

• 研究论文 •

CdSe/ZnS 量子点探针用于检测猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白(MRP) 抗原的新方法研究

武红敏^a 韩鹤友^{*,a} 金梅林^b 张安定^b

(^a 华中农业大学理学院 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

(^b 华中农业大学动物科技学院 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘要 合成了高发光效率的 CdSe/ZnS 量子点并制备了 CdSe/ZnS 量子点-溶菌酶释放蛋白(MRP)抗体探针, 利用凝胶电泳和分子光谱法研究了 MRP 抗体与 CdSe/ZnS 量子点的结合机理. 荧光光谱法优化了 CdSe/ZnS 量子点-MRP 抗体探针制备的影响因素, 建立了一种测定 MRP 抗原的新方法, 其线性范围为 $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-6}$ mol/L, 线性相关系数为 0.9976, 检测限为 1.9×10^{-8} mol/L.

关键词 猪链球菌 2 型; 溶菌酶释放蛋白(MRP); CdSe/ZnS 量子点探针; 检测

A Novel Method to Detect Muramidase Released Protein(MRP) Antigen of *Streptococcus suis* Serotype 2 Based on CdSe/ZnS Quantum Dot Probe

Wu, Hongmin^a Han, Heyou^{*,a} Jin, Meilin^b Zhang, Anding^b

(^a College of Science, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(^b College of Veterinary Medicine, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract High-quality CdSe/ZnS quantum dot and the CdSe/ZnS quantum dot-muramidase released protein (MRP) antibody probe were prepared, and the conjugation mechanism was studied according to the results of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and molecular spectrometry. The factors influencing the preparation of CdSe/ZnS quantum dot-MRP antibody probe were optimized by fluorescence spectrometry. Under the optimum conditions, the probe showed good sensitivity to MRP antigen. The calibration graph was linear in the range from 5.0×10^{-8} to 1.5×10^{-6} mol/L of MRP antigen concentration, with a correlation coefficient of 0.9976 and a detection limit of 1.9×10^{-8} mol/L.

Keywords *Streptococcus Suis* serotype 2; muramidase released protein (MRP); CdSe/ZnS quantum dot probe; detection

猪链球菌病是由猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)引起的一种以发烧、败血症、脑膜炎、肺炎、关节炎等为主要特征的人畜共患疾病. 它在世界上几乎所有国家都有发生, 其传播、流行给养猪业造成极大的经济损失,

并严重威胁人类的健康^[1]. 猪链球菌病原根据荚膜抗原的不同可分为 35 个血清型(1~34 和 1/2 型), 其中以 2 型(SS2)流行最广, 致病性最强^[2]. 目前对猪链球菌病的检测主要依靠微生物学和分子生物学等方面的技术^[3],

* E-mail: hyhan@mail.hzau.edu.cn

Received July 4, 2008; revised December 20, 2008; accepted January 20, 2009.

国家自然科学基金(No. 20675034)、湖北省自然科学基金重点项目(No. 2008CDA080)、武汉市学科带头人计划(No. 200851430484)、国家 973 计划(No. 2006CB504404)资助项目.

虽然这些方法对该病的诊断起到了重要的作用,但普遍存在检测周期长,操作繁琐,容易出现假阳性等问题,难以满足实时快速检测的要求,特别是这些方法很难用于该病的致病机理研究.因此,研究新的检测技术和方法对猪链球菌病的监测和控制具有十分重要的意义.

量子点(Quantum Dot, QD)作为一类新的荧光标记物,与传统的荧光试剂相比,具有荧光量子产率高、激发光谱范围宽、发射光谱范围窄、抗光漂白性强、空间兼容性好等优良特性^[4-6].近年来,量子点荧光探针引起了生物和医学研究人员的广泛关注^[7,8],特别是其用于癌症等重大疾病的诊断和治疗已逐渐成为研究的热点^[9,10],但在动物重大疾病尤其是人畜共患疾病方面的研究报道还比较少.

