

文章编号: 1673-1689(2011)04-0506-05

上转换 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ 发光纳米粒子 制备及其生物功能化

李 双^{1,2}, 王周平^{* 1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 采用水热法制备了上转换发光纳米材料, 并对其表面采用改良的 Stöber 法包覆二氧化硅, 进一步采用硅烷化试剂进行氨基化修饰, 最后通过戊二醛交联将亲和素成功偶联到纳米粒子表面, 制备了亲和素生物功能化上转化发光纳米粒子。对制备的纳米粒子及其表面功能化处理过程进行了荧光光谱、TEM、XRD、FT-IR 表征。结果表明, 功能化后的上转换发光纳米粒子与亲和素成功结合, 并保持了良好的上转换发光特性, 可应用于生物标记。

关键词: 上转换发光; 纳米粒子; 生物功能化

中图分类号: TL 271. 5

文献标识码: A

Preparation and Biofunctionalization of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ Upconversion Luminescent Nanoparticles

LI Shuang^{1,2}, WANG Zhou-ping^{* 1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Upconversion nanophosphors were prepared by a solvothermal method. Then the surface of the upconversion nanophosphors was capped with silica by a modified Stöber method. It was further treated with silane coupling agent to modify amino groups onto the surface of the nanophosphors. Finally, avidin was coupled onto the surface of the nanophosphors using glutaraldehyde as cross-linker. So, a avidin-functionalized upconversion nanophosphors was successfully prepared. The nanophosphors together with its functionalized process were characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, respectively. The results suggested that the functionalized nanophosphors have successfully conjugated with avidin and still keep its upconversion luminescence property.

Key words: upconversion luminescence, nanoparticles, biofunctionalization

收稿日期: 2010-06-28

基金项目: 国家 863 计划项目(2008AA10Z419), 教育部博士点基金新教师项目(20070295014), 江苏省自然科学基金项目(BK20081603)。

* 通信作者: 王周平(1974-), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品营养与安全研究。Email: wangzp@jiangnan.edu.cn

生物分子中某些成分核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、氨基酸、蛋白质等含量的测定在科学研究中尤其重要,但其可供分析的信号较弱,要获得高灵敏度的检测,常常需借助外来的标记物获得可测量的信号分析,这样使生物标记已成为现代化学和生命科学的研究热点之一。其中荧光分析方法由于灵敏度高,选择性好,受外界因素影响较小,因此近年来从事荧光分析方法的研究较为深入。荧光分析法利用各种荧光探针与待测组分相连,以增大荧光量子产率,提高检测的灵敏度。由于生物体系的特殊性和复杂性,为了能测定更多的生物活性物质,对选择生物荧光探针上有较高的要求^[1-2]。首先,荧光探针应当具有较好的光稳定性,不易被光解或漂白,光谱特征突出,有良好的激发和荧光效率。其次,对待测生物体本身功能的影响要小,对所测量的生物活性反应敏感且无毒副作用。常用的荧光探针有荧光染料,量子点,稀土掺杂纳米晶等等。

稀土掺杂的无机纳米材料能够通过多光子机制把长波辐射(近红外光)转换成短波辐射,发射出比激发光波长短的上转换荧光。上转换荧光材料具有高稳定性,高灵敏性,无自身荧光,弱的激发散射光和等优点,应用生物标记中,可以大大提高检测灵敏度和线性范围^[3-5]。

作者以简单的化学试剂通过水热法在 195 °C 的反应条件下制备 45~55 nm 粒径的 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶,然后采用 Stöber 法修饰纳米晶表面,使其包覆硅和氨基,并进一步通过戊二醛法与亲和素交联,实现所制备上转化发光纳米粒子的表面生物功能化,更利于其在生物标记及分析检测中的应用。

1 材料与方法

1.1 仪器

DF-101S 型集热式磁力加热搅拌器:河南巩义市予华仪器厂产品,用于纳米粒子合成;KJ-300 超声波发生器:无锡市科洁电子有限公司产品,用于纳米材料的制备和分散处理;5804R 高速离心机:上海安亭科学仪器厂产品,用于纳米粒子及生物功能化纳米粒子离心分离;JEM 2100 透射电镜(TEM):日本 JEOL 公司产品,用于合成的纳米粒子的形貌表征;D8 Advance 型 X-射线衍射仪:德国 Bruker 公司产品,用于荧光纳米粒子的形貌表征;UV-2012 PCS 型紫外可见分光光度计:尤尼科(上海)有限公司产品,用于测定纳米粒子吸收光谱;F-

