

[研究快报]

新型“内标”式双重荧光自组装膜的制备和 DNA 的界面传感

汪志芳, 孙向英, 刘 辉, 刘 斌
(华侨大学材料科学与工程学院, 泉州 362021)

关键词 荧光内标; 双重荧光; 自组装膜; 界面传感; CdTe; 吖啶橙

中图分类号 O657; O647

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)09-1747-03

荧光分析以灵敏度高,可采集信号丰富以及使用方便等优点备受人们关注,近年来已得到了迅速发展^[1].但荧光分析的荧光强度除了受检测底物的影响外,还可能同时受到激发光强度的波动、传感器位置的移动等诸多因素的干扰,从而在一定程度上影响着荧光分析的准确度.目前,提高荧光定量分析准确度的一个有效途径就是采用比率检测,即在荧光探针分子中引入某一个参比荧光团,能够与探针中的感应荧光团一起受光激发,通过检测两个荧光团发射强度比值来实现对分析物种的定量分析.Edwin等^[2]将 Coumarin 343 和 Texas Red dextran 合成至球形颗粒中,利用各自的荧光信号设计为比率型金属离子传感器.Jin等^[3]将对 pH 敏感的染料 Oregon Green 和对 pH 惰性的染料 Texas Red 偶合为双重荧光的新型纳米颗粒,利用其荧光信号对 pH 的响应设计了 pH 比率型传感器.Maria等^[4]利用硅土将 dansyl 1 和 dansyl 2 包裹在其内部,形成核壳结构的荧光纳米颗粒,通过其荧光信号比设计了检测铅离子的比率型传感器.但是,设计此类比率传感器涉及到繁琐的有机合成,且纯液相分析的灵敏度也不高.

自组装膜(Self-assembled membranes, SAMs)是构膜分子通过分子间及其与基体材料间的物理化学作用而自发形成的热力学稳定且排列规则的单(或多)层分子膜^[5].因其具有制备容易、结构简单且易控制等特点而引起人们极大的兴趣^[6],在化学和生物化学传感方面获得了广泛的应用^[7].本实验室在荧光性自组装膜的构建和应用方面开展了较好的工作,基于自组装技术构建的界面荧光传感膜具有强的荧光信号,较之于纯溶液相分析,界面荧光传感可将分析的灵敏度提高数个数量级^[8~11].

为了有效降低依据单一荧光强度定量分析的误差,充分发挥自组装膜设计灵活、制备简单且分析灵敏度高的优点,提高荧光定量分析的准确度和灵敏度,本文提出构建“内标”式自组装膜,即于硅烷化石英表面分别组装吖啶橙(AO)和量子点 CdTe.以 AO 为内标, CdTe 为荧光探针,通过静电吸引作用于 AO 和 CdTe 之间,依次组装聚苯乙烯磺酸钠(PSS)和壳聚糖(CS).PSS 和 CS 的组装有效地“屏蔽”了 AO,使其荧光强度 I_1 不随分析物种浓度的引入而变化,这样既可发挥荧光内标作用,又使膜外层量子点 CdTe 的荧光强度 I_2 随分析物种浓度的改变而改变.所构建的自组装膜双重荧光强度比 I_2/I_1 不随激发光强度的波动和传感器位置的移动等微环境变化而变化,但与被分析物种的浓度呈良好的线性关系,从而实现了直接利用 I_2/I_1 准确定量的“内标”式荧光分析,显著提高了荧光分析的准确度.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 吖啶橙(Acridine Orange,简称 AO,中国医药上海化学试剂公司)、氯化镉(上海光华科技有限公司)、巯基乙酸(上海化工试剂有限公司)、 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷(APES,上海化学试

收稿日期: 2008-05-12.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20575023)、福建省国际合作重点项目(批准号: 2006I0021)、福建省自然科学基金(批准号: D0710017)、教育部留学回国人员科研启动基金及教育部现代分析科学重点实验室(厦门大学)资助.

联系人简介: 孙向英,女,教授,博士生导师,主要从事光化学和电化学传感分析研究. E-mail: sunxy@hqu.edu.cn

剂有限公司)、聚苯乙烯磺酸钠(PSS, Acros 公司)、壳聚糖(CS, 浙江玉环县化工厂). 实验用水为 Milli-Q 基础型(美国 Millipore 公司)纯化水系统提供.

荧光分光光谱仪(Varian Cary Eclipse); 共聚焦荧光显微镜(Lecia Tcs Sps).

