

粗糙化金纳米棒 SERS 探针用于生物成像研究

梅荣超¹, 殷颖超¹, 王运庆²

(1 烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 分子药理和药物评价教育部重点实验室, 烟台大学, 山东 烟台 264005 2 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 金纳米棒(AuNR)是制备近红外表面增强拉曼散射(SERS)探针最为经典的纳米材料,但存在拉曼信号增强能力弱等缺点.本研究通过在巯基-聚乙二醇修饰的AuNR表面原位还原、生长金纳米颗粒的方法,制备了一种新型的表面粗糙化金纳米棒(R-AuNR),并以此构建SERS纳米探针用于生物成像研究.金纳米颗粒的生长使AuNR表面生成了大量的纳米间隙(即“热点”区域),提高了AuNR表面粗糙度,因此其SERS增强能力显著提高.基于R-AuNR的SERS探针的灵敏度较基于AuNR的探针提高2~8倍.细胞与活体小鼠的成像实验表明R-AuNR SERS探针具有很好的生物成像能力.

关键词: 表面增强拉曼散射(SERS); 光学探针; 金纳米棒; 巯基-聚乙二醇; 生物成像
中图分类号: R917 **文献标志码:** A

近年来,近红外(near infrared, NIR)活体荧光成像技术在药物研究领域引起了人们的极大关注^[1-2],但该技术存在空间分辨率低、多元检测能力弱等局限^[3].表面增强拉曼散射(SERS)成像技术已成为其有益补充.SERS成像技术采用NIR激光照射活体动物,通过测定体内SERS探针发出的NIR散射信号,实现探针的体内示踪.SERS成像技术具有灵敏度高、多元信号识别能力强、谱峰清晰尖锐等多方面的优越性^[4-5].

SERS探针是实现活体SERS成像的重要工具,典型的SERS探针主要包括金银等贵金属纳米粒子和具有特定散射信号的有机分子(即拉曼报告分子)两部分,其中贵金属纳米颗粒的形貌对探针的灵敏度有显著影响^[6-7].二维AuNR具有横向和纵向2个表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)谱峰,且纵向SPR峰位可以通过调节

纳米棒的长宽比进入到近红外区,现已被广泛用作于生物成像的SERS探针贵金属纳米颗粒基底的研究^[8-9].SERS基本理论认为,表面粗糙的纳米结构具有更强的电磁增强效应,即更好的拉曼信号增强能力,据此人们合成了金纳米星^[10]、金纳米花^[11]和核-卫星复合粒子^[12]等表面粗糙度高、SERS效应强的纳米基底.对AuNR而言,尽管其具有近红外SPR谱峰的优点,但其表面较光滑,局域表面的电磁场较弱.如何提升其SERS增强能力,制备高灵敏NIR纳米SERS探针,是本领域关注的热点问题.

本研究通过巯基聚乙二醇修饰、金纳米颗粒原位生长等步骤,合成一种表面结合金纳米颗粒的“粗糙化”AuNR(Rough(R)-AuNR).R-AuNR纳米粒子表面富含的纳米间隙和SERS“热点”,其SERS增强能力较AuNR显著提高.将其作为增强基底制备NIR纳米SERS探针成功应用于细胞和活体

收稿日期:2018-01-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81573393),山东省科学技术发展计划(2014GF01074).

作者简介:梅荣超(1990-),男,安徽马鞍山人,硕士研究生.

通信作者:王运庆(yqwang@yic.ac.cn),副研究员,博士,从事SERS的相关研究.

