

氨基化单分散量子点/二氧化硅核壳纳米粒子的制备及其细胞标记

张兵波¹, 宫晓群¹, 林婷婷², 何彦津², 成靖¹, 单顺阳¹, 常津¹

(1. 天津大学材料学院纳米生物技术研究所, 天津 300072; 2. 天津医科大学眼科中心, 天津 300070)

摘要 通过反向微乳液法, 在油溶性量子点表面包裹二氧化硅外壳, 使油溶性量子点水溶化, 再利用 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 在已形成的二氧化硅纳米颗粒表面进行氨基化改性, 制备富含氨基的二氧化硅包裹的量子点荧光纳米球. 通过透射电子显微镜 (TEM)、粒径分析、*zeta* 电位检测、紫外-可见分光光度、荧光分光光度和红外光谱等手段对产品进行了表征. 结果表明, 所制备的二氧化硅量子点纳米球 (45 nm) 具有单分散性、水溶性好及光化学稳定性强等优点. 通过静电作用, 所制备的单分散氨基化二氧化硅量子点对肿瘤细胞表面膜电荷进行了初步标记显像.

关键词 量子点; 氨基; 二氧化硅; 细胞标记

中图分类号 O613.7; O657.3

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)02-0246-04

量子点 (QDs), 又称无机纳米晶体, 在生物领域显示出广阔的应用前景, 尤其是作为荧光探针用于生物标记、生物检测和生物成像等方面^[1-3]. 与有机荧光分子相比, 量子点具有许多独特的光学特性: 发射峰波长可由组成材料和粒径的大小来调节, 激发光波长范围很宽, 具有较大的斯托克位移和狭窄对称的荧光谱峰. 此外, 量子点还具有良好的光化学稳定性, 与有机染料分子相比, 具有耐受更强的激发光及更长的光发射周期的特点^[4]. 高质量量子点一般是亲油性的, 需要进行水溶性改性. 二氧化硅包覆工艺是无机材料修饰中最具代表性的方法之一. 二氧化硅材料具有制备简单、表面光滑且透明及生物相容性好等优点^[5, 6]. 利用硅烷偶联剂对二氧化硅表面改性, 可以获得带有氨基、巯基及羧基等不同化学基团的纳米粒子, 为二氧化硅的生物应用提供了保证^[7].

细胞表面电荷的变化从侧面反映了细胞的形态和结构的变化. 癌变细胞表面唾液酸的表达量增多, 且癌瘤细胞表面负电荷大部分是由其表面糖链唾液酸化所致, 从而使得肿瘤细胞表面负电荷增加. 本文利用反向微乳液方法制备的具有单分散的氨基化二氧化硅量子点荧光纳米球, 从单个细胞和分子水平标记肿瘤细胞表面所有负电荷, 直观地反映了单个细胞的表面电荷分布状态.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

硒粉、CdO、三辛基氧化膦 (TOPO)、油酸和硫粉均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 十八胺和十八烯购自比利时 Acros 公司; 正三丁基磷 (TBP) 购自日本 TCI 公司; 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 购自 Alfa 公司; 壬基酚聚氧乙烯醚乳化剂 (NP-40) 购自 Fluka 公司; 正硅酸己酯 (TEOS)、25% 氨水、丙酮、环己烷及二氯甲烷均为市售分析纯. 人腺样囊性肿瘤 (Adenoid cystic carcinoma, ACC) 细胞系由上海交通大学医学院附属第九人民医院提供.

UV-2450 型紫外-可见分光光度计 (SHIMADZU); F-4500 荧光分光光度计 (日本日立公司); JEM-100CX II 型透射电子显微镜, 加速电压 100 kV; PSS 粒径/*zeta* 电位检测仪 (美国 PSS 公司); FTIR 光谱仪 (Bio-Rad FTS 6000); Olympus IX71 倒置荧光显微镜, DP70 照相系统.

收稿日期: 2008-06-03.

基金项目: 国家“八六三”计划 (批准号: 2007AA021808) 资助.

联系人简介: 常津, 男, 博士, 教授, 主要从事纳米基因载体和量子点荧光探针研究. E-mail: jinchang@tju.edu.cn

1.2 实验过程

1.2.1 CdSe/CdS/Cd_{0.5}Zn_{0.5}S/ZnS 量子点合成 按文献[8]方法制备 CdSe/CdS/Cd_{0.5}Zn_{0.5}S/ZnS 量子点.

1.2.2 二氧化硅包裹油溶性量子点 取 10.0 mL 环己烷、1.3 mL NP-40、100 μ L TEOS 和 200 μ L 量子点(3.3×10^{-6} mol/L)环己烷溶液, 加入到三口烧瓶中, 搅拌 30 min 后, 加入 100 μ L 氨水, 密封搅拌反应 24 h.

