

CdTe量子点 罗丹明 6G 荧光共振能量转移体系的构建及其应用研究

王绪炎, 梁建功, 马金杰, 陈姝含, 韩鹤友

(华中农业大学理学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要 采用巯基化合物修饰的 CdTe量子点构建了量子点(供体)罗丹明 6G(受体)荧光共振能量转移体系, 研究了 CdTe量子点与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用. 结果表明, CdTe量子点与 BSA相互作用后提高了 CdTe量子点罗丹明 6G体系的荧光共振能量转移(FRET)效率, 减小了 CdTe量子点和罗丹明 6G分子间的距离(r), 证实 BSA是通过其色氨酸(Tyr)残基与 CdTe量子点表面金属发生配位作用而直接结合到量子点表面的.

关键词 CdTe量子点; 罗丹明 6G; 荧光共振能量转移; 牛血清白蛋白

中图分类号 O657.3

文献标识码 A

文章编号 0251-2079(2010)02-260-04

荧光共振能量转移(FRET)技术作为一种有效的光物理分析方法被广泛应用于分子间距离和分子结构的测定以及生物学方面^[1]. 其中, 基于量子点的 FRET在生物大分子相互作用^[2-4]及生物传感器^[5-6]等方面的研究已成为热点和 FRET领域发展的一个有意义的新方向^[7].

牛血清白蛋白(BSA)的氨基酸序列与人血清白蛋白(HSA)非常类似, 经常作为模型蛋白用于研究外源物质与蛋白质之间的相互作用^[8]. 近年来, 研究量子点与 BSA相互作用已引起关注. Shao等^[9]采用毛细管电泳和荧光相关光谱法^[10]研究了 CdTe量子点与 BSA之间的相互作用, 认为两者之间的相互作用主要是静电引力; Zhao等^[11]在评估 CdTe量子点对 BSA的毒性过程中发现, 氢键和范德华力是稳定 CdTe量子点BSA复合物的主要结合力; 本课题组^[12]研究发现, 在 CdTe量子点与 BSA形成复合物的过程中主要的相互作用为疏水作用和配位作用. 但目前对量子点与 BSA的作用机理尚不清楚.

本文构建了一种量子点罗丹明 6G FRET体系, 应用该体系研究了 BSA与量子点的相互作用, 证实了 BSA是通过其色氨酸残基与量子点表面金属发生配位作用而直接结合到量子点表面这一作用机理, 为今后量子点在生物学上更广泛的应用提供了前期工作基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

氯化镉、无水亚碲酸钠、巯基乙酸(TGA)、还原型谷胱甘肽(GSH)和罗丹明 6G(R6G)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 牛血清白蛋白(BSA, Roche公司); PBS缓冲溶液(0.01 mol/L, pH = 7.4); MilliQ超纯水(18125M8 # cm).

Evolution300紫外可见分光光度计(美国 Thermo Nicolet公司); LS255荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer公司); APEX微波化学工作站(上海屹尧微波化学技术有限公司).

1.2 实验过程

1.2.1 CdTe量子点罗丹明 6G FRET体系的构建 采用微波加热法分别合成了 TGA 和 GSH 修饰的 CdTe量子点^[13, 14]. 参考文献[15]方法, 计算出 CdTe^x和 CdTe^y量子点的尺寸和浓度分别为 119 nm,

收稿日期: 2009209227

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20975042)、转基因科技重大专项基金(批准号: 2009ZX080122015B)、湖北省自然科学基金重点项目(批准号: 2008CDA080)和湖北省自然科学基金面上项目(批准号: 2008CDB031)资助.

联系人简介: 韩鹤友, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米生物分析领域的研究. E2mail: hyhan@mail.hzau.edu.cn

616 @10⁻⁶ mol/L 和 210 nm 712 @10⁻⁵ mol/L 在 10 mL 比色管中, 用 PBS 缓冲溶液配制 CdTe 量子点溶液 (110 @10⁻⁶ mol/L), 依次加入 R6G 溶液 (R6G/量子点摩尔比为 0, 1, 2, 3, 5 和 10), 并测定其荧光光谱 (测定条件: 激发波长 390 nm; 入射狭缝 1010 nm; 出射狭缝 310 nm). 按 $E = 1 - F_{DA} / F_D$ 关系式计算出 FRET 体系荧光共振能量转移效率^[5, 16], 其中, 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.

