

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00632

# CdS 量子点制备与单增李斯特菌抗体偶联的研究

王洪江 柳婷 谢跻 粟婉媛 郭爱玲\* 蔡朝霞

(华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

**摘要** 以  $\text{CdCl}_2$  和  $\text{Na}_2\text{S}$  为原料, 以巯基乙酸为稳定剂, 采取水相合成方法制备了 CdS 量子点。结果表明, 合成 CdS 量子点最佳条件是: 作用时间 3 h,  $[\text{Cd}^{2+}]$   $[\text{S}^{2-}]$  为 2:1, 50  $\mu\text{L}$  稳定剂, pH 8.0, 反应温度 30  $^\circ\text{C}$ 。通过 EDC·HCl 和 NHS 的作用, 成功地将单增李斯特菌抗体 IgG 与 CdS 量子点偶联。偶联后的 IgG-CdS 荧光强度显著增强, 为偶联前的 4 倍。血清凝集反应和直接免疫荧光实验证明, 偶联 CdS 量子点的单增李斯特菌抗体的特性没有发生变化, 在荧光显微镜下可快速灵敏地检测出单增李斯特菌。本方法特异性强、稳定性和重复性高, 可用于食品中致病菌的快速检测。

**关键词** 量子点; 单增李斯特菌; 偶联; 荧光强度

## 1 引言

CdS 为 II-VI 型量子点, 是常见核壳型量子点的主要组成部分<sup>[1]</sup>。CdS 量子点具有良好的光学性质, 合成发射不同颜色荧光的水溶性 CdS 量子点对于多色生物标记和核壳型量子点合成具有重要意义。有关 CdS 量子点的制备的研究较多<sup>[2~5]</sup>, 且多采用化学液相法。该方法具有反应条件温和、易控制, 可制得组成均匀、纯度高的纳米材料等优点。

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是一种能使人 and 动物患脑膜炎、败血症以及流产等疾病的致病菌, 死亡率极高。检测单增李斯特菌的常规方法虽然准确性好, 但所需时间长, 操作繁琐, 不能满足当前食品安全快速检测的要求。分子生物学方法快速、灵敏、特异性强, 但成本较高, 且要求较高的技术水准; 大型仪器分析方法<sup>[6]</sup>如 VITEK (全自动细菌鉴定/药敏系统)、MIS (微生物鉴定系统) 等, 虽然快速准确、检测量大, 但仪器费用颇高, 一般检测单位和食品企业不具备这种条件; 免疫学中 ELISA 方法, 操作简便、快速、灵敏, 因而广泛应用于致病菌的检测。

本研究利用纳米材料的光学性质和免疫学反应的特异灵敏性, 进行了 CdS 量子点与单增李斯特菌抗体偶联的研究, 对单增李斯特菌进行了快速检测。本方法适用于食品安全的致病菌快速检测。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

DF-101S 智能集热式恒温加热磁力搅拌器 (上海东玺制冷仪器设备有限公司); UV-1700 紫外分光光度计、RF-5301 荧光分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); JEM-2010 透射电子显微镜 (日本 JEOL LTD 公司)、Nikon 80i 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司)。

单增李斯特菌抗体 (本实验室制备); 巯基乙酸 (TGA)、硫代乙酰胺 (TAA)、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  和 KOH (分析纯, 国药集团); *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl, 分析纯, 上海晶纯试剂有限公司)。水为去离子水。

### 2.2 CdS 量子点的合成及条件优化

参照并改进文献 [7] 的方法, 合成 CdS 量子点。在一定温度下, 在 100 mL 三口烧瓶中加入 50 mL 去离子水和 1 mL 0.0585 mol/L  $\text{CdCl}_2$  溶液, 充氮气除氧 20 min 后加入 TGA, 调节 pH 值, 继续充氮气除氧 10 min 后加入 1 mL 0.0585 mol/L  $\text{Na}_2\text{S}$  溶液, 继续通氮气除氧密闭搅拌后即得水溶性 CdS 量子点溶

