

• 检验技术与方法 •

量子点荧光免疫渗滤法定量检测血清 C 反应蛋白的研究

吴卫华¹, 陈佳², 张鹏飞^{2△}, 冉贵萍¹

(1. 上海奉贤区奉城医院检验科, 上海 201411; 2. 上海长征医院转化医学中心, 上海 200433)

摘要: 目的 对基于量子点荧光的免疫渗滤快速定量检测血清 C 反应蛋白(CRP)方法进行初步探索, 旨在建立一种较好的快速定量检测方法。方法 采用双抗夹心法原理在免疫渗滤板上建立自制量子点和量子点-抗体复合物快速免疫检测法, 其结果在紫外光照射下进行荧光定性检测。采用激光器和荧光光谱仪相结合的方法, 可对荧光检测结果进行定量分析。结果 定性检测到 CRP 的最低浓度为 0.156 mg/L; 定量检测 CRP 浓度范围在 0.1~100.0 mg/L 的样本, 其检测荧光值与浓度有线性对应关系, 线性拟合方程为: $\log(Y) = 0.563 \log(X) + 4.570, r^2 = 0.958$ 。结论 荧光免疫渗滤快速定量法可对血清 CRP 进行定量检测; 量子点免疫标记技术平台具有开发新型免疫诊断试剂的潜力。

关键词: 量子点; 荧光; 免疫渗滤; C 反应蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.042

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)11-1471-03

Study on fluorescent quantum dot immunofiltration assay for quantitative detection of C-reactive protein

Wu Weihua¹, Chen Jia², Zhang Pengfei^{2△}, Ran Guiping¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Fengcheng Hospital, Shanghai 201411, China;

2. Translational Medicine Centre, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To study the feasibility of using fluorescent immunofiltration test based on quantum dots (QDs) for rapid and quantitative detection of C-reactive protein. **Methods** Based on homemade QDs and QDs-antibody bioconjugates, an immune detection method was established via the double antibodies sandwich technique on the immunochromatography card. The test results could be read under the irradiation of UV light, and quantitative results could be measured through the combination of a laser and fluorescent spectroscopy. **Results** Under UV light irradiation, the minimum detection concentration of CRP was 0.156 mg/L. Using the quantitative detection method, the fluorescent intensities on the cards could be established a linear relationship with the concentration of CRP, and the linear equation was that $\log(Y) = 0.563 \log(X) + 4.570, r^2 = 0.958$. **Conclusion** The fluorescent quantum dot immunofiltration assay can be used for quantitative detection of CRP; The quantum dots immuno-labels have the potential to develop new type of immune-diagnostic reagents.

Key words: quantum dots; fluorescence; immunofiltration; C-reactive protein

量子点又称半导体纳米晶, 是一种新型荧光纳米材料, 具有优于传统有机荧光染料的光谱特性和光化学稳定性^[1-2]。近年来, 在生物标记应用领域得到广泛应用。传统的免疫荧光诊断试剂中, 常见的标记材料有机荧光染料、稀土元素、荧光乳胶等^[3], 与这些荧光材料相比较, 量子点具有荧光发射峰狭窄对称、激发光范围宽、荧光稳定性能优良等特点, 因而是一种理想的免疫诊断试剂标记材料。尤其是在快速免疫诊断试剂的方面, 近年有较多的报道, 如 Li 等^[4]使用量子点为标记材料制备的免疫层析试纸可用于定量检测血清中的铜蓝蛋白, Yang 等^[5]用量子点免疫层析试纸, 结合免疫荧光分析系统定量检测了血清中的甲胎蛋白。

C 反应蛋白(CRP)是临床诊断炎症疾病的一个常用指标^[6], 快速、准确地检测血清中 CRP 的含量具有重要的临床意义。本文初步建立了一种基于 CdSe/ZnSe/ZnS 量子点免疫探针的快速定量检测血清中 CRP 的方法, 仅需 5 μL 血清, 在 5 min 内实现对血清中 CRP 的快速定量检测。

1 材料与方法

1.1 材料 CRP 6405 单克隆抗体和包被了 CRP 单克隆抗体的免疫渗滤反应板由奥普生物科技有限公司提供。N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 水溶性 CdSe/ZnSe/ZnS 核壳量子点的制备和表面改性方法 参见文献[7-8]。

