

## 贵金属团簇探针用于细胞成像及体外检测\*

刘 茹 王亚玲 崔岩岩 孙志鹏 魏岳腾 高学云\*\*

(中国科学院高能物理研究所, 中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100049)

**摘要** 贵金属团簇(noble metal clusters)是近年来新兴的一类荧光标记材料。由于具有物理尺寸小、荧光可调及生物相容性等优异的性能使得其在生物成像及检测领域都有着广泛的应用前景。本文讨论了贵金属团簇的制备和荧光特性, 重点论述了其作为标记材料在细胞成像方面及体外检测应用中的研究进展。

**关键词** 贵金属团簇, 荧光探针, 细胞成像, 生物检测

**学科分类号** Q2

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00283

细胞成像以其可视化的优点可实现实时观察靶向材料与输运材料的具体位置, 观察细胞及生物体对纳米材料的代谢反应途径以及机理, 然而生物有机体的特性限制了成像材料的选择范围, 细胞成像材料的寻找一直是成像领域的研究前沿<sup>[1-2]</sup>。

常见的用于细胞标记的荧光探针主要有: 有机染料、量子点、上转换荧光材料以及贵金属团簇等几大类型。有机染料分子由于发射波长和激发波长比较靠近, 并且有些分子吸收谱及发射谱都较宽, 长时间激发荧光容易被漂白等缺点限制了其应用<sup>[3]</sup>; 量子点虽然有着发射波长可调的较强荧光信号, 但存在着本身尺寸较大及成像中的闪烁现象等不利因素<sup>[4-5]</sup>; 上转换发光标记具有较深的光穿透深度、无生物背景荧光干扰、对生物组织几乎无损伤等显著优势<sup>[6]</sup>, 但其本身物理尺寸较大<sup>[7]</sup>; 与这些材料相比, 贵金属团簇材料物理尺寸较小 (< 2 nm), 具有确定的发色团组成(即团簇核包含明确的原子数目, 如 Ag<sub>3</sub>、Ag<sub>4</sub>、Au<sub>25</sub> 等), 其发射波长可通过制备条件的改变来调节(紫外到近红外波段), 且量子产率较高, 同时通过合理选择团

簇保护剂可以赋予其良好的生物相容性<sup>[8-10]</sup>。因此, 近年来贵金属团簇逐渐成为细胞成像这一领域的新型材料, 引起了广大研究者的兴趣<sup>[11]</sup>。另外, 由于贵金属团簇荧光对环境的灵敏性, 可以实现对其他金属离子及生物分子的灵敏检测, 因而团簇在生物分析以及医学检测领域的应用也是目前的研究热点。

### 1 贵金属团簇的合成制备与荧光性质

#### 1.1 贵金属团簇的合成

贵金属团簇的制备方法主要包括物理法和化学法两大类。物理制备方法获得的团簇由于没有适当的稳定剂保护极易发生聚集, 因而目前的研究中较为常用的为化学方法, 主要包括单分子层保护法

\* 国家重大科学研究计划(2013CB932703, 2013CB932704)及国家自然科学基金(31271072, 31070891, 31200751, 81201133)资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-88236709, Fax: 010-88236456, E-mail: gaoxy@ihep.ac.cn

收稿日期: 2013-06-20, 接受日期: 2013-07-04

(monolayer-protected nanoclusters, MPCs)和模板法.

**1.1.1 MPCs 法.** MPCs 法利用含一定官能团的小分子作为保护基, 在团簇表面形成一层保护层用以稳定团簇. 常用官能团一般包括巯基、氨基以及膦基等, 它们分别以硫原子、氮原子以及磷原子与贵金属原子形成稳定的配位键结合于团簇表面, 多用于制备金团簇. 1994 年, Brust 等<sup>[12]</sup>最先通过 MPCs 方法在烷基硫醇存在下利用硼氢化钠还原  $AuCl_4^-$  制备得到 1~3 nm 的金团簇. 此后, 众多研究者逐步改进和发展 MPCs 法以制备贵金属团簇. Cui 等<sup>[13]</sup>以具有原位还原并捕获贵金属团簇的功能性序列 CCY 为基础, 设计了多肽序列 CCYTAT. 在无外加还原剂的条件下, 通过控制反应体系的 pH 值, 可制备了分别具有特定个数的红色荧光 ( $Ag_{28}$ ) 和蓝色荧光 ( $Ag_5$ 、 $Ag_6$ 、 $Ag_7$ ) 的银团簇纳米材料(图 1). 这种简易温和的团簇合成方法有助于贵金属团簇材料的生物应用.

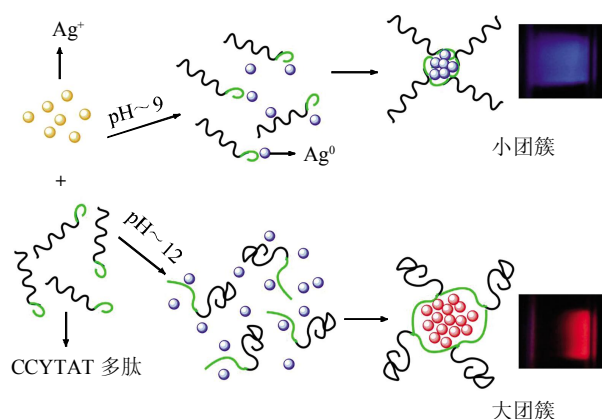


Fig. 1 Illustration of peptide-Ag cluster formation<sup>[13]</sup>

图 1 小肽-银团簇形成机理<sup>[13]</sup>

**1.1.2 模板法.** 模板法主要基于高分子聚合物<sup>[14-15]</sup>、微乳液<sup>[16]</sup>、聚合电解质<sup>[17]</sup>以及功能性生物分子如 DNA、多肽和蛋白质等分子<sup>[18-19]</sup>的特殊空间结构或功能, 在强还原剂( $NaBH_4$ )条件下获得稳定、荧光可调的贵金属团簇. 模板分子给予团簇提供了一个预生长的空间, 使得团簇的制备更加容易, 尺寸与

形状也更易控制. 早在 1998 年, Balogh 等<sup>[20]</sup>就利用多聚胺分子(PAMAM)作为模板制备了铜团簇. 2002 年, Dickson 小组<sup>[21]</sup>首次利用树枝状高聚物(Dendrimer)作为保护剂合成了水溶性的稳定银团簇(图 2). 水溶性的制备条件使得贵金属团簇有了生物应用的前景, 随后越来越多的研究组关注包括 Au、Ag 和 Cu 在内的贵金属团簇的溶液合成, 研究其光学、电学以及磁学等性质, 并探讨其在生物领域的应用.

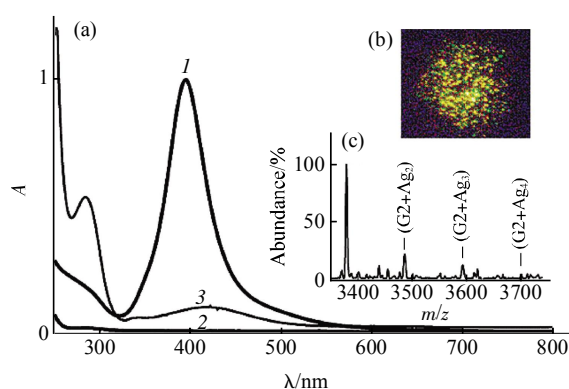


Fig. 2 UV-VIS spectra of Ag/dendrimer

图 2 Ag/树枝状高聚物紫外-可见光谱

(a) Ag/dendrimer 溶液的紫外-可见光谱. 1: 1: 12(dendrimer: Ag)溶液光活化前, 2: 1: 3 (dendrimer: Ag)溶液光活化前, 3: 光活化后产生荧光的银团簇. (b) 溶液(3)的荧光图像. (c) ESI 质谱<sup>[21]</sup>.

## 1.2 贵金属团簇的荧光性质

贵金属团簇的尺寸接近或小于电子的费米波长时, 金属连续的能级会变为准连续甚至是离散能级<sup>[22]</sup>, 从而使团簇产生光致发光现象. 荧光是团簇最为重要的性质, 当构成团簇的原子数目不同即团簇大小不同时, 能级之间能量差值也不同, 因此其荧光性质也随之变化<sup>[23-24]</sup>. Zheng 等<sup>[25]</sup>利用树枝状高聚物(Dendrimer)制备了一系列不同原子数的金团簇, 并研究了其荧光性质随原子数及尺寸的变化规律. 此外, 团簇的荧光性质也会受表面化学效应(如包裹剂和溶剂)的影响而发生变化. Choi 等<sup>[26]</sup>总结了不同模板包裹剂制备的银团簇荧光性质(表 1).

