

硅包覆上转换纳米晶制备和表征及生物特异性标记研究

宋 凯^{1,2}, 田利金^{1,2}, 孔祥贵^{1*}, 刘 开^{1,2}, 张庆彬^{1,2},
杜 创^{1,2}, 曾庆辉¹, 孙雅娟¹, 刘晓敏¹

1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所激发态重点实验室, 吉林 长春 130033
2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘 要 以 NaYF₄ 为代表的上转换纳米晶作为细胞及组织标记的研究越来越热。但易团聚, 水溶性、生物相容性差, 没有与生物偶联官能团等缺点限制了其应用, 因而表面修饰显得尤为重要。作者通过水热和共沉淀相结合方法, 制备了 NaYF₄ : Yb³⁺, Er³⁺ 上转换纳米晶, 并对其包覆二氧化硅壳层。SEM 表征硅包覆前后分别为 25 和 250 nm 的单分散粒子, 说明硅已成功地包覆于纳米晶表面。980 nm 激光照射下, 样品的 PBS 胶体溶液呈可视上转换绿光。上转换荧光光谱和寿命均表明二氧化硅壳层对其发光性质影响很小。圆二色谱说明蛋白分子通过戊二醛与纳米晶偶联前后的二级结构基本不变。基于硅片上的抗原抗体荧光免疫识别试验进一步验证了偶联蛋白分子的特异性, 表明该上转换纳米晶适合于生物标记。

关键词 上转换; 硅包覆; 生物偶联; 免疫荧光成像

中图分类号: O472.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)01-0133-04

引 言

发光上转换纳米晶是一类在长波长光激发下发射短波长光的材料, 与传统的染料比较, 上转换荧光探针具有高灵敏性、抗漂白、不受环境影响(比如 pH 值、温度), 弱的激发散射光和无自身荧光等优点, 应用于生物标记中, 可以大大提高检测灵敏度和线性范围^[1-5]。然而在实际应用中, 各种方法制备的上转换纳米晶往往因表面配体分子的性质, 不足以使其获得理想的水溶性、单分散性和生物相容性。因此, 对上转换纳米晶的进一步表面修饰成为目前的研究热点。

本文通过对 NaYF₄ : Yb³⁺, Er³⁺ 发光上转换纳米晶的二氧化硅包覆, 利用硅烷化试剂的多样性以及所带配体的可控性, 使硅层表面修饰的化学基团与生物分子共价偶联。硅包覆修饰后纳米晶的上转换发光性质不变, 发光效率略有提高; 与蛋白分子共价偶联后, 纳米晶包硅表面对生物分子的构象影响非常小。通过模式的抗原抗体反应, 成功地实现了蛋白分子的特异性标记检测。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

硝酸钇、硝酸铒、硝酸镱为自制; 戊二醛、正硅酸乙酯 (TEOS)、丙氨基三乙氧基硅烷 (APTES) 购于 Sigma 公司; 小牛血清蛋白 (BSA) 及各类抗体 (IgG) 购于北京鼎国生物技术公司。其他试剂均为分析纯, 购于北京化工厂。

应用 Hitachi S-4800 型场发射扫描电镜对样品 FESEM 表征。Jobin-Yvon LabRam Raman 共聚焦光谱仪采集上转换光谱, 光源为 980 nm 半导体激光器。荧光寿命测量采用具有 3~6 ns 脉冲宽度的 10 MHz 重复频率的 980 nm (OPO 调谐产生, 调谐范围 445~1 750 nm), TEX-3000 示波器记录信号。蛋白圆二色谱使用日本 Jasco 公司的 J-810 圆二色谱仪。

1.2 发光上转换纳米晶的制备及二氧化硅包覆

将硝酸钇、硝酸铒、硝酸镱按 78/20/2 的摩尔比溶于 8 mL 去离子水中, 待溶解透明后, 加入等量的 EDTA 并氨水调节 pH 值至形成透明的稀土螯合物。2 mL 曲拉通 100 滴入 20 mL 乙二醇, 加入 3 mL 氢氟酸作为氟源搅拌 30 min。将 EDTA 稀土螯合溶液逐滴加入乙二醇溶液并快速搅拌, 反应

收稿日期: 2009-01-20, 修订日期: 2009-04-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (60771051, 60601015, 60601014, 10674132, 20603035) 和国家“863”项目 (2006AA03Z335) 资助

作者简介: 宋 凯, 1979 年生, 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所博士研究生 e-mail: 22533734@163.com

