

基于 Au@Ag/碳纳米管的 SERS-荧光双模 探针癌细胞成像应用研究

陈 鹏¹, 王著元²

(1. 金陵科技学院网络与通信工程学院, 江苏 南京 211169;

2. 东南大学电子科学与工程学院, 江苏 南京 210096)

摘 要: 报告了一种基于 Au@Ag/碳纳米管(CNTs)的 SERS-荧光双模细胞成像探针, 其可以产生表面增强拉曼散射(SERS)和荧光信号。在这种探针中, 金/银核壳纳米粒子(Au@Ag NPs)作为 SERS 增强基底首先通过静电作用组装到碳纳米管表面, 然后标记 4-巯基苯甲酸(4MBA)以产生 SERS 信号, 接着通过氨基与硫碳胺键作用将异硫氰酸荧光素(FITC)和碳纳米管连接以产生荧光信号。使用 HeLa 细胞作为模型癌细胞, 通过荧光和 SERS 成像结果证实了所提出的探针可以实现细胞成像功能。

关键词: 表面增强拉曼散射; 荧光; 碳纳米管; 细胞成像

中图分类号: O657

文献标识码: A

文章编号: 1672-755X(2018)02-0057-05

A SERS and Fluorescence Dual Mode Cancer Cell Imaging Probe Based on Au@Ag Nanoparticles Functionalized Carbon Nanotubes

CHEN Peng¹, WANG Zhu-yuan²

(1. Jingling Institute of Technology, Nanjing 211169, China; 2. Southeast University, Nanjing 210096, China)

Abstract: We report a dual mode cancer cell imaging probe based on Au@Ag nanoparticles functionalized carbon nanotubes, which can generate both surface enhanced Raman scattering (SERS) and fluorescence signals. In such a probe, gold/silver core-shell nanoparticles (Au@Ag NPs) are adsorbed on the surfaces of MWCNTs through an electrostatic interaction, which serve as the SERS substrate. Then the Au@Ag NPs are labeled with 4-mercaptobenzoic acid (4MBA) to generate SERS signals. Finally, FITC are conjugated to the carbon nanotubes by the amino and thiocarbonic bonds to yield fluorescence. Using HeLa cells for in vitro experiments, both the fluorescence and SERS imaging results confirm that the proposed probe can be used as an efficient cancer cell imaging probe.

Key words: surface enhanced Raman scattering; fluorescence; carbon nanotubes; cell imaging

细胞是完成生命活动的基本单位,从细胞层面研究纳米粒子与细胞相互作用是现在生物医学领域的研究热点。荧光技术因其快速、简单的优点成为研究细胞的主要技术。但是基于荧光光谱的材料有一些缺点,如染料容易光漂白、激发带宽较窄而发射带宽很宽等,这样在多色彩染色时容易出现发射峰的交叠。发射带宽较窄的量子点因生物毒性问题阻碍了其在生物标记与成像生物的应用^[1]。近年来,表面增强拉

收稿日期: 2018-03-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(61535003)

作者简介: 陈鹏(1988—),男,安徽宿州人,讲师,博士,主要从事生物光学传感器及生物光学成像研究。

曼散射(SERS)光谱技术在生物成像与传感等领域被越来越多地使用。SERS信号不易光漂白,谱线宽度很窄,检测技术灵敏度高,能实现细胞内分子水平的检测;SERS技术的检测条件温和,对生物样品损伤小;可用红外光激发,受生物样品自身荧光以及水的干扰很小;SERS光谱的指纹特性可以在复杂细胞环境中对目标物进行有效跟踪与检测^[2-6]。文献[7-10]设计了不同类型的SER纳米探针,并进行了应用研究。虽然SERS优点明显,但SERS信号需要较长的采集时间,不利于实时动态监测,而荧光采集时间较短。因此,同时使用荧光和表面增强拉曼光谱作为分析工具在复杂的细胞环境中实现检测和成像功能得到学者的广泛关注^[4-5,11]。

本文拟提出一种新型的荧光-SERS双模成像探针。该探针为基于金核银壳纳米粒子修饰的碳纳米管,该探针进入HeLa细胞后可以有效地实现荧光与SERS双模细胞成像。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),聚丙烯胺盐酸盐(PAH, MW 15 000),硝酸银(AgNO_3),4-巯基苯甲酸(4MBA),二水合柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), H_2SO_4 (质量分数98%), HNO_3 (质量分数65%),去离子水($18\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$),多壁碳纳米管(MWCNTs,直径40~60 nm,长度1~2 μm)。

