

量子点在生物检测中的应用

初丛波^a 单玉萍^{b*} 王宏达^{b*}

(^a吉林省水利水电勘测设计研究院 长春 130021;

^b中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室 长春 130022)

摘 要 过去十几年里,量子点从材料科学到生命科学、从基础研究到实际应用都开展了广泛的研究。量子点在生物成像、光治疗、药物/基因转运、太阳能电池等领域均具有广泛的应用。通过调节量子点的表面性质,实现量子点与细胞相互作用的可控性是一个关键的问题。伴随着量子点潜在毒性问题的产生,纳米毒性成为纳米材料安全性评估的重要指标,并且受到科学家们的高度关注。本文综述了量子点的特性、细胞生物学应用及在生物医药领域相关的细胞毒性研究,并展望了量子点的未来发展趋势。

关键词 量子点,生物应用,荧光标记,细胞毒性

中图分类号:O652

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2014)04-0377-12

DOI:10. 3724/SP. J. 1095. 2014. 30457

21 世纪是生命科学的世纪,它与纳米科学的交叉应用将成为新世纪科学研究的焦点之一。近年来,无机半导体纳米微晶-量子点作为一种品质优良的新型胶质材料被广泛应用于物理、化学和生物医学等领域,特别是作为荧光标记探针在生物学领域被广泛的研究^[1-14]。量子点的出现始于 20 世纪 70 年代末,经历了由单一量子点到多元素复合量子点的发展历程。2006 年, Nature 杂志将半导体量子点列为最有可能率先实现大规模商业化应用的四类纳米材料之一^[15]。在显像领域,量子点因其高颜色饱和度及高发光量子产率,适合用作有机发光二极管染料。将有机半导体材料和量子点结合预期可以制造出量子点有机发光二极管及新一代超亮显示器,未来有可能取代现有的液晶显示器。在能源领域,太阳能电池也受益于量子点的开发利用。量子点能够吸收紫外到远红外区的光,即使是在阴天也能捕捉到散射光,而且吸光效率高,吸收转化能源效率高达 65%,因此研究人员将它们用于聚能器来开发高效太阳能电池。这种新一代太阳能电池具有巨大的市场潜力,将会为未来实现低碳节能作出贡献。伴随着高科技产业的需求,量子点规模化生产必将在未来得到广泛的发展^[16]。

量子点具有尺寸效应、粒径可调、单吸收、多发射、发射波长范围宽等特点,因此单一激发就能得到一系列发射波长不同、颜色各异的量子点荧光探针。量子点还有光化学稳定性高、抗光漂白能力强、荧光不易淬灭等优良光学特性,因此成为生物学领域倍受关注的纳米荧光材料之一^[17-22]。在生物领域中,用作荧光标记探针是量子点最具发展前景的应用。Nie 和 Alivisatos 两个研究小组^[23-24]于 1998 年同时在 Science 上发表了将量子点作为生物荧光探针用于细胞和组织标记的文章,这标志着量子点在生命科学中的应用开始起步。随后的十几年中,量子点荧光标记探针在组织成像、活体成像、活细胞和动物体内的靶向示踪等研究领域取得了一系列瞩目的成果。2010 年 Nie 等^[25-26]又将多色和复用能力很强的量子点用于癌症诊断,极大地改善了体外分子和细胞诊断的特异性和灵敏度。最近 Pang 课题组又利用量子点实现了细胞内快速准确的三维单颗粒定位示踪^[27],从而预示了量子点将会在生物化学、细胞生物学、分子生物学、蛋白质组学、临床医学和药物筛选释放等研究领域发挥重要作用。下面我们将着重阐述量子点的性质、合成、生物学应用以及潜在的细胞毒性。

2013-09-09 收稿,2013-11-08 修回,2013-12-18 接受

国家自然科学基金资助项目(21303181)

通讯联系人:王宏达,研究员; Tel:0431-85262864; E-mail:hdwang@ciac.ac.cn; 研究方向:纳米粒子与细胞相互作用

共同通讯联系人:单玉萍,助理研究员; Tel:0431-85262864; E-mail:shanyup@ciac.ac.cn; 研究方向:量子点与细胞膜相互作用

1 量子点的物理化学性质

量子点尺寸在1~100 nm之间,由II-VI或III-V族元素组成。它是一种三维团簇,三个维度尺寸均在纳米量级。与传统荧光染料相比,它有稳定性好、荧光吸收谱宽、发射谱峰窄且对称、无长波段拖尾现象、荧光强度大、荧光寿命长、量子产率高、不易发生光漂白等优点^[28-29]。

量子点独特的性质是基于它自身的量子效应,当颗粒尺寸进入纳米量级时,尺寸限域将引起尺寸效应、量子限域效应和表面效应,从而产生与宏观体系和微观体系不同的低维物性,具有宏观材料无法比拟的特殊物理化学性质。在合成过程中,通过改变合成时间、温度、配体分子可以精确地控制量子点的大小和形状^[30],而且修饰后生物相容性较好^[31]。量子点在外界能量激发的情况下,可发出与其自身能级相对应的荧光。用一种激发光源同时激发不同粒径和组成的量子点,其发射光谱可以覆盖紫外到近红外的光谱区域,且光谱重叠区域小^[32],实现了单激发、多发射,有利于实现多个目标大分子的检测^[33]。

在单颗粒水平下,量子点发出不连续的荧光,这是由量子点特殊的发光性质所导致的。为了克服这个困难并避免表面原子氧化或发生其它化学反应,就要以核为中心,外围生长另一种材料的原子层,形成核壳结构的量子点。经过仔细设计包覆的量子点,其量子产率能达到90%,同时也增加了量子点的光稳定性^[34]。量子点自身具有优秀的光学性质,是普通荧光染料所无法比拟的,为研究细胞中生物分子长时间相互作用提供了实验的可能性。有望能够成为一种近理想的荧光标记物,应用于生物学领域的原位实时动态检测。

2 量子点的合成及生物耦合

高质量的量子点可以通过多种方法合成^[35-36],1993年以前人们利用气相沉积法在水溶液体系中加稳定剂合成量子点,这种方法合成的量子点量子产率偏低。目前,普遍的制备方法大致可以分为高温有机溶剂裂解法和常温水相合成法。比较而言,有机相合成的产物具有优越的荧光性质,是实验研究的首选方法。通过涂覆使产物表面结合一层有机溶剂分子,封闭纳米晶体表面的晶格缺陷使悬空键(Dangling Bonds)饱和,提高了量子产率和荧光强度,进而可以有效地应用在生物学标记领域^[37]。

1993年Bawendi小组^[38]在有机体系中合成了高质量的硒化镉(CdSe)量子点,制得的硒化镉量子点具有很好的晶体结构和较窄的粒径分布,但量子产率只有10%。1996年,Hines^[39]对Bawendi的方法进行了改进,合成了核/壳结构CdSe/ZnS量子点。在真空条件下,将TOPO(三辛基氧化膦)加热到200℃,然后在氩气环境下,升温至350℃,待温度稳定后,将Cd/Se/TOP(三辛基膦)储备液注入反应器中,停止加热。待反应混合物冷却至310℃时,抽样检测CdSe的生长情况。随后降温至300℃,在20s内将反应物溶液注入反应器。冷却温度至100℃并搅拌1h,离心分离沉淀,再用无水甲醇洗去多余的TOPO,然后将所得微粒分散到无水氯仿中,除去未反应物和残余物,得到核壳结构纳米颗粒,其粒径分布较窄,量子产率达50%。在此基础上,2001年Peng小组^[40]改进了有机相合成方法,他们用氯化镉(CdCl₂)、氧化镉(CdO)、醋酸镉(CdAc₂)、碳酸镉(CdCO₃)等镉的前驱体替代以往使用的具有毒性的有机镉。在一定条件下与S、Se的溶液混合,能够一步合成Cds、CdSe量子点,合成的量子点具有较高的量子产率。量子点还可以在水相中进行合成,此方法解决了量子点的水溶性问题。与有机相的合成方法相比,水相合成法操作简便、成本低、量子点表面电荷和性质可控,但是这种合成方法的量子产率低,尺寸分布较大。Vossmeier等^[41]利用高氯酸镉(Cd(ClO₄)₂)取代二甲基镉(CdMe₂)首次完成了胶体量子点的可控合成。

