

ICP - Mass Spectrometry

作者:

Ruth Merrified¹Jamie Lead¹Chady Stephan²

¹Center for Environmental NanoScience and Risk (CENR), Arnold School of Public Health
University of South Carolina, SC

²PerkinElmer Inc.
Shelton, CT

利用单细胞 ICP-MS 监测淡水藻类对金纳米颗粒和金离子的摄入行为

引言

对于人类健康和环境安全来说，监测单细胞对于金属离子和纳米颗粒 (NPs) 的摄入

都是非常重要的¹⁻³。目前，利用 ICP-MS 对于细胞内金属含量的常规测定方法为：通过离心或过滤将细胞从其天然培养介质中分离出来，再用新鲜介质进行清洗，然后用酸消解后上机检测⁴。采用这种方法可以得到一定数量细胞中金属的总量，而无法获得单个细胞的相关数据，单个细胞内金属的含量只能通过假定所有细胞内含有的金属颗粒或离子浓度相同，通过计算获得。而通过透射电子显微镜 (TEM)⁵、扫描电子显微镜 (SEM)⁶ 或荧光示踪法⁷ 的辅助表征，证明利用这种方法获得的单细胞数据并不准确。如果利用上述显微方法对细胞摄入纳米颗粒进行表征，又存在耗时长、人为误差大的缺点。而且，TEM 和 SEM 法只能定性，也容易由于纳米颗粒标示物化学性质不稳定而导致假阳性结果。

相比于这些常规方法，全新的基于单颗粒 ICP-MS (SP-ICP-MS)^{8,9} 的单细胞 ICP-MS (SC-ICP-MS) 具有可以精确地对单个细胞中金属离子或纳米颗粒进行定量的优势，一次性检测的细胞数量也大于显微镜方法。与 SP-ICP-MS 类似，SC-ICP-MS 是基于利用等离子体将单个细胞完全离子化后对离子含量进行测定来获得结果的。

进行单颗粒和单细胞检测对 ICP-MS 的要求是相同的：必须具有非常高的数据采集速率，才可以有足够高的灵敏度从而不遗漏金属离子或纳米颗粒的检测信号。为了达到这一要求，小于 75 μ s 的驻留时间是仪器必须具备的¹⁰。具备了这一性能，SC-ICP-MS 就可以快速检测单个细胞中的金属离子或纳米颗粒含量（低至阿克 (ag)/ 细胞），以及含有金属成分的细胞的数量。当总细胞数量已知（利用细胞计数仪测得），就可以计算出含有金属成分的细胞所占百分比，一次检测获得的信息量要比常规方法更为丰富。所以，SC-ICP-MS 可以用于监控单细胞对金属离子和纳米颗粒的摄入和排出行为，从而对生物曝露风险进行研究和评估。由于过程中损耗的细胞数量少，所以 SC-ICP-MS 要比常规方法所需的细胞样品少。

本文利用 SC-ICP-MS 技术测定单个淡水中藻类 (*Cyptomonas ovata*) 对金离子和纳米颗粒的摄入行为。

实验

样品与样品制备

细胞培养液的浓度为 200,000 细胞 /mL，分别曝露于不同浓度的金离子和金纳米颗粒 (60 nm, NIST 8013) 溶液中，具体培养条件见表 1。藻类曝露过程研究在 20 °C 下进行，以光照 12 小时、黑暗 12 小时为一个循环，循环三次，共 72 小时。

在曝露过程中，每隔一段时间取 1 mL 样品用于分析。在分析之前，将样品中的细胞从曝露培养环境中分离出来，并用培养液清洗三次。清洗流程包括：离心 (300 g 离心力) 15 分钟，然后重新将沉积物分散至 1 mL 新鲜的含有金离子或纳米颗粒的培养液中。流程图见图 1，清洗后细胞的回收率为 $43.8 \pm 8.6\%$ 。

仪器条件

PerkinElmer NexION ICP-MS, Syngistix™ 操作软件配备单细胞模块，可实现实时数据监控和处理¹¹。

仪器参数见表 2，操作软件的单细胞模块界面见图 2。由于细胞比常规的雾化器产生的气溶胶颗粒大很多，所以常规的雾室会影响细胞进入等离子体的传输效率。为了解决这一困难，我们设计了专利的 Asperon™ 单细胞雾室，以提高细胞进入等离子体的传输效率。这种特殊雾室的设计主要是基于单细胞样品气溶胶在雾室中的气流状态：在雾室上特意设计了一个双通道辅助气入口，向雾室内部以雾室壁切线方向吹入气体，以防止细胞碰到或者粘附在雾室壁上；雾化器内还安置了一根带有多个微通道的内管，辅助气流经这些微通道，可以有效防止液体沉积在气路通道上；为了达到最大的细胞传输效率，雾室采用层流设计。

标准溶液

以离子态和纳米颗粒态标准溶液对体系进行了校准，金属离子标准溶液是以在藻类介质中将标液稀释至 1、2、3 ppb 得到的；金纳米颗粒标准溶液是以将 10、30、60 nm NIST Au 纳米颗粒标准样品（分别为 NIST 8011, 8012, 8013）在藻类介质中稀释至 50' 000 part/mL 得到的。以 60 nm Au 颗粒表征了传输效率。

表 1. 曝露过程研究

处理流程	细胞浓度 (细胞数 /mL)	Au 离子浓度 (ppb)	Au 纳米颗粒浓度 (part/mL)
细胞控制	200,000	0	0
纳米颗粒控制	0	0	200,000
溶解离子控制	0	1	0
纳米颗粒水平 1	200,000	0	200,000
纳米颗粒水平 2	200,000	0	400,000
纳米颗粒水平 3	200,000	0	600,000
离子水平 1	200,000	1	0
离子水平 2	200,000	2	0
离子水平 3	200,000	3	0

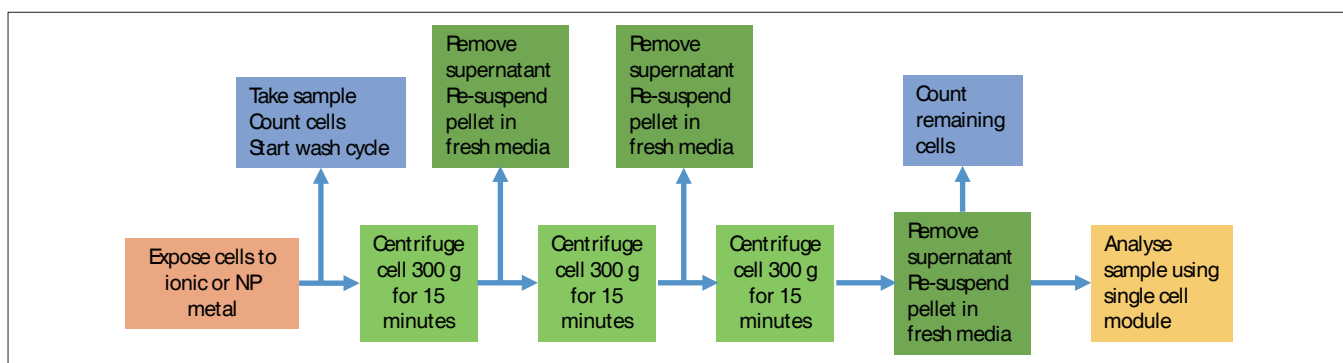


图 1. 样品预处理流程

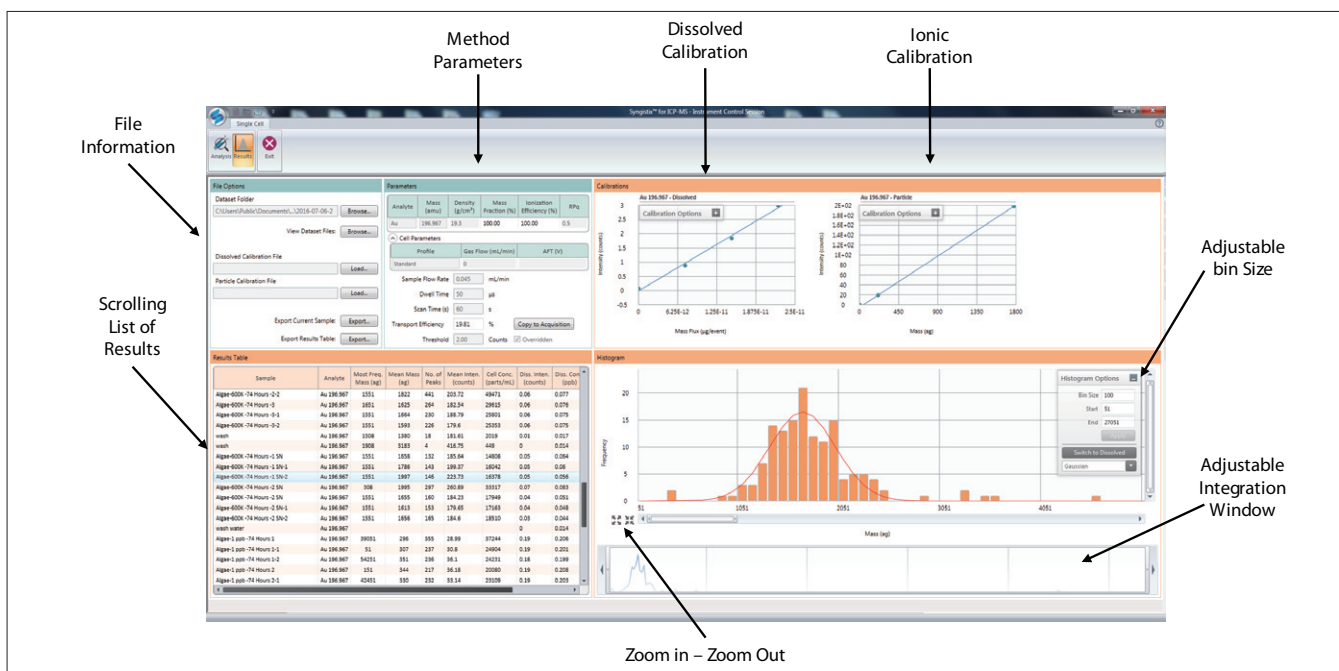


图 2. Syngistix 软件单细胞模块操作界面

表 2. NexION 2000 ICP-MS 操作条件

参数 / 配件	型号 / 参数值
进样速率	0.03-0.04 mL/min
雾化器	MEINHARD® HEN