1.2.2 BSA /CdTe 量子点摩尔比对荧光共振能量转移效率及供体-受体之间距离的影响 配制一系列 CdTe 量子点和 CdTe 量子点-BSA 溶液 (CdTe 量子点浓度均为 110 @10⁻⁶ mol/L, BSA/量子点摩尔比依次为 0, 1, 2, 3, 5 和 10), 37 °C 下振荡反应 2 h, 冷却至室温后测定并计算量子产率^[5] 及加入不同量的 BSA 后, FRET 体系的荧光共振能量转移效率.

按 $E = nR_0^6 / (nr_0^6 + r^6)$, $J_{AD} = \int_0^\infty PL_{D2cor}(K) I_A(K) K^4 dK$, $R_0^6 = 8.79 \times 10^{25} k^2 n_D^{-4} \phi_D J_{AD}$, $r = R_0 [n(1-E)/E]^{1/6}$ 计算 CdTe 量子点-罗丹明 6G 之间的距离 r ^[5, 16], 其中, R_0 为 Förster 半径; r 为供体与受体间的距离; k^2 为空间取向因子, 通常假设为 2/3; ϕ_D 是供体的荧光量子产率; J_{AD} 为供体荧光发射光谱与受体紫外吸收光谱之间的光谱重叠积分; n_D 为供体与受体之间介质的折射指数; n 为接近单个受体分子的供体分子个数.

2 结果与讨论

2.1 CdTe 量子点-罗丹明 6G FRET 体系的构建

从图 1 可知, CdTe²⁺ 和 CdTe³⁺ 量子点荧光发射峰与 R6G 的紫外吸收峰均能有效重叠, 具备构建 FRET 体系的条件. 按公式 $J_{AD} = \int_0^\infty PL_{D2cor}(K) I_A(K) K^4 dK$ 计算出 CdTe²⁺ 及 CdTe³⁺ 量子点与 R6G 的光谱重叠积分分别为 3184 @10⁻¹³ 和 3170 @10⁻¹³ cm³ # L/mol

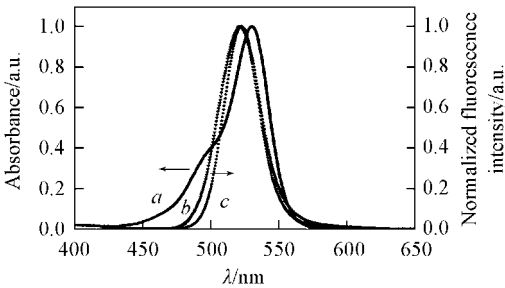


Fig 1 UV-Vis absorption spectra of R6G (a) and normalized fluorescence spectra of CdTe²⁺ (b) and CdTe³⁺ (c)

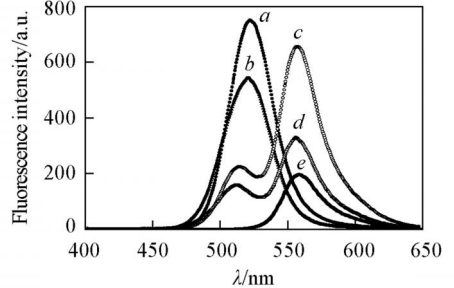


Fig 2 Fluorescence spectra of FRET systems: a. CdTe³⁺; b. CdTe²⁺; c. CdTe³⁺/R6G; d. CdTe²⁺/R6G; e. R6G

在量子点溶液中加入 R6G 后, 量子点的荧光强度下降, R6G 的荧光强度增加, 这表明量子点与 R6G 之间发生了荧光共振能量转移 (图 2). 原因可能在于量子点表面修饰基团上的羧基与 R6G 分子上的氨基发生相互作用, 使供、受体之间的距离满足了发生 FRET 的条件. 随着 R6G /CdTe 量子点摩尔比的增大, CdTe 量子点-R6G 之间的荧光共振能量转移效率不断增加 (图 3), 这是因为增加接近单个供体表面的受体分子个数能够提高体系的荧光能量转移效率^[16].

