

• 论 著 •

## 量子点-磁微粒技术同步检测输血后肝炎的体系建立及初步应用\*

李 蒙<sup>1</sup>, 刘琳琳<sup>1</sup>, 邓莉萍<sup>2</sup>, 蒲晓允<sup>1△</sup>

(第三军医大学新桥医院: 1. 检验科; 2. 输血科, 重庆 400037)

**摘要:**目的 结合量子点-磁微粒(QD-MMS)技术,建立针对 HBV 及 HCV 的多抗原同步快速检测体系。方法 以碳二亚胺交联法活化 QD-MMS 以夹心法检测抗原。在分别建立 HBV 与 HCV 抗原检测方法的基础上整合优化体系,对 188 份随机临床标本进行同步检测,结果与聚合酶链反应(PCR)及酶联免疫吸附法(ELISA)方法比较。结果 QD-MMS 同步检测体系检测范围为 HbsAb 2 ng/mL~10 μg/mL、HcAg 5 ng/mL~5 μg/mL,40 min 内完成同步检测。与 ELISA 方法比较灵敏度及特异性无差异,符合率分别为 95.8%、98.4%。与 TP、HAV 阳性标本无交叉反应。试剂于 4℃ 保存 4 周后使用,与新配制试剂检测结果无差异。结合目标抗原后的复合物标本,经 4℃ 放置 4 周后荧光强度无明显衰减。最长放置 8 周后仍可检出荧光。结论 建立了对 HBsAg 和 HcAg 的同步检测体系,采用图像分析软件解析荧光强度值可达到半定量检测效果。检测时间同步缩短到了 40 min 左右,提高了检测效率,操作简便快速,检测成本低,所需样本量少,特异度较好,能初步满足多抗原同步检测的需求,为同步检测更多病原体抗原体系的建立奠定了基础。

**关键词:**量子点; 抗原; 磁微粒; 同步检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-1915-03

### Establishment and application of the synchronous detection system of post-transfusion hepatitis based on quantum dots and magnetic microspheres technology\*

Li Meng<sup>1</sup>, Liu Linlin<sup>1</sup>, Deng Liping<sup>2</sup>, Pu Xiaoyun<sup>1△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Blood Transfusion, Xin qiao Hospital, Chongqing 400037, China)

**Abstract:** Objective To establish a synchronous detection system against multiple antigens of HBV and HCV based quantum dots (QDs) and magnetic microspheres (MMS). **Methods** Sandwich method was constructed with QDs and MMS activated with carbodiimide cross-link technique. On the basis of single test systems, the optimal detection system was constructed and synchronously performed to detect 188 unknown samples. The detection results were compared with those of polymerase chain reaction (PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The detecting ranges were 2 ng/mL—10 μg/mL for HBsAb and 5 ng/mL—5 μg/mL for HcAg. The time of detection were shortened in 40 min. And there were no significant difference between ELISA and this method, with the accordance rates of 95.8% and 98.4% for HBsAb and HcAg in parallel test system. The fluorescence intensity of compound samples did not decline, after being stored at 4℃ for 4 weeks. The longest storing period could be 8 weeks. **Conclusion** The synchronous detection system of HBsAg and HcAg and semi-quantitative detection could be achieved by using image analyzing software. The measure period could be shortened to 40 min in parallel, with advantages of high detection efficiency, fast detection speed, low cost, low requirement of sample volume and high specificity, could be fit for synchronous detection of multiple antigens. This technology might be helpful for parallel detection of antigens.

