文章编号:1000-5404(2009)11-1057-03

论著

量子点快速检测弓形虫IgG抗体方法的建立及初步应用

李 玲,刘琳琳,蒲晓允,纽 琴,余娟春 (第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037)

摘 要:目的 建立一种简便、快速的人弓形虫(Toxoplasma, TOXO)IgG抗体检测新方法,并在临床初步应用。**方法** 应用TOXO抗原包被羧基磁珠作为固相载体,量子点标记羊抗人IgG作为检测抗体,建立TOXO IgG检测方法,同时优化检测条件;对255份临床血清标本进行了检测,并与意大利DiaSorin TOXO IgG ELISA试剂进行比较。**结果** 检测最佳条件为:抗原包被浓度100 μg/ml,量子点标记二抗工作浓度为1∶200,待测血清稀释度为1∶100。本方法的诊断敏感性、特异性分别为93.3%、96.7%,与进口试剂盒的总符合率为96.5%。**结论** 基于量子点标记及免疫磁珠技术检测TOXO IgG,操作简便、快速,具有较高的特异性、敏感性和有较好的临床应用价值。

关键词:量子点;免疫磁珠;弓形虫
中图法分类号:R382.5; R392.11; R446.5 **文献标识码**:A

Establishment and application of quantum dots for TOXO IgG detection

LI Ling, LIU Lin-lin, PU Xiao-yun, NIU Qin, YU Juan-chun (Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a new method for the detection of anti-Toxoplasma IgG antibodies (TOXO IgG) in serum and to evaluate its preliminary significance in clinical application. **Methods** The immunomagnetic beads were prepared by coating Toxoplasma antigen onto the surfaces of magnetic microspheres. The purified conjugate of goat anti-human IgG labeled with QDs was used as the second antibody. Then the TOXO IgG in the serum samples were detected and then the detection conditions were optimized. The serum of 255 pregnant women was assayed with this new method. The results were analyzed and compared with those by the DiaSorin TOXO IgG ELISA kit made in Italy. **Results** The best test conditions were determined as follows: the magnetic microspheres coated by Toxoplasma antigen at the concentration of 100 μg/ml, the working dilution of QDs-labeled rabbit anti-mice IgG at 1∶200, and dilution of serum samples at 1∶100. The sensitivity and specificity were 93.3% and 96.7%, respectively. The coincidence rate with the imported kit reached as high as 96.5%. **Conclusion** The method established in this study is of easy operation, fast reaction, and reliable result, and may be of potential value in clinical application.

Key words: quantum dot; immunomagnetic bead; Toxoplasma

量子点(quantum dots,QDs)又称半导体纳米微晶体,是一种由Ⅱ~Ⅳ族和Ⅲ~Ⅴ族元素组成的纳米颗粒。作为一种新型荧光标记材料,与传统的有机荧光染料相比,量子点具有以下优点:①激发光谱宽且发射光谱窄;②发光颜色可调,只需改变量子点粒径就可获得多色发光;③具有较高的光稳定性,不易被光分解和漂白;④可经受多次激发而不易发生荧光淬灭,荧光强度持续时间长。因此,量子点在免疫生物学和临床检验学等研究中将会有广阔的应用前景[1-4]。

弓形虫病是由弓形虫(Toxoplasma,TOXO)引起的一种全球性人畜共患疾病,大部分人感染弓形虫后无症状,然而TOXO常作为一种机会性感染因子致使免疫功能受损的患者死亡,孕妇感染则可导致流产、死胎及胎儿畸形等严重后果。由于其临床症状十分复杂,要检获病原体而确诊较困难。免疫学检测是诊断TOXO感染的常用手段,目前已建立的TOXO IgG抗体相应检测方法较多,但兼有敏感、简便、特异的方法较少[5-7]。本研究采用量子点标记羊抗人IgG抗体,应用免疫磁珠为固相载体,成功研制出一种新型TOXO IgG抗体快速检测方法,不仅特异性强、敏感性高,操作也更为简便快速。

基金项目:重庆市人口和计划生育委员会资助项目(06204)
Supported by the Program of Chongqing Population and Family Planning Commission(06204)
作者简介:李 玲,女,山西省稷山县人,硕士研究生,检验技师,主要从事免疫检测方面的研究。E-mail:sbccfa@qq.com
通信作者:蒲晓允,电话:(023)68755637
收稿日期:2008-07-23;修回日期:2008-08-30

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 羧基磁珠(25 mg/ml)购自陕西西大北美生物有限公司,CdSe 量子点购自美国 OCEAN NANOTECH 公司,TOXO 重组抗原(2 mg/ml)购自深圳菲鹏生物有限公司,TOXO IgG ELISA 试剂盒购自意大利 DiaSorin 公司,羊抗人 IgG、1-乙基-3-(3-二甲氨基)碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)均购自 Sigma 公司,荧光显微镜(BX51TR-32FB3-E01)为日本 OLYMPUS 公司产品,荧光分光光度仪(RF-5301)为日本 SHIMADZU 公司产品。

