



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107576787 B

(45)授权公告日 2020.06.05

(21)申请号 201710704138.3

(22)申请日 2017.08.17

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107576787 A

(43)申请公布日 2018.01.12

(73)专利权人 上海大学  
地址 200444 上海市宝山区上大路99号

(72)发明人 王艳丽 姚晨婕 丁琳 李晨晨  
章康康 吴明红

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266  
代理人 徐迅 王正君

(51)Int.Cl.  
G01N 33/533(2006.01)  
C12Q 1/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 105106974 A,2015.12.02,  
KR 20140130308 A,2014.11.10,  
CN 101531993 A,2009.09.16,  
KR 20130122585 A,2013.11.07,

审查员 王在竹

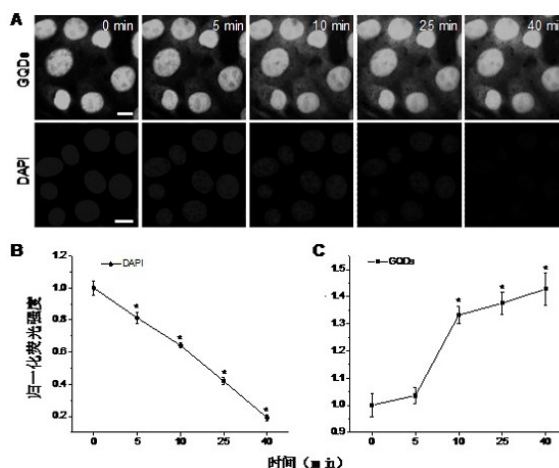
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

荧光标记细胞核用试剂盒及其标记方法

(57)摘要

本发明涉及一种荧光标记细胞核用试剂盒及其标记方法。具体而言,本发明提供了石墨烯量子点对细胞核进行荧光标记的方法,及上述量子点用于细胞核稳定荧光标记的试剂盒,通过本发明的方法和试剂盒可简单易行、高效稳定地对细胞核进行荧光标记,为细胞的长时间观察研究提供了细胞核稳定示踪的方法,所述方法和试剂盒可用于细胞和组织等的细胞核的高效荧光标记。



1. 一种荧光标记细胞核用试剂盒,其特征在于,荧光标记细胞核用试剂盒的组成部分包括固定液及标记液,所述标记液是粒径范围2~3 nm的磺酸基石墨烯量子点溶液,其浓度为10-30 mg/L;所述固定液为对于细胞标记、免疫组化使用的固定液;且所述的试剂盒的工作温度为室温或37℃。

2. 根据权利要求1所述的荧光标记细胞核用试剂盒,其特征在于,所述的溶液的溶剂为去离子水、生理盐水或者用于细胞培养的培养基缓冲液。

3. 一种荧光标记细胞核的方法,采用根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,该方法的具体步骤为:

a. 用4%多聚甲醛固定生物样品;

b. 使如权利要求1或2所述的试剂盒中的2~3 nm的磺酸基石墨烯量子点溶液与生物样品共孵育,量子点覆盖生物样品表面;在室温或37℃下共孵育5 min,使用PBS缓冲体系洗去生物样品表面多余量子点;

c. 对生物样品进行405 nm波长的激发光照射下观察细胞核。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述的荧光标记的对象包括细胞、组织或动物的细胞核染色体DNA。

## 荧光标记细胞核用试剂盒及其标记方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及石墨烯量子点生物荧光探针和细胞荧光标记技术领域,具体而言,本发明提供了一种新型石墨烯量子点对细胞核直接进行稳定荧光标记的方法,及含有上述量子点用于细胞核稳定荧光标记的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 在传统细胞核荧光标记技术中,大多使用有机荧光染料,如4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 和碘化内啶 (PI),进行细胞核标记。DAPI和PI都可以和细胞核内的染色体DNA强力结合,从而可以用于细胞核定位、观察结构和形态的改变。

[0003] 目前,随着材料科学的迅速发展,石墨烯量子点 (GQDs) 因其独特的光学特性,逐步用于生物医学领域。与有机荧光染料相比,在激发光波长范围量子点具有更好的光稳定性,荧光强度高,激发光谱宽,发射光谱窄,不易被光漂白。这些特性决定了GQDs适用于生物检测与成像领域,可以作为优异的多元标记物。

