

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.006

· 专题报道 ·

人黑素瘤单链抗体-量子点纳米探针的制备及其与黑素瘤细胞特异性结合

张小敏¹, 张堂德¹, 鲍晨晨², 宋 华², 李 娜², 刘 彬², 贺 蓉², 李智铭², 崔大祥², 任秋实^{3*} (1. 南方医科大学珠江医院 皮肤科, 广东 广州 510280; 2. 上海交通大学 微纳科学研究院 生物纳米工程研究室, 上海 200240; 3. 上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200240)

[摘要] 目的: 制备抗人黑素瘤细胞单链抗体与碲化镉量子点(CdTe quantum dot, CdTe)连接的纳米探针, 观察其对恶性黑素瘤细胞的特异性结合效果。方法: 将抗人黑素瘤神经节苷脂单链抗体(anti-human melanoma ganglioside single chain variable fragment antibody, GD/ScFvMEL)基因克隆到 pET32a(+)载体中, 然后在 BL21(DE3)细菌中进行诱导表达, 采用变性法纯化表达的蛋白, 再用改良的透析法复性目的蛋白, SDS-PAGE 分析表达的 GD/ScFvMEL 抗体蛋白。制备的 GD/ScFvMEL 抗体与量子点连接制备成纳米探针 GD/ScFvMEL-QDs, 然后与黑素瘤 A375 细胞株及胃癌 MGC-803 细胞株孵育, 观察纳米探针与肿瘤细胞结合的特异性。结果: PCR、双酶切和序列测定证实重组子的拼接完全正确, SDS-PAGE 结果显示, GD/ScFvMEL 抗体的表达量达 40%。纯化复性后的 GD/ScFvMEL 抗体连接量子点制备 GD/ScFvMEL-QDs 纳米探针, 经扫描电镜、X 衍射分析、荧光光谱和 SDS-PAGE 分析证实纳米探针的成功制备。GD/ScFvMEL-QDs 纳米探针能特异性结合 A375 黑素瘤细胞, 不与胃癌细胞 MGC-803 细胞结合。结论: 成功制备抗人黑素瘤神经节苷脂单链抗体-量子点纳米探针, 该探针可特异性结合黑素瘤细胞。

[关键词] 黑素瘤; 神经节苷脂; 单链抗体; 量子点; 纳米探针

[中图分类号] R739.5; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)01-0030-06

Preparation of human malignant melanoma ganglioside ScFv antibody-conjugated quantum dot nanoprobe and its specific binding with human malignant melanoma cells

ZHANG Xiao-min¹, ZHANG Tang-de¹, BAO Chen-chen², SONG Hua², LI Na², LIU Bin², HE Rong², LI Zhi-ming², CUI Da-xiang², REN Qiu-shi^{3*} (1. Department of Dermatology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Department of Bio/Nano Science and Engineering, Research Institute of Micro/Nano Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 3. College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare a nanoprobe, anti-human melanoma ganglioside single chain variable fragment (GD/ScFvMEL) antibody conjugated with CdTe quantum dot, and to observe its ability to specifically bind human malignant melanoma cells. **Methods:** The GD/ScFvMEL gene was cloned into pET32a(+), and the plasmid was then transformed into *E. coli* BL21(DE3) for GD/ScFvMEL protein antibody expression. The expressed GD/ScFvMEL antibody was purified by denaturing method and further refolded by modified dialysis method. The purified GD/ScFvMEL antibody was analyzed by SDS-PAGE. The GD/ScFvMEL-QDs nanoprobe was prepared by conjugating GD/ScFvMEL antibody with CdTe quantum dot, and its specificity was observed by incubating with MGC-803 cells and melanoma A375 cells. **Results:** The recombinant pET32a-GD/ScFvMEL was constructed and confirmed by PCR, restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. The proportion of expressed GD/ScFvMEL antibody in total bacteria proteins was about 40% as detected by

