

用于荧光免疫检测的荧光纳米球制作方法研究

王 怡 廖天作 柯 鹏 孙红梅 郭惠玲 刘明星* 孙宏浩*

(湖北工业大学生物工程与食品学院,湖北省工业发酵协同创新中心,武汉 430068)

摘 要 分别采用 Stöber 溶胶-凝胶法、反相微乳聚合法和原位聚合法研究制得 3 种荧光纳米球:(1)羧基功能化二氧化硅(SiO_2)荧光纳米小球;(2)聚丙烯酰胺聚丙烯酸共聚物(PAAAM)荧光纳米小球;(3) SiO_2 为核,PAAAM 为壳的核壳结构 SiO_2 @PAAAM 荧光纳米小球。以上 3 种纳米球具有较好的水分散性和稳定性。采用透射电镜、动态光散射和红外光谱、荧光光谱等对样品进行了表征。荧光光谱分析结果表明,荧光分子偶联加入量为 1%(wt,质量分数)的 3 种纳米球均具有最大荧光强度。采用 SNP@PAAAM 纳米球与罗丹明红 X(RhX)偶联,制得的 SNP@PAAAM@RhX 既可以很好的从水中离心分离也具有良好的水分散性,电动电位为 -22.7mV ,平均粒径 90nm 。所制备的 3 种荧光纳米球,可应用于快速体外检测、疾病追踪等重要领域。

关键词 荧光纳米球, SiO_2 ,聚丙烯酰胺纳米球,免疫荧光光检测

Preparation of fluorescent nanoparticles for immunofluorescence assay

Wang Yi Liao Tianzuo Ke Peng Sun Hongmei Guo Huiling
Liu Mingxing Sun Honghao

(Institute of Bioengineering and Food,Industrial Fermentation of Collaborative Innovation
Center in Hubei Province,Hubei University of Technology,Wuhan 430068)

Abstract The preparation of three types of fluorescent nanoparticles were studied by applying Stöber method, inverse microemulsion polymerization and in-situ polymerization, respectively: (1) carboxyl functional SiO_2 fluorescent nanoparticles, (2) polyacrylamide-co-polyacrylic acid polymer (PAAAM) fluorescent nanoparticles, (3) core shell structure SNP@PAAAM fluorescent nanoparticles. All these nanoparticles were well dispersed in water. Transmission electron microscope, infrared spectroscopy, fluorescence spectrophotometry, dynamic light scattering analysis and zeta potentials were used to characterize the nanoparticles. Fluorescence spectroscopy showed that three NPs with RhX 1wt% all had highest fluorescent intensity. SNP@PAAAM nanoparticles and rodamine red X(RhX) were conjugated to obtain SNP@PAAAM@RhX, which can be well separated from the water and also had good water dispersion. The zeta potential was -22.7mV , and the average particle size was 90nm . Three prepared fluorescence nanoparticles can be widely applied in important rapid biomarker diagnosis and disease tracking.

Key words fluorescent nanoparticle, SiO_2 , polyacrylamide nanoparticle, fluorescence immunoassay

免疫分析(IA)是利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质的分析方法^[1-3]。而标记免疫分析技术凭借其高灵敏度和特异性被广泛应用于基础医学和临床各领域,是检测生物分子最主要的方法^[4]。标记免疫分析主要包括酶免疫标记技术(EIA)、化

学发光免疫技术(CLIA)和荧光免疫分析技术(FIA)。其中,以固相载体吸附抗原/抗体为基础的酶联免疫分析法(ELISA)凭借其高的灵敏度、良好特异性以及较快检测速度,成为 EIA 中应用最广泛的分析方法。但由于重复性较低、稳定性较差及存

基金项目:国家自然科学基金(21401051,21501054);湖北省自然科学基金(2014CFA080);湖北省科技厅高等学校优秀中青年科技创新团队计划(T201705);湖北省“楚天学者”计划(2013);湖北省百人计划(2013);湖北省大学生创新创业训练计划(201410500021)

作者简介:王怡(1992-),女,硕士,主要研究纳米材料在生物医药中的应用。

联系人:孙宏浩(1973-),男,博士,教授,主要研究领域为靶向纳米药物和快速检测,纳米微球的表面修饰,纳米微球和生物分子之间的相互作用机理研究。

刘明星(1970-),男,博士,教授,主要研究领域为化学药物、现代药剂、新型药用材料等。

在交叉反应,阻碍了 ELISA 的进一步应用^[5]。化学发光免疫分析技术是将化学发光测定技术和免疫反应结合后建立的技术,具有高的灵敏度和特异性,但是化学发光标记物稳定性差且标记技术落后使其应用受到限制^[6]。免疫荧光微球可以直接和抗原/抗体耦合,荧光强度不随时间变化,并且可以通过微球上偶联大量荧光分子实现荧光增强,使其有望用于免疫荧光微球检测技术。