本文合成了具有高发光效率的巯基乙酸修饰的CdSe/ZnS量子点,并制备了基于猪链球菌2型的重要致病病毒力相关因子-溶菌酶释放蛋白(Muramidase Released Protein, MRP)抗体(MRP_{Ab})的CdSe/ZnS量子点荧光探针.利用这种探针,建立了一种检测MRP抗原(MRP_{Ag})的新方法,该方法的线性检测范围为 $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-6}$ mol/L,线性相关系数为0.9976,检测限为 1.9×10^{-8} mol/L.此外,凝胶电泳电泳和分子光谱的研究结果表明,CdSe/ZnS量子点与MRP抗体是通过表面配位作用结合的.

1 实验部分

1.1 试剂

三正辛基膦(TOP)购于Sigma-Aldrich公司,氧化三正辛基膦(TOPO)、十六胺(HDA)、二辛胺(DOA)及十八碳烯(ODE)购于Alfa-Aesar公司,氧化镉(CdO)、醋酸锌(ZnAC)、硒粉(Se)、硫粉(S)购于国药集团(用于合成油溶性CdSe/ZnS量子点);巯基乙酸(MAA)、三氯甲烷、聚丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)等为国药集团产品.试验中所用其他试剂均为分析纯,所用水均为Milli-Q超纯水($18.25 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

1.2 仪器

LS-55 荧光分光光度计(Perkin-Elmer公司),BioTek Synergy HT 酶标仪(Gene 有限公司),Evolution 300 紫外-可见分光光度计(Thermo Nicolet公司),Avatar330 傅立叶变换红外光谱仪(Thermo Nicolet公司),DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂).

1.3 实验方法

1.3.1 MRP 抗体的制备及纯化

克隆SS2的MRP开放阅读框(ORF, 301~1170 b.p.)

并重组表达,利用组氨酸(His)标签纯化^[11],并以纯化的蛋白作为抗原免疫家兔制备高免血清,具体程序如下:首先免疫使用弗氏完全佐剂乳化的抗原0.5 mg;两周后以弗氏不完全佐剂乳化的蛋白0.5 mg加强免疫一次;间隔7~10 d采血,测试效价.当抗体水平达到琼脂扩散1:16时采血.收集的血清采用“Protein A GE Healthcare”层析柱亲和层析,纯化抗体用于后续研究.

1.3.2 水溶性 CdSe/ZnS 量子点的制备

巯基乙酸修饰的水溶性CdSe/ZnS量子点的制备参照文献[6]的方法并经过适当的改进获得,具体如下:将油溶性CdSe/ZnS量子点(合成方法参照文献[12])用丙酮沉淀并重新分散于三氯甲烷中,加入适量的MAA,充分混合后静置反应2 h.离心除去上清液,加缓冲溶液使其完全溶解,再加入丙酮提纯.如此反复2~3次,最后将沉淀分散于磷酸盐缓冲溶液中,4℃储存备用.

1.3.3 量子点探针的制备及检测

将适量的MRP抗体与CdSe/ZnS量子点混合并进行荧光光谱扫描(LS-55 荧光分光光度计)和荧光强度检测(BioTek Synergy HT 酶标仪),其中 F_0 为初始荧光强度, F 为加入样品后的荧光强度, F/F_0 为相对荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 MRP 抗体和 CdSe/ZnS 量子点的表征

用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对MRP抗体进行了表征,考马斯亮蓝染色后在胶片上可以看到清晰均一的蛋白条带(图1),说明制备的MRP抗体具有较高的纯度和稳定性.

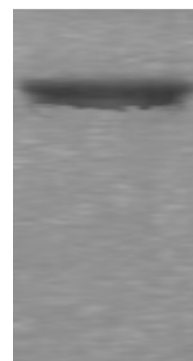


图1 MRP抗体的SDS-PAGE电泳表征
Figure 1 SDS-PAGE verification of MRP antibody

图2是CdSe/ZnS量子点的光谱表征图.在图2a的紫外-可见吸收光谱(UV-Vis)中,量子点的最大紫外吸收波长为573.0 nm,根据文献^[13]可知其粒径约为3.6 nm,浓度约为 1.1×10^{-5} mol/L(使用时根据需要进行适当稀释).荧光光谱图(图2b)中,量子点最大发射波长为

