技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)07-0920-06

半导体量子点单克隆抗体荧光探针对牙乳头细胞内 Smad4 信号蛋白分子核移位过程的检测

杨 凯[1],孙德平[1],吴明军[2],陈 睿[1],梅 杰[1],张国栋[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科,重庆 400016; 2. 重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:制备半导体量子点 -Smad4 单克隆抗体荧光探针(Semiconductor quantum dots,QDS-Smad4),并用其对大鼠牙乳头细胞内 Smad4 蛋白分子在 TGF-β1 的刺激下发生的核移位过程进行检测。方法:①用化学偶连法制备水溶性的 QDS-Smad4 单抗荧光探针并纯化;②测定 QDS-Smad4 单抗荧光探针的吸收光谱、发射光谱并用激光共聚焦显微镜对 QDS-Smad4 单抗荧光探针的光学性质进行检测;③采用 SP 免疫组化法、QDS 直接标记法、Smad4 单抗直接标记法和 QDS-Smad4 单抗荧光探针直接免疫荧光成像法比较观察 QDS-Smad4 单抗荧光探针对大鼠牙乳头细胞内 Smad4 的特异性识别能力,并检测细胞内 QDS-Smad4 单抗荧光探针的光学性质;④在大鼠牙乳头细胞内加入 TGF-β1,分别于加入前、加入后 12 h 和 24 h,采用 SP 免疫组化法和 QDS-Smad4 单抗荧光探针直接免疫荧光成像法观察比较 Smad4 在细胞内发生核移位的动态变化。结果:半导体量子点与 Smad4 单抗通过共价结合形成稳定的 QDS-Smad4 单抗荧光探针,QDS-Smad4 单抗荧光探针对大鼠牙乳头细胞内 Smad4 分子仍具有特异性的免疫识别能力,能成像显示 Smad4 所产生核移位的动态变化;QDS-Smad4 单抗荧光探针仍具有 QDS 所具有的激发光谱宽,发射光谱窄,荧光度强,光化学稳定性好等光学特征。结论:半导体量子点和单抗共价结合形成分子探针后仍具有独特的光学性质和特异免疫识别能力,能长时间对细胞内蛋白质分子进行成像标记,这为半导体量子点用于可视化研究活细胞内蛋白质分子的运动和相互作用等过程提供了科学依据。

【关键词】半导体量子点;纳米技术;牙乳头细胞;Smad4

【中国图书分类法分类号】R349.54 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-11

The detection of the nucleation shifting process of smad4 signal protein in rat dental papillae cells with quantum dots-smad4 monoclonal antibody fluorescent probes

YANG Kai, et al

(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare semiconductor quantum dots (QDs)-Smad4 monoclonal antibody Fluorescent probes, and to detect nucleation shifting process of Smad4 signal protein in Rat dental papillae cells (RDPCs) stimulated by TGF-β1 with the Fluorescent probes. *Methods*: ①QDs were chemically modified with Smad4 proteins to prepare water soluble QDs-Smad4 monoclonal antibody Fluorescent probes which were purified after the preparation. ②The properties of these probes were studied through absorption band analyses, fluorescence spectra, fluorescence spectrum analyses and confocal laser scanning fluorescence microscopy. ③The location of Smad4 proteins in RDPCs was studied with SP anti-Smad4 immunocytochemical method, QDs direct mark method, Smad4 monoclonal antibody direct mark method, and direct immunofluorescence imaging. And the properties of Quantum Dots-Smad4 monoclonal antibody Fluorescent probes in RDPCs were detected. ④After RDPCs ware cultivated by TGF-β1 for 0 hours, 12 hours, and 14 hours, the dynamic nucleation shifting process of Smad4 signal protein in RDPCs was separately detected with SP anti-Smad4 immunocytochemical method and direct immunofluorescence imaging. *Results*: QDs and monoclonal antibody ware covalently bonded to form the fluorescent probes which could specifically and effectively recognize Smad4 proteins in RDPCs. It is to demonstrate the dynamic nucleation shifting process of Smad4 signal protein in RDPCs. These Fluorescent probes still had good properties, including broad excite spectra, narrow emission spectra, high fluorescence intensity, and photostability. *Conclusion*: QDs and monoclonal antibody could be covalently bonded to form the fluorescent probes with distinct optics character, special immunity recognition capability and the ability of imaging mark the protein in cells for long time, which provides the scientific evidence that

作者介绍:杨 凯(1965-),男,教授,博士,

研究方向:口腔颌面-头颈肿瘤临床及相关基础研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470893)。

QDs can visually research the movement and interaction of protein in living cell .

