View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

学校编号：10384　　分类号 _____ 密级 _____
学　　号：200425061　　UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

自组装构筑SERS基底、细胞膜的SERS和基于SERS的细胞内pH传感研究初探

Fabricating SERS Substrates by Self Assembly, SERS of Cell Membrane and Preliminary Study of Cellular pH Sensor Based on SERS

李 明 德

指导教师姓名：田 中 群 教授

任　　斌 教授

专 业 名 称：物 理 化 学

论文提交时间：2007 年 11 月

论文答辩时间：2007 年　　月

学位授予时间：2007 年　　月

答辩委员会主席：_____

评　　阅　　人：_____

2007 年 11 月

厦门大学博硕士论文摘要库

Fabricating SERS Substrates by Self Assembly, SERS of Cell Membrane and Preliminary Study of Cellular pH Sensor Based on SERS

A Thesis Submitted for Degree of

Master of Science

By

Ming-de Li

Directed by

Prof. Zhong-Qun Tian

Prof. Ren Bin

Department of Chemistry, Xiamen University

November, 2007

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈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的研究成果，均在文中以明确的方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（　），在　　年解密后适用本授权书。

2、不保密（　）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：　　日期：　年　月　日

导师签名：　　日期：　年　月　日

厦门大学博硕士论文摘要库

目　录

中文摘要 ····· I

英文摘要 ····· III

第一章　绪论 ····· 1

§1.1 前　言 ····· 1

§1.2 细胞与单细胞技术 ····· 1

§1.3 拉曼光谱 ····· 14

§1.4 表面增强拉曼光谱 ····· 16

§1.5 细胞的表面增强拉曼光谱研究 ····· 22

§1.6 本论文的研究目的及设想 ····· 26

参考文献 ····· 28

第二章　实验 ····· 41

§2.1 药品 ····· 41

§2.2 仪器 ····· 41

§2.3 细胞培养及观察 ····· 47

参考文献 ····· 51

第三章　SERS 基底制备和表面杂质的处理 ····· 52

§3.1 引言 ····· 52

§3.2 **SERS** 基底的组装及其表征 ····· 54

§3.3 **ITO/Au** 基底表面杂质处理 ····· 58

本章小结 ····· 67

参考文献 ····· 67

第四章　细胞膜的表面增强拉曼光谱 ····· 70

§4.1 引言 ····· 70

§4.2 滴加纳米粒子法 ····· 72

厦门大学博硕士论文摘要库

§4.3 基底法 …… 76
本章小结 …… 81
参考文献 …… 82

第五章　基于 SERS 的细胞内的 pH 传感研究初探 ……84
§5.1 引言 ……84
§5.2 **pH** 传感功能纳米粒子的合成及其表征 ……85
§5.3 表面增强拉曼光谱探测细胞内 **pH** 变化 ……90
§5.4 **SEM** 和 **TEM** 表征 **pH** 传感 Au 纳米粒子在细胞中的分布 ……96
§5.5 细胞的 **SERS** 成像 ……99
本章小结 …… 101
参考文献 …… 101

总结与展望 …… 104

作者攻读硕士学位期间发表与交流论文 ……105

致谢 ……106

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese ····· I

Abstract in English ····· III

Chapter 1 Introduction ····· 1

§ 1. 1 Preface ····· 1

§ 1. 2 Cell and single cell analytical technologies ····· 1

§ 1. 3 Raman spectroscopy ····· 14

§ 1. 4 Surface-enhanced Raman Spectroscopy ····· 16

§ 1. 5 Surface-enhanced Raman Spectroscopy Applied in Cell Research ····· 22

§ 1. 6 Objectives and conceivability of this thesis ····· 26

References ····· 28

Chapter 2 Experimental ····· 41

§ 2. 1 Reagents ····· 41

§ 2. 2 Instruments ····· 41

§ 2. 3 Cell Culture and Observation ····· 47

References ····· 51

Chapter 3 Fabricating SERS Substrates and Removed Impurities from SERS Substrates ····· 52

§ 3. 1 Introduction ····· 52

§ 3. 2 Assembly and characterization of SERS substrate ····· 54

§ 3. 3 Removed impurities from ITO/Au substrates ····· 58

Conclusions ····· 67

References ····· 67

Chapter 4 SERS of cell membrane ····· 70

§ 4. 1 Introduction ····· 70

厦门大学博硕士论文摘要库

§ 4. 2 Method of dropping Au nanoparticles ····· 72
§ 4. 3 Method of ITO/Au substrates ····· 76
Conclusions ····· 81
References ····· 82

