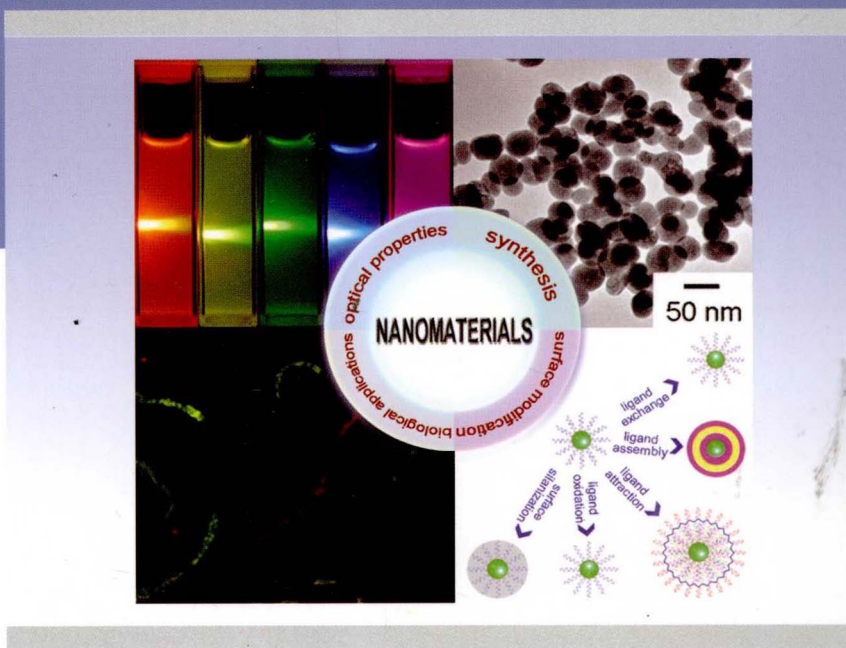


“十一五”国家重点图书出版规划项目

现代化学基础丛书 28

无机纳米探针的制备及其生物应用

徐淑坤 等 编著



科学出版社

内 容 简 介

全球纳米科技发展迅猛,正在给分析化学界带来革命性的变化。运用纳米科技研制纳米探针在分析化学特别是生物分析化学等方面具有重大意义。本书介绍近十几年来无机纳米探针领域的研究成果和最新进展,包括纳米颗粒的合成、纳米离子探针或生物探针的制备、表征方法,无机离子、化合物和生物大分子的定性或定量检测,以及细胞、组织的标记和成像等新方法和新技术。

本书可供分析化学、材料科学、生物医学和药学等领域的科研工作者阅读,也可以作为高等院校高年级学生及研究生的教材或参考书使用。

图书在版编目(CIP)数据

无机纳米探针的制备及其生物应用/徐淑坤等编著. —北京:科学出版社,2012

(现代化学基础丛书:28)

ISBN 978-7-03-032757-4

I. 无… II. 徐… III. 纳米技术-探针 IV. TH83

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 231645 号

责任编辑:张淑晓 刘志巧 / 责任校对:钟 洋

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年1月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2012年1月第一次印刷 印张:17 1/2

字数:330 000

定价:58.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《现代化学基础丛书》编委会

主 编 朱清时

副主编 (以姓氏拼音为序)

江元生 林国强 佟振合 汪尔康

编 委 (以姓氏拼音为序)

包信和 陈凯先 冯守华 郭庆祥

韩布兴 黄乃正 黎乐民 吴新涛

习 复 杨芑原 赵新生 郑兰荪

卓仁禧

本书参加编写人员

(以姓氏笔画为序)

于永丽	王 猛	王 楠
王文星	李 锋	杨冬芝
徐淑坤	黄淮青	密丛丛
董 微	董再蒸	

《现代化学基础丛书》序

如果把牛顿发表“自然哲学的数学原理”的 1687 年作为近代科学的誕生日,仅 300 多年中,知识以正反馈效应快速增长;知识产生更多的知识,力量导致更大的力量。特别是 20 世纪的科学技术对自然界的改造特别强劲,发展的速度空前迅速。

