

荧光量子点的生物合成方法研究进展

杜晴晴 施科如 王倩 王佳凤 原宇鹏 吕航 严拯宇* 吴盛美*

(中国药科大学理学院 江苏 南京 210009)

摘要: 作为一种新型纳米材料, 荧光量子点的合成方法大致可分为物理法、化学法和生物合成法。生物合成方法因其绿色、环保、产物生物相容性好而备受关注。本文通过对国内外荧光量子点生物合成方法的资料研究, 以细菌、真菌、其它生物机体、生物辅助等角度对生物合成荧光量子点的方法进行归纳总结, 并着重对基于微生物的合成方法进行了分类。在探讨微生物合成机理的基础上, 对生物合成法的未来方向提出展望。

关键词: 荧光量子点, 生物合成, 微生物基体

Advance of approaches for fluorescent quantum dots biosynthesis

DU Qing-Qing SHI Ke-Ru WANG Qian WANG Jia-Feng YUAN Yu-Kun
LYU Hang YAN Zheng-Yu* WU Sheng-Mei*

(School of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: As a novel nanomaterial, fluorescent quantum dots (QDs) have been synthesized by a variety of approaches, including physical, chemical and biological (bionic) methods. Among these methods, biosynthetic technique has gained increasing interest for its environmentally friendly process and good biocompatibility of product. Based on the literatures, this review summarized the methods to manufacture fluorescent QDs by different biomatrices, such as bacteria, fungi, some other living organisms, and bionic. We also addressed the prospects of biosynthetic (bionic) methods.

Keywords: Fluorescent quantum dots, (Bionic) Biosynthesis, Microorganism matrices

荧光量子点的尺寸在三个维度上均小于 100 nm, 因此又被称为零维纳米材料。因其具有荧光而被作为荧光探针应用于生物标记领域^[1]。相比于传统的荧光材料, 量子点具有激发光谱宽而发射光谱窄^[2]、荧光寿命较长以及抗光漂白^[3]的优点,

因此在生物分子和多色标记^[4]、生物组织和细胞的标记成像^[5]、免疫分析以及疾病诊断^[6]等领域的研究中取得了很大的进展。

近年来, 高质量荧光量子点的化学制备方法主要有两种: 有机法和水相法, 并且技术在不断的发

Foundation item: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20140661); National Fund for Fostering Talents of Basic Science (NFFTBS) (No. J1030830)

*Corresponding authors: E-mail: YAN Zheng-Yu: yanzhengyujiang@126.com; WU Sheng-Mei: wsm310317@126.com

Received: February 29, 2016; Accepted: April 26, 2016; Published online (www.cnki.net): May 24, 2016

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(No. BK20140661); 大学生创新药物研制能力提高项目(No. J1030830)

*通讯作者: E-mail: 严拯宇: yanzhengyujiang@126.com; 吴盛美: wsm310317@126.com

收稿日期: 2016-02-29; 接受日期: 2016-04-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-24

展中。目前有机金属法是有有机相制备量子点的主要方法,此方法通过前驱体在高沸点的有机溶剂中热解来制备量子点。配体溶剂有己二酸二癸酯(DDA)、三辛基氧膦(TOPO)和液体石蜡、橄榄油等,由于有机试剂本身具有毒性,因此限制了有机金属法的应用以及发展。2005年,Deng等^[7]采用液体石蜡作为配体溶剂,得到了荧光量子产率高达60%的CdSe量子点,虽然解决了有机试剂的毒性问题,但是有机相得到的量子点具有油溶性,无法直接应用。与之相对应,水相合成量子点具有试剂无毒、优越的生物相容性等优点,成为量子点制备的潮流。2014年,Wu等^[8]采用水相法制备出CdTe量子点,进行蛋白修饰后连接光敏剂,通过荧光共振能量转移将量子点发射出的能量用来激发光敏剂以达到肿瘤治疗的作用。除此之外,量子点制备技术还有水热法、辅助微波法等水相法新技术。然而,基于水相法制备的大部分量子点发光性能较差,有待于荧光量子产率的进一步提高。

因化学法制备量子点具有局限性,科学家把目光投向生物相容性更好的有机生物体。在微生物合成纳米材料领域,磁性纳米铁的研究开始最早^[9]。所有的趋磁细菌均能够于体内合成独特的结构——磁小体。磁小体是由3–4 nm厚的双层脂膜包裹的磁矿晶(Fe_3O_4 或 Fe_3S_4),一般粒径为35–100 nm。磁小体具有很高的化学纯度,较窄的粒径范围和种属特异性的晶体形状^[10],这些特征都暗示了在趋磁细菌的细胞内有严格的生物调控过程。经过研究磁小体的合成机理,科学家们受到启发,尝试利用各种生物体进行荧光纳米材料量子点的胞内外合成。

1 细菌

由于原核生物生长较快且易于培养,因此是合成生物学中生产纳米颗粒的优良载体。目前,化学合成的双元素量子点材料通常由II–VI族、IV–VI族、III–V族的元素组成。自1980年首次发现量子点后,人们对量子点的研究逐渐深入。不同元素组成的量子点光学性质不尽相同,材料学家对于半导体CdS、

