

基于蛋白和多肽为模板的贵金属纳米簇合成研究

杨维涛^a 郭伟圣^a 张兵波^{*,b} 常津^{*,a}^(a) 天津大学材料学院 纳米生物技术研究室 天津市材料复合与功能化重点实验室 天津 300072)^(b) 同济大学附属东方医院转化研究中心 同济大学医学院生物医学工程与纳米科学研究院 上海 200092)

摘要 贵金属(Au, Ag, Pt等)纳米簇通常指的是由几个到约一百个原子组成的分子聚集体, 具有生物相容性好、超小尺寸(<2 nm)以及优异的物理化学性质, 尤其是能发出较强荧光等特点引起了人们的广泛关注。目前多种贵金属纳米簇的合成方法已相继被报道, 且已应用于生物荧光成像、电化学发光、生物传感器以及细胞标记等多个领域。本文共分为五部分, 首先重点介绍近几年兴起的以蛋白和多肽为模板来合成纳米簇的方法及优点, 并随后总结列举了文献中所采用的蛋白以及自主设计的多肽组分序列的类别, 随后探索了蛋白和多肽中的特定氨基酸与合成的贵金属纳米簇的荧光波长、量子产率、粒径之间的联系。本文最后总结阐述了蛋白和多肽为模板成功合成贵金属纳米簇的先决条件并对其生物医学应用前景进行了展望。

关键词 贵金属; 纳米簇; 蛋白; 多肽; 荧光

Synthesis of Noble Metal Nanoclusters Based on Protein and Peptide as a Template

Yang, Weitao^a Guo, Weisheng^a Zhang, Bingbo^{*,b} Chang, Jin^{*,a}^(a) Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin Key Laboratory of Composites and Functional Materials, Tianjin 300072)^(b) Research Center for Translational Medicine, East Hospital, The Institute for Biomedical Engineering & Nano Science, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092)

Abstract Noble metal nanoclusters (NMNCs) are the molecular aggregates, which are composed of several to one hundred atoms, and possess good biocompatibility, ultra small size (smaller than 2 nm), excellent physical and chemical properties, especially the strong photoluminescence, have aroused people's wide concern. Currently various kinds of methods to synthesize the NMNCs have been reported, and the NMNCs have been applied in many fields, such as bioimaging, electrochemiluminescence (ECL), biosensor and cell labeling. After BSA was the first protein to synthesize the Au nanoclusters, subsequently other kinds of similar protein and self-designed peptide appear. This review focuses on the advantages of this emerging method in recent years that choosing the protein and peptide as the template, simultaneously lists the protein and the peptide sequence reported in recent years, and explores the connection between the specific amino acids composition of protein or peptide and the wavelength, quantum yield (QY), size of NMNCs. In the end, we explain the prerequisites possessed of protein and peptide in synthesizing the NMNCs as well as predict the further development and the future of this synthesis method based on the protein and peptide as the template in the biomedical application.

Keywords noble metal; nanocluster; protein; peptide; fluorescence

1 引言

贵金属纳米簇近年来在纳米科技许多领域中逐渐成为了一种广泛应用的纳米材料^[1]。它是由 Au, Ag, Pt 等贵金属元素组成的分子聚集体, 一般由几个到几十个原子组成, 核簇直径通常小于 2 nm, 尺寸及性质均介于单个原子和纳米粒子之间^[2]。

贵金属纳米簇长期以来一直成为人们的研究热点主要是基于以下几个原因:

(1) 贵金属纳米簇的元素组成中尤其是金、银元素本

身具有低毒性且高化学惰性, 避免了对生物组织造成损害的同时保持了纳米簇的结构完整性。

(2) 贵金属纳米簇一般由贵金属原子组成的核与配体组成的外壳组成, 其内核本身就具有超小的尺寸(<2 nm), 若选用的配体合适不仅会使其整体尺寸小于肾阈值, 而且会使纳米簇表面带两性离子电荷使得纳米簇更容易被排出体外^[3]。

(3) 纳米簇的尺寸接近于传导电子的费米波长, 因此其光学性质、化学性质、电学性质与单个原子和大的纳米颗粒相比都表现出了明显的不同^[4], 由于量子限域

* E-mail: jinchang@tju.edu.cn; bingbozhang@tongji.edu.cn; Tel.: 022-27401821; 021-65983706-805

Received August 5, 2014; published October 10, 2014.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 81371618) and Key Innovation Project of Shanghai Municipal Education Commission (14ZZ039).

项目受国家自然科学基金(No. 81371618)和上海市教委科技创新重点项目(14ZZ039)资助。

效应的存在,使纳米簇能发出较强的荧光,且通过改变原子的数目可以实现对波长从紫外到近红外的调节。

(4)与传统的有机荧光染料和量子点相比,贵金属纳米簇毒性更小、尺寸更小,因而易于排出体外,且不易自聚,同时其光稳定性更好。

目前贵金属纳米簇的合成方法按照大类分主要有以下两种^[5]。

第一种是采用单分子层保护的方法,可以选用的作为贵金属纳米簇表面的单分子层的有磷化氢^[6]、十二烷基磺酸钠(SDS)^[7]、小分子硫醇化合物^[8-10]比如二氢硫辛酸(DHLA)^[11,12]、巯基丁二酸(H₂MSA)^[13]、谷胱甘肽(GSH)^[14-20]等。

第二种是模板法,可以作为模板的有树枝状大分子比如聚酰胺-胺型树枝状高分子(Polyamidoamine, PAMAM)^[21,22]、高分子聚合物如超支化聚乙烯亚胺(hPEI)^[23]、寡核苷酸 DNA^[24,25]以及蛋白和自主设计的多肽等。

图1总结了近年来关于贵金属纳米簇表面配体的演变趋势,在众多的贵金属纳米簇的合成方法中,本文重点详细介绍以蛋白和多肽为模板的合成方法,同时简要评述和展望了这两种方法的应用前景和发展方向。

2 蛋白和多肽作为模板的特点

近年来蛋白和多肽已经被作为一种有效的模板来合成各无机纳米材料,广泛应用于各个方面^[27-29]。例如已有报道以牛血清白蛋白(BSA)为模板可以合成出CdSe量子点用于细菌标记^[30],基于Gd的混杂纳米粒子用于磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)血池造影(图2)^[31],Ag₂S近红外量子点偶联血管内皮生长因子抗体用于体内肿瘤靶向成像^[32],波长可调节的HgS近红外量子点用于金属离子的传感^[33]等。对于合成贵金属纳米簇,蛋白和多肽上均含有能螯合贵金属的官能团,比如巯基、氨基、羧基等,这些基团对Au或Ag原子具有较强的亲和力,能较好地结合贵金属原子使其更稳定^[34]。

总结该类模板法合成贵金属纳米簇的优点主要集中在以下几方面:

