

基于 DNA 双链增强量子点自组装膜 能量转移的界面比率传感

孙艳凤, 孙向英, 杨传孝

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 分别以巯基乙酸(TGA)和三聚磷酸钠(STPP)为稳定剂,在水相条件下制备 CdTe 量子点和 ZnO@CdS 量子点.基于 DNA 双链增强自组装膜能量转移的原理,以 ZnO@CdS 量子点为能量供体,CdTe 量子点为能量受体,构筑 Quartz/PDDA/CdTe/PDDA/T₁-DNA/PDDA/ZnO@CdS SAMs 自组装膜,并实现对 DNA 的界面比率传感.随着匹配 DNA(P₁-DNA)的加入,ZnO@CdS 量子点的荧光强度 F_D 减小,相对荧光强度 F_A/F_D 和 P₁-DNA 浓度的负对数呈线性关系,线性范围为 $8.686 \times 10^{-9} \sim 6.080 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限为 $0.707 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词: 能量转移;自组装膜;界面荧光;比率传感;脱氧核糖核酸

中图分类号: O 657.3

文献标志码: A

荧光共振能量转移(FRET)技术因其高灵敏度、高分辨率和体内无损多色荧光成像等独特优点,被广泛应用于分子间距离和分子结构的测定^[1-3].将 DNA 杂交技术与 FRET 相结合,可用于基因突变检测、同源性分析和核酸定量分析等^[4-5].在荧光共振能量转移体系中,与传统荧光染料相比,量子点(QDs)因宽的吸收光谱和窄的发射光谱而成为非常理想的能量供受体材料.基于能量转移而构建的比率荧光传感,不仅能有效降低依据单一荧光强度定量分析的误差,而且可极大提高荧光分析的灵敏度和准确性.荧光自组装膜具有设计灵活、灵敏度高、操作简便等优点^[6],为构建比率传感提供了极大地便利.FRET 核酸杂交分析的原理很简单,即当分别带有 D, A 标记物的核酸探针单链发生杂交时,给体、受体之间的距离发生变化,就会引起荧光强度的变化,但对 DNA 进行标记的过程很复杂.因此,利用静电相互作用层层自组装多层膜,设计一个在膜上的荧光共振能量转移体系,避免了 DNA 的标记,同时达到检测 DNA 的目的.利用 DNA 杂交增强自组装膜能量转移,导致自组装膜中能量给体 ZnO@CdS 的荧光强度降低,受体 CdTe 的荧光强度增大,从而建立起基于 DNA 双链增强量子点自组装膜能量转移的界面比率传感新方法.本文利用静电相互作用将供受体连接起来,形成双色荧光 Quartz/PDDA/CdTe/PDDA/T₁-DNA/PDDA/ZnO@CdS SAMs 自组装膜,研究其能量转移的界面比率传感.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Varian Cary Eclipse 型荧光光谱仪(美国 Varian 公司),UV-2800H 型紫外分光光度计(上海 Unico 公司).CdCl₂·2.5H₂O,碲粉(纯度 99.999%),巯基乙酸(TGA),过氧化氢,硼氢化钾,浓硫酸,NaOH,三聚磷酸钠(STPP),乙酸锌(Zn(Ac)₂),硫脲(TU),除碲粉外均为分析纯试剂,上海国药集团化学试剂有限公司;聚二甲基二烯丙基氯化铵(PDDA),北京百灵威化学技术有限公司;实验用水采用 Milli. Q

收稿日期: 2013-04-27

通信作者: 孙向英(1965-),女,教授,主要从事纳米材料自组装与传感的研究. E-mail:sunxy@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21275059, 21175049);福建省自然科学基金资助项目(2011J01049, 2012J01044);中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(JB-2R1118)

型超纯水系统(美国 Millipore 公司)纯化. DNA 序列(购于广州英韦创津生物科技有限公司):靶 DNA 为 ssDNA (T_1 -DNA), $5'$ -AATGTAAGT- $3'$;完全配对 DNA 为 ctDNA (P_1 -DNA), $5'$ -CAGTTA-CATT- $3'$;完全不配对 DNA 为 mtDNA (P_{10} -DNA), $5'$ -TCAGGCTGCC- $3'$.

