单个氮化碳纳米片电化学发光成像监测细胞分泌铜离子

马诚, 吴婉婉, 朱俊杰*

南京大学化学化工学院, 南京 210023

*通讯作者, E-mail: jjzhu@nju.edu.cn

收稿日期: 2019-12-26; 接受日期: 2020-01-19; 网络版发表日期: 2020-03-25

国家自然科学基金(编号: 21834004, 21904063)和江苏省自然科学基金青年基金(编号: BK20190279)资助项目

摘要 单细胞显微成像技术已经逐渐成为生物学中不可缺少的基础诊断工具. 电化学发光(ECL)显微成像技术具有无需激发光源、零光学背景和响应速度快等优点, 因此在单细胞分析中具有很大的优势. 我们开发了基于石墨相氮化碳纳米片的ECL显微成像传感平台, 用于实时监测单细胞分泌铜离子的含量. 体外实验发现纳米片的ECL强度对铜离子具有良好的线性响应和选择性. 细胞实验也同样证明了在细胞体系中, 细胞周围的纳米片能够作为ECL探针用于监测细胞分泌铜离子的过程. 这项单颗粒ECL成像技术有望用于进一步监测其他细胞分泌物.

关键词 电化学发光, 铜离子, 石墨相氮化碳纳米片, 显微成像, 单细胞

1 引言

单细胞分析技术能够直接观察细胞异质性和准确评估细胞的生理和病理过程^[1,2]. 其中, 电化学检测方法能够快速提供单细胞通讯过程中细胞局域微环境的生物分子浓度^[3,4]. 扫描电化学显微镜能够利用微电极探针测量单细胞不同区域电化学信息, 但是这种扫描的方法需要较长的时间才能完成整个细胞的信号采集, 损失了时间分辨率^[5]. 微电极阵列可以同时去记录细胞不同区域的电化学信号, 来反映细胞动态的通讯过程^[6,7]. 但是这种方法需要复杂的微加工工艺, 目前还很难应用和推广. 另一种方法是利用基于表面等离子体共振的电化学阻抗显微成像技术^[8], 这种技术利用金膜电极表面电化学过程中表面物质折射率的变化

来反映电化学阻抗, 因此可以时空分辨成像单细胞电化学过程. 但是这种方法检测灵敏度较低, 很难对细胞局域微量的分泌物进行成像.

电化学发光(ECL)是通过电极表面发生的电化学反应产生高能自由基, 这些高能自由基之间的电子传递导致发光分子从基态跃迁到激发态, 从而发射出光子^[9,10]. 相比于电化学检测方法, ECL排除了电极充电和电路噪音等电信号背景; 相比于荧光检测方法, ECL避免了光散射和溶液荧光等光学背景^[11]. 由于ECL具有电激发、光发射的特点, 所以这种方法具有较高的检测灵敏度, 被广泛应用于临床微量疾病标志物的检测. 近期, 我们将ECL与光学显微成像技术结合, 开发出了ECL显微成像技术^[12]. 该技术具有低光学背景、良好的时空可控性和响应快速等特点, 在单

引用格式: Ma C, Wu W, Zhu JJ. Electrochemiluminescence microscopy of single carbon nitride nanosheets monitors copper ion secretion from single cells. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 631–638, doi: [10.1360/SSC-2019-0167](https://doi.org/10.1360/SSC-2019-0167)

细胞研究方面得到了极大的关注并取得了一系列进展^[13-15].

目前单细胞ECL成像技术已经成功用于检测单细胞膜蛋白和单细胞分泌物^[16-18]. 在单细胞膜蛋白检测方面, Sojic课题组^[13,14]利用标记三联吡啶分子的抗体, 特异性地识别细胞膜表面的膜蛋白, 实现了单细胞膜蛋白的ECL成像. 在此基础上, 为了提高成像的灵敏度, 曹俊涛等^[17]合成了三联吡啶掺杂的二氧化硅与金纳米颗粒复合物作为发光体, 去标记细胞膜表面的前列腺特异性抗原, 由于纳米材料相比于小分子具有更强的ECL强度, 所以能够实现对单个前列腺癌细胞表面抗原的成像. 最近, 江德臣等^[15]开发了一种测量电容的ECL成像技术, 可以用于免标记检测细胞膜蛋白. 在单细胞分泌物检测方面, 该课题组^[19-21]以细胞产生的过氧化氢作为检测对象, 利用过氧化氢增强鲁米诺衍生物L012的发光强度, 做出了许多开创性的研究工作, 并将其拓展到测量细胞膜活性胆固醇、葡萄糖等生物分子. 在此基础上, 本课题组^[18]在FTO导电玻璃表面修饰二氧化钛与壳聚糖薄膜, 实现了单细胞分泌过氧化氢的信号“turn on”成像方法, 提高了细胞分泌过氧化氢的测量灵敏度.