Table 1 Photophysical parameters of Ag nanoclusters<sup>[26]</sup>表 1 银团簇光物理参数<sup>[26]</sup>

发光材料	保护基	(激发波长 /nm)/ (发射波长 /nm)	荧光寿命	$\Phi$ /%	$\epsilon$ /M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	双光子吸收 截面( $\sigma$ , GM)
蓝色 Ag 1	巯基琥珀酸	350/440	0.01 <sup>2)</sup>	9	n/a	
蓝色 Ag 2	DNA	370/475	n/a	14	n/a	
蓝色 Ag 3	DNA	340/485	3.0	n/a	n/a	
绿色 Ag 1	DNA	420/520	0.2	16	n/a	
绿色 Ag 2	DNA	467/523	3.6	27	120 000	4000@750 nm
绿色 Ag 3	胺 / 四氢呋喃	450/530	2.6	11	n/a	
绿色 Ag 4	DNA	350/545	n/a	n/a	n/a	
绿色 Ag 5	沸石	375/550	0.2/1.1/3.9	n/a	n/a	
绿色 Ag 6	DNA	460/550	0.6/2.5	0.2	n/a	
黄色 Ag 1	DNA	480/562	4.3	38	200 000	
黄色 Ag 2	DNA	520/572	2.6	34	n/a	
桔红色 Ag 1	DNA	543/590	2.0	36	350 000	
桔红色 Ag 2	DNA	530/600	0.8/2.9	10	n/a	
红色 Ag 1	聚合物	490/615	0.3/1.4	3	n/a	
红色 Ag 2	DNA	560/615	2.5	42	950 000	50 000@800 nm
红色 Ag 3	DNA	560/618	2.3	16	280 000	
红色 Ag 4	DNA	570/620	2.2	32	120 000	
红色 Ag 5	聚合物	510/620	2.3	19	n/a	
红色 Ag 6	聚合物	504 528/614 626	1.0/2.4/20 000/148 000	5	n/a	
红色 Ag 7	多肽	475/630	0.4/2.9	3	n/a	
红色 Ag 8	DNA	570/635	2.7	26	320 000	
红色 Ag 9	巯基琥珀酸	550/650	0.04 <sup>2)</sup>	0.3	n/a	
红色 Ag 10	DNA	595/650	1.3/3.5	64	n/a	
红色 Ag 11	硫辛酸	425/652	37 000 <sup>1)</sup>	2	n/a	
红色 Ag 12	DNA	590/660	3.0	18	n/a	35 000@880 nm
红色 Ag 13	DNA	600/670	3.5	34	250 000	
红色 Ag 14	DNA	615/680	3.0	37	n/a	34 000@890 nm
红色 Ag 15	沸石	450/690	115 000/835 000	n/a	n/a	
近红外 Ag 1	DNA	640/700	3.6	52	42 000	
近红外 Ag 2	DNA	650/700	2.6	17	320 000	
近红外 Ag 3	DNA	645/705	3.5	34	350 000	50 000@830 nm
近红外 Ag 4	DNA	750/810	1.8	30	180 000	
近红外 Ag 5	DNA	840/900	1.4	6	900 000	
荧光素		491/521	4.1	79	88 000	37@780 nm
半导体量子点		可见光 - 近红外	10-100	10-80	100 000-1 000 000	5 000-90 000

<sup>1)</sup> 观察到长荧光寿命; <sup>2)</sup> 观察到少量长荧光寿命组分.

## 2 贵金属团簇探针在细胞成像与标记中的应用

自水溶性团簇的制备方法发展以来, 研究者对于团簇的细胞成像与标记应用展开了广泛的研究.

### 2.1 金纳米团簇的细胞标记

前期利用金团簇实现细胞标记的主要技术路线为首先使用各种聚合物分子或硫辛酸(DHLA)等保护剂制备具有特定发光性质的团簇, 随后通过共价修饰在团簇表面的包裹剂连接上多肽、抗体或其他具有生物活性或特异性的分子, 以使团簇具备靶向

性和生物相容性.

2009年, Lin等<sup>[27]</sup>利用硫辛酸制备具有红色荧光的AuNC@DHLA团簇. 之后, 通过共价修饰在团簇表面修饰链霉亲和素 streptavidin, 利用 streptavidin 与 HepG2 中的生物素特异性识别实现了金团簇对 HepG2 细胞的特异性标记.

Retnakumari等<sup>[28]</sup>利用抗坏血酸作为绿色还原剂合成BSA-Au团簇, 进而在BSA表面共价修饰叶酸, 实验表明, 该复合团簇在pH 4~14的范围内都能稳定存在, 并且探针荧光效率高达7.4, 通过叶酸受体的特异识别功能, 成功地标记了叶酸受体(FR)表达阳性较高的鼻咽癌KB细胞.

虽然通过在包裹剂表面修饰识别分子可以实现团簇的靶向功能,但是这种路线需要经过复杂的修饰过程或者使用强还原剂,使得团簇材料的靶向性和特异性并不高.进一步的研究着眼于采用本身具有识别能力的包裹剂制备团簇以实现靶向功能. Wang 等<sup>[29]</sup>利用设计的一种同时具有还原能力和良好亲水性的双功能多肽(CCYTAT),开发了温和简易的原位矿化制备金团簇的方法.通过控制反应体系的 pH、反应产物的配比,即可获得高量子产率(11%)的稳定红色金团簇(最大发射波长 677 nm).

利用温和解离的生物质谱(MALDI-TOF MS)获得了多肽-金团簇的组成信息:多肽-金团簇由 Au<sub>25</sub>核及其表面包裹的 9 条肽链组成.所制备的团簇探针借助 CCYTAT 对于亚细胞器核靶向的特异性,通过与不同的细胞共培养,实现了对于宫颈癌细胞 HeLa、肺成纤维细胞 GES-1、胃黏膜细胞 MRC-5 三种不同类型细胞系细胞核的染色,并且通过与能够特异性标记细胞核的有机染料吖啶橙相比,证实了多肽-金团簇探针具有更好的光稳定性(图 3).

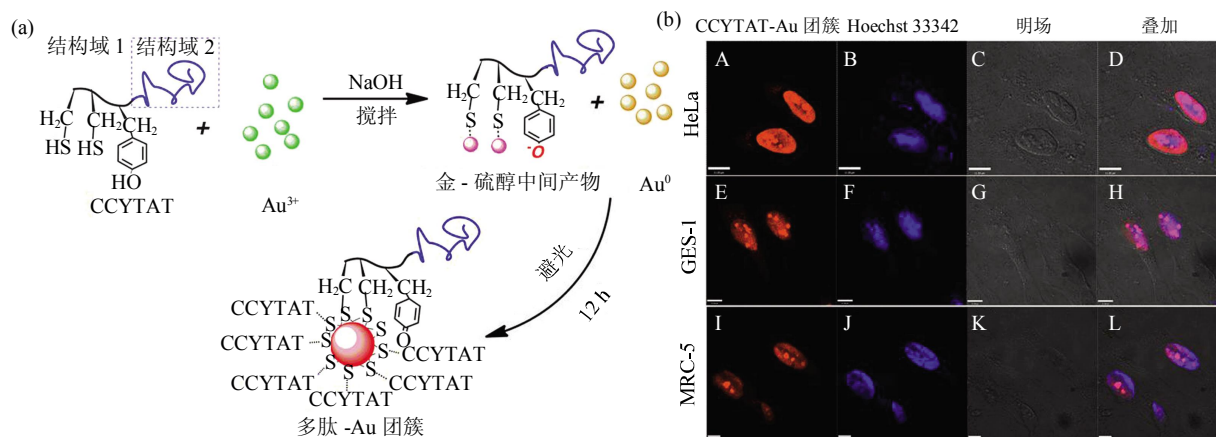


Fig. 3 A schematic illustration of peptide-Au clusters formation

图 3 多肽-金团簇形成及机理

(a)多肽-金团簇形成机理.(b)CCYTAT-Au 团簇标记细胞核的激光共聚焦图像<sup>[29]</sup>.

双光子荧光成像采用长波长激发,能够对于组织进行深层次扫描,并可以避免细胞或组织对光的吸收和散射,因此提高了光谱选择性和分辨率,更适于生物成像.银团簇的双光子吸收横截面在缓冲溶液中与量子点不相上下,而金团簇的双光子吸收性质则远远优于一般的有机荧光染料和量子点<sup>[30-31]</sup>.因此,团簇材料在双光子的灵敏标记领域显示出了较好的应用前景. Liu 等<sup>[32]</sup>以 dextran 修饰巯基十一烷酸包裹制备的金团簇(11MUA-Au nanodots),研究了其双光子效应用于人骨髓间充质干细胞(hMSCs)的生物成像.首先,光谱研究证实了 dextran 修饰的 11MUA-Au nanodots 探针以 800 nm 波长的近红外激光脉冲获得了发射波长在 530 nm 的绿色荧光.进一步将探针与 hMSCs 细胞共培养 24 h 后获得了双光子的荧光图像,验证了金团簇用于双光子生物成像的可行性.随后, Polavarapu 等<sup>[33]</sup>也研究了 glutathione 保护的 Au 团簇探针的细胞双光子成

像. 2011 年, Nienhaus 课题组<sup>[34]</sup>以青霉胺(DPA)包裹制备 Au 团簇,在生理 pH 条件下具有良好的水溶性和稳定性.以 810 nm 的双光子激发获得了 DPA-Au 团簇材料在 HeLa 细胞中的荧光成像(图 4).