大多数在有机溶剂中的合成反应要求体系温度高且有表面活性剂(TOPO或TOP)存在,这样能够产生稳定、单分散性好、表面易于修饰的量子点颗粒。通过这种方法制得的量子点表面是疏水的,使得它们可以均匀地分散在有机溶剂中,但很难在水相中稳定存在。暴露在量子点外面的长烃链使其亲水性和生物相容性很差,然而涉及细胞生物的实验均要求材料具有水溶性。因此,表面修饰成为量子点制

备的一个重要步骤,取代表面活性剂或者直接涂覆一层亲水性聚合物可以解决这个问题。配体置换是早期的修饰方法,即通过巯基丙酸^[42]、巯基乙胺^[43]和半胱氨酸^[44]等取代量子点表面的有机分子,使其变为亲水性产物。这种方法相对简单,但由于破坏了量子点表面疏水层的保护作用,导致产物的荧光减弱、量子产率降低以及有毒物质 Cd^{2+} 的释放。由于巯基配体不稳定,与 Zn 或 Cd 之间结合力也不强,致使量子点易于团聚和沉淀。Dabbousi^[45]使硒化镉量子点外延生长出一层硫化锌外壳,制备了核壳结构的量子点。后来 Kim 等^[46]优化了 CdTe/CdSe 量子点的制备,半导体外壳改进了量子点内核的光学特性并且保护内核化学降解;但是由于生物相容性和生物耦合反应,一些溶液中多余的硅酸酐、聚合物、有机生物分子也就更容易包覆沉积在外壳上。

为了使修饰后的量子点具有良好的特异性、稳定性、完整性且能够抵御各种复杂体系的刺激,研究者对量子点的修饰提出了更高的要求,应尽可能地选择生物相容性好、非特异性吸附少的修饰试剂。Nie 等^[47]使用双功能基团的配体巯基乙酸基和二硫苏糖醇(DTT)直接吸附到量子点表面,他们将含巯基的化合物和有机碱加入 TOPO 包覆的量子点溶液,有机碱夺去巯基和羧基上的质子使硫原子表面带一个单位的负电荷,通过静电作用与量子点表面 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 结合,这些量子点可以重新溶于水溶液中。这种方法突破性地解决了量子点溶于水相的问题以及通过表面活性基团与生物大分子偶联的问题,后来巯基被广泛应用于多种水相量子点的合成中。

量子点与抗体、蛋白、肽、核苷酸、小分子、脂质体的共价或非共价结合被称为生物偶联量子点,可以用来直接或间接地标记细胞外蛋白和亚细胞器。制备生物偶联量子点是生物成像的先决条件。生物偶联量子点已经成为生物学和生物技术中的一部分,广泛应用于大分子、细胞、动物组织的显微成像^[48]。根据一些特殊应用(如传感器、细胞标记、胞内运动以及活体内成像等),选择特异性生物分子,通过静电、疏水及共价偶联等作用结合到带有表面修饰基团的量子点上。换句话说,通过连接量子点,生物分子才能够被荧光标记。生物分子的共价偶联主要是利用基团之间的化学反应,通过偶联剂的作用将特异性生物大分子与量子点连接。对于核壳结构量子点的表面,为了促进生物标记反应,抗生素、维生素、伯胺、巯基、羧酸等活性官能团或分子是必不可少的。

3 量子点在生物标记和示踪中的应用

3.1 细胞内标记和示踪

鉴于其独特的光物理性能,量子点被广泛应用于体外细胞标记^[49-50]。相比于传统的有机荧光染料,量子点的主要优势是其具有较强的抗漂白性能(从几分钟到几小时)、较高的消光系数($0.5 \sim 5 \times 10^6 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1})$)和量子产率^[35]。由量子点标记得到的图像具有更好的对比度和清晰度,因此能够在大多数领域中替代有机染料。近年来,量子点用于细胞内成像取得了较大的进展,很多活细胞和固定细胞内的组分以及蛋白被量子点标记、成像,如细胞核、线粒体、微管、微丝蛋白、细胞角质蛋白和内吞体等^[51-52];同时,量子点也用来研究细胞膜蛋白和受体,包括前列腺特异性膜抗原(PSMA)、HER 激酶、甘氨酸受体、血清素运输蛋白、*p*-糖蛋白、Band III 蛋白和钠-钾 ATPase 等^[33,49,51,53-54]。量子点在免疫荧光应用中最有利的一面是微量的量子点就能够产生检测信号。一些研究已经报道量子点在细胞样品中有忽隐忽现的现象,被称为“闪烁”^[55]。量子点这种特性可以把免疫荧光检测灵敏度提高到单分子水平。

量子点在细胞外标记是相对简单的,但是对细胞内蛋白进行标记是十分困难的。科学家尝试了多种方法将量子点输送到细胞质中用于胞内蛋白的染色,然而仅有少数几种方法取得了成功。2002 年 Dubertret 等^[56]报道,用显微注射技术对爪蟾胚胎进行量子点标记;2005 年 Rieger 等^[57]也采用这种方法标记了斑马鱼的胚胎细胞,但是这一技术操作难度极大,因此也难于进行高通量的分析和大规模的推广。细胞通过内吞^[58-59]和非内吞的途径摄入量子点得到众多研究者的青睐,但这些方法仅仅是对内吞体进行荧光定位。Mansson 等^[60]用量子点标记了 F-肌动蛋白丝,他们用酶联亲合素化的量子点标记了单个的生物素化的 F-肌动蛋白丝,这种方法标记的肌动蛋白丝是具有活性的。量子点也用于标记肿瘤细胞,如死亡蛋白(mortalin)^[61]和 *p*-糖蛋白^[62]。

诸多的研究组报道了量子点用于细胞内不同组织结构的多色成像,Hanaki等^[59]利用不同发射波长的量子点同时标记了细胞核结构和微丝纤维;Nisman等^[63]用红色量子点标记了细胞核仁,而用绿色量子点标记了线粒体,非常清晰地区别了两种结构。量子点也被应用到酪胺信号放大上,为了更好的连接抗体,利用辣根过氧化物酶将酪胺连接到抗体目标上,这种方法可以提高荧光强度并且使其被检测到。量子点和电子显微镜技术的结合可以标记细胞核的早幼粒细胞性白血病蛋白和cAMP应答相关结合蛋白,还可以通过量子点和金纳米粒子结合标记两个目标来实现双靶向定位。

