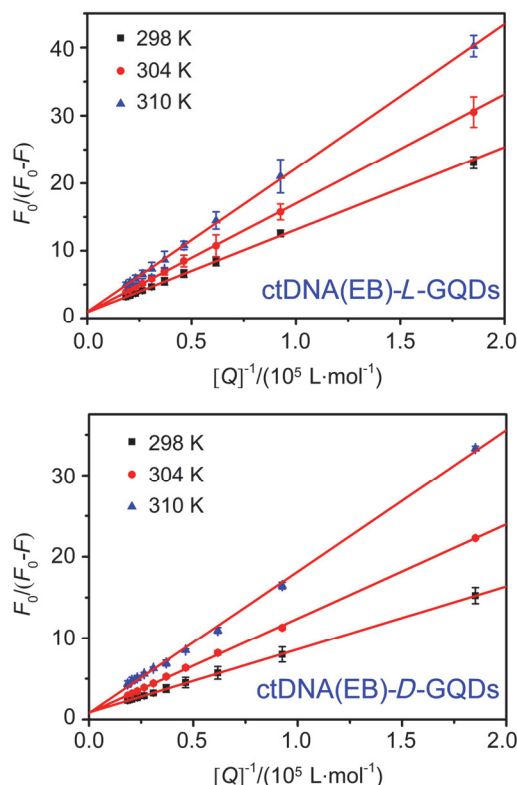


图6 ctDNA(EB)-GQDs 体系修正的 Stern-Volmer 图

Figure 6 Modified Stern-Volmer plots of ctDNA(EB)-GQDs system.

2.2.4 结合力

ctDNA-EB-GQDs 体系中的结合力通常包含氢键、疏水力、静电相互作用和范德华相互作用^[31]. ctDNA-EB-GQDs 体系的结合力可以从热力学参数值大致推测, 包括焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和自由能变化(ΔG)^[32]. 这些热力学参数的值可以根据 van't Hoff 方程(式 3、式 4)计算:

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

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

图 7 为加入 *L*(or *D*)-GQDs 前后 ctDNA-EB-GQDs 体系的 van't Hoff 图, 所求出的 ΔH 、 ΔS 和 ΔG 如表 S1 所示, 两个 ctDNA-EB-GQDs 体系的 ΔG 为负值表明, *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA-EB 复合物的结合过程是自发的. 在两个 ctDNA-EB-GQDs 体系中, ΔH 和 ΔS 均为负值, 表明两个体系的主要作用力均为氢键和范德华相互作用^[32].

2.2.5 结合相互作用的影响

FT-IR 和 XPS 表征反映了在 *L*(or *D*)-GQDs 的表面携带有胺基官能团, 且通过 ζ -电势测量可知(图 S2), *L*-GQDs 与 *D*-GQDs 均带正电荷, 分别为 +2.5 mV、+2.8 mV, 而 ctDNA 在溶液中携带负电(-10.9 mV). 因

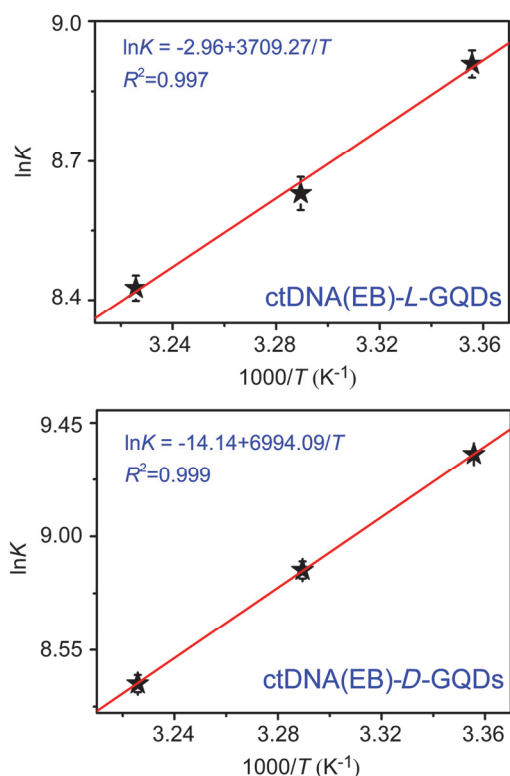


图7 ctDNA(EB)-GQDs 体系的 van't Hoff 图

Figure 7 Van't Hoff plot of ctDNA(EB)-GQDs system.

