## 基于近红外上转换荧光共振能量传递体系的均相免疫分析

宋 凯1,2, 冉营营1,2, 孔祥贵1\*

- 1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所激发态重点实验室, 吉林 长春 130033
- 2. 中国科学院研究生院,北京 100049

摘 要 在上转换纳米晶(UCNPs)为供体的荧光共振能量传递(FRET)生物均相检测体系中,弱的供体光强度使 FRET 信号难于检测,同时还有来自生物基质的自发荧光干扰。这使得 UCNPs 不产生背景荧光和散射光的优点不能够充分地体现。针对这个问题,作者利用在 800 nm 处有强近红外光的 NaYF4:Yb³+,Tm³+ UCNPs 作为供体,在 784 nm 处有表面等离子共振吸收带的金纳米粒子(GNPs)作为受体构建了新型的 FRET 体系。UCNPs 偶联抗体(goat antihuman IgG)及 GNPs 偶联抗原(human IgG),在抗原抗体免疫亲和作用下两者距离靠近;UCNPs 荧光光谱和 GNPs 吸收光谱有效交叠,使 FRET 发生。当体系中加入单纯human IgG,竞争性地争夺与 goat antihuman IgG 结合位点,破坏 FRET 构建,供体近红外光增强。根据此对应关系,确定 human IgG 检测限为 5  $\mu$ g·mL $^{-1}$ 。这种方法可适用于更广泛的荧光分析。

关键词 近红外;上转换;荧光共振能量传递

中图分类号: O472. 3 文献标识码: A **DOI**: 10. 3964/i, issn. 1000-0593(2011)01-0086-05

## 引言

稀土离子掺杂的 UCNPs 是一种在红外光激发下能发出 短波长光,即通过多光子机制把长波辐射转换成短波辐射的 发光粒子。相对于传统的下转换材料(如有机染料分子,半 导体量子点等),它显示出了优异的特性: Stokes 位移大的 窄带发射、荧光寿命长、光学性质稳定、低背景荧光和杂散 射光、深的光穿透尺度、可多色标记等[1]。作为新型的荧光 标记材料,它们在生物医学领域中显示出了巨大的应用潜 力[2,3]。其中有代表性的实例是 UCNPs 在 FRET 的体系中 作为供体分子用于生物的均相检测。因为采用近红外光为外 激发光,生物基质不能被激发,提高了检测信号的信噪比。 尽管如此,这种方法也有无法避免的缺点。与以往所采用荧 光染料或量子点相比, UCNPs 的发光微弱, 要想获得同样的 荧光信号强度,需要大的激发光功率或者高灵敏度的检测仪 器。此外,现有报道都是利用 NaYF4: Yb+3, Er+3或 NaYF4 : Yb3+, Tm3+ UCNPs 的绿光或蓝紫光作为供体荧光; 受体 分子也都是那些波长在可见光区的荧光染料分子或胶体金纳 米晶[4-9]。这些波长范围内的光与生物基质自发的荧光相重 叠,这对检测的信号产生干扰,并不能达到绝对的无背景光 影响。针对这个问题,我们利用 Tm³+掺杂的 UCNPs 在 800 nm 处的强近红外荧光为供体光<sup>[10,11]</sup>,解决了以前构建中上转换供体光强度弱的问题。同时这也带来一个额外的优点,800 nm 的荧光恰好在生物穿透光谱窗口范围内,生物基质在这个波长范围内吸收很弱不产生自身荧光<sup>[12]</sup>,更适合于生物检测和标记,彻底地排除了背景光的干扰。在这个FRET 体系中,考虑到传统的近红外吸收的染料化学性质不稳定和光的漂白性,用具有独特的表面等离子体共振性质的GNPs 作为 FRET 的受体。因为共振吸收带可通过改变金纳米粒子长短轴比精确地调控到近红外区域,保证了供体的荧光光谱和受体的吸收光谱有效交叠。此外,GNPs 有较大的消光系数,理论上可以获得高的能量传递效率。这种利用NaYF4:Yb³+,Tm³+ UCNP和 GNPs 之间能量传递的新型构建可以获得强的、无背景干扰的检测信号。