尽管ECL成像技术可以用来检测单细胞分泌物, 但是目前报道的方法依然存在细胞背景的干扰, 对定量细胞局部生物分子的浓度造成影响^[21]. 因此我们开发了低背景的ECL单细胞成像技术. 这种技术利用单个石墨相氮化碳(g-C₃N₄)纳米片作为ECL探针, 由于g-C₃N₄纳米片具有稳定的阴极ECL强度和快速的Cu²⁺响应能力, 所以可以快速监测单细胞分泌的Cu²⁺浓度, 并展示出良好的选择性.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

过二硫酸钾和硫酸钾购自国药集团化学试剂有限公司(中国), 多巴胺购自Sigma-Aldrich试剂公司(美国), 谷胱甘肽(GSH)购自阿拉丁试剂有限公司(美国), 硫酸铜、硝酸铁和无水硫酸镁购自南京化学试剂有限公司(中国). 本研究使用的二次水均是处理后的超纯水(Milli-Q system, Millipore, 美国). 玻碳电极、抛光粉、抛光打磨帆布和麂皮购自上海辰华仪器有限公司. 铂丝对电极购自武汉高仕睿联有限公司. Ag/AgCl

参比电极购自上海金匠仪器有限公司. 聚二甲基硅氧烷(PDMS)购自美国道康宁公司. 宫颈癌细胞HeLa细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所.

透射电子显微镜照片使用JEOL JEM 200CX高分辨透射电子显微镜(日本)获得, 动态光散射通过Brookhaven Instruments (美国)获得, 原子力显微镜照片使用布鲁克ICON(德国)获得. X射线粉末衍射(XRD)由Philip-X'Pert X射线粉末衍射仪以Cu K α X射线源($\lambda=0.15418$ nm) (美国)进行表征. 电化学信号由CHI 660D电化学工作站提供(上海辰华仪器有限公司, 中国). 电极打磨机购自武汉高仕睿联科技有限公司. 在电化学反应系统中, 由玻碳电极作为工作电极, 铂电极作为对电极, Ag/AgCl (饱和KCl)作为参比电极, 以此构成三电极体系. ECL图像由Andor公司生产的EMCCD (iXon Ultra)获得. 水浸物镜购自奥林巴斯(Olympus LUMFLN $\times 60$, NA=1.10). 其他光学零件和光机组件购自索雷博公司.

2.2 实验方法

2.2.1 g-C₃N₄纳米片的合成

将三聚氰胺在管式炉中550℃加热4 h, 随后将得到的块状材料研磨成粉末. 将100 mg粉末加入到100 mL水中超声24 h后, 将获得的悬浊液在6000 r/min转速下离心10 min, 收集包含g-C₃N₄纳米片的上层清液^[22].

2.2.2 玻碳电极处理和修饰

将直径为3 mm的玻碳电极分别用0.3和0.05 μm Al₂O₃粉末在电极打磨机上抛光打磨, 随后在水、丙酮、乙醇和水中各超声2 min, 高纯氮气吹干后待用. 取5 μL 的0.2 mg/mL的g-C₃N₄纳米片溶液滴涂到玻碳电极表面, 随后自然晾干.

2.2.3 g-C₃N₄纳米片的ECL与荧光成像

用于成像的电解池由透明池体和密封底座构成, 池体制作材料为石英, 密封底座为PDMS. 石英池体和PDMS中部都有一个直径为6.3 mm的通孔, 将直径6.3 mm的玻碳电极分别穿过PDMS和池体, 再将石英池体底面与PDMS的表面紧密接触, 即可起到密封效果.

实验采用Ag/AgCl (饱和KCl)电极为参比电极, 铂

电极为对电极, 与玻碳电极共同构成三电极系统. 玻碳电极位于水浸物镜正下方, 并且其与电化学池一起固定在镜头下方的可移动载物台上. 向电化学池中加入电解液, 将Ag/AgCl电极、铂电极(均由夹持装置固定)浸没于电解液中. 实验中由电化学工作站对三电极系统施加电压, 产生的ECL信号经由物镜采集, 通过凸透镜成像于EMCCD上. 循环伏安扫描设置参数: 初始电位和高电位为0 V, 低电位为-1.5 V, 扫描速度为0.1 V/s, 采样间隔0.001, 灵敏度 10^{-3} ; ECL成像参数: 曝光1 s, EM gain 300. 荧光成像使用汞灯作为激发光源, 将荧光入射带通滤光片(381/399 nm)、荧光发射带通滤光片(430/490 nm)和二相色镜(反射带360/407 nm; 透射带425/575 nm)插入到显微镜中. 图像信号的处理由Image J软件完成, 图像以TIFF格式输出.