2009-09-23 收稿; 2009-12-30 接受

\* E-mail: guoailing@mail.hzau.edu.cn

胶。稀释后测其紫外可见吸收光谱和荧光发射光谱。按表 1 所列条件合成 CdS量子点。

表 1 CdS量子点合成的反应条件

Table 1 Reaction conditions of CdS quantum dots (QDs) synthesized

氯化镉 Cadmium chloride (mL)	硫化钠 Sodium sulfide (mL)	巯基乙酸 Thioglycolic acid ( $\mu$ L)	pH 值 pH value	反应温度 Reaction temperature ( $^{\circ}$ )	反应时间 Reaction time (h)
1	1	100	10	30	4
1	2	100	10	30	4
2	1	100	10	30	4
1	1	50	10	30	4
1	1	150	10	30	4
1	1	100	8	30	4
1	1	100	9	30	4
1	1	100	10	40	4
1	1	100	10	50	4
1	1	100	10	30	1
1	1	100	10	30	2
1	1	100	10	30	3
1	1	100	10	30	5

### 2.3 CdS量子点的表征分析

(1)透射电子显微镜 (TEM)表征分析:取少量 CdS溶液,用于 TEM 观察;(2)紫外吸收分析:取少量 CdS溶液进行紫外扫描分析,扫描波长范围为 200~600 nm;(3)荧光光谱分析:将 CdS量子点溶液进行荧光光谱扫描。扫描范围 220.0~800.0 nm,激发波长:350.0 nm,激发狭缝:5.0 nm,发射狭缝:5.0 nm。

### 2.4 CdS量子点与单增李斯特菌抗体 IgG偶联

参照并改进文献 [8] 的方法。取水溶性量子点 磷酸盐缓冲液 30  $\mu$ L,加入 20  $\mu$ L 60 g/L EDC·HCl 溶液,振荡混匀,再加入 100  $\mu$ L 0.15 g/L NHS 溶液,20  $^{\circ}$ C 温和搅拌 0.5 h,在持续搅拌下与含 0.14 mg单增李斯特菌抗体 IgG的磷酸盐缓冲溶液混合、密闭,20  $^{\circ}$ C 继续搅拌 0.5 h。

### 2.5 偶联 CdS量子点单增李斯特菌抗体的特性测定

(1)血清凝集实验:在洁净载玻片上滴加一滴偶联 CdS量子点的单增李斯特菌抗体溶液后,加适量的单增李斯特菌菌体抗原,轻轻晃动载玻片使二者混匀,观察载玻片上是否有凝集的细小颗粒。待载玻片上的反应物自然干燥后用荧光显微镜观察。(2)直接荧光免疫实验:在洁净载玻片上滴加适量的单增李斯特菌灭活抗原,自然干燥,在 -20  $^{\circ}$ C 用丙酮固定 10~15 min,加偶联 CdS量子点的单增李斯特菌抗体溶液,37  $^{\circ}$ C 温育 1 h,取出玻片用蒸馏水洗涤,再经 0.1%伊文氏兰染色、洗涤,完全干燥后在荧光显微镜下进行检测。

## 3 结果与讨论

### 3.1 CdS量子点的表征分析

本实验制备的 CdS量子点在 TEM 下观察 (图 1)以单分散形式存在,分散性良好,颗粒均匀呈球形,直径约 5 nm;UV-vis分析 (图 2)表明,在 400 nm 处有较强的吸收峰。

### 3.2 反应时间对量子点粒径和荧光光谱的影响

随着制备量子点反应时间延长,CdS量子点的紫外吸收产生逐渐红移现象。量子点的制备反应时间对量子点的荧光强度有一定影响。当反应时间为 3 h时,合成 CdS量子点的荧光强度最强;反应时间为 1 h时,CdS量子点的荧光强度最弱;当反应时间为 2,4和 5 h时,合成 CdS量子点的荧光强度比较接近,处于中等水平。

### 3.3 $[Cd^{2+}]$ 与 $[S^{2-}]$ 比例对制备 CdS量子点的影响

合成 CdS量子点的  $[Cd^{2+}]$ 与 $[S^{2-}]$ 的比例不同,其紫外吸收曲线也有差异。当  $[Cd^{2+}]/[S^{2-}] = 1/1$ 和  $2/1$ 时,在 400 nm 处有较强的紫外吸收峰;当  $[Cd^{2+}]/[S^{2-}] = 1/2$ 时,在 430 nm 处有较强的紫外

