

量子点-DNA 电化学发光传感器的制备与表征

许世超,王才富,张雪平,张忆一

(天津工业大学 环境与化学工程学院,天津 300387)

摘要:为实现对特定基因序列的快速、灵敏检测,该文制备了一种基于碲化镉量子点的 DNA 电化学发光传感器并对测试条件进行了优化。电化学发光传感器是以金电极作基底,然后依次键合 L-半胱氨酸和探针单链 DNA。采用循环伏安法和电化学阻抗谱法对传感器的组装过程进行表征。电化学发光试剂碲化镉量子点标记的目标 DNA 与探针 DNA 杂交构成电化学发光传感器体系。结果表明,扫描时间 6 s,扫描电位 $-3.0 \sim -1.5$ V,扫描速率 0.1 V/s 时,电化学发光传感器体系的电化学发光效果最佳。

关键词:量子点;DNA;L-半胱氨酸;电化学发光;生物传感器

中图分类号:O657;TN383;TP212.3 **文献标识码:**A

The Preparation and Characterization of Quantum Dots-DNA Electrochemiluminescence Sensor

XU Shichao, WANG Caifu, ZHANG Xueping, ZHANG Yiyi

(School of Environmental and Chemical Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China)

Abstract: The CdTe quantum dots (QDs)-based DNA electrochemiluminescence (ECL) sensor was prepared for rapid and sensitive detection of the specific gene sequence. The proposed sensor used the gold electrode as the substrate, the L-cysteine and the probe of single-stranded DNA (ssDNA) were bonded successively. The assembly process of sensor was characterized by the cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The target ssDNA labeled by CdTe QDs and the probe ssDNA were hybridized to form an ECL sensing system. The result indicated that the optimum electrochemiluminescence performance was obtained at the scan time of 6 s, scan potential of $-3.0 \sim -1.5$ V and scan rate of 0.1 V/s.

Key words: quantum dots; DNA; L-cysteine; electrochemiluminescence; biosensor

0 引言

DNA 传感器是一种检测特定 DNA 片段的检测装置,它通常以探针 DNA 作为敏感元件,将目标 DNA 与探针 DNA 杂交前、后生物信号的变化转变为可记录分析的信号。其中,常见 DNA 传感器包括荧光 DNA 传感器^[1-3]及电化学 DNA 传感器^[4-7]等。电化学发光^[8-9]又称电致化学发光,是指溶液中电化学反应生成的激发态物质返回低能态或基态时产生光辐射的现象。电化学发光分析兼具电化学分析的可控性和发光分析的灵敏性。目前,电化学发光技术已广泛应用于化学分析、环境科学及生物医学等领域。基于电化学发光技术构建的一类 DNA 传感器称为 DNA 电化学发光传感器^[10-11]。DNA 电化学发光传感器集 DNA 传感器和电化学发光技

术的优势于一身,具有简单快速,灵敏度高,选择性及可控性好等优点。电化学发光试剂是 DNA 电化学发光传感器的重要组成部分,常用的电化学发光试剂包括鲁米诺试剂^[11-12]、钌联吡啶^[13-15]及稠环芳烃等。但钌联吡啶试剂昂贵,鲁米诺和多环芳烃对溶液的酸碱度太敏感,这限制了其广泛应用。量子点^[16-20]亦称半导体纳米晶,是一个很有前途的电化学发光试剂^[21-25],其制备简单,激发电位低,抗干扰能力强。目前,基于量子点的 DNA 电化学发光传感器的检测分析鲜有报道。

本文以碲化镉量子点为电化学发光试剂,制备和表征了基于量子点的 DNA 电化学发光传感器,并对其测试条件进行了优化。碲化镉量子点采用水相路线合成,制得的量子点分别用透射电子显微镜

收稿日期:2016-05-12

基金项目:天津市自然科学基金重点资助项目(12JCZDJC29500);天津市外专局基金资助项目(Y2012061)

作者简介:许世超(1975-),男,天津人,副教授,硕士生导师,博士,主要从事纳米材料与生物传感器方面的研究。E-mail: xushichao@tjpu.edu.cn.

