

量子点免疫层析快速定量检测HCG*

杨秋花^{1)**} 王鑫^{2)**} 杨久敏³⁾ 李雪¹⁾ 宋涛¹⁾

宫晓群¹⁾ 张兵波^{4)***} 常津^{1)***}

⁽¹⁾ 天津大学材料学院纳米生物技术研究所, 天津 300072; ⁽²⁾ 天津医科大学总医院, 天津 300052;

⁽³⁾ 天津医科大学基础医学院, 天津 300070; ⁽⁴⁾ 同济大学先进材料与纳米生物医学研究院, 上海 200092)

摘要 近年来, 量子点以其独特的光学性质被广泛应用到医学检测上. 血清中人绒毛膜促性腺激素(HCG)的含量是诊断早期妊娠的常用指标, 也可用于异常妊娠性疾病的早期发现和鉴别诊断. 本文采用超声乳化法制备了高质量的亲水性量子点, 并将其与免疫层析试纸条技术相结合, 在此基础上自主研发了用于试纸条检测的量子点免疫荧光检测仪, 对血清中 HCG 的含量进行了高灵敏度的快速定量检测. 结果表明, 对于血清中的 HCG 含量检测, 最优检测条件为加样体积 50 μ l, 反应时间 15 min, 检测的灵敏度达到 0.85 U/L, 高于商品化的胶体金试纸条. 这种检测技术简单、快速、灵敏, 有望在其他蛋白质类标志物的检测中得到广泛应用.

关键词 量子点, 免疫层析, 现场检测, 人绒毛膜促性腺激素(HCG)

学科分类号 K826.13, K826.2, R44

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00181

近年来, 随着科学技术的不断发展, 在生物医学检测领域涌现出了大量新颖的检测技术和检测设备^[1-9]. 其中, 基于免疫反应的检测技术更是引起了人们的广泛关注, 这是因为免疫反应涉及抗体和抗原间高度互补的立体化学、静电力、氢键、范德华力和疏水力的综合作用, 因而可以达到很高的选择性和灵敏度, 这是其他任何单独一种理化分析技术难以达到的. 目前, 免疫检测技术已经广泛应用到众多相关的领域, 如医学检测、环境监测、食品质量检测以及出入境检验检疫等方面. 自 1959 年 Yalow 和 Berson 首次将放射性同位素与免疫反应相结合发展出放射性免疫检测技术以来^[10], 一系列的免疫检测技术纷纷涌现并不断发展, 如酶联免疫吸附法^[11-14]、荧光免疫检测技术^[15-18]以及化学发光检测技术^[19-22]等. 尽管这些检测技术优点很多, 如特异性好、灵敏度高并且可以进行定量检测等, 但操作都比较复杂, 费时费力, 这些缺点在很大程度上限制了它们的使用范围. 在 20 世纪 80 年代初, 人们发展了一种新型的快速检测技术, 即免疫层析技术. 这种检测技术过程简单、迅速, 不需要专门人员进行操作, 很好地弥补了上述几种检测技术的

缺陷. 自 1990 年 Beggs 等^[23]利用胶体金免疫层析技术检测人绒毛膜促性腺激素(HCG)以来, 胶体金也发展成为免疫层析技术中最常用到的标记物. 但是, 这种检测方法只能进行定性或半定量检测, 极大地限制了它的应用范围^[24-30]. 鉴于此, 人们发展了一系列标记物如乳胶颗粒、磁性纳米粒子、上转换发光以及有机荧光染料等, 以达到可以对待测物进行定量检测的目的^[31-40]. 由于依靠光学系统来检测具有灵敏度高、检测速度快、有望实现高通量检测等优点, 因此采用荧光标记的免疫层析技术得到了广泛关注. 但是传统的有机荧光染料荧光强度不高, 且容易发生光漂白, 影响了检测的灵敏度以及稳定性. 与传统的有机荧光染料相比, 量子点具有很多优点, 比如吸收光谱宽、发射光谱窄且呈高斯

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2012AA022603).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

常津. Tel: 022-27401821, E-mail: jinchang@tju.edu.cn

张兵波. Tel: 021-65983706-819, E-mail: bingbozhang@tongji.edu.cn

收稿日期: 2013-04-25, 接受日期: 2013-08-19

对称、发射波长可以调节, 荧光强度高且稳定等^[41-44]. Zhang 等^[45]将量子点与免疫层析技术结合起来, 并研发了配套的定量检测分析仪, 可以对检测结果进行定量检测, 但是检测过程中的各种参数并没有系统研究, 且定量检测时只选择检测线的荧光强度. 由于实际检测中病人的血清样品差别很大, 对量子点的荧光强度产生很大影响, 因此采用检测线的荧光强度定量会产生较大误差. 为此, 本研究制备了量子点免疫层析试纸条, 在此基础上自主研发了量子点免疫荧光检测仪, 采用检测线与质控线上荧光强度的比值作为参数进行定量, 可以对待测物进行定量检测并有效避免系统误差. HCG 的含量是诊断早期妊娠的常用指标, 也可用于异常妊娠性疾病的早期发现和鉴别诊断, 如妊娠滋养细胞肿瘤、恶性葡萄胎、绒毛膜上皮癌以及男性睾丸畸胎瘤等. 因此我们选择检测血清中的 HCG 含量, 证明这种检测技术的可行性. 由于这种方法简单快速, 可实现现场检测, 有望实现在临床上的应用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂. 硒粉(Se, 99.99%), 氧化镉(CdO, 99.5%), 氧化锌(ZnO, 99.9%), 硫粉(S, 99.98%), 正三辛基膦(TOP, 90%), 正三辛基氧化膦(TOPO, 90%), 油酸(OA, 90%), 普朗尼克 F68, 辛胺(99%)以及聚(叔丁基丙烯酸酯乙基丙烯酸酯甲基丙烯酸)三嵌段共聚物购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 十八胺(ODA, 90%)以及十八烯(ODE, 99%)购自美国 ACROS 公司; 碳二亚胺盐酸盐(EDC)购自上海吉尔生化公司; 羊抗鼠 IgG, 牛血清白蛋白(BSA)和胎牛血清(FCS)购自北京鼎国生物技术有限公司; HCG 单抗由天津博奥赛斯提供.

1.1.2 设备. 紫外-可见分光光度计(Shimadzu UV-2450), 荧光分光光度计(Hitachi F-4500), 透射电子显微镜(TEM, JEOL JEM-100CX II).