(1)反应条件较为缓和,远优于其它传统材料基质来合成。该类反应多是在室温或者37℃左右水相中进行。整个反应过程都是依靠自身结构以及特定的化学基团原位合成,减少了能源的消耗,同时避免了有机溶剂和硼氢化钠等外加强还原剂的使用,尽管还原反应速率有所下降,反应周期会加长,但是环境相容性更好,本质上可以说是一种绿色合成过程^[29]。

(2)以蛋白和多肽来合成贵金属纳米簇实质是一种生物矿化的过程,即通过调控生物分子的结构和组成来合成无机纳米材料。如可以通过控制贵金属离子的浓度、反应的pH值、蛋白的结构或多肽的序列组成、适当的改变反应环境等得到尺寸、荧光性质以及表面化学性质均不同的贵金属纳米簇^[26,29],与其它调控剂相比,该方法合成的贵金属纳米簇荧光强度更加优异,生物相容性更好。

(3)利用蛋白和多肽可合成具有高度特定功能和多功能的贵金属纳米簇,蛋白和多肽表面所具有丰富基团和结合位点便于荧光金纳米簇的后期多功能化^[35,36]。

3 蛋白为模板合成贵金属纳米簇

3.1 BSA为模板合成金、银纳米簇

牛血清白蛋白(BSA)是一种常见的商品化结构蛋白。BSA结构中含有581个氨基酸残基,其中35个半胱氨酸(C)组成了17对二硫键和一自由巯基^[37],利用BSA中的巯基与贵金属原子表面的强亲和性与BSA中的酪氨酸(Y)在碱性条件下强还原性可以成功合成出贵金属纳米簇。

Xie等^[38]2009年首次报道了采用一种绿色一锅法制备金纳米簇的方法(如图3),即选用BSA同时作为稳定剂和还原剂在pH=12,生理温度(37℃)的条件下合成AuNCs($\lambda_{\text{em max}}=640\text{ nm}$,量子产率(QY)≈7%,尺寸分布比较均一,约0.8 nm^[38],如图4)。考虑到BSA本身成本较低、合成纳米簇效率较高,且不会参与其它生物反

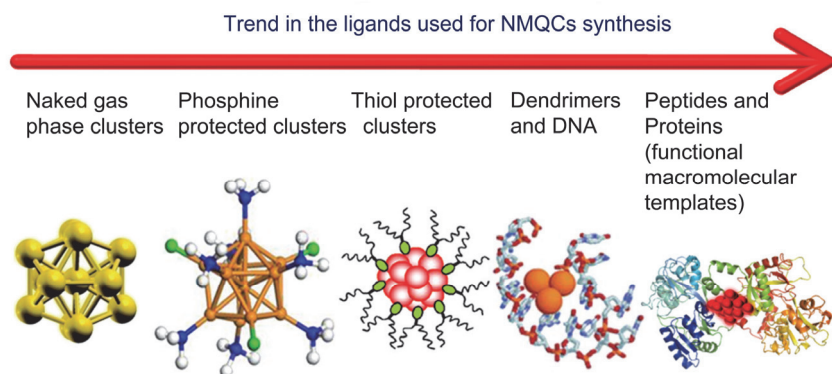


图1 贵金属纳米簇合成过程中表面配体的演变趋势^[26]
Figure 1 The trend of ligands in the synthesis of NMNCs^[26]

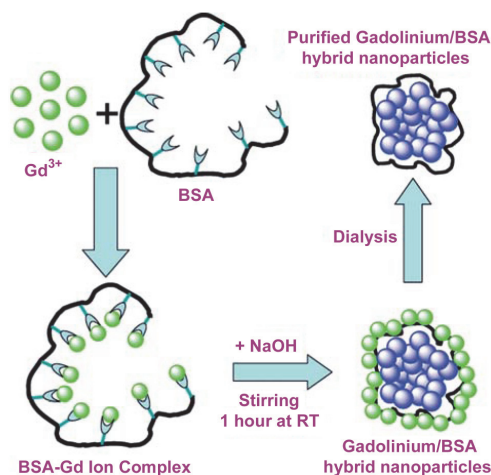


图2 以BSA为模板合成基于钆的复合纳米粒子^[31]

Figure 2 Formation of the gadolinium-based hybrid (GH) nanoparticles in BSA template^[31]

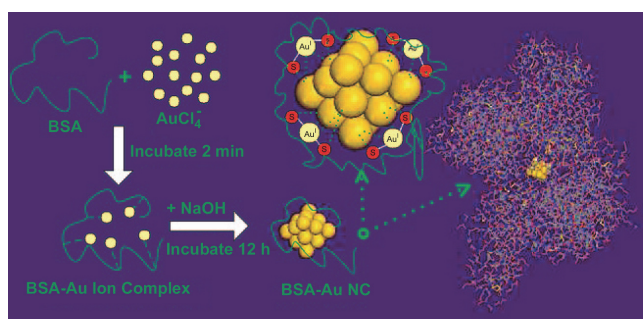


图3 首次以BSA为模板合成金纳米簇^[38]

Figure 3 Synthesis of the gold nanocluster choosing BSA as the template for the first time^[38]

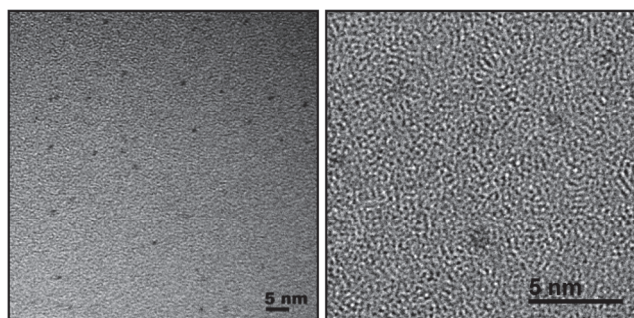


图4 以BSA为模板合成金纳米簇的TEM照片^[38]

Figure 4 TEM images of BSA-Au NCs^[38]

应、稳定性好, Mathew 等^[39]选用 BSA 为封端剂, NaBH_4 为还原剂成功地合成了由 15 个银原子组成的银纳米簇 ($\text{Ag}_{15}@\text{BSA}$, $\lambda_{\text{em max}}=685 \text{ nm}$), 在 pH 值 1~12 中都较稳定. Guo 等^[40]采用变性的 BSA(dBSA)作为稳定剂和多价的配体成功合成了水溶性且稳定性好的银纳米簇 (Ag Clusters , $\lambda_{\text{em max}}=637 \text{ nm}$, $\text{QY} \approx 1.2\%$), 并利用噬金属作用实现对环境中的 Hg^{2+} 的高灵敏性检测. Yan 等^[41]报道了借助微波法分别合成了用 BSA 稳定的和 HSA 保护的

金纳米簇 (BSA-AuNCs : $\lambda_{\text{em max}}=645 \text{ nm}$; HSA-AuNCs :

$\lambda_{\text{em max}}=685 \text{ nm}$), 该方法简便快捷, 而且是首次报道在极短时间内成功合成近红外贵金属纳米簇.