1.2.2 量子点与 CRP 6405 抗体的标记反应 在 500 μL PBS 缓冲液(pH 6.0, 10 mmol/L)中, 加入量子点 200 μL(浓度约 5 μmol/L)混合均匀; 然后分别加入偶联剂 75 μL sulfo-NHS(10 mmol/L)和 EDC(10 mmol/L), 室温下避光孵育 0.5 h; 200 μL(浓度约 2 mg/mL)CRP 抗体用 PBS 缓冲液(pH 7.4, 10 mmol/L)透析过夜后, 加入上述量子点反应体系, 室温下避光孵育 1 h; 加入 BSA 封闭, 条件 BSA 的终浓度约为 10 mg/mL, 室温下避光封闭 1 h; 将得到的量子点-抗体偶联复合物, 22 000 r/min 离心分离 1 h, 弃去上清后用 PBST 洗涤液, 离心洗涤 3 次, 最后分散在 200 μL 的 BSA 1% PBS 保存液中, 待用。

1.2.3 斑点免疫渗滤反应 步骤 1.2.2 制备的量子点-抗体复合物用 1% BSA 溶液稀释至适当浓度, 取 200 μL 复合物加入 5 μL 待测样本, 混合均匀后取 120 μL 加入反应板孔内, 待液体完全渗入后, 加入 4 滴洗涤液(10 mmol/L PBS, 0.05% 吐温-20)。

1.2.4 结果读取 定性检测, 反应板在紫外灯(365 nm)照射暗箱中观察, 同时数码相机拍照。定量检测, 将反应板置于

LIFS 405 荧光光谱仪(海洋光学,美国)探头下,反应板上的量子点在 405 nm 激光照射下,光谱仪可检测反应板上荧光斑点的荧光光谱和强度。

2 结 果

2.1 量子点的荧光光谱和吸收光谱 图 1 为使用表面带羧基的 CdSe/ZnSe/ZnS 量子点水溶液的紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱(405 nm 激发),第一激发光吸收峰 574 nm,则理论上小于 574 nm 的光源都能激发该量子点发射荧光。选择 405 nm 激光激发量子点发射荧光,可见荧光发射峰狭窄对称(半高宽约 35 nm),荧光发射峰 618 nm。

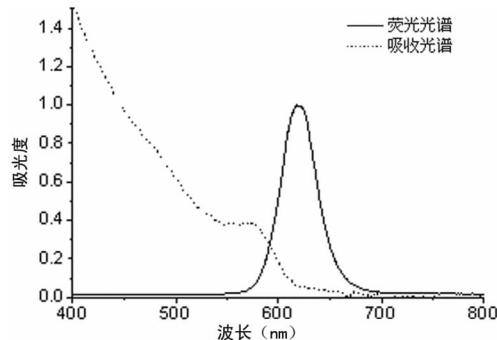
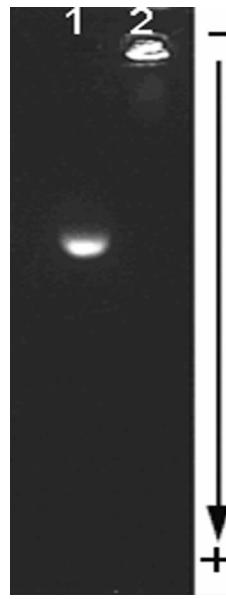


图 1 CdSe/ZnSe/ZnS 量子点的荧光光谱和吸收光谱图

2.2 量子点-抗体耦联的验证 在 EDC 和 sulfo-NHS 的活化作用下,将量子点表面的羧基和与抗体分子中的氨基共价耦联。如图 2 所示,琼脂糖凝胶电泳图上可见,量子点由于粒径较小,表面带负电荷,可以在琼脂糖凝胶内迁移;而耦联抗体后的复合物由于粒径增大,故而阻滞在上样孔内,表明抗体和量子点已经共价耦联在一起。



1:量子点;2:量子点-抗体复合物。

图 2 量子点和量子点-抗体复合物的琼脂糖凝胶电泳图

2.3 CRP 的定性检测 图 3 所示为使用自制的量子点-抗体复合物为标记物,在免疫渗滤板上梯度定量检测 CRP 的结果,可见随着样品中 CRP 浓度的逐渐降低,反应板中心的抗体印记处的量子点荧光强度也逐渐减弱,最低可以检测到样品中 CRP 的浓度为 0.156 mg/L。

2.4 CRP 的定量检测 为了进一步研究开发定量快速免疫诊断试剂,本研究使用 405 nm 的激光和荧光光谱仪相结合,来

检测反应板上荧光印记斑点的荧光强度和光谱。图 4 所示为检测不同浓度 CRP 样本后渗滤板上荧光斑点的荧光光谱图。可见随着样本中 CRP 浓度的增加,荧光斑点的荧光强度逐渐增加,最低可以检测到 0.1 mg/L 的样本。对荧光光谱积分后计算荧光强度值,如图 5 所示,为不同 CRP 浓度的样本与斑点荧光强度的关系图,经线性拟合后可得到关系方程为: $\log(Y) = 0.563\log(X) + 4.570, r^2 = 0.958$, 其中 Y 代表荧光强度, X 代表 CRP 浓度, 斑点上荧光强度与样本中 CRP 浓度有较好的线性对应关系,为开发基于量子点的荧光免疫渗滤诊断试剂提供了研究基础。