1.2 核壳量子点的制备

称取 0.3 mmol 氧化镉, 0.4 ml 油酸和 4 ml 十八烯, 加入三口瓶中, 在氩气氛围中保持 30 min 后加热至 270℃, 保持一段时间至液体为完全澄清状态, 然后冷却至室温. 称取 0.5 g 正三辛基氧化膦和 2.5 g 十八胺, 加入上述混合溶液中. 再通氩气 45 min 后, 将混合溶液加热至 250℃后, 快速注入已经制备好的硒前体的混合溶液(1.8 mmol 硒粉溶解在 2 ml 正三辛基膦里), 保持温度不变反应

10 min, 关闭加热, 继续搅拌冷却至室温. 制备好的 CdSe 核量子点用丙酮洗涤, 于 8 000 r/min 离心分离 30 min, 沉淀物溶于 10 ml 三氯甲烷中. 包壳时, 将分散在三氯甲烷中的核量子点加入到 25 ml 三口烧瓶中, 向其中加入 1.5 g 十八胺和 5 g 十八烯, 通入氩气 30 min 后, 加热至 100℃保持 5~10 min 保证体系中的三氯甲烷完全挥发. 然后加热至 240℃, 依次注入计算好的包壳所用的镉前体、锌前体以及硫前体, 并控制反应时间. 最终得到的 CdSe/CdS/CdS/Cd_{0.75}Zn_{0.25}S/Cd_{0.5}Zn_{0.5}S/Cd_{0.25}Zn_{0.75}S/ZnS/ZnS(7 层壳)核壳量子点用丙酮洗涤, 并通过离心分离.

1.3 亲水性量子点的制备

首先在聚(叔丁基丙烯酸酯乙基丙烯酸酯甲基丙烯酸)三嵌段共聚物上引入一端疏水链, 使其具有一定的双亲性, 具体来说将三嵌段共聚物与辛胺(摩尔比为 1:40)分散于二甲基甲酰胺中, 用 EDC 偶联的方法对共聚物进行疏水化改性, 得到的产物经过透析后冻干备用^[46]. 对量子点进行亲水性改性时, 取 200 μl 量子点的二氯甲烷溶液(6.4×10⁻⁶mol/L)加入到 800 μl 双亲性高分子的二氯甲烷溶液中形成油相, 待充分溶解后, 在超声的过程中将油相加入到 5 ml 的 F68 水溶液中(7 g/L), 并超声 5 min 形成稳定的乳液. 之后, 将二氯甲烷完全挥发后, 产物用双蒸水洗涤纯化.

1.4 免疫量子点的制备

免疫量子点的制备是通过 EDC 活化量子点的羧基, 然后偶联抗体. 偶联时量子点、抗体、EDC 的摩尔比为 1:10:4000, 反应体系为 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L), 将该混合液置于旋转混合架上, 在室温下反应 2 h 后, 离心纯化, 分散在含 2% BSA 的 PBS 缓冲液中, 4℃静置过夜封闭后保存.

1.5 量子点免疫荧光试纸条的组装

首先将划有检测线和质控线的硝酸纤维素膜固定于不干胶底板上, 然后将浸润了量子点抗体复合物的玻璃纤维膜固定于硝酸纤维素膜上, 最后将样品垫和吸收垫固定好, 相互之间重叠区域为 2 mm. 之后采用自动切膜机将其切成 4 mm 宽的试纸条, 并将其装入塑料板中, 最后将做好的试纸条与干燥剂一起装入铝箔袋内密封储存.

2 结果与讨论

2.1 量子点的表征

超声乳化法制备亲水性量子点的过程如图 1a

所示. 首先, 将疏水性的量子点以及双亲性高分子分散在二氯甲烷中形成油相, 将 F68 分散在水中形成水相. 然后在超声的过程中将油相加入到水相中, 并继续超声使溶液形成稳定的乳液. 在这个过程中, 由于乳化剂 F68 以及双亲性高分子的作用, 量子点分散在水相中, 形成很多分散的小胶束. 由于表面活性剂的存在, 为了降低表面张力, 小的油滴趋向于彼此融合形成大的油滴. 在挥发二氯甲烷的过程中, 量子点与双亲性高分子通过分子间疏水力的作用紧密结合在一起形成一个大的纳米团簇^[47].

图 1b 所示为改性后亲水性量子点纳米团簇的透射电镜照片, 由图可以看到改性后纳米团簇粒径分布比较均匀, 约为 50 nm, 且团簇中的量子点并没有发生团聚, 这可能是因为量子点表面含有的疏水配体之间的疏水作用力造成的. 图 1c 所示为利

用激光粒度仪分析改性后亲水性量子点纳米团簇水溶液的粒度分布情况, 由图 1c 分析平均粒径约为 68 nm. 这是因为改性后量子点纳米团簇表面包裹有一层双亲性高分子, 在透射电镜的样品制备过程中, 溶剂被挥发, 因此量子点之间会彼此靠近导致粒径稍微减小. 而粒度仪检测的样品为水溶液, 量子点纳米团簇表面带有羧基基团, 在表面形成双电层, 从而保证量子点纳米团簇之间不会发生团聚, 导致粒径稍微增大^[48].

图 1d 所示为改性前后量子点的荧光发射光谱, 由图可以看到改性后量子点的发射波长(630 nm)几乎没有发生改变, 半峰宽(36 nm)也没有增加, 量子产率稍稍降低(5%), 表明这种改性方法没有使量子点发生团聚, 熟化或者改变量子点表面的折射率, 几乎可以保持量子点原有的优异的光学性能.

