

文章编号: 1004-0374(2010)04-0391-05

荧光量子点探针及其标记技术

蒋飞荣^{1,2#}, 贾文婷^{1#}, 张兴燊², 任彩萍^{1*}

(1 中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; 2 广西中医学院, 南宁 530001)

摘要: 量子点作为一种新型荧光标记物, 与有机染料和荧光蛋白质相比, 它们具有可调谐且宽的吸收光谱, 激发可产生多重荧光颜色、强荧光信号、抗光漂白能力强等独特的光学特性, 使其广泛应用于生物和医学领域。该文就量子点探针的表面修饰和功能性及其标记技术的研究进展进行了阐述。

关键词: 荧光量子点; 探针; 生物标记

中图分类号: Q6-33 **文献标识码:** A

Fluorescent quantum dots probes and their biological labeling

JIANG Fei-rong^{1,2#}, JIA Wen-ting^{1#}, ZHANG Xing-shen², REN Cai-ping^{1*}

(1 Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China; 2 Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

Abstract: As emerging promising fluorescent labels, semiconductor quantum dots (QDs) have tremendous potential in the fields of biology and medicine because of their unique optical properties with size-tunable light emission, broad absorption spectra for simultaneous excitation of multiple fluorescence colors, superior signal brightness, resistance against photobleaching, etc. This article briefly discusses the recent progresses on fluorescent QDs probes and their biological labeling including their surface modification and functionalization.

Key words: fluorescent quantum dots; probe; biological labeling

荧光半导体量子点(fluorescent semiconductor quantum dots, QDs)是一种由II-VI族(如CdSe和CdTe)或III-V族(如InP和InAs)或IV-VI族(如PbS和PbSe)元素组成的、直径一般在1~100 nm、能够接受激发光产生荧光的半导体纳米颗粒。Bruchez等^[1]通过在QDs表面包裹SiO₂, 再连接上羟基以及Chan和Nie^[2]采用巯基乙酸修饰QDs, 解决了QDs的水溶性和生物兼容性问题。

QDs独特的光学特性、表面修饰和生物功能化以及标记技术的优势使得QDs在生物学、活细胞和体内成像、药物研究和筛选、生物芯片等领域得到了广泛应用。本文就QDs探针的表面修饰和功能性及其标记技术进行阐述。

1 QDs的特征

一种典型的水溶性核壳型QDs应该包括: (1)一

个半导体核(如CdSe), 其直径决定荧光的波长; (2)一个半导体外壳(如ZnS), 用来提高量子产率; (3)一个亲水层, 用来保证其水溶性^[3]。与传统的有机荧光标记物相比, QDs具有以下特点: (1)激发波长范围宽、发射波长范围窄, 可以采用同一波长激发光同时激发不同颜色QDs^[4]; (2)QDs的荧光强度高及核壳结构稳定性好, 可以经受反复多次激发, 荧

收稿日期: 2009-10-09; 修回日期: 2009-12-09

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2007AA021809; 2007AA021811); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2010CB833605); 湖南省科技厅资助项目(2008FJ3186); 2009年度新世纪优秀人才支持计划(NCET-10-0790)

共同第一作者

*通讯作者 E-mail: rencaiping@xysm.net; Tel: 0731-82355066

光寿命长, 具有能够对所标记的物体进行长时间观察等优势^[5]; (3) 化学修饰后可得到生物相容性好的 QDs, 并可以与抗体或小分子特异性连接, 对生物体毒性小, 可以进行靶向标记和检测^[6-8]。

