·实验教学·

单元素硫量子点的制备及其生物性能研究综合实验设计

陈红利[1]，康茂萍[2]，郝丽英[1*]

（1. 四川大学 华西口腔医院口腔疾病防治全国重点实验室，成都 610041；2. 山西能源学院 能源化学与材料工程系，晋中 030600）

摘要：结合材料、化学和生命科学的研究热点，设计了单元素硫量子点的制备、表征及生物性能研究的综合实验。采用自上而下的方法获得聚乙二醇修饰的硫量子点 (PEG-SQDs)。通过多种表征手段对其形貌、元素、官能团、粒径、电位及荧光性质进行综合表征分析，并研究了 PEG-SQDs 的生物相容性、荧光成像能力和入胞行为。该实验包含量子点的制备、表征分析、生物性能探究等多个步骤，涉及材料、化学、生命科学的基础知识，不仅能拓展学生的知识面，且有利于培养学生的综合实践能力和分析解决问题的能力。

关　键　词：硫量子点；生物性能；综合实验

中图分类号：TB34　　**文献标志码：**A　　DOI: 10.12179/1672-4550.20230195

Comprehensive Experiment on Preparation and Biological Properties of Single Element Sulfur Quantum Dots

CHEN Hongli[1], KANG Maoping[2], HAO Liying[1*]

（1. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
2. Department of Energy Chemistry and Materials Engineering, Shanxi Institute of Energy, Jinzhong 030600, China）

Abstract: Combined with the research hotspot of material, chemistry and life science, a comprehensive experiment on the preparation, characterization and biological properties of single element sulfur quantum dots was designed. Polyethylene glycol modified sulfur quantum dots (PEG-SQDs) were obtained by the top-down method. The morphology, elements, functional groups, particle size, potential and fluorescence properties of PEG-SQDs were comprehensively characterized and analyzed by various characterization methods. Meanwhile, the biocompatibility, fluorescence imaging ability and cell entry behavior of PEG-SQDs were also studied. This experiment includes several steps such as the preparation, characterization and biological property analysis of quantum dots, involving the basic knowledge of materials, chemistry and life science. It not only expands students' scope of knowledge, but also helps to cultivate students' comprehensive practical ability and problem-analyzing and solving ability.

Key words: sulfur quantum dots; biological properties; comprehensive experiment

荧光量子点由于其独特的尺寸和结构特性、良好的化学稳定性、宽泛的激发谱及均一对称的发射光谱、长的荧光寿命及耐光漂白性等优点在光电设备、生化分析、生物标记、生物成像、生物医学等领域具有潜在的应用价值[1−2]。然而，传统的荧光量子点通常含有一些重金属离子(CdTe、CdS、HgS、PbS 等)[3−4]，由于重金属离子潜在的生物毒性和环境危害，极大地限制了其在各领域尤其是生物医学领域中的应用。此外，小分子荧光材料由于其具有较高的荧光量子产率、较好的生物相容性等特点也被广泛应用于生物成像领域，如商业化的荧光素衍生物、罗丹明衍生物、花菁类衍生物等[5−6]。但是此类荧光材料的合成纯化比较复杂且原材料的污染比较大。因此，近年来无金属单元素量子点的合成及生物性能研究受到了研究者的关注，如碳量子点(CQDs)[7]、磷量子点(PQDs)[8]、硅量子点(SiQDs)[9]、硫量子点(SQDs)[10] 等。

硫量子点(SQDs)由于其原料来源丰富、无毒、化学稳定性好且具有天然抗菌活性等优点[11−12]，

收稿日期：2023−04−10；**修回日期：**2023−07−17

基金项目：四川大学华西口腔医院基础与应用基础研究项目(RD-02-202105)；四川大学实验技术项目(SCU1076)。

作者简介：陈红利(1991−)，女，硕士，实验师，主要从事口腔肿瘤免疫方面的研究。

*** 通信作者：**郝丽英(1987−)，女，博士，高级实验师，主要从事碳质材料的改性与应用方面的研究。E-mail: haoliying2008163@163.com

已成为近年来研究的一种新型材料。早在 2014 年，文献 [13] 首次采用硝酸刻蚀方法从 CdSQDs 中制备出 SQDs，并研究了 SQDs 的结构及光学性质；随后，文献 [14] 通过自上而下的方法合成了 PEG 修饰的 SQDs，并研究了合成条件对其光谱性质的影响；文献 [15] 采用纯氧环境下合成 SQDs，并研究了其荧光性质及量子效率；文献 [16] 采用过氧化氢辅助法改良了 SQDs 的合成方法；文献 [17] 进行了 SQDs 在分析检测方面的应用研究等。目前对 SQDs 的研究报道依然较少，且主要集中在合成方法的改进、光谱性质的研究等，对其生物性能的研究还鲜有报道。