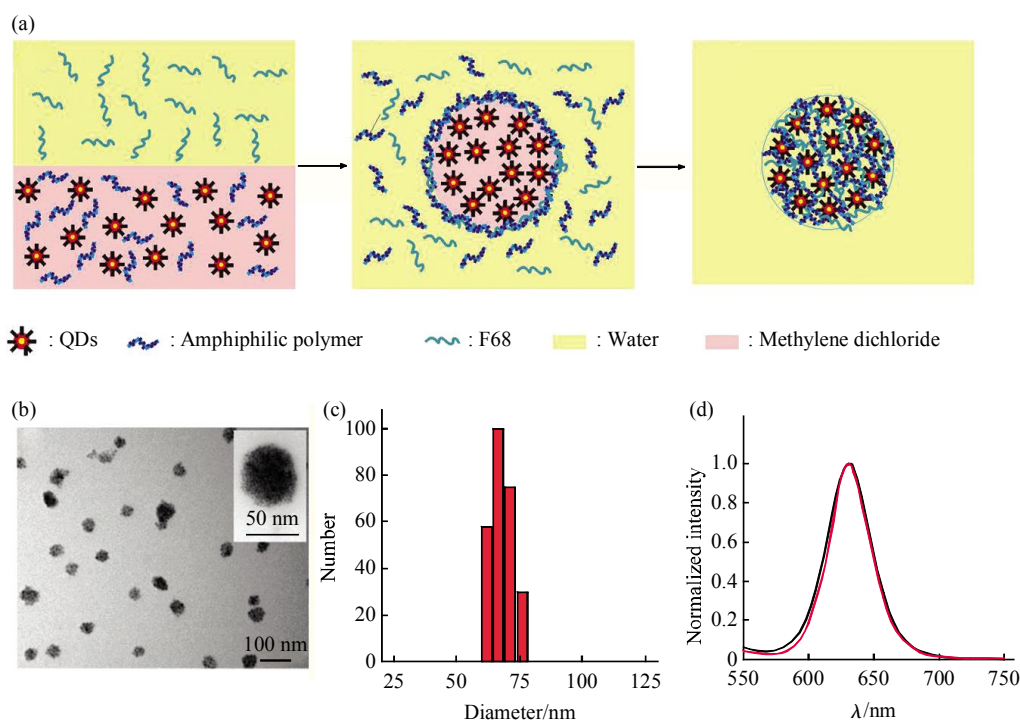


Fig. 1 Characterization of amphiphilic polymer coated QDs

(a) Scheme of the formation of water-soluble QDs in the O/W emulsion system. (b) TEM image of water-soluble QDs. (c) DLS data of the water-soluble QDs. (d) PL spectra of hydrophobic QDs and amphiphilic polymer coated QDs. — : Hydrophobic QDs; — : Hydrophilic QDs.

2.2 量子点免疫荧光试纸条的组装

试纸条的组成部分包括样品垫、结合垫、吸收垫以及硝酸纤维素膜(划有检测线和质控线), 所有部分最后组装到塑料板上, 各组成部分之间重叠的部分可以保证待测液在试纸条上连续流动(图 2a). 根

据在试纸条上发生的特异性免疫反应的不同, 可以分为三大类, 分别是夹心模式、竞争模式以及间接模式. 本研究所采用的是双抗体夹心模式, 利用量子点免疫荧光试纸条检测的基本原理(图 2b), 检测过程如下: 结合垫上固定有免疫量子点, 用

QD-Ab1 表示. 检测线上固定有针对待测抗原的另一种特异性抗体, 用 Ab2 表示. 其中, Ab1 和 Ab2 是针对待测抗原上不同位点的两种单克隆抗体. 质控线上固定有能跟免疫量子点表面抗体即 Ab1 发生反应的二抗, 用 Ab3 表示. 滴加待测液时, 由于在试纸条的另一端固定有吸收垫, 所以在吸水垫的作用下, 通过毛细作用、渗透与虹吸作用, 待测液可以迅速湿透结合垫, 同时, 结合垫上固定的免疫量子点 QD-Ab1 被溶解, 同样由于吸水垫的虹吸作用, 溶解的免疫量子点伴随着测试液一起, 沿层析材料向前移动. 在此过程中, 如果测试液中存在目标抗原 Ag, 就会与待测液中溶解的免疫量子点 QD-Ab1 发生特异性免疫反应, 形成 QD-Ab1-Ag 免疫复合物. 然后免疫复合物 QD-Ab1-Ag 以及过量的未与目标抗原发生反应的免疫量子点 QD-Ab1 将伴随着测试液, 在层析作用下向前移动. 流经检测线时, 免疫复合物 QD-Ab1-Ag 将被固定在检测线上的另一种抗体所捕获, 发生特异性免疫反应, 形成免疫复合物 QD-Ab1-Ag-Ab2, 此时一部分量子点会被固定在检测线上, 形成 T 线. 然后未与目标抗原发生反应的免疫量子点 QD-Ab1 将伴随着测试液向前移动,

流经质控线时被固定的二抗所捕获, 发生特异性免疫反应, 形成 QD-Ab1-Ab3 免疫复合物, 从而使得游离的免疫量子点滞留在质控线处, 形成 C 线, 最后如果还有过量的量子点, 则会随着测试液到达吸收垫处. 综上所述, 如果待测液中含有目标抗原, 当滴加样品, 反应一段时间后, 试纸条上将会同时出现 T 线和 C 线. 由于我们使用的是量子点作为标记, 在紫外灯下, 可以观察到检测线和控制线处均有荧光, 并且待测液中含有的目标抗原越多, 被 T 线捕获的量子点相对就会增加, T 线的荧光强度就越高. 反之, 如果待测液中不含有目标抗原, 滴加样品后, 免疫量子点 QD-Ab1 不能被 T 线上固定的抗体捕获, 就无法在 T 线处滞留, 而绝大部分只能被 C 线上固定的二抗捕获, 其余的过量部分就到达吸收垫处. 这种情况下, 在紫外灯激发下, 试纸条上只有 C 线可以观察到荧光. 因此, 对于检测结果, 我们可以非常方便地进行判断. 此外, 如果检测过程中, 某一个试纸条在滴加样品反应一段时间后, 在紫外灯照射下, 质控线上没有出现荧光, 则表明试纸条已经失效, 此时不管检测线处是否能够观察到荧光, 检测结果都是没有意义的.

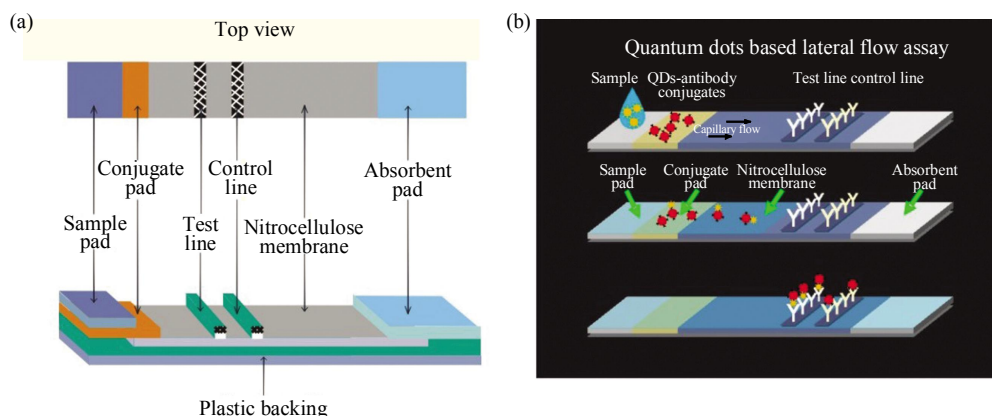


Fig. 2 Characterization of the test strip

(a) Schematic illustration of the test strip. (b) Basic principle of the QD-based lateral flow immunoassay.

2.3 量子点免疫荧光检测仪的构建

由于试纸条技术具有操作简单、快速、可随时随地检测、测试结果易于判断且操作人员不需专门培训等优点, 所以广泛应用于实时检测. 而传统的应用最多的试纸条是以胶体金作为标记物, 它只能进行定性或者半定量检测, 当人们需要知道待测抗原的确切浓度时, 这种检测技术显然就不适用了.