1.2.3 二氧化硅表面氨基化改性 在上述反应体系中继续加入 40 μ L APTES, 继续密封反应 24 h 后, 在反应液中加入丙酮破乳, 离心洗涤数次, 除去未反应的物质和 NP-40 表面活性剂. 将纯化得到的氨基化二氧化硅量子点纳米颗粒分散在 PBS 缓冲溶液中, 用 TEM、粒径分析、zeta 电位检测及紫外光谱表征. 将二氧化硅量子点纳米颗粒真空烘干后进行 FTIR 检测.

1.2.4 肿瘤细胞的标记 将 ACC 细胞贴壁预培养于 96 孔板上, 加入 100 μ L 0.20 μ g/mL 氨基化二氧化硅量子点荧光纳米球水溶液, 孵育 1.0 h 后用 PBS 洗涤 3 次, 拍干, 于倒置荧光显微镜下观察并摄片记录.

2 结果与讨论

2.1 二氧化硅量子点荧光纳米球的尺寸表征

图 1 为氨基化二氧化硅量子点荧光纳米颗粒的 TEM 照片. 由图 1 可见, 油溶性量子点经过二氧化硅包覆后粒径均一, 大小为 45 nm 左右. TEM 表征是将氨基化二氧化硅量子点荧光纳米颗粒分散在 PBS 缓冲溶液中, 再取少量溶液滴加在铜网上, 晾干, 在透射电子显微镜下观测拍照. 氨基化二氧化硅量子点颗粒在水溶液中分散较好, 没有聚集, 原因在于氨基化后各粒子表面均呈正电荷, 通过静电排斥而使得粒子均匀分散, 这与粒径分布检测所得结果(图 2)一致. 经水溶性改性后, 颗粒在水相中的分布均一性对其生物医学应用起到很重要的影响. 本文所制备的氨基化二氧化硅量子点纳米球在水相中的分散很好, 其多分散系数为 0.095. 纳米颗粒在未经表面修饰的情况下一般会发生相互聚集, 而达到能量最低, 不能发挥纳米粒子的小尺寸效应. 为了更好地利用纳米粒子的小尺寸效应, 一般需在纳米颗粒表面进行改性, 使其在分散相中呈均一分布.

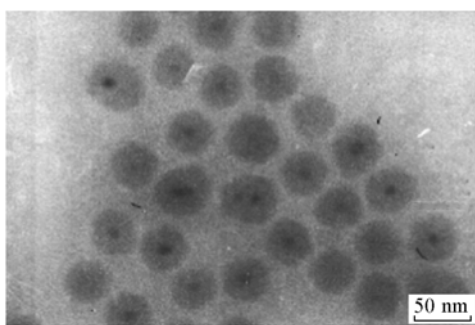


Fig.1 TEM image of silica-coated QDs

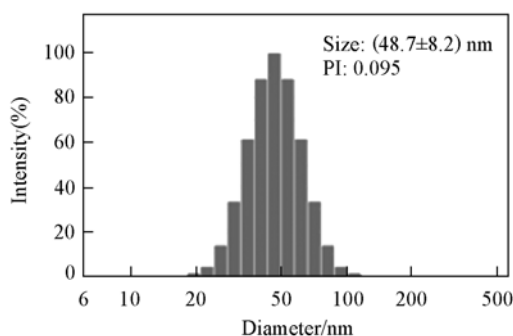


Fig.2 Size distribution of silica-coated QDs

2.2 二氧化硅量子点荧光纳米球的光谱表征

油溶性量子点水溶性改性后依然保持量子点原有的光谱特性. 图 3 为油溶性量子点经二氧化硅水溶性改性前后的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱图. 从紫外-可见吸收谱上可以看出, 由于在油溶性量子点表面包覆了二氧化硅, 其第一激子吸收峰变得平坦^[9]. 图 3 中的荧光光谱变化不明显, 改性后的光谱依然对称尖锐. 其荧光产率由原来的 63.1% 下降到 22.7%. 水溶性改性后量子点光谱特性的保持为其生物医学应用打下了基础.