因此，本文聚焦硫量子点在生物医学领域的应用，从硫量子的合成及生物性能的研究出发，采用升华硫粉为原料，通过自上而下的方法合成聚乙二醇修饰的硫量子点(PEG-SQDs)，采用多种表征手段分别从形貌、元素、官能团、粒径及电位进行分析表征。此外，通过分子荧光手段研究 PEG-SQDs 的荧光性质，并通过不同介质下的静置实验和细胞毒性实验研究其生物相容性。最后，利用其荧光特性，通过细胞摄取实验研究 PEG-SQDs 的荧光成像功能及入胞行为，为其在生物医学领域的应用奠定前期研究基础。本实验涵盖了材料、化学和生物医学的交叉渗透，材料新颖，制备环保、安全、简单、可行，有利于培养学生的多种实验操作实践能力和分析解决问题的综合能力，从而提升学生的科学研究兴趣和探索精神。

1　实验方法

1.1　试剂

升华硫、浓硝酸(HNO_3)、氢氧化钠(NaOH)和聚乙二醇 400(PEG-400)(成都科龙化学试剂，中国)均为分析纯，实验用二次去离子水由优普超纯水系统提供。胎牛血清(FBS)和磷酸盐缓冲溶液(PBS)(PAN 公司，德国)，青霉素链霉素、胰蛋白酶和 RPMI 1 640 培养基(Hyclone 公司，美国)，CCK-8 试剂盒(Solarbio 公司，中国)，碘化丙啶(Propyl iodide，PI)(Solarbio 公司，中国)。

1.2　合成方法

聚乙二醇修饰的硫量子点的合成可分为以下两步[14]。

1) 硫粉预处理

称取 1.000 0 g 升华硫粉与 40 mL 浓硝酸混合，搅拌条件下置于 70 ℃ 下反应 48 h。反应结束后离心洗涤至中性。

2) 一步合成

将 40 mL 蒸馏水、2 mL PEG-400 和 3.000 0 g NaOH 依次加入硝酸处理后的硫粉中，70 ℃ 下继续反应 72 h，待反应结束后，置于 3 500 Da 的透析袋中透析至中性，命名为聚乙二醇修饰的硫量子点 (PEG-SQDs)。

具体操作流程如图 1 所示。

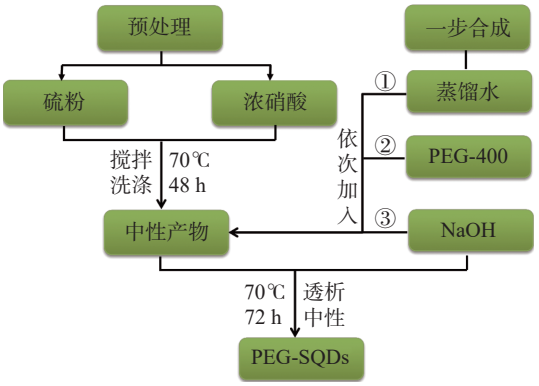


图 1　PEG-SQDs 的合成流程图

1.3　硫量子点的表征

采用英国 Malvern 公司 Nano ZS90 型动态光散射仪进行硫量子点表面电荷和粒径大小的测定；采用美国 FEI 公司 Inspect F 型场发射扫描电子显微镜(FE-SEM)和日本岛津公司 SPM-9 700 型原子力显微镜(AFM)进行其表面微观形貌的表征；采用美国 Thermo 公司 Nicolet IS10 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)对其官能团进行分析表征；采用英国 Kratos 公司 AXIS Ultra DLD 型的 X-射线光电子能谱仪(XPS)进行元素分析表征；采用日本岛津公司 RF-5301PC 型分子荧光仪进行量子点荧光性能的分析；采用美国 Thermo 公司 VariOskanFlas 3 001 型酶标仪进行细胞毒性的定量分析；采用日本 Nikon 公司 Ni-E 型激光共聚焦显微镜(CLSM)进行硫量子点的入胞监测。

