

Advances of Quantum Dots as Fluorescent Probes in Biological and Medical Fields

Guolong Song, Xiangdong Kong*

Institute of Biomaterials and Marine Biological Resources, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou Zhejiang

Email: sgl19890325@163.com, kongxiangdong@gmail.com, 2860622804@qq.com

Received: Jan. 27th, 2016; accepted: Feb. 13th, 2016; published: Feb. 16th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Quantum dots (QDs), three-dimensional (3-D) nanocrystals, possess a great deal of unique optical performances, such as wide excitation wavelength, narrow and symmetric emission wavelength, high quantum yield, long fluorescence lifespan, stable optical property. QDs can be used as fluorescent probes to label different components in biosystem, which contains tissues, cells, molecules and living animals imaging. A review on the advances of QDs as fluorescent probes in Biological and Medical fields is given in the paper.

Keywords

Quantum Dots, Biological Probes, *In Vivo* Imaging

量子点作为荧光探针在生物医学领域的研究进展

宋国龙, 孔祥东*

浙江理工大学生命科学院, 生物材料与海洋生物资源研究所, 浙江 杭州

Email: sgl19890325@163.com, kongxiangdong@gmail.com, 2860622804@qq.com

收稿日期: 2016年1月27日; 录用日期: 2016年2月13日; 发布日期: 2016年2月16日

*通讯作者。

摘要

量子点是一种三维纳米晶粒, 具有许多优异的光学性能, 如激发波长范围宽、发射波长范围窄且对称、量子产率高、荧光寿命长、光学性能稳定等优点。量子点可以作为荧光探针来标记生物体系的不同成分, 如组织、细胞、生物大分子以及动物活体成像, 本文就量子点在生物医学领域作为荧光标记物的研究进展加以综述。

关键词

量子点, 生物探针, 活体成像

1. 引言

自 20 世纪 90 年代量子点开始兴起到现在, 这一领域已经发展了 20 多年, 随着研究的不断深入与扩展, 量子点材料的制备技术有了很大提高, 可以重复的稳定制备出粒径可控的高荧光性能的量子点, 并且可以在其表面修饰不同的化学基团, 为量子点在生物、化学领域的应用奠定了基础。目前, 量子点在生物领域的应用主要体现在以下几个方面: 一是作为生物探针用于生物大分子标记(抗体、DNA), 细胞核组织的标记与成像, 动物活体成像, 微生物检测等。二是作为离子探针可以用于金属离子, 阴离子的检测等。三是作为小分子探针用于检测有机小分子, 药物小分子, 环境污染物等。该文章主要就量子点作为生物探针在生物医学领域的应用进展进行综述。

量子点作为荧光探针标记生物体系是一个非常有前景的应用领域。这一构思最初是由 Alivisatos 研究小组[1]和 Nie 研究小组[2]提出的。他们的研究使具有独特荧光性能的量子点应用于生物标记成为可能, 并且充分展现了这种新型生物标记具有传统有机荧光染料无法比拟的优越性。量子点荧光探针与生物分子的结合方式主要有两种: 一种是共价结合。通过共价结合形成的量子点与生物大分子共轭物比较牢固, 可以用于较复杂的研究体系, 如活体标记、抗原抗体标记等。另一种是物理吸附, 如可以通过静电吸附使量子点与生物分子结合。

2. 量子点荧光探针用于生物大分子标记

简单生物大分子的检测是量子点在生命科学领域的首次尝试。所采用的方法是将带有羧基或者氨基修饰的量子点与生物大分子上的氨基或者羧基共价偶联, 也可以通过静电吸附来完成生物分子与量子点的连接。Anderson 等利用生物素化的 CdSe/ZnS QDs 进行免疫检验, 用于测定 B 型葡萄球菌肠毒素, 检出限为 10 ng/ml。首先在碱性条件下, 用带正电荷的麦芽糖结合蛋白包裹带负电荷的水溶性量子点, 然后将蛋白量子点结合物进行生物素化处理[3]。Chang 等在用纳米金和量子点这两种纳米材料研究蛋白酶水解的研究中, 通过实验说明量子点与纳米金之间存在能量转移, 首先将量子点与目标蛋白相连, 再用纳米金与量子点-蛋白质偶联, 复合物的荧光强度大大减弱, 然后加入蛋白水解酶之后, 复合物的荧光强度逐渐恢复[4]。