在 BSA 为模板合成贵金属纳米簇被报道后, 后续的科研工作者在此基础上又对这种蛋白-纳米簇键合体系进行了功能性完善.

Hu 等^[43]将合成的 BSA-AuNCs 首次应用于检测胰蛋白酶含量上, 主要是基于: (1)BSA-AuNCs 最大发射波长为 650 nm ; (2)胰蛋白酶是胰腺炎的标志物; (3)通过酶的水解作用可实现 BSA-AuNCs 解体, 从而造成纳米簇荧光淬灭, 信噪比为 3 的情况下胰蛋白酶检测限达 2 ng/mL (86 pmol/L). 此外以 BSA 为模板合成的贵金属纳米簇还可应用于敏感和筛选 Hg^{2+} ^[44]、过氧化氢^[45]、 Cu^{2+} ^[46]、戊二醛^[47]、水中的氰化物^[48]等, 以及用于体内生物成像^[49].

多模态成像技术最近几年也是人们研究的热点^[50]. 由于纳米金团簇本身具有荧光性能, 因此可以考虑将其与其它成像技术相结合进而设计双(多)模态探针来进行病灶的诊断. Sun 等^[42](如图 5)在这一生物矿化合成反应中采用 BSA 为模板, 合成了 $\text{Gd}_2\text{O}_3/\text{AuNCs}@\text{BSA}$ 的 MRI/荧光双模态探针, 表面修饰 RGD (精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸组成的短肽序列, 能特异性结合 11 种整合素) 后, 实现体内肿瘤靶向成像. 荧光性质方面, 该纳米簇探针可以在近红外 700 nm 处发出较强荧光, QY 为 6.5% , 胶体稳定性好; MRI 成像方面, 金纳米团簇中包含有 Gd^{3+} , 弛豫效率 $r_1=13.1 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, 是商品化 Gd-DTPA ($r_1=4.3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) 的三倍.

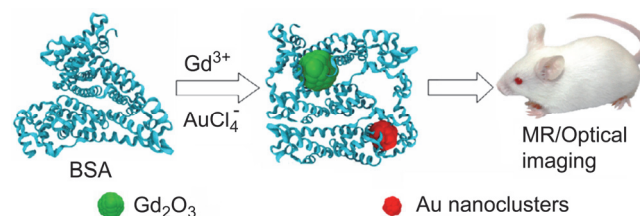


图5 以BSA为模板设计BSA-Gd₂O₃/Au双模态探针^[42]

Figure 5 Design the BSA-Gd₂O₃/Au dual-modal probe choosing BSA as the template^[42]

Zhang 等^[51]在 BSA 中原位合成了纳米金团簇之后还发现该团簇除了具有荧光性能之外还具有较高的 X 射线吸收系数, 因此可用于荧光/X 射线双模态成像. Sun 等^[52]同样以 BSA 为模板合成纳米金团簇之后通过外部共价键连接 Gd-DTPA , 因此功能化之后的纳米簇既能够荧光成像($\lambda_{\text{em max}}=640 \text{ nm}$), 又可以 MRI 成像 ($r_1=23.7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$). Hu 等^[53]在此基础上进行了深入研究, 设计出了基于 $\text{AuNCs-Gd}@\text{BSA}$ 的 NIRF/CT/MRI 多模态探针, 三种技术的互补结合使得肿瘤部位的成像更加准确全面. Durgadas 等^[54]合成出 BSA 包覆的荧光金纳米簇表面连接了顺磁性纳米粒子可以用于可视化的从血液中筛选去除癌细胞系(C6 神经胶质瘤细胞).

3.2 以其他蛋白为模板合成金、银纳米簇

在 BSA 被率先应用于合成贵金属纳米簇之后, 相应的一些具有类似结构的蛋白陆续被应用到这方面中.

转铁蛋白是一种很有生物医学应用前景的多功能蛋白. 转铁蛋白受体是一种与细胞膜相关的糖蛋白, 主要用于调节细胞的生长与细胞对铁离子的摄取. 由于肿瘤细胞表面转铁蛋白受体的过表达(最高为正常细胞的 100 倍), 因此转铁蛋白具有高度的特异靶向性^[55,56]. Guével 等^[57]以人转铁蛋白合成了包含有 22~33 个金原子组成的荧光金纳米簇($\lambda_{\text{em max}}=695 \text{ nm}$, $\text{QY}\approx 7\%$), 且发现在运载铁离子之后并没有造成荧光淬灭, 这是一种新型的无毒的荧光转铁蛋白, 应用于肿瘤的靶向成像. 紧接着 Wang 等^[58]设计了转铁蛋白-金纳米簇/氧化石墨烯的纳米复合体, 先用氧化石墨烯将金纳米簇荧光淬灭, 凭借供体-受体强亲和性, 肿瘤细胞中高表达的去转铁蛋白受体会优先结合去转铁蛋白功能化的荧光金纳米簇后使其荧光得以恢复, 从而首次利用金纳米簇在肿瘤细胞和小动物体内实现“Turn-On”式生物成像.

此外根据一些特定蛋白比如去铁铁蛋白、热休克蛋白等的中空对称结构来构建蛋白纳米笼(Protein Nanocages)从而实现在纳米级平台来合成纳米材料也引起了研究者的兴趣^[59,60]. 转铁蛋白结构由蛋白部分(又称去铁铁蛋白)和铁核两部分组成^[61,62], 包含 24 个蛋白亚基. Nie 等^[63]选用马脾脏的铁蛋白(22 个轻链亚基和 2 个重链亚基, 如图 6), 其中重链亚基(H-ferritin)上的铁氧化酶中心包含组氨酸(H), 利用咪唑基团与 Au^{3+} 的较强亲和性合成了可控的自组装金纳米簇用于肾脏的靶向荧光成像.

Xavier 等^[64]选用了转铁蛋白家族成员之一即乳铁蛋白并首次利用了其还原性和作为稳定剂来合成贵

金属纳米簇, 并介绍了利用乳铁蛋白中含有 34 个半胱氨酸(C)中的巯基结合金原子, 22 个酪氨酸(Y)作为还原剂在特定的氯金酸和乳铁蛋白的比例且 NaOH 存在的条件下才会形成稳定的金纳米簇. Chaudhair 等^[65]主要以乳铁蛋白和 BSA 为例介绍了在蛋白模板中合成荧光金纳米簇所经历的整个过程, 并着重点出了碱性 pH 对该反应的重要性.

