



论文

量子点-罗丹明B比率型荧光探针的制备与性能

梁潇, 袁野, 曹婷婷, 董丽杰*

武汉理工大学智能材料与器件研究中心, 武汉 430070

*通讯作者, E-mail: dong@whut.edu.cn

收稿日期: 2017-05-06; 接受日期: 2017-08-01; 网络版发表日期: 2017-09-26

国家自然科学基金(编号: 51273157)和湖北省自然科学基金(编号: 2016CF008)资助项目

摘要 本文采用CdSe/Cd_xZn_{1-x}S核/合金壳量子点(QDs)作为荧光共振能量转移体系(FRET)的供体, 通过巯基络合作用在其表面修饰一层L-半胱氨酸(Cys)分子, 赋予QDs优异的水溶性, 再通过静电相互作用将罗丹明B (RhB)构筑于QDs-Cys表面, 获得了一类新型的水溶性FRET体系. 采用荧光光谱分析了pH以及供受体浓度比对FRET能量转移效率的影响. 研究表明, 通过静电结合构筑的QDs-Cys-RhB荧光共振能量转移体系对pH和供受体浓度具有敏感的荧光信号响应性能. 当pH从10降到7时, FRET体系的荧光共振能量转移效率由49.39%增加到58.99%; 当供受体浓度比为3:1时, FRET体系的能量转移效率高达61.09%. 由此可见, 通过表面络合与静电相互作用构筑的QDs-Cys-RhB荧光共振能量转移体系具有优异的光信号响应性, 可以作为一类灵敏、精确的可调式比率型荧光探针, 在生物检测、免疫分子等领域中具有广阔的应用前景.

关键词 荧光共振能量转移, 量子点, 罗丹明B, 可调式比率型荧光探针

1 引言

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术被称为“光学分子尺”, 被广泛应用于生物大分子结构、性质和反应机理研究^[1,2]以及环境、医学领域的痕量组分检测^[3,4]. 目前常用的FRET探针大多采用有机染料作为供、受体对, 但是由于有机染料易光漂白、吸收光谱窄、发射光谱较宽且伴有拖尾, 使得所构筑的FRET体系因具有光稳定性差、假阳性信号高等问题, 使其应用受到极大的限制^[5-8].

半导体量子点(quantum dots, QDs)以其发射光谱窄、吸收光谱宽、荧光波长随粒径变化连续可调、性能稳定等诸多优点^[9,10], 可取代FRET体系的有机荧光染料, 在可调式荧光探针^[11,12]、基因检测^[13]、痕量

分析^[3,4]等领域具有十分广阔的应用前景. QDs既可作为能量供体, 也可作为能量受体^[14-16]. 目前文献报道的FRET供体量子点主要包括CdTe^[5]、CdSe^[17]、CdS^[18]以及CdTe/CdS^[19]、CdSe/CdS^[20]等. CdSe和CdTe表面存在大量缺陷和不饱和悬键, 荧光效率较低, 虽然可以通过表面包覆宽带隙的CdS或ZnS来降低表面缺陷、提高荧光效率、改善荧光寿命, 但由此使得晶格失配, 合成复杂、颜色调控困难以及光学稳定性较差, 因此基于这一类QDs所构筑的FRET体系在应用中受到了很大的限制^[21,22].

本文采用高温注射法制备了CdSe/Cd_xZn_{1-x}S核/合金壳量子点^[23], 相较于常见的核壳量子点, 如CdSe/CdS量子点, CdSe/Cd_xZn_{1-x}S核/合金壳量子点具有制备工艺简单、荧光性能优异、结构稳定、可通过调节组

引用格式: 梁潇, 袁野, 曹婷婷, 董丽杰. 量子点-罗丹明B比率型荧光探针的制备与性能. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1191-1197
Liang X, Yuan Y, Cao T, Dong L. Preparation and properties of QDs and RhB ratiometric fluorescent probe. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1191-1197, doi: 10.1360/N032017-00079

