

• 基础实验研究论著 •

检测肿瘤标志物 CA125 纳米金探针的制备及应用*

邹瑟音, 夏 勇

(广州医科大学附属第三医院检验科, 广东广州 510150)

摘 要:目的 该研究应用自行设计合成的纳米金探针通过比色法定量检测 CA125, 并初步探讨其临床应用的可行性。方法 将待检测的 CA125 捕获抗体连接到纳米金粒子表面制备纳米金探针, 经过抗原抗体免疫反应形成纳米金聚集体, 通过比色法定量检测 CA125。结果 成功制备纳米金探针, 可快速、简便检测患者血清中 CA125 的浓度, 结果与病理确诊相一致, 最低检测限为 0.5 U/mL, 远低于传统的酶联免疫吸附试验。结论 该纳米金探针制备简单、快速、容易操作、成本低廉, 在临床尤其是基层医院早期检测卵巢癌标志物 CA125 具有重要的应用价值。

关键词: 纳米金探针; 卵巢肿瘤; 肿瘤标记, 生物学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)15-1976-03

Preparation and application of gold nanoparticle probes for detecting tumor marker CA125*

Zou Seyin, Xia Yong

(Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510150, China)

Abstract: **Objective** To quantitatively detect CA125 with self-designed synthetic gold nanoparticle probes by the colorimetric immunoassay and to initially investigate the feasibility of clinical application. **Methods** The capture antibody of detective CA125 was conjugated to the gold nanoparticle surface for preparing the gold nanoparticle probes. The gold nanoparticle aggregation was formed by the antigen-antibody immunoreaction, CA125 was quantitatively detected by the colorimetric immunoassay. **Results** The gold nanoparticle probes was successfully prepared, which could detect the serum CA125 content rapidly and conveniently, the detection results were coincident with the pathological diagnosis. The lowest limit of quantitation was 0.5 U/mL, which was far lower than that in ELISA. **Conclusion** This gold nanoparticle probes are simple to be prepared, rapid and easy to operate with low cost, and have the important application value in clinical early detection of ovarian cancer marker CA125, especially in the primary hospitals.

Key words: gold nanoparticle probes; ovarian neoplasms; tumor markers, biological

在美国, 卵巢癌是妇科中的第 5 大盛行肿瘤, 患者的患病风险为 1.4%~1.8%, 在我国发病率也逐年升高, 致命的是卵巢癌患者早期没有任何指征以致直到晚期才能做出诊断, 尽管发病率仅为乳腺癌的 1/10, 其致命性却是乳腺癌 3 倍^[1]。糖类抗原 CA125 已被广泛研究来评估卵巢癌的患病风险, 但目前主要应用于临床的 CA125 检测方法仍存在许多不足。纳米金(Au-NanoParticles, Au-NPs)由于独特的光学特性而被发展为一种新型标记方法, 大量基于纳米金的免疫比色分析法被应用于肿瘤标志物、致癌基因、甚至肿瘤细胞的检测^[2-4]。本研究应用自行设计合成的纳米金粒子通过物理吸附作用, 将特异性的抗-CA125 单克隆抗体连接到纳米金粒子表面, 应用比色法定量检测 CA125, 初步探讨其进行卵巢癌早期检测的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血清标本选自广州医科大学附属第三医院盆腔肿块性质待查患者。

1.2 仪器与试剂 恒温磁力搅拌器(RHbasicKTPC, 德国 IKA 公司), 台式低温高速离心机(J2-MC, 美国 Beckman 公司), 离心机(5804R, Eppendorf); 紫外-可见分光光度计(DU800, 美国 Beckman 公司), 动态光散射粒径仪(美国布鲁克海文/90PLus), 摇床(STS-3 型, 上海琪特分析仪器有限公司); 硝酸纤维素薄膜过滤器(0.22 μm, 美国 Corning Incorporated 公司)。小牛血清蛋白(BSA)、K₂CO₃、NaCl、柠檬酸三钠、四氯金酸(HAuCl₄)均购自 Sigma-Aldrich 公司。抗原 CA125