CdSe和CdTe等的潜力展开研究^[11]。其中,硫族量子点CdS得到了更广泛的关注,其微生物合成的探索也最为深入。1993年,Cunningham等^[12]在大肠杆菌中加入 CdCl_2 和0.05%盐酸半胱氨酸,共培养24 h后,在细胞表面和介质中均观察到亮黄色的CdS量子点。大肠杆菌是一种革兰氏阴性菌,是经常被用作生物研究的模型生物。大多数大肠杆菌菌株是无害的,且易于培养。同样是利用大肠杆菌合成CdS量子点,Sweeney等^[13]进一步简化了操作。他们在处于稳定期的大肠杆菌培养环境中添加镉和硫化物 Na_2S ,获得了2–5 nm大小的球形和椭圆形的纤锌矿形晶体。由于生物体的生长阶段不同,修饰蛋白种类、数量存在差异,并可能最终显著影响纳米晶体成核,因此,微生物基体的不同培养阶段可以用来调节纳米颗粒形成的大小、形状和晶体结构。近年来,随着生物技术的发展,基因工程等技术也在合成方面应用于修饰细胞,以得到期望的产物和探求产物生成的机理。在2008年,Kang等^[14]用基因重组的大肠杆菌表达植物螯合肽酶(这将在植物合成中作进一步介绍),成功合成CdS量子点。2011年,Mi等^[15]以基因工程大肠杆菌细胞为载体,通过引入外源基因编码一个硫化镉结合肽制备CdS量子点。合成的水溶性CdS粒子具有完全的单分散性,平均粒径6 nm,发射波长为445–513 nm。实验结果显示,硫化镉量子点存在于细胞质中,具有立方晶体结构。实验还对合成参数进行了研究,发现细菌细胞的培养时间和反应时间会显著影响硫化镉量子点的形成。Holmes等^[16]发现,不仅大肠杆菌,当肺炎克雷伯杆菌暴露在 Cd^{2+} 离子溶液中时,同样在细胞内形成CdS纳米粒子,其尺寸范围为20–200 nm。而Smith等^[17]则在肺炎克雷伯杆菌的细胞表面合成了硫化镉纳米颗粒,粒径范围为5–200 nm,且和化学合成的CdS具有类似的光学和光敏特性。

除此之外,光合细菌沼泽红假单胞菌被证实可以在镉存在的情况下通过细胞内半胱氨酸提供的硫源产生CdS量子点^[18]。硫酸镉溶液与沼泽红假单

胞菌共培养后, 培养溶液从 48 h 开始变黄, 从侧面说明硫化镉纳米粒子产生。纯化后的纳米溶液最大吸收峰位于 425 nm 处。此外, X 射线分析纯化的纳米颗粒, 证实了硫化镉的形成。样品的透射电镜分析结果表明, 纳米颗粒分布均匀, 平均粒径 8.01 ± 0.25 nm, 电子衍射证实了硫化镉晶体为面心立方结构。研究表明, 沼泽红假单胞菌的半胱氨酸脱硫酶产生的 S^{2-} 位于细胞质中。因此, CdS 纳米粒子是在细胞内合成, 然后排出细胞。而沼泽红假单胞菌分泌体外的蛋白起到稳定硫化镉纳米粒子的作用。类似研究表明, 沼泽红假单胞菌同样能够在加入铅盐后形成 PbS 纳米粒子, 经表征, 平均粒径为 10.50 ± 0.15 nm^[19]。

此后, 2010 年 Bao 等^[20]利用大肠杆菌实现了胞外合成 CdTe 量子点。合成的量子点具有很强的荧光, 发射峰位置随量子点尺寸而改变, 最大发射波长位于 488–551 nm 范围内, 以 510 nm 处为主。产物为球形颗粒, 粒度均匀、结晶性好, 大小在 2–3 nm 之间。研究者推测机理是大肠杆菌的分泌蛋白质辅助量子点的合成。CdTe 的生物合成方法由于新细菌的发现而有了一些新的进展。Pawar 等^[21]发表了由两个热带海洋细菌合成 CdTe 纳米结构的研究: 短小芽孢杆菌(革兰氏阳性细菌)和粘质沙雷氏菌(革兰氏阴性菌)。实验中, 镉盐和亚碲酸钠被分别添加到细胞悬液和滤液中。实验结果显示, 两种方法均可以合成出 CdTe 纳米粒子, 且尺寸约为 10 nm。从荧光图上可见, 短小芽孢杆菌的合成产物最大吸收在 465 nm 处, 而粘质沙雷氏菌的则位于 540 nm 处。这些结果与先前报道的通过化学和生物途径合成的碲化镉纳米结构相符, 证实了这些微生物合成半导体纳米粒子的潜力。2014 年, Yan 等^[22]用大肠杆菌成功合成 CdSe 量子点。实验确定了最优化的合成条件, 在一定范围内, 随着共培养时间加长, 量子点粒径逐渐变大。产物位于胞内, 最大吸收波长在 412 nm 左右。合成的量子点为球形, 大小集中在 8–11 nm 之间。颗粒表面有帽子结构(蛋白质), 因此具有较好的生物相容性。2015 年,

Wu 等^[23]又利用酿酒酵母合成了发射波长在 506–562 nm 的 CdSe 量子点, 并利用细胞毒性试验证明了该法合成量子点的毒性远远小于化学法合成的同种量子点。同年, 枯草芽孢杆菌作为一种新的生物载体被该课题组用于 CdSe 量子点的合成, 合成量子点的菌体可用于致病菌金黄色葡萄球菌的可视化检测^[24]。

