分类号: _____065 ____

密 级:_____

单位代码: <u>10335</u> 学 号: <u>11737045</u>

浙江大学

博士学位论文



中文论文题目: <u>细胞电化学发光成像分析</u> 英文论文题目: <u>Cell Analysis by Electrochemiluminescence</u> <u>Imaging</u>

丁昊
苏彬 教授
化学
分析化学
化学系

论文提交日期 2021 年 7 月

细胞电化学发光成像分析

论文作者签名:____

指导教师签名:_____

- 论文评阅人 1:
 匿名评审

 评阅人 2:
 匿名评审

 评阅人 3:
 匿名评审

 评阅人 4:
 匿名评审

 评阅人 5:
 匿名评审
- 答辩委员会主席: 邬建敏 教授 浙江大学
 - 委员1: 刘清君教授 浙江大学
 - 委员 2: 黄又举 教授 杭州师范大学
 - 委员 3: 傅迎春 教授 浙江大学

答辩日期: 2021 年 9 月 1 日

Cell Analysis by Electrochemiluminescence Imaging

Author's signature:_____

Supervisor's signature:_____

External Reviewers: Anonymous Reviewer

Anonymous Reviewer

Anonymous Reviewer

Anonymous Reviewer

Anonymous Reviewer

Examining Committee Chairperson:

Prof. Jianmin Wu, Zhejiang University

Examining Committee Members:

Prof. Qingjun Liu, Zhejiang University

Prof. Youju Huang, Hangzhou Normal University

Prof. Yingchun Fu, Zhejiang University

Prof. Xingyu Lin, Zhejiang University

Date of oral defence: 2021.9.1

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。 据我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写 过的研究成果,也不包含为获得<u>浙江大学</u>或其他教育机构的学位或证书而使用过的材 料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢 意。

学位论文作者签名: 签字日期: 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有关保留、使用学位论文的规定,有权保留并 向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅和借阅。本人授权 <u>浙</u> <u>江大学</u>可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩 印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

学位论文作者签名:

导师签名:

签字日期: 年月日 签字日期: 年月日

知识产权保护声明

本人郑重声明:我所提交答辩的学位论文,是本人在导师指导下完成的成果,该成果 属于浙江大学理学院化学系,受国家知识产权法保护。在学期间与毕业后以任何形式公开 发表论文或申请专利,均需由导师作为通讯联系人,未经导师的书面许可,本人不得以任 何方式,以任何其它单位作全部和局部署名公布学位论文成果。本人完全意识到本声明的 法律责任由本人承担。

学位论文作者签名:

日期: 年月日

致谢

本论文是在苏彬教授的悉心指导下完成的。从论文的选题、实验的开展,到数据的讨论与文章的撰写,苏老师关心学生科研成长的每一个环节,亲力亲为,给予 我们及时的帮助和指导,使我们尽可能得到锻炼,获得成长。苏老师广阔的科研视 野、扎实的理论功底令我佩服;对待科研始终精力充沛,也让我惊叹。除了科研外, 苏老师也教给我们生活的经验和道理,帮助我们褪去幼稚,走向成熟。我深知自己 的点滴进步都离不开苏老师的培养,谢谢老师,也祝您一切顺利!

感谢课题组同学们的关心和帮助。感谢已经毕业的孙琴琴、晏菲、杨倩、谢李 斯琪、黄晓师姐和林星宇、吴万豪师兄,与你们相识时,我还是刚进组的小师妹, 感谢你们在实验和生活中的热情指导和帮助,让我很快地融入苏组大家庭。感谢"有 点虚"的赵美姣和段子手刘燕欢,有你们的实验室欢声笑语不断。感谢我的"饭友", 总是热心帮忙的我的老乡周萍,幽默风趣的王亚锋师兄和淡定的丁鹭榕师妹,与你 们相处的时光总是轻松愉快。感谢学霸曹芷源和同级的孙磊和周璘在实验中的帮助。 感谢杨蓉婕、刘姗姗、胡书杰、孙慧、胡诗帆、丁家连和李心如师妹,以及傅文轩 和朱博宇师弟,感谢大家在生活中的帮助和实验中的启发,祝愿大家的实验顺顺利 利,生活快快乐乐。感谢我的男朋友郭维亮一直以来的支持和陪伴。

另外,特别感谢南京大学江德臣老师和张晶晶师姐、浙江大学邬建敏老师和王 涛同学在细胞培养与成像方面提供的帮助。也感谢化学实验中心的老师和同学们的 帮助。

最后,感谢我的父母和亲人。你们给予我无条件的爱与支持,家是我永远的港 湾。

丁昊

2021 年 8 月于紫金港

I

摘要

细胞是生命体结构和功能的基本单位,也是联结生命科学宏观和微观研究的枢 纽。在解析细胞的物质组成和结构的基础上,细胞分析聚焦细胞结构与功能的关系, 理解细胞内的基因表达、信号转导等过程,以揭示细胞生命活动的基本规律。不同于 溶液中的分析测量,细胞体系物质组成和结构更加复杂,且处于动态变化中。如何实 现细胞成分和结构的选择性识别和动态研究,是细胞分析领域的基础科学问题。电化 学发光成像具有灵敏度高、背景低、时空可控性强等特点与优势,已在细胞分析领域 崭露头角。本论文采用电化学发光成像分析技术,针对细胞分析中生化分子和细胞结 构的选择性识别和动态分析开展研究工作。

论文首先介绍了电化学发光的特点及常见的电化学发光反应体系,总结了电化 学发光反应机理。介绍了电化学发光成像的仪器、装置及生化分析应用。综述了现有 单细胞分析方法和现存挑战,并提出了本论文的选题意义和设计思路。

以二氧化硅纳米孔薄膜为基础,制备了具有电化学发光活性的二氧化硅纳米笼 阵列。发光分子尺寸较大,被物理限域于纳米笼内;分析物多巴胺可穿过纳米孔薄膜 "围栏",淬灭纳米笼内发光探针的电化学发光。基于此原理,该二氧化硅纳米笼可 作为固态电化学发光传感器,实现细胞释放的多巴胺的免标记成像。

基于电化学发光的表面限域性质和二氧化硅纳米均孔膜对电化学发光的显著增强作用,实现了单个活细胞的细胞-基质黏着免标记成像。以胰酶消化黏着过程为例, 研究了细胞-基质黏着的动态变化过程,分析了单细胞和亚细胞水平细胞-基质黏着强度及其与细胞形态的关系。将该方法应用于细胞集体迁移分析,验证了后缘细胞在细胞集体迁移中的重要作用。

在深入理解电化学发光产生机制的基础上,通过改变发光分子和(或)共反应剂 分子的浓度,调控电化学发光路径,使电化学发光层限域于电极表面或向溶液中延 展。将电化学发光层与不同种类细胞连接的空间位置相匹配,实现了位于细胞底部的 细胞-基质黏着和靠近细胞顶部的细胞-细胞间连接的空间选择性成像。

最后,对本论文进行总结,并展望了电化学发光单细胞分析的发展方向。

关键词: 电化学发光成像; 细胞分析; 多巴胺; 细胞-基质黏着; 细胞-细胞间连接

Abstract

The cell is the basic unit of life, and also the link between life science research from macroscopic to microcosmic perspective. Based on the understanding of the molecules and structures within cells, the cell analysis concentrates on the relation between cell structure and function, and the control of biological processes such as gene expression and signal transduction, exploring the fundamentals of life science. Due to the heterogeneous and dynamic nature of cells, chemical and structural analysis within cells is much more difficult than that performed in solution and is one of the key issues in this field. Electrochemiluminescence (ECL) possesses several advantages such as high sensitivity, low background and superior spatiotemporal control, which has manifested itself as a powerful tool in cell imaging. This thesis addresses the analysis of molecules and structures within cells by ECL imaging, including the design of solid-state ECL sensor, the development of ECL mechanisms and systems for single cell imaging. Details are as follows.

This thesis starts with a brief introduction of the characteristics of ECL and summarizes typical ECL systems and mechanisms. Then it focuses on ECL imaging, highlighting the instruments and recent progress in ECL biosensors. Methods and challenges in single cell analysis are finally discussed, after which the framework of this thesis is introduced.

An electrochemiluminescent nanocage array (ENA) was prepared as a solid-state ECL sensor. The ENA is composed of two layers of silica nanoporous membrane, both of which consist of a high density of vertically aligned nanochannels. The luminophores were physically confined yet remain diffusive inside nanocage while dopamine can permeate the ENA and quench the ECL of luminophores. Therefore, the ENA functions as the solid state ECL sensor and was employed for the detection of dopamine released from living PC12 cells in terms of its quenching effect.

Thanks to the surface confined nature of ECL generation and the enhancement effect of silica nanochannel membrane, the ECL imaging of cell-matrix adhesions was achieved

IV

in a label-free manner. With this methodology, we studied the spatial distribution, as well as dynamic variations, of cell-matrix adhesions and the adhesion strength at the subcellular level. Cell-matrix adhesions of an advancing cell sheet were finally imaged to study the movement of cells in collective migration. A statistical analysis suggests that cells on the far side of leading edge also have the propensity to migrate and do not act as just passive followers.

The ECL reaction pathway can be modulated and the ECL layer can be extended from the electrode surface to a position of several micrometers away from the electrode surface by rationally varying the concentration of luminophore and/or coreactant. This scheme provides the feasibility of matching the ECL layer with the spatial location of different cell junction structures, thus allowing the sequential and selective imaging of cell-matrix adhesions and cell-cell junctions in a single sample.

Finally, the thesis is summarized and the challenges and outlooks of this field are discussed.

Keywords: Electrochemiluminescence imaging; Cell analysis; Dopamine; Cell-matrix adhesions; Cell-cell junctions

目录

致谢	I
摘要	II
ABSTRACT	IV
目录	VI
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 电化学发光概述	1
1.2.1 电化学发光的特点	
1.2.2 电化学发光体系及反应机理	5
1.2.2.1 湮灭型电化学发光	
1.2.2.2 共反应剂型电化学发光	7
1.2.2.3 鲁米诺电化学发光	
1.2.2.4 电化学发光反应机理研究	
1.3 电化学发光成像	
1.3.1 仪器与装置	
1.3.2 生化分析应用	
1.3.2.1 传感阵列	
1.3.2.2 指纹成像	
1.4 单细胞分析	
1.4.1 光学方法	
1.4.1.1 荧光分析	
1.4.1.2 免标记光学分析方法	
1.4.2 质谱学分析方法	
1.4.3 电化学分析方法	

1.4.3.1 微纳电极(阵列)	
1.4.3.2 电化学扫描探针显微镜	
1.4.3.3 电化学发光	
1.5 本论文的选题意义和设计思路	
第二章 纳米笼阵列电化学发光测定细胞释放的多巴胺	
2.1 引言	
2.2 实验部分	
2.2.1 试剂与材料	
2.2.2 仪器与设备	
2.2.3 ENA/ITO 电极制备	
2.2.3.1 二氧化硅纳米通道薄膜的制备	
2.2.3.2 ENA/ITO 电极的制备	
2.2.4 ENA/ITO 电极表征	
2.2.4.1 电镜表征	
2.2.4.2 电化学表征	
2.2.4.3 电化学发光强度测试、光谱采集	
2.2.5 电化学发光成像	
2.2.5.1 电化学池制作	44
2.2.5.2 电化学发光成像系统	44
2.2.6 ENA/ITO 电极定量检测多巴胺	44
2.2.7 PC12 细胞培养及处理	
2.3 结果与讨论	
2.3.1 二氧化硅纳米通道薄膜的制备和表征	
2.3.1.1 二氧化硅纳米通道薄膜的制备原理	
2.3.1.2 二氧化硅纳米通道薄膜的表征	
2.3.2 ENA/ITO 电极的制备和表征	
2.3.2.1 ENA/ITO 电极的制备	

50
53
55
56
的应用
57
60
60
60
60
61
61
61
61
61
62

3.3.2.2 SNM 对电化学发光的增强效应	72
3.3.2.3 电化学发光的表面限域性质	73
3.3.3 细胞-基质黏着强度分析	74
3.3.3.1 亚细胞和单细胞水平的细胞-基质黏着强度分析	74
3.3.3.2 不同细胞间细胞-基质黏着强度比较	76
3.3.4 细胞集体迁移过程分析	78
3.3.4.1 电化学发光成像监测细胞集体迁移过程	78
3.3.4.2 细胞集体迁移倾向性分析	81
3.4 本章小节	82
第四章 细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的空间选择性电化学发光成像	84
4.1 引言	84
4.2 实验部分	85
4.2.1 试剂与材料	85
4.2.2 仪器与设备	86
4.2.3 光胶点阵列的制备和表征	86
4.2.4 MCF-7 细胞培养	87
4.2.5 光胶点阵列和细胞的电化学发光成像	87
4.2.6 细胞免疫荧光成像	87
4.2.7 COMSOL 模拟	88
4.3 结果与讨论	91
4.3.1 研究模型	91
4.3.2 Ru(bpy)3 ²⁺ /TPrA 体系的电化学发光	92
4.3.3 光胶点阵列的形貌表征	93
4.3.4 表面限域的电化学发光成像	94
4.3.4.1 光胶点阵列成像	94
4.3.4.2 COMSOL 模拟验证电化学发光表面限域性质	96
4.3.4.3 限域电化学发光用干细胞-基质黏着成像	97

作者简介及攻博期间取得的研究成果	
参考文献	110
第五章 总结与展望	108
4.4 本章小节	107
4.3.5.4 细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的顺次成像	
4.3.5.3 COMSOL 模拟验证电化学发光机理	103
4.3.5.2 曝光时间对光胶点阵列电化学发光图像的影响	101
4.3.5.1 光胶点阵列电化学发光成像	
4.3.5 空间延展的电化学发光成像	

第一章 绪论

1.1 引言

细胞是生命体结构和功能的基本单位。细胞的增殖、分化、衰老和死亡过程即为 单细胞有机体的生命过程。对于多细胞有机体,生殖、遗传、变异等重大生命过程均 以细胞为基础。有关细胞内生化反应分子机制及细胞结构与功能的研究,不断更新着 人们对生命过程的认知,直接且有力地影响着人类健康和生产生活。传统的细胞分析 多以细胞群体为研究对象,但是越来越多的研究结果表明,即使在相同条件下培养的 同源细胞间也存在个体差异。也就是说,细胞异质性是一种普遍的生物学现象,通过 研究细胞群体得到的平均信息可能无法准确地阐明细胞的行为。因此,发展单细胞分 析方法是生命科学领域的重要研究方向之一。

电化学发光成像技术既具有电化学分析灵敏度高的特点,又有光学测量方法通 量高的优势,在电极表面微区结构表征、微纳米颗粒活性分析、生化传感阵列检测、 指纹成像等领域均有重要应用。电化学发光成像分析无需激发光,避免了细胞自体荧 光干扰,近年来在细胞分析领域崭露头角,吸引了研究者的广泛关注。本章将概述电 化学发光的技术特点,重点介绍几种常见的电化学发光反应体系及其发光反应机理。 在此基础上,介绍电化学发光成像技术在生化分析中的应用。最后,总结现有的时空 分辨单细胞分析方法,并提出本论文的选题意义与设计思路。

1.2 电化学发光概述

电化学发光(Electrochemiluminescence,简称 ECL)是一种由电化学反应触发的 暗场光辐射。早在 1927 年和 1929 年,Dufford 和 Harvey 等就已分别观察到电解过 程中的发光现象^[1-2],但对电化学发光的详细研究直到 20 世纪中期才开始。得益于电 化学和光电检测技术的发展,电化学发光研究取得重要进展(图 1.1)。1964 年, Hercules 研究了有机溶剂中电解芳香烃产生的阴极电化学发光^[3]; Chandross 等证明 氧化还原过程可以产生化学发光^[4]。1972 年,Bard 等将三联吡啶钌(Ru(bpy)3²⁺)引

入电化学发光体系,该分子至今仍是电化学发光体系中最常用的发光探针^[5]。1981年, 首个水相电化学发光体系被报道,使电化学发光在生化分析中的应用成为可能^[6]。 1990年,共反应剂三正丙胺的发现大大提高了电化学发光分析的灵敏度^[7]。进入 21 世纪,纳米材料电化学发光体的发现极大丰富了电化学发光探针的种类^[8]。随着超高 灵敏光学检测器件的发展,电化学发光成像成为电化学发光研究领域的热点。近年 来,聚集诱导、光诱导、光波导等新原理和新方法涌现,为电化学发光研究注入新的 活力^[9-11]。电化学发光不仅在基础研究中发挥着重要作用,同时也在临床诊断领域创 造着巨大的经济价值。IGEN、Roche Diagnostics 等已成功将电化学发光技术商业化, 电化学发光免疫分析是当前临床诊断的主流技术之一^[12]。

ECI Wayequide	2020
W. Guo, H. Ding, P. Zhou, Y. Wang, B. Su, Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59,	
6745-6749.	ELL MICROScopy of Cells
Aggregation-induced ECL	Rapino, S. Arbault, F. Paolucci, N. Sojic, J. Am. Chem. Soc. 2017, 139,
5. Carrara, A. Aliprandi, C. F. Hogan, L. De Cola, J. Am. Chem. Soc. 2017, 139–14605-14610	16830-16837.
	3D ECL
	M. Sentic, S. Arbault, L. Bouffier, D. Manojlovic, A. Kuhn, N. Sojic, Chem. Sci. 2015 6. 4433-4437
	2013, 0, 4435-4457.
	2010
ECL from single nanoparticles	
YL. Chang, R. E. Palacios, FR. F. Fan, A. J. Bard, P. F. Barbara, J. Am.	DBAE as coreactant
Chem. Soc. 2008, 130, 8906-8907.	X. Liu, L. Shi, W. Niu, H. Li, G. Xu, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 421-424.
Nanocrystals solution ECI	
Z. Ding, B. M. Quinn, S. K. Haram, L. E. Pell, B. A. Korgel, A. J. Bard.	Bipolar ECL
Science 2002, 296, 1293-1297.	2000 A. Arora, J. C. T. Eijkel, W. E. Morf, A. Manz, Anal. Chem. 2001, 73, 3282-3288.
Laser action driven by ECI	Near-field scanning ECL microscopy
T. Horiuchi, O. Niwa, N. Hatakenaka, <i>Nature</i> 1998 , <i>394</i> , 659-661.	Y. Zu, Z. Ding, J. Zhou, Y. Lee, A. J. Bard, Anal. Chem. 2001, 73, 2153-2156.
	ECL from single molecules
First commercial ECL instrument for bioassay	M. M. Collinson, R. M. Wightman, Science 1995 , 268, 1883-1885.
by Igen International, Inc. 1994	ECL at ultramicroelectrodes
sy igen monational, nor ree r	M. M. Collinson, R. M. Wightman, Anal. Chem. 1993 , 65, 2576-2582.
ECL for bioassay	1990
G. F. Blackburn, H. P. Shah, J. H. Kenten, J. Leland, R. A. Kamin, J. Link, J.	TPrA as coreactant
1539.	H. S. White, A. J. Bard, J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 6891-6895.
Ru(bpy) ₃ ²⁺ as ECL label	
D. Ege, W. G. Becker, A. J. Bard, Anal. Chem. 1984, 56, 2413-2417.	Demulfets on consistent
Aguagua ECL system	H S White A Bard Am Cham Soc 1982 104 6891-6895
Rubinstein A. J. Bard. J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 512-516.	1980 1980
$Ru(bpv)_{2}^{2+}$ in polymer	
I. Rubinstein, A. J. Bard, J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 5007-5013.	
	Oxalate as coreactant M.M. Chang, T. Soii, A. J. Bard, J. Am. Cham. Soc. 1977, 99, 5399, 5403
	Wi-Wi. Chang, T. Saji, A. J. Baid, J. Am. Chem. Soc. 1917, 99, 5595-5405.
Ru(bpy) ₃ ²⁺	
N. E. Tokel, A. J. Bard, J. Am. Chem. Soc. 1972, 94, 2862-2863.	1970
	Magnetic field effects
Treatment of FCI transient	L. R. Faulkner, A. J. Bard, J. Am. Chem. Soc. 1969, 91, 209-210.
S. W. Feldberg, J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 390-393.	
	Theory of ECL
First ECL experiments	R. A. Marcus, J. Chem. Phys. 1965, 43, 2654-2657.
D. M. Hercules, Science 1964 , 745, 808-809. R. F. Visco, F. A. Chandross, J. Am. Chem. Soc. 1964 , 86, 5350-5351	
K. S. V. Santhanam, A. J. Bard, J. Am. Chem. Soc. 1965, 87, 139-140.	Luminescence during electrolysis of Grignard compounds
	and luminol
	R. Dufford, D. Nightingale, L. Gaddum, J. Am. Chem. Soc. 1927, 49, 1858-1864.
	N. Harvey, J. Phys. Chem. 1929 , 33, 1456-1459.

图 1.1 电化学发光研究历史

Fig. 1.1 Time line of Electrochemiluminescence.

1.2.1 电化学发光的特点

光致发光(photoluminescence, PL)、化学发光(chemiluminescence, CL)和电 化学发光的光辐射过程均不产热,是常见的发冷光现象。三种冷光产生过程如图 1.2 所示。光致发光的产生机制为,物质吸收外界光辐射,跃迁至激发态电子能级,经驰 豫或系间窜越后,再跃迂回到基态电子能级,此时产生的光辐射即光致发光。与光致 发光的激发方式不同,化学发光和电化学发光过程中的激发态均由高能电子转移反 应生成。从本质上来说,电化学发光是化学发光的一种。其特殊之处在于,电化学发 光由电极表面的电化学反应触发,发光过程受电极反应过程严格调控。



图 1.2 光致发光、化学发光和电化学发光的原理



图 1.3 比较了电化学发光、化学发光和光致发光三种发光分析方法的特点与优势。(1) 灵敏度:电化学发光由电化学反应引发,在电极表面附近的扩散层内发生, 发光物质的局部浓度很高,因此相较于化学发光和光致发光,电化学发光分析的灵敏 度更高。(2) 背景效应:电化学发光与化学发光均无需外加光,有效避免了光致发光 中普遍存在的光漂白和光散射问题。(3) 样品稳定性:电化学发光和化学发光过程涉 及高能电子转移反应,强还原性、强氧化性的物种可能影响样品稳定性;光致发光使 用的强激发光可能破坏样品的稳定性。(4) 空间分辨率:电化学发光仅在电极表面附 近产生,而且由于中间体寿命有限,发光探针和共反应剂中间体的有效扩散距离受到 很大限制,因此电化学发光成像的空间分辨率较高;化学发光需要将底物和发光探针 均匀混合,因此化学发光成像分析的空间分辨率较低;普通宽场光学显微镜能够激发 视场范围内的发光探针,空间选择性较差,基于全内反射、共聚焦或超分辨方法等光 学成像技术,其空间分辨率得到极大提高。(5)时空可控性:电化学发光在电极表面 附近的溶液薄层内产生,发光的速率、时间和空间分布等受电化学激励信号严格控 制,时空可控性强;化学发光由溶液中均相化学反应产生,时空可控性较差;光致发 光的时空分辨能力主要由光源、成像系统和发光探针自身性质决定,使用特殊的光激 发方式或光学采集系统,能够实现高时空分辨分析。此外,电化学发光分析还具有仪 器简单、分析速度快、线性范围宽、分析对象广等优势,已成为生化分析和体外诊断 领域最灵敏的测量技术之一。



图 1.3 电化学发光、化学发光和光致发光的特点与优势[13]

Fig. 1.3 Comparison table showing the advantages and disadvantages of electrochemiluminescence, chemiluminescence and photoluminescence.

1.2.2 电化学发光体系及反应机理

按照发光探针种类的不同,可将电化学发光分为无机发光探针体系、有机发光探 针体系和纳米材料发光探针体系。无机探针主要包括各类金属配合物,其中钌、铱金 属配合物是典型代表,铬、铜、铝、铂、钼等金属配合物的电化学发光现象也有报道 ^[14]。有机探针主要包括鲁米诺等酰肼类化合物、以光泽精和吖啶酯为代表的吖啶类 化合物、过氧草酸酯和多环芳烃等^[15]。纳米材料探针种类多样,自 2002 年硅纳米晶 的电化学发光现象被报道以来,丰富的半导体量子点探针被广泛用于电化学发光研 究^[16-17]。此外,纳米金属团簇、碳点、金属-有机框架、钙钛矿等新材料的电化学发 光也相继被报道^[18-21]。



图 1.4 电化学发光反应机理 Fig. 1.4 Different mechanistic pathways of ECL generation.

按照激发态的最终产生方式不同,可将电化学发光反应分为三类,即电子转移电 化学发光、键断裂电化学发光和热电子诱导电化学发光(图1.4)^[22]。电子转移电化 学发光是指溶液中两物种(或同一物种的不同氧化还原状态)间发生高能电子转移反 应,生成激发态发光探针。激发态探针辐射跃迂回到基态,实现发光探针再生。湮灭 型和共反应剂型电化学发光是电子转移电化学发光的两种主要类型。发光探针发生 分子内化学键断裂或原子转移反应也可生成激发态。由于涉及化学键的形成和断裂, 该电化学发光过程不可逆,单个发光探针分子只能产生一次光辐射。键断裂电化学发 光的典型发光探针包括鲁米诺、光泽精和吖啶酯等,其中鲁米诺最为常用。热电子诱 导电化学发光完全不同于前两种过程。在覆盖氧化物的金属电极上施加较高电位,绝

缘氧化物层阻碍了物质直接在电极表面得失电子。在较高电场强度下,热电子可直接 注入电解质溶液,生成强氧化性物质,触发溶液中的化学发光。该机理可以用于检测 三联吡啶钌和鲁米诺等发光探针^[23-24]。

在实际电化学发光应用体系中,前两种电化学发光过程更常见。本小节将重点介 绍电子转移机理中的湮灭路径和共反应剂路径,并以鲁米诺电化学发光为例,介绍键 断裂电化学发光机理。

1.2.2.1 湮灭型电化学发光



图 1.5 常见的湮灭型电化学发光探针

Fig. 1.5 Molecular structures of typical ECL luminophores in annihilation ECL.

湮灭型电化学发光是最早被报道的电化学发光过程,电化学反应生成的自由基 阴/阳离子之间发生高能电子转移反应产生激发态。金属配合物和稠环芳烃等均能以 该路径产生电化学发光。图 1.5 中三联吡啶钌、红荧烯和 9,10-二苯基蒽 (DPA) 是常 见的湮灭型电化学发光探针。式 1.1-1.3 描述了湮灭型电化学发光的反应过程:发光 探针 R 发生电化学氧化/还原反应,生成阳离子自由基 R^{•+}和阴离子自由基 R^{•-},二者 之间发生湮灭反应生成激发态。

$\mathbf{R} + e^- \rightarrow \mathbf{R}^{\bullet -}$	(reduction at electrode)	(式1.1)

 $\mathbf{R} - e^{-} \to \mathbf{R}^{\bullet+}$ (oxidation at electrode) $(\ddagger 1.2)$

 $R^{\bullet-} + R^{\bullet+} → R^* + R$ (excited state formation) (式 1.3)

需要注意的是,同一发光探针经不同反应过程可能产生不同激发态。若湮灭反应 (式1.3)释放的能量足够高,则生成激发单重态,激发态辐射跃迁回到基态,称为 "S-route"(式1.4):

$${}^{1}R^{*} \rightarrow R + hv \text{ (light emission)} \tag{± 1.4)}$$

若湮灭反应释放的能量不足以直接生成激发单重态,而是生成三重激发态,则激发态 分子间经三重态-三重态湮灭反应,使其中一个分子直接回到基态,另一个则生成激 发单重态,辐射跃迁回到基态,该路径称为"T-route":

 ${}^{3}R^{*}+{}^{3}R^{*} \rightarrow R+{}^{1}R^{*}$ (triplet-triplet reaction)

(式1.5)

以DPA 为例,在电极上施加阶跃电位将其氧化和还原,阴阳离子间发生湮灭反应生成单重激发态分子 ¹DPA*, ¹DPA*回到基态,释放光子。湮灭型电化学发光反应中的阴/阳离子自由基也可以来自不同的物质。将 *N*,*N*,*N*',*N*'-四甲基对苯二胺(TMPD)与 DPA 混合,由于前者的氧化电位低于后者,施加合适的电位可选择性地生成TMPD^{•+}和 DPA^{•-},二者经由湮灭反应生成三重激发态分子 ³DPA*。具体反应过程如下:

$DPA + e^- \rightarrow DPA^{\bullet-}$	(式1.6)
$\mathrm{TMPD} - e^{-} \to \mathrm{TMPD}^{\bullet_{+}}$	(式1.7)
$DPA^{\bullet-} + TMPD^{\bullet+} \rightarrow^{3} DPA^{*} + TMPD$	(式1.8)
2^{3} DPA* \rightarrow^{1} DPA* + DPA	(式1.9)
$^{1}\text{DPA}^{*} \rightarrow \text{DPA} + h\nu$	(式 1.10)

此外,对于某些特殊体系(如芘等),湮灭反应生成激基缔合物,激基缔合物辐射跃迂回到基态并分解,该过程称为"E-route"^[25]。

在电极上交替施加氧化和还原电位,或在距离较近的两个电极上分别施加氧化 电位和还原电位,均可触发湮灭型电化学发光。由于水溶液的电位窗较窄,难以满足 湮灭反应的电位窗要求,湮灭型电化学发光一般只发生在有机溶液中,这大大限制了 其在生化分析领域的应用。因此,虽然湮灭型电化学发光是最早被发现和研究的电化 学发光体系,但现行电化学发光测量应用几乎全部依赖共反应剂型电化学发光或鲁 米诺电化学发光。

1.2.2.2 共反应剂型电化学发光

与湮灭型电化学发光不同,共反应剂型电化学发光只需进行单向电位扫描。施加 合适的正电位,发光体和共反应剂分别在电极表面发生电化学氧化反应,生成氧化态 发光探针和共反应剂阳离子自由基。后者分解后生成的强还原性物种,将氧化态发光

分子还原至激发态,激发态跃迂回到基态,产生光辐射。由于经由氧化反应生成了强 还原性的自由剂中间体,该发光反应过程被称为氧化-还原型电化学发光。在电极上 施加负电位时,电化学发光过程与前述过程恰好相反,即还原反应生成的共反应剂阴 离子自由基分解产物具有强氧化性,将还原态发光探针氧化至激发态,激发态跃迂回 到基态,释放出光子,该过程被称为还原-氧化型电化学发光。

Luminophores



图 1.6 常见的共反应剂型电化学发光试剂

BPO

-O-S-O-O-S-O

S2082-

Fig. 1.6 Molecular structures of typical ECL luminophores and coreactants in coreactant ECL.

图 1.6 展示了常见的共反应剂型电化学发光试剂,其中发光探针主要包括钌、铱 金属配合物等,共反应剂可分为"氧化-还原型"与"还原-氧化型"两类,前者包括三正 丙胺(TPrA)、二丁基乙醇胺(DBAE)和草酸根等,后者主要有过硫酸根和过氧化 苯甲酰(BPO)。下面以 Ru(bpy)3²⁺/TPrA 为例,说明氧化-还原型电化学发光的四种 反应机理。图 1.7 中路线 a 展示了经典的氧化-还原路径电化学发光过程: Ru(bpy)3²⁺ 和 TPrA 分别在电极表面发生电化学氧化反应,生成 Ru(bpy)3³⁺和 TPrA^{•+},后者脱去 质子生成强还原性的 TPrA[•],将 Ru(bpy)3³⁺还原至激发态 Ru(bpy)3^{2+*},激发态跃迁回 到基态,释放出光子,即电化学发光。具体反应路径可由如下方程式描述:

$\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{2+} \rightarrow \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{3+} + e^{-}$	(式1.11)
$\text{TPrA} \rightarrow \text{TPrA}^{\bullet+} + e^-$	(式1.12)
$TPrA^{\bullet_+} \rightarrow TPrA^{\bullet} + H^+$	(式1.13)
$\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{3+} + \operatorname{TPrA}^{\bullet} \rightarrow \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{2+*} + P$	(式 1.14)
$\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{2+*} \rightarrow \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{2+} + h\nu$	(式1.15)

如图 1.7b 所示,除由 TPrA[•]和 Ru(bpy)₃³⁺间的化学反应生成激发态外,强还原性的 TPrA[•]还可以将 Ru(bpy)₃²⁺还原为 Ru(bpy)₃⁺, Ru(bpy)₃⁺与 Ru(bpy)₃³⁺发生湮灭反应, 生成 Ru(bpy)₃^{2+*}(式 1.16, 1.17)。该过程可与路径 a 同时发生,但较路径 a 的贡献 更小。

 $Ru(bpy)_{3}^{2+} + TPrA^{\bullet} \rightarrow Ru(bpy)_{3}^{+} + P \qquad (武 1.16)$

 $Ru(bpy)_{3}^{3+} + Ru(bpy)_{3}^{+} → Ru(bpy)_{3}^{2+*} + Ru(bpy)_{3}^{2+}$ (式 1.17)

路径 c 中,只有 Ru(bpy)₃²⁺在电极表面氧化,生成的 Ru(bpy)₃³⁺可催化氧化 TPrA 产生 TPrA^{•+}(式 1.18)。与直接在电极表面氧化生成的 TPrA^{•+}相同,阳离子自由基脱 质子后与 Ru(bpy)₃³⁺反应生成 Ru(bpy)₃^{2+*}(式 1.10, 1.11)。该过程也被称为"催化路 径",当 Ru(bpy)₃²⁺浓度较高时主导电化学发光过程。

Ru(bpy)₃³⁺ + TPrA → Ru(bpy)₃²⁺ + TPrA^{•+} (式 1.18)

若只有 TPrA 在电极表面氧化,与路径 b 中一致,强还原性的 TPrA•可将 Ru(bpy)3²⁺还原为 Ru(bpy)3⁺,后者与 TPrA•+反应,生成 Ru(bpy)3^{2+*}(式 1.19)。

 $Ru(bpy)_{3}^{+} + TPrA^{\bullet+} \rightarrow Ru(bpy)_{3}^{2+*} + TPrA \qquad (武 1.19)$

该路径解释了基于磁微粒的电化学发光免疫分析灵敏度高的原因。在磁微粒免疫分析体系中,发光分子结合在磁珠表面,能够直接在电极表面氧化的发光分子数目十分 有限。但通过选择合适直径的磁微粒 (2.8 μm),使共反应剂中间体可扩散到达磁微 粒顶部,则电化学发光仍可以有效发生,保障了分析灵敏度。



图 1.7 "氧化-还原型"电化学发光机理 Fig. 1.7 Mechanisms of "oxidative-reduction" ECL.

