



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107629792 A

(43)申请公布日 2018.01.26

(21)申请号 201710919433.0

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2017.09.30

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 华南师范大学

地址 510006 广东省广州市番禺区广州大学城外环西路378号华南师范大学理科5栋

(72)发明人 詹求强 周超 黄冰如

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 刘巧霞

(51)Int.Cl.

G09K 11/85(2006.01)

G09K 11/02(2006.01)

B82Y 20/00(2011.01)

B82Y 40/00(2011.01)

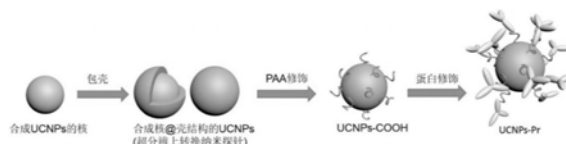
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

上转换超分辨成像纳米探针及其制备方法
和应用

(57)摘要

本发明公开了一种上转换超分辨成像纳米探针及其制备方法和应用,上转换超分辨成像纳米探针具有核@壳结构,制备方法是先采用溶剂热法,制备得到粒径可控、分散性好的稀土上转换纳米颗粒,再经过聚丙烯酸表面修饰,最后进行蛋白质修饰。将上述的上转换超分辨成像纳米探针应用于细胞的亚细胞结构的免疫荧光标记,从而实现亚细胞结构的荧光超分辨成像。相比传统的基于荧光素的超分辨光学成像方法,本发明是一种基于上转换超分辨成像纳米探针的荧光零漂白、零闪烁超分辨显微成像方法,能够对生物样品长时间观察。



1. 上转换超分辨成像纳米探针, 其特征在于: 该探针是具有核@壳结构的上转换纳米颗粒, 该探针的化学组成是: 以 NaYF_4 或 NaGdF_4 为基质、按照一定比例掺杂至少两种的镧系稀土元素; 合成的上转换纳米颗粒粒径大小为3~20nm;

所述探针具有光控损耗发光的特性: 根据掺杂元素不同, 每一种探针存在一激发光A波长, 在该A波长光激发下能得到强度高于一定阈值的荧光, 存在一损耗光B波长, 在该B波长损耗光作用下能进行荧光损耗。

2. 将权利要求1所述的上转换超分辨成像纳米探针应用于细胞的亚细胞结构的免疫荧光标记, 并进行亚细胞结构的荧光超分辨成像。

3. 一种权利要求1所述上转换超分辨成像纳米探针的制备方法, 包括步骤: 首先, 使用现有的溶剂热法制备出粒径可控、大小均匀且分散性良好的油溶性上转换纳米颗粒; 其次, 对油溶性上转换纳米颗粒进行亲水性羧基修饰, 使其表面性质由疏水变为亲水性, 并带有丰富的羧基, 然后对上转换纳米颗粒进行蛋白修饰, 进一步标记具有生物活性的抗体蛋白, 进而制备出上转换超分辨成像纳米探针。

4. 根据权利要求3所述的上转换纳米颗粒的制备方法, 其特征在于, 使用现有的溶剂热法制备出油溶性上转换纳米颗粒的步骤如下:

(1) 合成油溶性上转换纳米颗粒的核结构:

在油酸/1-十八烯体系中, 加入一定比例的Y (CH_3CO_2)₃或Gd (CH_3CO_2)₃溶液, 再按照一定掺杂比例加入另外至少两种Ln (CH_3CO_2)₃溶液, 其中Ln为镧系稀土元素, 敞口加热到一定温度以去除反应体系中的水分;

降至室温后, 逐滴加入适量的 NH_4 -甲醇溶液和NaOH-甲醇溶液, 水浴搅拌一段时间;

随后撤去水浴, 体系加热升温、抽真空并彻底除去甲醇;

结束抽真空, 氩气氛围下在220℃~300℃反应一段时间; 随后降至室温, 加入无水乙醇后进行离心操作弃去上清液收集产物;

用乙醇和环己烷混合液清洗, 获得上转换纳米颗粒的核, 产物分散在环己烷中, 用于下一步的反应;

(2) 合成核@壳结构:

上转换纳米颗粒核和惰性壳的物质的量比为1:1, 向三口圆底烧瓶中加入一定量Y (CH_3CO_2)₃或Gd (CH_3CO_2)₃溶液, 在油酸/十八烯的混合体系中敞口加热到一定温度并不断搅拌, 以去除水分;

反应降至80℃, 加入等比例步骤(1)合成的上转换纳米颗粒的核, 保持一段时间除去环己烷;

随后在40℃水浴的情况下, 逐滴加入适量 NH_4 -甲醇溶液和NaOH-甲醇溶液, 保持该温度并搅拌一段时间;

升温抽真空彻底除去甲醇;

最后体系在氩气氛围保护下220℃~300℃反应一段时间;

反应结束后降至室温, 加入适量无水乙醇, 进行离心操作, 弃去上清液收集产物; 用乙醇/环己烷混合液清洗, 加入环己烷溶解, 获得制备的核@壳结构上转换纳米颗粒。

5. 根据权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 对油溶性上转换纳米颗粒进行亲水性羧基修饰的步骤是:

称取适量的DEG和PAA加入三口圆底烧瓶,混合搅拌加热至110℃~120℃,在氩气氛围保护下反应1h~2h;

缓慢加入适量上述合成的核壳上转换纳米颗粒溶液,抽真空;

氩气氛围保护下230℃~250℃反应1h~2h;降至室温,往体系中加入15~20ml的1%稀盐酸搅拌反应,进行离心操作,弃去上清液收集产物;

随后用50%的乙醇和去离子水清洗;

最后,去离子水溶解产物,制得羧基修饰的上转换纳米颗粒,记作UCNPs-COOH。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,采用EDC/NHS介导的氨基、羧基反应的共价偶联方法对上转换纳米颗粒进行蛋白修饰。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,蛋白修饰采用的蛋白质,是靶向亚细胞结构的一抗,或者是能够与靶向亚细胞结构的一抗高效亲和的二抗,或者是能与生物素化一抗高效结合的链霉亲和素;所述的一抗根据不同的亚细胞结构决定。

