DOI: 10.3724/SP. J. 1096.2012.10953

基于 CdSe-CdTe 量子点能量转移荧光猝灭法测定前列腺抗原

陶慧林 黎舒怀 李建平*

(桂林理工大学化学与生物工程学院,桂林 541004)

摘 要 研究了 CdSe-CdTe 量子点间发生的荧光共振能量转移,并用于荧光猝灭法测定超痕量前列腺抗原 (PSA)。在 pH 8.0的 Tris-HCl 缓冲溶液中,CdSe-CdTe 间发生有效能量转移,使 CdTe 荧光大大增强。PSA 抗 原与 CdTe 标记的 PSA 抗体发生特异性反应,使能量转移体系的 CdTe 上的荧光强度降低,即发生猝灭。建立 了 CdSe-CdTe 能量转移荧光猝灭法测定 PSA 抗原的方法。在优化的实验条件下,PSA 抗原的线性范围为 0.28~10 μ g/L,相关系数 *r*=0.9992 检出限达 1.5×10⁻² μ g/L(*n*=11)。

关键词 量子点; 共振能量转移; 荧光猝灭法; 前列腺抗原; CdSe; CdTe

1 引 言

荧光共振能量转移^[1](Fluorescence resonance energy transfer ,FRET) 是指在两个不同的荧光基团中, 若一个荧光基团(供体 Donor)的发射光谱与另一个基团(受体 Acceptor)的吸收光谱有一定的重叠,两 个荧光基团间的距离合适时(一般小于 10 nm)即可观察到荧光能量由供体向受体转移的现象。

量子点(Quantumdots QDs) 是直径约为 2 ~ 20 nm,能够接受激发光产生荧光的半导体纳米颗粒。 传统的 FRET 研究主要集中于有机荧光分子类,作为一种新型 FRET 试剂,QDs 具有许多有机荧光分子 不具备的优点,如有可调谐的激发波,抗漂白性,同时连接多个染料分子、狭窄的激发波长和远离激发 峰激发等优良的光学性质。因此,QDs 可以成为比有机荧光分子更好的 FRET 的供体或受体^[2]。近年 来,QDs 作为供体的 FRET 已被广泛报道^[3~9]。研究表明,量子点也可以作为 FRET 受体^[10,11],为同时 使用不同量子点作为 FRET 供体和受体,建立新型的 FRET 提供了理论依据。目前,这方面的研究尚处 于起始阶段,相关报道较少^[12,13]。

荧光能量转移体系发光强度大,灵敏度高,方法简单。本研究将 CdSe-CdTe 能量转移体系应用于 PSA 测定。详细研究了其能量转移规律,计算了荧光共振能量转移相关参数,建立了 CdSe-CdTe 能量转 移荧光猝灭法测定超痕量 PSA 抗原的灵敏方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光光度计(日本岛津公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器 有限公司); FA1004 型电子分析天平(上海市天平仪器厂); pHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

人前列腺游离 PSA 抗原,鼠抗人前列腺 PSA 单克隆抗体(桂林英美特生物技术有限公司); $CdCl_2$ 、 巯基乙酸、碲粉、NaBH₄、1-乙基-3(二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC),*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、 NaOH 等试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 水溶性量子点的合成 (1) CdSe 水溶性量子点的制备 参考文献 [14]并做适当修改,在三口 烧瓶中加入 3 mL 蒸馏水,通氮气2~3 min 除氧。然后分别加入 0.04 g Se 粉 ρ . 12 g NaBH₄,停止通氮, 塞住瓶口,置于冰浴中反应 2 h 得到无色的澄清溶液 NaHSe。在氮气保护下,在 100 mL 0.0025 mol/L CdCl₂ 溶液中加入 0.1 mL 巯基乙酸,调节 pH ≈ 9,继续通氮除氧 30 min,并在搅拌下迅速加入 3 mL

²⁰¹¹⁻⁰⁸⁻²⁵ 收稿; 2011-09-29 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21165007)资助项目

