

in the diagnosis of bloodstream infections[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(12):751-760.

[5] Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30(Suppl 1):S7-15.

[6] Schrenzel J. Clinical relevance of new diagnostic methods for bloodstream infections[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30(Suppl 1):S2-6.

[7] Palka-Santini M, Cleven BE, Eichinger L, et al. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays[J]. BMC Microbiol, 2009, 9:1.

[8] Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(Suppl 1):S51-59.

[9] Peters RP, Savelkoul PH, Simoons-Smit AM, et al. Faster identification of pathogens in positive blood cultures by fluorescence in situ hybridization in routine practice[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(1):119-123.

[10] Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2):830-838.

[11] 孙敬, 汤学夫. 脑外科术后气管插管吸出物的细菌检验方法[J]. 中华医院感染学杂志, 2000, 10(4):317-318.

[12] Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1):324-329.

(收稿日期:2011-01-11)

• 综 述 •

量子点在生物医学领域应用的研究进展

龚 敏, 李金密 综述, 邓少丽 审校

(第三军医大学大坪医院检验科, 重庆 400042)

关键词:量子点; 体内成像; 体外成像

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)14-1596-03

在生物医学领域中,人们对生命现象的观察和研究已经深入到单细胞、单分子水平。因此提高生命过程中蛋白质、核酸、多肽等重要生物分子检测的灵敏度已成为研究者努力的方向。荧光分析法是生命科学研究中十分重要的方法之一,其检测灵敏度很大程度上取决于标记物的发光强度和光化学稳定性。目前使用的有机荧光染料由于其不可克服的荧光性能缺陷,极大地限制了其应用。

纳米技术的发展为生命体系中化学、生物信息的快速、原位、实时、动态和高灵敏获取提供了新的途径,通过纳米材料标记、示踪来解释一些生命现象已成为目前世界范围内的热点交叉研究领域。近年来,量子点(QDs)作为一类新型的荧光标记材料已成为纳米技术在生命科学领域发展最快的学科之一。由于其独特的光学特性,QDs已经被广泛应用于无机离子传感器、有机小分子传感器、生物大分子传感器、生物标记、细胞标签、动物成像及治疗等领域,成为纳米技术、纳米生物技术和纳米医学领域连接的桥梁。

1 QDs 及其特点

QDs 主要是由Ⅱ~Ⅳ族或Ⅲ~Ⅴ族元素组成的无机纳米颗粒,粒径范围2~20 nm。由于其物理尺寸小于激子的波尔半径,从而导致量子尺寸效应、表面效应和量子隧穿效应等,使QDs具有独特的光学和电学性质。1998年,有学者同时在Science上报道了QDs应用于生物标记和细胞成像领域的开创性的研究成果,初步解决了QDs作为生物探针的靶向性和生物相容性问题,促使QDs真正进入生物荧光标记领域,也标志着QDs在生物学领域的应用开始起步^[1-2]。对QDs在生物医学方面的应用产生深远影响。

与传统的有机荧光物相比,QDs具有其独特的理化特性:(1)波长可调谐,可通过控制QDs的大小或组成材料比例来调节其发光颜色;(2)一元激发,多元发射,不同波长的QDs可用同一波长激发;(3)荧光光谱窄且对称;(4)强度高且不易漂白,

QDs荧光强度是荧光素的20倍,稳定性是其100倍,可经受多次激发而不易漂白。因此在肿瘤的活体成像与靶向治疗及分子诊断领域展现出巨大的潜能^[3-5]。

2 QDs 在生物医学中的应用

QDs最广泛的应用是被作为荧光探针对生物体系进行研究。不同材料的QDs可代替各种荧光染料分子与生物分子相偶联,用于细胞器定位、信号转导原位杂交、胞内组分的运动和迁移等研究。另外,由于QDs上存在的修饰基团与一些药物键合后会引起其荧光性质的变化,故也可用于药物的分析测定。

