DOI: 10.13718/j. cnki. xdzk. 2018.03.019

# ·碲化镉量子点与朊蛋白相互作用研究<sup>®</sup>

## 张凌燕<sup>1</sup>, 隆异娟<sup>2</sup>

1. 包头医学院 公共卫生学院, 内蒙古 包头 014040; 2. 西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

摘要:碲化镉量子点(CdTe QDs)与重组型朊蛋白(rPrP)相互作用时,rPrP 会诱导 CdTe QDs 发生聚集,引起 CdTe QDs 荧光显微镜成像、紫外-可见吸收光谱和荧光光谱发生改变.而 CdTe QDs 会加速 rPrP 纤维化,引起硫磺素 T (ThT)荧光明显增强和刚果红(Congo Red)紫外-可见吸收光谱红移.

关键词:量子点; 朊蛋白;聚集; 纤维化

**中图分类号: 0657** 文献标志码: A 文章编号: 1673-9868(2018)03-0127-06

量子点(quantum dots, QDs)作为一类性能优良的纳米材料被广泛运用于免疫分析、活体分析、蛋白 质标记和 DNA 检测等纳米生物医学领域<sup>[1-5]</sup>.当 QDs 进入生物体后,可能会与生物体内蛋白质结合,从而 导致蛋白质的构象和功能发生重大变化<sup>[6-7]</sup>.当 QDs 表面聚集大量蛋白质时,会引起蛋白质局部浓度过 高,从而导致蛋白质活性发生变化,增加其聚集和纤维化出现的可能性,甚至加速纤维化<sup>[8-9]</sup>.

朊蛋白(Prion Protein, PrP)是导致可传播的致死性神经退行性海绵状脑病(TSEs)的罪魁祸首,其致 病机理是基于正常型的 PrP 发生错误折叠,α螺旋结构减少,β折叠结构增加,形成富含β-片层的抗蛋白 酶水解的致病型 PrP<sup>[10-11]</sup>.由于致病型 PrP 有强烈的聚集倾向,会逐渐形成淀粉样纤维和淀粉样斑块,最 终发展为可被临床诊断的大脑海绵状退化变性疾病<sup>[12-13]</sup>.

本研究以巯基乙酸为修饰剂,合成了荧光性能良好的水溶性 CdTe QDs,并从表达 PrP 的大肠杆菌 体内提取纯化了重组型 PrP(rPrP).其次,以 CdTe QDs 和 rPrP 的相互作用体系为研究模型,通过紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、荧光倒置显微镜成像以及硫磺素 T(ThT)和刚果红(Congo Red)检测蛋白质 纤维化等技术,对二者相互作用过程中 rPrP 诱导的 CdTe QDs 聚集和 CdTe QDs 对 rPrP 纤维化的影响 进行了研究.

#### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

仪器:NU-201-430E 超净工作台(美国 NUAIRE 公司);手提式不锈钢蒸汽消毒器(上海三申医疗器械 有限公司);pHS-4C 型酸度计(成都方舟科技开发公司);LRH-250-Z 振荡培养箱(常州澳华仪器有限公 司);Z383K 高速台式冷冻离心机(德国 HERMLE 公司);Y92-IIN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技 股份有限公司);JB-3 定时恒温磁力搅拌器(金坛市富华仪器有限公司);砂芯过滤装置(上海申迪玻璃仪器 有限公司);HL-2 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂);镍柱(上海华美实验仪器厂);PY-120 水平脱色摇床(北

① 收稿日期: 2017-09-12

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2016MS(LH)0827);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY16217);包头市科技计划 项目(CX2017-50);包头医学院科学研究基金项目(BYJJ-QM201639).

作者简介:张凌燕(1986-),女,内蒙古人,讲师,硕士研究生,主要从事发光分析及纳米毒理学研究.

京鼎国生物科技有限公司); UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); F-4500 型荧光分光光度计 (日本日立公司); OLYMPUSix70 倒置式系统显微镜(奥林巴斯公司); 电子倍增型冷 CCD 系统(ANDOR 公司); JEOL 2010 透射电子显微镜(日本电子株式会社).