量子点光稳定性和信噪比的优势可以使其成为单分子示踪研究的理想探针,一些研究人员已经尝试着应用量子点追踪包含细胞信号在内的细胞表面受体动力学。早期的尝试利用量子点标记血清素转运载体,由于效率低、不稳定从而不能区分血清素受体和转运载体而受到限制^[64];后来,量子点被广泛的成功应用到成像和示踪神经PC12细胞内部甘氨酸受体^[65]、erb/HER受体^[66]、AMPA受体^[67]、GABA_A受体^[68]和TrKA受体^[69]等活动。在这些研究中受体的动力学可以追踪,并且对于长期的示踪来说量子点比有机荧光团有较大的改进。Lidke研究小组^[66]在erbB/HER受体中研究受体介导的信号转导,在细胞内吞的过程中追踪受体并发现了一个未知的退化传送机制,Sundara^[69]研究用量子点用来示踪神经细胞中受体的活动来证明未知的受体。然而两个研究小组^[65,67]报道了一些可以用有机荧光团标记的受体,量子点却不可以进入,这可能是由于量子点尺寸相对较大。后来研究人员发现一种新奇的方法可以示踪此过程,这种方法是用一个小的受体肽来取代抗-AMPA抗体以减小整个受体-量子点复合体的尺寸^[67],但是大尺寸的量子点复合体结合到目标分子上时也可能影响蛋白的正常功能^[69]。

由于一些蛋白可以被多肽特异性识别,所以制备多肽结合的功能化量子点是研究者们感兴趣的内容之一。Hoshino^[70]发现,分别连接了细胞核和线粒体特异性短肽的量子点,进入细胞后分别定位在细胞的细胞核和线粒体上。Santra^[71]研究发现,连接了细胞核靶向肽的量子点可以透过大鼠的血脑屏障,进入到脑软组织的细胞核中;此结果很有应用价值,研究人员可以实现无伤害的活体亚细胞结构的标记和示踪。

量子点的光稳定性是有机染料Alexa488的480倍^[62],因此它能有效地用于长时间细胞内示踪,从而监测细胞内的动态,包括胞内运动、分化和凋亡等^[56,58,72]。研究者用多种方法将量子点输送到活细胞内,包括显微注射^[56]、肽诱导转运^[73]、电穿孔^[74]和吞噬^[58]等。一旦量子点进入细胞,在细胞分化过程中,量子点会从母细胞转移到子细胞。外源凝集素包裹的量子点被用于标记革兰氏阳性菌,研究者监测到单个量子点在几分钟内扩散到活体细胞膜,然后由细胞膜进入胞质中^[75]。

3.2 生物体内组织成像

量子点因具有近红外发光光谱、长时间稳定性、高亮度荧光、抗光漂白性等独特的优势使它们成为活体内荧光成像和标记的优先选择。Akerman小组^[76]将巯基化靶向肽连接的量子点注射到癌变大鼠体内,取出组织切片,发现大量多肽量子点探针富集在癌变组织内。Kim小组^[64]将量子点分别注入到鼠和猪的皮下,它们定向运动到哨位淋巴结,通过低能量近红外激发(5×10^{-3} W/cm²)得到了猪淋巴结1 cm深度处的荧光成像。这为活体动物的体内成像奠定了基础,也为临床医学成像、外科手术的准确性提供了依据。之后在2005年,Ravindran等^[77]首次将量子点应用于植物体内成像,他们用量子点技术研究了血蓝蛋白在植物花粉管和卵子生长过程中的作用,开创了量子点在植物细胞中实时成像的先河。为了应用到活体成像和其它的生物学领域,量子点需要有效、特异性、可靠地标记到特定的器官或者疾病位点,特定目标的追踪可以通过将示踪分子连接到量子点表面来实现。由于量子点复合物的体积相对大(通常直径约20 nm)、循环时间短,活体内示踪和成像是具有挑战性的,到目前为止相关报道的成功率只有一半。

目前,关于量子点用于生物整体成像的报道还相对较少,整个动物成像会有一些困难,其中最重要的就是在动物和人类体内应用存在潜在的毒性,需要进一步工作确立量子点在这个领域的利弊。生物体组织有自身的吸光、散射以及自发荧光等特点,这些会给动物体内成像带来很多问题;但是组织自身的吸光和散射远比量子点在近红外区域(700~1000 nm)的荧光弱^[78],所以利用近红外量子点在近红外区域发射荧光可以加强荧光信号。组织自发荧光也依赖于激发光的波长^[79],而量子点已经拓宽了吸收

波长范围,因此可以选择一个可以降低组织自发荧光的波长。一些研究也报道了量子点的自发荧光^[80],这类似于荧光能量共振转移,只是在这个系统中生物发光分子通过酶的激发输出能量,例如荧光素酶激发量子点的荧光。这种方法的优点是不需要激发光,并且减少自发荧光和背景噪音,但缺点是引进两个潜在的免疫性物质,它还要依赖于生化酶恰当的体内分布。关于量子点活体应用需要重点考察的一个问题是它容易从血液中被清除,量子点和其它的纳米粒子会被外延的网状内皮组织摄入,这降低了其在血液中的浓度^[81]。用聚乙二醇包覆可以阻止调理素和纳米粒子的相互作用,据报道,这样还可以延长量子点的循环寿命,但是不能避免非特异物质的摄入^[77,82-83]。一些研究人员报道了量子点在活体生物靶向的自动引导,靶向包括肿块^[84-85]、各个不同组织的脉管系统^[78]、尸体剖检和活体注射量子点之后部分组织中的一些位点^[86]。Gao等^[87]利用抗体修饰的聚乙二醇量子点靶向定位前列腺特异性的膜抗原,用作为前列腺上皮细胞的表面标志,这些抗原也在大量非前列腺早期癌症的新脉管系统中表达^[88]。量子点特异性地结合到前列腺肿块异种移植植物上,并且产生明显比绿色荧光蛋白亮的荧光信号,之前这种技术就已经应用到活体中癌症成像^[89-90]。另外有报道合成一个肿块特异的嵌合体噬菌体(量子点-噬菌体-抗生物素蛋白),它可以用作肿块的特异性靶向定位^[85]。然而无论活体内还是活体外,相比于有机荧光团,量子点的组织渗透均被降低,这可能是由于量子点复合物相对大的体积造成的,并且在转移到活体细胞和组织中时,由于不稳定性会有冷光损失^[91]。也有人尝试在进行外科手术时利用核壳结构的量子点成像脉管系统,在信噪比5:1的条件下可以观察到冠状脉管系统,激发光类似于外科手术时照明的强度^[78]。胸廓切开之前或者之后,在1.5~2.0 mm深度处成像鼠的冠状脉管系统都是可以的,并对指定的血管组织进行鉴定^[84,92]。透过鼠的完整皮肤和脂肪组织成像,可以在900 μm深处的底部看到脉管系统,透过250 μm的脂肪组织也可以成像毛细血管,相比于传统的有机荧光团异硫氰酸荧光素-右旋糖酐,它可以在更深的地方用更小的能量看到更多的细节^[92-93]。

