

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01383

## 量子点银增强可视化检测方法的研究与应用

许国峰<sup>1</sup> 李慧<sup>1</sup> 张翠<sup>1</sup> 孙子因<sup>2</sup> 钟文英<sup>\* 1</sup> 许丹科<sup>\* 2</sup> 陈洪渊<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(中国药科大学分析化学教研室, 南京 210009) <sup>2</sup>(南京大学化学化工学院, 南京 210093)

**摘要** 通过制备链霉亲和素修饰的 CdTe 量子点探针, 建立了基于量子点探针的银增强显色可视化检测方法, 并结合蛋白质芯片分析技术, 将此方法应用于反相蛋白芯片的分析检测。以人 IgG 测定为模式, 在醛基片上固定人 IgG, 加入 10 ng Bio-羊抗人 IgG 及 CdTe-SA 探针, 银增强显色 15 min。结果显示, 人 IgG 样品量在 100 pg ~ 1.6 ng 范围内, 其对数值与信号灰度值呈良好的线性关系 ( $r = 0.997$ ), 检出限为 50 pg。本方法可实现微量蛋白的灵敏检测, 具有操作简单, 对仪器要求低, 结果可视化等特点。

**关键词** 量子点探针; 银增强显色; 可视化; 蛋白芯片

### 1 引言

近年来, 随着纳米技术的飞速发展, 量子点作为一种新兴的纳米材料, 因其具有优良、独特的光电性质在诸多领域, 尤以生命科学为代表, 发挥着越来越大的作用<sup>[1]</sup>。目前, 量子点更多的是依据其具有激发光谱宽且连续分布, 发射光谱窄而对称, 抗光漂白能力强等特点而作为荧光探针标记生物体系应用于药物筛选、荧光编码、细胞示踪、生物成像等<sup>[2~4]</sup>。

量子点作为一种三维尺寸在纳米级别 (1 ~ 100 nm) 的半导体纳米晶, 因其颗粒粒径小, 比表面积大, 表面具有的活性位点多, 结合其本身量子点半导体纳米晶的组成的元素, 存在诸如纳米金、纳米银<sup>[5, 6]</sup>类似的作为电子传递载体, 在还原剂(如对苯二酚)存在下可催化  $Ag^+$  还原成单质 V 沉积于表面的催化潜力。Chou 等<sup>[7]</sup>在观测组织内量子点的分布情况时应用量子点的催化特性, 通过组织切片银增强染色肉眼可视方法直接定性观测了 CdSe/ZnS 量子点在各组织内的分布。同时与荧光成像方法相比较, 银染方法更能准确定位量子点的分布情况, 不受生物体内荧光猝灭因素影响, 方法快速、直观、简便。

本实验通过合成 CdTe 量子点并制备链霉亲和素修饰的 CdTe 量子点探针, 利用 CdTe 量子点催化  $Ag^+$  还原成单质 Ag 沉积于量子点周围, 形成黑色肉眼可见的颗粒, 结合蛋白质芯片分析技术平台, 建立了一种基于量子点银增强显色的可视化检测新方法。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

晶芯 SmartArrayer48 微阵列芯片点样仪(博奥生物有限公司); ScanMaker i900 CCD 芯片扫描仪(上海中晶科技有限公司); JEM-200CX 透射电镜(日本 JEM 公司); RF-5301 荧光分光光度计、UV-Vis 2100 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); PHS-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂); BS-124S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); CT15RT 台式高速冷冻离心机(上海天美科学仪器有限公司); ZD-85 气浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司)。

醛基化玻片(美国 CEL Associates 公司); 牛血清白蛋白(BSA, 南京布克生物技术有限公司); 链霉亲和素(SA)、人 IgG、Bio-羊抗人 IgG(北京博奥森生物技术有限公司); 银增强试剂 A、B 液(美国 Sigma

2010-06-07 收稿; 2010-06-27 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 20975050, 20575079) 973 项目子课题(No. 2006CB910803), 蛋白质组学国家重点实验室开放课题, 江苏省“六大人才高峰”和中国药科大学研究生专项经费(No. JKY20009063) 项目资助