量子点以其独特的光学性质被人们关注, 我们选择用量子点代替胶体金, 应用到试纸条上. 在紫外光的激发下, 量子点可以发射出荧光. 基于这种原理, 我们自主研发了量子点免疫荧光检测仪, 通过检测量子点的荧光强度, 使试纸条技术可以同时进行定性和定量检测.

图 3a 所示为我们自主研发的量子点免疫荧光

检测仪的原理图, 采用 405 nm 的 LD 激发量子点, 用光纤光谱仪进行检测量子点的荧光. 试纸条的移动是由步进电机控制器控制, 保证试纸条在检测过程中匀速前行. 同时量子点免疫荧光检测仪配有一个平板电脑和迷你打印机, 检测结果可以直接打印输出, 操作非常简单. 量子点免疫荧光检测仪的实物图中可以看到供试纸条检测时放进的插槽, 以及打印结果的输出(图 3b). 与目前国内外相关设备相比, 自制的量子点免疫荧光检测仪有很多优点. 我们采用单个固态紫外半导体激光器激发, 体积小、集成度高、出光效率高; 采用光纤传输, 效率更高, 且设备防震防尘等可靠性更高; 检测器件选用光纤光谱仪, 可以检测出 300~900 nm 的精细光谱, 分辨率为纳米量级; 采用彩色面阵 CCD 采集量子点邻域图像, 避免误诊和漏诊. 此外, 设备操作简单且价格较低也是一大亮点.

由于制作试纸条过程中采用了玻璃纤维膜以及硝酸纤维膜等, 这些膜的结构比较复杂, 且并不能

保证各部分结构完全相同, 因此相同的层析试纸条的不同批次可能出现很大的不均一性, 即批间差, 这会对检测过程中结合垫上固定的量子点抗体复合物的释放产生极大影响, 造成有些试纸条中量子点不能完全释放, 也会不可避免地使层析速度出现差异. 除此之外, 在实际的检测过程中, 病人的血清样品差别很大, 其中的 pH 值、离子强度以及蛋白质含量都不尽相同, 所以, 对于试纸条检测来说, 如何有效地控制批间差成为一个急需解决的问题, 尤其是需要进行定量检测时. 目前的免疫层析技术很难将 CV(coefficient of variance)值控制在 10%以内, 因此, 需要通过调整检测参数以使得免疫层析技术更加准确可靠. 如图 3c, d 所示, 滴加待测液后, 如果待测液中含有抗原, 则在紫外灯照射下, 试纸条会同时出现检测线(T)和质控线(C); 反之, 如果待测液中不含有抗原, 则试纸条上只出现质控线(C). 用我们自主研发的量子点免疫荧光检测仪检测时, 检测结果表现为阳性样品会同时出现两个

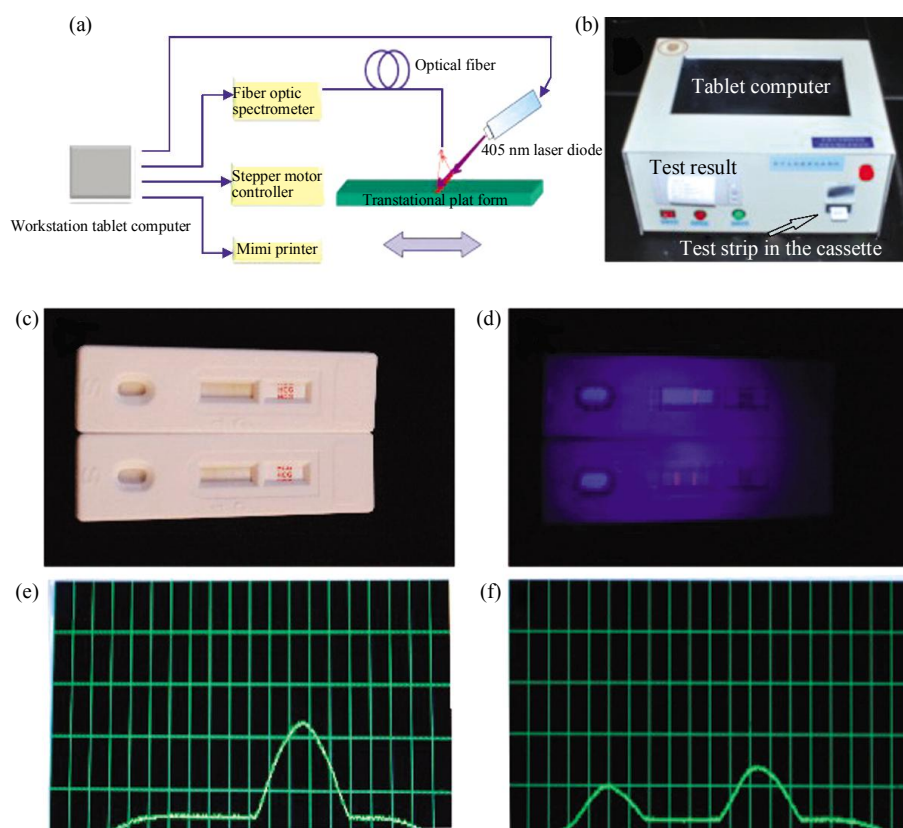


Fig. 3 Characterization of the test strip reader and the results of the detection

(a) Schematic diagram of the test strip reader used for detection the fluorescence intensity on the test line and control line. (b) Picture of the portable test strip reader integrated with test strip in the cassette and the test results printed out. (c) Photograph of the test strip. (d) Fluorescence imaging of the test strip excited by an ultraviolet lamp, FCS (up) and 50 IU/L HCG (down). (e) Fluorescence responses of the corresponding test strip in (d) (FCS (up)). (f) Fluorescence responses of the corresponding test strip in (d) (50 IU/L HCG (down)). The immunoreaction time was 15 min and the sample volume was 100 μ L.

峰, 分别对应着检测线和质控线上量子点的荧光强度值, 而阴性样品则只出现一个峰, 对应着质控线上量子点的荧光强度值, 如图 3e, f 所示. 为了消除样品以及试纸条本身存在的差异等引起的误差, 我们选择用试纸条上检测线上量子点的荧光强度与质控线上量子点荧光强度的比值作为参数, 进行定量检测.

2.4 量子点免疫荧光试纸条的质量评价

2.4.1 特异性.

试纸条对检测的特异性是免疫层析检测技术中考察的一个重要指标. 只有特异性的检测才能保证检测结果的准确性, 避免因物理性的非特异吸附导致的假阳性结果. 因此, 量子点免疫荧光试纸条的研制过程中, 必须保证其检测的特异性.