2 QDs 的标记原理

QDs 可以与特定抗体或小分子结合后, 在不改变其化学特性的情况下, 当受到光激发后发出特定波长的荧光, 这样 QDs 通过抗体和小分子结合实现了对细胞的不同细胞器或骨架系统的标记^[9, 10]。QDs 的光谱性质主要取决于半导体纳米粒子的半径大小, 半径越小, 其能带越宽, 使其吸收带蓝移, 粒子发射蓝光; 反之则红移, 粒子发射绿、黄、橙、红光等, 激发 QDs 的激发波长范围很宽, 可以涵盖整个光谱, 从紫外到红外区, 可以用同一波长的光激发不同大小的 QDs, 并且不同的量子点通过调整其粒径大小可以由同一波长的光激发发出不同颜色的荧光^[11], 从而使不同生物分子的标记、识别变得更容易, 在生物化学、分子和细胞生物学等研究领域显示了极其广阔的应用前景。

3 QDs 的表面修饰

高质量的 QDs 通常在长烷氧化三辛基磷 (tri-n-octylphosphine oxide, TOPO) 等高沸点溶剂中合成, 这些有机溶剂分子暴露在外面的长烃链致使 QDs 的亲水性和生物相容性差, 不能直接与生物物质作用制成探针。近年来, 通过在 QDs 表面修饰上亲水性的官能团^[12] 或包裹一层亲水性的物质在其表面, 解决了半导体 QDs 的水溶性和生物相容性问题。目前常用的表面修饰的方法主要有: (1) 表面硅烷化; (2) 配体交换; (3) 配体包裹; (4) 微球包裹。

3.1 表面硅烷化

Bruchez 等^[11] 用 Si/SiO₂ 取代疏水有机配体 TOPO 与 QDs 发生偶联, 从而使 QDs 获得水溶性, 在水溶液或缓冲液中很稳定, 且能保持较高的量子产率, 但结合过程复杂, 耗时长, 硅层易水解, 容易发生颗粒之间的交联, 引起团聚和沉淀。Chen 等^[13] 用偶联上羟基的 CdSeS/SiO₂ 核壳型的 QDs, 在模拟人体血液环境下孵育 5 d, QDs 的最大发射波长和荧光强度都没有降低, 然后将 QDs 注射小鼠尾静脉, 用等离子体质谱检测 ¹¹¹Cd, 测出肝、脾、肺和肾脏是其主要的靶器官。Knopp 等^[14] 报道了用 SiO₂ 与胺、羧基、醛、环氧树脂、硫醇等官能团

结合修饰 QDs, 发现不仅降低与 QDs 表面的吸附, 不容易引起团聚和沉淀, 而且可以提高量子产率。

3.2 配体交换

用带有功能性基团的配体分子交换疏水的表面活性层。这些配体通常一端有能与 QDs 结合的功能性基团 (如巯基), 而另一端具有亲水性的基团 (如羧基), 通过巯基与 QDs 表面的 Zn 原子结合, 游离的亲水性基团既使 QDs 具有水溶性, 又可与不同的生物分子相互偶联。这种方法简单方便, 但问题是巯基与 QDs 结合并不牢固, 从长期稳定性考虑, 这样形成的亲水层易于瓦解。

3.2.1 巯基乙酸 (mercaptoacetic acid, MAA)

用 MAA 修饰 QDs 能使其在水溶液中有更好的溶解性和稳定性。Yu 等^[15] 用 AFP 单克隆抗体作为一抗, 用巯基乙酸修饰的水溶性 CdSe/ZnS 核壳型 QDs 与相应二抗结合制备成 QDs-IgG 探针, 实现了对体外培养高表达 AFP 的人肝癌细胞株 HCCLM6 的免疫荧光成像, 将细胞分别通过皮下和尾静脉注射建立肝癌裸鼠模型和人肝癌肺转移裸鼠模型, 用该 QDs 探针均成功地实现了肿瘤的体内成像。

3.2.2 二氢硫辛酸 (dihydrolipoic acid, DHLA)

