

应用指南

表面功能化纳米颗粒的特征光谱分析

Miranda N Hurst, Dr. Robert K DeLong (Nanotechnology Innovation Center of Kansas State (NICKS), Department of Anatomy and Physiology, College of Veterinary Medicine, Kansas State University)

简介

鉴于其在生物医学研究的应用潜力，纳米技术是一个快速发展的领域并受到科学界的持续关注。纳米材料通常直径小于100 nm，足够能穿透哺乳动物细胞。同时，纳米材料合成时不受形状和元素组成限制。形状上纳米材料可以以杆状，筒状或颗粒状呈现。不同的元素，如金属，金属氧化物或者它们的组合都能用于合成纳米材料。纳米材料具有较大的表面积体积比，因此适于通过表面功能化偶联靶向或治疗性分子。在全身给药的情况下，偶联的靶向分子可完成对特定细胞群体如肿瘤细胞的标记，而偶联的治疗性化合物则可以针对标记的细胞群体发挥作用。

纳米粒子的组成材料会有一个特定的带隙，就是其电子基态和激发态之间的间距。一般情况下，电子处于基态，也就是能量最低的状态。在吸收光子或光能量后，电子跃迁至激发态，这两个状态之间的间距被称为带隙。一般单一或多特定波长的光会被纳米颗粒材料选择性吸收，其能量一部分会转换成振动能，剩余的以荧光的形式发射，同时电子返回到基态。因此通过扫描、比较不同激发、发射波长下的荧光强度，我们可以获得测试纳米颗粒的特征光谱。

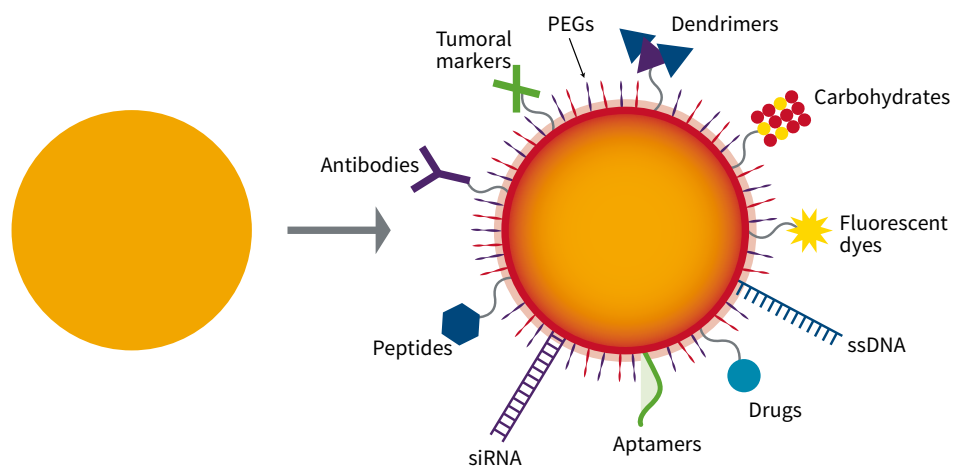
目前对纳米颗粒和其与分子相互作用的相关描述和检测手段还十分有限。在此我们提出特征光谱分析作为一种新方法用于确定纳米颗粒和表面涂层分子之间的相互作用。在表面结合到另外一个分子后，纳米颗粒材料的电子特性会发生变化，引起其激发光和发射光的荧光峰发生迁移，也就是特征光谱的变化。因此，对比有无涂层的纳米颗粒的特征光谱可协助我们确定纳米颗粒和涂层分子之间是否发生了静电相

互作用。通过使用SpectraMax® i3x多功能微孔板读板机并结合SoftMax® Pro自带的光谱优化向导，我们在此展示了如何分析纳米颗粒的特征光谱。

光谱优化向导允许用户自定义的激发和发射波长范围组合的自动扫描。扫描结果以热图的形式展现。热点则代表获得最高信号时对应的激发发射波长对。通过比较热点的位置可以发现不同样本间是否出现光谱特征变化。

优势

- 轻松检测包被过程对纳米颗粒光谱带来的变化
- 检测纳米颗粒的表面功能化进程
- 应用光谱优化向导自动分析光谱变化



图一：纳米颗粒表面功能化图解。左：未功能化的纳米颗粒。右图：通过表面功能化纳米颗粒可以和各种靶向分子如化合物，抗体和核酸的结合。

材料

- 氧化铁纳米颗粒 (PlasmaChem cat. #PL-FeO)
- 氧化锌纳米颗粒, <100 nm size (Sigma Aldrich cat. #544906-10G)
- 聚乙二醇甲醚(mPEG5000, Sigma Aldrich cat. #81323-250G)
- 超纯水
- 96孔黑板(Greiner cat. #655076)
- SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机