2.3 二氧化硅量子点荧光纳米球的表面基团表征

二氧化硅改性后由于其表面只带有羟基, 不利于偶联生物分子, 在生物医学中难以应用. 为此, 利用带有氨基的硅烷偶联试剂, 在已形成的二氧化硅颗粒表面形成一层单分子层, 使其氨基化. 图 4 为二氧化硅量子点荧光纳米球的红外光谱. 1095.5, 945.1 和 801.2 cm^{-1} 的特征峰表明二氧化硅的形

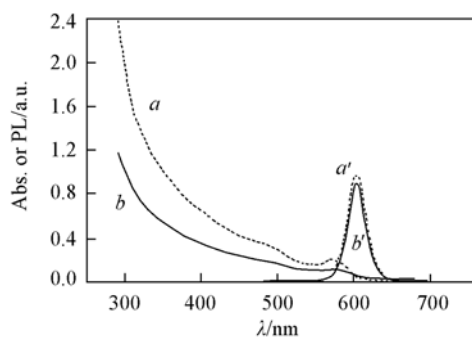


Fig. 3 Changes of UV-Vis(*a, b*)/PL(*a', b'*) spectra before and after silica-encapsulation

a, a'. Hydrophobic QDs in cyclohexane; *b, b'*. silica-coated QDs in water.

成; 2931.7 cm^{-1} 特征峰来自 APTES 的亚甲基, 说明 APTES 已结合到二氧化硅表面; 同时 1697.3 和 1558.4 cm^{-1} 的氨基特征峰也说明了 APTES 的存在.

氨基化前后的二氧化硅量子点纳米颗粒的 *zeta* 电位检测结果见图 5. 二氧化硅包覆改性后, 颗粒表面的 *zeta* 电位为 -50.31 mV , 引入氨基后 *zeta* 电位变为 6.89 mV . 这与红外表征结果一致, 说明已成功制备了氨基化二氧化硅量子点荧光纳米球.

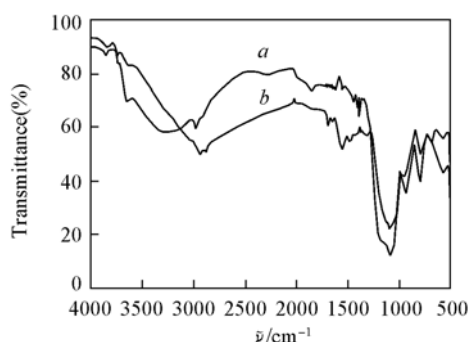


Fig. 4 FTIR spectra of silica-coated QDs(*a*) and amino silica-coated QDs(*b*)

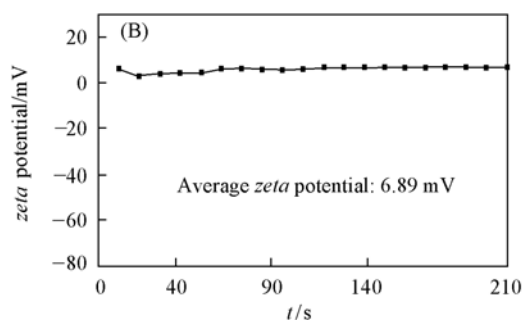
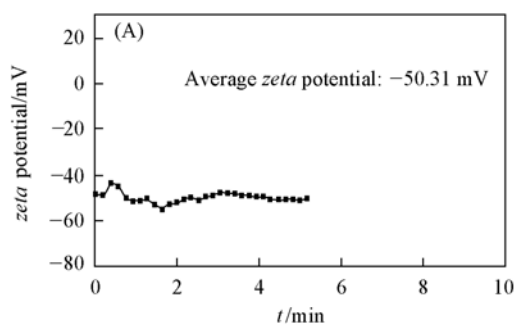


Fig. 5 *zeta* potential of silica-coated QDs(A) and amino silica-coated QDs(B)

2.4 二氧化硅量子点荧光纳米球的肿瘤细胞标记

细胞标记是生物医学领域中一个重要的课题. 传统的有机染料分子由于光稳定性差, 不能进行长时间观测, 使之在很多荧光标记应用中有所欠缺. 近年来, 量子点荧光标记技术的发展日新月异, 与传统的有机染料分子相比, 量子点荧光试剂更具光稳定性, 能长时间激发而保持较高的荧光强度^[4]. 研究肿瘤细胞表面电荷, 可以为细胞各项结构功能参数的变化提供依据. 以往对于细胞膜表面电荷特性的研究大多是针对群体细胞, 对于肿瘤细胞的研究多集中于其不同分化阶段糖链唾液酸化的程度差异, 对单个细胞表面电荷的分布情况的研究则很少. 本文利用自制的氨基化二氧化硅量子点荧光试剂来标记肿瘤细胞表面膜. 由于细胞表面带有负电荷, 可以与带正电的氨基化二氧化硅量子点荧光纳米颗粒通过静电结合. 图 6 是肿瘤细胞与自制的氨基化二氧化硅量子点荧光试剂静电结合后的荧光显微

