

引用格式:

刘丽莉, 孟圆圆, 杨晓盼, 代晓凝, 郝威铭. 磁性氧化石墨烯的制备及其对沙门氏菌荧光探针的猝灭机理[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(1): 108–116 .

LIU L L, MENG Y Y, YANG X P, DAI X N, HAO W M. Preparation of magnetic graphene oxide and the quenching mechanism on salmonella fluorescent probe[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(1): 108–116.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



磁性氧化石墨烯的制备及其对沙门氏菌 荧光探针的猝灭机理

刘丽莉^{1,2}, 孟圆圆^{1,2}, 杨晓盼^{1,2}, 代晓凝^{1,2}, 郝威铭^{1,2}

(1.河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2.食品加工与安全国家级教学示范中心, 河南 洛阳 471023)

摘要:为探讨磁性氧化石墨烯($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$)对荧光的猝灭作用,通过扫描电镜(SEM)、透射电镜(TEM)、X射线衍射(XRD)及傅里叶变换红外光谱(FT-IR)对化学共沉淀法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 和氧化石墨烯(GO)的结构进行对比表征,发现 Fe_3O_4 磁性纳米粒子负载在GO的表面,表明成功合成了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 。以 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 为荧光猝灭剂,沙门氏菌荧光探针为荧光剂,通过荧光、紫外吸收光谱,结合Stern-Volmer方程及Lineweaver-Burk双倒数曲线方程,对其荧光猝灭机理进行初步分析,结果表明: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 具有荧光猝灭作用,当 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 质量浓度为 3.2×10^{-4} g/mL时,荧光猝灭率可达96.86%,其猝灭为静态猝灭;用 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 荧光探针复合物检测沙门氏菌DNA具有较好的选择性。

关键词:磁性氧化石墨烯;沙门氏菌;荧光探针;猝灭机理;静态猝灭

中图分类号: TQ127.1⁺²; Q819

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2021)01-0108-09

Preparation of magnetic graphene oxide and the quenching mechanism on salmonella fluorescent probe

LIU Lili^{1,2}, MENG Yuanyuan^{1,2}, YANG Xiaopan^{1,2}, DAI Xiaoning^{1,2}, HAO Weiming^{1,2}

(1.College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2.National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Processing and Security, Luoyang, Henan 471023, China)

Abstract: In order to investigate the quenching effect of magnetic graphene oxide($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$) on fluorescence, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ was prepared using chemical method and then characterized using scanning electron microscopy(SEM), transmission electron microscopy(TEM), X-ray diffraction(XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy(FT-IR). The results showed that Fe_3O_4 magnetic nanoparticles successfully synthesized and were loaded on the surface of GO. In its application on quenching, the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ was used as the fluorescence quenching agent, and the fluorescence probe of salmonella was used as the fluorescence agent. The fluorescence quenching mechanism of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ was preliminarily analyzed by fluorescence and ultraviolet absorption spectra, combined with Stern-Volmer equation and Lineweaver-Burk double reciprocal curve equation. The results showed that $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ had fluorescence quenching effect. When the concentration of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ was 3.2×10^{-4} g/mL, the fluorescence quenching rate was up to 96.86%, in a static quenching way. Moreover, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ fluorescence probe complex has good selectivity in the detection of salmonella DNA.

收稿日期: 2019-11-07

修回日期: 2019-12-01

基金项目: 河南省重大专项(161100110900); 河南省重点攻关项目(182102110346)

作者简介: 刘丽莉(1974—), 女, 河南洛阳人, 博士, 教授, 主要从事畜产品加工技术研究, yangliuyilang@126.com

Keywords: magnetic graphene oxide; salmonella; fluorescent probe; quenching mechanism; static annihilation

石墨烯是由单层碳原子以 sp^2 方式杂化并有序排列堆积而成的新型二维蜂窝状原子晶体^[1], 因其结构独特, 使石墨烯具有优良的热导性、吸附性、化学稳定性等物理化学特性, 但石墨烯在溶剂中分散性较差且易团聚^[2-3]。氧化石墨烯(GO)是石墨烯的衍生物, 其表面含有丰富的羟基、环氧基和羧基等亲水基团, 在一定程度上改善了石墨烯的分散性、水溶性及生物相容性^[4-5]。为进一步扩大 GO 的应用范围, 将 GO 与 Fe_3O_4 等磁性纳米颗粒相结合, 制备的磁性氧化石墨烯复合材料因更具有优良特性而成为当前研究的热点。

Fe_3O_4/GO 集磁性纳米材料和 GO 的优良特性于一体^[6], 不仅具有较强的超顺磁性, 还拥有对荧光的猝灭作用及对 DNA 单链强烈的吸附能力^[7-8]。已报道的 Fe_3O_4/GO 的制备方法有水热法、微乳液法、溶胶-凝胶法、水解法、化学共沉淀法等。利用 Fe_3O_4/GO 所建立的检测方法操作简便、成本较低、特异性好、灵敏度高。杨宇等^[9]将 Fe_3O_4/GO 作为荧光猝灭剂, 利用磁性富集荧光法分离大肠埃希菌 O157 H7, 从而实现对其高灵敏检测。LI 等^[10]以萘酰亚胺衍生物标记富含胸腺嘧啶(T)的 ssDNA, 以 Fe_3O_4/GO 为猝灭剂和预浓缩剂, 建立了一种检测汞(II)的荧光法。但以上 Fe_3O_4/GO 的制备方法仍存在对设备要求高、粒子结晶性能差、产量低、影响因素多等缺点。目前, 关于 Fe_3O_4/GO 制备表征后在沙门氏菌荧光猝灭方面的应用尚少见报道。本研究中, 采用改进后的化学共沉淀法制备 Fe_3O_4/GO , 并对其结构进行表征, 以达到降低成本、操作简单、提高荧光猝灭率的效果; 利用 Fe_3O_4/GO 的顺磁性、