以 Ru(bpy)3²⁺/S₂O8²⁻为例,说明还原-氧化型电化学发光的反应路径。在电极上施 加负电位,Ru(bpy)3²⁺和 S₂O8²⁻分别在电极表面还原为 Ru(bpy)3⁺,SO4²⁻和强氧化性的 SO4^{•-},SO4^{•-}与 Ru(bpy)3⁺反应生成激发态,激发态回到基态,释放出光子(式 1.20-1.22)。

$$S_2O_8^{2-} + e^- → SO_4^{2-} + SO_4^{--}$$
 (式 1.20)

 $Ru(bpy)_{3}^{+} + SO_{4}^{\bullet-} → Ru(bpy)_{3}^{2+*} + SO_{4}^{2-}$ (式 1.22)

与氧化-还原型电化学发光中的催化路径类似, SO4-可由 Ru(bpy)3+还原 S2O82-获

Ru(bpy)₃²⁺ + SO₄^{•−} → Ru(bpy)₃³⁺ + SO₄^{2−} (式 1.24)

除 Ru(bpy)3²⁺/S2O8²⁻体系外,多种纳米材料探针体系如氮化碳/S2O8²⁻、量子点/S2O8²⁻等也都能以相似过程产生电化学发光。

1.2.2.3 鲁米诺电化学发光



图 1.8 鲁米诺和过氧化氢的电化学发光 Fig. 1.8 ECL generation by luminol and H₂O₂.

1954年,研究者首次报道了鲁米诺(5-氨基-2,3-二氢-1,4-二杂氮萘二酮)在滴汞 电极上的电化学发光现象^[26]。随后,又在铂电极上观察到鲁米诺的阳极电化学发光 ^[27]。鲁米诺的发光过程与联吡啶钌等非常不同。在已有报道中,鲁米诺可在不同的 溶剂、pH、电位、电极材料等条件下产生电化学发光^[28]。一般认为,在电极上施加 正电位,鲁米诺和过氧化氢发生电化学氧化及均相化学反应,生成激发态。但也有一 些研究认为,氧气、过氧化氢及其他氧化态中间体可能都不是鲁米诺电化学发光反应 中必须的^[29]。图 1.8 展示了一种可能的鲁米诺/过氧化氢电化学发光机理^[30]。在电极上施加氧化电位,鲁米诺电化学氧化生成偶氮醌。过氧化氢生成超氧阴离子(HOO⁻),或电化学氧化生成超氧阴离子自由基(O₂[•]),与偶氮醌反应生成内过氧化物。内过氧化物脱氮气生成激发态 3-氨基邻苯二甲酸盐,激发态回到基态,释放出波长为 425 nm 的光。

由于多种生物氧化酶可以氧化底物产生过氧化氢,将鲁米诺与氧化酶结合,可使 用电化学发光作为读出信号,测定不同生物分子。不过,鲁米诺在碱性溶液中光强较 强,中性条件下光强较弱,在一定程度上限制了其应用。L012(8-氨基-5-氯-7-苯基 吡啶并[3,4-d]哒嗪-1,4(2H,3H)-二酮钠盐)是一种鲁米诺类似物,其分子结构如图 1.9 所示。该分子可在中性条件下产生较鲁米诺更强的电化学发光^[31],常被用于电化学 发光细胞分析。



图 1.9 L012 的分子结构 Fig. 1.9 Molecular structure of L012.

1.2.2.4 电化学发光反应机理研究

电化学发光过程不仅涉及电极表面的异相电子转移反应,还伴随着复杂的溶液 相化学反应和传质过程,多种反应机理共存,反应过程非常复杂。目前已有光谱电化 学、扫描电化学显微镜、电化学发光成像、自干涉光谱法等多种技术应用于电化学发 光机理研究。这些方法各有优势,从不同的角度对电化学发光机理进行了解析。

光(波) 谱电化学是一种将电化学与谱学方法(包括吸收光谱、荧光光谱、拉曼 光谱、红外光谱、核磁共振谱、电子自旋共振光谱、质谱等) 相结合,用于研究电化 学反应过程的技术^[32]。ECL spooling 技术是常用的光谱电化学分析方法。在电极上施 加扫描电位,同步记录不同时刻(也即不同电位)的电化学发光光谱,解析电化学发 光反应机制^[33]。例如, Ding 等制备了一种含二甲氨基联吡啶配体的铱金属配合物发 光探针,无需加入共反应剂,该探针可实现自增强电化学发光(图 1.10)^[34]。ECL

spooling 谱图中,较低电位下该探针的发光波长位于 543 nm,对应激发态 1*;随着 氧化电位的增加, ECL 光谱峰红移至 608 nm 和 651 nm,分别对应激发态 2*和 3*。



图 1.10 铱配合物的分子结构和 ECL spooling 谱^[34] Fig. 1.10 Iridium(III) complex [(dFphtl)₂Ir(dmabpy)]PF₆ and its ECL spooling spectra.

质谱技术具有强大的成分识别能力,将其与电化学方法结合,可鉴定反应中间 体。如图 1.11 所示, Shao 等制备了一种杂化的θ管超微电极,该θ管既可以作为微型 电化学池,同时又是质谱的纳喷雾喷针,可用于电化学反应中间体的在线质谱监测 ^[35]。对于 Ru(bpy)₃²⁺/TPrA 体系,当施加的氧化电位较低时,仅能观察到 Ru(bpy)₃⁺的 质谱峰信号,证明电化学发光的低氧化电位路径(式1.16);当电位较高时,则可以 直接观察到 Ru(bpy)₃³⁺的质谱峰,表明此时氧化-还原路径占主导。苏彬课题组借助该 技术,研究了苯基吡啶铱电化学发光的高电位淬灭机制,证明在较高电位下,TPrA⁺⁺ 可氧化淬灭苯基吡啶铱激发态^[36]。由于苯基吡啶铱是为数不多的具有电化学发光"开 -关"效应的分子,解析其淬灭反应机理为建立多色电化学发光体系提供了理论依据。





Fig. 1.11 The setup used for in situ electrochemistry/mass spectrometry measurement.

Bard 等使用扫描电化学显微镜 (scanning electrochemical microscopy, SECM)和 电子自旋共振 (electron spin resonance, ESR)光谱,提出了共反应剂型电化学发光 中的低电位路径,并确认了关键中间体 TPrA^{•+[37]}。图 1.12 展示了 SECM-ECL 的测 量装置图。在 ITO 基底上共价修饰 Ru(bpy)s²⁺,并保持 ITO 基底处于开路状态。在探 针上施加+0.85 V 电位,溶液中的 TPrA 在探针表面氧化。在探针渐进基底的过程中, 使用光电倍增管 (PMT)检测电化学发光信号。当探针渐进至距离基底 5-6 µm 时, 开始检测到电化学发光信号;继续渐进,电化学发光增强。该体系中 Ru(bpy)s²⁺未被 氧化,仅有 TPrA 被氧化,与提出的低电位电化学发光机理相符。同时,探针距基底 距离较远时,无法观察到电化学发光信号,表明共反应剂中间体寿命有限。根据可扩 散距离 5-6 µm 推算,共反应剂自由基中间体寿命约为 0.2 ms。使用 ESR 对 Ru(bpy)s³⁺ 和 TPrA 混合体系进行监测,证实了 TPrA^{•+}的存在。



图 1.12 使用 SECM 研究电化学发光机理的装置示意图^[37] Fig. 1.12 Setup for SECM-ECL measurement.

电化学发光显微成像能够提供电化学发光信号的空间分辨信息,同时也是一种 解析发光过程的有力工具。Sojic 等将三联吡啶钌衍生物标记至聚苯乙烯微球表面, 分别从俯视和侧视两个方向观察微球表面的电化学发光图像(图 1.13)^[38]。由于三 联吡啶钌分子固载在微球表面,不能直接发生电化学氧化,电化学发光主要由低电位 路径产生。使用 TPrA 为共反应剂,可在微球底部 3 – 4 μm 范围内观察到电化学发 光信号,即 TPrA+可扩散距离约为 3 – 4 μm。以 DBAE 为共反应剂,则无法观察到 微球表面发光,这是因为 DBAE 中间体的寿命更短,难以扩散至较远距离。尽管在 均相溶液中,Ru(bpy)3²⁺/DBAE 体系的电化学发光强于 Ru(bpy)3²⁺/TPrA,在基于磁微 粒的免疫分析中,选择 TPrA 为共反应剂更合适。



图 1.13 PS 微球修饰方法 (a) 及电化学发光成像装置图 (b); PS 微球的侧视荧光、电化学发 光图像 (c)^[38]

Fig. 1.13 (a) Sandwich immunoassay with PS beads. (b) The configuration used in the top-view (A) and side-view (B) ECL imaging. (c) Side-view images of a 12 μm PS bead labelled with the ruthenium complex.

苏彬课题组制备了一种金微米管电极阵列(图 1.14)^[39],在电极上施加电位,电 化学发光在垂直金微米管内壁产生,并沿管径向延伸。以TPrA 为共反应剂,当发光 分子 Ru(bpy)3²⁺浓度较低(10 μM)时,微米管电极的电化学发光图像呈现为圆环, 表明电化学发光限域在电极表面。此时,发光过程由氧化-还原路径主导,发光层分 布主要由寿命较短的共反应剂中间体 TPrA^{•+}决定。提高发光分子浓度至 500 μM,发 光过程由催化路径主导,Ru(bpy)3³⁺直接氧化溶液中的 TPrA,通过均相化学反应延展 TPrA^{•+}的空间分布,微米管电极的电化学发光图像趋近圆斑。当使用 DBAE 为共反 应剂时,改变发光分子浓度,微米管电化学发光图像始终呈现为圆环,表明 DBAE 中 间体较 TPrA 中间体寿命更短,Ru(bpy)3²⁺/DBAE 体系催化路径中各反应步骤的速率 常数等可能与 Ru(bpy)3²⁺/TPrA 体系也有较大不同。



图 1.14 使用微米管电极测量电化学发光反应层厚度(a);发光分子浓度较低(b)和较高(c) 时微米管电极的电化学发光图像^[39]

Fig. 1.14 (a) Illustration of measuring the thickness of ECL layer by microtube electrodes (MTEs). ECL images obtained with microtube electrodes at low (b) and high (c) concentrations of $Ru(bpy)_3^{2+}$.

电化学发光成像的空间分辨率受成像系统限制,只能达到亚微米水平。苏彬课题 组发展了一种电化学发光自干涉光谱方法,可以实现纳米水平的纵向分辨测量^[40]。 如图 1.15 所示,以超薄金膜/二氧化硅/硅为基底电极,电极表面直接产生的电化学发 光与经薄膜电极反射的电化学发光之间发生自干涉,电化学发光光谱呈现为规则有 序的干涉峰。分析干涉峰位置,可得出发光分子与基底间距离的信息。当发光分子 Ru(bpy)3²⁺的浓度由 1 μM 提高至 1 mM 时,干涉峰红移。计算得到两种情况下的发 光层厚度分别为 350 – 450 nm 和 800 – 950 nm,证明电化学发光反应层分布与发光 分子浓度密切相关。



图 1.15 电化学发光自干涉原理 (a)、实验装置 (b) 及典型的电化学发光自干涉光谱图 (c) ^[40] Fig. 1.15 (a) ECL self-interference at the gold/silica/silicon electrode surface. (b) The configuration used in ECL self-interference spectroscopy measurement. (a) A typical ECL self-interference spectrum.

1.3 电化学发光成像

传统电化学发光分析多基于电极表面光强的整体平均化测量,单次测试可获取 的信息有限。电化学发光成像具有高通量、可视化的优势,能够获取电极表面的空间 分辨信息,在免疫分析、基因毒素筛选、酶生物传感阵列中均有重要应用。

1.3.1 仪器与装置



图 1.16 使用 CCD (a)、数码相机 (b) 或智能手机 (c) 作为电化学发光成像检测器^[41-43] Fig. 1.16 Different setups for ECL imaging using (a) CCD, (b) digital camera, and (c) smartphone as the detector.

电化学发光成像无需外加光源,仪器构成相对简单,主要包括电化学设备(一般 为电化学工作站)和光学设备两部分。按照是否需要显微成像系统,电化学发光成像 分为宏观成像和微观成像两类。手机、数码相机及配备微距镜头的电感耦合器件 (CCD)等均可作为电化学发光宏观成像的检测器。成像时,施加合适电位触发电化 学发光,使用上述检测器拍摄图像,操作简单快速。例如,将印有油潜指纹的导电基 底浸入含发光分子和共反应剂的溶液中,使用 CCD 采集导电基底上的电化学发光图 像(图 1.16a)^[41]。指纹嵴线区域油脂覆盖电极,电化学发光受抑制; 峪线区域电极 活性不受影响,产生电化学发光,这样就实现了油潜指纹的反相成像。Francis 等借 助数码相机优异的色彩识别能力,拍摄了电极表面多探针混合体系的多色电化学发

光图像(图 1.16b)^[42]。智能手机不仅可作为电化学发光的图像采集器,也可作为电 化学组件,触发电极表面的电化学发光,实现电化学发光成像"all in one phone"(图 1.16c)^[43]。随着智能手机的普及,这类电化学发光传感器在开发床旁检测设备中极 具优势。

电化学发光显微成像一般在普通光学显微镜上完成(图1.17)。首先在显微镜明 场模式下聚焦成像对象,关闭显微镜光源后,通过电化学工作站施加电位,触发电极 表面的电化学发光,物镜收集发光信号,经由镜筒等结构到达 CCD,获得电化学发 光图像。电化学发光成像是一种弱光成像方法,使用高数值孔径的物镜和高灵敏的电 子倍增 CCD (EMCCD)可以提高收光效率和检测灵敏度。



Electrode

图 1.17 电化学发光显微成像系统^[44] Fig. 1.17 Schematic setup of ECL microscopy.

除上述成像体系外,将扫描电化学显微镜与PMT结合,前者实现空间定位和电 化学发光信号激发,后者记录发光强度,也可获得电化学发光图像^[45-46]。Bard 等使 用直径低至155nm的纳米电极作为SECM探针,当探针对基底进行扫描时,探针上 产生的电化学发光信号受探针与基底距离、基底光学性质和电化学性质等影响,因此 可对基底进行成像^[47]。该方法在原理上与近场扫描光学显微镜(nearfield scanning optical microscopy, NSOM)类似,分辨率也与之相当。

1.3.2 生化分析应用

按照分析对象不同,电化学发光成像应用可划分为生化传感阵列、指纹成像和单

细胞成像三大类。在电化学发光传感阵列中,发光信号强度用于表征分析物浓度,信 号的空间位置表征分析对象种类;而在指纹和细胞成像中,电化学发光强度和空间位 置相结合,共同反映物质浓度及分布的空间分辨信息。本小节将主要介绍电化学发光 成像在生化传感阵列和指纹成像中的应用,单细胞成像将在单细胞分析方法小节中 进行详细阐述。

1.3.2.1 传感阵列

Marquette 等以光敏聚合物分别包埋负载鲁米诺和不同生物氧化酶的琼脂糖小球, 通过点样技术将小球固载至玻碳电极表面,制备得到可同时检测多种小分子的电化 学发光成像传感阵列(图1.18)^[48]。在待测核酸或蛋白质分子上修饰生物素,再结合 亲和素修饰的生物氧化酶,或采用竞争策略,使待测分子与标记有生物氧化酶的非特 异性抗原竞争结合位点,可以实现生物大分子的测定^[49]。相比而言,使用包埋固载 的方法可有效抑制发光分子鲁米诺和酶反应产物过氧化氢的扩散,减弱相邻位点间 信号的相互干扰,电化学发光图像呈现更高的空间分辨率^[50]。



图 1.18 生物酶传感阵列示意图及血清中六种成分同时测定的电化学发光成像图^[48] Fig. 1.18 Illustration of the ECL multifunctional bio-sensing chip and the ECL image of simultaneous detection.

基因毒素会破坏 DNA 双螺旋结构,暴露出其内部鸟嘌呤,后者可作为三联吡啶 钉电化学发光的共反应剂,产生电化学发光。因此,基因毒素毒性越强,暴露出的鸟 嘌呤越多,电化学发光也越强。基于此原理,Rusling等设计制备了多种电化学发光 基因毒素筛选传感器^[51]。以聚乙烯基吡啶(PVP)配位二联吡啶钉,制备发光聚合物。 将聚合物、DNA 与可能的基因毒性物质(包括苯并芘、苯乙烯、4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮、乙酰氨基芴等)层层组装至电极表面,一定时间后拍摄电化学 发光图像,判定其基因毒性^[52-53]。免疫分析是电化学发光成像分析的重点之一。

Rusling 等以免疫组化笔勾勒疏水边缘,将结合捕获抗体的单壁碳纳米管固定于基底 电极;以掺杂三联吡啶钌的硅球为发光探针,其上接枝检测抗体。捕获抗体、抗原和 检测抗体三者形成免疫夹心复合物,实现了血清中前列腺特异性抗原(PSA)和白细 胞介素-6(IL-6)等多种疾病标志物的电化学发光成像测定(图1.19)^[54]。手工制作 的电化学发光阵列密度有限,通量较低,平行性较差。结合微加工与微流控、3D打 印、纸芯片等技术,可显著降低电极尺寸,提高电极密度,同时使操作更加便捷,还 可制备多通道、自动化的微型电化学发光分析仪器,已经实现了食物、香烟和污水等 实际样品中基因毒素的分析,以及胰岛素样生长因子等八种疾病标志物的同时测定 ^[55-57]。



图 1.19 牛血清中 PSA 和 IL-6 的电化学发光成像测定^[54] Fig. 1.19 Detection of PSA and IL-6 in calf serum using ECL imaging.

除平面电极外,光纤束也可用于制作电化学发光阵列。Walt 等化学刻蚀光纤束 顶端,并溅射金层,覆盖绝缘环氧树脂,制备得到具有锥状尖端的光纤束电极^[58]。 Sojic 等在光纤尖端直接溅射透明的 ITO,或刻蚀暴露在环氧树脂外的金层,暴露光 纤尖端,实现了还原型辅酶 I、过氧化氢等分子的远程传感^[59-61]。均匀刻蚀光纤束顶 端,使其形成微孔,可制备微孔电极阵列。分别在掺杂有不同浓度染料分子的聚苯乙 烯微球表面修饰不同种类的捕获抗体,固定微球于微孔内,捕获抗体、抗原、连接生 物素的检测抗体和亲和素标记的钌分子间形成三明治夹心结构,实现了三种抗原的 同时检测(图 1.20)^[62]。该策略巧妙地采用荧光强度进行抗原种类定性分析,以电化 学发光强度进行定量分析,首次在单颗粒水平实现了多种抗原的同时检测。进一步增



加荧光强度种类或荧光颜色种类,理论上可同时检测的抗原数将成指数增加。

Fig. 1.20 Illustration of the sandwich ECL immunoassay based on antibody-functionalized microbeads.

双极电极是一段浸没在溶液中的导体,也称为漂浮电极。双极电极电化学体系由 两个驱动电极和一个无线连接的导体构成。双极电极上电流的直接读出十分困难,电 化学发光是最常用的双极电极信号报告方式之一。2001年,Manz等以一段"U"形铂 丝为双极电极,检测色谱分离的 Ru(bpy)s²⁺和 Ru(phen)s²⁺,首次将电化学发光用于双 极电极信号读出^[63]。2002年,Crooks等创新性地将分子检测与电化学发光反应分离, 双极电极阴极端发生苄基紫精的还原反应,阳极端发生三联吡啶钌和 TPrA 的电化学 发光反应。由于双极电极两端氧化和还原反应的电流值相同,阳极端电化学发光图像 的强度反映了苄基紫精的浓度^[64]。类似地,在双极电极阴极端修饰单链 DNA,捕获 溶液中标记有铂纳米颗粒的互补 DNA 链,铂纳米颗粒催化氧气还原,阳极端 ECL 图 像强度则相应地增强,据此实现 DNA 检测^[65]。无线连接的特点使双极电极特别适合 制备阵列,实现多物种同时测定或平行测定。Crooks 等制备了含 1000 个双极电极的 阵列,电极密度高达 2000 个/平方厘米。以电化学发光成像读出双极电极信号,可实 现超高密度分析传感^[66]。

前述双极电极的阴极和阳极端处在同一溶液中,称为"开放式"双极电极。在该模式下,阴阳极氧化还原反应间可能相互干扰,影响结果测定。"闭合式"双极电极则将阴阳两极置于两个储液池中,物理阻隔了氧化和还原反应,在双极电极成像分析中应用更广。Xu 等制备了一种双通道、双电极的闭合式"H"形双极电极。若样品中存在 PSA 抗原,"H"形双极电极阳极端发光,且电化学发光信号随检测通道中 PSA 浓度的升高而增强;若溶液中不存在 PSA 抗原,两段双极电极互相隔绝,阳极端均不发 光^[67]。闭合式双极电极有效隔绝了电化学发光信号报告体系和生化传感体系,使得

图 1.20 基于微球的电化学发光免疫分析示意图[62]
有机相电化学发光也可用于水溶液中的生化分析检测。将两种电位分辨多色电化学发光探针溶于乙腈,置于阳极端。检测通道内结合不同浓度的待测物时,双极电极电位不同,据此可实现双极电极多色电化学发光检测[68-69]。

1.3.2.2 指纹成像

人手指与电极接触时,指纹的嵴线与物体直接接触,留下潜在指纹。潜在指纹的 成分通常包括指纹嵴线上的沉积物(汗液和其它分泌物的残留物),包括无机盐、氨 基酸和脂肪酸等。这些物质多具有电化学惰性,能够钝化电极,抑制电极表面的电化 学发光反应。与此相反,潜在指纹的峪线区域未被污染,电化学发光反应可以正常发 生。这样,电化学发光图像中,潜在指纹嵴线表现为灰暗区域,而峪线表现为明亮区 域,可实现潜在指纹的电化学发光反相成像(图1.21a)^[70]。如图1.21b所示,该方 法可以清晰成像指纹的湖、终点、分叉等二级结构,甚至可对汗腺孔等三级结构进行 成像。需要注意的是,在反相模式中,发光分子和共反应剂均自由扩散,潜在指纹的 成像分辨率在一定程度上受到了分子扩散的影响。采用电聚合方法将鲁米诺电沉积 在峪线区域,可以获得清晰的反相指纹图像^[71]。



图 1.21 潜在指纹的正相和反相电化学发光成像原理(a, c)及指纹图像(b, d)^[70] Fig. 1.21 The imaging strategy for visualizing LPFs in the negative (a) and positive (b) mode. ECL images obtained in the negative mode (b) and positive mode (d).

将配体中含有 N-羟基琥珀酰亚胺酯(即 NHS)的钌配合物通过酰胺化反应共价

结合指纹中的氨基酸(图1.21c,d)^[70],或将红荧烯物理吸附于潜在指纹嵴线^[72],可 以实现潜在指纹的电化学发光正相成像。使用双面胶将残留在非导电物体表面(如门 窗等)的指纹转移至不锈钢表面,可将电化学发光指纹成像的应用范围由导电基底拓 展至非导电基底^[73]。

潜在指纹中包含的内源性代谢物、外源性爆炸物等潜藏着丰富的医学诊断和安 全保障信息,具有极高的研究价值。结合酶联免疫反应,将潜在指纹先后与一抗及标 记有辣根过氧化物酶(HRP)的二抗共孵育,可在嵴线上成功修饰 HRP。在电极上 施加还原电位生成过氧化氢,后者扩散至潜在指纹嵴线处,在嵴线上 HRP 的催化下, 与鲁米诺发生化学发光释放光子,获得指纹的正相图像。该方法称为电辅助化学发光 ^[74]。使用该方法,可对潜在指纹中的 IgG、抗菌肽、表皮生长因子等进行特异性成像。 将指纹先后与一抗、结合生物素的二抗、修饰有链霉亲和素的 HRP 共孵育,可提高 HRP 负载量,进一步增强发光信号。2,4,6-三硝基甲苯(TNT)能够淬灭多孔硅的电 化学发光,据此可实现指纹中痕量爆炸物的检测^[75]。

1.4 单细胞分析

细胞是产生和运行生命活动的枢纽。解析单细胞内生化过程的运行机制,理解细胞的结构和功能,既是生物学研究的主要目标之一,也与生物技术、医药、农业等领域的发展密不可分。传统的细胞分析的对象多为细胞群体,经典的 Southern 杂交、Western 印记等针对 DNA、蛋白质等生物大分子的分析方法,得出的是细胞群体中物质含量的平均信息。但是,越来越多的研究证据表明,细胞异质性是一种普遍的生物学现象,且存在于任一细胞群体中。例如,单个肿瘤内细胞间的异质性是癌症治疗及精准医疗的主要障碍^[76]。一项有关黑色素瘤的研究发现,肿瘤内异质性与机体免疫应答、患者存活率负相关^[77]。在细胞与细胞间增殖能力、药物反应等均不相同的情况下,基于测量细胞群体获得的平均信息能够在何种程度上反映细胞的真实行为,尚不得而知。因此,发展单细胞分析方法,获取细胞间异质性的信息,可能革新传统的以细胞群体为研究对象获得的生物学认知。

单细胞分析主要使用两种策略,一种是将单个细胞裂解,采用毛细管电泳等方法 分离并检测分析物^[78];二是单细胞原位分析。其中后者能够提供时空分辨信息,本

节将重点介绍。实现单细胞原位分析并非易事。单细胞直径一般在微米级,体积仅有 数飞升至数皮升,物质总量少,测量方法须具有高灵敏度;细胞的胞内组分和胞外微 环境复杂,仅蛋白质的种类就有数千至数万种^[79],在复杂基质中特异性测量目标分 子或目标结构,要求分析方法具有高选择性;活细胞内各种生化反应相互串联,细胞 结构持续变化,分析方法的时间分辨率需要与研究过程相匹配;监测方法不应影响细 胞的本征状态和活性,免标记和非侵入式技术是理想的细胞分析手段;此外,高通量、 分析速度快等也是单细胞分析技术的理想特征。不过,鲜有单细胞分析方法能够满足 前述所有条件,但新的分析策略、方法和技术不断涌现。

细胞组分分析和形貌结构观察相结合,是单细胞研究的典型策略,为揭示细胞中 物质和结构在空间的定位、功能和相互关系提供了有力手段。光学、质谱学和电化学 方法是目前最常用的单细胞分析方法,本节将主要介绍这三类方法在细胞组分分析 和形态结构观察中的应用与挑战。

1.4.1 光学方法

1.4.1.1 荧光分析

荧光分析是细胞生物学中应用最广泛的分析方法。细胞中还原型辅酶 II、核黄素 等物质构成细胞自体荧光,但其它待测的生物分子大多无荧光信号。因此,进行荧光 分析通常需要荧光探针标记。例如,Lederer 等使用 Fluo-3 钙离子探针,观察到心肌 细胞中的钙火花现象^[80];Sulzer 和 Sames 等设计了与神经递质多巴胺结构相近的荧 光探针 FFN511,根据其荧光信号变化推测神经递质释放机制^[81]。使用荧光标记的核 酸探针与细胞内的 DNA、RNA 等分子原位杂交(即荧光原位杂交技术),可以确定 特异性核酸序列在细胞或在染色体中的位置^[82]。借助基因工程方法或免疫学方法在 目标抗原上标记荧光分子,可以对细胞中的蛋白结构进行成像(图 1.22)^[83]。

化学敏感的有机探针以及量子点、碳点等新材料荧光探针的设计^[84-85],纳米抗 体、适配体、融合标签等新型标记方法的开发^[86-88],以及荧光共振能量转移、荧光漂 白恢复等分析策略的构建^[89-90],都大大拓展了荧光分析的研究领域与范围。激光扫描 共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, CLSM)可选择性地选取荧光焦平 面,经重构后获得细胞的三维立体结构,在荧光分析中的应用越来越广泛^[91-92]。此外,

结构光照明显微镜(structured illumination microscopy, SIM)^[93-94]、超分辨光学波动 显微成像(super-resolution optical fluctuation imaging, SOFI)^[95-96]和受激发射损耗显 微镜(stimulated emission depletion microscopy, STED)^[97]、随机光学重建显微镜 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[98-99]等高分辨、超分辨显微 成像技术,或大大提高了荧光成像的分辨率,或直接突破了光学衍射极限,将荧光成 像的分辨率提升至纳米水平,在亚细胞结构和过程研究中发挥了重要作用。



图 1.22 肌动蛋白干涉光激活定位荧光成像俯视图(上)和侧视图(下)^[83] Fig. 1.22 Top view (top) and cross-sectional (bottom) iPALM images of actin.

尽管荧光分析是一种强大的细胞分析方法,需要探针标记是该方法的主要局限 之一。标记步骤使分析流程复杂费时,且可能干扰蛋白正常功能、影响细胞活性。此 外,高功率激光还可能造成光漂白和光毒性。这些都是单细胞荧光分析需要关注的问题。

1.4.1.2 免标记光学分析方法

免标记的光学分析方法具有非侵入式优势,可在细胞正常生命活动过程中进行 探测,并长期观察细胞行为。普通明场光学显微镜可直接观察体外培养的活细胞,是 细胞研究的基础工具。但其分辨率有限,一般仅用于细胞形貌观察。基于光的散射、 干涉、光声效应等原理增强样品的对比度,可在一定程度上提高光学显微镜的分辨率 ^[100-103]。例如,相差显微镜 (phase-contrast microscope)将光线通过物质的光程差或 相位差转变为振幅差,在图像中体现为明暗差异,据此可分辨细胞中密度不同的区域 [104]。在此基础上发展的微分干涉显微镜(differential-interference microscope),以平面偏振光为光源,将样品厚度/折射率差异转换为明暗区别,更适于研究活细胞^[105]。 计算机辅助处理图像,可分辨普通光学显微镜难以观察到的结构,如单根微管等^[106-107]。使用反射干涉显微镜(reflection interference microscope)观察细胞时,大部分入射光直接穿过孵育在玻璃基底上的细胞,仅有小部分光被反射。如图 1.23a 所示,光反射主要发生在四个界面。根据折射率计算,当细胞膜与基底直接接触时,干涉光强出现极小值。因此,黏着斑在反射干涉图像中表现为暗斑(图 1.25b)^[108]。这类光学分析方法不常用于细胞物质组分分析,多是为一类细胞结构分析问题给出特定解答。



图 1.23 细胞-基质黏着反射干涉成像原理(a) 与纤维细胞的细胞-基质黏着图像(b)^[108] Fig. 1.23 Principal surfaces involved in reflection in IRM (a) and IRM micrograph of a fibroblast (b).

表面等离子体共振 (Surface plasmon resonance, SPR)产生于金属/介质界面,可 以探测金属表面附近微小的折射率变化,是一种免标记的光学分析方法。由于表面等 离子体波穿透深度有限 (100 – 200 nm), SPR 具备表面敏感特性。细胞贴壁时,细 胞底部细胞膜与基底的距离仅有 100 – 150 nm,适合使用 SPR 进行分析。Tao 等将细 胞孵育在金基底上,当细胞处在正常渗透压下,细胞各处 SPR 信号差异不大。提高 溶液渗透压后,细胞皱缩。局部细胞膜与基底间距增大,SPR 强度降低,据此可以推 测细胞与基底间的黏着强度 (图 1.24)^[109]。使用 SPR 测量细胞与基底间距离时,一 般认为胞浆内折射率一致,使计算结果准确度较差。Offenhäusser 等将胞浆折射率分 析与距离分析拆分,不同位置处细胞与基底间距离不同,因此共振角不同;固定入射 角时,细胞各处的折射率不同。将测量得到的局部折射率带入距离计算,可以大大提 高距离测量精度^[110]。除进行细胞形貌表征外,SPR 还可用于表征细胞膜蛋白结合速 率,观察细胞膜微运动及细胞器移动等^[111]。不过,SPR 的探测距离较短,即使使用

长程 SPR, 探测深度也仅有 500-1000 nm, 难以分析整个细胞^[112]。此外, 由于等离 子体波的传播特性, 普通 SPR 成像的横向分辨率较低^[113]。



图 1.24 使用 SPR 显微镜研究细胞-基底相互作用^[109]

Fig. 1.24 Schematic illustration of mapping cell-substrate interactions with SPR microscopy.

拉曼光谱法也是一种非侵入式、免标记的技术,可以实现活细胞的物质组成分 析。单细胞的拉曼光谱包含1000多个拉曼峰,其中包含丰富的细胞核、蛋白、糖类 和脂质等物质的信息,可以据此判断细胞的基因型、表现型和生理状态等[114]。单细 胞的拉曼光谱具有特异性,可作为单个细胞的"指纹",用于区分原核细胞与真核细胞 等^[115]。Gardner 等构建了激光光镊拉曼光谱采集系统,并使用该系统采集单个细胞的 拉曼光谱(图 1.25)。通过比对人外周血白血病 T 细胞(jurkat 细胞)与人前列腺癌 细胞(PC-3细胞)的拉曼特征峰,可高效区分两种细胞^[116]。不过,单个分子的拉曼 散射截面通常仅在约 10^{-30} cm⁻² 量级, 而单个分子的荧光截面约为 10^{-16} cm⁻²。因此, 拉曼信号远远弱于荧光信号。但是,当分子吸附在贵金属、半导体等基底上时,基于 化学增强或电磁增强的表面增强拉曼(surface enhanced Raman scattering, SERS)效 应使拉曼光谱的灵敏度大大提高,甚至可以实现单分子的拉曼信号监测[117-118]。相比 普通拉曼方法, SERS 是细胞成像中更常用的拉曼技术。由于需要将 SERS 探针与靶 标结合, SERS 成像分析常需标记。例如, Tian 等制备了一种基于电荷转移原理的三 元 SERS 探针 (Fe₃O₄@GO@TiO₂), 该探针的增强因子可达 8.08×10^6 。将该探针免 疫结合至细胞程序性死亡受体配体1(PD-L1)上,可实现单个细胞上PD-L1蛋白的 拉曼成像[119]。



图 1.25 激光光镊拉曼光谱仪器和 PC-3、Jurkat 细胞的平均拉曼光谱[116]

Fig. 1.25 Laser Tweezers Raman Spectroscopy set-up and average Raman spectra for PC-3 and Jurkat cells.