Chapter 5 Preliminary study of cellular pH sensor based on SERS ····· 84
§ 5. 1 Introduction ····· 84
§ 5. 2 Synthesis and characterization of pH functional Au nanoparticles ····· 85
§ 5. 3 Detecting cellular pH based on SERS ····· 90
§ 5. 4 Characterization cellular functional Au nanoparticles by TEM and SEM ····· 96
§ 5. 5 SERS mapping of cell ····· 99
Conclusions ····· 101
References ····· 101

Summary of this thesis and future work ····· 104

Publication during M. Sc. study ····· 105

Acknowledgements ····· 106

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

细胞是生命活动的基本结构单位，一切生命现象，包括新陈代谢、呼吸作用、光合作用、信息传递、跨膜运输等生命活动都与细胞的整体状态息息相关，一切疾病的发病机制也要以细胞病变研究为基础。因此，细胞研究是生命科学中最基本、最重要的研究课题，建立发展各种原位甚至活体研究细胞的新方法和新技术势在必行。

表面增强拉曼光谱（SERS）具有极高的检测表面物种的灵敏度，能从分子水平上获得物质详细的结构和化学组成信息，进而识别各类分子的“指纹”。表面增强拉曼效应来源于合适的纳米级粗糙基底或纳米粒子， SERS技术与纳米粒子结合，可望从分子水平上探究细胞的复杂的生理活性，特别在活体细胞检测方面具有独特的优势。最近，SERS作为高灵敏的多功能的光学探针应用于活细胞的研究开始受到重视。 但是，细胞内组份复杂，动态变化，细胞体系的各组分与SERS基底作用一般较弱，杂质影响严重，导致获取的SERS谱在重现性、选择性和可行度方面皆存在不少难题，如何应用SERS从分子水平上研究细胞的识别、分化、繁殖、病变和凋亡等引起的微化学环境的变化是一个极具挑战的课题。

本论文主要工作是探索将SERS应用于细胞研究，获得的主要成果如下：

1. 利用自组装方法制备了具有较高SERS活性的基底，通过碘取代SERS基底表面的杂质和电化学氧化除碘方法，获得了干净的、均匀的、适合细胞检测的SERS基底。

2. 较系统地探索了几种获取细胞膜分子的SERS谱的方法。实验表明，直接利用将纳米粒子和细胞一起培养，将细胞培养在ITO/Au基底，以及将细胞培养在盖玻片上然后倒扣在SERS基底上等三种方法，皆难以获得可信和有意义的SERS谱图。只有将悬浮细胞滴加在干净透明的ITO/Au基底上的方法可获得活体CHL细胞的细胞膜的SERS光谱，通过SERS成像，初步研究了该细胞膜组成及其有关组分分布。

3. 合成了能够检测细胞内pH变化的功能纳米粒子。初步结果表明，基于SERS的pH传感Au纳米粒子能用于监测细胞内的某些组分的pH变化，而且有望探

厦门大学博硕士论文摘要库

测pH传感Au纳米粒子进入细胞后Au纳米粒子周围微化学环境的变化情况。

关键词：SERS；金纳米粒子；细胞；表征；pH

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Cell is the fundamental structure unit in life activities. All of life phenomena, such as metabolism, respiration, photosynthesis, information transfer, and transmembrane transport, are closely bound up with the behaviour of cell. Almost all diseases are caused by the pathologic change of cell. Therefore, cell research is one of most important and fundamental research project，it is necessary to establish and develop all kinds of in-situ and in vivo new methods and technologies for cell research.

SERS is an ultrasensitive analytical method to probe the surface species and can provide detailed information of the structure and chemical composition of the species on the molecular level. Thus, SERS can provide “fingerprint” of the species to be analyzed. It is well-known that enhancement effect of SERS is closely connected with the suitable nanoscale roughness of the substrates or nanoparticles, SERS using nanoparticles as the enhancing substrate can be used to understand the complicated physiological activities of cell on the molecular level, which shows its unique advantage in detecting the living cells. Recently, SERS as supersensitive multi-functional optical probe has attracted increasing attention in the study of living cells. However, cellular components are very complicated and cells are always in dynamic state. In addition, because of weak absorption features between cellular components and SERS substrates, signals of the cellular components are easily interfered by impurities. Which produce some difficult problems in obtaining reproducible and selective SERS signals and feasibility study cells by SERS. Therefore, how to use SERS to study the environmental micro-chemical changes caused by recognition, differentiation, reproduction, pathological change and apotosis of cell is a virtually challenging project.