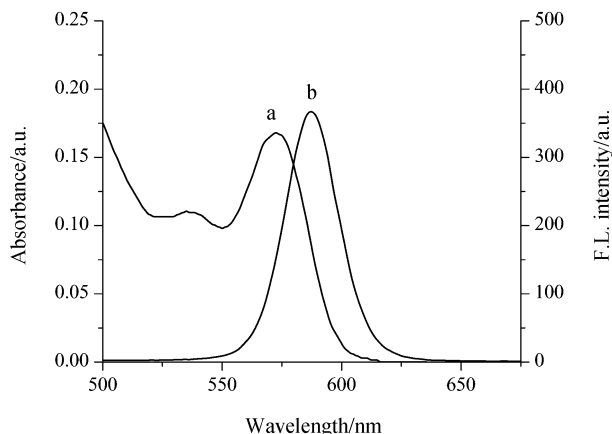


图2 量子点的紫外-可见吸收(a)和荧光光谱图(b)

Figure 2 The UV-Vis absorption (a) and fluorescence (b) spectra of CdSe/ZnS QD

587.0 nm, 半峰宽为 26.0 nm, 峰形对称, 无拖尾现象, 表明该量子点具有良好的荧光性能。

2.2 MRP 抗体与 CdSe/ZnS 量子点的相互作用研究

CdSe/ZnS 量子点通过其表面的 Cd^{2+} , Zn^{2+} 连接巯基乙酸修饰剂的 $-\text{SH}$ (图 3A), 再借助外端的 $-\text{COO}^-$ 使得该量子点具有良好的水溶性, 并且能与生物大分子结合 (图 3B)。MRP 抗体则是由二硫键 ($\text{S}-\text{S}$) 连接的四条多肽链组成的, 呈 Y 型的生物大分子。根据二者的结构特征及文献报道^[14-16], 我们推断 CdSe/ZnS 量子点与 MRP 抗体的结合主要是通过表面配位作用实现的, 具体的作用过程如图 3 所示。为了证实这种作用模式, 我们对 CdSe/ZnS 量子点与 MRP 抗体进行了 SDS-PAGE、荧光光谱、UV-Vis 和傅立叶变换红外光谱 (FT-IR) 等方面的详细研究。

图 4 中 SDS-PAGE 电泳结果证明, CdSe/ZnS 量子点

与 MRP 抗体已完全结合, 图中 CdSe/ZnS 量子点与 MRP 抗体结合物电泳速度比单独的 MRP 抗体要快是由于 MRP 抗体表面的质荷比发生改变所致。荧光光谱研究表明, MRP 抗体对 CdSe/ZnS 量子点的荧光信号具有明显的增强作用 (图 5), 这主要是因为 MRP 抗体分子将量子点表面包覆后, 对其表面起到钝化作用, 有效祛除了表面缺陷, 使荧光强度明显提高。傅立叶变换红外光谱对量子点、MRP 抗体及量子点-MRP 抗体结合物进行研究时 (图 6A), 三者酰胺 I 带 (1630 cm^{-1})、 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动 (1116 cm^{-1})、 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩和 $\text{N}-\text{H}$ 变形振动 (1394 cm^{-1})^[17] 处的主要吸收峰没有发生明显变化, 而低波数区的 1070 和 540 cm^{-1} 处的吸收峰增强, 这是由于 MRP 抗体与量子点通过表面配位作用结合后, 分子中 $\text{C}-\text{C}$ 和 $\text{C}-\text{H}$ 的偶极距受到影响^[17], 导致化学键伸缩振动增强引起的。在紫外-可见吸收光谱中 (图 6B), 与 MRP 抗体结合的 CdSe/ZnS 量子点的最大吸收峰未发生明显移动, 但吸光度有所减弱, 根据文献报道^[18,19] 进一步推断二者通过表面配位作用结合。

综合以上研究结果及量子点和 MRP 抗体的结构特征, 可以得知 MRP 抗体与 CdSe/ZnS 量子点能够完全结合, 并且在结合过程中仅仅改变了量子点的表面状态, 即这种结合是通过表面配位作用实现的, 与我们的推断相符合。

