

• 论 著 •

基于量子点标记技术在人血清甲胎蛋白中的意义

张光辉,程晓曦,邓爱凤,蒋锦程
(深圳恒生医院,广东深圳 518102)

摘 要:**目的** 建立 1 种基于新型纳米颗粒——量子点(QD)作为荧光标志物检测人血清甲胎蛋白的新方法。**方法** 生物素标记的甲胎蛋白单克隆抗体与血清中的甲胎蛋白抗原特异性结合形成抗原抗体复合物,耦联生物素的 QD-605 和 QD-655 作为荧光标志物与抗原抗体复合物结合,借助磁场的清洗分离效应,去除反应体系中的非特异性物质,利用荧光分光光度计检测 QD 标记的甲胎蛋白抗原抗体复合物的荧光强度及光谱。**结果** 用 350 nm 波长的光作为激发光,量子点 QD-605 单独作为标志物时,荧光发射谱在 605 nm 处有 1 个波峰;QD-655 单独作为标志物时,荧光发射谱在 655 nm 处有 1 个波峰;QD-605 和 QD-655 混合作为标志物时,荧光发射谱出现 2 个波峰,分别在 605 和 655 nm 处。**结论** 本选题利用 QD 标记技术检测血清中的甲胎蛋白,有望为临床免疫诊断学提供 1 种更快捷、有效的方法。

关键词:量子点; QD-605; QD-655; 甲胎蛋白; 荧光强度
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.02.026 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)02-0216-03

Based on quantum dots clinical significance in human serum AFP
ZHANG Guanghui, CHENG Xiaoxi, DENG Aifeng, JIANG Jincheng
(Shenzhen Hengsheng Hospital, Shenzhen, Guangdong 518102, China)

Abstract:**Objective** To establish a method for the detection of AFP in human serum based on quantum dots(QD), a novel kind of nanoparticles fluorescent marker. **Methods** Biotin labeled AFP monoclonal antibody was specific binding to AFP antigen in human serum, then the antigen-antibody complex was combined with the fluorescent markers of biotin coupled QD-605 and QD-655. The nonspecific material in the reaction system was removed by the separation effect of magnetic field. Using fluorescence spectrophotometer, the AFP fluorescence intensity and spectrum of QD labeled antigen-antibody complex was detected. **Results** With the exciting light at 350 nm wavelength, when QD-605 or QD-655 is used as marker individual, the fluorescence emission spectrum had a peak at 605 or 655 nm accordingly. When both QD-605 and QD-655 were used as markers together, the fluorescence emission spectra showed two peaks, just right at 605 and 655 nm. **Conclusion** In this research, we used quantum dots as marker to detect AFP in human serum, which make it possible to provide a more rapid and efficient method for clinical diagnosis of immune in future.

Key words: quantum dots; QD-605; QD-655; AFP; fluorescence intensity

近年来,纳米粒子在生物医学分析技术领域中取得了突破性的进展,尤其是在生物标记分析方面,建立了一系列有机分子不可比拟的标记探针,其中最引人瞩目的是 1 种新型纳米晶体——量子点(QD)。QD 因其独特的量子限域效应而表现出优良的光化学稳定性,与传统的有机荧光染料相比, QD 具有激发谱宽而连续、发射谱窄而对称、发光时间长、发光颜色可调、低毒性等优点。作为荧光标志物用于生物医学的分析检测及疾病的早期诊断,是 QD 近几年研究的热点之一。

本研究利用 QD-605 和 QD-655 分别作为单独标志物和共同标志物标记甲胎蛋白单克隆抗体以检测人血清中的甲胎蛋白抗原,并利用荧光分光光度计分别检测发射光不同的 QD 标记甲胎蛋白抗原抗体复合物样本的荧光强度及光谱,研究当人血清中存在甲胎蛋白抗原时,利用 2 种不同发射光波长的 QD 标记对应的单克隆抗体,用于检测对应标志性抗原的可行性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 日本日立公司(HITACHI)的 F-4600 荧光分光光度计,江苏康健医疗用品有限公司的 XH-B 型漩涡混合器, Thermo-Shaker 公司的 MSC-100 恒温混匀仪,上海天能公

司(Tanon)的磁板、电子秤;美国 Life Technologies 公司的 Qdot 605 ITK™ Streptavidin Conjugate Kit 和 Qdot 655 ITK™ Streptavidin Conjugate Kit,深圳新产业生物医学工程股份有限公司的血清甲胎蛋白定量测定试剂盒,福州迈新公司(Maixin)的磷酸盐缓冲液(粉剂)。

1.2 试验前准备 配制 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液:称取 1/3 的磷酸盐缓冲液(粉剂)加入 500 mL 量瓶中,加入纯净水,充分摇匀并定容至 500 mL,调节至 pH(7.25~7.35),用于清洗样本。

