

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.007

基于量子点荧光共振能量转移(FRET)效应的裂开型 CD20 核酸适配体 探针用于非霍奇金淋巴瘤的检测研究 *

张李钰¹ 刘瑞萍² 杨 颖¹ 孙宏利¹ 王 猛³ 武海滨^{4△}

(1 西安市儿童医院 陕西省儿科疾病研究所 陕西 西安 710002; 2 西安市儿童医院营养科 陕西 西安 710002;

3 解放军第 946 医院 骨一科 新疆 伊犁 835000; 4 西安市儿童医院儿科重症监护病房 陕西 西安 710002)

摘要 目的: 构建新型的基于量子点荧光共振能量转移效应的裂开型 CD20 核酸适配体激活式荧光探针用于非霍奇金淋巴瘤 (Non-Hodgkin Lymphoma, NHL) 的检测。**方法:** 将 CD20 核酸适配体 CE4-1 进行裂解, 结合量子点和 Cy5 荧光供受体队之间的 FRET 效应, 利用流式细胞术, 对裂开型核酸适配体的裂开位置、比例、浓度和反应时间进行优化, 并在最优条件下评估该检测体系对 CD20⁺ 细胞的检测特异性。**结果:** 将 CD20 核酸适配体 CE4-1 分别裂开成 CE4-1-1a/CE4-1-1b 和 CE4-1-2a/CE4-1-2b 两种组合, 分别修饰量子点 (QD) 或荧光受体 Cy5 后两两组合, 分别与 CD20⁺ 细胞孵育, 流式细胞术发现 CE4-1-1a/CE4-1-2b 组合时信号最强; 进一步, 通过探索两种探针比例、探针浓度、孵育时间等参数, 发现当 CE4-1-1a 和 CE4-1-2b 浓度比例为 1:5、CE4-1-1a 浓度为 4 nM、孵育时间为 50 min 时, 该裂开型核酸适配体体系显示出对靶肿瘤细胞最强的亲和力和 FRET 信号激活性能。进一步, 实验发现该体系与 CD20⁺ 细胞 (Raji 和 Ramos) 可产生较强信号, 而与 CD20⁻ 细胞 (Jurkat、K562、Min6 和 Hela) 均未产生阳性信号, 提示该探针可有效保持对 CD20⁺ 细胞的高特异性。**结论:** 基于量子点荧光共振能量转移 (FRET) 效应的裂开型 CD20 核酸适配体探针体系在检测 CD20⁺ 细胞方面表现出了极低的背景信号, 同时有着较好的 FRET 信号值, 有望实现 CD20⁺ NHL 细胞的高灵敏激活式检测。

关键词: 核酸适配体; CD20; 量子点; FRET; 非霍奇金淋巴瘤

中图分类号: R-33; R733 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)18-3432-06

Detection of NHL Cells based on Split CD20 Aptamer and QDs-mediated FRET Effect *

ZHANG Li-yu¹, LIU Rui-ping², YANG Ying¹, SUN Hong-li¹, WANG Meng³, WU Hai-bin^{4△}

(1 Shaanxi Institute of Pediatric Diseases, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710002, China;

2 Department of Nutritional, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710002, China;

3 Department of orthopedics, The 946th hospital of PLA, Yili, Xinjiang, 835000, China;

4 Department of Pediatric intensive care unit, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710002, China)

ABSTRACT Objective: To construct novel splitted CD20 aptamer system based on FRET for the detection of NHL. **Methods:** CD20 aptamer CE4-1 was splitted as CE4-1-1a/CE4-1-1b group or CE4-1-2a/CE4-1-2b group. Splitted aptamers were modified with QD or Cy5 separately, and incubated with CD20⁺ cells. Cells were evaluated by flow cytometry and CE4-1-1a/CE4-1-2b group generated the strongest signal. Further, the ratio, concentration and incubation time of splitted aptamer system were explored, and the detection specificity was evaluated. **Results:** It is shown that when the ratio of CE4-1-1a/CE4-1-2b was 1:5, the concentration of CE4-1-1a was 4 nM, and the incubation time was 50 min, the splitted aptamer system exhibited the strongest FRET signal. In addition, this system generated relative strong signal with CD20⁺ cell lines (Raji and Ramos), whereas exhibited no positive signal with CD20⁻ cell lines (Jurkat, K562, Min6 and Hela), indicating the detection specificity to CD20⁺ cells. **Conclusions:** The CD20 splitted aptamer system based on FRET for the detection of NHL exhibits weak background signal and relatively strong FRET signal, which presents a promising method for detection of CD20⁺ NHL cells.

