

量子点的荧光特性在生物探针方面的应用

杨冬芝, 徐淑坤*, 陈启凡

东北大学化学系, 辽宁 沈阳 110004

摘要 量子点具有传统有机荧光染料无可比拟的光学魅力, 在生物医学及材料领域已引起广泛的兴趣, 许多科学工作者在量子点用于生物学领域方面已经取得一定进展。目前, 量子点最有前途的应用领域是在生物体系中作为荧光标记物。通过观察量子点标记分子与靶分子相互作用的部位, 及其在活细胞内的运行轨迹, 可能为信号传递的分子机制提供线索, 从而为阐明细胞生长发育的调控及癌变规律提供直观依据。文章介绍了量子点研究生物大分子之间的相互作用、生物大分子荧光标记、细胞及生物组织的荧光标记与成像以及活体成像等方面的应用。并概述了纳米量子点作为生物荧光探针的应用前景以及亟待解决的问题。

关键词 量子点; 生物探针; 荧光; 活体成像; 综述

中图分类号: Q6-33 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)09-1807-04

引言

量子点(QDs)可以解释为粒径小于或接近激子波尔半径的半导体纳米颗粒。它的直径只有1~12 nm, 因此存在特殊的物理性质, 如量子尺寸效应、表面效应等, 表现出优良的荧光纳米效应。它的激发光谱宽且连续分布、发射光谱窄而对称、发射光稳定性强, 不易发生光漂白, 通过改变粒子的尺寸和组成可获得从UV到近红外范围内任意点的光谱, 因此相对传统有机荧光试剂具有无可比拟的优越性。由于量子点具有上述独特的性质, 自20世纪70年代末, 它就在物理学、材料科学、化学及电子工程学等方面引起广泛的关注。近年来, 量子点在生命科学等相关学科的应用也越来越成为人们关注的焦点, 特别是量子点在生物物质的荧光标记方面应用更多。已报道的QDs在这一领域的应用大部分集中于荧光探针的识别和成像方面, 如生物大分子之间的相互作用、细胞及组织的单色和多色标记、生物体组织和在体光学成像、基因测序等。

到目前为止用于生物探针的量子点主要集中于II-V型, 即由第二副族和第六主族元素组成, 如CdSe, CdS, CdTe, CdSe/ZnS, CdSe/ZnSe和CdS/ZnS等。它们的合成方法概括起来有两大类: 有机相合成法和水相合成法^[1,2]。有机相合成一般采用高温热分解有机物, 其操作条件苛刻、毒性大, 但是合成的量子点荧光产率高、尺寸均匀、稳定性好, 通过表面修饰可以和生物分子链接。目前应用最为广泛的是有机

相合成的CdSe/ZnS, 通过不同的方法将其转移至水相, 满足生物物质检测的需要; 水相合成方法操作简单, 合成出的量子点可以直接用于标记生物分子, 但是合成的量子点尺寸分布较宽, 荧光效率低。应用较多、效果最好的是CdTe。

目前对量子点在合成方面的综述国内已有报道^[3]。本文介绍了量子点在研究生物大分子之间的相互作用、细胞及生物组织的荧光标记与成像以及活体成像等方面的应用。并概述了纳米量子点作为生物荧光探针的应用前景以及亟待解决的问题。

1 量子点在生物探针方面的应用

1.1 基于荧光能量转移(FRET)研究生物大分子之间的相互作用

由于QDs激发波长具有很大的灵活性、发射峰狭窄、在红外光谱区没有拖尾的发射谱峰等诸多优点, 因此可以选择受体发射光谱相对于供体激发光谱有很大红移的供体-受体对进行研究^[4-6]。假如2个生物分子之间可以发生相互作用, 则标记在它们上面的不同量子点就会因此靠近, 那么在这一区域中的光谱就会发生变化, 成为两个光谱的叠加, 在合适的条件下, 甚至可能发生能量转移, 即受体量子点的荧光增强。那么就可以通过检测这两种不同量子点光谱谱图的变化来间接观察生物分子之间的相互作用。如果将某一生物过程中的有关生物分子标记上不同颜色的量子点进行跟踪, 就可能制作一个监测生物分子之间相互作用的“电影”^[7]。将

收稿日期: 2006-06-06, 修订日期: 2006-08-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(20675011)和教育部博士点基金项目(20021045001)资助

