

量子点与人源抗谷胱甘肽单链抗体的连接与表征

徐俊杰¹, 王诗雯¹, 赵虹⁴, 陈桂秋⁵, 霍锐¹,
田莉¹, 段玉晶¹, 李敏杰³, 杨柏³, 魏景艳^{1,2}

(1. 吉林大学药学院, 2. 生命科学学院, 分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130021;
3. 吉林大学化学学院, 超分子结构与材料国家重点实验室, 长春 130012;
4. 吉林大学中日联谊医院中心实验室, 5. 病理科, 长春 130031)

摘要 用已构建的表达载体 pPELB-B3, 在大肠杆菌 Rosetta 中可溶性表达人源抗谷胱甘肽(GSH)单链抗体 B3(scFv-B3), 经 Ni²⁺ 螯合亲和层析纯化后, 用点印迹法验证了其 GSH 结合的特异性. 将水相合成的半导体纳米粒子(半导体量子点, QDs)在 *N*-羧基琥珀酰亚胺(NHS)和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)的作用下, 与 scFvs 连接. 光谱分析和膜印迹结果表明, scFvs 成功地共价连接到 QDs 表面, 所得的 QD-scFvs 复合物能够较好地识别 GSH. 荧光显微镜观察 QD-scFvs 与人乳腺癌细胞 MCF-7 的作用结果, 初步判断 QD-scFvs 能够跨膜进入细胞.

关键词 量子点; 人源单链抗体; 谷胱甘肽过氧化物酶(GPX); 共价结合; 印迹

中图分类号 O629.72; Q511

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)03-0506-04

谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)是抗氧化应激酶体系的一个重要成员, 具有消除体内自由基及防止脂质过氧化等作用, 并在许多疾病的治疗中起重要作用^[1]. 但是由于其具有不稳定、来源有限、分子量等特点, 极大地限制了该酶的开发和利用. 基于此, 人们制备了许多该酶的人工模拟物, 尤其是以抗体酶理论为基础制备的一系列能和底物谷胱甘肽(GSH)特异性结合的 GPX 模拟酶^[2~5], 并已证明有较高的酶活性. 在真核细胞中有 60%~75% 的 GPX 存在于胞浆中, 25%~40% 存在于线粒体中^[6], 但是对于 GPX 模拟物进入细胞后的活性定位研究还很少.

荧光标记是生物分析中广泛采用的一种技术手段, 近年来用于生物荧光标记的发光材料日益增多^[7,8], 尤其是具有较高发光效率的半导体量子点(QDs)在生物荧光标记领域的应用已成为研究热点. QDs 标记作为高灵敏度的非同位素荧光分析法, 在细胞标记、生物分子检测及免疫反应分析等方面都取得了许多重要的成果^[9~18]. 与传统的荧光材料相比, QDs 显示出了很多优点: 狭窄对称的荧光谱峰、可调的发射光谱、较宽的激发光谱、很强的抵抗化学和生理降解的作用、较高的光漂白阈值及较好的光稳定性等^[9,10,18]. 本文利用巯基丙酸修饰的水溶性 QDs, 在 NHS 和 EDC 的作用下, 成功标记了人源抗 GSH 单链抗体, 并建立了一种简单直观的膜印迹的方法进行验证, 结果表明, 标记后的单链抗体仍能识别 GSH 分子, 并且能够跨膜进入细胞, 为今后进一步研究人源抗体酶在亚细胞水平的作用部位和抗体类药物在体内的示踪研究奠定了基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

水溶性 QDs 溶液(吉林大学杨柏教授提供, QDs 粒径 2~4 nm, CdTe 表面经巯基丙酸修饰, 溶液

收稿日期: 2008-06-20.

基金项目: 吉林省科学技术厅基金(批准号: 200705380 和 20070726)、中国博士后基金(批准号: 2004036395)和吉林大学本科生创新性实验计划资助.

联系人简介: 魏景艳, 女, 博士, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究. E-mail: jingyanwei@yahoo.com.cn

浓度约 2.0×10^{-6} mol/L; 表达载体 pPELB-B3 (本研究小组构建^[5]); NHS (Cxbio Biotechnology Ltd., 高纯级); EDC (BBI, 超纯级); 牛血清白蛋白 (BSA, Genview).

UV-2550 紫外-可见分光光度计 (日本 Shimadzu); RF-5301PC 荧光分光光度计 (日本 Shimadzu); 紫外分析仪 (北京六一仪器厂).

1.2 人源抗 GSH 单链抗体 B3 的制备及特异性验证

按照文献[5]中的方法制备人源抗 GSH 单链抗体 B3 溶液, 并按照文献[19]中的方法验证其特异性.

