

• 生物技术与方法 •

降钙素原荧光免疫层析方法的建立

刘传志, 李伟, 刘桂莹, 杨羽, 官平, 侯玥

长春理工大学 生命科学技术学院, 吉林 长春 130021

刘传志, 李伟, 刘桂莹, 等. 降钙素原荧光免疫层析方法的建立. 生物工程学报, 2018, 34(3): 440-448.

Liu CZ, Li W, Liu GY, et al. Detection of procalcitonin based on fluorescence immune chromatography. Chin J Biotech, 2018, 34(3): 440-448.

摘要: 降钙素原 (Procalcitonin, PCT) 是降钙素的前体物质, 与人体细菌感染情况严重程度相关。通过 PCT 抗体与量子点偶联, 自制试纸条, 开发一种高灵敏度、快速便捷的 PCT 检测产品, 对其初步应用。PCT 单抗效价达 10^7 , PCT 蛋白与量子点偶联, 具有较好稳定性。试纸条线性检测范围 0.15-120 $\mu\text{g/L}$, 灵敏度 0.007 $\mu\text{g/L}$, 回收率范围 91%-113%, 批内批间变异系数小于 8%。自制的荧光检测试纸条与市场上已有的降钙素原 ELISA 试剂盒进行比对, 检测结果良好, 基本能够完成临床样品的检测。

关键词: 降钙素原, 荧光免疫层析, 量子点, 试纸条

Detection of procalcitonin based on fluorescence immune chromatography

Chuanzhi Liu, Wei Li, Guiying Liu, Yu Yang, Ping Gong, and Yue Hou

College of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130021, Jilin, China

Abstract: Procalcitonin (PCT) is the precursor of calcitonin related to the severity of human bacterial infection. We made a test strip by coupling anti-PCT to quantum dot, in order to develop a highly sensitive and convenient PCT testing product. The anti-PCT titer had reached 10^7 because of the stability by coupling anti-PCT with quantum dot. The detecting linear range of the experiment was 0.15 to 120 $\mu\text{g/L}$, the sensitivity was 0.007 $\mu\text{g/L}$, the recovery range was 91% to 113%, and the intra- and inter-assay coefficient of variation was less than 8%. Comparing the homemade fluorescence-detected test strip with PCT ELISA kit on sale, we got accurate results which could mostly accomplish the test of clinical samples.

Keywords: procalcitonin, fluorescence immune chromatography, quantum dot, test strip

目前临床上 PCT 的检测方法主要有两种: 半定量法和定量法^[1-5]。半定量法主要是胶体金法, 但其只能依靠肉眼观察颜色深浅来估计 PCT 含量的大概范围, 人的主观性较强, 影响后期用药。

Received: August 2, 2017; **Accepted:** November 7, 2017

Supported by: The 13th Five-year Science and Technology Research Project of Jilin Provincial Education Department ([2016] No. 385).

Corresponding author: Yue Hou. Tel/Fax: +86-431-85583084; E-mail: duguchuanzhi@163.com

吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目 (吉教科合[2016]第 385 号) 资助。

网络出版时间: 2017-11-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20171120.1305.002.html>

定量法主要是免疫发光法, 临床应用较多, 但其对检测人员的专业化水平要求较高, 应用限制也较大。

荧光定量免疫层析是免疫荧光技术和传统免疫层析技术相结合, 具有操作简便、检测快速、便携性强的优点, 检测结果更为精确和灵敏^[6-9]。荧光标记物采用一种新型标记方法——量子点(Quantum dots, ODs), 它是一种半导体荧光纳米材料, 具有激发谱线范围宽、发射谱线窄、发光效率高、发光颜色可调、光稳定性好等优良特征, 十分适合作为荧光标记物^[10-13]。2009年宋健等^[14]首次应用量子点标记抗体对心肌肌钙蛋白进行特异性定量检测, 检测限达 0.4 $\mu\text{g/L}$, 比其他方法的最低检出度降低了 10 倍。2014年, Taranova 等^[15]研究了一种基于多色量子点同步时检测牛奶中多种抗生素的方法, 氧氟沙星、氯霉素、链霉素的检测限分别达 0.3、0.12、0.2 ng/mL , 且仅在 10 min 中内就能完成检测。此种方法不仅快速、成本低, 而且具有高特异性和灵敏性。建立一种操作简单、快速、灵敏度高的 PCT 检测方法, 定量检测 PCT 的含量为开发相关产品及试剂盒提供实验基础, 对临床治疗和检测具有重大实际价值^[16-20]。本文利用实验室已纯化好的降钙素原抗原, 经弗氏佐剂混合免疫 Balb/c 小鼠制备 PCT 多克免疫腹水、取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合制备单克隆抗体; 将制备得到的抗体与 CdSe/ZnS 量子点偶联, 研究一种基于量子点标记的荧光免疫层析方法, 制备出试纸条, 设立对照 C 线, 并对检测的 T 线进行了分析检测范围、误差、稳定性等。对制备的试纸条行了初步应用, 与现有市售产品进行了检验比对, 检测效果较好, 可用于替代进口产品。

