



单位代码 10635

学 号 112013316001118

西南大學

硕士学位论文

量子点为探针的夹心免疫法检测
 β -淀粉样肽的含量

论文作者：皮江丽

指导教师：郑鹄志 教授

学科专业：分析化学

研究方向：发光分析及光学生物传感器

提交论文日期： 2016 年 4 月 26 日

论文答辩日期： 2016 年 5 月 29 日

学位授予单位：西南大学

中国·重庆

2016 年 5 月

M.S. Thesis

**The Detection of β -amyloid Peptide Based
on Quantum Dots and Immunoassay**

Pi Jiang-Li

Supervisor

Prof. Zheng Hu-Zhi

**School of Chemistry and Chemical Engineering,
Southwest University, Chongqing, P.R. China**

May, 2016

独创性声明

学位论文题目：量子点为探针的夹心免疫法检测 β -淀粉样肽的含量

本人提交的学位论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中引用他人已经发表或出版过的研究成果，文中已加了特别标注。对本研究及学位论文撰写曾做出贡献的老师、朋友、同仁在文中作了明确说明并表示衷心感谢。

学位论文作者：凌江丽 签字日期：2016 年 5 月 30 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解西南大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南大学研究生院（筹）可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书，本论文：☐不保密，☐保密期限至 年 月止）。

学位论文作者签名：凌江丽 导师签名：郑雄飞

签字日期：2016 年 5 月 30 日 签字日期：2016 年 5 月 30 日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	IV
第一章 绪论.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 量子点.....	2
1.2.1 量子点的概述.....	2
1.2.2 量子点的结构.....	2
1.2.3 量子点的荧光性能.....	3
1.2.4 量子点的制备.....	7
1.2.5 量子点的应用.....	8
1.3 阿尔茨海默病.....	13
1.3.1 阿尔茨海默病的简介.....	13
1.3.2 β -淀粉样肽的简介.....	14
1.3.3 β -淀粉样肽的检测.....	15
1.4 本论文的研究内容及意义.....	15
第二章 基于量子点的夹心免疫法检测 $A\beta(1-42)$	17
2.1 引言.....	17
2.2 实验部分.....	18
2.2.1 试剂与仪器.....	18
2.2.2 $A\beta(1-42)$ 单体的制备和脑脊液样品的制备.....	18
2.2.3 抗体的溶解与保存方法.....	19
2.2.4 缓冲液的配制.....	19
2.2.5 $A\beta(1-42)$ 的检测步骤.....	19
2.3 结果和讨论.....	21
2.3.1 $A\beta(1-42)$ 的检测机制.....	21
2.3.2 夹心免疫检测的条件优化.....	22
2.3.3 方法的选择性.....	24
2.3.4 人脑脊液中 $A\beta(1-42)$ 的检测.....	26
2.4 结论.....	26
第三章 基于量子点双抗体夹心免疫法检测 $A\beta(1-42)$	29
3.1 引言.....	29

3.2 实验部分.....	31
3.2.1 试剂与仪器.....	31
3.2.2 A β (1-42)单体的制备和脑脊液样品的制备.....	31
3.2.3 抗体的溶解与保存方法.....	32
3.2.4 缓冲溶液的配制.....	32
3.2.5 A β (1-42)的检测步骤.....	32
3.3 结果和讨论.....	33
3.3.1 A β (1-42)的检测原理.....	33
3.3.2 检测条件的优化.....	33
3.3.3 方法的选择性.....	35
3.3.4 人脑脊液中 A β (1-42)的检测.....	36
3.4 结论.....	37
参考文献.....	39
致谢.....	53
硕士期间发表论文.....	55

量子点为探针的夹心免疫法检测 β -淀粉样肽的含量

分析化学专业硕士研究生 皮江丽

指导教师 郑鹄志 教授

摘 要

量子点(quantum dots, QDs), 又称半导体纳米晶, 是准零维的纳米材料, 由少量的原子组合所形成的, 三个维度的尺寸都在 100 nm 以下。量子点的外观恰似一极小的点状物, 主要为球形或类球形, 是由 IIB~VIA 或 IIIA~VA 元素组成的半导体材料制成的, 直径纳米级的颗粒。量子点由于它自身的量子效应, 当颗粒尺寸为纳米级时, 尺寸限域将引起尺寸效应、量子限域效应、宏观量子隧道效应和表面效应, 因此与传统有机荧光试剂相比, 它具有宽的激发光谱和窄的发射光谱、很好的光稳定性、较大的斯托克斯位移等优越的荧光特性, 是一种理想的荧光探针。因此, 近年来, 量子点在生命科学等相关学科的应用也越来越成为人们关注的焦点, 特别是量子点在生物物质的荧光标记方面应用更多。已报道的 QDs 在这一领域的应用大部分集中于以量子点为荧光探针的识别和成像方面, 如生物大分子之间的相互作用、细胞及组织的单色和多色标记、生物体组织和在体光学成像, 以及其在蛋白质、DNA 等生物样品检测中的应用。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性的神经系统疾病。临床主要表现为认知功能下降、行为障碍、执行功能障碍以及人格和行为改变等。根据 2015 年《世界阿尔茨海默病报告》显示, 预计到 2050 年, 全球患有老年痴呆的人数将从目前的 4600 万人增加至 1.315 亿人。从报告显示的数据可知近年来 AD 患者的数量急剧增加, 并且该病在老年人中的患病率和致残率高, 治疗的时间长且治疗费用很高, 给患者的家庭和社会带来极大的负担。毫无疑问, 阿尔茨海默病是当今和未来人类所面临的最大的全球公共健康和社会保健挑战之一。所以, 探索早期诊断和治疗这种疾病的方法是至关重要的。研究表明, 细胞外淀粉样斑块的沉积是导致 AD 的主要原因, 淀粉样蛋白斑块的主要成分是由 42 个氨基酸组成的肽, 这种肽被称为 β -淀粉样肽 ($A\beta(1-42)$), 它具有折叠和形成毒性聚合物的趋势。由于 $A\beta(1-42)$ 和 AD 之间的关系, $A\beta(1-42)$ 被认为是 AD 早期诊断的标志物。目前, 已建立一些检测 $A\beta$ 的方法, 但是大多数的方法操作繁琐, 仪器昂贵, 灵敏度不高。因此, 发展高灵敏度并且不需要昂贵仪器的检测方法对早期诊

断 AD 非常有必要。

基于量子点良好的荧光性能，和其能够用在生物样品中作为信号标记物，本论文的主要研究工作如下：

(1) 以量子点作为荧光探针和磁分离技术相结合而建立的夹心免疫法定量检测 $A\beta(1-42)$ 的含量。以表面修饰链霉亲和素 (Streptavidin, SA) 磁珠 (Magnetic Beads) 与生物素修饰的 $A\beta$ C-端抗体 (C terminated Antibody, C-Ab) 偶联，与样品混合，再依次加入生物素修饰的 N 端抗体 (N-Ab)、过量链霉亲和素修饰的量子点 (SA-QDs)。当样品中存在 $A\beta(1-42)$ 时，会形成 MB-C-Ab- $A\beta$ -N-Ab-QDs 免疫夹心复合物。通过外加磁场可以从溶液中除去此夹心复合物，导致溶液中 QDs 浓度减小、荧光降低；且荧光的降低与 $A\beta(1-42)$ 的浓度成线性。基于此，成功构建了免疫测定 $A\beta(1-42)$ 的新方法，检测的线性范围是 $0.5-8.0 \text{ nmol L}^{-1}$ ，检出限为 0.2 nmol L^{-1} 。该方法能用于检测人脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中的 $A\beta(1-42)$ 的检测。

(2) 基于第一个工作，为了减少反应时间，第一个工作时间为 10.5 h，第二个工作时间为 6 h；不需要用磁铁进行分离，实验操作更简单，同时提高检测的灵敏度，本研究建立了一个以 QDs 作为信号标记的高灵敏度免疫分析方法检测 $A\beta(1-42)$ 。首先，将 $A\beta(1-42)$ 的 C 端抗体 (C-Ab) 固定在对抗体具有强结合力的 96 孔板上，加入样品后，再加入生物素化的 N 端抗体 (N-Ab)；最后加入过量的 QDs。当样品中存在 $A\beta(1-42)$ 时，会形成紧密结合在微孔板表面的 C-Ab- $A\beta$ -N-Ab-QDs 免疫夹心复合物而导致上清中 QDs 浓度减小、荧光降低。上清溶液 525 nm 处的荧光强度与 $A\beta(1-42)$ 的浓度在 $5-100 \text{ pmol L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系，检出限 1.7 pmol L^{-1} 。该方法也成果用于 CSF 中 $A\beta(1-42)$ 的检测。相比磁分离再检测，本方法灵敏度更高、操作更简单、分析速度更快、检测成本更低，有希望用于临床检测中。

关键词：阿尔茨海默病 量子点 β -淀粉样肽 夹心免疫法

The Detection of β -amyloid Peptide Based on Quantum Dots and Immunoassay

Postgraduate majoring in Analytical Chemistry: Pi Jiang-Li

Supervisor: Prof. Zheng Hu-Zhi

Abstract

Quantum dots (QDs) were made of semiconductor materials, also known as semiconductor nanocrystals, is quasi zero dimensional nanomaterials, and the three dimensions are less than 100 nm. The appearance like a tiny point, mainly spherical or have spherical shape, consisting of IIB ~ VIA or IIIA ~ VA element and the particles' diameter are also nanoscale. Due to the quantum dots with quantum effects, size effect, quantum confinement effect, macroscopic quantum tunneling effect and surface effect. When it compared with conventional organic fluorescent reagent, it has exhibits excellent fluorescent properties, including wide excitation spectrum and narrow optical emission spectroscopy, good light stability, large Stokes shift, good biocompatible, so it is a kind ideal fluorescent probe. Therefore, in recent years, the application of QDs in the science of life and related disciplines caused more and more person's attention, especially QDs in biological molecular fluorescent labeling. Most of the application of QDs in this area has focused on the fluorescent probes' identification and imaging, such as the interaction between biological macromolecules, cells and tissues of single color and multi-color labeling, biological tissue and in vivo optical imaging, and its application in biological samples such as protein, DNA testing.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative pathology causing dementia in humans. The clinical manifestations of AD included a decline in cognitive ability, alterations in behavior, irreversible memory loss, and language impairment. According to the 2015 world Alzheimer's disease report shows that today over 46 million people live with dementia worldwide, more than the population of Spain. This number is estimated to increase to 131.5 million by 2050. Obviously, there is a growing

awareness of dementia, and the high prevalence and morbidity of the disease in the elderly, the treat time is long and the cost is expensive, which has a tremendous burden on the patient's family and society. It is no doubt that Alzheimer's disease is one of the biggest global public health and social care challenges facing people today and in the future. Methods for early diagnosis are critical for the development of effective treatments to combat this debilitating disease. Studies have confirmed that deposition of extracellular amyloid plaque is the main cause of AD, and the major component of amyloid plaque is the 42-residue-long peptide ($A\beta(1-42)$), which has great tendency to misfold and form toxic aggregates. With regard to the close relationship between AD and $A\beta(1-42)$, $A\beta(1-42)$ is considered as a promising biomarker for AD. In recent years, some attempts have been made to detect $A\beta$ species in both aqueous solutions and cell derived samples. These methods, however, have some limitations. Some methods need expensive instruments, which limit their applications in routine testing. And the sensitivity of some methods is not very high. Therefore, it is highly desirable to develop a sensitive method for $A\beta(1-42)$ without using expensive instruments. Based on the superior properties of QDs, the main works of this thesis are summarized as follows:

(1) A new sandwich immunoassay method for the detection of $A\beta(1-42)$ based on quantum dot (QDs) nanolabels and magnetic separation. With beads as the substrate, first of all, the biotinylated C-terminal antibody bonding on the streptavidin modified magnetic beads by biotin - avidin binding interaction, and then bind $A\beta(1-42)$ and biotinylated N-terminal antibody specifically, finally the biotinylated N-terminal antibody bound with streptavidin modified QDs, respectively. In the presence of $A\beta(1-42)$, QDs linked to magnetic beads (MB) via the formation of immune-sandwich complex and can be removed by a magnetic field. And as a result, fluorescence intensity from QDs in the supernatant decreased. Under the optimized conditions, there is a linear relationship between the fluorescence intensity of supernatant solution and the concentration of $A\beta(1-42)$ from 0.50 to 8.0 nmol L⁻¹ with a limit of detection 0.2 nmol L⁻¹ (38). This immunoassay was applied to detect $A\beta(1-42)$ in human cerebrospinal fluid (CSF) successfully.

(2) Based on the first job, in order to reduce the reaction time, make the operation more simple, while improve the detection sensitivity, this work established a high sensitivity sandwich immunassay for detecting $A\beta(1-42)$ with QDs as the

fluorescent signal label. First of all, the the undecorated C-terminal antibody (C - Ab) which has special combination with one end of A β (1-42) will be binded on the 96-well plates. And then combing with A β (1-42) and biotinylated N-terminal antibodies (N - Ab) which has special combination with the other end of A β (1-42); Finally adding QDs. Removing the supernatant and determining fluorescence intensity, we find that the fluorescent intensity at 525 nm of the supernatant solution showed a good linear relationship with A β (1-42), and the concentration of A β (1-42) from 5 to 100 pmol L⁻¹. Therefore, another sandwich immunassay was developed, therefore, applying this method to determine the content of A β (1-42), the limit of detection is 1.7 pmol L⁻¹ (3 δ). This method can better to detect A β (1-42) in human cerebrospinal fluid (CSF).

Keywords: Alzheimer's disease quantum dots β -amyloid peptide sandwich immunoassay

第一章 绪论

1.1 引言

1959年,著名物理学家、诺贝尔奖获得者理查德·费曼在《在底部还有很大空间》的一次讲演中指出,从最原始的时代开始,人类的每一次技术改革都是把物质改造成与人类生活相关的物质形态。但是从物理学的发展规律来看,我们可以把单个的分子或者是原子通过组装变成物质。对于纳米技术最早梦想就是,人类可以根据自己的意愿,将原子进行逐个排列制造出我们所需要的物质。在20世纪80年代末、90年代初,纳米技术飞速发展,科学家们发明了扫描隧道显微镜,揭开了分子和原子微观世界的神秘面纱,这对纳米科技的发展产生了巨大的推动作用。随着人类的不断努力,20世纪80年代中期成功研制出了纳米金属材料,后来人们又研制出了纳米半导体薄膜、纳米陶瓷、纳米瓷性材料和纳米生物医学材料等。1990年7月,在美国巴尔的摩举办了第一届国际纳米科学技术会议,正式宣布纳米材料科学为材料科学的一个新分支,标志着纳米科学技术的正式诞生 [1-5]。

纳米材料的出现很快引起了人们浓厚的兴趣和关注。纳米最初命名为“小粒子”,后来,德国科学家 Gleiter 提出了“纳米晶体材料”的概念后,人类通过人工制备获得了纳米晶体,并对它的各种面貌与性质进行了系统的研究[6-7]。纳米材料是纳米级结构材料的简称,主要是指由纳米颗粒组成构成的,大小范围为1-100 nm 的材料或者由这些组成的粒子为基本单元构成的材料。由于构成的基本单元不同,纳米材料可分为超微颗粒材料与纳米固体材料。超微颗粒材料主要是由大小为1-100 nm 之间的纳米粒子构成的。纳米固体材料主要是由超微颗粒材料为基本单元构成的。

纳米材料处在原子簇和宏观物体交界的过渡区域,从通常的关于微观和宏观的观点看,这样的系统既非典型的微观系统亦非典型的宏观系统,是一种典型的介观系统。所以,它具有表面效应,小尺寸效应,量子尺寸效应,宏观量子隧道效应[8-10]。由于纳米的这些特性使得它们在磁、光、电等方面呈现出常规材料不具备的独特性质。纳米材料诞生与发展,使得纳米科学与技术也得以迅速发展,因此纳米微粒在磁性材料、电子材料、光学材料、高致密度材料的烧结、催化、传感、陶瓷增韧、环境、能源、生命科学等领域的研究与应用等方面有广阔的应用前景[11-21]。因此,纳米材料被公认为本世纪最有前景的材料。

近些年来,随着社会的发展人类研发出一些新型的纳米材料,包括半导体量子点[22]、二氧化硅纳米材料[23-25]、磁性纳米颗粒[26]、稀土发光材料[27]等及

其复合材料[28]。量子点作为一种新颖的半导体纳米材料,具有许多独特的性质,在生物医学领域发挥着巨大的潜能。

1.2 量子点

1.2.1 量子点的概述

量子点(quantum dots, QDs),又称半导体纳米晶,是准零维的纳米材料,由少量的原子组合所形成的,三个维度的尺寸都在 100 nm 以下。量子点的外观恰似一极小的点状物,主要为球形或类球形,是由 IIB~VIA 或 IIIA~VA 元素组成的半导体材料制成的,直径纳米级的颗粒[29-31]。量子点是原子和分子所构成的集合体,在该纳米级的集合体中,一些是由一种半导体材料组成,如由 IIB 和 VIA 族元素组成的 CdS、CdSe、CdTe、ZnSe 等量子点,或者是 IIIA 和 VA 族元素组成的 InP、InAs 等量子点;也有的量子点由两种或两种以上的半导体材料所组成的。

1983 年,贝尔实验室科学家 Brus 在《Chemical Physics》发表成果,初次提出了胶体量子点(colloidal quantum dot)的概念[32]。经过十年的研究与发展,1993 年, Bawendi 教授领导的科研小组第一次合成出了大小均一的量子点[33]。1998 年, Alivisatos [34]和 Nie [35]两个研究小组首次将量子点作为生物荧光标记应用于活细胞体系,该成果刊登在 Science 上,这也是有关量子点作为生物探针的最早的论文;同时,他们也解决量子点水溶性的问题,以及量子点如何通过表面修饰的活性基团与生物大分子偶联的问题,使量子点用于生物医学的研究就成为了可能,由此也引起了量子点的研究热潮。至 2016 年 3 月为止,关于量子点方面的报道的文献非常多,在 Web of Science 数据库中搜索,主题为“semiconductor nanocrystals”有 18,896 个结果,主题为“quantum dots”,有 105,277 个结果。因此,量子点的研究和发展为时代的进步提供了重要的推动力。

量子点的粒径大多介于 2-20nm 之间,由于量子限域效应,电子和空穴被量子限域,因此连续的能带结构变成了分立能级结构并具有分子特性,受到能量激发后可以发射荧光。基于量子点的独特性质,从而派生出纳米体系具有宏观体系和微观体系不同的低维物性,展现出很多不同于宏观物体材料的物理化学性质,因此,量子点在太阳能电池、发光器件、光学生物标记、生命科学和信息技术等领域的研究具有重大意义。

1.2.2 量子点的结构

到目前为止,科学家已经发明许多不同的方法来制造量子点,不同的方法所合成的量子点也具有不同的结构和性能。现在用作荧光探针的量子点主要有

CdSe、CdTe、CdS 等单核量子点和 CdSe/ZnS、CdSe/ZnSe 等核壳式量子点。在生物医学领域，核壳式的量子点运用较多，而且在量子点的结构中核（core）和壳（shell）各自扮演不同的角色，核的结构、形状以及大小决定了量子点的光学性质，而壳具有保护核的作用，同时也为生物分子的修饰提供了有利的条件，如图 1.1 所示[15]。

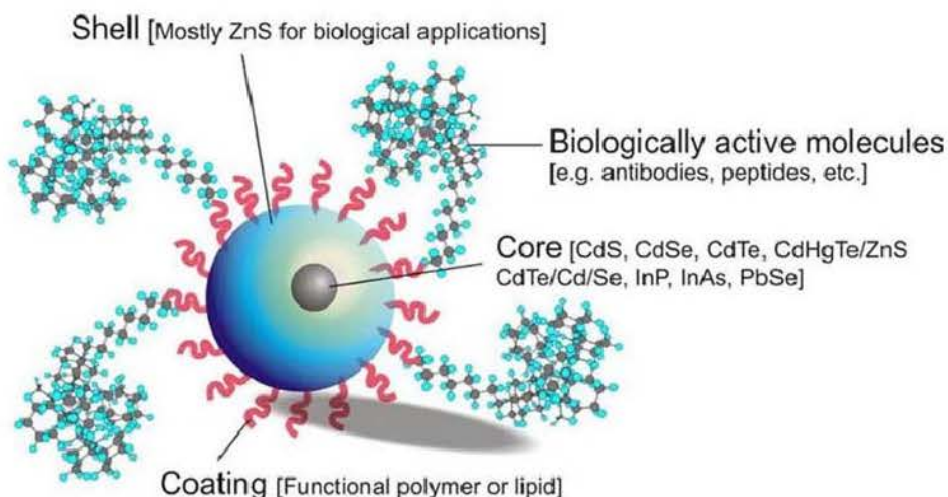


图 1.1 量子点的微观结构和表面修饰。

1.2.3 量子点的荧光性能

量子点与其它材料相比具有独特的性质，主要是由于它自身的量子效应，当颗粒尺寸为纳米级时，尺寸限域将引起尺寸效应、量子限域效应、宏观量子隧道效应和表面效应，从而派生出纳米体系具有宏观体系和微观体系不同的低维物性，展现出许多不同于宏观体材料的物理化学性质。因此，量子点与传统的荧光试剂比较，具备一些独特的荧光性能：

(1)不同粒径和组成的量子点其发射波长不同。近来，香港城市大学 Andrey Rogach 教授研究组，运用配体辅助再沉淀的方法，通过调控反应温度，实现了对制备的 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ 量子点可在蓝-绿波段进行调节。如图 1.2 所示，在 0-60 °C 的范围内，随着反应温度的升高，所制备量子点的粒径从 1.8 nm 到 3.6 nm 逐渐增大，对应的发射波长从 475 nm 红移到了 520 nm [36]。量子点的粒径越小，其表面的原子就越多，吸收的能量也就越大，因此，改变量子点的尺寸的大小和它的组成，可以获得发射波长从蓝到近红外的一系列量子点[37]。