2.2 BSA /CdTe 量子点摩尔比对荧光共振能量转移效率的影响

量子点与 BSA 相互作用后, BSA 钝化了量子点的表面缺陷, 降低了无辐射跃迁的几率, 从而使量子产率有所提高^[17]; 但随着 BSA/量子点摩尔比的持续增大, 过量 BSA 在量子点表面起电子陷阱的作用, 使得荧光强度有所下降, 量子产率反而有所降低^[18, 19] (表 1). 由于在量子点成核过程中, Cd²⁺ 2 GSH 层分解形成的 CdS 壳有效地钝化了 CdTe 量子点的表面缺陷, 故 CdTe³⁺ 量子点的量子产率大于

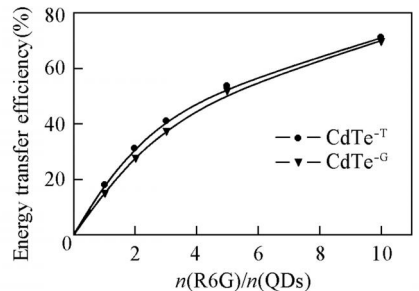


Fig 3 Effect of molar ratio of R6G to CdTe on energy transfer efficiency

$\text{CdTe}^{2\text{T}}$ 量子点的量子产率^[20],且随着BSA/量子点摩尔比的持续增大, $\text{CdTe}^{3\text{G}}$ 量子点的量子产率比 $\text{CdTe}^{2\text{T}}$ 量子点的量子产率减少得快.这也表明 $\text{CdTe}^{3\text{G}}$ 量子点的表面缺陷少于 $\text{CdTe}^{2\text{T}}$ 量子点,其表面过量BSA的电子陷阱作用更明显.

Table 1 Effect of molar ratio of BSA to CdTe on Förster radius and distance between CdTe and R6G

CdTe ^{2T}				CdTe ^{3G}				CdTe ^{2T}				CdTe ^{3G}					
n(BSA) /	$5_D(\%)$	R_0/nm	r/nm	$5_D(\%)$	R_0/nm	r/nm	n(CdTe)	$5_D(\%)$	R_0/nm	r/nm	$5_D(\%)$	R_0/nm	r/nm	n(CdTe)	$5_D(\%)$	R_0/nm	r/nm
0	35.2	3.68	4.70	51.6	3.90	5.08	3	44.9	3.83	4.37	51.9	3.90	4.93	5	44.5	3.83	4.27
1	39.7	3.76	4.44	54.0	3.93	4.97	10	43.5	3.81	4.17	51.7	3.89	4.91				
2	45.0	3.83	4.41	53.5	3.92	4.96											

从图4可知,量子点与BSA相互作用后,提高了 CdTe 量子点R6G之间的荧光共振能量转移效率.随着BSA/ CdTe 量子点摩尔比的持续增大, $\text{CdTe}^{2\text{T}}$ 量子点R6G之间的荧光共振能量转移效率也不断提高,但 $\text{CdTe}^{3\text{G}}$ 量子点罗丹明6G之间的荧光共振能量转移效率的变化却不明显.

以上结果表明,量子点罗丹明6G之间的荧光共振能量转移效率除与量子点的量子产率有关外,还应该与量子点与罗丹明6G分子之间的距离有关.