分来获得不同发射波长的QDs等优点^[24-26]. 以其作为FRET供体, 可以确保所构筑的FRET体系的高效与稳定. 采用Cys作为表面修饰剂, 利用其优异的水溶性能通过配体交换使Cys络合于QDs的表面, 再基于能量匹配, 通过QDs-Cys表面带负电荷的羧酸根与罗丹明B (Rhodamine B, RhB)上带正电的氮原子发生静电相互作用, 构筑一类高效灵敏的QDs-Cys-RhB荧光共振能量转移体系, 如图1所示.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

氧化镉(CdO, AR, 上海亭新化工试剂厂, 中国), 硒粉(Se, 99.99%, Sigma-Aldrich公司, 美国), 硫粉(S, >99.5%, 国药集团化学试剂有限公司, 中国), 醋酸锌($\text{Zn}(\text{Ac})_2$, AR, 国药集团化学试剂有限公司), 三辛基膦(TOP, 90%, Sigma-Aldrich公司), 油酸(OA, CP, 国药集团化学试剂有限公司), 1-十八烯(ODE, 90%, Alfa Aesar公司, 美国), L-半胱氨酸(Cys, AR, Alfa Aesar公司), 罗丹明B (RhB, AR, Alfa Aesar公司), 氢氧化钠(NaOH, AR, 国药集团化学试剂有限公司). 其他有机溶剂如正己烷、三氯甲烷、丙酮、乙醇等均购自国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 去离子水为实验室自制.

用场发射高分辨透射电子显微镜(HR-TEM, JEM-2100, JEOL, 日本)观察样品形貌. 用X射线衍射仪(XRD, D8 Advance, 布鲁克AXS公司, 德国)表征晶型. 用Nexus智能型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR, Nicolet6700, 美国)和X射线光电子能谱仪(XPS, ESCALAB 250Xi, 赛

默飞世尔科技有限公司, 美国)表征元素结构. 利用紫外-可见分光光度计(UV-2500, 岛津公司, 日本)测定溶液吸收光谱, 荧光分光光度计(RF-5301PC, 岛津公司, 日本)测定溶液荧光光谱, 激发狭缝宽度均为3 nm, 发射狭缝宽度均为5 nm. PHS-3C型精密pH计(上海精密科学仪器有限公司, 中国).

2.2 油溶性合金量子点的制备

基于文献方法^[23], 通过高温注射, “一锅法”制备具有高量子产率、高稳定的 $\text{CdSe}/\text{Cd}_x\text{Zn}_{1-x}\text{S}$ 核/合金壳量子点. 典型的制备方法如下: 称取0.04 mmol Se粉, 4 mmol S粉, 分别溶解于TOP中, 常温搅拌3 h, 制得Se和S的前驱体; 称取0.4 mmol CdO、4 mmol $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ 和一定量的ODE, 置于250 mL三口烧瓶中, 反复抽真空和充氮气, 以使反应体系在无水无氧条件下进行, 缓慢升温至体系温度达到150℃, 保持20 min后继续升温至310℃, 迅速注入Se和S的前驱体, 温度降至300℃, 持续反应6 min. 反应结束后将体系降至室温, 取出反应物加入乙醇进行沉淀, 再用丙酮洗涤3次后得到油溶性合金量子点, 并溶解于三氯甲烷避光保存.

2.3 通过配体交换制备QDs-Cys水溶液

取一定量的Cys加入到NaOH水溶液中, 通过剧烈搅拌使其溶解并将溶液pH调至9~10; 取1 mL制备好的QDs三氯甲烷溶液和过量的Cys水溶液于反应管中进行混合, 可清晰地看到分层现象. 用365 nm的紫外灯照射, 下层QDs-三氯甲烷溶液呈现明亮的绿色荧光, 而上层水溶液无变化; 将反应管于室温下抽真空, 反复