在科学技术的各个领域,化学与人类的日常生活关系最为密切,对人类社会的发展产生的影响也特别巨大。从合成 DDT 开始的化学农药和从合成氨开始的化学肥料,把农业生产推到了前所未有的高度,以致人们把 20 世纪称为“化学农业时代”。不断发明出的种类繁多的化学材料极大地改善了人类的生活,使材料科学成为了 20 世纪的一个主流科技领域。化学家们对在分子层次上的物质结构和“态-态化学”、单分子化学等基元化学过程的认识也随着可利用的技术工具的迅速增多而快速深入。

也应看到,化学虽然创造了大量人类需要的新物质,但是在许多场合中却未有效地利用资源,而且产生了大量排放物造成严重的环境污染。以至于目前有不少人把化学化工与环境污染联系在一起。

在 21 世纪开始之时,化学正在两个方向上迅速发展。一是在 20 世纪迅速发展的惯性驱动下继续沿各个有强大生命力的方向发展;二是全方位的“绿色化”,即使整个化学从“粗放型”向“集约型”转变,既满足人们的需求,又维持生态平衡和保护环境。

为了在一定程度上帮助读者熟悉现代化学一些重要领域的现状,科学出版社组织编辑出版了这套《现代化学基础丛书》。丛书以无机化学、分析化学、物理化学、有机化学和高分子化学五个二级学科为主,介绍这些学科领域目前发展的重点和热点,并兼顾学科覆盖的全面性。丛书计划为有关的科技人员、教育工作者和高等院校研究生、高年级学生提供一套较高水平的读物,希望能为化学在 21 世纪的发展起积极的推动作用。

生活+

前 言

21 世纪的主导科学之一是生命科学。生命科学的飞速发展对分析化学提出了大量新课题,使得生命分析化学成为分析化学中最活跃的研究领域。目前,生命分析化学主要集中在对生物大分子和生物药物、生物活性物质的分析,以及生理元素在蛋白质、生物组织、细胞中的分布、结合状态及相互作用的分析上。这些分析都需要依靠有效的分析试剂和分析仪器的配合来实现。在有机化学、配位化学、超分子化学、生物化学、免疫化学等化学学科以及医学、药学等学科的推动和促进下,生物化学分析试剂在近 30 年得到了较快的发展,推动和促进了生命科学和分析化学的发展。在生物学与生命医学领域里,探索和发展高灵敏度的非同位素检测方法一直是各国学者共同努力的方向。由于许多生物大分子自身可检测的特性较弱,要进行高灵敏度的分析,必须借助于外来标记物获得可测量的信号。因此,标记分析法成为检测生物大分子的主要方法之一,而其中应用最为普遍的是基于光信号的标记分析方法。传统的光学标记物即有机染料具有成本低廉、分子质量小、易于标记、水溶性好等优点,在生物标记中发挥了巨大的作用,但仍然存在一些难以克服的缺陷,如激发光谱窄、发射光谱宽且有拖尾,稳定性差、容易光漂白等。近年来开发的一些新型有机染料虽然各方面性能都有一定的提高,但仍然无法从根本上摆脱有机染料固有的缺陷,在实际应用中受到了很大的限制。因此,发展发光强度高、灵敏度好、选择性强的发光标记物用于生物大分子的检测,成为分析化学研究的热点内容之一。

十几年来,随着纳米科技和纳米材料的飞速发展,基于纳米材料的标记物,或者称为纳米探针,如金属纳米粒子、量子点、稀土掺杂的纳米粒子等,其独特的光学和电学性质使之在分析化学、特别是生物分析化学、医学临床检验和药物分析、靶向药物中的应用已经逐渐成为一个蓬勃发展并具有广阔应用前景的前沿领域。利用纳米颗粒作为新型标记物,不仅能够有效地克服传统标记物的缺陷,还为生物标记技术拓宽了发展的方向。纳米科技与生物技术的结合,不仅为研究和改造生物分子结构提供了新颖的技术手段和思维方式,也为实现纳米科技的最终目标开辟了可行的途径。

本书内容共分 7 章。第 1 章对于生物分析化学中的传统标记物及其应用,纳米分析化学的产生、发展及其主要发展现状进行简单的介绍。第 2 章对金属纳米颗粒标记物,主要是贵金属金、银等纳米颗粒的制备、表面修饰和在生物分析中的应用进行阐述。由于这些纳米颗粒具有良好的吸收光谱和共振瑞利散射特性,它