[0004] 目前,常用于细胞核荧光标记的荧光染料,例如:DAPI,PI等,都存在一个主要缺点,就是光稳定性很差,在激发光持续照射下,会迅速发生光漂白现象,导致很难长时间保持细胞核的荧光标记状态。因此,需要开发长期稳定荧光标记细胞核的示踪方法和产品。

[0005] 另一方面,目前未有研究单纯利用量子点独特的化学优势直接实现对细胞核的选择性定位,此前的研究皆是將量子点与细胞核定位的导向分子,如抗体、细胞核定位信号等分子交联才能实现量子点对细胞核的定位标记,导致量子点对细胞核荧光标记步骤复杂,成本高且效率低下。而且国内外仅有联合使用GQDs和DAPI或PI等细胞核标记物,来联合对细胞核进行标记,而尚无研究直接利用GQDs独特的光学性能,不经任何特殊靶向分子介导的细胞核稳定长期示踪和标记。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的之一在于克服现有技术中存在的技术问题,提供一种荧光标记细胞核用试剂盒。

[0007] 本发明的目的之二在于提供采用该试剂盒进行荧光标记的方法。

[0008] 为达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 为克服常规荧光染料DAPI或PI和无机染料量子点在细胞核染色上的上述缺陷,本发明进行多方面研究,合成一种独特的磺酸基石墨烯量子点结构,制备方法详见专利:(磺酸基石墨烯量子点生物荧光探针及其应用)(201510394852.8)。其对细胞核内特有组蛋白和DNA有高效且特异性结合,在荧光显微镜(或共聚焦显微镜)下标记样本,用405 nm波长激发照射时细胞核呈现稳定的荧光,从而实现对生物样本的细胞核稳定的选择性示踪标记。

[0010] 1、一种荧光标记细胞核用试剂盒,其特征在于该试剂盒是粒径范围2~3 nm的磺酸基石墨烯量子点溶液,其浓度为10-30 mg/L。

[0011] 2、根据权利要求1所述的荧光标记细胞核用试剂盒,其特征在于所述的溶液的溶剂为去离子水、生理盐水或者用于细胞培养的培养基缓冲液。

[0012] 3、一种荧光标记细胞核的方法,采用根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于该方法的具体步骤为:

[0013] 1)用4%多聚甲醛固定生物样品;

[0014] 2)使量子点与生物样品共孵育(量子点覆盖生物样品表面即可);在室温下共孵育5 min,使用PBS缓冲体系洗去生物样品表面多余量子点(覆盖表面即可)。

[0015] 3)对生物样品进行405 nm波长的激发光照射下观察细胞核。

[0016] 生物样品保存在常温、4 °C或者-70 °C环境下。所述的荧光标记对象包括细胞、组织或动物的细胞核染色体DNA。

[0017] 本发明还提供如下试剂盒,其中包括:(1) 标记液,所述标记液为量子点溶液,其粒径范围为2-3 nm。所用的量子点的包装为可以配制成工作液为10 mg/L的母液形式(100 mg/L),而且其中的量子点可以配制在用于细胞培养的培养基缓冲液中(如DMEM, RPMI 1640培养基),还可以配制在生理盐水缓冲液中,或适合标记细胞核的其他本领域公认的缓冲液中,工作温度为37 °C,也可以是室温,所述试剂盒还包括细胞标记、免疫组化等常规使用的(2)固定液,(3)封片液等,此外,所述试剂盒还可以包括(4)说明书。所述说明书具体阐述了试剂盒中所含试剂外,还具体阐述了如何通过前述方法实施所述的荧光标记。

[0018] 有益效果:通过实验验证,发明人发现本发明与现有传统有机荧光标记细胞核的技术相比具有以下优点和效果:

[0019] 1.成像清晰,稳定。本发明荧光标记的细胞核具有很强的抗光淬灭能力,可以用来长时间稳定标记细胞核。

[0020] 2.标记方法简单、快捷。

[0021] 3.适用范围广,经过多种实验验证本发明的标记方法和试剂盒,量子点的细胞核靶向性能对多种细胞和动物组织切片皆适用,进而所述方法和试剂盒可以进一步应用到流式细胞仪和组织染色中。

[0022] 4.方法简单,操作方便,实用性强,本发明与目前传统荧光标记技术相比,不必将量子点与细胞核定位的导向分子,如抗体、细胞核定位信号等分子交联,而直接利用量子点独特的化学优势直接实现对细胞核的选择性定位,节省了中间步骤。

