

文章编号: 1006-3080(2025)03-0307-09

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20240924001

手性单壁碳纳米管与牛血红蛋白复合物氧化还原过程的光谱学研究

谭惠心¹, 陈静¹, 董开翔¹, 刘岩¹, 章弘扬², 胡坪², 张敏¹

(1. 华东理工大学药学院, 上海市细胞代谢光遗传学技术前沿科学研究基地, 上海 200237;
2. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海市功能性材料化学重点实验室, 上海 200237)

摘要:探讨了未分离的单壁碳纳米管(SWCNTs), 以及两种具有特定手性的单壁碳纳米管((6,5)-SWCNTs和(8,3)-SWCNTs)分别与牛血红蛋白(BHb)结合的相互作用, 考察了3种SWCNTs对SWCNTs/BHb复合物氧化还原状态的光谱特性的影响。结果表明, SWCNTs与BHb的结合引起了BHb二级结构的显著变化, 尤其是未分离的SWCNTs对BHb产生了最显著的影响, 表现为BHb荧光强度的显著降低和 α -螺旋结构的明显减少。在氧化过程中, BHb和SWCNTs在各自的最大发射波长处的荧光强度均有所增加; 而在还原过程中, BHb和SWCNTs的荧光强度则逐渐恢复至原始状态。本文的研究结果可为血红蛋白氧化还原过程的监测提供一种新思路。

关键词:单壁碳纳米管; 牛血红蛋白; 相互作用; 荧光光谱; 氧化还原

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

血红蛋白(Hb)在动物肌肉组织中扮演着关键角色, 它是一种富含铁的蛋白质, 在体内执行多项生理功能, 如氧气的运输、储存及参与氧化还原反应^[1-2]。在肺部, 血红蛋白与氧气结合, 形成氧合血红蛋白(HbO₂), 随后在组织细胞中释放氧气, 恢复为还原态的血红蛋白(HHb)。在临床中, 血红蛋白在没有超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等抗氧化酶系统保护的情况下, 易于自发氧化, 形成高铁血红蛋白(MetHb)。这种氧化产物不仅会干扰血红蛋白的正常氧气输送功能, 还可能在一氧化过程中引起蛋白质或血红素的损伤^[3]。因此, 监测血红蛋白的氧化还原状态对于评估氧气输送效率及疾病诊断具有显著的临床意义。目前, 可以利用高效液相色谱法^[4]、电子顺磁共振法^[5]、电化学法^[6]和近红外吸收光谱法^[7]来监测血红蛋白的氧化还原状态。上述方法具有一定的局限性, 检测过程易受仪器条件的限制, 因此亟待开发

一种可以排除蛋白自身荧光影响的新方法, 以实现血红蛋白氧化还原状态的快速、高灵敏检测。

单壁碳纳米管(SWCNTs)是由单层石墨烯片卷曲而成的无缝圆柱体, 直径通常为1~2 nm。根据电子结构的不同, SWCNTs可分为金属性SWCNTs和半导体性SWCNTs。其中, 直径为0.5~1.4 nm的半导体性SWCNTs经辐照激发后, 通过跃迁释放的光子所对应的波长位于生物透明窗口的近红外区域, 能够有效降低生物组织的散射和吸收损耗^[8]。碳纳米管因其独特的光学和物理化学特性, 在生命科学领域得到了广泛的研究和应用^[9-11]。为了实现其在生物医学领域的应用, 对SWCNTs进行功能化修饰是至关重要的一步。通过生物分子或有机聚合物的非共价修饰, 不仅能提高SWCNTs的分散性, 还赋予其良好的生物相容性。研究表明, 经DNA、蛋白质、表面活性剂和脂质修饰的SWCNTs在人脐静脉内皮细

收稿日期: 2024-09-24

基金项目: 国家自然科学基金(81573397)

作者简介: 谭惠心(1998—), 女, 辽宁人, 硕士生, 研究方向为药物分析; 陈静(2001—), 女, 江西人, 硕士生, 研究方向为药物分析。两位作者贡献相同

通信联系人: 刘岩, E-mail: liuyancrystal@ecust.edu.cn; 张敏, E-mail: zhangm@ecust.edu.cn

引用本文: 谭惠心, 陈静, 董开翔, 等. 手性单壁碳纳米管与牛血红蛋白复合物氧化还原过程的光谱学研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(3): 307-315.

Citation: TAN Huixin, CHEN Jing, DONG Kaixiang, et al. Spectroscopic Analysis of the Redox Processes of the Ensemble between Chiral Single-Walled Carbon Nanotubes and Bovine Hemoglobin Complex[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(3): 307-315.

胞、肺上皮细胞和巨噬细胞中显示出极低的毒性^[12-15]。Kam 等^[12]发现,核酸包裹的 SWCNTs 能通过内吞作用进入细胞内部,在质量浓度低于 5 mg/L 的条件下不会引起细胞毒性。

由于 SWCNTs 的光学特性易受到自身结构和周围环境的影响,利用生物分子与 SWCNTs 的相互作用开发的荧光探针和生物传感器已成为研究热点。基于 SWCNTs 的荧光传感器成功用于检测神经递质^[16]、脂质^[17]、pH^[18]、阿霉素^[19]和离子^[20]、NO^[21]、H₂O₂^[22]等小分子物质。蛋白质是生物体内最常见的生物分子,它能通过 π - π 堆积、疏水作用和静电作用与碳纳米管结合^[23-25]。不同尺寸和结构的 SWCNTs 与蛋白质的相互作用有所不同。

本文将未分离的 SWCNTs 与两种具有特定手性的 (6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 分别与牛血红蛋白(BHb)结合,旨在通过光谱学响应深入探究它们之间的相互作用以及 SWCNTs/BHb 复合物的氧化还原过程的特性,以揭示 SWCNTs 与血红蛋白结合后的光学行为,为开发新型的生物传感器和成像技术提供理论基础。这些发现有望推动 SWCNTs 在生物医学诊断中的应用。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

单壁碳纳米管 CoMoCAT、聚乙二醇(PEG, $M_w=8000$)和脱氧胆酸钠(DOC),均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;葡聚糖(Dex, $M_w=70000$)由东京化成工业株式会社提供;十二烷基硫酸钠(SDS)购自永华化学科技有限公司;牛血红蛋白(BHb)、L-抗坏血酸(AA),购自麦克林生物科技有限公司;过氧化氢溶液(H₂O₂, 质量分数 3%)由广东恒健制药有限公司提供。

