

基于胶体金的 8-羟基-2'-脱氧鸟苷免疫层析试纸条

叶伟伟¹, 王丽文², 张宇², 李潮锋^{3,4}, 钱天润², 付贤树^{3,4}, 张明洲^{3,4}, 单继宏¹

1 浙江工业大学 机械工程学院, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学 食品科学与工程学院, 浙江 杭州 310014

3 中国计量大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018

4 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 浙江 杭州 310018

叶伟伟, 王丽文, 张宇, 李潮锋, 钱天润, 付贤树, 张明洲, 单继宏. 基于胶体金的 8-羟基-2'-脱氧鸟苷免疫层析试纸条. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1197-1208.

YE WW, WANG LW, ZHANG Y, LI CF, QIAN TR, FU XS, ZHANG MZ, SHAN JH. Development of a colloidal gold based immunochromatographic strip for 8-OHdG detection. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1197-1208.

摘要: 8-羟基-2'-脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) 是评价 DNA 氧化损伤较灵敏和稳定的生物标志物。文中采用竞争法建立一种快速、灵敏检测 8-OHdG 的胶体金免疫层析试纸条。将样品垫 (玻璃纤维素膜)、结合垫 (玻璃纤维素膜)、硝酸纤维素膜和吸水垫依此粘贴在聚氯乙烯 (polyvinyl chloride, PVC) 底板上, 构建试纸条。通过柠檬酸钠还原三水合四氯金酸制备胶体金 (gold nanoparticles, AuNPs), 8-OHdG 配对的抗体 (antibody, Ab) 包被于 AuNPs 的外层 (Ab coated AuNPs, Ab@AuNPs) 作为探针。牛血清蛋白 (bovine serum protein, BSA) 与 8-OHdG 用碳二亚胺盐酸盐偶联制备人工抗原, 作为检测线的包被抗原。羊抗鼠多抗 (immunoglobulin G, IgG) 作为质控线的包被抗体。对试纸条的硝酸纤维素膜、上样液的配方、金标抗体喷涂量等实验参数进行了优化。结果表明, 硝酸纤维素膜 (nitrocellulose film, NC) 膜采用 CN 95, 上样液的最优配方为 1% BSA+3%吐温-20+3%蔗糖+0.9% NaCl 溶液, 最适金标抗体喷涂量为 4 μ L。利用试纸条在可见光下检测 8-OHdG, 根据检测线 (test line, T 线) 和质控线 (control line, C 线) 的显色强度对比, 可初步判断尿液中 8-OHdG 的含量水平。并通过 T 线的灰度值计算尿液中的 8-OHdG 的浓度, 检测限为 2.55 μ g/L。该方法简单、快速且有较好的特异性, 可检测人体尿液中的 8-OHdG 含量, 以初步评价人体的健康状态。

关键词: 免疫层析; 胶体金; 8-羟基-2'-脱氧鸟苷; 试纸

Received: May 25, 2021; **Accepted:** October 18, 2021; **Published online:** November 9, 2021

Supported by: Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (LY20D060008); Science and Technology Plan Project of Zhejiang Province-Technological Research for Public Welfare, China (LGG19F010008); Science and Technology Plan Project for Public Welfare in Ningbo City, China (20211JCGY020387)

Corresponding author: YE Weiwei. Tel: +86-571-88332832; E-mail: yeweimei0@163.com

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY20D060008); 浙江省科技计划项目-公益技术 (LGG19F010008); 宁波市公益类科技计划项目 (20211JCGY020387)

Development of a colloidal gold based immunochromatographic strip for 8-OHdG detection

YE Weiwei¹, WANG Liwen², ZHANG Yu², LI Chaofeng^{3,4}, QIAN Tianrun², FU Xianshu^{3,4}, ZHANG Mingzhou^{3,4}, SHAN Jihong¹

1 College of Mechanical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

3 College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

4 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is a sensitive and stable biomarker for evaluating DNA oxidative damage. A rapid and sensitive colloidal gold immunochromatographic strip was developed for 8-OHdG detection by a competitive method. The sample pad (glass cellulose film), bonding pad (glass cellulose film), nitrocellulose film and absorbent pad were pasted on the polyvinyl chloride (PVC) base plate to construct the test strip. Colloidal gold (AuNPs) was prepared by the reduction of chloroauric acid with sodium citrate. 8-OHdG antibody (Ab) was coated on the outer layer of AuNPs to form Ab@AuNPs as a probe. Bovine serum albumin (BSA) and 8-OHdG were conjugated with carbodiimide hydrochloride to prepare an artificial antigen, which was used as the coating antigen of detection line. Goat anti mouse polyclonal antibody IgG was used as the coating antibody of control line. The experimental parameters were optimized including the type of nitrocellulose membrane, the formula of loading solution, and the spraying amount of gold labeled antibody. The results showed that the appropriate nitrocellulose membrane was CN 95. The optimal loading solution included BSA (1%), Tween-20 (3%), sucrose (3%) and NaCl (0.9%). The optimal spraying amount of gold labeled antibody was 4 μ L. 8-OHdG can be detected by the strip under visible light, and the level of 8-OHdG in urine can be preliminarily determined by comparing the color intensity of T line and C line. The 8-OHdG concentration in urine was further calculated by the gray value of T line and the threshold of detection was 2.55 μ g/L. This colloidal gold immunochromatographic strip is simple, rapid and specific for detecting 8-OHdG in human urine to preliminarily evaluate the human status.

