DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.049

·论 著·

量子点标记免疫层析技术检测布鲁氏菌病的方法研究

李广强[1,2]，王升启[3]，荣 振[3]，王素华[1]，姜 海[2]

摘 要：目的 通过研究量子点标记免疫层析技术检测布鲁氏菌病抗体，制备量子点免疫层析试纸条，验证快速检测布鲁氏菌病的可行性。**方法** 将蛋白A和布鲁氏菌全菌蛋白分别作为质控线和检测线喷涂在硝酸纤维素膜上，以量子点标记布鲁氏菌全菌蛋白，稀释后喷涂在玻璃纤维素膜上，最后进行组装、切割制成检测用试纸条。应用该试纸条检测布鲁氏菌病患者样本102例，健康人血清47例，以试管凝集试验为对照，比较两组方法的符合率。**结果** 建立的量子点免疫层析试纸条性能较好，布鲁氏菌病抗体的检测敏感性为99.0%，特异度为95.8%，两者符合率为98.0%；将阳性血清稀释至128倍，通过荧光检测仪仍可检测到T线荧光值，该纸条重复性好，储存时间30 d内稳定性较好，其变异系数为4.1%。**结论** 该方法操作简单、快速稳定、灵敏度高、成本低，15 min内完成检测，血清用量低，可实现现场快速检测，在布鲁氏菌病的早期检测中具有良好前景。

关键词：量子点；免疫层析；布鲁氏菌病
中图分类号：R378.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1002－2694(2019)05－0389－04

Rapid detection method of brucellosis by quantum dot labeled immunochromatographic assay

LI Guang-qiang[1,2], WANG Sheng-qi[3], RONG Zhen[3], WANG Su-hua[1], JIANG Hai[2]

(1. *Baotou Medical College, Baotou* 014000, *China*;
2. *Chinese Center for Disease Control and Prevention, State key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Beijing* 102206, *China*;
3. *Academy of Military Medical Sciences, Institute of Radiation Medicine, Beijing* 100850, *China*)

Abstract: In this study, we prepared quantum dots immunochromatographic test strips for the detection of brucellosis antibodies by immunochromatography and studied the feasibility of rapid detection of brucellosis. Protein A and *Brucella* Whole Protein were sprayed on nitrocellulose membranes as control lines and detection lines respectively. *Brucella* Whole Protein were labeled with quantum dots diluted and sprayed on glass cellulose membranes. Paste the sample pad, release pad, reaction membrane and absorbent pad on the backing card in the corresponding order and cut them into test strips. We collected 149 effective serum samples, including 102 clinical samples of brucellosis patients and 47 healthy human sera. The Tube Agglutination Test (SAT) was used as control and the coincidence rates of the two methods were compared. The results showed that the established quantum dots immunochromatographic strip has good performance. The detection sensitivity of brucellosis antibody is 99.0%, the specificity is 95.8%, and the coincidence rate is 98.0%. The positive serum was diluted to 128 times, and T-line fluorescence value was detected by fluorescence detector. The strips prepared in the same batch were tested for brucellosis positive serum within 30 days, and the coefficient of variation was 4.1%. It is indicated that this method is simple, rapid, stable, sensitive, and low cost. Under optimized conditions, the concentration of brucellosis antibodies could be determined within 15 min with high sensitivity and specificity using only 10 μL of sample. Therefore, it can realize rapid on-site detection and has a good prospect in the early detection of brucellosis.