1.2 仪器与设备

SCQ-250F 型功率可调细胞粉碎机(上海声彦超声波仪器有限公司);Fresco-21 型高速离心机(Thermo Fisher 公司);MINI-10K⁺型低速离心机(杭州米欧仪器有限公司);UV-2600 型紫外(UV)-可见(Vis)-近红外(NIR)吸收光谱仪(日本岛津公司);Horiba-Yvon-nanologo-3 型荧光光谱仪(堀场(中国)贸易有限公司);F-4600 型日立荧光分光光度计(日立高新技术公司);Chirascan V100 型圆二色谱仪(英国应用光物理有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 SWCNTs 的分散 称取 1.0 mg SWCNTs,加入 1.0 mL DOC 溶液($w=2%$),在冰水浴下超声 1 h 使

其分散,之后于 25 °C 下离心 1 h,转速为 13800 r/min。取上清液,即得 SWCNTs 分散液。

1.3.2 单一手性 SWCNTs 的分离 (6,5)-SWCNTs 的分离:在离心管中加入 250 μ L PEG($w=15%$)和 250 μ L Dex($w=15%$)溶液,混匀后离心以形成双水相。在双水相系统中加入 10 μ L SWCNTs 分散液、15 μ L SDS($w=10%$)和 6 μ L DOC 溶液($w=1%$),混匀离心。取出下相,加入 250 μ L PEG($w=15%$)和 5~10 μ L DOC 溶液($w=2%$),混匀离心后上相出现紫色即得 (6,5)-SWCNTs。

(8,3)-SWCNTs 的分离:将上一步的上相与 250 μ L Dex($w=15%$)混合,再加入 4~6 μ L DOC 溶液($w=2%$),混匀离心。下相出现淡绿色即得 (8,3)-SWCNTs。

1.3.3 BHb/SWCNTs 复合物制备 将 BHb 溶解于磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)中,使其浓度为 20 μ mol/L。分别取 25 μ L、浓度为 0.4 μ mol/L 的 SWCNTs、(6,5)-SWCNTs、(8,3)-SWCNTs 分散液与 1 mL 浓度为 4 μ mol/L 的 BHb 溶液混合,室温下孵育 30 min。测定复合物样品的吸收光谱、荧光光谱和圆二色谱。

1.3.4 过氧化氢对 SWCNTs/BHb 复合物的氧化作用

在 SWCNTs/BHb、(6,5)-SWCNTs/BHb 和 (8,3)-SWCNTs/BHb 复合物中,分别加入不同浓度的 H₂O₂ 溶液,并在室温条件下反应 30 min。为了测量荧光光谱, H₂O₂ 浓度范围为 0~21.5 μ mol/L;而对于近红外荧光光谱的测量, H₂O₂ 浓度范围为 0~16.3 μ mol/L。实验中,将未添加 SWCNTs 的 BHb 溶液作为空白对照组。

1.3.5 抗坏血酸对 SWCNTs/BHb 复合物的还原作用

为了研究抗坏血酸的还原作用,先在 3 个复合物中加入 H₂O₂ 溶液并反应 30 min,使血红蛋白转化为高铁血红蛋白,再分别加入不同浓度的抗坏血酸溶液,继续反应 30 min。在测定荧光光谱时, H₂O₂ 的终浓度为 20 μ mol/L,抗坏血酸的浓度范围设定为 0~51.3 μ mol/L;而在测定近红外荧光光谱时, H₂O₂ 的终浓度为 16 μ mol/L,抗坏血酸的浓度范围设定为 0~15.1 μ mol/L。实验中,使用未添加 SWCNTs 的 BHb 溶液作为空白对照组。

1.3.6 光谱测定 使用 Chirascan V100 型圆二色谱仪对样品进行圆二色谱的测定,氮气吹扫速率为 3 L/min,扫描速率 20 nm/min,波长测量范围为 190~260 nm,采用 CDNN 程序(一个基于神经网络的圆二色谱数据分析软件,可用于预测蛋白质的二级结构和螺旋含量^[26])对数据进行分析,以计算 BHb 的二级结构。以空白双水相溶液为对照,在 300~500 nm 和 300~1300 nm

波长范围内测定样品的吸收光谱。使用 F-4600 型荧光分光光度仪测定荧光发射光谱, 狭缝宽度 10 nm, 激发波长 280 nm, 发射波长为 300~550 nm。使用 Horiba-Yvon-nanologo-3 型荧光光谱仪测定样品的近红外荧光光谱, 狭缝宽度 8 nm, 测量范围 900~1 080 nm。SWCNTs 和 (6,5)-SWCNTs 的激发波长均为 575 nm, (8,3)-SWCNTs 的激发波长为 679 nm。每个样品平行测定 3 次。

2 结果与讨论

2.1 SWCNTs 的分离

双水相萃取法是分离手性 SWCNTs 的常用手段^[27]。该技术通过调整表面活性剂的浓度来改变不同手性 SWCNTs 在两相中的分配比例, 实现它们的分离。图 1(a) 示出了 SWCNTs 在分离前后的紫外-可见-近红外吸收光谱, 其中未分离的 SWCNTs 表现出多个手性体的吸收峰, 而单一手性的 (6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 则在特定波长(分别为 980、575 nm

和 950、660 nm)^[28]显示出其电子跃迁能 E_{11} 和 E_{22} 的特征吸收峰。由图 1(b) 和图 1(c)、(d) 可见, 与 SWCNTs 相比, (6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 显示出更强的荧光强度, 这归因于在 SWCNTs 中存在能够抑制荧光的金属性 SWCNTs。本文通过应用朗伯-比尔定律 $A = \epsilon lc$ (其中, A 为吸光度; ϵ 为摩尔吸光系数, $\epsilon_{(6,5)} = 6\ 700\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$, $\epsilon_{(8,3)} = 4\ 500\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ ^[29]; l 为液层厚度; c 为 SWCNTs 的浓度), 可以计算出每种 SWCNTs 的具体浓度。本文得到 SWCNTs、(6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 的浓度分别为 19.3、0.39 mmol/L 和 0.38 mmol/L。

2.2 SWCNTs/BHb 复合物表征

图 2 示出了 BHb、SWCNTs、(6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 及其形成的复合物的紫外-可见-近红外吸收光谱。BHb 在 400 nm 处的吸收峰是由 $\pi \rightarrow \pi$ 电子跃迁引起的 Soret 带吸收峰^[30]。SWCNTs、(6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 与 BHb 结合后, 复合物的吸收光谱在 400 nm 处也出现显著的吸收峰, 初步表明了 BHb 与这三种 SWCNTs 之间发生了偶联作用。