1 材料

1.1 实验仪器设备

荧光检测仪 TBS-380 购于上海捷宁生物科技

有限公司; YHQ-LS-50A 型立式压力蒸汽灭菌器; SW-CJ-2FD 型超净工作台; BioTeK Synergy 型多功能微孔板检测仪; Galaxy170s 型 CO_2 培养箱; 三维划膜喷金仪购于上海金标实业有限公司; Deaou-308C 荧光检测仪购于迪奥生物生物科技有限公司。

1.2 材料与药品

新西兰大耳兔、Balb/c 小鼠购于吉林大学实验动物中心; SP2/0 骨髓瘤细胞实验室存种; 血清样本来自长春 461 医院。

PCT 抗原为本实验制备保存; 聚乙二醇、HAT 培养液、HT 培养液、青霉素、链霉素购于美国 SIGMA 公司; 培养细胞用小牛血清购于杭州四季青公司; 蛋白亲和层析柱购于 Amersham; 量子点 CdSe/ZnS 购于深圳海王英特龙生物有限公司; 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS) 购于深圳海王英特龙生物有限公司; 试纸条材料购于上海杰一公司; 降钙素原 ELISA 检测试剂盒购于德国 IBL 公司。

2 方法

2.1 PCT 抗体的制备

取实验室已经制备纯化好的 PCT 抗原, 免疫新西兰大白兔, 经 4 次兔子皮下多点注射免疫接种, 每只兔子注射蛋白 20 μg 。免疫完成 5 d 后进行耳缘静脉采血测定效价, 达到标准后 2 周进行颈动脉采血, 离心分离血清, 采用间接 ELISA 方法测定效价, 考马斯亮蓝法测定浓度, 分装后于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

选取 3 只 6 周龄的 Balb/c 鼠, 用实验室已制备好的 PCT 抗原进行免疫, 经 4 次小鼠皮下多点注射免疫接种。第 4 次免疫 7 d 后, 断尾取血, 用 ELISA 方法测定血清中抗体效价。选取免疫效价高小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞 sp2/0 进行融合,

培养 10–20 d, 用间接 ELISA 方法筛选产生的杂交瘤细胞, 有限稀释法进行 3 次克隆化, 将最后克隆出的细胞株注入小鼠腹腔得到腹水。

收集细胞破碎离心, 回收蛋白, 抗体纯化采用辛酸-硫酸铵法得到初步纯化的抗体, 然后再经亲和层析柱得到最终纯化的抗体。纯化抗体用考马斯亮蓝法测定其浓度, ELISA 法测其效价, 并用 SDS-PAGE 进行检测。同时采取无关蛋白 BSA、CRP 和常见交叉物 CT、CGRP 为对照对其特异性进行鉴定。

2.2 PCT 抗体与量子点偶联及试纸条的制备

活化量子点 CdSe, 通过透射电镜进行分析。用 MES 缓冲液进行初洗 3 次, 然后用 EDC 和 NHS 避光活化, 加入 PCT 抗体偶联过夜, 次日离心收集沉淀, 用缓冲液重悬, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 然后即可使用。

在硝酸纤维素膜上用划线机划好由 PCT-自备鼠源抗体形成的检测线, 将制备好的量子点标记的 PCT 单抗均匀地加在释放垫上, 并用冻干机冷冻干燥 2 h, 完成后, 将样品垫、释放垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次叠加组装, 用机器切割成宽为 0.4 cm、长为 7 cm 大小的试纸条。

2.3 PCT 质控线控制和特异性

质控线 C 的制备: 羊抗鼠二抗质控线于硝酸纤维素膜上, 胶体金与抗体的连接同 PCT-自备鼠源抗体的方法相同。

取血清中常见干扰物质胆红素 (2.0 g/L)、三酰甘油 (30.0 g/L) 和 PCT 常见干扰物 CGRP (10 μg/L) 来进行试纸条的特异性检测。每种物质重复进行 3 次检测。