二氧化硅(SiO_2)纳米粒子(SNP)是荧光免疫分析技术中被广泛应用的纳米材料之一^[7-10],其粒子密度大,容易离心分离和表面修饰。但 SNP 在水中分散性较差且容易团聚,离心处理后不易分散,从而限制了其应用。聚丙烯酰胺是重要的水溶性聚合物,将其修饰在 SNP 表面,能有效改善其在水中的分散性与团聚现象^[11]。因此,本研究制备了 3 种不同结构的荧光纳米粒子:(1) SiO_2 荧光纳米粒子[SNP@罗丹明红 X(RhX)];(2)聚丙烯酰胺聚丙烯酸共聚物(PAAAM)荧光纳米粒子(PAAAM@RhX);(3) SiO_2 @PAAAM 的荧光纳米粒子(SNP@PAAAM@RhX)。利用 Stöber 溶胶-凝胶法制备粒径为 50~100nm 的单分散 SNP,将荧光染料分子与氨基修饰的三乙氧基硅烷(APTES)反应后接到 SNP 表面,最后对纳米球表面进行羧基改性,增加 SNP 在水中的分散性。通过反相微乳聚合法制备 PAAAM 纳米小球^[12-13],将丙烯酰胺单体的水溶液借助油包水型(W/O)乳化剂分散在油的连续介质中,然后引发聚合。由于反相微乳聚合在油相中容易溶解大量的氧气,造成自由基淬灭,因此反相微乳过程需要多次冷冻-真空-解冻的除氧过程,操作步骤繁琐,且除氧不充分极易导致聚合失败。本研究以 SNP 为核,在水相中加入丙烯酰胺和丙烯酸等单体的方法,实现水相中的原位聚合,形成 SiO_2 包埋 PAAAM 的核壳结构(SiO_2 @PAAAM)荧光纳米小球,由于水相中氧含量少,因此不需要繁琐的除氧步骤。PAAAM 的引入,使得 SiO_2 @PAAAM 纳米球在水相具有更好的分散性和稳定性^[14-16]。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

正硅酸四乙酯(TEOS)、顺丁烯二酸酐、二氯甲烷、乙醇、正己醇、环己烷、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、氯化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、氨水、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS),均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;RhX,德国布鲁克公司;氨丙

基三乙氧基硅烷(APTES)、3-(异丁烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS)、亚甲基双丙烯酰胺,均为分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司;丙烯酰胺、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES),Biosharp 公司;丙烯酸(分析纯),天津博迪化工股份有限公司;Triton X-100(分析纯),上海玉博生物科技有限公司;(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC·HCl,分析纯),上海共价化学科技有限公司。

离心机(TGL-205 型),长沙平凡仪器仪表有限公司;动态光散射仪(Zetasizer-Nano ZS 型),英国马尔文仪器有限公司;傅里叶红外光谱仪(FT-IR, Nicolet 6700 型),美国赛默飞公司;透射电子显微镜(TEM, Tecnai G2 S-TWIN 型),美国 FEI 公司;荧光分光光度计(XRF, LS-55 型),美国 PE 公司。

1.2 样品制备

1.2.1 羧基功能化荧光硅纳米小球

硅烷偶联剂 APTES 的羧基改性:取 1.96g 马来酸酐置于 10mL 的乙醚中,在冰浴的条件下逐滴加入 3.4mL 的 APTES,搅拌 4h,旋蒸除乙醚后,即制得 APTES-COOH。

用 Stöber 法^[17]制备 SNP:取 1mL TEOS, 1.2mL 的氨水和 1mL 的超纯水加入到 25mL 乙醇中,室温搅拌 10h;10000r/min 离心 15min,用超纯水和无水乙醇反复离心洗涤 4 次,分散于乙醇中,配制成 10mg/mL 溶液。

SNP@RhX 的制备:(1)取 1mg RhX 加入到 1mL 乙醇中,混合均匀后加入 1 μ L 的 APTES,避光搅拌 2h,制得 APTES-RhX;(2)取 10mL 硅纳米球溶液,加入 0.5mL 的氨水和 0.1mL 的超纯水,搅拌均匀后加入 APTES-RhX,避光搅拌 2h;(3)加入 25mg APTES-COOH 和 30 μ L 的 TEOS 避光搅拌 7h;(4)10000r/min 离心 15min,再用超纯水和无水乙醇洗涤 6 次,分散在超纯水中,配制成 10mg/mL 的 SNP@RhX 分散液。

