

· 论 著 ·

量子点荧光探针用于汉坦病毒重组抗原的检测

陈 琼^{1,5}, 郑锦峰², 孙军红³, 姚苹苹⁴, 王 洁¹, 李 晶⁵, 邓小昭⁵, 王长军⁵, 朱函坪⁴, 张 云^{1,5}

[摘要] **目的** 应用量子点荧光探针检测汉坦病毒(Hantavirus, HV)重组抗原。 **方法** 合成水溶性量子点荧光纳米颗粒,并在其表面修饰 G 蛋白和 anti-HV 抗体作为量子点荧光探针,对 HV 重组抗原进行检测并优化检测条件。 **结果** 量子点与抗体的最佳偶联条件:pH 6.0、反应时间 2 h、抗体浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 。用本方法检测 HV 重组抗原的最低检测值为 5 ng/ml。 **结论** 该探针能有效的识别 HV 抗原,且操作简便快速,为 HV 重组抗原的检测和肾出血热综合征的诊断提供了新方法。

[关键词] 量子点荧光探针;汉坦病毒;重组抗原

[中图分类号] R446.621 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)06-0483-04

Detection of recombinant Hantavirus antigens by using water-solubility quantum dots fluorescent probe

CHEN Qiong^{1,5}, ZHENG Jin-feng², SUN Jun-hong³, YAO Ping-ping⁴, WANG Jie¹, LI Jing⁵, DENG Xiao-zhao⁵, WANG Chang-jun⁵, ZHU Han-ping⁴, ZHANG Yun^{1,5}. 1. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 2. Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 3. Division of Health, Department of Joint Logistics, Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 4. Zhejiang Center of Disease and prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China; 5. Medical Institute of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To detect recombinant Hantavirus antigens by using a quantum dots (QDs) fluorescent probe. **Methods** The probe of water-solubility QDs fluorescence nanoparticle was synthesized and modified with protein G and anti-HV Antibodies. We detected recombinant Hantavirus antigens by probe combining immune method, and optimized the detecting conditions. **Results** The optimum reaction time, pH and goat antibodies concentration for conjugating the QDs were 2 h, 6.0, and 20 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The limit of detection of recombinant antigens was 5 ng/ml. **Conclusion** The fluorescent probe could effectively recognize HV antigens. The method was specific, sensitive and convenient. We developed a new method for HV antigens detection.

[Key words] quantum dots fluorescent probe; Hantavirus; recombinant antigens

汉坦病毒(Hantavirus, HV)所引起的肾出血热综合征(hemorrhagic fever with renal syndromes, HFRS)和汉坦病毒肺综合征(hantavirus pulmonary syndrome, HPS)是全世界流行的病毒性传染病^[1]。我国是世界上受其危害最严重的国家,近十年来年发病例数稳定在 4 万~6 万例,占世界报道病例数

90% 以上^[2]。HV 的检测方法已有报道,如传统免疫荧光分析、HV-IgM 捕捉酶联免疫吸附实验(ELISA)法、RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)法等,然而均存在一些方法学上的问题。建立快速简便、安全、高敏感性和特异性的 HFRS 血清学诊断新方法有其重要意义。

针对传统检测方法中所存在的问题,结合新兴纳米材料量子点优异的光谱性能^[3-6],本研究利用性能优异的量子点荧光纳米颗粒(QDs),在其表面修饰 G 蛋白(protein G, PG)和 anti-HV 抗体,得到 QDs-PG-IgG 偶联复合物,作为量子点荧光探针,成功地对 HV 抗体进行了检测,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 仪器:荧光分光光度计(F700,

基金项目: 国家自然科学基金(81171609);浙江省自然科学基金(Y205749)

作者简介: 陈 琼(1971-),女,安徽定远人,硕士研究生,副主任技师,从事军队卫生学研究

作者单位: 1. 210029 江苏南京,南京医科大学公共卫生学院;2. 210002 江苏南京,南京军区南京总医院营养科;3. 210016 江苏南京,南京军区联勤部卫生部;4. 310051 浙江杭州,浙江省疾病预防控制中心;5. 210002 江苏南京,南京军区疾病预防控制中心