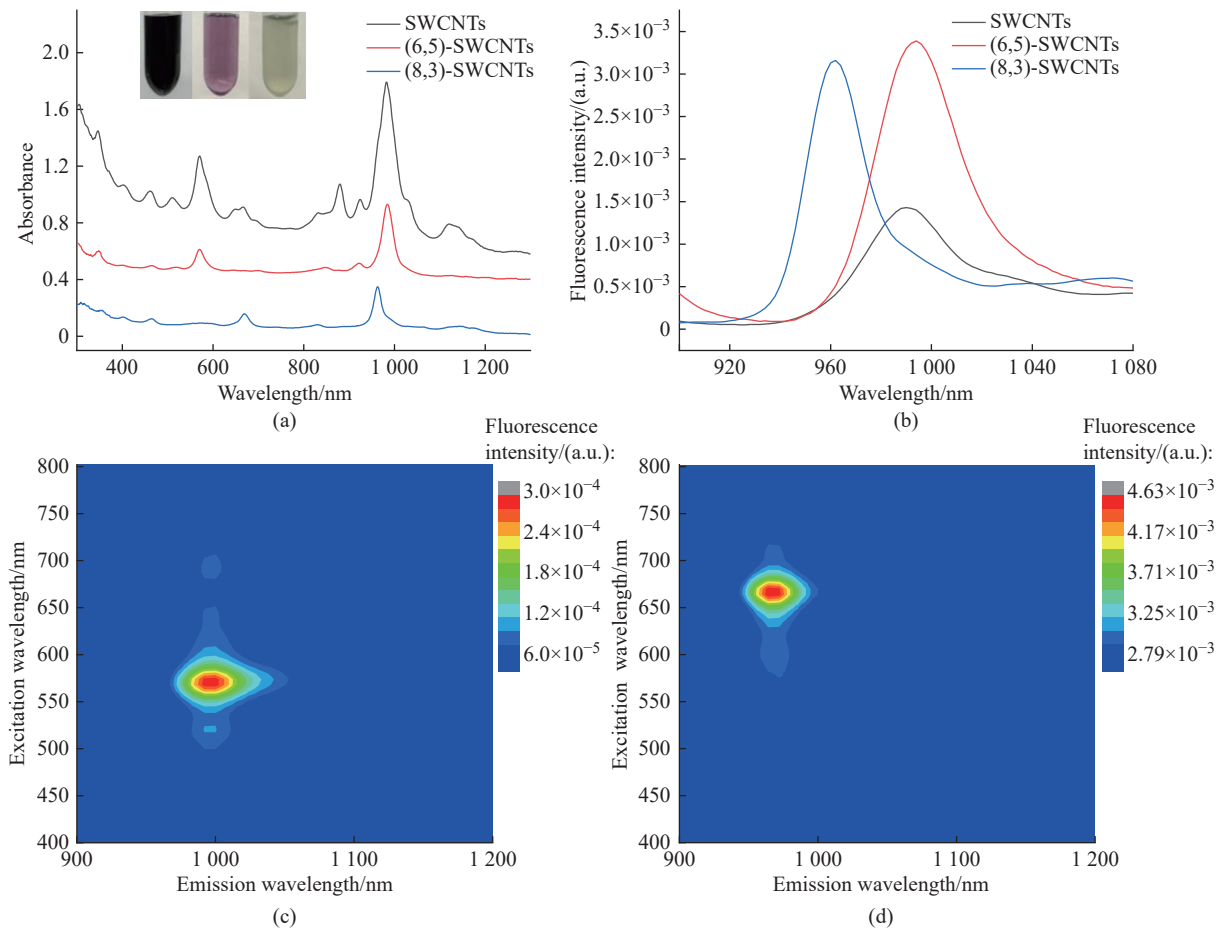


图 1 几种 SWCNTs 的紫外-可见-近红外吸收光谱图(a); 几种 SWCNTs 的近红外荧光光谱图(b); (6,5)-SWCNTs 的三维荧光光谱图(c); (8,3)-SWCNTs 的三维荧光光谱图(d)

Fig. 1 UV-Vis-NIR absorption spectra of the different SWCNTs(a); NIR fluorescence spectra of the different SWCNTs(b); 3D fluorescence spectrum of (6,5)-SWCNTs(c); 3D fluorescence spectrum of (8,3)-SWCNTs(d)

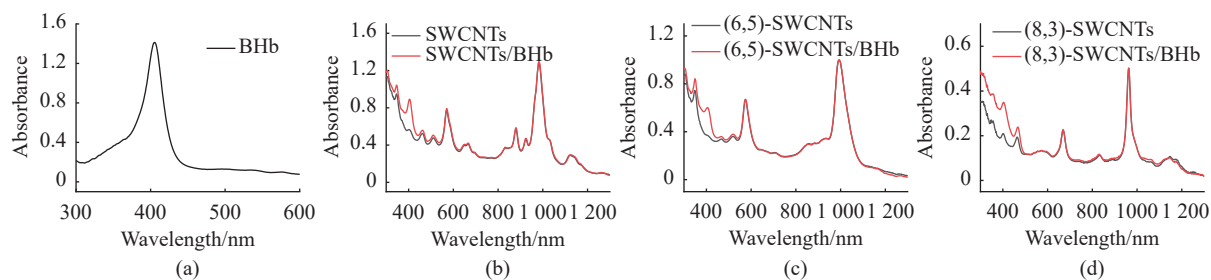


图 2 不同物质的紫外-可见-近红外吸收光谱

Fig. 2 UV-Vis-NIR absorption spectra of the different substances

图 3(a)所示为 BHb 及其与不同 SWCNTs 结合前后的荧光光谱。在 280 nm 的激发波长下, BHb 在 337 nm 波长处产生荧光发射, 这是来自色氨酸和酪氨酸残基的荧光贡献^[31]。当 BHb 分别与 3 种不同的 SWCNTs 结合后, 其荧光强度普遍降低。相同浓度的 SWCNTs、(6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 分别使 BHb 的荧光淬灭 59.9%、10.9% 和 3.3%, 表明 BHb 与 SWCNTs 之间存在相互作用。研究表明 BHb 的色氨酸残基对 SWCNTs 侧壁具有很高的结合亲和力, 当 BHb 与 SWCNTs 结合后, 氨基酸残基的极性降低, 使 BHb 与 SWCNTs 复合物的疏水性增加, 进而抑制了 BHb 的固有荧光^[32-33]。在这些 SWCNTs 中, 未分离的 SWCNTs 对 BHb 荧光的淬灭作用最为显著, 可能是因为未分离的 SWCNTs 中混合的金属性管比半导体性管对蛋白质有更强的结合作用, 从而使 BHb 荧光发生明显的淬灭^[34]。相比之下, 经分离后的单一手性 (6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 对 BHb 的影响较小。