This thesis is focused on the application of SERS in the study of cells. The major results of the thesis are outlined as follows:

1. Uniform and higher SERS-active substrates were prepared by the self-assembly method, which were then modified with iodide to replace the impurities during the synthesizing process. After removal of iodide using the electrochemical oxidation, the substrates become clean, uniform, and high SERS-active, which is suitable for cell

厦门大学博硕士论文摘要库

detection.

2. Several methods have been explored to obtain the SERS of cell membrane. Results show that direct culture of cell with Au nanoparticles, or culturing the cell on Au/.ITO substrate, or culturing cell on glass slide and then cover on the SERS substrates can not produce reliable SERS signals. Only by dropping the suspended cell solution onto the clean and uniform Au/ITO substrates can obtain SERS of living CHL cell membrane. Furthermore, by doing SERS mapping, we can get the composition and chemical distribution of cell membrane.

3. Functionalized nanoparticles that were able to detect the pH changes of the cellular components were synthesized and characterized by using SERS and TEM. Such kind of nanoparticles can also be used to detect the change of micro-chemical environment in cells after the pH sensing Au nanparticles enter the cell.

Key words： SERS**;** Au nanoparticle; Cell; Characterization; pH

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章　　绪论

§1-1 前 言

细胞是生命的基本结构单位，是独立生存的生命实体，是组成生物体的结构和功能的基本单元，一切生命现象都是细胞活动的表现。细胞是以膜为界的一个小室，充满着生物分子，其浓度和组成的变化都决定着细胞的生存、繁殖、损伤和死亡。细胞的新陈代谢、呼吸作用、光合作用、信息传递、跨膜运输等生命活动都与细胞的整体状态有关。总之，各种生命活动都是在细胞内实现的、发育、生长，一切疾病的发病机制也要以细胞病变研究为基础。因此，如何利用和发展各种细胞分析技术来观测细胞，分析检测细胞的各种变化，从细胞中提取生命的信息，研究细胞中各种化学物质的定性、定位、定形、定量以及结构的变化等都具有十分重要的学术意义和应用价值。细胞是一个结构实体，人类对细胞的研究经历了整体、显微、超微和分子几个发展阶段。从目前来看，细胞的整体和超微结构已基本查清，细胞研究已经从细胞整体(单细胞) 深入到亚细胞(局部细胞质、细胞膜、囊泡) 和分子水平(DNA 等生物大分子及单分子)。随着生命分析化学中分支—单细胞分析的迅速发展，使我们能用崭新的手段在生命活体最基本的单位-单个细胞水平上进行研究，发现了许多过去未曾探测到的微观现象，单细胞分析方面已经取得了令人瞩目的成就。

§1-2 细胞与单细胞研究技术

1．2．1 细胞简介

生命科学作为21 世纪的带头学科之一，今后的研究将继续向微观和宏观两个方向深入和扩展：分子生物学和生物复杂系统的研究。作为生命基本单位的细胞本身就是有自组织能力的复杂的开放系统，因此细胞研究一直是重要的前沿领域。随着研究的深度与广度的日益提升，人们发现生命的复杂性远远超乎以往的想象。

细胞表面是一层质膜，也称细胞膜，将细胞与外界微环境隔离，细胞膜结构

厦门大学博硕士论文摘要库

见图1，细胞膜的基本结构包括：(1)脂双层，脂双层由磷脂、胆固醇、糖脂组成。(2)膜蛋白，分为内在蛋白和外在蛋白两种。内在蛋白以疏水的部分直接与磷脂的疏水部分共价结合，两端带有极性，贯穿膜的内外；外在蛋白以非共价键结合在固有蛋白的外端上，或结合在磷脂分子的亲水头上。如载体、特异受体、酶、表面抗原。(3)膜糖和糖衣。

