

## 微生物检测中糖量子点的制备及其与凝集素的相互作用

孔潇艺<sup>1,2</sup> 程水红<sup>2</sup> 刘雪峰<sup>3</sup> 李学兵<sup>2\*</sup> 吴培星<sup>4\*</sup>

(1. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

2. 中国科学院 微生物研究所/中科院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;

3. 国家纳米科学中心, 北京 100190; 4. 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050)

**摘要** 为了以量子点为探针建立简便快速的病原微生物检测方法, 采用配体交换法将具有微生物特异性的糖链偶联到 CdSeS/ZnS 量子点表面, 制备 2 种糖量子点复合材料(甘露糖-量子点和半乳糖-量子点)。通过对它们的结构、物性和光谱学特性进行表征, 结果显示: 2 种糖量子点均具有良好的水溶性、荧光发射和紫外-可见光吸收性能。进一步以这 2 种糖量子点为探针与凝集素共孵育后, 溶液颜色和荧光发射光谱的变化表明: 甘露糖-量子点对刀豆蛋白具有特异性, 最低可检测浓度为 95 nmol/L; 而半乳糖-量子点对蓖麻毒素具有特异性, 最低可检测浓度为 3 nmol/L。因为细菌和病毒表面的粘附素多为凝集素类蛋白, 本研究为进一步建立病原微生物的检测方法奠定了基础。

**关键词** 微生物检测; 量子点; 糖; 复合材料; 凝集素

中图分类号 O 657.3

文章编号 1007-4333(2011)04-0001-08

文献标志码 A

## Preparation of glyco-quantum dots for microbial detection

KONG Xiao-yi<sup>1,2</sup>, CHENG Shui-hong<sup>2</sup>, LIU Xue-feng<sup>3</sup>, LI Xue-bing<sup>2\*</sup>, WU Pei-xing<sup>4\*</sup>

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology/Institute of Microbiology,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3. National Center of Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China;

4. Lanzhou Institute of Animal Husbandry and Veterinary Drug, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

**Abstract** Carbohydrates with the binding capability to microbes were coupled with luminescent quantum dots(QDs) for microbial detections. Mannose and galactose-coated QDs(Man-QDs and Gal-QDs) were prepared using the thiolated sugars to replace the original ligands(mercaptoacetic acid) on the surface of CdSeS/ZnS QDs, according to a ligand exchange method. Structural and spectral characterizations of the resulting glyco-QDs revealed intense luminescent emission and UV-visible absorption, as well as high solubility and stability in water. Further studies on interactions between the glyco-QDs and corresponding lectins(ConA and RCA<sub>120</sub>) demonstrated that luminescent aggregations of the lectins caused by the multiple and specific bindings with the glyco-QDs could occur at nanomolar concentrations in a very short time(90 min). This indicated the potentials of the glyco-QDs for rapid and sensitive biosensings. As the lectin-like adhesins are commonly found on the surfaces of many kinds of microbes, the present work provides a baseline for the future studies on microbial detections with the glyco-QDs probes.

**Key words** microbial detection; quantum dot; carbohydrate; conjugate; lectin

收稿日期: 2011-02-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30770486); 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-YW-G-032, KSCX2-YW-R-178)

第一作者: 孔潇艺, 硕士研究生, E-mail: kxy198608@163.com

通讯作者: 李学兵, 研究员, 主要从事糖化学和化学糖生物学研究, E-mail: lixb@im.ac.cn

吴培星, 研究员, 主要从事生物技术药物研究, E-mail: peixwu@yahoo.com.cn

病原微生物检测与防治技术是人类与传染病抗争的基础,现代社会的发展对公共卫生及疾病防治事业提出了更高的要求,使传统的微生物检测技术也面临着新的问题与挑战。目前微生物检测主要有形态学、免疫学和分子生物学3种技术;形态学检测是最为经典的方法,虽简便易行,但操作费时,而且对实验条件和操作人员的经验有较高要求;免疫学检测方法(如酶联免疫技术)相对快速,但灵敏度和特异性较差,应用范围有局限性;分子生物学检测方法(如PCR法和荧光实时PCR法)灵敏度高且快速,但通量低、周期长、应用范围窄。此外,这3种方法往往需要微生物培养或者核酸提取,均存在操作繁琐、技术要求高等缺点<sup>[1]</sup>。因此,在改进、优化这些传统方法的同时,结合近年微生物研究领域中的新发现和生物检测领域中的新技术,开发更加简单快速的新检测方法和检测体系,日益受到人们的关注。

传染病的发生起始于病原体对宿主细胞的粘附,而后引发一系列的病理生理过程。近年糖生物学和人们对微生物感染分子机制的研究表明,许多病原体对宿主的粘附依赖于其表面的蛋白(一般为凝集素类)与宿主表面糖类化合物之间的特异性结合,宿主表面寡糖受体序列的差异决定了微生物定植的宿主范围和组织趋向<sup>[2-3]</sup>。例如,大肠杆菌ORN178通过其菌毛上的FimH蛋白特异性识别肠道宿主表面的甘露糖(Man),进而与之结合并侵染宿主细胞<sup>[4]</sup>;放线菌(WVU45)则结合口腔宿主表面的半乳糖(Gal)而引起龋齿等口腔疾病<sup>[5]</sup>;流感病毒则通过其表面HA蛋白(Hemagglutinin)结合呼吸道表面的唾液酸寡糖受体<sup>[6]</sup>。这种微生物与寡糖受体的特异性相互作用为建立快速、简便的检测方法提供了极佳的切入点,笔者设想用化学或生物学方法将寡糖耦合到具有可分析光谱学特性的物质(如荧光物质)上,制备可用于光学检测的寡糖复合物,以该复合物为探针使之与病原微生物发生特异性结合,同时借助光学检测手段来实现微生物的定性及定量分析。

