

量子点标记的斑点免疫渗滤分析定量检测 cTnI

范佳^{1,3}, 宋健², 毕丽荣⁵, 周广宇⁵, 张皓⁴, 魏景艳^{1,3}, 杨柏⁴

(1. 吉林大学药学院, 2. 电子科学与工程学院, 3. 分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130021;
4. 吉林大学化学学院, 长春 130012; 5. 吉林大学中日联谊医院, 长春 130033)

摘要 利用量子点良好的光谱特征和光化学稳定性, 结合免疫分析技术, 对心肌钙蛋白 I (cTnI) 特异性进行定量检测. 用量子点标记 cTnI 的单克隆抗体(2F11), 通过 SDS-PAGE 电泳证明标记成功. 斑点免疫膜渗滤法证明标记后的 2F11 仍具有良好的生物学活性, 再将标记并纯化后的 2F11 与 NC 膜上不同浓度的 cTnI 进行免疫反应, 使用 ImageMaster 图像分析软件对膜上荧光斑点图像进行定量分析. 应用此方法测得 cTnI 的浓度和斑点处相对荧光值有良好的线性关系 ($R^2 = 0.9966$), 最低检出值为 120 ng.

关键词 心肌钙蛋白 I; 特异性抗心肌钙蛋白 I 单克隆抗体; 斑点免疫渗滤; 量子点

中图分类号 O627.73

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)11-2180-04

半导体纳米粒子(又称半导体量子点, Quantum dot, 简称 QD)是一种由 II ~ VI 和 III ~ V 族元素组成的纳米颗粒(如 CdSe, CdTe, ZnSe, InP, InAs 等), 具有良好的光谱特征和光化学稳定性. 自 Alivisatos^[1] 和 Nie^[2] 分别完成了 QD 对生物分子的标记后, 量子点在生物技术中的应用受到越来越多的关注. 与传统的标记免疫分析试剂相比, 量子点的发射光是有机荧光染料(如罗丹明 6G)的 20 倍, 稳定性大于 100 倍^[2], 可以经受反复多次激发, 而不易荧光猝灭; 发射峰大小均匀, 为对称的高斯分布, 而荧光染料峰为对称的正态分布, 且有红移拖尾; QD 作为标记物对生物大分子的活性无伤害^[3], 而且 QD 与生物大分子的偶联方法和方式相对比较单一. 因此, 在免疫生物学和临床检验学等领域, 量子点标记这种新型荧光定量检测技术具有广阔的应用前景^[4~10].

肌钙蛋白(Troponin, Tn)是组成横纹肌细丝的结构蛋白, 其亚单位 I, T, C 组成的复合物在肌肉收缩和舒张过程中起重要作用. 其中, 心肌钙蛋白 I(Cardiac troponin I, cTnI)是一种心肌的特异性蛋白. 当心肌细胞受到损伤后, cTnI 先于其它生化指标快速进入血液, 随着损伤的加重, 其在血液中的浓度不断升高, 形成较长的时间窗. 大量研究表明, cTnI 已被证实是心肌细胞损伤最特异和最敏感的血清标志物之一^[11]. 因此, 快速、敏捷且准确检测 cTnI 具有重要的临床意义.

本文在提纯 cTnI 和制备特异性抗 cTnI 单克隆抗体(2F11)基础上, 采用水相合成 CdTe 量子点标记 2F11, 研究了标记前后量子点光谱变化和标记后 2F11 的生物活性; 应用斑点免疫渗滤法并结合斑点图像分析软件 ImageMaster, 在硝酸纤维素膜上成功地对 cTnI 进行定量检测. 此方法快速, 简单, 直观, 灵敏度较高, 为进一步建立量子点标记的定量免疫分析法检测 cTnI 及其它抗体或抗原奠定了基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)为上海西宝生物技术有限公司产品; Sephadex G-75, GE Healthcare 公司产品; 牛血清白蛋白(BSA), 华美生物工程公司产品. 日本岛津 UV-2550 型紫外分光光度计; 日本岛津 RF-5301PC 型荧光分光光度计.