Keywords: immunochromatography; colloidal gold; 8-OHdG; strip

活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 通常与生物体共存, 可以诱导动物和人类的 DNA 氧化损伤, 在氧化损伤的过程中, 会形成大量的 DNA 损伤产物^[1]。食品中存在的邻苯二甲酸盐、重金属、防腐剂、农兽药残留等, 可以使人体细胞中的 ROS 水平升高。另外, 外源性活性氧也会造成 DNA 氧化损伤, 如吸烟、紫外

线辐射和电离辐射等^[2]。由于在 4 种碱基中鸟嘌呤的氧化电位最低, 最容易受到 ROS 攻击^[3], 而造成 DNA 氧化损伤, 其主要产物之一为 8-羟基-2'-脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG), 被广泛用作评价 DNA 氧化损伤较灵敏和稳定的生物标志物^[4-5]。8-OHdG 具有与任何碱基配对的能力, 在 DNA 复制时会引起基因

突变和癌基因的表达^[6]。DNA 损伤可以通过体内的几种酶来修复,如 8-OHdG 可以被核酸内切酶和糖基化酶等酶切割,然后通过血液运输排到尿液中^[7]。但 DNA 中未修复的 8-OHdG 能够继续与其他碱基互补配对,进而诱发癌变^[1]。DNA 氧化损伤可以引起多种疾病,如癌症^[8]、神经退行性疾病^[9]、糖尿病^[10]以及心血管疾病^[11],对人体造成巨大且不可逆的伤害。

8-OHdG 经人体代谢后,可在尿液中被检测到。用于 8-OHdG 检测的方法有多种,包括酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[12]、毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE)^[13]、气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[14]、高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[1]等。虽然这些传统的检测技术已经具备优良的选择性以及合适的检测限,但大多存在仪器昂贵、样品前处理繁琐、操作过程复杂等问题^[15]。纸基生物传感器具有快速、简单、经济、准确的优点,在许多领域被广泛使用^[16],其中,免疫层析试纸是一种常用的纸基生物传感器。免疫层析试纸可以使用多种信号读数,包括电化学、荧光、导电性和比色法,免疫层析试纸结合比色法可以通过简单的颜色变化监测待测物的存在,但是比色分析灵敏度不高,通过与不同种类的纳米材料结合可以提高检测灵敏性和选择性^[17]。常用的纳米材料包括碳纳米材料、金属纳米材料、二氧化硅纳米颗粒和量子点^[18]。胶体金 (gold nanoparticles, AuNPs) 合成简单,得到的产物也很稳定,并且 AuNPs 具有强烈的红色,免疫层析试纸结合 AuNPs 可以实现更加简单、快速的检测^[19]。Jafari 等^[20]研究开发了一种基于 AuNPs 的免疫层析试纸,能够快速分析实际样品中的苯丙氨酸水平。

本研究采用竞争法原理,使用 AuNPs 作为

8-OHdG 抗体的标记物,以 8-OHdG 与其抗体之间的特异性结合为基础,研发了一种 AuNPs 试纸条,用于快速测定尿液中的 8-OHdG。本方法具有分析速度快、灵敏度高、操作简单等优点。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

柠檬酸钠、氯化金 (III) 三水合物 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99.9%)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)、牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、8-OHdG (98%)、8-OHdG 抗体 (antibody, Ab)、碳二亚胺盐酸盐 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC)、 KH_2PO_4 和甲醇购自 Sigma-Aldrich 公司;浓盐酸 (37%) 购自西陇科学股份有限公司;浓硝酸 (68%) 购自上海凌峰化学试剂有限公司;氯化钠、胞嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、吐温-20 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司;蔗糖、四硼酸钠购自中国医药集团有限公司;人工尿液购自英创生物科技有限公司;羊抗鼠 (immunoglobulin G, IgG)、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜 (nitrocellulose film, NC)、吸水纸、PVC 底板购自上海杰一生物技术有限公司。Agilent eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 50 mmol/L KH_2PO_4 与甲醇 9 : 1; 流速: 1 mL/min; 紫外检测波长: 300 nm。所用 KH_2PO_4 和甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,实验用水均为自制去离子水。

1.2 主要仪器

XYZ-3000 型试纸条三维喷膜仪 (美国 Bio Dot 公司); 透射电子显微镜 (日本日立 HT7700); 动态光散射粒径与 Zeta 电位分析仪 (美国 Brookhaven Omni); 紫外分光光度计 (普析通用 TU-1810PC); Centrifuge 5418 型台式离心机, 2.5/10/20/200/1 000 μL 移液枪 (德国 Eppendorf

公司); BT 25 S 型高精度分析天平 (北京 Sartorius 仪器系统有限公司); KQ5200DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); C-MAG-HS4 型数显型恒温加热磁力搅拌器, V 1 S 000 型涡旋振荡器 (德国 IKA 集团); 高效液相色谱仪 (日本岛津 SPD-20A), 针头式过滤器, 微孔滤膜 (0.22 μm), C18 固相萃取 (SPE, 天津 BOJIN), DHG-9015A 型电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 胶体金的制备

根据 Ye 等^[21]的方法并略做修改, 通过柠檬酸钠辅助还原氯金酸制备 AuNPs。用王水 (浓盐酸: 浓硝酸=3:1, 现配现用) 洗涤三颈烧瓶、磁力转子、冷凝管、玻璃棒和量筒, 再用去离子水冲洗干净, 并在鼓风干燥箱中烘干。称取 0.143 g 氯化金三水合物溶解于 1 mL 水中配制 14.3% (W/V) 的 HAuCl_4 储备溶液; 称取 0.1 g 柠檬酸钠溶于 10 mL 水中配制 1% (W/V) 的柠檬酸钠溶液。取 40 mL 水于三颈烧瓶中, 在磁力搅拌和回流条件下加热至沸腾后, 加入 20 μL $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14.3%, W/V), 再次煮沸后迅速加入 7.2 mL 柠檬酸钠溶液 (1%, W/V), 约 15 min 后溶液转变为酒红色, 此时停止加热, 保持回流和搅拌至溶液冷却到室温, 得到的 AuNPs 于 4 $^\circ\text{C}$ 下保存。

1.3.2 胶体金的表征

将胶体金 (10 μL) 滴加在 400 目带铜网的超薄碳膜上, 将碳膜置于 100 W 白炽灯下快速干燥, 用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察制备得到胶体金的尺寸和形貌等特征。采用动态光散射粒径与 Zeta 电位分析仪测得胶体金的 Zeta 电位值。采用紫外分光光度计测试胶体金的紫外吸收光谱, 根据吸收光谱值计算胶体金的浓度。