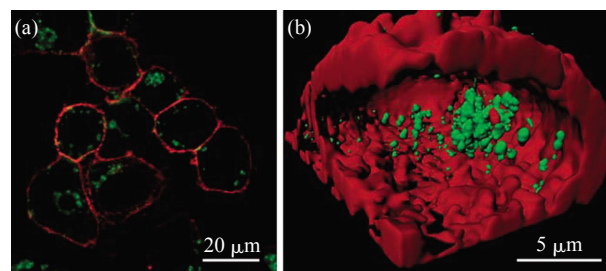


Fig. 4 Confocal images of DPA-AuNCs incubation with cells

图 4 青霉胺-金团簇与细胞共培养的激光共聚焦成像图片 (a) HeLa 细胞与 DPA-AuNCs 共培养 2 h 后的激光共聚焦图像. (b) 细胞吞噬 DPA-AuNCs 后的 3D 切面图, 细胞膜以红色染料 DiI 标记<sup>[34]</sup>.

## 2.2 银纳米团簇的细胞标记

2005年, Baskakov 研究组<sup>[35]</sup>最早利用团簇作为细胞标记材料进行研究. 他们选择对淀粉样蛋白纤维(amyloid fibrils)有高度特异性的硫磺素 T (thioflavin T, ThT)作为保护剂, 利用光还原的方法原位合成了银团簇. 实验结果表明, 制备的团簇具有较强的荧光强度和光稳定性, 并且实现了对于 amyloid fibrils 的成像标记. 至此, 开启了银团簇用于细胞成像和比较的研究先河.

利用类似的方法, Dickson 小组开展了系列研究. 首先, 利用一段短肽序列合成了银团簇, 并且实现了固定细胞的细胞核成像<sup>[36]</sup>. 利用短序列小肽合成的团簇能够避免一般纳米材料依靠内吞作用进入细胞进而聚集在溶酶体的缺陷, 实现了团簇材料在亚细胞器定位的可能. 在利用 DNA 作为保护剂合成团簇的报道之后, DNA- 团簇也开始用于细胞标记的研究, 随后的实验证明, 当 DNA 浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  的条件下, DNA- 团簇可以很好地标记固定的 NIH3T3 细胞核<sup>[37]</sup>.

由于 DNA 本身并没有靶向功能, 进一步的标记研究主要是借助于辅助分子和基团. Yu 等<sup>[38]</sup>将一段 ssDNA 连接于亲和素 Avidin 之上, 并利用 DNA 模板制备 Avidin-C24-Ag 团簇, 提高了团簇的荧光效率和成像信号强度, 之后又将团簇连接于 anti-HS 抗体之上, 成功标记了活细胞膜表面蛋白, 从而实现了团簇的成像功能与靶向功能的结合.

2010年, Antoku 等<sup>[39]</sup>利用 ssDNA 制备了具有红色荧光的银团簇, 并由转染试剂脂质体 TM 2000 将团簇载入 HeLa 细胞, 同时, 该实验也验证了材料对于活细胞的安全性, 为银团簇用于特定蛋白的标记检测提供了可能性. 与此同时, Choi 等<sup>[37]</sup>利用细胞穿膜肽 CPP 连接 DNA- 银团簇, 实现了利用显微注射的手段对于固定细胞和活细胞的染色.

我们研究组在银团簇的成像方面也做了一些工作, 利用具有特异靶向性的核酸适配体作为模板制备稳定银团簇, 实现了活细胞的细胞核标记. 核酸适配体(aptamer)是具有独特三维结构的能够特异靶向目标分子的单链 DNA 或 RNA 分子. 其靶向分子的范围相当广泛, 包括有机小分子、多肽、核苷酸、蛋白质甚至一些超分子复合物等. 由于具有高特异性、高亲和力、高稳定性、无毒无免疫原性、便于化学修饰与功能化、易于大量低成本与可重复性合成等优势, 核酸适配体较之抗体更适于靶向识别, 也为团簇的细胞成像提供了更好的应用条件<sup>[40]</sup>.

Sun 等<sup>[41]</sup>选择特定靶向人急性淋巴细胞白血病 T 淋巴细胞(CCRF-CEM)的核酸适配体序列 sgc8c, 通过筛选优化获得适于合成团簇的短链 ssDNA 8C 序列. 实验证明, 短链 8C ssDNA 序列与 sgc8c aptamer 连接之后可以用于合成具有高荧光强度的红色  $\text{Ag}_3$  和  $\text{Ag}_4$  团簇, 此团簇具有特异的靶向 CCRF-CEM 活细胞核的能力(图 5). 该研究实现了团簇荧光与 aptamer 靶向功能的结合, 随着 cell-SELEX 筛选 aptamer 方法的完善和改进, 利用具有不同靶向能力的 aptamer 可控制备团簇探针可实现不同细胞位点的成像与标记. 这种温和和简易的合成方法以及特定靶向的性质拓宽了银团簇的生物使用潜能.

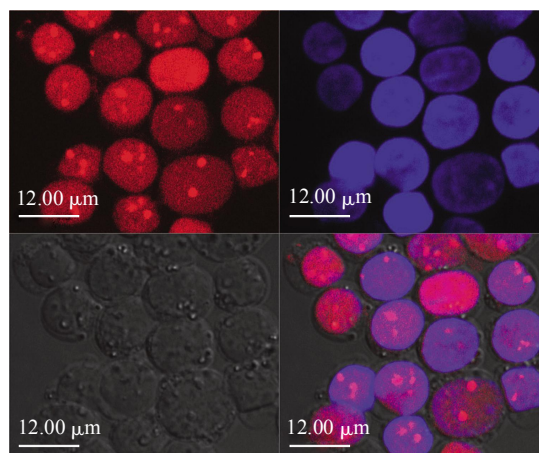


Fig. 5 Confocal microscopy images of the cluster-aptamer hybrids and Hoechst 33342 in live CCRF-CEM cells

图 5 CCRF-CEM 与 cluster-aptamer 团簇共定位的激光共聚焦图像

红色为团簇材料(561 nm 激发), 蓝色为细胞核染料 Hoechst 33342 (488nm 激发)<sup>[41]</sup>.

最近, Li 等<sup>[42]</sup>选用一种已经进入临床 II 期实验的抗肿瘤增殖寡核苷酸试剂 AS1411, 通过一锅法制备了具有高荧光效率的银团簇. AS1411 的抗肿瘤靶向作用类似于 aptamer, 可以特定结合核仁蛋白以此达到靶向治疗的目的. 通过激光共聚焦三维扫描, 证实该材料可以精确靶向人乳腺癌 MCF-7 细胞的细胞核. 实现了对特定细胞类型标记的效果. 同时, 与单独的 AS1411 相比, AS1111-Ag 材料对于 MCF-7 的增殖具有明显的抑制效果. 这种温和和简易的合成方法以及特定靶向的性质拓宽了银团簇的生物实用范围.

### 2.3 铜团簇的生物成像

相对于金银团簇来说，铜团簇的研究较少还处于起始阶段，因此用于生物成像的研究也较少。

Wang 等<sup>[43]</sup>制备的一价铜团簇  $\text{Cu}_4\text{I}_4\text{L}_4$  具有较高的量子产率和较宽的双光子吸收横截面，实现了对于活细胞核酸的双光子成像分析(图 6)。

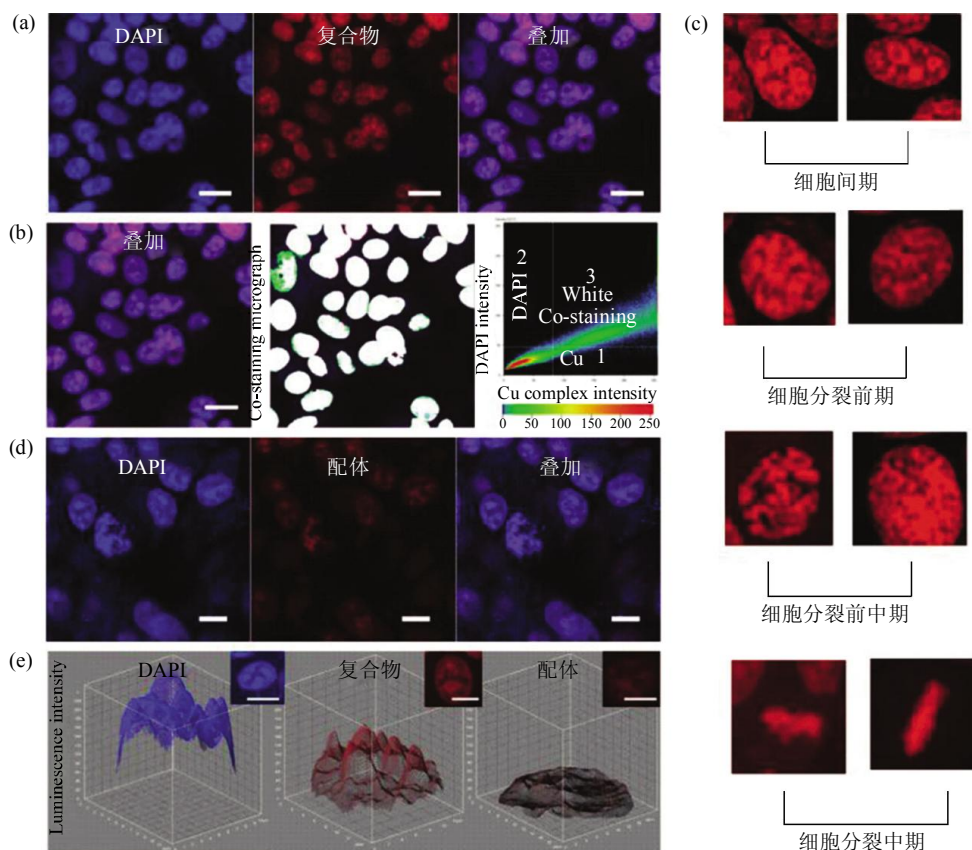


Fig. 6 Two-photon microscopy biological imaging of  $\text{Cu}_4\text{I}_4\text{L}_4$

图 6  $\text{Cu}_4\text{I}_4\text{L}_4$  团簇的双光子成像

(a)  $\text{Cu}_4\text{I}_4\text{L}_4$ (红色)与核染料 DAPI(蓝色)共定位. (b)共染区域位于细胞核. (c)染色体荧光. (d)合物 L 与 DAPI 共染. (e) 与 MCF-7 共培养 2 h 后 DAPI,  $\text{Cu}_4\text{I}_4\text{L}_4$  及 L 的 3D 荧光<sup>[43]</sup>.