雾室	Asperon
中心管	2.0 mm 内径, 石英
RF 功率	1600 W
雾化气流量	0.36 L/min
辅助气流量	0.7 L/min
待测元素	¹⁹⁷ Au

结果与讨论

在对细胞输入纳米颗粒的行为进行表征之前，必须先表征金离子和纳米颗粒对细胞活性的影响。这可以通过将细胞暴露在不同浓度的金离子或纳米颗粒培养液中进行观察。利用细胞计数器对培养液中的细胞含量进行监控的结果见图 3，可见细胞在暴露于金离子（图 3A）和金纳米颗粒（图 3B）74 小时后，对照对比样品，细胞的含量并没有显著差别。由此可以看出，金离子和纳米颗粒不会对细胞的活性产生影响。

进样过程细胞存活率

本次实验中使用的样本为 *Cyptomonas ovata*，大小为 20-30 μm 。当细胞被喷入雾室之后，它们将承受较常规状态更高的压力，这一压力的大小由雾化器形状、进样速率、雾化气流量等因素决定。为评估细胞存活率，

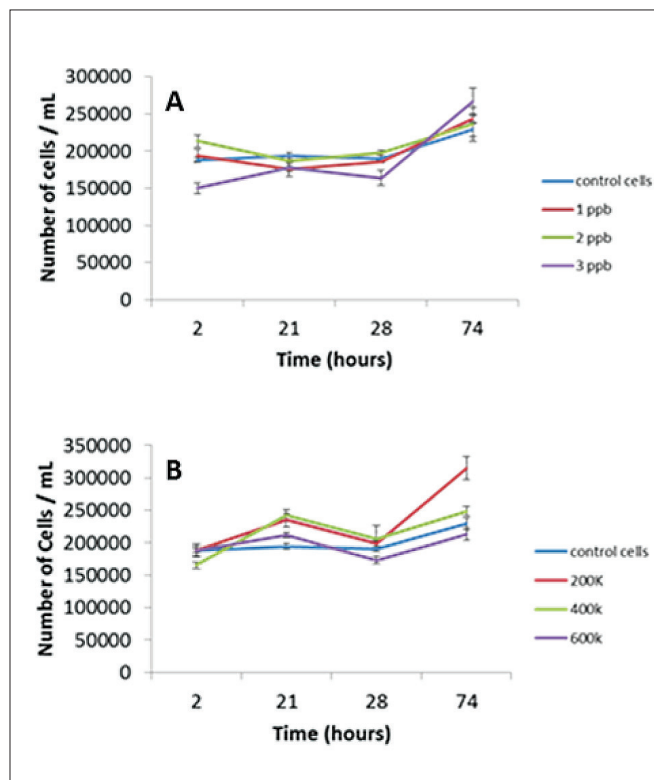


图 3. 细胞在暴露于金离子 (A) 和金纳米颗粒 (B) 74 小时后的每毫升数量

利用显微镜对不同进样速率和雾化气流量下雾化后完整细胞数量进行了观察，结果见图 4，可见在 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 进样速率和 0.5 mL/min 雾化气流量下，细胞在雾化后能够 100% 保持完整。