方法

纳米颗粒的制备

用分析天平称取氧化铁纳米颗粒(Fe_2O_3 NP) 2 mg于微量离心管中, 以1 mL超纯水重悬制成2 mg/mL储液, 震荡混悬后备用。移出100 μL 储液于新微量离心管中, 加入100 μL 超纯水, 得到1 mg/mL的纳米颗粒对照样品, 震荡混悬后移至96孔板黑板中的选定孔中。

用分析天平称取氧化锌纳米颗粒(ZnO NP) 3.5 mg于微量离心管中, 以1 mL超纯水重悬制成3.7 mg/mL储液, 震荡混悬后备用。移出57 μL 储液于新微量离心管中加入143 μL 超纯水, 得到1 mg/mL的纳米颗粒对照样品, 震荡混悬后移至96孔板黑板中的选定孔中。

纳米颗粒表面功能化

在两个新微量离心管中分别加入100 μL 氧化铁纳米颗粒储液和57 μL 氧化锌储液。用分析天平称取4 mg mPEG溶于1 mL超纯水, 获得终浓度为4 mg/mL的储液, 震荡混悬后向每个溶有纳米颗粒的离心管中加入50 μL mPEG 储液, 然后用超纯水补足至200 μL , 震荡混悬后移至96孔黑板中, 静置30分钟以确保完成包被。

	Fe_2O_3 NP +/- mPEG	ZnO NP +/- mPEG
Optical configuration	Monochromator	Monochromator
Read mode	Fluorescence	Fluorescence
Read type	Spectrum	Spectrum
Wavelengths	Excitation: 260 nm Emission start: 295 nm Emission stop: 750 nm Step: 5 nm	Excitation: 350 nm Emission start: 375 nm Emission stop: 750 nm Step: 5 nm
Read height (mm)	1	1
Flashes/read	6	6
PMT & optics	Auto	Auto
Read area	Top	Top

表一: SoftMax Pro 软件初步光谱扫描参数

Optical configuration	Monochromator
Read mode	Fluorescence
Read type	Endpoint
Wavelengths	Unknown

表二: SoftMax Pro 软件提示光谱扫描初始化参数



图二: 纳米颗粒光谱扫描参数。图中展示了针对氧化铁和氧化锌纳米颗粒(包被样本和对照样本)的光谱扫描参数。对于氧化锌纳米颗粒样本, 波长步进为5 nm。

荧光检测

按照表1的参数用SpectraMax i3x多功能微孔板读板机检测样本的荧光值。在初步扫描中，氧化铁纳米颗粒对照和包被样本以260 nm激发，以5 nm 步进在295nm至750 nm范围扫描发射光谱。氧化锌纳米颗粒样本则以350 nm 激发，5 nm 步进在375 nm至750 nm范围扫描发射光谱(表1)。读板前微孔板以回旋振荡方式高速振荡5秒钟。完成初步验证后，按照用户定义的激发光和发射光范围使用光谱优化向导(Spectral Optimization Wizard, SOW)进行一系列的荧光值读取，并获得每个样本的最佳波长组合。SOW可按照表2的设置进行初始化。点击Read后会弹出一个新的对话框让用户确定激发和发射波长的测试范围。此次实验中激发波长的扫描范围为250到500 nm，发射波长范围为300到700 nm。对于氧化铁纳米颗粒样本，扫描步进为10 nm。对于氧化锌纳米颗粒样本扫描步进则为5 nm。对所有的样本读取高度为默认1 mm。参数对话框参见图2。

数据采集

光谱优化向导旨在识别样本的最佳激发和发射波长组合并以此为基础进行后续的检测。软件本身不会自动保存分析热图和有关荧光值数据。但是，我们可以在热图窗口打开的情况下，右击热图，选择复制原始数据(Copy Raw Data)，并粘贴到合适的软件中，做到原始数据的导出。如果原始数据是导出到电子表格，因为软件没有自动输出原始数据能力，必须手动输入扫描中使用的激发和发射波长参数。扫描中的原始热图可以通过在Softmax Pro软件中右键，选择图片另存为(Save Image As)的方式导出。

