

• 短篇论著 •

肺炎支原体抗原量子点免疫层析法的建立及初步应用*

胡纪文¹, 张大准², 熊建辉¹, 马东礼³, 陈卓诚¹, 王贵萍¹, 叶 蕾¹

(1. 罗湖医院集团医学检验中心/深圳市罗湖区中医院检验科, 广东深圳 518001; 2. 深圳市伯劳特生物制品有限公司, 广东深圳 518052; 3. 深圳市儿童医院检验科, 广东深圳 518038)

摘要:目的 建立肺炎支原体(Mp)抗原量子点免疫层析的检测方法, 初步评价其在临床辅助诊断中的应用价值。方法 在偶联剂碳二亚胺 EDC 和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)作用下, 使鼠抗人 Mp 单克隆抗体(针对 P1 蛋白)与羧基量子点(CdSe/ZnS)偶联, 制备量子点标记抗体包被在玻璃纤维膜上, 以另一株 Mp 单抗(针对 P1 蛋白)作为捕获抗体包被在硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 建立双抗体夹心量子点免疫层析法检测肺炎支原体抗原。该方法检测 130 份临床咽拭子标本, 并与荧光聚合酶链反应方法相比较。结果 经过一系列的优化, 确定偶联剂 EDC 用量为 0.4 mg/mL, sulfo-NHS 用量为 0.58 mg/mL, 标记抗体浓度 1:100 稀释, 捕获抗体浓度为 0.75 mg/mL, 反应时间为 10 min。量子点免疫层析法检测临床标本, 阴性符合率为 96.4%, 阳性符合率为 90.0%。结论 量子点(CdSe/ZnS)标记免疫层析法检测 Mp 与荧光聚合酶链反应法具有较好的符合性, 该方法操作简便、检测快速、灵敏度高, 适用于 Mp 感染的早期诊断。

关键词:肺炎支原体; 抗原; 量子点; 免疫层析法**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.030**中图法分类号:**R446.6**文章编号:**1673-4130(2018)02-0220-04**文献标识码:**B

肺炎支原体(Mp)是儿童社区获得性肺炎的重要病原菌, 可占其 10%~30%, 流行高峰年或地区性爆发流行时可高达 50%~80%, 且每 3~7 年可引起一次全球性的暴发流行, 每次流行持续 1~2 年^[1]。Mp 除引发原发性非典型肺炎、支气管炎、咽炎等呼吸道感染性疾病外, 还可引起神经系统、血液系统、心血管系统以及皮肤、肌肉、关节等并发症。由于 Mp 感染的治疗方案与其他细菌和病毒感染不同, 因此 Mp 的早期诊断具有重要意义。目前 Mp 的诊断存在问题: 与其他病原体引起的感染症状相似, 常规诊断难以鉴别; Mp 细胞膜表面的糖脂抗原与其他微生物存在非特异交叉反应; Mp 感染后特异性抗体在血液中出现的时间变化较大。现存的实验室检验方法检测时间长、操作较复杂、费用较高, 临床使用存在一定局限性^[2]。本研究参考相关文献[3-7]建立双抗体夹心量子点免疫层析法检测人咽拭子 Mp 抗原, 完成 Mp 量子点免疫层析诊断试剂的研制和性能确定工作, 初步评价其临床应用价值, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 9 月至 2017 年 2 月罗湖区人民医院、深圳市儿童医院和罗湖区中医院儿科门诊就诊的疑似 Mp 肺炎患者的 130 份临床咽拭子标本, 年龄小于 14 岁, 其中男 60 例, 女 70 例。30 份健康人咽拭子标本取自罗湖区中医院体检科, 年龄 25~50 岁, 其中男 15 例, 女 15 例。