## 1 实验部分

## 1.1 试剂和仪器

高氯酸金(HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O,99.9%),聚苯乙烯磺酸盐(PSS,MW=15 300,95%),Sigma公司;硝酸银(AgNO<sub>3</sub>,99.8%),上海国药集团试剂公司;一缩二乙二醇(DEG,

收稿日期: 2010-05-10, 修订日期: 2010-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(60771051, 10674132, 20603035, 10904142)资助

作者简介: 宋 凯,1979 年生,中国科学院长春光学精密机械与物理研究所博士研究生 e-mail;22533734@163.com

\*通讯联系人 e-mail: xgkong14@ciomp. ac. cn

98%),己二酸(HAD, 99%),硼氢化钠(NaBH<sub>4</sub>, 98%),天津化学试剂公司;氯仿(分析纯)、乙醇(分析纯)、十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)、抗坏血酸(99.7%)等均购于北京化工厂;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDAC, 99%)和 N-羟基硫代琥珀酰亚胺(sulfo-NHS, 99%),Aldrich公司。2-(N-吗啉) 乙磺酸(MES),羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES),Genview公司。小牛血清蛋白(BSA)、人免疫球蛋白抗体(human IgG)、羊抗人抗体(goat antihuman IgG)、吐温 20(Tween-20, 99%),北京鼎国生物技术公司。实验用去离子水,来自 Milli-Q 水处理系统,电阻率大于 18.2 M $\Omega$ ·cm。

上转换光谱采集:使用 Jobin-Yvon LabRam Raman 共聚焦光谱仪,光栅 1 800 和 600 grooves·mm<sup>-1</sup>,空气冷却的CCD,激发光源采用 980 nm 波长的半导体激光器。吸收光谱:采用 UV-3101PC 型 UV-Vis-NIR 光谱仪(Shimadzu 公司),1 cm 厚石英比色皿,双光路平行测试。用 Hitachi S-4800型(日立公司)场发射扫描电镜(SEM),进行 FESEM 测量。

#### 1. 2 UCNPs-goat antihuman IgG 的制备

表面配体为己二酸的水溶性 NaYF4:Yb³+, Tm³+ UC-NPs 合成,参见本课题组以前的制备方法[¹³]。取约 2 mg 的 NaYF4:Yb³+, Tm³+ UCNPs 分散于 1 mL 的 MES(0.02 mol·L⁻¹, pH 6.0)缓冲溶液中,加入 5 mg 的 EDAC 和 15 mg 的 sulfo-NHS 活化其表面羧基,在室温下搅拌反应 12 h, UCNPs 离心纯化处理之后重新分散于 MES 缓冲液中,并加入 1 mg 的 goat antihuman IgG,在 4 ℃下搅拌反应 48 h。离心纯化后。最后产物溶于 5 mmol·L⁻¹硼酸盐缓冲液中(1% BSA, 0.05 % Tween-20, pH 8.5)。

## 1.3 Human IgG-GNPs 的制备

GNPs 参考 El-Sayed 等改进的方法制备[14]。金纳米晶种 的合成: 室温下, 0.6mL 的 HAuCl<sub>4</sub> (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)与 5 mL 的  $CTAB(0.1 mol \cdot L^{-1})$ 混合均匀,溶液变为黄色乳浊 液。取水浴环境下的 0.3 mL NaBH<sub>4</sub> (0.1 mol·L<sup>-1</sup>)快速注 人至上述溶液中, 搅拌反应 2 min 后静置, 溶液变为黄褐色, 表明晶种溶液的生成。晶种诱导生成 GNPs: 1.5 mL  $HAuCl_4$  (50 mmol •  $L^{-1}$ ), 0. 224 mL  $AgNO_3$  (50 mmol • L<sup>-1</sup>)和 100 mL 的 CTAB(0. 1 mol·L<sup>-1</sup>)三种溶液充分混合 后缓慢加入 1,25 mL 的抗坏血酸,这时可观察到溶液由黄色 变为无色。保持反应温度在 27~30 ℃之间,加入 0.2 mL上 述金纳米晶种储备液。10 min 后,溶液由无色渐变为粉红 色,随着反应时间的延长,溶液颜色最后变为深红色,继续 搅拌 10 h, 10 000 r · min-1 离心 15 min 沉淀样品后溶于去离 子水中。GNPs 的表面修饰: 75 mL PSS(2 mg·mL<sup>-1</sup>, 6 mmol • L<sup>-1</sup> NaCl) 溶液超声 10 min 后加入新鲜制备的 GNPs 溶液中。剧烈搅拌反应 3 h, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心两次除去 多余的 PSS。 沉淀重新溶解在 human IgG(50 μg·mL<sup>-1</sup>)的 HEPES(0, 01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7, 4)的缓冲液中, 低温搅拌反 应 30 min。最后将产物 human IgG-GNPs 离心纯化,溶于硼 酸盐缓冲液中。

