

基于磁性微球 AFP 时间分辨荧光免疫分析法的建立

朱利国¹, 范俊², 浦洪波¹, 荀雪影¹, 林秀峰¹, 黄颀²

(1 江苏省原子医学研究所附属江原医院, 江苏 无锡 214063; 2 江苏省原子医学研究所, 江苏 无锡 214063)

摘要:目的 建立基于磁性微球(磁珠)AFP时间分辨荧光免疫分析法。方法 用磁珠偶联标记抗AFP单克隆抗体(301M), Eu³⁺标记抗AFP单克隆抗体(304M), 采用双抗体夹心法建立基于磁性微球法的AFP-TRFIA, 并对106名我院健康体检人员和住院患者进行该方法血清学检测。结果 其检测灵敏度为0.02 IU/mL, 线性范围2.12~1210 IU/mL; 癌胚抗原(CEA)、CA199、CA125对AFP-TRFIA均无交叉反应。磁珠偶联301M 4℃保存3个月免疫反应性基本无损, 而Eu³⁺标记304M于-20℃下保存6个月免疫反应性也基本无损; 同批试剂连续3个月应用分析结果稳定。样品的平均添加回收率为98.75%, 低、中、高质控的批内和CV分别为20.46IU/mL和4.75%, 50.58 IU/mL和4.25%, 120.51 IU/mL和2.89%。批间和CCV分别为19.54IU/mL和9.55%, 46.32 IU/mL和7.38%, 125.10 IU/mL和3.69%。血清AFP检测结果与传统时间分辨荧光法检测结果对比, 结果高度相关, 相关系数为0.976。结论 基于磁性微球建立的AFP时间分辨荧光免疫分析法敏感性、特异性、准确度等均符合临床应用要求, 可用于临床血清标本中AFP含量的免疫测定。

关键词: 磁性微球; AFP; 时间分辨荧光; 肝癌

Establishment of Time Resolved Fluoroimmunoassay of AFP Based on Magnetic Microspheres

ZHU Li-guo, FAN Jun, PU Hong-bo, XUN Xue-ying, LIN Xiu-feng, HUANG Biao

(Jiangsu Institute of Nuclear Medicine Affiliated Jiang Yuan Hospital, Wuxi 214063, China)

Abstract: Objective To establish the time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) of AFP based on magnetic microspheres. **Methods** The AFP monoclonal antibody (McAb) 301M was labeled with magnetic microspheres and another AFP McAb 304M was labeled with Eu³⁺. The two site time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) of AFP based on the sandwich technique was established. The serum AFP levels in 106 patients and healthy were determined by established AFP-TRFIA. **Results** The sensitivity of established AFP-TRFIA was 0.02 IU/mL and the measurement range was 2.12-1210 IU/mL. The recovery rate was 98.75%. The cross-reacting rates with CEA, CA19-9 and CA125 were negligible. The labeled monoclonal antibody 301M with magnetic microspheres was stable for three months at 4℃, and the europium labeled 304M was stable for six months at -20℃. The detection results with TRFIA established in this study and traditional TRFIA showed linear correlation with coefficient of 0.976. **Conclusion** The newly developed AFP-TRFIA based on magnetic microspheres technique was highly sensitive, stable and specificity, and might be used for clinic determination of serum AFP.

Key words: Magnetic microspheres; AFP; TRFIA; Liver cancer

DOI: 10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2016.01.027

收稿日期: 2015-07-09; 修回日期: 2015-08-03

基金项目: 江苏省卫生科技计划项目(Q201204); 江苏省卫生计生委指导性科研项目(Z201506)

作者简介: 朱利国(1974—)男, 副主任技师。E-mail: zhuliguo@jsinm.org

通讯作者: 黄颀。E-mail: huangbiao@jsinm.org

甲胎蛋白(AFP)由Abelev 1963年发现。主要由胚胎肝、卵黄囊和胃肠上皮细胞产生,成人的AFP由肝脏产生,是单链多肽糖蛋白。AFP是原发性肝癌血清学检测的一个重要标志物。检测AFP的常用方法有放射免疫法(RIA)、化学发光法(CLIA)、电化学发光法(ECLIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)和金标记免疫渗滤法等^[1-3]。而本研究基于磁性微球(磁珠)建立了AFP时间分辨荧光免疫分析法并对其进行临床评估。

