

## • 方法研究 •

## 新型钬络合物用于 HBsAg 的时间分辨荧光免疫检测

朱艳冰<sup>1</sup>, 李庆阁<sup>1</sup>, 王桂兰<sup>2</sup>, 袁景利<sup>2</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116012)

**摘要:** 利用稳定的新型钬荧光络合物 BHHCT 与  $\text{Eu}^{3+}$  标记羊抗人 HBsAb 和  $\text{Eu}^{3+}$  标记 BSA-SA, 建立定量测定血清 HBsAb 的  $\text{Eu}^{3+}$ -BHHCT-HBsAb-TRFIA 法和  $\text{Eu}^{3+}$ -BHHCT-BSA-SA-TRFIA 法。结果表明, 这两种方法最低检出值分别为 0.2 ng/mL 和 0.05 ng/mL, 标准曲线范围均为 0-100 ng/mL, 批内变异系数 CV 均小于 10%, 后者回收率为 85%-115%。用  $\text{Eu}^{3+}$ -BHHCT-BSA-SA-TRFIA 法与 ELISA 法同时检测 118 份血清样品, 结果表明前者的检出率比后者高。

**关键词:** 钬荧光络合物; 时间分辨荧光免疫分析法; 乙型肝炎病毒表面抗原; 定量测定

**中图分类号:** R446.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-1703(2002)03-0157-04

时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 作为一种高灵敏的定量免疫测定方法, 近年来应用范围不断扩大<sup>[1-4]</sup>。目前应用的主要是 Wallac 公司的 DELFIA 系统, 该系统开发最早, 技术成熟, 灵敏度高, 是临床应用的主要定量免疫测定技术。该系统的缺点是免疫反应完成后, 需要一个  $\text{Eu}^{3+}$  溶出步骤才能测定。由于溶出液中存在过量  $\beta$ -萘酰三氟丙酮, 使得背景信号升高, 并易引入环境中  $\text{Eu}^{3+}$  的干扰。加拿大 Diamandis 等<sup>[2]</sup> 采用一种稳定的荧光  $\text{Eu}^{3+}$  络合物, 开发出固相测定的 FIAgen 系统, 基本克服了 DELFIA 系统的不足。但由于络合物荧光效率低, 使得 FIAgen 系统的灵敏度低于 DELFIA 系统。最近 Yuan 等<sup>[5]</sup> 合成出一种稳定的能发出强烈荧光的  $\text{Eu}^{3+}$  络合剂 4,4'-二(1',1',1',2',2',3',3'-七氟-4',6'-己二酮-6'-基)-氯磺酰-邻三联苯 (BHHCT), 可以作为标记物直接固相检测, 已用于固相 TRFIA 法测定 AFP、IgE、TSH 等, 使其灵敏度极大提高<sup>[5-7]</sup>。

乙型肝炎是我国重点防治的流行性传染病之一, 乙肝表面抗原 (HBsAg) 是乙肝病毒的一个检测指标。医学上研究乙肝和乙肝防治, 特别是观察疗效, 都需要定量的分析手段。目前, 测定 HBsAg 的

方法有 ELISA<sup>[8]</sup>、RIA<sup>[9]</sup>、胶体金免疫层析法 (GICA)<sup>[10]</sup>、斑点金免疫渗滤法 (DIGFA)<sup>[11]</sup> 等, 以 ELISA 为主。这些方法中除 RIA 之外, 灵敏度均低, 如 ELISA、GICA 的灵敏度只有 1 ng/mL, 且属定性或半定量方法。RIA 虽可以进行定量分析, 并具有较高的灵敏度, 但由于放射性同位素半衰期短, 存在放射性污染及废液处理等问题, 应用范围日渐缩小。

本文以  $\text{Eu}^{3+}$ -BHHCT 标记 HBsAb 和 BSA-SA, 分别建立了双抗体夹心的 TRFIA, 用于定量测定 HBsAg, 获得了满意结果, 灵敏度高于现有方法, 且具有不受样品背景荧光干扰、精密度好、标准曲线线性范围宽等优点, 加上标记物制备简便、稳定, 显示出良好的应用前景。

## 材料与amp;方法

## 1 试剂

BHHCT: 按文献[5]合成; 链霉亲和素 (SA): Chemicon 公司; BSA 第五组分: Sigma 公司; 生物素化试剂 sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido) hexanoate (NHS-LC-Biotin): Pierce 公司; 鼠抗人 HBs 单克隆抗体、羊抗人 HBsAb、HBsAg 阳性血清及血清标本均由厦门新创科技有限公司提供; HBsAg 标准参比品: 中国药品生物制品检定所产品;

Sephadex G-50 (Pharmacia) 分离柱: 10mm × 420mm, 自制; 96 微孔板条 (FluoroNunc plate): Nunc 公司; 乙肝病毒表面抗原酶联免疫诊断试剂盒: 厦门新创科技有限公司; 实验中所用稀释液为含 0.2% BSA、0.9% NaCl 及 0.1% NaN<sub>3</sub> 的 0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.8), 洗涤液 iv 为含 0.05% Tween-20 的 0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.8), 洗涤液 ㊟为不含 Tween-20 的洗涤液 iv, 洗涤液 ㊠为含 0.05% