



同济大学 1907-2017
Tongji University



同济博士论丛
TONGJI Dissertation Series

总主编 伍江 副总主编 雷星晖

朱安伟 田 阳 著

基于无机-有机功能纳米材料检测 金属离子及其生物成像

Inorganic-Organic Functional Nanomaterials
for Biosensing and Bioimaging of Metal Ions



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS



总主编 伍江 副总主编 雷星晖

朱安伟 田阳 著

基于无机-有机功能纳米材料检测 金属离子及其生物成像

Inorganic-Organic Functional Nanomaterials
for Biosensing and Bioimaging of Metal Ions



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

内 容 提 要

本书将特异性识别单元(有机小分子、生物分子)与无机纳米材料(半导体量子点、碳纳米点、石墨烯量子点)复合,发展了三种 Cu^{2+} 比率型荧光探针。通过在 CdSe/ZnS 量子点表面同时组装 AE-TPEA 与 PYEA,制备了具有双发射荧光的比率型荧光探针 QDs@PYEA-TPEA ,并且实现了比率荧光成像活细胞内 Cu^{2+} 浓度的变化;设计并合成了 Cu^{2+} 比率型荧光探针 CdSe@C-TPEA ,不仅实现了可视化灵敏检测 Cu^{2+} 的浓度,而且基于碳纳米点复合材料实现了比率荧光成像细胞内 Cu^{2+} 的浓度变化;设计并合成了具有双光子吸收的无机-有机功能纳米材料 $\text{GQDs@Nile-E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$,发展了一种高灵敏、高选择性检测 Cu^{2+} 的比率型荧光探针,并将其应用于双光子比率型荧光成像活细胞和组织切片内的 Cu^{2+} ,并进一步研究了抗坏血酸处理细胞对去铜超氧化物歧化酶重组 Cu^{2+} 的影响。

本书可作为从事无机-有机功能纳米材料研究与应用的研发及工程技术人员参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

基于无机-有机功能纳米材料检测金属离子及其生物
成像/朱安伟,田阳著. —上海:同济大学出版社,
2017.8

(同济博士论丛/伍江总主编)

ISBN 978-7-5608-7029-8

I. ①基… II. ①朱…②田… III. ①生物分析-荧
光探头-纳米材料-铜离子-生物-图象处理-研究
IV. ①Q503②TB383

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 093900 号

基于无机-有机功能纳米材料检测金属离子及其生物成像

朱安伟 田 阳 著

出 品 人 华春荣 责任编辑 胡哈欣 助理编辑 翁 晗
责任校对 徐春莲 封面设计 陈益平

出版发行 同济大学出版社 www.tongjipress.com.cn

(地址:上海市四平路 1239 号 邮编:200092 电话:021-65985622)

经 销 全国各地新华书店

排版制作 南京展望文化发展有限公司

印 刷 浙江广育爱多印务有限公司

开 本 787 mm×1092 mm 1/16

印 张 9.25

字 数 185 000

版 次 2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5608-7029-8

定 价 50.00 元

本书若有印装质量问题,请向本社发行部调换 版权所有 侵权必究



“同济博士论丛”编写领导小组

组 长：杨贤金 钟志华

副 组 长：伍 江 江 波

成 员：方守恩 蔡达峰 马锦明 姜富明 吴志强
徐建平 吕培明 顾祥林 雷星晖

办公室成员：李 兰 华春荣 段存广 姚建中

“同济博士论丛”编辑委员会

总 主 编：伍 江

副 总 主 编：雷星晖

编委会委员：（按姓氏笔画顺序排列）

丁晓强	万 钢	马卫民	马在田	马秋武	马建新
王 磊	王占山	王华忠	王国建	王洪伟	王雪峰
尤建新	甘礼华	左曙光	石来德	卢永毅	田 阳
白云霞	冯 俊	吕西林	朱合华	朱经浩	任 杰
任 浩	刘 春	刘玉擎	刘滨谊	闫 冰	关侗红
江景波	孙立军	孙继涛	严国泰	严海东	苏 强
李 杰	李 斌	李风亭	李光耀	李宏强	李国正
李国强	李前裕	李振宇	李爱平	李理光	李新贵
李德华	杨 敏	杨东援	杨守业	杨晓光	肖汝诚
吴广明	吴长福	吴庆生	吴志强	吴承照	何品晶
何敏娟	何清华	汪世龙	汪光焘	沈明荣	宋小冬
张 旭	张亚雷	张庆贺	陈 鸿	陈小鸿	陈义汉
陈飞翔	陈以一	陈世鸣	陈艾荣	陈伟忠	陈志华
邵嘉裕	苗夺谦	林建平	周 苏	周 琪	郑军华
郑时龄	赵 民	赵由才	荆志成	钟再敏	施 骞
施卫星	施建刚	施惠生	祝 建	姚 熹	姚连璧

袁万城	莫天伟	夏四清	顾 明	顾祥林	钱梦騄
徐 政	徐 鉴	徐立鸿	徐亚伟	凌建明	高乃云
郭忠印	唐子来	閻耀保	黄一如	黄宏伟	黄茂松
戚正武	彭正龙	葛耀君	董德存	蒋昌俊	韩传峰
童小华	曾国荪	楼梦麟	路秉杰	蔡永洁	蔡克峰
薛 雷	霍佳震				

秘书组成员：谢永生 赵泽毓 熊磊丽 胡晗欣 卢元姗 蒋卓文

总序

在同济大学 110 周年华诞之际，喜闻“同济博士论丛”将正式出版发行，倍感欣慰。记得在 100 周年校庆时，我曾以《百年同济，大学对社会的承诺》为题作了演讲，如今看到付梓的“同济博士论丛”，我想这就是大学对社会承诺的一种体现。这 110 部学术著作不仅包含了同济大学近 10 年 100 多位优秀博士研究生的学术科研成果，也展现了同济大学围绕国家战略开展学科建设、发展自我特色，向建设世界一流大学的目标迈出的坚实步伐。

坐落于东海之滨的同济大学，历经 110 年历史风云，承古续今、汇聚东西，秉持“与祖国同行、以科教济世”的理念，发扬自强不息、追求卓越的精神，在复兴中华的征程中同舟共济、砥砺前行，谱写了一幅幅辉煌壮美的篇章。创校至今，同济大学培养了数十万工作在祖国各条战线上的人才，包括人们常提到的贝时璋、李国豪、裘法祖、吴孟超等一批著名教授。正是这些专家学者培养了一代又一代的博士研究生，薪火相传，将同济大学的科学研究和学科建设一步步推向高峰。

大学有其社会责任，她的社会责任就是融入国家的创新体系之中，成为国家创新战略的实践者。党的十八大以来，以习近平同志为核心的党中央高度重视科技创新，对实施创新驱动发展战略作出一系列重大决策部署。党的十八届五中全会把创新发展作为五大发展理念之首，强调创新是引领发展的第一动力，要求充分发挥科技创新在全面创新中的引领作用。要把创新驱动发展作为国家的优先战略，以科技创新为核心带动全面创新，以体制机制改

革激发创新活力,以高效率的创新体系支撑高水平的创新型国家建设。作为人才培养和科技创新的重要平台,大学是国家创新体系的重要组成部分。同济大学理当围绕国家战略目标的实现,作出更大的贡献。

大学的根本任务是培养人才,同济大学走出了一条特色鲜明的道路。无论是本科教育、研究生教育,还是这些年摸索总结出的导师制、人才培养特区,“卓越人才培养”的做法取得了很好的成绩。聚焦创新驱动转型发展战略,同济大学推进科研管理体系改革和重大科研基地平台建设。以贯穿人才培养全过程的一流创新创业教育助力创新驱动发展战略,实现创新创业教育的全覆盖,培养具有一流创新力、组织力和行动力的卓越人才。“同济博士论丛”的出版不仅是对同济大学人才培养成果的集中展示,更将进一步推动同济大学围绕国家战略开展学科建设、发展自我特色、明确大学定位、培养创新人才。

面对新形势、新任务、新挑战,我们必须增强忧患意识,扎根中国大地,朝着建设世界一流大学的目标,深化改革,勠力前行!

万 钢

2017年5月

论丛前言

承古续今,汇聚东西,百年同济秉持“与祖国同行、以科教济世”的理念,注重人才培养、科学研究、社会服务、文化传承创新和国际合作交流,自强不息,追求卓越。特别是近20年来,同济大学坚持把论文写在祖国的大地上,各学科都培养了一大批博士优秀人才,发表了数以千计的学术研究论文。这些论文不但反映了同济大学培养人才能力和学术研究的水平,而且也促进了学科的发展和国家的建设。多年来,我一直希望能有机会将我们同济大学的优秀博士论文集中整理,分类出版,让更多的读者获得分享。值此同济大学110周年校庆之际,在学校的支持下,“同济博士论丛”得以顺利出版。

“同济博士论丛”的出版组织工作启动于2016年9月,计划在同济大学110周年校庆之际出版110部同济大学的优秀博士论文。我们在数千篇博士论文中,聚焦于2005—2016年十多年间的优秀博士学位论文430余篇,经各院系征询,导师和博士积极响应并同意,遴选出近170篇,涵盖了同济的大部分学科:土木工程、城乡规划学(含建筑、风景园林)、海洋科学、交通运输工程、车辆工程、环境科学与工程、数学、材料工程、测绘科学与工程、机械工程、计算机科学与技术、医学、工程管理、哲学等。作为“同济博士论丛”出版工程的开端,在校庆之际首批集中出版110余部,其余也将陆续出版。

博士学位论文是反映博士研究生培养质量的重要方面。同济大学一直将立德树人作为根本任务,把培养高素质人才摆在首位,认真探索全面提高博士研究生质量的有效途径和机制。因此,“同济博士论丛”的出版集中展示同济大

学博士研究生培养与科研成果,体现对同济大学学术文化的传承。

“同济博士论丛”作为重要的科研文献资源,系统、全面、具体地反映了同济大学各学科专业前沿领域的科研成果和发展状况。它的出版是扩大传播同济科研成果和学术影响力的重要途径。博士论文的研究对象中不少是“国家自然科学基金”等科研基金资助的项目,具有明确的创新性和学术性,具有极高的学术价值,对我国的经济、文化、社会发展具有一定的理论和实践指导意义。

“同济博士论丛”的出版,将会调动同济广大科研人员的积极性,促进多学科学术交流、加速人才的发掘和人才的成长,有助于提高同济在国内外的竞争力,为实现同济大学扎根中国大地,建设世界一流大学的目标愿景做好基础性工作。

虽然同济已经发展成为一所特色鲜明、具有国际影响力的综合性、研究型大学,但与世界一流大学之间仍然存在着一定差距。“同济博士论丛”所反映的学术水平需要不断提高,同时在很短的时间内编辑出版 110 余部著作,必然存在一些不足之处,恳请广大学者,特别是有关专家提出批评,为提高同济人才培养质量和同济的学科建设提供宝贵意见。

最后感谢研究生院、出版社以及各院系的协作与支持。希望“同济博士论丛”能持续出版,并借助新媒体以电子书、知识库等多种方式呈现,以期成为展现同济学术成果、服务社会的一个可持续的出版品牌。为继续扎根中国大地,培育卓越英才,建设世界一流大学服务。

伍 江

2017 年 5 月

前言

铜是人体内第三丰度的微量金属元素,其氧化还原性对于有机体维持正常的生理功能具有重要的作用。当细胞内铜的动态平衡发生紊乱时会引起氧化应激,并进一步破坏核酸、蛋白质等生物大分子。因此,细胞通过复杂的铜摄取、转运与储存机制,严格控制着细胞内铜的水平与分布。目前,关于高等真核细胞尤其是与脑、心脏、肠、肝等组织相关的特定细胞是如何在亚细胞层次调节铜离子的水平与分布,以及细胞内铜的动态平衡发生紊乱与衰老和疾病的关系的问题还没有理解清楚。因此,发展能够检测活细胞内铜离子的荧光分析法,对于理解铜离子在各种生理病理过程中的复杂作用具有重要的意义。