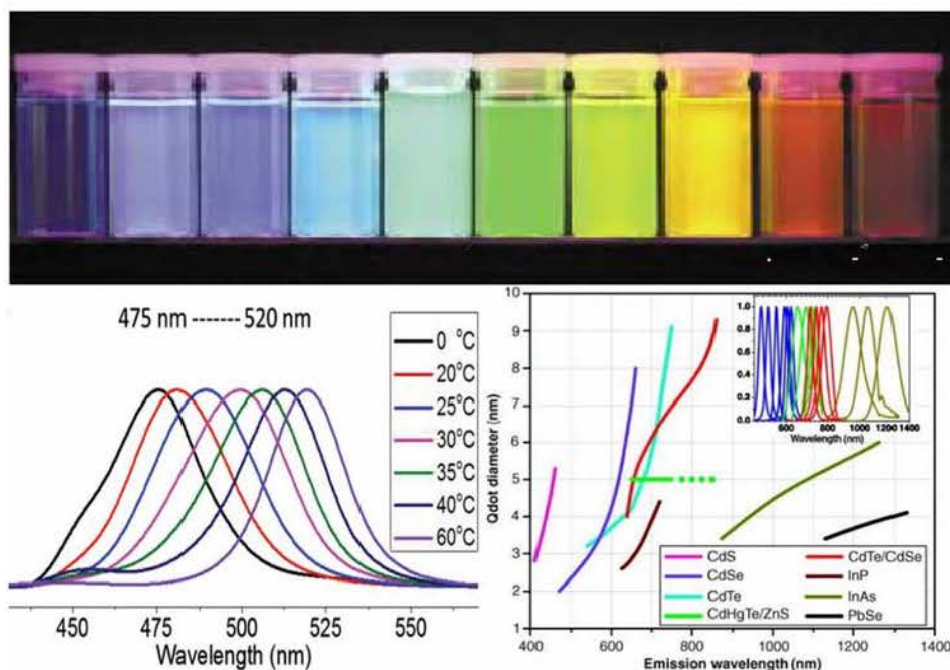


图 1.2 不同粒径和组成的荧光光谱图和 CdSe 型量子点可以覆盖整个可见光区的荧光颜色图。

(2) 量子点具备宽的激发谱和窄的发射谱。根据之前的一些报道, 我们知道传统的有机荧光染料的激发光波长范围较窄, 而且不同荧光染料一般都需要多种波长的激发光来激发, 这给现实的研究工作带来了很多不便。然而量子点的激发波长的范围很宽, 小于量子限域峰的任意波长都能够激发。此外, 量子点的荧光发射峰窄而对称, 而且无拖尾, 从而避免相邻探测通道的干扰 (图 1.3)。

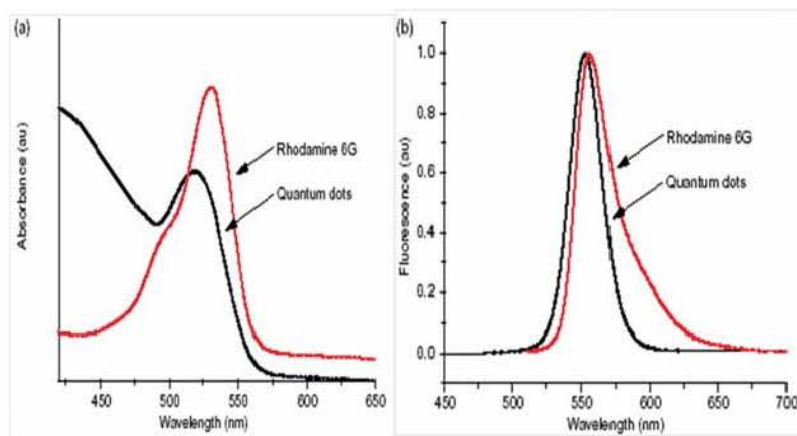


图 1.3 量子点与罗丹明 6G 的吸收光谱和发射光谱。

(3) 量子点具有很好的光稳定性。量子点荧光强度不仅很强, 而且光稳定性也很好, 抗漂白能力强, 可经受反复多次激发而不易发生荧光猝灭[38-40], 如图 1.4 所示。因此, 对量子点标记的物体可以对进行长时间的观察实验, 这很大程度上为观察细胞中生物分子之间的长期相互作用提供了有力的条件。

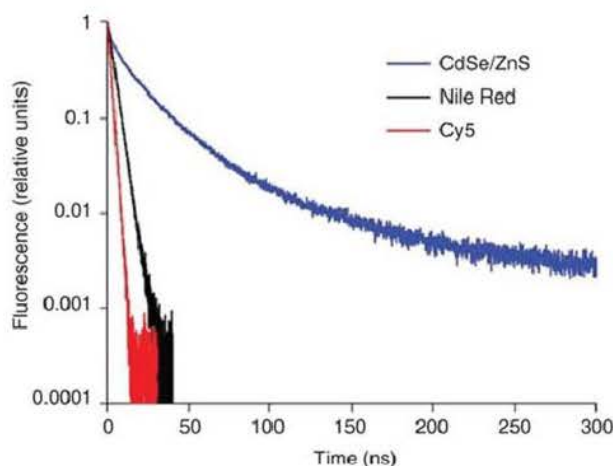


图 1.4 量子点与荧光染料的光漂白能力比较

(4)量子点具有较大的斯托克斯位移。量子点不同于有机染料的另一独特的光学性质就是具备较大的斯托克斯位移，这样可以防止发射光谱与激发光谱之间的重叠，有利于荧光光谱信号的检测，如 1.5 所示。

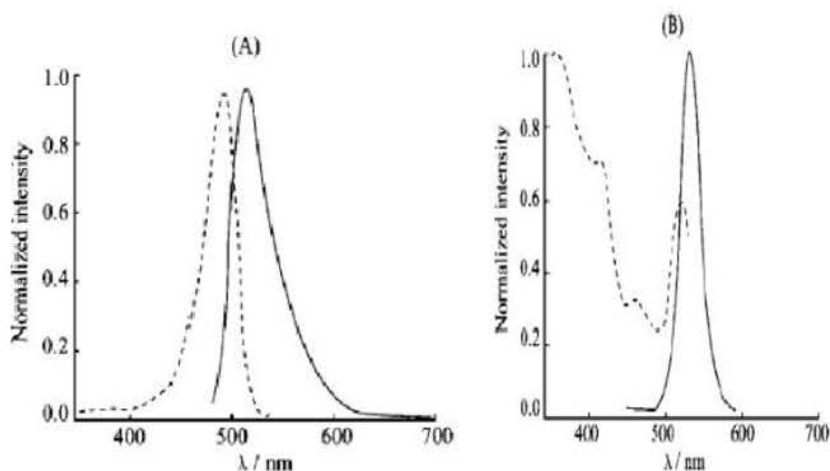


图 1.5 (A)传统荧光素的激发与发射光谱 (B) 量子点的激发与发射光谱。

(5)生物相容性好。1998 年，Alivisatos[34]和 Nie[35]两个研究小组初次解决了量子点作为生物探针所遇到的生物相容性问题，标志着量子点的在生命科学领域的应用时代到来了。量子点细胞毒性低，对生物大分子标本的活性无伤害，特别是经过各种化学修饰之后，可以进行特异性连接，进而对生物活体标记和检测[41-46]，如图 1.6 所示。

(6)量子点的荧光寿命长。一般有机荧光染料的荧光寿命仅为几纳秒，这与很多生物样本的自发荧光衰减的时间相当。而量子点的荧光寿命可持续 20 ns-40 ns [26]，可以很好地与背景荧光区分。因此，量子点便于长期跟踪和保存结果。长寿命在时间分辨成像领域具有极为明显的优势[47-50]，如图 1.7 所示。

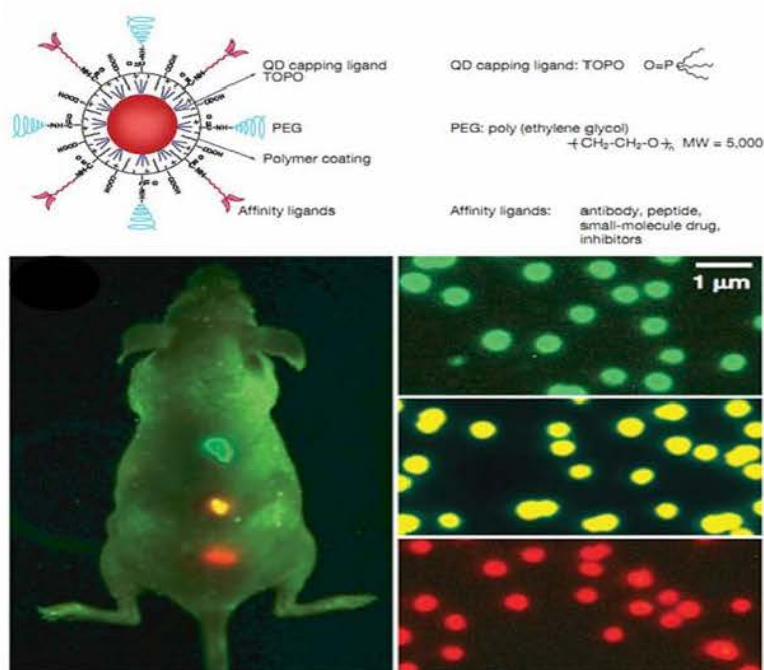


图 1.6 量子点用于体内肿瘤成像。

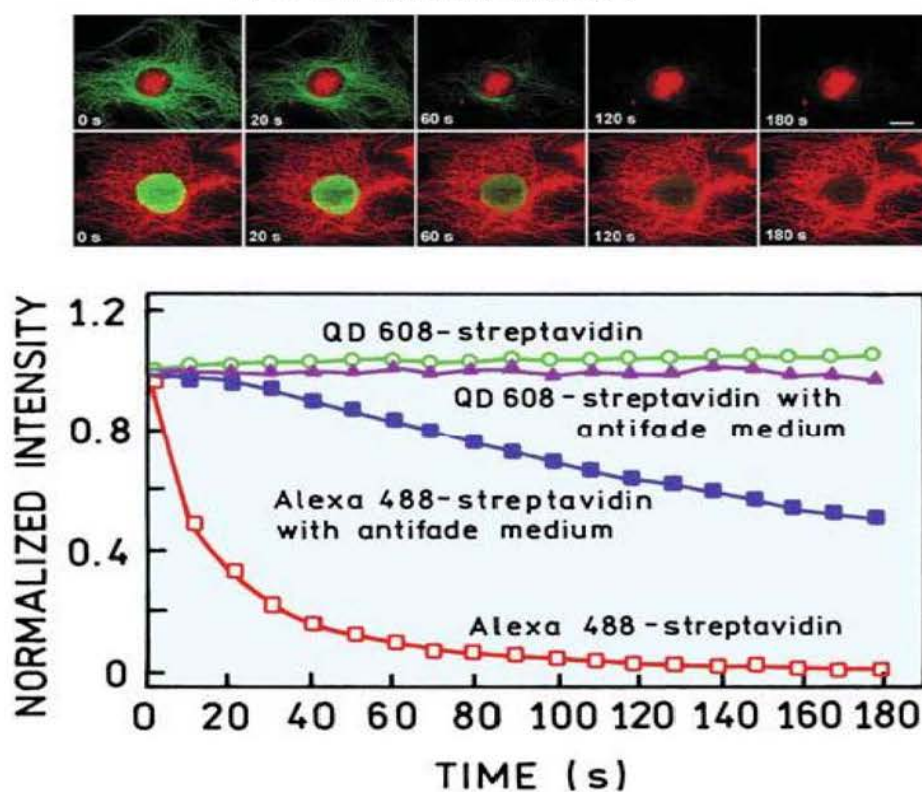


图 1.7 QDs 和 Alexa 488 的荧光寿命比较。

总而言之，量子点具有激发光谱宽且连续分布、而发射光谱窄而对称、颜色可调、光化学稳定性高、荧光寿命长等优越的荧光特性，是一种理想的荧光探针。

1.2.4 量子点的制备

通过十余年的不停努力,已经建立了许多种量子点的制备方法,主要有物理方法和化学方法,以化学方法为主。当前,为了制备纯净、稳定、单分散、晶体结构好的高质量量子的方法主要有金属有机相合成法和水相直接合成法。

(1) 金属有机相合成法

在有机相中制备量子点主要运用有机金属法,有机金属法是在高沸点的有机溶剂中经过前驱体热解制备量子点。具体做法就是将有机金属前驱体溶液注入 250-300℃ 的配体溶液中,有机金属前驱体在高温下迅速热解并成核,晶核缓慢生长就变成了量子点。也可以通过配体的吸附作用阻止晶核的生长,这样量子点就可以稳定的存在溶剂中。有机金属前驱体主要包括 CdO 、 $\text{Cd}(\text{Ac})_2$ 、 CdCO_3 、 $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ 、 $[\text{CdE}_2\text{CNR}_1\text{R}_2]_2$ ($\text{E}=\text{S}, \text{Se}, \text{Te}$)、 $[\text{CdSe}_2\text{CN}(\text{CH}_3)\text{Hex}]_2$ 等化合物;主配体可选择十二胺 (DDA)、三辛基氧化膦 (TOPO)、吡啶或咪唑等,溶剂兼次配体为三辛基膦 (TOP)。

采用这种方法合成的量子点的类型主要包括单核量子点、核壳型结构量子点和多元混晶型量子点。1993 年 Murray 等运用 $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ 和 TOP-Se 作为有机金属前驱体参加反应,TOPO 作为配体溶剂,高温反应制备了粒径为 2.3-13 nm,荧光量子产率约为 10% 的 CdSe 量子点[51]。此后, Peng 等通过改变有机金属前驱体浓度和配体的比例制备出了棒状 CdSe 量子点,拓宽了量子点的晶体类型[52]。后来研究者们发现在量子点的表面包覆一层无机物可以使量子点的表面发生钝化,从而减少量子点表面的缺陷,提高量子点的稳定性和量子产率。1996 年, Hines 等以二甲基锌 $\text{Zn}(\text{CH}_3)_2$ 和六甲基二硅硫烷 $(\text{TMS})_2\text{S}$ 作为前体,制备出了 CdSe/ZnS 核壳型结构的量子点,在室温下其量子产率可以达到 50% [53]。2002 年 Reissue 等用 CdO 作为有机金属前驱体,以硬脂酸锌作为锌源,制备了荧光量子产率为 60-85% 的 CdSe/ZnS 核壳型结构的量子点[54]。2003 年, Mekis 等以 $\text{Cd}(\text{Ac})_2$ 作为前驱体,采用一锅法制备了 CdSe 量子点,然后在 CdSe 量子点溶液上方通入 H_2S 气体,制备出了荧光量子产率达 50-85%,并且荧光光谱从绿色到红色调谐的 CdSe/ZnS 核壳型结构的量子点[55]。1994 年, Bhargav 等初次制备了掺杂 Mn 的 ZnS 量子点,量子产率为 18%,量子点的尺寸从 3.5-7.5 nm 可调 [56]。自此之后,就有大量的有关掺杂式量子点的研究报道,并应用于生化分析领域[57-60]。

总之,用有机相合成的量子点晶型较好,表面缺陷少,发光效率高,且尺寸分布较窄。随着人们的不断研究,用此方法合成量子点已经成熟,可以有效的分离成核和生长阶段,从而获得粒径分布更窄和量子产率更高,并且可以成功合成多种高质量的半导体纳米粒子。然而这种反方法也有一些不足,主要是反应条件

要严格的无水无氧操作，有机镉和有机锌等试剂自身含有剧毒，常温下不稳定，易燃易爆；另外，其价格昂贵，限制了有机金属法合成量子点的扩大生产和发展。

(2) 水相直接合成法

水相合成法是指在稳定剂存在的条件下用无机试剂在水溶液中直接合成量子点，如常用 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 或 Hg^{2+} 等作为阳离子前驱体， Se^{2-} 、 Te^{2-} 作为阴离子前驱体，用可溶性的巯基试剂作为有机配体，如巯基乙醇、巯基乙酸、巯基乙胺、谷胱甘肽、半胱氨酸等，经过加热回流前驱体混合溶液的方法，使量子点逐步成核并生长[61-64]。另外还有水热法，该方法主要是在特制的密闭的反应容器中进行，主要通过将水加热到超临界温度或者接近超临界温度而制备量子点[65]。采用这种方法，反应温度很高，使得量子点的制备周期明显缩短，量子点的成核和生长过程分离，明显改善量子点的表面缺陷，提高了量子点的量子荧光产率[66-67]。此外还可以采用微波辅助法，这种方法运用微波辐射从分子内部加热，避免了普通水浴和油浴局部过热和量子点生长缓慢等缺点，制备得到的尺寸分布均匀、荧光量子产率较高和半峰宽窄的量子点[68-70]。

尽管有机相合成的量子点荧光量子产率高，尺寸分布范围窄，但是油性量子点无法直接应用于生物体系，需经过水溶性基团表面修饰。表面修饰过后的量子点容易导致表面难以钝化[71]。水相合成量子点的实验条件易控制，方法简单，成本低，可大批量制备，表面性质可控，很容易引入各种官能团。一方面解决了量子点的水溶性问题，另一方面其表面可以修饰氨基 ($-\text{NH}_2$)、羧基 ($-\text{COOH}$) 等，可直接与生物大分子作用，使量子点具有良好的生物相容性。水相合成法已成为制备量子点的常用方法，水溶性的量子点将成为具有发展潜力的生物荧光探针[72]。

1.2.5 量子点的应用

量子点作为一种新型的纳米材料，已经逐渐的被广泛应用到物理、化学、生物、传感、能源等各个领域。由于量子点本身具有的多色、灵敏、稳定的荧光特性，它已经被作为一种荧光探针应用在生物医学的研究中。1998 年，Alivisatos AP[34]和 Nie S[35]两个实验室同时在著名杂志 *Science* 上发表了量子点应用于生物领域的文章，解决了量子点的水溶性和生物相容性的难题，从此开创了量子点在生物领域应用的先河，量子点在生物领域的研究迅速成为研究的热点，在多个领域得到广泛应用。

(1) 量子点与生物分子相互作用研究

量子点的发光性质与其表面修饰分子的结构性质有密切关系。QDs 可用于非同位素标记的生物分子的超灵敏检测，如在 QDs 表面连接上巯基乙酸

($\text{HS-CH}_2\text{COOH}$), 从而使量子点既具有水溶性, 还能与生物分子 (如蛋白质、多肽、核酸等) 偶联 (图 1.8), 从而使生物分子识别一些特定的物质[73-78], 也能与一些蛋白结合形成生物传感器, 测定生物体内物质的特性[79-81], 如图 1.9 所示。

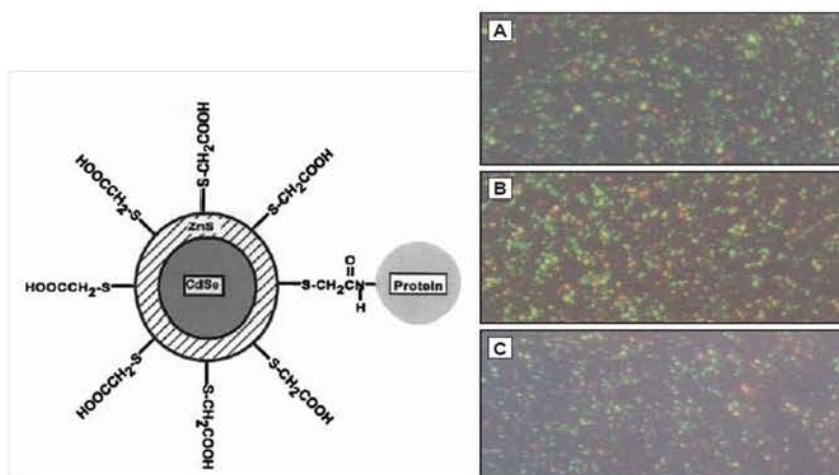


图 1.8 量子点表面修饰巯基乙酸后与蛋白质偶联和荧光成像图。A: 裸量子点; B: 修饰了巯基乙酸的量子点; C: 先修饰巯基乙酸、再偶联蛋白质的量子点。

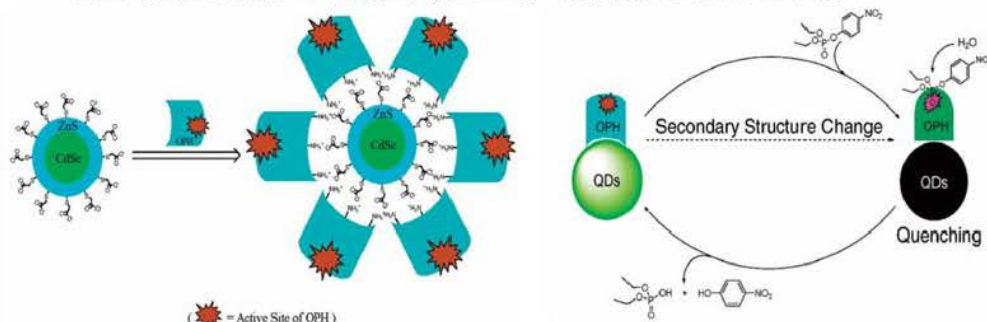


图 1.9 CdSe/ZnS 与有机磷水解蛋白 (OPH) 通过静电作用偶联, 测定对氧磷。

(2) 基于量子点的荧光共振能量转移及其生物应用

荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是指在两个不同的荧光基团中, 一个荧光基团作为能量供体 (Donor), 另一个荧光基团作为能量受体 (Acceptor), 供体的发射光谱与受体的吸收光谱有一定的重叠, 当这两个荧光基团之间的距离合适时, 就可观察到荧光能量由供体向受体转移的现象。目前量子点作为能量供体在生物传感、核苷酸检测、癌症研究等方面都有很广泛的应用[82-85]。Kull 等人以 CdSe/ZnS 多色量子点作为能量供体, 荧光基团 Cy3 和 Alexa647 作为能量受体, 基于多色量子点的技术进行了寡核苷酸杂交检测分析[86], 如图 1.10 所示。Stevens 等人基于 QD-荧光共振能量转移的方法分析蛋白激酶活性[87]。Cai 等人基于 CdTe 量子点和罗丹明 B 的荧光共振能量转移对八氯