量子点与 DNA 分子的研究也取得的很大的进展。Alivisatos 等首先用硅烷包覆的 CdSe/ZnS 核壳结构的量子点, 然后在硅烷外壳接枝不同的基团, 通过交联剂的作用于 DNA 分子共价偶联[5]。Ebenstein 研究小组利用单量子点识别 DNA 结合蛋白, 然后将 DNA 与四种不同量子点偶联的 DNA 结合蛋白相连, 经过单一光源激发, 发出四种不同颜色的光, 并通过荧光显微技术来确定 DNA 分子上的多个蛋白质位置

[6]。Liu 等用羧甲基壳聚糖(CMCS)修饰的 CdTe QDs 对溶菌酶(lyz)进行了超灵敏定量检测。首先加入 Zn^{2+} 使 CMCS-CdTe QDs 的荧光增强, 这是因为 CMCS 的 N-乙酰-葡萄糖胺(NAG)的氨基可以与 Zn^{2+} 牢固结合使量子点的荧光增强; 接着引入溶菌酶将 CMCS 降解随之形成的 Lyz-QDs 复合物使量子点的荧光淬灭。在最佳测试条件下, 检出限可以达到 0.031 ng/ml 实现对溶菌酶的超微量检测[7]。由于量子点的荧光寿命较长, 并且荧光强度稳定, 所以在一定条件, 可以根据量子点荧光强度的变化与待测物质之间的关系来进行特异性的检测。Zhang 等用半胱氨酸修饰的 CdTe/CdS 核壳结构的量子点作为荧光探针, 对胰蛋白酶进行了定量测定, 检出限为 0.02~50.0 mg/L, 这种方法快速、简洁, 待测样品不需要复杂的预处理, QD-胰蛋白酶复合物的荧光强度的变化与胰蛋白酶的浓度之间具有良好的线性关系[8]。量子点对生物大分子的标记为生命科学领域研究 DNA、蛋白质等提供了新的方法和思路, 虽然这一领域的研究开始的相对较早, 但是目前仍然十分活跃。

3. 量子点荧光探针用于细胞核组织的标记与成像

近年来, 量子点与不同的生物分子的连接技术得到了不断的改善和发展, 使得量子点在细胞和组织成像领域的应用越来越凸显。量子点与靶标分子的连接让研究对象在生物体或者细胞内的活动轨迹可以直接观察, 从而为研究生命活动的分子机制提供有力的证据, 这是其他有机荧光染料所不能比拟的特点之一。

在细胞成像方面, 量子点的应用主要集中在两个方面: 一是离体活细胞成像如细胞内特定大分子的失踪; 二是固定细胞成像, 这主要包括细胞膜标记、细胞骨架成像和细胞核成像等。1998 年, Nie 研究小组首次将量子点用于离体活细胞实验, 拉开了量子点标记细胞研究的序幕, 用 TGA-QD 标记转铁蛋白, 然后将该复合物与 Hela 细胞共同孵育, 实验发现该复合物经过 Hela 细胞表面的受体识别进入细胞内部[2]。Gerion 等在 2004 年首次报道量子点对细胞核的成像标记, 该工作为研究细胞核的交换机制及其过程提供了新的方法; 首先将量子点与猴病毒(SV40)的 T 抗原核定位信号(NLS)偶联, 经过转染进入活细胞, 并通过荧光成像系统检测复合物从细胞质运动到细胞核的过程, 大约经过一周的培养观察可以看到复合物积聚在细胞核中, 同时在观察的过程中没有发现量子点对细胞的产生明显的副作用[9]。Alivisatos 课题组首次实现了用双色荧光量子点来同时标记单个细胞, 首先根据硅烷化的绿色量子点对细胞核具有高度亲和力的特点, 直接利用它们标记鼠纤维原细胞的细胞核, 把另一种硅烷化的红色量子点用亲和素修饰, 并通过生物素与亲和素相互作用来标记细胞表面的 F-肌动蛋白, 从而实现了用红色和绿色两种量子点来标记单个鼠纤维原细胞[10]。量子点作为荧光探针标记细胞的应用, 标志着以量子点为荧光手段探究生命现象的时代已经到来。Dong 等用 GSH 修饰的 CdTe QDs 与大鼠抗小鼠 CD4 抗体偶联, 得到水溶性的 CdTe-CD4 复合物荧光探针, 然后与淋巴细胞共同孵育, 经过抗原-抗体之间的特异性免疫反应, 实现了量子点对鼠淋巴细胞的标记, 本研究中还将 CdTe-CD4 荧光探针和有机荧光染料 FITC 标记的 CD4 进行了比较, 证明了量子点荧光探针在细胞成像方面的独特优势, 如荧光寿命长、荧光强度高, 光学稳定性好等[11]。量子点与抗体的偶联, 通过抗原抗体特异性免疫反应, 从而实现对待测成分的识别和检测。Lim 等将发射近红外光的量子点与 CD56 抗体偶联, 用于失踪自然杀伤细胞(NK 细胞)在体内的分布, 实验证明, 量子点与 CD56 抗体的结合不会影响抗体的活性并且能够保证良好的成像效果[12]。