【Key words】Semiconductor quantum dots; Nanotechnology; Dental papillae cells; Smad4

如何对活细胞内蛋白质分子进行实时、原位的动态监测,研究其运动规律和相互作用等信号传递过程,以获得最真实原始的生理或病理信息,是目前生命科学研究中亟需解决的技术难题,解决以上问题的重要途径之一就是开发具有良好光学性质的荧光探针。半导体量子点(Semiconductor quantum dots, QDs)作为一种新型的纳米荧光材料,由于受到量子尺寸效应和介电限域效应的影响,与传统的荧光标记物比较具有荧光度强,光化学稳定性好,不易被光解或漂白,发射光谱窄而激发光谱宽等独特的光学性质,提供了能长时间对标记对象进行单通道或多通道持续动态观测的可能[1-3]。本研究用最大发射波长为 605 nm 的半导体量子点[CdSe/ZnS]和 Smad4 单克隆抗体分子偶连制备半导体量子点-Smad4 单克隆抗体荧光探针(605QDs-Smad4),在检测其特异性免疫识别能力和相关光学性质后,用 605QDs-Smad4 荧光探针标记牙乳头细胞内 smad4 蛋白分子,检测在转化生长因子(Transforming growth factor-β1, TGF-β1)刺激下,牙乳头细胞质内的 Smad4 信号蛋白分子发生核移位的过程,为半导体量子点用于可视化研究活细胞内蛋白质分子的运动和相互作用等信号通道及传递过程提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

最大发射波长为 605 nm 半导体量子点 [CdSe/ZnS](美国 invitrogen 公司),偶连试剂盒[包含:DTT 液(二硫苏糖醇液体)、SMCC 液(琥珀酰亚胺-4-(N-甲基马来酰亚胺)环已烷-1-碳酸酯液体)、染料指示标记液,缩硫醛乙醇 β、分离介质,交换缓冲液、NAP-5 柱、超滤装置管、Pierce 柱、Superdex 200 gel](美国 invitrogen 公司),倒置相差荧光显微镜(日本 NIKON 公司,TE2004-U),激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司,Tcs-sp2),DMEM/F12 培养液(美国 Sigma),胎牛血清(杭州四季青),羊抗鼠 Smad4 单克隆抗体(美国 Sigma)、SP 免疫试剂盒、DAB 显色液(北京中杉公司),TGF-β1(美国 promega),荧光分光光度计(日本 shimadzu 公司,RF-540),冷冻离心机(德国 HERMLE 公司,Z233MK-2),紫外分光光度计(日本 shimadzu 公司,UV-265),大鼠牙乳头细胞(本课题组原代培养保存[4])。

1.2 实验方法

1.2.1 605QDs-Smad4 单抗荧光探针的制备 ①量子点的活化和洗脱:在 1.5 ml 的 EP 管内把 13.9 μl、浓度为 10 mol/L 的双功能 SMCC 溶液和 125 μl、浓度为 20 μmol/L 的 605QDs 均匀混合,在室温下活化反应 1 h。用 NAP-5 柱子洗脱反应样本,收集有色的洗脱液约 400~500 μl。②抗体的还原:Smad4 单抗溶于 300 μl、pH 为 7.2~7.4 的 PBS 液中,浓度为 1 mg/ml。把 6.1 μl 浓度为 1 mol/L 的 DTT 液体加入配好的抗体溶液中,均匀混合,室温下还原反应 0.5 h。20 μl 双蒸水稀释染料指示标记液后,再加入到反应好的抗体样本中,让无色的反应样本着色。用 NAP-5 柱子分离反应样本,从洗脱出的第 1 滴着色样本开始,收集接近 90%有颜色的洗脱液,约为 500~600 μl。③偶连和灭活:把以上收集的洗脱液均匀混合、室温下偶连反应 1 h;取 4 μl 即配的浓度为 10 mol/L 的缩硫醛乙醇 β 和偶连样本均匀混合、室温下灭活反应 0.5 h。