苯乙烯（OCS）进行检测[88]。

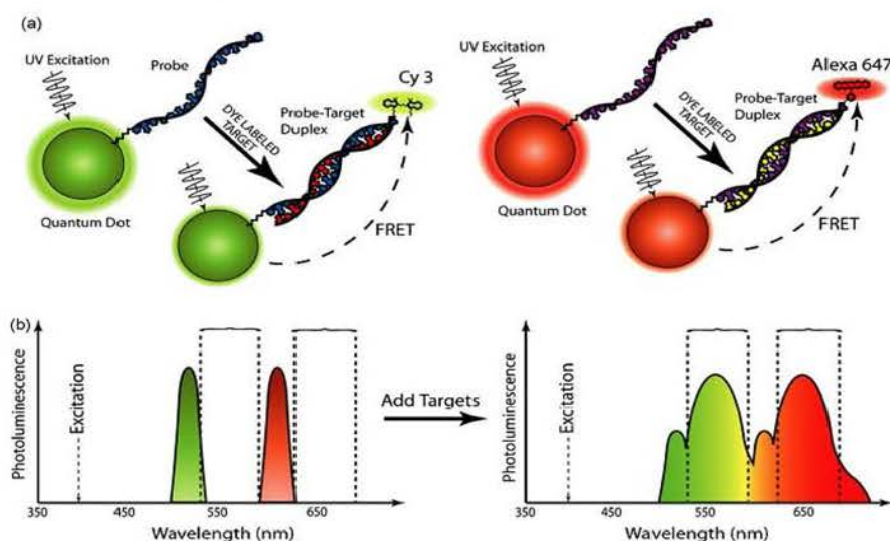


图 1.10 基于量子点的荧光共振能量转移检测检测寡核苷酸。

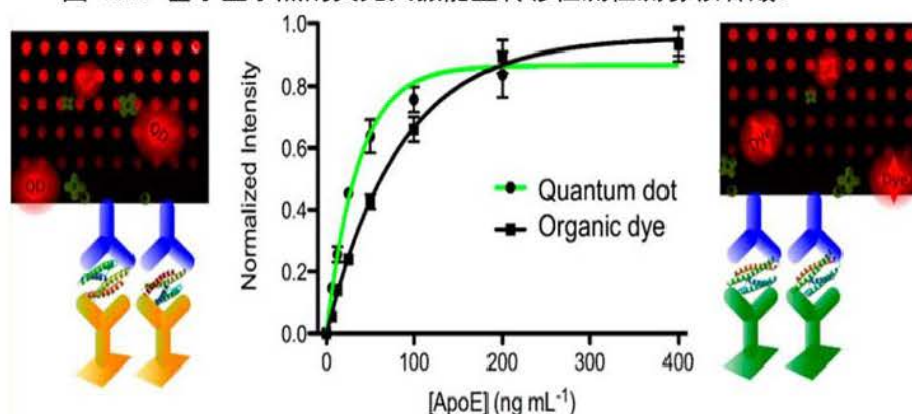


图 1.11 基于量子点或有机染料的免疫夹心法的原理图。

(3) 量子点的免疫检测分析应用

免疫分析法(immunoassay)利用抗原与抗体之间的特异性结合反应检测药物、激素、蛋白质和微生物等的分析方法。以荧光量子点作为信号标记物，与已知的抗体或抗原结合，用于分析检测[89-92]。1998 年，Nie 等发现在牛血清白蛋白（BSA）中，多克隆抗体能识别量子点标记的免疫球蛋白（QDs-IgG），使量子点聚集在一起；相反，如果没有这种抗体，QDs-IgG 标记物就能很好地分散于 BSA 中。这一试验结果证明用量子点标记的免疫球蛋白分子（IgG）能识别专一的抗体[35]。Narvaez 等人用量子点和有机荧光染料作为信号标志物，采用夹心免疫法检测载脂蛋白 E[93]，如图 1.11 所示。Goldman 等人也将抗体与量子点结合进行免疫分析，他们首先制备了 CdSe/ZnS 核壳型量子点，通过静电作用和分子自主装作用与蛋白结合，再与抗体结合，量子点与抗体的偶联物成功地用于葡萄球菌肠毒素和 2,4,6-三硝基甲苯的荧光免疫分析[94]。Goldman 等人运用四种颜色不同

的量子点分别与蓖麻毒素、康霍毒素、志贺菌毒素 1 和葡萄球菌肠毒素 B 的抗体偶联，同时在一个微孔板上实现了四种毒素的检测[95]。可见，量子点越来越广泛的应用于免疫分析中。

(4) 量子点在细胞成像中的应用

生物医学的研究离不开光学成像技术，量子点由于尺寸小和光学性能强的特点，十分适合用于在生物成像中作为荧光标记物。1998 年，Bruchez 研究小组首次将量子点与生物分子偶联在一起，主要是通过静电吸附作用或配体-受体之间特异性结合，该研究组分别运用红色和绿色两种量子点对小鼠的成纤维细胞的肌动蛋白丝及细胞核同时进行了标记和光学成像[34]；而 Nie 等则通过量子点与转铁蛋白偶联物标记 HeLa 细胞，该实验证实与量子点结合后的转铁蛋白仍具有很强的生物活性，能够与细胞表面的受体结合并通过内吞作用进入细胞[35]，如图 1.12 所示。后来，Wu 等人将量子点与免疫球蛋白 G 和抗生物素蛋白偶联，成功的标记了乳腺癌细胞表面的 Her2 蛋白，从而实现了乳腺癌细胞的检测[40]，结果表明，基于量子点的荧光探针可以在细胞内成像并用于生物医学研究，而且与有机荧光染料相比具有显著的优点，如图 1.13 所示。随着纳米技术的飞速发展，量子点作为荧光标记物已被广泛应用细胞成像[96-99]。

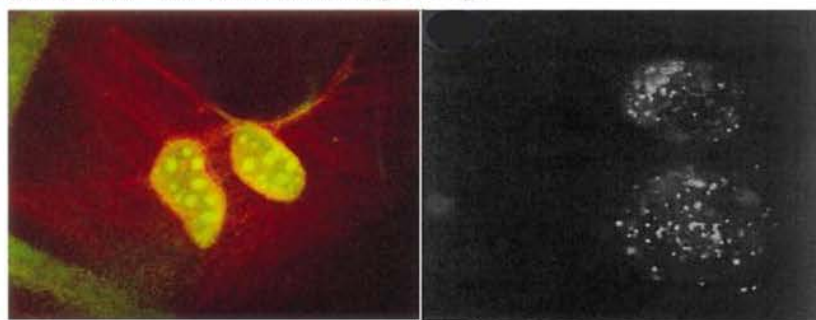


图 1.12 量子点在细胞中的成像图

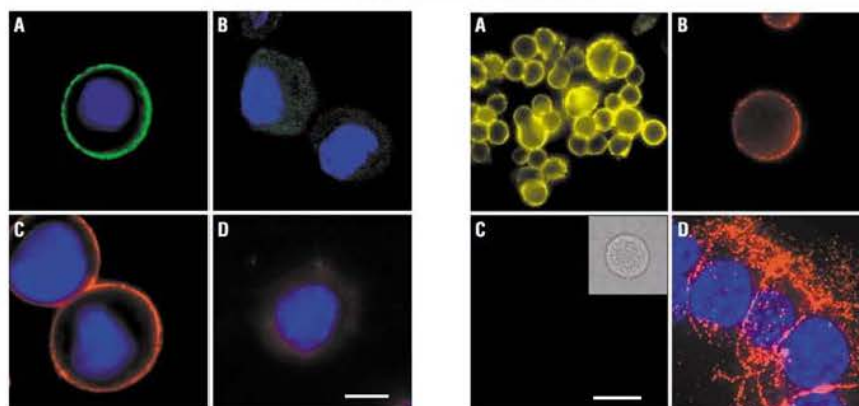


图 1.13 IgG 修饰的量子点和链霉亲和素修饰的量子点检测 Her2。

(5) 量子点在生物活体标记中的应用

量子点具有很好的光稳定性和良好的生物相容性，使其在活体示踪方面的研究成为可能。量子点主要是通过静脉注入进入生物活体内如图 1.14 所示。Ballou 等人采用两种不同的量子点进行活体成像，我们可以看到量子点能够稳定的存在于小鼠的体内[100]。Gao 等人将量子点与抗体结合进入癌细胞靶向作用于肿瘤，进而观察荧光成像[41]。Michalet 等人在小鼠体内通过静脉注射量子点，然后在小动物扫描成像仪中能很快的观察到量子点聚集在小鼠的肝脏中，可见量子点能够用于肿瘤的成像和诊断[30]。Cai 等用偶联 RGD 多肽的量子点分别对不同表达程度的 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白的乳腺癌细胞进行标记，结果表明，量子点能成功作用于高度表达 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白的成胶质细胞瘤细胞 U87MG 实体瘤。后来该课题组实现了近红外量子点的肿瘤被动靶向(EPR 效应)，如图 1.15 所示[101-102]。

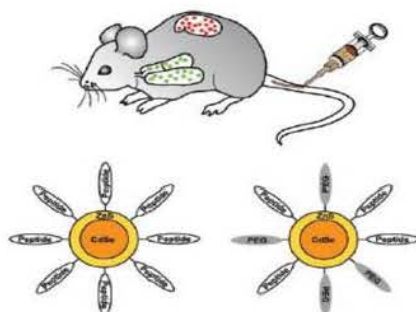


图 1.14 量子点进入小鼠体内的途径。

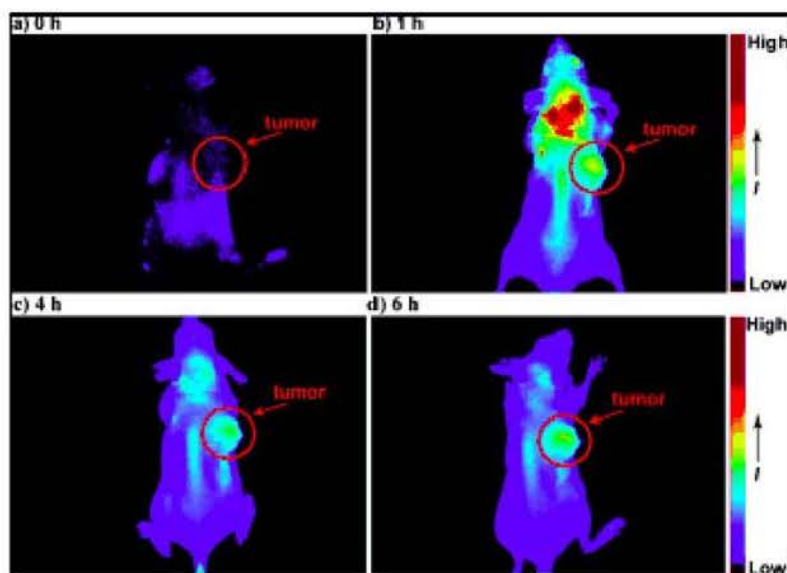


图 1.15 近红外量子点的活体肿瘤被动靶向成像图。(a) 静脉注射量子点之前的小鼠，(b) 静脉注射量子点 1 小时后的成像图，(c)和(d)分别为静脉注射后 4 小时和 6 小时的活体靶向图。肿瘤如红色箭头所示。

1.3 阿尔茨海默病

1.3.1 阿尔茨海默病的简介

1907年，德国巴伐利亚州的精神科医师和神经解剖学家阿洛伊斯-阿尔茨海默首次对阿尔茨海默病进行了描述，并以他的名字命名。阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD)，又称老年痴呆，是一种常见的进行性神经退行性疾病，临床表现为记忆障碍、失语、失用、失认，视空间能力损害，抽象思维和计算能力损害，人格和行为改变，长时间会导致日常生活能力减退，并伴随各种行为障碍和神经精神症状。根据发病者的年龄分为早发性痴呆和老年性痴呆，65岁以前发病者称为早发性痴呆，65岁以后发病者称老年性痴呆。阿尔茨海默病也可以根据身体机能的损伤程度和认知能力分成三个时期：第一阶段为轻度痴呆期（1-3年），表现为记忆减退，判断能力下降，社交困难，情感淡漠，出现时间定向障碍；第二阶段为中度痴呆期（2-10年），表现为记忆严重受损，在处理问题、辨别事物方面有严重损害，不能独自进行室外活动，出现各种神经症状，情感从开始的淡漠变为急躁不安；第三阶段为重度痴呆期（8-12年），患者日常生活不能自理，大小便失禁，记忆严重丧失，有强握、摸索和吸吮等原始反射，一切的生活都需要依赖他人。

目前对于阿尔茨海默病患者的检查手段主要有：神经心理学测验，包括简易精神量表（MMSE），日常生活能力评估包含躯体生活自理能力量表和工具使用能力量表，行为和精神症状（BPSD）的评估；血液学检查；神经影像学检查，头CT（薄层扫描）和MRI（冠状位）检查，功能性神经影像，正电子扫描（PET）和单光子发射计算机断层扫描（SPECT）；脑电图（EEG）；脑脊液检测，脑脊液中 β -淀粉样蛋白和Tau蛋白检测；基因检测等。

近年，美国国家老龄化研究所与阿尔茨海默氏症协会的专家组研究发现，阿尔茨海默症的潜伏期主要分为三个阶段：第一阶段，主要是人脑脊液中 β -淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)的含量开始逐渐减少，表明A β 开始在大脑中形成斑块；第二阶段，主要是人脊髓液中tau蛋白的含量开始下降，这表明脑细胞已经开始死亡，同时A β 的含量出现不正常或者继续下降；第三阶段，在前两个阶段生物标记物异常的情况下，能够通过心理测试检测到一些轻微的认知变化[103]。同时依照2015年《世界阿尔茨海默病报告》显示，患阿尔茨海默病的正在持续增加，预计到2050年，全球患有老年痴呆的人数将从目前的4600万人增加至1.315亿人，每3秒钟就可能出现有1例。由此可见这种病在老年人中的患病率极高，并且患者的致残率高，治疗的时间长且治疗费用很高，给患者的家庭和社会带来极大的负担。因此，阿尔茨海默病是现阶段以及未来人类必须面临的最大的全球公共健

康和社会保健挑战之一。所以我们要在还未出现临床症状前检测这种疾病，即对阿尔茨海默病第一阶段的标志物 β -淀粉样肽的检测，这能在很大程度延缓病人病情的恶化。

1.3.2 β -淀粉样肽的简介

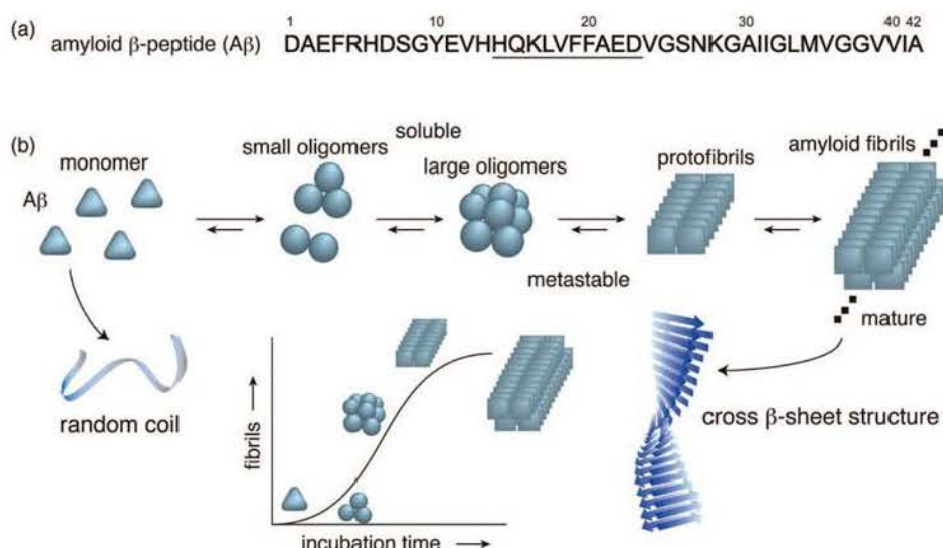


图 1.19 (a) $A\beta_{1-42}$ 的氨基酸序列; (b) $A\beta$ 单体聚集形成纤维的过程。

β -淀粉样肽在细胞基质沉淀聚积后具有很强的神经毒性作用，是大脑皮质老年斑的主要成分。 $A\beta$ 主要是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)通过 β -蛋白酶和 γ -蛋白酶的连续水解作用而产生的，含有 39-43 个氨基酸的多肽，其分子量约 4 kDa。由 β -蛋白酶作用于 APP 的 671 和 672 残基间的 t 肽键，产生 β -APPs 和 C99 片段多肽，C99 再经过 γ -蛋白酶的水解作用产生不同长度的 $A\beta$ 肽，如果在 710 和 713 残基间，产生短的 $A\beta$ 肽，即 $A\beta(1-40)$ ；如在 714 残基后，则产生长的 $A\beta$ 肽即 $A\beta(1-42)$ ；其中 $A\beta(1-40)$ 约占 90%， $A\beta(1-42)$ 约占 10%，但是 $A\beta(1-42)$ 比 $A\beta(1-40)$ 更容易形成纤维状聚合体，对神经元的毒性更大[104-105]。 $A\beta(1-42)$ 在阿尔茨海默病中起重要的致病作用，它能够迅速形成低聚物，再聚集形成原纤维 (fibrils)，这都与早期老年痴呆症的形成息息相关， $A\beta(1-42)$ 可存在于正常人和 AD 患者脑脊液中或者血液中。其中 $A\beta(1-42)$ 的第 28-42 位氨基酸残基具有较大的形成 β -折叠结构的可能性，而第 40-42 位的 3 个氨基酸残基对 $A\beta(1-42)$ 的 β -折叠的构象起到稳定的作用，而第 33-42 位的氨基酸残基与第 17-21 位的氨基酸残基构成了 $A\beta(1-42)$ 的疏水区， $A\beta(1-42)$ 的 N 端具有亲水性。不同条件下， $A\beta(1-42)$ 能够形成 α -螺旋结构、 β -折叠结构、无规则螺旋结构，而 β -折叠的构象有利于 $A\beta(1-42)$ 单体聚集，形成寡聚体和纤维 (图 1.19) [106-108]。

1.3.3 β -淀粉样肽的检测

由于 $A\beta$ 和阿尔茨海默病之间的关系, $A\beta$ 可作为阿尔茨海默病早期诊断的标志物, 因此对 $A\beta$ 的检测就变得非常重要了。近年来, 已有多种方法在水溶液或细胞样品中的 $A\beta$ 。1995 年 Gravina 等人用酶联免疫吸附法测定 $A\beta(1-42)$ 单体的浓度[109]; 1996 年, Wang 等人利用免疫沉淀-质谱法在细胞介质中测定了 $A\beta(1-42)$ 的含量[110]。2007 年, Santos 等人运用 Alexa Fluor 488 作为能量供体和 Alexa Fluor 594 作为能量受体而建立的荧光共振能量转移体系, 检测人脑脊液中 $A\beta$ 的含量[111]; 2011 年, Wang 等人用纳米金的共振光散射分别在水溶液和血浆中检测 $A\beta(1-42)$ 的含量[112]; 2012 年, Wang 等人基于纳米金的斑点印迹免疫法分别在脑脊液和水溶液样品中检测 $A\beta(1-42)$ 的含量[113]; 2013 年, Gagni 等人用硅微阵列芯片作为基底的免疫法检测人脑脊液中的 $A\beta(1-42)$ 的含量[114]; 2014 年, Liu 采用电化学竞争夹心免疫法检测脑脊液样品中 $A\beta(1-42)$ 的含量[115]。但是, 这些方法具有一定的局限性: 一些方法需要昂贵的仪器, 这限制它们在常规测试中的应用; 有些方法的灵敏度也不是很高。美国国家老龄化研究所与阿尔茨海默氏症协会的专家组指出, AD 早期阶段 β -淀粉样肽在脑脊液中的含量逐渐降低。因此, 发展一个高灵敏度并且不需要昂贵仪器的方法检测 AD 早期阶段的标志物, 对 AD 的早期诊断非常有必要。

1.4 本论文的研究内容及意义

基于量子点这种新型纳米材料优越的荧光性能及其在生物分析领域广阔的应用前景, 本论文的主要研究工作如下:

(1) 以量子点作为荧光探针和磁分离技术相结合而建立的夹心免疫法定量检测 $A\beta(1-42)$ 的含量。以磁珠作为基底, 首先将生物素修饰的 C 端抗体通过生物素-亲和素的相互作用结合, 再特异性结合 $A\beta(1-42)$, 再特异性结合生物素修饰 N 端抗体, 最后加入链霉亲和素修饰的量子点。成功构建了 MB-C-Ab- $A\beta(1-42)$ -N-Ab-QDs 的夹心免疫检测体系。当溶液中存在 $A\beta(1-42)$ 的条件下, 利用磁铁除去已结合了 QDs 和磁珠的复合物, 除去磁珠的上清液中多余的游离的 QDs 的荧光强度随着 $A\beta(1-42)$ 浓度的增加而降低。因此, 发展了一个免疫测定 $A\beta(1-42)$ 的方法, 检测的线性范围是 $0.5-8.0 \text{ nmol L}^{-1}$, 检测限为 0.2 nmol L^{-1} 。该方法能用于检测人脑脊液 (CSF) 中的 $A\beta(1-42)$ 的检测。

