

硒化物纳米材料的制备及其在生物传感器中的应用

摘要

本文使用水热合成法，制备了 Ag_2Se 、 PbSe 与 ZnSe 三种硒化物纳米粒子。在制备过程中对纳米粒子的表面进行修饰，使其在水体系中具有很好的分散性和生物相容性。使用 TEM、SEM、XRD、EDS、XPS、UV-Vis、FT-IR 等对产物进行了表征，探讨了它们的形成机理，并对制备的硒化物纳米粒子在生物传感器方面的应用进行了初步探究。

(1) 以 AgNO_3 ， KI ，PVP 形成的配合物 $[\text{PVP}(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)-}$ ($n \geq m$) 为前驱体与 Na_2SeSO_3 在 180°C 条件下水热反应 20 小时，制备了单分散 Ag_2Se 纳米粒子。透射电镜和扫描电镜测试显示制备的 Ag_2Se 为大米粒状，长约为 60-80nm，宽约为 30-40nm。配合物 $[\text{PVP}(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)-}$ 对控制 Ag_2Se 晶核的生成速度和生长方向起到了至关重要的作用，使得在高浓度 PVP 条件下可以制备出尺寸均一、大米粒状的 Ag_2Se 纳米粒子。通过 XPS 和 FT-IR 的检测证实 PVP 与 Ag_2Se 纳米粒子间以配位键形式的结合，并表明在 Ag_2Se 纳米粒子表面有大量 PVP 存在。利用 PVP 中 $\text{C}=\text{O}$ 与 DNA 分子中 $-\text{NH}_2$ 易于形成氢键，将制备的 PVP 修饰的 Ag_2Se 纳米粒子作为 DNA 探针的标记物用于电化学溶出检测 DNA。用该方法对对互补序列、三碱基错配及非互补序列 DNA 的控制表明，PVP 修饰的 Ag_2Se 对互补的 20 碱基 PEP 基因片段具有很好的选择性，其检测的线性范围为 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，检测限为 $2.3 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(2) 在表面活性剂 CTAB 存在的条件下， $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 与 NaHSe 在去离子水中于 150°C 条件下水热反应 24 小时制备了 PbSe 纳米粒子。XRD 显示制备的 PbSe 为立方晶型，TEM 显示 PbSe 纳米粒子粒径大约 40nm。FT-IR 检测证实了 CTAB 在 PbSe 纳米粒子表面的存在。 PbSe-CTA^+ 使得 PbSe 纳米粒子表面带正电性，通过与 DNA 中的 $-\text{COO}^-$ 的负电性的静电作用，将制备的 PbSe 纳米粒子标记寡核苷酸制成了新型的 DNA 探针。用该方法对对互补序列、三碱基错配及非互补序列 DNA 的控制表明，CTAB 修饰的 PbSe 对互补的 18 碱基 CaMV35S 基因片段具有很好的选择性，其检测的线性范围为 $5.0 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，检测限为 $6.1 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(3) 以生物分子 L-谷氨酸辅助水热法合成了 ZnSe 纳米粒子。XRD 检测显示制备的 ZnSe 为立方晶型，TEM 图像表明制备的 ZnSe 为尺寸在 100 纳米左右的球形粒子。制备过程中，生物分子 L-谷氨酸，起到了配位剂和生物分子模板的作用。FT-IR 检测表明， ZnSe 纳米粒子表面吸附有 L-谷氨酸，谷氨酸作为 ZnSe

纳米粒子与 DNA 分子的连接物,使 ZnSe 纳米粒子标记于 DNA 分子上。将 ZnSe 纳米粒子标记于合成的 5'端氨基修饰的寡聚核苷酸片段上,制成具有电化学活性的 ZnSe 纳米粒子标记 DNA 探针。测定目标 DNA 的线性范围为 1.0×10^{-11} 至 1.0×10^{-7} mol/L,检测限为 4.7×10^{-12} mol·L⁻¹。

关键词: 硒化物 纳米材料 Ag₂S PbSe ZnSe DNA 杂交 标记物

SYNTHESIS OF SELENIDE NANO-MATERIALS AND THE APPLICATION IN BIOLOGY SENSOR

ABSTRACT

Three kinds of selenide nanoparticles have been synthesized through hydrothermal route. The synthesized nanoparticles are well dispersed and have biology consistent ability as their surfaces are modified in the process of synthesis. The morphology and characteristic were characterized by TEM, SEM, XRD, EDS, XPS, UV-Vis, FT-IR respectively, and the possible growth mechanisms were elucidated based on our experimental results. The application of nanoparticles-based novel electrochemical DNA biosensor was studied and discussed.

(1) Monodispersed silver selenide (Ag_2Se) nanoparticles have been prepared successfully by a hydrothermal reaction of Na_2SeSO_3 with $[\text{PVP}(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)-}$ which is formed by AgNO_3 , KI and PVP. TEM revealed that the nanoparticles are much like husked rice with length of about 60~80 nm and width of about 30~40nm. $[\text{PVP}(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)-}$ acted an important role in the reaction. The formation rate of Ag_2Se crystal cores and the growth direction could be well controlled as the protection effect of PVP. Husked rice-like Ag_2Se nanoparticles with uniform size were obtained in the condition of high concentration of PVP. The XPS and FT-IR test indicted that there was a great number of PVP modified on the surface of Ag_2Se nanoparticles. The modification effect was not only a physical adsorption but also a chemical coordination. Ag_2Se was bound to the probe DNA via the formation of the hydrogen bond between $-\text{C}=\text{O}$ of PVP in the modified Ag_2Se and $-\text{NH}_2$ in the probe DNA. The proposed method showed a good and distinguishable ability to the three-base mismatch or non-complementary sequences with the complementary sequences. DNA specific-sequence related to PEP promoter gene in the transgenic plants was determined with a detection range from 1.0×10^{-12} to 1.0×10^{-8} mol L^{-1} and a detection limit of 2.3×10^{-13} mol L^{-1} (3σ).

(2) Lead selenide (PbSe) nanoparticles were synthesized by the reaction between $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ and NaHSe under hydrothermal conditions in the presence of CTAB at 150°C for 24h. The X-ray diffraction (XRD) pattern indicated that the product was cubic PbSe . Transmission electron

microscopy (TEM) revealed that the nanoparticles are about 40 nm in diameter. The FT-IR test indicated the adsorption of CTAB on the surface of PbSe nanoparticles. The ionization of CTAB produced cation CTA^+ on the surface of PbSe nanoparticles and made the nanoparticles with positive charge. As the $-COO^-$ of DNA made the DNA with negative charge, the PbSe nanoparticles can adsorb the negatively charged oligonucleotides by electrostatic interaction to form a nanoparticle labeled oligonucleotide probe. The PbSe nanoparticles showed a good distinguishable ability to the two-base mismatch or non-complementary sequences with the complementary sequences. DNA specific-sequence related to CaMV35S promoter gene in the transgenic plants was determined with a detection range from 5.0×10^{-12} to 5.0×10^{-7} mol/L and a detection limit of 6.1×10^{-13} mol/L (3σ).

(3) A simple biomolecule-assisted hydrothermal approach was developed to synthesize zinc selenide (ZnSe) nanoparticles. The X-ray diffraction (XRD) pattern indicated that the as-prepared product was cubic ZnSe. The TEM images showed the size of the ZnSe nanosphere was 100 nm in diameter. The L-glutamic acid acted as a complexing agent and biomolecule template to combine with Zn^{2+} in the process of the reaction. The FT-IR studies of the as-prepared ZnSe provide preliminary proof for confirming the adsorption between ZnSe nanoparticles and glutamic acid. Glutamic acid was the bridging agent between DNA molecule and zinc selenide nanospheres. So the ZnSe nanospheres could be used for the detection of DNA hybridization. DNA specific-sequence related to PAT gene in the transgenic plants was determined with a detection range from 1.0×10^{-11} to 1.0×10^{-7} mol L⁻¹ and a detection limit of 4.7×10^{-12} mol L⁻¹ (3σ).

KEY WORDS: selenide nano-material Ag₂Se PbSe ZnSe DNA hybridization label

独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

本人签名：刘鹤

日期：2008年6月19日

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解青岛科技大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权学校可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为青岛科技大学。(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

本学位论文属于：

保密 ，在 年解密后适用于本声明。

不保密 。

(请在以上方框内打“√”)

本人签名：刘鹤

日期：2008年6月19日

导师签名：付海

日期：2008年6月19日

第一章 文献综述

纳米科技是研究纳米尺度范围的物质、结构和应用的一门热门学科，这个尺度正好介于大分子与当今光刻技术的最小极限之间。在化学领域，这个尺度空间正好对应传统研究的胶体、胶束、聚合物分子、共聚物和相类似的结构，如巨大分子和分子团簇等。在物理和电子工程领域，纳米科技更多的是与量子行为、光子和电子在纳米结构的行为相关。在生物和生物化学领域，纳米科技直接与细胞结构单元相关，从 DNA 和病毒到亚细胞器官等，生物体中的许多有趣结构都可以视为纳米结构。纳米科技渗透于当今科技的各个尖端领域，成为现代科技发展最快的分支，是科技发达程度的典型代表。推动纳米科技发展的驱动力蕴藏于纳米材料和结构的内在魅力，以及人类孜孜追求的超大或超小的梦想，向着两个极端不断探索的好奇心。因此开展纳米材料研究具有重大科学理论和实际意义^[1-8]。

1.1 纳米晶形貌结构与性能关联性

尺寸、形貌、分布和结构等因素影响着纳米材料性能，因此可以通过人为调控以上因素调控目标材料的性能。纳米材料早期研究主要重点围绕小尺寸这一问题进行，开展的工作集中在如何制备纳米材料，即如何将材料尺寸降低到纳米尺度。深入研究发现，纳米材料的形貌和结构对其性能有着重要的影响，即使同一材料同一尺度，不同形貌的纳米晶体现出许多不同一般的物理和化学性能，从而提供了一条从材料形貌角度裁剪材料性能的可行途径^[9,10]。

1.1.1 光学性能

由于量子尺寸效应作用，当纳米晶一个方向尺寸降低到某个临界尺寸后，其光学性能将发生许多奇异的变化，因此纳米晶的光学性能对纳米晶自身尺寸形貌和表面状况具有很强的敏感性。对于量子点来说量子尺寸效应主要导致吸收峰和发射峰的蓝移，而一维纳米晶的发射光谱沿着轴向还将发生明显的极化现象。利用金属催化法 Yang 等^[11]制备了 ZnO 纳米线，发现具有很强的紫外—可见发射和深层绿光发射，比表面积随纳米线直径降低而增加，深层发射增强，这些纳米线在光电设备中可用作发光元件。Alivisatos 等^[12]将 CdSe 纳米棒在聚合物有机材料中组装成薄膜太阳能电池材料，通过调整 CdSe 纳米棒的长径比可以调控太阳能电池性能，比单纯使用 CdSe 量子点具有良好的可控性。

贵金属纳米晶的表面等离子体共振(SPR)性能对纳米晶形貌和结构具有很高

的敏感性，形貌各异的纳米晶体现出不同于普通纳米颗粒的特性。EI-Sayed 等^[13]研究金属 Au 和 Ag 纳米线体系 SPR 性能时发现一维纳米晶存在两种 SPR 模式，横向激发和纵向激发。当具有一定直径的 Au 和 Ag 纳米线的横向激发模式波长在 (Au) 520 nm 和 (Ag) 410 nm 时，通过改变它们的长径比能够将它们的纵向激发模式在可见光到近红外光这一广泛的区域内自由调控。研究还发现长径比 2.0-5.4 的 Au 纳米棒的荧光产率要比单纯的纳米颗粒要高出数百万倍^[14]。加上贵金属 Au 和 Ag 具有良好的生物相容性，Au 和 Ag 纳米棒可作为理想的医学诊断成像设备中的发光器件、传感器件和着色材料等。

1.1.2 磁学性能

纳米颗粒结构及形貌对自身的磁学性能也有显著影响，由于纳米棒体现出各向异性效应，因此体现出奇特的磁学性能^[15]。Hyeon 等^[16]用有机金属热降解法成功制备了 Fe 纳米棒，研究其磁学性能发现 Fe 纳米棒的磁性各向异性常数为体相块材的两倍。Xu 等^[17]使用多孔氧化铝模板上排列的聚丙烯胺纳米管作为模板成功制备 Co 和 Fe 纳米线，研究它们的磁学性能发现残余磁化小于饱和磁化，这是由于紧密排列的纳米线之间具有较强的相互作用，在磁性天线材料和垂直磁记录材料方面具有潜在的应用价值。

1.1.3 力学性能

传统多晶材料的强度和硬度与晶粒尺寸的关系可以用 Hall-Petch 公式表示，随着晶粒尺寸的降低呈现提高的趋势，其主要机制是位错增加导致的在晶界相互缠绕钉扎。卢柯等^[18]采用电沉积法制备 Cu 纳米晶材料体现出奇异的超塑性。他们使用脉冲电化学沉积制备的 Cu 纳米晶材料的屈服强度达 900 MPa，断裂强度 1068 MPa，比传统粗晶材料至少高一个数量级^[19]。但是对于单晶一维纳米结构来说，由于缺陷的大量减少，它们的强度要比相应的多晶块材高得多。Lieber 等^[20]使用 AFM 研究了 SiC 纳米线的力学性能发现其杨氏模量可达 610-660 GPa，接近 SiC 单晶[111]方向的理论计算值，渴望在传统材料增强增韧中得到应用。

纤维增强很早就材料增强增韧的实践中得到应用，能够显著提高柔性材料的强度，改善脆性材料的韧性。一维纳米结构的出现使以一维纳米线纳米棒增强传统材料成为现实，现有的大量一维纳米结构都能在改性传统材料中得到广泛的应用，其中碳纳米管的尝试也得到了令人鼓舞的成功^[21]。

1.1.4 场发射性能

纳米线和纳米管具有尖锐的尖端是冷场发射阴极的理想材料。Lee 等^[22]通过电流—电压测试研究了 Si 和 SiC 纳米棒场发射性能,发现两者都具有良好的场发射性能。Si 和 SiC 纳米棒的场发射电压分别是 15 和 20 $\text{V}\mu\text{m}^{-1}$, 电流密度 0.01mA cm^{-2} , 可以与碳纳米管和金刚石场发射材料性能接近。Lee 等^[23]研究了低温 CVD 生长的 ZnO 纳米棒阵列的场发射性能,发射电压 $6\text{V}\mu\text{m}^{-1}$, 电流密度 $0.01\mu\text{A cm}^{-2}$ 。当电压提高到 $11\text{V}\mu\text{m}^{-1}$ 后电流密度能提高到几毫安。现在纳米棒和纳米线的制备技术已经日趋成熟,使用这些一维纳米结构作场发射显示设备的活性部件将具有重要的潜在意义。

1.2 低维纳米晶形貌和结构的控制

纳米材料的研究已经跨越了以单纯降低尺度为目的的纳米材料合成,对形貌结构的关注成为近年来研究的热点。特别是对一维纳米材料的关注,成功制备了多种一维纳米结构,如:纳米线、纳米棒、纳米带、纳米条、纳米管以及枝晶、分形结构等,并且在制备手段呈现多样性。

纳米晶的生长与普通晶体生长属于同一个范畴,其中涉及两个重要环节:形核和长大。正确理解影响形核和长大的工艺和因素对于准确实现对纳米晶形貌结构的控制具有重要意义。一般来说,要形成一个完整晶体结构必须具备两个条件:结构单元在固体界面和传输介质(包括气体、液体和熔融态)中的输送具有可逆性,这样可以保证结构单元能够在正确的位置形核生长以形成长程有序的结构;结构单元在传输介质中输送必须是一个比较恒定的供给速率,以便整个反应或者传输介质中具有均匀物质浓度,利于形成均匀的形貌结构。在形貌结构控制研究中,以一维或准一维纳米结构的研究最具有代表性,或多或少地采用人为引导的办法实现纳米晶的一维生长。纳米材料制备科学遵循的几个主要基本原则:

- (1) 根据自身晶体结构各向异性和具有择优取向生长的特性,在合适的生长环境中自发生长;
- (2) 引入固—液界面改变籽晶的对称性,实现非均匀形核生长;
- (3) 直接采用模板限制或者导向晶粒生长;
- (4) 采用超饱和条件改变籽晶生长习性;
- (5) 选用合适的表面修饰剂限制不同晶面的生长速率,从而实现动力学角度对晶体形貌的控制;
- (6) 零维粒子的自组装等。

1.2.1 自发生长

晶体的外在形貌其实是其内在晶体结构的外在表现,晶体结构的自身特征决

定着纳米晶的形貌结构。许多固体材料由于其自身晶体结构的各向异性，它们在适当的条件下就有生长成低维材料的趋势，体现出一种自发生长习性。这类晶体一般呈现链状结构，或者由于晶体结构各向异性导致不同方向对于原子或离子团的结合能力具有取向性，在生长过程中沿某些选择方向生长。

Se 是一类典型的例子，Se 一维纳米结构的报道层出不穷，有纳米棒、纳米线、纳米带和纳米管等。其中最典型的报道是 Xia 及其合作者对此进行的大量研究，他们成功实现了大规模合成径向尺寸可控的 10-100nm 粗的 t-Se 纳米线^[24,25]。首先将 H_2SeO_3 与过量的 N_2H_4 回流反应生成直径~300nm 的砖红色的非晶 Se 胶体，当产物冷却之后，原先溶于溶液中的少量 Se 开始结晶析出 t-Se。在黑暗处陈化处理，t-Se 籽晶长大成纳米线，在室温下通过超声处理同样也获得了结晶良好的 t-Se 纳米线。这种工艺的基本过程是首先 H_2SeO_3 与过量的 N_2H_4 反应生成的胶体干燥重新分散在乙醇中，当施加短暂的超声波照射，空化效应导致 t-Se 在胶体表面形核，随后非晶 a-Se 向 t-Se 聚集长大直至结晶完全。

第 V 族的 Sb、Bi 与第 VI 族的 S、Se 所形成的 V_2-VI_3 化合物中的 Sb_2S_3 、 Bi_2S_3 和 Sb_2Se_3 也是一种链状结构，通过气相法或者液相化学方法都能很方便的制备一维纳米结构。Xie 等^[26]以二乙基二硫代胺基甲酸钠为硫源，通过水热分解单分子有机络合物成功制备了 Sb_2S_3 和 Bi_2S_3 纳米棒。Yang 等^[27]通过简单的气相蒸发沉积法制备了 Sb_2S_3 纳米管。Li 等^[28]以 Na_2S 为硫源采用水热法合成了 Sb_2S_3 纳米棒。Shao 等^[29]以硫粉做硫源，采用盐酸辅助水热法制备 Bi_2S_3 纳米条。Ye 等^[30]采用气相蒸发沉积制备了 Bi_2S_3 纳米管。Xie 等^[31]通过 PVA 辅助水热法成功制备超长的 Sb_2S_3 纳米线。Shen 等^[32]采用乙二醇辅助多元醇法制备了 Sb_2S_3 纳米线。这些一维纳米结构的形成除了与制备和方法工艺又关，更与它们自身晶体结构息息相关。

1.2.2 引入固液界面

控制纳米晶体形貌可以从形核和长大入手，通过改变其中的工艺条件实现低维纳米结构的生长。引入固液界面既是在成核阶段改变成核籽晶的对称性，通过在固液界面析出成核牵引纳米晶在一维方向生长。在此机制的启发下的气-液-固 (VLS) 法是制备一维纳米单晶最成功的方法之一，能够实现一维纳米晶体的大规模生产^[33]。VLS 法的典型工艺如下：首先将气相反应物溶解在纳米尺度的催化剂金属液滴中，随后在液固界面成核生长成纳米晶。生长过程中液滴引导着晶体的生长，整个过程中气相作为物质输送介质，液相为液态模板，固相是目标材料。采用 VLS 法的起码要求是中间形成的合金对目标材料有着良好的溶解度，最好是

存在共晶成分点。VLS 法已经广泛用作制备各种一维纳米线和纳米棒的有效手段,从金属到元素半导体到半导体化合物等,包括元素半导体 Si、Ge、B 等; III-V 族化合物半导体 GaN、GaAs、GaP、InP、InAs 等; II-VI 族化合物半导体 ZnSe、ZnS、CdSe、CdS 等; 氧化物 ZnO、MgO、SiO₂ 等。在这些化合物中 GaN、GaAs、ZnO 和 CdSe 由于其直接宽带隙特性,在光学和光电应用领域备受关注,因此大量 VLS 法的研究都集中在此类材料的制备上,为推动纳米功能器件的产业化应用迈出了一大步^[33]。

1.2.3 模板法

模板法是用于制备纳米材料中最常规的思路,它通过自身的纳米尺度限制或者引导纳米晶生长,以主体的构造和构型去控制影响和修饰所得客体的形貌和性质,期望获得粒径及其分布可控,易掺杂和反应易控的超分子材料。由于选定的组装模板和纳米颗粒之间的识别作用,从而使模板对组装过程具有指导作用,组装过程更为完善。如果模板仅仅发挥物理空间限制作用,不参与化学反应,反应体系随后还应进行后处理以除去模板基体,如化学腐蚀或焙烧;而如果模板在反应过程中逐渐耗尽,那就有可能直接获得纳米产物,这就是一种牺牲模板工艺。当然,该方法也存在明显不足,后处理去除模板往往将对纳米产物造成损害,并且获得的纳米材料多为多晶,产率低。但不管怎样,模板法还是被人们普遍接受为一种重复性高、简便实用、能制备形貌复杂的低维纳米材料行之有效的办法。根据模板限域能力的不同,可以将模板分为硬模板和软模板。

1.2.3.1 硬模板

1.2.3.1.1 孔道模板

采用孔道作为模板能够最大限度的将纳米晶限制在纳米孔道中生长,不至于超越纳米尺度范围。现在采用的孔道模板多是一些多孔纳米材料,在孔道中合成纳米材料本身就是一门重要的纳米组装科学,其中涉及两方面的关键技术:多孔纳米材料的制备;目标纳米材料在孔道中的组装。对于如何将目标材料装入这些细小的孔洞中,可以通过普通的溶液浸渍、喷涂、气相输送和电气化学沉积等手段实现。

介孔材料在近年来得到快速发展,最早的研究主要集中在将纳米颗粒组装入介孔孔道,研究组装体系的特殊物理化学性能。当时的研究主要还是集中在纳米颗粒制备^[34],用于一维纳米结构合成的报道较少。近年来使用介孔材料实现