1.3 水溶性 QDs 标记人源抗 GSH 单链抗体

取 2 μ L 浓度为 5 μ g/ μ L 的 scFvs 溶液、100 μ L 0.1 mol/L 的 NHS 和 50 μ L 0.1 mol/L 的 EDC 溶液加入到 450 μ L 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4) 中, 用 NaOH 调节 pH 到 8.0, 加入 500 μ L 水溶性 QDs (约 2.0×10^{-6} mol/L), 于 30 $^{\circ}$ C, 70 r/min 慢速振荡 1 h, 得到 QD-scFvs 样品溶液.

1.4 膜印迹法验证 QDs 与 scFvs 的偶连

取 2 μ L 5 μ g/ μ L 的 scFvs 溶液划线于硝酸纤维素 (NC) 膜上, 于 4 $^{\circ}$ C 晾干后, 采用 1.3 节中的反应体系及反应条件进行反应, 反应结束后将 NC 膜取出, 用 PBS 漂洗 3 次, 于紫外分析仪中观察.

1.5 QD-scFvs 吸收光谱及荧光光谱的测定

用 Shimadzu UV-2550 紫外-可见分光光度计测量 QDs、scFvs 以及 QD-scFvs 的吸收光谱, 以各自的溶解缓冲液作空白校正基线. 用 Shimadzu RF-5301PC 荧光分光光度计测量 QD-scFvs 的荧光发射光谱, 激发波长为 380 nm^[20], 以缓冲液调零, 同时测定相同浓度的 QDs 溶液和相同蛋白浓度的 scFvs 溶液作为对照.

1.6 QD-scFvs 对 GSH 的识别

向 QD-scFvs 样品液中加入过量的 BSA, 于 30 $^{\circ}$ C, 70 r/min 慢速振荡反应 30 min, 封闭多余 QDs, 用 Gly 终止反应. 将一定量的 GSH 溶液划线于 NC 膜上, 于 4 $^{\circ}$ C 晾干后, 放入 5% BSA 中于 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 取出放入上述反应体系中, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h. 用 PBS 漂洗 3 次, 于紫外分析仪中观察.

1.7 细胞的培养及荧光显微镜观察 QD-scFvs 进入细胞的状况

将人乳腺癌细胞 (MCF-7) 在 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养, 细胞培养基为 10% 胎牛血清、100 Unit/mL 青霉素和 100 Unit/mL 链霉素的 DMEM 培养基. 预先在六孔细胞培养板中放入无菌盖玻片, 然后将细胞分装入培养板中培养 24 h. 按 1.3 节的方法制备大量 QD-scFvs 溶液, 经 Sephadex-G25 层析除去未结合的 QDs 及其它杂质后加入培养板, 培养 6 h. 将盖玻片取出, 用 PBS 缓冲液洗 3 次后于荧光显微镜下观察.

2 结果与讨论

2.1 人源抗 GSH 单链抗体 B3 的表达、纯化及特异性验证

与 GSH 具有较高亲和力的人源 scFv-B3 的表达结果与文献[5]的结果一致, 采用膜印迹法证明了所制备的 scFv-B3 能够与 GSH 结合, 与文献[19]的结果相同.

2.2 单链抗体的 QDs 标记及表征

为了直接观察 QDs 与 scFvs 的连接, 建立了一种简单的膜印迹方法. 将要标记的 scFvs 印迹在 NC 膜上, 再与 QDs 进行连接, 将该 NC 膜漂洗后置于紫外分析仪中观察. 结果表明, 只在 GSH 印迹部位可观察到明显的绿色荧光带, 膜上其余部位无荧光显现, 验证了 QDs 与 scFvs 的连接. 光谱分析证实了这个结论. 图 1(A) 显示, 在 350 ~ 700 nm 波长范围内, scFv 基本无紫外吸收, 不会对测定产生影响; 与游离的 QDs 相比, QD-scFvs 的吸收光谱仅有很小的变化, 但这不影响 QDs 的光学性质. 图 1(B) 为 380 nm 单独激发时的荧光发射光谱. QD-scFvs 溶液的荧光发射峰位于 534 nm 处, 与 QDs 溶液 (545 nm) 相比, 蓝移了 11 nm, 而这种变化并不是由于 scFvs 本身的荧光发射造成的 (scFvs 在测定范围内无荧光发射). 因此, 引起发射峰位变化的原因可能是在 NHS 和 EDC 的作用下, CdTe 纳米粒子表面的羧基与 scFvs 共价结合, 使得 CdTe 纳米粒子的表面电荷数减少, 从而降低了 CdTe 纳米粒子周围分子的

定向极化率,使得 Stokes 位移减小,导致 QD-scFvs 的发射光谱相对于 QDs 的发射光谱发生了蓝移^[21].