小鼠体内成像,展示了良好的光学成像应用潜力.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

氯金酸(HAuCl_4)、硝酸银(AgNO_3)、抗坏血酸(L-AA)、结晶紫(CV)、硼氢化钠(NaBH_4)、孔雀石绿(MG)、对硝基苯硫酚(NT)和巯基-聚乙二醇(mPEG-SH)购自国药集团化学试剂有限公司;3,3'-二乙基硫醛三碳菁化碘(DTTC)、3,3'-二乙基硫醛二碳菁化碘(DTDC)和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)购自Sigma-Aldrich西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;DMEM培养基、胰蛋白酶和胎牛血清购自赛默科技公司;实验所用的水均是经过二次纯化所得的超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

扫描电子显微镜(S-4800)购自日本Hitachi公司;DXR激光共聚焦显微拉曼光谱仪购自ThermoFisher公司;紫外-近红外分光光度计购自ThermoFisher公司.

1.2 实验内容

1.2.1 AuNR的合成 根据相关文献报道^[13], AuNR的合成采用种子合成法进行.

种子的合成:2 mL 0.2 mol/L CTAB 中加入 2 mL 0.5 mmol/L HAuCl_4 溶液,均匀搅拌 5 min 后,再加入 240 μL 0.01 mol/L 的冰镇 NaBH_4 溶液,快速搅拌,等溶液由浅黄色变为棕色即停止搅拌,并于室温下放置 2 h.

AuNR的合成:13 mL 23 mmol/L 的 HAuCl_4 搅拌下加入到 200 mL 0.2 mol/L CTAB 中,再加入 11.2 mL 4 mmol/L 的 AgNO_3 ,反应 5 min,再逐滴加入 5 mL 0.08 mol/L L-AA,等溶液变为无色时,再加入 3.6 mL 上述合成的种子溶液,并在室温下反应 30 min 之后,停止搅拌,过夜即可.

1.2.2 基于 R-AuNR 的 SERS 探针合成 取 300 μL 上述合成的 AuNR 溶液,9 500 r/min,离心 15 min,底物分散在 1.0 mL 的 10^{-3} mol/L 的 mPEG-SH 中,充分涡旋后,室温下,静置过夜.将静置过夜的上述溶液 9 300 r/min,离心 13 min,底物分散在 1.0 mL 的去离子水中,取 500 μL 上述溶液(Abs 1.0),加入 50 μL 0.1 mol/L 的 L-AA,在均匀搅拌下加入 50 μL 1.5 mol/L 的 HAuCl_4 ,即可得到 R-AuNR.取 100 μL 的 R-AuNR 溶液 6 份,分别加入一定量的拉曼报告分子 CV(10^{-6} mol/L)、MG(10^{-6} mol/L)、NT(10^{-5} mol/L)、DTDC(10^{-6} mol/L)、DTTC(10^{-6} mol/L)、Cy7(10^{-6} mol/L),室温下放置 0.5

h 后即可得到含有不同报告分子的 R-AuNR 的 SERS 探针.

1.2.3 基于 AuNR SERS 探针的合成 取 300 μL 上述合成的 AuNR 溶液,9 500 r/min,离心 15 min,底物分散在 1.0 mL 的去离子水中,在 9 300 r/min,离心 13 min,底物分散在 1.2 mL 的去离子水中.取 100 μL 的 R-AuNR 溶液 6 份,分别加入一定量的拉曼报告分子 CV(10^{-6} mol/L)、MG(10^{-6} mol/L)、NT(10^{-5} mol/L)、DTDC(10^{-6} mol/L)、DTTC(10^{-6} mol/L)、Cy7(10^{-6} mol/L),室温下放置 0.5 h 后即可得到含有不同报告分子的 R-AuNR 的 SERS 探针.