Jaiswal 等^[7] 将 DHLA 包被的 QDs 与活细胞于 37°C 共育, 观察到 QDs 通过内吞作用进入细胞, 交联 avidin 的 QDs 进入生物素化的细胞, 并不影响细胞的形态和生长。Susumu 等^[16] 设计了一种用来修饰 QDs 的多功能配体, 该配体由三部分组成, 即 DHLA (与 QDs 和 PEG 短链结合)、PEG (用来改善其水溶性) 以及生物功能性官能团 (如羧酸和氨基)。这使得 QDs 可以更广泛稳定地应用在亲和素-生物素等生物共轭技术中。

3.2.3 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)

Ballou 等^[17] 将 PEG 包裹的 QDs 通过尾静脉注入小鼠体内, 于不同的时间剖检后观察 QDs 在体内荧光稳定性, 结果表明 PEG 修饰后的 QDs 不仅具有水溶稳定性, 可以有效降低探针在网状内皮系统的非特异性吸附, 而且在肝脏、淋巴结和骨髓中至少可以保留 1 个月, 同时可以增加 QDs 在循环中的半衰期, 有助于实现 QDs 活体内长时间实时动态示踪观察。

3.2.4 其他

如三(2-氨基乙基)胺^[18] [Tris(2-aminoethyl) amine, Tren] 修饰 QDs 使 QDs 表面带正电, 有效被细胞吸收; 聚胺^[19] (poly amidoamine, PAMAM) 修饰 QDs

可以使QDs有效通过细胞屏障; 聚乙烯亚胺^[20] (poly ethyleneimine, PEI) 修饰QDs可使QDs溶于极性溶剂中; 磷化氢聚合物^[21] (phosphine polymer) 修饰QDs可以增加QDs发光强度。

3.3 配体包裹

用两亲聚合物包裹QDs, 这种方法能够克服以上两种方法存在的问题, 这些两亲聚合物包含疏水末端和亲水基团, 两性分子中疏水基团与QDs表面疏水基团相互作用发生偶联, 从而防止了两性分子从QDs表面脱附, 同时又能保留QDs表面控制QDs的粒子尺寸分布的疏水配体TOPO, 由于在体系中引入了亲水基团, 可使QDs转换为水溶性。

3.3.1 磷脂(phospholipid, PE)

Dubertret等^[22]将QDs包裹于PEG-PE胶束中, 利用PE分子中的氨基与DNA连接, 不但能够用于体内及体外成像, 而且制成的量子点微球大小均匀, 形状规则, 几乎不存在团聚情况。Liu等^[23]用磷脂将QDs包裹并研究其与培养的非小细胞肺癌细胞的相互作用, 发现QDs可以有效封装在磷脂内, 通过荧光去极化实验确认QDs主要分布在细胞质中。

3.3.2 两亲三嵌段共聚物(amphiphilic triblock copolymers)

Gao等^[6]设计了一种能够靶向动物活体内的肿瘤并同时成像的多功能QDs探针。这种探针包含一种两亲的三嵌段共聚物, 该配体由三部分组成, 即TOPO(用来控制QDs粒径尺寸分布)、PEG分子(增强探针生物学效能, 保护QDs在体内环境中不被水解和酶解, 同时防止体内实验中颗粒聚集和荧光效率降低等问题)和特异性靶向配体[前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)的单克隆抗体]。该研究小组首先用此探针对PSMA高表达的人前列腺癌细胞C4-2进行了特异性识别, 随后通过尾静脉将探针分别注入到正常小鼠和前列腺癌肿瘤模型小鼠体内, 成功地实现了前列腺癌小鼠的非损伤体内成像, 发现QDs探针在肿瘤生长部位定位、积累并且发出很强的荧光信号, 荧光强度和持续时间均明显高于绿色荧光蛋白。

3.3.3 壳聚糖(chitosan)

Tan等^[24]用壳聚糖包裹的水溶性CdSe/ZnS QDs与HER-2单克隆抗体结合, 通过识别SK-BR-3乳腺癌细胞表面的HER-2分子, 特异性地将HER2/neu siRNA转入过表达HER2的SK-BR-3乳腺癌细胞中, 并通过跟踪QDs的荧光信号证实药物载体靶向传送到SK-BR-3乳腺肿瘤细胞, 通过荧光素酶和酶联免

