

技术与方法

解离增强镧系元素
荧光免疫分析灵敏度的改进*

赵启仁 张福华 刘洁 林汉

(中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192)

摘要 为提高解离增强镧系荧光免疫分析(DELFLIA)的灵敏度或信/噪比, 进行了一些重要的方法学研究. 观察到了对于不同的镧量, 荧光响应和信/噪比都随着增强液体积而明显地变化. 对于确定的镧量, 存在一个最佳体积, 且镧量越小, 其最佳体积也越小. 实验中选择最佳体积是重要的. 研究了增强液制备技术, 发展了微滴定板条有效的清洗和干燥方法, 使本底荧光明显降低.

关键词 时间分辨荧光免疫分析, 解离增强镧系荧光免疫分析, 灵敏度

时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)用镧系元素作为标志物和用时间分辨技术测量荧光使其成为全新的免疫分析技术. 由于其灵敏度高、特异性好、标记物稳定、动态范围宽、测定快速、不用放射性核素等优点, 发展很迅速. 目前已有解离增强镧系荧光免疫分析(DELFLIA)^[1]、Cyber Fluor 免疫分析^[2]和酶放大 TRFIA^[3]等 3 种系统. 其中 DELFLIA 系统比较成熟, 研究和应用广泛. 它用具有双功能基团螯合剂作桥, 把抗体(或抗原)与 Eu^{3+} 连接起来, 作为标记抗体(或抗原), 然后与抗原(或抗体)进行免疫反应. 但所生成的免疫反应复合物荧光极弱, 只有再加入一种增强液, 把 Eu^{3+} 从复合物上解离下来, 并为增强液中另一种螯合剂所螯合, 在紫外光激发下才会发出强荧光, 这是因为实现了从配位体到 Eu^{3+} 高效率能量传递^[4]. 此系统特点是把实现抗体稳定标记和提高荧光产额分开处理. 由于必须使用增强液, 这就存在着容易受到金属离子污染和增强液的最佳应用等实际问题. 研究和解决这些问题, 以提高灵敏度, 是本工作的目的.

1 材料和方法

1.1 材料

Eu_2O_3 : 99.9%, Koch-Light 公司产品. 三正辛基氧化膦(TOPO): >97%, Fluka 公司产品. β -萘甲酰三氟丙酮(β -NTA): 解放军中南新技术所产品. Triton X-100: BDH 公司产品. 水: 去离子石英亚沸三蒸水. 12 孔微滴定板条: Labsystem Finland 公司产品. 增强液: 冰乙酸 0.1ml, 邻苯二甲酸氢钾 7mmol, Triton X-100 1g, β -NTA 15 μmol , TOPO 50 μmol , 加水至 1L.

1.2 仪器

LKB-Wallac Arcus 1230 时间分辨荧光仪测荧光强度. LKB-Wallac 1296-001 板式振荡器. 上海雷磁仪器厂 DDS-304 型电导率仪.

1.3 方法

1.3.1 增强液体积与其本底荧光的关系 分别测量增强液体积为 50, 100, 150, 200 和 250 μl 时的本底荧光, 每体积制 4 个平行样,

* 国家自然科学基金资助.

收稿日期: 1993-05-03, 修回日期: 1993-08-02

结果取均值。

1.3.2 Eu 的荧光信号和信/噪比与增强液体积的关系 为了对不同的 Eu 量, 确定最佳增强液体积, 进行本实验. 第一组, 先测增强液体积分别为 50, 100, 150, 200 和 250 μl 时的本底荧光. 再每孔加入 EuCl_3 溶液 10 μl (含 Eu $3.3 \times 10^{-12} \text{mol}$), 慢振荡 15min, 静置 15min 后, 测荧光强度. 每个增强液体积制 4 个平行样, 结果取均值, 并计算相应的 Eu 的净计数率和信/噪比. 第二组, 除 Eu 量为 $3.3 \times 10^{-13} \text{mol}$ 外, 其它均与第一组相同.