Key words: Aptamer; CD20; Quantum dot; FRET; NHL

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R733 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)18-3432-06

* 基金项目: 陕西省重点研发项目 (2017-SF-280); 西安市科技计划项目 (SF1510(4))

作者简介: 张李钰 (1989-), 硕士, 助理研究员, 主要研究方向: 核酸适配体, 电话: 18066858662, E-mail: liyu_17@sina.com

△ 通讯作者: 武海滨 (1971-), 主任医师, 主要研究方向: 儿内科, 电话: 18092695726, E-mail: whb13991280571@126.com

(收稿日期: 2019-01-28 接受日期: 2019-02-23)

前言

儿童淋巴瘤是继白血病、颅内肿瘤内后的第3位常见肿瘤^[1],其中儿童非霍奇金淋巴瘤(NHL)是最常见的高侵袭性、高恶性的淋巴瘤建立淋巴瘤的正确诊断和分类对于儿童淋巴瘤的治疗具有重大意义^[2]。据临床数据统计,儿童淋巴瘤误诊率高,由于病理诊断造成的误诊占24.8%。目前使用的免疫染色多是免疫酶标技术,其通过携带荧光素或者酶反应显色等方法实现对肿瘤组织的蛋白表达进行分析^[3]。这种方法有激发光谱窄、发射光谱宽、光漂白现象严重等缺陷,同时采取的是"always on"信号模式,由于体系中未与靶标结合探针的信号始终存在,"always on"模式往往表现出背景信号高、灵敏度有限等不足,难以适应肿瘤早期诊断的需要。因此,亟需寻找新型免疫染色技术策略。

核酸适配体(Aptamer)是新型DNA或RNA小分子^[4],可与靶标特异性结合,在生物检测上有显著优势^[5]:无批次间差异、成本低、易于修饰等优点^[6-9]。量子点由于具有吸收光谱宽、发射光谱窄、荧光强度高、光稳定性好、发射光谱可调等优越特性,在体内外肿瘤检测中受到了重要关注^[10,11]。因此,本文对CD20的核酸适配体CE4-1进行裂开,分别标记量子点和荧光受体Cy5,利用FRET效应对该裂开型核酸适配体探针用于NHL肿瘤细胞检测进行系统考察和优化,初步探讨其用于NHL检测的可行性。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

CD20核酸适配体CE4-1(5'-TGCGTGTGTAGTGTGTCT-GTTTTTATCTTCTTTTATCTACTCTTAGGGATTTGGGCG-G-3')^[12]、其裂开序列和荧光修饰均由上海生工合成;人IFN- γ 蛋白和牛血清蛋白BSA购于北京义翘神州生物技术有限公司;胎牛血清为四季青公司产品;链霉亲和素包被顺磁纳米磁珠购于德国Promega公司;磁性微球Affimag UF表面修饰羧基COOH购买于天津倍思乐色谱技术开发中心;PBS缓冲液购买于Hyclone公司;碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCL)购买于Sigma公司;羧基化量子点购于Thermo Fisher公司;人B淋巴瘤细胞系Raji和Ramos、人T淋巴瘤细胞Jurkat、人急性髓系白血病细胞K562、乳腺癌细胞MCF-7、胰腺癌细胞Min6和Hela细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

CD20核酸适配体CE4-1(5'-TGCGTGTGTAGTGTGTCT-GTTTTTATCTTCTTTTATCTACTCTTAGGGATTTGGGCG-G-3')^[12]、其裂开序列和荧光修饰均由上海生工合成;人IFN- γ 蛋白和牛血清蛋白BSA购于北京义翘神州生物技术有限公司;胎牛血清为四季青公司产品;链霉亲和素包被顺磁纳米磁珠购于德国Promega公司;磁性微球Affimag UF表面修饰羧基COOH购买于天津倍思乐色谱技术开发中心;PBS缓冲液购买于Hyclone公司;碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCL)购买于Sigma公司;羧基化量子点购于Thermo Fisher公司;人B淋巴瘤细胞系Raji和Ramos、人T淋巴瘤细胞Jurkat、人急性髓系白血病细胞K562、乳腺癌细胞MCF-7、胰腺癌细胞Min6和

Hela细胞由本实验室保存。

流式细胞仪为美国BD公司产品,型号为FACS Calibur。

1.3 细胞培养

人B淋巴瘤细胞系Raji,Ramos,人T淋巴瘤细胞Jurkat和人急性髓系白血病细胞K562分别培养于含10%胎牛血清的1640培养基中,培养条件为37℃,5%CO₂。细胞均为悬浮细胞,每日观察细胞生长状态,及时更换培养基,定时传代,以保证细胞处于良好状态。乳腺癌细胞MCF-7、胰腺癌细胞Min6和宫颈癌Hela细胞分别培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,培养条件为37℃,5%CO₂,当细胞密度达到80%时,胰酶消化细胞进行传代。所有试验所用细胞均是处于对数生长期的细胞。

1.4 裂开型核酸适配体的构建

选择NHL的肿瘤标志物分子CD20的核酸适配体分子CE4-1为研究对象,将完整的CE4-1从2个位置进行裂开,分别得到了CE4-1-1a、CE4-1-1b和CE4-1-2a、CE4-1-2b共两对裂解片段,其可共组成4种不同的配对组合,将其进行相应的量子点及Cy5标记。将不同的片段组合分别和 2×10^5 个细胞于冰上孵育30 min,当二者与靶细胞结合形成特定构型后量子点和Cy5染料对可以相互靠近进而产生FRET效应,采用流式细胞术检测不同片段组合对Raji细胞的识别能力,Jurkat细胞作为阴性对照,评估各组平均荧光强度,选择信号最强的作为最佳的片段组合。