2.3 BSA/ CdTe 量子点摩尔比对供体-受体之间距离的影响

计算得出的量子点与罗丹明6G之间Förster半径(R_0)和距离(r)列于表1.由于巯基乙酸分子尺寸小于谷胱甘肽分子,罗丹明6G与 $\text{CdTe}^{2\text{T}}$ 量子点之间的距离要小于与其 $\text{CdTe}^{3\text{G}}$ 量子点之间的距离.BSA/量子点摩尔比的增加使 CdTe 量子点与罗丹明6G之间的整体平均距离有所减小,即 $\text{CdTe}^{2\text{T}}$ 和 $\text{CdTe}^{3\text{G}}$ 量子点与罗丹明6G之间的距离减小值分别为0.153和0.118 nm.这可能是量子点与BSA相互作用后,有一部分罗丹明6G分子能够在更接近于量子点表面的结合位点与量子点发生荧光共振能量转移.实验还发现卵清蛋白也存在着与BSA类似的现象.

2.4 BSA与 CdTe 量子点的作用机理

Mamedova等^[21]在研究BSA与 CdTe 量子点生物结合的过程中发现,富集在 CdTe 量子点胶体表面的 Cd^{2+} 能够与BSA表面的金属结合位点发生配位作用;Zhao等^[11]在研究 CdTe 量子点对BSA的毒性时发现,量子点会影响BSA的结构,使位于疏水区的色氨酸残基(Trp213)逐步暴露于水中,同亲水区的Trp2134一起与量子点之间产生更好的相互作用.Mattoussi课题组^[15,16]在组装大肠杆菌麦芽糖结合蛋白与 CdSe/ZnS 量子点生物传感器过程中发现,蛋白是通过其表面组氨酸残基与量子点表面金属的配位作用直接结合到量子点表面的.

综合以上研究可认为,BSA是通过其色氨酸残基与量子点表面金属发生配位作用而直接结合到量子点表面的.由于R6G也可与BSA色氨酸残基相结合^[22],所以与量子点表面的修饰基团结合相比,一部分R6G分子与更接近于量子点表面的色氨酸残基发生相结合,使得量子点与R6G之间的整体平均距离有所减小(图5). $\text{CdTe}^{2\text{T}}$ 量子点表面缺陷较多,BSA的色氨酸残基能更好地结合到其表面,量子点与罗丹明6G之间的整体平均距离就更小.同步荧光光谱显示,色氨酸残基的最大发射波长(λ_{K})

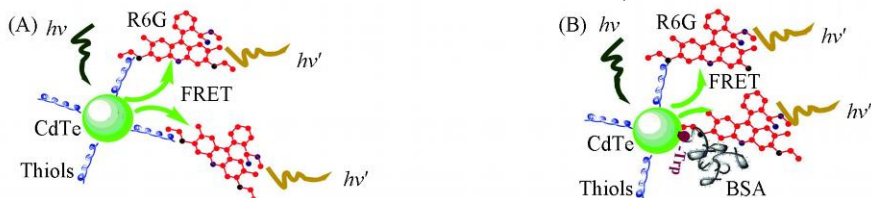


Fig 5 Schematic diagram of fluorescence resonance energy transfer between CdTe and R6G before (A) or after (B) interacting CdTe with BSA

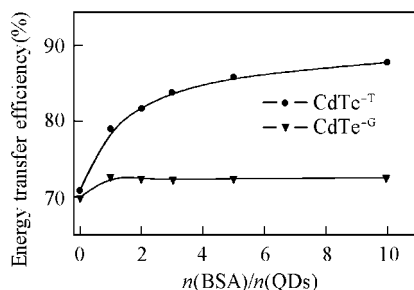


Fig 4 Effect of molar ratio of BSA to CdTe on energy transfer efficiency $n(\text{R6G})/n(\text{CdTe}) = 10$.

60 nm)略有红移, 而酪氨酸残基的最大发射波长 ($\lambda_{K=20}$)基本不变(图略), 表明量子点与 BSA 的结合位点确实更接近于色氨酸残基, 使得色氨酸残基所处环境的疏水性降低, BSA 构象发生变化^[23]. 这一作用机理与之前的研究结果^[12]一致.