1.2.2 PAAAM 荧光纳米小球制备

制备 PAAAM 纳米球^[18]:取 1.03g 丙烯酰胺, 0.5g 亚甲基双丙烯酰胺,10 μ L 的丙烯酸溶于 3mL 的超纯水中,作为水相;取 25mL 正己醇,8mL TX-100,120mL 环己烷混匀作为油相;将水相逐滴加入油相,搅拌 15min 后,用液氮冷冻-真空-解冻反复 4 次除氧;在通 N_2 保护的情况下,加入 30 μ L 的 30% (wt, 质量分数,下同)的过硫酸铵和 20 μ L 的 TEMED,室温搅拌 4h;加入一定量的乙醇和氯化钠饱和溶液,静置 12h;收集沉淀,乙醇洗涤离心

(5000r/min, 15min) 4 次, 超声分散于超纯水中; 透析 72h, 冷冻干燥后, 用超纯水配成 10mg/mL 的分散液。

制备荧光 PAAAM 纳米球: (1) 取 1mg RhX 加入 1mL 10mmol (pH=9.0) 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中, 加入 0.5 μ L 的乙二胺, 避光反应 2h; (2) 取 2mL PAAAM 纳米小球分散液加入到 20mL 10mmol (pH=7.4) 的 PB 缓冲液, 搅拌均匀后加入 150 μ L 0.1mol EDC 溶液和 100 μ L 0.2mol NHS 溶液, 室温活化 30min 后加入前一步制得的氨基改性的 RhX, 室温反应 2h; (3) 加入 200 μ L 0.1mol 盐酸羟胺溶液, 搅拌 1h; (4) 加入乙醇将制得的荧光 PAAAM 纳米小球沉淀出来, 用乙醇洗涤离心 (5000r/min, 15min) 4 次, 分散于超纯水中, 透析 72h, 冷冻干燥后, 用超纯水配成 10mg/mL 的溶液。

1.2.3 荧光 SNP@PAAAM 纳米球的制备

制备 SNP@PAAAM 纳米球^[19]: 取 10mL SNP 分散液加入 1mL 水、20mL 乙醇和 0.5mL 氨水, 室温下搅拌均匀, 加入 80 μ L 的 MPS, 回流搅拌 3h, 离心分散在乙醇中; 上述乙醇分散液中加入 0.15g 丙烯酰胺, 0.08g 亚甲基双丙烯酰胺, 20 μ L 丙烯酸, 通氮气保护, 加入 40 μ L 的 30% (体积质量百分数) 的过硫酸铵和 30 μ L 的四甲基乙二胺, 40 $^{\circ}$ C 反应 6h; 离心 (1000r/min, 15min) 洗涤 4 次, 分散在超纯水中, 配制成 10mg/mL 的分散液。

SNP@PAAAM 纳米球与 RhX 的偶联: (1) 取 10mL SNP@PAAAM 纳米球溶液离心 (10000r/min, 15min) 后, 分散于 10mL 10mmol (pH=7.4) 的 PB 缓冲液, 加入 150 μ L 0.1mol EDC 溶液和 100 μ L 0.2mol NHS 溶液, 室温活化 30min 后加入氨基改性的 RhX, 室温反应 2h; (2) 加入 200 μ L 0.1mol 盐酸羟胺溶液, 搅拌 1h; (3) 离心 (1000r/min, 15min) 洗涤 5 次后, 分散在超纯水中, 配制成 10mg/mL 的溶液。

2 结果与讨论

2.1 纳米球水合粒径分析

各种纳米球的水合粒径图见图 1。从图可以看出, SNP 的水合粒径为 99nm, 制得的 SNP@RhX 纳米球的水合粒径为 105nm, 这是偶联 RhX 后又包覆了一层硅的结果; SNP 制备成 SNP@PAAAM@RhX 纳米球后, 其水合粒径为 143nm, 比 SNP@RhX 纳米球的粒径增大 38nm, 这是因为 PAAAM 具有良好的亲水性, 从而导致整体水合粒径增大;