1.4.2 质谱学分析方法

质谱是物质鉴定最有力的工具之一,具有灵敏度高、特异性强、可检测分子范围 广、结构识别能力强等优势,在单细胞基因组学和代谢组学研究中占据重要地位。按 照离子化方式不同,单细胞质谱分析方法主要分为真空离子源质谱和常压离子源质 谱方法两类^[120]。使用真空离子源时,细胞需预先脱水,随后离子束或激光束轰击细 胞,使样品离子化。这类单细胞质谱技术主要包括二次离子质谱(secondary-ion mass spectrometry, SIMS)^[121]、基质辅助激光解吸质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI-MS)^[122]和无基质辅助激光解吸电离 质谱(matrix-free LDI-MS)^[123]。这些离子源灵敏度高,分析通量高,但细胞脱水死 亡,无法分析细胞自然状态下的物质分布。Passarelli和 Newman 等将细胞冻干后, 使用三维 SIMS 成像研究了药物胺碘酮的代谢物在细胞内的分布(图 1.26)^[124]。以 腺嘌呤(质荷比 m/z 134.1)和磷酸基团的离子峰(m/z 158.9 和 180.9)分布表征细胞 核位置,发现代谢物(以碘离子表征,m/z 127)分布于除细胞核外的整个细胞中。

常压离子化方法对细胞的损伤较小,通常可以进行原位、甚至活细胞分析。最常用的单细胞常压离子源为电喷雾离子源。相比前述真空离子源质谱,该类质谱方法的灵敏度较低^[125]。此外,将纳喷雾喷针刺入细胞取样,随后进行电喷雾质谱分析,分

析通量较低,难以获得单细胞内物质分布的图谱。Mimura 等对长春花茎尖进行单细胞质谱分析,揭示了抗癌药物萜类吲哚生物碱在茎尖中的分布^[126]。Zhang 等使用固相萃取探针在单个洋葱细胞的不同位置取样,可以获得亚细胞水平代谢物差异的信息^[127]。因质谱方法的取样过程大多具有侵入性,如何在不干扰正常生命活动的条件 下获取单个活细胞的物质分布信息,对现有质谱技术来说仍有较大挑战。



图 1.26 SIMS 揭示不同深度下去乙基胺碘酮在巨噬细胞中的分布: 红色表示细胞核, 绿色表示 去乙基胺碘酮 (a); 细胞核与胺碘酮的 3D 分布图 (b)^[124]

Fig. 1.26 (a) SIMS images showing I⁻ at m/z 127 (green) and the summed ion contribution of the nuclear-markers at m/z 134, 158.9, and 180.9 (red); (b) 3D isosurface rendering of the doped cell.

1.4.3 电化学分析方法

1.4.3.1 微纳电极(阵列)

电化学方法是生物学分析中的重要方法,它将分析物的电化学行为或物质间的 相互作用转化为电流、电量、电位和电导等电化学信号,同时提供实时、定量的生物 学信息。微纳电极的尺寸通常小于单个哺乳动物细胞,因此可以放置在距细胞表面微 米、亚微米的位置,甚至置于细胞内部,以检测单个细胞外泄或细胞内的生物分子。 不同于大电极,微纳电极表面物质呈球形或半球形扩散,信噪比更高;*RC* 常数小, 响应速度快;*iR* 降小,可在不加电解质的溶液中直接进行电化学扫描。上述优势使 微纳电极在神经科学领域应用广泛。早在 1976, Adams 就使用微电极监测了小鼠脑 中电化学活性物质^[128]。Wightman 等将碳纤维电极置于细胞表面,采用快扫伏安和计 时安培法测量了单个嗜铬细胞释放的儿茶酚胺总量,还可对肾上腺素和去甲肾上腺 素加以区分^[129-131]。Cheng 等比较了分别使用直径 5 μm 和 100 nm 的电极采集的多巴 胺释放的电流信号(图 1.27)^[132]。由于纳米电极的尺寸与单个囊泡相当,仅能测得 纳米电极尖端对应位置处单个囊泡释放的多巴胺,因此测得的胞吐频率远低于微米 电极^[132]。该方法的空间分辨率可达纳米水平。Ewing 等比较了微电极测得的溶液中 单个囊泡内的神经递质的量与细胞胞吐释放的神经递质的量,前者远大于后者,表明 细胞胞吐时并未将囊泡内的所有神经递质释放^[133]。将纳米电极直接刺入细胞,囊泡 吸附于电极表面并释放出神经递质,此时测得的神经递质含量也高于细胞胞吐释放 量,表明细胞胞吐很可能是以囊泡"kiss-and-run"的形式发生^[134]。Huang 等将纳米 电极置于突触间隙,实现了神经元间信号传递的原位监测^[135]。



图 1.27 使用微米(a, b) 或纳米电极(c, d) 检测细胞释放的多巴胺^[132] Fig. 1.27 Photographs and amperometric recordings of microelectrode (a, b) and nanoelectrode (c, d).

单根微米电极或纳米电极的时间和空间分辨率很高,但通量较低,单次测试仅能获得单个位点的电化学信号。电极阵列可在一定程度上解决上述问题。Lindau 等结合光刻和微加工方法,在盖玻片上制备了由四个铂微电极组成的电极阵列(图1.28),可对单个细胞不同位置处的神经递质释放过程进行表征^[136]。CMOS 技术能够显著提升集成电路的规模。Müller 等在 3.85 × 2.10 mm² 大小的基底上集成了 26400 个微电极,可对孵育在其上的皮层神经元网络的电化学性质进行研究^[137]。不过,电极阵列中单个电极的尺寸通常在微米级,细胞的尺寸也在此范围。因此,即使使用电极阵列,

也难以较高通量地得到亚细胞水平的物质分布信息。



图 1.28 电极阵列检测单个细胞释放的多巴胺[136]

Fig. 1.28 Electrochemical detector array recording from a chromaffin cell. Light microscope image (a) and amperometric recordings (b) from the four electrodes.

除儿茶酚胺类神经递质(多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素等)外,葡萄糖、氧 气、一氧化氮、过氧化氢、抗坏血酸、吲哚乙酸等细胞内或细胞释放的小分子电活性 物质也可使用微纳电极进行探测。修饰电极实现选择性,或基于酶促反应检测电活性 产物等方法,可以间接实现非电活性分子的电化学检测。Jiang 等将商业化试剂盒组 分装载入纳米管电极,电极刺入细胞后,目标分子(如葡萄糖、鞘磷脂等)进入纳米 管,在相应酶的作用下产生过氧化氢,后者在电极上氧化,引起电量变化,据此实现 目标分子测定^[138]。借助电泳现象将单个溶酶体引入纳米管内,可分析单个溶酶体内 的酶活性^[139]。

1.4.3.2 电化学扫描探针显微镜

单个微纳电极或电极阵列通量较低, 难以实现细胞成像。扫描探针技术使用超微 电极(即探针)对基底进行扫描,可以原位、非侵入式地获得基底形貌和物质组成等 定性和定量的信息。扫描电化学显微镜(SECM)和扫描离子电导显微镜(SICM)是 两种主要的电化学扫描探针技术。SECM 扫描时, 常需在溶液中加入氧化还原探针。 以不能进入细胞的 Ru(NH3)6²⁺为氧化还原探针,固定探针与基底间的距离,可对不同 分化阶段的 PC12 细胞进行 SECM 扫描, 表征细胞形貌(图 1.29)^[140]。静置探针,则可监测细胞神经递质的释放过程。甲醇二茂铁可以穿透细胞,以其为氧化还原探 针,可以研究药物、重金属等对细胞膜渗透性的影响^[141]。此外, 细胞外泄的还原性

谷胱甘肽可将二茂铁阳离子还原为二茂铁,使探针电流增加,据此可对细胞氧化还原 状态、还原性谷胱甘肽相关通道蛋白活性等进行表征^[142]。SECM 探针本质上是一种 可以移动的微纳电极,因此,修饰探针可使其适用于不同场景。Amatore 和 Mirkin 等 以铂黑修饰的碳电极为探针,比较了正常细胞和癌变细胞内多种活性氧和活性氮的 含量^[143]。在探针表面固定氧化酶,可对细胞表面相应底物进行表征^[144]。



图 1.29 未分化(a)、分化前期(b)及分化后的(c) PC12 细胞的 SECM 形貌图(上)和对应的明场图像(下)^[140]

Fig. 1.29 Topographic images acquired by SECM (top pannel) and corresponding bright field images (bottom pannel): (a) undifferentiated PC12 cell, (b) PC12 cells in the early stage of neurite development and (c) differentiated PC12 cell.

SICM 以纳米吸管为探针,测量管内电极和溶液中电极间的离子电流。当纳米吸管靠近样品表面时,两电极间电阻增大,离子电流减小。因此,离子电流可反映纳米 吸管与样品间的距离。与 SECM 类似,SICM 可用于细胞形貌、机械性质、pH 等方面的研究^[145]。此外,基于细胞表面电荷及对应双电层可影响离子电流大小的原理,可对细胞表面电荷分布进行表征^[146-147]。使用中空纳米管电极,可同时进行 SECM 和 SICM 测试^[148]。扫描探针成像技术兼具电化学方法的高灵敏度与成像方法的高通量,但扫描过程通常较为耗时(数分钟)。高速 SECM 和 SICM 可将单次扫描成像的时间降至数秒,有望实现细胞动态成像^[149]。

1.4.3.3 电化学发光

将电化学发光探针分散在溶液中,或标记于特定的细胞结构上,研究者已经实现 了对单个细胞的电化学发光显微成像。电化学发光成像避免了细胞自体荧光,降低了 背景光干扰,提高了分析灵敏度。电化学发光单细胞成像分析策略主要可分为两类, 基于细胞外泄或细胞内的生化物质对发光信号的增强或减弱作用,可实现细胞组分 分析;通过特异性的免疫反应将电化学发光探针标记至特定结构上,多用于细胞形貌 结构观察。

2009 年, Roda 等以聚苯乙烯微球(直径 8 μm)模拟细胞,并将 Ru(bpy)3²⁺标记 至微球表面,成功采集到微球的电化学发光图像^[150]。由于 Ru(bpy)3²⁺的表面浓度仅 为1×10⁻¹⁹ mol/μm²,该结果验证了电化学发光成像方法具有超高灵敏度,也指出了 电化学发光细胞成像的可能性。



图 1.30 电化学发光单细胞成像装置图(左)与细胞释放过氧化氢的成像图(右)^[151] Fig. 1.30 Facility and potential mode used in ECL imaging of single cells (left). Typical image showing the efflux of H₂O₂ from single cells (right).

2015年, Jiang 等首次报道了单个细胞的电化学发光成像^[151]。如图 1.30 所示, 以平面 ITO 导电玻璃为工作电极并在其上孵育细胞,施加阶跃电位,触发溶液中 L012 的电化学发光。无细胞处电化学发光正常产生,在图像中呈现为明亮区域;细胞黏着 于电极表面,发光反应被抑制,因此细胞在电化学发光图像中光强较低,呈现为暗处, 即实现细胞的反相成像。该细胞成像方法本质上与油潜指纹反相成像原理一致。刺激 细胞产生过氧化氢后,电化学发光强度增强。比较刺激细胞前后的电化学发光图像并 作差减,得到细胞外泄过氧化氢的电化学发光图像。胆固醇氧化酶可将细胞膜表面的 胆固醇氧化,同时产生过氧化氢。电化学发光差减图中不同细胞间电化学发光强度的 差异反映了单细胞水平细胞膜胆固醇含量的异质性。除胆固醇外,鞘磷脂、磷脂酰丝 氨酸等生物分子也可基于类似原理被检测^[152-153]。理论上,只要有合适的氧化酶,该 方法可应用于各种生物分子的测定。

制备微孔电极阵列提高细胞密度,可进一步提高电化学发光单细胞分析的通量 ^[154-155]。借助光刻方法在 ITO 基底上制备直径和高度均为 30 μm 的光胶微孔,单个 微孔内仅能容纳一个细胞。在溶液中同时加入 Triton X-100、葡萄糖氧化酶和鲁米诺, Triton X-100 裂解细胞释放葡萄糖,后者被葡萄糖氧化酶氧化产生过氧化氢,增强鲁 米诺的电化学发光。单次拍摄可同时获得 64 个细胞的胞内葡萄糖含量。将葡萄糖氧 化酶替换为胆固醇氧化酶,拍摄 Triton X-100 加入的前后电化学发光图像,可分别获 得细胞膜胆固醇与胞内胆固醇含量的信息^[156]。抑制酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 (ACAT)的活性,测得胞内胆固醇含量降低,细胞膜胆固醇含量增加。

前述工作中,细胞膜底部与基底电极间的空间有限,发光分子数量较少,因此成像的灵敏度也受限制。壳聚糖等三维多孔材料减弱或消除了细胞位阻,发光分子和共反应剂扩散到达细胞底部的电极活性表面,可以实现亮背景下细胞结构或代谢物的成像^[157-158]。Zhu等使用壳聚糖和二氧化钛纳米颗粒修饰 ITO 电极,当修饰层达到一定厚度后,细胞处电化学发光强度提高至与无细胞处相当。刺激细胞产生过氧化氢后,细胞处电化学发光强度增强,实现过氧化氢的直接成像。

纳米颗粒和微电极常用于细胞局域分析。二氧化钛和磷酸铁锂等纳米颗粒或使 电化学发光电位显著降低,或明显增强电化学发光,可以在较低电压下实现高灵敏电 化学发光分析^[157,159]。在中空微米管电极内填充鲁米诺并以聚合物封装,刺入细胞后, 可在电极尖端观察到电化学发光信号,实现细胞内过氧化氢的测定^[160]。在中空纳米 管尖端沉积多孔铂作双极电极,由于纳米限域效应,双极电极的电压降集中于多孔铂 处,使驱动电压大大降低,避免了高电压可能导致的细胞电穿孔现象。将纳米管刺入 细胞,胞内分析物进入纳米管,与管内商业化试剂盒反应产生过氧化氢,双极电极阳 极端发生电化学发光^[161]。

Zhang 等借助纳米颗粒装载化疗药物,标记有识别单元的纳米颗粒结合细胞内癌 症标志物(如 miRNA 等),释放颗粒内装载的化疗药物,刺激细胞产生过氧化氢,

促使细胞凋亡^[162-163]。因此, 癌细胞处电化学发光强度高于背景, 在电化学发光图像 中呈现为亮处。该方法将电化学发光成像与单细胞光热诊疗相结合, 提供了一种新的 电化学发光细胞研究思路。



图 1.31 细胞膜完整时(a)与裂解后(b)细胞的荧光(左)、ECL图像(中)及二者叠加图 (右)^[164-165]

Fig. 1.31 FL (left), ECL (middle) and overlay of FL and ECL (right) images on the same region of interest. Cell membrane in panel a is intact and it is destroyed in panel b.

不难发现,基于鲁米诺电化学发光的单细胞免标记分析工作多围绕成分分析展 开,且一般需要将待测物转化为过氧化氢,通过比较过氧化氢生成前后发光强度的变 化,实现物质定量分析。而基于标记方法的电化学单细胞成像,其分析对象多为细胞 蛋白结构。例如,Sojic等将三联吡啶钌修饰在细胞膜表面,发光分子的荧光信号分 布于整个细胞。在溶液中加入TPrA,基底电极上施加电位,细胞膜边缘在电化学发 光图像中清晰可见,即电化学发光信号主要集中于电极附近区域(图1.31a)^[164]。这 是因为,发光分子固定于细胞膜表面,不能直接在电极表面氧化,电化学发光主要以 低电位机理进行,依赖共反应剂中间体 TPrA•+和 TPrA•的扩散。由于这些中间体寿命 有限,可以扩散到达的距离较短,因此只有电极附近的三联吡啶钌分子能够发光。又 因为细胞贴壁,细胞底部共反应剂中间体扩散受限,电化学发光强度较弱,发光图像 中细胞边缘较亮、中间较暗。若先将细胞膜裂解,再标记发光分子,共反应剂的扩散 不再受细胞膜阻碍,细胞底部的发光分子也会发光(图1.31b)^[165]。研究还发现,电

化学发光成像的焦面位于荧光焦面下方约 1.2 μm 处,距离电极表面更近,证明电化 学发光成像的确是一种电极表面限域的成像技术,与表面等离子体共振成像、全内反 射荧光成像等方法有相似之处。

分别将阴极和阳极发光探针(氮化碳和 L012)特异性修饰在细胞膜表面与细胞 凋亡相关的磷脂酰丝氨酸和表皮生长因子受体上,可以实现两种抗原的电位分辨成 像,表征细胞凋亡过程^[158]。Ju等制备了一种共反应剂内嵌的聚合物点发光探针,将 该探针标记于细胞膜表面,无需共反应剂即可实现电化学发光细胞成像^[166]。由于该 成像体系不涉及共反应剂扩散,电化学发光图像中底部细胞膜清晰可见。

前述结构识别工作都需要将发光探针标记于细胞表面,而标记过程可能影响细胞的本征状态。最近,Jiang等设计了一种电化学发光电容显微镜,用于细胞膜表面癌胚抗原(CEA)的免标记成像(图2.32)^[167]。施加高频交流电触发溶液中鲁米诺的电化学发光,当抗体结合至细胞膜表面时,结合区域的电容降低,双电层电压降增加,电化学发光信号增强。抗体加入前后电化学发光图像的变化反映相应抗原的含量及分布。该方法的检测限低至1pg。



图 1.32 抗体结合前后细胞的 ECL 图像和二者的差减图^[167] Fig. 1.32 ECL images of two adjacent cells before (top panel) and after (middle panel) binding with antibodies. The bottom panel shows the difference image. Each column was obtained with a certain frequency marked on the top.

随着电化学发光机理研究的不断深入,新的电化学发光成像方法也在持续发展。

Chen等在溶液中加入高浓度三联吡啶钌分子,以细胞内的鸟嘌呤等胺类生化分子为 共反应剂,实现了时间分辨的单细胞成像^[168]。在电极上施加正电位,氧化态三联吡 啶钌持续生成,并与细胞中的鸟嘌呤经由催化路径产生电化学发光,释放出光子。图 1.33a 和 b 分别为细胞和荧光图像和连续 400 帧电化学发光图像的叠加图。由于细胞 核中核酸含量高,鸟嘌呤分布集中,细胞核在电化学发光图像中光强最强。在电极表 面持续施加电位,并逐帧分析图像,可观察细胞电穿孔、三联吡啶钌分子进入细胞的 动态过程。在此基础上,研究者定义了一种新的电化学发光成像技术,即催化路径电 化学发光成像。与常用的标记发光分子、共反应剂自由扩散的低电位电化学发光成像 机理相反,该方法使用共反应剂标记目标蛋白,发光探针在溶液中自由扩散,基于催 化路径产生电化学发光。由于氧化态三联吡啶钌的寿命远长于共反应剂中间体,发光 可在距离电极表面更远处产生,细胞顶部的蛋白也可被成像^[169]。



图 1.33 细胞核荧光图像(a)和细胞电化学发光图像(b)^[168] Fig. 1.33 Fluorescence image (a) and ECL image (b) of the same set of cells.

尽管电化学发光显微成像已在生物活性物质成像、细胞结构分析、特异性抗原识 别等方面有了突破性进展,高浓度的发光分子或共反应剂,较高的氧化电位,强氧化 性和还原性的发光中间体,都可能对细胞活性产生影响。细胞固定和发光探针标记也 是多数细胞结构分析工作所必须的,目前能够实现长时间活细胞电化学发光监测的 工作还比较少见。针对电化学发光中的电扰动等问题,苏彬课题组设计制备了铱金属 配合物单晶分子线,该分子线本身可产生电化学发光,又可将电极表面产生的电化学 发光传输至非电极表面,有望实现电化学发光细胞无扰动分析和远程传感^[9]。此外, 电化学发光偏振和光漂白等新技术的发展,可能为电化学发光细胞分析带来新的研 究方法与思路^[170-171]。

1.5 本论文的选题意义和设计思路

尽管细胞分析技术在近数十年中取得了突破性进展,但细胞中的生命活动如何 有序进行、其自我调控机制如何发挥作用等生命科学基础问题还远未清楚,单细胞分 析仍将是今后相当一段时间内的研究重点。在现行细胞成分分析和结构分析方法中, 以荧光分析为主导的光学成像方法灵敏度高,应用广泛,但一般需要标记;质谱学方 法强于物质鉴定,但由于方法自身的侵入性特征,较难实现活细胞成像;电化学方法 具有较高的时空分辨率和灵敏度,但单根电极的通量较低,扫描探针方法也比较耗 时。电化学发光成像结合了光学方法和电化学方法的优势,既能高通量地获取物质和 结构分布的信息,又具有分析速度快、灵敏度高等特点。此外,电化学发光独特的产 生方式使其具有免光激发、背景低、时空可控性强等优势,是一种极具潜力的细胞分 析技术。本论文围绕细胞分析中成分鉴定和结构识别等关键问题,拟发展免标记的电 化学发光成像策略,具体开展以下研究:

(1)为实现复杂细胞代谢环境中小分子的选择性分析,设计二氧化硅纳米笼固态电化学发光传感器。基于尺寸选择性和电荷选择性,细胞释放的神经递质多巴胺可自由扩散进入纳米笼,淬灭纳米笼内发光探针的电化学发光,实现细胞培养液中多巴胺的直接电化学发光成像测定。

(2)针对细胞结构成像需标记、动态成像较困难等问题,发展免标记电化学发光细胞-基质黏着成像方法,实现活细胞的细胞-基质黏着免标记动态成像,并在亚细胞水平揭示局域细胞-基质黏着强度。将该方法应用于细胞集体迁移分析,探究引领细胞和后缘细胞的迁移性质。

(3)在深入理解电化学发光反应机制的基础上,调控发光过程,突破电化学发光成像的表面限域限制,发展高时空可控性的电化学发光成像方法,拓展电化学发光成像的应用范围,实现细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的空间选择性成像。

第二章 纳米笼阵列电化学发光测定细胞释放的多巴胺

2.1 引言

多巴胺是一种重要的神经递质,于1958年由Arvid Carlsson首次发现;随后,Paul Greengard阐明了与多巴胺相关的细胞信号通路,二人因此获得2000年诺贝尔生理学 或医学奖。针对多巴胺的研究极大地推动了生物精神病学、精神药理学和神经心理学 的发展。已有证据证明,多巴胺缺失与帕金森病、注意缺陷多动障碍相关,而精神分 裂症患者脑内多巴胺含量过高。神经医学中广泛使用的左旋多巴、哌醋甲酯及安定类 等药物,直接或间接作用于多巴胺信号通路,实现疾病治疗。

突触是多巴胺等神经递质在神经元间或神经元与其它可兴奋细胞间传递信息的 关键结构,由突触前膜、突触间隙和突触后膜构成。静息状态下,神经递质储存于神 经元末梢的突触小泡内。当神经冲动传导至神经元末端,突触小泡到达突触前膜,释 放神经递质至突触间隙。神经递质到达突触后膜,引起突触后细胞的动作电位,完成 神经冲动在两个细胞间的信号转导^[172]。因此,测量神经元静息状态与动作电位下神 经化学物质的浓度变化对理解神经元通信和疾病发生过程具有重要意义。

目前已有多种方法可用于多巴胺等神经化学物质的测量,主要包括光学方法、质 谱学方法和电化学方法三大类。其中,光学技术可实现单细胞时空分辨分析,但由于 多巴胺等神经递质无荧光活性,常需设计对应的纳米材料探针;质谱技术具有强大的 成分分析能力,但对神经递质的实时检测还面临挑战;电化学分析灵敏度高,借助纳 米电极还可以实现超高的时间和空间分辨,但单个电极通量较低。也有研究者将电化 学方法和荧光方法结合,以神经递质类似物为对象研究时空分辨的细胞胞吐过程^[173-174]。这些方法为神经化学研究提供了许多有效的信息。

电化学发光巧妙结合了电化学方法和光学方法,具有零背景、灵敏度高、时空分 辨率高等特点与优势,已被广泛应用于生物传感领域。尽管已报道的电化学发光探针 种类繁多,三联吡啶钌(Ru(bpy)3²⁺)及其衍生物仍然是最常用的发光分子,也是商 业化诊断设备中使用的发光探针。多巴胺在电极表面的氧化产物可与Ru(bpy)3²⁺激发

态间发生电子转移,有效淬灭Ru(bpy)3²⁺的电化学发光^[175]。基于此原理,已有许多"开 -关"型的电化学发光传感体系被建立起来。例如,将Ru(bpy)3²⁺加入毛细管电泳的缓 冲液,多巴胺到达检测电极处时可以观察到明显的电化学发光信号的降低^[176]。

与许多化学发光试剂不同, Ru(bpy)3²⁺可在电化学发光过程中循环再生, 保证了 电化学发光方法的灵敏度及稳定性。但在实际应用体系中, Ru(bpy)3²⁺通常直接加入 缓冲液中,较难回收利用。固态电化学发光传感器通过将Ru(bpy)3²⁺及其衍生物等固 定于电极表面,可以实现发光探针的重复使用,还具有操作简单、试剂消耗量低等优 势。常用的发光体固定方法包括Langmuir-Blodgett膜^[177]、溶胶-凝胶^[178]、自组装^{[179-} ^{180]}、阳离子交换^[181-182]和化学键合^[183]等。这些方法大多依赖发光分子与电极表面的 相互作用,如π-π相互作用、静电吸引和吸附等,因此难以避免发光分子的流失。尽 管共价结合可以解决这一问题,但电极表面修饰的发光分子的数量有限,因此传感器 的灵敏度不高。

本章工作设计制备了一种具有电化学发光活性的纳米笼阵列 (electrochemiluminescent nanocage array, ENA)固态电化学发光传感器。该传感器 由两层孔径不同的垂直有序二氧化硅纳米多孔薄膜(silica nanoporous membrane, SNM)构成。底部的SNM孔径较大,约为5.5 nm,记作LSNM;顶部的SNM孔径较小, 约为2.3 nm,记作SSNM。由于分子尺寸较大,三(4,7-联苯-1,10-邻菲啰啉)钉(II) (Ru(dpp)s²⁺)可通过LSNM的纳米通道,但无法通过SSNM的纳米孔道,因此被SSNM 物理限域于LSNM膜内。尺寸较小的共反应剂TPrA等可以通过SSNM到达电极表面, 与钌分子共同发生电化学发光反应。多巴胺也可进入纳米笼内,淬灭电化学发光。因 此,ENA可作为固态电化学发光传感器,用于生化分析。作为概念验证性实验,ENA 成功检测了水溶液中及活细胞释放的多巴胺。

2.2 实验部分

2.2.1 试剂与材料

如无特殊说明,所用试剂均购于试剂公司,纯度为分析纯,使用时未经进一步纯化。三(4,7-联苯-1,10-邻菲啰啉)二氯化钌(II)(Ru(dpp)3Cl2)和十六烷基三甲基溴化铵

(CTAB, 98%)购于 Alfa Aesar。四乙氧基硅烷(TEOS, ≥99.0%)、三乙醇胺(TEA)、 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA, *M*w=996000)、浓氨水(25 wt%)、杜氏磷酸盐缓冲液 (DPBS)和杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)购于 Sigma Aldrich。组胺二盐酸盐 (98%)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC, 97%)、三正丙胺(TPrA)、邻苯二甲酸 氢钾(KHP)和铁氰化钾(K₃Fe(CN)₆)购于 Aladdin。胎牛血清(FBS)购于 Gibco。 聚二甲基硅氧烷(PDMS)购于 Dow Corning。浓盐酸、氢氧化钠、乙醇、环己烷、 苯甲醚及丙酮等购于国药集团化学试剂有限公司。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12) 购于北京北纳创联生物技术研究院。径迹刻蚀对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜购于江 碧透。高纯氮气(N₂, 99.999%)购于杭州今工特种气体有限公司。氧化铟锡导电玻 璃(ITO,方阻<17Ω/sq)购于珠海凯为光电科技有限公司。溶液配制均使用超纯水 (>18.2 MΩ cm, Millipore)。

2.2.2 仪器与设备

玻璃切割器(珠海凯为仪器设备有限公司)

数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)

加热板(KW-4AH, Chemat Technology)

台式匀胶机(KW-4A,中国科学院微电子研究所)

磁力搅拌器(RCT Basic, IKA)

真空低压等离子体清洗机(PDC-32G-2, Harrick Scientific)

电化学工作站(CHI920C/CHI812,上海辰华仪器有限公司)

电致化学发光检测仪(MPI-E, 西安瑞迈分析仪器有限责任公司)

光纤光谱仪(QEpro, Ocean Optics)

荧光光谱仪(RF-5301pc,岛津)

鼓风干燥箱(DHG-9030A,上海精恒仪器制造有限公司)

Tanon 5200 化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)

二氧化碳培养箱(Heal Force HF90,力康生物医疗科技控股有限公司)

扫描电子显微镜(SU8010, Hitachi)

透射电子显微镜(HT7700, Hitachi)

2.2.3 ENA/ITO 电极制备

2.2.3.1 二氧化硅纳米孔薄膜的制备

两种孔径的二氧化硅纳米多孔膜(silica nanoporous membrane, SNM)均依照文 献制备^[184-185]。孔径较小的 SNM(SSNM)由 Stöber 溶液生长法制得,具体步骤如 下。将 ITO 电极切割至合适尺寸,在1 M NaOH/乙醇溶液中浸泡过夜。随后依次在 丙酮、乙醇和超纯水中超声 20 min,氮气吹干备用。准备含 0.16 g CTAB、10 μL 浓 氨水和 80 μL TEOS 的乙醇/水混合溶液(70 mL 水, 30 mL 乙醇),小心将洗净吹干 的 ITO 电极浸入。密封后置于 60 °C 水浴锅中静置反应 24 h。反应结束后将 ITO 电 极取出,用大量水冲洗,氮气吹干,100 °C 老化过夜,即得到孔道内保留有表面活性 剂 CTAB 的 SSNM/ITO 电极。

孔径较大的 SNM (LSNM) 由两相分层生长法制得,具体步骤如下。将切割为 合适大小的 ITO 电极在 2 M NaOH 的水溶液中超声 1 h,大量水冲洗后氮气吹干备 用。准备含 2.5gCTAC 和 90 μL TEA 的水溶液 (25 mL),超声 15 min 后转移至圆底 烧瓶。将 ITO 电极浸入前述溶液中,圆底烧瓶置于 60 ℃ 水浴锅中。搅拌下反应 1 h 后,逐滴滴加 0.75 mL TEOS 和 8.25 mL 环已烷的混合溶液,该溶液与已存在的水溶 液分层。搅拌下继续反应 5 h。反应结束后,将 ITO 电极取出,依次用大量乙醇和水 冲洗,60 ℃ 老化 1 h,即得到孔道内保留有 CTAC 的 LSNM/ITO 电极。

2.2.3.2 ENA/ITO 电极的制备

制备 ENA/ITO 电极前,首先将 SSNM/ITO 电极和 LSNM/ITO 电极浸入 0.1 M 盐酸乙醇溶液中,搅拌 15 min,除去纳米孔道内的 CTAB 和 CTAC 胶束。接下来,使用 PMMA 辅助转移法将 SSNM 从 ITO 基底上剥离^[186],具体步骤如下。首先将 SSNM/ITO 电极切割为 2.5 cm × 2.5 cm 小块,导电面朝上置于匀胶机内,滴加含 PMMA 的苯甲醚溶液。开启匀胶机,在 SSNM/ITO 电极表面均匀旋涂一层 PMMA。苯甲醚挥发后,将涂覆有 PMMA 的 SSNM/ITO 电极置于加热板上,115 ℃ 加热 15 min,自然冷却后置于浓度为 2 M 的盐酸水溶液中,刻蚀 ITO 层。刻蚀完成后,将 SSNM/ITO 由盐酸刻蚀液中取出置于清水中,PMMA 支撑的 SSNM 漂浮于溶液表面。使用等离子体处理的 PET 膜将 SSNM 捞出,在清水中洗涤后,置于含 70 µM Ru(dpp)3²⁺

的水溶液表面。使用预先富集有 Ru(dpp)s²⁺的 LSNM/ITO 电极将 SSNM 捞出,即获 得 PMMA 覆盖的 SSNM/LSNM/ITO 多层复合结构。将获得的电极置于加热板,100 °C 加热 2h,使两层 SNM 间通过 Si-O 化学键键合。最后,将电极置于丙酮中浸泡 2 h,除去电极表面覆盖的 PMMA 层,得到 SSNM 封装、LSNM 装载发光分子的 ENA/ITO 电极。若直接在清水中使用 LSNM/ITO 电极将 SSNM 捞起,其余制备过程与 ENA/ITO 制作流程一致,则得到未装载 Ru(dpp)3²⁺的空白纳米笼阵列电极 (bare nanocage array, BNA),记为 BNA/ITO 电极,作为 ENA/ITO 电极的空白对照。

2.2.4 ENA/ITO 电极表征

2.2.4.1 电镜表征

使用小刀将 SSNM 或 LSNM 从 ITO 电极表面刮下,加入适量乙醇后超声,使 SNM 分散均匀。使用微量移液器移取超声后溶液的上清液,滴加至铜网表面,待干 燥后置于透射电子显微镜中观察,表征 SSNM 及 LSNM 的孔道结构和纳米孔分布。

将 ENA/ITO 电极切割为小块,导电面向上贴于样品架上,喷铂后置于扫描电子显微镜中观察,表征 ENA/ITO 电极表面结构。将新折断的 ENA/ITO 电极垂直贴于 SEM 样品架上,喷铂后表征 ENA/ITO 电极截面结构。

2.2.4.2 电化学表征

以 K₃Fe(CN)₆ 或 Ru(dpp)₃Cl₂ 为探针,表征 SSNM/ITO、LSNM/ITO、BNA/ITO 或 ENA/ITO 电极的渗透性。两种探针分子溶液的具体构成为:K₃Fe(CN)₆浓度为 0.5 mM, 配制于 0.05 M 的 KHP 缓冲液 (pH=4) 中; Ru(dpp)₃Cl₂浓度为 100 μ M, 配制于 0.01 M 的 DPBS (pH=7.4) 中。以 ENA/ITO 电极为工作电极, 铂丝为对电极, 充有饱和 氯化钾的银/氯化银电极为参比电极, 使用 CHI920C 电化学工作站表征电极渗透性。 循环伏安 (CV) 测试中扫速为 0.05 V s⁻¹, 差示脉冲伏安 (DPV) 测试参数如下: 电 势台阶 0.01 V, 脉冲幅度 0.05 V, 脉冲宽度 0.05 s, 脉冲周期 0.5 s。

2.2.4.3 电化学发光强度测试、光谱采集

以 TPrA 为共反应剂,使用电致化学发光检测仪采集 ENA/ITO 电极的电化学发光光强,研究该体系的电化学发光性质。循环扫描多圈,验证其稳定性。

使用光纤光谱仪采集 ENA/ITO 电极的电化学发光光谱。将准直透镜及光纤对准 电极表面,施加+1.3 V 电位,光谱采集时间设置为 5 s,即可得到电化学发光光谱。

2.2.5 电化学发光成像

2.2.5.1 电化学池制作

电化学发光成像实验使用的电化学池为手工制作的 PDMS 池,具体制备流程如下。将 PDMS 单体与固化剂按 10:1 比例混合,搅拌均匀,置于4℃冰箱。2 h 后取出,倒入干净的塑料培养皿中。随后置于加热板上,75℃固化 1.5 h。使用打孔器在 PDMS 表面打孔(孔直径约为 9 mm),并小心将打孔后的 PDMS 片切块取出,覆盖 在洁净的电极表面,PDMS 池即制作完成。

2.2.5.2 电化学发光成像系统

使用课题组搭建的电化学发光成像分析平台,采集 ENA/ITO 电极表面的电化学 发光图像。该平台由 Tanon 5200 化学发光图像分析系统和 CHI812 电化学工作站组 成。成像实验中使用的三电极体系由 ENA/ITO 工作电极、铂丝对电极和银/氯化银丝 参比电极构成。首先在成像系统中聚焦电极表面,随后关闭光源,使用电化学工作站 施加+1.3 V 电位,触发 ENA/ITO 电极与溶液中 TPrA 的电化学发光反应,使用 CCD 同步采集发光信号,即可得到电极表面的电化学发光图像。实验中 CCD 曝光时间为 5 s。使用 ImageJ 软件测量图片灰度值并进行定量分析。

2.2.6 ENA/ITO 电极定量检测多巴胺

采用光强测量和成像两种方法对溶液中的多巴胺进行检测。光强测量是在 MPI-E 电化学发光分析仪上完成的。在 DPBS 溶液中加入 5 mM TPrA 和不同浓度的多巴 胺,电位扫描至 1.3 V,采集电化学发光强度随时间变化的曲线。取发光强度峰值进 行数据分析。

由于成像系统使用的 CCD 检测器不如光强测量使用的光电倍增管(PMT)灵敏度高,成像实验中共反应剂 TPrA 的浓度提高至 10 mM。施加+1.3 V 电位,曝光时间5 s,采集不同多巴胺浓度下的电化学发光图像。使用 ImageJ 软件分析图像灰度,并

进行数据分析。

2.2.7 PC12 细胞培养及处理

PC12 细胞为大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞,可分泌包括多巴胺在内的多种儿茶酚 胺类神经递质。孵育时间较短时,PC12 细胞仅产生多巴胺,据此保证多巴胺检测的 特异性。PC12 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM,每两天更换一次培养基。培养箱 温度设置为 37 °C,CO2 含量为 5%。为了检测细胞释放的多巴胺,将细胞由培养皿 转移至离心管,计数后取合适浓度接种于 96 孔板中,并孵育过夜。设置无细胞组(仅 有培养基)为空白对照。刺激细胞产生多巴胺前,除去 96 孔板中的培养基,使用 DPBS 洗三次。随后加入含 20 μM 组胺的 DPBS 溶液,培养箱中孵育 20 min。取上清液,加入 10 mM TPrA 后置于电化学池,拍摄 ENA/ITO 电极表面的电化学发光图像。

2.3 结果与讨论

2.3.1 二氧化硅纳米通道薄膜的制备和表征

2.3.1.1 二氧化硅纳米孔薄膜的制备原理

图 2.1a 为 Stöber 溶液生长法制备 SSNM 的原理图。在 Stöber 溶液中,表面活性 剂阳离子(十六烷基三甲基胺,CTA⁺)吸附于带负电荷的基底表面(如 ITO 或玻璃), 并形成球状胶束(步骤 1)。TEOS 在氨水的催化下缓慢水解,形成带负电荷的硅酸 盐,后者由于静电作用吸附在带正电荷的球状胶束附近(步骤 2)。当浓度较低时, 自由扩散的硅酸盐更倾向于沉积在邻近的球状胶束之间,屏蔽邻近胶束头部的静电 排斥作用。同时,溶液中乙醇的存在减弱了球形胶束内部烷基链间的相互作用,增加 了胶束内部疏水空间,减小球状胶束曲率。此外,氨水的存在使 CTAB 与邻近的硅 酸盐间形成氢键。这三个因素都促使 CTAB-硅酸盐复合物的构象由球状转变圆柱状 (步骤 3)。新水解的硅酸盐吸附在胶束头部,使二氧化硅孔道沿垂直基底方向延伸 (步骤 4)。去除胶束后,即得到垂直有序的二氧化硅纳米孔薄膜(SNM)。

两相分层生长法的原理与前述 Stöber 溶液生长法类似。其区别在于,该方法中 胶束由油-水两相界面处表面活性剂包裹油相(本实验中为环己烷)而来。因此,该

条件下生成的胶束尺寸更大,最终获得的二氧化硅纳米孔薄膜的孔径也更大。环己烷 等油相溶剂也因此被称为扩孔剂。



图 2.1 Stöber 溶液生长法和两相分层生长法制备 SSNM 和 LSNM 的原理图^[184-185] Fig. 2.1 Illustration of the Stöber-solution growth approach (a) and the biphasic-stratification growth method (b) for the preparision of SSNM and LSNM, respectively.