8. 一种利用权利要求1所述的上转换超分辨成像纳米探针实现超分辨成像的系统,其特征在于,包括激发光生成模块、损耗光生成模块、耦合二向色镜、多光子显微扫描模块、光电探测模块、信号采集器、计算机,所述激发光生成模块用于生成用作近红外激发光的近红外稳态激光束,波长为A,所述损耗光生成模块用于生成用作近红外损耗激光的近红外空心光束,波长为B;所述偏振分光棱镜将互相垂直的近红外稳态激光束与近红外空心光束在空间上共轭耦合成一束耦合激光束,该耦合激光束通过多光子显微扫描模块聚焦在载物台上标记了本发明所述上转换超分辨成像纳米探针的样品上;光电探测模块用于探测纳米颗粒发出的上转换荧光,进而由信号采集器采集后,通过计算机软件实时显示荧光图像。

上转换超分辨成像纳米探针及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于荧光显微成像和免疫荧光技术领域,特别涉及一种上转换超分辨成像纳米探针,以及该探针的制备方法和应用。

背景技术

[0002] 根据德国科学家阿贝 (Abbe) 根据衍射理论首次推导出衍射分辨极限,即能够被光学分辨的两点间的距离约为入射光波长的一半。因此,光学荧光成像技术的分辨率一直限制在200nm左右。这显然不能满足科学家们对亚显微结构的观察与研究。因此,近几年来多种打破光学衍射极限的荧光成像技术被提出和使用,这些突破光学衍射极限的荧光成像技术被称作超分辨荧光成像技术。受激发射损耗荧光显微技术 (Stimulated Emission Depletion Microscopy, 简称STED) 就是其中一种超分辨荧光成像技术。STED荧光成像技术中主要涉及两束光:一束激发光,作用是利用受激辐射使得荧光基团产生荧光;另一束光是损耗光,即是通过相位调制所产生的空心光。作用是将激发光产生的荧光外围光斑淬灭回基态,使得外围荧光被损耗,从而提高荧光成像分辨率。STED的分辨率已经从最初的突破光学衍射极限的100nm,到如今已经能达到数纳米 (5nm左右) 的水平。STED因此成为许多生物学研究中重要的技术手段之一。

[0003] 虽然STED具有许多其他几种超分辨荧光成像技术没有的优势,如:采用激光扫描成像方式、无需复杂的成像重构过程、成像速度快且可进行三维断层扫描等。但是,STED技术仍然面临许多问题和挑战,如:成像深度低,传统的荧光探针易发生光漂白,从而导致无法对生物样品进行长时间观察等。

[0004] 免疫荧光成像技术 (又称荧光抗体技术),根据抗原抗体反应的原理,将荧光素/荧光基团偶联到已知的靶向特异抗原的抗体上制备成荧光探针。与细胞或组织中的特异抗原特异性的结合,细胞中主要是一些亚细胞结构,包括细胞器 (细胞核、线粒体、内质网和溶酶体等) 和一些非细胞器 (微管、微丝和细胞膜等) 的亚细胞结构,从而对待测样品 (细胞或组织) 中的特异抗原进行定性、定量和/或定位的检测、分析。免疫荧光技术包括荧光抗体法、荧光抗原法和免疫荧光细胞/组织化学技术等等。

[0005] 虽然免疫荧光技术具有特异性强、敏感度高、速度快等优势,但是目前的免疫荧光技术也存在着不足。目前免疫荧光技术实验中常用的荧光基团大多都是有机荧光染料,有机荧光染料不仅光化学稳定性差,且易发生光解与光漂白,这非常不利于生物样品 (细胞或组织切片) 的长时间观察。

[0006] 上转换纳米颗粒 (Upconversion nanoparticles, 简称UCNPs) 作为一种新型纳米晶,近年来颇受生物医学领域的关注。主要是因为,上转换纳米颗粒是具有多种光学优势的荧光纳米材料,它能够在两个或多个低能量的光子的低功率密度下发射一个高能量的光子,从而实现能量上转换的目的。此外,上转换纳米材料还具有新颖且令人满意的特性,例如光化学稳定性好、无光漂白、无光闪烁、发射光谱峰狭窄对称和反斯托克斯位移大等。

发明内容

[0007] 本发明的主要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种上转换超分辨成像纳米探针及其制备方法,该探针基于稀土上转换纳米颗粒的特异靶向细胞亚细胞结构,具有荧光零漂白、零闪烁的优点,这里所述的亚细胞结构包括细胞器和一些非细胞器。细胞器主要包括:细胞核、线粒体、内质网和溶酶体等,但不限于此;非细胞器主要包括:微管、微丝、中间丝和细胞膜等,但不限于此。

[0008] 本发明的另一目的在于运用常用的免疫荧光标记方法,将上述的上转换超分辨成像纳米探针应用于细胞的亚细胞结构的免疫荧光标记,并进行亚细胞结构的荧光超分辨成像。

[0009] 本发明的目的通过以下的技术方案实现:一种上转换超分辨成像纳米探针,该探针是具有核@壳结构的上转换纳米颗粒,纳米颗粒的化学组成为:以 NaYF_4 或 NaGdF_4 为基质,再按照一定比例掺杂至少两种(即两种或多种)的镧系稀土元素。合成的上转换纳米颗粒粒径大小为3~20nm。所述探针具有光控损耗发光的特性:根据掺杂元素不同,每一种探针存在一激发光A波长,在该A波长光激发下能得到强度高于一定阈值的荧光,存在一损耗光B波长,在该B波长损耗光作用下能进行荧光损耗。即在采用该上转换超分辨成像纳米探针时,在激发光A波长光激发下可以得到高强度荧光,同时使用另一束B波长的损耗光可以进行荧光损耗,从而具有可进行亚细胞结构的荧光超分辨成像的用途。

[0010] 一种上述上转换超分辨成像纳米探针的制备方法,包括步骤:首先,使用现有的溶剂热法制备出粒径可控、大小均匀且分散性良好的油溶性上转换纳米颗粒;其次,对油溶性上转换纳米颗粒进行亲水性羧基修饰,使其表面性质由疏水变为亲水性,并带有丰富的羧基,然后对上转换纳米颗粒进行蛋白修饰,进一步标记具有生物活性的抗体蛋白,进而制备出上转换超分辨成像纳米探针。

[0011] 优选的,使用现有的溶剂热法制备出油溶性上转换纳米颗粒的步骤如下:

[0012] (1) 合成油溶性上转换纳米颗粒的核结构:

[0013] 在油酸/1-十八烯体系中,先加入一定比例的Y(CH_3CO_2)₃或Gd(CH_3CO_2)₃溶液,再按照一定掺杂比例加入另外两种或多种Ln(CH_3CO_2)₃溶液(其中Ln为镧系稀土元素),敞口加热到140℃~160℃,搅拌反应;

[0014] 降至室温后,逐滴加入适量的 NH_4 -甲醇溶液和NaOH-甲醇溶液,水浴保持在40℃搅拌2h~4h;

[0015] 随后撤去水浴,体系加热升温至100℃~110℃抽真空30min~40min彻底除去甲醇;

[0016] 结束抽真空,氩气氛围下反应升温至220℃~300℃,恒温反应30min~60min;降至室温,加入过量无水乙醇后进行离心操作,弃去上清液收集产物;

[0017] 用乙醇和环己烷混合液清洗,获得上转换纳米颗粒的核,产物分散在环己烷中,用于下一步的反应;

[0018] (2) 合成核@壳结构:

[0019] 上转换纳米颗粒核和惰性壳的物质的量比为1:1,向三口圆底烧瓶中加入等物质的量的Y(CH_3CO_2)₃或Gd(CH_3CO_2)₃溶液,8ml油酸和15ml 1-十八烯,混合体系敞口加热至140

℃~160℃并在该温度下搅拌反应30min~50min;

[0020] 反应降至80℃,加入适量步骤(1)合成的上转换纳米颗粒的核,保持30min~50min除去环己烷;

[0021] 随后在40℃水浴的情况下,逐滴加入适量的NH₄-甲醇溶液NaOH-甲醇溶液,保持该温度并搅拌2h~4h;

[0022] 升温至100℃~110℃抽真空30min~40min彻底除去甲醇;

[0023] 最后体系在氩气氛围保护下升温至220℃~300℃,反应30min~60min;

[0024] 反应结束后降至室温,加入过量无水乙醇,进行离心操作,弃去上清液收集产物;用乙醇和环己烷混合液清洗,加入环己烷溶解,获得制备的核@壳结构上转换纳米颗粒。

[0025] 优选的,对油溶性上转换纳米颗粒进行亲水性羧基修饰的步骤是:

[0026] 取30ml~50mlDEG和0.5g~1g PAA (Mw=1800) 加入三口圆底烧瓶,混合搅拌加热至110℃~120℃,在氩气氛围保护下反应1h~2h;

[0027] 缓慢加入适量上述合成的核壳上转换纳米颗粒溶液,抽真空20min~40min;

[0028] 反应升温至230℃~250℃,氩气氛围保护下反应1h~2h;降至室温,往体系中加入过量的1%稀盐酸搅拌5min~20min,进行离心操作,弃去上清液收集产物;

[0029] 随后用50%的乙醇和去离子水清洗;

[0030] 最后,用去离子水溶解产物,制得羧基修饰的上转换纳米颗粒,记作UCNPs-COOH。

[0031] 优选的,采用EDC/NHS介导的氨基、羧基反应的共价偶联方法进行蛋白修饰。

[0032] 更进一步的,蛋白修饰采用的蛋白质,可以是靶向亚细胞结构的一抗,也可以是能够与靶向亚细胞结构的一抗高效亲和的二抗,还可以是能与生物素化一抗高效结合的链霉亲和素,但不限于此;所述的一抗根据不同的亚细胞结构(靶向抗原)决定;所述的二抗,可以是单抗或多抗。

[0033] 将本发明所述的上转换超分辨成像纳米探针应用于荧光超分辨成像时,采用下述的超分辨显微成像系统,该系统包括激发光生成模块、损耗光生成模块、耦合二向色镜、多光子显微扫描模块、光电探测模块、信号采集器、计算机,所述激发光生成模块用于生成用作近红外激发的近红外稳态激光束,波长为975nm,所述损耗光生成模块用于生成用作近红外损耗激光的近红外空心光束,波长为810nm;所述偏振分光棱镜将互相垂直的近红外稳态激光束与近红外空心光束在空间上共轭耦合成一束耦合激光束,该耦合激光束通过多光子显微扫描模块聚焦在载物台上标记了本发明所述上转换超分辨成像纳米探针的样品上;光电探测模块用于探测纳米颗粒发出的上转换荧光,进而由信号采集器采集后,通过计算机软件实时显示荧光图像。

[0034] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:相比传统的荧光素或其它免疫荧光探针,本发明的超分辨上转换超分辨成像纳米探针,不仅具有传统免疫荧光的特异免疫标记作用,还具有上转换纳米颗粒的优势,例如:长波长激发、光化学稳定性好、发射光谱峰狭窄对称、反斯托克斯位移大和无光漂白等。另外,该免疫荧光探针还能够作为超分辨光学成像探针,实现生物样品的超分辨光学成像。

附图说明

[0035] 图1表示本发明中的上转换超分辨成像纳米探针合成、修饰流程示意图。

[0036] 图2表示实施例1中的上转换超分辨成像纳米探针的透射电镜图。

[0037] 图3表示实施例1中上转换超分辨成像纳米探针($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}(18/8)@\text{NaYF}_4$)的荧光及荧光损耗光谱图。

[0038] 图4(a)表示实施例3中的上转换超分辨成像纳米探针免疫标记的975nm激光单独激发下的细胞骨架荧光成像图。

[0039] 图4(b)表示实施例3中的上转换超分辨成像纳米探针免疫标记的细胞骨架的超分辨荧光成像图。

[0040] 图5表示实施例1中的上转换超分辨成像纳米探针扫描3000次的455nm蓝色荧光的强度变化。图5(a)表示在975nm激光单独激发下,探针扫描3000次的强度变化;图5(b)表示在975nm和810nm激光共同激发下,探针扫描3000次荧光强度发生次数的实验数据。

[0041] 图6表示在0.5秒钟照射下,实施例1中的上转换超分辨成像纳米探针的455nm蓝色荧光的强度变化。图6(a)表示在975nm激光单独激发下,探针在0.5秒钟内的强度变化;图6(b)表示在975nm激光激发下,探针在0.5秒钟内荧光强度发生次数的实验数据和理论模拟;图6(c)表示在975nm和810nm激光共同激发下,探针在0.5秒钟内的强度变化;图6(d)表示在975nm和810nm激光共同激发下,探针在0.5秒钟内荧光强度发生次数的实验数据和理论模拟。

