

- marrow mesenchymal stem cells in a thermo – sensitive injectable chitosan/collagen/beta – glycerophosphate hydrogel: in vitro and in vivo [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(9): 2111 – 2118
- 8 Dang JM, Sun DD, Shin – Ya Y, *et al.* Temperature – responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disk cells [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(3): 406 – 418
 - 9 Lu WN, Lu SH, Wang HB, *et al.* Functional improvement of infarcted heart by co – injection of embryonic stem cells with temperature – responsive chitosan hydrogel [J]. *Tissue Engineering, Part A*, 2009, 15(6): 1437 – 1447
 - 10 Leipzig ND, Wylie RG, Kim H, *et al.* Differentiation of neural stem cells in three – dimensional growth factor – immobilized chitosan hydrogel scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(1): 57 – 64
 - 11 Seo BM, Miura M, Gronthos S, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149 – 155
 - 12 Wang L, Stegemann JP. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with beta – glycerophosphate for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 3976 – 3985
 - 13 Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(4 – 5): 300 – 311
 - 14 Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, *et al.* Bone regeneration: current concepts and future directions [J]. *BMC Med*, 2011, 9: 66
 - 15 Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, *et al.* Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8): 1888 – 1897

(收稿日期:2013 – 07 – 28)

(修回日期:2013 – 08 – 26)

量子点联合磁微粒技术检测 HBsAg 方法的建立及评价

何紫琪 李从荣 杨艳兵 吴 青 余 华

摘 要 **目的** 建立并评价一种基于量子点、磁微粒技术检测 HBsAg 的方法。**方法** 以针对 HBsAg 不同抗原决定簇的抗体与量子点及磁微粒偶联,利用双抗体夹心原理检测 HBsAg,用荧光定量 PCR(qPCR)、ELISA 法同时检测 120 例临床标本,并对比分析其检测效果。**结果** 磁微粒(magnetic nanoparticles, MMS)、量子点(quantum dots, QD)偶联抗体最佳浓度分别为 50 μg/ml、25 μg/ml,本法对 HBsAg 最低检出浓度为 1 ng/ml;本法的敏感度、特异性分别为 93.3%、86.7%;本法检测效果与 ELISA 一致,但其检测速度更快。**结论** 基于量子点、磁微粒技术检测 HBsAg 的方法方便、迅速,具有较高的敏感度与特异性,可以作为 HBsAg 快速筛查的方法。

关键词 量子点 磁微粒 HBsAg ELISA

[中图分类号] R575 [文献标识码] A

Establishment and Evaluation of the Method of Detection for HBsAg Based on Quantum Dots and Magnetic Nanoparticles. He Ziqi, Li Congrong, Yang Yanbing, Wu Qing, Yu Hua. *Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China*

Abstract Objective To establish and evaluate a method of detection for HBsAg based on quantum dots and magnetic nanoparticles. **Methods** The antibodies which can combined HBsAg on the quantam dots and magnetic nanoparticles were fixed, and then the HBsAg which double antibody sandwich principle were detected. Totally 120 cases of clinical specimens were detected with both qPCR and ELISA methods, and then compared and analysed their detection efficiency. **Results** The optimal antibody concentration which conjugated MMS and QD were 50 μg/ml and 25 μg/ml, respectively. The minimum detectable concentration of HBsAg was 1 ng/ml. The sensitivity and specificity of this method were 93.3% and 86.7%, respectively. Compared with ELISA, this method had a good consistency, while its test time was shortened. **Conclusion** The test method established in this study has been demonstrated to be specific, sensitive, easy and rapid for HBsAg detection, and it may also be practical.

