

文章编号: 1000-7032(2012)08-0911-05

# CdTe 量子点-罗丹明 B 荧光共振能量转移法测定溶菌酶

高桂园<sup>1</sup>, 刘璐<sup>1</sup>, 付璇<sup>1</sup>, 杨冉<sup>1\*</sup>, 屈凌波<sup>1,2</sup>

(1. 郑州大学 化学与分子工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 河南工业大学 化学化工学院, 河南 郑州 450001)

**摘要:** 合成了以硫代乙醇酸为稳定剂的 CdTe 量子点, 以发射波长为 530 nm 的量子点为供体, 罗丹明 B 为受体, 建立一种以十六烷基三甲基溴化铵为介质的荧光共振能量体系检测溶菌酶含片中溶菌酶含量的方法。结果表明: 在 pH = 5.0 时, 溶菌酶的浓度与共振能量转移效率降低值在  $2 \times 10^{-7} \sim 8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内呈线性关系, 其线性方程为  $Y = 306.07 - 13.85X$ , 相关系数为 0.991 0, 检出限为  $2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD 为 5.8%, 平均回收率为 101% ( $n = 5$ )。

**关键词:** CdTe; 罗丹明 B; 荧光共振能量转移; 溶菌酶

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fjxb20123308.0911

## Fluorescence Resonance Energy Transfer Between CdTe QDs and Rhodamine B with Its Application in The Determination of Lysozyme

GAO Gui-yuan<sup>1</sup>, LIU Lu<sup>1</sup>, FU Xuan<sup>1</sup>, YANG Ran<sup>1\*</sup>, QU Ling-bo<sup>1,2</sup>

(1. The College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

\* Corresponding Author, E-mail: yangran@zzu.edu.cn

**Abstract:** The water-soluble CdTe was synthesized using thioglycolic acid as stabilizer. The fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the CdTe QDs and Rhodamine B (RhB) in the presence of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was characterized, in which the QDs with an emission wavelength of 530 nm was used as energy donor and rhodamine B as acceptor. Lysozyme content in lysozyme buccal tablets was determined by fluorescence resonance energy transfer. The results showed that the extent of fluorescence energy transfer quenching was linearly proportional to the concentration of lysozyme from  $2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  with a correlation coefficient of 0.991 0. The minimum detection concentration was  $2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD and the average recovery was 5.8% and 101% ( $n = 5$ ), respectively.

**Key words:** CdTe; RhB; FRET; lysozyme

### 1 引 言

溶菌酶(Lysozyme)作为一种能水解致病菌中

黏多糖的碱性酶,具有抗菌、消炎、抗病毒等作用,被广泛应用于医药、食品工业、生物工程等方面。目前常用的检测方法包括紫外可见分光光度

收稿日期: 2012-04-20; 修订日期: 2012-05-23

作者简介: 高桂园(1986-),女,河南漯河人,主要从事纳米材料合成与应用的研究。

E-mail: gaoguiyuan532@163.com

法<sup>[1]</sup>、浊度测定、共振光散射法<sup>[2]</sup>、光电比色法、表面增强激光解吸电离飞行时间质谱<sup>[3]</sup>、放射免疫试验、ELISA<sup>[4]</sup>等方法。

荧光共振能量转移(FRET)是一种非辐射能量跃迁,通过分子间的电偶极相互作用实现供体和受体之间的能量转移,要求供体荧光量子产率高、供体的发射峰与受体的吸收峰有很好的重叠。量子点作为一种新型荧光纳米材料,具有高荧光量子产率、激发光谱宽、发射光谱窄、发射峰位可调等良好的光学性质,作为一种 FRET 供体为人们所关注。目前,FRET 已广泛应用于金属离子测定<sup>[5-6]</sup>、蛋白质分析<sup>[7-9]</sup>、生物分子荧光探针<sup>[10-11]</sup>等方面。

本文合成了以硫代乙醇酸为稳定剂的 CdTe,并以 CdTe 为能量供体、罗丹明 B 为能量受体建立 FRET,并在最优试验条件下实现了溶菌酶含量的测定。

## 2 实 验

### 2.1 仪器与试剂

实验仪器有 F-4500 荧光分光光度计(日本,日立);UV-1800PC 型紫外可见分光光度计(上海谱达仪器);PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司)。

实验试剂包括碲粉、氯化镉(AR,国药集团);罗丹明 B(AR,西安化学试剂厂);十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,AR,中国医药公司北京采购供应站);硼氢化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠(AR,天津科密欧公司);溶菌酶(郑州金赛尔生物科技有限公司);硫代乙醇酸(GR,阿拉丁);甲醇(AR,天津市风船化学试剂科技有限公司);亚沸水、二次蒸馏水。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 量子点合成

