

流动注射化学发光免疫分析研究

II. 偶合反应测定 HRP 及其标记物

邵 谦 马望百 封满良 章竹君*

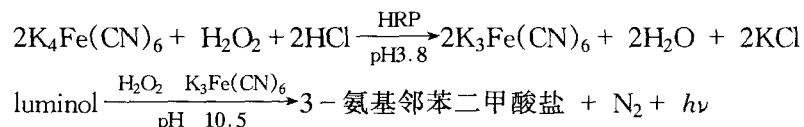
(陕西师范大学化学系 西安 710062)

摘要 本文详细考查了壳质胺,多孔玻璃和粗孔硅胶作为流动注射免疫分析免疫反应器基质的可行性,在此基础上将 HRP 催化 H_2O_2 氧化 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 生成 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的反应,与 H_2O_2 和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 对 luminol 的共氧化化学发光反应相耦合首次提出了一种新的流动注射免疫分析的最终检测手段,由于酶促反应与化学发光反应在检测系统的不同位置进行,因而这种方法克服了已报道的流动注射化学发光免疫分析不能协调酶催化和化学发光反应的最佳 pH,底物与酶不能充分接触及载体对光的散射等缺点,具有灵敏度高、精密度好等优点,该方法测定 HRP 及其标记物检测限均可达 f mol 级,测定时间为 $1\sim 2\text{min}$,相对标准偏差为 3.9% .

关键词 流动注射,免疫分析,化学发光

流动注射化学发光免疫分析是一种具有高灵敏度,高精度,快速和易于实现免疫分析自动化等特点的免疫分析技术,在临床检验中比当前国内外普遍使用的微点滴板法,具有更大的优越性. Shellum, Liu 和我们曾分别报道了以尼龙管^[1], 聚偏二氟乙烯膜^[2] (商品名为 immobilon Av 亲合膜)和多孔玻璃^[3]作为流动注射固相免疫分析的免疫反应器,并用于辣根过氧化物酶(HRP)及其标记物, IgG 和乙型肝炎表面抗原的测定,上述所有方法毫无例外的都是直接将反应器放在光电倍增管窗口的前面,以对碘苯酚为增强剂,用 HRP 催化鲁米诺(luminol)与过氧化氢的化学发光反应进行检测. 这类免疫反应器存在几个主要的缺点:首先,反应器对光的散射降低了到达光电倍增管的光通量和测定的重现性,第二,在反应器中化学发光反应和酶反应的最佳 pH 值不相匹配,第三,酶的活性中心与底物不能充分接触,影响到灵敏度的提高.

我们曾提出过一种偶合反应化学发光酶免疫分析的新概念^[4], 本文再次发展了一种新的偶合反应;即将 HRP 催化 H_2O_2 氧化 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 生成 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的反应与 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 同 H_2O_2 对 luminol 的共氧化化学发光反应相耦合,在一个流动注射系统中,用壳质胺,多孔玻璃或粗孔硅胶为基质,测定 HRP 及其标记物的偶合反应免疫反应器,反应中生成的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 在 PMT 前的盘管中发生化学发光反应,根据发光强度确定 HRP 及其标记物的量,其反应为:



这种方法除了具有文献已报道的流动注射免疫分析的优点外还有以下几个特殊的优点:

首先,可以将偶合反应的 pH 值调至 HRP 起催化作用的最佳酸度(中性或弱酸性),而其产物与 luminol 起发光反应的 pH 值亦可调至发光反应量子产率最高的条件(碱性),从而解决了直接使用 HRP 催化 luminol-H₂O₂ 化学发光体系测定 HRP 及其标记物时所存在的 HRP 作用最佳酸度与 luminol-H₂O₂ 发光反应的最佳酸度不相匹配的问题;第二,在免疫反应器中可采用停流技术,使 HRP 及其标记物与底物接触一段时间,这样,即使标记后空间位阻增大,HRP 的活性中心也能与底物充分接触,产生更多偶合反应产物,以增大测定的灵敏度;第三,由于偶合反应和发光反应在分析系统的不同部位发生,因而不存在光散射问题,测定精度有较大提高.本法测定 HRP 及其标记物检测限均可达 fmol 级,测定时间为 1~2min,相对标准偏差为 3.9%.

1 实验

1.1 试剂及仪器

HRP (RZ=2.5~3,中科院上海生物化学研究所);羊抗人 IgG-HRP(IR2343,华美生物工程公司);壳质胺(浙江玉环县化工厂),用 1% HOAc 经三次重结晶提纯;多孔玻璃(CPG)(PG-240-200 Sigma 公司);粗孔硅胶(粒度为 100~140 μ m,青岛海洋化工厂); γ -氨丙基三乙氧基硅烷(武汉大学化工厂); $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ luminol 溶液,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ -NaOH 溶液溶解配制成贮备液,分析液用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 溶液稀释制得; $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 溶液; $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液,用 HCl 调节 pH 值为 3.8.流动注射免疫分析装置(自制,其结构见图 1).