近年来,纳米技术在生物检测方面发展迅速。纳米颗粒粒径小,有许多独特的理化性质,如比表面积大、光谱特性强等。而具有半导体特性的纳米粒子—量子点(QDs,quantum dots),以其独特的光谱

学特性(如光稳定性好、发光强度高、激发与发射光谱分离等)和良好的生物相容性在生物检测新技术开发方面备受瞩目<sup>[7-9]</sup>。本实验室着眼于病原体对寡糖序列的特异识别能力,旨在建立糖量子点复合材料(Glyco-QDs)制备方法,并以Glyco-QDs为探针探索一种快速、简便的病原微生物检测新方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料与试剂

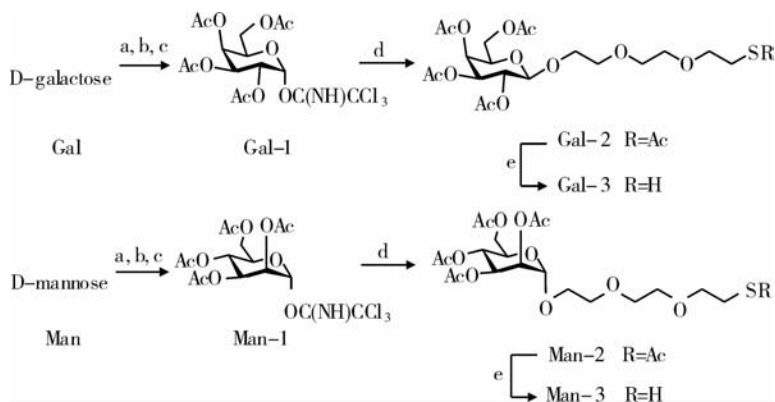
量子点(MAA-QDs)购买于武汉珈源量子点公司,为CdSeS/ZnS核/壳结构,表面修饰有巯基乙酸(Mercaptoacetic acid,MAA),溶解于的硼酸盐缓冲液(50 mmol/L,pH 9.0),浓度为8  $\mu$ mol/L,粒径为18~27 nm;ConA和RCA<sub>120</sub>购买于Sigma公司;柱色谱采用200~300目的硅胶(青岛海洋化工厂),以乙酸乙酯-石油醚(AR,北京化学试剂厂)为淋洗液;无水二氯甲烷(DCM,AR,北京化学试剂厂)经氯化钙干燥;Man、Gal、对甲苯磺酸(TfOH)、乙酸酐(Ac<sub>2</sub>O)、吡啶(Py)、三乙胺(TEA)、苄胺(BnNH<sub>2</sub>)、四氢呋喃(THF)、三氯乙腈(CNCCl<sub>3</sub>)、甲醇(MeOH)、甲醇钠(NaOMe)、氯仿、磷酸二氢钠、氢氧化钠(NaOH)、氯化镁、氯化锰、磷酸氢二钠和磷酸二氢钾均为分析纯,购买于北京化学试剂厂;1,8-二氮杂环[5,4,0]十一烯-7(DBU)和三甲基硅基三氟甲磺酸酯(TMSOTf)为分析纯,购买于Aldrich公司。化合物按照文献<sup>[12]</sup>方法事先合成。

### 1.2 试验仪器

Bruker ARX-400核磁共振仪(以CDCl<sub>3</sub>、D<sub>2</sub>O或CD<sub>3</sub>OD为溶剂,以Me<sub>4</sub>Si为内标进行测定);Shimadzu UV-2550紫外-可见分光光度计;Fluoromax-4可见-红外荧光分光光度计(HORIBA Jobin Yvon, France);Alpha Imager HP凝胶成像系统(Alpha Innotech);ZF-C型紫外灯;Canon D550数码相机;使用Zetasizer Nano ZS纳米粒度仪(Malvern Instruments, Inc.)测定MAA-QDs和Glyco-QDs粒径(以50 mmol/L,pH 9.0的硼酸盐缓冲溶液为溶剂),薄层色谱(TLC)在HF<sub>254</sub>硅胶板(烟台芝罘硅胶开发试验厂)上用体积分数为30%的硫酸甲醇溶液或紫外分析仪(UV)检测。

### 1.3 巯基化单糖Gal-3和Man-3的制备

巯基化单糖Gal-3和Man-3的制备见图1。



试剂和条件: a) Py,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , rt; b) THF,  $\text{BNNH}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ ; c) DBU,  $\text{Cl}_3\text{CN}$ , dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 53% and 55% overall yields of 3 steps synthesis of Gal-1 and Man-1, respectively; d) Compound 1, TMSOTf, dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 60% for Gal-2, 65% for Man-2; e) MeONa, MeOH, rt, 90% for Gal-3, 92% for Man-3.

