

一种新型酶促化学发光增强液的发光性能 及其在免疫分析中的应用

包德泉, 刘一兵, 官国英, 王玉肖, 韩世泉, 罗志福

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

摘要:在辣根过氧化物酶/鲁米诺/增强剂/过氧化氢(HRP/luminol/enhancer/H₂O₂)增强化学发光体系中,加入一系列辅助试剂,获得了一种灵敏度高、发光持续稳定、可长期贮存的新型酶促化学发光增强液。该增强液灵敏度为2.4 amol/孔,发光半衰期为40 min,工作液在室温可稳定存放1个月,在37℃下可稳定存放14 d。在此基础上,在TSH-BAS ECL EIA和AFP ECL EIA上进行了应用。TSH-BAS ECL EIA测量范围为0.17~35 mIU/L,信噪比大于5;分析灵敏度为0.04 mIU/L,功能灵敏度为0.06 mIU/L;批内变异系数为2.96%~5.05%,批间变异系数为4.01%~7.56%;回收率为101%~119%;稀释实验相关方程为 $y = 44.6 \pm 0.352x + 0.352$, $r = 0.996$;与Bayer ACS:180系统进行方法学比较,相关方程为 $y = 0.889x - 0.351$, $r = 0.984$ 。AFP ECL EIA测量范围为5~2 000 ng/mL,信噪比大于4。动力学实验表明,加入发光液之后15 min测量,结果准确可靠。

关键词:辣根过氧化物酶(HRP);鲁米诺(luminol);增强剂(enhancer);增强化学发光酶免疫分析(ECL EIA);促甲状腺素(TSH)

中图分类号:R392-33

文献标识码:A

文章编号:1000-6931(2004)02-0125-06

Chemiluminescent Characteristic of a New Type of Enhanced Chemiluminescent Substrate Solution and It's Application in Immunoassay

BAO De-quan, LIU Yi-bing, GUAN Guo-ying, WANG Yu-xiao,
HAN Shi-quan, LUO Zhi-fu

(Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

Abstract: A series of assistant reagents were added to the horseradish peroxidase (HRP)/luminol/enhancer/H₂O₂ system, and got a new type of enhanced chemiluminescent substrate solution catalyzed by HRP. It has the advantage of high sensitivity, slow decay of light emission, being stored for long time, and so on. The assay sensitivity for HRP is 2.4 amol per well. The half-life of decay of light emission is about 40 min. The work solution can be stored for more than 14 d at 37℃ or 30 d at room temperature. A two-site sandwich BAS

收稿日期:2003-06-11;修回日期:2003-08-28

作者简介:包德泉(1973—),男,四川灵水人,助理工程师,免疫分析专业

ECL EIA for TSH and a two-site sandwich ECL EIA for AFP were developed. In the TSH-BAS ECL EIA, the range of detection is 0.17 ~ 35 mIU/L. The signal to background ratio is above 5. The assay sensitivity and function sensitivity are 0.04 mIU/L and 0.06 mIU/L, respectively. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation are 2.96% ~ 5.05% and 4.01% ~ 7.56%, respectively. The recovery is 101% ~ 119%. The correlation coefficient and the correlation equations of sample dilution are 0.996, $y = 44.65x + 0.352$. The correlation coefficient and the correlation equations of assay with Bayer ACS:180 system are 0.984, $y = 0.889x - 0.351$. In the AFP ECL EIA, the range of detection is 5 ~ 2 000 ng/mL. The signal to background ratio is above 4. The kinetics experiment shows that the result is accurate and reliable in 15 min after initiation the chemiluminescent reaction.