本书将特异性识别单元(如有机小分子、生物分子)与具有优异光电特性的无机纳米材料(如半导体量子点、碳纳米点、石墨烯量子点)复合发展了三种 Cu^{2+} 比率型荧光探针。通过在羧基化的 CdSe/ZnS 量子点表面修饰有机荧光分子 N -pyridin-4-ylmethylene-ethane-1, 2-diamine (PYEA)和金属离子配体 N -(2-aminoethyl)- N , N' , N' -tris(pyridin-2-ylmethyl)ethane-1,2-diamine(AE-TPEA),既增强了 CdSe/ZnS 量子点对 Cu^{2+} 的选择性,也实现了双发射荧光,并且借助比率荧光成像法检测

到细胞内 Cu^{2+} 的浓度变化。考虑到半导体量子点对环境与生物的潜在危害,而碳纳米点(C-dots)具有出色的生物相容性和表面易于功能化的优点,本书研究将表面覆盖 SiO_2 壳层的 CdSe/ZnS 量子点与 C-dots 组装成纳米复合材料($\text{CdSe}@C$),然后再与有机功能配体 AE-TPEA 耦合,制备了 Cu^{2+} 比率型荧光探针($\text{CdSe}@C\text{-TPEA}$)。由于被包裹在纳米硅球核心, CdSe/ZnS 量子点既不受金属离子干扰,也能避免本身对细胞的毒性。基于该比率型探针良好的选择性、荧光稳定性和生物相容性,实现了基于碳纳米点复合材料的细胞内铜离子传感与荧光成像。为了更好地理解 Cu^{2+} 的动态平衡在某些生理病理过程中的作用,我们通过在石墨烯量子点(GQDs)表面修饰耐尔蓝染料(Nile blue A)和去铜超氧化物歧化酶($\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$),设计并合成了在双光子激发下具有双发射荧光的无机-有机功能纳米探针 $\text{GQD}@ \text{Nile-E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 。由于 $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 能够选择性地与 Cu^{2+} 重组后猝灭 GQDs 的蓝色荧光,而 Nile blue A 不受干扰,所以该纳米探针可以比率型荧光检测 Cu^{2+} 。同时,基于该纳米复合材料优异的生物相容性和荧光稳定性,在实现双光子比率型荧光成像活细胞和组织切片不同深度的 Cu^{2+} 后,我们进一步研究了抗坏血酸处理细胞对去铜超氧化物歧化酶重组过程的影响。

目 录

总序

论丛前言

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 铜离子的研究	1
1.1.1 铜离子的研究意义	1
1.1.2 铜离子的检测方法	2
1.1.3 铜离子的荧光分析法	3
1.2 基于半导体量子点的荧光传感	8
1.3 基于染料掺杂纳米颗粒的传感	12
1.4 发光碳点的研究	14
1.4.1 碳纳米点的介绍	14
1.4.2 碳纳米点的合成	16
1.4.3 发光碳点的性质	23
1.4.4 发光碳点的生物成像	30
1.4.5 石墨烯衍生化的发光碳	31
1.4.6 碳纳米点研究总结与展望	32
1.5 本书的研究目的、内容与创新点	33

1.5.1	研究目的	33
1.5.2	研究内容	35
1.5.3	创新点	35
第2章	基于功能化量子点的比率型荧光探针检测细胞内铜离子	36
2.1	概述	36
2.2	实验部分	38
2.2.1	试剂与材料	38
2.2.2	实验仪器	39
2.2.3	AE-TPEA的合成	39
2.2.4	PYEA的合成	40
2.2.5	CdSe@PYEA-TPEA的制备	40
2.2.6	细胞培养	40
2.2.7	细胞毒性实验	41
2.2.8	荧光寿命测定	42
2.2.9	共聚焦荧光成像	42
2.3	结果与讨论	43
2.3.1	QDs@PYEA-TPEA的表征	43
2.3.2	QDs@PYEA-TPEA检测 Cu^{2+}	47
2.3.3	QDs@PYEA-TPEA的选择性	49
2.3.4	CdSe@C-TPEA的荧光稳定性	53
2.3.5	QDs@PYEA-TPEA的细胞毒性	54
2.3.6	基于QDs@PYEA-TPEA的细胞内 Cu^{2+} 成像与 传感	54
2.4	本章结论	56
第3章	基于碳纳米点复合材料的细胞内铜离子传感与比率荧光 成像	58
3.1	概述	58
3.2	实验部分	60