图 1 Gal-3 和 Man-3 的合成

Fig. 1 Synthetic route of the activated glycoside Gal-3 and Man-3

### 1.3.1 Gal-3 的合成

在 100 mL 的圆底烧瓶中加入 Gal (3 g, 16.65 mmol),  $\text{Ac}_2\text{O}$  (7.9 mL, 83.25 mmol) 和 Py (30 mL), 室温反应过夜, 旋转蒸发浓缩。把得到的化合物溶于 THF (60 mL), 冰水浴条件下小心滴入  $\text{BnNH}_2$  (1.5 mL, 14.09 mmol), 室温下搅拌过夜。TLC 检测完毕后, 用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) 稀释反应液, 然后依次用饱和 NaCl 水溶液和水洗涤, 有机相用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 浓缩。经硅胶柱纯化 (1:1, petroleum ether-EtOAc) 得到白色固体, 使之溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL), 冷却至  $0^\circ\text{C}$ , 小心滴入  $\text{CNCCL}_3$  (3.7 mL, 37.02 mmol), 再滴入 DBU (0.37 mL, 2.4 mmol),  $0^\circ\text{C}$  搅拌反应 1 h。TLC 检测完毕后, 浓缩, 经硅胶柱纯化 (3:1, petroleum ether-EtOAc) 得黄色固体 Gal-1 (3.95 g, 三步总产率 53%)。R<sub>f</sub> 0.61 (2:1, petroleum ether-EtOAc)。

将所得的化合物 Gal-1 (3.95 g, 8.01 mmol) 和化合物 1<sup>[12]</sup> (3.55 g, 23.70 mmol) 溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL), 冷却至  $0^\circ\text{C}$ , 小心滴入 TMSOTf (139.19  $\mu\text{L}$ , 0.767 2 mmol),  $\text{N}_2$  保护下  $0^\circ\text{C}$  反应 15 min。TLC 监测完毕后, 再加入少量 TMSOTf, 以防止生成原酸酯, 反应 5 min 后加入几滴 TEA, 中和并浓缩反应液, 经硅胶柱纯化 (2:1, petroleum ether-EtOAc) 得糖浆状物质 Gal-2, 使之溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10

mL), 后添加 MeOH (20 mL), 再添加 NaOMe 的 MeOH 溶液 (1 mol/L) 使反应液 pH 升至 10~11。在此条件下反应 30 min, TLC 检测完毕后, 加入 Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ) 淬灭反应, 滤去树脂, 浓缩, 经硅胶柱纯化得白色固体 Gal-3 (1.50 g, 两步总产率 54%)。

### 1.3.2 Man-3 的合成

与制备 Gal-3 的方法相同, 以 33% 的总产率得到 Man-3。

### 1.4 Glyco-QDs 的制备

根据配体交换法<sup>[13]</sup>, 用巯基化单糖 Gal-3 或 Man-3 取代原料量子点表面的 MAA 配体, 分别制备了水溶性糖量子点 Gal-QDs 和 Man-QDs。实验操作简要叙述如下: 将 Gal-3 或 Man-3 适量 (表 1) 溶解于硼酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 9.0), 超声波分散后与硼酸盐缓冲液中的 MAA-QDs 混合, 置于摇床中振荡 2~3 h ( $37^\circ\text{C}$ , 200 r/min), 反应结束后, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清, 用事先平衡好的 NAP-5 脱盐柱脱盐, 收集有荧光的部分, 将收集到的量子点溶解于硼酸盐缓冲液, 用超滤管 (NMWL: 30 ku) 超滤 4 次, 所得滤液 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清可得到 Gal-QDs 或 Man-QDs (硼酸盐缓冲液溶液), 于  $4^\circ\text{C}$  下密封保存。反应投料比和产率如表 1 所示。

表1 制备糖量子点的反应物投料比及产率

Table 1 Reaction conditions(reactant ratio and product yield) of glyco-QDs preparations

材料	巯基化单糖用量/ mg(nmol)	MAA-QDs 用量 <sup>①</sup> / nmol	摩尔比 巯基化单糖/MAA-QDs	Glyco-QDs 产率 <sup>②</sup> / %
Man-3	97.19(296 203)	40	7 405	22.41
Gal-3	89.4(272 461)	40	6 812	23.25

注:① 硼酸盐缓冲液中 MAA-QDs 颗粒(8  $\mu\text{mol/L}$ )的摩尔数;② Glyco-QDs 颗粒的摩尔数/MAA-QDs 颗粒的摩尔数,量子点的摩尔浓度由所测定的吸光度和朗伯比尔定律算出,根据摩尔浓度和溶液体积换算得到摩尔数。

## 1.5 Glyco-QDs 与凝集素相互作用的检测与分析

### 1.5.1 Man-QDs 与 ConA 的相互作用

将 ConA(2 mg)溶于 HEPES 缓冲液(1 mL, 0.1 mol/L, pH 7.2),配置成 19.6  $\mu\text{mol/L}$  的 ConA 溶液,并依次稀释成 5 种浓度。将溶解于硼酸盐缓冲液 Man-QDs 的原溶液(8  $\mu\text{mol/L}$ , pH 9.0)稀释 50 倍,配置成浓度为 0.16  $\mu\text{mol/L}$  的母液,然后以 1/3 的体积配比分别与不同浓度的 ConA 溶液混合,25  $^{\circ}\text{C}$  震荡摇匀后静置 90 min,待沉淀完全生成,目视溶液澄清度不再有变化时,在紫外灯下拍照,并进行荧光全波长扫描。

