

• 检验技术与方法 •

量子点标记间接免疫荧光技术在雌激素受体检测中的应用*

黄 慧^{1,2}, 郑 芳^{1△}, 彭 俊³, 孙 慧¹, 饶 艳¹

(1. 武汉大学中南医院基因诊断中心 430071; 2. 广东省中医院芳村分院检验科, 广州 510370;

3. 武汉大学化学与分子学院 430072)

摘 要:目的 采用量子点标记间接免疫荧光技术检测子宫内膜石蜡包埋组织切片中雌激素受体 α (ER α) 水平。方法 应用量子点标记间接免疫荧光技术和免疫组织化学法检测 112 例不同病理类型人子宫内膜中 ER α 的表达。结果 不同病理类型子宫内膜组织中均有 ER α 阳性表达的标本。阳性信号为桔红色荧光, 定位于腺上皮细胞或癌细胞的细胞核。结论 量子点标记间接免疫荧光技术可成功地应用于石蜡包埋组织切片中雌激素受体表达水平的检测。

关键词:量子点; 子宫内膜; 雌激素受体 α ; 荧光抗体技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.11.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)11-1215-02

量子点(QDs)为纳米荧光半导体量子点的简称,是一类由元素周期表中的 II~VI 族或 III~V 族元素组成的新型纳米荧光材料。自从 1998 年有学者在《Science》上首次报道了 QDs 应用于生物标记和细胞成像领域的开创性研究成果后, QDs 就凭借其优越的光学特性被应用到荧光共振能量转移、荧光原位杂交、细胞及分子成像、活体靶向示踪及病原体检测等多个方面^[1-5]。将 QDs 应用于石蜡包埋组织切片中抗原的检测,国内外相关报道较少。本研究将 QDs 标记到链霉亲和素上,利用链霉亲和素与生物素、抗原、抗体特异性结合的原理,以检测不同病理类型人子宫内膜石蜡切片中雌激素受体 α (ER α) 的表达。作者也用传统的免疫酶组织化学 S-P 法进行了检测,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 武汉大学中南医院 2005 年开腹手术及门诊刮宫患者 112 例。其中增殖期子宫内膜 24 例,简单性增生 21 例,复杂性增生 40 例,子宫内膜样腺癌 27 例。诊断均经病理证实。新鲜组织离体后,经福尔马林固定,脱水,透明,石蜡包埋,制备成组织蜡块,每例组织连续切片,切片厚度 4 μ m。

1.2 主要试剂 鼠抗人 ER α 单克隆抗体 IgG₁ 和生物素化的羊抗鼠 IgG₁-B 购自美国 Santa Cruz 公司, SP-9002 免疫组化染色试剂盒和 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, QDs 标记的链霉亲和素 605(QDs-SA)由武汉大学化学与分子学院庞代文教授提供。

1.3 QDs-SA 检测 ER α 的表达 石蜡包埋组织切片脱蜡、水化,高温高压抗原修复;3%牛血清清蛋白封闭,37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 30 min;滴加鼠抗人 ER α 单克隆抗体 IgG₁ (稀释度 1:100),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;TBS-T 漂洗,3 min $\times$ 3 次;滴加生物素化的羊抗鼠 IgG₁-B(稀释度 1:200),37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min;TBS-T 漂洗,3 min $\times$ 3 次;滴加 QDs-SA(稀释度 1:150),37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 40 min;TBS-T 漂洗,3 min $\times$ 3 次;缓冲甘油封片剂封片,荧光显微镜下观察。

1.4 免疫酶组织化学 S-P 法检测 ER α 其主要步骤同 QDs-SA 检测 ER α ,不同之处在于用辣根过氧化物酶标记链霉卵白素代替 QDs-SA。用 DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,中性树胶封

固,光学显微镜下观察。

2 结 果

2.1 QDs-SA 检测 ER α 的表达 将用 QDs-SA 检测的切片置荧光显微镜下观察,用蓝光激发,可看到不同病理类型子宫内膜组织中均有 ER α 阳性表达的标本。阳性信号为桔红色荧光,定位于腺上皮细胞或癌细胞的细胞核,少数间质细胞核也呈桔红色,组织的自发荧光呈绿色。

