• 研究论文 •

碳量子点对基于能量转移电化学发光 DNA 传感体系影响的研究

杨 帆 王伶俐 郭志慧*

(陕西省生命分析化学重点实验室 陕西师范大学化学化工学院 西安 710062)

摘要 实验发现在鲁米诺-结晶紫能量转移电化学发光体系中再加入碳量子点后, 体系的灵敏度和重现性均提高. 本实验中, 探究出用能量转移电化学发光分析法区分单双链 DNA 的优化条件. 在优化条件下, 测定目标 DNA 的线性范围为 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ mol/L, 相关系数为 0.9881, 检出限为 4.0×10^{-12} mol/L, 并且讨论了 DNA 与碳量子点可能的作用方式. 本法操作方便, 灵敏度高.

关键词 电化学发光; 碳量子点; DNA 检测; 鲁米诺; 结晶紫

Study on the Influence of Carbon Quantum Dots on Electrogenenerated Chemiluminescence Energy Transfer Sensing System of DNA

Yang, Fan Wang, Lingli Guo, Zhihui*

(Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science of Shaanxi Province, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

Abstract The effect of carbon quantum dots on the electrogenerated chemiluminescence (ECL) energy transfer sensing system for the determination of DNA was investigated. The results showed that the signal-to-noise ratio of luminol-crystal violet ECL system was increased and its reproducibility was improved by the addition of carbon quantum dots. The conditions of the detection of DNA were optimized. Under optimal conditions, the linear range for the determination of target DNA was $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ mol/L, the correlation coefficient was 0.9881 and the detection limit was 4.0×10^{-12} mol/L. The possible interaction mechanism between DNA and carbon quantum dots was also discussed. This method was convenient and showed high sensitivity.

Keywords electrogenerated chemiluminescence; carbon quantum dots; DNA detection; luminol; crystal violet

美国克莱蒙森大学的科学家首次制造出了一种新型的碳纳米材料——碳量子点. 与各种金属量子点类似, 碳量子点在光照的情况下可以发出明亮的光. 这种新型的荧光碳纳米粒子^[1~9]的平均粒径小于 10 nm, 发光性质十分稳定, 而且具有很长的荧光寿命^[10], 最重要的是, 它较以往的荧光材料更具生物安全性, 由于碳量子点具有优良的发光性能和低毒性^[1,2], 碳量子点在生

物成像^[11~15]等领域具有很好的应用前景. 实验证明, 它可以通过细胞的吞噬作用进入癌细胞的细胞膜和细胞质而不影响细胞核^[16], 还可以与 DNA 这种生物大分子相互作用, 从而来进行 DNA 的识别与检测^[17], 所以碳量子点作为生物标记材料有望解决以往荧光材料在生命研究中的安全问题.

DNA 作为一种生物大分子, 可以与许多小分子发

* E-mail: zhguo@snnu.edu.cn

Received January 12, 2012; accepted February 27, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20905044).

国家自然科学基金(No. 20905044)资助项目.

生相互作用. 比如结晶紫染料, 它与单双链 DNA 的结合方式不同, 它与单链 DNA 是以静电吸附方式结合, 与双链 DNA 是以嵌插方式结合, 因而各自发出不同强度的荧光^[18,19]. 结晶紫可以嵌插入双链 DNA 分子双螺旋的碱基对之间, 结合的作用力一般是平面芳环的离域 π 体系间形成的 π - π 相互作用和疏水相互作用. 这种作用力可以使结晶紫分子的光学性质有所改变, 因此设想嵌插入双链 DNA 双螺旋结构中的结晶紫分子到达激发态需要的能量有所改变, 即激发光的波长改变, 在此波长激发光的作用下可以使得双螺旋结构中的结晶紫分子激发, 而与单链 DNA 静电吸附结合的结晶紫分子及物理吸附在电极表面的结晶紫分子不能被激发. 由此可以使结晶紫分子这种杂交指示剂的基态和激发态具有明显不同的电化学行为. 有望用电化学发光法实现灵敏度高、选择性好的 DNA 分析与检测.

