

功能化 CdS:Mn 荧光探针测定 hs-DNA

张 艺, 李紫薇, 何晓燕, 王兴磊

(伊犁师范学院化学与生物科学学院; 新疆凝聚态相变与微结构实验室, 新疆 伊宁 835000)

摘要:在油胺溶剂中, 利用溶剂热法于 160℃ 加热反应 12 h, 合成了 CdS:Mn 量子点, 并用巯基乙酸对合成的量子点进行了包裹。借助 X 射线衍射分析、傅里叶红外光谱、荧光谱图等测试方法对材料进行表征, 数据表明, 合成的 CdS:Mn 量子点 JCPDS# 为 80-0019, 在 CdS:Mn 量子点上成功修饰上了羧基(-COOH), CdS:Mn 晶体修饰前后主要发射峰从 526 nm 蓝移至 488 nm。以 COOH-CdS:Mn 功能化材料为荧光探针, 基于 DNA 对材料的荧光猝灭, 实现了对 DNA 的定量测定。实验在 pH = 6.6 条件下, 功能化荧光材料的荧光强度和鲑鱼精 DNA (hs-DNA) 的质量浓度呈线性关系, 线性方程为 $\Delta F = 78.69 - 0.179c$, 检出限为 0.053 mg/L, 相关系数 $R = 0.9988$, $RSD = 0.27\%$ 。

关键词: 鲑鱼精 DNA (hs-DNA); 羧基功能化; 荧光猝灭; 油胺

中图分类号: TB333

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2015)06-0180-03

Detection of hs-DNA by functional CdS:Mn fluorescent probe

ZHANG Yi, LI Zi-wei, HE Xiao-yan, WANG Xing-lei

(Collage of Chemistry and Biology Science, Yi Li Normal University, Xingjiang Laboratory of Phase Transitions and Microstructure in Condensed Matters, Yining 835000, China)

Abstract: The CdS:Mn quantum dots are synthesized by using solvothermal method in oleylamine at 160℃ for 12 hours. The as-prepared CdS:Mn quantum dots are investigated by X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The results show that the JCPDS# of CdS:Mn quantum dots is 80-0019. The carboxyl group (-COOH) is successfully introduced onto the surface of CdS:Mn quantum dots. The main peak of modified CdS:Mn quantum dots is blueshifted from 526 nm to 488 nm. It is found that DNA can quench the luminescence of the particles effectively. And there is a quantitative relation of luminescence quenching with the amount of nucleic acids. Under pH = 6.6, the fluorescence intensity of functionalized material (-COOH/CdS:Mn) is proportional to the concentration over the range of 0.30 - 0.90 mg/L for herring sperm DNA (hs-DNA). The linear regression equation is $\Delta F = 78.69 - 0.179c$. The corresponding detection limit, R and RSD are 0.053 mg/L, 0.9988 and 0.27%, respectively.

Key words: herring sperm DNA (hs-DNA); carboxyl-functionalization; luminescence quenching; oleylamine

荧光分析法常用于生物样品中某些成分含量的测定(如蛋白质、核糖核酸)^[1-5], 然而生物体系的特殊性和复杂性对生物荧光探针提出了很高的要求: ①所用的荧光探针对生物体的功能影响要小, 对所检测的生物无毒性; ②荧光探针应当具有较好的光稳定性, 不易被光漂白; ③所用的荧光探针要具有较宽的激发光谱。但目前常用的有机荧光染料的激发光谱都较窄, 荧光光谱又较宽且不对称, 出现拖尾, 最严重的缺陷是光化学稳定性差, 光漂白严重, 光解产物对生物体具有杀伤作用。而量子点作为生物荧光探针能较好地解决有机荧光染料遇到的问题^[6-11]。

大部分量子点在油相中合成并用到稳定剂, 合成条件苛刻等。限制了量子点在生物检测领域的应用, 所以对量子点的功能化变得至关重要。王伦等^[12]合成了 CdS, 在超声辐射下由引发剂 $K_2S_2O_8$ 引发 4-戊烯酸在 CdS 表面聚合, 得到了具有羧基的

CdS/PPA 复合粒子, 并利用表面的功能性基团(-COOH), 以此为荧光探针测定了蛋白质的含量。Rosenzweig 等^[13]制备了 CdS, 并用 L-半胱氨酸和硫代甘油对量子点进行包裹, 复合材料应用在环境中金属离子的检测。