1.4　成纤维细胞培养

将冻存的不超过 4 代的小鼠成纤维细胞株(L929)复苏于 RPMI 1 640 培养基中(10% FBS+1% 青霉素链霉素)，贴壁生长 24 h 后，经 PBS 洗涤、换液处理，直至瓶底长满细胞，观察其形态和铺展情况良好后，备用。

1.5　生物相容性评估

PEG-SQDs 的生物相容性从稳定性和细胞毒性两方面评估。

1）稳定性

分别将 PEG-SQDs 和水、PBS、RPMI 1640 和含有血清的 RPMI 1640 以 1:1 比例混合，静置 3 个月后观察其在各介质中的情况。

2）细胞毒性

将消化后的 L929 细胞接种于 96 孔板中（2×10^4/孔），培养过夜使其形态生长状态良好，然后加入不同浓度的 PEG-SQDs（0，50，100，200，300，400，500，800，1 000，2 000，3 000 μg/mL）培养 24，48，72 h 后，通过 CCK-8 测试原理记录在 450 nm 处的吸光度，用不同处理条件下测得的吸光度计算细胞存活率为：

$$细胞存活率 = [(A_s - A_b)/(A_c - A_b)]\times 100\% \quad (1)$$

式中：A_s 代表实验孔，A_c 代表对照孔，A_b 代表空白孔。

1.6　材料入胞实验

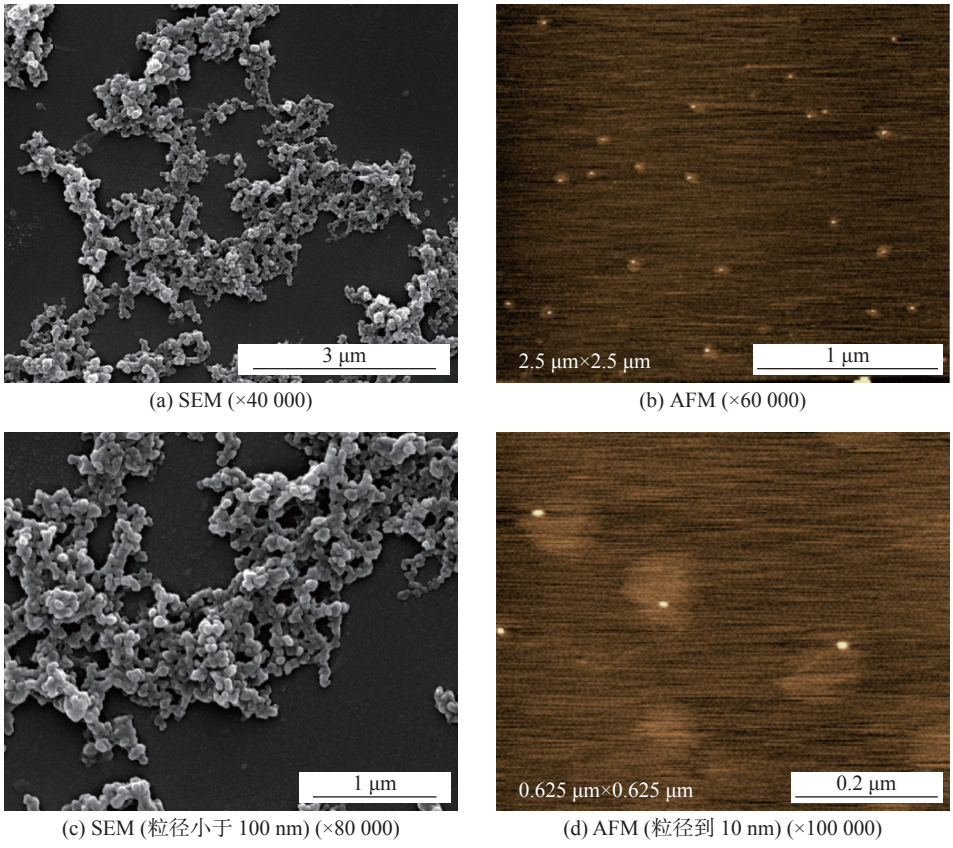
将消化好的 L929 接种于经紫外消毒后的铺有细胞爬片的 24 孔板中（4×10^4/孔），培养过夜使其贴壁生长；然后将 200 μg/mL 的 PEG-SQDs 加入孔中，与细胞共培养 6 h 和 12 h 后，使用 PBS 洗涤几次；再使用多聚甲醛固定 15 min，经过 PBS 洗涤，参考使用说明书加入 PI 染色，再使用 PBS 洗涤 3 次；最后通过激光共聚焦显微镜。561 nm 激发，红色荧光代表 PI 染色的细胞核；405 nm 激发，绿色荧光代表 PEG-SQDs 的入胞情况。