1.3.3 金标抗体的制备

取 100 μL 的 8-OHdG Ab (1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 500 μL AuNPs (0.4 nmol/L) 混合, 将 pH 调节为 9.0, 室温条件下孵育 1 h, 形成金标抗体 (Ab coated AuNPs, Ab@AuNPs)。加入 66.6 μL 的 BSA 溶液 (10%), 继续孵育 0.5 h, 对 Ab@AuNPs 的剩余结合位点进行封闭。配制含四硼酸钠 (20 mmol/L) 和 BSA (1%) 的混合溶液作为离心洗涤液。配制重悬液含吐温-20 (0.5%)、BSA (2%)、NaCl (0.6 mol/L)、蔗糖 (3%) 和四硼酸钠溶液 (20 mmol/L), 重悬液现用现配。将 Ab@AuNPs 溶液 10 000 r/min 离心 2 min, 去除上清液, 用离心洗涤液重悬沉淀部分。重复上述步骤离心洗涤两次, 用重悬液重悬 Ab@AuNPs 至 400 μL 备用。

1.3.4 完全抗原的制备

取 0.004 5 g BSA 溶于 1 mL 水中, 取 0.009 6 g 8-OHdG 溶于 10 mL 水中, 用稀盐酸分别调节 BSA 和 8-OHdG 溶液的 pH 至 5.0, 取 0.005 7 g EDC 溶于 200 μL 水中。立即将上述 3 种溶液各取 200 μL 混合并振荡, 室温下搅拌反应 2 h 后用 500 Da 的透析膜和 500 mL PBS 透析过夜 (期间更换透析液 3 次), 于 4 $^\circ\text{C}$ 下保存备用。

1.3.5 试纸条的搭建

将样品垫 (玻璃纤维素膜)、结合垫 (玻璃纤维素膜)、NC 膜 (CN 95) 和吸水垫依此粘贴在 PVC 底板上, 相互之间重叠 1-2 mm。使用 BioDot 三维喷膜仪在结合垫上喷涂 4 μL 制备好的金标抗体 (0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在 NC 膜上以 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的量分别喷涂 1 mg/mL 的 8-OHdG 完全抗原与羊抗鼠 IgG, 作为检测线 (test line, T 线) 和质控线 (control line, C 线)。将喷涂好的试纸条放入烘箱中, 42 $^\circ\text{C}$ 干燥 30 min。将干燥后的试纸条切成 5 mm 宽的纸条, 放入密封袋中加干燥剂保存。

1.3.6 检测标准样品 8-OHdG

配制含有 1% BSA、3%吐温-20、3%蔗糖和 0.9% NaCl 的上样液。以上样液为溶剂配制不同浓度的 8-OHdG 溶液,浓度分别为 0、0.001、0.003、0.009、0.027、0.081、0.243、0.263、0.283 mg/L,依次编号为 1-9,其中不含 8-OHdG 的上样液作为阴性对照。每组样品各取 80 μ L 溶液分别滴加到试纸条上,反应 5 min 后在可见光下观察结果。

1.3.7 特异性分析

为了分析试纸条检测 8-OHdG 的特异性检测效果,将胞嘧啶、胸腺嘧啶和腺嘌呤作为检测对照组,对试纸条的检测特性进行分析。分别配制浓度为 150 mg/L 的 8-OHdG、胞嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤溶液,将以上样品各取 80 μ L 分别滴加到制备好的试纸条上,反应 5 min 后观察结果。

1.3.8 检测尿液样品中的 8-OHdG

为了模拟尿液环境中 8-OHdG 的检测,选用标准化的人工尿液样品为基质进行加样检测。用人工尿液配制浓度为 0、0.001、0.003、0.009、0.027、0.081、0.243、0.263、0.283 mg/L 的 8-OHdG 溶液,依次编号为 1-9,用不含 8-OHdG 的人工尿液作为阴性对照。每组样品各取 80 μ L 含不同浓度 8-OHdG 的人工尿液分别滴加到试纸条上,反应 5 min 后在可见光下观察结果。为了验证胶体金试纸对实际样品的检测效果,取 80 μ L 含上样液配方的健康人尿液和直肠癌转移患者尿液(取自浙江省人民医院)分别滴加到试纸条上,反应 5 min 后在可见光下观察结果。同时采用 HPLC 方法对人体尿液中的 8-OHdG 含量进行检测,首先通过 HPLC 检测 8-OHdG 标准溶液,获得标准曲线。配制浓度分别为 4、8、16、32、64 μ g/L 的 8-OHdG 标准溶液,分别取 100 μ L 注入 HPLC 检测,流

动相为 50 mmol/L KH_2PO_4 与甲醇,体积比为 9:1;流速为 1 mL/min;紫外检测波长为 300 nm,按保留时间定性,峰面积定量,计算回归方程 ($Y=bX+a$) 得到 8-OHdG 的标准曲线。各取 4 mL 待检测尿样,加入 2 mL 0.1 mol/L KH_2PO_4 混匀,12 000 r/min 离心 10 min。取 1 mL 上清液备用。SPE 小柱依次用 1 mL 甲醇、1 mL 去离子水、1 mL 0.1 mol/L KH_2PO_4 和 1 mL 去离子水冲洗,在最大真空度下真空干燥 10 min。取 1 mL 过滤后的尿液过 SPE 小柱,用 1 mL 0.1 mol/L KH_2PO_4 洗脱,收集洗脱液,用 Millipore 针头式滤器 (0.22 μ m, 4 mm) 过滤至自动进样小瓶,取 100 μ L 注入 HPLC 进行检测。

2 结果与分析

2.1 基于胶体金的免疫层析试纸检测 8-OHdG 的原理

免疫层析试纸的原理主要包括竞争法和双抗夹心法,其中,竞争法适用于小分子物质的检测。8-OHdG 是典型的小分子物质,通过选择竞争法原理制备试纸。如图 1 所示,将样品滴加到样品垫上,在压力差的作用下,样品流经结合垫,结合垫上的 Ab@AuNPs 探针随层析液流动释放,并继续向前流动到达 NC 膜,流经 T 线和 C 线时会发生免疫反应从而导致 T 线和 C 线颜色改变,最后被吸水垫吸收。当样品不含 8-OHdG 时,结合垫上 Ab@AuNPs 探针的免疫反应位点未被占用,随层析到达 T 线,可以被 T 线捕捉,与 T 线上的完全抗原充分反应,T 线显红色。未被 T 线捕捉的探针继续向前层析,被 C 线捕捉,导致 C 线显淡红色。当样品中含有 8-OHdG 时,样品中的 8-OHdG 会先与结合垫上的 Ab@AuNPs 探针结合,导致 Ab@AuNPs 探针的部分位点或全部位点被占用,即 T 线只能捕捉剩余部分探针或无法捕捉探针,因此,T 线