2.2.4 g-C₃N₄纳米片的ECL对Cu²⁺响应的选择性

将g-C₃N₄纳米片修饰的玻碳电极固定在显微镜下方, 加入0.10 M K₂S₂O₈电解液后, 给电极表面施加循环电压扫描: 初始电位和高电位为0 V, 低电位为-1.5 V, 扫描速度为0.1 V/s, 采样间隔0.001, 灵敏度 10^{-3} ; ECL成像: 曝光1 s, EM gain 300. 当g-C₃N₄纳米片的ECL强度稳定后, 在250 s时, 用注射器向电解液中注入50 μ M Mg²⁺、Fe³⁺、H₂O₂、GSH、多巴胺或Cu²⁺, 以及Cu²⁺和Mg²⁺、Fe³⁺、H₂O₂、GSH、多巴胺这五种物质共存的溶液, 记录g-C₃N₄纳米片ECL强度的变化.

2.2.5 g-C₃N₄纳米片的ECL对Cu²⁺的滴定曲线

将g-C₃N₄纳米片修饰的玻碳电极固定在显微镜下方, 加入0.10 M K₂S₂O₈电解液后, 给电极表面施加循环电压扫描: 初始电位和高电位为0 V, 低电位为-1.5 V, 扫描速度0.1 V/s, 采样间隔0.001, 灵敏度 10^{-3} ; ECL成像: 曝光1 s, EM gain 300. 当g-C₃N₄纳米片的ECL强度稳定后, 分别在758、944、1183、1342和1555 s, 用注射器向电解液中注入10 μ M Cu²⁺, 记录g-C₃N₄纳米片ECL强度随时间的变化.

2.2.6 HeLa细胞培养

人宫颈癌细胞株HeLa在DMEM培养基中培养, 其中含有10%胎牛血清(Gibco, Grand Island, 美国), 100 μ g/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素. 培养环境为含有5% CO₂的37℃培养箱. 当细胞处于对数生长期时,

用胰蛋白酶让贴壁细胞从培养瓶底部脱离, 离心得到细胞团块后, 将细胞进行传代培养.

2.2.7 g-C₃N₄纳米片的ECL成像HeLa细胞分泌Cu²⁺

将玻碳电极浸泡在200 μ L的HeLa细胞悬液中, 放入到培养箱中培养8 h, 让细胞贴附在玻碳电极表面. 用磷酸盐缓冲液(PBS)小心冲洗掉未贴附的细胞后, 向电极表面加入含有g-C₃N₄纳米片的缓冲液, 让纳米片贴附到电极表面. 用PBS缓冲液小心冲洗掉未贴附的g-C₃N₄纳米片后, 向电极表面加入含有不同浓度Cu²⁺的缓冲液, 与细胞共同孵育1 h, 让Cu²⁺进入到细胞内部. 用缓冲液小心冲洗掉游离的Cu²⁺后, 立即加入1 mL 100 mM K₂S₂O₈电解液并给电极表面施加电压激发g-C₃N₄纳米片发射ECL. 电化学参数: 循环电压扫描, 初始电位和高电位为0 V, 低电位为-1.5 V, 扫描速度0.1 V/s, 采样间隔0.001, 灵敏度 10^{-3} ; ECL成像: 曝光1 s, EM gain 300.

3 结果与讨论

3.1 g-C₃N₄纳米片的表征

我们利用高分辨透射电子显微镜(HRTEM)去观察g-C₃N₄纳米片的形貌. 如图1(a)所示, 超声剥离后的g-C₃N₄纳米片的尺寸在100~300 nm之间, 呈现出薄片少层结构. 动态光散射(图1(b))表明纳米片的平均尺寸在145 nm. 原子力显微镜(图1(c, d))展示出纳米片的厚度大约在10 nm. XRD图谱(图1(e))显示出g-C₃N₄纳米片在 $2\theta=27^\circ$ 处有一个明显的衍射峰, 这个峰对应g-C₃N₄层状堆叠的二维结构^[23]. 图1(f)显示获得的g-C₃N₄纳米片溶液为澄清透明状, 在波长为365 nm的紫外光激发下发射出蓝色的荧光. 而当我们把g-C₃N₄纳米片溶液滴涂到碳纸上干燥成膜后, 放入到含有K₂S₂O₈的电解液中, 并且施加一定的电压, 同样可以发现g-C₃N₄纳米片表现出肉眼可见的蓝色ECL发射, 说明g-C₃N₄纳米片具有很高的ECL发射强度.