1.3 方法

1.3.1 确定试验激发波长 取 3 支离心管标记为 A、B、C,分别加入 500 μL 磷酸盐缓冲液;A 组加入 40 μL 磁珠,B 组加入 1 μL QD-605,C 组加入 1 μL QD-655;用漩涡混合器分别将 3 支离心管溶液混匀后,使用荧光分光光度计在 301、325、350 和 375 nm 的激发光下,测量各管的荧光发射光谱(范围 500~700 nm)。

1.3.2 QD-605 作发光标志物 (1)取 3 支离心管,标记为 B、L、H,每管分别加入异硫氰酸荧光素-甲胎蛋白抗体 100 μL;

(2)B 管为空白对照组,加入去离子水 30 μL ,L 管加入标准品 L 30 μL ,H 管加标准品 H 30 μL (标准品 H、L 为 1 套试剂,具体甲胎蛋白抗原水平不明,标准品 L 的抗原水平低于 H 的抗原水平);(3)每管加异硫氰酸荧光素-磁珠抗体 100 μL ,异硫氰酸荧光素-磁珠抗体每次使用前需用漩涡混合器摇匀;(4)将以上 3 支离心管用锡纸包住避光,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min;(5)再于磁板上静置 5 min,待试管底部出现沉淀物后,弃去上清;(6)每管加 500 μL 磷酸盐缓冲液并摇匀,以达到清洗目的,置磁板上 5 min,待试管底部出现沉淀物后,弃去上清;(7)每管分别加入 10 μL 生物素标记的甲胎蛋白抗体,再加入 2 μL 亲和素-QD-605,漩涡混合器摇匀;(8)重做(3)→(6),以去除未标记的 QD,减少对试验的干扰;(9)使用荧光分光光度计在 350 nm 的激发光下,分别测量荧光强度及光谱。

1.3.3 QD-655 作发光标志物 (1)取 5 支离心管,标记为 B、L1、L2、H1、H2,每管分别加入异硫氰酸荧光素-甲胎蛋白抗体 100 μL ;(2)B 为空白对照组,加入去离子水 30 μL ,L1、L2 管加入标准品 L 30 μL ,H1、H2 管加标准品 H 30 μL ;(3)每管加入异硫氰酸荧光素-磁珠抗体 60 μL ,磁珠每次使用前需用漩涡混合器摇匀;(4)将以上 5 管用锡纸包住避光,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min;(5)再于磁板上静置 5 min,待试管底部出现沉淀物后,弃去上

清;(6)每管加 500 μL 磷酸盐缓冲液并摇匀,置磁板上 5 min,待试管底部出现沉淀物后,弃去上清;(7)每管分别加入 10 μL 生物素标记的甲胎蛋白抗体,再加入 1 μL 亲和素-QD-605,漩涡混合器摇匀;(8)重做(3)→(6),以去除未标记的 QD,减少对试验的干扰;(9)使用荧光分光光度计在 350 nm 的激发光下,分别测量荧光强度及光谱。

2 结 果

2.1 试验激发波长的确定 通过荧光发射谱分析结果可知,QD-605 最佳激发波长为 301 nm,QD-655 最佳激发波长为 325 nm,而磁珠本身具有荧光,且在 301 和 325 nm 激发光下荧光效果较强,对 QD 标记造成影响,而在 350、375 和 400 nm 激发光下荧光效果极小。另外,激发光波长逐渐增大时,QD-605 和 QD-655 的荧光强度会逐渐减弱,因此,试验选择用 350 nm 作为激发波长为佳。