作者简介: 杨冬芝, 女, 1979年生, 东北大学化学系在读博士生 *通讯联系人 e-mail: xushukun46@126.com

发绿、红两种颜色的量子点分别与牛血清白蛋白(BSA)和 anti-BSA 结合,通过 BSA 与 anti-BSA 之间的特异性相互作用,可以观察到两种颜色的 QDs 之间发生的 FRET。Goldman^[8]等将 anti-TNT 的特异性抗体标记于 QDs,而用染料标记 TNT(三硝基甲苯),通过两者之间发生的能量转移可以测定环境中的 TNT 含量。

1.2 用于大分子标记及组织细胞的标记与成像

1.2.1 用于生物大分子探针标记

量子点最初用于生物领域是应用于简单的生物大分子,链接方法是将量子点用带有氨基或羧基的试剂修饰,改变溶液环境,通过共价偶联或静电作用等完成量子点与生物大分子(蛋白质、核酸和生物酶等)的链接;如 BSA, DNA 单链,天花粉蛋白^[9],木瓜蛋白酶^[10],有机磷水解酶^[11]等。目前这一领域的应用仍然非常活跃。Chang^[12]等将量子点与纳米金两种纳米材料用于蛋白酶水解的研究,当纳米金与连有蛋白的量子点连接后,其复合物的荧光强度大大减小,但当加入蛋白水解酶后荧光强度又逐渐恢复,说明量子点与纳米金之间发生了能量转移。将两条互补的 DNA 单链分别链接于不同的量子点上,然后将其混合在一起,观察其荧光变化,还可以判定其杂交情况。

目前量子点标记最为活跃的领域是在荧光免疫方面。借助于抗原-抗体、生物素-亲和素等之间的特异性识别作用完成各种研究。Goldman^[13]等曾将量子点与抗体结合,首先将工程重组蛋白通过静电作用结合到量子点上,然后再与抗体相连接。反应物浓度不同结合抗体的数目也不相同,通过色谱将结合与未结合的分子分离,成功地对一种蛋白质毒素和 2,4,6-三硝基甲苯进行了荧光免疫分析。2003 年^[14]他们又发展了此技术,将量子点与蛋白质偶联后再生物素化,检测限降低,灵敏度提高。

经证实, QDs 稳定性好,荧光杂质少,链接于生物体后不影响其活性,特异性高。因此研究人员将越来越多的兴趣转移至量子点荧光免疫探针在细胞的标记与成像方面上。

1.2.2 用于生物组织细胞的标记与成像

量子点极强的荧光稳定性使得用其进行细胞内过程的实时监测和跟踪成为可能,也就是说,可以用量子点标记蛋白质的方法来观察细胞的活动。包括细胞的内存作用、细胞膜标记、细胞核标记以及细胞的骨架标记等。特别是美国量子点公司的研究人员^[15]最近成功地实现了对同一细胞不同细胞器的三色标记,用绿色荧光量子点标记微管,橙黄色荧光量子点标记高尔基体,红色荧光量子点标记细胞核,经单一波长激光激发后,三种颜色同时显现。由于细胞膜具有天然的屏蔽作用,量子点不能直接进入细胞内部,因此需要通过物理或化学作用来保证量子点与细胞分子的链接。物理方法主要采用显微注射技术和细胞电穿孔技术^[16];而化学方法即在量子点上连接具有穿膜功能的生物试剂,如转铁蛋白^[17]、链霉素亲和素、生物素、穿膜肽或肽链上的氨基酸残基^[18]等。

量子点有较大的斯托克位移,因此能够将靶标信号与背景荧光清楚地区分开来,同时多波长量子点可使发射光强度逐渐增强,从而实现空间协同定位,达到对移动的单个肿瘤

定位、单个解剖结构靶标定位测定等。量子点与抗体结合,特异性识别组织中的抗原,从而实现病态肿瘤细胞的识别与检测,必要时要通过一抗或二抗的链接。吴兴勇研究小组采用了一种十八氨修饰的聚丙烯酸的高分子材料实施了对纳米晶的表面包覆,包覆后的荧光材料用于对乳腺癌细胞 Her2 的检测,同时也完成了用纳米晶对细胞核与细胞微管双标的工作^[19]。将量子点与抗体结合可以用于荧光免疫分析^[20, 21]。Goldman^[22]等用四种不同颜色的量子点分别与抗霍乱毒素、蓖麻毒素、志贺菌毒素 1 和葡萄球菌肠毒素 B 的抗体偶联,在同一个微孔板上实现了四种毒素的同时检测。对于在免疫检测中出现的抗原和抗体与量子点结合时的非特异性问题,李军^[23]和 Bhatia 等^[24]分别将 BSA 和烯基乙二醇(EGF)修饰于量子点来解决。