对纳米晶形貌结构的控制研究也取得显著进展, Yunfeng Lu 等^[35-37]通过电化学方法将纳米颗粒组装进入孔道, 将介孔模板合成一维纳米结构和三维骨架拓展成为一种具有普遍性的合成手段, 在多种材料类别上获得成功的尝试, 如 Pt、Co、PtNi、CdSe、CdS 和 Bi₂Te。由于介孔聚集体相貌的多样性, 使用球形介孔球还能很方便的合成各种空心结构。因为纳米颗粒的组装总是易于将孔道口堵塞, 因此在球形结构中易于形成外壳包裹层, 当去除介孔模板之后就能得到空心结构。

1.2.3.1.3 纳米结构模板

使用现有的纳米晶为模板是另外一种硬模板使用思路, 它直接以模板的形貌结构影响或者控制目标材料的形貌结构。原则上所有的现有纳米结构都可以作为模板、包括纳米颗粒、纳米棒、纳米线和纳米管等。在使用过程中首先要解决的问题是将目标材料吸附或者键合到模板上, 其次是如何去除模板材料。

使用现有的纳米线或者纳米管作模板构建一维纳米结构使用更加广泛。虽然碳纳米管由于在内孔道组装还存在较大困难, 但是在外壁组装纳米颗粒的研究还是取得了很大地成功^[38]。由于 Se 纳米线很容易获得, 因此 Younan Xia 等以 Se 纳米线为模板, 通过与金属离子反应成功制备了 Ag₂Se 单晶纳米线^[39]、Se 和 CdSe 同轴缆线和 CdSe 多晶纳米管^[40]。并且由于 Se 容易升华的特性, 能够很方便的用于制备金属单质纳米管, 如 Pt、Rh 和 Ir 等^[41]。

牺牲模板由于在反应中能逐渐被消耗, 省去后续去除模板的工艺, 而且也排除了模板本身对目标材料性能和结构的不利影响。王中林等^[42]以 ZnO 为模板通过与 H₂S 反应制备了 ZnO-ZnS 纳米缆线和 ZnS 纳米管。Younan Xia 等^[43-46]在成功制备不同形貌 Ag 纳米晶后, 成功将 Ag 纳米晶(包括纳米棒、纳米线、纳米立方块、纳米三角晶等)作为牺牲模板, 与 Au、Pd 和 Pt 的离子发生质换反应制备了与 Ag 外轮廓相似的 Au、Pd 或 Pt 空心结构或者合金结构。

1.2.3.2 软模板

软模板大多数是基于两亲分子形成的有序聚集体, 能够很好地模拟生物矿化过程, 而且形态多样, 能够用于合成多种复杂形貌的低维纳米材料, 甚至可以认为所有有机分子参与的形貌控制都可以认为是软模板。软模板构建简单, 对工艺设备要求不高, 反应过程具有良好的可控性, 当然软模板也存在明显不足, 稳定性差, 产率低。现在广泛使用的软模板有胶束/反胶束、单分子膜模板、生物分子模板及液晶模板等。

微乳液是由表面活性剂(有时候还有助表面活性剂)、油相和水相按一定

的比例混合形成的热力学稳定的透明或半透明的、具有纳米尺度反应微区的液-液均相体系。胶束是指水包油 (O/W) 微乳液中长链烃分子内形成的烃内核；反胶束则指油包水 (W/O) 微乳液中长链烃分子包含的水池。微乳液与反胶束的区别在于水池的大小，其实是反映在核心自由水的存在与否，反胶束中水核被固定，而微乳液中不但有固定的油水界面的水分子，在核心还存在自由度更大的自由水。利用微乳液形成的微小核心作微反应器是制备纳米材料的有效合成手段，由于反应物是以高度分散的状态供给，可以防止反应产物局部过饱和，从而使微粒的形核及长大能够均匀进行，并可通过调节外部因素制备出单分散的纳米晶。此外，纳米颗粒在水池中受表面活性剂分子的保护而处在稳定状态，不至于形成团聚，制备的纳米颗粒易于长期保存^[47-50]。这些表面活性剂自组装结构呈现多种形态，如球形和棒状等，因此通过微反应器形状能够有效控制所得纳米晶的形貌，不仅仅有纳米颗粒，还有一维纳米线、纳米棒束等。

有时候所制备的纳米晶的尺寸大于胶束或者微乳液所提供的微反应器尺寸，此时形貌控制更主要是来自表面活性剂在纳米颗粒表面吸附组装结构的影响。Murphy 等^[51,52]发展了一种籽晶生长工艺合成 Au 纳米线和纳米棒，首先通过强还原剂直接还原生成大量籽晶纳米颗粒 (Au 或者 Ag)，然后在胶束溶液中通过弱还原剂提供纳米棒或者纳米线生长所需的物质，缓慢均匀的提供单体。李亚栋等^[53]针对表面活性剂的层状前驱体结构，提出了一种真空裂解前驱物法制备一维纳米线或者纳米管，以表面活性剂 CTAB 作为插层骨架形成层状结构，分解后通过卷曲机制获得 W、Co、Cu 和 Cd 纳米线。

一些具有线性结构的高分子和生物分子也是良好的软模板，它们通过物理或者化学作用力将目标材料吸附到模板材料上，最终生成了与模板形貌相似的纳米结构。其中 DNA 由于其对纳米颗粒具有较强的络合能力和静电吸附力，成为最成功的生物模板^[54]。与简单的有机分子模板不同，DNA 模板组装过程不是通过模板与纳米团簇的识别，而是通过与纳米团簇的低聚核苷酸分子与模板间的分子识别来实现。由于 DNA 具有更加完善和严密的分子识别功能，使得组装过程具有高度的选择性；并且由于分子模板的高温稳定性较差，升温后 DNA 被破坏，组装的纳米团簇将自动分散开。此外，由于组装动力来源于纳米团簇外包覆分子的分子识别，用这种方法来实现不同种类及不同粒径的纳米团簇的组装将成为可能，在制备特殊性质和要求的纳米器件等方面具有潜在的应用价值。大量研究报道成功地将一系列纳米颗粒组装成一维纳米结构，包括 Ag、Pd、Au、Pt^[55-57]和 CdSe^[58]等。

1.2.4 过饱和条件

通过控制纳米晶周边环境的过饱和度能够有效地降低籽晶形核生长的对称性，促进一维方向的生长，这对于一维纳米晶的制备尤为重要。这在直接气相沉积生长和水热/溶剂热合成中得到了充分的应用，它们所提供的环境由于所处高温或者高压介质中，能够提供稳定的目标材料的单体浓度，在纳米晶生长尖端维持稳定的过饱和度，形成一维生长的驱动力。

1.2.4.1 直接气相生长

利用气相法制备低维纳米材料已经十分广泛，该方法被大量用于生长一维纳米晶。Edwards 等^[59]使用简单的气相沉积成功制备了 Nb_3Te_4 一维纳米结构。ShiheYang^[60]及其合作者通过高温下控制通入的氧气气流等工艺条件成功实现在金属铁薄片表面生长一维 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米带。他们通过调整工艺，将类似方法在其它金属薄片上生长相应的氧化物或者硫属化合物，如 CuO 纳米带、纳米线^[61]和 Ag_2S 纳米线^[62]。现在普遍认为控制生长尖端的过饱和度对于获得一维纳米结构至为重要，大量的实验结果证明这种因素的决定作用，比如晶须等一维结构都是在较低过饱和度的环境中获得，而结构完整的块体单晶往往在中等过饱和度环境中生长获得。在这方面的研究中，王中林^[63,64]及其合作者开展了大量的理论和实验工作，成功合成了形貌新奇的纳米结构，采用气相生长具有产率高和高效快捷的优点，是最有希望实现产业化的一维纳米晶的制备途径。

1.2.4.2 水热/溶剂热法

水热法是指在特制的密闭容器（反应釜）中，采用水溶液作反应体系，通过对反应体系加热而产生压力超过溶解临界点，由于在高压下大多数反应物都能溶解在水中，促使反应在液相或气相中进行。水热法通过高压反应釜中水热反应实现从原子、分子级的微粒构建和晶体生长，能够制备物相均匀、纯度高、晶型完整、单分散、形状尺寸可控的纳米结构。并且反应在密闭容器中进行有利于有毒体系中产物的合成。溶剂热法是在水热基础上，以有机溶剂代替水溶液，扩展了在新的溶剂体系中设计新颖的合成路线的思路。同时，某些胺类溶剂还能发挥络合剂和模板作用，在合适的反应条件下能够很好地控制纳米产物的形貌、尺寸及分布。使用水热/溶剂热制备低维纳米晶是近 10 年来发展最迅速的制备手段，大量研究人员对此投入了极大的热情。钱逸泰院士^[65-69]及其合作者将该方法广泛用于制备各种氧化物、硫属化合物、氮化物、磷化物及金属等，成功制备了各种纳

米粒子、纳米棒、纳米线。李亚栋教授^[70-72]进一步将此工艺发挥到极致，合成的低维纳米材料涵盖了各种无机材料。但是水热和溶剂热法也存在明显的不足，比如产率低，纯度差，在形貌尺寸及分布上还有待进一步改进，而且机理研究远远落后于实验研究，其中复杂的反应机制还并不是很明确。

1.2.5 表面修饰

Wulff或Gibbs-Curie-Wulff晶面理论被认为是晶体生长形貌控制的经典理论，根据该理论思想，晶体生长形貌受控于各晶面表面能。在平衡态，晶体形貌往往向最能降低体系表面能的形状生长，由此，晶体形貌反映出晶体结构的对称性。而且，形貌还反映出晶体生长动力学，生长较快的晶面往往会因为其它生长较慢的晶面的限制而逐渐消失，使得暴露表面一般是生长最慢的晶面。因此采用表面修饰剂将某些特定晶面进行修饰能够从动力学角度对晶体形貌进行控制。在制备半导体硫属化合物中广泛使用的胶体法是依此类指导思想的典型例子。胶体法利用 TOPO 的限制作用，通过控制反应动能实现对纳米粒子形貌的有效控制。Alivisatos^[73,74]和 Xiaoguang Peng^[75,76]及其合作者在这方面进行了大量的研究工作，成功制备了各种形貌的 CdSe 纳米晶，包括棒状、箭头状、二叉、三叉形、三角形等相貌的纳米晶，并对形貌控制生长机理研究进行了卓有成效的尝试。Xiaoguang Peng 等^[76]研究发现 CdSe 纳米晶生长受控于扩散机制，基于纯平衡热力学的 Wulff 理论在此时已经不再适用。反应溶液的单体浓度对晶体形貌有着显著影响，在一定反应体系中，所需单体浓度的大小按以下次序依次升高：点状，米粒形状、棒状及分叉状结构。提高溶液中剩余单体浓度，颗粒晶体有向一维方向生长的趋势；相反，如果剩余单体浓度不够高，一维生长的晶体也会重新生长成点状颗粒晶体。Xiaoguang Peng 提出魔法尺寸“magic size”的概念，指出在形核过程中往往出现一些能量低于正常形核能量的纳米团簇，它具有单分散的径向尺寸，因此如果控制反应体系只产生一种类型的“魔法尺寸”的纳米团簇，就能使棒状纳米晶的径向尺寸几乎维持在一恒定值。“魔法尺寸”的出现还可以解释在更高单体浓度下形成的多臂和分叉纳米晶结构。通过试验观察发现，不管形貌如何，CdSe 枝晶的内核具有闪锌矿结构籽晶提供足够的单体，使其在四个(111)晶面完全生长出枝晶。而一般高浓度单体溶液只能提供一个方向的枝晶生长而呈一维生长，最终产物为棒状。修饰剂一般选择一些具有较大分子量的聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)等。Younan Xia 等^[77]利用 PVP 作修饰剂，采用多元醇方法成功制备了 Ag 纳米线和立方纳米晶。观察发现立方纳米晶六个暴露表面为{100}面，因为面心立方{111}生长速度明显快于{100}晶面，导致生长

过程中逐渐消失,仅发现{001}晶面夹角之间尚存小面积的{110}晶面棱。所制备的 Ag 纳米线的轴向是{111},这种结构的产生的关键因素是{100}晶面和{111}晶面与 PVP 分子具有不同的作用力, PVP 分子大量吸附在{100}晶面,从而极大地抑制该方向的生长,从而促进沿[111]方向快速一维生长^[78,79]。他们通过类似的方法同样实现了对 Pt^[80]和 Pb^[81]等金属单质的形貌控制合成。这种对不同晶面的表面修饰,从动力学角度控制某一个晶面生长的思路在使用 CTAB 导向制备 Au 纳米棒的试验中也得到了验证^[82]。虽然大量实验证明高分子聚合物或者表面活性剂能够选择性的吸附在无机纳米晶的不同晶面,但是理论研究远远落后于实验合成,很多还处在假设推测阶段,需要更加细致的从微观入手研究不同晶面吸附的确切机制。

1.3. 纳米材料表面的修饰

纳米粒子具有较大的比表面积、较高的活性,在其制备和应用过程中很容易聚集或团聚,从而影响了材料的质量和性能。为了防止这种弊病,一般对纳米粒子进行表面改性。纳米粒子的表面改性已成为纳米材料研究开发中的一个极其重要的课题。纳米粒子的表面改性就是对其进行新的加工,使其表面特性发生较大的改变,从而赋予其新的功能。表面改性的目的包括以下几个方面:(1)改善或改变纳米粒子的分散性;(2)改善耐久性,如耐药、耐光、耐热性;(3)提高颗粒表面的活性;(4)使颗粒表面产生新的物理、化学和机械性能及新的功能。纳米粒子表面改性的方法很多,分类方法也很多。根据表面改性剂与颗粒间有无化学反应,大概可以分为表面化学改性和表面物理改性两大类。

1.3.1 纳米颗粒表面物理修饰

总的来说,表面物理修饰就是通过吸附、涂敷、包覆等物质作用对微粒进行表面改性。利用紫外线、等离子射线等对粒子进行表面改性也属于物理修饰。表面物理修饰主要有以下两种方法。

通过范德华力等将异质材料吸附在纳米微粒的表面,可防止纳米微粒的团聚。采用表面活性剂对无机纳米微粒表面的修饰就是属于此类方法。液相法制备纳米粉体过程中存在的最大问题是粉体的团聚,研究表明粉体中硬团聚的存在,会导致烧制陶瓷时需要较高的烧结温度和得到较差的制成品性能,并影响功能材料的性能。无机纳米粒子在水溶液中分散,表面活性剂的非极性亲油基吸附到微粒表面,而极性的亲水基与水相容,这就达到了无机纳米粒子在水中分散性好的目的。反之,在非极性的油性溶液中分散纳米粒子,表面活性剂的极性官能团吸

附到纳米微粒表面,而非极性的官能团与油性介质相溶合。例如,以十二烷基苯磺酸钠为表面活性剂修饰纳米 Cr_2O_3 , Mn_2O_3 ^[83]这些纳米粒子能稳定地分散在乙醇中。胡金华等^[84]人以 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 吸附硬脂酸钠或油酸钠等,可使亲水性的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 转变为亲油性,从而能改善其在聚丙烯中分散性和复合材料的机械力学性能。

表面沉积法是将一种物质沉积到纳米微粒表面,形成与颗粒表面无化学结合的异质包敷层。利用溶胶可以实现对无机纳米粒子的包敷,例如将 ZnFeO_3 ^[85]纳米粒子放入 TiO_2 溶液中, TiO_2 溶胶沉积到 ZnFeO_3 纳米粒子表面,这种带有 TiO_2 包敷层的 ZnFeO_3 纳米粒子的光催化效率大大提高了。用 Al_2O_3 包敷 TiO_2 纳米粒子也属于这一类方法。具体过程是,先将纳米 TiO_2 粒子分散在水中,加热至 60°C ,用浓硫酸调节pH值到1.5-2.0,同时加入铝酸钠水溶液,结果在纳米 TiO_2 粒子表面形成了 Al_2O_3 包敷层。这种方法可以举一反三,既可包敷无机 Al_2O_3 ,也可包敷金属。

1.3.2 纳米颗粒表面化学修饰

通过纳米微粒表面与改性剂之间进行化学反应,改变纳米微粒的表面结构和状态,以达到表面改性的目的称为纳米微粒的表面化学修饰。表面化学修饰法在纳米微粒表面改性中占有极其重要的地位,例如在解决液相法制备纳米粉体的关键问题,即防止微粒发生团聚的问题时,采用化学表面改性法,在制备过程中通过添加各种表面改性剂与颗粒表面进行化学反应,改变颗粒的表面状态。当进行干燥时,由于其吸附或键合在颗粒表面,降低了表面基团的作用力,消除了颗粒间的氢键作用,阻止氧桥键的形成,从而防止了硬团聚的发生。当温度升高到一定程度时,改性剂分解成气体放出,留下松散未硬团聚的纳米粉体。表面化学修饰是纳米粉体获得有效应用的重要措施,是纳米粉体材料研究与开发中的基础性研究课题。

由于纳米微粒比表面积很大,表面原子配位不全导致悬挂键大量存在,使这些表面原子具有很高的反应活性,极不稳定,很容易与其它原子配合,这就为人们利用化学反应方法对纳米微粒表面修饰改性提供了有利条件。对于表面改性过程中所使用的修饰剂通常为一些典型的表面活性剂,而工业萃取剂由于具有较高的表面活性,也可用来做修饰剂。表面活性剂分子一般由极性基和非极性基组成,因其具有双亲性而得到广泛的研究和应用。表面活性剂通常被分为阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、两性表面活性剂和非离子表面活性剂。目前已受到研究者关注的可用于无机纳米颗粒表面修饰的表面活性剂主要包括:有机酸(盐)、有机胺、有机硫磷酸(盐)、聚异丁烯丁二酰亚胺等。曾戎等^[86]采用水/十二烷基硫酸钠(SDS)/正己醇/环己烷微乳液体系制备了纳米银粒子,然后加入十

二硫醇，静置后得到十二硫醇修饰的纳米银粒子，发现十二硫醇修饰的纳米银粒子在溶剂如环己烷、甲苯和丙酮等有良好的分散性。邱孙青等^[87]用十二烷基硫酸钠/异辛醇/水微乳化体系制备的Cu粒子分别分散于含有T154(聚丁二酞亚胺)，T101(石油磺酸钙)Aliquet 336(甲基三烷基氯化铵)的500 SN基础油中，结果表明，混合使用分散剂能得到更好的实验效果。何峰等^[88]分析了单分散粉末颗粒和超细金属粉末在液体中实现稳定分散和悬浮的条件，结果表明未加包覆的粉末难以在液相中稳定存在，而表面包覆的超细金属粉末在吸附层厚度大于5 nm 时，由于粉末表面吸附层产生的空间位阻效应，能在有机溶剂中实现稳定悬浮。

萃取剂也具有两亲性，其界面化学性质与表面活性剂非常类似。根据萃取剂的分子结构和萃取机理，萃取剂可分为酸性萃取剂(皂化)、胺类萃取剂(盐化)及中性萃取剂，它们分别类似于阴离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂及非离子型表面活性剂^[89]。萃取界逐步从理论和实验上证实了萃取有机相可以形成 W/O 型反胶团或微乳液，水相可以形成 O/W 型正胶团或微乳液。萃取体系的第三相可与表面活性剂体系的中相微乳液相类比。萃取剂具有对纳米粒子的表面改性作用，Song^[90]等用萃取还原法在有机溶剂中直接制备了含 HDEHP (二(2-乙基己基)磷酸)修饰的 Cu 纳米粒子。他们认为萃取剂由于具有高的表面活性而吸附于纳米粒子表面，提高了纳米粒子的稳定性，同样起到了表面修饰的作用。

我们课题组分别用单硫代磷酸萃取剂 Cyanex 301 和 Cyanex 302 以及与两亲嵌段共聚物 PEO-PPO-PEO 共同作为修饰剂在直接有机溶剂中采用一步反应法(包括萃取还原、萃取沉淀法)制备了大量高负载量的有机纳银流体，并详细分析了其中纳米粒子在不同溶剂中的最大含量，其中 Cyanex302 用作萃取剂和表面修饰剂来制备金属银或金属硫化物纳米 Bi₂S₃ 流体^[91]。含 2 个硫原子的 Cyanex301 显示出对银纳米颗粒更好的表面修饰作用，不需要任何添加剂，汽油中 Ag^[92]和 Ag₂S^[93]粒子的最高负载量均很高，所制备的纳米流体几个月后仍无沉淀析出。

1.4 硒化物纳米材料的制备

硒化物是一类重要的半导体材料，广泛用作各种发光装置、激光与红外探测器件、红外窗口与非线性光学材料、光催化和光敏传感器材料等。在发光材料、太阳能电池、红外光窗口材料、光纤通讯、现代热电制冷机等多方面有良好的商业应用前景。

但是硒化物的合成显得相对不足，这主要是因为可供选择的硒源相对较少。硒与硫同属于氧族元素，与硫化物相对应的硒化物在常规条件下大多不稳定，毒性较大，而且伴随着恶臭气味，致使合成条件要求苛刻，一般要求在保护气氛或

密闭反应室内进行，不利于大规模推广。虽然硒化物的合成方法经过长期实践和发展也是种类繁多，但是主要使用的硒源还是局限于Se和 Na_2SeSO_3 ，与硫源相对应的 H_2Se 、 CSe_2 及有机物合成难度较大， Na_2Se 见光易分解析出单质Se，这些硒源的获得都有较大困难。在此，我们将以硒源的不同进行分类对硒化物的液相化学控制合成进展进行概述。

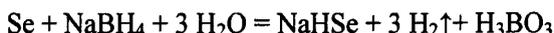
由于常见硒源反应活性较低，为了解决这个问题，实验中经常使用有机金属化合物或者有机硒化物来提高反应活性，这些反应一般都是在有机溶剂中进行。在经典的胶体法制备硒化物的实验中，单质Se溶于TOPO或者TBP中形成有机前驱物，在高温溶液反应中逐渐分解，以比较恒定的速率释放Se，是一种比较理想的硒源。Alivisatos^[94-96]和Peng^[97,98]等大量使用此工艺合成多种硒化物纳米晶，并且体现出良好的形貌可控性。所合成的纳米晶表面包裹一层TOPO等有机物，存在较多的活性基团，能够通过基团交换很好地溶于其它不同极性的溶剂中，这样就可以根据需要详细地研究半导体纳米材料的各种光学性质以及可能存在的应用前景，具有非常重要的理论和实际意义。

