

基于金纳米团簇的比率型 pH 荧光探针制备及表征

许朝用 刘琳 傅艺颖 白艳丽 梁建功 陈璐

华中农业大学理学院, 武汉 430070

摘要 在合成牛血清白蛋白(BSA)修饰的金纳米团簇(金簇)的基础上,将荧光素异硫氰酸酯(FITC)与金簇偶联,构建一种新型比率型 pH 荧光探针。当体系 pH 值在 4.0~10.0 之间变化时,FITC 的荧光强度逐渐增加,而金簇的荧光强度基本保持不变。在 pH 为 5.5~8.0 之间,该探针对于 pH 具有良好的线性关系,线性方程为 $Y=1.72X-8.8$,相对标准偏差为 0.994,同时该探针在 pH 为 6.0~9.0 之间还具有良好的可逆性。此外,将此 pH 荧光探针与 PK15 细胞共培养,通过 MTT 实验证明该比率型 pH 荧光探针对于细胞几乎没有毒性。

关键词 金纳米团簇; 荧光素异硫氰酸酯; 比率型 pH 荧光探针; MTT 实验

中图分类号 O 657.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0077-06

金纳米团簇(AuNCs)是一种新型荧光纳米材料,它是由几个到几十个金原子组成,尺寸小于 2 nm 的发光纳米材料^[1]。这种超小尺寸使金簇展现出独特的量子尺寸效应和一些类分子的性能。与传统的有机染料相比,光学稳定性好,斯托克斯位移大,反聚合能力强;与量子点相比,金簇不含镉等有毒的重金属,因此,金簇毒性小,具有很好的生物相容性^[2]。由于这些优异的特性,金簇引起了研究者的广泛关注,有望取代量子点并在金属离子检测^[3-6]、生物传感器^[7]、生物成像^[8-9]、活体成像^[10-11]等领域得到广泛应用。

pH 荧光探针是随 pH 变化而荧光性质随之变化的一类物质。通过 pH 荧光探针在某特定 pH 值范围内荧光强度的增强或者减弱可以实现对 pH 的定性测量,如罗丹明类 pH 荧光探针^[12]、荧光素类 pH 荧光探针^[13]、苯乙烯类 pH 荧光探针^[14]、花菁类 pH 荧光探针^[15]、BODIPY 类 pH 荧光探针^[16]。然而,这种测量可能受到许多因素,包括探针浓度、光学路径长度、温度变化、激发强度的改变以及不同的发射收集效率等的影响。因此,构建了比率型 pH 荧光探针,这类探针要求至少在 2 个激发(或发射)波长对被分析物(如 H^+)有不同的敏感度。例如,对于某一特定的 pH 荧光探针,一个选定的激发

(或发射)波长的荧光强度相对于另一个激发(或发射)波长可增强或降低。这些信号之间的比例通过校准可以指示 pH 值。比率型 pH 荧光探针的优点在于其与光学路径长度、探针浓度、光漂白和探针从细胞内流失等参数无关,因为这 2 个信号数据是从完全相同的环境中得到的,所以能够更好地做到定量检测和识别^[17]。笔者将金簇与 FITC 偶联制备一种比率型 pH 荧光探针,研究不同 pH 条件下该探针的荧光变化及可逆性,并对该探针的细胞毒性进行探究。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

1) 仪器。RF-5301PC 型荧光光谱仪,Shimadzu,日本;Evolution 300 型紫外-可见光谱仪,Thermo Nicole,美国;PHS-3C 型 pH 计,上海仪中科学仪器服务有限公司;Zetasizer Nano ZS90 型动态光散射粒度仪,英国 Malvan 公司;Synergy HT 型酶标仪,美国 Biotek 公司;Milli-Q 型超纯水机,美国 Millipore 公司。

2) 试剂。牛血清白蛋白、生物试剂,如吉生物科技有限公司;四水合氯化金($HAuCl_4 \cdot 4H_2O$),分析纯,国药集团化学试剂有限公司;荧光素异硫氰酸

收稿日期: 2015-12-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(21305049,31372439)