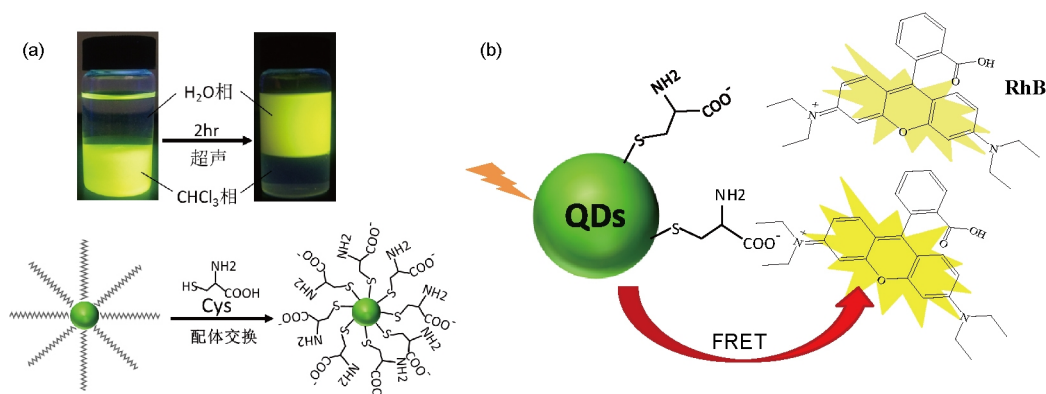


图1 QDs-Cys-RhB FRET体系示意图. (a) QDs与Cys配体交换机理和相转移图; (b) 改性后QDs与RhB通过表面的静电相互作用进行荧光共振能量转移(网络版彩图)

脱气后,以200 W的功率超声10 min,剧烈搅拌1 h后以8000 r/min的转速下超速离心10 min. 可以发现,反应管中的上层清液呈现了明亮的绿色荧光. 将上层清液放置于截留率为8000的透析袋中在循环水中透析72 h以上,除去过量的Cys,得到QDs-Cys水溶液.

2.4 QDs-Cys-RhB FRET体系的制备与参数计算

配制一定浓度的RhB乙醇溶液,向其中缓慢滴加不同浓度的QDs-Cys水溶液,如图1所示,通过两者之间的静电相互作用,使得QDs与RhB之间的距离满足荧光共振能量转移的条件,进而得到一系列不同浓度比的FRET体系.

根据Förster能量转移理论,荧光共振能量转移效率(E)与能量供体、受体跃迁偶极的相对取向、能量供体的荧光发射光谱与受体的紫外、可见吸收光谱的重叠程度以及能量供体与受体之间的距离等密切相关,通过以下公式:

$$E = 1 - F_{DA} / F_D = nR_0^6 / (nR_0^6 + r^6) \quad (1)$$

$$J_{AD} = \int_0^\infty PL_{D-conv}(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} k^2 n_D^{-4} \Phi_D J_{AD} \quad (3)$$

$$r = R_0 [n(1 - E) / E]^{1/6} \quad (4)$$

对FRET体系荧光共振能量转移效率和QDs-RhB之间的距离 r ^[2,20]进行计算,其中 E 为荧光共振能量转移效率, F_{DA} 为受体存在时供体的荧光强度, F_D 为受体不存在时供体的荧光强度, R_0 为Förster半径, J_{AD} 为供体(QDs)荧光光谱与受体(RhB)吸收光谱的重叠积分面积, Φ_D 为供体的荧光量子产率(罗丹明6G为标准); k^2 为偶极空间取向因子,一般取2/3; n_D 为介质的折射系数, n 表示与供体分子相互作用的受体分子的平均个数.

3 结果与讨论

3.1 QDs-Cys的结构与形貌分析

图2是QDs-Cys在不同分辨率下的高分辨率的透射电子显微镜图(HRTEM). 从图中可以看出,量子点尺寸约为7 nm,呈现出粒径均一、尺寸规则、单分散性较好等特点. 经过Cys修饰后,QDs仍可观察到清晰的晶格条纹,晶面间距为0.311 nm.

图3为CdSe/Cd_xZn_{1-x}S合金量子点的XRD谱图. 从图中可以看出, 2θ 位于28.3°、47.2°、56.1°附近出现了3个尖锐的衍射峰,分别对应于Cd_xZn_{1-x}S合金壳层的(111)、(220)、(311)晶面^[27],其中HRTEM图中显示0.311 nm的晶面间距对应于其(111)晶面,而在49.7°附近出现的小衍射峰对应于CdSe核层的(311)晶面,说明合成的合金量子点属于闪锌矿结构的晶体结构.