收稿日期: 2008-11-24.

基金项目: 吉林省科学技术厅基金(批准号: 200705380)、中国博士后基金(批准号: 2004036395)和吉林大学本科生创新性实验计划(批准号: 2007C3268)资助.

联系人简介: 魏景艳, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究. E-mail: jingyanwei@yahoo.com.cn

1.2 实验过程

1.2.1 水溶性量子点 CdTe 的制备 用巯基丙酸包覆的 CdTe 纳米粒子的制备方法参见文献[12,13].

1.2.2 心肌钙蛋白 I(cTnI)的提纯及鉴定 方法见文献[14,15].

1.2.3 特异性抗 cTnI 单克隆抗体的制备 方法见文献[16,17].

1.2.4 CdTe 量子点与 2F11 的标记反应 在 PBS 缓冲体系(pH = 8.0, 0.01 mol/L)中,依次加入水溶性量子点 CdTe(300 μ L), EDC(25 μ L, 0.1 mol/L)和 NHS(50 μ L, 0.1 mol/L),并加入 5 μ L 2F11(20 μ g/ μ L),于 30 $^{\circ}$ C 摇床中避光反应 1.5 h.

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳验证 CdTe 与 2F11 的偶联 用不连续的 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 CdTe 与 2F11 的偶联. 样品 1 为偶联前的 2F11, 样品 2 为偶联后的 CdTe-2F11 溶液, 样品 3 为未加偶联剂 NHS 和 EDC 的 CdTe 与 2F11 混合液, 样品 4 为游离的 CdTe 量子点. 电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色液对凝胶进行染色,再用脱色液脱色.

1.2.6 CdTe-2F11 吸收光谱和荧光光谱的测定 方法参见文献[18].

1.2.7 斑点免疫渗滤法验证 CdTe-2F11 与 cTnI 的免疫反应 在硝酸纤维素薄膜(NC 膜)上直接点样: 0.3 μ g/ μ L 的 cTnI 和 5% BSA 的点样量均为 2 μ L. 晾干后浸泡于磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH = 7.4, 内含 5% BSA)中,封闭未饱和的蛋白结合位点,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,封闭后将膜取出,用 PBS 洗涤.按 1.2.4 节方法制备 CdTe-2F11 溶液,经过 Sephadex G-75 柱层析^[19][洗脱液为 PBS(pH = 8.0, 0.01 mol/L)]纯化得到量子点标记的 2F11 (CdTe-2F11). 将晾干后的 NC 膜再放入纯化后的 CdTe-2F11 液中,于 37 $^{\circ}$ C 摇床避光反应 2 h,最后用 PBS 缓冲溶液洗涤,于紫外灯下观察.

1.2.8 斑点免疫渗滤法定量检测 cTnI 在 NC 膜上直接点样 5 个不同浓度、相同体积的 cTnI 样品,斑点风干后加入 5% BSA 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,将膜上空位点封闭.再将膜取出后用 PBS 洗涤 3 次,放入纯化后的 CdTe-2F11 液中,于 37 $^{\circ}$ C 摇床避光反应 2 h.反应后用 PBS 再洗涤 3 次,于紫外灯下观察并进行图像采集,应用 ImageMaster 图像分析软件对斑点图像进行分析.

2 结果与讨论

2.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳验证 CdTe 与 2F11 的偶联

凝胶电泳图(图 1)上的泳道 1~4 分别对应样品 1~4. 标记前的 2F11 和未加偶联剂的混合液中的 2F11 在电泳中的迁移率相同,而发生偶联反应的样品 2 中的 2F11 的迁移率加快. 没有偶联剂的量子点和抗体即使形成了复合物,可能大部分结合也是靠静电吸附作用,此复合物在变性电泳条件下会被分离成游离的量子点和抗体. 因此从图 1 可见,样品 3 中的 2F11 与未被标记样品 1 的迁移率相同. 如果偶联反应成功,则 CdTe 量子点和抗体之间将形成稳定的共价键,此共价键不受变性电泳的破坏,并且量子点本身带有大量的负电荷,使得标记后的 2F11 所带负电荷远远大于标记前 2F11 所带负电荷,导致迁移率加快. 从图 1 中样品 2 的电泳结果可见,偶联反应后溶液中 2F11 的迁移率加快,因此证明偶联反应成功.