1.2.4 细胞培养与细胞成像 将 SMMC7721 细胞(肝癌细胞系)作为单层在 37°C 的空气/ CO_2 (95:5) 中的增湿培养箱中生长,培养基是补充有 10% 胎牛血清的 DMEM.待细胞贴壁后,用 PBS 洗涤并用胰蛋白酶消化处理,并重新悬浮在新鲜的 DMEM 培养基中.细胞成像时,将该稀释后的细胞悬浮液 500 μL (2×10^4 个细胞)接种在含有玻璃盖玻片的 24 孔板上,并培养 12 h 以使细胞贴壁.然后将 150 μL 含有 DTTC 的 R-AuNR SERS 探针加入到 24 孔板中.孵育 3 h 后,将盖玻片上的细胞单层用 PBS 重复洗涤以除去没有被细胞摄取的 R-AuNR SERS 探针,然后用玻璃载玻片密封该盖玻片.最后通过 DXR 激光共聚焦显微拉曼光谱仪进行拉曼信号的测量(780 nm,30 mW).

1.2.5 小鼠成像 分别将 R-AuNR 和 AuNR 制备的 SERS 探针(各 100 μL)注射到小白鼠(约 20 g)皮下的不同位置,用 DXR 激光共聚焦显微拉曼光谱仪(780 nm,150 mW)分别在上述两处进行拉曼信号测定.采集未注射 SERS 探针的空白皮肤拉曼信号作为对照.

2 结果与讨论

R-AuNR 纳米粒子和 SERS 探针的合成过程如图 1 所示.首先将过量的 mPEG-SH 与 AuNR 充分混合,mPEG-SH 将 AuNR 表面的配体分子 CTAB 置换,并通过 Au-S 化学键稳定地结合在 AuNR 表面;进一步用抗坏血酸还原氯金酸的方法,以巯基为介导在 mPEG-SH 上原位生长金纳米颗粒,从而得到多个金纳米颗粒结合、表面粗糙化的 R-AuNR 纳米粒子.最后,在 R-AuNR 表面吸附一定种类的拉曼报告分子,得到具有该报告分子特征散射信号的高灵敏 SERS 探针.

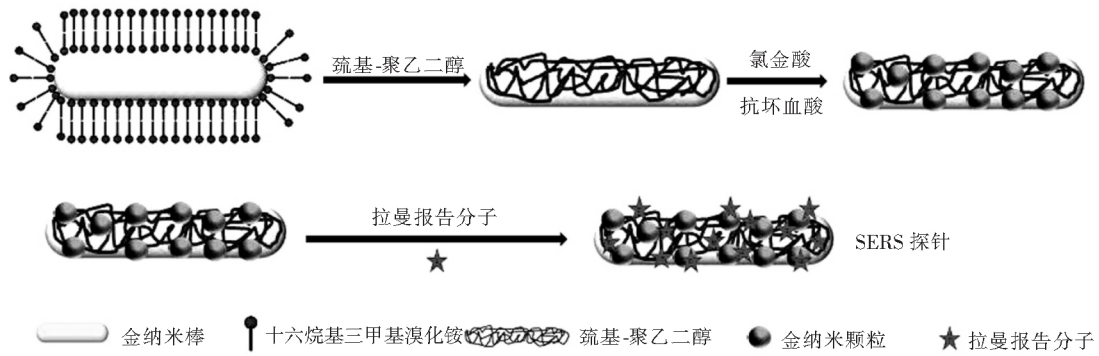


图 1 R - AuNR 纳米粒子和 SERS 探针的合成示意图

Fig. 1 Schematic of synthesis process of R-AuNR and SERS tags

2.1 R - AuNR 的形貌考察

对 R - AuNR 的生长过程进行形貌和光谱性质考察. 图 2 中的扫描电镜图(图 2A) 显示是 AuNR 母核长约 38 nm, 宽约 11 nm, 表面光滑平整. mPEG - SH 修饰后, AuNR 母核的电位由 33 mV 下降至 5.1 mV, 表面带正电荷的 CTAB 配体被 mPEG - SH 置换. 加入氯金酸和抗坏血酸后, AuNR 侧面生长了多个粒径约为 5 nm 的金纳米颗粒, 形成 R - AuNR 结构(图 2B). 随着 Au 纳米颗粒的生长, AuNR 母核与 Au 纳米颗粒的等离子体耦合增强^[14], 使得 R - AuNR 的纵向 SPR 波长由 AuNR 的 760 nm 红移至 840 nm(图 2D). 该红移保持了纳米材料的 NIR 光