标准品及捕获抗体兔 IgG 购自 CST 公司。配制纳米金探针重悬液[0.05 mmol/L Tris, pH 7.8, 1.25% 蔗糖, 0.2% BSA, 0.05% PEG, 0.05% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 0.15% Tween20]的试剂 Tris、聚乙二醇 8000(PEG)、PVP、Tween20、蔗糖均购自上海凌峰化学试剂有限公司。所用试剂为分析纯, 配制试剂用水为二次蒸馏水, 试剂配制后高压灭菌并于 4℃ 保存。

1.3 方法

1.3.1 纳米金粒子的制备 高质量的纳米金是制备高质量金标探针的前提, 本实验按照 Frens 方法^[5], 采用柠檬酸三钠还原法制备粒径为(17±2.5)nm 纳米金粒子。制备前均将所有的玻璃器皿和磁力搅拌器的搅拌珠用王水浸泡, 然后用去离子水冲洗, 最后于 120℃ 下烘干, 将配制好的 HAuCl₄ 浓度 100 mL 加热至 130℃, 同时持续搅拌, 沸腾 5 min 后迅速加入配制好的柠檬酸三钠溶液, 当溶液颜色由浅黄迅速变为深红色时, 再持续加热搅拌 15 min, 搅拌下自然冷却至室温, 以 0.22 μm 硝酸纤维素过滤器过滤溶液, 即可得到颗粒均匀的纳米金溶液, 于 4℃ 避光保存备用, 用紫外可见分光光度计扫描纳米金溶液的吸收峰, 用动态光散射仪测定其粒径分布。

1.3.2 纳米金探针的制备 制备纳米金探针, 首先应先确定抗体牢固结合纳米金溶液的最适 pH 和最小抗体用量。本研究通过梯度实验确定了反应最适 pH 值和抗体 CA125(1 mg/1 mL)的最小用量。用 1% HCl 和 0.2 mol/L K₂CO₃ 调节纳米金溶液(1 mL)pH 值分别为 3.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.5、

* 基金项目: 广州医科大学青年基金项目(2011A14)。 作者简介: 邹瑟音, 女, 主管技师, 主要从事肿瘤标志物的早期检测及肿瘤的防治研究。

13.0, 观察每管溶液的颜色变化, 选定颜色仍保持红色的 pH 范围, 后加入 2.0 μL CA125 抗体, 混匀, 静置 15 min, 各管中加入 1/10 体积的 12% NaCl 溶液, 室温静置 30 min。观察每管的颜色变化, 颜色仍保持红色者即为最适反应 pH。将纳米金溶液(最适 pH)和抗体按照不同的比例混匀, 室温静置 15 min, 后加入 1/10 体积的 12% NaCl 溶液, 室温静置 30 min。观察每管的颜色变化, 颜色仍保持红色者即为最小抗体用量。取 10 mL 最适 pH 纳米金溶液加入相应最小用量 CA125 抗体, 混匀, 摇床室温轻摇 1 h, 加入 1/20 体积的 10% PEG8000, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置过夜。加入纳米金重悬液在 4 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 30 min, 重复 3 次, 最后加入 1.5 mL 纳米金探针重悬液, 并加入 1.5 μL 的 12% NaCl 溶液混匀, 储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用, 用紫外可见分光光度计扫描纳米金溶液的吸收峰, 用动态光散射仪测定其粒径分布。

1.3.3 纳米金探针应用于 CA125 蛋白检测 将制备好的纳米金探针和待测的 CA125 蛋白样品按一定比例混合后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 后用紫外可见分光光度计进行比色分析。