使用金属单质与元素硒直接反应是最早使用的方法，钱逸泰院士及其合作者在元素直接反应合成硫化物的基础上以Se粉与金属粉末为原料在乙二胺介质中采用溶剂热法成功合成多种硒化物纳米棒和纳米颗粒^[99,100]。研究表明，选用合适的溶剂和控制一定的反应温度对产物的尺寸、形貌和分布有着重要影响。使用胺类有机溶剂主要是因为它们对Se及各种过渡金属离子有很强的络合能力，形成络合有机前驱物，并在随后的高温溶剂热环境中分解脱除有机物质。当然，提供有机物分解的能力来源多样化，比如可以采用超声波、微波加热、射线辐射等，由此衍生出相应的合成方法。但是这些体系合成的硒化物形貌上更多的是随机性的，研究人员并不能很好地控制纳米晶的生长。Se的化学惰性使研究者在合成硒化物之前必须将单质还原成 Se^{2-} ，因此使用强还原剂也是经常使用的方法，如 $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、 NaBH_4 、 KBH_4 等^[101,102]。直接采用还原剂将Se在溶液中还原成 Se^{2-} 还能够避免直接使用 Se^{2-} 时由于 Se^{2-} 不稳定带来的Se沉淀副产物，提高产物纯度。其中 $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 可以既做还原剂又做溶剂，直接溶解热合成硒化物。由于反应是释放出 N_2 ，特别在密闭反应容器中相当于施加保护气体，能够获得更加纯净的硒化物晶体。Zhang^[103]和Wang^[104]等利用Se与NaOH的歧化反应将Se溶于强碱溶液释放出 Se^{2-} ，通过液相法成功合成了多种硒化物，包括 CdSe 、 PbSe 、 Ag_2Se 、 CoSe_2 、 Cu_{2-x}Se 和 SnSe 等。同时为了防止在碱性条件下金属氢氧化物沉淀的析出，适当地添加配合剂也是不可缺少的，通过配合成配合离子如 $\text{M}(\text{EDTA})^{2+}$ ，减缓金属离子的释放速度。 Na_2SeSO_3 作为硒源最早用作化学沉积和电沉积制备各种硒化物薄膜，是一种良好的可溶性硒源。Gary Hodes等^[105,106]以 Na_2SeSO_3 为硒源通过化学沉积制备

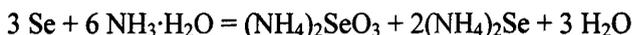
了PbSe和CdSe薄膜，根据 Na_2SeSO_3 在碱性条件下能够释放出 Se^{2-} ，为防止金属氢氧化物的析出，选择合适的配合剂对于薄膜的沉积质量尤为重要。常用配合剂有TSC、NTA和 $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 等。

综上所述，我们可能用的硒源主要有以下几种：

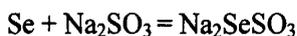
1. 用硒粉和强还原剂反应，如 $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、 NaBH_4 和 KBH_4 等，制得 Se^{2-} 。反应如下：



2. 硒粉和碱性溶液发生歧化反应，如氨水，乙二胺等，制得 Se^{2-} 。反应如下：



3. 硒粉和亚硫酸钠溶液反应，制得硒代亚硫酸钠，即 Na_2SeSO_3 。反应如下：



4. 亚硒酸 H_2SeO_3 和亚硒酸钠 Na_2SeO_3

1.5 半导体纳米粒子在 DNA 标记中的应用

随着基因结构与基因功能研究的不断深入，特别是“人类基因组项目”的快速进展，已迅速推动人类疾病的DNA诊断及基因治疗的研究，发现及鉴定了大量致病基因。由于基因DNA分子序列中微小改变，导致基因突变及多态性，如一个或几个核苷酸的取代、缺失或插入DNA序列，就会导致遗传性状的改变或各种疾病的出现。因此，通过对人体的血液、组织、体液等样品中特定DNA序列的测定，可用来确证感染疾病的根源。通过检测与疾病有关的基因变异，将对基因筛选、药物的研制与开发、食品及环境污染的控制和在分子水平上对遗传疾病进行诊断和治疗产生十分深远的意义。

传统的DNA杂交分析以放射性同位素作标记，通过放射自显影进行测定。这种方法虽然灵敏度高，但由于使用放射性同位素，操作又费时费力，自20世纪80年代以来已逐渐被一些非放射性标记的其他方法如荧光法、化学发光法、电化学法等所取代。其中利用电化学原理检测基因的DNA电化学生物传感器是一种新的基因检测技术。与传统的同位素标记DNA技术方法相比，它具有快速、灵敏、操作简便、无污染的特点，不仅具有分子识别功能，而且还有无可比拟的分离纯化基因的功能，因此，在分子生物学和生物医学工程领域中有着很大的实际意义。

纳米技术的出现为纳米材料在分析化学领域的发展和應用开辟了新的思路。纳米粒子由于其独特的物理和化学性质，使其在纳米科学领域受到广泛的重视，同时也推动了化学和生物传感器的迅速发展。半导体纳米量子点有望在生物科学中得到广泛应用。纳米粒子的性质与生物杂交反应和电检测过程结合，使其应用范围更加广阔（例如纳米生物电子）。其中利用生物分子形成纳米结构或者对纳

米粒子修饰引起人们很大的兴趣。纳米粒子生物连接可能用于DNA疾病的诊断,并且对生物分析化学产生巨大的影响。尽管有很好的发展前景,但基于纳米粒子的基因检测还处于初级阶段。

半导体纳米粒子,也叫做半导体纳米晶或量子点,是由半导体材料制成的稳定的、溶于水的、尺寸在 2~20nm 之间的纳米晶体,常见的有 ZnS、CdS、PbS 等;半导体纳米粒子在电化学 DNA 生物传感器的研究中也得到应用。Wang^[107]利用纳米 CdS 标记的 DNA 探针和吸附在磁性微粒上的待测 DNA 杂交后,利用磁场作用将其分离,电化学溶出法检测 Cd^{2+} ,大大降低了目标 DNA 的检测限,可达 $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Fang 等^[108]将纳米 CdS 标记寡核苷酸作为探针,以滴汞电极上阴极溶出镉的电化学信号作为分析信号,进行 DNA 序列的检测,互补 DNA 的检出限可达 $0.2 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Wang^[109]利用电化学译码技术(coding technology),结合 CdS、ZnS 和 PbS 三种纳米粒子的电化学溶出检测,同时测定多个 DNA 目标分子。磁性微粒上标记多个不同的单链 DNA 序列,与不同纳米粒子标记的探针杂交后,酸性条件下化学法溶出金属离子,利用阳极溶出伏安法在不同电位下检测多个不同的 DNA 序列,为多种 DNA 的序列检测提供了一个新思路。

1.6 本课题的提出和研究内容

纳米材料是科学中发展最迅速的分支,是尖端材料科技的最典型代表。纳米颗粒的比表面积大、表面反应活性高、催化效率高、吸附能力强等优异性质,为生物医学研究提供了新的研究途径,同时也推动了化学和生物传感器的迅速发展。纳米粒子的独特性质与生物分子杂交反应的特异性和电化学检测方法的高灵敏性相结合,使其应用范围更加广阔(例如纳米生物电子)。纳米粒子与生物分子连接用于 DNA 疾病的诊断,对生物分析化学将产生巨大的影响。

本论文的目的就是采用水热/溶剂热反应合成硒化物纳米粒子,在制备过程中通过对纳米粒子表面改性,提高纳米粒子的亲水性和生物相容性,利于 DNA 在纳米粒子表面的固定。利用无机半导体量子点标记和纳米粒子修饰电极,将制备的硒化物纳米粒子用于新型电化学 DNA 生物传感器。

主要包括:

- (1) 以高分子聚合物聚乙烯吡咯烷酮为配位剂及修饰剂,水热反应合成了单分散的 Ag_2Se 纳米粒子,并做为标记物用于 DNA 电化学检测。
- (2) 以表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵为修饰剂,水热反应合成了 PbSe 纳米粒子,并做为标记物用于 DNA 电化学检测。
- (3) 以生物分子谷氨酸作为配位剂及表面修饰剂,水热反应合成了球形

ZnSe纳米晶，并作为标记物用于DNA电化学检测。

第二章 水热合成法制备单分散硒化银纳米粒子

及其在生物电化学中的应用

硒化银 (Ag_2Se) 具有很多有用的性质, 一直备受人们关注。高温相硒化银以 $\beta\text{-Ag}_2\text{Se}$ 形式存在, 是一种超离子导体, 用于光电二次电池中的固体电极材料。低温相 $\alpha\text{-Ag}_2\text{Se}$ 具有较窄的带隙, 作为光敏剂广泛应用于光学材料和热色材料领域^[110-111]。近几年来, 硒化银越来越引起研究人员的关注, 并利用不同的化学或物理方法, 合成了具有不同显微结构的硒化银, 例如真空蒸发法, 化学沉积法, 溶剂热法, 声化学法, 由 Ag 或 Se 粒子作为模板反应法等^[112-120]。

在纳米生物技术发展研究领域, 半导体量子点 (QDs) 与生物材料相结合形成的混合系统越来越受到关注^[121]。最近的研究表明纳米粒子可被用于多种电化学生物检测。Wang^[122-124]等人用碳纳米管负载 CdS、ZnS 和 PbS 作为标记物来检测 DNA 杂交。Fang^[125, 126]等人利用 CdS 和 PbS 作为标记物用于电化学溶出检测 DNA 杂交, 检测限可达 $10^{-13} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。除了溶出技术以外, 电化学交流阻抗谱也可用于 DNA 杂交检测^[127]。但是目前所报道的除了以 RNA-CdSe 结合物作为探针检测小干扰 RNA (siRNA) 以外^[128], 大部分标记物用的都是硫化物, 这是因为硫化物在湿法合成中易得到。使用硒化物作为 DNA 探针标记物的报道目前还较少。

本文以 AgNO_3 , KI, PVP 形成的 $[\text{PVP}(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)}$ 配合物为前驱体, 利用水热法合成了单分散的、形貌良好的、具有亲水特性的 PVP 修饰的 Ag_2Se 纳米粒子, 并将其作为 DNA 探针的标记物用于电化学溶出检测 DNA 杂交。用该方法对对互补序列、三碱基错配及非互补序列 DNA 的控制表明, PVP 修饰的 Ag_2Se 对互补的 20 碱基 PEP 基因片段具有很好的选择性, 其检测的线性范围为 $1.0\times 10^{-12}\sim 1.0\times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测限为 $2.3\times 10^{-13} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1 实验部分

2.1.1 实验仪器和试剂

仪器:

JEOL-2000EX 型透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司); JSM-5600LV 低真空扫描电子显微镜 (日本电子光学公司); D/Max r-B 型转靶 X 射线衍射仪 (日本理学公司); PHI5702 型多功能 X 射线光电子能谱仪 (XPS, 美国 物理电子公司);

UV-vis 756 CRT 紫外-可见分光光度仪 (上海); CHI832 电化学分析仪 (上海辰华仪器公司); 三电极系统: 银-氯化银电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 碳糊电极为工作电极; Cary 50 型紫外-可见分光光度计 (澳大利亚 Varian 公司); 510P 型红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司); TGL-16C 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); 79-1 型磁力加热搅拌器 (江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); GSY-II 电热恒温水浴锅 (北京市医疗设备厂), KQ-50B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 202-1AB 型电热恒温干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); 玻碳电极用于铅的阳极溶出法测定。

试剂:

硒粉 (Se, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 硝酸银 (AgNO_3 , 上海化学试剂总厂); 碘化钾 (KI, 天津市北方天医化学试剂厂); 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, 济宁市化工研究所); 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, 分子量 10000); HAC-NaAc 缓冲溶液 (pH 5.4); $2\times\text{SSC}$ 缓冲溶液 ($0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠- $0.03\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠) 作为杂交液; 铁氰化钾 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 天津市瑞金特化学品有限公司); 亚铁氰化钾 ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 上海亨达精细化学品有限公司); 石墨粉 (上海胶体化工厂, 粒度 $\leq 30\mu\text{m}$); 高效切片石蜡 (上海华灵康复器械厂); 0.2 % 的十二烷基硫酸钠 (SDS, 上海亨达精细化学品有限公司); 亚甲紫 (MV, 北京化工厂); $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.0 的 Britton-Robinson(B-R)缓冲溶液作为反应的支持电解质; 所用试剂均为分析纯, 所有溶液均为 Aquapro 超纯水 (电阻率 $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, 由 Aquaplus AWL-1002-P 制备, 颐洋企业发展有限公司) 配制。

检测 PEP 基因片段的材料: 20 碱基目标 DNA 序列 (Target ssDNA, 即 PEP 基因序列中的 20 碱基片段, 也即本文中的 DNA 探针的互补序列 cDNA), 寡核苷酸探针 (Probe ssDNA), 3 碱基错配序列 (3-base mismatch DNA) 和非互补序列 (ncDNA), 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。以上 DNA 序列如下:

Probe NH_2 -ssDNA: 5'- NH_2 -CAG CAC CTA GGC ATA GGT TC -3'

Target ssDNA: 5'- GAA CCT ATG CCT AGG TGC TG -3'

ncDNA: 5'-TGC GAT AAA GGA AAG GCT AT-3'

3-Base mismatch DNA: 5'- GAG CCT CTG CCG AGG TGG TG -3'

2.1.2 Ag_2Se 纳米粒子的制备与表征

称取 0.395g 硒粉和 1.26g 亚硫酸钠, 加入 50mL 水中, 加热到接近沸腾, 待溶液变为无色后加盖密封避光保存, 得到 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硒代亚硫酸钠 (Na_2SeSO_3) 溶液。

取 0.5g PVP 加入到装有 27.5mL 去离子水的锥形瓶中, 室温条件下磁力搅拌, 待 PVP 完全溶解后加入 5mL KI 溶液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 搅拌一段时间后得到浅黄色溶液, 再加入 5mL AgNO_3 溶液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 持续搅拌, 溶液颜色略显不透明呈乳胶状。待溶液稳定后, 滴加 2.5mL Na_2SeSO_3 溶液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。随着 Na_2SeSO_3 溶液的加入, 溶液颜色逐渐加深, 最终得到黑褐色溶液。上述溶液共计 40mL, 此时 PVP 浓度为 $12.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Ag^+ 的浓度是 $0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, I^- 的浓度是 $0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SeSO_3^{2-} 的浓度是 $0.00625 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。稳定一段时间后, 把 40mL 上述溶液转移至容积为 50mL 的内衬聚四氟乙烯的不锈钢反应釜中, 在温度 180°C 下, 水热反应 20h。待反应釜冷却到室温后, 取出产物离心分离, 用去离子水和乙醇分别洗涤三次, 干燥即得黑褐色的 Ag_2Se 粉末, 记为样品 1。恒定反应温度, 改变反应物的浓度和反应时间以观察它们对产物形貌的影响。具体实验条件与产品标号列于表 2-1。

表 2-1 水热法 180°C 制备 Ag_2Se 的实验条件汇总

Table 2-1 Experimental conditions of Ag_2Se nanoparticles prepared via hydromatheral route at 180°C

Sample number	PVP/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	KI/ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$[\text{Ag}^+]:[\text{I}^-]$	Reaction time/(h)
1	12.5	0.0125	1:1	20
2	7.5	0.0125	1:1	20
3	2.5	0.0125	1:1	20
4	12.5	0.033	3:8	20
5	7.5	0.033	3:8	20
6	2.5	0.033	3:8	20
7	12.5	0.033	3:8	48
8	12.5	0.0375	1:3	20
9	7.5	0.0375	1:3	20
10	2.5	0.0375	1:3	20

注: 在所有的样品中, AgNO_3 和 Na_2SeSO_3 的浓度始终是 $0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.00625 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

分别使用 XRD, TEM, SEM, EDS, XPS, FT-IR, UV-Vis 等对制备的 Ag_2Se 进行了表征。

2.1.3 电化学检测

取 0.5 mL 在水中分散的 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Ag_2Se 加入到 $300 \mu\text{L}$ $1.0\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的探针 ssDNA 的水溶液中, 室温下搅拌反应过夜。将该反应物在 $10,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心分离 30 min, 用水洗涤沉淀物, 再离心分离, 其沉淀即为 Ag_2Se -DNA 探针结合物。 Ag_2Se 与 DNA 探针的结合是因为 Ag_2Se 表面修饰的 PVP 上的 $-\text{C}=\text{O}$ 与 DNA 5' 端上的 $-\text{NH}_2$ 形成了氢键。

将石墨粉和固体石蜡按 3:1 (m/m) 制成碳糊电极 (CPE), 室温下把 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB 滴在打磨光滑的碳糊电极表面, 使其表面不要风干, 保持 2 h, 然后用二次水洗净, 得到 CTAB 修饰电极, 记为 CTAB/CPE。

将目标 DNA 滴在 CTAB/CPE 表面, 使其表面不要风干, 保持 1 h, 然后用二次蒸馏水清洗, 即得到目标 DNA 修饰电极, 记为 target DNA/CTAB/CPE。

将 target DNA/CTAB/CPE 放入含有 Ag_2Se -DNA 探针的杂交缓冲溶液 ($2 \times \text{SSC}$) 中, 40°C 水浴中反应 30 min; 用二次水和 0.2% 的 SDS 溶液洗涤电极 3 次以除去未杂交的 Ag_2Se -DNA, 所得电极记为 Ag_2Se -dsDNA/CTAB/CPE。

将上面的电极置于 $100 \mu\text{L}$ $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HNO_3 液中, Ag_2Se 立刻氧化溶解。向其中加入 pH 5.4 的 HAc-NaAc 缓冲溶液 2.0 mL 作为支持电解质, 将玻碳电极放入上述待测溶液中在搅拌条件下于 -0.5 V 恒电位预还原 150 s, 然后从 $-0.4 \sim 0.4 \text{ V}$ 记录微分脉冲阳极溶出伏安曲线, 在约 0.016 V 得到银的阳极溶出伏安峰。

2.2 结果与讨论

2.2.1 单分散 Ag_2Se 的制备与表征

2.2.1.1 TEM 和 SEM 表征

Ag_2Se 样品 1 的透射电镜 (TEM) 和扫描电镜 (SEM) 图像示于图 2-1a 和 2-1b 中。产品为长约 60~80 nm, 宽约 30~40 nm, 单分散大米状微粒, 产品分散均匀, 无团聚。图 2-1c 和图 2-1d 分别是样品 2 ($\text{PVP } 7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KI } 0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{AgNO}_3 \text{ } 0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和样品 3 ($\text{PVP } 2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KI } 0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{AgNO}_3 \text{ } 0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的透射电镜图。其中在 KI 和 AgNO_3 浓度不变的条件下, PVP 的浓度由样品 1 的 $12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 变为样品 2 的 $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和样品 3 的 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与样品 1 的形貌相比较, 样品 2 和样品 3 的形貌是直径在 30~60nm 和 10~30nm 的球形粒子。说明较高浓度的 PVP 是纳米粒子的尺寸增大, 并利于粒子的形貌生长成大米粒形。

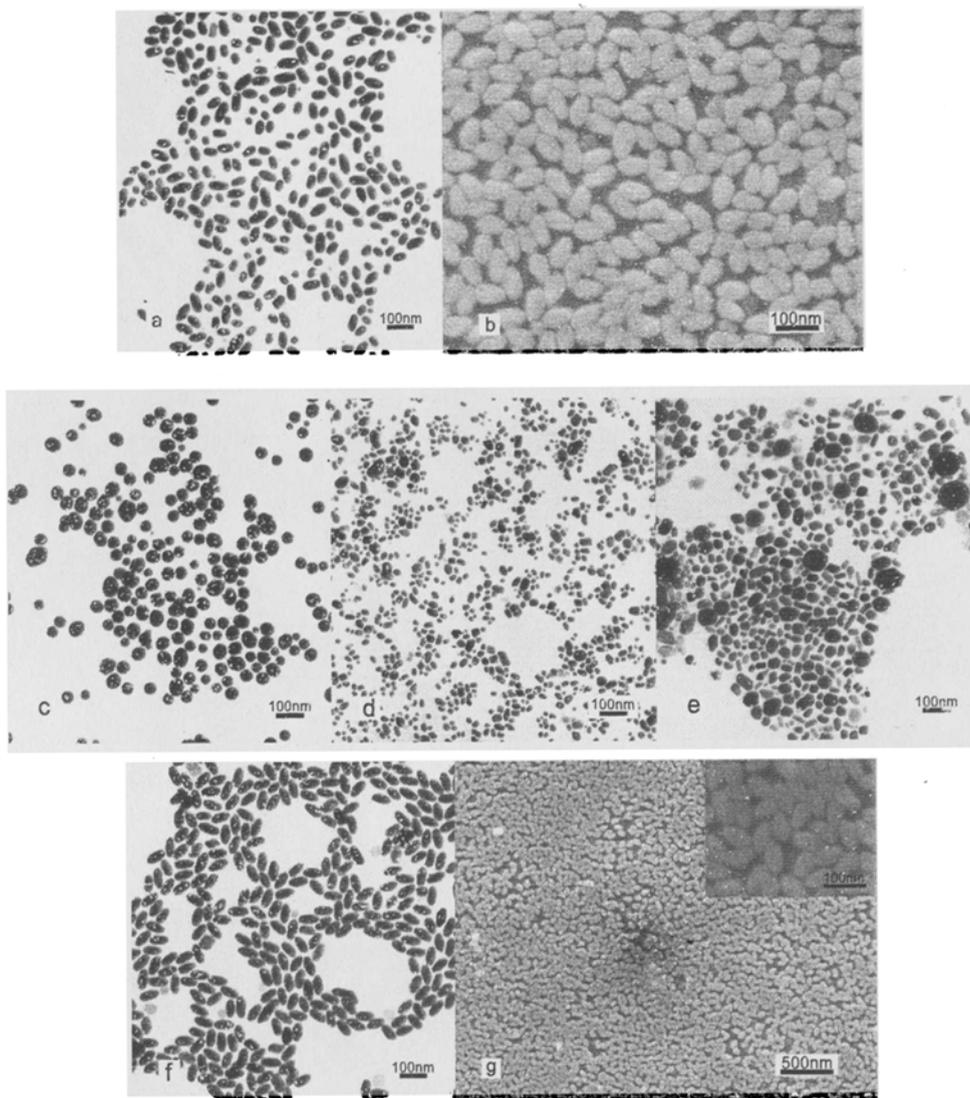


图2-1 Ag_2Se 纳米粒子的TEM和SEM图, (a)样品1的TEM图; (b)样品1的SEM图;
 (c)样品2的TEM图; (d)样品3的TEM图; (e)样品4的TEM图;
 (f)样品7的TEM图; (g)样品7的SEM图

Fig.2-1 TEM and SEM images of Ag_2Se nanoparticles: (a) TEM of sample 1;
 (b) SEM of sample 1; (c) TEM of sample 2; (d) TEM of sample 3;
 (e) TEM of sample 4; (f) TEM of sample 7; (g) SEM of sample 7.