此, ctDNA 与 *L*(or *D*)-GQDs 之间存在静电相互作用, 并可能受强电解质(如 NaCl 和 CaCl₂)的影响^[33]. 因此, 研究了强电解质(NaCl 和 CaCl₂)对 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 之间的结合相互作用的影响, 并通过修正的 Stern-Volmer 方程(式2)分析了具有或不具有电解质的三种 ctDNA-EB-GQDs 体系的结合常数. 图8为存在或不存在电解质的两种 ctDNA-EB-GQDs 体系的修正的 Stern-Volmer 图, 计算出的 K_a 值显示在表 S2 中. 在 ctDNA-EB-GQDs 体系中, NaCl 的存在使体系的 K_a 值均略有下降, 在 CaCl₂ 存在下, K_a 值下降更为显著, 这意味着两个手性石墨烯量子点与 ctDNA 之间可能存在静电吸引.

ctDNA 与 *L*(or *D*)-GQDs 之间的嵌插结合可能会受到某些化学变性剂(Urea 和 GuHCl)的影响^[33], 因为这些化学变性剂会干扰碱基对的氢键并解开 ctDNA 的双链^[34]. 因此, 研究在添加化学变性剂前后 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 之间的结合相互作用, 以阐明这些化学变性剂的影响. 图8显示了存在和不存在化学变性剂条件下的 ctDNA-EB-GQDs 体系修正的 Stern-Volmer 图, 计算出的 K_a 值显示于表 S2. 由表 S2 可知, 在 Urea 和 GuHCl 的存在下, 体系的 K_a 值均显著降低, 表明这些化学变性剂可以解开 ctDNA 的双螺旋结构, 并从 ctDNA 的双螺旋结构中释放出 *L*(or *D*)-GQDs.