材料与方法

1 主要试剂与材料

NHS偶联磁珠(NHS磁珠)、缓冲液和封闭液为英芮诚 Prot Elut 公司产品,抗AFP单克隆抗体301M和304M及AFP参考标准、质控品、增强液和洗涤液以及微孔板条式AFP-TRFIA试剂盒均由江苏省无锡市江原实业技贸总公司所提供。Eu³⁺标记盒(1244-302)和二乙烯三胺五乙酸(DTPA)系PE公司产品。牛血清白蛋白(BSA)系Sigma产品。PD-10和Sepharose CL-6B系Pharmacia产品。96孔微孔板系Nunc产品,去离子超纯水由本室自制,其他试剂均为国产分析纯。HG-1000型时间分辨荧光免疫分析仪,上海互帼公司产品。CEA、CA125、CA199标准液系达安基因公司产品。血清样品106例,年龄25~83岁,江苏省江原医院健康体检者和住院患者。

2 偶联AFP抗体磁珠的制备

2.1 样品 取适量抗AFP-301M单克隆抗体样品,用试剂盒中的偶联缓冲液稀释至浓度 $\geq 15\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液待用

2.2 磁珠的洗涤 100 μL 的磁珠悬浮液于1.5mL ep管中,磁性分离,保留磁珠,弃上清液;加0.5mL 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 的偶联缓冲液于ep管中,涡旋15s,混匀磁珠;磁性分离,保留磁珠,弃上清液。

2.3 抗AFP抗体磁珠的偶联 加1mL已配制的AFP-301M单克隆抗体样品溶液于ep管中,涡旋30s,混匀磁珠;将ep管置于旋转混合仪上,室温孵育1~2h。

2.4 封闭未反应的活性基团 偶联结束后,磁性分离,保留磁珠;加入1mL的封闭试剂于ep管中,涡旋20s,磁性分离,保留磁珠,弃上清液;再加入1mL的封闭试剂于ep管中,涡旋20s,将ep管置于

旋转混合仪上,室温孵育1h,磁性分离,保留磁珠,弃上清液;最后加入1mL的PBS缓冲液(pH=7.35)于ep管中,充分混匀,磁性分离,保留磁珠,弃上清液;重复操作该步骤一次。

2.5 向已完成上述步骤的偶联抗AFP抗体的磁珠中加入1mL的保存试剂(含0.05%叠氮化钠的PBS)于ep管中充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

3 Eu³⁺-AFP的制备

参照Eu³⁺标记盒说明书操作。取抗AFP的单抗304M 1mL,经PD-10柱转换缓冲条件,洗脱液为含0.155mol/L NaCl的50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃(pH8.5)缓冲液。收集蛋白峰,浓缩至2g/L。取500 μL 加入含0.2mg的Eu³⁺-N₂-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸(Eu³⁺-DTPA)冻干粉的小瓶中,25 $^{\circ}\text{C}$ 磁力搅拌反应20小时。反应液经用80mmol/L Tris(pH7.8)缓冲液平衡的Sepharose CL-6B柱(1 \times 40cm)层析,A₂₈₀监测收集蛋白峰,稀释后分装冻干保存。

4 测定方法

96孔微孔板中先加入被磁珠偶联的抗AFP-301M单抗5 μL ,再依次加入50 μL AFP参考标准和待测血清,再加入150 μL 含8mmol/L NaCl、0.1% BSA、0.2%牛IgG、0.1mL/L的Tween-80和0.1% NaN₃的50mmol/L Tris-HCl(pH7.8)反应缓冲液,25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育5分钟后,在磁力板上静置2分钟,移弃上清液,保留磁珠;用含14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80和0.2% NaN₃上述缓冲液洗涤液重复上述步骤洗涤5次,再加入200 μL 以反应缓冲液1:50稀释的Eu³⁺-抗AFP304M 25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育5分钟后,用洗涤液重复上述洗涤步骤洗涤5次;再加增强液200 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应5min,荧光检测。检测过程在HG-1000型时间分辨荧光免疫分析仪上完成。微孔板条式AFP-TRFIA在全自动AutoDELFIA 1235上完成。