Key words: horseradish peroxidase (HRP); luminol; enhancer; enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay (ECL EIA); thyrotropin (TSH)

1977年, Halman 首先将化学发光应用于免疫分析, 创建了化学发光免疫分析 (chemiluminescence immunoassay, CLIA), 至今, 它已成为发展和推广应用最快的免疫分析方法。目前, 国外的自动化免疫分析系统大多采用 CLIA 体系^[1-4]。

增强化学发光酶免疫分析 (enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay, ECL EIA) 是 CLIA 的一种。辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP/ALP) 是增强化学发光酶免疫分析常用的两种标记体系, 它们有各自的发光底物。不同厂家各自拥有受专利保护的底物和增强剂^[5]。相对于 HRP 体系, AP 体系的底物价格昂贵。同时, HRP 因其具有高转换系数、对不同灵敏度分析系统的适应性及适用不同的联接方法和相对分子质量小等特点而受到广泛应用^[6]。HRP 可催化氧化发光的底物种类很多, 适合的底物包括鲁米诺及结构相近的分子。如果不使用增强剂, 鲁米诺体系的发光基本上为闪光型, 且信号弱。但通过加入增强剂, 大多数问题均可解决^[7]。增强化学发光的特点是: 通过增强作用使发光时间明显延长, 使其从短暂的闪光型改进为持续 30 min 至数小时甚至更久的辉光型; 明显增强信号和提高信噪比、灵敏度; 简化操作和测量, 易于形成规范化产品。用于 ECL EIA 的增强剂非常广泛, 最初的增强剂包括荧光素、取代酚、萘酚和六羟基苯并噻唑。随后, 具有增强性质的其他分子也被发现, 如芳香胺、取代硼酸、靛酚

等^[8,9]。

目前, 我国化学发光免疫分析的研究尚处于起步阶段, 已有几项化学发光液的专利^[10-12]问世。北京医海引航生物技术有限公司已开发研制出了化学发光免疫分析系统。近年来, 我们进行 HRP 体系的增强化学发光酶免疫分析研究, 研制具有自主知识产权的化学发光增强液, 并在 TSH-BAS ECL EIA 和 AFP ECL EIA 中进行开发应用。

1 仪器、材料和试剂

1.1 主要仪器

Wallac Victor 1420 Multilabel Counter, 芬兰 Wallac 公司产品; Shaker, 美国 DPC 公司产品。

1.2 主要材料和试剂

96 孔白色微孔板, 丹麦 Nunc 公司产品。两株抗 TSH McAb, 其中一株抗 TSH McAb (代号 02Ab) 由协和医科大学提供, 另一株抗 TSH McAb 由中国原子能科学研究院同位素研究所提供。两株抗 AFP McAb (A₄A₁₁ 用于标记, A₁₄A₁₁ 用于包被), 中国原子能科学研究院同位素研究所产品。TSH 血样, 中国人民解放军总医院提供。HRP p8415, 尿素过氧化氢 (UREA-H₂O₂), 鲁米诺 (luminol), Sigma 产品。牛血清蛋白 (BSA), 华美生物医学工程公司产品。NaIO₄, 北京朝阳区中联化工试剂厂产品。硫柳汞, 上海化学试剂采购供应站分装厂 (日本进口分装) 产品。酶促化学发光增强液 (简称发光

液),本工作配制。

分析缓冲液:0.1 mol/L Tris-HCl, pH=8.

5.

洗涤缓冲液:0.01 mol/L Tris-HCl, pH=

8.5,含0.05% Tween-20,0.01%硫柳汞。

标记缓冲液:0.1 mol/L PB, pH=7.4。

包被缓冲液:0.05 mol/L CB, pH=9.5。

封闭缓冲液:0.05 mol/L CB, pH=9.5,含3%BSA。

2 方法与结果

2.1 发光液的发光性能

1) 发光液发光动力学研究

在微孔板中加入 50 μL HRP、150 μL 发光液,混匀,使用 Wallac Victor 1420 Multilabel Counter 立即进行发光计数测量,每 60 s 测量 1 次,测量 1 h。图 1 为 HRP 催化化学发光反应的动力学曲线。