2.3.1.2 二氧化硅纳米通道薄膜的表征

使用透射电镜对 SSNM 及 LSNM 薄膜的孔道结构和表面形貌进行表征。图 2.2a 和 b 分别展示了 SSNM 和 LSNM 的截面图,图中垂直有序的纳米通道互相平行。两种纳米孔薄膜的厚度分别约为 95 nm 和 53 nm,LSNM 的厚度更小。图 2.2c 和 d 分别为 SSNM 及 LSNM 的俯视图,图中亮点即为纳米孔,纳米孔薄膜在较大范围内无缺陷。放大的插图中可观察到,两种薄膜的纳米孔均呈六方排布,SSNM 和 LSNM 的平均孔径分别为 2.3 nm 和 5.5 nm。



图 2.2 SSNM (a, c) 和 LSNM (b, d) 的透射电镜表征图 Fig. 2.2 Cross-sectional (a, b) and top-view (c, d) TEM images of SSNM (a, c) and LSNM (b, d), showing parallel nanochannels and the nanopores as bright spots. The insets of c and d are the magnified images with a scale bar of 10 nm.



图 2.3 $Fe(CN)_6^{3-}$ 在 SSNM/ITO(a)和 LSNM/ITO(b)电极上的循环伏安曲线 Fig. 2.3 CV responses obtained with bare ITO electrode (black), SSNM/ITO (a) or LSNM/ITO (b) electrode before (blue) and after (red) removal of the surfactants in the nanochannels. The solution was 0.05 M KHP (pH = 4) buffer containing 0.5 mM Fe(CN)₆³⁻. The scan rate was 0.05 V s⁻¹.

以铁氰化钾为氧化还原探针,对两种薄膜进行电化学表征。保留纳米孔道内的胶束(图 2.3,蓝线),SSNM/ITO及LSNM/ITO电极上均未观察到明显的铁氰化钾的氧化还原信号。这是因为,纳米孔道内的胶束形成疏水空间,阻碍带负电荷的Fe(CN)6³⁻进入孔道,到达电极表面发生氧化或还原。去除胶束后(图 2.3,红线),两

种电极上均可观察到明显的铁氰化钾的氧化还原峰,但均小于裸 ITO 电极上铁氰化钾的氧化还原信号(图 2.3,黑线)。这是因为,去除胶束后,二氧化硅纳米通道表面带负电荷,抑制同样带负电荷的 Fe(CN)6³⁻进入孔道,因此其电化学信号相对裸 ITO 较低。上述结果证明了 SSNM 与 LSNM 在分子水平上的完整性。



图 2.4 Ru(dpp)₃²⁺的分子结构 Fig. 2.4 Molecular structure of Ru(dpp)₃²⁺.

图 2.4 为 Ru(dpp)3²⁺的分子结构,使用 Chem3D 等软件测得该分子的直径约为 2 nm。由于其尺寸与 SSNM 孔径相当,理论上 Ru(dpp)3²⁺应较难通过 SSNM 孔道。已 有文献报道,使用 SSNM 作为过滤膜时,该分子无法穿过薄膜进入滤液^[186]。LSNM 的孔直径大于 Ru(dpp)3²⁺的分子直径,因此 Ru(dpp)3²⁺可能可以进入 LSNM 孔道内部。



图 2.5 Ru(dpp)₃²⁺分子在 SSNM/ITO 电极(黑线)和 LSNM/ITO 电极(蓝线)上的循环伏安 (a)及差示脉冲曲线(b)



使用循环代安(CV)和差示脉冲伏安(DPV)表征 Ru(dpp)3²⁺在两种电极上的渗透性,验证上述讨论结果。图 2.5a 和 b 分别为 Ru(dpp)3²⁺在两种电极溶液中的 CV 和 DPV 曲线。LSNM/ITO 电极上,约+1.1 V 处 CV 与 DPV 曲线中均出现明显的氧化还 原信号,对应 Ru(dpp)3²⁺的氧化还原反应(蓝线)。而在 SSNM/ITO 电极上未观察到 明显的电流信号(黑线)。表明由于尺寸排阻效应,Ru(dpp)3²⁺不能通过 SSNM 孔道 到达基底 ITO 电极表面。以上结果证明,SSNM 的确可作为 LSNM 纳米通道的"围栏",将 Ru(dpp)3²⁺物理限域在 LSNM 通道内,制备 LSNM 孔道装载发光分子、SSNM 封装的 ENA/ITO 电极。

2.3.2 ENA/ITO 电极的制备和表征

2.3.2.1 ENA/ITO 电极的制备

使用 PMMA 辅助转移法将 SSNM 从玻璃基底上剥离,并转移至孔道内装载发光 分子 Ru(dpp)₃²⁺的 LSNM/ITO 电极表面,制得 ENA/ITO 电极(图 2.6)。SSNM 与 LSNM 膜间形成牢固的硅-氧化学键,将 Ru(dpp)₃²⁺封装在 ENA 内。SSNM 的纳米孔 道结构阻碍 Ru(dpp)₃²⁺由 ENA 渗漏,同时允许 TPrA 等共反应剂分子到达基底 ITO 电极表面,使电化学发光反应可以正常发生。



图 2.6 ENA/ITO 电极的制备流程图 Fig. 2.6 Illustration of the preparation of ENA/ITO electrode.

2.3.2.2 ENA/ITO 电极表征



图 2.7 ENA/ITO 电极的扫描电镜俯视图(a) 和截面图(b) Fig. 2.7 Top-view (a) and cross-sectional (b) SEM images of the ENA/ITO electrode.

使用扫描电镜表征 ENA/ITO 的电极结构。图 2.7a 为 ENA/ITO 电极的俯视图。 SSNM 覆盖在 LSNM 上,两种薄膜均在较大范围内光滑无裂痕。图 2.7b 为 ENA/ITO 电极的截面图,图中可清晰观察到电极的多层结构,由上至下分别为 SSNM 层、LSNM 层、基底 ITO 电极和玻璃, SSNM 层和 LSNM 层的厚度分别约为 90 nm 和 50 nm, 与图 2.2 透射电镜表征结果接近。



图 2.8 未装载发光分子的 BNA/ITO 电极在 DPBS(黑线)和含 Ru(dpp)₃²⁺的溶液(蓝线)中的 CV(a)和 DPV 曲线(b)

Fig. 2.8 CV (a) and DPV (b) curves of BNA/ITO electrode in DPBS (black) or DPBS containing 100 μ M Ru(dpp)₃²⁺ (blue). The scan rate was 0.05 V s⁻¹.

制备 ENA/ITO 电极时,不装载发光分子,即得到 BNA/ITO 电极。以 BNA/ITO 电极为工作电极,在 Ru(dpp)3²⁺溶液中扫描循环伏安及差示脉冲伏安曲线(图 2.8)。 与空白 DPBS 溶液中得到的曲线(黑线)相比,在 Ru(dpp)3²⁺溶液中扫描得到的曲线

(蓝线)中无明显的氧化还原信号,表明溶液中的 Ru(dpp)3²⁺无法通过 BNA/ITO 电极上层的 SSNM 到达基底 ITO 电极表面发生氧化还原反应,证实 2.3.2.1 小结所述的 ENA/ITO 电极制备流程不影响 SSNM 膜的完整性。制备得到的 ENA/ITO 电极仍具 有分子水平的完整性。



图 2.9 (a) ENA/ITO 电极(红线)与 BNA/ITO 电极(黑线)的 DPV 曲线对比;(b) ENA/ITO 电极的固体荧光(黑线)和电化学发光光谱(红线);(c) ENA/ITO 电极的电化学发光测试及(d) 电极稳定性测试

Fig. 2.9 (a) DPVs obtained with the ENA/ITO (red line) and BNA/ITO (black line) electrodes in 0.01 M DPBS (pH 7.4). (b) Normalized solid-state FL under excitation at 460 nm and ECL spectra of the ENA/ITO electrode. (c, d) The ECL-potential curve overlaid with CV (c) and the time-dependent ECL signals collected for 20 consecutive CV scans (d) of the ENA/ITIO electrode in 0.01 M DPBS (pH 7.4) containing 5 mM TPrA. The scan rate was 100 mV s⁻¹ and the PMT was biased at 600 V.

图 2.9a 为 ENA/ITO 电极在 DPBS 溶液中的 DPV 曲线(红线),+1.10 V 处的氧 化电流对应 Ru(dpp)3²⁺氧化为 Ru(dpp)3³⁺。作为空白对照的 BNA/ITO 电极上未观察到 明显的氧化还原信号(黑线),证明伏安响应的确来源于封装在纳米笼阵列中的 Ru(dpp)3²⁺。图 2.9b 为 ENA/ITO 电极的固体荧光光谱(黑线)和电化学发光光谱(红

(式 2.1)

线)。固体荧光光谱的最大波长位于 610 nm 处,而电化学发光光谱的最大波长红移 至 640 nm 处,半峰宽也有所展宽,这可能是由 Ru(dpp)3²⁺分子所处的物理化学环境 不同导致的。此外,荧光光谱由荧光光谱仪测得,电化学发光光谱由光纤光谱仪测得, 不同仪器及测试参数也可能是造成两种光谱间差异的原因。

ENA/ITO 电极在 5 mM TPrA 溶液中的循环伏安曲线和电化学发光光强-电位曲 线展示于图 2.9c。电位扫描至+0.95 V 和+1.05 V 处后分别开始观察到明显的氧化电 流和电化学发光信号。之后,二者随扫描电位的增加而增加。当施加电位为+1.3 V 时, ENA/ITO 电极上的电化学发光反应大致可由如下方程式描述:

 $\text{TPrA} \rightarrow \text{TPrA}^{\bullet+} + e^-$

TPrA^{•+} → TPrA[•] + H⁺ (式 2.2)

Ru(dpp)₃³⁺+TPrA → Ru(dpp)₃²⁺+TPrA^{•+} (式 2.4)

 $Ru(dpp)_{2}^{3+} + TPrA^{\bullet} \rightarrow Ru(dpp)_{2}^{2+*} + P \qquad (武 2.5)$

由于发光分子限域于电极表面 LSNM 的孔道中,仅有共反应剂直接在电极表面氧化 产生电化学发光的"低氧化电位路径"的贡献可能相对较小,主要的发光路径可能是 氧化-还原路径。循环扫描 20 圈(图 2.9d),电化学发光光强无明显下降,相对标准 偏差仅为 1%,表明 ENA/ITO 电极电化学发光的稳定性。将 ENA/ITO 电极置于超纯 水中,浸泡不同时长后取出测其固态荧光光谱。如图 2.10 所示,浸泡 5 h 后,电极 的固态荧光光强有明显下降,可能是由于 ENA/ITO 电极外表面吸附的 Ru(dpp)s²⁺被 洗脱。之后数十小时,荧光光强不再发生明显变化,证明该电极长期使用的稳定性。

需要指出的是,尽管 Ru(dpp)s²⁺被限域在 ENA 的纳米笼内,但其在一定程度上仍可在笼内扩散。ENA/ITO 电极的分子筛分能力,使其既能阻碍 Ru(dpp)s²⁺外泄,又保障了共反应剂和待测物多巴胺顺利到达电极表面。此外,已有许多工作验证,SSNM 具有优异的抗污染性能^[187-189]。这些特征均保证了 ENA/ITO 电极传感性能的稳定性和可重复性。



图 2.10 ENA/ITO 电极的固体荧光光谱(a) 和强度(b) 随浸泡时间的变化 Fig. 2.10 Solid-state FL spectra (a) and peak intensity (b) of the ENA/ITO electrode at different time intervals.

2.3.3 溶液中多巴胺的定量检测



图 2.11 ENA/ITO 电极的电化学发光强度与多巴胺浓度的关系

Fig. 2.11 (a) ECL responses of the ENA/ITO electrode to different concentrations of dopamine. (b) The linear dependence of the relative variation of peak ECL intensity on the concentration of dopamine. I_0 is the peak ECL intensity in the absence of DA and *I* is that in the presence of DA.

以多巴胺为待测分子,测试 ENA/ITO 电极的分析性能。图 2.11a 为 ENA/ITO 电极在含 5 mM TPrA 和不同浓度的多巴胺分子的 DPBS 溶液中的电化学发光强度图。随着多巴胺的加入, ENA/ITO 电极的电化学发光光强明显降低。这是因为多巴胺在电极表面氧化生成的苯醌类化合物可与 Ru(dpp)3²⁺激发态间发生电子转移,淬灭Ru(dpp)3²⁺激发态的发光。图 2.11b 为电化学发光强度的相对变化值与多巴胺浓度的

关系图, I_0 和 I分别为初始电化学发光光强及加入多巴胺后的光强。两段线性分别为 0.500-1.22 μ M (R^2 =0.9996)和 1.22-25.0 μ M (R^2 =0.9879),检测限为 0.0886 μ M。



图 2.12 ENA/ITO 电极检测多巴胺的电化学发光图像(a)和标准曲线(b) Fig. 2.12 (a) ECL images of the ENA/ITO electrode surface in the presence of different concentrations of dopamine. The exposure time of the CCD camera was 5 s. The solution was 0.01 M DPBS (pH 7.4) containing 10 mM TPrA. Note that the image contrast has been adjusted optimally by ImageJ. (b) The relative variation of gray values of the ECL images. *I*₀ is the gray value in the absence of DA and *I* is that in the presence of DA.

成像检测技术具有直观、可视化的特点,在研制微型化、便携式的传感元器件方面也展现出较强优势。由于可使用智能手机、数码相机等作为检测器,电化学发光成像在实际应用中前景广阔。为了提高成像质量,成像实验中使用的共反应剂 TPrA 的浓度提高至 10 mM。如图 2.12a 所示,随着多巴胺浓度的提高,ENA/ITO 电极表面的电化学发光图像明显变暗。图 2.12b 为成像方法检测多巴胺含量的标准曲线。电化学发光强度(图像灰度)的相对变化值((*I-I*₀)/*I*)与多巴胺浓度的对数成线性关系。两段线性区间分别为 0.250-1.12 μM (*R*²=0.9941)和 1.12-20.0 μM (*R*²=0.9822),检测限为 0.228 μM。由于 CCD 灵敏度不及 PMT,成像方法的检测限略高于强度测

量方法。

2.3.4 电化学发光成像测定细胞释放的多巴胺

为了验证 ENA/ITO 在实际样品中的检测能力,收集 96 孔板中刺激细胞后的上 清液,加入 10 mM TPrA 后移入电化学池中直接进行电化学发光成像测试(图 2.13a)。 图 2.13b 中三幅图像分别为无细胞(左)、细胞浓度为 1 × 10⁶ cells/mL(中)和溶液 中再加入 2 μM 多巴胺(右)时 ENA/ITO 电极表面的电化学发光图像,三幅图像的 灰度值依次降低。计算图像的灰度与含 10 mM TPrA 的 DPBS 溶液中 ENA/ITO 电极 表面灰度的相对变化量,结果如图 2.13c 所示。根据图 2.12b 中的标准曲线,得出细 胞浓度为 1 × 10⁶ cells/mL 时,细胞释放的多巴胺浓度为 1.10±0.10 μM;细胞浓度为 1 × 10⁷ cells/mL 时,细胞释放多巴胺的浓度为 9.55±0.90 μM。该结果与以往文献报 道的数值相当^[190]。



图 2.13 (a)样品采集方法示意图; (b) ENA/ITO 电极表面的电化学发光图像; (c) 图像灰度 相对变化值

Fig. 2.13 (a) Schematic illustration of the sample collection. (b) ECL images of ENA/ITO electrode surface in the presence of the supernatant without cells (left), with cells at a concentration of 1×10^6 cells/mL (middle) and further added with 2 μ M dopamine (right). (c) The relative variations of gray values. Note that the image contrast has been adjusted optimally by ImageJ.

在前述上清液中定量加入标准多巴胺溶液,进行回收率测试。结果列于表 2.1。 两种浓度下的回收率分别为103%和95.6%,证明该方法在实际样品中应用的可靠性。

表 2.1 实	际样品	中多	巴胺的	回收率
---------	-----	----	-----	-----

Tal	ble	2	.1	Recov	very	of	DA	in	real	samp	le.
-----	-----	---	----	-------	------	----	----	----	------	------	-----

Labeled / µM	Added / μM	Found / μM	Recovery / %
0.989	2.00	3.06	103
8.59	6.00	14.3	95.6

2.4 本章小节

本章设计制备了一种二氧化硅纳米笼装载发光分子的固态电化学发光传感器, 即 ENA/ITO 电极,实现了 PC12 细胞释放的多巴胺的电化学发光成像分析。ENA 由 两层孔径不同的纳米多孔膜构成,可将发光分子 Ru(dpp)3²⁺物理限域在二氧化硅纳米 笼内。使用电化学、光谱学及显微成像方法对 ENA/ITO 电极进行表征,该电极表现 出良好的稳定性、灵敏度及抗污染能力,实现了实际生物样本中多巴胺的成像测量。

SNM 由绝缘的二氧化硅构筑,具有较好的生物相容性。若将细胞直接孵育在 ENA/ITO 电极表面,既可避免对细胞的电刺激,又能隔绝细胞与电化学发光体系的 直接接触,结合电化学发光成像技术,有望实现多巴胺等物质的原位成像测量。改变 构成 ENA/ITO 电极的两层 SNM 的孔径,可将更多种类和尺寸的发光体(例如分子 探针、纳米团簇和量子点等)装载进纳米笼,拓展 ENA/ITO 电极的检测范围。进一 步在 ENA/ITO 表面结合生物识别元件,利用待测物的空间位阻等对电化学发光过程 的影响,可以实现如 DNA、蛋白质和细胞等的成像分析。

第三章 细胞-基质黏着的免标记电化学发光成像及其在细胞集 体迁移分析中的应用

3.1 引言

细胞-基质黏着是由多种蛋白构成的复杂跨膜结构,它在胞内与细胞骨架相连, 胞外识别特定黏着位点,将细胞锚定于胞外基质。整联蛋白是介导细胞与胞外基质间 黏着的关键。它是由α、β两个亚基构成的跨膜异二聚体,具有较小的胞内区、跨膜 区和较大的胞外配体结合区。其胞内区域通过桩蛋白、踝蛋白、黏着斑蛋白、斑联蛋 白、α-辅肌动蛋白等结合至细胞骨架(如肌动蛋白、微丝等),胞外区域则通过自身 结构域识别胞外基质,介导细胞-基质黏着。脊椎动物中已鉴定得到18种不同的α亚 基和8种不同的β亚基,共可形成24种不同类型的整联蛋白^[191]。不同种类的整联蛋 白与不同的胞浆蛋白结合,形成黏着斑、丝状伪足、片状伪足、微突等多样的细胞-基质黏着结构^[192]。在细胞的生长、生存、凋亡等过程中,细胞-基质黏着的空间分布 和分子结构不断变化。

作为一种复杂的分子机器,细胞-基质黏着的功能不仅仅是细胞粘附,它同时参与"由内向外"和"由外向内"的信号传递,识别胞外化学和物理环境,在伤口愈合、胚胎发育、组织与器官形成、癌症发生和转移等过程中均发挥重要作用^[193]。例如,大多数癌细胞黏着表达异常;黏着缺失促使原发性癌细胞侵袭和转移。因此,深入理解细胞-基质黏着的结构和功能对基础生物学研究及临床医学应用均有重要意义。但是,细胞膜底部与基底间的距离仅为100-150 nm,该距离在黏着位点处进一步缩小至10-15 nm^[194.195]。如何实现这一限域空间内细胞-基质黏着的选择性成像,仍十分具有挑战性。此外,细胞-基质黏着结构多样,且处在高度动态变化中,这要求分析方法不能干扰细胞正常生命过程,而且能够实现细胞-基质黏着的动态成像分析。

在过去的数十年中,研究者们基于成像技术,发展了多种细胞-基质黏着分析方法,对细胞-基质黏着相关的重要生命过程进行了深入探索。电子显微镜是较早研究 细胞-基质黏着的工具之一,但由于样品制备要求高,该方法无法用于活细胞观察。
全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)和激 光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM))等荧光成像方法 是目前生物学研究中最常用的细胞-基质黏着成像方法。但荧光成像前需预先对细胞 -基质黏着蛋白进行荧光标记,基于抗原-抗体免疫识别或基于基因工程的标记手段都 较为复杂费时。反射干涉显微镜(interference reflection microscopy, IRM)可以实现 细胞-基质黏着的免标记实时动态分析。不过, IRM 较难分辨厚度小于 100 nm 的细 胞区域,胞浆局部折射率异质性也会影响分析结果。表面等离子体共振显微镜

(surface plasmon resonance microscopy, SPRM)是一种表面敏感的免标记成像方法,可以探测消逝场内微小的折射率信号变化,也被成功应用于细胞-基质黏着成像。但由于表面等离子体波的横向传输, SPRM 分辨率受限; SPRM 的分析基底必须为特定的等离子体表面(如金、铝等),这在一定程度上限制了 SPRM 在实际生物分析中的应用。

电化学发光是一种由电化学反应引发的暗场光辐射。由于电化学发光反应过程 中的中间体寿命有限,电化学发光被限域于电极表面,是一种表面敏感的分析方法, 已经实现指纹、底部细胞膜等结构的成像分析。本章采用电化学发光显微成像技术, 借助二氧化硅纳米孔薄膜对发光的显著增强作用和电化学发光的表面限域性质,实 现了细胞-基质黏着的免标记成像;对胰酶消化细胞过程进行动态成像分析,研究了 亚细胞水平黏着强度的差异,以及单细胞水平黏着强度与黏着形态的关系;将该方法 应用于细胞集体迁移分析,证实了后缘细胞并非被动的"跟随者"。

3.2 实验部分

3.2.1 试剂与材料

若无特殊说明,所用试剂均由试剂公司购得,纯度为分析纯且未经进一步纯化。制备二氧化硅纳米孔薄膜(孔径 2.3 nm)所需试剂与材料与第二章中相同。吐温-20(Tween-20)购于 Aladdin。牛血清白蛋白(BSA)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)、 六水合三联吡啶二氯化钌(Ru(bpy)3Cl2·6H2O,98%)和杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)购于 Sigma-Aldrich。胎牛血清(FBS)购于 Gibco。RIPA 非变性组织裂解液、4',6-二

脒基-2-苯基吲哚 (DAPI)、封闭山羊血清、磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 M, pH7.4)、 二乙酸荧光素 (FDA)、碘化丙啶 (PI) 和胰蛋白酶-EDTA 消化液 (0.25%, 不含酚 红)购于 Solarbio。多聚甲醛(PFA,4%)购于碧云天。兔抗黏着斑蛋白抗体(ab129002) 和荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (Alexa Fluor® 488, ab150077) 购于 Abcam。聚二 甲基硅氧烷 (PDMS) 购于 Dow Corning。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (PC12) 购于 北京北纳创联生物技术研究院; 人肝癌细胞 (Huh-7) 由浙江大学化学系邬建敏教授 课题组提供。氧化铟锡导电玻璃 (ITO, 方阻<17 Ω/sq, 厚度 100±20 nm) 购于珠海 凯为电子元器件有限公司。高纯氮气 (99.999%) 购于杭州今工特种气体有限公司。 所有溶液均使用超纯水 (>18.2 MΩ cm, Millipore) 配制。

3.2.2 仪器与设备

玻璃切割器(珠海凯为仪器设备有限公司)

数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)

二氧化碳培养箱(Heal Force HF90,力康生物医疗科技控股有限公司)

正置荧光显微镜(Nikon, ECLIPSE LV100ND)

水浸物镜(CFI Apo 40×, N.A. 0.8, Nikon)

EMCCD 相机(iXon Ultra 897, Andor)

电化学工作站(CHI832C,上海辰华仪器有限公司)

电致发光检测仪(MPI-E, 西安瑞迈分析仪器有限责任公司)

扫描电子显微镜(SU8010, Hitachi)

透射电子显微镜(HT7700, Hitachi)

3.2.3 电化学发光显微成像系统

课题组自行搭建的单细胞电化学发光显微成像系统主要由电化学设备与光学设备两部分构成。实验中使用的电化学池与第二章相同,均为自制的 PDMS 池。工作电极为二氧化硅纳米孔薄膜修饰的 ITO 电极(孔径 2.3 nm,本章记为 SNM/ITO 电极),制备方法与第二章相同。使用前首先将电极浸入 0.1 M 的盐酸/乙醇溶液中处理 15 min,除去 SNM 孔道内的 CTAB。以 SNM/ITO 电极为工作电极, Ag/AgCl 丝为参

比电极,铂丝为对电极,电化学激励信号由 CHI832C 电化学工作站提供。光学成像 系统由配备水浸物镜和 EMCCD 的正置荧光显微镜构成,主要完成电化学发光信号 采集功能。在电极上施加合适电位,电化学发光在电极表面产生,经由水浸物镜收集, 到达 EMCCD,得到电化学发光图像。

3.2.4 Ru(bpy)32+/HEPES 体系的电化学发光测试

3.2.4.1 电化学发光强度测试

使用 MPI-E 电致化学发光检测仪记录 SNM/ITO 电极上 Ru(bpy)3²⁺/HEPES 体系的循环伏安及发光强度-时间曲线,研究该体系的电化学发光性质。循环扫描多圈,验证其稳定性。

3.2.4.2 电化学发光图像采集

将小块绝缘胶带贴于 SNM/ITO 电极表面,无胶带处电极表面可正常产生电化学 发光,而胶带覆盖区域则无光信号。拍摄电极表面的电化学发光图像,若图像中胶带 区域与空白电极表面呈现明显的对比度,即胶带边缘清晰可见,表明此时电化学发光 信号可被成像系统有效收集。改变发光分子浓度,比较电化学发光图像的对比度,优 化成像条件。在相同条件下采集 ITO 电极表面的电化学发光图像,考察 SNM 对电化 学发光的增强效应。

3.2.5 电化学发光细胞-基质黏着成像

3.2.5.1 电化学池的制作和预处理

电化学池的制作方法与第二章相同,在此不再描述。制备完成的 PDMS 电化学 池首先置于 75%的乙醇/水溶液中,浸泡 30 min 以上;除去乙醇/水溶液后,使用 0.01 M 的 PBS 润洗三遍;最后,在电化学池中加入适量 PBS,置于超净台内,紫外照射 过夜。次日,胰酶消化处在对数生长期的细胞(PC12 或 Huh-7 细胞),制得细胞悬 液。吸除电化学池内的 PBS,加入一定浓度的细胞悬液(一般为 1%),置于 37 °C、 含 5% CO₂ 的培养箱内孵育 12 h,细胞与电极间形成细胞-基质黏着,贴附在电极表 面。

3.2.5.2 单细胞的细胞-基质黏着成像

将孵育有细胞的 SNM/ITO 电极由细胞培养箱取出,置于正置显微镜载物台,固定电极位置。除去细胞培养基后使用 PBS 轻柔洗涤电极三次,再向 PDMS 池内加入含 50 μM Ru(bpy)3²⁺和 20 mM HEPES 的 PBS。拍摄细胞明场图片后,关闭显微镜光源,施加+1.3 V 恒电位触发电化学发光,EMCCD 同步记录发光图像,曝光时间 5 s,即可获得细胞-基质黏着的电化学发光图像。

3.2.5.3 细胞-基质黏着强度分析

使用胰酶消化模型研究细胞-基质黏着强度,具体步骤如下。获得细胞-基质黏着 图像后(方法同 3.2.5.2 小节),将溶液更换为含 50 μM Ru(bpy)₃²⁺和 20 mM HEPES 的胰蛋白酶-EDTA 消化液。固定时间间隔(一般为 3 min)拍摄电化学发光图像,拍 摄条件同样为施加+1.3 V 恒电位,曝光时间 5 s,获得不同消化时长下的细胞-基质黏 着图像。

3.2.5.4 电化学发光细胞集体迁移成像

采用经典的细胞划痕法(或称为体外伤口愈合实验)研究细胞集体迁移过程。同 3.2.5.1 小结在电极上孵育细胞,提高细胞的接种浓度,使其约12h后生长为汇合的 单层。随后使用 200μL 吸头在单层细胞的中央区域划线,去除中央区域的细胞。使 用 PBS 轻柔洗涤电极三次,随后加入含 2% FBS 的 DMEM 继续孵育细胞。划痕两侧 的细胞朝向划痕迁移,表现出类似伤口愈合的现象。拍摄不同时刻的单层细胞的电化 学发光图像。除发光分子 Ru(bpy)3²⁺的浓度提高至 100 μM 外,其余成像条件与单细 胞的细胞-基质黏着成像条件相同。

3.2.6 细胞荧光成像

3.2.6.1 细胞-基质黏着的免疫荧光标记

为了验证电化学发光图像的确是对细胞-基质黏着成像,使用免疫荧光方法标记 黏着斑蛋白(参与构成细胞-基质黏着复合物),并比较电化学发光图像与荧光成像结 果,具体步骤如下。(1)如3.2.5.1小节所述,在电极表面孵育细胞。12h后除去培 养基,加入4%多聚甲醛固定细胞(10min),随后使用冰PBS洗三次。(2)如3.2.5.2 小节所述,拍摄细胞的明场和电化学发光图像。弃去含 Ru(bpy)3²⁺和 HEPES 的溶液 后,PBS 洗三次。(3)使用裂解液裂解细胞(10 min),随后 PBS 洗三次,每次 5 min。 (4)使用含 10%山羊封闭血清的 PBST(含 0.1% Tween-20 的 PBS)封闭细胞(1 h)。

(5) 弃去前述溶液, 加入含 1% BSA 及 1% 免抗黏着斑蛋白抗体的 PBST 溶液, 4℃ 孵育过夜。(6) 弃去前述溶液, PBS 洗三次后, 加入含 1% BSA 及 0.1% 荧光标记的 山羊抗兔 IgG 抗体的 PBS 溶液, 室温下避光孵育 1 h。(7) 弃去前述溶液, PBS 洗涤 细胞三次, 加入 DAPI 染细胞核 (10 min), 以确定细胞数量和位置。最后弃去 DAPI 溶液, PBS 洗三次后使用荧光显微镜观察。

3.2.6.2 细胞活性测定

无荧光的 FDA 可进入细胞, 在活细胞内酯酶的作用下转化为具有荧光活性的荧 光素, 发射绿色荧光, 因此可用于活细胞鉴定。活细胞的细胞膜具有选择透过性, 不 允许 PI 穿过细胞膜进入胞内; 细胞凋亡后, PI 可进入细胞并与细胞核内染色体结合 并发出荧光, 因此 PI 可用于死细胞鉴定。使用 10 μg/mL 的 FDA 和 5 μg/mL 的 PI 对 细胞同时染色, 可表征细胞活性。

3.2.7 图像处理

MATLAB (R2017b)、ImageJ 和 NIS-Element Analysis D 是本章中主要用到的图像 处理软件。NIS-Element Analysis D 可以识别图像的亮/暗区域边界,并给出图像面积、 周长和 Feret 直径等形状相关参数。参数间的皮尔逊相关系数(Pearson correlation coefficient, PCC)使用 Excel 计算得到。细胞集体迁移实验中明场和 ECL 图像的矢 量场分布由 ImageJ 插件 OrientationJ 计算得到^[196-197]。具体的图像处理步骤如下。(1) 拍摄细胞的明场和 ECL 图像,并使用 ImageJ 平滑所得图像。(2)使用 OrientationJ 检测局部窗口结构张量的最大特征矢量方向(局部窗口设置为细胞尺寸的三分之一, 约为 20 个像素点),得到矢量方向分布于-90°至+90°范围内的矢量场,其中 0°为垂 直划痕方向,-90°或+90°为平行划痕方向。(3)使用 Origin 将矢量绘制为黑色箭头, 或使用 MATLAB 将不同方向的矢量用不同颜色编码,绘制成易于辨识的矢量分布图。 由于细胞垂直划痕迁移,定义-45°至+45°范围内的矢量为方向性矢量,并进一步进行

统计分析。

3.3 结果与讨论

3.3.1 Ru(bpy)32+/HEPES 体系的电化学发光

生物缓冲剂是一类两性离子型缓冲剂,其pKa 接近生理pH,水溶性好,常被用 于细胞培养等领域。因其最早被 Good 等研究发现,也被称 Good's 缓冲剂。最近, Francis 和 Hogan 等研究了以生物缓冲剂为共反应剂的电化学发光体系^[198],并指出, 这些生物缓冲剂可同时作为支持电解质、pH 缓冲剂和共反应剂,可以大大简化电化 学发光测量步骤。同时,相较 TPrA 或 DBAE 等小分子胺类共反应剂,生物缓冲剂毒 性低、水溶性高、不易挥发的特点也使其更适于生化分析。图 3.1 所示为几种已被应 用于电化学发光分析的生物缓冲剂。本章选用 HEPES 为共反应剂,进行电化学发光 实验。



图 3.1 几种生物缓冲剂的分子结构

Fig. 3.1 Molecular structures of biological buffers: HEPES, PIPES, HEPPS, POPSO and BIS-TRIS.