(2) 基于第一个工作, 为了减少反应时间, 第一个工作的反应时间为 10.5 h, 第二个工作时间为 6 h; 不需要用磁铁进行分离, 实验操作更简单, 同时提高检测的灵敏度, 本研究建立了一个以 QDs 作为信号标记的高灵敏度免疫分析方法检测

A β (1-42)。首先, 将 A β (1-42)特异性的无修饰的 C 端抗体 (C-Ab) 结合在对抗体具有强结合力的 96 孔板上, 然后在结合 A β (1-42)和 A β (1-42)特异性的生物素化的 N 端抗体 (N-Ab); 最后加入过量的 QDs。取出上清测定起荧光强度, 上清溶液 525 nm 处的荧光强度与 A β (1-42)的浓度在 5-100 pmol L⁻¹ 范围内呈良好的线性关系。因此, 发展了另一个夹心免疫法测定 A β (1-42)的的含量, 检测限为 1.7 pmol L⁻¹。该方法能更好的用于检测人脑脊液 (CSF) 中的 A β (1-42)。

第二章 基于量子点的夹心免疫法检测 A β (1-42)

2.1 引言

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性的神经变性疾病, 在人类中能引起老年痴呆 [116]。随着人口的老齡化, AD 的发病率逐渐增加, 全世界超过 3500 万人受到影响[117]。AD 患者会出现以下的临床表现: 认知能力下降; 行为异常; 不可逆的记忆丧失; 语言障碍等[118]。这种疾病的治疗时间长且花费昂贵, 因此, 探索这种疾病的早期诊断方法是至关重要的[119]。研究表明, 细胞外淀粉样斑块的沉积是导致 AD 的主要原因[120], 淀粉样蛋白斑块的主要成分是有 42 个氨基酸组成的肽, 这种肽被称为 β -淀粉样肽即 A β (1-42), 它具有折叠和形成毒性聚合物的趋势。正是因为 A β (1-42)和 AD 之间的关系, A β (1-42)被认为是 AD 早期诊断的标志物[103]。

近年来, 已有多种方法用于水溶液或细胞样品中的 A β 检测: 如酶联免疫吸附试验法[109]、毛细管电泳法[121]、免疫沉淀-质谱法[110]、荧光共振能量转移法[111]、表面等离子体共振-免疫芯片法[122-123]、共振光散射法[112]、基于纳米金的斑点印迹免疫法[113]等。但是, 这些方法具有一定的局限性: 一些方法需要昂贵的仪器, 这限制了它们在常规测试中的应用; 有些方法的灵敏度也不是很高。有研究表明 A β (1-42)在正常人群中的含量是 0.31 nmol L^{-1} (1.40 ng/mL), 在 AD 患者中的含量为 0.16 nmol L^{-1} (0.72 ng/mL) [123]。美国国家老齡化研究所与阿尔茨海默氏症协会的专家组指出, AD 早期阶段 β -淀粉样肽在脑脊液中的含量逐渐降低[103]。因此, 发展一个高灵敏度并且不需要昂贵仪器的方法检测 AD 早期阶段的标志物, 对早期诊断 AD 非常有必要。

量子点 (Quantum dots, QDs), 具有激发光谱宽、发射光谱窄而对称、量子产率高等优良荧光性能[124-128], 在分析检测和荧光成像等方面得到广泛应用[129-131]。本研究利用量子点优良的荧光性能, 建立了以 QDs 作为荧光信号标记的夹心免疫分析方法检测 A β (1-42)。首先, 将生物素化的 A β (1-42) C 端抗体 (C-Ab) 与表面修饰链霉亲和素的磁珠 (MB) 结合; 然后再依次加入样品、生物素化的 A β (1-42) N 端抗体 (N-Ab); 最后加入过量的 QDs。当样品中存在 A β (1-42), 会生成 MB-C-Ab-A β (1-42)-N-Ab-QDs 的免疫夹心复合物; 在外加磁场的作用下, 免疫复合物会与溶液游离的量子点分离开, A β (1-42)的浓度越大, 分离出来的量子点浓度减小、荧光强度降低; 且荧光强度的降低与 A β (1-42)的浓度在一定范围内成线性关系。基于此, 构建了检测 A β (1-42)的夹心免疫分析法, 检出限为 0.2 nmol L^{-1} , 成功用于检测人脑脊液 (CSF) 中的 A β (1-42)。

2.2 实验部分

2.2.1 试剂与仪器

试剂： $A\beta(1-42)$ (DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA, purity>95%) 购自于上海强耀生物科技有限公司；链霉亲和素修饰的磁珠 (MB)，平均粒径为 $1\ \mu\text{m}$ ，购自于郑州英诺生物科技有限公司；生物素标记的 $A\beta_{1-16}$ 抗体 (Anti-beta Amyloid 1-16/Biotin, N-Ab)、生物素标记的 β -Amyloid 1-42 (CT) 抗体 (Anti-beta-Amyloid 1-42 (CT)-Biotin, C-Ab)、人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA)、人分泌型免疫球蛋白 A (SIgA)、人免疫球蛋白 M (IgM)、人免疫球蛋白 G (IgG) 均购自于北京博奥森生物技术有限公司；葡萄糖购于重庆北碚化学试剂厂；所有氨基酸，包括赖氨酸 (Lysine, K)、谷氨酸 (Glutamic acid, E)、精氨酸 (Arginine, R)、酪氨酸 (Tyrosine, Y)、缬氨酸 (Valine, V)、亮氨酸 (Leucine, L)、组氨酸 (Histidine, H)、苯丙氨酸 (Phenylalanine, F) 和天冬氨酸 (Aspartic acid, D) 均购自北京鼎国生物技术有限责任公司；牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 购于上海生工生物工程有限公司；链霉亲和素修饰的 CdSe/ZnS 量子点 (QDs)，最大发射为 525 nm，购自于武汉珈源量子点技术开发有限公司；整个实验过程用水均是由 Milli-Q-Plus 系统 (Millipore, 美国) 所制 $18.2\ \text{M}\Omega$ 的超纯水。

仪器：UV-2450 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司)；F-4500 型荧光分光光度计 (日本日立公司)；高速台式冷冻离心机 LRH-250-Z Z383K (德国 HERMLE 公司)；48-孔板 (北京鼎国生物技术有限责任公司)；Tecnai G2 F20 S-TWIN 透射电子显微镜 (美国 FEI 公司)；漩涡混合器 (金坛市医疗仪器厂)；pH 计 PB-10 (赛多利斯科学仪器有限公司)；十万分之一天平 ME204 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)；超声仪 KQ5200 (昆山市超声仪器有限公司)； -80°C 冰箱 TSE240V (赛默飞世尔科技中国有限公司)；PHMP 型微孔板恒温振荡器 (赛默飞世尔科技中国有限公司)。

2.2.2 $A\beta(1-42)$ 单体的制备和脑脊液样品的制备

$A\beta(1-42)$ 单体溶液的参照文献报道的方法[132-133]：首先将 1 mg $A\beta(1-42)$ 的冻干粉溶解在 1 mL $10\ \text{mmol L}^{-1}$ 现配制的 NaOH 溶液中，然后超声 1 分钟；用 LRH-250-Z Z383K 高速台式冷冻离心机，在 4°C 条件下，用 12500 rpm 离心 1 小时除去大的颗粒，取上清液，用磷酸盐缓冲溶液稀释，最后用 UV-2450 紫外可见分光光度计测定 $A\beta(1-42)$ 溶液 276 nm 处的吸光度值，根据朗伯比尔定律 $A=\epsilon bc$ ($\epsilon=1410\ \text{L cm}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$) 确定 $A\beta(1-42)$ 单体溶液的浓度。

人脑脊液样品从重庆医科大学第二附属医院获得，储存在 - 80℃ 的冰箱里，夹心免疫测定前解冻，再在 4℃ 条件下 12500 rpm 离心 1 小时除去大的颗粒和其它杂质。

2.2.3 抗体的溶解与保存方法

将 100 μ g 抗体的冻干粉（已经包含了 0.01 mol L⁻¹ PBS、1% BSA 和 0.1% 防腐剂），加入 100 μ L 的超纯水将其充分溶解，再加入 100 μ L 甘油涡旋均匀，分装在冻存管中，置于 - 20℃ 保存，避免反复冻融，可保证至少 1 年有效；后续试验时，再使用对应的缓冲液稀释成工作液，即用即配。抗体冻干粉在 - 20℃ 下保存，至少三年有效。

2.2.4 缓冲液的配制

封板缓冲液：称取 2.204 g Na₂HPO₄·12H₂O，0.6 g NaH₂PO₄·2H₂O 和 8.766 NaCl，溶解在超纯水中形成 1 L 溶液，pH=7.4。封板时加入 1% 的 BSA，现配现用。

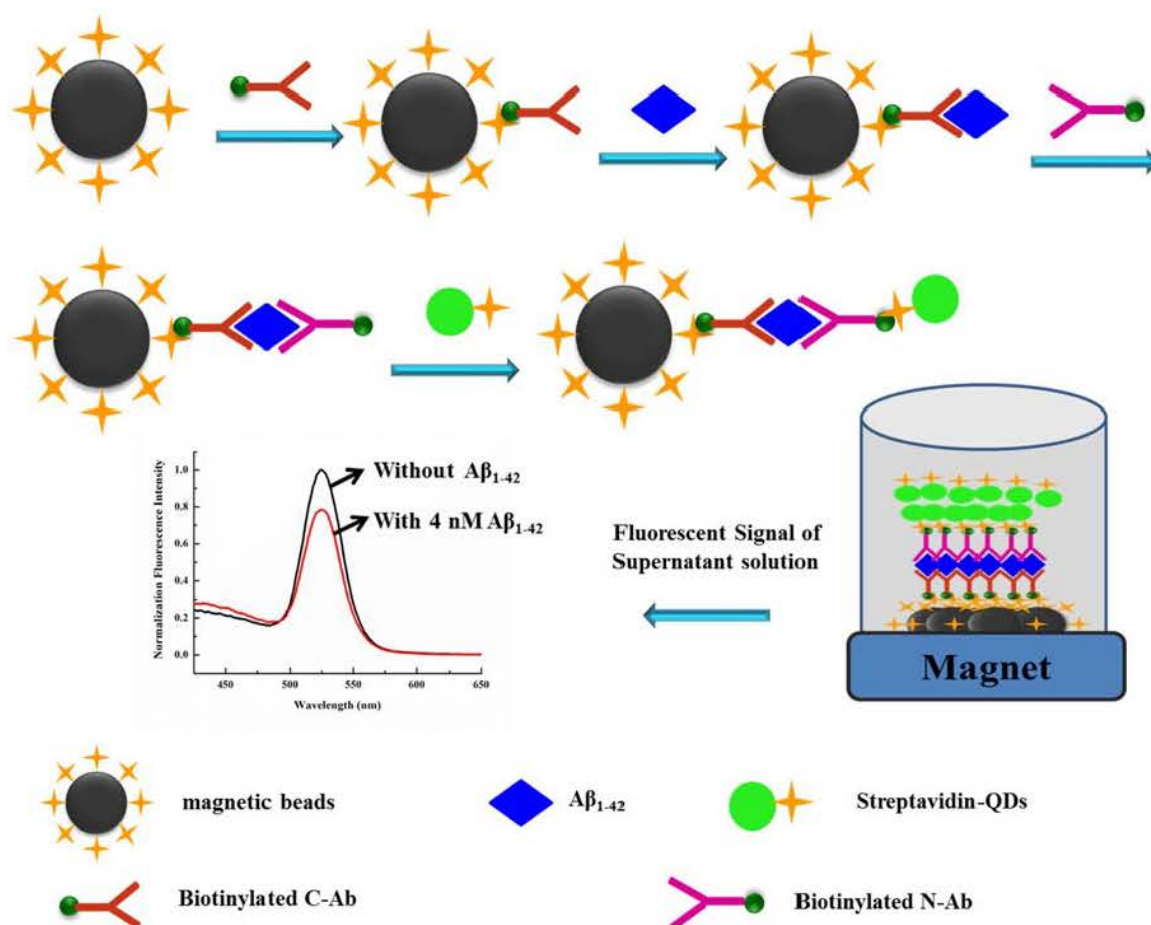
免疫缓冲液：称取 71.64g Na₂HPO₄·12H₂O 溶解在超纯水中形成 1 L 溶液，配置成 0.2 mol L⁻¹ 的溶液。称取 32.21g NaH₂PO₄·2H₂O 溶解在超纯水中形成 1 L 溶液，配置成 0.2 mol L⁻¹ 的溶液。用两种磷酸盐溶液调配成 0.2 mol L⁻¹，pH=7.4 的 PBS。实验时加入超纯水将其稀释成 0.01 mol L⁻¹，并加入 0.05% (v/v) 的 Tween 20 形成免疫缓冲液。

2.2.5 A β (1-42)的检测步骤

该实验步骤主要在 48 孔板中完成，免疫检测的原理如图 2.1 所示。

第一步，在 48 孔板中加入 0.01 mol L⁻¹ pH 为 7.4 的封板缓冲液（包含 1% BSA），1000 μ L/孔，在 4℃ 条件下孵育过夜。然后除去微孔板中的封板缓冲溶液，每个孔加入 50 μ L 10 mg mL⁻¹ 的 MB（在溶液中的最终浓度为 1.25 mg mL⁻¹），用免疫缓冲液（0.01 mol L⁻¹ PBS，pH 7.4，包含 0.05% (v/v) Tween 20，350 μ L/孔）清洗三次，除去 MB 中的叠氮化钠和其它杂质。

第二步，向每个孔中加入过量的 10 μ L 2.4 μ M C-Ab 和 390 μ L 免疫缓冲液，C-Ab 在溶液中的最终浓度为 60 nmol L⁻¹，在 37℃ 的条件下孵育 60 min。利用亲和素和生物素之间的强结合力将 C-Ab 偶联在 MB 的表面。然后用缓冲液（350 μ L/孔）清洗四次除去多余的 C-Ab。清洗完后向微孔板中加入 1000 μ L 封板缓冲液，在 37℃ 的条件下孵育 60 min 后，主要是为了封闭上述反应中未结合的位点和提高反应的灵敏度；再除掉缓冲液。


 图 2.1 夹心免疫法检测 $A\beta(1-42)$ 的原理

第三步，再向每个孔加入不同浓度的 $A\beta(1-42)$ 的标准溶液（10 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ）或待测样品和 390 μL 免疫缓冲液，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下孵育 4 h 后， $A\beta(1-42)$ 的一端与 C-Ab 特异性结合在一起，然后用 350 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的免疫缓冲清洗 4 次。

第四步，向每个孔中加入过量的 10 μL 4 μM N-Ab 和 390 μL 免疫缓冲，N-Ab 在溶液中的最终浓度为 100 nmol L^{-1} ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下孵育 60 min 后， $A\beta(1-42)$ 的另一端与 N-Ab 特异性结合，用 350 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的免疫缓冲清洗 5 次除去多余的未结合的 N-Ab。

最后，向每个孔中加入过量的 10 μL 80 nmol L^{-1} QDs 和 390 μL 免疫缓冲，QDs 在溶液中的最终浓度为 2.0 nmol L^{-1} ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下孵育 3 h。然后用磁铁将上清溶液和免疫复合物分离出来，用 F-4500 荧光分光光度计测定上清溶液的荧光强度。所有孵育步骤都在 PHMP 微孔板恒温振荡器中完成。

2.3 结果和讨论

2.3.1 A β (1-42)的检测机制

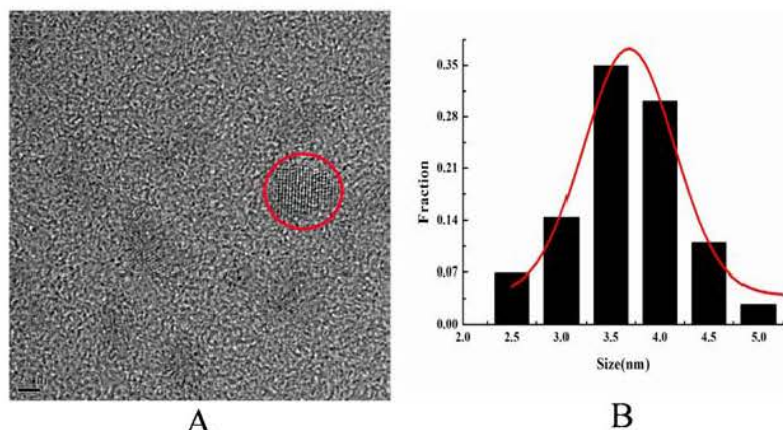


图 2.2 (A) QDs 的透射电子显微镜成像图 (B) QDs 的粒径分布图.

链霉亲和素修饰的 QDs 的最大发射为 525 nm, 平均粒径为 3.7 nm (测定 146 颗), 图 2 为 QDs 的透射电子显微镜成像和粒径分布图。由于 QDs 具有良好的荧光性能, 在我们的夹心免疫体系里用 QDs 作为纳米信号标记物。该实验分步将生物素化的 C-Ab 结合在链霉亲和素修饰的磁珠上面, 再结合抗原 A β (1-42), 进而连接生物素化的 N-Ab, 最后在这个免疫体系上面结合信号标记物 QDs。在该体系中, 如果不加入 A β (1-42), QDs 就不能结合在 MB 连接的复合物上。用磁铁分离后, 上清溶液的荧光强度就不会发生改变 (图 2.1 和 2.3)。但是, 当有 A β (1-42) 存在时, QDs 就能结合在 MB 为载体形成 C-Ab- A β (1-42)-N-Ab 夹心免疫

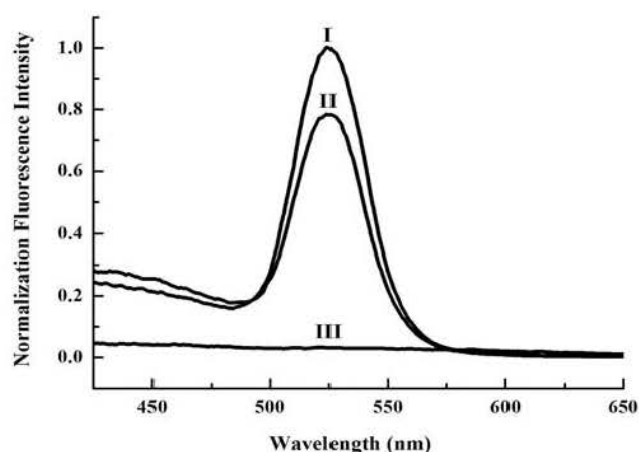


图 2.3 夹心免疫体系的荧光光谱。(I) 不存在 A β (1-42); (II) 存在 4.0 nmol L⁻¹ A β (1-42); (III) 纯的 MB。生物素化得 C-Ab 和 N-Ab 的浓度分别为 60 nmol L⁻¹ 和 100 nmol L⁻¹。

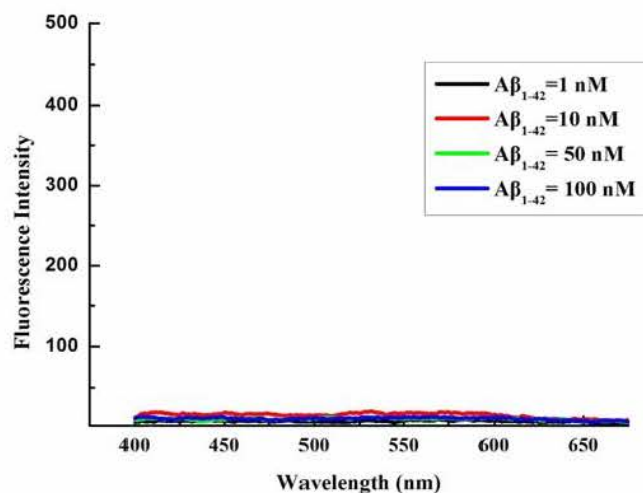


图 2.4 MB 影响 QDs 荧光的猝灭。A β (1-42) 的浓度分别为 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 nmol L⁻¹。

复合物上, 形成 MB-C-Ab-A β (1-42)-N-Ab-QDs 夹心免疫检测体系。用磁铁分离出来的上清溶液的荧光强度随着 A β (1-42) 浓度的增加而降低。因为, A β (1-42) 的浓度增加, 就会结合上更多的 QDs 在磁珠上, 溶液中游离的 QDs 就会减少, 所以荧光强度会逐渐降低。同样, 我们也检测了被磁铁分离出来的夹心免疫复合物的荧光, 将分离出来的 MB-C-Ab-A β (1-42)-N-Ab-QDs 的复合物用 PBS 清洗四次, 然后分散在 400 μ L PBS 中, 立刻检测其荧光强度, 得到的结果如图 2.4 所示, 发现 MB-C-Ab-A β (1-42)-N-Ab-QDs 的荧光非常弱, 其原因是 MB 能够猝灭 QDs 的荧光, 图 2.4。

2.3.2 夹心免疫检测的条件优化

为了提高检测的灵敏度, 我们以 $\Delta I/I_0$ 为指标对 MB 浓度、QDs 浓度、封板时间和 QDs 的孵育时间等检测条件进行优化。其中 $\Delta I = I_0 - I$, I_0 和 I 分别代表存在和不存在 2 nmol L⁻¹ A β (1-42) 时的荧光强度。 $\Delta I/I_0$ 的值越高, 表示该检测的灵敏度越高。