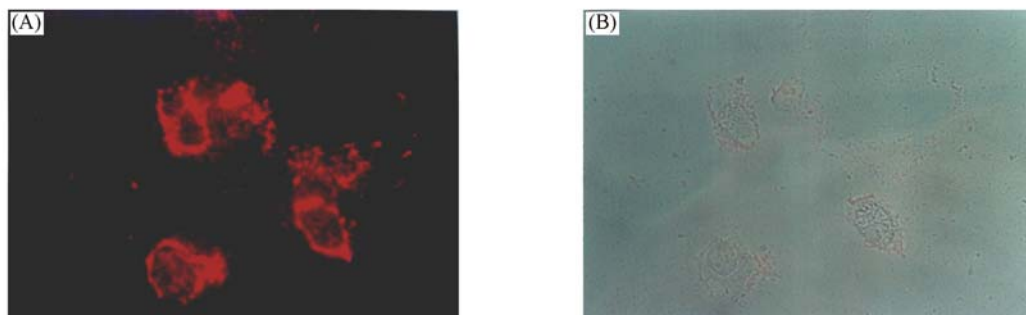


Fig. 6 Dark-field image(A) and bright-field image(B) of fixed adenoid cystic carcinoma cells treated with amino silica-coated QDs($400\times$)

镜照片和明场照片. 由图 6 可见, 细胞外周膜已成功地被量子点标记, 且肿瘤细胞外周荧光强度很不均匀, 表明肿瘤细胞表面负电荷分布不均匀, 这将对某些疾病的临床诊断具有一定的意义.

参 考 文 献

- [1] Fu A. H. , Gu W. W. , Boussert B. , *et al.* . Nano Lett. [J] , 2007 , 7(1) : 179—182
- [2] Wu X. , Liu H. , Liu J. , *et al.* . Nature Biotechnology[J] , 2003 , 21 : 41—46
- [3] Edgar R. , McKinstry M. , Hwang J. , *et al.* . PNAS[J] , 2006 , 103(13) : 4841—4845
- [4] Chan W. , Maxwell D. , Gao X. , *et al.* . Curr. Opin. Biotechnol. [J] , 2002 , 13 : 40—46
- [5] Jovanovic A. V. , Flint J. A. , Varshney M. , *et al.* . Biomacromolecules[J] , 2006 , 7 : 945—949
- [6] Gerion Daniele , Pinaud Fabien , Williams Shara C. , *et al.* . J. Phys. Chem. B[J] , 2001 , 105 : 8861—8871
- [7] Kumar Rajiv , Roy Indrajit , Ohulchanskyy Tymish Y. , *et al.* . ACS Nano[J] , 2008 , 2(3) : 449—456
- [8] Zhang B. B. , Cheng J. , Gong X. Q. , *et al.* . J. Colloid Interface Sci. [J] , 2008 , 322 : 485—490
- [9] Han M. , Gao X. , Su J. Z. , *et al.* . Nat. Biotechnol. [J] , 2001 , 19 : 631—635

Preparation and Cell-labeling Function of Monodisperse Core/Shell Structured Quantum Dots/SiO₂ with Amino Groups

ZHANG Bing-Bo¹ , GONG Xiao-Qun¹ , LIN Ting-Ting² , HE Yan-Jin² ,
CHENG Jing¹ , SHAN Shun-Yang¹ , CHANG Jin^{1*}

(1. Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science & Engineering,
Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Eye Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Water-soluble silica-coated quantum dots(QDs) were prepared by encapsulating hydrophobic QDs into silica *via* the reverse microemulsion method. The silica-coated QDs nanoparticles were further modified with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). The as-prepared samples were characterized with transmission electron microscopy(TEM) , particle size analyzer and *zeta* potential , UV-Vis absorption/Photoluminescence (PL) and Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR) measurements. The results show that the silica-coated QDs are well defined with *ca.* 45 nm , monodisperse , water-soluble , highly-stable. And the as-obtained silica-coated QDs with amino groups can label the cancer cell *via* the electrostatic attraction.

Keywords Quantum dots ; Amino group ; SiO₂ ; Cell-labeling

(Ed. : H, J, Z)