**Key words:** quantum dots; antigens; magnetic microspheres; parallel analyze

人类乙型肝炎病毒(HBV)与丙型肝炎病毒(HCV)是目前在中国导致输血后肝炎的主要病原体,HBV、HCV 感染作为献血员和献血员筛查的重要项目,在保证临床输血和血液制品安全方面及控制输血后肝炎的发病率方面有着重要意义<sup>[1-2]</sup>。目前针对上述两种抗原的实验室诊断试剂盒检测时间差距较大,无法快速同步报告结果。聚合酶链反应(PCR)方法检测 HBV DNA 和 HCV RNA 由于逆转录步骤差异,也无法同步报告<sup>[3-4]</sup>。在此前的研究中,本科室建立了基于量子点-磁微粒(QD-MMS)方法分别针对 HBsAg 和 HcAg 的检测体系<sup>[5]</sup>。在本研究中将体系整合以期达到在同一体系同步检测和报告两种抗原的目的。

#### 1 材料与与方法

**1.1 材料** 随机收集本院检验科 188 份临床血液标本进行

检测。

**1.2 仪器与试剂** 发射波长为 581、618 nm 的硒化镉量子点(QDs),美国 Ocean Nanotech 公司;羧基化磁微粒(MMS)3 μm,25 mg/mL,陕西西大北美生物有限公司;鼠抗 HBsAg-IgG、兔抗 HBsAg-IgG,深圳菲鹏生物股份有限公司;HBV DNA、HCV RNA 诊断试剂盒,深圳匹基基因诊断中心;HBsAg ELISA 试剂盒,上海科华生物工程股份有限公司;HcAg 检测试剂盒、HCV 重组核心抗原(Core、E1、E2),湖南景达生物工程有限公司。荧光显微镜(DM2000 LEICA),荧光定量 PCR 仪(Corbet Research, Rotor Gene 3000);荧光强度采用 IPP 6.0(Image-ProPlus)图像分析软件分析。

#### 1.3 方法

**1.3.1** 将直径 3 μm 的 MMS 及发射波长为 581、618 nm 的羧

\* 基金项目:国家重大传染病专项基金资助项目(2009ZX10601)。

△ 通讯作者,E-mail:puxiaoyong@yahoo.com。

基化硒化镉 QDs 以碳二亚胺共价交联法活化, 选择最适的活化剂浓度组合。以不同浓度的鼠抗 HBsAg-IgG、鼠抗 HCCAg-IgG 连接 MMS, 以不同浓度的兔抗 HBsAg-IgG、兔抗 HCCAg-IgG 连接 QDs, 以 Folin-酚法评价抗体连接效率<sup>[6]</sup>。

**1.3.2 体系结构** 试剂构成: R1 为鼠源 IgG 标记的 MMS 悬液(以 MMS 浓度 25 mg/mL 计); R2 为兔源 IgG 标记的 QDs, 16 000 g 离心 30 min 弃上清液后以 pH 为 7.4 的 PBS 补至初始体积。R1HBV 及 R1HCV 各 5 μL, R2HBV 与 R2HCV 各 100 μL, 加入过量的 HBsAg/HCCAg 标准品混合物(10 μg/mL, 各 50 μL), 37 °C 振荡孵育, 时间分别为 5、10、20、30、40、60 min, Trise-HCl 洗涤后磁分离; 以 pH 为 7.4 的 PBS 调整总体积为 100 μL, 取 20 μL 置于酶标板内以荧光显微镜检测并分析荧光强度值。

**1.3.3 QD-MMS 体系检测 HBsAg/HCCAg 混合物结果的判读** HBsAg 及 HCCAg 标准品等体积混合物(以阴性血清稀释至 100 ng/mL)20 份作为阳性对照。HBV DNA 及 HCV RNA 为阴性的血清各 40 份, 等体积混匀后分为 40 组。pH 为 7.4 的 PBS 共 20 份作为空白对照。

**1.3.4 检测范围的确定** 以 pH 为 7.4 的 PBS 作空白对照, 健康人血清作阴性对照, 将 HBsAg/HCCAg 标准品混合物作一系列稀释(20 μg、10 μg、1 μg、500 ng、100 ng、50 ng、10 ng、5 ng、2 ng、1 ng/mL), 取 100 μL 混合物作同步检测。以(阴性对照均值×2+空白对照均值)作为单指标检测临界(cut off)值判读结果。以更换红绿两色滤光片方法记录混合激发光。

