

·研究快报·

量子点荧光技术标记口腔鳞癌细胞中 bcl-2 的研究

盘杰, 赵建江*, 王治平, 黄宇华, 陈军

(南方医科大学附属口腔医院//广东省口腔医院, 广东 广州 510280)

摘要:【目的】利用量子点(QD)优良的光学性质对人舌癌 Tca8113 细胞内 bcl-2 进行特异性荧光标记,并与异硫氰酸荧光素(FITC)进行光稳定性比较。【方法】分别利用 QD_{605nm} 和 FITC,通过间接免疫荧光法,在激光共聚焦显微镜下观测人舌癌 Tca8113 细胞内 bcl-2 的表达,并激光连续照射 1 h,用激光共聚焦显微镜自带软件 Leica Confocal Software 测量量子点 QD_{605nm} 和 FITC 的荧光信号强度。【结果】激光共聚焦显微镜下可见人舌癌 Tca8113 细胞内 bcl-2 明显表达,量子点 QD605 标记的荧光信号比 FITC 更具特异性,且激光连续照射 1 h, QD_{605nm} 标记的荧光未见明显衰减,而 FITC 标记的荧光 1 h 内已基本淬灭。【结论】量子点荧光标记技术能对细胞内 bcl-2 进行标记,比传统的有机荧光具有更显著的优点。

关键词:量子点;舌癌 Tca8113 细胞; bcl-2; 免疫荧光

中图分类号: R78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)05-0634-02

近年来基于半导体量子点(quantum dot, QD)发展起来的生物亲和性功能化的纳米荧光探针,由于其独特的光学性质, QD 技术在生物医学领域的应用,尤其在肿瘤学的生物成像技术研究中,前景非常广阔。国外已有将 QD 运用于乳腺癌细胞膜蛋白的分析及作为研究血液细胞的分子成像工具^[1-2],国内外未见有 QD 在口腔鳞癌蛋白研究中的报道。我们将 QD 标记技术引入口腔鳞癌的研究,通过对口腔鳞癌细胞中 bcl-2 特异性识别,研究 bcl-2 在口腔鳞癌的发生发展中的作用及量子点的生物学应用,为今后量子点在肿瘤研究中的应用和进一步发展提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人舌癌 Tca8113 细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。量子点(QD_{605nm})标记的链霉亲和素(QDs-SA)试剂盒购自武汉珈源量子点技术开发有限责任公司。鼠抗人 bcl-2 单克隆抗体,生物素化羊抗鼠 IgG,羊抗鼠 FITC-IgG 均购自武汉博士德生物工程有限公司。RPMI1640 培养基和胰蛋白酶向 Gibcobre 公司(USA)购买。胎牛血清采用杭州四季青公司产品。激光共聚焦显微镜(德国 Leica TCS SP2)检测在中山大学生命科学院实验中心进行。

1.2 方法

1.2.1 量子点的荧光和形态观察 用激光共聚焦显微镜观察量子点的发光颜色,发光强度和形态。

1.2.2 细胞培养 人舌鳞癌 Tca8113 细胞株培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中。置于 37℃、体积分数 5%的 CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,隔日换液,2~3 d

后胰蛋白酶消化细胞后传代。

1.2.3 细胞爬片与固定 将无菌盖玻片置于 12 孔培养板,然后取消化好的细胞按 1×10^6 /孔接种,培养 1~2 d,细胞长满盖玻片。用 0.01 mol/L TBS (pH 7.4)洗涤 2 次,冰甲醇固定 10 min。

1.2.4 量子点对舌癌细胞 bcl-2 蛋白的特异性识别 将固定好的舌癌 Tca8113 细胞 TBS 洗涤 2 次,加入通透液室温孵育 10 min, TBS 洗涤 3 次。滴加封闭缓冲液 37℃湿盒中孵育 30 min,加入鼠抗人 bcl-2 抗体(稀释比 1:100, 50 μL/孔,阴性对照采用 TBS 代替一抗) 37℃湿盒中孵育 1 h, TBS 洗涤 3 次。封闭缓冲液 37℃湿盒中孵育 10 min,加入生物素化羊抗鼠 IgG(稀释比 1:100, 50 μL/孔) 37℃湿盒中孵育 45 min, TBS 洗涤 3 次。封闭缓冲液 37℃湿盒中孵育 10 min,滴加 QDs-SA(稀释比 1:100, 50 μL/孔) 37℃湿盒中孵育 45 min, TBS 洗涤 3 次。最后取出盖玻片,缓冲甘油封片。