2 结 果

2.1 纳米金粒子的制备 纳米金溶液呈红色, 浓度越高颜色越深至酒红色, 在高浓度盐溶液下由于不稳定会发生纳米金粒子聚沉, 颜色由酒红变为灰蓝, 但抗体通过物理吸附作用连接到纳米金粒子表面可以使纳米金粒子在高浓度盐溶液中保持稳定; 此外, 纳米金粒子的稳定性还与浓度有关, 溶液浓度越高越不稳定, 加入很少量的抗体都会引起聚集, 本研究分别制备了不同浓度的纳米金溶液, 各取 500 μL 分别加入相应量的抗体和 12% NaCl 后肉眼观察溶液颜色的变化, 为了排除因为抗体用量不够而引起纳米金在高盐浓度中聚集的原因, 将最小浓度的 1 号管设为两管 1-1 和 1-2, 其中 1-2 与其他浓度一样加入 0.5 μL 抗体, 而 1-1 加入 2 μL 抗体, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。3、4、5 管加入抗体后溶液颜色由红色变为蓝色, 2 管颜色变深, 1-1、1-2 仍保持红色, 而加入 NaCl 后, 3、4、5 管能看见明显的聚集颗粒附在管壁上, 2 管变为紫色, 1-2 管红色中带着点紫色, 1-1 管仍保持红色。最后选定最小浓度(0.01% HAuCl_4)纳米金溶液用于制备纳米金探针。波长扫描显示其在 522 nm 有最大吸收峰(图 2), 动态光散射仪测定其粒径分布为(17 $\pm$ 2.5)nm(图 3)。

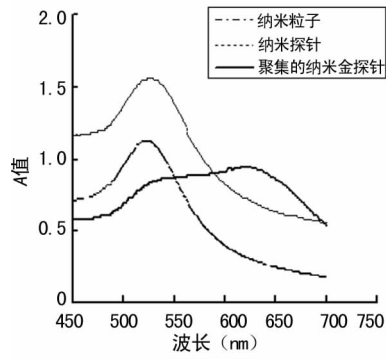


图 2 紫外吸收扫描光谱图

2.2 最适 pH 和最小抗体用量的确定 测定纳米金最小抗体用量, 需在最佳 pH 值下进行。用 1% HCl 和 0.2 mol/L K_2CO_3 调节纳米金溶液(1 mL) pH 值分别为 3.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.5、13.0, 肉眼观察发现纳米金溶液在 pH 值 6.0~9.0 时仍保持红色, 而在极酸和极碱环境中都不稳定, 出现聚集而由红色变为浅蓝色见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 而 pH 6.0~9.0 的纳米金溶液在加入相

应量的抗体和 12% NaCl 后, pH 7.0~8.0 的纳米金溶液仍保持红色, 而其余的溶液颜色偏紫色, 说明纳米金出现了聚集, 因此 pH 7.0~8.0 为纳米金探针制备的最适 pH。将抗体连接到纳米金粒子表面可以使纳米金粒子在高盐溶液中保持稳定, 最小抗体用量, 即使纳米金探针在高盐溶液中稳定并保持抗体活性的用量。先用 0.2 mol/L K_2CO_3 将纳米金溶液 pH 值调至 7.0~8.0, 将纳米金溶液和抗体按照不同的体积比(V/V, $\mu\text{L}/\mu\text{L}$), 混匀(20/1、50/1、100/1、200/1、500/1、1 000/1、2 000/1), 室温静置 15 min, 后加入 1/10 体积的 12% NaCl 溶液, 室温静置 30 min。观察到体积比为 500/1 时纳米金溶液颜色仍持红色, 1 mL/1 μL 时纳米金溶液颜色稍微变灰, 而体积比为 2 mL/1 μL 时纳米金溶液颜色明显变灰, 故确定 500/1 为纳米金溶液和抗体制备纳米金探针的最小体积比。纳米金探针溶液波长扫描显示在 525 nm 有最大的吸收峰, 发生 3 nm 的漂移(图 2); 动态光散射仪测定其粒径分布为(28.0 $\pm$ 2.5)nm(图 3), 说明抗体标记到纳米金粒子表面使其粒径增大, 最大吸收波长呈现红移, 与文献[6]报道一致。