1.5 裂开型核酸适配体比例优化

为了最大程度增强荧光信号,我们对裂开型核酸适配体之间的比例进行优化。以50 nM为基准,选择信号最优的CE4-1-1a和CE4-1-2b配对,采用1:20、1:10、1:5、1:1、2:1、5:1和10:1这四组浓度比例,分别与 2×10^5 个Raji细胞于冰上孵育30 min,流式细胞术检测不同片段对靶细胞的识别能力,评估各组平均荧光强度,选择信号最强的浓度比例进行后续试验。

1.6 裂开型核酸适配体浓度优化

核酸适配体的裂开将影响其原始的解离常数。若核酸适配体浓度过低,会导致阳性信号强度太弱,若核酸适配体浓度过高,则会导致非特异性信号增强。为了最大程度提高阳性信号的强度同时降低背景噪音,我们分别将1 nM、2 nM、4 nM、8 nM、10 nM的CE4-1-2b-Cy5分别与5倍浓度的CE4-1-1a-QD进行组合,分别与 2×10^5 个细胞于冰上孵育30 min,流式细胞术检测其信号强度,评估各组平均荧光强度,以确定最佳浓度。

1.7 裂开型核酸适配体孵育时间优化

为了进一步提高信号强度,我们对裂开型核酸适配体体系与靶细胞的孵育时间进行优化。将已优化的裂开型核酸适配体按照4 nM、CE4-1-1a和CE4-1-2b浓度比例为8:1分别与CD20⁺细胞Raji分别孵育20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、90 min,流式细胞术检测信号强度,评估各组平均荧光强度。

1.8 裂开型核酸适配体检测特异性评估

为了评估裂开型核酸适配体体系对CD20⁺细胞的检测特异性,将已优化的裂开型核酸适配体按照4 nM、CE4-1-1a和CE4-1-2b浓度比例为1:5分别与CD20⁺细胞(Ramos,Raji)和CD20⁻细胞(Jurkat、K562、MCF-7、Min6和Hela)于冰上孵育

50 min, 流式细胞术检测信号强度, 评估各组平均荧光强度。

1.9 统计学分析

多样本数据采用方差分析, 使用 SPSS 15.0 统计软件包进行分析, 每组数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验原理

本实验以 CD20⁺ 细胞为研究对象, 通过将 CD20 核酸适

体分割为两段, 并分别标记 FRET 荧光供体量子点和荧光受体 Cy5, 利用核酸适配体构象多样的特点, 在适当的情况下, 当出现靶标分子时两端残片会靶向识别细胞膜表面蛋白并组合成类似完整核酸适配体的功能结构, 从而拉近分别标记在两端的荧光供体与受体, 以产生 FRET 效应, 发生信号激活并产生荧光信号(图 1), 以期弥补传统 "always on" 探针高背景的缺陷, 进一步改善了现存 "激活式" 探针在复杂环境中降解引起假阳性信号的不足, 具备极低的背景信号, 从而能够具备较高的检测灵敏度, 达到对 NHL 肿瘤细胞的早期检测。

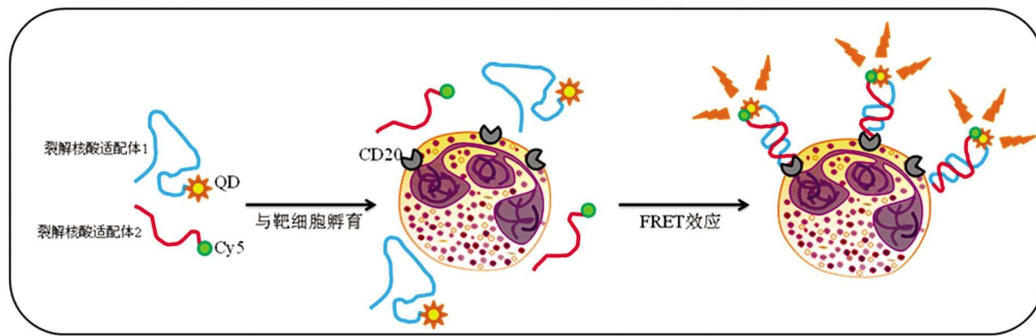


图 1 基于 FRET 信号模式的裂开型核酸适配体探针用于 CD20⁺ 细胞检测原理图

Fig.1 Schematic representation of the detection of CD20⁺ cells based on split aptamer and QDs-mediated FRET effect

2.2 构建裂开型核酸适配体检测体系

如图 2 所示, 我们根据自由能及熵等数值, 采用了两种策略对核酸适配体 CE4-1 进行裂开, 分别获得了 4 条核酸适配体片段, 分别命名为 CE4-1-1a、CE4-1-1b、CE4-1-2a 和 CE4-1-2b。其中, CE4-1-1a 和 CE4-1-2a 核酸适配体的 3' 端标记量子点, CE4-1-1b 和 CE4-1-2b 的 5' 端标记 Cy5 荧光染料。以上核酸适配体两两组合可以获得 4 种不同裂开位置的 FRET 组合。将这

