

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20520121151482

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

金属表面增强荧光效应的单颗粒水平研究 Study of Surface Enhanced Fluorescence at the Single-Nanoparticle Level

严 娅

指导教师姓名: 颜晓梅 教授

专 业 名 称: 分 析 化 学

论文提交日期: 2015 年 9 月

论文答辩时间: 2015 年 12 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人提交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人(签名)：

年 月 日

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 贵金属纳米材料.....	1
1.2 表面增强荧光效应.....	2
1.2.1 表面增强荧光效应的机理.....	2
1.2.2 表面增强荧光效应的应用.....	3
1.2.3 表面增强荧光效应的研究方法.....	7
1.3 超高灵敏流式检测技术（HSFCM）.....	8
1.3.1 超高灵敏流式检测装置的简介.....	8
1.3.2 超高灵敏流式检测技术的应用.....	9
1.4 本论文的选题思路以及研究内容.....	12
1.5 参考文献.....	14
第二章 银纳米颗粒 AgNPs 及核壳型 Ag@SiO ₂ 纳米颗粒的制备与表 征.....	22
2.1 引言	22
2.2 银纳米颗粒的制备与表征.....	24
2.2.1 实验仪器与试剂.....	24
2.2.2 实验方法.....	26
2.2.3 结果与讨论.....	28
2.3 核壳型 Ag@SiO ₂ 纳米颗粒的制备与表征.....	34
2.3.1 实验仪器与试剂.....	34
2.3.2 实验方法.....	34

2.3.3 结果与讨论.....	35
2.4 本章小结	41
2.5 参考文献	42
第三章 荧光 Ag@SiO₂@FITC 纳米颗粒的制备与表征	45
3.1 引言	45
3.2 材料与方法	46
3.2.1 仪器与设备.....	46
3.2.2 实验试剂与材料.....	46
3.2.3 实验方法.....	46
3.3 结果与讨论	48
3.3.1 荧光染料的选择.....	48
3.3.2 染料浓度的优化.....	49
3.3.3 TEOS:APTES 摩尔比的优化	50
3.3.4 TEOS 加入方法对荧光纳米颗粒信号的影响.....	51
3.3.5 TEOS 加入量的优化.....	53
3.3.6 荧光 Ag@SiO ₂ @FITC 和 SiO ₂ @FITC 纳米颗粒的制备与表征 ...	55
3.4 本章小结	57
3.5 参考文献	57
第四章 金属表面增强荧光效应的单颗粒水平研究方法的建立	59
4.1 引言	59
4.2 材料与方法	60
4.2.1 仪器与设备.....	60
4.2.2 实验试剂与材料.....	60
4.2.3 实验方法.....	60
4.3 结果与讨论	62
4.3.1 考察银核粒径、二氧化硅壳层厚度对表面增强荧光效应的影响	62
4.3.2 荧光光谱仪与 HSFCM 检测结果的比较	70
4.3.3 考察颗粒浓度对荧光光谱仪测定表面增强荧光效应的影响.....	71

4.3.4 Ag@SiO ₂ 核壳纳米颗粒表面增强荧光效应的理论模拟	72
4.4 本章小结	79
4.5 参考文献	79
第五章 总结与展望	81
在校期间发表论文	83
致谢	84

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English)	III
Chapter 1. Preface	1
1.1 Noble metal nanomaterials	1
1.2 Surface enhanced fluorescence (SEF)	2
1.2.1 Mechanisms of SEF	2
1.2.2 Applications of SEF	3
1.2.3 Methods for SEF study	7
1.3 High sensitivity flow cytometry (HSFCM)	8
1.3.1 Introduction of HSFCM.....	8
1.3.2 Applications of HSFCM	9
1.4 Objectives and main contents of this diSSERTation	12
1.5 References	14
Chapter 2. Synthesis and characterization of AgNPs and Ag@SiO₂ core-shell nanoparticles	22
2.1 Introduction	22
2.2 Synthesis and characterization of AgNPs	24
2.2.1 Instruments and reagents.....	24
2.2.2 Methods.....	26
2.2.3 Results and discussion	28
2.3 Synthesis and characterization of Ag@SiO₂ core-shell nanoparticles	34
2.3.1 Instruments and reagents.....	34
2.3.2 Methods.....	34