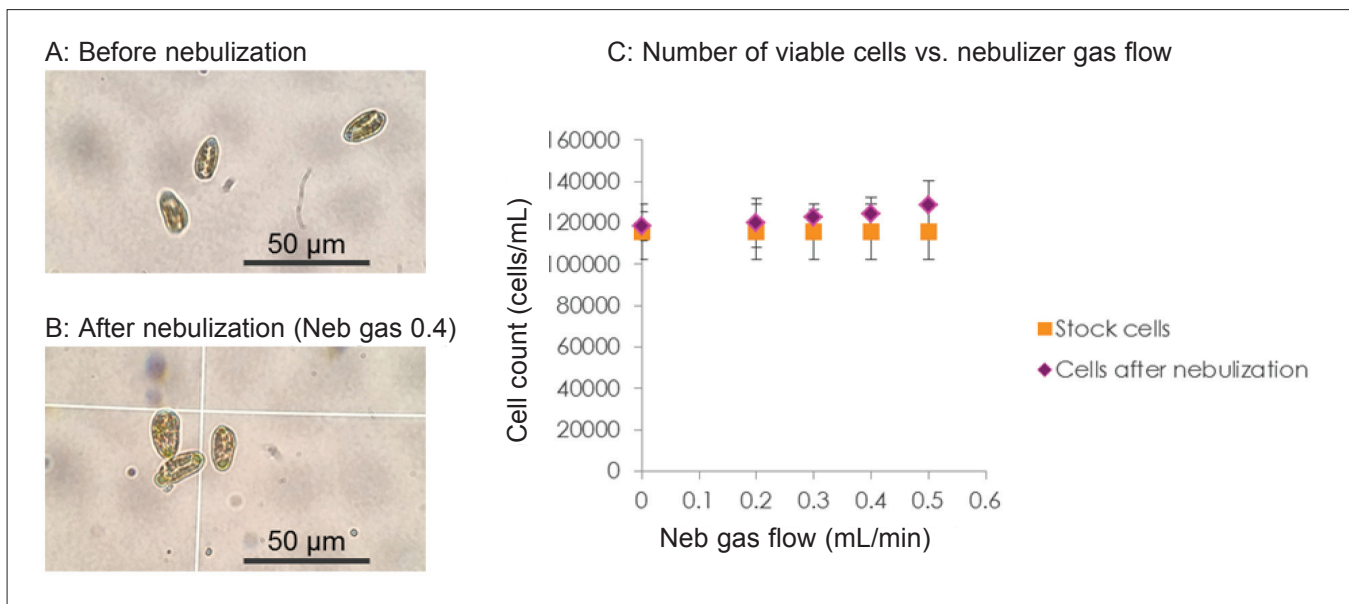


图 4. (A)、(B)Cryptomonas ovata 细胞在雾化之前和之后的光学显微镜照片，雾化气流量为 0.4 L/min，进样速率为 0.04 mL/min；(C) 在不同雾化气流量下细胞经雾化的存活量（未破损细胞数量）

将金纳米颗粒从细胞培养介质中去除

确认清洗后细胞中的金属检测信号是来自于细胞内部，而不是来自于细胞外部的培养液残留是非常重要的。这就要首先确认细胞在经历清洗后，培养液内无纳米颗粒的残留。按照图 1 的流程对细胞清洗 3 次，然后利用 SC-ICP-MS 对每次清洗完毕后的上清液进行检测，结果见图 5。可见，纳米颗粒含量随着清洗次数的增加而减小，第三次清洗完成后已经检测不到纳米颗粒残留。图 5(D) 中的表格给出了每次清洗后的颗粒数量，通过它可以确认经过 3 次清洗，对细胞的检测信号都来自于细胞内部。

由于细胞暴露实验需进行 74 小时，期间图 5 所示的实验过程将会重复多次，所得结果都与图 5 所示的结果相似，既没有发现金纳米颗粒的信号峰变宽或变窄，也没有检测到金离子信号，由此可以得到金纳米颗粒的粒径分布保持恒定。可见，金纳米颗粒没有出现溶解或团簇的现象。由此可以推断，如果细胞内部的纳米颗粒尺寸或尺寸分布与上清液中不同，这是由于细胞内部对纳米颗粒的作用所导致的，与外界因素无关。

