

文章编号: 1000-7032(2010)01-0101-04

# 生物偶联过程对于聚合物包覆的水溶性 CdSe/ZnS 核壳量子点发光的影响

张友林<sup>1, 2</sup>, 曾庆辉<sup>1</sup>, 孔祥贵<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所 激发态物理重点实验室, 吉林 长春 130033;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 以传统的戊二醛交联的方法实现了聚丙烯酸包覆的 CdSe/ZnS 量子点和人 IgG 蛋白分子的偶联, 同时研究了偶联过程对量子点发光性能的影响。通过琼脂糖凝胶电泳技术证明量子点和蛋白分子偶联成功。通过稳态光谱和时间分辨光谱研究了偶联过程对量子点荧光性质的影响。发现偶联到量子点表面的戊二醛分子能够破坏量子点的表面从而增加其表面缺陷, 使量子点发光效率降低; 上述产物进一步与人 IgG 偶联增强了量子点的荧光强度, 这是由于连接到量子点上的蛋白分子修复了量子点的表面, 从而降低了表面缺陷所致。

**关键词:** CdSe/ZnS; 量子点; 生物偶联; 荧光性质

中图分类号: O482.31

PACS: 78.67.-n

PACC: 7855

文献标识码: A

## 1 引言

自1998年, 美国的 Nie 小组<sup>[1]</sup>和 Alivisatos 小组<sup>[2]</sup>同时在 Science 上发表了荧光量子点可以作为生物探针标记细胞的创新性论文, 并初步解决了量子点的水溶性以及生物相容性问题以来, 量子点在生物分析方面的应用立即引起国内外学术界的高度重视。从此, 围绕量子点新型荧光探针的研究蓬勃发展起来。特别是近几年来, 量子点荧光探针作为新兴的分析工具备受瞩目, 在生物化学传感、生物成像和生物标记等方面的研究取得了重大进展, 显示了量子点荧光探针巨大的应用价值和开发潜力<sup>[3-6]</sup>。

要实现量子点的生物应用, 一般需要三个步骤: 首先, 将量子点通过表面修饰变成生物相容性的量子点, 然后对其表面进行功能化处理, 将氨基和羧基等<sup>[7, 8]</sup>能够与蛋白分子偶联的基团连接到量子点表面上<sup>[7, 8]</sup>; 其次, 发展能够将量子点和生物分子偶联的方法, 如静电吸附和共价偶联等<sup>[9, 10]</sup>; 最后, 将获得的复合物根据相应的研究目

的应用在生物和医学诊断上。直到目前为止, 人们一直将研究重点放在上述几个方向, 并且取得了一系列的成果。

然而, 量子点由于具有小的尺寸和大的比表面积, 使得其荧光性质极易受周围环境的影响<sup>[11]</sup>。这是由于量子点大的比表面积使其表面存在着大量的表面态, 进而影响了量子点的荧光性质。但是, 通过包覆有机或者无机壳层可以有效地改善量子点的荧光性质, 其中利用宽带隙的半导体材料(如 CdS、ZnS)对 CdSe 量子点进行壳层包覆能够将量子点的量子产率提高到 50% 以上并且使其稳定性增加。尽管如此, 包覆核壳以及多壳层结构的量子点, 其荧光性质仍然对周围环境非常敏感<sup>[12]</sup>。鉴于量子点的生物应用由其荧光性质决定, 因此在应用过程中维持量子点的荧光性质稳定尤为重要。

本文中, 我们先利用修饰在聚丙烯酸侧链上的辛胺和油相量子点表面的配体通过疏水性相互作用将量子点从油相转移到水相, 然后利用共价连接方法实现了量子点对人免疫球蛋白 IgG 的偶联, 同时研究了偶联过程对量子点荧光性质的影

收稿日期: 2009-05-08; 修订日期: 2009-06-24

基金项目: 国家自然科学基金(60601015, 10674132); 国家“863”计划(2006AA03Z335); 荷兰皇家科学院与中国科学院合作交流资助项目