量子点还可以为哨位淋巴结绘图提供一个新的选择,哨位淋巴结绘图可以鉴定原发肿瘤流入的淋巴第一节^[94]。目前的情况,许多癌症中的淋巴结切除术都会导致严重的术后不健全,只有切除哨位淋巴结可以避免这种不健全。病理学家可以详细地诊察被切除的节点,尤其是运用专门的技术,例如PCR可以从一百万个细胞中检测出一个肿瘤细胞^[94]。目前多使用存在严重缺陷的异构硫蓝和放射性同位素标记过的染料隔离哨位淋巴结^[95-97]。而量子点提供了更好的选择,因为它可以在近红外区发荧光并且可根据淋巴的分块来合成大小合适的量子点。报道表明,量子点和一个常用的腋窝节点淋巴染料-异构硫蓝在注入小鼠体内后是共定位的^[98]。已经有研究者用量子点在猪的胸腔^[95,97]、食道^[99]、胃肠道和黑素瘤切除位点^[100]鉴定哨位淋巴结,这些研究人员证实,注入的量子点可以快速地定位哨位淋巴结并且可以在肺组织高达5 cm的深处成像^[97],量子点可以停留在哨位淋巴结原位3 h并保持荧光强度不变。将量子点图片叠加到正常的表面解剖学图片上可以给外科医生进行手术指导^[92]。但是,关于生物相容的研究报道称,近红外发光的量子点会稍微蓝移,大于量子点可见光的发光范围^[68],且光致发光量子产率较低(低于4%);其它的缺陷是目前还未知的量子点毒性,建议同样的量子点分段载入切除的淋巴,毒性可能被忽略。

3.3 生物体内病菌和毒素检测

量子点可以用于检测病原体 and 毒素并表明它们的性质(如毒性等),一些研究已经得到了很好的结果,多色成像在这方面尤其有用。目前,几种病原体已经作为靶向检测目标,包括担孢子、隐孢子虫、蓝氏贾第鞭毛虫^[101-102]、埃希氏菌属大肠杆菌和伤寒沙门氏杆菌^[103]等。利用量子点通过免疫荧光方法同时多色标记小隐孢子虫和贾第虫产生高的信噪比,比常用的商业化染色方法具有更好的光稳定性和光强^[102],可是也有研究发现,基于量子点的分析没有酶联免疫吸附测定技术敏感^[104]。量子点连接麦胚凝集素和铁传递蛋白已用于标记细菌和真菌^[75]。铁传递蛋白结合量子点可以测试引起疾病的毒性,因为人类的铁传递蛋白和毒性密切相关^[105]。在这个研究中,只是葡萄球菌的致病家族被铁传递蛋白-量子点结合体标记,这可以用于快速的检测侵害性的葡萄球菌。量子点也已经用于病毒检查^[106-107],利用免疫荧光技术来检测呼吸道合胞病毒F蛋白,有利于定量地分析出家族之间F蛋白表达的区别^[107]。利用原位杂交和量子点技术检测乙型和丙型肝炎病毒也已经被证实,用与乙型和丙型肝炎病毒互补的

DNA 微阵列与量子点结合,检测乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒信噪比可以高达 150,并且不需要长的孵育时间^[106]。

一些研究已经应用量子点来检测毒素^[108-110],量子点免疫荧光用于标记葡萄球菌的肠毒素 B、霍乱毒素、志贺样毒素和蓖麻毒素等,对于葡萄球菌肠毒素 B 的检测浓度可以低至 3×10^{-9} g/mL。利用毒素的混合物多色检测表明,所有的 4 个毒素均可以被检测到,但仍存在交叉反应和非特异性结合问题,还有待进一步改进^[111]。

3.4 量子点的细胞毒性

随着量子点合成技术的不断改进,量子点有望成为最具潜力的荧光标记物之一,尤其是在活体细胞标记领域的应用。但是现在尚未推广到临床及实际生活中,主要是由于量子点本身含有镉、铅有毒重金属成份。在量子点与细胞的作用过程中,它们给细胞膜造成极小的微孔,这可能改变细胞内外的离子浓度差以及细胞内部起保护细胞完整性和正常运作功能的大分子浓度。微环境中的酸碱度变化也会诱导量子点的变质,向环境释放重金属离子,导致细胞发炎甚至死亡^[112-114]。当量子点进入机体后,通过光解或生物降解释放出内核的重金属离子 Cd^{2+} 、 Se^{2+} 等,导致对机体细胞或组织的损伤^[115]。重金属离子在脊椎动物体内经过肝、肾器官代谢解毒时,易沉积在肝脏和肾脏中,严重损伤肝、肾器官的功能。为了避免或尽量减小量子点毒性,最直接方法是在量子点表面涂覆一层无毒或低毒的有机分子、无机分子或聚合物(如聚乙二醇)来屏蔽毒性。量子点的细胞毒性作用不仅与量子点自身性质有关,也与量子点表面修饰有关。一些研究已经证明了 CdSe、CdSe/ZnS 水溶性量子点的细胞毒性,主要是由于量子点外表面不稳定的包覆层或生物降解导致 Cd^{2+} 的释放而造成的^[116]。

Kirchner 等^[117]采用巯基丙酸、硅烷化以及聚合物包覆 3 种不同方法修饰量子点,研究其对细胞的毒性。发现量子点对细胞的毒性取决于纳米粒子所释放有毒 Cd^{2+} 的多少,而量子点的表面涂层稳定性是影响其毒性的重要因素。分别用 CdTe 量子点和包被巯基丙酸(MPA)、半胱氨酸(Cys)、乙酰半胱氨酸(NAC)的 CdSe/ZnS 量子点作用于癌细胞,研究发现与 CdTe 量子点作用后,细胞内 Cd^{2+} 浓度升高,而与包被巯基丙酸(MPA)、半胱氨酸(Cys)、乙酰半胱氨酸的 CdSe/ZnS 量子点作用后,胞内 Cd^{2+} 浓度没有明显变化。量子点对细胞的毒性不仅仅是由于游离态 Cd^{2+} 的释放而引起的,CdSe/ZnS 量子点几乎是无毒的,而 CdTe 量子点则具有一定的毒性,但细胞生存力与胞内 Cd^{2+} 浓度却没有必然的相关性。共聚焦显微镜观察显示,CdTe 量子点作用过的细胞其溶酶体出现肿胀变形,是由 Cd^{2+} 和单态氧同时作用引起的。Su 等^[118]研究了量子点毒性与 Cd^{2+} 离子的关系,以 CdCl_2 溶液富含 Cd^{2+} 作为对照,经处理后使细胞内 Cd^{2+} 离子浓度相同,CdTe 的毒性远大于 CdCl_2 溶液,表明 Cd^{2+} 的确是量子点毒性的重要影响因素。Chang 等^[119]建立了一种依据细胞内量子点摄入的量对其毒性进行评估的体系,比较了 3 种不同量子点对细胞死亡率的影响,发现细胞毒性随着量子点浓度的增加而增加。当 3 种量子点的胞外浓度相同时,未修饰量子点的毒性大于修饰量子点的毒性,细胞对未加修饰的量子点吞入量远大于修饰后量子点的吞入量。无论量子点表面涂层是什么,细胞的死亡和吸收量子点的量呈正相关关系。虽然如此,量子点表面涂层也会影响细胞对量子点的摄入量,并且进而影响细胞内的细胞毒性^[120]。Tang 等^[121]报道了 D-glutathione(右旋-谷胱甘肽)包覆量子点的毒性小于 L-glutathione(左旋-谷胱甘肽)包覆量子点的毒性,这与其引起细胞自噬能力有关。量子点具有细胞毒性的另一个可能作用机制是活性氧的产生,量子点通过给邻近的氧分子传递光能而产生单态氧(ROS),ROS 能够破坏细胞膜,促使脂质过氧化以及形成 DNA 切口,导致细胞损伤或死亡^[50]。

这些研究表明,表面修饰物质对量子点的毒性具有显著的影响,不同材料量子点的毒性机制仍需进一步研究。除了在量子点外表面涂覆一层稳定且坚实包覆层以减小其毒性外,另外一种方法就是创造一种不包含毒性成份的量子点体系。这就要求相关学科的共同研究,建立合适的模型,在基因、分子、细胞以及哺乳动物水平上进行研究,对多种暴露途径产生的毒复效应进行研究,从免疫系统、神经系统、生殖系统、代谢动力学等进行综合研究,探索开发出一条环保、经济、可以大量合成量子点的路线,这对于当前以及今后的科学研究、工业产业化生产应用都具有指导性的意义。