Keywords: quantum dots; immunochromatography; brucel-

辽宁省社发攻关及产业化项目(No. 2017225073)
通讯作者：姜 海，Email:jianghai@icdc.cn；
ORCID:0000-0002-8886-4385
作者单位：1.包头医学院，包头 014000；
2.中国疾病预防控制中心传染病预防控制所，传染病预防控制国家重点实验室，感染性疾病协同诊治协同创新中心，北京 102206；
3.军事医学研究院辐射医学研究所，北京 100850

losis

Supported by the Liaoning Social Development and Industrialization Project(No. 2017225073)
Corresponding author: Jiang Hai, Email: jianghai@icdc.cn

布鲁氏菌病是一种世界范围内常见的人兽共患疾病,全世界每年有超过50万例新发病例诊断为布鲁氏菌病[1]。该病给养殖生产者和国家造成严重的经济损失,作为生物恐怖病原被一些西方国家用作生物战剂[2],危害国家安全和人民健康。近年来,布鲁氏菌病的疫情出现回升趋势,并且引发严重的公共卫生问题。传统鉴定布鲁氏菌方法主要以试管凝集试验(SAT)和酶联免疫吸附试验(ELISA)为主。随着科学技术的发展,一些新的方法技术被用到布鲁氏菌的检测中来[3-4]。而以胶体金为标记物的免疫层析方法(GICA),因操作简单、结果易判读、血清用量少、成本低、无需专业技术人员以及专业设备等优点,广泛应用于布鲁氏菌病的现场检测。量子点(Quantum dots,QDs)作为一种新型的荧光标记材料,因其具有较好的荧光特性,广泛应用于发光生物探针领域量,以用来提高检测灵敏度[5-7]。相较于胶体金免疫层析法,量子点免疫层析技术的应用前景也非常广阔。因此,本研究将量子点代替胶体金,开发一种量子点免疫层析技术,以检测血清中的布鲁氏菌抗体。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器 硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane,NC膜,型号:HF13502S25);玻璃纤维素膜(型号:Ahlstrom8964);血清样品垫(型号:XQ-Y2);吸水纸(型号:H5072);PVC底板(型号:DB-6),以上均购自上海杰一生物技术有限公司;划膜仪(型号:XY1000,Bio-Dot公司);微电脑自动斩切机(型号:ZQ2000,上海金标生物科技公司);高功率数控超声清洗仪(型号:KQ-800KDE);冷冻干燥机(型号:LGJ-10B,北京四环科学仪器厂);全系列德国eppendorf离心机(型号:C5424);数控裁条机(型号:CTS300,上海金标生物科技有限公司)。

1.2 试剂 牛血清白蛋白(BSA),含吐温20的磷酸盐缓冲液(PBST),2-吗啉乙磺酸溶液(Mercapto-succinicacid,MES);N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide,NHS);1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC,Sigma公司);量子点(QDs,表面活性基团为羧基,购自于NanoGen公司);布鲁氏菌全菌蛋白(由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供);蛋白A(staphylococcal protein A,SPA,Sigma公司),其他试剂均为分析纯。试验中所用水(18.2MΩ)由Milli-Q纯水系统提供。

1.3 样本来源 布鲁氏菌病病人阳性血清、布鲁氏病国家标准阳性血清、正常人阴性血清由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供,含炭疽、霍乱抗原血清由军事医学研究院辐射医学研究所分子诊断实验室提供。

1.4 方 法

1.4.1 量子点的偶联及包被 取25 μL QDs,加5 μL 0.1 mol/L pH6.0 MES和20 μL去离子水洗涤;加入一定量的交联剂NHS、EDC 37 ℃下活化30 min;反应结束后离心弃上清液,加入10 mol/L MES的溶液重悬至量子点原始体积,加入一定量的布鲁氏菌全菌蛋白溶液充分反应,使用BSA进行封闭,待封闭完成离心后弃去上清液,根据需要稀释至合适浓度均匀喷涂在释放垫上,冷冻干燥3～4 h。

1.4.2 硝酸纤维素膜的包被 将SPA和布鲁氏菌全菌蛋白稀释至所需浓度,分别作为C线(质控线)和T线(检测线),将膜置于相对湿度20%,温度37 ℃条件下干燥2.5～3 h。