许朝用,硕士研究生,研究方向: 纳米生物分析, E-mail: 1134971791@qq.com

通信作者: 陈璐,博士,研究方向: 分析化学, E-mail: chenlu@mail.hzau.edu.cn

酯(95%),东京化成工业株式会社;醋酸、醋酸钠、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、氯化钠、氢氧化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、氯化锌都是分析纯,国药集团化学试剂有限公司;14 ku 透析袋,武汉申试化工仪器有限公司。

1.2 金簇的合成及表征

1)金簇的合成及纯化。参考文献[18]合成 BSA 修饰的金簇。在 25 mL 的单口瓶中加入 5 mL 质量浓度为 50 mg/mL 的 BSA 溶液,37 °C 水浴锅中剧烈搅拌,边搅拌边向单口瓶中加入 5 mL 浓度为 10 mmol/L 的 HAuCl₄ 溶液。2 min 后,向搅拌体系中加入 0.5 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液,将混合液 37 °C 反应 48 h,当溶液的颜色从浅黄色变为浅棕色最后变为深褐色则合成了 BSA 修饰的金簇。得到的金簇用 14 ku 的透析袋在超纯水中透析 24 h (每 8 h 换 1 次超纯水),除去多余的 BSA 残基,然后将透析袋中的金簇收起,置于 4 °C 的冰箱中保存备用。

2)金簇的表征。金簇的粒径用高分辨透射电子显微镜进行表征,将金簇用 10 mmol/L 的 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 20 倍进行制样后做 TEM 成像。紫外吸收光谱是通过 1.0 cm×1.0 cm 的双面石英比色皿在紫外-可见光谱仪中测得,扫描范围 200~700 nm。荧光发射光谱通过 1.0 cm×1.0 cm 的四面石英比色皿在荧光光谱仪中测得,激发波长 494 nm,采集 500~700 nm 范围的数据。

1.3 不同 pH 缓冲溶液的配制

配制 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、7.4、7.5、8.0、9.2、9.9 的缓冲溶液,再用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 HCl 调节 pH,用 PHS-3C 型 pH 计对各缓冲溶液的 pH 进行校准。其中 pH 4.0~5.0 为醋酸-醋酸钠缓冲液,pH 6.8~8.0 为磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液,pH 9.2 和 9.9 为碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液。

1.4 比率型 pH 荧光探针的制备及表征

1)pH 荧光探针的制备。取已纯化好的金簇原液(3.6×10^{-4} mol/L) 5 mL 于 10 mL 的 EP 管中,然后加入体积为 75 μ L 的 FITC (7.2×10^{-5} mol/L),将 FITC 与金簇混合 30 min,使其通过化学键偶联到一起。然后将混合液用 14 ku 的透析袋在超纯水中透析至有大量絮状沉淀为止,约为 45 h (每 8 h 换 1 次超纯水),然后 3 000 r/min 离心 5 min 使其分层。将沉淀用 5 mL 的 NaOH 溶液 (5 mol/L) 重新溶解,置于 4 °C 冰箱中备用。

2)比率型 pH 荧光探针的表征。取 11 个 EP 管编号 1~11,在每个 EP 管中加入 pH 荧光探针分散液,然后向其中依次加入适当体积的 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.2、9.5、10.0 的缓冲溶液,最后用超纯水稀释到刻度,混合均匀,再用 1 cm×1 cm 的石英比色皿在荧光光谱仪上扫描荧光(激发波长为 494 nm,500~700 nm 范围扫描),测 pH 荧光探针在不同 pH 条件下的荧光光谱。

1.5 比率型 pH 荧光探针干扰条件的试验

1)比率型 pH 荧光探针的可逆性研究。取 3 mL pH 荧光探针分散液用 pH 值分别为 6 和 9 的缓冲溶液稀释至 300 mL,用 PHS-3C 型 pH 计校准 pH 值。取 pH 分别为 6 和 9 的上述稀释液 3 mL,用 1 cm×1 cm 的石英比色皿在荧光光谱仪上测荧光(激发波长为 494 nm,扫描范围为 500~700 nm),观察 pH 在 6 和 9 之间重复变化时 pH 荧光探针的荧光比例值(I_{520}/I_{608})的变化。

