·论　著·

量子点标记技术同步检测抗弓形虫 IgG 和 IgM 抗体的实验研究*

李　玲[1]，刘琳琳[2]，白　晓[3]，罗慧琴[1]，李　蒙[2]，蒲晓允[2△]

（1. 中国人民解放军二六四医院检验科，太原 030001，2. 第三军医大学新桥医院检验科，重庆 400037，
3. 武警陕西省总队医院检验科，西安 710054）

摘　要：目的　建立抗弓形虫（TOX）IgG 和 IgM 抗体同步检测体系。**方法**　分别用不同发射波长的量子点标记羊抗人 IgG、羊抗人 IgM 作为检测抗体，以免疫磁珠作为固相载体，建立抗弓形虫 IgG 和 IgM 抗体同步检测体系，并对该检测体系进行了优化；同时检测 280 份临床血清标本，并与进口酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒进行方法学比较。**结果**　TOX 抗原的最适固化浓度为 50 μg/mL，固化效率在 35%～55%之间。抗 TOX IgG、IgM 抗体检测结果与进口 ELISA 试剂盒相比符合率分别为 96.4%，97.1%，本体系同时检测两种抗体的阳性检测率达 8.2%。**结论**　成功建立了抗 TOX IgG 和 IgM 抗体同步检测体系，该体系操作简便快速，灵敏度高，具有有良好的临床应用价值。

关键词：量子点；　抗弓形虫 IgG 抗体；　抗弓形虫 IgM 抗体；　同步检测

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.007　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2011)17-1929-03

Synchronous detection of anti-TOX IgG and IgM based on quantum dot technique*

Li Ling[1], *Liu Linlin*[2], *Bai Xiao*[3], *Luo Huiqin*[1], *Li Meng*[2], *Pu Xiaoyun*[2△]

(1. *Department of Laboratory Medicine, Chinese People's Liberation Army 264th Hospital, Taiyuan* 030001, *China*;
2. *Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing* 400037, *China*;
3. *Department of Laboratory Medicine, Shanxi People's Armed Police Forces Hospital, Xi'an* 710054, *China*)

Abstract: Objective　To construct the synchronous detection system of anti-Toxoplasma(TOX) IgG and IgM antibodies. **Methods**　Goat anti-human IgG and IgM antibodies, labeled with quantum dots of different emission wavelength, were used as detection antibody, and immunomagnetic beads were used as solid phase, to construct the synchronous detection system. 280 cases of clinical serum samples were detected by optimized system and the results were compared with imported enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit. **Results**　The optimal curing concentration was 50 μg/mL with curing efficiency of 35%－55%. The coincidence of anti-TOX IgM and IgG antibodies, detected by constructed system and ELISA kits, were 96.4% and 97.1% respectively. The positive rate of constructed system for the synchronous detection of the two antibodies was 8.2%. **Conclusion**　Synchronous detection system of anti-TOX IgG and IgM antibodies were successfully constructed and the detection system was fast and with high sensitivity and potential value in clinical application.

Key words: quantum dots;　anti-TOX IgG;　anti-TOX IgM;　simultaneous detection

弓形虫病是由弓形虫（toxoplasma，TOX）感染引起的一种严重危害人类健康和影响优生优育的人畜共患疾病，据统计全世界约有 25%～50%的人受到感染[1-2]。酶联免疫吸附测定（ELISA）是目前诊断 TOX 感染的常规方法[3]，主要通过检测特异性免疫水平指标（IgG）和近期感染指标（IgM）的有无来判断机体的感染情况，临床通过结合 TOX IgG、IgM 两种特异性抗体的检测结果来对 TOX 感染的病程及预后进行判断和鉴别诊断，但该方法存在不能同步检测 IgG 和 IgM 抗体、检测时间长、检测灵敏度不高等缺点。

量子点（quantum dots，QDs）又称导体纳米微晶体，是一种由Ⅱ～Ⅳ族和Ⅲ～Ⅴ族元素组成的纳米颗粒。作为一种新型荧光标记材料，与传统荧光染料相比，QDs 具有激发光谱宽、发射光谱窄以及不同粒径的 QDs 其发射波长不同的特性。应用不同发射波长的 QDs 对不同的待检分析物同时进行标记，可以达到多个指标同时检测的目的，有着广阔的应用前景[4-7]。本研究以 QDs 作为标记物和免疫磁珠技术相结合，研制一种可同步检测抗 TOX IgG 和 IgM 抗体的检测体系。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2009 年 10 月至 2011 年 3 月于本院就诊的孕妇血清标本 280 例。阳性血清标本由重庆市妇幼保健院提供。

