

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.08.039

量子点作为荧光标记物在临床检测方面的应用研究进展

夏成静 综述,周小合 审校

中国科学院大学深圳医院(光明),广东深圳 518106

关键词:量子点; 探针; 流式微球

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)08-1157-03

量子点作为一种极具应用前景的信号标记,与传统有机荧光染料相比,具有宽而有效的激发谱,窄而对称的发射谱,高的荧光量子效率,优异的光化学稳定性,方便、灵活的表面可修饰性,且不同尺寸量子点可以被同一波长的光激发,发射不同波长的荧光等独特的光学特性^[1-2],在生物分析中的应用日益广泛,尤其有望在多重检测方面发挥重要的作用。

1995 年 ALIVISATOS 和 NIE 两个小组几乎同时在《Science》上分别发表了量子点应用于不同生物体系实现量子点荧光标记的开创性工作,此后,关于量子点在生物领域应用研究工作的报道越来越多。

1 量子点荧光标记的基本原理

量子点即半导体纳米粒子或纳米晶,是指半径小于或接近于激子玻尔半径的半导体纳米晶粒。它们多由Ⅱ~Ⅵ族或Ⅲ~Ⅴ族元素组成,性质稳定,直径在 1~100 nm,这一微小的粒径导致了电子及空穴被量子限域,从而使分离的能级结构取代原来连续的能带,因此具备了一些类似大分子多环芳香烃的光学特性,即由高能量激发导致能级跃迁而产生荧光,而量子点同时具有传统荧光染料没有的多种物理和光学特性,在荧光标记领域正发挥着卓越的优势。

2 量子点在核酸检测方面的应用

以偶联上量子点的核酸作为探针,可以与目标物的核酸相杂交,通过检测量子点的荧光量来对目标物进行定量,灵敏度较普通荧光显色检测法更高,显示出卓越的标记特性。杨向荣^[3]利用 Cd S/ZnS 量子点标记能与肺癌肿瘤标志物 miR-21 互补的核酸结合,再利用磁珠核酸探针与 miR-21 配对,然后利用磁分离手段将磁珠从检测体系中分离,部分量子点探针因未捕获到 miR-21 而遗留在上清液中,通过检测上清溶前后的量子点荧光信号的强弱,实现对肺癌标志物 miR-21 的定性和定量检测,检测下限可达 1 fmol/L,线性范围涵盖 1 fmol/L~10 pmol/L,且具有较高的检测特异性。GLIDDON 等^[4]利用荧光偏振技术通过 QD525 和 QD655 同时检测结核杆菌 GBP6 和 TM-CC1 基因,实现了基于量子点光学特性的多重检测。LEE 等^[5]报道了基于 535、575、620 这 3 种激发荧光谱的量子点标记核苷酸检测尿中 3 种前列腺癌融合

基因,获得了很好的线性范围和 1 fmol/L 的检测限,整个检测 60 min 内完成,证明了量子点用于核酸多重检测的优良特性。

3 量子点在蛋白检测方面的应用

量子点与核酸结合成为了基因研究的新宠,并且获得了非常满意的效果,但都需要首先对标本进行 PCR 扩增,才能达到检测效果。与传统荧光标记物相比,如果利用量子点灵敏度更高的特性,标记抗体蛋白,就可以不需要扩增步骤,在病程早期更快速地获得检测结果。吴思敏^[6]制备了高荧光性的量子点肺癌肿瘤标志物癌胚抗原(CEA)的高灵敏检测探针,检测探针和磁珠结合的捕获探针与 CEA 发生免疫反应形成三明治结构,利用磁力分离器对免疫复合物进行富集后,通过检测富集在磁珠表面的量子点荧光信号,实现对 CEA 定量检测的目的,该方法的检测灵敏度为 38 pg/mL,较传统酶联免疫方法提高了约 40 倍,同时为实现对多种肿瘤标志物的同步检测,作者在建立高灵敏度单指标检测方法的基础上,实现了对肺癌肿瘤标志物 CEA、细胞角蛋白 19 片段(CYP-FA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)的同步检测,筛选出 3 种不同发射波长的量子点,即 QD525、QD585、QD625,分别对 NSE、CEA 和 CYPFA21-1 单克隆抗体进行标记,待免疫反应完成后,通过荧光成像分析方法对富集在磁珠表面的量子点荧光信号的种类和强度进行直接读取,实现对多靶标抗原的定性与定量检测,该方法不仅灵敏度和检测范围满足临床需求,而且能够有效地节省时间、样品量和成本。MONTORO BUSTOS 等^[7]在质谱法中用量子点作为标记物标记 Ab2 抗体,不仅避免了量子点与不同的靶抗体进行复杂的交联,而且可以利用量子点的元素特性在质谱仪中进行多重检测和质量控制,灵敏度也远远高于 ELISA 等光谱测定方法,转铁蛋白的检测限可以达到 0.23 fmol/L。