2.3 CdSe/ZnS 量子点-MRP 抗体荧光探针制备条件的优化

2.3.1 pH 值的优化

研究了 pH 值为 4.0~10.0 的 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液中 MRP 抗体与 CdSe/ZnS 量子点结合物的荧光强度变化。如图 7 所示, 在 pH 7.0 的缓冲溶液中相对荧光强度最强。因此, 选择 pH 7.0 作为最佳结合 pH 值。

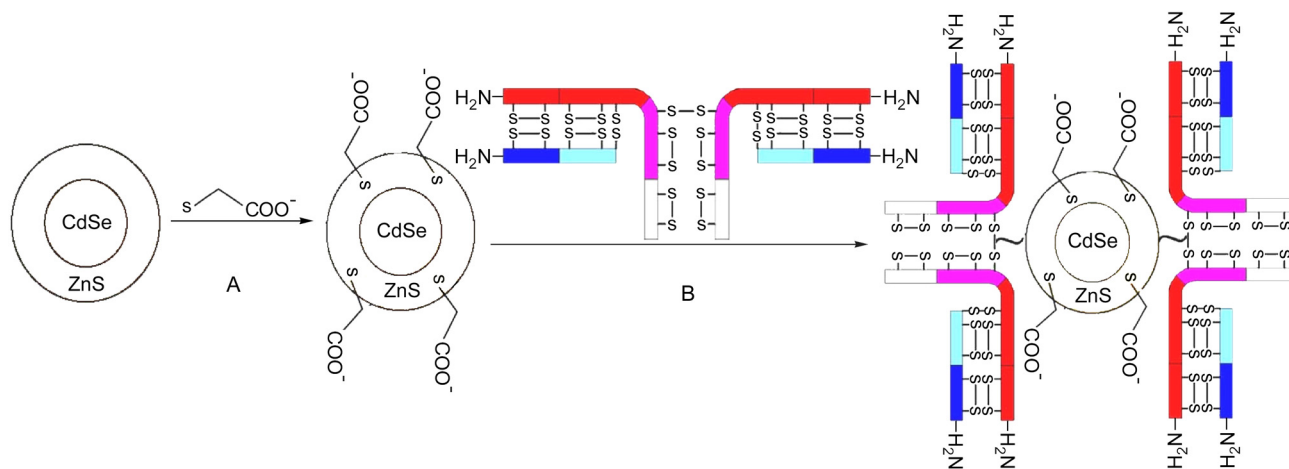


图3 CdSe/ZnS 量子点与 MRP 抗体的结合作用示意图

Figure 3 Scheme of the conjugation of CdSe/ZnS QD and MRP antibody

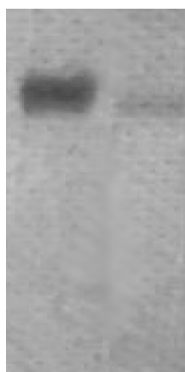


图4 量子点与MRP抗体结合的电泳表征

左: MRP_{Ab}; 右: CdSe/ZnS QD-MRP_{Ab}

Figure 4 SDS-PAGE for verification of the conjugation of CdSe/ZnS QD (right) and MRP (left) antibody

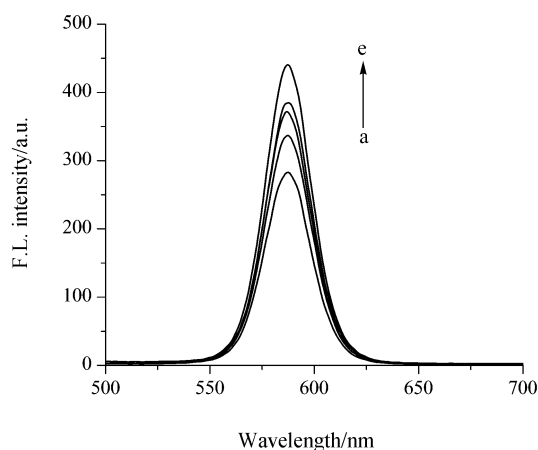


图5 MRP抗体与量子点相互作用的荧光光谱研究

a: CdSe/ZnS QD; b~e: CdSe/ZnS QD-MRP_{Ab}. $c_{MRP_{Ab}}$: 3.7×10^{-7} , 5.5×10^{-7} , 7.3×10^{-7} , 9.2×10^{-7} mol/L

Figure 5 Fluorescence study of the interaction between CdSe/ZnS QD and MRP antibody

2.3.2 反应时间的优化

CdSe/ZnS 量子点与MRP抗体混合后, 量子点的荧光瞬间增强, 并且1 h内强度未发生较大的变化(图8), 说明二者迅速达到作用平衡点, 具有较好的光学稳定性.

