

阳离子胶体金标记活细胞阴离子位点的 双光子荧光成像及其应用*

李 政 张镇西**

(西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 生命科学与技术学院, 西安 710049)

摘要 使用阳离子胶体金标记中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1)的阴离子位点, 并采用双光子荧光显微成像和荧光寿命成像技术记录活细胞的阴离子场分布. 阳离子胶体金是纳米量级金微粒与多聚 L- 赖氨酸的结合物, 金纳米微粒在超短激光脉冲的照射下可以产生高度局域化的光热效应. 当飞秒激光脉冲聚焦在细胞膜上标记的金纳米微粒时会产生这种纳米尺度的微光热效应, 并在不影响细胞活性的前提下暂时提高细胞膜的通透性. 基于这种效应, 使用聚焦的飞秒激光脉冲三维扫描照射 CHO-K1 细胞, 将分子质量为 10 ku 的荧光探针大分子异硫氰酸荧光素葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-D)递送到 CHO-K1 细胞的内部, 并用双光子荧光图像记录其递送的过程. 使用流式细胞仪分析不同实验条件下 FITC-D 的转导率和细胞死亡率的关系.

关键词 阳离子胶体金, 细胞标记, 双光子荧光, 阴离子位点, 荧光寿命成像

学科分类号 Q362

荧光染料用于在体或离体细胞标记配合荧光显微镜进行成像的技术已经发展得非常成熟, 近年来结合双光子荧光成像的方法, 一些贵金属纳米探针和半导体量子点等材料越来越多地应用于该领域^[1,2], 例如高分辨率细胞成像、细胞跟踪和肿瘤定位等方面. 阳离子胶体金(cationic colloidal gold, CCG)是由 10、15 或 20 nm 等纳米量级的金微粒与多聚 L- 赖氨酸构成的结合物, 多聚 L-赖氨酸在生理 pH 值条件下表现出强烈的正电荷, 所以 CCG 微粒可以标记在细胞的阴离子位点上. CCG 细胞标记技术常用于电镜下观察细胞膜表面或组织中的阴离子场分布^[3,4], 一般认为细胞膜表面的这种电荷分布与可溶性大分子的穿膜运动有关. 但电镜不适用于活细胞标记的观察, 本文采用双光子荧光显微成像技术对阳离子胶体金标记的活细胞进行高分辨率的断层成像, 可以更清晰地记录细胞内部的阴离子场分布. 同时, 可以采用基于时间相关单光子计数(TCSPC)技术的荧光寿命成像方法来区别不同荧光物质成分.

金纳米颗粒受到超短激光脉冲照射时, 一方面金微粒吸收大量光子产生热效应, 很容易将金微粒加热到熔点以上的温度, 另一方面, 由于金微粒体

积很小且激光脉宽很短, 产生的热量只能在很短的时间内扩散到周围纳米量级的范围内, 这种高度局域化的微光热效应在很多方面得以应用. Hüettmann 和姚翠萍等^[5,6]利用金纳米微粒在纳秒、皮秒激光脉冲照射下的高精度微光热效应来定量测量蛋白质的快速热变性. 姚翠萍和 Pitsillides 等^[7,8]利用这种微效应来提高细胞膜的通透性, 实现将 FITC-D、绿色荧光蛋白 EGFP 等大分子物质递送到细胞内部. Zharov 和 El-Sayed 等^[9-11]将其用于癌症诊断、选择性灭活细菌和癌细胞等方面的研究. 以上应用的都是纳秒或皮秒激光脉冲, 飞秒(femtosecond, fs)激光因为脉宽更短且单脉冲能量太小而很少被用到, 但是飞秒激光波长都在红外、近红外波段, 穿透深度方面的优势使其在在体应用方面拥有更好的前景. 本文采用聚焦的飞秒激光脉冲三维扫描阳离子胶体金标记的 CHO-K1 细胞, 成功地将大分子荧光探针 FITC-D 递送到细胞内部.

* 国家自然科学基金资助项目(60578026)和西安交通大学博士论文基金资助项目(DFXJTU2005-06).