[基金项目] 国家高技术研究发展(863)计划重点项目(No. 2007AA022004); 国家重点基础研究发展(973)计划资助项目(No. 2010CB933900)。Project supported by the National High Technology Research and Development Program (863) of China (No. 2007AA022004), and the Major State Basic Research Development Program (973) of China (No. 2010CB933901)

[作者简介] 张小敏(1981-), 女, 广东东莞市人, 硕士, 主要从事皮肤肿瘤防治的研究

[通信作者] 崔大祥(CUI Da-xiang, corresponding author), E-mail: dxcui@sjtu.edu.cn; 任秋实(REN Qiu-shi, corresponding author), E-mail: renqsh@sjtu.edu.cn。* 为共同通信作者

SDS-PAGE. The purified- and refolded-GD/ScFvMEL antibody was effectively conjugated with CdTe quantum dot, and the resulting GD/ScFvMEL-QDs nanoprobe was successfully prepared. The GD/ScFvMEL-QDs nanoprobe could specifically bind melanoma A375 cells, but could not bind stomach cancer MGC-803 cells. **Conclusion:** We have successfully prepared an anti-human melanoma ganglioside single-chain antibody-CdTe quantum dot nanoprobe, which can specifically bind melanoma cells.

[**Key words**] melanoma; ganglioside; single-chain antibody; quantum dot; nanoprobe

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 30-35]

皮肤黑素瘤又名恶性黑素瘤(malignant melanoma),起源于皮肤表皮的黑素细胞,是恶性程度最高的一种皮肤肿瘤^[1-3]。最近几十年,皮肤黑素瘤的发生率在欧美和亚洲地区都在逐年增长^[4-7]。黑素瘤侵袭性很强,若在早期得不到有效治疗,肿瘤细胞会扩散到皮肤的深层^[8-9],迅速进入淋巴系统,播散到全身,从而增加治疗的难度^[10-11]。

ScFv(single chain variable fragment)抗体分子^[12-13]是由单克隆抗体上的轻链和重链的可变区通过一段连接肽连接组成的小分子抗体。ScFv和完整的IgG抗体都能识别同一个抗原表位,但ScFv分子大小只有完整抗体的1/6,可以更好地渗透到肿瘤组织中;并且ScFv比完整的鼠源性抗体免疫原性小,改善了药物代谢动力学。

量子点是一种半导体纳米晶体^[14],已经成功地用在细胞影像^[15]、免疫分析^[16]、光学编码^[17]以及蛋白质分子之间相互作用的研究^[18-19]。这些合成的量子点与传统荧光染料相比,具有下列优势:更好的稳定性,更强的荧光强度,颜色与粒径大小密切相关^[20-22]。量子点为生物分析与医学工程提供了一个新的功能性平台。而碲化镉量子点(CdTe quantum dot, CdTe)^[22]除了具备普通量子点的抗漂白能力强、激发光谱分布连续、荧光发射光谱窄、荧光发射波长可随尺寸变化调节等一系列优点之外,由于CdTe是在水溶性体系中合成的,可作为生物探针应用于同为水溶性的生物体系中。

本研究将抗黑素瘤神经节苷脂(gangliosides, GD)抗体的ScFv基因片段插入pET32a载体,在细菌中进行高效表达,并将纯化后的表达产物与CdTe相连接,制备成纳米探针(GD/ScFvMEL-QDs),然后与黑素瘤A375细胞和胃癌MGC-803细胞共培养,研究纳米探针的靶向性,为黑素瘤细胞的早期检测和疗效评价提供新的技术策略。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