们作为标记物被广泛用于核酸、蛋白质检测和免疫分析中。第3章介绍量子点的制备、表面修饰和在无机离子与生物大分子检测、细胞标记、组织与活体成像等方面的研究现状和应用前景。基于独特而优越的光学性质,量子点可以取代绝大部分有机染料而发展成为更优越的荧光探针材料,甚至可以作为药物载体用于重大疾病的早期诊断和治疗。第4章介绍稀土掺杂下转换发光纳米颗粒的制备、表面修饰及在分析检测中的应用。稀土离子掺杂的发光纳米材料具有发射光谱窄、发光寿命长、光化学稳定性高和 Stokes 位移大等特性。作为新型的荧光探针,稀土发光纳米材料不仅是对有机荧光染料、量子点探针的补充,更重要的是开辟了荧光检测的新途径和新方法。第5章介绍稀土掺杂上转换发光纳米颗粒的制备、表面功能化修饰及在生物大分子检测和标记等领域中的应用。与传统荧光标记物相比,上转换发光纳米颗粒毒性较低,对被测生物样品影响小。另外,上转换发光纳米颗粒的激发光为红外光,可以避免生物样品自体荧光的干扰,从而降低检测背景,提高信噪比。因此,尽管目前在生物中的应用还不是很广泛,上转换发光纳米颗粒作为一种新兴的标记物在生物学、医学和生命科学等领域都有着广阔的应用前景。第6章介绍磁性复合纳米材料,以及有磁性/荧光/生物亲和性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{QDs}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{NaYF}_4$ 等复合纳米材料的制备、性质及其在分析化学中的应用前景。目前,越来越多的研究致力于合成兼具磁性、荧光和生物相容性的多功能复合纳米颗粒,它们集各组分的优越性能于一体,为癌细胞标记和活体成像、靶向药物输送和治疗提供高性能的多功能探针。第7章简单介绍新兴的荧光碳点及其应用。最近,荧光碳纳米材料由于其独特的光学性质和生物相容性及低毒性引起了广泛关注,成为荧光材料方面一个新的研究热点。与量子点相比,荧光碳纳米粒子具有优越的生物相容性和低毒性,对细胞损伤小,尤其适用于生物活体标记;与有机染料相比,荧光碳纳米材料具有稳定性好,抗光漂白能力强等优点。因此,荧光碳纳米粒子是理想的生物荧光标记材料之一,具有广阔的应用前景。

本书第1章由徐淑坤撰写,第2章由王文星、王楠撰写,第3章由杨冬芝、董微、董再蒸撰写,第4章由于永丽、李锋撰写,第5章由王猛撰写,第6章由密丛丛撰写,第7章由黄淮青撰写。全书由徐淑坤负责统稿。本书涉及多学科交叉领域,作者知识有限,虽经多次修改,书中难免有不当和疏漏之处,恳请读者批评指正。

本书写作过程中得到东北大学理学院特别是化学系的大力支持,得到李静、武洪燕、田振煌、韩宝福等同学的帮助,在此表示感谢。感谢国家自然科学基金委员会、辽宁省科学技术厅、辽宁省教育厅和东北大学为课题组长期研究所提供的资金等各方面的支持和帮助。

徐淑坤
2011 年

目 录

《现代化学基础丛书》序

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 探针与生物标记技术	1
1.2 纳米材料与生物标记	3
1.2.1 纳米科技与纳米材料	3
1.2.2 用于生物标记的几种纳米颗粒	4
1.3 无机纳米探针的主要类型及其应用进展	6
1.3.1 金纳米颗粒	6
1.3.2 发光量子点	7
1.3.3 稀土掺杂的发光纳米颗粒	9
1.3.4 磁性纳米颗粒	10
1.3.5 荧光碳纳米颗粒	11
1.4 无机纳米探针的应用前景	12
参考文献	13
第 2 章 金属纳米探针	17
2.1 引言	17
2.2 金属纳米颗粒的性质	17
2.2.1 金属纳米颗粒的基本效应	17
2.2.2 金属纳米颗粒的物理特性	19
2.2.3 金属纳米颗粒的化学特性	22
2.3 金属纳米颗粒的制备	23
2.3.1 物理法	24
2.3.2 化学法	25
2.3.3 生物学法	29
2.4 金属纳米颗粒的表征	38
2.4.1 尺度及微观结构测量	39
2.4.2 表面分析	39
2.4.3 化学成分分析	40
2.5 金属纳米颗粒的表面修饰	41