### 1.5.2 Gal-QDs 与 RCA<sub>120</sub> 的相互作用

取 RCA<sub>120</sub> 原液(12 mg/mL, in PBS buffer) 30  $\mu\text{L}$  加入 PBS 缓冲溶液(1 mL, pH 7.4)中,配置成 0.09  $\mu\text{mol/L}$  的 RCA<sub>120</sub> 溶液。并依次稀释成 5 种浓度。将溶解于硼酸盐缓冲液的 Gal-QDs 的原溶液(8  $\mu\text{mol/L}$ , pH 9.0)稀释 50 倍,配置成浓度为 0.16  $\mu\text{mol/L}$  的母液,然后以 1/3 的体积配比分别与不同浓度的 RCA<sub>120</sub> 溶液混合,25  $^{\circ}\text{C}$  震荡摇匀后静置 90 min,待沉淀完全生成,目视溶液澄清度不再有变化时,在紫外灯下拍照,并进行荧光全波长扫描。

## 1.6 凝胶电泳的测定

使用凝胶成像系统,在 0.5 $\times$ TAE 电泳缓冲液中,控制缓冲液下电压为 100 V,电流为 50 mA,光圈为 2.0、焦距为 3.0,曝光时间为 200 ms,在琼脂糖凝胶上电泳 30 min。

## 1.7 紫外-可见光吸收和荧光发射光谱的测定

将 MAA-QDs 和 Glyco-QDs 溶解于硼酸盐缓冲液(8  $\mu\text{mol/L}$ , pH 9.0),配制成待测样品,室温条件下,在波长范围为 400~700 nm 范围内进行高速紫外扫描,扫描间距为 0.5 nm;设定荧光激发光波长为 388 nm,扫描步长为 1 nm,在狭缝宽度为 1 nm 的范围内进行荧光全波长扫描。

## 2 结果与分析

### 2.1 巯基单糖 Gal-3 和 Man-3 的合成与表征

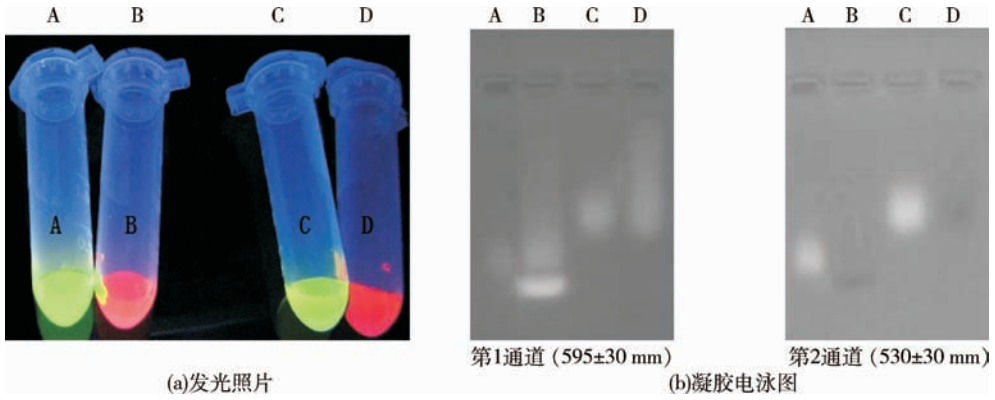
根据图 1 所示的合成路线,分别制备了半乳糖衍生物 Gal-3 和甘露糖衍生物 Man-3,并用核磁共振(氢谱)和质谱对其结构进行了检定,所得结果与文献报道<sup>[11]</sup>的相一致。由于组成 Gal-3 和 Man-3 分子的糖基和糖苷配基(三聚乙二醇)部分均为高亲水性基团,这 2 种化合物表现出良好的水溶性。此外,由于它们的分子末端含有巯基(SH),为下一步配体交换法合成水溶性 Glyco-QDs 做好了准备。

Gal-3:<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, MeOD).  $\delta$  4.37(d, 1H,  $J$  7.8 Hz), 4.02(m, 2H), 3.85(m, 1H), 3.78(m, 1H), 3.76-3.55(m, 10H), 3.51(dd, 1H,  $J$  7.8 Hz, 8.4 Hz), 2.68(t, 1H,  $J$  6.0 Hz). ESI-MASS( $m/z$ ) calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>S; 328.12. Found 351.11 [M+Na]<sup>+</sup>.

Man-3:<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, MeOD).  $\delta$  4.83(d, 1H,  $J$  1.5 Hz), 3.91(dd, 1H,  $J$  1.5 Hz, 3.0 Hz), 3.85-3.76(m, 3H), 3.75-3.60(m, 10H), 2.91(t, 1H,  $J$  6.0 Hz), 2.69(t, 1H,  $J$  6.0 Hz). ESI-MASS( $m/z$ ) calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>S; 328.12. Found 351.11[M+Na]<sup>+</sup>.