鲁米诺电化学性质活泼, 但不容易与 DNA 相互作用. 在外加电位的作用下鲁米诺得到电子后处于激发态, 可以将能量转移给本身电化学性质不活泼的结晶紫与 DNA 的结合物. 碳量子点作为安全的生物标记物, 它的加入可能会对单双链 DNA 与结晶紫分子结合后的电化学发光产生影响. 本实验试图通过控制碳量子点的粒径大小、浓度和检测的电位等, 找出最佳条件用电化学发光分析法来区分单双链 DNA, 所以本文选用鲁米诺-结晶紫-碳量子点-DNA 体系进行研究.

1 实验部分

1.1 仪器

REC-100 型电化学分析工作站(西安瑞迈分析仪器有限公司); RFL-1 型超微弱化学发光/生物发光检测仪(西安瑞迈分析仪器有限公司); TG16-W 微量高速离心机(湘仪); 恒温磁力搅拌器 85-1(国华); 微波炉 EG720FA4-NR(美的); 三电极体系: 石墨电极为工作电极, 铂丝为对电极, Ag/AgCl 电极作参比电极; 电解池 (25×40 mm 称量瓶).

1.2 试剂

结晶紫(CV), 鲁米诺, 葡萄糖, 聚乙二醇-200 (PEG-200), 氯化钠(NaCl), 三羟甲基氨基甲烷(Tris), EDTA 二钠盐; pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液; Tris-EDTA (TE)缓冲溶液; probe DNA (LDNA): 5'-GTT CAT GCC GCC CAT-3', target DNA (CDNA): 5'-ATG GGC GGC ATG AAC-3'(上海生工生物工程有限公司). 以上所用化学试剂均为分析纯; 试验用水均为二次蒸馏水.

1.3 DNA 溶液的配制

将购得的 DNA 在 10000 r/min 的转速下离心 3 min, 收集 DNA 制品于管底, 然后慢慢打开管盖, 加适量的 TE 缓冲液, 盖上管盖, 充分上下振荡或用手指弹管底, 使 DNA 充分溶解. 然后将 DNA 溶液在 94 °C 下温浴 2~5 min, 然后快速冷却到室温(25 °C 以下), 4 °C 下保存备用.

1.4 碳量子点的制备

制备碳量子点的方法很多, 鉴于大多数合成方法太过于复杂、昂贵、花费时间较长, 本文我们采用简单、易行、便宜、快速的微波合成法^[20]来合成碳量子点. 取 2.0 g 葡萄糖放入小烧杯中, 加入 10 mL PEG-200(聚乙二醇)和 3 mL 蒸馏水, 微波不同的时间合成碳量子点, 合成时间越长, 碳量子点溶液的颜色越深, 粒径越大. 将碳量子点用水稀释不同倍数, 得到碳量子点溶液.

1.5 电化学发光的测定

电化学方法分别采用循环伏安法和阶跃脉冲法, 为了获得较好的灵敏度, 光电倍增管负高压采用 900 V. 在电解池中加入 4.4 mL pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 加入 0.5 mL 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液, 加入 20 μ L 1.0×10^{-4} mol/L 的探针 DNA 储备液, 加入 0.5 mL 1.0×10^{-4} mol/L 的结晶紫溶液, 加入 0.1 mL 5.0×10^{-4} mol/L 的鲁米诺溶液后, 将电极插入到电解液中, 进行电化学发光的检测, 此时得到的电化学发光信号为 ssDNA 溶液的信号; 再将 20 μ L 目标 DNA 储备液也加入到原电解液中, 在室温下杂交 30 min 后, 再次将电极插入到电解液中, 进行电化学发光的检测, 此时得到 dsDNA 溶液的电化学发光信号.

按以上的检测步骤, 再在上述体系中加入适当粒径、适当浓度的碳量子点溶液, 分别测定 ssDNA, 以及 dsDNA 所在的电解质溶液的电化学发光信号.