参 考 文 献

- [1] Fang C, Zhao B M, Lu H. T., et al. J Phys Chem C [J], 2008 112(18): 7278) 7283
- [2] Medintz I L, Konnerth J H., Clapp A. R., et al. PNAS [J], 2004 101(26): 9612) 9617
- [3] Eunkeu O, Hong M. Y., Lee D., et al. J Am Chem Soc [J], 2005 127(10): 3270) 3271
- [4] Clapp A. R., Medintz I L, Uyeda T. H., et al. J Am Chem Soc [J], 2005 127(51): 18212) 18221
- [5] Medintz I L, Clapp A. R., Mattoussi H., et al. Nat Mater [J], 2003 2(6): 630) 638
- [6] Li F. S., Vaná D. P., Nitsa R., et al. J Am Chem Soc [J], 2006 128(32): 10378) 10379
- [7] Medintz I L, Mattoussi H. Phys Chem Chem Phys [J], 2009, 11(1): 17) 45
- [8] SUN YanTao(孙艳涛), ZHANG Yu2Pu(张玉璞), BI Shu2Yun(毕淑云), et al. Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2009 30(6): 1095) 1100
- [9] Shao L. W., Dong C. Q., Ren J. C., et al. Chin Chem Lett [J], 2008 19(6): 707) 710
- [10] Shao L. W., Dong C. Q., Ren J. C., et al. J Fluoresc [J], 2009 19(1): 151) 157
- [11] Zhao L. Z., Liu R. T., Zhao X. C., et al. Sci Total Environ [J], 2009, 407(18): 5019) 5023
- [12] Liang J G, Chen Y. P., Han H. Y.. J Mol Struct [J], 2008, 892(1) 3): 116) 120
- [13] Rogach A L, Franzl T, Klar T A, et al. J Phys Chem C [J], 2007, 111(40): 14628) 14637
- [14] Han H. Y., Sheng Z. H., Liang J G. Anal Chim Acta [J], 2007, 596(1): 73) 78
- [15] Qu L. H., Guo W. Z., Peng X. G., et al. Chem Mater [J], 2003 15(14): 2854) 2860
- [16] Clapp A. R., Medintz I L, Mattoussi H., et al. J Am Chem Soc [J], 2004, 126(1): 301) 310
- [17] ZENG QingHui(曾庆辉), ZHANG You2Lin(张友林), DU Chuang(杜创), et al. Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2009 30(6): 1158) 1161
- [18] Jeong S, Achemann M, Nanda J, et al. J Am Chem Soc [J], 2005, 127(29): 10126) 10127
- [19] Wang Q, Kuo Y. C., Wang Y. W., et al. J Phys Chem. B [J], 2006, 110(34): 16860) 16866
- [20] Qian H. F., Dong C. Q., Weng J. F., et al. Small [J], 2006 2(6): 747) 751
- [21] Mamedova N. N., Nicholas A, Kotov Andrey L., et al. Nano Lett [J], 2001, 1(6): 281) 286
- [22] YANG ManMan(杨曼曼), YANG Pin(杨频), XI Xiaoli(席小莉). Chin Sci Bull (科学通报) [J], 1997, 2(12): 1277) 1279
- [23] ZHANG XiaoWei(张晓威), ZHAO FengLin(赵凤林), LI KeAn(李克安), et al. Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 1999 20(7): 1063) 1067

Construction and Application of CdTe Quantum Dots Rhodamine 6G Fluorescence Resonance Energy Transfer Systems

WANG XuYan, LIANG JianGong, MA JinJie, CHEN ShuHan, HAN HeYou*

(College of Science, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,

Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract Two kinds of thiol modified CdTe quantum dots were used to construct the CdTe quantum dots (donor) Rhodamine 6G (acceptor) fluorescence resonance energy transfer (FRET) systems which were applied to investigate the interaction mechanism between CdTe quantum dots and bovine serum albumin (BSA). The results showed that the energy transfer efficiency of the CdTe quantum dots Rhodamine 6G FRET systems were improved and the distance between CdTe quantum dots and rhodamine 6G (r) were decreased after CdTe quantum dots interacted with BSA. BSA were directly binding to the surface of quantum dot by the coordination between its tryptophan (Trp) residues and the metal

Keywords CdTe quantum dot, Rhodamine 6G, Fluorescence resonance energy transfer, Bovine serum albumin

(Ed: A, G)