2.1 QDs在体外成像中的应用 QDs的体外成像意味着实验条件是人为控制的,只有通过重新调整才可能发生在体内的过程中,目前QDs的体外成像主要应用于细胞成像、生物分子的细胞内追踪和组织染色。

2.1.1 在细胞成像中的应用 QDs最有前途的应用领域是在生物体系中作为荧光探针,将不同材料制成的QDs与生物分子相偶联,就可以代替很多的荧光染料分子,从而在细胞生物学研究中发挥巨大的作用。QDs应用于细胞成像方面的工作主要分为以下2大类:(1)固定细胞的成像(细胞和组织的成像);(2)离体活细胞成像(膜表面受体的显像,细胞器及胞内特定大分子的示踪)。

Wu等^[6]改进了QDs的修饰方法,利用抗原-抗体及生物素-亲和素特异性结合成功实现了3T3鼠纤维原细胞及人乳腺癌SK-BR-3细胞的双色QDs标记。利用偶联了链霉亲和素的绿色QDs与生物素抗鼠IgG的特异性结合标记3T3鼠纤维原细胞骨架纤维微管,用偶联了链霉亲和素的红色QDs与生物素-IgG及抗核抗体结合标记3T3鼠纤维原细胞核。SK-BR-3细胞膜上的Her2则用偶联了IgG的绿色QDs标记。

Jaiswal等^[7]报道了利用QDs标记活细胞并首次证明QDs可以用于活细胞的超长时间标记示踪。分别采用2种不

同的方式来标记细胞-细胞内吞 QDs 和利用抗原-抗体特异作用来标记细胞表面受体。QDs 标记后的细胞在生长和传代的过程中其生长和发育并没受到影响。同时,细胞内的 QDs 也仍可保持其荧光稳定性^[8]。证实了 QDs 可用于细胞生长和发育等过程的长时间示踪研究。

2.1.2 在生物分子细胞内追踪中的应用 除了细胞成像,细胞内生物分子检测有更实际的临床意义。肿瘤标志物是一种典型的生物分子,其在肿瘤细胞和癌组织过度表达。肿瘤标志物的存在和相对数量标志着肿瘤的发生和肿瘤细胞的分化程度,因此检测和量化肿瘤标志物有利于肿瘤早期诊断、分类和治疗^[9-10]。Yehelyev 等^[11]证明了利用 QDs 对培养乳腺癌细胞和临床患者石蜡切片的 5 种肿瘤标志物进行检测。同时与传统的免疫组织化学、免疫印迹和荧光原位杂交进行了量化比较,表明 QDs 技术非常适合用于肿瘤标志物的检测。

Ko 等^[12]采用精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸肽、AS1411 适体(连接在 QDs 羟基末端)对多种肿瘤细胞和正常组织的两个假定的癌症生物标志物整合素 $\alpha\beta 3$ 和核仁素进行了检测。共聚焦显微镜结果显示 QDs 结合的核仁素和整合素可以同步跟踪 2 个不同的目标及其在细胞内的分布。由此可见,此方法在癌细胞成像中具有强大潜能,是一种很好的癌症定位技术。还有用 QDs 对猴人泡病毒 40(SV40)的衣壳蛋白 VP1 基因进行标记对 SV40 的感染进行检测^[13],可见 QDs 技术在生物分子的细胞内追踪的研究中具有重要的意义。

近年来将 QDs 用于组织染色是 QDs 用于生物医学研究领域的另一个研究方向。但目前主要问题在于组织切片固定后的标记问题。有学者通过亲和素标记对神经肌肉接头的烟碱能受体进行了染色^[14]。同时有研究采用 QDs 标记的鼠抗人 c-erbB-2 的单克隆抗体对表皮生长因子受体 2 进行了染色^[15]。可见 QDs 用于组织染色得到了很好的发展。