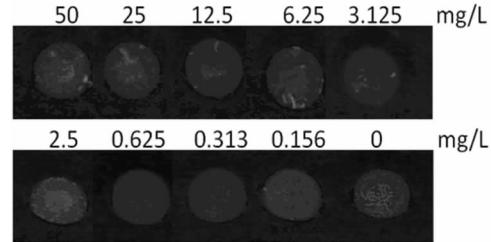


图 3 量子点荧光免疫渗滤法检测不同浓度 CRP 样本的荧光斑点图

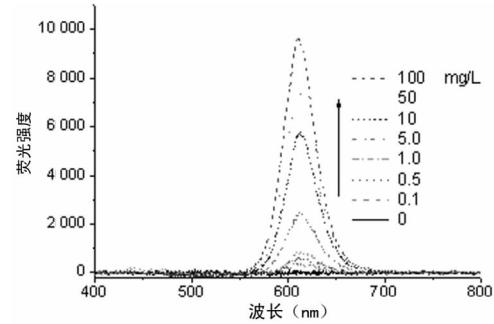


图 4 量子点荧光免疫渗滤板检测不同浓度 CRP 样本的荧光光谱图

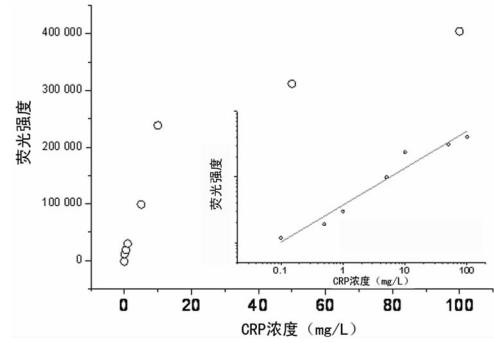


图 5 量子点荧光免疫渗滤板检测 CRP 样本的浓度与荧光强度的关系图(插图为线性拟合图)

3 讨 论

即时检验技术(POCT)具有操作简便,结果迅速可靠等特点,为临床急重症患者的即时诊断及治疗提供了有利条件^[9]。免疫层析技术是 POCT 中应用最广泛的方法之一,传统胶体金作为标记材料建立的免疫层析技术,虽具有结果裸眼可读性,但多用于定性或半定量检测,定量检测具有一定困难^[10]。近年来,基于胶体金的定量免疫层析技术也有一定发展,但由于胶体金的定量是依据图像灰度分析进行,因而定量检测结果精密度还有待提高^[10]。荧光免疫层析技术由于具有检测灵敏度高、结果易于定量等特点,受到较大的关注,荧光乳胶作为标

记材料目前已有部分上市产品。量子点作为一种新型荧光纳米材料,具有传统有机荧光染料不具备的荧光特性,在荧光免疫检测领域也受到一定的关注,但还多处于研究开发阶段。

本文在已有的量子点制备和偶联的研究基础上^[7-8],使用量子点-抗体复合物进行荧光免疫渗滤层析的方法检测样本中的 CRP 浓度。研究结果表明量子点荧光可以在一定范围内对 CRP 进行检测,在紫外灯照射下肉眼可见反应板上免疫斑点,具有定性检测意义;进一步采用激光照射和荧光光谱仪联合的方法,可实现对反应板上量子点荧光强度的记录,并可建立荧光强度与样本中 CRP 浓度间的对应关系。但对于建立 CRP 定量免疫检测仍有较多工作要做,如灵敏度、特异性、精密度、重复性和试剂的稳定性等研究。

对于定量免疫检测结果的精密度和灵敏度,除了免疫层析板本身的质量控制外,量子点-抗体复合物的制备是关键因素。为了进一步提高免疫荧光标记物的特性,仍需进一步优化量子点与抗体的偶联步骤,如采用定向偶联技术、柔性偶联基团和不同封闭剂的影响等。另外,量子点具有荧光发射波长可控和激发波长范围宽的特点,适于进行多元标记,进而建立多项同测技术平台,这些是传统的胶体金和有机荧光染料难于实现的技术。总之,随着研究的深入,量子点标记技术可以为免疫诊断提供一种新的技术平台,形成有竞争力的新型免疫诊断产品。

