

基于量子点免疫荧光技术快速检测过敏原特异性 IgE 抗体

亓涵¹, 孙燕燕¹, 武建伟¹, 李忠春¹, 亓德胜^{1*}, 梁玉^{2*}

(1. 济南德亨医学科技有限公司, 济南 250031; 2. 山东德渡生物技术有限公司, 济南 250031)

摘要: **目的** 探讨基于量子点免疫荧光技术的过敏原特异性 IgE 抗体快速检测方法的灵敏度、特异性。**方法** 实验以 125 例临床血清样本(过敏原特异性 IgE 抗体阳性患者 65 例, 过敏原特异性 IgE 抗体阴性患者 60 例)为研究对象, 采用量子点免疫荧光技术检测不同浓度过敏原特异性 IgE 抗体的荧光信号强度, 测定荧光信号强度与 IgE 抗体浓度的相关性, 评估方法的灵敏度、特异性及检测结果一致性。**结果** 荧光信号强度与 IgE 抗体浓度呈正相关, 过敏原特异性 IgE 抗体阳性组相关系数 r 为 0.556~0.678, 过敏原特异性 IgE 抗体阴性组相关系数 r 为 0.375~0.922。检测灵敏度达到 100%, 特异性为 100%。**结论** 基于量子点免疫荧光技术的过敏原特异性 IgE 抗体检测方法具有灵敏度高、特异性好、检测限低的显著优势, 为过敏性疾病的诊断和个体化治疗提供了精准可靠的技术路径, 具备广阔的临床应用前景。

关键词: 量子点; 免疫荧光技术; 过敏原; 特异性抗体; 体外诊断

0 引言

量子点是一类具有高量子产率、优异光学稳定性和窄带发射光谱的半导体纳米材料, 其独特的光物理特性使其成为免疫荧光检测领域的研究对象^[1]。量子点免疫荧光技术利用量子点作为荧光标记物, 与抗体或抗原偶联实现对靶分子的高灵敏检测^[2]。在体外诊断领域, 量子点免疫荧光技术已被广泛应用于癌症标志物、炎症因子及病毒抗体的快速检测中^[3]。过敏性疾病已成为全球范围内日益严重的公共健康问题, 过敏原特异性 IgE 抗体的检测被广泛应用于过敏性疾病的诊断与管理^[4]。针对过敏原特异性 IgE 抗体的检测, 量子点免疫荧光法凭借其高灵敏度和高特异性, 能够显著降低检测限, 同时提高诊断的准确性和可靠性^[5]。本文探究基于量子点免疫荧光技术的过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂的开发, 为提高过敏性疾病的早期诊断准确性和检测灵敏度提供参考, 并为该技术的临床应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂

实验中所用试剂如下: 尘螨、花粉、食物过敏原。量子点

荧光标记抗人 IgE 抗体试剂(Glen Research, 产品编号为 QB-IgE, 规格为 100 μ g), 其含有表面修饰的量子点, 具有优良的荧光特性, 波长为 520 nm。抗人 IgE 单克隆抗体(Abcam, UK, 产品编号为 ab99804, 规格为 200 μ g)。标记用抗人 IgE 抗体的偶联剂为 PEG- 硫醇修饰量子点(Amersham Biosciences, UK, 产品编号为 Q550, 批号为 658233, 规格为 500 μ g)。所有缓冲液均使用 PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4), 其来源为 Invitrogen(产品编号为 10010023, 规格为 500 mL)。

1.1.2 实验样本

实验所用血清样本经医院伦理委员会批准, 来自临床过敏性疾病患者(过敏原特异性 IgE 抗体阳性患者 65 例, 过敏原特异性 IgE 抗体阴性患者 60 例), 血清样本采集后立即冷冻储存于 -80°C 条件下, 用于后续 IgE 抗体检测。所有临床样本均严格遵循《医学伦理委员会伦理审查办法》进行处理。纳入标准: 研究对象为 18 岁以上的成人, 无性别限制; 同意参与本研究, 并签署知情同意书; 样本采集前无服用抗过敏药物或免疫抑制剂至少 2 周。排除标准: 具有严重免疫系统疾病或其他慢性疾病; 孕妇或哺乳期女性; 过敏性疾病伴有严重并发症, 如过敏性休克等; 近 6 个月内有过敏性过激反应史的患者。