结 果

1 磁珠偶联的抗AFP-301M单抗的理化和免疫学鉴定

(1) 磁珠浓度以及反应体系时间的优化

在2.5、10、50 μL 磁珠偶联的抗AFP-301M单抗加入1000IU/mL的AFP标准液和Eu³⁺-304M单抗,分别反应2、5、10、30、60min,发现5 μL 磁珠即可;另

5 μ L 磁珠偶联抗体加入 1, 100, 1000IU/mL 的 AFP 标准液和单抗, 分别作用 0, 2, 5, 10, 30, 60min, 如图 1、图 2 5min 即可完成反应, 因而 5 μ L 磁珠偶联抗体、5min 反应时间为本实验的最佳反应条件。

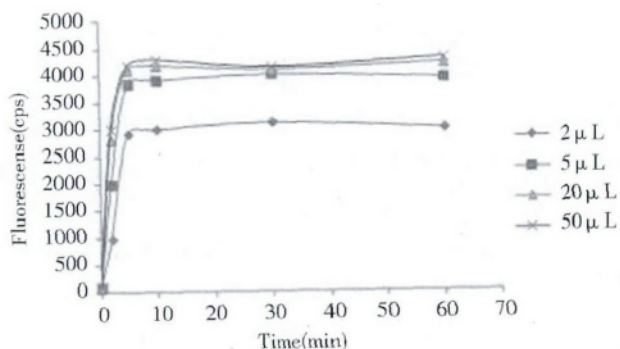


图 1 磁珠偶联单抗浓度的选择

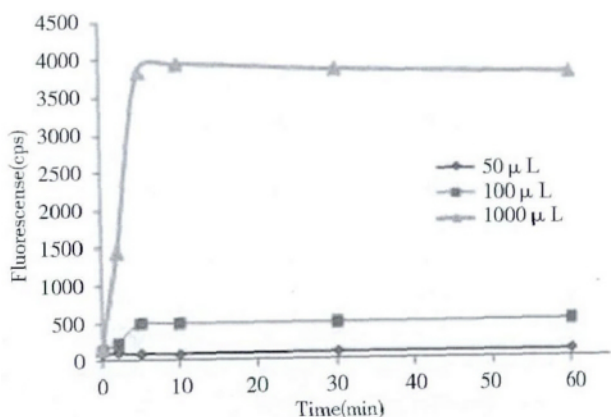


图 2 反应时间的选择

(2) 分别定量检测偶联开始前与结束后的溶液中鼠 IgG 抗体的量, 加入磁珠前检测达 32 μ g, 反应结束后移去磁珠后上清液中鼠 IgG 抗体的量为 5 μ g。该方法的标记率为 27/32 = 84.4%。

2 Eu³⁺-304M 单抗的理化和免疫学鉴定

Eu³⁺-242# 单抗经 Sepharose CL-6B 层析, 收集第 1 洗脱峰。以 PE 公司提供的 Eu³⁺ 标准为参考, 第 1 洗脱峰的 Eu³⁺ 含量为 31 ixmoL/L, 304M 单抗蛋白含量为 3.2 Izmol/L, 即平均每个 304M 单抗上连接了 9.7 个 Eu³⁺。

3 磁珠 AFP TRFIA 的考核

经双对数函数处理程序处理所得磁珠 AFP-TRFIA 标准曲线见图 3。

3.1 方法的特异性 将达安基因公司 CEA 标准液(500ng/mL), CA125 标准液(660U/mL)、CA199 标准液(330U/mL) 用磁珠法 AFP-TRFIA 进行检测。在上述值范围内 CEA, CA125、CA199 对 AFP 均无交叉反应。