1.2 TGA 稳定的 CdTe 量子点的制备

水溶性的 CdTe 量子点参照文献[7-8]的方法合成. 将 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Te 粉和 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KBH_4 加入到 5 mL 的二次水中,通高纯氮气 15 min,密封,于 4°C 冰箱中反应 8 h,得到 KHTe 溶液;将 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TGA 溶于 100 mL 二次水中,用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节 pH 值至 9~10,在高纯氮气保护 30 min,剧烈搅拌下迅速加入新配制的 KHTe 溶液,于 100°C 下加热回流,控制回流时间,即可得到不同发射波长的 CdTe 量子点溶液.

1.3 ZnO@CdS 量子点的合成

ZnO@CdS 量子点的制备方法参考文献[9]. 将 1.2 mL, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 溶液和 8 mL, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三聚磷酸钠(STPP)溶液加入到装有 180 mL 二次水的 250 mL 三口烧瓶中,用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液调节溶液的 pH 至 12.0. 同时,边搅拌边将 0.6 mL, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲(TU)溶液加入到混合反应液中,然后加热回流. 用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液调节 9 mL, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸锌溶液的 pH 至 12.5;当混合反应液的回流温度达到 100°C 时,将 pH 为 12.5 的乙酸锌溶液加入到上述回流溶液中,同时剧烈搅拌. 最终,在 100°C 下回流时间持续 3 h,所得产物即为 ZnO@CdS 量子点溶液.

1.4 石英基底的预处理

将石英玻片切割成 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的方片,依次在铬酸洗液、二次水、无水乙醇中超声清洗 10 min;然后,在 Piranha 溶液($98\% \text{H}_2\text{SO}_4$ 与 $30\% \text{H}_2\text{O}_2$ 的体积比为 7:3)中于 80°C 下超声清洗 30 min;最后用二次水超声清洗 10 min,高纯氮气吹干.

1.5 Quartz/PDDA/CdTe/PDDA/ T_1 -DNA/PDDA/ZnO@CdS SAMs 的制备

以 ZnO@CdS 量子点为能量供体 D, CdTe 量子点为能量受体 A, PDDA 和单链 DNA(T_1 -DNA)做桥梁,利用静电相互作用将供受体连接起来,形成双色荧光 Quartz/PDDA/CdTe/PDDA/ T_1 -DNA/PDDA/ZnO@CdS SAMs(简称 T_1 -DNA SAMs)自组装膜,如图 1 所示.

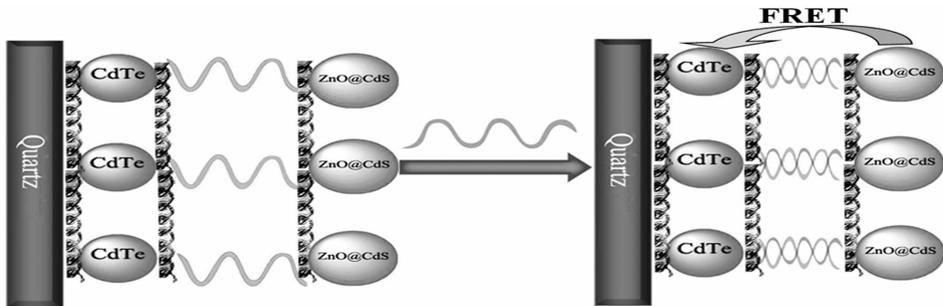


图 1 DNA 影响量子点自组装膜荧光共振能量转移示意图

Fig. 1 Schematic illustration of DNA-induced FRET of QDs SAMs

经预处理后的石英玻片在体积分数为 1% 的 PDDA 溶液组装 2 h,并在 CdTe 量子点溶液中组装 2 h,接着组装 PDDA. 然后,置于 T_1 -DNA 溶液中组装 3 h,继续组装 PDDA;最后,置于 ZnO@CdS 量子点($0.574 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,按 Cd^{2+} 浓度计算)溶液中组装 2 h,可得 T_1 -DNA SAMs 自组装膜. 每次组装完成后,先用二次水淋洗,高纯氮气吹干后,再进行下一层组装.

1.6 荧光检测

在 10 mL 比色管中,加入 1 mL 的 CdTe 量子点溶液,然后分别加入不同量的 ZnO@CdS 量子点,用二次水定容至 5.0 mL,摇匀后,分别测定其荧光强度(I),考察在不同 ZnO@CdS 浓度的 CdTe 量子点的荧光变化. 采用同样方法,考察在不同 CdTe 浓度的 ZnO@CdS 量子点的荧光变化.

将制备的 T_1 -DNA SAMs 置于 1 mL, pH 为 8.0, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,调整膜的位置,使其表面与入射光夹角保持在 50° , PMT 电压为 700 V,设定激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$,狭缝比为 $5.0 \text{ nm}/5.0 \text{ nm}$. 用微量进样器加入微量 P_1 -DNA 溶液,待稳定后,测定膜表面荧光强度(I).