(TEM)、X 线衍射仪(XRD)、紫外、红外等技术表征。DNA 电化学发光传感器以金电极基底,依次组装 L-半胱氨酸和探针单链 DNA,传感器的组装过程采用循环伏安法和电化学阻抗谱法表征。讨论了扫描时间和电位对传感器电化学发光信号的影响。

1 实验

1.1 仪器与试剂

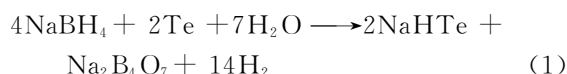
仪器选用 H-7650 TEM,UV-1800 紫外-可见分光光度计,Dmax-2500 XRD 仪,FTIR-650 傅里叶红外光谱仪,LK2010 电化学工作站及 LK5100 电化学发光分析系统。

试剂选用碲粉(Te)、硼氢化钠(NaBH_4)、氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)、巯基丙酸(MPA)、巯基己醇(MCH)、三(羟甲基)氨基甲烷、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、L-半胱氨酸(L-Cys)、过硫酸钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、无水乙醇,除特别说明外,以上试剂均为分析纯,溶液均用超纯水配制。实验所用的 DNA 序列购买于上海英潍捷基贸易有限公司:探针 DNA 为 5'-ACCATTACTTATAC-CGCGACG-3'- NH_2 ;目标 DNA 为 5'-CGTCGCG-GTATAAGTAATGGT-3'- NH_2 。

1.2 碲化镉量子点的制备

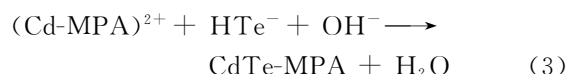
1.2.1 NaHTe 的制备

将 0.102 1 g Te 粉,0.318 6 g NaBH_4 混合后放入针筒,抽取 5 mL 超纯水,然后将针筒内气体排出,常温静置反应 4 h,直至溶液变成淡粉色。该过程的反应方程式为



1.2.2 CdTe 量子点的合成

首先将 0.456 8 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 286 mL 超纯水中,再加入 365 μL 巯基丙酸,磁力搅拌,然后用 1.0 mol/L NaOH 调节上述溶液的 pH=11.0,通高纯氮气 30 min,最后,将制备好的 NaHTe 溶液快速注入混合液中(保证无氧环境,防止 NaHTe 被氧化)。在 96 $^\circ\text{C}$ 条件下加热回流 5 h 即得到 CdTe 量子点。合成过程的反应方程式为



在不同的回流时间取样,可得到不同颜色的 CdTe 量子点水溶液。

1.3 碲化镉量子点对目标 DNA 的标记

将 2 mL CdTe 量子点水溶液和 1 mL Tris-HCl (含 60 mmol/L EDC 和 15 mmol/L NHS, pH=7.4) 缓冲液混合摇匀,反应 30 min。再加入 10 μL 、5 $\mu\text{mol/L}$ 目标 DNA 溶液于 37 $^\circ\text{C}$ 密封反应 6 h。此过程如图 1(a) 所示。