## 附图说明

[0023] 图1为石墨烯量子点(GQDs)与DAPI荧光稳定性对比实验。A:4T1细胞(小鼠乳腺癌细胞)用4%多聚甲醛溶液固定后,分别使用GQDs和DAPI对细胞核进行染色,并在激光共聚焦显微镜下,经过不同时间点持续激光照射后,两种荧光染料荧光强度的变化。标尺:10 μm。B,C:DAPI和GQDs归一化荧光强度统计图。

[0024] 图2 GQDs 高效靶向不同细胞的细胞核。细胞用4%多聚甲醛溶液固定后,使用GQDs对细胞核进行染色。A:4T1细胞;B:C17.2细胞(小鼠神经干细胞);C:GES-1细胞(人胃粘膜细胞)。标尺:10 μm。

[0025] 图3 GQDs高效靶向肿瘤组织细胞核(小鼠皮下瘤肿瘤模型)。组织切片用4%多聚甲醛溶液固定后,使用GQDs对细胞核进行染色。A:肝癌组织;B:乳腺癌组织;C:宫颈癌组织;

D:肺癌组织。标尺:10  $\mu\text{m}$ 。

[0026] 图4 GQDs高效靶向正常组织细胞核。组织切片用4% 多聚甲醛溶液固定后,使用GQDs对细胞核进行染色。A:心;B:肝;C:脾;D:肺;E:肾;F:脑。标尺:10  $\mu\text{m}$ 。

[0027] 图5 GQDs靶向细胞核机理探讨。A:GQDs与不同浓度组蛋白(细胞核内特有蛋白)混合,孵育不同时间后,检测组蛋白与GQDs的吸附率。B:GQDs与不同量DNA相互作用(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9, 1 mL),相互作用后GQDs荧光强度变化。

### 具体实施方式

[0028] 下面通过实施例对本发明的方法和试剂盒进行详细的说明,不过本申请所要求保护的并不局限于所述实施例。

[0029] 实施例1:

[0030] GQDs与DAPI荧光稳定性对比实验:

[0031] 为研究GQDs的光稳定性,我们使用DAPI,一种传统的细胞核荧光染料,作为参照。具体如下:

[0032] 1. 4T1 细胞(小鼠乳腺癌细胞)培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,于37°C,含5% CO<sub>2</sub>条件下培养。

[0033] 2. 细胞用PBS溶液洗涤2次,每次2-5分钟。

[0034] 3. 细胞经4%多聚甲醛-PBS固定液固定15 min。

[0035] 4. 细胞用PBS溶液洗涤2次,每次2-5分钟。

[0036] 5. 将处理好的细胞分成两组。分别滴加GQDs(10 mg/L)和DAPI(2 mg/L),室温孵育5 min。

[0037] 6. 细胞用PBS溶液洗涤2次。

[0038] 7. 滴加封片液封片。

[0039] 8. 细胞置于共聚焦显微镜下,用405 nm激发光激发,并观察细胞核成像。用激光持续照射细胞,每隔5 min采集图像,观察染料光漂白现象。

[0040] 结果:具体参见图1,从图1中可以看出,GQDs经过激光持续照射40 min,荧光不但没有衰减,荧光反而明显增强;同时DAPI在同样条件下,发生明显的光漂白现象,40 min后DAPI的荧光几乎消失。体现GQDs作为细胞核标记染料的优势性,无光淬灭现象发生。

[0041] 实施例2:

[0042] GQDs高效靶向不同细胞的细胞核:

[0043] 为研究GQDs对不同种细胞的细胞核的性能,我们使用几种不同种类细胞进行实验。具体如下:

[0044] 1. 4T1细胞、C17.2细胞(小鼠神经干细胞)、GES-1细胞(人胃黏膜细胞)培养于含10%胎牛血清的DMEM或RPMI1640培养基中,于37°C,含5% CO<sub>2</sub>条件下培养。