1.1.2 血清标本 20 份 TOXO IgG 抗体阳性血清、40 份正常人血清由重庆妇幼保健院提供。255 例孕妇血清标本采集自第三军医大学新桥医院门诊部。

1.2 方法

1.2.1 抗原包被磁珠的制备 聚苯乙烯羧基磁珠用 MES 缓冲液(25 mmol/L,pH 6.0)洗涤 2 次后,用 MES 重新悬浮,校正磁珠浓度至 20 mg/ml。取 500 μl 磁珠悬液分别加入 EDC 和 NHS 共 6 mg,室温下振荡反应 30 min,用 PBS(0.1 mol/L,pH 7.4)洗涤 2 次后,磁分离。取不同浓度的 TOXO 抗原溶液分别与已活化的磁珠进行包被,37 ℃振荡反应 2 h,加入 5 μl 氨基乙醇(1 mol/L,pH 8.0)反应 10 min。用洗涤液缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl-0.05% Tween 20,pH 8.0)清洗 3 次后,加入封闭液(1% BSA,0.01% NaN_3 的 PBS,pH 7.4)封闭 1 h。最后用 PBS(0.01% NaN_3,pH 7.4)缓冲液 500 μl 复悬,4 ℃储存。

1.2.2 量子点标记羊抗人 IgG 的制备 取 20 μl 的羧基量子点溶液加入微量离心管中,然后依次加入 1 ml PBS(0.1 mol/L,pH 6.0)溶液及 EDC、NHS(4 mg/ml)溶液各 100 μl,室温下振荡反应 30 min 后,加入 2 μl 氨基乙醇(1 mol/L,pH 8.0)振荡反应 10 min。将活化了的量子点与一定浓度的羊抗人 IgG 溶液混合,室温下震荡反应 2 h。把反应后的溶液 14 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入去离子水溶解沉淀,重复操作 3 次。调整标记好的产物溶液 pH 值至 7.4,4 ℃储存。

1.2.3 检测方法的建立 将上述制备的不同浓度抗原包被的免疫磁珠各取 10 μl,分别加入 1∶100 倍稀释的 TOXO 阳性血清和阴性对照血清各 100 μl,37 ℃振荡孵育 30 min,洗涤 3 次后加入量子点标记的二抗溶液 100 μl,37 ℃振荡孵育 30 min,用洗涤缓冲液洗涤 3 次,磁分离。用荧光显微镜检测荧光强度。计算临界值(cut off value,COV):COV = 阴性对照荧光强度值 ×2。检测结果 > COV 即判定为阳性,< COV 则为阴性。

1.2.4 阻断实验 随机抽取 5 份 TOXO 抗体阳性血清作为对照组,在加入等量的包被抗原混合后作为实验组,37 ℃反应 30 min,用已建立的方法进行检测。对二者的检测结果进行比较并计算阻断率。

阻断率(%) = (对照组 − 实验组)/对照组 ×100%

1.2.5 与国外 ELISA 试剂盒比较 根据上述实验建立的最佳检测条件,对临床 255 份孕妇血清标本进行检测,同时与意大利 DiaSorin 公司生产的 TOXO IgG ELISA 诊断试剂进行比较,方法参照试剂盒说明书进行。通过比较 2 种方法,计算评价实验室检测方法的 3 项主要指标:

敏感性(%) = 真阳性/(真阳性 + 假阴性) ×100%

特异性(%) = 真阴性/(真阴性 + 假阳性) ×100%

符合率(%) = (真阳性 + 真阴性)/所有被检样品数 ×100%

2 结果

2.1 检测方法的建立

2.1.1 抗原包被的磁珠条件 在制备免疫磁珠的过程中,我们发现抗原的包被浓度及包被时间对抗体的检测结果均有显著的影响。恒定其他检测条件,分别用不同浓度抗原包被的免疫磁珠检测待测血清,结果发现,随着抗原浓度增加,检测灵敏度也逐渐增加,当抗原浓度 > 100 μg/ml 时,荧光强度趋于稳定,甚至会逐渐降低(图 1)。因此,确定包被抗原的最佳工作浓度为 100 μg/ml。在最佳抗原包被浓度时 TOXO IgG 阳性血清检测结果,在荧光显微镜下可见荧光分布均匀且光强度高(图 2),表明磁珠表面抗原包被较好,极大的提高了检测灵敏度。同样,恒定其他检测条件,用不同包被时间的免疫磁珠进行抗体检测,最后确定最佳包被时间为 2 h。