1.2.2 605QDs-Smad4 单抗荧光探针的纯化 把约 1 ml 偶连灭活后的样本加入超滤装置管中超速离心 10~15 min (7 000 r/min),收集超滤离心膜内侧约 20 μl 的偶连样本溶液。垂直固定底部有釉料的 Pierce 柱,并向柱内加入凝胶悬液,重力作用下装柱,调整凝胶柱的长度为 45 mm,并保证凝胶床水平面上有液体覆盖。用 5 ml PBS 液洗脱平衡凝胶柱,当 PBS 液面接近凝胶床 2~3 mm 时,轻轻加入偶连样本,在重力作用下引流样本。引流过程中轻轻加入 PBS 液保证液面不低于凝胶床。监测柱子底部釉料平面和柱子尖部间的"死腔",当有颜色的洗脱液出现在"死腔"内时收集前 10 滴样本。

根据产品提供的消退系数和测量波长两个参数可以求出最后纯化的 605QDs-Smad4 单抗荧光探针浓度。其计算公式为:$C = 1\ g(I_0/I)/Kb$,其中 I 和 I_0 是透射光强度和发射光强度、K 为溶液的消光(吸收)系数、b 为光程(溶液的厚度)。

1.2.3 605QDs 和 605QDs-Smad4 单抗荧光探针的光学性质检测 将 605QDs 和 605QDs-Smad4 单抗荧光探针分别涂于洁净的载玻片上,在激光共聚焦显微镜下用波长为 488 nm 光激发,分别观察 605QDs 和 605QDs-Smad4 单抗荧光探针的发光颜色、形态,测定相对荧光比值。然后用波长为 200~275 nm 的紫外线持续照射 605QDs 和 605QDs-Smad4 单抗荧光探针,12 h 后在激光共聚焦显微镜下观察它们的颜色和测定相对荧光比值。

室温下保持 605QDs 与 Smad4 分子偶连前后溶剂的组成、浓度、pH 相同的条件下,用紫外分光光度计、荧光分光光度计分别测定 605QDs 和 605QDs-Smad4 探针的吸收光谱和发射光谱。吸收光谱测定条件:氘灯光源,扫描精度 1 nm;发射光谱测定条件:氙灯光源,激发波长 488 nm,激发和发射带宽 5 nm。

1.2.4 605QDs-Smad4 单抗探针对大鼠牙乳头细胞内 Smad4 分子特异识别性的检测 取生长良好的第 4 代原代培养的

大鼠牙乳头细胞，以 4×10^4 个 /ml 的细胞浓度接种到 24 孔板内，用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养细胞常规爬片，接种 12 h 后，取出细胞爬片以 4%多聚甲醛固定 0.5 h，0.25%Triton X-100 处理 0.5 h。①按照 SP 免疫试剂盒说明书作细胞内抗 Smad4 蛋白质免疫细胞化学染色，最后光镜控制下，进行 DAB 显色，用公司提供的已知阳性对照片作阳性对照(细胞内出现黄色颗粒为阳性表达)，黄色到棕黄色为表达增高。②把浓度稀释为 10 nmol/L 的 605QDs-Smad4 单抗探针滴加到同一条件下处理的细胞爬片上，湿盒内过夜，第 2 d 用 PBS 冲洗反应后的细胞爬片 8~10 次，梯度酒精脱水，甘油封片，激光共聚焦显微镜下 488 nm 激发光照射、观察细胞内的荧光分布、颜色，测定相对荧光比值。用波长为 200～275 nm 的紫外线持续照射 12 h 后，在激光共聚焦显微镜下观察荧光分布、颜色，测定相对荧光比值。③把浓度稀释为 10 nm 的单纯 605QDs 和 Smad4 单克隆抗体分别滴加到同一条件下处理的细胞爬片上，湿盒内过夜，第 2 d PBS 冲洗反应后的细胞爬片 8~10 次，梯度酒精脱水，甘油封片，激光共聚焦显微镜下 488 nm 激发光照射、观察细胞内的荧光分布。