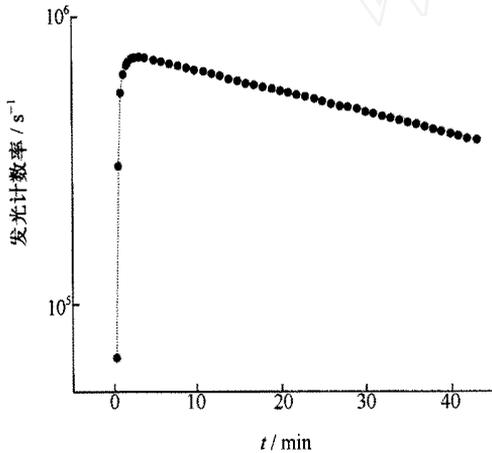


图 1 发光液发光动力学曲线

Fig. 1 Kinetics curve of light emission

图 1 结果显示,发光反应 3 min 达到峰值,43 min 时下降到峰值的 51%。说明发光反应达到峰值的时间短,且具有很好的发光持续性,可保证测量结果的准确性和可重复性。

2) 发光液标准曲线及灵敏度

将 HRP 稀释成系列浓度:0.04、0.2、0.4、2、4、20 fmol/mL,每孔加入 50 μL HRP,然后加入 150 μL 发光液,2 min 后测量发光计数。以 HRP 浓度为横坐标,发光计数率为纵坐标,取双对数作标准曲线(图 2)。以分析缓冲液为

“0”标准,平行测定 10 孔,以 $\bar{x} + 2s$ 计算,对应于标准曲线上 HRP 浓度即为分析灵敏度,为 2.4 amol/孔。

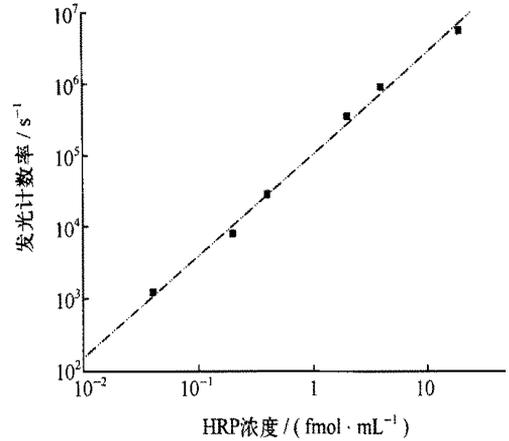


图 2 HRP/luminol/enhancer/H₂O₂ 化学发光曲线

Fig. 2 Calibration curve of HRP/luminol/enhancer/H₂O₂ system

3) 发光液稳定性试验

根据物理化学性质,将发光液分为 A、B 两组分,以 4 为参照,对比在室温、37 $^{\circ}\text{C}$ 贮存时的稳定性(图 3)。其中,B 组分还对比以浓溶液状态保存时的稳定性。HRP 为 4 fmol/孔。

由图 3 可看出:4、和 1,和 3 和 4 发光性能衰减一致,说明 A 组分极为稳定,B 组分的稳定性决定了整个发光液体系的稳定性;由 和 2 可以看出,B 组分在高浓度情况下可稳定贮存。

该发光液稳定性很好,可长期贮存。工作液在室温下可稳定存放 1 个月,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下可稳定存放 14 d。

2.2 在 TSH-BAS ECL EIA 中的应用

1) TSH-BAS ECL EIA 操作步骤

在已包被好抗 TSH McAb 的微孔板板孔中加入 100 μL TSH 标准品或血样,然后加入 100 μL TSH Ab-Biotin,摇匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h 或室温振荡 2 h,倾去液体,用洗涤液洗涤 4 次,每次每孔 300 μL ;加入 200 μL HRP-Streptavidin,摇匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 或室温振荡 30 min,倾去液体,用洗涤液洗涤 4 次,每次每孔 300 μL ;加入发光液 200 μL ,振荡摇匀,2 min 后用

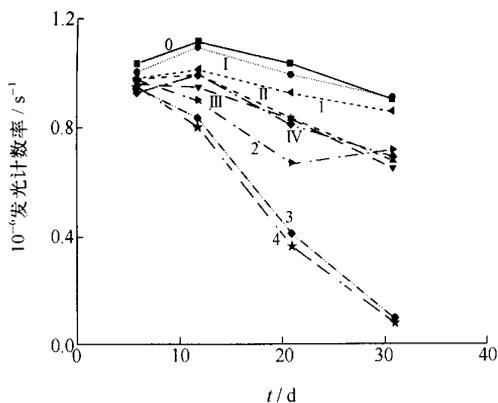


图3 发光液稳定性曲线

Fig. 3 Temperature stability curves of enhanced chemiluminescent substrate solution catalyzed by HRP