\* E-mail: wenyingshij@163.com; xudanke@126.com

公司); 巯基乙酸 TGA(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,纯度 >96%,上海金山亭新化工试剂厂); 碲粉(纯度 99.9%,国药集团化学试剂有限公司) 缩合剂碳二亚胺 EDC、*N*-羟基琥珀酰亚胺 NHS(阿拉丁试剂(中国)有限公司); 其它试剂均为国产分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

## 2.2 实验方法

**2.2.1 TGA 修饰的 CdTe 量子点的合成** 改进文献[8,9]方法,将 47 mg Te 粉和 50 mg  $\text{NaBH}_4$  加入密闭反应瓶中,加入 3 mL 无水乙醇和 1 mL 超纯水,控制水浴温度 40 °C,磁力搅拌反应至 Te 粉完全消失,体系为氮气保护的无氧环境。反应结束后,用冰浴冷却 10 min。用 1 mol/L NaOH 调节含有巯基乙酸的  $\text{CdCl}_2$  溶液(Cd-SR)至 pH 8.0,然后在剧烈搅拌下加入新制得的  $\text{NaHTe}$  前驱液( $\text{Cd}^{2+}$ 、Te 与 TGA 的摩尔比为 1:0.5:2.4),搅拌反应 20 min,初始得到亮黄色透明胶体溶液,100 °C 回流 10 h 得到 CdTe 量子点。

**2.2.2 链霉亲和素修饰量子点探针的制备** 参考文献[10,11]量子点偶联蛋白方法,在磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中,加入纯化好的表面包覆巯基乙酸的 CdTe 纳米粒子、链霉亲和素以及缩合剂 EDC 和 NHS,使 QD:SA:EDC:NHS 摩尔比为 1:1:1500:1500,气浴恒温振荡器 37 °C 反应 3 h 后,将量子点标记液以 15000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,用 PBS 重悬沉淀,同样方法重复操作 3 次,最后将链霉亲和素修饰好的量子点探针分散于 PBS 中,在 4 °C 冰箱保存备用。

**2.2.3 反相蛋白质芯片的制备** 用晶芯 SmartArrayer48 微阵列芯片点样仪将系列不同浓度的人 IgG 点于醛基化玻璃片上,BSA 及 Bio-羊抗人 IgG 作为阴性及阳性对照。每个阵列包含 16 个点(4×4),每个浓度的样品重复 2 个点,每个点的样品量为 10 nL。点样完成后,将醛基片放入湿盒中。在 37 °C 水浴放置 2 h,再将湿盒在 4 °C 冰箱中存放 12 h,通过蛋白上的氨基与玻片表面的醛基实现样品的固定。

**2.2.4 反相蛋白质芯片的可视化检测** 以 25  $\mu\text{L}$  10 g/L BSA 封闭制备好的蛋白质芯片,在 37 °C 水浴放置 1 h,用 0.1 mol/L PBST(PBS+0.05% 吐温)清洗 2 次,每次 5 min,吹干。加入 25  $\mu\text{L}$  4 mg/L Bio-羊抗人 IgG,在 37 °C 孵育 1 h,用 0.1 mol/L PBST 清洗 3 次,每次 5 min,去除多余的未反应的 Bio-羊抗人 IgG,吹干。再加入稀释 2 倍的 25  $\mu\text{L}$  量子点探针(QD-SA),37 °C 孵育 1 h,用 0.1 mol/L PBST 清洗 3 次,每次 5 min,去除多余的未反应的量子点探针,吹干。加入 25  $\mu\text{L}$  银增强试剂(A+B),显色 15 min,以水冲洗干净,吹干,供 ScanMaker i900 CCD 芯片扫描仪扫描并进行数据分析。基本操作步骤见图 1。

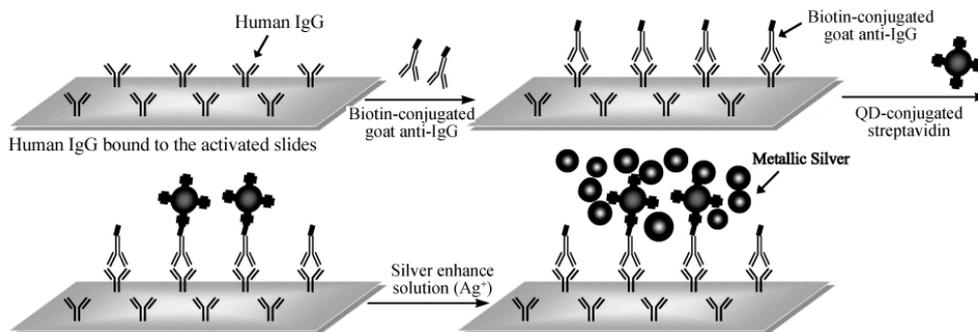


图 1 量子点探针银增强显色的反相蛋白芯片可视化检测原理示意图

Fig. 1 Schematic illustration of colorimetric detection of protein microarrays based on quantum dot probes coupled with silver enhancement

