

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00488

新型 FITC 掺杂的二氧化硅荧光纳米粒子的合成 及其应用于 pH 传感的研究

谢春娟¹ 尹东光^{* 1} 李剑² 张礼¹ 刘斌虎¹ 吴明红¹

¹(上海大学环境与化学工程学院, 上海 200444) ²(南昌航空大学环境与化学工程学院, 南昌 330063)

摘 要 将异硫氰酸荧光素 (FITC) 与 3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (APTMS) 反应制得前驱体 FITC-APTMS, 采用油包水微乳液法, 利用 APTMS 与正硅酸乙酯 (TEOS) 的共水解与聚合作用, 制备了 FITC 掺杂的二氧化硅核壳型荧光纳米粒子。经 TEM 与荧光光谱表征及光稳定性实验与染料泄露实验等, 表明所制得纳米颗粒呈规则球形, 粒径为 (150 ± 15) nm, 具有良好的单分散性与光稳定性, 不易发生染料泄露。这种纳米颗粒对 pH 值敏感, 在 pH 3.6 ~ 9.7 范围内, 荧光强度与溶液酸度有良好的响应, 其中在 pH 6.0 ~ 9.0 之间呈良好的线性关系, 此纳米颗粒能被单个小鼠神经干细胞吞噬, 可应用于细胞的 pH 值实时监测。

关键词 异硫氰酸荧光素; 3-氨基丙基三甲氧基硅烷; 油包水微乳液; pH 传感

1 引 言

直接对活体细胞进行原位监测, 可以真实地了解活细胞的生命活动, 但是传统的方法很难实现。荧光纳米颗粒可直接进入单个活体细胞体内, 基于荧光纳米颗粒建立的纳米生物探针可高灵敏、高选择性地监测活细胞中的活性物质如 Ca^{2+} 、 H^+ 和 RNA 等^[1, 2]。

酸碱度对生物体的生命活动起着重要的调控作用, 一些生命现象的发生常伴随着细胞内 pH 值的变化。因此, 单细胞水平上 pH 值的测量对生命机理的解释以及疾病病变的预测具有非常重要的意义^[3, 4]。如果将对 pH 值敏感的荧光纳米颗粒制备成 pH 探针, 可用于单细胞中 pH 值的实时监测^[5]。

由于二氧化硅良好的水溶性及生物相容性, 荧光染料掺杂的二氧化硅核壳荧光纳米粒子用作细胞分析的探针具有良好的应用前景^[6~8]。本研究将异硫氰酸荧光素 (FITC) 与 3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (APTMS) 反应制成前驱体 FITC-APTMS, 采用油包水微乳液法, 制得了一种新的 FITC 掺杂的二氧化硅核壳纳米颗粒。由于 APTMS 与正硅酸乙酯 (TEOS) 的共水解与聚合作用, 使 FITC 通过牢固的化学键与二氧化硅外壳相连接, 有效地防止了 FITC 荧光染料分子的泄露, 同时硅壳的保护作用提高了染料的化学稳定性与光稳定性。此外, 由于二氧化硅壳层是多孔网状立体结构, 裸露的质子能穿过去, 而且此纳米颗粒能被单个小鼠神经干细胞吞噬并对 pH 值有良好的响应, 可望应用于纳米 pH 传感器件, 实现对单个细胞 pH 值的实时监测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

FV1000 激光共聚焦扫描显微镜 (日本 Olympus 公司); SPM-9600 原子力显微镜 (日本 Shimadzu 公司); JSM-2010F 型透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司); F-7000 型荧光分光光度计、U-3010 型紫外-可见分光光度计和 CR21GH 高速离心机均为日本 Hitachi 公司产品; PHS-3C 精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂)。FITC、APTMS、表面活性剂 TritonX-100 (分析纯, Sigma 公司); 小鼠神经干细胞 (上海大学生命科学学院); 其它试剂均为分析纯。实验用水均为超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 FITC-APTMS/SiO₂ 核壳纳米粒子的制备 所用玻璃容器在使用前以 5% HF 溶液清洗, 再用去

