

· 论 著 ·

基于石墨烯量子点和 Fe_3O_4 纳米复合探针的肾病管型的荧光成像技术的研究*

倪丹妮, 蒋栋能, 蒲晓允[△]

(第三军医大学附属新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 建立一种基于石墨烯量子点(GQDs)的肾病管型荧光检测技术。方法 首先,将 Fe_3O_4 纳米颗粒与抗人免疫球蛋白抗体(anti-IgG)结合,然后将氨基化修饰的 GQDs 连接到 Fe_3O_4 /anti-IgG 表面,构建荧光探针。为了避免交联试剂 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)对 GQDs 的荧光猝灭效应,只加入交联试剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)。再用牛血清清蛋白(BSA)封闭纳米颗粒上的剩余活性基团。最后,将 Fe_3O_4 /GQDs 复合材料作为荧光探针,标记样品中的管型,再用荧光成像进行检测,对该方法进行初步性能评价。结果 Anti-IgG、GQDs 与 Fe_3O_4 纳米颗粒表面连接后通过透射电子显微镜成像显示连接成功。GQDs 的荧光强度没有在 Fe_3O_4 /anti-IgG 连接后明显下降。这种荧光检测方法具有高灵敏度(最低检出限为 2 mL^{-1})、高特异性及线性范围宽($2 \sim 2000 \text{ mL}^{-1}$)的特点,可对肾病患者尿中的管型(红细胞管型、白细胞管型、颗粒管型)进行准确定量分析。结论 这种标记管型荧光成像分析可作为肾病诊断的新方法。

关键词:肾脏; 管型; 石墨烯量子点; 荧光成像

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.17.003 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)17-2414-03

Fluorescence imaging of nephropathy casts based on amine-modified graphene quantum dots and nano Fe_3O_4 composite probes*

NI Danni, JIANG Dongneng, PU Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital Affiliated to Third Military

Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract:Objective To establish a method for fluorescence imaging of nephropathy casts based on amine-modified graphene quantum dots and nano Fe_3O_4 composite probes. **Methods** First, Fe_3O_4 nanoparticles were conjugated with anti human IgG antibody(anti-IgG). Then, connect the amine-modified graphene quantum dots (GQDs) to the surface of Fe_3O_4 /anti-IgG nanocomposites. In order to avoid the fluorescence quenching effect of crosslinking reagent NHS, only cross-linking reagent EDC was added. After that, bovine serum albumin(BSA) was used to block the remaining active groups on nanoparticles. Finally, the Fe_3O_4 /GQDs composites as fluorescent probes were used to detect the casts in clinical samples and preliminary performance evaluation of this method was done. **Results** The electron microscope showed that the anti-IgG, GQDs with Fe_3O_4 nanoparticles were connected successfully. The fluorescence intensity of GQDs weren't decrease after Fe_3O_4 /anti-IgG connection. The fluorescence detection method was with high sensitivity(the limits of detection was 2 mL^{-1}), high specificity and wide linear range ($2 \sim 2000 \text{ mL}^{-1}$), and can be used for accurate and quantitative analysis of various types of casts, including red blood cell, white blood cell and granular casts. **Conclusion** This fluorescent imaging analysis can be used as a new method for diagnosis of renal failure.

Key words: kidney; cast; graphene quantum dots; fluorescence imaging

肾脏疾病日益全球化,威胁人类健康^[1]。目前,管型的检出成为肾脏损伤的重要标志之一,受到广泛关注^[2]。但是,目前管型的检出主要依靠光学显微镜,存在灵敏度、特异性低的缺点。因此,研究一种对管型检出更灵敏、特异的方法迫在眉睫。量子点(QDs)有着生物相容性和强烈的光致发光性,其本身就是一个潜在的显像剂^[3],表面修饰的 QDs 可提高细胞成像的效率^[4]。本研究将石墨烯量子点(GQDs)与 Fe_3O_4 纳米颗粒连接成一种新型纳米复合材料,应用于管型检测具有高灵敏度、高特异性等优点,现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 氨基化的 GQDs 由先丰纳米材料公司提供。羧基

化的 Fe_3O_4 纳米颗粒购自百运纳米科技有限公司。抗人免疫球蛋白抗体(anti-IgG)及牛血清清蛋白(BSA)购自 Sigma 公司。1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)及 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)购自阿拉丁公司。所有试剂的配制均采用去离子水。

1.2 方法

1.2.1 Fe_3O_4 /GQDs 荧光探针的制备 首先,10 mL anti-IgG (1.0 g/L), 1 mL EDC(40 g/L)和 1 mL NHS(10 g/L)混合,室温反应 30 min。然后,与 10 mL 羧基化 Fe_3O_4 纳米颗粒(10 g/L) 在 PBS(pH 值为 7.4)中置于黑暗中反应 3 h。反应产物通过磁性分离,并用 10 mL PBS 溶液冲洗 3 次。随后,10 mL 氨