荧光猝灭效应及对 DNA 单链强烈的吸附能力等优良特性, 及荧光探针具有选择性好、灵敏度高和成本低等优点, 探究 Fe_3O_4/GO 对沙门氏菌荧光探针的猝灭作用, 得出 Fe_3O_4/GO 猝灭沙门氏菌荧光探针的速率常数(k_q)、结合常数(K), 以进一步探讨其荧光猝灭机理, 并对 Fe_3O_4/GO 荧光探针复合物的选择性进行研究, 以期建立一种基于荧光标记 DNA 结合 Fe_3O_4/GO 荧光猝灭效应快速检测沙门氏菌的新方法, 减少由沙门氏菌所引起的食品中毒事件的发生及对人和动物生命健康造成的危害。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氧化石墨烯, 由南京先丰纳米材料科技有限公司生产; 溴化钾, 分析纯, 由上海一研生物有限公司生产。

$FeCl_3$ 、 $FeCl_2$, 由天津市福晨化学试剂厂生产; 氨水, 分析纯, 由上海强顺化学试剂有限公司生产; 无水乙醇, 分析纯, 由天津市德恩化学试剂有限公司生产。所有沙门氏菌 DNA 碱基序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 沙门氏菌 DNA 序列的设计

根据文献^[11-12], 采用 Primer Premier 5.0 设计沙门氏菌 DNA 碱基序列, 并用 Ribosomal Database Project II 和 NCBI Blast 2 数据库提供的 Probe Match 检测序列的特异性。设计的沙门氏菌 DNA 序列如表 1 所示。

表 1 沙门氏菌 DNA 碱基序列

Table 1 Salmonella DNA base sequence

探针名称	序列(5'—3')	碱基数
荧光探针	FAM-TTT TTT TTT TGA GCG TGC CTT ACC GAC GAT AIT AAC AGC AAT	42
释放探针	AAA AAA AAA A	10
目标 DNA 序列	TAT CGT CGG TAA GGC ACG CTC AAT TGT CGT TA	32
单碱基配错序列(MT1)	TAT CGT CGG TAA GGC GCG CTC AAT TGT CGT TA	32
双碱基配错序列(MT2)	TAT CGT CAG TAA GGC ACA CTC AAT TGT CGT TA	32
三碱基配错序列(MT3)	TAT CGT CGG CAA GGC ACG CCC AAT TGT CAT TA	32

1.2.2 Fe₃O₄/GO 的制备

在刘闯^[13]的方法上作适当改进。采用化学共沉淀法制备 Fe₃O₄/GO, 分别取 2 g FeCl₃ 和 1 g FeCl₂ 加入到 100 mL 灭菌超纯水中, 超声处理 2 h, 得溶液 A; 取 0.3 g GO 加入到 100 mL 灭菌超纯水中, 超声处理 4 h 得溶液 B, 将以上 2 种溶液进行混合, 加入 30% 氨水, 将溶液 pH 调整为 9~10 左右, 置于水浴锅中加热到 90 °C, 同时搅拌至混合物颜色完全变黑, 将其从水浴锅中取出, 自然冷却到室温, 置于离心机中离心 5 min(10 000 r/min), 得到黑色固体, 用灭菌超纯水和无水乙醇洗涤数次至混合物上清液的 pH 为 7 左右, 再将黑色固体置于 70 °C 的干燥箱中烘干, 即可制得 Fe₃O₄/GO。

1.2.3 Fe₃O₄/GO 溶液的配制

取一定质量的 Fe₃O₄/GO 加入到灭菌超纯水中, 放入超声波清洗仪中进行超声, 直到 Fe₃O₄/GO 完全分散到水中为止; 再将超声后的 Fe₃O₄/GO 分别稀释成 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} 、 1.2×10^{-4} 、 1.6×10^{-4} 、 2.0×10^{-4} 、 2.4×10^{-4} 、 2.8×10^{-4} 、 3.2×10^{-4} 、 3.6×10^{-4} g/mL 不同质量浓度的溶液。

1.2.4 GO 和 Fe₃O₄/GO 的结构表征

1) 扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)分析。分别取微量的 GO 和 Fe₃O₄/GO 待测样品, 用导电银胶将待测样品粘到样品台上, 并将其置于扫描电子显微镜下对其形貌进行表征; 分别将 GO 和 Fe₃O₄/GO 粉末通过超声制成分散液, 取 1~2 滴分散液于碳支持膜的铜网格上, 再放在干燥的滤纸上自然干燥后将其置于 JEM 2100 型透射电镜上, 观察其形貌并摄像。

2) X 射线衍射(XRD)分析。在党志敏^[14]的方法上作适当改进。采用粉末衍射法, 分别取适量的 GO 和 Fe₃O₄/GO 待测样品于研钵中研细, 置于样品台上, 放入 X 射线衍射仪中, 对待测样品进行表征。采用 Cu_{K α} 辐照($\lambda=0.154$ nm), 管压 40 kV, 管流 30 mA, 2θ 值为 5°~80°。

3) 傅里叶变换中远红外(FT-IR)分析。采用 KBr 压片法制样, 将待测样品与干燥后的 KBr 按 1:100 进行混合, 并置于玛瑙研钵中, 研磨均匀后进行压片, 在压强约为 15 MPa 的条件下保持 1 min, 即可得到样品薄片。对 KBr 薄片作背景扫