CdSe/Cd_xZn_{1-x}S多元合金量子点表面与Cys的作用方式可以通过对QDs-Cys与Cys的FTIR进行分析(图4). 从图中可知,Cys修饰在QDs表面后,Cys中2563 cm⁻¹对应为S-H键伸缩振动峰,1223 cm⁻¹对应为-COOH中-OH的面内弯曲振动峰消失以及3408 cm⁻¹处出现-NH₂伸缩振动峰,这表明Cys是通过巯基的硫原子与QDs表面的金属离子发生了络合作用,而在1590和1479 cm⁻¹处出现了新的振动峰,而这两个新振动峰分别对应为羧酸根(-COO⁻)中的反对称和对称振动,所以表明Cys在其中是以羧酸盐的形式存在,表明Cys通过硫原子与QDs发生配位反应,使Cys改性的QDs表

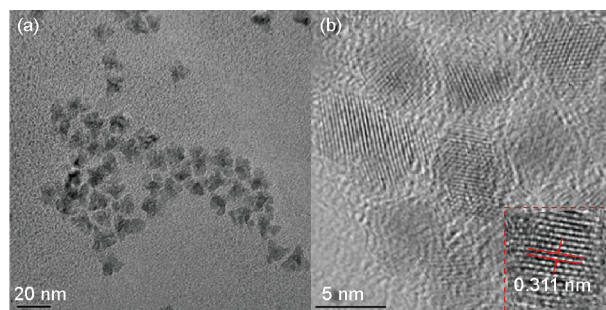


图2 低分辨率(a)和高分辨率(b)下QDs-Cys的HRTEM图(网络版彩图)

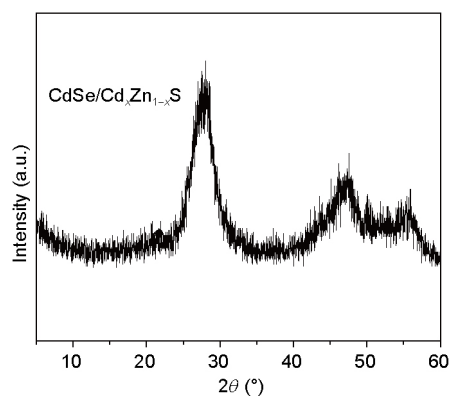


图3 CdSe/Cd_xZn_{1-x}S量子点的XRD谱图

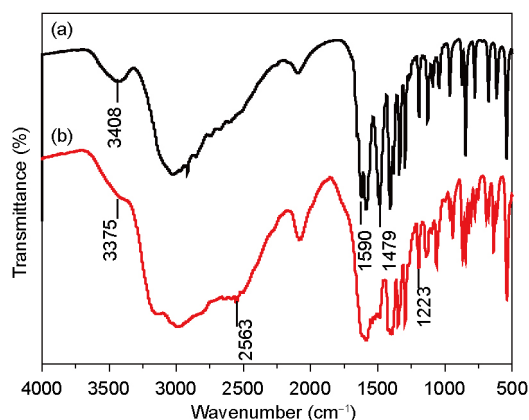


图4 QDs-Cys (a)和Cys (b)的FTIR图(网络版彩图)

面披覆了大量的羧酸根离子。

图5(a)为CdSe/Cd_xZn_{1-x}S量子点和QDs-Cys的XPS的全谱图。结果显示, QDs-Cys表面存在C、N、S、Cd、Se、Zn等元素, 这些都与文献值相符合^[28]。同时, Cys修饰的QDs, S2p峰的相对强度明显增大, 并出现了结合能为400.1 eV对应于N1s的特征峰, 证明QDs表面富含Cys。图5(b)是QDs-Cys的S元素的分峰拟合曲线, 从图中可以看到, S2p_{1/2}的峰位于163.2 eV, 而S2p_{3/2}位于162.2 eV, 这是由自旋-轨道相互作用裂解引起的, 这与已有文献中QDs中重金属离子与巯基分子形成的化学键一致^[29,30], 进一步表明, Cys通过硫原子与QDs表面的重金属离子络合形成了Cd-S键或Zn-S键。

