

谷胱甘肽包被的 CdSe/CdS 量子点的直接水相制备及其 对人血淋巴细胞的标记成像

董 微^{1,2}, 葛 欣², 王宣怡², 徐淑坤^{1*}

1. 东北大学化学系, 辽宁 沈阳 110004

2. 沈阳医学院化学系, 辽宁 沈阳 110034

摘 要 首次用谷胱甘肽(GSH)作为稳定剂,在水溶液中制备了稳定地发射绿色荧光和橙色荧光的两种 CdSe/CdS 核/壳结构的纳米量子点。用紫外-可见分光光度法和荧光光谱方法研究了 CdSe/CdS 量子点的发光特性。透射电镜(TEM)结果表明 CdSe/CdS 量子点近似球形,在水中分散性良好,比 CdSe 量子点具有更优异的发光特性,发射光谱和吸收光谱都有红移现象。将 CdSe/CdS 量子点与鼠抗人 CD3 抗体连接,制备了水溶性 CdSe/CdS-CD3 复合物探针,对人血淋巴细胞进行标记和成像。结果表明用该探针对人血淋巴细胞成像清晰,其荧光在 30 min 的连续蓝光激发下无明显衰减,而 FITC 荧光在 20 min 内基本完全猝灭。

关键词 谷胱甘肽; CdSe/CdS 量子点; 免疫荧光标记; 人血淋巴细胞

中图分类号: O644.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)01-0118-05

引 言

半导体量子点(Quantum dots, QDs),是指半径小于或接近于激子玻尔半径的半导体纳米晶粒。由于量子点的吸收光谱宽且连续,发射光谱窄而对称,通过调节组成和大小可以使其发射出不同颜色的光,并且具有较高的荧光强度和光稳定性,在生物医学等方面的应用日益受到关注^[1-3]。与有机溶剂法相比,水相合成法具有成本低、操作简单、毒性小和生物兼容性好等优点^[4,5]。但是在水体系中,水化作用使所合成量子点的荧光量子产率降低(3%~10%)。采用无机包覆层对量子点表面进行修饰,可以有效地限制对核的激发,消除非辐射弛豫途径并防止光化学褪色,从而提高核层的荧光量子产率^[6]。近年来已经研究的核/壳结构体系,如 CdSe/ZnS, CdSe/CdS, CdS/ZnS 等均证实了选择合适的修饰壳层能明显提高量子点的发光效率^[7,8]。

用荧光染料分子对细胞进行标记是一种经典的细胞生物学研究方法,而传统的荧光染料有着不可逾越的缺陷:其激发光谱窄,荧光染料发射光谱的半峰宽(full width at half maximum, FWHM)很宽,有时还有很长的拖尾,造成谱峰之间的重叠,限制了能同时被应用的荧光探针数目,有机染料易光漂白和光解,光解产物对生物分子往往有杀伤作用。如果能够解决量子点与生物分子偶联的问题,就可以用量子

点来代替很多荧光染料分子,在细胞器定位、信号传导、原位杂交、胞内组分的运动和迁移、细胞免疫标记和成像等研究中做出贡献^[9-12]。Wu 等^[13]用量子点标记细胞与有机染料 Alexa 488 标记比较,量子点发射的荧光较强且不易被激发光猝灭。Wang 等^[14]用最大发射波长为 605 nm 的量子点来检测各类型样本卵巢癌细胞中癌抗原 125(CA125)的表达,取得了较好的效果。

本研究用谷胱甘肽(GSH)作为稳定剂,首次在水溶液中合成了稳定的 CdSe/CdS 核/壳结构的纳米量子点。用紫外-可见分光光度计和荧光光谱仪对其进行了表征。同时,将 2 种不同发射波长的 CdSe/CdS 量子点和鼠抗人 CD3 抗体连接,制备水溶性 CdSe/CdS-CD3 复合物探针,对人血淋巴细胞标记成像。实验结果表明, CdSe/CdS 量子点与传统的有机染料异硫氰酸荧光素(FITC)相比,具有更高的荧光强度和光稳定性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LS-55 荧光光度计(Perkin Elmer, USA), UV-2100 双光束紫外-可见分光光度计(北京瑞利公司), Philips EM420 透射电子显微镜(TEM, Holland, 工作电压 100 kV), DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂), pH