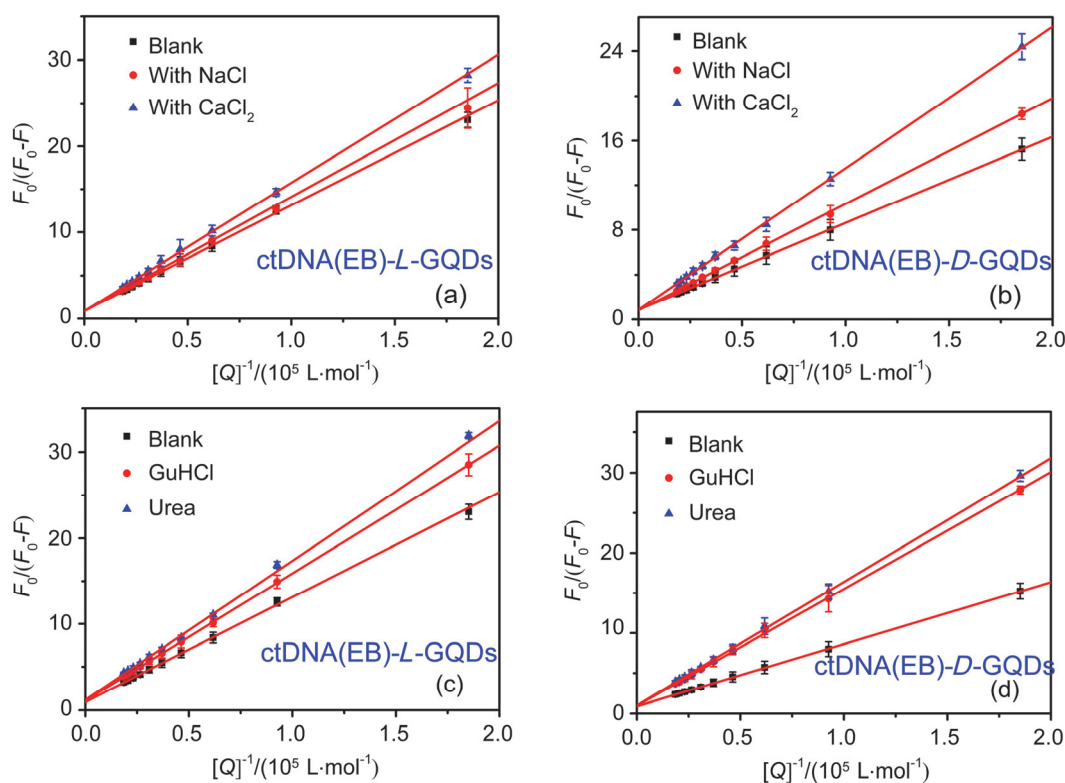


图8 ctDNA-EB-GQDs 体系修正的 Stern-Volmer 图

Figure 8 Stern-Volmer plots of ctDNA-EB-GQDs system

2.3 ctDNA 的构象结构研究

2.3.1 圆二色光谱法

CD 光谱法可在 ctDNA 与 *L*(or *D*)-GQDs 相互作用后提供 ctDNA 的构象信息^[33]. 在典型的 ctDNA 的 CD 光谱中, 在 245 nm 附近的负峰归因于右旋 B 型螺旋, 在 275 nm 附近的正峰属于碱基堆积^[33]. 这些吸收峰在 ctDNA 与不同物质分子之间的结合相互作用后可能会发生变化. 为了揭示 *L*(or *D*)-GQDs 对 ctDNA 手性构象的影响, 图 9 显示了 ctDNA、*L*(or *D*)-GQDs 和具有不同物质的量比的[GQDs]:[ctDNA]的 CD 光谱. 如图 9 所示, 随着 *D*-GQDs 浓度的增加, ctDNA 在 245 nm 处负峰的强度增加, 而在 275 nm 处正峰强度显著下降, 并伴有明显的波长红移. 而 *L*-GQDs 与 ctDNA 的结合, 仅引起了 275 nm 处的正峰强度轻微下降, 波长不发生明显移动, 245 nm 处的负峰强度几乎没有改变. 这证明了具有右手手性的石墨烯量子点(*D*-GQDs)与具有右手 B 型螺旋的 ctDNA 结合较强, 这之前荧光实验结果一致, *D*-GQDs 不仅削弱了 ctDNA 的右手 B 型螺旋性, 还降低了 ctDNA 碱基堆积作用, 而具有左手手性的石墨烯量子点(*L*-GQDs)由于空间位阻效应的影响, 与 DNA 结合较弱^[35], 仅仅降低了 ctDNA 的碱基堆积作用, 而对 ctDNA 的右手 B 型螺旋性没有明显影响, 为了进一步证明手性石墨烯量子点与 ctDNA 结合的构象差异性, 我们还通过红外实验对手性石墨烯量子点与 ctDNA 结合进行进一步验证.

2.3.2 红外吸收光谱法

FT-IR 光谱可用于分析 ctDNA 与 *L*(or *D*)-GQDs 相互作用后的构象变异^[33]. 图 10 显示了 ctDNA 的 FT-IR 光谱, 以及 ctDNA-GQDs 与相应 GQDs 在[complex]/[ctDNA]值不同时的 FT-IR 光谱差异. 在 ctDNA 的 FT-IR 光谱中, ctDNA 在 835 cm^{-1} 附近显示出磷酸盐伸缩振动峰, 这反映了 ctDNA 的右手 B 型螺旋结构^[24]. 脱氧核糖的伸缩振动峰约在 968 cm^{-1} , 这归因于 ctDNA 的脱氧核糖 C—C 和 C—O 伸缩振动^[33]. 在 1222 和 1090 cm^{-1} 处出现两个明显的频率峰值, 分别归因于磷酸盐的不对

称和对称振动. 此外, 随着[GQDs]/[ctDNA]值的增加, 磷酸盐伸缩振动带(835 cm^{-1})的强度和位置均不变. 脱氧核糖伸缩振动(968 cm^{-1})和磷酸盐振动(1222 和 1090 cm^{-1})的峰值位置均保持恒定. 表明在 *L*(or *D*)-GQDs 作用下, ctDNA 仍然保留内部脱氧核糖结构和右手 B 型螺旋结构.