1.2.5 605QDs-Smad4 单抗探针对大鼠牙乳头细胞内 Smad4 分子在 TGF-β1 作用下发生核移位的检测 取生长良好的第 4 代原代培养的大鼠牙乳头细胞，以 4×10^4 个 /ml 的细胞浓度接种到 24 孔板内，分为 1、2、3 组，每组 8 孔，用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养细胞常规爬片，接种 12 h 后，取出第 1 组细胞爬片以 4%多聚甲醛固定 0.5 h，0.25% Triton X-100 处理 0.5 h，然后于第 2、3 组中加入终浓度为 0.1 nmol/L 的 TGF-β1 再培养，分别于培养后 12 h 和 24 h 取出第 2 组和第 3 组细胞爬片以 4%多聚甲醛固定 0.5 h，0.25%Triton X-100 处理 0.5 h。分别用 SP 免疫组化法和浓度为 10 nmol/L 的 605QDs-Smad4 单抗探针按上面 1.2.4 实验中方法检测第 1、2、3 组细胞内 Smad4 蛋白质表达分布情况。

2 结 果

2.1 605QDs-Smad4 单抗荧光探针的制备

收集纯化的 605QDs-Smad4 单抗荧光探针样本，通过产品提供的在 638 nm 下的消光系数(800 000 mol/L-cm)，证明实验得到最终纯化的 QDs-Smad4 单克隆抗体探针样本浓度为 1.5 μmol/L。

2.2 605QDs 和 605QDs-Smad4 探针的光学表征

2.2.1 激光共聚焦显微镜下观察检测 在激光共聚焦下 605QDs 为圆形或椭圆形的红色荧光体，605QDs-Smad4 单抗荧光探针为椭圆形或梭形的红色荧光体(图 1、图 2)。605QDs 和 605QDs-Smad4 单抗荧光探针的相对荧光比值分别为 250、254。在波长为 200～275 nm 的紫外线持续照射 12 h 后，荧光强度无明显减退，605QDs 和 605QDs-Smad4 的相对荧光比值分别为 240 和 242(图 1、图 2)。

2.2.2 吸收光谱分析 605QDs 和 605QDs-Smad4 单抗荧光探针的吸收光谱图显示：①605QDs-Smad4 单抗荧光探针在 280 nm 处出现蛋白吸收峰、在 400～650 nm 处出现另一吸收峰(图 3)，而 605QDs 只在 400～650 nm 处出现吸收峰(图 4)，这间接证明：层析柱分离纯化后的反应物为量子点和抗体的偶连物，即 605QDs 与 Smad4 单抗产生有效偶连；②在 400～650 nm 范围内，605QDs-Smad4 探针的吸收光谱比 605QDs 的吸收光谱平坦(图 5)，这是由于 605QDs 共价结合 Smad4 单抗后吸收偶极距发生改变所致，这也表明了 605QDs 与 Smad4 单抗发生了偶连。

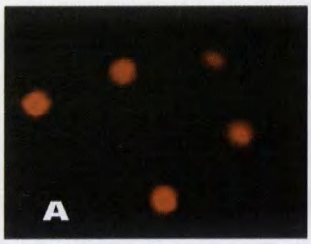
2.2.3 发射光谱分析 在 488 nm 激发光下，605QDs 的发射光谱的峰宽在 600～650 nm 范围内，最大发射波长为 617 nm(图 6)，这证明本试验所用最大发射波长为 605 nm 的[CdSe/ZnS]量子点由于表面包裹有水溶性的特殊多聚化合物，其最大发射波长由 605 nm 红移到 617 nm。605QDs-Smad4 单抗荧光探针的最大发射波长为 625 nm(图 6)，即在 QDs 最大发射波长的基础上再红移了 8 nm，但发射光谱的半峰宽未变，这是由于 605QDs 与 Smad4 单抗共价偶连后，偶极与偶极的相互作用增加，使其 Stokes 位移(激发峰波长和发射峰波长的差值)增加，从而发生红移；但是 605QDs 与 Smad4 单抗共价结合前后其量子点([CdSe/ZnS])的核心粒径没有改变，这决定了发射光谱的半峰宽不变，同时也说明标记过程中量子点之间没有发生团聚。