^{*} E-mail: likianping@263.net

NaHSe 溶液 继续于 90 ℃下加热搅拌回流 2.5 h,即得 CdSe 水溶性量子点。(2) CdTe 水溶性量子点的 制备 参考文献 [15]并做适当的修改 称取 0.048 g Te 粉和 0.12 g KBH₄ 于三口烧瓶中,混匀,加入 2 mL 水 在 65 ℃水浴和磁力搅拌下反应 20 min,直至黑色 Te 粉完全消失,得到紫色透明的0.2 mol/L KHTe 溶液,备用。在氮气的保护下,在 200 mL 0.0025 mol/L CdCl₂ 水溶液中,加入 0.1 mL 巯基乙酸, 调节 pH≈10 在强磁力搅拌下,继续通氮气除氧 30 min,迅速加入 2 mL KHTe 溶液,继续于 95 ℃下加入 搅拌回流 2 h,即获得颜色透明的 CdTe 水溶性量子点。

2.2.2 PSA 抗体的标记 参照文献 [16] 取上述制备的 CdTe 溶液 20 mL 于锥形瓶中,加入 0.0005 g EDC 0.0006 g NHS 200 µL PSA 抗体,置于 30 ℃ 摇床中避光振荡 1.5 h,即得到标记了 PSA 抗体的 CdTe 水溶性量子点,备用。

2.2.3 CdSe-CdTe 量子点间的荧光共振能量转移(FRET)现象的研究 分别测两种量子点的紫外吸收光谱和荧光发射光谱,观察受体的紫外吸收光谱和供体的荧光发射光谱重叠程度;再分别测 CdSe, CdTe 和 CdSe-CdTe 混合物反应体系的荧光发射光谱,研究两者间的荧光共振能量转移现象,即保持 CdSe(或 CdTe)浓度不变,逐渐增加 CdSe(或 CdTe)浓度,观察 CdTe(或 CdSe)荧光强度的变化。

2.2.4 CdSe 和 CdTe 量子产率的估算 于 3 支 5 mL 比色管中 ,分别加入适量 CdSe、CdTe 和参比标准 物质罗丹明 B ,以 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 稀释至刻度 摇匀。于 λ_{ex} = 370 nm λ_{em} = 390 nm 处 ,测定荧 光强度 $I_{\rm F}$ 。仪器的激发和发射光谱带宽均为 15 nm。

2.2.5 荧光共振能量转移效率的测定 于 5 mL 比色管中 ,加入适量 CdSe 和 CdTe ,以 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 稀释至刻度 ,摇匀。于 λ_{ex} = 370 nm λ_{em} = 390 nm 处 ,测定荧光强度 I_{F} 。仪器的激发和发射光 谱带宽均为 15 nm。

2.2.6 CdSe-CdTe 能量转移体系测定 PSA 抗原的研究 于一系列 5 mL 比色管中,依次加入 0.1 mL CdSe ρ .2 mL CdTe 不同量的 PSA 抗原,以 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 稀释至刻度,摇匀。静置反应 30 min 后,于 λ_{ex} =370 nm, λ_{em} =390 nm 处,测定荧光强度 I_{F} 。仪器的激发和发射狭缝光谱带宽均为 15 nm。

3 结果与讨论

3.1 标记 PSA 的 CdTe 的表征

由 PSA 抗体与标记了 CdTe 的 PSA 抗体溶液的紫外吸收光谱(图1)可见,与标记前 PSA 溶液的紫 外吸收光谱比较 280 nm 处蛋白的吸收峰变小,证明 PSA 标记到了量子点上。图2为 CdTe 量子点溶液 和 CdTe-PSA 标记物溶液的发射光谱,标记前 CdTe 量子点溶液的发射峰比 CdTe-PSA 标记物溶液的发 射峰发生了红移。而 CdTe 与 CdTe-PSA 发射谱的半峰宽基本不变,表明在标记过程中量子点之间没有 发生团聚,分散性较好。