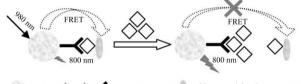
## 1.4 基于能量传递原理的 human IgG 免疫检测

约 1 mg・mL<sup>-1</sup>的 UCNPs-goat antihuman IgG 与浓度为 5 mg・mL<sup>-1</sup>的 human IgG-GNPs 溶液等体积混合,37 ℃下 缓慢摇晃孵育 1 h。分别取 50  $\mu$ L 等份溶液加入不同量的 human IgG(其终浓度分别为: 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 120, 150  $\mu$ g・mL<sup>-1</sup>),继续反应 1 h。反应液虹吸至毛细管,置于光谱仪下采集上转换光谱。

## 2 分析与讨论

#### 2.1 基于近红外上转换 FRET 设计的检测原理

如图 1 所示,在 UCNPs-goat antihuman IgG/human IgG-GNPs 的混合体系中,借助 goat antihuman IgG 和 human IgG 之间特异的识别作用,UCNPs 被连接到 GNPs 的表面,这时,荧光供体和受体之间的距离足够近,能量传递发生,UCNPs 的近红外上转换荧光被 GNPs 所猝灭,荧光强度降低。向体系中加入单纯的 human IgG 后,它们竞争性地争夺与 UCNPs-goat antihuman IgG 结合位点。human IgG-GNPs 被替换下来,UCNPs 与 GNPs 之间距离被拉远。能量传递效率降低。近红外处的供体荧光强度增加。这样的荧光信号变化能指示加入 human IgG 的多少,用于定量的分析。



NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Tm<sup>3+</sup>  $\longrightarrow$  goat antihuman lgG gold nanoparticles  $\diamondsuit$  human lgG

Fig 1 Principle of the competitive homogeneous upconversion  $FRET\ between\ NaYF_4:\ Yb^{3+}\ ,\ Tm^{3+}\ UCNPs\ (Donor)$  and GNPs (Acceptor) assay

## 2.2 具有与生物偶联功能的纳米粒子的制备

可用于生物标记的发光 UCNPs 必须满足以下几点要求: 小尺寸 (<20 nm)、单分散性、水溶性和表面具有可与生物分子相偶联的活泼基团。这里我们采用配体交换的办法,制备了满足进一步生物标记需求的水溶性粒子。从图 2 (a)的电镜可以看出,制备的 UCNPs 具有良好的分散性,其平均尺寸大约为 12 nm 左右,这个大小可与已有报道最小粒径的 UCNPs 相比[<sup>7]</sup>。本实验的设计是基于 UCNPs 到 GNPs 的能量传递。根据 Førster 理论,供体分子粒径越小,能量传递的效率越高[<sup>15]</sup>。图 2(b)为实验中制备的 GNPs,可以看出样品形貌不规则,有棒状、椭球型和立方体,且都有长成棒状的趋势。根据银离子介导 GNPs 生成的机理,推测可能是作为导向剂的 AgNO<sub>3</sub> 加入不是很均匀,导向作用不明显。因为本实验主要利用金在近红外 800 nm 处的吸收,所以对GNPs 形貌要求并不严格,不作为重点研究。

在合成 GNPs 的过程中,加入了大量带有正电荷的 CTAB 分子作为模板剂和表面活性剂,它们吸附在 GNPs 的表面,维持其在溶液中的稳定性。但这也同时使生物分子不易于 GNPs 偶联,限制了进一步的生物应用<sup>[16]</sup>,而且有研究表明 CTAB 分子对细胞、蛋白质等生物分子具有生物毒