颜色变浅甚至不显色。探针会继续层析，到达 C 线。由于 8-OHdG 抗体与 8-OHdG 的结合并不影响其与对应的二抗羊抗鼠 IgG 的结合，所以探针会被 C 线捕捉，导致 C 线显红色。所以，样品中 8-OHdG 浓度越高，T 线显色越浅。当样品浓度超过检测限时，T 线不显色。无论样品有无 8-OHdG，C 线都显色，且 C 线显色是表示有效的检测。

2.2 胶体金的表征

采用 TEM 观察胶体金的形貌和尺寸大小等信息，得到胶体金 TEM 图 (图 2)。胶体金体系中的金纳米颗粒粒径分布均匀 (图 2A)，在溶

液体系中较分散。胶体金体系中金纳米颗粒的形状近似球形，平均直径大约 23 nm (图 2B)，满足胶体金免疫层析试纸的使用要求。为了确定胶体金分散体系的稳定性，利用动态光散射粒径与 Zeta 电位分析仪对胶体金的表面 Zeta 电位进行测定。胶体金的 Zeta 电位为 -29.73 ，表明胶体金分散体系具有较好的稳定性。

2.3 实验条件的优化

2.3.1 上样液的优化

胶体金试纸上样液的配方成分为 BSA、无机盐、吐温-20 和蔗糖。其中固定 BSA 含量为 1%，对吐温-20 的含量、蔗糖的含量和盐离子

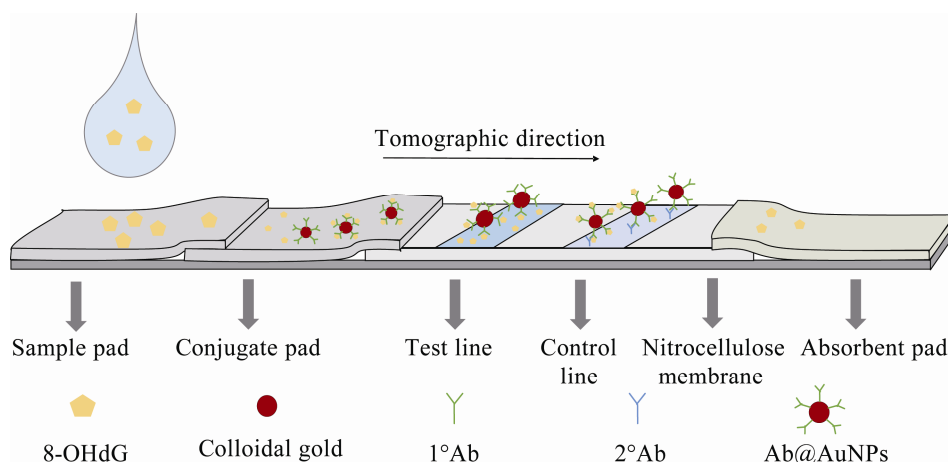


图 1 胶体金免疫层析试纸竞争法检测 8-OHdG 的工作原理示意图

Figure 1 Schematic illustration of the working principle of immunochromatographic strip based on colloidal gold for 8-OHdG detection.

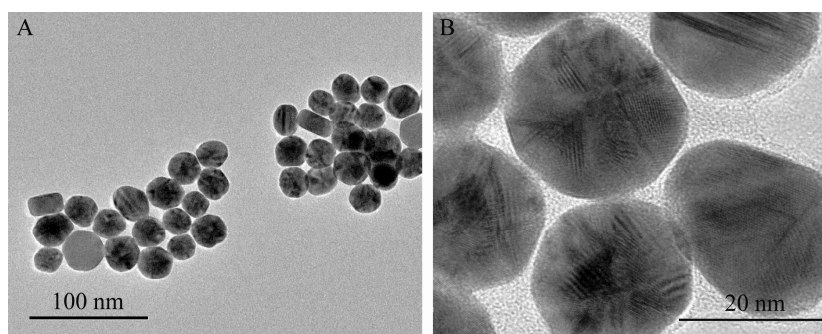


图 2 AuNPs 的 TEM 图像

Figure 2 TEM image of AuNPs. (A) Particle size distribution of AuNPs. (B) The morphology of AuNPs.

强度 3 个因素做三水平正交实验。选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行设计, 每个实验组层析 5 min 后观察结合垫的残留情况与出线颜色强度。不同实验条件下胶体金免疫层析试纸的上样液优化结果如表 1 所示, 在其他条件不变的前提下, 随着吐温-20 含量的增加, 结合垫上的残留逐渐减少, 当吐温-20 的含量达到 3% 时结合垫上几乎无残留。蔗糖含量与离子强度的增加对结合垫的残留无明显影响。离子强度是影响 T 线、C 线显色效果的重要因素, 当离子强度较高时会导致 T 线与 C 线周围形成明显的疏水区域, 无法显色, 这可能与较高离子强度与蛋白质之间的相互作用有关。在去离子水中, T 线与 C 线显色较浅。而免疫反应需要在一定的离子强度环境中进行, 结果显示, 0.9% 的 NaCl 可以提供合适的离子强度, 促进免疫反应进行, 加强显色效果。最终胶体金试纸的上样液配方优化为: 1% BSA+3% 吐温-20+3% 蔗糖+0.9% NaCl 溶液。

2.3.2 最佳金标抗体浓度的确定

配制不同浓度的 8-OHdG 抗体溶液, 浓度分别为 0、0.5、1、2、4、6、8、10 $\mu\text{g/mL}$ 。分别取 100 μL 不同浓度的 8-OHdG 抗体溶液与 500 μL 的胶体金混合, pH 调为 9, 室温孵育 1 h。

