

JIAO Bao-quan, JIA Bu-nian, HU Rong-liang, JIN Ning-yi, YIN Zhen (*Changchun University of Agriculture and Animal Sciences, Changchun 130062, China*); SHI Jiang, NIE Hai-yang, HU Yur-long, WU Gang, ZHOU Zong-an (*Military Medical Institute of Nan Jing Army, Nanjing 210002, China*).

Abstract The expression vector was successfully constructed with the cloning of ery-

thropoietin genomic DNA into the downstream of CMV promoter, and expressed in transfected transiently BHK21 cells. Then it was introduced into the skeletal muscle of mice by the mediation of lipofectin. As a result, the EPO expressed in serum of mice reached highly to 1 340 ng/L in one month.

Key words erythropoietin, gene transfer, expression

酶放大镧系元素发光法测定碱性磷酸酶*

赵启仁 李美佳 刘 洁 宋娜玲 庄湘莲 陈 艾 林 汉

(中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192)
(中国协和医科大学)

摘要 报告了应用酶放大镧系元素发光法测定碱性磷酸酶的方法. 应用 5-氟水杨酸磷酸酯作为酶底物, 并对方法学中的多种因素进行了最佳比. 用甲基硅油 (I) 改进了信/噪比的稳定性. 方法的灵敏度为 4 U/L. 精密度为 10%. 精密度为 10% 的浓度范围是 2.00~ 3.00 × 10² U/L. 测量值的相对误差 < 10%. 测定了血清中的碱性磷酸酶浓度, 回收率为 93% ~ 95%.

关键词 酶放大镧系元素发光分析法, 酶放大时间分辨荧光分析法, 碱性磷酸酶

学科分类号 Q55, O657

酶放大镧系元素发光分析法 (EALL), 也称酶放大时间分辨荧光分析法 (EATRFA), 是把酶放大与时间分辨荧光分析技术相结合的一种超灵敏生物分析技术. 它是由 Diamandis 等在 Bobrow 等的工作基础上提出的^[1~3]. EALL 法集中酶放大作用、镧系元素螯合物以及时间分辨和波长分辨荧光测量技术等优点, 成为一种灵敏、精密的非同位素分析方法. 已应用于时间分辨荧光免疫分析等许多领域.

用 EALL 法测定了碱性磷酸酶 (AP). 基本原理如下. AP 作用于底物 5-氟水杨酸磷酸酯 (5-FSAP), 水解生成 5-FSA. 它与铽-乙二胺四乙酸 (Tb-EDTA) 螯合物作用时, 生成荧光寿命长、产额高的 Tb-EDTA: 5-FSA 三元复合物. 用时间分辨荧光仪测量荧光强度而确定 AP 的量.

1 材料和方法

1.1 材料

5-FSAP: 本所研制^[4]. Tb₄O₇: 上海跃龙有色金属公司. AP: Sigma 公司产品. 12 孔微滴定板条: 芬兰 Labsystem 公司产品.

1.2 仪器

LKB-Wallac Arcus-1230 时间分辨荧光仪. LKB-Wallac 1296-001 板式振荡器. ADIL 公司自动微滴定板洗涤器.

1.3 实验方法

1.3.1 溶液制备: AP 稀释缓冲液: 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), 每升含 6 g BSA 和 0.5 g NaN₃. AP 标准溶液: 用 AP 稀释缓

* 国家自然科学基金资助课题 (39370223).

收稿日期: 1996-10-30, 修回日期: 1997-06-17

冲液稀释 AP 成 $1.22 \times 10^4 \sim 3.90 \times 10^{-1}$ U/L 系列浓度. 底物缓冲液: 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0), 含 0.1 mol/L NaCl 和 0.01 mol/L MgCl_2 . 5-FSAP 储备液及工作液: 5-FSAP 溶于 0.1 mol/L NaOH 中, 制得 1.016×10^{-2} mol/L 5-FSAP 溶液, 存于 4°C , 为储备液. 用前, 用底物缓冲液稀释 10 倍, 得 5-FSAP 工作液. 荧光发展溶液: 第一步: 0.05 mol/L Tb:0.05 mol/L EDTA:0.1 mol/L HCl (体积比为 1:1:8), 得 0.005 mol/L Tb-EDTA 0.01 mol/L HCl 溶液. 用前进行第二步: 0.005 mol/L Tb-EDTA 0.01 mol/L HCl:2.5 mol/L Tris:水 (体积比为 1:1:3), 得 0.001 mol/L Tb-EDTA 0.5 mol/L Tris 液.