### 2.2 Glyco-QDs 的制备与表征

为了在生物检测中观察到显著的颜色差异,选取了 2 种不同粒径的 MAA-QDs 为原料制备 Glyco-QDs,粒径为 18.61 nm 的 MAA-QDs<sub>545</sub> 最大激发波波长为 545 nm,呈绿色,用于制备 Man-QDs;粒径为 27.23 nm 的 MAA-QDs<sub>625</sub> 最大激发波波长为 625 nm,呈红色,用于制备 Gal-QDs(图 2(a))。凝胶电泳显示 Man-QDs 和 Gal-QDs 较对应的 MAA-QDs 移动速度变慢(图 2(b)),表明电荷较少的 MAA 已被电荷较多的糖基成功取代,而且 Man-QDs 和 Gal-QDs 在琼脂糖凝胶上的条带较窄,



第一通道和第二通道采用不同的发射滤光片检测量子点的移动,第一通道的发射滤光片狭缝为 565-625 nm,此时荧光发射光波峰为 625 的 B 和 D 的条带较为明显,在第二通道的发射滤光片狭缝为 500-560 nm,荧光发射光波峰为 545 的 A 和 C 的条带较为明显。

A. MAA-QDs-545; B. MAA-QDs-625; C. Man-QDs-545; D. Gal-QDs-625

图 2 量子点在水溶液中的发光照片和琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Images of aqueous solution(a) and agarose gel electrophoresis(b) of the QDs

说明它们的粒径均一,表面配体修饰良好。采用配体交换法<sup>[13]</sup>以 Gal-3 和 Man-3 取代原料量子点中的 MAA,分别得到了 Man-QDs 和 Gal-QDs(表 2,图 3),并通过核磁(氢谱)确认了其结构中糖基的存在(图 4)。通过动态光散射法(Zetasizer Nano ZS

表 2 MAA-QDs 和 Glyco-QDs 的粒径\*

Table 2 Size of Gal-QDs and Man-QDs

名称	粒径/nm	标注偏差
MAA-QDs545	18.61	0.225
MAA-QDs625	27.23	1.059
Man-QDs545	21.68	0.290
Gal-QDs625	36.74	2.090

注: \* 使用纳米粒度仪测定。

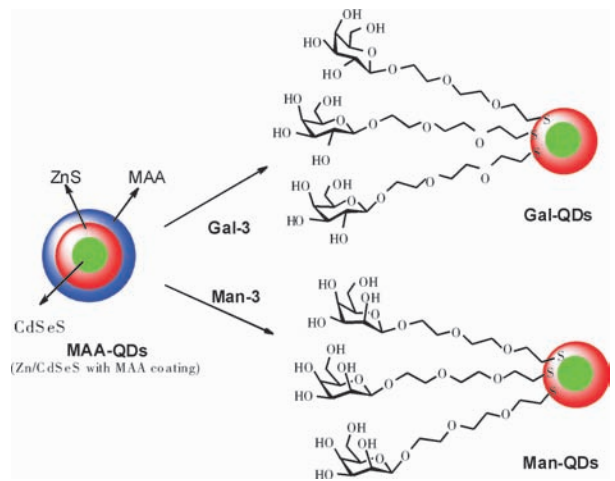


图 3 Gal-QDs 和 Man-QDs 的合成

Fig. 3 Preparation of Gal-QDs and Man-QDs

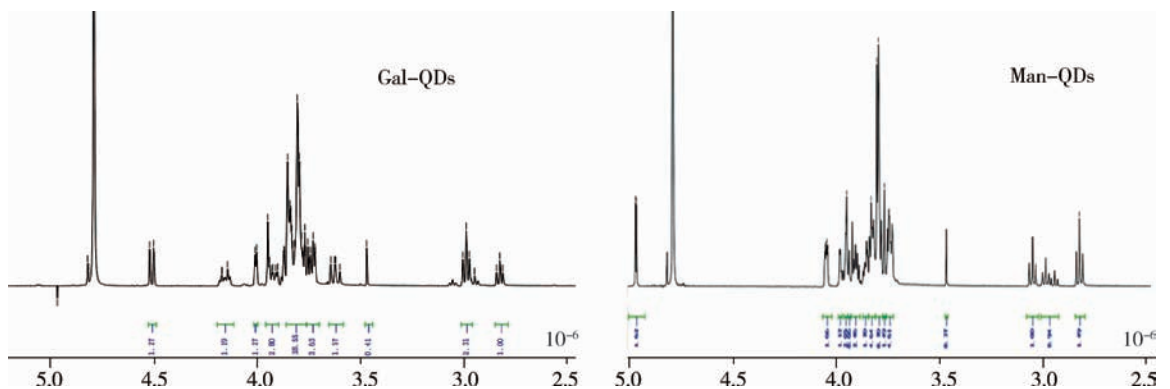


图 4 Gal-QDs 和 Man-QDs 的核磁图(氢谱)

Fig. 4 <sup>1</sup>H NMR spectra(500 MHz, 27 °C) of Gal-QDs and Man-QDs

纳米粒度仪)测定的 Man-QDs<sub>545</sub> 和 Gal-QDs<sub>625</sub> 的动力学粒径较对应的 MAA-QDs 有所增加(图 3),这与糖基分子(Man-3 和 Gal-3)的尺寸大于 MAA 相一致。此外,2 种 Glyco-QDs 均表现出良好的水溶性,在缓冲液中形成均一而稳定的分散系,与糖基修饰前的 MAA-QDs 相比较,在发光特性及水溶液稳定性方面均无显著差异,紫外-可见吸收谱和荧光发射谱也都显示糖基修饰对量子点的光学特性没有显著影响(图 5),这些结果表明 Man-QDs 和 Gal-QDs 可作为探针用于生物检测。

