基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法 及其在细胞识别中的应用

何晓晓 王柯敏* 谭蔚泓 肖丹 李军 羊小海

(湖南大学化学化工学院, 长沙 410082. * 联系人, E-mail: kmwang@mail.hunu.edu.cn)

摘要 以荧光染料(联吡啶钌配合物)为核, 二氧化硅为外壳制备了大小均匀的荧光纳米颗粒. 结合纳米技术、生物技术与荧光标记技术, 建立了一种基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法. 与传统的荧光标记方法比较, 该方法在稳定性、灵敏度、应用范围等方面都有重要突破. 应用这一新型荧光标记方法成功地识别了人外周血中 SmIgG⁺B 淋巴细胞.

关键词 生物荧光纳米颗粒 荧光标记 细胞识别

在生物学与医学研究领域里, 探索和发展高灵敏度的非同位素检测方法一直是研究者十分关注的课题. 当前比较常用的非同位素检测方法主要有: 酶联免疫法、化学发光法、电化学方法及荧光分析法等^[1-3]. 其中荧光分析法是一种重要的非同位素方法, 在荧光标记生物分子用于细胞内外物质的检测^[4,5]、核酸的杂交与测序^[6,7]、疾病早期诊断^[8]等生物学研究和医学研究领域里发挥了很大的作用. 但是传统的荧光分析方法在生物医学研究应用中存在一些难以克服的缺陷. 如多数荧光试剂存在光漂白的现象, 导致荧光信号不稳定; 荧光试剂对活体细胞有一定的毒副作用. 另外, 传统的生物分子荧光标记方法, 只能在生物分子的活性基团上连接少数的几个荧光分子, 分析灵敏度有限. 最近 Weiss 等人^[9]和 Nie 等人^[10]的研究小组应用量子点荧光纳米颗粒(如 CdS, CdSe 等)标记生物分子, 是一种非传统的荧光标记方法. 应用该方法实现了细胞核膜、肌动蛋白纤维的染色及 HeLa 细胞的检测. 但是, 制备这种量子点纳米颗粒的实验条件苛刻, 需在高温、绝氧、绝水的条件下成核^[11,12].

本文报道的采用正硅酸乙酯水解产物包裹油包水(W/O)形成的微胶囊¹⁾, 在温和的条件下一步制备了具二氧化硅外壳的荧光纳米颗粒, 基于该荧光纳米颗粒建立的生物分子荧光标记方法也是一种非传统的荧光分析新方法. 通过对荧光纳米颗粒的特性及基于该荧光纳米颗粒建立的荧光标记方法在细胞识别中的应用进行研究, 结果表明这一新型的荧光标记方法在很大程度上克服了传统荧光标记方法的

缺陷, 尤其在光稳定性和灵敏度方面比传统的异硫氰酸荧光素(FITC)标记方法有重大改善, 可望为生物医学研究提供一种新的高灵敏的非同位素检测方法.

1 实验

(i) 试剂、生物材料与仪器. 试剂和生物材料: 联吡啶钌配合物([Ru(II)(bpy)₃]²⁺ · 6H₂O, Fluka), 羊抗人免疫球蛋白 G(IgG)抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗人 IgG 抗体(北京华美生物工程公司), 溴化氰(CNBr)(根据文献[13]合成), 其他试剂均为国产分析纯. B 淋巴细胞(采用淋巴细胞分离液分离人外周血制备)实验所用水均为二次蒸馏水. 实验器皿及试剂均经过高压灭菌或过滤除菌.

仪器: 日立 F-2500 型荧光分光光度计, Nikon E-600 型荧光显微镜, Hitachi-800 型透射电子显微镜(TEM), 19HW-1 型恒温磁力搅拌器.

(ii) 实验方法. (1) 荧光纳米颗粒的制备. 将环己烷、表面活性剂 Triton X-100 和正己醇按一定比例(4:1:1, 体积比)混合均匀, 以适量的水作为分散相, 加入 0.1 mol/L 的 [Ru(II)(bpy)₃]²⁺ 水溶液, 搅拌 1 h 后, 加入正硅酸乙酯(TEOS)与氨水, 以上混合物持续搅拌 23 h 后, 分离颗粒.