描, 再对样品薄片进行扫描, 设置扫描范围为 400~4000 cm⁻¹^[14]。

1.2.5 荧光猝灭机理分析

1) 荧光光谱分析。分别取上述不同质量浓度的 Fe₃O₄/GO 与合成的 50 nmol/L 沙门氏菌荧光探针进行混合, 在四维旋转混匀器上 37 °C 条件下孵育 1 h, 利用磁场磁力收集 Fe₃O₄/GO 荧光探针复合物, 取上清液于荧光石英比色皿中, 在激发波长 495 nm、发射波长 517 nm 条件下, 采用荧光分光光度计进行荧光测定。为消除 Fe₃O₄/GO 纳米材料对荧光强度的遮蔽效应, 以超纯水代替沙门氏菌荧光探针, 在相同条件下, 对不同质量浓度的 Fe₃O₄/GO 进行荧光测定。扣除自身荧光背景吸收, 所测荧光强度 $\Delta F = F - F_t$ (F 为加入沙门氏菌荧光探针时的荧光强度, F_t 为未加入沙门氏菌荧光探针时的荧光强度)。

2) 紫外(UV)光谱分析。分别取 3.2×10^{-4} g/mL 质量浓度的 GO 溶液、Fe₃O₄/GO 及 Fe₃O₄/GO 荧光探针溶液置于紫外石英比色皿中, 在 185~400 nm 扫描范围内用紫外分光光度计进行测定, 并扣除其背景吸收。

1.2.6 Fe₃O₄/GO 荧光探针复合物的选择性分析

分别吸取浓度为 1 pmol/L 的沙门氏菌目标 DNA 溶液和单碱基配错序列(MT1)、双碱基配错序列(MT2)、三碱基配错序列(MT3), 加入到质量浓度为 3.2×10^{-4} g/mL 的 Fe₃O₄/GO 荧光探针复合物溶液中, 在 42 °C 条件下反应一定时间, 以完成部分杂交, 随后置于磁场中磁分离 10 min, 收集磁性颗粒, 移除原溶液, 取 PBS 缓冲液清洗磁性颗粒, 除去未反应的 DNA。再吸取用 PBS 缓冲液稀释的释放探针溶液加入到磁性颗粒中, 富集 5 倍, 在 42 °C 条件下反应 2 h, 根据碱基互补配对原则完成杂交试验。完成杂交之后的 DNA 双链将脱离 Fe₃O₄/GO 表面, 荧光恢复, 再利用磁场磁性分离 Fe₃O₄/GO, 通过检测上清液的荧光强度变化, 即对建立的纳米复合材料 Fe₃O₄/GO 荧光探针复合物采用检测沙门氏菌 DNA 的方法进行选择性的分析。

1.2.7 数据分析

每组试验重复 3 次, 取平均值。所有光谱图均扣除其背景吸收, 采用 Origin 8.5 对试验数据进行统计分析并绘图。

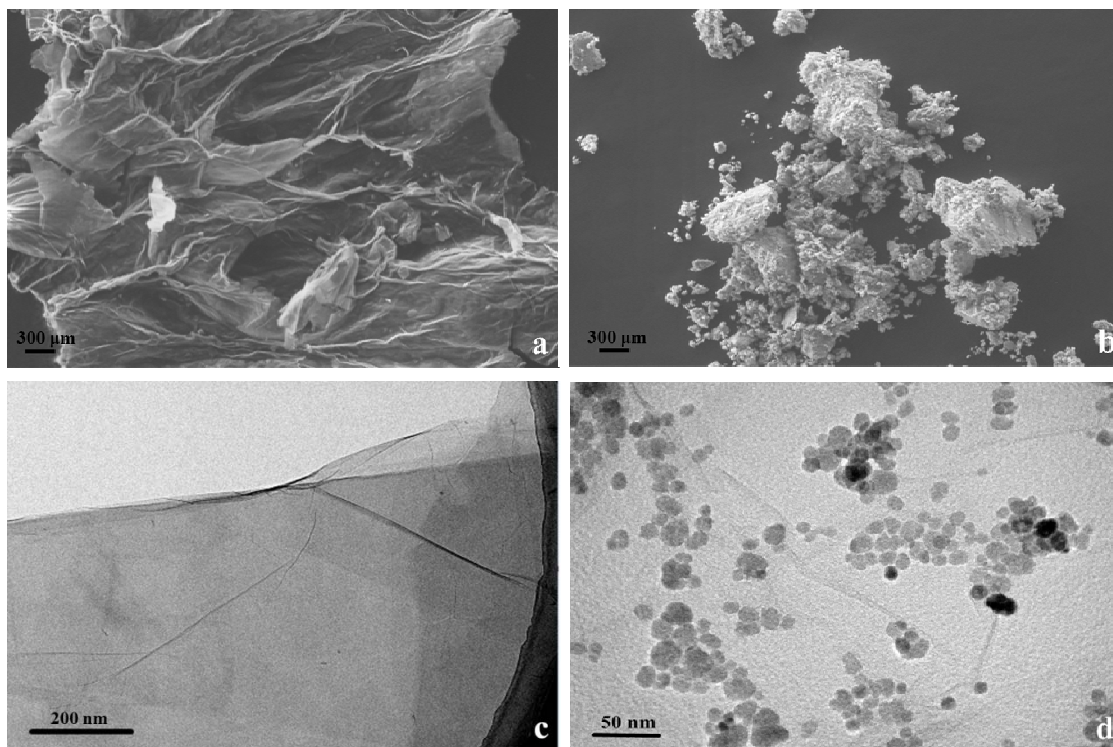
2 结果与分析

2.1 氧化石墨烯和磁性氧化石墨烯的结构表征

2.1.1 扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)分析

由图 1-a 扫描电镜图可知, GO 的形貌为层状结构,但也存在层面团聚现象,且有许多褶皱,可增大其比表面积,有利于负载磁性纳米粒子,这种特性可使 GO 作为载体材料^[15]。从图 1-b 可以看出,