2　结果与讨论

2.1　聚乙二醇修饰的硫量子点的表征

1）微观形貌表征

采用 SEM 和 AFM 进行 PEG-SQDs 的微观形貌观察。如图 2（a）、（c）的 SEM 图所示，获得的硫材料呈现圆形颗粒堆积状态，高倍放大下，呈现纳米颗粒形貌，粒径小于 100 nm。AFM 进一步更清楚地观察硫材料的微观形貌及粒径大小。如图 2（b）、（d）所示，PEG-SQDs 呈现一种小颗粒被包裹的“鸡蛋式”单分散结构，其中中间的“蛋黄式”小颗粒表示纯硫点，粒径约为 10 nm，周围“蛋白式”包裹的材料是 PEG，表明硫量子点被 PEG 修饰，获得 PEG 修饰的硫量子点（PFG-SQDs）粒径约为 80 nm。以图 2 分析表明，粒径为 10 nm 左右的纯硫量子点被 PEG 成功修饰，获得 PFG-SQDs，降低了硫量子点的团聚，以期增强其生物相容性。



(a) SEM (×40 000)　(b) AFM (×60 000)

(c) SEM (粒径小于 100 nm) (×80 000)　(d) AFM (粒径到 10 nm) (×100 000)

图 2　不同倍数下 PEG-SQDs 的 SEM 和 AFM 图

2）元素及官能团表征

采用 XPS 和 FTIR 进行 PEG-SQDs 的元素及官能团分析。如图 3（a）XPS 结果所示，PEG-SQDs 中主要含有 C、S 和 O 元素，由于 PEG-400 的修饰，可清楚观察到 C 和 O 两种元素。图 3（b）FT-IR 分析 PEG-SQDs 的官能团，结果显示：3 433 cm^{-1} 和 1 647 cm^{-1} 处观察到 H_2O 中 O—H 的伸缩振动和 H—O—H 的弯曲振动峰[18−19]。此外，修饰 PEG-SQDs 的 PEG-400 的特征峰也同时被观察到，分别是：2 866 cm^{-1} 处 C—H 伸缩振动吸收峰；1 452 cm^{-1} 和 1 348 cm^{-1} 处 C—H 弯曲振动的吸收峰；1 093 cm^{-1} 处 C—O—H 伸缩振动引起的吸收峰；943 cm^{-1} 处 O—H 伸缩振动引起的吸收峰[20]。其中，指纹区的红外吸收光谱复杂特征性差，但是可以反映分子结构的细微变化。如本工作中在 669 cm^{-1} 处观察到一个小峰，主要是由于 S—O 的弯曲振动引起的[17]。此外，FTIR 图中未观察到新的吸收峰出现，表明 PEG-400 物理吸附在 SQDs 的表面，作为覆盖剂和稳定剂修饰 SQDs，获得 PEG-SQDs，降低了 SQDs 的团聚性，使得材料具有较强的稳定性。