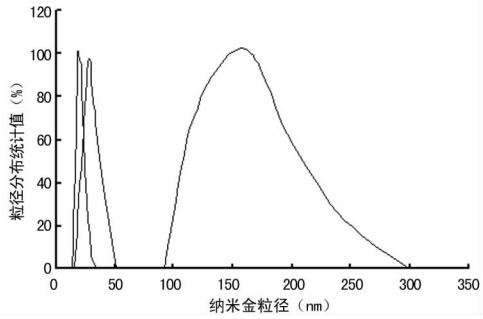


图 3 动态光散射粒径分布图

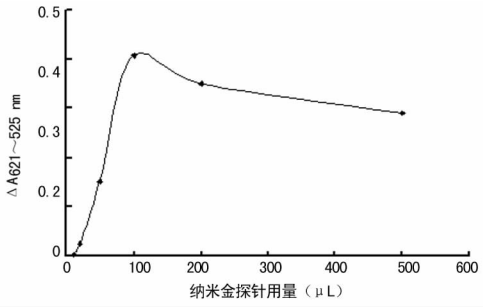


图 5 纳米金探针用量梯度优化

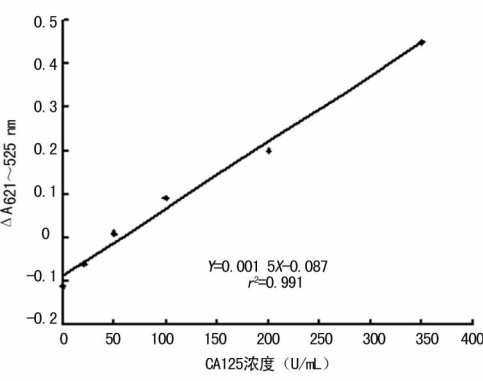


图 6 纳米金探针检测 CA125 蛋白标准曲线

2.3 标准曲线的绘制 用不同体积的纳米金探针(10、20、50、100、200、500 μL)分别与 10 μL 最高浓度 CA125 标准品(350 U/mL)反应, 波长扫描显示纳米金探针发生聚集时在 621 nm 处有最大吸收峰, 呈现明显“红移”现象, 与文献[7]报道相一

致。随着纳米金探针的量增加,525 nm 处吸光度值减小,621 nm 处吸光度值增大,ΔA_{621~525 nm}增大,当纳米金探针体积大于 100 μL 时,ΔA_{621~525 nm}开始下降(图 5),因此选择 100 μL 为纳米金探针最佳用量。用 100 μL 纳米金探针与 10 μL 不同浓度的 CA125 标准品反应,绘制标准曲线,CA125 浓度与 ΔA_{621~525 nm}间线性关系良好(图 6), $r^2=0.991$,最低检测限为 0.5 U/mL,传统的 ELISA 方法检测 CA125 的最低检测限为 3.8 U/mL。

2.4 血清标本检测 本研究选择 5 例盆腔肿块性质待查患者血清,分别用本检测方法和 ELISA 检测 CA125 的浓度(用相同标准品绘制标准曲线)。两者结果基本一致见表 1,病理确诊为卵巢癌的 2 例患者血清 CA125 浓度均明显升高。

检测方法	血清样本				
	1	2	3	4	5
ELISA	2.71	174.60	17.50	7.29	49.79
纳米金探针	2.52	176.28	17.15	7.42	48.69

3 讨 论

纳米金颗粒在生物分子检测中具有许多优势,如容易标记生物分子(生物相容性好)、可同时标记多个生物分子(比表面积大)、放大信号容易检测(独特的光学和电学物理特性)等,因而越来越受到众多研究者的重视,Nam 等^[8]利用纳米金粒子在不同状态下颜色会发生显著变化的特性建立了比色法定量检测蛋白质水平。纳米金粒径不同,呈现的表现颜色也会不同,从小到大依次为橘红色(<5 nm)、红色(10~20 nm)、深红色(>20 nm)和蓝紫色(>50 nm)等,制备时浓度越高,纳米金粒径越大,溶液颜色就会越深,但此时的纳米金粒子越不稳定^[9]。本实验室的前期工作及其他研究报道显示纳米金粒径在 10~20 nm 效果才好^[9-10],见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。本研究制备了一系列不同浓度的纳米金,高浓度的纳米金很容易发生聚集,因此选择低浓度的纳米金进行纳米金探针制备。纳米金颗粒由紧密连接在金核表面的内层负离子(AuCl₂⁻)和外层离子层 H⁺ 构成,分散在纳米金溶液中的外离子层 H⁺ 使纳米金游离于溶胶间保持悬浮状态,但在高盐溶液中外离子层 H⁺ 被破坏而发生不可逆性聚集,本研究结果显示纳米金粒子在极酸和极碱条件下不稳定而聚集见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),可能也是由于外离子层 H⁺ 被破坏所致。抗体分子通过与离子层 H⁺ 的静电作用牢固吸附到纳米金粒子表面,使得纳米金粒子在高盐溶液中仍保持稳定,但抗体用量不够起不到稳定作用,用量过多增加成本也影响抗体本身的活性,本研究通过梯度实验确定了制备纳米金探针的反应最适 pH 值为 7.0~8.0,每 500 μL 纳米金溶液中加入抗体的最小量为 1 μL。制备好的纳米金粒子和纳米金探针用紫外可见分光光度计进行光谱扫描和动态光散射仪进行粒径分布检测(图 2、3),纳米金探针粒径比单独纳米金粒子的大,在紫外光谱上表现为 3 nm“红移”,说明抗体分子与纳米金颗粒连接成功,与文献^[6]报道相一致。