与 GO 相比, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的结构发生了明显的变化,其表面形貌不规则且有很多粒径较小的白色粒子聚合^[16]。从图 1-c 可以看出, GO 为不规则片状结构,表面光滑,上面有部分褶皱,具备作为载体的优势。由图 1-d 可知, Fe_3O_4 的粒径为 10~20 nm,且均匀地附着在 GO 表面,表明化学共沉淀法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 具有良好的结构。



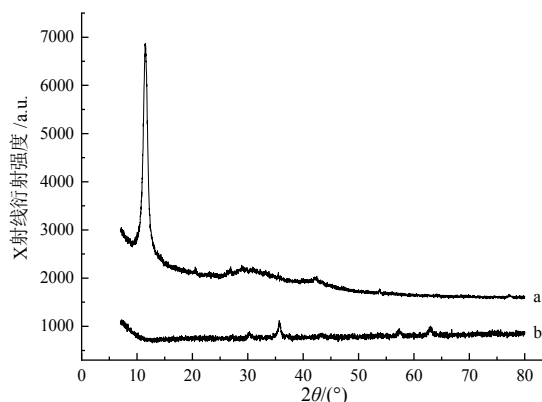
a、b 分别为 GO 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的 SEM 扫描结果; c、d 分别为 GO 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的 TEM 扫描结果。

图 1 GO 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的 SEM 扫描结果和 TEM 扫描结果

Fig.1 SEM and TEM results of GO and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$

2.1.2 X 射线衍射(XRD)分析

图 2 为 GO 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的 XRD 图。两者都出现了特征衍射峰,但其位置明显不同。由 a 曲线可知,在 2θ 为 11.54° 处出现的强峰对应着 GO 特征衍射峰;由 b 曲线可知,在 2θ 为 30.44° 、 35.53° 、 43.21° 、 53.55° 、 57.14° 、 63.09° 处的特征衍射峰,分别与 Fe_3O_4 纯立方尖晶石晶体结构中(220)、(331)、(400)、(422)、(511)和(440)的位置相对应^[7,16]。其中, 2θ 为 30.44° 、 35.53° 、 43.21° 、 57.14° 处的衍射峰属于具有磁性的磁赤铁矿(maghemite)或磁铁矿(magnetite),在 2θ 为 53.55° 和 63.09° 处的衍射峰属于赤铁矿(hematite),这与前面的表征相一致,说明所制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 中含有 Fe_3O_4 晶体^[7,17]。



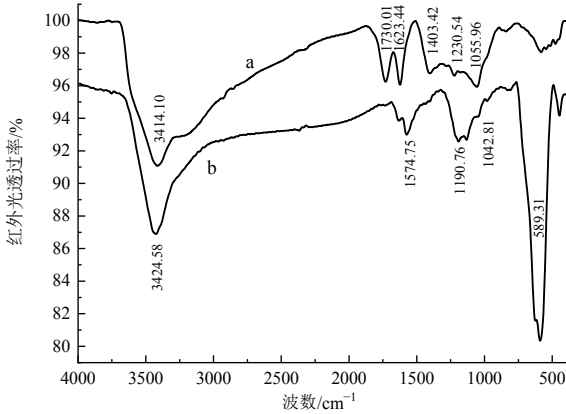
a GO; b $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 。

图 2 GO 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的 X 射线衍射结果

Fig.2 X-ray diffraction results of GO and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$

2.1.3 傅里叶变换中远红外 (FT-IR) 分析

由图 3 可知,GO 和 Fe₃O₄/GO 的红外光图谱存在差异,说明两者结构之间存在一定的差异。由 a 曲线可知,GO 在 3414.10 cm⁻¹ 处出现一个强吸收峰,可能是由于—OH 的伸缩振动引起的^[16];在



a GO; b Fe₃O₄/GO.

图 3 GO 和 Fe₃O₄/GO 不同波数的红外光透过率

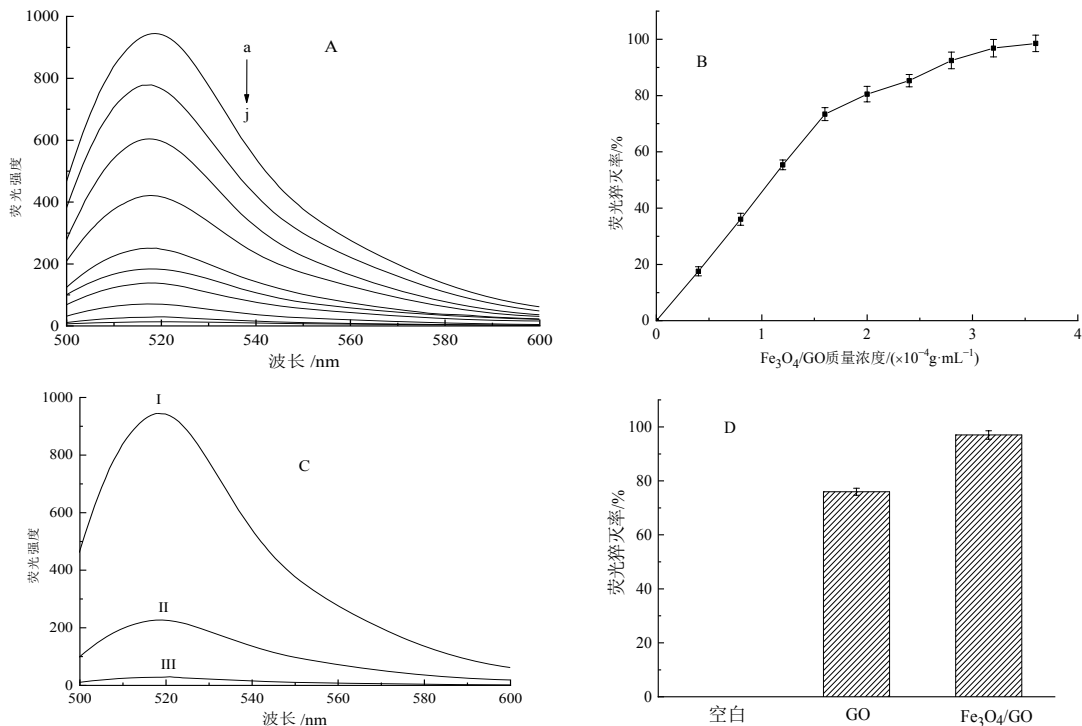
Fig.3 Infrared transmittance of GO and Fe₃O₄/GO with different wave numbers