通讯作者: 姚苹苹, E-mail: pingpingyao@yahoo.com.cn; 张 云, E-mail: zhangyun111@sohu.com

日本 Hitachi 公司)、荧光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)、台式冷冻多功能离心机(22R, 美国 Beckman 公司)、紫外/可见分光光度计(DU800, 美国 Beckman 公司)。试剂: CdTe 羧基量子点(QDs)、碳化二亚胺(EDC, 分析纯)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 分析纯)、聚乙二醇(PEG)、fisher 盖玻片均由东南大学惠赠; 汉坦病毒重组抗原购于 ProSpec 公司; PG、小鼠 anti-HV 抗体购于 sigma 公司; 用于鉴别对照的 FITC 标记的小鼠 anti-HV 抗体购于百斯凯公司。

1.2 量子点的纯化 QDs 粗品溶液中, 过量的巯基乙酸以游离形式存在, 对后续的表面功能化修饰会产生一定的影响。为了更好地与 PG 和羊抗人 IgG 进行连接, 先用凝胶过滤层析法对量子点粗品溶液进行初步纯化, 采用葡聚糖凝胶 G-25 中颗粒作为填料, 以超纯水为洗脱液, 去除游离的巯基乙酸。再用超速离心机, 离心半径 8 cm, 37500 r/min 离心 2 h, 可见明显橘色荧光沉淀, 得到浓缩纯化 QDs^[7]。

1.3 表面偶联 PG 的 QDs 荧光探针的制备 采用 EDC 连接法在 QDs 表面修饰 PG, QDs 表面的羧基首先被 EDC 活化, 接着与 NHS 反应生成活泼酯; 活泼酯易与含伯胺的分子反应, 从而将 PG 修饰到 QDs 表面。再加入纯化的小鼠 anti-HV 抗体, 使得抗体的 Fc 端和 PG 的 $\beta 2$ 区域紧密结合, 得到 QDs-PG-Ab 偶联复合物^[8]。具体步骤如下:

1.3.1 将纯化后的羧基量子点溶液与 EDC 和 NHS 混合(1:100:200, 摩尔比), 即 0.1 ml 的 QDs (60 μM) 中加入 10 μl 的 EDC 和 10 μl 的 NHS, 以 PBS 为反应介质(pH=7.4), 磁搅拌 30 min, 室温活化。

1.3.2 活化后, 在反应管中加入 10 ng PG, 磁搅拌 30 min, 使得 PG 的氨基端和 QDs 的活化羧基端反应生成酰胺键。室温静置 2 h。为去除游离的 EDC 和 NHS 等小分子物质, 以半径 8 cm、5000 r/min 离心 10 min, 再溶于 PBS 中并透析 8 h 进一步纯化。

1.3.3 在 QDs-PG PBS 溶液中按 1:1 的摩尔比加入纯化的小鼠 anti-HV 抗体, 磁搅拌 2h, 使 Ab 的 Fc 端和 PG 的 $\beta 2$ 区域紧密结合, 透析 8 h, 进一步纯化, 便得到 QDs-PG-Ab 复合物。

1.4 QDs 荧光探针对 HV 重组抗原的检测^[9]

1.4.1 在醛基化处理过的玻片表面滴加梯度稀释的汉坦病毒重组抗原, 每组 10 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜包被。

1.4.2 弃去抗原液后, 用 PBS 洗涤玻片 3 次, 每次 5 min, 氮气吹干玻片后, 滴加 PEG 封闭, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。

1.4.3 去封闭液, 实验组每组加梯度稀释的 10 μl QDs-PG-Ab 复合物, 对照组加 PBS 缓冲液, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。

1.4.4 弃去抗体后, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 氮气吹干, 封片后荧光共聚焦显微镜下成像观察。并用同样的方法采用 FITC 标记的小鼠 anti-HV 抗体对 HV 重组抗原进行鉴别实验。

