

金纳米荧光分子信标在 BRCA1 mRNA 检测中的应用

刘若男, 李婷婷, 周秋梅, 顾月清

中国药科大学生物医学工程教研室, 江苏 南京 210009

摘要 为实时检测活细胞中乳腺癌易感基因 1(BRCA1)的信使核糖核酸(mRNA)的表达量,设计并成功制备出一种新型金纳米荧光分子信标。研究了该信标的特异性、灵敏度、稳定性和毒性,并通过激光共聚焦和流式细胞术技术检测了该信标的荧光恢复强度,实现了对人胃癌细胞 BGC823 和其耐药细胞 BGC823/DDP 中 BRCA1 mRNA 表达量的检测。利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,验证了该信标用于检测细胞中 BRCA1 mRNA 表达量的可靠性。结果表明,该信标具有优良特性,能可靠检测出肿瘤细胞中 BRCA1 mRNA 的表达水平。

关键词 医用光学; mRNA 检测; 分子信标; 乳腺癌易感基因 1; 金纳米颗粒

中图分类号 Q331

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207021

Application of Gold-Nanoparticle-Based Fluorescent Molecular Beacons in BRCA1 mRNA Detection

Liu Ruonan, Li Tingting, Zhou Qiumei, Gu Yueqing

Laboratory of Biomedical Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China

Abstract In order to detect the expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) of the breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) in real time in living cells, a novel gold-nanoparticle-based fluorescent molecular beacon is designed and successfully prepared. The specificity, sensitivity, stability and toxicity of this beacon are investigated, the fluorescence recovery strength of this beacon is detected by the techniques of laser confocal microscopy and flow cytometry, and thus the expression of BRCA1 mRNA in human gastric cancer cell BGC823 and its drug-resistant cell BGC823/DDP is realized. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique is used to verify the reliability of this beacon for detecting the expression of BRCA1 mRNA in cells. The results show that this beacon has excellent characteristics and can be reliably used to detect the expression level of BRCA1 mRNA in tumor cells.

Key words medical optics; mRNA detection; molecular beacon; breast cancer susceptibility gene 1; gold-nanoparticle

OCIS codes 170.1420; 170.1790; 170.1530

1 引 言

乳腺癌易感基因 1(BRCA1)^[1]是一种抑癌基因,其参与脱氧核糖核酸(DNA)双链的损伤修复。当 DNA 双链断裂时,其编码蛋白可与其他 DNA 修复因子相互作用而修复受损的 DNA^[2]。研究表明,

BRCA1 的 DNA 损伤修复功能会使肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性^[3]。与其他抗肿瘤药物相比, BRCA1 表达缺陷的肿瘤细胞对铂类药物更为敏感。顺铂药物可与肿瘤细胞的 DNA 结合,干扰 DNA 复制,致使 DNA 链断裂或损伤,从而杀死肿瘤细胞^[4-5]。BRCA1 的 DNA 修复功能可修复铂类药物

收稿日期: 2017-07-26; 收到修改稿日期: 2017-09-28

基金项目: 国家 973 计划(2015CB755504)、国家自然科学基金(81220108012)、国家重大科研仪器设备研制项目(8172780057)

作者简介: 刘若男(1992—),女,硕士研究生,主要从事肿瘤标志物检测方面的研究。E-mail: liu_ruonan@sina.cn

导师简介: 顾月清(1963—),女,博士,教授,博士生导师,主要从事纳米材料方面的研究。

E-mail: cpuyueqing@163.com(通信联系人)

对肿瘤细胞造成的 DNA 损伤,从而降低铂类药物对肿瘤细胞的毒性^[6-7]。BRCA1 的表达水平与肿瘤细胞对铂类药物的敏感性呈负相关^[8-9]。另外, BRCA1 的表达可增强紫杉醇对肿瘤细胞的杀伤力^[10-11]。紫杉醇可诱导 BRCA1 蛋白激活信号转导途径,激活纺锤体的检查点,诱导细胞凋亡^[12]。因此,检测 BRCA1 的信使核糖核酸(mRNA)的表达水平在预测肿瘤细胞对化疗药物的敏感性及指导肿瘤个体化用药方面发挥着重要作用。

目前,用于检测 mRNA 的方法包括逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)^[13]、原位杂交(ISH)^[14]、狭缝杂交(SB)^[15]、诺瑟杂交(NB)^[16]等,这些方法均费时费力。其中 RT-PCR 技术的灵敏度最高、特异性最强,但也存在局限性,如需避免核糖核酸(RNA)酶污染、操作复杂、不能实时检测活细胞内 mRNA 的表达差异等。