** 通讯联系人.

Tel: 029-82666854, E-mail: zxzhang@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2008-01-28, 接受日期: 2008-03-18

1 材料和方法

1.1 实验装置

双光子荧光图像和飞秒激光脉冲扫描都在同一台扫描双光子荧光成像系统(DermaInspect, JenLab GmbH, Germany)下获得, 图 1 为实验系统示意图. 系统集成基于时间相关的单光子计数卡(SPC830, Becker & Hickl, Germany), 用于荧光寿命成像. 双光子荧光的光源和扫描激光来自同一台 Mai Tai Ti:sapphire 飞秒激光器(脉宽 75 fs, 重复频率 80 MHz, Spectra Physics, Darmstadt, Germany), 波长为 750 nm 的脉冲激光通过油浸物镜(Zeiss, Plan Neofluar 40 $\times$, 数值孔径 1.3)聚焦为一个尺寸达到衍射极限的点对样品进行扫描. 其中扫描模块包括电控遮光器、光束衰减器和二维扫描振镜. 荧光信号通过一个低通滤光片(BG39, Scott, Mainz, Germany)后用电倍增管(H7732-01, Hamamatsu, Herrsching, Germany)检测.

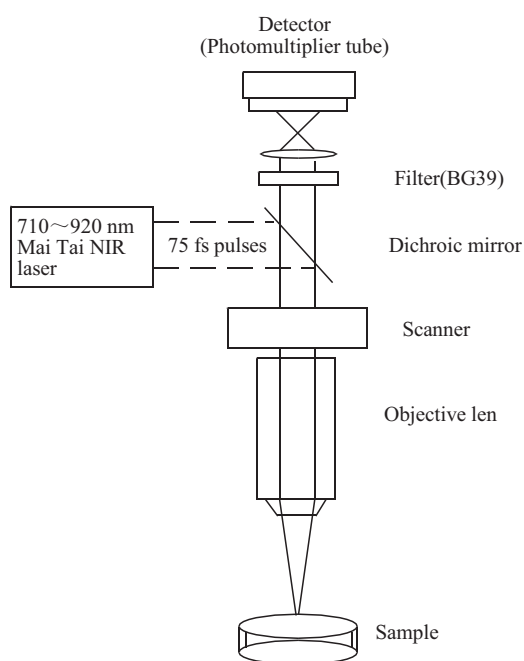


Fig. 1 Schematic presentation of two-photon microscope of sample

细胞被 FITC-D 染色的比率(转导率)及细胞活性通过流式细胞仪(FASCAN, Beckman Counter, USA)检测, 细胞活性由荧光探针 PI 标记. 荧光探针 FITC-D 和 PI 均由波长 488 nm 的氩离子激光器激发, FITC-D 的绿色荧光和 PI 的红色荧光分别由 (525 $\pm$ 5) nm 的带通滤光片和 (600 $\pm$ 5) nm 的长通滤光

片筛选. 流式细胞仪的数据通过 WinMDI 2.8 软件处理生成散点图.

1.2 实验材料

中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 培养在特殊的刻有栅格和数字的圆形盖玻片(BELLCO Glass, INC, USA)上, 通过在光学显微镜下识别刻在栅格中的数字可以对靶定的细胞区域进行重复定位. 这种圆形盖玻片作为一个密封面和 MiniCem (JenLab GmbH, Germany)及其他配件构成自制的密闭样品池, 培养细胞的表面为样品池内表面, 样品池中可注入并更换培养液. 细胞培养基为 Ham's F12K (GIBCO: 含 Hepes 缓冲液、L- 谷氨酰胺和 10%胎牛血清). 阳离子胶体金 (BBI: British Biocell International, UK)为 15 纳米金微粒与多聚 L- 赖氨酸的结合体. 荧光探针异硫氰酸荧光素葡聚糖 (FITC-D)和碘化丙锭(PI)购自美国 Sigma 公司.

1.3 实验方法

1.3.1 阴离子场的标记. 细胞在样品池中培养至合适的密度, 更换培养液为 Ham's F12K (1.2 ml)与 CCG (2 μ l)混合液, 并将其放在二氧化碳培养箱内培养 1 h. 然后除去混合液, 用培养液清洗细胞并再次在样品池中注满培养液. 将样品池安装在自制的三维电动样品台上用于双光子荧光成像. 激光波长 750 nm, 激光功率 4 mW.