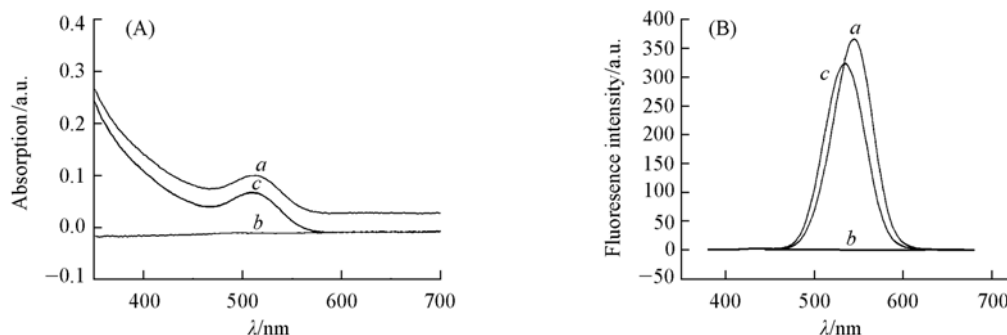


Fig. 1 Absorption (A) and fluorescence (B) spectra of QDs (a), scFvs (b) and QD-scFvs (c) solution

2.3 QD-scFvs 对 GSH 分子的识别

当制备与 GSH 反应的 QD-scFvs 溶液时,在标记体系中加入过量的 BSA,这样不仅封闭了未反应的 QDs,防止在识别过程中游离 QDs 与 GSH 结合造成的假阳性,也可以提高识别的特异性.图 2 为 QD-scFvs 对 GSH 的识别结果.在 GSH 印迹处(图 2 中 a, b)有明显的荧光条带,而没有 GSH 印迹而仅被 BSA 封闭的膜没有明显的荧光条带(图 2 中 c).这表明 QDs 的结合并未影响 scFvs 的抗原识别活性,也再次证明 scFv-B3 能特异性地与 GSH 结合.与 1.2 节中 scFvs 特异性验证的方法相比, QDs-scFv-B3 可直接用于检测 GSH,方便快捷,节省时间,这表明将 QD 标记抗体应用于 Western blot 等抗原抗体检测有很好的前景.

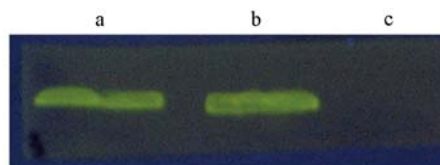


Fig. 2 Recognising GSH blotted on the NC membrane by QD-scFvs

a and b: GSH dot; c: control.

2.4 荧光显微镜观察 QD-scFvs 进入细胞的状况

图 3 为荧光显微镜下观察到的 QD-scFvs 进入 MCF-7 细胞的状况.可见有的细胞周围呈现绿色荧光,表明 QD-scFvs 尚未进入细胞,而有的细胞整体或局部呈现绿色荧光,且强度不均匀,为 QD-scFvs 进入细胞并在靶部位聚集.可以初步判断, QD-scFvs 能够进入 MCF-7 细胞.这一结果为后续研究抗体酶在细胞内发挥活性的准确定位奠定了基础.

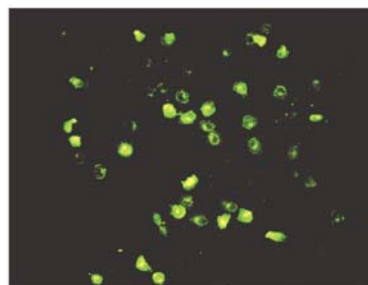


Fig. 3 Fluorescent microscopic image of QD-scFvs acting on the cells

本研究结果预示用量子点标记抗体识别亚细胞水平的分子靶点或者利用量子点标记进行抗体类药物的体内示踪研究有很好的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Böck A., Forchhammer K., Heider J., *et al.*. Mol. Microbiol. [J], 1991, **5**(3): 515—520
- [2] Luo G. M., Zhu Z. Q., Ding L., *et al.*. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1994, **198**: 1240—1247
- [3] Su L., Ren X. J., You D. L., *et al.*. Arch. Biochem. Biophys. [J], 2001, **395**(2): 177—184
- [4] Ren X. J., Gao S. J., You D. L., *et al.*. Biochem. J. [J], 2001, **359**: 369—374
- [5] Huo R., Wei J. Y., Xu J. J., *et al.*. J. Mol. Recognit. [J], 2008, **21**: 323—328
- [6] Zakowski J. J. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1978, **84**: 248—253
- [7] Klimov V. I., Mikhailovskiy A. A., Xu S., *et al.*. Science [J], 2000, **290**: 314—317
- [8] Rogach A. L., Susha A., Caruso F., *et al.*. Adv. Mater. [J], 2000, **12**: 333—337
- [9] Jaiswal J. K., Mattoussi H., Mauro J. M., *et al.*. Nat. Biotechnol. [J], 2003, **21**(1): 47—51