作者简介: 张友林(1977-), 男, 山东新泰人, 主要从事量子点光纤生物探针的研究。

E-mail: zyl0579@yahoo.com.cn, Tel: (0431)86176313

\*: 通讯联系人; E-mail: xgkong14@ciomp.ac.cn, Tel: (0431)86176313

响。上述实验结果为获得具有高效率发光的量子点与生物分子复合物提供了有益的参考。

## 2 实 验

### 2.1 实验试剂

聚丙烯酸包覆的 CdSe/ZnS 量子点,表面含有氨基;硼氢化钠、琼脂糖、戊二醛 (Glutaraldehyde)、人 IgG 购于北京鼎国生物试剂公司;硼酸盐缓冲溶液:0.05 mol/L 硼砂 ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ),0.2 mol/L 硼酸 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 配制 pH 值为 7.4 的缓冲溶液是把上述的硼砂和硼酸以 1:9 (体积比) 比例均匀混合即可。

### 2.2 CdSe/ZnS 量子点与人 IgG 的共价偶联

CdSe/ZnS 量子点与人 IgG 的共价偶联采用戊二醛交联的方法来完成 (见图 1)。具体实验如下:2 mL 的硼酸盐缓冲溶液 (pH = 7.4) 中加入 10  $\mu\text{L}$  的量子点在氩气环境中搅拌 2 h 后分离提纯除去多余的戊二醛,然后再加入 2 mg 的人 IgG,继续在氩气环境中搅拌 10 h;分离提纯除去多余的人 IgG,得到均匀分散的量子点与人 IgG 复合物溶液。

## 3 结果与讨论

我们通过聚合物包覆的方法将量子点从油相转移到水相,使其具有生物相容性。通过聚丙烯酸侧链修饰的辛胺和量子点表面配体之间的疏水性相互作用<sup>[13]</sup>把聚合物包覆在量子点的表面,并且在聚合物包覆层上含有能够和蛋白分子偶联的活性基团——氨基。由于在蛋白分子上可以利用的活性基团也是氨基。所以,我们利用传统的方法,通过戊二醛的交联作用把量子点表面的氨基和蛋白分子表面的氨基连接在一起形成复合物,偶联反应过程见图 1。

通过上述反应得到的量子点和蛋白分子复合物,可通过琼脂糖凝胶电泳技术验证人 IgG 分子是否已经被连接到量子点表面。图 2 给出了量子点不同阶段的偶联产物的琼脂糖电泳照片。因为量子点表面含有氨基,即量子点带有正电荷,所以量子点在电场的作用下向电泳槽的负极移动 (见图 2 的 1 带)。当把戊二醛分子偶联到量子点表面以后,量子点表面有一部分氨基将会被醛基取代,导致其表面所带的电荷量减少,因此相对于未被戊二醛偶联的量子点,泳动速度变慢 (见图 2 的

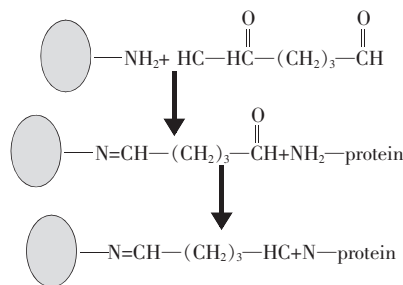


图 1 人 IgG 通过戊二醛交联法连接到量子点表面的示意图

Fig. 1 Scheme for conjugating human IgG to QDs via a glutaraldehyde cross-linking procedure

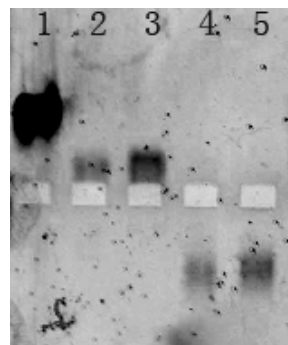


图 2 量子点在不同阶段的偶联产物的电泳照片,1 是聚丙烯酸包覆的量子点;2 和 3 是与戊二醛偶联后的量子点;4 和 5 是与人 IgG 分子偶联后的量子点。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis luminescence image of QDs, QD-CHO, QD-IgG. Wells: 1-QDs, 2 and 3-QD-CHO, 4 and 5-IgG.