利用溶剂热法在油胺溶剂中制备 CdS:Mn 晶体, 并用巯基乙酸(TGA)对材料进行功能化, 考察了各种因素影响, 在最佳实验条件下, 功能化 CdS:Mn 荧光强度与鲑鱼精 DNA (hs-DNA) 浓度之间的线性区间为 $\Delta F = 78.69 - 0.179c$, 检出限为 0.053 mg/L, 相关系数 $R = 0.9988$, $RSD = 0.27\%$, 数据表明, 该方法方便、灵敏度高。

1 实验

1.1 试剂与仪器

油胺(分析纯), 阿拉丁试剂公司生产; 四水硝

酸镉(分析纯),北京化工厂生产;四水氯化锰(分析纯),北京化学试剂厂生产;硫代乙酰胺(分析纯),天津市科密欧化学试剂开发中心生产;环己烷(分析纯),天津市北联精细化学品开发有限公司生产;95%乙醇(分析纯),天津市北联精细化学品开发有限公司生产;PBS 磷酸缓冲溶液(磷酸氢二钠和磷酸二氢钠混合水溶液配制)(分析纯),天津市科密欧化学试剂开发中心生产;100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鲑鱼精 DNA 水溶液(标准品),北京鼎国生物技术有限责任公司生产;所有试剂均没有进一步提纯,实验用水均为去离子水。

电子天平(FA2104N型),上海民桥精密科学仪器有限公司生产;移液器(CYIYE-QI型),上海求精生化试剂仪器有限公司生产;磁力加热搅拌器(79-1型),北京市永光明医疗仪器厂生产;数显鼓风干燥箱(GZX-9146MBE型),上海博讯实业有限公司医疗设备厂生产;高速台式离心机(TGL-16C型),上海安亭科学仪器厂生产。

1.2 CdS:Mn 量子点的制备

CdS:Mn 量子点的合成方法:取 20 mL 油胺于烧杯中,搅拌条件下加入 0.9 mmol 四水硝酸镉与 0.1 mmol 四水氯化锰的混合盐,再加 1.2 mmol 硫代乙酰胺,搅拌 20 min 后,转入到不锈钢反应釜中,加热 160 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 h。反应结束后,自然冷却至室温,釜底黄色沉淀即为合成的 CdS:Mn 量子点。稍微加热融化,再向其中加入适量的 95% 乙醇,使材料沉淀,然后转速为 8 000 r/min 离心 8 min,得到较纯净的 CdS:Mn 量子点。

1.3 巯基乙酸对 CdS:Mn 材料的修饰

称取 0.029 2 g CdS:Mn 样品,加到 5 mL 巯基乙酸和 20 mL 无水乙醇混合溶液中,超声 48 h 后用去离子水和无水乙醇离心清洗 3 次,离心清洗后的样品超声分散在 25 mL 去离子水中,得到 TGA-CdS:Mn 功能复合材料,样品浓度为 8.12×10^{-3} mol/L(以 CdS 的物质的量浓度计算),备用。

1.4 TGA-CdS:Mn 功能材料测定鲑鱼精 DNA

取 1 mL 8.12×10^{-3} mol/L TGA-CdS:Mn 样品定容至 10 mL,此时样品浓度为 8.12×10^{-4} mol/L。在 10 mL 容量瓶中分别加 1 mL TGA-CdS:Mn (8.12×10^{-4} mol/L) 样品,用磷酸缓冲溶液调 pH = 6.6,再分别加 30、50、70、90 μL 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鲑鱼精 DNA 水溶液,最后用蒸馏水定容至 10 mL(样品浓度为 8.12×10^{-5} mol/L)。25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 30 min 后,用荧光分光光度计测其荧光强度,以

360 nm 为激发波长,488 nm 为发射波长。

2 结果与讨论

用 XRD-6000 型 X-射线粉末衍射仪对样品进行分析,辐射源为 Cu, $\text{K}\alpha$ 辐射, $\lambda = 1.054\ 060\ \text{\AA}$,扫描范围 $2\theta = 20 \sim 80^{\circ}$;用 LS-55 型型荧光分光光度计测得样品的发射光谱和激发光谱;用 Prestige-21 型红外光谱仪(日本 Shimadzu 公司)测样品的红外吸收峰。