含黑素瘤神经节苷脂抗体的ScFv(GD/

ScFvMEL)基因片段的表达质粒pGEX-4T-1-ScFv及宿主菌*E. coli* JM109^[23]由军事医学科学院王字玲教授惠赠。*E. coli* DH5 α 和*E. coli* BL21(DE3)感受态细菌、质粒小提试剂盒、抗-His鼠源单克隆抗体、硫酸卡那霉素、沉淀型单组分TMB底物溶液购自天根生化科技(北京)有限公司,限制性核酸内切酶*Xho* I、*Nde* I购自New England公司,耐热性DNA聚合酶、DNA分子量标准Marker、T4 DNA连接酶购自TaKaRa公司,免疫荧光染色试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒和蛋白质分子量标准Marker购自碧云天生物技术研究所,羊抗鼠IgG-HRP抗体购自Precision Task公司,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)及1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)购自上海西宝生物技术有限公司。其余试剂皆购自Sigma公司。CdTe量子点由崔大祥教授提供^[22]。

1.2 质粒的构建

根据王字玲教授提供的图谱,含黑素瘤神经节苷脂抗体的ScFv基因片段的pGEX-4T-1-ScFv质粒中黑素瘤神经节苷脂抗体的ScFv片段为729 bp^[23]。将菌种重新接种后,过夜培养,抽提质粒,测定质粒的纯度和浓度。PCR引物序列,上游引物为:5'-GGAATTC CATATGCAGGTGCAGCTGGTGA GTCTGG-3';下游引物为:5'-CCG CTCGAG TTAAC GTTTGATCTCCAGCTTGCTCCC-3'(其中方框分别为*Eco*R I和*Xho* I限制性酶切位点)。参照TaKaRa公司耐热性DNA聚合酶的反应体系进行PCR反应,以获取目的基因片段。然后将目的基因片段和pET32a载体分别用*Eco*R I和*Xho* I双酶切,电泳分析并回收电泳后的DNA片段,然后用T4 DNA连接酶进行连接。连接产物转化DH5 α 感受态细胞,在含50 μ g/ml氨苄青霉素的LB固体培养基中筛选阳性菌落,阳性重组质粒再转化BL21细菌,然后进行PCR扩增、双酶切和序列测定鉴定。

1.3 表达产物进行Western blotting分析

将过夜培养阳性克隆菌液以1:100的比例扩大培养2~3 h后,加入IPTG至终浓度为

0.5 mmol/L。取 1 ml 菌液 $17\ 000 \times g$ 离心收集菌体, 加入 30 μ l SDS 加样缓冲液, 重悬, 混匀, 煮沸 10 min, 离心取上清, 存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 备用。制备 5% 的浓缩胶和 15% 的分离胶, 取蛋白样品上样, 行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 转印到硝酸纤维膜上, 5% BSA 封闭后加入抗 His 抗体 (1:3 000 稀释), 室温孵育 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的羊抗鼠 IgG 二抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 加入 TMB 底物显色^[24]。

1.4 GD/ScFvMEL 表达产物的纯化

GD/ScFvMEL 表达产物的纯化和复性按照 Qiagen 公司的 Ni-NTA superflow cartridges 说明书进行。取 800 ml IPTG 诱导后菌液, 离心后加入 12 ml 裂解液重悬, 离心取上清, 注入 His 标签纯化柱, 用 10 ml 洗涤缓冲液洗涤除去非特异性蛋白后, 加入 10 ml 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度后, 用稀释缓冲液 (4 mol/L 尿素、0.1 mmol/L Tris-Cl、0.1 mmol/L NaH_2PO_4) 将蛋白稀释至 0.1 mg/ml, 注进透析袋中, 在复性缓冲液 I (2 mol/L 尿素、0.1 mmol/L Tris-Cl、0.1 mmol/L NaH_2PO_4 、0.9 mmol/L 还原型谷胱甘肽、0.1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽、0.4 mmol/L CuSO_4 、0.1 mol/L EDTA、0.5 mol/L L-精氨酸) 中 $4\ ^\circ\text{C}$ 透析 12 h, 换成复性缓冲液 II (1 mol/L 尿素、0.1 mmol/L Tris-Cl、0.1 mmol/L NaH_2PO_4 、0.9 mmol/L 还原型谷胱甘肽、0.1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽、0.4 mmol/L CuSO_4 、0.1 mol/L EDTA、0.5 mol/L L-精氨酸) 中 $4\ ^\circ\text{C}$ 透析 12 h。更换为 PBS, $4\ ^\circ\text{C}$ 继续透析 24 h。取出透析袋内蛋白液体, 用超滤管浓缩后放 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。