(2) 荧光纳米颗粒的生物修饰. 将荧光纳米颗粒悬浮于 2 mol/L Na₂CO₃ 溶液中, 超声波振荡 15 min 后, 加入溴化氰/乙腈溶液, 室温下搅拌 10 min. 经溴化氰修饰过的纳米颗粒分别用冰水和 pH 7.6 的磷酸缓冲液(PBS)洗涤后, 用 PBS 分散, 再加入稀释后的羊抗人 IgG 抗体溶液, 4℃下连续搅拌 24 h, 用 PBS

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2001-46-16-1353>

1) 王柯敏, 谭蔚泓, 肖丹. 核壳型纳米颗粒. 专利申请号: 001 13681.X, 2000-09-13

洗涤产物，储存于 4℃ 备用。

(3) 荧光纳米颗粒与 B 淋巴细胞培育. 在分离的 B 淋巴细胞悬浮液中，加入等体积荧光纳米颗粒悬浮液，37℃ 下培育 1 h，离心、洗涤，此过程重复几次，除去与细胞非特异性吸附的生物荧光纳米颗粒，吸取细胞悬液制片。

(4) 荧光光谱测量和细胞显微荧光成像. 应用单臂光纤(北京玻璃研究所)连接荧光显微镜与荧光分光光度计，实现荧光光谱测量和细胞实时成像二维信号同时采集. 以 100 W 高压汞灯作激发光源，在光路上放置一滤光片(型号: B-2A, $\lambda_{\text{ex}} = 450\sim 490\text{ nm}$, BA 520 nm)，用荧光显微镜的物镜收集信号，通过单臂光纤将耦合好的荧光信号从荧光显微镜的照相机接口传导至荧光分光光度计，记录荧光发射光谱；CCD 摄像系统与自编的图像采集软件采集细胞图像. 实验装置如图 1 所示。

图 1 细胞成像及光谱测量仪器装置示意图

2 实验结果和讨论

2.1 荧光纳米颗粒的特征

(i) 荧光纳米颗粒的大小. 利用油包水形成微乳液与正硅酸乙酯(TEOS)水解的方法制备纳米颗粒的实验装置简单，操作容易，无需高温、高压及其他苛刻的实验条件，在室温下可一步制备出包上二氧化硅外壳的荧光纳米颗粒. 通过控制水与表面活性剂的摩尔比(定义为 R_w)及正硅酸乙酯(TEOS)与氨水的摩尔比(定义为 R_N)来有效地控制纳米颗粒的大小和二氧化硅外壳的形成. 图 2 示本文所制备的具二氧化硅外壳的荧光纳米颗粒的透射电子显微镜照片($\phi = (28 \pm 4)\text{ nm}$).

(ii) 荧光纳米颗粒的荧光光谱特性. 以 $\lambda_{\text{ex}} =$

图 2 荧光纳米颗粒的透射电子显微镜照片($\times 10^5$)
 $R_w = 10, R_N = 0.5$

451 nm 为激发波长，测量荧光染料($[\text{Ru}(\text{II})(\text{bpy})_3]^{2+}$)水溶液、抗体修饰的荧光纳米颗粒悬浮液及与未经抗体修饰的荧光纳米颗粒悬浮液的荧光发射光谱. 结果表明：荧光染料($[\text{Ru}(\text{II})(\text{bpy})_3]^{2+}$)水溶液的荧光发射光谱的最大发射波长在 600 nm；抗体修饰的荧光纳米颗粒悬浮液与未经抗体修饰的荧光纳米颗粒悬浮液的荧光发射光谱的最大发射波长都在 596 nm，较荧光染料水溶液的最大发射波长只蓝移了 4 nm. 因此，纳米颗粒的形成和生物分子的修饰都没有引起荧光染料的荧光光谱的明显改变。

(iii) 荧光纳米颗粒的荧光稳定性. (1) 氧气对荧光纳米颗粒荧光强度的影响. 以 $\lambda_{\text{ex}} = 451\text{ nm}$ 为激发波长，分别测量荧光染料($[\text{Ru}(\text{II})(\text{bpy})_3]^{2+}$)水溶液、未经抗体修饰的荧光纳米颗粒悬浮液及抗体修饰的荧光纳米颗粒悬浮液，在通氮除氧前后的荧光强度变化. 联吡啶钌配合物($[\text{Ru}(\text{II})(\text{bpy})_3]^{2+}$)是一种对氧气敏感的荧光试剂^[14,15]. 在其水溶液中通入高纯氮气，随着溶液中氧气的减少，溶液的荧光强度增强($F/F_0 = 1.67$, F 为通入高纯氮气饱和后的荧光强度， F_0 为空气饱和时的荧光强度)；而在包埋荧光染料($[\text{Ru}(\text{II})(\text{bpy})_3]^{2+}$)的荧光纳米颗粒悬浮液中，通入高纯氮气后，荧光强度几乎没有变化($F/F_0 = 1.01$)；在抗体修饰的荧光纳米颗粒悬浮液中通入高纯氮气，荧光强度也没有发生太大的变化($F/F_0 = 1.03$). 结果表明了该荧光纳米颗粒由于二氧化硅外壳的保护，减少了外界氧气对壳内荧光染料的影响，使荧光强度的稳定性显著提高. (2) 强光激发对荧光纳米颗粒荧光强度的影响. 将荧光纳米颗粒的光稳定性与传统的抗体荧光标记试剂(FITC)的光稳定性进行了比较. 以 100 W 高压汞灯作激发光源，经过 1500 s 的连