1.3.2 将 FITC-D 导入细胞. 第一步同上, 将细胞在培养液与 CCG 的混合液中培养 1 h. 然后除去混合液, 用培养液清洗细胞后将样品池注满 Ham's F12K (1.2 ml)与 FITC-D (2 μ l)的混合液. 将样品池安装在样品台上用于三维激光扫描和荧光成像. 飞秒激光聚焦在贴壁生长细胞 CHO-K1 所在的区域. 激光波长 750 nm, 激光功率 4 mW. 激光汇聚的焦点对一定区域内的单层贴壁细胞进行三维扫描, 每帧扫描的区域为 142 μ m $\times$ 142 μ m (x, y 平面), 扫描时间为 13.4 s. 两帧之间 z 轴的间隔距离为 0.3 μ m, 一次三维扫描由 25 帧构成, 总的扫描时间 335 s. 荧光图像固定取其中的细胞轮廓清晰的一帧图像(z 轴位置相同).

1.3.3 流式细胞术分析.

自制样品池: 在载玻片上作 3 mm $\times$ 3 mm 的正方形通孔 9 个, 然后粘上 0.14 mm 的盖玻片做底面. 细胞在样品池中培养至合适的密度, 将其与 CCG 混合培养 30 min, 用培养液清洗后补满 Ham's F12K 与 FITC-D 的混合液, 将样品池安装在三维激光扫描平台上进行扫描. 样品池范围划分为

若干 $142\ \mu\text{m} \times 142\ \mu\text{m}$ 的子区域, 每个区域按照前一部分的扫描方法进行并提高扫描速度, 每帧的区域扫描时间为 2.1 s, 两帧之间 z 轴的间距为 $1.2\ \mu\text{m}$ 共扫 6 帧, 这样每个区域的扫描时间为 12.6 s. 区域之间的切换由程控样品台运动实现, 总的扫描时间为 6 098.4 s, 加上 z 轴步进和区域切换的时间, 一次扫描过程约 110 min.

a. 不同扫描次数实验. 按照上述扫描方法分别对 3 个样品(细胞金微粒数量比均为 $5 \times 10^5/\text{cell}$)分别进行 1 次、2 次和 3 次扫描, 并且用标记了 CCG 但未经激光照射的样品为对照组. 在照射后 30 min 以后, 4 组样品分别添加 $1\ \mu\text{l}$ 的 PI, 然后进行流式细胞仪分析.

b. 不同细胞金微粒数量比实验. 制备 3 个样品的细胞金微粒数量比分别为: $1 \times 10^5/\text{cell}$ 、 $5 \times 10^5/\text{cell}$ 、 $10 \times 10^5/\text{cell}$, 对照组为未经 CCG 标记的样品. 对 4 组样品分别进行两次激光扫描后加入 PI 进行流式细胞仪分析.