2.4 PCT 试纸条的性能测试

将试纸条依次排开, 取 80 μL 待测样品加到样品垫上, 每个待测样品重复检验 6 次, 10 min 后, 用荧光检测仪测定其荧光值, 取其平均值。

2.4.1 检测范围

对 PCT 蛋白浓度进行梯度稀释, 分别为 750、350、150、80、50、30、15、7.5、3.5、0.15、0.075 μg/L, 每个浓度作 6 个试纸条, 用荧光检测仪测定, 剔除跳值, 取其平均值制作出标准曲线。

2.4.2 灵敏度

将 PCT 抗原从 1.5 μg/L 的浓度用 PB 液开始稀释 1.5、0.15、0.075、0.015、0.007 5、0.001 5 μg/L, 确定该方法的最低检出量, 即为灵敏度。

2.4.3 回收率

定量检测方法的回收实验作为评估准确度的一种方法, 可用于对定量检测方法准确测定加入纯分析物的能力进行评估, 结果的表示指标是回收率。采用基础样本 PCT 抗原浓度为 5 μg/L, 分别向其中加入不同浓度的 PCT 抗原, 检测其回收浓度, 并计算出回收率。

2.4.4 精密度

分别选取不同浓度共 6 个血清样本进行批内精密度测定, 一个批次的试纸条 1 d 内检测完成, 为荧光免疫层析法检测 PCT 批内实验结果。取 10 d 每天做一个批次的试纸条, 每天检测 6 个浓度的 PCT 抗原样本并重复检测 2 次取平均值, 10 d 的批间实验结果。计算其平均值、标准差和变异系数。

2.4.5 稳定性

根据 4 °C 蛋白保存变性标准, 放置 37 °C、3 d 相当于置于 4 °C 半年, 放置 37 °C、3 d 相当于置于 4 °C 一年。将制备好的试纸条分 3 次检测, 第 1 次是制备好后 37 °C 第 2 天检测, 第 2 次是置于 37 °C 培养箱第 3 天检测, 第 3 次是置于 37 °C 培养箱第 6 天再进行检测, 每次检测 6 个浓度, 分别编号 A–F 每个浓度检测 3 次, 取平均值后, 比较 3 次的实验结果。

2.5 PCT 试纸条的临床样品测试

利用进口降钙素原 ELISA 检测试剂盒与本文所建立的荧光免疫试纸条方法, 分别检测从长春

461 医院带回的血清样本, 共 15 例, 其中 3 例为正常人血清即无细菌感染, 12 例为不同程度细菌感染的血清, 初步分析测量的准确性。将样品血清标记好, 分别标记为 1-15 号, 逐个滴加到试纸条上, 每个试纸条加 80 μL , 每个样品加 3 个试纸条。用荧光检测仪分别检测出各个试纸条的荧光值, 并计算平均值, 将其代入建立出的标准曲线方程, 求出血清样品中 PCT 的含量。

3 结果与分析

3.1 PCT 抗体效价测定

通过间接 ELISA 方法, PCT 抗原以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行包被, 测得 PCT 多克隆抗体效价可达 5×10^5 。用考马斯亮蓝法测蛋白含量 6 mg/mL 。经过多次检测筛选出阳性单克隆的细胞株分别命名为 2F5、5C9, 制备腹水测效价结果如表 1 所示, 表明得到的 PCT 单抗效价达 10^7 。

经纯化后浓缩的单抗, 考马斯亮蓝法测蛋白含量为 4 mg/mL , 纯化后抗体的效价能达到 1×10^5 , SDS-PAGE 分析结果见图 1。

3.2 PCT 抗体与量子点偶联检测及试纸条制备

将 EDC 和 NHS 浓度分别稀释至原来的 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 进行活化, 抗体和量子点的偶联时间为过夜, 分别 8 h、10 h、12 h、14 h、16 h。提示活化剂浓度为原来的 1/32 时, 偶联时间在 10 h 时形成较为均匀的溶液, 鉴定结果见图 2, 其中泳道 2-6 是在偶联 10 h 且 EDC 和 NHS 浓度分别稀释至原来的 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 时 CdSe/ZnS-PCT 的凝胶电泳图, 提示量子点同蛋白的偶联分布均匀, 得到弥散的条带, 其中泳道 1 是量子点 CdSe/ZnS。