根据文献报道,发光分子-生物缓冲剂体系的电化学发光过程如下:在电极上施 加合适电位,发光分子 Ru(bpy)3²⁺和生物缓冲剂 B(B=buffer)同时在电极表面氧化, 分别生成 Ru(bpy)3³⁺和共反应剂阳离子自由基 B^{•+};后者脱质子生成强还原性物种 B[•], 将 Ru(bpy)3³⁺还原至激发态 Ru(bpy)3^{2+*};激发态 Ru(bpy)3^{2+*}回到基态,释放出光子, 即电化学发光。上述反应过程可由如下方程式表述:

$$\mathbf{B} \to \mathbf{B}^{*+} + e^{-} \tag{δ 3.1}$$

$$\mathbf{B}^{*+} \to \mathbf{B}^{*} + \mathbf{H}^{+} \tag{$\ddagger 3.2$}$$

$$\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{2+} \to \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{3+} + e^{-}$$
 (式 3.3)

$$Ru(bpy)_{3}^{3+} + B' \rightarrow Ru(bpy)_{3}^{2+*} + P$$
 (式 3.4)

$$Ru(bpy)_{3}^{2+*} → Ru(bpy)_{3}^{2+} + h\nu$$
 (式 3.5)

除由 B 在电极表面的直接氧化生成外, B^{•+}还可由 Ru(bpy)₃³⁺与 B 问的溶液相氧 化还原反应获得(式 3.6)。不过,该过程更易在发光分子 Ru(bpy)₃²⁺浓度较高的体系 (>500 µM) 中发生,本章中使用的 Ru(bpy)₃²⁺浓度仅为 50 µM,该过程的贡献应该 较小。

选定发光分子与共反应剂后,使用电致化学发光检测仪测试了 SNM/ITO 电极上 50 µM Ru(bpy)s²⁺/20 mM HEPES 体系的电化学发光。图 3.2a 展示了该体系的循环伏 安曲线和电化学发光光强-电位曲线。当电位扫描至约+0.95 V 处时,氧化电流迅速增 加; 电化学发光的启光电位约为+1.05 V,最大值在约在+1.25 V 处获得。图 3.2b 为 电化学发光强度随时间变化的曲线,循环扫描 10 圈后光强峰值无明显降低,证明该 体系电化学发光的稳定性。



图 3.2 Ru(bpy)₃Cl₂/HEPES 体系在 SNM/ITO 电极上的循环伏安(黑线)和电化学发光强度-电位 曲线(蓝线)(a)及电化学发光稳定性(b)

Fig. 3.2 (a) CV (black) and ECL-voltage curve (blue). (b) The ECL intensities of ten consecutive cycles. The ECL signals were recorded in PBS containing 50 μ M Ru(bpy)₃Cl₂ and 20 mM HEPES at the SNM/ITO electrode. The scan rate was 100 mV s⁻¹. The PMT voltage was biased at 300 V.

已有文献报道, SNM 可显著增强 Ru(bpy)s^{2+/}TPrA 体系的电化学发光, 其 ECL 强度较裸 ITO 电极高两个数量级^[199-201]。为了探究 SNM 是否可增强 Ru(bpy)s²⁺/HEPES 体系的电化学发光强度, 同时验证该体系是否可用于电化学发光成像, 分别对 SNM/ITO 电极和裸 ITO 电极进行电化学发光成像。图 3.3a 和 3.3g 为部分覆盖绝缘 胶带的 SNM/ITO 电极和裸 ITO 电极的明场(bright field, BF)图片。关闭显微镜光 源, 固定共反应剂 HEPES 浓度为 20 mM, 采集不同发光分子浓度下电极表面的电化 学发光图像。如图 3.3b-f 所示, 在 5 – 50 μM 浓度范围内, SNM/ITO 电极表面的电化学发光图像 bt 20 mM 浓度范围内, SNM/ITO 电极表面的电化学发光图像始终较为灰暗。当 Ru(bpy)s²⁺浓度提高至 50 μM 时, 电极表面才能观察到比较明显的电化学发光信号。



图 3.3 SNM/ITO 电极 (a-f) 和裸 ITO 电极 (g-l) 的明场 (a, g) 和电化学发光图像 (b-f, h-l) 比较

Fig. 3.3 Bright field (BF) images (a and g) of a tape-covered SNM/ITO electrode (a) and ITO electrode (g). ECL images obtained on the SNM/ITO (b–f) or ITO (h–l) electrode were acquired at different concentrations of Ru(bpy)₃²⁺ (b, h: 5 μM; c, i: 10 μM; d, j: 15 μM; e, k: 20 μM and f, l: 50 μM). In all cases, 20 mM HEPES dissolved in PBS was used as co-reactant. The exposure time was 5 s and the applied potential was +1.3 V (vs. Ag/AgCl).

对两种电极表面的电化学发光图像进行灰度分析,结果如图 3.4 所示。在实验浓度范围内, SNM/ITO 电极上的电化学发光灰度值都远高于裸 ITO 电极(图 3.4a),证实 SNM 对 Ru(bpy)s²⁺/TPrA 体系的电化学发光确实有显著的增强效应。进一步计算 两种电极上灰度值的比例,定量表征 SNM 对电化学发光的增强效果。由于发光分子 浓度过低(5μM)时, ITO 电极上的光强与背景光强接近,几乎无 ECL 信号,因此

仅计算 Ru(bpy)3²⁺浓度在 10-50 μM 范围内的灰度比值,结果见图 3.4b。当 Ru(bpy)3²⁺ 浓度为 10 μM 时, SNM 上的 ECL 强度比相同条件下 ITO 电极上的 ECL 强高两个数 量级。随着发光分子浓度提高, SNM 对发光的增强倍数降低。这是因为,随着发光 分子浓度提高, ITO 电极上也开始出现 ECL 信号,使灰度比值降低。当发光分子浓 度提高至 50 μM 时,灰度比值约为 10 左右,此时 ITO 上也可观察到较为明显的 ECL 信号。为了保证细胞成像体系的灵敏度,后续实验中发光分子的浓度选定为 50 μM。



图 3.4 SNM/ITO 与裸 ITO 电极表面的电化学发光灰度值比较(a)和 SNM 对发光的增强作用(b)

Fig. 3.4 (a) Dependence of the gray value of ECL images on the concentration of Ru(bpy)₃²⁺ at the SNM/ITO electrode (blue) and bare ITO electrode (black). (b) The enhancement factor of ECL intensity for various concentrations of Ru(bpy)₃Cl₂.

3.3.2 电化学发光细胞-基质黏着成像

3.3.2.1 单细胞的细胞-基质黏着成像

电化学发光细胞-基质黏着成像是在 SNM/ITO 基底上完成的。SNM 由四乙氧基 硅烷水解而得,主要成分为二氧化硅,具有较高的生物相容性。为了探究 SNM/ITO 电极是否影响细胞活力,使用 FDA/PI 染料对培养皿及 SNM 表面的细胞染色,表征 细胞活性。图 3.5a-c 和 d-f 分别为培养皿及 SNM/ITO 电极上的细胞明场及荧光图像。 比较明场图像(图 3.5a, d),两种基底上的细胞形态没有明显差异。在蓝光激发下, 两种基底上荧光图像中细胞均呈现出明显的绿色荧光(图 3.5b, e),表明 FDA 在活 细胞内脂酶的作用下,分解为发射绿色荧光的荧光素。当使用绿光激发时,荧光图像 中无 PI 的红光信号(图 3.5c, f),表明 PI 不能进入细胞,故无法与细胞内的 DNA 结合并发射荧光。上述结果证实 SNM/ITO 电极对细胞活性无影响,是一种合适的细胞培养基底。





图 3.6 为电化学发光细胞-基质黏着成像示意图。将细胞孵育在 SNM/ITO 电极 上,细胞底部的细胞-基质黏着将细胞锚定于 SNM 表面。细胞-基质黏着为结构致密 的跨膜蛋白,其胞外部分黏着于 SNM 纳米通道孔口,堵塞对应孔道,抑制该处的电 化学发光反应,同时阻碍溶液中的发光分子扩散至黏着处发光。无黏着处的电化学发 光正常产生,并被 SNM 显著增强。因此,电极表面细胞-基质黏着与无黏着处可产生 足够的光学对比度。电化学发光图像中细胞-基质黏着呈现为暗斑,而无黏着处表现 为明亮背景,即实现了细胞-基质黏着的反相电化学发光成像。



图 3.6 电化学发光细胞-基质黏着成像示意图

Fig. 3.6 Schematic illustration of imaging cell-matrix adhesions by ECL microscopy. The cell is cultured on the surface of SNM/ITO electrode. The ECL generation from nonadherent regions beneath basal cell membrane highlights a dark map of cell-matrix adhesions.

图 3.7 比较了单个 PC12 细胞的明场和 ECL 图像,其中细胞明场图像在透射模 式下拍摄。关闭显微镜光源后,施加+1.3 V 电位,触发工作电极表面的电化学发光, EMCCD 同步记录电化学发光图像。明场图像(图 3.7a-c)中,可观察到细胞的轮廓 及细胞核。ECL 图像(d-f)中,细胞底部一些区域的电化学发光强度明显弱于周围 无细胞处,呈现为暗斑。尽管明场图像和 ECL 图像中细胞的轮廓大致可以对应,但 二者差异也非常明显。如图 3.7a 和 d 中白色箭头所指位置,电化学发光图像中清晰 可见的突起或微突起(通常较短,长约 2 – 10 μm),明场图像中几乎观察不到。图 3.7e 中的伪足,图 3.7f 中的卷边等,也均在对应的明场图像中难以辨识。除细胞边 缘外,细胞内部的明场和 ECL 图像也非常不同。如图 3.7d 和 f 中白色圆圈所示,电 化学发光图像中细胞底部许多区域呈现出与无细胞处相同的亮度,表明此处电化学 发光不受抑制。比较图 3.7b 与 e,明场图像中细胞中部胞体区域明显较 ECL 图像更 宽。图 3.7f 中左侧细胞内部分立但规则有序排布的斑块(约一微米宽,数微米长) 符合细胞黏着斑的结构特征。这些现象都说明,电化学发光并不是对细胞整体进行成 像。前述突起、伪足、卷边和黏着斑等均为细胞-基质黏着结构,因此,我们推测, 该电化学发光体系可成像细胞-基质黏着。



图 3.7 单细胞的明场 (a-c) 和 ECL 图像 (d-f)

Fig. 3.7 BF (a-c) and corresponding ECL images (d-f) of living PC12 cells. The former ones were captured in the light transmission mode. ECL images were recorded in PBS containing 50 μM Ru(bpy)₃²⁺ and 20 mM HEPES. The scale bar is 20 μm. Note that all of the image contrast has been adjusted optimally by ImageJ.

为了验证电化学发光成像是对细胞-基质黏着的显现,使用生物学中常用的免疫 荧光标记方法,对细胞-基质黏着中的黏着斑蛋白进行荧光标记,并比较了电化学发 光图像与荧光图像的异同。图 3.8 展示了同一区域细胞的明场(a)、ECL(b)和免疫 荧光(c)图像。荧光图像中绿色代表黏着斑蛋白,蓝色为细胞核。比较三种细胞成 像结果,明场与荧光图像更为接近。这是因为,用于免疫荧光标记的黏着斑蛋白也参 与构成细胞骨架,因此其分布与细胞明场轮廓接近。在箭头所指的细胞边缘的突起 处,荧光图像和 ECL 图像可以一一对应,证明 ECL 图像的确是对细胞基质黏着的成 像。需要注意的是,由于细胞骨架处黏着斑蛋白荧光信号的干扰,胞体处的细胞-基 质黏着无法在普通宽场显微镜中观察到。例如星号标记的位置,ECL 图像显示此处 无黏着,而荧光图像中可观察到明显的黏着斑蛋白的荧光信号。这些位置细胞-基质 黏着荧光信号的选择性识别依赖 CLSM 或 TIRFM 实现。对电化学发光图像中划线位 置处的细胞-基质黏着进行灰度分析,结果展示于图 3.8d。曲线中部灰度值显著降低, 表征此处为黏着区域。黏着与非黏着区域的灰度值差异约为 1000,因此黏着在 ECL 图像中清晰可辨。不同位置处曲线灰度变化趋势不同,表明单细胞水平细胞-基质黏

着的异质性。



图 3.8 PC12 细胞的明场 (a)、ECL (b) 和免疫荧光图像 (c); ECL 图像的灰度变化曲线 (d), 1-4 分别对应图 b 中 1-4 划线位置

Fig. 3.8 BF (a) and ECL (b) images of multiple PC12 cells. (c) FL image of the same cells after lysis and staining vinculin (green) and nuclei (blue). The scale bar is 20 μm. (d) Variation of ECL intensity (gray value) along the lines marked in b. The dotted lines in d represent the average ECL intensity of bright background.

使用同样的实验方法对孵育在 SNM/ITO 电极上的 Huh-7 细胞进行成像,验证了 电化学发光细胞-基质黏着成像方法的通用性。图 3.9 展示了 Huh-7 细胞的明场(a)、 ECL (b) 和两种图像的叠加图 (c)。与 PC12 细胞成像实验观察到的现象类似,在明 场中无法清晰观察到的丝状伪足、侵袭性伪足等可被 ECL 成像捕捉。将明场图像与 ECL 图像叠加,对比两种成像结果的差异。叠加图 (图 3.9c)中,ECL 图像设置为 绿色,明场图像设置为红色,因此无细胞处电极表面呈现为橙色,即红色和绿色的叠 加。由于细胞的伪足等黏着区域在 ECL 图像中灰度较低,因此叠加图中黏着结构呈 现红色。容易观察到,叠加图中细胞胞体处的明场图像尺寸明显大于黏着区域尺寸。



图 3.9 Huh-7 细胞的明场 (a)、ECL (b) 和明场/ECL 叠加图 (c) Fig. 3.9 BF (a), ECL (b) and merged images (c) of Huh-7 cells. The scale bar is 50 μm.

为了更加定量地描述明场图像和 ECL 图像(即细胞-基质黏着图像)的差异,分 别对 PC12 细胞和 Huh-7 细胞在明场和 ECL 图像中的面积进行统计分析,结果如图 3.10 所示。单个绿色三角形对应的明场和 ECL 面积数值来源于同一个细胞。黑色虚 线斜率为 1,将数据点划分为上下两个区域。虚线上方的数据点表示细胞 ECL 面积 大于明场面积,这可能是由一些较薄的细胞结构不易在明场图像中观察到导致的。虚 线下方的细胞 ECL 图像面积小于明场图像面积,表明不是细胞底部所有区域均形成 了细胞-基质黏着。图 3.10a 和 b 中均有约 75%的细胞 ECL 面积小于明场图像面积。 两种细胞的明场和 ECL 图像面积的皮尔逊相关系数(PCC)分别为 0.798 和 0.960, 即 Huh-7 细胞明场面积和黏着面积的相关性更高、二者间差异相对更小,这可能是 由两种细胞的黏着类型及黏着强度不同导致的。



图 3.10 PC12 细胞(a) 和 Huh-7 细胞(b) 的 ECL 和明场图像面积比较 Fig. 3.10 Comparison between the area of single PC12 cells (a) and Huh-7 cells (b) in ECL images (A_{ECL}) and that in BF images (A_{BF}). The dotted line has a slope of 1, meaning that A_{ECL} is equal to A_{BF} on this line.

上述结果证实,本小节所建立的单细胞电化学发光成像体系具有通用性,可以对 不同细胞的细胞-基质黏着结构成像。并且,该方法无需标记及前处理,可直接进行 活细胞成像。SNM 对电化学发光的增强效应及电化学发光的表面限域效应使该体系 具有足够的成像对比度和表面灵敏度,是该体系能够成功实现细胞-基质黏着免标记 成像的关键。



3.3.2.2 SNM 对电化学发光的增强效应

图 3.11 ITO 电极上 PC12 细胞的明场 (a) 和 ECL 图像 (b)。ECL 图像灰度曲线 (c), 1-4 分 别对应于图 b 中 1-4 位置; ITO 电极与 SNM/ITO 电极上细胞-基质黏着图像对比度的比较 (d) Fig. 3.11 BF (a) and ECL (b) images of living PC12 cells on the bare ITO electrode. ECL image was recorded in PBS containing 50 µM Ru(bpy)₃²⁺ and 20 mM HEPES. The scale bar is 50 µm. (c) Variation of ECL intensity (gray value) along the lines marked in b. The dotted lines represent the average ECL intensity of bright background. (d) The normalized ECL intensity of cell-matrix adhesions for PC12 cells on bare ITO (blue) or SNM/ITO (green) electrode.

与前述成像方法相同,仅将工作电极更换为裸 ITO 电极,得到的电化学发光成像结果如图 3.11 所示。图 3.11a 和 b 分别为裸 ITO 电极上 PC12 细胞的明场和 ECL 图像。明场图像中 PC12 细胞形貌与 SNM 及普通培养皿上的细胞形貌相似,均为多

角形或长梭形。但 ECL 图像中, 仅能观察到模糊的灰色阴影, 无法分辨细胞-黏着结构。分析 ECL 图像中划线部分的灰度, 结果展示于图 3.11c。由于整体图像光强较弱, 灰度曲线噪声大, 难以分辨黏着区域。图 3.11d 统计分析了单个细胞黏着处灰度与背景灰度的比值, 即归一化 ECL 强度。裸 ITO 电极上的归一化 ECL 强度约为 0.85, 即黏着处灰度与无细胞处背景灰度非常接近; 而 SNM/ITO 电极上此数值仅为约 0.65, 又由于 SNM 上的背景灰度约为 ITO 电极上的 10 倍(图 3.4), SNM/ITO 电极上细胞-基质黏着的对比度更高。

3.3.2.3 电化学发光的表面限域性质

仅有足够的光强并不足以实现细胞-基质黏着成像。由于细胞膜底部与基底之间 的距离仅有 100 – 150 nm,在该限域空间内对细胞-基质黏着成像,还要求成像方法 表面灵敏,可以实现限域空间测量。与全反射荧光仅能激发靠近基底表面几百纳米范 围内的荧光分子的性质类似,由于电化学发光反应过程中的自由基等物种寿命有限, 电化学发光仅存在于电极表面附近,因此特别适于电极表面的微结构成像。细胞-基 质黏着恰好位于这一区域。



图 3.12 不同焦面下 Huh-7 细胞的明场(左)和 ECL(右)图像

Fig. 3.12 BF (left) and ECL (right) of two Huh-7 cells captured at the focal plane of ECL (a) and BF imaging (b). All the other conditions for the two series of images were the same.

进行细胞-基质黏着的电化学发光成像时,首先需在明场中聚焦细胞边缘等细微结构,使焦面恰好位于电极表面,此时电化学发光图像中细胞-基质黏着结构清晰可

见,将该焦面定义为 ECL 焦面。如图 3.12a 所示,此时明场图像中细胞核较为模糊 而 ECL 图像清晰。将载物台略微下调,使明场图像中细胞核清晰,将此焦面定义为 BF 焦面(图 3.12b),此时 ECL 图像模糊。上述结果表明,ECL 焦面位于明场焦面 下方,距离电极表面更近。实验使用的水浸物镜景深约为 1.2 μm,因此,Huh-7 细胞 的明场焦面与 ECL 焦面间的高度差至少为 0.6 μm。明场焦面与细胞立体结构有关, 不同类型的细胞或同一类细胞中的不同细胞个体,其明场焦面可能有差异。而 ECL 焦面始终位于电极表面,这也是电化学发光能够对多细胞的细胞-基质黏着同时成像 的基础。

3.3.3 细胞-基质黏着强度分析

3.3.3.1 亚细胞和单细胞水平的细胞-基质黏着强度分析

细胞-基质黏着是一种高度动态的细胞结构, 在秒甚至毫秒尺度发生结构变化。 本章提出的电化学发光细胞-基质黏着成像方法无需标记, 可对活细胞进行成像, 因 此适合观测细胞-基质黏着的动态变化过程。胰酶消化细胞是细胞培养中的常规操作: 将细胞置于胰酶溶液中,胰酶水解细胞-基质黏着蛋白,使贴壁细胞从基底上脱离后, 可进行传代等后续操作。作为概念验证性实验, 本小节以该过程为例, 使用电化学发 光成像方法研究了细胞-基质黏着的动态变化过程。

图 3.13 比较了胰酶消化过程中单个细胞的明场 (a-c) 和 ECL (d-f) 图像。加入 胰酶 3 min 后,明场图像中细胞上部缩回变圆 (图 3.13b), ECL 图像中细胞上部较为 疏松的黏着结构消失,下部较为紧实的结构基本保持原状 (图 3.13e)。6 min 后,明 场图像中细胞上部继续变圆(图 3.13c),ECL 图像显示黏着区域逐渐变小(图 3.13f)。 细胞处在均匀的胰酶溶液中,且不受其他外力干扰,在此条件下得到胰酶消化细胞的 结果能够表征细胞黏着的强度:细胞上部的黏着强度较低,易被消化;而下部强度较 高,不易被消化。虽然已有工作报道单个细胞的黏着强度,但能够实现空间分辨黏着 强度分析的工作还相对较少。



图 3.13 胰酶消化中细胞的明场 (a-c) 和 ECL (d-f) 图像,消化时长分别为 0 min (a, d)、3 min (b, e) 和 6 min (c, f);消化速率与细胞-基质黏着的面积 (g)、周长 (h) 和 Feret's 直径 (i) 的关系

Fig. 3.13 BF (a-c) and ECL (d-f) images showing the detachment of a single PC12 cell in the course of digestion by trypsin for different time: 0 min (a, d), 3 min (b, e) and 6 min (c, f). The scale bar is 20 μm. (g-i) The statistical dependence of digesting rate on the area (g), perimeter (h) and Feret's diameter (i) of cell-matrix adhesions estimated from a series of ECL images at the single cell level.

细胞黏着强度与细胞形态相关^[202]。为了研究细胞黏着强度与黏着形态的关系, 定义单位时间内单个细胞黏着面积的变化量为消化速率,在单细胞水平研究了细胞 消化速率与黏着形态,包括面积、周长和 Feret's 直径的关系(图 3.13g-i)。结果表明, 黏着面积相同的细胞,消化速率越大,黏着强度越低。消化速率与面积、周长和 Feret's 直径均呈现正相关关系,皮尔逊相关系数(PCC)分别为 0.949、0.798 和 0.782,即 消化速率与黏着面积相关性最高。黏着面积越大,意味着黏着蛋白与胰酶的接触面积 越大、反应截面越大,反应速率也越高。



图 3.14 胰酶消化速率与明场细胞图像的面积(a)、周长(b)和 Feret's 直径(c)的关系 Fig. 3.14 Relations between the digestion rate and morphology of cells in BF images: area (a), perimeter (b) and Feret's diameter (c).

类似地, 胰酶消化速率与明场图像中单个细胞的面积、周长和 Feret's 直径的关系展示于图 3.14, 皮尔逊相关系数分别为 0.829、0.700 和 0.381。与预期相符, 消化 速率与明场图像的相关性明显低于其与黏着图像的相关性。这是因为胰酶的作用对 象主要为细胞-基质黏着蛋白, 而非整个细胞。

3.3.3.2 不同细胞间细胞-基质黏着强度比较



图 3.15 胰酶消化中 Huh-7 细胞的明场 (a-d) 和 ECL (e-h) 图像

Fig. 3.15 Detachment of single Huh-7 cell. BF (a-d) and corresponding ECL (e-h) images during Huh-7 cell detachment for different time: 0 min (a, e), 3 min (b, f), 6 min (c, g) and 9 min (d, h). The scale bar is 20 μm.

使用相同的方法,研究了 Huh-7 细胞的细胞-基质黏着在胰酶消化过程中随时间的变化。图 3.15a 和 e 展示了消化初始时刻 Huh-7 细胞的明场和 ECL 图像。ECL 图

像中细胞边缘的侵袭性伪足十分清晰,但由于侵袭性伪足厚度较小,细胞较薄,难以 在明场图像中观察到。因此在图 3.15a-d 中,Huh-7 细胞的形貌随消化时间的变化不 明显。在对应的 ECL 图像中(图 3.15e-h),细胞边缘的侵袭性伪足逐渐消失。Huh-7 细胞的面积较 PC12 细胞更大,细胞形状也更接近圆形。因此,胰酶消化 Huh-7 细 胞的动力学可能与 PC12 细胞非常不同。



图 3.16 Huh-7 细胞的胰酶消化速率与细胞-基质黏着 (a-c) 或明场 (d-f) 细胞图像的面积 (a, d)、周长 (b, e) 和 Feret's 直径 (c, f) 的关系

Fig. 3.16 The statistical dependence of the detachment rate of Huh-7 cells on the area (a, d), Feret's diameter (b, e) and perimeter (c, f) estimated from a series of time evolution of ECL (a-c) and BF (d-f) images at the single cell level.

与胰酶消化 PC12 细胞的数据处理过程相似,图 3.16 分析了胰酶消化 Huh-7 细胞的速率与黏着形态 (a-c) 和明场细胞形态 (d-f) 的关系。胰酶消化速率与黏着面积、Feret's 直径及周长的皮尔逊相关系数分别为 0.642、0.668 和 0.703。可能由于Huh-7 黏着面积较大,黏着强度较高,胰酶主要由边缘开始消化细胞(图 3.15),消化速率与黏着周长的相关性最高。消化速率与明场细胞面积、Feret's 直径及周长的皮尔逊相关系数分别为 0.685、0.660 和 0.738,与消化速率与黏着形态的皮尔逊相关系数差异不大,可能是因为 Huh-7 细胞明场图像与黏着图像本身的相关性较高 (PCC=

0.960,图 3.10b)。



图 3.17 PC12 细胞和 Huh-7 细胞的归一化 ECL 强度(a) 和消化速率(b) 比较 Fig. 3.17 The normalized ECL intensity of cell-matrix adhesions (a) and the rate of digesting (b) for PC12 and Huh-7 cells.

PC12 细胞和 Huh-7 细胞的胰酶消化实验结果总结于图 3.17。PC12 细胞的平均 消化速率高于 Huh-7 细胞(图 3.17a),前者 ECL 图像的灰度值也高于后者(图 3.17b)。 较高的 ECL 图像灰度可能归因于较低的黏着强度。由此说明,在无胰酶的情况下, 可以通过 ECL 灰度大致判断黏着强度。上述单细胞分析结果与常规细胞培养中观察 到的结果类似——PC12 细胞的消化时长明显短于 Huh-7 细胞。

3.3.4 细胞集体迁移过程分析

3.3.4.1 电化学发光成像监测细胞集体迁移过程

细胞-基质黏着直接调控细胞迁移,在细胞集体迁移中起关键作用。人们对单个 细胞在迁移过程中的黏着行为已经有了较为清楚的认识,但细胞集体迁移过程中,细 胞群体如何感知迁移方向,引领细胞(leader cell)和后缘细胞(follower cell)分别 起到何种作用,目前尚无定论。

划痕实验是经典的研究细胞集体迁移的方法。该方法人为在汇合的单层细胞中 创建无细胞表面,即"伤口"或"划痕"。随后,类似有机体的伤口愈合过程,划痕 两侧的细胞向无细胞的表面迁移,最终覆盖划痕,即完成伤口愈合。在制得划痕后, 间隔固定时间拍摄细胞明场图像,计算细胞迁移速率,研究药物、基底或细胞与细胞 间的相互作用对细胞迁移的影响。本小节使用电化学发光成像方法识别集体迁移的



细胞群体中细胞-基质黏着分布,并对集体迁移动态进行分析。

图 3.18 划痕实验研究 PC12 细胞集体迁移

Fig. 3.18 Analysis of PC12 migration by *in vitro* scratch assay. (a) BF images acquired at 0, 2, 4, 8, 12 and 24 h. The scale bar is 200 μm. (b) The variation of wound area with migration time. (c) Dynamic progression of the border of cell sheet.

首先,按照经典的划痕实验方案,对 PC12 细胞的集体迁移过程进行分析。如图 3.18 所示,迁移开始后,划痕两侧的细胞向划痕迁移。迁移约 4 h 后,细胞边缘出现 明显的垂直划痕的细胞。迁移时长越长,边缘细胞朝向划痕的迁移越明显。使用 ImageJ 分析图像,得到划痕面积随时间变化的曲线(图 31.8b)。迁移 24 h 后,划痕 面积由初始的 $6 \times 10^5 \,\mu\text{m}^2$ 缩减为 $2 \times 10^5 \,\mu\text{m}^2$,细胞迁移距离为 218 μ m,计算得到细胞迁移速率约为 9 μ m/h。



图 3.19 细胞划痕实验中初始时刻(左侧)和2h后(右侧)单层 PC12 细胞的 ECL 图像(a, b);图 a 和 b 中的红线代表局部细胞取向,图 c、d 和 e、f 分别将其以有向箭头和彩图的形式展示

Fig. 3.19 ECL (a, b) images of PC12 cell monolayer captured in the classical wound healing assay. Red lines in images a and b show local cell orientations and are represented again as black arrows (c, d) and color-coded graphs (e, f). The left panel (a, c, e) was recorded right after the scratch while the right panel (b, d, f) was captured after migration for two hours. The scale bar in all graphs is 50 μm.

随后,使用电化学发光方法研究细胞迁移过程。图 3.19 对比了划痕实验中初始 时刻及迁移 2 h 后的 ECL 图像。初始时刻,细胞-基质黏着无序分布(图 3.19a)。迁 移 2 h 后,细胞-基质黏着呈现出明显的朝向划痕的取向(图 3.19b)。为了更好地描 述细胞的定向迁移,使用 OrientationJ 对 ECL 图像的矢量场分布进行分析。图 3.19a、 b 中的红线及 c、d 中的黑色箭头代表了图像的局部矢量。图 3.19e 和 f 将矢量场分布 以彩图形式展示,其中金黄色和深蓝色表示矢量方向平行于划痕(±90°),绿色表示 矢量方向垂直划痕(0°),后者指示的方向为细胞集体迁移方向。两个时刻的矢量分 布差异明显:迁移未开始时,矢量场分布界限清晰,平行于划痕边界;迁移 2 h 后, 同一位置的矢量场较多垂直于划痕方向。该结果表明,迁移开始后 2 h,细胞已经调 整取向,准备迁移。



图 3.20 除图 a 和 b 来源于明场图像外,所有条件与图 3.19 相同 Fig. 3.20 All conditions are the same as those in Fig. 3.19, except that the pictures were captured under bright field.

使用相同方法分析明场图像则无法得到这一结果。如图3.20所示,分别与图3.19a 和 b 对应的明场图像中,未开始迁移的细胞(图3.20a)及迁移 2 h 后(图3.20b)的 细胞均无序分布。分析两个时刻的明场图像矢量场分布,均未在细胞边缘观察到明显 的垂直划痕的迁移倾向。该结果证实了细胞-基质黏着在细胞迁移分析中的优势。正 因细胞-基质黏着直接参与细胞迁移——沿迁移方向,前端新黏着生成,后端黏着消 失,从而使细胞向前运动——其分析结果可以更加准确地揭示细胞的迁移行为。

3.3.4.2 细胞集体迁移倾向性分析

为了更加定量地描述细胞集体迁移,定义方向在±45°范围内的矢量为"方向性矢量",方向性矢量的比例表征了细胞朝向划痕迁移的倾向。如图 3.21a 所示,当迁移

开始后,方向性矢量的比例在划痕附近较高并出现平台,距划痕越远,方向性矢量比 例越低。随着迁移时间的延长,平台的范围越来越大。定义方向性矢量比例大于 80% 的距离为"方向性距离"。如图 3.21b 所示,该距离随时间延长而增加,且远远大于 细胞迁移的距离。例如,迁移 12h 时,方向性距离约为 350 μm,而迁移距离仅有 100 μm。这说明不仅仅是划痕边缘正在迁移的细胞决定了迁移方向,远离划痕的细胞也 已调整方向,做好迁移准备。这一结果强调了"follower"细胞在迁移中的作用,它 们并不是被动的跟随者。



图 3.21 方向性矢量比例随距划痕的距离变化(a)及方向性距离(黑色)和迁移距离(划痕实 验得到,蓝色)随时间变化(b)

Fig. 3.21 (a) Percentage of preferential orientations towards the wound within the cell sheet as a function of the distance from the leading edge. Data were pooled from n ≥ 3 different cell sheets at different time intervals. (b) The time evolution of both the distance with preferential orientations (black) and the wound edge advancement (blue). The former was deduced from image a, while the latter from the classical analysis of wound healing under bright field.