3.2 g-C₃N₄纳米片的ECL成像

如图2(a)所示, 将修饰有g-C₃N₄纳米片的玻碳电极放置在物镜下方, 向电解池中加入包含100 mM K₂S₂O₈的电解液, 并将Ag/AgCl参比电极和铂丝对电极插入到电解液中. 接着使用自制的显微镜对g-C₃N₄纳米片

图1 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的表征. $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的TEM图(a), 动态光散射粒径分布图(b), 原子力显微镜成像图(c). (d) 在图(c)中白线划过的两个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的厚度分布. (e) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的XRD图谱. (f) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片溶液的明场(左图)、荧光(中图, 365 nm激发)和ECL (右图, 碳纸电极为工作电极)(网络版彩图)

Figure 1 Characterization of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets. TEM (a), DLS (b) and AFM (c) of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets. (d) Thickness of two $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets in (c). (e) XRD spectrum of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets. (f) Photo (left), fluorescence (middle) and ECL (right) of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets. Excitation light: 365 nm. Work electrode: carbon paper (color online).

进行ECL成像, 当向电极表面施加0 V到-1.5 V的循环电压时, 玻碳电极表面的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片发射出的ECL被水浸物镜所收集, 最终成像在EMCCD上. 由于物镜的放大倍率很大, 所以EMCCD的成像视野只有大约 $160\ \mu\text{m} \times 160\ \mu\text{m}$ 的区域. 图2(b)展示了玻碳电极表面 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片发射出的ECL图像, 图像中每一个离散的斑点代表了单个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片所发射出的ECL. 为了证明这一点, 我们对同一片区域进行了荧光成像. 利用汞灯作为激发光源, 并向光路中插入了荧光滤色片和二相色镜, 最后用EMCCD对单个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片所发射出的荧光进行成像. 如图2(c)所示, 通过荧光共定位技术, 发现荧光成像与ECL成像的发光斑点几乎完全一致, 证明了这些离散的ECL斑点确实来自于单个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片, 并且说明我们的ECL成像能够达到与荧光成像相当的灵敏度. 图2(d)统计了视野中所有 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的荧光与ECL强度, 统计数据表明每个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的ECL强度与其荧光强度具有大致的正

图2 (a) ECL显微镜的光路示意图. 电极表面 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片发射出的ECL被物镜收集, 经过凸透镜汇聚到EMCCD上, 得到最终的ECL图像. (b) 玻碳电极表面单个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的ECL成像图. 电化学方法: 循环伏安法. 扫描电压范围: 0~-1.5 V. 扫描速度: 0.1 V/s. (c) 玻碳电极表面单个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的荧光成像图, 其中成像区域与(b)相同. (d) 视野中所有 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的ECL强度与其荧光强度的对应关系. (e) 单个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片随着连续11圈循环伏安扫描的ECL强度变化(网络版彩图)

Figure 2 (a) ECL microscopy setup. ECL from $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets on the electrode is collected by a water-immersion objective of high numerical aperture. The diverging light is focused by the imaging lens and then is imaged on the EMCCD. (b) ECL image of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets. (c) Fluorescence image of the same set of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets. (d) Relationship between ECL and fluorescence intensity of single $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheets. (e) ECL trajectory of single $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanosheet with continuous cyclic voltammetry scans (11 circles) (color online).

相关性, 但是也存在一定的偏差, 这种差异表明ECL与荧光有着不同的产生机制. $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的荧光发射主要来源于光生电子与空穴复合的光物理过程, 而ECL发射则一方面来自于材料与电极之间的电化学反应, 另一方面来自于材料与电生高能自由基的电子转移反应, 通过两者共同作用产生ECL, 所以ECL的产生机制要比荧光更加复杂^[24].

我们考察了单个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的ECL发光稳定性. 如图2(e)所示, 记录了在连续的循环伏安扫描下, 单个 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片ECL强度的变化. 结果表明, $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片的ECL发光强度并没有出现明显衰减, 展示了良好的发光稳定性, 因此说明 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片是一种发光强度高并且稳定性好的ECL发光材料. 我们认为这种发光稳定性得益于 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片是一种化学惰性的结构, 在连续的电氧化还原反应中能够维持自身的结构不被破坏, 并且每个均三嗪结构都能作为一个最小的ECL发光单元体, 使得 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米片表现出了与三联吡啶钌和鲁米诺相媲美的ECL发光强度^[24].