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81371898,81472034)。

作者简介:倪丹妮,女,技师,主要从事检验医学方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:xqyyjyk@foxmail.com。

基化的 GQDs(1 g/L), 10 mL Fe₃O₄/anti-IgG 纳米材料(10 g/L), 1 mL EDC(10 g/L) 混合, 置于黑暗中反应 3 h。不加 NHS, 以避免 NHS 对 GQDs 的荧光猝灭。接下来, 加入 1 mL BSA(1 g/L), 室温下反应 1 h, 封闭纳米粒子上的剩余活性基团。最后 Fe₃O₄/GQDs 荧光探针通过磁性分离, 并用 10 mL PBS 溶液冲洗 3 次。并存储于 4~8 °C 备用。纳米颗粒通过 Tecnai G2 F20 S-TWIN 型透射电子显微镜(FEI 公司)进行表征。Fe₃O₄/GQDs 荧光探针的制备流程见图 1。

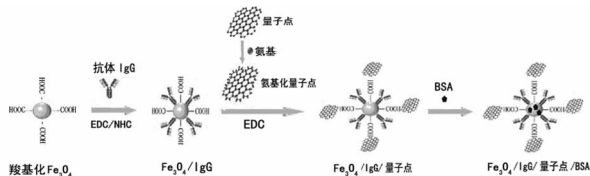


图 1 Fe₃O₄/GQDs 荧光探针的制备流程

1.2.2 Fe₃O₄/GQDs 荧光探针的性能 Fe₃O₄/GQDs 荧光探针的荧光性能使用 F-7000 荧光分光计(日立公司)测量, 激发光谱为 300~450 nm, 发射光谱为 380~680 nm。

1.2.3 3 种常见管型的荧光成像 管型尿标本于第三军医大学附属新桥医院检验科获得, 尿液标本共有 3 种类型的管型(包括红细胞、白细胞、颗粒管型)。检测步骤: 10 mL 尿液标本与 1 mL Fe₃O₄/GQDs 荧光探针在 PBS(pH 值 7.4) 溶液中反应 15 min, 然后采用 DM-2 荧光显微镜(Leica 公司)进行荧光显像。

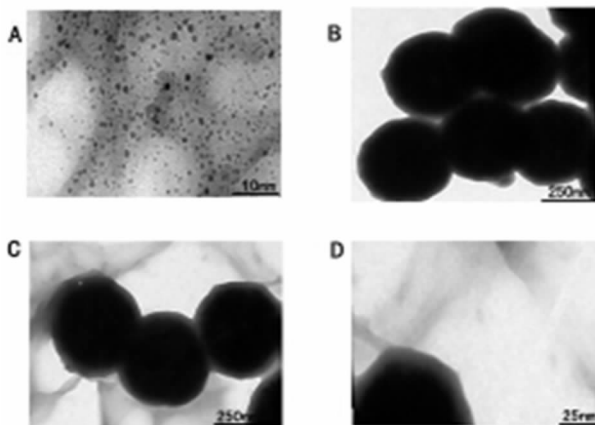
1.2.4 Fe₃O₄/GQDs 荧光检测的性能评价 将已经通过显微镜定量的管型尿标本倍比稀释为 14 个梯度浓度(819 2、409 6、204 8、102 4、512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 mL⁻¹), 然后用相同的荧光探针法进行检测, 以确定荧光成像分析法的灵敏度、线性范围和检出限。

2 结 果

2.1 Fe₃O₄/GQDs 探针的表征 GQDs 和 Fe₃O₄ 纳米颗粒经透射电子显微镜成像。anti-IgG、GQDs 与 Fe₃O₄ 纳米颗粒表面连接后透射电子显微镜成像。图 2A 显示了 GQDs 纳米粒子的结构及其分散性(直径约 2.0 nm), 适用于 QDs 和荧光成像^[5]。图 2B 显示了 Fe₃O₄ 纳米粒子的结构及其分散性。Fe₃O₄ 纳米颗粒的边缘清晰。图 2C 表明 Fe₃O₄ 纳米颗粒被一些物质包围(可能是 GQDs 和 anti-IgG)。在更高的分辨率下(图 2D), GQDs 粒子周围的 Fe₃O₄ 纳米颗粒更清楚明显。