具体实施方式

[0042] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0043] 在本发明实施例中涉及的化学试剂和生物试剂如下:

[0044] 化学试剂:

[0045] $\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ (99.9%, AR)、 $\text{Yb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ (99.9%, AR)、 $\text{Tm}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ (99.9%, AR)、聚丙烯酸(PAA, $M_w \sim 1800$)、二甘醇(DEG, 98%)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC, $\geq 98\%$) 购买于Sigma-Aldrich公司。油酸(OA, 90%)、1-十八烯(1-ODE, 90%)、氢氧化钠(NaOH, $>98\%$)、氟化铵(NH_4F , $>99.99\%$) 购买于Aladdin公司。甲醇、乙醇、环己烷和盐酸(HCl , AR, 36%~38%) 购买于国药集团化学试剂公司。N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 98%) 购买于Thermo Fisher Scientific公司。

[0046] 生物试剂:

[0047] DMEM高糖培养液、胎牛血清(FBS)、磷酸缓冲液(PBS)、胰蛋白酶(0.25%) 购买于Thermo Fisher Scientific公司。4%多聚甲醛(PFA) 购买自Invitrogen公司。曲通X-100(Triton X-100) 购买于Amresco公司。QuickBlock™封闭缓冲液、QuickBlock™一抗稀释液、免疫荧光洗涤液购买于碧云天生物技术公司。一抗(Anti-Desmin antibody, Y66, ab32362) 购买自Abcam公司。二抗(山羊抗兔IgG, bs-0295G) 购买于博奥森生物技术有限公司。

[0048] 实施例1

[0049] 参见图1, 本实施例中主要阐明上转换超分辨成像纳米探针的合成、羧基修饰以及光学损耗方式, 具体的, 包括以下步骤:

[0050] 1. 合成上转换纳米颗粒的方法(溶剂热法), 具体步骤如下:

[0051] (1) 超分辨上转换纳米颗粒核结构的合成:

[0052] 在油酸/1-十八烯(v:v=8:15,单位:mL)体系中,加入5ml 0.2mol/L ($n=1\text{mmol}$)的Ln(CH₃CO₂)₃ (Ln=Y:Yb:Tm=74:18:8)溶液。敞口加热到150℃,搅拌反应40min。降至室温后,逐滴加入10ml 0.4mol/L NH₄-甲醇溶液和2.5ml 1mol/L NaOH-甲醇溶液,水浴保持在40℃搅拌2h。随后撤去水浴,体系加热升温至100℃抽真空30min彻底除去甲醇。结束抽真空,氩气氛围下反应升温至230℃,恒温反应1h。降至室温,加入10ml无水乙醇在7,500r.p.m离心5min,弃去上清液收集产物。用乙醇和环己烷混合液清洗三遍,获得上转换超分辨成像纳米探针的核,化学式记作:NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺ (18/8)。产物分散在8ml环己烷中,用于下一步的反应。

[0053] (2) 超分辨上转换纳米颗粒核@壳结构的合成:

[0054] 上转换纳米颗粒核和惰性壳的物质的量比为1:1,向100ml的三口圆底烧瓶中加入5ml 0.2mol/L Y(CH₃CO₂)₃溶液,8ml油酸和15ml 1-十八烯,混合体系敞口加热至150℃并在该温度下搅拌反应40min。反应降至80℃,加入8ml步骤(1)合成的上转换纳米颗粒核,保持40min除去环己烷。随后在40℃水浴的情况下,逐滴加入10ml 0.4mol/L NH₄-甲醇溶液和2.5ml 1mol/L NaOH-甲醇溶液,保持该温度并搅拌2h。升温至100℃抽真空30min彻底除去甲醇。最后体系在氩气氛围保护下升温至230℃,反应1h。高温反应结束后降至室温,加入10ml无水乙醇,在7,500r.p.m离心5min,弃去上清液收集产物。用乙醇和环己烷混合液清洗三遍,加入8ml环己烷溶解,获得制备的核@壳结构上转换纳米颗粒,即上转换超分辨成像纳米探针,化学式记作:NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺ (18/8)@NaYF₄。

[0055] 2. 上转换超分辨成像纳米探针进行羧基修饰的方法,具体步骤如下:

[0056] 称取30ml DEG和0.5g PAA (M_w=1800) 加入100ml三口圆底烧瓶,混合搅拌加热至110℃,在氩气氛围保护下反应1h。缓慢加入4ml上述合成的核壳上转换纳米颗粒溶液,抽真空30min。反应升温至240℃,氩气氛围保护下反应2h。降至室温,往体系中加入15ml的1%稀盐酸搅拌10min,在15,000r.p.m离心30min,弃去上清液收集产物。随后用50%的乙醇清洗两遍,用去离子水洗一遍。最后,4ml去离子水溶解产物,制得羧基修饰的上转换纳米颗粒,记作UCNPs-COOH。其透射电镜图参见图2。

[0057] 3. 上转换超分辨成像纳米探针的光学损耗方式,具体步骤如下:

[0058] 在975nm和810nm共同作用下,在Tm离子掺杂浓度为8%的情况下,Tm离子能级之间会发生能级交叉弛豫现象,使得455nm的辐射光在975nm和810nm激光的共同作用下实现其损耗现象。其能级机制如下,455nm辐射光的能级是对应着¹D₂→³F₄,而¹D₂能级上的粒子数积累是在975nm激发下以五光子的形式传递的。这个能级上的电子可以通过810nm的光束受激损耗的形式到达³F_{2,3}。随后,³F_{2,3}能级上的粒子可以快速的弛豫到能级³H₄上。而高浓度下Tm粒子之间强烈的能级串扰作用³H₄+³H₆→³F₄+³F₄使得在³H₄能级上的粒子最终通过近红外光形式辐射出来。通过上述机制分析,同时我们做了实验验证。基于上面所述的STED光学系统,单独使用975nm的激发光激发样品和同时使用975nm和810nm的连续光共同激发样品来进行光控损耗的实验。