2 结果与分析

2.1 CHO-K1 细胞阴离子场的标记

CCG 标记 CHO-K1 细胞的双光子荧光及荧光寿命图像如图 2 所示. 图 2a 为双光子荧光图像,

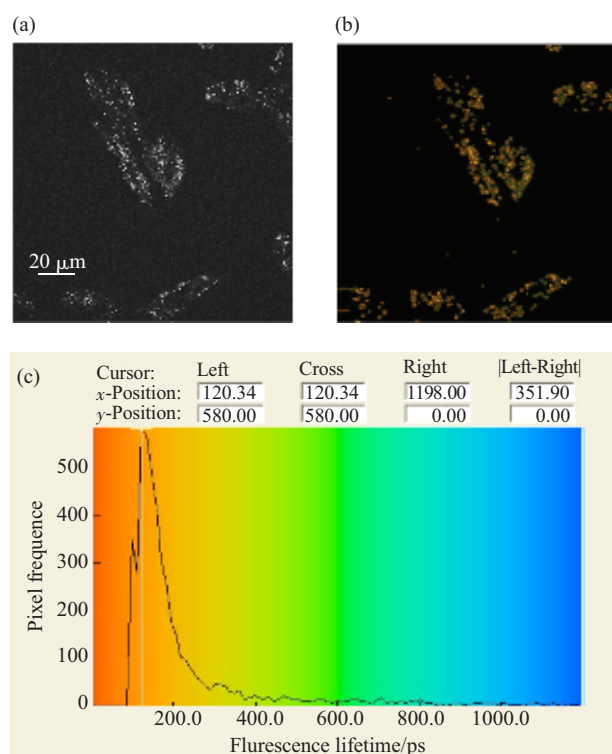


Fig. 2 CHO-K1 cells labeled with CCG

(a) Two-photon fluorescence image. (b) Fluorescence lifetime image. (c) Color-lifetime legend and frequency of pixels having the same lifetime.

图 2 中的亮点是标记在阴离子位点的金纳米颗粒, 全细胞的阴离子场可以清晰地显示出来. 我们可以看出阳离子胶体金主要分布在细胞膜上和胞浆中, 细胞核内没有分布. 图 2b 为相应的荧光寿命图像, 黄色对应发光物质的荧光寿命约为 150 ps (picosecond, ps), 即为金纳米微粒. 图 2c 是图 2b 中伪彩色与荧光寿命的对应关系, 其中横坐标代表图 2a 中荧光点(对应发光的像素)的荧光寿命, 单位为 ps, 纵坐标代表相应荧光寿命的荧光点出现的次数, 由图 2c 可以看出大部分像素的荧光寿命都在 100~200 ps 之间.

2.2 将 FITC-D 导入细胞

激光扫描之前, 先对一定区域(region of interest, ROI)中标记了 CCG 的 CHO-K1 细胞进行双光子荧光成像, 如图 3 所示. 细胞周围充满了不能自由出入细胞膜的大分子荧光探针 FITC-D, 其分子质量为 10 ku. 图 3a 是激光扫描前的双光子荧光图像, 激发波长 750 nm, 功率 4 mW. 在此实验条件下, 细胞自身的双光子荧光非常微弱, 所以梭形贴壁生长的 CHO-K1 细胞表现为图 3a 中的无荧光的区域, 其细胞膜上和细胞内部的阴离子位点由可以激发双光子荧光的 CCG 颗粒标记出. 图 3b 是对应的荧光寿命图像, 激光参数同上. 图 3b 中金黄色代表发光物质的荧光寿命为 150 ps 左右, 对应的荧光物质是金纳米微粒, 绿色代表发光物质的荧光寿命约为 2 000 ps 或更长, 对应的是大分子荧光探针 FITC-D. 图中四角的黑色边缘区域无荧光是由于系统原因造成的, 实际上充满了荧光探针 FITC-D.

采用 1.3.2 节中的扫描方法对细胞群进行第一次三维扫描, 图 4 记录了扫描后相同 ROI 的双光子荧光和荧光寿命图像. 由图 3c 可以看出经过 335 s 的聚焦激光扫描后, 1 号、2 号和 3 号细胞不同程度地摄取了一定的 FITC-D. 这可以清晰地从荧光寿命图像(图 3d)中看出, 这 3 个细胞的胞浆中含有荧光寿命为 2 000 ps 左右的荧光物质, 即 FITC-D. 4 号细胞也含有非常少量的 FITC-D.

图 3e 和 3f 记录了第二次激光扫描之后 ROI 中各细胞的状况, 1 号、2 号和 3 号细胞摄取了更多的 FITC-D, 4 号细胞也充满了大量的 FITC-D.

2.3 流式细胞术分析

2.3.1 不同扫描次数实验. 图 4 是不同扫描次数的流式细胞仪分析, 图 4 中的 4 个象限的意义为: 左下, PI 和 FITC-D 均为阴性, 未被 FITC-D 染色的

活细胞; 右下, PI 阴性, FITC-D 阳性, 被 FITC-D 染色的活细胞; 左上, PI 阳性, FITC-D 阴性, 未被 FITC-D 染色的死细胞; 右上, PI 和 FITC-D 均为阳性, 被 FITC-D 染色的死细胞. 由图 4 可以看出随着激光扫描次数的增加, 死亡细胞的数目单调增加, 而被 FITC-D 染色的活细胞数目先增后减. 对照组(图 4a, 进行 CCG 标记但无激光照射)中约 96% 的细胞未被 FITC-D 染色并保持活性. 在进行两次激光照射(图 4c)后, FITC-D 的转导率最高为 58.33%.

