

CdTe 量子点与微囊藻毒素-LR 抗体的偶联及其相互作用的研究

李莹¹, 孙嘉笛¹, 孙秀兰^{*1,2}, 张银志²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要:以巯基乙酸作为稳定剂制备了水溶性 CdTe 量子点,将纯化后的量子点与微囊藻毒素-LR 抗体偶联,通过分析紫外-可见吸收光谱和荧光光谱,研究了不同温度下 CdTe 量子点与微囊藻毒素-LR 抗体的相互作用,得到了量子点与抗体之间的表观结合常数 K_{app} ($84.3M^{-1}$), Stern-Volmer 猝灭常数 K_{SV} (6.74×10^4 (298 K), 6.11×10^4 (304 K), 5.93×10^4 (310 K)), 结合位点 n 和结合常数 K 。此外,还研究了量子点与抗体之间相互作用的热力学参数 $\Delta H(<0)$, $\Delta G(<0)$ 和 $\Delta S(>0)$, 经实验数据发现,量子点与抗体之间的作用力以静电相互作用为主,氢键、范德华力也起到了一定的作用。

关键词:量子点;微囊藻毒素-LR 抗体;光谱;热力学参数

中图分类号:R 392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1673—1689(2018)05—0463—09

Study of the Interaction Between Water-Soluble CdTe Quantum Dots(QDs) and Microcystin-LR Antibody-QDs

LI Ying¹, SUN Jiadi¹, SUN Xiulan^{*1,2}, ZHANG Yinzh²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Water-soluble CdTe quantum dots (QDs) were synthesized using thioglycolic acid as a stabilizer, and the purified QDs were bind to the Microcystin-LR antibody. The interaction between the QDs and the Microcystin-LR antibody at different temperatures were investigated. The association constant K_{app} ($84.3M^{-1}$), the Stern-Volmer quenching constant K_{sv} (6.74×10^4 (298 K), 6.11×10^4 (304 K), 5.93×10^4 (310 K)), the number of binding sites n , and the binding constant K were all calculated through the analysis of UV-Vis absorption and fluorescence spectrum. In addition, the interaction of the thermodynamic parameters between the QDs and the antibody were studied, $\Delta H(<0)$, $\Delta G(<0)$ and $\Delta S(>0)$, indicating that electrostatic played mainly roles in the interactions between CdTe QDs and Microcystin-LR antibody, and the hydrogen bond and van der

收稿日期: 2015-09-08

基金项目: 国家自然科学基金-广东省联合基金项目(U13012141); 国家 973 计划项目(2012CB720804); 公益性行业(农业)科研专项(201120130)。

* 通信作者: 孙秀兰(1976—), 女, 山东聊城人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全监测方面的研究。E-mail: sxlzzz@jiangnan.edu.cn

引用本文: 李莹, 孙嘉笛, 孙秀兰, 等. CdTe 量子点与微囊藻毒素-LR 抗体的偶联及其相互作用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(05): 463-471.

Waals also made the contributions.

Keywords: microcystin, quantum dots, spectrum, thermodynamic parameters

量子点(Quantum dots, QDs)是一类由 II-VI 族(如 CdSe、CdTe、ZnSe、CdS 等)或 III-V 族(如 InAs、InP 等)以及 Si 等元素组成的均一或核壳结构的纳米颗粒,是近年发展起来的一种新型纳米材料,它具有激发光谱宽,发射光谱窄,光稳定性好等众多优点^[1-3],自从有学者将量子点与生物分子成功偶联之后,量子点就逐渐开始被应用于荧光标记、免疫测定等生物学领域。然而量子点的荧光特性在生物环境下易猝灭^[4],从而限制了量子点的生物应用范围。所以作者在制备量子点-抗体荧光探针的同时,也对量子点与抗体之间的相互作用机理进行了研究。

作者首先合成了 CdTe 量子点,接着采用纯化后的量子点与微囊藻毒素-LR 抗体进行偶联,分别研究了不同条件对偶联效果的影响,然后通过紫外-可见吸收光谱、荧光光谱对比了偶联前后的光谱变化,借助聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE 凝胶电泳)来鉴定偶联产物。与此同时,结合经验公式,深入分析了 QDs 与抗体的相互作用机理。通过这些研究,为今后量子点在生物学领域方面的推广应用提供了一些参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、巯基乙酸、十二烷基磺酸钠、丙烯酰胺、N-N 亚甲基双丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵、考马斯亮蓝 R-250、甲醇、甘氨酸、氯化钠等,均购自国药集团;微囊藻毒素-LR(MC-LR)抗体为实验室免疫所得;所用试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

1.2 仪器

GRP-9050 型隔水式恒温培养箱,上海森信实验仪器有限公司产品;F-7000 型荧光分光光度计,日立高新技术公司产品;UV-1800 型紫外-可见分光光谱仪,日本岛津产品;DYCZ-24D 垂直板电泳槽,北京六一仪器厂制造;Tanon GLS-2010 凝胶成像仪,上海天能科技有限公司产品;5424 冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司产品;Tecna G2F20s-TWIN 透射电镜,美国 FEI 公司产品;PB-10C 标准 pH 计,