表 1 ELISA 方法检测单抗效价结果

Table 1 Monoclonal antibody titer by ELISA

Positive cell strains	Antibody titer	Ascites titer
2F5	$(6 \pm 1.5) \times 10^4$	$(4 \pm 1.25) \times 10^7$
5C9	$(8 \pm 0.42) \times 10^4$	$(5 \pm 0.37) \times 10^7$

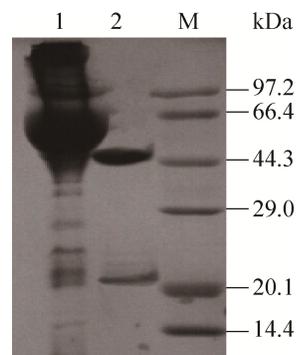


图 1 SDS-PAGE 检测 PCT 抗体

Fig. 1 Detection of PCT antibody by SDS-PAGE. M: marker; 2: unpurified antibody; 3: purified antibody.

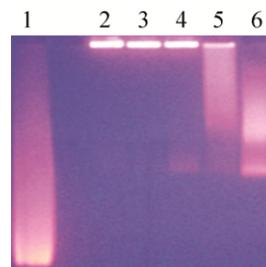


图 2 琼脂糖凝胶电泳检测 PCT 与量子点偶联

Fig. 2 Detection of PCT coupling with quantum dots by AGE.

3.3 PCT 质控线控制和特异性

干扰物质胆红素、三酰甘油和 CGRP 加入试纸条中, 均没有产生条带, 证明该试纸条特异性良好。实验图 3 试纸条特异性良好, 左上: PCT 抗原, 左下: 胆红素, 右上: 三酰甘油, 右下: CGRP。

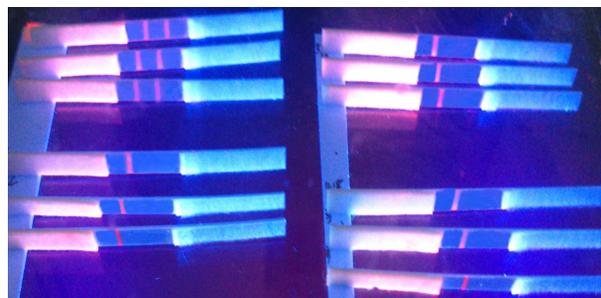


图 3 PCT 荧光免疫试纸条特异性测定

Fig. 3 Detection of the specificity of PCT fluorescent immunoassay strip.

3.4 PCT 试纸条的性能测试结果

3.4.1 检测范围

利用制备的 PCT 单抗,与各个浓度的抗原重复进行检测后,所加的 PCT 抗原浓度为横坐标,所测得的荧光值为纵坐标,建立标准曲线,如图 4 所示,方程为 $y=30.322x+250.73$, R^2 值为 0.990 6。而在浓度达到 0.15 $\mu\text{g/L}$ 时,荧光值趋近与 0, PCT 抗原浓度 150 $\mu\text{g/L}$ 时,荧光值 5 700,已不再该线性范围内,不再满足线性方程。此方法的线性检测范围是 0.15–120 $\mu\text{g/L}$ 。

3.4.2 灵敏度

将 PCT 抗原从 0.75 $\mu\text{g/L}$ 的浓度用 PB 液开始稀释,做 2 倍浓度的稀释,由于 Deaou-308C 荧光检测仪的限制,直至仪器检测不出荧光值为止,这时 PCT 抗原浓度 0.007 $\mu\text{g/L}$ (表 2)。

3.4.3 回收率

采用基础样本 PCT 抗原浓度为 5 $\mu\text{g/L}$,分别向其中加入 10 种不同样品浓度的 PCT 抗原,检

测其回收浓度,并计算出回收率,结果如表 3 所示,该方法的回收率达 91%–113%。

3.4.4 精密度

通过 1 个批次的荧光测定和 10 个批次的取样测定荧光值并计算相关 $\bar{x} \pm s$ 、AD、CV 值等,检测结果见表 4,批内、批间的变异系数均在 8.0% 以下, $P < 0.05$ 制备的试纸条精密度良好。