2 结果与讨论

2.1 液相中供受体的荧光光谱分析

ZnO@CdS 量子点和 CdTe 量子点荧光光谱, 如图 2 所示. 图 2 中: 曲线 a, b 分别为 ZnO@CdS 量子点和 CdTe 量子点的荧光发射光谱; 曲线 c 为 CdTe 量子点的吸收光谱. 从图 2 可知: STPP 稳定的 ZnO@CdS 最大发射波长在 480 nm, 其荧光发射光谱(曲线 a)与最大发射波长在 600 nm, TGA 稳定的 CdTe 吸收光谱(曲线 c)有重叠, 且各自的发射光谱分得更开, 只有很少部分发生重叠. 荧光共振能量转移发生的首要条件, 是能量供体的发射光谱和能量受体的吸收光谱有重叠^[10-11]. 因此, 可以认为该波长的 CdTe 量子点可以和 ZnO@CdS 量子点组成荧光共振能量转移体系中的供受体对.

2.2 ZnO@CdS 量子点和 CdTe 量子点在液相的荧光共振能量转移

固定 ZnO@CdS 量子点的浓度, 改变 CdTe 量子点的浓度, 设置激发波长为 340 nm, 其荧光光谱如图 3 所示. 从图 3 可知: 随着 CdTe 量子点浓度的增加, ZnO@CdS 量子点的荧光强度不断降低, 而 CdTe 量子点的荧光强度不断增强. 由于 ZnO@CdS 量子点的浓度没有改变, 但其荧光强度却降低了, 说明 ZnO@CdS 量子点的能量发生了转移. 另一方面, 激发波长 340 nm 可以同时激发 ZnO@CdS 量子点和 CdTe 量子点, 所以随着 CdTe 量子点浓度的增大, 其荧光强度也会增大, 即图 3 中 CdTe 荧光强度的变化包含了两部分: 浓度增加带来的改变和能量转移带来的改变.

继续固定 CdTe 量子点的浓度, 改变 ZnO@CdS 量子点的浓度, 得到的荧光光谱如图 4 的所示. 从图 4 可知: 随着 ZnO@CdS 浓度的增加, CdTe 量子点的荧光强度不断增强, 但 CdTe 量子点的浓度没有发生改变, 这充分说明了 ZnO@CdS 和 CdTe 量子点在液相状态下可以发生荧光共振能量转移, ZnO@CdS 量子点的能量转移给了 CdTe 量子点, 所以 CdTe 量子点的荧光强度增强.

综上所述, 液相中 ZnO@CdS 量子点和 CdTe 量子点之间发生了荧光共振能量转移.

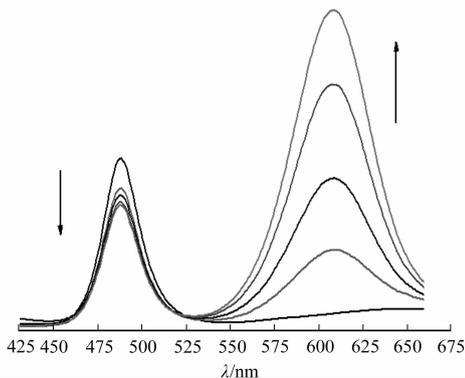


图 3 ZnO@CdS 量子点在不同浓度 CdTe 量子点中的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of ZnO@CdS QDs in variable concentration of CdTe QDs

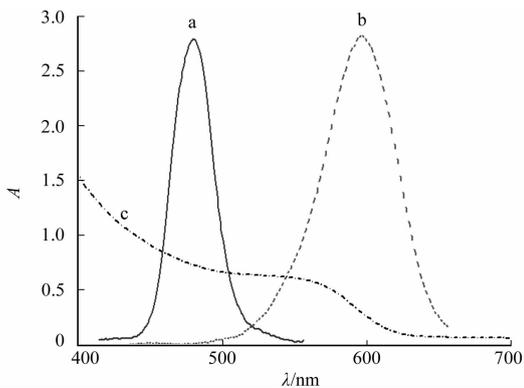


图 4 CdTe 量子点在不同浓度 ZnO@CdS 量子点中的荧光光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of CdTe QDs in variable concentration of ZnO@CdS QDs

2.3 自组装膜测试介质的选择

鉴于 ZnO@CdS 量子点和 CdTe 量子点可以在液相中发生能量转移, 因此可以利用层层自组装技术, 以 PDDA 和 DNA 为中间桥梁, 将两种量子点组装成 Quartz/PDDA/CdTe/PDDA/T₁-DNA/PDDA/ZnO@CdS 自组装膜, 基于 DNA 配对导致供受体间能量转移效率的改变来检测 DNA. 测试需要在缓冲溶液环境中进行. 由于检测 DNA 一般都在 Tris-HCl 缓冲溶液中, 且体系在 Tris-HCl 缓冲溶液中荧光强度很稳定, 所以选择 Tris-HCl 缓冲溶液.