[0059] 参见图3,在975nm的激发下,样品辐射的蓝光波段大部分是在455nm,它主要是来自Tm离子的D₂→F₄能级的辐射。而在475nm的小峰是来自Tm离子的G₄→H₆能级的辐射。在加入810nm的激光后,一个明显的现象被观察到,那就是原来很强的455nm的辐射光被有效的损耗了96%左右。这个非常高的损耗效率意味着810nm的连续光对于NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺ (18/

8) @NaYF₄。上转换颗粒的455nm的辐射来说可以作为损耗光。这也就意味着,上转换颗粒可以作为荧光探针应用到STED显微术中。另外,对于具有较强组织穿透能力的810nm的激光对于样品只会造成微弱的荧光背景,这意味着有利于STED显微成像的应用。

[0060] 图5(a)表示在975nm激光单独激发下,探针扫描3000次的强度变化;图5(b)表示在975nm和810nm激光共同激发下,探针扫描3000次荧光强度发生次数的实验数据。

[0061] 图6(a)表示在975nm激光单独激发下,探针在0.5秒钟内的强度变化;图6(b)表示在975nm激光激发下,探针在0.5秒钟内荧光强度发生次数的实验数据和理论模拟;图6(c)表示在975nm和810nm激光共同激发下,探针在0.5秒钟内的强度变化;图6(d)表示在975nm和810nm激光共同激发下,探针在0.5秒钟内荧光强度发生次数的实验数据和理论模拟。

[0062] 实施例2

[0063] 将实施例1所述的上转换超分辨成像纳米探针应用于荧光超分辨成像,可采用下述成像方法:近红外损耗光利用空间相位调制板调制为空心光束,与激发光束进行准直共轭聚焦后实现对稀土掺杂上转换纳米颗粒及其标记应用于细胞免疫荧光成像。基于该显微成像方法,在现有技术的基础上搭建由激发光生成模块、损耗光生成模块、二向色镜、多光子显微扫描模块和光电探测模块组成的超分辨光学显微成像系统,获得低成本、低复杂度、高分辨率、简便、有效的实时动态三维图像。

[0064] 本实施例具体描述一可用于实现本发明技术效果的超分辨光学显微成像系统,但实际应用中,本领域技术人员当理解该系统结构仅为一示例。

[0065] 本实施例超分辨光学显微成像系统包括激发光生成模块、损耗光生成模块、偏振分光棱镜、多光子显微扫描模块和光电探测模块,所述激发光生成模块用于生成用作近红外激发光的近红外稳态激光束,所述损耗光生成模块用于生成用作近红外损耗激光的近红外空心光束;所述偏振分光棱镜将互相垂直的近红外稳态激光束与近红外空心光束在空间上共轭耦合成一束耦合激光束,该耦合激光束通过多光子显微扫描模块聚焦在载物台上标记了稀土掺杂上转换纳米材料的样品上;光电探测模块用于检测上述样品被激发的超分辨上转换发光信号。

[0066] 所述激发光生成模块包括第一近红外连续激光器,以及沿该激光器所发射的激光束方向依次放置的第一滤光片、第一准直扩束镜、第一二分之一波片、第一偏振片,所述第一近红外连续激光器发出的激光束经过第一滤光片、第一准直扩束镜后处理成为一束平行光束,然后利用第一偏振片及第一二分之一波片调节其功率,该空心光束波长为975nm,该光束的波长与稀土掺杂上转换纳米材料的激发波长相匹配。

[0067] 所述损耗光生成模块包括第二近红外连续激光器,以及沿该激光器所发射的激光束方向依次放置的第二滤光片、第二准直扩束镜、第二二分之一波片、第二偏振片、空间相位调制板,所述第二近红外连续激光器发出的激光束经过第二滤光片、第二准直扩束镜后处理成为一束平行光束,然后利用第二偏振片及第二二分之一波片调节其功率,然后通过空间相位调制板调制成空心光束,空心光束波长为810nm,该光束的波长与本发明上转换超分辨成像纳米探针中稀土掺杂上转换纳米材料的激活剂中相对应的两个能级的能量间隙匹配。

[0068] 所述多光子显微扫描模块包括沿耦合激光束前进方向依次放置的扫描振镜、高反低透二向色镜和物镜,耦合激光束经过扫描振镜、高反低透二向色镜(反射近红外激发光及

近红外损耗激光,透射样品荧光)后被物镜聚焦,所述载物台上的样品放置在物镜的焦面上。

[0069] 所述光电探测模块包括依次同轴放置的聚焦透镜和光电探测器,聚焦透镜和光电探测器设置在沿耦合激光束前进方向的反方向上,所述光电探测器与外部计算机连接,实施例1制备的稀土掺杂上转换纳米材料标记的样品在近红外损耗激光的激发下发射沿各个方向上的超分辨上转换发光,一部分荧光信号被物镜收集,经过高反低透二向色镜、聚焦透镜后由光电探测器接收。

[0070] 将96孔板放在多光子荧光显微镜(60倍油镜)下观察成像。激发光和损耗光分别通过聚焦透镜后被光电探测器接收,与光电探测器相连的信号采集器能够读取光电探测器的电流信号值。将信号采集器传输到计算机的信号值与扫描坐标匹配得到强度分布图像输出到显示界面。另外,计算机中的图像处理软件中可以即时改变探测器电压、图像增益补偿、偏置强度等参数,以便调节得到最佳超分辨成像效果。当975nm波长的激发光单独作用时,通过明场观察细胞并使观察部分调节至焦平面,将细胞骨架在放大15倍情况下观察。显微镜图像扫描速度为100us,图像分辨率为2048bit。当第二束近红外损耗光同时作用时,可明显观察到细胞骨架的丝状精细结构,显著提高了所观测结构的分辨率,打破了传统显微镜的光学衍射极限。

[0071] 实施例3

[0072] 本实施例中阐明一抗修饰的上转换超分辨成像纳米探针的特异免疫标记方式:举例使用实施例1中修饰羧基的上转换超分辨成像纳米探针进行一抗蛋白(抗desmin蛋白一抗,desmin蛋白为一种细胞骨架蛋白)的修饰,用于细胞骨架特异性免疫标记,进而进行细胞骨架的超分辨成像:

[0073] (1) 羧基化的上转换超分辨成像纳米探针进行一抗修饰,具体步骤如下:

[0074] 取1ml的1mg/ml UCNPs-COOH,向其中分别加入20μl的0.3mg/μl NHS,和20μl的0.2mg/μl EDC室温下搅拌两小时。15,000rpm离心30min收集,用1ml去离子水溶解。将PH调节至7.2-7.5,加入100μl的抗体的一抗,制得一抗修饰的上转换超分辨成像纳米探针。

[0075] (2) 一抗修饰的上转换超分辨成像纳米探针应用于亚细胞结构超分辨成像,具体步骤如下:

[0076] 将细胞预培养在含有10%的胎牛血清的高糖DMEM培养基玻底96孔板中,每孔加入15,000个细胞,培养一天。用PBS清洗细胞三次,每次10min。加入200μl的4%PFA室温下固定15min。用PBS清洗细胞三次,每次10min。加入200μl的0.2%Triton X-100室温下通透20min。用PBS清洗细胞三次,每次10min。加入200μl的QuickBlock™封闭缓冲液室温下封闭15min。随后加入200μl的200μg/ml的一抗修饰的上转换超分辨成像纳米探针在4℃冰箱孵育过夜。用免疫荧光洗涤液清洗三遍,每遍10min。最后,将96孔板放置在多光子荧光显微镜(60倍油镜)下,使用实施例2中提及的超分辨显微成像方法和系统进行超分辨成像观察。参见图4,其中(a)表示在975nm激光单独激发下的细胞骨架荧光成像图,(b)表示上转换超分辨成像纳米探针免疫标记的细胞骨架的超分辨荧光成像图。该图是用实施例1所合成的探针,运用实施例4的免疫标记方法,在实施例2的光学系统下观察到的最终成像结果。

[0077] 实施例4

[0078] 本实施例中阐明二抗修饰的上转换超分辨成像纳米探针进行免疫标记的方法:举

例使用实施例1中修饰羧基的超分辨上转换超分辨成像纳米探针进行二抗蛋白(山羊抗兔抗体)修饰。用一抗、二抗联用的方式免疫标记亚细胞结构,并进行超分辨成像:

[0079] (1) 羧基化的上转换超分辨成像纳米探针进行二抗修饰,具体步骤如下:取1ml的1mg/ml UCNPs-COOH,向其中分别加入20 μ l的0.3mg/ μ l NHS,和20 μ l的0.2mg/ μ l EDC室温下搅拌两小时。15,000rpm离心30min收集,用1ml去离子水溶解。将PH调节至7.2-7.5,加入500 μ l的抗体的一抗,制得一抗修饰的超分辨上转换超分辨成像纳米探针。

[0080] (2) 二抗修饰的上转换超分辨成像纳米探针应用于亚细胞结构超分辨成像,具体步骤如下:

[0081] 将细胞预培养在含有10%的胎牛血清的高糖DMEM培养基玻底96孔板中,每孔加入15,000个细胞,培养一天。用PBS清洗细胞三次,每次10min。加入200 μ l的4%PFA室温下固定15min。用PBS清洗细胞三次,每次10min。加入200 μ l的0.2%Triton X-100室温下通透20min。用PBS清洗细胞三次,每次10min。加入200 μ l的QuickBlockTM封闭缓冲液室温下封闭15min。加入200 μ l的5 μ g/ml的一抗(抗desmin蛋白一抗)在4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜。用免疫荧光洗涤液清洗三遍,每遍10min。随后加入200 μ l的200 μ g/ml的一抗修饰的上转换超分辨成像纳米探针,室温下孵育2h。用免疫荧光洗涤液清洗三遍,每遍10min。最后,将96孔板放置在多光子荧光显微镜(60倍油镜)下,使用实施例2中提及的超分辨显微成像方法和系统进行超分辨成像观察。

[0082] 实施例5

[0083] 本实施例中阐明链霉亲和素修饰的上转换超分辨成像纳米探针进行免疫标记的方法:举例使用实施例1中修饰羧基的上转换超分辨成像纳米探针进行链霉亲和素的修饰。用生物素化一抗、链霉亲和素标记的上转换超分辨成像纳米探针进行免疫标记亚细胞结构,并进行超分辨成像:

[0084] (1) 羧基化的上转换超分辨成像纳米探针进行链霉亲和素修饰,具体步骤同实施例2中的步骤(1)类似。需将实施例2中的一抗用链霉亲和素等质量浓度、等体积替换。

[0085] (2) 链霉亲和素修饰的上转换超分辨成像纳米探针应用于亚细胞结构超分辨成像,具体步骤同实施例3的步骤(2)类似。需用生物素化的一抗等质量浓度、等体积地将实施例3中一抗替换,用链霉亲和素修饰的上转换超分辨成像纳米探针等质量浓度、等体积替换实施例3中的二抗修饰的上转换超分辨成像纳米探针。最后,使用实施例2中提及的超分辨显微成像方法和系统进行超分辨成像观察。