2.1 CdS:Mn 纳米晶的 XRD 表征

合成的 CdS:Mn 量子点 X 射线衍射图(XRD)如图 1 所示。与 CdS 标准谱图 JCPDS# 80-0019 的数据相吻合,表明成功合成了 CdS:Mn 量子点。且峰形较好,无明显杂质峰。

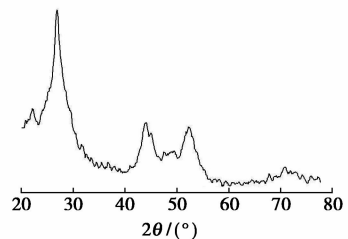


图 1 CdS:Mn 量子点的 XRD 图

2.2 红外谱图分析

TGA-CdS:Mn 量子点红外吸收谱图如图 2 所示。3 440 cm^{-1} 处吸收峰对应着 O—H 的伸缩振动峰,可能是样品吸收了空气中的水分,1 713 cm^{-1} 处是—COOH 基中羰基的伸缩振动峰。1 560 cm^{-1} 和 1 378 cm^{-1} 吸收峰为羧酸盐的特征吸收带,1 290 cm^{-1} 和 1 167 cm^{-1} 峰为—COOH 基中 C—O 伸缩振动峰,由此,可以确定巯基乙酸已成功修饰于 CdS:Mn 晶体表面上。

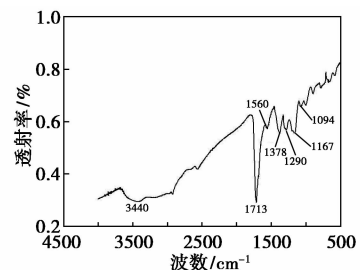


图 2 TGA-CdS:Mn 量子点的红外谱图

2.3 CdS:Mn 包裹前后荧光分析

CdS:Mn 量子点荧光谱图如图 3 所示。以 360 nm 为激发波长时,CdS:Mn 量子点的主要发射峰在 526 nm。当用巯基乙酸对量子点进行修饰后,

TGA-CdS:Mn 的主要发射峰蓝移至 488 nm。发射峰发生蓝移的原因是禁带宽度变大,使得主要发射峰向短波方向移动。

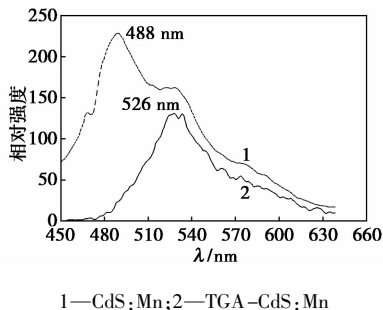
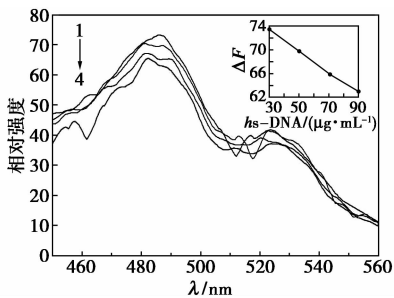


图 3 CdS:Mn 量子点包裹前后的荧光谱图

2.4 鲑鱼精 DNA 的测定

hs-DNA 体系荧光光谱如图 4 所示。谱线 1~4 给出了不同质量浓度 hs-DNA 存在时,体系荧光强度的变化。结果表明, pH = 6.6, $\lambda_{em}/\lambda_{ex} = 489/360$ nm,体系的荧光强度随 hs-DNA 质量浓度的增加呈线性降低。CdS:Mn 浓度为 8.12×10^{-5} mol/L。插图为 TGA-CdS:Mn 荧光强度与 hs-DNA 质量浓度之间的线性关系,由插图可知,在浓度为 0.30~0.90 mg/L 范围内, ΔF 与 hs-DNA 质量浓度呈良好的线性关系,线性方程为 $\Delta F = 78.69 - 0.179c$,检测限为 0.053 mg/L, RSD 为 0.27%。相关系数 $R = 0.9988$ 。宽的线性范围、低的检测限表明该方法对 DNA 的定量分析效果良好。