## 3 结果与讨论

### 3.1 量子点银增强及其机理讨论

将 CdTe 量子点溶液滴在铜网上,37 °C 烘干,透射电镜结果如图 2A 所示,量子点为粒径约 3 nm 的球状型晶体。将 CdTe 量子点溶液滴于导电玻璃上,自然晾干,加入商品化银增强试剂(A+B),以水冲净,扫描电镜结果如图 2B 所示,量子点经银增强之后银沉积于量子点表面后粒径显著增大,由约 3 nm

增加至 2 μm, 颗粒大小分布均匀, 显示银能均匀地沉积于量子点表面。图 2C 和 2D 为图 2B 的局部及单个放大电镜图。CdTe 量子点经银增强后银大量沉积于量子点表面, 其机理可能是: CdTe 量子点作为粒径很小的纳米颗粒, 粒径越小表面存在越多的活性位点, 在还原剂对苯二酚的存在下, 催化 Ag<sup>+</sup> 还原成单质 Ag, CdTe 量子点在此过程中起到催化及电子传递的作用。

### 3.2 CdTe-链霉亲和素量子点探针的表征

由图 3 可见, 量子点在修饰链霉亲和素前后其荧光强度未发生明显变化, 显示其具有良好的荧光发光性质。同时其荧光发射峰明显红移, 由 571 nm 红移至 594 nm, 表明链霉亲和素的确与 CdTe 量子点发生了共价耦合作用。红移现象的原因可能是, 在缩合剂 EDC 和 NHS 的作用下, CdTe 量子点表面的羧基与链霉亲和素的氨基发生了共价耦合, 导致量子点表面负电荷减少, 量子点之间相互斥力减弱, 量子点之间的距离缩短, 粒子间偶极与偶极之间的相互作用增加, Stokes 位移增大, 导致其发射光谱发生了明显的红移现象<sup>[12]</sup>。此外, 修饰链霉亲和素之后其荧光半峰宽减小, 可能由于链霉亲和素填补了原 CdTe 量子点表面存在的缺陷, 使其具有更好的光学性质。图 4 为 CdTe 量子点修饰链霉亲和素前后的透射电镜图, 修饰前的 CdTe 量子点(图 4A) 约为 3 nm 的似圆状颗粒, 单分散性良好; 修饰链霉亲和素后, 通过链霉亲和素的氨基与 CdTe 量子点的羧基发生共价结合, 而链霉亲和素分子大小与 CdTe 量子点相近, 理论计算形成的偶合物约为 6 nm。图 4B 显示的 6~7 nm 与理论基本相符, 粒径分布较均一, 单分散性良好。