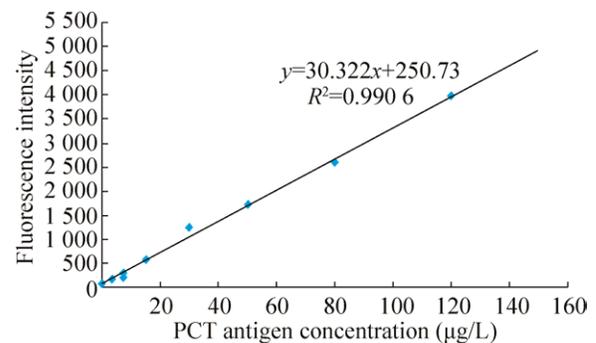


图 4 荧光免疫层析法所测得的 PCT 标准曲线

Fig. 4 PCT standard curve by fluorescence immune chromatography.

表 2 荧光免疫层析法检测 PCT 的灵敏度

Table 2 Sensitivity of PCT by fluorescence immune chromatography

PCT Ag levels ($\mu\text{g/L}$)	0.75	0.37	0.19	0.09	0.045	0.027	0.013	0.007
RFU	204 \pm 142	168 \pm 104	107 \pm 86	75 \pm 43	60 \pm 53	25 \pm 23	5 \pm 24	–

表 3 荧光免疫层析法回收率测定实验结果

Table 3 Recovery rate of the fluorescence immune chromatography

	Measured ($\mu\text{g/L}$)	Addition ($\mu\text{g/L}$)	Recycled ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)
Ori-samples	5.00			
Samples 1	7.27	2.00	2.27 \pm 1.2	113 \pm 3.1
Samples 2	9.65	5.00	4.65 \pm 2.1	93 \pm 2.4
Samples 3	13.69	8.00	8.69 \pm 2.3	109 \pm 3.7
Samples 4	14.20	10.0	9.20 \pm 4.1	92 \pm 1.4
Samples 5	26.93	20.0	21.93 \pm 5.2	109 \pm 2.6
Samples 6	35.18	30.0	30.18 \pm 4.5	101 \pm 3.1
Samples 7	44.85	40.0	38.64 \pm 4.6	96 \pm 2.3
Samples 8	56.76	50.0	51.76 \pm 5.1	103 \pm 4.2
Samples 9	82.31	80.0	77.31 \pm 6.2	91 \pm 3.7
Samples 10	99.82	100.0	94.82 \pm 8.2	94 \pm 2.6

3.4.5 稳定性

在第 2 天、第 3 天、第 6 天进行不同浓度样品检测, 结果相差相近, 表明 PCT 荧光免疫层析试纸条在 37 °C 下, 6 d 内可保持稳定, 3 次的荧光值相对均一, 变化不大, 试纸条 4 °C 可保持大约一年的生物稳定性。检测结果如表 5 所示。

3.5 PCT 试纸条的临床样品测试结果

将样品血清标记好, 分别标记为 1-15 号, 逐个滴加到试纸条上, 每个试纸条加 80 μ L, 静置 5 min, 每个样品加 3 个试纸条。用荧光检测仪分别检测出各个试纸条的荧光值, 并计算平均值, 将其代入建立出的标准曲线方程, 计算出血清样品中 PCT 的含量, 计算结果见表 6。

表 4 荧光免疫层析法的批内与批间变异

Table 4 Result of coefficient of variation fluorescence immune chromatography

Samples	Intra-AVG (%)	Intra-AD (%)	Intra-CV (%)	Inter-AVG (%)	Inter-AD (%)	Inter-CV (%)
A (7.5 μ g/L)	166.22 \pm 24.7	8.39 \pm 1.4	5.0 \pm 0.4	160.46 \pm 17.6	9.00 \pm 2.1	5.6 \pm 0.2
B (15 μ g/L)	585.96 \pm 51.5	18.78 \pm 1.7	3.2 \pm 0.3	602.74 \pm 64.8	49.70 \pm 3.8	8.0 \pm 0.1
C (30 μ g/L)	1 254.1 \pm 64.3	38.43 \pm 2.7	3.1 \pm 0.5	1 278.76 \pm 175.1	81.50 \pm 6.7	6.4 \pm 0.4
D (75 μ g/L)	1 932.1 \pm 121.4	55.71 \pm 5.4	3.0 \pm 0.4	1 966.20 \pm 241.5	88.46 \pm 8.1	4.5 \pm 0.2
E (80 μ g/L)	2 734.1 \pm 201.4	76.01 \pm 6.8	2.9 \pm 0.2	2 595.46 \pm 321.4	94.00 \pm 7.4	3.6 \pm 0.3
F (90 μ g/L)	3 113.6 \pm 362.4	72.28 \pm 4.6	2.3 \pm 0.2	3 159.91 \pm 435.3	128.73 \pm 6.1	4.1 \pm 0.2