3.2 QDs-Cys-RhB FRET体系的构建与性能研究

荧光共振能量转移体系的构建需要满足3个条件:

(1) 能量供体和受体的激发光谱足够分开; (2) 能量供体的发光光谱和能量受体的吸收光谱要重叠; (3) 能量供、受体的发射光谱不能互相干扰, 同时, 当供受体间的距离在1~10 nm时FRET现象最明显。

采用荧光发射波长在543 nm处的QDs作为能量供体, 最大发射波长在574 nm处的RhB作为能量受体可以构建荧光共振能量转移体系。从图6的归一化曲线可以看出, 作为能量供体的量子点和作为能量受体的RhB的发射光谱相互干扰不大, 作为能量供体的量子点的荧光发射峰在543 nm, 作为能量受体的RhB的最大吸收峰在556 nm, 两者的波谱分别在波长524、554和580 nm处产生交点, 重叠面积远大于整个激发荧光面积的1/2, 符合荧光共振能量转移能发生的必要条件, 即供体发光光谱与受体的吸收光谱重叠。按式(2)计算

出QDs与RhB的光谱重叠积分为 $3.8 \times 10^{-13} \text{ (cm}^3 \text{ L/mol)}$ 。

从图7中可以看出, 在380 nm波长的激发下, QDs-Cys的荧光强度下降了59.02%, 而RhB的荧光强度显著增强, 增加了12.75%, 该结果表明, QDs-Cys-RhB FRET

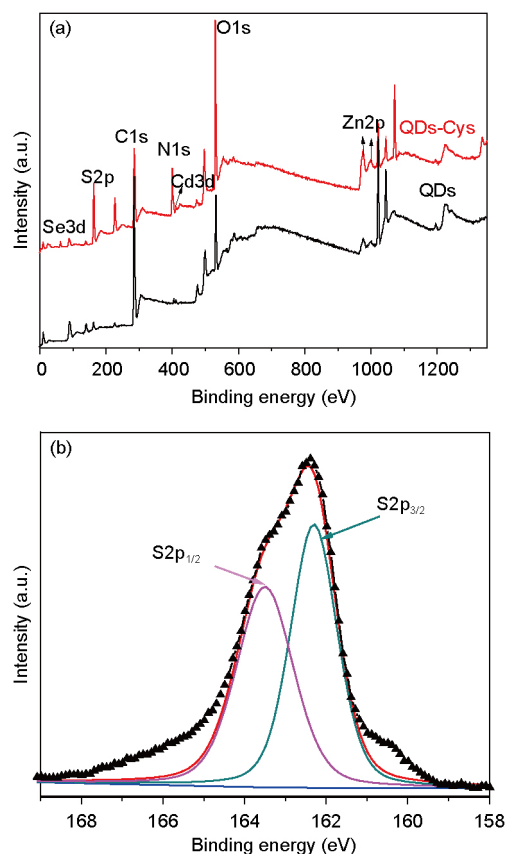


图5 (a) QDs-Cys和QDs的XPS全谱图; (b) QDs-Cys的XPS图谱S元素分峰拟合(网络版彩图)

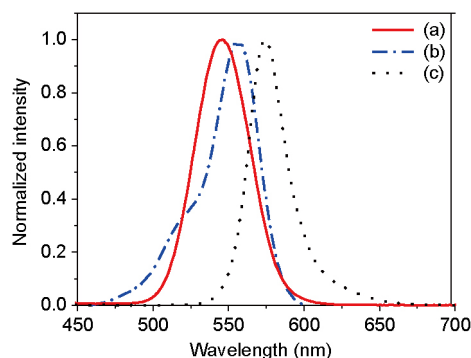


图6 (a) QDs-Cys的荧光光谱; (b) RhB的吸收光谱; (c) RhB的荧光光谱(网络版彩图)