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金(YDZX2022177); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程(2022TSGC1077); 济南市科技计划项目(202428026)

第一作者: 亓涵, 硕士, 研究方向为医疗器械的开发与应用。

*** 通信作者:** 亓德胜, 硕士, 高级工程师, 研究方向为医疗器械的开发与应用。E-mail: 3050950263@qq.com。梁玉, 中级工程师, 研究方向为医疗器械的开发与应用。E-mail: 417033040@qq.com

1.1.3 实验设备

实验所用设备主要为荧光显微镜(Olympus, 型号为 IX53, 批号为 202312, 使用波长为 520 nm), 用于观察量子点的荧光信号, 酶标仪(Thermo Fisher, 型号为 Multiskan GO, 批号为 7310417), 用于对反应体系中的荧光信号进行定量分析。

1.2 实验方法

1.2.1 抗体偶联物的制备

量子点溶解于无水 DMSO 中, 制备为浓度为 1 mg/mL 的量子点溶液。接着, 采用硫醇修饰的 PEG 作为连接基团, PEG 修饰的量子点与抗 IgE 单克隆抗体进行共价偶联反应。具体操作为: 先将抗 IgE 抗体溶解于 PBS 缓冲液中, 调节 pH 值至 7.4, 确保抗体的活性; 再加入适量的 PEG 修饰量子点, 继续在室温下震荡反应 4 h。反应完成后, 采用透析法去除未结合的试剂和低分子杂质, 纯化得到量子点抗体偶联物。最终得到的量子点抗体偶联物用于后续过敏原特异性 IgE 抗体检测。

1.2.2 检测试剂盒的制备

检测试剂盒基于免疫层析原理, 以硝酸纤维素膜(NC 膜)为核心, 采用层压结构设计, 主要组成涵盖 PVC 底板、样品垫、结合垫、吸水垫及 NC 膜(图 1)。NC 膜(Millipore, 规格 25 mm×300 mm, 批号为 AB320123)为抗原抗体反应的关键载体, 位于 PVC 底板上, 其表面预先喷涂测试线(T 线)和质控线(C 线)。T 线利用喷涂尘螨、花粉等过敏原蛋白, C 线利用喷涂抗 IgE 抗体。结合垫用于负载量子点标记的抗 IgE 抗体偶联物, 确保其与样本中 IgE 结合后的复合物顺利迁移至 T 线和 C 线。样品垫(Whatman, 批号为 20400030)用于样本的均匀分布, 避免非特异性干扰, 同时采用 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)浸润处理以维持 IgE 的活性。吸水垫(Merck, 批号为 AW0223)放置于最末端, 快速吸收过量反应液, 避免液体回流干扰。所有组分在层压机上依次装配, 并裁剪为宽度为 5 mm 的条带, 密封包装后储存于干燥室内。制备的检测试剂盒将用于后续的量子点荧光信号检测, 其 T 线和 C 线的荧光强度用于判断过敏原特异性 IgE 抗体的含量及检测的灵敏度和特异性。

1.2.3 样本检测

样本检测采用基于量子点免疫荧光技术的层析试剂盒, 旨在快速、高效地检测过敏原特异性 IgE 抗体。取 200 μL 临床血清样本稀释于 1:10 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)中, 确保 IgE 抗体在免疫反应中的活性。将稀释后的血清样本滴加至试剂盒的样品垫处, 血清样本在毛细作用下沿硝酸纤维素膜层析, 逐步经过结合垫和检测区域。结合垫中预装的量子点标记抗 IgE 抗体与样本中目标 IgE 抗体特异性结合后, 复合物迁移至 T 线和 C 线区域, 分别与预涂的过敏原和抗 IgE 抗体发生固定反应。完成层析反应后, 在荧光显微镜下激发量子点荧光信号, 采集 T 线和 C 线的荧光强度。使用标准曲线进行定量分析, 计算样本中特异性 IgE 抗体的浓度。检测的灵敏度和特异性采用分析 T 线荧光信号强度相对于 C 线荧光信号的比值确定。所有样本均重复检测三次以确保实验数据的可靠性, 为后续特异性和敏感性分析提供准确的实验依据。