1.3.3 微滴定板条清洗方法对增强液本底荧光的影响 实验中观察到板条清洁程度对增强液本底荧光影响很大, 且不稳定. 为此进行本实验. 对同一批板条, 分别用 1% EDTA, 3mol/L HCl, 3mol/L NaOH, 95% 乙醇, 三蒸水和洗洁净等单独清洗和不同的组合清洗, 共计 10 种方法, 最后均用三蒸水冲洗 3 次, 白炽灯下防尘干燥. 每种洗法的板条, 均制 12 个平行样, 结果取均值. 先后测空孔计数和加入 200 μl 增强液后的本底荧光.

1.3.4 清洗板条的干燥方法对本底荧光的影响 实验中观察到板条干燥方法对本底荧光有很大影响, 为此进行了比较. 对用防尘白炽灯等 4 种方法干燥的板条, 分别用增 1 号—3 号等 3 种增强液, 每孔加入 200 μl , 测其本底荧光.

1.3.5 增强液制备

增强液制备中水质控制和 $\beta\text{-NTA}$ 和 TOPO 的溶解很重要.

a. 水质控制 水是增强液的重要成分, 其纯度对荧光增强效果影响很大. 用电导率仪测量 6 种水的电导率. 每种水制 4 个平行样, 每样含 50 μl 水和 200 μl 增强液, 振荡、静置各 15min 后, 测荧光强度, 结果取均值.

b. $\beta\text{-NTA}$ 和 TOPO 溶解 $\beta\text{-NTA}$ 和 TOPO 在水中不易溶解. 实验中比较了用冰乙酸、水 (水浴 40°C), 0.1% Triton X-100 和无水乙醇的溶解效果.

2 结果与讨论

2.1 增强液体积与其本底荧光的关系

由图 1 可见, 体积小于 140 μl 时, 其本底荧光强度随体积增加而线性增加. 此后, 增加渐缓, 趋于稳定. 这主要是由于激发光从孔的侧面进入, 而发射光是由孔的底部出去的仪器结构决定的.