1.2 仪器与试剂 MV-2550 紫外-可见分光光度计(Shimadzu 公司); WFH-204B 紫外分析仪(杭州齐威); XYZ3210 喷膜仪(Bio-dot 公司); 切条仪(Bio-dot 公司); 荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(ABI 7300)。Stratos 全能高速台式冷冻离心机(Thermofisher); Synergy H1 全功能微孔板检测仪(Biotek); 硝酸纤维素膜(Millipore, HF13504); 玻璃纤维膜(Whatman, 型号 Accuflow G); 黏性 PVC 底板(上海捷宁); 吸水纸(Whatman); 2-吗啉代乙磺酸(MES, Sigma 公司); N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Sigma 公司); EDC(偶联剂, Sigma 公司 E7750); 发射波长 605 nm 的核壳型 CdSe/ZnS 硒化镉量子点, 表面活性基团为羧基(武汉伽源量子点公司); BCA 蛋白定量试剂盒(Thermofisher); Mp 单克隆抗体 2 株(6533#、6537# 购自 ViroStat 公司); Mp 抗原(318457# 购自 MyBioSource 公司); Mp 核酸检测试剂盒(PCR 荧光探针法)购自达安基因公司。

1.3 方法

1.3.1 量子点免疫层析试纸的制备与检测 (1)抗体的硝酸纤维素膜(NC 膜)包被: 羊抗鼠抗体浓度稀释至合适浓度喷膜作质控线(C 线), 捕获抗体(Mp 抗体)浓度调至合适浓度喷膜作检测线。(2)抗体的量子点偶联: 取 25 μ L 8 μ mol/L QD, 加 1 mL 50 mmol/L MES(pH6.0)洗涤, 离心(18 000 r/min, 30 min)弃上清, 重复洗涤 1 次; 用 100 μ L 50 mmol/L

* 基金项目: 深圳市科技研发基金项目(JCYJ20140415114003332)。

本文引用格式: 胡纪文, 张大准, 熊建辉, 等. 肺炎支原体抗原量子点免疫层析法的建立及初步应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2):

MES(pH6.0)重悬,加入一定量的 EDC/NHS 活化 30 min,离心(18 000 r/min,30 min)弃上清,用洗涤 2 次;加入一定量的抗体,补加 50 mmol/L MES(pH 7.2)至 100 μ L,室温震荡孵育 2 h,离心(15 000 r/min,30 min),取少量上清备用,然后加入 10%BSA 震荡封闭 30 min,之后离心(15 000 r/min,30 min),弃上清,用偶联物稳定剂(10 mmol/L 硼酸缓冲液,含 0.5%BSA,pH8.5)洗涤两次;加入 25 μ L 偶联物稳定剂于 4 $^{\circ}$ C 保存。(3)量子点偶联物的喷膜:取 10 μ L 偶联有抗体的 QD,稀释至合适的浓度,喷膜仪喷量 10 μ L/cm,在玻璃纤维素膜上喷涂。(4)试纸条的组装:在粘性 PVC 底板上依次搭接量子点结合物垫 NC 膜和吸水纸,各膜材之间相互重叠 2 mm,粘好后切成宽度为 3.5 mm 的试纸条。(5)咽拭子处理:将采集的拭子样本浸在 0.5 mL 缓冲液内搅拌,挤压数次,挤压出的液体作为样品震荡 10 min 后检测。(6)检测方法:每个试纸条加样 60 μ L,反应 10 min,在紫外灯下观察反应结果。

1.3.2 实验优化条件的选择 (1)捕获抗体的浓度确定:将包被抗体分别稀释成 0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 mg/mL 不同浓度包被 NC 膜。(2)偶联剂用量优化:将偶联剂 EDC/sulfo-NHS 用量设置为 0.10 mg/mL 与 0.14 mg/mL、0.20 mg/mL 与 0.29 mg/mL、0.40 mg/mL 与 0.58 mg/mL、0.60 mg/mL 与 0.87 mg/mL、0.80 mg/mL 与 1.16 mg/mL,活化后分别偶联 0.12 mg 单抗,比较检测灵敏度,以评价偶联体系中偶联剂的合适浓度。(3)抗体与量子点偶联比例的确定:按优化的活化体系,分别偶联 0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mg 单抗,比较检测灵敏度及偶联率,以确认偶联体系中量子点与单抗的最佳偶联比。(4)量子点偶联物工作浓度优化:将最佳偶联体系下制备的偶联物按 20、50、100、200、500 倍稀释为工作浓度。比较检测灵敏度,确认偶联物的最佳工作