- [10] Åkerman M. E., Chan W. C., Laakkonen P., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 2002, **99** (20): 12617—12621
- [11] Chan W. C. W., Maxwell D. J., Gao X., *et al.* Curr. Opin. Biotechnol. [J], 2002, **13**: 40—46
- [12] Watson A., Wu X., Bruchez M. Bio. Techniques [J], 2003, **34**: 296—303
- [13] Dubertret B., Skourides P., Norris D. J., *et al.* Science [J], 2002, **298**: 1759—1762
- [14] Goldman E. R., Balighian E. D., Mattoussi H., *et al.* Am. Chem. Soc. [J], 2002, **124**: 6378—6382
- [15] Bentzen E. L., House F., Utey T. J., *et al.* Nano Lett. [J], 2005, **5**: 591—595
- [16] Wu X., Liu H., Liu J., *et al.* Nat. Biotechnol. [J], 2003, **21**: 41—46
- [17] Ding S. Y., Chen J. X., Jiang H. Y., *et al.* J. Agric. Food Chem. [J], 2006, **54**: 6139—6142
- [18] LI Hong-Mei(李鸿梅), LIU Han-Zhi(刘含智), ZHANG Hao(张皓), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2004, **25**(5): 982—984
- [19] HUO Rui(霍锐), SHI Yi(石毅), WEI Jing-Yan(魏景艳), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2008, **29**(7): 1379—1383
- [20] Lin Z. B., Cui S. X., Zhang H., *et al.* Analytical Biochemistry [J], 2003, **319**: 239—243
- [21] LIN Zhang-Bi(林章碧), SU Xing-Guang(苏星光), ZHANG Hao(张皓), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2003, **24**(2): 216—220

Preparation and Characterization of Quantum Dots-anti-GSH Human scFvs Bioconjugations

XU Jun-Jie¹, WANG Shi-Wen¹, ZHAO Hong⁴, CHEN Gui-Qiu⁵, HUO Rui¹,
TIAN Li¹, DUAN Yu-Jing¹, LI Min-Jie³, YANG Bai³, WEI Jing-Yan^{1,2*}

(1. College of Pharmaceutical Science, 2. Key Laboratory for Molecular Enzymology and
Engineering of Ministry of Education, College of Life Science, Jilin University, Changchun 130021, China;

3. State Key Lab for Supramolecular Structure and Materials, College of Chemistry,
Jilin University, Changchun 130012, China;

4. Central Laboratory, 5. Pathology Department, China-Japan Union Hospital,
Jilin University, Changchun 130031, China)

Abstract In order to generate catalytic antibodies with glutathione peroxidase (GPX) activity, the clone B3 that bound specifically to glutathione (GSH) was selected from the phage display antibody library [human synthetic VH + VL single-chain Fv fragment (scFv) library] and the expression vector of scFv-B3 was constructed in previous study. The expression vector pPELB-B3 constructed was transformed into the *Escherichia coli* Rosetta to express the human anti-GSH single chain fragments variable (scFvs) antibodies. The scFv-B3 was purified by Ni²⁺-immobilized metal affinity chromatography (IMAC). 3-Mercaptopropyl acid-stabilized CdTe quantum dots synthesized in aqueous solution were used to conjugate with scFvs. Spectra analysis show that the fluorescent of QD-scFvs undergo a blue-shift in the emission peak, which suggest that the scFvs have been effectively bound to the scFvs, *via* covalent conjugation. It is also suggested by the result of the simple new method of dot blot. The results of membrane dot indicate that the QD-scFvs can specifically recognize the GSH. The status of the QD-scFvs acting on the MCF-7 cells was observed under fluorescence microscope. The results show that QD-scFvs can enter the cytoplasm across the membrane.

Keywords Quantum dot; Human single chain fragments variable (scFvs); Glutathione peroxidase (GPX); Covalent conjugation; Dot blot

(Ed.: H, J, Z)