

碳纳米管的快速糖基化及用于糖凝集素 特异性识别作用的研究

付 群, 吴明红, 焦 正, 王德庆

(上海大学环境与化学工程学院纳米化学与生物学研究所, 上海 201800)

摘要 将含糖基的简单两亲分子 *N*-十八烷基麦芽糖酰胺 (*N*-*n*-Octadecyl-*D*-maltonamide, NOMA)非共价修饰到单壁碳纳米管 (SWNT)表面形成糖-碳纳米管复合物 (NOMA-SWNT), 谱学和形态学结果表明, NOMA 不仅能快速、高效地吸附到 SWNT表面, 而且能有效地改善 SWNT在水溶液中的分散性能. 以 NOMA-SWNT管束为导通沟道构建了碳纳米管场效应管 (CNTFET)器件, 检测了麦芽糖和伴刀豆凝集素蛋白 (Con A)的特异性识别作用. 检测器件在每个修饰阶段的电学性能的变化证明了 NOMA对 SWNT的非共价糖基化修饰及用 CNTFET来检测糖凝集素特异性识别作用的可能性.

关键词 单壁碳纳米管; 糖基化; 糖-碳纳米管复合物; 碳纳米管场效应管; 糖凝集素识别

中图分类号 O647.3

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)03-0525-05

单壁碳纳米管 (SWNTs)作为一维纳米材料, 自被发现以来就因其独特的结构及优良的性能在纳米电子学、纳米机械及生物学^[1]等很多领域引起广泛的研究, 并被应用于生物体系尤其是生物传感器件^[2~4]方面. 然而, 碳纳米管 (CNTs)极差的水溶性使其生物学应用大受限制, 因此 CNTs的生物功能化成了重要的研究课题. 生物功能化的 CNTs具有很好的生物亲和性, 已经有不少关于 SWNTs共价修饰形成糖-碳纳米管复合物的报道^[5]. 但共价修饰不可避免地破坏了碳纳米管的固有结构和电学性能^[6]. 对于传感器的应用, 功能化过程中保持 CNTs的电学性能是非常必要的. 与众多的共价修饰方法相比, 非共价方法利用修饰分子与 CNTs之间的范德华力或 π -电子作用进行物理吸附或包裹, 对 CNTs表面破坏性小, 更有利于保持其 sp^2 结构, 发挥其独特的电学性能^[3]. 与此同时, 糖凝集素特异性识别作用也越来越多地被研究, 并逐步应用于基于电极修饰的生物传感器^[7~10].

本文在合成一种简单的含糖两亲化合物 *N*-十八烷基麦芽糖酰胺 (NOMA)的基础上, 研究 NOMA对 SWNTs表面的非共价糖基化修饰, 以形态学和谱学等方法对 NOMA-SWNT复合物进行了表征; 尝试以糖基化的 SWNTs管束 (NOMA-SWNT)为导通沟道构建碳纳米管场效应管 (CNTFET)器件, 用于麦芽糖残基和伴刀豆凝集素蛋白 (Con A)的特异性识别作用研究, 以期建立一种碳纳米管非共价糖基化修饰的简单方法及糖配体-受体作用的通用检测手段, 在生物功能材料、生物检测及癌症等疾病诊断方面有所应用.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本电子 JSM-6700F场发射扫描电子显微镜 (SEM); 日本电子 JEM-2010F透射电子显微镜 (TEM); Shimadzu SHM-9600原子力显微镜 (AFM); Rigaku D/MAX-2000 X射线粉末衍射仪 (XRD, Cu K α , 电压 40 kV, 电流 40 mA); Avatar 370傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR, KBr压片); Renishaw-in-Via显微拉曼光谱仪 (RAMAN); Keithley 4200半导体分析测试系统.

收稿日期: 2008-10-06

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 40830744)、上海市曙光计划 (批准号: 07SG46)和新世纪优秀人才计划 (批准号: NCET-05-0434)资助.