浓度。(5)反应时间优化:利用优选的包被浓度、标记浓度及偶联物工作浓度,设置反应时间分别为 3、5、10、15、20 min。

1.3.3 性能评估 (1)Mp 抗原最低检测限:将 Mp 抗原稀释成不同浓度梯度,每个试纸条加样 60 μ L,反应 10 min,在紫外灯下观察反应结果。以 PBS 作空白对照。(2)灵敏度:对 30 份已知 Mp 阳性咽拭子标本进行检测,观察反应结果。(3)特异度:健康人咽拭子标本 30 份进行检测,观察反应结果。

1.3.4 实验室初步考核 以荧光 PCR 方法为标准,用量子点免疫层析法、PCR 荧光探针法分别检测临床标本 130 份,计算阳性符合率、阴性符合率、总符合率。荧光 PCR 检测临床标本,严格按照 Mp 核酸检测试剂盒 PCR 荧光探针法说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 版对数据进行统计学处理,计算阳性符合率、阴性符合率、总符合率、Kappa 值。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最优化实验条件的选择

2.1.1 NC 膜单抗包被浓度确定 从表 1 的结果显示捕获抗体最佳浓度为 0.75 mg/mL。

表 1 检测线浓度的确定

项目	单抗 6533 # 浓度(mg/mL)				
	0.5	0.75	1.0	1.5	2.0
Mp 抗原 318457 # (0 μ g/mL)	—	—	—	—	±
Mp 抗原 318457 # (0.95 μ g/mL)	±	+	+	+	+
Mp 抗原 318457 # (19 μ g/mL)	+	++	++	++	++

注:—表示无荧光条带;+表示荧光强度;±表示可疑阳性

2.1.2 偶联剂用量优化 结果显示 EDC 用量 0.4 mg/mL,sulfo-NHS 用量 0.58 mg/mL 为最佳使用量。见表 2。

表 2 偶联剂用量优化

项目	EDC/sulfo-NHS				
	0.1/0.14	0.2/0.29	0.4/0.58	0.6/0.87	0.8/1.16
Mp 抗原 318457 # (0 μ g/mL)	—	—	—	—	—
Mp 抗原 318457 # (0.95 μ g/mL)	—	±	++	—	—
Mp 抗原 318457 # (19 μ g/mL)	++	++	+++	++	+

注:—表示无荧光条带;+表示荧光强度;±表示可疑阳性

表 3 抗体与量子点偶联比例

项目	抗体量(mg)				
	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12
Mp 抗原 318457 # (0 μ g/mL)	—	—	—	—	—
Mp 抗原 318457 # (0.95 μ g/mL)	±	±	+	+	+
Mp 抗原 318457 # (19 μ g/mL)	++	++	+++	+++	+++

注:—表示无荧光条带,+表示荧光强度;±表示可疑阳性

2.1.3 抗体与量子点偶联比例 表 3 结果显示,25

μ L 量子点偶联 0.08 mg 抗体较好,偶联率适中,检测灵敏度较好。

2.1.4 偶联物工作浓度优化 从表 4 结果显示,量子点标记的 6537 # 单抗工作浓度为 100 倍稀释时最优。

2.1.5 反应时间的确定 按包被浓度 0.75 mg/mL,EDC 用量 0.4 mg/mL,sulfo-NHS 用量 0.58 mg/mL,量子点偶联物稀释 100 倍,制备试纸并检测,见表 5。结果显示,反应 10 min 可以达到一个较佳的灵