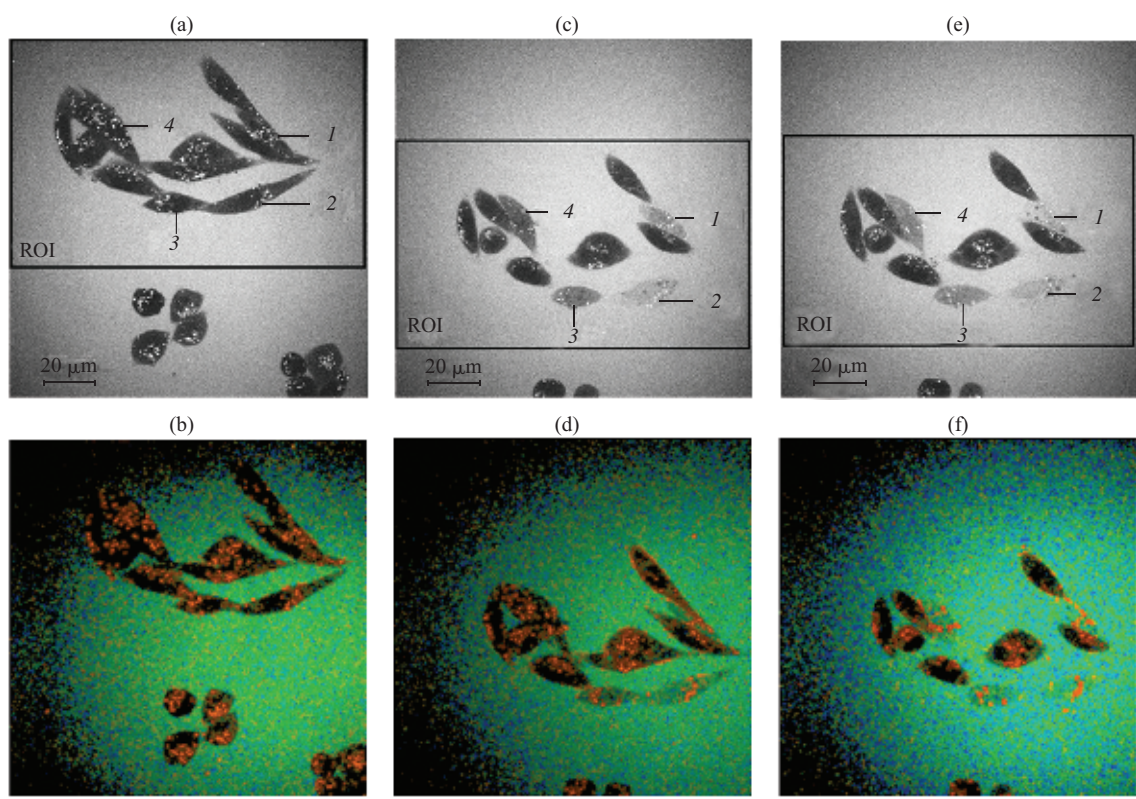


Fig. 3 CHO-K1 cells labeled with CCG and the surrounding FITC-D
(a), (b) are images before laser scanning. (c), (d) are images after the first scanning. (e), (f) are images after second scanning. (a),(c),(e): Two-photon fluorescence images. (b),(d),(f): Lifetime image before scanning.