为了验证我们自制的量子点免疫荧光试纸条对检测的特异性, 在针对 HCG 标准抗原而研发的试纸条上依次滴加 AFP、CEA、CA199、PSA、胎牛血清(FCS)和 HCG, 反应相同时间后, 对其反应结果进行检测. 由图 4 可以看到, 在紫外灯的激发下, 只有滴加 HCG 标准抗原的试纸条同时出现了明显的检测线和质控线, 而其余几组均只出现了明显的质控线. 通过自主研发的量子点免疫荧光检测仪分别检测各个试纸条检测线和质控线上量子点的

荧光强度, 选择二者的比值(I_T/I_C)作为参数进行比较, 发现 HCG 组 I_T/I_C 可以达到 1.7, 而其余几组 I_T/I_C 均低于 0.2, 即量子点免疫荧光试纸条的非特异性吸附很低, 可以忽略, 表明这种试纸条可以用于检测.

2.4.2 检测时间.

层析速度和检测时间对免疫层析技术非常重要, 即在试纸条上出现检测线和质控线的时间对整个检测过程的快慢有很大影响. 但是滴加待测液后试纸条上出现了检测线和质控线, 并不代表这个时间点就可以进行检测, 这种情况对传统的胶体金试纸条来说影响还不是很显著, 因为只需要判断有还是没有, 不需要进行定量检测. 而量子点免疫荧光试纸条的目的是为了可以同时进行定性和定量检测, 所以检测时间对检测结果的判定至关重要.

本文研究了量子点免疫荧光试纸条对 HCG 的检测过程, 对照组选择胎牛血清(FCS), 结果发现反应时间对检测结果的影响如图 5 所示. 检测参数如前所述, 选用 I_T/I_C 作为检测参数. 在相同的加样体积下, 滴加样品后分别反应 5、10、15、20 和 25 min. 实验组即 HCG 标准抗原组的 I_T/I_C 用 F 表示, 对照组即胎牛血清组的 I_T/I_C 用 F_0 表示. 由图 5a 可以看出, 对实验组 HCG 标准抗原来说, F 值在反应时间为 5 min 时, 达到最高值. 随着免疫反应的时间继续延长, F 值稍稍降低, 并在 15 min 后趋于稳定. 这种现象产生的原因可能是由抗体的活性引起的. 抗体活性很高, 所以免疫反应的反应速度非常快, 在 5 min 时免疫反应已经完成. 对照组 FCS, F_0 值的总体变化趋势与 HCG 组不同(图 5b), 即在 5 min 时达到最大值, 延长反应时间后, F_0 值的变化趋势是先降低后稍稍升高, 并在 20 min 时达到最小值. 同时, 将实验组与对照组整体进行比较发现, HCG 组的 F 值是由特异性免疫反应引起的, 所以 F 值都在 1.25 以上. 而 FCS 组的 F_0 值是由非特异性吸附引起的, 而且 F_0 值都在 0.25 以下, 这表明 HCG 量子点免疫荧光试纸条的非特异性吸附很低. 对于检测来说, 我们希望非特异性吸附引起的噪声越低越好, 但是同时还要兼顾到检测时间.

为了方便比较, 我们研究了 F/F_0 随时间的变化趋势. 由图 5c 中可以观察到, F/F_0 的总体变化趋势是先升高后降低, 在 20 min 时达到最大值. 这种变化趋势是由实验组、对照组双重调控的, 所以呈现出来的走向与单独的每一组都不同. 尽管 20 min

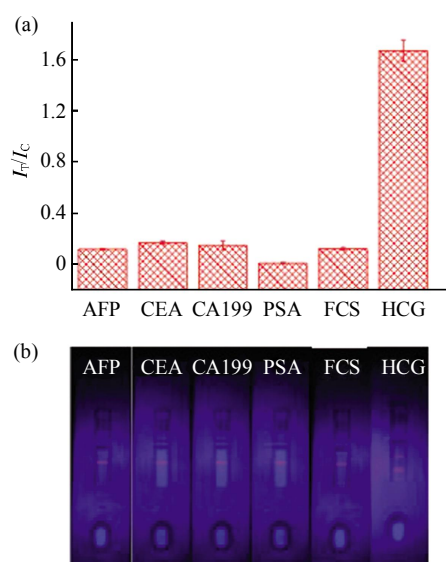


Fig. 4 Characterization of the fluorescence responses of the lateral flow immunoassay with different biomarkers

(a) Fluorescence responses of the lateral flow immunoassay applied with AFP (150 $\mu\text{g/L}$), CEA (150 $\mu\text{g/L}$), CA199 (150 $\mu\text{g/L}$), PSA (150 IU/L), FCS and HCG (150 IU/L) (from left to right). (b) Photograph of the corresponding test strips in (a). The immunoreaction time was 15 min and the sample volume was 100 μL .

时, 信噪比最大, 但是为了保证检测过程的简单快速, 我们选择信噪比较高的 15 min 作为反应时间, 即滴加待测液 15 min 后, 可以进行定量检测。

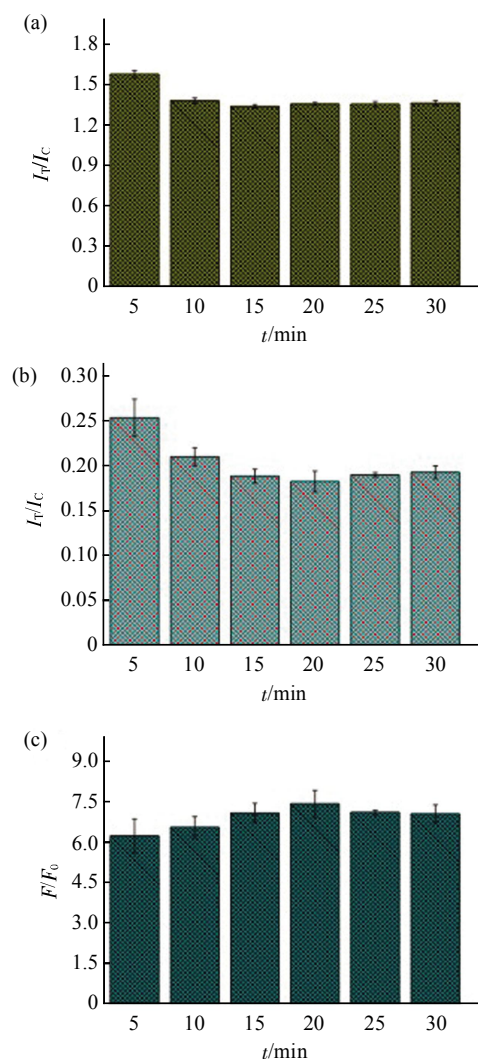


Fig. 5 Effect of immunoreaction time on the fluorescence responses of the lateral flow immunoassay

(a) HCG group. (b) FCS group. (c) Effect of immunoreaction time on F/F_0 . The lateral flow immunoassay was performed by applying 100 μl FCS and HCG (100 IU/L). Fluorescence signals were recorded at different immunoreaction time.