0—4 放置(A+B);
 —室温放置 A+4 放置 B;
 —4 放置 A+室温放置浓 B 稀释;
 —室温放置 B+4 放置 A;
 —室温放置 A+室温放置 B;
 1—37 放置 A+4 放置 B;
 2—4 放置 A+37 放置浓 B 稀释;
 3—37 放置 B+4 放置 A;
 4—37 放置 A+37 放置 B
 其中,浓 B 稀释表示 B 组分以浓溶液放置,使用前稀释至工作液浓度

Wallac Victor 1420 Multilabel Counter 测量。

2) TSH-BAS ECL EIA 标准曲线

在 TSH-BAS ECL EIA 测量范围为 0.17~35 mIU/L 内,标准曲线(图 4)线性良好,信噪比大于 5。

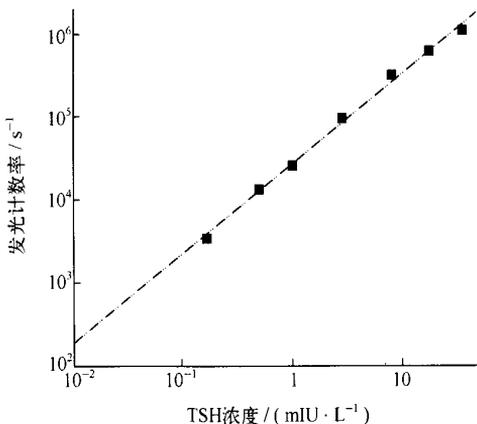


图 4 TSH-BAS ECL EIA 标准曲线

Fig. 4 TSH-BAS ECL EIA calibration curve

3) 灵敏度

平行测定“0”标准 10 孔,按 $\bar{x} + 2s$ 计算,在标准曲线上查出对应浓度,即分析灵敏度为 0.04 mIU/L。可以检测到的血样浓度最小值即功能灵敏度为 0.06 mIU/L

4) 精密度

批内变异系数:低、中、高 3 个血样,各平行测定 8 孔。计算批内变异系数为 2.96%~5.05%。

批间变异系数:低、中、高 3 个血样,各平行测定 10 次,计算批间变异系数为 4.01%~7.56%。

5) 准确度

取一血样,分别加入低、中、高 3 个标准品,测定浓度,以实际值比理论值,计算回收率为 101%~119%。

6) 稀释实验

取一血样,以“0”标准进行倍比稀释,测定浓度。以稀释比为横坐标(x),浓度为纵坐标(y)进行线性拟合,拟合方程为 $y = 44.65x + 0.352$, $r = 0.996$ 。

7) 方法学比较

测定 39 例血样(y),与 Bayer ACS:180 系统测定值(x)进行线性回归,线性方程为 $y = 0.889x - 0.351$, $r = 0.984$ 。其中,9 例为甲亢病人,均能准确与正常人分开(图 5)。

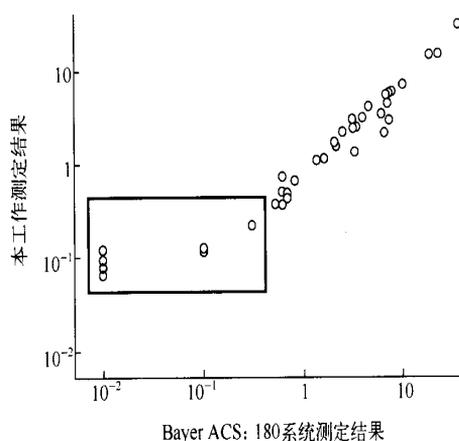


图 5 与 Bayer ACS:180 系统测定结果比较

Fig. 5 Sample measurement vs. Bayer ACS:180 system
方框内为甲亢病例

2.3 在 AFP ECL EIA 中的应用

1) AFP 标记物的制备及分析步骤

参考郭春祥的 HRP 快速标记法^[13], 标记 AFP McAb(A₄A₁₁)。AFP ECL EIA 操作步骤如下:在已包被好抗 AFP McAb(A₁₄C₁₁)的微孔板板孔中加入 50 μL AFP 标准品或血样, 然后加入 150 μL AFP McAb-HRP, 摇匀, 37 °C 温育 1 h 或室温振荡 1 h, 倾去液体, 用洗涤液洗涤 4 次, 每次每孔 300 μL; 加入发光液 200 μL, 振荡摇匀, 2 min 后用 Wallac Victor 1420 Multilabel Counter 测量。

