

CdTe 量子点 DNA 荧光纳米探针的合成及表征

张秋艳 孙 琳 李珍珍 潘玉瑾 王 青 赵 强*

(四川大学化学工程学院, 成都 610065)

摘要: 采用水相合成法合成了巯基乙酸(TGA)修饰的水溶性 CdTe 量子点, 通过反相微乳液法制备了二氧化硅及壳聚糖修饰的核壳型复合荧光纳米粒子, 将其与 DNA 吸附连接, 得到 CdTe 量子点 DNA 荧光纳米探针。用扫描电镜、透射电镜、荧光光谱、红外光谱、紫外光谱、 ζ 电位等测试方法对产物的理化性质进行了分析表征。结果表明制备了表面富含氨基的复合荧光纳米粒子, 其对 DNA 具有良好的吸附作用。

关键词: CdTe 量子点; 氨基化; 荧光; 纳米探针; DNA

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4861(2015)03-0543-05

DOI: 10.11862/CJIC.2015.093

Preparation and Characterization of CdTe QDs-DNA Fluorescent Nanoprobe

ZHANG Qiu-Yan SUN Lin LI Zhen-Zhen PAN Yu-Jin WANG Qing ZHAO Qiang*

(College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: The water-soluble CdTe quantum dots were synthesized with Thioglycolic acid (TGA) as stabilizer in the aqueous solution, and the ammonified core /shell nanoparticles coated with TEOS and chitosan were synthesized with reverse microemulsion method. The nanocomposites were connected with DNA by electrostatic adsorption. The property and morphology of these particles were characterized by SEM, TEM, FL, IR, UV and Zeta Potential. The results showed that the amino-modified nanocomposites were synthesized successfully and had high adsorption capacity for DNA.

Key words: CdTe Quantum Dots; ammonification; fluorescence; nanoprobe; DNA

近年来, 采用化学方法合成半导体纳米晶即量子点(Quantum Dots)^[1]荧光纳米材料已成为化学和材料领域中的研究热点之一。由于量子点比传统有机荧光染料等具有更好的荧光特性^[2], 如较强的量子尺寸效应、较高的荧光量子产率、发射谱线窄和激发谱线宽等优点, 其作为一种新型的荧光标记物已在生物分子探针^[3-4]、生物传感器^[5]、生物显像^[6]及诊断^[7]、生物分子相互作用^[8-9]等研究中显示出了很好的应用前景。

量子点表面生物功能化后, 便可与 DNA、蛋白质等生物分子特异性结合, 用于荧光探针标记^[10]。本

研究中所采用的 DNA 富含 G 碱基, 与人体端粒 DNA 末端重复序列 5'-TTAGGG-3' 类似, 经诱导可形成 G-四链体结构。G-四链体 DNA 的形成能够有效地抑制端粒酶活性以及端粒的延长, 进而遏制肿瘤细胞的大量增殖^[11]。因而, 富 G 碱基 DNA 荧光纳米探针的研究具有潜在的应用价值。

虽然各种功能基团修饰的量子点在生物领域已得到广泛应用^[12], 但采用二氧化硅与壳聚糖交联氨基化改性量子点形成核壳型的荧光复合纳米粒子, 并研究其对 DNA 的吸附性能则鲜有报道。目前有研究者采用巯基乙胺^[13]或 APTES(3-氨丙基三乙氧

收稿日期: 2014-11-24。收修改稿日期: 2015-01-07。

国家自然科学基金(No.20975072)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: zhaoliang@scu.edu.cn

基硅烷)^[14]修饰量子点,但采用这些方法合成的量子点不稳定并且带有一定的毒性^[15],不便与 DNA 连接进行后续研究。壳聚糖因为具有良好的生物相容性、无毒、可生物降解等优点^[16],目前已被广泛用于 DNA 研究领域^[17]。作为一种天然高分子化合物,壳聚糖结构中含有大量的-OH 和-NH₂,可通过静电吸附作用与带负电荷的 DNA 产生相互作用,形成荧光纳米探针。为此,本工作以巯基乙酸(TGA)为稳定剂在水相中制备了稳定的 CdTe 量子点,再采用反相微乳液法制备表面氨基改性的荧光复合纳米粒子,并研究其对 DNA 的吸附性能。