圆二色谱是研究蛋白质结构的重要工具。蛋白质的二级结构如 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲分别在远紫外区域的 208、222、217、195 nm 处呈现负峰, 而在 190、195~198、212 nm 处呈正峰^[35]。因此, 通过对圆二色谱光谱峰的位置和形状进行分析能够了解蛋白质的结构变化及其与其他分子的相互作用。从图 3(b)中可以看到, BHb 在 208、222 nm 处呈负峰, 对应于 α -螺旋构象。加入 SWCNTs 后两个负峰信号强度降低, 表明与 SWCNTs 结合使 BHb 的二级结构发生了改变。产生该结果的主要原因为 SWCNTs 与蛋白质的氨基酸残基产生了 π - π 堆积相互作用, 该作用可以影响蛋白质肽的疏水性和电子密度, 从而改变其结构^[36-37]。通过 CDNN 程序分析了 3 种 SWCNTs 对 BHb 二级结构的影响, 结果列于表 1。可以看出, (6,5)-SWCNTs 和 (8,3)-SWCNTs 的加入使 BHb 的 α -螺旋结构的含量(摩尔分数, 下同)分别减少了 9.2% 和 3.6%, 未分离的 SWCNTs 由于浓度较高, 对 BHb 的作用更加强烈, 使其 α -螺旋结构的含量减少

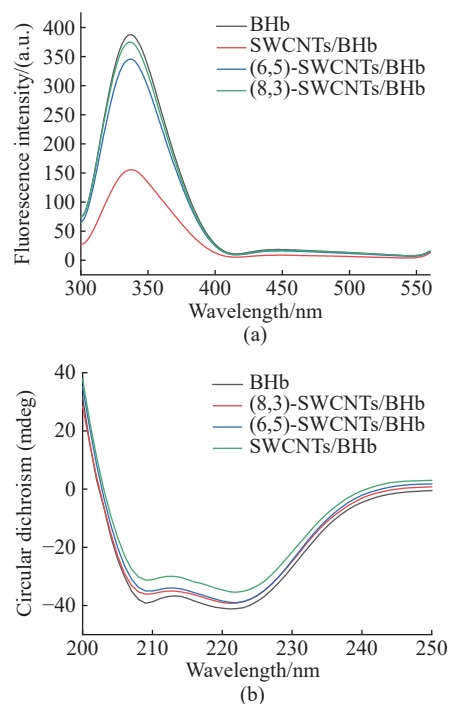


图 3 BHb 与 3 种 SWCNTs 结合前后的荧光光谱(a)和圆二色谱(b)

Fig. 3 Fluorescence spectra (a) and circular dichroism (b) of BHb before and after binding with three SWCNTs

了 13.8%。而 β -折叠、 β -转角和无规卷曲的含量均相应增加, 表明与 SWCNTs 结合导致 BHb 的结构发生变性和展开^[38-39], 这进一步证实了 SWCNTs/BHb 复合物的成功制备。

2.3 过氧化氢对 SWCNTs/BHb 复合物氧化过程的光谱学研究

血红蛋白与双电子氧化剂 H_2O_2 之间容易发生反应^[40], 易于转化为高铁血红蛋白, 这种转变可能引起供氧障碍和细胞损伤。通过光谱技术, 可以追踪血红蛋白的氧化还原状态。本文通过荧光光谱和近红外荧光光谱分析了 H_2O_2 对 3 种 SWCNTs/BHb 复合物的氧化过程, 结果分别见图 4 和图 5。

图 4 示出了随着 H_2O_2 浓度上升, BHb 及其与 SWCNTs 的复合物的荧光强度增加, 同时最大发射波长发生红移。这一现象表明, H_2O_2 促使亚铁血红

表1 BHb 与 SWCNTs 结合前后的二级结构含量

Table 1 Content of secondary structure of BHb before and after combination with SWCNTs

Sample	Mole fraction/%			
	α -Helix	β -Sheet	β -Turn	Random coil
BHb	72.7	3.8	10.8	13.6
SWCNTs/BHb	58.9	5.9	12.4	22.7
(6,5)-SWCNTs/BHb	63.5	5.6	12.0	19.2
(8,3)-SWCNTs/BHb	69.1	4.4	11.3	15.2

蛋白向高铁血红蛋白转变, 导致血红素分解, 荧光强度因此增加。发射波长的红移表明色氨酸和酪氨酸残基周围的微环境极性减少。在 H_2O_2 的影响下, BHb 的最终荧光强度比初始值增强了 3.5 倍, 而 SWCNTs/BHb、(6,5)-SWCNTs/BHb 和 (8,3)-SWCNTs/BHb 的荧光强度分别比初始值增强了 2.5 倍、3.2 倍和 2.9 倍。上述结果表明, 与 SWCNTs 的结合能在一定程度上减缓 BHb 的氧化, 减少高铁血红蛋白的形成。

SWCNTs 在近红外区域展现出稳定的荧光特性, 且不发生光漂白或光闪烁, 这些特性有助于减少生物组织背景吸收对血红蛋白氧化还原状态监测的干扰, 为血红蛋白的检测提供一种更为有效的技术手段。

图 5 示出了 3 种 SWCNTs/BHb 复合物的近红外

荧光光谱随 H_2O_2 浓度变化的情况。与 BHb 的荧光响应相似, SWCNTs 的荧光强度也随 H_2O_2 浓度的增加而增强, 与初始值相比, (6,5)-SWCNTs、(8,3)-SWCNTs 和未分离的 SWCNTs 的最终荧光强度分别增强了 77.6%、84.5% 和 57.3%。SWCNTs 荧光的变化可能与介电环境的改变或与氧化还原小分子之间的电荷转移有关^[41]。SWCNTs 为单原子层结构, 其光学跃迁能级容易受到周围介电环境的影响。一般来说, 随着聚合物在 SWCNTs 侧壁的覆盖率增加, 碳纳米管与水接触减少, 管壁附近介电常数下降, SWCNTs 的第一、第二子能带都会蓝移。而与氧化还原分子发生电荷转移会导致 SWCNTs 的价电子密度发生改变, 从而影响光学性质^[42-43]。因此, SWCNTs 荧光增强的原因可能为: (1) 在 H_2O_2 的作用下, 吸附在 SWCNTs 表面的 BHb 结构发生改变, 进而改变了 SWCNTs 周围的介电环境; (2) H_2O_2 与 SWCNTs/BHb 复合物之间的电荷转移增加了体系中的电子共轭程度, 从而减小了电子跃迁的能量差异, 导致 SWCNTs 的近红外荧光增强。