2.2 QDs 的体内成像 QDs 在生物标记中的应用的另一个重要部分是用于生物活体成像,即对动物体内的靶组织或细胞进行标记,其原理是:用于动物体内的 QDs 探针上的功能分子有不同的肽链,利用不同的肽链分子识别不同的靶细胞。Larson 等^[16]将水溶性的 CdSe-ZnS QDs 经尾静脉注射给小鼠,通过双光子扫描显微镜观察到皮下毛细血管高清晰度的三维影像及的毛细血管搏动。Dubertret 等^[17]将 QDs 技术用于非洲蟾蜍早期胚胎发育的体内成像,他们将 QDs 包入磷脂嵌段共聚物微粒中,并通过化学修饰,形成 QDs-DNA 微粒,将这些微粒注入胚胎卵裂球 8 个细胞中的 1 个,跟踪观察了胚胎发育的几个阶段。Gao 等^[18]采用前列腺特异性膜抗原(PSMA)的抗体与 QDs 连接,皮下注入小鼠体内,可清楚地观察到肿瘤的大小和位置,可以对含有 10~100 个肿瘤细胞的小鼠体内进行超敏感检测。

2.3 QDs 在微生物检测等领域的应用 QDs 应用于微生物的标记检测是近年来开拓发展的新研究领域。由于 QDs 优越的荧光性能、较高的荧光强度及良好的光稳定性,对于建立稳定且高灵敏度的微生物检测方法具有极高的潜在应用前景。Goldman 和 Clapp^[19]将 QDs 用于 4 种肠毒素:霍乱毒素(CT)、蓖麻毒素(RIC)、志贺样毒素(SLT)、葡萄球菌肠毒素(SEB)的同时分析。发射波长分别为 510、555、590、610 nm 的 QDs 分别标记 4 种毒素抗体,在同一个微孔板上对 4 种毒素进行同时检测。在混合物中每种毒素浓度较高(1 000 ng/mL)和较低(30 ng/mL)的情况下,均实现了 4 种毒素的同时检测。Kirchner 等^[20]用链酶亲和素修饰的 QDs 荧光探针检测 O157:H7,

其检测灵敏度比使用普通有机荧光染料探针要高出 2 个数量级。Lingerfeh 等^[21]利用 QDs 进行免疫分析,成功地完成了 B 型葡萄球菌肠毒素的测定,检测的灵敏度为 10 ng/mL。

由于 QDs 的表面结构对荧光的影响非常大,具有可调的发射波长可以满足任何供体的需求,其激发光谱较宽便于选择不直接激发受体的激发光谱等特性使 QDs 被广泛应用于生物传感领域,目前 QDs 在生物传感领域主要是用于金属和非金属离子、pH、糖类以及各种酶的活性的检测。同时近年来 QDs 技术在药物的高内涵筛选、靶向药物开发及药物体内研究等方面也取得了可喜的进展。

3 展 望

随着现代科学技术的迅速发展,QDs 因其独特的性质而引起了越来越多的关注,QDs 以其独特的光学属性令其成为具有广阔发展前景的荧光染料,可以作为药物载体、荧光标记物应用在生物医学等领域。QDs 的研究内容涉及了物理、化学、生物、材料等,已成为一门具有广阔研究前景的交叉学科。

但目前 QDs 的研究仍然存在很多问题。由于常见的 QDs 含具有生物毒性的重金属元素,但 QDs 的潜在毒性是由多因素决定的,因此其毒理学研究仍需深入。目前,有关 QDs 的毒理学研究主要集中在 QDs 短期内对体外培养单细胞的毒性影响,以及在动物体内的分布和急性毒理。尽管用于研究 QDs 毒性的方法多样,但是却没有成熟、可靠的毒性检测模型。QDs 的体内成像技术在不断优化和完善,但对活体深层组织的荧光成像技术的灵敏度低。目前主要通过多光子显微镜技术和发展红外与近红外探针等策略来解决,特别是后者在生命科学领域中有极大的发展空间。现已合成出 700 nm 以上甚至 900 nm 的 QDs,但是其荧光效率较低,需要更多、更深入的研究。

