

羧基水溶性量子点在鼻咽癌标志物 EBNA1 标记中的应用*

何 剑, 吴 平, 徐 婧, 米日喀米力·玉苏甫, 廖玲凤, 全华涛, 张 帅, 田勇泉, 唐瑶云[△](中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科/耳鼻咽喉重大疾病湖南省重点实验室, 长沙 410008)

【摘要】目的 探讨 605 nm 羧基水溶性量子点在鼻咽癌标志物 EB 病毒核抗原 1(EBNA1)中的标记方法。**方法** 将 605 nm 羧基水溶性量子点和鼻咽癌 EBNA1 在 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的作用下共价交联,生成量子点标记的抗原,对标记后的抗原采用紫外可见吸收谱、荧光光谱测定,琼脂糖凝胶电泳分析。**结果** 羧基水溶性量子点与鼻咽癌 EBNA1 抗原通过表面氨基与羧基缩合形成的稳定共价键,羧基水溶性量子点与鼻咽癌 EBNA1 抗原之间实现了成功连接,标记后荧光发射光谱检测结果表明,标记后的量子点 EBNA1 溶液的发射峰位置在 380 nm 附近,保持良好的荧光特性。**结论** 605 nm 羧基水溶性量子点采用共价交联法可稳定标记鼻咽癌标志物 EBNA1,为后续研究提供可靠依据。

【关键词】 羧基水溶性量子点; 鼻咽癌; EBNA1; 共价交联法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.06.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)06-0721-03

Application of carboxyl water-soluble quantum dots in nasopharyngeal carcinoma marker EBNA1 labeling* HE Jian, WU Ping, XU Jing, Mirikamili·Yusupu, LIAO Ling-feng, QUAN Hua-tao, ZHANG Shuai, TIAN Yong-quan, TANG Yao-yun[△] (Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital, Central South University/ Hunan Provincial Key Laboratory of Otolaryngology Major Diseases, Changsha, Hunan 410008, China)

【Abstract】Objective To explore the marking method of 605 nm carboxyl water-soluble quantum dots in nasopharyngeal carcinoma marker EBNA1. **Methods** The 605 nm carboxyl water-soluble quantum dots and nasopharyngeal carcinoma EBNA1 antigen were performed the covalent cross-linking under the action of 1-(3-dimethyl amino propyl)-3-2 ethyl carbon imine hydrochloride, the quantum dots labeled antigen was generated, then the labeled antigen was detected by UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectrometry and agarose gel electrophoresis analysis. **Results** The stable covalent bond formation of carboxyl water-soluble quantum dots with nasopharyngeal carcinoma EBNA1 antigen by the surface amino and carboxyl condensation on was found, the carboxyl water-soluble quantum dots achieved the successful connection with EBNA1 nasopharyngeal carcinoma antigen, the labeled fluorescence emission spectrum detection results showed that the emission peak position of the labeled quantum dots EBNA1 solution was near 380 nm, keeping good fluorescence properties. **Conclusion** The 605 nm carboxyl water-soluble quantum dots can stably label nasopharyngeal carcinoma marker EBNA1 by adopting the covalent cross-linking method to provide reliable basis for subsequent research.

【Key words】 carboxyl water-soluble quantum dots; nasopharyngeal carcinoma; EBNA1; covalent cross-linking method

量子点又称半导体纳米晶,主要由 II ~ IV 族元素(如 Cdse、Cds 等)或 III ~ V 族元素(如 InP、InAs)组成,其粒径小于 100 nm,由于其晶体核心的存在,在宽频紫外光的激发下可发射特定颜色的荧光^[1-2]。量子点主要分为亲水性和疏水性两种,医学领域应用的量子点常常是亲水性的,且为了与其他生物蛋白分子结合,在量子点表面带有氨基或羧基基团^[3]。应用于生物医学科学的量子点要求具有水溶性、荧光强、非特异性吸附低等特点,量子点的功能化修饰主要是把抗体、多肽、寡核苷酸、生物素等修饰在量子点表面,修饰方法主要包括静电吸附、共价耦联、非特异性吸附、巯基交换 4 种,其中共价耦联法是最常用、最稳定的方法。因此本文采用羧基化的水溶性量子点作为发光材料,采用共价交联法与 EB 病毒核抗原 1(EBNA1)进行耦联。相对于传统的有机荧光分子材料,量子