PAAAM@RhX 采用反相微乳法制备, 纳米球的水合粒径为 60nm。

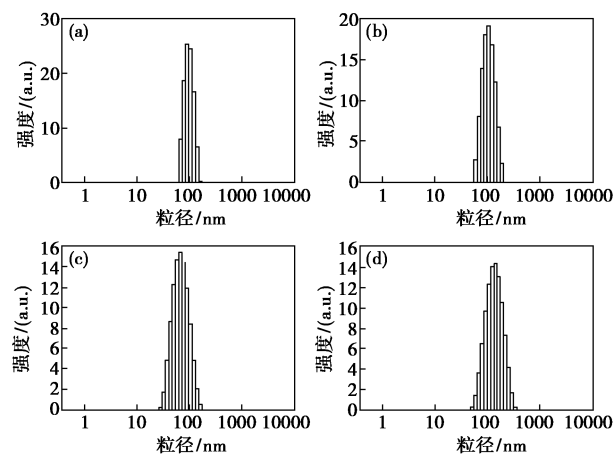


图 1 各种纳米球的水合粒径图

[(a) SNP; (b) SNP@RhX; (c) PAAAM@RhX; (d) SNP@PAAAM@RhX]

2.2 电动电位分析

纳米球的电动电位见图 2。从图可以看出, SNP 的电动电位为 -23.1mV, 因为 SNP 表面存在大量的 Si—OH, 其在纯水中以 SiO⁻ 形式存在; SNP@RhX 的电动电位为 -43.1mV, 是由于在硅表面引入了羧基, COO⁻ 的存在降低了纳米球的整体电动电位; PAAAM@RhX 的电动电位为 -24.6mV, 由于丙烯酰胺几乎不带电, PAAAM@RhX 中的负电荷是由丙烯酸中的羧基带来的, 表明 PAAAM@RhX 表面已经羧基化; SNP@PAAAM@RhX 电动电位为 -22.7mV, 因 PAAAM 中羧基的存在导致纳米球表现出负电动电位。

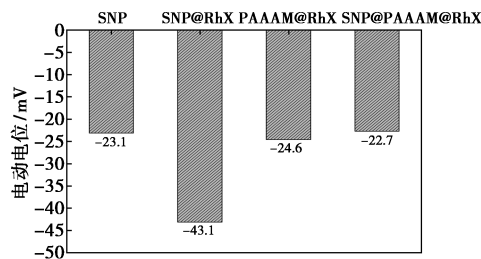


图 2 纳米球的电动电位图

2.3 TEM 分析

3 种荧光纳米球的 TEM 图见图 3。从图 3(a) 可以看出, SNP@RhX 表面光滑, 呈球形单分布状态, 粒径分布较为均一, 粒径约 85nm。从图 3(b) 可以看出, PAAAM@RhX 近似球形但是不规则, 平均粒径 40nm。从图 3(c) 可以看出, SNP@PAAAM@RhX 平均粒径 90nm, 纳米球表面包覆着一层深色的 PAAAM 层。

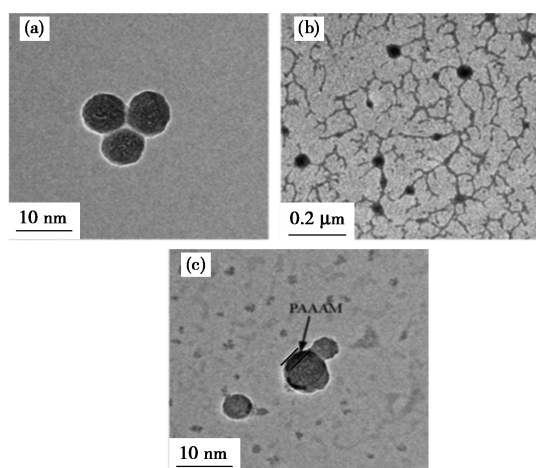


图3 3种荧光纳米球的TEM图

[(a) SNP@RhX; (b) PAAAM@RhX; (c) SNP@PAAAM@RhX]

2.4 FT-IR 分析

纳米球的FT-IR谱图见图4。从图可以看出, 2360cm^{-1} 、 1870cm^{-1} 和 1400cm^{-1} 分别为羧基的伸缩振动吸收峰,羧基中 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收峰和 $\text{C}-\text{H}$ 的弯曲振动吸收峰,表明 $\text{SNP}-\text{COOH}$ 纳米球羧基改性成功; 2925cm^{-1} 和 1454cm^{-1} 为PAAAM的特征吸收峰,进一步证明 $\text{SNP}@\text{PAAAM}$ 纳米球上被PAAAM成功包覆。