越来越多的自然界细菌被发现具有合成量子点的潜在能力, Suresh^[25]采用胞外生物合成法, 利用植物病原菌假单胞菌在 $CdCl_2$ 和 $SeCl_4$ 水溶液环境条件下合成单分散的 CdSe 量子点。量子点粒径在 5.5 ± 2.0 nm, 吸收波长在 488–551 nm, 大多数的颗粒是球体或几何立方体状。由于量子点的表面蛋白覆盖层提高, 其生物相容性也提高。人体内的细菌也开始被尝试作为生物基质进行研究。韦荣球菌属在人体内含量很高, 普遍存在于人的口腔、鼻腔与呼吸道中, 是人体的正常菌群。Pearce 等^[26]利用非典型韦荣球菌对硒的还原能力将硒(IV)还原为硒(II), 并和锌离子或镉离子反应生成 ZnSe 或 CdSe 量子点。同样是来源于口腔环境, 胡文锋等^[27]用唾液乳杆菌 L3 合成了纳米氧化锌, 合成后晶体粒径小于 40 nm。

2 真菌

真菌合成纳米晶直到最近几年才被发现, 使用真菌的好处在于其能分泌大量的还原酶, 可用于纳米材料的合成, 而且合成后产物的分离操作相对简单。利用真菌不仅可以实现单分散性纳米晶的简单制备, 而且还可以对其产物的晶形进行较好的控制^[28]。

酵母是长期以来公认的合成半导体的重要真核微生物^[29]。1989 年 Dameron 等^[30]第一次在酵母生物系统中合成出量子点。他们在光滑假丝酵母和粟酒裂殖酵母中分别加入镉盐从而获得胞内 CdS 量子点。Cd²⁺进入细胞后被胞内酶转化代谢并与胞内硫源结合生成纳米粒子。类似地, 球拟酵母^[31]在含 Pb²⁺溶液中胞内合成 PbS 纳米晶, 并通过冻融法提取出来。其在 330 nm 处有最大吸收峰, 粒径

大小为 2–5 nm。2008 年, Kowshik 等^[32]发现在粟酒裂殖酵母细胞内合成的 CdS 量子点表现出理想的二极管特性, 尺寸范围在 1.0–1.5 nm。除了酵母菌具有这种能力外, 2014 年, Chen 等^[33]利用白腐真菌也实现了胞外合成 CdS 量子点。当黄孢原毛平革菌在含硝酸镉溶液中孵育 12 h 后, 培养溶液变黄, 表明形成了 CdS 纳米晶。纯化的溶液表现出的最大吸收峰在 296–298 nm 之间。经 X 射线分析纳米颗粒为面心立方晶体结构。纳米颗粒的平均粒径约为 2.56 nm。实验还发现提高 pH 值可以改进合成效果。有些 CdS 纳米粒子的合成并不是利用微生物细胞本身的硫元素。例如尖孢镰刀菌^[34]在硫酸镉溶液中于胞外形成了 CdS 量子点。量子点中的硫离子是由溶液中的硫酸根离子经还原反应产生的, 真菌起到硫酸还原酶的作用。2015 年, Borovaya 等^[35]第一次证实担子真菌系统可以用来合成硫化镉量子点。他们利用平菇菌丝体与无机硫酸镉和硫化钠共培养, 得到了稳定发光的硫化镉纳米晶体。球形晶体粒径 4–5 nm, 为纤锌矿晶形。经测定, 荧光量子点的吸收峰在 462 nm 左右。酵母细胞除了用来合成 CdS 量子点外, 还可用于合成其他的纳米材料。2009 年, Cui 等^[36]利用活酵母细胞作为生物合成器在细胞内可控合成 CdSe 量子点, 将反应温度控制在 30 °C 代替原来有机合成法所需的 300 °C, 且避免了原有方法具有的易燃、易爆和应用有毒试剂等缺点。所合成的 CdSe 量子点粒径在 2.69±0.07 nm, 相比于化学合成量子点粒径较小, 最大吸收波长位于 520–560 nm。2010 年, Bao 等^[37]用酵母细胞合成了大小均匀、高荧光的 CdTe 量子点。产物分散在胞浆和细胞核中, 粒径约 2.0–3.6 nm。量子点的荧光发射波长为 490–560 nm。CdTe 的粒径大小和酵母细胞的孵育时间有关, 随着时间的延长, 粒径也在增加。用酵母细胞合成 CdTe 量子点不仅可以提供一个统一的环境友好的反应体系, 还可以产生作为量子点帽子的蛋白配体。这些加帽蛋白阻止了量子点的聚集, 并确保它们的高荧光性能和优越的生物相容性。