点具有如下优点:(1)激发光谱宽而连续,吸光系数大,量子产率高;(2)发射光谱窄而对称,无拖尾现象;(3)荧光强度高,信噪比高;(4)光稳定性好,抗光漂白能力强;(5)发射波长随粒径大小改变。由于其独特的化学和光学特性,量子点逐渐应用于肿瘤生物医学领域^[4-9]。本文就羧基水溶性量子点用于标记鼻咽癌标志物 EBNA1 做了初步研究,并表明量子点已成功标记 EBNA1。

1 材料与方法

1.1 量子点标记 EBNA1

1.1.1 样品预处理 将北新化成公司购买的 EBNA1 从 -20 °C 冰箱中取出,常温解冻后溶解于缓冲溶液(20 mmol/L Borate, pH7.4)中,采取截留相对分子质量 10×10^3 的超滤管超滤除去杂质,样品终浓度为 2.2 mg/mL。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170923)。

作者简介:何剑,男,博士,住院医师,主要从事头颈肿瘤基础与临床方面的研究。 △ 通讯作者,E-mail:373198721@qq.com。

1.1.2 样品用量 见表1。

表1 样品用量信息(n/n)

抗原性状	抗原/量子点	荧光最大发射峰(nm)	荧光全半峰宽(nm)
溶液A	10:1	605	24
溶液B	40:1	605	24

1.1.3 标记方法 羧基水溶性量子点(Q3605)和EBNA1在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的作用下共价交联,生成量子点标记的抗原,采取截留相对分子质量 100×10^3 的超滤管除去未反应的抗原和其他杂质,终产物保存于50 mmol/L borate, pH8.4, 0.05% NaN₃。

1.2 反应原理 本研究所使用的交联剂为EDC,其反应原理为羧基水溶性量子点上的-COOH先被交联剂EDC活化,形成一个中间产物,中间产物再与EBNA1上的-NH₂反应,最终在EBNA1与量子点之间形成稳定的共价键。

1.3 荧光光谱测定条件 荧光激发波长:380 nm,扫描步长:1 nm;温度:室温;溶剂:50 mmol/L borate, pH8.4, 0.05% NaN₃。

1.4 紫外可见吸收谱和荧光光谱测定条件 紫外扫描波长范围:450~700 nm,扫描间距:0.5 nm,扫描速度:高速;参比溶液:50 mmol/L borate, pH8.4, 0.05% NaN₃。

1.5 凝胶电泳测定条件 电泳缓冲液:0.5×TAE;凝胶浓度:1% Agarose;电压:140 V;电流:80 mA;时间:40 min。

2 结 果

2.1 标记后的量子点 EB病毒核抗原1(QD-EBNA1)发射光谱图 标记后QD-EBNA1溶液的发射峰位置在380 nm附近。见图1。

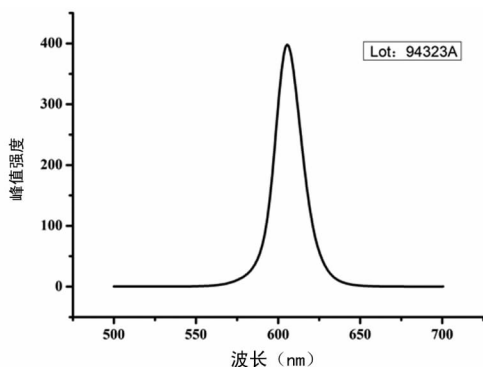


图1 量子点标记的抗原荧光发射光谱图

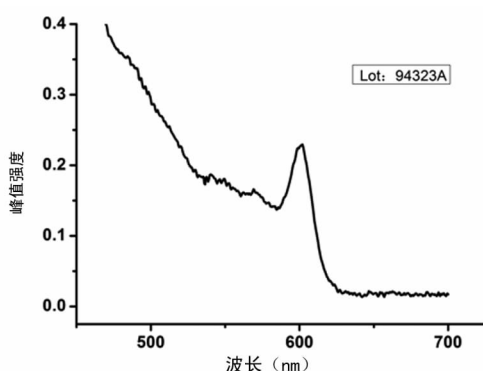


图2 量子点标记的抗原紫外可见吸收谱图

2.2 量子点标记的抗原紫外可见吸收谱图 标记后的QD-EBNA1紫外可见吸收谱见图2。

2.3 量子点标记后的QD-EBNA1凝胶电泳图 第1泳道表示标记后的QD-EBNA1的凝胶电泳图,第2泳道表示羧基水溶性量子点的凝胶电泳图。见图3。



图3 量子点标记的QD-EBNA1凝胶电泳图(302 nm 激发)

