

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.05.013

CdSe/ZnS 核壳型量子点标记肌蛋白的研究^①

杨利利, 郝建玉, 郑鹤志, 隆异娟

西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

摘要: 利用组氨酸与锌离子的特异性结合, 用水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记肌蛋白(PrP^C), 研究了量子点标记肌蛋白的荧光光谱、琼脂糖凝胶电泳以及二者结合比。标记后荧光强度增加两倍多, 二者结合比为 3:1。这种方法能快速简便地实现肌蛋白的定位点标记, 为进一步深入研究肌蛋白提供了一种新的标记手段。

关键词: 量子点(QDs); 标记; 肌蛋白(PrP^C)

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)05-0076-04

生物材料的标记是影响临床检测灵敏度的关键技术, 有机荧光染料是最常用的生物材料标记物。与有机荧光染料相比, 近年来发展快速的量子点具有荧光性能比较稳定、激发光谱单一、荧光谱线窄、发光效率高、发光颜色可调、可进行多色标记等优点, 因此是非常有前途的生物标记物^[1-4]。现已有许多关于量子点标记生物分子报道, 如用量子点标记转铁蛋白和免疫球蛋白、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、天花粉蛋白和表皮生长因子等^[5-7]。

肌蛋白疾病(TSEs)作为国际重大疫病, 曾在欧洲等地大面积暴发, 给当地的畜牧业带来极大危害。TSEs 具有高度的传染性, 跨国流行, 直接危及动物或人类健康, 影响全球经济发展、社会进步和政治稳定^[8-10]。因此各国都加大了研究力度, 希望能防范、抵御、控制肌蛋白病灾害。

本文以肌蛋白在细胞内的正常形式肌蛋白(PrP^C)为目标, 利用镍柱提取纯化得到高纯度肌蛋白, 然后根据其自身所带组氨酸与水溶性 CdSe/ZnS 量子点表面锌离子的特异性结合, 简单方便地实现了量子点定位点标记肌蛋白。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

高质量油溶性 CdSe/ZnS 量子点(武汉大学化学与分子科学学院庞代文教授赠送); 表达肌蛋白 PrP^C 的大肠杆菌菌种(中国科学院武汉病毒研究所肖庚富教授赠送); Ni-NTA Agarose(美国 Invitrogen 公司); 其他试剂均为国产市售分析纯, 整个实验过程用水均为 18.2 M Ω 的超纯水(Milli-Q-Plus 系统所制)。

ZF-90 型暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂); Canon A630 数码相机(佳能中国公司); DYCP-31DN 水平电泳仪(北京市六一仪器厂); DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂); F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司); FluorchemTM 8900 化学发光; 荧光可见光图像分析仪(美国 ALPHA INNO-TECH 公司)。

1.2 实验过程

水溶性 CdSe/ZnS 量子点的制备: 取 CdSe/ZnS 核壳型量子点的己烷溶液 0.5 mL, 与 1 mL 二巯基辛

① 收稿日期: 2015-05-26

基金项目: 国家自然科学基金(21175110); 西南大学中央高校基本业务费(XDJK2012C048); 西南大学博士基金(SWU112071)。

作者简介: 杨利利(1991-), 女, 四川达州人, 硕士研究生, 主要从事发光分析及光学生物传感器的研究。

通信作者: 隆异娟, 女, 高级实验师。

酸的甲苯溶液(二巯基辛酸(DHLA)参照文献[11]制备)涡旋混合数分钟,再加少量 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液,再次涡旋混合几分钟,低速离心取水层即得水溶性量子点.

PrP^C 的提取和纯化参照文献[12]进行.

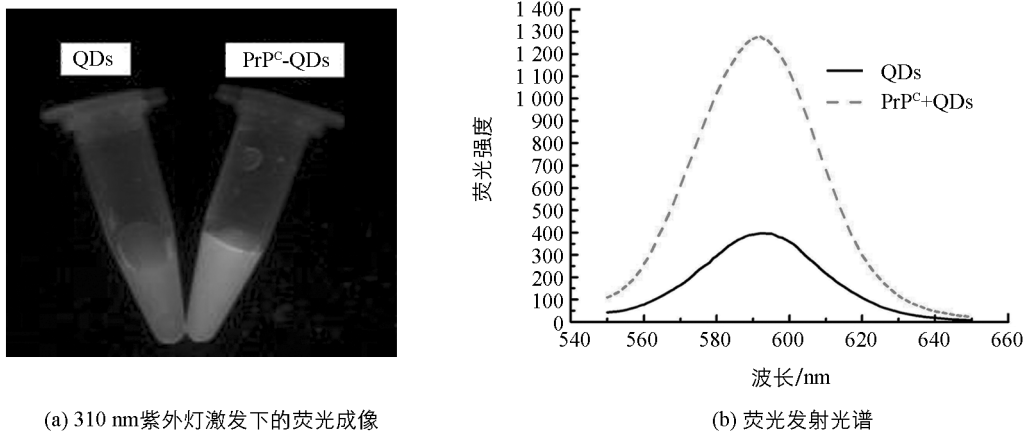
取 20 μL 水溶性 QDs(浓度为 9.74×10^{-6} mol/L)加 100 μL 超纯水稀释,取 37 μL PrP^C(浓度为 1.58×10^{-5} mol/L)加 343 μL 超纯水稀释,然后二者涡旋混合,溶液中 PrP^C 和 QDs 最终浓度比约为 $c_{\text{PrP}^{\text{C}}} : c_{\text{QDs}} = 3 : 1$;再取 20 μL QDs 加 37 μL 醋酸钠缓冲(PrP^C 所在的缓冲溶液, pH=4.0),超纯水补体积至 0.5 mL,涡旋混合,作为对照.混合物室温静置反应 0.5 h,即实现标记.

