

多聚螯合物酶联抗体交联磁性纳米乳胶的 脂联素免疫透射比浊方法研究

余红卫, 熊 萍, 胡富陶*

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用多聚螯合物酶联抗体交联磁性纳米乳胶的脂联素免疫透射比浊法检测了血清中脂联素。发现多聚螯合物酶上含有大量 HRP 酶, 可以极大地放大检测信号; 在优化条件下, 免疫比浊信号强度在脂联素 $0.005\sim 0.2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内变化时, 并随着 ADPN 浓度的增加呈线性关系 ($R^2=0.998$), 检出限为 $2\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。该方法能成功用于血清样本中脂联素的检测。

关键词: 多聚螯合物酶联抗体; 磁性纳米乳胶; 免疫透射比浊法; 血清; 脂联素; 信号放大

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 03-0013-06

脂联素(简称 ADPN)能预示糖尿病和冠心病的发展情况, 并在临床试验表现出抗糖尿病、抗动脉粥样和炎症的潜力。目前, 已用于 ADPN 检测免疫分析方法中, 常见的有酶联免疫法(简称 ELISA)、放射免疫法、荧光免疫测定法、化学发光法、电泳免疫测定法、质谱免疫分析法、免疫聚合酶链反应法等^[1-6]。其中, ELISA 法被广泛用于临床实验室检测肿瘤标志物, 具有较好的特异性和敏感性, 但该方法灵敏度较低。因此, 需要建立一种新方法能迅速和有效地监视肿瘤标志物浓度。免疫透射比浊法是利用免疫透射比浊技术和抗原-抗体特异性结合建立起来的一种检测手段, 它是基于夹心型免疫分析原理发展起来的夹心型免疫透射比浊法, 由于具有灵敏度高、特异性强、相容性好、检测限低、分析速度快、成本低廉等优点, 引起了广泛的研究兴趣^[7]。

人脂联素 ELISA 试剂盒是一种酶联免疫吸附技术, 用来定量检测人类血清、质膜及各种组织洗标培养液上清中的脂联素水平。该检测技术将抗人脂联素的单克隆抗体预包埋在 96 孔酶标板上。当标准品和样品上样之后, 脂联素通过免疫抗体结合在酶标板上。结合上去的脂联素然后又被抗

人脂联素多克隆抗体捕获。由于抗兔 IgG 标记了 HRP 以及 HRG 底物的存在, 比色度与结合在上面的脂联素成线性关系, 此时的比色度可通过酶标仪读数实现定量。但由于该方法较为繁琐, 笔者利用多聚螯合物(EnVision, EV)标记脂联素二抗(Ab_2), 制得 EV-ADPN Ab_2 , 构建了基于 EV-ADPN Ab_2 酶催化信号放大的夹心型免疫透射比浊法。首先利用电位沉积法在金免疫磁珠表面电沉积一层多纳米金, 经过硫醇化后的 G 蛋白固定在免疫磁珠表面, 此时免疫磁珠表面可定向固定脂联素抗体 Ab_1 , 使抗体结合位点一致向外, 增加免疫磁珠表面抗体固定量。然后采用夹心免疫模式, 利用夹心免疫复合物中 HRP 催化对苯二酚和 H_2O_2 的反应, 产生浊度变化, 测定 ADPN 的浓度。并通过高密度的酶催化放大浊度信号, 提高免疫反应的灵敏度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

PhoenixSpec 浊度仪(美国 Becton & Dickinson Company), H-7650 型透射电子显微镜(日本日立公司), 扫描电子显微镜(S-3400N, 日本日立公司), 恒温摇床(KY-C, 金坛市华诚开元实验仪器厂)。

收稿日期: 2014-10-10.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省公益技术应用研究 (2012C37012)。