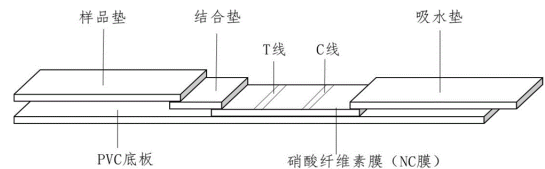


图 1 量子点免疫层析检测试剂盒

1.3 数据分析

采用 SPSS 24.0 统计软件对本次研究数据进行统计学分析。计数资料采用百分比(%)表示, 结果采用 χ^2 检验。结果采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 荧光信号强度与 IgE 抗体浓度的相关性分析

实验结果显示(表 1), 荧光信号强度与 IgE 抗体浓度在过敏原特异性 IgE 抗体阳性和阴性患者中均表现出一定程度的正相关性。荧光信号强度对 IgE 抗体浓度的反应在阴性组中更为显著。整体数据支持量子点免疫荧光技术具有检测 IgE 抗体的潜力, 但不同组别间的相关性差异值得进一步研究。

表 1 荧光信号强度与 IgE 抗体浓度的相关性分析

组别	样本数	IgE 抗体浓度均值(IU/mL)	荧光信号强度均值(AU)	相关系数(r)	P 值
Hp 阳性组	65	30.52 ± 10.25	420 ± 150	0.905	0.031
Hp 阴性组	60	20.42 ± 8.69	330 ± 120	0.991	0.003

2.2 量子点免疫荧光技术检测灵敏度分析

实验结果显示(表 2), 荧光信号强度与 IgE 浓度范围之间具有明显的线性关系, 不同浓度范围内的平均荧光强度逐步递增, 且标准差较小, 表明检测结果具有较高的一致性和稳定性。所有样本均检测为阳性, 实际结果与检测结果完全一致, 表明量子点免疫荧光技术在检测过敏原特异性 IgE 抗体时具有优异的灵敏度和准确性, 适用于多种浓度条件下的快速定量

分析。

2.3 量子点免疫荧光技术检测特异性分析

本研究对 65 例过敏原特异性 IgE 抗体阳性患者和 60 例过敏原特异性 IgE 抗体阴性患者的 IgE 抗体浓度等级进行了特异性分析, 结果表明(表 3), IgE 抗体浓度在各等级中的分布情况具有一定规律性。在过敏原特异性 IgE 抗体阳性组中, IgE 抗体浓度主要集中于 1 级和 2 级, 阳性样本数占比明显高于其他

浓度等级; 而过敏原特异性 IgE 抗体阴性组在相同浓度等级下的分布较为接近。在较高浓度等级(5 级和 6 级)中, 阳性样本数和阴性样本数逐渐减少, 显示高浓度下样本的特异性较高。说明量子点免疫荧光技术在区分过敏原特异性 IgE 抗体阳性与阴性样本时的特异性较强。本方法能够精准检测过敏原特异性 IgE 抗体浓度, 尤其在低浓度水平时表现出较好的区分能力, 为临床过敏原诊断提供有力支持。

表 2 量子点免疫荧光技术检测灵敏度分析

IgE 浓度范围 (IU/mL)	检测荧光强度(AU)	平均荧光强度(AU)	荧光强度标准差(AU)	实际结果	检测结果
5~15	140	280	140.000	阳性	阳性
5~15	280	280	140.000	阳性	阳性
5~15	420	280	140.000	阳性	阳性
15~30	260	400	140.000	阳性	阳性
15~30	400	400	140.000	阳性	阳性
15~30	540	400	140.000	阳性	阳性
30~50	360	540	154.919	阳性	阳性
30~50	480	540	154.919	阳性	阳性
30~50	600	540	154.919	阳性	阳性
30~50	720	540	154.919	阳性	阳性

表 3 量子点免疫荧光技术检测特异性分析

IgE 抗体浓度等级	过敏原特异性 IgE 抗体阳性样本数(n)	过敏原特异性 IgE 抗体阴性样本数(n)	总样本数(n)
0	10	9	19
1	15	14	29
2	12	11	23
3	10	10	20
4	8	8	16
5	6	5	11
6	4	3	7
<i>z</i>		10.456	
<i>P</i>		< 0.001	