通过Shimadzu UV-3600 PC紫外-可见分光光度计测量纳米粒子的吸收光谱,Tecnai透射电镜表征TEM图,英国安道尔公司Sharmrock光谱仪装配Newton 303i CCD采集SERS信号,Edinburg FLS920荧光光谱仪测量荧光光谱;Olympus FV 1000共焦显微镜配CCD测量细胞成像。

1.2 SERS-荧光双模光学探针的制备

基于 Au@Ag/MWCNTs 的双模成像探针结构如图1所示。具体制备流程如下:

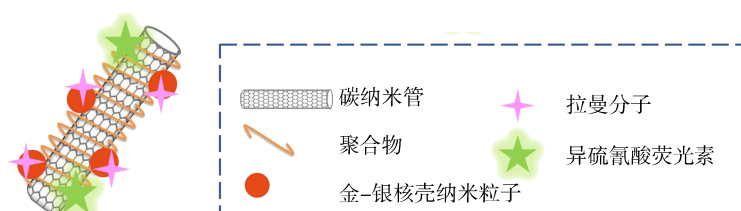


图1 双模式光学成像探针结构示意图

1.2.1 氨基化MWCNTs制备 取10 mg的原始MWCNTs分散到10 mL浓硫酸和浓硝酸($V/V=3:1$)混合溶液中超声氧化处理24 h,然后加入大量去离子水到MWCNTs的混酸溶液中稀释溶液,多次过滤和透析后使溶液达到中性pH值,此时处理后的MWCNTs表面含有大量的羧基功能团。

1.2.2 聚合物包裹MWCNTs 取1 mg按上述处理过的MWCNTs加入到10 mL的PAH溶液($10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)中,超声反应1 h后离心 $15\text{ 000 r} \cdot \text{min}^{-1}$,30 min清洗3次,所得沉淀物重新分散到10 mL离子水中,即得到氨基功能化的MWCNTs。

1.2.3 Au@Ag NPs 制备 Au@Ag NPs 通过柠檬酸钠加热还原氯金酸和硝酸银的方法制备。首先制备Au NPs。取100 mL的 $1.0 \times 10^{-4}\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氯金酸溶液剧烈搅拌并加热至沸腾,然后迅速加入8 mL 1%的柠檬酸钠溶液并保持沸腾30 min,待溶液变成酒红色,表明Au NPs生成。然后以Au NPs作为核继续反应包裹Ag壳层,过程如下:加入16 mL 1%的柠檬酸钠溶液到上述沸腾的Au NPs溶液剧烈搅拌并保持沸腾,然后逐滴加入5 mL $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸银溶液并继续加热大约1 h,待溶液由酒红色变成深棕色时且颜色保持稳定后停止加热,即得 Au@Ag NPs ,将溶液冷却至室温备用。

1.2.4 Au@Ag/MWCNTs 制备 取1 mL氨基功能化的MWCNTs溶液加入到20 mL Au@Ag NPs 溶液中超声反应30 min,然后将反应溶液以 $3\text{ 500 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min 2次,去除上清游离的 Au@Ag NPs 后重新分散到5 mL水溶液中,即得 Au@Ag/MWCNTs 。

1.2.5 SERS标记 取10 μL 4MBA酒精溶液($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)加入到10 mL制备好的 Au@Ag/MWC -

NTs 溶液,在室温暗室条件下过夜搅拌。然后将反应溶液 $3\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$ 离心多次,去除上清溶液中游离的 4MBA 后再分散到水溶液中,即得 4MBA-Au@Ag/MWCNTs。

1.2.6 荧光标记 在聚合物层上连接异硫氰酸荧光素。将 $100\ \mu\text{L}$ 的 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ FITC 水溶液加入到上述 $5\ \text{mL}$ 4MBA-Au@Ag/MWCNTs。避光反应 $12\ \text{h}$ 后 $15\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, $30\ \text{min}$ 离心清洗 3 次。所得沉淀物重新分散至 $10\ \text{mL}$ 去离子水,即得到荧光-SERS 双模光学成像探针。

1.3 细胞成像实验

宫颈癌细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液的 90% DMEM 高糖培养基的培养液中。培养液取自南京凯基生物技术有限公司。细胞培养条件为 5% CO_2 条件下培养,培养温度恒定在 $37\ ^\circ\text{C}$ 。在细胞成像实验中,先将 HeLa 细胞接种于培养皿培养 $24\ \text{h}$,然后将 Au@Ag/碳纳米管探针加入到细胞中,继续培育 $5\ \text{h}$ 。对细胞进行 SERS 和荧光成像前,培养皿用 PBS 磷酸盐缓冲液冲洗 3 次去除游离的 Au@Ag/碳纳米管探针后进行光谱采集。