第一作者: 余红卫 (1970—), 男, 浙江余姚人, 高级实验师, 主要研究方向: 食品安全与检测。E-mail: yuhongwei@nbu.edu.cn

*通信作者: 胡富陶 (1964—), 男, 浙江磐安人, 高级实验师, 主要研究方向: 食品安全与检测。E-mail: hufutao@nbu.edu.cn

人脂联素 Adiponectin ELISA 分析试剂盒(美国 Biovision 公司)脂联素抗体(anti-ADPN), 脂联素抗原标准品(ADPN)为郑州博赛生物技术有限公司产品, Envision 试剂盒为基因科技(上海)有限公司产品, 牛血清蛋白(BSA)、过氧化氢(H_2O_2)、碳酸钠(Na_2CO_3)、对苯二酚(HQ)、2-亚氨基遛烷盐酸盐、氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、吐温-20(Tween-20)等化学试剂均为 AR 级. 磷酸缓冲液(PBS)的配制: 由 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 混合而成.

1.2 EV-ADPN Ab_2 抗体复合物的合成

EV 试剂和 ADPN Ab_2 溶液等体积混合, 置于 4°C 的恒温摇床 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振摇 12 h. $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 获得 EV-ADPN Ab_2 抗体复合物, 4°C 储存备用.

1.3 制备硫醇化 G 蛋白

首先, 参考 Fowe 等人^[8]的方法并稍作改进合成硫醇化 G 蛋白, 取 G 蛋白和 2-亚氨基遛烷盐酸盐, 2-亚氨基遛烷盐酸盐用量是 G 蛋白的 12 倍. 将两者分别溶解于除氧后的磷酸缓冲溶液中, 4°C 反应 30 min, 过量的 2-亚氨基遛烷盐酸盐用离心过滤方法除去. 最后, G 蛋白溶液浓缩至 $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

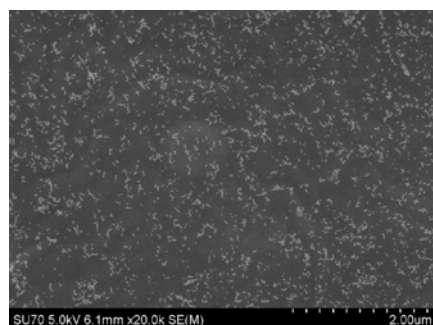
1.4 免疫磁珠的制备

根据文献报道^[9], 首先金免疫磁珠(GE)用 $0.05 \mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 粉末抛光, 再依次用乙醇、水超声清洗, 然后置于 H_2SO_4 和 H_2O_2 体积比为 7:3 的混合溶液中浸泡 15 min, 在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸中进行免疫比浊处理, 电势范围为 $-0.3 \sim -1.5 \text{ V}$. 蒸馏水洗净后, 氮气吹干.

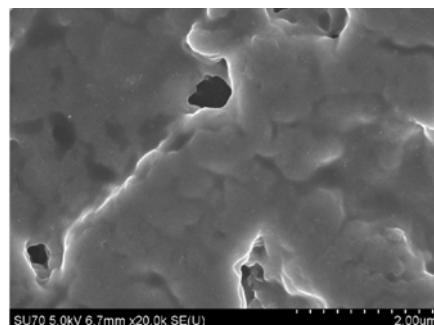
将 GE 浸入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯金酸溶液中, 在 -0.5 V 恒电位下电沉积 20 s, 制得 AuNPs/GE 免疫磁珠, 用水清洗 AuNPs/GE 免疫磁珠并晾干. 将 AuNPs/GE 免疫磁珠浸泡在硫醇化 G 蛋白溶液中置于 4°C 温育一晚, 将免疫磁珠取出, 用去离子水洗后, 滴加 $20 \mu\text{L}$ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ADPN Ab_1 溶液, 4°C 下温育 2 h, 用 PBS-T 缓冲溶液清洗, 即将 ADPN Ab_1 定向固定在 AuNPs/GE 表面上制得 ADPN Ab_1 /thiolated protein G/AuNPs/GE. 最后用质量浓度 3% 的 BSA 溶液封闭磁珠表面的空余位点, 用磷酸缓冲溶液和水冲洗, 晾干, 保存于 4°C 备用.