2009-09-21 收稿; 2009-12-09 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 40830744)、上海市重点学科项目 (No. S30109)、上海市浦江人才计划 (D 类)、上海市纳米专项项目 (No. 0752nm024) 资助

* E-mail: ydg@shu.edu.cn; wmh6688@yahoo.com.cn

离子水清洗,以除去玻璃容器可能带来的成核位点。称取 1 mg FITC,溶于 1 mL 经过重蒸的无水乙醇,超声分散。然后加入 5 μL APTMS。在干燥密闭的环境中避光搅拌反应 24 h,制得前驱体 FITC-APTMS。将环己烷、Triton X-100 和正己醇分别取 7.5, 1.77 和 1.8 mL 混和,磁力搅拌 30 min,缓慢滴加 250 μL 水,搅拌 30 min 使之混匀,形成清澈透明的微乳液。将 150 μL 1 g/L FITC-APTMS 加入上述微乳液中,充分搅拌混匀,依次加入 100 μL 正硅酸乙酯和 60 μL 25% 氨水,室温避光磁力搅拌反应 24 h 后,加入少量丙酮破乳,再用无水乙醇和超纯水交替离心、洗涤数次,洗掉残留的表面活性剂和染料分子等,得到纯的 FITC-APTMS/SiO₂ 核壳型荧光纳米粒子(简称 FAS);最后将纳米粒子在真空中 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干。

本研究还制备了 FITC 染料直接掺杂的二氧化硅纳米粒子,制备方法除了反应过程中未加入 APTMS 外,其余与上述相同。

2.2.2 FAS 纳米粒子的光稳定性实验 将 1 mg FITC 和 1 mg FAS 纳米粒子分别溶于 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.8)中,以 100 W 氙灯为激发光源,分别对两种溶液进行照射。样品距氙灯的距离为 5 cm,每隔 10 min 测量一次最大发射波长处的荧光强度,共测试 70 min。

2.2.3 FAS 纳米粒子的染料泄漏实验 将纯化的 FAS 纳米复合物及 FITC 直接掺杂的 SiO₂ 纳米粒子分别溶于超纯水中,超声;每隔 1 h 取出 1 mL 溶液,离心,弃去上清液,加入 1 mL 水;超声分散后用 F-2500 型荧光分光光度计在激发波长 492 nm 下检测纳米颗粒悬浮液的荧光强度,通过荧光强度的变化确定有机荧光染料泄露的程度。

2.2.4 FAS 纳米粒子对 pH 的响应 将 FAS 纳米颗粒经超声分散后,分别取 300 μL 1 g/L 纳米颗粒悬浮液加入到 1 mL 不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中,充分混匀后分别测量其在最大激发波长下的发射光谱及荧光强度随 pH 值的变化情况。

2.2.5 小鼠神经干细胞的培养、细胞的荧光成像与 pH 检测 将小鼠神经干细胞悬浮液接种到培养瓶中,放入二氧化碳培养箱中培养过夜(5% CO₂, 37 $^{\circ}\text{C}$)。然后用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗 3 次。将 100 μL 1 g/L 经高温消毒的 FAS 荧光纳米颗粒悬浮液加入到含 1 mL 培养液的小鼠神经干细胞的培养瓶中,放入二氧化碳培养箱中培育 30 min(5% CO₂, 37 $^{\circ}\text{C}$) ,PBS 洗涤 3 次,最后在 FV1000 激光共聚焦扫描显微镜下观察细胞的荧光成像。通过改变细胞培养液的 pH 值,调节细胞的 pH 值,分别测量在不同 pH 值时细胞的荧光光谱与荧光显微成像。