2) AFP ECL EIA 标准曲线

AFP ECL EIA 测量范围 5 ~ 2 000 ng/mL, 信噪比大于 4。标准曲线(图 6)线性良好。

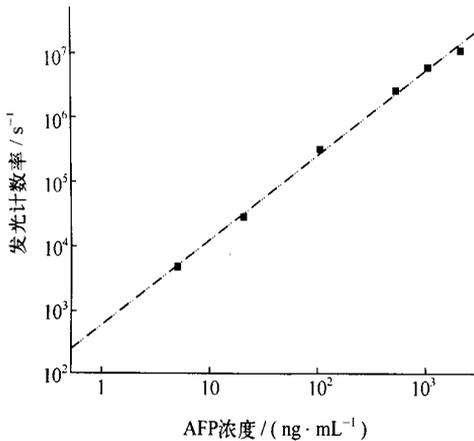


图 6 AFP ECL EIA 标准曲线

Fig. 6 AFP ECL EIA calibration curve

3) AFP ECL EIA 发光动力学曲线

AFP ECL EIA 发光动力学曲线示于图 7。

由图 7 看出:在 15 min 内, AFP ECL EIA 不同 AFP 浓度测量动力学曲线趋于平行, 说明在 15 min 内任何时间测量, 均可得到准确结果。

3 结论

1) 化学发光反应对增高本底和干扰光信号的因素甚敏感, 因此, 化学发光免疫分析欲得到准确可靠的结果, 就必须确保试剂纯度和器材设备的洁净^[14]。试剂纯度是限制化学发光灵敏度的重要因素, 鲁米诺的纯化因此受到重视^[15, 16]。鲁米诺的纯化常采用 NaOH 重结晶

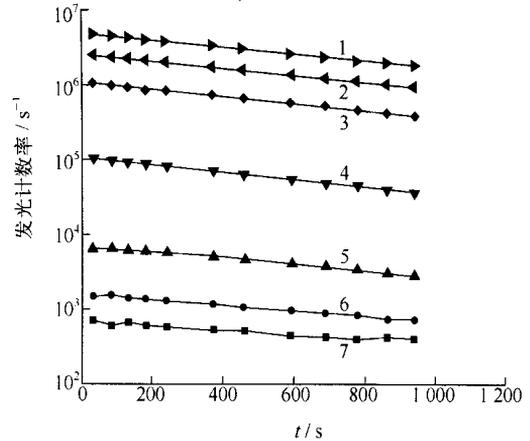


图 7 AFP ECL EIA 发光动力学曲线

Fig. 7 Kinetics curves of AFP ECL EIA

AFP 浓度, ng/mL:

1—0; 2—5; 3—20; 4—100;
5—500; 6—1 000; 7—2 000

方法。M. A. Mostenbocker^[17]的研究表明, 结晶纯化后, 鲁米诺可使灵敏度提高 13 倍。事实上, 很多化学物质均可催化化学发光, 甚至包括鲁米诺含有的某些杂质。研究表明: 使用未经纯化的鲁米诺已可满足分析需要, 也可获得理想灵敏度。因此, 直接使用不经纯化的鲁米诺, 既可简化操作, 又可降低分析成本。