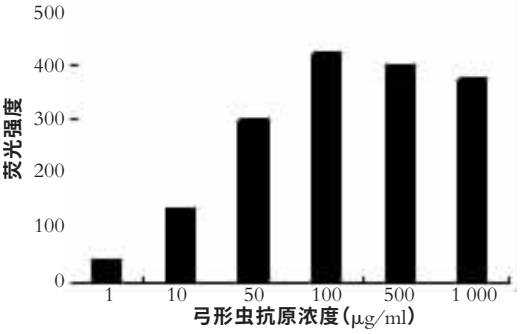


图 1 不同抗原包被浓度对抗体检测的影响

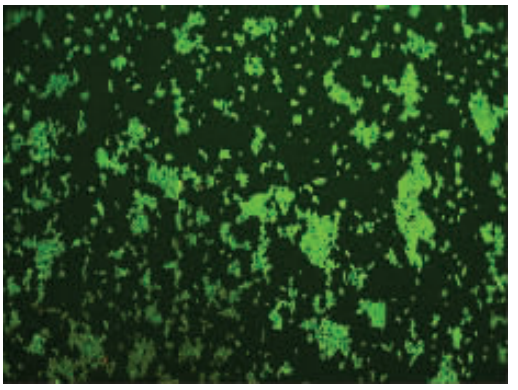


图 2 荧光显微镜观察最佳抗原包被浓度时弓形虫 IgG 阳性检测结果 (×200)

2.1.2 量子点标记羊抗人 IgG 条件的选择 通过对量子点标记羊抗人 IgG 后溶液的荧光强度进行测定,确定二者偶联的最佳反应条件为:pH 6.0,反应温度 37 ℃,反应时间 2 h。在选定的反应条件下,分别用与不同浓度的二抗进行标记,由于包被蛋白对量子点表面具有修饰作用[8],在 0 ~ 40 μg/ml 范围内,溶液荧光强度随着二抗浓度的增加逐渐增强,而当二抗浓度增加到一定值时,蛋白量趋于饱和,增加的蛋白在体系中以游离状态存在,对量子点的荧光发射形成干扰,使荧光强度逐渐降低。因此,确定最佳二抗标记浓度为 40 μg/ml(图 3)。

2.1.3 工作浓度的选择 选用 100 μg/ml 抗原包被浓度的免疫磁珠进行抗体检测。将量子点标记二抗进行 1∶50、1∶100、1∶200、1∶400、1∶800 稀释后,分别与 1∶50、1∶100、1∶500 及 1∶1 000 稀释的阳性血清进行反应,结果表明,待测血清稀释度为1∶100,量子点标记二抗的工作浓度为 1∶200 时,检测效果最佳。

2.1.4　作用时间的选择　　恒定其他检测条件,将免疫磁珠与待测血清、量子点标记二抗之间的作用时间分别设为 5、10、15、20、30、60 min。结果表明,荧光强度随着作用时间的延长逐渐增大,在反应 10 min 后检测结果趋于稳定,整个检测过程仅需 1 h 就可完成,而常规 ELISA 方法检测则需要 3 h。

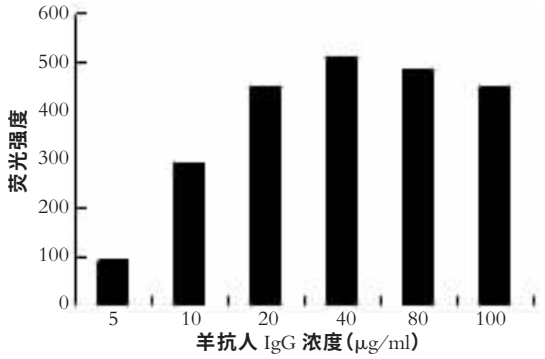


图 3　不同羊抗人 IgG 浓度对量子点标记二抗的影响

2.2　检测效果评价

2.2.1　特异性　　用已建立的操作方法检测,分别检测 4 例类风湿因子、2 例风疹病毒和 3 例巨细胞病毒阳性的血清标本,结果均为阴性,无交叉反应,提示该方法检测 TOXO IgG 具有较好的特异性。

2.2.2　阻断实验　　与对照组检测结果相比,实验组的相应荧光强度值明显降低。5 份 TOXO 抗体阳性标本的阻断率分别为 75%、80%、64%、60%、67%,结果均 >50%,说明二者的结合是特异的。

2.2.3　灵敏度　　将已知 TOXO IgG 阳性混合血清进行一系列稀释后,按所建立的检测方法,分别用 3 批试剂对每个稀释度进行检测,结果表明灵敏度均为 1∶1 000。