3 结果与讨论

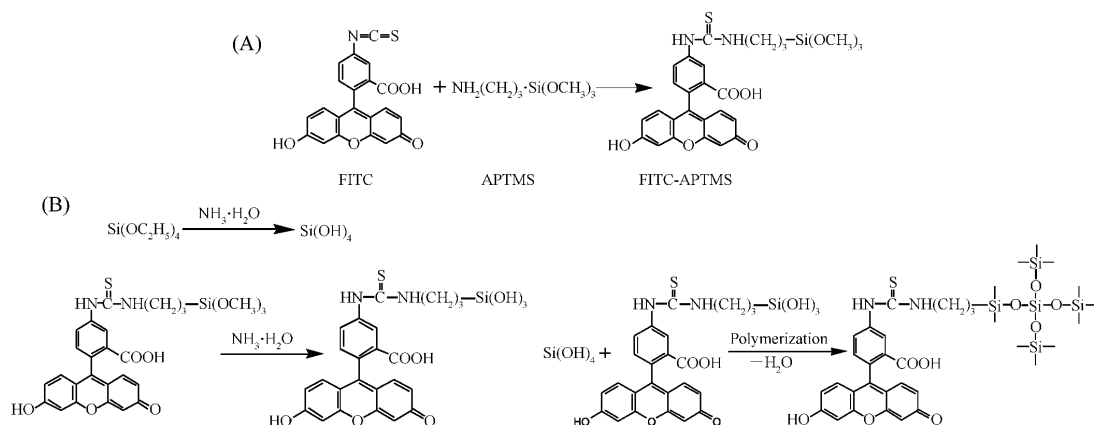
FITC 与 APTMS 的反应式如图解 1A 所示。前驱体 FITC-APTMS 的形成是 FITC 通过其分子中的活性官能团异硫氰基(—N=C=S)与 APTMS 分子的氨基发生加成反应形成 Schiff 碱。在制备 FAS 纳米粒子过程中,在氨水作用下,TEOS 与 APTMS 共水解,之后发生聚合反应,形成 Si—O—Si 键, FITC 通过 APTMS 与外壳 SiO₂ 通过共价键连接。TEOS 与 APTMS 的共水解及聚合反应式如图解 1B 所示。

3.1 FAS 纳米粒子的光谱表征

将 1 mg FITC 和 1 mg FAS 纳米粒子分别溶于 2 mL 超纯水中,分别测量紫外-可见光谱及荧光光谱,结果如图 1A 所示。由图 1A 可知, FAS 纳米粒子与 FITC 的最大吸收波长分别为 498 和 492 nm。与单纯的 FITC 相比, FAS 纳米粒子的吸收峰明显变窄,峰值位置稍有移动,这可能是由于 FITC 被限域在 SiO₂ 空间网状结构中以及 FITC 分子与 SiO₂ 空间网络的硅羟基相互作用引起的^[9]。图 1B 显示 FAS 纳米粒子与 FITC 在激发波长为 492 nm 时,二者最大发射波长分别为 518 和 515 nm。FAS 纳米粒子发射峰的位置较 FITC 略有红移,原因可能是由于二氧化硅基质与染料相互作用引起能量的损失,从而导致荧光发射峰的红移。

3.2 FAS 纳米粒子的投射电子显微镜表征

将所得的 FAS 纳米颗粒充分分散到乙醇相中,用移液器吸取少许滴加到铜网上,常温放置自然干燥后用透射电子显微镜对其进行扫描,观察其形貌(图 2)。由图 2 可见,所制备的 FAS 纳米粒子呈规则球型,大小比较均匀且分散性好,平均粒径约为(150 \pm 15) nm。



图解 1 FITC 与 APTMS 反应机理(A) ,TEOS 与 APTMS 水解及聚合反应机理(B)

Scheme 1 Schematic representation: reaction mechanism of FITC and 3-aminopropyl-trimethoxysilane (APTMS) (A) ,mechanisms of hydrolysis and polymerization reaction of tetraethoxysilane(TEOS) and APTMS (B)