3 讨 论

鼻咽癌是我国南方沿海及湖南湘西等地常见的恶性肿瘤,发病率最高可达30/10万,居耳鼻咽喉头颈外科恶性肿瘤之首。由于鼻咽部解剖结构复杂,鼻咽癌不易早期发现,临床上收治的患者中只有10%~20%属于早期,一旦出现明显症状就诊,多已处于中晚期,因此,鼻咽癌早期诊断尤为重要。鼻咽癌与EBV感染具有一定相关性,临床上用于鼻咽癌的早期诊断主要是检测鼻咽癌患者血清的EB病毒感染情况,如EBVCA IgA, EBNA1, Zta-IgA, EA/IgA等^[10-13]。EBNA1在所有的鼻咽癌患者中都有表达,是鼻咽癌唯一的病毒核蛋白质,它的改变可能是促进癌变的因素之一^[14]。有研究发现,EBNA1可能通过体外诱导的鼻咽癌G₁期细胞周期阻滞,从而抑制鼻咽癌细胞生长^[15]。

纳米科技的迅速发展为肿瘤的早期诊断、个体化治疗、靶向药物治疗及免疫组织化学诊断提供了新的思路。量子点具有独特的光物理和化学性质,作为一种新型的荧光材料结合肿瘤标志物为恶性肿瘤的发病机制、早期诊断、分期及预后监测提供了新的机遇,目前的研究主要集中于特定的肿瘤标志物或有形的载体,如细胞和组织基础上的分子检测。由于量子点具有特有的光物理和光化学特性,使得量子点在生物医学领域被广为应用,其中在细胞成像、活体动物成像、免疫分析技术中得到广泛应用。量子点用于肿瘤早期诊断一直是研究的主要焦点,量子点优越的性能可能影响生物医学成像,科学家对量子点分子探针成像有着极大的兴趣,因为有望进行肿瘤或者转移的早期诊断。量子点技术用于肿瘤中的诊治,一是通过在量子点表面或者内部耦联肿瘤标志物及基因片段或者靶向药物。二是利用量子点独特的光化学和光物理性质,进行细胞成像、活体动物成像等检测,通过与光动力疗法和荧光共振能量转移结合进行治疗。关于量子点在头颈部肿瘤中的报道不多,赵成等^[16]制备了近红外量子点表皮生长因子受体单克隆抗体荧光靶向探针(QD800-EGFR mAb),体外实验表明QD800-EGFR mAb能与U14头颈部移植鳞癌细胞表达的表皮生长因子受体(EGFR)特异性结合,体内活体成像显示QD800-EGFR mAb静脉注射后能对U14头颈部移植鳞癌进行清楚的原位可视化荧光成像,荧光成像一直可以持续24 h,且在1~6 h时间段内肿瘤成像最完整和信噪比最高,说明此技术对头颈部鳞癌的发生发展、原位可视化成像和个体化治疗具有独特的优势和前景。Yang等^[17]先利用U14头颈部鳞癌细胞株高表达表皮生长因子受体之一的EGFR,皮下注入裸鼠体内的头部和颈部区域,建立动物头颈部鳞癌模型,将波长800 nm的量子点与EGFR结合制成QD800-EGFR抗体探针,通过静脉注射可以在裸鼠体内成像,这项技术有望进行头颈部肿瘤的早期诊

断及个体化治疗。Xu 等^[18]采用基于量子点免疫组织化学技术与常规免疫组织化学技术在醛脱氢酶 1 在头颈部鳞癌表达的比较中证实量子点免疫组织化学技术更为敏感和客观。

本研究首次将羧基水溶性量子点应用于鼻咽癌早期诊断的初步研究,将水溶性羧基量子点与交联剂为 EDC 结合,其反应原理为羧基水溶性量子点上-COOH 先被交联剂 EDC 活化,形成一个中间产物,中间产物再与 EBNA1 上的-NH₂ 反应,最终在 EBNA1 与量子点之间形成稳定的共价键。标记后琼脂糖凝胶电泳实验结果表明,羧基水溶性量子点与鼻咽癌 EBNA1 通过表面氨基与羧基缩合形成的稳定共价键,羧基水溶性量子点与鼻咽癌 EBNA1 之间实现了成功连接,也就是说明标记是成功的。标记后荧光发射光谱检测结果表明,标记后的 QD-EBNA1 溶液的发射峰位置在 380 nm 附近,保持良好的荧光特性。本研究为后续研究量子点标记的 EBNA1 奠定了基础。