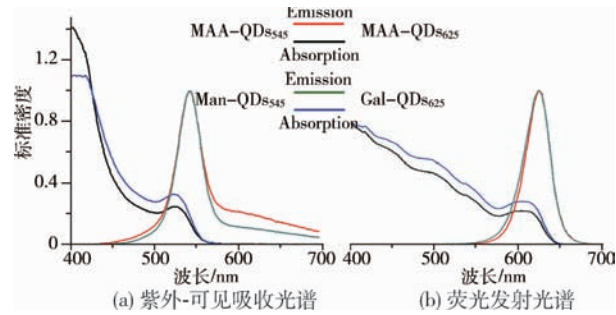


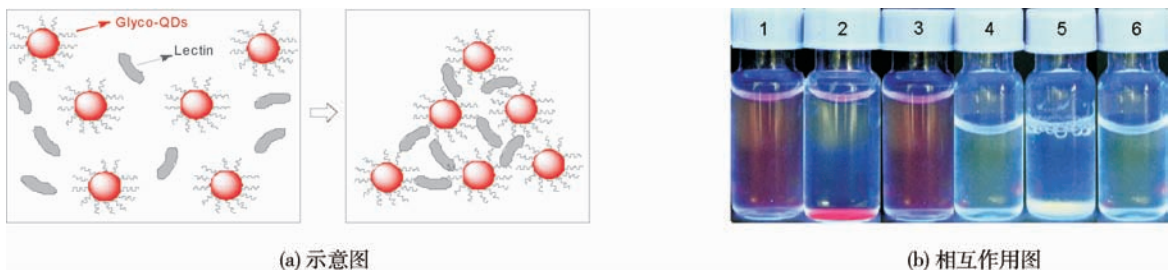
图 5 MAA-QDs 和 glyco-QDs 的紫外-可见吸收谱和荧光发射光谱

Fig. 5 UV-visible absorption and fluorescence-emission spectra of MAA-QDs and glyco-QDs

### 2.3 以 Glyco-QDs 为探针检测凝集素

凝集素蛋白对糖链具有高度的特异性,且一种凝集素往往拥有多个结合位点,可同时结合多个相同结构的寡糖。本试验使用了 2 种凝集素 ConA 和 RCA<sub>120</sub>,其中,ConA 对 Man 具有特异性<sup>[10]</sup>,RCA<sub>120</sub>对 Gal 具有特异性<sup>[11]</sup>。在溶液中将 2 种凝集素分别与 Man-QDs 和 Gal-QDs 混合孵育,由于

凝集素与 glyco-QDs 中的糖基部分发生“多价”<sup>[14]</sup>结合形成的交联结构可改变溶液的发光特征,并引起 glyco-QDs 和凝集素的共同沉降,随之析出而产生沉淀,因此通过比色法和光谱法可以快速而简单的检测溶液中的凝集素。图 6(a)是 glyco-QDs 与凝集素相互作用的示意图。图 6(b)是 glyco-QDs 与凝集素室温下共孵育 90 min 的照片,其中 2 号和 5 号瓶中反应液变为澄清,且瓶底部出现大量红色(2 号)及浅绿色(5 号)沉淀,而其余对照实验瓶中的反应液颜色自始至终没有变化。结果表明:Man-QDs 可用于检测 ConA,而 Gal-QDs 可用于检测 RCA<sub>120</sub>。图 7(a)是 ConA 与 Man-QDs 共孵育 90 min 时溶液的荧光发射光谱。从中可以看出,随着 ConA 浓度的增加,最大荧光发射光谱的强度减弱,证明结合反应进行 90 min 时(此时肉眼观察溶液已完全无色)溶液中残存的 Man-QDs 的浓度与反应前添加的 ConA 浓度存在依赖性,即此时溶液的荧光发射光谱反映了被测物 ConA 的浓度。这一结果预示通过 glyco-QDs 的荧光测定可以定量检测凝集素。图 7(b)是 ConA(0.38 μmol/L)与 Man-QDs(0.16 μmol/L)共孵育后溶液在不同时间节点的荧光发射光谱,从中可以看出,90 与 180 min 后的反应液的最大荧光发射强度差距不大,表明 90 min 时溶液中凝集素与 Man-QDs 的结合反应已基本达到平衡(即反应基本完成,沉淀几乎不再产生),这与图 6(b)肉眼观察的结果相一致,因此 90 min 可作为检测 Man-QDs 与 ConA 相互作用的理想时间节点。同样,荧光扫描也表明 Gal-QDs 具有定量检测 RCA<sub>120</sub> 的潜力,且理想检测时间节点也为 90 min(图 8)。



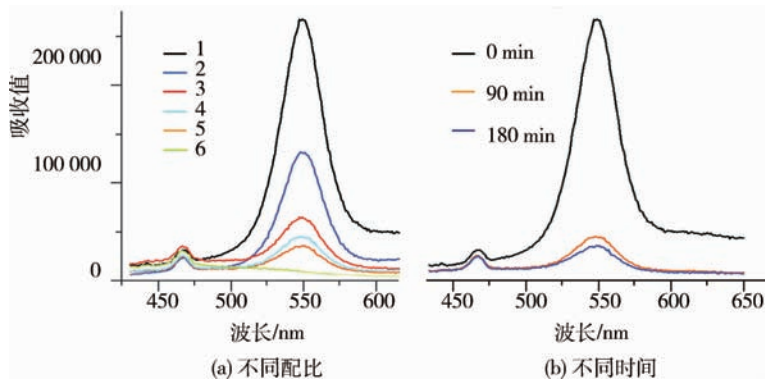
1. Gal-QDs<sub>625</sub>; 2. Gal-QDs<sub>625</sub> + RCA<sub>120</sub>; 3. Gal-QDs<sub>625</sub> + ConA; 4. Man-QDs<sub>545</sub>; 5. Man-QDs<sub>545</sub> + ConA; 6. Man-QDs<sub>545</sub> + RCA<sub>120</sub>