2 结果

2.1 QDs 荧光探针的光谱性能 QDs 的吸收光谱峰形窄而对称, 表明 QDs 具有非常优良的光谱性能(图 1)。标记前 QDs 溶液的吸收峰在 575 nm 处, 标记后 QDs 荧光探针的吸收峰位于 620 nm, 虹移了 45 nm。引起发射峰位变化的原因是由于在交联剂 EDC 的作用下, QDs 表面的羧基与 PG 的氨基共价结合, 由于 PG 是个大分子蛋白质, 在一个分子上可连接多个 QDs, QDs 间距离缩短, 粒子间偶极与偶极的相互作用增加, 使其 Stokes 位移增大, 所以其发射光谱对于 QDs 的发射光谱发生了虹移^[10]。而量子点溶液和量子点荧光探针的发射光谱的半峰宽基本不变, 表明在标记过程中 QDs 之间没有发生团聚, 分散性较好。

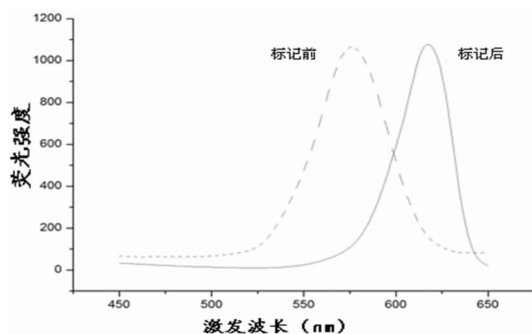


图 1 标记前后 QDs 溶液的荧光吸收光谱

2.2 QDs 与抗体偶联条件的选择 通过测定 QDs 与抗体偶联后溶液的荧光强度, 确定二者偶联的最佳反应条件。实验结果表明, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 选用不同 pH 值的 PBS 缓冲液进行量子点和抗体的偶联反应, 在 pH 值为 6.0 时, 荧光强度增幅最大(图 2), 且在反应 2 h 后荧光强度最稳定。在确定反应时间和缓冲液 pH 值的条件下, 采用不同浓度的小鼠 anti-HV 抗体与量子点进行偶联反应, 结果表明, 在 0 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 随着抗体浓度的增加荧光强度增大, 此后荧光强度趋于稳定不再增加, 最佳抗体标记浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (图 3)。

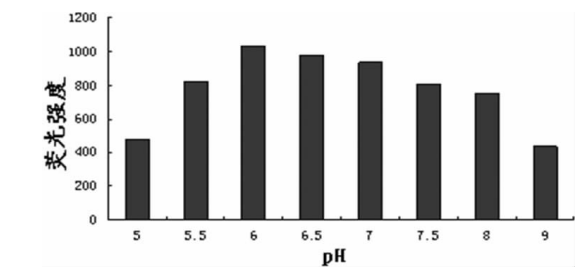


图2 pH 值对 QDs-PG-IgG 复合物的影响

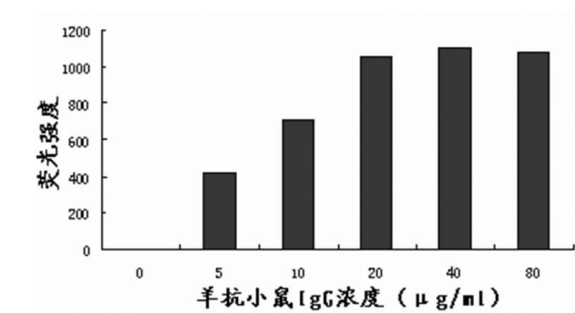


图3 小鼠 anti-HV 抗体浓度对 QDs-PG-IgG 复合物的影响

2.3 QDs 荧光探针对 HV 重组抗原的最低检测值
在抗体足量的前提下,将 HV 重组抗原稀释建立系列浓度 (10 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、500 ng/ml、1 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml),分别用新建的量子点标记条件对每个稀释度检测。测得阴性对照均值为 67,空白对照均值为 43。以阴性对照均值 2 倍 + 空白对照均值求得 cut off 值为 177,以此为标准判读荧光数据。根据不同浓度的标准 HV 重组抗原和其荧光强度值绘制标准曲线(图 4)。