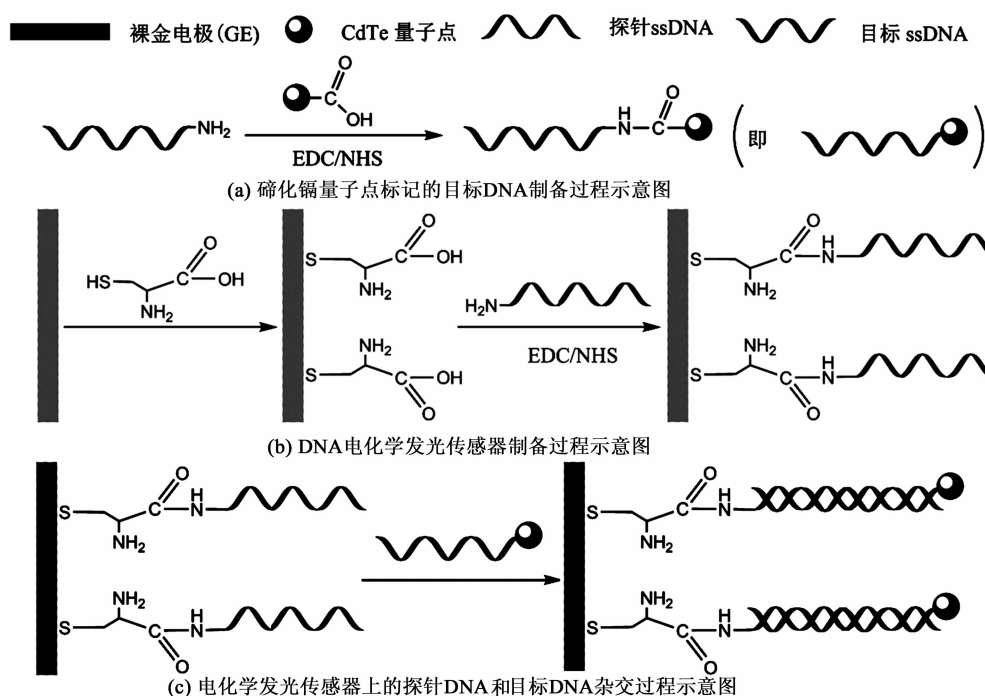


图 1 电化学发光传感器的制备与检测过程示意图

1.4 DNA 电化学发光传感器的制备

1.4.1 金电极的预处理

将金电极在抛光布(或麂皮)上分别用粒径为 $\varnothing 0.3\ \mu\text{m}$ 和 $\varnothing 50\ \text{nm}$ 的粗细抛光粉 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 打磨至光滑镜面,依次用无水乙醇和二次蒸馏水超声清洗1~2 min,用蒸馏水冲洗电极以去除多余的杂质,然后将电极置于1.0 mol/L H_2SO_4 溶液中用循环伏安(CV)法至少扫描10圈,待循环伏安曲线稳定后,用蒸馏水冲洗电极3次,氮气吹干备用。

1.4.2 L-半胱氨酸在金电极上的组装

将处理过的金电极在20 mL、15 mmol/L的L-半胱氨酸(L-Cys)溶液中浸泡20 h,取出后用超纯水冲洗电极3次,氮气吹干,倒置备用。

1.4.3 探针DNA与L-半胱氨酸在金电极上的键合

将5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针DNA溶液均匀滴涂在金电极表面,接着,滴加5~8 μL Tris-HCl(含60 mmol/L EDC,15 mmol/L NHS)缓冲溶液,重复3次。反应6 h后,取出电极依次用Tris-HCl缓冲溶液和超纯水冲洗3次。然后,将金电极在20 mL、2 mmol/L的巯基己醇(MCH)溶液中浸泡2 h,取出电极后用大量的超纯水冲洗(见图1(b))。

1.5 修饰电极与目标DNA的作用

将上述电极浸入含有一定浓度目标DNA的2 mL Tris-HCl溶液中,在摇床上37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应4 h。取出电极后依次用Tris-HCl缓冲溶液和超纯水冲洗3次,氮气吹干备用(见图1(c))。

1.6 电化学发光检测

电化学发光系统中以Au电极为工作电极,Pt丝电极和Ag/AgCl电极分别为对电极和参比电极。设置电位窗口为-3.0~0 V,光电倍增管电压(PMT)为800 V,以0.1 mol/L、pH=7.4的PBS(KCl 0.1 mol/L, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.1 mol/L)缓冲液作为电解质溶液进行电化学发光测试。

2 结果与讨论

2.1 碲化镉量子点的表征

2.1.1 形貌表征

图2为碲化镉量子点的高倍透射电镜图。由图可看出,碲化镉量子点呈类球形,大小均匀,分散良好,无明显的聚集现象。

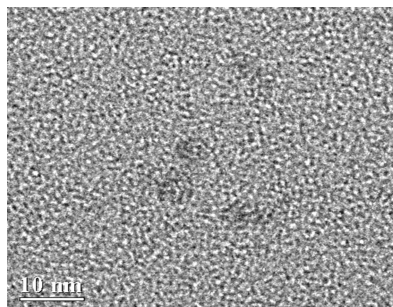


图2 CdTe量子点的高倍透射电镜图

2.1.2 粒径表征

图3为碲化镉量子点的XRD图。由图可见,在 $2\theta=24.4^{\circ}$ 、 40.5° 、 47.3° 处出现了3个明显的衍射峰,晶面(111)、(220)、(311)分别与之对应,这是鉴定CdTe量子点的特征晶面。量子点的粒径 D 可由Debye-Scherrer公式得