Key words Quantum dots; Magnetic nanoparticles; HBsAg; ELISA

基金项目:湖北省卫生厅采供血基金资助项目(CGX2010 – 4)

作者单位:430060 武汉大学人民医院检验科

通讯作者:李从荣,硕士生导师,电子信箱:congrongli33@hotmail.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)因其发病率高、传染性强、传播面广,已成为全球性的公共卫生问题。据 WHO 报道,全世界大约有 20 亿人曾经感染过 HBV,超过 2.4 亿的患者发展为慢性化,每年约有 60 万人因急、慢性 HBV 感染而死亡^[1]。乙型肝炎患者主要集聚在亚洲,该地区大多数人在儿童时期就感染 HBV,8%~10% 的成人发展为慢性感染者,在中国更为严重^[1]。HBV 主要通过血液传播,因此要对献血员进行严格的 HBsAg 筛查,国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)出台的《献血者健康检查要求》规定:献血者要进行 HBsAg 的检测。HBsAg 是 HBV 感染最早出现的免疫学标志物,HBsAg 检测可以缩短病原检出的“窗口期”,也能避免感染恢复后假阳性结果的产生,是病原体诊断的趋势所在。本研究拟利用量子点与磁微粒的特性,建立一种便捷、高灵敏度的 HBsAg 的检测方法。

材料与 方法

1. 试剂和仪器:发射波长为 605nm 的链霉亲和素化 CdSe/Zns 硒化镉量子点(武汉珈源量子点公司)、粒径 3 μm 的 xMagTM 异硫氰酸根末端磁微粒(陕西北美基因股份有限公司)、HBsAg adr protein、生物素化兔抗 HBsAg-IgG、鼠抗 HBsAg-IgG(英国 Abcam 公司)。DDHZ-300 型恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂)、磁选分离器(西北美基因股份有限公司)、EURO Star II 型荧光显微镜(德国 EURO 公司)、BIO-RAD680 型酶标仪(美国 BIO RAD 公司)。

2. 方法:(1)磁微粒(MMS)与抗体偶联:严格按照说明书进行 MMS 的活化、抗体偶联、清洗和封闭,分别以不同浓度的鼠抗 HBsAg-IgG 与 MMS 偶联,以 $(OD_{\text{原始抗体}} - OD_{\text{清洗液}})/OD_{\text{原始抗体}}$ 计算连接效率,并选择最合适的抗体浓度。(2)量子点(QD)与抗体连接方法学的建立:用 pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液以 1:500 稀释链霉亲和素化的量子点,4℃ 保存备用。用不

同浓度生物素化兔抗 HBsAg-IgG 连接 QD,37℃ 振荡反应 15min;将 QD-单抗复合物进行高速离心,取上清液行蛋白含量检测,以 $(OD_{\text{原始抗体}} - OD_{\text{清洗液}})/OD_{\text{原始抗体}}$ 计算连接效率,并选择最适抗体浓度。(3)HBsAg 检测体系的建立:取 5 μl MMS-单抗复合物与 100 μl QD-多抗复合物置于 1.5ml EP 管内,加入不同浓度的 HBsAg,用正常人血清作为阴性对照,37℃ 振荡反应,分别于 5、10、20、30、40、60、120min 时间点进行磁分离并洗涤,重悬至 100 μl。取 20 μl 于荧光显微镜下检测荧光。(4)临床应用评价:随机抽取笔者医院 HAV-IgM/HCV 核心抗原及 TP 抗体阳性患者的血清,以及脂血、溶血、黄疸标本,用上述方法检测,观察有无交叉反应。随机抽取笔者医院 HBV DNA 阳性、阴性患者血清标本各 60 例(经 qPCR 定量),用上述方法检测,并与 qPCR、ELISA 法比较,评价其 HBsAg 的检测效率。

3. 统计学方法:数据处理采用 SPSS 17.0 软件,不同方法检测率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MMS、QD 偶联抗体最佳浓度:MMS 偶联鼠抗 HBsAg-IgG 的效率在其浓度 $\leq 50 \mu\text{g/ml}$ 时,维持在 43%~56%,当抗体浓度超过 50 μg/ml 时,MMS 偶联效率降低,故以 50 μg/ml 作为偶联磁微粒的抗体最佳浓度。QD 偶联生物素化兔抗 HBsAg-IgG 的效率在其浓度 $\leq 25 \mu\text{g/ml}$ 时,维持在 37%~49%,当抗体浓度超过 25 μg/ml 时,QD 偶联效率降低,故以 25 μg/ml 作为偶联量子点的抗体最佳浓度。