此外, 一些具有特定结构组成的酶蛋白也可用于直接作为模板来合成贵金属纳米簇. 长期以来溶菌酶被用于合成贵金属纳米粒子^[66,67], 主要基于溶菌酶中含有 129 个氨基酸残基, 且包含自由羧基、氨基、酪氨酸和 4 个二硫键^[68], 二硫键被打开之后可以利用巯基结合贵金属原子, 同时酪氨酸(Y)具有一定的还原性^[69]. 以此为基础 Wei 等^[68]和 Zhou 等^[70]在碱性条件下分别以溶菌酶同时作为封端剂和还原剂、溶菌酶只作为封端剂, NaBH_4 为还原剂成功合成出荧光金纳米簇($\lambda_{\text{em max}}=657 \text{ nm}$, 尺寸 1 nm)和发出近红外荧光且表面带正电的银纳米簇($\lambda_{\text{em max}}=640 \text{ nm}$, $\text{QY}=1.3\%$)用于筛选和检测 Hg^{2+} , 前者检测限达 10 nmol/L, 后者检测限仅为 0.6 $\mu\text{mol/L}$.

胃蛋白酶是一种天冬氨酸消化蛋白酶, 其最大的特点就是富含酸性氨基酸残基以及酪氨酸(Y), 具体如下: 18 个酪氨酸(Y)、6 个色氨酸(W)、35 个自由羧基和 71 个二羧酸^[71,72]. 在较高碱性 pH 条件下色氨酸(W)与酪氨酸(Y)具有类似的还原性, 可以将贵金属由离子态还原成原子态^[73]. 基于以上, Kawasaki 等^[71](图 7)选用猪的胃蛋白酶为模板, 探究了反应过程中 pH 条件的改变对合成金纳米簇的影响, 最终合成了三种不同荧光的纳米簇: 蓝色荧光(Au_5/Au_8 ; $\lambda_{\text{em max}}=402 \text{ nm}$, $\text{QY}\approx 3.7\%$)、绿色荧光(Au_{13} ; $\lambda_{\text{em max}}=510 \text{ nm}$, $\text{QY}\approx 5.0\%$)、红色荧光(Au_{25} ; $\lambda_{\text{em max}}=670 \text{ nm}$, $\text{QY}\approx 3.5\%$), 并分析了三种不同

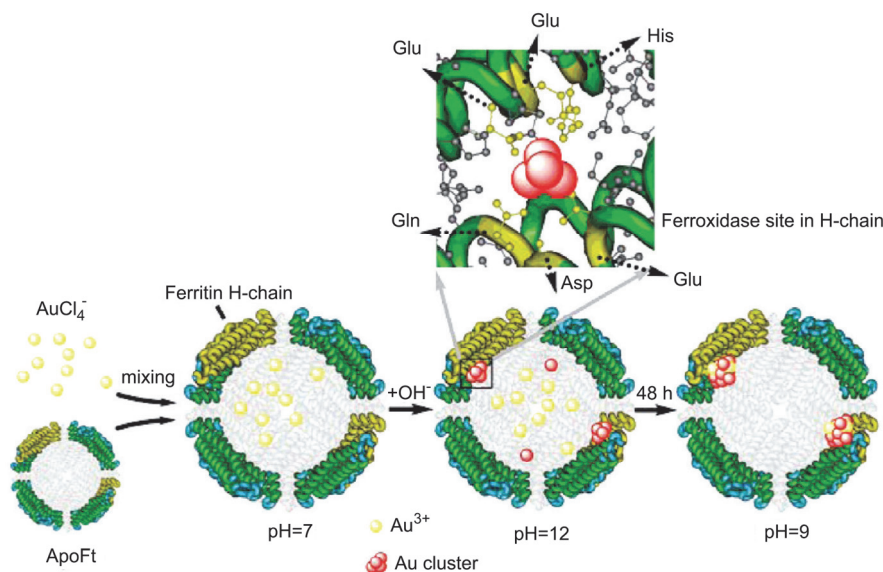


图 6 以去铁铁蛋白为纳米反应器合成金纳米簇示意图^[63]

Figure 6 Synthesis of the gold nanoclusters choosing apoferritin as the nanoreactor^[63]

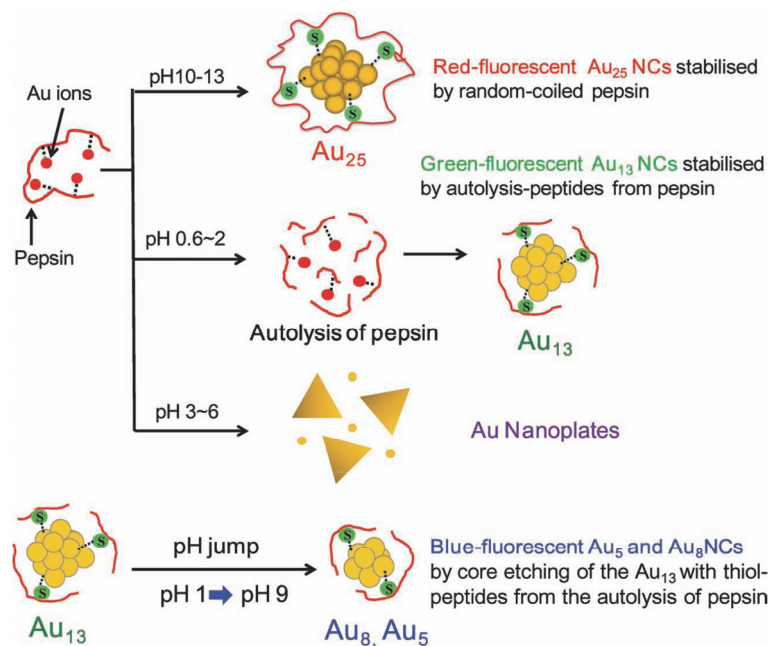


图7 不同 pH 条件下, 以胃蛋白酶为模板合成金纳米簇过程示意图^[71]

Figure 7 Schematic illustration of synthesizing the gold nanoclusters choosing pepsin as the template under the different pH condition^[71]

条件下产生纳米金团簇过程的机理, 对比之后得出了结论是: 胃蛋白酶中酸性氨基酸残基在酸性 pH 下还原金离子速率远低于碱性条件下酪氨酸(Y)和色氨酸(W)的还原能力。

胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素, 同时促进糖原、脂肪和蛋白质的合成。胰岛素由 A、B 两条链组成, 共包括 16 种 51 个氨基酸。其中四个半胱氨酸(C)中的巯基形成二硫键将 A、B 两条链相接, 此外 A 链中也存在一个二硫键。Liu 等^[74]首次报道了用胰岛素(分子量 5808 Da)作为模板合成了荧光金纳米簇($\lambda_{\text{em max}} = 670 \text{ nm}$, 尺寸 0.92 nm), 由于没有自由的巯基存在, 所以推测金纳米簇与胰岛素之间是通过金原子与其它氨基酸[如酪氨酸(Y)、赖氨酸(L)、天冬氨酸(D)等]的特定基团相互作用而链接, 并通过实验证明了合成之后仍保持了胰岛素的生物活性和生物相容性没有被破坏。