表 5 PCT 荧光试纸条的稳定性检测值

Table 5 Stability test by PCT fluorescence immune chromatography

Samples	The 2nd day	The 3rd day	The 6th day
A (7.5 μ g/L)	297.84 \pm 15.13	271.21 \pm 14.51	267.43 \pm 43.17
B (15 μ g/L)	583.04 \pm 23.48	497.92 \pm 24.52	253.67 \pm 34.46
C (30 μ g/L)	1 265.32 \pm 14.67	1 210.20 \pm 43.62	1 187.64 \pm 42.18
D (75 μ g/L)	1 941.54 \pm 32.51	1 879.36 \pm 33.74	1 801.32 \pm 22.52
E (80 μ g/L)	2 789.46 \pm 22.11	2 703.98 \pm 51.37	2 615.45 \pm 61.24
F (90 μ g/L)	3 139.50 \pm 17.56	3 098.41 \pm 56.18	3 007.35 \pm 87.53

表 6 荧光免疫层析方法检测血清样本实验结果

Table 6 Result of serum samples test by fluorescence immune chromatography

	FU 1 (μ g/L)	FU 2 (μ g/L)	FU 3 (μ g/L)	AVG (μ g/L)	PCT (μ g/L)
Sal 1	1 276.32	1 389.41	1 219.86	1 295.19	34.45
Sal 2	485.74	536.19	573.42	531.78	9.27
Sal 3	783.48	761.09	675.91	740.16	16.14
Sal 4	326.74	389.59	412.07	376.13	4.13
Sal 5	992.42	917.83	1 091.12	1 000.46	24.73
Sal 6	1 568.56	1 498.79	1 501.43	1 522.93	41.96
Sal 7	1 192.49	1 101.32	1 269.70	1 187.84	30.91
Sal 8	279.37	201.58	295.32	258.76	0.26
Sal 9	823.98	899.24	776.38	833.20	19.21
Sal 10	672.45	592.47	623.19	629.37	12.49
Sal 11	1 743.61	1 692.57	1 791.34	1 742.51	49.20
Sal 12	1 329.37	1 396.52	1 404.80	1 376.89	37.14
Sal 13	0.12	0.02	0.03	0.01	0.00
Sal 14	0.02	0.01	0.03	0.05	0.00
Sal 15	0.05	0.05	0.12	0.04	0.00
CON	0.02	0.07	0.05	0.10	0.00

根据购买的某公司 ELISA 试剂盒提供的 PCT 标准品绘制检测标准曲线, 并根据各个浓度及其吸光度值建立标准曲线, 为之后样品浓度检测做铺垫, 标准曲线方程为 $y=0.0091x+0.32171$, 其中 $R^2=0.99585$ 。表 7 是样品 PCT 浓度计算结果。

表 7 ELISA 方法检测血清样本实验结果

Table 7 The result of serum samples test by ELISA

No.	UV ($\mu\text{g/L}$)	PCT ($\mu\text{g/L}$)
Sal 1	0.645 \pm 0.003	35.60 \pm 0.31
Sal 2	0.402 \pm 0.002	8.90 \pm 0.07
Sal 3	0.475 \pm 0.003	16.84 \pm 0.08
Sal 4	0.363 \pm 0.002	4.67 \pm 0.05
Sal 5	0.549 \pm 0.002	25.02 \pm 0.23
Sal 6	0.699 \pm 0.001	41.52 \pm 0.34
Sal 7	0.606 \pm 0.001	31.28 \pm 0.26
Sal 8	0.323 \pm 0.002	0.23 \pm 0.02
Sal 9	0.504 \pm 0.001	20.05 \pm 0.18
Sal 10	0.442 \pm 0.002	13.24 \pm 0.06
Sal 11	0.764 \pm 0.003	48.57 \pm 0.47
Sal 12	0.654 \pm 0.002	36.51 \pm 0.34
Sal 13	0.065 \pm 0.001	0(N.V)
Sal 14	0.066 \pm 0.001	0(N.V)
Sal 15	0.072 \pm 0.002	0(N.V)
CON	0.049 \pm 0.001	