上海精密科学仪器有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 CdTe 量子点的制备 将 0.12 g 硼氢化钠溶于 5 mL 超纯水中,在氮气的保护下加入 30 mg 碲粉,常温磁力搅拌反应直至黑色碲粉完全溶解,反应液为无色(或粉红色)透明,即得到碲氢化钠(NaHTe)溶液,备用。称取一定量的 CdCl₂·2.5H₂O,用超纯水溶解于三口烧瓶中,加入适量巯基乙酸(TGA),用 0.1 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 值至最佳,通氮气 20 min 左右,排出体系中的氧气,然后在磁力搅拌以及氮气的保护下迅速加入新鲜制备的碲氢化钠溶液,100 °C 加热回流一定时间。避光冷却至室温,即可得到澄清透明的 CdTe 量子点(CdTe QDs)溶液^[5]。

1.3.2 CdTe 量子点荧光探针的制备及纯化 以巯基乙酸(TGA)为修饰剂所制备的 CdTe QDs,表面有羧基覆盖,在缩合剂 EDC 的作用下能与微囊藻毒素-LR 抗体(MC-LR)的氨基反应,从而实现量子点与抗体的共价偶联。由于量子点的粒径要远远小于抗体,所以对偶联物进行超滤离心,截留下与抗体偶联成功的量子点。具体操作如下^[6]:在 2 mL CdTe 量子点溶液中,加入 30 μL EDC,37 °C 反应 30 min,使量子点充分活化,然后加入 30 μL MC-LR 抗体,37 °C 反应一定时间,反应体系中,QDs:MC-LR 抗体:EDC 的摩尔比为 1:15:200,最后加入终质量浓度为 0.1 mg/dL 的 BSA 进行封闭。将溶液放入 10×10⁴ 的超滤离心管中,10 000 r/min 离心 10 min,截留物复溶于 PBS 中(pH 7.4),即得到纯化后的 QDs-MC-LR 抗体。

1.3.3 量子点及量子点-抗体偶联结果的分析 分别测定 CdTe QDs 的紫外可见吸收光谱和荧光光谱,并借助透射电镜表征其形貌。

分别测定 CdTe QDs 与 QDs-Ab 的紫外可见吸收光谱和荧光光谱,对比偶联前后光谱变化。

以 QDs 为对照,采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定偶联物。

1.3.4 量子点与抗体的光谱分析 在不同温度下,固定微囊藻毒素抗体的浓度,向其中加入不同浓度

的 CdTe 量子点,分别测定体系的吸收光谱和荧光光谱。对光谱进行分析,从而对量子点与抗体之间的相互作用有进一步了解。

2 结果与分析

2.1 CdTe 量子点的表征

量子点的粒径对其荧光,吸收光谱和荧光光谱都有着很大的影响,制备过程中,改变制备条件,就可以得到不同粒径的量子点,粒径从小到大,荧光依次从绿到红,吸收光谱和荧光光谱也随之改变。本文中以回流 3 h 所制备的 CdTe 量子点为例,对其进行表征。

2.1.1 外观 观察 CdTe 量子点在日光下(左)和紫外灯下(右)时的图片,由图 1 可知,在日光下,量子点为橘红色澄清透明的溶液,在紫外灯下可发出强烈的黄色荧光。

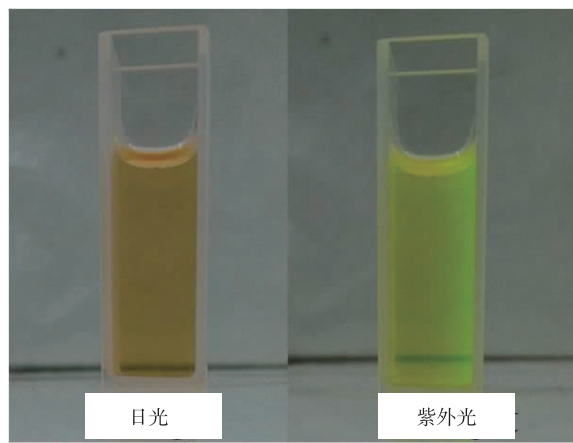


图 1 日光和紫外光下的 CdTe 量子点

Fig. 1 CdTe quantum dots in daylight and ultraviolet light

2.1.2 紫外-可见吸收光谱和荧光光谱 取适量量子点,分别进行紫外扫描分析和荧光光谱分析,其中荧光光谱的激发波长为 380 nm,激发狭缝和发射狭缝均为 5 nm。如图 2 所示分别为量子点的紫外吸收光谱(a)和荧光光谱(b),由图可知,量子点在较宽范围内有连续的吸收,最大吸收波长在 520 nm 左右,根据经验公式^[7]: $D = (9.812 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1.714 \times 10^{-3})\lambda^2 + 1.006 \lambda - 194.84$ (λ 为最大吸收波长),可计算出量子点尺寸约为 2.81 nm。由荧光光谱可知,最大发射峰的位置在 560 nm 左右,半峰宽较窄,说明了所制备的量子点粒径分布范围比较小。

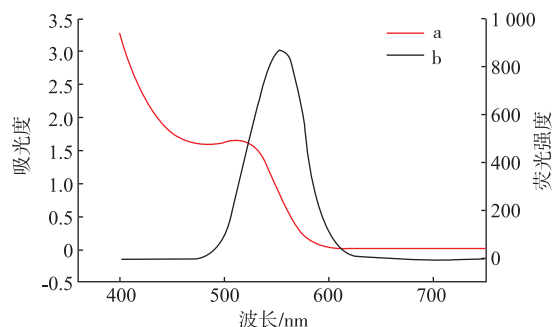


图 2 为量子点的紫外可见吸收光谱和荧光光谱

Fig. 2 Absorption and fluorescence spectra of CdTe quantum dots

2.1.3 电镜图 本方法所制备的 CdTe 量子点形状呈类球状,尺寸较为均一且分散性良好,粒径大小也与根据经验公式所推算出的结果基本吻合,见图 3 透射电镜图。