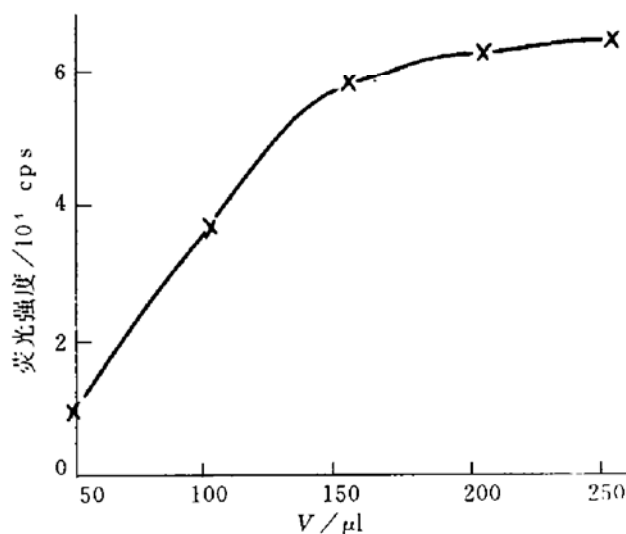


图 1 增强液体积与其本底荧光的关系

2.2 Eu 的荧光信号和信/噪比与增强液体积的关系

由图 2 可见, 信/噪比随增强液体积增加, 起初迅速下降, 约在 140 μl 后下降渐缓. 这主要是由于图 1 所示的增强液的本底荧光随其体积变化的规律所决定的. 对一定的 Eu 量, 存在一个最佳增强液体积, 它对应的荧光强度最大, 第一、第二组的最佳体积分别约为 140 μl 和 120 μl . 而且 Eu 量越小, 这一体积也越小. 这除了与样品的激发光和发射光的光路有关外, 也很可能与增强液中的分子淬灭有关. 我们进行了理论计算. 本文所用增强液的两种主要成分 $\beta\text{-NTA}$ 和 TOPO 的浓度分别为 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ ^[5], 分子量分别为 266 和 387. 根据配位理论, 每个 Eu^{3+} 与 3 个 $\beta\text{-NTA}$ 分子和 2—3 个 TOPO 分子相结合^[2]. 每孔 Eu 量分别为 $3.3 \times 10^{-12} \text{mol}$ 和 $3.3 \times 10^{-13} \text{mol}$, 则 $\beta\text{-NTA}$ 和 TOPO 的克分子过量倍数

的计算结果见表 1. 由表 1 可见, 当 Eu 量为 3.3×10^{-12} mol 而增强液体积为 150 μ l 时, β -NTA、TOPO (2:1) 和 TOPO (3:1) 的克分子过量分别为 2.25×10^2 、 1.14×10^3 和 7.60

$\times 10^2$; 而当 Eu 量为 3.3×10^{-13} mol 时, 这些克分子过量还要增大 10 倍. 当然增强液体积再大时, 克分子过量还要大.

表 1 β -NTA 和 TOPO 对 Eu 的克分子过量

Eu/mol	成 分	增强液体积/ μ l					
		50	100	130	150	200	250
3.3×10^{-12}	β -NTA	7.50×10^1	1.50×10^2	1.97×10^2	2.25×10^2	3.00×10^2	3.75×10^2
	TOPO (2:1) ¹⁾	3.79×10^2	7.58×10^2	9.85×10^2	1.14×10^3	1.51×10^3	1.89×10^3
	TOPO (3:1) ²⁾	2.53×10^2	5.05×10^2	6.57×10^2	7.60×10^2	1.01×10^3	1.26×10^3
3.3×10^{-13}	β -NTA	7.50×10^2	1.50×10^3	1.97×10^3	2.25×10^3	3.00×10^3	3.75×10^3
	TOPO (2:1)	3.79×10^3	7.58×10^3	9.85×10^3	1.14×10^4	1.51×10^4	1.89×10^4
	TOPO (3:1)	2.53×10^3	5.05×10^3	6.57×10^3	7.60×10^3	1.01×10^4	1.26×10^4

1), 2) 分别表示每个 Eu^{3+} 与 2 个或 3 个 TOPO 分子结合.

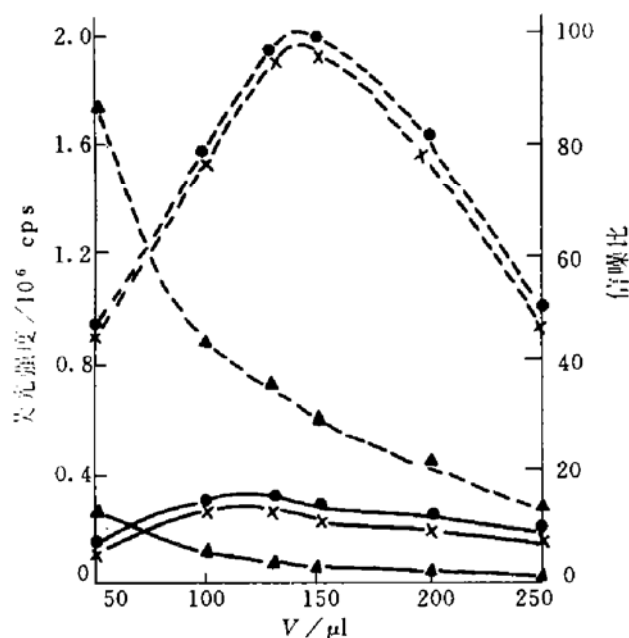


图 2 对不同的 Eu 量荧光信号和信/噪比与增强液体积的关系

Eu 实线: 3.3×10^{-13} mol, 虚线: 3.3×10^{-12} mol.
 荧光信号 ●—●和●—●: 总荧光强度; x—x和x—x: 净荧光强度; ▲—▲和▲—▲: 信/噪比.