从表 6、7 中可以看出, 检测的 15 个血清样本结果与市售的进口试剂盒检测值相近, 具有一定的相关性, 有一定的临床意义。而且建立的方法比市场上的 ELISA 试剂盒的检测方法更为方便、快捷, 操作人员不需要任何专业技能, 表明建立的 PCT 荧光免疫层析方法的初步应用比较成功。但考虑到检测的临床样品相对数量较少, 与市售产品比较还需要更多的血清样本, 所以该方法临床应用还有待进一步实验验证。

4 讨论

PCT 作为一种具有更高的特异性和灵敏度的临床诊断生物标志物并且可以指导抗生素的临床

应用, 研究其定量检测方法将具有广阔的应用前景^[21-24]。通过制备出高特异性及高效价的抗体, 并成功标记量子点, 建立得到 PCT 的荧光免疫层析方法。检测范围 0.15–120 $\mu\text{g/L}$, 灵敏度 0.007 $\mu\text{g/L}$, 回收率 91%–113%, 批内批间变异系数小于 0.1, 与血清中其他蛋白没有交叉反应, 特异性高, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置一年稳定性良好, 并与市售的进口降钙素原 ELISA 试剂盒进行对比, 检测结果表明两种方法的检测结果无明显差异, 并且具有更宽的检测范围、更低的灵敏度及较高的便捷性。同时本方法所用的主要试剂均为国产和自制所得, 生产成本低, 未来在市场上的售价也将是低于其他诊断试剂, 且荧光检测仪器便携, 可在患者身旁 20 min 内即可完成检测, 临床推广应用将具有广阔的空间。但本试纸条的开发在于市售的产品比较中相对样本较少, 只有 15 个, 在统计学中还欠缺比较意义, 还需要更多的临床样本进行对照。本荧光检测试纸条的开发旨在为 PCT 临床上检测提供更加简便、快捷的检测方法, 对 PCT 的早期诊断及临床检验有应用价值。

REFERENCES

- [1] Zeng H, Zhang ZX, He QY. Comparative study on two methods for the analysis of procalcitonin. *Med Inf*, 2013, 26(8): 242–243 (in Chinese).
曾华, 张智贤, 何秋莹. 降钙素原两种检测方法的比较. *医学信息*, 2013, 26(8): 242–243.
- [2] Ren HT, Li Y, Han CM, et al. Serum procalcitonin as a diagnostic biomarker for sepsis in burned patients: a meta-analysis. *Burns*, 2015, 41(3): 502–509.
- [3] Ren ZQ, Wu YS, Liu TC. The research progress of new immune chromatography technology. *Guangdong Med J*, 2013, 34(2): 312–314 (in Chinese).
任志奇, 吴英松, 刘天才. 新型免疫层析技术的研究进展. *广东医学*, 2013, 34(2): 312–314.
- [4] Volkov Y. Quantum dots in nanomedicine: recent trends, advances and unresolved issues. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(3): 419–427.
- [5] Zhang GH, Lai WH, Xiong YH, et al. Application of