2. HBsAg 检测体系:观察免疫反应时间对检测结果的影响发现,30min 后可观察到稳定的荧光。当 HBsAg 浓度为 1 ng/ml 时,可以检测到荧光。当浓度 $\geq 30 \text{ ng/ml}$ 时,镜下观察荧光趋于稳定,认为抗体已完全消耗。荧光显微镜下的观察结果见图 1。

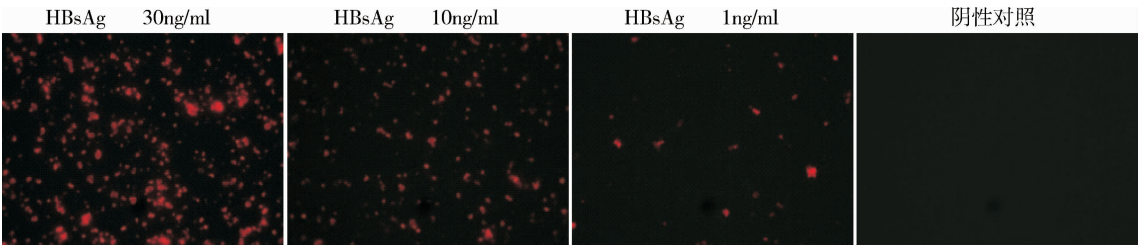


图 1 荧光显微镜下量子点磁微粒抗原复合物

3. 临床应用评价:HAV-IgM/HCV 核心抗原及 TP 抗体阳性患者的血清标中均未发现荧光,溶血、脂血、黄疸标本中也未检出荧光。60 例 HBV DNA 阳性患者血清中有 4 例未检出荧光,60 例阴性患者血清

检有 8 例检出荧光,ELISA 法检测结果与本研究方法结果一致(表 1)($P < 0.05$)。以荧光定量 PCR 方法作为参照方法,本方法检测 HBsAg 的敏感度、特异性分别为 93.3% (56/60)、86.7% (52/60)。

表 1 临床应用评价

QD	HBV DNA(+)		HBV DNA(-)	
	ELISA - Ag	ELISA - Ag	ELISA - Ag	ELISA - Ag
	(+)	(-)	(+)	(-)
QD(+)	56	0	8	0
QD(-)	0	4	0	52

讨 论

随着医学的发展,大量患者通过输血治疗缓解病情、挽救生命,然而,输血相关的感染性/非感染性危害(病毒感染、急性肺损伤、溶血反应和败血症)一直困扰着临床输血工作^[2,3]。因此输血安全是输血医学的基石,也是当前全社会关注的焦点问题。输血安全要做到以下4点:①保证献血者的安全;②杜绝输血传播疾病的发生;③保证输血操作准确无误;④减少输血不良反应的发生。其中杜绝经血液传播疾病,做好无偿献血的检测工作,是保证血液质量及输血安全的关键。

虽然血液筛查已极大地降低了输血传播疾病的风险,但由于“窗口期”的存在,早期感染会出现漏检的现象,而单纯依靠感染恢复后的抗体又可能出现阳性误判。病毒效价、免疫沉默性感染、病毒变异以及难以最终消除“窗口期”等因素的存在,输血相关传染病还是时有发生^[4]。抗原检测能直观、准确的检出病原体的感染,HBsAg在输血后50~60天首先被检测到,可以缩短病原检测的“窗口期”。在检测出HBsAg的前几周,血清中可检测到低水平病毒;在血清阳转前,HBV DNA增长速度慢于HCV和HIV,HBV感染的窗口期,由于HBV DNA水平相对较低(平均<1000拷贝/毫升,范围1~2400拷贝/毫升),核酸检测技术仅能检出小部分假阴性献血员。虽然核酸检测技术是一种核酸检测的重要方法,其敏感度、特异性均较高,但其检测仪器、技术及成本均高,基层单位不能常规开展该项目^[5]。胶体金检测技术虽然简便快捷,但其敏感度低、假阴性率高,而且成本较高,不适宜作为献血人员HBsAg的初筛方法。