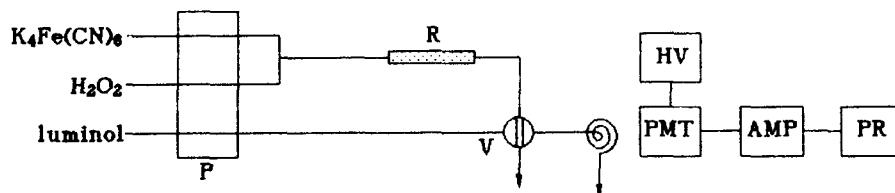


图 1 流动注射免疫分析装置图

R:反应器; V:阀; HV:负高压; PMT:光电倍增管; AMP:放大器; PR:数据处理器

1.2 免疫反应器的制备

取一定量提纯后的壳质胺,加 5% 甲醛(pH 8.5)溶液,室温下搅拌 1h 水洗除去残留甲醛,即得甲醛活化的壳质胺载体,后加入一定量 HRP 或羊抗人 IgG-HRP 溶液进行固定化.用多孔玻璃或粗孔硅胶作载体时,则按前文所述方法^[4]先用氨基硅烷化试剂将其表面的羟基转化为氨基,然后用戊二醛以两步法将 HRP 或羊抗人 IgG-HRP 键合到载体表面,为了防止载体表面剩余醛基造成的非特异性吸附,最后用赖氨酸溶液处理载体,以封闭残余醛基^[5].

将上述三种固定化 HRP 载体装入 $2 \times 50 \text{ mm}$ 两端塞有玻璃棉的玻璃管中,制成免疫反应器.进行免疫分析时,则按上法先固定抗原或抗体,再通过免疫反应导入 HRP 标记的抗体或抗原.

2 结果与讨论

2.1 免疫反应器的载体

在流动注射免疫分析中,曾经使用多种人工合成高聚物作为载体来固定抗原、抗体或酶,我们曾成功地使用过控制孔径的多孔玻璃作为载体,在本文中我们研究了一种天然的高聚物即壳质胺.壳质(Chitin)是从甲壳动物的外壳中提取出的一种乙酰多糖,即 *N*-乙酰基-D-葡萄糖通过 β -(1,4)-苷键联接的呈螺旋链的多糖,脱去乙酰基后成壳质胺(Chitoson);它在亲水分散体系中可保持 500~2000% 的水分,富含氨基且有很强的氢键能力,这些氨基经甲醛活化后可与甲醛形成 Schiff 碱,再与蛋白质形成次甲基桥,将其固定在载体上.由于壳质胺的优良性能,加之其来源丰富,制备简单,成本低廉,同时易于通过接枝而改性,可以期望它成为一种比较理想的流动注射固相免疫反应器的载体.我们的实验也表明,壳质胺除具有上述优点外,用它作为载体固定蛋白质的过程中反应条件较用控制孔径的多孔玻璃及粗孔硅胶要温和,不会造成抗原、抗体的破坏和酶活性的降低,且传质阻力小,因而灵敏度高,使用寿命长(表 1).

表 1 几种载体的性能比较

载体	相对活性	检测限 羊抗人 IgG-HRP	(fmol) HRP	重复使用次数
壳质胺	100	3	4	<250
CPG	27	20	33	100
粗孔硅胶	16	40	76	82

2.2 反应的酸度

如图 2 所示,HRP 催化 H_2O_2 氧化 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的反应,其最佳 pH 为 3.8,而 H_2O_2 和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 与 luminol 的共氧化反应其 pH 为 10.3 由于偶合反应和发光反应在测定系统的不同位置进行,两者最佳条件都能同时满足.

2.3 试剂浓度

在偶合反应中当 H_2O_2 浓度为 $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,所用 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 试液浓度以 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳,在本法中 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的纯度至关重要,是造成背景信号增大和限制 HRP 检测限的重要原因,应使用新制备的一级试剂.随着 H_2O_2 浓度的增加,无论偶合反应或化学发光反应的速度都增大,当酶促反应中的 H_2O_2 浓度高于 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,发光反应中 H_2O_2 浓度高于 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,发光强度的信噪比增加变得很缓慢,因而选择 $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 作为两种反应共用的试剂溶液,luminol 浓度增大时发光强度也增加,浓度高于 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,背景信号增大,发光信号也因内滤效应出现而降低,两者均导致信噪比的减少.