如图 5A 所示, MB 的最佳浓度为 1.25 mg mL⁻¹。MB 的浓度越低, 它捕获的 C-Ab 的量就比较少, 因此 $\Delta I/I_0$ 的值比较低。但是当 MB 的浓度高于 1.25 mg mL⁻¹ 时, $\Delta I/I_0$ 的值有一个下降的趋势, 这可能是由于 MB 的浓度太大, 部分 MB 发生了团聚[134], 降低了它与 QDs 的结合能力。因此 MB 的优化出来的浓度为 1.25 mg mL⁻¹。

如图 5B 所示, 我们对 QDs 的浓度进行了优化, 当 QDs 在溶液中的浓度为

2.0 nmol L⁻¹ 时, $\Delta I/I_0$ 的值达到最大。当 QDs 的浓度持续增大时, I_0 的值也会跟着增大, 这样反而会引起 $\Delta I/I_0$ 的值有略微的下降。所以, 我们选取 2.0 nmol L⁻¹ 的 QDs 用于后面的分析检测。

第二步加入 C-Ab 后清洗完后, 进而采用封板缓冲液封板。该封板的步骤能够减少后续抗原 A β (1-42) 和生物素化的 N-Ab 在 MB 上的非特异性吸附[135-136]。如图 5C 所示, 随着孵育时间的增加, 检测灵敏度逐渐增加。当孵育时间达到 90 min 时, 趋于平稳。所以选取 90 min 最佳封板时间。

我们以链霉亲和素修饰的 QDs 作为夹心免疫检测的信号标记物。QDs 通过链霉亲和素-生物素的作用结合在 N-Ab 上, 因此, 建立了 MB 与 QDs 之间的联系。所以, 在该免疫检测体系中我们优化了 QDs 的结合时间。随着时间的增加, 检测灵敏度逐渐增加。考虑到实验的灵敏度和时间的消耗, 选取 180 min 作为最佳孵育时间。

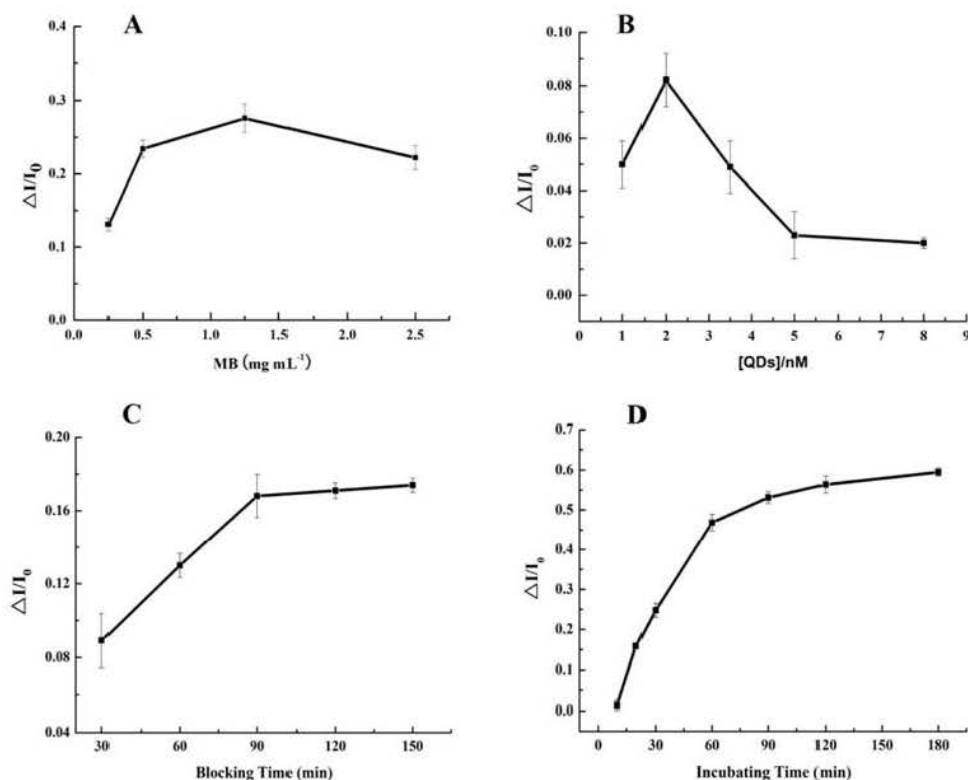


图 5 检测条件的优化。(A) MB 浓度的优化, MB 的浓度分别为 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 mg mL⁻¹。

(B) QDs 浓度的优化, QDs 的浓度分别为 1.0, 2.0, 3.5, 5.0, 8.0 nmol L⁻¹。(C) 封板时间优化, 孵育时间分别为 30, 60, 90, 120, 150 min。(D) QDs 结合时间优化, 孵育时间分别为 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 min。MB 的浓度为 1.25 mg mL⁻¹, QDs 的浓度分别为 2.0 nmol L⁻¹, C-Ab 的浓度为 60 nmol L⁻¹, N-Ab 的浓度为 100 nmol L⁻¹。 $\Delta I = I_0 - I$, I_0 和 I 分别代表存在和不存在 2 nmol L⁻¹ A β (1-42) 时的荧光强度。

在上述最优条件下, 基于 QDs 的夹心免疫法实现了对 A β (1-42) 的定量检测。如图 2.6 所示, 上清溶液 525 nm 处的荧光强度与 A β (1-42) 的浓度在 0.5-8.0 nmol L⁻¹ 范围内呈良好的线性关系。线性回归方程为 $I = -0.2527 C (\text{nmol L}^{-1}) + 0.9857$ (I 表示归一化的荧光强度, C 表示 A β (1-42) 的浓度; $n=5$), R 为 0.9915, 检出限 (LOD) 为 0.2 nmol L⁻¹ (3σ)。在 A β (1-42) 的浓度为 4 nmol L⁻¹ 时的标准偏差 (RSD) 是 2.4% ($n=11$)。

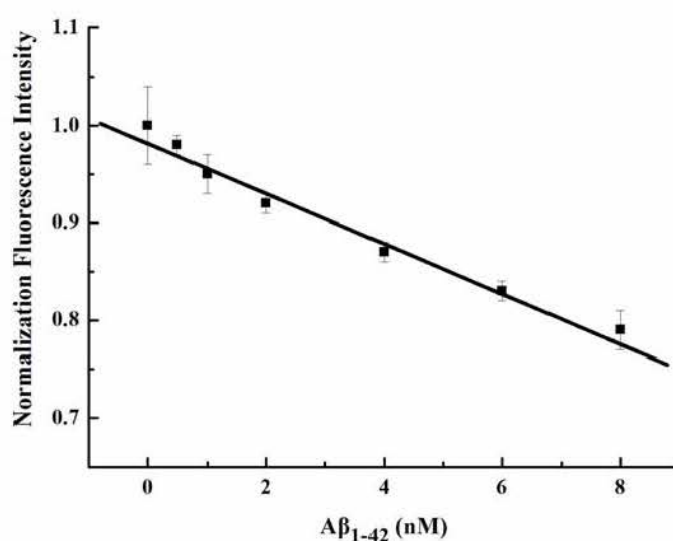


图 2.6 上清溶液荧光强度与 A β (1-42) 浓度的线性关系。A β (1-42) 的浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 和 8.0 nmol L⁻¹。MB 的浓度为 1.25 mg mL⁻¹, QDs 的浓度 2 nmol L⁻¹, C-Ab 的浓度为 60 nmol L⁻¹, N-Ab 的浓度为 100 nmol L⁻¹。

2.3.3 方法的选择性

为了考察基于 QDs 的夹心免疫检测体系的选择性, 我们选择了实际生物样品中存在的一些干扰物质, 如蛋白、葡萄糖、氨基酸、金属离子对该体系的影响。在溶液中分别加入 100 nmol L⁻¹ 蛋白 (HAS, HlgM, HlgG, HlgA), 500 nmol L⁻¹ 葡萄糖和 500 nmol L⁻¹ 氨基酸 (K, E, R, Y, V, L, H, F, D), 如图 2.7A 所示; 金属离子 100 nmol L⁻¹ Fe³⁺、Cu²⁺, 300 nmol L⁻¹ Zn²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺ 和 500 nmol L⁻¹ Co²⁺、Na⁺、K⁺、Mg²⁺, 如图 2.7B 所示。加入上述物质后, 上清溶液的荧光强度不发生变化。只有存在 A β (1-42) 时, 才会引起荧光信号的降低。证实了我们建立的检测方法的高选择性。

我们进一步考察了一些共存物质对 4.0 nmol L⁻¹ A β (1-42) 检测的影响共存物质引起的误差在 $\pm 5\%$ 的范围内, 就可以认为对 A β (1-42) 的检测无影响。我们实

验发现 100 nmol L⁻¹ HAS、HIgM、HIgA, 10 nmol L⁻¹ HIgG 和 500 nmol L⁻¹ Glc、K、E、R、Y、V、L、H、F、D (图 2.7C); 100 nmol L⁻¹ Fe³⁺、Cu²⁺, 300 nmol L⁻¹ Zn²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺、Co²⁺和 500 nmol L⁻¹ Na⁺、K⁺、Mg²⁺ (图 2.7D) 对 A β (1-42) 的检测无影响。

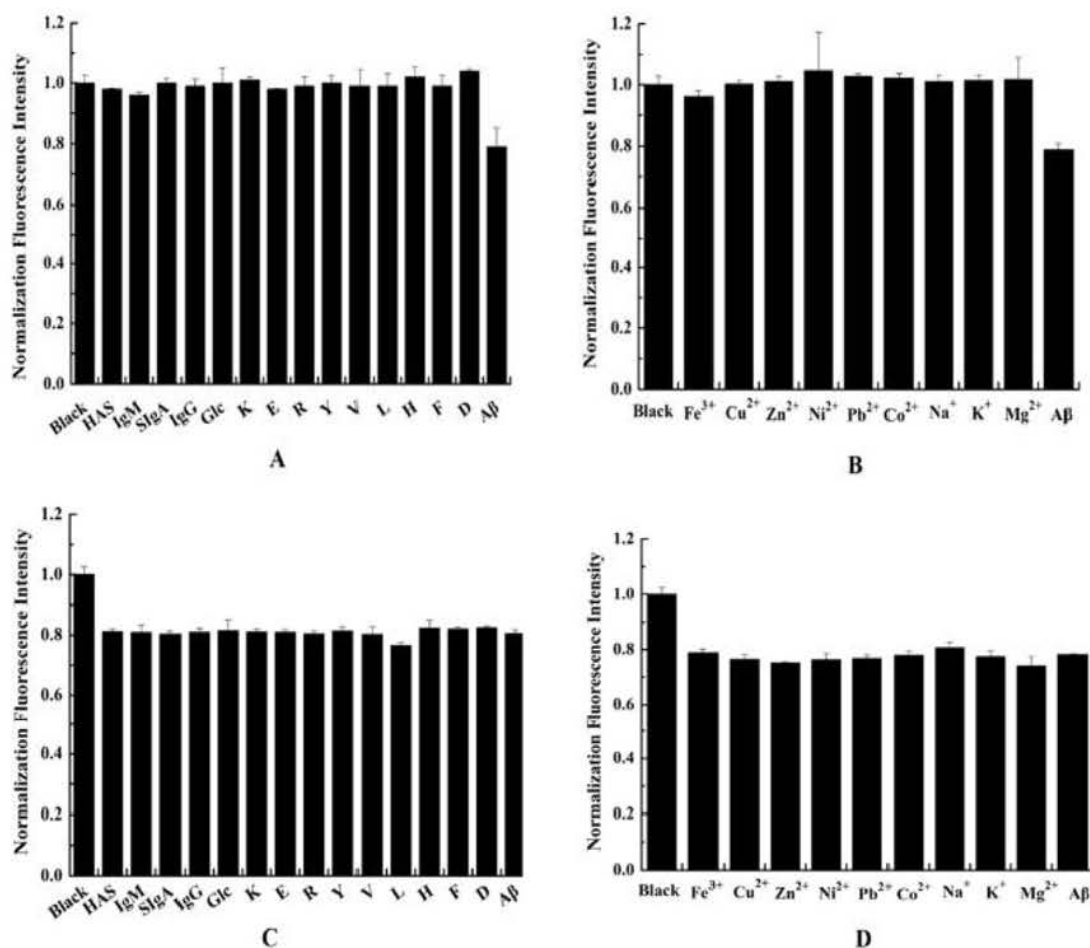


图 2.7 免疫检测的选择性。(A) 和 (B) 不同干扰物质的信号响应; (C) 和 (D) 检测 A β (1-42) 时共存干扰物质的影响。A: A β (1-42) 的浓度为 4.0 nmol L⁻¹; HAS, HIgM, HIgG, HIgA 的浓度为 100 nmol L⁻¹; Glc, K, E, R, Y, V, L, H, F, D 的浓度为 500 nmol L⁻¹。B: A β (1-42) 的浓度为 4.0 nmol L⁻¹; Fe³⁺, Cu²⁺ 的浓度为 100 nmol L⁻¹; Zn²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺ 的浓度为 300 nmol L⁻¹, Co²⁺、Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 的浓度为 500 nmol L⁻¹。C: A β (1-42) 的浓度为 4.0 nmol L⁻¹; HAS, HIgM, HIgA 的浓度为 100 nmol L⁻¹; Glc, K, E, R, Y, V, L, H, F, D 的浓度为 500 nmol L⁻¹; HIgG 的浓度为 10 nmol L⁻¹。D: A β (1-42) 的浓度为 4.0 nmol L⁻¹; Fe³⁺, Cu²⁺ 的浓度为 100 nmol L⁻¹; Zn²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺、Co²⁺ 的浓度为 300 nmol L⁻¹, Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 的浓度为 500 nmol L⁻¹。MB 的浓度为 1.25 mg mL⁻¹, QDs 的浓度为 2.0 nmol L⁻¹, C-Ab 的浓度为 60 nmol L⁻¹, N-Ab 的浓度为 100 nmol L⁻¹。

2.3.4 人脑脊液中 A β (1-42)的检测

采用标准加入法检测人脑脊液中 A β (1-42)的含量, 参照实验步骤三, 先向溶液中加入已稀释 40 倍的人脑脊液 (CSF), 再加入一系列不同浓度 (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 nmol L⁻¹) 的 A β (1-42), 孵育完成后, 用磁铁分离, 测上清的荧光强度, 结果如图 2.8。得到标准曲线的线性方程为 $I = -0.33 C (\text{nmol L}^{-1}) + 0.9947$ (I 表示归一化的荧光强度, C 表示加入的 A β (1-42)的浓度; $n=5$), 相关系数 (R^2) 为 0.9972。根据 I 和加入的 A β (1-42)的浓度, 我们算出人脑脊液中 A β (1-42)的浓度为 0.64 nmol L⁻¹ (3.1 ng mL⁻¹)。这个浓度与先前的报道人脑脊液中 A β (1-42)的浓度 0.6-8 nmol L⁻¹ (2.9-36 ng mL⁻¹) 一致[110]。但是, 有其它文献报道人脑脊液中 A β (1-42)的浓度为 1.5 ng mL⁻¹[123]。这种差异可能是由于不同的实验条件、不同的检测方法和不同的测试样品引起的。与以前报道的检测方法相比, 我们的工作具有较好的灵敏度和选择性, 如表 1 所示。

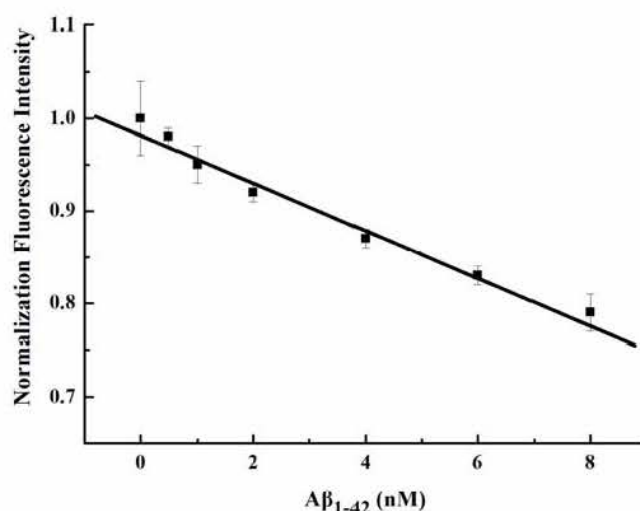


图 2.8 荧光强度与 A β (1-42)浓度的线性关系。A β (1-42) 的浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 nmol L⁻¹。MB 的浓度为 1.25 mg mL⁻¹, QDs 的浓度为 2 nmol L⁻¹, C-A β 的浓度为 60 nmol L⁻¹, N-A β 的浓度为 100 nmol L⁻¹。

2.4 结论

A β (1-42)作为 AD 早期诊断潜在的标志物, 其检测对 AD 的防治具有重要意义。我们以量子点为荧光标记物, 结合磁分离技术构建了检测 A β (1-42)的夹心免疫新方法。该方法选择性好; 检测 A β (1-42)的线性范围是 0.50-8.0 nmol L⁻¹ (2.25-36 ng mL⁻¹), 检出限为 0.2 nM (0.9 ng mL⁻¹); 并成功用于人脑脊液样品中 A β (1-42)的检测。我们相信本方法有望用于 AD 的早期诊断。

表 1: 与其它方法的比较

Methods	Linear rang	Limit of detection	Speed	Reference
Surface plasma resonance-immunochip assay	90.28-902.8 pg/mL	90.28 pg/mL	-	<i>Anal. Chem.</i> 2010 , 82, 10151–10157.
Gold nanoparticle -based dot-blot immunoassay	0.1 ng/mL - 10 μ g/mL	50 pg/mL	5.5 h	<i>Chem. Commun.</i> 2012 , 48, 8392-8394.
Immunoassay (use a silicon microarray platform)	0-5 ng/mL	73.07 pg/mL	7.5 h	<i>Biosens. Bioelectron.</i> 2013 , 47, 490-495.
Flow cytometry - fluorescence resonance energy transfer (using antibody)	0.04-10 ng/mL	-	-	<i>J. Alzheimer's Dis.</i> 2007 , 11, 117-125.
Immune-sensing platform	2.5-7.5 μ g/mL	3.0 μ g/mL	17 h	<i>Biosens. Bioelectron.</i> 2013 , 40, 329-335.
Enzyme-linked immunosorbent assay	375-4500 pg/mL	62.5 pg/mL	-	<i>APPS J.</i> 2012 , 14, 510-518.
Immunoprecipitation /Mass Spectrometric Analysis	4.5ng/mL - 4.5 μ g/mL	-	-	<i>J.Biol.Chem.</i> 1996 , 271, 31894–31902.
Electrochemistry (using antibody)	2-40 μ g/mL	-	-	<i>Bioelectrochemistry</i> 2008 , 74,118-123
Electrochemistry	-	0.7 μ g/mL	-	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> 2005 , 127,11892-11893
Resonance light scattering	1 ng/mL-1 μ g/mL and 5-50 μ g/mL	-	-	<i>Chem. Commun.</i> 2011 , 47,9339-9341
Sandwich immunoassay based on QDs	2.25 -36 ng/mL	0.9 ng/mL	10.5 h	The present work

第三章 基于量子点的双抗体夹心免疫法检测 A β (1-42)

3.1 引言

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是发生于老年期的最常见痴呆类型之一, 属于中枢神经系统退行性疾病, 典型症状是进行性认知功能障碍, 如记忆、定位、判断和推理出现障碍, 最终丧失说话和活动能力[137]。根据 2015 年《世界阿尔茨海默病报告》显示, 全球约有 990 万例新发痴呆患者——每 3 秒钟就有 1 例; 预计到 2050 年, 全球患有老年痴呆的人数将从目前的 4600 万人增加至 1.315 亿人。根据报告显示该病在老年人中的患病率和致残率高, 治疗的时间长且治疗费用很高, 给患者的家庭和社会带来极大的负担。毫无疑问, 阿尔茨海默病是当今和未来人类所面临的最大的全球公共健康和社会保健挑战之一。所以, 探索早期诊断和治疗这种疾病的方法是至关重要的[138]。AD 患者的脑部常伴随着细胞外 β -淀粉样肽 (β -amyloid peptide, A β) 沉积为核心的老年斑 (senile plaque, SP) [139]。1984 年, Glenner 和 Wong 从 AD 和 Down 综合征患者脑膜血管壁发现一种 39-43 个氨基酸组成的具有折叠的 A β 多肽, 相对分子质量约为 4 kDa[140], 其中约 90% 为 A β (1-40), 其余 10% 是 A β (1-42) 和 A β (1-43)。患者脑内老年斑主要是由具有神经毒性和血管毒性的 A β (1-42) 的聚集引起的[141-142]。目前 A β 的沉积发生于 AD 的早期, 因此, A β (1-42) 是导致 AD 的一个重要因素和关键环节[143], 并且被认定 AD 早期诊断的标志物之一[103]。

已有多种方法用于检测水溶液、细胞样品或唾液样品的 A β 含量, 如夹心免疫检测法[144]、电化学检测法[145]、基于磁性纳米材料和抗体的夹心免疫检测法[146]、电化学竞争夹心免疫法[115]、硅微阵列芯片免疫法[114]、酶联免疫吸附试验法[147]、毛细管电泳法[121]、免疫沉淀-质谱法[110]、表面等离子体共振-免疫芯片法[122-123]、共振光散射法[112]、基于纳米金的斑点印迹免疫法[113]等。但是, 这些方法具有一定的局限性: 一些方法需要昂贵的仪器, 这限制了它们在常规测试中的应用; 有些方法的灵敏度也不是很高。美国国家老龄化研究所与阿尔茨海默氏症协会的专家组指出, AD 早期阶段 β -淀粉样肽在脑脊液中的含量逐渐降低[103]。因此, 发展一个高灵敏度并且不需要昂贵仪器的方法对早期诊断 AD 非常有必要。