QD具有独特的光谱特征和光化学稳定性,因而受到研究者的重视,目前在医学领域主要用于体内成像、药物缓释、红外热疗及固相免疫组化分析等^[6~8]。MMS具有磁响应性,在磁场中会产生聚集,将其与相应抗原或抗体相连,制作成能捕获不同目标的免疫磁微粒,在磁场的作用下,便能达到分离结合被检物量子点的目的^[9]。量子点与磁微粒可连接多种生物活性基团,如抗体,通过抗原抗体反应即可获得量子点

磁微粒与抗原抗体的复合物,利用磁微粒的可富集特性,经过磁场聚集后放大量子点的荧光信号,达到高敏感度检测目标抗原的目的。合理利用量子点与磁微粒的特性,可以不依赖特殊仪器扩增标本而放大信号,从而在短时间内高敏感度检出目标抗原。

本研究采用抗HBsAg的异源单克隆抗体分别偶联QD、MMS,以双抗体夹心法结合待测标本中的HBsAg,利用磁微粒在磁场中的富集特性,在液相中聚集大量抗原,提高了检测的敏感度,本研究方法对HBsAg的最低检出浓度为1ng/ml。此外,由于QD的荧光强度高,光化学性质稳定,荧光淬灭作用小。偶联蛋白后的MMS也可冷藏保存,因此,可预先完成QD及MMS的偶联标记,然后进行处理标本及检测目标抗原,大大缩短检测时间,检测时间约为40min,较ELISA法可缩短2/3时间。由于本方法是基于量子点荧光信号直接检测目标抗原,而非检测吸光度,因而对标本的要求较低,不受脂血、溶血、黄疸等因素影响,具备良好的特异性。

以荧光定量PCR方法为参照方法,本方法检测HBsAg的敏感度、特异性均较高,而且与ELISA法检测结果无差异。HBV DNA阳性患者血清中有4例未检出HBsAg,究其原因可能是机体产生抗体,清除了HBsAg,HBsAg蛋白变性。HBV DNA阴性患者血清检有8例检出HBsAg,原因可能有机体产生e抗体,病毒被清除,病毒处于非复制期。本研究建立的方法检测结果与ELISA一致,但是检测速度快,与荧光定量PCR技术相比,其成本低,操作简便,对实验室及从业人员要求低,可用于献血、输血人员HBsAg的筛查。

磁微粒、量子点标记抗体直接荧光检测HBsAg操作简便、无需特殊仪器,敏感度也较高,在流动献血车及爱心献血屋的HBsAg人群筛查中有着巨大的潜力和应用前景。

参考文献

- World Health Organization. Hepatitis B [EB/OL]. 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
- Alter HJ, Klein HG. The hazards of blood transfusion in historical perspective [J]. Blood, 2008, 112(7): 2617-2626
- Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention [J]. Blood, 2009, 113(15): 3406-3417
- Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges [J]. Mol Diagn, 2000, 5(1): 11-22
- 蒲晓允. 现场快速检验[M]. 重庆:重庆出版社,2003

- 6 Yu HW, Lee J, Kim S, *et al.* Photoelectronic characterization of IgG antibody molecule – quantum dot hybrid as biosensing probe [J]. Nanotechnology, 2010, 21(42): 425–501
- 7 Biju V, Itoh T, Anas A, *et al.* Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications [J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(7): 2469–2495
- 8 Ghasemi Y, Peymani P, Afifi S. Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting [J]. Acta Biomed, 2009, 80(2): 156–165
- 9 De Dios AS, Díaz – García ME. Multifunctional nanoparticles: analytical prospects [J]. Anal Chim Acta, 2010, 666(1–2): 1–22
(收稿日期: 2013–07–22)
(修回日期: 2013–08–26)