### 2.4 铂团簇的生物成像

Tanaka 等<sup>[44]</sup>以第四代 PAMAM 制备铂团簇  $\text{Pt}_5(\text{MAA})_8$ ，为了进行生物成像，以 ProteinA 修饰之后连接趋化因子受体抗体 anti-CXCR4-Ab，得到

$\text{Pt}_5(\text{MAA})_8$ -(Protein A)-(anti-CXCR4-Ab)复合团簇。利用肿瘤过表达趋化因子受体这一特性，通过与乳腺癌 HeLa 细胞培养，实现铂团簇的细胞标记(图 7)。

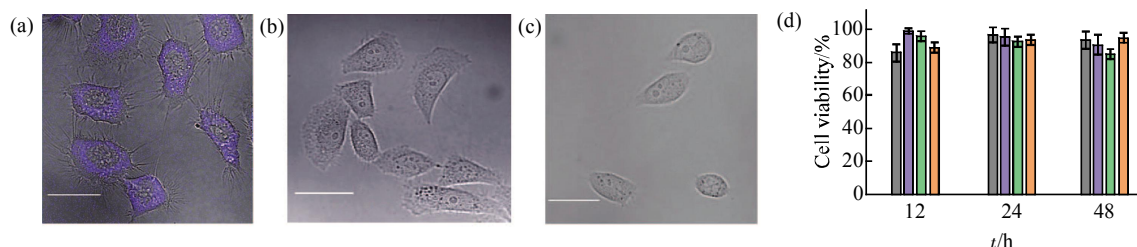


Fig. 7 Confocal fluorescence microscopic images of living HeLa cells

图 7 活细胞激光共聚焦成像

(a)  $\text{Pt}_5(\text{MAA})_8$ -(Protein A)-(anti-CXCR4-Ab)与 HeLa 细胞共培养的激光共聚焦图像. (b) HeLa 细胞空白对照. (c)  $\text{Pt}_5(\text{MAA})_8$ -(Protein A)-(anti-CXCR4-Ab)与 CHO-K1 细胞共培养的激光共聚焦图像. (d) HeLa 细胞毒性实验<sup>[44]</sup>. ■: Control; ■: 1 nmol/L  $\text{Pt}_5$ ; ■: 10 nmol/L  $\text{Pt}_5$ ; ■: 100 nmol/L  $\text{Pt}_5$ .

### 3 贵金属团簇探针在体外检测中的应用

#### 3.1 离子检测

##### 3.1.1 汞离子检测.

$\text{Hg}^{2+}$  是一种高毒性的金属离子, 较低剂量下就可以损伤脑、神经系统及肾脏<sup>[45]</sup>, 因此对其检测具有重要的意义. Huang 等<sup>[46]</sup>利用汞离子诱导团簇发生聚集的手段, 通过 11-MUDA-Au 团簇实现了  $\text{Hg}^{2+}$  的高灵敏检测, 检测限可达到 5 nmol/L. Xie 等<sup>[47]</sup>利用 BSA-Au 团簇实现了对于  $\text{Hg}^{2+}$  的更加灵敏的检测. 其检测主要依据  $\text{Au}^+$  对  $\text{Hg}^{2+}$  的高金属亲和性, 即  $\text{Hg}^{2+}$  能够与  $\text{Au}^+$  相互作用猝灭金团簇, 从

而将汞离子的检测限推进到了 0.5 nmol/L. 2010 年, Adhikari 与 Banerjee<sup>[48]</sup>利用二氢硫辛酸合成了 Ag4 与 Ag5 团簇, 并利用  $\text{Hg}^{2+}$  对其荧光的猝灭作用, 灵敏地检测了  $\text{Hg}^{2+}$ , 检测限达到 0.1 nmol/L. Guo 等<sup>[49]</sup>利用牛血清蛋白 BSA 合成具有 637 nm 荧光峰值的红色银团簇, 由于两种离子之间的相互作用  $5\text{d}^{10}(\text{Hg}^{2+})-4\text{d}^{10}(\text{Ag}^+)$  可引起团簇荧光猝灭, 因此该探针可用于汞离子的高灵敏和高选择性检测. 经实验证明, 该团簇探针对于汞离子的检测在 5~10 nmol/L 范围内, 团簇探针显示了良好的线性关系(图 8).

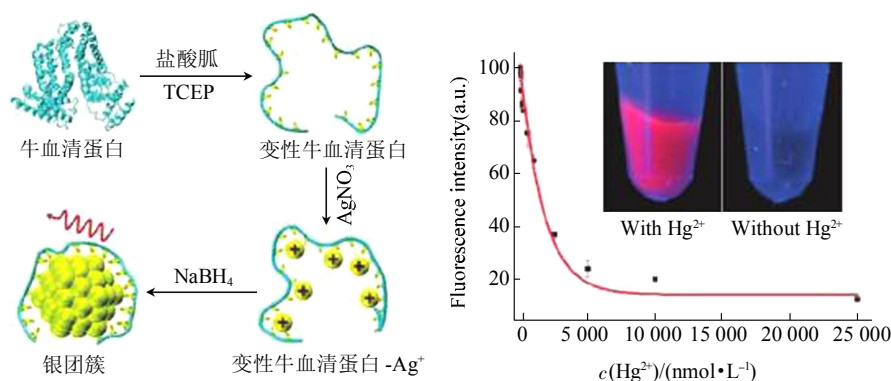


Fig. 8 Schematic of the denatured protein directed synthesis of fluorescent Ag clusters and detection for Hg ions<sup>[49]</sup>

图 8 BSA 保护的 Ag 团簇制备机理及汞离子的检测<sup>[49]</sup>

上述检测是基于离子对于团簇荧光的猝灭作用, 为了提高检测的准确性, 研究者开始尝试正向的实验方法. Deng 等<sup>[50]</sup>利用 T- $\text{Hg}^{2+}$ -T 的相互作用设计核酸序列, 当汞离子存在时, 通过改变两条错配单链核酸的构象, 进而影响团簇的荧光强度, 使得合成的银团簇荧光强度增加, 以此来达到灵敏检测汞离子的目的.

##### 3.1.2 铜离子检测.

虽然微量的  $\text{Cu}^{2+}$  是人体的一种必需营养素, 但是高剂量下却会对肝脏和肾脏造成较大的危害<sup>[51]</sup>. 因此, 对于铜离子的检测已经开展了一些研究. Shang 和 Dong<sup>[52]</sup>利用铜离子对于金团簇荧光的猝灭作用实现了对于  $\text{Cu}^{2+}$  的灵敏检测. George 等<sup>[53]</sup>利用 Au15 团簇制备类似 pH 试纸的薄膜检测了溶液

中的  $\text{Cu}^{2+}$ , 实验表明, 该团簇薄膜在  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{As}^{3+}$  及  $\text{As}^{5+}$  等其他干扰离子存在下稳定性不受影响. 最近 Chen 等<sup>[54]</sup>利用木瓜蛋白酶 papain 制备的金团簇成功地检测了  $\text{Cu}^{2+}$ , 进一步的实验表明, 该方法具有较好的检出限(3 nmol/L)及特异性.

Chang 小组<sup>[55]</sup>利用特异性核酸序列, 通过对团簇荧光增强的方法实现了对于  $\text{Cu}^{2+}$  的检测. 同时, 他们还合成了银 / 铜复合团簇<sup>[56]</sup>, 此探针在巯基丙酸 MPA 的作用下荧光猝灭, 但在铜离子存在的情况下荧光恢复. 借助于此原理实现了对于  $\text{Cu}^{2+}$  的高灵敏检测(检出限达到 2.7 nmol/L)(图 9). 此外, Zhang<sup>[57]</sup>利用 DNA 模板制备的银团簇也实现了对于  $\text{Cu}^{2+}$  的灵敏检测.