1 实验部分

1.1 实验试剂

硼氢化钠 NaBH₄(化学纯 CP,天津海纳川);碲粉 Te(>99%,Alfa Aesar);氯化镉 CdCl₂·2.5H₂O(>99%,Acros organics);巯基乙酸 TGA (98%,Acros organics);正硅酸乙酯 TEOS(>96%,TCI Chemicals);曲拉通 X-100(化学纯 CP,成都科龙);三羟甲基氨基甲烷(生物试剂 BR,成都科龙);环己烷、正己醇、氨水、丙酮(分析纯 AR,成都科龙);1%壳聚糖(chitosan,CS,脱乙酰度不低于 90%)溶液;准确称取 1.000 g 壳聚糖溶于 100 mL 1% HOAc 溶液中;DNA 样品:S12-DNA 5'-TTAGGGTTAGGG-3'(OPC 纯化,宝生物工程(TaKaRa)(大连)有限公司)。

1.2 水相合成 TGA 修饰的 CdTe 量子点

按照相关文献^[18]水相合成 TGA 修饰的 CdTe 量

子点。

1.3 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子的合成

采用反相微乳液法^[19]制备核壳型 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子,合成过程如图 1 所示。将 7.5 mL 环己烷、1.8 mL TritonX-100、1.8 mL 正己醇加入 50 mL 圆底烧瓶中,混合均匀,磁力搅拌至澄清透明,接着加入 500 μL CdTe 水溶液(0.2 μg·mL⁻¹)、250 μL 25%的氨水和 500 μL 的 1% 壳聚糖溶液,搅拌 30 min,随后在剧烈搅拌下加入 150 μL TEOS,密封避光反应 24 h。反应结束之后,加入 10 mL 丙酮破乳,在 10 000 r·min⁻¹ 下高速离心 15 min,弃去上清液,得到的产物分别用超纯水和乙醇反复清洗多次,50 °C 真空干燥备用。

CdTe@SiO₂ 纳米粒子的制备方法同上,只是合成过程中不加入壳聚糖。

1.4 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子对 DNA 的吸附作用

将 DNA 样品高速离心后(12 000 r·min⁻¹)溶于 Tris-HCl 缓冲液(1 mol·L⁻¹,pH=7.4)中配制成 100 μmol·L⁻¹ 贮备液。反应液总体积 10 mL,固定 DNA 溶液浓度(10 μmol·L⁻¹),依次增加 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子量(5 mg、10 mg、20 mg、30 mg…),混合后磁力搅拌反应至 DNA 被完全吸附。反应结束后,将产物在 10 000 r·min⁻¹ 下高速离心,收集上清液,紫外测试 DNA 残留含量。