2.4.3 加样体积. 尽管加样体积一般不是人们考虑的一个影响因素, 但是在实际临床检测中, 如果需要的加样体积很少, 那么病人的一个血样就可以做多次检测, 或者检测多个不同的指标, 减少抽取病人血样的次数。所以本文研究了量子点免疫荧光试纸条检测 HCG 标准抗原时, 加样体积对检测结果

的影响。对照组依旧选择胎牛血清, 检测结果如图 6 所示。同样选择 T/C 作为检测参数, 检测的各种参数表示的意义与之前所述相同。在相同的免疫反应时间下(15 min), 滴加样品的体积分别为 50、75、100、125、150、175 和 200 μl 。首先观察实验组 HCG 组, 发现加样体积对检测结果没有显著影响, 即加样体积的变化并不会引起试纸条的 I_T/I_C 比值出现波动。观察对照组胎牛血清组, 发现同样的加样体积对于噪声的产生也不会有很大影响, 只是稍微出现波动。最后研究加样体积对于信噪比是否有影响, 发现在双重因素的调控下, 信噪比随着加样体积的增加出现稍微升高的趋势, 但是升高的并不明显, 在加样体积为 175 μl 时达到最

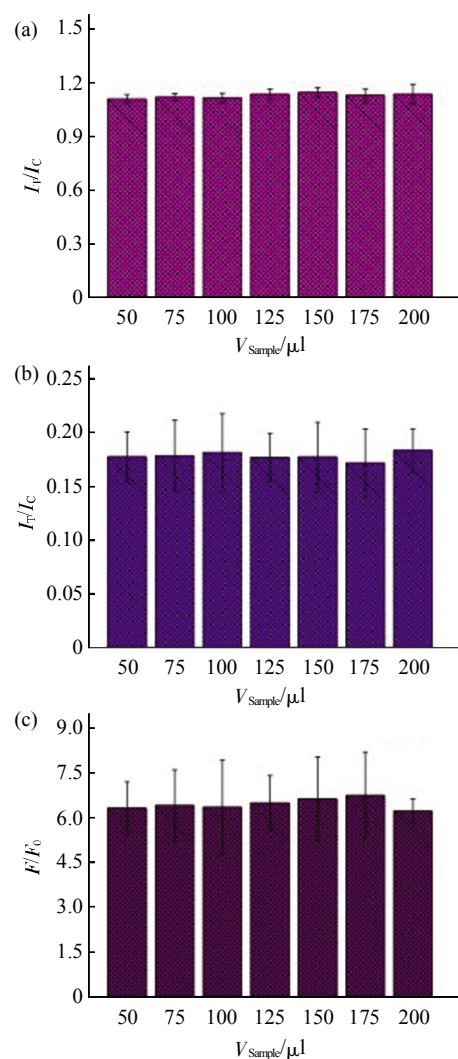


Fig. 6 Effect of sample volume on the fluorescence responses of the lateral flow immunoassay

(a) HCG (50 IU/L) group. (b) FCS group. (c) Effect of immunoreaction time on F/F_0 . The fluorescence signals were recorded after 15 min of immunoreaction.

大值. 由于在实际检测过程中, 我们希望加样体积越小越好, 因此继续研究了加样体积为 30 μl 时, 对检测结果的影响. 实验中发现, 当加样体积小于 50 μl 时, 由于加样体积太少, 导致液体很少, 不足以发生层析的过程. 综上所述, 我们认为 50 μl 的加样体积为实际检测的最佳值, 保证了足够可以发生层析过程, 又节省了病人的血样.

2.4.4 检测限和灵敏度.

检测限和灵敏度对于每种检测技术都是一个很重要的评价因素, 因为灵敏度的提高对于更早更准确地对疾病进行诊断有着重要的意义. 所以本文研究了量子点免疫荧光试纸条对 HCG 检测的灵敏度. 我们配制了一系列不同浓度的 HCG 抗原标准品, 分别为 1、5、15、100、250 和 500 U/L, 检测时, 加样体积为 50 μl , 反应时间为 15 min. 紫外灯激发下, 肉眼观察试纸条的检测结果如图 7a 所示. 由图可以看出, 各个试纸条均出现了质控线, 表明各个试纸条的检测结果均有效. 而检测线的荧光强度随着抗原浓度的增加而增强, 这与我们分析的结论是一致的. 其中, 当 HCG 浓度低至 1 U/L 时, 肉眼已经观察不到检测线上的荧光,

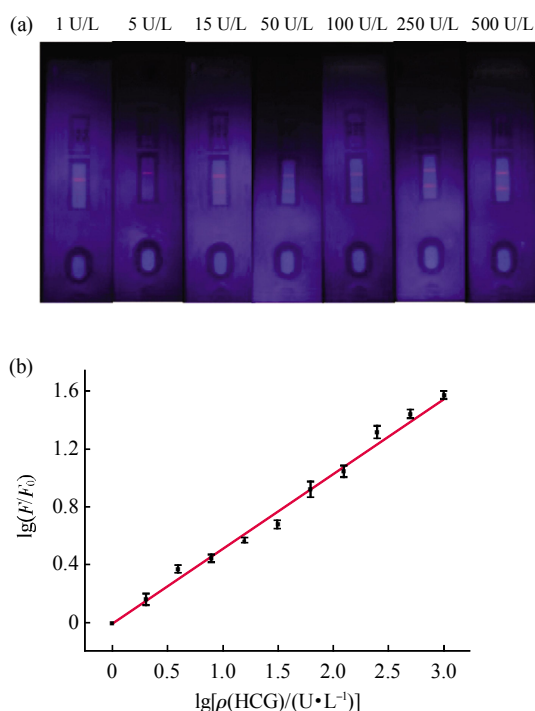


Fig. 7 Characterization of the fluorescence responses of the test strip with different concentration of HCG

(a) Typical fluorescence responses of the lateral flow immunoassay with increasing HCG concentrations, from left to right: 1 U/L, 5 U/L, 15 U/L, 50 U/L, 100 U/L, 250 U/L and 500 U/L. (b) The resulting calibration curve of HCG.

当 HCG 浓度为 5 U/L 时, 肉眼可以分辨出检测线上有很弱的荧光强度, 继续增大标准抗原的浓度时, 检测线变得清晰可见.