称取碲粉 0.127 6 g 和硼氢化钠 0.100 0 g 于一小试剂瓶中,橡皮塞封口并用注射器加入 4 mL 亚沸水,超声 3~4 h 后置于 4 °C 冰箱中 10 h,制得碲氢化钠前驱体。将 50 mL CdCl<sub>2</sub> (0.02 mol · L<sup>-1</sup>) 溶液转移到三口烧瓶中,加入 0.2 mL 稳定剂 TGA,用浓度为 2 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaOH 调解溶液 pH 至 10.0, N<sub>2</sub> 保护下加入 2 mL 新制 NaHTe 上清液,90 °C 下回流一定时间即可。将合成的量子点

于 4 °C 冰箱中保存备用。

对所得样品进行荧光检测(图 1),可知反应 1 h 的 CdTe 量子点样品的发射峰位于 530 nm 左右。图 2 为 CdTe 量子点的紫外吸收光谱,可以看出其吸收波长在 484 nm 处。根据文献[12]计算出量子点的粒径为 1.8 nm,浓度为 1.96 × 10<sup>-4</sup> mol · L<sup>-1</sup>。图 3 为 CdTe 量子点的透射电镜照片,可以看出 CdTe 量子点颗粒呈近似球形,粒径尺寸分布较均匀,其粒径与计算结果一致,为 2 nm 左右。

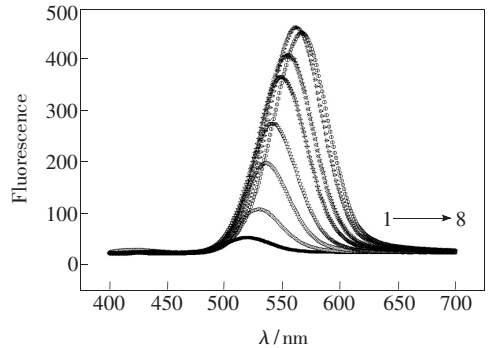


图 1 CdTe 荧光光谱图(1→8 分别表示 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 h)

Fig. 1 The fluorescence spectra of CdTe QDs

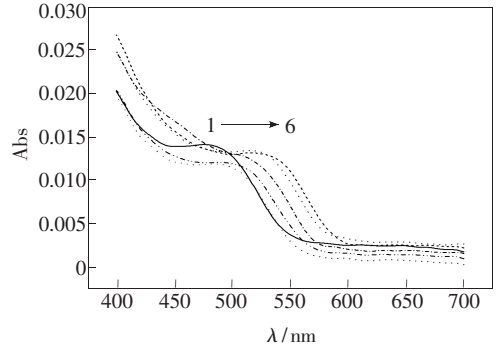


图 2 CdTe 紫外吸收光谱图(1→6 分别表示 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 h 的 CdTe)

Fig. 2 The absorption spectra of CdTe QDs

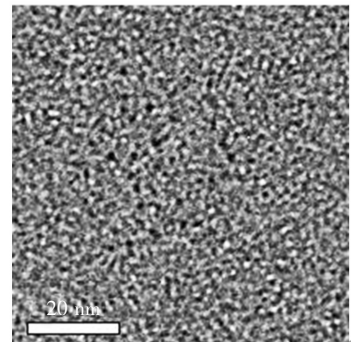


图 3 CdTe 透射电镜图

Fig. 3 TEM of CdTe QDs

### 2.2.2 共振能量转移体系的构建

图 4 分别为 CdTe 量子点和罗丹明 B 的荧光光谱和吸收光谱,从图中可以看出 CdTe 量子点的最大发射(530 nm)光谱与罗丹明 B 的最大吸收(550 nm)光谱有较好的重叠,为两者之间的能量转移提供了很好的光谱条件。从图 5 的 FRET 光谱中可以看出,二者明显发生了能量转移。参照文献[13]构建 FRET 体系,向 10 mL 比色管中分别加入 1 mL NaCl、1 mL PBS (pH = 5.0) 和一定体积的 CdTe、CTAB 和 RhB 定容至 5 mL。待反应 1 h 后,检测其荧光光谱。