2.4 抗坏血酸对 SWCNTs/BHb 复合物还原过程的光谱学研究

抗坏血酸是人体中重要的抗氧化剂, 它能够作为氧化还原辅助因子和催化剂, 消除导致游离血红蛋白氧化损伤的关键前体物质^[44]。本文首先引入

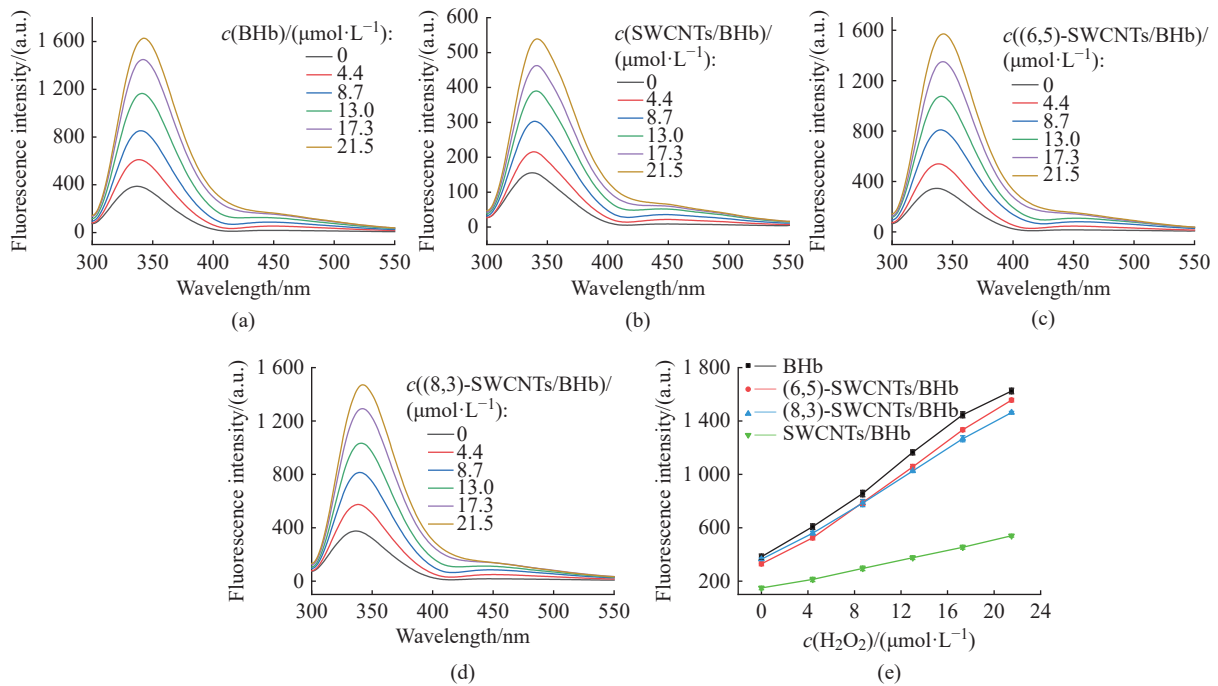


图 4 不同 H_2O_2 浓度下, BHb(a)、SWCNTs/BHb(b)、(6,5)-SWCNTs/BHb(c) 和 (8,3)-SWCNTs/BHb(d) 的荧光光谱图; 复合物荧光强度随 H_2O_2 浓度变化的关系图(e)

Fig. 4 Fluorescence spectra of BHb(a)、SWCNTs/BHb(b)、(6,5)-SWCNTs/BHb(c) and (8,3)-SWCNTs/BHb(d) at different H_2O_2 concentrations; Relationship between fluorescence intensity of complex and H_2O_2 concentration (e)

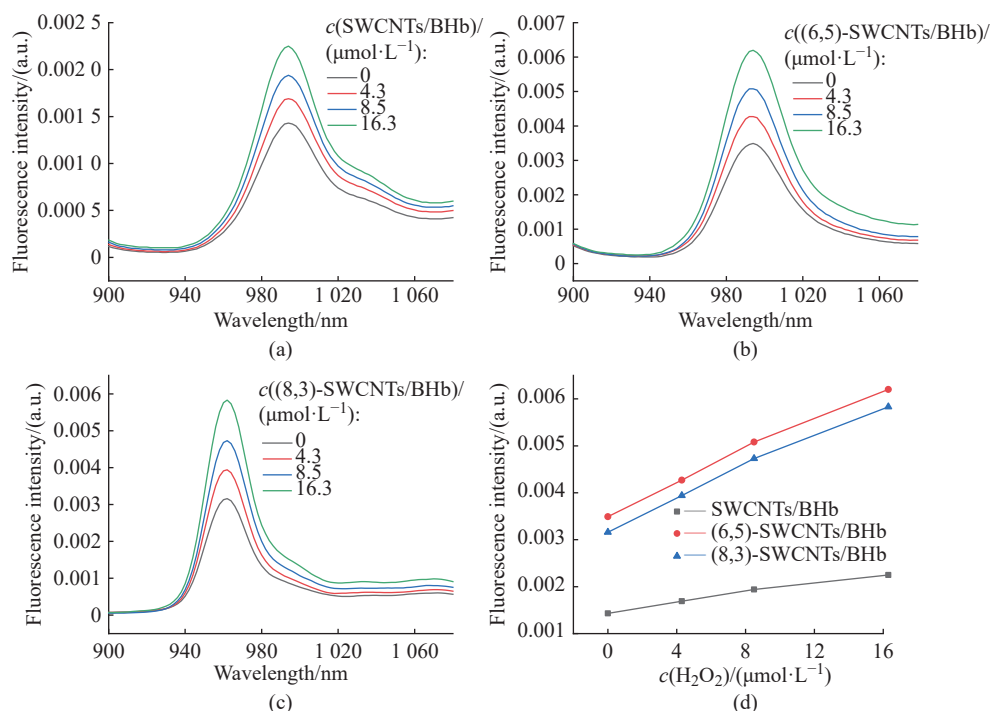


图 5 不同 H₂O₂ 浓度下, SWCNTs/BHb(a)、(6,5)-SWCNTs/ BHb(b)和 (8,3)-SWCNTs/BHb(c)的近红外荧光光谱图;复合物近红外荧光强度随 H₂O₂ 浓度的变化关系(d)