分子信标是一种基于荧光共振能量转移(FRET)而设计的核酸探针,由茎序列和一段与靶序列相互补的环序列组成,两端分别修饰荧光基团和猝灭基团^[17-19]。当无靶序列存在时,荧光基团和猝灭基团的距离很近,荧光基团的荧光被猝灭基团所猝灭,分子信标不发出荧光。而当靶分子序列存在时,分子信标的探针序列能够特异地与靶序列结合,使探针发卡型结构解开,猝灭基团对荧光基团的猝灭作用解除,因而释放出荧光^[20-22]。本文针对 BRCA1 mRNA 序列设计出一种新型特异性的 BRCA1 分子信标,可检测活细胞内的 BRCA1 mRNA。该分子信标含一段与 BRCA1 mRNA 靶序列互补的环序列,并修饰有异硫氰酸荧光素(FITC)染料和金纳米颗粒。该分子信标的荧光强度与 BRCA1 靶序列的含量成正比,因此可利用此荧光分子信标检测 BRCA1 mRNA^[23]。此分子信标无需借助载体即可被细胞摄取,具有优良的生物相容性。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

实验所用的氯金酸(HAuCl_4)、二水合柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)、硼氢化钠(NaBH_4)、二甲基亚砜(DMSO)、二硫苏糖醇(DTT)、谷胱甘肽(GSH)均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;BRCA1 引物序列、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶均购于美国赛默飞世尔科技有限公司;噻唑蓝(MTT)购于南京凯基生物公司。

所用实验仪器还包括透射电子显微镜(TEM, JEM-2100, 日本电子株式会社, 日本)、紫外可见分光光度计(UV-2550, SHIMADZU 公司, 日本)、一体化荧光光谱仪(FS5, Edinburgh Instruments 公司, 英国)、激光共聚焦显微镜(FV100, OLYMPUS 公司, 日本)、荧光定量 PCR 仪(ABI 7300, 美国应用生物系统公司, 美国)、流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson 公司, 美国)、细胞培养箱(Thermo 371, 赛默飞世尔科技有限公司, 美国)。人胃癌细胞 BGC823 及其耐药细胞 BGC823/DDP 均由中国药科大学郭青龙教授实验室馈赠,其中 BGC823/DDP 细胞株是通过逐步增加 BGC823 细胞中顺铂药物的浓度而反复间歇诱导出的新细胞株。

2.2 寡核苷酸序列的设计

首先通过美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库获取 mRNA 全序列,接着用编程软件将其打碎,并上传至 BLAST 检索库中进行序列同源性比对,利用 RNA Structure 软件筛选和设计出 BRCA1 金纳米分子信标的发卡型序列。委托上海生工生物技术公司在序列两端分别修饰 NH_2 和 FITC,合成发卡型探针序列。此外,为进行探针特异性的验证,合成了与分子信标环序列完全互补的靶 DNA 序列以及与靶序列相比具有不同碱基错配数的 DNA 靶序列,各序列结构如下。BRCA1 分子信标序列:5'-GCGAGAAGTAAGATGTTTCCGTCAACTCGCAA(9)-3';完全互补靶 DNA 序列:5'-TTGACGGAAACATCTTACTT-3';1 个碱基错配 DNA 序列:5'-TTGACGGAAGCATCTTACTT-3';3 个碱基错配 DNA 序列:5'-TTGACGAAGCACCTTACTT-3';6 个碱基错配 DNA 序列:5'-gTtACGAAGCAcCTTgCTT-3'。

2.3 金纳米颗粒的制备

以氯金酸和柠檬酸三钠为原料合成粒径为 15 nm 的金纳米颗粒^[24]。首先将合成过程中所用的玻璃仪器用王水浸泡,且用超纯水洗三遍后烘干备用。取 45 mL 浓度为 1 nmol/L 的氯金酸溶液加入圆底烧瓶中,100 °C 油浴加热回流至沸腾,接着加入 5 mL 浓度为 38.8 mmol/L(57 mg)的柠檬酸三钠溶液,反应液的颜色由浅黄色变成深红色。继续保持避光反应 30 min 后冷却至室温,扫描紫外可见光谱并利用 TEM 对金纳米颗粒进行表征,置于 4 °C 下避光储存。

2.4 BRCA1 金纳米分子信标的合成

首先将上述筛选的带巯基的探针序列置于

100 mmol/L的 DTT 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值为 8.0)体系中活化。然后将探针序列与金纳米颗粒按 100:1(物质的量比)的投料比避光混合反应 12 h 后,加入体积分数为 10%的吐温-20,使吐温-20 的最终体积分数为 0.1%。在 8 h 内分批次滴加 NaCl 溶液(最终 NaCl 溶液的浓度为 0.3 mol/L),置于 4 °C 下避光过夜反应。反应后,以 13000 rpm 的速率离心 20 min,获得分子信标沉淀,经 PBS(pH 值为 7.0)复溶后得到金纳米分子信标溶液。利用紫外可见分光光度计和 TEM 对金纳米分子信标进行表征。