2.3 605QDs-Smad4 单抗荧光探针对大鼠牙乳头细胞内 Smad4 分子特异性识别检测

常规 SP 免疫组化法结果显示：Smad4 在大鼠牙乳头细胞质内高表达，胞核内无表达(图 7)；605QDs-Smad4 单抗荧光探针直接免疫荧光检测 Smad4 结果显示：细胞质内有强红色荧光，胞核内无红色荧光(图 8)，这表明用常规 SP 免疫组化法和 605QDs-Smad4 单抗荧光探针直接免疫荧光法的结果显示了 Smad4 在细胞内分布一致；605QDs-Smad4 荧光探针标记的大鼠牙乳头细胞胞质所发荧光的相对荧光比值为 245，用 200～275 nm 的紫外线持续照射 12 h 后，荧光无明显减退，相对荧光比值为 239(图 8)；实验同时表明：用单纯 605QDs 和 Smad4 单克隆抗体分别处理的大鼠牙乳头细胞，在冲洗后细胞内无荧光可见(图 9)，表明单纯 605QDs 对细胞内的 Smad4 蛋白分子无特异结合能力，单纯 Smad4 单克隆抗体与 Smad4 蛋白分子结合后无量子点的荧光产生。以上实验证明：605QDs-Smad4 单抗荧光探针能对大鼠牙乳头细胞内的 Smad4 分子具有特异的免疫识别活性，并同时具有单纯 605QDs 的光稳定性。

2.4 605QDs-Smad4 单抗探针对大鼠牙乳头细胞内 Smad4 分子在 TGF-β1 作用下发生核移位的检测

605QDs-Smad4 单抗荧光探针直接免疫荧光检测 Smad4 结果显示：用 TGF-β1 刺激大鼠牙乳头细胞前 Smad4 均表达在细胞质内，用 TGF-β1 刺激大鼠牙乳头细胞 12 h 后 Smad4 在细胞质和细胞核内均匀表达，刺激 24 h 后 Smad4 在细胞质内低表达，细胞核内高表达(图 10)；常规 SP 免疫组化法结果也表明了在 TGF-β1 刺激大鼠牙乳头细胞前后 Smad4 在细胞内分布与 605QDs-Smad4 单抗荧光探针直接免疫荧光法结果的一致性(图 11)。



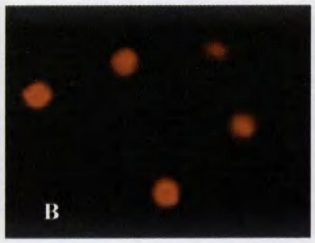


图 1　A、B 分别为 605QDs 在波长为 200~275 nm 的紫外线持续照射 12 h 前后的形态和发光颜色（激光共聚焦显微镜、488 nm 激发光源下，×30 000 000）





图 2　A、B 分别为 605QDs-Smad4 单抗荧光探针在波长为 200~275 nm 的紫外线持续照射 12 h 前后的形态和发光颜色（激光共聚焦显微镜、488 nm 激发光源下，×30 000 000）