收稿日期: 2009-01-29, 修订日期: 2009-05-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(20675011), 辽宁省教育厅基金项目(05L441)和辽宁省自然科学基金项目(20072063)资助

作者简介: 董 微, 女, 1973 年生, 沈阳医学院化学系副教授 *通讯联系人 e-mail: xushukun46@1261.com

酸度计 PB-21 型(北京赛多利斯仪器系统有限公司);恒温水浴振荡器(江苏,今坛),电热恒温培养箱(DHP-9082 上海一恒科学仪器有限公司),荧光显微镜(DMIL, Leica, 德国)。硒粉(Se 99.999%, 国药化学试剂公司),氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)(国药化学试剂公司),硼氢化钠(NaBH_4 , 96% 国药集团化学试剂有限公司),硫化钠($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 98%, 上海化工科技发展有限公司),还原型谷胱甘肽(GSH)(国药集团化学试剂有限公司),鼠抗人 CD3 抗体和 FITC 标记的鼠抗人 CD3 抗体(北京博奥森生物技术有限公司),NHS (N-Hydroxysuccinimide) 和 EDC (N-ethyl-N'-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (Fluka 公司)。所用试剂为分析纯,水为三次蒸馏水。

1.2 谷胱甘肽包被的 CdSe/CdS 纳米量子点的制备

(1) CdSe 量子点的制备

将 54.8 mg 氯化镉和 184.3 mg 谷胱甘肽溶于 25 mL 蒸馏水中,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液调节混合液的 pH 值 9~10,在剧烈搅拌下,通入氮气脱氧 20 min,然后迅速加入 1 mL 新制备的浓度为 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硒化氢钠溶液^[15],再将溶液缓慢加热至 95°C ,使其回流 2 h,得到黄色的 CdSe 量子点溶液。

(2) CdSe/CdS 量子点的制备

取上述制备的 CdSe 量子点溶液 10 mL 通入氮气 10 min 后,在快速搅拌下慢慢交替滴加 $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ CdCl_2 和 GSH 混合液和 $4 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ Na_2S 溶液(最终 CdSe 与 CdS 物质的量的比为 4:1),将溶液温度控制在 $60\sim 70^\circ\text{C}$ 左右,回流 2 h,得到黄色的 CdSe/CdS 量子点溶液,在 350 nm 激发下发射绿色荧光。将第一步中加入的硒化氢钠溶液浓度增加为 $2.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,按照同样的方法得到橙色的量子点溶液,在 350 nm 激发下发射橙色荧光。

1.3 CdSe/CdS-CD3 复合探针的制备

将上述制备的水溶性 CdSe/CdS 量子点,用含有 EDC (50 mmol)、NHS (5 mmol) 的磷酸盐缓冲液 0.5 mL (PBS, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 溶解,再加入 40 μg 鼠抗人 CD3 抗体, 37°C 摇床反应 2 h。

1.4 人血淋巴细胞荧光片的制备及染色

(1) 制备细胞涂片

取静脉血 1~2 mL,用人血淋巴细胞分离液分离静脉血中的淋巴细胞,离心。取出淋巴细胞,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗 2 次,离心。弃上清液。取 1 μL 该细胞液涂敷荧光片(12 孔),自然干燥后,放入冷丙酮中固定 10 min(丙酮先放入 4°C 冰箱中)取出,干燥后放入 -80°C 冰箱中待用。

(2) 染片

将制备的细胞涂片从冰箱中取出,快速吹干(最好放在干燥罐中),每孔加入封闭液 20 μL ,将其放入湿盒中,再放入 37°C 培养箱中孵育 30 min。取出细胞涂片,先用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 冲掉封闭液,再将细胞涂片放入冷 PBS 液体中浸泡 5 min。取出细胞涂片,用细条滤纸将孔周围液体吸干,每孔加入 20 μL 鼠抗人 CD3 抗体或 FITC 标记的鼠抗人 CD3 抗体后,将其放入 37°C 培养箱中孵育 2 h。取出细胞涂片,分别用 PBS 冲洗 2 次,再次将细胞涂片放入冷 PBS 液体中浸泡 5 min,取出用封片剂封片后,荧光显微镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 CdSe/CdS 纳米量子点的光学特性