相信在物理学家、化学家、生物学家的共同努力下,在不久的将来,QDs 的上述缺点将被克服,它也将生物医学领域中得到更加广泛的应用。

参考文献

- [1] Bruchez M, Moronne M, Alivisatos AP, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. Science, 1998, 281(5385):2013-2016.
- [2] Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. Science, 1998, 281(5385):2016-2018.
- [3] Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels[J]. Nature methods, 2008, 5(9):763-775.
- [4] Gao J, Xu B. Applications of nanomaterials inside cells[J]. Nano Today, 2009, 4(1):37-51.
- [5] Zimmerman R. Molecular diagnostics in the cytology laboratory: slowly making its way there[J]. Diagn Histopathol, 2008, 14(12):609-613.
- [6] Wu XY, Liu HJ, Liu JQ. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cell ular targets with semiconductor quantum dots[J]. Na Biotechnol, 2003, 21(1):41-46.
- [7] Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, et al. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(1):47-51.
- [8] Ruan G, Agrawal A, Marcus AI, et al. Imaging and tracking of tat peptide-conjugated quantum dots in living cells: new insights into nanoparticle uptake, intracellular transport, and vesicle shedding [J]. J Am Chem Soc, 2007, 129(47):14759-14766.

- [9] Barua S, Rege K. Cancer-cell-phenotype-dependent differential intracellular trafficking of unconjugated quantum dots[J]. Small, 2009, 5(3):370-376.
- [10] Orndorff RL, Rosenthal SJ. Neurotoxin quantum dot conjugates detect endogenous targets expressed in live cancer cells[J]. Nano Lett, 2009, 9(7):2589-2599.
- [11] Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, et al. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer[J]. Lancet Oncol, 2006, 7(8):657-667.
- [12] Ko MH, Kim S, Kang WJ, et al. In vitro derby imaging of cancer biomarkers using quantum dots[J]. Small, 2009, 5(10):1207-1212.
- [13] Li F, Zhang ZP, Peng J, et al. Imaging viral behaviors in mammalian cells with self-assembled capsid-quantum-dot hybrid particles[J]. Small, 2009, 5(6):718-726.
- [14] Orndorff RL, Warnement MR, Mason JN, et al. Quantum dot ex vivo labeling of neuromuscular synapses[J]. Nano Lett, 2008, 8(3):780-785.
- [15] Chen C, Peng J, Xia HS, et al. Quantum dots-based immunofluorescence technology for the quantitative determination of Her2 expression in breast cancer[J]. Biomaterials, 2009, 30(15):2912-2918.
- [16] Larson DR, Zipfel WR, Williams RM, et al. Water soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo[J]. Science, 2003, 300(5624):1434-1436.
- [17] Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, et al. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles[J]. Science, 2002, 298(5599):1759-1762.
- [18] 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.
- [19] Goldman ER, Clapp AR, Mattoussi H, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents[J]. J Anal Chem, 2004, 76(3):684-688.
- [20] Kirchner C, Liedl T, Kudera S, et al. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles[J]. Nano Letters, 2005, 5(2):331-338.
- [21] Lingerfeh BM, Mattoussi H, Goldman ER, et al. Preparation of quantum dot-biotin conjugates and their use in immunochromatography assays[J]. Anal Chem, 2003, 75(16):4043-4049.