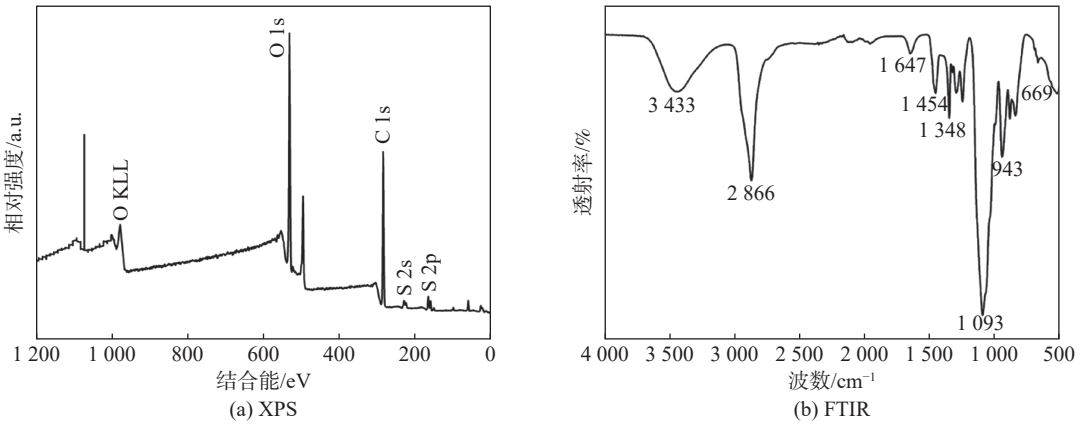


图 3　PEG-SQDs 的 XPS 和 FTIR 图

3）电位和粒径表征

采用动态光散射仪对 PEG-SQDs 的粒径和电位进行分析表征。如图 4（a）所示，PEG-SQDs 的直径约为 80 nm，与 AFM 的结果吻合。电位变化结果显示 PEG-SQDs 表面呈负性，电荷约为 −26 mV，可能是由于 PEG-SQDs 表面含有较多的磺酸盐，如图 4(b)所示。此外，较大的负电荷数值也表明了 PEG-SQDs 具有较好的稳定性。

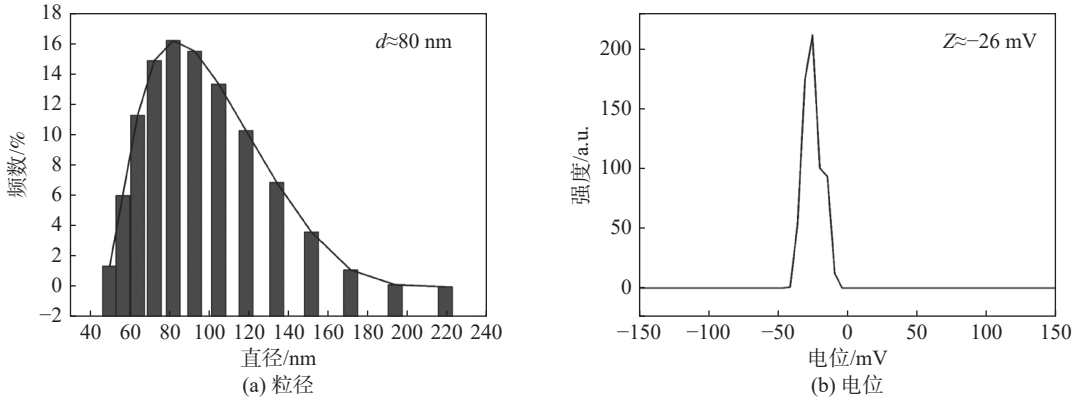
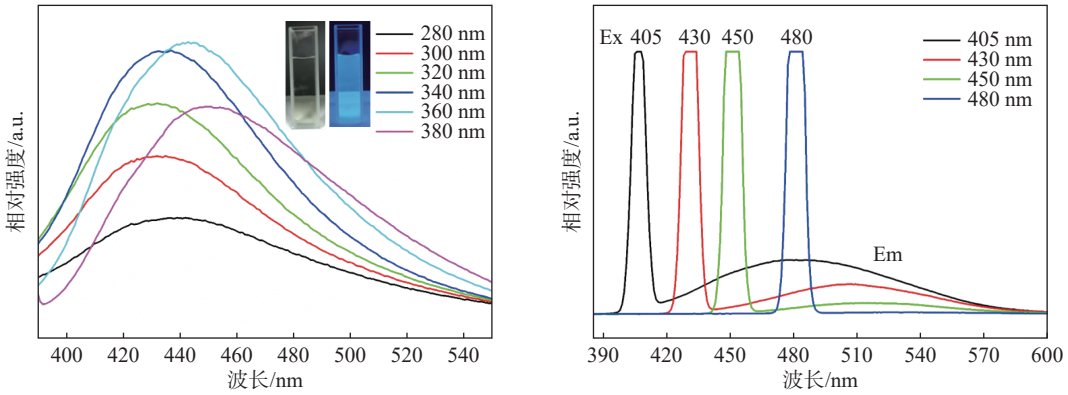