3 讨论与结论

本研究显示, 量子点免疫荧光技术对过敏原特异性 IgE 抗体的检测灵敏度为 100%。赵朋月等^[6]的研究表明, ELISA 的检测灵敏度通常在 80%~90% 之间, 而量子点的高荧光量子产率和信号放大效应有效改善了低浓度 IgE 的检出能力。本实验中, 荧光信号强度与 IgE 抗体浓度的正相关性在过敏原特异性 IgE 抗体阳性与阴性患者中均得到验证, 但过敏原特异性 IgE 抗体阴性组的相关性更强, 提示该方法在健康个体中的检测背景干扰较低。特异性分析显示检测结果与实际结果完全一致, 与黄慧等^[7]研究中约 5%~10% 的假阳性率形成对比, 表明量子点免疫荧光技术在特异性方面具有显著优势。检测方法一致性评估在不同 IgE 浓度范围内的实验结果展现出较高的一致性, 荧光信号的标准差小于 140 AU。过敏原特异性 IgE 抗体阳性患者中检测结果的标准差略高于阴性患者, 可能与过敏原种类及患者体内抗体反应的个

体差异有关^[8]。量子点免疫荧光技术利用量子点材料高效的荧光特性和特异性抗体的高亲和力, 成功实现了对过敏原特异性 IgE 抗体的快速检测^[9]。与龙子怡等^[10]研究中基于化学发光和荧光偏振等方法相比, 本技术成本较低, 适用于大规模临床检测。然而, 在过敏原种类复杂、IgE 浓度过低的样本中, 该方法仍需进一步优化以降低可能的背景干扰。

本研究开发的基于量子点免疫荧光技术的检测平台能够快速、高效地检测过敏原特异性 IgE 抗体, 展现出优异的灵敏度和特异性。研究结果验证了荧光信号强度与 IgE 抗体浓度的相关性, 表明该技术在过敏性疾病诊断中的潜在应用价值, 为临床诊断和精准医学提供了新的技术优化路径。未来研究需进一步优化检测条件, 并拓展其在其他免疫相关疾病中的应用场景。

参考文献

- [1] 刘莹, 刁波, 何泽民, 等. 化学发光免疫分析技术和量子点免疫荧光组织化学检测新型冠状病毒特异性抗体及其应用评价[J]. 华南国防医学杂志, 2021, 35(09): 630-634.
- [2] 周晶, 沈志祥, 罗和生. 量子点免疫荧光组化技术检测肝细胞癌中窖蛋白 1 的表达[J]. 临床消化病杂志, 2013, 25(05): 257-259, 285.
- [3] 阮远, 张孝斌, 程帆, 等. 量子点免疫荧光对比传统免疫组化技术检测人前列腺组织中前列腺特异性抗原的表达[J]. 武汉大学学报(医学版), 2013, 34(02): 188-191, 195.
- [4] 刘浩浩. 量子点免疫荧光法快速检测高敏肌钙蛋白 I(hs-cTnI) 及末梢血模式的临床应用[D]. 苏州: 苏州大学, 2022.
- [5] 张永良, 高应东, 谭明娟. 多重微球流式免疫荧光法检测 12 项细胞因子的性能评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2022, 29(12): 2131-2136.
- [6] 赵朋月, 宋建, 刁路明, 等. 量子点免疫荧光技术检测基质 Cav-1、LDH-B 和 PKM2 蛋白在人肺腺癌中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤, 2012, 32(09): 731-737.
- [7] 黄慧, 郑芳, 彭俊, 等. 量子点标记间接免疫荧光技术在雌激素受体检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1215-1216.
- [8] 张利改, 何远, 裴好, 等. 重庆地区不同人群过敏原特异性 IgE 抗体检测及流行病学特征分析[J]. 国际检验医学杂志, 2024, 45(18): 2177-2183.
- [9] 廖德权. 基于量子点标记的降钙素原快速、高灵敏荧光免疫层析检测方法的建立及应用[J]. 数理医药学杂志, 2021, 34(10): 1425-1429.
- [10] 龙子怡, 张启迪, 邹知欣, 等. 组分过敏原 IgE 检测显示屋尘螨特异性免疫治疗导致新增致敏的发生[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2024, 38(07): 572-577.