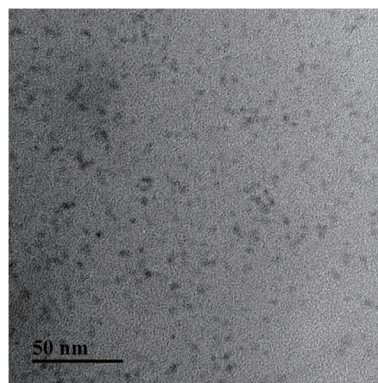


图 3 CdTe 量子点的透射电镜图

Fig. 3 TEM image of CdTe QDs

2.2 偶联条件的优化

量子点与抗体的偶联效果会因偶联条件的不同而有所变化,本文中分别比较了不同 pH、温度、时间及离子强度下,QDs-Ab 的荧光发射光谱,从而选择最优的偶联条件。

2.2.1 pH 分别配制不同 pH 值(5.5,6.0,6.8,7.4,8.0,8.8,9.5)的 PBS 溶液作为量子点与抗体偶联的反应体系,然后测量偶联物的荧光强度。如图 4 所示,当溶液 pH 值偏酸或偏碱性时,偶联物的荧光强度比较低,一方面可能是由于在不适宜的 pH 下量子点会出现荧光猝灭现象,另一方面是溶液的 pH 值会引起抗体的活性降低,使其与量子点的偶联率下降,削弱了它对量子点表面的包覆修饰作用,促使荧光强度的减小。当 pH 值为 7.4 时,抗体的活性最佳,与量子点的偶联率增加,荧光强度也达到最

大值。

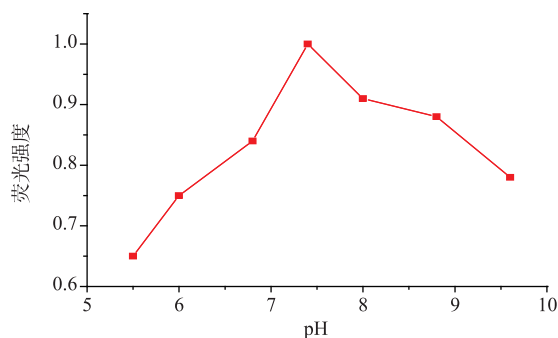


图 4 酸碱度对偶联物荧光强度的影响

Fig. 4 Effect of pH on the fluorescence intensity of conjugates

2.2.2 温度和时间 在 4, 25, 37 °C, 分别测定不同时间体系荧光强度的变化。如图 5 所示, 在 2 h 之内的不同温度下, 反应体系的荧光强度都在随着时间的延长而增加, 其中, 37 °C 的反应体系荧光强度要显著高于 4 °C 和 25 °C 的反应体系, 这也是由于反应速度会随着温度的升高逐渐加快, 荧光强度也就随之增大。但 2 h 之后, 37 °C 的反应体系荧光强度开始下降, 这是由于随着反应时间的延长, 抗体的活性会逐渐下降, 甚至最终会低于其他温度下的反应体系。但是考虑到抗体在 37 °C 下活性较高, 并且此温度下反应速度快, 省时, 所以最终选定的反应温度和时间为 37 °C、2 h。

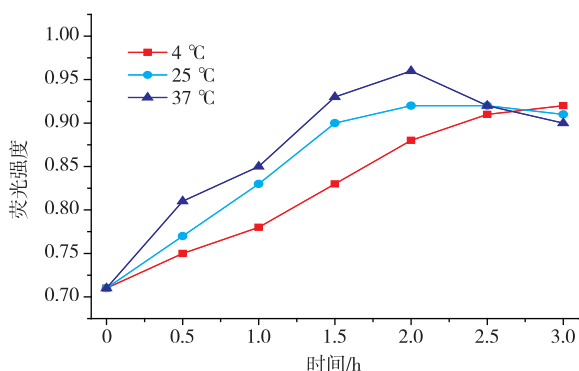


图 5 温度和反应时间对偶联物荧光强度的影响

Fig. 5 Effect of temperature and time on the fluorescence intensity of conjugates

2.2.3 离子强度 不同浓度氯化钠对 QDs-Ab 偶联物荧光强度的影响, 如图 6 所示, 少量氯化钠的加入可以抑制 QDs-Ab 形成静电双电层, 减少静电排

斥, 从而增强 QDs-Ab 的活性。但过量的氯化钠会增强蛋白质的水合作用, 同时抑制偶联物的亲和力^[8]。所以本实验最终选择的氯化钠终浓度为 0.2 mol/L。

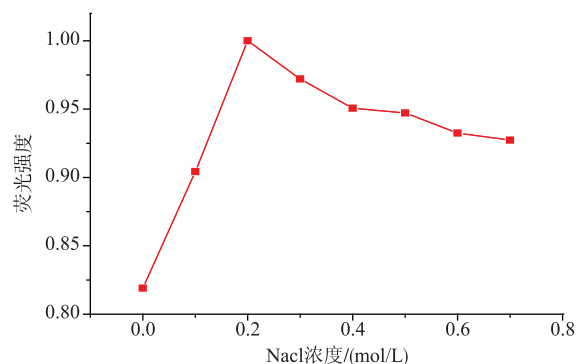
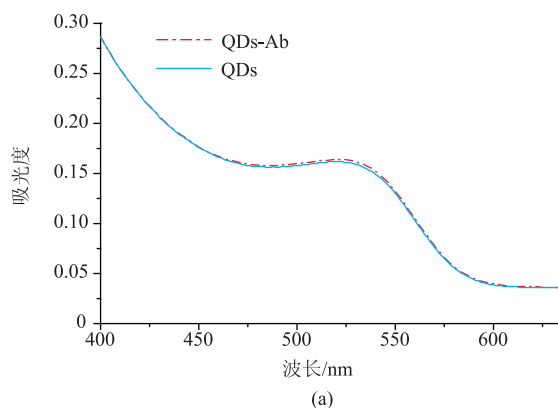