谱吸收的性质, 为后续的近红外成像提供了前提.

mPEG - SH 修饰是形成 R - AuNR 粗糙表面结构的关键步骤. mPEG - SH 中的巯基与 Au⁰ 和 Au³⁺ 具有强结合能力, 有助于金纳米粒子在 AuNR 纳米界面形成晶核和生长. 为了验证 mPEG - SH 的介导作用, 我们以未修饰 mPEG - SH 的 AuNR 为核进行对照实验, 如图 2C 所示, 在相同的还原生长条件下, 得到了比较粗大的 AuNR(Thick(T) - AuNR), 长约 40 nm, 宽约 17 nm, 表面光滑, 表明生成的金原子均匀沉积生长在 AuNR 核心表面, 不能形成粗糙表面结构. 其纵向 SPR 峰发生了 140 nm 的蓝移(图 2D), 与粒子的长径比减小相吻合.

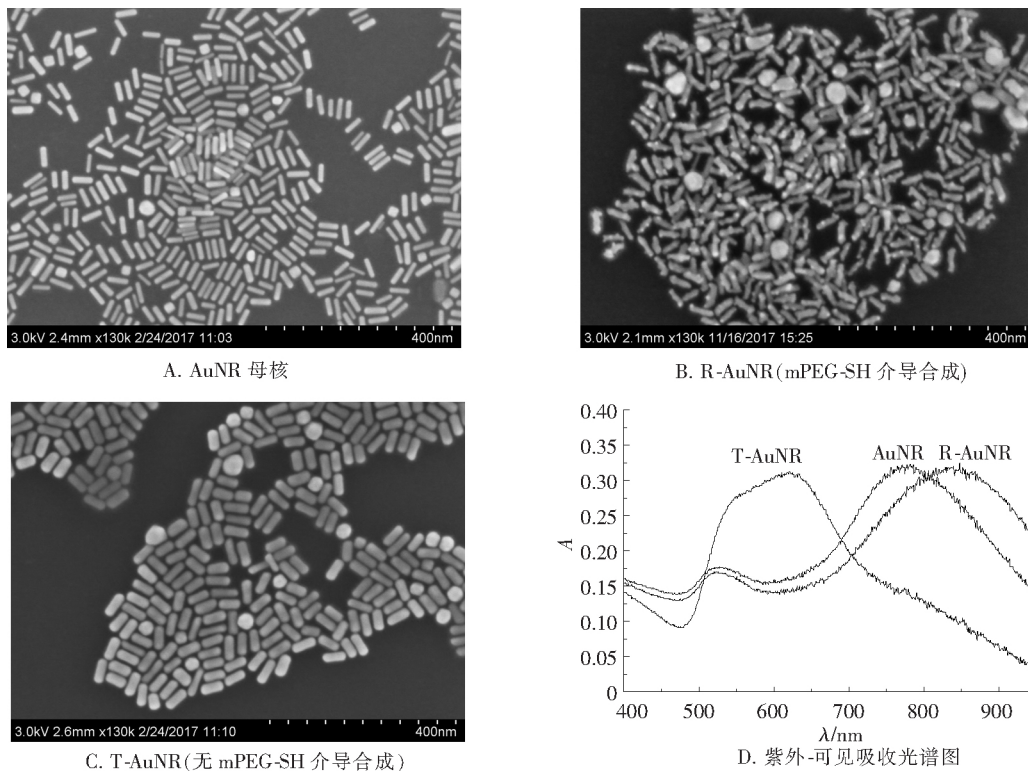
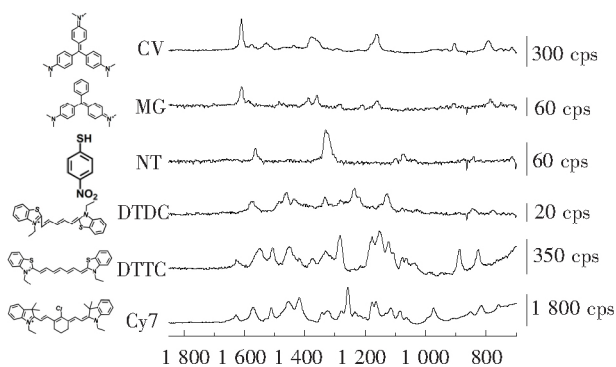