2.5.1 表面修饰方法	41
2.5.2 常用的表面修饰剂	42
2.6 金属纳米颗粒作为探针的应用	44
2.6.1 在核酸检测中的应用	44
2.6.2 在蛋白质检测中的应用	51
2.6.3 在免疫分析中的应用	52
2.6.4 在细胞成像中的应用	56
2.6.5 在其他领域中的应用	58
参考文献	65
第3章 量子点荧光探针	71
3.1 引言	71
3.2 量子点的合成	73
3.2.1 有机金属合成法	73
3.2.2 水相合成法	75
3.2.3 溶胶-凝胶法	77
3.2.4 微乳液法	78
3.2.5 仿生法	78
3.2.6 其他方法	80
3.3 量子点的表面修饰	81
3.3.1 无机壳层修饰法	81
3.3.2 有机配体修饰法	84
3.4 量子点探针的应用	87
3.4.1 量子点作为生物探针的应用	87
3.4.2 量子点作为离子探针的应用	98
3.4.3 量子点作为小分子探针的应用	105
3.4.4 基于荧光增强的量子点“开关”荧光探针	108
参考文献	110
第4章 稀土下转换发光纳米探针	116
4.1 引言	116
4.2 稀土发光纳米材料简介	117
4.2.1 稀土材料的发光特性	117
4.2.2 研究进展	117
4.3 稀土下转换发光纳米材料分类	118
4.3.1 氧化物基质纳米颗粒	118
4.3.2 含氧酸盐基质纳米颗粒	119

4.3.3 氟化物基质纳米颗粒	125
4.4 稀土下转换发光纳米颗粒的合成	127
4.4.1 固相合成法	127
4.4.2 液相合成法	127
4.5 稀土下转换发光纳米颗粒的修饰	133
4.5.1 有机分子修饰	134
4.5.2 硅烷化修饰	137
4.6 稀土下转换发光纳米颗粒的应用	139
4.6.1 对生物分子的标记及免疫分析应用	140
4.6.2 细胞标记成像	144
4.6.3 在发光共振能量转移中的应用	146
4.6.4 在其他方面的应用	147
参考文献	149
第5章 稀土上转换发光纳米探针	152
5.1 引言	152
5.2 上转换发光机理	152
5.2.1 激发态吸收	153
5.2.2 能量传递	154
5.2.3 光子雪崩	158
5.3 稀土上转换发光材料简介	159
5.3.1 上转换发光材料的组成	159
5.3.2 上转换发光材料的种类	160
5.3.3 上转换发光纳米颗粒在生物分析中的应用前景	162
5.4 稀土上转换发光纳米颗粒的合成	163
5.4.1 共沉淀法	163
5.4.2 热分解法	166
5.4.3 水热法	172
5.4.4 溶剂热法	175
5.4.5 其他方法	179
5.4.6 合成方法小结	181
5.5 稀土上转换发光纳米颗粒的表面修饰	182
5.5.1 无机壳层修饰法	183
5.5.2 有机配体修饰法	186
5.6 稀土上转换发光纳米颗粒的生物应用	189
5.6.1 芯片上免疫反应的检测	190

5.6.2 细胞成像	190
5.6.3 组织及活体成像	195
5.6.4 基于发光共振能量转移的生物检测	198
5.6.5 基于磁性分离的生物检测	202
参考文献	203
第6章 磁性纳米探针	207
6.1 磁性简介	207
6.2 磁性纳米粒子的合成	207
6.2.1 沉淀法	208
6.2.2 水/溶剂热法	208
6.2.3 溶胶-凝胶法	210
6.2.4 微波辅助加热法	210
6.2.5 其他方法	212
6.3 磁性纳米粒子的表面修饰	212
6.3.1 硅烷化修饰	213
6.3.2 高分子聚合物修饰	213
6.3.3 有机小分子修饰	215
6.4 磁性纳米粒子的应用	215
6.4.1 磁共振成像	215
6.4.2 药物输送	216
6.4.3 生物分离	217
6.4.4 靶向热疗	219
6.5 与其他纳米粒子的复合	219
6.5.1 磁性纳米金	219
6.5.2 磁性量子点	225
6.5.3 磁性稀土发光纳米材料	231
参考文献	238
第7章 荧光碳纳米探针	242
7.1 荧光碳点	242
7.1.1 荧光碳点的制备	243
7.1.2 荧光碳点的应用	251
7.2 纳米金刚石	256
7.2.1 纳米金刚石的制备	256
7.2.2 荧光纳米金刚石的应用	259
参考文献	261