2.2 QD-605 作为发光标志物 试验中使用 QD-605 标记的甲胎蛋白抗原抗体复合物的荧光光谱如图 1 所示,发射波在 605 nm 附近达到峰值。

2.3 QD-655 作为发光标志物 QD-655 标记的甲胎蛋白抗原抗体复合物的荧光光谱见图 2。发射波在 655 nm 附近达到峰值。

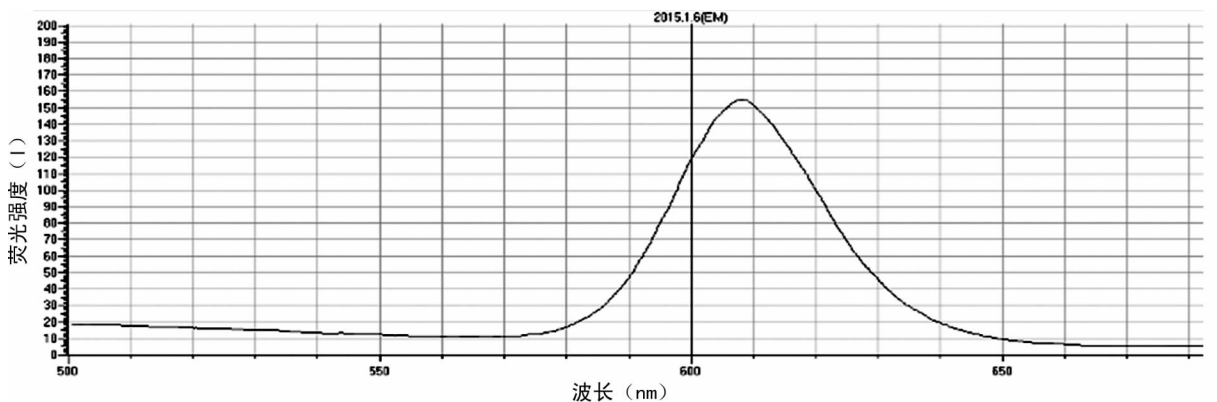


图 1 QD-605 标记的甲胎蛋白抗原抗体复合物在 350 nm 激发光下的发射光谱

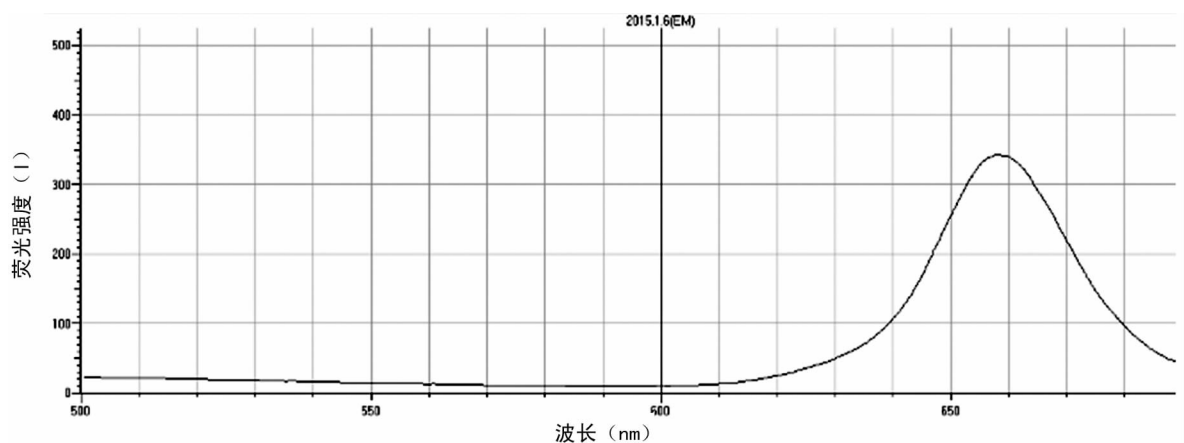


图 2 QD-655 标记的甲胎蛋白抗原抗体复合物在 350 nm 激发光下的发射光谱

3 讨 论

在我国常见恶性肿瘤中,原发性肝癌的发病率和病死率分别位列第 3 和第 2^[1]。甲胎蛋白是用于诊断原发性肝癌最主要的特异性标志物,健康成人血清中水平非常低^[2]。甲胎蛋白对原发性肝癌的早期诊断和治疗具有重要意义。目前,甲胎蛋

白临床检测技术包括放射免疫分析技术、酶联免疫吸附测定法、化学发光免疫分析技术、时间分辨荧光免疫分析技术、胶体金免疫层析技术等。

1998 年,美国 Alivisatos 小组和 Nie 小组几乎同时提出荧光 QD 可以与生物大分子相耦联作为生物探针应用于活细胞

体系标记,开创了荧光 QD 在生物技术中研究应用的先河^[3-4]。QD 独特的物理性质、优良的光学特性以及比传统有机染料具有更多的优势,并在分子生物学、细胞生物学、医学诊断、药物筛选等研究中展现出极大的应用前景^[5]。QD 可与多种分子进行耦联,如蛋白质、抗体、链霉亲和素等,作为荧光探针,检测特定靶分子的分布和功能。Kim 等^[6]合成 HA-QDs 复合物并注射到淋巴细胞中,观察到淋巴细胞的分布情况。Goldman 等^[7]把重组蛋白通过静电作用结合到 QD 上,再与抗体结合,成功地对葡萄球菌肠毒素和 2,4,6-硝基甲苯进行了荧光免疫分析。

本选题以新型纳米颗粒,即 QD-605 和 QD-655 标记甲胎蛋白单克隆抗体,用于检测样本中的甲胎蛋白抗原。其基本原理为:QD 与生物素标记的甲胎蛋白单抗耦联,异硫氰酸荧光素和甲胎蛋白抗体耦联,抗异硫氰酸荧光素-磁珠耦联,以甲胎蛋白抗原抗体复合物为核心,进而形成 1 套级联放大免疫反应体系。并在紫外灯照射下观察复合物的荧光成像,通过荧光分光光度计测量复合物的荧光强度及光谱。