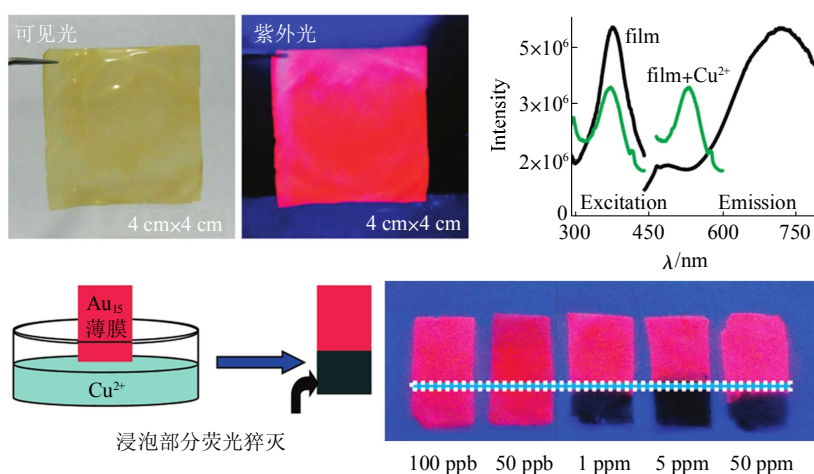


Fig. 9 Detection for Cu<sup>2+</sup> ions by Au<sub>15</sub> composite films<sup>[53]</sup>

图 9 Au<sub>15</sub> 团簇复合薄膜材料检测 Cu<sup>2+</sup><sup>[53]</sup>

### 3.1.3 其他离子检测.

Goswami 等<sup>[58]</sup>使用 BSA 作为模板, 在较高温度下合成了具有蓝色荧光的铜团簇样品. 由于 BSA 存在对于 Pb<sup>2+</sup> 的亲合作用位点, 随着 Pb<sup>2+</sup> 的加入会使 BSA 发生聚集, 从而导致团簇荧光的猝灭, 以此来检测 Pb<sup>2+</sup>. 并且研究了在其他干扰离子如 Hg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 及 K<sup>+</sup> 等存在下的检测效果.

Liu 等<sup>[59]</sup>以聚合电解质 PMAA-Na 为稳定剂, 采用微波辅助的绿色合成方法制备了水溶性的银团簇. 与其他干扰离子相比, 该团簇对于 Cr<sup>3+</sup> 离子具有很好的选择性和特异性, 以此来实现对于微量 Cr<sup>3+</sup> 的检测.

Chang 小组<sup>[60]</sup>利用发卡探针进行了溶液中 S<sup>2-</sup> 的检测. 他们以发卡结构(hairpin)的 DNA 为模板制备 Au/Ag 符合团簇. 当溶液中存在 S<sup>2-</sup> 时, S<sup>2-</sup> 会与 Au/Ag 团簇的原子 / 离子发生相互作用, 使得 DNA 的发卡结构改变, 从而导致团簇荧光猝灭, 以此实现对于 S<sup>2-</sup> 的检测. 实验结果表明, 该 Au/Ag 符合团簇对于 S<sup>2-</sup> 的检测限达到 0.83 nmol/L(图 10).

Qu 等<sup>[61]</sup>利用聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)包裹制备蓝色荧光的银团簇实现对于卤素离子的检测. 其检测原理是卤素离子通过氧化刻蚀及聚集作用引起荧光猝灭.

半胱氨酸、谷胱甘肽等生物小分子在可逆氧化还原、细胞的解毒及代谢中起到了重要的作用, 对于这些小分子在人体体液中的检测有利于心血管等疾病的早期诊断<sup>[62]</sup>. Shang 等<sup>[63]</sup>曾利用聚甲基丙烯

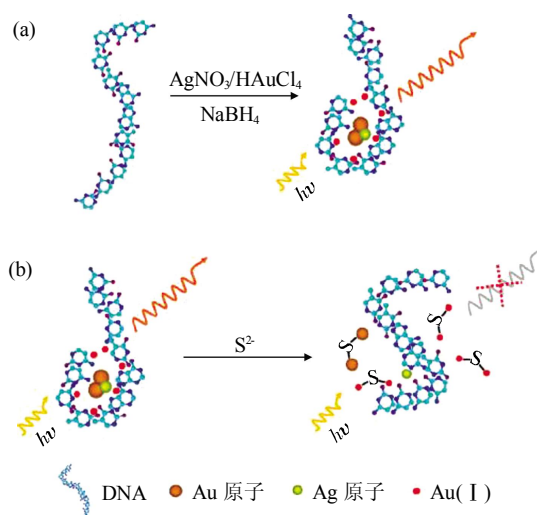


Fig. 10 Schematic representation of the preparation and the operation of the DNA-Au/Ag NCs probe for the detection of S<sup>2-</sup> ions<sup>[60]</sup>

图 10 DNA-Au/Ag 复合团簇的制备及 S<sup>2-</sup> 离子检测 (a)团簇制备. (b)S<sup>2-</sup> 导致团簇荧光猝灭<sup>[60]</sup>.

酸(PMAA)合成的 Ag 团簇实现了 2.5×10<sup>-8</sup>~6.0×10<sup>-6</sup> mol/L 范围内对于半胱氨酸的含量检测, 检测限达到 20 nmol/L.该检测主要依赖半胱氨酸的巯基能够吸附在银团簇表面, 从而加速银团簇的氧化而导致荧光猝灭的原理. 利用类似的原理, Han<sup>[64]</sup>及 Huang<sup>[65]</sup>等也分别对这些硫醇分子进行了相应的检测. 最近, Yuan 等<sup>[66]</sup>利用谷胱甘肽制备的银团簇实现了对于半胱氨酸的高选择性和高灵敏性检测. 该检测借助于 Ag 与 S 的化学关系, 利用空间位阻作用, 当 GSH-AgNCs 体系中存在半胱氨酸时, 会引起团簇空间结构的变化, 导致荧光消失



(图 11).

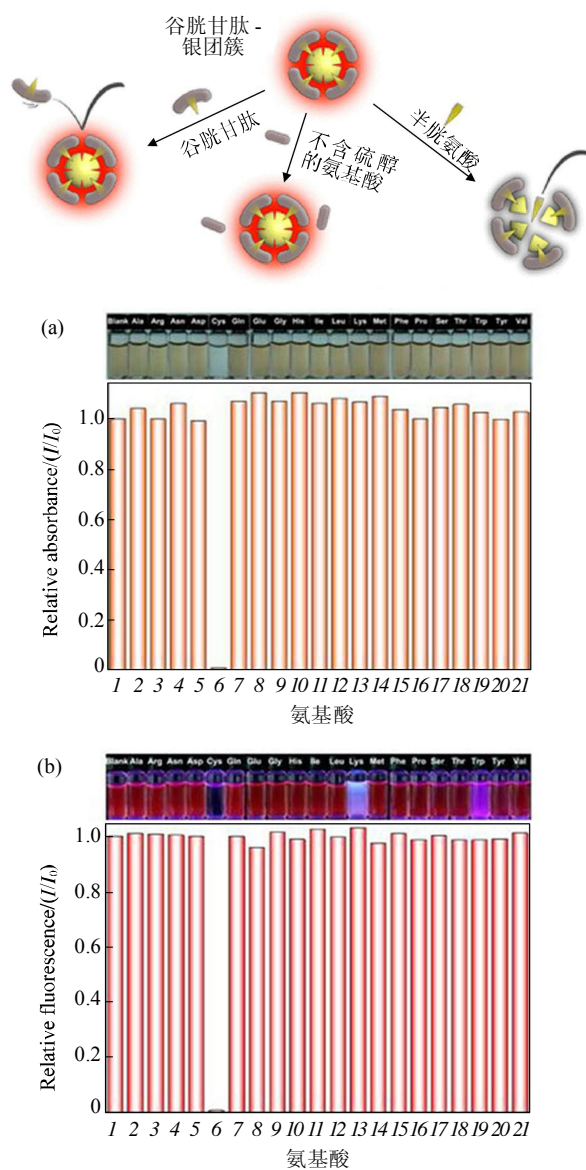


Fig. 11 Detection of cysteine by glutathione-protected silver nanoclusters<sup>[66]</sup>

图 11 谷胱甘肽-银团簇检测半胱氨酸示意图<sup>[66]</sup>

谷胱甘肽-银团簇在不同氨基酸存在下的吸收(a)和荧光(b)相对强度<sup>[66]</sup>. 1: Blank; 2: Ala; 3: Arg; 4: Asn; 5: Asp; 6: Cys; 7: Gln; 8: Glu; 9: Gly; 10: His; 11: Ile; 12: Leu; 13: Lys; 14: Met; 15: Phe; 16: Pro; 17: Ser; 18: Thr; 19: Trp; 20: Tyr; 21: Val.

可卡因是一种神经刺激药物, 过量摄入容易引起心力衰竭. Zhou 等<sup>[67]</sup>设计了两条可特异识别可卡因富含 G 碱基的 aptamer 序列, 初始状态下, 溶液中不含可卡因, 制备银团簇荧光较弱, 而当加入可卡因, 两段 G-DNA 序列因可卡因的结合而形成

易于稳定银团簇的发卡结构, 从而导致团簇荧光增强, 以此来实现对于可卡因的检测, 同样的办法也用于 ATP 的检测(图 12).