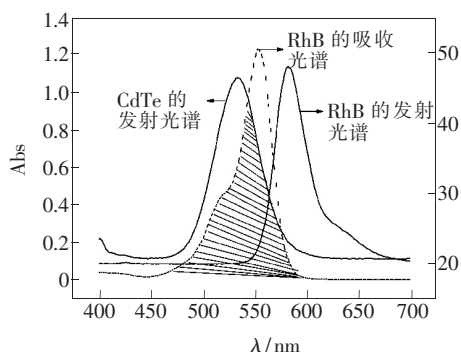


图 4 CdTe 的发射光谱和 RhB 的吸收、发射光谱。

Fig. 4 The emission spectra of CdTe and RhB and absorption spectrum of RhB

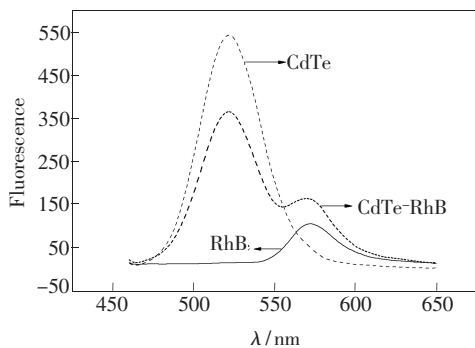


图 5 CdTe 与 RhB 的 FRET 光谱

Fig. 5 The FRET spectra of CdTe and RhB

### 2.2.3 标准曲线的制备

向构建的新体系中加入一定量的标准 Lyso 溶液,定容至 5 mL 放置 1 h 后,用 445 nm 的激发波长激发体系,激发发射狭缝均为 10 nm,测定 530 nm 和 583 nm 的荧光强度  $F$ ,计算出  $\Delta F (\Delta F = F_{583} - F_{530}, F_{583}、F_{530}$  分别为 583 nm 和 530 nm 处的荧光强度)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 Lyso 浓度对 FRET 的影响

在最佳条件下,CdTe-RhB 体系随着 Lyso 浓度

的增加,RhB 的荧光强度降低,CdTe 的荧光强度增强,说明 Lyso 的加入使体系的共振能量转移效率降低。若以该体系中共振能量转移的量对 Lyso 浓度作图(图 6),可以看出二者在一定范围内是线性相关的,其线性方程为  $Y = 306.07 - 13.85X$ ,相关系数为 0.991 0。上述结果说明 CdTe-RhB 体系可用于测定 Lyso 的浓度,其检出限为  $2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

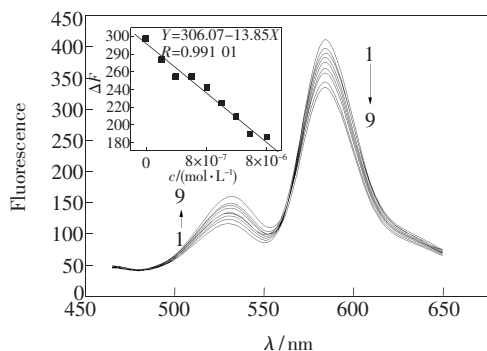


图 6 溶菌酶浓度对荧光共振能量转移的影响(1→9 的 Lyso ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的加入量分别为 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mL)

Fig. 6 Effect of the concentration of Lyso on FRET

### 3.2 影响因素的考察和条件优化

#### 3.2.1 pH 对 FRET 的影响

向 FRET 体系中加入 1 mL 不同酸度的 PBS 和一定体积的 Lyso 标准溶液,检测荧光强度如图 7 所示。可以看出在 pH = 5.0 时,体系的荧光强度明显增强,且能量转移效率提高。

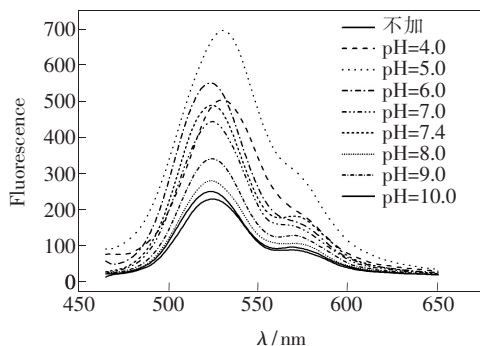


图 7 pH 对 FRET 的影响

Fig. 7 Effect of pH on FRET

#### 3.2.2 RhB 浓度对 FRET 的影响

在最适合 pH 条件下,向 FRET 体系中加入不同体积的 RhB 溶液,检测荧光光谱如图 8,随着 RhB 浓度的增大,RhB 的荧光强度逐渐增强,量子点荧光逐渐减弱;但当浓度增加到 0.15 mL 时,量子点荧光强度的变化减小。