1.5 GD/ScFvMEL 与 CdTe 量子点的连接

1.5.1 CdTe 量子点 CdTe 量子点由崔大祥教授研究室合成并提供^[22]。制备的量子点用高分辨透射电镜、荧光分光光度计进行表征分析。

1.5.2 CdTe 量子点与 GD/ScFvMEL 连接 将 N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 及 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 以 1:1 的比例混合后, 加入 300 μ l 去离子水, 加入 600 μ l 制备的 CdTe 量子点, 超声下混合反应 5 min。加入 2 mg/ml 的纯化的神经节苷脂单链抗体 300 μ l, 混匀后, 在旋转混合器上反应 2 h。采用亲和层析柱纯化, 去除未结合的量子点^[14, 20-22]。制备的纳米探针 (GD/ScFvMEL-QDs), 用荧光分光光度计与 SDS-PAGE 电泳分析。

1.6 纳米探针靶向结合黑素瘤细胞的成像实验

将黑素瘤 A375 细胞和胃癌 MGC-803 细胞分别用含 10% 小牛血清的 DEME 培养基置 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5%

CO_2 细胞培养箱中培养, 细胞贴壁后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.1% PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min, 3% BSA 封闭 10 min, 然后分别加入 20 μ l GD/ScFvMEL-QDs, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 次日用 0.1% PBS 溶液洗涤 3 次后, 在荧光显微镜下观察并拍照^[25]。

2 结果

2.1 GD/ScFvMEL 基因的克隆和重组表达载体的构建

如图 1 所示, GD/ScFvMEL 基因片段被成功扩增, 扩增后的目的基因片段和 pET32a 载体经 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切后, 连接构建重组表达载体 pET32a-GD/ScFvMEL。重组质粒经 PCR 或 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切后, PCR 产物 (729 bp) 与酶切片段 (729 bp) 的大小与预期结果相符。阳性重组质粒委托上海桑尼生物公司测序, 测序结果与预期相符。

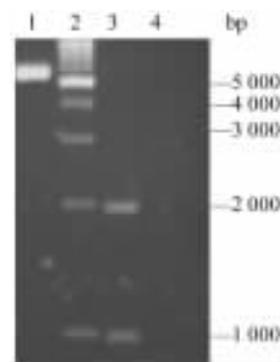


图 1 pET32a-GD/ScFvMEL 质粒的 PCR 和酶切鉴定
Fig. 1 Identification of pET32a-GD/ScFvMEL plasmid by PCR and restriction endonuclease digestion

1: pET32a-GD/ScFvMEL digested by *Eco*RI and *Xho*I ;
2: 1 kb marker; 3: DL2000 marker; 4: pET32a-ScFv PCR product

2.2 构建的质粒载体在大肠杆菌中的表达和纯化

构建的质粒载体在大肠杆菌中以 0.5 mmol/L IPTG 诱导 7 h, 间隔 1 h 取样进行 SDS-PAGE 分析, 以未诱导的菌液作为阴性对照。结果如图 2A 所示, 表达的蛋白分子质量约 45 000, 与预期蛋白大小相一致; 随着诱导时间的延长, 表达的蛋白量增加, 在诱导 4 h 时, 蛋白表达量增加到最大; 4 h 以后, 随着诱导时间的延长, 蛋白表达量并不再增加, 表达的蛋白几乎占细菌总蛋白量的 40%。图 2B 显示了包涵体不同部分纯化结果, 第 6 泳道显示了纯化的蛋白, 分子质量约为 45 000。图 3 显示了利用 anti-His 抗体作为第一抗体, Western blotting 检测显示制备的 ScFv 蛋白能够特异性结合 anti-His 抗体, 出现阳性条带。