3.2 CdSe-CdTe 量子点间的荧光共振能量转移

CdSe 的荧光光谱和 CdTe 的吸收光谱如图 3 所示。给体的发射光谱和受体的吸收光谱有相当程度的光谱重叠是分子间发生能量转移的必要条件之一。由图 3 可知,CdSe 的发射光谱,CdTe 的吸收光谱 有较好的重叠,这为它们发生能量转移提供了前提条件。其中 CdSe 是作为能量给予体,而 CdTe 则作 为能量受体。为保证能量转移效果,选用 390 nm 激发混合体系,既可以保证 CdTe 有较大的吸收,同时 CdSe 又不会被激发。体系中给体 CdSe 发生了荧光猝灭,将能量有效转移到受体 CdTe,使 CdTe 的荧光 显著增强,说明在 CdSe-CdTe 之间发生了荧光共振能量转移,如图 4 所示。

为进一步研究 CdSe-CdTe 间的能量转移体系,固定 CdTe 浓度不变,逐渐增加 CdSe 的浓度,得到体系荧光光谱。如图 5 所示,随 CdSe 浓度的增加,CdTe 的荧光逐渐增强。固定 CdSe 浓度不变,逐渐增加 CdTe 的浓度,得到体系荧光光谱。如图 6 所示,随 CdTe 浓度的增加,CdSe 的荧光逐渐猝灭。进一步说明 CdSe-CdTe 发生了有效的能量转移^[17]。

3.3 CdSe 和 CdTe 量子产率

参考文献[18]通过比较在相同激发条件下所获得的待测荧光试样和已知量子产率的参比荧光标





Fig. 1 Absorption spectra of prostat specific antigen (PSA) solution before (a) and after (b) labeling with CdTe



图 3 CdSe (a) 和 CdTe (b) 的吸收光谱及 CdSe (c) 和 CdTe (d) 的荧光光谱





图 5 CdSe 浓度对 CdSe-CdTe 间能量转移的影响

Fig. 5 Effect of CdSe concentration on energy transfer between CdSe and CdTe

CdTe: $3{\times}10^{-8}$ mol/L CdSe(a–d) : $4{\times}10^{-8}$ mol/L , $5{\times}10^{-8}$ mol/L , $6{\times}10^{-8}$ mol/L , $7{\times}10^{-8}$ mol/L.



图 2 标记前(a) 和后(b) CdTe 量子点溶液的荧光吸收 光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of CdTe solution before (a) and after (b) labeling with PSA



图 4 CdSe(a), CdTe(b)和 CdTe-CdSe 混合物(c) 荧光 发射光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of CdSe (a) , CdTe (b) and the mixture of CdTe-CdSe (c)



图 6 CdTe 浓度对 CdSe-CdTe 间能量转移的影响

Fig. 6 Effect of CdTe concentration on energy transfer between CdSe and CdTe

CdSe: 6×10^{-8} mol/L CdTe(a-c) : 1.5×10^{-8} mol/L , 2×10^{-8} mol/L , 3×10^{-8} mol/L.

准物质两种稀溶液的积分荧光强度(即校正荧光光谱所包括的面积)以及这一相同激发波长的入射光 (紫外-可见光)的吸光度,再将这些值分别代入公式(1),计算后可获得待测荧光试样的量子产率。

$$=\Phi_{\rm s}\frac{F_{\rm u}A_{\rm s}}{FA_{\rm u}}\tag{1}$$

式中, Φ_u 和 Φ_s 为待测物质和参比标准物质的荧光量子产率; F_u 和 F_s 为待测物质和参比物质的积分荧 光强度; A_u 和 A_s 为待测物质和参比物质在该激发波长的入射光的吸光度($A = \varepsilon bc$)。本研究采用罗丹明 B(RhB)溶液作参比荧光标准物质。根据文献报道 RhB 量子产率为 0.89,本方法测得 CdSe 量子产率为 0.34。同上计算得出 CdTe 的量子产率为 0.26。

 $\Phi_{\rm u}$

3.4 荧光共振能量转移效率

参考文献 [19] 根据 Förster 非辐射能量转移机制,其能量转移效率与给体-受体之间的距离(r) 及临界能量转移距离(R_0) 有关,给体与受体之间能量转移效率 E 为:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$
(2)