1.5 免疫分析步骤

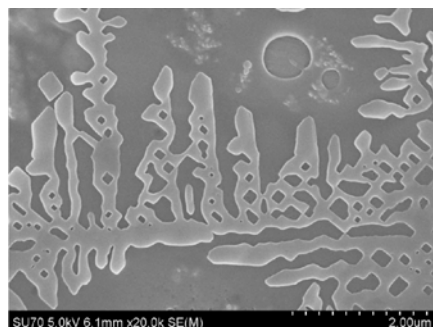
首先在室温条件下(37°C)将免疫反应与不同浓度的 ADPN 抗原溶液温育 30 min, 形成抗原-抗体免疫复合物, 再与 EV-ADPN Ab_2 检测抗体反应



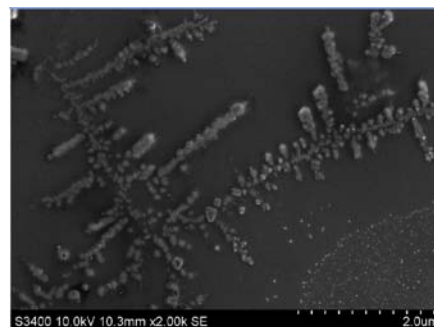
(a) AuNPs/GE



(b) ADPN Ab_1 /thiolated protein G/AuNPs/GE



(c) EV



(d) EV-ADPN Ab_2

图 1 免疫磁珠的扫描电镜和透射电镜图

5 min, 在免疫磁珠表面形成夹心型免疫复合物, 在 5 mL 通氮除氧含有 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 及 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HQ}$ 的 PBS 溶液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 测定免疫反应的响应浊度。因 HRP 可催化 HQ 与 H_2O_2 的反应, 产生浊度变化, 且与 ADPN 浓度呈线性关系, 故可用于定量测定 ADPN 浓度。

2 结果与讨论

2.1 免疫反应组装过程及信号探针的表征

扫描电子显微镜 (SEM) 能有效表征免疫磁珠的表面性能, 因此采用 SEM 分别对 AuNPs/GE、thiolated protein G/AuNPs/GE、ADPN Ab₁/thiolated protein G/AuNPs/GE 以及 EV-ADPN Ab₂ 温育后的免疫磁珠表面进行了表征, 结果如图 1 所示。从图 1(a) 可以发现, 电沉积纳米金在磁珠表面形成了一层均匀且排列有序的纳米金粒子。与未经修饰的 CE 相比, AuNPs/GE 的比表面积增大, 从而增加了 Ab₁ 的有效固定空间。图 1(b) 是在修饰免疫磁珠与 ADPN Ab₁ 温育后, 免疫磁珠表面形成了一层薄膜。这表明免疫磁珠表面通过夹心免疫反应, 成功将链状 EV-ADPN Ab₂ 固定至免疫磁珠表面。另外, 利用扫描电子显微镜对信号探针进行表征。从图 1(c) 可以看出, EV 是一种树枝状的链状物, 结果与试剂说明一致。图 1(d) 可见, 当 EV 与 ADPN Ab₂ 结合后, 形成了树枝状的形貌, 表明 ADPN Ab₂ 成功固定在 EV 表面。

2.2 EV 及 EV-ADPN Ab₂ 的紫外可见吸收光谱表征

将制得的 EV-ADPN Ab₂ 进行紫外光谱表征, EV-ADPN Ab₂ 在 280 nm 和 404 nm 同时出现了 2 个吸收峰, 这与纯 ADPN 抗体 Ab₂ 和 HRP 的特征峰位置相一致, EVC 表面标记了 HRP, 同时也表明 ADPN Ab₂ 被成功标记在 EVC 表面, 成功制备得到了 EV-ADPN Ab₂。