此外, ctDNA 在 1716 至 1490 cm^{-1} 范围内还显示出 4 个含氮碱基的伸缩振动峰. 如图 10 所示, 在 1490 和 1610 cm^{-1} 处的频率峰值分别归因于胞嘧啶(C)和腺嘌呤(A)的伸缩振动. 在 1659 和 1716 cm^{-1} 处的频率峰值分别归因于胸腺嘧啶(T)的拉伸振动和鸟嘌呤(G)的面内伸缩振动^[33]. 这些频率峰值的变化可用于分析配合物与 ctDNA 的结合机制. 随着[GQDs]/[ctDNA]值的增加, A 碱基和 T 碱基的伸缩振动峰位置几乎无影响. 但是, C 碱基和 G 碱基的伸缩振动带明显发生红移或蓝移, 这表明 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 的 G-C 碱基对之间的结合相互作用更强^[36].

这些振动峰强度的变化可用于分析 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 的结合机制. FT-IR 光谱中的相对振动强度变化是通过使用脱氧核糖伸缩振动强度(968 cm^{-1})作为参比来计算的. 如图 10 所示, 在 1090 cm^{-1} 处的峰值相对强度增加, 但在 1222 cm^{-1} 处的峰值相对强度稍微降低. 因此, *L*(or *D*)-GQDs 可从不对称结构诱导 ctDNA 对称结构的形成. 在 4 个含氮碱基伸缩振动峰中, 4 个峰值的相对强度均增加, 但在 1610 cm^{-1} 处的峰值相对强度增加幅度较大. 说明与 A-T 碱基对相比, G-C 碱基对发生更多的变化, 这种振动的变化归因于 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 的 G-C 碱基对的活性位点之间的结合作用^[36]. 据报道, 振动峰强度和峰位置的变化通常反映了物质小分子与 ctDNA 的嵌插结合模式^[37]. 以上结果表明 *L*(or *D*)-GQDs 更倾向于与 DNA 的 G-C 碱基对相互作用. 且值得注意的是, 由于配体 *L*(or *D*)-Trp 的存在使 GQDs 具备不同的手性, 因此造成了 *L*(or *D*)-GQDs 与 DNA 结合的手性差异. ctDNA 与 *D*-GQDs 结合后的各个峰强度和位置的变化均比与 *L*-GQDs 作用后的变化更显著, 这也从另一方面证明了 ctDNA 与 *D*-GQDs 之间的结合较强.