2.5 BRCA1 金纳米分子信标的特异性考察

将 1 nmol/L 的金纳米分子信标溶液分别与一定量的靶 DNA 序列和含有不同错配碱基数的 DNA 序列混合,置于 70 °C 避光反应 1 h,之后自然冷却至室温。利用荧光光谱仪检测溶液的荧光信号,激发光的波长为 488 nm。

2.6 BRCA1 金纳米分子信标的检测灵敏度考察

制备不同浓度的靶序列(0, 2, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/L),将其分别与 1 nmol/L 的金纳米分子信标在 37 °C 下反应 1 h,最后利用荧光扫描仪检测荧光信号。

2.7 BRCA1 金纳米分子信标的稳定性考察

体外考察脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)和 GSH 对 BRCA1 金纳米分子信标的降解作用。首先配制含有 50 mg/L 牛血清白蛋白和 0.25 mmol/L 的 MgCl₂ 的 PBS 溶液(pH 值为 7.0),模拟细胞内环境。以上述 PBS 溶液为溶剂配制四组 BRCA1 金纳米分子信标溶液(终浓度为 1 nmol/L),37 °C 下静置 10 min。向上述分子信标溶液中分别加入 GSH(终浓度为 10 mmol/L)、DNase I(终浓度为 0.38 mg/L)、过量的 DTT(0.35 mol/L)以及 PBS 溶液,随后在反应时间分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 时,检测溶液的荧光信号,激发光的波长为 450 nm,荧光检测的波长为 520 nm。

考察 BRCA1 金纳米分子信标在不同 pH 值环境下的稳定性。将金纳米分子信标分别用 pH 值为 4.5, 5.5, 6.5, 7.0, 7.5 的 PBS 溶液稀释,使得分子信标的终浓度为 1 nmol/L,随后每间隔 1 h 监测溶液中的荧光信号。激发光的波长为 450 nm,荧光检测的波长为 520 nm,动态扫描 12 h。

2.8 BRCA1 金纳米分子信标的毒性考察

BGC823/DDP 细胞株是通过逐步提高人胃癌细胞 BGC823 中顺铂药物的浓度而诱导获得的新细

胞株,该耐药细胞株对顺铂药物具有明显的耐药性。首先将 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞分别接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,将 0.375, 0.4, 0.75, 1.5 nmol/L 四种浓度的 BRCA1 分子信标与细胞孵育 48 h(每种浓度设 5 个复孔),然后每孔中加入 20 μL MTT 溶液(0.5 mg/mL),继续孵育 4 h,移除培养液,每孔中加入 150 μL DMSO,振荡 10 min。用酶标仪在光波长 490 nm 下检测各孔的吸光度。设置空白组(只加培养液、MTT 和 DMSO)和对照组(含细胞、培养液、MTT 和 DMSO)。

2.9 激光共聚焦显微镜检测 BRCA1 mRNA 的表达

将胃癌细胞 BGC823 和 BGC823/DDP 分别接种于激光共聚焦皿中(每平方厘米 3×10^5 个细胞),置于 37 °C、5%(体积分数)CO₂ 培养箱中培养至细胞贴壁,加入 BRCA1 金纳米分子信标(终浓度为 1 nmol/L),并通过超声处理促进细胞对分子信标的摄取,继续反应 2 h。用 PBS 溶液清洗后,利用激光共聚焦显微镜对 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞进行成像。其激发波长为 488 nm,检测波长设为 520 nm。

2.10 流式细胞术检测 BRCA1 mRNA 的表达

取对数生长期的 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞,经胰酶消化后,接种于六孔板内。随后的培养以及处理方法同上述利用激光共聚焦显微镜检测的方法一致。与分子信标反应结束后,用胰酶消化洗脱细胞,以 1500 rpm 速率离心 10 min 后,将细胞重悬于 PBS 缓冲液(pH=7.0)中。利用流式细胞仪定量测出细胞平均荧光强度(MFI)。