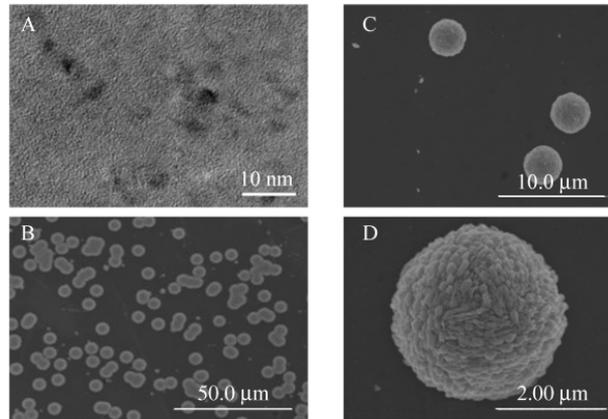


图 2 CdTe 量子点银增强前后的电镜图

Fig. 2 Electron microscope images of CdTe before and after silver enhancement

A. CdTe 量子点 TEM 图( TEM image of CdTe); B, C, D. CdTe 量子点银增强后的 SEM 图( SEM images of CdTe after silver enhancement)。

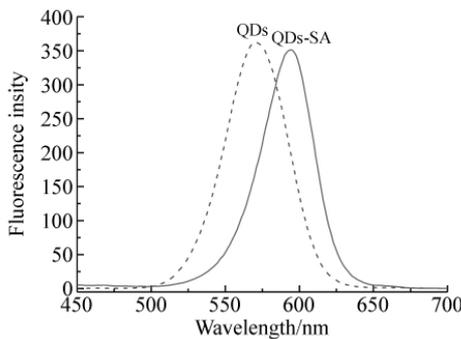


图 3 量子点修饰前后的荧光光谱图

Fig. 3 Fluorescence spectra of CdTe solution before and after modified with Streptavidin( SA)

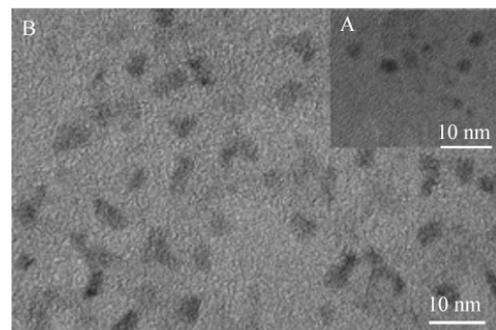


图 4 量子点修饰链霉亲和素前后的 TEM 图

Fig. 4 TEM images of CdTe before and after modified with Streptavidin

A. CdTe; B. CdTe-链霉亲和素偶合物( CdTe-SA)。

### 3.3 CdTe-SA 量子点探针浓度的筛选

在醛基修饰的玻璃基片上固定 0.1, 0.5 和 2.5 ng 的人 IgG 样品, 用 10 ng BSA 作为阴性对照品, 加入相同量的 Bio-羊抗人 IgG, 再加入不同稀释比例的 CdTe-SA 量子点探针( 1:1, 1:2, 1:4)。绘制点样不同量的人 IgG 与不同稀释比例的 CdTe-SA 信噪比图。结果显示, 1:2 稀释的 QD-SA 具有最高的信噪比值, 以固定 2.5 ng 人 IgG 为例, 1:1 稀释的 QD-SA 因具有较高的背景值而信噪比值低于 1:1 稀释的 QD-SA, 1:4 稀释的 QD-SA 因其信号灰度值较低而信噪比值低, 故 CdTe-SA 量子点探针最佳合适浓度选择 1:2 稀释, 结果如图 5 所示。

### 3.4 Bio-羊抗人 IgG 量的筛选

在醛基修饰的玻璃基片上固定 1 ng 人 IgG 样品,并用 10 ng BSA 为阴性对照品,分别加入 2, 10 和 50 ng 的 Bio-羊抗人 IgG 与之反应,再加入具有最好信噪比值的 1:2 稀释的 QD-SA 量子点探针,检测不同量的 Bio-羊抗人 IgG 信噪比。结果显示,加入 10 ng Bio-羊抗人 IgG 时,具有最高的信噪比值;加入 2 ng 时,其信号灰度值较低,故其信噪比值较小;加入 50 ng,其信号灰度值增强不明显,可能由于其与 IgG 量特异性结合时呈饱和趋势,且拥有较加入 10 ng 时高的背景值,导致其信噪比值也较小,故 Bio-羊抗人 IgG 量选择为 10 ng。

### 3.5 反相蛋白质芯片人 IgG 的定量分析

在醛基修饰的玻璃基片上分别固定 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 和 1.6 ng 人 IgG 样品,并以 10 ng BSA 为阴性对照品,0.1 ng Bio-羊抗人 IgG 为阳性对照品,制成 9 个相同 4 × 4 阵列,每个浓度重复 2 个点。加入 10 ng Bio-羊抗人 IgG 和 1:2 稀释的 CdTe-SA 量子点探针,银增强试剂显色 15 min,芯片扫描结果如图 6 所示。数据处理分析表明:在人 IgG 加入量为 100 pg ~ 1.6 ng 之间,样品量的对数与信号灰度值呈良好的线性关系(图 7),其回归方程为  $y = 24993x - 44701$ ,线性相关系数  $r = 0.997$ ,其中,  $y$  为信号灰度值,  $x$  为  $\lg m_{\text{IgG}}(\text{pg})$ 。在 50 pg 点的信号灰度值与其 2 倍 SD 之和小于 0.1 ng 的信号灰度值,故可推测此法的检出限为 50 pg。