* 通讯联系人 e-mail: xgkong14@ciomp.ac.cn

60 min。最后反应前驱物装入 50 mL 高压釜中,放入 200 °C 烘箱加热 12 h,反应溶液离心纯化。

10 mg 样品分散于 4 mL 去离子水中并超声 10 min,加入 20 mL 乙醇剧烈搅拌。氨水调节 pH 值后,滴入 40 μL 的 TEOS,超声下反应 2 h,最后加入 APTES 10 μL ,进行氨基修饰。90 min 后离心洗涤,室温真空干燥,得白色粉末。分别对样品形貌以及上转换光谱和荧光寿命予以表征,所有测量均在室温下进行。

1.3 纳米晶和抗体分子的生物偶联

2 mg 粒子分散于含 5% 戊二醛的 PBS 缓冲液中,室温搅拌 12 h,离心后分散于 PBS 缓冲液中。加入 0.5 mg 的兔抗人 IgG 或兔抗羊 IgG,4 °C 下搅拌反应 24 h,离心去除多余抗体。最后分散于 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ 硼酸盐缓冲液中(1% BSA, 0.05% Tween-20, pH 8.5),4 °C 存放。部分样品浓缩用于圆二色谱分析。

1.4 荧光免疫标记物的光稳定性试验

3 种不同的荧光标记物: FITC、量子点和上转换纳米晶在各自有效激发波长下连续照射 1 h,每隔 2 min 采集光谱一次,得到光强度随时间变化的曲线。

1.5 上转换纳米晶标记抗体分子的体外免疫分析

参照文献^[6,7]对硅片表面进行硅烷化和醛基化处理后,室温置于含有 1% Tween-20 的人 IgG(0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹)溶液中 2 h, PBST(0.05% Tween-20, pH 7.4)反复冲洗。再将硅片分别浸于 2% BSA 和 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 乙醇胺溶液中,封闭空余位点、猝灭表面未反应完全的醛基。最后用缓冲液清洗。37 °C 下用浓度为 0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 纳米晶标记抗体浸泡硅片约 0.5 h, PBST 缓冲液冲洗数次,氮气吹干。佳能 A630 相机采集显微镜下硅片表面上转换纳米粒子的荧光数码照片。

2 分析与讨论

2.1 扫描电镜表征

$\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 发光上转换纳米晶包硅前后电镜如图 1 所示。包硅前约为 24 nm。包硅后尺寸明显变大,颗粒均一、表面光滑,分散性好。分散在 PBS 缓冲液中,形成透明溶液。在 980 nm 激发光照射下,可以观察到胶体的丁达尔现象(图 1. c)。溶液超声 10 min 后静置,2 h 内并无沉降,说明其水溶性满足进一步生物标记的需要。

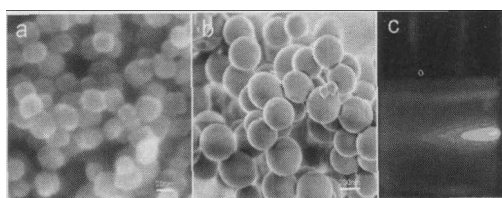


Fig. 1 SEM images of uncoated (a) and silica coated (b) $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nanoparticles and photograph of nanoparticles in the PBS buffer (c)

2.2 荧光光谱及寿命表征

发光纳米晶的粒径大小不同,被激发的粒子数也不同,

仅进行光谱测量分析将存在很大的误差。发光中心的寿命在吸收截面一致的情况下,直接反映粒子的发光效率,是表征发光强度的一个更为直接的方式。图 2 为发光上转换纳米晶包硅前(1)和包硅后(2)的上转换荧光光谱和荧光寿命。显而易见,无论是绿光发射带还是红光发射带相应能级的寿命并没有发生大的变化,对绿带而言,寿命由包硅前的 216 μs 增加到 239 μs ;红带由包硅前的 426 μs 增加到包硅后的 448 μs ,衰减基本一致。这是由于包硅后,纳米晶表面附近的 Yb^{3+} 和 Er^{3+} 发光中心受到来自表面电荷态和环境有机分子振动能量的影响减小,从而发光上转换效率得到了提高。依照文献^[8,9],纳米材料中相同的基质材料,固定的发光中心,辐射寿命不变的情况下,测量寿命越长,发光效率越高,相应的发光强度也越高,这里可看到上转换纳米晶体单个粒子的发光强度不会因为硅包覆而发生大的变化。结合上面光谱线形,可说明二氧化硅壳层不会对粒子的上转换发光性质造成破坏,既纯化了电荷表面电荷态,又阻隔了环境有机分子振动能量对发光中心的影响。

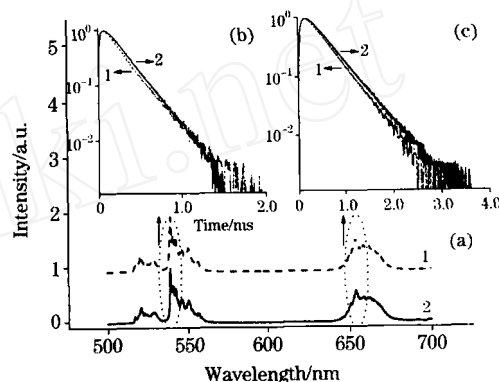


Fig. 2 a Up-conversion fluorescence spectra of the nanoparticles before (1) and after (2) silica coating. The inset shows decay curve of green light energy level b and red light energy level c