1730.01 cm⁻¹和 1623.44 cm⁻¹ 处出现了芳香基 C=O 和 C=C 的特征吸收峰,在 1403.42 cm⁻¹、1230.54 cm⁻¹ 和 1055.96 cm⁻¹ 处出现的吸收峰可能是由 C—OH、O—C—O 和 烷氧基 C—O 的伸缩振动引起的,说明 GO 结构中含有 C=O、—OH、C=C、O—C—O 等官能团。由 b 曲线可知,Fe₃O₄/GO 在 3424.58 cm⁻¹ 和 1190.76 cm⁻¹ 处出现了—OH 和 O—C—O 的伸缩振动峰,在 1574.75 cm⁻¹ 处 C=C 的特征吸收峰明显减弱,1042.81 cm⁻¹ 处的烷氧基 C—O 的吸收峰几乎消失,在 589.31 cm⁻¹ 指纹区出现了 Fe—O 的伸缩振动峰,说明含氧官能团与 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子发生了化学键合作用^[18],证明 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子已附着在 GO 表面,Fe₃O₄/GO 已成功合成。

2.2 荧光猝灭机理初探分析

2.2.1 荧光光谱分析

由图 4-A 可知,在未加入 Fe₃O₄/GO 时,沙门氏菌荧光探针在 495 nm 激发波长下,其荧光发射峰在 517 nm 处;当沙门氏菌荧光探针浓度为 50 nmol/L



A 不同质量浓度 Fe₃O₄/GO 下沙门氏菌荧光探针荧光强度的变化结果, a~j 示 Fe₃O₄/GO 质量浓度依次为 0、4.0×10⁻⁵、8.0×10⁻⁵、1.2×10⁻⁴、1.6×10⁻⁴、2.0×10⁻⁴、2.4×10⁻⁴、2.8×10⁻⁴、3.2×10⁻⁴、3.6×10⁻⁴ g/mL; B 不同 Fe₃O₄/GO 质量浓度下的荧光猝灭率; C GO 和 Fe₃O₄/GO 对沙门氏菌荧光探针荧光强度的影响结果; I、II、III 分别为空白(沙门氏菌荧光探针)、GO 和 Fe₃O₄/GO 的荧光强度; D 空白(沙门氏菌荧光探针)、GO 和 Fe₃O₄/GO 的荧光猝灭率。

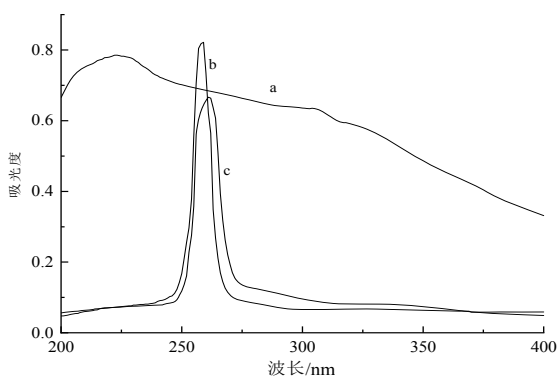
图 4 Fe₃O₄/GO 对沙门氏菌荧光探针荧光强度的影响结果

Fig.4 Effects of Fe₃O₄/GO on fluorescence intensity of salmonella fluorescent probe

时,扣除 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的背景吸收后,其荧光强度 $F=944.92$;由图 4-B 可知,固定沙门氏菌荧光探针浓度(50 nmol/L)不变,当向其溶液中加入不同质量浓度的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 后,沙门氏菌荧光探针的荧光被猝灭,且随着 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 质量浓度的增加,其荧光强度逐渐减小,荧光猝灭率逐渐增大;当 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 质量浓度为 3.2×10^{-4} g/mL 时,其荧光猝灭率可达 96.86%,表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针有强烈的荧光猝灭作用。由图 4-C、图 4-D 可知,在 3.2×10^{-4} g/mL 质量浓度下, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针的荧光猝灭率高于 GO,表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 具有较好的生物相容性,对沙门氏菌荧光探针的荧光猝灭率较高。