酵母菌和霉菌是真菌形态学上的分类。上文介绍了许多酵母菌基体的例子, 其实对于霉菌作为纳米材料合成基体的研究也相当广泛, 尤其是金银纳米粒子的合成^[38–40], 而半导体材料的合成则相对较少, 处于起步阶段。2014 年, Kaur 等^[41]首次用从鹰嘴豆根际土壤中分离出来的真菌黑曲霉合成 PdS 纳米晶。其最大吸收波长约为 300 nm, 粒径大小为 10–15 nm, 颗粒大体为球形。同一年, Sarkar 等^[42]利用植物病原真菌链格孢菌培养滤液作为还原剂还原硫酸锌, 合成粒径范围 75±5 nm 的 ZnO 量子点。当处于金属离子环境压力时, 大多数真菌往往表现为较高的壁结合能力以及细胞内的金属吸收能力。这种特性已被用来合成不同类型的纳米材料, 比传统的合成方法更为有利。该方法可以在较低温度下对量子点的生物相容性进行调控。此外, 用尖孢镰刀菌在室温下实现胞外合成首次被报道^[43], CdSe 量子点的平均粒径是 11±2 nm, 基本上是球形。

作为两种完全不同的微生物, 细菌和真菌在合成量子点方面各具特色。相比于细菌合成量子点, 真菌合成所需的时间更长且合成粒径较大; 但由于其菌体较大, 分泌酶量较多, 因此其合成产物较细菌而言也更加可观, 且部分真菌可利用其生长滤液进行胞外合成, 大大减少了合成后量子点纯化的工作量。因此, 在合成不同量子点时可根据其具体需求选择合适的微生物载体。表 1 中对一些常用微生物载体合成量子点进行了总结。

3 其它生物基体

以上两大类几乎囊括了常见的量子点微生物合成基体, 但是还有一些种类相对稀少却很重要的其它类型微生物, 且具有合成其它种类纳米材料的显著能力, 以下将一一介绍。

3.1 放线菌

放线菌被证实可以胞外合成金纳米粒子, 属于高温单孢菌属。得到的金纳米粒子的分散性大大提高。大多数颗粒是球形的, 平均粒径约 8 nm^[44]。

3.2 蓝藻

Lengke 等^[45]利用丝状蓝藻(鲍氏织线藻

表 1 微生物合成量子点种类的分类
Table 1 Classification of microbial synthesis of quantum dots

纳米粒子 Nanoparticles	合成生物 Microorganism	粒径 Particle size (nm)	最大吸收波长 The maximum absorption wavelength (nm)	合成位置 Synthesis location	形态 Shape
CdS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20.0–200.0	–	Intracellular	–
	<i>Candida glabrata</i>		–	Intracellular	–
	<i>Schizosaccharomyces</i>	1.0–1.5	–	Intracellular	–
	<i>Fusarium oxysporum</i>		–	Extracellular	–
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2.56	296–298	–	Face-centered cubic
	Genetically engineered <i>Escherichia coli</i>	6.0	–	Intracellular	Cubic crystals
	<i>Escherichia coli</i>	2.0–5.0	–	–	Oval, spherical
	<i>Mushroom mycelium</i>	4.0–5.0	462	–	–
	<i>Rhodospseudomonas</i>	8.01±0.25	425	–	–
CdSe	<i>Escherichia coli</i>	8.0–11.0	412	Intracellular	Spherical
	<i>Saccharomyces</i>	2.69±0.07	520–560	Intracellular	–
	<i>Fusarium oxysporum</i>	11.0±2.0	–	–	Spherical
	<i>Pseudomonas</i>	5.5±2.0	488–551	Extracellular	Sphere or cube-shaped
CdTe	<i>Escherichia coli</i>	2.0–3.0	510	Extracellular	Spherical
	<i>Bacillus pumilus</i>	10.0	465	–	–
	<i>Serratia marcescens</i>	10.0	540	–	–
	<i>Escherichia coli</i>	8.0–11.0	412	Intracellular	Spherical
	<i>Saccharomyces</i>	2.0–3.6	–	–	–
PdS	<i>Aspergillus niger</i>	10.0–15.0	300	–	Spherical

UTEX485)还原溶液中的 Au^{3+} 得到 Au 纳米粒子,并且蓝藻与 AuCl_4^- 的相互作用可以促进纳米金的生长。合成过程中,蓝藻与金离子最初在细胞壁上形成金的一价硫化物,最后在细胞表面和溶液中沉积为八面体金晶。

3.3 植物(提取物)

Philip^[46]介绍了一种 Ag 和 Au 纳米粒子制备的综合办法。利用一种天然食用菌草菇提取物作为还原剂和保护剂。通过这种新方法得到了大小不同的金纳米粒子(20–150 nm),其形状多样,有近球形、六边形和三角柱。产物的大小和形状也受反应温度影响。合成的银纳米粒子呈球形,大小约 15 nm。

最近,Al-Shalabi 等利用番茄毛根制备出具有量子点特性的 CdS 纳米粒子^[47]。在分批培养的生长

中期番茄毛根体系中,100 $\mu\text{mol/L}$ Cd 的添加引起根系细胞对镉的解毒反应,但不影响根系生长。合成的纳米粒子具有 CdS 量子点的尺寸和与尺寸相关的光电性质。这些粒子的直径为 4–10 nm,在对应的激发波长激发下发射蓝紫色荧光,并表现出高度的光稳定性。

研究发现植物提取物合成纳米材料多数与植物的解毒过程有关。通常植物的解毒机制分为两种:一种是将重金属附着到细胞壁上;另一种是在分子水平上通过细胞内巯基化合物的合成如金属硫蛋白、谷胱甘肽、植物螯合肽等来解毒。这些有机分子络合金属离子使其细胞毒性降低,并将金属运输和储存在液泡中。植物螯合肽广泛存在于植物界^[48],是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸排列而成,通式为