(收稿日期:2011-02-21)

• 综 述 •

血清前清蛋白和 C 反应蛋白的检测在临床疾病中的应用

黄跃斌 综述,何印蕾[△] 审校

(广西右江民族医学院医学检验学院,广西百色 533000)

关键词: C 反应蛋白质; 白蛋白; 血清

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 14. 033

文献标识码: A

文章编号:1673-4130(2011)14-1598-02

前清蛋白(PA)相对分子质量为 54×10^3 , 由肝细胞合成, 在电泳分离时, 常显示在清蛋白的前方, 其半衰期很短, 仅约 12 h。因此, 测定其在血浆中的浓度对于了解蛋白质营养不良、肝功能不全, 比清蛋白和转铁蛋白具有更高的敏感性。C 反应蛋白(CRP), 是人类重要的急性期反应蛋白, 急性期浓度可升高上千倍, 循环中的 CRP 半衰期为 19 h。人类 CRP 是由肝脏合成, 由 5 个相同的亚基依靠非共价键形成的环状五聚体, 这一特征性结构使其被归类于五聚素(一组具有免疫防御特性的钙结合蛋白)家族。低等动物同样存在 CRP, 如在蜃、河蚌等中也发现过, 但并不一定起急性期反应蛋白的作用。CRP 特征反应是能在钙离子存在的条件下特异性结合磷酸胆碱基团。由于 PA 和 CRP 都是急性时相反应蛋白, 其特殊性表现在临床疾病中具有独特的作用^[1-5]。现将其综述如下。

1 血清 PA、CRP 的检测在儿科感染性疾病中的应用

近年来血清 PA、CRP 等急性时相蛋白的检测受到儿科临床的重视, 被广泛用于细菌性与病毒性疾病的诊断与鉴别诊断, 或作为判断抗菌剂疗效的指标。但它们与白细胞计数之间的相关性分析, 鲜见报告。儿科感染性疾病是国内小儿发病率及病死率占首位的疾病, 而抗菌剂对非感染或病毒性感染不但无效, 而且存在许多隐患和副作用。由于抗菌剂的广泛应用, 细菌培养的阳性率越来越低, 而核酸扩增等较先进技术又难于普及, 因此感染性疾病的早期诊断与鉴别诊断有一定困难^[3]。CRP 在炎性反应后 6~8 h 即明显上升^[4], 可作为细菌感染的

早期诊断指标。邓茂雄等^[6]报告细菌感染组中 CRP 明显升高, 与病毒感染组及对照组比较差异有统计学意义, 认为 CRP 是区分细菌感染和病毒感染的有用指标, 且感染组经合理、有效抗感染治疗后, CRP 明显下降, 所以 CRP 对细菌感染及疗效观察也有一定参考价值。另有研究者也认为 CRP 可作为鉴别细菌与病毒感染的可靠指标^[6-7]。PA 是肝脏合成的一种负急性时相蛋白, 为非特异性宿主防御物质, 可以清除感染过程中释放于循环系统中的有毒代谢产物, 并逐渐被消化, 所以在急性感染时 PA 迅速下降^[8]。小儿细菌感染时, PA 含量降低与感染程度有关, 经有效抗菌治疗后血清 PA 含量逐渐上升并恢复到正常, 而病毒感染时未见明显降低。因此 PA 可作为小儿细菌感染和病毒感染的鉴别指标, 又可作为判断抗菌剂疗效的指标^[9]。由此可见, PA、CRP 在儿科感染性疾病中具有重要的作用。

2 血清 PA、CRP 的检测在外科疾病中的应用

当前, 血清 PA、CRP 的检测在外科疾病中的应用也越来越受到重视, 其水平的变化在普外科感染中尤为突出。顾淞芙^[10]报道, CRP 与病情严重程度呈正相关, PA 与病情严重程度呈负相关, 如果 CRP 持续高水平伴 PA 持续低水平, 说明患者感染严重、蛋白营养不良、免疫功能差, 是预后不良的表现。黄秀玲^[11]报道, CRP 是人体感染的一个重要标志。CRP 作为炎症标志物, 本身尽管为非特异性的, 但对于细菌感染、各种炎症过程及组织坏死与组织损伤(如外科手术术后)及其恢复期的

[△] 通讯作者, E-mail: heyinlei@163. com.