3.3 单个g-C₃N₄纳米片的ECL对Cu²⁺响应的选择性

文献报道许多半导体材料的ECL发射会被Cu²⁺淬灭^[10]. 由于Cu²⁺/Cu的氧化还原电势在g-C₃N₄纳米片的导带和价带之间, 所以g-C₃N₄纳米片的ECL也应该被Cu²⁺所淬灭^[24]. 为了验证单个g-C₃N₄纳米片的ECL对Cu²⁺的选择性并将其应用于细胞成像, 我们首先需要考察细胞体系中共存物质对于g-C₃N₄纳米片ECL强度的干扰. 我们选择了细胞体系广泛存在的Mg²⁺、Fe³⁺、H₂O₂、GSH和多巴胺这五种物质, 用于考察g-C₃N₄纳米片对Cu²⁺的选择性. 如图3所示, 使用单独g-C₃N₄纳米片的ECL发光强度作为对照, 当体系中存在Mg²⁺、Fe³⁺、H₂O₂、GSH和多巴胺这五种物质时, g-C₃N₄纳米片的ECL发光强度并没有明显的变化, 说明这些物质的存在并不会影响到g-C₃N₄纳米片的ECL发射. 而当体系中加入Cu²⁺后, g-C₃N₄纳米片的ECL发光强度却发生了明显的降低. 随后我们又在含有Mg²⁺、Fe³⁺、H₂O₂、GSH和多巴胺的电解液中加入了Cu²⁺, 发现这几种干扰物质的存在并不会影响g-C₃N₄纳米片对Cu²⁺的响应, 说明了g-C₃N₄纳米片对于Cu²⁺具有良好的选择性, 并且不会受到细胞体系中干扰物质的影响. 这保证了后期利用g-C₃N₄纳米片作为ECL探针对细胞分泌Cu²⁺进行监测的准确性.

3.4 单个g-C₃N₄纳米片的ECL对Cu²⁺的滴定曲线

为了能够得到g-C₃N₄纳米片的ECL强度与Cu²⁺浓度的关系, 我们在连续的循环伏安扫描过程中, 每隔一段时间向电解液中注入一定量的Cu²⁺, 同时记录g-C₃N₄纳米片的ECL强度变化. 如图4所示, 当g-C₃N₄纳米片的ECL发射强度稳定了以后, 我们向电解液中注入10 μM的Cu²⁺, 发现纳米片的ECL强度立即发生衰减, 随后达到一个稳定的发光平台, 说明注入的Cu²⁺通过扩散到达电极表面, 淬灭了g-C₃N₄纳米片的ECL, 而当电解液中的Cu²⁺扩散达到稳态以后, g-C₃N₄纳米片的ECL也随之达到了一个平台. 而后每间隔一段时间, 就向电解液中注入一次10 μM的Cu²⁺, g-C₃N₄纳米片的ECL强度都会随之衰减, 达到一个更低的发光平台. 将每次注入Cu²⁺后, g-C₃N₄纳米片的ECL发射平台的峰强度求统计平均值, 可以发现ECL强度的统计平均值与所加入的Cu²⁺浓度呈现出很好的线性相关性, 说明可以用单个g-C₃N₄纳米片去实时定量监测其周边

图 3 成像g-C₃N₄纳米片在干扰体系中对Cu²⁺的选择性. (a) 当体系中存在不同的干扰物质时, 单个g-C₃N₄纳米片的ECL图像. 标尺(白色): 3 μm. (b) 测量g-C₃N₄纳米片对只有Mg²⁺、Fe³⁺、H₂O₂、GSH和多巴胺(DA)这五种物质的选择性, 以及当Cu²⁺和这五种物质共存条件下的选择性. 体系中Cu²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、H₂O₂、GSH和多巴胺(DA)的浓度都为50 μM. 电解液: 100 mM K₂S₂O₈溶液. 电化学方法: 循环伏安法. 扫描范围: 0~−1.5 V. 扫描速度: 0.1 V/s. 曝光时间: 1 s. 误差棒: 5个g-C₃N₄纳米片ECL强度的标准偏差(网络版彩图)

Figure 3 Selectivity of ECL intensity of single g-C₃N₄ nanosheets to Cu²⁺ with interference agents. (a) ECL image of single g-C₃N₄ nanosheets with interference agents (Mg²⁺, Fe³⁺, H₂O₂, GSH and dopamine (DA)). Scale bar: 3 μm. (b) Statistic ECL intensity of single g-C₃N₄ nanosheets with interference agents (Mg²⁺, Fe³⁺, H₂O₂, GSH and dopamine (DA)). The concentration of five interference agents and Cu²⁺ is 50 μM. Electrolyte: 100 mM K₂S₂O₈ solution. Electrochemical method: cyclic voltammetry. Scan range: 0 - -1.5 V. Scan rate: 0.1 V/s. Exposure time: 1 s. Error bar: standard deviation (n=5) (color online).