2.2 免疫酶组织化学 S-P 法检测 ER α 应用免疫酶组织化学 S-P 法检测人不同病理类型子宫内膜中 ER α 的表达,ER α 在不同类型子宫内膜中均有阳性表达。阳性染色主要定位于腺上皮细胞或癌细胞的细胞核,呈棕黄色颗粒,间质细胞核也可着色,但着色比腺上皮细胞核浅。

3 讨 论

雌激素受体(ER)是类固醇受体超家族中的一员,位于核内,分为 ER α 和 ER β 两种亚型。在女性可再生组织中,ER α 和 ER β 主要存在于卵巢及乳房中,而子宫中以 ER α 为主^[6]。多数研究显示,子宫内膜癌的发生与 ER α 的表达缺失有关,ER α 的表达可以作为判断子宫内膜癌预后的指标,ER α 阳性肿瘤对激素药物、疗效较好,患者的预后明显好于 ER α 阴性患者。因而,雌激素受体是临床上通常用来检测的 1 项指标。目前,对 ER α 的检测普遍采用的方法是免疫酶组织化学 S-P 法,本法比较简便、成本较低。但是在该法中要用到 DAB 显色,显色液有一定的致癌作用,且需现配现用。显色的深浅受显色时间的影响较大,显色时间人为控制,存在较大误差。

在本研究中,作者将 QDs 标记到链霉亲和素上,应用量子点间接免疫荧光法对不同病理类型的子宫内膜石蜡组织切片进行了 ER α 的检测。结果在不同病理类型的子宫内膜组织中均检测到了 ER α 的阳性表达,阳性信号表达部位和免疫酶组织化学 S-P 法相一致,且阳性信号和阴性组织颜色对比鲜明,结果易于观察。由于 QDs 具有不同于普通荧光染料的耐光漂白性,即使长时间观察荧光信号仍不衰减。本研究表明, QDs 可成功地应用于石蜡包埋组织切片中抗原的检测,与陈洪雷等^[7]和 Chen 等^[8]的报道相一致。

QDs 优越的光学特性是传统有机荧光染料无法比拟的,

* 基金项目:武汉大学自主科研项目(3081005);国家自然科学基金创新团队项目(20621502、20921062)。△ 通讯作者, E-mail: zhengfang@whu.edu.cn。

其光稳定性好,耐光漂白,荧光寿命长,强度高。此外,QDs 激发光谱宽而连续,吸光系数大,荧光强度高,荧光发射峰窄而对称,且 QDs 可通过改变元素组成和粒径而呈现不同的光谱特征,这样就允许同时使用不同光谱特征的 QDs,而发射光谱不出现交叠,实现一元激发多元发射的同时标记,使生物分子的多组分同时检测成为可能。该特性具有很强的临床应用价值,既能缩短标本的检测时间,又能节省标本用量。研究已经证明,QDs 可以成功应用于石蜡包埋组织切片中抗原的检测。相信在研究者的努力下,一定可以实现石蜡包埋组织切片中多种抗原的同时检测,使 QDs 在免疫组化技术中大放异彩。

参考文献

[1] Medintz IL, Clapp AR, Brunel FM, et al. Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot-peptide conjugates[J]. Nat Mater, 2006, 5(7): 581-589.

[2] Xiao Y, Barker PE. Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(3): e28.

[3] Lidke DS, Nagy P, Heintzmann R, et al. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal trans-

duction[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(2): 198-203.

[4] Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(8): 969-976.

[5] Lee LY, Ong SL, Hu JY, et al. Use of semiconductor quantum dots for photostable immunofluorescence labeling of cryptosporidium parvum[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(10): 5732-5736.

[6] Sakaguchi H, Fujimoto J, Bao LH, et al. Quantitative analysis of estrogen recept proteins in rat ovary[J]. J Steroid Biochem Mole Biol, 2005, 94(1-3): 83-91.