参考文献

- [1] Chan WCW, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. Science, 1998, 281(5385): 2016-2018.
 [2] Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, et al. Quantum dot biocon-

(上接第 1470 页)

低,而在炎症患者血清中,CRP 浓度会有所增高,其增高程度与炎症程度呈正相关^[10]。CRP 可以作为诊断炎症的标志物^[11],血清 CRP 浓度的增减可以灵敏地反映炎症程度^[12]。因此,检测 CRP 可以有助于感染性疾病的诊断和抗感染疗效监测。

CRP 检测方法不同,其检测结果也具有差异。分析其原因可能在于各种检测方法原理不同所致。速率散射法是利用抗原抗体反应中形成的复合物,导致溶液中悬浮颗粒散射光增强比率不同而进行测定的^[8]。免疫层析法是根据样本与含有标记物的鼠抗人高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)的单克隆抗体反应,利用光学检测原理,通过光电管检测到发色芯片的散射光后,将信息输入磁卡,换算后得到 hs-CRP 浓度。免疫比浊法是根据样本中 CRP 与试剂中相应抗体在溶液中结合,立即形成抗原-抗体复合物,并形成一定浊度,在一定量抗体存在时与抗原浓度呈正比,通过与同样处理的校准液比较,计算得知样本中 CRP 的浓度。

本研究发现,3 种 CRP 检测方法中,免疫比浊法检测的 CRP 异常率最高,检测最为灵敏,与免疫层析法检测结果的相关性较高,证明这两种检测方法具有相似的检测效率。因此,临床可以选择较为合适的检测方法,更加准确、快速、灵敏地检测样本。

参考文献

- [1] 叶妙琴. 两种定标方法检测 C-反应蛋白结果的对比和评价[J]. 江西医学检验, 2006, 24(3): 221-222.

jugates for imaging, labelling and sensing[J]. Nat Mater, 2005, 4(6): 435-446.

- [3] Ngom B, Guo Y, Wang X, et al. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(3): 1113-1135.
 [4] Li Z, Wang Y, Wang J, et al. Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip[J]. Anal Chem, 2010, 82(16): 7008-7014.
 [5] Yang Q, Gong X, Song T, et al. Quantum dot-based immuno-chromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 30(1): 145-150.
 [6] 陈琦, 杨晶, 吕绳凯. C 反应蛋白金标定量试验的临床应用研究[J]. 检验医学, 2009, 24(1): 40-43.
 [7] Zhang P, Han H. Compact PEGylated polymer-caged quantum dots with improved stability[J]. Colloid Surface A, 2012, 402(1): 72-79.
 [8] 张鹏飞, 宋杰, 陈佳, 等. 量子点与抗乙肝表面抗原(HBsAg)抗体的偶联研究[J]. 分析化学, 2013, 41(6): 846-850.
 [9] Soper S A, Brown K, Ellington A, et al. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics[J]. Biosens Bioelectron, 2006, 21(10): 1932-1942.
 [10] Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393(2): 569-582.

(收稿日期:2014-01-18)

- [2] 黄小兵, 覃志坚. 血清 CRP 作为感染性标志的临床应用研究[J]. 右江民族医学院学报, 2002, 24(2): 271-272.
 [3] 罗南芬. 冠心病心功能不全与 C 反应蛋白的关系[J]. 医学信息: 上旬刊, 2011, 24(19): 6475.
 [4] 黄萍, 高敏 C 反应蛋白与急性心肌梗死的相关研究[J]. 中国当代医药, 2010, 17(23): 21-22.
 [5] 简序, 王金和, 程佩兰. C 反应蛋白的临床研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2004, 25(5): 471-473.
 [6] 康格非. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 15.
 [7] 王萍, 秦明群, 许连静, 等. 2 型糖尿病合并牙周病患者血清 C 反应蛋白及细胞间黏附分子的水平变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(37): 42-43.
 [8] 史俊敏, 吴晓勇. C 反应蛋白在慢性阻塞性肺疾病患者中的应用[J]. 检验医学与临床, 2005, 2(4): 176.
 [9] 周忠敬. C 反应蛋白检测方法的比较[J]. 中医临床研究, 2009, 1(3): 101-102.
 [10] 杨连喜, 侯卫科, 孙云霞. CRP 和 WBC 联合检测在儿童急性感染性疾病诊断中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(20): 2533-2534.
 [11] 白书玲, 李建军. C 反应蛋白与动脉粥样硬化[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(8): 765-768.
 [12] 王亚娟, 胡翼云, 杨永弘. C 反应蛋白在儿科临床的应用[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(3): 185-187.

(收稿日期:2014-01-08)