$$D = k\lambda / \beta \cos \theta \quad (4)$$

式中: $k=0.89$; $\lambda=0.154\ 056\ \text{nm}$ 为XRD波长; β 为半高峰宽; θ 为衍射角。

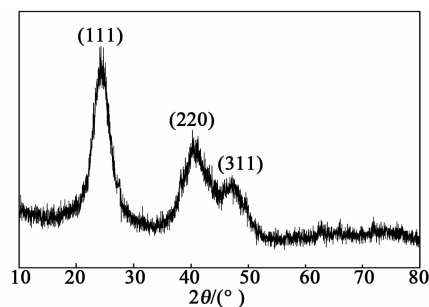


图3 CdTe量子点的XRD图

取回流3 h的量子点样品,测得其最强衍射峰在 $2\theta=24.4^{\circ}$ 处的半高峰宽为 3.1° ,计算得CdTe量子点的粒径为 $\varnothing 2.6\ \text{nm}$ 。

图4为碲化镉量子点的紫外-可见吸收光谱图。由图可看出,随着回流时间的延长,量子点最大吸收峰对应的波长从492 nm移动到520 nm,这是因为随着回流时间的增加,量子点粒径增大,最大吸收峰红移,即量子尺寸效应。量子点的粒径可利用经验

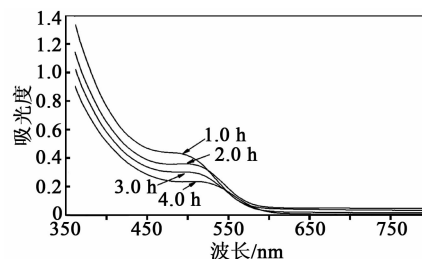


图4 CdTe量子点的紫外-可见吸收光谱

公式^[26]估算

$$D = (9.8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + 1.0064\lambda - 194.84 \quad (5)$$

式中 λ 为第一吸收峰对应的波长。

取回流 3 h 的量子点样品,测得其第一吸收峰对应的波长为 510 nm,计算得 CdTe 量子点的粒径为 $\varnothing 2.60$ nm,这与 XRD 获得的数据一致。

2.1.3 表面化学表征

图 5 为 CdTe 量子点的傅里叶红外光谱图。由图可获取量子点的表面化学信息(如化学键和官能团),波数 3440 cm^{-1} 对应 O—H 键的伸缩振动,波数 2920 cm^{-1} 和 3850 cm^{-1} 分别对应 C—H 键的不对称和对称伸缩。波数 1580 cm^{-1} 和 1395 cm^{-1} 对应着 C=O 的不对称和对称伸缩。波数 1130 cm^{-1} 处对应 C—O 的对称伸缩,这表明量子点表面有羧基存在。巯基的伸缩振动峰($2500\sim 2650\text{ cm}^{-1}$)消失,表明巯基丙酸 MPA 已成功地修饰到 CdTe 量子点表面,且量子点核表面上有大量羧基。