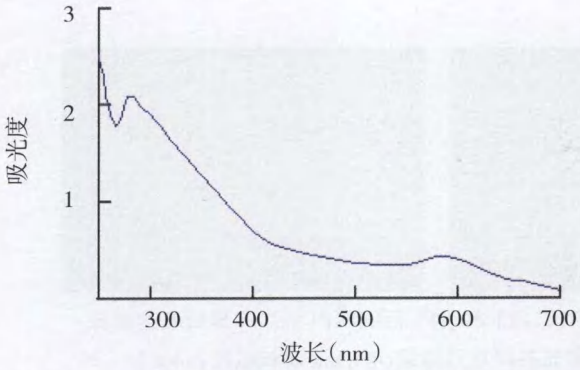


图 3　605QDs-Smad4 单抗荧光探针的吸收光谱（紫外分光光度计，氘灯光源、扫描精度 1 nm）

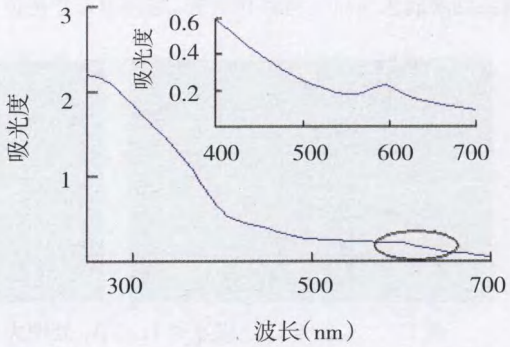


图 4　605QDs 的吸收光谱（紫外分光光度计，氘灯光源、扫描精度 1 nm）

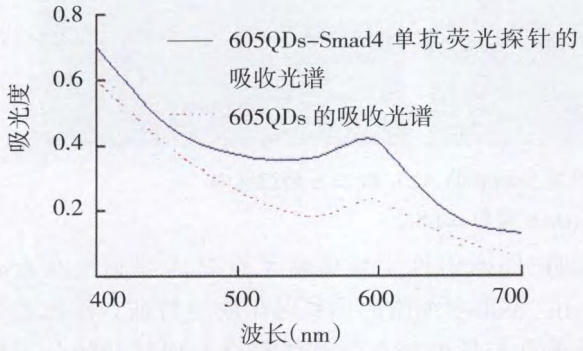


图 5　605QDs-Smad4 单抗荧光探针在 400~650 nm 范围内的吸收光谱比 605QDs 的吸收光谱平坦（紫外分光光度计，氘灯光源、扫描精度 1 nm）

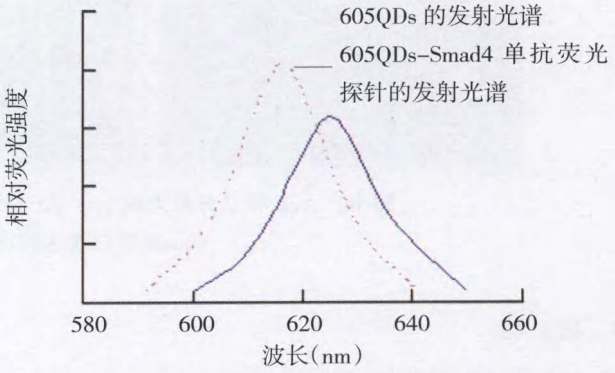


图 6　605QDs-Smad4 单抗荧光探针的发射光谱相对于 605QDs 的发射光谱红移 8 nm（荧光分光光度计，488 nm 激发光下）

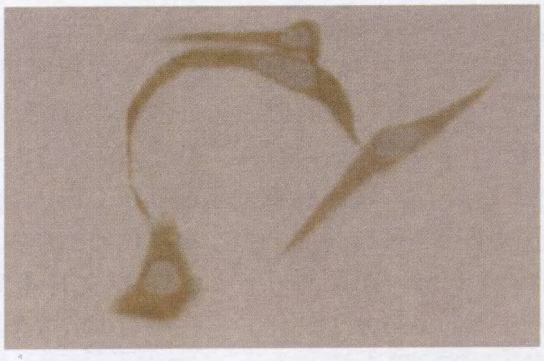
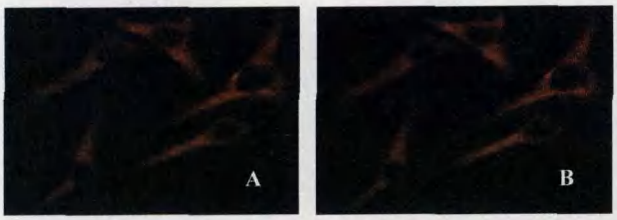


图 7　Smad4 在大鼠牙乳头细胞质内强阳性，细胞胞核内无表达（SP 法、DAB 显色，×400）



A、B 分别为 200～275 nm 的紫外线持续照射 12 h 前后的荧光图像，荧光强度无明显改变(激光共聚焦显微镜、488 nm 波长激发，×400)

图 8 605QDs-Smad4 单抗荧光探针直接免疫荧光法显示大鼠牙乳头细胞质内 Smad4 强红色荧光，胞核内无红色荧光

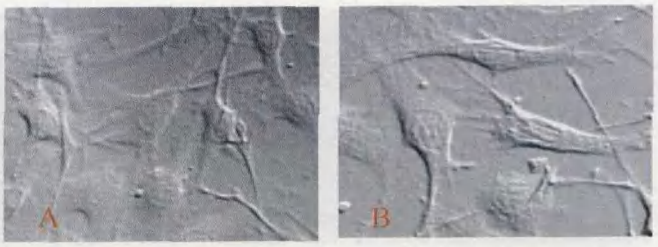


图 9 A、B 分别为单纯的 605QDs 和 Smad4 单克隆抗体处理后的 RDPCs，洗涤后无荧光(激光共聚焦显微镜、488 nm 波长激发，×400)