2.3.3 Results and discussion	35
2.4 Conclusion	41
2.5 References	42

Chapter 3. Synthesis and characterization of fluorescent

Ag@SiO₂@FITC nanoparticles.....	45
---	-----------

3.1 Introduction.....	45
3.2 Materials and methods	46
3.2.1 Instruments and apparatuses	46
3.2.2 Materials and reagents	46
3.2.3 Methods.....	46
3.3 Results and discussion	48
3.3.1 Selection of fluorescent dye.....	48
3.3.2 Optimization of dye concentration.....	49
3.3.3 Optimization of the molar ratio between TEOS and APTES.....	50
3.3.4 Comparison of the different ways of adding TEOS.....	51
3.3.5 Optimization of TEOS amount	53
3.3.6 Synthesis and characterization of fluorescent Ag@SiO ₂ @FITC and SiO ₂ @FITC nanoparticles	55
3.4 Conclusion	57
3.5 References.....	57

Chapter 4. Method development for surface enhanced fluorescence

study at the single-nanoparticles level by using HSFCM	59
---	-----------

4.1 Introduction.....	59
4.2 Materials and methods	60
4.2.1 Instruments and apparatuses	60
4.2.2 Materials and reagents	60
4.2.3 Methods.....	60

4.3 Results and discussion	62
4.3.1 Effect of silver core diameter and silica shell thicknesses on the SEF .62	
4.3.2 Comparison between fluorescence spectroscopic measurement and HSFCM analysis	70
4.3.3 Effect of particle concentration on SEF	71
4.3.4 Theoretical studies of the SEF	72
4.4 Conclusion	79
4.5 References	79
 Chapter 5. Summary and prospects.....	 81
 Publications	 83
 Acknowledgements	 84

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

金属表面增强荧光效应 (surface enhanced fluorescence, SEF) 作为表面增强光谱学中的一个重要分支, 已在生物传感、生物医学、光电子学等领域展示出广泛的应用前景。基于贵金属纳米粒子特有的表面等离子体共振性质, 纳米粒子表面的荧光分子可与金属纳米结构发生近场相互作用, 从而使荧光分子的激发效率、辐射衰减速率得到提高, 荧光信号大大增强。目前, 金属表面增强荧光效应已发展成为一门新兴的光谱技术, 大大地提高了荧光检测的灵敏度。因此, 系统地研究金属表面增强荧光效应将为进一步开拓 SEF 在生物检测、光电器件制造中的应用提供有效的理论指导与支撑。

研究表面增强荧光效应的主要方法有荧光分光光度法和激光共聚焦显微镜。荧光分光光度法是经典的荧光检测分析方法, 可以对大量颗粒的性状进行实时检测, 但是检测结果为大量样本的统计平均值, 因而难以揭示颗粒的内在异质性; 激光共聚焦显微镜虽然能在单颗粒水平对颗粒进行原位的时空分辨观测, 但是由于关注的样本数目有限, 多用于低通量分析, 同时存在操作繁琐、观测易受干扰等不足。流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是一种对悬液中的单个细胞或细胞大小的颗粒进行快速、高通量、多参数定量分析的先进技术, 通过对颗粒的散射光信号进行检测可表征其粒径大小, 对荧光信号的检测可表征其生化性状, 目前已广泛应用于细胞生物学、分子生物学、免疫学等领域。尽管如此, 传统的流式细胞仪难以检测粒径小于 200 nm 的聚合物颗粒或者荧光亮度小于 500 个荧光素分子的微弱信号, 由于检测灵敏度的局限性, 使得传统的流式细胞仪无法应用于单颗粒水平的 SEF 研究。本实验室结合瑞利光散射和鞘流单分子荧光检测技术, 成功研制出超高灵敏流式检测装置 (high sensitivity flow cytometer, HSFCM), 根据仪器配置的不同, 灵敏度相比于传统流式细胞仪提高了 2-5 个数量级, 已成功应用于细菌、病毒、线粒体等生物纳米颗粒以及纳米金、二氧化硅、纳米药物等人工合成纳米颗粒的单颗粒检测分析。因此, 本论文将利用 HSFCM 发展一种简单有效的分析方法在单颗粒水平对 SEF 进行研究。