2.2.2 紫外(UV)光谱分析

荧光猝灭通常可分为动态猝灭和静态猝灭 2 种类型:动态猝灭是猝灭剂与荧光团分子之间发生碰撞致使荧光强度降低的过程;静态猝灭是猝灭剂与荧光团形成不发光静态配合物,使得荧光强度降低的过程。荧光猝灭的类型与紫外吸收光谱密切相关,若为动态猝灭,其紫外吸收光谱不发生变化;若为静态猝灭,其紫外吸收光谱则发生相应的变化^[19-20]。由图 5 可知,沙门氏菌荧光探针的紫外吸收最强, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的紫外吸收次之, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 沙门氏菌荧光探针的紫外吸收最弱,吸收峰红移且峰形变宽,可能是因为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 与沙门氏菌荧光探针相互作用后,沙门氏菌荧光探针单链 DNA 碱基上的 C-N 杂环与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 碳六环结构之间存在 $\pi-\pi$ 堆积作用和静电引力作用而吸附在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 表面^[21],产



a $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$; b 沙门氏菌荧光探针; c $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 沙门氏菌荧光探针复合物。

图 5 不同紫外波长下 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的吸光度

Fig.5 Absorbance of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ under different ultraviolet wavelengths

生了屏蔽效应,使其紫外吸收峰值减弱,吸收峰红移 2 nm,说明形成了基态的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 沙门氏菌荧光探针复合物。而峰形变宽则是因为沙门氏菌荧光探针与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 之间存在着强烈的离子和 $\pi-\pi$ 堆积效应^[22]。根据猝灭后发生变化的紫外吸收光谱,可初步判断 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针的荧光猝灭属于静态猝灭。

2.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针的猝灭机理

为了进一步判断荧光猝灭的类型,则需计算出荧光猝灭剂与荧光物质之间的动态荧光猝灭速率常数(k_q)、结合常数(K)等^[20]。若为动态猝灭,应符合 Stern-Volmer 方程^[22-23]。

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \tag{1}$$

式(1)中: F_0 为未加入荧光猝灭剂时的荧光强度; F 为加入荧光猝灭剂后的荧光强度; $[Q]$ 为荧光猝灭剂浓度(g/mL); τ_0 为无荧光猝灭剂时的生物大分子平均荧光寿命,取 $\tau_0=10^{-8}$ s^[20]; k_q 为动态荧光猝灭速率常数; K_{sv} 为 Stern-Volmer 动态猝灭常数。

$$K_{sv} = k_q \tau_0 \tag{2}$$

根据不同温度下 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的荧光猝灭光谱图,可得 $F_0/F - [Q]$ 的 Stern-Volmer 关系图,如图 6 所示。

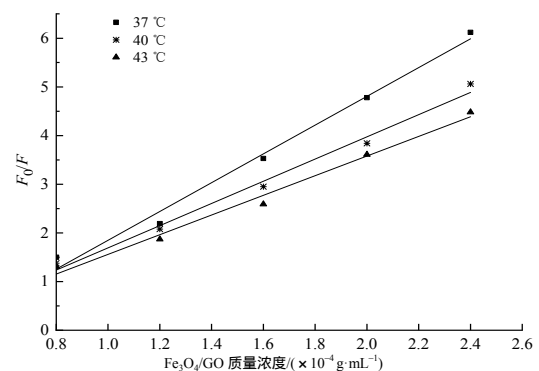


图 6 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针的荧光猝灭 Stern-Volmer 结果

Fig.6 Fluorescence quenching Stern-Volmer results of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ against salmonella fluorescent probe

若猝灭类型为静态猝灭,应符合 Lineweaver-Burk 方程^[24]。

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + k^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1} \tag{3}$$

式(3)中, K 为静态荧光猝灭结合常数,单位为 mL/g。根据不同温度下 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的荧光猝灭光谱图,可得 $(F_0 - F)^{-1} - [Q]^{-1}$ 的 Lineweaver-Burk 关系图,如图 7 所示。

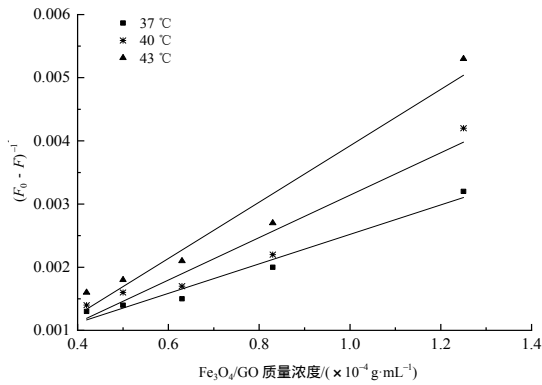


图7 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针的荧光猝灭 Lineweaver-Burk 结果

Fig.7 Fluorescence quenching of the salmonella fluorescent results by $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ Lineweaver-Burk plot

由图6、图7及式(1)、(2)、(3)可分别求得不同温度下 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 与沙门氏菌荧光探针的 K_{sv} 、 K_q

表2 不同温度下 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 与沙门氏菌荧光探针相互作用常数

Table 2 Interaction constants of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ and salmonella fluorescent probes at different

$T/^\circ\text{C}$	$K_{sv}/(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$	$K_q/(\text{mL}\cdot(\text{g}\cdot\text{s})^{-1})$	R_s	$K/(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$	R_L
37	1.58×10^4	1.58×10^{12}	0.986 0	1.89×10^4	0.962 7
40	9.00×10^3	9.00×10^{11}	0.986 4	1.42×10^4	0.927 3
43	7.25×10^3	7.25×10^{11}	0.984 9	1.31×10^4	0.942 3