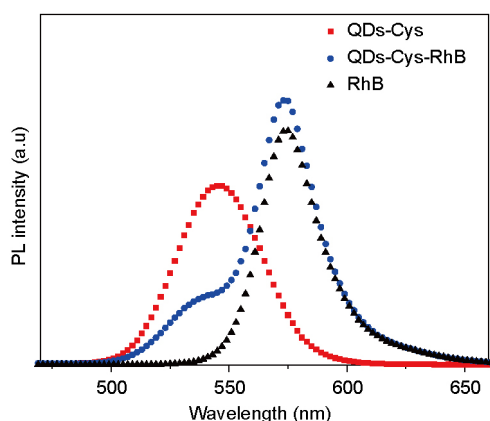


图7 QDs-Cys-RhB的荧光光谱图(网络版彩图)

体系可以发生高效的荧光共振能量转移. 这是由于QDs表面披覆的带负电的羧酸根与RhB分子上带正电的氮原子的静电相互作用, 缩短了QDs-Cys (供体)和RhB (受体)之间的距离, 并利用式(1)、(3)和(4)计算出 $E=58.99\%$, $R_0=2.99$ nm, $r=3.17$ nm, 表明该体系具有优异的荧光共振能量转移效率^[20].

图8是在不同pH时, QDs-Cys-RhB FRET体系荧

光共振能量转移效率变化关系图. 从图中可以看出, FRET体系的转移效率随着pH的减小而增大, 当供受体浓度比一定时, 根据荧光共振能量转移效率的公式计算, FRET体系的荧光共振能量转移效率从49.39% (pH 10)增加至52.84% (pH 9), 当溶液的pH下降到8.0时, QDs-Cys-RhB FRET体系的能量转移效率增加到55.70%, 而在pH为7.0的环境下, QDs-Cys-RhB FRET体系的转移效率进一步增大, 可达58.99%. 由于QDs在酸性条件下不稳定, 所以选择碱性环境, 并且QDs和罗丹明B (供体和受体)的荧光强度随pH的变化而变化, 从而引起受体与供体的相对荧光强度之比的变化, 最终使能量转移效率随pH增大而减小. 由此可以看出, 基于正负电荷结合所构筑的QDs-Cys-RhB FRET体系, 其光学性质对pH具有明显的响应性, 因此基于CdSe/Cd_{0.9}Zn_{0.1}S多元合金量子点构筑的QDs-Cys-RhB FRET体系可以作为一类高效的、对pH具有响应性的比率型荧光探针, 可用于检测环境pH的变化, 实现对微环境调控的实时监测.