2.3 圆二色谱表征

二氧化硅层不但增加了纳米晶粒子的水溶性,表面的活泼基团还可以与生物分子进行偶联,而且硅层减小了粒子表面电荷态对生物分子构象的影响,使蛋白生物活性得以保持。蛋白的圆二色谱可以研究不同条件下蛋白分子的二级结构变化^[10],这种构象变化也能间接地反映其生物活性。通过比较偶联前后蛋白分子的圆二色谱(图 3),发现光谱峰值仅有 1 nm 的移动。说明偶联反应对蛋白构象影响很小^[11,12],这为进一步的生物标记应用提供了理论依据。

2.4 光稳定性试验比较

光漂白是指由光激发引起发光物质分解而使荧光强度降低的现象,它也是荧光标记材料的一个重要评价参数。图 4 给出了 3 种不同荧光标记物的光漂白效应随时间的变化曲线。其中 FITC 分子发光强度迅速衰减,而 CdSe/ZnS 量子点发光逐渐变强。这是氧化作用导致的量子点表面钝化或者光激活能量势垒的增加,从而使光生载流子从量子点能级中逃逸^[13,14]。硅包覆上转换纳米晶发光强度基本维持不变,可

见它在生物标记和检测的独特优势,是一种发光稳定的理想荧光标记材料^[15-17]。

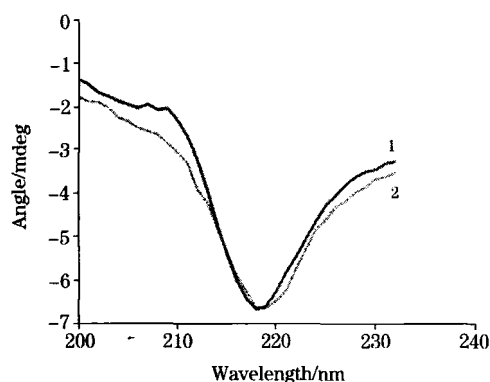


Fig. 3 CD spectra of rabbit anti-human IgG before (1) and after (2) bioconjugation

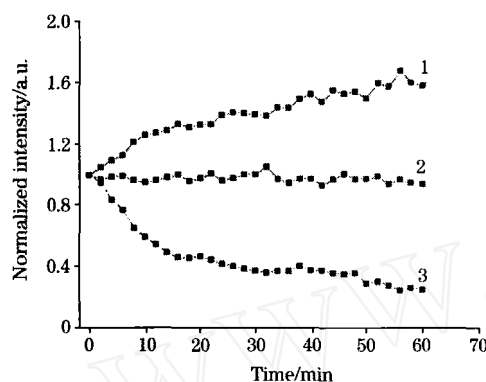


Fig. 4 Photobleaching effect of CdSe/ZnS (1), NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ (2) and FITC (3)

2.5 免疫荧光显微成像

为了验证该纳米晶可用于生物标记,进行了如下试验:

在硅片上共价固定人 IgG(作为抗原),用标记有纳米晶的兔抗人 IgG(作为抗体)来特异性的识别人 IgG。通过抗原抗体的亲和作用,发光纳米晶结合到硅片表面^[18]。图 5 中(a)为特异性识别,可以看到大量的纳米粒子固定到了硅片上。(b)是阴性对照试验,由于兔抗羊 IgG 和人 IgG 之间并无特异性识别作用,故不能结合到硅片表面,相应上转换纳米晶也不能固定到硅片上,观察到少量发光纳米晶是由于较弱的非特异性吸附引起的^[19]。

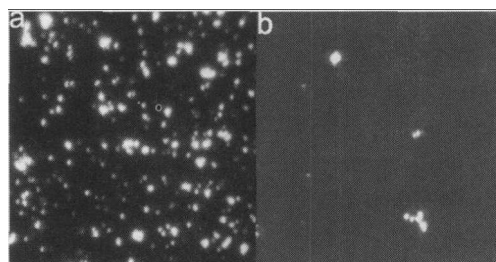


Fig. 5 Immunofluorescence images of nanoparticle-rabbit anti-human IgG bioconjugates recognizing human IgG. Specific binding of rabbit anti-human IgG(a), nonspecific adsorption of rabbit anti-goat IgG(b)