[7] 陈洪雷,朱小波,张玉霞,等.量子点免疫标记技术在肺癌组织芯片上的应用[J].武汉大学学报:医学版,2008,29(5):607-609.

[8] Chen C, Peng J, Xia HS, et al. Quantum-dot-based immunofluorescent imaging of HER2 and ER provides new insights into breast cancer heterogeneity[J]. Nanotechnology, 2010, 21(9): 95-101.

(收稿日期:2011-01-15)

• 检验技术与方法 •

化学发光微粒子免疫法监测他克莫司血药浓度的临床应用评价

刘旭华,戚润鹏
(河南省郑州市人民医院检验科 450003)

摘要:目的 对以化学发光微粒子免疫法(CMIA)进行他克莫司治疗药物监测进行评价。方法 根据美国临床与实验室标准化协会文件 EP10-A 提供的方法,以 Architect i2000 型分析仪连续 5 d 检测他克莫司定值质控品,计算偏差、总不精密度(CV)、截距、斜率、非线性、携带污染率和漂移度;以 CMIA 和微粒子酶免疫法(MEIA)平行检测 58 例临床患者全血标本,比较检测结果的相关性。结果 各水平质控品测定值与靶值的偏差和 CV 在可接受范围内;漂移度和携带污染率对检测结果的影响差异无统计学意义($P>0.05$);CMIA 与 MEIA 检测结果间有良好的相关性($r=0.982, P<0.05$),但比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 CMIA 具有良好的准确度和精密度,性能指标基本符合临床应用要求,可以替代 MEIA 用于他克莫司血药浓度的监测。

关键词:药物监测; 他克莫司; 化学发光微粒子免疫
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.11.034 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)11-1216-03

治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM)在指导临床医师制定和调整合理用药方案、保证药物治疗有效性和安全性方面发挥重要作用^[1]。他克莫司是一种大环内酯类抗菌剂,具有抗排异作用,广泛应用于接受器官移植的患者。因他克莫司治疗窗窄,药代动力学个体差异大,需常规监测其血药浓度^[2]。化学发光微粒子免疫法(chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA)是用于他克莫司血药浓度监测的最新方法,笔者对该方法的临床应用进行了初步评价,并分析了 CMIA 与微粒子免疫分析法(microparticle enzyme immunoassay, MEIA)的相关性,将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetracetic acid, EDTA)抗凝静脉血标本 2 mL,采集自 58 例在本院接受肝移植或肾移植,并接受他克莫司治疗的患者,均于给药后 12 h 清晨空腹抽取。

1.2 仪器及试剂 (1)CMIA 和 MEIA 分别采用美国 AB-BOTT 公司 Architect i2000 型全自动化学发光免疫分析仪(配

套他克莫司试剂盒、标准品)和 IMX 型分析仪(配套他克莫司Ⅱ试剂盒、标准品)。(2)他克莫司低值(4.90 ng/mL)、中值(12.10 ng/mL)、高值(20.70 ng/mL)定值质控品购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 加 200 μ L 样品(标准品、质控品或全血标本)于 1.5 mL 离心管,加 200 μ L 前处理液,充分涡旋混匀,16 440 g 离心 5 min,吸取上清液至测定管后上机检测^[3]。

1.3.2 每天按中、中、高、低、中、中、低、低、高、高、中的顺序以上述方法测定定值质控品各 1 次,前 2 个中值检测结果不纳入统计,后 9 个检测结果中任何 1 个不合格时弃掉该批全部数据,重新测定,连续 5 d 记录有效数据并确保质控品检测在控^[4]。

1.3.3 Architect i2000 型分析仪他克莫司质控品检测评价。(1)测定值与靶值偏倚分析:以靶值为横坐标、测定值与靶值的差值为纵坐标绘制散点图,按差值不超过($\pm 15\% \times$ 靶值)的标准判断有无离群点;计算每天各水平质控品测定值均值以及