胰蛋白酶由 229 个氨基酸残基组成, 结构中含有 5 个二硫键^[75]。Liu 等^[76]分别合成了胰蛋白酶包覆的金纳米簇($\lambda_{\text{em max}} = 690 \text{ nm}$, $\zeta = -9.07 \text{ mV}$)和半胱氨酸(C)包覆的金纳米粒子($\zeta = +14.2 \text{ mV}$), 并通过正负电荷相吸, 二者之间发生表面等离子体增强能量转移使得金纳米簇荧光强度明显变弱。肝素是一种抗凝剂, 是由二种多糖交替连接而成表面带有大量负电荷($\zeta = -24.3 \text{ mV}$)的多聚体, 在体内起到抗凝血、控制细胞增殖、变异以及粘附作用^[76-78]。肝素由于负电性远强于胰蛋白酶, 因此优先结合金纳米簇, 使得被释放之后的金纳米簇的荧光得以恢复, 同时借助其表面修饰的靶向物质叶酸进而实现动物体内肿瘤靶向成像。

木瓜蛋白酶(Papain), 一种半胱氨酸蛋白酶^[79], 是

由 212 个氨基酸残基组成的单肽链, 平均分子量为 23000, 且氨基酸序列中包含有酪氨酸(Y)、色氨酸(W)、组氨酸(H)以及其它富含氨基和羧基的氨基酸残基^[80-82]。Chen 等^[80]就首次用木瓜蛋白酶同时作为包覆剂和还原剂合成了尺寸均一的荧光金纳米簇($\lambda_{\text{em max}} = 690 \text{ nm}$, $\text{QY} \approx 4.3\%$)用于 Cu^{2+} 的敏感性检测。并研究了反应时间、浓度和温度对实验的影响, 该方法简单、绿色, 且所合成的金纳米簇的稳定性较好。此外 Wen 等^[83]用辣根过氧化物酶(HRP)经过一系列生物矿化的过程成功构建了酶功能化的金纳米簇($\lambda_{\text{em max}} = 650 \text{ nm}$, $\text{QY} \approx 1.2\%$), 使其同时具备荧光性能和催化能力, 用于有效的检测过氧化氢含量。

表 1 汇总分析了近年来所报道的用于贵金属纳米簇合成的蛋白。从表中可以看出多数蛋白需具有半胱氨酸(C), 利用巯基(-SH)与贵金属原子结合, 和酪氨酸(Y), 利用其碱性下还原性将贵金属离子还原成原子态。

4 以多肽为模板合成贵金属纳米簇

多肽是氨基酸之间以肽键连接起来形成的化合物, 一般由几十个氨基酸组成, 也是蛋白质的水解产物。目前以自主设计多肽序列来合成贵金属纳米簇是最近的一个研究热点, 一方面采用多肽来直接合成具有与蛋白相同优点比如生物相容性好, 生物活性高等, 更重要的是其结构更加简单明确, 分子量较小更直观体现出在合成过程中每一个特定氨基酸所起到作用, 且可以根据自己的需要的性质比如尺寸大小、表面电荷、靶向等来自行设计或者直接购买商品化的多肽产品^[3,73]。

表 1 用于合成贵金属纳米簇的蛋白模板汇总

Table 1 Summarize the synthesis of NMNCs in the protein template

Protein	MW/ kDa	Isoelectric point	Key amino acid	Binding amino acid	Reductive amino acid	Reaction condition (pH)	Maximum emission/nm	Quantum yield/%	Ref.
BSA	ca. 66	4.7	C(35)/Y(21)/W(3)	C	Y	Alkaline	Au ₂₅ NCs: 640, 637 Ag ₁₅ NCs: 685	7.0 1.2	[38~43], [51~54]
Lactoferrin	ca. 83	8.7	C(33)/Y(21)/H(9)	C	Y	ca. 12.4	AuNCs: 650	6.0	[64,65]
Transferrin	ca. 80	7.5	C(40)/Y(26)/W(8)	—	—	ca. 12	AuNCs: 695	7.0	[57,58,63]
Lysozyme	ca. 14.4	ca. 11	C(2)/Y(2)	C	Y	Alkaline (strong)	AuNCs: 657 AgNCs: 640	— 1.3	[68,70]
Pepsin	ca. 34	1.0	C(7)/Y(18)/W(6)	C	Y W	3~6 0.6~2 10~13	Au ₅ /Au ₈ : 402 Au ₁₃ NCs: 510 Au ₂₅ NCs: 670	3.7 5.0 3.5	[71]
Insulin	ca. 5.8	5.3~5.4	C(6)/Y/K/N/R/W	Y/K/N/R/W	Y	Alkaline	AuNCs: 670	—	[74]
Papain	ca. 23.4	8.75	C(8)/Y(28)/W(7)/H(3)	C/Y/W/H/R/K	Y	ca. 12	AuNCs: 690	4.3	[80]
Trypsin	ca. 24	10.5	C(7)/Y(10)/W(4)	C	Y	ca. 12	AuNCs: 690	6.5	[76]
HRP	ca. 40	3.0~9.0	C(10)/Y(5)/W(1)	C	Y	>12	AuNCs: 650	1.2	[83]

Cui 等^[84]人工合成 CCYRGRKKRRQRR(简称 CCYTAT)的多肽序列,通过调节反应的 pH 条件,合成了不同尺寸大小银纳米簇(pH=9, Ag₅/Ag₆/Ag₇, $\lambda_{\text{em max}}=432$ nm; pH=12, Ag₂₈, $\lambda_{\text{em max}}=667$ nm),这主要归因于碱性 pH 不同使得多肽序列中的酪氨酸(Y)还原能力不同.该多肽由以下两部分组成:区域一为 CCY,其中靠半胱氨酸(C)中的巯基(-SH)结合 Ag 原子,利用酪氨酸(Y)中的酚羟基来还原 Ag⁺;区域二为 TAT 即核定位信号序列,起靶向作用.这印证了在设计多肽序列的一种思路即:每一个存在的氨基酸序列都有其特定的功能,且结构简明.紧接着 Wang 等^[85]以同样的多肽序列 CCYTAT 又成功合成了荧光金纳米簇($\lambda_{\text{em max}}=677$ nm,图 8)并实现了对三种特定细胞系中的细胞核染色,该方法合成纳米簇为细胞核的染色提供了一个新的选择.

考虑到核仁蛋白由于体积所占空间较大且结构较为复杂不适合作为标记使用,Yu 等^[86]经过分析选择了核仁蛋白中的一些必要的氨基酸设计了三种多肽序列来合成高荧光性能的银纳米簇,其多肽序列组成如下:KECDKKECDKKECDK, $\lambda_{\text{em max}}=610$ nm,HLHLHDCH-LHLHCDH, $\lambda_{\text{em max}}=615$ nm;HDCNKDKHDCNKDKH-DCN, $\lambda_{\text{em max}}=630$ nm,从而可以负载在活细胞中,并在细胞核区域进行高效的染色.