第 1 章 绪 论

1.1 探针与生物标记技术

作为一门与人类健康密切相关的学科,生命科学一直是备受人们关注的学科之一。生命科学的飞速发展对分析化学提出了大量新课题,主要集中在多肽、蛋白质、核酸等生物大分子的分析,生物药物分析,超痕量、超微量生物活性物质分析,甚至微生物分析等方面。其中,生物大分子分析是生命科学研究的重点,识别和检测多肽、蛋白质、核酸等生物大分子,是研究其生理功能的基础,也是人类研究纷繁复杂的生命过程的基础。为了适应这种形势的需要,众多分析化学家正在不断努力开发新的方法和技术。如果将具有标志性信号的材料,如不同颜色的染料分子、能发射强荧光的分子、具有磁性或放射性的分子等,通过化学键或非共价键与待识别的生物组织连接起来,就可以直观地观察和分析该生物组织的存在和变化,这些都是生物标记技术所涉及的内容。

所谓探针(probe),在生物化学与分子生物学的方法与技术二级学科中是指分子生物化学和生物化学实验中用于指示特定物质(如核酸、蛋白质、细胞结构等)的性质或物理状态的一类标记分子,或者一些仪器的探测器,如 pH 探头、离子探头等。目前所说的生物探针通常是指生物分析中应用的各类标记物。

生物标记技术又称为生物示踪,是分子生物学中最常用、最重要的技术之一。它可以为人们提供待测生物分子在生物体内或生物体外的存在、表达、分布等各种信息,对于整个生物个体中物质代谢过程的研究具有重要意义^[1]。利用生物标记技术还可以揭示生物体内和细胞内生理过程的奥秘,理解生命活动的物质基础,如蛋白质的生物合成,核酸的结构、表达、分布和代谢,基因的活性表达等一些生物学中的根本问题。生物标记技术和显微成像技术的结合使人们对生物器官、组织、细胞的精细结构有了更深刻的认识,极大地促进了医学研究从宏观向微观的转化。生物标记技术与免疫学原理相结合则可以实现对生物大分子的定量检测。

生物大分子自身的结构因素限制了其检测的灵敏度,为获得可测量的信号常常需要引入标记物,标记物在生物标记中起着至关重要的作用。针对不同的标记物需要采用不同的检测方法来读取标记物的检测信号,按照标记物种类的不同,可将生物标记分为放射性同位素标记、酶标记、化学发光标记和荧光标记 4 种^[2]。表 1.1 列出了上述 4 种标记方法及其相应的特点。

表 1.1 生物标记的 4 种类型及各自特点

标记方法	优点	局限
放射性同位素标记	检测灵敏度很高($10^{-9} \sim 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 干扰少, 信号稳定; 对样品生物活性的影响比较小	存在放射性污染危险; 寿命短、难以获得长期稳定的检测标准; 试剂和仪器较贵、操作烦琐费时
酶标记	生物显色时间较长; 检测下限较低(fg 数量级); 操作安全简便	酶不稳定、需保温维持其活性; 对抑制和变性能敏感; 非特异性吸附较重; 测量动态范围窄; 精密度不高
化学发光标记	灵敏度高、特异性好; 检测限低, 可达 $10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 仪器简单、价格便宜、检测快速	发光瞬间完成、发光的峰值衰减很快; 发光不稳定、易受外界环境影响; 样品发光重现性差
荧光标记	检测灵敏度高、选择性好; 可测定参数多、测量动态范围宽; 操作简便、对样品无损伤	存在检测背景干扰; 对标记物的性能要求较高

其中, 荧光标记法具有灵敏度高、选择性好、可测定的参数多、操作简便、结果直观和对样品无损伤等诸多优点, 能够有效弥补其他 3 种生物标记方法的不足, 目前已成为最受关注的生物标记方法, 并被广泛地应用于生物分析领域中。利用荧光标记技术既可以对细胞和组织进行成像研究, 又可以对生物大分子或其他分子及离子等进行定量检测。

荧光标记研究的核心是寻找性能优良的荧光物质作为标记物, 荧光标记物的选择应遵循以下 7 个原则^[3]:

