

绿色荧光碳量子点的细胞成像研究

刘 欢 张洪文* 汤玉英 姜 彦

(常州大学,材料科学与工程学院,常州 213100)

摘 要 以葡萄糖为碳源,采用一步超声法制备氮掺杂碳量子点,并进行海拉(Hela)细胞成像研究。所获得的氮掺杂碳量子点平均粒径 3.3nm,并具有良好的水溶性、光致发光特性。氮掺杂碳量子点具有低细胞毒性,在氮掺杂碳量子点浓度为 1mg/mL 条件下,Hela 细胞的存活率高于 90%,在浓度高达 5mg/mL 条件下,Hela 细胞的存活率仍高于 60%。

关键词 氮掺杂碳量子点,光致发光,低细胞毒性,细胞成像

Study on cell imaging of green fluorescent carbon quantum dots

Liu Huan Zhang Hongwen Tang Yuying Jiang Yan

(School of Materials Science and Engineering,Changzhou University,Changzhou 213100)

Abstract Nitrogen-doped carbon dots (CDs) were synthesized directly by one-step ultrasonic treatment under mild conditions.And cell imaging experiments were carried out with HeLa cells.The results showed that the average size of CDs was approximately 3.3nm with good water solubility and photoluminescence.CDs had low toxicity,the results showed that more than 90% of Hela cells were viable when incubated with 1mg/mL or lesser CDs.In addition,the cell viability was more than about 60% even at CDs concentration as high as 5mg/mL.

Key words nitrogen-doped carbon dot,luminescence,low cytotoxicity,cell imaging

碳材料因其环境友好等优点,如石墨烯、碳纳米管等近年来引起人们广泛的关注。自然界富含宏观碳材料,通过调控碳材料的尺寸和结构可制备新型碳纳米荧光材料。这类碳量子点是碳纳米材料家族中的新成员^[1]。在 21 世纪初,Scrivens 等^[2]首次成功合成了碳点,但荧光产率很低。此后,更多的制备碳量子点的方法被逐渐发掘,激光蚀刻法制备的碳纳米粒子就具有良好的荧光性能,在进行一系列的表面修饰后,荧光产率可达 10% 以上,并首次称之为碳点。碳量子点具有碳骨架结构,通常以分散的形式存在,呈球状,碳纳米颗粒平均粒径 5nm。除了具有与半导体量子点相似的优越的荧光性能,这种新型碳纳米材料具有反应条件简单、制得容易、绿色环保和生物相容性好等长处,并可通过化学修饰的手段实现功能化,有望在生物和医学检测等领域实现应用。制备碳量子点的原料种类繁多,有炭黑、石墨、碳纳米管和活性炭等大分子^[3-4],也有咖

啡、蜂蜜、柠檬酸盐、糖类和聚合物等^[5-7]。针对不同的原料,研究人员探索出许多不同的碳量子点合成方法,制备的方法大致可以分为两大类:自下而上和自上而下。

这类荧光材料有望解决传统荧光材料光稳定性和毒性方面的弱点,是新兴的荧光材料。相比传统的量子点,碳量子点在具有相似的光物理化学性质之外,不含重金属、低毒和水溶性良好等特性,受到了不少研究人员的青睐。有研究人员将碳量子点应用于活体成像和细胞标记中^[8-11],此外通过表面官能化等处理方式可进一步有效优化碳量子点细胞毒性^[12]。本研究以葡萄糖为碳源,氨水为氮源,采用一步超声法简便合成氮掺杂碳量子点,并进行细胞成像实验。由于碳量子点显著的光致发光性质、低细胞毒性和易制备等优点,能较好应用于细胞成像,在生物应用领域具有较好的市场前景。

基金项目:国家自然科学基金项目(51203015)

作者简介:刘欢(1992-),男,硕士,研究方向为功能高分子材料。

联系人:张洪文,男,教授。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

葡萄糖(分析纯),上海凌峰化学试剂有限公司;氢氧化钠、无水乙醇、无水硫酸镁、盐酸,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;硫酸奎宁(分析纯)、去离子水,阿拉丁科技有限公司;青霉素、链霉素,均为生化试剂,Sigma-Aldrich公司;胎牛血清(生化试剂),Life Technologies公司;细胞活性和细胞增殖检测试剂盒(CCK-8试剂盒,生化试剂),百萤生物科技有限公司。