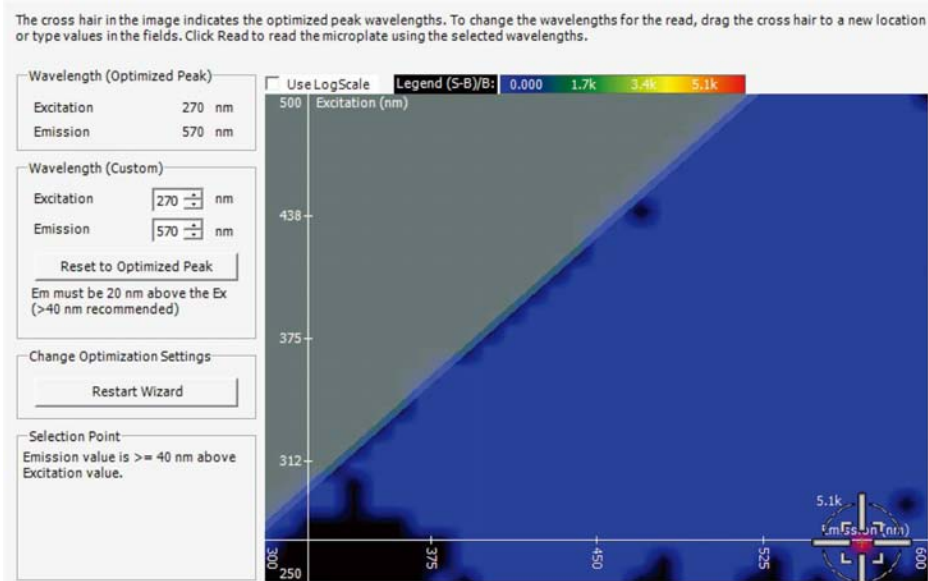
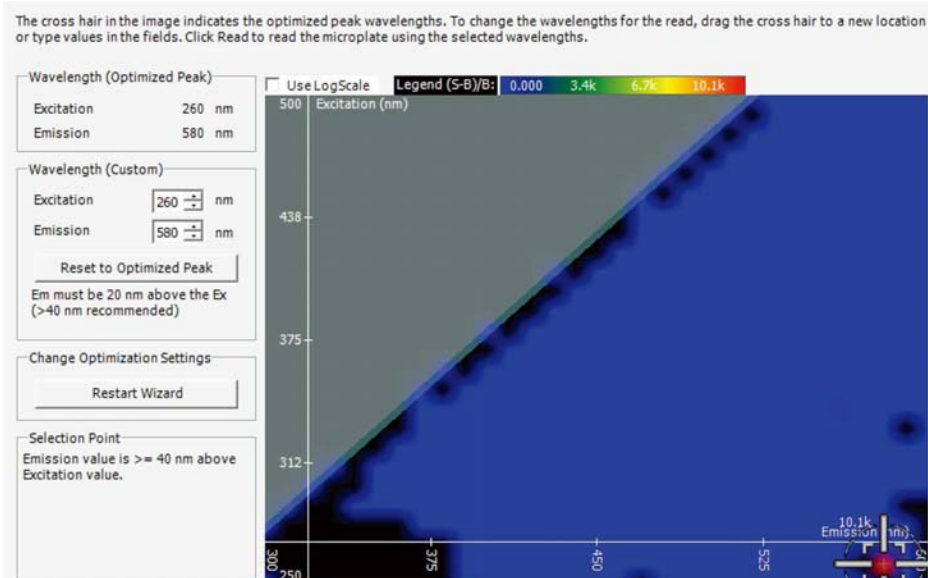


图3：氧化铁纳米颗粒(顶图)和mPEG表面功能化的氧化铁纳米颗粒(底图)的光谱特征图。光谱特征图以热图形式展现，纵坐标为激发波长，横坐标为发射波长。“红点”指示最佳波长组合。灰色区域表明软件定义不可行的波长组合。黑色区域标志荧光信号非常接近背景值。

结果

在260nm波长激发，580nm波长发射组合下，氧化铁纳米颗粒具有最高的荧光值(10.1K相对信号强度，图3，顶图)。在mPEG包被下，氧化铁纳米颗粒的最高荧光值为5.1K，此时激发波长为270 nm，发射波长为570nm(图3，底图)。因此，相较于没有包被的对照样本，mPEG包被引起最佳激发和发射波长10 nm的迁移。由于光谱预扫描中采用的是10 nm步进，因此所观察到的微弱迁移可能是来源于测量变异。但是近乎一半的荧光强度下降表明一些微弱的相互作用，即使到了结合解离平衡阶段，也会引起显著的荧光淬灭。