图 2 3 种粒子的扫描电镜图和紫外 - 可见吸收光谱图

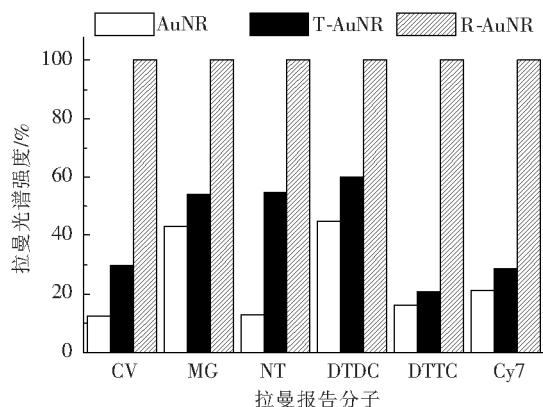
Fig. 2 SEM images and UV-vis spectra of the three nanoparticles

2.2 R - AuNR 拉曼信号增强性能的考察

为了考察 R - AuNR 的拉曼信号增强能力,选择吸收波长在紫外光区的 NT,可见光区的 CV、MG、DTDC 以及 NIR 光区的 DTTC、Cy7 作为代表性的拉曼报告分子,将其分别和 R - AuNR 粒子混合并测定信号强度.以 AuNR 和 T - AuNR 作为对照纳米材料.如图 3 所示,R - AuNR 对上述所有的报告分子都具有较好的拉曼增强能力,增强能力约是 AuNR 的 2 ~ 8 倍、T - AuNR 的 2 ~ 5 倍. R - AuNR 优异的拉曼信号增强能力与表面粗糙度增加密切相关:(1) R - AuNR 表面积增大,可以吸附和容纳的报告分子数目增多;(2) 表面的金纳米颗粒之间形成“SERS 热点”,使吸附其中的报告分子感受的电磁场显著增强^[15-16].



(A)各种报告分子的结构式和 R-AuNR 对它们的 SERS 光谱图



(B)3 种粒子对各种报告分子拉曼增强能力的比较

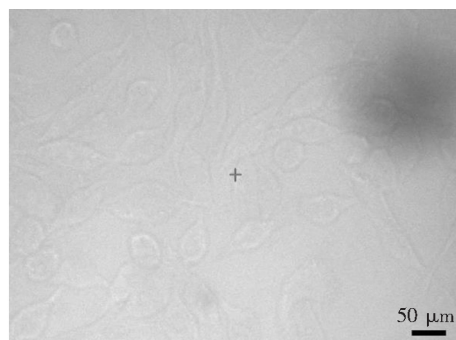
图 3 R - AuNR 对各种拉曼报告分子信号增强性能的考察

Fig. 3 The Raman enhanced performance inspection of R - AuNR on many kinds of Raman reporters

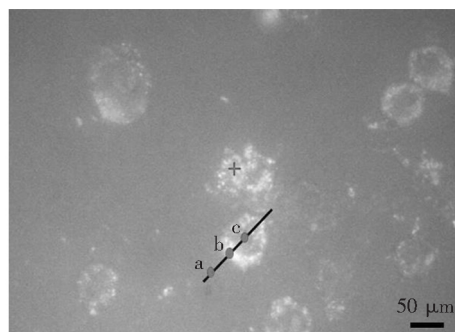
2.3 基于 R - AuNR 的 SERS 探针用于细胞成像

进一步以吸附 DTTC 报告分子的 R - AuNR 纳米颗粒作为 SERS 探针,将其与 SMMC7721 细胞共培养,研究探针在细胞内的分布和成像情况.图 4B 为 SERS 探针和细胞培育 3 h 后细胞的明场图像,图