以合成的绿色量子点为代表产物进行了光学和结构表征。TEM 结果表明 CdSe 量子点和 CdSe/CdS 量子点都近似呈球形,颗粒分散性较好,同时 CdSe/CdS 粒子的尺寸略大于单个的 CdSe 量子点,表明在 CdSe 量子点的表面上包覆上了一层 CdS 壳,所形成的核/壳结构的量子点的尺寸大约为 5 nm。图 1(a)所示核/壳结构的 CdSe/CdS 与 CdSe 量子点的吸收光谱表明 CdSe 量子点的表面包裹一定尺寸的 CdS 后,其吸收峰的位置从 395 nm 变化到 403 nm,红移了 8 nm,这是由于 CdS 壳层影响到了 CdSe 内核的电子态,使得 CdSe 核内的电子易于跃迁到 CdS 壳层中,空穴由于有效质量大而难于移动,从而留在 CdSe 内。这样造成电子和空穴相对分离,使所形成激子的受限程度有所减小,表现为 CdSe/CdS 量子点的吸收峰红移^[16]。图 1(b)中的 a 和 b 分别为 350 nm 激发下 CdSe 量子点和核/壳结构的 CdSe/CdS 量子点的荧光光谱。由图可见, CdSe 量子点的最大荧光发射波长为 529 nm,

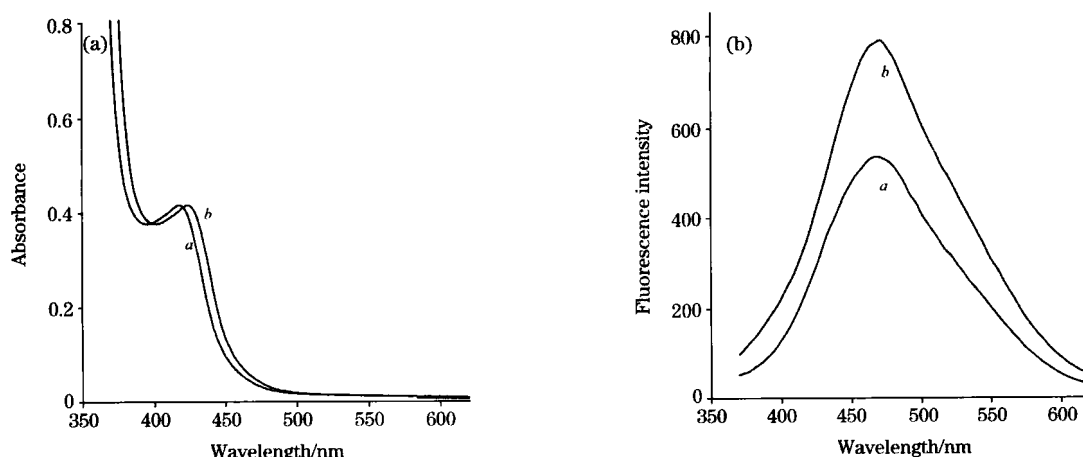


Fig. 1 Absorption (a) and fluorescence spectra (b) of prepared CdSe a and CdSe/CdS b QDs

而同样条件下合成的 CdSe/CdS 量子点的发射波长为 535 nm, 发射峰位发生红移, 并且强度增加。这是由于在 CdSe 量子点的表面包裹上 CdS 后, 这种壳层作用的存在有效地限制了对核的激发, 消除了非辐射弛豫途径并防止光化学褪色, 使核层 CdSe 的荧光量子产率有所提高, 发射峰位的红移是由于部分激子渗入到壳层中造成的^[6]。同样, 所制备的发射橙色荧光的 CdSe/CdS 量子点与 CdSe 核相比, 也表现了类似的荧光强度提高和波长红移[见图 4(b)中的插图]。