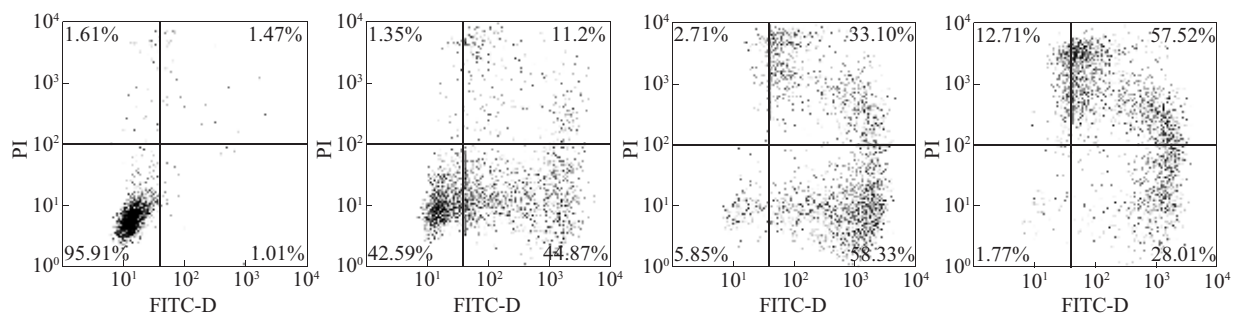


Fig. 4 Flow cytometer results of different scanning times
(a) Control: no laser scanning. (b) After one time scanning. (c) After two times scanning. (d) After three times scanning.

2.3.2 不同细胞金微粒数量比实验. 图 5 显示了不同细胞金微粒数量比的流式细胞仪分析结果: 随着细胞金微粒数量比的增加, 被 FITC-D 染色的死亡细胞单调增加, 而被 FITC-D 染色的活细胞数目也是先增后减. 对照组图 5a 为未标记 CCG 经激光照射的结果, 84.38% 的细胞未被 FITC-D 染色并保持

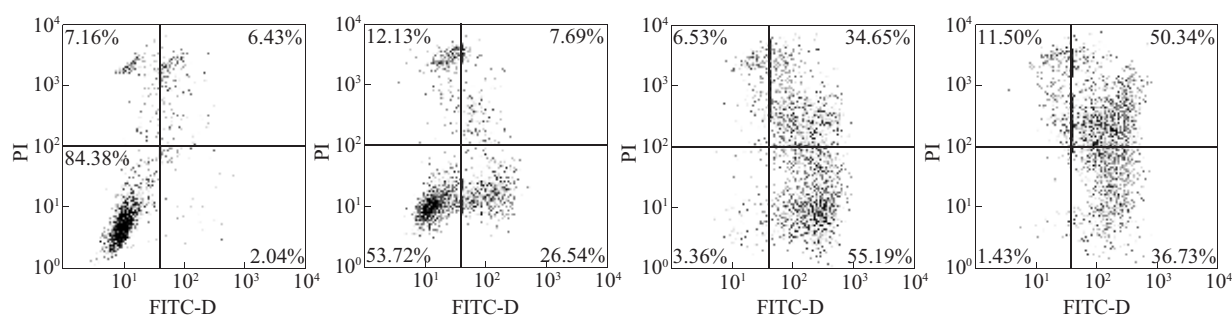


Fig. 5 Flow cytometer results of different cell-CCG ratio

(a) Control: no CCG. (b) $1 \times 10^5/\text{cell}$. (c) $5 \times 10^5/\text{cell}$. (d) $10 \times 10^5/\text{cell}$.

活性, 但和图 4a 比较起来死亡的细胞明显增多. 在细胞金微粒数量比 $5 \times 10^5/\text{cell}$ 时, FITC-D 的转导率最高位 55.19%.

2.4 分析讨论

从图 2 可以看出 CHO-K1 细胞膜上和胞浆内大量地分布着阴离子位点, 有文献指出通过内吞作用进入细胞内的 CCG 颗粒分布在内吞囊泡中^[12], 而囊泡破裂后 CCG 颗粒可能吸附在一些细胞器上. 细胞核内却没有 CCG 颗粒, 这说明 CCG 颗粒不能通过核膜或有选择性地穿过核孔. 实验中细胞和 CCG 一起培养的时间是 1 h, 这是因为 CCG 颗粒通过细胞膜进入细胞质是一个缓慢的过程, 大概 30 min 的时候大部分颗粒还只是标记在细胞膜上.