4 结论和展望

量子点作为新兴的荧光标记成像材料,由于其独特的光学特性,近年来越来越受到各个领域科研工作者的关注。高性能多功能的量子点与先进的光学成像技术结合,为实验室实时动态检测细胞内分子运动机制及生命活动规律提供了强大的技术依托。国内外利用量子点在医学方面的研究比较广泛,也取得了重要的成果。量子点的出现给生命科学众多领域的研究带来了新的契机,在细胞荧光标记、组织光学成像、细胞内微粒示踪、动植物活体定位成像、基因组学研究、生物芯片的制备等生命科学研究中发挥着越来越重要的作用。由于量子点表面修饰有大量的扩展空间,科学家正致力于研究用不同的共聚物包裹量子点使之多功能化,可以与多种药物分子结合;这不但可以追踪药物分子的动力学过程,而且可以实时的治疗和监测病理组织,还可能成为药物海量筛选的有力工具,有望为研究体内药物作用机制提供有效的实验方法。关键是如何从源头降低量子点的生物毒性,又能保证其荧光性能。

总之,量子点作为新一代荧光探针,在生命科学领域已经取得了显著的成果。随着纳米、生物、材料和检测技术的不断发展,以及对量子点合成与应用研究的不断深入,有望在未来合成出生物相容性好、性能稳定、低耗能、低毒性、特异性强的多功能量子点,从而能广泛地应用于各个学科领域,这对于疾病诊断、病理组织检测、药物筛选等生物和医学研究有重要的现实意义。

参 考 文 献

- [1] Li F, Chen H, Ma L, *et al.* Insights into Stabilization of a Viral Protein Cage in Templating Complex Nanoarchitectures: Roles of Disulfide Bonds[J]. *Small*, 2014, **10**(3):536-543.
- [2] Halder K K, Sen T, Patra A. Metal Conjugated Semiconductor Hybrid Nanoparticle-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer[J]. *J Phys Chem C*, 2010, **114**:4869-4874.
- [3] Weaver J E, Dasari M R, Datar A, *et al.* Investigating Photoinduced Charge Transfer in Carbon Nanotube-Perylene-Quantum Dot Hybrid Nanocomposites[J]. *ACS Nano*, 2010, **4**:6883-6893.
- [4] Louie A. Multimodality Imaging Probes: Design and Challenges[J]. *Chem Rev*, 2010, **110**:3146-3195.
- [5] Zhu H, Song N, Lian T. Charging of Quantum Dots by Sulfide Redox Electrolytes Reduces Electron Injection Efficiency in Quantum Dot Sensitized Solar Cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**:11461-11464.
- [6] Justo Y, Goris B, Kamal J S, *et al.* Multiple Dot-in-Rod PbS/CdS Heterostructures with High Photoluminescence Quantum Yield in the Near-Infrared[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**:5484-5487.
- [7] Bigall N C, Parak W J. Polymer Coating of Quantum Dots for Excellent Colloidal Stability[J]. *Protocol Exchange*, 2012, doi:10.1038/protex.2012.043.
- [8] ZHANG Chuazhou, TAN Hui, MAO Yan, *et al.* Synthesis and Properties of Luminescent Carbon Dots and Its Applications [J]. *Chinese J Appl Chem*, 2013, **30**(4):367-372 (in Chinese).
张川洲, 谭辉, 毛燕, 等. 发光碳量子点的合成、性质和应用[J]. *应用化学*, 2013, **30**(4):367-372.
- [9] WU Yuqin, CHEN Jinlong. Sensitive Detection of L-Cysteine by Using Blue Luminescent Gold Quantum Dots[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2013, **30**(2):225-231 (in Chinese).
吴玉芹, 陈金龙. 水溶性发光金量子点灵敏检测 L-半胱氨酸[J]. *应用化学*, 2013, **30**(2):225-231.
- [10] YIN Pengfei, GONG Huiping, LIU Zhengqing, *et al.* Determination of Jatropha Hydrochloride by Core-shell CdTe/CdS Quantum Dots with Fluorescence Quenching Method[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2012, **29**(3):320-326 (in Chinese).
殷鹏飞, 龚会平, 刘正清, 等. 紫外-可见吸收、荧光光谱研究 CdTe/CdS 量子点与盐酸药根碱的相互作用及其应用 [J]. *应用化学*, 2012, **29**(3):320-326.
- [11] LI Pingping, YIN Pengfei, GONG Huiping, *et al.* A Study on the Interaction Between CdTe/CdS Quantum Dots with Mitomycin C and Its Analytical Application[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2012, **29**(3):320-326. (in Chinese).
李萍萍, 殷鹏飞, 龚会平, 等. CdTe/CdS 量子点与丝裂霉素的相互作用及其应用[J]. *应用化学*, 2012, **29**(6):705-710.
- [12] Liu H, Tang J, Kramer IJ, *et al.* Electron Acceptor Materials Engineering in Colloidal Quantum Dot Solar Cells[J]. *Adv Mater*, 2012, **23**:3832-3837.
- [13] Scheibner M, Schmidt T, Worschech L, *et al.* Superradiance of Quantum Dots[J]. *Nat Phys*, 2007, **3**:106-110.
- [14] Luo Q Y, Lin Y, Li Y, *et al.* Nanomechanical Analysis of Yeast Cells in CdSe Quantum Dot Biosynthesis[J]. *Small*, 2014, **10**(4):699-704.