2.2 CdSe/CdS 纳米量子点合成条件的优化

实验中以发射绿色荧光的量子点的合成为研究对象, 进行了合成反应过程中条件的优化。在成核反应条件一定的条件下, 对壳层包被时间、反应温度和 CdS 用量对形成的核/壳结构纳米粒子的影响进行了讨论。

2.2.1 包被反应时间和温度对 CdSe/CdS 量子点的影响

图 2(a) 是不同包被时间内所形成的 CdSe/CdS 量子点荧光强度变化曲线。表明随包被反应时间的增长, 发射峰位置略有红移, 荧光强度增强。这可能是由于在一定温度下, 随

着反应时间增长, 晶粒长大与表面修饰同时进行, 只是颗粒长大程度不明显, 表现为发射峰位置红移不明显, 而表面修饰作用增强明显, 于是荧光强度增强。但当反应时间超过 2h 后, 荧光强度又逐渐降低, 这可能是由于反应时间过长, 能量明显增强, 分子运动剧烈, 表面缺陷增多, 荧光强度又有所降低。

图 2(b) 是在不同温度下滴加 CdCl₂-GSH 混合液和 Na₂S 溶液对制备的 CdSe/CdS 量子点荧光强度的影响。从图中可以看出, 起初随着加入时温度的升高, CdSe/CdS 量子点荧光强度也有所增加, 当温度达到 60 °C 时, 所制备的量子点的荧光强度最强。这可能是由于在此温度下 CdS 量子点能够很好地包被 CdSe 粒子, 使 CdSe 粒子表面缺陷减少, 导致荧光强度提高。但此后随着温度升高, 荧光强度反而降低, 这是由于温度继续升高使得 CdSe 颗粒长大, 同浓度下的 CdS 量子点已经不能很好地包裹 CdSe 粒子, CdSe 量子点表面缺陷露出的越来越多, 造成 CdSe/CdS 量子点荧光强度逐渐降低。

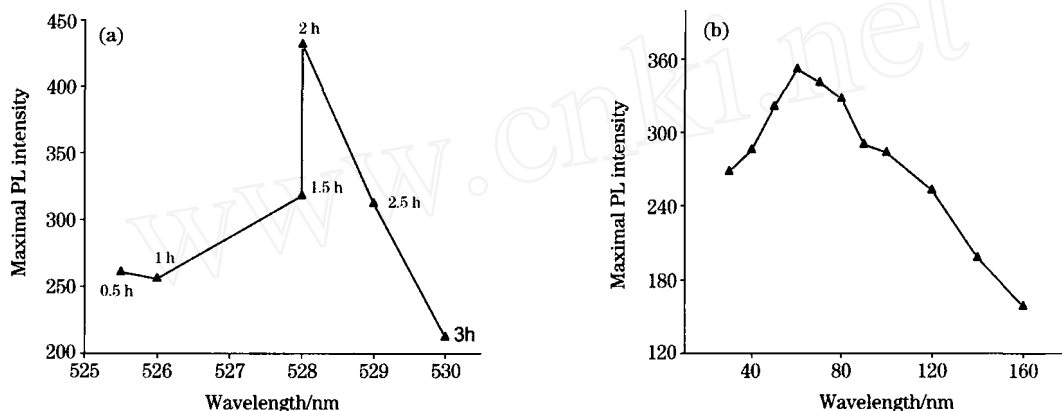


Fig. 2 Fluorescence intensity of the CdSe/CdS QDs obtained with different reaction time (a) and reaction temperature (b)