4 量子点与流式平台结合的应用

量子点以优于传统荧光标记物的特性用于核酸和蛋白质的多重及高灵敏检测已获得业界的肯定,但检测平台的不足限制了它在多重性检测方面的优势。胡晓璐等^[8-11]采用量子点流式微球技术,在流式细胞

仪上根据散射光检测携带特异性抗体的微球以确定检测物质,以量子点荧光强度确定检测物质的量,分别检测了曲霉菌半乳甘露聚糖、胰岛素抗体、降钙素原和胃癌相关抗原 MG7,并对精密度、线性范围、灵敏度进行评价,都优于传统的检测方法,并展望了利用不同大小免疫微球和不同粒径量子点结合用于多重检测的可能性。CABRAL FILHO 等^[12]在流式细胞仪上用 530 nm 和 580 nm 的量子点标记血型抗体检测红细胞上的多种血型抗原,不论是灵敏度还是特异度都获得了满意的效果。BRAZHNIK 等^[13]建立了利用发射不同荧光谱的量子点微球标记不同的抗体,在流式细胞仪上多重检测前列腺癌特异抗原,与 ELISA 相比,无论是速度、成本,还是检测限都有巨大的优势。BILAN 等^[14]用 3 种不同尺寸由量子点组装成的微球分别标记 3 种肺癌特异性抗原,在流式细胞仪上对肺泡灌洗液进行检测,与传统的 Luminex xMAP 系统比较获得很好的相关性。

由于量子点的优异光学特性,越来越多的学者利用量子点带来的高灵敏度,结合流式检测平台用于许多丰度较低的物质检测。LIN 等^[15]将 CuInS₂/ZnS 量子点与 Fe₃O₄ 复合成多聚微球,微球与抗 FcεR1α 单克隆抗体偶联后在流式细胞仪上检测血清中的 FcεR1α,发现 SLE 患者与健康人有明显差异,检测限可达到 0.29 ng/mL。SHANDILYA 等^[16]用量子点偶联的蛋白探针微球在流式细胞仪上检测与 AGO₂ 蛋白结合的胞外 miRNAs,也获得了很好的灵敏度和特异度。同时,蔡冰洁等^[17]建立了一种量子点的流式微球技术,用于高通量的 DNA 检测,将能与靶 DNA 一端杂交的探针 DNA(P1)标记在微球表面,与 DNA 配对杂交后,加入能与靶 DNA 另一端杂交的量子点标记的探针 DNA(P2),组装成一种流式微球-探针 P1、靶 DNA、量子点-探针 P2 的夹心复合结构,通过测定杂交前后平均荧光强度的变化检测 DNA 的浓度,该新型检测方法可以区分出完全互补、单碱基错配及完全非互补的 DNA。

5 量子点多重检测的展望

量子点代替传统荧光物质与流式微球技术结合既可以发挥量子点灵敏度高和荧光稳定性强的特点^[18],也可由它宽而有效的激发谱、窄而对称的发射谱、荧光发射谱随粒径大小可调、且可以做到互不干扰的特性使它与不同大小微球进行组合在流式平台上进行检测,可以满足临床多重检测的需要。目前不同颜色的量子点也可以渗入到微球内部或组装成微球成为编码微球,根据量子点的荧光颜色和强度用于多种物质的同时检测^[19-20],但量子点的泄漏和工艺仍然是国内阻碍量子点编码微球在多重检测方面的重要因素,但随着传统荧光染料在 Luminex 及流式平台上多重检测的限制,比如荧光谱的重叠补偿和荧光激发器需要量的增加,使具有多重编码优势的量子点微