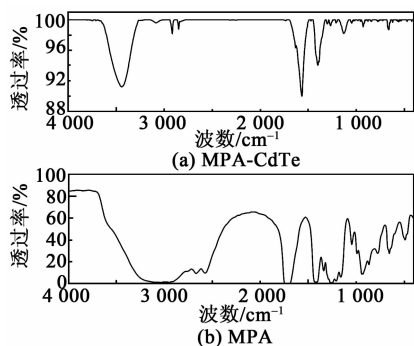


图 5 CdTe 量子点的傅里叶红外光谱图

2.2 DNA 电化学发光传感器的表征

2.2.1 循环伏安法表征

图 6 为表征 DNA 电化学发光传感器组装过程的循环伏安图。由图可看出,在电位窗口为 $0\sim 1.4\text{ V}$,裸金电极(GE)在 0.36 V 和 0.92 V 处出现了一对氧化还原峰。连接上半胱氨酸后的电极(Cys-GE)在相同的电位处也出现了一对氧化还原峰,但峰电流较裸电小。连接上探针 ssDNA 后的电极(ssDNA/Cys/GE)也在相同的电位处出现了一对氧化还原峰,但峰电流较前二者都小。这是因为裸金电极是电子的良导体,能快速定向传输电荷,峰电流大,连接上半胱氨酸后电极表面形成的半胱氨酸薄层阻碍电子的传导,降低电荷转移速率,峰电流减小,再连接上探针 ssDNA 后电子传导阻力进

一步增大,电荷转移速率再次降低,峰电流再次减小。事实表明,半胱氨酸、探针 ssDNA 依次成功组装到了金电极表面。

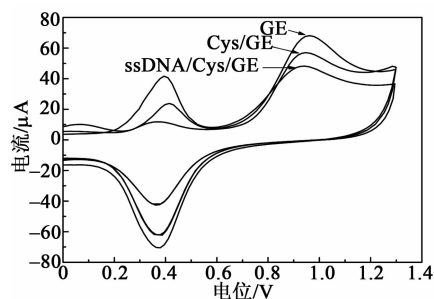


图 6 DNA 电化学发光传感器组装过程的循环伏安图

2.2.2 电化学阻抗谱法表征

图 7 为表征 DNA 电化学发光传感器组装过程的电化学阻抗谱图。由图可看出,裸金电极的 Nyquist 曲线呈直线状,高频段未出现圆弧,电子传递阻力接近于 0,这说明裸金电极能够高效地传输电子。连接上半胱氨酸后,曲线在低频段仍是直线状,在高频段出现了明显的圆弧,电子传递阻力变大,这是因为半胱氨酸覆盖在电极表面阻碍了电子的传递。当连接上探针 ssDNA 后,曲线高频段圆弧增大,电子传递阻力进一步增大,这表明 ssDNA 对电极表面电子的传递也有阻碍作用。以上事实表明,半胱氨酸、探针 ssDNA 依次成功组装到了金电极表面。这与循环伏安法表征电极组装过程获得的结果是一致的。

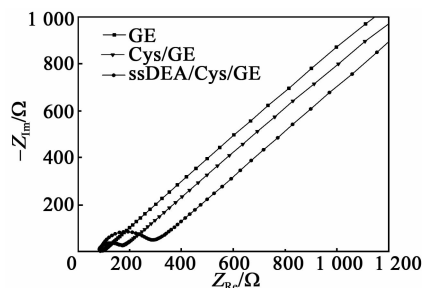


图 7 DNA 电化学发光传感器组装过程的电化学阻抗谱图

2.3 电化学发光检测条件的优化

2.3.1 扫描电位的影响

图 8 为 DNA 电化学发光传感器体系在连续循环扫描下的电化学发光(ECL)图。由图可看出,ECL 强度在减弱,这可能是在较高的阴极电位下,量子点本身有部分分解。这说明要获得较理想的分析信号,还必须考虑合适的扫描时间。由图还可看出,体系的电化学发光的扫描周期一般为 6 s 。在 1 个扫描周期内,ECL 强度对扫描时间的响应如图 9

所示。图中前 2 s 出现较强的电化学发光信号 (ECL 峰值在 0.5 s 附近), 这是 CdTe 量子点的阴极发光。随后电化学发光信号稳定不变, 但后 1 s 的时间内出现了较强的电化学发光信号, 这可能是溶液中某些杂质 (如溶氧) 引发的发光。