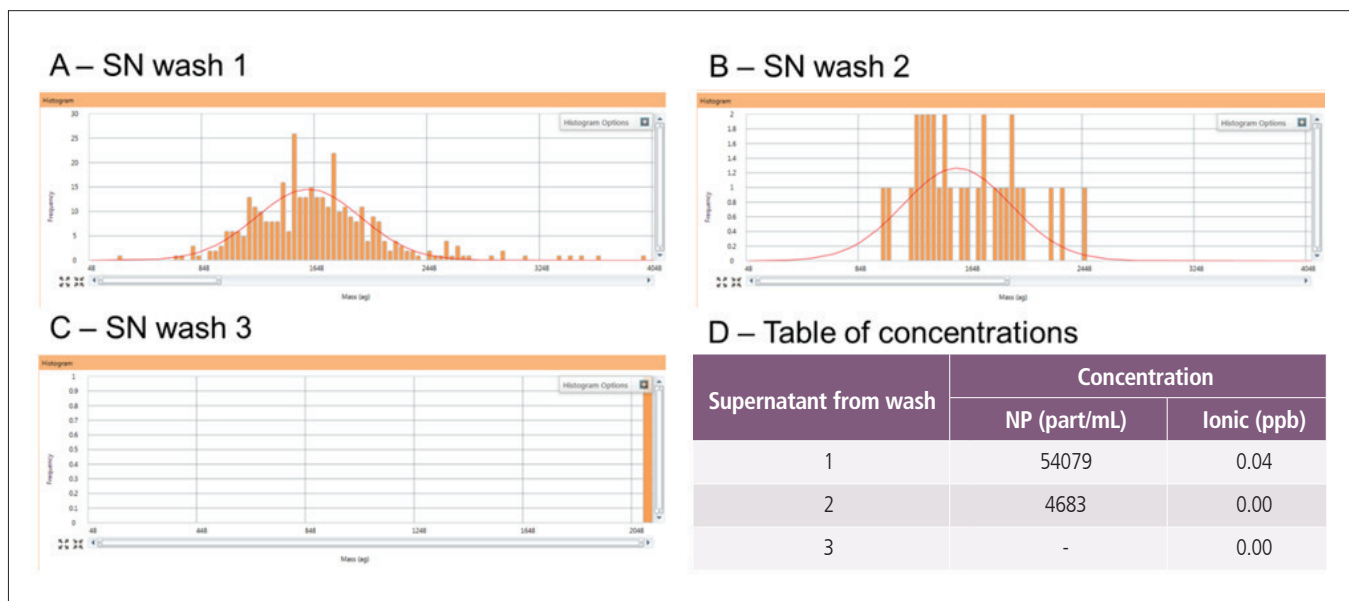


图 5. 第一次清洗 (A)、第二次清洗 (B)、第三次清洗 (C) 后上清液的检测信号；(D) 为三次清洗后纳米颗粒的数量及离子浓度

SC-ICP-MS 控制组实验

由表 1 的实验条件，利用 SC-ICP-MS 对三个控制组进行了表征，第一组为空白培养液组，第二组为金离子培养液组，第三组为金纳米颗粒培养液（60 nm，50,000 part/mL）组，所得结果见图 6。可见，空白组和离子组中没有检测到金纳米颗粒（图 6(A) 和 (B)），纳米颗粒组在横坐标 1800 ag/颗粒处可见一个符合高斯分布的信号峰（图 6(C)）。根据金的原子量为 197，且金颗粒为球形，1800 ag 与 56.26 nm 的金颗粒相对应，与 TEM 观测到的 NIST 标准物质尺寸相符（56 nm）。经过积分，测得颗粒的浓度为 49,500 part/mL，与加入量（50,000 part/mL）相符。由此可见，经过曝露实验，测得的金的信号均由细胞摄入的金纳米颗粒产生，未曝露的细胞不产生检测信号。此外，结果再次确认了细胞培养介质不会对金纳米颗粒的粒径和粒径分布产生影响。

细胞对纳米颗粒的摄入

SC-ICP-MS 的主要优势之一在于不仅能测定含有纳米颗粒的细胞的数量，还能够确认含有一个或多个纳米颗粒的细胞的比例，相关结果见图 7。在图 7 (A)-(D) 中，横坐标 1700 ag 附近有一个很明显的峰值，代表细胞内含有一个纳米颗粒（1NP/1C 代表一个细胞内含有一个纳米颗粒）。前面提到过，单个 60 nm 金颗粒对应着约 1800 ag，所以图 7 中的 1700 ag 左右也

可以代表单个 60 nm 金颗粒。根据推断，1700 ag 相较于 1800 ag，质量数上的微小差异是由于纳米颗粒存在于细胞内部导致的，这可以通过 TEM 的表征来证实。随着曝露时间从 2 小时（图 7(A)）到 74 小时（图 7(D)）3400 ag 处和 5200 ag 处出现了信号峰，代表细胞内出现了两个和三个纳米颗粒（图中分别标为 2NP/1C 和 3NP/1C）。

由于 SC-ICP-MS 具有测定每个细胞含有的纳米颗粒数量的功能，所以可以对不同培养液纳米颗粒浓度中，含有不同数量纳米颗粒的细胞的百分含量随时间的变化进行追踪。图 8 为不同培养液中起始纳米颗粒浓度下，每个细胞中的纳米颗粒数量随时间（从 2 到 74 小时）变化的柱状图。可见，无论是随着曝露时间的增加，还是培养液纳米颗粒浓度增加（从 200,000 到 600,000 part/mL），含有 1 个纳米颗粒的细胞数量都增加。相同的趋势也出现在培养液纳米颗粒浓度为 600,000 part/mL 时，含有两个和三个纳米颗粒的细胞数量。当培养液浓度为 200,000 part/mL 时，含有两个及以上纳米颗粒的细胞数量太少，其数量跟曝露时间的相关性不明显。