3.4 本章小节

本章工作发展了一种免标记的电化学发光细胞-基质黏着成像方法,实现了单个 活细胞的细胞-基质黏着成像。当将细胞孵育在电极上时,细胞与 SNM/ITO 电极间形 成紧密的细胞-基质黏着。无黏着处电极表面电化学发光反应正常发生,在电化学发 光图像中呈现为明亮区域;细胞-基质黏着抑制电化学发光反应,同时阻碍溶液中的 发光分子扩散至黏着处,使黏着处电化学发光信号较弱,在电化学发光图像中呈现为 灰暗区域,这样就实现了细胞-基质黏着的反相成像。电化学发光的表面限域性质及 SNM 对电化学发光的显著增强作用在实现细胞-基质黏着成像中起关键作用。以胰酶 消化为模型,实现了活细胞的细胞-基质黏着动态变化的成像,并在亚细胞水平揭示 了细胞-基质黏着的相对强度,在单细胞水平分析了细胞-基质黏着强度与黏着形态, 包括面积、周长和 Feret's 直径的关系。最后,将电化学发光细胞-基质黏着成像方法 应用于多细胞研究,揭示了"后缘细胞"在集体迁移中的重要作用,它们不是被动的 "跟随者"。

细胞-基质黏着的结构复杂,且处在高度动态变化中。它与细胞增殖、分化和凋 亡等过程密切相关,但许多具体的信号转导过程、黏着作用机制目前仍不清楚。后续 研究可进一步发展高时空分辨率及高选择性的电化学发光细胞成像方法,在结构识 别的基础上分辨黏着分子构成,探究细胞-基质黏着传感机制,理解相关生命过程。

第四章 细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的空间选择性电化学 发光成像

4.1 引言

细胞连接是指在细胞膜的特化区域,细胞与胞外基质或细胞与细胞之间形成的 连接结构,主要存在于上皮细胞中,是细胞社会性的结构基础。按照连接对象的不同, 细胞连接分为细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接。在具备顶底极性的上皮细胞中,前 者位于细胞底部,由整联蛋白介导;后者靠近细胞顶部,由钙黏蛋白介导[203]。细胞 连接是多细胞有机体形成组织、器官等结构的基础,同时调控包括神经形成、胚胎发 育、癌症侵袭和转移在内的多种生物学过程。尽管细胞-基质黏着与细胞-细胞间连接 的结构和功能不同,但二者协同作用,共同参与维持多细胞有机体稳态。因此,研究 与细胞连接相关的重要生命过程常需同时监测细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接两 种细胞结构。扫描/透射电镜和荧光显微镜,特别是激光扫描共聚焦显微镜,是常用 的细胞连接表征技术。也有许多表面灵敏的技术已被应用于细胞-基质黏着成像,包 括全内反射荧光显微镜和表面等离子体共振显微镜等。由于细胞-细胞间连接成像位 于细胞顶部,与基底距离较远,对其成像一般依赖前两种技术。但扫描/透射电镜及 激光扫描共聚焦显微镜都需要昂贵的设备、复杂的样品前处理或特异性的荧光标记。 发展操作简单、免标记的细胞连接成像技术将为相关生物学研究提供新的思路与方 法。

电化学发光是一种零背景、高灵敏、时空可控的分析方法和技术,具有操作容易、 设备简单、成像速度快等优势,已经成为生化分析领域有力的研究工具。近年来,基 于成像技术的电化学发光方法在细胞分析领域引起了广泛关注。例如,使用鲁米诺和 合适的生物氧化酶,可以实现葡萄糖、胆固醇等小分子的成像^[151,154]。使用发光分子 标记细胞膜蛋白,可以实现底部细胞膜成像^[164-165]。但需要注意的是,由于共反应剂 中间体寿命有限,电化学发光限域于电极表面,因此不管是小分子检测还是细胞膜成 像分析,电化学发光仅能探测距离电极表面非常近的区域内的目标物,这在一定程度

上限制了电化学发光成像分析的应用范围。如何调控电化学发光的空间分布,使电化 学发光层由电极表面延展至溶液内部,实现位于细胞底部的细胞-基质黏着和靠近细 胞顶部的细胞-细胞间连接的顺次识别,对现有的电化学发光分析方法来说仍十分具 有挑战性。

本章工作报道了一种通过调控电化学发光层的空间分布,实现细胞-基质黏着和 细胞-细胞间连接选择性成像的方法。首先以绝缘的光胶点模拟细胞,改变电化学发 光体系中发光分子(三联吡啶钌)和/或共反应剂(三正丙胺或二丁基乙醇胺)的浓 度,调控反应路径,研究发光层厚度的调控机制。使用 COMSOL 多物理场仿真模拟 软件模拟上述发光体系,解析了不同条件下的发光机理。最后,将该体系应用于细胞 成像,使发光层厚度与不同细胞连接的空间位置相匹配,实现了位于细胞底部的细胞 -基质黏着和靠近细胞顶部的细胞-细胞间连接的顺次成像。

4.2 实验部分

4.2.1 试剂与材料

如无特殊说明,所用试剂均购于试剂公司,纯度为分析纯,使用时未经进一步纯 化。六水合三联吡啶二氯化钌(Ru(bpy)3Cl2·6H2O,98%)、杜氏改良 Eagle 培养基 (DMEM)和牛血清白蛋白(BSA)购于 Sigma-Aldrich。RIPA 非变性组织裂解液和 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 M, pH7.4)购于 Solarbio。三正丙胺(TPrA)、二丁基乙 醇胺(DBAE)和吐温-20(Tween-20)购于 Aladdin。胎牛血清(FBS)购于 Gibco。 多聚甲醛(PFA,4%)和青霉素-链霉素溶液(PS)购于碧云天。鼠抗 E-钙黏素抗体 (ab231303)、兔抗黏着斑蛋白抗体(ab129002)、荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体(Alexa Fluor® 488, ab150077)和山羊抗鼠 IgG 抗体(Alexa Fluor® 555, ab150114)购于 Abcam。聚二甲基硅氧烷(PDMS)购于 Dow Corning。人乳腺癌细胞(MCF-7)购 于北京北纳创联生物技术研究院。氧化铟锡导电玻璃(ITO,方阻<17Ω/sq,厚度 100 ±20 nm)购于珠海凯为电子元器件有限公司。高纯氮气(N₂,99.999%)购于杭州今 工特种气体有限公司。所有溶液均使用超纯水(>18.2 M cm, Millipore)配制。

4.2.2 仪器与设备

玻璃切割器(珠海凯为仪器设备有限公司)

二氧化碳培养箱(Heal Force HF90,力康生物医疗科技控股有限公司)

正置荧光显微镜(Nikon, ECLIPSE LV100ND)

水浸物镜(CFI Apo 40×, N.A. 0.8, Nikon)

EMCCD (iXon Ultra 897, Andor)

电化学工作站(CHI440A,上海辰华仪器有限公司)

电化学发光分析系统(MPI-E, 西安瑞迈分析仪器有限责任公司)

扫描电子显微镜(SU8010, Hitachi)

台阶仪 (DEKTAK-XT, Bruker)

激光扫描共聚焦显微镜(TCS SP8, Leica)

4.2.3 光胶点阵列的制备和表征





Fig. 4.1 Fabrication process of the photoresist spot array based on the photolithography and thermal reflow methods.

光胶点阵列委托苏州研材微纳科技有限公司加工,主要采用光刻和热回流方法制得。具体制备流程如图 4.1 所示。在 ITO 基底上旋涂 AZ4620 光胶后,将带有阵列图案的铬版放置于基底表面,紫外照射曝光。显影后,得到圆柱形的光胶柱阵列。将

基底置于加热板上加热,由于表面张力作用,圆柱状的光胶转变为半球状。使用扫描 电镜表征光胶点阵列的表面形貌(加速电压3kV);使用台阶仪表征光胶点阵列的轮 廓及精确高度。

4.2.4 MCF-7 细胞培养

MFC-7 为人乳腺癌细胞,保留了乳腺上皮的特性。细胞培养基为含 10% FBS 和 1% PS 的 DMEM,每两天更换一次;培养环境为 37 °C、含 5% CO2 的细胞培养箱。 进行电化学发光细胞成像实验时,取对数生长期的细胞消化并重新孵育至 ITO 电极 表面。由于上皮细胞表达细胞-细胞间连接,即使孵育细胞的密度较低(通常为 1%), 细胞也倾向聚集成簇。

4.2.5 光胶点阵列和细胞的电化学发光成像

电化学池的制作方法及显微成像装置与第三章大致相同。电化学发光成像中,工作电极为修饰有光胶点阵列的 ITO 电极或孵育有 MCF-7 细胞的 ITO 电极,参比电极为银/氯化银丝,对电极为铂丝,施加电位为+1.3 V,曝光时间 5 s。固定 Ru(bpy)3²⁺ 浓度为 50 μM 或 500 μM,改变发光分子浓度分别为 20 mM、5 mM 和 2.5 mM,依 次拍摄电化学发光图像。在进行细胞电化学发光实验时,由于拍摄次数相对较多,需 要多次更换溶液,为保证细胞形态不发生变化,使用多聚甲醛固定细胞 10 min,随 后用 DPBS 洗三次,再进行电化学发光测试。

4.2.6 细胞免疫荧光成像

黏着斑蛋白既是细胞-基质黏着的成分,同时也参与构建上皮细胞的细胞-细胞间 连接。因此,依据 3.2.6.1 小节描述的方法,对黏着斑蛋白进行荧光标记,使用激光 扫描共聚焦显微镜可同时获得细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的空间位置信息。

使用免疫荧光方法对黏着斑蛋白和 E-钙黏素(细胞-细胞间连接组分)同时成像,可以分别表征同一细胞簇中细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的分布。细胞孵育、 ECL 图像拍摄和细胞封闭等步骤与 3.2.6.1 小节(1) – (4) 相同。弃去封闭液后,加 入含 1%免抗黏着斑蛋白抗体、0.2%鼠抗 E-钙黏素抗体及 1% BSA 的 PBST 溶液, 4

℃ 解育过夜。弃去前述溶液后, PBS 洗三次, 加入含 1% BSA、0.1% Alexa Fluor® 488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体及 0.1% Alexa Fluor® 555 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体的 PBS 溶液, 室温下孵育 1h。弃去前述溶液后, PBS 洗涤细胞三次, 使用荧光显微镜 观察。

4.2.7 COMSOL 模拟



Fig. 4.2 Geometry model employed in the COMSOL simulation.

使用 COMSOL Multiphysics[®]多物理场仿真模拟软件模拟电化学发光过程,理解 反应机理。选择软件中化学工程模块的稀物质传递物理场,建立如图 4.2 所示的二维 轴对称模型,研究单个光胶点附近的电化学发光信号。光胶点轮廓的数据来源于台阶 仪的轮廓扫描。r和z分别代表平行和垂直于电极表面方向。设置上边界和右边界为 无通量,使物质优先沿垂直电极表面方向扩散。

由于电化学反应过程非常复杂,结合具体实验条件,模拟中仅考虑氧化-还原路 径和催化路径。具体的反应方程式如下:

$\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{2+} \xrightarrow{k_{1}} \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{3+} + e^{-}$	(式 4.1)

- TPrA^{•+} $\xrightarrow{k_3}$ TPrA[•] + H⁺ (式 4.3)
- $TPrA^{\bullet} \xrightarrow{k_4} P_0 + e^{-} \qquad (\ddagger 4.4)$

$$Ru(bpy)_{3}^{3+} + TPrA \xrightarrow{k_{5}} Ru(bpy)_{3}^{2+} + TPrA^{\bullet+}$$
 (式 4.5)

$$Ru(bpy)_{3}^{3+} + TPrA^{\bullet} \xrightarrow{k_{6}} Ru(bpy)_{3}^{2+*} + P \qquad (式 4.6)$$

$$Ru(bpy)_{3}^{2+*} \xrightarrow{k_{7}} Ru(bpy)_{3}^{2+} + hv_{ECL}$$
 (式 4.7)

式 4.1、4.2 和 4.4, 即 Ru(bpy)3²⁺、TPrA 和 TPrA[•]的氧化,在电极表面发生。电极表面的通量可表示为:

$$J_{Ru^{2+}} = -J_{Ru^{3+}} = -k_1 \left[Ru^{2+} \right]$$
 (式 4.8)

$$J_{\text{TPrA}} = -J_{\text{TPrA}^{*+}} = -k_2 [\text{TPrA}] \qquad (\ddagger 4.9)$$

$$J_{\text{TPrA}^{\bullet}} = -J_{P_0} = -k_3 \left[\text{TPrA}^{\bullet} \right]$$
 (\$\delta\$ 4.10)

其中[Ru²⁺], [TPrA]和[TPrA•]分别为 Ru(bpy)3²⁺, TPrA 和 TPrA•的浓度。

其余化学反应发生在溶液中,物质传递均由扩散控制,符合菲克第二定律, $\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_i \nabla^2 c_i \qquad (式 4.11)$

其中 ci和 Di分别为物质 i 的浓度和扩散系数。

因此, 电化学发光反应中物种的浓度变化可由以下方程描述:

$$\frac{\partial \left[\operatorname{Ru}^{2+}\right]}{\partial t} = D_{\operatorname{Ru}}\Delta \left[\operatorname{Ru}^{2+}\right] + k_5 \left[\operatorname{Ru}^{3+}\right] \left[\operatorname{TPrA}\right] + k_7 \left[\operatorname{Ru}^{2+*}\right] \qquad (\ddagger 4.12)$$

$$\frac{\partial \left[\operatorname{Ru}^{3+}\right]}{\partial t} = D_{\operatorname{Ru}}\Delta \left[\operatorname{Ru}^{3+}\right] - k_5 \left[\operatorname{Ru}^{3+}\right] \left[\operatorname{TPrA}\right] - k_6 \left[\operatorname{Ru}^{3+}\right] \left[\operatorname{TPrA}^{\bullet}\right] \qquad (\ddagger 4.13)$$

$$\frac{\partial \left[\mathrm{Ru}^{2+*} \right]}{\partial t} = k_6 \left[\mathrm{Ru}^{3+} \right] \left[\mathrm{TPrA}^{\bullet} \right] - k_7 \left[\mathrm{Ru}^{2+*} \right]$$
 (式 4.14)

$$\frac{\partial \left[\text{TPrA}^{\bullet+} \right]}{\partial t} = D_{\text{TPrA}} \Delta \left[\text{TPrA}^{\bullet+} \right] - k_3 \left[\text{TPrA}^{\bullet+} \right] + k_5 \left[\text{Ru}^{3+} \right] \left[\text{TPrA} \right] \qquad (\not \exists 4.15)$$

$$\frac{\partial \left[\text{TPrA}^{\bullet} \right]}{\partial t} = D_{\text{TPrA}} \Delta \left[\text{TPrA}^{\bullet} \right] + k_3 \left[\text{TPrA}^{\bullet\bullet} \right] - k_6 \left[\text{Ru}^{3+} \right] \left[\text{TPrA}^{\bullet} \right] \qquad (\not \vec{\mathbf{x}} \ 4.16)$$

$$\frac{\partial [\text{TPrA}]}{\partial t} = D_{\text{TPrA}} \Delta [\text{TPrA}] - k_5 [\text{Ru}^{3+}] [\text{TPrA}] \qquad (\vec{\mathfrak{X}} 4.17)$$

其中[Ru³⁺], [Ru^{2+*}]和[TPrA⁺]分别为 Ru(bpy)₃³⁺, Ru(bpy)₃^{2+*}和 TPrA⁺的浓度, Δ为

二维轴对称模型中的拉普拉斯算符。所有反应速率常数和扩散系数均来自文献^[36], 并列于表 4.1.

表 4.1 模拟中使用的参数

Table 4.1 Parameters in Simulation

Name	Value	Description
c_0 _R u^{2+}	50/500 µM	Initial concentration of $Ru(bpy)_3^{2+}$
c0_TPrA	2.5/5/20 mM	Initial concentration of TPrA
$D_{ m Ru}$	$5.9\times10^{-6}~\text{cm}^{2}\text{/s}$	Diffusion coefficient of $Ru(bpy)_3^{2+}$, $Ru(bpy)_3^{3+}$ and $Ru(bpy)_3^{2+*}$
$D_{ m TPrA}$	$5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	Diffusion coefficient of TPrA, TPrA ^{•+} and TPrA [•]
<i>k</i> 1	15 cm/s	Rate constant of eq. S1
k2	0.01 cm/s	Rate constant of eq. S2
k3	3500 s^{-1}	Rate constant of eq. S3
<i>k</i> 4	0.01 cm/s	Rate constant of eq. S4
k5	$1.3\times 10^4~M^{-1}~s^{-1}$	Rate constant of eq. S5
<i>k</i> 6	$10^9 \ M^{-1} \ s^{-1}$	Rate constant of eq. S6
k7	$300 \ s^{-1}$	Rate constant of eq. S7

模型的网格划分如图 4.3 所示, 电极表面网格密度更高。



图 4.3 模型网格划分 Fig. 4.3 Mesh setting of the model.

4.3 结果与讨论

4.3.1 研究模型



图 4.4 调控电化学发光层厚度,实现光胶点(a)和细胞-基质黏着、细胞-细胞间连接的电化学发光顺次成像(b)

Fig. 4.4 Illustration of modulating the thickness of ECL layer for imaging an inert photoresist spot (a) and for sequential imaging of cell-matrix adhesions and cell-cell junctions (b).

图 4.4 为调控发光层厚度,实现从细胞-基质黏着到细胞-细胞间连接顺次成像的 原理图。本章实验中首先以具有规则形状的半球形光胶点为模型,研究发光层随发光 分子浓度及共反应剂浓度变化的趋势(图 4.4a)。由于光胶点不导电,且紧密贴附在 基底 ITO 电极表面,光胶点处的发光被完全抑制,因此在电化学发光图像中呈现为 暗斑。若电化学发光反应中间体、激发态等扩散距离较短,电化学发光表面限域,电 化学发光图像中暗斑的尺寸将与光胶点的物理尺寸相当。若电化学发光延展至距离 电极表面较远的位置,发光分子可由光胶两侧扩散至光胶顶部,使电化学发光图像中 光胶点暗斑的尺寸缩小。通过分析暗斑的尺寸,可大致推算电化学发光层厚度。该方 法与此前报道的垂直金微米管电极阵列均可测量发光层厚度。其区别在于,前述工作 中的微米管电极相当于将电极垂直放置,在电极侧面直接观察发光层分布;而本章发 展的光胶点阵列发光层厚度测量方法,则是在平面电极上构造了分子横向扩散的微结构,以实现发光层厚度的测量。在理解电化学发光原理的基础上,使用表面限域的电化学发光体系,可以实现细胞底部的细胞-基质黏着成像;使用发光层有效延展的体系,则可实现靠近顶部的细胞-细胞间连接成像(图4.4b)。

4.3.2 Ru(bpy)32+/TPrA 体系的电化学发光

本章中的电化学及电化学发光测试均在 ITO 电极上完成。首先对 ITO 电极上共 反应剂和发光分子的电化学行为进行表征。图 4.5a 和 b 分别为 ITO 电极上不同浓度 TPrA 和 Ru(bpy)3²⁺的循环伏安曲线。TPrA 在 ITO 电极上电化学氧化的反应动力学较 差,循环伏安曲线中未能观察到明显的氧化电流峰,其起始氧化电位约为+0.95 V。 Ru(bpy)3²⁺在 ITO 电极上的氧化还原峰电流明显,起始氧化电位约为+0.85 V。需要注 意的是,以往文献报道,玻碳电极和金属电极(金、铂等)上 TPrA 的氧化电位较 Ru(bpy)3²⁺更低,因此,仅由 TPrA 在电极表面氧化触发的一系列电化学发光过程称 为"低电位路径"电化学发光。由于 TPrA 在 ITO 电极上难以发生有效的电化学氧 化,"低电位路径"电化学发光可能在本章实验所用体系中较难实现。



图 4.5 不同浓度 TPrA (a) 和 Ru(bpy)₃²⁺ (b) 的循环伏安曲线

Fig. 4.5 CVs for different concentrations of TPrA (a) and Ru(bpy) $_{3}^{2+}$ (b) at ITO electrode in PBS. Scan rate: 0.1 V s⁻¹.

在 PBS 中同时加入 Ru(bpy)₃²⁺和 TPrA,采集电化学及电化学发光信号。当 Ru(bpy)₃²⁺浓度较低时(图 4.6a, 50 μM),提高共反应剂浓度,循环伏安曲线中电流 上升,发光强度明显提高。循环伏安曲线的起始氧化电位约为+0.9 V,电化学发光的 起光电位约为+1.0 V,二者不同步。根据图 4.5 中两种分子的循环伏安曲线判断,在 该条件下,只有当发光分子和共反应剂均被氧化后,才出现明显的电化学发光信号, 对应电化学发光的氧化-还原路径(式 4.1-4.3 和式 4.6, 4.7),即发光分子浓度较低 时,发光过程主要由氧化-还原路径决定^[204]。提高 Ru(bpy)3²⁺浓度至 500 µM 后(图 4.6b),电流和电化学发光强度随电位的变化趋势同步,均在电位扫描至+0.9 V 后出 现明显的氧化电流或电化学发光信号。在此电位下,仅有 Ru(bpy)3²⁺被氧化,说明电 化学发光的催化路径开始参与电化学发光过程(式 4.5, 4.3, 4.6 和 4.7),即发光分 子浓度较高时,催化路径主导电化学发光过程。上述电化学发光强度测量无法给出电 化学发光层的空间分布信息。接下来,使用电化学发光显微镜表征光胶点阵列的电化 学发光图像,以获取空间分辨的电化学发光层分布信息。



图 4.6 固定 Ru(bpy)₃²⁺浓度为 50 μM (a) 或 500 μM (b),使用不同浓度的 TPrA 得到的循环伏 安曲线(实线)和光强-电位曲线(虚线)

Fig. 4.6 CVs (solid line) and ECL-voltage curves (dotted line) obtained in PBS containing 50 μM (a) or 500 μM (b) Ru(bpy)₃²⁺ and different concentrations of TPrA (red line, 20 mM; blue line, 5 mM; black line, 2.5 mM). The scan rate was 0.1 V s⁻¹. The PMT voltage was biased at 250 V.

4.3.3 光胶点阵列的形貌表征

使用扫描电子显微镜表征制备于 ITO 基底上的光胶点阵列,结果展示于图 4.7。 俯视图中(图 4.7a),光胶点表面光滑,呈现为半球形,直径均一,约为 20 μm。侧 视图中(图 4.7b),光胶点类似平凸镜,高度约为 5.1 μm。


图 4.7 光胶点阵列的扫描显微镜表征图:(a)俯视图;(b) 侧视图 Fig. 4.7 Top-view and side-view SEM image of the photoresist spots on ITO electrode. The scale bar is 20 µm.

光胶点的具体轮廓由台阶仪给出。图 4.8 展示了连续四个光胶点的轮廓,光胶底 部约为 20 μm, 高度约为 5.1 μm, 与扫描电镜得到的结果一致。



图 4.8 台阶仪表征光胶点轮廓

Fig. 4.8 The cross-sectional altitude profile of spherical spots measured with profilometer.

4.3.4 表面限域的电化学发光成像

4.3.4.1 光胶点阵列成像

发光分子浓度较低时,电化学发光过程由经典的氧化-还原路径主导。如图 4.9 所示, Ru(bpy)3²⁺和 TPrA 均需在电极表面发生电化学氧化,氧化产物分别为 Ru(bpy)3³⁺和 TPrA^{•+},后者脱质子得到的 TPrA[•]与 Ru(bpy)3³⁺反应,生成激发态 Ru(bpy)3^{2+*}。电化学发光层厚度主要由 TPrA^{•+}的浓度分布决定。由于 TPrA^{•+}寿命较短(仅为 0.2 ms), 扩散距离有限,因此电化学发光限域于电极表面。



图 4.9 氧化-还原路径电化学发光,发光层限域于电极表面 Fig. 4.9 Schematic illustration of the oxidative reduction route at a low concentration of Ru(bpy)₃²⁺ where the ECL layer is confined in the vicinity of the electrode surface.

图 4.10a 展示了在含 50 µM Ru(bpy)3²⁺和 20 mM TPrA 的 PBS 溶液(0.01 M, pH 7.4) 中采集的光胶点修饰 ITO 电极的电化学发光图像,施加电位为+1.3 V,曝光时间为 5 s。无光胶点处电极表面呈现为明亮区域,光胶点处呈现为圆形暗斑,暗斑尺寸与光胶点物理尺寸相当。将 TPrA 浓度降低至 5 mM 和 2.5 mM 后(图 4.10b 和 c),由于发光强度降低(图 4.10g 上图),发光图像较为模糊。三种共反应剂浓度下单个光胶点的归一化灰度曲线重合(图 4.10g 下图),表明发光图像的形状几乎未发生变化,发光层厚度也保持一致。

定义有效发光层厚度为光胶边缘至发光强度降为一半处分子扩散的距离,则当 发光分子浓度为 50 μM 时,共反应剂 TPrA 浓度为 20 mM, 5 mM 和 2.5 mM TPrA 的 电化学发光体系,有效发光层厚度分别为 1.9±0.1 μm, 1.8±0.2 μm 和 2.3±0.3 μm。 TPrA 浓度较低时,发光强度较弱,图像对比度不高,因此标准偏差也更大,测量得 到的有效发光层厚度值可能误差较大。

DBAE 是一种较 TPrA 更有效的共反应剂,水溶液中 Ru(bpy)3²⁺/DBAE 体系的光 强较 Ru(bpy)3²⁺/TPrA 体系更高。将前述发光体系中的共反应剂替换为 DBAE,重复 电化学发光实验,得到图 4.9d-f。该体系光强更高,光胶图像更加清晰。将单个光胶 点的灰度对位置作图并归一化,得到图 4.9h。与 Ru(bpy)3²⁺/TPrA 体系观察到的现象 相同,改变 DBAE 浓度时,灰度曲线重合,即电化学发光图像不随共反应剂浓度变 化而变化。Ru(bpy)3²⁺浓度为 50 μM, DBAE 浓度分别为 20 mM, 5 mM 和 2.5 mM 时, 有效发光层厚度分别为 1.0±0.1 μm, 1.5±0.2 μm 和 1.9±0.1 μm。分别比较相同浓 度的 TPrA 和 DBAE 作为共反应剂时获得的电化学发光图像,后者得到的光胶点暗 斑明显更大,表明 Ru(bpy)3²⁺/DBAE 体系发光层更加限域。

95



图 4.10 发光分子 Ru(bpy)₃²⁺浓度为 50 μM 时,不同共反应剂种类和浓度下光胶点阵列的电化学 发光图像(a-f)及单个光胶点处的灰度变化曲线(g-h)

Fig. 4.10 (a-f) ECL images of photoresist spots in PBS containing 50 μ M Ru(bpy)₃²⁺ and different concentrations of TPrA or DBAE (a and d, 20 mM; b and e, 5 mM; c and f, 2.5 mM). The scale bar is 20 μ m. (g, h) ECL intensity profiles (top) and normalized profiles (bottom) obtained with a single photoresist spot at different concentrations of TPrA (g) or DBAE (h). Yellow line, 2.5 mM; green line, 5 mM; black line, 20 mM.

4.3.4.2 COMSOL 模拟验证电化学发光表面限域性质

因现有研究更多聚焦 Ru(bpy)3²⁺/TPrA 体系,其电化学及反应动力学参数已有报 道,因此以该体系为研究对象,使用 COMSOL 软件模拟发光过程。图 4.11a-c 展示 了发光分子浓度为 50 μM,改变共反应剂浓度时 Ru(bpy)3^{2+*}浓度分布的截面图。 Ru(bpy)3^{2+*}的寿命较短(小于1μs),扩散距离有限,因此可将 Ru(bpy)3^{2+*}浓度分布 近似视为电化学发光强度分布。图中黑色表示光强为0,红色、黄色和白色代表的光 强依次升高。比较图 4.11a-c, 三种共反应剂浓度下的光强分布图几乎相同, 均为电 极表面附近光强最高;随距离电极表面的距离增加, 光强迅速衰减至 0, 电化学发光 仅存在于电极表面附近区域。图 4.11d 为模拟得到的单个光胶点的归一化光强分布曲 线。与实际实验得到的数据(图 4.10g)类似, 光胶点边缘光强迅速降低, 光胶点覆 盖区域(±10μm)内, 光强最低。三个共反应剂浓度下曲线重合, 表明此时电化学发 光的表面限域性质不受共反应剂浓度影响。



图 4.11 发光分子浓度较低时,改变共反应剂浓度,Ru(bpy)₃^{2+*}浓度分布(即电化学发光光强分 布)的截面图(a-c)及单个光胶点处的归一化光强随位置变化的曲线(d) Fig. 4.11 Cross-sectional view of simulated concentration profiles of Ru(bpy)₃^{2+*} around a single photoresist spot in PBS with 50 μM Ru(bpy)₃²⁺ and TPrA (a, 20 mM; b, 5 mM; c, 2.5 mM). (d) Simulated ECL intensity profiles at different concentrations of TPrA (yellow, 2.5 mM; green, 5 mM; black, 20 mM).

4.3.4.3 限域电化学发光用于细胞-基质黏着成像

限域于电极表面的电化学发光仅能对发光薄层内的分子或结构成像,因此原理 上尤其适合细胞-基质黏着成像。如第三章所述,细胞-基质黏着仅存在于底部细胞膜 至基底电极之间的限域空间内。黏着结构不仅抑制局域电化学发光的产生,同时作为 体积排阻物,阻碍电化学发光中间体扩散至黏着处发光,因此在电化学发光图像中呈 现为暗斑。图 4.12a 为聚集成片的 MCF-7 细胞簇的明场图像。由于表达上皮细胞特 征的细胞-细胞间连接, MCF-7 细胞倾向聚集成团。图 4.12b 为该细胞簇中黏着斑蛋 白的免疫荧光图像,荧光信号表明黏着斑蛋白的分布和细胞-基质黏着位置。由于 MCF-7 细胞簇较厚(数微米),黏着斑蛋白又参与构成细胞骨架,仅能在细胞边缘处 观察到清晰的细胞-基质黏着结构(红色箭头所指位置)。ECL 图像在含 50 μM Ru(bpy)3²⁺和 20 mM TPrA(图 4.12c)/DBAE(图 4.12d)的 PBS 溶液中拍摄完成, 施加电位为+1.3 V, 曝光时间为 5 s。图 4.12c 和 d 中细胞-基质黏着结构清晰可见, 无黏着处电极表面灰度与无细胞处相当。以 DBAE 为共反应剂时发光强度更高, 发 光层更加限域,因此细胞-基质黏着图像更加清晰,对比度也更高。电化学发光图像 与荧光图像的边缘(红色箭头所指位置)对应一致,证明电化学发光确实是对细胞-基质黏着成像。



图 4.12 MCF-7 细胞的明场 (a)、荧光 (b) 及以 TPrA (c) 或 DBAE (d) 为共反应剂时的 ECL 图像

Fig. 4.12 BF (a), FL (b) and ECL (c, d) images of a single cell cluster. The ECL images were captured in PBS containing 50 μ M Ru(bpy)₃²⁺ and 20 mM TPrA (c) or DBAE (d). The scale bar is 20 μ m.

4.3.5 空间延展的电化学发光成像

4.3.5.1 光胶点阵列电化学发光成像

已有文献报道,当Ru(bpy)3²⁺浓度较高时,催化路径主导电化学发光过程。在该路径下,电化学发光可延展至距离电极表面较远的位置。若此时发光层厚度与细胞-



细胞连接的空间位置匹配,则有可能实现细胞-细胞连接的成像。

图 4.13 发光分子浓度较高时(500 µM),不同共反应剂种类和浓度下光胶点阵列的电化学发光 图像(a-f)及单个光胶点处灰度变化曲线(g-h)

Fig. 4.13 (a-f) ECL images of photoresist spots in PBS containing 500 μ M Ru(bpy)₃²⁺ and different concentrations of TPrA or DBAE (a and d, 20 mM; b and e, 5 mM; c and f, 2.5 mM). The scale bar is 20 μ m. (g, h) ECL intensity profiles (top) and normalized profiles (bottom) obtained with a single photoresist spot at different concentrations of TPrA (g) or DBAE (h). Yellow line, 2.5 mM; green line, 5 mM; black line, 20 mM.

图 4.13a 为在含有 500 µM Ru(bpy)3²⁺与 20 mM TPrA 的 PBS 溶液中拍摄的光胶 点的电化学发光图像。对比低浓度 Ru(bpy)3²⁺下获得的电化学发光图像(图 4.10a), 图 4.13a 中光胶点的尺寸并未明显缩小。尽管绝对光强有明显提升,两种情况下的归 一化光强变化曲线几乎完全重合(图 4.13g 与图 4.10g),即电化学发光仍限域于电极 表面。图 4.13a 观察到的现象与文献报道并不相符。但是,随着共反应剂浓度逐渐降

99

低, 电化学发光光强降低(图 4.13g 上图), 光胶点的电化学发光图像明显减小(图 4.13b 和 c), 即发光层厚度增加。此时, 归一化电化学发光强度曲线中部光强抬升, 表明电化学发光层已扩散越过光胶点顶部, 使光胶中部也出现明显的电化学发光信号。

更换共反应剂为 DBAE, 同样可观察到随共反应剂浓度降低, 光胶点图像缩小的 现象(图 4.13d-f)。但相同条件下, 以 DBAE 为共反应剂的光胶点 ECL 图像均较以 TPrA 为共反应剂的更大, 表明在这些条件下, DBAE 的发光层均较 TPrA 更薄。由 于以 DBAE 为共反应剂时电化学发光光强更高, 为防止 EMCCD 相机过曝, 拍摄图 4.13d-f 时设置的相机增益低于图 4.13a-c, 因此, 图 4.13g 和 h 中未归一化的电化学 发光强度无法直接比较。DBAE 浓度为 20 mM 时, 光强进一步增加, 因此进一步降 低 EMCCD 增益, 图 4.13h 上图中未归一化电化学发光强度曲线中的黑线不可与黄 线及绿线直接比较。



High concentration of TPrA

Low concentration of TPrA

图 4.14 催化路径电化学发光,发光层厚度受共反应剂浓度调节

Fig. 4.14 Schematic illustration of the catalytic route at a high (left) and low (right) concentrations of TPrA where the diffusion profile can extend over a short (left) and long (right) distance from the electrode surface, respectively.