敏度水平。

表 4 偶联物工作浓度优化

项目	量子点偶联物稀释倍数				
	20	50	100	200	500
Mp 抗原 318457 # (0 μg/mL)	+	±	—	—	—
Mp 抗原 318457 # (0.95 μg/mL)	+	+	+	±	—
Mp 抗原 318457 # (19 μg/mL)	+++	+++	+++	++	++

注：—表示无荧光条带；+表示荧光强度；±表示可疑阳性

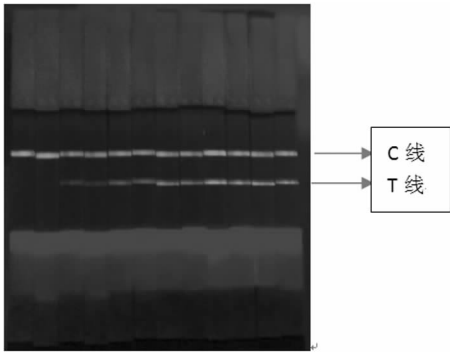
表 5 反应时间的确定

项目	反应时间(min)				
	3	5	10	15	20
Mp 抗原 318457 # (0 μg/mL)	—	—	—	—	—
Mp 抗原 318457 # (0.95 μg/mL)	—	+	+	+	+
Mp 抗原 318457 # (19 μg/mL)	++	++	+++	+++	+++

注：—表示无荧光条带；+表示荧光强度

2.2 试纸性能评估

2.2.1 Mp 抗原最低检测限 将 Mp 抗原稀释为 0.19、0.38、1.52、7.60、30.40 μg/mL 试验结果为±、+、+、++、+++，以 PBS 作零值空白对照(试验结果为一)。其中—表示无荧光条带，+表示荧光强度。见图 1。结果显示，Mp 试纸条检测天然抗原的最低检测限为 0.38 μg/mL。



注：从左至右抗原浓度依次是序号 1、2 为 0 μg/mL、序号 3、4 为 0.19 μg/mL、序号 5、6 为 0.38 μg/mL、序号 7、8 为 1.52 μg/mL、序号 9、10 为 7.60 μg/mL、序号 11、12 为 30.40 μg/mL

图 1 天然抗原检测限试验实物

表 6 量子点免疫层析法与 PCR 荧光探针法结果比较(n)

量子点免疫层析法	PCR 荧光探针法		
	阳性	阴性	合计
阳性	18	4	22
阴性	2	106	108
合计	20	110	130

2.2.2 灵敏度及特异度 对 30 份已知 Mp 阳性咽拭子标本进行检测，结果 30 份 Mp 标本全部检出阳性(30/30)。健康人咽拭子标本 30 份，结果全部检出阴性(30/30)。

2.3 实验室初步考核结果 两种方法检测结果一致性比较，达安基因 Mp PCR 荧光探针法为参考方法，计算量子点免疫层析法的阳性符合率、阴性符合率、

总符合率等。见表 6。量子点免疫层析法：阳性符合率为 $18/20 \times 100\% = 90.0\%$ ；阴性符合率为 $106/110 \times 100\% = 96.4\%$ ；总符合率为 $124/130 \times 100\% = 95.4\%$ ，Kappa=0.83。

3 讨论

目前 Mp 感染的实验室诊断方法主要分为病原体的分离培养、血清学检测及 PCR 法检测核酸。分离培养是诊断 Mp 的金标准，该方法需要在特殊的培养基进行传代培养，培养约需 21 d，且阳性分离率低，限制了其临床应用。PCR 法是一种模拟体内 DNA 复制的体外扩增法，可直接检测患者病原体核酸水平，不受机体免疫水平、病程及药物因素的影响，从提取患者标本开始至完成整个 PCR 试验过程需 2 h，从而达到早期诊断目的，国外有报道 PCR 法的灵敏度为 80.6%，特异度为 89.3%^[8]。Mp 的血清学检测即针对 Mp 特异性的抗体检测，是国内外应用最广的 Mp 感染实验诊断方法，通常采用急性期和恢复期双份血清抗体滴度的改变来诊断 Mp 感染。抗 Mp-IgM 是机体受 Mp 感染时最早出现的特异性抗体，Mp 感染临床症状出现 3 d 后血清中 IgM 可被检出，10~30 d 达到高峰；IgG 抗体较 IgM 晚出现 1~2 周，但持续时间长^[9]。