局域Cu²⁺浓度的变化.

3.5 g-C₃N₄纳米片作为ECL探针成像细胞分泌Cu²⁺

由于HeLa细胞内部Cu²⁺含量较少, 所以我们通过在培养基中加入Cu²⁺来提高细胞内部Cu²⁺的含量. 首先将贴附在玻碳电极表面的HeLa细胞与含有Cu²⁺的培养基一起孵育1 h, 让细胞外的Cu²⁺孵育到细胞内部. 随后将细胞外部的Cu²⁺洗去, 这时由于细胞内部Cu²⁺含量大于细胞外, 细胞就会开始向外分泌Cu²⁺. 因为细胞外部的g-C₃N₄纳米片的ECL强度能够被Cu²⁺所淬灭, 所以通过监测细胞外部g-C₃N₄纳米片的ECL强度, 就可以得到细胞分泌Cu²⁺的含量. 如图5所示, 当我们给细胞孵育不同浓度的Cu²⁺(0、100、200和300 μM), 导

图 4 (a) 连续加入Cu²⁺ (每次10 μM), g-C₃N₄纳米片的ECL图像. 标尺(白色): 2 μm. (b) 单个g-C₃N₄纳米片的ECL强度随着时间的变化曲线, 其中每间隔一段时间向电解液中注入10 μM Cu²⁺. (c) 单个g-C₃N₄纳米片在每次加入10 μM Cu²⁺后ECL强度的统计平均值与Cu²⁺浓度的线性拟合曲线. 电解液: 100 mM K₂S₂O₈溶液. 电化学方法: 循环伏安法. 扫描范围: 0~−1.5 V. 扫描速度: 0.1 V/s. 曝光时间: 1 s. 误差棒: 在每次加入Cu²⁺后, g-C₃N₄纳米片的ECL峰强度的标准偏差(网络版彩图)

Figure 4 (a) ECL images of single g-C₃N₄ nanosheet with continuous addition of 10 μM Cu²⁺. Scale bar: 2 μm. (b) ECL trajectory of single g-C₃N₄ nanosheet with continuous addition of 10 μM Cu²⁺. (c) Average ECL intensity of single g-C₃N₄ nanosheet at each plateau as a function of Cu²⁺ concentration. Electrolyte: 100 mM K₂S₂O₈ solution. Electrochemical method: cyclic voltammetry. Scan range: 0 ~ −1.5 V. Scan rate: 0.1 V/s. Exposure time: 1 s. Error bar: standard deviation of each ECL plateau (color online).

图 5 当HeLa细胞孵育不同浓度(0、100、200和300 μM)的Cu²⁺后, 洗去培养基中多余的Cu²⁺, 观察细胞周围g-C₃N₄纳米片的ECL强度. 标尺(白色): 20 μm. 电解液: 100 mM K₂S₂O₈溶液. 电化学方法: 循环伏安法. 扫描范围: 0~−1.5 V. 扫描速度: 0.1 V/s. 曝光时间: 1 s

Figure 5 ECL intensity of g-C₃N₄ nanosheets around single HeLa cell after the cell is incubated with 0, 100, 200 and 300 μM Cu²⁺. Scale bar: 20 μm. Electrolyte: 100 mM K₂S₂O₈ solution. Electrochemical method: cyclic voltammetry. Scan range: 0 ~ −1.5 V. Scan rate: 0.1 V/s. Exposure time: 1 s.

致细胞内部的初始Cu²⁺含量不同. 随后洗去细胞外的Cu²⁺后, 对电极表面施加电压, 监测细胞分泌Cu²⁺的浓度. 当细胞内部Cu²⁺浓度较高时, 细胞分泌的Cu²⁺浓度也较高, 那么细胞外g-C₃N₄纳米片的ECL强度就会降低, 反之亦然. 这说明可以通过监测细胞外g-C₃N₄纳米片的ECL强度来反映细胞分泌Cu²⁺的浓度.