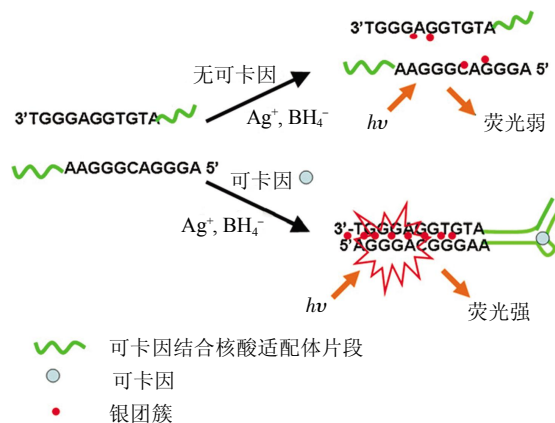


Fig. 12 Schematic representation of the sensing procedure for analysis of cocaine based on the CocaS1/CocaS2-Ag NCs<sup>[67]</sup>

图 12 CocaS1/CocaS2-Ag 团簇检测可卡因示意图<sup>[67]</sup>

除此之外, 金银团簇还被用于检测过氧化氢<sup>[68-69]</sup>及葡萄糖<sup>[70-71]</sup>等小分子. 最近 Hu 等<sup>[72]</sup>利用铜团簇的催化作用也实现了对于这两种小分子的检测.

### 3.2 核酸检测

对于利用单链核酸制备的贵金属团簇, 其荧光性质不仅与周围的溶剂环境有关, 与核酸的序列也有着很直接的关系, 这一特性可被用来检测溶液中的核酸.

最早利用团簇进行核酸检测的是 Wang 的研究组<sup>[73]</sup>. 他们根据互补序列双链杂化的特点, 利用不同序列的 DNA 合成银团簇, 由于突变造成单碱基的错配会影响团簇的形成, 以此来检测碱基的序列. 随后, 其他研究组<sup>[74-77]</sup>也分别利用设计的核酸序列制备团簇相继实现了对于核酸的检测.

Yeh 等<sup>[78]</sup>巧妙地设计了一种可变色的银团簇探针(chameleon nano cluster beacon, cNCB). 首先利用单链核酸制备不发光的团簇, 而当团簇接近不同的核酸序列时, 通过碱基配对杂交可使团簇产生荧光. 最近, 他们又利用这一现象实现了对于核酸链上单个碱基改变的检测<sup>[79]</sup>. 首先分别设计了 DNA-Ag 团簇探针和富含 G 碱基的单链核酸探针, 这两种探针共存时并无荧光产生, 当溶液中存在待测序列时, 使两种探针的核酸碱基分别与待测序列

的碱基发生配对, 进而会使探针产生荧光: 当与 wide-type 序列配对时, 产生桔色荧光, 而当与 mutant-type 序列配对时, 产生红色荧光, 两种荧光

发射波长相差 60~70 nm, 而两种序列仅有一个碱基发生了改变(G→T). 以此来实现对于单个碱基改变的检测(图 13).

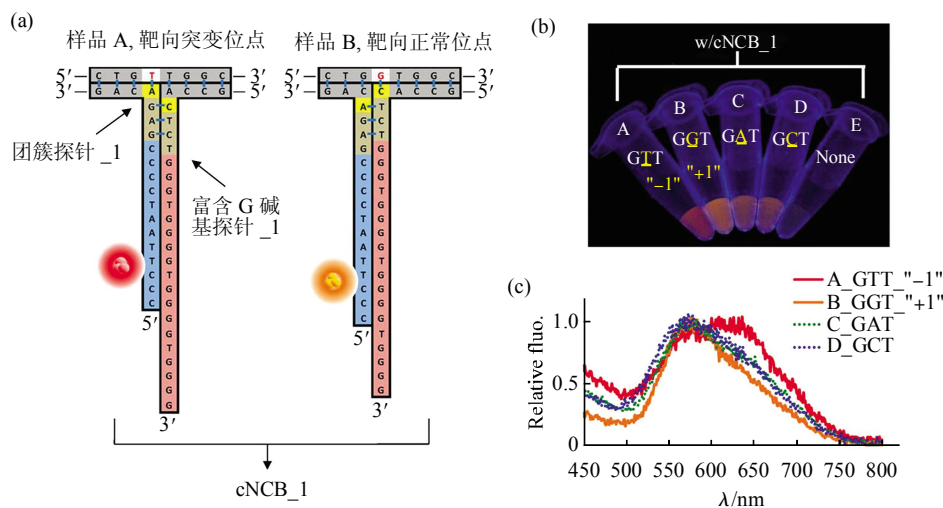


Fig. 13 Schematic (a) and results (b, c) of a chameleon NanoCluster Beacon (cNCB\_1) for single-nucleotide variation detection<sup>[79]</sup>

图 13 可变色银团簇探针用于检测单核苷酸改变<sup>[79]</sup>

端粒酶在细胞生物学过程中扮演了重要角色. 它通过延长细胞染色体末端的端粒来保护染色体在复制过程中不被降解, 从而延长细胞寿命. 另一方面, 当端粒酶活性被异常激活时, 常常会导致变异的细胞获得永生性, 即成为癌细胞. 因此对于端粒酶的研究具有重大的基础与临床意义. 本课题组 Wei 等<sup>[80]</sup>基于端粒酶中包含一段用于复制染色体端粒的核糖核酸片段(HR), 设计了一种新型荧光探针. 该探针一端是与 HR 互补的序列, 另一端能形成银团簇. 银团簇由于纳米效应具有较强荧光, 而且该荧光对周围核酸的变化极为敏感. 所以当荧光探针检测到 HR 时, 探针的互补序列能和 HR 结合形成双螺旋结构, 从而改变银团簇的荧光. 研究表明, 该荧光探针能检测到低至 20 nmol/L 的 HR, 且在 HR 浓度为 25~250 nmol/L 之间时, 荧光的变化和 HR 浓度之间有简单线性关系(图 14). 因此, 从荧光的变化就能反推 HR 的浓度. 由于这种检测端粒酶脱氧核糖核酸片段的方法灵敏、简便, 有望为端粒酶的检测提供一条新途径.

### 3.3 蛋白质检测

除了一些较小的分子, 也可以通过生物偶联的方法在团簇表面结合能够识别蛋白质分子的受体,

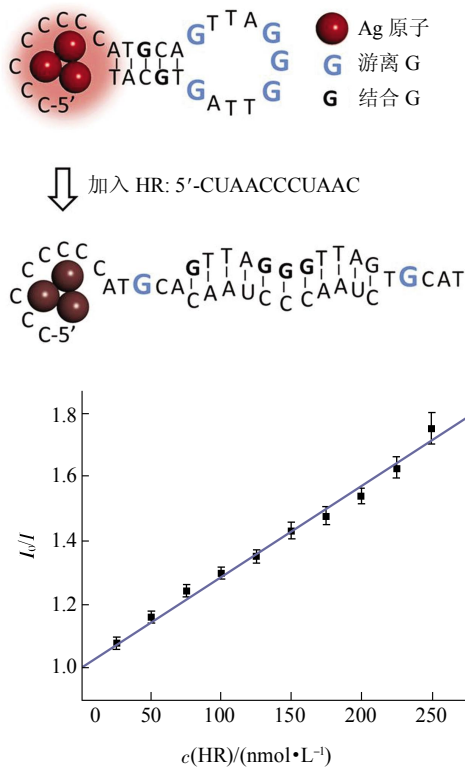


Fig. 14 Detection of telomerase by silver clusters<sup>[80]</sup>

图 14 利用银团簇检测端粒酶<sup>[80]</sup>

实现对蛋白质大分子的检测。

早在 2006 年, Triulzi 等<sup>[81]</sup>就曾利用 PAMAM 制备的金团簇实现了对于人免疫球蛋白 IgG 的免疫分析。他们在制备好的团簇表面通过静电相互作用与多克隆抗体(goat-derived anti-human IgG)结合, 利用抗体的特异识别能力, 在水溶液中检测微摩尔至纳摩尔级别的 IgG。随后, 研究者们对于蛋白质的检测展开了一系列的研究: Chen 等<sup>[82]</sup>利用谷胱甘肽包裹的金团簇实现了细胞裂解液中 S- 转移酶融合蛋白(glutathione S-transferase-fusion proteins)的检测; Lan 等<sup>[83]</sup>利用单链核酸序列制备的铜/银复合团簇高灵敏度地检测了单链 DNA 结合蛋白。Shiang 等<sup>[84]</sup>利用蛋白 A 结合的金团簇检测血浆中的 IgG; 最近, Hu 等<sup>[85]</sup>BSA 制备金团簇成功地检测了 0.01~100 mg/L 范围内的胰蛋白酶 trypsin, 检出限达到 2 μg/L。

#### 4 展 望

贵金属团簇这一新型材料以其优异的性能在荧光标记与灵敏检测方面有着良好的应用前景, 但是贵金属团簇需要优化合成方法以提高其量子产率, 控制反应条件以提高团簇纯度, 以及继续提高团簇荧光稳定性等。相信在这些问题的克服之后, 贵金属团簇能够广泛地应用于生物标记、药物靶向投递及疾病治疗等领域。