2.11 定量聚合酶链反应检测 BRCA1 mRNA 的相对表达量

首先利用 RNA 提取试剂盒提取两种胃癌细胞(BGC823 和 BGC823/DDP)中的总 RNA。然后利用 Super Script 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成互补 DNA(cDNA)。以 GAPDH 为内参基因,利用 GAPDH 和 BRCA1 对应的 cDNA 进行定量聚合酶链反应(q-PCR)。采用相对定量法分析和计算 BRCA1 mRNA 的相对表达值。所采用的上下游引物序列如下。GAPDH 上游引物序列:5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'; GAPDH 下游引物序列:5'-CTGGAAGATGGTGATGGGATT-3'; BRCA1 上游引物序列:5'-ACCTTGGAAGTGTGAGAACTCT-3'; BRCA1 下游引物序列:5'-TCTTGATCTCCCACACTGCAATA-3'。

3 实验结果与讨论

3.1 金纳米颗粒和 BRCA1 金纳米分子信标的合成与表征

合成金纳米颗粒和 BRCA1 金纳米分子信标后,首先利用紫外-可见分光光度计检测二者的紫外吸收光谱,并利用 TEM 表征二者的粒子形态,结果如图 1、2 所示。可以看出,所制备金纳米颗粒的最大吸收波长在 520 nm 处,其为粒径 15 nm 的金纳米颗粒的特征吸收峰。与金纳米颗粒的紫外光谱相比,BRCA1 金纳米分子信标在 260 nm 处存在明显吸收峰。寡核苷酸链的紫外特征吸收峰在 260 nm 处,这表明发卡型探针序列成功与金纳米颗粒表面发生了偶联。另外,如图 2 所示,金纳米分子信标的粒径与金纳米颗粒的相近,平均粒径为 15 nm,粒子分布比较均匀,分散性良好,未发生聚集现象。

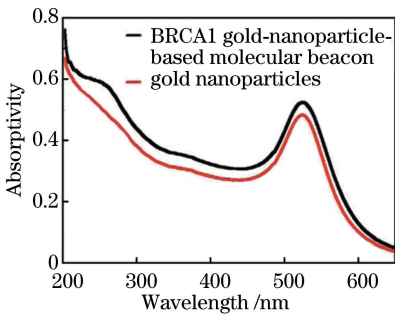


图 1 金纳米颗粒和 BRCA1 金纳米分子信标的紫外-可见吸收光谱

Fig. 1 Ultraviolet-visible absorption spectra of gold nanoparticles and BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacons

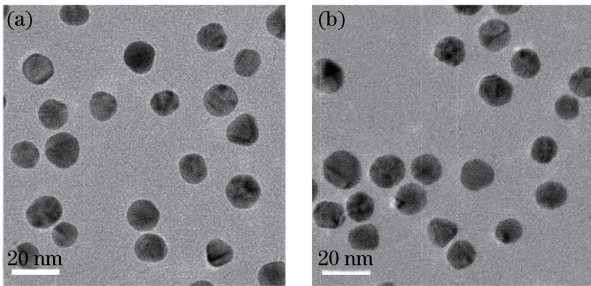


图 2 ETM 图。(a)金纳米颗粒;(b) BRCA1 金纳米分子信标

Fig. 2 TEM images. (a) Gold nanoparticles; (b) BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacon

3.2 BRCA1 金纳米分子信标的特异性

将 BRCA1 金纳米分子信标与体外合成的分子信标的靶 DNA 序列和含有不同错配碱基数的 DNA 序列进行杂交反应,体外分析 BRCA1 金纳米

分子信标与靶基因结合的特异性,结果如图 3 所示。可以看到,完全互补的靶 DNA 序列组较错配 DNA 序列组的荧光强度显著升高;含有 1、3 或 6 个碱基错配的 DNA 序列组的荧光强度与 BRCA1 金纳米分子信标本身的荧光强度基本一致,检测到的荧光信号强度均比较低。在完全互补靶序列存在的情况下,分子信标茎环结构打开,释放荧光,检测到的荧光强度最强,表明 BRCA1 金纳米分子信标可以与目标序列特异性结合。

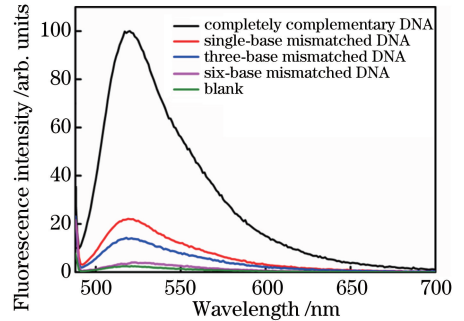


图 3 BRCA1 金纳米分子信标与互补 DNA 的杂交

Fig. 3 Hybridization of BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacon and complementary DNA