如图6所示, 在连续的循环伏安扫描时, 我们监测了细胞外g-C₃N₄纳米片的ECL强度变化, 发现细胞外纳米片的ECL强度表现出逐渐上升的趋势, 并在后期达到稳定. 而对照组的g-C₃N₄纳米片(孵育0 μM的Cu²⁺)

图 6 (a~d) 当给HeLa细胞孵育不同浓度的Cu²⁺后, 细胞外g-C₃N₄纳米片随着连续循环伏安扫描的ECL强度变化曲线. (e) 细胞孵育的Cu²⁺浓度与细胞外g-C₃N₄纳米片ECL强度的初始淬灭率的关系(黑色); 细胞孵育的Cu²⁺浓度和与细胞初始分泌Cu²⁺浓度的关系(红色). 误差棒: 4个g-C₃N₄纳米片获得信号的标准偏差, 直线代表线性拟合曲线. (f) 当给HeLa细胞孵育300 μM的Cu²⁺后, 细胞分泌Cu²⁺的浓度随着时间的变化趋势(网络版彩图)

Figure 6 (a~d) ECL trajectories of single g-C₃N₄ nanosheets around the cell with continuous cyclic voltammetry scans when HeLa cell is incubated with different concentration Cu²⁺. (e) Initial quenching rate of ECL intensity of g-C₃N₄ nanosheets around the cell as a function with incubation Cu²⁺ (black dots). Initial Cu²⁺ secretion of the cell as a function with incubation Cu²⁺ (red dots). Error bar: standard deviation ($n=4$). Black and red lines represent linear fitting curves. (f) Concentration of Cu²⁺ secreted by the cell with time elapse after the cell is incubated with 300 μM Cu²⁺ (color online).

的ECL强度始终保持稳定, 这说明细胞分泌 Cu^{2+} 的含量随着时间的延长而不断减少. 由于细胞分泌 Cu^{2+} 的含量受到细胞内 Cu^{2+} 的浓度和 Cu^{2+} 在细胞外扩散的双重影响, 因此 Cu^{2+} 会在细胞外形成一定的浓度梯度. 由于细胞外电解液的体积远大于细胞内的体积, 所以随着细胞内部 Cu^{2+} 不断分泌到细胞外环境中, 细胞内部 Cu^{2+} 含量逐渐减少, 而细胞外 Cu^{2+} 浓度则随着扩散稀释效应而趋近于零. 所以随着时间的延长, 细胞分泌到胞外的 Cu^{2+} 浓度也随之减少, 所以g- C_3N_4 纳米片的ECL强度会不断上升. 当细胞内 Cu^{2+} 完全分泌以后, 此时电解液中 Cu^{2+} 的浓度达到了稳态(近似于零), 于是g- C_3N_4 纳米片的ECL强度也达到了一个平台. 如图6(e)所示, 我们发现g- C_3N_4 纳米片的初始ECL淬灭率和细胞分泌 Cu^{2+} 的初始浓度都与细胞内部 Cu^{2+} 浓度呈现正相关. 图6(f)也表明, 细胞分泌 Cu^{2+} 浓度随着时间的延长而不断降低, 直到细胞内外 Cu^{2+} 浓度一致而达到稳态.

4 结论

我们利用单个g- C_3N_4 纳米片构建了一个ECL显微成像传感器, 用于实时监测细胞分泌 Cu^{2+} 的含量. g- C_3N_4 纳米片展示出极高的ECL强度, 结合我们自主搭建的ECL显微镜, 实现了单个纳米片的ECL成像灵敏度. 由于g- C_3N_4 纳米片能够对 Cu^{2+} 具有灵敏的响应以及在细胞体系中展示出较好的选择性, 利用单个g- C_3N_4 纳米片ECL强度作为信号输出, 用于实时监测电解液中 Cu^{2+} 浓度的变化. 最后证明了g- C_3N_4 纳米片ECL显微成像传感也能够监测细胞分泌的 Cu^{2+} 浓度的变化, 其中细胞分泌 Cu^{2+} 的浓度与细胞内部 Cu^{2+} 浓度呈现正相关, 并且随着时间的延长, 分泌的 Cu^{2+} 含量逐渐降低. 这种g- C_3N_4 纳米片ECL显微成像传感具有较高的时空分辨率和检测通量, 可以对微观区域的分析物进行快速的响应. 基于此显微成像平台, 将有望开发出更多的成像传感方法用于生命分析检测.