量子点标记技术在生物医学分析,特别是生命过程动态生化信息获取的靶向示踪与成像分析中极具发展潜力,我国的分析化学工作也已在该领域取得显著的进展,占有一席之地。武汉大学的庞代文等在细胞标记和成像的研究方面取得了多项突破性进展。他们用 CdSe/ZnS 核壳结构量子点标记的羧甲基壳聚糖作为探针成功地用于酵母活细胞成像^[25],获得很好的生物兼容性和光稳定性;他们研制成功荧光和磁敏双功能纳米球并共价偶联的方式将其与免疫球蛋白、抗生物素蛋白、生物素等表面链接,形成新的具有荧光-磁性和生物靶向的三功能纳米球,应用于生物医学领域,如肿瘤细胞的分离和处理等^[26];他们还研制成功具有多色荧光和磁性的多功能纳米球作为智能化生物探针,可以同时捕获、识别和分类检索各种细胞,其应用前景得到高度评价^[27]。宋强等^[28]采用最大发射波长为 550 nm 的绿色量子点转铁蛋白复合物分别在体外和体内对小鼠骨髓造血细胞进行标记研究,并观察量子点转铁蛋白复合物对骨髓造血干细胞 567C89 的影响。结果表明量子点转铁蛋白复合物可标记骨髓中大部分造血细胞,而且荧光强度高,光学和化学稳定性好,对骨髓造血干细胞的增殖分化功能无影响。可以看出量子点在血液细胞成像方面表现了优良的特性,在细胞生物学研究中具有重要作用。

1.3 用于活体医学成像

在医学上将活体内的生物过程在细胞和分子水平上进行特征的显示,有利于疾病的无创诊断,从而有助于制定更合适的治疗方案。量子点用于医学成像将是一种很有前途的技术。Hoshino 等^[29]通过内存作用使量子点进入小鼠的淋巴瘤细胞,然后将量子点标记的细胞由静脉注入小鼠体内,由此可以观察淋巴瘤细胞的成像,并且标记物不影响细胞的活动和功能。近红外或红外光子可以提高组织的穿透深度和成像灵敏度,可满足传统染料不能达到的多种要求。因此将某些在红外区发光的量子点标记到组织或细胞内的特异组分上,并用红外光激发,就可以通过成像检测的方法来分析研究组织内部的情况。Bawendi^[30]等提出利用近红外荧光 QDs 进行动物体内前哨淋巴结活组织检查的好方法,他们将近红外 QDs 用多配位基配体包覆后注入动物体内进行整体成像,发现通过 QDs 标记,医生可看清 1cm 深组织下的前哨淋巴结,且可准确地指导手术进行,确保前哨淋巴结的完全切除。

Zimmer^[31]等合成了发射波长在 700~900 nm 之间的 InAs/ZnSe 核壳结构的量子点,虽然量子效率(正己烷中为 7%~10%,水相中 6%~9%)比应用较为广泛的 CdSe/ZnS 小很多,但长波段的优势足以满足活体成像的需要。

1.4 其他应用领域

1.4.1 用于基因测序和基因芯片

受有机染料荧光探针性能的限制,现有研究蛋白质与蛋白质相互作用的芯片应用中,虽在芯片上有大量的蛋白质,但是一次通常只能将一种或几种标记了荧光探针的蛋白质与芯片相互作用,如研究多个蛋白质则需要重复多次上述操作。但如果将各种待检测的蛋白质分别用一系列不同的量子点标记,则可能实现用同一波长的光激发,同时检测所有标记的蛋白质与芯片上的蛋白质之间的相互作用,这将大大提高检测效率。因此量子点在生物芯片研究方面具有很大应用潜力,预计量子点在生物芯片上的应用会给基因组学和蛋白质组学的研究带来大的突破。