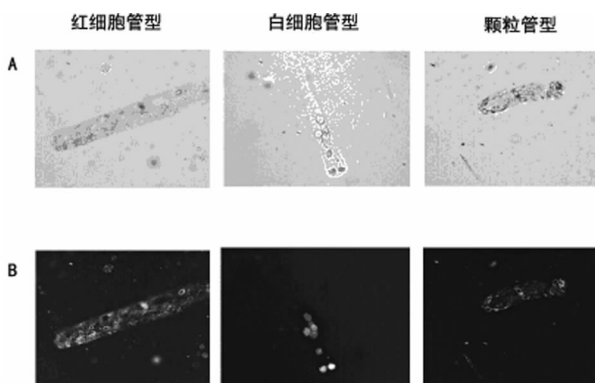
2.2 Fe₃O₄/GQDs 探针的荧光性能 Fe₃O₄/GQDs 荧光探针在紫外线照射的时候有明显的荧光。此外, 荧光扫描的结果显示, 适合的激发波长为 350~420 nm, 发射波长为 420~520 nm。340~420 nm 的激发光谱扫描(每隔 20 nm 扫描一次并作图)提示 380 nm 是最佳激发波长, 与以往报道的 GQDs 及 Fe₃O₄ 纳米粒子最佳激发波长一致^[6-7], 这表明 Fe₃O₄/GQDs 纳米复合材料可以被用作磁性和荧光探针。

2.3 Fe₃O₄/GQDs 探针测定临床标本 3 种类型的管型(包括红细胞管型、白细胞管型、颗粒管型)是由光学显微镜和荧光成像技术同步获取和测试。光学显微镜和荧光成像见图 3。与光学显微镜检测法相比, 荧光探针检测的图像更清晰, 杂质的干扰更少。因此, 本研究构建的管型的荧光成像技术是适用于管型的临床标本检测的。



注: A 为 GQDs 纳米粒子; B 为 Fe₃O₄ 纳米粒子; C 为 Fe₃O₄ 纳米颗粒被一些物质包围; D 为更高的分辨率下 GQDs 粒子周围的 Fe₃O₄ 纳米颗粒。

图 2 Fe₃O₄/GQDs 探针的透射电子显微镜图像



注: A 为显微镜法检测(400×); B 为 Fe₃O₄/GQDs 探针法检测(400×)。

图 3 3 种管型临床标本的检测

2.4 Fe₃O₄/GQDs 探针测定的灵敏度及检出限 该方法的检出限约为 2 mL⁻¹。然而, 当测试浓度高于 4 000 mL⁻¹ 时, 计数的值也不会相应增加了。因此, 本荧光成像测定的线性范围是 2~2 000 mL⁻¹。回归分析的结果也表明, 这种荧光成像分析的荧光计数与管型浓度有良好的线性相关关系(Y = 1.120 2X + 42.454, R² = 0.989 4), 见图 4。

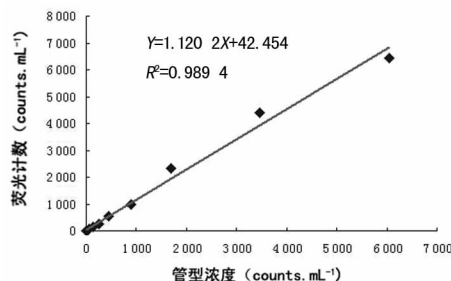


图 4 Fe₃O₄/GQDs 荧光成像计数与管型浓度的线性相关分析

3 讨 论

管型是一个圆柱形的结构, 其基质由 Tamm-Horsfall 蛋白组成, 在泌尿系统感染时白细胞及红细胞的数量急剧增加可导致管型的产生^[8-9]。管型产生于肾单位远曲小管及集合管, 从而进入尿液, 提示肾脏疾病的进展。但是, 目前管型的检出主

要依靠光学显微镜,但其存在低灵敏度、低特异性的缺点。因此,研究一种对管型的检测更为灵敏、特异的方法迫在眉睫。QDs 的生物相容性及强烈的光致发光性使其本身就是一个潜在的显像剂。QDs 结合各种纳米颗粒材料的研究已经被广泛报道^[10]。表面修饰的 QDs 可提高细胞成像的效率。QDs 链接有磁性的物质可作为探针已被相关学者研究^[11]。有报道指出,将 QDs 与药物微粒连接后可用于治疗肿瘤及其他疾病^[12]。

本研究构建了一种基于 GQDs 和 Fe₃O₄ 纳米颗粒标记管型的荧光成像技术。带有磁性的 Fe₃O₄/GQDs 纳米新型复合材料,增强了管型检出的特异性,可排除尿液中非蛋白杂质和可溶性蛋白的干扰。它可以检测临床标本中常见的管型(包括红细胞管型、白细胞管型、颗粒管型)。同时,这种荧光检测方法灵敏度高(最低检出限 2 mL⁻¹、特异性好、线性范围宽(2~2 000 mL⁻¹)。这个检测限为光学显微镜的 1/10,主要是由于 GQDs 高荧光性和 Fe₃O₄ 纳米颗粒的磁性聚集使灵敏度增加。回归分析表明,该检测方法有很好的线性关系($Y = 1.120 2X + 42.454, R^2 = 0.989 4$),可以用于肾脏疾病中尿液管型的定量分析。总之,本研究建立的荧光成像分析为肾脏损伤的诊断提供了一种全新的方法。