图 6 离子强度对偶联物荧光强度的影响

Fig. 6 Effect of quality of sodium chloride on the fluorescence intensity of conjugates

2.3 偶联结果的鉴定

2.3.1 偶联前后光谱的变化 量子点与抗体偶联前后的紫外吸收曲线并没有发生明显的位移, 如图 7(a) 所示, 说明偶联后量子点的大小和形貌并没有发生明显的改变, 但偶联后的荧光强度略有增强 (图 7(b)), 原因可能是抗体将量子点表面包覆后, 对量子点的表面起到了钝化作用, 有效去除量子点表面缺陷, 降低了无辐射跃迁的几率^[9], 使荧光强度有所提高。此外, 由于量子点经 EDC 与抗体偶联之后, 一个蛋白可能结合多个量子点, 拉近量子点之间距离, 导致量子点之间的偶极相互作用增强^[10], 使其斯托克斯位移增大, 荧光发射峰的峰位发生轻微的红移^[11]。



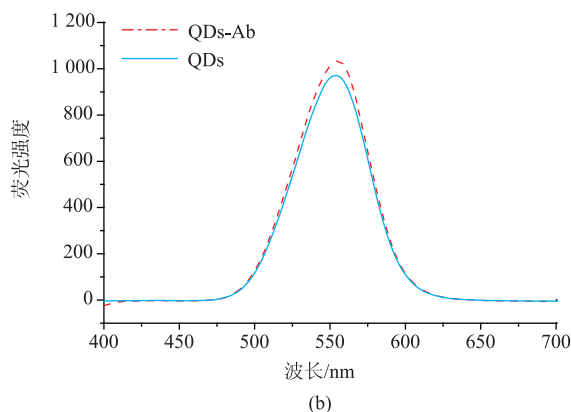


图7 量子点与量子点-抗体偶联物的紫外吸收光谱和荧光光谱

Fig. 7 Absorption spectrum and fluorescence spectrum of QDs and QDs-Ab

2.3.2 电泳鉴定 对 QDs-Ab 偶联物进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,各道上样的样品及上样量分别是:1 泳道为 10 μL 标准蛋白 Marker,2 泳道为 10 μL 量子点,3 泳道为 10 μL 微囊藻毒素抗体,4 泳道为 10 μL QDs-Ab 偶联物,5 泳道为 20 μL QDs-Ab 偶联物。电泳结束后,用凝胶成像仪对其进行透射拍照,获得图 8(a)。然后将凝胶经过染色、脱色处理后,再用成像仪对凝胶再次进行拍照,获得图 8(b)。

未标记的抗体(或 Marker)不会产生荧光,透射拍照也就不会产生亮带。而量子点有荧光,所以在紫外照射下会有条带,如图 8(a)所示,2、4、5 泳道都有亮光,并且 QDs-Ab 偶联物(4、5 泳道)亮光的强度会随着上样量的增加而增强。在考马斯亮蓝染色之后,图 8(b)中所示,QDs(2 泳道)无条带,Marker,抗体及 QDs-Ab 均有明显的条带,表明 QDs 与 Ab 偶联成功。

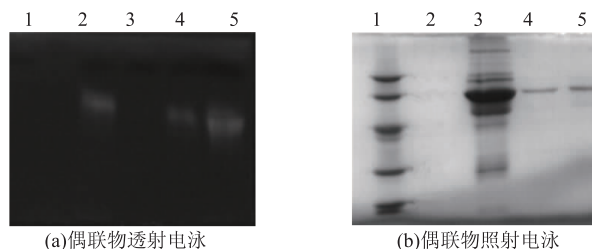


图8 偶联物透射电泳图和偶联物照射电泳

Fig. 8 Transmission electrophoresis of QDs-Ab conjugations and the exposure electrophoresis of QDs-Ab conjugations

2.4 量子点与抗体相互作用的研究

2.4.1 量子点对抗体吸收光谱的研究 37 $^{\circ}\text{C}$ (310 K)时,不同浓度的量子点(0.2×10^{-6} , 4×10^{-6} , 8×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1.2×10^{-5} , 1.4×10^{-5} , 1.6×10^{-5} , 1.8×10^{-5} , 2×10^{-5} mol/L)对抗体(浓度为 1×10^{-5} mol/L)吸收光谱的影响,如图 9 所示,抗体本身的吸收峰较宽,最大吸收峰值在 280 nm 左右,随着量子点浓度的增加,抗体的吸收峰逐渐增加,并发生轻微的蓝移(从 280 nm 移动至 278 nm),这表明了抗体结构发生一定的变化,由于动态猝灭不会引起吸收光谱的变化^[12],因此可以进一步证明量子点与抗体之间的作用属于静态猝灭。除此之外,我们还可以依据公式(1)推算出量子点与抗体之间的表现结合常数 K_{app} ^[13]。

$$\frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{A_c-A_0} + \frac{1}{K_{\text{app}}(A_c-A_0)[\text{QDs}]} \quad (1)$$