2.3.3 MRP抗体与CdSe/ZnS量子点结合浓度比的优化

用不同浓度的MRP抗体与CdSe/ZnS量子点结合发现, 当MRP抗体与量子点浓度比小于1.2:1时, 相对荧光强度逐渐增加; 当浓度比约为1.2:1时, 为荧光增强最大值(图9); 随着抗体浓度继续增加, 相对荧光强度又逐渐减弱. 因此选择浓度比为1.2:1作为二者结合的最佳浓度比.

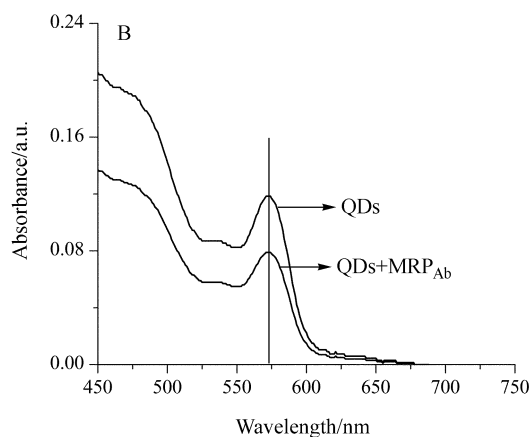
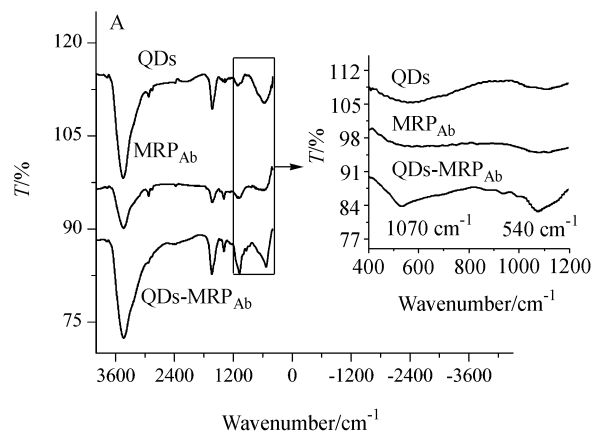


图6 CdSe/ZnS量子点与MRP抗体相互作用的傅立叶变换红外光谱(A)和紫外-可见吸收光谱(B)

Figure 6 Characterization of the conjugation of CdSe/ZnS QD and MRP antibody by FT-IR (A) and UV-Vis spectra (B)