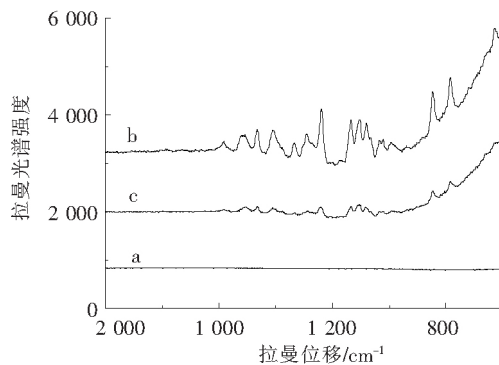
4A 为没有探针培育的对照组,图 4B 中单个细胞中的亮黄色部分表示探针在细胞中的位置,可以发现探针可以被细胞摄取,且主要分布在细胞质中,细胞的形态仍保持圆整.进一步采集单个细胞不同位置处(a ~ c 分别为细胞外培养基质、细胞质和细胞核所处位点)的拉曼信号.如图 4C 所示,拉曼信号强度和探针的分布情况有良好的吻合.细胞质中分布的 SERS 探针较多,因而呈现出较强的拉曼信号;细胞核附近探针较少,拉曼信号明显减弱;细胞外的培养基质中未发现探针颗粒,没有拉曼信号检出.以上结果表明,基于 R - AuNR 的 SERS 探针可以进入细胞并生成灵敏的信号,通过单个细胞内不同区域信号强度的分析,可以反映探针粒子的空间分布差异.



(A)无探针共培养的细胞



(B)与 R-AuNR SERS 探针共培养后的细胞



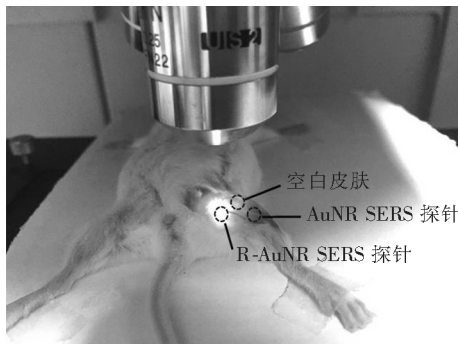
(C)R-AuNR SERS 探针在单个细胞不同位置处的拉曼光谱图

图 4 R - AuNR SERS 探针用于细胞成像时的明场照片与拉曼光谱图

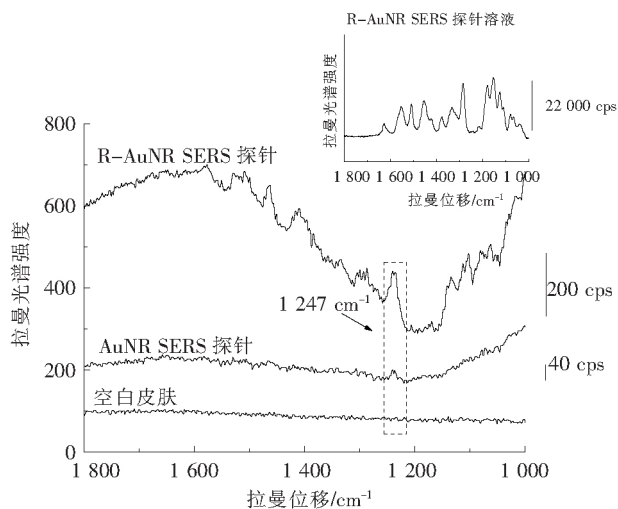
Fig. 4 The bright image of cells after incubation with R-AuNR SERS tags and its Raman spectra for cells imaging