2)pH 荧光探针对照内干扰离子的试验。取 8 个 EP 管分别编号 1~8。向每个 EP 管中均加入最优条件的 pH 荧光探针分散液和适当体积的 0.2 mol/L 的缓冲溶液调节 pH 为 7.4,然后分别向 2~8 号管中分别加入 BSA (1 mmol/L)、葡萄糖 (0.1 mol/L)、Na⁺ (10 mmol/L)、K⁺ (30 mmol/L)、Ca²⁺ (2 mmol/L)、Mg²⁺ (2 mmol/L)、Zn²⁺ (2 mmol/L),然后用超纯水稀释至刻度,最终 BSA、葡萄糖、Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 的浓度依次为 0.1、10、1、1、0.1、0.1、0.1 mmol/L,1 号为空白对照。将所有 EP 管中的溶液混合均匀,用 1 cm×1 cm 的石英比色皿在荧光光谱仪上测荧光,取混合液在 520 nm 和 608 nm 处的荧光比例(I_{520}/I_{608})作图。

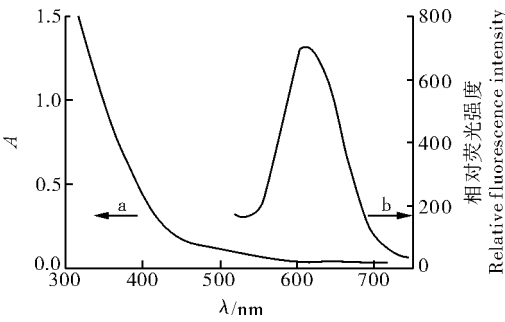
1.6 比率型 pH 荧光探针细胞毒性分析

MTT 法探究探针的细胞毒性,具体方法如下:在长满单层 PK15 细胞的 96 孔板中加入不同浓度的探针,浓度依次为 5、10、20、50、100 μ mol/L,同时设置空白对照试验。将 96 孔板 37 °C 分别培养 12、24 h,然后每孔加入 20 μ L MTT 试剂,继续 37 °C 培养 4 h,4 h 后弃去上清液,每孔均加入 150 μ L DM-SO,置于摇床上摇 10 min,最后在酶标仪上测 490 nm 处的吸光度。细胞的存活率 $V_R = A/A_0 \times 100\%$,其中 A 为实验组在 490 nm 的吸光度,A₀为对照组在 490 nm 的吸光度。

2 结果与分析

2.1 金簇的合成及表征

从图 1 紫外-可见吸收光谱可以看出,金簇的紫外-可见吸收光谱在 520 nm 处没有明显的金纳米颗粒的表面等离子体共振峰,说明合成的金簇中没有大粒径的金纳米颗粒生成。而从图 1 荧光发射光谱可以看出,金簇在 608 nm 处有明显的荧光发射峰,并且发射光谱窄而对称,说明合成的金簇粒径比较均一。通过高分辨透射电子显微镜对合成的金簇的粒径进行表征(图 2),合成金簇的粒径约为 $(8.0 \pm 1.0) \text{ nm}^{[18-19]}$ 。



a: 紫外-可见吸收光谱 UV-vis absorption spectrum; b: 荧光发射光谱 Fluorescence emission spectrum.

图 1 金簇的紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱 (激发波长 494 nm)

Fig.1 UV-vis absorption spectrum and fluorescence emission spectrum ($\lambda=494 \text{ nm}$) of the AuNCs

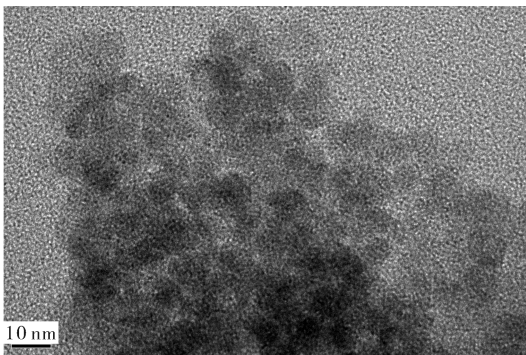


图 2 金簇的高分辨透射电子显微镜成像

Fig.2 HRTEM of AuNCs

2.2 比率型 pH 荧光探针的合成及表征

1) 金簇-FITC 探针和金簇的红外光谱。由图 3 显示,金簇在 3400 cm^{-1} 左右的 $-\text{NH}_2$ 伸缩振动峰在偶联前后急剧减少,在 1710 cm^{-1} 未见 FITC 的异硫氰酸键伸缩振动峰,说明金簇中的氨基和 FITC 中的异硫氰酸键结合形成硫脲键,所以 FITC 能够