为确定 QDs 和 PrP^C 的结合比,取多份 10 μL QDs(浓度为 9.74×10^{-6} mol/L)溶液,然后分别加入适量 PrP^C,使溶液中 PrP^C 与 QDs 最终浓度比为 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1 和 6 : 1,反应 0.5 h 后,用 F-4500 型荧光仪记录 PrP^C-QDs 荧光光谱,激发波长取 260 nm,狭缝宽度为 5 nm.

2 结果与讨论

2.1 QDs 与 PrP^C-QDs 荧光谱图

图 1(a)为 310 nm 紫外灯激发下 QDs 与 PrP^C-QDs 照片,可以明显看出 PrP^C-QDs 的荧光比单纯 QDs 强.加入 PrP^C 后,量子点发射峰峰型和峰宽均无明显变化(图 1(b)),说明标记以后复合物仍然保持量子点发射光谱窄而对称的特征.同时荧光强度由原来的 398.4 增加到 1 277.0,增强了两倍多,荧光强度变化与有关文献报道相一致^[13-17]. PrP^C 将量子点表面包覆后,一方面对量子点的表面起到钝化作用,有效去除了量子点表面缺陷,使得深阱荧光减少,提高了量子点发光强度;另一方面通过包覆使量子点不易受外界条件干扰,荧光得到保护,因而荧光强度显著增强.



(a) 310 nm 紫外灯激发下的荧光成像

(b) 荧光发射光谱

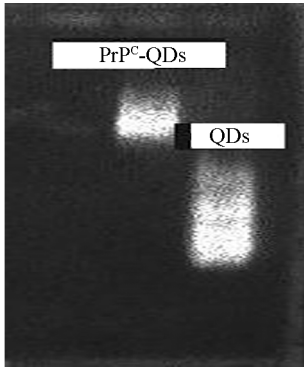
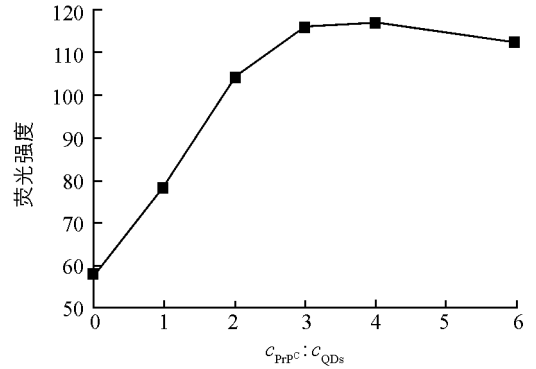
图 1 QDs 和 PrP^C-QDs 的荧光比较

2.2 PrP^C-QDs 凝胶成像图

0.5% 琼脂糖凝胶电泳,在 100 V 恒压模式下电泳 30 min,FluorchemTM 8900 图像分析仪上观察 QDs 与 PrP^C 标记情况(图 2). PrP^C-QDs 的迁移速率明显小于 QDs,这是由于一方面 PrP^C-QDs 复合物的质量和体积比游离量子点要大,导致迁移速率变慢;另一方面 PrP^C 在实验条件下荷正电,量子点表面荷负电,PrP^C 与 QDs 表面结合后,QDs 表面电荷密度减小,也造成 PrP^C-QDs 迁移速率减慢.

2.3 PrP^C 与 QDs 结合比的确定

如图 3 所示,随着 PrP^C 浓度的增加,PrP^C-QDs 荧光强度初始逐渐增强,后来慢慢趋于稳定,说明二者反应完全.由图 3 可知 PrP^C 和 QDs 的结合比为 3 : 1,即每个 QDs 表面结合 3 个 PrP^C 分子.据有关文献报道,一分子二巯基辛酸修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点约结合 12~15 个麦芽糖结合蛋白(MBP)^[18],实验中 MBP 的碳端被预先连接组氨酸五聚体片段,形成 MBP-5HIS,然后依靠这个组氨酸尾巴与量子点相结合.本研究依据 PrP^C 中 4 个八肽重复序列中含有的 4 个组氨酸,以及 96 位和 111 位的组氨酸,实现蛋白与量子点的结合,这种定位结合使得整个 PrP^C 分子都包裹在 QDs 表面,而非单单尾部相接,所以结合的蛋白数目较少.