3.3 BRCA1 金纳米分子信标的检测灵敏度考察

考察了金纳米分子信标的荧光强度随互补靶序列浓度的变化,结果如图 4 所示。可以看出,随着靶序列浓度的逐步增大,金纳米分子信标的荧光强度先呈线性快速递增,然后呈现缓慢增强的趋势并趋于平缓。图 4 中的内插图表明,当靶序列浓度小于 20 nmol/L 时,金纳米分子信标(1 nmol/L)的荧光信号与靶序列的浓度呈线性关系(斜率 K 为 4.16593,相关系数为 0.9222),检测限为 0.108 nmol/L(样本数 $n=3$,信噪比为 3),说明此分子信标具有良好的灵敏度。当靶序列浓度大于

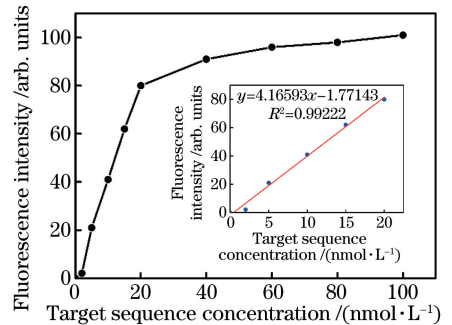


图 4 BRCA1 金纳米分子信标荧光强度与靶序列浓度间的关系

Fig. 4 Relationship between fluorescence intensity of BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacon and target-sequence concentration

20 nmol/L时,金纳米分子信标的信号强度增大缓慢。这种现象可能是由于当金纳米分子信标与靶序列互补结合时,发卡结构被打开,在金纳米颗粒的表面形成一定的空间位阻,从而影响了其他靶序列再与探针序列互补结合。

3.4 BRCA1 金纳米分子信标的稳定性考察

分子信标是一种寡核酸类探针,在细胞内最常受 DNase I 和 GSH 的降解作用。因此,体外考察二者对金纳米分子信标的稳定性影响^[25],另外设 DTT 组作为对照。DTT 作为强还原剂可使金硫键断裂,从而导致分子信标从金纳米表面脱落。体外考察金纳米颗粒对 FITC 荧光的猝灭作用失效后 FITC 的荧光恢复强度。如图 5 所示,经 DNase I 以及 GSH 处理后 60 min 内,金纳米分子信标释放的荧光信号与金纳米分子信标本身的荧光信号相比基本无差异,荧光强度都很小,说明分子信标没有发生断裂。而在加入过量 DTT 的对照组中,随着反应时间的延长,荧光强度显著增大。这说明 DTT 能够还原巯基,而使 FITC 得以释放荧光,并且 DNase I 和 GSH 均不会破坏金纳米分子信标本身的结构,原因可能是发卡型的探针序列包覆在金纳米颗粒的表面,形成空间位阻,从而使 DNase I 无法破坏核酸序列。GSH 也可能因为空间位阻效应,而无法到达 Au-S 部位取代巯基,从而保证了金纳米分子信标的稳定性。

研究表明,金纳米分子信标通过内吞作用进入细胞后会先进入胞内体,再由胞内体释放至胞浆中^[26]。因此,考察了 BRCA1 金纳米分子信标在酸性环境下的稳定性,结果如图 6 所示。可以看出,金纳米分子信标在 pH 值为 4.5~7.5 的 PBS 溶液中的荧光信号强度均很弱,说明金纳米分子信标在 pH 值为 4.5~7.5 的 PBS 溶液没有受到破坏,结构完整,说明 BRCA1 金纳米分子信标在细胞内的稳定性能得到了保障。

3.5 BRCA1 金纳米分子信标的细胞毒性考察

为研究金纳米分子信标对细胞的毒性,将不同浓度的金纳米颗粒和金纳米分子信标分别同胃癌细胞 BGC823 及其耐药细胞 BGC823/DDP 反应 48 h 后,检测细胞存活率,结果如图 7 所示,其中 AuNP 代表金纳米颗粒。可见细胞存活率均在 85% 以上,说明该金纳米颗粒和金纳米分子信标均具有优良生物相容性,不具有细胞毒性。

3.6 BRCA1 金纳米分子信标检测 BRCA1 mRNA 的表达

利用合成的 BRCA1 金纳米分子信标检测人胃

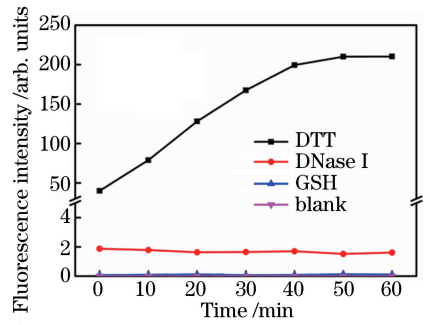


图 5 BRCA1 金纳米分子信标的稳定性

Fig. 5 Stability of BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacon

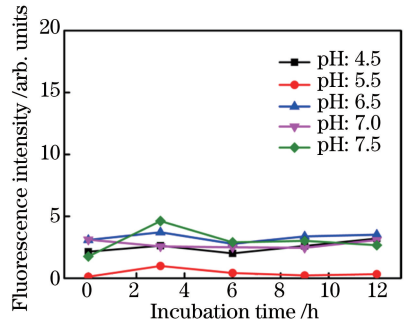


图 6 不同 pH 值下 BRCA1 金纳米分子信标的荧光强度

Fig. 6 Fluorescence intensities of BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacons under different pH