保持其他反应条件不变, 而只改变增加 KI 的量, 使物量比 $[\text{Ag}^+]:[\text{I}^-]$ 为 3:8, 分别制备了样品 4 ($\text{PVP } 12.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{KI } 0.033 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AgNO}_3 \text{ } 0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 样品 5 ($\text{PVP } 7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{KI } 0.033 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AgNO}_3 \text{ } 0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 样品 6 ($\text{PVP } 2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{KI } 0.033 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AgNO}_3 \text{ } 0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。结果与 $[\text{Ag}^+]:[\text{I}^-] = 1:1$ 时相似, 产品的尺寸在 PVP 浓度为 $12.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 要大于 PVP 浓度为 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 但是球形

粒子并没有向大米粒形粒子生长的趋势。延长样品 4 的反应时间至 48 小时，得到样品 7，产品的形貌与样品 1 类似，透射电镜 (TEM) 和扫描电镜 (SEM) 图分别见图 2-1f 和图 2-1g。

2.2.1.2 样品的 XRD 表征

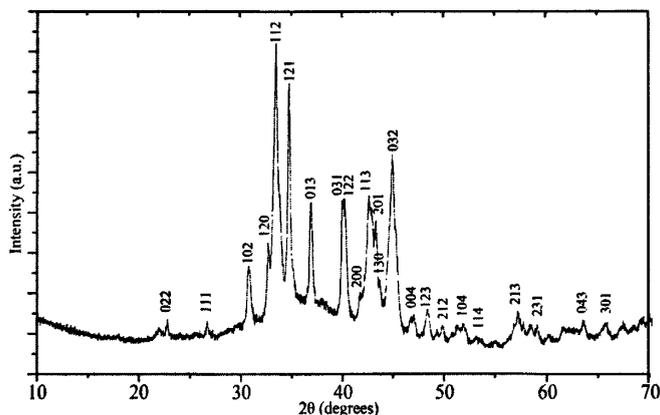


图2-2 Ag_2Se 样品1的XRD图

Fig.2-2 XRD pattern of Ag_2Se (sample 1)

样品 1 的 X 射线粉末衍射 (XRD) 峰示于图 2-2，其主要的衍射峰与 JCPDS 卡 No. 24-1041 很好的相对应。六条主要的强峰 $2\theta = 33.44, 34.64, 36.93, 39.91, 42.59$ 和 44.94 分别对应于 $\beta\text{-Ag}_2\text{Se}$ 的 (112), (121), (013), (031), (113) 和 (032) 晶面。通过 Debye-Scherrer 公式计算 Ag_2Se 纳米微晶的尺寸为 15nm。

2.2.1.3 样品的 EDS 表征

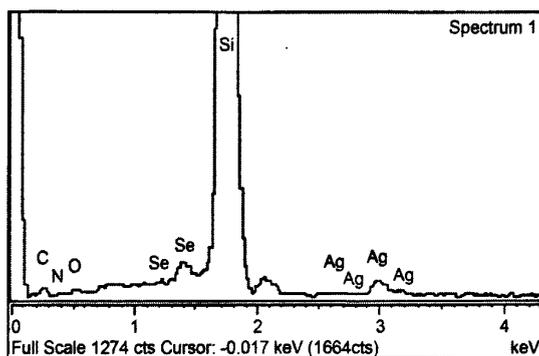


图2-3 Ag_2Se 样品1的EDS分析图

Fig.2-3 EDS pattern of Ag_2Se (sample1)

样品 1 的 EDS 检测结果示于图 2-3，结果显示元素 Se 和元素 Ag 的比例是

1:1.94 接近于 Ag_2Se 中元素 Se 和元素 Ag 的比例。还显示出有元素 C, N 和 O 存在于 Ag_2Se 粒子中, 证明即使经过去离子水和乙醇的多次洗涤, 仍有大量 PVP 吸附于粒子上。

2.2.1.4 样品的红外表征

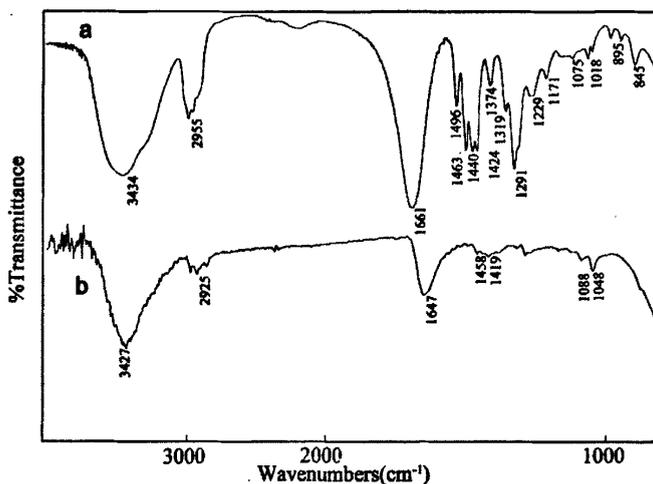


图2-4 PVP (a)和制备的 Ag_2Se 样品1 (b)的红外光谱图

Fig.2-4 FT-IR spectra of pure PVP (a) and as-prepared Ag_2Se (b) (sample 1).

样品 1 和纯 PVP 的红外吸收光谱示于图 2-4。在图 2-4a 中 1463 cm^{-1} 和 1424 cm^{-1} 规属于  的特征吸收峰, 在 1661 cm^{-1} 和 1018 cm^{-1} 的吸收峰分别归属于 PVP 中 C=O 和 C-N 的特征吸收峰。图 2-4b 是 Ag_2Se 的红外吸收光谱, 尽管吸收峰强度低于图 2-4a, 但是典型的 PVP 吸收峰均可在图 2-4b 中发现, 表明 Ag_2Se 上吸附有 PVP, 与 EDS 结果相一致。图 2-4a 与图 2-4b 相比较, 还可以发现 1661 cm^{-1} 红移至 1647 cm^{-1} , 说明 Ag_2Se 上吸附的 PVP 中 O 原子与 Ag_2Se 中 Ag 发生配位作用。纯 PVP 中 C-N 在 1018 cm^{-1} 处的特征吸收峰在 Ag_2Se 纳米粒子上分裂为 1048 cm^{-1} 和 1088 cm^{-1} , 予示 N 原子与 Ag_2Se 中也 Ag 也有化学结合。

2.2.1.5 样品的 XPS 表征

PVP 分子中的 N 原子被三个 C 原子包围, 为了证实 N 原子与 Ag 原子之间发生配位作用, 依次对纯 PVP 和 PVP-AgI ($\text{PVP } 12.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{I}^- 0.0125\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Ag}^+ 0.0125\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行了 XPS 分析, 示于图 2-5。

形成 PVP-Ag⁺、PVP-I 配合物，阻碍了 AgI 沉淀的生成。新生成的 AgI 也会被 PVP 包覆，生成 PVP-AgI 配合物。或者生成的(Ag_mI_n)^{(n-m)-} 和 AgI 由于 PVP 的保护会非常稳定，或者认为生成了[PVP-Ag_mI_n]^{(n-m)-} 和 [PVP-AgI]配合物。稳定的配合物前驱体的生成，显然有利于降低 Ag₂Se 晶核的生成速度。

2.2.1.7 紫外可见分光光度分析

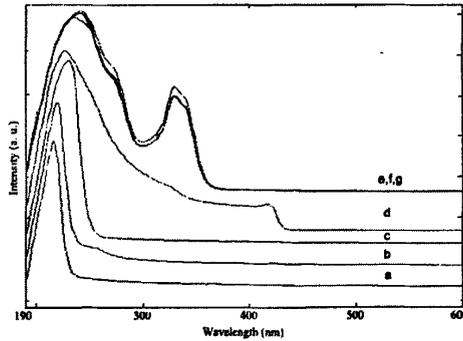
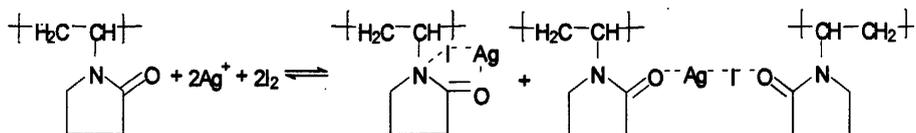


图2-6不同浓度条件下溶液的可见紫外光谱图a. PVP 7.5 g·L⁻¹; b. PVP 7.5 g·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹; c. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0125 mol·L⁻¹; d. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0125 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹; e. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0125 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹; f. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0375 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹; g. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0330 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹. (在溶液稀释50倍条件下测定)

Fig.2-6 UV-Vis absorption spectra of aqueous solutions a. PVP 7.5 g·L⁻¹; b. PVP 7.5 g·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹; c. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0125 mol·L⁻¹; d. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0125 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹; e. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0125 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹; f. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0375 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹; g. PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0330 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹. (All the solutions were diluted by 50 times)

本文对以下溶液如 PVP (7.5 g·L⁻¹), PVP-Ag⁺ (PVP 7.5 g·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹), PVP-I⁻ (PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0125 mol·L⁻¹) 和 PVP-Ag⁺-I⁻ (PVP 7.5 g·L⁻¹, KI 0.0125 mol·L⁻¹, AgNO₃ 0.0125 mol·L⁻¹)进行了紫外可见分光光度检测,示于图 2-6a、b、c 和 d。图 2-6a 中在 217 nm 处的吸收峰归属与 PVP 中 R₂N-C=O 的吸收。在图 2-6b、c 和 d 中,该峰分别红移至 223 nm、238 nm 和 232 nm 处。在图 2-6c 中,吸收峰 238 nm 并非源于图 2-6d 中 232 nm 处的吸收峰的红移,而归因于改吸收峰是 PVP-I⁻ 和 I⁻共同作用,因为纯 KI 在 226 nm 表现出 1.34×10⁴ L·mol⁻¹·cm⁻¹ 强摩尔吸光系数^[134]。在图 2-6d 中从 340 nm 到 420 nm 出现的吸收平台是黄色 AgI 粒子分散于 PVP 溶液中的可见光吸收,这是由于 PVP-(AgI)配合物的生成,AgI 可以以分子水平稳定的分散于溶液中。



不同物质质量比 $\text{Ag}^+:\text{I}^- = 1:2$ 、 $3:8$ 和 $1:3$ 的 $\text{PVP-Ag}^+:\text{I}^-$ 水溶液的紫外可见吸收光谱示于图 2-6e、f、g，三条吸收曲线基本一致。与其他吸收曲线相比，在 330nm 处出现一新的吸收峰，并迅速下降，认为是 AgI 与过量的 KI 结合生成 $\text{PVP-}[\text{Ag}_m\text{I}_n]^{(n-m)-}$ ，得到三组澄清溶液。

2.2.1.8 Ag_2Se 生长机理

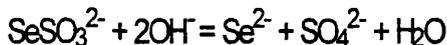
表征实验表明，PVP 浓度对纳米粒子的形貌及尺寸有重要影响。在 PVP 浓度是 $12.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下制备了大米粒状以及较大尺寸的 Ag_2Se 纳米粒子。PVP 在这里起到两个作用，既作为配位剂，又通过自身的碳原子长链缠绕在 $[\text{PVP-}(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)-}$ 、 $[\text{PVP}(\text{AgI})]$ 以及最终的 Ag_2Se 纳米粒子上起到保护作用。

当反应系统中存在少量的 PVP ($2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)，PVP 对 AgI 的配位及空位位阻的作用都较弱， Se^{2-} 可以轻易地与 Ag^+ 反应，同时生成大量的 Ag_2Se 晶核，使 Ag_2Se 最终尺寸较小。当 PVP ($7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 时，聚乙烯吡咯烷酮单体的配位作用及碳链的空间位阻作用，使 Ag_2Se 晶核的生成量减少，由此导致 Ag_2Se 最终尺寸变大。当 PVP ($12.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 时， AgI 同样与 PVP 发生配位作用，PVP 的空间位阻不仅使 Se^{2-} 不易进攻 Ag 的前驱物，而且 Ag_2Se 纳米晶体的生长具有一定的方向性。这归因于 Se^{2-} 对 AgI 的作用可能垂直于 N-Ag-I-O-C 的配位面， Ag_2Se 晶体向相对方向生长，从而生成了 $60\sim 80 \text{ nm}$ 长、 $30\sim 40 \text{ nm}$ 宽的米粒状 Ag_2Se ，例如样品 1 和样品 7。

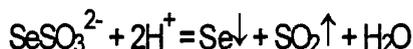
固定其他反应条件不变，只增加 KI 的量，使物质质量比达到 $[\text{Ag}^+]:[\text{I}^-]=1:3$ ，分别制备了样品 8 ($\text{PVP } 12.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{KI } 0.0375 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AgNO}_3 \text{ } 0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)，样品 9 ($\text{PVP } 7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{KI } 0.0375 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AgNO}_3 \text{ } 0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 样品 10 ($\text{PVP } 2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{KI } 0.0375 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AgNO}_3 \text{ } 0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。样品 8 的透射电镜显示，生成的 Ag_2Se 纳米粒子尺寸大于 100nm ，而样品 9 和样品 10 则有大量黄色 AgI 存在于 Ag_2Se 中。在进行水热反应之前， 40mL 反应液中 KI 和 AgNO_3 的量分别为 $1.5\times 10^{-3} \text{ mol}$ 和 $0.5\times 10^{-3} \text{ mol}$ ，按照 PVP 的分子量为 10000，一分子 PVP 中的单体数为 90 计算，样品 8、样品 9、样品 10 中 PVP 的物质质量分别为 $4.5\times 10^{-3} \text{ mol}$ 、 $2.7\times 10^{-3} \text{ mol}$ 和 $0.9\times 10^{-3} \text{ mol}$ ，所以样品 10 中单体的物质质量远低于 I^- 的物质质量。尽管在上述三个样品制备过程中没有 AgI 沉淀生成，但是在 180°C 条件下，PVP 对 I^- 的保护较弱，所以在样品 9 和样品 10 的最终产物中有 AgI 存在。

为了显示配合物在反应过程中所起到的作用，我们作了以下对比试验：其他

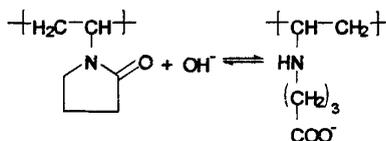
条件不变, 如果不加 KI, 水热反应前即会有大量的 Ag_2Se 生成; 如果不加入 PVP, 在水热反应前及最终产物中都有大量的 AgI 沉淀。试验过程中我们还注意到反应液酸碱度对最终产品的影响, SeSO_3^{2-} 在碱性条件下释放 Se^{2-} ,



如果反应液是酸性溶液, 将会有 Se 沉淀析出, 无法提供反应所需的 Se^{2-} 。



而碱性条件下则需要 pH 控制在 8~9 范围内。如果碱性过强, PVP 会在水热反应过程中发生水解反应, 失去对 AgI 配位及保护的作用:



总之, 本文通过新的配合物 $[\text{PVP}-(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)-}$ 或 $[\text{PVP}-(\text{AgI})]$ 在水热反应条件下与 Na_2SeSO_3 反应, 制备了 PVP 修饰的单分散 Ag_2Se 纳米粒子, 其中 PVP 的浓度及 Ag^+ 和 I 比例对控制最终产物的形貌及尺寸起到了关键作用。

2.2.2. 电化学探测目标 DNA

本文用 DNA/CTAB/CPE 传感器以微分脉冲阳极溶出伏安法对转基因植物 PEP 基因片段进行检测。分别将 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 20 碱基 PEP 基因片段、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 20 碱基的 3-碱基错配 DNA 序列和 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 20 碱基非互补 DNA 序列固定于 CTAB/CPE 电极表面, 然后分别按实验方法与 PEP 基因序列互补的 Ag_2Se 标记的 ssDNA 杂交, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 溶解, 再以玻碳电极对 HNO_3 溶解液进行微分脉冲阳极溶出伏安法测定, 并同时固定有 PEP 基因片段但未进行杂交反应的电极进行同样的测定, 结果示于图 2-7。曲线 a 为固定 PEP 基因片段进行杂交后所得的溶出伏安曲线, 在 0.016 V 得到溶解银的良好溶出峰。曲线 b 为三碱基错配的 DNA 序列的测定曲线, 其溶出峰较曲线 a 大为减小。曲线 c 为非互补 DNA 序列的测定曲线, 其溶出峰较曲线 b 又有明显减小, 与电极表面未固定 PEP 片段所测得的结果 (曲线 d) 相差不多。曲线 d 中较小的溶出峰为测定空白峰。从图 7 可知, 由此方法测定 PEP 基因片段具有很好的选择性, 可以很好地鉴别 PEP 基因片段和非互补 DNA 序列及三碱基错配 DNA 序列。

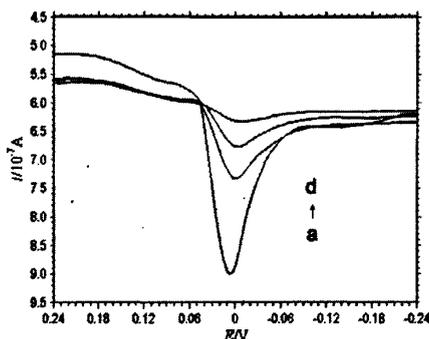


图2-7 寡聚核苷酸功能化的 Ag_2Se 纳米粒子与不同基因片段杂交后溶解的银在玻碳电极上的微分脉冲阳极溶出伏安图：(a) 互补的20碱基PEP基因片段，(b) 3碱基错配的寡聚核苷酸序列，(c) 非互补的寡聚核苷酸序列，(d) 空白溶液，振幅：50 mV，脉冲宽度：60 ms，脉冲周期：0.2 s

Fig.2-7 Differential pulse anodic stripping voltammograms of the dissolved silver at glassy carbon electrode after oligonucleotides-functionalized Ag_2Se nanoparticle probes hybridized with complementary 20-base PEP gene fragment (a); the three-base mismatch oligonucleotide sequences (b); and the noncomplementary oligonucleotide sequences (c); and the blank solution (d) for the DNA hybridization detection, pulse amplitude: 50 mV, pulse width: 60 ms, pulse period: 0.2 s.

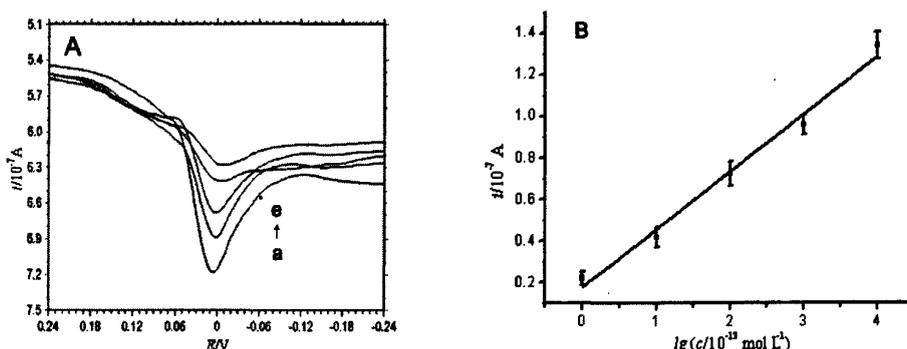


图2-8 (A) 不同浓度的PEP基因序列的微分脉冲阳极溶出伏安图：(a) 10000，(b) 1000，(c) 100，(d) 10，(e) 1×10^{-12} mol/L。(B) 浓度对数值与电流的线性关系曲线。其他参数同图2-7

Fig.2-8 Differential pulse voltammograms for different target DNA concentrations (A): (a) 10000; (b) 1000; (c) 100; (d) 10; (e) 1×10^{-12} mol L^{-1} and the resulting logarithmic standard plot (B). Other conditions are the same as in Fig.2-7.