1.2 KHTe 的制备 将 4 mmol KBH_4 和 2 mmol Te 粉加入到 10 mL 超纯水中, 反应 8 h, 静置 1 h 备用^[12].

1.3 CdTe 量子点的制备 量子点 CdTe 参照文献[13]方法合成. 将 4 mmol $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和 10 mmol 巯基乙酸溶于 100 mL 超纯水中, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 9~10, 在高纯 N_2 气保护和剧烈搅拌下, 向溶液中迅速加入新配制的 KHTe 溶液, 回流 20 h, 制得量子点 CdTe, 其最大荧光发射峰位于 600 nm.

1.4 自组装膜的制备 将经预处理的石英片置入体积分数为 1% 的 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷(APES) 水溶液中保持 6 h. 将硅烷化的石英片浸泡于 1 g/L 的 PSS 溶液中 6 h, 取出, 用二次水冲洗, N_2 气吹干后, 浸泡于 pH = 4~5 的 0.1 mmol/L AO 溶液中组装至 12 h, 用二次水清洗后, 将组装有 AO 的自组装膜(Quartz/APES/PSS/AO)依次分别置于 1 g/L 的 PSS、pH = 4~5 的 0.1 g/L 壳聚糖和 CdTe 溶液中各保持 6 h, 即得到 Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装膜.

2 结果与讨论

2.1 Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装多层膜的荧光特征 在荧光显微镜下可以观察到 AO 和 CdTe 溶液分别呈现绿色和橙红色荧光, 将所制备的 Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 膜在共聚焦荧光显微镜下观察(图 1), 可以发现膜表面有大量分布均匀的绿色与橙黄色荧光亮点, 橙黄色荧光亮点是因为 AO 绿色荧光与 CdTe 橙红色荧光叠加所致(图中深色为 AO 绿色荧光, 浅色为 AO 与 CdTe 荧光叠加所呈的橙黄色荧光), 表明 AO 与 CdTe 依次组装到石英基底表面, 成功地制备了 Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装膜.

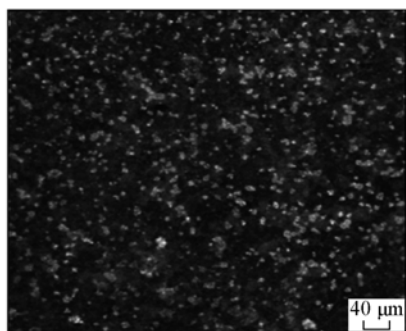


Fig. 1 Confocal image of Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe SAM

采用 $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, 激发/发射单色器狭缝 5 nm/5 nm, 测绘 AO, CdTe 组装液和 Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装多层膜的荧光光谱. 由图 2 可见, AO 和 CdTe 组装液分别于 531 和 602 nm 处有最大荧光发射. Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装膜的双重荧光分别位于 526 和 597 nm(图 3), 这也说明量子点 CdTe 和 AO 均已组装到石英表面. 进一步的实验结果表明, Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装多层膜双重荧光强度比值 I_2/I_1 不随外界因素的变化而变化. 分别在 400, 700 和 950 V 的电压下采用 $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ 测量自组装膜, AO 的荧光强度 I_1 与 CdTe 的荧光强度 I_2 分别随电压值的增加而急剧增加, 而 I_2/I_1 值几乎不变. 移动自组装膜, 重复 10 次测定, I_2/I_1 值的标准偏差为 0.012. 说明 Quartz/APES/PSS/AO/PSS/

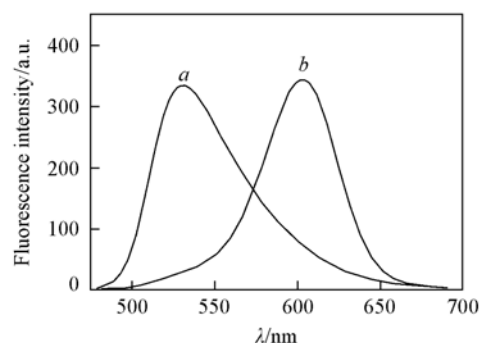


Fig. 2 Fluorescence spectra of AO(a) and CdTe(b) in aqueous solution

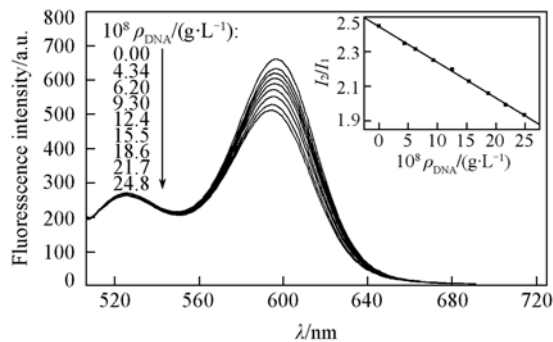


Fig. 3 Fluorescence spectra of Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe SAM in the presence of DNA

Inset shows the linear correlation of I_2/I_1 ratio with DNA mass concentration.