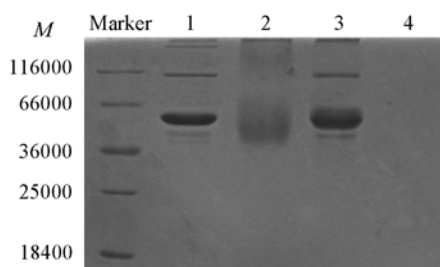


Fig. 1 SDS-PAGE stained by coomassie brilliant blue
Lane 1: 2F11; lane 2: CdTe coupled with 2F11; lane 3: CdTe and 2F11 mixture (without coupling agent); lane 4: CdTe nanoparticles.

2.2 CdTe-2F11 的荧光光谱和吸收光谱分析

从图 2 和图 3 可以看出,标记反应后量子点仍然很好地保持了自身的光学特性,只是发射峰位置红移了 36 nm,吸收值有所增加.

2.3 斑点免疫渗滤法验证 CdTe-2F11 与 cTnI 的免疫反应

膜 1 [cTnI-(CdTe-2F11)] cTnI 印迹处有明显的荧光斑点[图 4(A)],而膜 2 [BSA-(CdTe-2F11)] 在 BSA 替代 cTnI 的印迹处没有荧光斑点. 经 SDS-PAGE 电泳鉴定 CdTe 与 2F11 偶联成功. 图 4(A)表明, 2F11 单克隆抗体被量子点标记后仍然具有特异性结合 cTnI 抗原的免疫活性. 图 4(B)为斑点渗滤法梯

度定量检测 cTnI 的结果, 可见随着 cTnI 浓度的逐渐降低, cTnI 印迹处量子点的荧光强度也逐渐减弱.

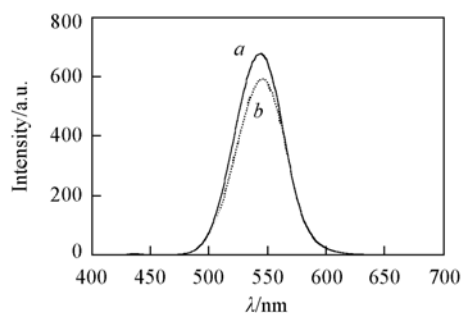


Fig. 2 Fluorescence spectra of CdTe nanoparticles solution (a) and CdTe-2F11 solution (b)

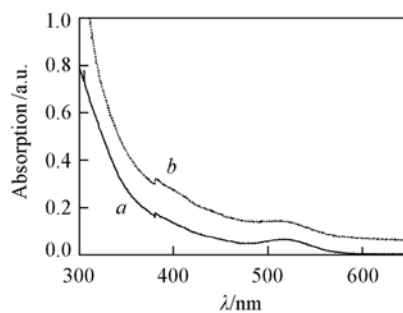


Fig. 3 Absorption spectra of CdTe nanoparticles solution (a) and CdTe-2F11 solution (b)

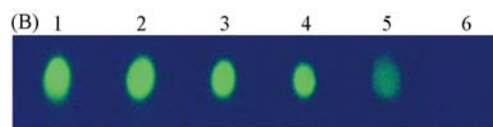


Fig. 4 Verification of immunoreaction between cTnI and CdTe-2F11 by dot immunofiltration assay on NC membrane

(A) Recognizing cTnI dot by CdTe-2F11. Film 1: cTnI (NC membrane) + (QD-2F11); film 2: BSA (NC membrane) + (QD-2F11);
(B) gradient quantitative immunoassay of cTnI.