在以多肽为模板合成金纳米簇的基础上,许多科研工作者又进行了进一步探索,同时由于多模态成像技术也一直是最近几年的研究的热点,因此 Liang 等^[87]自主设计环状十肽(cyclodecapeptide)合成了金纳米簇的同时又螯合了 Gd³⁺,该探针最大发射波长为 660 nm,纵向弛豫效率 $r_1=41.5\pm 2.5$ s⁻¹•mM⁻¹, $r_2/r_1\approx 1\sim 1.2$,实现了 MRI/荧光的双模态成像.该一锅法简易可行且容易实现批量化生产,同时该策略也是实现高分辨率血池造影的一个合适选择.表 2 汇总分析了近年来应用于贵金属纳米簇的合成而设计的多肽序列.

然而,由于长期以来对多肽设计的原则缺少系统全面探究使得以多肽为模板合成贵金属纳米簇发展缓慢,仅仅停留在单个的氨基酸的性质研究上.为此 Tan 等^[88]专门研究并揭示了合成纳米粒子所需多肽的设计原则,即所设计的多肽须前提具有两个功能:还原能力和包覆(结合)能力.发现色氨酸(W)是所有 20 种氨基酸中还原速度最快的,且随着多肽链的增长,多肽序列变复杂的同时构象和结构也在变化,这样的多肽能够赋予纳米粒子更多的功能.经过研究发现要合成近红外荧光的金纳米簇,半胱氨酸(C)和酪氨酸(Y)是必不可少的,且半胱氨酸(C)和金离子的反应前体比例同样也是至关重要的^[73].

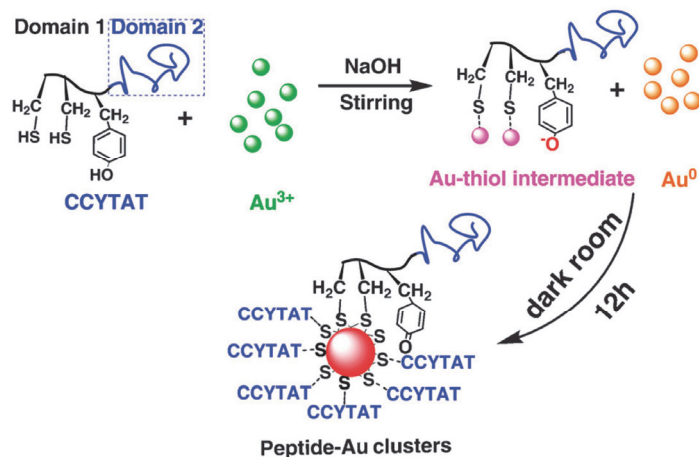


图8 自主设计的多肽序列(CCYRGRKKRRQRRR,简称 CCYTAT)为模板合成具有靶向功能的金纳米簇示意图^[85]

Figure 8 Schematic illustration of synthesizing the gold nanoclusters choosing self-designed peptide (CCYTAT) as the template^[85]

表2 用于合成贵金属纳米簇的多肽序列汇总

Table 2 Summarize the synthesis of NMNCs in the peptide template

Peptide name	MW/ Da	Binding amino acid	Reductive group	Reaction condition (pH)	Maximum emission/nm	Quantum yield/%	Ref.
CCYRGRKKRRQRRR	—	C	Y	12/9	AgNCs: 661/432	0.8/1.5	[84]
				12	Au ₂₅ NCs: 677	11	[85]
KECDKKECDKKECDK	—	C	NaBH ₄	—	AgNCs: 610	—	[86]
HLHLHDCHLHLHCDH	—	C	NaBH ₄	—	AgNCs: 615	—	[86]
HDCNKDKHDCNKDKHDCN	—	C	NaBH ₄	—	AgNCs: 630	—	[86]
CCYEEEEERRR	1631	C	Y	12	AuNCs: 655	—	[73]
[D-Cys ⁶]-GnRH-II	1282	C	Y/W	12	AuNCs: 612	—	[73]
[(D-Cys ⁶)-GnRH-II] ₂	2563	C	Y/W	12	AuNCs: 624	—	[73]
Cyclodecapeptide	—	C	Y	Alkaline	AuNCs: 660	3.6	[87]

5 总结与展望

本文对以蛋白和多肽为模板这一方法来合成贵金属(Au, Ag)纳米簇进行了总结, 阐明了该方法的优点, 并列举出了当前文献中报道的能被用来合成的蛋白和多肽序列, 以及根据特定氨基酸残基的功能不同来选择不同蛋白或者设计多肽序列作为合适的模板. 与蛋白复杂的内部结构相比, 多肽序列结构更加简明, 分子量较小, 且经过自主设计之后合成的贵金属纳米簇更具有目的性, 再加上现在随着多肽合成技术的快速发展, 能方便的为科研工作者提供各种商品化的所需多肽序列, 这样就大大减少了实验的繁琐程度, 目前关于该方面的报

道相对较少, 是一个很有前景的发展方向. 然而尽管蛋白和多肽该模板法有诸多优点, 从总结的文献中不难发现, 由于纳米金团簇量子产率较低、稳定性不足, 受表面配体包覆的影响太大且蛋白与多肽与贵金属团簇的真正作用机理不是很明确等等因素限制其在生物医学领域广泛应用. 因此选择合适的蛋白与多肽序列, 合成稳定性好、产率高的荧光纳米簇, 并以此为基础结合其他技术, 实现多功能化也是一个发展前景. 相信随着科研人员的努力, 不久会有一些新的蛋白或者新设计的多肽序列应用于贵金属纳米簇的合成中去, 使其具有更多的新功能, 且性能更加优异.

作者简介



常津, 2002.8~今, 天津大学材料学院纳米生物技术研究
所所长. 1994年毕业于南开大学, 获高分子化学与物理专业理
学博士学位(导师: 何炳林 中国科学院院士), 1999.11~今, 天
津大学材料学院高分子材料系教授, 博士生导师, 2000.8~
2002.8 美国密歇根大学(UM)药学院高级访问学者, 研究方向
涉及纳米生物材料和技术在肿瘤等重大疾病靶向控释基因及
药物输送系统、特异性诊断试剂和相关医疗器械等方面的基
础和应用研究. 研究所已承担 863 重点项目、973 专项、国家
科技攻关项目、国家支撑计划项目、国家自然科学基金、天
津市支撑计划重点项目等 50 余项, 累计科研经费达 2800 余万
元, 在国内外杂志发表学术论文 180 余篇, 引用 1200 余次,
SCI 影响因子累计 238. 申请和获得国家发明专利 50 余项, 两
次荣获“天津市科技进步一等奖”.



张兵波, 现就职于同济大学医学院, 生物医学工程与纳
米科学研究院. 2004 年于苏州大学获得材料学学士学位, 大学
期间曾获得“若政学者”研究基金(诺贝尔获得者李政道和其
夫人设立的本科生研究基金, 鼓励学科交叉研究); 2009 年 3
月获天津大学工学材料学博士学位. 2009 年 4 月入职同济大
学后, 现主持国家自然科学基金项目 2 项; 主持上海市教委创新
重点项目 1 项; 合作主持国家自然科学基金面上项目 2 项, 上
海市纳米专项 1 项; 同时主持多项国家和教育部重点实验室
研究基金项目. 2009 年入选为同济大学优秀青年教师培养对
象; 2011 年入选同济大学“英才计划”青年教师; 2012 年
入选上海市“大学生创新活动计划项目”指导教师; 2013 年入
选同济大学“英才计划”骨干教师.