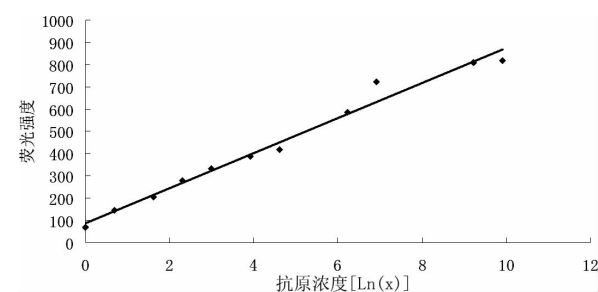


图4 HV 抗原浓度的标准曲线

量子点荧光检测体系的回归方程为 $y = 78.957\ln(x) + 86.28$, 相关系数 (r) = 0.9815 ($P < 0.05$),显示荧光强度与待测抗原浓度呈正相关。QDs 荧光检测体系最低检测值为 5 ng/ml,而用于鉴别对照的 FITC 荧光体系为 20 ng/ml。

2.4 特异性实验 用 QDs 荧光探针法对已知乙肝重组抗原 (HBsAg) 进行特异性实验,只有 HV 重组抗原组呈阳性有荧光结果,HBsAg 组和对照组均为阴性,证明该方法特异性好,与 HBsAg 无交叉反应。

2.5 准确性实验 500 ng/ml 的标准汉坦病毒抗原 20 次重复检测后,平均荧光强度值为 568,根据回归方程计算出真值为 577,偏倚系数为 1.56%。

2.6 重复性实验 批内和批间重复性实验的结果见表 1,批内偏倚系数 (CV) 均值为 9.2%,批间 CV 均值为 10.1%。

表 1 重复性测定结果

| 实验 | 100 ng/ml | 500 ng/ml | 1 μg/ml |
|-----------------|-----------|-----------|----------|
| 批内 (n = 10) | | | |
| $\bar{x} \pm s$ | 415 ± 42 | 568 ± 59 | 734 ± 57 |
| CV (%) | 10.1 | 10.3 | 7.8 |
| 平均 CV (%) | | 9.2 | |
| 批间 (n = 10) | | | |
| $\bar{x} \pm s$ | 408 ± 48 | 561 ± 60 | 720 ± 63 |
| CV (%) | 11.8 | 10.9 | 8.7 |
| 平均 CV (%) | | 10.1 | |

3 讨 论

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^[11-13]:发射光谱窄而对称、单色性好,荧光信噪比高,抗荧光猝灭性强。而且标记方法十分简单,只需简单离心就可对标记产物进行纯化^[14]。本实验采用以 protein G 为“桥”的偶联法制作荧光探针,比传统的静电力偶联法更稳定。

本研究将量子点标记和间接免疫荧光检测技术相结合,制备了检测 HV 感染的量子点荧光探针。本方法采用 EDC 交联法,以 HV 重组抗原片为固相载体,以 QDs-PG-IgG 复合物为二抗检测 HV 抗原,将量子点标记技术应用于汉坦病毒感染血清学检测。该方法具有良好的灵敏度和特异性,且光稳定性强,操作简便、快速,临床应用前景广。在此研究基础上,可利用量子点改变材质和粒径大小即可获得不同发射波长荧光的特性,为选用不同抗体标记多种量子点检测多种抗原^[15],开拓快速同步检测多种病原体抗原的新技术。

【参考文献】

[1] Heyman P, Vaheri A, Lundkvist A, et al. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009, 7 (2): 205-217.

[2] 张永振,肖东楼,王 玉,等. 中国肾综合征出血热流行趋势及其防制对策[J]. 中华流行病学杂志 2004, 25(6): 466-469.

[3] 孟 磊,宋增璇. 量子点在生物医学中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(2): 185-187.