7000 荧光分光光度计(关闭内置光源,通过光纤外接一 980 nm 激光光源),日本 Hitachi 公司产品,用于发光纳米粒子的荧光光谱测定;Nicolet Nexus 470 傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo Electron Co. 产品,用于纳米材料表面功能化基团的表征。

1.2 试剂

氧化钇,氧化镱,氧化铒(99.99%):均购自国药集团化学试剂有限公司;硝酸,乙二胺四乙酸(EDTA),氢氧化钠,氢氟酸,乙二醇,十六烷基三甲基溴化胺(CTAB),磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,异丙醇,氨水,正硅酸四乙酯(TEOS),无水乙醇,戊二醛,己二胺,无水醋酸钠,氯化高铁:分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),亲和素:购自 sigma 公司;双蒸水为实验室自制。

1.3 实验方法

1.3.1 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶的制备 参照文献^[7]并稍作修改。

1) 取 0.5 g Y₂O₃, 0.035 g Yb₂O₃, 0.085 g Er₂O₃ 置于烧杯中,加入 5~7 mL 浓硝酸加热蒸干多余水份,加入 1.36 g EDTA, 5 mL 超纯水搅拌溶解,然后加入约 0.5 g NaOH 至溶液澄清,调节 pH 值至 8.5,加水定容至 8 mL 备用。

2) 上述储备液在搅拌条件下加入 0.4 g CTAB, 25 mL 乙二醇,再逐滴加入 3.0 mL HF,得到白色乳状胶体。最后再加入 5.5 mL 浓硝酸,搅拌均匀后,转移到 50 mL 带聚四氟乙烯内衬的反应釜中,195 °C 反应 24 h。

3) 反应结束后,让其在空气中自然冷却至室温,弃上层液体,釜底的固体用热水冲洗到烧杯中,超声 5 min,然后静置数分钟,待固体沉淀至底部后,将上层液体倒掉,再加热水超声,重复 3 次。然后加乙醇超声分散,并以 4800 r/min 的转速离心 2 min,所得固体置于 70 °C 烘箱干燥 10 h,固体粉末即为 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶。

1.3.2 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 表面功能化 采用改良的 Stöber 法^[8,9]: 20 mg NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶在 60 mL 的异丙醇中超声 30 min,完全分散后在 35 °C 搅拌条件下加入 2.5 mL 氨水和 20 mL 水。将 25 μL TEOS 溶于 20 mL 异丙醇中,逐滴加入上述溶液,搅拌 4 h。再将 200 μL APTES 溶于 30 mL 异丙醇中,逐滴加入,搅拌 1 h。离心分离沉淀,用无水乙醇清洗 3 次,在 50 °C 烘箱内干燥 12 h。

1.3.3 纳米粒子和亲和素的结合 利用戊二醛做为交联剂将氨基化的纳米粒子与亲和素进行结合,

制备了亲和素修饰的上转换发光纳米粒子^[10, 11]。具体方法如下:

- 1) 2 mg NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶超声分散在体积分数 5% 戊二醛的 PBS 溶液中, 至于摇床上室温反应 4 h;
- 2) 用 PBS(10 mmol/L, PH 7. 4) 离心分离清洗 3 次, 洗去多余戊二醛;
- 3) 再将纳米晶分散在 PBS 中, 加入亲和素(亲和素与原纳米晶之比为 0.15 mg/ mg), 反应 12 h;
- 4) 用 PBS 清洗 3 次洗去未反应的亲和素, 沉淀的纳米晶分散在 1 mL PBS 中。

1.3.4 纳米粒子的表征 采用透射电镜(TEM)对合成的 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶及二氧化硅包覆的 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶的形貌和大小进行表征; 采用 D8 Advance 型 X-射线衍射仪对所制备上转换发光纳米晶的组成及晶相进行表征; 采用 F-7000 荧光分光光度计对所制备上转换发光纳米晶的荧光光谱进行测定; 采用 UV-2012 PCS 型紫外可见分光光度计测定所制备纳米粒子吸收光谱; 采用红外光谱对所制备氨基化的二氧化硅包覆上转换发光纳米晶构成进行表征; 采用 Nicolet Nexus 470 傅里叶变换红外光谱仪对所制备纳米材料表面功能化基团进行表征。

2 结果与讨论

2.1 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶的表征

图 1 为所制备 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶的 TEM 图, 显示利用水热法制备的 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶呈球形, 粒径约为(40±5) nm。水热法制备的纳米晶形态一致, 大小较为均匀, 具有良好的分散性。