超声波清洗仪(KQ5200E型),昆山超声仪器公司;离心机(TGL-16M型),上海卢湘仪器有限公司;恒温培养箱(Series 800型),thermo公司;傅里叶红外光谱仪(FT-IR, Nicolet Avatar 370型),美国尼高力仪器公司;高分辨透射电子显微镜(TEM, JEM-2100型),日本电子株式会社;荧光分光光度计(XRF, LS45型),美国珀金埃尔默公司;紫外-可见分光光度计(UV-Vis, CARY100型),日本岛津公司;激光共聚焦显微镜(LSM710型),德国蔡司公司;酶标仪(Biorad型),美国BioTek公司;旋转蒸发仪(RE-2000B型),上海亚荣生化仪器厂。

1.2 氮掺杂碳量子点的制备

称取4.5g葡萄糖、1g氢氧化钠,分别溶解于40mL去离子水中,与2mL氨水混合均匀。将上述混合液加入到250mL的单口烧瓶中,采用超声波清洗仪(KQ5200E型,昆山超声仪器公司)超声处理12h。采用旋转蒸发仪(RE-2000B型,上海亚荣生化仪器厂)旋蒸除去多余水分(剩余原溶液约10mL),用浓盐酸调节pH至中性,然后往体系中逐滴滴加乙醇100mL,加入过量无水硫酸镁去除剩余水分。过滤,采用离心机(TGL-16M型,上海卢湘仪器有限公司)10000r/min高速离心20min,取上层透明清液,得到碳点乙醇溶液。将碳量子点转移至水溶液中,使用1000截留量透析膜处理1周,即制得氮掺杂碳量子点,保存备用。

1.3 样品的测试

采用傅里叶红外光谱仪(FT-IR, Nicolet Avatar 370型,美国尼高力仪器公司)对样品官能团进行表征。采用高分辨透射电子显微镜(TEM, JEM-2100型,日本电子株式会社)对样品微观形貌进行表征。采用荧光分光光度计(XRF, LS45型,美国珀金埃尔默公司)对样品的光致发光性能进行表征。

采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis, CARY100型,日本岛津公司)对样品的光学性能进行测试。采用激光共聚焦显微镜(LSM710型,德国蔡司公司)对样品的细胞成像进行测试。

细胞成像和细胞毒性测试。首先,将氮掺杂碳量子点分散在三蒸馏水中,经过0.22 μ m的消毒过滤膜过滤。海拉(HeLa)细胞由基础培养液(DMEM)的高葡萄糖培养基培养,培养基中含有10%的胎牛血清、100单位/mL青霉素和100mg/mL链霉素,采用二氧化碳含量为5%具有加湿功能的恒温培养箱(Series 800型,thermo公司)中培养24h。称取氮掺杂碳量子点溶液添加到细胞中,经过24h孵化后,采用预先加热处理过的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次。采用激光共聚焦显微镜(LSM710型,德国蔡司公司)观察样品细胞的成像(样品清洗后,在30min内完成测试)。

氮掺杂碳量子点的细胞毒性测试。采用CCK-8试剂盒(百萤生物科技有限公司)测定细胞活性并加以评估。首先,HeLa细胞被植入一个24孔细胞培养基板中,在37℃孵化后,不同浓度(0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0和5.0mg/mL)的氮掺杂碳量子点溶液加入到细胞中,在37℃的环境中孵化12h。然后,称取含有10% CCK-8的介质添加到培养基板中,37℃的环境中孵化5h。在活细胞脱氢酶存在条件下,CCK-8可以转化为橙色甲瓞。将100 μ L的反应溶液转移到一个新的96孔基板中,采用酶标仪(Biorad型,美国BioTek公司)测试溶液的吸光度(OD),在450nm条件下,重复3次,取平均值。

1.4 荧光量子产率计算

荧光量子产率的测定和计算方法选择参比法。采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis, CARY100型,日本岛津公司)测量样品在固定激发波长处的吸光度。采用荧光分光光度计(XRF, LS45型,美国珀金埃尔默公司)在给定激发波长条件下,测得样品的荧光发射光谱图,得到荧光积分面积。量子产率计算公式见式(1)。

$$Q = Q_s \times \frac{I}{I_s} \times \frac{A}{A_s} \times \frac{n_s}{n} \quad (1)$$

式中, Q 为荧光量子产率,%; I 为待测物的荧光积分面积,a.u.; A 为待测物的吸光度; n 为待测样品物质的溶剂的折射率; Q_s 为参照物的量子产率,%; I_s 为参照物的荧光积分面积,a.u.; A_s 为参照物的吸光度; n_s 为参照物溶剂的折射率,%。