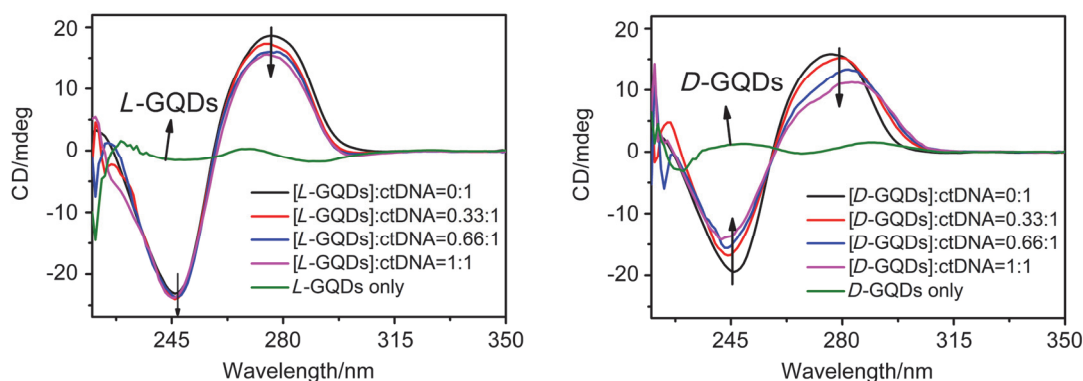


图 9 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 作用的圆二色光谱图

Figure 9 CD spectra of the interaction between *L*(or *D*)-GQDs and ctDNA

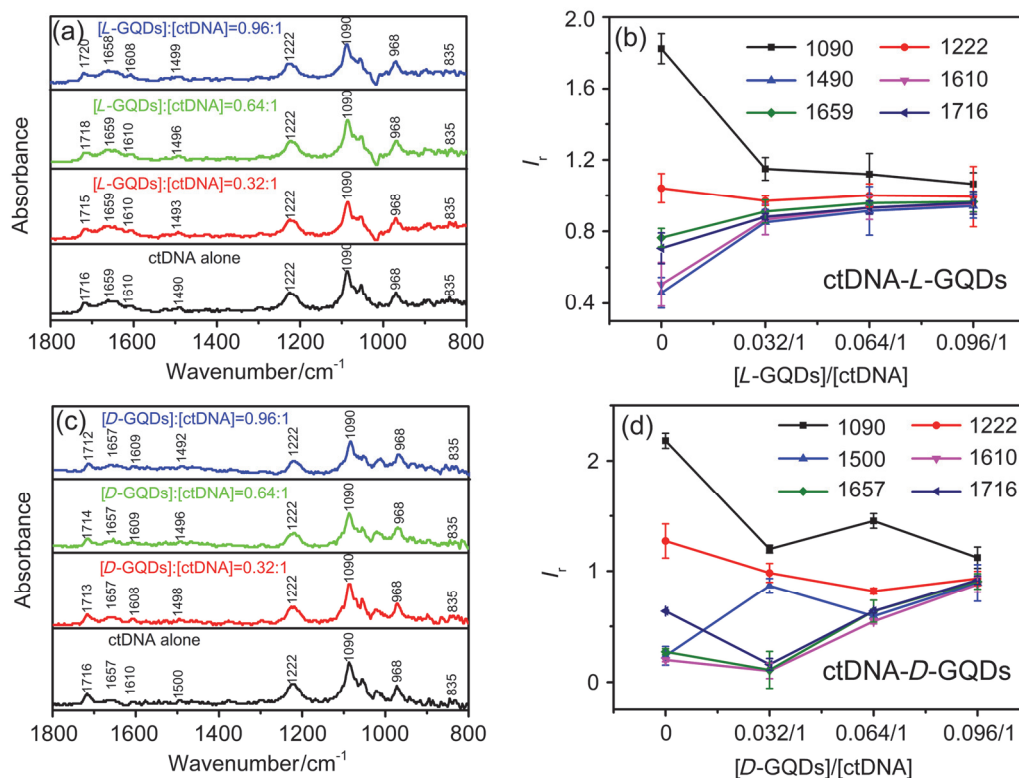


图 10 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 作用的红外吸收光谱图
Figure 10 FTIR spectra of the interaction between *L*(or *D*)-GQDs and ctDNA