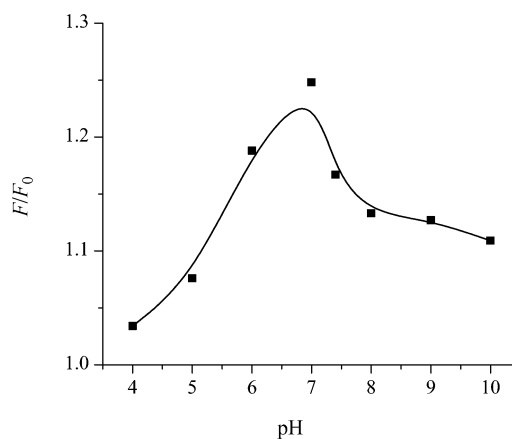


图7 pH值对CdSe/ZnS量子点-MRP抗体探针荧光强度的影响

Figure 7 The effect of pH on the fluorescence of CdSe/ZnS QD-MRP antibody probe

c_{QD} : 4.5×10^{-7} mol/L; $c_{MRP_{Ab}}$: 5.5×10^{-7} mol/L

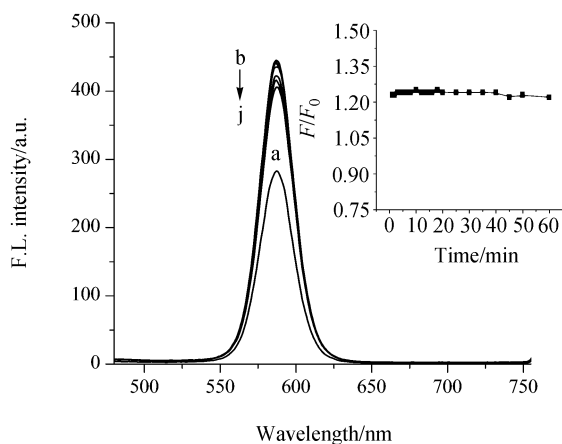


图 8 反应时间对 CdSe/ZnS 量子点-MRP 抗体探针荧光强度的影响

a: CdSe/ZnS QD; b~j: 不同作用时间的 CdSe/ZnS QD-MRP_{Ab}, c_{QD} : 4.5×10^{-7} mol/L; c_{MRPAb} : 5.5×10^{-7} mol/L

Figure 8 The effect of conjugate time on the fluorescence of CdSe/ZnS QD-MRP antibody probe

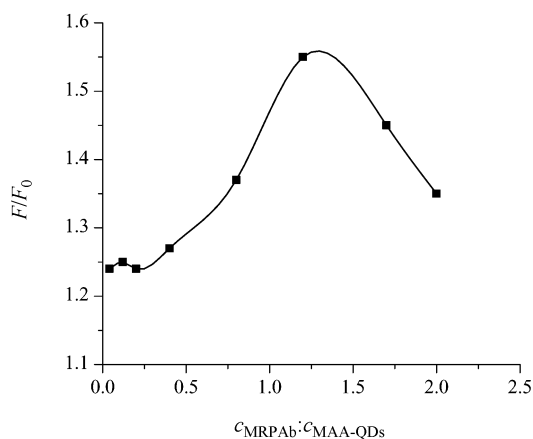


图 9 MRP 抗体浓度对 CdSe/ZnS 量子点-MRP 抗体探针荧光强度的影响

Figure 9 The effect of MRP concentration on the fluorescence of CdSe/ZnS QD-MRP antibody probe

c_{QD} : 4.5×10^{-7} mol/L; c_{MRPAb} : 1.8×10^{-8} , 5.5×10^{-8} , 9.2×10^{-8} , 1.8×10^{-7} , 3.7×10^{-7} , 5.5×10^{-7} , 7.3×10^{-7} , 9.2×10^{-7} mol/L

3 CdSe/ZnS 量子点探针对 MRP 抗原的分析检测

用制备的 CdSe/ZnS 量子点-MRP 抗体荧光探针对 MRP 抗原进行定量检测。研究表明, 这种量子点荧光探针对浓度在 $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-6}$ mol/L 范围的 MRP 抗原呈现良好的线性关系(图 10), 线性回归方程为: $y = 1.01 + 0.03 c_{\text{MRPAg}} \times 10^{-7}$ mol/L, 线性相关系数为 0.9976, 检测限约为 1.9×10^{-8} mol/L。

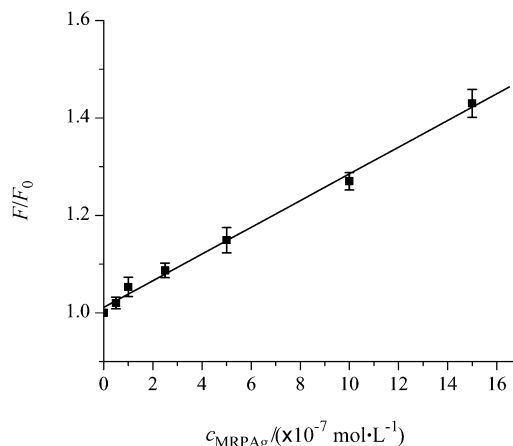


图 10 CdSe/ZnS 量子点-MRP 抗体荧光探针对 MRP 抗原的检测

Figure 10 The determination of MRP antigen by the probe of CdSe/ZnS QD-MRP antibody

c_{MRPAg} : 5.0×10^{-8} , 1.0×10^{-7} , 2.5×10^{-7} , 5.0×10^{-7} , 1.0×10^{-6} , 1.5×10^{-6} mol/L