2 结果与讨论

2.1 TEM 分析

氮掺杂碳量子点的 TEM 图见图 1。从图可以看出,在空气氛围条件下,通过超声法获得的氮掺杂碳量子点是一种直径小于 4.5nm 的类球形纳米颗粒,在碳核周围环绕着类似晕轮的低碳化或未碳化的分子,这与 Bourlinos^[13] 的报道一致,氮掺杂碳量子点中心为明显结晶结构,晶格连贯且清晰,晶格尺寸接近平面芳香碳或(102) sp^2 石墨碳^[14-16],这意味着氮掺杂碳量子点的结构像晶体石墨碳,氮掺杂碳量子点的粒径主要分布在 2~4.5nm 之间,平均粒径 3.3nm。

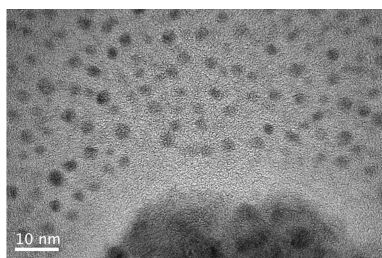


图 1 氮掺杂碳量子点的 TEM 图

2.2 FT-IR 分析

葡萄糖、氮掺杂碳量子点的 FT-IR 谱图见图 2。从图可以看出,3740 cm^{-1} 处的特征吸收峰归因于 O—H 伸缩振动峰,2945 cm^{-1} 处是 C—C 的特征吸收峰,1415 cm^{-1} 处是 C—O 吸收峰,1125 cm^{-1} 附近的特征峰为羧酸酯基团的对称伸缩振动特征吸收峰。研究结果表明,碳点富含羧基、羟基等亲水基团,良好的水溶性为细胞成像提供了可能。氮掺杂碳量子点的形成过程:可以推测为超声波为反应体系提供了能量(交替的低压和高压波),导致小真空气泡的形成和剧烈的崩溃,葡萄糖前体脱水碳化并与氨水反应形成中间体^[17],在强的流体力学剪切力的作用下,反应形成的中间体进一步碳化并最终形成碳量子点。

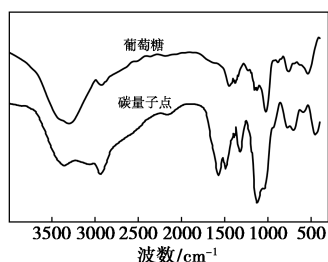


图 2 葡萄糖、氮掺杂碳量子点的 FT-IR 谱图

2.3 光致发光分析

激发波长不同氮掺杂碳量子点的光致发光谱图见图 3。从图可以看出,在激发波长不同条件下(340nm~520nm,间隔 20nm),氮掺杂碳量子点随着激发波长的增大,荧光强度呈先逐渐增大而后逐渐减小态势,同时随着激发波长的增加,发射峰位置出现红移,在激发波长为 400nm 条件下氮掺杂碳量子点的荧光强度最高,发射峰的位置为 502nm,氮掺杂碳量子点的表现出明显的光致发光特性,由于碳核中心有明显结晶结构,推测这可能是因为碳核中的 sp^2 区域的 π 到 π^* 的电子能级受 sp^3 基底骨架的 σ 和 σ^* 态影响,以及氮掺杂碳量子点的表面态和边缘态(包括带边发光)等因素引起荧光现象^[18],另外采用参比法获得的氮掺杂碳量子点的荧光量子产率约 6.5%。

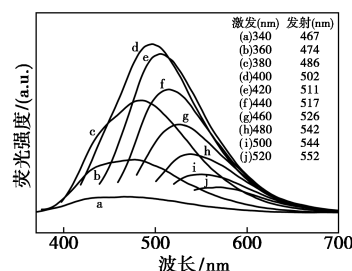


图 3 激发波长不同氮掺杂碳量子点的光致发光谱图

2.4 生物相容性分析

HeLa 细胞在浓度为 3mg/mL 氮掺杂碳量子点溶液培养 24h,测试激发波长为 380nm 条件下,HeLa 细胞的激光共聚焦显微图见图 4。从图可以看出,HeLa 细胞孵育情况良好,在 380nm 的激发波长条件下,可以观察到清晰的绿色荧光,这说明氮掺杂碳量子点被 HeLa 细胞有效吸收,具有良好的生物相容性。

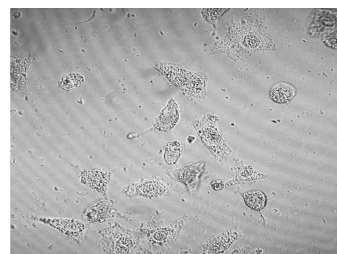


图 4 氮掺杂碳量子点溶液培养 HeLa 细胞的激光共聚焦显微图

2.5 细胞毒性分析

为了进一步分析碳量子点溶液对细胞的毒性,在氮掺杂碳量子点溶液不同浓度(0.5~5.0mg/mL)培养

HeLa 细胞 24h 条件下,采用 CCK-8 来评估氮掺杂碳量子点的细胞毒性,结果见图 5。从图可以看出,在氮掺杂碳量子点溶液浓度不超过 1mg/mL 的条件下,HeLa 细胞的存活率大于 90%,在氮掺杂碳量子点溶液浓度为 5mg/mL 条件下,HeLa 细胞的存活率仍超过了 60%,表明氮掺杂碳量子点具有较低的细胞毒性。