分别将不同浓度的20碱基PEP基因片段固定于CTAB/CPE电极表面，然后按标准实验方法与 Ag_2Se -ssDNA进行杂交、 HNO_3 溶解并进行微分脉冲阳极溶出伏安测定，结果示于图2-8。其中A为不同浓度PEP基因片段所得微分脉冲阳极溶出伏安曲线，以0.016 V的峰高作为检测20碱基PEP基因片段的检测信号。以三次平行测定的峰高的平均值对PEP基因片段的浓度的对数值在 1.0×10^{-8} mol·L⁻¹到

$1.0 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性关系,其线性回归方程为 $y = 0.2775 \log x + 0.1774$ (其中 x 为被测PEP基因片段的浓度,单位为 $10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; y 为Ag的溶出峰电流,单位为 10^{-7} A),线性相关系数 $R = 0.9944$ 。在DNA固定步骤中以不含PEP基因片段的空白溶液代替PEP基因片段溶液进行实验并在同样实验程序下作测定,11次平行测定的标准偏差为 σ ,根据 3σ 法计算此方法检测PEP基因片段的检测限为 $2.3 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所提出的方法检测转基因植物PEP基因片段具有很宽的检测范围和很低的检测限。

对浓度为 $1.0 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的目标DNA序列进行7次重复测定,其相对标准偏差(RSD)为3.8%,说明利用 Ag_2Se 纳米粒子的DNA检测方法对PEP基因片段的检测具有很好的重现性。

2.3 本章小结

通过新的配合物 $[\text{PVP}-(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)-}$ 或 $[\text{PVP}-(\text{AgI})]$ 在水热反应条件下与 Na_2SeSO_3 反应,制备了PVP修饰的单分散球形和大米粒形的 Ag_2Se 纳米粒子。XRD表明最终产物的 Ag_2Se 纳米粒子属于 $\beta\text{-Ag}_2\text{Se}$,紫外可见吸收光谱和XPS证明了 $[\text{PVP}-(\text{Ag}_m\text{I}_n)]^{(n-m)-}$ 和 $[\text{PVP}-\text{AgI}]$ 配合物的存在。EDS和FT-IR证明了PVP在 Ag_2Se 表面的物理吸附及化学键合。阐述了一种可能的 Ag_2Se 纳米粒子生长机理,探讨了PVP的浓度及 Ag^+ 和 I^- 比例对最终产物形貌及尺寸的影响。在较高PVP浓度条件下,长时间的反应有利于生成尺寸均一,大米粒状的 Ag_2Se 纳米粒子。

进一步将其作为DNA探针的标记物用于识别检测固定在CTAB修饰的CPE上的目标DNA序列。固定和杂交的DNA的量是利用DPASV间接检测从 Ag_2Se -dsDNA/CTAB/CPE上释放出来的银得到的。此种方法对转基因植物中PEP启动子的20个碱基的基因片段的检测范围为 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限为 $2.3 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该方法具有良好的选择性、高灵敏度、低检测限、宽线性范围和良好的重现性等优点。

第三章 水热合成法制备硒化铅纳米粒子及其作为

标记物在电化学检测 DNA 杂交中的应用

由于具有特殊的尺寸性能和其在纳米尺寸排列组装的可行性, 半导体纳米粒子逐渐被人们所关注^[135,136]。而且, 半导体纳米粒子的这些性能主要依赖于其尺寸大小和形貌^[137,138]。II-VI 半导体体系在光发射二极管以及生物传感器方面有重要的应用价值^[139,140]。其中 PbSe 作为一种窄禁带宽度半导体^[141], 被广泛应用在光电二极管, 光敏电阻和红外光度计中^[142,143]。不同形貌的 PbSe 纳米材料, 例如有量子点^[144], 纳米线^[145]和纳米管^[146]等已经报道。硒化物的制备方法有很多, 其中包括电化学方法^[147], 微波辅助制备^[148], 化学沉积法^[149], 高温分解单一前驱物法^[150], 和光化学方法^[151]等。

本章用 150℃ 条件下水热反应 24 小时合成了表面带有十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB) 的 PbSe 纳米粒子, 并对其形貌及结构进行了表征。PbSe-CTA⁺使得 PbSe 纳米粒子表面带的正电性与 DNA 中的-COO⁻的负电性通过静电作用可标记于人工合成的寡聚核苷酸片段上。用该方法对对互补序列、三碱基错配及非互补序列 DNA 的控制表明, CTAB 修饰的 PbSe 对互补的 18 碱基 CaMV35S 基因片段具有很好的选择性, 其检测的线性范围为 $5.0 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $6.1 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.1 实验部分

3.1.1 实验仪器和试剂

仪器:

JEOL-2000EX 型透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司); D/Max r-B 型转靶 X 射线衍射仪 (日本理学公司); CHI832 电化学分析仪 (上海辰华仪器公司); 三电极系统: 银-氯化银电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 碳糊电极为工作电极; Cary 50 型紫外-可见分光光度计 (澳大利亚 Varian 公司); 510P 型红外仪 (美国 Nicolet 公司); TGL-16C 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); 79-1 型磁力加热搅拌器 (江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); GSY-II 电热恒温水浴锅 (北京市医疗设备厂), KQ-50B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 202-1AB 型电热恒温干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); 玻碳电极用于铅的阳极溶出法测定。

试剂:

硒粉 (Se, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 硼氢化钠, 分析纯 (上海冠戈实业有限公司); 醋酸铅, 分析纯 (天津市盛大化工销售有限公司); 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, 济宁市化工研究所); 无水乙醇, 分析纯 (烟台三和化学试剂有限公司); N, N-二甲基甲酰胺, 分析纯 (天津市瑞金特化学品有限公司); HAC-NaAc 缓冲溶液 (pH 5.4); 2×SSC 缓冲溶液 ($0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠- $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠) 作为杂交液; 铁氰化钾 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 天津市瑞金特化学品有限公司); 亚铁氰化钾 ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 上海亨达精细化学品有限公司); 石墨粉 (上海胶体化工厂, 粒度 $\leq 30\mu\text{m}$); 高效切片石蜡 (上海华灵康复器械厂); 0.2 % 的十二烷基硫酸钠 (SDS, 上海亨达精细化学品有限公司); 亚甲紫 (MV, 北京化工厂); 0.20 mol/L pH 6.0 的 Britton-Robinson(B-R)缓冲溶液作为反应的支持电解质; 所用试剂均为分析纯, 所有溶液均为 Aquapro 超纯水 (电阻率 $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, 由 Aquaplus AWL-1002-P 制备, 颐洋企业发展有限公司) 配制。

检测 PEP 基因片段的材料: 20 碱基目标 DNA 序列 (Target ssDNA, 即 PEP 基因序列中的 20 碱基片段, 也即本文中的 DNA 探针的互补序列 cDNA), 寡核苷酸探针 (Probe ssDNA), 3 碱基错配序列 (3-base mismatch DNA) 和非互补序列 (ncDNA), 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。以上 DNA 序列如下:

人工合成的 18 个碱基的 CaMV 35S 寡核苷酸片段

探针序列: $5' \text{- TCT TTG GGA CCA CTG TCG -3}'$

互补序列: $5' \text{- NH}_2\text{-CGA CAG TGG TCC CAA AGA -3}'$

非互补序列: $5' \text{- NH}_2\text{-GCA TCG AGC GAG CAC GTA -3}'$

两碱基错配序列: $5' \text{- NH}_2\text{- CGA AAG TGG TCC AAA AGA -3}'$

3.1.2 PbSe 纳米粒子的制备与表征

称取 0.1g 硼氢化钠溶于 30mL 去离子水中, 加 0.2g 硒粉, 氮气气氛保护下, 常温搅拌大约半小时得到硒化钠 (NaHSe) 澄清溶液, 浓度是 $0.08 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

将 0.25g CTAB 溶于制备的 30 mL NaHSe 溶液中, 在氮气保护下持续搅拌 1h 至分散均匀, 将 1.2g $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶于 10mL 去离子水中后加入其中, 搅拌 0.5h。总体积大约 40mL, CTAB 的浓度是 $6.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 的浓度是 $0.079 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaHSe 的浓度为 $0.08 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将溶液转移到 50mL 聚四氟乙烯内衬的不锈钢反应釜中密封, 于 150°C 反应 24h。反应完后自然冷却到室温, 离心得到黑色产物, 用去离子水和乙醇分别洗涤三次, 50°C 干燥 6h。

改变温度、溶剂或 CTAB 浓度，也制备了 PbSe，以进行比较。

分别使用 XRD，TEM，FT-IR，UV-Vis 等对制备的 Ag₂Se 进行了表征。

3.1.3 PbSe-DNA纳米结合物的制备

取0.5 mL在水中分散的1 g·L⁻¹的PbSe加入到300 μL 1.0×10⁻⁴ mol·L⁻¹的探针 ssDNA 的水溶液中，室温下搅拌反应过夜。将该反应物在10,000 r/min下离心分离，用水洗涤沉淀物，再离心分离，其沉淀即为PbSe-DNA探针结合物。

3.1.4 电化学检测

对PbSe的电化学检测方法同2.1.4。

3.2 结果与讨论

3.2.1 PbSe 纳米颗粒的表征

3.2.1.1 样品的 XRD 表征

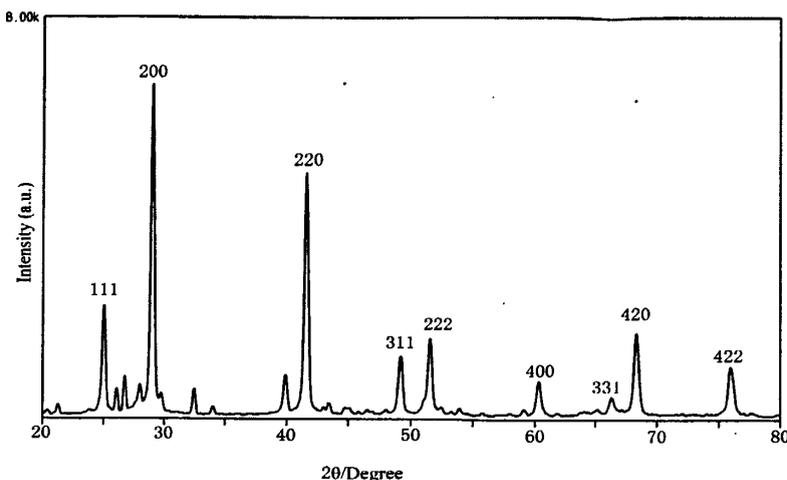


图3-2 制备的PbSe的XRD图像

Fig. 3-2 XRD pattern of as-prepared PbSe products

使用 D/max r B (日本理学) X-射线衍射仪 (XRD) 确定于 150°C 水热反应 24 小时，CTAB 浓度为 6.25 g·L⁻¹ 条件下制备的 PbSe 晶型 (铜靶，λ=1.54178 Å)。如图 3-2 所示，九个主要衍射峰对应于 (111)、(200)、(220)、(311)、(222)、(400)、(311)、(420) 和 (422) 晶面，制备的 PbSe 属于立方晶型。尖锐的衍射峰表明 PbSe 纳米晶的结晶度良好，由 Debye-Scherrer 公式算得组成 PbSe 纳米

材料的纳米微晶尺寸为 16 nm。

3.2.1.4 红外谱图分析

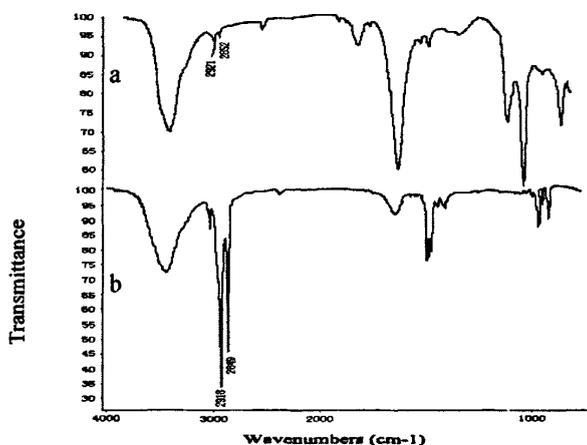


图3-5 PbSe(a)和CTAB (b)的红外谱图

Fig. 3-5 FT-IR spectra of PbSe (a) and CTAB (b)

图3-5a、b分别是PbSe和CTAB的红外谱图，曲线a中在 2921 cm^{-1} 、 2852 cm^{-1} 处的吸收峰与曲线b中CTAB的特征吸收峰相一致，说明所制得的PbSe纳米粒子表面吸附有大量的CTAB，表面被CTAB成功修饰，提高了PbSe纳米粒子在水溶液中的分散性。

3.2.1.2 TEM 和 ED 表征

图 3-3 是在不同条件下反应 24h，CTAB 浓度为 $6.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时制备的 PbSe 纳米粒子的 TEM 和 ED 图像。从图 3-3a 中可以看出，在 150°C 水热条件下制备的 PbSe 纳米粒子的粒径大约是 40nm 分散性良好。ED 图像表明 PbSe 是由六方形 PbSe 单晶构成。各试剂浓度同上，在室温条件下于去离子水中合成了 PbSe 纳米颗粒。其 TEM 图像如图 3-3(b)所示，从图中可以看出，制备的 PbSe 形态是粒子、棒状和片状混合物，形态较杂乱。(3)用 DMF 作溶剂，代替去离子水进行室温反应，TEM 图像如图 3-3(c)，此条件下制备的 PbSe 形态是纳米棒和纳米粒子。采用溶剂热法，在 150°C 条件下，以 DMF 作溶剂，其制得的 PbSe 形态是纳米粒子和纳米棒，TEM 图像见图 3-3(d)。从图 3-3 中可以看出，以水热法制备的 PbSe 为尺寸、形貌均一的纳米粒子晶体。

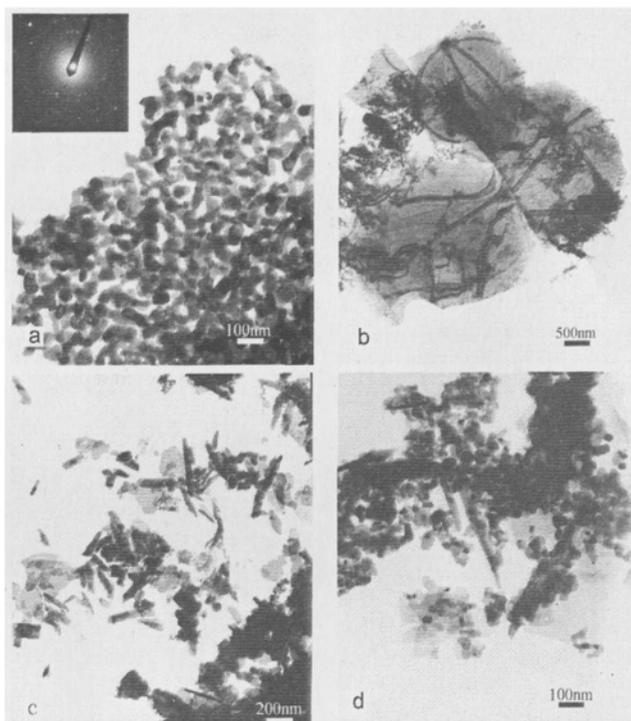


图3-3 (a)水热 (b)室温, 在去离子水中 (c)室温, 在DMF里 (d)溶剂热, 在DMF中, 得到的PbSe样品的TEM和ED图

Fig. 3-3 TEM and ED of PbSe samples prepared via (a)hydrothermal route; (b) at room temperature, in distilled water; (c) at room temperature, in DMF; (d) solvothermal route in DMF

改变 CTAB 的浓度, 进行了三组对比实验以观察不同 CTAB 的浓度对 PbSe 纳米颗粒的影响, 如图 3-4 所示。

CTAB 对 PbSe 纳米颗粒的形成起很重要的作用。CTAB 不只是起表面活性剂的作用, 它还是纳米粒子的表面模板剂。没有使用 CTAB 条件下, 只能得到尺寸较大的易团聚的颗粒, 并且不易在水溶液中分散 (图 3-4a)。使用一定量的 CTAB 不仅可以减小 PbSe 纳米粒子的尺寸, 还使制备的 PbSe 纳米粒子在水溶液中具有较好的分散性, 利于作为标记物, 在 DNA 检测中的使用。

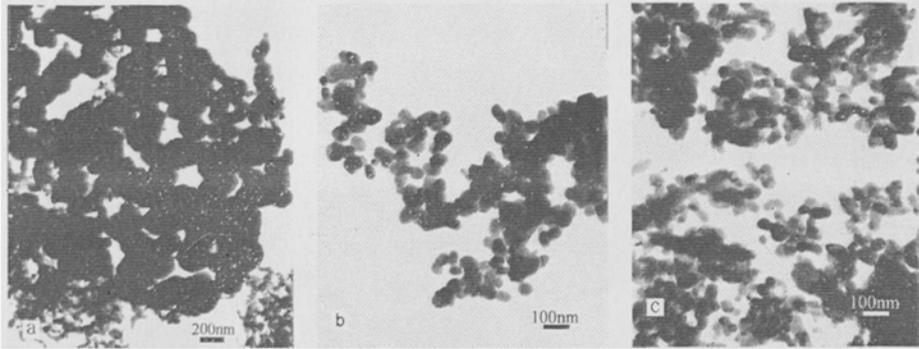


图3-4 不同CTAB浓度得到的PbSe的TEM图像 (a) $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (c) $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Fig. 3-4 TEM of as-prepared PbSe samples with different CTAB concentration (a) $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (c) $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

3.2.2 电化学探测目标 DNA

3.2.2.1 紫外-可见光谱分析

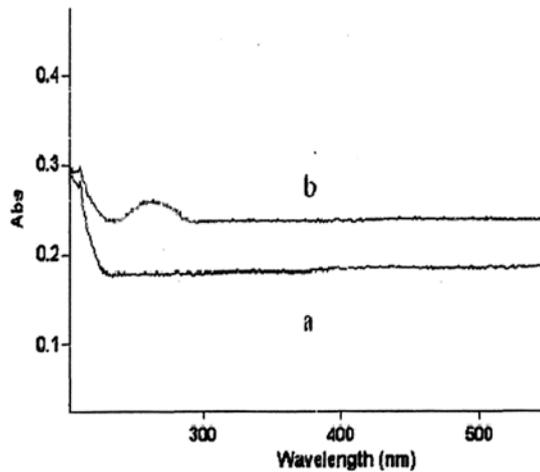


图 3-6 PbSe (a)和 PbSe 纳米粒子标记 DNA 探针(b) 的 UV-vis 谱图
Fig. 3-6 UV-vis spectra of PbSe (a) and PbSe labeled DNA probe (b)

通过Cary 50紫外光谱分光光度计对PbSe-DNA纳米结合物和PbSe的检测，得到如图3-6所示的 UV-Vis谱图。和未与DNA结合的PbSe相比，与DNA结合的PbSe有一个大约在260 nm处的新吸收峰出现，此特征吸收峰是DNA分子中-NH₂的特征吸收峰，表明了DNA分子在PbSe上的吸附。这证明了PbSe被成功地标记在了DNA上，PbSe-DNA纳米结合物可用于DNA的检测。

3.2.2.2 PbSe 纳米材料的筛选

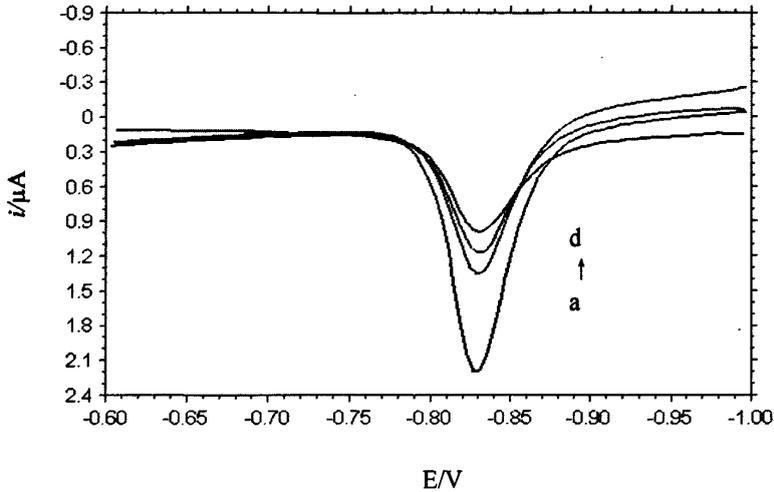


图3-7 PbSe修饰的ssDNA探针ASV信号图: (a) 水热法制得的PbSe, (b) 室温蒸馏水中制得PbSe, (c) 室温DMF中制得的PbSe, (d) 溶剂热法制得的PbSe

Fig.3-7 ASV of PbSe labeled ssDNA probe, the preparation of PbSe is (a) Hydrothermal route (b) At room temperature, in distilled water (c) At room temperature, in DMF and (d) Solvothermal route

利用微分脉冲阳极溶出伏安法检测溶解铅的溶出峰，通过溶解铅的溶出峰的强度检测PbSe纳米对DNA标记能力。图3-7是不同实验条件下制备的PbSe纳米材料作为标记物对应的铅的溶出峰电流。由图示可知，水热条件下制备的PbSe纳米粒子作为标记物用于检测的灵敏度最好，检测峰电流值最高。而常温水溶液中和DMF溶液中及溶剂热条件下制备的PbSe纳米粒子作为标记物用于检测的灵敏度不是很好。这可能是由于常温水溶液中制备的PbSe纳米粒子与CTAB的吸附作用没有水热条件下的强，CTAB分子在洗涤纳米粒子流失较多，导致PbSe对DNA的吸附作用减弱，使得DNA链上吸附的PbSe纳米粒子量减少，导致检测峰电流值强度减弱。以DMF为溶液和溶剂热条件下制备的PbSe纳米粒子，亲油性较强，在水溶液中分散差，烷基链空间位阻和弱极性导致PbSe对DNA的吸附作用减弱，同样使得DNA链上吸附的PbSe纳米粒子量减少，导致检测峰电流值强度减弱。所以选区水热条件下制备的PbSe纳米粒子作为标记物进行最终检测限的测定。

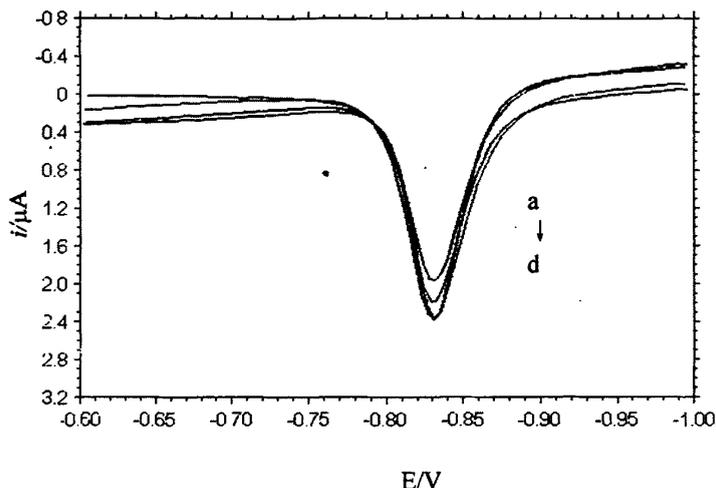


图3-8 不同CTAB浓度得到PbSe标记的ssDNA的ASV信号图: (a) $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (b) $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (c) $6.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (d) $12.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Fig.3-8 ASV of PbSe labeled ssDNA probe with different concentration of CTAB: (a) $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (c) $6.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (d) $12.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

图3-8为不同浓度CTAB下通过水热反应得到的PbSe纳米粒子最为标记物对应的铅溶出峰电流曲线。随着CTAB浓度的增加，铅溶出峰电流值增加，当CTAB的浓度大于 $6.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，铅溶出峰电流变化不大。因为CTAB电离后， PbSe-CTA^+ 使得PbSe纳米粒子表面带的正电性，而DNA中的 $-\text{COO}^-$ 的负电性，正电性的增加利于PbSe对DNA的吸附。所以随着CTAB浓度的增加，最终制备的PbSe表面吸附的CTAB的量增加，使得PbSe纳米粒子表面带的正电性增强，使得DNA结合的PbSe纳米粒子增加，铅溶出峰电流变大。但是当CTAB浓度增大到一定程度以后，PbSe纳米粒子表面吸附的CTAB不再增加，PbSe表面的正电性达到最大值，PbSe纳米粒子与DNA结合的量达到最大。由此可知CTAB的浓度影响PbSe对DNA的标记能力。

综合上述实验结果，本文选择水热条件下，CTAB浓度为 $6.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时制备的PbSe纳米粒子作为标记物进行检测限的测定。

3.2.2.3 CaMV35S 基因片段的微分脉冲阳极溶出伏安法检测

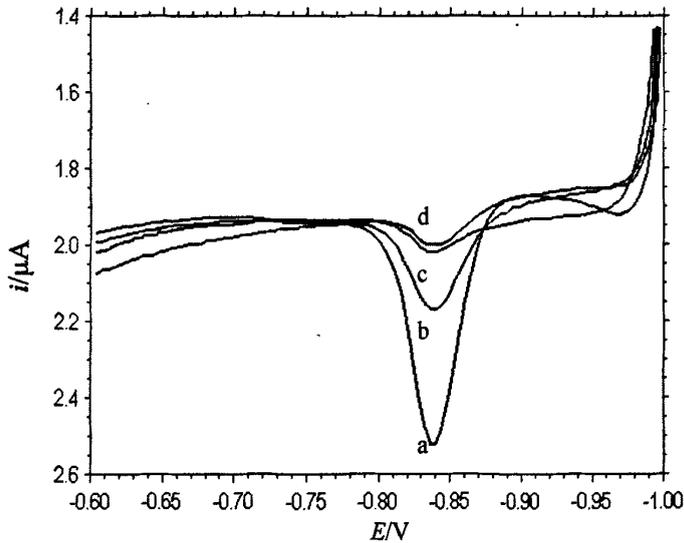


图 3-9 寡聚核苷酸功能化的PbSe纳米粒子与不同基因片段杂交后溶解的铅在同位镀汞膜玻璃碳电极上的微分脉冲阳极溶出伏安图：（a）互补的18碱基CaMV35S基因片段，（b）2碱基错配的寡聚核苷酸序列，（c）非互补的寡聚核苷酸序列，（d）空白溶液，振幅：50 mV，脉冲宽度：60 ms，脉冲周期：0.2 s