在这样一个谈“癌”色变的年代, 量子点在肿瘤细胞标记中的应用势必会得到进一步的拓展, 通过量子点与肿瘤细胞表面的特异性抗原偶联来标记肿瘤细胞, 从而实现对患者体内肿瘤细胞的诊断并进行下一步的治疗。Gao 等利用量子点与 PSMA 抗体的结合, 实现了对前列腺癌肿瘤细胞的识别并成像, 实验表明通过特异性修饰的量子点的主动靶向比单纯的被动靶向要高效、迅速很多, 该方法为前列腺癌的诊断和预后研究开辟了一种新的思路[13]。Nida 等用生物素化的 EGFR (表皮生长因子受体)单克隆抗体与

宫颈癌 SiHa 细胞高表达的 EGFR 结合, 然后用 QD-亲和素荧光探针进行识别, 通过激光共聚焦显微镜即可实现对宫颈癌 SiHa 的示踪, 这为宫颈癌的早期诊断提供了一条新途径[14]。量子点在组织成像学中的应用也得到了不断发展, santra 等利用量子点与 TAT (一种对细胞敏感的缩氨酸)结合, 使量子点通过血脑屏障, 而没有与 TAT 连接的量子点则不能穿过血脑屏障, 该研究为脑内药物靶向传递提供了一条新途径[15]。量子点在细胞和组织方面的成像技术不仅可以用于动物细胞与肿瘤细胞, 还可以应用于植物细胞。Ravidran 等首次将量子点应用于植物细胞, 为量子点的应用开拓了新领域, 首先把量子点与 SCA (花粉粘着素)蛋白偶联, 然后加入到已经发芽的百合花花粉颗粒中, 通过激光共聚焦荧光显微镜对该蛋白进行定位观察[16]。

4. 量子点荧光探针用于动物活体标记

量子点所具有的独特性能使其在动物活体成像方面展现出显著的优越性。量子点在动物活体成像方面的应用有利于疾病的无创诊断, 继而可以帮助为患者制定个性化治疗方案。由于生物体内存在各种各样的生物分子, 很容易与量子点发生非特异性结合, 因此, 用于活体或者组织内进行成像标记的量子点必须具有高度的特异性。在广大科研工作者长时间的努力下, 可以合成具有良好生物相容性和水溶性的量子点, 并且经过对量子点的表面修饰能够最大限度的减少量子点与细胞以及胞外基质的非特异性结合。基于如受体-配体、抗原-抗体、生物素-亲和素等特异性结合作用, 能够实现量子点对活体细胞和组织靶标的高度特异性。

目前, 近红外荧光成像(700~900 nm)研究的重点, 因为近红外 QD 对生物体深层组织和器官的检测比可见光区的 QD 具有更高的灵敏度与对比度, 同时在这个频区生物分子的光吸收值最低, 从而对体内成像的干扰最小。

5. 展望

虽然量子点最初的研究目的和内容主要集中在其光学特性、信息传输以及功能器件等方面, 但是随着研究的不断深入与扩展, 量子点所具有的独特性能如宽激发、窄发射、高强度、长寿命、抗漂白可调谐以及可以实现多色标记等诸多优点, 为生物标记技术带来了新的突破和发展, 在生物学领域得到了蓬勃发展。在生物医学领域量子点本身具有无可比拟的优势, 作为一种新型的生物标记试剂, 它完全可以取代传统的有机荧光染料。目前, 量子点生物荧光探针已经成功用来标记生物体系的不同成分, 如组织、细胞、生物大分子以及动物活体成像等。量子点生物荧光探针为生物医学领域的研究注入了一股新的活力, 它的应用潜力正在不断被开发出来。同时, 量子点生物荧光探针的商品化生产已经开始形成规模。随着量子点制备工艺的不断提高和完善, 表面修饰技术的稳定性以及修饰功能多样性的不断丰富和成熟, 将使量子点生物探针在生物标记和医学诊断中发挥重要作用。

参考文献 (References)