3 结 论

本文通过硅包覆的方法,获得了发光稳定的水溶性发光上转换纳米晶,其发光稳定性优于 FITC 荧光染料分子和量子点。通过形貌,光谱等表征分析,硅包覆钝化了上转换发光纳米晶的表面和阻隔了环境生物分子的影响,其发光寿命变长,从而提高了发光效率。除此之外,硅包覆的纳米晶具有较好的生物相容性,对蛋白分子的构象影响非常小。利用生物分子之间的特异性识别反应,实现了上转换纳米晶标记生物分子作为具有生物荧光探针的功能。这些结果表明,硅包覆的上转换纳米晶具有在细胞和动物体内成像的广泛应用前景。

参 考 文 献

- [1] Wang L, Li Y. Chem. Commun., 2006, 24: 2557.
- [2] Chatterjee D K, Ruffaihan A J, Zhang Y. Biomaterials, 2008, 29(7): 937.
- [3] Zhang P, Steelant W, Kumar M, et al. J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(15): 4526.
- [4] Sivakumar S, Diamante P R, van Veggel F C J M. Chem. Eur. J., 2006, 12(22): 5878.
- [5] Jalil R A, Zhang Y. Biomaterials, 2008, 29(30): 4122.
- [6] Krasnoslobodtsev A V, Smirnov S N. Langmuir, 2002, 18(8): 3181.
- [7] Keating C D, Kovalski K M, Natan M J. J. Phys. Chem. B, 1998, 102: 9404.
- [8] Rolli R, Gatterer K, Wachtler M, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2001, 57: 2009.
- [9] Vetrone F, Boyer J C, Capobianco J A, et al. Appl. Phys. Lett., 2002, 80(10): 1752.
- [10] WANG Jing-yun, LIU Dan, TANG Qian, et al(王静云, 刘 丹, 唐 乾, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(2): 426.
- [11] Wang S P, Natalia M, Nicholas A K, et al. Nano Lett., 2002, 2(8): 817.
- [12] Hua Xiao-feng, Liu Tian-cai, Cao Yuan-cheng, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2006, 386(6): 1665.
- [13] Zhang Y, He J, Wang P N, et al. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(41): 13396.
- [14] Korsunskaya N E, Dybiec M, Zhukov L, et al. Semicond. Sci. Technol., 2005, 20(8): 876.
- [15] Niedbala R S, Feindt H, Kardos K, et al. Anal. Biochem., 2001, 293(1): 22.

- [16] Hampl J, Hall M, Mufti N A, et al. *Anal. Biochem.*, 2001, 288(2): 176.
[17] Chatterjee D K, Rufaihah A J, Zhang Y. *Biomaterials*, 2008, 29(7): 937.
[18] Zhang B B, Cheng J, Li D N, et al. *Materials Science and Engineering B*, 2008, 149(1): 87.
[19] Kamimura M, Miyamoto D, Saito Y, et al. *Langmuir*, 2008, 24(16): 8864.

Preparation, Characterization and Specific Biological Labeling of Silica Coated Upconversion Fluorescent Nanocrystals

SONG Kai^{1, 2}, TIAN Li-jin^{1, 2}, KONG Xiang-gui^{1*}, LIU Kai^{1, 2}, ZHANG Qing-bin^{1, 2}, DU Chuang¹, ZENG Qing-hui¹, SUN Ya-juan¹, LIU Xiao-min¹

1. Key Laboratory of Excited State Process, Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract The authors synthesized a kind of upconversion nanocrystals $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ via the hydrothermal assisted homogeneous precipitation method, and then the nanocrystal was coated with silica. The SEM image demonstrated that the as-prepared samples were uniform in size distribution with ca. 25 nm before and ca. 250 nm after silica coating, respectively. The up-conversion spectra and photoluminescence lifetime measurement showed that the silica shell had hardly effect on the properties of fluorescence of the $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nanocrystals. At the same time, the naked eye-visible green upconversion fluorescence pattern was acquired from the as-prepared upconversion nanoparticles in the PBS buffer (2 wt%) excited by 980 nm laser at room temperature. These water-soluble nanoparticles were linked to the antibodies using the coupling reagents glutaraldehyde. The circular dichroism (CD) spectra of antibody and upconversion nanoparticles-antibody conjugates were very similar to each other, indicating that the secondary structure of antibody remained largely intact after the conjugation. Finally, antigen-antibody recognition reaction was performed on the surface of a silicon slide. The immunofluorescence in vitro indicated that the upconversion nanoparticles-antibody bioconjugates had excellent species-specific detection ability with hardly non-specific binding. Based on the present results, it is anticipated that the silica-coated upconversion nanoparticles are suitable for use as biolabeling materials.

Keywords Up-conversion; Silica coating; Bioconjugation; Immunofluorescence images

(Received Jan. 20, 2009; accepted Apr. 22, 2009)

* Corresponding author