很好地偶联到金簇表面,从而制备了一种比率型荧光探针。

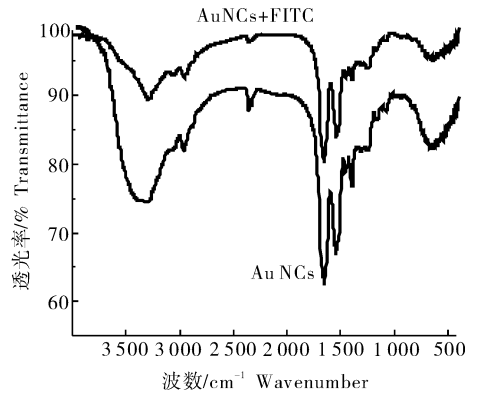


图 3 金簇-FITC 探针和金簇的红外光谱

Fig.3 FT-IR of AuNCs-FITC and AuNCs

2) 比率型 pH 荧光探针的荧光光谱及线性。图 4 为该 pH 荧光探针在不同 pH 值的缓冲溶液中的荧光发射光谱(激发光波长为 494 nm)。其中,金簇在 608 nm 处的荧光随着 pH 改变没有明显的变化,FITC 作为一种常用的 pH 敏感的荧光染料,如图 4 所示,其荧光刚开始随 pH 的增大而增大,当 $\text{pH} > 8.5$ 时不再随 pH 的增大而改变,使得利用金簇和 FITC 偶联构建 pH 荧光探针的可能付诸实现。一般的荧光探针往往会受到光强度和光路的影响,但是这种比率型荧光探针却能够避免这些不足,当适量的 FITC 与金簇偶联以后,当入射光改变时,两者的荧光会同时发生改变,但是其比值不会发生变化,同时这种比率型荧光探针受光路影响也很小,该探针的主要影响因素就是金簇与 FITC 的结合量的比值。因此,这种比率型 pH 荧光探针不仅具有时间和空间上的优越性,同时还能避免光路、浓度等条件的干扰,是一种比较理想的荧光探针。

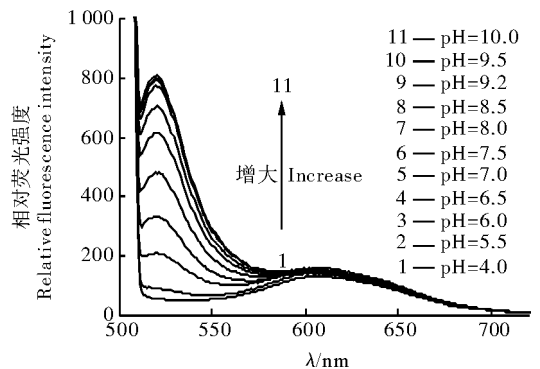


图 4 不同 pH 条件下 pH 荧光探针的荧光光谱

Fig.4 Fluorescence emission spectra of pH probe with increasing pH

图 5A 为 pH 探针在 pH 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.2、9.5、10.0 条件下测其在 520 nm 和 608 nm 处的峰值的比值图谱,其中每组探针均是 3 组平行试验的结果(激发波长为 494 nm,扫描范围为 500~700 nm)。从图 5B 中可以看出,该探针的

敏感范围在 pH 为 5.5~8.5 之间。从 5.5 变到 8.0 时,探针的荧光比值具有良好的线性关系,线性方程为 $Y=1.72X-8.8$,根据荧光比值拟合出来的标准曲线的相对标准偏差为 0.994,这使得该探针的 pH 检测成为可能。