加入 0.06 g 的氯化钠后, 观察溶液颜色变化。结果如图 3 所示, 从左到右 8-OHdG 抗体的浓度分别为 0、0.5、1、2、4、6、8、10 $\mu\text{g/mL}$ 。不含 8-OHdG 抗体时, 加入 NaCl 后, 溶液完全变成蓝紫色; 抗体浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 溶液略微变紫; 抗体浓度在 1–10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内溶液都没有变色, 表明当 8-OHdG 抗体浓度大于 1 $\mu\text{g/mL}$ 时, 胶体金表面基本上被抗体全部覆盖, 提高了溶液的稳定性。因此, 选取抗体浓度最低且不变蓝的一组, 在此浓度下增加 20% 作为最适抗体标记浓度, 最终选择 1.2 $\mu\text{g/mL}$ 抗体作为胶体金的最适标记浓度。

2.3.3 最佳金标抗体喷涂量的确定

当结合垫上金标抗体喷涂量不同, NC 膜上 T 线出线的颜色深浅也不同。为了确定最佳金标抗体喷涂量, 分别取 3、4、5、6 μL 金标抗体喷涂在 5 mm 宽的结合垫上, 干燥后层析, 观察显色情况。随着金标抗体喷涂量的增加, 出线的显色深度会加深。喷涂量大于 4 μL 后 T 线的显色深度不再随着喷涂量的增加而增加 (表 2), 因此, 选择 4 μL 作为最佳金标抗体喷涂量。

2.3.4 NC 膜的选择

NC 膜是免疫反应的场所, 不同的 NC 膜层

表 1 胶体金免疫层析试纸上样液的优化结果

Table 1 Optimization of sample solution on colloidal gold immunochromatography paper

Sample No.	Factors			Conjugate pad residue	The color of T line and C line on NC membrane
	Tween-20 (V/V)	Saccharose (W/V)	Ionic strength		
1	0.1	3	1×PBS	++	White
2	0.1	4	Deionized water	++	Faint red
3	0.1	5	0.9% sodium chloride solution	++	Red
4	1	3	Deionized water	+	Faint red
5	1	4	0.9% sodium chloride solution	+	Red
6	1	5	1×PBS	+	White
7	3	3	Deionized water	–	Faint red
8	3	4	1×PBS	–	White
9	3	5	0.9% sodium chloride solution	–	Red

++: little residue; +: less residue; –: no residue.

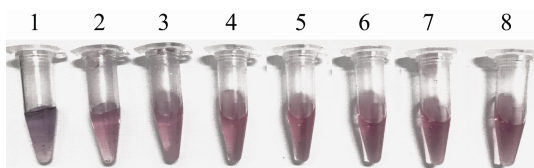


图3 不同浓度的金标抗体溶液加入NaCl后的颜色变化

Figure 3 The color change of different concentrations of antibody labeled colloidal gold with the addition of NaCl. The concentrations of 8-OHdG antibody are as follows: (1) 0 $\mu\text{g/mL}$; (2) 0.5 $\mu\text{g/mL}$; (3) 1 $\mu\text{g/mL}$; (4) 2 $\mu\text{g/mL}$; (5) 4 $\mu\text{g/mL}$; (6) 6 $\mu\text{g/mL}$; (7) 8 $\mu\text{g/mL}$; (8) 10 $\mu\text{g/mL}$.

表2 不同金标抗体喷涂量的出线结果

Table 2 The color change of T line with different amount of antibody labeled colloidal gold

Spraying amount of gold-antibody (μL)	Color depth of lines
3	++
4	+++
5	+++
6	+++

++: the color is lighter; +++: the color is darker.

析速度不一样,孔径也不同,会影响出线的深浅、时间以及金标抗体在膜上的残留情况。选择CN 140、CN 95、FF120HP、Pall 170四个型号的NC膜进行实验,保持其他条件一致,层析后,观察出线时间、效果与残留情况。通常来说层析速度越慢免疫反应越完全,但会产生残留较多或假阴性问题。层析速度越快显色速度越快,但会产生显色较浅、残缺或假阳性问题。经实验验证,CN 95膜层析速度较快,NC膜残留少,出线显色较深且完整。因此,选择CN 95作为本研究的NC膜。

2.4 胶体金免疫层析试纸对标准样品8-OHdG的检测

以上样液为溶剂配制不同浓度的标准品8-OHdG溶液,浓度分别为0、0.001、0.003、0.009、0.027、0.081、0.243、0.263、0.283 mg/L,

研究胶体金免疫层析试纸对标准品8-OHdG的检测效果。不同浓度的8-OHdG检测结果如图4所示,当8-OHdG的浓度从0 mg/L增加到0.243 mg/L时,试纸的T线显色强度随着8-OHdG浓度的增加而逐渐降低;当8-OHdG的浓度达到0.243 mg/L时,肉眼识别试纸的T线完全消线;当8-OHdG的浓度超过0.243 mg/L时,试纸的T线不出线。C线的颜色随着8-OHdG浓度增加,显色呈加深趋势。根据竞争法原理,当待测溶液中8-OHdG浓度较低时,与待测溶液中8-OHdG结合的金标抗体Ab@AuNPs探针较少,使得Ab@AuNPs探针被T线捕捉较多,T线颜色较深,层析到达C线的Ab@AuNPs探针较少,C线颜色较浅。随着待测溶液中8-OHdG浓度增加,与8-OHdG结合的金标抗体Ab@AuNPs探针较多,被T线捕捉的Ab@AuNPs探针较少,T线颜色变浅,层析到C线的Ab@AuNPs探针增多,C线颜色加深。