2.3 不同浊度反应的免疫特性表征

图 2 为夹心免疫反应构建过程中不同修饰免疫磁珠在 PBS 缓冲溶液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 中的循环伏安表征图。在 $-0.6 \sim 0.6 \text{ V}$ 范围内, 裸金免疫磁珠在 PBS 溶液中无氧化还原峰出现 (图 2 中的 a)。当溶液中加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对苯二酚时, 免疫磁珠在 -0.12 V 和 0.42 V 位置出现了 1 对氧化还原峰 (图 2 中的 b), 当免疫磁珠电沉积纳米金后, 由于纳米金

导电性良好, 氧化浊度迅速增加, 但当免疫磁珠分别与巯醇化 G 蛋白、ADPN Ab₁、BSA、ADPN 抗原不导电的生物大分子温育并结合, 导致氧化浊度减少 (图 2 中的 c~g)。由于该免疫比浊现象主要是由于上述生物大分子导电性差, 阻碍免疫磁珠表面电子传递, 从而引起氧化还原峰浊度的变化。

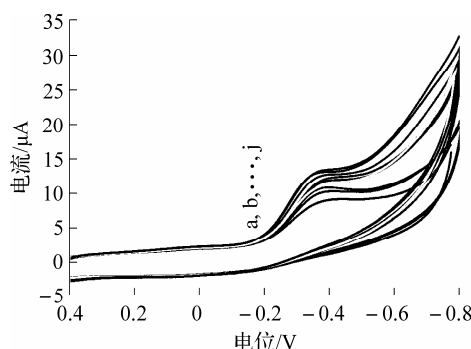


图 2 不同浓度 ADPN 反应在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 PBS 溶液中的循环伏安曲线

2.4 比较不同信号探针的免疫行为

分别制备了 2 种不同检测抗体 (即 ADPN Ab₂-HRP 和 EV-ADPN Ab₂), 以 $5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ADPN 抗原为例比较 2 种抗体催化效果。发现在 pH 值 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 当 BSA/ADPN Ab₁/thiolated protein G/AuNPs/GE 与 ADPN 抗原结合后, 加入 H_2O_2 峰浊度相对较小 (图 3(a)); 与 ADPN Ab₂-HRP 形成夹心免疫复合物后, 随着 H_2O_2 的加入, 比浊曲线增加 (图 3(b))。这主要是在对苯二酚的作用下, 夹心免疫复合物中 HRP 对 H_2O_2 的免疫比浊产生催化还原作用, 引起还原峰浊度变化。而使用 EV-ADPN Ab₂ 作为检测抗体时, 免疫反应呈现出高浊度响应 (图 3(c)), 其原因可能是因为 EV-ADPN Ab₂ 含有大量 HRP 和抗体。因此, 当使用 EV-ADPN Ab₂ 作为检测抗体时能提高该免疫反应的灵敏度。