其中 A , A_0 , A_c 分别代表加入不同浓度量子点时,不含量子点时 BSA 的吸光度以及混合物的吸光度。根据公式(1),计算 $1/(A-A_0)$,并与 $1/[\text{QDs}]$,通过线性拟合,可以看出 $1/(A-A_0)$ 与量子点浓度的倒数呈线性关系(见图 9 插图),其中斜率为 $1/K_{\text{app}}(A_c-A_0)$,截距为 $1/(A_c-A_0)$,最终计算可知 K_{app} 大约为 $3.37 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($R^2=0.9906$)

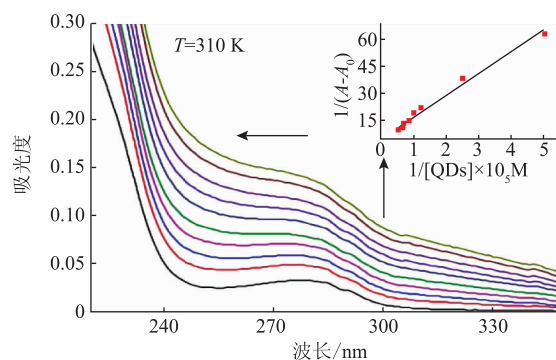


图9 加入不同浓度的 CdTe 量子点,抗体吸收光谱的改变(插图为 $1/(A-A_0)$ 与量子点浓度的线性关系)

Fig. 9 Absorption spectrum of antibody in the absence and presence of CdTe QDs at 310 K (The insert is the straight line dependence of $1/(A-A_0)$ on the reciprocal concentration of CdTe QDs)

2.4.2 量子点对抗体荧光光谱的影响 荧光光谱是获得蛋白构象及动态变化的一种有效方法,众所周知,荧光猝灭通常是由 2 种因素引发的,一种由碰撞引起(动态猝灭),另外一种猝灭剂与荧光物

质形成复合物引起的(静态猝灭)^[14]。因此我们通过研究 QDs 对抗体荧光光谱的影响可以判断引发荧光猝灭的类型,并能对猝灭机制有进一步的了解。如图 10 所示,为不同温度下(a:298 K,b:304 K,c:310 K),量子点对抗体荧光光谱的影响,其中抗体浓度固定为 1×10^{-5} mol/L, QDs 浓度(从 A 到 I)分别为 0 、 8.0×10^{-6} 、 1.6×10^{-5} 、 2.0×10^{-5} 、 4.0×10^{-5} 、 6.0×10^{-5} 、 8.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} 、 1.2×10^{-4} mol/L。如图所示,抗体的最大发射波长在 340 nm 左右,随着 QDs 浓度的增加,抗体的荧光强度显著下降,不同温度下,荧光强度的下降程度也有所不同,量子点对抗体荧光强度的猝灭,可通过 Stern-Volmer 公式进行计算^[15]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2)$$

其中, F_0 、 F 分别代表没有 QDs 存在,以及有 QDs 存在时抗体的荧光强度; $[Q]$ 为量子点的浓度; K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数。从图 10 插图可以看出,在量子点较低浓度范围内 ($2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-5}$ mol/L), F_0/F 与浓度的关系与 Stern-Volmer 公式比较吻合。因此,在低浓度范围,将不同温度下 F_0/F 与量子点的浓度进行线性拟合。

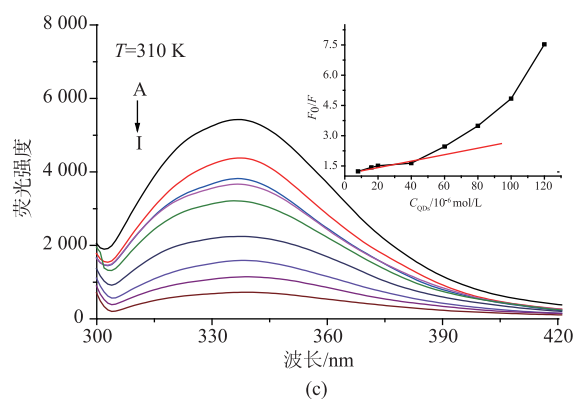
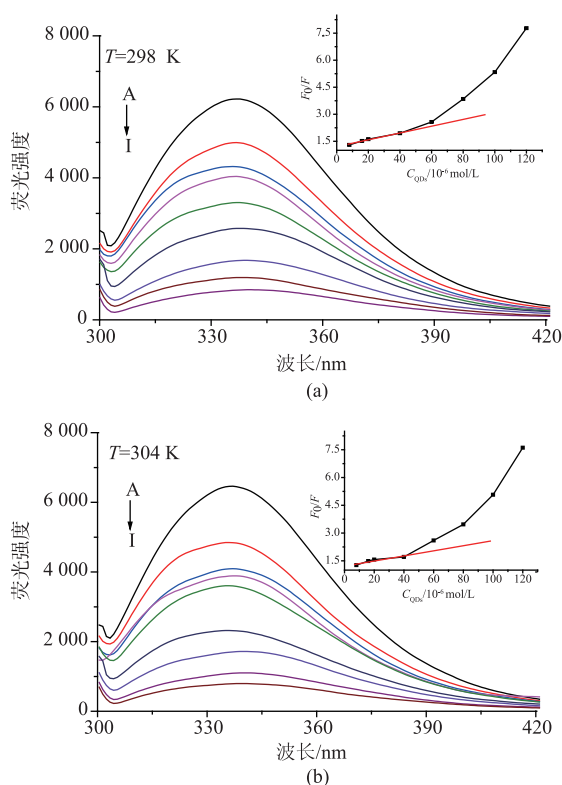