图 4　PEG-SQDs 的粒径和电位图

4）荧光性能表征

采用分子荧光仪对 PEG-SQDs 进行荧光性质评估。如图 5（a)所示，当激发波长为 280~360 nm 时，PEG-SQDs 的荧光强度逐渐增强，且当激发波长为 360 nm 时荧光强度最大并出现红移趋势；继续增大激发波长至 380 nm 时荧光强度出现减

弱趋势；当激发波长继续增大时(405~480 nm)，荧光强度急剧下降，如图 5(b) 所示。综上表明，PEG-SQDs 具有荧光性能，最佳激发波长为 360 nm，最大发射波长为 446 nm，为蓝色荧光(图 5(a)中 插图)，为其荧光成像的应用奠定基础。



(a) 激发波长为 280~380 nm　　(b) 激发波长为 405~480 nm

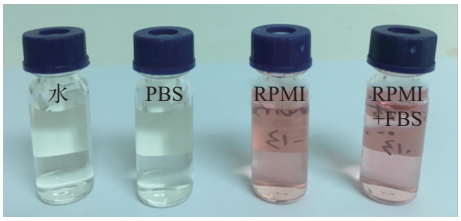
图 5　PEG-SQDs 在不同激发波长下的荧光图

2.2　生物相容性评估

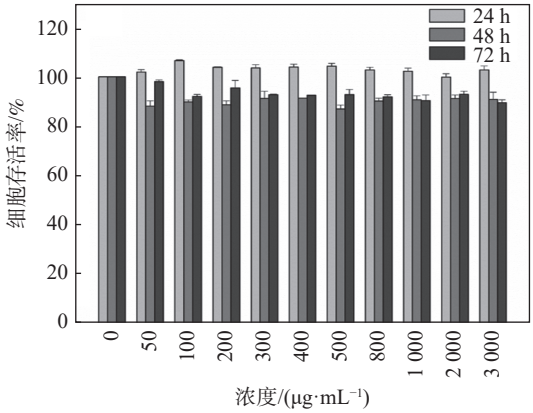
PEG-SQD 的生物相容性从稳定性和细胞毒性两方面评估。

1) 稳定性

将 PEG-SQD 与不同的介质溶液混合，静置 3 个月后，观察其在各介质中的分散情况。如图 6(a) 所示，静置 3 个月后，观察到 PEG-SQD 在水、PBS、RPMI 和 PRMI+FBS 体系中均具有良好的溶解性，未观察到沉淀或悬浮，表明 PEG-SQD 具有良好的稳定性。



(a) PEG-SQDs 在不同体系中的稳定性



(b) PEG-SQDs 对细胞的毒性研究

图 6　PEG-SQDs 生物相容性评估

2) 细胞毒性

选用小鼠成纤维细胞(L929)对 PEG-SQD 进行细胞毒性的评估。如图 6(b) 所示，当 PEG-SQD 的浓度升高到 3 000 μg/mL，72 h 的细胞存活率依然高于 90%，且在 24 h 时具有一定的促进增殖效果，表明 PEG-SQD 对 L929 几乎没有毒性，具有细胞友好性。综上结果表明，PEG-SQD 具有良好的生物相容性，为其在生物医学领域的应用奠定了基础。

2.3　入胞行为评估

200 μg/mL 的 PEG-SQDs 与 L929 细胞分别共培养 6 h 和 12 h 后，采用激光共聚焦显微镜成像技术，研究不同时间下 PEG-SQDs 的入胞情况。由材料的荧光性质(图 5)可知，PEG-SQDs 在 405 nm 处可被激发，因为与细胞核染料 DAPI 激发和发射均有重叠，为避免荧光成像的误判，本实验采用 PI 染料进行固定细胞细胞核的染色，因此 405 nm 激发，赋予材料绿色荧光，561 nm 激发，赋予细胞核红色荧光。采集图像时，共聚焦成像条件一致，因此成像图片的荧光强度可间接反映不同时间下 PEG-SQDs 的入胞量。如图 7 所示，分别共培养 6 h 和 12 h 后，PEG-SQDs 在 DAPI 通道可以看到明显的绿色荧光，且有细胞轮廓痕迹，表明 PEG-SQDs 可以顺利入胞；由图 7(a)~图 7(c)和图 7(d)~图 7(f)入胞图对比，共同培养 6 h 后，在细胞核边缘可见绿色荧光；共同培养 12 h 后，在细胞核内可见明