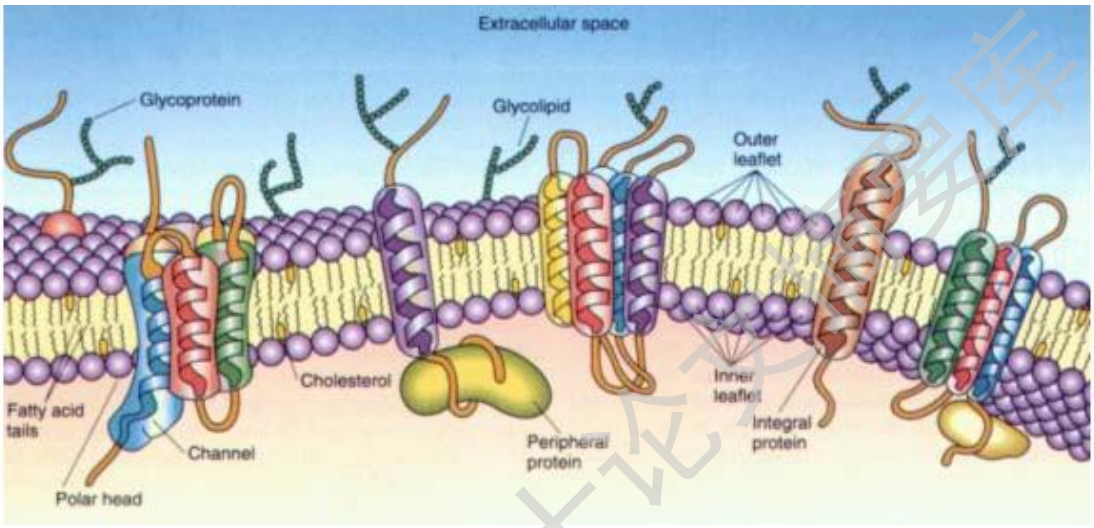

Fig.1-1 Scheme of cell membrane 图片来自http://www.bbioo.com

虽然不同细胞的细胞膜组成不一样，但细胞膜具有一些共同特征：(1)镶嵌性：磷脂双分子层和蛋白质形成镶嵌面，或按二维排成相互交替的镶嵌面；(2)蛋白质极性：膜内在性蛋白质的极性区突向膜表面，非极性部分埋在双层内部；(3)流动性：膜结构中的蛋白质和脂质具有相对侧向流动性；(4)相变性：随着环境条件的变化，脂质分子的晶态和液晶态是互变的；(5)更新态：在细胞中，膜的组份处于不断更新的状态；(6)不对称性：膜中各组份的排列是不对称的。

细胞膜的组成和其特征决定了细胞膜的功能。其主要重要功能如下：为细胞的生命活动提供相对稳定的内环境；选择性的物质运输，包括代谢底物的输入与代谢产物的排出；提供细胞识别位点，并完成细胞内外信息的跨膜传递；为多种酶提供结合位点，使酶促反应高效而有序地进行；介导细胞与细胞、细胞与基质之间的连接；参与形成具有不同功能的细胞表面特殊化结构。

细胞内主要是细胞质(Cytoplasm)，细胞质又称胞浆，是由细胞质基质，内膜系统、细胞骨架和包涵物组成。细胞质基质的功能如下：1)具有较大的缓冲容量，为细胞内各类生化反应的正常进行提供了相对稳定的离子环境。2)许多代谢过程

是在细胞基质中完成的，如①蛋白质的合成、②核酸的合成、③脂肪酸的合成、④糖酵解、⑤磷酸戊糖途径、⑥糖原代谢、⑦信号转导。3)供给细胞器行使其功能所需要的一切底物。4)细胞骨架参与维持细胞形态，做为细胞器和酶的附着点，并与细胞运动、物质运输和信号转导有关。5)控制基因的表达与细胞核一起参与细胞的分化。

在细胞质中分散了许多细胞器，图2是动物细胞的结构。不同细胞器具有不同的生理功能：1)内质网(Endoplasmic reticulum)：由膜围成一个连续的管道系统，粗面内质网(Rough endoplasmic reticulum，RER)，表面附有核糖体，参与蛋白质的合成和加工；光面内质网(Smooth endoplasmic reticulum，SER)表面没有核糖体，参与脂类合成。2)高尔基体(Golgi body；Golgi apparatus)：由成摞的扁囊和小泡组成，与细胞的分泌活动和溶酶体的形成有关。3)溶酶体(Lysosome)：动物细胞中进行细胞内消化作用的细胞器，含有多种酸性水解酶。4) 线粒体(Mitochondrion)：由双层膜围成的与能量代谢有关的细胞器，主要作用是通过氧化磷酸化合成ATP。5)细胞骨架(Cytoskeleton)：由微管、微丝和中间丝构成，细胞骨架与细胞运动和维持细胞形态有关。6)中心粒(Centriole)：位于动物细胞的中心部位，由相互垂直的两组三联微管组成。中心粒加中心粒周物质称为中心体(Centrosome)。7)微体(microbody)：由单层单位膜围成的小泡状结构，含有多种氧化酶，与分解过氧化氢和乙醛酸循环有关。