球逐渐替代传统荧光染料成为现实^[21-22]。

量子点作为一种极具应用前景的信号标记,虽然现在临床只用于一些炎症指标等的单重免疫检测,在多重检测和流式方面的应用还只是停留在实验室研究阶段,它的最佳荧光发射需要紫外光的激发阻碍了其与其他检测平台的结合和限制了它的应用。但随着流式细胞仪激发光选择性的增加(最先进的流式细胞仪已可提供 405 nm 的激发波长),以及为了适应量子点的多重检测,新的检测仪器可能被开发出来,可以为量子点的激发提供紫外附近的光源,如果和流式微球技术相结合使得量子点成为临床最受欢迎的多重荧光标记物成为可能,使其成为多重、高通量、高灵敏的标记物逐渐成为现实。

参考文献

- [1] 唐宗文,刘星.基于量子点的荧光免疫分析方法研究进展[J].食品科技,2017,42(12):308-314.
- [2] 郭欣欣,尔夏提·图尔荪,韩振玉,等.量子点作为荧光探针的生物应用进展[J].分子诊断与治疗杂志,2017,9(6):422-425.
- [3] 杨向荣.量子点的表面修饰及其在肿瘤核酸标志物检测中的应用[D].南京:南京邮电大学,2016.
- [4] GLIDDON H D, HOWES P D, KAFOROU M, et al. A nucleic acid strand displacement system for the multiplexed detection of tuberculosis-specific mRNA using quantum dots[J]. Nanoscale, 2016, 8(19):10087-10095.
- [5] LEE H, KIM C, DONGJIN L, et al. Optical coding of fusion genes using multicolor quantum dots for prostate cancer diagnosis[J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12(12):4397-4407.
- [6] 吴思敏.基于量子点荧光探针的多种肺癌肿瘤标志物同步检测方法[D].上海:华东师范大学,2015.
- [7] MONTORO BUSTOS A R, GARCIA-CORTES M, GO NZÁLEZ-IGLESIAS H, et al. Sensitive targeted multiple protein quantification based on elemental detection of quantum dots[J]. Anal Chim Acta, 2015, 879(16):77-84.
- [8] 胡晓璐.量子点流式微球技术定量检测半乳甘露聚糖方法学建立及初步临床应用[D].南昌:南昌大学,2013.
- [9] 胡晓璐,王占科,李剑.量子点流式微球技术检测抗胰岛素抗体方法学建立[J].免疫学杂志,2012,28(11):985-989.
- [10] 胡晓璐,王滨,祝仲珍,等.量子点荧光探针流式技术定量检测血清降钙素原的方法学及临床应用[J].中国老年学杂志,2013,33(8):1828-1831.
- [11] 胡晓璐,段荣,柯江维,等.量子点流式微球技术定量检测血清胃癌相关抗原 MG7 的方法学建立及评价[J].临床检验杂志,2014,32(12):894-897.
- [12] CABRAL FILHO P E, PEREIRA M I, FERNANDES H P, et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10(8):4393-4404.
- [13] BRAZHNIK K, SOKOLOVA Z, BARYSHNIKOVA M, et al. Quantum dot-based lab-on-a-bead system for multi-

- plexed detection of free and total prostate-specific antigens in clinical human serum samples[J]. *Nanomedicine*, 2015, 11(5):1065-1075.
- [14] BILAN R, AMETZAZURRA A, BRAZHNİK K, et al. Quantum-dot-based suspension microarray for multiplex detection of lung cancer markers: preclinical validation and comparison with the Luminex xMAP® system[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):44668-44671.
- [15] LIN K, XU W, LI W, et al. Establishment of a novel quantum dots-encoded microbead-based flow cytometric method for quantification of soluble FcεRIα in serum[J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(7):686-693.
- [16] SHANDILYA R, SOBOLEV A M, BUNKAR N, et al. Quantum dot nanoconjugates for immuno-detection of circulating cell-free miRNAs [J]. *Talanta*, 2020, 208: 120486-120491.
- [17] 蔡冰洁, 熊晓庆. 量子点流式微球技术用于 DNA 的检测
- 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.08.040
- 研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(13):1-5
- [18] 胡晓璐, 王占科. 流式微球技术及量子点在实验室诊断中的应用进展[J]. *山东医药*, 2012, 52(42):90-92.
- [19] 陈伟, 赵桂红, 孙清江. 量子点/硅质体编码纳米载体的制备[J]. *东南大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(2):368-372.
- [20] 邓丽. 基于量子点的液相芯片检测关键技术研究及其系统研制[D]. 深圳: 深圳大学, 2018.
- [21] TELFORD W, GEORGES T, MILLER C, et al. Deep ultraviolet lasers for flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(2):227-233.
- [22] NOLAN J P, CONDELLO D, DUGGAN E, et al. Visible and near infrared fluorescence spectral flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2013, 83(3):253-264.
- (收稿日期: 2020-06-20 修回日期: 2021-01-20)