2 结果与讨论

2.1 溶液 pH 的影响

DNA 是生物大分子, 它在中性及弱酸弱碱性条件下比较稳定, 酸度过强或过弱都会破坏它的结构, 使之失活. 而鲁米诺在碱性条件下的电化学发光信号较强, 在中性和酸性条件下发光很弱. 因此, pH 值对电化学发光型 DNA 生物传感器的影响较大, 选择合适的 pH 条件是重要的. 除此之外, 溶液 pH 对结晶紫与 DNA 的结合物的发光也有影响, 在 pH=5.0~10.0 范围内, 结晶紫的发光强度随溶液 pH 值变化很小, pH 超过 10.0 之后, pH 对发光强度影响较大. 综上所述, 我们选择 pH=8.0

的弱碱性的溶液来作为电化学发光测定 DNA 的最佳介质, 这样既保证了 DNA 的杂交效率, 又可保证鲁米诺电化学发光体系的灵敏度和稳定性.

2.2 离子强度的影响

根据文献^[21]报道, 一价阳离子钠离子的存在可以提高异源单链 DNA 杂交形成双链的生成速率, 杂交液中 NaCl 的存在对电化学发光信号也有很大的影响. 合适量的 NaCl 有利于提高发光信号的信噪比, 使发光体系的稳定性增强. 但离子强度的增大会使 DNA 双螺旋结构的刚性增强而减弱与结晶紫分子的作用. 实验结果显示, 向体系中加入 0.5 mL 0.5 mol/L NaCl 溶液时电化学发光信噪比最大.

2.3 电解方式的影响

电化学发光的分析特性与激发信号的施加方式关系极为密切, 主要原因是电化学发光物质的产生速度在扩散层中的动态分布以及电化学反应与电化学发光反应相匹配的程度受电化学激发方式的调控.

实验中考察了解电方式对电化学发光的影响. 如图 1, 2 所示, 阶跃法测得的发光强度的重现性比循环伏安法好, 而且采用阶跃脉冲法还能更好地区分单双链 DNA. 利用阶跃脉冲法激励的电化学发光比循环伏安法激励的电化学发光的灵敏度高, 所以实验中采用阶跃脉冲法激励进行电化学发光检测.

图 1 阶跃脉冲法激励的电化学发光检测

Figure 1 The ECL motivated by step pulse method

ECL sensing system of DNA: Luminol (9.0×10^{-6} mol/L)+Crystal violet (9.0×10^{-6} mol/L)+DNA (3.6×10^{-7} mol/L), the volume of CDots solution (appropriate size and dilution ratio) added to the system was 0.2 mL. The scanning potential: 0~0.6 V; the scanning rate: 100 mV/s

2.4 电位的影响

在电化学发光体系中, 所加的电位越大, 体系的发光强度越大, 本实验中设定了 0~0.4 V, 0~0.5 V, 0~0.6 V 和 0.2~0.5 V, 0.2~0.6 V 等电位范围的电化学参

图 2 循环伏安法激励的电化学发光检测

Figure 2 The ECL motivated by cyclic voltammetry method
ECL sensing system of DNA: Luminol (9.0×10^{-6} mol/L)+Crystal violet (9.0×10^{-6} mol/L)+DNA (3.6×10^{-7} mol/L), the volume of CDots solution (appropriate size and dilution ratio) added to the system was 0.2 mL. The scanning potential: 0~0.6 V; the scanning rate: 100 mV/s

数, 分别测定了单双链 DNA 电化学发光体系的发光强度. 由图 3 可知, 其中电位范围在 0~0.6 V 和 0.2~0.6 V 时, 单双链 DNA 发光体系的发光强度的差别较大, 但电位范围在 0~0.6 V 时, 单双链 DNA 发光体系的发光强度的差别最大. 所以选择电位范围为 0~0.6 V 进行电化学发光分析.