Fig. 5 NIR fluorescence spectra of SWCNTs/BHb(a)、(6,5)-SWCNTs/ BHb(b)and (8,3)-SWCNTs/BHb(c) at different H₂O₂ concentrations; Relationship between NIR fluorescence intensity of complex and H₂O₂ concentration (d)

H₂O₂ 溶液促使血红蛋白转变为高铁血红蛋白,随后在不同浓度的 L-抗坏血酸作用下,探讨了 BHb 与 SWCNTs 复合物的还原过程。图 6 示出了 BHb 和 SWCNTs 复合物的荧光光谱变化情况。随着 L-抗坏血酸浓度的增加, BHb 及其与 SWCNTs 复合物的发

射波长出现了轻微的蓝移,荧光强度也随之降低。这表明血红蛋白向高铁血红蛋白的转化过程是可逆的。在还原过程中, BHb 的结构逐渐恢复,高铁血红蛋白被还原回亚铁血红蛋白,导致色氨酸残基和酪氨酸残基周围的微环境疏水性更强^[45],从而降低

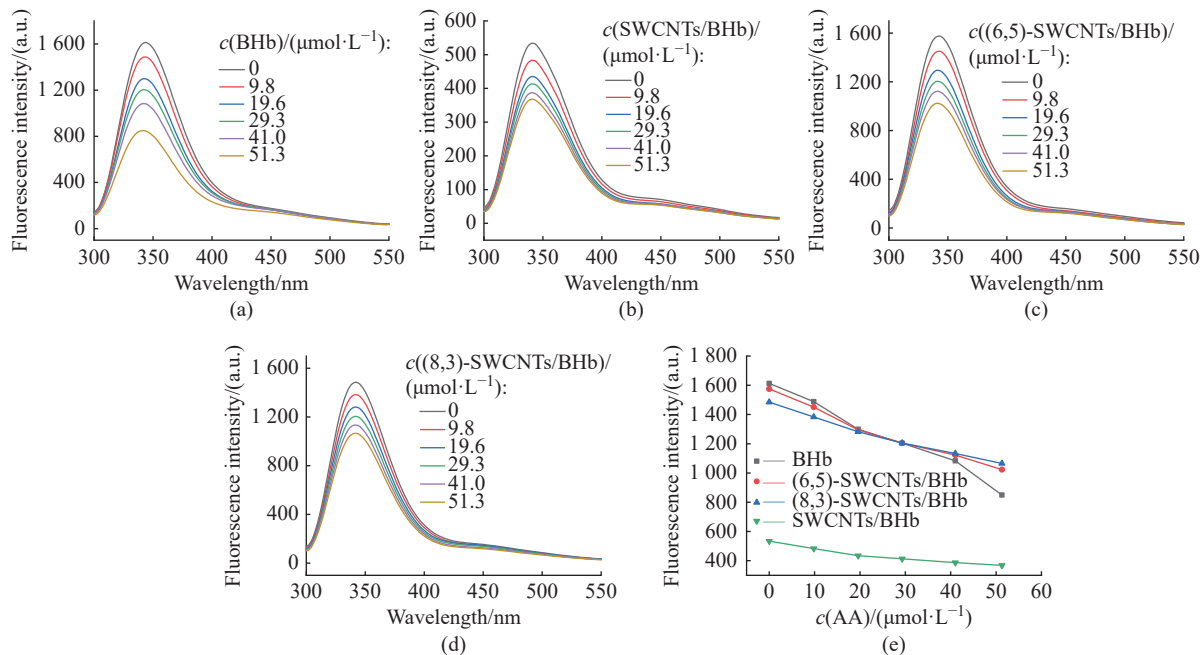


图 6 不同抗坏血酸浓度下, BHb(a)、SWCNTs/BHb(b)、(6,5)-SWCNTs/ BHb(c)和 (8,3)-SWCNTs/BHb(d)的荧光光谱图;复合物荧光强度随抗坏血酸浓度的变化关系(e)

Fig. 6 Fluorescence spectra of BHb(a)、SWCNTs/BHb(b)、(6,5)-SWCNTs/BHb(c)and (8,3)-SWCNTs/ BHb(d) at different ascorbic acid concentrations; Relationship between fluorescence intensity of complex and ascorbic acid concentration (e)

了复合物体系的荧光强度。具体来说,随着 *L*-抗坏血酸浓度增加,空白 BHb 的荧光强度相比初始值降低了 47.3%, 而 SWCNTs/BHb、(6,5)-SWCNTs/BHb 和 (8,3)-SWCNTs/BHb 中 BHb 的荧光强度相比初始值分别降低了 31.1%、35.0% 和 28.2%。研究结果表明,尽管 *L*-抗坏血酸能够促使高铁血红蛋白的还原,但并不能完全恢复到其原始状态。

对 *L*-抗坏血酸还原 BHb/SWCNTs 复合物的过

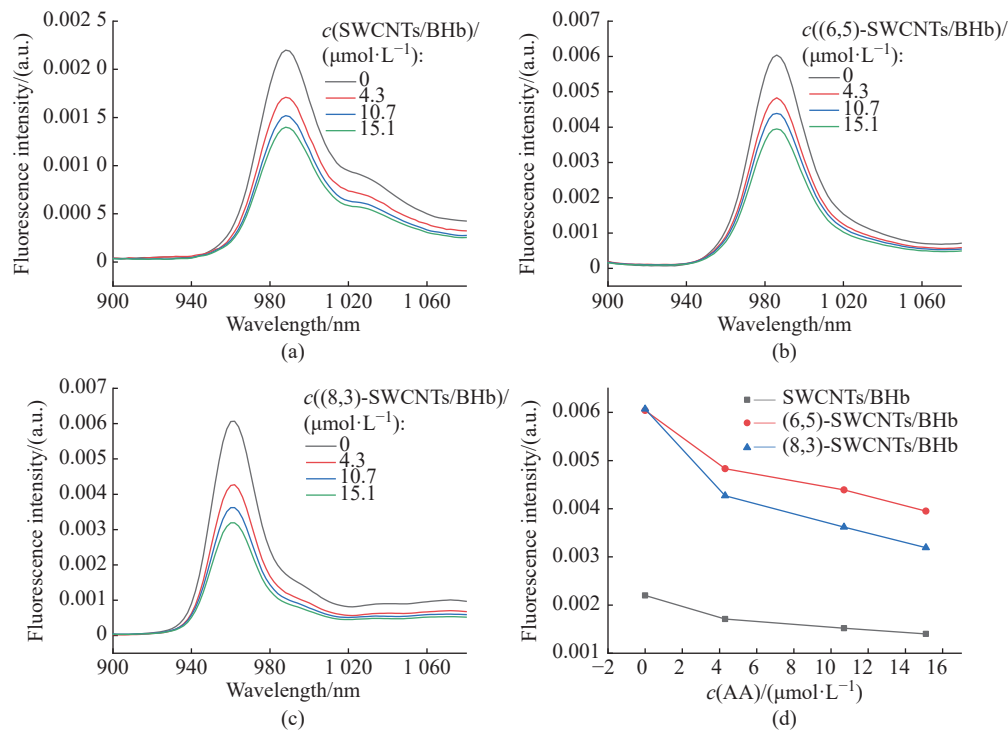


图7 不同抗坏血酸浓度下, SWCNTs/BHb(a)、(6,5)-SWCNTs/BHb(b)和(8,3)-SWCNTs/BHb(c)的近红外荧光光谱图;复合物近红外荧光强度随抗坏血酸浓度变化关系(d)