**1.3.5 检测体系性能评价** 选取 10 ng/mL、100 ng/mL、1 μg/mL 3 个浓度抗原标准品作同步检测的批内、日间重复性实验。以脂血、溶血、黄疸标本作干扰实验。以 HAV、TP 抗体阳性标本作特异性实验。将制备好的试剂及反应后的复合物于 4 °C 保存一定时间后观察保存时间对检测效果的影响。

**1.3.6 同步检测临床标本的初步应用** 以 PCR 结果为参照, 以 QD-MMS 体系、酶联免疫吸附法(ELISA)分别检测, 结果作配对计数卡方检验, 以[(真阳性+真阴性)/标本总数]计算符合率, 以 Youden 指数[YI, 即 C 灵敏度+特异度-D]综合评价结果真实性。

**1.4 统计学处理** ELISA 与 QD-MMS 法检测结果以配对计数卡方检验评价差异性。

**2 结 果**

**2.1 检测混合物充分反应以所需时间较长的 HCV 组试剂完全结合目标抗原所需时间为准, 确定同步检测反应时间为 40 min。**

**2.2 因同步采样出现连接不同 QDs 及目标抗原的 MMS 复合物相互重叠, 使用软件中颜色采样工具造成读取值低于实际荧光强度值。因此同步检测体系结果的判读采用更换滤光片分别采取两种荧光后计算。以[阴性对照荧光值×2+空白对照(荧光本底)]作为各自 cut off 值, 以此为标准判读荧光数据。HBsAg cut off 值为 133, HCCAg cut off 值为 140。**

**2.3 对 HBsAg/HCCAg 标准品混合物, 阴性对照均值为 48/52, 空白组荧光本底均值为 37/36, 2 ng/mL 组荧光强度均值为 133/140, 5 ng/mL 组荧光强度均值为 158/160。以 cut off 值 133/140 确定本方法对 HBsAg/HCCAg 标准品混合物的检测灵敏度为 HBsAg 2 ng/mL, HCCAg 5 ng/mL。在 HBsAg 浓度大于 10 μg/mL、HCCAg 浓度大于 5 μg/mL 时荧光强度变化**

不明显, 认为试剂完全消耗, 检测范围分别为 2 ng/mL~10 μg/mL、5 ng/mL~5 μg/mL。由图 1、2 可见, 同步检测体系中荧光强度与抗原浓度呈正相关。