- (1) 标记物易与生物分子牢固结合, 因此要求标记物表面具有活泼的基团;
- (2) 标记物与生物体偶联后应不影响生物体本身的活性;
- (3) 荧光标记物应具有较好的化学稳定性和光化学稳定性;
- (4) 荧光标记物应具有良好的光吸收和较高的荧光量子产率;
- (5) 荧光标记物的荧光发射波长最好大于 500 nm, 以减少背景荧光的干扰;
- (6) 荧光标记物的最大吸收最好能在长波光谱区域内, 这样既可以避免使用紫外光源又可以减少背景荧光的干扰;
- (7) 荧光标记物的 Stokes 位移(最大激发光波长与发射光波长的距离)应至少大于 50 nm, 以减少样品散射光的干扰。

有机染料是最早应用于生物荧光标记的一类发光材料, 早期应用于生物荧光标记的有机染料主要是荧光素(fluorescein)和罗丹明(rhodamine)。但是, 由于它们的 Stokes 位移小, 荧光寿命短, 发光性质受 pH 影响较大, 且与生物组织的自体荧光具有相似的发射光谱, 导致检测灵敏度下降, 所以应用受到很大限制^[4]。近年来, 随着有机染料基础理论和制备技术的发展, 一批性能更好的新型有机染料被逐

步应用于生物标记,具有代表性的是菁染料^[5](cyanine dyes)和 Alexa 染料^[6]。菁染料主要包括酞菁类染料和花菁类染料,菁染料的光谱性质极大地依赖于其分子结构上烯烃链的长度。基于这一原理,目前已经合成了一系列具有不同发射波长的菁类染料,其发射波长已经拓展到了近红外区域。但是有研究表明,当菁类染料分子结构上烯烃链的长度达到一定值后,继续增加链长会导致其发光效率显著降低^[7],因此目前近红外光菁染料的发光性能普遍不佳。Alexa 染料是由罗丹明、氨基香豆素(aminocoumarin)和羰花青(carbocyanine)等传统染料经磺化后得到的一系列染料^[8]。在传统染料分子上引入磺酸基后会使其带上负电荷,从而使染料分子的亲水性增强,与生物分子的连接也变得更加容易。不过,表面带负电荷的 Alexa 染料在某些情况下会与带正电荷的细胞发生非特异性的静电吸附,从而限制了 Alexa 染料的应用范围。

有机染料因具有成本低廉、分子质量小、易于标记、水溶性好的优点,曾在生物标记中发挥巨大的作用,其中大部分仍是目前十分活跃的荧光标记材料。但是,这类材料存在很多严重的缺陷,如激发光谱窄、发射光谱宽且有拖尾,稳定性差、容易光漂白等^[9]。虽然新开发的一些新型有机染料其各方面性能都有一定程度的提高,但是它们仍然无法从根本上摆脱有机染料与生俱来的缺陷,在实际应用中受到了很大的限制。

随着纳米科技的迅速发展,纳米材料在生物标记中的应用引起了人们的广泛关注^[2,10]。利用纳米颗粒作为新型标记物用于生物标记,不仅能够有效克服传统标记物的缺陷,还为生物标记技术拓宽了发展的方向。纳米科技与生物技术的结合,不仅为研究和改造生物分子结构提供了新颖的技术手段和思维方式,也为实现纳米科技的最终目标开辟了可行的途径。

1.2 纳米材料与生物标记

1.2.1 纳米科技与纳米材料

早在 1959 年,美国物理学家、诺贝尔奖获得者 Richard Feynman 就在其著名演讲^[11]中提出:如果能够在微小的尺度上操控物质的结构,将会看到物质的物理化学性质发生异常的变化。这位科学家设想:如果有朝一日,人们能把百科全书存储在一个针尖大小的空间里,并能移动原子,那将会给科学带来什么?实质上, Richard Feynman 已经预见性地提出了一种崭新的技术,即纳米科技。

纳米科技研究尺寸为 1~100 nm 的物质组成体系的运动规律和相互作用,以及可能的实际应用中的技术问题^[12]。20 世纪 80 年代,随着扫描隧道显微镜和原子力显微镜的问世,纳米科技得到了迅猛发展。到了 20 世纪 90 年代,人工制备的