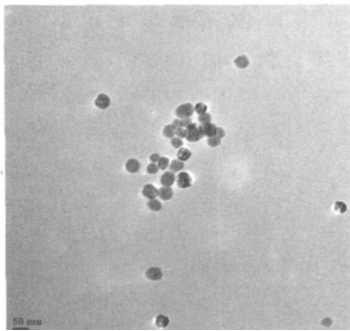


图 1 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶的 TEM 图
Fig.1 TEM image of the prepared NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ upconversion nanocrystals

图 2(a) 为所制备 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶的 XRD 图谱, 结果显示所制备纳米晶中既有立方相结构(α 型, JCPDS 卡号: 77-2042)也有六方相结构(β 型, JCPDS 卡

号: 16-0334), 是两种形态混合的纳米晶。
由图 2(b) 可以看出, 所制备上转换 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 发射了特征的可见绿色上转换荧光。3 个特征发射峰分别位于 528、544 和 657 nm 处, 分别对应 Er³⁺ 离子的 ²H_{11/2} → ⁴I_{15/2} (528 nm)、⁴S_{3/2} → ⁴I_{15/2} (544 nm) 和 ⁴F_{9/2} → ⁴I_{15/2} (657 nm) 跃迁^[12]。

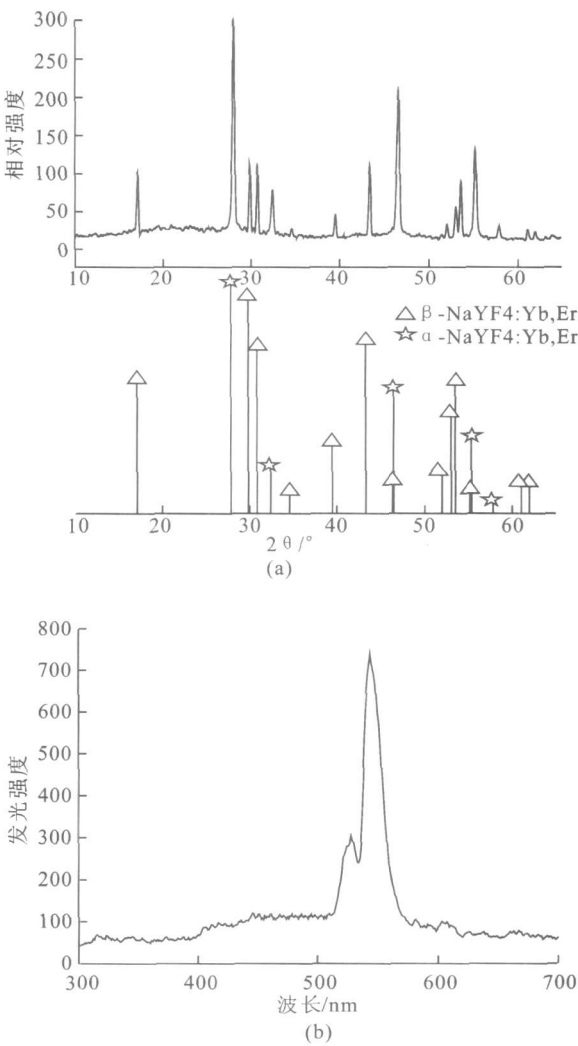


图 2 上转换 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶的 XRD 图及 α-NaYF₄, β-NaYF₄ 标准卡(a) 和发光光谱(b)
Fig.2 XRD patterns of the NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ upconversion nanocrystals and the standard data for α-NaYF₄, β-NaYF₄ as a reference (a), and the luminescence spectra of NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ upconversion nanocrystals (b)

2.2 表面功能化 NaYF₄: Yb, Er 的表征

尽管乙二醇体系中所合成的纳米晶具有亲水性表面, 但由于表面没有可同生物识别物质(如氨基酸、多肽、抗原、抗体、核酸等)键合的活性官能团, 生物分子将不能被偶联到纳米晶的表面, 因而不能用于生物荧光标记, 因此, 必须对其表面进行

功能化修饰。图 3 是用 Stöber 法修饰后 SiO₂ 包覆的纳米晶, 可以看到硅层厚度约为 10 nm 左右, 纳米粒子大小为(50±5) nm, 证实 SiO₂已经均匀地包覆在纳米粒子外层。包覆后的纳米颗粒具有更好的水溶性, 在水溶液中分散良好。