图 10 A、B 和 C 分别为用 TGF-β1 处理大鼠牙乳头细胞前、12 h 和 24 h 后细胞内 Smad4 蛋白表达情况(605QDs-Smad4 单抗荧光探针的直接免疫荧光法，激光共聚焦显微镜、488 nm 波长激发，×400)

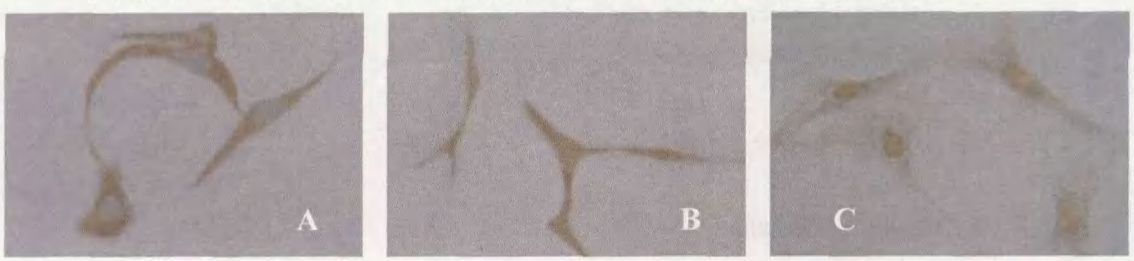


图 11 A、B 和 C 分别为用 TGF-β1 处理大鼠牙乳头细胞前、12 h 和 24 h 后细胞内 Smad4 蛋白表达情况(SP 法、DAB 显色，×400)

3 讨 论

半导体量子点又称为半导体纳米微晶体(Semiconductor nanocrystals)，是由半导体材料制成的直径在 2~10 nm 范围内的纳米微晶体，通常由Ⅱ~Ⅵ或Ⅲ~Ⅴ族元素组成。QDs 具有很突出的光谱特性，与传统的荧光探针相比：QDs 发光度强，光化学稳定性好，不易被光解或漂白，能承受反复长时间激发光的激发而荧光强度不发生明显降低，同时 QDs 的激发光波长的范围宽且连续分布，而发射波长的范围窄且呈对称分布，不同半导体材料的量子点或同一材料不同粒径的量子点在同一光源照射下发射出不同颜色的光，从而使不同生物分子的标记、区分、识别变得更加容易[3,5]，QDs 以上的光学特征是目前传统荧光探针所不具有的。目前研究也证明[3,6]：水溶性半导体量子点对活细胞没有毒副作用、不影响细胞的生长等生物学特征。因此若将量子点与各种单克隆抗体结合形成特异的分子探针，就可将量子点这些独特的光学性质和良好的光稳定性用于在生命科学中对活细胞内蛋白质等生物分子进行长时间、动态的可视化观察[7,8]，从而获取最直接、最真实的生物信息。

本课题所用的量子点是最大发射波长为 605 nm 的水溶性半导体量子点[CdSe/ZnS]，该量子点为核-壳纳米结构，核由半导体材料 CdSe 形成，ZnS 包绕在 CdSe 的表面形成外壳，壳的表面包裹具有水溶性的特殊多聚化合物，从而使该量子点具有水溶性，这些特殊多聚化合物在特定条件下能够和蛋白质和多肽等生物分子结合。本试验用异型双功能 SMCC 溶液活化该量子点后，其表面的多聚化合物产生马来酰亚胺基团，然后用 DTT 溶液还原 Smad4