CS/CdTe 自组装多层膜双重荧光强度比值 I_2/I_1 不随激发光强度波动及传感器位置的移动等外界因素的变化而变化, 以此定量可显著地提高荧光分析的准确度.

2.2 Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装多层膜对 DNA 的界面传感 将 Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装膜置于不同浓度的 DNA 溶液中测定荧光光谱. 由图 3 可以看出, 随 DNA 浓度的增加, Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装膜中量子点 CdTe 的荧光强度 I_2 逐渐减弱, 而 AO 的荧光强度 I_1 几乎不变, 说明该自组装膜中 AO 确实可发挥荧光检测中的内标作用. Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe 自组装膜的双重荧光强度比 I_2/I_1 与 DNA 浓度呈良好的线性关系, 线性相关系数 $r=0.9990$, 定量检测下限($3 SD/k$) 为 6.6 ng/L .

参 考 文 献

- [1] de Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Gunnlaugsson T., *et al.*. Chem. Rev. [J], 1997, **97**(5): 1515—1566
- [2] Edwin J. P., Murphy B., Caleb B., *et al.*. Anal. Chem. [J], 2003, **75**(15): 3784—3791
- [3] Jin J., Rosenzweig N., Griffin C., *et al.*. Anal. Chem. [J]. 2000, **72**(15): 3497—3503
- [4] Maria A., Fabrizio M., Paolo T., *et al.*. Langmuir [J], 2007, **23**(16): 8632—8636
- [5] LI Jing-Hong(李景虹). Electrochemistry of Self-assembled Monolayers(自组装膜电化学)[M], Beijing: High Education Press, 2002: 4—11
- [6] WU Tao(吴涛), ZHANG Xi(张希). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2001, **22**(6): 1057—1065
- [7] Kianoush M., David C. M. J. Am. Chem. Soc. [J], 1998, **120**(29): 7328—7336
- [8] Sun X. Y., Liu B., Weng W. T., *et al.*. Talanta [J], 2004, **62**(5): 1035—1040
- [9] Sun X. Y., Liu B., Jiang Y. B. Anal. Chim. Acta [J], 2004, **515**: 285—290
- [10] Sun X. Y., Liu B., He F. Thin Solid Films [J], 2008, **516**(8): 2213—2217
- [11] SUN Xiang-Ying(孙向英), WENG Wen-Ting(翁文婷). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(6): 1030—1034
- [12] Zhang H., Zhou Z., Yang B., *et al.*. J. Phys. Chem. B [J], 2003, **107**(1): 8—13
- [13] Gao M. Y., Rogach A. L., Weller H. J. Phys. Chem. B [J], 1998, **102**(43): 8360—8363

Preparation of Novel Dual Fluorescent Self-assembled Multilayer Film Bearing a Fluorescent Internal Standard for Interfacial Sensing

WANG Zhi-Fang, SUN Xiang-Ying*, LIU Hui, LIU Bin

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract In this paper we described the construction of a novel dual fluorescent film sensor using fluorescent dye Acridine Orange (AO) as an internal standard and CdTe as a fluorescent probe. Poly-sodium-4-styrenesulfonate (PSS) and Chitosan (CS) were respectively assembled between AO and CdTe. The constructed self-assembly multilayers, Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe, emits dual fluorescence at 600 and 530 nm, respectively. AO is shielded effectively by the assembled PSS and CS and thus its fluorescent intensity I_1 doesn't change with the variation of the analyte concentration, thereby acting as an internal standard to provide reference signal. The ratio of dual fluorescence intensities of the thus constructed film sensor is not affected by the variations of the external environment factors such as excitation intensity and sensor position in the cell holder. A good linear relationship was found between dual fluorescence intensity ratio and DNA concentration over 0—250 ng/L. Quartz/APES/PSS/AO/PSS/CS/CdTe film is capable of an extremely highly sensitive detection for DNA with a detection limit of 6.6 ng/L . The analysis based on dual fluorescent self-assembled multilayers bearing a fluorescent internal standard would greatly improve the detection accuracy.

Keywords Fluorescent internal standard; Dual fluorescence; Self-assembled multilayer film; Interfacial sensor; CdTe; Acridine orange

(Ed.: Y, G)