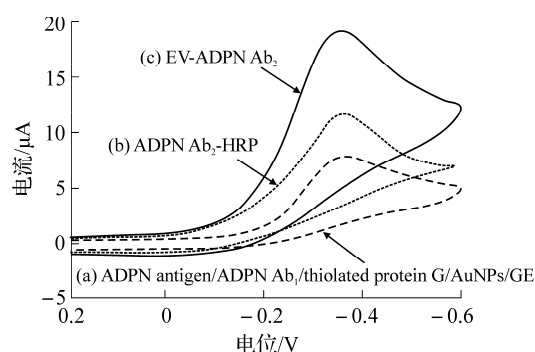


图 3 不同标记抗体免疫比浊的免疫分析方法

2.5 实验条件优化

2.5.1 EV 和 ADPN Ab₂ 体积比优化

在实验中,ADPN Ab₂是结合到EV上制得信号探针,因此EV和ADPN Ab₂的体积比是影响免疫反应响应信号的重要因素,所以需考察EV:ADPN Ab₂在不同体积比情况下对免疫反应催化信号的影响。由图4可见,随着EV:ADPN Ab₂体积比的增加,免疫反应的浊度值不断增加,且在1:1时达到最大。增加EV:ADPN Ab₂的体积比可增加EV-ADPN Ab₂中ADPN Ab₂的标记量,从而增强反应的灵敏度;增加夹心免疫复合物中HRP的量,提高免疫反应的浊度值。但是在EV上HRP和抗抗体的量是固定的,因此需要找出最合适的ADPN Ab₂的标记量,也就找到了最好的抗体结合效率。因此,在实验中采用 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADPN Ab₂与EV试剂原始液。由于HRP可催化过氧化对苯二酚(HQ),产生氧化还原浊度。最终实验得出EV:ADPN Ab₂的最佳体积比为1:1。

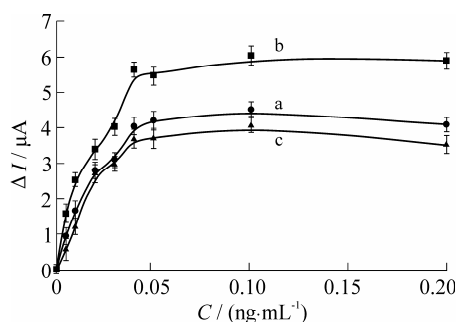


图4 EV:ADPN Ab₂ 体积比

2.5.2 磷酸缓冲溶液 pH 优化

由于免疫反应分析过程在磷酸缓冲溶液中进行,磷酸缓冲溶液的pH值会影响抗原抗体等生物分子的活性^[10-11],因此磷酸缓冲溶液的pH值对免疫反应有重要的影响。笔者考察了pH 4.0~8.5的磷

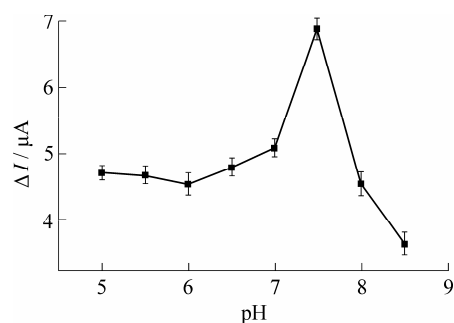


图5 PBS 缓冲溶液 pH 值

酸缓冲溶液对免疫反应的影响,由图5可见,免疫反应的还原峰浊度值先随着磷酸缓冲溶液pH值的增大而增大,在pH 7.5时达到最大,然后随着pH增大而浊度值减小。因此,最终选择pH 7.5的磷酸缓冲溶液作为免疫反应的测试底液。

2.5.3 温育时间优化

温度、时间对抗原-抗体的特异性反应具有重大影响,在25℃下,考察了时间对免疫反应响应性能的影响。由图6可见,当温育时间达到5 min后出现了一个平台,说明5 min为本实验抗原抗体最佳温育时间。

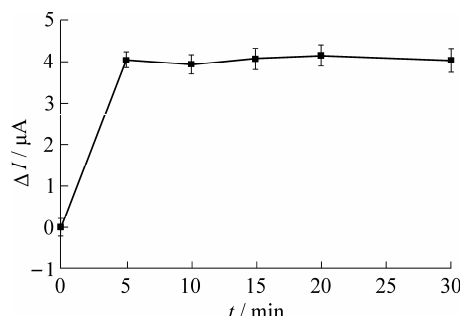


图6 温育时间对免疫反应免疫比浊响应的影响

2.5.4 对苯二酚(HQ)浓度优化

HQ的浓度是一个重要参数。因此,笔者以 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADPN为例,研究不同HQ浓度对免疫反应响应信号的影响。由图7可见,免疫反应的浊度响应信号在 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最佳。因此选择加入的HQ浓度分别为 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