2 结果与分析

2.1 探针的表征

在选取 SERS 增强的金属基底材料中,银纳米粒子的增强效果最好,但银纳米粒子的形貌较难控制,而且通过实验对比,碳纳米管表面修饰银纳米粒子难以实现反应液体中游离银纳米粒子的分离,且溶液制成的探针容易沉淀,不利于细胞实验。金纳米粒子的形貌控制工艺较成熟,但其构成的探针 SERS 增强效应不高。因此,本研究选取 Au@Ag NPs 作为 SERS 增强基底并将其吸附到 MWCNTs 表面形成 SERS 衬底。柠檬酸钠可以作为还原剂制备出 Au@Ag NPs,还可以作为 Au@Ag NPs 稳定剂。

实验所得到的 Au@Ag NPs 和 Au@Ag/MWCNTs 的消光光谱如图 2 所示。根据的 Song 的研究报道,单分散 $15\ \text{nm}$ 的金纳米粒子吸收峰在 $520\ \text{nm}$ 处,本文以 $15\ \text{nm}$ 的金纳米粒子为核,在其表面通过柠檬酸钠还原 AgNO_3 沉积一层银壳形成金核银壳纳米球以后,得到的单分散 Au@Ag NPs 的消光峰在 $400\ \text{nm}$ 处。

从图 3(a)可以看出,绝大多数粒子呈球形,并有明显的核壳结构纳米粒子形成,其尺寸较金纳米粒子发生显著变化,表明金核银壳纳米粒子的形成。当 Au@Ag NPs 吸附到 MWCNTs 表面后,该消光峰会红移到 $431\ \text{nm}$,比单分散的 Au@Ag NPs 明显地加宽,这与 Zhao

等^[12]报道的实验现象一致。通过该光谱变化,我们判断产生这种现象的主要原因是纳米粒子部分聚集,由此推断 Au@Ag NPs 已经组装到了 MWCNTs 的表面。图 3(b)是 Au@Ag/MWCNTs 的电镜图,其结果进一步说明 Au@Ag NPs 成功装载到了 MWCNTs 的表面。还可以看到,碳纳米管表面的金核银壳纳米粒子之间的距离变得更为紧密且形成了很多的聚集体。这些聚集体的出现可以产生许多的 SERS“热点”,根据 SERS 增强原理描述,Au@Ag NPs 聚集处的电磁场强度将会极大增强,从而产生更强的 SERS 信号。

为了获得水溶性良好且官能团功能化的碳纳米管,本研究首先将原始的碳纳米管加入到混酸中,通过超声波处理氧化及去离子水清洗到 pH 中性后,其水溶性得到了明显的改善。图 3(c)是氧化处理的碳纳米管的 TEM 图,其尺寸在 $500 \sim 1\ 000\ \text{nm}$ 且均匀分散。为了在碳纳米管表面上修饰金属纳米粒子和荧光素,我们将具有大量氨基功能团的阳离子聚合物 PAH 与氧化后的碳纳米管直接混合超声分散,从而修饰上氨基功能团,为下一步实验做铺垫,而且进一步提高了碳纳米管在水溶液中的分散性。