\* 注: glyco-QDs(0.16 μmol/L)与 RCA<sub>120</sub>(0.024 μmol/L)或 ConA(0.38 μmol/L)混合,共孵育 90 min,

空白对照(瓶 1 和瓶 4)中 glyco-QDs 的浓度为 0.16 μmol/L。

图 6 Glyco-QDs 与凝集素相互作用的示意图及照片

Fig. 6 Schematic illustration(a) and photograph(b) of interactions between glyco-QDs and lectins



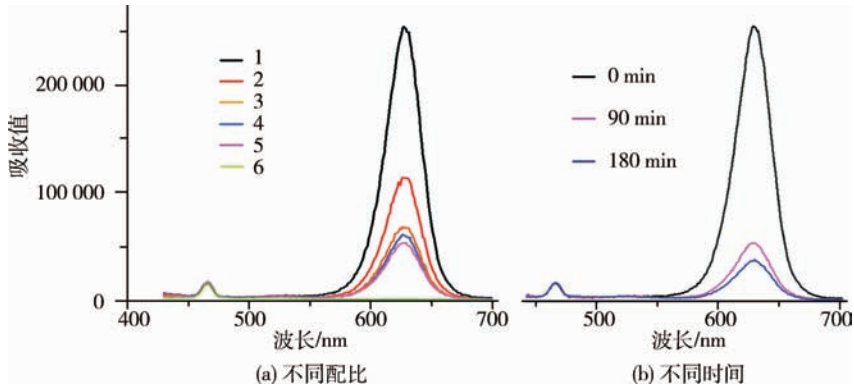
注 1: 下表为试验(a)中 ConA 与 Man-QDs 的浓度(50  $\mu\text{L}$  Man-QD 与 150  $\mu\text{L}$  ConA 溶液混合后, 共孵育 90 min)。

序号	1	2	3	4	5	6
ConA/( $\mu\text{mol/L}$ )	0	0.095	0.19	0.38	0.76	0.76
Man-QDs/( $\mu\text{mol/L}$ )	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0

注 2: 试验(b): 50  $\mu\text{L}$  Man-QDs(0.16  $\mu\text{mol/L}$ )与 150  $\mu\text{L}$  ConA(0.38  $\mu\text{mol/L}$ )溶液混合后, 共孵育 90 min。

图 7 不同 ConA 浓度(a)及相互作用时间(b)下的反应液荧光发射光谱

Fig. 7 Effect of ConA concentration(a) and reaction time(b) on the fluorescence-emission of the ConA-Man-QDs interaction



注 1: 下表为试验(a)中 RCA<sub>120</sub>与 Gal-QDs 的浓度(50  $\mu\text{L}$  Gal-QDs 与 150  $\mu\text{L}$  RCA<sub>120</sub>溶液混合后, 共孵育 90 min)。

序列	1	2	3	4	5	6
RCA <sub>120</sub> /( $\mu\text{mol/L}$ )	0	0.003	0.006	0.012	0.024	0.024
Gal-QDs/( $\mu\text{mol/L}$ )	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0

注 2: 试验(b): 50  $\mu\text{L}$  Gal-QDs(0.16  $\mu\text{mol/L}$ )与 150  $\mu\text{L}$  RCA<sub>120</sub>(0.24  $\mu\text{mol/L}$ )溶液混合后, 共孵育 90 min。

图 8 不同 RCA<sub>120</sub> 浓度(a)及相互作用时间(b)下的反应液荧光发射光谱

Fig. 8 Effect of RCA<sub>120</sub> concentration(a) and reaction time(b) on the fluorescence-emission of the RCA<sub>120</sub>-Gal-QDs interaction

### 3 讨论

#### 3.1 Glyco-QDs 的制备与表征

将生物分子(如蛋白质和核酸)与量子点耦合有多种方法, 配体交换法是其中较为常用的一种, 具有简便、高效的特点<sup>[15]</sup>。使用配体交换法制备 Glyco-QDs 也已见诸于报道<sup>[16]</sup>, 本实验以糖苷配基末端含有巯基的半乳糖和甘露糖衍生物(Gal-3 和 Man-3)

取代原料量子点的表面配体 MAA, 成功制备了 2 种糖量子点(Gal-QDs 和 Man-QDs)。选择高亲水性的三聚乙二醇作为糖基与量子点之间的连接臂, 使得糖量子点呈现出良好的水溶性, 在水中可形成稳定而均一的分散体系。实验结果显示, 糖基修饰没有改变原料量子点的光谱学特性, 制备的 2 种糖量子点均保持有显著的荧光发射和紫外-可见光吸收光谱特征, 这为开发建立以量子点为探针的病原