Fig. 7 NIR fluorescence spectra of SWCNTs/BHb(a)、(6,5)-SWCNTs/BHb(b) and (8,3)-SWCNTs/BHb(c) at different ascorbic acid concentrations; Relationship between NIR fluorescence intensity of complex and ascorbic acid concentration (d)

3 结论

本文采用光谱分析技术,深入探讨了 SWCNTs 与 BHb 在形成 SWCNTs/BHb、(6,5)-SWCNTs/BHb 及(8,3)-SWCNTs/BHb 复合物时,两者间的相互作用机制,并分析了复合物在氧化还原反应过程中荧光特性的动态变化。研究表明,与 SWCNTs 的结合改变了 BHb 的二级结构以及荧光基团所处的局部环境,进而触发了 BHb 的荧光淬灭。未分离的 SWCNTs 因其自淬灭效应,导致了 BHb 荧光淬灭程度及 α -螺旋结构破坏的加剧。在氧化条件下,通过 H₂O₂ 的作用,亚铁血红蛋白转化为高铁血红蛋白,这一过程不仅改变了 BHb 中氨基酸残基周围的极性环境,也影响了 SWCNTs 的介电性质。随着 H₂O₂ 浓度的递增, BHb 与 SWCNTs 的荧光强度均呈现上升趋势。相反

程进行近红外荧光光谱检测(图7)。从图7中可以看出,在 *L*-抗坏血酸作用下,(6,5)-SWCNTs、(8,3)-SWCNTs 和未分离 SWCNTs 的荧光强度基本恢复到初始水平,说明氧化还原导致的荧光强度的改变是可逆的,其中(8,3)-SWCNTs/BHb 的荧光强度在 *L*-抗坏血酸浓度为 0~4.3 μmol/L 范围内急剧下降,表明其对于 *L*-抗坏血酸的浓度响应更加敏感。(8,3)-SWCNTs 有望作为近红外荧光探针用于体内 *L*-抗坏血酸的检测。

地,在抗坏血酸的还原作用下,上述变化得以逆转, BHb 与 SWCNTs 的荧光强度基本恢复至初始水平,这一发现证实了 SWCNTs/BHb 复合物在氧化还原过程中的可逆性。本研究不仅为血红蛋白氧化还原状态的监测开辟了新的途径,还为开发基于 SWCNTs 的近红外光学传感器提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] AHMED M H, GHATGE M S, SAFO M K. Hemoglobin: Structure, function and allostery[J]. *Subcell Biochem*, 2020, 94: 345-382.
- [2] GIARDINA B. Hemoglobin: Multiple molecular interactions and multiple functions. An example of energy optimization and global molecular organization[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2022, 84: 101040.
- [3] JIA Y, BUEHLER P W, BOYKINS R A, et al. Structural

- basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(7): 4894-4907.
- [4] NEMATI H, BAHRAMI G, RAHIMI Z. Rapid separation of human globin chains in normal and thalassemia patients by RP-HPLC[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38: 3213-3218.
- [5] RIFKIND J M, RAMASAMY S, MANOHARAN P T, *et al.* Redox reactions of hemoglobin[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6(3): 657-660.
- [6] TRAORE Z S, SHAH S M, SU S G. Flow-injection chemiluminescence determination of hemoglobin in the blood[J]. *Luminescence*, 2013, 28: 56-62.
- [7] WUORI E, GMITTER M. Noninvasive *in vivo* monitoring of total blood hemoglobin[J]. *Proceedings of SPIE: The International Society for Optical Engineering*, 2003, 4965: 160-167.
- [8] HONG G S, ANTARIS A L, DAI H J. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 0010.
- [9] JNANS D. Perfectly imperfect: A review of chemical tools for exciton engineering in single-walled carbon nanotubes[J]. *Materials Horizons*, 2020, 7: 2860-2881.
- [10] CHEN C, WANG J S. Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review[J]. *Analyst*, 2020, 145(5): 1605-1628.
- [11] SULTANA N, DEWEY H M, ARELLANO A G, *et al.* Understanding the molecular assemblies of single walled carbon nanotubes and tailoring their photoluminescence for the next-generation optical nanosensors[J]. *Chemistry of Materials*, 2024, 36(9): 4034-4053.
- [12] KAM N W S, O'CONNELL M J, WISDOM J A. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(33): 11600-11605.
- [13] GE C C, DU J F, ZHAO L N, *et al.* Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(41): 16968-16973.
- [14] CHERUKURI P, BACHILLO S M, LITOVSKY S H, *et al.* Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(48): 15638-15639.
- [15] YADAV A, KELICH P, KALLMYER N, *et al.* Characterizing the interactions of cell-membrane-disrupting peptides with lipid-functionalized single-walled carbon nanotubes[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(20): 24084-24096.
- [16] NIBLER R, KURTH L, LI H, *et al.* Sensing with chirality-pure near-infrared fluorescent carbon nanotubes[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93: 6446-6455.
- [17] JENA P V, ROXBURY D, GALASSI T V, *et al.* A carbon nanotube optical reporter maps endolysosomal lipid flux[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(11): 10689-10703.
- [18] SULTANA N, DEWEY H, BUDHATHOKI-UPRETY J. Optical detection of pH changes in artificial sweat using near-infrared fluorescent nanomaterials[J]. *Sensors & Diagnostics*, 2022, 1: 1189-1197.
- [19] HARVEY J D, WILLIAMS R M, TULLY K M, *et al.* An *in vivo* nanosensor measures compartmental doxorubicin exposure[J]. *Nano Letters*, 2019, 19: 4343-4354.
- [20] GONG X, CHO S Y, KUO S, *et al.* Divalent metal cation optical sensing using single-walled carbon nanotube corona phase molecular recognition[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94: 16393-16401.
- [21] GIRALDO J P, LANDRY M P, KWAK SY, *et al.* A ratiometric sensor using single chirality near-infrared fluorescent carbon nanotubes: Application to *in vivo* monitoring[J]. *Small*, 2015, 11(32): 3973-3984.
- [22] SAFAEE M M, GRAVELY M, ROXBURY D. A wearable optical microfibrillar biomaterial with encapsulated nanosensors enables wireless monitoring of oxidative stress[J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(13): 2006254.
- [23] HIRANO A, KAMEDA T. Aromaphilicity index of amino acids: Molecular dynamics simulations of the protein binding affinity for carbon nanomaterials[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2021, 4(3): 2486-2495.
- [24] SINGH S, DIVECHA H R, AYOOLA A, *et al.* Computational investigation of chirality-based separation of carbon nanotubes using tripeptide library[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(1): 175.
- [25] NEPAL D, GECKELER K. pH-Sensitive dispersion and debundling of single-walled carbon nanotubes: Lysozyme as a tool[J]. *Small*, 2010, 2(3): 406-412.
- [26] BÖHM G. New approaches in molecular structure prediction[J]. *Biophysical Chemistry*, 1996, 59(1/2): 1-32.
- [27] KHRIPIN C Y, FAGAN J A, ZHENG M. Spontaneous partition of carbon nanotubes in polymer-modified aqueous phases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(18): 6822.
- [28] WEISMAN R B, BACHILLO S M. Dependence of optical transition energies on structure for single-walled carbon nanotubes in aqueous suspension: An empirical katura plot[J]. *Nano Letters*, 2003, 3(9): 1235-1238.
- [29] STREIT J K, BACHILLO S M, GHOSH S, *et al.* Directly measured optical absorption cross sections for structure-selected single-walled carbon nanotubes[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(3): 1530-1536.
- [30] MAHATO M, PAL P, KAMILYA T, *et al.* Hemoglobin-silver interaction and bioconjugate formation: A spectroscopic study[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(20): 7062-7070.
- [31] DOHARE N, SIDDIQUEE M A, AY M P, *et al.* Esterase activity and interaction of human hemoglobin with diclofenac sodium: A spectroscopic and molecular docking study[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2020, 33: e2841.
- [32] 杨兴, 谭慧心, 章弘扬, 等. 荧光光谱法研究单壁碳纳米管与牛血红蛋白的相互作用 [J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(1): 12-18.