单抗暴露出硫氢基,通过马来酰亚胺基团和硫氢基反应形成稳定的化学键制备出水溶性的 QDs-Smad4 单抗荧光探针。

对 QDs-Smad4 单抗荧光探针光学表征检测显示:量子点与 Smad4 单克隆抗体偶连后最大发射波长红移到 625 nm(图 6)。同时偶连前后吸收光谱分析表明:605QDs 偶连后在 280 nm 处比偶连前多出现了一个蛋白吸收峰,同时 605QDs-Smad4 单抗荧光探针的吸收光谱在 400~650 nm 范围内比 605QDs 的吸收光谱平坦,这均证明 605QDs 和 Smad4 单抗发生了有效的偶连。QDs 和 Smad4 单抗偶连后,引起发射峰的红移和紫外吸收光谱变化的原因是:QDs 和蛋白质共价结合后偶极与偶极的相互作用增加,使其 Stokes 位移(激发峰波长和发射峰波长的差值)增加,由于 QDs 只有在偶连后才出现了发射光谱和吸收光谱的的变化,因而本试验的结果证明了 QDs 和 Smad4 单抗产生了有效连接,即 QDs-Smad4 单抗荧光探针制备成功。本试验结果还表明:QDs-Smad4 单抗荧光探针和 QDs 的相对荧光比值没有明显差异,用波长为 200~275 nm 的紫外线持续照射 12 h 后,QDs-Smad4 单抗荧光探针的相对荧光比值没有明显减小,证明 QDs-Smad4 单抗荧光探针仍具有良好的光稳定性。同时由于量子点与单克隆抗体共价结合后吸收偶极距发生改变,在 400~650 nm 范围内 QDs-Smad4 探针的吸收光谱较平坦,其激发性能大为改善,表明 QDs 连接 Smad4 单抗后,激发波长的选择范围更大。与游离的 QDs 相比,QDs-Smad4 单克隆抗体探针发射光谱的半峰宽不变表明在标记过程中量子点之间没有发生团聚,分散性较好,同时量子点连接 Smad4 单克隆抗体后的发射光谱仍然保持 QDs 对称分布的窄谱特征。

目前研究证明[9]:信号蛋白 Smad4 存在于牙乳头细胞的细胞质内,在 TGF-β1 的刺激下,细胞质内的 Smad4 和 Smad2 发生异源结合而移位入核,调节细胞核内的基因,从而参与 TGF-β1 调节细胞分化的信号传递。本试验制备的 605QDs-Smad4 单抗荧光探针用于标记大鼠牙乳头细胞内的 Smad4,以常规 SP 免疫组化结果作为对照,对 TGF-β1 刺激前、刺激 12 h 和 24 h 后大鼠牙乳头细胞内 Smad4 蛋白分子核移位情况进行比较,希望通过验证这一目前研究较为成熟的信号通路来比较观察 605QDs-Smad4 单抗荧光探针对 Smad4 蛋白分子的免疫识别特异性和移位检测能力,为进一步的实验提供依据和科学基础。试验结果证明:常规 SP 免疫组化法和用 QDs-Smad4 单抗荧光探针的直接免疫荧光法显示 Smad4 分子在大鼠牙乳头细胞内分布一致,这证明本实验制备的 605QDs-Smad4 单抗荧光探针能和目的 Smad4 蛋白质分子发生良好的免疫特异性结合并对其运动情况进行检测。

本实验通过制备 QDs-Smad4 单抗荧光探针并标记大鼠牙乳头细胞内的 Smad4 分子研究证明:半导体量子点和单抗结合形成分子探针后,能特异性地识别相应的蛋白质分子,同时荧光强度没有受到影响,仍具有 QDs 独特的光稳定性等相关光学特征。这证明半导体量子点和单抗偶连后能作为一种特异的分子探针用于细胞内分子水平的成像检测,这为半导体量子点单抗荧光探针用于活细胞内信号通路的研究和对蛋白质分子进行实时、原位、长时间可视化动态观察检测提供了科学实验依据。

参 考 文 献

[1] Tanke H J, Dirks R W, Raap T. FISH and immunocytochemistry: towards visualising single target molecules in living cells[J].Curr Opin Biotechnol, 2005, 16(1): 49-54.

[2] 杨 凯. 生物功能化半导体量子点对活细胞内蛋白质分子可视化的研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2006, 29(3): 142-144.

[3] 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.

[4] 孙德平, 杨 凯, 陈 睿. 半导体量子点对原代培养大鼠牙乳头细胞生物相容性的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(12): 1237-1241.

[5] Chan W C W, Maxwell D J, Gao X H, et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging[J].Curr Opin Biotechnol, 2003, 13(1): 40-46.

[6] 杨 凯, 孙德平, 陈 睿. 半导体量子点对舌鳞状细胞癌 Tca8113 系生物学行为影响的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2007, 42(8): 483-486.

[7] Tada H, Higuchi H, Wanatabe T M, et al. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice[J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1138-1144.

[8] Jaiswal J K, Simon S M. Imaging single events at the cell membrane [J]. Nat Chem Biol, 2007, 3(2): 92-98.

[9] Heldin C H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-β1 signaling from cell memberance to nucleus through Smad proteins[J]. Nature, 1997, 390(4): 464-471.

(责任编辑:冉明会)