1.5 表征测试

用 FEI 公司 TecnaiG²F20S-TWIN 型透射电镜及

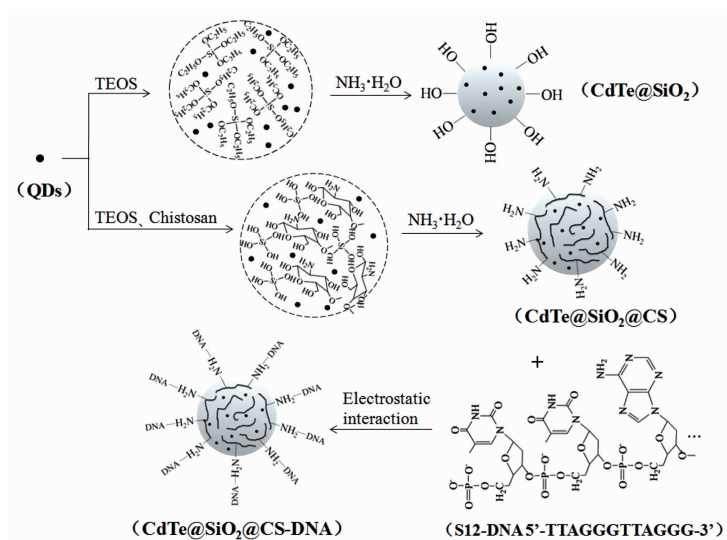


图 1 荧光纳米探针的合成示意图

Fig.1 Schematic illustration of the preparation of fluorescent nanoprobes

FEI 公司 INSPECT F 型扫描电镜表征样品的形貌。红外光谱分析采用 Nicolet 公司 NEXUS 670 型傅立叶变换红外光谱仪, KBr 压片测定。紫外及荧光光谱的测定分别采用紫外-可见分光光度计(TU-1901, 北京普析通用仪器) 和荧光分光光度计(F-4500 型, Hitachi 日立)。 ζ 电位的测定采用 Malvern 公司 ZEN 3690 型 ζ 电位分析仪。

2 结果与讨论

2.1 CdTe 量子点及复合荧光纳米粒子的形貌表征

透射电镜(TEM)和扫描电镜(SEM)是研究纳米粒子的形貌、尺寸及粒径分布的有效手段。本研究中 CdTe 量子点的透射电镜图如图 2(a)所示, 由图可以看出 CdTe 纳米晶呈球状, 粒径在 3 nm 左右, 分布

较为集中, 分散性良好。CdTe@SiO₂ 及 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子的扫描电镜图如图 2(b)(c)所示, 由图可看出粒子呈规则圆球形且尺寸分布较集中(平均粒径分别为 73、66 nm)。图 3 为由图 2(c)得到的粒径分布图。

2.2 CdTe 量子点的紫外和荧光光谱分析

如图 4 所示, 从 CdTe 量子点的紫外-可见吸收光谱图得出我们合成的量子点最大吸收波长值为 541 nm, 可以采取彭氏经验公式对 CdTe 量子点的粒径进行推算^[20], 有 $D = (9.812 \times 10^{-7})\lambda_{\max}^3 - (1.714 \times 10^{-3})\lambda_{\max}^2 + 1.0064\lambda_{\max} - 194.84$, 上式中, $\lambda_{\max}$ 为量子点的最大吸收波长值。用上述经验公式计算出量子点的尺寸约为 3.14 nm。与图 2(a)TEM 统计计算出的粒径大小基本吻合。

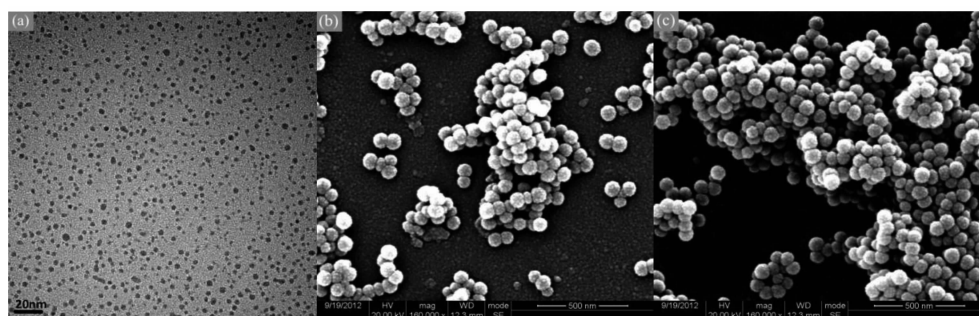


图2 CdTe 量子点(a)的透射电镜图, CdTe@SiO₂(b)及 CdTe@SiO₂@CS(c)复合荧光纳米粒子的扫描电镜图

Fig.2 TEM image of CdTe QDs and SEM images of CdTe@SiO₂(b) and CdTe@SiO₂@CS(c)