3 结论

本工作通过简单的一步水热法, 制备了具有手性的石墨烯量子点(*L*(or *D*)-GQDs), 并对该量子点与 ctDNA 的结合作用模式进行了系统地探究. 结果证明了, 所制备的手性石墨烯量子点具有优异的荧光性能以及较好的水溶性. 通过与 ctDNA 的作用模式探究, 反映了 *L*(or *D*)-GQDs 与 ctDNA 之间的结合模式均为嵌插结合, 主要作用力为氢键和范德华相互作用力, 并伴随着轻微的静电结合力. 值得注意的是, 由于空间位阻效应的影响, 具备右手性的 *D*-GQDs 与 ctDNA 之间的结合能力较强, *L*-GQDs 与 ctDNA 的结合较弱. 一些化学变性剂如 Urea、GuHCl 的存在可以诱发 ctDNA 的双螺旋结构解开, 并从 ctDNA 的双螺旋结构中释放出 *L*(or *D*)-GQDs. 圆二色光谱法和红外光谱法证明了 *L*(or *D*)-GQDs 均通过与 DNA 的 G-C 碱基对之间的氢键进行了嵌插结合, 并影响了 DNA 的碱基堆积, 但是 *L*-GQDs 由于较大的空间位阻与 DNA 结合能力较小, 因此对 DNA 的 B 型螺旋结构无明显影响, 而 *D*-GQDs 则明显地削弱了 DNA 的螺旋性. 这些结果提供了有关手性石墨烯量子点与 ctDNA 之间结合机理的详细信息. 为 *L*(or *D*)-GQDs 作为一种有潜力的荧光探针用于细胞追踪以及成像领域提供理论参考.

4 实验部分

手性石墨烯量子点的制备: *L*(or *D*)-GQDs 通过热解法进行制备. 摩尔浓度是根据 MALDI-TOF-MS 测定的平均分子量($\approx 603 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)进行计算的. 首先将 1.0 g 柠檬酸一水合物和 1.0 g *L*(or *D*)-色氨酸(Trp)溶解于 15 mL 水中. 在此, 柠檬酸和 Trp 分别用作碳源和掺杂元素源. 然后, 将混合物溶液转移到聚四氟乙烯密封高压釜中, 在 180 °C 条件下反应 1.5 h. 然后, 用 500 Da 透析袋(中国上海绿鸟科技发展有限公司)进行透析 2 d, 以纯化产物. 透析后, 通过冷冻干燥法, 获得 *L*(or *D*)-GQDs 的黄色棉花糖状固体. 最后, 将 *L*(or *D*)-GQDs 作为储备溶液, 重新分散在超纯水中, 以备后用.

References

- [1] Crassous, J. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 830.
- [2] Li, Q.; Jia, Y.; Li, J. B. *Acta Chim. Sinica* **2019**, 77, 1173. (李琦, 贾怡, 李峻柏, 化学学报, **2019**, 77, 1173.)
- [3] Xiong, F.; Li, L. *Chinese J. Org. Chem.* **2018**, 38, 2927. (熊斐, 李莉, 有机化学, **2018**, 38, 2927.)
- [4] Cai, J.; Hao, C.; Sun, M.; Ma, W.; Xu, C.; Kuang, H. *Small* **2018**, 14, 1703931.
- [5] Mohammadi, E.; Tsakmakidis, K. L.; Askarpour, A. N.; Dehkhoda, P.; Tavakkoli, A.; Altug, H. *ACS Photonics* **2018**, 5, 2669.
- [6] Liu, G. J.; Shi, H. *Chinese J. Org. Chem.* **2016**, 36, 2583.
- [7] Liu, Q.; Guo, B. D.; Rao, Z. Y.; Zhang, B. H.; Gong, J. R. *Nano Lett.* **2013**, 13, 2436.
- [8] Ge, S. Y.; He, J. B.; Ma, C. T.; Liu, J. Y.; Xi, F. N.; Dong, X. P. *Talanta* **2019**, 199, 581.