Fig. 3-9 differential pulse anodic stripping voltammograms of the dissolved lead at an in-situ prepared mercury film glassy carbon electrode after oligonucleotides-functionalized PbSe nanoparticle probes hybridized with complementary 18-base CaMV35S gene fragment (a), the two-base mismatch oligonucleotide sequences (b), and the non-complementary oligonucleotide sequences (c), and the blank solution (d) for the DNA hybridization detection, amplitude: 50 mV, pulse width: 60 ms, pulse period: 0.2 s

用DNA/CNTs-COOH/CPE传感器以微分脉冲阳极溶出伏安法对转基因植物CaMV35S启动子基因片段进行检测。分别将 $10\ \mu\text{L}\ 0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的18碱基CaMV35S基因片段、 $10\ \mu\text{L}\ 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的18碱基的2-碱基错配DNA序列和 $10\ \mu\text{L}\ 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的18碱基非互补DNA序列固定于CNTs-COOH/CPE电极表面，然后分别按实验方法与CaMV35S基因序列互补的PbSe标记的ssDNA杂交，用 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{HNO}_3$ 溶解，再以同位镀汞膜玻璃碳电极对 HNO_3 溶解液进行微分脉冲阳极溶出伏安法测定，并同时固定有CaMV35S基因片段但未进行杂交反应的电极进行同样的测定，结果示于图3-9。曲线a为固定CaMV35S基因片段进行杂交后所得的溶出伏安曲线，在-0.84 V得到溶解铅的良好溶出峰。曲线b为两碱基错配的DNA序列的测定曲线，其溶出峰较曲线a大为减小。曲线c为非互补DNA序列的测定曲线，其溶出峰较曲

线b又有明显减小，与空白试验（表面未固定DNA）所测得的结果（曲线d）相差不多。曲线d中较小的溶出峰为测定空白峰。从图3-9可知，由此方法测定CaMV35S基因片段具有很好的选择性，可以很好地鉴别CaMV35S基因片段和非互补DNA序列及两碱基错配DNA序列。

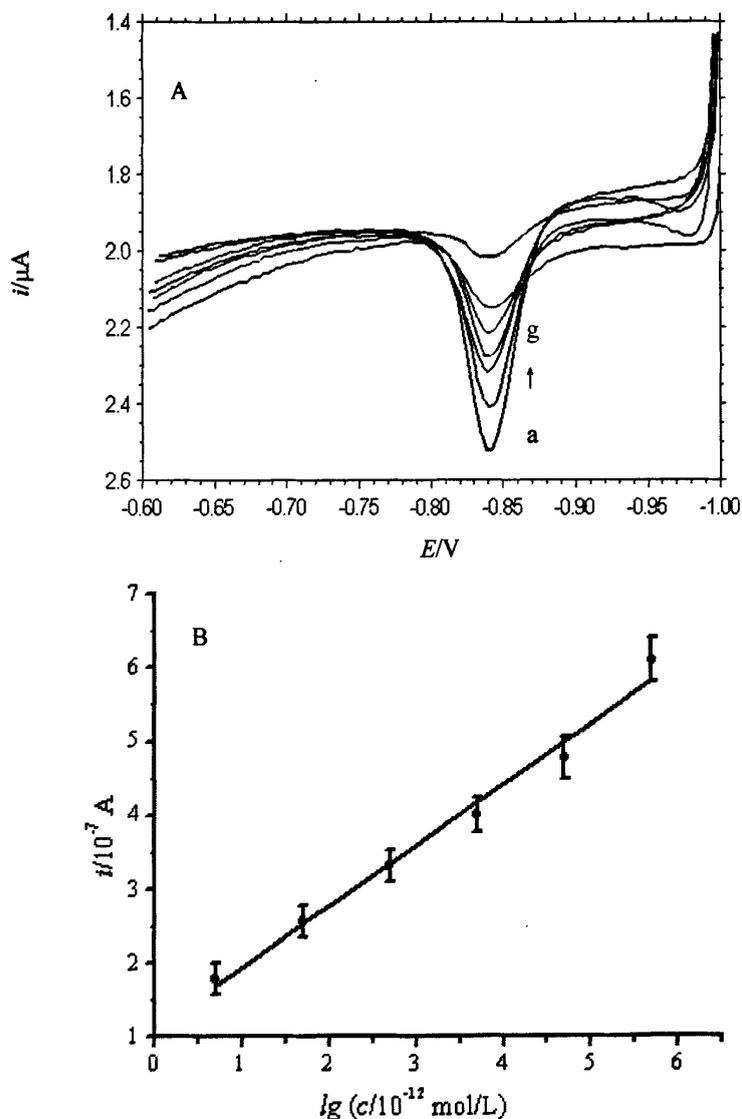


图3-10 (A) 不同浓度的CaMV35S基因序列的微分脉冲阳极溶出伏安图：(a) 500000, (b) 50000, (c) 5000, (d) 500, (e) 50, (f) 5, (g) 0×10^{-12} mol/L；(B) 浓度对数值与电流的线性关系曲线。其他参数同图3-9

Fig. 3-10 (A). DPASV diagrams for different concentrations of CaMV35S gene sequence: (a) 500000, (b) 50000, (c) 5000, (d) 500, (e) 50, (f) 5 and (g) 0×10^{-12} mol/L. (B). The logarithmic standard plot. Other conditions are the same as in Figure 3-9

分别用10 μ L不同浓度的18碱基CaMV35S基因片段固定于CNTs-COOH/CPE电极表面, 然后按标准实验方法与PbSe-ssDNA进行杂交、HNO₃溶解并进行微分脉冲阳极溶出伏安法测定, 结果示于图3-10。其中A为不同浓度CaMV35S基因片段所得微分脉冲阳极溶出伏安曲线, 以-0.84 V的峰高作为检测18碱基CaMV35S基因片段的检测信号。以三次平行测定的峰高的平均值对CaMV35S基因片段的浓度的对数值在5.0 $\times 10^{-7}$ mol \cdot L⁻¹到5.0 $\times 10^{-12}$ mol \cdot L⁻¹浓度范围内呈良好的线性关系, 其线性回归方程为 $y = 0.8252 \log x + 1.1223$ (其中 x 为被测CaMV35S基因片段的浓度, 单位为10⁻¹² mol \cdot L⁻¹; y 为Pb的溶出峰电流, 单位为10⁻⁷ A), 线性相关系数 $r = 0.9932$ 。在DNA固定步骤中以不含CaMV35S基因片段的空白溶液代替CaMV35S基因片段溶液进行实验并在同样实验程序下作测定, 11次平行测定的标准偏差为 σ , 根据3 σ 法计算此方法检测CaMV35S基因片段的检测限为 6.1 $\times 10^{-13}$ mol \cdot L⁻¹。所提出的方法检测转基因植物CaMV35S启动子基因片段具有很宽的检测范围和很低的检测限。

3.3 本章小结

使用水热法于150 $^{\circ}$ C制备了CTAB修饰的立方晶型约40nm的PbSe纳米粒子, 此法制备PbSe纳米颗粒在水溶液中具有良好的分散性。CTAB是一种常见的表面活性剂, 在此方法中CTAB不仅起到了防止PbSe纳米颗粒团聚的作用, 还起到了对纳米粒子表面改性的作用。对PbSe的红外吸收光谱分析, 证实了PbSe表面吸附有一定量的CTAB。CTA⁺与DNA上得-COO⁻以静电结合, 使PbSe纳米粒子作为标记物标记在DNA上。对不同条件下制备的PbSe样品铅的溶出峰电流值进行比较, 得出水热法制备的PbSe纳米粒子的铅溶出峰电流值最高。在水热法中, 随着CTAB浓度的增加, PbSe的铅溶出峰电流值增加并且会趋近于恒定, 并不会随着CTAB浓度的增加而无限增加。PbSe纳米粒子做DNA探针检测有高灵敏度, 而且对于ASV探测互补DNA有选择性, 可以用于电化学检测和生物传感器。利用阳极溶出伏安法, PbSe纳米粒子标记的DNA探针对于互补序列DNA的检测有较高的灵敏度和较好的选择性, 其检测的线性范围为5.0 $\times 10^{-12}$ mol \cdot L⁻¹到5.0 $\times 10^{-7}$ mol \cdot L⁻¹, 检测下限达6.1 $\times 10^{-13}$ mol \cdot L⁻¹, 能够被用于电化学检测。

第四章 水热条件下生物分子辅助法制备硒化锌纳米晶

及其在寡核苷酸标记上的应用

生物分子作为生命组成的最基本物质,不仅具有特殊的分子结构,在自组装方面还有着奇特的性能。基于这些特性,生物分子被用作在分子水平上,设计、合成复杂结构材料的模板^[152,153]。因此,许多合成方法都使用生物分子作为模板进行纳米结构的组装^[154-156]。在生物分子中胺基和羧基之间通过化学反应可以形成多肽,多肽可以作为模板来组装纳米粒子、二维和三维的结构^[157]。在胺基酸的辅助下,已经合成出纳米线,纳米管,纳米棒并被报道^[157-159]。

半导体纳米晶展现了其潜在的应用,其范围从光电子设备^[160,161]到生物标记^[162,163]。这是由于此半导体纳米晶体的尺寸小,具有独特的量子效应和优异的化学性能。在种类繁多的 II-VI 半导体纳米晶体中,CdSe 和 CdTe 纳米晶体的研究最为广泛,但是目前关于 ZnSe 纳米晶体制备和应用的研究还很少。Hines 等人^[164]采用有机金属法合成了高质量的 ZnSe 纳米晶体。但是,此方法合成的 ZnSe 纳米晶体只能分散于有机溶剂中,而不能直接分散在水溶液中。Murase 等人^[165]在水溶液中制备出光致发蓝光的 ZnSe 纳米晶体,但是此方法所需 Se 的前驱物为 H₂Se 气体,极易被氧化,实验室操作十分不方便。

本文以在水热条件下以 Na₂SeSO₃ 为硒源,以谷氨酸为配位剂,合成了谷氨酸修饰的硒化锌纳米粒子。利用谷氨酸中的-COOH 可与 DNA 中的-NH₂ 发生共价作用,谷氨酸作为 ZnSe 纳米粒子与 DNA 分子的连接物,使合成的硒化锌纳米球用于寡核苷酸的标记物,用于 DNA 的电化学检测。

4.1 实验部分

4.1.1 实验仪器和试剂

仪器:

JEOL-2000EX 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); D/Max r-B 型转靶 X 射线衍射仪(日本理学公司); CHI832 电化学分析仪(上海辰华仪器公司); 三电极系统:银-氯化银电极为参比电极,铂丝电极为对电极,碳糊电极为工作电极; Cary 50 型紫外-可见分光光度计(澳大利亚 Varian 公司); 510P 型红外仪(美国 Nicolet 公司); TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂); 79-1 型磁力加热搅

拌器（江苏金坛市金城国胜实验仪器厂）；GSY-II 电热恒温水浴锅（北京市医疗设备厂），KQ-50B 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；202-1AB 型电热恒温干燥箱（天津市泰斯特仪器有限公司）；玻碳电极用于铅的阳极溶出法测定。

试剂：

硒粉， Na_2SO_3 ， ZnSO_4 ，L-谷氨酸，NaOH 均为分析纯；十六烷基三甲基溴化铵（CTAB，济宁市化工研究所）；HAc-NaAc 缓冲溶液（pH 5.4）； $2\times\text{SSC}$ 缓冲溶液（ $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠- $0.03\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠）作为杂交液；铁氰化钾（ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ，天津市瑞金特化学品有限公司）；亚铁氰化钾（ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ，上海亨达精细化学品有限公司）；石墨粉（上海胶体化工厂，粒度 $\leq 30\mu\text{m}$ ）；高效切片石蜡（上海华灵康复器械厂）；0.2 %的十二烷基硫酸钠（SDS，上海亨达精细化学品有限公司）；乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺（EDC）（Sigma）；N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）（上海延长生化公司）；亚甲紫（MV，北京化工厂）； $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.0 的 Britton-Robinson(B-R)缓冲溶液作为反应的支持电解质；所用试剂均为分析纯，所有溶液均为 Aquapro 超纯水（电阻率 $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ，由 Aquaplus AWL-1002-P 制备，颐洋企业发展有限公司）配制。

检测 PEP 基因片段的材料：20 碱基目标 DNA 序列（Target ssDNA，即 PEP 基因序列中的 20 碱基片段，也即本文中的 DNA 探针的互补序列 cDNA），寡核苷酸探针（Probe ssDNA），3 碱基错配序列（3-base mismatch DNA）和非互补序列（ncDNA），由北京赛百盛基因技术有限公司合成。以上 DNA 序列如下：

Probe ssDNA: 5'-NH₂-ACA CGG TCG ACT CGG CCG TCC AGT C -3'

Target NH₂-ssDNA: 5'-NH₂-GAC TGG ACG GCC GAG TCG ACC GTG T -3'

4.1.2 ZnSe 纳米粒子的制备与表征

硒代亚硫酸钠（ Na_2SeSO_3 ）被用来做为硒源，将 0.005 mol 硒粉加入到 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3 的 50ml 水溶液中，加热至沸水条件下反应 30 分钟，得到澄清的 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2SeSO_3 水溶液。

0.3 g L-谷氨酸加入盛有 30ml 去离子水的锥形瓶中，在室温条件下磁力搅拌至澄清溶液，并使用一定浓度的 NaOH 溶液调 pH 值在 8-9 之间。取 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnSO_4 溶液 5 mL 加入到谷氨酸的澄清溶液中，并持续搅拌半小时。然后取 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SeSO_3 溶液 4 mL 加入到 ZnSO_4 与谷氨酸形成的前驱物溶液中，并将总计 40ml 反应液加入 50ml 聚四氟乙烯内衬的不锈钢反应釜中密封。其中 ZnSO_4 ，谷氨酸和 Na_2SeSO_3 的浓度分别是 $0.0125\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ， $0.0500\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.0100\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 $160\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下反应 10 小时。反应完后自然冷却到室温，离心得到亮

黄色产物，用去离子水和乙醇分别洗涤三次，50℃干燥 6h。

分别使用 XRD, TEM, FT-IR, UV-Vis 等对制备的 Ag₂Se 进行了表征。

4.1.3 电化学检测

4.1.3.1 ZnSe-DNA 纳米结合物的制备

取 0.5 mL 在水中分散的 1 g·L⁻¹ 的 ZnSe 加入到含有 300 μL 1.0×10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的 P-DNA 和 5.0 mmol·L⁻¹ EDC、10.0 mmol·L⁻¹ NHS 的 pH 7.0 的 PBS 中，室温下搅拌反应过夜。将该反应物在 10,000 r/min 下离心分离，用去离子水洗涤沉淀物，再离心分离，其沉淀即为 ZnSe-DNA 探针结合物。

4.1.3.2 羧基化碳纳米管 (CNTs-COOH) 和 CNTs-COOH/CPE 的制备

参照文献^[166]处理碳纳米管，取 1 g CNTs 加入 40 mL 3:1 的 H₂SO₄ (98 %) 和 HNO₃ (16 mol·L⁻¹) 混合酸，超声 5 h，离心分离，用蒸馏水洗至中性，然后 100 °C 下烘干，即得到实验所需羧基化 CNTs (CNTs-COOH)。

将 CNTs-COOH 超声分散于 DMF 中，使其浓度为 1 g·L⁻¹。将石墨粉和固体石蜡按 3:1 (m/m) 制成碳糊电极，取 5 μL CNTs-COOH 的混合液滴于电极表面，室温下自然晾干，用二次蒸馏水清洗。即得到 CNTs-COOH 修饰电极，记为 CNTs-COOH/CPE。

4.1.3.3 DNA 的固定，杂交和检测

将 CNTs-COOH/CPE 浸泡在含有 5.0 mmol·L⁻¹ EDC 和 10.0 mmol·L⁻¹ NHS 的 pH 7.0 的 PBS 中 15 min，活化电极表面的羧基。然后将 10 μL 目标 DNA 滴在电极表面，室温下自然晾干，用二次蒸馏水清洗，即得到目标 DNA 修饰电极，记为 Target DNA/CNTs-COOH/CPE。

将 Target DNA/CNTs-COOH/CPE 放入含有 ZnSe-DNA 探针的杂交缓冲溶液 (2×SSC) 中，40 °C 水浴中反应 30 min；用二次水和 0.2 % 的 SDS 溶液洗涤电极 3 次以除去未杂交的 ZnSe-DNA，所得电极记为 ZnSe-dsDNA/CNTs-COOH/CPE。

将上面的电极置于 100 μL 1 mol·L⁻¹ 的 HNO₃ 液中，ZnSe 立刻氧化溶解。向其中加入 pH 5.4 的 HAc-NaAc 缓冲溶液 2.0 mL 作为支持电解质及 200 μL 0.1 g·L⁻¹ HgCl₂，将玻碳电极放入上述待测溶液中于 -1.2 V 恒电位预还原 400 s，然后从 -0.8~1.6 V 记录微分脉冲阳极溶出伏安曲线，在约 1.24 V 得到 Zn 的阳极溶出伏安峰。

4.2 结果与讨论

4.2.1 硒化锌纳米的制备与表征

4.2.1.1 TEM 表征

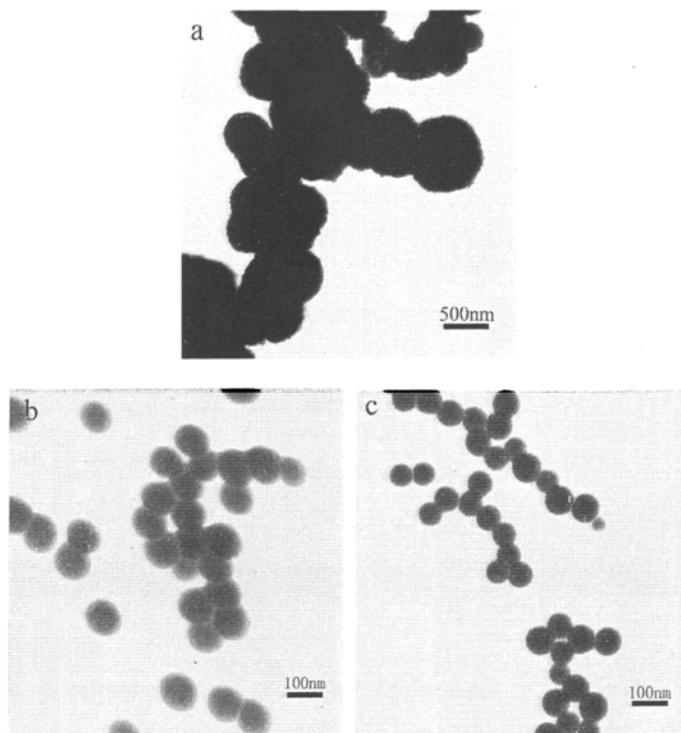


图4-1 不同L-谷氨酸浓度条件下制备的ZnSe透射电镜图，谷氨酸浓度分别为(a) $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，(b) $0.050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，(c) $0.100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Fig.4-1 TEM images of ZnSe prepared with different concentrations of L-glutamic acid (a) $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) $0.050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (c) $0.100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

不同条件下制备的样品的透射电镜图示于图 4-1，图 4-1a 是谷氨酸浓度在 $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下制备的 ZnSe 样品，其尺寸大约在 500nm 左右。图 4-1b 是谷氨酸浓度增加到 $0.050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的时候，制备的 ZnSe 样品的尺寸减小至 100nm 左右，其形貌为类球形。当谷氨酸浓度增加到 $0.100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，图 4-1c 显示得到了尺寸均匀的 ZnSe 纳米球。以上事实证明，高浓度谷氨酸条件下进行水热反应，易于得到尺寸均匀，形貌为球形的纳米粒子。选取图 4-1c 中的 ZnSe 样品进行后续检测。

4.2.1.2 样品的 XRD 表征

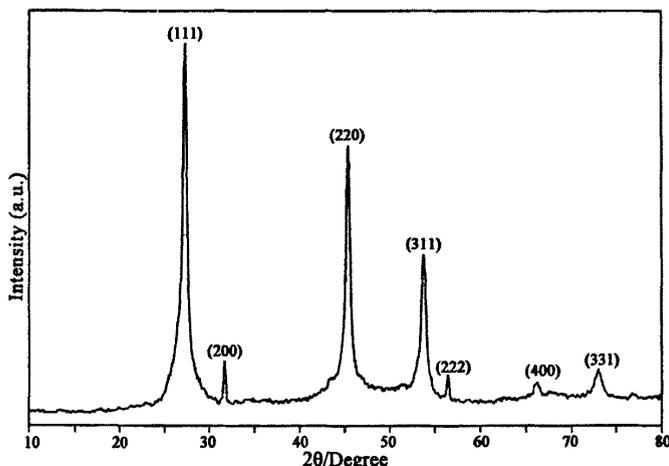


图4-2 ZnSe的XRD图

Fig.4-2 XRD pattern of ZnSe

图 4-2 是 160℃ 条件下谷氨酸浓度为 $0.100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 通过水热法制备的 ZnSe 纳米粒子的 X 射线粉末衍射谱图, 其主要的衍射峰与 JCPDS 卡 No. 37-1463 很好地相对应。七条主要的强吸收峰在 $2\theta = 27.15, 31.56, 45.17, 53.58, 56.15, 65.81$ 和 72.56 分别对应于立方 ZnSe 的 (111), (200), (220), (311), (222), (400) 和 (331) 晶面。没有明显的其他杂质峰。

4.2.1.3 样品的红外检测

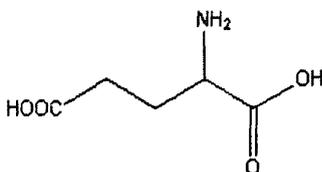


图4-3 L-谷氨酸的分子结构式

Fig.4-3 Chemical structure of L-glutamic acid

图 4-3 为本文使用的 L-谷氨酸的结构示意图, 在谷氨酸分子中存在 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{COOH}$ 和官能团, 在本反应中锌离子与谷氨酸配位形成前驱物。此外, $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{COOH}$ 发生化学反应可能生成二肽或者多肽, 而二肽或者多肽也可以与 Zn^{2+} 配位生成前驱物。