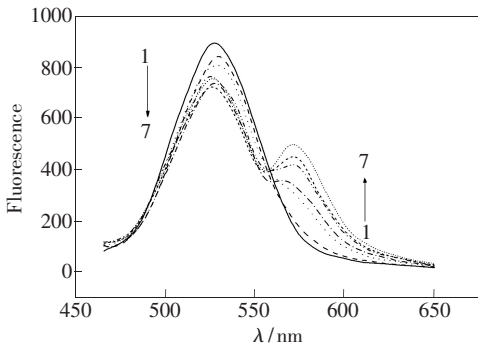


图 8 RhB 浓度对 FRET 的影响(1→7 分别为加入 0, 0.02,0.05,0.08,0.10,0.12,0.15 mL 的 RhB( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ))

Fig. 8 Effect of the concentration of RhB on FRET

3.2.3 CdTe 浓度对 FRET 的影响

在 pH = 5.0 的体系中,固定 RhB 的浓度(0.15 mL)加入不同体积的量子点。从图 9 可以看出,加入 0.1 mL 的量子点后,RhB 的荧光强度基本不再变化,能量转移效率达到最大。

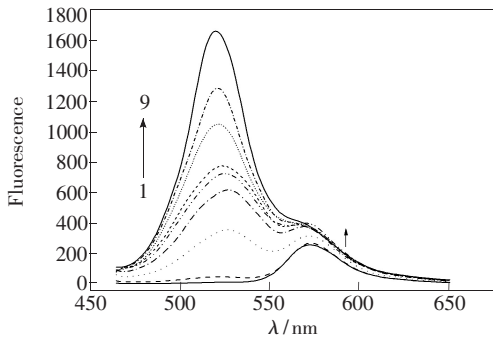


图 9 CdTe 浓度对 FRET 的影响(1→9 分别表示加入 CdTe( $1.96 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0,0.02,0.05,0.08, 0.10,0.12,0.15,0.18,0.20 mL)

Fig. 9 Effect of the concentration of CdTe on FRET

3.2.4 CTAB 浓度对 FRET 的影响

在 pH = 5.0 时,向 0.15 mL RhB 和 0.1 mL CdTe 的体系中加入不同体积的 CTAB 溶液。从图 10 可以看出,当 CTAB 浓度增大时,量子点的荧光强度降低,RhB 的荧光强度先增加后降低;在

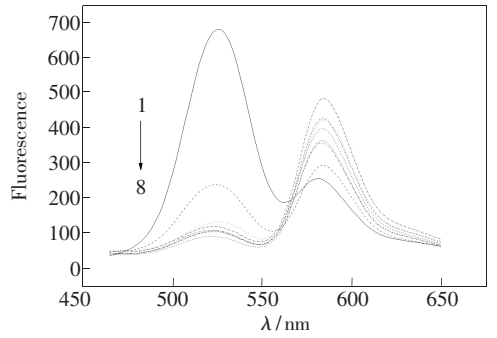


图 10 CTAB 浓度对 FRET 的影响(1→8 分别表示加入 CTAB( $2.74 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0,0.04,0.08, 0.12,0.18,0.20,0.24,0.28 mL)

Fig. 10 Effect of the concentration of CTAB on FRET

0.12 mL 时,体系能量转移效率最高。而且当加入量过高时,溶液会有沉淀生成。这主要是因为 CTAB 溶液中含有甲醇,而量子点是不溶于甲醇的,甲醇的存在会降低量子点的荧光强度,同时过高的甲醇含量也会使量子点沉淀出来。

3.2.5 干扰因素

按照试验方法,当 Lyso 的浓度为  $2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,考察了多种金属离子和常见氨基酸对体系的影响,结果见表 1。可以看出,该检测方法对很多金属离子和氨基酸有较强的抗干扰能力,受其影响很小。

表 1 干扰物质的影响

Table 1 Effects of interfering substances on fluorescence

| 干扰物质             | 允许倍数  | 相对误差/% | 干扰物质        | 允许倍数  | 相对误差/% |
|------------------|-------|--------|-------------|-------|--------|
| K <sup>+</sup>   | 1 000 | 0.11   | GSH         | 1 000 | 4.9    |
| Al <sup>3+</sup> | 200   | -0.25  | Vc          | 500   | 2.8    |
| Ni <sup>2+</sup> | 200   | 0.98   | L-Cysteine  | 1 000 | -4.2   |
| Zn <sup>2+</sup> | 1 000 | 4.8    | L-Leucine   | 1 000 | -4.1   |
| Ba <sup>2+</sup> | 1 000 | 1.8    | L-Clycine   | 100   | 5.4    |
| Pb <sup>2+</sup> | 200   | 4.3    | L-Serine    | 1 000 | 3.4    |
| Mg <sup>2+</sup> | 1 000 | 2.8    | L-Threonine | 1 000 | -5.8   |
| Fe <sup>3+</sup> | 500   | 1.6    |             |       |        |