由于金属表面增强荧光效应主要受金属纳米颗粒的组成、粒径以及金属纳米

颗粒与荧光分子之间的距离等因素的影响，为了寻求最佳的纳米颗粒结构体系，本论文集集中探讨了上述因素对 SEF 的影响。基于银纳米颗粒显著的表面等离子体共振性质，本论文以银纳米颗粒作为研究对象，以 Ag@SiO_2 核壳纳米颗粒作为模型，选择粒径与 Ag@SiO_2 核壳纳米颗粒相同的二氧化硅纳米颗粒作为参照，并在 Ag@SiO_2 核壳纳米颗粒和二氧化硅纳米颗粒表面共价偶联荧光染料分子，利用超高灵敏流式检测装置在单颗粒水平研究银纳米颗粒的表面增强荧光效应，通过考察银核的粒径大小、以及银核与荧光分子之间的距离等因素，获得最佳的纳米颗粒结构体系，这将为提升表面增强荧光效应的应用奠定基础。

我们采用种子生长法制备出不同粒径大小的球形银纳米颗粒作为荧光增强的基底物质；采用 Stöber 法在银纳米颗粒表面包被不同厚度的二氧化硅壳层以调节荧光分子与银纳米颗粒之间的距离；采用共价偶联法对粒径相同的 Ag@SiO_2 核壳纳米颗粒和二氧化硅标准球进行荧光分子 FITC 的掺杂。最终选取一系列不同银核大小（40、50、60、70、80、100 nm）、不同壳层厚度（5、10、15、20、25、30 nm）的 $\text{Ag@SiO}_2@FITC$ 纳米颗粒和与之粒径相同的 $\text{SiO}_2@FITC$ 纳米颗粒，利用 HSFCM 在单颗粒水平对其散射光和荧光信号进行双参数检测，测定荧光增强的倍数，以考察银核粒径大小、壳层厚度等因素对表面增强荧光效应的影响。此外，我们将 HSFCM 检测的结果与荧光光谱仪检测的结果进行比较，分析单颗粒检测手段与宏观分析方法对于 SEF 研究的利弊。同时，我们还利用时域有限差分（finite difference time domain, FDTD）法进行理论建模、计算金属纳米结构存在时的局域电磁场增强因子 G 、荧光量子效率 Q 以及表面荧光增强因子 EF 。我们理论模拟的结果与 HSFCM 测得的实验结果吻合，可见单颗粒水平的表面增强荧光效应的检测结合理论计算更能真实地揭示金属纳米结构与荧光分子之间的近场相互作用。

关键词：表面增强荧光效应， Ag@SiO_2 核壳结构，单颗粒检测，超高灵敏流式检测技术

Abstract

Surface enhanced fluorescence (SEF) which originates from the interactions of the excited-state fluorophores with the plasmon resonance of a metal particle, is an effective technology used in fluorescence-based detection in biochemistry and biomedicine. The interactions result in an increased radiative decay rate, an increased quantum yield, a reduced lifetime and an enhanced fluorescence. However, the enhancement scale is dependent on the shape, size of the metal nanoparticles and the distance between the metal nanoparticles and the fluorophores. Thus, in this work, we investigate the SEF by changing the metallic diameter and the distance between the metal nanoparticles and the fluorophores, which will be very helpful in promoting the applications of SEF.

Many researches on SEF have been reported. Among those, fluorescence spectroscopy and scanning confocal microscopy are the two most commonly used technologies to study SEF. However, they either measure the ensemble average of a large number of particles or offer limited throughput. Flow cytometry (FCM) is a well-established technique for the rapid, multiparameter, and quantitative analysis of individual cells and microscopic particles in aqueous suspension. Information regarding size, shape of particles can be gathered via light scatter measurements, and biochemical attributes can be gathered via fluorescent measurements. Nevertheless, it has been challenging for the conventional FCM to detect nanoparticles smaller than 200 nm or dim particles having less than five hundred fluorescent molecules. In our laboratory, we have developed a high sensitivity flow cytometer (HSFCM) that is 2-5 order of magnitudes more sensitive than conventional flow cytometers. Recently, HSFCM has already been applied in the analysis of biological nanoparticles including bacteria, viruses, mitochondria, and synthetic nanoparticles including gold, silica, etc. In this work, we would apply HSFCM to study the SEF at the single-particle level.

Silver has been recognized as an attractive fluorescence enhancer due to its

intense plasmon band and high scattering efficiency. Moreover, coating the silver nanoparticle with a suitable silica shell can not only improve the chemical stability of silver, but also modulate the distance between silver and the fluorophores precisely for maximum enhancement. Thus, we use the fluorescent core-shell nanostructure as the model system which comprised of a silver core, a silica shell, and a fluorophore-doped shell. Additionally, the fluorophore-doped silica nanoparticles of the same particle size but without Ag core are used as the counterparts.