纳米材料已经达到百种以上。1990年7月在美国巴尔的摩召开的第一届NST(Nanoscale Science and Technology)会议,标志着纳米科技的正式诞生^[13]。时至今日,纳米科技已经与多种学科结合起来并形成了比较完备的研究体系,包括纳米物理学、纳米化学、纳米材料学、纳米生物学、纳米电子学、纳米加工学、纳米力学7个相对独立而又相互渗透的学科,以及纳米材料、纳米器件、纳米尺度的检测与表征3个研究领域。据专家推测,纳米技术、信息技术和生物技术将成为21世纪社会经济发展的三大支柱。

纳米材料的制备及性质研究是纳米科技的基础,也是纳米科技领域中最活跃、最丰富、最接近应用的重要组成部分。通常认为,纳米材料是指其基本颗粒为1~100 nm的材料^[14]。按照近代固体物理学观点,纳米材料依据三维空间中未被纳米尺度约束的自由度计,大致可分为3类^[15]:①零维纳米材料,是指3个维度均在纳米尺度的纳米材料,如纳米微粒、纳米团簇等,即所谓的量子点;②一维纳米材料,是指在空间三维中有二维处于纳米尺度的纳米材料,如纳米线、纳米棒、纳米管等,即所谓的量子线;③二维纳米材料,是指在空间三维中只有一维在纳米尺度的纳米材料,如多层膜、超薄膜、超晶格等,即所谓的量子阱。目前,广义的纳米材料是指三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围或由它们作为基本单元所构成的材料^[16]。

纳米颗粒是由有限数量的原子或分子组成,保持原来物质的化学性质并处于亚稳态的原子团或分子团。当颗粒的尺度减小时,其表面原子数的相对比例增大,使单原子的表面能迅速增大。当尺度减小到纳米级别时,颗粒的电子态密度逐渐由连续分布过渡到类似于原子能级的分立分布^[17],此种变化反馈到物质结构和性能上,就会显示出一系列奇特的效应,如小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应、量子限域效应、宏观量子隧道效应以及熔点降低等。除此之外,纳米材料还表现出在此基础上的其他特性,如介电限域效应、表面缺陷以及量子隧穿效应等^[18]。正是由于这些特性,纳米材料呈现出许多奇异的物理、化学性质,如光学、力学、电学、磁学、热学和催化等性质,从而使纳米材料具有更为广阔的应用前景。当前,纳米材料的研究得到了迅速发展,近15年来国内外有关纳米材料的制备及其应用的论文及论著的发展趋势如图1.1所示(截至2010年底),其研究成果已经涉及材料、化学、物理、生物、医学等多个领域。我国的学者在纳米科学领域的研究也非常活跃,目前处于国际研究的前列(图1.2)。

1.2.2 用于生物标记的几种纳米颗粒

随着对生命科学认识的不断深入,人们认为生物世界是由纳米级单元构成的,生命系统是由纳米尺度上的分子的行为所控制的。例如,血液中红细胞的大小为6000~9000 nm,普通细菌的长度为2000~3000 nm,病毒尺寸一般为几十纳米,蛋