#### 参 考 文 献

- [1] Wang F, Tan W B, Zhang Y, *et al.* Luminescent nanomaterials for biological labelling. *Nanotechnology*, 2006, **17**(1): R1-R13
- [2] Baker M. Nanotechnology imaging probes: smaller and more stable. *Nat Methods*, 2010, **7**(12): 957-962
- [3] Chen F, Gerion D. Fluorescent CdSe/ZnS nanocrystal-peptide conjugates for long-term, nontoxic imaging and nuclear targeting in living cells. *Nano Lett*, 2004, **4**(10): 1827-1832
- [4] Neuhauser R G, Shimizu K T, Woo W K, *et al.* Correlation between fluorescence intermittency and spectral diffusion in single semiconductor quantum dots. *Phys Rev Lett*, 2000, **85**(15): 3301-3304
- [5] Nirmal M, Dabbousi B, Bawendi M, *et al.* Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature*, 1996, **383**(6603): 802-804
- [6] Hongtao S, Shixun D, Shiqing X, *et al.* Upconversion emission in Er<sup>3+</sup> doped novel bismuthate glass. *J Rare Earth*, 2005, **23**(3): 331-335
- [7] Jiang T, Qin W, Zhao D. Size-dependent upconversion luminescence in CaF<sub>2</sub>: Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> nanocrystals. *Mater Lett*, 2012, **74**: 54-57
- [8] Muhammed M A H, Pradeep T, Demchenko A P. Advanced fluorescence reporters in chemistry and biology II. London: Springer, 2010: 333-353
- [9] Diez I, Ras R. Advanced fluorescence reporters in chemistry and biology II. London: Springer, 2010: 307-332
- [10] Lin C A J, Lee C H, Hsieh J T, *et al.* Review: Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: recent progress and present challenges. *J Med Biol Eng*, 2009, **29**(6): 276-283
- [11] Xu H, Suslick K S. Water-Soluble fluorescent silver nanoclusters. *Adv Mater*, 2010, **22**(10): 1078-1082
- [12] Brust M, Walker M, Bethell D, *et al.* Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1994, **7**: 801-802
- [13] Cui Y, Wang Y, Liu R, *et al.* Serial silver clusters biomimetic by one peptide. *ACS Nano*, 2011, **5**(11): 8684-8689
- [14] Grohn F, Bauer B J, Akpalu Y A, *et al.* Dendrimer templates for the formation of gold nanoclusters. *Macromolecules*, 2000, **33**(16): 6042-6050
- [15] Zheng J, Petty J T, Dickson R M. High quantum yield blue emission from water-soluble Au<sub>8</sub> Nanodots. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(26): 7780-7781
- [16] Ledo-Suárez A, Rivas J, Rodríguez-Abreu C F, *et al.* Facile synthesis of stable subnanosized silver clusters in microemulsions. *Angew Chem*, 2007, **46**(46): 8823-8827
- [17] Shang L, Dong S. Facile preparation of water-soluble fluorescent silver nanoclusters using a polyelectrolyte template. *Chem Commun*, 2008, **9**: 1088-1090
- [18] Petty J T, Sengupta B, Story S P, *et al.* DNA sensing by amplifying the number of near-infrared emitting, oligonucleotide-encapsulated silver clusters. *Anal Chem*, 2011, **83**(15): 5957-5964
- [19] Yu J, Patel S A, Dickson R M. *In vitro* and intracellular production of peptide-encapsulated fluorescent silver nanoclusters. *Angew Chem*, 2007, **119**(12): 2074-2076
- [20] Balogh L, Tomalia D A. Poly(amidoamine) dendrimer-templated nanocomposites. I. synthesis of zerovalent copper nanoclusters. *J Am Chem Soc*, 1998, **120**(29): 7355-7356
- [21] Zheng J, Dickson R M. Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silver nanodot fluorescence. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(47): 13982-13983
- [22] Kubo R. Electronic properties of metallic fine particles. I. *J Phys Soc Jpn*, 1962, **17**(6): 975-986
- [23] Chen S, Ingram R S, Hostetler M J, *et al.* Gold nanoelectrodes of varied size: transition to molecule-like charging. *Science*, 1998, **280**(5372): 2098-2101
- [24] Lee D, Donkers R L, Wang G, *et al.* Electrochemistry and optical absorbance and luminescence of molecule-like Au<sub>38</sub> nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(19): 6193-6199
- [25] Zheng J, Nicovich P R, Dickson R M. Highly fluorescent noble metal quantum dots. *Annu Rev Phys Chem*, 2007, **58**: 409-431
- [26] Choi S, Robert M, Yu J. Developing luminescent silver nanodots for biological applications. *Chem Soc Rev*, 2012, **41**(5): 1867-1891
- [27] Lin C A J, Yang T Y, Lee C H, *et al.* Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications. *ACS Nano*, 2009, **3**(2): 395-401
- [28] Retnakumari A, Setua S, Menon D, *et al.* Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging. *Nanotechnology*, 2010, **21**(5): 055103-055114
- [29] Wang Y, Cui Y, Zhao Y, *et al.* Bifunctional peptides that precisely

- biomineralize Au clusters and specifically stain cell nuclei. *Chem Comm*, 2012, **48**(6): 871–873
- [30] Patel S A, Richards C I, Hsiang J C, *et al.* Water-soluble Ag nanoclusters exhibit strong two-photon-induced fluorescence. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(35): 11602–11603
- [31] Shang L, Dörlich R M, Brandholt S, *et al.* Facile preparation of water-soluble fluorescent gold nanoclusters for cellular imaging applications. *Nanoscale*, 2011, **3**(5): 2009–2014
- [32] Liu C L, Ho M L, Chen Y C, *et al.* Thiol-functionalized gold nanodots: two-photon absorption property and imaging *in vitro*. *J Phys Chem C*, 2009, **113**(50): 21082–21089
- [33] Polavarapu L, Manna M, Xu Q H. Biocompatible glutathione capped gold clusters as one- and two-photon excitation fluorescence contrast agents for live cells imaging. *Nanoscale*, 2011, **3**(2): 429–434
- [34] Shang L, Dorlich R M, Brandholt S, *et al.* Facile preparation of water-soluble fluorescent gold nanoclusters for cellular imaging applications. *Nanoscale*, 2011, **3**(5): 2009–2014
- [35] Makarava N, Parfenov A, Baskakov I V. Water-soluble hybrid nanoclusters with extra bright and photostable emissions: a new tool for biological imaging. *Biophys J*, 2005, **89**(1): 572–580
- [36] Yu J, Patel S A, Dickson R M. *In vitro* and intracellular production of peptide-encapsulated fluorescent silver nanoclusters. *Angew Chem*, 2007, **119**(12): 2074–2076
- [37] Choi S, Yu J, Patel S A, *et al.* Tailoring silver nanodots for intracellular staining. *Photochem Photobiol Sci*, 2011, **10**(1): 109–115
- [38] Yu J, Choi S, Richards C I, *et al.* Live cell surface labeling with fluorescent Ag nanocluster conjugates. *Photochem Photobiol Sci*, 2008, **84**(6): 1435–1439
- [39] Antoku Y, Hotta J, Mizuno H, *et al.* Transfection of living HeLa cells with fluorescent poly-cytosine encapsulated Ag nanoclusters. *Photochem Photobiol Sci*, 2010, **9**(5): 716–721
- [40] Fang X, Tan W. Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach. *Accounts Chem Res*, 2010, **43**(1): 48–57
- [41] Sun Z, Wang Y, Wei Y, *et al.* Ag cluster-aptamer hybrid: specifically marking the nucleus of live cells. *Chem Comm*, 2011, **47**(43): 11960–11962
- [42] Li J, Zhong X, Cheng F, *et al.* One-pot synthesis of aptamer-functionalized silver nanoclusters for cell-type-specific imaging. *Anal Chem*, 2012, **84**(9): 4140–4146
- [43] Wang X, Tian X, Zhang Q, *et al.* Assembly, two-photon absorption, and bioimaging of living cells of a cuprous cluster. *Chem Mater*, 2012, **24**(5): 954–961
- [44] Tanaka S I, Miyazaki J, Tiwari D K, *et al.* Fluorescent platinum nanoclusters: synthesis, purification, characterization, and application to bioimaging. *Angew Chem*, 2011, **123**(2): 451–455
- [45] Holmes P, James K A F, Levy L S. Is low-level environmental mercury exposure of concerns to human health?. *Sci Total Environ*, 2009, **408**(2): 171–182
- [46] Huang C C, Yang Z, Lee K H, *et al.* Synthesis of highly fluorescent gold nanoparticles for sensing mercury (II). *Angew Chem*, 2007, **119**(36): 6948–6952
- [47] Xie J, Zheng Y, Ying J Y. Highly selective and ultrasensitive detection of Hg<sup>2+</sup> based on fluorescence quenching of Au nanoclusters by Hg<sup>2+</sup>-Au<sup>+</sup> interactions. *Chem Commun*, 2009, **46**(6): 961–963
- [48] Adhikari B, Banerjee A. Facile synthesis of water-soluble fluorescent silver nanoclusters and Hg II sensing. *Chem Mater*, 2010, **22**(15): 4364–4371
- [49] Guo C, Irudayaraj J. Fluorescent Ag clusters *via* a protein-directed approach as a Hg (II) ion sensor. *Anal Chem*, 2011, **83**(8): 2883–2889
- [50] Deng L, Zhou Z, Li J, *et al.* Fluorescent silver nanoclusters in hybridized DNA duplexes for the turn-on detection of Hg<sup>2+</sup> ions. *Chem Commun*, 2011, **47**(39): 11065–11067
- [51] Georgopoulos P G, Roy A, Yonone-Lioy M J, *et al.* Environmental copper: its dynamics and human exposure issues. *J Toxicol Environ Health, Part B*, 2001, **4**(4): 341–394
- [52] Shang L, Dong S. Silver nanocluster-based fluorescent sensors for sensitive detection of Cu (II). *J Mater Chem*, 2008, **18**(39): 4636–4640
- [53] George A, Shibu E S, Maliyekkal S M, *et al.* Luminescent, freestanding composite films of Au<sub>15</sub> for specific metal ion sensing. *ACS Appl Mater Inter*, 2012, **4**(2): 639–644
- [54] Chen Y, Wang Y, Wang C, *et al.* Papain-directed synthesis of luminescent gold nanoclusters and the sensitive detection of Cu<sup>2+</sup>. *J Colloid Interf Sci*, 2013, **396**: 63–68
- [55] Lan G Y, Huang C C, Chang H T. Silver nanoclusters as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions. *Chem Commun*, 2010, **46**(8): 1257–1259
- [56] Su Y T, Lan G Y, Chen W Y, *et al.* Detection of copper ions through recovery of the fluorescence of DNA-templated copper/silver nanoclusters in the presence of mercaptopropionic acid. *Anal Chem*, 2010, **82**(20): 8566–8572
- [57] Zhang M, Ye B C. Label-free fluorescent detection of copper (II) using DNA-templated highly luminescent silver nanoclusters. *Analyst*, 2011, **136**(24): 5139–5142
- [58] Goswami N, Giri A, Bootharaju M, *et al.* Copper quantum clusters in protein matrix: potential sensor of Pb<sup>2+</sup> ion. *Anal Chem*, 2011, **83**(24): 9676–9680
- [59] Liu S, Lu F, Zhu J J. Highly fluorescent Ag nanoclusters: microwave-assisted green synthesis and Cr<sup>3+</sup> sensing. *Chem Commun*, 2011, **47**(9): 2661–2663
- [60] Chen W Y, Lan G Y, Chang H T. Use of fluorescent DNA-templated gold/silver nanoclusters for the detection of sulfide ions. *Anal Chem*, 2011, **83**(24): 9450–9455
- [61] Qu F, Li N B, Luo H Q. Polyethyleneimine-templated Ag nanoclusters: a new fluorescent and colorimetric platform for sensitive and selective sensing halide ions and high disturbance-tolerant recognitions of iodide and bromide in coexistence with chloride under condition of high ionic strength. *Anal Chem*, 2012, **84**(23): 10373–10379
- [62] Chen X, Zhou Y, Peng X, *et al.* Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols. *Chem Soc Rev*, 2010, **39**(6): 2120–2135
- [63] Shang L, Dong S. Sensitive detection of cysteine based on fluorescent silver clusters. *Biosensors Bioelectron*, 2009, **24**(6): 1569–1573
- [64] Han B, Wang E. Oligonucleotide-stabilized fluorescent silver nanoclusters for sensitive detection of biothiols in biological fluids. *Biosensors Bioelectron*, 2011, **26**(5): 2585–2589
- [65] Huang Z, Pu F, Lin Y, *et al.* Modulating DNA-templated silver nanoclusters for fluorescence turn-on detection of thiol compounds.