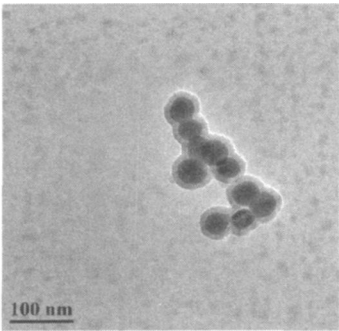


图 3 表面氨基化 SiO₂ 包覆的 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 上转换发光纳米晶 TEM 图

Fig. 3 TEM image of SiO₂ capped NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ up-conversion nanocrystals functionalized with- NH₂ group

图 4 (a) 是表面氨基功能化的 SiO₂ 包覆 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 的红外图谱。结果显示, 在 1 045 cm⁻¹ 出现的强吸收谱带属于 Si-O-Si 的反对称伸缩振动吸收, 781 cm⁻¹ 也是 SiO₂ 的特征峰。3 415 cm⁻¹ 和 1 660 cm⁻¹ 的吸收峰是氨基中 N-H 键的伸缩振动和弯曲振动, 2 933 cm⁻¹ 是 APTES 中的亚甲基的伸缩振动。证实了纳米晶在包覆 SiO₂ 时同时也连接了氨基。

实验进一步对氨基化 SiO₂ 包覆 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 上转换发光纳米晶的发光光谱进行了考察。(图 4 (b)) 显示, 相对于 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 上转换发光纳米晶而言, 氨基化 SiO₂ 包覆 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 上转换发光纳米晶的特征上转化发光特性未发生改变, 其 3 个特征发射峰仍分别位于 528、544 和 657 nm 处, 表现为绿色荧光。

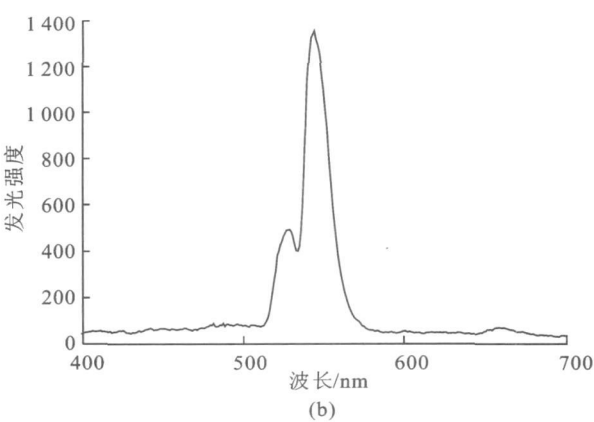
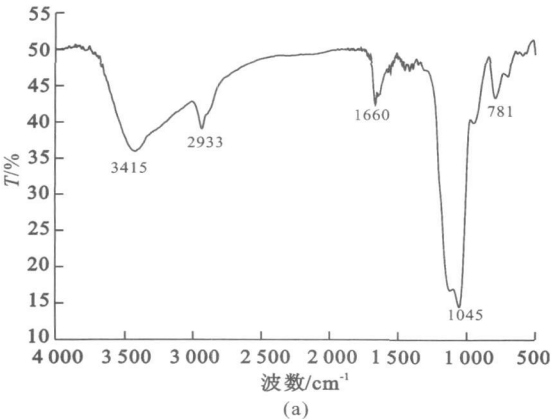


图 4 表面氨基功能化的 SiO₂ 包覆 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 纳米晶的红外图谱 (a) 和发光光谱 (b)

Fig. 4 FT-IR spectra (a) and luminescence spectrum of SiO₂ capped NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ up-conversion nanocrystals functionalized with- NH₂ group

2 3 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 上转换发光纳米晶与亲和素的偶联

氨基化 SiO₂ 包覆 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 上转换发光纳米晶与亲和素的偶联是其进一步与生物素或生物素化生物分子结合的一个必要条件。按照实验部分所述步骤将亲和素与氨基化 SiO₂ 包覆 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 上转换发光纳米晶表面的 NH₂ 进行偶联, 由于亲和素在 280 nm 有吸收, 而上转换纳米晶在紫外光区无特征吸收, 所以可以用紫外分光光度法对上转换纳米晶与亲和素结合情况进行表征。如图 5 所示, 图 5 中 a 为亲和素原液的紫外吸收谱图, b 为上转换纳米晶与亲和素反应完成离心后的上清液。可以看到, 上转换纳米晶的上清液中亲和素的量显著减少, 表明亲和素与上转换纳米晶表面的 NH₂ 连接成功。