4 结论

建立了一种用 CdSe/ZnS 量子点探针检测猪链球菌 2 型的重要致病毒力因子 MRP 抗原的新方法。通过荧光光谱的方法对 CdSe/ZnS 量子点-MRP 抗体探针的制备条件进行了优化, 在最佳条件下制备的量子点探针对 $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-6}$ mol/L 范围 MRP 抗原进行检测时获得了良好的线性关系, 线性相关系数为 0.9976, 检测限为 1.9×10^{-8} mol/L。凝胶电泳和光谱研究结果表明, MRP 抗体与 CdSe/ZnS 量子点的结合是通过表面配位作用实现的。本研究不仅提供了一种新的猪链球菌病检测方法, 并且为量子点用于动物重大疾病研究提供了重要的参考依据。

References

- Lu, C.-P. *Sci. Technol. Rev.* **2005**, *23*, 9 (in Chinese). (陆承平, 科技导报, **2005**, *23*, 9.)
- Starts, J. J.; Feder, I. *Vet. Res. Commun.* **1997**, *21*, 387.
- Baums, C. G.; Da, S. L. M.; Goethe, R. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **2003**, *110*, 378.
- Liu, T.-C.; Wang, J.-H.; Luo, Q.-M.; Zhang, H.-L.; Zhang, Z.-H.; Hua, X.-F.; Cao, Y.-C.; Zhao Y.-D.; Luo, Q.-M. *J. Biomed. Mater. Res.* **2007**, *83*, 1209.
- Bruchez, M. J.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Science* **1998**, *281*, 2013.
- Chan, W. C. W.; Nie, S.-M. *Science* **1998**, *281*, 2016.
- Li, P.; Liu, M.-C.; Zhang, C.-L.; Zhang, L.; Jin, L.-T. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*, 1075 (in Chinese). (李平, 刘梅川, 张成林, 程欲晓, 张莉, 金利通, 化学学报, **2005**, *63*, 1075.)

- 8 You, X.-G.; He, R.; Gao, F.; Shao, J.; Cui, D.-X. *Acta Chim Sinica* **2007**, *65*, 561 (in Chinese).
(尤晓刚, 贺蓉, 高峰, 邵君, 潘碧峰, 崔大祥, 化学学报, **2007**, *65*, 561.)
- 9 Hua, X.-F.; Liu, T.-C.; Cao, Y.-C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1665.
- 10 Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. *Science* **2005**, *307*, 538.
- 11 Fan, H.-J.; Lu, C.-P.; Tang, J.-Q. *Acta Microbiol. Sinica* **2004**, *44*, 54 (in Chinese).
(范红结, 陆承平, 唐家琪, 微生物学报, **2004**, *44*, 54.)
- 12 Peng, Z. A.; Peng, X.-G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 183.
- 13 Yu, W. W.; Qu, L.-H.; Guo, W.-Z.; Peng, X.-G. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854.
- 14 Hu, D.-H.; Wu, H.-M.; Liang, J.-G.; Han, H.-Y. *Spectrochim. Acta, Part A* **2008**, *69*, 830.
- 15 Liu, M.-C.; Shi, G.-Y.; Zhang, L.; Cheng, Y.-X.; Jin, L.-T. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 305.
- 16 Liang, J.-G.; Zhang, S.-S.; Ai, X.-P.; Ji, X.-H.; He, Z.-K. *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, *61*, 2974.
- 17 Dudley, H. W.; Ian, F. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Ed.: Zhao, X. F., **2001**, pp. 27~34.
- 18 Xu, L.; Xie, R.-G.; Zhuang, J.-Q.; Wang, L.-Y.; Yang, W.-S.; Li, T.-J. *J. Funct. Mater. Devi.* **2003**, *9*, 201 (in Chinese).
(徐力, 郭轶, 解仁国, 庄家骥, 王连英, 杨文胜, 李铁津, 功能材料与器件学报, **2003**, *9*, 201.)
- 19 Liu, T.-C. *Ph.D. Thesis*, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, **2006** (in Chinese).
(刘天才, 博士学位论文, 华中科技大学, 武汉, **2006**.)

(A0807044 Zhao, X.; Dong, H.)