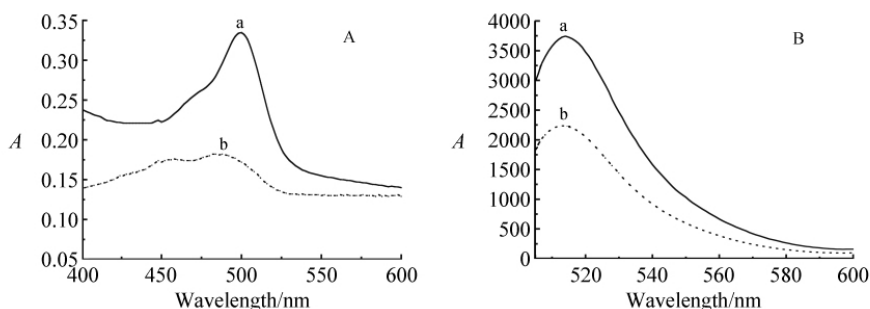


图 1 FAS 纳米粒子(a)和 FITC(b)的紫外-可见吸收光谱(A)和荧光光谱(B)

Fig.1 Ultraviolet-visible absorption spectra (A) and fluorescence spectra (B) of (a) FITC/APTMS/SiO₂ (FAS) nanoparticles and (b) Free FITC

3.3 FAS 纳米粒子的光稳定性

氙灯照射 70 min 后 ,FITC 水溶液的荧光强度下降 52% ,而 FAS 纳米粒子的荧光强度下降小于 5% (图 3) 表明 FAS 纳米粒子具有良好的光稳定性。可见 将 FITC 用二氧化硅包覆形成纳米粒子后 ,由于二氧化硅壳层的保护作用 ,有效地减少外界光源对荧光分子的光漂白作用 ,使其抗光漂白能力显著提高。

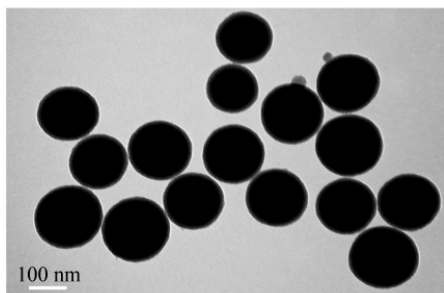


图 2 FAS 纳米粒子的透射电镜图

Fig.2 Transmission electron microscope image of FAS nanoparticles

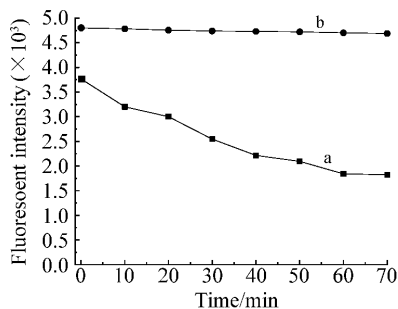


图 3 FITC (a)和 FAS 纳米粒子(b)的光稳定性实验

Fig.3 Photostability curve of FITC (a) and FAS nanoparticles (b)

3.4 FAS 纳米粒子的染料泄露

两种纳米粒子的染料泄露实验结果如图 4 所示。FAS 纳米复合物的荧光强度在 6 h 内基本保持不变 ,6 h 后下降率小于 8% ; 而 FITC 直接掺杂的二氧化硅纳米粒子的荧光强度的下降率大于 40% 。

实验结果表明 FAS 纳米粒子在溶液中不易发生染料泄露。原因是由于 FITC 与 APTMS 形成前驱体 FITC-APTMS 后,由于 APTMS 与正硅酸乙酯 (TEOS) 的共水解与聚合作用,使 FITC 通过牢固的化学键与二氧化硅外壳相连接,有效地防止了 FITC 荧光染料分子的泄露。