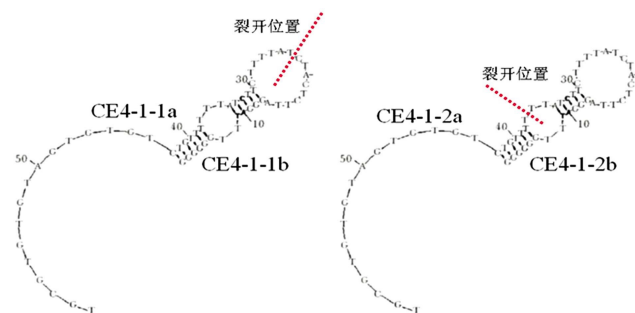


图 2 两种不同裂开位点的核酸适配体片段具体裂开位置以及碱基序列

Fig.2 Cleavage sites and sequences of two types split aptamer

2.3 裂开型核酸适配体检测体系比例优化

将量子点和 Cy5 分别标记的 CE4-1-1a/CE4-1-2b 两条裂开型核酸适配体片段的 4 中不同比例特异性识别 Raji 细胞。如图 4 所示, 随着比例的降低, 信号呈先上升再下降的趋势, 其中 1:5 比例时信噪比最低, 荧光信号最强, 与最低信号相比, 达到统计学差异。这可能是高浓度的核酸适配体片段会诱导低浓度的核酸适配体更多的结合到细胞从而导致信号的增强, 当继续增加一条链的浓度时反而会降低信号, 这可能因为背景噪音增强。因此, 我们选择 CE4-1-1a/CE4-1-2b 为 5:1 作为后续实验的核酸适配体片段最佳比例。

4 种组合分别与 Raji 细胞孵育后, 采用流式细胞术进行检测的结果及其信噪比分析 (如图 2 和图 3)。实验结果显示, 与 CD20⁻ 细胞 Raji 相比, CD20⁺ 细胞均产生较强的信号, 同时, CE4-1-1a 和 CE4-1-2b 可以产生最强的阳性信号, 因此, 我们选择 CE4-1-1a / CE4-1-2b 这一组合对作为后续实验的裂开型核酸适配体片段。

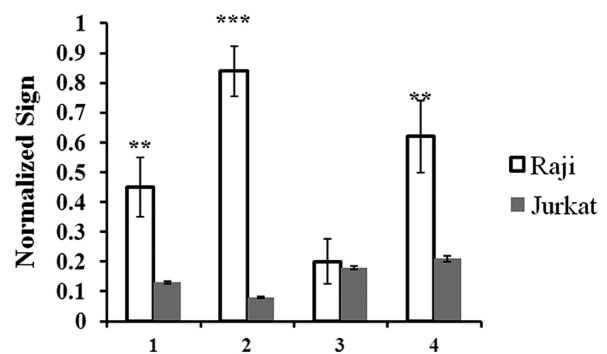


图 3 四种裂开型核酸适配体组合识别靶细胞归一化信背比柱状图。

其中, 1) CE4-1-1a-QD/CE4-1-1b-Cy5; 2) CE4-1-1a-QD/CE4-1-2b-Cy5; 3) CE4-1-2a-QD/CE4-1-1b-Cy5; 4) CE4-1-2a-QD/CE4-1-2b-Cy5. (* 代表 $P<0.05$; ** 代表 $P<0.01$; *** 代表 $P<0.001$)

Fig.3 Normalized ratio of four split aptamer groups incubated with cells. (* presents $P<0.05$; ** presents $P<0.01$; *** presents $P<0.001$)

2.4 裂开型核酸适配体浓度优化

为了进一步增加荧光信号并降低背景噪音, 我们采用 CE4-1-1a/CE4-1-2b 为 1:5 的比例进行浓度优化。我们分别将 1 nM、2 nM、4 nM、8 nM、10 nM 的 CE4-1-2b-Cy5 分别与 5 倍浓度的 CE4-1-1a-QD 进行组合, 与 Raji 细胞孵育后进行流式

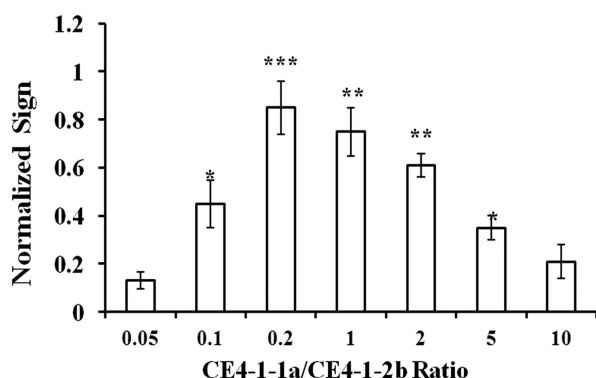


图4 裂开型核酸适配体体系比例优化归一化信背比柱状图(*代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$; ***代表 $P < 0.001$)