性<sup>[17]</sup>。为了消除这种影响,我们选用 PSS 对 GNPs 进行修饰。这种方法是基于以下两点考虑:第一,电负性的聚合物 PSS 分子缠绕到正电 CTAB 分子上减少了难以避免的生物毒性;第二,生物分子可以静电物理吸附等作用通过 PSS 与 GNPs 结合在一起,实现其生物标记<sup>[18]</sup>。

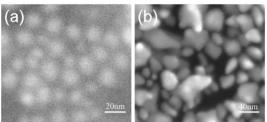


Fig 2 SEM images of (a) NaYF<sub>4</sub>: Yb<sup>3+</sup>,
Tm<sup>3+</sup> UCNPs and (b) GNPs

#### 2.3 光谱性质

UCNPs 和 GNPs 通过抗原抗体的免疫识别反应,间接 地连接在一起。这样就满足了 FRET 发生的两个必备条件之 一,即供体分子和受体分子距离足够靠近。另一个是要求供 体分子的荧光光谱和受体分子的吸收光谱能够有效的重叠。 图 3(1)给出了在 980 nm 光激发下, NaYF<sub>4</sub>: Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> UCNPs 的上转换荧光光谱。可以看见 Tm3+ 在紫外区以及可 见光区的蓝紫光、红光发射和较强的近红外发射,其中800 nm 处的强近红外光发射为 $^{3}H_{4} \rightarrow ^{3}H_{6}$  跃迁。图 3(2)显示 GNPs 在 509 nm 和近红外 784 nm 处有两个吸收峰, 类似于 金纳米棒沿棒的短轴和长轴方向光的吸收和散射产生的横向 和纵向等离子体吸收带[19]。其中, GNPs 在近红外区的宽吸 收带恰好完全覆盖了 Tm3+ 800 nm 处的上转换发射带。因 此,从光谱性质上看,NaYF4:Yb3+,Tm3+ UCNPs和 GNPs 是匹配很好的一对供体和受体分子,满足荧光能量共 振传递的需求。至于 509 nm 处的吸收带, 仅与 Tm3+ 蓝光部 分有较小重叠,且上转换蓝光光强较弱,能量传递效率会很 低,本实验近似的忽略对它对近红外部分能量传递的影响。

#### 2.4 human IgG 的均相免疫检测

在 UCNPs-goat antihuman IgG/human IgG-GNPs 所组

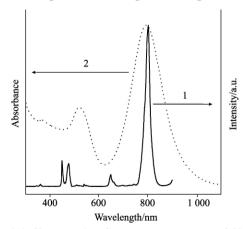
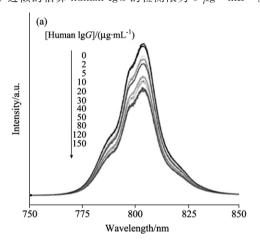


Fig. 3 (1) Upconversion fluorescence spectrum of NaYF $_4$ : Yb $^{+3}$ , Tm $^{+3}$  UCNPs and (2) absorption spectrum of GNPs

成的 FRET 体系中,随着加入 human IgG 量的增加, human IgG-GNPs 不断地被从免疫复合体上替换下来,导致能量传 递效率降低,相应的 Tm3+近红外 800 nm 处的上转换荧光强 度逐渐增强。荧光强度差值  $\Delta I(\Delta I = I - I_0, I)$  为加入 human IgG 后体系的荧光强度, I<sub>0</sub> 为加入 human IgG 前体系的荧光 强度)与 human IgG 浓度间呈良好的线性关系。图 4 给出了 相关检测结果,因为监测的光谱范围窗口不同,Tm3+800 nm 处的发光峰形与前面图 3(1)略有不同。从图 4(a)中可以 明显地看出,在 human IgG 浓度  $0 \sim 150 \, \mu g \cdot mL^{-1}$ 范围内, Tm3+的荧光强度总的趋势是增加,低浓度时增加明显,到 高浓度的时候趋于平稳。这是因为开始的时候结合在 UC-NPs-goat antihuman IgG上的 human IgG-GNPs 相对加入的 human IgG 数量相当,大多数被替换下来。随着 human IgG 量的增加,免疫复合体上可以被替换 human IgG-GNPs 越来 越少。因此对 FRET 的影响也越来越小,导致 Tm3+发光变 化趋于平缓。图 4(b)给出  $\Delta I$ 与 human IgG 浓度之间的关系 曲线。当 human IgG 浓度在 10~50 μg·mL<sup>-1</sup>之间变化时, 两者呈良好的线性关系。其相关系数为 0.9945, 基于这样的 模型,近似的估算 human IgG 的检测限为 5 μg·mL<sup>-1</sup>。尽