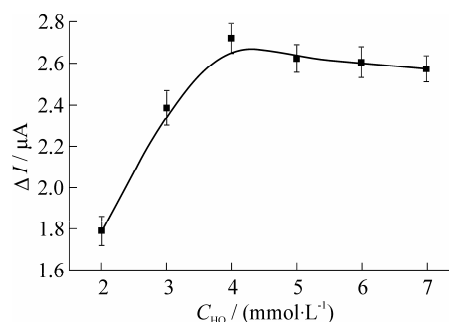


图7 HQ 浓度对免疫反应免疫比浊响应的影响

2.5.5 定量分析结果

图8为免疫透射比浊法测定ADPN的标准曲线。由图可见ADPN浓度在 $0.005\sim 0.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内变化时,免疫比浊信号强度也随着ADPN浓度的增加呈线性关系($R^2 = 0.998$),该方法的检出限为 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。线性分为两端的主要原因是由于免

表 1 本法与 ELISA 法对实际血清样品中 ADPN 的测定结果比较(n=3)

血清样本	1	2	3	4	5	6
ELISA ¹⁾	ND ²⁾	10	20	40	ND ²⁾	ND ²⁾
Immunosensor/(ng·mL ⁻¹) ¹⁾	2.1	10.5	21	42	0.2	0.1
相对偏差/%	2.3	4.5	2.4	3.1	3.2	3.2

注: 1) 5 个连续的平均值; 2) 未检出。

表 2 本法与其他部分 ADPN 免疫透射比浊法的对比

分析方法	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)	检测抗体	参考文献
ELISA	0.700~15.000	0.200	HRP 示踪的 ADPN Ab ₂	Kit's 操作方式
电化学免疫分析法	0.100~30.000	0.018	label-free	[13]
	0.020~3.500	0.096	修饰金纳米粒子的 DNA	[14]
化学荧光法	0.010~100.000	0.005	SiO ₂ /HRP 抗体	[15]
免疫比浊法	0.050~50.000	0.030	Ru-silica@Au 抗体	[16]
	0.005~0.2000	0.002	EV-ADPN Ab ₂	本文

疫磁珠表面固定的抗体量有限, 随着与抗原结合位点的越来越少, 方法灵敏度下降^[12]。

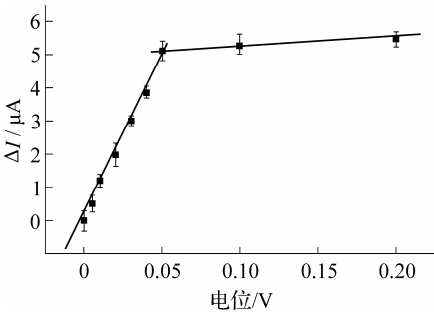


图 8 ADPN 测定的标准曲线

2.5.6 免疫反应对人体血清中 ADPN 检测应用

为研究本实验的临床应用价值, 用该方法和标准 ELISA 法对 6 份实样中的 ADPN 含量进行检测。表 1 数据表明, 该方法与标准 ELISA 法测定结果具有非常好的相关性, 相对偏差介于 2.3%~4.5% 之间。由此可见, 笔者构建的方法可用于 ADPN 的临床检验。

2.5.7 与其他 ADPN 分析方法的对比

将本法与文献[13-16]报道 ADPN 检测方法进行比较。从表 2 可见, 该方法用 EV 结合 ADPN Ab₂, 大大简化了抗体标记过程, 提高了抗体及酶标记密度, 显著地放大了免疫比浊反应响应信号, 提高了检测灵敏度, 而检测限得到了明显降低。

3 结论

采用抗原抗体特异性结合, 制备了 EV-ADPN

Ab₂ 信号探针并研究了其免疫比浊信号放大作用, 以 ADPN 为模型, 提出了一种新型的测定生物分子的方法。新方法有以下特点: (1) 硫醇化 G 蛋白有定向固定的作用, 可以提高免疫磁珠表面抗体固定量; (2) 免疫比浊方法具有灵敏度高和检测限低的优点, 适用于复杂体系中痕量待测物的测定。因此, 免疫比浊免疫分析在生物分子的分析中有很好的应用前景。

参考文献:

[1] 苏丽清, 苏胜偶. 胰岛素抵抗患者血清脂联素与超敏 C-反应蛋白相关性研究[J]. 中国医师进修杂志: 内科版, 2006, 29(7):30-32.