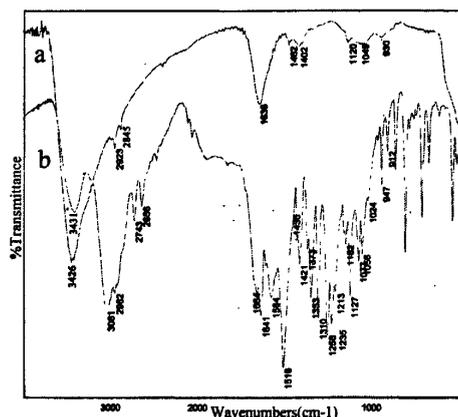


图4-4 制备的ZnSe (a) 和L-谷氨酸(b)的红外光谱图

Fig.4-4 FT-IR spectrum of as-prepared ZnSe (a) and pure L-glutamic acid (b)

对制备的 ZnSe 进行红外光谱分析见图 4-4，为谷氨酸与 ZnSe 分子间的结合提供了证据，图 4-4a 为 ZnSe 纳米粒子的红外吸收曲线，图 4-4b 为纯谷氨酸的红外吸收曲线。图 4-4a 吸收曲线中的 1635 cm^{-1} 和 3426 cm^{-1} 与图 4-4b 吸收曲线中的 1641 cm^{-1} 和 3431 cm^{-1} 对应于 $-\text{NH}_2$ 的特征吸收峰。图 4-4a 吸收曲线中的 1402 cm^{-1} 是 $-\text{COOH}$ 的特征吸收峰，而 2923 cm^{-1} , 2845 cm^{-1} 和 1462 cm^{-1} 则是 $-\text{CH}_2$ 的特征吸收峰，由此可以确定 ZnSe 纳米粒子表面吸附有谷氨酸。

4.2.2 电化学探测目标 DNA

4.2.2.1 紫外分析

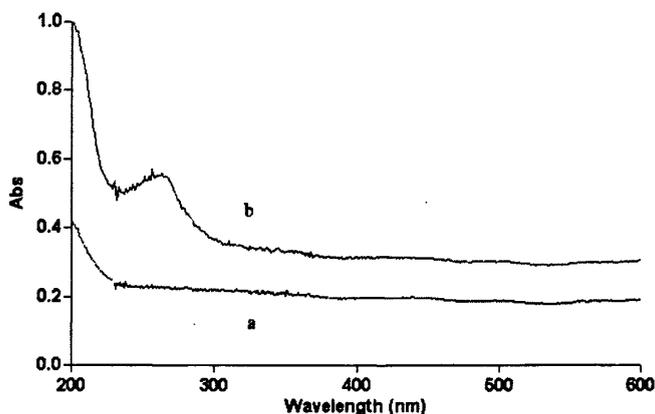


图4-5 ZnSe纳米粒子(a)和标记有DNA的ZnSe纳米粒子探针(b)的可见紫外光谱图

Fig.4-5 UV-Vis spectra of ZnSe (a) and the ZnSe nanoparticles-labeled DNA probes (b)

标记有ZnSe纳米粒子的DNA探针的紫外-可见吸收光谱见图4-5，可以看出，经寡聚核苷酸修饰的ZnSe纳米粒子在约260 nm处出现一个新的吸收带（曲线b），表明ZnSe纳米粒子已成功标记在寡聚核苷酸表面。这是因为ZnSe纳米粒子表面修饰有L-谷氨酸，其自由羧基可与DNA5'端上的-NH₂在EDC和NHS作用下共价作用结合^[167]；所以纳米ZnSe很容易标记在DNA探针上。

4.2.2.1 PAT 基因片段的微分脉冲阳极溶出伏安法检测

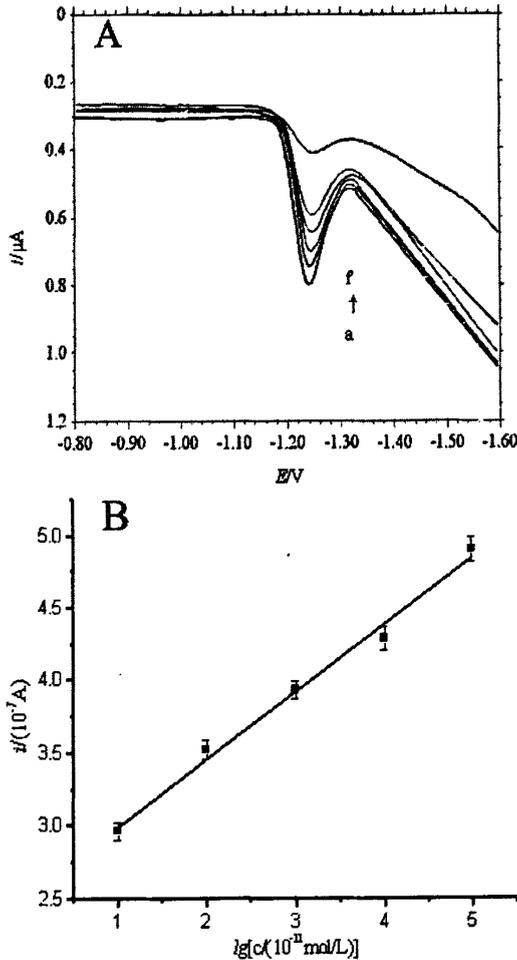


图4-6 (A) 不同浓度的PAT基因序列的微分脉冲阳极溶出伏安图：(a) 10000，(b) 1000，(c) 100，(d) 10，(e) 1，(g) 0×10^{-11} mol/L。(B) 浓度对数值与电流的线性关系曲线，振幅：50 mV，脉冲宽度：60 ms，脉冲周期：0.2 s

Fig.4-6 (A). DPASV diagrams for different concentrations of PAT gene sequence: (a) 10000, (b)1000, (c) 100, (d) 10, (e) 1, (f) 0×10^{-11} mol·L⁻¹. (B). The logarithmic standard plot, pulse amplitude: 50 mV, pulse width: 60 ms, pulse period: 0.2 s.

分别将不同浓度的20碱基PEP基因片段固定于CTAB/CPE电极表面,然后按标准实验方法与ZnSe-ssDNA进行杂交、HNO₃溶解并进行微分脉冲阳极溶出伏安法测定,结果示于图4-6。其中A为不同浓度PEP基因片段所得到微分脉冲阳极溶出伏安曲线,以0.016 V的峰高作为检测20碱基PEP基因片段的检测信号。以三次平行测定的峰高的平均值对PEP基因片段的浓度的对数值在 1.0×10^{-11} mol·L⁻¹到 1.0×10^{-7} mol·L⁻¹浓度范围内呈良好的线性关系,其线性方程回归方程为 $y = 0.4638 \text{ Log } x + 2.5298$ (其中x为被测PEP基因片段的浓度,单位为 10^{-11} mol·L⁻¹; y为Zn的溶出峰电流,单位为 10^{-7} A),线性相关系数R = 0.9959。在DNA固定步骤中以不含PEP基因片段的空白溶液代替PEP基因片段溶液进行实验并在同样实验程序下作测定,11次平行测定的标准偏差为σ,根据3σ法计算此方法检测PEP基因片段的检测限为 4.7×10^{-12} mol·L⁻¹。

将浓度为 1.0×10^{-9} mol·L⁻¹的目标DNA固定在电极表面,进行7次平行测定,其相对标准偏差为3.9%,具有较好的重现性。

4.3 本章小结

本文在生物分子谷氨酸的辅助下,以水热合成法制备了谷氨酸修饰的ZnSe纳米粒子。谷氨酸作为生物分子,在本文中不仅做为配位剂,还在最终产品上起到了修饰剂的作用,红外光谱图证明了谷氨酸吸附于ZnSe纳米粒子表面。

以谷氨酸修饰的ZnSe纳米粒子作为标记物,通过共价作用,将其标记于合成的5'端氨基修饰的寡聚核苷酸片段上,制成具有电化学活性的ZnSe纳米粒子标记DNA探针。在一定条件下,使其与固定在碳糊电极表面的PAT基因的目标DNA特定序列进行杂交,杂交过程通过氧化溶解标记的ZnSe纳米粒子和微分脉冲阳极溶出伏安法间接测定Zn²⁺来检测。此方法对PAT基因可进行有效测定,其测定目标DNA的线性范围为 1.0×10^{-11} 至 1.0×10^{-7} mol/L,检测下限为 4.7×10^{-12} mol·L⁻¹。

结 论

本论文使用水热合成法分别制备了硒化银、硒化铅、硒化锌纳米粒子。在制备过程中分别使用高分子聚合物、表面活性剂、氨基酸为修饰剂，对产物的尺寸和形貌进行控制。通过修饰剂对纳米粒子表面的改性，使得制备的纳米粒子在水体系中具有很好的分散性和生物相容性。利用三种修饰剂可以与 DNA 通过不同键合方式结合，将制备的纳米粒子做为标记物用于 DNA 的电化学检测。通过对实验总结得出以下结论：

(1) 以 $[PVP(Ag_mI_n)]^{(n-m)}$ 配合物为前驱体与 Na_2SeSO_3 进行水热反应，制备了单分散的 Ag_2Se 纳米粒子。PVP 的浓度和 $[Ag^+]$ 与 $[I^-]$ 比例对 Ag_2Se 纳米粒子的尺寸和形貌影响显著。高浓度 PVP 条件下可以制备出尺寸均一、大米粒状的 Ag_2Se 纳米粒子。利用 PVP 中 C=O 与 DNA 分子中 -NH₂ 易于形成氢键，将制备的 PVP 修饰的 Ag_2Se 纳米粒子作为 DNA 探针的标记物用于电化学溶出检测 DNA 杂交。可用于 PEP 基因片段的检测，线性范围为 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，检测限为 $2.3 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(2) 在表面活性剂 CTAB 存在的条件下， $Pb(CH_3COO)_2$ 与 NaHSe 在去离子水中水热反应制备了 CTAB 修饰的 PbSe 纳米粒子。高浓度 CTAB 条件下易得到尺寸较小、分散性较好的 PbSe 纳米粒子，和较好的 DNA 电化学检测信号。PbSe-CTA⁺ 使得 PbSe 纳米粒子表面带的正电性，而 DNA 中的 -COO⁻ 负电性，利用静电作用将制备的 PbSe 纳米粒子标记寡核苷酸制成了新型的 DNA 探针。此 PbSe 纳米粒子标记的 DNA 探针对互补序列、两碱基错配及非互补序列有良好的选择性。检测的线性范围为 $5.0 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，对互补序列的检测限为 $6.1 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(3) 以生物分子 L-谷氨酸辅助水热法合成了 ZnSe，得到了尺寸在 100 纳米左右的球形纳米粒子。制备过程中，生物分子 L-谷氨酸和 Zn^{2+} 作用，起到了配位剂和生物分子模板的作用。对 ZnSe 纳米粒子的尺寸起到了控制作用。谷氨酸作为 ZnSe 纳米粒子与 DNA 分子的连接物，通过共价作用，使 ZnSe 纳米粒子标记于 DNA 分子上。将制成具有电化学活性的 ZnSe 纳米粒子标记 DNA 探针用于测定目标 DNA，检测的线性范围为 1.0×10^{-11} 至 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ，检测限为 $4.7 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献

- [1] Korgel B. A., Nanosprings take shape[J], *Science*, 2005, 309: 1683-1684
- [2] Valiev R., Nanomaterial advantage[J], *Nature*, 2002, 419: 887-888
- [3] Arico A. S., Bruce P., Scrosati B., et. al, Nanostructured materials for advanced energy conversion and storage devices[J], *Nature Materials*, 2005,4: 366-377
- [4] Medintz I. L., Uyeda H.T., Goldman E. R., et. al, Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing[J], *Nature Materials*, 2005, 4: 435-447
- [5] Parak W.J., Gerionl D., Pellegrino T., et. al, Biological applications of colloidal nanocrystals[J], *Nanotechnology*, 2003, 14: R15-R27
- [6] Mcdonald S. A., Konstantatos G., Zhang S., et. al, Solution-Processed PbS Quantum Dot Infrared Photodetectors and Photovoltaics[J], *Nature Materials*, 2005, 4: 138-143
- [7] Doh Y. J., Dam J. A. V., Roest A. L., et. al, Tunable Supercurrent through Semiconductor Nanowires[J], *Science*, 2005, 309: 272-275
- [8] 陈名海, 低维硒化物纳米晶的液相化学控制合成与表征, 中国科学院上海硅酸盐研究所, 博士论文
- [9] Burda C., Chen X., Narayanan R., et. al, Chemistry and Properties of Nanocrystals of Diferent Shapes[J], *Chem. Rev*, 2005, 105(4): 1025-1102
- [10] Xia Y., Yang P., Sun Y., et. al, One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications[J], *Adv. Mater.*, 2003, 15(5): 353-389
- [11] Huang M. H., Wu Y., Feick H., et. al, Catalytic Growth of Zinc Oxide Nanowires by Vapor Transport[J], *Adv. Mater.*, 2001, 13(2): 113-116
- [12] Huynh W. U., Dittmer J. J., Alivisatos A. P., Hybrid Nanorod-Polymer Solar Cells[J], *Science*, 2002, 295: 2425-2427
- [13] El-Sayed M. A., Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Diferent Shapes[J], *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34(4): 25 7-264
- [14] Mohamed M. B., Volkov V., Link S., et. al, The 'lightning' gold nanorods: fluorescence enhancement of over a million compared to the gold metal[J], *Chem. Phys. Lett.*, 2000, 317(6): 517-523
- [15] Zhang Z., Blom D. A., Gai Z., et. al, High-Yield Solvothermal Formation of Magnetic Copt Alloy Nanowires[J], *J. Am. Chem. Soc*, 2003, 125(25): 7528-7529
- [16] Park S. J., Kim S., Lee S., et. al, Synthesis and Magnetic Studies of Uniform Iron Nanorods and Nanospheres[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(35): 8581-8582
- [17] Cao H. Q., Xu Z., Sang H., et. al, Template Synthesis and Magnetic Behavior of an Array of Cobalt Nanowires Encapsulated in Polyaniline Nanotubules[J], *Adv. Mater*, 2001, 13(2): 121-123
- [18] Lu L., Sui M. L., Lu K., Superplastic extensibility of nanocrystalline copper at room temperature[J], *Science*, 2000, 287: 1463-1466
- [19] Lu L., Shen Y., Chen X., et. al, Ultrahigh Strength and High Elecrtical Conductivity in Copper[J], *Science*, 2004, 304: 422-426
- [20] Wong E. W., Sheehan P. E., Lieber C. M., Nanobeam Mechanics: Elasticity, Strength, and Toughness of Nanorods and Nanotubes[J], *Science*, 1997, 277: 1971-197
- [21] Sheldon B. W., Curtin W. A., Nanoceramic Composites Tough To Test[J], *Nature Materials*,

2004, 3: 505-506

[22] Zhou X. T., Zhang R. Q., Peng H. Y., et. al, Highly Efficient and Stable Photoluminescence from Silicon Nanowires Coated with SiC[J], Chem. Phys. Lett., 2000, 332(3-4): 215-218

[23] Lee C. J., Lee T. J., Iyu S. C., et. al, Field Emission from Well-Aligned Zinc Oxide Nanowires Grown at Low Temperature[J], Appl. Phys. Lett., 2002, 81(19): 3648-3650

[24] Mayers B. T., Liu K., Sunderland D., et. al, Sonochemical Synthesis of Trigonal Selenium Nanowires[J], Chem. Mater., 2003, 15(20): 3852-3858

[25] Gates B., Yin Y., Xia Y., A Solution-Phase Approach To the Synthesis of Uniform Nanowires of Crystalline Selenium with Lateral Dimensions in the Range of 10-30nm[J], J. Am. Chem. Soc. 2000, 122(50): 12582-12583

[26] Xie G., Qiao Z. P., Zeng M. H., et. al, A Single-Source Approach To Bi₂S₃ and Sb₂S₃ Nanorods via a Hydrothermal Treatment[J], Cryst. Growth Des., 2004, 4(3): 513-516

[27] Yang J., Liu Y. C., Lin H. M., et. al, A Chain-Structure Nanotube: Growth and Characterization of Single-crystal Sb₂S₃ Nanotubes via a Chemical Vapor Transport Reaction[J], Adv. Mater., 2004, 16(8): 713-716

[28] Li C., Yang X., Liu Y., et. al. Growth of Crystalline Sb₂S₃ Nanorods by Hydrothermal Method[J], J. Cryst. Growth, 2003, 255(3-4): 342-347

[29] Shao M. W., Zhang W., Wu Z. C., et. al, A Template-Free Route To Bi₂S₃ Nanoribbons[J], J. Cryst. Growth, 2004, 265: 318-321

[30] Ye C., Meng G., Jiang Z., et. al, Growth of Bi₂S₃ Nanotubes from Quasi-Two-Dimensional Precursors[J], J. Am. Chem. Soc., 2002, 124(51): 15180-15181

[31] Liu Z., Peng S., Xie Q., et. al, Large-Scale Synthesis of Ultralong Bi₂S₃ Nanoribbons via a Solvothermal Process[J], Adv. Mater., 2003, 15(11): 936-940

[32] Shen G. Z., Chen D., Tang K. B., et. al, A Rapid Ethylenediamine-Assisted Polyol Route To Synthesize Sb₂E₃ (E=S, Se) Nanowires[J], J. Cryst. Growth, 2003, 252(1-3): 350-354

[33] Duan X., Lieber C. M., General Synthesis of Compound Semiconductor Nanowires[J], Adv. Mater., 2000, 12, 298-302

[34] Selvam P., Bhatia S. K., Sonwane C. G., Recent Advances in Processing and Characterization of Periodic Mesoporous MCM-41 Silicate Molecular Sieves[J], Ind. Eng. Chem. Res., 2001, 40 (15): 3237-3261

[35] Yang Z. L., Niu Z. W., Cao X. Y., et. al, Template Synthesis of Uniform 1D Mesostructured Silica Materials and Their Arrays in Anodic Alumina Membranes[J], Angew. Chem. Int. Ed, 2003, 42: 4201-4203

[36] Wang D. H., Luo H. M., Kou R., et. al, A General Route To Macroscopic Hierarchical 3D Nanowire Networks[J], Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43: 6169-6173

[37] Yang Z. Z., Niu Z. W., Lu Y. F., et. al, Templated Synthesis of Inorganic Hollow Spheres with a Tunable Cavity Size on to Core-Shell Gel Particles[J], Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 42: 1943-1945

[38] Haremza J. M., Hahn M. A., Krauss T. D., et. al, Attachment of Single CdSe Nanocrystals To Individual Single-Walled Carbon Nanotubes[J], Nano Lett., 2002, 2(11): 1253-1258

[39] Gates B., Wu Y., Xia Y., et. al, Single-Crystalline Nanowires of Ag₂Se Can be Synthesized by Templating Against Nanowires of Trigonal Se[J], J. Am. Chem. Soc., 2001, 123(46): 11500-11501

[40] Jiang X., Mayers B., Xia Y., Direct Synthesis of Se@CdSe Nanocables And CdSe Nanotubes

- by Reacting Cadmium Salts with Se Nanowires[J], *Adv. Mater.*, 2003, 15(20): 1740-1743
- [41] Mayers B., Jiang X., Xia Y., et. al, Hollow Nanostructures of Platinum with Controllable Dimensions Can Be Synthesized by Templating against Selenium Nanowires and Colloids[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(44): 13364-13365
- [42] Wang X., Gao P., Li J., et. al, Rectangular Porous ZnO-ZnS Nanocables and ZnS Nanotubes[J], *Adv. Mater.*, 2002, 14(23): 1732-1735
- [43] Sun Y., Xia Y., Alloying and Dealloying Processes Involved in the Preparation of Metal Nanoshells through a Galvanic Replacement Reaction[J], *Nano Lett.*, 2003, 3(11): 1569-1572
- [44] Chen J., Wiley B., Xia Y., Optical Properties of Pd-Ag and Pt-Ag Nanoboxes Synthesized via Galvanic Replacement Reactions[J], *Nano Lett.*, 2005, 5(10): 2058-2062
- [45] Sun Y., Mayers B. T., Xia Y., Template-Engaged Replacement Reaction: a One-Step Approach To the Large-Scale Synthesis of Metal Nanostructures with Hollow Interiors[J], *Nano Lett.*, 2002, 2(5): 481-485
- [46] Sun Y., Xia Y., Mechanistic Study on the Replacement Reaction between Silver Nanostructures and Chloroauric Acid in Aqueous Medium[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126(12): 3892-3901
- [47] Lisiecki I., Pileni M. P., Synthesis of Well-Defined and Low Size Distribution Cobalt Nanocrystals: the Limited Influence of Reverse Micelles[J], *Langmuir*, 2003, 19(22): 9486-9489
- [48] Quinlan F. T., Kuther J., W. Tremel, Synthesis and Characterization of ZnSe Nanoparticles[J], *Langmuir*, 2000, 16(8): 4049-4051
- [49] Bunker C. E., Harruff B. Pathak A., P., et. al, Formation of Cadmium Sulfide Nanoparticles in Reverse Micelles: Extreme Sensitivity TOP reparation Procedure[J], *Langmuir*, 2004, 20: 5642-5644
- [50] Lee Y., Lee J., Bae C. J., Large-Scale Synthesis of Uniform and Crystalline Magnetite Nanoparticles using Reverse Micelles as Nanoreactors under Reflux Conditions[J], *Adv. Funct. Mater.*, 2005, 15(3): 503-509
- [51] Sau T. K., Murphy C. J., Self-Assembly Patterns Formed upon Solvent Evaporation of Aqueous CTAB-Coated Gold Nanoparticles of Various Shapes[J], *Langmuir*, 2005, 21: 2923-2929
- [52] Murphy C. J., Jana N. R., Controlling the Aspect Ratio of Inorganic Nanorods and Nanowires[J], *Adv. Mater.*, 2002, 14(1): 80-82
- [53] Li Y. D., Li X. L., Deng Z. X., et. al, Surfactant-Inorganic Mesostructures To Tungsten Nanowires[J], *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41(2): 333-335
- [54] Hopkins D. S., Pekker D., Goldbart P. M., et. al, Quantum Interference Device Made by DNA Templating of Superconducting Nanowires[J], *Science*, 2005, 308: 1762-1765
- [55] Keren K., Krueger M., Gilad R., et. al, Sequence-Specific Molecular Lithography on Single DNA Molecules[J], *Science*, 2002, 297: 72-75
- [56] Richter J., Seidel R., Kirsch R., et. al, Nanoscale Palladium Metallization of DNA[J], *Adv. Mater.*, 2000, 12(7): 507-510
- [57] Ford W. E., Harnack O., Yasuda A., et. al, Platinated DNA as Precursors To Templated Chains of Metal Nanoparticles[J], *Adv. Mater.*, 2001, 13(23): 1793-1797
- [58] Alivisatos P., The Use of Nanocrystals in Biological Detection[J], *Nature Biotechnology*, 2004, 22(1): 47-52
- [59] Edwards H. K., Salyer P. A., Roe M. J., et. al, Nanowires of Nb₃Te₄: a Nanostructured Chalcogenide[J], *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 3555-3558