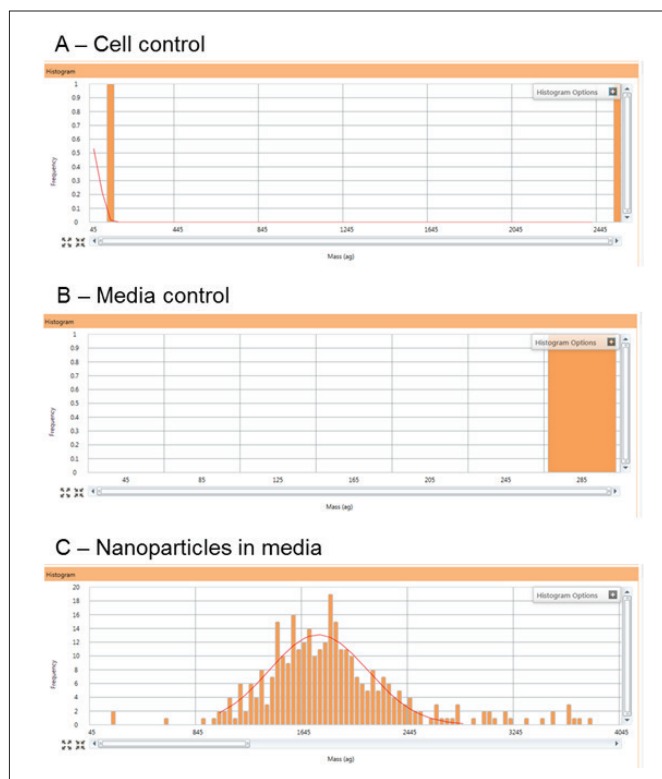


图 6. 空白培养液组 (A)，金离子培养液组 (B)，金纳米颗粒培养液组 (60 nm，50,000 part/mL) (C)，典型信号响应值

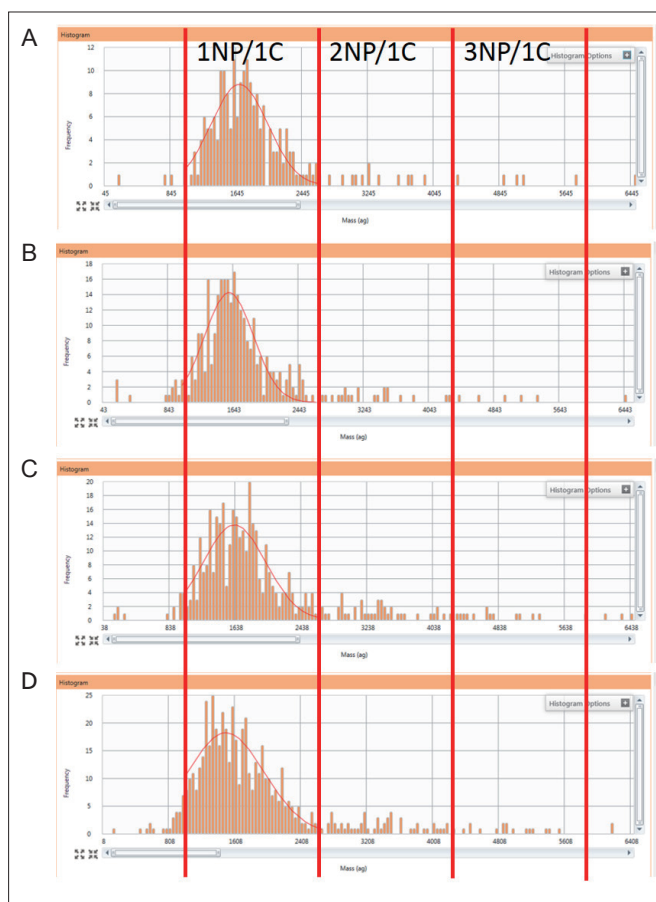


图 7. 随着曝露时间的增加，含有金元素的细胞数量增加，同时含有多个纳米颗粒的细胞数量也增加。(A) 曝露时间 2 小时；(B) 曝露时间 28 小时；(C) 曝露时间 53 小时；(D) 曝露时间 74 小时。1NP/1C 代表一个细胞内含有一个纳米颗粒；2NP/1C 代表一个细胞内含有两个纳米颗粒；3NP/1C 代表一个细胞内含有三个纳米颗粒

细胞对金离子的摄入

为观察细胞对金离子的摄入行为，藻类细胞被分别暴露于 1、2、3 $\mu\text{g/L}$ 金离子溶液中 74 小时，暴露过程中，在第 2、第 28 和第 74 小时对溶液取样进行分析，结果见图 9。可见，无论培养液金离子起始浓度是多少，随着时间的增加，每个细胞中含有金离子的平均值 (ag/cell) 都明显下降 (图 9(A))。而从图 9(B) 可以看到，随着暴露时间和初始金离子浓度增加，含有金的细胞百分比呈现增加的趋势。这些数据说明，存在某种细胞作用机制，限制了细胞对金的摄入，而这种机制受培养液中金离子浓度的显著影响。