疫吸附试验法验证了导入细胞的siRNA的基因沉默效应, 也同时证实了壳聚糖包裹的QDs载体在体外具有较高的转染效率和精准的靶向识别能力。

3.4 微球包裹

将QDs包覆入带有功能基团氨基或羧基的水溶性高分子微壳或微球中, 得以实现QDs的水溶性和生物功能化。Han等^[25]将不同颜色和数目的QDs包裹到高分子聚苯乙烯微球中, 根据微球上的QDs的种类和它们间的荧光强度的比例, 形成具有光谱编码功能的微粒; 用10种发光强度和6种颜色的QDs进行不同组合, 理论上可提供100万种可识别的编码; 并且把DNA序列连接到微球上, 根据微球中QDs的种类和它们之间荧光强度的比例, 可以确定特异的DNA序列, 同时可以获得固定探针DNA和游离探针DNA的荧光信号。

4 荧光QDs标记技术

为了靶向特定的生物分子, 需要使QDs结合到达要研究的特定的细胞。QDs用于荧光标记主要利用偶联的方式与生物分子结合, 偶联的方法主要有两种: 一种是静电吸附方法, 带电荷的量子点可以与带相反电荷的生物分子通过静电相互作用吸附偶联; 另一种是共价结合法, 即通过化学反应将量子点表面进行羧基、氨基或环氧基等官能团化的修饰改性, 使之能与生物分子中的氨基或羧基结合实现偶联。

4.1 静电吸附

带电荷的量子点可以与带相反电荷的生物分子通过静电相互作用吸附偶联。由于CdSe和ZnS以静电引力相结合, 表面带负电, 可结合中性电荷或阳性电荷的蛋白质及抗体等生物分子通过静电相互作用吸附偶联^[5]。对于蛋白质类的分子, 可以在其一个末端构建一种带正电荷的拉链结构, 如亮氨酸拉链肽段Zb^[26], 从而使其能静电吸附于QDs表面。或者在QDs外层修饰上DHLLA, 使得QDs带负电, 靠静电吸附力连接上亲和素, 依靠biotin-avidin之间的高度特异性结合力将QDs标记到目标分子上^[7]。

4.2 亲和素-生物素(streptavidin-biotin)

通过羧基、氨基或环氧基等官能团化的修饰, 亲和素共价结合于QDs表面, 然后与生物素化的生物分子结合实现偶联。在目前的生物医学研究领域, 将QDs与生物分子结合的最常用方法就是通过链(霉)亲和素生物素系统结合, 该系统可用于较为

复杂的研究,如抗原抗体对间的识别、活体标记及特异性标记等。Wu等^[27]在高表达HER-2抗原的人SK-BR-3乳腺细胞表面连接HER-2单克隆抗体后,分别用两种QDs-IgG探针成功对细胞表面的HER-2进行特异性识别,而随后换用亲和素-生物素QD-IgG探针,不但可特异性识别细胞表面的HER-2,且荧光强度更高,接着他们用两种不同的亲和素QDs探针,配合HER-2单抗、核抗原抗体及其相应的生物化二抗,实现了一种波长光激发下对HER-2及核抗原的同时识别。Wang等^[28]用亲和素QDs探针配合生物素化的单抗检测了H08910人卵巢癌细胞、人卵巢癌组织和小鼠肿瘤细胞3种不同标本的CA125水平,与FITC标记的CA125单抗探针相比,亲和素QDs探针敏感性更高,荧光更强,持续时间更久。