1.4.2 用于测定简单金属离子

由于有些金属离子会对量子点的荧光产生猝灭或增强作用,可以据此对这些金属离子做定量或定性分析。庞代文等^[32]通过银离子对 CdSe-BSA 荧光的猝灭效应对银离子作了定量测定,检出限达到 $7.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,并讨论了反应的机理。庞代文等^[33]将 CdSe/ZnS 表面用 BSA 修饰,利用修饰后的 QDs-BSA 作为荧光探针,通过 Cu^{2+} 对其发生的荧光猝灭测定了中药片中微量铜,检测限达到了 $1.0 \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 展 望

尽管 QDs 具有以上种种优点,它也不是无所不适的,仍存在许多需进一步研究的问题。

(1) 设计合成亲水性的发光量子点,修饰表面的化学基团以适应各种生物学上的应用。有机相合成的量子点发光效率高、尺寸均匀,但是生物相容性差,应用于生命体或对生物物质进行检测时需要解决诸多问题。目前已经出现不少方法解决这一难题,但量子点的荧光效率都有不同程度的减小,因此在水溶性、生物相容性研究领域仍有很大发展空间^[34-36]。

(2) 在高选择性、高度特异性标记细胞和生物分子的技术上推陈出新,对非特异性背景进行弱化。目前主要是利用抗原-抗体、亲和素-生物素之间的特异性识别进行细胞或组织的标记。但生物分子所处环境复杂,发展特异性和选择性的细胞和生物分子标记是量子点用于生物研究的重大挑战^[37]。

(3) QDs 在活体内的惰性,即对活体的长期毒性还有待验证。现阶段对于量子点在生命体中的应用绝大部分尚处于实验阶段,周期较短,对 QDs 的毒性问题没有细致深入的研究。当然考虑到 QDs 的实际应用时,不可避免地要涉及它的毒性及消除问题。

(4) 量子点的体内成像技术不断优化和完善,但活体深层组织成像技术灵敏度低。目前主要通过多光子显微镜技术和发展红外、近红外探针等策略解决,特别是后者在生命领域有极大的发展空间。目前已经合成出 700 nm 以上甚至 900 nm 的量子点,但是荧光效率较低,需要更多、更深入的研究。

纳米生物医学是由纳米科学、生物学和医学交叉结合形成的,这种结合尽管只有十几年的历史,但已经取得了许多令人鼓舞的成就。而半导体量子点正向人们展示它独特的性质魅力,并拥有广阔而深远的应用前景,围绕 QDs 在生物方面的应用研究正蓬勃发展,它也将成为纳米技术领域一个引人注目的方向。

参 考 文 献

- [1] Luccardini C, Tribet C, Vial F, et al. Langmuir, 2006, 22, 2304.
- [2] TENG Feng, TANG Ai-wei, GAO Yin-hao, et al (滕 枫,唐爱伟,高银浩,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(5): 651.
- [3] XU Hai-e, YAN Cui-e(徐海娥,闫翠娥). Progress in Chemistry(化学进展), 2005, 17(05): 800.
- [4] Clapp A R, Medintz I L, Mauro J M, et al. J. Am. Chem. Soc., 2004, 126 (1): 301.
- [5] Eunkeu O, Hong M Y, Dohoon L, et al. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127 (10): 3270.
- [6] Clapp A R, Medintz I L, Fisher B R, et al. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127(4): 1242.
- [7] Mitchell G P, Mirkin C A, Letsinger R L. J. Am. Chem. Soc., 1999, 121(35), 8122.
- [8] Goldman E R, Medintz I L, Whitley J L, et al. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127: 6744.
- [9] ZHANG Chun-yang, MA Hui, DING Yao, et al(张春阳,马 辉,丁 尧,等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2001, 22(1): 34.
- [10] LIN Zhang-bi, ZHANG Hao, CHEN Qi-dan, et al(林章碧,张 皓,陈奇丹,等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24(4): 609.
- [11] Ji X J, Zheng J Y, Xu J M, et al. J. Phys. Chem. B, 2005, 109(9): 3793.
- [12] Chang E, Miller J S, Sun J T, et al. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2005, 334: 1317.
- [13] Goldman E R, Anderson G P, Tran P T, et al. Anal. Chem., 2002, 74: 841.
- [14] Lingerfelt B M, Mattoussi H, Goldman E R, et al. Anal. Chem., 2003, 75: 4043.
- [15] Tanke Hans J, Dirks Roeland W, et al. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16: 1.