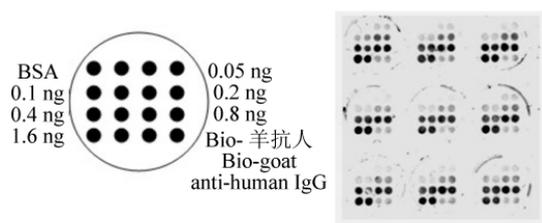


图 6 点样示意图及银增强显色可视化结果图

Fig. 6 Diagram of spotting and visual results after silver enhancement

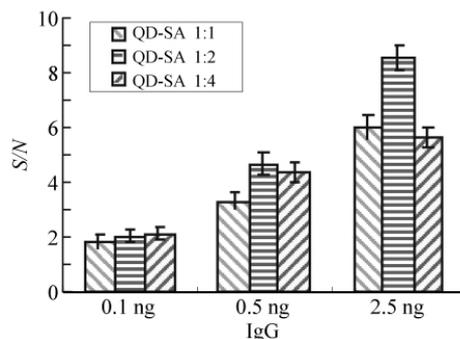


图 5 不同浓度 QD-SA 的信噪比

Fig. 5 Relationship between  $S/N$  and QD-SA at different concentrations of human IgG

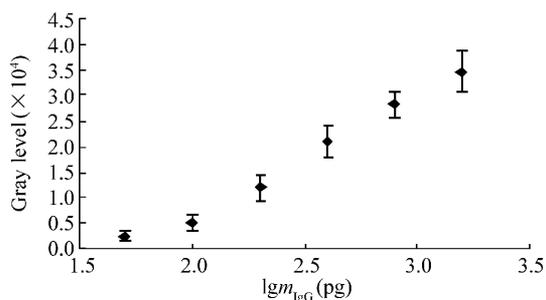


图 7 信号灰度值与人 IgG 量的对数的线性关系图

Fig. 7 Relationship between gray level and logarithm of human IgG

## 4 结论

本实验从最开始的合成巯基乙酸包覆的 CdTe 量子点出发,合成出可通过控制其粒径谐调其发射波长的 CdTe 量子点。通过缩合剂 EDC(碳二亚胺)和 NHS(*N*-羟基琥珀酰亚胺)的作用,活化 CdTe 量子点周围的羧基,使其与链霉亲和素的氨基共价结合。控制各物质间的比例及反应的时间、温度,优化偶联策略,利用高速离心方法纯化 CdTe 量子点偶联物,成功地制备出链霉亲和素修饰的 CdTe 量子点探针。运用在还原剂对苯二酚存在下,量子点催化银离子还原成单质银能均匀沉积于量子点表面的原理,成功建立了基于量子点探针的银增强显色可视化检测的新方法,并结合蛋白芯片分析技术,将此方法应用于反相蛋白芯片的分析检测。利用量子点的催化新特性进行显色可视化检测。本方法具有操作简单,对仪器要求低、结果可视化等特点,为量子点应用于其它领域提供了较新的思路。

## References

- ZOU Ming-Qiang(邹明强), YANG Rui(杨蕊), LI Jin-Feng(李锦丰), MA Ji-Xiang(马吉湘), WANG Nan(王楠). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), 2005, 24(6): 133 ~ 137