图 3 电位范围对单双链 DNA 电化学发光体系的影响

Figure 3 The influence of potential range on ssDNA and dsDNA ECL system

ECL sensing system of DNA: Luminol (9.0×10^{-6} mol/L)+Crystal violet (9.0×10^{-6} mol/L)+DNA (3.6×10^{-7} mol/L), the volume of CDots solution (appropriate size and dilution ratio) added to the system was 0.2 mL. The scanning rate: 100 mV/s

2.5 碳量子点粒径大小的影响

在本文中, 合成了四种不同粒径的碳量子点, 它们的合成时间分别是 60 s, 70 s, 90 s, 120 s. 当碳量子点的合成时间为 60 s 时, 葡萄糖与聚乙二醇的混合物几乎没

有变化, 所以 60 s 的时间内不能合成碳量子点. 在 DNA 电化学发光传感体系中分别加入其余三种粒径不同的碳量子点, 考察碳量子点粒径对电化学发光体系的影响, 结果显示当加入合成时间为 120 s 的碳量子点溶液时, 电化学发光强度很低. 可能是由于碳量子点的粒径太大, 对体系的电化学发光有很强的猝灭作用. 图 4 为合成时间为 70 s 的碳量子点的透射电镜图, 由图可知, 大部分碳量子点的粒径为 4~6 nm. 图 5, 6 为在 DNA 电化学发光传感体系中分别加入了合成时间为 70 s 和 90 s 的碳量子点溶液时的电化学发光行为. 由图可见, 在 DNA 电化学发光传感体系中分别加入了合成时间为 70 s 和 90 s 的碳量子点溶液时, 与未加碳量子点溶液的电化学发光传感体系相比, 体系的电化学发光强度没有降低反而略有增强, 说明这两种粒径的碳量子点对 DNA 电化学发光传感体系没有猝灭作用, 并且使得体系的电化学发光的稳定性增强. 其中合成时间为 70 s 的碳量子点使得单双链 DNA 电化学发光体系发光强度的差值更大. 而且体系的电化学发光强度和重现性也增强, 所以选择合成时间为 70 s 的碳量子点溶液.

图 4 碳量子点的 TEM 图

Figure 4 TEM image of carbon quantum dots

图 5 合成时间为 70 s 的碳量子点对电化学发光体系的影响

Figure 5 The influence of carbon quantum dots of 70 s synthesis time on the ECL system

ECL sensing system of DNA: Luminol (9.0×10^{-6} mol/L)+Crystal violet (9.0×10^{-6} mol/L)+DNA (3.6×10^{-7} mol/L), the volume of CDots solution (70 s synthesis time and appropriate dilution ratio) added to the system was 0.2 mL

图 6 合成时间为 90 s 的碳量子点对电化学发光体系的影响

Figure 6 The influence of carbon quantum dots of 90 s synthesis time on the ECL system

ECL sensing system of DNA: Luminol (9.0×10^{-6} mol/L)+Crystal violet (9.0×10^{-6} mol/L)+DNA (3.6×10^{-7} mol/L), the volume of CDots solution (90 s synthesis time and appropriate dilution ratio) added to the system was 0.2 mL

2.6 碳量子点浓度的选择

由图 7 可知, 当加入稀释倍数为 5 倍的碳量子点时, 测得的单双链 DNA 体系电化学发光强度差值最大, 可以明显区分单双链 DNA. 同时可以看出高浓度的碳量子点对单双链 DNA 体系的电化学发光都有猝灭作用, 稀释 5 倍的碳量子点只对单链 DNA 体系的电化学发光有猝灭作用, 却会显著增强双链 DNA 体系的电化学发光强度, 因此, 碳量子点最佳的稀释倍数为 5 倍.

图 7 碳量子点浓度对单双链 DNA 电化学发光体系的影响

Figure 7 The influence of carbon quantum dots concentration on ssDNA and dsDNA ECL system

ECL sensing system of DNA: Luminol (9.0×10^{-6} mol/L)+Crystal violet (9.0×10^{-6} mol/L)+DNA (3.6×10^{-7} mol/L), the volume of CDots solution (70 s synthesis time and various dilution ratio) added to the system was 0.2 mL

2.7 线性范围及检出限

在最佳实验条件下制作 DNA 的校准曲线, 如图 8 所示, 计算可得其回归方程为 $y = 50.9x + 805.9$, 相关系数 R 为 0.9881. 其中 x 为目标 DNA 浓度(mol/L)的对数;

y 为电化学发光强度. 目标 DNA 浓度的对数在 -11 ~ -7 范围内与电化学发光强度呈线性关系, 并由此方程确定传感系统的检出限为 4.0×10^{-12} mol/L.