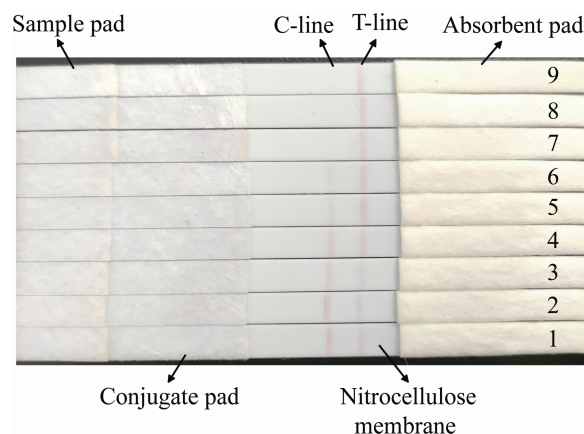


图4 胶体金免疫层析试纸对不同浓度标准样品8-OHdG的检测结果

Figure 4 Detection results of different concentrations of standard sample 8-OHdG by colloidal gold immunochromatographic strip. 1: 0 mg/L; 2: 0.001 mg/L; 3: 0.003 mg/L; 4: 0.009 mg/L; 5: 0.027 mg/L; 6: 0.081 mg/L; 7: 0.243 mg/L; 8: 0.263 mg/L; 9: 0.283 mg/L.

2.5 人工尿液样品中 8-OHdG 的检测

8-OHdG 作为 DNA 损伤的产物,代谢后随尿液排出人体。本研究首先选用标准化的人工尿液样品为基质进行加样检测,以验证胶体金免疫层析试纸条在复杂基质中检测 8-OHdG 的性能。T 线显色随着 8-OHdG 浓度的增加而颜色逐渐变淡,C 线显色随着 8-OHdG 浓度的增加而颜色逐渐加深(图 5A)。当 8-OHdG 浓度小于 0.009 mg/L 时,T 线颜色比 C 线深;当 8-OHdG 浓度大于 0.009 mg/L 时,T 线颜色比 C 线浅;当人工尿液中 8-OHdG 的浓度超过 0.243 mg/L 时,胶体金免疫层析试纸条的 T 线不出线,C 线颜色较深。通过电脑软件 Image J 对图片进行处理,使彩色图片转换为灰度图片,框选亮色的 T 线区域,计算所选区域的积分灰度值,得到 T 线的灰度值(图 5B)。T 线的灰度值随着 8-OHdG 浓度的增加而降低,灰度值和 8-OHdG 浓度关系为 $y = -0.035 \ln(x) + 0.7309$ ($R^2 = 0.9555$),其中, x 为 8-OHdG 的浓度, y 为 T 线颜色的灰度值。以

对照组为基准,样品标准偏差的 3 倍的灰度值为变化值,计算得到检测限为 2.55 $\mu\text{g/L}$ (9 nmol/L)。试纸条检测效果比较稳定,不受尿液中的尿素、肌酐、氨等物质的干扰。批内差异为 2.93%,批间差异 3.34%。检测过程中 T 线、C 线没有出现疏水区域,证明尿液中的无机盐导致的离子强度升高不会影响检测效果。

为了研究胶体金免疫层析试纸对 8-OHdG 的特异性检测,本研究通过在人工尿液中添加高浓度的潜在干扰物(腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和鸟嘌呤)来研究胶体金试纸的特异性。如图 6 所示,1 至 4 号样品依此为:150 mg/L 胞嘧啶、150 mg/L 胸腺嘧啶、150 mg/L 腺嘌呤、150 mg/L 鸟嘌呤,添加高浓度的胞嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤后,胶体金免疫层析试纸条的 T 线颜色基本不变。当检测高浓度的鸟嘌呤时,T 线颜色有点变淡,而人体尿液中鸟嘌呤的浓度较低,不影响试纸条对 8-OHdG 的检测结果。特异性实验证明了胶体金免疫层析试纸具有良好的特异性。

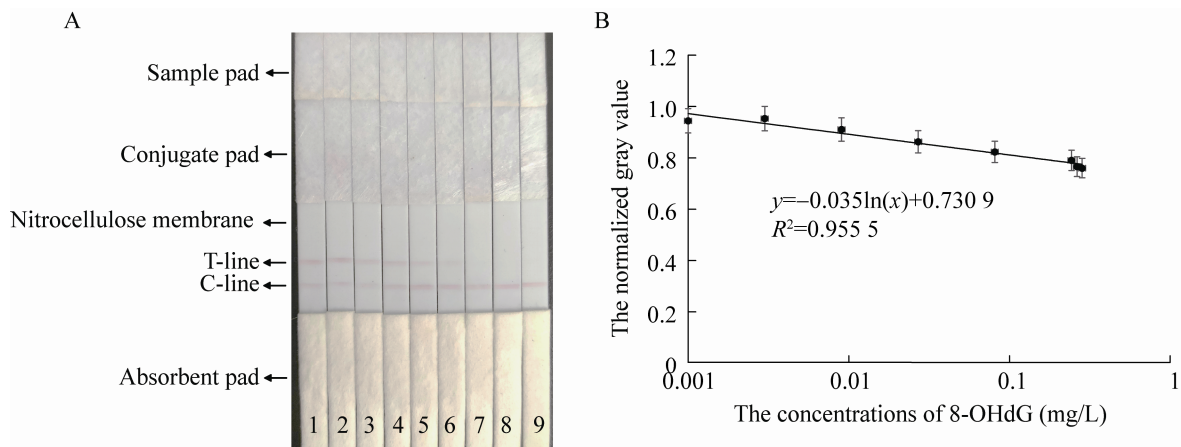


图 5 人工尿液中 8-OHdG 的检测结果 A: 胶体金免疫层析试纸条对人工尿液中不同浓度 8-OHdG 的检测结果; B: 胶体金免疫层析试纸条 T 线的灰度值变化

Figure 5 Detection results of 8-OHdG in artificial urine samples. (A) The detection results of 8-OHdG in artificial urine samples by colloidal gold immunochromatographic strip. 1: 0 mg/L; 2: 0.001 mg/L; 3: 0.003 mg/L; 4: 0.009 mg/L; 5: 0.027 mg/L; 6: 0.081 mg/L; 7: 0.243 mg/L; 8: 0.263 mg/L; 9: 0.283 mg/L. (B) The normalized gray value of T-line detected by colloidal gold immunochromatographic strip with different concentrations of 8-OHdG in artificial urine samples.