1.2.5 FITC 对舌癌细胞 bcl-2 蛋白的特异性识别 洗涤孵育等同 1.2.4,二抗改羊抗鼠 FITC-IgG(稀释比 1:48, 50 μL 孔),孵育洗涤后取出盖玻片,缓冲甘油封片。

1.2.6 激光共聚焦显微镜下检测与比较 激光共聚焦显微镜观察,参数设置:激发光谱波长 488 nm,激光强度 100 mW, QD_{605nm} 所用发射光滤光片范围是 590~615 nm, FITC 所用发射光滤光片范围是 505~530 nm。所用的检测都是在相同的室温共聚焦条件下进行,激光连续激发时间为 1 h。在激光共聚焦显微镜下,每 5 min 自动获取一张图像。荧光强度用 Leica Confocal Software 测量,重复测量 3 次,取平均值作为测量结果。平均荧光强度 = 总的荧光强度/细胞数,将其归一化后对 QD 和 FITC 进行光稳定性比较。

收稿日期: 2009-01-19

基金项目: 国家自然科学基金(30672340); 广东省科技计划项目(2008B030301183); 广东省医学科学技术研究基金(A2006106; A2007103)

作者简介: 盘杰, 硕士研究生, 医师; * 通信作者, 赵建江, 教授, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: zjj2521@sina.com

2 结 果

2.1 两种标记的 Bcl-2 形态

在激光共聚焦显微镜下量子点为接近圆形的红色荧光,最大发射波长为 605 nm。激光共聚焦显微镜下可以清楚的观察到, QD_{605nm} 特异性标记的 bcl-2 在人舌癌 Tca8113 细胞浆,核膜上均有明显表达,表现为红色荧光,而没有加一抗的舌癌 Tca8113 细胞检测到 QD 荧光非常弱且不能显示细胞形态, 形成阴性对照。FITC 特异性标记的 bcl-2 在人舌癌 Tca8113 细胞浆上有明显表达,表现为绿色荧光,在核膜表达不明显(图 1)。

2.2 QD 和 FITC 光稳定性实验

QD 红色荧光在高强度共聚焦激光连续激发 1 h 后荧光无明显减弱,而 FITC 绿色荧光在共聚焦激光前 5 min 衰减不明显,从激发 5 min 后衰减特别明显,1 h 内基本淬

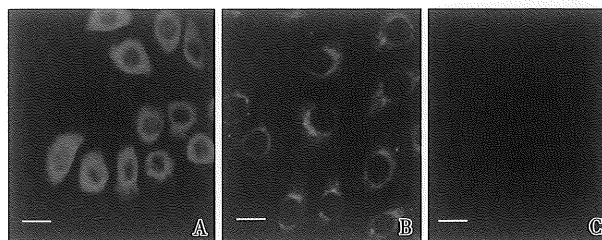


图 1 人舌癌 Tca8113 细胞内 bcl-2 的荧光成像

Fig.1 Confocal fluorescence images of bcl-2 in Tca8113 cells

A: Cells incubated with monoclonal anti-bcl-2 antibody and QD_{605nm}; B: Cells incubated with monoclonal anti-bcl-2 antibody and FITC; C: Negative control, in which the cells were incubated with TBS and QD_{605nm}; Images were captured with a confocal microscope; Scale bar:20 μm

灭。激光共聚焦显微镜自带的软件测量,在激光照射 1 h 内将每隔 5 min 收集到的量子点荧光数据标准后制成图,对 QD 和 FITC 进行光稳定性比较(图 2、3)。