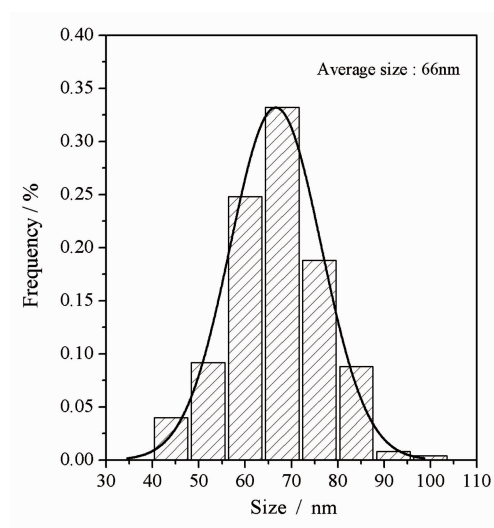


图3 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子的粒径分布图

Fig.3 Particle size distribution of CdTe@SiO₂@CS

由 CdTe 量子点的激发光谱图可看出 CdTe 纳米晶体具有很宽的激发范围, 从 250~600 nm 都可以激发。从发射光谱可看出 CdTe 量子点在 600 nm

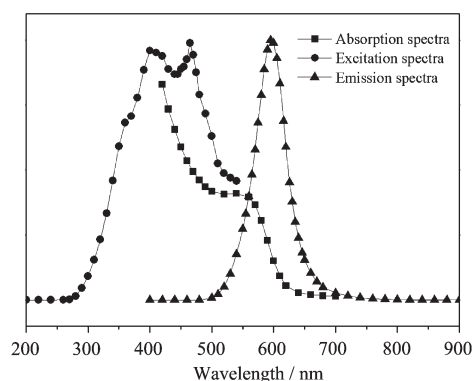
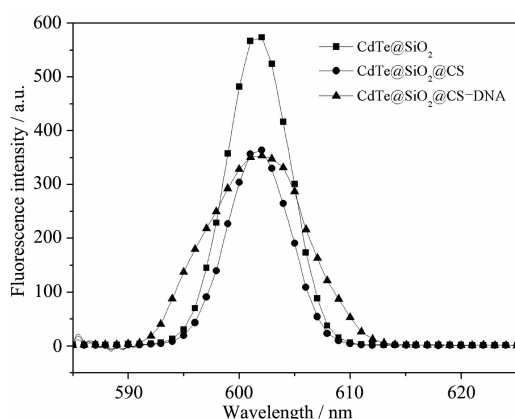


图4 CdTe 量子点的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱图(激发谱发射波长为 600 nm, 发射谱激发波长为 350 nm)

Fig.4 UV-Vis absorption spectra and fluorescence spectra($\lambda_{\text{em}}=600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}}=350 \text{ nm}$) of CdTe QDs

具有最大发射峰, 且荧光发射峰对称性很好, 并未出现拖尾现象。

2.3 复合荧光纳米粒子与 DNA 连接前后荧光性能



$\lambda_{\text{ex}}=300 \text{ nm}$, $E_{\text{ex}}=2.5 \text{ nm}$, $E_{\text{ex}}=5 \text{ nm}$

图 5 CdTe@SiO₂、CdTe@SiO₂@CS 及 CdTe@SiO₂@CS-DNA 复合荧光纳米粒子荧光发射光谱图

Fig.5 Fluorescence emission spectra of CdTe@SiO₂、CdTe@SiO₂@CS and CdTe@SiO₂@CS-DNA

本研究中所制备的复合荧光纳米粒子均具有较高的荧光强度、半峰宽窄、发光性能良好,如图 5 所示,分别为 CdTe@SiO₂、CdTe@SiO₂@CS 及 CdTe@SiO₂@CS-DNA (浓度均为 1 mg·mL⁻¹) 在激发波长为 300 nm 下的荧光发射光谱图。与壳聚糖交联引入氨基-NH₂ 后,荧光强度有所下降,但与 DNA 连接前后,仍具有较强的荧光性能。由图可知,连接 DNA 后,荧光半峰宽有所加大,这可能是由于复合荧光纳米粒子与 DNA 结合后粒径增大,表面结构发生变化,DNA 共轭结构引起粒子表面电荷发生变化所导致的。

2.4 CdTe 量子点及复合荧光纳米粒子的红外分析

图 6(a)是 CdTe 量子点的红外光谱图。3 000~3 500 cm⁻¹ 间宽峰为羧酸官能团中的-OH 伸缩振动峰,图中在 2 565 cm⁻¹ 附近无-SH 的特征峰,说明在量子点合成中,巯基乙酸的-SH 与 CdTe 量子点表面 Cd²⁺发生了配位,形成巯基乙酸稳定的 CdTe 量子点。