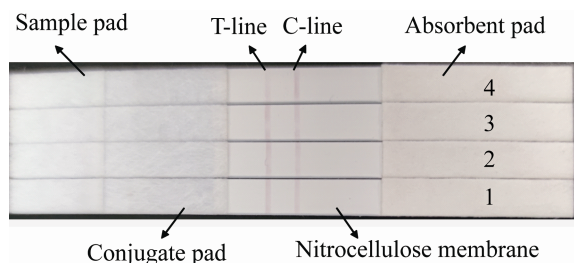


图 6 特异性检测结果 1 至 4 号样品依此为：150 mg/L 胞嘧啶、150 mg/L 胸腺嘧啶、150 mg/L 腺嘌呤、150 mg/L 鸟嘌呤

Figure 6 Specificity detection results. 1: 150 mg/L Cytosine; 2: 150 mg/L Thymine; 3: 150 mg/L Adenine; 4: 150 mg/L Guanine.

2.6 健康人和癌症患者尿液样品中 8-OHdG 的检测

对健康人和癌症患者的尿液进行检测来验证试纸条对实际样品的检测效果，结果如图 7 所示。健康人尿液的检测结果 T 线颜色比 C 线颜色深，T 线检测结果归一化后的灰度值为 0.93，计算得到健康人尿液中 8-OHdG 的含量为 3.38 $\mu\text{g/L}$ 。用 HPLC 法测得健康人尿液中 8-OHdG 的浓度为 4.01 $\mu\text{g/L}$ ，不同的健康人在不同时期 8-OHdG 水平存在差异。两种方法的检测结果都符合健康人的 8-OHdG 水平^[7]。癌症患者尿液的检测结果 T 线颜色比 C 线浅，

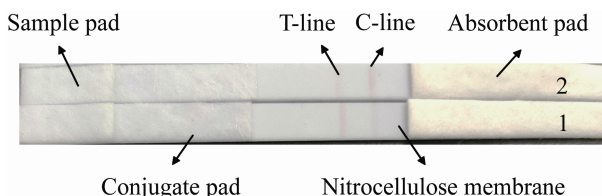


图 7 胶体金免疫层析试纸条对健康人和癌症患者尿液中 8-OHdG 的检测结果

Figure 7 Detection of 8-OHdG in urine of healthy persons and cancer patients by colloidal gold immunochromatographic strip. 1: Urine of healthy persons; 2: Urine of cancer patients.

T 线检测结果归一化后的灰度值为 0.84，尿液中 8-OHdG 的含量为 44.3 $\mu\text{g/L}$ 。测得癌症患者尿液中 8-OHdG 的浓度高于健康人尿液中 8-OHdG 的浓度，与文献报道的结果^[22] (图 7) 一致。因此，通过 T 线和 C 线颜色深浅的比较可以初步确定尿液中 8-OHdG 的含量水平，通过 T 线的灰度值可进一步计算人体尿液中 8-OHdG 浓度。

3 讨论

ROS 水平的增加会导致 DNA 氧化损伤，在氧化损伤的过程中会形成大量的 DNA 氧化损伤产物^[3]。8-OHdG 是研究最多的 DNA 氧化损伤产物，被公认为氧化应激产生的生物标志物。8-OHdG 可通过人体代谢进入尿液，尿液中 8-OHdG 的浓度与 DNA 氧化损伤程度密切相关^[6,23]。胶体金免疫层析法与其他方法相比，具有简单、快速等诸多优点，无需特殊设备和复杂的技术^[24]。Zeng 等^[25]开发了一种基于胶体金的免疫层析方法以检测牛奶中的磺酰胺残留物，操作简单，检测时间短且成本低廉。

本研究成功构建了基于胶体金的免疫层析试纸，用于尿液中 8-OHdG 的快速检测，并对 NC 膜、上样液的配方、金标抗体喷涂量等实验参数进行了优化。以 EDC 为偶联剂制备 8-OHdG 完全抗原，选择上样液上样的方法层析，NC 膜采用 CN 95，上样液的优化配方为：1% BSA+3% 吐温-20+3% 蔗糖+0.9% NaCl 溶液，确定胶体金的最适抗体标记浓度为 1.2 $\mu\text{g/mL}$ ，最适金标抗体喷涂量为 4 μL 。研究了胞嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤等潜在干扰物对检测结果的影响，结果表明胶体金试纸特异性良好。本研究建立的胶体金免疫层析试纸仅需 5 min 便可以得到结果，通过 T 线和 C 线颜色深浅的比较可以初步确定尿液中 8-OHdG 的含量水平，通过

T 线的灰度值可进一步计算人体尿液中 8-OHdG 的浓度,检测限为 2.55 $\mu\text{g/L}$ 。用于 8-OHdG 检测的传统方法,例如 ELISA、GC-MS 和 CE 等具有较高的灵敏度和特异性,但这些技术非常耗时,通常需要复杂费力的操作技术、有经验的技术人员以及对生物样品的复杂处理^[12-14,26]。对于 GC-MS 法,8-OHdG 的衍生化是必不可少的,这个过程容易导致假阳性^[27]。以碳量子点和金纳米颗粒分别为荧光供体和荧光受体的荧光共振能量转移生物传感器和基于磁性纳米颗粒的共振光散射适配体传感器、电化学发光生物传感器、可扩展且可靠的电化学生物传感器等被研究用于尿液中 8-OHdG 的检测,具有较宽的检测范围和较好的灵敏度,检测限在 pmol/L 至 nmol/L 之间,但这些方法需要相对精密和昂贵的实验仪器或设备进行测量^[5,7,28-30]。胶体金免疫层析法检测 8-OHdG,检测限在 nmol/L 水平。该方法主要通过分析试纸条的灰度值得到检测限,试纸条上框选条带区域间的大小以及框选位置的不同都会影响灰度分析结果。但相比于其他检测方法,该方法具有操作简单、快速、成本低、无需复杂仪器设备等优点,可用于尿液样品中 8-OHdG 的快速测定,以初步评价人体的健康状态。