Fig.4 Normalized ratio of the ratio optimization for split aptamer system.
(* presents $P < 0.05$; ** presents $P < 0.01$; *** presents $P < 0.001$)

细胞术检测。如图5所示,随着探针浓度的升高,信号逐渐增加。当CE4-1-2b-Cy5浓度为4 nM时,信号最强,与信号最弱组相比达到统计学差异。而当浓度高于4 nM后,我们观察到细胞出现大面积死亡,如图6所示,MTT结果显示探针浓度为8 nM时细胞存活率为 $71 \pm 8\%$,浓度为10 nM时细胞存活率仅为 $46 \pm 5.6\%$,其可能由于渗透压和缓冲浓度的原因导致,因此,我们选择了4 nM作为CE4-1-1a / CE4-1-2b的最适浓度进行后续实验。

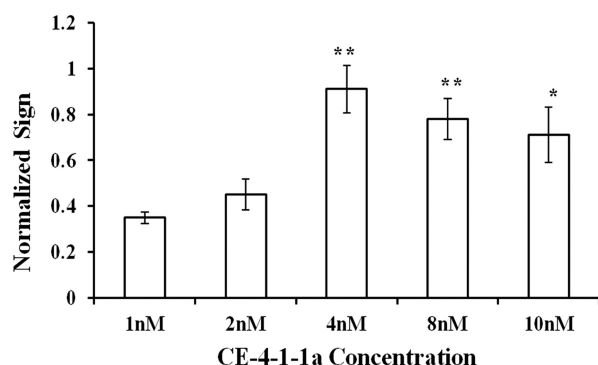


图5 裂开型核酸适配体体系浓度优化归一化信背比柱状图(*代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$)

Fig.5 Normalized ratio of the concentration optimization for split aptamer system. (* presents $P < 0.05$; ** presents $P < 0.01$)

2.5 裂开型核酸适配体孵育时间优化

为了进一步提高信号强度,我们对裂开型核酸适配体体系与靶细胞的孵育时间进行优化。将已优化的裂开型核酸适配体按照4 nM、CE4-1-1a和CE4-1-2b浓度比例为1:5分别与CD20⁺细胞Raji分别孵育20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、90 min,流式细胞术检测信号强度。如图7所示,随着培育时间的延长,信号逐渐增强,在50 min信号强度达到顶峰,达到统计学差异。而在60 min以后背景噪音增强,可能与非特异性吸附相关。因此,我们选择50 min孵育时间为标准。

2.6 裂开型核酸适配体检测特异性评估

为了评估裂开型核酸适配体体系对CD20⁺细胞的检测特异性,将已优化的裂开型核酸适配体按照4 nM、CE4-1-1a和CE4-1-2b浓度比例为1:5分别与CD20⁺细胞(Ramos和Raji)

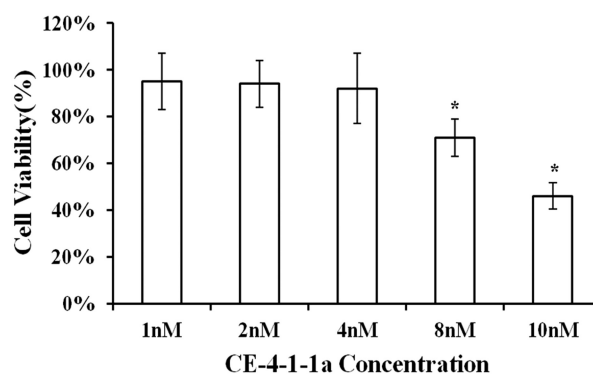


图6 MTT检测裂开型核酸适配体体系对细胞存活率的影响(*代表 $P < 0.05$)

Fig.6 The influence of splitted aptamer to cell viability detection by MTT assay (* presents $P < 0.05$;))

和CD20⁻细胞(Jurkat, K562, Min6和Hela)于冰上孵育50 min,流式细胞术检测信号强度。如图8所示,CD20⁺细胞均产生较强的信号,而CD20⁻细胞几乎无信号产生。因此,该裂开型核酸适配体检测体系具有较好的检测特异性。

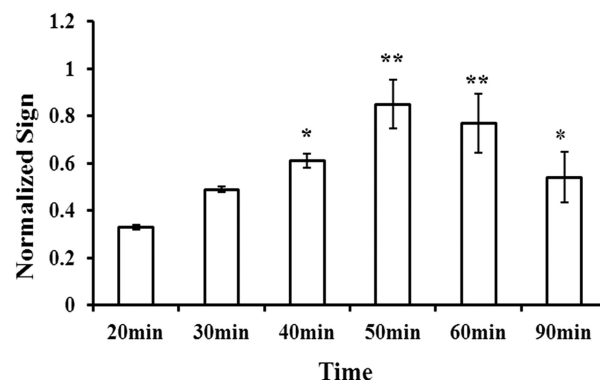


图7 裂开型核酸适配体体系孵育时间优化归一化信背比柱状图。

(*代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$)

Fig.7 Normalized ratio of the incubation time optimization for split aptamer system. (* presents $P < 0.05$; ** presents $P < 0.01$)