结论

本文介绍了 SC-ICP-MS 在检测藻类细胞内部金属离子和纳米颗粒含量的能力。随着暴露在金纳米颗粒培养液的时间和培养液浓度的增加，含有一个纳米颗粒的细胞比例增加；而含有 2 个或 3 个纳米颗粒的细胞比例只在高培养液浓度 (600,000 part/mL) 时才随时间而增加。与此相对，在金离子培养液中，随着暴露时间和培养液浓度的增加，含有金的细胞数量有所增加，但每细胞中含有的金并没有增加。

上述结果首次证明利用 SC-ICP-MS 可以用来对细胞中的金属离子或纳米颗粒进行定量，并阐明了暴露浓度与摄入量之间的关系。对于细胞分析来讲，足够大的样本量才可以获得有意义的统计数据，相较于传统分析方法，SC-ICP-MS 的优势在于可以在更短的时间内分析更多的细胞数量。NexION ICP-MS 的优势还体现在快速的数据采集速率，低于 100 μs 的驻留时间保证数据具有更高的精密性¹²。NexION ICP-MS 独特的单细胞检测能力可用于研究细胞内部在其自然环境中固有的金属含量和对于金属的摄入行为。

本文的研究也可以为环境中纳米颗粒含量限量的相关法规制定提供参考。例如，欧盟正在考虑将纳米颗粒数量浓度作为《化学品的注册、评估、授权和限制》(REACH) 法规中的计量单位，而目前除 SC-ICP-MS 和 SP-ICP-MS 之外还没有其他表征手段可以对细胞内颗粒个数进行准确计数。