3.2.1	试剂与材料	60
3.2.2	实验仪器	60
3.2.3	C-dots 的合成	61
3.2.4	AE-TPEA 的合成	61
3.2.5	CdSe@SiO ₂ 与 CdSe@C-TPEA 的制备	61
3.2.6	细胞培养	62
3.2.7	细胞毒性实验	63
3.2.8	共聚焦荧光成像	63
3.3	结果与讨论	64
3.3.1	CdSe@C-TPEA 的表征	64
3.3.2	CdSe@C-TPEA 检测 Cu ²⁺	68
3.3.3	CdSe@C-TPEA 的荧光稳定性	70
3.3.4	CdSe@C-TPEA 的选择性	71
3.3.5	CdSe@C-TPEA 的细胞毒性	73
3.3.6	基于 CdSe@C-TPEA 的细胞内 Cu ²⁺ 成像与 传感	75
3.4	本章结论	76

第 4 章 基于石墨烯量子点的双光子比率型探针荧光成像细胞和组织内的铜离子

4.1	概述	78
4.2	实验部分	80
4.2.1	试剂与材料	80
4.2.2	实验仪器	80
4.2.3	石墨烯量子点的合成	81
4.2.4	去铜超氧化物歧化酶的制备	81
4.2.5	纳米复合探针 GQD@Nile-E ₂ Zn ₂ SOD 的制备	81
4.2.6	线性光学实验	82
4.2.7	双光子荧光光谱与双光子作用截面	82
4.2.8	荧光寿命测定	82

4.2.9	双光子显微镜	83
4.2.10	细胞培养	83
4.2.11	细胞毒性实验	84
4.2.12	细胞流式实验	85
4.2.13	组织切片的制备与染色	86
4.3	结果与讨论	86
4.3.1	GQD@Nile - E ₂ Zn ₂ SOD 的表征	86
4.3.2	GQD@Nile - E ₂ Zn ₂ SOD 检测 Cu ²⁺	91
4.3.3	GQD@Nile - E ₂ Zn ₂ SOD 的选择性	93
4.3.4	GQD@Nile - E ₂ Zn ₂ SOD 的细胞毒性	95
4.3.5	基于 GQD@Nile - E ₂ Zn ₂ SOD 的细胞内 Cu ²⁺ 成像与传感	95
4.3.6	基于 GQD@Nile - E ₂ Zn ₂ SOD 的组织内 Cu ²⁺ 成像与传感	99
4.4	本章结论	101
第 5 章	结论与展望	102
5.1	结论	102
5.2	展望	103
参考文献		105
后 记		129

第 1 章

绪 论

1.1 铜离子的研究

1.1.1 铜离子的研究意义

铜是人体内第三丰度的微量金属元素。不仅合成化学家利用铜离子催化合成不同的化学键^[1-5],在许多生理活动中铜离子也具有极其重要的作用。由于铜离子可以在合适的电位窗口进行氧化还原反应^[6],例如 Cu^{2+} 可以被细胞内丰富的抗氧化剂谷胱甘肽或者生理还原剂抗坏血酸所还原,也可以被广泛存在的双氧所氧化^[7-8],所以铜离子既可作为辅酶因子催化生化反应(酪氨酸羟基化与黑色素的形成),也可以维持生物氧化平衡(通过超氧化物歧化酶催化降解超氧阴离子)^[9-17]。

然而,细胞内铜的动态平衡发生紊乱与一些严重疾病存在某种关联^[18-19]。例如,造成胚胎与神经发育受阻的门克斯病表现出铜流动受阻,而且门克斯病患者通常存活不到三年^[20-21]。此外,与铜稳态失调有紧密关系的神经退行性疾病还包括阿尔茨海默症^[22-23]、帕金森症^[24-26]和淀粉样蛋白侧索硬化^[27]。因此,细胞需要通过复杂的铜摄取、转运与储存机制严格控制细胞内的铜的水平与分布。