LPS 对 THP – 1 细胞 sCD14 和 mCD14 表达的影响

张 颖 王金文 李向阳

摘 要 目的 观察不同浓度脂多糖(LPS)刺激 THP – 1 细胞(human acute monocytic leukemia cell line)不同时间对可溶性 CD14(soluble CD14, sCD14)和膜 CD14(Membrane CD14, mCD14)表达的影响及 sCD14、mCD14 表达之间的关系。方法 不同浓度 LPS(0、0.1、1.0、10、50ng/ml)刺激经佛波酯(PMA)诱导的 THP – 1 细胞不同时间(0.5、1、3、5、8h),用酶联免疫吸附法检测 sCD14 的量,流式细胞术检测 mCD14 的量。结果 LPS 浓度为 0ng/ml 时, sCD14 的表达与时间呈正相关($r=0.915, P=0.029$), 8h 达最高值(1044.39 ± 12.21 pg/ml), mCD14 的表达与时间呈正相关($r=0.945, P=0.015$), 8h 达最高值($4.23\% \pm 2.11\%$), 且随着时间的延长, sCD14 的表达与 mCD14 的表达呈正相关($r=0.969, P=0.006$); LPS 浓度为 0.1ng/ml 时,随着时间的延长, sCD14 的表达与 mCD14 的表达呈正相关($r=0.944, P=0.016$);当 LPS 刺激细胞 0.5h 时, sCD14 的表达与 mCD14 的表达呈负相关($r=-0.839, P=0.037$);1h 时, mCD14 的表达与 LPS 浓度呈正相关($r=0.839, P=0.037$), 100ng/ml 时达最高值($3.24\% \pm 1.95\%$)。结论 未经 LPS 刺激的 THP – 1 细胞可以表达 sCD14 及 mCD14; LPS 的浓度及刺激细胞的时间促进 sCD14 和 mCD14 表达。

关键词 LPS THP – 1 细胞 sCD14 mCD14

[中图分类号] R392 [文献标识码] A

Effect of LPS on THP – 1 Expressing sCD14 and mCD14. Zhang Ying, Wang Jinwen, Li Xiangyang. Clinical laboratory, Wenzhou Hospital of Integrated and Western Medicine, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effect of different concentrations of LPS on THP – 1 cell expressing soluble CD14 and mCD14 for different time. **Methods** Cultured THP – 1 monocyte cell was induced by PMA to macrophage and stimulated it with different concentrations of LPS(0, 0.1, 1.0, 10 and 50ng/ml) for different time(0, 0.5, 1, 3, 5 and 8h). Then sCD14 was detected by Enzyme – linked immunosorbent assay, and mCD14 by Flow cytometry. **Results** When the concentration of LPS was 0ng/ml, sCD14 enhanced along time($r=0.915, P=0.029$), and reached the highest value(1044.39 ± 12.21 pg/ml) at 8h. When LPS concentration was 0ng/ml, mCD14 enhanced as time extended($r=0.945, P=0.015$), and reached the highest value ($4.23\% \pm 2.11\%$) at 8h. And as time extended, the expression of sCD14 and mCD14 were positively correlated($r=0.969, P=0.006$). When LPS concentration was 0.1ng/ml, sCD14 and mCD14 had a positive correlation as time extended($r=0.944, P=0.016$). When LPS stimulated cells 0.5h, sCD14 and mCD14 had a negative correlation with LPS concentration increasing($r=-0.839, P=0.037$). At 1h, mCD14 enhanced as the LPS concentration increasing($r=0.839, P=0.037$). And at 100ng/ml it reached the highest value ($3.24\% \pm 1.95\%$). **Conclusion** THP – 1 cells induced by PMA spontaneously expressed sCD14 and mCD14 without LPS stimulation. The concentration of LPS and stimulation time increased the expression of sCD14 and mCD14.

Key words Lipopolysaccharide; THP – 1 cell; sCD14; mCD14

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y20080596);温州市科技计划项目(Y20100094)

作者单位:325000 温州市中西医结合医院(张颖);163000 大庆油田总医院(王金文);325000 温州医科大学附属第二医院(李向阳)

通讯作者:李向阳, 电子信箱:lxxy@wzhealth.com

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,也是全身炎症反应的重要触发剂,可以和体内多种蛋白结合,引起各种炎症效应。CD14 是一种髓系膜糖蛋白,是 LPS 和脂多糖结合蛋白(LBP)复合物的受体。低浓度 LPS 可刺激机体免疫系统,增强固有免疫功能;高