- [15] Katsnelson M I, Novoselov K S, Geim A K. Chiral Tunnelling and the Klein Paradox in Graphene[J]. *Nat Phys*, 2006, **2**: 620-625.
- [16] Sanderson K. A Small Industry could be on the Verge of a Boom, Reports Katharine Sanderson[J]. *Nature*, 2009, **459**: 760-761.
- [17] Dickerson M B, Sandhage K H, Naik R R. Protein- and Peptide-Directed Syntheses of Inorganic Materials[J]. *Chem Rev*, 2008, **108**: 4935-4978.
- [18] Singh S C, Mishra S K, Srivastava R K, *et al.* Optical Properties of Selenium Quantum Dots Produced with Laser Irradiation of Water Suspended Se Nanoparticles[J]. *J Phys Chem C*, 2010, **114**: 17374-17384.
- [19] Tikhomirov G, Hoogland S, Lee P E, *et al.* DNA-based Programming of Quantum Dot Valency, Self-assembly and Luminescence[J]. *Nat Nano* 2011, **6**: 485-490.
- [20] Kim T H, Cho K S, Lee E K, *et al.* Full-colour Quantum Dot Displays Fabricated by Transfer Printing[J]. *Nat Photon*, **5**: 176-182.
- [21] Kamat P V, Quantum Dot Solar Cells. Semiconductor Nanocrystals as Light Harvesters[J]. *J Phys Chem C*, 2008, **112**: 18737-18753.
- [22] Li F, Chen Y, Chen H, *et al.* Monofunctionalization of Protein Nanocages[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**: 20040-20043.
- [23] Chan W C, Nie S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection[J]. *Science*, 1998, **281**: 2016-2018.
- [24] Bruchez M, Moronne M, Gin P, *et al.* Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels[J]. *Science*, 1998, **281**: 2013-2016.
- [25] Liu J, Lau S K, Varma V A, *et al.* Multiplexed Detection and Characterization of Rare Tumor Cells in Hodgkin's Lymphoma with Multicolor Quantum Dots[J]. *Anal Chem*, 2010, **82**: 6237-6243.
- [26] Liu J, Lau S K, Varma V A, *et al.* Molecular Mapping of Tumor Heterogeneity on Clinical Tissue Specimens with Multiplexed Quantum Dots[J]. *ACS Nano*, 2010, **4**: 2755-2765.
- [27] Liu S L, Li J, Zhang Z L, *et al.* Fast and High-Accuracy Localization for Three-Dimensional Single-Particle Tracking[J]. *Sci Rep*, 2013, doi:10.1038/srep02462.
- [28] Cassette E, Pons T, Bouet C, *et al.* Synthesis and Characterization of Near-Infrared CuInSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots for *in vivo* Imaging[J]. *Chem Mater*, 2011, **22**: 6117-6124.
- [29] Midgett A G, Hillhouse H W, Hughes B K, *et al.* Flowing versus Static Conditions for Measuring Multiple Exciton Generation in PbSe Quantum Dots[J]. *J Phys Chem C*, 2010, **114**: 17486-17500.
- [30] Lord S J, Lee H I D, Moerner W E. Single-Molecule Spectroscopy and Imaging of Biomolecules in Living Cells[J]. *Anal Chem*, 2010, **82**: 2192-2203.
- [31] Vannoy C H, Xu J, Leblanc R M. Bioimaging and Self-Assembly of Lysozyme Fibrils Utilizing CdSe/ZnS Quantum Dots [J]. *J Phys Chem C*, 2009, **114**: 766-773.
- [32] Neo M S, Venkatram N, Li G S, *et al.* Synthesis of PbS/CdS Core-Shell QDs and Their Nonlinear Optical Properties[J]. *J Phys Chem C*, 2010, **114**: 18037-18044.
- [33] Rehberg M, Praetner M, Leite C F, *et al.* Quantum Dots Modulate Leukocyte Adhesion and Transmigration Depending on Their Surface Modification[J]. *Nano Lett*, 2010, **10**: 3656-3664.
- [34] Medintz I L, Uyeda H T, Goldman E R, *et al.* Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing[J]. *Nat Mater*, 2005, **4**: 435-446.
- [35] Allen P M, Bawendi M G. Ternary I-III-VI Quantum Dots Luminescent in the Red to Near-Infrared[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**: 9240-9241.
- [36] Mandal A, Tamai N. Influence of Acid on Luminescence Properties of Thioglycolic Acid-Capped CdTe Quantum Dots[J]. *J Phys Chem C*, 2008, **112**: 8244-8250.
- [37] Lee S, Xie J, Chen X. Peptides and Peptide Hormones for Molecular Imaging and Disease Diagnosis[J]. *Chem Rev*, 2010, **110**: 3087-3111.
- [38] Murray C B, Norris D J, Bawendi M G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) Semiconductor Nanocrystallites[J]. *J Am Chem Soc*, 1993, **115**: 8706-8715.
- [39] Hines M A, Guyot-Sionnest P. Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals[J]. *J Phys Chem*, 1996, **100**: 468-471.
- [40] Peng Z A, Peng X. Formation of High-Quality CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals Using CdO as Precursor[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, **123**: 183-184.
- [41] Vossmeier T, Katsikas L, Giersig M, *et al.* CdS Nanoclusters: Synthesis, Characterization, Size Dependent Oscillator Strength, Temperature Shift of the Excitonic Transition Energy, and Reversible Absorbance Shift[J]. *J Phys Chem*, 1994, **98**: 7665-7673.

- [42] Akerman M E, Chan W C W, Laakkonen P, *et al.* Nanocrystal Targeting *in vivo* [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, **99**: 12617-12621.
- [43] Mamedova N N, Kotov N A, Rogach A L, *et al.* Albumin-CdTe Nanoparticle Bioconjugates: Preparation, Structure, and Interunit Energy Transfer with Antenna Effect [J]. *Nano Lett*, 2001, **1**: 281-286.
- [44] Putzer M A, Rogers J S, Bazan G C. Intramolecular Nucleophilic Substitution on Coordinated Borabenzenes: A New Entry into Boratabenzene Complexes [J]. *J Am Chem Soc*, 1999, **121**: 8112-8113.
- [45] Dabbousi B O, Rodriguez-Viejo J, Mikulec F V, *et al.* (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites [J]. *J Phys Chem B*, 1997, **101**: 9463-9475.
- [46] Kim S, Fisher B, Eisler H-Jr, *et al.* Type-II Quantum Dots: CdTe/CdSe (Core/Shell) and CdSe/ZnTe (Core/Shell) Heterostructures [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**: 11466-11467.
- [47] Gao X, Yang L, Petros JA, *et al.* *In vivo* Molecular and Cellular Imaging with Quantum Dots [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, **16**: 63-72.
- [48] Wilson R, Spiller D G, Prior I A, *et al.* A Simple Method for Preparing Spectrally Encoded Magnetic Beads for Multiplexed-Detection [J]. *ACS Nano*, 2007, **1**: 487-493.
- [49] Kumar R, Ding H, Hu R, *et al.* *In vitro* and *In vivo* Optical Imaging Using Water-Dispersible, Noncytotoxic, Luminescent, Silica-Coated Quantum Rods [J]. *Chem Mater*, 2010, **22**: 2261-2267.
- [50] Green M, Howman E. Semiconductor Quantum Dots and Free Radical Induced DNA Nicking [J]. *Chem Commun*, 2005, **1**: 121-123.
- [51] Cho SJ, Maysinger D, Jain M, *et al.* Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells [J]. *Langmuir*, 2007, **23**: 1974-1980.
- [52] Mahto S K, Park C, Yoon T H, *et al.* Assessment of Cytocompatibility of Surface-modified CdSe/ZnSe Quantum Dots for BALB/3T3 Fibroblast Cells [J]. *Toxico In Vitro*, 2010, **24**: 1070-1077.
- [53] Shan Y, Wang Z, Hao X, *et al.* Locating the Band III Protein in Quasi-native Cell Membranes [J]. *Anal Meth* 2010, **2**: 805-808.
- [54] Jiang J, Hao X, Cai M, *et al.* Localization of Na⁺-K⁺ ATPases in Quasi-native Cell Membranes [J]. *Nano Lett*, 2009, **9**: 4489-4493.
- [55] Neuhauser R G, Shimizu K T, Woo W K, *et al.* Correlation Between Fluorescence Intermittency and Spectral Diffusion in Single Semiconductor Quantum Dots [J]. *Phys Rev Lett*, 2000, **85**: 3301-3304.
- [56] Dubertret B, Skourides P, Norris D J, *et al.* *In Vivo* Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles [J]. *Science*, 2002, **298**: 1759-1762.
- [57] Rieger S, Kulkarni R P, Darcy D, *et al.* Quantum Dots are Powerful Multipurpose Vital Labeling Agents in Zebrafish Embryos [J]. *Developmental Dynamics*, 2005, **234**: 670-681.
- [58] Jaiswal J K, Mattoussi H, Mauro J M, *et al.* Long-term Multiple Color Imaging of Live Cells Using Quantum Dot Bioconjugates [J]. *Nat Biotech*, 2003, **21**: 47-51.
- [59] Hanaki K-i, Momo A, Oku T, *et al.* Semiconductor Quantum Dot/Albumin Complex is a Long-life and Highly Photostable Endosome Marker [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **302**: 496-501.
- [60] Mansson A, Sundberg M, Balaz M, *et al.* *In Vitro* Sliding of Actin Filaments Labelled with Single Quantum Dots [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **314**: 529-534.
- [61] Kaul Z, Yaguchi T, Kaul S C, *et al.* Mortalin Imaging in Normal and Cancer Cells with Quantum Dot Immuno-conjugates [J]. *Cell Res*, 2003, **13**: 503-507.
- [62] Sukhanova A, Devy Jrm, Venteo L, *et al.* Biocompatible Fluorescent Nanocrystals for Immunolabeling of Membrane Proteins and Cells [J]. *Anal Biochem*, 2004, **324**: 60-67.
- [63] Nisman R, Dellaire G, Ren Y, *et al.* Application of Quantum Dots as Probes for Correlative Fluorescence, Conventional, and Energy-filtered Transmission Electron Microscopy [J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, **52**: 13-18.
- [64] Rosenthal S J, Tomlinson I, Adkins E M, *et al.* Targeting Cell Surface Receptors with Ligand-Conjugated Nanocrystals [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 4586-4594.
- [65] Dahan M, Lavi S, Luccardini C, *et al.* Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking [J]. *Science*, 2003, **302**: 442-445.
- [66] Lidke DS, Nagy P, Heintzmann R, *et al.* Quantum Dot Ligands Provide New Insights into ErbB/HER Receptor-mediated Signal Transduction [J]. *Nat Biotech*, 2004, **22**: 198-203.
- [67] Howarth M, Takao K, Hayashi Y, *et al.* Targeting Quantum Dots to Surface Proteins in Living Cells with Biotin Ligase [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, **102**: 7583-7588.
- [68] Giepmans B N G, Deerinck T J, Smarr B L, *et al.* Correlated Light and Electron Microscopic Imaging of Multiple