1.3.2 AP 与 5-FSAP 的作用时间对标准曲线的影响: 每孔加入 100 μl 5-FSAP 工作液和 20 μl AP 标准液 (本底孔加 20 μl AP 稀释缓冲液), 振荡 1 min, 室温下分别作用 5、10 和 20 min 后, 每孔再加入 100 μl 荧光发展溶液, 振荡 1 min, 静置 5 min 后, 用 TRF 仪测荧光强度. 以 T 和 B 分别表示总荧光强度 (CPS) 和本底荧光强度, 以 $(T-B)/B$ 比值对 AP 浓度作图. 从图中选定作用时间为 20 min.

1.3.3 荧光发展溶液的 pH 值对标准曲线的影响: 测定方法与 1.3.2 基本相同, 但荧光发展溶液的 Tris 浓度不同, 故 pH 值不同. 从改进灵敏度和稳定性考虑, 选定 pH=11, 此时 Tris 浓度为 0.6 mol/L.

1.3.4 开始测量荧光的时间对标准曲线的影响: 测定方法与 1.3.3 同, 只是在加入荧光发展溶液且振荡后的第 0、10、20 和 30 min 开始测量荧光. 观察测量荧光的时间对标准曲线的影响. 从兼顾灵敏度、稳定性和标准曲线线性范围考虑, 选定开始测量荧光的时间为第 30 min.

1.3.5 甲基硅油 (I) 对 $(T-B)/B$ 稳定性的影响: 为减小开始测量荧光的时间对 $(T-B)/B$ 的影响, 每孔加入 100 μl 5-FSAP 工作液、20 μl 4.85×10^2 U/L AP 标准液 (本底孔加 20 μl AP 稀释缓冲液). 其他条件与

1.3.4 同, 只是在加入荧光发展溶液且振荡 1 min 后, 每孔再加入不同体积的甲基硅油 (I), 且在不同时间测荧光强度. 实验选定加 40 μl 硅油.

1.3.6 分析程序及特性指标: 综上实验, 确定分析程序为: 每孔加入 100 μl 5-FSAP 工作液, 20 μl AP 标准液 (本底孔为 20 μl AP 稀释缓冲液) 或血清, 振荡 1 min. 室温反应 20 min. 每孔加入 100 μl 荧光发展溶液, 其 Tris 浓度为 0.6 mol/L. 振荡 1 min 后, 每孔加入甲基硅油 (I) 40 μl . 第 10 min 开始测荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 AP 与 5-FSAP 作用时间对标准曲线的影响

图 1 中示出在所列 AP 浓度范围中, 作用时间较长时, $(T-B)/B$ 均有所升高, 尤以高浓度段明显. 以 20 min 时的标准曲线的线性 and 灵敏度更好, 选作用时间为 20 min 或稍长.

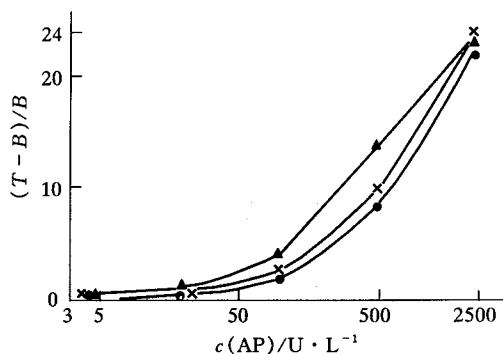


图 1 AP 与 5-FSAP 作用时间对标准曲线的影响

●—●: 5 min; ×—×: 10 min; ▲—▲: 20 min.

2.2 荧光发展液 pH 值对标准曲线的影响

当 pH 分别为 11 和 13 时, 标准曲线的线性都较好. 当 pH=11 时, 其 $(T-B)/B$ 在高浓度段较低, 但在低浓度段却较高, 选定 pH=11, 此时 Tris 浓度为 0.6 mol/L.

2.3 测量荧光的时间对标准曲线的影响

由图 2 可见, 随开始测量荧光的时间延迟, 标准曲线有些变化. 随时间延迟, $(T-B)/B$ 在高浓度段上逐渐有所降低, 而在中、低浓度段上略有升高, 标准曲线的线性

部分略有缩短. 为兼顾灵敏度、稳定性和线性, 选定开始测量荧光时间为 10 min.

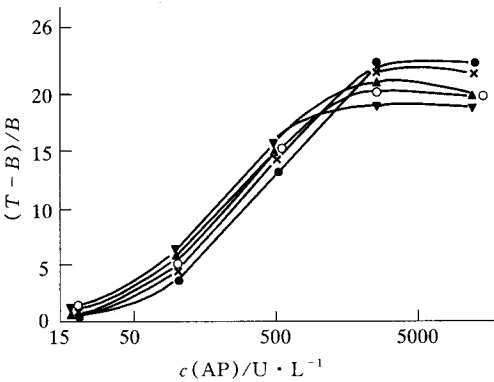


图 2 测量开始时间对标准曲线的影响
●—●: 0 min; ×—×: 10 min; ▲—▲: 20 min;
○—○: 25 min; ▼—▼: 30 min.