微生物检测方法提供了物质保障。

### 3.2 凝集素的检测

以蛋白质或核酸-量子点复合物为探针进行生物检测在国际上已有较为广泛的研究<sup>[17]</sup>,而 Glyco-QDs 作为一种新型材料也逐渐引起人们的重视<sup>[18]</sup>,目前已报道的糖量子点主要应用于细胞标记<sup>[19-20]</sup>,关于细菌检测的报道迄今为止只有一篇,该研究使用 Glyco-QDs 对大肠杆菌进行的定量检测灵敏度可达  $10^4$  个/mL<sup>[21]</sup>。本试验作为病原微生物检测的前期工作,较为详细地研究了 2 种糖量子点分别与对应的凝集素之间的相互作用。因细菌和病毒表面的粘附素多为凝集素类蛋白<sup>[22]</sup>,本实验为进一步将 Glyco-QDs 应用于检测病原微生物摸索了条件。实验结果显示, Gal-QDs 和 Man-QDs 对凝集素具有高度的特异性, Man-QDs 的特异性引起 ConA 凝集,反应伴随着显著的荧光发射光谱改变,且可在短时间内(90 min)肉眼直接检测,可检测 ConA 的最低浓度为 95 nmol/L; Gal-QDs 与 RCA<sub>120</sub> 的特异性相互作用也具有类似的特点,可检测 RCA<sub>120</sub> 的浓度最低可达 3 nmol/L。通过本试验,笔者对糖量子点及其与凝集素反应的特性有了较为深入的了解,为进一步摸索建立病原微生物的检测方法奠定了基础。

### 参 考 文 献

[1] Lazcka O, Del Campob F J, Munoz F X. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22: 1205-1217

[2] Lingwood C A. Oligosaccharide receptors for bacteria: A view to a kill[J]. Curr Opin Chem Biol, 1998(2): 695-700

[3] Olofsson S, Bergström T. Glycoconjugate glycans as viral receptors[J]. Ann Med, 2005, 37: 154-172

[4] Valenski M L, Horton J R, Orndorff P E, et al. The product of the *fimI* gene is necessary for *Escherichia coli* type 1 pilus biosynthesis[J]. J Bacteriol, 2003, 185: 5007-5011

[5] Brennan M J, Joralmón R A, Cisar J O, et al. Binding of *actinomyces naeslundii* to glycosphingolipids [J]. Infect Immun, 1987, 55: 487-489

[6] Gambaryan A S, Tuzikov A B, Piskarev V E, et al. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: Non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-Sialyl (N-acetylactosamine) [J]. Virol, 1997, 232: 345-350

[7] Alivisatos A P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots[J]. Science, 1996, 271: 933-937

[8] Smita Pathak, Davidson Marie C, Silva Gabriel A.

Characterization of the functional binding properties of antibody conjugated quantum dots[J]. Nano Lett, 2007(7): 1839-1845

[9] Vinayaka A C, Basheer S, Thakur M S. Bioconjugation of CdTe quantum dot for the detection of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by competitive fluoroimmunoassay based biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24: 1615-1620

[10] Karamanska R, Mukhopadhyay B, Russell D, et al. Thioctic acid amides: convenient tethers for achieving low nonspecific protein binding to carbohydrates presented on gold surfaces [J]. Chem Commun, 2005, 26: 3334-3336

[11] Schofield C L, Mukhopadhyay B, Hardy S M, et al. Colorimetric detection of *Ricinus communis* Agglutinin 120 using optimally presented carbohydrate-stabilised gold nanoparticles[J]. Analyst, 2008, 133: 626-634

[12] Barrientos A G, De la Fuente J M, Fernández A, et al. Gold Glyconanoparticles: Synthetic polyvalent ligands mimicking glycocalyx like surfaces as tools for glycobiological studies[J]. Chem Eur J, 2003, (9): 1909-1921

[13] 武汉大学武汉珈源量子点技术开发有限责任公司. 荧光量子点标记的 DNA 生物探针及其制备方法: 中国, 200610018426 [P]. 2006-10-25

[14] Lee Y C, Lee R T. Carbohydrate-protein interactions: Basis of glycobiology[J]. Accounts Chem Res, 1995, 28: 321-327

[15] Sutherland Andrew J. Quantum dots as luminescent probes in biological systems[J]. Curr Opin Solid State Mater Sci, 2002 (6): 365-370

[16] Yu M, Yang Y, Han R, et al. Polyvalent lactose-quantum dot conjugate for fluorescent labeling of live leukocytes [J]. Langmuir, 2010, 26: 8534-8539

[17] Merkoçi A. Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 26: 1164-1177

[18] De la Fuente J M, Penadés S. Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1760: 636-651

[19] Kikkeri R, Lepenies B, Adibekian A, et al. *In vitro* Imaging and *in vivo* liver targeting with carbohydrate capped quantum dots [J]. J Am Chem Soc, 2009, 131: 2110-2112

[20] Yang Y, Yu M, Yan T-T, et al. Characterization of multivalent lactose quantum dots and its application in carbohydrate-protein interactions study and cell imaging [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18: 5234-5240

[21] Mukhopadhyay B, Martins M B, Karamanska R, et al. Bacterial detection using carbohydrate-functionalised CdS quantum dots: a model study exploiting *E. coli* recognition of mannosides[J]. Tetrahedron Lett, 2009, 50: 886-889

[22] Esko J D, Sharon N. Microbial Lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins, in Essentials of Glycobiology[M]. 2 ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009