- Endogenous Proteins Using Quantum Dots[J]. *Nat Meth*,2005,**2**:743-749.
- [69] Sundara Rajan S,Vu T Q. Quantum Dots Monitor TrkA Receptor Dynamics in the Interior of Neural PC12 Cells[J]. *Nano Lett*,2006,**6**:2049-2059.
- [70] Hoshino A,Fujioka K,Oku T,*et al.* Quantum Dots Targeted to the Assigned Organelle in Living Cells[J]. *Microbiol Immunol*,2004,**48**:985-994.
- [71] Santra S Y H,Stanley J T,Holloway P H,*et al.* Rapid and Effective Labeling of Brain Tissue using TAT-conjugated CdS: Mn/ZnS Quantum Dots[J]. *Chem Commun*,2005,**25**:3144-3146.
- [72] Pellegrino T,Parak WJ,Boudreau R,*et al.* Quantum Dot-based Cell Motility Assay[J]. *Differentiation*,2003,**71**:542-548.
- [73] Mattheakis L C,Dias J M,Choi Y J,*et al.* Optical Coding of Mammalian Cells using Semiconductor Quantum Dots[J]. *Anal Biochem*,2004,**327**:200-208.
- [74] Ramachandran S,Merrill N E,Blick R H,*et al.* Colloidal Quantum Dots Initiating Current Bursts in Lipid Bilayers[J]. *Biosens Bioelectron*,2005,**20**:2173-2176.
- [75] Kloepfer J A,Mielke R E,Wong M S,*et al.* Quantum Dots as Strain- and Metabolism-Specific Microbiological Labels[J]. *Appl Environ Microbiol*,2003,**69**:4205-4213.
- [76] Marshall D,Pedley R B,Boden J A,*et al.* Polyethylene Glycol Modification of a Galactosylated Streptavidin Clearing Agent:Effects on Immunogenicity and Clearance of a Biotinylated Anti-tumour Antibody[J]. *Br J Cancer*,1996,**73**:565-572.
- [77] Cai W,Shin D W,Chen K,*et al.* Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum Dots for Imaging Tumor Vasculature in Living Subjects[J]. *Nano Lett*,2006,**6**:669-676.
- [78] Lim YT,Kim S,Nakayama A,*et al.* Selection of Quantum Dot Wavelengths for Biomedical Assays and Imaging[J]. *Mol Imaging*,2003,**2**:50-64.
- [79] Frangioni J V. *In Vivo* Near-infrared Fluorescence Imaging[J]. *Curr Opin Chem Biol*,2003,**7**:626-634.
- [80] So M K,Xu C,Loening A M,*et al.* Self-illuminating Quantum Dot Conjugates for *in Vivo* Imaging[J]. *Nat Biotech*,2006,**24**:339-343.
- [81] Brannon-Peppas L,Blanchette J O. Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy[J]. *Adv Drug Deliver Rev*,2004,**56**:1649-1659.
- [82] Peracchia M T,Fattal E,Desmêle D,*et al.* Stealth® PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles for Intravenous Administration and Splenic Targeting[J]. *J Control Release*,1999,**60**:121-128.
- [83] Porkka K,Laakkonen P,Hoffman JA,*et al.* A Fragment of the HMGN2 Protein Homes to the Nuclei of Tumor Cells and Tumor Endothelial Cells *In Vivo*[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*,2002,**99**:7444-7449.
- [84] Morgan NY,English S,Chen W,*et al.* Real Time *In Vivo* Non-invasive Optical Imaging using Near-infrared Fluorescent Quantum Dots[J]. *Acad Radiol*,2005,**12**:313-323.
- [85] Chen L,Zurita AJ,Ardelt PU,*et al.* Design and Validation of a Bifunctional Ligand Display System for Receptor Targeting [J]. *Chem Biol*,2004,**11**:1081-1091.
- [86] Ballou B,Lagerholm BC,Ernst LA,*et al.* Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice[J]. *Biocon Chem*,2003,**15**:79-86.
- [87] Gao X,Cui Y,Levenson RM,*et al.* *In Vivo* Cancer Targeting and Imaging with Semiconductor Quantum Dots[J]. *Nat Biotech*,2004,**22**:969-976.
- [88] Chang S S,Reuter V E,Heston WDW,*et al.* Metastatic Renal Cell Carcinoma Neovasculature Expresses Prostate-specific Membrane Antigen[J]. *Urology*,2001,**57**:801-805.
- [89] Hoffman R M. Green Fluorescent Protein Imaging of Tumour Growth, Metastasis, and Angiogenesis in Mouse Models[J]. *Lancet Oncol*,2002,**3**:546-556.
- [90] Yang M,Baranov E,Wang JW,*et al.* Direct External Imaging of Nascent Cancer, Tumor Progression, Angiogenesis, and Metastasis on Internal Organs in the Fluorescent Orthotopic Model[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*,2002,**99**:3824-3829.
- [91] Akerman M E,Chan W C W,Laakkonen P,*et al.* Nanocrystal Targeting *in Vivo*[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*,2002,**99**:12617-12621.
- [92] Jamieson T,Bakhshi R,Petrova D,*et al.* Biological Applications of Quantum Dots[J]. *Biomaterials*,2007,**28**:4717-4732.
- [93] Larson D R,Zipfel W R,Williams RM,*et al.* Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging *in Vivo* [J]. *Science*,2003,**300**:1434-1436.
- [94] Jakub JW,Pendas S,Reintgen DS. Current Status of Sentinel Lymph Node Mapping and Biopsy:Facts and Controversies [J]. *The Oncologist*,2003,**8**:59-68.
- [95] Parungo C P,Colson Y L,Kim S W,*et al.* Sentinel Lymph Node Mapping of the Pleural Space[J]. *Chest J*,2005,**127**:1799-1804.