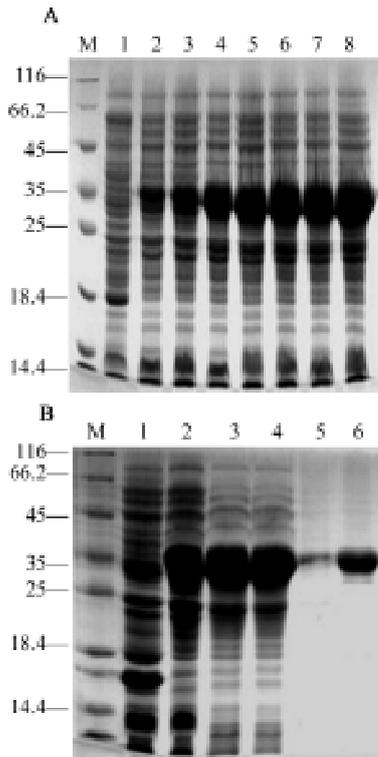


图 2 SDS-PAGE 分析单链抗体的表达
Fig. 2 Expression of pET32a-GD/ScFvMEL as detected by SDS-PAGE

(A). M: Marker; 1: Uninduced protein of pET32a-GD/ScFvMEL; 2-8: pET32a-GD/ScFvMEL induced for 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 h; (B). M: Marker; 1: Total protein of non-induced cell lysate; 2: Total protein of induced cell lysate; 3: Induced bacterial soluble lysate; 4: Cell lysate after purification by Ni-NTA metal affinity chromatography; 5: Protein eluted by washing buffer; 6: Purified ScFv antibody

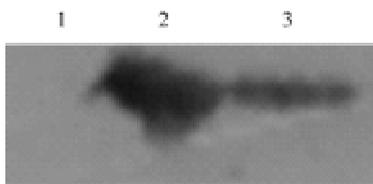


图 3 纯化后 GD/ScFvMEL 蛋白的 Western blotting 检测
Fig. 3 Purified GD/ScFvMEL protein as detected by Western blotting

1: Total protein of uninduced GD/ScFvMEL; 2: Total protein of induced GD/ScFvMEL; 3: Purified protein

2.3 碲化镉量子点的表征与纳米探针的鉴定

如图 4A 所示, 高分辨电镜照片清晰地显示出制备的量子点大小均匀, 直径约在 5 nm; 图 4B 是 X 衍射分析结果, 表明制备的量子点含有碲元素与镉

元素, 与预期的一致, 是碲化镉量子点。图 5A 是制备的量子点标记的 ScFv 抗体探针的荧光分析光谱, 红色线是制备的量子点荧光光谱, 波峰约位于 580 nm 处, 表明制备的量子点是红颜色的; 黑色线是标记后的纳米探针荧光光谱, 波峰约位于 560 nm 处, 与标记前相比波峰左移了 20 nm, 表明量子点成功地标记上了 ScFv 抗体, 而且, 结果显示标记后的量子点荧光强度增强了一些, 表明蛋白质具有增强量子点荧光信号的功能, 与部分报道一致。图 5B 是制备的纳米探针电泳分析结果, 制备的抗体在电泳中位于 45 000 处, 而制备的纳米探针则位于样品孔, 不能进入凝胶中, 进一步证明抗体与量子点完全结合在一起, 纳米探针被成功制备。

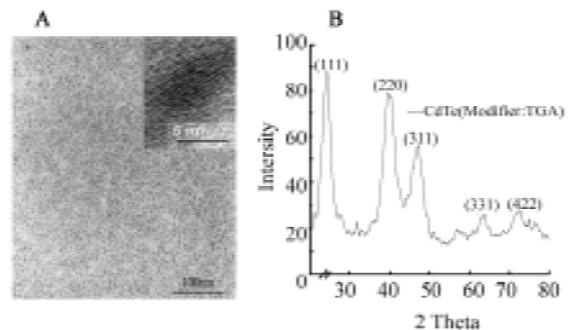


图 4 碲化镉量子点的表征
Fig. 4 Characterization of CdTe quantum dots
A: Transmission electron microscope; B: X-ray diffraction analysis