联系人简介: 吴明红, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事辐射化学和纳米器件研究. E-mail: mhwu@staff.shu.edu.cn

NOMA 由麦芽糖内酯和十八胺合成, 经分离、提纯及表征后使用; 1,2-二氯乙烷 (分析纯, 国药集团上海化学试剂有限公司); 单壁碳纳米管 (SWNTs, 直径 1~2 nm, 长度 ~10 μm , 纯度 > 90%, 中国科学院成都有机化学有限公司), 使用前在 6 mol/L HCl 中于微沸状态下回流 12 h, 再于空气状态下在箱式炉中于 420 保持 1 h, 得到纯化的 SWNTs; 伴刀豆凝集素和大豆凝集素 (SBA) 购自 Sigma 公司; 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 0.1 mol/L, pH = 7.06) 由 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 按比例用二次蒸馏水配制而成; 其它试剂为实验室常用试剂.

1.2 SWNTs 的糖基化

取适量纯化 SWNTs 分散于 10 mL NOMA 水溶液 (质量分数 1%) 中, 超声 (42 kHz) 10 h, 得黑色悬浮液, 5000 r/min 离心 30 min, 以除去较大颗粒的碳纳米管聚集体. 取上清液, 以 0.22 μm 混合纤维素膜过滤, 得到 NOMA 包覆的 SWNTs. 将膜上复合物超声分散于去离子水中, 过滤, 重复 3 次以洗去未包覆 SWNTs 的多余 NOMA 分子, 收集后于室温下真空晾干, 得糖基化的 SWNT (NOMA-SWNT).

1.3 碳纳米管场效应管 (CNTFET) 器件的构建

在表面有 200 nm 热氧化层的 p 型硅衬底上, 加工出 FET 的叉指型源漏 Au 电极, 电极长 5 μm , 宽 3 μm , 相邻两指间距 3 μm . 将纯化的 SWNTs 样品分散于 1,2-二氯乙烷中, 经超声、离心, 取上清液, 再超声分散于 1,2-二氯乙烷中, 制得分散良好的 SWNTs/1,2-二氯乙烷极稀溶液. 以微量移液器取溶液滴在源漏电极对上, 待溶剂挥发完毕后, 选择电极对间良好搭建了细小 SWNTs 管束的器件, 以硅衬底为栅极, 施加 +10 V 的栅压, 采用施加大电流烧断的方法烧除源漏电极间的金属性 SWNTs^[11], 由此构成以半导体性 SWNTs 为导通沟道的 CNTFET 器件. 将器件在 200 , N_2 条件下热退火处理 10 min, 以使 SWNT 与 Au 电极之间形成良好接触.

1.4 CNTFET 的 NOMA 修饰及对 Con A 的识别检测

初始电学性能测试后, 选择性能良好的 CNTFET 器件浸于质量分数为 1% 的 NOMA 水溶液中进行糖基化修饰, 于室温下静置过夜, 取出, 用去离子水反复冲洗, 在 N_2 气流中充分干燥, 以去除 SWNT 与电极接触界面处的 NOMA 和水分子; 再浸入 10 mL 0.1 mg/mL 的 Con A / PBS 溶液 (PBS, 0.1 mol/L, pH = 7.06, 含 0.1 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L MnCl_2 , 0.1 mol/L NaCl) 中, 于 25 下静置 1 h, 取出, 以去离子水反复冲洗以去除物理吸附的 Con A 并以 N_2 气吹干. Con A 中含有 -D 葡萄糖糖残基的结合位点, 位于金属 Mn 和 Ca 附近. 采用上述相同条件, 以大豆凝集素 SBA (特异性识别半乳糖) 进行对照实验. 在每个修饰阶段测试器件的特性曲线.

2 结果与讨论

2.1 NOMA-SWNT 的形态学表征

在超声作用下, NOMA-SWNT 可充分分散在去离子水中, 形成稳定均匀的黑色悬浮液 [图 1(A) 中样品], 表明由于 NOMA 的吸附使 SWNTs 侧壁形成了高亲水性的表面. NOMA-SWNT 悬浮液能够稳定存在达 7 d 以上, 而未修饰的 SWNTs 即便长时间超声也很快从水中沉淀析出 [图 1(A) 中样品].