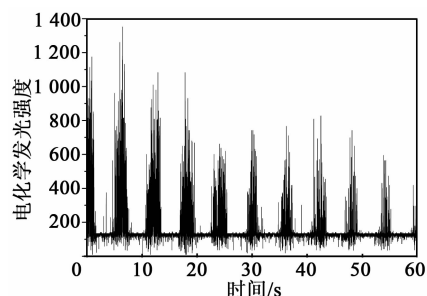


图 8 DNA 电化学发光传感器体系在连续循环扫描下的电化学发光图

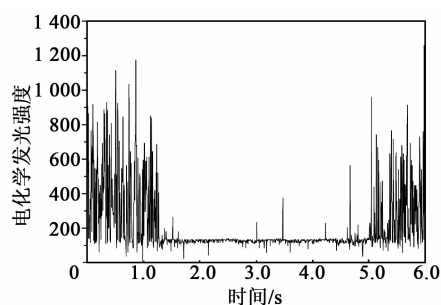


图 9 DNA 电化学发光传感器体系的电化学发光强度与扫描时间响应图(1 个周期)

2.3.2 扫描电位的影响

图 10 为一个扫描周期内, 电化学发光强度对扫描电位的响应图。由图可看出, 当电位窗口为 $-3.0 \sim -1.5$ V 时, 电化学发光信号较强 (ECL 峰值在 -2.5 V 附近), 当电位窗口为 $-1.5 \sim 0$ V 时, 电化学发光信号稳定不变。这是因为在较低的电位下, 激发态中间体难以生成, 导致化学发光过程受阻。因此, 在较低的电位下, 电化学发光极其微弱, 在较高电位下, 电化学发光强度很强。

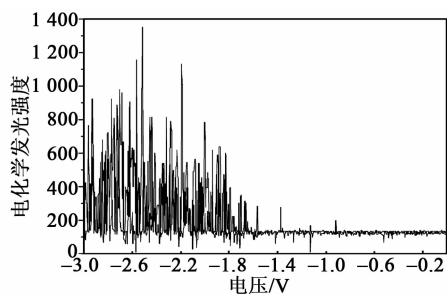


图 10 DNA 电化学发光传感器体系的电化学发光强度与扫描电位响应图(1 个周期)

3 结束语

本文主要制备了一种检测特定基因序列的 DNA 电化学发光传感器, 它由金电极作基底, 依次组装 L-半胱氨酸和探针 ssDNA 而构成, 其中, 碲化镉量子点作为电化学发光试剂参与电化学发光反应。制得的电化学发光传感器采用循环伏安法和电化学阻抗谱法等电化学技术表征, 最后, 对传感器体系进行了电化学发光测试条件的优化。结果表明, 扫描时间 6 s, 扫描电位 $-3.0 \sim -1.5$ V, 扫描速率 0.1 V/s 时, 电化学发光传感器体系的电化学发光效果最佳。

参考文献:

- [1] LOO A H, SOFER Z, BOUSA D, et al. Carboxylic carbon quantum dots as a fluorescent sensing platform for DNA detection [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(3): 1951-1957.
- [2] SUN J D, JI J, SUN Y Q, et al. DNA biosensor-based on fluorescence detection of E-coli O157:H7 by Au@Ag nanorods [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 70: 239-245.
- [3] SHI J Y, CHAN C Y, PANG Y T, et al. A fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor based on graphene quantum dots (GQDs) and gold nanoparticles (AuNPs) for the detection of mecA gene sequence of staphylococcus aureus [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 67: 595-600.
- [4] YOLA M L, EREN T, ATAR N. A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe@Au nanoparticles decorated graphene oxide [J]. *Electrochimica Acta*, 2014, 125: 38-47.
- [5] HUANG K J, LIU Y J, WANG H B, et al. Signal amplification for electrochemical DNA biosensor based on two-dimensional graphene analogue tungsten sulfide-graphene composites and gold nanoparticles [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014, 191: 828-836.
- [6] CHEN M, HOU C J, HUO D Q, et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on a copper oxide nanowires/single-walled carbon nanotubes nanocomposite [J]. *Applied Surface Science*, 2016, 364: 703-709.
- [7] WANG T, ZHOU L L, BAI S L, et al. Ultraspecific electrochemical DNA biosensor by coupling spontaneous cascade DNA branch migration and dual-signaling sensing strategy [J]. *Biosensors & Bioelectronics*,