3.3 样品分析

取溶菌酶含片 12 片(每片 20 mg),研磨后加

表 2 样品中溶菌酶的测定(n=5)

Table 2 Determination results of Lyso in samples (n=5)

| 编号 | 加标量/<br>( $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 样品量/<br>( $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 测定值/<br>( $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 回收率/<br>% | 平均回收率/<br>% | RSD/<br>% |
|----|---|---|---|-----------|-------------|-----------|
| 1  | 4.0   | 6.2   | 3.78  | 94.5      |             |           |
| 2  | 4.0   | 6.2   | 3.8   | 95        |             |           |
| 3  | 4.0   | 6.2   | 4.14  | 103.5     | 101         | 5.8       |
| 4  | 4.0   | 6.2   | 4.3   | 107.5     |             |           |
| 5  | 4.0   | 6.2   | 4.18  | 104.5     |             |           |

水适量溶解,过滤后续滤液定容于 50 mL 的容量瓶中。取适量溶液用该法检测,并进行加标回收试验,测定结果见表 2。

## 4 结 论

采用水相法合成了高稳定性高荧光效率的 CdTe 量子点,并构建了 CdTe 与 RhB 的共振能量

转移体系。在最优试验条件下实现了量子点与罗丹明 B 之间的能量转移,根据 Lyso 可使 FRET 的能量转移效率降低的特性,建立了一种检测 Lyso 的方法。能量转移效率的降低与 Lyso 的浓度在  $2 \times 10^{-7} \sim 8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围内呈良好的线性关系,相关系数为 0.991 0,检出限为  $2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 参 考 文 献:

- [1] Wang T X, Liu Z H, Xia L Y, *et al.* Determination of lysozyme in honey by ultraviolet spectrophotometry [J]. *Food Science and Technology* (食品科技), 2010, 35(4):292-297 (in Chinese).
- [2] Zhang Y L, Zeng Q H, Kong X G. The influence of bioconjugate process on the photoluminescence properties of water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots capped with polymer [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2010, 31(1):101-104 (in Chinese).
- [3] Dragoni I, Balzaretto C, Rossini S, *et al.* Detection of hen lysozyme on proteic profiles of grana padano cheese through SELDI-TOF MS high-throughput technology during the ripening process [J]. *Food Analytical Methods*, 2011, 4(1):233-239.
- [4] Hemmen E, Mahana W, Jollds P, *et al.* Common antigenic properties of a g-type (goose) and a c-type (duck) egg white lysozyme: Antibody responses in rabbits and mice [J]. *Experientia*, 1992, 48(1):79-84.
- [5] Li J, Mei F, Li W Y, *et al.* Study on the fluorescence resonance energy transfer between CdTe QDs and butyl-rhodamine B in the presence of CTMAB and its application on the detection of Hg(II) [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2007, 70(4):811-817.
- [6] Liu Y L, Lv X, Zhao Y, *et al.* A naphthalimide-rhodamine ratiometric fluorescent probe for  $\text{Hg}^{2+}$  based on fluorescence resonance energy transfer [J]. *Dyes and Pigments*, 2012, 92(3):909-915.
- [7] Ge S G, Lu J J, Yan M, *et al.* Fluorescence resonance energy transfer sensor between quantum dot donors and neutral red acceptors and its detection of BSA in micelles [J]. *Dyes and Pigments*, 2011, 91(3):304-308.
- [8] Tao H L, Li S H, Li J P. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dots of CdSe and CdTe and its application for determination of serum prostate-specific antigen [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (分析化学), 2012, 40(2):224-229 (in Chinese).
- [9] Bhuvanewari J, Fathima A K, Rajagopal S. Rhenium (I)-based fluorescence resonance energy transfer probe for conformational changes of bovine serum albumin [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2012, 227(1):38-44.
- [10] Hu B, Zhang L P, Chen M L, *et al.* The inhibition of fluorescence resonance energy transfer between quantum dots for glucose assay [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 32(1):82-88.
- [11] Liu H L, Wang Y H, Shen A G, *et al.* Highly selective and sensitive method for cysteine detection based on fluorescence resonance energy transfer between FAM-tagged ssDNA and graphene oxide [J]. *Talanta*, 2012, 93(15):330-335.
- [12] Yu W W, Qu L H, Guo W Z, *et al.* Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals [J]. *Chem. Mater*, 2003, 15(14):2854-2860.
- [13] Zheng J J, Zheng Z H. An inerratic variation of nonlinear co-efficient with temperature in CdSe/ZnSe self assembled quantum dots [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2010, 31(6):836-841 (in English).