2) 对于酶促化学发光免疫分析, 发光持续多长时间以临床需要为原则。发光达到峰值的时间不应太长, 达到峰值后, 发光的衰减应缓慢平稳。M. A. Motsenbocker^[17]则通过加入过硫酸铵、紫外线辐射发光试剂、光活性染料处理及纯化鲁米诺等措施来消除测量低浓度 HRP 时的发光滞后时间现象, 以提高光产出, 从而提高灵敏度。在鲁米诺、增强剂、H₂O₂ 等因素不变情况下, 该方法牺牲发光持续时间, 可能会使测量结果重复性变差。Vitros Eci System (由 Amerlite 发展而来, Johnson & Johnson) 则通过加入发光底物后在 25 °C 下温育 2 ~ 25 min 的方法来缩短发光延迟时间。事实上, 延长化学发光持续时间的途径有多种: (1) 使用 AP/AMPPD 体系, AP 催化 AMPPD 的化学发光在 15 min 达到峰值, 15 ~ 60 min 内光信号强度维持一致, 变化很小, 即使在 12 h 后仍能测定得出正确结果; (2) 使用 Glucose Oxidase/ Glucose 体系, 国内专利^[11]和日本 Showa University 发

明的 Luminomaster™ 化学发光系统采用了该体系,通过 Glucose Oxidase 催化 -D(+) Glucose 氧化产生的 H₂O₂ 来氧化鲁米诺;(3) 本工作采用的方法,即通过使化学发光反应体系变得浓稠的方法,降低了反应速度,使发光时间延长,发光时间半衰期达到 40 min,同时又具有一定增强作用。

参考文献:

- [1] 陈国南,张帆. 化学发光与生物发光,理论及应用[M]. 福州:福建科学出版社,1998. 200 ~ 235.
- [2] 尹伯元,王仁芝,李振甲,等. 标记免疫学[M]. 北京:原子能出版社,1998. 6 ~ 7.
- [3] 韩佩珍. 化学发光免疫分析[J]. 国外医学:放射医学核医学分册,2000,24:196 ~ 201.
- [4] 吴健民. 临床化学自动化免疫分析[M]. 北京:科学出版社,2000. 225 ~ 244.
- [5] Thorpe GHG, Kricka LJ. Enhanced Chemiluminescent Reactions Catalyzed by Horseradish Peroxidase [J]. *Methods in Enzymology*, 1986, 133:353.
- [6] Edwards R. Immunodiagnosics [M]. England: Oxford University Press, 1999. 126.
- [7] Gosling JP. Decade of Development in Immunoassay Methodology[J]. *Clin Chem*, 1990, 36(8): 1408 ~ 1427.
- [8] Kricka LJ, Voyta JC, Bronstein I. Chemiluminescent Methods for Detecting and Quantitating Enzyme Activity[J]. *Methods in Enzymology*, 2000, 305:370 ~ 390.
- [9] Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, et al. Phenols as Enhancers of the Chemiluminescent Horseradish Peroxidase-luminol-hydrogen Peroxide Reaction: Application in Luminescence Enzyme Immunoassays[J]. *Clin Chem*, 1985, 31:1335 ~ 1341.
- [10] 张雯艳,朱果逸,丁家华,等. 酶促化学发光的新型增强剂[P]. 中国专利:98125659.7,1998-12-24.
- [11] 王京. 高稳定性化学发光底物及检测方法[P]. 中国专利:01118410.8,2001-05-30.
- [12] 杨晓林,王申五. 超高敏酶促化学发光液配方[P]. 中国专利:91110621.9,1991-11-14.
- [13] 郭春祥,郭锡琼. 介绍一种简单、快速的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. *免疫学杂志*, 1983, 33:97 ~ 100.
- [14] Edwards R. *Immunoassays* [M]. London: John Wiley, 1996. 82.
- [15] Stott RAW, Kricka LJ. Purification of Luminol for Use in Enhanced Chemiluminescence Immunoassay [A]. Scholmerich J, Andreesen R, Kapp A, et al. *Bioluminescence and Chemiluminescence* [C]. Chichester: John Wiley, 1987. 237 ~ 240.
- [16] Thorpe GHG, Williams LA, Kricka LJ, et al. A Rapid Luminescently Monitored Enzyme Immunoassay for IgE[J]. *J Immunological Methods*, 1985, 79:57 ~ 63.
- [17] Mostenbocker MA, Kondo K. Improvements to Enhanced Horseradish Peroxidase Detection Sensitivity [J]. *J Biolumin Chemilumin*, 1994, 9: 15 ~ 20.