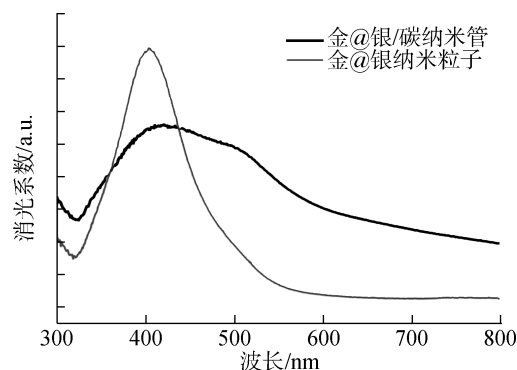


图2 金核银壳纳米粒子和金核银壳/碳纳米管复合纳米粒子的消光谱

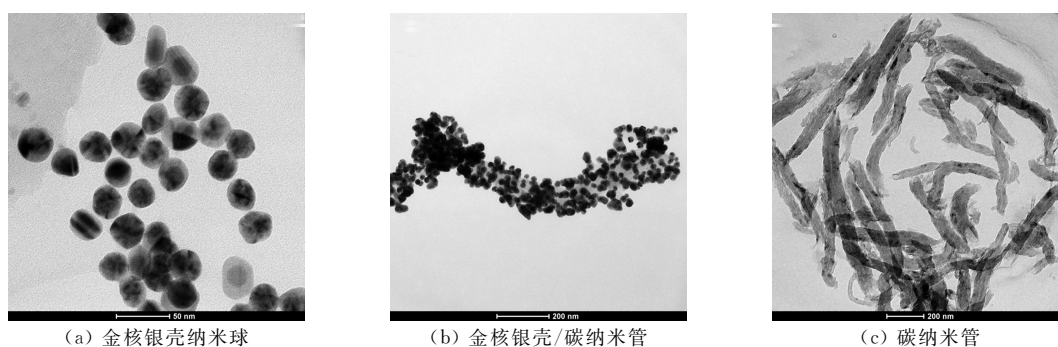


图 3 不同材料的 TEM 图

2.2 探针的 SERS 和荧光特性

实验选取 4-巯基苯甲酸(4MBA)作为拉曼分子产生 SERS 信号。由于探针表面的金核银壳纳米粒子表面为银,能产生很强的 SERS 增强效应,因此 4MBA 标记在 Au@Ag/MWCNTs 上可以得到较强的 SERS 光谱,如图 4(a)所示。图中 $1\,077$ 和 $1\,590\text{ cm}^{-1}$ 位置的峰位归属于 4MBA 分子结构中苯环的特征峰。采集 SERS 信号使用的是 633 nm 激光器激发,此时 FITC 的荧光不会被激发,从 SERS 光谱上也可以观察到没有荧光背景信号产生,只有 4MBA 的特征峰出现。这主要是因为 FITC 是连接在碳纳米管表面的氨基官能团上,并没有和金核银壳纳米粒子直接接触,因而不能获得拉曼信号增强。探针的荧光光谱如图 4(b)所示,实验采用波长为 488 nm 的激光器激发 FITC 的荧光信号,其荧光峰在 512 nm 处,且荧光光谱上未观察到 4MBA 的 SERS 信号。由此可见,通过选择不同的激发光波长,该探针粒子能分别产生 SERS 和荧光信号。

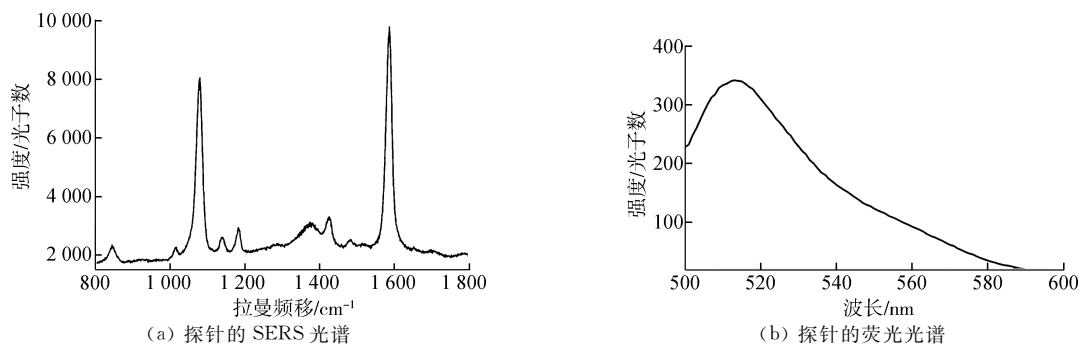


图 4 探针的 SERS 光谱和荧光光谱

2.3 细胞成像实验

为检验该 SERS-荧光双模探针在活细胞成像方面的应用,本研究采集探针进入细胞内的 SERS 和荧光光谱。图 5 是探针与 HeLa 细胞共同培养后的细胞白光透射图、荧光和 SERS 成像图。如图 5(a)所示,细胞内具有较多的黑点,这说明碳纳米管进入到细胞中,而且细胞的形貌正常。图 5(b)是选用 488 nm 激发光对 HeLa 细胞进行荧光图像采集。图 5(c)是采用 633 nm 激光从 HeLa 细胞中采集到的 SERS 信号成像图(取 4MBA 在 $1\,077\text{ cm}^{-1}$ 处峰成像)。图 5(d)是将细胞荧光和 SERS 成像图进行重合。