续照射后, 荧光纳米颗粒的荧光强度下降到初始强度的 63% 左右 ($F_E/F_0 = 63\%$, F_E 为照射后的荧光强度, F_0 为照射前的荧光强度), 在荧光显微镜下还可观察到明显的红色荧光; 而 FITC 的荧光强度只有初始强度的 1% 左右 ($F_E/F_0 = 1\%$) (图 3), 在荧光显微镜下几乎观察不到荧光. 说明了荧光纳米颗粒的光稳定性显著高于传统的抗体荧光标记试剂 (FITC).

图 3 荧光纳米颗粒与异硫氰酸荧光素 (FITC) 的光稳定性对比
1 示荧光纳米颗粒 ($\lambda_{em} = 596\text{ nm}$), 2 示异硫氰酸荧光素 FITC ($\lambda_{em} = 533\text{ nm}$)

2.2 基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法在细胞识别中的应用

(i) 生物荧光纳米颗粒对靶细胞的识别. 将与荧光纳米颗粒培育、洗涤后的 B 淋巴细胞, 分别在显微镜下进行光学和荧光成像. 经抗体修饰的荧光纳米颗粒结合到靶细胞的表面, 使靶细胞被生物荧光纳米颗粒标记, 在激发光源激发下, 靶细胞发出明显的红色荧光 (图版 I -1(b), 附本刊后, 下同); 而在对照实验中, 未经抗体修饰的荧光纳米颗粒不具有特异识别功能, 因而不能实现对靶细胞的识别与结合, 在激发光源激发下, 未见有发红色荧光的细胞 (图版 I -1(d)). 因此, 表明了抗体被固定在纳米颗粒上, 抗体的活性基本上没有受到影响, 当与人外周血中的 B 淋巴细胞一起培育时, 通过抗原抗体结合反应, 固定羊抗人 IgG 抗体的荧光纳米颗粒可与 SmIgG⁺ B 淋巴细胞表面的 IgG 结合, 使靶细胞被生物荧光纳米颗粒标记, 从而实现了生物荧光纳米颗粒对 SmIgG⁺ B 淋巴细胞的识别 (图版 I -1(b) 箭头所示).

(ii) 基于生物荧光纳米颗粒的荧光标记方法的灵敏度. 分别应用荧光纳米颗粒和 FITC 标记羊抗人

IgG 抗体去识别 SmIgG⁺ B 淋巴细胞, 对被识别的细胞进行荧光光谱测量和显微荧光成像. 图版 I -2(a)和(b)是应用两种不同荧光标记方法识别的 SmIgG⁺ B 淋巴细胞的荧光强度和细胞成像. 结果明显表明, 应用生物荧光纳米颗粒识别细胞的灵敏度显著高于 FITC.

基于 FITC 的传统抗体荧光标记方法, 是通过 FITC 的异硫氰基 ($-N=C=S$) 与抗体的自由氨基 (主要是赖氨酸残基的 ϵ -氨基) 经碳酰胺化而成为荧光标记抗体, 对于一个抗体分子来说最多只能结合少数的几个荧光分子^[16]. 而在本实验所建立的基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法中, 荧光分子是通过纳米颗粒的外壳间接与抗体分子连接. 通过测出荧光纳米颗粒的比重, 可以估算出在一个直径为 30 nm 的荧光纳米颗粒内, 可包被 7 约 8000 个荧光分子. 当应用荧光纳米颗粒标记抗体时, 与抗体连接的荧光分子增多, 荧光信号增强, 导致识别灵敏度显著提高.