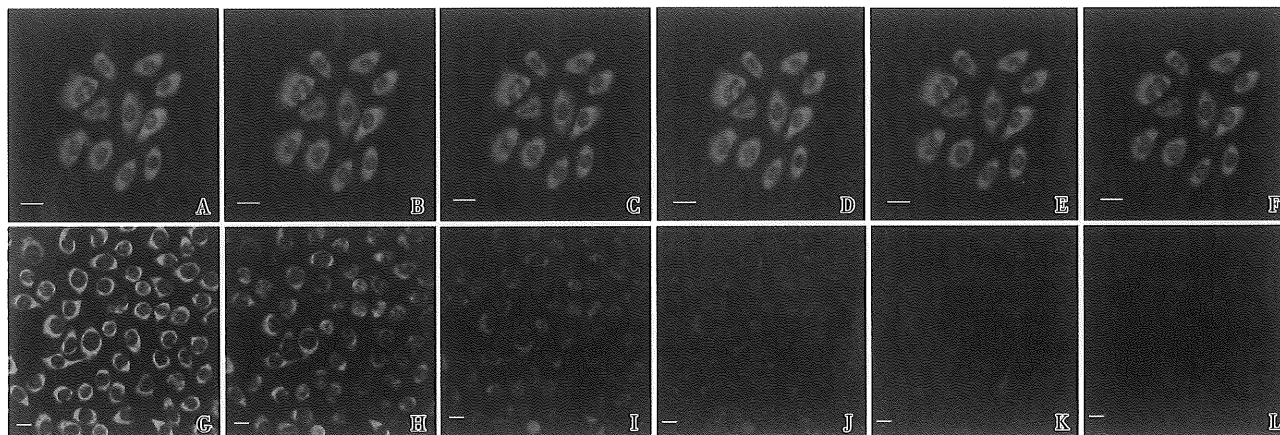


图 2 QD_{605nm} 和 FITC 标记的 Tca8113 细胞内 bcl-2 的荧光成像

Fig.2 Confocal fluorescence images of bcl-2 in Tca8113 cells with QD_{605nm} and with FITC

A-F: QD_{605nm} at 0,10,20,30,40, and 50 min, Scale bar = 20 μm; G-L: FITC at 0,10,20,30,40, and 50 min, Scale bar: 20 μm (images for the use of under continuous illumination with 488 nm laser)

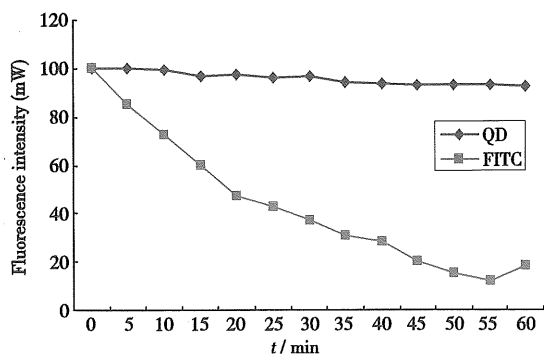


图 3 QD_{605nm} 与 FITC 荧光强度比较

Fig.3 Comparison of fluorescence intensity between QD_{605nm} and FITC conjugated to Tca8113 cells

3 讨 论

量子点是近年来发现的一种新型荧光标记物,比传统的有机荧光材料具有更优秀的光学特性: 激发光谱宽, Stokes 位移(激发峰波长和发射峰波长差值)较大(300 ~ 400 nm)^[3]。目前研究较多的量子点是由 CdSe 核心和 ZnS 外壳组成的壳核结构,直径 2 ~ 6 nm。本实验采用链霉素和素标记的量子点复合物(QDs-SA),它是亲和素共价结合于 QD 表面,然后生物素化与生物分子(如蛋白和抗体)结合,结合后所得生物分子与量子点的复合物性质稳定,有利于实验观察。

凋亡抑制蛋白 bcl-2 在口腔鳞癌中高表达,bcl-2 蛋白最早是从 B 细胞淋巴瘤分离出来的癌基因,已经证实 bcl-

(下转第 638 页 to page 638)