- [33] WANG Y Q, ZHANG H M, CAO J. Binding of hydroxylated single-walled carbon nanotubes to two hemoproteins, hemoglobin and myoglobin[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, 141: 26-35.
- [34] NEPAL D, GECKELER K E. Proteins and carbon nanotubes: Close encounter in water[J]. *Small*, 2007, 3(7): 1259-1265.
- [35] OVUNG A, MAVANI A, GHOSH A, *et al.* Heme protein binding of sulfonamide compounds: A correlation study by spectroscopic, calorimetric, and computational methods[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(6): 4932-4944.
- [36] BALAMURUGAN K, GOPALAKRISHNAN R, RAMAN S S, *et al.* Exploring the changes in the structure of α -helical peptides adsorbed onto a single walled carbon nanotube using classical molecular dynamics simulation[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(44): 14048-14058.
- [37] BALAMURUGAN K, AZHAGIYA SINGAM E R, SUBRAMANIAN V. Effect of curvature on the α -helix breaking tendency of carbon based nanomaterials[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011, 115(18): 8886-8892.
- [38] RANJBAR B, GILL P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses—A review[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2009, 74(2): 101-120.
- [39] DONG J, LI X, ZHOU Y, *et al.* Interactions of gallic acid with porcine hemoglobin: Effect on the redox state and structure of hemoglobin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(1): 397-403.
- [40] KHOR H K, FISHER M T, SCHÖNEICH C. Potential role of methionine sulfoxide in the inactivation of the chaperone groel by hypochlorous acid (HOCl) and peroxynitrite (ONOO⁻)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(19): 19486-19493.
- [41] BOGHOSSIAN A A, ZHANG J, BARONE P W, *et al.* Near-infrared fluorescent sensors based on single-walled carbon nanotubes for life sciences applications[J]. *ChemSusChem*, 2011, 4(7): 848-863.
- [42] HARVEY J D, JENA P V, BAKER H A, *et al.* A carbon nanotube reporter of microRNA hybridization events *in vivo*[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 0041.
- [43] POLO E, KRUSS S. Impact of redox-active molecules on the fluorescence of polymer-wrapped carbon nanotubes[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2016, 120(5): 3061-3070.
- [44] FOSTER M N, CARR A C, ANTONY A, *et al.* Intravenous vitamin C administration improved blood cell counts and health-related quality of life of patient with history of relapsed acute myeloid leukaemia[J]. *Antioxidants*, 2018, 7(7): 92.
- [45] SHANG L, WANG Y, JIANG J, *et al.* pH-Dependent protein conformational changes in albumin: Gold nanoparticle bioconjugates: A spectroscopic study[J]. *Langmuir*, 2007, 23(5): 2714-2721.

Spectroscopic Analysis of the Redox Processes of the Ensemble between Chiral Single-Walled Carbon Nanotubes and Bovine Hemoglobin Complex

TAN Huixin¹, CHEN Jing¹, DONG Kaixiang¹, LIU Yan¹, ZHANG Hongyang², HU Ping², ZHANG Min¹

(1. Shanghai Frontiers Science Center of Optogenetic Techniques for Cell Metabolism, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Functional Materials Chemistry, School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: In this paper, unseparated single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and two types of single-chiral SWCNTs, namely (6,5)-SWCNTs and (8,3)-SWCNTs, were used to associate with bovine hemoglobin (BHb), respectively. The interaction between SWCNTs and BHb, and the spectral responses corresponding to the redox process of SWCNTs/BHb composites, were analyzed. The results indicated that the binding with SWCNTs led to changes in the secondary structure of BHb, with the largest structural alteration observed for unseparated SWCNTs, resulting in fluorescence quenching and α -helix loss in BHb. During the oxidation process, the fluorescence intensity of both BHb and SWCNTs at their maximum emission wavelengths increased; Whereas, during the reduction process, the fluorescence intensity of BHb and SWCNTs gradually recovered to the original state. The findings of this study provide insight into monitoring the redox process of hemoglobin.

Key words: single-walled carbon nanotubes; bovine hemoglobin; interaction; fluorescence spectrum; redox

(责任编辑: 张欣)