2.4 甲基硅油(I)对 $(T-B)/B$ 稳定性的影响

图 3 中纵坐标 R 为不同测量时间的不加硅油的 $(T-B)/B$ 为 1 的归一化值. 可见, 加入硅油可明显减小 $(T-B)/B$ 随开始测量时间的变化. 当分别加入 20、40 和 60 μl /孔硅油时, 10~60 min 内, $(T-B)/B$ 变化在 5% 左右, 且硅油量大时变化小. 当硅油为 60 μl /孔时, 直至 415 min, 变化也小于 5%. 选定 40 μl /孔硅油.

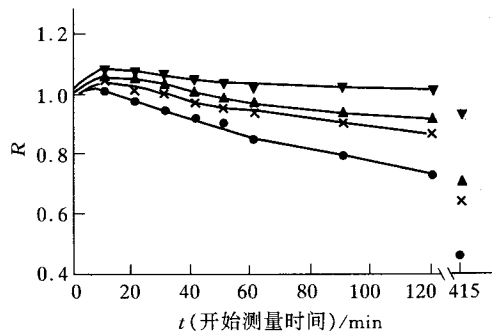


图 3 甲基硅油 (I) 对信/噪比稳定性的影响
●—●: 0 μl /孔; ×—×: 20 μl /孔; ▲—▲:
40 μl /孔; ▼—▼: 60 μl /孔.

12.5 方法的特性指标

2.5.1 标准曲线: 标准曲线见图 4. 回归方

程为 $Y = 2.8899 + 0.4993X$, $r = 0.9374$. 线性段大于二个数量级.

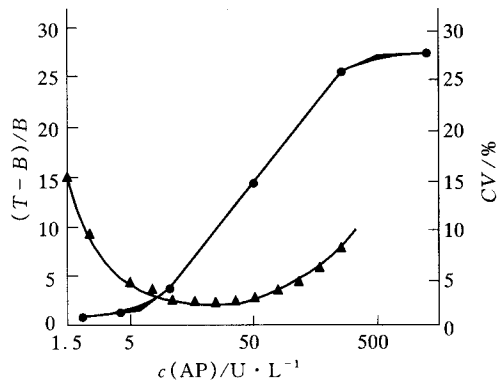


图 4 EALL 法测定 AP 的标准曲线和精密度图
●—●: 标准曲线; ▲—▲: 精密度图.

2.5.2 灵敏度: 以零标准 + $2s$ ($n = 6$) 的相应浓度计, 为 4 U/L.

2.5.3 准确度: 分别加入 20 μl 不同浓度的 AP 标准液. 每个浓度为 6 个平行样. 对期望值为 2.43×10^3 U/L 和 9.70×10^1 U/L 的测量值分别为 2.22×10^3 U/L 和 1.03×10^2 U/L, 相应的相对误差分别为 8.66% 和 6.18%.

2.5.4 精密度: 精密度图见图 4. 精密度为 10% 的浓度范围是 $2.00 \sim 3.02 \times 10^2$ U/L. 批内、批间精密度如下. 批内每种 AP 浓度 6 个平行样. 批间每种 AP 浓度 6 个平行样, 共 3 批. 批内和批间的测量均值分别为 $(2.20 \pm 0.36) \times 10^3$ 、 $(1.03 \pm 0.06) \times 10^2$ 及 $(2.30 \pm 0.67) \times 10^3$ 、 $(1.02 \pm 0.11) \times 10^2$ U/L. 相应的 CV% 分别为 16.2%、6.31% 和 29.13%、10.78%. 其中的高浓度样品的精密度较差, 是由于其浓度不在标准曲线线性段内.

2.6 血清中 AP 浓度的测定

测定血清液中 AP 浓度为 2.45 U/L, 分别加入 2.43×10^1 和 9.75×10^{-1} U/L 的 AP 标准液后的测得值相应地为 2.48×10^1 和 3.25 U/L, 回收率分别为 93% 和 95%.