- [16] YANG Rui, JI Wei, YAN Yu-xi, et al(杨蕊, 冀伟, 闫玉禧, 等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2005, 26(6): 1043.
- [17] Chan Warren C W, Nie Shuming. Science, 1998, 281: 2016.
- [18] Goldman E R, Medintz I L, Hayhurst A, et al. Anal. Chim. Acta, 2005, 534: 63.
- [19] Wu X Y, Liu H J, Liu J Q, et al. Nature Biotechnology, 2003, 21(4): 452.
- [20] Sun B Q, Xie W Z, Yi G S, et al. J. Immunological Methods, 2001, 249: 85.
- [21] Yang W, Zhang C G, Qu H Y, et al. Anal. Chim. Acta, 2004, 503: 163.
- [22] Goldman E R, Clapp A R, Anderson G P, et al. Anal. Chem., 2004, 76(3): 684.
- [23] LI Jun, YUAN Hang, ZHAO Kui, et al(李军, 袁航, 赵奎, 等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24(7): 1293.
- [24] Bhatia S N, Chan W C W, Derfus A M. Nano Lett., 2004, 4(1): 118.
- [25] Xie M, Liu H H, Chen P, et al. Chem. Commun., 2005, (44): 5518.
- [26] Wang G P, Song E Q, Xie H Y, et al. Chem. Commun., 2005, (34): 4276.
- [27] Xie H Y, Zuo C, Liu Y, et al. Small, 2005, 1(5): 506.
- [28] SONG Qiang, ZHAO Chuan-li, LI Li-zhen, et al(宋强, 赵川莉, 李丽珍, 等). Journal of Shandong University(Health Science) (山东大学学报·医学版), 2005, 43(8): 753.
- [29] Hoshino A, Hanakik, Suzuki K, et al. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 314: 46.
- [30] Kim S, Lim Y T, Bawendi M G, et al. Nature Biotechnology, 2003, 22: 93.
- [31] Zimmer J P, Kim S W, Ohnishi S, et al. J. Am. Chem. Soc. (Communications), 2006, 128: 2526.
- [32] Ai X P, He Z K, Pang D W. J. Analyst, 2004, 129: 619.
- [33] YAN Zheng-yu, PANG Dai-wen, SHAO Xiu-fen, et al(严拯宇, 庞代文, 邵秀芬, 等). Journal of China Pharmaceutical University(中国药科大学学报) 2005, 36(03): 230.
- [34] Wang X. H., Du Y. M, Ding S, et al. J. Phys. Chem. B, 2006, 110: 1566.
- [35] Palaniappan K, Xue C H, Arumugam G, et al. Chem. Mater., 2006, 18: 1275.
- [36] Jang W, Mardiyani S, Ficher H, et al. Chem. Mater., 2006, 18: 872.
- [37] Elizabeth L B, Ian D T, et al. Bioconjugate Chem., 2005, 16: 1488.

Applications of Quantum Dots to Biological Probes

YANG Dong-zhi, XU Shu-kun*, CHEN Qi-fan

Department of Chemistry, Northeastern University, Shenyang 110004, China

Abstract Quantum dots (QDs) have shown unique optical properties compared with traditional organic dyes. Now, more and more attention has been paid to them, especially in the fields of biological medicine and materials. Much work about QDs application in biology has been done by many researchers. In recent years, QDs have been widely used as biological probes. By observing the conjugation site between QDs and target molecules or tracking the movement of QDs in live cells, some information about transferring signals mechanism may be obtained, therefore, offering apparent evidence for controlling cell's growth and finding the factors in the deterioration of cancer. In the present paper, interactions among macro molecules are introduced with fluorescence resonance energy transfer (FRET), fluorescent labeling of biological macro molecules, labeling and imaging of cells and tissues, and imaging *in vivo*. Furthermore, some developments and problems in application are summarized. Thirty seven references are cited.

Keywords Quantum dots; Biological probes; Fluorescence; Imaging *in vivo*; Review

(Received Jun. 6, 2006; accepted Aug. 18, 2006)

* Corresponding author