- [1] Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S. and Alivisatos, A.P. (1998) Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science*, **281**, 2013-2016. <http://dx.doi.org/10.1126/science.281.5385.2013>
- [2] Chan, W.C. and Nie, S. (1998) Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science*, **281**, 2016-2018. <http://dx.doi.org/10.1126/science.281.5385.2016>
- [3] Lingerfelt, B.M., Mattoussi, H., Goldman, E.R., Mauro, J.M. and Anderson, G.P. (2003) Preparation of Quantum Dot-Biotin Conjugates and Their Use in Immunochromatography Assays. *Analytical Chemistry*, **75**, 4043-4049. <http://dx.doi.org/10.1021/ac034139e>
- [4] Chang, E., Miller, J.S., Sun, J., Yu, W.W., Colvin, V.L., Drezek, R., et al. (2005) Protease-Activated Quantum Dot Probes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **334**, 1317-1321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.028>

- [5] Parak, W.J., Gerion, D., Zanchet, D., Woerz, A.S., Pellegrino, T., Micheel, C., *et al.* (2002) Conjugation of DNA to Silanized Colloidal Semiconductor Nanocrystalline Quantum Dots. *Chemistry of Materials*, **14**, 2113-2119. <http://dx.doi.org/10.1021/cm0107878>
- [6] Ebenstein, Y., Gassman, N., Kim, S., Antelman, J., Kim, Y., Ho, S., *et al.* (2009) Lighting up Individual DNA Binding Proteins with Quantum Dots. *Nano Letters*, **9**, 1598-1603. <http://dx.doi.org/10.1021/nl803820b>
- [7] Song, Y., Li, Y., Liu, Z., Liu, L., Wang, X., Su, X., *et al.* (2014) A Novel Ultrasensitive Carboxymethyl Chitosan-Quantum Dot-Based Fluorescence “Turn on-off” Nanosensor for Lysozyme Detection. *Biosensors & Bioelectronics*, **61**, 9-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.036>
- [8] Zhang, H., Sun, P., Liu, C., Gao, H., Xu, L., Fang, J., *et al.* (2011) L-Cysteine Capped CdTe-CdS Core-Shell Quantum Dots: Preparation, Characterization and Immuno-Labeling of HeLa Cells. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, **26**, 86-92. <http://dx.doi.org/10.1002/bio.1188>
- [9] Chen, F. and Gerion, D. (2004) Fluorescent CdSe/ZnS Nanocrystal-Peptide Conjugates for Long-Term, Nontoxic Imaging and Nuclear Targeting in Living Cells. *Nano Letters*, **4**, 1827-1832. <http://dx.doi.org/10.1021/nl049170q>
- [10] Gao, J. and Xu, B. (2009) Applications of Nanomaterials inside Cells. *Nano Today*, **4**, 37-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2008.10.009>
- [11] Dong, W., Ge, X., Wang, M. and Xu, S. (2010) Labeling of BSA and Imaging of Mouse T-Lymphocyte as Well as Mouse Spleen Tissue by L-Glutathione Capped CdTe Quantum Dots. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, **25**, 55-60.
- [12] Lim, Y.T., Cho, M.Y., Noh, Y.-W., Chung, J.W. and Chung, B.H. (2009) Near-Infrared Emitting Fluorescent Nanocrystals-Labeled Natural Killer Cells as a Platform Technology for the Optical Imaging of Immunotherapeutic Cells-Based Cancer Therapy. *Nanotechnology*, **20**, 475102. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/20/47/475102>
- [13] Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W. and Nie, S. (2004) *In Vivo* Cancer Targeting and Imaging with Semiconductor Quantum Dots. *Nature Biotechnology*, **22**, 969-976. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt994>
- [14] Nida, D.L., Rahman, M.S., Carlson, K.D., Richards-Kortum, R. and Follen, M. (2005) Fluorescent Nanocrystals for Use in Early Cervical Cancer Detection. *Gynecologic Oncology*, **99**, S89-S94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.07.050>
- [15] Santra, S., Yang, H., Stanley, J.T., Holloway, P.H., Moudgil, B.M., Walter, G., *et al.* (2005) Rapid and Effective Labeling of Brain Tissue Using TAT-Conjugated CdS:Mn/ZnS Quantum Dots. *Chemical Communications*. **2005**, 3144-3146. <http://dx.doi.org/10.1039/b503234b>
- [16] Ravindran, S., Kim, S., Martin, R., Lord, E.M. and Ozkan, C.S. (2005) Quantum Dots as Bio-Labels for the Localization of a Small Plant Adhesion Protein. *Nanotechnology*, **16**, 1. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/16/1/001>