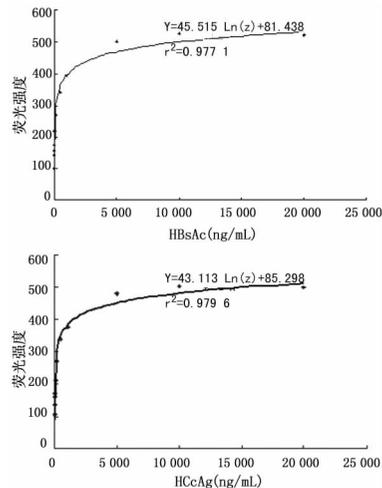


图 1 同步检测的 HBsAg 与 HCCAg 标准曲线

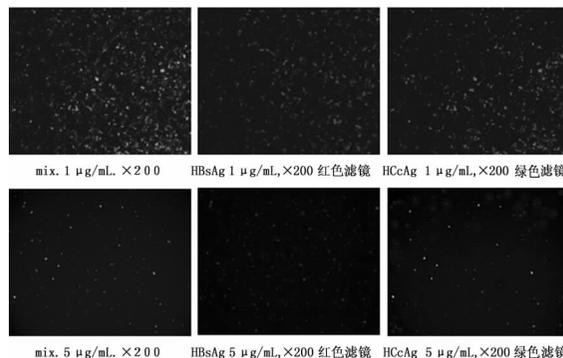


图 2 荧光显微镜观察结合抗原后的 QD-MMS 复合物

**2.4 临床标本的初步检测**

**2.4.1 188 份标本检出 HBsAg 阳性结果** PCR、ELISA 检测 HBsAg, 与 PCR 方法检测 HBV DNA 符合率 97.9%, 灵敏度 91.7%, 特异度 99.3%, YI 为 89.6%。QD-MMS 体系检测 HBsAg, 与 PCR 方法检测 HBV DNA 符合率 98.4%, 灵敏度 94.4%, 特异度 99.3%, YI 为 93.7%, 见表 1。

表 1 ELISA 与 QD-MMS 检测 HBsAg 结果比较(n)

QD-MMS	ELISA 法		合计
	+	-	
+	32	3	35
-	2	151	153
合计	34	154	188

ELISA 与 QD-MMS 法检测 HBsAg 结果以配对计数卡方检验,  $\chi^2 < 0.02, \nu = 1, P > 0.05$ , 两种方法差异无统计学意义, 两种方法符合率为 95.8%。

**2.4.2 188 份标本检出 HCCAg 阳性结果** PCR 方法 11 例, QD-MMS 体系阳性 11 例, ELISA 方法 8 例。ELISA 检测 HCCAg 结果与 PCR 方法检测 HCV RNA 符合率 98.4%, 灵敏度 72.7%, 特异度 100%, YI 为 72.7%。QD-MMS 体系检测 HCCAg, 与 PCR 方法检测 HCV RNA 符合率 97.9%, 灵敏

度 81.8%, 特异度 98.9%, YI 为 79.9%。

表 2 ELISA 与 QD-MMS 法检测 HCcAg 结果比较 (n)

QD-MMS 法	ELISA 法		合计
	+	-	
+	8	3	11
-	0	177	177
合计	8	180	188

ELISA 与 QD-MMS 法检测 HCcAg 结果以配对计数卡方检验,  $\chi^2=1.33, \nu=1, P>0.05$ , 两种方法差异无统计学意义。两种方法符合率为 98.4%。

2.4.3 混合标准品阳性对照 5 份及临床标本中以 PCR 确认混合感染 HBV 及 HCV 者两例, ELISA 分别检测与 QD-MMS 法同步检测体系均成功检出。

2.5 同步检测的批内重复性实验, 平均 CV 值为 10.0%、10.1%。同步检测日间重复性实验, 平均 CV 值为 10.7%、10.6%。干扰实验中, QD-MMS 体系检测溶血、脂血、黄疸及正常外观标本共 45 例, 未观察到明显影响, 无假阳性及假阴性。同步检测的特异性实验中, 两项目均有较好特异性, 与 HAV、TP 阳性标本未发生交叉反应。

2.6 将同一批制备的 R1、R2 试剂避光冷藏后配套使用, 4 周内效果较稳定; 反应后标本复合物避光冷藏 4 周后荧光强度无明显下降, 8 周内仍可测得较明显荧光。

### 3 讨论

本研究采用针对 HBsAg 与 HCcAg 两种抗原的异源抗体分别连接 QD-MMS, 以夹心法结合待测标本中的抗原。以 MMS 富集以提高灵敏度, 利用不同 QDs 在相同波长激发光下发射不同荧光的特性达到同步检测的目的<sup>[7-10]</sup>。预先完成用抗体对 QD-MMS 的标记后, 检测标本中目标抗原所需时间仅 40 min 左右, 解决了实际工作中采用 ELISA 方法检测两种抗原时检测时间差异较大, 较快检出者必须等待全部结果得出后方可发出报告的问题, 将全部操作所需时间缩短到了 1 h 以内, 方便了两项检测的结果同步报告, 提高了速度和效率。