为了方便实际检测, 需要对所制备的试纸条测定出标准曲线. 我们使用自制的量子点免疫荧光检测仪对滴加了不同浓度的 HCG 标准抗原(1、2、3.9、7.8、15.6、31.25、62.5、125、250、500 和 1000 U/L)的各个试纸条进行检测后, 发现以标准抗原浓度的对数值作为横坐标, 以信噪比(F/F_0)的对数值为纵坐标时, 可以拟合出一条线性关系很好的标准曲线, 如图 7b 所示,

$$y = 0.5193x - 0.0078, r^2 = 0.9949$$

根据测得的标准曲线最后确定 HCG 量子点荧光试纸条的检测限为 0.85 U/L.

然后, 我们将自制的量子点免疫荧光试纸条与商品化的胶体金试纸条的灵敏度进行了比较. 结果如图 8 所示. 滴加 HCG 标准抗原的浓度均为 10 IU/L, 反应时间为 15 min. 在紫外光激发下, 肉眼观察不到胶体金试纸条出现明显的检测线, 但是量子点免疫荧光试纸条可以看到清晰的检测线, 这表明我们自制的量子点免疫荧光试纸条的灵敏度比商品化的胶体金试纸条的灵敏度要高, 对于疾病的早期诊断非常有利.

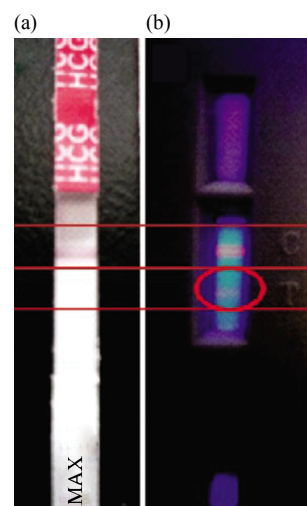


Fig. 8 Results of detection of HCG (10 IU/L) by Colloidal gold (a) and QDs based lateral flow immunoassay (b)

3 结 论

采用量子点标记免疫层析试纸条, 并自主研发了量子点免疫荧光检测仪, 对 HCG 进行了快速、

定量、灵敏的检测, 并对试纸条的质量进行了评价, 结果表明试纸条检测的特异性好、检测时间短(只需 15 min)、加样体积小(只需 50 μ l)、灵敏度高(检测限为 0.85 U/L), 明显高于商品化的胶体金试纸条. 这种新的检测技术可以实现现场检测, 有望在疾病的社区筛查中得到广泛应用.

参 考 文 献

- [1] Golden J P, Kim J S, Erickson J S, *et al.* Multi-wavelength microflow cytometer using groove-generated sheath flow. *Lab Chip*, 2009, **9**(13): 1942–1950
- [2] Rieger M, Cervino C, Saucedo J C, *et al.* Efficient hybridoma screening technique using capture antibody based microarrays. *Analytical Chemistry*, 2009, **81**(6): 2373–2377
- [3] Tang D, Su B, Tang J, *et al.* Nanoparticle-based sandwich electrochemical immunoassay for carbohydrate antigen 125 with signal enhancement using enzyme-coated nanometer-sized enzyme-doped silica beads. *Analytical Chemistry*, 2010, **82**(4): 1527–1534
- [4] Wolter A, Niessner R, Seidel M. Detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system. *Analytical Chemistry*, 2008, **80**(15): 5854–5863
- [5] Wang J, Liu G, Merkoçi A. Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. *J Amer Chem Soc*, 2003, **125**(11): 3214–3215
- [6] Helb D, Jones M, Story E, *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol*, 2010, **48**(1): 229–237
- [7] Zhang Z, Wen Y, Ma Y, *et al.* Mixed DNA-functionalized nanoparticle probes for surface-enhanced Raman scattering-based multiplex DNA detection. *Chem Commun*, 2011, **47**(26): 7407–7409
- [8] Pramanik S, Zheng C, Zhang X, *et al.* New microporous metal-organic framework demonstrating unique selectivity for detection of high explosives and aromatic compounds. *J Amer Chem Soc*, 2011, **133**(12): 4153–4155
- [9] Liu N, Liang W, Ma X, *et al.* Simultaneous and combined detection of multiple tumor biomarkers for prostate cancer in human serum by suspension array technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **47**(0): 92–98
- [10] Yalow R S, Berson S A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 1959, **184**(4699): 1648–1649
- [11] Rissin D M, Kan C W, Campbell T G, *et al.* Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature Biotechnology*, 2010, **28**(6): 595–599
- [12] Kvach E J, Ferguson D, Riska P F, *et al.* Comparison of BD GeneOhm Cdiff real-time PCR assay with a two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol*, 2010, **48**(1): 109–114
- [13] Lai S, Wang S, Luo J, *et al.* Design of a compact disk-like microfluidic platform for enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical Chemistry*, 2004, **76**(7): 1832–1837
- [14] Young P R, Hilditch P A, Bletchly C, *et al.* An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(3): 1053–1057
- [15] Hsu C C, Wobus C E, Steffen E K, *et al.* Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, **12**(10): 1145–1151
- [16] Yu F, Persson B, Löfås S, *et al.* Surface plasmon fluorescence immunoassay of free prostate-specific antigen in human plasma at the femtomolar level. *Analytical Chemistry*, 2004, **76**(22): 6765–6770
- [17] Choi S, Choi E Y, Kim D J, *et al.* A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I). *Clinica Chimica Acta*, 2004, **339**(1–2): 147–156
- [18] Zhang Q, Guo L H. Multiple labeling of antibodies with Dye/DNA conjugate for sensitivity improvement in fluorescence immunoassay. *Bioconjugate Chemistry*, 2007, **18**(5): 1668–1672
- [19] Brabant G, von zur Mühlen A, Wüster C, *et al.* Serum insulin-like growth factor I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicenter study. *Hormone Research in Paediatrics*, 2003, **60**(2): 53–60
- [20] Tanaka T, Matsunaga T. Fully automated chemiluminescence immunoassay of insulin using antibody-protein A-bacterial magnetic particle complexes. *Analytical Chemistry*, 2000, **72**(15): 3518–3522
- [21] Bhattacharyya A, Klapperich C. Design and testing of a disposable microfluidic chemiluminescent immunoassay for disease biomarkers in human serum samples. *Biomedical Microdevices*, 2007, **9**(2): 245–251
- [22] Magliulo M, Simoni P, Guardigli M, *et al.* A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria. *J Agric Food Chem*, 2007, **55**(13): 4933–4939
- [23] Beggs M, Novotny M, Sampedro S. A selfperforming chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic gonadotrophin (HCG) in urine and serum. *Clin Chem*, 1990, **36**(11): 1084–1085
- [24] Shyu R H, Shyu H F, Liu H W, *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon*, 2002, **40**(3): 255–258
- [25] Pyo D, Choi J, Hong J, *et al.* Rapid analytical detection of microcystins using gold colloidal immunochromatographic strip. *J Immunoassay Immunochem*, 2006, **27**(4): 291–302
- [26] Li D, Wei S, Yang H, *et al.* A sensitive immunochromatographic assay using colloidal gold – antibody probe for rapid detection of