2.4 基于 R - AuNR 的 SERS 探针用于小鼠成像

构建具有活体成像能力的高灵敏 NIR SERS 探针是研发 R - AuNR 粒子的重要目标. 在细胞成像基础上, 进一步将 DTTC 吸附的 R - AuNR SERS 探针注射到小鼠皮下(图 5A), 以 NIR 780 nm 激光作为激发光源, 考察探针信号在活体内穿透能力. 同时以传统 AuNR 为基底的 SERS 探针为对照. 如图 5B 所示, 注射 SERS 探针的两处皮肤位置有拉曼信号, 拉曼谱峰与 DTTC 分子特征峰相吻合(图 5B 插图) 而空白皮肤处无明显拉曼信号, 表明 SERS 探针的 NIR 拉曼信号可以透过皮肤而被检测. 在相同的注射条件下, 比较 $1\ 247\ \text{cm}^{-1}$ 处探针的拉曼信号, R - AuNR SERS 探针的拉曼信号约为 AuNR SERS 探针的 5 倍, 表明其活体测定的灵敏度明显提高.



(A) 拉曼成像的小白鼠照片



(B) 皮下注射 R-AuNR、AuNR SERS 探针和空白皮肤处的拉曼光谱图, 右上角为 R-AuNR SERS 探针溶液的拉曼光谱图

图 5 R - AuNR 与 AuNR SERS 探针用于小鼠成像时的照片与拉曼光谱图

Fig. 5 The photo and Raman spectra of R-AuNR and AuNR SERS tags for mice imaging

3 小 结

本研究提出了一种简单的 AuNR 表面粗糙化方

法, 即先用巯基 - 聚乙二醇修饰 AuNR 的表面, 再通过原位生长的方法得到粗糙化的 AuNR, 其中巯基 - 聚乙二醇修饰是生成表面“热点”、形成 R - AuNR 结构的关键步骤. 通过对多种拉曼报告分子 SERS 增强能力的研究, 表明 R - AuNR 的 SERS 增强性能较 AuNR 显著提高. 进一步构建了基于 R - AuNR 的 SERS 纳米光学探针, 细胞实验表明 SERS 探针可以进入细胞并生成灵敏的 SERS 信号, 小鼠实验表明 SERS 探针的 NIR 拉曼信号可以透过皮肤而被检测, 并且较 AuNR 的灵敏度提高 5 倍. 以上结果表明基于 R - AuNR 的 SERS 纳米光学探针在细胞与小鼠的成像实验中展示了良好的生物成像能力. 该探针有望在肿瘤部位成像、肿瘤的早期诊断与生物组织成像等生物医学领域发挥一定的作用.

参考文献:

- [1] QIAN J, WANG D, HE S, et al. Photosensitizer encapsulated organically modified silica nanoparticles for direct two-photon photodynamic therapy and in vivo functional imaging [J]. *Biomaterials* 2012, 33(19): 4851-4860.
- [2] MORGAN N, CHEN W, GANDJBAKHICHE A, et al. Real time in vivo non-invasive optical imaging using near-infrared fluorescent quantum dots [J]. *Academic Radiology* 2005, 12(3): 313-323.
- [3] DIAO S, BLACKBURN, DAI H, et al. Fluorescence imaging in vivo at wavelengths beyond 1500 nm [J]. *Angewandte Chemie International Edition* 2015, 54(49): 14758-14762.
- [4] WANG Y, YAN B, CHEN L. SERS tags: novel optical nanoprobes for bioanalysis [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(3): 1391-1428.
- [5] LEE S, CHON H, LIM D, et al. Fabrication of SERS - fluorescence dual modal nanoprobes and application to multiplex cancer cell imaging [J]. *Nanoscale* 2012, 4(1): 124-129.
- [6] LI Y, WANG Z, GUO S, et al. Raman tags: Novel optical probes for intracellular sensing and imaging [J]. *Biotechnology Advances* 2017, 35(2): 168-177.
- [7] NOLAN J, DUGGAN E, LIU E, et al. Single cell analysis using surface enhanced Raman scattering (SERS) tags [J]. *Methods* 2013, 57(3): 272-279.
- [8] SUN C, GAO M, ZHANG X, et al. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging-guided real-time photothermal ablation of target cancer cells using polydopamine-encapsulated gold nanorods as multifunctional agents [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2017, 409(20): 4915-4926.
- [9] QIAN J, JIANG L, HE S, et al. Fluorescence-surface enhanced Raman scattering co-functionalized gold nanorods as near-infrared probes for purely optical in vivo imaging [J]. *Biomaterials* 2011, 32(6): 1601-1610.