2 和 3 带)。当把人 IgG 分子连接到量子点表面后,由于蛋白分子带有大量的负电荷,中和了戊二醛修饰的量子点表面剩余的正电荷并使其带有负电荷,因此量子点和人 IgG 的复合物在电场的作用下向正极移动 (见图 2 4 和 5 带)。上述的琼脂糖凝胶电泳实验证明人 IgG 分子已经通过共价方法成功偶联到聚丙烯酸包覆的 CdSe/ZnS 量子点表面上。

由于量子点的荧光性质极易受周围环境的影响,因此应尽量减少偶联过程对量子点发光的影响。图 3 给出了量子点不同阶段偶联产物的荧光光谱,激发波长为 488 nm。当把戊二醛分子通过共价反应连接到量子点表面后,量子点的发光强度降低;而当把人 IgG 蛋白分子连接到戊二醛修饰的量子点表面后,量子点的发光强度增强,并且最终量子点和人 IgG 复合物的发光强度会大于量子点的发光强度,而且偶联过程对量子点的荧光

光谱的形状没有影响。通过荧光光谱的测量可知,经过一系列偶联过程后获得的量子点和蛋白分子的复合物维持了量子点原有的荧光性质。为了研究偶联过程对量子点荧光影响的机制,我们对其做了时间分辨光谱的测量。图 4 给出了量子点不同阶段偶联产物的荧光衰减曲线,激发波长为 350 nm。荧光衰减曲线可以用双指数函数进行很好的拟合。为了比较寿命的变化,我们用下面的公式:

$$\tau_{AV} = \frac{A_1\tau_1^2 + A_2\tau_2^2}{A_1\tau_1 + A_2\tau_2}, \tag{1}$$

计算得到了不同阶段偶联产物的平均寿命。量子点的平均寿命为 24.02 ns,当把戊二醛通过共价反应连接到量子点表面后,减小了量子点的寿命(18.42 ns),而把人 IgG 蛋白分子连接到戊二醛修饰

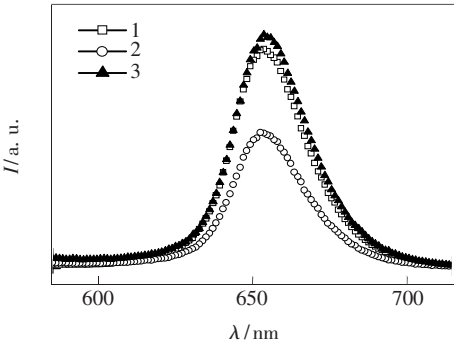


图 3 量子点在不同阶段偶联产物的荧光光谱图,1 是量子点 2 是戊二醛修饰的量子点 3 是人 IgG 修饰的量子点。

Fig. 3 Photoluminescence spectra of different conjugates , 1-QDs , 2-QD-Cho , and 3-QD-IgG.

参 考 文 献:

[ 1 ] Chan W C , Nie S M . Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [ J ] . *Science* , 1998 , **281** ( 5385 ) : 2016-2018 .

[ 2 ] Bruchez M , Moronne M , Alivisatos A P , et al . Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels [ J ] . *Science* , 1998 , **281** ( 5385 ) : 2013-2016 .

[ 3 ] Dubertret B , Skourides P , Norris D J , et al . In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles [ J ] . *Science* , 2002 , **298** ( 5599 ) : 1759-1762 .

[ 4 ] Jaiswal J K , Mattoussi H , Mauro J M , et al . Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates [ J ] . *Nat. Biotechnol.* , 2003 , **21** ( 1 ) : 47-51 .

[ 5 ] Dahan M , Levi S , Luccardini C , Rostaing P , et al . Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking [ J ] . *Science* , 2003 , **302** ( 5644 ) : 442-445 .

[ 6 ] Kim S , Lim Y T , Soltesz E G , et al . Near-infrared fluorescent type quantum dots for sentinel lymph node mapping [ J ] . *Nat. Biotechnol.* , 2004 , **22** ( 1 ) : 93-97 .

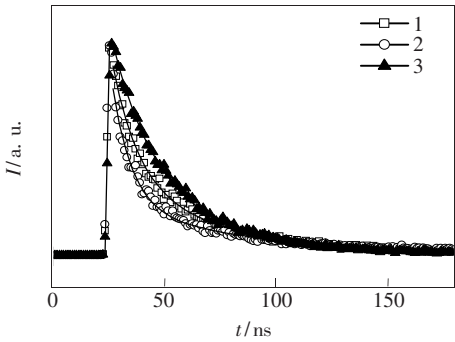


图 4 量子点在不同阶段偶联产物的荧光衰减曲线,1 是量子点 2 是戊二醛修饰的量子点 3 是人 IgG 修饰的量子点。

Fig. 4 Fluorescence decay curves of different conjugates , 1-QDs , 2-QD-Cho , and 3-QD-IgG.