量子点 (quantum dots, QDs) 作为一种新型荧光探针, 因其独特的理化性质而广受关注[148]。QDs 具有独特的量子尺寸效应和表面效应, 与传统荧光染料相比, 显示出优良的光谱特征和光化学稳定性[149]。由于 QDs 的优良性能, 在分析检测和生物成像领域得到广泛应用[129-131]。

在上一章, 我们基于量子点优良的荧光性能和磁性纳米材料所具有的分选性能, 建立了 MB-C-Ab-A β (1-42)-N-Ab-QDs 体系检测人脑脊液中的 A β (1-42)。该检测体系的检出限为 0.2 nmol L^{-1} (9.0 ng/mL), 但是有文献报道 A β (1-42) 在正常人群中的含量是 0.31 nmol L^{-1} (1.40 ng/mL), 在 AD 患者中的含量为 0.16 nmol L^{-1} (0.72 ng mL^{-1}) [123]。我们的检测方法的灵敏度还不够高, 检测脑脊液中的 A β (1-42) 还只能采取标准加入法。此外, 前一个方法检测时间也太长, 不便于实际应用。所以章以 QDs 作为信号标记的, 将捕获抗体直接结合在强结合力的微孔板上, 建立了一个高灵敏度夹心免疫分析方法检测 A β_{1-42} 的含量。首先, 将无修饰的 A β (1-42) C 端抗体 (C-Ab) 结合在对抗体具有强结合力的 96 孔板上, 然后依次加入样品和生物素化的 A β (1-42) N 端抗体 (N-Ab); 最后加入过量的 SA-QDs。检测时测定上清溶液的荧光强度。该方法无需用磁铁进行分离, 简化了操作与反应时间, 提高了灵敏度, 检出限为 1.7 pmol L^{-1} (7.6 pg mL^{-1}); 简化了操作步骤, 缩短了检测时间, 成功用于人脑脊液 (CSF) 中 A β (1-42) 的检测。

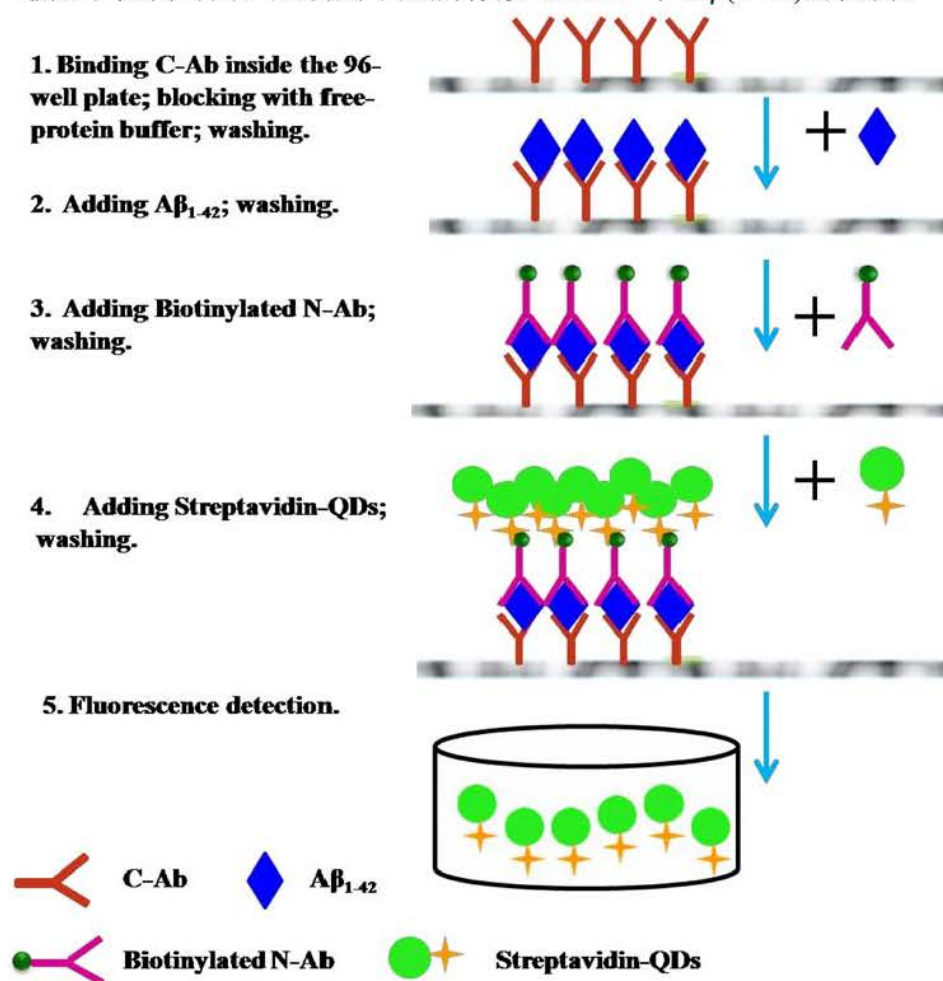


图 3.1 夹心免疫法检测 A β (1-42) 的原理。

3.2 实验部分

3.2.1 试剂与仪器

试剂：试剂：A β (1-42) (DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA, purity>95%) 购于上海强耀生物科技有限公司；生物素标记的A β ₁₋₁₆抗体(Anti-beta Amyloid 1-16/Biotin, N-Ab)、无标记的 β -Amyloid 1-42 (CT) 抗体 (Anti-beta-Amyloid 1-42 (CT)-Biotin, C-Ab)、人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA)、人分泌型免疫球蛋白 A (SIgA)、人免疫球蛋白 M (IgM)、人免疫球蛋白 G (IgG) 均购自于北京博奥森生物技术有限公司；葡萄糖 (Glucose, Glc) 购于重庆北碚化学试剂厂；所有氨基酸，包括赖氨酸 (Lysine, K)、谷氨酸 (Glutamic acid, E)、精氨酸 (Arginine, R)、酪氨酸 (Tyrosine, Y)、缬氨酸 (Valine, V)、亮氨酸 (Leucine, L)、组氨酸 (Histidine, H)、苯丙氨酸 (Phenylalanine, P) 和天冬氨酸 (Aspartic acid, D) 均购自北京鼎国生物技术有限责任公司；无蛋白封板缓冲液 (Protein-Free Blocking Buffer)，购自于赛默飞世尔科技中国有限公司；链霉亲和素修饰的 CdSe/ZnS 量子点 (QDs)，最大发射为 525 nm，购自于武汉珈源量子点技术开发有限公司；整个实验过程用水均是由 Milli-Q-Plus 系统所制 18.2 M Ω 的超纯水。

仪器：UV-2450 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司)；F-4500 型荧光分光光度计 (日本日立公司)；漩涡混合器 (金坛市医疗仪器厂)；强结合力的 96-孔板 (High Bind Microplate) (美国康宁公司)；高速台式冷冻离心机 LRH-250-Z Z383K (德国 HERMLE 公司)；pH 计 PB-10 (赛多利斯科学仪器有限公司)；十万分之一天平 ME204 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)；超声仪 KQ5200 (昆山市超声仪器有限公司)；-80℃ 冰箱 TSE240V (赛默飞世尔科技中国有限公司)；微孔板加热振荡器 PHMP (赛默飞世尔科技中国有限公司)。

3.2.2 A β (1-42)单体的制备和脑脊液样品的制备

A β (1-42)单体溶液参考文献[132-133]配制：首先将 1 mg A β (1-42)的冻干粉溶解在 1 mL 10 mmol L⁻¹ 新鲜配制的 NaOH 溶液中，然后超声 1 分钟；用 LRH-250-Z Z383K 高速台式冷冻离心机，4℃ 12500 rpm 离心 1 小时除去大的颗粒，取上清液，用磷酸盐缓冲溶液稀释，最后用 UV-2450 紫外可见分光光度计测定 A β (1-42)溶液 276 nm 处的吸光度值，根据朗伯比尔定律 $A = \epsilon bc$ ($\epsilon = 1410 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) 确定 A β (1-42)单体溶液的浓度。

人脑脊液样品从重庆医科大学第二附属医院获得，储存在 - 80℃ 的冰箱里，夹心免疫测定前解冻，4℃ 12500 rpm 离心 1 小时除去大的颗粒和其它杂质。经

上述处理, 就得到检测所需的生物实际样品。

3.2.3 抗体的溶解与保存方法

将 100 μL 1mg/ml 抗体的储备液 (已经包含了 0.01 mol L^{-1} TBS pH=7.4、1% BSA 和 50% 的甘油), 分装在冻存管中, 置于 -20°C 保存, 避免反复冻融, 可保证至少 1 年有效; 后续试验时, 再使用对应的缓冲液稀释成工作液, 即配即用。

3.2.4 缓冲溶液的配制

0.01 mol L^{-1} PBS 缓冲液: 称取 0.2 g KCl, 0.2 g K_2HPO_4 , 2.9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 8.0 g NaCl, 再加入 0.05% (v/v) Tween 20, 溶解在超纯水中形成 1 L 溶液, pH 7.4。

3.2.5 $\text{A}\beta(1-42)$ 的检测步骤

该实验步骤主要在具有强结合力的 96 孔板中完成, 免疫检测的原理如图 3.1 所示。

第一步, 在对抗体具有强结合力的 96 孔板中加入 200 μL 100 nmol L^{-1} 的无修饰的 C-Ab 抗体, 在 4°C 条件下孵育过夜, 让抗体结合在 96 孔板的表面。然后除去多余的抗体溶液, 用 300 μL 10 mmol L^{-1} 的 PBS 缓冲液清洗三次。每个孔再加入 300 μL 无蛋白的封闭缓冲, 在室温下孵育 1 h 后除去多余的封板缓冲液, 用 300 μL PBS 清洗 3 次。

第二步, 向每个孔加入不同浓度的 $\text{A}\beta(1-42)$ (10 μL /孔) 标准溶液 (或样品) 和 190 μL PBS 缓冲液, $\text{A}\beta(1-42)$ 的一端能够特异性结合在 C-Ab 上, 在 37°C 的条件下孵育 2 h 后, 用 300 μL PBS 清洗 4 次。

第三步, 向每个孔中加入过量的 10 μL 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 生物素化的 N-Ab 和 190 μL PBS 缓冲液, N-Ab 在溶液中的最终浓度为 50 nmol L^{-1} , N-Ab 特异性结合在 $\text{A}\beta(1-42)$ 的另外一端, 在 37°C 的条件下孵育 2h 后。用 300 μL /孔的 PBS 缓冲液清洗 3 次, 以除去过量的 N-Ab。

最后, 向每个孔中加入过量的 10 μL 10 nmol L^{-1} 链霉亲和素修饰 QDs 和 190 μL PBS 缓冲液, QDs 在溶液中的最终浓度为 0.25 nmol L^{-1} , 在 37°C 的条件下孵育 1 h。因为生物素和亲和素之间的强结合力, 适量的量子点能够连接在直接 N-Ab 上, 过量的 QDs 就会游离在溶液中。取出上清溶液稀释到 400 μL , 用 F-4500 荧光分光光度计测定上清溶液的荧光强度。第三步和第四步的孵育在 PHMP 微孔板加热振荡器中完成的。

3.3 结果和讨论

3.3.1 A β (1-42)的检测原理

链霉亲合素修饰的 QDs 的最大发射为 525 nm, 平均粒径为 3.7 nm (146 颗), 透射电子显微镜成像和粒径分布图见图 2.2。由于 QDs 具有良好的荧光性能, 在我们建立的夹心免疫检测体系里, QDs 作为荧光信号标记物。该实验分步将无修饰的 C-Ab 结合在强结合力的 96 孔板表面上, 再用封板液封板以封闭 96 孔板上未结合蛋白的位点, 防止其他蛋白, 如 A β (1-42)、N-Ab 在微孔板表面的结合; 再加入抗原 A β (1-42), 进而加入生物素化的 N-Ab, 最后在这个免疫体系中加入 SA-QDs。在该体系中, 如果不加入 A β (1-42), QDs 就全部游离在溶液中, 取出的上清溶液的荧光强度就是最大。随着 A β (1-42) 的加入并增大浓度, 游离在溶液中的量子点的量就会减少, 并伴随荧光强度的下降。因此建立的一个新的夹心免疫检测体系来测定 A β (1-42)。

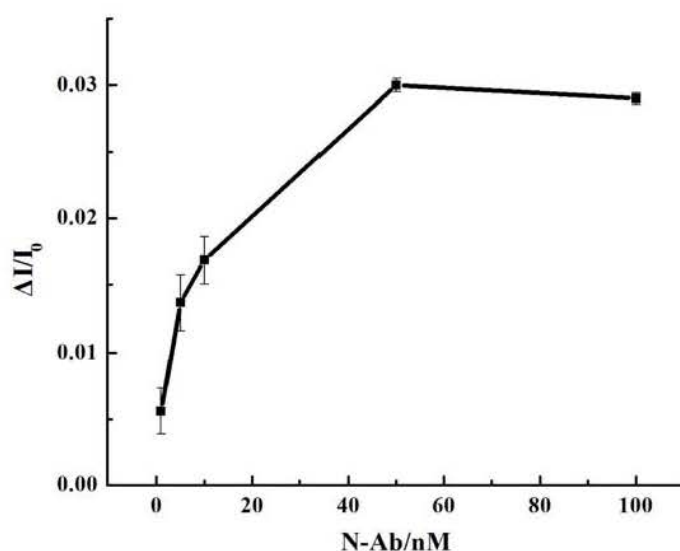


图 3.2 优化 N-Ab 的浓度。N-Ab 的浓度分别为 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 和 100.0 nmol L⁻¹。C-Ab 的浓度为 100 nmol L⁻¹, QDs 的浓度为 0.25 nmol L⁻¹。 $\Delta I = I_0 - I$, I_0 和 I 分别代表存在和不存在 10.0 pmol L⁻¹ A β (1-42)时的荧光强度。

3.3.2 检测条件的优化

为了提高检测的灵敏度。我们对检测的所需的条件进行了优化, 包括 N-Ab 和 QDs 的浓度。我们用 $\Delta I/I_0$ 的值作为条件优化的标准, $\Delta I = I_0 - I$, I_0 和 I 分别代表存在和不存在 10.0 pmol L⁻¹ A β (1-42)时的荧光强度。 $\Delta I/I_0$ 的值越高, 表示该检测的灵敏度越高。

如图 3.2 所示, 我们对 N-Ab 的浓度进行了优化, N-Ab 的最佳浓度为 50 nmol L^{-1} 。随着 N-Ab 浓度的增大, $\Delta I/I_0$ 的值逐渐增大, 当 N-Ab 的浓度为 50 nmol L^{-1} 时, $\Delta I/I_0$ 的值趋于平稳。所以选择 50 nmol L^{-1} 作为后面实验分析的最佳浓度。

如图 3.3 所示, 我们对 QDs 的浓度进行了优化, 当 QDs 在溶液中的浓度为 0.25 nmol L^{-1} 时, $\Delta I/I_0$ 的值达到最大。当 QDs 的浓度持续增大时, I_0 的值也会跟着增大, 这样反而会引起 $\Delta I/I_0$ 的值有略微的下降。虽然从图像中可以看出 1.5 nmol L^{-1} 的 QDs 的 $\Delta I/I_0$ 也有所增大, 但是选择 1.5 nmol L^{-1} 的量子点会加大药品的消耗, 浪费药品。所以, 选择 0.25 nmol L^{-1} 的 QDs 用于分析检测。

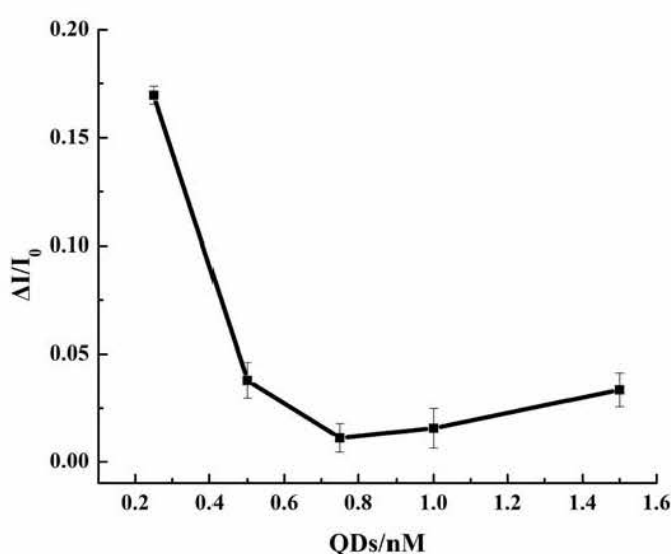


图 3.3 优化 QDs 的浓度。QDs 的浓度分别为 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 nmol L^{-1} 。C-Ab 的浓度为 100 nmol L^{-1} , N-Ab 的浓度分别为 50 nmol L^{-1} 。 $\Delta I = I_0 - I$, I_0 和 I 分别代表存在和不存在 10.0 pmol L^{-1} $\text{A}\beta(1-42)$ 时的荧光强度。

在上述优化的条件下, 基于 QDs 的高灵敏度的夹心免疫法实现了对 $\text{A}\beta(1-42)$ 的定量检测。如图 3.4 所示, 上清溶液的荧光强度 (525 nm 处) 与 $\text{A}\beta(1-42)$ 的浓度在 $5-100 \text{ pmol L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。线性回归方程为 $I = -0.0012 C (\text{pmol L}^{-1}) + 0.97079$ (I 表示归一化的荧光强度, C 表示 $\text{A}\beta(1-42)$ 的浓度; 每个浓度平行测定 5 次并取平均值), 相关系数 (R) 为 0.9686, 检出限 (LOD) 为 1.7 pmol L^{-1} (3δ)。在 $\text{A}\beta(1-42)$ 的浓度为 25 pmol L^{-1} 时的标准偏差 (RSD) 是 4.2% ($n=11$)。

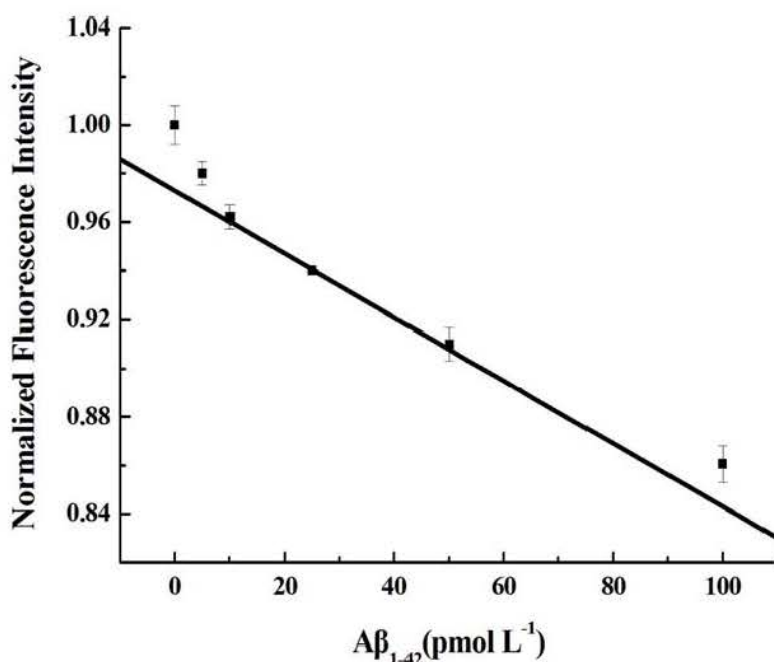


图 3.4 上清溶液荧光强度与 A β (1-42)浓度的线性关系。A β (1-42) 的浓度分别为 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 和 100 pmol L $^{-1}$. C-Ab 的浓度为 100 nmol L $^{-1}$, N-Ab 的浓度为 50 nmol L $^{-1}$, QDs 的浓度 0.25 nmol L $^{-1}$ 。

3.3.3 方法的选择性

为了考察以 QDs 为信号标记的夹心免疫检测体系的选择性,我们选择了实际生物样品中存在的一些干扰物质,如蛋白、葡萄糖 (Glc)、氨基酸和金属离子对该体系产生的影响。在溶液中分别加入 100 nmol L $^{-1}$ 蛋白 (HAS, IgM, IgG, SIgA),如图 3.5A 所示; 500 nmol L $^{-1}$ 葡萄糖和 500 nmol L $^{-1}$ 氨基酸 (K, E, R, Y, V, L, H, P, D),如图 3.5B 所示; 金属离子 500 nmol L $^{-1}$ Zn $^{2+}$ 、Ni $^{2+}$ 、Pb $^{2+}$ 、Ca $^{2+}$ 、Cr $^{3+}$ 、Co $^{2+}$ 、Na $^{+}$ 、K $^{+}$ 、Mg $^{2+}$,如图 3.5C 所示。加入上述物质后,上清溶液的荧光强度不发生明显变化。只有当溶液中加入 A β (1-42)时,才会引起荧光信号的降低。证实了我们建立的检测方法的高选择性。

我们进一步考察了一些共存物质对检测 100.0 pmol L $^{-1}$ A β (1-42)的影响。共存物质引起的误差在 $\pm 5\%$ 的范围内,就可以认为对 A β (1-42)的检测无影响。实验发现 100 nmol L $^{-1}$ HAS, IgM, SIgA, IgG (3.4 D); 500 nmol L $^{-1}$ Glc, K, E, R, Y, V, L, H, P, D, (3.5 D); 300 nmol L $^{-1}$ Zn $^{2+}$ 、Ni $^{2+}$ 、Pb $^{2+}$ 、Ca $^{2+}$ 、Cr $^{3+}$ 、Co $^{2+}$ 、Na $^{+}$ 、K $^{+}$ 、Mg $^{2+}$ (3.4 F) 共存时对 A β (1-42)的检测都无影响。