Briefly, the Ag@SiO₂ nanoparticles with different silver core diameter (40, 50, 60, 70, 80, 100 nm) and silica shell thicknesses (5, 10, 15, 20, 25 and 30 nm) were synthesized. A second layer of silica (approximately 5 nm) was coated onto the Ag@SiO₂ nanoparticles, and fluorescein isothiocyanate (FITC) was doped into the outer most silica shell to form fluorescent core-shell Ag@SiO₂ structures. The fluorescence enhancement factor (EF) was estimated by a ratio of the fluorescence intensity of FITC doped nanoparticles with and without silver core. The effects of Ag core diameter and the distance between the fluorophore and the Ag core, i.e. the shell thickness on the EF, were investigated at the single-particle level using HSFCM. Compared with the fluorescence spectroscopic measurement, our results demonstrate the great advantage of studying SEF at the single-particle level. Moreover, we calculated the dependence of the electric field enhancement factor (G), the quantum yield (Q), and the EF on the silica shell thickness with different silver diameters via finite difference time domain (FDTD) method. The theoretical calculation results agreed well with HSFCM analysis. Present study represents an advanced technique for SEF study.

Key words: Surface enhanced fluorescence, Core-shell Ag@SiO₂ nanoparticle, Single-nanoparticle level, High sensitivity flow cytometry

第一章 绪论

1.1 贵金属纳米材料

随着纳米技术的迅猛发展,纳米材料由于具有特有的小尺寸效应、表面效应、量子效应以及宏观量子隧道效应,在光学、催化、生物传感、成像、信息存储等领域都得到了广泛应用。贵金属纳米材料,如金、银、铜等更是以其独特的光学性质—表面等离子体共振(surface plasma resonance, SPR)性质成为众多研究者关注的热点之一^[1-3]。

表面等离子体共振是指金属纳米粒子受到外部电场作用时,如入射光的照射,其内部自由电子随着外部电场的振荡产生周期性振荡,当二者的振荡频率相同时发生共振的现象^[4, 5]。如图 1.1 所示,金属纳米粒子内部的自由电子在外部电场的作用下会相对原子核产生位移,从而使正负电荷分离。但是由于库仑力的作用,自由电子会在正负电荷的中心位置进行周期性的往复振荡,这种振荡模式被称为偶极振荡。对于较大粒径的金属纳米粒子而言,其振荡模式除了有偶极振荡外还有更高级的四极振荡等^[6]。研究发现,等离子体振荡的频率主要受到电子密度、有效电子质量、电荷分布的形状与尺寸的影响。而对于银纳米粒子而言,等离子体振荡的频率还受到 d 轨道电子的影响,即银纳米粒子的等离子体振荡频率与粒子的形状、尺寸以及周围介质的折射率有关^[7]。

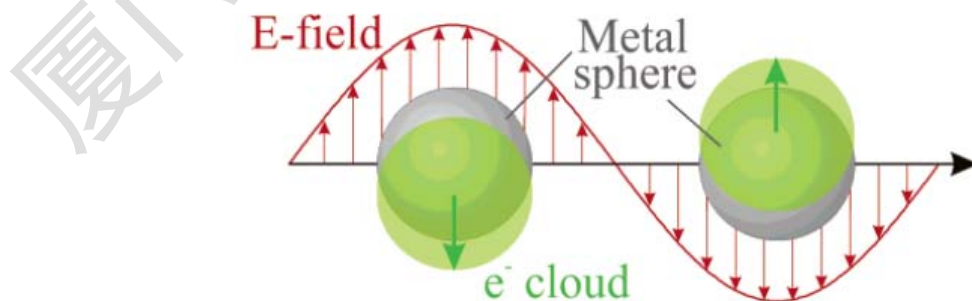


图 1.1 球形金属纳米颗粒的等离子体共振示意图^[7]

Figure 1.1 Schematic of plasmon oscillation for a metal sphere

1.2 表面增强荧光效应

随着研究者对等离子体光谱学的深入研究,表面增强荧光效应受到了越来越多的关注,已在生物传感、生物医学以及光电器件等领域得到广泛应用^[8-11]。表面增强荧光效应以激发态荧光分子与金属纳米结构之间的近场相互作用为基础,是指分布于金属纳米粒子附近的荧光分子,其荧光发射强度相比于自由态时大大增强的现象^[12-14]。由于表面增强荧光效应可提高荧光检测的灵敏度,增加荧光分子的荧光量子效率,因而具有广泛的应用价值和研究意义。

