

论著 · 临床研究

基于上转换纳米荧光快速定量检测 PCT 技术研究

雷 萌, 许新强, 冀天星, 周 强[△]

(广州医科大学附属第二医院检验科, 广州 510260)

摘要:目的 研制基于上转换纳米荧光快速定量检测降钙素原(PCT)的免疫层析检测技术。方法 采用溶剂热法制备上转换纳米荧光颗粒(UCNP), 为稀土铽和铒掺杂于四氟钇钠的混合物($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$), 利用反相微乳法对 UCNP 进行改性和二氧化硅(SiO_2)包裹, 利用干式免疫层析技术建立 PCT 检测技术。结果 利用反向微乳法成功制备了分散性好的水溶性 UCNP, 基于 UCNP 的干式免疫层析技术检测降钙素原的最低检测限为 0.02 ng/mL, 线性范围为 0.05~44.00 ng/mL, 批内精密度 $\text{CV}<10\%$, 批间精密度 $\text{CV}<13\%$ 。结论 基于 UCNP 的免疫层析检测技术是快速、灵敏定量检测血清 PCT 的有效方法。

关键词:上转换纳米荧光颗粒; 免疫层析试纸条; 降钙素原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.018

中图法分类号:R392.33

文章编号:1673-4130(2018)01-0067-04

文献标识码:A

Study on upconversion nanoparticles-based rapid fluorescence procalcitonin quantitative detection technology

LEI Meng, XU Xinqiang, JI Tianxing, ZHOU Qiang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

Abstract: **Objective** To research and develop the immunochromatographic detection technology of upconverting nanoparticles(UCNP)-based rapid fluorescence quantitative procalcitonin(PCT) detection. **Methods** UCNP ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$) was prepared by solvothermal method, which was the compound of rare earth yttrium and erbium with four fluorine sodium yttrium. UCNP was conducted the modification and silica (SiO_2) packing by using the reverse microemulsion method. Then the PCT determination method was established by using the dry-type immunochromatographic technology. **Results** The water-soluble UCNP with good dispersibility was successfully prepared by using the reverse microemulsion method. The lowest detection limit for detecting PCT by UCNP-based dry-type immunochromatographic technology was 0.02 ng/mL, the linear range was 0.05—44.00 ng/mL, the intra-batch and inter-batch coefficients variable(CV) were $<10\%$ and 13% respectively. **Conclusion** UCNP-based immunochromatography technology is a rapidly and sensitively effective method for quantitatively detecting serum PCT.

Key words: upconverting fluorescence nanoparticles; immunochromatographic test strip; procalcitonin

上转换纳米荧光颗粒(UCNP)是由稀土金属掺杂的纳米晶颗粒^[1]。UCNP 发光具有较大的反斯托克斯位移、稳定性好、无毒、发射光寿命长等优良的特性。因此,UCNP 已成为病毒、细菌、生物大分子和核酸检测广泛开发应用的新一代发光材料^[2-6]。降钙素原(PCT)是无激素活性的糖蛋白,是诊断脓毒症、鉴别细菌和病毒感染、临床抗菌药物指导治疗的血清生物标记物^[2]。本研究拟结合上转换纳米颗粒与免疫层析技术,研制 PCT 即时快速定量检测技术。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 荧光分光光度计(RF-5301PC)购于日本岛津公司;透射电子显微镜(TEM, JEOL-200CX)购于日本电子株式会社;XYZ 三维划膜喷金

仪(HM3030)购于上海金标生物科技有限公司。浓度分别为 99.99%的氧化钇(Y_2O_3)、氧化铽(Yb_2O_3)和氧化铒(Er_2O_3)购于上海能源化工有限公司;油酸、十八烯、环己烷、正硅酸乙酯(TEOS),购于 Sigma-Aldrich 上海贸易有限公司;PCT 抗原 JG01、PCT 单抗 JG03、PCT 单抗 JG05、羊抗鼠 IgG 购于杭州启泰生物技术有限公司; γ -(2,3 环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(GPTMS)购于北京鼎国生物技术有限公司;硝酸纤维素膜购于汕头伊能膜业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 制备和表面修饰 采用溶剂热法制备 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ ^[3]。称取 1.76 g 氧化钇(Y_2O_3)、0.79 g 氧化铽(Yb_2O_3)和 0.077 g 氧化铒

作者简介:雷萌,女,研究生在读,主要从事新型临床检测技术研究。 [△] 通信作者, E-mail: qiangzhou70@163.com。

本文引用格式:雷萌,许新强,冀天星,等. 基于上转换纳米荧光快速定量检测 PCT 技术研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 67-69.