对临床标本的检测结果, 本体系与 PCR 法检测 HBV DNA 及 HCV RNA 相比较, 检测 HBV 特异度为 98.8%, 灵敏度为 91.7%; 检测 HCV 特异度为 98.3%, 灵敏度为 81.8%。HCcAg 检测体系与 PCR 检测结果对比灵敏度较低, 但效果与 ELISA 试剂盒比较无显著性差异, 可能与阳性标本数量较少有关, 有待加大阳性标本量进行论证。

就本体系检测 HBsAg、HCcAg 而言, 两者相互之间以及与 HAV 抗体、TP 抗体阳性标本之间无交叉反应, 证明以本体系检测目标抗原是可行的。ELISA 方法因为需要读取吸光度, 易受溶血、黄疸、脂血等因素干扰, 而本体系直接检测荧光复合物的荧光强度, 不受其影响。

此外, 对 HBsAg 的检测灵敏度为 2 ng/mL, 对 HCcAg 检测灵敏度为 5 ng/mL, 低于 ELISA 标称的灵敏度, 而实际对临床标本的检测与 ELISA 检测结果无显著差异, 需增加标本检

测量以确定低浓度标本的判断灰区。提高检测系统对光信号的敏感度后还有望进一步提高本方法的检测灵敏度。同步检测体系检测的结果与 ELISA 方法比较有假阳性出现, 说明同步检测时需进一步消除背景干扰信号。避光冷藏原始试剂 4 周, 检测效果无明显下降, 使该检测体系的商品化成为可能。反应后的复合物避光冷藏 4 周后荧光强度无明显下降, 8 周后仍可测得较明显荧光, 适合保存、复查及长期动态监测。试剂保存期间, QDs-抗体保存效果较好, MMS-抗体保存效果相对稍差, 可能由保存环境的 pH 值非中性造成。

以本体系对 HBsAg 与 HCcAg 两种抗原进行同步检测, 可同步报告结果, 所需设备简单, 缩短了从感染到检出的时间, 灵敏度和特异度较高, 较 PCR 方法简单、廉价, 较 ELISA 方法 (主要指 HCV 检测) 提高了检测速度, 适用于大批量门诊及体检标本检测。由于采用了 QDs 作为荧光标记, 可利用其材质和粒径不同时发射波长亦不同的特性, 为多种抗原的同步检测提供了一种新的参考方法, 也为建立针对输血性传染病病原体的多抗原液相检测芯片奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, et al. Occult hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2007, 46: 160-170.
- [2] 季阳, 郑忠伟, 庄文. 保障我国输血安全的策略和措施 [J]. 中国输血杂志, 2007, 20(5): 359-361.
- [3] 邢文革, 石向东, 陈光增, 等. 国产丙型肝炎病毒抗体酶免检测试剂盒的质量评价 [J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(5): 314.
- [4] Lee SR, Peterson J, Niven P, et al. Efficacy of a hepatitis C virus core antigen enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of window-phase blood donations [J]. Vox Sanguinis, 2001, 80(1): 19-23.
- [5] 李蒙, 蒲晓允, 李玲, 等. 基于量子点技术快速检测 HCV 核心抗原的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 430-432.
- [6] 王爱军, 王凤山, 王友联, 等. 低浓度蛋白质含量测定方法的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(2): 78-80.
- [7] Casabianca A, Gori C, Orlandi C, et al. Fast and sensitive quantitative detection of HIV DNA in whole blood leucocytes by SYBR green I real-time PCR assay [J]. Mol Cell Probes, 2007, 21(5-6): 368-378.
- [8] Dabbousi BO, Rodriguez-Viejo J, Mikulec FV, et al. (CdSe) ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites [J]. J Phys Chem B, 1997, 101(46): 9463-9475.
- [9] Hild WA, Breunig M, Goepferich A. Quantum dots-nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 68(2): 153-168.
- [10] Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents [J]. Anal Chem, 2004, 76 (3): 684-688.

(收稿日期: 2011-05-20)