2.4 流速的影响

本法中三种试剂的流速都用同一个蠕动泵控制, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 H_2O_2 溶液的流速不但影

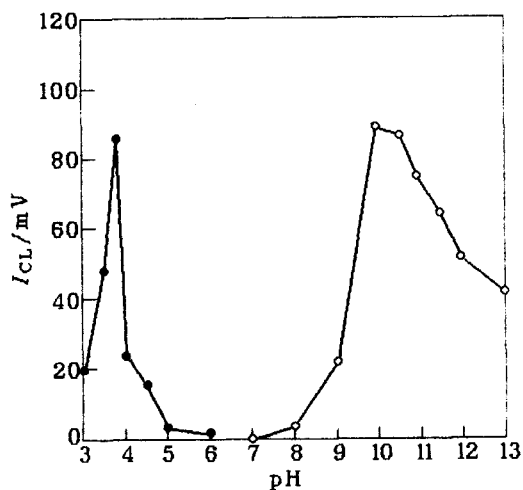


图 2 酸度的影响曲线

● 偶合反应; ○ 发光反应

响偶合反应产物生成的效率,也影响发光反应物混合的均匀程度、扩散情况和发光部分在盘管中停留的时间.通过实验发现当各试剂流速均控制在 $1.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,有最好的信噪比,停流可以增大偶合反应产物的生成量,使测定灵敏度增大,停流时间以 $1\sim 2\text{min}$ 为宜.

2.5 工作曲线和稀释曲线

分别用壳质胺,控制孔径多孔玻璃和粗孔硅胶为载体作成免疫反应器,对 HRP 和羊抗人 IgG-HRP 进行测定,图 3 表明在 50ng 以下,HRP 量与化学发光强度均呈良好线性关系,使用三种载体时的线性范围分别为 $10\sim 1250\text{ f mol}$ (壳质胺), $110\sim 1250\text{ f mol}$ (多孔玻璃)和 $180\sim 1250\text{ f mol}$ (粗孔硅胶),检测限(信噪比为 3)分别为 4 f mol (壳质胺), 33 f mol (多孔玻璃)和 76 f mol (粗孔硅胶).对不同稀释度的羊抗人 IgG-HRP 进行测定,并与通用 ELISA 法进行比较,实验结果表明,本法最低稀释度为 $1:3.8\times 10^4$, ELISA 法为 $1:4.0\times 10^3$,较通用 ELISA 法灵敏度提高了近 10 倍,用本法对 125 f mol HRP 作 7 次测定,相对标准偏差为 3.9%,大大优于通用 ELISA 法的测定精度(10%左右).

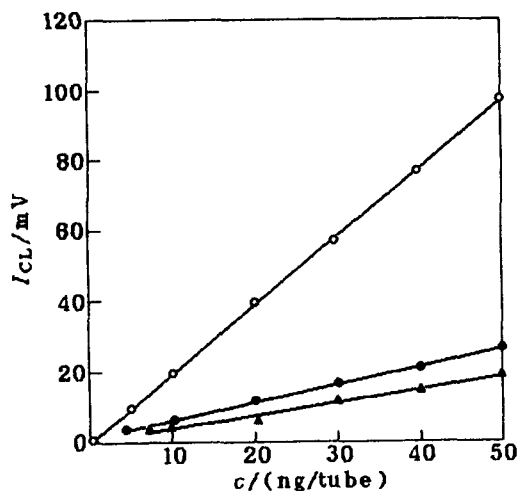


图 3 工作曲线

○ 壳质胺; ● 多孔玻璃; ▲ 粗孔硅胶

参考文献

- 1 C. Shellum, G. Gubiltz, *Anal. Chim. Acta*, **1989**, 227, 97.
- 2 Liu, H., Yu, J. C., D. S. Bindra, R. S. Givens, G. S. Wilson, *Anal. Chem.*, **1991**, 63(7), 666.
- 3 张新荣, 封满良, 吕九如, 章竹君, *化学学报*, **1994**, 52, 83.
- 4 章竹君, 拜明岐, 张新荣, *化学学报*, **1991**, 49, 389.
- 5 蒋成淦, “酶免疫测定法”, 人民卫生出版社, 北京, **1984**, 第 31 页.

Studies on Flow – injection Chemiluminescence Immunoassay II. Determination of HRP and Its Conjugates with Coupled Reaction

SHAO Qian MA Wang – Bai FENG Man – Liang ZHANG Zhu – Jun *

(*Department of Chemistry, Shanxi Normal University, Xian, 710062*)

Abstract In this paper chitoson, controlled pore glass and silica – gel have been investigated with respect to its potentiality of being used as solid support of flow – injection immunoassay. A new flow – injection immunoassay end – point detection method has also been developed on the basis of coupling the reaction of H_2O_2 and $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, catalyzed by HRP, with H_2O_2 and $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ co – oxidized chemiluminescence reaction of luminol. As enzymatic and chemiluminescent reaction were generated at different sites of the detection system. The general shortcomings of such as unable to select a optimum pH for both enzymatic and chemiluminescent reaction, incomplete contact between enzyme and substrate, and scattering of support have been eliminated. It has the advantages of high sensitivity and good accuracy. HRP and its conjugates at f mol level can be detected within 1 ~ 2 min. and the relative standard deviation is 3.9%.