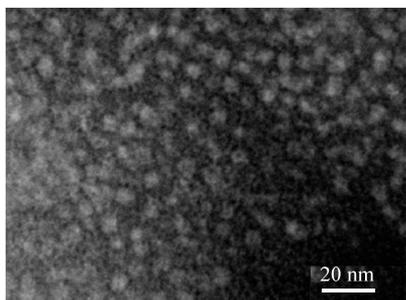


图 1 CdS量子点的透射电子显微镜照片

Fig 1 TEM photograph of CdS QDs

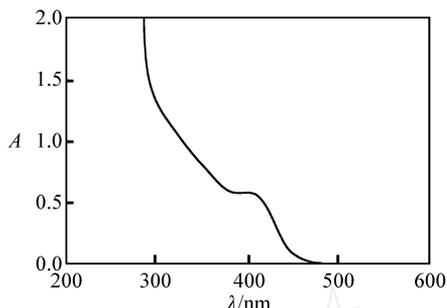


图 2 CdS量子点的紫外吸收光谱

Fig 2 UV-vis absorption spectrum of CdS QDs

吸收,量子点的紫外吸收曲线很明显地发生了红移。

由表 2 可知,当  $[Cd^{2+}] / [S^{2-}]$  的比例不同时,制备的 CdS 量子点荧光强度也有很大差别。当  $[Cd^{2+}] / [S^{2-}] = 2:1$  时, CdS 量子点荧光强度最大,约为  $[Cd^{2+}] / [S^{2-}] = 1:2$  的 13 倍,  $[Cd^{2+}] / [S^{2-}] = 1:1$  的 5 倍; 当  $[Cd^{2+}] / [S^{2-}] = 1:2$  时, CdS 量子点的荧光吸收峰发生明显红移效应。  $Cd^{2+}$  过量更易得到粒径小、荧光强度高的 CdS 量子点。这是由于  $Cd^{2+}$ 、 $S^{2-}$  等在粒子表面发生了复杂的吸附作用。根据 Fajans 规则<sup>[9]</sup>, 构晶离子将优先吸附在粒子表面。 CdS 量子点表面通过静电吸附这种配合物起到稳定作用。而  $S^{2-}$  过量时,不能形成这样的包覆层。

表 2  $[Cd^{2+}] / [S^{2-}]$  不同比例制备的 CdS 量子点荧光强度Table 2 Fluorescence intensity of synthesizing CdS QDs at different ratio of  $[Cd^{2+}]$  to  $[S^{2-}]$ 

$[Cd^{2+}] / [S^{2-}] = 1:1$		$[Cd^{2+}] / [S^{2-}] = 1:2$		$[Cd^{2+}] / [S^{2-}] = 2:1$	
波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity	波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity	波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity
555	18.731	693	4.872	550	91.915
558	19.491	696	6.807	554	93.511
561	19.957	699	7.569	557	94.513
564	19.660	702	7.008	560	93.040
567	19.024	705	5.150	563	91.318

### 3.4 稳定剂对 CdS 量子点的影响

胶体法制备量子点常用的稳定剂有六偏磷酸钠 (HMP)、聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP)<sup>[10,11]</sup> 及 TGA 等巯基类化合物<sup>[12]</sup>。本实验以 TGA 为稳定剂。随着稳定剂含量的增加, CdS 量子点紫外吸收曲线发生红移。由表 3 可知, 添加不同体积 TGA, 合成的 CdS 量子点在 550 ~ 600 nm 之间有荧光吸收, 但荧光强度有很大的影响。加入 50  $\mu$ L TGA 制备的 CdS 量子点荧光强度最强, 约是加入 100 和 150  $\mu$ L TGA 的 6 倍和 18 倍。

表 3 不同体积巯基乙酸制备的 CdS 量子点荧光强度

Table 3 Fluorescence intensity of synthesizing CdS QDs at different volume of thioglycolic acid (TGA)

50 $\mu$ L TGA		100 $\mu$ L TGA		150 $\mu$ L TGA	
波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity	波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity	波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity
548	125.453	555	17.887	565	6.442
551	126.731	558	18.731	568	6.849
554	127.429	561	19.491	571	7.202
558	123.451	564	19.660	574	6.979
560	121.626	567	19.024	578	6.391

### 3.5 pH 值对合成 CdS 量子点的影响

由表 4 可知, 当体系中的 pH 值升高时, 量子点的荧光吸收略微出现红移, 而荧光强度则急剧降低。结果表明, 在 pH 8 时, CdS 量子点的荧光强度最强, 约是 pH 9 和 pH 10 时的 14 倍和 22 倍。随着 pH 值降低, CdS 量子点的荧光逐渐增强。这是由于在较低的 pH 下, 粒子表面高度质子化的硫化钠分子减少了粒子间的氢键作用且使粒子 电位增加<sup>[13]</sup>, 从而提高了粒子的分散性。