2.4 荧光显微图像分析

如图 5(A) 所示, 单独的 CdTe 量子点分布均匀, 发光均匀; 在图 5(B) 中, 标记并纯化后的 CdTe-2F11 溶液量子点发生了局部团聚. 这从另一方面解释了上述推测的由于量子点和抗体的共价结合使得量子点发生局部团聚, 从而使量子点间的距离减小, 增加了粒子间的偶极相互作用的结论; 在图 5(C) 中, 标记后 2F11 与 BSA 反应液未发生进一步局部团聚; 而在图 5(D) 中, 标记并纯化后 CdTe-2F11 与 cTnI 的反应液局部团聚更加明显. 比较图 5(C) 和(D) 可见, 局部团聚的增加是由 cTnI 与 2F11 发生了免疫反应所致, 这也从另一个角度说明量子点标记后的抗体 2F11 仍有很好的免疫活性.

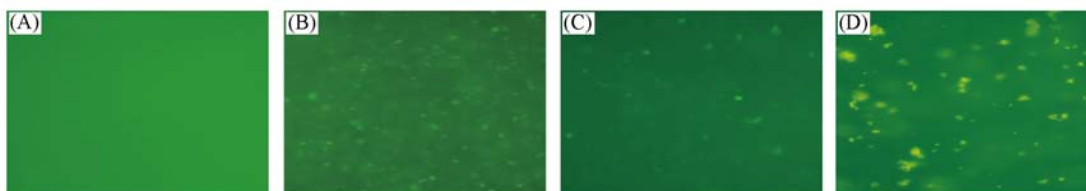


Fig. 5 Fluorescence microscopy images analysis of CdTe nanoparticles labeling

(A) CdTe nanoparticles solution; (B) CdTe-2F11 solution; (C) solution of CdTe-2F11 and BSA; (D) solution of CdTe-2F11 and cTnI.

2.5 cTnI 的定量检测

应用 Image Master 软件分析 NC 膜上量子点斑点的发光强度, 每点的相对光强度值如表 1 所示. cTnI 的质量在 0 ~ 480 ng 内与荧光强度有很好的线性关系 ($R^2 = 0.9966$, 图 6), 最低检出值为 120 ng. 由此可见, 本研究应用的量子点标记免疫分析法, 不但可以较好地保持标记抗体的活性, 而且能直接检测待测抗原样品. 对于含量较低的样品, 可通过增加点样次数和点样体积的方法来提高检出率. 本

Table 1 Relative fluorescence intensity of CdTe-2F11 on the NC membrane of Fig. 5(B) *

Spot ID	$m(\text{cTnI})/\text{ng}$	$c(\text{cTnI})/(\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	Vol. area/a. u.
1	600	0.2	27.2701
2	480	0.16	28.8999
3	360	0.12	20.8170
4	240	0.08	15.4878
5	120	0.04	7.5405
6	0	0	0

* The image of Fig. 5(B) was analyzed by Image Master program.

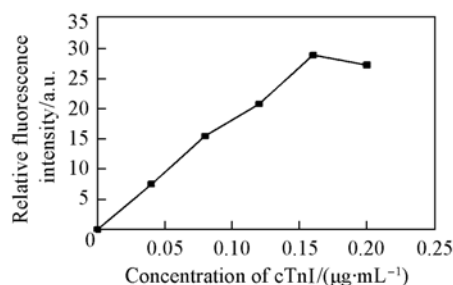


Fig. 6 Relative fluorescence intensity of CdTe-2F11 on the NC membrane with different concentrations of cTnI

法快速, 简便, 结果直观, 灵敏度高, 不需要昂贵的仪器设备, 为量子点在定量免疫分析中的应用提供了可靠的理论依据.