(γ -Glu-Gly) $_n$ -Cys, 其中 n 在 2–11 之间^[49]。当金属离子如二价镉存在时, 植物螯合肽的合成明显增加。

3.4 病毒

1999 年, Shenton 等发现烟草花叶病毒(TMV) 含有丰富的蛋白亚基组成的多电荷氨基酸残基, 具备作为 CdS 和 PbS 纳米合成的成核位点^[50]。而随着基因工程的发展, 人为构建的工程 M13 噬菌体能够在病毒衣壳上表达半导体核肽, 成功实现了 CdS 和 ZnS 量子点的合适方位组装^[51]。

3.5 体细胞

在活体细胞中研究量子点的合成阻碍较大, 所以相关的报道也很少。2014 年, Tan 等^[52]通过给肝癌细胞(HepG2)饲喂硝酸银和硫酸钠溶液来合成近红外量子点 Ag_2S 。利用实验动物研究相关的代谢机理并进行间接合成也有所报道, 比如大鼠肝细胞对镉离子的毒性处理可被认为是一种绿色合成纳米粒子的方法。Trabelsi 等^[53]用氯化镉对大鼠进行腹腔注射, 30 d 后进行活体荧光成像、X 射线衍射等处理, 表明在肝脏中可能存在纳米颗粒, 它是量子点的可能性比较大。

3.6 动物

Stürzenbaum 等^[54]利用蚯蚓体内内源性重金属解毒过程, 将蚯蚓暴露在 $CdCl_2$ 和 $NaTeO_3$ 溶液中, 得到发光和水溶性的 CdTe 量子点。

4 生物辅助合成方法

生物合成法因其绿色、环保受到大家的青睐, 在此基础上发展起来的生物辅助合成方法也正在不断发展中。此方法合成量子点产生的荧光波长和粒径更容易调节, 可进行广泛的胞外合成, 不需要复杂的后处理。

梁任龙^[55]利用生物有机分子 L-丝氨酸辅助溶剂热法合成了单分散超顺磁 Fe_3O_4 纳米立方块, 其边长为 16 nm。合成的过程中, L-丝氨酸中的羧基氧原子与游离的三价铁离子生成配合物, 从而阻止了三价铁离子与氢氧根反应。2015 年 Sharan 等^[56]利用酿酒酵母分解化学合成的纳米棒, 使其分解为

直径约 10 nm 的准球形氧化锌纳米颗粒。分解过程可能与酵母所分泌的蛋白有关, 同时还形成了纳米粒子周围的“电晕”。细胞内蛋白 SDS-PAGE 分析结果表明, 某一单一的蛋白质在细胞中过度表达时可能起到了转运锌的作用。ICP-OES 结果表明, 当进行生物铣削时, 酵母细胞中积累了高含量的锌, 与胞外锌含量几乎相同。因此, 作者认为, 酵母细胞通过分泌蛋白质和维持细胞外液中的锌含量在生物铣削过程中发挥着重要作用。

总之, 生物合成方法向操作简单、量子点合成的重现性好、产物荧光强度增强、稳定性好的方向发展。

5 生物合成机理

生物合成量子点主要依赖于细胞内分泌物, 包括还原酶、封盖蛋白、醌、细胞色素、电子转运体或植物螯合肽、蛋白质等。大多数生物利用自身分泌的还原性酶类作用于金属离子从而合成量子点, 其中研究最多的是微生物。微生物合成量子点的过程通常被看作一种内在的防御机制, 用于解除金属离子对细胞的毒害作用。当然, 在生物体内还有一些生物分子和相关的类似物(如 DNA, 核糖核酸酶, 双功能肽等)可以作为模板来合成量子点。

趋磁细菌是一类厌氧细菌, 能够在胞内合成磁小体(Fe_3O_4 纳米粒子), 在研究磁小体合成机制的过程中, 研究人员发现磁小体的合成由 MamP 蛋白质主导进行。当对 MamP 蛋白质进行进一步研究后, 发现其具有一种特殊的蛋白质折叠“磁铬”结构, 有助于提高其聚集铁原子的能力, 并具有氧化作用, 能够将正二价铁氧化为正三价铁, 最终合成四氧化三铁纳米粒子。同时, 在胞外仅提供正二价铁的实验, 通过 MamP 蛋白质的作用获得了正三价铁, 从而进一步证实了 MamP 蛋白质的作用^[57]。

红假单胞菌是一种光合细菌, 其在胞内合成 ZnS 量子点则是另一番景象。将红假单胞菌置于硫酸盐溶液中, 硫酸盐主动吸附到细菌菌体上, 然后在硫酸盐转运蛋白作用下转移至红假单胞菌细胞

内膜上。随后,硫酸盐被 ATP 硫酸化酶、磷酸腺苷、磷酸-硫酸还原酶还原为亚硫酸盐,亚硫酸盐还原酶接着将亚硫酸盐还原为硫化物,再通过 O-乙酰丝氨酸硫醇基酶使硫化物与 O-乙酰丝氨酸反应生成半胱氨酸。最后,通过半胱氨酸脱硫水化酶水解半胱氨酸产生负二价硫,负二价硫与锌离子反应生成 ZnS 纳米粒子,并将这些纳米颗粒从红假单胞菌细胞释放到溶液中^[58]。