- quantum dot labeling to development of immunochromatographic test strip for rapid detection of ractopamine. *Food Sci*, 2013, 30(12): 254–257 (in Chinese).
- 张国华, 赖卫华, 熊勇华, 等. 量子点标记免疫层析试纸条快速检测莱克多巴胺的研究. *食品科学*, 2009, 30(12): 254–257.
- [6] Zhang PF, Song J, Chen J, et al. Study on conjugation of quantum dot with anti-hepatitis b surface antigen antibody. *Chin J Anal Chem*, 2013, 41(6): 846–850 (in Chinese).
- 张鹏飞, 宋杰, 陈佳, 等. 量子点与抗乙肝表面抗原(HBsAg)抗体的偶联研究. *分析化学*, 2013, 41(6): 846–850.
- [7] Akshath US, Shubha LR, Bhatt P, et al. Quantum dots as optical labels for ultrasensitive detection of polyphenols. *Biosens Bioelectron*, 2014, 57: 317–323.
- [8] Hu HJ, Fu T, Zhang MZ, et al. Development of CdTe/ZnSe core/shell quantum dots-based lateral-flow immunoassay for rapid detection of clenbuterol. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(12): 1727–1731 (in Chinese).
- 胡华军, 付涛, 张明洲, 等. CdTe/ZnSe核壳量子点免疫层析试纸条检测克伦特罗的研究. *分析化学*, 2010, 38(12): 1727–1731.
- [9] Choi S, Choi EY, Kim DJ, et al. A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I). *Clin Chim Acta*, 2004, 339(1/2): 147–156.
- [10] Yang B, Kang M. Calcitonin original application in diagnosis and treatment of bacterial infectious diseases. *Mod Prev Med*, 2009, 36(3): 596–597 (in Chinese).
- 杨滨, 康梅. 降钙素原在细菌感染性疾病诊断及治疗中的应用. *现代预防医学*, 2009, 36(3): 596–597.
- [11] Guo LN, He HQ. Development of an immunochromatographic test strip for the detection of anti-CCP antibody based on quantum dots. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2014, 29(4): 389–395 (in Chinese).
- 郭利宁, 何红秋. 一种基于量子点检测抗 CCP 抗体的免疫荧光层析法. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(4): 389–395.
- [12] Goryacheva IY, Speranskaya ES, Gofman VV. Synthesis and bioanalytical applications of nanostructures multiloaded with quantum dots. *TrAC Trends Anal Chem*, 2015, 66: 53–62.
- [13] Yang QH, Gong XQ, Song T. Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein. *Biosens Bioelectron*, 2011, 30(1): 145–150.
- [14] Song J, Fan J, Song DQ, et al. Sandwich immunosensing method for measuring cardiac troponin I with quantum dots-coupled antibody against troponin I. *Chem J Chin Univ*, 2009, 30(10): 1940–1944 (in Chinese).
- 宋健, 范佳, 宋大千, 等. 量子点偶联抗体型夹心免疫传感法检测心肌钙蛋白 I. *高等学校化学学报*, 2009, 30(10): 1940–1944.
- [15] Taranova NA, Berlina AN, Zherdev AV. ‘Traffic light’ immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 255–261.
- [16] Zhang T, Zhou H, Wang YJ, et al. Calcitonin original diagnosis significance in emergency anti-infection. *Chin J Emerg Med*, 2010, 19(5): 556–558 (in Chinese).
- 张涛, 周虹, 王用金, 等. 降钙素原在急诊抗感染中的诊断意义. *中华急诊医学杂志*, 2010, 19(5): 556–558.
- [17] Wang LX, Han GQ. Clinical value of procalcitonin for the early diagnosis of bacterial sepsis. *Zhejiang Clin Med J*, 2009, 11(11): 1150–1152 (in Chinese).
- 王林霞, 韩国强. 降钙素原对细菌性脓毒症早期诊断的临床意义. *浙江临床医学*, 2009, 11(11): 1150–1152.
- [18] Kong WQ, Zhuang R, Wei DZ, et al. Procalcitonin and C-reactive protein in diagnosis of early bacterial infection in severe multiple injury patients. *Chongqing Med*, 2009, 38(16): 2018–2019 (in Chinese).
- 孔万权, 庄荣, 魏大臻, 等. 降钙素原与血清 C-反应蛋白联合测定对严重多发伤患者早期细菌感染的诊断价值. *重庆医学*, 2009, 38(16): 2018–2019.
- [19] Monneret G, Pachot A, Laroche B, et al. Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced TNF production by human

- circulating blood cells. *Cytokine*, 2000, 12(6): 762–764.
- [20] Wang HY, Wang H, Chen SP, et al. Development of a fluorescent immunochromatographic assay for the procalcitonin detection of clinical patients in China. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 37–42.
- [21] Liu YL, Zhao XH, Zhang KW. Calcitonin original with allergic C-reactive protein in acute aggravating period of chronic obstructive pulmonary disease clinical significance. *Chin J Coal Ind Med*, 2012, 15(9): 1384–1385 (in Chinese).
刘玉玲, 赵小慧, 张克武. 降钙素原与超敏 C-反应蛋白在慢性阻塞性肺疾病急性加重期中的临床意义. *中国煤炭工业医学杂志*, 2012, 15(9): 1384–1385.
- [22] Baylan O, Balkan A, Inal A, et al. The predictive value of serum procalcitonin levels in adult patients with active pulmonary tuberculosis. *Jpn J Infect Dis*, 2006, 59(3): 164–167.
- [23] Charles PE, Dalle F, Aho S, et al. Serum procalcitonin measurement contribution to the early diagnosis of candidemia in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 2006, 32(10): 1577–1583.
- [24] Gilbert DN. Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(7): 2325–2329.

(本文责编 陈宏宇)