

[研究快报]

# 利用水相合成的量子点标记木瓜蛋白酶的研究

林章碧<sup>1</sup>, 张皓<sup>2</sup>, 陈奇丹<sup>1</sup>, 万异<sup>1</sup>, 杨柏<sup>2</sup>,  
苏星光<sup>1,3</sup>, 张家骅<sup>3</sup>, 金钦汉<sup>1</sup>

(吉林大学, 1 化学学院分析科学研究所; 2 超分子结构与材料教育部重点实验室, 长春 130023;  
3 中国科学院激发态物理开放实验室, 长春 130021)

关键词 量子点; 木瓜蛋白酶; 静电相互作用

中图分类号 O 657.31

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2003)04-0609-03

利用半导体纳米粒子(也称半导体量子点, Quantum Dots, 以下简称QDs)和表面修饰技术制备的半导体荧光探针具有极其优良的光谱特征和光化学稳定性<sup>[1]</sup>。自1997年以来, 随着量子点制备技术的不断提高, 量子点在生物医学方面已有应用。1998年, Alivisatos<sup>[1]</sup>和Nie<sup>[2]</sup>两个研究小组分别将结合了生物分子的QDs作为荧光探针应用于生物体系, 开创了纳米粒子应用的新领域。最近Nie等<sup>[3]</sup>在利用量子点编码生物分子的研究中取得了突破性进展。目前, 纳米粒子与生物分子的连接以共价键方式相结合最为常见<sup>[1,2,4,5]</sup>, 而且在这些应用中所使用的QDs大都是在有机溶剂中制备的, 其制备条件比较苛刻, 成本较高, 这给进一步推广应用带来了一定的困难。因此, 研究在水溶液中直接合成半导体量子点及其在生物医学研究中的应用具有重要意义。本文所采用的QDs是直接在水溶液中合成的尺度较均一的被巯基丙酸包覆的CdTe纳米粒子。在选定的pH值条件下, 通过静电相互作用, 使纳米粒子与带正电荷的生物分子——木瓜蛋白酶相结合, 并通过光谱数据和TEM图像证实了这一结果。本方法简便、快速, 为生物医学研究提供了一种非传统的荧光检测新方法。

## 1 实验部分

1.1 仪器与试剂 RF-5301PC型荧光分光光度计(日本岛津), UV-1200型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), H-8100IV型透射电子显微镜(日本日立), TEM操作电压200 kV, 光学测试均在室温下进行。木瓜蛋白酶(质量体积浓度10 mg/mL)购自Roche公司, 用pH值为7.3的硼酸缓冲液稀释并于0~4℃时保存, 实验中所用高纯水的电阻率大于18 MΩ·cm。

1.2 CdTe纳米粒子的制备 巯基丙酸包覆的CdTe纳米粒子的制备方法见文献[4, 6]。

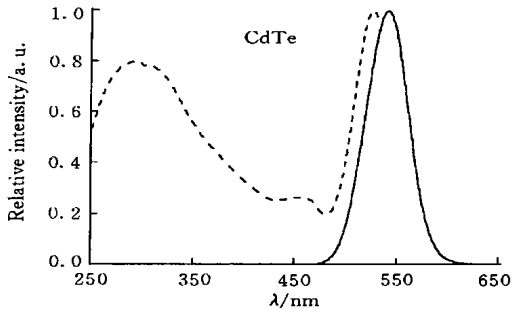
1.3 CdTe纳米粒子标记木瓜蛋白酶 用pH值为7.3的硼酸缓冲液(2 mmol/L)分别将木瓜蛋白酶和CdTe纳米粒子溶液稀释。向CdTe纳米粒子溶液中加入一定量的木瓜蛋白酶(1 mg/mL), 混合均匀后即可进行光谱检测。

## 2 结果与讨论

2.1 CdTe纳米粒子溶液的荧光光谱 图1为所合成的CdTe纳米粒子在pH=7.3的硼酸缓冲液中的激发和发射光谱。可见, CdTe纳米粒子在542 nm处有一窄而强的带边发射(FWHM=49 nm)。

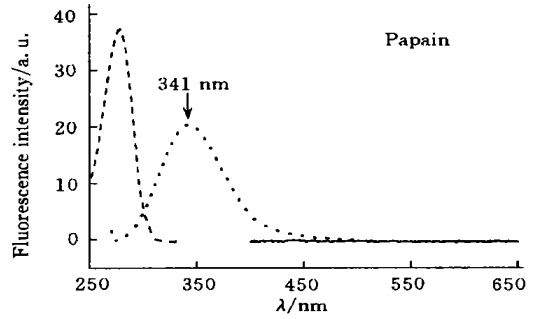
2.2 木瓜蛋白酶溶液的光谱分析 由图2(木瓜蛋白酶在硼酸缓冲溶液中的吸收光谱和发射光谱)可见, 木瓜蛋白酶分子自身发出的荧光(341 nm)不会对CdTe纳米粒子的荧光(542 nm)测定产生影响。