EDTA 与金属离子的反应只是 EDTA 的阴离子形式在起作用, 当 $\text{pH} > 10.26$ 时, 特

别是当 $\text{pH} > 13$ 时, 水中的 EDTA 才主要以阴离子形式出现. 此时才能形成 $\text{Tb}:\text{EDTA}:5\text{-FSA}$ 高荧光三元复合物. 所以荧光发展溶液的 Tris 浓度要适当高, 或者是再加入适量的 NaOH, 保证高 pH 值. 但此情况下, 荧光发展溶液易吸收空气中的 CO_2 . 为此, 在配制荧光发展溶液时, Tris 液应即配即用并密封. 即使这样, 测量过程中, $(T-B)/B$ 随测量时间延长也稍有变化. 因此, 在测荧光强度之前, 加入 $40 \mu\text{l}/\text{孔}$ 甲基硅油 (I), 不仅可提高 $(T-B)/B$ 的值, 而且可提高其稳定性. 因为硅油的加入一方面增加了荧光的反射率, 另一方面起到隔离空气的作用, 未见文献报道.

在荧光发展溶液研究中, 进行了 EDTA 对 Tb 摩尔比过量实验. 结果显示, 摩尔比为 1 或稍大时, 发展荧光的效果最好, 最大不超过 2. 这是由于 EDTA 与金属离子形成配位比为 1:1 的配合物. 另外, 观察到 EDTA-Tb 溶液在 EDTA 过量时, 出现白色沉淀. 但加入 Tris 液后, 沉淀消失, 可能与 pH 有关.

Eu^{3+} 螯合物的发射最大波长为 615 nm, 而 Tb^{3+} 螯合物的发射最大波长为 547 nm, 其他还有 491、587 和 624 nm 发射峰. 而实验中, 用测量 Eu^{3+} 螯合物的条件来测 Tb^{3+} 螯合物, 主要测得是 Tb^{3+} 的 624 nm 峰. 但有文献报道, 在 Tb^{3+} 螯合物的 4 个发射峰上, 所获得的信/噪比与在 615 nm 上所获得的信/噪比很相近. 因为在 Tb^{3+} 螯合物的峰处, 不仅信号计数率增大, 而且本底计数率也相应增大^[5].

EALL 法测定 AP 是灵敏的, 原因之一是可以过量 5-FSAP 存在情况下, 测量其产物 5-FSA. 因为 $\text{Tb}^{3+}:\text{EDTA}:5\text{-FSA}$ 三元复合物对 337 nm 的激发波长吸收最大, 而底物 5-FSAP 的吸收只为本底水平. 而且, 5-FSAP 与 EDTA- Tb^{3+} 之间极小或根本不形成三元复合物^[6].

参 考 文 献

1 Diamandis E P, Kitching R, Christopoulos T K. Enzyme-

amplified time-resolved fluoroimmunoassays. Clin Chem, 1991, 37 (6): 1038

2 Bobrow N M, Harris T D, Shaughnessy K J *et al.* Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Method, 1989, 125 (1-2): 279~285

3 Evangelista R A, Pollak A, Gudgin-Templeton E F. Enzyme-amplified lanthanide luminescence for enzyme detection in bioanalytical assays. Anal Biochem, 1991, 197 (1): 213~224

4 李美佳, 赵启仁, 庄湘莲等. 酶放大时间分辨荧光免疫分析酶底物试剂 5-氟水杨酸磷酸酯的研制. 中国医学科学院学报, 1997, 19 (2): 106

5 Papanastasiou-Diamandi A, Christopoulos T K, Diamandis E P. Ultrasensitive thyrotropin immunoassay based on enzymatically amplified time-resolved fluorescence with a terbium chelate. Clin Chem, 1992, 38 (4): 545~548

6 赵启仁, 李美佳, 刘 洁等. 酶放大镧系元素发光法测定碱性磷酸酶. 见: 中国生物物理学会光生物学专业委员会主编. 第四届全国光学生物学术交流会论文摘要汇编. 西安: 中国生物物理学会, 1996. 50

Enzyme-amplified Lanthanide Luminescence Assay of Alkaline Phosphatase. ZHAO Qi-ren, LI Mei-jia, LIU Jie, SONG Na-ling, ZHUANG Xiang-lian, CHEN Ai, LIN Han (*Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China*).

Abstract An enzyme-amplified lanthanide luminescence assay of alkaline phosphatase was described. Optimization of important factors in this assay was studied. Improvement of stability of signal/noise ratio by using methyl silicon oil (I) was first reported. The sensitivity and the accuracy of the assay were 4 U/L and < 10% respectively. The concentration range corresponding to 10% precision was $2.00 \sim 3.02 \times 10^2$ U/L. The activity of alkaline phosphatase in serum was also detected and the recovery was 93% ~ 95%. 5-fluorosalicyl phosphate was synthesized and used as substrate.

Key words enzyme-amplified lanthanide luminescence assay, enzyme-amplified time-resolved fluorescence assay, alkaline phosphatase