1.4.3 试纸条的组装 将样品垫、释放垫、层析膜、吸收垫相互重叠1～1.5 mm粘贴在PVC底板上。其中样品垫和结合垫为玻璃纤维素膜,层析膜采用硝酸纤维素膜,吸水纸采用吸水滤纸,试纸条结构见图1。将组装好的试纸条切割成长6.5 cm、宽3.5 mm,加入干燥剂后室温密封保存。

1.4.4 检测原理及结果判定 本研究采用双抗原夹心法,检测过程如下:将待测样品滴加到样品垫上,当样品中存在布鲁氏菌抗体时,会和释放垫上QDs标记物结合,形成QDs-Ag-抗体免疫复合物,流经检测线时,该免疫复合物和固定在检测线上的抗原结合,发生特异性免疫反应,此时一部分量子点固定在检测线上,形成T线。未与抗原发生反应的免疫复合物继续向前迁移,流经质控线时被固定的二抗(SPA)捕获,发生免疫反应,形成C线。多余的QDs标记物则会迁移,最终停留在吸收垫处。

以布鲁氏菌病阳性血清为样品,滴加70 μL到试纸条样品垫,反应10 min后在紫外灯照射下查看结果。若C线出现红色条带,T线无条带,判定为

阴性;若 C 线和 T 线均出现红色条带,判定为阳性;若 C 线无条带,不论 T 线有无条带均视试纸条无效。

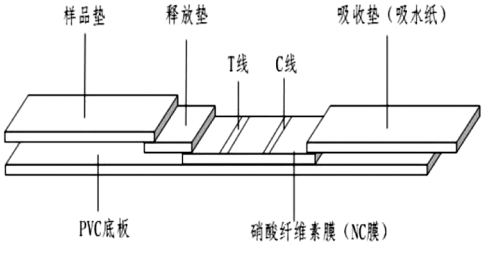


图 1　量子点免疫层析试纸条模型图

Fig.1　Mmodel diagram of a quantum dot immunochromatographic strip

1.5　试纸条的初步性能评价试验　将阳性血清(1∶3 200)稀释成不同浓度滴加到样品垫上,以 PBST 稀释的 BSA 和正常人阴性血清作对照进行检测,出现荧光条带的血清最高稀释度作为试纸条的灵敏度。同时检测牛血清白蛋白、炭疽阳性血清、霍乱阳性血清、正常人阴性血清、布鲁氏菌病阳性血清,判断该试纸条有无非特异性。将 102 份布鲁氏菌病阳性血清和 47 份健康人阴性血清分别使用试纸条和试管凝集试验进行检测,计算两种方法的符合率。

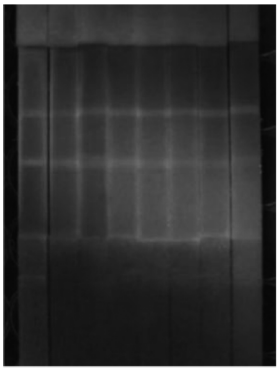
2　结　果

2.1　试纸条的优化　本研究从 QDs 用量、抗原标记使用量、抗原包被量、封闭时间、封闭剂用量等方面进行了优化。根据荧光亮度确定 T 线、C 线的包被浓度分别为 2 mg/mL、1 mg/mL,固定喷涂 T 线、C 线的包被量分别设置为 0.6 μL/cm、1 μL/cm。当 QDs 标记的抗原使用量为 15 μL 时,T 线荧光最强,而在使用量分别为 10 μL、20 μL 时,荧光强度出现下降趋势,分析可能是抗原过少未能与 QDs 完全偶联,抗原过多抑制 QDs 偶联效率。当封闭剂加入量为 25 μL、封闭时间为 3 h 时,试纸条的荧光效果最好。最后对 QDs 用量进行了优化,使用 25 μLQDs 可使其荧光最强。后续试纸条性能评价试验均采用上述优化参数进行检测。