致谢: 感谢浙江省人民医院在该项目研究中给予的支持。感谢浙江工业大学膜分离与水科学技术研究院和分析测试中心给予的研究工作的支持。

REFERENCES

- [1] Wu D, Liu B, Yin J, et al. Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) as a biomarker of oxidative damage in peripheral leukocyte DNA by UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1064: 1-6.
- [2] Wu LL, Chiou CC, Chang PY, et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 2004, 339(1/2): 1-9.
- [3] Prabhulkar S, Li CZ. Assessment of oxidative DNA damage and repair at single cellular level via real-time monitoring of 8-OHdG biomarker. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(4): 1743-1749.
- [4] Alak G, Yeltekin AÇ, Tas IH, et al. Investigation of 8-OHdG, CYP1A, HSP70 and transcriptional analyses of antioxidant defence system in liver tissues of rainbow trout exposed to eprinomectin. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 65: 136-144.
- [5] Hu W, Chen T, Zhang Y, et al. A carbon dot and gold nanoparticle-based fluorometric immunoassay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidatively damaged DNA. *Microchim Acta*, 2019, 186(5): 303.
- [6] Martins GV, Marques AC, Fortunato E, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) biomarker detection down to picoMolar level on a plastic antibody film. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 225-234.
- [7] Ye WW, Zhang Y, Hu W, et al. A sensitive FRET biosensor based on carbon dots-modified nanoporous membrane for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) detection with Au@ZIF-8 nanoparticles as signal quenchers. *Nanomaterials*, 2020, 10(10): 2044.
- [8] Zińczuk J, Maciejczyk M, Zaręba K, et al. Pro-oxidant enzymes, redox balance and oxidative damage to proteins, lipids and DNA in colorectal cancer tissue. is oxidative stress dependent on tumour budding and inflammatory infiltration? *Cancers*, 2020, 12(6): 1636.
- [9] Kumar J, Sathua KB, Flora SJS. Chronic copper exposure elicit neurotoxic responses in rat brain: assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and neurobehavioral parameters. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)*, 2019, 65(1): 27-35.
- [10] Sahan A, Akbal C, Tavukcu HH, et al. Melatonin prevents deterioration of erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats via sirtuin-1 expression. *Andrologia*, 2020, 52(9): e13639.
- [11] Nagao M, Kobashi G, Umesawa M, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and cardiovascular disease incidence in Japan. *J Atheroscler Thromb*, 2020, 27(10): 1086-1096.
- [12] Hutson KH, Willis K, Nwokwu CD, et al. Photon versus proton neurotoxicity: Impact on mitochondrial function and 8-OHdG base-excision repair mechanism in human astrocytes. *Neurotoxicology*, 2021, 82: 158-166.

- [13] Zhang P, Lian K, Wu X, et al. Evaluation of the oxidative deoxyribonucleic acid damage biomarker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the urine of leukemic children by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr A*, 2014, 1336: 112-119.
- [14] Omran MM, Rashed RE, Darwish H, et al. Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for breast cancer diagnosis based on nucleoside metabolites 1-methyl adenosine, 1-methylguanosine and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(1): e4713.
- [15] Ersöz A, Diltemiz SE, Özcan AA, et al. 8-OHdG sensing with MIP based solid phase extraction and QCM technique. *Sensor Actuat B: Chem*, 2009, 137(1): 7-11.
- [16] Sun B, Wang Z, Wang X, et al. Paper-based biosensor based on phenylalanine ammonia lyase hybrid nanoflowers for urinary phenylalanine measurement. *Int J Biol Macromol*, 2021, 166: 601-610.
- [17] Nguyen QH, Kim MI. Nanomaterial-mediated paper-based biosensors for colorimetric pathogen detection. *Trends Analyt Chem*, 2020, 132: 116038.
- [18] Ge XX, Asiri AM, Du D, et al. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors. *Trac Trends Anal Chem*, 2014, 58: 31-39.
- [19] Quesada-González D, Stefani C, González I, et al. Signal enhancement on gold nanoparticle-based lateral flow tests using cellulose nanofibers. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111407.
- [20] Jafari P, Beigi SM, Yousefi F, et al. Colorimetric biosensor for phenylalanine detection based on a paper using gold nanoparticles for phenylketonuria diagnosis. *Microchem J*, 2021, 163: 105909.
- [21] Ye WW, Shi JY, Chan CY, et al. A nanoporous membrane based impedance sensing platform for DNA sensing with gold nanoparticle amplification. *Sensor Actuat B: Chem*, 2014, 193: 877-882.
- [22] Zhang S, Sun X, Wang W, et al. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a combination of on-line molecularly imprinted monolithic solid phase microextraction with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *J Sep Sci*, 2013, 36(4): 752-757.
- [23] Miyachi Y, Shimizu N, Ogino C, et al. Selection of a DNA aptamer that binds 8-OHdG using GMP-agarose. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(13): 3619-3622.
- [24] Lin LR, Fu ZG, Dan B, et al. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to *Treponema pallidum* with TPN17 and TPN₄₇. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 68(3): 193-200.
- [25] Zeng Y, Liang D, Zheng P, et al. A simple and rapid immunochromatography test based on readily available filter paper modified with chitosan to screen for 13 sulfonamides in milk. *J Dairy Sci*, 2021, 104(1): 126-133.
- [26] Yin B, Whyatt RM, Perera FP, et al. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18(6): 1023-1032.
- [27] Ravanat JL, Turesky RJ, Gremaud E, et al. Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol*, 1995, 8(8): 1039-1045.
- [28] Lv Y, Chen S, Shen Y, et al. Competitive multiple-mechanism-driven electrochemiluminescent detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(8): 2801-2804.
- [29] Faria AM, Peixoto EBMI, Adamo CB, et al. Controlling parameters and characteristics of electrochemical biosensors for enhanced detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7411.
- [30] Tao LX, Yue QL, Hou YN, et al. Resonance light scattering aptasensor for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on magnetic nanoparticles: a preliminary study of oxidative stress association with air pollution. *Microchim Acta*, 2018, 185(9): 1-7.

(本文责编 郝丽芳)