测试体系 Quartz/PDDA/CdTe/PDDA/ T_1 -DNA/PDDA/ZnO@CdS 中的 DNA 和 ZnO@CdS, CdTe 量子点均受 pH 值的影响,且 DNA 配制在 pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液中最好保存, ZnO@CdS/CdTe 在碱性环境中更稳定. 所以,选择 pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液作为测试时的液相环境.

2.4 T_1 -DNA SAMs 对 DNA 界面比率传感

按照实验方法,在 T_1 -DNA SAMs 体系中加入完全配对 DNA(P_1 -DNA)溶液,其荧光光谱如图 5 所示. 图 5 中:内插图表示 CdTe 量子点的荧光强度(F_A)与 ZnO@CdS 量子点的荧光强度(F_D)的比值与 P_1 -DNA 浓度的负对数变化曲线. 从图 5 可知:随着 P_1 -DNA 浓度的增加,ZnO@CdS 量子点的荧光强度 F_D 逐渐降低,CdTe 量子点的荧光强度 F_A 逐渐增大,且变动趋势越来越缓. 究其原因,可能是由于随着 P_1 -DNA 的加入, T_1 -DNA 与 P_1 -DNA 进行杂交,形成双螺旋结构,供受体间距离缩短,增强能量转移效率^[12-13],使供体荧光强度降低,受体荧光强度升高.

从图 5 的插图可知: F_A/F_D 与 P_1 -DNA 浓度的负对数呈线性关系,线性响应范围为 $8.686 \times 10^{-9} \sim 6.080 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,相关系数为 0.990 32,方法检出限为 $0.707 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

相反,如果加入完全不配对的 DNA(P_{10} -DNA),则供受体荧光基本不变,其荧光光谱如图 6 所示. 从图 6 可知:随着 P_{10} -DNA 的加入,体系 T_1 -DNA SAMs 的荧光不变. 说明由于 DNA 不匹配,不能发生碱基配对反应,无法改变供受体间的距离,因此荧光转移效率不变,则荧光强度不变.

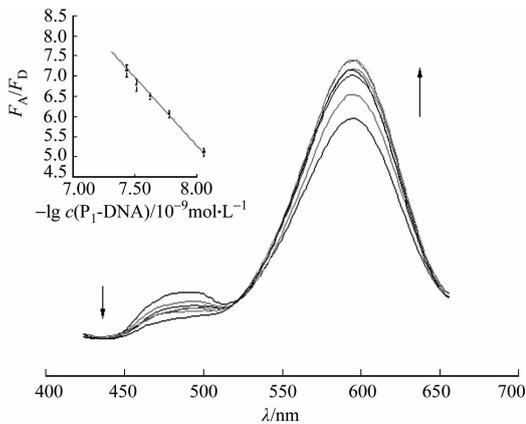


图 5 不同浓度 P_1 -DNA 溶液中 T_1 -DNA SAMs 的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence spectra of T_1 -DNA SAMs with different concentrations of P_1 -DNA

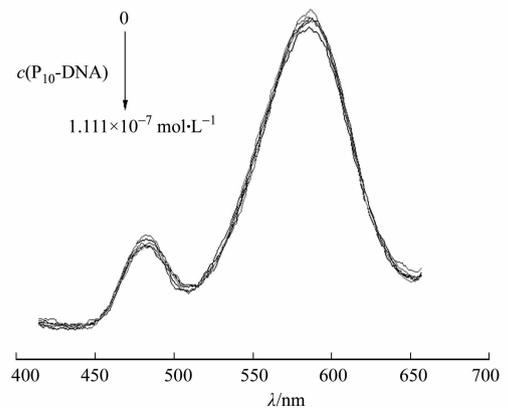


图 6 不同浓度 P_{10} -DNA 溶液中 T_1 -DNA SAMs 的荧光光谱

Fig. 6 Fluorescence spectra of T_1 -DNA SAMs with different concentrations of P_{10} -DNA

3 结束语

以 ZnO@CdS 量子点为能量供体,CdTe 量子点为能量受体,构筑了 Quartz/PDDA/CdTe/PDDA/ T_1 -DNA/PDDA/ZnO@CdS SAMs 自组装膜,并基于荧光共振能量转移对 DNA 进行界面比率传感. 实验结果表明:基于能量转移而构建的比率荧光传感不仅能有效降低依据单一荧光强度定量分析的误差,而且可极大提高荧光分析的灵敏度和准确度.