3.5 FAS 纳米粒子对 pH 的响应

实验测得 FAS 纳米粒子的荧光光谱随 pH 值变化如图 5 所示(图 5 中的 1 2 3 4 5 6 7 分别与插图中的 pH 值由低到高一一对应)。结果表明,在 pH 3.6~9.7 范围内,FAS 纳米粒子对 pH 值有良好的响应。随着 pH 值的增加,荧光强度逐渐增强。当 pH 值从 3.6 变至 9.7 时,荧光强度提高了约 30 倍,且在 pH 6.0~9.0 之间呈良好的线性关系。从图 5 还可知,随着 pH 值的增加,荧光强度增强,但发射波长未发生变化。

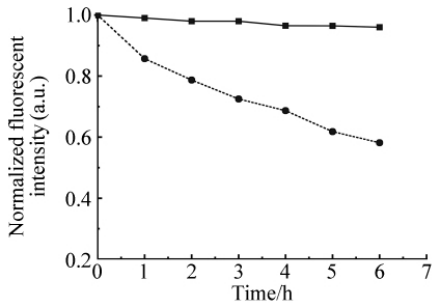


图 4 FAS 纳米粒子(实线)和 FITC 硅纳米粒子(虚线)的染料泄露曲线

Fig. 4 Fluorescent leakage curve of FAS nanoparticles (solid) and FITC silica nanoparticles (dotted)

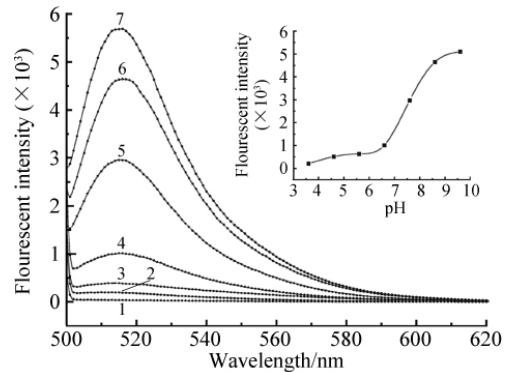


图 5 FAS 纳米粒子的荧光强度随 pH 值变化曲线

Fig. 5 pH Response curve of FAS nanoparticles

3.6 细胞的荧光成像与 pH 检测

图 6 为 FAS 纳米粒子与小鼠神经干细胞共培育 30 min 后的激光共聚焦扫描显微镜图片。由图 6 可看到在细胞内检测到较强荧光信号,且 pH 7.8 的细胞荧光信号高于 pH 6.6 的细胞。图 7 为它们的荧光光谱图。这表明 FAS 纳米颗粒可被小鼠神经干细胞有效摄入,且在活细胞体内保持较强的荧光信号,随 pH 值的不同,荧光强度不同。由此可知,将 FAS 纳米粒子与细胞共培育后,通过细胞成像测量其荧光强度可检测细胞内的 pH 值。

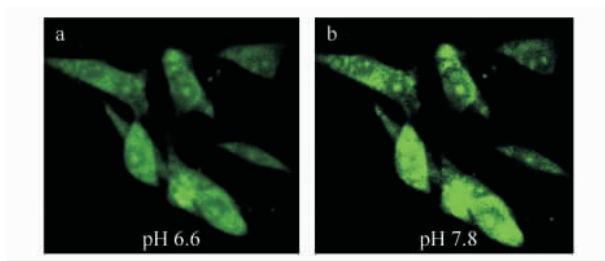


图 6 吞噬 FAS 纳米粒子的小鼠神经干细胞激光共聚焦扫描显微镜图像

Fig. 6 Laser scanning confocal microscope images of mouse neural stem cells phagocytized FAS nanoparticles at different pH values