的量子点表面后增加了量子点的寿命(27.77 ns)。根据文献[14,15]可知,偶联过程主要改变了量子点的非辐射跃迁率。因此,稳态和时间分辨光谱的测量表明偶联戊二醛破坏了量子点的表面,导致量子点的发光效率降低;偶联蛋白修复了量子点的表面,导致量子点的发光效率提高<sup>[14~16]</sup>。

4 结 论

利用传统的戊二醛交联的方法成功实现了聚合物包覆的水溶性 CdSe/ZnS 量子点和免疫球蛋白 IgG 分子的偶联。通过稳态光谱发现,戊二醛偶联后的量子点发光的量子产率下降,而连有戊二醛的量子点和蛋白分子偶联后其发光的量子产率提高,时间分辨光谱的测量表明:偶联戊二醛的过程增加了量子点的表面缺陷,而偶联蛋白的过程修复了量子点的表面缺陷。

- [7] Wu X, Liu H, Liu J, *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**(1):41-46.
- [8] Mamedova N N, Kotov N A, Rogach A L, *et al.* Albumin-CdTe nanoparticle bioconjugates: preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect [J]. *Nano Lett.*, 2001, **1**(6):281-286.
- [9] Mattoussi H, Mauro J M, Goldman E R, *et al.* Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dots bioconjugates using an engineered recombinant protein [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**(49):12142-12150.
- [10] Gerion D, Chen F, Kannan B, *et al.* Room-temperature single-nucleotide polymorphism and multiallele DNA detection using fluorescent nanocrystals and microarrays [J]. *Anal. Chem.*, 2003, **75**(18):4766-4772.
- [11] Daboussi B O, Viejo J R, Mikulec f V, *et al.* CdSe-ZnS core-shell quantum dots; synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites [J]. *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**(46):9463-9475.
- [12] Xie R, Kolb U, Li J, Basche T, *et al.* Synthesis and characterization of highly luminescent CdSe-core CdS/ZnCdS/ZnS multishell nanocrystals [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**(20):7480-7488.
- [13] Feng Liyun, Kong Xiangui. Preparation and characterization of fluorescence CdSe-liposome compound [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2007, **28**(3):417-420 (in Chinese).
- [14] Jones M, Nedeljkovic J, Ellingson, *et al.* Photoenhancement of luminescence in colloidal CdSe quantum dot solution [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**(41):11346-11352.
- [15] Hess B C, Okhrimenko I G, Davis R C, *et al.* Surface transformation and photoinduced recovery in CdSe nanocrystals [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **86**(14):3132-3135.
- [16] Yan Haizhen, Cheng Cheng, Zhang Qinghao. Effect of the temperature on absorption and photoluminescence spectra of CdSe/ZnS quantum dots [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2008, **29**(1):166-171 (in Chinese).

## The Influence of Bioconjugate Process on the Photoluminescence Properties of Water-soluble CdSe/ZnS Core-shell Quantum Dots Capped with Polymer

ZHANG You-lin<sup>1,2</sup>, ZENG Qing-hui<sup>1</sup>, KONG Xiang-gui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Excited State Process, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Conjugates of human IgG and CdSe/ZnS quantum dots (QDs) capped with an amphiphilic poly (acrylic acid) polymer modified with poly (ethylene glycol) amine were synthesized by a glutaraldehyde (Cho) cross-linking procedure. The IgG-QD assemblies form in this reaction, as evidenced by gel electrophoresis. The key function of QD bioconjugates is to fluoresce readily and remain stable in biological conditions in order to allow for efficient bioapplication. However, the photoluminescence (PL) properties of QDs are sensitive to their environment, so it is particularly important to study the mechanisms of the PL change of QDs linked to biomolecules. The effect of cross-linking processes on the PL of QDs was studied by means of steady-state and time-resolved photoluminescence spectroscopy. Attachment of Cho on the surface of QDs results in a significant decrease of QD emission due to the increase of surface defects with Cho destroying the surface of QDs. Attachment of IgG on the surface of QDs results in a significant increase of QD-Cho emission, which is attributed to the conjugation of IgG to QD modifying the surface of CdSe/ZnS QDs.

**Key words:** CdSe/ZnS; quantum dots; bioconjugation; photoluminescence

**CLC number:** O482.31

**PACS:** 78.67.-n

**PACC:** 7855

**Document code:** A