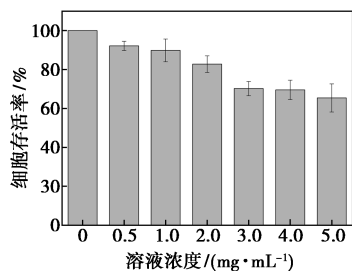


图5 氮掺杂碳量子点溶液浓度不同培养 24h 的 HeLa 细胞存活率图

3 结论

采用一步超声法简便合成绿色氮掺杂碳量子点,并进行了细胞成像研究,获得的氮掺杂碳量子点具有良好的水溶性、光致发光、低细胞毒性和高效细胞吸收特性。制备的氮掺杂碳量子点能较好的应用于细胞成像,能被 HeLa 细胞有效吸收,在氮掺杂碳量子点溶液浓度为 1mg/mL 条件下,HeLa 细胞的存活率超过 90%;在氮掺杂碳量子点溶液浓度达到 5mg/mL 条件下,HeLa 细胞的存活率仍超过 60%。环境友好型的氮掺杂碳量子点在生物领域具有较好的市场潜力。

参考文献

- [1] Baker S N, Baker G A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(38): 6726-6744.
- [2] Xu Xiaoyou, Ray Robert, Gu Yunlong, et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(40): 12736-12737.
- [3] Zhou J G, Booker C, Li R Y, et al. An electrochemical avenue to blue luminescent nanocrystals from multiwalled carbon nanotubes[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(4): 744-745.
- [4] Qiao Z A, Wang Y F, Gao Y, et al. Commercially activated carbon as the source for producing multicolor photoluminescent carbon dots by chemical oxidation[J]. *Chem Commun*, 2010, 46(46): 8812-8814.
- [5] Zheng M, Xie Z G, Qu D, et al. On-off-on fluorescent carbon dot nanosensor for recognition of chromium (VI) and ascorbic acid based on the inner filter effect[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013(5): 13242-13247.
- [6] Shen L M, Zhang L P, Chen M L, et al. The production of pH-sensitive photoluminescent carbon nanoparticles by the carbonization of polyethylenimine and their use for bioimaging[J]. *Carbon*, 2013, 55: 343-349.
- [7] Guo X, Wang C F, Yu Z Y, et al. Facile access to versatile fluorescent carbon dots toward light-emitting diodes[J]. *Chem Commun*, 2012, 48(21): 2692-2694.
- [8] Li H, He X, Liu Y, et al. One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties[J]. *Carbon*, 2011, 49(2): 605-609.
- [9] 初丛波, 单玉萍, 王宏达. 量子点在生物检测中的应用[J]. *应用化学*, 2014, 31(4): 377-388.
- [10] 梁梓承. 生物质碳量子点的制备与应用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [11] Corneliu Sergiu Stan, Petronela Gospei Horlescu, Laura Elena Ursu, et al. Facile preparation of highly luminescent composites by polymer embedding of carbon dots derived from N-hydroxyphthalimide[J]. *J Mater Sci*, 2017, 52(1): 185-196.
- [12] Wang W J, Hai X, Mao Q X, et al. Polyhedral oligomeric silsesquioxane functionalized carbon dots for cell imaging[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(30): 16609-16616.
- [13] Bourlinos A B, Stassinopoulos A, Angelos D, et al. Surface functionalized carbogenic quantum dots[J]. *Small*, 2008, 4(4): 455-458.
- [14] Li H, He X, Kang Z, et al. Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(26): 4430-4434.
- [15] Kim S, Hwang S W, Kim M K, et al. Anomalous behaviors of visible luminescence from graphene quantum dots: interplay between size and shape[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(9): 8203-8208.
- [16] Jin S H, Kim D A H, Jun G H, et al. Tuning the photoluminescence of graphene quantum dots through the charge transfer effect of functional groups[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(2): 1239-1245.
- [17] Sun X M, Li Y D. Colloidal carbon spheres and their core/shell structures with noble-metal nanoparticles[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43(5): 597-601.
- [18] Wang L, Zhu S J, Wang H Y, et al. Common origin of green luminescence in carbon nanodots and graphene quantum dots[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(3): 2541-2547.

收稿日期: 2017-09-11

修稿日期: 2018-11-29