2.2.2 CdS 用量对 CdSe/CdS 纳米量子点的影响

图 3 为 CdS 与 CdSe 摩尔比 r 为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 和 6.0 时的荧光光谱。从图中可以看出, 随着 CdS 加入量的增加, 荧光强度先增大后减小, 同时伴随着荧光光谱峰的峰位略有红移, 当 CdS 与 CdSe 摩尔比 r 为 4 时荧光强度达到最大。这可能是由于核壳型量子点的荧光效率主要与壳 CdS 包被核 CdSe 的均匀程度有关, 包被得越均匀, 受激电子越容易跳回到基态而发出荧光。当 CdS 的用量少时, CdS 量子点不能很好地包被 CdSe 粒子, 晶粒表面缺陷很多, 大部分受激电子不发荧光, 于是荧光强度较低。随着 CdS 用量的不断增加, 当 CdS 与 CdSe 摩尔比 r 为 4.0 时, CdS 量子点能够均匀地包被 CdSe 粒子, 晶粒表面的缺陷减少, 荧光强度最强。而当 CdS 与 CdSe 摩尔比 r 超过 4 时, 由于晶粒 CdSe/CdS 继续长大, 表面形成了新的缺陷, 于是荧光强度减弱。

2.3 直接标记人血淋巴细胞

2.3.1 CdSe/CdS 纳米量子点与 CD3 抗体的连接

图 4 为 CdSe/CdS 量子点和 CdSe/CdS-CD3 复合探针的荧光发射光谱。由图 4(a) 可见, CdSe/CdS 量子点的发射峰

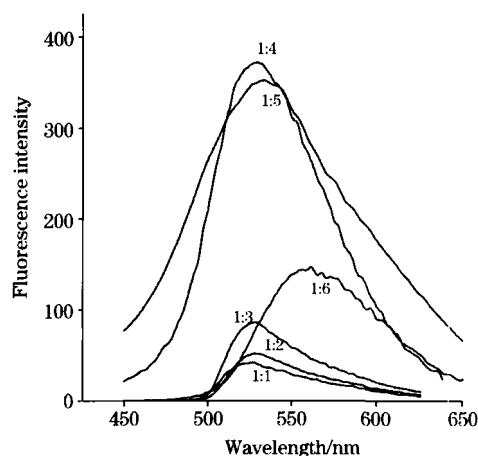


Fig. 3 Fluorescence spectra of CdSe/CdS solution with different CdS/CdSe molar ratio

在 525 nm 处, CdSe/CdS-CD3 复合探针的发射峰位于 529.5 nm, 蓝移了 4.5 nm, 同时荧光强度增强。引起发射峰位变化的原因可能是在活化剂 EDC 和 NHS 的作用下, CdSe/CdS

量子点表面的羧基与抗体的氨基共价偶联,使 CdSe/CdS 量子点的表面电荷数减少,从而降低了 CdSe/CdS 纳米粒子间的偶极与偶极的相互作用,导致 Stokes 位移减小,其荧光发射位发生了蓝移^[17]。由于 CD3 抗体包被在量子点的表面,减少了量子点的表面缺陷,使得量子点的荧光产率增加。

将通过改变硒化钠合成时硒与硼化钠的用量制备的发射橙色荧光的 CdSe/CdS 量子点与鼠抗人 CD3 抗体的连接,制备发射成色荧光的 CdSe/CdS-CD3 复合探针。由图 4 (b)可见, CdSe/CdS 量子点的发射峰在 583 nm 处, CdSe/CdS-CD3 复合探针的发射峰位于 581 nm,蓝移了 2 nm,同时荧光强度增强。