- [96] Cimmino V M, Brown A C, Szocik J F, *et al.* Allergic Reactions to Isosulfan Blue during Sentinel Node Biopsy Common Event[J]. *Surgery*, 2001, **130**:439-442.
- [97] Soltesz E G, Kim S, Laurence R G, *et al.* Intraoperative Sentinel Lymph Node Mapping of the Lung Using Near-Infrared Fluorescent Quantum Dots[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, **79**:269-277.
- [98] Kim S H, Suh H J, Koh K N, *et al.* Surface Plasmon Resonance Study on the Interaction of Photochromic Spiroanthoxazine with *L*-phenylalanine in Self-assembled Monolayers on Gold[J]. *Dyes Pigm*, 2004, **62**:93-97.
- [99] Parungo C P, Ohnishi S, Kim S W, *et al.* Intraoperative Identification of Esophageal Sentinel Lymph Nodes with Near-infrared Fluorescence Imaging[J]. *J Thorac Cardiovasc Sur*, 2005, **129**:844-850.
- [100] Tanaka E, Choi H, Fujii H, *et al.* Image-Guided Oncologic Surgery Using Invisible Light: Completed Pre-Clinical Development for Sentinel Lymph Node Mapping[J]. *Ann Surg Oncol*, 2006, **13**:1671-1681.
- [101] Lee LY, Ong SL, Hu JY, *et al.* Use of Semiconductor Quantum Dots for Photostable Immunofluorescence Labeling of *Cryptosporidium Parvum*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**:5732-5736.
- [102] Zhu L, Ang S, Liu W T. Quantum Dots as a Novel Immunofluorescent Detection System for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**:597-598.
- [103] Yang L, Li Y. Simultaneous Detection of Escherichia Coli O157[ratio]H7 and Salmonella Typhimurium Using Quantum Dots as Fluorescence Labels[J]. *Analyst*, 2006, **131**:394-401.
- [104] Tully E, Hearty S, Leonard P, *et al.* The Development of Rapid Fluorescence-based Immunoassays, Using Quantum Dot-labelled Antibodies for the Detection of *Listeria Monocytogenes* Cell surface Proteins[J]. *Int J Biol Macromol*, 2006, **39**:127-134.
- [105] Modun B, Morrissey J, Williams P. The Staphylococcal Transferrin Receptor: a Glycolytic Enzyme with Novel Functions [J]. *Trend Microbiol*, 2000, **8**:231-237.
- [106] Gerion D, Chen F, Kannan B, *et al.* Room-Temperature Single-Nucleotide Polymorphism and Multiallele DNA Detection Using Fluorescent Nanocrystals and Microarrays[J]. *Anal Chem*, 2003, **75**:4766-4772.
- [107] Agrawal A, Tripp R A, Anderson L J, *et al.* Real-Time Detection of Virus Particles and Viral Protein Expression with Two-Color Nanoparticle Probes[J]. *J Virology*, 2005, **79**:8625-8628.
- [108] Goldman E R, Anderson G P, Tran P T, *et al.* Conjugation of Luminescent Quantum Dots with Antibodies Using an Engineered Adaptor Protein To Provide New Reagents for Fluoroimmunoassays[J]. *Anal Chem*, 2002, **74**:841-847.
- [109] Goldman E R, Balighian E D, Mattoussi H, *et al.* Avidin: A Natural Bridge for Quantum Dot-Antibody Conjugates[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**:6378-6382.
- [110] Goldman E R, Clapp A R, Anderson G P, *et al.* Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents[J]. *Anal Chem*, 2003, **76**:684-688.
- [111] Park H Y, Kim K, Hong S, *et al.* Compact and Versatile Nickel-Nitrilotriacetate-Modified Quantum Dots for Protein Imaging and Fö rster Resonance Energy Transfer Based Assay[J]. *Langmuir*, 2009, **26**:7327-7333.
- [112] Derfus A M, Chan W C W, Bhatia S N. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots[J]. *Nano Lett*, 2003, **4**:11-18.
- [113] Tan S J, Jana N R, Gao S, *et al.* Surface-Ligand-Dependent Cellular Interaction, Subcellular Localization, and Cytotoxicity of Polymer-Coated Quantum Dots[J]. *Chem Mater*, 2010, **22**:2239-2247.
- [114] Qu Y, Li W, Zhou Y, *et al.* Full Assessment of Fate and Physiological Behavior of Quantum Dots Utilizing *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism[J]. *Nano Lett*, 2011, **11**:3174-3183.
- [115] Navarro D A G, Watson D F, Aga D S, *et al.* Natural Organic Matter-Mediated Phase Transfer of Quantum Dots in the Aquatic Environment[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, **43**:677-682.
- [116] Maity A R, Jana N R, Chitosan-Cholesterol-Based Cellular Delivery of Anionic Nanoparticles[J]. *J Phys Chem C*, 2010, **115**:137-144.
- [117] Kirchner C, Liedl T, Kudera S, *et al.* Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles[J]. *Nano Lett*, 2004, **5**:331-338.
- [118] Su Y, Hu M, Fan C, *et al.* The Cytotoxicity of CdTe Quantum Dots and the Relative Contributions from Released Cadmium Ions and Nanoparticle Properties[J]. *Biomaterials*, 2010, **31**:4829-4834.
- [119] Chang E, Yu W W, Colvin V L, *et al.* Quantifying the Influence of Surface Coatings on Quantum Dot Uptake in Cells[J]. *J Biomed Nanotech*, 2005, **1**:397-401.
- [120] Clark R J, Dang M K M, Veinot J G C. Exploration of Organic Acid Chain Length on Water-Soluble Silicon Quantum Dot Surfaces[J]. *Langmuir*, 2010, **26**:15657-15664.
- [121] Li Y, Zhou Y, Wang H Y, *et al.* Chirality of Glutathione Surface Coating Affects the Cytotoxicity of Quantum Dots[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **50**:5860-5864.

Application of Quantum Dots in Biological Detection

CHU Congbo^a, SHAN Yuping^{b*}, WANG Hongda^{b*}

(^a*Jilin Province Water Resource and Hydropower Consultative Company, Changchun 130021, China;*

^b*State Key laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)*

Abstract During the past ten years, the application of semiconductor nanocrystal material-quantum dots has displayed an increased tendency in scientific and industrial production fields, and a broad research is developed from materials science to biological applications. The application of quantum dots has substantially impacted on many research areas, such as biological imaging, phototherapy, drug/gene delivery, and solar cell. It is a key point to control the interactions between quantum dots and cell through adjusting surface properties of quantum dots. As the potential cytotoxicity of quantum dots arise, nanotoxicity becomes an important indicator of nanomaterials security assessment, and scientists pay more attention to the research of their potential toxicity. In this review we overviewed the properties of quantum dots, the applications in cell biology and the cytotoxicity research in biomedicine related field. Moreover, the future prospects for applications of quantum dots were briefly presented.

Keywords Quantum dots, biological application, fluorescence label, cytotoxicity

Received 2013-09-09; Revised 2013-11-08; Accepted 2013-12-18

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 21303181)

Corresponding author: WANG Hongda, professor; Tel: 0431-85262864; E-mail: hdwang@ciac.ac.cn; Research interests: the interaction between nanoparticles and cells

Co-corresponding author: SHAN Yuping, ; Tel: 0431-85262864; E-mail: shanyp@ciac.ac.cn; Research interests: the interaction between quantum dots and cell membranes