2.3 CdTe-木瓜蛋白酶溶液的光谱分析 图3为用380 nm激发时单独的CdTe纳米粒子溶液和加入木瓜蛋白酶后CdTe纳米粒子溶液的荧光发射光谱。由图3可见, 单独的CdTe纳米粒子溶液的荧光发射峰在542 nm处, 而加入了木瓜蛋白酶的CdTe纳米粒子溶液的荧光发射峰位于557 nm, 红移了



**Fig 1** Excitation (dashed) and fluorescence (solid) spectra of CdTe nanoparticles in sodium borate buffer solution

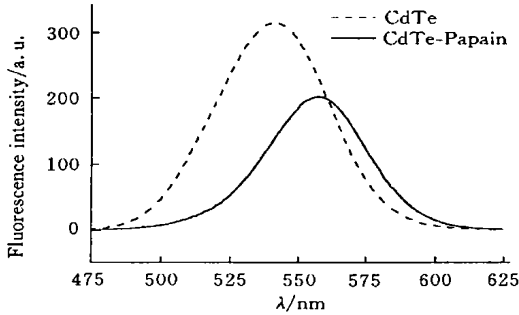
Excitation spectrum was obtained at  $\lambda_m = 542$  nm and fluorescence spectrum was obtained at  $\lambda_{ex} = 380$  nm.



**Fig 2** Excitation (dashed) and fluorescence (dotted and solid) spectra of papain in sodium borate buffer solution

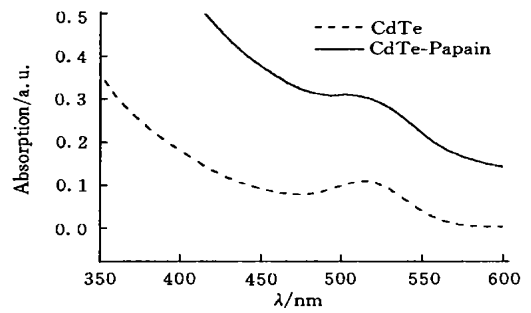
Excitation spectrum was obtained at  $\lambda_m = 340$  nm and fluorescence spectra were obtained at  $\lambda_{ex} = 260$  nm (dotted) and at  $\lambda_{ex} = 380$  nm (solid).

15 nm, 而发射谱的半峰宽不变, 表明CdTe-木瓜蛋白酶的发射谱仍然保持QDs对称分布的窄谱特征<sup>[1]</sup>。比较二者的吸收光谱(图4)可见, CdTe-木瓜蛋白酶溶液的吸收值增强, 其在400~600 nm范围内的吸收曲线变得较为平坦。引起吸收光谱及发射峰位变化的原因可能是由于CdTe纳米粒子与木瓜蛋白酶通过静电相互作用结合, 使得CdTe纳米粒子之间的距离缩短, 从而粒子间偶极与偶极的相互作用增强, 使其Stokes位移增大, 所以其发射光谱相对于CdTe纳米粒子的发射光谱发生了红移<sup>[7]</sup>。



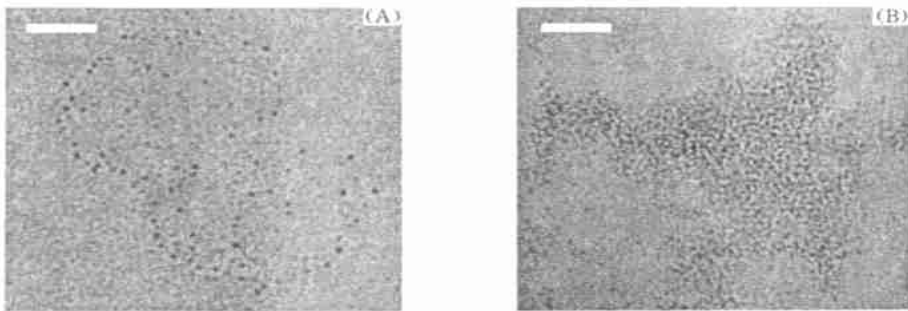
**Fig 3** Fluorescence spectra of CdTe nanoparticles solution and CdTe-papain solution

The  $\lambda_{ex}$  for obtaining the two spectra was all at 380 nm.