2.2　重复性实验结果　该试纸条重复性较好,紫外灯照射下阳性、阴性血清无特异性出现,并且阳性血清 T 线亮度没有出现下降的趋势。

2.3　特异性试验结果　该试纸条检测牛血清白蛋白、炭疽阳性血清、霍乱阳性血清、正常人阴性血清 T 线位置均无条带;检测布鲁氏菌病阳性血清 T 线位置出现条带,证明该试纸条无特异性出现。

2.4　灵敏度试验结果　使用试纸条分别检测原液、稀释为 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍 8 种不同浓度阳性血清,在紫外灯照射下不同稀释倍数阳性血清均出现 T 线(见图 2)。



(从左到右依次为原液、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍)

图 2　试纸条灵敏度试验结果图

Fig.2　Test results of strip sensitivity

2.5　试纸条性能初步评价结果　经试管凝集试验及量子点免疫层析试纸条检测,试纸条检测敏感性为 99.0%,特异度为 95.8%,两种方法符合率为 98.0%,见表 1。

表 1　两种不同方法检测病例结果

Tab.1　Cases tested with different methods

量子点标记试纸条	试管凝集试验		
	＋	－	合计
＋	100	2	102
－	1	46	47
合计	101	48	149

2.6　试纸条稳定性结果　用同一批次制备的试纸条分别在第 5、10、15、20、25、30、35 d 时检测布鲁氏菌病阳性血清,用干式免疫荧光分析仪对试纸条读取 T 值,重复 3 次检测并取平均值(见图 3),其变异系数为 4.1 %,表明量子点免疫层析试纸条检测布鲁氏菌病抗体重复性好,一个月的保存期内稳定性良好。

3　讨　论

近年来,量子点作为一种优异的荧光标记物引起人们的重视,因其具有较宽的吸收峰,较高的荧光强度,稳定性好等特点,与传统发光材料相比具有更优越的性能,是一种极具潜力的荧光探针制备物,在生物领域和医学免疫方面得到飞速的发展,已广泛

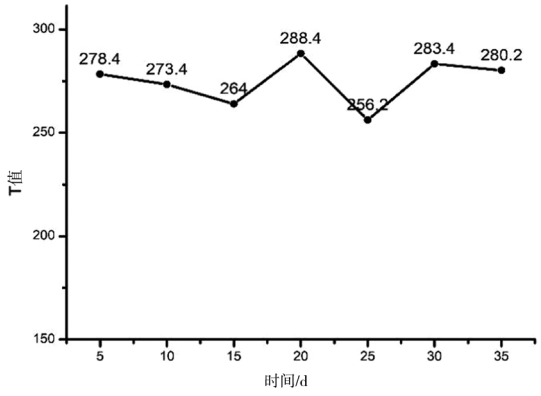


图 3 量子点试纸条稳定性试验

Fig.3 Stability test of paper strip with quantum dots

应用于副溶血弧菌[8]、C 反应蛋白[9]的检测和非洲猪瘟[10]、中东呼吸综合征[11]等传染病的快速诊断研究。目前在生物领域使用的免疫层析试纸条多以胶体金为标记物,其普遍存在灵敏度低、易现假阳性等问题。本研究所制备的量子点免疫层析试纸条是基于免疫层析技术和抗原-抗体特异性反应建立的快速检测布鲁氏菌病抗体的方法,其过程是将金黄色葡萄球菌 A 蛋白与布鲁氏菌全菌蛋白固定于硝酸纤维素膜,量子点与全菌蛋白偶联物稀释后与释放垫冷冻干燥,构建免疫层析系统,组装量子点免疫层析试纸条检测布鲁氏菌抗体。该法不仅结合了免疫反应与层析技术准确快速的优点,同时选择了能与布鲁氏菌抗体特异性结合的布鲁氏菌抗原,相比于胶体金试纸,由于量子点基于荧光显色,因而其抗干扰性更强,检测限更低。同时该试纸条应用范围广,可针对感染布鲁氏菌的人或动物进行检测,相较于市场现有的仅用来检测动物布鲁氏菌病的胶体金试纸条,其更加具有应用价值。