3 讨论

非霍奇金淋巴瘤是一种严重威胁儿童健康的疾病,是恶性淋巴瘤的一大类型,在我国非霍奇金淋巴瘤(NHL)所占比例远高于霍奇金病(HD),是小儿血液系统中仅次于白血病而威胁儿童身心健康的第二大恶性肿瘤^[1,13]。NHL是一组很不均一的疾病,由于淋巴细胞的分化阶段不同,因而在受侵袭的淋巴组织或者淋巴结处会出现不同阶段的肿瘤细胞,可有低分化的细胞,也可有高分化的细胞,甚至可能随着病变的进展,出现组织学类型转变,所以NHL的病因、病理、临床表现和治疗都有差异。据临床数据统计,儿童淋巴瘤误诊率高,由于病理诊断造成的误诊占24.8%^[14],其中包括病例医师对病理形态认识不够所致,标本取材不当,染色不当等原因,同时,传统的荧光素有激发光谱窄、发射光谱宽、光漂白现象严重等缺陷,降低了免疫荧光分析的准确度,增加了对儿童NHL的误诊率。核酸适配体是近年新兴的靶向小分子,其化学本质是一段寡核苷酸链,可为

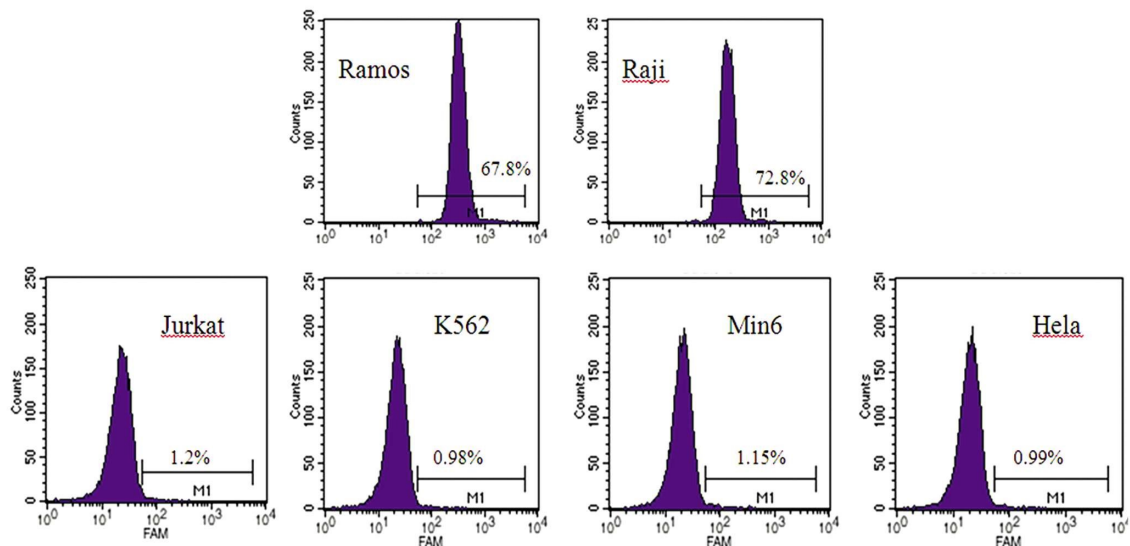


图8 流式细胞术评估裂开型核酸适配体体系检测特异性。

Fig.8 Specificity evaluation of split aptamer system by flow cytometry.

脱氧核苷酸(DNA)或核苷酸(RNA),一般含有 20-100 个碱基不等^[15]。大量实验证实,核酸适配体是具有应用前景的靶向小分子,可与靶标以高特异性及高亲和力进行结合,其对靶标的特异程度不亚于抗体,甚至强于抗体^[15-20]。核酸适配体有望成为新一代分子识别探针,并在肿瘤成像、检测和治疗等领域发挥重要作用。量子点(QDs)是一种新型荧光纳米微粒,由 II~VI 族和 III~V 族元素组成的半导体荧光纳米材料,通常直径在 1~100 nm 之间。与传统荧光基团相比,QDs 吸收光谱宽,可以被小于发射波长 10 nm 的任何波长激发;发射光谱窄^[10];不同直径的 QDs 之间不会存在串色的可能;荧光强度高、灵敏度高,稳定性好。当 QDs 作为荧光标记物用于细胞蛋白的检测,灵敏度和特异性更高,背景噪音小,更有利于检测出含量极少的异性细胞;互不串色,不影响检测结果。量子点为发展高灵敏、高稳定的肿瘤细胞荧光检测方法提供了一种理想的信号报告探针^[21]。