图 10 不同温度下,加入不同浓度的量子点,抗体荧光光谱的变化(插图为量子点溶液对抗体相对应的 Stern-Volmer 猝灭曲线)

Fig. 10 Fluorescence spectra of antibody in the presence of different concentrations of QDs at different temperature, and the inset corresponds to Stern-Volmer plots of the quenching of the fluorescence of antibody by QDs

如图 11 所示,为不同温度下,量子点对抗体荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线,结果表明,量子点对抗体荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线具有良好的线性关系,且该猝灭曲线与温度相关。表 1 列出了不同温度下的 Stern-Volmer 猝灭常数 K_{SV} ,随着温度的升高, K_{SV} 反而会下降。由于动态猝灭依赖于扩散,而扩散系数会随着温度的升高而增加,因此动态猝灭常数一般也会随着温度的升高而增大,然而对于静态猝灭来说,形成的复合物的稳定性会随着温度的升高而下降,因此,静态猝灭常数就会与温度呈负相关^[16],所以进一步说明了量子点与抗体之间的相互作用属于静态猝灭,双分子猝灭公式如下:

$$K_{SV} = K_q \cdot \tau_0 \quad (3)$$

式中, K_q 为双分子速率常数, τ_0 为无猝灭剂时荧光物质的平均寿命,对于生物大分子,通常 $\tau_0 = 10^{-8}$ s。根据公式(3)可计算出不同温度下的 K_q ,结果列于表 1。荧光猝灭剂对生物大分子的扩散碰撞猝灭常数,最大时通常为 $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[17],量子点对抗体猝灭实验所得的 K_q 远远大于扩散碰撞猝灭常数,结果也同样表明量子点对抗体的猝灭方式为静态猝灭。

由于前面的研究表明,量子点对抗体的猝灭机制为静态猝灭,因此需要用修正的 Stern-Volmer 公式(4)来计算猝灭参数^[12]。

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a} \frac{1}{[QDs]} + \frac{1}{f_a} \quad (4)$$

其中, ΔF 为猝灭剂(量子点)不存在时和存在时, 抗体荧光强度的差值; f_a 为可被荧光猝灭剂接近的发色基团的摩尔百分比; $[QDs]$ 为量子点的浓度; K_a 为有效猝灭常数。以 $F_0/\Delta F$ 与 $1/[QDs]$ 作图(图 12 所示), 经线性拟合后, 斜率为 $1/(f_a K_a)$, 截距为 $1/f_a$, 不同温度下的 K_a 的计算结果列于表 1, 结果表明 K_a 也会随温度的升高而下降, 这一变化趋势与 K_{SV} 一致, 这一特性符合静态猝灭机制。

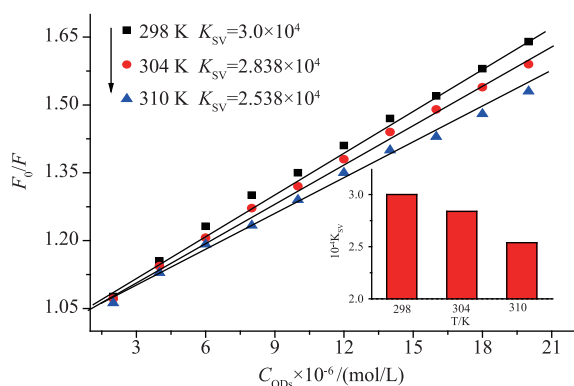


图 11 不同温度下, 量子点溶液对抗体的 Stern-Volmer 猝灭曲线(插图 Stern-Volmer 猝灭常数 K_{SV} 与温度的关系)

Fig. 11 Stern-Volmer plots for the quenching of antibody by QDs at different temperatures. The inset shows the relationship of the Stern-Volmer quenching constants K_{SV} and temperature

表 1 不同温度下, CdTe 量子点溶液与抗体相互作用的 Stern-Volmer 公式和修正的 Stern-Volmer 公式的猝灭常数

Table 1 Stern-Volmer and modified Stern-Volmer quenching constants of the QDs-antibody system at different temperatures

T/K	Stern-Volmer 公式			修正的 Stern-Volmer 公式	
	$K_a/(L/mol)$	R^2	K_q	$K_a/(L/mol)$	R^2
298	3×10^4	0.992 0	3×10^{12}	4.76×10^4	0.998 6
304	2.838×10^4	0.990 2	2.838×10^{12}	4.6×10^4	0.999 0
310	2.538×10^4	0.993 7	2.538×10^{12}	3.97×10^4	0.998 2

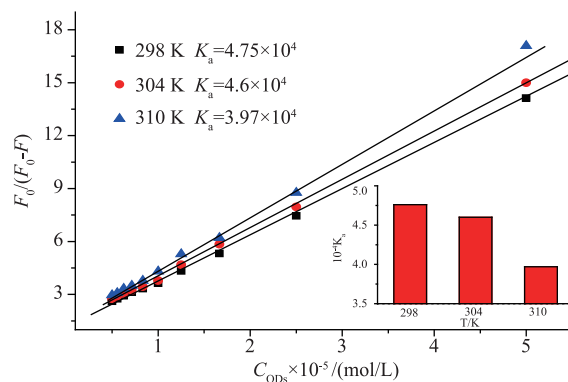


图 12 不同温度下, 量子点溶液对抗体的修正的 Stern-Volmer 猝灭曲线(插图修正的 Stern-Volmer 猝灭常数 K_a 与温度的关系)