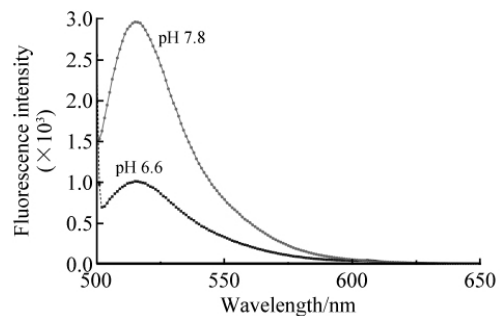


图 7 不同 pH 值 FAS 纳米粒子的荧光光谱

Fig. 7 Fluorescence spectra of FAS nanoparticles at different pH values

References

- 1 Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed M R. *Exp. Cell. Res.*, **1999**, 249(1): 1~12
- 2 Johnson I. *Histochem. J.*, **1998**, 30(3): 123~140
- 3 Zoumi A, Yeh A, Tromberg B J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99(17): 11014~11019

- 4 Cluzel P , Surette M , Leibler S. *Science* , **2000** , 287(5458) : 1652 ~ 1655
- 5 LUO Guo-An (罗国安) , WANG Yi-Ming(王义明). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **1995** , 23(8) : 953 ~ 959
- 6 Santras S , Wang K M , Tapeç R , Tan W H. *J. Biomedical. Optics* , **2001** , 6(2) : 160 ~ 166
- 7 HE Xiao-Xiao(何晓晓) , WANG Ke-Ming(王柯敏) , TAN Wei-Hong(谭蔚泓). *Chinese J. Science Bulletin.* (科学通报) , **2001** , 46(16) : 1353 ~ 1356
- 8 Santras S , Zhang P , Wang K M , Tapeç R , Tan W H. *Anal. Chem.* , **2001** , 73(20) : 4988 ~ 4993
- 9 Taton T A , Mirkin C A , Letsinger R L. *Science* , **2000** , 289(8) : 1757 ~ 1760

Preparation of A Novel Type of Fluorescein Isothiocyanate Doped Fluorescent Silica Nanoparticles and Its Application as pH Probe

XIE Chun-Juan¹ , YIN Dong-Guang*¹ , LI Jian² , ZHANG Li¹ , LIU Bin-Hu¹ , WU Ming-Hong¹

¹(College of Environmental and Chemical Engineering , Shanghai University , Shanghai 200444)

²(College of Environmental and Chemical Engineering , Nanchang Hangkong University , Nanchang 330063)

Abstract A novel core-shell fluorescein isothiocyanate (FITC) doped silica fluorescent nanoparticle was developed with a water-in-oil (W/O) microemulsion method. To prepare the nanoparticle , a silane reagent of 3-aminopropyl-trimethoxysilane (APTMS) was first used to synthesize a novel precursor of FITC-APTMS. By characterizations using transmission electron microscopy and fluorescent spectra , photostable experiment and dye leaking experiments , it was found that the nanoparticles are spherical and uniform in size of 150 ± 15 nm with monodisperse , high fluorescent signal and high photostability. No obvious dye leaking was observed. The possibility of using the fluorescent nanoparticles as a novel pH probe was also investigated. It was found that the fluorescence nanoparticles are pH sensible. The pH response range and pH responsive linear ranges are 3.6 - 9.7 and 6.0 - 9.0 , respectively. The nanoparticles could be phagocytosed by single murine neural stem cell and could be applied to detect pH value for this single alive cell.

Keywords Fluorescein isothiocyanate; Water in oil microemulsion; 3-Aminopropyl-trimethoxysilane; pH sensor

(Received 21 September 2009; accepted 9 December 2009)

《色谱在生命科学中的应用》

全书共分五章 ,介绍了目前在生命科学研究中常用的色谱技术 ,详细讨论了液相色谱、气相色谱和毛细管电泳等色谱技术在脱氧核糖核酸分析、生物技术药物的纯化、蛋白质和核酸性质的鉴定、生物标志物检测 ,以及在蛋白质组学研究中的应用与发展。

该书为化学工业出版社出版的色谱技术丛书之一 ,可供从事色谱分析的人员及大专院校分析化学相关专业师生学习参考。该书由廖杰、钱小红、董方霆、张养军编著 ,定价 29.00 元。