量子点是一种新型荧光材料，具有激发光谱范围宽，发射线窄，发光效率高，发光颜色可调，光稳定性好等优点^[10]。量子点免疫层析技术是目前抗原、抗体快速检测方法学的热点课题^[11-16]。本研究以交联剂 EDC 和 NHS 共价键连接的方法对抗人 Mp P1 蛋白单克隆抗体进行量子点标记，EDC 和量子点表面的羧基反应生成酰基异脲，加入 NHS 后，酰基异脲和 NHS 生成具有胺反应活性的 NHS 酯，与 P1 单抗表面的氨基反应生成稳定的酰胺，从而偶联到 P1 单抗上，将其喷涂在玻璃纤维膜上，将另一株配对使用的针对 Mp P1 蛋白的单克隆抗体包被在 NC 膜上，建立双抗体夹心免疫层析法快速检测咽拭子 Mp 抗原。经过一系列的反应条件最优化选择，确定偶联剂 EDC 用量为 0.4 mg/mL，sulfo-NHS 用量为 0.58 mg/mL，标记抗体浓度 1：100 稀释，捕获抗体浓度为 0.75 mg/mL，反应时间为 10 min。以此实验参数制备量子点检测该试纸检测患者咽拭子 Mp。该试纸检测 Mp 天然抗原最低检测限为 0.38 μg/mL，灵敏度和特异度均符合规定。以荧光 PCR 为参考方法，用量子点免疫层析法、PCR 荧光探针法同时检测临床标本 130 份，结果量子点免疫层析法阴性符合率为 96.4%；阳性符合率为 90.0%，总符合率为 95.4%。

综上所述，量子点免疫层析法直接检测人咽拭子 Mp 抗原是一种快速、灵敏、特异的方法，适用于 Mp 感染的早期实验室诊断。

参考文献

[1] 李少丽,赵汉青,孙红妹,等.培养法、PCR 法和血清学法

在检测儿童肺炎支原体感染中的应用比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(1): 73-77.

[2] 赵阅, 孙红妹. 肺炎支原体实验诊断技术现状及发展[J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29(5): 304-308.

[3] 胡华军, 付涛, 张明洲, 等. CdTe/ZnSe 核壳量子点免疫层析试纸条检测克伦特罗的研究[J]. 分析化学, 2010, 38(12): 1727-1731.

[4] 赵斌, 赵肃清, 周丽华, 等. 水溶性量子点标记狂犬病 P 蛋白单克隆抗体研究[J]. 分析化学, 2012, 40(6): 857-861.

[5] 余皓, 徐良, 漆晓萍, 等. 量子点标记免疫层析技术检测血液中的降钙素原[J]. 分析化学研究报告, 2014, 42(11): 1592-1597.

[6] 何紫琪, 李从荣, 杨艳兵, 等. 量子点联合磁微粒技术检测 HBsAg 方法的建立及评价[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(1): 38-41.

[7] 段宏, 陈雪岗, 江湖, 等. 量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测恶性疟原虫[J]. 分析化学研究报告, 2015, 43(3): 338-343.

[8] HONDA J, YANO T, KUSABA M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnose mycoplasma pneumoniae[J]. J Clin Microbiology, 2000, 38(4): 1382-1384.

[9] 张杰, 胡军, 刘杨, 等. 肺炎支原体快速检测方法的建立及应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(17): 2379-1381.