细胞通过有丝分裂不断的繁殖，细胞周期(Cell cycle)是指细胞从前一次分裂结束起到下一次分裂结束为止的活动过程，分为间期与分裂期两个阶段。

(一) 间期：间期又分为三期、即DNA合成前期(G1期)、DNA合成期(S期)与DNA合成后期(G2期)。

(二)分裂期：细胞的有丝分裂(Mitosis)需经前、中、后，末期，是一个连续变化过程，由一个母细胞分裂成为两个子细胞，一般需1～2小时。

厦门大学博硕士论文摘要库

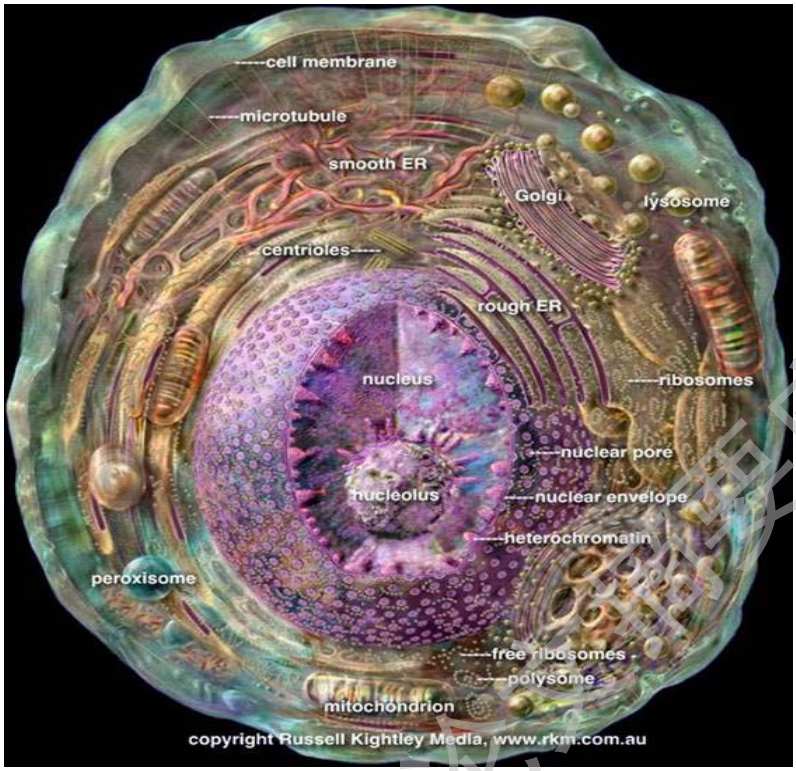

Fig.1-2 Structure of animal cell, 图片来自http://www.rkm.com.au

在体内，不同细胞分裂能力不同，各自执行不同的功能。细胞分裂的同时，同样细胞也会发生死亡，但细胞死亡并非与机体死亡同步。正常的组织中，经常发生“正常”的细胞死亡，它是维持组织机能和形态所必需的。细胞死亡的方式通常有3种：即①细胞坏死(Necrosis)，②细胞凋亡(Apoptosis)，③细胞程序性死亡(Programmed cell death，PCD)。

细胞坏死是细胞受到强烈理化或生物因素作用引起细胞无序变化的死亡过程。表现为细胞胀大，胞膜破裂，细胞内容物外溢，核变化较慢，DNA 降解不充分，引起局部严重的炎症反应。

细胞凋亡是指为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主的有序的死亡。细胞凋亡与细胞坏死不同，细胞凋亡不是一件被动的过程，而是主动过程，它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用；它并不是病理条件下，自身损伤的一种现象，而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。凋亡细胞的主要特征是：①在细胞凋亡早期位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)迁移至细胞膜外测，染色质聚集、分块、位于核膜上，胞质凝缩，最后核断裂，细胞通过出芽的方式形成许多凋亡小体；②凋亡小体内有结构完整的细胞器，还有凝缩的染

厦门大学博硕士论文摘要库

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