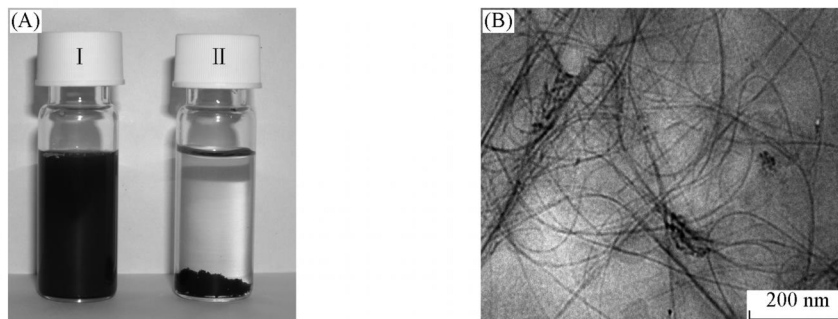


Fig 1 Photographs of vials (A) and TEM image of NOMA-SWNT (B)

(A) . A stable suspension of NOMA-SWNT in H_2O after 7 d; . purified SWNTs in H_2O , which precipitate in 1 h

通过 TEM [图 1(B)] 观察可见, 原本团聚、缠结成大大管束的 SWNTs 经 NOMA 修饰后, 很容易在水中被分散成非常细小的管束. 图 2(A) 是 NOMA-SWNT 管束的高分辨透射电镜 (HRTEM) 照片, 可以清晰看到 SWNTs 管束表面 NOMA 层的包覆, 管束直径约 15~20 nm, 包覆层厚度 2~5 nm 不等. 图 2(B) 给出了 NOMA-SWNT 管束轻敲模式下的 AFM 照片, 采用将 SWNTs 管束沉积在硅片上再浸入 NOMA 溶液中过夜的方法制样. 由高度测得 SWNTs 管束直径约 20 nm 左右, 表面 NOMA 包覆层清晰可见. 说明在无超声、单纯浸泡过夜的操作中, SWNTs 表面也很容易被 NOMA 吸附. 以上形态学结果表明, NOMA 不仅能在 SWNTs 表面吸附包裹, 而且提高了 SWNTs 在水溶液中的分散性能.

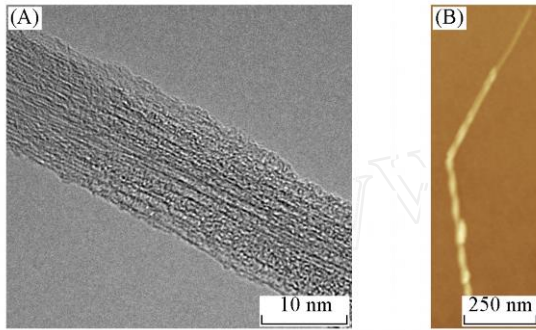


Fig 2 HRTEM image of NOMA-SWNT bundle (A) and tapping mode AFM image of NOMA-SWNT bundle on a silicon substrate (B)

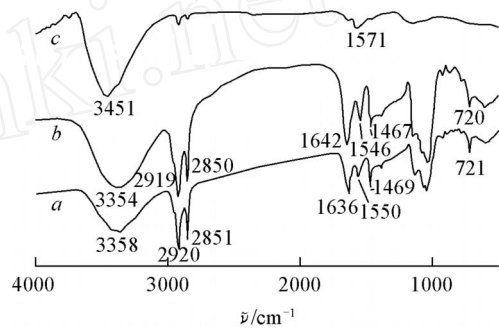


Fig 3 FTIR spectra of NOMA-SWNT (a), NOMA (b) and purified SWNT (c)

2.2 NOMA-SWNT 的光谱表征

将 SWNTs 分散到 NOMA 的水溶液中时, NOMA 分子很容易借助疏水作用吸附到 SWNTs 表面形成 NOMA-SWNT 复合物, 这一结论可以从 IR 光谱的结果得到证实. 在 NOMA-SWNT 的 IR 谱图 (图 3a) 上可看到对应于 NOMA 的羰基的伸缩振动吸收峰 (1636 cm^{-1} , 酰胺)、N—H 的弯曲振动吸收峰 (1550 cm^{-1} , 酰胺) 和糖单元中羟基与碳相连的 C—O ($1150 \sim 1030 \text{ cm}^{-1}$) 伸缩振动特征峰, 以及长的烷基链的特征吸收 ($2920, 2851, 1469$ 和 721 cm^{-1}), 与 NOMA 的 IR 谱图 (图 3 谱线 b) 上相应吸收峰位置非常接近, 仅仅发生很小的移动. NOMA-SWNT 的 IR 曲线上没有看到对应于 SWNT (图 3 谱线 c) 的 C=C (1571 cm^{-1}) 伸缩振动吸收, 可能是由于强度太弱而检测不到所致, 但 3358 cm^{-1} 附近可以看到活泼氢吸收峰比 NOMA 和 SWNT 都明显加宽, 这是因为此时结构中除了有来自 NOMA 的酰胺氢和羟基氢两种活泼氢, 还有 SWNT 在纯化后携带的羟基氢的影响.