2.2.4　稳定性　　将制备好的试剂分别于 4 ℃保存 6 个月及 37 ℃保存 2 周后,与新配置的试剂同时检测 10 份 TOXO IgG 抗体阳性血清、10 份正常血清样品,检测结果一致。

2.2.5　检测结果保存时间　　将检测结果于 4 ℃保存,每间隔 10 天后再次进行检测。研究表明,检测结果在存放 30 d 后,仍能与初次检测保持一致。

2.2.6　与国外 ELISA 试剂的比较结果　　对 255 份临床孕妇血清标本进行了检测,用意大利 DiaSorin TOXO IgG ELISA 试剂与本方法同时比较,结果显示本方法诊断敏感性、特异性分别为 93.3%、96.7%,2 种方法符合率为 96.5%,说明本方法与进口 ELISA 试剂盒法检测结果相似,都有具有较好的特异性和敏感性。

3　讨论

酶联免疫吸附测定法(ELISA)是当前临床诊断 TOXO 病的主要检测方法,但是往往存在操作繁琐、测定时间长、检测灵敏度不高等缺点[9]。此外,目前国内有关 TOXO 抗体诊断 ELISA 试剂盒很多,但由于缺乏统一的质量控制标准,大多存在检测结果符合率低、敏感性和特异性不高等问题。进口试剂虽然检测效果好,但价格昂贵,难以用于群体筛查[10]。因此,建立一种检测结果准确、方法简便、经济实用的检测方法是非常必要的。

本研究将量子点标记和免疫磁珠技术相结合,建立了一种新的 TOXO 抗体快速检测方法。该方法具有以下优点:①具有较高的灵敏度。ELISA 法因采用聚乙烯板作为固相载体,使蛋白结合量有限,检测的灵敏度往往不高。而本方法应用磁珠作为固相载体,具有较大的比表面积,可以包被大量的抗原,再均匀地分散到整个反应溶液中,增加了反应面积,极大的提高了检测灵敏度。②检测过程简便快速。微球具有磁响应性,在磁场作用下可以快速富集,简化了操作过程,整个检测过程仅需 1 h 就可完成,而常规 ELISA 法至少需要 3 h。③检测结果有效保存时间长。量子点作为一种新型荧光标记物,具有普通荧光物质无法比拟的光学特性,其最大特点是可经受多次激发而不易发生荧光淬灭,荧光强度持续时间长。本方法的检测结果在存放 30 d 后,仍能与初次检测保持一致,有利于结果的复查,而 ELISA 法在加酶反应底物显色后,需要在 30 min 内观察结果。除上述优点之外,量子点还具有发光颜色可调,可进行多色标记的特点,在开展多指标同步检测的研究中将会有良好的应用前景。

综上所述,本研究建立的新型 TOXO 抗体检测方法,不仅检测结果可靠,具有较高的灵敏度和很好的特异性,操作也更为简便快速。通过与进口试剂盒对 255 份临床血清标本的检测结果进行比较,得出二者符合率为 96.5%,说明本方法具有较高的诊断价值,可适用于广大人群 TOXO 抗体的筛查,值得推广使用。

参考文献:

[1] Corr S A, Rakovich Y P, Gun'ko Y K, *et al*. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications[J]. Nanoscale Res Lett,2008,3(3):87 – 104.

[2] Diltemiz S E, Say R, Buyuktiryaki S,*et al*. Quantum dot nanocrystals having guanosine imprinted nanoshell for DNA recognition[J]. Talanta,2008,75(4):890 – 896.

[3] Mulder W J, Koole R, Brandwijk R J, *et al*. Quantum dots with a paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe[J]. Nano Lett,2006,6(1):1 – 6.

[4] Smith A M, Dave S, Nie M, *et al*. Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2006, 6(2): 231 – 244.

[5] 苑文英. 弓形虫研究进展[J]. 河北职工医学院学报,2004, 21(4): 42 – 44.

[6] 蒋守富, 张述义, 潘彩娥, 等. 5 种市售弓形虫抗体检测试剂盒的评价[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003,19(1):97 – 99.

[7] 段建华,邓家芬,夏丽莎,等. 孕妇弓形虫感染的 IgM、IgG 和 IgA 抗体检测[J]. 第三军医大学学报, 2000, 7(22): 709 – 710.

[8] 杨冬芝,孙世安,陈启凡,等. CdSe 量子点与蛋白质的作用研究[J]. 激光生物学报,2007,16(5):528 – 531.

[9] 王兰兰. 临床免疫学和免疫检验[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:87 – 88.

[10] 于恩庶, 甘绍伯. 对国内几种弓形虫 IgG 抗体检测试剂盒的再评估[J]. 中国人兽共患病杂志,2001,17(4):104 – 108.

(编辑　张　维)