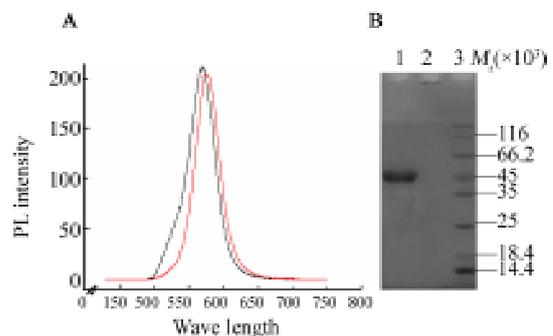


图 5 纳米探针荧光光谱分析与 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 5 Analysis of prepared nanoprobe by photoluminescent spectra (A) and SDS-PAGE (B)
A: Fluorescence intensity of GD/ScFvMEL before (red) and after (black) binding to QDs; B: 1: GD/ScFvMEL; 2: QDs-GD/ScFvMEL; 3: Marker

2.4 免疫荧光显微镜观察纳米探针 GD/ScFvMEL-QDs 与肿瘤细胞的特异性结合

黑色素瘤 A375 细胞与胃癌 MGC-803 细胞与纳米

探针孵育后,在荧光显微镜下观察,结果如图6所示,黑素瘤 A375 细胞能发出红色荧光信号,表明制备的 GD/ScFvMEL-QDs 纳米探针能特异性地与 A375 细胞结合;而胃癌细胞 MGC-803 不能与制备的纳米探针结合,只有散在的非特异荧光信号。

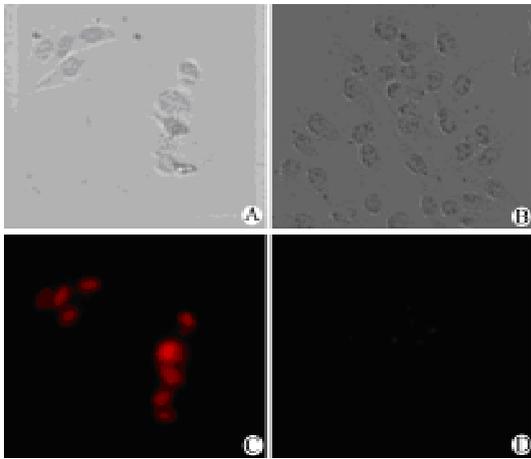


图6 QDs-GD/ScFvMEL 纳米探针与黑素瘤 A375 细胞特异性结合(×200)

Fig. 6 QDs-GD/ScFvMEL nanoprobe specifically binded A375 cells(×200)

A: A375 cells under light microscopy; B: MGC-803 cells under light microscope; C: A375 cells under fluorescence microscopy; D: MGC-803 cells under fluorescence microscopy

3 讨论

恶性黑素瘤的发病率呈现增高趋势。黑素瘤发现早,治愈机会大,但中晚期黑素瘤目前尚无有效治疗方法。因此,研发黑素瘤的分子影像早期诊断技术具有重要的临床意义。

分子影像是一个新的技术方向。2000年 Piwnica-Worms 等^[26]在第48届放射科医师年会上明确提出“molecular imaging”的概念。2001年 Weissleder 等^[27]详细介绍了分子影像学的定义并阐明与以往影像医学的异同以及分子影像学的优点、缺点、作用等。我国2002年在杭州召开“第194次香山科学会议”研讨“分子影像学”的发展,与会者敏锐地意识到这一新兴领域对我国影像医学孕育着新的机会和挑战。

荧光量子点是一类非常重要的功能纳米材料。由于量子效应,它们表现出独特的发光性能,如发射波长范围窄、斯托克斯(Stokes)位移大、量子产率高、荧光寿命长、化学和光学稳定性好。由于吸收光谱重叠范围宽,可采用单一波长的激光为激发光源,实现多色标记,特别适合于活体细胞成像和多组分