图 2 QDs 和 PrP^c-QDs 琼脂糖凝胶电泳的发光成像图 3 不同浓度比下 PrP^c-QDs 的荧光强度

3 结 论

用二巯基辛酸修饰的 CdSe/ZnS 水溶性量子点标记朊蛋白, 确定结合比约为 3 : 1, 并通过荧光光谱、琼脂糖凝胶电泳对标记结果进行验证, 实验结果证明量子点和朊蛋白成功偶联. 这种方法的优势在于根据朊蛋白自身所带组氨酸与量子点表面锌离子的特异性结合实现定位点标记, 同时又无需在蛋白后面附加“-His tag”, 也不用加 EDC, NHS 等偶联剂, 操作简便、快速, 又有效地避免了复杂操作中蛋白失活的可能, 因此为进一步深入研究朊蛋白提供了一种简便可行的标记手段.

参考文献:

- [1] MICHALET X, PINAUD F F, BENTOLILA L A, et al. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics [J]. *Science*, 2005, 307(5709): 538–544.
- [2] DUBERTRET B, SKOURIDES P, NORRIS D J, et al. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles [J]. *Science*, 2002, 298(5599): 1759–1762.
- [3] MANAIA E B, KAMINSKI R C K, CAETANO B L, et al. Surface Modified Mg-Doped ZnO QDs for Biological Imaging [J]. *European Journal of Nanomedicine*, 2015, 7(2): 109–120.
- [4] VU T Q, LAM W Y, HATCH E W, et al. Quantum Dots for Quantitative Imaging: From Single Molecules to Tissue [J]. *Cell and Tissue Research*, 2015, 360(1): 71–86.
- [5] LIN Z, CUI S, ZHANG H, et al. Studies on Quantum Dots Synthesized in Aqueous Solution for Biological Labeling via Electrostatic Interaction [J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 319(2): 239–243.
- [6] BAILEY R E, SMITH A M, NIE S. Quantum dots in biology and medicine [J]. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 2004, 25(1): 1–12.
- [7] ZHANG C Y, GONG Y X, MA H, et al. Trichosanthin Induced Calcium-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species in Human Choriocarcinoma Cells [J]. *Analyst*, 2000, 125(9): 1539–1542.
- [8] WILLIAMS E S, MILLER M W. Chronic Wasting Disease in Deer and Elk in North America [J]. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 2002, 21(2): 305–316.
- [9] LEONTIDES S, PSYCHAS V, ARGYROUDIS S, et al. A Survey of More Than 11 Years of Neurologic Diseases of Ruminants with Special Reference to Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) in Greece [J]. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 2000, 47(4): 303–309.
- [10] BUDKA H, GOOSSENS B, RU G. BSE and TSEs: Past, Present and Future [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, 19(S1): S34–S39.
- [11] 高梅, 郑鹤志, 隆异娟, 等. 多臂 CdS 纳米棒的合成、表征及修饰 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 36(2): 69–71.
- [12] LIANG L, LONG Y, ZHANG H, et al. Visual Detection of Prion Protein Based on Color Complementarity Principle [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 50: 14–18.
- [13] GOLDMAN E R, MATTOUSSI H, ANDERSON G P, et al. Fluoroimmunoassays Using Antibody-Conjugated Quan-

- tum Dots [M]. Nano Biotechnology Protocols. Humana Press, 2005: 19–34.
- [14] UYEDA H T, MEDINTZ I L, JAISWAL J K, et al. Synthesis of Compact Multidentate Ligands to Prepare Stable Hydrophilic Quantum Dot Fluorophores [J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(11): 3870–3878.
- [15] MEDINTZ I L, CLAPP A R, BRUNEL F M, et al. Proteolytic Activity Monitored by Fluorescence Resonance Energy Transfer Through Quantum-Dot-Peptide Conjugates [J]. Nature Materials, 2006, 5(7): 581–589.
- [16] SHIBU E S, HAMADA M, NAKANISHI S, et al. Photoluminescence of CdSe and CdSe/ZnS Quantum Dots: Modifications for Making The Invisible Visible at Ensemble and Single-Molecule Levels [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2014, 263: 2–12.
- [17] PONS T, MEDINTZ I L, WANG X, et al. Solution-Phase Single Quantum Dot Fluorescence Resonance Energy Transfer [J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(47): 15324–15331.
- [18] MATTOUSSI H, MAURO J M, GOLDMAN E R, et al. Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using An Engineered Recombinant Protein [J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(49): 12142–12150.

Labeling Prion Protein with CdSe/ZnS Quantum Dots

YANG Li-li, HAO Jian-yu, ZHENG Hu-zhi, LONG Yi-juan

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Water-soluble CdSe/ZnS quantum dots were used to label Prion Protein (PrP^C) through metal-histidine coordination. The fluorescence spectrum, agarose gel electrophoresis and their binding ratio of PrP^C-QDs were studied in this paper. The fluorescence intensity of PrP^C-QDs increases more than two-fold compared with QDs and their binding ratio is 3 : 1. This method achieved location labeling quickly and easily. A new labeling method was proposed for further study on prion protein.

Key words: quantum dots; labeling; Prion Protein

责任编辑 潘春燕