显的绿色荧光。综上表明，PEG-SQDs 可被 L929 细胞摄取，且随着时间的推移入胞量增多，12 h 后可进入细胞核内，在细胞成像及载体领域具有潜在的应用价值。

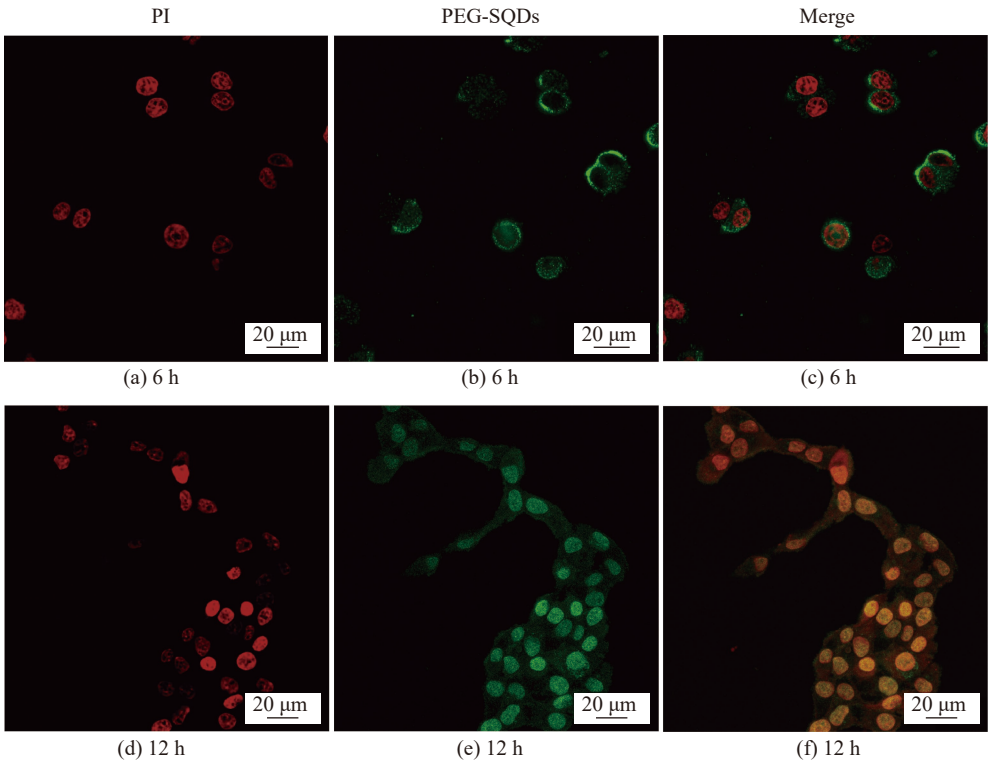


图 7　不同时间下 PEG-SQDs 的入胞成像

3　结束语

发光量子点在生物标记、生物医学等领域受到广泛的关注。其中，单元素量子点由于其毒性低、稳定性和生物相容性好且具有稳定的荧光性质等，已逐渐成为下一代供选择的荧光纳米材料。本文以近期研究热点荧光材料——硫量子点为研究对象，提出制备修饰后的硫量子点的方法并进行合成验证，同时对其荧光性质、生物相容性和入胞情况进行分析研究。结果表明：

1）通过自上而下的方法可以获得 PEG 修饰的单元素硫量子点，记为 PEG-SQDs；

2）采用多种表征手段进行理化性质的分析表征，PEG-SQDs 呈现 PEG 包裹硫量子点的“鸡蛋式”结构，粒径约为 80 nm，表面带有负电荷（−26 mV），且在 360 nm 激发下达到最大发射强度，同时 405 nm 激发下也表现出良好的荧光性质；

3）PEG-SQDs 在不同体系中具有良好的稳定性，且在高浓度下（3 000 μg/mL）未发现细胞毒性，表明 PEG-SQDs 具有良好的生物相容性；

4）PEG-SQDs 可利用自身的荧光性进行细胞荧光成像，随着时间的推移进入细胞的量增多，当共培养 12 h 后，PEG-SQDs 可以进入细胞核。

实验内容涉及材料、分析化学、仪器分析、生命科学等理论知识，具有交叉学科的特点及基础综合性。实验操作简单、环保、安全，适于学生操作。通过本实验的开展使学生了解多学科的知识及技术手段，培养和提高学生的综合实践和应用能力，进一步提升科研兴趣并提升综合素质。

参 考 文 献

[1] 刘佳欣, 彭大鹏, 梁建功, 等. 硫量子点的合成及其分析应用研究进展[J]. 分析科学学报, 2022, 38(1): 108−114.