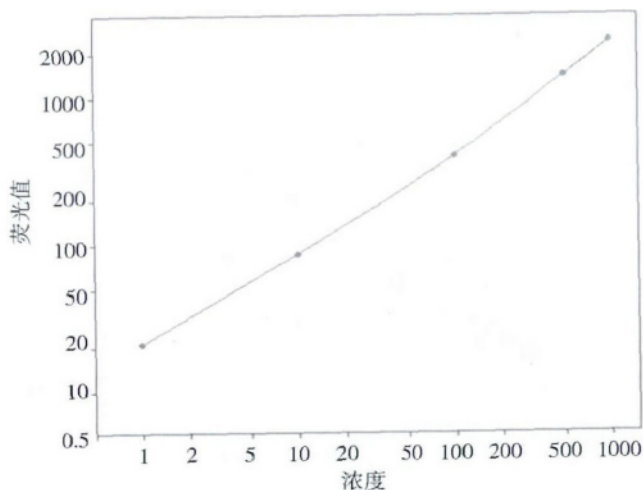


图 3 磁珠 AFP-TRFIA 的标准曲线

3.2 精密性、回收率和健全性 取江原实业技贸总公司所提供的低、中、高浓度的 AFP 质控冻干品各 10 份, 批内实验(20 次) 平均浓度值(\bar{x}) 和 CV 分别为 20.46IU/mL 和 4.75%, 50.58IU/mL 和 4.25%, 120.51 IU/mL 和 2.89%。批间实验(20 次) 的浓度和 CV 分别为 19.54IU/mL 和 9.55%, 46.32IU/mL 和 7.38%, 125.10IU/mL 和 3.69%。在 100 μ L 全血中加入 50 μ L 浓度为 50IU/mL、100IU/mL、500IU/mL 的标准液, 所测回收率分别为 99.65%、101.15%、97.45%, 平均回收率为 98.75%。把 V(高含量的 AFP 血清样品): V(缓冲液) = 1:(2~32) 的溶液用本方法测定, 换算后的 AFP 含量非常接近; 用该系列稀释血清代替 AFP 参考标准作标准曲线, 其斜率与 AFP 的标准曲线斜率基本一致, 表明该有良好的健全性。

3.3 灵敏度和稳定性 以零剂量点发光值 $\bar{x} \pm 2s$ 的发光值在标准曲线上得到的相应值为 0.02IU/mL, 线性范围为 2.12~1210 IU/mL。4 $^{\circ}$ C 保存的磁珠偶联抗 301M 单抗, 三个月内每隔十天所进行的 8 条不同时间段的磁珠 AFP-TRFIA 标准曲线最高浓度点(1000IU/mL) 的计数值基本无变化(计数值 CV < 10%), 说明 4 $^{\circ}$ C 保存的磁珠偶联抗 301M 单抗免疫活性基本不受损, 可稳定应用。

4 临床应用

4.1 与微孔板条式 AFP TRFIA 对照 采用磁珠法 AFP-TRFIA 和微孔板条式 AFP TRFIA 平行检测 106 名我院健康体检人员和住院患者的血清并进行结果对比, 结果见图 4 相关方程为: $Y = 0.9249X + 4.8263$, 其中相关系数 $r = 0.976$, 两者结果高度相关, 其中微孔板条式 AFP-TRFIA 检出的阳性血清样