恶性肿瘤的早期诊断依赖于新的标志物的发现,而免疫检测技术的进步依赖于检测方法的改进,随着纳米科技技术在生物学中的应用,量子点发光技术作为微粒子中的一种,以其独特的光物理和光化学优势,量子点具有粒径小、荧光产率高、连接方法简便、稳定性好等特点,用于样品生物分子检测。与肿瘤标志物相结合,可以作为一种新的发光标记物,有望取代传统的胶体金应用于免疫层析技术,不过量子点在肿瘤早期诊断研究领域的应用还需要大量更为细致的工作。

参考文献

[1] Gwansu Y, Jinhong P, Lee SSB, et al. Anisotropic charge Kondo effect in a triple quantum dot[J]. *Phys Rev Lett*, 2014, 113(23):236601.

[2] Karki KJ, Widom JR, Seibt J, et al. Coherent two-dimensional photocurrent spectroscopy in a PbS quantum dot photocell[J]. *Nat Commun*, 2014, 5:5869.

[3] Blum AS, Moore MH, Ratna BR. Quantum dot fluorescence as a function of alkyl chain length in aqueous environments[J]. *Langmuir*, 2008, 24(17):9194-9197.

[4] Yum K, Wang N, Yu MF. Electrochemically controlled deconjugation and delivery of single quantum dots into the nucleus of living cells[J]. *Small*, 2010, 6(19):2109-2113.

[5] Ebenstein Y, Gassman N, Kim S, et al. Combining atomic force and fluorescence microscopy for analysis of quantum-dot labeled protein-DNA complexes[J]. *J Mol Recognit*, 2009, 22(5):397-402.

[6] Yong KT, Law WC, Hu R, et al. Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies [J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(3):1236-1250.

[7] Liu L, Yong KT, Roy I, et al. Bioconjugated pluronic triblock-copolymer micelle-encapsulated quantum dots for targeted imaging of cancer: in vitro and in vivo studies

[J]. *Theranostics*, 2012, 2(7):705-713.

[8] Folarin E, Ching-Wen C, May JL, et al. Bioconjugation of luminescent silicon quantum dots to gadolinium ions for bioimaging applications[J]. *Nanoscale*, 2012, 4(17):5483-5489.

[9] Rui H, Wing-Cheung L, Guimiao L, et al. Pegylated phospholipid micelle-encapsulated near-infrared PbS quantum dots for in vitro and in vivo bioimaging[J]. *Theranostics*, 2012, 2(7):723-733.

[10] Corey S, Janice T, Leone B, et al. Effective treatment of metastatic forms of Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma with a novel adenovirus-based adoptive immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5):1116-1125.

[11] 季明芳, 郭媛卿, 梁锦胜, 等. 鼻咽癌患者发病前后 EB 病毒 VCA/IgA 和 EA/IgA 滴度动态分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25(3):243-245.

[12] 张晓梅, 钟建明, 汤敏中, 等. EBV4 型 IgA/VCA IgA/EA IgG/EA IgG/ZEBRA 抗体在鼻咽癌普查和早期诊断中的应用[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20(3):263-265.

[13] 蔡永林, 郑裕明, 成积儒, 等. EB 病毒 Rta/IgG、EBNA1/IgA、VCA/IgA 及 EA/IgA 抗体与鼻咽癌分期的关系 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(3):509-511.

[14] Jennifer YC, Sheila M, Lori F. Changes in the nasopharyngeal carcinoma nuclear proteome induced by the EBNA1 protein of Epstein-Barr virus reveal potential roles for EBNA1 in metastasis and oxidative stress responses [J]. *J Virol*, 2012, 86(1):382-294.

[15] 万仁强, 李湘平, 王路, 等. EB 病毒核抗原 1 对鼻咽癌细胞增殖及细胞周期的影响[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(8):675-680.

[16] 赵成, 杨凯, 唐洪, 等. 近红外量子点单克隆抗体荧光探针对于 U14 头颈部移植鳞癌的原位可视化成像研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(2):139-142.

[17] Yang K, Zhao C, Cao YA, et al. In vivo and in situ imaging of head and neck squamous cell carcinoma using near-infrared fluorescent quantum dot probes conjugated with epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in mice[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6):1925-1931.

[18] Xu J, Muller S, Nannapaneni S, et al. Comparison of quantum dot technology with conventional immunohistochemistry in examining aldehyde dehydrogenase 1A1 as a potential biomarker for lymph node metastasis of head and neck cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(11):1682-1691.

(收稿日期:2015-09-25 修回日期:2015-11-15)