基于此,本研究将 CD20 核酸适配体 CE4-1 通过裂解并连接量子点与荧光受体 Cy5,基于靶细胞可诱导上述两段裂开片段形成特定识别构型拉近荧光供受体对进而导致 FRET 效应的原理,构建了一种新型 CD20⁺ 细胞激活式检测荧光探针。通过系统考察该核酸适配体探针的裂开位点、探针比例和浓度和反应时间等实验条件,在 CE4-1-1a-QD 和 CE4-1-2b-Cy5 浓度为 1:5、CE4-1-1a 浓度为 4 nM、孵育时间为 50 min 时,染料标记在裂开位点处等一系列条件下,该探针显示出对靶肿瘤细胞最强的亲和力和 FRET 信号激活性能,同时,该体系能以一定的特异性识别 CD20⁺ 细胞,实现了 CD20⁺ 细胞的特异性激活式分析检测研究。

在本研究中,考虑到在实际应用中,血清等复杂生物样品存在大量内源性荧光干扰物质,在可见光激发下会产生较强的荧光背景噪音,会导致 CD20⁺ 细胞检测的灵敏度降低。因此,本实验选择近红外 QD 作为荧光供体。与其他 QD 相比,近红外 QDs 具有 Stokes 位移大、信号强度高优点,其荧光发射处于近红外光区^[22-25],可有效降低生物本底自发荧光干扰,实验数据

显示基于近红外 QD 的裂开型核算适配体检测体系在血清中背景噪音显著低于传统检测技术。因此,基于近红外 QD 的裂开型核酸适配体对于血清等复杂生物样品具有更强的适应性和检测性能。

CD20 核酸适配体 CE4-1 是性能优良的核酸适配体,体外细胞实验显示其能以较强的特异性与较高的亲和力识别细胞表面 CD20 分子。本研究的裂开型核酸适配体检测体系基于 CE4-1,利用其对 CD20 分子的结合特异性通过 FRET 效应达到 CD20⁺NHL 细胞的识别作用。实验数据发现,尽管裂开型核酸适配体能以一定的特异性检测 CD20⁺NHL 细胞,然而,我们的实验数据显示,标记了 QD 和 Cy5 的裂开型核酸适配体在保持了对 CD20⁺NHL 细胞识别能力,但 FRET 信号明显降低。由于 FRET 主要是基于受体供体之间距离变化而产生的光物理现象^[26-30],其荧光信号传导效率极度依赖受体与供体荧光分子之间的距离,我们分析其可能的原因有:1. 将 CE4-1 裂开成两条核酸适配体后,其对 CD20 的识别能力下降,进而使得 FRET 信号减弱;2. 我们在原核酸适配体 CE4-1 两端分别标记量子点以及 Cy5,由于量子点比较大的空间位阻以及 FRET 信号产生基团分别位于核酸适配体的两端,因此当裂开型核酸适配体与靶细胞结合后,稳定的识别构象会因 QDs 大的空间位阻以及端部动态平衡导致 QDs 与 Cy5 染料分子之间存在较大的距离,从而削弱了 FRET 效应;3. 供体发射光谱和受体激发光谱的重叠度也将严重影响其 FRET 信号的强度。本研究所用的 QD 发射光谱与 Cy5 荧光基团的激发光谱重叠度小,可能导致能量转移不充足,导致 FRET 信号弱。因此,在后续的研究中,将基于以上问题,进一步提高 FRET 效应,完善 CD20⁺ NHL 细胞靶向检测特异性和灵敏度。

综上,基于 CD20 核酸适配体 CE4-1 的裂开型核酸适配体检测体系,可特异性识别 CD20⁺ 细胞,并克服了传统 "always on" 探针背景高、灵敏度低的缺陷,具备极低的背景信号,有望发展成为一种新型核酸适配体探针设计模式用于低背景、高灵敏检测肿瘤细胞。

参 考 文 献(References)