[0045] 2. 细胞用PBS溶液洗涤2次,每次2-5分钟。

[0046] 3. 细胞经4%多聚甲醛-PBS固定液固定15 min。

[0047] 4. 细胞用PBS溶液洗涤2次,每次2-5分钟。

[0048] 5. 处理好的细胞中,滴加GQDs(10 mg/L),室温孵育5 min。

[0049] 6. 细胞用PBS溶液洗涤2次。

[0050] 7. 滴加封片液封片。

[0051] 8. 细胞置于共聚焦显微镜下,用405 nm激发光激发,并观察细胞核成像。

[0052] 结果:具体参见图2,从图2中可以看出,本发明的GQDs标记的细胞核显示出很强的荧光,而且对4T1细胞、C17.2细胞、GES-1细胞等三种细胞都取得了相似的结果,由此证明本发明的标记方法适用于各种固定了的细胞(例如包括正常细胞和肿瘤细胞)的细胞核标记。所述方法能够特异地对细胞核进行稳定的荧光标记。

[0053] 实施例3:

[0054] GQDs高效靶向不同肿瘤及正常组织的细胞核:

[0055] 为研究GQDs对不同种肿瘤及正常组织的细胞核的性能,我们使用几种不同种类肿瘤及正常组织进行实验。具体如下:

[0056] 1. 使用不同类型肿瘤及正常组织切片,如肝癌组织、乳腺癌组织、宫颈癌组织、肺癌组织、心、肝、脾、肺、肾、脑等。

[0057] 2. 组织切片用4%多聚甲醛-PBS固定液固定15 min。

[0058] 3. 组织切片用PBS溶液洗涤2次,每次2-5分钟。

[0059] 5. 处理好的组织切片中,首先滴加SYTO17 (5  $\mu$ M,一种细胞核标记染料,激发波长605 nm),室温孵育5 min,然后滴加GQDs (10 mg/L),室温孵育5 min。

[0060] 6. 组织切片用PBS溶液洗涤2次。

[0061] 7. 滴加封片液封片。

[0062] 8. 组织切片置于共聚焦显微镜下,用405 nm激发光激发,并观察细胞核成像。

[0063] 结果:具体参见图3、4,从图3、4中可以看出,本发明的GQDs标记的细胞核显示出很强的荧光,此外发现对肝癌组织、乳腺癌组织、宫颈癌组织、肺癌组织、心、肝、脾、肺、肾、脑等,都得到了相似的结果,由此证明本发明的标记方法适用于各种固定了的组织切片的细胞核标记。所述方法能够特异地对细胞核进行稳定的荧光标记。

[0064] 实施例4:

[0065] GQDs进核机理探讨:

[0066] 为研究GQDs能够直接靶向细胞核的原因,我们设计如下两个实验:

[0067] GQDs与细胞核内组蛋白结合实验:

[0068] 1. 组蛋白溶于水,溶液置于高速离心机20000 rpm,离心20 min,去除杂质,收集上清进行实验。

[0069] 2. 组蛋白和GQDs相混合,组蛋白终浓度为0.5或2 mg/mL,GQDs终浓度为60 mg/L。

[0070] 3. 溶液在PBS中 (37°C,pH7.4) 孵育不同时间 (10 min,30 min,2 h)。

[0071] 4. 每个样品置于高速离心机20000 rpm,离心20 min,收集蛋白与GQDs的聚合物。

[0072] 5. 聚合物重新溶于PBS中,组蛋白的浓度用Bradford测试检测。

[0073] GQDs与DNA结合实验:

[0074] 1. DNA溶于水后,GQDs与不同量DNA相互作用 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9, 1 mL),DNA终浓度为1 mmol/L,GQDs终浓度为60 mg/L。