图 4.14 以 Ru(bpy)3²⁺/TPrA 体系为例,展示催化路径电化学发光过程。首先, Ru(bpy)3²⁺在电极表面氧化生成 Ru(bpy)3³⁺,后者进一步将 TPrA 氧化为 TPrA⁺⁺。TPrA⁺⁺ 脱质子后生成强还原性的 TPrA[•],该自由基将 Ru(bpy)3³⁺还原至激发态,激发态回到 基态,释放出光子。上述步骤中,Ru(bpy)3³⁺与 TPrA 间的均相化学反应为速控步骤, 决定整个发光反应过程。因此,电化学发光层厚度由 Ru(bpy)3³⁺的浓度分布决定。 Ru(bpy)3²⁺浓度较高时,Ru(bpy)3³⁺在电极表面大量生成,由于其稳定性相对较高, Ru(bpy)3³⁺可扩散至距离电极表面较远处并产生电化学发光,使发光有效延展。而当 溶液中的TPrA 浓度较高时,Ru(bpy)3³⁺在电极表面附近即被TPrA 和 TPrA•消耗并发 光,使发光仅能发生在电极表面附近。在这种情况下,尽管与Ru(bpy)3²⁺浓度较低时 的发光机理不同,此时发光层也限域于电极表面,与氧化-还原路径控制的电化学发 光层厚度接近。可能由于Ru(bpy)3³⁺与DBAE反应速率与Ru(bpy)3³⁺/TPrA 体系不同, 以DBAE 为共反应剂时Ru(bpy)3³⁺可扩散的距离更短,发光也更限域。



4.3.5.2 曝光时间对光胶点阵列电化学发光图像的影响

图 4.15 发光分子浓度较高时,以 TPrA 为共反应剂, ECL 图像及单个光胶点处的发光强度曲线 随曝光时间的变化

Fig. 4.15 ECL images and ECL intensities along the radial direction of photoresist spots in PBS containing 500 μ M Ru(bpy)₃²⁺ and different concentrations of TPrA. The exposure time is different (black line, 0.5 s; brown line, 1 s; blue line, 3 s; gray line, 5 s; green line, 7s; yellow line, 10 s). The scale bar is 20 μ m.



图 4.16 发光分子浓度较高时,以 DBAE 为共反应剂, ECL 图像及单个光胶点处的发光强度曲 线随曝光时间的变化

Fig. 4.16 ECL images and ECL intensities along the radial direction of photoresist spots in PBS containing 500 μ M Ru(bpy)₃²⁺ and different concentrations of DBAE. The exposure time is different (black line, 0.5 s; brown line, blue line, 3 s; gray line, 5 s; green line, 7s; yellow line, 10 s). The scale bar is 20 μ m.

Ru(bpy)3³⁺在溶液中扩散的距离与时间相关。图 4.15 考察了曝光时间对 500 μM Ru(bpy)3²⁺/TPrA 体系的光胶点阵列电化学发光图像的影响。当 TPrA 浓度为 20 mM 时,光胶点电化学发光图像几乎不随曝光时间变化,不同曝光时间下单个光胶点的归 一化电化学发光强度曲线重合,表明此时 Ru(bpy)3³⁺在溶液中的扩散不明显,发光层 厚度不受曝光时间影响,始终限域于电极表面。当 TPrA 浓度降至 5 mM 时,电化学 发光图像中光胶点的尺寸随曝光时间延长而缩小,光胶点中部的电化学发光强度随 曝光时间延长而提高。此时电化学发光层受 Ru(bpy)3³⁺扩散控制,曝光时间越长, Ru(bpy)3³⁺扩散的距离越大,电化学发光层越厚,电化学发光图像中光胶点的尺寸越

102

小。TPrA 浓度为 2.5 mM 时,光胶点电化学发光图像的变化规律与 5 mM 时类似。 相同曝光时间下,2.5 mM TPrA 对应的电化学发光图像中光胶点尺寸更小,电化学发 光层更厚。

以DBAE 为共反应剂时,同样可观察到高浓度 DBAE (20 mM)条件下,光胶 点的电化学发光图像尺寸不随曝光时间变化;共反应剂分子浓度较低 (5 mM 或 2.5 mM)时,图像尺寸随曝光时间延长而减小 (图 4.16),证实发光分子浓度较高时, 电化学发光层厚度的确由 Ru(bpy)₃³⁺扩散控制。

4.3.5.3 COMSOL 模拟验证电化学发光机理

为了验证前述讨论,使用 COMSOL 软件模拟高浓度发光分子(500 μM Ru(bpy)₃²⁺) 条件下的电化学发光过程。图 4.17a-c 为 Ru(bpy)₃^{2+*}浓度分布(即电化学发光光强分 布)的截面图。与实验结果一致,当共反应剂浓度为 20 mM 时,发光限域于电极表 面(图 4.17a);当共反应剂浓度降至 5 mM 或 2.5 mM 时,发光层明显由电极表面延 展至溶液内部(图 4.17b, c)。模拟得到的光强分布曲线(图 4.17d)与实验结果(图 4.13g)相符。



图 4.17 发光分子浓度较高时,改变共反应剂浓度,Ru(bpy)3^{2+*}浓度分布(即电化学发光光强分 布)的截面图(a-c)及单个光胶点处的归一化光强随位置变化的曲线(d)

Fig. 4.17 (a-c) Cross-sectional view of simulated concentration profiles of Ru(bpy)₃^{2+*} around a single photoresist spot in PBS with 500 μM Ru(bpy)₃²⁺ and TPrA (a, 20 mM; b, 5 mM; c, 2.5 mM). (d) Simulated ECL intensity profiles at different concentrations of TPrA (black, 20 mM; green, 5 mM; yellow, 2.5 mM).

催化路径中, Ru(bpy)3³⁺的浓度分布决定了电化学发光反应层的厚度。图 4.18 为 不同浓度 TPrA 存在时 Ru(bpy)3³⁺浓度分布的截面图。与前述讨论相同,当 TPrA 浓 度由 20 mM 降至 2.5 mM 时, Ru(bpy)3³⁺的扩散距离显著增加,其分布由表面限域延 展至溶液内部,与电化学发光强度的分布规律一致。与改变曝光时间的实验类似,该 结果再次验证了 Ru(bpy)3³⁺的浓度分布决定了发光层分布。



图 4.18 改变 TPrA 浓度, Ru(bpy)33+浓度分布截面图

Fig. 4.18 Side-view simulated concentration profiles of $Ru(bpy)_3^{3+}$ in PBS containing 500 μ M $Ru(bpy)_3^{2+}$ and different concentrations of TPrA (a, 20 mM; b, 5 mM; c, 2.5 mM).

4.3.5.4 细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的顺次成像

上述结果表明,当发光体系中发光分子浓度较高时(500µM),可以通过改变共 反应剂浓度调控电化学发光层分布,使其限域于电极表面或延展至距离电极表面较 远位置。这为在同一样品中空间选择性地顺次成像细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接 提供了可能。



图 4.19 单个细胞簇的 CLSM 截面图 Fig. 4.19 CLSM image of the cross-sectional view of a cell cluster. The scale bar is 10 µm.

两种连接结构的具体空间位置由免疫荧光和激光扫描共聚焦显微镜获得。黏着 斑蛋白不仅是细胞-基质黏着及细胞-细胞间连接的结构成分,同时参与细胞骨架构建, 因此,它是一种理想的可用于同时研究细胞连接结构和细胞整体形态的蛋白^[205]。图 4.19 为使用免疫荧光标记黏着斑蛋白的 MCF-7 细胞簇的激光扫描共聚焦显微成像截 面图,测量得到细胞的高度约为 6~8 μm。



图 4.20 MCF-7 细胞的 CLSM 图, 图 a 和 b 分别拍摄于细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接焦面 Fig. 4.20 CLSM images of a cell cluster obtained at the focal plane of cell-matrix adhesions (a) or cellcell junctions (b). The vinculin of cells was labeled by immunostaining. The scale bars are 20 μm.

图 4.20 为同一区域不同焦面拍摄的荧光图像。当聚焦于细胞-基质黏着焦面时, 荧光图像中可观察到分立的荧光光斑(图 4.20 中白色箭头所指位置);将焦面抬升 3.6 µm 后,荧光图像中细胞边缘的荧光强度增强,勾勒出单个细胞的多边形形状(图 4.20b 中白色箭头),揭示了细胞-细胞间连接的空间分布。上述结果表明,细胞-细胞 间连接位于细胞-基质黏着上方数微米处。两种细胞连接结构空间位置的差异使其可 被电化学发光显微成像方法顺次识别。



图 4.21 MCF-7 细胞的明场图像 Fig. 4.21 BF images of a single cell cluster. The scale bar is 50 µm.

图 4.21 为单个 MCF-7 细胞簇的明场图像, 对应的电化学发光及免疫荧光图像展示于图 4.22。电化学发光图像均在含有较高浓度 Ru(bpy)s²⁺(500 μM)的溶液中获得; 荧光标记黏着斑蛋白和 E-钙黏素分别用以验证细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接结构。图 4.22a 和 b 分别为使用 20 mM TPrA 或 DBAE 为共反应剂拍摄得到的细胞电化学发光图像。此时, 共反应剂浓度较高, 电化学发光表面限域, 图像对比度主要来源于细胞-基质黏着位点与无黏着的电极表面。因此, 细胞-基质黏着在电化学发光图像中清晰可见(例如箭头所指位置及圆圈圈出位置), 且可与免疫荧光结果对应(图 4.22c)。



图 4.22 发光分子浓度较高时,降低共反应剂浓度,实现细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的顺次成像 (a, b, d, e);图 c 和 f 分别为对应的细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的免疫荧光图像。

Fig. 4.22 ECL images obtained in PBS with 500 μ M Ru(bpy)₃²⁺ and different concentrations of TPrA (a, 20 mM; d, 2.5 mM) or DBAE (b, 20 mM; e, 2.5 mM). Inset shows the magnified ECL images. FL images of the same region of interest with vinculin (c) and E-cadherin (f) stained simultaneously. The scale bar is 50 μ m.

降低共反应剂浓度至 2.5 mM,得到电化学发光图像 4.22d 和 e。此时,电化学发光层由电极表面向溶液中延展。由于 Ru(bpy)3²⁺及共反应剂不可穿过细胞膜,细胞膜

作为绝缘的物理屏障,阻碍电化学发光在细胞处产生,因此细胞整体呈现为暗斑。而 细胞-细胞间连接位于细胞与细胞间,靠近细胞顶部,发光分子与共反应剂可自由扩 散至其下部细胞与细胞间的缝隙中。由于细胞膜弧度,细胞与细胞间的缝隙下部较 大,上部较窄。随着发光层延展至溶液中数微米,电化学发光图像中细胞-细胞间连 接呈现为狭窄的亮边(图 4.22a、d 内插图及白色箭头标出位置)。细胞底部细胞膜与 基底之间的距离,即细胞-基质黏着存在区域的高度仅为100~150 nm,在该限域空 间内产生的电化学发光与数微米厚的发光反应层相比可忽略不计,此时图像对比度 主要来源于细胞胞体与细胞-细胞间连接,细胞-基质黏着对对比度的贡献较小(图 b、 e内插图)。共反应剂浓度较低时,发光层较厚,可以越过细胞边缘到达细胞膜上部, 因此图 d 与 e 中细胞边缘均变模糊。以 TPrA 为共反应剂时(图 4.22a、d 星号标注位 置),该现象尤为明显。将电化学发光成像的结果(图 4.22d、e)与 E-钙黏素免疫荧 光标记结果比较(图 4.22f),证实发光层较厚时,的确可实现细胞-细胞间连接成像。 因此,发光分子浓度较高时,通过逐渐降低共反应剂浓度,即可调控发光层厚度由薄 至厚,实现从细胞-基质黏着蛋白到细胞-细胞间连接蛋白的顺次成像。

4.4 本章小节

通过改变发光分子和/或共反应剂浓度,调控电化学发光反应路径,电化学发光 层可由表面限域延展至距离电极表面数微米处。使发光层厚度与不同细胞连接的空间位置相匹配,实现了同一细胞样本中位于细胞底部的细胞-基质黏着和靠近细胞顶部的细胞-细胞间连接蛋白的空间选择性成像。该工作阐明了电化学发光催化路径的反应机制,实现了电化学发光空间分布的调控,突破了电化学发光表面限域测量的限制,拓展了电化学发光在细胞分析领域的应用范围,为电化学发光空间定位测量提供了一种新的思路。

电化学发光是一种时空调控能力强的技术。研究电极表面电化学发光信号的空间分布,能够揭示电化学发光反应机理,提升对电化学发光基本过程的科学认知,弥补传统电化学发光强度分析中空间分辨信号缺失的不足,同时也为构建新型电化学发光细胞分析和传感检测平台提供了技术支撑。

107

第五章 总结与展望

细胞是生命活动的基本单位。解析其成分和结构是揭示细胞生命活动规律的基础和前提。免光激发、灵敏度高、时空可控性强等优势,使电化学发光成像在细胞分析中崭露头角。本论文以电化学发光成像为技术手段,实现了细胞成分和结构的免标记、动态分析,具体完成了如下工作:

(1)制备了二氧化硅纳米笼阵列装载发光分子的固态电化学发光传感器,发光 分子物理限域于纳米笼内,神经递质多巴胺可通过纳米通道到达纳米笼内,淬灭发光 分子的电化学发光。该结构有效排阻了生物体系中大分子物质对电极界面电化学发 光过程的干扰,实现了活细胞释放的多巴胺的免标记成像分析。

(2)构建了单个活细胞的电化学发光细胞-基质黏着免标记成像方法,以胰酶消 化过程为例,研究了细胞-基质黏着的动态变化过程,分别在亚细胞和单细胞水平揭 示了细胞基质黏着强度及其与细胞形貌的关系。最后,将该方法应用于细胞集体迁移 过程分析,揭示了后缘细胞的主动迁移倾向。

(3)突破了电化学发光的表面限域性质,阐明了电化学发光催化路径的反应机制,发展了单个细胞簇的细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接的电化学发光识别方法, 实现了两种细胞连接结构的空间选择性成像。

由于时间有限,本论文还存在一些不足和需要进一步完成的工作:

(1)使用发光性能更佳的发光探针,如量子点、金属-有机框架等新型发光体, 提高电化学发光纳米笼电极阵列的灵敏度,实现单个细胞释放的多巴胺的时空分辨 电化学发光成像分析。

(2)提高电化学发光分析的时间分辨率,调控胞外微环境,研究细胞-基质黏着 的物理和化学传感机制。

(3)细胞-基质黏着和细胞-细胞间连接共同参与上皮-间质转化等重要生命过程, 采用电化学发光空间选择性成像方法,研究两种连接结构的协同或拮抗作用。

基于电化学发光细胞成像已取得的研究成果,对该领域的发展提出如下展望:

(1)开发低/无电扰动和化学扰动的电化学发光细胞成像分析方法,实现细胞成

108

分和结构的长时间实时动态监测。

(2) 在深入理解电化学发光反应机制的基础上,充分发挥电化学发光的技术特 点与优势,设计与电化学发光过程匹配的细胞分析体系。

(3)针对特异性抗原分析等单细胞分析目标,发展标准化电化学发光单细胞成像分析流程,与常规生物学细胞成像或分析方法配套,推进电化学发光在生物学研究中的应用。

参考文献

- [1] N. Harvey, Luminescence during Electrolysis. J. Phys. Chem. 1929, 33 (10), 1456-1459.
- [2] R. Dufford, D. Nightingale, L. Gaddum, Luminescence of Grignard Compounds in Electric and Magnetic Fields, and Related Electrical Phenomena. J. Am. Chem. Soc. 1927, 49 (8), 1858-1864.
- [3] D. M. Hercules, Chemiluminescence Resulting from Electrochemically Generated Species. *Science* **1964**, *145* (3634), 808-809.
- [4] R. E. Visco, E. A. Chandross, Electroluminescence in Solutions of Aromatic Hydrocarbons. J. Am. Chem. Soc. 1964, 86 (23), 5350-5351.
- [5] N. E. Tokel, A. J. Bard, Electrogenerated Chemiluminescence. IX. Electrochemistry and Emission from Systems Containing Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) Dichloride. J. Am. Chem. Soc. 1972, 94 (8), 2862-2863.
- [6] I. Rubinstein, A. J. Bard, Electrogenerated Chemiluminescence. 37. Aqueous ECL Systems Based on Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) and Oxalate or Organic Acids. J. Am. Chem. Soc. 1981, 103 (3), 512-516.
- [7] J. K. Leland, M. J. Powell, Electrogenerated Chemiluminescence: An Oxidative -Reduction Type ECL Reaction Sequence Using Tripropyl Amine. J. Electrochem. Soc. 1990, 137 (10), 3127-3131.
- [8] Z. Ding, B. M. Quinn, S. K. Haram, L. E. Pell, B. A. Korgel, A. J. Bard, Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence from Silicon Nanocrystal Quantum Dots. *Science* 2002, 296 (5571), 1293-1297.
- [9] W. Guo, H. Ding, P. Zhou, Y. Wang, B. Su, Electrochemiluminescence Waveguide in Single Crystalline Molecular Wires. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (17), 6745-6749.
- [10] S. Carrara, A. Aliprandi, C. F. Hogan, L. De Cola, Aggregation-Induced Electrochemiluminescence of Platinum(II) Complexes. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139 (41), 14605-14610.
- [11] Y. Zhao, J. Yu, G. Xu, N. Sojic, G. Loget, Photoinduced Electrochemiluminescence at Silicon Electrodes in Water. J. Am. Chem. Soc. 2019, 141 (33), 13013-13016.
- [12] A. J. Bard, A Life in Electrochemistry. Annu. Rev. Anal. Chem. 2014, 7 (1), 1-21.
- [13] A. Zanut, A. Fiorani, S. Rebeccani, S. Kesarkar, G. Valenti, Electrochemiluminescence as Emerging Microscopy Techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019, 411 (19), 4375-4382.
- [14] M. M. Richter, Electrochemiluminescence (ECL). Chem. Rev. 2004, 104 (6), 3003-3036.
- [15] 李云辉, 王春燕, 电化学发光, 化学工业出版社, 2008.
- [16] N. Myung, Z. F. Ding, A. J. Bard, Electrogenerated Chemiluminescence of CdSe Nanocrystals. *Nano Lett.* 2002, 2 (11), 1315-1319.
- [17] Y. Bae, N. Myung, A. J. Bard, Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence of CdTe Nanoparticles. *Nano Lett.* **2004**, *4* (6), 1153-1161.
- [18] X. Tan, B. Zhang, G. Zou, Electrochemistry and Electrochemiluminescence of Organometal Halide Perovskite Nanocrystals in Aqueous Medium. J. Am. Chem. Soc.

2017, *139* (25), 8772-8776.

- [19] Y. Xu, J. Liu, C. Gao, E. Wang, Applications of Carbon Quantum Dots in Electrochemiluminescence: A Mini Review. *Electrochem. Commun.* **2014**, *48*, 151-154.
- [20] I. Díez, M. Pusa, S. Kulmala, H. Jiang, A. Walther, A. S. Goldmann, A. H. E. Müller, O. Ikkala, R. H. A. Ras, Color Tunability and Electrochemiluminescence of Silver Nanoclusters. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48 (12), 2122-2125.
- [21] Y. Xu, X. Yin, X. He, Y. Zhang, Electrochemistry and Electrochemiluminescence from a Redox-Active Metal-Organic Framework. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 68, 197-203.
- [22] N. Sojic, Analytical Electrogenerated Chemiluminescence: From Fundamentals to Bioassays, Royal Society of Chemistry, 2019.
- [23] T. Ala-Kleme, S. Kulmala, L. Väre, P. Juhala, M. Helin, Hot Electron-Induced Electrogenerated Chemiluminescence of Ru(bpy)₃²⁺ Chelate at Oxide-Covered Aluminum Electrodes. *Anal. Chem.* 1999, 71 (24), 5538-5543.
- [24] S. Kulmala, T. Ala-Kleme, A. Kulmala, D. Papkovsky, K. Loikas, Cathodic Electrogenerated Chemiluminescence of Luminol at Disposable Oxide-Covered Aluminum Electrodes. *Anal. Chem.* 1998, 70 (6), 1112-1118.
- [25] B. Fleet, G. Kirkbright, C. Pickford, The Electrogenerated Chemiluminescence of Pyrene and Some Related Compounds. J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 1971, 30 (1), 115-121.
- [26] V. Vojíř, Chemilumineszenz um die Quecksilbertropfelektrode. Collect. Czech. Chem. Commun. 1954, 19 (5), 868-872.
- [27] T. Kuwana, B. Epstein, E. T. Seo, Electrochemical Generation of Solution Luminescence. J. Phys. Chem. 1963, 67 (10), 2243-2244.
- [28] W. Miao, Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications. Chem. Rev. 2008, 108 (7), 2506-2553.
- [29] A. Wróblewska, O. V. Reshetnyak, E. P. Koval'chuk, R. I. Pasichnyuk, J. Błażejowski, Origin and Features of the Electrochemiluminescence of Luminol – Experimental and Theoretical Investigations. J. Electroanal. Chem. 2005, 580 (1), 41-49.
- [30] C. A. Marquette, L. J. Blum, Electro-chemiluminescent Biosensing. Anal. Bioanal. Chem. 2008, 390 (1), 155-168.
- [31] Y. Nishinaka, Y. Aramaki, H. Yoshida, H. Masuya, T. Sugawara, Y. Ichimori, A New Sensitive Chemiluminescence Probe, L-012, for Measuring the Production of Superoxide Anion by Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 193 (2), 554-559.
- [32] R. J. Gale, Spectroelectrochemistry: Theory and Practice, Springer Science & Business Media, 2012.
- [33] M. Hesari, Z. Ding, Spooling Electrochemiluminescence Spectroscopy: Development, Applications and Beyond. *Nat. Protoc.* 2021, 16 (4), 2109-2130.
- [34] K. N. Swanick, S. Ladouceur, E. Zysman-Colman, Z. Ding, Self-Enhanced Electrochemiluminescence of an Iridium(III) Complex: Mechanistic Insight. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51 (44), 11079-11082.
- [35] R. Qiu, X. Zhang, H. Luo, Y. Shao, Mass Spectrometric Snapshots for Electrochemical

Reactions. Chem. Sci. 2016, 7 (11), 6684-6688.

- [36] W. Guo, H. Ding, C. Gu, Y. Liu, X. Jiang, B. Su, Y. Shao, Potential-Resolved Multicolor Electrochemiluminescence for Multiplex Immunoassay in a Single Sample. J. Am. Chem. Soc. 2018, 140 (46), 15904–15915.
- [37] W. Miao, J.-P. Choi, A. J. Bard, Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)₃²⁺)/Tri-n-propylamine (TPrA) System RevisitedA New Route Involving TPrA⁺⁺ Cation Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, *124* (48), 14478– 14485.
- [38] M. Sentic, M. Milutinovic, F. Kanoufi, D. Manojlovic, S. Arbault, N. Sojic, Mapping the Electrogenerated Chemiluminescence Reactivity in Space: Mechanistic Insight into Model Systems Used in Immunoassays. *Chem. Sci.* 2014, 5 (6), 2568-2572.
- [39] W. Guo, P. Zhou, L. Sun, H. Ding, B. Su, Microtube Electrodes for Imaging the Electrochemiluminescence Layer and Deciphering the Reaction Mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60 (4), 2089-2093.
- [40] Y. Wang, W. Guo, Q. Yang, B. Su, Electrochemiluminescence Self-Interference Spectroscopy with Vertical Nanoscale Resolution. J. Am. Chem. Soc. 2020, 142 (3), 1222-1226.
- [41] L. Xu, Y. Li, S. Wu, X. Liu, B. Su, Imaging Latent Fingerprints by Electrochemiluminescence. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (32), 8068-8072.
- [42] E. H. Doeven, G. J. Barbante, E. Kerr, C. F. Hogan, J. A. Endler, P. S. Francis, Red-Green-Blue Electrogenerated Chemiluminescence Utilizing a Digital Camera as Detector. *Anal. Chem.* 2014, 86 (5), 2727-2732.
- [43] S. Li, Y. Lu, L. Liu, S. S. Low, B. Su, J. Wu, L. Zhu, C. Li, Q. Liu, Fingerprints Mapping and Biochemical Sensing on Smartphone by Electrochemiluminescence. *Sens. Actuators, B* 2019, 285, 34-41.
- [44] J. Zhang, S. Arbault, N. Sojic, D. Jiang, Electrochemiluminescence Imaging for Bioanalysis. Annu. Rev. Anal. Chem. 2019, 12 (1), 275-295.
- [45] R. G. Maus, E. M. McDonald, R. M. Wightman, Imaging of Nonuniform Current Density at Microelectrodes by Electrogenerated Chemiluminescence. *Anal. Chem.* 1999, 71 (21), 4944-4950.
- [46] F.-R. F. Fan, D. Cliffel, A. J. Bard, Scanning Electrochemical Microscopy. 37. Light Emission by Electrogenerated Chemiluminescence at SECM Tips and Their Application to Scanning Optical Microscopy. *Anal. Chem.* 1998, 70 (14), 2941-2948.
- [47] Y. Zu, Z. Ding, J. Zhou, Y. Lee, A. J. Bard, Scanning Optical Microscopy with an Electrogenerated Chemiluminescent Light Source at a Nanometer Tip. *Anal. Chem.* 2001, 73 (10), 2153-2156.
- [48] C. A. Marquette, A. Degiuli, L. J. Blum, Electrochemiluminescent Biosensors Array for the Concomitant Detection of Choline, Glucose, Glutamate, Lactate, Lysine and Urate. *Biosens. Bioelectron.* 2003, 19 (5), 433-439.
- [49] C. A. Marquette, L. c. J. Blum, Conducting Elastomer Surface Texturing: A Path to Electrode Spotting: Application to the Biochip Production. *Biosens. Bioelectron.* 2004,

20 (2), 197-203.

- [50] C. A. Marquette, L. J. Blum, Self-Containing Reactant Biochips for the Electrochemiluminescent Determination of Glucose, Lactate and Choline. *Sens. Actuators, B* **2003**, *90* (1), 112-117.
- [51] E. G. Hvastkovs, J. B. Schenkman, J. F. Rusling, Metabolic Toxicity Screening Using Electrochemiluminescence Arrays Coupled with Enzyme-DNA Biocolloid Reactors and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2012, *5*, 79-105.
- [52] S. Krishnan, E. G. Hvastkovs, B. Bajrami, J. B. Schenkman, J. F. Rusling, Human Cyt P450 Mediated Metabolic Toxicity of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) Evaluated Using Electrochemiluminescent arrays. *Mol. BioSyst.* 2009, 5 (2), 163-169.
- [53] S. Pan, L. Zhao, J. B. Schenkman, J. F. Rusling, Evaluation of Electrochemiluminescent Metabolic Toxicity Screening Arrays Using a Multiple Compound Set. *Anal. Chem.* 2011, 83 (7), 2754-2760.
- [54] N. P. Sardesai, J. C. Barron, J. F. Rusling, Carbon Nanotube Microwell Array for Sensitive Electrochemiluminescent Detection of Cancer Biomarker Proteins. *Anal. Chem.* 2011, 83 (17), 6698-6703.
- [55] K. Kadimisetty, I. M. Mosa, S. Malla, J. E. Satterwhite-Warden, T. M. Kuhns, R. C. Faria, N. H. Lee, J. F. Rusling, 3D-Printed Supercapacitor-Powered Electrochemiluminescent Protein Immunoarray. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 77, 188-193.
- [56] D. P. Wasalathanthri, S. Malla, I. Bist, C. K. Tang, R. C. Faria, J. F. Rusling, High-Throughput Metabolic Genotoxicity Screening with A Fluidic Microwell Chip and Electrochemiluminescence. *Lab Chip* 2013, *13* (23), 4554-4562.
- [57] V. Mani, K. Kadimisetty, S. Malla, A. A. Joshi, J. F. Rusling, Paper-Based Electrochemiluminescent Screening for Genotoxic Activity in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47 (4), 1937-1944.
- [58] S. Szunerits, J. M. Tam, L. Thouin, C. Amatore, D. R. Walt, Spatially Resolved Electrochemiluminescence on an Array of Electrode Tips. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (17), 7.
- [59] A. Chovin, P. Garrigue, P. Vinatier, N. Sojic, Development of an Ordered Array of Optoelectrochemical Individually Readable Sensors with Submicrometer Dimensions: Application to Remote Electrochemiluminescence Imaging. *Anal. Chem.* 2004, 76 (2), 357-364.
- [60] A. Chovin, P. Garrigue, N. Sojic, Electrochemiluminescent Detection of Hydrogen Peroxide with An Imaging Sensor Array. *Electrochim. Acta* 2004, 49 (22-23), 3751-3757.
- [61] A. Chovin, P. Garrigue, N. Sojic, Remote NADH Imaging Through An Ordered Array of Electrochemiluminescent Nanoapertures. *Bioelectrochemistry* **2006**, *69* (1), 25-33.
- [62] F. Deiss, C. N. La Fratta, M. Symer, T. M. Blicharz, N. Sojic, D. R. Walt, Multiplexed Sandwich Immunoassays Using Electrochemiluminescence Imaging Resolved at the Single Bead Level. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (17), 6088-6089.
- [63] A. Arora, J. C. T. Eijkel, W. E. Morf, A. Manz, A Wireless Electrochemiluminescence Detector Applied to Direct and Indirect Detection for Electrophoresis on a

Microfabricated Glass Device. Anal. Chem. 2001, 73 (14), 3282-3288.

- [64] W. Zhan, J. Alvarez, R. M. Crooks, Electrochemical Sensing in Microfluidic Systems Using Electrogenerated Chemiluminescence as a Photonic Reporter of Redox Reactions. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124 (44), 13265-13270.
- [65] K.-F. Chow, F. Mavre, R. M. Crooks, Wireless Electrochemical DNA Microarray Sensor. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130 (24), 7544-7545.
- [66] K. Chow, F. Mavré, J. A. Crooks, B. Chang, R. M. Crooks, A Large-Scale, Wireless Electrochemical Bipolar Electrode Microarray. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (24), 8364-8365.
- [67] M. Wu, D. Yuan, J. Xu, H. Chen, Electrochemiluminescence on Bipolar Electrodes for Visual Bioanalysis. Chem. Sci. 2013, 4 (3), 1182-1188.
- [68] Y. Wang, S. Ji, H. Xu, W. Zhao, J. Xu, H. Chen, Bidirectional Electrochemiluminescence Color Switch: An Application in Detecting Multimarkers of Prostate Cancer. *Anal. Chem.* 2018, 90 (5), 3570-3575.
- [69] Y. Wang, C. Xu, W. Zhao, Q. Guan, H. Chen, J. Xu, Bipolar Electrode Based Multicolor Electrochemiluminescence Biosensor. *Anal. Chem.* 2017, 89 (15), 8050-8056.
- [70] L. Xu, Y. Li, S. Wu, X. Liu, B. Su, Imaging Latent Fingerprints by Electrochemiluminescence. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (32), 8068-8072.
- [71] S. Hu, Z. Cao, L. Zhou, R. Ma, B. Su, Electrochemiluminescence Imaging of Latent Fingerprints by Electropolymerized Luminol. J. Electroanal. Chem. 2020, 870, 114238.
- [72] Y. Li, L. Xu, B. Su, Aggregation Induced Emission for the Recognition of Latent Fingerprints. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (34), 4109-4111.
- [73] L. Xu, Y. Li, Y. He, S. Bin, Non-destructive Enhancement of Latent Fingerprints on Stainless Steel Surfaces by Electrochemiluminescence. *Analyst* 2013, 138 (8), 2357-2362.
- [74] L. Xu, Z. Zhou, C. Zhang, Y. He, B. Su, Electrochemiluminescence Imaging of Latent Fingermarks through the Immunodetection of Secretions in Human Perspiration. *Chem. Commun.* 2014, 50 (65), 9097-9100.
- [75] J. Tan, L. Xu, T. Li, B. Su, J. Wu, Image-Contrast Technology Based on the Electrochemiluminescence of Porous Silicon and Its Application in Fingerprint Visualization. Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53 (37), 9822-9826.
- [76] V. Almendro, A. Marusyk, K. Polyak, Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis. 2013, 8 (1), 277-302.
- [77] Y. Wolf, O. Bartok, S. Patkar, G. B. Eli, S. Cohen, K. Litchfield, R. Levy, A. Jiménez-Sánchez, S. Trabish, J. S. Lee, H. Karathia, E. Barnea, C.-P. Day, E. Cinnamon, I. Stein, A. Solomon, L. Bitton, E. Pérez-Guijarro, T. Dubovik, S. S. Shen-Orr, M. L. Miller, G. Merlino, Y. Levin, E. Pikarsky, L. Eisenbach, A. Admon, C. Swanton, E. Ruppin, Y. Samuels, UVB-Induced Tumor Heterogeneity Diminishes Immune Response in Melanoma. *Cell* **2019**, *179* (1), 219-235.e221.
- [78] L. M. Borland, S. Kottegoda, K. S. Phillips, N. L. Allbritton, Chemical Analysis of Single Cells. Annu. Rev. Anal. Chem. 2008, 1, 191-227.

- [79] A. Schmid, H. Kortmann, P. S. Dittrich, L. M. Blank, Chemical and Biological Single Cell Analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 21 (1), 12-20.
- [80] H. Cheng, W. J. Lederer, M. B. Cannell, Calcium Sparks: Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle. *Science* 1993, 262 (5134), 740-744.
- [81] N. G. Gubernator, H. Zhang, R. G. W. Staal, E. V. Mosharov, D. B. Pereira, M. Yue, V. Balsanek, P. A. Vadola, B. Mukherjee, R. H. Edwards, D. Sulzer, D. Sames, Fluorescent False Neurotransmitters Visualize Dopamine Release from Individual Presynaptic Terminals. *Science* 2009, 324 (5933), 1441-1444.
- [82] C.-H. L. Eng, M. Lawson, Q. Zhu, R. Dries, N. Koulena, Y. Takei, J. Yun, C. Cronin, C. Karp, G.-C. Yuan, L. Cai, Transcriptome-Scale Super-Resolved Imaging in Tissues by RNA SeqFISH+. *Nature* 2019, 568 (7751), 235-239.
- [83] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, C. M. Waterman, Nanoscale Architecture of Integrin-Based Cell Adhesions. *Nature* 2010, 468 (7323), 580-584.
- [84] K. Jiang, S. Sun, L. Zhang, Y. Lu, A. Wu, C. Cai, H. Lin, Red, Green, and Blue Luminescence by Carbon Dots: Full-Color Emission Tuning and Multicolor Cellular Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54 (18), 5360-5363.
- [85] P. Zrazhevskiy, X. Gao, Quantum Dot Imaging Platform for Single-Cell Molecular Profiling. *Nat. Commun.* 2013, 4 (1), 1619.
- [86] V. Herrera, S.-C. J. Hsu, M. K. Rahim, C. Chen, L. Nguyen, W. F. Liu, J. B. Haun, Pushing the Limits of Detection for Proteins Secreted from Single Cells Using Quantum Dots. *Analyst* 2019, 144 (3), 980-989.
- [87] S. Sograte-Idrissi, T. Schlichthaerle, C. J. Duque-Afonso, M. Alevra, S. Strauss, T. Moser, R. Jungmann, S. O. Rizzoli, F. Opazo, Circumvention of Common Labelling Artefacts Using Secondary Nanobodies. *Nanoscale* 2020, *12* (18), 10226-10239.
- [88] S. Strauss, P. C. Nickels, M. T. Strauss, V. Jimenez Sabinina, J. Ellenberg, J. D. Carter, S. Gupta, N. Janjic, R. Jungmann, Modified Aptamers Enable Quantitative Sub-10-nm Cellular DNA-PAINT Imaging. *Nat. Methods* 2018, 15 (9), 685-688.
- [89] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb, Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics. *Biophys. J.* 1976, 16 (9), 1055-1069.
- [90] S. Hohng, S. Lee, J. Lee, M. H. Jo, Maximizing Information Content of Single-Molecule FRET Experiments: Multi-Color FRET and FRET Combined with Force or Torque. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43 (4), 1007-1013.
- [91] B. Joshi, S. S. Strugnell, J. G. Goetz, L. D. Kojic, M. E. Cox, O. L. Griffith, S. K. Chan, S. J. Jones, S.-P. Leung, H. Masoudi, S. Leung, S. M. Wiseman, I. R. Nabi, Phosphorylated Caveolin-1 Regulates Rho/ROCK-Dependent Focal Adhesion Dynamics and Tumor Cell Migration and Invasion. *Cancer Res.* 2008, 68 (20), 8210-8220.
- [92] S. J. Franco, M. A. Rodgers, B. J. Perrin, J. Han, D. A. Bennin, D. R. Critchley, A. Huttenlocher, Calpain-Mediated Proteolysis of Talin Regulates Adhesion Dynamics. *Nat.*

Cell Biol. **2004**, *6* (10), 977-983.