(Er₂O₃)加入 36 mL 水和 6 mL 盐酸(36%~38%),在油浴中反应,得到稀土氯化物。取 0.32 g 制备的稀土氯化物加入 10 mL 油酸和 11 mL 十八烯,吹氮气除氧,加热反应 30 min,冷却至室温。缓慢加入 10 mL 甲醇[含 200 mg 氢氧化钠(NaOH)和 150 mg 氟化铵(NH₄F)],室温继续搅拌 30 min,尽快加热除甲醇和水。在氮气保护下,迅速加热至 330 ℃并保持沸腾 60 min,自然冷却。乙醇和环己烷离心洗涤后将颗粒分散于甲苯中。采用反相微乳法,利用正硅酸乙酯(TEOS)在碱性环境下水解,在 UCNP 表面通过共价键作用包裹一层二氧化硅(SiO₂)层:取 2 mL 上述 UCNP 加入 9 mL 环己烷,超声溶解。加入 0.5 mL 曲拉通 X-100(TritonX-100)、0.1 mL 氨水(25%~28%),超声 20 min。随后,加入 0.04 mL TEOS,超声 2 min,形成透明溶液,室温搅拌反应 48 h。反应结束后,用乙醇离心清洗,最后分散于水中,得到硅化后的 UCNP(UCNP@SiO₂)。

1.2.2 UCNP 标记 PCT 单克隆抗体和免疫层析试纸条组装 γ-(2,3 环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(GPTMS)具有能与无机材料结合的甲氧基,又有可与有机材料结合的环氧基^[4],本实验利用 GPTMS 使 UCNP@SiO₂ 和生物活性分子相连。称取 2 mg UCNP@SiO₂ 分散于 1 mL 无水乙醇中,加入 20 μL γ-(2,3 环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(GPTMS),在室温下反应 12 h,得到环氧化纳米颗粒(UCNP@SiO₂@GPTMS)。40 μg UCNP@SiO₂@GPTMS 加入 15 μg PCT 单克隆抗体 JG03,在 0.1 mol/L、pH 为 9.0 的硼酸钠缓冲液中结合,室温下震荡 30 min;向上述反应体系中加入 10 % BSA (100 μL)封闭 30 min。用 PBS 洗涤 2 次后重悬于 500 μL PBS 溶液(含 0.1 % BSA、0.25 % 吐温 20)中。

制备好的 UCNP-JG03 结合物用划膜喷金仪喷在玻璃纤维膜上,喷量为 1 μL/cm。0.3 mg/mL 的 PCT 单克隆抗体 JG05 及 0.3 mg/mL 的羊抗鼠 IgG 用划膜喷金仪分别划在硝酸纤维素膜上,构成检测区和质控区,划线量为 1 μL/cm。把样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜及吸水垫分别组装在聚氯乙烯(PVC)胶板上,各个部重叠 2 mm,4 ℃干燥保存备用。

1.2.3 双抗体夹心法模式 利用上转换荧光免疫层析技术(UPT-ICA)定量检测 PCT 抗原。将不同浓度 PCT 抗原标准品 60 μL 滴加到组装好的免疫层析试纸条上,液体通过层析向前移动。反应 10 min,用 UPT 免疫定量分析仪进行扫描检测,用 T/C 表示比值与荧光强度呈正比,从而达到定量检测 PCT 的目的。

1.2.4 上转换纳米荧光免疫层析试纸条的条件优化 以硼酸钠缓冲液的浓度、JG03 抗体标记量、UCNP-JG03 复合物量、捕获抗体 JG05 浓度为因素,设计四因素三水平正交试验,优化试纸条性能,见表 1。选取阳性样本 S=T1/C1 与阴性样本 N=T0/C0 的比

值(S/N)最大时的条件为试纸条最佳工艺条件。最优条件下,将浓度为 22 ng/mL 的 PCT 溶液滴加到样品垫上,以检测线与质控线荧光比值(T/C)趋于稳定时为最佳反应时间。

表 1 四因素不同水平正交试验

水平	硼酸钠浓度 (mol/L)	标记抗体 JG03 量(μg)	UCNP-JG03 复合物量(μL/cm)	捕获抗体 JG05 浓度(mg/mL)
1	0.07	9	0.5	0.1
2	0.10	15	1.0	0.3
3	0.15	21	2.0	0.5