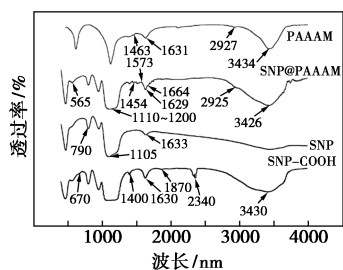


图4 纳米球的FT-IR谱图

2.5 荧光光谱分析

为了探究3种荧光纳米球RhX的最佳偶联量,荧光染料加入量分别为0.10% (wt, 相对荧光球的质量分数,下同)、0.25%、0.50%、1.00%、2.00% (反应后渗透提纯过程无荧光分子泄露,因此认为荧光分子的偶联效率近似为100%)。

3种荧光纳米球偶联不同量RhX后的荧光光谱图见图5。从图可以看出,3种荧光纳米球上RhX的偶联量从0.10%升高到1.00%的过程中,它们的荧光强度随偶联量的增加而增强,当RhX的偶联量从1.00%增加到2.00%时,荧光强度明显下降,这是由于纳米球偶联过多的荧光分子,荧光分子之间的距离过近导致荧光淬灭;对比3种荧光纳米球,发现PAAAM纳米球的荧光淬灭最为明显,这

是因为其粒径小(40nm),在偶联等量的条件下,其荧光分子之间的距离最近,研究表明,3种荧光纳米球的最佳偶联量均为1.00%。

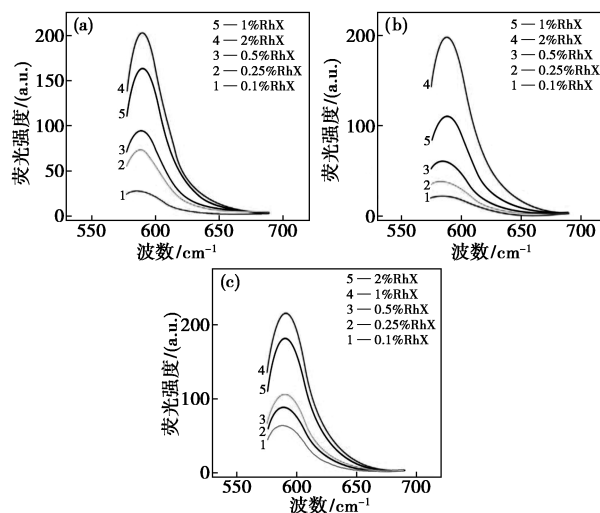


图5 3种荧光纳米球偶联不同量RhX的荧光光谱图

[(a) SNP@RhX; (b) PAAAM@RhX;

(c) SNP@PAAAM@RhX]

3 结论

由于荧光免疫分析检测中针对不同的病原体和层析条件,单一荧光纳米微粒很难满足所有检测要求。成功制得的3种不同材质的纳米荧光粒子以适应不同检测需求。这3种荧光纳米球制备工艺以及性能各有特点:(1) SNP@RhX的制备方法简单,尺寸可控易于离心分离,但较难分散,需要引入大量的羧基来提高纳米球的分散性;(2) PAAAM@RhX粒径较小,具有很好的水分散性能和长期稳定性,但是制备方法复杂,需要用冷冻-真空-解冻多次循环除氧;(3) SNP@PAAAM@RhX既可以很好的从水中离心分离也具有良好的水分散性,电动电位为 -22.7mV ,平均粒径90nm。以上3种纳米球均具有较好的水分散性和稳定性,可应用于快速体外检测、疾病追踪等领域。

参考文献

- [1] Wu D P, Han D, Steckl A J. Immunoassay on free-standing electrospun membranes [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2010, 2(1): 252-258.
- [2] Maurer H H, Fritz C F. Toxicological detection of pholcodine and its metabolites in urine and hair using radio immunoassay, fluorescence polarisation immunoassay, enzyme immunoassay and gas chromatography-mass spectrometry [J]. International Journal of Legal Medicine, 1990, 104(1): 43-46.
- [3] Ma M F, Wen K, Wang Z H, et al. Chemiluminescence reso-