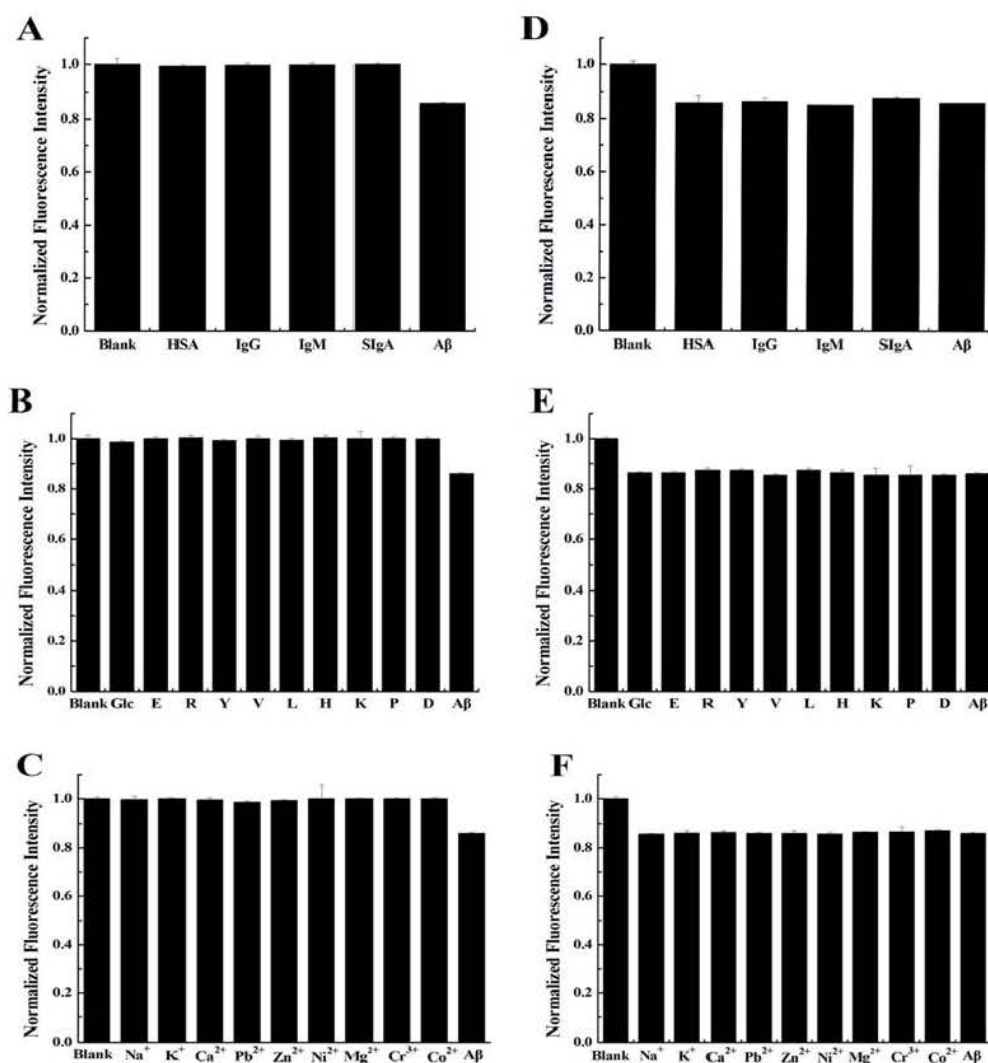


图 3.4 免疫检测的选择性。(A)、(B) 和 (C) 不同干扰物质的信号响应； A: Aβ(1-42) 的浓度为 100 pmol L⁻¹； HAS, IgM, IgG, SIgA 的浓度为 100 nM； B: Aβ(1-42) 的浓度为 100 pmol L⁻¹, Glc, K, E, R, Y, V, L, H, P, D 的浓度均为 500 nM； C: Aβ(1-42) 的浓度为 100 pmol L⁻¹, Zn²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺、Ca²⁺、Cr³⁺、Co²⁺、Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 的浓度均为 500 nmol L⁻¹。(D)、(E) 和 (F) 检测 Aβ(1-42) 时共存干扰物质的影响。D: Aβ(1-42) 的浓度为 100 pmol L⁻¹； HAS, IgM, IgG, SIgA 的浓度为 100 nmol L⁻¹； E: Aβ(1-42) 的浓度为 100 pmol L⁻¹, Glc, K, E, R, Y, V, L, H, P, D 的浓度均为 500 nmol L⁻¹； F: Aβ(1-42) 的浓度为 100 pmol L⁻¹, Zn²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺、Ca²⁺、Cr³⁺、Co²⁺、Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 的浓度均为 500 nmol L⁻¹。C-Aβ 的浓度为 100 nmol L⁻¹, N-Aβ 的浓度为 100 nmol L⁻¹, QDs 的浓度为 0.25 nmol L⁻¹。

3.3.4 人脑脊液中 Aβ(1-42) 的检测

采用标准加入法检测人脑脊液中 Aβ(1-42) 的含量, 向已稀释 40 倍的人脑脊液 (CSF) 中加入一系列不同浓度 (5.0, 10.0, 25.0, 50.0 和 100 pmol L⁻¹) 的

A β (1-42)，然后按 3.2.5 所述检测。如图 3.5 所示，得到标准曲线线性回归方程为 $I = -0.00137C \text{ (pmol L}^{-1}\text{)} + 0.99841$ (I 表示归一化的荧光强度， C 表示 A β (1-42) 的浓度； $n=5$)，相关系数 (R) 为 0.9984。根据荧光强度和加入的 A β (1-42) 的浓度，我们算出人脑脊液中 A β (1-42) 的浓度为 0.29 nmol L^{-1} (1.3 ng mL^{-1})。这个浓度与先前的报道人脑脊液中 A β (1-42) 的浓度 1.5 ng mL^{-1} 一致[14]。采用这个方法检测 A β (1-42) 比我们建立的第一种方法灵敏度更高，反应时间为 6 h，所花时间更短，能够用于人脑脊液中 A β (1-42) 的检测。与以前报道的检测方法相比，我们的工作也具有合理的灵敏度和选择性，如表二所示。

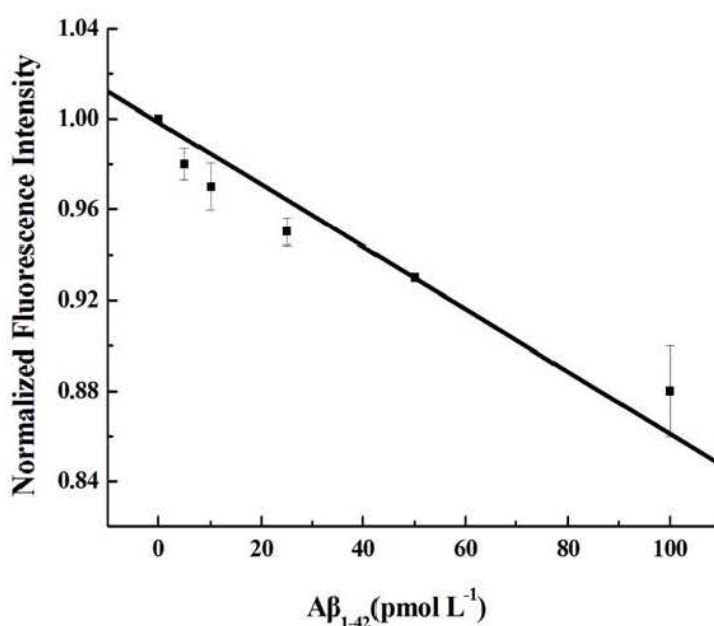


图 3.5 荧光强度与 A β (1-42) 浓度的线性关系。A β (1-42) 的浓度分别为 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 和 100 pmol L $^{-1}$ 。C-Ab 的浓度为 60 nmol L $^{-1}$ ，N-Ab 的浓度为 50 nmol L $^{-1}$ ，QDs 的浓度为 0.25 nmol L $^{-1}$ 。

3.4 结论

我们基于量子点良好的荧光性能和抗体与抗原之间的特异性结合，构建了双抗夹心免疫法定量检测 A β (1-42)。当溶液中加入 A β (1-42) 时，测得上清的荧光强度会随着 A β (1-42) 浓度的增加而减少。检测的线性范围为 5.0-100 pmol L $^{-1}$ (0.023-0.45 ng/mL)，检出限 (LOD) 1.7 pmol L $^{-1}$ 。这种方法具有较高的灵敏度和良好的选择性。为检测 AD 患者脑脊液中 A β (1-42) 的含量提供了潜在的可能，也对早期的临床诊断具有重要的意义。

表二：与其它方法的比较

Methods	Detected species	Samples	Linear rang	Limit of detection	Reference
Immune-sensing platform	A β ₁₋₄₂	The cerebrospinal fluid (CSF)	2.5-7.5 μ g/mL	3.0 μ g/mL	<i>Biosensors and Bioelectronics</i> 2013 ,40,329-335.
Electrochemistry (A β (1-16)-heme-modified gold nanoparticles)	A β	Artificial cerebrospinal fluid (aCSF)	0.09-677.1 ng/mL	45.1pg/mL	<i>Biosensors and Bioelectronics</i> 2013 ,49,231-235.
Immunoassay (use a silicon microarray platform)	A β ₁₋₄₂	Artificial cerebrospinal fluid (aCSF)	0-5ng/mL	73.07 pg/mL	<i>Biosensors and Bioelectronics</i> 2013 ,47,490-495.
Competitive electrochemical immunoassay	A β ₁₋₄₂	Artificial cerebrospinal fluid (aCSF)	0.23-4.5 ng/mL	22.6 pg/mL	<i>Biosensors and Bioelectronics</i> 2014 ,51,208-212.
Antibody-based magnetic nanoparticle immunoassay	A β	saliva	10-3000 pg/mL	20 pg/mL	<i>Journal of biomedical optics</i> 2014 , 19,051205(1)-(7).
Enzyme-linked immunosorbent assay	A β ₁₋₄₂	cerebrospinal fluid (CSF)	375-4500 pg/mL	62.5 pg/mL	<i>APPS</i> 2012 , 14,510-518.
IP/MS (Immunoprecipitation/Mass Spectrometric Analysis)	A β	cerebrospinal fluid (CSF)	4.5ng/mL-4.5 μ g/mL	-	<i>J.Biol.Chem.</i> 1996 , 271, 31894-31902.
Electrochemistry (using antibody)	A β ₁₋₄₀ / A β ₁₋₄₂	Aqueous solution	2-40 μ g/mL	-	<i>Bioelectrochemist ry</i> 2008 , 74, 118-123
Electrochemistry	A β ₁₋₂₈ / A β ₁₋₄₀	Aqueous solution	-	0.7 μ g/mL	<i>J. Am. Chem.Soc.</i> 2005, 127, 11892-11893
Gold nanoparticle based dot-blot immunoassay	A β ₁₋₄₂	Aqueous solution	0.1 ng/mL-10 μ g/mL	50 pg/mL	<i>Chem. Commun.</i> 2012 ,48, 8392-8394
Resonance light scattering	A β ₁₋₄₂	Aqueous solution	1 ng/mL-1 μ g/mL and 5-50 μ g/mL	-	<i>Chem. Commun.</i> 2011 , 47, 9339-9341
High sensitivity immunoassay (use a high binding 96-well plate)	A β ₁₋₄₂	The cerebrospinal fluid (CSF)	0.023-0.45 ng/mL	7.6 pg L ⁻¹	The present work

参考文献

- [1] Zhang X, Guo Q, Cui D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors[J]. *Sensors*, 2009, 9(2): 1033-1053.
- [2] Kim P S, Djazayeri S, Zeineldin R. Novel nanotechnology approaches to diagnosis and therapy of ovarian cancer[J]. *Gynecologic oncology*, 2011, 120(3): 393-403.
- [3] Zhang Z, Fu Y, Li B, et al. Self-assembly-based structural DNA nanotechnology[J]. *Current Organic Chemistry*, 2011, 15(4): 534-547.
- [4] Baruah S, Dutta J. Nanotechnology applications in pollution sensing and degradation in agriculture: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2009, 7(3): 191-204.
- [5] Slevin M, Badimon L, Grau-Olivares M, et al. Combining nanotechnology with current biomedical knowledge for the vascular imaging and treatment of atherosclerosis[J]. *Molecular BioSystems*, 2010, 6(3): 444-450.
- [6] Henglein A. Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles[J]. *Chemical Reviews*, 1989, 89(8): 1861-1873.
- [7] Pan J, Li Y, Li D. The application of computer simulation in the heat-treatment process of a large-scale bearing roller[J]. *Journal of materials processing technology*, 2002, 122(2): 241-248.
- [8] Ball P, Garwin L. Science at the atomic scale [J]. *Nature*, 1992, 355: 761-766.
- [9] Ekimov A, Efros A L, Onushchenko A. Quantum size effect in semiconductor Microcrystals [J]. *Solid State Commun*, 1985, 56(11): 921-924.
- [10] Geerligs L, Averin D, Mooij J. Observation of macroscopic quantum tunneling through the Coulomb energy barrier [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1990, 65(24): 3037-3040.
- [11] Wang X, Peng Q, Li Y D. Interface-mediated growth of monodispersed nanostructures. *Acc Chem Res*, 2007, 40: 635-643
- [12] Rogach A L, Talapin D V, Weller H. Semiconductor nanoparticles[M]. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG*, 2003.
- [13] Duan X F, Huang Y, Cui Y, Wang J F, Lieber C M. Indium phosphide nanowires as building blocks for nanoscale electronic and optoelectronic devices. *Nature*, 2001, 409: 66-69

- [14] Huang Y, Duan X F, Cui Y, Lauhon L J, Kim K H, Lieber C M. Logic gates and computation from assembled nanowire building blocks. *Science*, 2001, 294: 1313-1317
- [15] Pathak S, Cao E, Davidson M C, et al. Quantum dot applications to neuroscience: new tools for probing neurons and glia[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2006, 26(7): 1893-1895.
- [16] Wang X, Li Y D. Monodisperse nanocrystals: General synthesis, assembly, and their applications. *Chem commun*, 2007, 2901-2910
- [17] Colvin V L, Schlamp M C, Alivisatos A P. Light-emitting-diodes made from cadmium selenide nanocrystals and a semiconducting polymer. *Nature*, 1994, 370: 354-357
- [18] Nirmal M, Dabbousi B O, Bawendi M G, Macklin J J, Trautman J K, Harris T D, Brus L E. Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature*, 1996, 383: 802-804
- [19] Nie S M, Emery S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science*, 1997, 275: 1102-1106
- [20] Chan W C W, Maxwell D J, Gao X H, Bailey R E, Han M Y, Nie S M. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 40-46.
- [21] Rosi N L, Mirkin C A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev*, 2005, 105: 1547-1562.
- [22] Medintz I L, Uyeda H T, Goldman E R, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing[J]. *Nature materials*, 2005, 4(6): 435-446.
- [23] Ow H, Larson D R, Srivastava M, et al. Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles[J]. *Nano letters*, 2005, 5(1): 113-117.
- [24] Zou H, Wu S, Shen J. Polymer/silica nanocomposites: preparation, characterization, properties, and applications[J]. *Chem. Rev*, 2008, 108(9): 3893-3957.
- [25] Burns A, Ow H, Wiesner U. Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards “Lab on a Particle” architectures for nanobiotechnology[J]. *Chemical Society Reviews*, 2006, 35(11): 1028-1042.
- [26] Gao X, Yang L, Petros J A, et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots[J]. *Current opinion in biotechnology*, 2005, 16(1): 63-72.

- [27] Bünzli J C G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging[J]. Chemical reviews, 2010, 110(5): 2729-2755.
- [28] Hu Z, Lu X, Gao J, et al. Polymer gel nanoparticle networks[J]. Advanced Materials, 2000, 12(16): 1173-1176.
- [29] Larson D R, Zipfel W R, Williams R M, et al. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo[J]. Science, 2003, 300(5624): 1434-1436.
- [30] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics[J]. science, 2005, 307(5709): 538-544.
- [31] Hahn M A, Tabb J S, Krauss T D. Detection of single bacterial pathogens with semiconductor quantum dots[J]. Analytical chemistry, 2005, 77(15): 4861-4869.
- [32] Rossetti R, Nakahara S, Brus L E. Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution[J]. The Journal of Chemical Physics, 1983, 79(2): 1086-1088.
- [33] Murray C B, Norris D J, Bawendi M G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites[J]. Journal of the American Chemical Society, 1993, 115(19): 8706-8715.
- [34] Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. science, 1998, 281(5385): 2013-2016.
- [35] Chan W C W, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. Science, 1998, 281(5385): 2016-2018.
- [36] Huang H, Susha A S, Kershaw S V, et al. Control of Emission Color of High Quantum Yield CH₃NH₃PbBr₃ Perovskite Quantum Dots by Precipitation Temperature[J]. Advanced Science, 2015, 2(9).
- [37] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics[J]. science, 2005, 307(5709): 538-544.
- [38] Alivisatos A P, Gu W, Larabell C. Quantum dots as cellular probes[J]. Annu. Rev. Biomed. Eng., 2005, 7: 55-76.
- [39] Lu S, Xu X, Zhao W, et al. Targeting of embryonic stem cells by peptide-conjugated quantum dots[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12075.
- [40] Wu X, Liu H, Liu J, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots[J]. Nature biotechnology, 2007, 25(12): 1503-1508.

- 2003, 21(1): 41-46.
- [41] Gao X, Cui Y, Levenson R M, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. Nature biotechnology, 2004, 22(8): 969-976.
- [42] Dubertret B, Skourides P, Norris D J, et al. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles[J]. Science, 2002, 298(5599): 1759-1762.
- [43] Chan W C W, Maxwell D J, Gao X, et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging[J]. Current opinion in biotechnology, 2002, 13(1): 40-46.
- [44] Mattoussi H, Mauro J M, Goldman E R, et al. Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein[J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(49): 12142-12150.
- [45] Cheng X, Lowe S B, Reece P J, et al. Colloidal silicon quantum dots: from preparation to the modification of self-assembled monolayers (SAMs) for bio-applications[J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(8): 2680-2700.
- [46] Petryayeva E, Algar W R, Medintz I L. Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging[J]. Applied spectroscopy, 2013, 67(3): 215-252.
- [47] Jakobs S, Subramaniam V, Schonle A, et al. EGFP and DsRed expressing cultures of Escherichia coli imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy [J]. Febs Lett., 2000, 479(3): 131-135.
- [48] Kilina S V, Kilin D S, Prezhdov O V. Breaking the phonon bottleneck in PbSe and CdSe quantum dots: time-domain density functional theory of charge carrier relaxation[J]. Acs Nano, 2008, 3(1): 93-99.
- [49] Dahan M, Laurence T, Pinaud F, et al. Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots[J]. Optics letters, 2001, 26(11): 825-827.
- [50] Tada H, Higuchi H, Wanatabe T M, et al. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice[J]. Cancer research, 2007, 67(3): 1138-1144.
- [51] Rogach A L, Talapin D V, Shevchenko E V, et al. Organization of matter on different size scales: Monodisperse nanocrystals and their superstructures[J]. Advanced Functional Materials, 2002, 12(10): 653-664.
- [52] Peng X G, Manna L, Yang W D, Wickham J, Scher E, Kadavanich A, Alivisatos A P. Shape control of CdSe nanocrystals. Nature, 2000, 404: 59-61

- [53] Hines M A, Guyot-Sionnest P. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals[J]. The Journal of Physical Chemistry, 1996, 100(2): 468-471.
- [54] Reiss P, Bleuse J, Pron A. Highly luminescent CdSe/ZnSe core/shell nanocrystals of low size dispersion[J]. Nano letters, 2002, 2(7): 781-784.
- [55] Mekis I, Talapin D V, Kornowski A, et al. One-pot synthesis of highly luminescent CdSe/CdS core-shell nanocrystals via organometallic and “greener” chemical approaches[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2003, 107(30): 7454-7462.
- [56] Bhargava R N, Gallagher D, Hong X, et al. Optical properties of manganese-doped nanocrystals of ZnS[J]. Physical Review Letters, 1994, 72(3): 416.
- [57] Pradhan N, Battaglia D M, Liu Y, et al. Efficient, stable, small, and water-soluble doped ZnSe nanocrystal emitters as non-cadmium biomedical labels[J]. Nano Letters, 2007, 7(2): 312-317.
- [58] Sooklal K, Cullum B S, Angel S M, et al. Photophysical properties of ZnS nanoclusters with spatially localized Mn²⁺[J]. The Journal of Physical Chemistry, 1996, 100(11): 4551-4555.
- [59] St. John J, Coffey J L, Chen Y, et al. Synthesis and characterization of discrete luminescent erbium-doped silicon nanocrystals[J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(9): 1888-1892.
- [60] Radovanovic P V, Norberg N S, McNally K E, et al. Colloidal transition-metal-doped ZnO quantum dots[J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(51): 15192-15193.
- [61] Guo J, Yang W, Wang C. Systematic study of the photoluminescence dependence of thiol-capped CdTe nanocrystals on the reaction conditions[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2005, 109(37): 17467-17473.
- [62] Rogach A L, Franzl T, Klar T A, et al. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: state-of-the-art[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2007, 111(40): 14628-14637.
- [63] Zhao K, Li J, Wang H, et al. Stoichiometric ratio dependent photoluminescence quantum yields of the thiol capping CdTe nanocrystals[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2007, 111(15): 5618-5621.
- [64] YAN Y, Ying M, FENG G, et al. Novel strategy for synthesis of high quality CdTe