- 2 Ornberg R L , Harper T F , Liu H. *Nature Methods* , **2005** , 2( 1) : 79 ~ 81
- 3 Wang H , Liu T , Cao Y , Huang Z , Wang J , Li X , Zhao Y. *Anal. Chim. Acta* , **2006** , 580( 1) : 18 ~ 23
- 4 WANG Yang( 王 洋 ) , DENG Yu-Lin( 邓玉林 ) , QING Hong( 庆 宏 ) , XIE Hai-Yan( 谢海燕 ) . *Chem. J. Chinese Universities( 高等学校化学学报)* , **2008** , 29( 4) : 661 ~ 668
- 5 Zhang Z , Chen C , Zhao X. *Electroanalysis* , **2009** , 21( 11) : 1316 ~ 1320
- 6 Yeh C H , Chen W T , Lin H P , Chang T C , Lin Y C. *Sensors and Actuators B* , **2009** , 139( 2) : 387 ~ 393
- 7 Chou L Y T , Fisher H C , Perrault S D , Chan W C W. *Anal. Chem.* , **2009** , 81( 11) : 4560 ~ 4565
- 8 Yu W W , Qu L H , Guo W Z , Peng X G. *Chem. Mater.* , **2003** , 15( 14) : 2854 ~ 2860
- 9 Zhong W Y , Liang J R , Yu J S. *Spectrochimica Acta Part A* , **2009** , 74( 3) : 603 ~ 606
- 10 CHEN Li-Hua( 陈莉华 ) , BU Xiao-Ying( 卜晓英 ) , WEN Shi-Cai( 文世才 ) , LI Chao-Yang( 李朝阳 ) . *Chinese J. Anal. Chem. ( 分析化学)* , **2007** , 35( 8) : 1211 ~ 1214
- 11 SHAO Jun( 邵 君 ) , YOU Xiao-Gang( 尤晓刚 ) , GAO Feng( 高 峰 ) , HE Rong( 贺 蓉 ) , CUI Da-Xiang( 崔大祥 ) . *Chinese J. Anal. Chem. ( 分析化学)* , **2006** , 34( 11) : 1625 ~ 1628
- 12 SHAO Jun( 邵 君 ) , GAO Feng( 高 峰 ) , YOU Xiao-Gang( 尤晓刚 ) , HE Rong( 贺 蓉 ) , CUI Da-Xiang( 崔大祥 ) . *Journal of Shanghai Jiaotong University( 上海交通大学学报)* , **2008** , 42( 5) : 827 ~ 830

## Research and Application of Visual Detection Based on Quantum Dots Coupled with Silver Enhancement

XU Guo-Feng<sup>1</sup> , LI Hui<sup>1</sup> , ZHANG Cui<sup>1</sup> , SUN Zi-Yin<sup>2</sup> , ZHONG Wen-Ying<sup>\* 1</sup> , XU Dan-Ke<sup>\* 2</sup> , CHEN Hong-Yuan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( Department of Analytical Chemistry , China Pharmaceutical University , Nanjing 210009)

<sup>2</sup>( School of Chemistry and Chemical Engineering , Nanjing University , Nanjing 210093)

**Abstract** CdTe quantum dot probe modified with streptavidin ( SA ) was synthesized and prepared. A novel visual detection method based on the quantum dot coupled with silver enhancement was successfully established. Combined with the protein microarray analysis technique , this novel method did well in the detection of the reverse phase protein microarray. To detect the analytical performance , human IgG was used as a mode in this experiment. First , human IgG was immobilized on Aldehyde slides , then the optimized bio-goat anti-human IgG and CdTe-SA probe was added , finally silver enhancement coloration was carried out for 15 min. The results showed a good linear correlation between the signal gray level and the logarithm of human IgG immobilized on slides from 100 pg to 1.6 ng with a correlation coefficient (  $R^2$  ) of 0.997 while its lowest detectable limit was about 50 pg human IgG. This novel method could be used to the sensitive detection of micro-amount protein and showed the characteristics of the simple operation , lower request to the instruments and the visual results.

**Keywords** Quantum dot probe; Silver enhancement; Visual detection; Protein microarray

( Received 7 June 2010; accepted 27 June 2010)

---

### 《近红外光谱解析实用指南》

该书是现有惟一介绍近红外光谱吸收谱带与分子结构之间关系的专著。书中给出了 300 多张近红外光谱图 , 几乎覆盖了所有在近红外光谱区有吸收的官能团。附录给出了大量的图表和数据以解析分子结构与近红外光谱之间的相关关系 , 书中还扼要介绍了近红外光谱产生的机理和应用发展史。

该书对读者深入了解和掌握近红外光谱分析技术将有很大帮助 , 具有广泛的参考价值。特别适合作为光谱分析工作者的手册类工具书 , 也可用作科研院所和高等院校师生的教学参考书。

该书由杰尔·沃克曼等编著 , 褚小立等译 , 化学工业出版社出版 , 定价 60.00 元。