- nance energy transfer competitive immunoassay employing hapten-functionalized quantum dots for the detection of sulfamethazine[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(28): 17745-17750.
- [4] 康娟, 张新祥. 荧光纳米颗粒标记免疫分析[J]. 化学进展, 2006, 18(11): 1523-1529.
- [5] Mythili T, Rajendra L, Srinivasan V A, et al. Development and comparative evaluation of a competitive ELISA with rose bengal test and a commercial indirect ELISA for serological diagnosis of brucellosis[J]. Indian Journal of Microbiology, 2011, 51(4): 528-530.
- [6] Zheng L, Wang J, Meng M, et al. A sensitive chemiluminescent immunoassay for point-of-care testing of repaglinide in natural dietary supplements and serum[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(7): 1973-1980.
- [7] Tu C C, Chen K P, Yang T A, et al. Silicon quantum dot nanoparticles with antifouling coatings for immunostaining on live cancer cells[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(22): 13714-13723.
- [8] Mumin A M, Barrett J W, Dekaban G A, et al. Dendritic cell internalization of foam-structured fluorescent mesoporous silica nanoparticles[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2010, 353(1): 156-162.
- [9] Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy T Y, et al. Covalently dye-linked, surface-controlled, and bioconjugated organically modified silica nanoparticles as targeted probes for optical imaging[J]. ACS Nano, 2008, 2(3): 449-456.
- [10] Chen H, He J, Tang H, et al. Porous silica nanocapsules and nanospheres: dynamic self-assembly synthesis and application in controlled release[J]. Chemistry of Materials, 2008, 20(18): 5894-5900.
- [11] 王骁男, 于培志. 聚丙烯酰胺衍生物凝胶体系的合成与光谱表征[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(3): 730-733.
- [12] 殷福珊. 微乳化技术及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 400-413.
- [13] 赵振国. 胶束催化与微乳催化[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006, 222-231.
- [14] Bourgeat-Lami E, Lang J. Encapsulation of inorganic particles by dispersion polymerization in polar media[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 1998, 197(2): 293-308.
- [15] 李永超, 张毅, 金日光. 分散聚合法制备二氧化硅/聚苯乙烯单分散复合微球[J]. 复合材料学报, 2005, 22(2): 21-26.
- [16] 邱晓清, 钟家桢, 龙震, 等. 聚苯乙烯/纳米 TiO_2 复合粒子的制备[J]. 武汉大学学报(理学版), 2003, 49(06): 675-679.
- [17] Stöber W, Fink A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range[J]. J Colloid Interface Sci, 1968, 26: 62-69.
- [18] Wan T, Xu N, Chen L Y, et al. Synthesis and properties of a dual responsive hydrogel by inverse microemulsion polymerization[J]. Journal of Chemical Sciences, 2014, 126(6): 1623-1627.
- [19] Tang Q Q, Chen M M, Yang C Y, et al. Enhancing the energy density of asymmetric stretchable supercapacitor based on wrinkled $\text{CNT}@\text{MnO}_2$ cathode and $\text{CNT}@\text{polypyrrole}$ anode[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(28): 15303-15313.

收稿日期: 2017-03-06

修稿日期: 2018-03-19

深圳先进院研发出基于 MoS_2/C 纳米复合材料的钠型双离子电池

近日, 中国科学院深圳先进技术研究院集成所功能薄膜材料研究中心研究员唐永炳及其研究团队, 成功研发出一种基于 MoS_2/C 纳米复合负极材料的钠型双离子电池。

锂离子电池已广泛应用于便携式电子设备、电动汽车、储能设备等领域。但由于锂离子电池的大规模应用加之锂资源的匮乏和分布不均, 使锂离子电池成本日益攀升, 难以满足未来能源存储的低成本、长循环寿命、安全可靠等要求。钠与锂有相似的物理化学性质, 且储量丰富、成本较低, 使得基于钠离子的二次电池体系的研究近年来受到广泛关注。然而钠离子半径较大, 导致 Na^+ 在电极材料中扩散缓慢, 从而影响电池的倍率性能和循环性能。

为改善钠离子电池的倍率性能和循环性能, 唐永炳研究团队成员朱海莉、张帆等成功研发出一种基于 MoS_2/C 纳米复合负极材料的钠型双离子电池。该电池采用膨胀石墨作为正极材料, 具有分级结构的 MoS_2/C 纳米复合材料作为负极材料。由于这种具有分级结构的 MoS_2/C 具有更宽的晶体片层间距, 有利于提高 Na^+ 在其中的离子扩散速率, 且碳层的引入提高了材料的电导率, 使基于该 MoS_2/C 纳米复合材料的钠型双离子电池具有良好的倍率性能和循环性能。结果表明, 该电池在 1.0~4.0 V 的电压区间, 2C 的电流密度下循环 200 圈后容量保持率为 85%。这种新型钠离子电池在清洁能源、智能电网等具有潜在的应用前景。

(新型)