Raman 光谱的结果也表明 NOMA 在 SWNT 表面的吸附. 图 4 为纯化的 SWNT, NOMA 和 NOMA-SWNT 的 Raman 光谱. 在图 4 谱线 a 中, 1572 cm^{-1} 处 (G 带) 为 SWNT 的石墨 Raman 峰, 1342 cm^{-1} 处的小峰 (D 带) 是由于样品中无定形碳的 Raman 吸收和缺陷引起的, 从 D 峰和 G 峰的强度对比可以得出 CNT 样品中无定形碳等杂质的含量极少, 缺陷也较少. SWNT 表面修饰 NOMA 后, 两峰仅仅发生了极小位移 (分别位移至 1573 和 1344 cm^{-1} , 图 4 谱线 b), 说明 NOMA 的修饰并未影响 SWNT 本身结构, 而 NOMA-SWNT 的 Raman 光谱中也出现了和纯 NOMA (图 4 谱线 c) 类似的吸收峰, 表明 NOMA 吸附到

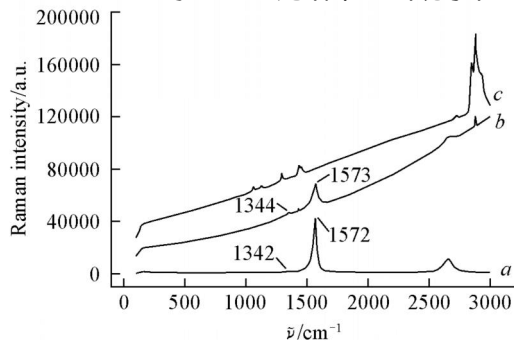


Fig 4 Raman spectra of purified SWNT (a), NOMA-SWNT (b) and NOMA (c)

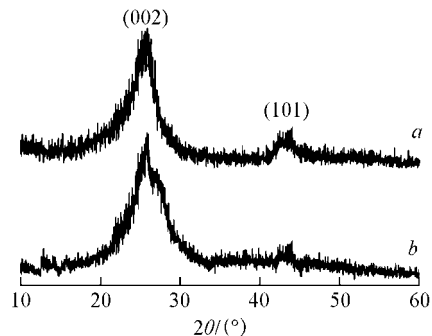


Fig 5 XRD patterns of SWNT (a) and NOMA-SWNT (b)

SWNT表面后自身结构也未受到破坏. 图 4 中 NOMA 和 NOMA-SWNT 的 Raman 谱线倾斜向上, 应是 NOMA 自身存在荧光特性使谱图出现一定的荧光背景所致.

图 5 为 SWNT 和 NOMA-SWNT 的 XRD 谱, 图中 SWNTs 在 NOMA 修饰前后主要衍射峰 [(002) 和 (101)] 的位置没有发生移动, 说明 SWNTs 的石墨化结构在被 NOMA 糖基化修饰后没有受到破坏.

2.3 CNTFET 的构建及用于麦芽糖残基与 Con A 凝集素识别作用的检测

图 6(A) 为制备的 CNTFET 器件的叉指型源漏电极显微镜照片, 图 6(B) 为 1,2-二氯乙烷挥发后, 源漏电极之间搭建了一个 SWNTs 管束的 CNTFET 器件的 SEM 照片. 尽管洒落法存在无法定位的缺点, 但仍有其优点, 可预先对 CNT 样品进行处理, 不失为一种简单的方法. 经过不同溶剂的对比实验, 1,2-二氯乙烷对本实验使用的 SWNTs 分散较好, 且本身具有很强的挥发性, 一般不会对电极上引入杂质, 从而保证了 SWNTs 的纯度. 实验中采用分散良好的 SWNTs/1,2-二氯乙烷极稀溶液, 以便于搭建细小的单根 SWNTs 管束, 避免因管束较大难于烧断金属性的 SWNTs 而影响器件的性能, 同时克服了单根 SWNT 所能承受的最大电流非常有限的问题.