参考文献

- 1 Stender AS, Marchuk K, Liu C, Sander S, Meyer MW, Smith EA, Neupane B, Wang G, Li J, Cheng JX, Huang B, Fang N. *Chem Rev*, 2013, 113: 2469–2527
- 2 Liu Q, Wu C, Cai H, Hu N, Zhou J, Wang P. *Chem Rev*, 2014, 114: 6423–6461
- 3 Pan R, Xu M, Burgess JD, Jiang D, Chen HY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 4087–4092
- 4 Zheng XT, Li CM. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 2061–2071
- 5 Pitta Bauermann L, Schuhmann W, Schulte A. *Phys Chem Chem Phys*, 2004, 6: 4003–4008
- 6 Dipalo M, Amin H, Lovato L, Moia F, Caprettini V, Messina GC, Tantussi F, Berdondini L, De Angelis F. *Nano Lett*, 2017, 17: 3932–3939
- 7 Abbott J, Ye T, Qin L, Jorgolli M, Gertner RS, Ham D, Park H. *Nat Nanotech*, 2017, 12: 460–466
- 8 Wang W, Foley K, Shan X, Wang S, Eaton S, Nagaraj VJ, Wiktor P, Patel U, Tao N. *Nat Chem*, 2011, 3: 249–255
- 9 Miao W. *Chem Rev*, 2008, 108: 2506–2553
- 10 Ma C, Cao Y, Gou X, Zhu JJ. *Anal Chem*, 2020, 92: 431–454
- 11 Ma C, Wu W, Peng Y, Wang MX, Chen G, Chen Z, Zhu JJ. *Anal Chem*, 2018, 90: 1334–1339
- 12 Ma C, Wu W, Li L, Wu S, Zhang J, Chen Z, Zhu JJ. *Chem Sci*, 2018, 9: 6167–6175
- 13 Voci S, Goudeau B, Valenti G, Lesch A, Jović M, Rapino S, Paolucci F, Arbault S, Sojic N. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 14753–14760
- 14 Valenti G, Scarabino S, Goudeau B, Lesch A, Jović M, Villani E, Sentic M, Rapino S, Arbault S, Paolucci F, Sojic N. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 16830–16837
- 15 Zhang J, Jin R, Jiang D, Chen HY. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 10294–10299
- 16 Liu G, Jin BK, Ma C, Chen Z, Zhu JJ. *Anal Chem*, 2019, 91: 6363–6370
- 17 Cao JT, Wang YL, Zhang JJ, Dong YX, Liu FR, Ren SW, Liu YM. *Anal Chem*, 2018, 90: 10334–10339
- 18 Liu G, Ma C, Jin BK, Chen Z, Zhu JJ. *Anal Chem*, 2018, 90: 4801–4806
- 19 Zhou J, Ma G, Chen Y, Fang D, Jiang D, Chen HY. *Anal Chem*, 2015, 87: 8138–8143
- 20 Xu J, Huang P, Qin Y, Jiang D, Chen HY. *Anal Chem*, 2016, 88: 4609–4612
- 21 Cui C, Chen Y, Jiang D, Chen HY, Zhang J, Zhu JJ. *Anal Chem*, 2019, 91: 1121–1125
- 22 Zhang X, Xie X, Wang H, Zhang J, Pan B, Xie Y. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 18–21

- 23 Shang Q, Zhou Z, Shen Y, Zhang Y, Li Y, Liu S, Zhang Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 23672–23678
24 Cheng C, Huang Y, Tian X, Zheng B, Li Y, Yuan H, Xiao D, Xie S, Choi MMF. *Anal Chem*, 2012, 84: 4754–4759

Electrochemiluminescence microscopy of single carbon nitride nanosheets monitors copper ion secretion from single cells

Cheng Ma, Wanwan Wu, Jun-Jie Zhu^{*}

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China

^{*}Corresponding author (email: jjzhu@nju.edu.cn)

Abstract: Single-cell microscopy has been becoming an irreplaceable diagnosis tool in fundamental biological research. Electrochemiluminescence (ECL) microscopy possesses great merits in single-cell analysis such as fast response, zero optical background, and dispensation from light source. Here we develop ECL microscopy to *in-situ* monitor copper ion secretion from single cells on the basis of graphitic carbon nitride nanosheets. ECL emission of single g-C₃N₄ nanosheets shows good linear response and selectivity to copper ion *in vitro*. We also demonstrate that g-C₃N₄ nanosheets around the cell act as ECL probes to trace the copper ion secretion from the cell. The proposed ECL microscopy has great potential to monitor other cell secretion in the future.

Keywords: electrochemiluminescence, copper ion, graphitic carbon nitride, microscopy, single-cell

doi: [10.1360/SSC-2019-0167](https://doi.org/10.1360/SSC-2019-0167)