试剂:表达 rPrP 的大肠杆菌菌种(武汉大学病毒学国家重点实验室肖庚富教授赠送);CdCl<sub>2</sub> • 2.5H<sub>2</sub>O (成都化学试剂厂);碲粉(国药集团化学试剂有限公司);巯基乙酸(上海强顺化学试剂有限公司);硫磺素 T(比利时 ACROS ORGANICS 公司);刚果红(北京鼎国生物技术有限责任公司).纯化 rPrP 所需试剂 (Genview 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 MΩ 的超纯水(Milli-Q-Plus 系统所制).

### 1.2 实验方法

1.2.1 CdTe QDs 的制备

以巯基乙酸修饰的 CdTe QDs 的制备方法见文献[14].

1.2.2 rPrP 的提取及纯化

从表达 rPrP 的大肠杆菌菌种中提取和纯化 rPrP 的方法见文献[14],得到的 rPrP 的浓度通过 Bradl-rord 蛋白定量试剂盒测定,于4 ℃保存.

1.2.3 CdTe QDs 溶液加入 rPrP 前后的荧光显微镜成像

在 pH = 7.0 的 PBS 缓冲溶液中加入  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L 的 CdTe QDs 溶液,然后加入 320 nmol/L rPrP. 分别取加入 rPrP 前后的 CdTe QDs 溶液 10  $\mu$ L 滴在盖玻片中央,置于荧光显微镜载物台上,使用 OLYMPUS  $100 \times$  油浸物镜(数值孔径为 1.3), U-MWB2 滤光片(460-490/500/520 nm)进行观察,并且 选择适当视野使用 Canon PowerShot A630 照相机拍下 CdTe QDs 溶液加入 rPrP 前后的荧光显微镜成像. 1.2.4 CdTe QDs 溶液加入 rPrP 前后的紫外-可见吸收光谱的测定

在 pH = 7.0 的 PBS 缓冲溶液中加入  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L 的 CdTe QDs 溶液, 然后加入 320 nmol/L rPrP, 10 000 r/min(离心半径为 8.5 cm)离心 10 min 后, 采用 UV-2450 紫外-可见分光光度计分别测定离 心后的 CdTe QDs 溶液和加入 rPrP 的 CdTe QDs 溶液的紫外-可见吸收光谱.

1.2.5 CdTe QDs 溶液加入 rPrP 前后的荧光光谱的测定

在 pH = 7.0 的 PBS 缓冲溶液中加入  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L 的 CdTe QDs 溶液, 然后加入 320 nmol/L rPrP, 采用 F-4500 型荧光分光光度计分别测定 CdTe QDs 溶液和加入 rPrP 后的 CdTe QDs 溶液的荧光光谱. 荧光激发波长为 360 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm.

1.2.6 ThT 测定 CdTe QDs 和 rPrP 混合物的纤维化程度

配制 1 mmol/L 的 ThT 储备液 4 ℃避光保存,使用时稀释至 30 μmol/L. 采用 F-4500 型荧光分光光度 计测定 rPrP 和 rPrP-QDs 溶液 40 ℃孵育 4 h 后引起的 ThT 荧光的变化. 荧光激发波长为 440 nm,激发和 发射狭缝宽度均为 10 nm.

1.2.7 Congo Red 测定 CdTe QDs 和 rPrP 混合物的纤维化程度

配制 50 μmol/L 的 Congo Red 储备液 4 ℃避光保存,使用时稀释至 10 μmol/L. 采用 UV-2450 紫 外-可见分光光度计测定 rPrP 和 rPrP-QDs 溶液 40 ℃孵育 4 h 后引起的 Congo Red 紫外-可见吸收光 谱的变化.

# 2 结果与讨论

#### 2.1 rPrP 诱导的 CdTe QDs 聚集

2.1.1 荧光显微镜成像

在荧光显微镜下可以观察到,CdTe QDs 溶液呈现较明亮的绿色荧光,且大部分粒子独立存在,均匀分散于溶液中;而加入 rPrP 后的 CdTe QDs 溶液中出现很多由多个 CdTe QDs 组成的聚集体,呈现很强的荧光,且由于聚集后颗粒之间距离的缩短和偶极相互作用,部分较大的团聚体呈现橙色荧光(图 1).这表

明,加入rPrP后,CdTeQDs可能发生了聚集.