**Fig 4** The absorption spectra of CdTe nanoparticles solution and CdTe-papain

2.4 电镜分析 图5为单独的CdTe纳米粒子[图5(A)]和结合了木瓜蛋白酶的CdTe纳米粒子[图5(B)]的透射电镜图象。由图5(A)可知, CdTe纳米粒子的平均尺寸约为3 nm, 尺寸分布较为均匀。由图5(B)可以看出, 与木瓜蛋白酶分子通过静电相互作用结合后, CdTe纳米粒子之间的距离明显缩短,



**Fig 5** TEM images of mercaptopropyl acid stabilized CdTe nanoparticles (A) and CdTe nanoparticles bound to papain (B)

The scale bar corresponds to 50 nm.

这也支持了上述推断

2.5 pH 值的影响 用不同 pH 值的硼酸缓冲液稀释木瓜蛋白酶和 CdTe 纳米粒子溶液, 当所用硼酸缓冲液的 pH 值为 9.3 时, 加入木瓜蛋白酶的 CdTe 纳米粒子溶液的荧光发射峰位与单独 CdTe 纳米粒子溶液相同, 均在 542 nm 处。这是由于木瓜蛋白酶的等电点为 8.75<sup>[8]</sup>, 当溶液的 pH = 9.3 时, 木瓜蛋白酶呈负电性, 与带相同电荷的 CdTe 纳米粒子相互排斥, 所以两者之间不会发生静电相互作用, 即荧光发射峰位不会发生变化; 而当溶液的 pH = 7.3 时, 木瓜蛋白酶呈正电性, 因此能通过静电相互作用与表面带负电荷的 CdTe 纳米粒子结合。这也进一步说明加入了木瓜蛋白酶后, CdTe 纳米粒子溶液的发射光谱和吸收光谱的变化确实是由 CdTe 纳米粒子与木瓜蛋白酶之间的静电结合反应引起的。

纳米粒子与生物分子通过静电相互作用相结合的方法简便易行。通过改变体系的 pH 值, 可以使纳米粒子选择性地标记目标生物分子。这种类型的生物荧光探针可以作为灵敏的检测试剂或细胞内的示踪剂, 也可以用于细胞表面的标记等研究<sup>[9]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Bruchez Jr M., Moronne M., Alivisatos A. P. *et al.* Science[J], 1998, **281**: 2 013—2 016
- [2] Chan W. C. W., Nie S. M. Science[J], 1998, **281**: 2 016—2 018
- [3] Han M. Y., Gao X. H., Nie S. M. *et al.* Nature Biotech [J], 2001, **19**: 631—635
- [4] L N Zhang-Bi(林章碧), SU Xing-Guang(苏星光), J N Q in-Han(金钦汉) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(2): 216—220
- [5] ZHANG Chun-Yang(张春阳), MA Hui(马 辉), D NG Yao(丁 尧) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2001, **22**(1): 34—37
- [6] Zhang H., Yang B. Thin Solid Films[J], 2002, **418**: 169—174
- [7] Döllefeld H., Weller H., Eychem Üler A. Nano Letters[J], 2001, **1**: 267—269
- [8] HUANG Wen-Tao(黄文涛), HU Xue-Zhi(胡学智). Application Handbook Enzymes(酶应用手册)[M], Shanghai Science and Technology Press, 1989: 113—116
- [9] Mattoussi H., Mauro J. M., Goldman E. R. *et al.* J. Am. Chem. Soc [J], 2000, **122**: 12 142—12 150

## Studies on Labeling of Papain with Quantum Dots Synthesized in Aqueous Solution

L N Zhang-Bi<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>2</sup>, CHEN Qi-Dan<sup>1</sup>, WAN Yi<sup>1</sup>, YANG Bai<sup>2</sup>,  
SU Xing-Guang<sup>1,3,\*</sup>, ZHANG Jia-Hua<sup>3</sup>, J N Q in-Han<sup>1</sup>

(1. Institute of Analytical Science, College of Chemistry; 2. Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130023, China; 3. Laboratory of Excited State Processes, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130021, China)

**Abstract** The feasibility of the mercaptopropyl acid modified CdTe nanoparticles synthesized in aqueous solution to the labeling of biomolecules — papain *via* electrostatic interaction was studied in this paper. The absorption spectrum of CdTe-papain solution became more flat than that of CdTe nanoparticles in the wavelength range from 400 to 600 nm. While the emission peak of CdTe-papain solution underwent a red-shift, the intrinsic emission band width was unchanged. The TEM images of monodisperse mercaptopropyl acid stabilized CdTe nanoparticles and CdTe-papain solution were compared and the effect of pH of buffer solution was studied. It was proved that the red-shift of the emission peak was the result of the electrostatic interaction between CdTe nanoparticles and papain.

**Keywords** Quantum dots; Papain; Electrostatic interaction

(Ed: A, G)