1.2　仪器与试剂　CdSeQDs 购自美国 Ocean Nanotech 公司，弓形虫重组抗原 SAG1、SAG2（2 mg/mL）由深圳菲鹏生物有限公司提供，羧基磁珠（25 mg/mL）购自陕西西大北美生物有限公司，TOX IgG、IgM 抗体 ELISA 检测试剂盒购自意大利 Dia Sorin 公司，羊抗人 IgG、羊抗人 IgM、碳二亚胺（EDC）、N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）、牛血清清蛋白（BSA）均购自 Sigma 公司，荧光显微镜为日本 Olympus 产品，荧光分光光度仪为日本 Shimadzu 公司产品。

1.3　方　　法

1.3.1　QDs 与二抗的偶联反应　分别取两种不同发光波长的 QDs 各 20 μL，依次加入浓度为 4 mg/L 的 EDC、NHS 溶液各 100 μL 进行活化，37℃振荡反应 30 min 后，加入 1 μL 的氨基乙醇（1 mol/L，pH 8.0）振荡反应 10 min 后终止反应。分别

*　基金项目：重大传染病专项基金资助项目（2009ZX10601）。　△　通讯作者，E-mail：puxiaoyong@yahoo.com。

向两种已活化好的羧基 QDs 中加入一定浓度的羊抗人 IgG、羊抗人 IgM 溶液，37℃振荡反应 4 h。将反应溶液与高速离心机 14 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液后用去离子水重新溶解沉淀，重复操作 3 次，最后调整已标记好的产物溶液 pH 值至 7.4，4 ℃保存备用。

1.3.2　免疫磁珠的制备　将 TOX 重组抗原 SAG1、SAG2 进行等量混合后，用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS）稀释成不同浓度的抗原固化液，分别与已活化羧基磁珠进行包被，置 37 ℃振荡反应 2 h 后磁分离，加入洗涤缓冲液（0.1 mol Tris-HCL，0.05% Tween20，pH7.4）清洗 3 次，用封闭液（含 1% BSA，0.01NaN_3 的 PBS，pH7.4）4 ℃震荡过夜。对包被抗原浓度进行优化选择，同时计算抗原的固化效率，采用改良 Lowry 法蛋白定量法测定加入抗原溶液的蛋白总量，固化反应后，将洗脱液收集，再测定其中的蛋白含量，固化率＝（加入总蛋白量－洗脱蛋白量）/加入总蛋白量×100%。

1.3.3　检测方法的建立　吸取不同浓度抗原包被的免疫磁珠悬液各 10 μL，分别加入预先用样品稀释液稀释 100 倍的血清标本 100 μL，置 37 ℃振荡反应 30 min，洗涤 3 次后分别加入工作浓度的 QDs 标记羊抗人 IgG 和 IgM 抗体溶液各 100 μL，37 ℃振荡反应 30 min 后洗涤 3 次，磁分离。采用荧光显微镜检测结果，同时做阴、阳性和空白对照。

1.3.4　同步检测体系的临床应用及方法学比较　收集临床血清标本 280 例，分别用本方法和意大利 Diasorin TOX IgG、TOX IgM ELISA 试剂盒进行检测。以 FDA 认证的进口 ELISA 试剂盒为标准，判断两种方法检测抗 TOX IgG、IgM 抗体的符合率。分别计算本方法灵敏度、特异度、符合率。Youden 指数（Youden index，YI）是反映诊断真实性的综合指标，YI 的值在－1～1 之间，其值越大，说明诊断实验的真实性越好；其计算公式为：YI＝灵敏度＋特异度－1。

1.4　统计学处理　采用 SPSS 10.0 软件进行 χ^2 检验统计分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　抗原固化浓度确定　TOX 重组抗原的固化浓度对抗 TOX IgG、IgM 抗体的检测结果有着直接影响；随着抗原浓度增加，检测荧光强度也逐渐增加，当抗原浓度大于 50 μg/mL 时，荧光强度趋于稳定，甚至会逐渐降低（图 1）。因此，确定 TOX 重组抗原的最适固化浓度为 50 μg/mL。以浓度为 5、10、50、100、200 μg/mL 的 TOX 重组抗原分别固化磁性微球，固化效率为 35%～55%，其中，当浓度为 50 μg/mL 时，固化效率最高，可达 54.2%，见图 2。

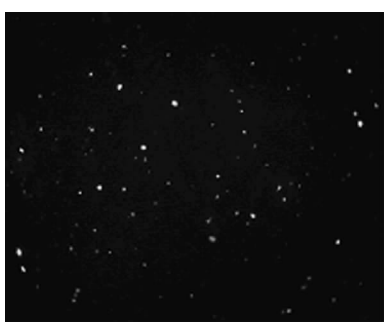

图 1　包被浓度为 50 μg/mL 时荧光检测

2.2　特异性实验结果　为进一步证实本同步检测体系的特异性，笔者设计了阻断实验，随机抽取 10 份阳性血清标本，分别加入包被抗原进行混合，37 ℃反应 1 h 后，用已建立的方法进行检测，结果显示阻断率大于 50%。另取 TORCH 系列的 CMV、HSV、RV 呈阳性的血清标本合计 20 份，按照已建立的方法进行检测，结果均为阴性，无交叉反应。以上结果均提示本方法检测抗 TOX IgG 和 IgM 抗体具有较好的特异性。