(a) CdTe ODS溶液



(b) 加入rPrP后的CdTe QDs溶液

C<sub>CdTe QDs</sub>=1.0×10<sup>-6</sup> mol/L, C<sub>rPrP</sub>=320 nmo/L, 拍摄焦距为 17 nm, 照片大小为 16.5 µm×12.4 µm.

```
图 1 CdTe QDs 溶液及加入 rPrP 后的 CdTe QDs 溶液荧光显微镜成像
```

2.1.2 紫外-可见吸收光谱的变化

为了进一步证实加入 rPrP 后的 CdTe QDs 发生聚集的现象,按照 1.2.4 的实验条件,分别检测了离心 后的 CdTe QDs 上清溶液和离心后的加入 rPrP 的 CdTe QDs 上清溶液的紫外-可见吸收光谱.结果发现, CdTe QDs 上清溶液的紫外-可见吸收光谱的最大吸收波长在 523 nm,而加入 rPrP 后的 CdTe QDs 上清溶液的紫外-可见吸收光谱的最大吸收波长在 519.5 nm,即蓝移 3.5 nm(图 2).

这表明,尽管本研究所合成的 CdTe QDs 粒径较均匀,但其中仍然含有一系列粒径不同的 CdTe QDs, 且粒径较大的 CdTe QDs 的最大吸收波长比粒径较小的 CdTe QDs 的最大吸收波长长.当加入 rPrP 后,部 分粒径较大的 CdTe QDs 会优先发生聚集,形成粒径更大的聚集体,经 10 000 r/min(离心半径为 8.5 cm) 离心 10 min 后沉淀.因此,在加入 rPrP 后的 CdTe QD 上清溶液中,由于除去了部分粒径较大的 CdTe QDs,因而最大吸收波长会较 CdTe QDs 上清溶液发生蓝移.

2.1.3 荧光光谱的变化

按 1.2.5 的实验条件,分别检测了 CdTe QDs 溶液和加入 rPrP 后的 CdTe QDs 溶液的荧光光谱.结果 发现,CdTe QDs 溶液的荧光光谱窄而对称,荧光最大发射波长在 551 nm 处;而加入 rPrP 后,溶液的荧光 强度显著增强,荧光光谱转变为宽而连续的两个峰,且荧光最大发射波长红移至 580 nm(图 3).



溶液荧光光谱的变化可能是由于 rPrP 的加入使得部分 CdTe QDs 颗粒之间的距离缩短,偶极-偶极相 互作用增强,荧光最大发射波长比单独的 CdTe QDs 荧光最大发射波长长<sup>[15]</sup>.因此,当聚集体的荧光峰与 单独的 CdTe QDs 的荧光峰叠加在一起时,就形成了宽而连续的两个峰.而溶液荧光强度的增强可能是由于 rPrP 将 CdTe QDs 表面包覆,一方面钝化了 CdTe QDs 表面,有效去除了 CdTe QDs 表面缺陷,从而使得 CdTe QDs 荧光增强;另一方面通过 rPrP 的包覆使 CdTe QDs 不易受外界条件干扰,自身荧光得到保护,因而荧光强度增强<sup>[16-17]</sup>.

### 2.2 CdTe QDs 对 rPrP 纤维化的影响

2.2.1 ThT 检测 CdTe QDs 对 rPrP 纤维化的影响

ThT 被广泛运用于检测纤维中β折叠结构的存在,通过检测 ThT 荧光强度的变化可以判断纤维结构 的变化.由于黄绿色发射的 CdTe QDs(λ<sub>em</sub>=551 nm)的荧光光谱与 ThT 的荧光光谱有部分重合,会干扰 ThT 荧光强度的测定,故使用同浓度的红色发射的 CdTe QDs(λ<sub>em</sub>=591 nm)与 rPrP 相互作用.

研究发现,与CdTeQDs溶液混合后,ThT的荧光强度几乎没有发生变化;与rPrP混合后,ThT的荧 光强度略有增强;而当与rPrP-QDs混合溶液混合后,ThT的荧光强度有明显增强.这表明,在没有CdTe QDs存在下,rPrP在pH=7.0的PBS缓冲溶液中40℃孵育4h后已经开始纤维化,但因纤维化程度较低,引起ThT荧光强度的变化不明显;而将CdTeQDs加入到rPrP溶液中混合孵育后,由于CdTeQDs 大的表面区域为rPrP纤维化过程中最关键的成核作用提供了平台,使得rPrP很快在CdTeQDs表面聚 集,加速了rPrP纤维化进程,使得ThT荧光有较明显增强<sup>[18]</sup>(图4).