- [60] Wen X., Wang S., Ding Y., et. al, Controlled Growth of Large-Area, Uniform, Vertically Aligned Arrays of Fe₂O₃ Nanobelts and Nanowires[J], *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109(1): 215-220.
- [61] Wen X., Zhang W., Yang S., Synthesis of Cu(OH)₂ and CuO Nanoribbon Arrays on a Copper Surface[J], *Langmuir*, 2003, 19(14): 5898-5903
- [62] Wen X., Wang S., Xie Y., et. al, Low-Temperature Synthesis of Single Crystalline Ag₂S Nanowires on Silver Substrates[J], *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109(20): 10100-10106
- [63] Kong X. Y., Ding Y., Yang R. S., et. al, Single-Crystal Nanorings Formed by Epitaxial Self-Coiling of Polar-Nanobelts[J], *Science*, 2004, 303: 1348-1351
- [64] Wang Z. L., Self-Assembled Nanoarchitectures of Polar Nanobelts/Nanowires[J], *J. Mater. Chem.*, 2005, 15: 1021-1024
- [65] Tang K. B., Qian Y. T., Zeng J. H., et. al, Solvothermal Route To Semiconductor Nanowires[J], *Adv. Mater.*, 2003, 15(5): 448-450
- [66] Wang D. B., Mo M. S., Yu D. B., et. al, Large-Scale Growth and Shape Evolution of Cu₂O Cubes, *Cryst. Growth Des.*, 2004, 4: 717-720
- [67] Xu D., Liu Z., Liang J., et. al, Solvothermal Synthesis of CdS Nanowires in a Mixed Solvent of Ethylenediamine and Dodecanethiol[J], *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109(30): 14344-14349
- [68] Yang J., Cheng G. H., Zeng J. H., et. al, Shape Control and Characterization of Transition Metal Diselenides MSe₂(M = Ni, Co, Fe) Prepared by a Solvothermal-Reduction Process[J], *Chem. Mater.*, 2001, 13(3): 848-853
- [69] Yu S. H., Wu Y. S., Yang J., et. al, A Novel Solvothermal Synthetic Route To Nanocrystalline CdE(E=S, Se, Te) and Morphological Control[J], *Chem. Mater.*, 1998, 10: 2309-2312
- [70] Deng H., Li X., Peng Q., et. al, Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres[J], *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 2782-2785
- [71] Liu J. F., Li Q. H., Wang T. H., et. al, Metastable Vanadium Dioxide Nanobelts: Hydrothermal Synthesis, Electrical Transport, and Magnetic Properties[J], *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 5048-5052
- [72] Wang X., Zhuang J., Peng Q., et. al, A General Strategy for Nanocrystal Synthesis[J], *Nature*, 2005, 437: 121-124
- [73] Wang X., Lu J., Xie Y., et. al, A Novel Route To Multiwalled Carbon Nanotubes and Carbon Nanorods at Low Temperature[J], *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106(5): 933-937
- [74] Manna L., Scher E. C., Alivisatos A. P., Synthesis of Soluble and Processable Rod-, Arrow-, Teardrop-, and Tetrapod-Shaped CdSe Nanocrystals[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(51): 12700-12706
- [75] Peng Z. A., Peng X. G., Nearly Monodisperse and Shape-Controlled CdSe Nanocrystals via Alternative Routes: Nucleation and Growth[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124(13): 3343-3353
- [76] Peng X. G., Mechanisms for the Shape-Control and Shape-Evolution of Colloidal Semiconductor Nanocrystals[J], *Adv. Mater.*, 2003, 15(5): 459-463
- [77] Sun Y. G., Xia Y. N., Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles[J], *Science*, 2002, 298: 2176-2179
- [78] Sun Y., Mayers B., Xia Y., et. al, Polyol Synthesis of Uniform Silver Nanowires: A Plausible Growth Mechanism and the Supporting Evidence[J], *Nano Lett.*, 2003, 3(7): 955-960
- [79] Sun Y., Yin Y., Xia Y., et. al, Uniform Silver Nanowires Synthesis by Reducing AgNO₃ with Ethylene Glycol in the Presence of Seeds and Poly(Vinyl Pyrrolidone)[J], *Chem. Mater.*, 2002, 14(11): 4736-4745

- [80] Herricks T., Chen J., Xia Y., Polyol Synthesis of Platinum Nanoparticles: Control of Morphology with Sodium Nitrate[J], *Nano Lett.*, 2004; 4(12): 2367-2371
- [81] Wang Y., Jiang X., Herricks T., et. al, Single Crystalline Nanowires of Lead: Large-Scale Synthesis, Mechanistic Studies, and Transport Measurements[J], *J. Phys. Chem. B*, 2004; 108(25): 8631-8640
- [82] Sau T. K., Murphy C. J., Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2004,126(28): 8648-8649
- [83] 楼迪民, 方荣恩, 十二烷基苯磺酸钠性能改进的研究[J], *精细化工*, 1990 7(4): 71-74
- [84] 胡金华, 王伟宁, 新型氢氧化镁阻燃剂的应用研究[J], *工程塑料应用*, 1990(4): 15-17
- [85] 杨咏来, 宁桂玲, 液相法制备纳米粉体时防团聚方法概述[J], *材料导报*, 1998 b12(2): 11-13
- [86] 曾戎, 容敏智, 章明秋等, 纳米银粒子/有机溶剂的界面作用、分散性及光学性能[J], *材料研究学报*, 2000, 14 (5): 475-480
- [87] 邱孙青, 董浚修, 陈国需, 分散介质对铜纳米粒子润滑油添加剂摩擦学性能的影响[J], *润滑与密封*, 1999, (3): 14-16
- [88] 何峰, 张正义, 汪武祥等, 超细粉润滑剂的稳定性[J], *北京科技大学学报*, 2000, 22(3): 263-269
- [89] 傅洵, 胡正水, 王德宝等, 萃取体系第三相的生成, 微观结构与应用研究: 三相萃取体系研究进展[J], *化学通报*, 2000, 63(4): 13-17
- [90] Song X., Sun S., Zhang W, A method for the synthesis of spherical copper nano-particles in the organic phase[J], *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 273: 463
- [91] 张绍玲, 石华强, 傅洵, 胡正水, 含萃取剂修饰的纳米 Bi_2S_3 有机流体的制备与表征[J], *《稀有金属材料与工程》*, 2005, 6, 192-195
- [92] Shi H. Q., Fu X., Zhou X. D., Hu Z. S., Preparation of organic fluid containing Ag nano-particles with extractant Cyanex 301[J], *J. Disp. Sci. Tech.*, 2005, 26: 315-318
- [93] Shi H. Q., Fu X., Zhou X. D., Hu Z. S., Preparation of organic fluids with high loading concentration of Ag_2S nano-particles using extractant Cyanex 301[J], *J. Mater. Chem.*, 2006, 16 (21) 2097-2101.
- [94] Wang X., Lu J., Xie Y., et. al, A novel route to multiwalled carbon nanotubes and carbon nanorods at low temperature[J], *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106(5): 933-937
- [95] Peng X. G., Manna L., Yang W. D., et. al, Shape control of CdSe nanocrystals[J], *Nature*, 2000, 404: 59-61
- [96] Manna L., Scher E. C., Alivisatos A. P., Synthesis of soluble and processable rod-, arrow-, teardrop-, and tetrapod-shaped CdSe nanocrystals[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(51): 12700-12706
- [97] Peng X. G., Wickham J., Alivisatos A. P., Kinetics of II-VI and III-V colloidal semiconductor nanocrystal growth: "Focusing" of size distributions[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120(21): 5343-5344
- [98] Peng X. G., Mechanisms for the shape-control and shape-evolution of colloidal semiconductor nanocrystals[J], *Adv. Mater.*, 2003, 15(5): 459-463
- [99] Li Y. D., Liao H. W., Ding Y., et. al, Nonaqueous synthesis of CdS nanorod semiconductor[J], *Chem. Mater.*, 1998, 10(9): 2301-2303

- [100] Yang J., Cheng G. H., Zeng J. H., et. al, Shape control and characterization of transition metal diselenides MSe_2 ($M=Ni, Co, Fe$) prepared by a solvothermal-reduction process[J], *Chem. Mater.*, 2001, 13(3): 848-853
- [101] Wang W., Geng Y., Yan P., et. al, A novel mild route to nanocrystalline selenides at room temperature[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121(16): 4062-4063
- [102] Liu Y., Cao J., Li C., et. al, Hydrazine route to one-dimensional structural metal selenides crystals[J], *J. Cryst. Growth*, 2004, 261(4):508-513
- [103] Zhang W., Zhang X., Zhang L., et. al, A redox reaction to synthesize nanocrystalline $Cu_{1-x}Se$ in aqueous solution[J], *Inorg. Chem.*, 2000, 39(9):1838-1839
- [104] Zhang W., Wang C., Zhang L., et. al, Room temperature synthesis of cubic nanocrystalline CdSe in aqueous solution[J], *J. Solid State Chem.* 2000, 151(2):241-244
- [105] Gorer S., Albu Y. A., Hodes G., Quantum size effects in chemically deposited, nanocrystalline lead selenide films[J], *J. Phys. Chem.*, 1995, 99(44):16442-16448
- [106] Gorer S., Hodes G., Quantum size effects in the study of chemical solution deposition, mechanisms of semiconductor films[J], *J. Phys. Chem.*, 1994, 98(20):5338-5346
- [107] Wang J., Liu G. D., Polsky R., et. al, Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags[J], *Electrochem. Commun.*, 2002, 4: 722-726
- [108] Zhu N., Zhang A., Fang Y. Z., et. al, Cadmium sulfide nanocluster-based electrochemical stripping detection of DNA hybridization[J], *Analyst*, 2003, 128(3):260-264
- [109] Wang J., Liu G., Merkoçi A., Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125:3214-3215
- [110] Kobayashi M., Review on structural and dynamical properties of silver chalcogenides[J], *Solid State Ionics*, 1990, 39: 121-149
- [111] Ferhat M., Nagao J., Thermoelectric and transport properties of β - Ag_2Se compounds[J], *J. Appl. Phys.*, 2000, 88: 813-816
- [112] Das V. D., Karunakaran D., Thermoelectric power of annealed β - Ag_2Se alloy thin films: Temperature and size effects—possibility of a new (β_2) phase at low temperatures[J], *J. Appl. Phys.*, 1990, 67: 878-883
- [113] Okabe T., Ura K., High-resolution electron-microscopic studies of the polymorphs in $Ag_{2+\delta}Se$ films[J], *J. Appl. Crystallogr.*, 1994, 27, 140-145
- [114] Sáfrán G., Geszti O., Radnóczy G., et. al, TEM study of Ag_2Se developed by the reaction of polycrystalline silver films and selenium[J], *Thin Solid Films*, 1998, 317: 72-76
- [115] Pejova B., Najdoski M., Grozdanov L., et. al, Chemical bath deposition of nanocrystalline (111) textured Ag_2Se thin films[J], *Mater. Lett.*, 2000, 43: 269-273
- [116] Batabyal S. K., Basu C., Das A. R., et. al, Micropatterns of Ag_2Se Nanocrystals[J], *Cryst. Growth Des.*, 2004, 4, 509-511
- [117] Zhan J. H., Yang X. G., Li S. D., et. al, Synthesis of Ag_2Se by sonochemical reaction of Se with $AgNO_3$ in non-aqueous solvent[J], *Int. J. Inorg. Mater.*, 2001, 3: 47-49
- [118] Tan H., Li S. P., Fan W. Y., Core-Shell and Hollow Nanocrystal Formation via Small Molecule Surface Photodissociation; $Ag@Ag_2Se$ as an Example[J], *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110: 15812-15816
- [119] Gates B., Y., Yang P. D., Xia Y. N., et. al, Single-Crystalline Nanowires of Ag_2Se Can Be Synthesized by Templating against Nanowires of Trigonal Se[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123:

11500-11501

- [120] Zhu W., Wang W. Z., Shi J. L., A Reverse Cation-Exchange Route to Hollow PbSe Nanospheres Evolving from Se/Ag₂Se Core/Shell Colloids[J], *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110: 9785-9790
- [121] Bruchez M., Moronne M., Gin P., et. al, Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 12142-12150
- [122] Wang J., Liu G. D., Polsky R., Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags[J], *Electrochem. Commun.*, 2002, 4: 722-726
- [123] Wang J., Liu G. D., Merkoçi A., Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 3214-3215
- [124] Wang J., Liu G. D., Zhu Q. Y., et. al, Electrochemical detection of DNA hybridization based on carbon-nanotubes loaded with CdS tags[J], *Electrochem. Commun.*, 2003, 5, 1000-1004
- [125] Zhu N. N., Zhang A. P., He P. G., et. al, DNA Hybridization at Magnetic Nanoparticles with Electrochemical Stripping Detection[J], *Electroanalysis*, 2004, 16: 1925-1930
- [126] Zhu N. N., Zhang A. P., Wang Q. J., et. al, Lead Sulfide Nanoparticle as Oligonucleotides Labels for Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization[J], *Electroanalysis*, 2004, 16: 577-582
- [127] Xu Y., Cai H., Fang Y. Z., et. al, Probing DNA Hybridization by Impedance Measurement Based on CdS-Oligonucleotide Nanoconjugates[J], *Electroanalysis*, 2004, 16: 150-155
- [128] Bakalova R., Zhelev Z., Baba Y., et. al, Quantum Dot-Conjugated Hybridization Probes for Preliminary Screening of siRNA Sequences[J], *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127: 11328-11335
- [129] http://srdata.nist.gov/xps/main_search_menu.htm.
- [130] Zhang Z. T., Zhao B., Hu L. M., PVP Protective Mechanism of Ultrafine Silver Powder Synthesized by Chemical Reduction Processes[J], *J. Solid State Chem.*, 1996, 121: 105-110
- [131] Wu J. H., Li P. J., Hao S. C., et. al, A polyblend electrolyte (PVP/PEG+KI+I₂) for dye-sensitized nanocrystalline TiO₂ solar cells[J], *Electrochim. Acta*, 2007, 52, 5334-5338
- [132] Dean J. A., *Lange's Handbook of Chemistry - 15th edition*. McGraw-Hill, 1998, ISBN 0070163847.
- [133] Zhang H. Q., *Handbook of Practical Chemistry (in Chinese); the Publication of Science: Beijing*, 2001, 488.
- [134] 魏永巨, 刘翠格, 默丽萍, 碘、碘离子和碘三离子的紫外吸收光谱[J], *光谱学与光谱分析*, 2005, 25: 86-88
- [135] El-Sayed M.A., Small is different: shape-, size-, and composition-dependent properties of some colloidal semiconductor nanocrystals[J], *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37: 326-333
- [136] Badr Y., Mahmoud M. A., Size-dependent spectroscopic, optical, and electrical properties of PbSe nanoparticles[J], *J. Cryst. Res. Technol.*, 2006, 41, 658-663
- [137] Alivisatos A.P., Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals[J], *J. Phys. Chem.*, 1996, 100: 13226-13239
- [138] Fendler J. H., Meldrum F. C., The colloid chemical approach nanostructured materials[J], *Adv. Mater.*, 1995, 7: 607-632
- [139] Chan W. C. W., Nie S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J], *Science*, 1998, 281: 2016-2018
- [140] Mitchell G. P., Mirkin C. A., Letsinger R. L. Programmed assembly of DNA functionalized

- quantum dots[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121: 8122-8123
- [141] Gautier C., Breton G., Nouaoura M., et. al, Chemical and electrochemical passivation of PbSe thin layers grown by molecular beam epitaxy[J], *J. Electrochem. Soc.*, 1998, 145: 512-517
- [142] Tetyorkin V. V., Sipatov A. Y., Sizov F.F., et. al, (001)-oriented lead selenide films grown on silicon substrates[J], *Infrared Phys. Technol.*, 1996, 37: 379-384
- [143] Beyer T., Tacke M., Antireflection coatings for PbSe diode lasers[J], *Appl. Phys. Lett.*, 1998, 73: 1191-1193
- [144] Wehrenberg B. L. and Guyot-Sionnest P., Electron and hole injection in PbSe quantum dot films[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 7806-7807
- [145] Cho K. S., Talapin D. V., Gaschler W. et. al, Designing PbSe nanowires and nanorings through oriented attachment of nanoparticles[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 7140-7147
- [146] Tong H., Zhu Y. J., Yang L. X., et. al, Lead chalcogenide nanotubes synthesized by biomolecule-assisted self-assembly of nanocrystals at room temperature[J], *Angew. Chem.*, 2006, 118: 7903-7906
- [147] Xu D. S., Shi X. S., Guo G. L., et. al, Electrochemical preparation of CdSe nanowire arrays[J], *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104: 5061-5063
- [148] Zhu J. J., Palchik O., Chen S. G. et. al, Microwave assisted preparation of CdSe, PbSe, and Cu_{2-x}Se nanoparticles[J], *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104: 7344-7347
- [149] Sasha G. Ana A. Y., Gary H., Chemical solution deposition of lead selenide films: a mechanistic and structural study[J], *Chem. Mater.*, 1995, 7: 1243-1256
- [150] Ptatschek V., Schreder B., Herz K., et. al, Sol-gel synthesis and spectroscopic properties of thick nanocrystalline CdSe films[J], *J. Phys. Chem. B*, 1997, 101: 8898-8906
- [151] Zhao W. B., Zhu J. J., Chen H. Y., Photochemical preparation of rectangular PbSe and CdSe nanoparticles[J], *J. Crystal Growth*, 2003, 252: 587-592
- [152] Kiriy A., Minko S., Gorodyska G., et. al, Wire-Shaped Nanoparticles from Single Synthetic Polycation Molecules[J], *Nano Lett.*, 2002, 2: 881-885
- [153] Bronstein L. M., Linton C., Karlinsey R., et. al, Synthesis of Metal-Loaded Poly(aminoethyl)(aminopropyl)silsesquioxane Colloids and Their Self-Organization into Dendrites[J], *Nano Lett.*, 2002, 2: 873-876
- [154] Storhoff J. J., Lazarides A. A., Mucic R. C., et. al, What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 4640-4650
- [155] Monson C. F., Woolley A. T., DNA-Templated Construction of Copper Nanowires[J], *Nano Lett.*, 2003, 3: 359-363
- [156] Kanehara M., Oumi Y., Sano T., et. al, Formation of Low-Symmetric 2D Superlattices of Gold Nanoparticles through Surface Modification by Acid-Base Interaction[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 8708-8709
- [157] Zhang B., Ye X. C., Hou W. Y., et. al, Biomolecule-Assisted Synthesis and Electrochemical Hydrogen Storage of Bi₂S₃ Flowerlike Patterns with Well-Aligned Nanorods[J], *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110: 8978-8985
- [158] Chen X. Y., Zhang X. F., Wang Z. H., et. al, Biomolecule-assisted hydrothermal synthesis and one-dimensional self-assembly of copper sulfide nanocrystallites[J], *Mater. Chem. and Physics*, 2006, 98: 419-421
- [159] Tong H., Zhu Y. J., Yang L. X., et. al, Lead Chalcogenide Nanotubes Synthesized by Biomolecule-Assisted Self-Assembly of Nanocrystals at Room Temperature[J], *Angew. Chem.*,

2006, 118: 7903-7906

[160] Klein D. L., Roth R., Lim A. K. L., et. al, A single-electron transistor made from a cadmium selenide nanocrystal[J], *Nature*, 1997, 389: 699-701

[161] Colvin V. L., Schlamp M. C., Alivisatos A. P., Light-emitting diodes cadmium selenide nanocrystals and a semiconducting polymer[J], *Nature*, 1994, 370: 354-357

[162] Chan W. C. W., Nie S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J], *Science*, 1998, 281: 2016-2018

[163] Bruchez M., Moronne M., Gin P., et. al, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J], *Science*, 1998, 281: 2013-2016

[164] Hines M. A., Guyot-Sionnest P., Bright UV-Blue Luminescent Colloidal ZnSe Nanocrystals[J], *J. Phys. Chem. B*, 1998, 102: 3655-3657

[165] Murase N.; Gao M. Y., Preparation and photoluminescence of water-dispersible ZnSe nanocrystals[J], *Mater. Lett.*, 2004, 58: 3898-3902

[166] Zhang J., Zou H. L., Qing Q., et. al, Effect of Chemical Oxidation on the Structure of Single-Walled Carbon Nanotubes[J], *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107: 3712-3718

[167] Huang E., Zhou F. M., Deng L., Studies of Surface Coverage and Orientation of DNA Molecules Immobilized onto Preformed Alkanethiol Self-Assembled Monolayers[J], *Langmuir*, 2000, 16: 3272-3280

致 谢

本学位论文是在傅洵教授的悉心指导下完成的。傅老师严谨的治学态度、活跃敏锐的学术思想以及勤奋高效的科研作风永远是我效仿的典范。求学期间，傅老师积极乐观的人生态度和以身作则的科研精神深深地影响了我，特别是老师坚持注重提高学生综合素质的培养方法，使我在学习和生活的各个方面都有了很大的提高，在此向老师表示深深地谢意。

论文完成期间焦奎老师、王磊老师、周晓东老师、朱海涛老师、蔺玉胜老师、胡正水等老师给予了我热心的指导和帮助，在此向各位老师表示真诚的感谢。

此外感谢张波、石华强、侯金霞、王继鑫、张辉、杨晓慧等同学对我的帮助和支持。

我要特别感谢我的家人，他们多年的支持、关怀和爱护是我顺利完成学业的保证。

感谢教育部重点实验室（KLECE 2007-001）、教育部博士点基金（20050426003）和国家自然科学基金重大基金（20635020）对本课题的资助。

攻读学位期间已发表和待发表的相关学位论文

[1] He Liu, Bo Zhang, Huaqiang Shi, Yingjun Tang, Kui Jiao and Xun Fu, Hydrothermal synthesis of monodisperse Ag_2Se nanoparticle in the presence of PVP and KI and its application as oligonucleotides label, *Journal of Materials Chemistry*, 2008, 18, 2573–2580

[2] He Liu, Bo Zhang, Huaqiang Shi, Kui Jiao, Xun Fu, Biomolecule-assisted hydrothermal synthesis ZnSe nanocrystallites and its application as oligonucleotides label, *Journal of Dispersion Science and Technology*,(accepted)