缺血性脑血管病相关的新型生物标志物的研究进展

黄翠波 综述, 黄之虎[△] 审校

广西壮族自治区民族医院检验科, 广西南宁 530001

关键词: 缺血性脑血管病; 危险因素; 生物标志物

中图法分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)08-1159-05

脑血管疾病是全球第二大致死疾病, 其中 80% 死于缺血性脑血管病。缺血性脑血管病即缺血性脑卒中, 是脑血管疾病中最常见的类型, 其具有高患病率、高致残率、高病死率、高复发率等特点, 给社会和患者家属带来沉重的经济负担和精神压力^[1]。因此, 缺血性脑血管病的预防显得尤为重要, 但由于缺血性脑血管病早期症状不明显且与其他疾病(如颈椎病、高血糖高渗透压综合征等)的早期症状相似, 鉴别诊断难度较大, 仅根据临床症状判断不利于缺血性脑血管病的早期预防、诊断以及治疗^[2]。目前公认的传统危险因素包括高血压、高血糖、高血脂等对脑血管疾病的早期预防、诊断和治疗作用不大^[3]。因此寻找与缺血性脑血管病相关的生物标志物, 通过确定最佳生物标志物诊断模型来提高疾病诊断、预后的预测率, 对缺血性脑血管病的早期预防、诊断、治疗和预后是一条重要的途径。炎症因子、凝血和纤溶等生物标志物在缺血性脑血管病中的作用已备受关注^[4]。本文对与缺血性脑血管病相关的新型生物标志物的研究及进展作一综述。

1 炎症生化标志物

炎症细胞和炎症信号启动血管内膜损伤后修复, 参与动脉粥样硬化的发生、发展过程, 炎症反应贯穿

着动脉粥样硬化、斑块形成及脱落等过程, 参与血栓形成的各个阶段。

1.1 系统性炎症生化标志物

1.1.1 超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和 C 反应蛋白(CRP) CRP 是动脉粥样硬化的介质, 它通过活化炎症细胞造成血管内皮损伤及功能障碍, 促进血栓形成。研究表明 hs-CRP 和 CRP 在缺血性脑血管病患者的血清中呈高表达, 是缺血性脑血管病的独立危险因素^[5]。同时, CRP 与脑血管粥样硬化程度及疾病严重程度呈正相关, 可作为一个独立因素预测缺血性脑血管病的短期病死率^[6]。由于结构稳定、易于检测及重复性好等特点, CRP 和 hs-CRP 被广泛应用于临床, 可作为预测和治疗缺血性脑血管病的监测指标。

1.1.2 白细胞介素-6(IL-6) IL-6 是神经系统主要细胞因子, 参与炎症反应和发热反应, 具有神经保护或导致神经退行性病变的特性。当脑组织缺血坏死时引起相应的免疫应答, 产生大量的 IL-6, IL-6 通过增强中性粒细胞的通透性, 细胞破坏增加, 毒性作用增大, 加重炎症反应, 导致脑损伤加重。有研究发现 IL-6 在急性脑梗死患者血清和脑脊液中升高, 是脑梗死的独立预测因子, 并且 IL-6 水平与急性缺血性脑血管病斑块的不稳定性^[7]及疾病严重程度呈正相关^[8]。

[△] 通信作者, E-mail: hoftiger@163.com。

本文引用格式: 黄翠波, 黄之虎. 缺血性脑血管病相关的新型生物标志物的研究进展[J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(8):1159-1163.