与之相对应的,酵母细胞内合成 CdSe 量子点首先通过还原 Na_2SeO_3 , 从而在细胞内累积硒代胱氨酸,再用 CdCl_2 对硒化后的酵母细胞进行处理,从而合成量子点。在探索合成机制的过程中发现酵母细胞内 CdSe 量子点的合成受到谷胱甘肽代谢途径的控制。首先,使用野生型酵母菌和 *GSH1* 基因缺乏的突变菌株同时合成 CdSe 量子点,发现野生型菌株合成的 CdSe 量子点发出的荧光效果较好,而突变菌株细胞内的 CdSe 量子点的荧光强度明显较低。其次,分别用硒化后的完整酵母细胞和 *GSH1* 基因缺乏的突变株进行合成试验,表明谷胱甘肽代谢过程仅对硒代胱氨酸前体的制备有影响,谷胱甘肽代谢途径对硒化镉量子点的形成过程有重要的意义^[59]。

研究表明,其它生物体内的生物大分子也具备合成量子点的潜力,如核酸具有独特的三维结构,同时具有许多金属结合基团(如磷酸盐、羟基、氮原子等),可作为量子点合成的模板。Levina 等通过在 DNA 模板上添加硝酸酶,随后加入硫化钠溶液合成具有红外发射的 PbS 量子点。而 DNA 的巯基改性,将 P=O 键更换为 P=S 可以提高 DNA 表面对量子点的亲和力^[60]。

6 展望

量子点自发现以来仅仅过了 30 年,但其相关合成技术发展迅速,现用于生产量子点的方法主要包括化学合成法和生物合成法。化学合成法中的水相合成法具有试剂无毒、优越的生物相容性等优点,然而,由水相法制备的大部分量子点发光性能

较差,有待于荧光量子产率的进一步提高。而化学合成法中的有机相合成法由于有机试剂本身具有毒性,限制了其使用,且有机相得到的量子点具有油性,无法直接应用。

从文中综述的各种微生物合成不同类型的量子点文献来看,用于量子点合成的微生物种类丰富,涵盖了原核、真核、病毒等多个领域。微生物合成量子点的种类也有很多,但主要是一些单元素的纳米粒子和双元素的量子点,多元素掺杂的量子点尚缺乏。生物合成步骤较简单,不需要高温高压等极端条件,且合成所得产物量子点后处理简单。生物合成的量子点较化学合成法具有较好的单分散性,可以通过优化反应过程中的参数(温度、pH)来提高产量,也可利用现代基因工程技术整合各个方法的优势促进新合成方法的发展。但在翻阅较多微生物合成量子点文献后不难发现,对于仿生物合成的具体过程,研究者们仍是知之甚少。多数文献都是将重心放在量子点的合成及表征工作上,很少涉及反应的机理,对于合成的具体路径及参与反应的酶的探索仍是需要花费精力的领域。只有在了解掌握了合成规律之后,才能对合成量子点的粒径及形状进行调控,为微生物合成量子点的工业化生产提供支持。

笔者实验室从事量子点研究工作多年,在化学法^[8]和微生物生物合成方面均进行了很多探索,目前已成功利用不同的真菌^[23]及细菌^[22,24]合成了 CdSe 量子点、CdS 量子点,利用合成出的生物相容性高量子点作为荧光探针进行了水样和血样中重金属离子的检测^[61],对微生物合成量子点的应用进行了积极探索,为其后续研究工作提供了一定基础。

近些年来对量子点在医学领域应用的探索也更为深入。前段时间厦门大学分子影像与转化医学研究中心彭乔立等^[62],利用修饰后的碳量子点在小鼠体内实验证实了其可作为高性能光声造影剂的潜质,可用于肿瘤血管成像,且具有较好的生物相容性。可见,量子点除了作为性能优良的荧光探