1—0.3 mg/L; 2—0.5 mg/L; 3—0.7 mg/L; 4—0.9 mg/L

图 4 hs-DNA 体系荧光光谱

2.5 pH 的选择

考察了 pH 为 4.6、5.6、6.6、8.6、9.6 和 10.6 6 种不同缓冲溶液对体系荧光强度的影响,结果如图 5 所示。在 10 mL 容量瓶中分别加 1 mL TGA-CdS:Mn 样品(浓度为 8.12×10^{-5} mol/L), 1 mL 鲑鱼精 DNA,用 PBS 缓冲溶液调 pH,最后蒸馏水定容。由图 5 可知,体系的荧光强度随 pH 的增加略有增强, pH 为 6.6 时,荧光最强,当 pH > 6.6 时,体系的荧光强度反而降低。故选择 pH 为 6.6 的测定体系。

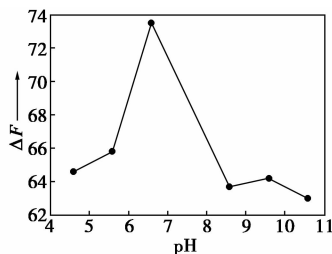


图 5 酸度对体系荧光强度的影响

2.6 共存物的干扰

当 hs-DNA 质量浓度为 0.50 mg/L 时,不同质量浓度的干扰物质对测定的影响如表 1 所示。由表 1 可知,大部分共存物质对 hs-DNA 的分析的干扰都很小。表明该方法有较好的选择性。

表 1 共存物质对测定的干扰

干扰物质	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	相对荧光强度/%
Hg(II), Cl ⁻¹	5.0	-0.9
牛血清蛋白	2.0	-3.1
葡萄糖	2.0	-1.5
Zn(II), NO ₃ ⁻	5.0	1.3
Cu(II), SO ₄ ⁻	5.0	0.9

2.7 温度的影响

体系研究了室温(冬天)、25℃和 38℃ 3 种温度对测定的影响,体系在 25℃ 反应 30 min 后,荧光强度达到最小值且稳定,当温度低或高时,体系出现沉淀。所以采用的条件是 25℃ 和 30 min。

3 结论

在油胺溶剂中,采用溶剂热法成功制备了 CdS:Mn 晶体,并用巯基乙酸对材料进行了功能化修饰,利用巯基乙酸上-SH 与金属离子间的键合作用,合成出羧基功能化的 TGA-CdS:Mn 材料。不仅增大了材料的水溶性还使材料具有生物相容性,据此建立了与鲑鱼精 DNA 之间的荧光探针,利用荧光猝灭法,对核酸进行了定量测定,灵敏度和选择性较好。该方法可以用于生物样品的测定。生物相容性的量子点将在生物领域具有巨大的应用前景,可以应用在毒效测定、农药残留等领域。

参考文献

[1] Xu Y, Liu Y, Xia X, et al. Fluorescent probe-based lateral flow assay for multiplex nucleic acid detection[J]. Anal Chem, 2014, 86 (12): 5611-5614.

效应扣除背景。

1.3 样品前处理

准确称取经阴干、研磨、过 120 目筛的土壤样品 0.250 0 g 于消解罐中,用少量去离子水浸湿后加入硝酸 5 mL、盐酸 3 mL、氢氟酸 2 mL,放入微波消解装置中按表 1 所示消解程序消解^[9]。消解完毕,消解罐冷却后加入 1 mL 高氯酸,转移至电子控温电加热器于 140℃ 加热飞硅,蒸至样液呈白色或淡黄色黏稠状。消解罐冷却后用少量温热 5% 硝酸溶液将罐内黏稠物及残液转移至 50 mL 比色管中,用 5% 硝酸定容至标线,摇匀待测,同时进行样品空白实验。

表 1 微波消解程序

步骤	升温时间/min	功率/W	温度/℃	保持时间/min
1	5	800	室温 ~ 110	4
2	4	1000	120 ~ 150	4
3	5	1500	150 ~ 190	15

1.4 标准溶液配制和样品测定

将 100 mg/L 锡标准液用 5% 硝酸溶液稀释成质量浓度为 0.00、10.0、20.0、30.0、60.0、80.0 μg/L 标准系列,在上述仪器工作条件下进行测定,以吸光值对应质量浓度绘制标准曲线,线性回归方程为 $Y=0.00145X+0.002$,相关系数 $r=0.9995$ 。