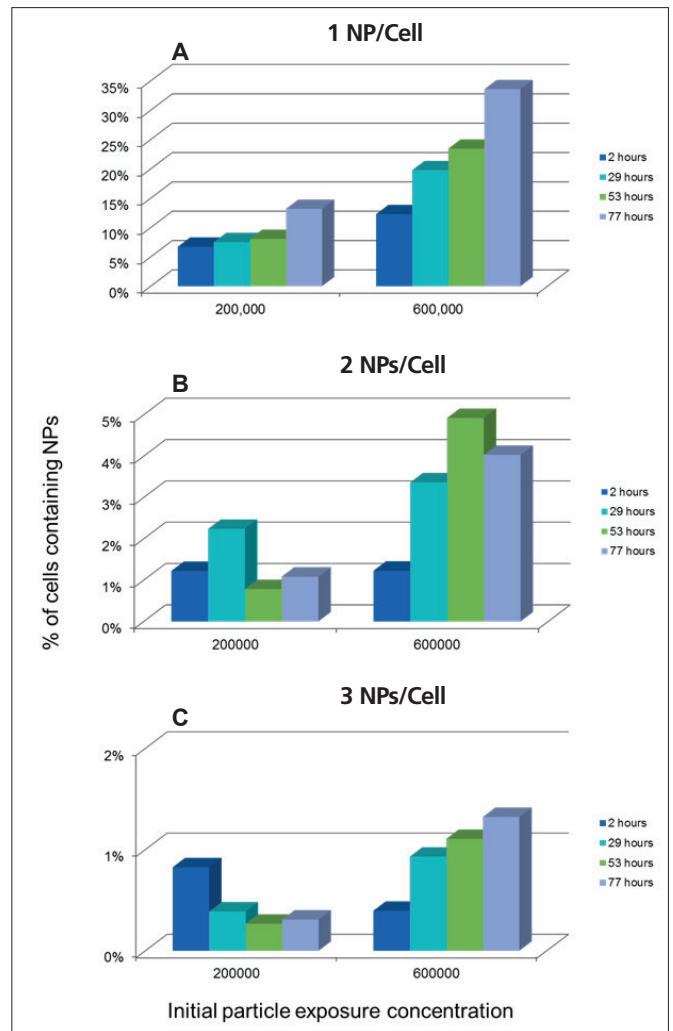


图 8. 不同培养液中起始纳米颗粒浓度下，含有 1 个 (A)、2 个 (B) 和 3 个 (C) 纳米颗粒的细胞的数量

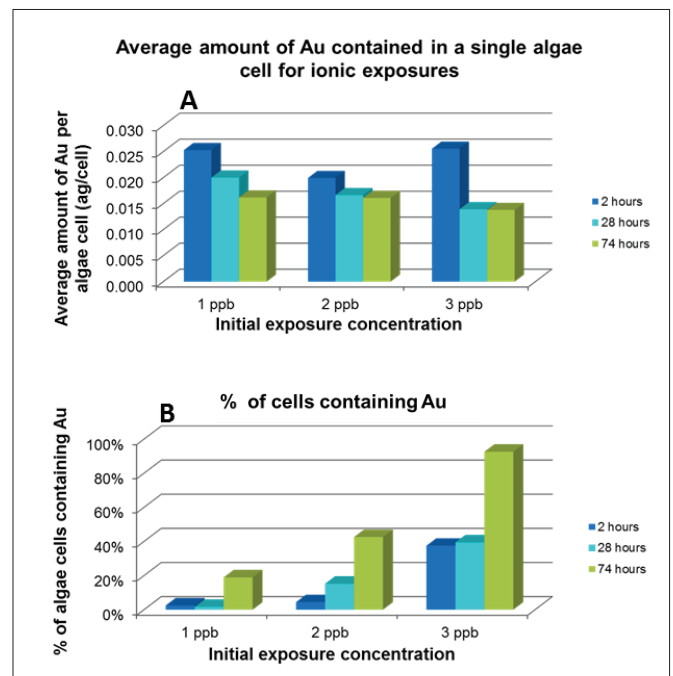


图 9. 1、2、3 ppb 金离子培养液培养 74 小时期间，每细胞中金的平均含量 (A) 和含有金的细胞百分比 (B)

参考文献

1. Sigg, L.; Behra, R.; Groh, K.; Isaacson, C.; Odzak, N.; Piccapietra, F.; Rohder, L.; Schug, H.; Yue, Y.; Schirmer, K., Chemical Aspects of Nanoparticle Ecotoxicology. *Chimia* 2014, 68, (11), 806-811.
2. Zhao, L. L.; Kim, T. H.; Kim, H. W.; Ahn, J. C.; Kim, S. Y., Enhanced cellular uptake and phototoxicity of Verteporfin-conjugated gold nanoparticles as theranostic nanocarriers for targeted photodynamic therapy and imaging of cancers. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 2016, 67, 611-622.
3. Akrami, M.; Balalaie, S.; Hosseinkhani, S.; Alipour, M.; Salehi, F.; Bahador, A.; Haririan, I., Tuning the anticancer activity of a novel pro-apoptotic peptide using gold nanoparticle platforms. *Scientific Reports* 2016, 6, 12.
4. Egger, A. E.; Rappel, C.; Jakupec, M. A.; Hartinger, C. G.; Heffeter, P.; Keppler, B. K., Development of an experimental protocol for uptake studies of metal compounds in adherent tumor cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2009, 24, (1), 51-61.
5. Journal of Physics: Conference Series 522, (2014), 012058.
6. Taylor, N. S.; Merrifield, R.; Williams, T. D.; Chipman, J. K.; Lead, J. R.; Viant, M. R., Molecular toxicity of cerium oxide nanoparticles to the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* is associated with supra-environmental exposure concentrations. *Nanotoxicology* 2016, 10, (1), 32-41.
7. Wolfbeis, O. S., An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chemical Society Reviews* 2015, 44, (14), 4743-4768.
8. Hineman, A.; Stephan, C., Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2014, 29, (7), 1252-1257.
9. Montano, M. D.; Olesik, J. W.; Barber, A. G.; Challis, K.; Ranville, J. F., Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016, 408, (19), 5053-5074.
10. "A Comparison of Microsecond vs. Millisecond Dwell Times on Particle Number Concentration Measurements by Single Particle ICP-MS", PerkinElmer application note, 2016.
11. "Syngistix Nano Application Module for Single Particle ICP-MS", Product Note, PerkinElmer Inc., 2014.
12. Abad-Álvo, I., Peña Vazquez, E., Bolea, E., Bermejo-Barrera, P., Castillo, J., Laborda, F. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, 408, 5089.

耗材与试剂

耗材 / 标准溶液	参数	货号
进样管	橙色 / 红色 (内径: 0.38mm), PVC, 扩口, 一包 12 根	N0773111
雾室排液管	灰色 / 灰色 (内径: 1.30 mm), 山都平, 一包 12 根	N077444
金 (Au) 标准溶液	1000 mg/L, 125 mL	N9303759
30 nm 金 (Au) 纳米颗粒	2.00E+11 part/mL, 25 mL	N8142300
60 nm 金 (Au) 纳米颗粒	2.60E+10 part/mL, 25 mL	N8142303
样品管	15 mL, 一箱 500 个 50 mL, 一箱 500 个	B0193233 B0193234

珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司
地址: 上海张江高科技园区张衡路1670号
邮编: 201203
电话: 021-60645888
传真: 021-60645999
www.perkinelmer.com.cn

要获取我们全球办公室的完整列表, 请访问 www.perkinelmer.com/ContactUs

©2017, PerkinElmer, Inc. 版权所有。保留所有权利。PerkinElmer® 是 PerkinElmer, Inc. 的注册商标。所有其他商标均为其各自所有者的财产。所有解释权归PerkinElmer。

013132_CHN_01 PKI



欲了解更多信息,
请扫描二维码关注我们的
微信公众号