R_s 为 Stern-Volmer 的相关系数； R_L 为 Lineweaver-Burk 的相关系数。

由图7、表2可知， $(F_0 - F)^{-1}$ 与 $[Q]^{-1}$ 呈良好的线性关系，随着温度的升高，Lineweaver-Burk 直线斜率增大，结合常数 K 减小，这与 Lineweaver-Burk 方程相符合。说明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针的荧光猝灭不是由荧光猝灭剂与荧光分子之间的碰撞所引起的动态猝灭，而是由于两者之间发生非辐射能量转移生成复合物所引起的静态猝灭^[20]。由表2可知，其结合常数 K 较大，说明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 与沙门氏菌荧光探针之间所形成的复合物较稳定，这是由于沙门氏菌荧光探针单链 DNA 碱基上的 C-N 杂环能与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 碳六环结构之间存在 $\pi-\pi$ 堆积作用而吸附在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 表面^[21]。

2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 沙门氏菌荧光探针复合物的选择性分析

为了验证 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 沙门氏菌荧光探针复合物的选择性，分别对相同浓度的沙门氏菌 DNA 序列和单碱基配错序列(MT1)、双碱基配错序列(MT2)和三碱基配错序列(MT3)进行荧光强度测定，结果如图8所示，MT1、MT2和MT3的荧光强度远低于沙门氏菌 DNA 序列所对应的荧光强度，说明所

和 K 值，如表2所示。

若荧光猝灭过程为动态猝灭，在一定温度范围内，其分子活化能随温度的升高而不断增大，增加了荧光猝灭剂与荧光分子团之间的有效碰撞，从而加快荧光猝灭速率，使得 Stern-Volmer 直线斜率、 K_{sv} 及 K_q 值均增大。由图6、表2可知， F_0/F 与 $[Q]$ 呈良好的线性关系，随着温度的升高，Stern-Volmer 直线斜率、 K_{sv} 及 K_q 值均减小。在 37、40、43 $^\circ\text{C}$ 时， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 与沙门氏菌荧光探针的 K_q 分别为 1.58×10^{12} 、 9.00×10^{11} 、 7.25×10^{11} $\text{mL}/(\text{g}\cdot\text{s})$ ，故其 K_q 值大于动态猝灭中的最大扩散碰撞猝灭常数^[20]，初步证明了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针的猝灭过程不是动态猝灭。

建立的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 荧光探针复合物检测沙门氏菌 DNA 具有良好的选择性。

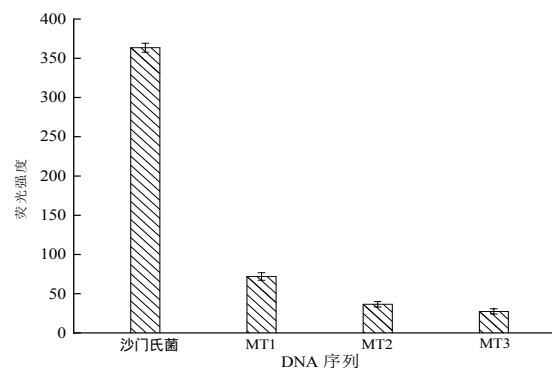


图8 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 沙门氏菌荧光探针复合物的荧光强度
Fig.8 Fluorescence intensity of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ salmonella fluorescent probe complex

3 结论

本研究中，以 GO 为载体，采用化学共沉淀法制备了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ ，并分别采用 SEM、TEM、XRD、FT-IR 对 GO 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 的结构进行了对比表征；在此基础上，分析了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对沙门氏菌荧光探针猝灭的机理。结果表明：所制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 结构良