图 8 目标 DNA 的校准曲线

Figure 8 Calibration curve of target DNA

ECL sensing system of the probe DNA: Luminol (9.0×10^{-6} mol/L) + Crystal violet (9.0×10^{-6} mol/L) + DNA (1.09×10^{-6} mol/L), the volume of CDots solution (70 s synthesis time and dilution five times) added to the system was 0.2 mL. The concentration of target DNA was 1.0×10^{-11} mol/L, 1.0×10^{-10} mol/L, 1.0×10^{-9} mol/L, 1.0×10^{-8} mol/L, 1.0×10^{-7} mol/L, respectively

2.8 碳量子点对电化学发光体系的影响机理初探

与不加碳量子点的 DNA 电化学发光体系相比, 加入碳量子点之后, DNA 体系电化学发光强度的稳定性增强, 背景干扰减小, 而且可以更好地区分单双链 DNA. 可见碳量子点的加入对增强体系的电化学发光稳定性有一定的作用.

据文献报道, 单链 DNA 可以吸附到碳量子点表面, 而双链 DNA 却不能^[22,23]. 此外, 大多数有机染料, 如结晶紫等, 也可以吸附在碳量子点表面, 一方面, 染料自身的荧光强度下降^[23,24], 另一方面, 量子点的荧光强度也减弱^[17]. 然而, 由于结晶紫等染料可以插入 dsDNA 的沟槽中间, 与 ssDNA 与染料的结合程度相比, 染料与 dsDNA 能更好的结合, 而且可以显示出较强的荧光^[18,19]. 再者, 染料与 dsDNA 之间的嵌插作用力远远大于染料与碳量子点之间的吸附作用力^[25,26]. 这样, 处于激发态的电化学发光体鲁米诺就可以将自身的能量选择性地转移给与 dsDNA 结合的结晶紫染料, 使其达到激发态, 回到基态时就以光子的形式将能量释放出来. 如图 9 所示, 为碳量子点对鲁米诺-结晶紫-DNA 这个 ECL 能量转移体系影响的示意性说明. 因此, 由于碳量子点的加入, 就可以使得鲁米诺-结晶紫-DNA 这个 ECL 能量转移体系的信噪比以及重现性得到提高, 所以在 DNA 电化学发光传感体系中加入碳量子点能更好地区分单双链 DNA.

图 9 碳量子点对鲁米诺-结晶紫-DNA 电化学发光能量转移传感体系影响的原理图

Figure 9 Schematic diagram of the influence of carbon quantum dots (CDots) on the luminol-crystal violet-DNA-ECL energy transfer sensing system

3 结论

本文运用电化学发光分析法研究了碳量子点的加入对 DNA 电化学发光体系的影响, 发现加入碳量子点可以增强 DNA 体系的电化学发光强度的稳定性和重现性, 建立了 DNA 电化学发光分析的新方法. 而且通过本实验, 还初步探讨了碳量子点与生物大分子 DNA 的相互作用, 为 DNA 传感器的研究和基因芯片的开发提供了新的思路和方法.