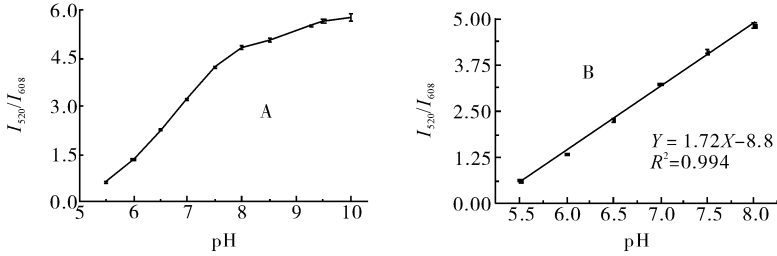


图 5 不同缓冲液中 pH 探针的荧光强度比值(A)及其标准曲线(B),激发波长为 494 nm
Fig.5 The ratio of fluorescence intensity for versus pH values (A) and the pH calibration curve (B) of pH probe, $\lambda=494$ nm

3)比率型 pH 荧光探针可逆性研究。从图 6 可知,当 pH 在 6 和 9 之间来回改变时,探针在 520 nm 和 608 nm 处的荧光比值基本保持不变,说明合成的 pH 荧光探针有良好的可逆性。BSA-AuNCs 在 pH 为 3~12 之间变化时,其荧光没有明显的改变^[18]。FITC 在不同的 pH 条件下有着不同的解离形式,不同的解离形式的荧光强度不一样,因此,不同的 pH 会导致 FITC 荧光强度不一样。结果导致 pH 在 6.0 到 9.0 之间不断变化时,FITC 与 BSA-AuNCs 的比值不一样,并且具有很好的可逆性。

nm 处的荧光比值基本保持不变,这说明这些胞内物质对 pH 荧光探针没有明显的影响。同时还发现,当 Zn^{2+} 浓度高达 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,探针的荧光比例有一定的下降,这说明高浓度的 Zn^{2+} 对探针有一定的影响^[20]。

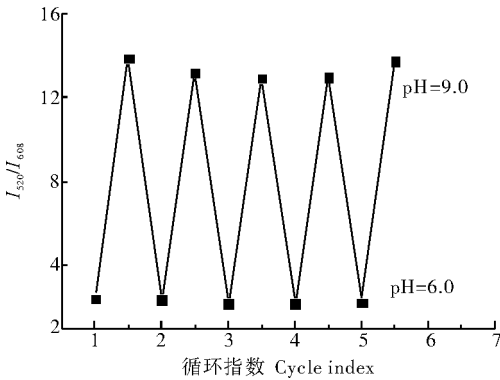


图 6 探针在 pH 为 6.0 和 9.0 之间的可逆性
Fig.6 pH reversibility study of probe between pH 6.0 and 9.0

4)胞内物质对比率型 pH 荧光探针的影响。从图 7 可知,当 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、BSA 浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 、 Na^+ 、 K^+ 浓度为 1 mmol/L 以及葡萄糖的浓度达 10 mmol/L 时,pH 探针在 520 nm 和 608

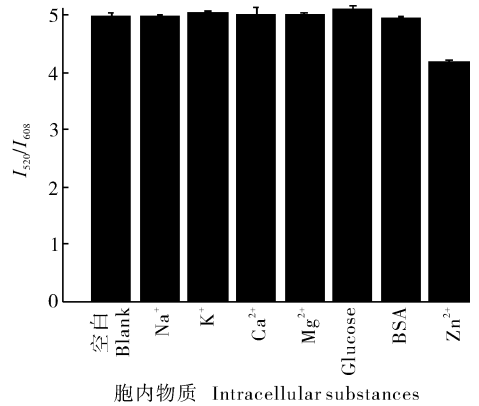
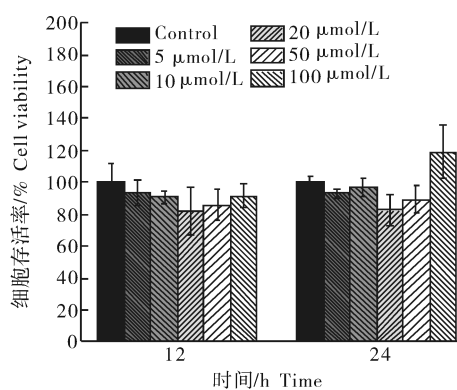