图 3~5 记录了将 FITC-D 递送到 CHO-K1 细胞内部的过程. 一般认为金纳米微粒吸收超短激光脉冲产生的高度局域化的微光热效应可以暂时提高细胞膜的通透性, FITC-D 可以通过细胞膜进入细胞内部, 但其微观机理目前尚未完全清楚. 很多文献对此进行了探讨: 金纳米微粒吸收光子后短时间内被加热到很高的温度, 足以把微粒周围的水汽化产生快速膨胀的气泡, 这些气泡可能是提高细胞膜通透性的原因, 金纳米微粒周围的气泡可以通过实验观察到^[13, 14]. 此外, 金微粒可能溶化并分裂成更小的颗粒碎片^[15, 16], 还有空化气泡快速扩张收缩产生的机械作用^[8]都被用于解释细胞膜通透性的提高. 这三种因素都可能对细胞膜造成高度局域化的损伤从而提高细胞膜的通透性, 由于细胞膜具有自我修复能力, 所以这种通透性是短暂的. Pitsillides 等^[8]测得细胞在激光照射后 2 min 达到一个吸收 FITC-D 的高峰, 之后细胞膜的通透性迅速下降.

在激光扫描的过程中, ROI 中不同细胞摄取的

FITC-D 的量和速度不同, 这可能是由于细胞膜上标记的阳离子胶体金的数量不同造成的. 有些细胞需要更多的激光脉冲扫描来提高细胞膜的通透性, 但继续增加扫描次数或提高激光的能量可能导致细胞形态的改变, 甚至细胞死亡.

在对大量细胞进行 FITC-D 转导时, 关键在于寻找最佳实验条件来提高转导率并降低细胞死亡率, 图 4 和图 5 显示了其大概的规律. 通常细胞具有自我修复功能, 但长时间的激光照射可以使细胞膜受到不可逆的破坏, 所以 FITC-D 的转导率会先升后降. 还有一个关键的问题就是 CCG 的量及其与细胞的孵育时间, 适当的孵育时间可以使大量的 CCG 标记在细胞膜上而不是标记在细胞内的阴离子位点, 同时细胞膜上的阴离子位点总数也是有限的, 过量的 CCG 将导致其更多地进入细胞内部, 这部分金微粒对细胞通透的改变没有贡献但可能导致细胞死亡.

3 结 论

通过双光子荧光及荧光寿命图像可以观察到, 大量的阳离子胶体金颗粒标记在 CHO-K1 细胞的细胞膜上和细胞质中, 但阳离子胶体金无法进入细胞核; 由于金颗粒物理化学性质稳定, 这种标记方法可以用于在体细胞跟踪. 标记在细胞膜表面的金纳米颗粒在聚焦的飞秒激光脉冲照射下产生高度局域化的微光热效应, 可以暂时提高细胞膜的通透性并将大分子荧光探针 FITC-D 递送到 CHO-K1 的细胞质中. 对于大量细胞进行转导时, 控制实验条件可使 FITC-D 的转导率超过 50%.

致谢 感谢德国吕贝克大学生物医学光学研究所 Hüttmann 博士在实验中给予的帮助和指导.