好; $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 具有荧光猝灭作用, 当 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 质量浓度为 $3.2 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$ 时, 荧光猝灭率可达 96.86%; 其猝灭机理为静态猝灭; 结合常数 K 较大, 两者之间所形成的复合物较稳定, 对沙门氏菌 DNA 的检测具有良好的选择性。可为下一步更深层次地探究其荧光猝灭机理提供依据, 为后续利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ 对荧光的猝灭作用及磁分离技术在沙门氏菌及其他致病菌检测方面提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 王凯乐, 温增润, 黄科汛, 等. 石墨烯在光纤激光器中的应用[J]. 现代物理知识, 2018, 30(1): 27-30.
WANG K L, WEN Z R, HUANG K X, et al. Application of graphene in fiber laser[J]. Modern Physics, 2018, 30(1): 27-30.
- [2] 王飞, 贾书海, 唐振华, 等. 石墨烯纳米复合材料光驱动技术的研究进展[J]. 材料工程, 2018, 46(4): 12-22.
WANG F, JIA S H, TANG Z H, et al. Research progress on light-driven technology for graphene-based nanocomposites[J]. Journal of Materials Engineering, 2018, 46(4): 12-22.
- [3] DONG L, CHEN Z X, ZHAO X X, et al. A non-dispersion strategy for large-scale production of ultra-high concentration graphene slurries in water[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 76.
- [4] 宋子强, 张洋, 潘恒, 等. 氧化石墨烯的制备及其在生物医学领域的应用[J]. 胶体与聚合物, 2017, 35(2): 77-80.
SONG Z Q, ZHANG Y, PAN H, et al. Preparation of graphene oxide and its application in the biomedical field[J]. Chinese Journal of Colloid and Polymer, 2017, 35(2): 77-80.
- [5] 高扬, 吴丁威, 殷广达, 等. 氧化石墨烯在生物医学领域的应用[J]. 材料导报, 2016, 30(15): 144-150.
GAO Y, WU D W, YIN G D, et al. A survey for biological applications of graphene oxide[J]. Materials Review, 2016, 30(15): 144-150.
- [6] 成婧, 付善良, 丁利, 等. 磁性固相萃取-液质联用测定环境水体中喹诺酮类抗生素[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2016, 42(3): 328-333.
CHENG J, FU S L, DING L, et al. Determination of quinolone antibiotics in water by magnetic solid phase extraction and HPLC-MS[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2016, 42(3): 328-333.
- [7] LYU X S, XUE X Q, JIANG G M, et al. Nanoscale Zero-Valent Iron(nZVI) assembled on magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{graphene}$ for Chromium(VI) removal from aqueous solution[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2014, 417: 51-59.
- [8] SONG Z L, ZHAO X H, LIU W N, et al. Magnetic graphitic nanocapsules for programmed DNA fishing and detection[J]. Small, 2013, 9(6): 951-957.
- [9] 杨宇, 牛承岗, 曾光明. 磁性富集荧光法检测大肠杆菌[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2017, 48(5): 1134-1140.
YANG Y, NIU C G, ZENG G M. Fluorescent detection of *Escherichia coli* based on magnetic enrichment[J]. Journal of Central South University (Science and Technology), 2017, 48(5): 1134-1140.
- [10] LI M K, HU L Y, NIU C G, et al. A fluorescent DNA based probe for Hg(II) based on thymine-Hg(II)-thymine interaction and enrichment via magnetized graphene oxide[J]. Microchimica Acta, 2018, 185: 207.
- [11] 谢同彬, 梅林. 基于纳米金复合探针的沙门氏菌快速定量检测[J]. 食品与机械, 2017, 33(11): 57-60.
XIE T B, MEI L. Rapid quantitative detection of salmonella based on nanogold composite probes[J]. Food & Machinery, 2017, 33(11): 57-60.
- [12] 鲁子敬, 熊威威, 翟琨, 等. 基于双重猝灭分子信标及核酸染料 Hoechst 33258 对单链核酸的双色定量检测[J]. 分析化学, 2019, 47(7): 1014-1020.
LU Z J, XIONG W W, ZHAI K, et al. Dual color fluorescence quantitative detection of DNA sequences with double-quenching molecular beacons and nucleic acid hoechst 33258[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, 47(7): 1014-1020.
- [13] 刘闯. 磁性氧化石墨烯的制备及同时吸附水中 Cd(II) 和 As(V) 的研究[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2015.
LIU C. Synthesis of magnetic graphene oxide and the research of its simultaneous adsorption to Cd(II) and As(V) from aqueous solution[D]. Xiangtan, China: Xiangtan University, 2015.
- [14] 党志敏. 氧化石墨烯及其复合材料的制备与表征[D]. 南京: 南京理工大学, 2010.
DANG Z M. Preparation and characterization of graphene oxide and its composite materials[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2010.
- [15] YE N S, XIE Y L, SHI P Z, et al. Synthesis of magnetite/graphene oxide/chitosan composite and its application for protein adsorption[J]. Materials Science and Engineering: C, 2014, 45: 8-14.
- [16] 刘泽玲. 磁性氧化石墨烯复合材料的制备及其吸附染料的性能研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2017.

- LIU Z L . Preparation of magnetic graphene oxide composite material and study on its dye adsorption performance[D] .Tianjing :Tianjin Polytechnic University , 2017 .
- [17] 王旭珍,周泉,任素贞,等.溶剂热法制备 Fe_3O_4 /氧化石墨烯复合材料及其性能研究[J].功能材料,2015,46(3):3045-3049 .
- WANG X Z , ZHOU Q , REN S Z , et al . Solvothermal synthesis and performances of magnetite/reduced graphene oxide composites[J] . Journal of Functional Materials , 2015 , 46(3) : 3045-3049 .
- [18] LEE D W , DE LOS SANTOS V L , SEO J W , et al . The structure of graphite oxide : investigation of its surface chemical groups[J] . The Journal of Physical Chemistry B , 2010 , 114(17) : 5723-5728 .
- [19] JAYABHARATHI J , THANIKACHALAM V , SRINIVASAN N , et al . Luminescent study on the binding interaction of bioactive imidazole with bovine serum albumin : a static quenching mechanism[J]. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy , 2011 , 84(1) : 233-237 .
- [20] 弓巧娟,王永东,杨海英,等.氧化石墨烯对 L-色氨酸荧光猝灭及机理研究[J].新型炭材料,2016,31(6):639-645 .
- GONG Q J , WANG Y D , YANG H Y , et al . The mechanism of the fluorescence quenching of L-tryptophan by graphene oxide[J] . New Carbon Materials , 2016 , 31(6) : 639-645 .
- [21] TANG L H , WANG Y , LIU Y , et al . DNA-directed self-assembly of graphene oxide with applications to ultrasensitive oligonucleotide assay[J] . ACS Nano , 2011 , 5(5) : 3817-3822 .
- [22] HE Y , WANG X , ZHU J , et al . Ni^{2+} -modified gold nanoclusters for fluorescence turn-on detection of histidine in biological fluids[J] . Analyst , 2012 , 137(17) : 4005-4009 .
- [23] HUANG D W , NIU C G , WANG X Y , et al . “Turn-on” fluorescent sensor for Hg^{2+} based on single-stranded DNA functionalized Mn : CdS/ZnS quantum dots and gold nanoparticles by time-gated mode[J] . Analytical Chemistry , 2013 , 85(2) : 1164-1170 .
- [24] 张丽娜,陈欣,夏阳,等.荧光光谱法研究四苯基-锌金属卟啉与蛋白质的相互作用机理[J].光谱学与光谱分析,2009,29(3):773-776 .
- ZHANG L N , CHEN X , XIA Y , et al . Study on interaction mechanism between *Meso-Tetra*-(4-hydroxyphenyl)-Zn porphyrin and bovine serum albumin by fluorescence method[J] . Spectroscopy and Spectral Analysis , 2009 , 29(3) : 773-776 .

责任编辑:毛友纯

英文编辑:柳正