本研究对试纸条制备条件进行了优化,设计制成了量子点标记免疫层析试纸条,用于检测血清中布鲁氏菌抗体,在 15 min 内即可实现对布病的检测。血清用量少,当使用 10 μL 人或动物血清,依旧可以对其进行检测。本实验结果证明,量子点免疫层析试纸条是一种特异性强的检测方法,分别滴加正常人阴性血清、胎牛血清、炭疽阳性血清、霍乱阳性血清均无非特异。朱明东等[12]使用胶体金免疫层析法检测人血清的研究中,当血清用量为 10 μL 时,敏感性和特异性分别为 93.6%和 94.9%;另一篇关于胶体金法检测布鲁氏菌的研究中[13],采集某市地方病防治中心布病门诊的就诊者血清,以布鲁氏菌分离培养作为确诊布病的"金标准"进行检测。结果显示,该课题组自制的胶体金诊断试剂盒对确诊病人诊断的灵敏度为 94.12%,特异度为 79.41%,该试剂盒与布病诊断"金标准"比较 Kappa 值为 0.724,符合率为 86.76%。Wang[14]等以 SAT 法作为金标准,GICA 法灵敏度和特异度分别为 94.1%和 81.0%。总符合率达到 88.5%。在本研究中,以试管凝集试验作为布病确诊的"金标准",使用自制的量子点免疫层析试纸条对 149 例临床血清进行检测,结果显示其敏感度为 99.0%,特异度为 88.9%,两种方法符合率为 98.0%。从本次研究检测布鲁氏菌病中,敏感性、灵敏度等均较高,但是由于收集病例较少,因此后期还需要加大样本量继续验证灵敏度。

随着科学技术的发展,布鲁氏菌的现场快速检测技术已经有了很大的进展。本试验利用量子点标记的免疫层析试纸条检测布鲁氏菌病,不论是在试验仪器的使用,检测时间的时长,检测技术的应用等方面,以及对检测布鲁氏菌病敏感性与特异性上都具有显著的优势。该方法与试管凝集试验相比,仍然具有操作便捷、省时省力、灵敏度高、特异性强等优点。本研究方法制备的量子点免疫层析试纸条将布鲁氏菌全菌蛋白作为标记抗原,其在目标血清检测方面应用更加广泛,具有便携、高灵敏度、检测时短、特异等优点,更适合于布鲁氏菌病诊断、流行病学调查及现场应用,同时在牧区布鲁氏菌病检测、疫情控制等方面提供一种新的检测方法。

利益冲突:无

引用本文格式:李广强,王升启,荣振,等.量子点标记免疫层析技术检测布鲁氏菌病的方法研究[J].中国人兽共患病学报,2019,35(5):389-392,398.DOI:10.3969/j.issn.1002－2694.2019.00.049

参考文献:

[1] Harrison ER, Posada R. Brucellosis[J]. Pediatr Rev,2018,39(4):222-224. DOI: 10.1542/pir.2017-0126

[2] Matyas Z,Fujikura T.Brucellosis as a world problem[J].Dev Biol Stand,1984,56(7):3-20.

[3] Kaden R, Ferrari S, Alm E, et al.A novel real-time PCR assay for specific detection of *Brucella melitensis*[J]. BMC Infect Dis, 2017,17(1):230-236.DOI: 10.1186/s12879-017-2327-7

[4] Song DD,Qu XF,Liu YS,et al.A rapid detection method of Brucella with quantum dots and magnetic beads conjugated with different polyclonal antibodies[J]. Nanoscale Res Lett,2017,12(1):179-188. DOI: 10.1186/s11671-017-1941-z

[5] 王素梅,蒋治良,梁爱惠.CdTe 量子点的光谱特性及其应用[J].光谱学与光谱分析,2008,28(9):2152-2155.

(下转第 398 页)