式中 R_0 是转移效率为 50% 时的临界距离:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \tag{3}$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda}$$
(4)

式中 $F(\lambda)$ 为荧光给体在波长 λ 处的荧光强度 $e(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸收系数 ,能量转移效 率 E 可由下式求出:

$$E = 1 - F/F_0 \tag{5}$$

根据公式(2)~(5),本实验计算的 CdSe-CdTe 能量转移效率 E为 0.32,说明 CdSe-CdTe 量子点间具有 较高的荧光共振能量转移效率。

实验表明,选用 pH=8.0的 Tris-HCl 缓冲液,能量转移效果最好。CdSe-CdTe 体系荧光能量的转移 效率与二者的浓度密切相关,且对 CdSe-CdTe/PSA 体系而言,能量转移效率越高,免疫特异性反应猝灭 CdTe 的程度越大。当 $C_{\text{cdse}}/C_{\text{cdTe}}$ =4 时,免疫特异性反应对 CdSe-CdTe 荧光猝灭效果最好。此时,体系 在室温下反应 30 min 即可完成,且1 h 内稳定。

3.5 工作曲线

在最佳实验条件下进行了标准曲线的绘制,如图 7 所示。结果表明,PSA 抗原浓度在 0.28 ~10 μg/ L 的范围内与体系的荧光猝灭强度呈良好的线性关系,其线性回归方程为 ΔI_F = 4.4629*c*+34.853,线性 相关系数*r*=0.9992;检出限为 1.5×10⁻² μg/L (*n*=11)。按上述方法对加入 4.0 μg/L 的 PSA 抗原体系 进行 10 次平行测定 相对标准偏差为 2.1%,说明具有良好的精密度。



图7 工作曲线

Fig. 7 Calibration curve

Concentration of CdSe: 6×10^{-8} mol/L , CdTe: 3×10^{-8} mol/L. Concentration of PSA($a \sim m$) : 0.28 , 0.56 , 0.84 , 1. 12 , 1.40 , 1.68 , 1.96 , 2.24 , 1.92 , 5.60 , 7.28 , 8.40 , 10.08 µg/L.

3.6 干扰实验

按照实验方法 ,当 PSA 抗原浓度为 4.0 µg/L 时 ,考察了多种常见氨基酸及其它离子对反应的干扰 ,结 果见表 1。由表 1 可知 ,氨基酸及许多金属离子对体系基本没有影响 ,说明本方法具有较好的选择性。

表1	共存干扰物的影响

Table 1 Effects of interfering substances on fluorescence									
干扰物质 Interferent	加入浓度 Added concentration (g/mL)	荧光强度改变量 Change of fluorescence intensity (%)	干扰物质 Interferent	加入浓度 Added concentration (g/mL)	荧光强度改变量 Change of fluorescence intensity (%)				
<i>L-</i> 缬氨酸 , <i>L-</i> 赖氨酸 <i>L-</i> Valine , <i>L</i> -Lysine	3×10 ⁻⁷	2.4	Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+}	1.5×10 ⁻⁷	4.7				
<i>L</i> -色氨酸, <i>L</i> -精氨酸 <i>L-</i> Tryptophan, <i>L</i> -Arginine	2.5×10 ⁻⁷	2.6	${\rm Cr}^{3+}$, ${\rm Fe}^{3+}$, ${\rm Cu}^{2+}$	1.8×10^{-7}	4.5				
<i>L</i> -组氨酸, <i>L</i> -脯氨酸 <i>L</i> -Histidine, <i>L</i> -Proline	2×10 ⁻⁷	4.6	$\mathrm{C}_{2}\mathrm{O}_{4}^{2-}$, NO_{3}^{-}	1×10 ⁻⁶	3.5				
<i>L</i> -葡萄糖 , <i>D</i> -果糖 <i>L-</i> Glucose , <i>D-</i> Fructose	3×10 ⁻⁷	3.7	NO^{2-} , CO_3^{2-}	1×10 ⁻⁵	3.2				
<i>D_L</i> -丝氨酸 , <i>L</i> -鼠李糖 <i>D_L</i> -Serine , <i>L</i> -Rhamnose	4×10 ⁻⁷	1.8	IO_3^- , HCO_3^-	2×10 ⁻⁶	3.1				
淀粉 , 柠檬酸 Starch , Citric acid	1.5×10 ⁻⁷	2.3	Na ⁺ , K ⁺	2×10 ⁻⁵	4.7				
PO_3^{3-} , SO_3^{2-} , SO_4^{2-}	1×10^{-6}	1.9	I ⁻ , Br ⁻	2×10^{-6}	2.7				
${\rm Hg}^{2+}$, ${\rm NH}_4^+$, ${\rm Mg}^{2+}$	2.5×10 ⁻⁵	4.8							