2.2.2 Congo Red 检测 CdTe QDs 对 rPrP 纤维化的影响

Congo Red 溶液紫外-可见吸收光谱的最大吸收波长为 484 nm,当加入 rPrP 孵育 4 h 后,溶液吸光度 最大的波长范围变为 484~490 nm;而当加入 rPrP-QDs 混合溶液孵育 4 h 后,溶液的紫外-可见吸收光谱 发生红移,且溶液吸光度最大的波长范围为 492~510 nm.这表明,在没有 CdTe QDs 存在时,单纯的 rPrP 纤维化程度较低,由于 Congo Red 检测纤维化的灵敏度没有 ThT 高,少量的纤维化只能引起 Congo Red 最大吸收波长范围变宽,而不能引起 Congo Red 紫外-可见吸收光谱红移;而当加入一定量的 CdTe QDs 后,由于 CdTe QDs 加速了 rPrP 的纤维化,体系中产生了较多的 rPrP 纤维,导致 rPrP 纤维与 Congo Red 之间发生明显相互作用,引起 Congo Red 的 π 电子体系扩展以及发生构象变化,从而导致紫外-可见吸收 光谱的红移<sup>[19]</sup>(图 5).



2.2.3 CdTe QDs 和 rPrP 之间相互作用机理

rPrP 的等电点是 10,在 pH=7.0 溶液中,带正电荷的 rPrP 和带负电荷的巯基乙酸修饰的 CdTe QDs 之间存在静电作用<sup>[20-21]</sup>. Vanik 等人研究发现,rPrP 自身不稳定,即使在生理缓冲条件下也会形成一些纤 维状结构的低聚物和一些无规则的聚集体<sup>[22]</sup>. Wu 等还发现纳米粒子可以显著增强蛋白质纤维化或纤维形 成的速率<sup>[23]</sup>. 因此, CdTe QDs 和 rPrP 之间相互作用机理可能是二者通过静电作用先形成低聚物结构. 这 种低聚物作为"种子",能够吸引溶液中游离的 CdTe QDs 继续吸附在其外层,形成更大的聚集体.在聚集过程中,CdTe QDs 间距离缩短,发生聚集;而 rPrP 则聚集形成纤维和淀粉样斑块.

### 3 结 论

以巯基乙酸修饰的 CdTe QDs 与 rPrP 相互作用,发现 rPrP 的存在会导致 CdTe QDs 发生聚集,引起 CdTe QDs 荧光颜色、紫外-可见吸收光谱和荧光光谱发生改变.与此同时,CdTe QDs 还会加速 rPrP 的纤 维化,引起 ThT 荧光明显增强和 Congo Red 紫外-可见吸收光谱红移.