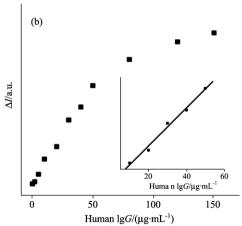


Fig. 4 (a) PL spectra of the FRET system at different concentrations of human IgG as indicated (mg  $\cdot$  mL $^{-1}$ ); (b) Plot of  $\Delta I$  value versus human IgG concentration, Inset: the linear relationship of the  $\Delta I$  value and human IgG concentration ranging from 10 to 50  $\mu$ g  $\cdot$  mL $^{-1}$ 

管我们在制备纳米粒子生物偶联物时,加入小分子 BSA 以减少非特异性吸附的影响。但抗原抗体、纳米粒子以及 PSS 聚合物之间非特异性作用的对实验准确性的影响还应进一步排除,本文仅是实验原理性验证的结果。

## 3 结 论

本文采用 NaYF<sub>4</sub>: Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> UCNPs 为供体分子,

具有近红外等离子共振吸收的 GNPs 为受体分子组成 FRET模型,构建了一个具有高的供体光强度且无背景干扰荧光的生物检测系统。human IgG 竞争性的取代 UCNPs-goat anti-human IgG/human IgG-GNPs 免疫复合体上的 human IgG-GNPs,引起 FRET 荧光信号变化,最终确定了这个原理性实验 human IgG 微克量级的检测限。

#### References

- [1] WANG Meng, MI Cong-cong, WANG Shan, et al(王 猛,密丛丛,王 单,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(12); 3327.
- [2] Lim S F, Riehn R, Ryu W S, et al. Nano Lett., 2006, 6(2): 169.
- [3] Zhang P, Steelant W, Kumar M, et al. J. Am. Chem. Soc, 2007, 129(15): 4526.
- [4] Kuningas K, Ukonaho T, Päkkilä H, et al. Anal. Chem., 2006, 78(13): 4690.
- [5] Zhang P, Rogelj S, Nguyen K, et al. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(38): 12410.
- [6] Wang L, Yan R, Huo Z, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 44: 6054.
- [7] Chen Z, Chen H, Hu H, et al. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(10); 3023.
- [8] Kumar M, Zhang P. Langmuir, 2009, 25(11): 6024.
- [9] Wang M, Hou W, Mi C C, et al. Anal. Chem., 2009, 81 (21); 8783.
- [10] Yang W, Lu F, Zhang X R, et al. J. Alloys Compounds, 2008, 455(1-2): 376.
- [11] Nyk M, Kumar R, Ohulchanskyy TY, et al. Nano Lett., 2008, 8(11): 3834.
- [12] Greer L F, Szalay A A. Luminescence, 2002, 17(1): 43.
- [13] Zhang Q B, Song K, Zhao J W, et al. J. Colloid. Interface. Sci., 2009, 336: 171.
- [14] Nikoobakht B, El-Sayed M A. Chem. Mater., 2003, 15(10): 1957.
- [15] Algar W R, Krull U J. Anal. Bioanal. Chem., 2008, 391: 1609.
- [16] Nikoobakht B, El-Sayed M A. Langmuir, 2001, 17(20): 6368.
- [17] Mirska D, Schirmer K, Funari S S. Colloids Surf. B., 2005, 40(1): 51.
- [18] Sokolov K, Follen M, Aaron J. Cancer Res., 2003, 639(9): 1999.
- [19] Huang X, El-Sayed I H, Qian W, et al. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(6): 2115.