3.7 样品的测定

利用本方法对人血清(桂林医 学院附属医院提供)中的 PSA 总量 进行测定,同时进行标准加入回收 实验,结果见表 2。正常人血清中 PSA 的参考值通常为0~4 μg/L,本 法测定结果与之基本吻合,结果令

表 2 血清样品分析结果

Table 2 Analytical results of serum samples

血清样品 ^{Serum} sample	测定值 Found (µg/L , <i>n</i> =6)	$(\% \ n=6)^{RSD}$	加入值 Added (µg/L)	总测定量 Total found (µg/L)	回收率 Recovery (%)
1	0.95	1.67	1	1.89	96.9
2	0.88	1.85	2	2.78	97.5
3	0.56	1.98	2.5	3.21	104.9

人满意。CdSe-CdTe 荧光能量转移体系发光强度大,操作简单,成本低廉,可针对不同免疫反应构建不 同免疫荧光共振能量体系,扩大其临床使用范围。

References

- SUN Xue-Gang, ZHANG Li-Hua, JIANG Yong. Chinese Journal of Pathophysiology, 2004, 20(9): 1721~1724
 孙学刚,张丽华,姜勇. 中国病理生理杂志, 2004, 20(9): 1721~1724
- YAN Mei, GE Shen-Guang, LU Juan-Juan, YU Jing-Hua. Chinese J. Anal. Chem., 2011, 39(11): 1711~1715
 颜梅, 葛慎光, 卢娟娟, 于京华. 分析化学, 2011, 39(11): 1711~1715
- 3 Wang Y L , Liu J B. Tong Z F. Acta Chimica Sinica , 2009 , 67(19) : 2222 ~ 2226
- 4 Chen H H , Ho Y P , Jiang X , Mao H Q , Wang T Z , Liang K W. Nano Today , 2009 , 4(2): 125 ~ 134
- 5 Dong H F , Gao W C , Yan F , Ji H X , Ju H X. Anal. Chem. , 2010 , 82 (13): 5511 ~ 5517
- 6 Algar W R , Krull U J. Sensors , 2011 , 11(6): 6214 ~ 6236
- 7 Galvez E M , Pardo J. Intern. J. Biomed. Nanosci. Nanotech. , 2011 , 2(1): 55 ~ 74
- 8 WANG Xu-Yan , LIANG Jian-Gong , MA Jin-Jie , CHEN Shu-Han , HAN He-You. Chem. J. Chinese Universities , 2010 , 31 (2): 260 ~ 263

王绪炎,梁建功,马金杰,陈姝韩,韩鹤友.高等学校化学学报,2010,31(2):260~263

- 9 Britton J , Antunes E , Nyokong T. Inorg. Chem. Commun. , 2009 , 12(9): 828 ~ 831
- 10 Xu H, Huang X M, Zhan W J, Chen G J, Zhu W H, Zhong X H. Chem. Phys. Chem. , 2010, 11(14): 3167 ~ 3171
- 11 Lunz M, Bradley A L, Chen W Y, Yurii K, Gun'ko K. Superlattices Microstruct. , 2010, 47(1): 98 ~ 102
- 12 YANG Tong-Hui, TIAN Bao-Li, JIANG Xiao-Hong, LI Lin-Song, DU Zu-Liang. Acta Chimica Sinica, 2010, 68(12): 1188 ~ 1192