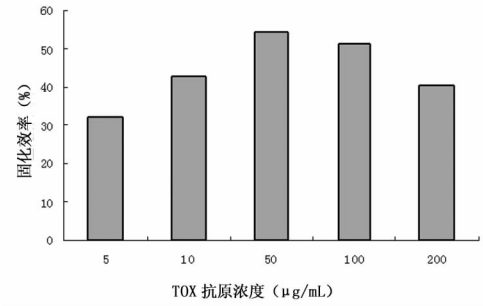

图 2　不同浓度 TOX 重组抗原的固化效率

2.3　灵敏度实验结果　将已知抗 TOX IgG、IgM 抗体阳性混合血清标本进行一系列稀释后，按所建立的检测方法进行检测，结果表明本方法在 1∶1 000 稀释时仍能检测到特异性荧光，而 ELISA 法检测到的最大稀释度为 1∶500。

表 2　QDs 标记检测技术与 ELISA 试剂盒检测 TOX IgG 的比较

QDs 标记检测技术（TOX IgG）	TOX IgG ELISA 检测		小计（n）	评价
	阳性（n）	阴性（n）		
阳性	22	8	30	灵敏度＝91.7%
阴性	2	248	250	特异度＝96.8%
合计	24	256	280	$P>0.05$

表 3　QDs 标记检测技术与 ELISA 试剂盒检测 TOX IgM 的比较

QDs 标记检测技术（TOX IgM）	TOX IgM ELISA 检测		小计（n）	评价
	阳性（n）	阴性（n）		
阳性	13	7	20	灵敏度＝92.9%
阴性	1	259	260	特异度＝97.3%
合计	14	266	280	$P>0.05$

表 4　血清中两种抗体检测结果

项目	标本例数（n）	阳性例数（n）	阳性率（%）
TOX IgG ELISA	280	22	7.8%
TOX IgM ELISA	280	13	4.6%
同步检测体系	280	23	8.2%

2.4　抗 TOX IgG、IgM 抗体相互干扰实验　经 Diasorin ELISA 试剂盒筛选出抗 TOX IgG、IgM 抗体强、中、弱阳性血清标本各 3 份，进行交叉组合后分别进行检测，观察同步检测抗 TOX IgG、IgM 抗体阳性血清标本时的相互影响。实验结果表明，抗 TOX IgG、IgM 抗体间的干扰较小，没有出现假阴性检测结果。

2.5　同步检测体系的临床应用及方法学比较结果　以进口

ELISA 试剂盒作为对照，同时检测临床孕妇血清标本 280 例。计算本方法的抗 TOX IgG 抗体诊断灵敏度、特异度分别为 91.7%、96.8%（$P<0.05$），二者符合率为 96.4%（见表 2），YI 为 0.885；抗 TOX IgM 抗体诊断灵敏度、特异度分别为 92.9%、97.3%（$P<0.05$），二者符合率为 97.1%（见表 3），YI 为 0.9，说明两种方法的测定结果无显著性差异。同步检测两种抗体的检测阳性率达 8.2%，较 ELISA 法单个检测其中一个抗体阳性率高（见表 4）。本方法同步检测抗 TOX IgG、IgM 抗体具有较好的诊断价值。

3　讨　论

ELISA 是当前诊断 TOX 抗体的主要检测方法。目前国内有关 TOX IgG、IgM 抗体的 ELISA 诊断试剂盒很多，但由于缺乏统一的质量控制标准，这两种试剂盒大多存在检测结果符合率低、灵敏度和特异度不高等问题[8]；进口试剂虽然检测效果好，但价格昂贵，且存在每次所检测的抗体种类有限的缺点，需对各抗体逐一检测，耗时较长，难以满足临床快速检测的需要。本实验采用间接法原理同步检测抗 TOX IgG、IgM 抗体，以免疫磁性微球作为固相载体，利用 QDs 多色性标记的优势，以不同发射波长的 QDs 标记羊抗人 IgG 和羊抗人 IgM，可以达到同时检测抗 TOX IgG、IgM 两种特异性抗体的目的。