图 6(b)和(c)分别为接氨基前后复合荧光纳米粒子的红外光谱图,由图可知 1 099、799、468 cm⁻¹ 特

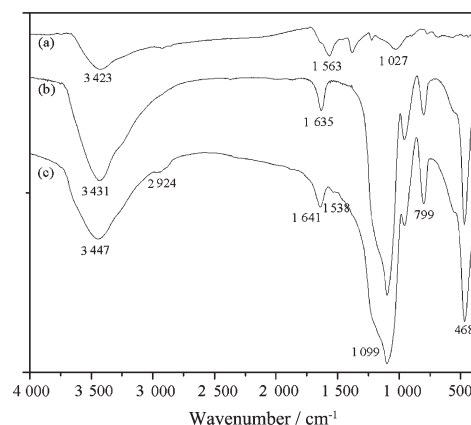


图 6 CdTe 量子点(a)、CdTe@SiO₂(b)及 CdTe@SiO₂@CS (c)复合荧光纳米粒子的红外光谱图

Fig.6 FTIR spectra of CdTe QDs(a)、CdTe@SiO₂(b)and CdTe@SiO₂@CS(c)

征峰表明了量子点表面 SiO₂ 壳层的形成^[21], 其中 1 099 cm⁻¹ 对应 Si-O-Si 反对称伸缩振动,468 cm⁻¹ 对应 Si-O-Si 弯曲振动。与图(b)相比,图(c)在 2 924、1 538 cm⁻¹ 处出现了新的吸收峰,应为壳聚糖的-CH₂ 伸缩振动峰和-NH₂ 弯曲振动峰。结果表明,壳聚糖已成功包裹在量子点外层,使粒子表面带有氨基基团。

2.5 CdTe 量子点及复合荧光纳米粒子的 ζ 电位分析

CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子如与 DNA 之间是通过静电作用进行吸附的,壳聚糖结构中大量的-NH₂ 使之带正电,粒子理论上应具有与壳聚糖一致的正电性。 ζ 电位测量中,CdTe 量子点浓度为 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,CdTe@SiO₂ 及 CdTe@SiO₂@CS 粒子浓度为 1 mg·mL⁻¹,缓冲液(buffer)为 Tris-HCl 溶液(1 mol·L⁻¹,pH=7.4)。测定粒子表面电荷结果如表 1 所示,CdTe 量子点及 CdTe@SiO₂ 的 ζ 电位值为负值,而包覆了壳聚糖的 CdTe@SiO₂@CS 的 ζ 电位为正值。由此可看出,CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子表面已接上氨基基团且电位为正值,从而可以通过静电作用与 DNA 进行吸附。

表 1 CdTe 量子点、CdTe@SiO₂ 及 CdTe@SiO₂@CS 复合纳米粒子 ζ 电位值

Table 1 ζ Potential of CdTe QDs、CdTe@SiO₂ and CdTe@SiO₂@CS

No.	Nanoparticles	ζ / mV
1	CdTe QDs	-46.2
2	CdTe@SiO ₂	-38.7
3	CdTe@SiO ₂ @CS	10.7

2.6 复合荧光纳米粒子对 DNA 吸附性能

CdTe@SiO₂ 及 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子与 DNA 进行静电吸附作用后产物离心分离, 通过测定上清液紫外吸收可得到不同粒子加入量对应的吸附 DNA 量, 如图 7 所示。由图可看出, 随着粒子加入量增加, CdTe@SiO₂ 对 DNA 几乎没有吸附作用, 而 CdTe@SiO₂@CS 所吸附的 DNA 量随之增加, 当粒子加入量达到 60 mg 时, 所加入 DNA 被完全吸附, 达到吸附平衡, 因而可计算出 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子的吸附能力为 $Q_{\max}=16.67 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。由此可见, 氨基修饰后的 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子对 DNA 具有良好的吸附作用。