参考文献:

- [1] CHI Chun-wei, LAO Y H, LI Yi-shan, et al. A quantum dot-aptamer beacon using a DNA intercalating dye as the FRET reporter: Application to label-free thrombin detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(7): 3346-3352.
- [2] WANG T H. Discerning single molecule interactions of DNA and quantum dots[J]. Biotechnology Journal, 2013, 8(1): 15-16.
- [3] ASTAKHOVA I K, KUNAR T S, CAMLBELL M A, et al. Branched DNA nanostructures efficiently stabilized and monitored by novel pyrene-perylene 2'- α -L-amino-LNA FRET pairs[J]. Chemical Communications, 2013, 49(5): 511-513.

- [4] SUZUKI M, HUSIMI Y, KOMATSU H, et al. Quantum dot FRET biosensors that respond to pH, to proteolytic or nucleolytic cleavage, to DNA synthesis or to a multiplexing combination[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(17): 5720-5725.
- [5] JIANG G, SUSHI A S, LUTICH A A, et al. Cascaded FRET in conjugated polymer/quantum dot/dye-labeled DNA complexes for DNA hybridization detection[J]. *ACS Properties*, 2009, 3(12): 4127-4131.
- [6] SUN Xiang-ying, LIU Bin, ZHANG Ying. Rhodamine B aggregation in self-assembled multilayers induced by polyelectrolyte and interfacial fluorescence recognition for DNA[J]. *Talanta*, 2011, 85(2): 1187-1192.
- [7] ZHANG Hao, ZHOU Zhen, YANG Bai. The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107(1): 8-13.
- [8] ZHANG Hao, WANG Li-ping, XIONG Huan-ming, et al. Hydrothermal synthesis for high-quality CdTe nanocrystals[J]. *Advanced Materials*, 2003, 15(20): 1712-1715.
- [9] YANG Chuan-xiao, SUN Xiang-ying, LIU Bin. Visual and trap emission spectrometric detections of Ag(I) ion with mesoporous ZnO/CdS@SiO₂ core/shell nanocomposites[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 746(9): 90-97.
- [10] SCHOLLES G D. Long-range resonance energy transfer in molecular systems[J]. *Annual review of physical chemistry*, 2003, 54(1): 57-87.
- [11] MARRAS S A E, KRAMER F R, TYAGI S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(21): e122.
- [12] HANNESTAD J K, SANDIN P, ALBINSSON B. Self-assembled DNA photonic wire for long-range energy transfer[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(47): 15889.
- [13] LEE L, JOHNSTON A P R, CARUSO F. Probing the dynamic nature of DNA multilayer films using Förster resonance energy transfer[J]. *Langmuir*, 2012, 28(34): 12527-12535.

Interfacial Ratio Sensing Based on DNA Double Helix Enhancing Energy Transfer in Quantum Dots Self-Assembled Multilayers

SUN Yan-feng, SUN Xiang-ying, YANG Chuan-xiao

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: CdTe quantum dots (QDs) and ZnO@CdS QDs were synthesized directly in aqueous solution which were respectively stabilized by thioglycolic acid and sodium tripolyphosphate. With ZnO@CdS quantum dots as energy donors and CdTe quantum dots as energy acceptor, Quartz/PDDA/CdTe/PDDA/T₁-DNA/PDDA/ZnO@CdS SAMs was constructed and detected DNA by interfacial ratio sensing successfully based on DNA double helix enhancing energy transfer of quantum dots self-assembled multilayers. With the matching DNA (P₁-DNA) adding, the fluorescence intensity of ZnO@CdS QDs decreased and CdTe QDs increased. A good linear relationship between the relative fluorescence intensity F_A/F_D and the negative logarithm of concentration of P₁-DNA could be obtained in the range from 8.686×10^{-9} to $6.080 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the detection limit was $0.707 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Keywords: energy transfer; self-assembled layers; interfacial fluorescence; ratio sensing; deoxyribonucleic acid

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:熊兴泉)