图 7 pH 为 7.4 条件下不同浓度的胞内物质对 pH 探针影响
Fig.7 The impact of pH probe in the absence and presence of different concentrations of intracellular substances at pH 7.4

5)比率型 pH 荧光探针的细胞毒性分析。分别对不同浓度的探针与 PK15 细胞共培养,分别取 12、24 h 2 个时间点进行 MTT 实验(图 8),从图 8 可以看出,探针的浓度增大至 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞的存活率仍然没有明显的改变,说明合成的探针具有极小的细胞毒性和良好的生物相容性。因此,合成的 pH 荧光探针可以用于胞内 pH 的检测。



每组为8次试验的平均值 The results are the mean \pm standard deviation of eight separate measurements.

图8 不同浓度pH荧光探针对PK15细胞存活率的影响

Fig.8 Effects of pH probe at different concentrations on the viability of PK15 cells

3 讨论

以BSA作为保护剂和还原剂合成了一种发射红光的金簇,根据Xie等^[18]报道,TEM表征显示这种BSA-AuNCs的核粒径约为0.8 nm,而Poderys等^[19]的研究表明,BSA的粒径约为8.7 nm。结果显示,本研究合成的金簇粒径为(8.0 \pm 1.0) nm,与文献报道一致。我们将金簇与FITC混合,采用紫外可见光谱、荧光光谱、pH值、红外光谱等检测手段对探针进行表征,对探针的物料比进行了优化,选取最优物料比的探针进行进一步研究。同时进行胞内物质的干扰实验和细胞毒性实验,发现低浓度的胞内物质对比率型探针没有明显的影响,在碱性条件下OH⁻能够稳定地结合到金簇表面的Au⁺上,当有Zn²⁺存在时,金簇表面的OH⁻能够与Zn²⁺形成Zn(OH)₂,Zn(OH)₂的形成能够大大提高金簇的荧光强度,从而使I₅₂₀/I₆₀₈的比值有所减小。并且当探针的浓度增大至100 μmol/L时,细胞的存活率仍没有明显改变,这说明该探针的细胞毒性很小。我们用金簇和荧光素异硫氰酸酯偶联构建了一种比率型pH光探针,较一般的单信号荧光探针来说,比率型pH荧光探针不容易受到环境(如温度、pH值和粘度)、样品本身(如浓度)、设备(如光漂白和背景光)和其他因素的影响,有利于获得准确的结果,而且该探针的细胞毒性很低,为下一步进行细胞内等复杂体系中pH的检测奠定了基础。

参 考 文 献

[1] YU P, WEN X M, TOH Y R, et al. Fluorescent metallic nanoclusters; electron dynamics, structure, and applications[J]. Particle & particle systems characterization, 2015, 32(2): 142-163.

[2] 杨群峰, 刘建云, 陈华萍, 等. 贵金属纳米团簇的制备及在生物检测中的应用[J]. 化学进展, 2011, 23(5): 880-892.

[3] MU X Y, QI L, QIAO J, et al. One-pot synthesis of tyrosine-stabilized fluorescent gold nanoclusters and their application as turn-on sensors for Al³⁺ ions and turn-off sensors for Fe³⁺ ions[J]. Analytical methods, 2014, 6(16): 6445-6451.

[4] WANG Y Q, ZHAO T, HE X W, et al. A novel core-satellite CdTe/Silica/Au NCs hybrid sphere as dual-emission ratiometric fluorescent probe for Cu²⁺[J]. Biosensors and bioelectronics, 2014, 51: 40-46.

[5] ZHANG G M, LI Y H, XU J, et al. Glutathione-protected fluorescent gold nanoclusters for sensitive and selective detection of Cu²⁺[J]. Sensors and actuators b: chemical, 2013, 183: 583-588.