- pharmaceutical indomethacin in water samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, **24**(7): 2277–2280
- [27] Zhou Y, Pan F G, Li Y S, *et al.* Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, **24**(8): 2744–2747
- [28] Zhao Y, Zhang G, Liu Q, *et al.* Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**(24): 12138–12142
- [29] Omidfar K, Kia S, Kashanian S, *et al.* Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity. *Appl Biochem Biotech*, 2010, **160**(3): 843–855
- [30] Gas F, Baus B, Pinto L, *et al.* One step immunochromatographic assay for the rapid detection of *Alexandrium minutum*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, **25**(5): 1235–1239
- [31] Hampl J, Hall M, Mufti N A, *et al.* Upconverting phosphor reporters in immunochromatographic assays. *Analytical Biochemistry*, 2001, **288**(2): 176–187
- [32] Peck R B, Schweizer J, Weigl B H, *et al.* A magnetic immunochromatographic strip test for detection of human papillomavirus 16 E6. *Clinical Chemistry*, 2006, **52**(11): 2170–2172
- [33] Handali S, Klarman M, Gaspard A N, *et al.* Development and evaluation of a magnetic immunochromatographic test to detect *Taenia solium*, which causes taeniasis and neurocysticercosis in humans. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, **17**(4): 631–637
- [34] Granade T C, Workman S, Wells S K, *et al.* Rapid detection and differentiation of antibodies to HIV-1 and HIV-2 using multivalent antigens and magnetic immunochromatography testing. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, **17**(6): 1034–1039
- [35] Corstjens P L, Zuiderwijk M, Nilsson M, *et al.* Lateral-flow and up-converting phosphor reporters to detect single-stranded nucleic acids in a sandwich-hybridization assay. *Analytical Biochemistry*, 2003, **312**(2): 191–200
- [36] Corstjens P L, van Lieshout L, Zuiderwijk M, *et al.* Up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen in serum. *J Clin Microbiol*, 2008, **46**(1): 171–176
- [37] Krska R, Molinelli A. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, **393**(1): 67–71
- [38] Chatterjee D K, Gnanasammandhan M K, Zhang Y. Small upconverting fluorescent nanoparticles for biomedical applications. *Small*, 2010, **6**(24): 2781–2795
- [39] Khreich N, Lamourette P, Boutal H, *et al.* Detection of *Staphylococcus enterotoxin B* using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Analytical Biochemistry*, 2008, **377**(2): 182–188
- [40] Oh S W, Kim Y M, Kim H J, *et al.* Point-of-care fluorescence immunoassay for prostate specific antigen. *Clinica Chimica Acta*, 2009, **406**(1–2): 18–22
- [41] Zrazhevskiy P, Sena M, Gao X. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chem Soc Rev*, 2010, **39**(11): 4326–4354
- [42] Wu W, Aiello M, Zhou T, *et al.* *In-situ* immobilization of quantum dots in polysaccharide-based nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging, and drug delivery. *Biomaterials*, 2010, **31**(11): 3023–3031
- [43] Smith A M, Duan H, Mohs A M, *et al.* Bioconjugated quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**(11): 1226–1240
- [44] Liu W, Howarth M, Greytak A B, *et al.* Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging. *J Amer Chem Soc*, 2008, **130**(4): 1274–1284
- [45] Zhang X, Li D, Wang C, *et al.* A CCD-based reader combined quantum dots-labeled lateral flow strips for ultrasensitive quantitative detection of anti-HBs antibody. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2012, **8**(3): 372–379
- [46] Gao X, Cui Y, Levenson R M, *et al.* *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*, 2004, **22**(8): 969–976
- [47] Qiu P, Jensen C, Charity N, *et al.* Oil phase evaporation-induced self-assembly of hydrophobic nanoparticles into spherical clusters with controlled surface chemistry in an oil-in-water dispersion and comparison of behaviors of individual and clustered iron oxide nanoparticles. *J Amer Chem Soc*, 2010, **132**(50): 17724–17732
- [48] Liu J, Song T, Yang Q, *et al.* Highly stable quantum dots with silica-poly (EGDMA-co-MAA) synergistic protection and the preliminary application in immunoassay. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**(8): 1156–1163

Development of Quantum Dot-Based Lateral Flow Immunoassay System for Rapid Quantitative Detection of Human Chorionic Gonadotropin*

YANG Qiu-Hua^{1)**}, WANG Xin^{2)**}, YANG Jiu-Min³⁾, LI Xue¹⁾, SONG Tao¹⁾,
GONG Xiao-Qun¹⁾, ZHANG Bing-Bo^{4)***}, CHANG Jin^{1)***}

¹⁾ Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science & Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

²⁾ Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China;

³⁾ School of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

⁴⁾ The Institute for Advanced Materials & Nano Biomedicine, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract In this work, we developed a novel fluorescent biosensor that integrates a lateral flow test strip with quantum dot (QD) and a home-made test strip reader for rapid, low-cost, quantitative, and sensitive human chorionic gonadotropin (HCG) detection. The serum HCG level is a reliable marker for detecting persistent gestational trophoblastic neoplasia (GTN) and reflects the clinical course of the disease. The biosensor is designed to combine the rapidness of lateral flow immunoassay and sensitivity of fluorescent immunoassay. The principle of this biosensor is on the basis of a sandwich immunoreaction that was performed on the test strip and the QDs are captured on the test line through antibody-antigen reaction and on the control line through the immobilized secondary antibody. Quantitative detection is realized by recording the intensity of the test line and control line with our home-made test strip reader. The results are determined by the ratio of the fluorescence intensity of the test line and control line (I_T/I_C), which would cancel out the influence of the stability of QDs and antibody. The immunoreaction time and the sample volume are optimized to get a higher sensitivity. Under optimal conditions, the QD-based lateral flow immunoassay system has a wide dynamic range and is capable of detecting a minimum 0.85 IU/L HCG standard analyte in 15 min with 50 μ l sample volume. The novel QD-based lateral flow immunoassay biosensor offers a rapid, sensitive and quantitative tool for point-of-care testing of the level of serum HCG and shows great promise in other protein markers.

Key words quantum dot, lateral flow immunoassay, point-of-care testing, human chorionic gonadotropin

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00181

*This work was supported by grants from The National High Technology Research and Development Program of China (2012AA022603).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

CHANG Jin. Tel: 86-22-27401821, E-mail: jinchang@tju.edu.cn

ZHANG Bing-Bo. Tel: 86-21-65983706-819, E-mail: bingbozhang@tongji.edu.cn

Received: April 25, 2013 Accepted: August 19, 2013