1.2.5 性能评价 PBS 作为空白对照,取 60 μL 用 UPT-ICA 检测,10 min 后用上转换荧光定量分析仪读取试纸条 T 线和 C 线的荧光值,并得出 T/C 的值,检测 10 次。计算出平均值与 3 倍标准差之和,即为检测低限;PBS 配制 PCT 抗原系列标准液(0.05、0.10、0.50、2.20、5.00、10.00、22.00、30.00、44.00 ng/mL),同样检测方法得出 T/C 的值,绘制标准曲线,每种浓度平行测试 3 次;分别测试 0.5、2.0、20.0 ng/mL 的 PCT 抗原的批内精密度和批间精密度,重复 10 次。

2 结 果

2.1 上转换纳米荧光材料修饰前后的表征 UCNP 外貌主要包括立方体和六方体。与立方体相比,六方体 UCNP 具有较强发光强度^[5]。本实验采用溶剂热法制备的 UCNP(NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺)六方体,具有良好的发光强度,其发射光谱波峰为 545 nm。见图 1。用 980 nm 激光器直接激发 UCNP(NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺),肉眼可见绿光。溶剂热法合成的 UCNP 转化为水溶性和表面修饰活性基团有利于抗体等结合。本实验利用反相微乳法将 UCNP 表面包裹一层 SiO₂,能够制备出成分散性较好的水溶性上转换纳米颗粒。改性前 UCNP(NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺)平均直径为 25 nm,改性修饰后的 UCNP(NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺)@SiO₂ 平均直径为 50 nm,见图 2。

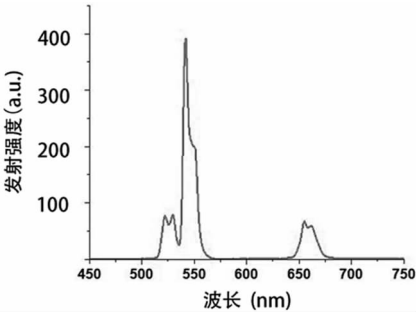
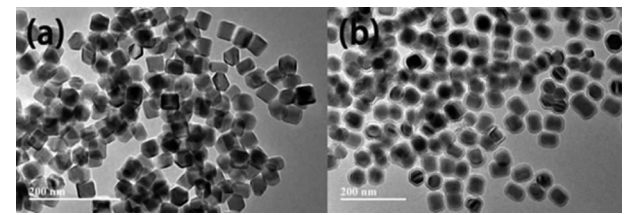


图 1 980 nm 激发光激发下 UCNP 的发射光谱

2.2 上转换纳米发光免疫层析试纸条组装及条件优化 将试纸条各个元件组装,通过正交试验对检测影响因素进行优化。如硼酸钠缓冲液的浓度(A)、JG03 抗体标记量(B)、UCNP-JG03 复合物量(C)、捕获抗体

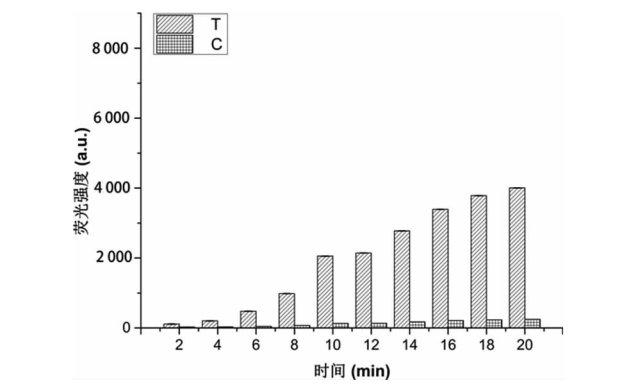
JG05 浓度(D)。检测阳性样本与阴性标本,得出阳性标本荧光比值(S)等于 T1/C1,与阴性样本荧光比值(N)等于 T0/C0,算出信噪比 S/N 值的大小,以 S/N 作为最佳实验条件的依据。当硼酸钠浓度为 0.07 mol/L, JG03 抗体标记量为 15 μ g, UCNP-JG03 复合物喷在结合垫上的量为 1 μ L/cm, 捕获抗体 JG05 浓度为 0.3 mg/mL 时, S/N 最大, 即为最佳检测条件。见表 2。反应时间对检测的影响见图 3、4, 检测 10 min 后, 试纸条检测线(T)与质控线(C)荧光比值进入稳定状态, 因此确定 UPT-ICA 检测 PCT 的时间为 10 min。