参 考 文 献

- [1] Bruchez M. J., Moronne M., Alivisatos A. P., *et al.*. *Science*[J], 1998, **281**(5385): 2013—2016
- [2] Chan W., Nie S. M.. *Science*[J], 1998, **281**(5385): 2016—2018
- [3] Seydel C.. *Science*[J], 2003, **300**(5626): 1659
- [4] Sun B. Q., Xie W. Z., Yi G. S., *et al.*. *J. Immunol. Methods*[J], 2001, **249**(1/2): 85—89
- [5] Goldman E. R., Anderson G. P., Tran P. T., *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 2002, **74**(4): 841—847
- [6] Wang S. P., Mamedova N., Kotov N. A., *et al.*. *Nano Lett.* [J], 2002, **2**(8): 817—822
- [7] Lingerfelt B. M., Mattoussi H., Goldman E. R., *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 2003, **75**(16): 4043—4049
- [8] Wu X. Y., Liu H. J., Liu J. Q., *et al.*. *Nat. Biotechnol.* [J], 2003, **21**(1): 41—46
- [9] Alivisatos A. P., Gu W., Larabell C.. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* [J], 2005, **7**: 55—76
- [10] Ghazani A. A., Lee J. A., Klostranec J., *et al.*. *Nano Lett.* [J], 2006, **6**(12): 2881—2886
- [11] Barton P., Cullen M. E., Townsend P. J., *et al.*. *Genomics*[J], 1999, **57**(1): 102—109
- [12] Zhang H., Yang B.. *Thin Solid Films*[J], 2002, **418**(2): 169—174
- [13] LIN Zhang-Bi(林章碧), SU Xing-Guang(苏星光), ZHANG Hao(张皓), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2003, **24**(2): 216—220
- [14] WEI Jing-Yan(魏景艳), QIAN Li-Na(钱丽娜), LU Jie(芦杰), *et al.*. *Chin. J. Biologicals(中国生物制品学杂志)* [J], 2002, **15**(5): 29—31
- [15] WEI Jing-Yan(魏景艳), FU Ping-Ping(付平平), SONG Ang(宋昂). *Chin. J. Biologicals(中国生物制品学杂志)* [J], 2000, **13**(4): 218—220
- [16] Wei J. Y., Song D. Q., Bu L. S., *et al.*. *Chem. Res. Chinese Universitis*[J], 2003, **19**(2): 183—189
- [17] WEI Jing-Yan(魏景艳), BU Li-Sha(卜丽莎), DONG Yu-Jun(董玉军), *et al.*. *Chin. J. Laboratory Medicine(中华检验医学杂志)* [J], 2003, **26**(5): 1—3
- [18] SONG Jian(宋健), FAN Jia(范佳), SONG Da-Qian(宋大千), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2009, **30**(10): 1940—1944
- [19] Hua X. F., Liu T. C., Cao Y. C., *et al.*. *Anal. Bioanal. Chem.* [J], 2006, **386**(6): 1665—1671

Dot Immunofiltration Assay for Quantitative Detecting cTnI Using Quantum Dots

FAN Jia^{1,3}, SONG Jian², BI Li-Rong⁵, ZHOU Guang-Yu⁵, ZHANG Hao⁴, WEI Jing-Yan^{1,3*}, YANG Bai⁴
(1. *College of Pharmacy*, 2. *College of Electronic Science and Engineering*, 3. *Key Laboratory of Molecular Enzymology and Engineering, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China*; 4. *College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China*; 5. *China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China*)

Abstract Quantum dots have physical and optical properties that make them useful tools for high-resolution labeling immunoassay. In this work, a rapid and simple method of quantitative immunoassay for Cardiac troponin I (cTnI) was developed with quantum dots-labeled antibodies. The monoclonal antibodies of cTnI(2F11) could be labeled with CdTe quantum dots and the coupled product(CdTe-2F11) were characterized by SDS-PAGE. The result of immunofiltration assay indicates that the CdTe-2F11 maintains the antibody activity. The cTnI at the different concentrations in NC membrane could react with CdTe-2F11 and be detected with ImageMaster to analyze the fluorescence intensity of the immunodotting. The results show that the detection limit of cTnI is 120 ng, and there is a good linear relation between concentration of cTnI and the fluorescence intensity($R^2=0.9966$).

Keywords Cardiac troponin I; Monoclonal antibody to cardiac troponin I; Dot immunofiltration assay; Quantum dot
(Ed.: H, J, Z)