- [1] Chen ZS, Zheng YZ, Chen YQ, et al. Clinical features and prognosis of children with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 28 cases[J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2018, 20(6): 470-474
- [2] Rath FW. The significance of the enzyme histochemistry in the diagnosis of malignant non-Hodgkin's lymphomas (author's transl) [J]. Arch Geschwulstforsch, 1979, 49(8): 702-714
- [3] Burkhardt B, Oschlies I, Klapper W, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in adolescents: experiences in 378 adolescent NHL patients treated according to pediatric NHL-BFM protocols [J]. Leukemia, 2011, 25(1): 153-160
- [4] Wu HB, Wang M, Dai B, et al. Novel CD123-aptamer-originated targeted drug trains for selectively delivering cytotoxic agent to tumor cells in acute myeloid leukemia theranostics[J]. Drug Deliv, 2017, 24(1): 1216-1229
- [5] Liu D, Zhang Z, Yin Y, et al. Development and evaluation of a novel in situ target-capture approach for aptamer selection of human noroviruses[J]. Talanta, 2019, 193: 199-205
- [6] Bouvier Muller A, Duconge F, Application of aptamers for in vivo molecular imaging and theranostics [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 134: 94-106
- [7] Dougherty CA, Cai W, Hong H, et al. Applications of aptamers in targeted imaging: state of the art [J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15(12): 1138-1152
- [8] He F, Wen N, Xiao D, et al. Aptamer Based Targeted Drug Delivery Systems: Current Potential and Challenges[J]. Curr Med Chem, 2018, Oct 8 [Epub ahead of print]
- [9] Li J, Zhou W, Yuan R, et al. Aptamer proximity recognition-dependent strand translocation for enzyme-free and amplified fluorescent detection of thrombin via catalytic hairpin assembly [J]. Anal Chim Acta, 2018, 1038: 126-131
- [10] Shariatifar H, Hakhamaneshi MS, Abolhasani M, et al. Immunofluorescent labeling of CD20 tumor marker with quantum dots for rapid and quantitative detection of diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 4564-4572
- [11] Li CC, Hu J, Lu M, et al. Quantum dot-based electrochemical biosensor for stripping voltammetric detection of telomerase at the single-cell level[J]. Biosens Bioelectron, 2018, 122: 51-57
- [12] 张李钰, 胡燕, 曹蓓蓓, 等. 新型 CD20 核酸适配体的筛选及鉴定 [J]. 基础医学与临床, 2014, (05): 628-632
- [13] Seidemann K, Book M, Zimmermann M, et al. MTHFR 677 (C→T) polymorphism is not relevant for prognosis or therapy-associated toxicity in pediatric NHL: results from 484 patients of multicenter trial NHL-BFM 95[J]. Ann Hematol, 2006, 85(5): 291-300
- [14] 柏玉宝, 郝文鹏, 任实, 等. 儿童淋巴瘤白血病 38 例临床治疗观察[J]. 中国实用内科杂志, 2007, S1: 98
- [15] Zhou J, Tiemann K, Chomchan P, et al. Dual functional BAFF receptor aptamers inhibit ligand-induced proliferation and deliver siRNAs to NHL cells[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(7): 4266-4283
- [16] Singh NK, Thungon PD, Estrela P, et al. Development of an aptamer-based field effect transistor biosensor for quantitative detection of Plasmodium falciparum glutamate dehydrogenase in serum samples [J]. Biosens Bioelectron, 2018, 123: 30-35
- [17] Batool S, Argyropoulos KV, Azad R, et al. Dimerization of an aptamer generated from Ligand-guided selection (LIGS) yields a high affinity scaffold against B-cells [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2019, 1863(1): 232-240
- [18] Mai J, Li X, Zhang G, et al. DNA Thioaptamer with Homing Specificity to Lymphoma Bone Marrow Involvement [J]. Mol Pharm, 2018, 15(5): 1814-1825
- [19] Mann AP, Somasunderam A, Nieves-Alicea R, et al. Identification of thioaptamer ligand against E-selectin: potential application for inflamed vasculature targeting[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e13050
- [20] Ismail SI, Alshaer W. Therapeutic aptamers in discovery, preclinical and clinical stages[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 134: 51-64
- [21] Guo J, Qiu X, Mingoes C, et al. Conformational Details of Quantum Dot-DNA Resolved by Förster Resonance Energy Transfer Lifetime Nanoruler[J]. ACS Nano, 2019, 13(1): 505-514
- [22] Tsuboi S, Jin T. Fluorescent, Recombinant-Protein-Conjugated, Near-Infrared-Emitting Quantum Dots for in Vitro and in Vivo Dual-Color Molecular Imaging[J]. Chembiochem, 2019, 20(4): 568-575
- [23] Zhang Y, Zhao N, Qin Y, et al. Affibody-functionalized Ag2S quantum dots for photoacoustic imaging of epidermal growth factor receptor overexpressed tumors [J]. Nanoscale, 2018, 10(35): 16581-16590
- [24] Zheng X, Zhang F, Zhao Y, et al. Self-assembled dual fluorescence nanoparticles for CD44-targeted delivery of anti-miR-27a in liver cancer theranostics[J]. Theranostics, 2018, 8(14): 3808-3823
- [25] Chan YC, Chan MH, Chen CW, et al. Near-Infrared-Activated Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Nanocomposite to Sense MMP2-Overexpressing Oral Cancer Cells [J]. ACS Omega, 2018, 3(2): 1627-1634
- [26] Xing H, Wei T, Lin X, et al. Near-infrared MnCuInS/ZnS@BSA and urchin-like Au nanoparticle as a novel donor-acceptor pair for enhanced FRET biosensing[J]. Anal Chim Acta, 2018, 1042: 71-78
- [27] Dalfen I, Dmitriev RI, Holst G, et al. Background-free fluorescence decay time sensing and imaging of pH with highly photostable diazoxotriangulenium dyes [J]. Anal Chem, 2018, [Epub ahead of print]
- [28] Lerchundi R, Kafitz KW, Winkler U, et al. FRET-based imaging of intracellular ATP in organotypic brain slices[J]. J Neurosci Res, 2018 Dec 1 [Epub ahead of print]
- [29] Ke W, Hong E, Saito RF, et al. RNA-DNA fibers and polygons with controlled immunorecognition activate RNAi, FRET and transcriptional regulation of NF- κ B in human cells [J]. Nucleic Acids Res, 2018 Dec 4 [Epub ahead of print]
- [30] Konishi Y, Terai K, Furuta Y, et al. Live-Cell FRET Imaging Reveals a Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity Dynamics in Thymocyte Motility[J]. iScience, 2018, 10: 98-113