总之, 这个实验提示, 在实验中要选择最

佳增强液体积, 因为它对荧光强度和信/噪比的影响是很大的; 同样也要对 β -NTA 和 TOPO 的最佳浓度进行选择.

2.3 微滴定板条清洗方法对增强液本底荧光的影响

表 2 示出板条清洗方法对本底荧光影响很大. 在所比较的 10 种方法中, 以方法 6 的本底荧光最低, 且一致. 它先后用 95% 乙醇和 1% EDTA 各浸泡 12h. 其它各法的本底荧光及其标准差分别为方法 6 的 1.31—4.28 和 1.44—18.5 倍. 空孔本底荧光很低, 且不能用它反映清洗效果.

2.4 板条干燥方法对本底荧光的影响

由表 3 可见, 4 种方法中以防尘自然风干和防尘白炽灯下干燥为好. 温箱烤干法不能用, 对 3 种增强液, 它的本底荧光分别为防尘自然风干的 2.59—6.20 倍. 实验中还观察到, 凡是与测量荧光及制备增强液有关的容器等均不能用温箱干燥的方法, 否则会引起本底荧光大幅度升高, 这是挥发的金属气氛污染的结果.

果.

2.5 增强液制备

从表 4 看到电导率增大时, 荧光强度反而逐渐下降. 这表明, 在电导率一定范围内, 水

质不好对荧光的淬灭作用比水中所含金属离子对本底荧光的贡献还大. 一定选用电导率小的水. 我们实验中用去离子石英亚沸三蒸水, 电导率约 $0.5\mu\text{S}/\text{cm}$.

表 2 板条清洗方法对本底荧光的影响

	清 洗 方 法									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
空孔 (cps $\pm$ SD)	309 $\pm$ 27	302 $\pm$ 23	313 $\pm$ 211	300 $\pm$ 18	310 $\pm$ 25	321 $\pm$ 27	333 $\pm$ 24	324 $\pm$ 32	329 $\pm$ 26	290 $\pm$ 15
本底荧光 (cps $\pm$ SD)	24860 (3.7) ¹⁾	19193 (2.86)	20580 (3.06)	19605 (2.92)	28770 (4.28)	6719 (1.00)	9119 (1.36)	8804 (1.31)	10324 (1.54)	11154 (1.66)
	$\pm$ 10940 (18.48) ²⁾	$\pm$ 2919 (4.93)	$\pm$ 1042 (1.73)	$\pm$ 854 (1.44)	$\pm$ 10959 (18.51)	$\pm$ 592 (1.00)	$\pm$ 857 (1.45)	$\pm$ 2081 (3.52)	$\pm$ 1176 (1.99)	$\pm$ 1310 (2.21)

^{1),2)}分别表示其它方法的底底荧光及其 SD 为方法 6 的倍数.

表 3 板条干燥方法对本底荧光的影响

干燥方法	增 强 液		
	No. 1	No. 2	No. 3
恒温箱 (37℃)	6.20 ¹⁾	3.60	2.59
电扇	1.45	0.91	0.82
白炽灯 (防尘)	1.30	—	—
自然风干 (防尘)	1.00	1.00	1.00

¹⁾以防尘自然风干的底底荧光为 1 的归一化数.

表 4 不同水的荧光强度和电导率

	水					
	No. 1 ¹⁾	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6-
电导率($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1.00	1.00	1.15	1.20	1.20	<100
荧光 (cps $\pm$ SE(%))	23545 $\pm$ 1.0	22878 $\pm$ 0.7	22476 $\pm$ 3.5	20333 $\pm$ 1.2	20428 $\pm$ 3.6	18802 $\pm$ 1.6

¹⁾1 至 6 号水分别是某半导体所、某显像管厂的去离子水, 某化工厂的去离子一蒸水和去离子水、一蒸水及自来水.