[2] LIU L L, ZHANG Y, YUAN R, et al. Ultrasensitive electrochemiluminescence biosensor using sulfur quantum dots as an emitter and an efficient DNA walking machine with triple-stranded DNA as a signal amplifier[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(22): 15112−15119.

[3] POOJA, CHOWDHURY P. Optical and electronic properties of CdTe quantum dots in their freezed solid matrix phase and solution phase[J]. Materials Today: Proceedings, 2020, 28(1): 201−204.

[4] YAN X, PEI Y F, CHEN H, et al. Self-assembled networked PbS distribution quantum dots for resistive switching and artificial synapse performance boost of memristors[J]. Advanced Materials, 2019, 31(7): 1805284−1805293.

[5] LEE M H, SHARMA A, CHANG M J, et al. Fluorogenic reaction-based prodrug conjugates as targeted cancer theranostics[J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(1): 28−52.

[6] BEZNE B J, RYAN L S, LIPPERT A R. Reaction-based luminescent probes for reactive sulfur, oxygen, and nitrogen species: Analytical techniques and recent progress[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(1): 309−326.

[7] ZHOU L, HE B Z, HUANG J C. Amphibious fluorescent carbon dots: one-step green synthesis and application for light-emitting polymer nanocomposites[J]. Chemical Communications, 2013, 49(73): 8078−8080.

[8] SUN Z B, XIE H H, TANG S Y, et al. Ultrasmall black phosphorus quantum dots: Synthesis and use as photothermal agents[J]. Angewandte Chemie, 2015, 54(39): 11526−11530.

[9] 余婷. 硅量子点的性能研究与应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

[10] WANG Y, ZHAO Y N, WU J L, et al. Negatively charged sulfur quantum dots for treatment of drug resistant pathogenic bacterial infections[J]. Nano Letters, 2021, 21(11): 9433−9441.

[11] RAO K J, PARIA S. Use of sulfur nanoparticles as a green pesticide on Fusarium solani and Venturia inaequalis phytopathogens[J]. RSC Advances, 2013(3): 10471−10478.

[12] 邓双飞, 童婷, 任国兰, 等. 硫量子点的光稳定性研究[J]. 武汉大学学报, 2021, 67(1): 75−80.

[13] LI S, CHEN D, ZHANG F Y, et al. Water-soluble and lowly toxic sulphur quantum dots[J]. Advanced Functional Materials, 2014, 24(45): 7133−7138.

[14] SHEN L H, WANG H N, LIU S N, et al. Assembling of sulfur quantum dots in fission of sublimed sulfur[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(25): 7878−7884.

[15] SONG Y H, TAN J S, WANG G, et al. Oxygen accelerated scalable synthesis of highly fluorescent sulfur quantum dots[J]. Chemical Science, 2020, 11(3): 772−777.

[16] WANG H G, WANG Z G, YUAN X, et al. Hydrogen peroxide assisted synthesis of highly luminescent sulfur quantum dots[J]. Angewandte Chemie, 2019, 58(21): 7040−7044.

[17] TAN Q, AN X X, PAN S, et al. Hydrogen peroxide assisted synthesis of sulfur quantum dots for the detection of chromium (VI) and ascorbic acid[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, 247(2): 119122−119131.

[18] HU Z, DAI H Q, WEI X, et al. 49.25% efficient cyan emissive sulfur dots via a microwave-assisted route[J]. RSC Advances, 2020(10): 17266−17269.

[19] QIAO G X, LIU L, HAO X X, et al. Signal transduction from small particles: Sulfur nanodots featuring mercury sensing, cell entry mechanism and in vitro tracking performance[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 382(2): 122907−122918.

[20] WANG Z G, ZHANG C C, WANG H G, et al. Two step oxidation synthesis of sulfur with a red aggregation-induced emission[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(25): 9997−10002.

编辑　张俊