[2] 葛庆峰, 闫杰. 急性心肌梗死患者血清脂联素水平的动态变化[J]. 临床荟萃, 2005, 20(11):601-603.

[3] 郭继龙, 袁清, 马仰国. 血清脂联素水平与脑梗死的关系研究[J]. 检验医学, 2009, 24(2):140-142.

[4] 严俊, 徐东杰, 李其龙, 等. 胶体金法和免疫比浊法大便隐血检测在人群结直肠癌筛查中的应用[J]. 中国肿瘤, 2014(2):92-96.

[5] 张洪瑞, 向代军, 白洁, 等. 乳胶增强免疫比浊法测定血浆和尿液中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的方法学评价[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(11):1027-1032.

[6] 陈建文, 张凡, 刘玉侠, 等. 乳胶增强免疫比浊法测定血清肌钙蛋白 I 的实验探讨[J]. 中华全科医学, 2013, 11(11):121-124.

[7] Zou Y, Li Y H, Jin H, et al. Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-

- point extraction[J]. *Anal Biochem*, 2012, 421:378-382.
- [8] Kanimozhia S, Basheer C, Neveliappan S, et al. Investigation of bioaccumulation profile of oestrogens in zebrafish liver by hollow fibre protected liquid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometric detection[J]. *J Chromatogr B*, 2012, 909:37-41.
- [9] Chen X B, Wu Y L, Yang T. Simultaneous determination of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol in bovine milk by isotope dilution ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2011, 79:799-805.
- [10] Zhao C D, Ji Y S, Shao Y L, et al. Novel molecularly imprinted polymer prepared by nanoattapulgit as matrix for selective solid-phase extraction of diethylstilbestrol[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216:7546-7551.
- [11] Lad U, Khokhar S, Kale G M. Electrochemical creatinine biosensors[J]. *Anal Chem*, 2008, 80:7910-7915.
- [12] Liu G, Lin Y. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays[J]. *Talanta*, 2007, 74: 308-312.
- [13] Huang K, Niu D, Xie W, et al. A disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on nano-Au/multi-walled carbon nanotubes-chitosans nanocomposite film modified glassy carbon electrode[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 659:102-106.
- [14] Zhang H, Zhao Q, Li X F, et al. Ultrasensitive assays for proteins[J]. *Analyst*, 2007, 132:724-729.
- [15] Yin Z Z, Cui R J, Liu Y, et al. Ultrasensitive electrochemical immunoassay based on cadmium ion-functionalized PSA@PAA nanospheres[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25:1319-1321.
- [16] Kämmerer U, Kapp M, Gassel A M, et al. A new rapid immunohistochemical staining technique using the environment antibody complex[J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49:623-627.

Turbidimetry Based Analysis of Adiponectin Using Polychelate Enzyme Linked Antibody Cross-linked Magnetic Nano Emulsion as Probes

YU Hong-wei, XIONG Ping, HU Fu-tao*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A novel turbidimetric immune method is engineered by transmission of poly-chelate enzyme linked antibody cross-linked magnetic nano emulsion to determine adiponectin in serums. Polymeric chelate enzyme contains a large amount of HRP enzyme, which significantly facilitates the signal amplification. Under the optimized conditions, the immune turbidimetric signal intensity changes in the range of $0.005\sim 0.2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ adiponectin, with the detection limit of $2\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. It has been successfully applied to the detection of adiponectin in serum samples.

Key words: poly chelate enzyme-linked antibody; magnetic nanotags; immune turbidimetry; serum; adiponectin; signal amplification

(责任编辑 章践立)