在所比较的几种溶解 β -NTA 和 TOPO 方法中, 先用少许无水乙醇把 β -NTA 和 TOPO 溶解, 再配制其它成分, 不仅溶解得好, 而且荧光增强效果也好.

上述实验都是在我们研究工作^[6]实践中遇到问题 and 解决问题时进行的, 未见报道.

参 考 文 献

- 1 Diamandis E P. Clin Biochem, 1988; 21: 139
- 2 Hemmila I. Scand J Clin Lab Invest, 1988; 48: 389
- 3 Anastasia Papanastasiou-Diamandis, Christopoulos T K, Diamandis E P. Clin Chem, 1992; 38: 545
- 4 赵启仁. 国外医学放射医学核医学分册, 1992; 16 (4): 182
- 5 Toivonen E, Hemmila I, Marniemi J *et al.* Clin Chem, 1986; 32 (4): 637
- 6 赵启仁, 林 汉, 张福华等. 中国医学科学院学报, 1993; 16 (3): 230

was modulated by the ratio of different nucleotides in reaction system. Through this binding, the interaction of VIP and its receptor was regulated.

Key words VIP, photo-affinity, nucleotide

Study on Sensitivity Improvement of Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay. Zhao Qiren, Zhang Fuhua, Lu Jie, Lin Han. (*Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 255

Factors influencing the sensitivity, or the signal/noise ratio, of dissociation enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFA) have been studied. The fluorescence responses and signal/noise ratios for different europium amount were shown to be changed with the volume of enhancement solution, and there was an optimum volume at a certain europium amount. The smallest europium amount leads to the smallest optimum volume. 20% of the net fluorescence intensity was increased by using tinfoil reflection layer. Effective washing and drying methods of microtitration strips decreased background fluorescence have been developed.

Key words time-resolved fluoroimmunoassay, dissociation enhanced lanthanide fluoroimmunoassay, sensitivity

Purification of Cuprozinc Superoxide Dismutase From Human Erythrocytes by Cu^{2+} Chelate Affinity Chromatography. Lu Xing, Chen Jizhong, Li Peifeng, Yang Suhong, Fang Yunzhong. (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 259

Cuprozinc superoxide dismutase (CuZn-SOD)

from human erythrocytes was purified by a procedure involving Cu^{2+} chelate affinity chromatography. It was shown in three experiments that the special chromatography held a number of important advantages for protein purification, such as a high rate of repeating performance and a large protein capacity. The purified enzyme, with a specific activity of 3073 U/mg protein, was tested for homogeneity by activity-stained and SDS gel electrophoresis. Accompanied by the study, a simple and efficient method was worked out for assessing the homogeneity of CuZn-SOD using its ratio of the absorbance at 260nm to that at 280nm.

Key words cuprozinc superoxide dismutase, metals-chelate affinity chromatography, human erythrocyte, purification

Determination of Isoenzyme 1 of Lactate Dehydrogenase by an Immunoprecipitation Method.

Wu Xiyun, Yue Xiuling, Chen Yan, Si Xuezhong, Wang Zhongquan. (*Clinic Laboratory, Beijing TianTan Hospital, Beijing 100050*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 262

Isoenzyme 1 of lactate dehydrogenase (LD1) was measured by an immunoprecipitation method. The antibody to M subunit of LD was added to the patient's serum and incubated for 5 min, at room temperature. The ratio of serum to antibody was 10 : 1. After incubation, a saturated ammonium sulphate solution was added with the same volume as serum. Then, centrifuged to precipitate all M-containing isoenzyme (LD2—LD5) as insoluble antigen-antibody complex. Determined the residual activity of LD in supernatant fluid. The relationship Between the LD activity and absorbance was linear up to 618U/L. Within-run