QDs-Cys-RhB FRET体系荧光共振能量转移效率随供受体浓度比的变化曲线如图9所示. 由图中可以看

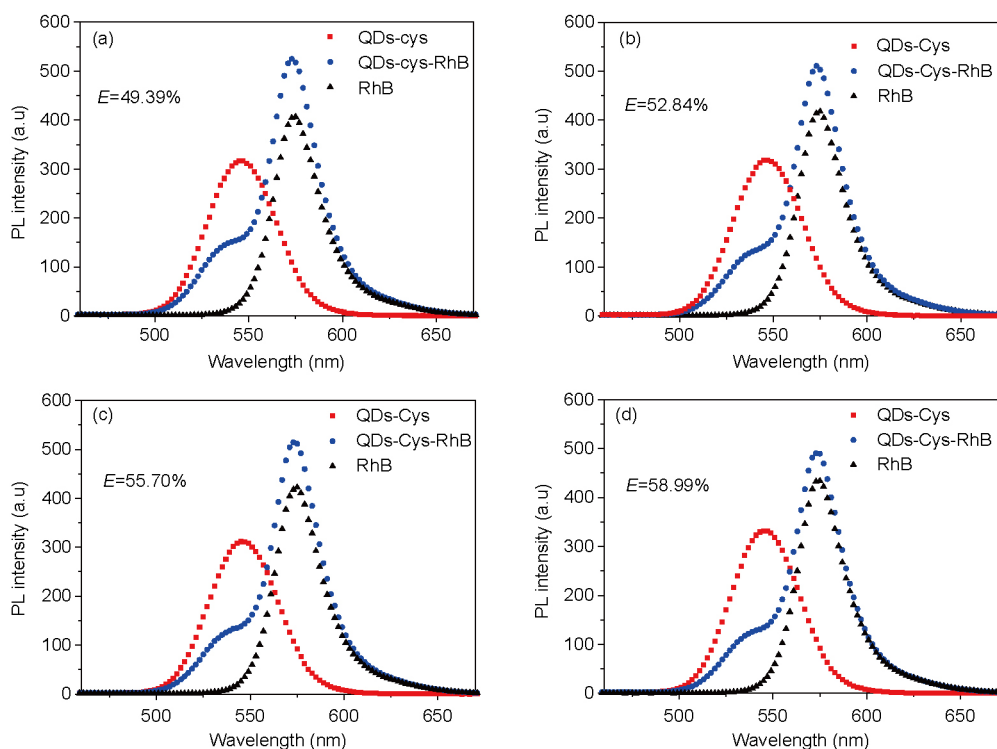


图8 pH 10 (a), pH 9.0 (b), pH 8.0 (c), pH 7.0 (d)对QDs-Cys-RhB体系能量转移效率的影响(网络版彩图)

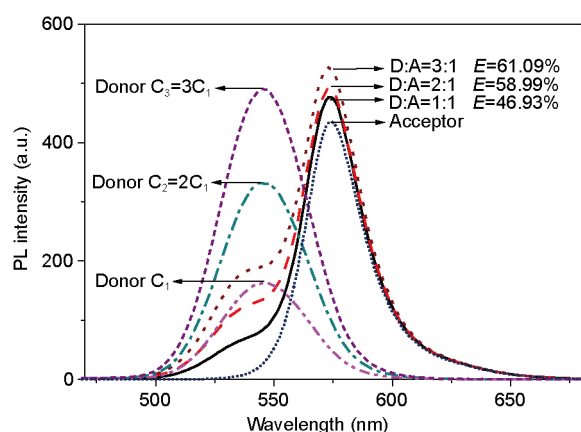


图9 供受体浓度比对FRET体系能量转移效率的影响(网络版彩图)

出,随着供受体浓度比的增加,QDs-Cys-RhB体系的荧光共振能量转移效率也相应增大,当供受体浓度为3:1时,QDs-Cys-RhB体系的FRET转移效率可达61.09%,这可能是由于供体浓度增加,使得供体转移给受体的能量增大,转移效率增大^[15]。由此可见,QDs-Cys-RhB

FRET体系是一类高效、灵敏的比率型荧光探针,具有优异的荧光共振能量转移效率以及极其敏感的光信号响应性。

4 结论

本文基于稳定的CdSe/Cd_xZn_{1-x}S多元合金量子点,采用Cys进行表面修饰,得到QDs-Cys水溶液,并通过静电相互作用构筑了QDs-Cys-RhB FRET体系。QDs-Cys和RhB之间发生了高效的荧光共振能量转移,并对pH和供受体浓度比具有敏感的信号响应性。当体系的pH在7~10范围变化时,FRET体系的转移效率随pH降低而增加。当体系的pH为7时,FRET体系的转移效率为58.99%;调节供受体浓度比,可以调控FRET体系的能量转移效率,当供受体浓度为3:1时,FRET的转移效率可达61.09%。由此可见,QDs-Cys-RhB FRET体系可以应用于水性环境,并具有非常灵敏的pH和浓度响应能力,可以用作一类pH和浓度变化敏感的比率型荧光探针,在体内生物检测、高精度痕量分析等分析技术中具有广阔的应用前景。