- 2016,78:464-470.
- [8] DENG S Y, JU H X. Electrogenerated chemiluminescence of nanomaterials for bioanalysis [J]. *Analyst*, 2013,138(1):43-61.
- [9] LIU Z Y, QI W J, XU G B. Recent advances in electrochemiluminescence [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015,44(10):3117-3142.
- [10] DING C F, ZHANG W, WANG W, et al. Amplification strategies using electrochemiluminescence biosensors for the detection of DNA, bioactive molecules and cancer biomarkers [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2015,65:137-150.
- [11] LI Y, LUO X E, YAN Z, et al. A label-free sandwich electrogenerated chemiluminescence method for the detection of DNA methylation and assay of the methyltransferase activity [J]. *Chemical Communications*, 2013,49(37):3869-3871.
- [12] GUO Z H, KONG H F, YANG F, et al. Electrogenerated chemiluminescence energy transfer and its application in label-free sensing long DNA [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2015,220:270-278.
- [13] DONG Y P, GAO T T, ZHOU Y, et al. Anodic electrogenerated chemiluminescence of Ru (bpy) (3) (2+) with CdSe quantum dots as coreactant and its application in quantitative detection of DNA [J]. *Scientific Reports*, 2015,5:10.
- [14] HONG L R, WANG J P, ZHUO Y, et al. A regenerable electrochemiluminescence aptasensor incorporating poly(ethylenimine) and thiosemicarbazide as dual co-reactants for signal amplification [J]. *Electrochimica Acta*, 2015,186:174-181.
- [15] LI L B, YU B, ZHANG X P, et al. A novel electrochemiluminescence sensor based on Ru (bpy) (3) (2+)/N-doped carbon nanodots system for the detection of bisphenola [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 895: 104-111.
- [16] PISANIC T R, ZHANG Y, WANG T H. Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms [J]. *Analyst*, 2014,139(12):2968-2981.
- [17] LI L, QIAN H F, REN J C. Rapid synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals in the aqueous phase by microwave irradiation with controllable temperature [J]. *Chemical Communications*, 2005(4):528-530.
- [18] LI Y L, JING L H, QIAO R R, et al. Aqueous synthesis of CdTe nanocrystals; progresses and perspectives [J]. *Chemical Communications*, 2011,47(33):9293-9311.
- [19] HUANG H P, LI J J, ZHU J J. Electrochemiluminescence based on quantum dots and their analytical application [J]. *Analytical Methods*, 2011,3(1):33-42.
- [20] JIE G F, QIN Y Q, MENG Q M, et al. Autocatalytic amplified detection of DNA based on a CdSe quantum dot/folic acid electrochemiluminescence energy transfer system [J]. *Analyst*, 2015,140(1):79-82.
- [21] HUA L J, HAN H Y, CHEN H B. Enhanced electrochemiluminescence of CdTe quantum dots with carbon nanotube film and its sensing of methimazole [J]. *Electrochimica Acta*, 2009,54(5):1389-1394.
- [22] JIE G F, ZHAO Y B, NIU S Y. Amplified electrochemiluminescence detection of cancer cells using a new bifunctional quantum dot as signal probe [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013,50:368-372.
- [23] JIE G F, ZHANG J, JIE G X, et al. A novel quantum dot nanocluster as versatile probe for electrochemiluminescence and electrochemical assays of DNA and cancer cells [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014,52:69-75.
- [24] HU X F, ZHANG X L, JIN W R. Applications of electrochemiluminescence resonance energy transfer between CdSe/ZnS quantum dots and cyanine dye (Cy5) molecules in evaluating interactions and conformational changes of DNA molecules [J]. *Electrochimica Acta*, 2013,94:367-373.
- [25] JIE G F, WANG L, YUAN J X, et al. Versatile electrochemiluminescence assays for cancer cells based on dendrimer/CdSe-ZnS-quantum dot nanoclusters [J]. *Analytical Chemistry*, 2011,83(10):3873-3880.
- [26] YU W W, QU L H, GUO W Z, et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals [J]. *Chemistry of Materials*, 2003,15(14):2854-2860.