本试验首先通过对 QD-605 和 QD-655 的激发光特征的探索,选择 2 种 QD 的最佳激发光。通过对其他背景或干扰作最小化处理,如磁珠对试验结果的干扰影响,最终将两者的最佳激发光波长确定为 350 nm。此时,发射光谱虽不是最佳,但其他干扰已经非常小,可以忽略。

选定试验的激发光波长后,利用 QD-605 和 QD-655 作为标志物,分别用于标记对应的甲胎蛋白单克隆抗体。利用前述亲和素、生物素作为桥联放大抗原抗体反应系统,以提高试验的相应敏感度。最终通过激发光(350 nm)的激发,紫外分光光度计捕捉到两者反应体系中的甲胎蛋白抗原。依此证实,本选题以 QD 作为标志物,用于抗原抗体分析技术有一定的可行性。

试验中应特别注意,各种条件对 QD 检测甲胎蛋白的影响。磁珠使用前应充分摇匀;试验试剂及试验过程需避光操

作;测定荧光强度前宜将样本充分摇匀。

QD 相对传统标记染料具有稳定、准确而不受干扰的优势,将 QD 应用于检测人血清中的特异性肿瘤标志物,可为临床肿瘤的免疫诊断提供 1 种更快捷、有效的新途径。

参考文献

[1] 陈万青,郑荣寿. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2016,25(1):1-8.

[2] Baig JA, Alam JM, Mahmood SR, et al. Hepatocellular carcinoma(HCC) and diagnostic significance of A-feto-protein(AFP)[J]. J Ayub Med Coll Abbottabad,2010,21(1):72-75.

[3] Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. Science,1998,281(5385):2013-2016.

[4] Chan WCW, Nie SM. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. Science,1998,281:2016-2018.

[5] 何振宇,周培疆. 量子点在生物医学检验中的应用及毒性研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(12):3016-3018.

[6] Kim S, Lim YT, Soltesz EG, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping[J]. Nat Biotechnol,2004,22(1):93-97.

[7] Goldman ER, Balighian ED, Kuno MK, et al. Luminescent quantum dot-adaptor protein-antibody conjugates for use in fluoroimmunoassays[J]. Physica Status Solidi B-Basic Research,2002,229(1):407-414.

(收稿日期:2016-07-13 修回日期:2016-10-16)

(上接第 215 页)

[4] Yang Q, Ding J, Cao J, et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A10[J]. J Med Virol, 2015, 87(6):954-960.

[5] Wu SX, Wu JF, Yang J, et al. Hand-foot-mouth disease pathogen separation and EV71 VP1 gene analysis in Sanmenxia City, Henan Province, China[J]. Bingdu Xuebao, 2014, 30(6):630-635.

[6] Chen C, Xie H, Cui M, et al. An investigation on a case of hand-foot-mouth disease caused by coxsackie-virus A6 associated with a vaccine-derived poliovirus co-infection[J]. Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi, 2014, 35(1):61-65.

[7] Chen SM, Du JW, Jin YM. et al. Risk Factors for Severe Hand-Foot-Mouth Disease in Children in Hainan, China, 2011—2012[J]. Asia Pac J Public Health, 2015, 27(7):715-722.

[8] 孙炳欣,许爽,崔薇,等. 长春市 2013 年手足口病病原学监测结果及分析[J]. Chin J Lab Diagn, 2015, 19(5):762-764.

[9] 伏瑾,张艳玲,孙春荣,等. 实时 RT-PCR 检测 159 例手足口病患儿童样本中肠道病毒的结果分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(6):488-490.

[10] Wang J, Cao Z, Zeng DD, et al. Epidemiological analysis, detection, and comparison of space-time patterns of Beijing hand-foot-mouth disease (2008 — 2012) [J]. PLoS One, 2014, 9(3):e92745.

[11] Wang J, Zhu H, Chen Y, et al. Epidemiological analysis on 589 children with hand-foot-mouth disease from Xianju county of Zhejiang province[J]. Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi, 2014, 35(6):708-709.

[12] Liu RH, Li J, Qu XF, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of children with critical hand-foot-mouth disease treated with mechanical ventilation[J]. Zhongguo Dangdai Erke Zazhi, 2015, 17(3):249-253.

[13] Jiang M, Wei D, Ou WL, et al. Autopsy findings in children with hand foot and mouth disease[J]. N Engl J Med, 2012, 367(1):91-92.

(收稿日期:2016-09-10 修回日期:2016-10-29)