表 4 不同 pH 条件下制备的 CdS量子点荧光强度

Table 4 Fluorescence intensity of synthesizing CdS QDs at different pH

pH 8		pH 9		pH 10	
波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity	波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity	波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity
525	409.575	543	28.441	555	18.731
528	414.744	549	30.173	558	19.491
531	418.972	561	32.294	561	19.957
534	416.528	572	30.239	564	19.660
536	414.213	578	28.549	567	19.024

### 3.5 温度对合成 CdS量子点的影响

在 40 °C 下,制备的 CdS量子点在 400 nm 处有较强的紫外吸收,在 30 °C 和 50 °C 条件下制备的 CdS量子点紫外吸收发生红移。当制备量子点的温度升高时,量子点的荧光吸收峰逐渐红移。如表 5 所示,反应温度越低,生成量子点的颗粒越小,对应的荧光发射峰波长越小;反之,温度越高,生成量子点的颗粒越大,对应的荧光发射峰波长越大。当反应温度为 30 °C 时,其荧光吸收峰在 560 nm 处;反应温度为 40 °C 时,其荧光吸收峰在 590 nm 处;如果将反应温度升到 50 °C,其荧光吸收峰转移到 700 nm 附近。量子点的荧光强度随着温度的升高有所降低,30 °C 时合成的量子点荧光强度最强,40 °C 和 50 °C 时合成的量子点荧光强度较为接近,但均比 30 °C 时弱。

表 5 不同温度条件下制备的 CdS量子点荧光强度

Table 5 Fluorescence intensity of synthesizing CdS QDs at different temperature

30		40		50	
波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity	波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity	波长 Wavelength (nm)	强度 Intensity
555	18.73	553	11.62	694	9.13
558	19.49	559	12.77	697	13.11
561	19.96	578	14.39	700	14.48
564	19.66	600	12.54	703	12.03
567	19.02	609	11.54	706	8.32

### 3.6 CdS-IgG 的表征分析

由图 3 可见,偶联单增李斯特菌抗体 IgG 的 CdS量子点仍以单分散形式存在,形态均匀、呈球形,粒径大小约为 8 nm,较 CdS量子点稍大。

单增李斯特菌抗体 IgG 的紫外吸收光谱(图 4)显示,在 280 nm 处出现的强吸收峰,为蛋白质的特征吸收峰。CdS-IgG 偶联后只在 410 nm 处有较强的紫外吸收峰,而蛋白质特征吸收峰则消失。

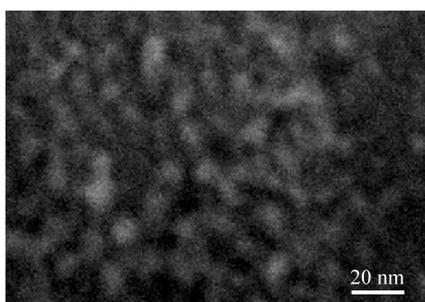


图 3 CdS-IgG透射电子显微镜图片

Fig 3 TEM photograph of CdS-IgG

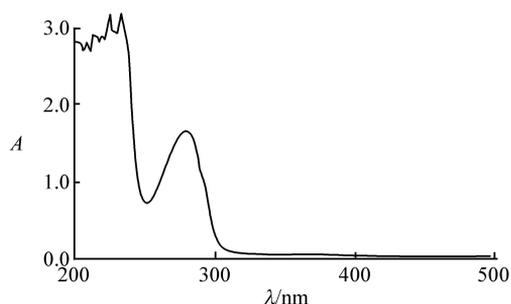


图 4 抗体 IgG紫外吸收光谱

Fig 4 UV-vis absorption spectrum of antibody IgG

如图 5 所示,在 682 ~ 715 nm 处 CdS量子点和抗体 IgG 蛋白以及偶联后的 CdS-IgG 均有荧光吸收峰,其中 CdS量子点的荧光强度比 IgG 蛋白略高。但经过偶联后,CdS-IgG 的荧光强度明显增强,约是单独存在时的 4 倍。IgG 偶联的 CdS量子点荧光光谱与偶联前水溶性量子点相比,发射波长 ( $\lambda_{em}$ ) 几乎没有变化,说明 CdS-IgG 保持了原有水溶性量子点的荧光发射特性。

### 3.7 偶联 CdS量子点的单增李斯特菌抗体特性的测定

**3.7.1 血清凝集实验** 对偶联 CdS量子点的单增李斯特菌抗体进行血清凝集实验发现,在抗体与抗原接触混匀后约 30 s,肉眼可清晰看见有固体小颗粒形成,说明抗原与抗体发生了凝集反应,偶联量子点后的抗体性质没有发生变化。在对反应样品进行荧光显微镜镜检时,可清楚地看到凝集成团的菌体表面有荧光出现(图 6)。