注:(a)为改性前 UCNP ;(b)为改性后 UCNP@SiO₂

图 2 改性前后 UCNP 透射电子显微镜

表 2 UCNP 免疫层析试纸条正交试验结果							
项目	A (mol/L)	B (μ g)	C (μ L/cm)	D (mg/mL)	S	N	S/N
1	0.07	9	0.5	0.1	10.24	9.28	1.10
2	0.07	15	1.0	0.3	35.99	23.35	1.54
3	0.07	21	2.0	0.5	55.34	37.00	1.49
4	0.10	9	1.0	0.5	28.82	20.13	1.43
5	0.10	15	2.0	0.1	60.61	49.70	1.22
6	0.10	21	1.0	0.3	17.66	16.31	1.08
7	0.15	9	2.0	0.3	60.09	49.67	1.21
8	0.15	15	0.5	0.5	68.51	61.70	1.11
9	0.15	21	1.0	0.1	50.09	38.26	1.31

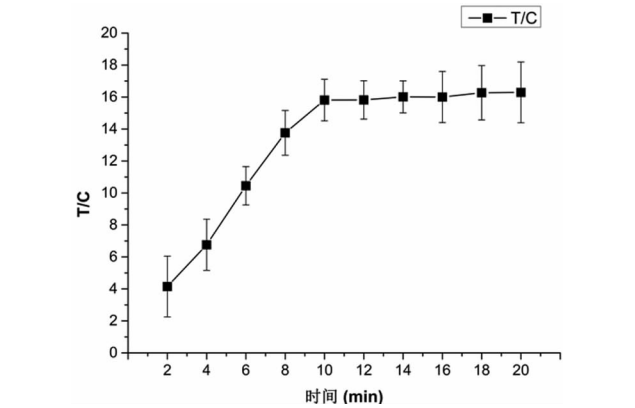


注:T 为检测线;C 为质控线

图 3 UPT-ICA 检测线与质控线荧光强度随时间的关系

2.3 UCNP-ICA 检测性能评价 本实验对所建立的 PCT 上转发光检测技术进行了性能评价。其中检测低限为 0.02 ng/mL;PCT 在 0.05~44.00 ng/mL 范围内与 T/C 呈线性关系,线性回归方程为 $Y =$

$1.621\ 6X + 3.221\ 1 (r^2 = 0.983\ 8)$, 见图 5。同时,在 0.5、2.0、20.0 ng/mL 的批内精密密度 $CV < 10\%$, 批间精密密度 $CV < 13\%$ 。见表 3。



注:T 为检测线;C 为质控线

图 4 UPT-ICA 检测线与质控线荧光比值随时间的关系

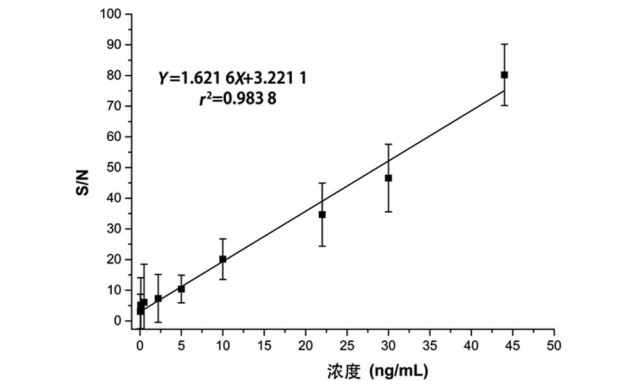


图 5 UCNP 试纸条定量检测 PCT 的标准曲线

表 3 UPT-ICA 的批内和批间精密密度比较 (%)

浓度 (ng/mL)	批内 CV	批间 CV
0.5	9.8	12.6
2.0	6.3	9.7
20.0	5.1	6.8

3 讨 论

本研究探讨了反应时间对检测的影响,随着检测时间的延长,试纸条 T、C 线荧光强度逐渐增强,直到 20 min 后, T、C 线荧光强度仍没有进入稳定状态; T/C 的线型图显示,检测 10 min 后,试纸条 T/C 比值进入稳定状态。实验结果表明,采用 T/C 值为基础的试纸条定量检测模型一定程度上可校正外界环境的影响^[6]。

综上所述, NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ UCNP 发光标记与免疫侧流层析技术结合的便携式生物监测技术是即时快速检测 PCT 的有效手段,具有广阔的临床应用价值。

参考文献

[1] HAMPL J, HALL M, MUFTI N A, et al. Upconverting phosphor reporters in immunochromatographic assays [J]. Anal Biochem, 2001, 288(2): 176-187. (下转第 73 页)

参考文献

[1] SEHGAL C V,BAJWA S J,CONSALVO J A,et al. Clinical conundrums in management of sepsis in the elderly [J]. J Transl Int Med,2016,3(3):106-112.