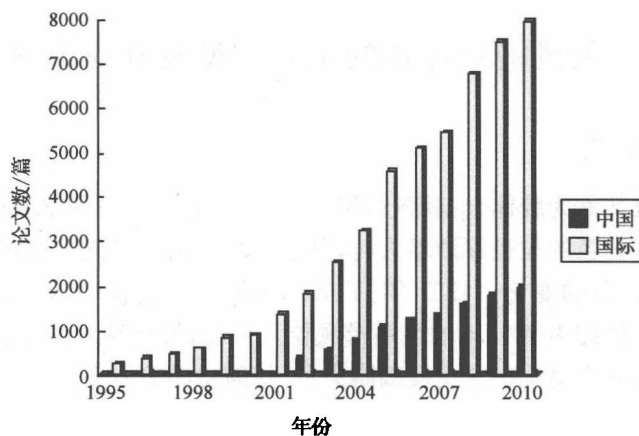


图 1.1 纳米材料的制备及其应用的论文及论著的发展趋势

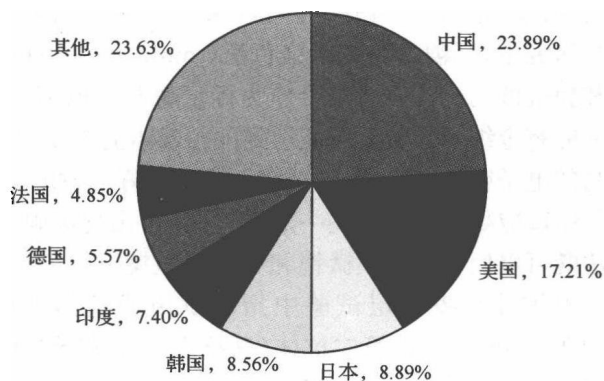


图 1.2 纳米材料的制备及其应用的论文分布情况

白质的尺寸为 $1\sim 20\text{ nm}$ ，生物体内的 RNA 蛋白质复合体的线度为 $15\sim 20\text{ nm}$ ，DNA 链的直径约为 1 nm 等^[2]。纳米颗粒的尺寸为 $1\sim 100\text{ nm}$ ，与常见生物分子（如蛋白质、核酸等）的尺寸相当，这为生物学提供了一个新的研究方向，即把纳米颗粒作为标记物使之进入生物组织内部以探测生物分子的生理功能，进而在分子水平上揭示生命过程^[19,20]。目前，应用于生物标记的无机纳米颗粒主要有金纳米颗粒、半导体量子点、稀土掺杂的发光（包括发射下转换荧光和上转换荧光）纳米粒子以及碳点等^[21-24]。

1.3 无机纳米探针的主要类型及其应用进展

1.3.1 金纳米颗粒

金纳米颗粒又称为胶体金,其颗粒尺寸为1~100 nm,是研究较早的一种纳米材料。当金纳米颗粒的粒径逐渐增大时,其表观颜色依次呈现出橙黄色、葡萄酒红色、深红色和蓝紫色的变化。1951年,Turkevitch等^[25]首次引入柠檬酸盐还原氯金酸制备出了粒径约为20 nm的金纳米颗粒。目前,将金纳米颗粒作为标记物用于生物标记的研究主要集中在免疫细胞染色、核酸检测等方面。

金纳米颗粒表面带有较多的电荷,能够对蛋白质等大分子进行吸附结合而不影响蛋白质的生物活性。利用这种表面吸附作用可以将蛋白质吸附在金纳米颗粒表面,即得到金纳米颗粒标记的蛋白质。抗原和抗体等免疫球蛋白也可以通过这种吸附作用与金纳米颗粒相结合。1971年,Faulk等^[26]首次将金纳米颗粒作为标记物引入到免疫学研究中,开创了免疫金染色法(immunogold-staining, IGS)。他们将金纳米颗粒和兔抗沙门氏菌血清结合作为标记物并与该菌共同孵育,吸附有金纳米颗粒的抗体能将金纳米颗粒定向载运到固相载体上抗原的相应位置。由于金纳米颗粒有很高的电子密度,在电子显微镜下具有良好的衬度,当金纳米颗粒在固相载体上抗原抗体反应处聚集并达到一定密度时,可出现肉眼可见的粉红色斑点。免疫金染色法既可以用于电子显微镜和光学显微镜下抗原的定位、定性和定量研究,也可以用于体外免疫夹层试验中指示抗原或抗体的存在。1974年,Romano等^[27]将金纳米颗粒标记在第二抗体(马抗人免疫球蛋白)上,从而建立了间接免疫金染色法。1987年,Teasdale等^[28]基于金催化银还原的原理创立了免疫金银染色法(immunogold-silver staining, IGSS),该方法在免疫金标记的基础上增加了一个染色标记物放大的过程,利用银的增强作用使检测的灵敏度大大提高。

当金纳米颗粒分散在溶液中时,溶液的颜色会随着金纳米颗粒之间距离的变化而变化,这是由金纳米颗粒的表面等离子体共振引起的。基于这一性质,Mirkin等^[29]在1996年首次利用巯基与金纳米颗粒表面强烈的共价结合力将3'端或5'端连接有巯基的单链DNA固定到金纳米颗粒表面,形成金纳米颗粒标记的DNA探针,从而建立了用该探针检测特定多核苷酸序列的新方法,为特定DNA序列检测的研究和应用开辟了新领域。其原理是将金纳米颗粒标记的寡核苷酸探针与靶序列杂交,从而形成了伸展的金纳米颗粒和多核苷酸的聚集体,通过检测溶液颜色的相应变化实现对DNA的测定,该检测方法属于光学比色分析法。此外,借助表面等离子体共振^[30]、表面增强拉曼散射^[31]及电学检测^[32-35]等分析检测技术,金纳米颗粒在核酸检测中的应用更为广泛。有文献系统详尽地叙述了金纳米颗粒的研究