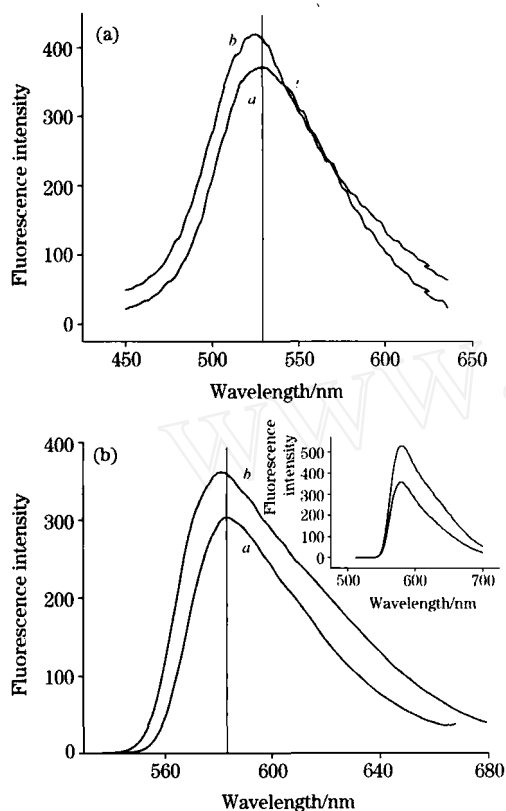


Fig. 4 (a) fluorescence spectra of CdSe/CdS λ 525 a and CdSe/CdS linked mouse anti-human CD3 b; (b) fluorescence spectra of CdSe/CdS λ 583 a and CdSe/CdS linked mouse anti-human CD3 b. The insert of (b) is the fluorescence spectra of CdSe and CdSe/CdS λ 583

2.3.2 人血淋巴细胞的标记

图 5(a)是淋巴细胞被蓝光激发的显微照片。从中可以看出,人血淋巴细胞本身并不发光。(b), (c)和(d)分别是 FITC 和 CdSe/CdS-CD3 复合探针(发橙色光)和 CdSe/CdS-CD3 复合探针(发绿色光)标记的人血淋巴细胞在蓝光激发下的照片,可以清楚观察到人血淋巴细胞被 CdSe/CdS-CD3 复合探针特异性标记,并表现出较 FITC 绿色更为明亮的非常清晰的绿色和橙色荧光图像。

2.3.3 CdSe/CdS-CD3 复合探针的光稳定性

用蓝光激发块分别激发用 CdSe/CdS-CD3 复合探针和 FITC-CD3 标记的人血淋巴细胞,各取 1, 5, 10, 20, 30 min 的荧光图像作比较,如图 6 所示。CdSe/CdS-CD3 复合探针标记的细胞在受激发 30 min 后,荧光仍无明显衰退,而 FITC 绿色荧光从激发开始就出现明显衰退的趋势,在 30 min 内基本猝灭。实验结果表明,与传统染料相比较,量子点探针具有稳定性高,荧光寿命长,特异性好等特点,更具备在长时间示踪性生物荧光标记领域应用的优势。

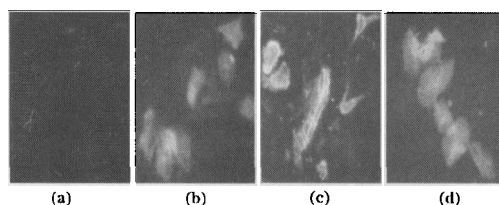


Fig. 5 Lymphocyte in dark-field illumination (a), lymphocyte incubated with FITC for 2 hours (b), lymphocyte incubated with CdSe/CdS-CD3 (orange) for 2 hours (c) and lymphocyte incubated with CdSe/CdS-CD3 (green) (d) for 2 hours in dark-field illumination with blue excitation

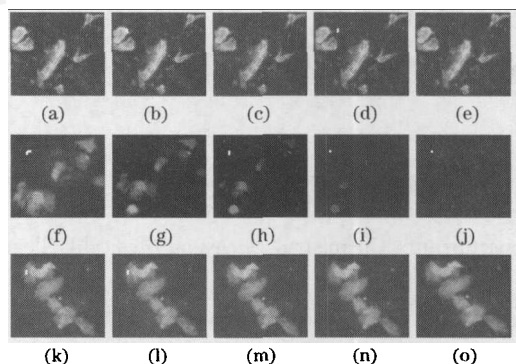


Fig. 6 Comparison of photo stabilities of CdSe/CdS QDs (a)~(e), (k)~(o) and FITC (f)~(j) labeled lymphocyte. The images were taken at irradiation times of 0 (a, f, k), 5 (b, g, o), 10 (c, h, m), 20 min (d, i, n) and 30 min (e, j, o) respectively, under blue excitation

3 结论

本文提出了一种简单可行的制备水溶性核壳纳米量子点的实验方法。用谷胱甘肽作为稳定剂,首次成功地合成了高质量的 CdSe/CdS 核壳纳米粒子,并将其作为荧光标记物对人血淋巴细胞进行标记。所制备的 CdSe/CdS 核壳纳米粒子荧光强度较相同条件下制备的 CdSe 量子点有所提高,其吸收峰和发射峰略有红移,体现了量子点的尺寸效应。免疫荧光标记实验结果表明,与传统染料相比较,量子点具有荧光稳定性高,对光漂白的抵抗能力强,荧光寿命长等特点,使其在长时间生物荧光标记领域中体现更强的优势和具有发展前景。