同时检测。目前荧光量子点已用于细胞荧光成像等领域^[10-14,28]。

王宇铃教授等^[23]研究发现针对一段神经节苷脂(gangliosides)的抗体具有黑素瘤的特异性,并且筛选、克隆出相应的 ScFv 基因片段。本研究利用此单链抗体分子量小的优势,与量子点的荧光信号优势结合,把神经节苷脂的 ScFv 基因片段抗体克隆入带有 His 标签的 pET32a 载体中,成功地构建了表达载体。利用 IPTG 进行诱导,获得了以包涵体形式表达的抗神经节苷脂的单链抗体,表达量高达40%。经过反复摸索变性与复性条件,最终获取了高纯度的单链抗体。

本研究将量子点与制备的 ScFv 抗体成功地连接在一起,制备出了相应的纳米探针,并对制备的纳米探针进行了表征分析,验证了纳米探针制备的成功。利用黑素瘤 A375 细胞与胃癌 MGC-803 细胞对制备纳米探针的特异性进行了研究。结果表明,制备的纳米探针能够与黑素瘤 A375 细胞特异结合,不结合对照 MGC-803 细胞,表明制备的纳米探针具有很好的特异性,能够靶向黑素瘤细胞。下一步的工作将主要集中在制备的纳米探针对接体动物黑素瘤模型中的黑素瘤细胞结合的动力学与分子影像学研究,为进一步的黑素瘤分子影像诊断研究打下坚实的基础。

[参考文献]

- [1] Ferrari Junior NM, Muller H, Ribeiro M, Maia M, Sanches Junior JA. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study [J]. Sao Paulo Med J, 2008, 126(1): 41-47.
- [2] Garbe C, Eigentler TK. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006 [J]. Melanoma Res, 2007, 17(2): 117-127.
- [3] Torrens R, Swan BA. Promoting prevention and early recognition of malignant melanoma [J]. Dermatol Nurs, 2009, 21(3): 115-123.
- [4] Byrnes P, Ackermann E, Williams ID, Mitchell GK, Askew D. Management of skin cancer in Australia: a comparison of general practice and skin cancer clinics [J]. Aust Fam Physician, 2007, 36(12): 1073-1075.
- [5] Moncrieff MD, Thompson JF, Quinn MJ, Stretch JR. Reconstruction after wide excision of primary cutaneous melanomas: part I-the head and neck [J]. Lancet Oncol, 2009, 10(7): 700-708.
- [6] Valsamaki P, Zanglis A, Gerali S. Cutaneous malignant melanoma; diagnostic procedures and their evaluation in diagnosing and mapping sentinel nodes [J]. Hell J Nucl Med, 2009, 12(3): 296-303.
- [7] Eide MJ, Weinstock MA, Clark MA. Demographic and socioeconomic predictors of melanoma prognosis in the United States [J]. J Health Care Poor Underserved, 2009, 20(1): 227-245.
- [8] Garg S, Kothari K, Thopate SR, Doke AK, Garg PK. Design,