[2] LIAQ K,ECKL J,GEIGER C,et al. A novel and effective method to generate human porcine-specific regulatory T cells with high expression of IL-10, TGF- β 1 and IL-35 [J]. Sci Rep,2017,7(1):3974-3974.

[3] VENKATESHA S H,DUDICS S,ACHARYA B A. Cytokine-Modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy[J]. Int J Mol Sci,2015,16(1):887-906.

[4] PANDIYAN P,ZHU J F. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3(+) regulatory T cells[J]. Cytokine,2015,76(1):13-24.

[5] PENG G,ZHEN Z S,LV XUE J L,et al. Interleukin-35 in asthma and its potential as an effective therapeutic agent[J]. Mediators Inflamm,2017,59(3):1865-1868.

[6] HATLEY M E,PATRICK D M,GARCIA M R,et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21[J]. Cancer Cell,2010,18(3):282-293.

[7] MEDINA P P,NOLDE M,SLACK F J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma[J]. Nature,2010,46(7):86-90.

[8] THUM T,GROSS C,FIEDLER J,et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. Nature,2008,44(2):980-984.

[9] LEVY M M,FINK M P,MARSHALL J C,et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference[J]. Intensive Care Med,2003,29(4):530-538.

[10] KALBITZ M,FATTAHI F,HERRON T J,et al. Complement destabilizes cardiomyocyte function in vivo after polymicrobial sepsis and in vitro[J]. J Immunol,2016,197(6):2353-2361.

[11] VIGNALI D A,KUCHROO V K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers[J]. Nat Immunol,2012,13(8):722-728.

[12] KOCHETKOVA I,GOLDEN S,HOLDERNESS K,et al. IL-35 stimulation of CD39⁺ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10[J]. J Immunol,2010,184(12):7144-7153.

[13] ZHOU Y L,ZHANG H,LI Y M. IL-35 expression in peripheral blood CD4(+) T cells from chronic hepatitis B virus-infected patients directly correlates with virus load [J]. Cytokine,2015,73(1):169-175.

[14] BAI J,QIU S L,ZHONG X N,et al. Erythromycin enhances CD4 + Foxp3 + regulatory T-cell responses in a rat model of smoke-induced lung inflammation[J]. Mediators Inflamm,2012,79(5):4102-4132.

[15] LOBODA A,SOBCZAK M,JOZKOWICZ A,et al. TGF- β 1/smads and miR-21 in renal fibrosis and inflammation [J]. Mediators Inflamm,2016,83(1):9283-9239.

[16] LATRUFFE N,LANÇON A,FRAZZI R,et al. Exploring new ways of regulation by resveratrol involving miRNAs, with emphasis on inflammation[J]. Ann Sci,2015,1348(1):97-106.

[17] WANG Z P,YAO W,LI K,et al. Reduction of miR-21 induces SK-N-SH cell apoptosis and inhibits proliferation via PTEN/PDCD4 [J]. Oncol Lett,2017,13(6):4727-4733.

[18] HUANG J H,CAO Y,ZENG L,et al. Tetramethylpyrazine enhances functional recovery after contusion spinal cord injury by modulation of MicroRNA-21, FasL, PDCD4 and PTEN expression [J]. Brain Res,2016,64(8):35-45.

[19] ZHANG X M,NG W L,WANG P,et al. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive Oxygen species by targeting SOD3 and TNF α [J]. Cancer Res,2012,72(18):4707-4713.

[20] HASHIMI S T,FULCHER J A,CHANG M H,et al. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation[J]. Blood,2009,114(2):404-414.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-10-06)

(上接第 69 页)

[2] 王猛,刘金玲,密丛丛,等. NaYF₄:Yb,Er 上转换荧光纳米颗粒的合成及表面修饰[J]. 东北大学学报(自然科学),2010,20(2):232-235.

[3] WANG J,SONG H,XU W,et al. Phase transition, size control and color tuning of NaREF₄:Yb³⁺,Er³⁺ (RE = Y,Lu) nanocrystals[J]. Nanoscale,2013,5(8):3412-3420.

[4] 姚海波. 纳米 SiO₂ 的表面改性研究及应用[J]. 化工新型材料,2015,43(8):244-246.

[5] LI Z,ZHANG Y. An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF₄:Yb,Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence[J]. Nanotech,2008,19(34):345606.

[6] 李超辉. 胶体金免疫层析试纸条定量检测猪尿以及猪肉中的克伦特罗残留[D]. 南昌:南昌大学,2014.

(收稿日期:2017-06-20 修回日期:2017-09-21)