参考文献

- dos Reis Santos I, Danaga AR, de Carvalho Aguiar I, et al. Cardiovascular risk and mortality in end-stage renal disease patients undergoing dialysis: sleep study, pulmonary function, respiratory mechanics, upper airway collapsibility, autonomic nervous activity, depression, anxiety, stress and quality of life: a prospective, double blind, randomized controlled clinical trial [J]. BMC Nephrol, 2013, 14(1): 215-218.
- van Slambrouck CM, Salem F, Meehan SM. Bile cast nephropathy is a common pathologic finding for kidney injury associated with severe liver dysfunction [J]. Kidney Int, 2013, 84(1): 192-197.
- Amato G. Silica-Encapsulated efficient and stable Si quantum Dots with high biocompatibility [J]. Nanoscale Res Lett, 2010, 5(7): 1156-1160.
- Sunbul M, Yen M, Zou YK, et al. Enzyme catalyzed site-specific protein labeling and cell imaging with quantum dots [J]. Chem Commun (Camb), 2008(45): 5927-5929.
- Sohn CH, Park SP, Choi SH, et al. MRI molecular imaging using GLUT1 antibody-Fe₃O₄ nanoparticles in the hemangioma animal model for differentiating infantile hemangioma from vascular malformation [J]. Nanomedicine, 2015, 11(1): 127-135.
- Shi JY, Chan CY, Pang Y, et al. A fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor based on graphene quantum dots (GQDs) and Gold nanoparticles (AuNPs) for the detection of mecA gene sequence of Staphylococcus aureus [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 67 (SI): 595-600.
- He L, Yao L, Liu F, et al. Magnetic Fe₃O₄@chitosan nanoparticle: synthesis, characterization and application as catalyst carrier [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2010, 10(10): 6348-6355.
- Kyle RA. Henry bence jones - physician, chemist, scientist and biographer: a man for all seasons [J]. Br J Haematol, 2001, 115(1): 13-18.
- Gallery ED, Ross M, Gyary AZ. Urinary red blood cell and cast excretion in normal and hypertensive human pregnancy [J]. Am J Obstet Gynecol, 1993, 168(1 Pt 1): 67-70.
- Mittal R, Bruchez MP. Biotin-4-Fluorescein based fluorescence quenching assay for determination of biotin binding capacity of streptavidin conjugated quantum Dots [J]. Bioconjug Chem, 2011, 22(3): 362-368.
- Jing LH, Ding K, Kershaw SV, et al. Magnetically engineered semiconductor quantum Dots as multimodal imaging probes [J]. Adv Mater, 2014, 26(37): 6367-6386.
- Saurabh S, Beck LE, Maji S, et al. Multiplexed modular genetic targeting of quantum Dots [J]. ACS Nano, 2014, 8(11): 11138-11146.

(收稿日期: 2016-02-15 修回日期: 2016-05-11)

(上接第 2413 页)

- 王栋梁, 苏永梅. 游离脂肪酸和超敏 C-反应蛋白在 2 型糖尿病合并冠心病中的检测意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(21): 2536-2537.
- 赵桂东. 白芍总苷对糖尿病合并冠心病患者血清脂联素和 hs-CRP 水平的影响 [J]. 山东医药, 2015, 55(6): 65-66.
- 赵弋于, 曾凤兰. 冠心病合并糖代谢异常患者血浆 CRP 水平变化及意义 [J]. 山东医药, 2013, 53(3): 43-44.
- 胡龙江, 吕湛, 苟连平, 等. 2 型糖尿病并发冠心病患者血浆瘦素、超敏 C 反应蛋白的变化及相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(13): 3552-3554.

- 林转娣. 糖尿病合并冠心病的发病特征与冠状动脉病变程度相关性研究 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(13): 2097-2099.
- 许莹, 罗松辉, 徐焱成. 2 型糖尿病合并冠心病患者血清 TNF- α 、hs-CRP、APN 和 HMG B1 水平的变化及临床意义 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2013, 34(4): 545-549.
- Vepsäläinen T, Soinio M, Marniemi J, et al. Physical activity, high-sensitivity C-reactive protein, and total and cardiovascular disease mortality in type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2011, 34(7): 1492-1496.

(收稿日期: 2016-03-09 修回日期: 2016-05-17)