针,仍有很多未知的潜能等待人们去发现。也正因此,量子点制备的低毒高效才更具有重要意义。

参考文献

- [1] Bruchez Jr M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. *Science*, 1998, 281(5385): 2013-2016
- [2] Alivisatos AP. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots[J]. *Science*, 1996, 271(5251): 933-937
- [3] Chan WCW, Nie SM. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. *Science*, 1998, 281(5385): 2016-2018
- [4] Lin ZH. The applications of near-infrared quantum dots in biomedical analysis and biological imaging[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2015 (in Chinese)
林咨含. 近红外量子点在生物医学分析与生物成像方面的应用研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2015
- [5] Yang DD, Luo X, Wang RF. Study on single bio-molecule imaging of quantum dots[J]. *Medical Recapitulate*, 2015, 21(5): 871-873 (in Chinese)
杨丹丹, 罗雪, 王润芳, 等. 量子点的单分子生物成像[J]. *医学综述*, 2015, 21(5): 871-873
- [6] Gao X. The doped quantum dot applications in biomedical detection and disease diagnosis[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2013 (in Chinese)
高雪. 掺杂型量子点在生物医学检测和疾病诊断方面的应用研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2013
- [7] Deng ZT, Lie FL, Shen SY, et al. water-based route to ligand-selective synthesis of ZnSe and Cd-doped ZnSe quantum dots with tunable ultraviolet to blue photoluminescence[J]. *Langmuir*, 2009, 25(1): 434-442
- [8] Wu SM, Sun XJ, Wang LL, et al. Singlet oxygen-generating from fluorescent probes based on denatured bovine serum albumin-conjugated CdTe quantum dots and photosensitizer Chlorin e6[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, 16(11): 1-9
- [9] Wu SM, Su YL, Ma LY, et al. Synthesis of nanoparticles using microorganisms: a review of its mechanism[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(12): 2516-2524 (in Chinese)
吴盛美, 苏义龙, 马丽雅, 等. 基于微生物生物合成纳米颗粒机制的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(12): 2516-2524
- [10] Bazylinski DA, Frankel RB. Magnetosome formation in prokaryotes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(3): 217-230
- [11] Jacob JM, Lens PNL, Balakrishnan RM. Microbial synthesis of chalcogenide semiconductor nanoparticles: a review[J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(1): 11-21
- [12] Cunningham DP, Lundie LL. Precipitation of cadmium by *Clostridium thermoaceticum*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1993, 59(1): 7-14
- [13] Sweeney RY, Mao CB, Gao XX, et al. Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals[J]. *Chemistry & Biology*, 2004, 11(11): 1553-1559
- [14] Kang SH, Bozhilov KN, Myung NV, et al. Microbial synthesis of CdS nanocrystals in genetically engineered *E. coli*[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(28): 5186-5189
- [15] Mi CC, Wang YY, Zhang JP, et al. Biosynthesis and characterization of CdS quantum dots in genetically engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 153(3/4): 125-132
- [16] Holmes JD, Smith PR, Evans-Gowing R, et al. Energy-dispersive X-ray analysis of the extracellular cadmium sulfide crystallites of *Klebsiella aerogenes*[J]. *Archives of Microbiology*, 1995, 163(2): 143-147
- [17] Smith PR, Holmes JD, Richardson DJ, et al. Photophysical and photochemical characterisation of bacterial semiconductor cadmium sulfide particles[J]. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 1998, 94(9): 1235-1241
- [18] Bai HJ, Zhang ZM, Guo Y, et al. Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*[J]. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 70(1): 142-146
- [19] Bai HJ, Zhang ZM. Microbial synthesis of semiconductor lead sulfide nanoparticles using immobilized *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Materials Letters*, 2009, 63(9/10): 764-766
- [20] Bao HF, Lu ZS, Cui XQ, et al. Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(9): 3534-3541
- [21] Pawar V, Kumar AR, Zinjarde S, et al. Bioinspired inimitable cadmium telluride quantum dots for bioimaging purposes[J]. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology*, 2013, 13(6): 3826-3831
- [22] Yan ZY, Qian J, Gu YQ, et al. Green biosynthesis of biocompatible CdSe quantum dots in living *Escherichia coli* cells[J]. *Materials Research Express*, 2014, 1(1): 015401
- [23] Wu SM, Su YL, Liang RR. Crucial factors in biosynthesis of fluorescent CdSe quantum dots in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(96): 79184-79191
- [24] Yan ZY, Ai XX, Su YL, Liu X Y, et al. Intracellular biosynthesis of fluorescent CdSe quantum dots in *Bacillus subtilis*: a strategy to construct signaling bacterial probes for visually detecting interaction between *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2016, 22(1): 13-21
- [25] Suresh AK. Extracellular bio-production and characterization of small monodispersed CdSe quantum dot nanocrystallites[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 130: 344-349
- [26] Pearce CI, Coker VS, Charnock JM, et al. Microbial manufacture of chalcogenide-based nanoparticles via the reduction of selenite using *Veillonella atypica*: an in situ EXAFS study[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(15): 785-790
- [27] Hu WF, Liu XY, Zhang M, et al. Biosynthesis of ZnO nanoparticles by *Lactobacillus salivarius* L3[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(9): 2192-2198 (in Chinese)
胡文锋, 刘小阳, 张明, 等. 唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的工艺研究[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(9): 2192-2198
- [28] Fu YZ, Zhang YQ. Research progress on biosynthesis of nano-crystal[J]. *Materials China*, 2011, 30(3): 47-53 (in Chinese)
付云芝, 张永强. 生物合成纳米晶的研究进展[J]. *中国材料进展*, 2011, 30(3): 47-53
- [29] Shu GW, Chen H, LYU JL. Research progress of microbial synthesis of metal nanoparticles[A]//Proceedings of the Sixth China Academic Conference Functional Materials and Their Applications[C]. Chongqing: China Instrument and Control Society, 2007: 2052-2055 (in Chinese)
舒国伟, 陈合, 吕嘉桡. 微生物合成金属纳米粒子研究进展[A]//第六届中国功能材料及其应用技术学术会议论文集[C]. 重庆: 中国仪器仪表学会, 2007: 2052-2055
- [30] Dameron CT, Reese RN, Mehra RK, et al. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites[J]. *Nature*, 1989, 338(6216): 596-597
- [31] Kowshik M, Vogel W, Urban J, et al. Microbial synthesis of semiconductor PbS nanocrystallites[J]. *Advanced Materials*, 2002, 14(11): 815-818
- [32] Kowshik M, Deshmukh N, Vogel W, et al. Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2002, 78(5): 583-588
- [33] Chen G, Yi B, Zeng G, et al. Facile green extracellular biosynthesis of CdS quantum dots by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 117: 199-205