4.3 连接剂偶联法

利用连接剂1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐盐酸盐[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC/EDAC]或者EDC/EDAC和N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS)或N-羟基硫代琥珀酰亚胺(N-Hydroxysulfosuccinimide, Sulfo-NHS),使得QDs上的羧基和小分子(肽,抗体)上的氨基通过缩合反应进行偶联的标记方法。Kairdolf等^[29]采用EDC和Sulfo-NHS交联方法,通过1,3-二氨基-2-丙醇(1,3-diamino-2-propanol, DAP)将羧酸化QDs偶联成羟基化的QDs,这种新型的QDs不但具有直径小(为13~14 nm)、荧光强度大、在酸性环境下稳定等特点,而且通过QDs结合实验证明,羟基化的QDs可以显著降低非特异性细胞结合(是羧基化QDs的1/140)。Fuente等^[30]用EDC和NHS将用N-(2-巯基丙酰基)-甘氨酸(N-(2-mercaptopropionylglycine)经配体交换修饰的QDs偶联上人成纤维细胞转肽(hTERT-BJ1),通过紫外可见吸收和荧光发射光谱证实其稳定性和水溶性良好,而且荧光染色实验证实这种QDs可以穿透细胞膜,靶向细胞核,这对于其他肽和蛋白质偶联QDs提供了很好的方法。Choi等^[31]用聚丙烯酰胺(octylamine-modified polyacrylic acid)包裹TOPO的CdSe/ZnS(表面带羧基)与含氨基的DNA偶联,然后与目标mRNA特异性杂交,结果显示QD-DNA探针可以作为基因表达的直接定位和定量工具。

4.4 双功能交联剂法

采用磺基琥珀酰亚胺-4-[N-甲基马来酸]-1-羧

环己烷[Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate, Sulfo-SMCC]和二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT),将QDs的氨基与抗体或配体的巯基通过缩合反应进行偶联的标记方法。Feng等^[32]用SMCC-DTT将生物素化的QDs与单克隆抗人抗体偶联,首次应用在毛细管免疫分析法研究中。他们发现,在pH 9.8、20 mM硼砂缓冲液中可以加强抗原抗体结合并且减少蛋白质在毛细血管壁的吸附。Wu等^[33]用SMCC-DTT将CdSe/ZnS与抗白介素-1 α 抗体偶联,经过夹心免疫反应分离出白细胞介素-1 α 蛋白质,然后采用电化学分析法成功检测到白细胞介素-1 α 蛋白质生物标志物。这种以QDs为基础的电化学免疫方法表明双功能交联剂法能够快速、简便、高效分析蛋白质生物标志物。

5 展望

尽管目前QDs在各种细胞和动物实验中没有显示出它会对生物体的生理状态造成明显影响,但含有重金属组分QDs的生物相容性和长期毒性仍然不容忽视。不过我们相信,随着QDs的表面修饰和功能性以及标记技术的不断地完善,具有高稳定性、生物安全性的新型QDs会不断涌现,届时QDs必将成为最有前途的荧光标记物之一,在未来的生命科学、医药等领域得到广泛应用。

[参 考 文 献]

- [1] Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, 281(5385): 2013-6
- [2] Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, 281(5385): 2016-8
- [3] Parak WJ, Pellegrino T, Plank C. Labeling of cells with quantum dots. *Nanotechnology*, 2005, 16(2): R9-25
- [4] Nirmal M, Brus L. Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystal. *Acc Chem Res*, 1999, 32(5): 407-14
- [5] Smith AM, Ruan G, Rhyner MN, et al. Engineering luminescent quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Ann Biomed Eng*, 2006, 34(1): 3-14
- [6] Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8): 969-76
- [7] Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, et al. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 47-51
- [8] Yu X, Chen L, Li K, et al. Immunofluorescence detection with quantum dots bioconjugates for hepatoma *in vivo*. *J Biomed Opt*, 2007, 12(1): 014008
- [9] Tomlinson ID, Mason JN, Blakely RD, et al. High affinity