# Homogeneous Immunoassay Technology Based on Near Infrared Upconversion Fluorescence Resonance Energy Transfer

SONG Kai<sup>1, 2</sup>, RAN Ying-ying<sup>1, 2</sup>, KONG Xiang-gui<sup>1\*</sup>

- 1. Key Laboratory of Excited State Process, Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China
- 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract A FRET based assay utilizing NaYF<sub>4</sub>: Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> UCNPs as an energy donor, which can emit intense near infrared (NIR) upconversion emission around 800 nm ranges under illumination with a 980 nm laser, and GNPs as an energy acceptor, which has an surface plasmon absorption maximum at 784 nm, was demonstrated. Their optical properties satisfy the requirement of spectral overlap between donors and acceptors for FRET. A model assay for human IgG was then constructed, in which amino-functionalized NaYF<sub>4</sub>: Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> UCNPs and GNPs were first prepared and then conjugated with the antibody (goat antihuman IgG) and antigen (human IgG), respectively. The mutual affinity of the antigen and antibody brought the nanocrystals close enough together to allow the FRET to occur, resulting in a significant quenching of UCNPs upconversion emission at 800 nm. When free human IgG was added to the immunocomplex, it competitively binds to UCNPs-goat antihuman IgG, thereby replacing human IgG-GNPs from the immunocomplex and inhibits the FRET process. As a result, the gradually increasing the NIR emission was observed. The authors associate the fluorescence enhancement effect with the concentration of human IgG.

Under our experimental conditions, the detection limit is  $5 \mu g \cdot mL^{-1}$ . This approach is expected to be extended to the detection of other biological fields, enabling measurements without background fluorescence interference.

Keywords Near infrared; Upconversion; Fluorescence resonance energy transfer

(Received May 10, 2010; accepted Aug. 20, 2010)

\* Corresponding author

## 欢迎订阅 欢迎投稿 承接广告

中国科技核心期刊 CODEN: YACEEK

《岩矿测试》

ISSN 0254-5357 CN 11-2131/TD

《岩矿测试》1982年创刊,由中国地质学会岩矿测试专业委员会和国家地质实验测试中心共同主办,宗旨是根据国家地质工作的重点由单一资源向资源环境并重的转变,突出服务于地球科学、矿产资源、生态环境地球化学研究和地质找矿事业,促进岩矿测试技术的发展,是目前国内唯一的地质分析专业期刊。主要报道国内外与分析科学、资源环境、地球科学相关领域的地质矿产、环境保护、石油化工、冶金工业、矿产品检验、煤炭等行业的新理论、新方法、新技术的研究成果、评述及实践经验。适合于地质、冶金、环保、石油、化工、煤炭等部门从事分析测试的科技工作者及大专院校师生阅读。

《岩矿测试》近年来刊物地位不断提高,是中文核心期刊,中国科技核心期刊,中国期刊方阵双效期刊,中国科技论文统计源期刊,美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、英国《分析文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等数据库收录期刊。

《岩矿测试》在《中文核心期刊要目总览》2008 年版的 88 种矿业工程类期刊中排名第一,在我国地质分析测试领域有较高的知名度。近年来本刊的投稿数量、论文质量、审稿周期、学术影响力明显提升。《岩矿测试》远程稿件采编系统(http://www.ykcs.ac.cn),率先实施了作者网上投稿/查稿、专家网上审稿的办刊模式,具备读者和审稿专家信息检索、查询等众多功能,有助于提高论文引用率和显示度。采编系统的月平均访问量约 3 万次。

《岩矿测试》为双月刊,大 16 开版本,逢双月出版;国内外公开发行,国内邮发代号 2-313;国际书店发行代号 BM4089; 广告经营许可证:京西工商广字第 0227 号;定价 10.00 元/本,全年 60.00 元。漏订的读者可直接与编辑部联系。

《岩矿测试》编辑部地址:北京西城区百万庄大街 26 号

国家地质实验测试中心(邮政编码 100037)

电话: 010-68999562; 68999563 传真: 010-68999563

e-mail: ykcs\_zazhi@163.com; ykcs\_zazhi@sina.com 《岩矿测试》网站(在线投稿): http//www.ykcs.ac.cn