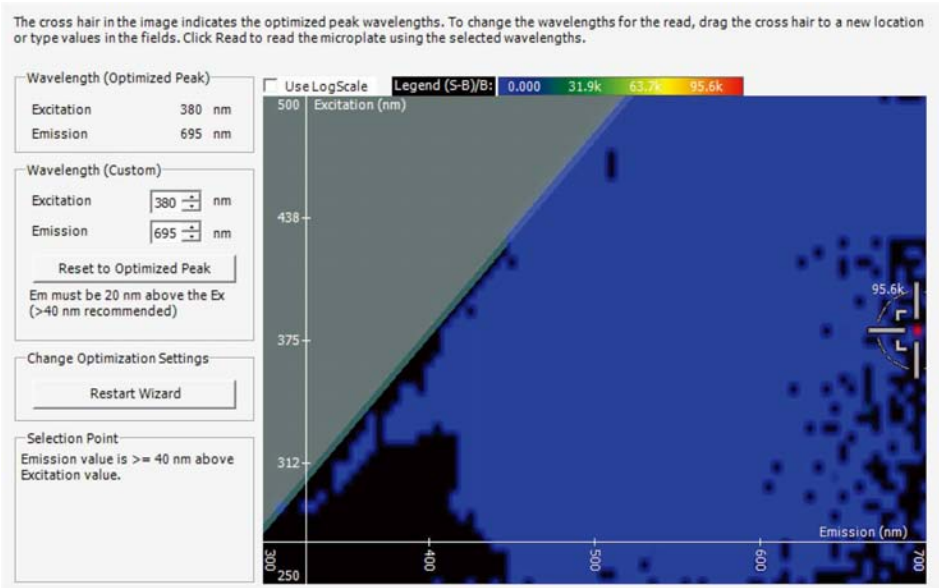
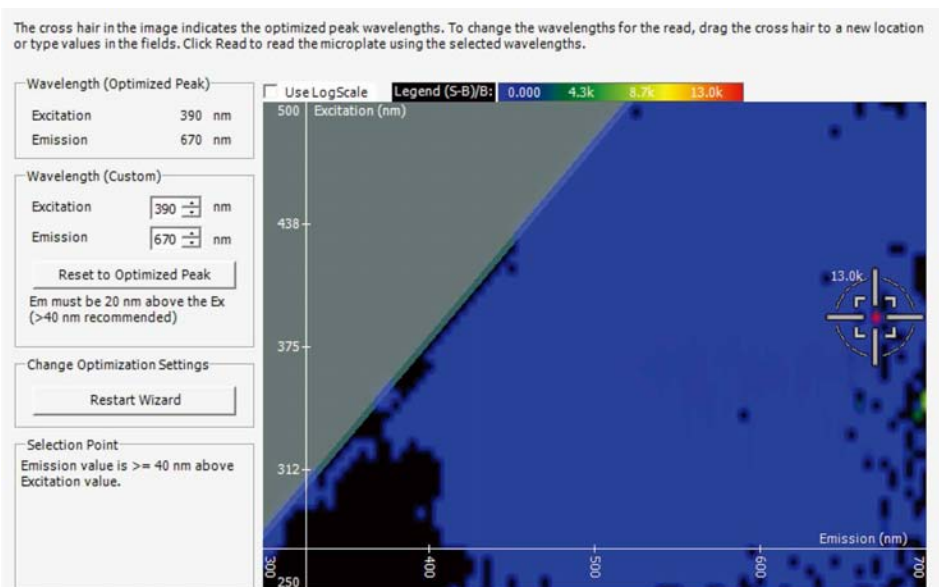
相比之下，氧化锌纳米颗粒在390 nm波长激发，670 nm波长发射下具有最强的荧光值(13K，图4，顶图)。在mPEG包被下，氧化锌纳米颗粒最佳波长组合变为380 nm波长激发，695 nm波长发射，此时荧光值为95.6K(图4，底图)。因此，在5 nm 扫描步进下，mPEG包被能引起25 nm最佳发射波长的迁移，说明mPEG多聚物和氧化锌纳米颗粒表面存在相互作用。因为mPEG的结合会改变表面原子的电子性质。同时荧光信号的增强表明存在多聚物和材料中氧分子的相互作用。表3总结了上述的光谱扫描结果。

总结

测试中观察到的20 nm 激发和发射波长位移表明氧化锌纳米颗粒和mPEG多聚物之间出现了静电相互作用，相比下mPEG处理则不能引起氧化铁纳米颗粒的光谱特征改变。在此，我们展示如何通过结合SoftMax Pro软件的光谱优化向导，用SpectraMax i3x多功能微孔板读板机进行纳米颗粒的表征和其表面相互作用的分析。该方法不仅可以用于质控纳米分析表面功能化过程，还可以进一步在利用纳米颗粒为载体运送靶向治疗化合物的药物开发过程中确保产品的正确包装。



扫一扫关注我们的官方微信



图四：氧化锌纳米颗粒(顶图)和mPEG表面功能化的氧化锌纳米颗粒(底图)的光谱特征图。图上可见包被过程显著改变了最佳波长组合。

Surface coating	Spectral signatures (Ex/Em)	
	FeO	ZnO
none	260 nm/580 nm	390 nm/670 nm
mPEG	270 nm/570 nm	380 nm/695 nm

表三：mPEG包被与否的氧化铁和氧化锌纳米颗粒的光谱特征。表中指出了不同情况下Softmax Pro软件光谱优化向导提供的最佳波长组合。mPEG加入对氧化铁纳米颗粒的光谱迁移影响微弱，然而对氧化锌纳米颗粒能迅速引起25 nm的波长变化。