- [93] M. G. L. Gustafsson, Surpassing the Lateral Resolution Limit by A Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy. J. Microsc. 2000, 198 (2), 82-87.
- [94] L. Schermelleh, P. M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M. C. Cardoso, D. A. Agard, M. G. L. Gustafsson, H. Leonhardt, J. W. Sedat, Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. *Science* 2008, *320* (5881), 1332-1336.
- [95] S. Geissbuehler, A. Sharipov, A. Godinat, N. L. Bocchio, P. A. Sandoz, A. Huss, N. A. Jensen, S. Jakobs, J. Enderlein, F. Gisou van der Goot, E. A. Dubikovskaya, T. Lasser, M. Leutenegger, Live-Cell Multiplane Three-Dimensional Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging. *Nat. Commun.* 2014, 5 (1), 5830.
- [96] T. Dertinger, R. Colyer, G. Iyer, S. Weiss, J. Enderlein, Fast, Background-Free, 3D Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI). *PNAS* 2009, 106 (52), 22287-22292.
- [97] H. Blom, J. Widengren, Stimulated Emission Depletion Microscopy. Chem. Rev. 2017, 117 (11), 7377-7427.
- [98] B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang, Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science* 2008, 319 (5864), 810-813.
- [99] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Nat. Methods* 2006, 3 (10), 793-796.
- [100] M. Mir, Z. Wang, Z. Shen, M. Bednarz, R. Bashir, I. Golding, S. G. Prasanth, G. Popescu, Optical Measurement of Cycle-Dependent Cell Growth. *PNAS* 2011, 108 (32), 13124-13129.
- [101] G. de Wit, J. S. H. Danial, P. Kukura, M. I. Wallace, Dynamic Label-Free Imaging of Lipid Nanodomains. PNAS 2015, 112 (40), 12299-12303.
- [102] Z. Wang, L. Millet, M. Mir, H. Ding, S. Unarunotai, J. Rogers, M. U. Gillette, G. Popescu, Spatial Light Interference Microscopy (SLIM). *Opt. Express* 2011, 19 (2), 1016-1026.
- [103] M. Abi Ghanem, T. Dehoux, O. F. Zouani, A. Gadalla, M. C. Durrieu, B. Audoin, Remote Opto-acoustic Probing of Single-cell Adhesion on Metallic Surfaces. J. Biophotonics 2014, 7 (6), 453-459.
- [104] F. Zernike, Phase Contrast, A New Method for the Microscopic Observation of Transparent Objects. *Physica* 1942, 9 (7), 686-698.
- [105] E. B. Van Munster, L. J. Van Vliet, J. A. Aten, Reconstruction of Optical Pathlength Distributions from Images Obtained by A Wide-Field Differential Interference Contrast Microscope. J. Microsc. 1997, 188 (2), 149-157.
- [106] V. Bormuth, J. Howard, E. SchÄFfer, LED Illumination for Video-Enhanced DIC Imaging of Single Microtubules. J. Microsc. 2007, 226 (1), 1-5.
- [107] R. D. Allen, N. S. Allen, J. L. Travis, VideeEnhanced Contrast, Differential Interference Contrast (AVEGDIC) Microscopy: A New Method Capable of Analyzing Microtu bu

Ie-Related Motility in the Reticulopodial Network of Allogromia laticollaris. *Cell Motil.* **1981**, *1* (3), 291-302.

- [108] M. R. Holt, Y. Calle, D. H. Sutton, D. R. Critchley, G. E. Jones, G. A. Dunn, Quantifying Cell-Matrix Adhesion Dynamics in Living Cells Using Interference Reflection Microscopy. J. Microsc. 2008, 232 (1), 73-81.
- [109] W. Wang, S. Wang, Q. Liu, J. Wu, N. Tao, Mapping Single-Cell–Substrate Interactions by Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Langmuir* 2012, 28 (37), 13373-13379.
- [110] E. Kreysing, H. Hassani, N. Hampe, A. Offenhausser, Nanometer-Resolved Mapping of Cell-Substrate Distances of Contracting Cardiomyocytes Using Surface Plasmon Resonance Microscopy. ACS Nano 2018, 12 (9), 8934-8942.
- [111] X. Zhou, Y. Yang, S. Wang, X. Liu, Surface Plasmon Resonance Microscopy: From Single-Molecule Sensing to Single-Cell Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020, 59 (5), 1776-1785.
- [112] Y. Su, W. Wang, Surface Plasmon Resonance Sensing: from Purified Biomolecules to Intact Cells. Anal. Bioanal. Chem. 2018, 410 (17), 3943-3951.
- [113] H. Yu, X. Shan, S. Wang, N. Tao, Achieving High Spatial Resolution Surface Plasmon Resonance Microscopy with Image Reconstruction. *Anal. Chem.* 2017, 89 (5), 2704-2707.
- [114] M. Li, J. Xu, M. Romero-Gonzalez, S. A. Banwart, W. E. Huang, Single Cell Raman Spectroscopy for Cell Sorting and Imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012, 23 (1), 56-63.
- [115] I. W. Schie, R. Kiselev, C. Krafft, J. Popp, Rapid Acquisition of Mean Raman Spectra of Eukaryotic Cells for A Robust Single Cell Classification. *Analyst* 2016, 141 (23), 6387-6395.
- [116] S. Casabella, P. Scully, N. Goddard, P. Gardner, Automated Analysis of Single Cells Using Laser Tweezers Raman Spectroscopy. *Analyst* 2016, 141 (2), 689-696.
- [117] J. A. Dieringer, R. B. Lettan, K. A. Scheidt, R. P. Van Duyne, A Frequency Domain Existence Proof of Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (51), 16249-16256.
- [118] S. Nie, S. R. Emory, Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* 1997, 275 (5303), 1102-1106.
- [119] E. Feng, T. Zheng, X. He, J. Chen, Y. Tian, A Novel Ternary Heterostructure with Dramatic SERS Activity for Evaluation of PD-L1 Expression at the Single-Cell Level. *Sci. Adv.* 2018, 4 (11), eaau3494.
- [120] L. Zhang, A. Vertes, Single-Cell Mass Spectrometry Approaches to Explore Cellular Heterogeneity. Angew. Chem. Int. Ed. 2018, 57 (17), 4466-4477.
- [121] D. Breitenstein, C. E. Rommel, R. Möllers, J. Wegener, B. Hagenhoff, The Chemical Composition of Animal Cells and Their Intracellular Compartments Reconstructed from 3D Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46 (28), 5332-5335.
- [122] B. Spengler, M. Hubert, Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (SMALDI) Mass Spectrometry: Instrumentation for Sub-Micrometer

Resolved LDI and MALDI Surface Analysis. J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2002, 13 (6), 735-748.

- [123] B. N. Walker, J. A. Stolee, A. Vertes, Nanophotonic Ionization for Ultratrace and Single-Cell Analysis by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2012, 84 (18), 7756-7762.
- [124] M. K. Passarelli, C. F. Newman, P. S. Marshall, A. West, I. S. Gilmore, J. Bunch, M. R. Alexander, C. T. Dollery, Single-Cell Analysis: Visualizing Pharmaceutical and Metabolite Uptake in Cells with Label-Free 3D Mass Spectrometry Imaging. *Anal. Chem.* 2015, 87 (13), 6696-6702.
- [125] Y. Yang, Y. Huang, J. Wu, N. Liu, J. Deng, T. Luan, Single-Cell Analysis by Ambient Mass Spectrometry. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2017, 90, 14-26.
- [126] K. Yamamoto, K. Takahashi, H. Mizuno, A. Anegawa, K. Ishizaki, H. Fukaki, M. Ohnishi, M. Yamazaki, T. Masujima, T. Mimura, Cell-Specific Localization of Alkaloids in Catharanthus Roseus Stem Tissue Measured with Imaging MS and Single-Cell MS. *PNAS* 2016, *113* (14), 3891-3896.
- [127] X. Gong, Y. Zhao, S. Cai, S. Fu, C. Yang, S. Zhang, X. Zhang, Single Cell Analysis with Probe ESI-Mass Spectrometry: Detection of Metabolites at Cellular and Subcellular Levels. *Anal. Chem.* 2014, 86 (8), 3809-3816.
- [128] R. N. Adams, Probing Brain Chemistry with Electroanalytical Techniques. *Anal. Chem.* 1976, 48 (14), 1126A-1138A.
- [129] E. L. Ciolkowski, B. R. Cooper, J. A. Jankowski, J. W. Jorgenson, R. M. Wightman, Direct Observation of Epinephrine and Norepinephrine Cosecretion from Individual Adrenal Medullary Chromaffin Cells. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114 (8), 2815-2821.
- [130] R. M. Wightman, J. A. Jankowski, R. T. Kennedy, K. T. Kawagoe, T. J. Schroeder, D. J. Leszczyszyn, J. A. Near, E. J. Diliberto, O. H. Viveros, Temporally Resolved Catecholamine Spikes Correspond to Single Vesicle Release from Individual Chromaffin Cells. *PNAS* **1991**, *88* (23), 10754-10758.
- [131] D. J. Leszczyszyn, J. A. Jankowski, O. H. Viveros, D. E. Jr, J. A. Near, R. M. Wightman, Nicotinic Receptor-Mediated Catecholamine Secretion from Individual Chromaffin Cells. Chemical Evidence for Exocytosis. J. Biol. Chem. 1990, 265 (25), 14736-14737.
- [132] W. Wu, W. Huang, W. Wang, Z. Wang, J. Cheng, T. Xu, R. Zhang, Y. Chen, J. Liu, Monitoring Dopamine Release from Single Living Vesicles with Nanoelectrodes. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127 (25), 8914-8915.
- [133] D. M. Omiatek, Y. Dong, M. L. Heien, A. G. Ewing, Only a Fraction of Quantal Content is Released During Exocytosis as Revealed by Electrochemical Cytometry of Secretory Vesicles. ACS Chem. Neurosci. 2010, 1 (3), 234-245.
- [134] X. Li, S. Majdi, J. Dunevall, H. Fathali, A. G. Ewing, Quantitative Measurement of Transmitters in Individual Vesicles in the Cytoplasm of Single Cells with Nanotip Electrodes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54 (41), 11978-11982.
- [135] Y. Li, S. Zhang, L. Wang, R. Xiao, W. Liu, X. Zhang, Z. Zhou, C. Amatore, W. H. Huang, Nanoelectrode for Amperometric Monitoring of Individual Vesicular Exocytosis inside Single Synapses. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53 (46), 12456-12460.

- [136] I. Hafez, K. Kisler, K. Berberian, G. Dernick, V. Valero, M. G. Yong, H. G. Craighead, M. Lindau, Electrochemical Imaging of Fusion Pore Openings by Electrochemical Detector Arrays. *PNAS* 2005, *102* (39), 13879-13884.
- [137] J. Muller, M. Ballini, P. Livi, Y. Chen, M. Radivojevic, A. Shadmani, V. Viswam, I. L. Jones, M. Fiscella, R. Diggelmann, A. Stettler, U. Frey, D. J. Bakkum, A. Hierlemann, High-Resolution CMOS MEA Platform to Study Neurons at Subcellular, Cellular, and Network Levels. *Lab Chip* 2015, *15* (13), 2767-2780.
- [138] R. Pan, M. Xu, D. Jiang, J. D. Burgess, H. Chen, Nanokit for Single-Cell Electrochemical Analyses. PNAS 2016, 113 (41), 11436-11440.
- [139] R. Pan, M. Xu, J. D. Burgess, D. Jiang, H. Chen, Direct Electrochemical Observation of Glucosidase Activity in Isolated Single Lysosomes from A Living Cell. *PNAS* 2018, *115* (16), 4087-4092.
- [140] R. T. Kurulugama, D. O. Wipf, S. A. Takacs, S. Pongmayteegul, P. A. Garris, J. E. Baur, Scanning Electrochemical Microscopy of Model Neurons: Constant Distance Imaging. *Anal. Chem.* 2005, 77 (4), 1111-1117.
- [141] F. P. Filice, M. S. Li, J. M. Wong, Z. Ding, The Effects of Long Duration Chronic Exposure to Hexavalent Chromium on Single Live Cells Interrogated by Scanning Electrochemical Microscopy. J. Inorg. Biochem. 2018, 182, 222-229.
- [142] D. Polcari, J. A. Hernández-Castro, K. Li, M. Geissler, J. Mauzeroll, Determination of the Relationship between Expression and Functional Activity of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 Using Scanning Electrochemical Microscopy. *Anal. Chem.* 2017, 89 (17), 8988-8994.
- [143] Y. Li, K. Hu, Y. Yu, S. A. Rotenberg, C. Amatore, M. V. Mirkin, Direct Electrochemical Measurements of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Nontransformed and Metastatic Human Breast Cells. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139 (37), 13055-13062.
- [144] A. Soldà, G. Valenti, M. Marcaccio, M. Giorgio, P. G. Pelicci, F. Paolucci, S. Rapino, Glucose and Lactate Miniaturized Biosensors for SECM-Based High-Spatial Resolution Analysis: A Comparative Study. ACS Sens. 2017, 2 (9), 1310-1318.
- [145]C. Chen, Y. Zhou, L. A. Baker, Scanning Ion Conductance Microscopy. Annu. Rev. Anal. Chem. 2012, 5 (1), 207-228.
- [146] D. Perry, A. Page, B. Chen, B. G. Frenguelli, P. R. Unwin, Differential-Concentration Scanning Ion Conductance Microscopy. *Anal. Chem.* 2017, 89 (22), 12458-12465.
- [147] D. Perry, B. Paulose Nadappuram, D. Momotenko, P. D. Voyias, A. Page, G. Tripathi,
 B. G. Frenguelli, P. R. Unwin, Surface Charge Visualization at Viable Living Cells. J. Am. Chem. Soc. 2016, 138 (9), 3152-3160.
- [148] Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y. E. Korchev, T. Matsue, Simultaneous Noncontact Topography and Electrochemical Imaging by SECM/SICM Featuring Ion Current Feedback Regulation. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132 (29), 10118-10126.
- [149] M. Kang, D. Momotenko, A. Page, D. Perry, P. R. Unwin, Frontiers in Nanoscale Electrochemical Imaging: Faster, Multifunctional, and Ultrasensitive. *Langmuir* 2016,

32 (32), 7993-8008.

- [150] L. S. Dolci, S. Zanarini, L. Della Ciana, F. Paolucci, A. Roda, Development of a New Device for Ultrasensitive Electrochemiluminescence Microscopy Imaging. *Anal. Chem.* 2009, 81 (15), 6234-6241.
- [151] J. Zhou, G. Ma, Y. Chen, D. Fang, D. Jiang, H. Y. Chen, Electrochemiluminescence Imaging for Parallel Single-Cell Analysis of Active Membrane Cholesterol. *Anal. Chem.* 2015, 87 (16), 8138-8143.
- [152] R. Wang, D. Fang, Detection of Phosphatidylserine in the Plasma Mmbrane of Single Apoptotic Cells Using Electrochemiluminescence. *RSC Adv.* 2017, 7 (21), 12969-12972.
- [153] Y. Chen, Y. Liu, J. Xia, J. Liu, D. Jiang, D. Jiang, Analysis of Sphingomyelin in Plasma Membrane at Single Cells Using Luminol Electrochemiluminescence. *RSC Adv.* 2016, 6 (12), 9518-9521.
- [154] J. Xu, P. Huang, Y. Qin, D. Jiang, H. Y. Chen, Analysis of Intracellular Glucose at Single Cells Using Electrochemiluminescence Imaging. *Anal. Chem.* 2016, 88 (9), 4609-4612.
- [155] J. Xia, J. Zhou, R. Zhang, D. Jiang, D. Jiang, Gold-coated Polydimethylsiloxane Microwells for High-throughput Electrochemiluminescence Analysis of Intracellular Glucose at Single Cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, 410 (20), 4787-4792.
- [156] J. Xu, D. Jiang, Y. Qin, J. Xia, D. Jiang, H. Y. Chen, C₃N₄ Nanosheet Modified Microwell Array with Enhanced Electrochemiluminescence for Total Analysis of Cholesterol at Single Cells. *Anal. Chem.* 2017, 89 (4), 2216-2220.
- [157] G. Liu, C. Ma, B. Jin, Z. Chen, J. Zhu, Direct Electrochemiluminescence Imaging of A Single Cell on A Chitosan Film Modified Electrode. *Anal. Chem.* 2018, 90 (7), 4801-4806.
- [158] G. Liu, B. Jin, C. Ma, Z. Chen, J. Zhu, Potential-Resolved Electrochemiluminescence Nanoprobes for Visual Apoptosis Evaluation at Single-Cell Level. *Anal. Chem.* 2019, 91 (9), 6363-6370.
- [159] J. Zhang, R. Jin, Y. Chen, D. Fang, D. Jiang, Enhanced Electrochemiluminescence at Single Lithium Iron Phosphate Nanoparticles for the Local Sensing of Hydrogen Peroxide Efflux from Single Living Cell under a Low Voltage. *Sens. Actuators, B* 2020, 129208.
- [160] R. He, H. Tang, D. Jiang, H. Chen, Electrochemical Visualization of Intracellular Hydrogen Peroxide at Single Cells. *Anal. Chem.* 2016, 88 (4), 2006-2009.
- [161] Y. Wang, R. Jin, N. Sojic, D. Jiang, H. Chen, Intracellular Wireless Analysis of Single Cells by Bipolar Electrochemiluminescence Confined in a Nanopipette. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020, 59 (26), 10416-10420.
- [162] H. Zhang, W. Gao, Y. Liu, Y. Sun, Y. Jiang, S. Zhang, Electrochemiluminescence-Microscopy for microRNA Imaging in Single Cancer Cell Combined with Chemotherapy-Photothermal Therapy. *Anal. Chem.* 2019, 91 (19), 12581-12586.
- [163] H. Zhang, B. Li, Z. Sun, H. Zhou, S. Zhang, Integration of Intracellular Telomerase Monitoring by Electrochemiluminescence Technology and Targeted Cancer Therapy

by Reactive Oxygen Species. Chem. Sci. 2017, 8 (12), 8025-8029.

- [164] G. Valenti, S. Scarabino, B. Goudeau, A. Lesch, M. Jovic, E. Villani, M. Sentic, S. Rapino, S. Arbault, F. Paolucci, N. Sojic, Single Cell Electrochemiluminescence Imaging: from the Proof-of-Concept to Disposable Device-Based Analysis. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139 (46), 16830-16837.
- [165] S. Voci, B. Goudeau, G. Valenti, A. Lesch, M. Jovic, S. Rapino, F. Paolucci, S. Arbault, N. Sojic, Surface-Confined Electrochemiluminescence Microscopy of Cell Membranes. J. Am. Chem. Soc. 2018, 140 (44), 14753-14760.
- [166] N. Wang, H. Gao, Y. Li, G. Li, W. Chen, Z. Jin, J. Lei, Q. Wei, H. Ju, Dual Intramolecular Electron Transfer for In Situ Coreactant-Embedded Electrochemiluminescence Microimaging of Membrane Protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60 (1), 197-201.
- [167] J. Zhang, R. Jin, D. Jiang, H. Chen, Electrochemiluminescence-Based Capacitance Microscopy for Label-Free Imaging of Antigens on the Cellular Plasma Membrane. J. Am. Chem. Soc. 2019, 141 (26), 10294-10299.
- [168] C. Ma, S. Wu, Y. Zhou, H. Wei, J. Zhang, Z. Chen, J. Zhu, Y. Lin, W. Zhu, Bio-Coreactant-Enhanced Electrochemiluminescence Microscopy of Intracellular Structure and Transport. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60 (9), 4907-4914.
- [169] C. Ma, M. Wang, H. Wei, S. Wu, J. Zhang, J. Zhu, Z. Chen, Catalytic Route Electrochemiluminescence Microscopy of Cell Membranes with Nitrogen-Doped Carbon Dots as Nano-Coreactants. *Chem. Commun.* 2021, 57 (17), 2168-2171.
- [170] D. Han, B. Goudeau, D. Manojlovic, D. Jiang, D. Fang, N. Sojic, Electrochemiluminescence Loss in Photobleaching. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60 (14), 7686-7690.
- [171] F. Zinna, S. Voci, L. Arrico, E. Brun, A. Homberg, L. Bouffier, T. Funaioli, J. Lacour, N. Sojic, L. Di Bari, Circularly-Polarized Electrochemiluminescence from a Chiral Bispyrene Organic Macrocycle. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (21), 6952-6956.
- [172] N. T. N. Phan, X. Li, A. G. Ewing, Measuring Synaptic Vesicles Using Cellular Electrochemistry and Nanoscale Molecular Imaging. *Nat. Rev. Chem.* 2017, 1 (6), 1-18.
- [173] X. Liu, A. Savy, S. Maurin, L. Grimaud, F. Darchen, D. Quinton, E. Labbe, O. Buriez, J. Delacotte, F. Lemaitre, M. Guille-Collignon, A Dual Functional Electroactive and Fluorescent Probe for Coupled Measurements of Vesicular Exocytosis with High Spatial and Temporal Resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (9), 2366-2370.
- [174] A. Meunier, O. Jouannot, R. Fulcrand, I. Fanget, M. Bretou, E. Karatekin, S. Arbault, M. Guille, F. Darchen, F. Lemaître, C. Amatore, Coupling Amperometry and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy at ITO Surfaces for Monitoring Exocytosis of Single Vesicles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50 (22), 5081-5084.
- [175] F. Li, Y. Pang, X. Lin, H. Cui, Determination of Noradrenaline and Dopamine in Pharmaceutical Injection Samples by Inhibition Flow Injection Electrochemiluminescence of Ruthenium Complexes. *Talanta* 2003, 59 (3), 627-636.
- [176] J. Kang, X. Yin, X. Yang, E. Wang, Electrochemiluminescence Quenching as An

Indirect Method for Detection of Dopamine and Epinephrine with Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* **2005**, *26* (9), 1732-1736.

- [177] C. J. Miller, P. McCord, A. J. Bard, Study of Langmuir Monolayers of Ruthenium Complexes and Their Aggregation by Electrogenerated Chemiluminescence. *Langmuir* 1991, 7 (11), 2781-2787.
- [178] L. Zhang, Z. Xu, S. Dong, Electrogenerated Chemiluminescence Biosensor Based on Ru(bpy)₃²⁺ and Dehydrogenase Immobilized in Sol–Gel/Chitosan/Poly(sodium 4styrene sulfonate) Composite Material. *Anal. Chim. Acta* 2006, 575 (1), 52-56.
- [179] Z. Guo, Y. Shen, M. Wang, F. Zhao, S. Dong, Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence of SiO₂ Nanoparticles/Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Multilayer Films on Indium Tin Oxide Electrodes. *Anal. Chem.* 2004, 76 (1), 184-191.
- [180] X. Sun, Y. Du, L. Zhang, S. Dong, E. Wang, Luminescent Supramolecular Microstructures Containing Ru(bpy)₃²⁺: Solution-Based Self-Assembly Preparation and Solid-State Electrochemiluminescence Detection Application. *Anal. Chem.* 2007, 79 (6), 2588-2592.
- [181] I. Rubinstein, A. J. Bard, Polymer Films on Electrodes. 4. Nafion-Coated Electrodes and Electrogenerated Chemiluminescence of Surface-Attached Tris(2,2'bipyridine)ruthenium(2+). J. Am. Chem. Soc. 1980, 102 (21), 6641-6642.
- [182] I. Rubinstein, A. J. Bard, Polymer films on electrodes. 5. Electrochemistry and Chemiluminescence at Nafion-Coated Electrodes. J. Am. Chem. Soc. 1981, 103 (17), 5007-5013.
- [183] W. Guo, Z. Cao, Y. Liu, B. Su, Electrochemiluminescence of a Vinyl-Functionalized Ruthenium Complex and Its Monolayer Formed through the Photoinduced Thiol-Ene Click Reaction. *ChemElectroChem* 2017, 4 (7), 1763-1767.
- [184] Z. Teng, G. Zheng, Y. Dou, W. Li, C. Y. Mou, X. Zhang, A. M. Asiri, D. Zhao, Highly Ordered Mesoporous Silica Films with Perpendicular Mesochannels by A Simple Stober-Solution Growth Approach. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51 (9), 2173-2177.
- [185] Y. Liu, D. Shen, G. Chen, A. A. Elzatahry, M. Pal, H. Zhu, L. Wu, J. Lin, D. Al-Dahyan,
 W. Li, D. Zhao, Mesoporous Silica Thin Membranes with Large Vertical Mesochannels for Nanosize-Based Separation. *Adv. Mater.* 2017, *29* (35), 1702274-1702281.
- [186] X. Lin, Q. Yang, L. Ding, B. Su, Ultrathin Silica Membranes with Highly Ordered and Perpendicular Nanochannels for Precise and Fast Molecular Separation. ACS Nano 2015, 9 (11), 11266-11277.
- [187] F. Yan, B. Su, Tailoring Molecular Permeability of Nanochannel-Micelle Membranes for Electrochemical Analysis of Antioxidants in Fruit Juices without Sample Treatment. *Anal. Chem.* 2016, 88 (22), 11001-11006.
- [188] Q. Sun, F. Yan, L. Yao, B. Su, Anti-Biofouling Isoporous Silica-Micelle Membrane Enabling Drug Detection in Human Whole Blood. *Anal. Chem.* 2016, 88 (17), 8364-8368.
- [189] F. Yan, W. Zheng, L. Yao, B. Su, Direct Electrochemical Analysis in Complex Samples Using ITO Electrodes Modified with Permselective Membranes Consisting of

Vertically Ordered Silica Mesochannels and Micelles. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (100), 17736-17739.

- [190] C. Yang, M. Liu, F. Bai, Z. Guo, H. Liu, G. Zhong, H. Peng, W. Chen, X. Lin, Y. Lei, A. Liu, An Electrochemical Biosensor for Sensitive Detection of Nicotine-Induced Dopamine Secreted by PC12 cells. J. Electroanal. Chem. 2019, 832, 217-224.
- [191] I. D. Campbell, M. J. Humphries, Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2011**, *3* (3), a004994.
- [192] J. C. Adams, Cell-Matrix Contact Structures. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 2001, 58 (3), 371-392.
- [193] A. L. Berrier, K. M. Yamada, Cell-Matrix Adhesion. J. Cell. Physiol. 2007, 213 (3), 565-573.
- [194] B. Moreira, J. Tuoriniemi, N. Kouchak Pour, L. Mihalcikova, G. Safina, Surface Plasmon Resonance for Measuring Exocytosis from Populations of PC12 Cells: Mechanisms of Signal Formation and Assessment of Analytical Capabilities. *Anal. Chem.* 2017, 89 (5), 3069-3077.
- [195] K. F. Giebel, C. Bechinger, S. Herminghaus, M. Riedel, P. Leiderer, U. Weiland, M. Bastmeyer, Imaging of Cell/Substrate Contacts of Living Cells with Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Biophys. J.* 1999, 76 (1), 509-516.
- [196] R. Rezakhaniha, A. Agianniotis, J. T. C. Schrauwen, A. Griffa, D. Sage, C. V. C. Bouten, F. N. van de Vosse, M. Unser, N. Stergiopulos, Experimental Investigation of Collagen Waviness and Orientation in the Arterial Adventitia Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2012, *11* (3), 461-473.
- [197] T. B. Saw, A. Doostmohammadi, V. Nier, L. Kocgozlu, S. Thampi, Y. Toyama, P. Marcq, C. T. Lim, J. M. Yeomans, B. Ladoux, Topological Defects in Epithelia Govern Cell Death and Extrusion. *Nature* 2017, 544, 212-2116.
- [198] N. Kebede, P. S. Francis, G. J. Barbante, C. F. Hogan, Electrogenerated Chemiluminescence of Tris(2,2' bipyridine)ruthenium(II) Using Common Biological Buffers as Co-reactant, pH Buffer and Supporting Electrolyte. *Analyst* 2015, 140 (21), 7142-7145.
- [199] L. Zhou, H. Ding, F. Yan, W. Guo, B. Su, Electrochemical Detection of Alzheimer's Disease Related Substances in Biofluids by Silica Nanochannel Membrane Modified Glassy Carbon Electrodes. *Analyst* 2018, 143 (19), 4756-4763.
- [200] Z. Zhou, W. Guo, L. Xu, Q. Yang, B. Su, Two Orders-of-Magnitude Enhancement in the Electrochemiluminescence of Ru(bpy)₃²⁺ by Vertically Ordered Silica Mesochannels. *Anal. Chim. Acta* 2015, 886, 48-55.
- [201] W. Guo, X. Lin, F. Yan, B. Su, Vertically Ordered Silica Mesochannel Modified Bipolar Electrode for Electrochemiluminescence Imaging Analysis. *ChemElectroChem* 2016, 3 (3), 480-486.
- [202] S. Mao, W. Zhang, Q. Huang, M. Khan, H. Li, K. Uchiyama, J. M. Lin, In Situ Scatheless Cell Detachment Reveals Correlation Between Adhesion Strength and Viability at Single-Cell Resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57 (1), 236-240.

- [203] M. Burute, M. Thery, Spatial Segregation Between Cell-Cell and Cell-Matrix Adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012, 24 (5), 628-636.
- [204] Y. Zu, A. J. Bard, Electrogenerated Chemiluminescence. 66. The Role of Direct Coreactant Oxidation in the Ruthenium Tris(2,2')bipyridyl/Tripropylamine System and the Effect of Halide Ions on the Emission Intensity. *Anal. Chem.* 2000, 72 (14), 3223-3232.
- [205] X. Peng, L. E. Cuff, C. D. Lawton, K. A. DeMali, Vinculin Regulates Cell-Surface E-Cadherin Expression by Binding to β-Catenin. J. Cell Sci. 2010, 123 (4), 567-577.

作者简介及攻博期间取得的研究成果

作者简介

丁昊, 女, 1995年8月出生于山东省济南市。

2013年9月至2017年6月在浙江大学化学系学习,获理学学士学位。

2017年9月至2021年9月在浙江大学化学系学习,攻读博士学位。

攻读博士学位期间发表和待发表的学术论文

- [1] <u>Hao Ding</u>, Weiliang Guo*, Lurong Ding and Bin Su*, Confined Electrochemiluminescence at Microtube Electrode Ensembles for Local Sensing of Single Cells, *Chinese Journal of Chemistry*, 2021, 39: 2911.
- [2] <u>Hao Ding</u>, Ping Zhou, Wenxuan Fu, Lurong Ding, Weiliang Guo and Bin Su*, Spatially Selective Imaging of Cell-Matrix and Cell-Cell Junctions by Electrochemiluminescence, *Angewandte Chemie International Edition*, **2021**, 60(21): 11769-11773.
- [3] <u>Hao Ding</u>⁺, Weiliang Guo⁺ and Bin Su*, Imaging Cell-Matrix Adhesions and Collective Migration of Living Cells by Electrochemiluminescence Microscopy, *Angewandte Chemie International Edition*, **2020**, 59(1): 449-456. (⁺: equal contribution)
- [4] <u>Hao Ding</u>, Weiliang Guo, Ping Zhou and Bin Su*, Nanocage-Confined Electrochemiluminescence for the Detection of Dopamine Released from Living Cells, *Chemical Communications*, 2020, 56(59): 8249-8252.
- [5] <u>Hao Ding</u>, Weiliang Guo and Bin Su*, Electrochemiluminescence Single Cell Analysis: Intensity- and Imaging-based Methods, *ChemPlusChem*, **2020**, 85(4): 725-733.
- [6] <u>丁昊</u>,晏菲,郑雯静,郭维亮,苏彬*,二氧化硅纳米均孔膜修饰电极检测化妆水中的抗氧化剂,应用化学,2017,34(11):1307-1313.
- [7] 丁鹭榕,傅文轩,<u>丁昊</u>,周萍,郭维亮*,苏彬*,电化学发光显微成像:从机理 解析到生化分析,分析化学,2021,49(7):1188-1197.

- [8] Weiliang Guo, Ping Zhou, Lei Sun, <u>Hao Ding</u> and Bin Su*, Microtube Electrodes for Imaging the Electrochemiluminescence Layer and Deciphering Reaction Mechanism, *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(4): 2089-2093.
- [9] Weiliang Guo, <u>Hao Ding</u>, Ping Zhou, Yafeng Wang and Bin Su*, Electrochemiluminescence Waveguide in Single Crystalline Molecular Wires, *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(17): 6745-6749.
- [10] Jingjing Zhang, <u>Hao Ding</u>, Shengyu Zhao, Dechen Jiang* and Hongyuan Chen, Confined electrochemiluminescence in vertically ordered silica mesochannels for the imaging of hydrogen peroxide released from single cells, *Electrochemistry Communications*, 2019, 98: 38-42.
- [11] Weiliang Guo, <u>Hao Ding</u>, Chaoyue Gu, Yanhuan Liu, Xuecheng Jiang, Bin Su* and Yuanhua Shao, Potential-resolved Multicolor Electrochemiluminescence for Multiplex Immunoassay in a single Sample, *Journal of the American Chemical Society*, **2018**, 140(46): 15904-15915.
- [12] Weiliang Guo, <u>Hao Ding</u> and Bin Su*, Electrochemiluminescence of Metallated Porous Organic Polymers, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2018**, 818: 176-180.
- [13] Lin Zhou, <u>Hao Ding</u>, Fei Yan, Weiliang Guo and Bin Su*, Electrochemical Detection of Alzheimer's Disease Related Substances in Biofluids by Silica Nanochannel Membrane Modified Glassy Carbon Electrodes, *Analyst*, **2018**, 143(19): 4756-4763.

会议论文

- [1] 电化学发光细胞-基质黏着动态成像和细胞集体迁移分析(全国电分析化学学术会 议),南京,2020.
- [2] Imaging Cell-Matrix Adhesions and Collective Migration of Living Cells by Electrochemiluminescence Microscopy (BCEIA), Beijing, 2019.