**3.7.2 直接荧光免疫实验** 用直接免疫荧光实验对单增李斯特菌进行检测结果显示,加入有荧光 CdS量子点标记的单增李斯特菌抗体反应后,载玻片上的菌体有特异性黄绿色荧光出现(图 7)。

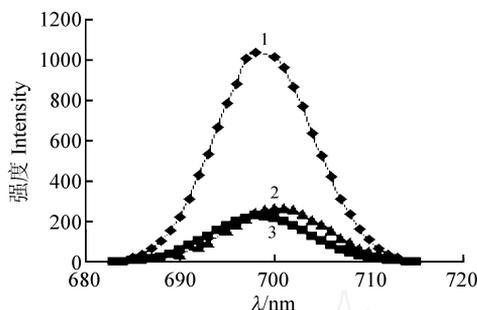


图 5 CdS量子点、IgG抗体和 CdS-IgG荧光光谱

Fig 5 Fluorescence spectra of CdS QDs, antibody IgG and CdS-IgG

1. CdS-IgG; 2. CdS; 3. IgG

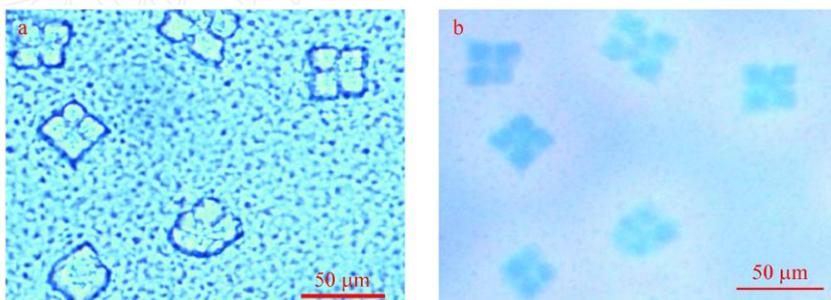


图 6 血清凝集实验显微镜照片 (a)和荧光显微镜照片 (b)

Fig 6 Microscope photograph (a) and fluorescence microscope photograph (b) of SAT

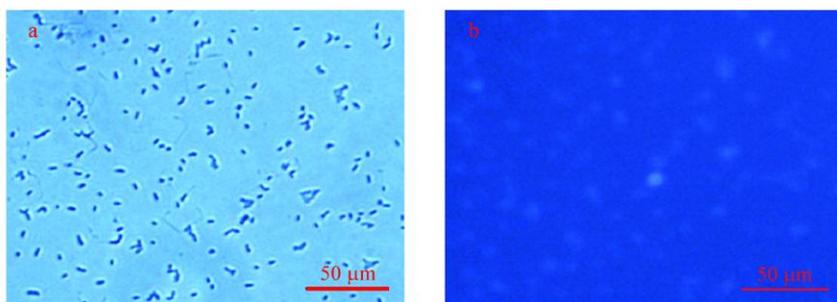


图 7 直接免疫荧光实验显微镜照片 (a)和荧光显微镜照片 (b)

Fig 7 Microscope photograph (a) and fluorescence microscope photograph (b) of direct immunofluorescence

## 4 结 论

通过 EDC·HCl 与 NHS 的作用,使单增李斯特菌抗体 IgG 与 CdS 量子点偶联稳定,体系的荧光峰位置没有发生变化,但荧光强度显著增强,偶联 CdS 量子点的单增李斯特菌抗体的荧光强度是偶联前的 4 倍。结果证明:巯基能与硫化镉产生较强的相互作用。当修饰剂与硫化镉作用加强时,会导致硫化镉纳米微粒的荧光强度增强,这与文献 [14] 报道的结果一致。通过血清凝集反应和直接免疫荧光实验证明,偶联 CdS 量子点的单增李斯特菌抗体的特性没有发生变化,在荧光显微镜下可快速灵敏地检测出单增李斯特菌。由于偶联 CdS 量子点的单增李斯特菌抗体荧光强度显著增强,只要样品中有极少量的单增李斯特菌在荧光显微镜下就会被抗体捕获到并发出荧光。