参 考 文 献

- [1] Michalet X, Pinaud F, Lacoste T D, et al. *Single Molecules*, 2001, 2(4): 261.
- [2] Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. *Science*, 1998, 281: 2013.
- [3] YANG Dong-zhi, XU Shu-kun, CHEN Qi-fan(杨冬芝, 徐淑坤, 陈启凡). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(9): 1807.
- [4] Gaponik N, Talapin D V, Rogach A L, et al. *Phys. Chem. B*, 2002, 106: 7177.
- [5] Li H, Rothberg L. *PNAS*, 2004, 101: 14036.
- [6] Spahnel L, Haase M, Weller H, et al. *Journal of Am. Chem. Soc.*, 1987, 109: 5649.
- [7] TANG Ai-wei, TENG Feng, GAO Yin-jie, et al(唐爱伟, 滕 枫, 高银洁, 等). *Journal of Inorganic Materials(无机材料学报)*, 2006, 21(2): 323.
- [8] Yang D Z, Chen Q F, Xu S K. *J. Luminescence*, 2007; 126: 853.
- [9] Jaiswal J K, Mattoussi H, Mauro J M, et al. *Nature Biotechnol.*, 2003, 21: 47.
- [10] Gao X, Nie S. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21: 371.
- [11] Yang D Z, Chen Q F, Wang W X, et al. *Luminescence*, 2008, 23(3): 169.
- [12] Chan W C W, Nie S M, *Science*, 1998, 281: 2016.
- [13] Wu X Y, Liu H J, Liu J Q, et al. *Nature Biotechnol.*, 2003, 21: 41.
- [14] Wang H Z, Wang H Y, Liang R Q. *Acta Bichimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(10): 681.
- [15] Rajh T, Mico O I, Nozik A J. *J. Phy. Chem.*, 1993, 97: 11999.
- [16] Zhu C Q, Zhao D H, Chen J L, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378: 811.

Preparation of GSH Capped CdSe/CdS Core-Shell QDs and Labeling of Human T-Lymphocyte

DONG Wei^{1, 2}, GE Xin², WANG Xuan-yi², XU Shu-kun^{1*}

1. Department of Chemistry, Northeastern University, Shenyang 110004, China

2. Department of Chemistry, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China

Abstract Two kinds of L-glutathione capped highly fluorescent CdSe/CdS core-shell quantum dots (QDs) emitting green and orange fluorescence at 350 nm excitation were firstly prepared by an aqueous approach and used as fluorescent labels, to link mouse anti-human CD3 which was expressed on human T-lymphocyte. UV-Vis absorption and fluorescence emission spectra of the as-prepared CdSe/CdS core-shell QDs were studied. Compared with the CdSe QDs, a remarkable enhancement in the emission intensity and a red shift of emission wavelength of CdSe/CdS core-shell QDs was observed for the two kinds of QDs emitting green and orange fluorescence. The TEM results showed that the as prepared CdSe and CdSe/CdS QDs dispersed well in aqueous solution, and their shape was approximately spherical, and the CdSe/CdS QDs nano particles emitting green fluorescence are of about 5 nm in diameter. The two kinds of CdSe/CdS QDs were linked with mouse anti-human CD₃ to image human T-lymphocyte. The fluorescent microscopical images of human T-lymphocyte labeled with CdSe/CdS QDs-CD₃ and FITC-CD₃ demonstrated that the fluorescent CdSe/CdS QDs exhibited much better photo stability and brighter fluorescence than FITC, showing a good application potential in the immuno-labeling of cells.

Keywords Aqueous CdSe/CdS core-shell QDs; L-glutathione; Immunolabeling; Human T-lymphocyte

(Received Jan. 29, 2009; accepted May 2, 2009)

* Corresponding author