[6] ZHU R, ZHOU Y, WANG X L, et al. Detection of Hg²⁺ based on the selective inhibition of peroxidase mimetic activity of BSA-Au clusters[J]. Talanta, 2013, 117: 127-132.

[7] SELVAPRAKASH K, CHEN Y C. Using protein-encapsulated gold nanoclusters as photoluminescent sensing probes for biomolecules[J]. Biosensors and bioelectronics, 2014, 51: 88-94.

[8] RAUT S L, FUDALA R, RICH R, et al. Long lived BSA Au clusters as a time gated intensity imaging probe[J]. Nanoscale, 2014, 6(5): 2594-2597.

[9] WANG C, XU L, XU X, et al. Near infrared Ag/Au alloy nanoclusters: tunable photoluminescence and cellular imaging[J]. Journal of colloid and interface science, 2014, 416: 274-279.

[10] WANG H H, LIN C A J, LEE C H, et al. Fluorescent gold nanoclusters as a biocompatible marker for *in vitro* and *in vivo* tracking of endothelial cells[J]. Acs Nano, 2011, 5(6): 4337-4344.

[11] WU X T, LI C X, LIAO S C, et al. Silica-encapsulated Gd³⁺-aggregated gold nanoclusters for *in vitro* and *in vivo* multimodal cancer imaging[J]. Chemistry a European journal, 2014, 20(29): 8876-8882.

[12] ZHU H, FAN J, XU Q, et al. Imaging of lysosomal pH changes with a fluorescent sensor containing a novel lysosome-locating group[J]. Chemical communications, 2012, 48: 11766-11768.

[13] BRADLEY M, ALEXANDER L, DUNCAN K, et al. pH sensing in living cells using fluorescent microspheres[J]. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2008, 18: 313-317.

[14] FAN L, XIU Q, LU D, et al. A novel far-visible and near-infrared pH probe for monitoring near-neutral physiological pH changes; iniaging in Eve cells[J]. Journal of materials chemistry b, 2013, 1: 4281-4288.

[15] 向德成, 刘恒, 孟庆华. 一种耐光漂白的碳菁型pH荧光探针的合成与细胞成像[J]. 化学学报, 2013, 71: 1435-1440.

[16] 刘洋. 对pH敏感和对氧化还原敏感的荧光分子探针的设计、合成及在肿瘤细胞成像中的应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.

[17] 孙辉. pH荧光探针的构筑[D]. 南京: 南京大学, 2011.

[18] XIE J, ZHENG Y, YING Y P, et al. Protein directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters[J]. Journal of the ameri-

can chemical society, 2009, 131(3): 888-889.

[19] PODERYS V, MATULIONYTE M, SELSKIS A, et al. Interaction of water-soluble CdTe quantum dots with bovine serum albumin[J]. *Nanoscale research letters*, 2011, 6(1): 1-6.

[20] GUAN G, ZHANG S Y, CAI Y, et al. Convenient purification of gold clusters by coprecipitation for improved sensing of hydrogen peroxide, mercury ions and pesticides[J]. *Chemical communications*, 2014, 50: 5703-5705.

Preparation and characterization of a ratiometric fluorescent pH probe based on gold nanoclusters

XU Chaoyong LIU Lin FU Yiyong BAI Yanli LIANG Jiangong CHEN Lu

College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A red-emitting gold nanoclusters was prepared by using the bovine serum albumin(BSA) and a ratiometric fluorescent pH probe was prepared by using the BSA-capped AuNCs and FITC. Results showed that the fluorescence intensity of FITC was gradually enhanced with pH changing from acid to alkali condition, while the fluorescence intensity of AuNCs was constant. The probe displayed a fine linear relationship towards pH, with the corresponding linear regression equation of $Y = 1.72X - 8.8$ and the relative standard deviation of 0.994 when the pH changed from 5.5 to 8.0. The probe had good reversibility when the pH was between 6.0 and 9.0. In addition, the PK15 cells were cultivated with the pH probe. Result of MTT assay showed that the pH probe was almost no toxicity to cells.

Keywords Au nanoclusters; fluorescein isothiocyanate; ratiometric pH probe; MTT assay

(责任编辑:陆文昌)