- [10] PARK S , LEE J , KO H , et al. Transparent and flexible Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) sensors based on gold nanostar arrays embedded in silicon rubber film [J]. ACS Applied Materials & Interfaces 2017 9(50) : 44088–44095.
- [11] XIE J , ZHANG Q , WANG D , et al. The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for *in vivo* applications [J]. ACS Nano 2008 2(12) : 2473–2480.
- [12] TIAN B , MA J , STROMBERG M , et al. Optomagnetic detection of microRNA based on duplex-specific nuclease-assisted target recycling and multilayer core-satellite magnetic superstructures [J]. ACS Nano 2017 11(2) : 1798–1806.
- [13] NIKOOBAKHT B , EL-SAYED M. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method [J]. Chemistry of Materials 2003 15(6) : 1957–1962.
- [14] PRASAD J , ZINS I , SONNICHSEN C , et al. Plasmonic core-satellite assemblies as highly sensitive refractive index sensors [J]. The Journal of Physical Chemistry C 2015 119(10) : 5577–5582.
- [15] TRUGLER A , TINJUELY J , HOHENAU A , et al. Near-field and SERS enhancement from rough plasmonic nanoparticles [J]. Physical Review B 2014 89(16) : 5409.
- [16] TIAN L , MORRISSEY J , KHARASCH E , et al. Off-Resonant gold superstructures as ultrabright minimally invasive surface-enhanced Raman scattering (SERS) probes [J]. Chemistry of Materials 2015 27(16) : 5678–5684.

Rough Au Nanorods Based SERS Tags for Bioimaging Research

MEI Rong-chao¹ , YIN Ying-chao¹ , WANG Yun-qing²

(1. School of Pharmacy , Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation , Ministry of Education , Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong , Yantai University , Yantai 264005 , China. 2. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation , Yantai Institute of Coastal Zone Research , Chinese Academy of Sciences , Yantai 264003 , China)

Abstract: Gold nanorods (AuNR) are the most classic nanomaterials for preparing surface-enhanced Raman scattering (SERS) tags for *in vivo* imaging. However , AuNR has weak Raman enhancement ability. In this study , a new type of AuNR with rough surface (R-AuNR) is designed and synthesized , and the SERS tags based on R-AuNR is constructed for bioimaging research. R-AuNR is prepared by *in situ* reduction growth of gold nanoparticles on a thiol-polyethylene glycol-modified AuNR surface. The growth of gold nanoparticles make the surface of AuNR produce a large number of nano-gaps (“hot spots”) and thus improve the surface roughness of AuNR , so that its SERS enhancement ability is significantly enhanced. The sensitivity of R-AuNR-based SERS tags is 2 – 8 times higher than that of AuNR-based SERS tags. The imaging experiments of the cells and the live mice show that the R-AuNR SERS tags have good biological imaging ability.

Key words: surface-enhanced Raman scattering (SERS) ; tags ; gold nanorods ; mercapto-polyethylene glycol ; bioimaging

(责任编辑 周雪莹)