- Chem Commun, 2011, **47**(12): 3487–3489
- [66] Yuan X, Tay Y, Dou X, *et al.* Glutathione-protected silver nanoclusters as cysteine-selective fluorometric and colorimetric probe. *Anal Chem*, 2013, **85**(3): 1913–1919
- [67] Zhou Z, Du Y, Dong S. DNA-Ag nanoclusters as fluorescence probe for turn-On aptamer sensor of small molecules. *Biosensors Bioelectron*, 2011, **28**(1): 33–37
- [68] Shiang Y C, Huang C C, Chang H T. Gold nanodot-based luminescent sensor for the detection of hydrogen peroxide and glucose. *Chem Commun*, 2009, **23**: 3437–3439
- [69] Wen F, Dong Y, Feng L, *et al.* Horseradish peroxidase functionalized fluorescent gold nanoclusters for hydrogen peroxide sensing. *Anal Chem*, 2011, **83**(4): 1193–1196
- [70] Jin L, Shang L, Guo S, *et al.* Biomolecule-stabilized Au nanoclusters as a fluorescence probe for sensitive detection of glucose. *Biosensors Bioelectron*, 2011, **26**(5): 1965–1969
- [71] Zhou Z, Du Y, Dong S. Double strand DNA-templated formation of copper nanoparticles as fluorescent probe for label-free aptamer sensor. *Anal Chem*, 2011, **83**(13): 5122–5127
- [72] Hu L Z, Yuan Y, Zhang L, *et al.* Copper nanoclusters as peroxidase mimetics and their applications to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose detection. *Anal Chim Acta*, 2013, **762**: 83–86
- [73] Guo W, Yuan J, Dong Q, *et al.* Highly sequence-dependent formation of fluorescent silver nanoclusters in hybridized DNA duplexes for single nucleotide mutation identification. *J Am Chem Soc*, 2009, **132**(3): 932–934
- [74] Yeh H C, Sharma J, Han J J, *et al.* A DNA-silver nanocluster probe that fluoresces upon hybridization. *Nano letters*, 2010, **10**(8): 3106–3110
- [75] Lan G Y, Chen W Y, Chang H T. One-pot synthesis of fluorescent oligonucleotide Ag nanoclusters for specific and sensitive detection of DNA. *Biosensors Bioelectron*, 2011, **26**(5): 2431–2435
- [76] Jeffrey T P, Sengupta B, Sandra P S, *et al.* DNA sensing by amplifying the number of near-infrared emitting, liganucleotide-encapsulated silver clusters. *Anal Chem*, 2011, **83**(15): 5957–5964
- [77] Shah P, Rørvig-Lund A, Chaabane S B, *et al.* Design aspects of bright red emissive silver nanoclusters/DNA probes for microRNA detection. *ACS Nano*, 2012, **6**(10): 8803–8814
- [78] Yeh H C, Sharma J, Han J J, *et al.* In Nanocluster beacon—A new molecular probe for homogeneous detection of nucleic acid targets, nano/micro engineered and molecular systems//2011 IEEE International Conference. *Kaohsiung: IEEE*, 2011: 267–270
- [79] Yeh H C, Sharma J, Shih I M, *et al.* A fluorescence light-up Ag nanocluster probe that discriminates single-nucleotide variants by emission color. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(28): 11550–11558
- [80] Wei Y, Liu R, Sun Z, *et al.* Luminescent silver nanoclusters anchored by oligonucleotides detect human telomerase ribonucleic acid template. *Analyst*, 2013, **138**(5): 1338–1341
- [81] Triulzi R C, Micic M, Giordani S, *et al.* Immunoassay based on the antibody-conjugated PAMAM-dendrimer-gold quantum dot complex. *Chem Commun*, 2006, 5068–5070
- [82] Chen C T, Chen W J, Liu C Z, *et al.* Glutathione-bound gold nanoclusters for selective-binding and detection of glutathione S-transferase-fusion proteins from cell lysates. *Chem Commun*, 2009, **48**: 7515–7517
- [83] Lan G Y, Chen W Y, Chang H T. Characterization and application to the detection of single-stranded DNA binding protein of fluorescent DNA-templated copper/silver nanoclusters. *Analyst*, 2011, **136**(18): 3623–3628
- [84] Shiang Y C, Lin C A, Huang C C, *et al.* Protein A-conjugated luminescent gold nanodots as a label-free assay for immunoglobulin G in plasma. *Analyst*, 2011, **136**(6): 1177–1182
- [85] Hu L, Han S, Parveen S, *et al.* Highly sensitive fluorescent detection of trypsin based on BSA-stabilized gold nanoclusters. *Biosensors Bioelectron*, 2012, **32**(1): 297–299

## Recent Development of Noble Metal Clusters for Bioimaging and *In vitro* Detection\*

LIU Ru, WANG Ya-Ling, CUI Yan-Yan, SUN Zhi-Peng, WEI Yue-Teng, GAO Xue-Yun\*\*

(*Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract** The noble metal clusters is a new class of fluorescent material. With a set of attractive features, such as ultrasmall size, fluorescence tenability and good biocompatibility, the clusters are ideal candidate for the fluorescent labels and detection. In this review, we summarize the synthesis and fluorescence characteristic of the clusters, and the recent development of their application in bioimaging and *in vitro* detection.

**Key words** noble metal clusters, fluorescent probe, bioimaging, *in vitro* detection

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00283

\* This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2013CB932703, 2013CB932704) and The National Natural Science Foundation of China (31271072, 31070891, 31200751, 81201133).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-88236709, Fax: 86-10-88236456, E-mail: gaoxy@ihep.ac.cn

Received: June 20, 2013 Accepted: July 4, 2013