[4] Goldman ER, Anderson GP, Tran PT, et al. Conjugation of lumines-

- cent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays [J]. Anal Chem, 2002, 74(4): 841-847.
- [5] Wu H, Liu GD, Wang J, et al. Quantum-dots based electrochemical immunoassay of interleukin-1 α [J]. Electrochem Commun, 2007, 9: 1573-1577.
- [6] Anderson RE, Warren Chan WC. Systematic investigation of preparing biocompatible, single, and small ZnS-Capped CdSe quantum dots with amphiphilic polymers [J]. ACS Nano, 2008, 2(7): 1341-1352.
- [7] Jesse MK, Warren CW. Quantum Dots in biological and biomedical research: recent progress and present challenges [J]. Adv Mater, 2006, 18: 1953-1964.
- [8] Zeng QH, Zhang YL, Song K. Enhancement of sensitivity and specificity the fluoroimmunoassay of Hepatitis B virus surface antigen through "flexible" coupling between quantum dots and antibody [J]. Talanta, 2009, 80(1): 307-312.
- [9] 姚仁南, 张建辉, 陈复兴, 等. 丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂的初步应用 [J]. 东南国防医药, 2008, 10(3): 168-169.
- [10] Yu WW, Chang E, Drezek R, et al. Water-soluble quantum dots for biomedical applications [J]. Bioch Biophys Res Commun, 2006, 34(8): 781-786.
- [11] Hild WA, Breunig M, Goeperich A. Quantum dots-Nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting [J]. Eur J Pharmac Biopharmac, 2008, 68(2): 153-168.
- [12] Ding S, Chen J, Jiang H, et al. Application of quantum dot-antibody conjugates for detection of sulfamethazine residue in chicken muscle tissue [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(17): 6139-6142.
- [13] Jiang DF, Wang L, Jiang W. Quantitative detection of antibody based on single-molecule counting by total internal reflection fluorescence microscopy with quantum dot labeling [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 634(1): 83-88.
- [14] 孙应明, 罗颂椒. 免疫荧光法观察正畸大鼠牙周 P 物质神经纤维变化的研究 [J]. 东南国防医药, 2006, 8(4): 249-250.
- [15] Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents [J]. Anal Chem, 2004, 76(3): 684-688.
- (收稿日期: 2012-07-30; 修回日期: 2012-09-03)
(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

· 短 篇 ·

手术标本安全管理的持续质量改进

许凤燕, 蒋玉娣, 鲍磊

[关键词] 手术标本; 安全管理; 持续质量改进
[中图分类号] R197.32 [文献标志码] B
[文章编号] 1672-271X(2012)06-0486-02

持续质量改进(CQI)是在全面质量管理的基础上发展起来的,更加注重过程管理和环节质量控制的一种质量管理理论。我科从2010年5月起,应用持续质量改进方法对手术病理标本的保存和送检进行改进,取得了满意效果。

1 检查分析标本安全管理中存在的问题

1.1 手术标本处理不规范 包括手术标本未放固定液或固定液未浸过标本,标本袋漏液使标本自溶;同一患者多个标本固定在同一标本袋中,无法做出准确的病理诊断^[1]。

1.2 申请单、登记本及标本袋标签填写 病理申请单一般是手术医生在术前部分填写,术后补充填写完整;部分申请单不是术者或者第一助手亲自填写,对术中所见及手术切取部位描写不够详细,给诊断造成困难^[2]。

1.3 病理标本交接制度不健全 与病理科之间未建立有效地登记交接制度,造成相互推责。

1.4 手术标本丢失 缺少“逢切必检”的观念,或其他原因造成标本随垃圾处理或送检途中不慎丢失^[3]。

1.5 电话报告 用电话报告的快速病理诊断易误传结果。

2 建立目标、制定改进方案

2.1 建立目标 制定和完善标本管理制度和送检流程,从每一个细节,每一个环节着手,杜绝差错事故发生。

2.2 制定改进方案 成立由护士长负责的持续质量改进小组,共同探讨存在的标本管理缺陷,制定新的标本管理制度,设计常规病理和快速病理标本送检登记本,规范送检流程,并组织全科护理人员对各制度、流程进行培训。护士长或指定负责人监控制度、流程的执行情况,发现问题及时处理。

2.2.1 建立常规病理和快速病理送检本 内容包括:日期、科室、手术间号、患者姓名、ID号、标本名称与件数、巡回护士签名、手术医生签名、病理送检员签名、病理科医生签名等。

2.2.2 规范送检流程 ①常规病理标本:凡是在手术中切取下来的标本,均应视为病理标本妥善保管,洗手护士向手术医生问清标本名称及切取部位后及时交给巡回护士,巡回护士再次核对后将标本装入标本袋内,并在标本袋上记录患者姓名、科室、床号、住院号、ID号、标本名称及切取部位,手术结束后巡回护士、洗手护士和手术医生三方进行标本名称和数量的交接,手术医生在手术清点记录单上签收标本件数及签名,并将病理申请单和标本送至标本间,在病理标本送检本上进行登记和签名。总管护士对标本进行核对,包括标本袋上的标签、病理申请单、病理标本送检本三者核对正确

(下转第496页)