Fig. 12 Modified Stern-Volmer plots for the quenching of antibody by QDs at different temperatures. The inset shows the relationship of the modified Stern-Volmer quenching constants K_a and temperature

2.4.3 结合位点 n 和结合常数 K 由于量子点对抗体的荧光猝灭属于静态猝灭, 因此, 它们之间应该存在结合位点, 之前的研究, 结合位点可以通过公式(5)来进行计算^[18]

$$\lg \frac{(F_0-F)}{F} = \lg K + n \lg [QDs] \quad (5)$$

其中, K 是结合常数; n 为结合位点的个数。以 $\lg [(F_0-F)/F]$ 与 $\lg [QDs]$ 作图(图 10 所示), 通过线性拟合, 可以得到不同温度下的结合常数 K 和结合位点 n , 计算结果列于表 2, 结果表明随着温度的升高, 结合常数 K 会不断减小, 和修正的 Stern-Volmer 猝灭常数 K_a 有相同的变化趋势。由于有效猝灭常数 K_a 可以近似的认为是猝灭剂和受体体系中的表观结合常数^[19]。将结合常数 K 的值和表观结合常数的值相比较发现, 结合常数均在同一个数量级上, 因此, 可以断定量子点和抗体之间的结合常数约 10^4 M^{-1} ^[20]。此外, 我们发现不同温度下量子点和抗体的结合位点均接近于 1, 表明两者仅有一个结合位点。

2.4.4 热力学常数 ΔH , ΔG 和 ΔS 通常, 内源性或外源性配体与生物大分子之间的作用力包括静电相互作用、氢键、范德华力、疏水相互作用等。为了进一步研究量子点与抗体之间的作用, 我们需要了解两者之间作用的热力学参数 ΔH , ΔS 和 ΔG 。其中焓变 (ΔH) 是反应过程中分子内键能交换的结果; 熵变 (ΔS) 是反应体系中混乱度变化的指标; 自由能 (ΔG) 的变化可以判断反应是否自发进行。

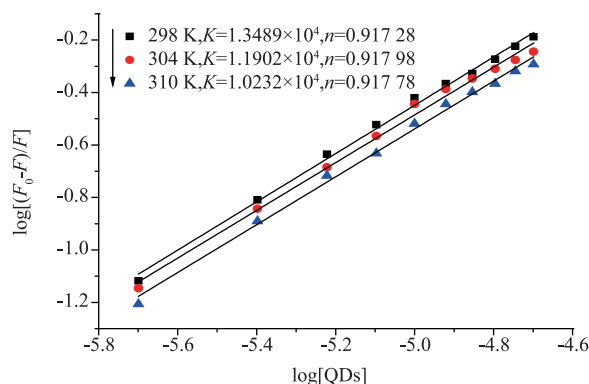


图 13 不同温度下,量子点溶液与抗体相互作用时 $\log[(F_0-F)/F]$ 对 $\log[QDs]$ 时的曲线

Fig. 13 Plot of $\log [(F_0-F)/F]$ versus $\log [QDs]$ for antibody with QDs at different temperature

在实验温度范围内, ΔH 受温度影响不大,则 ΔH 和 ΔS 我们可以通过 van't Hoff 公式(6)计算出热力学常数

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (6)$$

其中, K 为结合常数; ΔH , ΔS 分别代表反应的标准焓变和熵变; R 为气体常数 ($8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$); T 为温度(单位为 K)。如图 14 所示, $\ln K$ 与 $1/T$ 具有良好的线性关系, $R^2=0.99778$, ΔH 和 ΔS 可通过斜率和截距求得,自由能 ΔG 可根据公式(7)进行计算,计算结果全部列于表 2 中,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

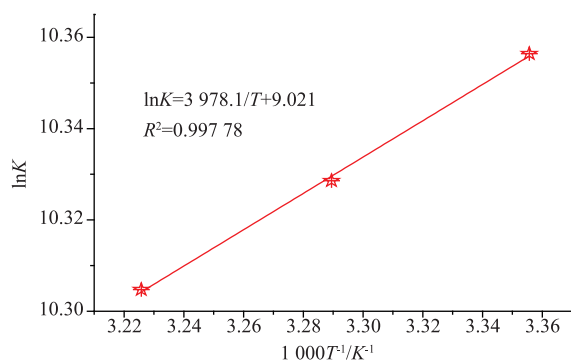


图 14 量子点与抗体相互作用的 Van't Hoff 关系图

Fig. 14 Van't Hoff plots of QDs-antibody system

之前的研究表明^[21]疏水作用会对体系的 $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ 产生贡献, $\Delta H < 0$, 则反应主要为静电作

用, $\Delta S < 0$, 起主要作用的可能是氢键和范德华力, 如表 2 所示, 在不同温度下, $\Delta G < 0$, 表明量子点与抗体的结合是自发进行的, $\Delta H (< 0)$ 和 $\Delta S (> 0)$ 表明在这个结合反应中, 量子点与抗体之间的作用力是静电相互作用为主, 此外氢键、范德华力也会起一定的作用。

表 2 不同温度下,量子点溶液与抗体相互作用的结合常数、结合位点数及热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters and the number of binding sites of QDs-antibody at different temperatures

T/K	$K/(\text{L}/\text{mol})$	$\Delta H/(\text{KJ}/\text{mol})$	$\Delta S/(\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K}))$	$\Delta G/(\text{KJ}/\text{mol})$	R^2	n
298	1.35×10^4			-55.42		0.92
304	1.19×10^4	-33.07	75	-55.87	0.997 8	0.91
310	1.02×10^4			-56.32		0.91