- [9] Lu, H. T.; Li, W. J.; Dong, H. F.; Wei, M. L. *Small* **2019**, *15*, 1902136.
- [10] Sajjadi, S.; Khataee, A.; Soltani, R. D. C.; Hasanzadeh, A. *J. Phys. Chem. Solids* **2019**, *127*, 140.
- [11] Zhou, X. Q.; Sun, Q.; Jiang, L.; Li, S. T.; Gu, W.; Tian, J. L.; Liu, X.; Yan, S. P. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 9516.
- [12] Carrillo-Carrión, C.; Cárdenas, S.; Simonet, B. M.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4730.
- [13] Zeng, C. J.; Jin, R. C. *Chem* **2017**, *12*, 1839.
- [14] Jiang, S.; Chekini, M.; Qu, Z. B.; Wang, Y. C.; Yeltik, A.; Liu, Y. G.; Kotlyar, A.; Zhang, T. Y.; Li, B.; Demir, H. V.; Kotov, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13701.
- [15] Li, F.; Li, Y. Y.; Yang, X.; Han, X. X.; Yang, J.; Wei, T. T.; Yang, D. Y.; Xu, H. P.; Nie, G. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 2377.
- [16] Suzuki, N.; Wang, Y. C.; Elvati, P.; Qu, Z. B.; Kim, K.; Jiang, S.; Baumeister, E.; Lee, J.; Yeom, B. J.; Bahng, J. H.; Lee, J.; Violi, A.; Kotov, N. A. *ACS Nano* **2016**, *10*, 1744.
- [17] Xu, L. G.; Xu, Z.; Ma, W.; Liu, L. Q.; Wang, L. B.; Kuang, H.; Xu, C. H. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4478.
- [18] Gan, Z.; Xu, H.; Hao, Y. *Nanoscale* **2016**, *8*, 7794.
- [19] Xu, M. H.; He, G. L.; Li, Z. H.; He, F. J.; Gao, F.; Su, Y. J.; Zhang, L. Y.; Yang, Z.; Zhang, Y. F. *Nanoscale* **2014**, *6*, 10307.
- [20] Singh, H.; Sreedharan, S.; Tiwari, K.; Green, N. H.; Smythe, C.; Pramanik, S. K.; Thomas, J. A.; Das, A. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 52.
- [21] Simoes, E. F. C.; Da Silva, J. C. G. E.; LeitaO, J. M. M. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *852*, 174.
- [22] Liu, Z. G.; Xiao, J. C.; Wu, X. W.; Lin, L. Q.; Weng, S. H.; Chen, M.; Cai, X. H.; Lin, X. H. *Sens. Actuators, B* **2016**, *229*, 217.
- [23] Peng, J.; Gao, W.; Gupta, B. K.; Liu, Z.; Romero-Aburto, R.; Ge, L. H.; Song, L.; Alemany, L. B.; Zhan, X. B.; Gao, G. H.; Vithayathil, S. A.; Kaiparettu, B. A.; Marti, A. A.; Hayashi, T.; Zhu, J. J.; Ajayan, P. M. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 844.
- [24] Zhou, X.; Zhang, G.; Wang, L. J. *Lumin.* **2014**, *154*, 116.
- [25] Kurbanoglu, S.; Dogan-Topal, B.; Hlavata, L.; Labuda, J.; Ozkan, S. A.; Uslu, B. *Electrochim. Acta* **2015**, *169*, 233.
- [26] Kumar, C. V.; Turner, R. S.; Asuncion, E. H. *J. Photochem. Photobiol., A* **1993**, *74*, 231.
- [27] Li, Y.; Zhang, G. W.; Pan, J. H.; Zhang, Y. *Sens. Actuators, B* **2014**, *191*, 464.
- [28] Cohen, G.; Eisenberg, H. *Biopolymers* **1969**, *8*, 45.
- [29] Coury, J. E.; Mcfail-Isom, L.; Williams, L. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 12283.
- [30] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, **2006**.
- [31] Leckband, D. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 1.
- [32] Ross, P. D.; Subramanian, S. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3096.
- [33] Huang, S.; Liang, Y.; Huang, C. S.; Su, W.; Lei, X. L.; Liu, Y.; Xiao, Q. *Luminescence* **2016**, *31*, 1384.
- [34] Blackburn, G. M.; Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2nd ed., Oxford University Press, New York, **1996**.
- [35] Barton, J. K. *Science* **1986**, *233*, 727.
- [36] Hanczyc, P.; Lincoln, P.; Norden, B. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 2947.
- [37] Jangir, D. K.; Charak, S.; Mehrotra, R.; Kundu, S. *J. Photochem. Photobiol., B* **2011**, *105*, 143.

(Cheng, B.)