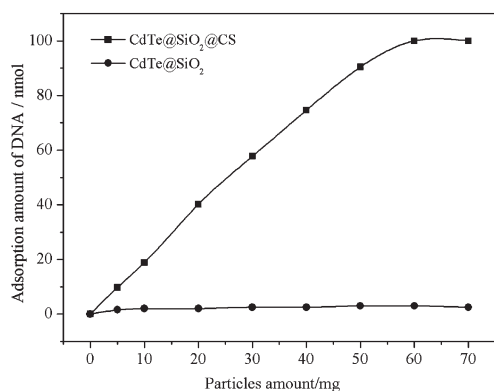


图7 CdTe@SiO₂ 及 CdTe@SiO₂@CS 复合荧光纳米粒子加入量对 DNA 的吸附量

Fig.7 Adsorption quantity of CdTe@SiO₂ and CdTe@SiO₂@CS

3 结 论

通过水相合成法合成了具有高荧光强度的 CdTe 量子点并通过反相微乳液法成功制备了表面氨基化、粒径均一的 CdTe@SiO₂@CS 核壳型复合荧光纳米粒子。结果表明, 复合荧光纳米粒子在 Tris-HCl 缓冲液中对 DNA 具有良好的吸附作用。富含 G 碱基 DNA 荧光纳米探针的成功制备对 G-四链体结构在肿瘤治疗和抗肿瘤药物设计开发研究中具有潜在应用价值。与此同时, 本研究中所制备的表面富含氨基的复合荧光纳米粒子也可与其他 DNA、蛋白质等生物活性分子特异性结合, 在生物探针、载药系统及基因诊断等生物医药领域显示出广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Ron G, Maya Z, Itamar W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, **47**: 7602-7625
- [2] Dong K Y, Tamil S, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, **127**: 4990-4991
- [3] Zhao Y, Hao C L, Ma W, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2011**, **115**: 20134-20140
- [4] Igor L M, Lorenzo B, Thomas P, et al. *Nano Lett.*, **2007**, **7**(6): 1741-1748
- [5] Aditya S, Chandra M P, Gajjala S, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2012**, **38**: 107-113
- [6] Weng J F, Song X T, Li L, et al. *Talanta*, **2006**, **70**: 397-402
- [7] Wang X, Lou X H, Guo Q C, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, **25**: 1934-1940
- [8] LIN Zhang-Bi(林章碧), SU Xing-Guang(苏星光), ZHANG Hao(张皓), et al. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2003**, **24**(2): 216-220
- [9] Han M Y, Gao X H, Su Jack Z, et al. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, **19**: 631-635
- [10] Manuela F F, Nikos C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, **396**: 229-240
- [11] Gary N P, Michael P H L, Stephen N. *Nature*, **2002**, **417**: 876-880
- [12] Akiyoshi H, Kouki F, Taisuke O, et al. *Nano Lett.*, **2004**, **4**(11): 2163-2169
- [13] YANG Wei-Hai(杨卫海), LI Wan-Wan(李万万), SUN Kang(孙康). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2008**, **29**(4): 681-685
- [14] ZHANG Bing-Bo(张兵波), GONG Xiao-Qun(宫晓群), LIN Ting-Ting(林婷婷), et al. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2009**, **30**(2): 246-249
- [15] Li Y B, Zhang H X, Guo C X, et al. *Chem. Res. Chinese Univ.*, **2012**, **28**(2): 276-281
- [16] Felipe J P, Luciano C, Osvaldo N O. *Biomacromolecules*, **2010**, **11**: 1897-1908
- [17] Liu W G, Sun S J, Cao Z Q, et al. *Biomaterials*, **2005**, **26**: 2705-2711
- [18] ZHANG Xue-Lian(张雪莲), LI Ya-Ru(李亚茹), PAN Yuan-Yuan(潘园园), et al. *Chem. Res. Appl.*(化学应用与研究), **2012**, **24**(5): 666-671
- [19] Yang Y H, Gao M Y. *Adv. Mater.*, **2005**, **17**: 2354-2357
- [20] Yu W W, Qu L H, Guo W Z, et al. *Chem. Mater.*, **2003**, **15**: 2854-2860
- [21] Wang Z Q, Zhou Y M, Yao Q Z, et al. *Appl. Surf. Sci.*, **2009**, **256**: 1404-1408