References

- Huang, W.; Fernando, S.; Allard, L. F.; Sun, Y.-P. *Nano Lett.* **2003**, 3(4), 565.
- Hasheminezhad, M.; Fleischner, H.; McKay, B. D. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, 464(1-3), 118.
- Ramachandran, C. N.; Sathyamurthy, N. *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111(30), 6901.
- Cook, S. M.; Aker, W. G.; Rasulev, B. F.; Hwang, H. M.; Leszczynski, J.; Jenkins, J. J.; Shockley, V. *J. Hazard. Mater.* **2010**, 176(1-3), 367.
- Kamanina, N. V.; Serov, S. V.; Savinov, V. P. *Tech. Phys. Lett.* **2010**, 36(1), 40.
- Fu, C. C.; Lee, H. Y.; Chen, K.; Lim, T. S.; Wu, H.-Y.; Lin, P.-K.; Wei, P.-K.; Tsao, P. H.; Chang, H.-C.; Fann, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104(3), 727.
- Gunningham, G.; Panich, A. M.; Shames, A. I.; Petrov, I.; Shenderova, O. *Diamond Relat. Mater.* **2008**, 17(4-5), 650.
- Kong, X.-L. *Chin. Optics Lett.* **2008**, 6(6), 417.
- Novikov, N. V.; Bogatyreva, G. P. *J. Superhard Mater.* **2008**, 30(2), 73.
- Sun, Y.-P.; Zhou, B.; Lin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7756.
- Kang, J.-L.; Nash, P.; Li, J.-J.; Shi, C.-S.; Zhao, N.-Q. *Nanotechnology* **2009**, 20(23), 235607.
- Latorre, N.; Villacampa, J. I.; Ubieta, T.; Romeo, E.; Royo, C.; Borgna, A.; Monzon, A. *Top. Catal.* **2008**, 51(1-4), 158.
- Barcena, J.; Maudesa, J.; Coletoa, J.; Baldonado J. L.;

- Gomez de Salazar, J. M. *Compos. Sci. Technol.* **2008**, 68(6), 1384.
- 14 Pico, F.; Ibañez, J.; Lillo-Rodenas, M. A.; Linares-Solano, A.; Rojas, R. M.; Amarilla, J. M.; Rojo, J. M. *J. Power Sources* **2008**, 176(1), 417.
- 15 Xu, X.-Y.; Ray, R.; Gu, Y. L.; Ploehn, H. J.; Geatheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(40), 12736.
- 16 Cao, L.; Wang, X.; Meziani, M. J.; Lu, F. S.; Wang, H. F.; Luo, P. G.; Lin, Y.; Harruff, B. A.; VecaL, M.; Murray, D.; Xie, S.-Y.; Sun, Y.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11318.
- 17 Bai, W.-J.; Zheng, H.-Z.; Long, Y.-J.; Mao, X.-J.; Gao, M.; Zhang, L.-Y. *Anal. Sci.* **2011**, 27(3), 243.
- 18 Kong, D.-M.; Ma, Y.-E.; Wu, J.; Shen, H.-X. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 901.
- 19 Kong, D.-M.; Guo, J.-H.; Yang, W.; Ma, Y.-E.; Shen, H.-X. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 25, 88.
- 20 Zhu, H.; Wang, X.-L.; Li, Y.-L.; Wang, Z.-J.; Yang, F.; Yang, X.-R. *Chem. Commun.* **2009**, 5118.
- 21 Li, J.-Q.; Wei, Y.-L.; Dong, C. *J. Anal. Sci.* **2010**, 26, 35 (in Chinese).
(李建晴, 卫艳丽, 董川, 分析科学学报, **2010**, 26, 35.)
- 22 Yang, R.-H.; Jin, J.-Y.; Chen, Y.; Shao, N.; Kang, H.-Z.; Xiao, Z.-Y.; Tang, Z.-W.; Wu, Y.-R.; Zhu, Z.; Tan, W.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8351.
- 23 Zheng, M.; Jagota, A.; Semke, E. D.; Diner, B. A.; Mclean, R. S.; Lustig, S. R.; Richardson, R. E.; Tassi, N. G. *Nat. Mater.* **2003**, 2, 338.
- 24 Ouyang, X.-Y.; Yu, R.-Q.; Jin, J.-Y.; Li, J.-S.; Yang, R.-H.; Tan, W.-H.; Yuan, J.-L. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 782.
- 25 Ouyang, X.-Y.; Liu, J.-H.; Li, J.-S.; Yang, R.-H. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 88.
- 26 Gong, H.-P.; Liu, S.-P.; Yin, P.-F.; Yan, S.-G.; Fan, X.-Q.; He, Y.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2011**, 69, 2843 (in Chinese).
(龚会平, 刘绍璞, 殷鹏飞, 闫曙光, 范小青, 何佑秋, 化学学报, **2011**, 69, 2843.)

(A1201124 Cheng, B.; Lu, Z.)