杨维涛, 2012 级硕博连读生, 主要研究方向为多肽模板法
合成多功能贵金属纳米簇, 以及基于近红外 CuInS_2 量子点的
多功能荧光纳米探针的设计与合成、MRI 造影剂等方面.

郭伟圣, 2012 级博士, 2010 年毕业于天津大学, 取得材料
工学学士学位. 主要研究方向集中于无毒近红外量子点的制
备、多功能纳米探针的设计及其在肿瘤诊断方面的应用. 2013
年, 作为联合培养博士公派前往美国国立卫生研究院(NIH)深
造学习, 目前致力于研究纳米颗粒与生物分子的相互作用.

References

- [1] Lin, C.; Gong, H.; Fan, L. Z.; Li, X. H. *Acta Chim. Sinica* **2014**, 72, 704. (蔺超, 宫贺, 范楼珍, 李晓宏, 化学学报, **2014**, 72, 704.)
- [2] Yang, Q. F.; Liu, J. Y.; Chen, H. P.; Wang, X. X.; Huang, Q. M.; Shan, Z. *Prog. Chem.* **2011**, 23, 879. (杨群峰, 刘建云, 陈华萍, 王显祥, 黄乾明, 单志, 化学进展, **2011**, 23, 879.)
- [3] Luo, Z.; Zheng, K.; Xie, J. *Chem. Commun.* **2013**, 50, 5143.
- [4] Zheng, J.; Nicovich, P. R.; Dickson, R. M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58, 409.
- [5] Yuan, X.; Luo, Z.; Zhang, Q.; Zhang, X.; Zheng, Y.; Lee, J. Y.; Xie, J. *ACS Nano* **2011**, 5, 8800.
- [6] Copley, R. C. B.; Mingos, D. M. P. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, (4), 491.
- [7] Zheng, C.; Wang, H.; Liu, L.; Zhang, M.; Liang, J.; Han, H. *J. Anal. Methods Chem.* **2013**, 2013, 261648.
- [8] Zhu, M.; Aikens, C. M.; Hollander, F. J.; Schatz, G. C.; Jin, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5883.
- [9] Shichibu, Y.; Negishi, Y.; Tsukuda, T.; Teranishi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13464.
- [10] Ackerson, C. J.; Jadzinsky, P. D.; Kornberg, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6550.
- [11] Shang, L.; Yang, L.; Stockmar, F.; Popescu, R.; Trouillet, V.; Bruns, M.; Gerthsen, D.; Nienhaus, G. U. *Nanoscale* **2012**, 4, 4155.
- [12] Shang, L.; Azadfar, N.; Stockmar, F.; Send, W.; Trouillet, V.; Bruns, M.; Gerthsen, D.; Nienhaus, G. U. *Small* **2011**, 7, 2614.
- [13] Udaya Bhaskara Rao, T.; Pradeep, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 3925.
- [14] Yuan, X.; Tay, Y.; Dou, X.; Luo, Z.; Leong, D. T.; Xie, J. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 1913.
- [15] Akola, J.; Walter, M.; Whetten, R. L.; Häkkinen, H.; Grönbeck, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3756.
- [16] Le Guével, X.; Spies, C.; Daum, N.; Jung, G.; Schneider, M. *Nano Res.* **2012**, 5, 379.
- [17] Jin, R. *Nanoscale* **2010**, 2, 343.
- [18] Ingram, R. S.; Hostetler, M. J.; Murray, R. W.; Schaaff, T. G.; Khoury, J. T.; Whetten, R. L.; First, P. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9279.
- [19] Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5261.
- [20] Yu, Y.; Luo, Z.; Yu, Y.; Lee, J. Y.; Xie, J. *ACS Nano* **2011**, 5, 8684.
- [21] Zheng, J.; Zhang, C.; Dickson, R. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 93, 007402.
- [22] Zheng, J.; Petty, J. T.; Dickson, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7780.
- [23] Yuan, Z.; Cai, N.; Du, Y.; He, Y.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 419.
- [24] Richards, C. I.; Choi, S.; Hsiang, J. C.; Antoku, Y.; Vosch, T.; Bongiorno, A.; Tzeng, Y. L.; Dickson, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5038.
- [25] Petty, J. T.; Zheng, J.; Hud, N. V.; Dickson, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5207.
- [26] Xavier, P. L.; Chaudhari, K.; Baksi, A.; Pradeep, T. *Nano Rev.* **2012**, 3, 14767.
- [27] Slocik, J. M.; Naik, R. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3454.
- [28] de la Rica, R.; Matsui, H. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3499.
- [29] Dickerson, M. B.; Sandhage, K. H.; Naik, R. R. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4935.
- [30] Wang, Q.; Ye, F.; Fang, T.; Niu, W.; Liu, P.; Min, X.; Li, X. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, 355, 9.
- [31] Zhang, B.; Jin, H.; Li, Y.; Chen, B.; Liu, S.; Shi, D. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 14494.
- [32] Wang, Y.; Yan, X. P. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 3324.
- [33] Goswami, N.; Giri, A.; Kar, S.; Bootharaju, M. S.; John, R.; Xavier, P. L.; Pradeep, T.; Pal, S. K. *Small* **2012**, 8, 3175.
- [34] Shi, Y. C.; Huang, C. C.; Chen, W. Y.; Chen, P. C.; Chang, H. T. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 12972.
- [35] Chevrier, D. M.; Chatt, A.; Zhang, P. *J. Nanophotonics* **2012**, 6, 064504.
- [36] Goswami, N.; Saha, R.; Pal, S. K. *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 5485.
- [37] Wang, C. M. S. *Thesis*, Jilin University, Changchun, **2012**. (王灿, 硕士论文, 吉林大学, 长春, **2012**.)
- [38] Xie, J.; Zheng, Y.; Ying, J. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 888.
- [39] Mathew, A.; Sajanlal, P. R.; Pradeep, T. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 11205.
- [40] Guo, C.; Irudayaraj, J. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 2883.