同步检测抗 TOX IgG、IgM 抗体，可能会存在两种抗体同时识别同一抗原表位现象，但不同抗原表位同时被 IgG、IgM 抗体识别程度不同。本实验采用主要被抗 TOX IgG 抗体识别的 SAG1 重组抗原，和主要被抗 TOX IgM 抗体识别的 SAG2 重组抗原作为固化抗原[9-10]。将不同浓度的抗 TOX IgG、IgM 抗体阳性标本交叉组合后，按同步检测方法进行检测，观察同步检测抗 TOX IgG、IgM 抗体时有无相互干扰，结果表明抗 TOX IgG、IgM 抗体阳性标本间的相互干扰较小，没有出现假阴性检测结果，可以满足同步检测的需要。而当标本中同时存在较高浓度的 IgG、IgM 抗体时，前者可能竞争结合固相抗原而使一部分 IgM 抗体不能结合到固相上，会导致 IgM 检测结果的假阴性。本实验采用免疫磁性微球作为固相载体，由于磁性微球具有较大的比表面积[11-12]，可以包被大量的抗原，在均匀分散到整个反应溶液中后，又可以使抗原抗体间的反应更彻底，即使在遇到较高抗体浓度的标本时，磁性微球表面的固相抗原也可以满足 IgG、IgM 的检测需要，IgG、IgM 抗体竞争结合抗原位点的现象较少，很大程度上减少了假阴性检测结果的出现。

以进口 ELISA 试剂盒作为对照，同时检测孕妇血清标本 280 例，研究结果表明，抗 TOX IgG、IgM 抗体的检测符合率分别为 96.4%、97.1%，说明两种方法的测定结果符合程度较高。同时笔者发现有的血清标本中只能检出一种抗体，而有的可以同步检测出两种抗体，同时检测两种抗体的可以使检测阳性率达 8.2%，较 ELISA 法每次检测其中一类抗体的阳性率高，再一次证明本方法同步检测抗 TOX IgG、IgM 抗体具有较好的诊断价值。

本研究成功构建了抗 TOX IgG、IgM 抗体同步检测体系，研究结果表明，与 ELISA 法相比，本方法不仅操作更简便、检测更快速，具有较好的灵敏度和特异度，同时检测两种抗体也明显提高了 TOX 感染的阳性检测率，为临床提供了一种新型的双抗体同步检测技术。

参考文献

[1] 谢霖崇. 人体弓形虫病的临床诊断[J]. 中国人兽共患病杂志，1997：13(6)：60.

[2] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，2005，23(5)：332-340.

[3] 王艳华，张德林，李学瑞. 弓形虫病免疫学杂志诊断方法研究进展[J]. 动物医学进展，2007，28(6)：53-57.

[4] Corr SA，Rakovich YP，Gun ko YK，et al. Multifunctional magnetic-fluores centnanocomposites for biomedical applications[J]. Nanoscale Res Lett，2008，3(3)：87-104.

[5] Diltemiz SE，Say R，Buyuktiryaki S，et al. Quantum dot nanocrystals having guanosine imprinted nanoshell for DNA recognition[J]. Talanta，2008，5(75)：890-896.

[6] Mulder WJ，Koole R，Brandwijk RJ，et al. Quantum dots with a paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe[J]. Nano Lett，2006，6(1)：1-6.

[7] Smith AM，Dave S，Nie S，et al. Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn，2006，6(2)：231-244.

[8] 于恩庶. 对国内几种弓形虫 IsG 抗体检测试剂盒的再评估[J]. 中国人兽共患病杂志，2001，17(4)：104-108.

[9] 蒋守富，张述义，曹琳，等. 弓形虫感染者血清 IgM 和 IgG 抗体免疫印迹谱分析[J]. 中国人兽共患病杂志，2004，20(11)：973-976.

[10] 苑文英，刘辉，刘秀华，等. 弓形虫表面抗原和致密颗粒蛋白的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报，2007，23(3)：289-291.

[11] Morozoy VN，Morozova TY. Active bead-linked immunoassay on protein microarrays[J]. Analytica Chimica Acta，2006(564)：40-52.

[12] Tully E，Hearty S，Leonard P，et al. The development of rapid fluorescence-based immunoassays，using quantum dot-labelled antibodies for the detection of Listeria monocytogenes cell surface proteins[J]. Int J Biol Macromol，2006，39(1-3)：127-134.

（收稿日期：2011-05-25）

（上接第 1928 页）

生物传感器[J]. 微纳电子技术，2010，47(12)：753-756.

[7] 孙慧斌，钟德钰，王颜刚，等. 糖尿病患者胰岛素治疗前后唾液葡萄糖含量分析[J]. 实用口腔医学杂志，2006，22(6)：866-868.

[8] 王福俊，王培楠. 血糖检测中的影响因素分析与对策[J]. 检验医学与临床，2009，6(18)：1560-1561.

[9] 刘波，张晓艳，缪京莉，等. 2 型糖尿病患者脂代谢紊乱与大血管病变的关系[J]. 现代中西医结合杂志，2011，20(1)：5-6.

（收稿日期：2011-05-25）