按标准系列绘制时的仪器工作条件和方法步骤分别测定样品和样品空白,将测得的样品吸光度值减去空白吸光度值后,由标准曲线得样品中锡的质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 微波消解条件优化

微波消解仪是密闭的高温高压系统,能使氧化剂的氧化能力得以提高,使待测组分消解更彻底且样品无挥发,参加消解的酸用量较少,解决了电热板消解法用酸量消耗多、消解时间长和操作繁琐的问题。微波消解常用的酸包括硝酸、氢氟酸、盐酸和过氧化氢等。土壤有机物质量分数较高,加入过氧化氢后反应激烈,通常需放置一段时间;如微波消解时加入高氯酸破坏有机物,高氯酸氧化性极强,与有机物混合有爆炸的危险,在微波消解中应尽可能不使用。因此,采用硝酸 + 氢氟酸 + 盐酸体系消解土壤样品,消解后加入高氯酸进行飞硅。

微波消解土壤时,采用梯度升温程序中步骤 1、步骤 2 缓慢升温并进行短暂保持,步骤 3 的温度和时间设计较为重要,温度过低或保持时间过短会使样品测定结果的准确度和精密度较差。实验结果表明,当步骤 3 中温度设置小于 180℃ 时,土壤标准样品的测定值偏低;当温度设置为 190 ~ 200℃ 时,样品消解完全,标准样品测定值较准确。

2.2 灰化温度和原子化温度的选择

较高的灰化温度有助于共存物质的蒸发,降低背景吸收,提高灵敏度;较低的原于化温度又有利于延长石墨管的使用寿命。以 30 μg/L 锡标准溶液进行灰化温度和原于化温度的选择,灰化温度在 500 ~ 1 200℃ 之间进行选择,原于化温度在 1 500 ~ 2 000℃ 之间进行选择,实验结果表明,灰化温度在

(上接第 182 页)

- [2] Juskowiak B. Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(9):3157-3176.
- [3] 廉淑芹,徐洲,郁兴太,等. 固定波长同步荧光法测定生物样品中蛋白含量[J]. *分析科学学报*, 2012, 28(6):870-873.
- [4] 吴彤,彭孝军,胡明明,等. 一种高效灵敏的 DNA 荧光探针的合成及应用[J]. *高等学校化学学报*, 2012, 33(7):1407-1412.
- [5] 胡悦立,孙玉绣,李妍. 荧光探针组合技术研究进展[J]. *现代化工*, 2013, 33(8):29-32.
- [6] Pan X B, Li Z, Wang T L, et al. Study of polycation-capped Mn: ZnSe quantum dots as a novel fluorescent probe for living cells[J]. *Journal of Fluorescence*, 2014, 24(3):767-774.
- [7] 陈启凡,王文星,葛颖新,等. 水热法合成 CdTe 量子点及其与蛋白质连接作为生物荧光探针的研究[J]. *分析实验室*, 2007, 26

(3):1-5.

- [8] 代昭,张纪梅,许世超,等. 新型量子点修饰分子灯塔探针及其作为 DNA 传感器应用[J]. *现代化工*, 2008, 28(3):47-51.
- [9] 赵丹华,李永新,朱昌青. L-半胱氨酸包覆纳米 ZnS 荧光探针在测定人血清中蛋白质的应用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(7):1318-1321.
- [10] 邹函君,曹渊,徐彦芹,等. 荧光量子点及其在生物检测中的应用[J]. *化学通报*, 2012, 75(3):209-215.
- [11] Wang L, Wang L Y, Zhu C Q, et al. Preparation and application of functionalized nanoparticles of CdS as a fluorescence probe[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 468(1):35-41.
- [12] 陈红旗,梁阿妮,许轶,等. CdS/PPA 纳米溶胶荧光探针同步荧光光度法测定水溶液中牛血清蛋白[J]. *应用化学*, 2008, 25(12):1484-1486.
- [13] Chen Y F, Rosenzweig Z. Luminescent CdS Quantum dots as selective ion probes[J]. *Anal Chem*, 2002, 74:5132-5138. ■