- [41] Yan, L.; Cai, Y.; Zheng, B.; Yuan, H.; Guo, Y.; Xiao, D.; Choi, M. *M. F. J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 1000.
- [42] Sun, S. K.; Dong, L. X.; Cao, Y.; Sun, H. R.; Yan, X. P. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 8436.
- [43] Hu, L.; Han, S.; Parveen, S.; Yuan, Y.; Zhang, L.; Xu, G. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 32, 297.
- [44] Tian, D.; Qian, Z.; Xia, Y.; Zhu, C. *Langmuir* **2012**, 28, 3945.
- [45] Patel, A. S.; Mohanty, T. J. *Mater. Sci.* **2013**, 49, 2136.
- [46] Durgadas, C. V.; Sharma, C. P.; Sreenivasan, K. *Analyst* **2011**, 136, 933.
- [47] Wang, X.; Wu, P.; Lv, Y.; Hou, X. *Microchem. J.* **2011**, 99, 327.
- [48] Liu, Y.; Ai, K.; Cheng, X.; Huo, L.; Lu, L. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, 20, 951.
- [49] Wu, X.; He, X.; Wang, K.; Xie, C.; Zhou, B.; Qing, Z. *Nanoscale* **2010**, 2, 2244.
- [50] Louie, A. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3146.
- [51] Zhang, A.; Tu, Y.; Qin, S.; Li, Y.; Zhou, J.; Chen, N.; Lu, Q.; Zhang, B. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, 372, 239.
- [52] Sun, G.; Zhou, L.; Liu, Y.; Zhao, Z. *New J. Chem.* **2013**, 37, 1028.
- [53] Hu, D. H.; Sheng, Z. H.; Zhang, P. F.; Yang, D. Z.; Liu, S. H.; Gong, P.; Gao, D. Y.; Fang, S. T.; Ma, Y. F.; Cai, L. T. *Nanoscale* **2013**, 5, 1624.
- [54] Durgadas, C. V.; Sharma, C. P.; Sreenivasan, K. *Nanoscale* **2011**, 3, 4780.
- [55] Yersin, A.; Osada, T.; Ikai, A. *Biophys. J.* **2008**, 94, 230.
- [56] Daniels, T. R.; Delgado, T.; Rodriguez, J. A.; Helguera, G.; Penichet, M. L. *Clin. Immunol.* **2006**, 121, 144.
- [57] Le Guevel, X.; Daum, N.; Schneider, M. *Nanotechnology* **2011**, 22, 275103.
- [58] Wang, Y.; Chen, J. T.; Yan, X. P. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 2529.
- [59] Young, D. T. M. *Nature* **1998**, 393, 152.
- [60] Li, F.; Chen, Y.; Chen, H.; He, W.; Zhang, Z. P.; Zhang, X. E.; Wang, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 20040.
- [61] Chasteen, N. D.; Harrison, P. M. *J. Struct. Biol.* **1999**, 126, 182.
- [62] He, W. *M.S. Thesis*, China Three Gorges University, Yichang, **2012**. (何微, 硕士论文, 三峡大学, 宜昌, **2012**.)
- [63] Sun, C.; Yang, H.; Yuan, Y.; Tian, X.; Wang, L.; Guo, Y.; Xu, L.; Lei, J.; Gao, N.; Anderson, G. J.; Liang, X. J.; Chen, C.; Zhao, Y.; Nie, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8617.
- [64] Xavier, P. L.; Chaudhari, K.; Verma, P. K.; Pal, S. K.; Pradeep, T. *Nanoscale* **2010**, 2, 2769.
- [65] Chaudhari, K.; Xavier, P. L.; Pradeep, T. *ACS Nano* **2011**, 5, 8816.
- [66] Wei, H.; Wang, Z.; Zhang, J.; House, S.; Gao, Y. G.; Yang, L.; Robinson, H.; Tan, L. H.; Xing, H.; Hou, C.; Robertson, I. M.; Zuo, J. M.; Lu, Y. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 93.
- [67] Yang, T.; Li, Z.; Wang, L.; Guo, C.; Sun, Y. *Langmuir* **2007**, 23, 10533.
- [68] Wei, H.; Wang, Z.; Yang, L.; Tian, S.; Hou, C.; Lu, Y. *Analyst* **2010**, 135, 1406.
- [69] Harriman, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 6102.
- [70] Zhou, T.; Huang, Y.; Li, W.; Cai, Z.; Luo, F.; Yang, C. J.; Chen, X. *Nanoscale* **2012**, 4, 5312.
- [71] Kawasaki, H.; Hamaguchi, K.; Osaka, I.; Arakawa, R. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21, 3508.
- [72] Jin, K. S.; Rho, Y.; Kim, J.; Kim, H.; Kim, I. J.; Ree, M. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 15821.
- [73] Söptei, B.; Naszályi Nagy, L.; Baranyai, P.; Szabó, I.; Mező, G.; Hudecz, F.; Bóta, A. *Gold Bull.* **2013**, 46, 195.
- [74] Liu, C. L.; Wu, H. T.; Hsiao, Y. H.; Lai, C. W.; Shih, C. W.; Peng, Y. K.; Tang, K. C.; Chang, H. W.; Chien, Y. C.; Hsiao, J. K.; Cheng, J. T.; Chou, P. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 7056.
- [75] Wang, G. K.; Yan, C. L.; Lu, X. M.; Chen, D. J.; Lu, Y. *Acta Chim. Sinica* **2009**, 67, 1967. (王公轲, 闫长领, 卢秀敏, 陈得军, 卢雁, 化学学报, **2009**, 67, 1967.)
- [76] Liu, J. M.; Chen, J. T.; Yan, X. P. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 3238.
- [77] Korir, A. K.; Larive, C. K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 155.
- [78] Wang, M.; Zhang, D.; Zhang, G.; Zhu, D. *Chem. Commun.* **2008**, 4469.
- [79] Xue, Y.; Li, S. B.; Zhang, H. T.; Nie, H. L.; Zhu, L. M. *Acta Chim. Sinica* **2009**, 67, 2390. (薛勇, 李树白, 张海涛, 聂华丽, 朱利民, 化学学报, **2009**, 67, 2390.)
- [80] Chen, Y.; Wang, Y.; Wang, C.; Li, W.; Zhou, H.; Jiao, H.; Lin, Q.; Yu, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, 396, 63.
- [81] Xiong, H. *Sichuan Food and Fermentation*, **2005**, 4, 9. (熊华, 四川食品与发酵, **2005**, 4, 9.)
- [82] Drenth, J.; Jansonius, J. N.; Koekoek, R.; Swen, H. M.; Wolthers, B. *G. Nature* **1968**, 218, 929.
- [83] Wen, F.; Dong, Y.; Feng, L.; Wang, S.; Zhang, S.; Zhang, X. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1193.
- [84] Cui, Y.; Wang, Y.; Liu, R.; Sun, Z.; Wei, Y.; Zhao, Y.; Gao, X. *ACS Nano* **2011**, 5, 8684.
- [85] Wang, Y.; Cui, Y.; Zhao, Y.; Liu, R.; Sun, Z.; Li, W.; Gao, X. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 871.
- [86] Yu, J.; Patel, S. A.; Dickson, R. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 119, 2074.
- [87] Liang, G.; Ye, D.; Zhang, X.; Dong, F.; Chen, H.; Zhang, S.; Li, J.; Shen, X.; Kong, J. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1, 3545.
- [88] Tan, Y. N.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5677.

(Cheng, B.)