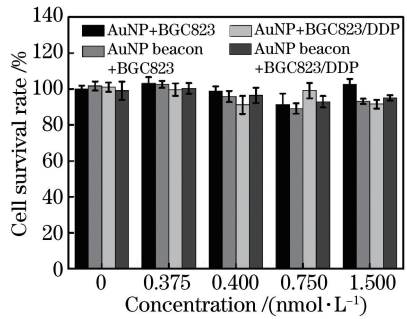


图 7 BRCA1 金纳米分子信标的细胞毒性

Fig. 7 Cytotoxicity of BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacon

癌细胞 BGC823 及其耐药细胞 BGC823/DDP 中 BRCA1 mRNA 的表达水平。研究表明, BRCA1 的表达水平与肿瘤细胞对铂类药物的敏感性呈负相关。因而, BGC823/DDP 耐药细胞中 BRCA1 mRNA 的表达量应当比 BGC823 的偏大。向 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞中分别加入 BRCA1 金纳米分子信标溶液,反应后,通过激光共聚焦显微镜检测 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞中分子信标释放的荧光强度,结果如图 8 所示,可见荧光强度与 BRCA1 mRNA 目标序列的含量成正比,还可明显

看出 BRCA1 金纳米分子信标在 BGC823/DDP 细胞中的荧光强度明显大于 BGC823 细胞的。这说明 BGC823/DDP 耐药细胞中 BRCA1 mRNA 的表达水平明显高于 BGC823 细胞的,与上述理论结果一致。为进一步准确量化 BRCA1 金纳米分子信标在胃癌细胞中的荧光强度,采用流式细胞术定量测定两种肿瘤细胞与 BRCA1 金纳米分子信标作用后的荧光强度^[27],结果如图 9 所示,可见相比于 BGC823 细胞,分子信标在 BGC823/DDP 细胞中的平均荧光强度显著增大。该结果与激光共聚焦的检测结果一致,表明 BRCA1 mRNA 在 BGC823/DDP 耐药细胞中的表达水平明显高于 BGC823 细胞的。

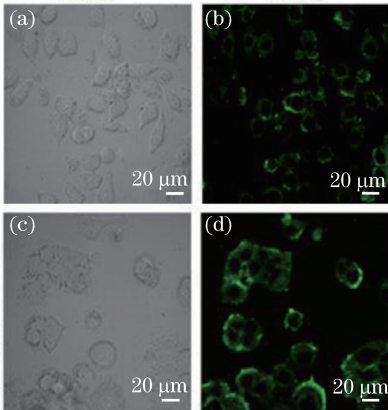


图 8 BRCA1 金纳米分子信标在 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞中的激光共聚焦显微镜成像。(a) BGC823, 明场像; (b) BGC823, 荧光图; (c) BGC823/DDP, 明场像; (d) BGC823/DDP, 荧光图

Fig. 8 Confocal microscopy imagings of BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacon in BGC823 and BGC823/DDP. (a) BGC823, bright field image; (b) BGC823, fluorescence image; (c) BGC823/DDP, bright field image; (d) BGC823/DDP, fluorescence image

3.7 q-PCR 检测 BRCA1 mRNA 的相对表达量

为进一步验证实验室细胞株中 BRCA1 mRNA 的含量,确保 BRCA1 金纳米分子信标检测结果的准确性,采用传统的 q-PCR 技术定量检测 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞中 BRCA1 mRNA 的相对表达量。BRCA1 mRNA 的表达量通过 GAPDH mRNA 的表达量进行标准化,结果如图 10 所示。可以看到,BGC823/DDP 细胞中的 BRCA1 mRNA 的表达水平显著高于 BGC823 细胞的,约为 BGC823 细胞中 BRCA1 mRNA 表达量的 10 倍。这表明利用 BRCA1 金纳米分子信标检测肿瘤细胞中 BRCA1 的表达结果与 q-PCR 的结果基本一致,同时也验证了 BRCA1 金纳米分子信标检测