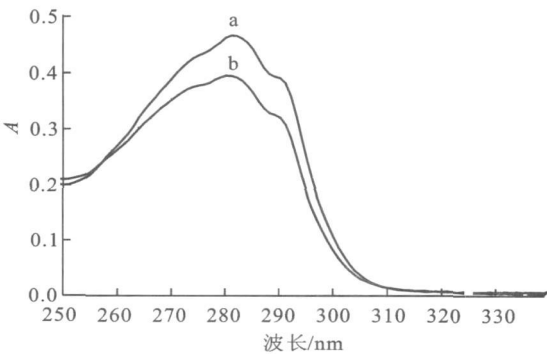


图 5 亲和素原液 (a) 以及亲和素和氨基化的 NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ 结合后离心所得上清液 (b) 的紫外可见吸收图谱

Fig. 5 Absorption spectra of initial avidin solution (a) and supernatant after avidin conjugated amino-functionalized NaYF₄: Yb³⁺ Er³⁺ nanoparticles (b)

3 结 语

采用水热溶剂法,制备了 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ 上转换发光纳米材料,随后通过 Stöber 法表面 SiO_2 包覆、氨基修饰,使其通过戊二醛交联与亲和素分子结合,实现了所制备 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ 上转换发光

纳米材料的表面生物功能化。TEM、XRD、荧光光谱、FT-IR、UV-vis 图谱表征结果显示 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ 上转换发光纳米材料及其表面生物功能化均告成功,为其后续应用于生物标记和分析检测奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. **Science**, 1998, 281, 2013– 2016.
- [2] Chan WCW, Nie SM. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [J]. **Science**, 1998, 281, 2016 – 2018.
- [3] Vetrone F, Boyer JC, Capobianco JA, et al. Concentration-dependent near-infrared to visible upconversion in nanocrystalline and bulk $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}^{3+}$ [J]. **Chem Mat**, 2003, 15, 2737– 2743.
- [4] Yan RX, Li YD. Down/Up conversion in $\text{Ln}^{(3+)}$ -doped YF_3 nanocrystals [J]. **Adv Funct Mater**, 2005, 15, 763– 770.
- [5] 杨奉真, 衣光舜, 陈德朴. 纳米 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Ho}$ 上转换荧光粉的合成及其性质研究[J]. 高等学校化学学报. 2004, 9 (25), 1589– 1592.
YANG Feng-zhan, YI Guang-shun, CHEN De-pu. Synthesis and up-conversion luminescence properties of nanocrystal Yb,Ho -doped sodium yttrium fluoride[J]. **Chem J Chin Univ**, 2004, 9(25), 1589– 1592.(in Chinese)
- [6] Gu H W, Zheng R K, Zhang X X, et al. Facile one-pot synthesis of bifunctional heterodimers of nanoparticles: A conjugate of quantum dot and magnetic nanoparticles[J]. **J Am Chem Soc**, 2004, 126, 5664– 5665.
- [7] Wang L, Li Y. Green upconversion nanocrystals for DNA detection[J]. **Chem Commun**, 2006, 2557– 2559.
- [8] Mader HS, Link M, Achatz DE, et al. Surface-modified upconverting microparticles and nanoparticles for use in click chemistries[J]. **Chem Eur J**, 2010, 16, 5416– 5424.
- [9] Wang M, Hou W, Mi C C, et al. Immunoassay of Goat Antihuman Immunoglobulin G Antibody Based on Luminescence Resonance Energy Transfer between Near-Infrared Responsive $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ Upconversion Fluorescent Nanoparticles and Gold Nanoparticles[J]. **Anal. Chem**, 2009, 81, 8783– 8789.
- [10] Kong D, Quan Z, Yang J, et al. Avidin conjugation to up-conversion phosphor $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ by the oxidation of the oligosaccharide chains [J]. **J Nanopart Res**, 2009, 11, 821– 829.
- [11] Lu H, Yi G, Zhao S, et al. Synthesis and characterization of multi-functional nanoparticles possessing magnetic, up-conversion fluorescence and bio-affinity properties[J]. **J Mater Chem**, 2004, 14, 1336– 1341.
- [12] Wang M, Mi C C, Wang W X, et al. Immunolabeling and NIR-Excited Fluorescent Imaging of HeLa Cells by Using $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ Upconversion Nanoparticle [J]. **ACS Nano**, 2009, 3(6), 1580– 1586.