3 结语

试验优化了荧光探针的制备条件, 结果表明在 pH 为 7.4, 37 °C 反应 2 h, 离子浓度为 0.2 mol/L 时, 制备的荧光探针效果最好, 然后通过电泳对偶联结果进行鉴定。此外, 选取 298 K、304 K、310 K 作为实验条件, 对量子点与抗体的相互作用进行了深入的研究, 根据公式(1—7), 可以分别得到量子点与抗体的表观结合常数 K_{app} , 荧光猝灭常数 K_{sv} , 结合常数 K , 结合位点 n , 以及热力学参数 $\Delta H (< 0)$ $\Delta G (< 0)$ $\Delta S (> 0)$ 等, 结果表明, 量子点对抗体具有荧光猝灭作用, 猝灭方式属于静态猝灭, 即量子点是与抗体形成某种特定结构的配合物而引起的荧光猝灭。量子点与抗体的结合起主要作用的是静电相互作用, 同时氢键、范德华力也会起一定的作用。

随着量子点的应用越来越广泛, 如何实现量子点与抗体等物质的偶联, 同时还能保持它们的生物活性, 也是推动量子点在生物标记, 免疫学检测等方面应用的一个重要环节, 通过本文作者这一系列的研究, 我们对量子点与抗体之间的作用有了更深入的了解, 这也为荧光探针的制备以及量子点在免疫学方面的应用提供一些理论支持。

参考文献:

- [1] ZHAO Y, ZHANG Y, ZHU H, et al. Low-temperature synthesis of hexagonal (wurtzite) ZnS nanocrystals[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2004, 126(22): 6874-6875.
- [2] XU S, KUMAR S, NANN T. Rapid synthesis of high-quality InP nanocrystals[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2006, 128(4): 1054-1055.
- [3] LI Yuanyuan, LI Peiwu, ZHANG Qi, et al. Fluoroimmunoassay using quantum dots label for detecting of aflatoxin B1 in peanuts [J]. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, 2012, 34(4): 438-442. (in Chinese)
- [4] YIN Kuiyu, HAN Yonghe, XU Zunlian, et al. A Study on the Interactions between CdTe QDs and Bovine Hemoglobin [J]. **Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)**, 2013, 29(4): 80-85. (in Chinese)
- [5] UUG T D T, TRAN T K C, PHAM T N, et al. CdTe and CdSe quantum dots: synthesis, characterizations and applications in agriculture[J]. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 2012, 3(4): 043001
- [6] MENG Yuanhua, ZHOU Xiaopan, TAO Guanhong, et al. Determination of microcystin-LR in environmental water samples by bioconjugates between CdSe/CdS quantum dots and microcystin-LR antibody [J]. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**, 2010, 27(6): 2354-2358. (in Chinese)
- [7] YU W W, QU L, GUO W, et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals[J]. **Chemistry of Materials**, 2003, 15(14): 2854-2860.
- [8] 孟元华. CdSe/CdS 量子点检测环境中的微囊藻毒素-LR 以及镉离子的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [9] WANG Q, KUO Y, WANG Y, et al. Luminescent properties of water-soluble denatured bovine serum albumin-coated CdTe quantum dots[J]. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2006, 110(34): 16860-16866.
- [10] DOLLEFELD H, WELLER H, EYCHMULLER A. Particle-particle interactions in semiconductor nanocrystal assemblies [J]. **Nano Letters**, 2001, 1(5): 267-269.
- [11] ZENG Qinghui, ZHANG Youlin, DU Chuang, et al. Investigation on the fluorescent labeling between CdTe/CdS Core/Shell quantum dots and protein[J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 2009, 30(6): 1158-1161. (in Chinese)
- [12] LAKOWICZ J R. Principles of fluorescence spectroscopy[M]. Springer Science & Business Media, Springer, Boston, MA, 2007.
- [13] WANG Q, ZHANG X, ZHOU X, et al. Interaction of different thiol-capped CdTe quantum dots with bovine serum albumin[J]. **Journal of Luminescence**, 2012, 132(7): 1695-1700.
- [14] XIAO Q, HUANG S, QI Z D, et al. Conformation, thermodynamics and stoichiometry of HSA adsorbed to colloidal CdSe/ZnS quantum dots[J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 2008, 1784(7): 1020-1027.
- [15] GHALI M. Static quenching of bovine serum albumin conjugated with small size CdS nanocrystalline quantum dots[J]. **Journal of Luminescence**, 2010, 30(7): 1254-1257.
- [16] DING L, ZHOU P, LI S, et al. Spectroscopic studies on the thermodynamics of L-cysteine capped CdSe/CdS quantum dots—BSA interactions[J]. **Journal of fluorescence**, 2011, 21(1): 17-24.
- [17] 王启岁. 水溶性量子点的制备, 应用及其与 BSA 相互作用的研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2009.
- [18] LEI-IRER S. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion[J]. **Biochemistry**, 1971, 10: 3254-3263.
- [19] ANBAZHAGAN V, RENGANATHAN R. Study on the binding of 2,3-diazabicyclo[2.2.2] oct-2-ene with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy[J]. **Journal of Luminescence**, 2008, 128(9): 1454-1458.
- [14] PU L. Fluorescence of organic molecules in chiral recognition[J]. **Chemical Reviews**, 2004, 104(3): 1687, 1716.
- [20] ROSS P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. **Biochemistry**, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [21] LECKBAND D. Measuring the forces that control protein interactions[J]. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 2000, 29(1): 1-26.