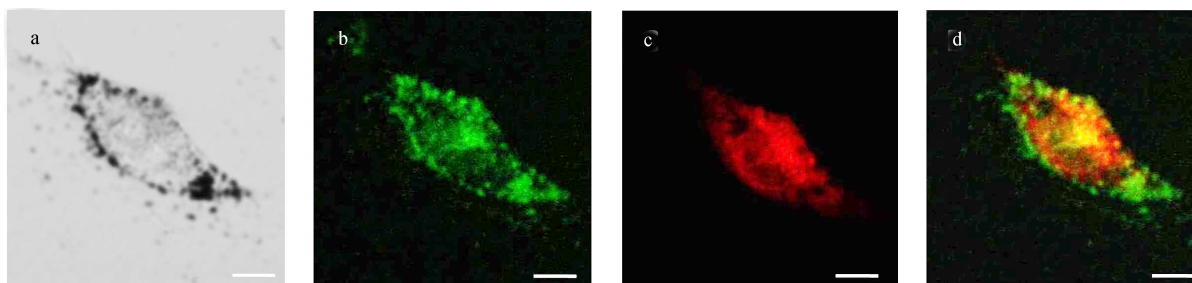


图 5 HeLa 细胞内双模探针的共聚焦成像

作为活细胞探针,其应具有较好的生物亲和性,实验利用 MTT 检验探针的细胞毒性。将 HeLa 细胞与探针在 37 °C 下共培养。如图 6 所示,HeLa 细胞与 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 探针共培养 24 h 后,探针没有显示出明显的细胞毒性。因此,这种双模探针具有较低的细胞毒性,可以运用于细胞光学成像及其他活细胞应用。

3 结 语

本文设计制备了一种基于 Au@Ag/碳纳米管复合材料的新型荧光-SERS 双模光学成像探针。采用聚合物包裹的方式使碳纳米管具有良好的生物兼容性和表面氨基功能化,然后将 Au@Ag NPs 组装到碳纳米管表面再标记上拉曼分子产生 SERS 信号,最后通过聚合物连接上荧光标记物 FITC 产生荧光信号。该探针进入活细胞之后,使用不同的激发波长可以实现细胞内荧光与 SERS 成像。这种光学探针的形成在细胞内环境成像、药物载体示踪以及粒子与细胞相互作用分析等领域具有重要的潜在应用价值。

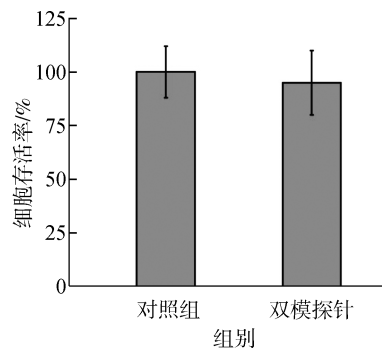


图 6 HeLa 细胞与探针共培养的细胞存活率实验

参考文献:

- [1] Kim S, Lim Y T, Soltesz E G, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping[J]. Nature Biotechnology, 2003, 22(1): 93 - 97
- [2] Qian X M, Peng X H, Ansari D O, et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(1): 83 - 90
- [3] Wang Y Q, Yan B, Chen L X. SERS tags: novel optical nanoprobes for bioanalysis[J]. Chemical Reviews, 2013, 113(3): 1391 - 1428
- [4] Wang Z Y, Zong S F, Yang J, et al. Dual-mode probe based on mesoporous silica coated gold nanorods for targeting cancer cells[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26(6): 2883 - 2889
- [5] Zong S F, Wang Z Y, Yang J, et al. A SERS and fluorescence dual mode cancer cell targeting probe based on silica coated Au@Ag core-shell nanorods[J]. Talanta, 2012, 97: 368 - 375
- [6] Zong S F, Wang Z Y, Yang J, et al. Intracellular pH sensing using p-aminothiophenol functionalized gold nanorods with low cytotoxicity[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(11): 4178 - 4183
- [7] Song J B, Duan B, Wang C X, et al. SERS-encoded nanogapped plasmonic nanoparticles: growth of metallic nanoshell by templating redox-active polymer brushes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(19): 6838 - 6841
- [8] Qian X, Peng X H, Ansari D O, et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags[J]. Nature Biotechnology, 2007, 26(1): 83 - 90
- [9] Li D W, Qu L L, Hu K, et al. Monitoring of endogenous hydrogen sulfide in living cells using surface-enhanced Raman scattering[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2015, 54(43): 12758 - 12761
- [10] Mohs A M, Mancini M C, Singhal S, et al. Hand-held spectroscopic device for in vivo and intraoperative tumor detection; contrast enhancement, detection sensitivity, and tissue penetration[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(21): 9058 - 9065
- [11] Wang Z, Wu H, Wang C, et al. Gold aggregates-and quantum dots-embedded nanospheres: switchable dual-mode image probes for living cells[J]. J. Mater Chem, 2011, 21: 4307 - 4313
- [12] Zhao L, Shingaya Y, Tomimoto H, et al. Functionalized carbon nanotubes for pH sensors based on SERS[J]. Journal of Materials Chemistry, 2008, 18(40): 4759 - 4761

(责任编辑:湛 江)