- inhibitors of the dopamine transporter (DAT): novel biotinylated ligands for conjugation to quantum dots. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(17): 4664-7
- [10] Gao X, Yang L, Petros JA, et al. *In vivo* molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(1): 63-72
- [11] Pinaud F, Michalet X, Bentolila LA, et al. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 1679-87
- [12] Chan WC, Maxwell DJ, Gao X, et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(1): 40-6
- [13] Chen Z, Chen H, Meng H, et al. Bio-distribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 23(3): 364-71
- [14] Knopp D, Tang D, Niessner R. Review: bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Anal Chim Acta*, 2009, 647(1): 14-30
- [15] Yu XF, Chen LD, Deng YL, et al. Fluorescence analysis with quantum dot probes for hepatoma under one- and two-photon excitation. *J Fluoresc*, 2007, 17(2): 243-7
- [16] Susumu K, Mei BC, Mattoussi H. Multifunctional ligands based on dihydrolipoic acid and polyethylene glycol to promote biocompatibility of quantum dots. *Nat Protoc*, 2009, 4(3): 424-6
- [17] Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, et al. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem*, 2004, 15(1): 79-86
- [18] Wang S, Song H, Ong WY, et al. Positively charged and pH self-buffering quantum dots for efficient cellular uptake by charge mediation and monitoring cell membrane permeability. *Nanotechnology*, 2009, 20(42): 425102
- [19] Wisher AC, Bronstein I, Chechik V. Thiolated PAMAM dendrimer-coated CdSe/ZnSe nanoparticles as protein transfection agents. *Chem Commun*, 2006, 21(15): 1637-9
- [20] Nann T. Phase-transfer of CdSe@ZnS quantum dots using amphiphilic hyperbranched polyethyleneimine. *Chem Commun*, 2005, 7(13): 1735-6
- [21] Kim SW, Kim S, Tracy JB, et al. Phosphine oxide polymer for water-soluble nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(13): 4556-7
- [22] Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 2002, 298(5599): 1759-62
- [23] Liu S, Lee CM, Wang S, et al. A new bioimaging carrier for fluorescent quantum dots: phospholipid nanoemulsion mimicking natural lipoprotein core. *Drug Deliv*, 2006, 13(2): 159-164
- [24] Tan WB, Jiang S, Zhang Y. Quantum-dot based nanoparticles for targeted silencing of HER2/neu gene via RNA interference. *Biomaterials*, 2007, 28(8): 1565-71
- [25] Han M, Gao X, Su JZ, et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(7): 631-5
- [26] Goldman ER, Anderson GP, Tran PT, et al. Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays. *Anal Chem*, 2002, 74(4): 841-7
- [27] Wu X, Liu H, Liu J, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 41-6
- [28] Wang HZ, Wang HY, Liang RQ, et al. Detection of tumor marker CA125 in ovarian carcinoma using quantum dots. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, 36(10): 681-6
- [29] Kairdolf BA, Mancini MC, Smith AM, et al. Minimizing nonspecific cellular binding of quantum dots with hydroxyl-derivatized surface coatings. *Anal Chem*, 2008, 80(8): 3029-34
- [30] de la Fuente JM, Fandel M, Berry CC, et al. Quantum dots protected with tiopronin: a new fluorescence system for cell-biology studies. *ChemBioChem*, 2005, 6(6): 989-91
- [31] Choi Y, Kim HP, Hong SM, et al. In situ visualization of gene expression using polymer-coated quantum-dot-DNA conjugates. *Small*, 2009, 5(18): 2085-91
- [32] Feng HT, Law WS, Yu LJ, et al. Immunoassay by capillary electrophoresis with quantum dots. *J Chromatogr A*, 2007, 1156(1-2): 75-9
- [33] Wu H, Liu GD, Wang J, et al. Quantum-dots based electrochemical immunoassay of interleukin-1 α . *Electrochem Commun*, 2007, 9(7): 1573-7