在抗原抗体反应体系中,抗原抗体的浓度比例是影响检测结果的重要因素,在本研究中,应用标准品中 CA125 蛋白的最高浓度对纳米金探针的用量进行梯度优化,这样可以确保在绘制标准曲线时纳米金探针的量始终是足够的,从曲线图中可以看到,CA125 浓度与 ΔA_{621~525 nm}线性关系良好, $r^2=0.991$,5

例盆腔肿块性质待查患者中病理确诊为卵巢癌的 2 例血清,本检测方法检测到 CA125 水平明显比其他标本要高,检测结果与 ELISA 基本一致,但操作过程却要比 ELISA 简单快速很多,省去了洗板、底物显色等过程,从而大大减少了人为因素对检测结果的影响,而且典型的 ELISA 一个酶标抗体只能结合 1~2 个 HRP 分子,导致检测灵敏度不高。然而,利用此纳米金探针,一个直径为 15 nm 的纳米金颗粒表面可以标记 10 多个抗体分子^[11],使分子信号迅速扩增,大大提高检测灵敏度^[12],说明应用本实验室自制的纳米金探针临床标本进行检测是可行的。

本研究制备的纳米金探针制备过程简单且充分利用了纳米金的特性,首先它作为整个反应体系的载体与多个抗体分子结合并产生信号放大的效应,其次它本身成为反应体系中的检测信号,使整个反应体系简单、快速、容易操作、无污染、成本低廉等,只需要普通的光学仪器即可检测,甚至肉眼都可识别,在临床尤其是基层医院早期检测卵巢癌标志物 CA125 具有重要的应用价值。

参考文献

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.

[2] Kim G, Kim K, Park Y, et al. Colorimetric assay of matrix metalloproteinase activity based on metal-induced self-assembly of carboxy gold nanoparticles[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 15(41): 833-839.

[3] Piao J, Chung D. Novel colorimetric assay of LSD1 activity using gold nanoparticles[J]. Analyst, 2012, 137(11): 2669-2673.

[4] Vilela D, González MC, Escarpa A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation; Chemical creativity behind the assay. A review[J]. Anal Chim Acta, 2012, 751(1): 24-43.

[5] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution[J]. Nat PhysSci, 1973, 241(105): 20-22.

[6] Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimerpsdisease[J]. Proc Natl Acad USA, 2005, 102(7): 2273-2276.

[7] Xu Y, Wang J, Cao Y, et al. Gold nanoparticles based colorimetric assay of protein poly (ADP-ribosyl) ation[J]. Analyst, 2011, 136(10): 2044-2046.

[8] Nam J, Jang K, Groves J. Detection of proteins using a colorimetric bio-barcode assay[J]. Nature protocols, 2007, 2(6): 1438-1444.

[9] Griffin J, Singh A, Senapati D, et al. Sequence-specific HCV RNA quantification using the size-dependent nonlinear optical properties of gold nanoparticles[J]. Small, 2009, 5(7): 839-845.

[10] Cui Y, Tang D, Liu B, et al. Biofunctionalized dendritic polyaniline nanofibers for sensitive electrochemical immunoassay of biomarkers[J]. Analyst, 2012, 137(7): 1656-1662.

[11] Liu M, Jia C, Huang Y, et al. Highly sensitive protein detection using enzyme-labeled gold nanoparticle probes[J]. Analyst, 2010, 135(2): 327-331.

[12] Ambrosi A, Castaneda MT, Killard AJ, et al. Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis [J]. Anal Chem, 2007, 79(14): 5232-5240.