参考文献

- Willard DM, Carillo LL, Jung J, van Orden A. *Nano Lett*, 2001, 1: 469-474
- Clapp AR, Medintz IL, Mauro JM, Fisher BR, Bawendi MG, Mattoussi H. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 301-310
- Sapsford KE, Berti L, Medintz IL. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 4562-4589
- Wang Q, Kuo Y, Wang Y, Shin G, Ruengruglikit C, Huang Q. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 16860-16866
- Wang S, Mamedova N, Kotov NA, Chen W, Studer J. *Nano Lett*, 2002, 2: 817-822
- Willard DM, Van Orden A. *Nat Mater*, 2003, 2: 575-576
- Yuan L, Lin W, Chen B, Xie Y. *Org Lett*, 2012, 14: 432-435
- Dong Y, Li J, Jiang X, Song F, Cheng Y, Zhu C. *Org Lett*, 2011, 13: 2252-2255
- 王云云, 宋尔群. 中国科学:化学, 2011, 41: 785-797
- 刘亭廷, 彭程, 马云川. 化学学报, 2013, 71: 962-966
- Niu WJ, Shan D, Zhu RH, Deng SY, Cosnier S, Zhang XJ. *Carbon*, 2016, 96: 1034-1042
- Mu Q, Li Y, Xu H, Ma Y, Zhu W, Zhong X. *Talanta*, 2014, 119: 564-571
- Suzuki M, Husimi Y, Komatsu H, Suzuki K, Douglas KT. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 5720-5725
- Xu H, Huang X, Zhang W, Chen G, Zhu W, Zhong X. *Chem Eur J Chem Phys*, 2010, 11: 3167-3171
- Clapp AR, Medintz IL, Fisher BR, Anderson GP, Mattoussi H. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 1242-1250
- Britton J, Antunes E, Nyokong T. *Inorg Chem Commun*, 2009, 12: 828-831
- Samia ACS, Chen X, Burda C. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 15736-15737
- Gore AH, Kale MB, Anbhule PV, Patil SR, Kolekar GB. *RSC Adv*, 2014, 4: 683-692
- Zhao J, Wu H, Jiang J, Zhao S. *RSC Adv*, 2014, 4: 61667-61672
- Medintz IL, Clapp AR, Mattoussi H, Goldman ER, Fisher B, Mauro JM. *Nat Mater*, 2003, 2: 630-638
- Law WC, Yong KT, Roy I, Ding H, Hu R, Zhao W, Prasad PN. *Small*, 2009, 5: 1302-1310
- Wang CH, Chen CW, Wei CM, Chen YF, Lai CW, Ho ML, Chou PT. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 15548-15552
- Bae WK, Char K, Hur H, Lee S. *Chem Mater*, 2008, 20: 531-539

- 24 Liu W, Choi HS, Zimmer JP, Tanaka E, Frangioni JV, Bawendi M. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 14530–14531
- 25 Deng Z, Yan H, Liu Y. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 17744–17745
- 26 Regulacio MD, Han MY. *Acc Chem Res*, 2010, 43: 621–630
- 27 Zhong X, Liu S, Zhang Z, Li L, Wei Z, Knoll W. *J Mater Chem*, 2004, 14: 2790–2794
- 28 Zhang YY, Kim JY, Kim Y, Jang DJ. *J Nanopart Res*, 2012, 14: 1117
- 29 Cavalleri O, Gonella G, Terreni S, Vignolo M, Floreano L, Morgante A, Canepa M, Rolandi R. *Phys Chem Chem Phys*, 2004, 6: 4042–4046
- 30 Bao H, Gong Y, Li Z, Gao M. *Chem Mater*, 2004, 16: 3853–3859

Preparation and properties of QDs and RhB ratiometric fluorescent probe

Xiao Liang, Ye Yuan, Tingting Cao, Lijie Dong*

Center for Smart Materials and Device Integration, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

*Corresponding author (email: dong@whut.edu.cn)

Abstract: Due to the unique quantum size effect, surface effect and macro quantum tunnel effect, QDs have attracted much attention in the past decade as a new class of biological nanoprobe. In this article, the multicomponent alloyed quantum dots were modified by *L*-cysteine to form aqueous QDs which showed good fluorescence properties. The FRET system was built by linking the energy donor QDs with Rhodamine B as acceptor. Their photoluminescence ability was further characterized. The result indicated that the energy transfer efficiency increased with pH 10 to 7. Besides, The FRET efficiency increased with the donor/acceptor concentration ratio within a certain scope, can be as high as 61.09% when the ratio was 3:1. Therefore, the as-constructed FRET system via positive and negative ions reaction exhibited a well-resolved response at pH values and donor/acceptor concentration ratio. Such QDs-Cys-RhB FRET system has a great potential as an efficient and sensitive ratiometric fluorescence nanoprobe in biological application.

Keywords: fluorescence resonance energy transfer, quantum dots, Rhodamine B, ratiometric fluorescence nanoprobe

doi: [10.1360/N032017-00079](https://doi.org/10.1360/N032017-00079)