[0086] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

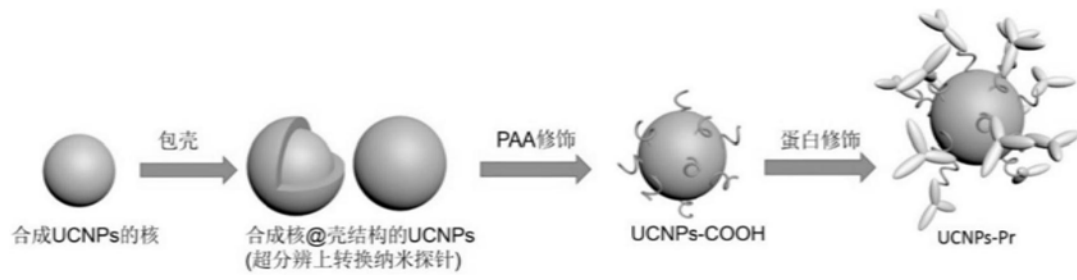


图1

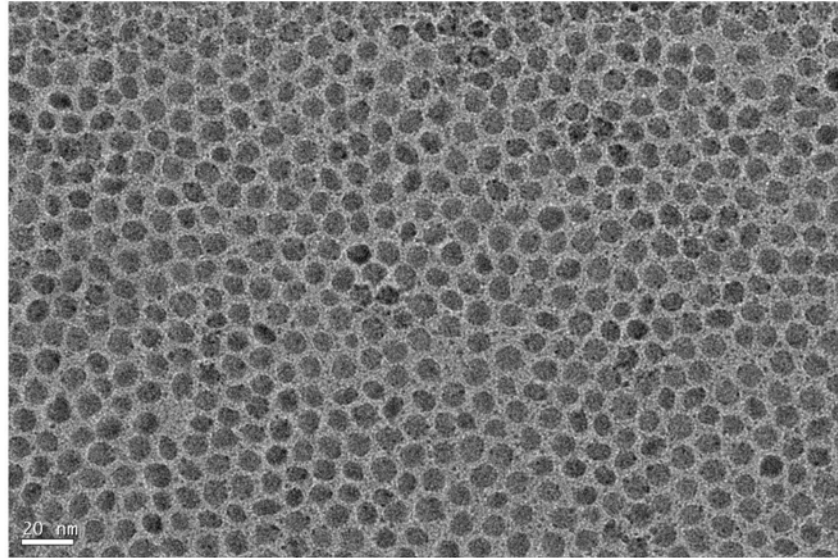


图2

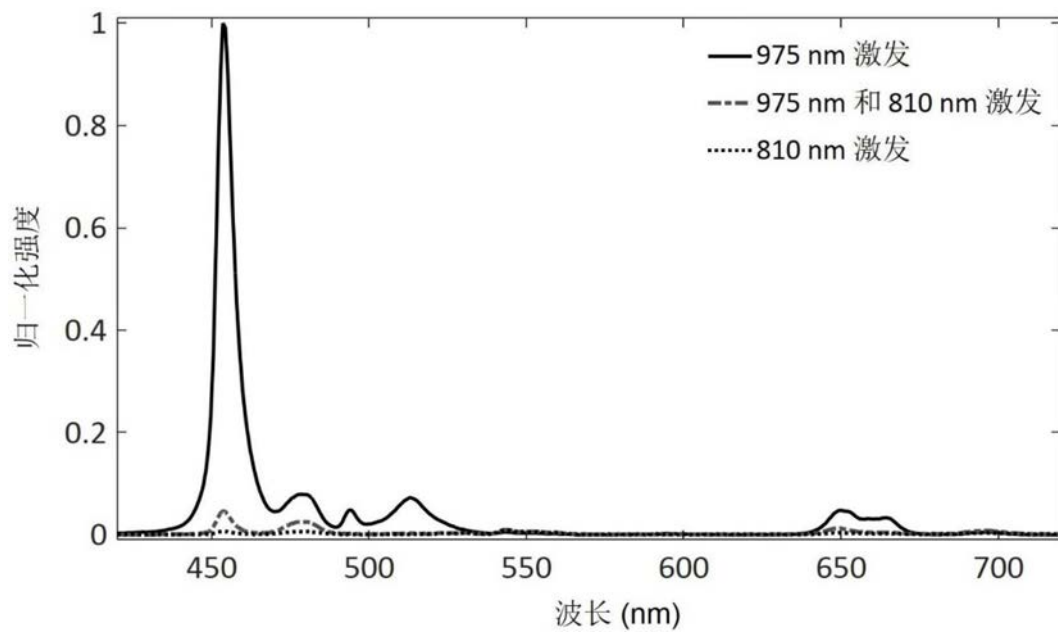


图3

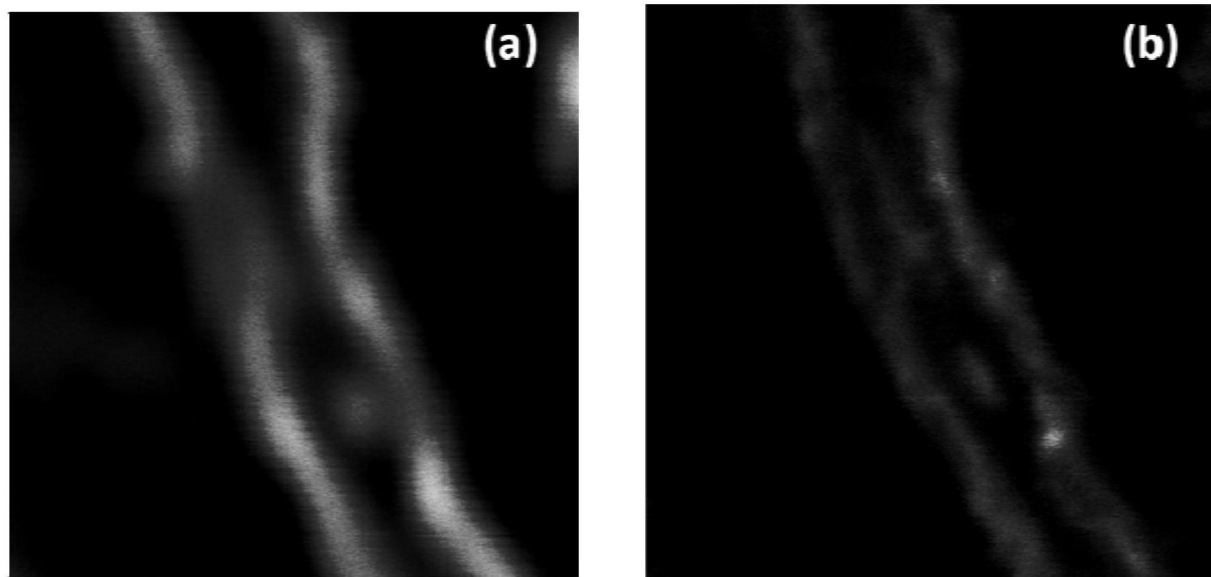


图4

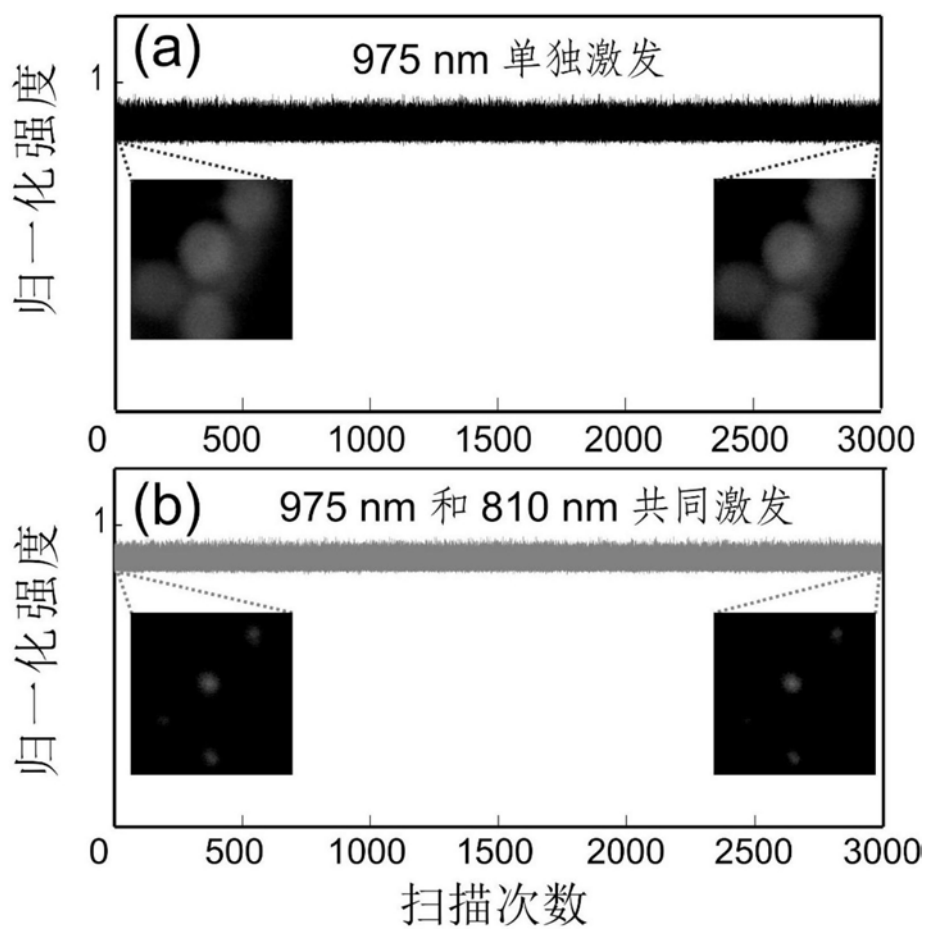


图5

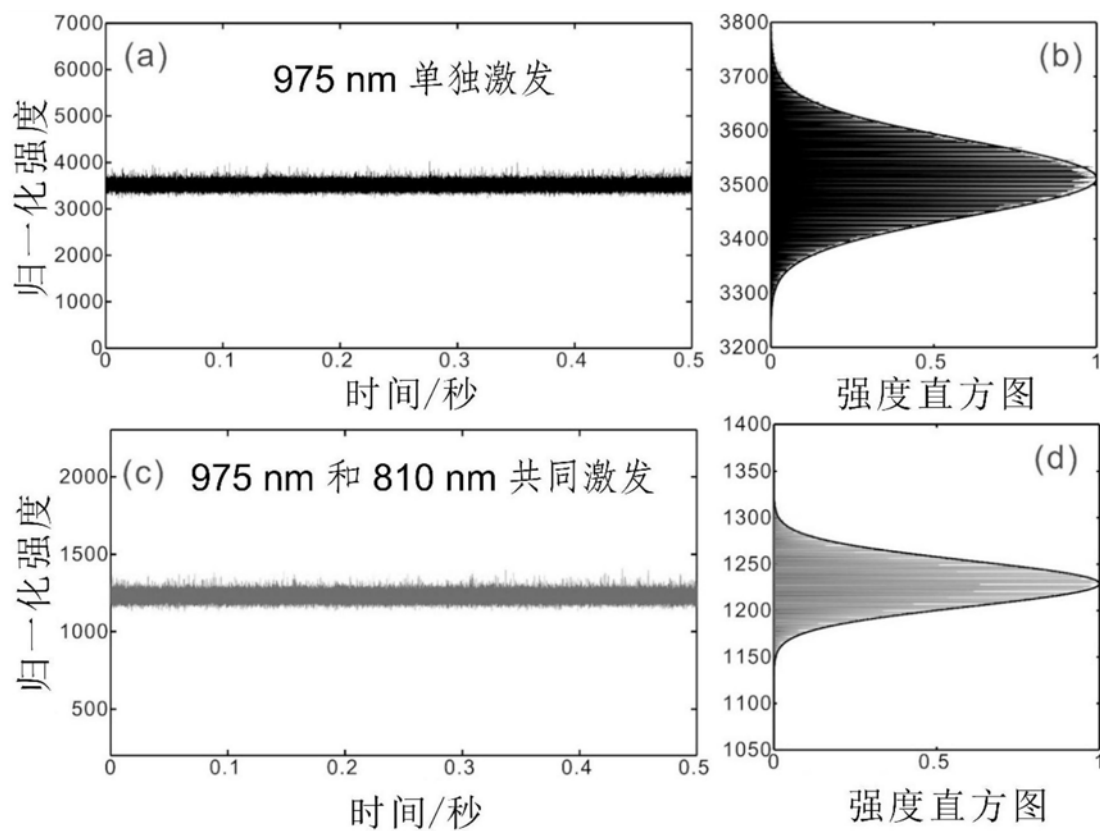


图6

专利名称(译)	上转换超分辨成像纳米探针及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN107629792A	公开(公告)日	2018-01-26
申请号	CN2017110919433.0	申请日	2017-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
[标]发明人	詹求强 周超 黄冰如		
发明人	詹求强 周超 黄冰如		
IPC分类号	C09K11/85 C09K11/02 B82Y20/00 B82Y40/00 G01N21/64 G01N33/533		
代理人(译)	刘巧霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种上转换超分辨成像纳米探针及其制备方法和应用，上转换超分辨成像纳米探针具有核@壳结构，制备方法是先采用溶剂热法，制备得到粒径可控、分散性好的稀土上转换纳米颗粒，再经过聚丙烯酸表面修饰，最后进行蛋白质修饰。将上述的上转换超分辨成像纳米探针应用于细胞的亚细胞结构的免疫荧光标记，从而实现亚细胞结构的荧光超分辨成像。相比传统的基于荧光素的超分辨光学成像方法，本发明是一种基于上转换超分辨成像纳米探针的荧光零漂白、零闪烁超分辨显微成像方法，能够对生物样品长时间观察。