参 考 文 献

- 1 Wang H F, Huff T B, Zweifel D A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(44): 15752~15756
- 2 Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, *et al.* Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science*, 2005, **307**(5709): 538~544
- 3 Skutelsky E, Roth J. Cationic colloidal gold-a new probe for the detection of anionic cell surface sites by electron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 1986, **34**(5): 693~696
- 4 吕梦翔, 李 颖, 刘 浩. 前包埋阳离子胶体金标记技术定量检测硬脑膜毛细血管阴离子场方法的探讨. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2000, **9**(1): 93~96
Lu M X, Li Y, Liu H. *Chin J Histochem Cytochem*, 2000, **9**(1): 93~96
- 3 Yelin D, Oron D, Thiberge S, *et al.* Multiphoton plasmon-resonance microscopy. *Optics Express*, 2003, **11**(12): 1385~1391
- 5 Hüttmann G, Birngruber R. On the possibility of high-precision photothermal microeffects and measurement of fast thermal denaturation of proteins. *IEEE J Select Topics Quantum Electro*, 1999, **5**: 954~962
- 6 姚翠萍, 李 政, 张镇西. 激光高精度细胞微手术机理的研究. *光学学报*, 2005, **25**(12): 1664~1669
Yao C P, Li Z, Zhang Z X. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(12): 1664~1669
- 7 Yao C P, Rahmzadeh R, Endl E, *et al.* Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles. *J Biomed Optics*, 2005, **10**(6): 064012
- 8 Pitsillides C M, Joe E K, Wei X B, *et al.* Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophys J*, 2003, **84**(6): 4023~4032
- 9 Zharov V P, Galitovskaya E N, Johnson C, *et al.* Synergistic enhancement of selective nanophotothermolysis with gold nanoclusters: potential for cancer therapy. *Laser Surg Med*, 2005, **37**(3): 219~226
- 10 Zharov V P, Mercer K E, Galitovskaya E N, *et al.* Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnosics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophys J*, 2006, **90**(2): 619~627
- 11 El-Sayed I H, Huang X, El-Sayed M A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFP antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Letters*, 2005, **5**(5): 829~834
- 12 Yelin D, Oron D, Thiberge S, *et al.* Multiphoton plasmon-resonance microscopy. *Optical Express*, 2003, **11**(12): 1385~1391
- 13 Zharov V P, Galitovsky V. Photothermal detection of local thermal effects during selective nanophotothermolysis. *Appl Phys Lett*, 2003, **83**(401): 4897~4899
- 14 Plech A, Kotaidis V, Lorence M, *et al.* Thermal dynamics in laser excited metal nanoparticles. *Chem Phys Lett*, 2005, **401**(4-6): 565~569
- 15 Link S, Burda C, Mohamed M B, *et al.* Laser photothermal melting and fragmentation of gold nanorods: energy and laser pulse-width dependence. *J Phys Chem A*, 1999, **103**(9): 1165~1170
- 16 Plech A, Kotaidis V, Gresillon S, *et al.* Laser-induced heating and melting of gold nanoparticles studied by time-resolved x-ray scattering. *Phys Rev B*, 2004, **70**(19): 195423

Two-photon Fluorescence Imaging of Living Cells' Anionic Sites Labeled by Cationic Colloidal Gold and Its Nano-scale Microeffect*

LI Zheng, ZHANG Zhen-Xi**

(Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Education Ministry, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract Cationic colloidal gold (CCG) nanoparticles were used for labeling on the anionic sites of living cells under two-photon fluorescence (TPF) microscope, and for delivering macromolecules into the target cells when irradiated by focused femtosecond laser pulses. 15 nm CCG nanoparticles which were made by conjugation with poly-L-Lysine, were attached on the anionic sites, especially on the membrane, of CHO-K1 cells because of their strong positive charge at physiological pH. Target cells labeled with cationic gold nanoparticles were imaged under TPF microscope, and lifetime images of the same targets were taken by time correlated single photon counting (TCSPC) technique in order to verify the fluorescence of the marker and the luminescence of the gold particles. The results shown that CCG nanoparticles first accumulated on the negatively charged sites of the membrane, then entered via endocytic pathway and attached anionic sites in plasma. A macromolecular 10 ku fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-D) was added into the sample and the focused femtosecond laser of TPL microscope was employed to scan the target cells layer by layer. Typical laser power level used in biological imaging is about 3~5 mW. Here the laser power of scanning was below 5 mW in order to prevent photochemical damage of the fs-pulses alone and to localize effects to the nanoparticles on a nano-scale. After scanning the target cells under stack mode, macromolecular fluoresceins surrounding the cells was observed to cross the membrane and to diffuse in the cytoplasm. Comparing with the images before scanning, the two-photon fluorescence and fluorescence lifetime images revealed the delivery of FITC-D into target cells. Photothermal effects, which may be responsible for the permeabilisation, are highly localized in nanoscale and are not expected to cause damage exceeding the cell membrane. After extensive of laser scanning also cell death occurred. The ratio of the uptake of FITC-D and cellular death under different conditions were measured by flow cytometer. The results shown: with the increased scanning times or ratio of particles to cells, transfer efficiency increased first and decreased afterwards, but the ratio of cellular death went up all along.

Key words cationic colloidal gold, cell labeling, two-photon fluorescence, anionic sites, fluorescence lifetime imaging

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (60578026) and The Doctoral Foundation of Xi'an Jiaotong University (DFXJTU2005-06).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-82666854, E-mail: zxzhang@mail.xjtu.edu.cn

Received: January 28, 2008 Accepted: March 18, 2008