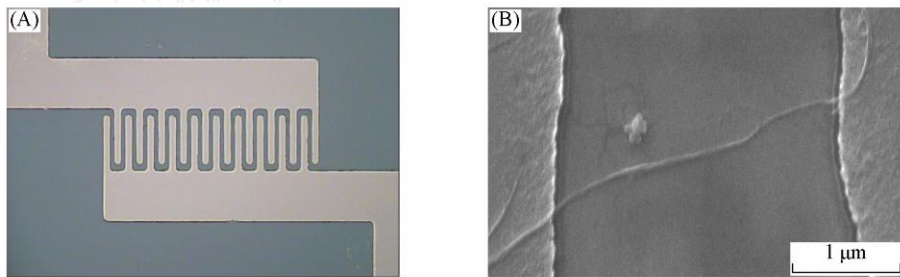


Fig 6 Optical image of the electrode pairs of FET device (A) and SEM image of a typical CNTFET (B)

CNTFET 器件浸泡在 NOMA 水溶液中时, NOMA 分子就会借助其端部 C_{18} 线型脂肪长链与 SWNTs 侧壁之间的疏水作用组装在 SWNTs 表面, 这种范德华作用力很强, 足以抵挡 NOMA 从 SWNTs 表面解吸下来, 因此 NOMA 可以稳定地存在于 SWNTs 表面, 并且有足够的覆盖度. 而 NOMA 分子另一端的麦芽糖残基则趋向于伸展入周围溶液中形成浓密的亲水性糖基表面, 保证了与 Con A 分子的特异性结合, 也一定程度上减少了 SWNTs 表面与其它蛋白分子非特异性结合的几率, 使得 NOMA 修饰后的 SWNTs 在水中的分散性大大提高.

NOMA-SWNT 上麦芽糖残基与 Con A 的特异性结合可由 AFM 观察到. NOMA-SWNT 在 Con A 溶液中浸泡过后, 经过充分冲洗, 仍能看到 (图 7 中小插图所示) 有大量的球形 Con A 分子沿 NOMA-SWNT 表面密集排列, 但同样的簇集的现象在使用 SBA 的对照实验中却未看到. 证明 Con A 在 SWNT 表面的吸附排列确实是由于 SWNT 表面 NOMA 层中麦芽糖残基与 Con A 之间特异性结合所致, 而且麦芽糖残基的高亲水性阻碍了 SBA 在 SWNT 表面的非特异性吸附. 这种吸附由 CNTFET 器件初步测试结果也能验证. 图 7 是 CNTFET 器件初始性能及各个修饰阶段的转移特性曲线. 从图 7 可以看出, 在 NOMA 修饰之前, 器件在一定的 V_{SD} (1 V) 下, 随着 V_G 的增大, 输出电流 I_{SD} 减小, 当 $V_G > 5$ V 时沟道电导很小, CNTFET 被关断, 呈现出 p 型场效应管特性. 但修饰 NOMA 后, 器件性能显著改变, 呈现 n 型特性. 这很可能是由于 NOMA 分子中仲胺基 ($-NH$) 具有给电子能力引起的. 吸附了 Con A 之后, 器件测出的输出电流 I_{SD} 比修饰前显著降低, 而且关断电压向负方向有较大位移, 可能的机理是当 Con A 分子通过与麦芽糖残基特异性识别作用被吸

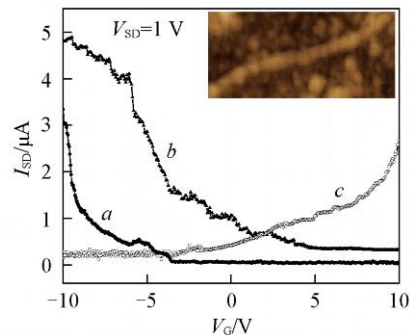


Fig 7 Gate voltage V_G dependence of the source-drain current I_{SD} of a device before and after NOMA coating and after Con A adsorption to the NOMA layer

a. Con A/NOMA/SWNT; b. SWNT; c. NOMA/SWNT. Inset shows an AFM image of the NOMA-SWNT attached with Con A.