- synthesis, and preliminary *in vitro* and *in vivo* evaluation of N-(2-diethylaminoethyl)-4-[(18 F)]fluorobenzamide ([(18 F)]-DAF-BA): a novel potential PET probe to image melanoma tumors [J]. *Bioconjug Chem*, 2009, 20(3): 583-590.
- [9] Marcoval J, Moreno A, Torras A, Baumann E, Graells J, Gallego MI. Changes in incidence of malignant melanoma in the last 19 years in a tertiary hospital on the Mediterranean coast [J]. *Actas Dermosifiliogr*, 2008, 99(6): 464-468.
- [10] Schmidt CR, Panageas KS, Coit DG, Patel A, Brady MS. An increased number of sentinel lymph nodes is associated with advanced breslow depth and lymphovascular invasion in patients with primary melanoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(4): 948-952.
- [11] Allan CP, Hayes AJ, Thomas JM. Ilioinguinal lymph node dissection for palpable metastatic melanoma to the groin [J]. *ANZ J Surg*, 2008, 78(11): 982-986.
- [12] Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Jonson S, Kaufman BM, Lee SM, *et al.* Single-chain antigen-binding proteins [J]. *Science*, 1988, 242(4877): 423-426.
- [13] Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, *et al.* Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(16): 5879-5883.
- [14] Cui D, Pan B, Zhang H, Gao F, Wu R, Wang JP, *et al.* Self-assembly of quantum dots and carbon nanotubes for ultrasensitive DNA and antigen detection [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(21): 7996-8001.
- [15] Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing [J]. *Nat Mater*, 2005, 4(6): 435-446.
- [16] Hoshino A, Fujioka K, Manabe N, Yamaya S, Goto Y, Yasuhara M, *et al.* Simultaneous multicolor detection system of the single-molecular microbial antigen with total internal reflection fluorescence microscopy [J]. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(5): 461-470.
- [17] Han M, Gao X, Su JZ, Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(7): 631-635.
- [18] Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(11): 1387-1395.
- [19] Huang X, Li L, Qian H, Dong C, Ren J. A resonance energy transfer between chemiluminescent donors and luminescent quantum-dots as acceptors (CRET) [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, 45(31): 5140-5143.
- [20] He R, You XG, Shao J, Gao F, Pan BF, Cui DX. Core/shell fluorescent magnetic silica-coated composite nanoparticles for bioconjugation [J]. *Nanotechnology*, 2007, 18(31): 315601.
- [21] 邵君, 尤晓刚, 高峰, 贺蓉, 崔大祥. 量子点标记链霉亲和素及其生物活性监测 [J]. *分析化学*, 2006, 34(11): 1625-1628.
- [22] Yang H, Guo Q, He R, Li D, Zhang XQ, Bao CC. A Quick and parallel analytical method based on quantum dots labeling for ToRCH-related antibodies [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2009, 4(12): 1469-1474.
- [23] 王字玲, 邓健蓓. 抗人黑色素瘤单链抗体基因在大肠杆菌中的融合表达 [J]. *生物工程学报*, 1999, 15(2): 221-224.
- [24] Cui GX, Jin GQ, Gao TW, Sun TB, Tian FR, Estrada GG. Characterization of BRCA1 and its novel antigen epitope identification [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(7): 1136-1145.
- [25] Cui GX, Han YD, Li ZM, Song H, Wang K, He R. Fluorescent magnetic nanoprobes for *in vivo* targeted imaging and hyperthermia therapy of prostate cancer [J]. *Nano Biomed Eng*, 2009, 1(1): 45-58.
- [26] Pivnicka-Worms D. Molecular imaging [C]. Orlando, Florida: The 48th Annual Meeting of the Association of University Radiologists, 2000, 6-9.
- [27] Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging [J]. *Radiology*, 2001, 219: 316-333.
- [28] He R, You XG, Tian H, Gao F, Cui DX. Synthesis of CdTe colloidal quantum dots (QDs) in water [J]. *Front Chem China*, 2008, 3(3): 325-329.
- [收稿日期] 2009-11-05 [修回日期] 2009-12-10
[本文编辑] 徐红梅

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

- (1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。
- (2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。
- (3)限制性内切核酸酶缩写符号前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* HI、*Sal* I 等。
- (4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 n 、均数 \bar{x} 、样本标准差 s 、 t 检验、 F 检验、概率 P 、相关系数 r 等。
- (5)各种物理量的量符号应斜体(pH 用正体除外),例如长度 L 、面积 A (或 S)、体积 V 、质量 m 、时间 t 、压力 p 、相对分子质量 M_r 、物质的量浓度 c_B 等。
- (6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体,例如左旋 L -、右旋 D -、邻位 o -、对位 p -、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。
- (7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。
- (8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *et al.*、*vs.*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)