#### 参考文献:

- KUANG H, ZHAO Y, MA W, et al. Recent Developments in Analytical Applications of Quantum Dots [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2011, 30(10): 1620-1636.
- [2] HÄRMÄ H, PIHLASALO S, CYWINSKI P J, et al. Protein Quantification Using Resonance Energy Transfer between Donor Nanoparticles and Acceptor Quantum Dots [J]. Anal Chem, 2013, 85(5): 2921-2926.
- [3] 杨利利,郝建玉,郑鹄志,等.CdSe/ZnS核壳型量子点标记朊蛋白的研究[J].西南大学学报(自然科学版),2016, 38(5):76-79.
- [4] ZHANG P F, LIU S H, GAO D Y, et al. Click-Functionalized Compact Quantum Dots Protected by Multidentate-Imidazole Ligands: Conjugation-Ready Nanotags for Living-Virus Labeling and Imaging [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(20): 8388-8391.
- [5] 杨文雨,罗凡雨,朱姗姗,等.以葡萄糖为碳源的荧光碳点构建 Hg<sup>2+</sup>的检测方法 [J].西南师范大学学报(自然科学版),2014,39(10):81-86.
- [6] ROACH P, FARRAR D, PERRY C C. Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry [J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(12): 3939-3945.
- [7] AGUZZI A, O'CONNOR T. Protein Aggregation Diseases: Pathogenicity and Therapeutic Perspectives [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(3): 237-248.
- [8] LUNDQVIST M, SETHSON I, JONSSON B H. High-Resolution 2D <sup>1</sup>H—<sup>15</sup> N NMR Characterization of Persistent Structural Alterations of Proteins Induced by Interactions with Silica Nanoparticles [J]. Langmuir, 2005, 21(13): 5974-5979.
- [9] PIHLASALO S, KIRJAVAINEN J, HANNINEN P, et al. High Sensitivity Luminescence Nanoparticle Assay for the Detection of Protein Aggregation [J]. Anal Chem, 2011, 83(4): 1163-1166.
- [10] MOORE R A, TAUBNER L M, PRIOLA S A. Prion Protein Misfolding and Disease [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2009, 19(1): 14-22.
- [11] JAIN S, UDGAONKAR J B. Evidence for Stepwise Formation of Amyloid Fibrils by the Mouse Prion Protein [J]. J Mol Biol, 2008, 382(5): 1228-1241.
- [12] SOTO C, SABORIO G P. Prions: Disease Propagation and Disease Therapy by Conformational Transmission [J]. Trends Molecular Medicine, 2001, 7(3): 109-114.
- [13] LU X J, WINTRODE P L, SUREWICZ W K. β-Sheet Core of Human Prion Protein Amyloid Fibrils as Determined by Hydrogen/Deuterium Exchange [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(5): 1510-1515.
- [14] ZHANG L Y, ZHENG H Z, LONG Y J, et al. CdTe Quantum Dots as a Highly Selective Probe for Prion Potein Detection: Colorimetric Qualitative, Semi-Quantitative and Quantitative Detection [J]. Talanta, 2011, 83: 1716-1720.
- [15] DÖLLEFELD H, WELLER H, EYCHMULLER A. Particle-Particle Interactions in Semiconductor Nanocrystal Assemblies [J]. Nano Letters, 2001, 1(5): 267-269.
- [16] MEDINTZ I L, CLAPP A R, MATTOUSSI H, et al. Self-Assembled Nanoscale Biosensors Based on Quantum Dot FRET Donors [J]. Nature Materials, 2003, 2(9): 630-638.
- [17] CLAPP A R, MEDINTZ I L, MAURO J M, et al. Fluorescence Resonance Energy Rransfer between Quantum Dot Donors and Dye-Labeled Protein Acceptors [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(1): 301-310.

- [18] COLVIN V L, KULINOWSKI K M. Nanoparticles as Catalysts for Protein Fibrillation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(21): 8679-8680.
- [19] MIURA T, YAMAMIYA C, SASAKI M, et al. Binding Mode of Congo Red to Alzheimer's Amyloid β-Peptide Studied by UV Raman Spectroscopy [J]. J Raman Spectrosc, 2002, 33(7): 530-535.
- [20] LI J, HE X W, WU Y L, et al. Determination of Lysozyme at the Nanogram Level by a Resonance Light-Scattering Technique with Functionalized CdTe Nanoparticles [J]. Anal Sci, 2007, 23(3): 331-335.
- [21] CAO M, CAO C, LIU M G, et al. Selective Fluorometry of Cytochrome C Using Glutathione-Capped CdTe Quantum Dots in Weakly Basic Medium [J]. Microchim Acta, 2009, 165: 341-346.
- [22] VANIK D L, SUREWICZ W K. Disease-Associated F198S Mutation Increases the Propensity of the Recombinant Prion Protein for Conformational Conversion to Scrapie-Like Form [J]. J Biol Chem, 2002, 277(50): 49065-49070.
- [23] WU W H, SUN X, YU Y P, et al. TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Promote β-Amyloid Fibrillation in Vitro [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373(2): 315-318.

# Study on the Interaction of CdTe Quantum Dots with Prion Protein

# ZHANG Ling-yan<sup>1</sup>, LONG Yi-juan<sup>2</sup>

1. School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou Neimenggu 014040, China;

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

**Abstract**: When CdTe QDs interact with rPrP, the latter will induce CdTe QDs aggregates, thus resulting in changes of CdTe QDs fluorescent microscopic imaging, UV-Vis absorption spectra and fluorescence spectra. Meanwhile, CdTe QDs can accelerate rPrP fibrosis, causing obvious enhancement of thioflavine T fluorescence and inducing a red shift of the Congo Red UV-Vis absorption spectra. **Key words**: quantum dot; prion protein; aggregation; fibrosis

责任编辑 潘春燕