[10] 王素梅, 蒋治良, 梁爱惠. CdTe 量子点的光谱特性及其应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(9): 2152-2155.

[11] 胡晓璐, 段荣, 柯江维, 等. 量子点流式微球技术定量检测血清胃癌相关抗原 MG7 的方法学建立及评价[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(12): 894-897.

[12] 谢子平, 谭艳, 谢胜, 等. 量子点荧光标记技术与免疫组织化学染色检测泌尿系统肿瘤组织特异性抗原表达的效果比较[J]. 广东医学, 2014, 35(15): 2372-2376.

[13] 张晶, 虞伟, 夏海燕, 等. 量子点标记酶亲合素-生物素系统用于抗核抗体检测的对比研究与评价[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(12): 895-897.

[14] 袁润, 张孝斌, 程帆, 等. 量子点-前列腺干细胞抗原荧光探针针对膀胱癌细胞的靶向成像研究[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(12): 2658-261.

[15] 何剑, 吴平, 徐婧, 等. 羧基水溶性量子点在鼻咽癌标志物 ENEA1 标记中的应用[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(6): 721-723.

[16] 张光辉, 程晓曦, 邓爱凤, 等. 基于量子点标记技术在人血清甲胎蛋白中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(2): 216-218.

(收稿日期: 2017-07-20 修回日期: 2017-09-26)

• 短篇论著 •

罗氏电化学发光免疫分析仪检测系统的性能验证*

魏 松¹, 陈秋序¹, 李宜珊¹, 胡访溪², 张 剑^{3△}

(1. 沈阳医学院基础医学院医学检验技术 2014 级, 沈阳 110034; 2. 沈阳医学院公共卫生学院预防医学 2013 级, 沈阳 110034; 3. 沈阳医学院附属中心医院检验科, 沈阳 110034)

摘 要:目的 验证罗氏电化学发光免疫分析仪检测系统的性能情况。方法 依据国家临床实验室标准委员会(NCCLS)的各项文件对精密度、线性范围、最低检测限、参考范围及电化学发光法与酶联免疫吸附试验(ELISA)两种方法比对进行验证。结果 罗氏电化学发光免疫分析仪(MODULRA E170)的批内精密度、批间精密度、正确度、分析测量范围、最低检测限、参考区间、仪器间比对以及方法学间比对均合格。结论 罗氏电化学发光免疫分析仪(MODULRA E170)检测系统的性能验证合格, 满足临床诊断与治疗的需要。

关键词:罗氏电化学发光免疫分析仪; 肝炎病毒; 性能验证

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2018. 02. 031 **中图法分类号:**R446. 6

文章编号:1673-4130(2018)02-0223-03 **文献标识码:**B

近年来,随着电化学发光免疫分析仪在肝炎病毒检测中的应用,极大减轻了检验人员的劳动程度,提高了检验结果的质量,缩短了报告时间,为临床提供了精确的数据^[1]。为保证检验质量,临床实验室应对使用的检验设备和检验方法的基本性能进行验证,明确该设备或该方法的检测系统是否有足够的可靠性,以满足临床使用的要求,并对厂家的声明和提供的数

据予以确认,达到要求后才能应用于临床常规检测^[2-6]。本研究对罗氏电化学发光免疫分析仪(MODULRA E170)检测肝炎病毒标志物的基本性能,包括精密度、正确度、分析测量范围、参考区间、灵敏度、仪器间对比、方法学间对比等性能进行了验证。

1 材料与方法

1.1 标本来源 血清样品为沈阳医学院附属中心医

* 基金项目: 2016 国家大学生科研课题(201610164018); 辽宁省大学生科研课题(201610164018); 2016 沈阳医学院大学生科研课题(20160828)。

△ 通信作者, E-mail: zjlhy1998@163. com。

本文引用格式: 魏松, 陈秋序, 李宜珊, 等. 罗氏电化学发光免疫分析仪检测系统的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2): 223-225.