杨同辉,田宝丽,蒋晓红,李林松,杜祖亮.化学学报,2010,68(12):1188~1192

- 13 Lunz M, Bradley A L, Gerard V A, Byrne S J, Gun´ko K, Yurii K, Lesnyak V, Nikolai G. Phys. Rev. B, 2011, 83 (11): 5423 ~ 5233
- SHI Bao-Qin, CAI Cao-Xia, MA Mei-Hu. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(3): 720~724
 石宝琴,蔡朝霞,马美湖. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(3): 720~724
- 15 LIN Zhang-Bi, SU Xing-Guang, ZHANG Hao, MOU Ying, SUN Ye, HU Hai, YANG Bai, YAN Gang-Lin, LUO Gui-Min, JIN Qin-Han. Chem. J. Chinese Universities, 2003, 24(2): 216~220 林章碧,苏星光,张皓,牟颖,孙晔,胡海,杨柏,闫岗林,罗贵民,金钦汉. 高等学校化学学报, 2003, 24(2): 216~220
- 16 SONG Jian , FAN Jia , SONG Da-Qian , BI Li-Rong , ZHOU Guang-Yu , ZHANG Hao , WEI Jing-Yan , YANG Bai. Chem. J. Chinese Universities , 2009 , 30(10) : 1940 ~ 1944
 - 宋健,范佳,宋大千,毕丽荣,周广宇,张皓,魏景艳,杨柏.高等学校化学学报,2009,30(10):1940~1944
- 17 LIU Hai-Yan, WU Sheng-Mei, CHENG Fang, HU Yu-Zhu, YAN Zheng-Yu. Chinese J. Anal. Chem., 2010, 38(7): 1036 ~ 1039

刘海燕,吴盛美,程芳,胡育筑,严拯宇.分析化学,2011,38(7):1036~1039

- YANG Xi, PAN Zu-Ting, Ma Yong. Journal of Analytical Science, 2003, 19(6): 588~589
 杨洗,潘祖亭,马勇. 分析科学学报, 2003, 19(6): 588~589
- 19 LIU Bao-Sheng , ZHANG Hong-Yi , WANG Fu-Li , CAO Yong-Xian. Spectroscopy and Spectral Analysis , 2003 , 23(3): 999 ~ 1001

刘保生,张红医,王甫丽,曹永献.光谱学与光谱分析,2003,23(5):999~1001

Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Quantum Dots of CdSe and CdTe and Its Application for Determination of Serum Prostate Specific Antigen

TAO Hui-Lin , LI Shu-Huai , Li Jian-Ping^{*} (College of Chemistry and Bioengineering , Guilin University of Technology , Guilin 541004)

Abstract Fluorescence resonance energy transfer (FRET) from CdSe quantum dots to CdTe quantum dots and the application for determining serum prostate specific antigen (PSA) were studied. It was found that the effective energy transfer can occur between CdSe and CdTe in the Tris-HCl buffer solution at pH = 8.0 in which the CdTe fluorescence intensity has been increased. As adding prostate specific antigen, the fluorescence intensity of CdSe-CdTe system is decreasing and finally quenching because of the specific immunological reaction between the PSA antigen and CdTe labled PSA antibody. There were good linear correlations between the concentrations of PSA antigen and the fluorescence quenched intensities. Then a new determination strategy of PSA was built by using the CdSe-CdTe system. Under optimum conditions , the linear range of determining PSA antigen was 0.28-10 µg/L , with a correlation coefficient of r=0.9992 and a detection limit of 1.5 ×10⁻²µg/L (n=11).

Keywords Quantum Dots; Fluorescence resonance transfer; Fluorescence quenching; Prostate specific antigen; Cadmium selenide; Cadmium telluride

(Received 25 August 2011; accepted 29 September 2011)