## References

- 1 TENG Feng (滕枫), TANG Ai-Wei (唐爱伟), GAO Yin-Hao (高银浩), LANG Chun-Jun (梁春军), XU Zheng (徐征), WANG Yong-Sheng (王永生). *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), **2005**, 25(5): 651 ~ 654
- 2 Pattabi M, Amma B S. *J. Solar Energy Materials & Solar Cells*, **2006**, 90: 2377 ~ 2383
- 3 ZHANG Ai-Wei (张爱梅), YAN Wei (闫炜), WANG Huai-Sheng (王怀生). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(4): 444 ~ 448
- 4 Ghosh P K, Maiti U N, Chattopadhyay K K. *J. Materials Letters*, **2006**, 60(23): 2881 ~ 2885
- 5 YANG Yi (羊亿), SHEN De-Zhen (申德振), YU Guang-You (于广友), ZHANG Ji-Ying (张吉英), YANG Bao-Jun (杨宝均), FAN Xi-Wu (范希武). *Chinese Journal of Luminescence* (发光学报), **1999**, 20(3): 251 ~ 253
- 6 GUO Ai-Ling (郭爱玲), ZHENG Hua-Ying (郑华英), MA Ai-Min (马爱民), YU Gong-Bao (余功保), LÜ Jun (吕均), QN Qiao-Ling (秦巧玲), WANG Zhen (王震). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(5): 700 ~ 702
- 7 JIANG Cha (蒋茶), XU Shu-Kun (徐淑坤), YANG Dong-Zhi (杨冬芝), ZHANG Feng-Hua (张凤华), WANG Wen-Xing (王文星). *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析实验室), **2007**, 26(5): 1 ~ 4
- 8 Hua X F, Liu T C, Cao Y C, Liu B, Wang H Q, Wang J H, Huang Z L, Zhao Y D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 386(6): 1665 ~ 1671
- 9 Frank S, William R. *Journal of the American Chemical Society*, **1937**, 59(2): 354 ~ 357
- 10 CAO Wei-Liang (曹维良), ZHANG Kai-Hua (张凯华), ZHANG Jing-Chang (张敬畅). *Chinese Journal of Inorganic Chemistry* (无机化学学报), **2002**, 18(10): 997 ~ 1002
- 11 Kundu M, Khosravi A A, Kulkarni S K. *Journal of Materials Science*, **1997**, 32(1): 245 ~ 258
- 12 Gaponik N, Talapin D V, Rogach A L, Rogach K, Hoppe E V, Shevchenko A, Komowski A, Eychmuller, Weller H. *Journal of Physical Chemistry B*, **2002**, 106(29): 7177 ~ 7185
- 13 ZHANG Yu (张宇), ZHANG Jun-Xiang (张俊祥), FU De-Gang (付德刚), WANG Yi-Hong (王怡红), LIU Ju-Zheng (刘举正), LU Zu-Hong (陆祖宏). *Chinese Journal of Inorganic Chemistry* (无机化学学报), **1999**, 15(5): 595 ~ 600
- 14 CHEN Xun-Dong (陈旭东), WANG Xin-Bo (王新波), FAN Li (范莉), YANG Da-Cheng (杨大成). *Acta Chimica Sinica* (化学学报), **2005**, 63(17): 1600 ~ 1606

## Cadmium Sulfate Quantum Dots Synthesized and Coupled with Listeria Monocytogenes Antibody IgG

WANG Hong-Jiang, LIU Ting, XIE Ji, SU Wan-Yuan, GUO Ai-Ling\*, CAI Zhao-Xia  
(College of Food Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** The CdS quantum dots were synthesized by using the precursors including CdCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>S and thioglycolic acid (TGA) as stabilizing agent in aqueous solution. The optimal conditions for synthesis of CdS quantum dots were as follows: reaction time of 3 h, 2:1 of ratio of [Cd<sup>2+</sup>] to [S<sup>2-</sup>], TGA volume of 50 μL, system pH value of 8.0 and reaction temperature of 30 °C for preparing the CdS quantum dots. The Listeria monocytogenes antibody IgG was successfully coupled to the CdS quantum dots by using the EDC · HCl and the NHS as coupling reagents. The fluorescence intensity of Listeria monocytogenes antibody IgG coupled with the CdS quantum dots was enhanced significantly and was four times of that coupled before. The results of serum agglutination reaction and direct immunofluorescence test showed that the characteristics of Listeria monocytogenes antibody coupled with CdS quantum dots did not change, and the Listeria monocytogenes could be detected quickly and sensitively by fluorescence microscope. This method can be effectively used in the rapid detection of pathogens in the food because of its high specificity, stability and repeatability.

**Keywords** Quantum dots; Listeria monocytogenes; Coupling; Fluorescence intensity

(Received 23 September 2009; accepted 30 December 2009)