[0075] 2. 溶液在PBS中 (37°C,pH7.4) 孵育30 min。

[0076] 3. 混合物利用荧光分光光度计检测荧光变化情况。

[0077] 结果:具体参见图5,从图5中可以看出,GQDs与DNA都要有明显的结合,且存在明显

的剂量效应和时间效应,说明GQDs与细胞核内特有的DNA和组蛋白有特异性结合,因此其很适于用来标记细胞核。

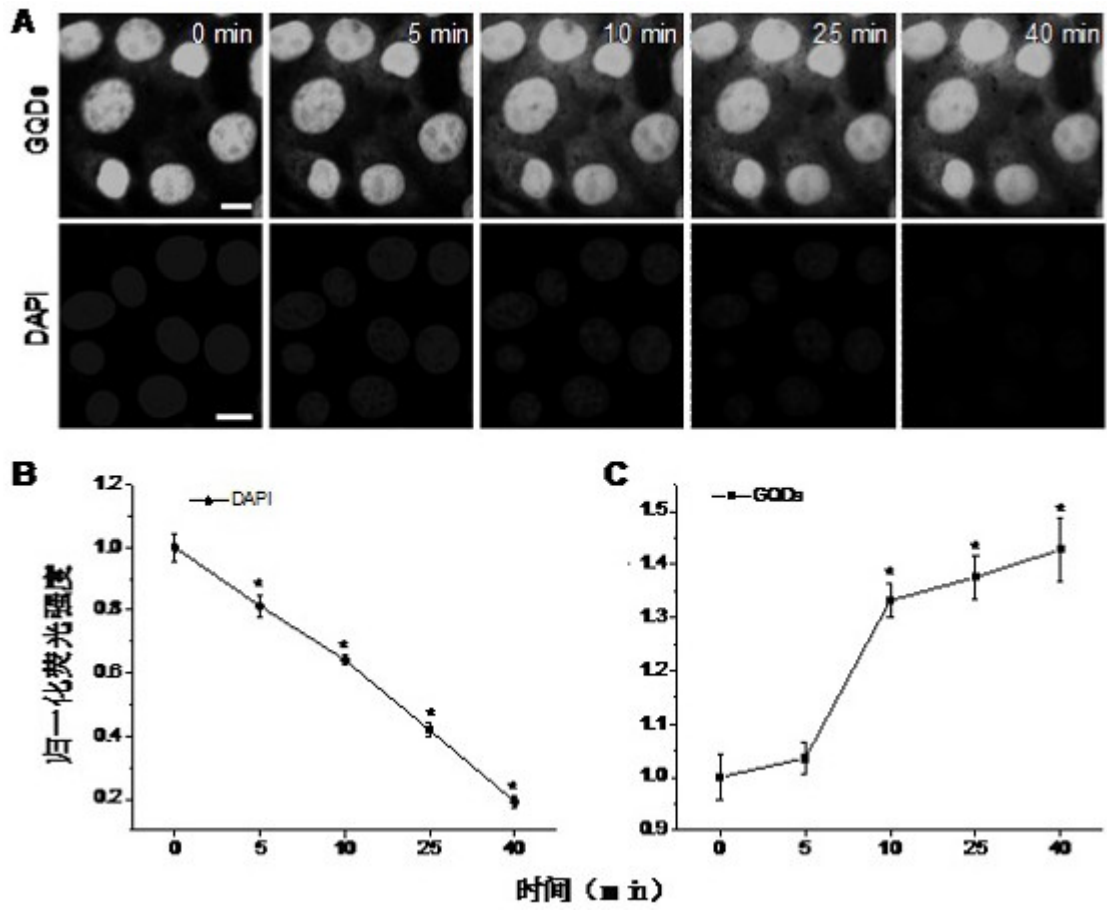


图 1

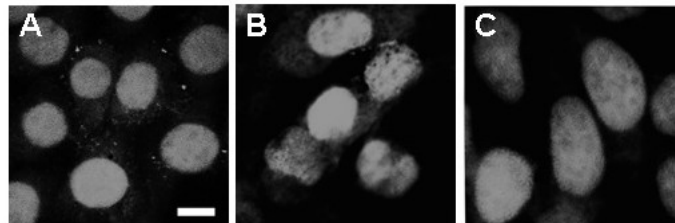


图 2

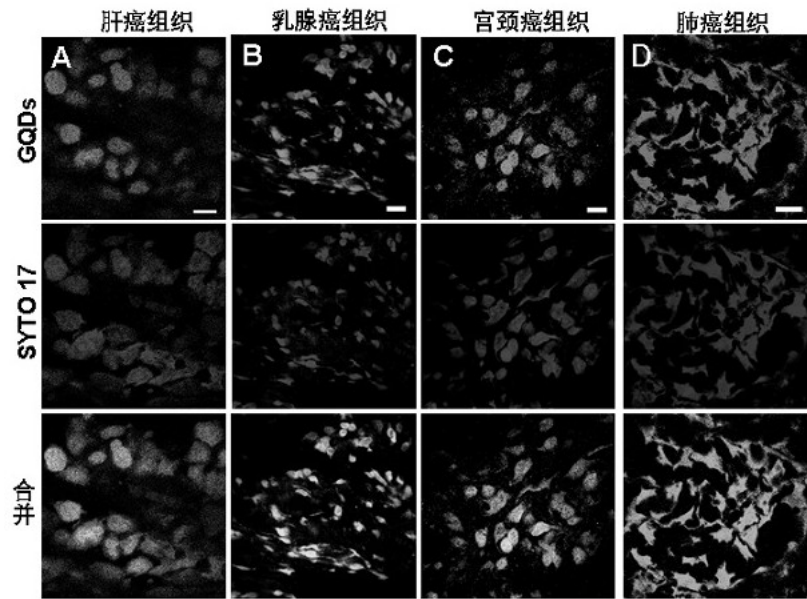


图 3

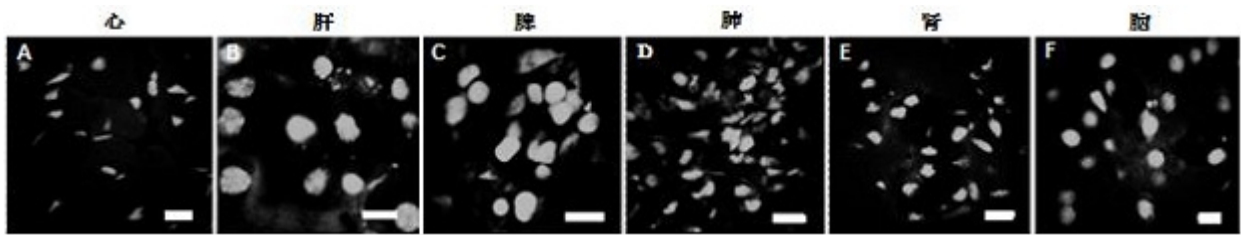


图4

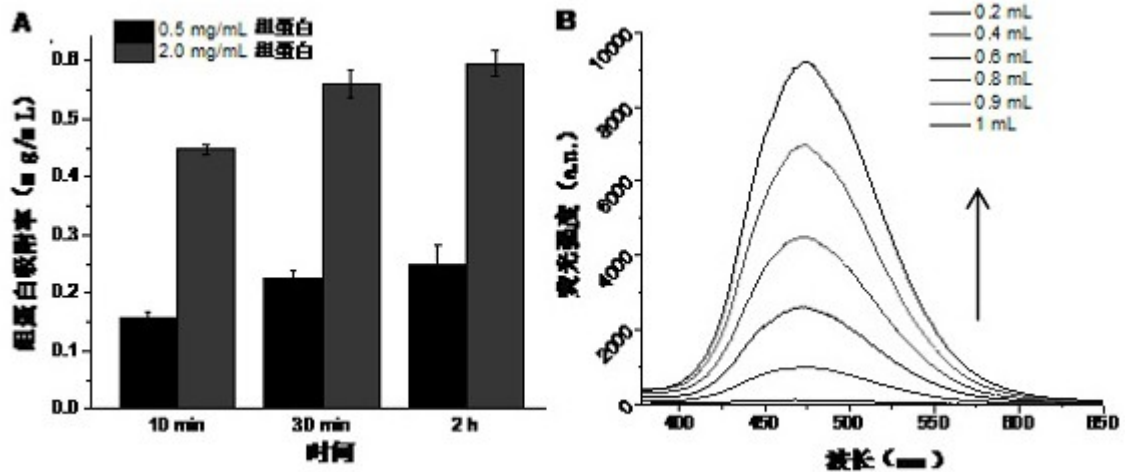


图5

专利名称(译)	荧光标记细胞核用试剂盒及其标记方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107576787B</a>	公开(公告)日	2020-06-05
申请号	CN2017110704138.3	申请日	2017-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	上海大学		
申请(专利权)人(译)	上海大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海大学		
[标]发明人	王艳丽 姚晨婕 丁琳 李晨晨 章康康 吴明红		
发明人	王艳丽 姚晨婕 丁琳 李晨晨 章康康 吴明红		
IPC分类号	G01N33/533 C12Q1/02		
代理人(译)	徐迅 王正君		
其他公开文献	CN107576787A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种荧光标记细胞核用试剂盒及其标记方法。具体而言，本发明提供了石墨烯量子点对细胞核进行荧光标记的方法，及上述量子点用于细胞核稳定荧光标记的试剂盒，通过本发明的方法和试剂盒可简单易行、高效稳定地对细胞核进行荧光标记，为细胞的长时间观察研究提供了细胞核稳定示踪的方法，所述方法和试剂盒可用于细胞和组织等的细胞核的高效荧光标记。