1.2.1 表面增强荧光效应的机理

目前,关于表面增强荧光效应的机理研究主要由马里兰大学的 Lakowicz 教授^[15-19]和 Geddes 教授^[20-22]课题组开展,并已提出两种较为成熟的理论模型,分别是局域场增强理论和荧光分子辐射衰减速率增加理论。如图 1.2 所示,自由态的荧光分子在入射光的照射下由基态跃迁至激发态。处于激发态的分子由于吸收光子能量而不稳定,因而将以辐射跃迁和非辐射跃迁的形式回到基态。其中辐射跃迁的过程可产生光信号,发射荧光;而非辐射跃迁主要以动能或热能的形式消耗。当荧光分子分布于金属纳米粒子附近时,金属纳米粒子在入射光的照射下发生表面等离子体共振,极大地增强了粒子周围的局域电磁场,从而作用于激发态荧光分子使其激发效率得到提高,并最终使荧光信号增强^[23]。这种基于局域电磁场的理论模型主要从物理角度进行讨论分析,与金属纳米粒子的形貌、尺寸、表面粗糙程度等因素有关^[24]。此外,从荧光分子辐射衰减速率角度进行解释,荧光分子与金属纳米粒子之间的近场相互作用还能使荧光分子的辐射衰减速率增加,进而使其荧光量子效率增加、荧光寿命缩短、荧光强度大大增强^[25]。因而对于此过程,低量子效率的荧光分子受到的影响更大,荧光增强效应更显著。

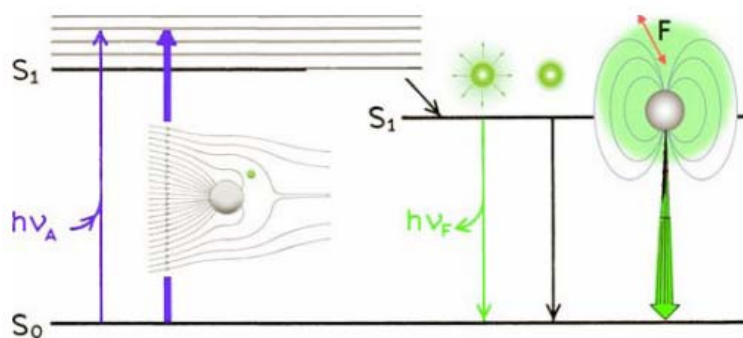


图 1.2 金属纳米粒子不存在和存在时的 Jablonski 能级图^[12]

Figure 1.2 Modified Jablonski diagram that includes metal-fluorophore interactions. The thicker arrows represent increased rates of excitation and emission.

1.2.2 表面增强荧光效应的应用

由于表面增强荧光效应可大大地提高荧光检测、荧光成像的灵敏度，因而在生物分子的检测^[26-28]、生物医学^[29-31]、荧光共振能量转移效应^[32, 33]以及光电子学^[34, 35]等领域得到了广泛应用。

1.2.2.1 生物分子的检测

对于生物分子如 DNA、RNA、血清蛋白、毒素蛋白等的检测，表面增强荧光效应作为一门新兴的光谱技术，为相关工作的研究提供了有力的检测手段^[36-38]。2010 年 Lakowicz 等利用硅核-银壳的纳米结构通过表面反应偶联上经荧光分子 Cy3 标记的寡核苷酸序列，并以此作为模型实现了肺癌细胞中 microRNA-486 分子的检测^[39]。相比于具有相同尺寸大小的硅核，硅核-银壳纳米结构可使荧光强度明显增强，检测灵敏度提高，这为肺癌等疾病的早期诊断带来了希望。Lakowicz 等还将牛血清蛋白 BSA 和免疫球蛋白 IgG₃ 置于银岛膜表面，并分别与抗体进行特异性识别。由于银岛膜特有的表面等离子体共振性质，可使蛋白分子中色氨酸残基的荧光强度增大 3 倍，从而实现了对生物蛋白的无标记检测^[40]。此外，值得一提的是，2011 年 Dai 等发展了灵敏度高、检测限低、适用性广的等离子体蛋白芯片技术。他们在金纳米阵列表面（如图 1.3 所示）通过三明治夹心结构检测癌胚抗原 CEA 分子，可实现 IR-800 近红外荧光高达 100 倍的增强效果、并首次

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库