3 结论

我们结合纳米技术、生物技术与荧光标记技术, 建立基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法, 具有下列优点:

- (1) 制备荧光纳米颗粒的实验条件温和. 可在常规实验室, 大量制备大小均匀、光学性质稳定的荧光纳米颗粒.
- (2) 荧光纳米颗粒的表面特别易于修饰, 因而使这一方法具有广泛的应用性, 可以根据特定的对象选择合适的生物分子进行修饰. 如: 修饰抗体检测抗原, 修饰配体定位受体, 修饰探针 DNA 检测目标 DNA 等.
- (3) 基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法, 其灵敏度及光学稳定性都较传统的荧光标记试剂 (FITC) 显著提高, 在生命体系的超痕量分析中具有非常重要的意义.

致谢 衷心感谢湖南大学材料学院李绍禄老师对样品测试所给予的大力支持和帮助. 本工作为国家杰出青年基金 (批准号: 29825110)、教育部重大项目基金 (批准号: 2000-156)、教育部骨干教师基金 (批准号: 2000-65)、海外青年学者合作研究基金 (批准号: 20028506) 及湖南省自然科学基金 (批准号: 00GKY1011) 资助项目.

参 考 文 献

1 Issac P G. Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes. Humana, New York: Totowa, 1994. 12~16
2 Diamandis E P, Christopoulos T K. Immunoassay. New York: Academic Press, 1996. 10~18
3 Holme D J, Peck H. Analytical Biochemistry. 3rd. ed. 北京: 世界

- 图书出版公司北京公司, 1999. 248~251
- 4 Bui J D, Zelles T, Lou H J, et al. Probing intracellular dynamics in living cells with near-field optic. *J Neurosci Meth*, 1999, 89: 9~15
 - 5 Tan W H, Parpura V, Haydon P G, et al. Neurotransmitter imaging in living cells based on native fluorescence detection. *Anal Chem*, 1995, 67: 2575~2579
 - 6 Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5463~5467
 - 7 Fung J C, Marshall W F, Dernburg A D, et al. Homologous chromosome pairing in *Drosophila melanogaster* proceeds through multiple independent initiations. *J Cell Biol*, 1998, 141: 5~20
 - 8 Bornhop D J, Hubbard D S, Houlne M P, et al. Fluorescent tissue site-selective lanthanide chelate, TB-PCTMB for enhanced imaging of cancer. *Anal Chem*, 1999, 71: 2607~2615
 - 9 Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological-labels. *Science*, 1998, 281: 2013~2016
 - 10 Chan W C W, Nie S M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, 281: 2016~2018
 - 11 Peng X G, Wickham J, Alivisatos A P. Kinetics of II~VI and III~V colloidal semiconductor nanocrystal growth: focusing of size distributions. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 5343~5344
 - 12 Hines M A, Guyot-Sionnest P. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. *J Phys Chem*, 1996, 100: 468~471
 - 13 日本化学会编. 无机化合物合成手册, 第一卷. 曹惠民译. 北京: 化学工业出版社, 1998. 205~206
 - 14 McNamara K P, Rosenzweig Z. Dye-encapsulating liposomes as fluorescence-based oxygen nanosensors. *Anal Chem*, 1998, 70: 4853~4859
 - 15 Rosenzweig Z, Kopelman R. Development of a submicrometer optical fiber oxygen sensor. *Anal Chem*, 1995, 67: 2650~2654
 - 16 许屏. 荧光和免疫荧光染色技术及应用. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 64

(2001-04-16 收稿, 2001-06-22 收修改稿)

1. 生物荧光纳米颗粒识别 SmIgG⁺ B 淋巴细胞($\times 200$). (a)和(b)示与修饰羊抗人 IgG 抗体的荧光纳米颗粒一起培育洗脱后的 B 淋巴细胞在普通光学显微镜下的细胞成像图和在荧光显微镜下的细胞成像图; (c)和(d)示与未修饰羊抗人 IgG 抗体的荧光纳米颗粒一起培育洗脱后的 B 淋巴细胞在普通光学显微镜下的细胞成像图和在荧光显微镜下的细胞成像图

2. 被识别的 SmIgG⁺ B 淋巴细胞的细胞荧光成像($\times 1000$)及其相对荧光强度. (a) 生物荧光纳米颗粒识别 SmIgG⁺ B 淋巴细胞; (b) 异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗体识别 SmIgG⁺ B 淋巴细胞

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/eng-2016-46-16-1353>