- [34] Syed A, Ahmad A. Extracellular biosynthesis of platinum nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 97: 27-31
- [35] Borovaya M, Pirkov Y, Krupodorova T, et al. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum dots by using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015, 29(6): 1-8
- [36] Cui R, Liu HH, Xie HY, et al. Living yeast cells as a controllable biosynthesizer for fluorescent quantum dots[J]. Advanced Functional Materials, 2009, 19(15): 2359-2364
- [37] Bao HF, Hao N, Yang YX, et al. Biosynthesis of biocompatible cadmium telluride quantum dots using yeast cells[J]. Nano Research, 2010, 3(7): 481-489
- [38] Bhainsa KC, D'Souza SF. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 47(2): 160-164
- [39] Gade AK, Bonde P, Ingle AP, et al. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles[J]. Journal of Biobased Materials & Bioenergy, 2008, 2(3): 243-247
- [40] Mansoori GA. Synthesis of nanoparticles by fungi[P]. US: 2010/0055199 A1. 2010-03-04
- [41] Kaur P, Jain P, Kumar A, et al. Biogenesis of PbS nanocrystals by using rhizosphere fungus i.e., *Aspergillus* sp. isolated from the rhizosphere of Chickpea[J]. Bionanoscience, 2014, 4(2): 189-194
- [42] Sarkar J, Ghosh M, Mukherjee A, et al. Biosynthesis and safety evaluation of ZnO nanoparticles.[J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2014, 37(2): 165-171
- [43] Kumar SA, Ansary A, Ahmad A, et al. Extracellular biosynthesis of cdse quantum dots by the fungus, *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2007, 3(2): 190-194
- [44] Sastry M, Ahmad A, Islam Khan M, et al. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete[J]. Current Science, 2003, 85(2): 162-170
- [45] Lengke MF, Bruce R, Fleet ME, et al. Mechanisms of gold bioaccumulation by filamentous cyanobacteria from gold(III)-chloride complex[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(20): 6304-6309
- [46] Philip D. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009, 73(2): 374-381
- [47] Al-Shalabi Z, Stevens-Kalceff MA, Doran PM. Application of *Solanum lycopersicum* (tomato) hairy roots for production of, passivated CdS nanocrystals with quantum dot properties[J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 84: 36-44
- [48] Clemens S. Evolution and function of phytochelatin synthases[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(3): 319-332
- [49] Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(2): 439-443
- [50] Shenton W, Douglas T, Young M, et al. Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus[J]. Advanced Materials, 1999, 11(3): 253-256
- [51] Mao C, Flynn CE, Hayhurst A, et al. Viral assembly of oriented quantum dot nanowires[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(12): 6946-6951
- [52] Tan LJ, Wan AJ, Li HL. Synthesis of near-infrared quantum dots in cultured cancer cells[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013, 6(1): 18-23
- [53] Trabelsi H, Azzouz I, Sakly M, et al. Subacute toxicity of cadmium on hepatocytes and nephrocytes in rat could be considered as a green biosynthesis of nanoparticles[J]. International Journal of Nanomedicine, 2013, 8(10): 1121-1128
- [54] Stürzenbaum SR, Höckner M, Panneerselvam A, et al. Biosynthesis of luminescent quantum dots in an earthworm[J]. Nature Nanotechnology, 2013, 8(1): 57-60
- [55] Liang RL. Bio-organic molecules assisted synthesis of nano-oxide and functionalization of graphenes[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University, 2012 (in Chinese) 梁任龙. 生物有机分子辅助合成纳米氧化物及石墨烯的功能化[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2012
- [56] Sharan C, Khandelwal P, Poddar P. Biomilling of rod-shaped ZnO nanoparticles: a potential role of *Saccharomyces cerevisiae* extracellular proteins[J]. RSC Advances, 2014, 5(3): 1883-1889
- [57] Siponen MI, Legrand P, Widdrat M. Structural insight into magnetochrome-mediated magnetite biomineralization[J]. Nature, 2013, 502(7373): 681-684
- [58] Bai HJ, Zhang ZM, Gong J. Biological synthesis of semiconductor zinc sulfide nanoparticles by immobilized *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(14): 1135-1139
- [59] Li Y, Cui R, Zhang P, et al. Mechanism-oriented controllability of intracellular quantum dots formation: the role of glutathione metabolic pathway[J]. ACS Nano, 2013, 7(3): 2240-2248
- [60] Levina L, Sukhovatkin V, Musikhin S, et al. Efficient infrared-emitting PbS quantum dots grown on DNA and stable in aqueous solution and blood plasma[J]. Advanced Materials, 2005, 17(15): 1854-1857
- [61] Su YL, Du QQ, Qu XC, et al. Fluorescent yeast containing intracellularly biosynthesized CdSe QDs as a sensitive probe for simple determination of Copper (II) in water and plasma[J]. RSC Advances, 2016, 6(34): 28187-28193
- [62] Peng QL, Wang XY, Huang C, et al. Carbon dots as highly efficient photoacoustic contrast agents for biomedical imaging[J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition), 2015(6): 859-863 (in Chinese) 彭乔立, 王骁勇, 黄超, 等. 碳量子点作为光声造影剂的性能评价与基础研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2015(6): 859-863