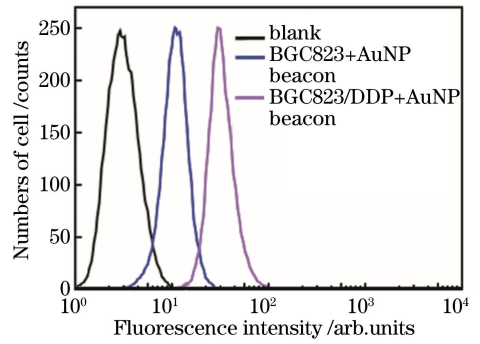


图 9 BRCA1 金纳米分子信标在 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞中的荧光强度
Fig. 9 Fluorescence intensities of BRCA1 gold-nanoparticle-based molecular beacon in BGC823 and BGC823/DDP

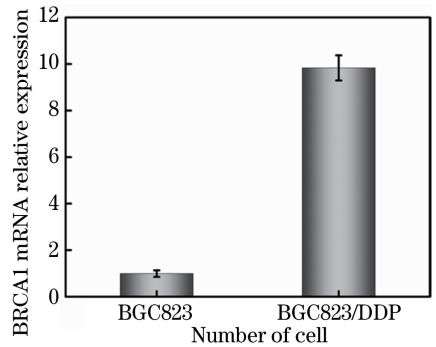


图 10 BGC823 和 BGC823/DDP 细胞中 BRCA1 mRNA 的相对表达量
Fig. 10 Relative expression of BRCA1 mRNA in BGC823 and BGC823/DDP

BRCA1 mRNA 表达结果的准确性和可靠性。

4 结 论

BRCA1 基因具有修复 DNA 损伤及调节细胞凋亡的功能,与肿瘤细胞对药物的敏感性密切相关。BRCA1 是一种双向性的药敏相关分子,其表达水平与肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性呈正相关,而与肿瘤细胞对铂类药物的敏感性呈负相关。BRCA1 的表达水平可作为肿瘤细胞对紫杉醇和顺铂敏感性的预测指标。对于 BRCA1 高表达的肿瘤患者,可避开铂类药物而选择紫杉醇用药;对于 BRCA1 低表达的肿瘤患者,则优先考虑铂类药物。BRCA1 金纳米分子信标是一种简单、快速、准确的基因检测技术,根据其在肿瘤细胞中的荧光恢复强度判断 BRCA1 mRNA 在肿瘤活细胞中的表达水平,可以预测肿瘤细胞对紫杉醇和顺铂的敏感性,为肿瘤个体化治疗提供科学依据,从而可为肿瘤患者制定合理的给药方案。

针对 BRCA1 mRNA 序列设计并合成了一种新型高特异性的 BRCA1 分子信标,通过观察和检测该分子信标在细胞中所释放出的荧光信号强度,实现了对细胞 BRCA1 mRNA 表达的检测。此荧光分子信标容易被细胞直接摄取,不易被酶降解。另外,金纳米分子信标独特的结构也使其在 mRNA 检测中具有显著的优势,如特异性强、灵敏度高、信噪比高、操作简便、生物相容性良好等。BRCA1 金纳米分子信标可以准确可靠地检测活细胞内 BRCA1 mRNA 的表达水平,可以作为检测细胞内 BRCA1 mRNA 表达量的一种有效手段。