品采用磁珠法 AFP-TRFIA 检测均为阳性。

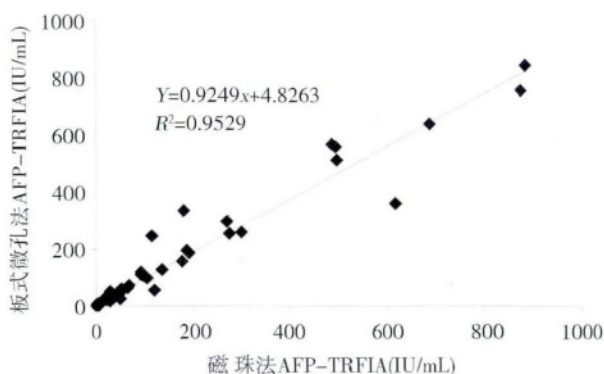


图4 结果相关性比较

讨 论

肝癌是我国比较常见的恶性肿瘤之一,其病死率在男性中居恶性肿瘤的第3位,在女性中居第4位,每年死于肝癌的人数大约在10万以上。肝癌早期手术切除治疗效果较好,但晚期由于癌细胞扩散到全身,其手术切除治愈效果差。因此,早发现、早诊断、早治疗是改善肝癌预后的关键。血清学检测是肝癌早发现早诊断的重要手段之一,AFP是目前公认的诊断原发性肝癌的最为特异的指标。另外,在新生儿先天愚型和神经管畸形诊断方面,AFP也是一个公认的重要指标。时间分辨荧光检测法具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、稳定性好等优点,相较于放射免疫法和酶免疫而言具有无放射性和无化学物污染等优势,其线性亦远超酶免;而本文所建方法学中 NHS 磁珠是以超顺磁性四氧化三铁(Fe_3O_4)为核^[4-6],平均直径(100~150nm),表面修饰有大量的 NHS 基团;偶联量高,每100 μL 的磁珠约偶联15~20 μg 的生物分子;操作简单、条件温和,可直接与生物配体共价偶联,键合生物配体后稳定;室温1~2h完成偶联,时间短,效率高;生物相容性良好,非特异性吸附少;IP实验后,洗脱可获得纯的目标蛋白。与微孔板相比,磁珠直径小,可以均一的分散于液相中,反应体系可以暴露更多的结合位点,显著减小抗原-抗体反应的空间位阻,利于抗体与血清标本中特异性结合效率提高,提高检测的特异性^[7-8]。其次,灵敏度更高,NHS磁珠具有超顺磁性,可在外加磁场的作用下快速移动和分离,磁性分离器可以对免疫磁珠快速富集分离,经过洗涤液的充分洗涤,可以有效降低检测过程中的携带污染和干

扰,提高检测灵敏度和降低检测信噪比;检测速度更快,传统的时间分辨荧光免疫分析中,AFP抗体与微孔板上捕获物质结合较慢,而免疫磁珠均匀散于液液中,与AFP抗体接触机会更大,从而加快免疫磁珠与AFP抗体的结合速率^[9-10],大大提高检测反应的比表面积,缩短了检测时间,微孔板条式的时间分辨荧光免疫分析法的反应时间一般要2h左右,而本实验仅需10min。本方法中磁珠偶联抗体时抗体用量仅为0.5mg,而微孔板条式抗体包被抗体用量为3mg,两者相差巨大,故该方法能产生较大的经济效益。综上所述本文所建方法学将TRFIA的灵敏性、磁分离技术的快速性相结合,检测方法操作简便,检测时间大大缩短,提高了获得临床检验结果的速度,重复性良好,便于自动化操作,可大面积应用于临床检测。

参考文献

- [1] 杨凤爱,吴修宇,利定建,等.自制AFP/CEA双标记TRFIA试剂临床应用效果观察.山东医药,2012,52(38):27-29.
- [2] 徐伟文,吴英松,杭建峰,等.时间分辨荧光法定量检测AFP试剂盒临床应用研究.标记免疫分析与临床,2006,13(1):43-45.
- [3] 李晶,滕霞,刘传银.电化学生物传感器测定甲胎蛋白的研究进展.化学研究与应用,2015,27(1):21-27.
- [4] Zhang Q Y, Wang X, Li Z J, et al. Evaluation of α -fetoprotein (AFP) in human serum by chemiluminescence enzyme immunoassay with magnetic particles and coated tubes as solid phases. Analytica Chimica Acta, 2009, 631(2):212-217.
- [5] Roda A, Pasini P, Mirasoli M, et al. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. Trends Biotechnol, 2004, 22(6):295-303.
- [6] Wu A H B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta, 2006, 369(2):119-124.
- [7] 焦艳华,郭卫强,梁媛媛.表面功能化磁性纳米微球的制备研究.杭州师范大学学报:自然科学版,2013,12(4):74-77.
- [8] Zhao X, Hilliard L R, Mchery S J, et al. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(42):15027-15032.
- [9] Ahmed M, Douek M. The role of magnetic nanoparticles in the localization and treatment of breast cancer. Biomed Res Int, 2013, 2013:281230.
- [10] Kim S M, Chae M K, Yim M S, et al. Hybrid PET/MR imaging of tumors using an oleanolic acid-conjugated nanoparticle. Biomaterials, 2013, 34(33):8114-8121.

(李凌编辑)