- nanocrystals in aqueous solution[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2008, 24(1): 8-14.
- [65] Yu S, Shu L, Qian Y, et al. Hydrothermal preparation and characterization of nanocrystalline powder of β -indium sulfide[J]. Materials research bulletin, 1998, 33(5): 717-721.
- [66] Zhang H, Wang L, Xiong H, et al. Hydrothermal Synthesis for High - Quality CdTe Nanocrystals[J]. Advanced Materials, 2003, 15(20): 1712-1715.
- [67] Zhao D, He Z, Chan W H, et al. Synthesis and characterization of high-quality water-soluble near-infrared-emitting CdTe/CdS quantum dots capped by N-acetyl-L-cysteine via hydrothermal method[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2008, 113(4): 1293-1300.
- [68] Qian H, Qiu X, Li L, et al. Microwave-assisted aqueous synthesis: a rapid approach to prepare highly luminescent ZnSe (S) alloyed quantum dots[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110(18): 9034-9040.
- [69] Rogach A L, Nagesha D, Ostrander J W, et al. "Raisin bun"-type composite spheres of silica and semiconductor nanocrystals[J]. Chemistry of materials, 2000, 12(9): 2676-2685.
- [70] Wang Y, Tang Z, Correa-Duarte M A, et al. Multicolor luminescence patterning by photoactivation of semiconductor nanoparticle films[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(10): 2830-2831.
- [71] Talapin D V, Rogach A L, Mekis I, et al. Synthesis and surface modification of amino-stabilized CdSe, CdTe and InP nanocrystals[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2002, 202(2): 145-154.
- [72] Jiang C, Xu S, Yang D, et al. Synthesis of glutathione - capped CdS quantum dots and preliminary studies on protein detection and cell fluorescence image[J]. Luminescence, 2007, 22(5): 430-437.
- [73] Kobayashi Y, Pan L, Tamai N. Effects of Size and Capping Reagents on Biexciton Auger Recombination Dynamics of CdTe Quantum Dots†[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2009, 113(27): 11783-11789.
- [74] Mandal A, Nakayama J, Tamai N, et al. Optical and dynamic properties of water-soluble highly luminescent CdTe quantum dots[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2007, 111(44): 12765-12771.
- [75] Giepmans B N G, Adams S R, Ellisman M H, et al. The fluorescent toolbox for

- assessing protein location and function[J]. *Science*, 2006, 312(5771): 217-224.
- [76] Willard D M, Carillo L L, Jung J, et al. CdSe-ZnS quantum dots as resonance energy transfer donors in a model protein-protein binding assay[J]. *Nano Letters*, 2001, 1(9): 469-474.
- [77] Medintz I L, Trammell S A, Mattoussi H, et al. Reversible modulation of quantum dot photoluminescence using a protein-bound photochromic fluorescence resonance energy transfer acceptor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(1): 30-31.
- [78] Mattoussi H, Mauro J M, Goldman E R, et al. Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(49): 12142-12150.
- [79] Ji X, Zheng J, Xu J, et al. (CdSe) ZnS quantum dots and organophosphorus hydrolase bioconjugate as biosensors for detection of paraoxon[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109(9): 3793-3799.
- [80] Zhang C Y, Yeh H C, Kuroki M T, et al. Single-quantum-dot-based DNA nanosensor[J]. *Nature materials*, 2005, 4(11): 826-831.
- [81] Yuan J, Guo W, Yang X, et al. Anticancer drug–DNA interactions measured using a photoinduced electron-transfer mechanism based on luminescent quantum dots[J]. *Analytical chemistry*, 2008, 81(1): 362-368.
- [82] Medintz I L, Berti L, Pons T, et al. A reactive peptidic linker for self-assembling hybrid quantum dot-DNA bioconjugates[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(6): 1741-1748.
- [83] Clapp A R, Medintz I L, Mauro J M, et al. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(1): 301-310.
- [84] Kajihara D, Abe R, Iijima I, et al. FRET analysis of protein conformational change through position-specific incorporation of fluorescent amino acids[J]. *Nature methods*, 2006, 3(11): 923-929.
- [85] Algar W R, Krull U J. Quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer for the bioanalysis of nucleic acids, proteins, and other biological molecules[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008, 391(5): 1609-1618.
- [86] Algar W R, Krull U J. Towards multi-colour strategies for the detection of oligonucleotide hybridization using quantum dots as energy donors in fluorescence resonance energy transfer (FRET)[J]. *Analytica chimica acta*, 2007,

- 581(2): 193-201.
- [87] Ghadiali J E, Cohen B E, Stevens M M. Protein kinase-actuated resonance energy transfer in quantum dot-peptide conjugates[J]. *Acs Nano*, 2010, 4(8): 4915-4919.
- [88] Wang X, Sheng P, Zhou L, et al. Fluorescence immunoassay of octachlorostyrene based on Förster resonance energy transfer between CdTe quantum dots and rhodamine B[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 60: 52-56.
- [89] Sun B, Xie W, Yi G, et al. Microminiaturized immunoassays using quantum dots as fluorescent label by laser confocal scanning fluorescence detection[J]. *Journal of immunological methods*, 2001, 249(1): 85-89.
- [90] Jie G, Li L, Chen C, et al. Enhanced electrochemiluminescence of CdSe quantum dots composited with CNTs and PDDA for sensitive immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(11): 3352-3358.
- [91] Goldman E R, Anderson G P, Tran P T, et al. Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(4): 841-847.
- [92] Charbonnière L J, Hildebrandt N, Ziessel R F, et al. Lanthanides to quantum dots resonance energy transfer in time-resolved fluoro-immunoassays and luminescence microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(39): 12800-12809.
- [93] Morales-Narváez E, Montón H, Fomicheva A, et al. Signal enhancement in antibody microarrays using quantum dots nanocrystals: application to potential Alzheimer's disease biomarker screening[J]. *Analytical chemistry*, 2012, 84(15): 6821-6827.
- [94] Goldman E R, Anderson G P, Tran P T, et al. Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(4): 841-847.
- [95] Goldman E R, Clapp A R, Anderson, G P, et al. Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76(3): 684-688.
- [96] Jaiswal J K, Mattoussi H, Mauro J M, et al. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates[J]. *Nature biotechnology*, 2003, 21(1): 47-51.
- [97] Jaiswal J K, Goldman E R, Mattoussi H, et al. Use of quantum dots for live cell

- imaging[J]. *Nature Methods*, 2004, 1(1): 73-78.
- [98] Zheng Y, Gao S, Ying J Y. Synthesis and Cell - Imaging Applications of Glutathione - Capped CdTe Quantum Dots[J]. *Advanced Materials*, 2007, 19(3): 376-380.
- [99] Muro E, Pons T, Lequeux N, et al. Small and stable sulfobetaine zwitterionic quantum dots for functional live-cell imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(13): 4556-4557.
- [100] Ballou B, Lagerholm B C, Ernst L A, et al. Noninvasive imaging of quantum dots in mice[J]. *Bioconjugate chemistry*, 2004, 15(1): 79-86.
- [101] Cai W, Shin D W, Chen K, et al. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects[J]. *Nano letters*, 2006, 6(4): 669-676.
- [102] He Y, Zhong Y, Su Y, et al. Water - Dispersed Near - Infrared - Emitting Quantum Dots of Ultrasmall Sizes for In Vitro and In Vivo Imaging[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(25): 5695-5698.
- [103] Vos S J, Xiong C, Visser P J, et al. Grant 887 EA, Cairns NJ, Morris JC, Holtzman DM, Fagan AM (2013) 888 Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: A longitu-889 dinal cohort study[J]. *Lancet Neurol*, 12: 957-965.
- [104] Selkoe D J. The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease [J]. *Trends Cell boil*, 1998, 8(11): 447-453.
- [105] LaFerla F M, Green K N, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007, 8(7): 499-509.
- [106] Soto C, Branes M C, Alvarez J, et al. Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide [J], *J. Neurol. Chem.* 1994, 63(4): 1191-1198.
- [107] Barrow C J, Zagorski M G. Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition [J]. *Science*, 1991, 253(5016): 179-182.
- [108] Takahashi T, Mihara H. Peptide and protein mimetics inhibiting amyloid β -peptide aggregation [J]. *Accounts. Chem. Res.*, 2008, 41(10): 1309-1318.
- [109] Gravina S A, Ho L, Eckman C B, et al. Amyloid β Protein (A β) in Alzheimer's Disease Brain Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A β 40 or A β 42 (43)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(13): 7013-7016.
- [110] Wang R, Sweeney D, Gandy S E, et al. The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media Detection and quantification of amyloid β protein and

- p>
variants by immunoprecipitation-mass spectrometry[J].
- Journal of Biological Chemistry*
- , 1996, 271(50): 31894-31902.
- [111] Santos A N, Torkler S, Nowak D, et al. Detection of amyloid- β oligomers in human cerebrospinal fluid by flow cytometry and fluorescence resonance energy transfer[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2007, 11(1): 117-125.
- [112] Wang C, Liu D, Wang Z. Resonance light scattering as a powerful tool for sensitive detection of β -amyloid peptide by gold nanoparticle probes[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(33): 9339-9341.
- [113] Wang C, Liu D, Wang Z. Gold nanoparticle based dot-blot immunoassay for sensitively detecting Alzheimer's disease related β -amyloid peptide[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(67): 8392-8394.
- [114] Gagni P, Sola L, Cretich M, et al. Development of a high-sensitivity immunoassay for amyloid-beta 1-42 using a silicon microarray platform[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 47: 490-495.
- [115] Liu L, He Q, Zhao F, et al. Competitive electrochemical immunoassay for detection of β -amyloid (1-42) and total β -amyloid peptides using p-aminophenol redox cycling[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 51: 208-212.
- [116] Choi I, Lee L P. Rapid detection of A β aggregation and inhibition by dual functions of gold nanoplasmonic particles: Catalytic activator and optical reporter[J]. *ACS nano*, 2013, 7(7): 6268-6277.
- [117] Anstey K J, Cherbuin N, Herath P M. Development of a new method for assessing global risk of Alzheimer's disease for use in population health approaches to prevention[J]. *Prevention Science*, 2013, 14(4): 411-421.
- [118] Tanzi R E. The synaptic A β hypothesis of Alzheimer disease[J]. *Nature neuroscience*, 2005, 8(8): 977-979.
- [119] Capule C C, Yang J. Enzyme-linked immunosorbent assay-based method to quantify the association of small molecules with aggregated amyloid peptides[J]. *Analytical chemistry*, 2012, 84(3): 1786-1791.
- [120] LaFerla F M, Green K N, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007, 8(7): 499-509.
- [121] Picou R, Moses J P, Wellman A D, et al. Analysis of monomeric A β (1-40) peptide by capillary electrophoresis[J]. *Analyst*, 2010, 135(7): 1631-1635.
- [122] Ryu J, Joung H A, Kim M G, et al. Surface plasmon resonance analysis of

- Alzheimer's β -amyloid aggregation on a solid surface: from monomers to fully-grown fibrils[J]. *Analytical chemistry*, 2008, 80(7): 2400-2407.
- [123] Xia N, Liu L, Harrington M G, et al. Regenerable and Simultaneous Surface Plasmon Resonance Detection of A β (1– 40) and A β (1– 42) Peptides in Cerebrospinal Fluids with Signal Amplification by Streptavidin Conjugated to an N-Terminus-Specific Antibody[J]. *Analytical chemistry*, 2010, 82(24): 10151-10157.
- [124] Norris D J, Bawendi M G. Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in CdSe quantum dots[J]. *Physical Review B*, 1996, 53(24): 16338.
- [125] Gao X, Tang M, Li Z, et al. Streptavidin-conjugated CdSe/ZnS quantum dots impaired synaptic plasticity and spatial memory process[J]. *Journal of nanoparticle research*, 2013, 15(4): 1-12.
- [126] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics[J]. *science*, 2005, 307(5709): 538-544.
- [127] Allen T M, Cullis P R. Drug delivery systems: entering the mainstream[J]. *Science*, 2004, 303(5665): 1818-1822.
- [128] Zhang L Y, Zheng H Z, Long Y J, et al. CdTe quantum dots as a highly selective probe for prion protein detection: Colorimetric qualitative, semi-quantitative and quantitative detection[J]. *Talanta*, 2011, 83(5): 1716-1720.
- [129] Tanke H J, Dirks R W, Raap T. FISH and immunocytochemistry: towards visualising single target molecules in living cells[J]. *Current opinion in biotechnology*, 2005, 16(1): 49-54.
- [130] Chen F, Gerion D. Fluorescent CdSe/ZnS nanocrystal-peptide conjugates for long-term, nontoxic imaging and nuclear targeting in living cells[J]. *Nano Letters*, 2004, 4(10): 1827-1832.
- [131] Voura E B, Jaiswal J K, Mattoussi H, et al. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy[J]. *Nature medicine*, 2004, 10(9): 993-998.
- [132] Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue W F, et al. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(21): 8691-8696.
- [133] Wu W, Sun X, Yu Y, et al. TiO₂ nanoparticles promote β -amyloid fibrillation in

- p>
vitro[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2008, 373(2): 315-318.
- [134] Sista R S, Eckhardt A E, Srinivasan V, et al. Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform[J]. Lab on a Chip, 2008, 8(12): 2188-2196.
- [135] Qu S, Liu J, Luo J, et al. A rapid and highly sensitive portable chemiluminescent immunosensor of carcinoembryonic antigen based on immunomagnetic separation in human serum[J]. Analytica chimica acta, 2013, 766: 94-99.
- [136] Gao H, Wang W, Wang Z, et al. Amorphous carbon nanoparticle used as novel resonance energy transfer acceptor for chemiluminescent immunoassay of transferrin[J]. Analytica chimica acta, 2014, 819: 102-107.
- [137] Boeve BF. Mild cognitive impairment asso-ciated with underlying Alzheimer's disease versus Lewy body disease [J]. Parkinsonism Relat Dis-ord, 2012, 18: S41-S44.
- [138] Quan L, Wu J, Lane L A, et al. Enhanced Detection Specificity and Sensitivity of Alzheimer's Disease Using Amyloid-beta Targeted Quantum Dots[J]. Bioconjugate chemistry, 2016.
- [139] Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011, 1:a006189
- [140] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's dis-ease: initial report of the purification and charac-terization of a novel cerebrovascular amyloid protein [J]. Biochem Biophys Res Commun,1984, 120: 885-890.
- [141] White J A, Manelli A M, Holmberg K H, et al. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β 1-42 on astrocyte-mediated inflammation[J]. Neurobiology of disease, 2005, 18(3): 459-465.
- [142] Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, et al. The various aggregation states of β -amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2006, 41(2): 202-212.
- [143] Ishigaki Y, Tanaka H, Akama H, et al. A Microliter-Scale High-throughput Screening System with Quantum-Dot Nanoprobes for Amyloid- β Aggregation Inhibitors[J]. PloS one, 2013, 8(8): e72992.
- [144] Ammar M, Smadja C, Phuong L G T, et al. A new controlled concept of

- immune-sensing platform for specific detection of Alzheimer's biomarkers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 40(1): 329-335.
- [145] Liu L, Zhao F, Ma F, et al. Electrochemical detection of β -amyloid peptides on electrode covered with N-terminus-specific antibody based on electrocatalytic O_2 reduction by $A\beta$ (1–16)-heme-modified gold nanoparticles[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49: 231-235.
- [146] Kim C B, Choi Y Y, Song W K, et al. Antibody-based magnetic nanoparticle immunoassay for quantification of Alzheimer's disease pathogenic factor[J]. *Journal of biomedical optics*, 2014, 19(5): 051205-051205.
- [147] Cullen V C, Fredenburg R A, Evans C, et al. Development and advanced validation of an optimized method for the quantitation of $A\beta_{42}$ in human cerebrospinal fluid[J]. *The AAPS journal*, 2012, 14(3): 510-518.
- [148] Rizvi S B, Yang S Y, Green M, et al. Novel POSS–PCU Nanocomposite Material as a Biocompatible Coating for Quantum Dots[J]. *Bioconjugate chemistry*, 2015, 26(12): 2384-2396.
- [149] Bilan R, Fleury F, Nabiev I, et al. Quantum dot surface chemistry and functionalization for cell targeting and imaging[J]. *Bioconjugate chemistry*, 2015, 26(4): 609-624.

致 谢

人生如画，岁月如歌。弹指间，三年的研究生生涯已接近尾声，日子总是像从指尖流过的细沙，在不经意间悄然滑落。然而站在毕业的门槛上远远望去，初来乍到时的场景却历历在目。回忆起这三年的点点滴滴，感慨不已，欣慰之余而又庆幸无比。值得欣慰的是，我这三年的时间过得非常充实，学到了许多的东西；庆幸的是我来到了一个很好的环境，遇到了一个好的老师和很多可爱的朋友，他们给了我很多的指引和帮助，使我能够顺利地完成学业，再此谨向他们表示最衷心的感谢！

首先，最应该感谢的是我的导师郑鹄志教授。非常感谢您当初选择了我，让我有机会进入我梦想的西南大学，开启我的研究生生涯，感谢您让我成为了您的学生，感谢您让我拥有了人生中最好的老师，感谢您在我的实验中的正确引导，感谢您在我每次犯错后都能够包容我，原谅我，一切的一切都感谢您。郑老师真的是一位对工作兢兢业业，尽心尽力的好老师。还记得我刚入学时，对科研还不是很了解，郑老师会跟我们聊一些你对科研的态度和想法，你的思想深深的影响着我们，激发了我们对科研的兴趣。初次做文献报告的时候，我们对一些专业名词和实验步骤理解得都不是很准确，您每次都很耐心的为我们讲解，总是鼓励我们，给我们信心。当我们开始做实验了，您总是不厌其烦的教我们设计实验方案，分析实验现象，处理实验数据，让我们对实验要有清晰的思路和建立正确的分析方法。实验中的每一个细节都讨论的非常细致，当实验获得新发现时，郑老师敏捷而发散性的思路和激情的演讲，常常让我激动万分，仿佛已经感受到实验完成时的喜悦心情；而当实验遇到困难时，您会第一时间和我一起讨论，认真分析原因，寻找突破口。等到实验完成时，您又会耐心的指导我论文的书写，每一字每一句您都会认真的帮我们修改。在这三年中，您不仅教会了我做实验，还教会了我很多做人的道理，待人真诚，学会包容。您不仅关心我们的科研，还关心我们的生活，您时常提醒我们要注意锻炼身体，您还经常组织我们去春游；您让我们整个 CBN 实验室的成员凝聚在一起，感受温暖和快乐。您以渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的科研作风，平易近人的人格魅力深深的影响着我。在这里，我谨向郑老师致以最诚挚的感谢和祝福！

其次要感谢我的师母隆异娟老师，隆老师是一位漂亮而又温和的好老师。经常给予我们关心和帮助。感谢您隆老师！

感谢重庆医科大学的程老师和黄宁师兄对我试验提供的帮助。

同时，还要感谢实验室的每一位成员。特别是我们刚到实验室时，实验室的

师姐们给我们提供了很多的帮助。特别是美丽而又温柔的梁立平师姐，我刚来西南大学时，正值七月，梁师姐顶着炎炎烈日奔走在校园里为我安排住宿，带我去超市买东西，熟悉学校的环境，您还教会了我报账，每当我遇到困难和失落时候，你总是能够给予我帮助，让我们在这里感受到了友爱和温暖。并且梁师姐是实验室里第一个探究 β -淀粉样蛋白的人，梁师姐细心的引导我进行实验，尽你所能为我解决试验和生活中所遇到的问题，为我实验的顺利进行提供的许多宝贵意见。还有王玺梁师姐，玺梁师姐做事非常认真和严谨，在实验里严格要求我们，玺梁师姐严谨的科研态度深深的影响着我这三年研究生生涯。藤萍师姐，温柔善良的你一直是实验室的知心姐姐，虽然外表看似柔弱，但内心却坚强无比，您对我们总是那么好，让我觉得暖暖的。沈冬军师姐，沈师姐的脾气非常好，在实验室耐心的教我使用每一个实验仪器，你小小的身体里住着一个宽容二坚强的心。王杰师姐，拥有着东北大姐的风范，你豪爽的个性给实验室带来了很多的欢乐，我们一起吃饭、一起逛街、一起出去玩，这些都成为了我内心深处最美好的记忆。感谢杨裕芳师妹，谢谢你为溶解了那么多次 $A\beta$ ，测了那么多次 $A\beta$ 的浓度，溶解那么多次抗体。感谢万冬梅师妹，你每次回家都会给我们带好多好吃的，自家的蜂蜜，乐山的甜皮鸭，每次都能让我们胃口大开。感谢温祖煌师弟，你在作为实验室唯一的男生，为实验室干了很多体力活，减轻了师姐们的负担。感谢庞艳娇师妹，邓智利师妹，李梦露师妹，你们的到来为实验室增加了青春活力和无限多的欢乐。最后，感谢于媛媛，杨利利，我们三个一路走来相互帮助和支持，还要感谢缘分，给我一个和你们大家相识相知的机会，与你们在一起的欢声笑语我将永远铭记在心。

此外，我要感谢我的室友欧新、常园园，李娜，感谢你们三年来的陪伴。感谢杜俊宏，谢谢你对我实验工作的大力支持，每次在我实验做到很晚时都会来接我，也谢谢你三年来的陪伴和理解。

最后，我还要感谢我的父母。感谢你们给予女儿这么多的爱与温暖！感谢你们在我这 20 几年的求学生涯中的无微不至的关心、照顾和支持。在这里，女儿向你们道一声：你们辛苦了！

感谢所有爱我和帮助过我的人，我会带着大家的期望继续努力的！

珍重！

再见！

皮江丽

2016 年 5 月于橘园十舍

硕士期间发表论文

- [1] **Pi J L**, Long Y, Huang N, et al. A sandwich immunoassay for detection of $A\beta_{1-42}$ based on quantum dots[J]. Talanta, 2016, 146: 10-15.
- [2] 皮江丽, 郑鹄志. 基于量子点和磁性微球的夹心免疫法检测 $A\beta_{1-42}$. 中国微米纳米技术学会纳米科学技术分会第三届年会暨 2014' 全国纳米生物与医学学术会议论文, 2014, 1-P-31.