参 考 文 献

- [1] Ali R, Rakha E A, Madhusudan S, *et al.* DNA damage repair in breast cancer and its therapeutic implications[J]. *Pathology*, 2017, 49(2): 156-165.
- [2] Xu X Y, Wang Q, Xu P, *et al.* Expression of ERCC1 and BRCA1 in tissues of advanced non-small-cell lung cancer and its relationship with the sensitivity of platinum based chemotherapy [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention & Treatment*, 2017, 24(3): 178-182.
徐向勇, 王清, 许平, 等. 晚期非小细胞癌组织 ERCC1 和 BRCA1 表达与铂类化疗敏感性临床研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(3): 178-182.
- [3] Anantha R W, Simhadri S, Foo T K, *et al.* Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance [J]. *eLife*, 2017, 6: e21350.
- [4] O'Grady S, Finn S P, Cuffe S, *et al.* The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2014, 40(10): 1161-1170.
- [5] Wieringa H W, van der Zee A, de Vries E G E, *et al.* Breaking the DNA damage response to improve cervical cancer treatment [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2016, 42: 30-40.
- [6] Albarakati N, Abdel-Fatah T M A, Doherty R, *et al.* Targeting BRCA1-BER deficient breast cancer by ATM or DNA-PKcs blockade either alone or in combination with cisplatin for personalized therapy [J]. *Molecular Oncology*, 2015, 9(1): 204-217.
- [7] Domagala P, Hybiak J, Rys J, *et al.* Pathological complete response after cisplatin neoadjuvant therapy is associated with the downregulation of DNA repair genes in BRCA1-associated triple-negative breast cancers [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(42): 68662-68673.
- [8] Shim H J, Yun J J, Bae W K, *et al.* BRCA1 and XRCC1 polymorphisms associated with survival in advanced gastric cancer treated with taxane and cisplatin [J]. *Cancer Science*, 2010, 101(5): 1247-1254.
- [9] Sun C, Li N, Yang Z, *et al.* miR-9 regulation of BRCA1 and ovarian cancer sensitivity to cisplatin and PARP inhibition [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2013, 105(22): 1750-1758.
- [10] Busschots S, O' Toole S, O' Leary J J, *et al.* Carboplatin and taxol resistance develops more rapidly in functional BRCA1 compared to dysfunctional BRCA1 ovarian cancer cells [J]. *Experimental Cell Research*, 2015, 336(1): 1-14.
- [11] Bernabeu E, Cagel M, Lagomarsino E, *et al.* Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 526(1/2): 474-495.
- [12] Promkan M, Liu G, Patmasiriwat P, *et al.* BRCA1 suppresses the expression of survivin and promotes sensitivity to paclitaxel through the calcium sensing receptor (CaSR) in human breast cancer cells [J]. *Cell Calcium*, 2011, 49(2): 79-88.
- [13] Qi S, Yang L, Wen X, *et al.* Reference gene selection for RT-qPCR analysis of flower development in chrysanthemum morifolium and chrysanthemum lavandulifolium [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(651): 287.
- [14] Rooper L M, Gandhi M, Bishop J A, *et al.* RNA *in-situ* hybridization is a practical and effective method for determining HPV status of oropharyngeal squamous cell carcinoma including discordant cases that are p16 positive by immunohistochemistry but HPV negative by DNA *in-situ* hybridization [J]. *Oral Oncology*, 2016, 55: 11-16.
- [15] Kumar S, Zheng H, Deng B, *et al.* A slot blot immunoassay for quantitative detection of plasmodium falciparum circumsporozoite protein in mosquito midgut oocyst [J]. *Plos One*, 2014, 9(12): e115807.
- [16] Schwarzkopf M, Pierce N A. Multiplexed miRNA northern blots via hybridization chainreaction [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(15): e129.
- [17] Adinolfi B, Pellegrino M, Giannetti A, *et al.* Molecular beacon-decorated polymethylmethacrylate core-shell fluorescent nanoparticles for the detection of survivin mRNA in human cancer cells [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 88: 15-24.
- [18] Jackson S R, Wong A C, Travis A R, *et al.* Applications of hairpin DNA-functionalized gold nanoparticles for imaging mRNA in living cells [J]. *Methods in Enzymology*, 2016, 572: 87-103.
- [19] Zhou Q, Ma Y, Wang Z, *et al.* Optimized

- ultrasound conditions for enhanced sensitivity of molecular beacons in the detection of MDR1 mRNA in living cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(5): 2808-2816.
- [20] Deng D, Li Y, Xue J, *et al.* Gold nanoparticle-based beacon to detect STAT5b mRNA expression in living cells: a case optimized by bioinformatics screen [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 3231-3244.
- [21] Kor K, Turner A P, Zarei K, *et al.* Structurally responsive oligonucleotide-based single-probe lateral-flow test for detection of miRNA-21 mimics [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(5): 1475-1485.
- [22] Xue J, Shan L, Chen H, *et al.* Visual detection of STAT5B gene expression in living cell using the hairpin DNA modified gold nanoparticle beacon [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 41(8): 71-77.
- [23] Li Y, Xue J P, Cui S S, *et al.* Gold nanoparticle-based fluorescent molecular beacon for the detection of STAT5b mRNA expression in living cell [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(7): 537-544.
- 李洋, 薛建鹏, 崔思思, 等. 金纳米荧光分子信标对活细胞中 STAT5b mRNA 的检测 [J]. *科学通报*, 2013, 58(7): 537-544.
- [24] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. *Nature*, 1973, 241(105): 20-22.
- [25] Wang M, Hou X, Wiraja C, *et al.* Smart magnetic nanosensors synthesized through layer-by-layer deposition of molecular beacons for non-invasive and longitudinal monitoring of cellular mRNA [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(9): 5877-5886.
- [26] Wu X A, Choi C H J, Zhang C, *et al.* Intracellular fate of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(21): 7726-7733.
- [27] Zhang J, Zhao Q, Wu Y, *et al.* The construction of a novel nucleic acids detection microplatform based on the NSET for one-step detecting TK1-DNA and microRNA-21 [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 97: 26-33.