附到糖基化的 CNTFET时, Con A表面的电荷对器件施加了门效应或者是传输电荷给 SWNT, 因而引起 FET器件传导性能的改变. 表明 Con A分子已成功吸附在糖基化后的 CNTFET器件上. CNTFET器件在每个修饰阶段的性能变化, 也进一步证明了 NOMA对 SWNT的非共价修饰和以 CNTFET为检测平台检测糖凝集素作用的可能性.

参 考 文 献

- [1] Boussaad S , Tao N. J , Zhang R. , *et al.* Chem. Commun [J], 2003: 1502—1503
- [2] Chen R. J , Bangsaruntip S , Drouvalakis K A. , *et al.* Proc Natl Acad Sci USA [J], 2003, **100** (9): 4984—4989
- [3] Star A. , Gabriel J. -C. P. , Bradley K. , *et al.* Nano Lett [J], 2003, **3** (4): 459—463
- [4] Park D. W. , Kim Y. H. , Kim B. S. , *et al.* J. Nanosci Nanotech [J], 2006, **6**: 3499—3502
- [5] HUANG Yi (黄毅) , HUANG Jin-Hua (黄金花) , XIE Qing-Ji (谢青季) , *et al.* Prog Chem. (化学进展) [J], 2008, **20** (6): 942—950
- [6] Hasegawa T , Fujisawa T , Numata M. , *et al.* Chem. Commun [J], 2004: 2150—2151
- [7] ZHANG Xi (张希) , SHEN Jia-Cong (沈家骢) , Rump E. , *et al.* Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 1994, **15** (5): 783—784
- [8] SHILi-Xin (史立新) , LU Ying-Xi (卢迎习) , SHEN Jia-Cong (沈家骢) , *et al.* Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2004, **25** (3): 575—579
- [9] LI Yang-Mei (李扬眉) , JIANG Xiu-Ming (江秀明) , CHEN Zhi-Chun (陈志春) , *et al.* Acta Phys. Chim. Sin. (物理化学学报) [J], 2004, **20** (2): 216—220
- [10] WANG Zhi-Jie (王志杰) , YANG Yun-Hui (杨云慧) , YANG Ming-Hui (阳明辉) , *et al.* J. Anal. Sci. (分析科学学报) [J], 2006, **22** (3): 249—252
- [11] Collins P. G , Arnold M. S , Avouris P. Science [J], 2001, **292**: 706—709

Rapid Glycosylated Functionalization of Single-walled Carbon Nanotubes for Lectin Recognition

FU Qun, WU Ming-Hong^{*}, JIAO Zheng, WANG De-Qing

(Institute of Nanochemistry and Nanobiology, College of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 201800, China)

Abstract Single-walled carbon nanotube (SWNT) was functionalized with *N*-*n*-octadecyl-*D*-maltonamide (NOMA), a simple sugar-containing amphiphatic compound, by a method of noncovalent adsorption to form a NOMA-SWNT nanocomposite. The spectroscopic and morphology results show that NOMA could be rapidly and effectively adsorbed on the surface of SWNT without changing the native structure of NOMA and the structure properties of SWNT. Moreover, it was shown that the dispersion ability of SWNT in aqueous solution had a significant improvement after coating with NOMA. Field effect transistor (FET) devices with a NOMA-SWNT bundle as the conducting channel have been developed to detect maltose-Concanavalin A (Con A) interaction. Obvious changes in the Carbon nanotube field effect transistor (CNTFET) characteristics have been detected after NOMA functionalization and after Con A adsorption to the NOMA coating layer, which demonstrates the possibility of noncovalent glycosylated functionalization of SWNTs with simple molecule NOMA and sugar-lectin recognition detection by CNTFET. The presented method for functionalization of SWNT had several advantages, such as rapid and facile CNT functionalization, good hydrophilicity and biocompatibility, versatile detection of receptor *via* various glycoligand molecule, *etc.*, and could be used for bio-functionalized materials, detection of carbohydrate-protein interactions and diagnose processes of deleterious disease.

Keywords SWNT; Glycosylated; NOMA-SWNT nanocomposite; Carbon nanotube field effect transistor (CNTFET); Sugar-lectin recognition (Ed: M, G)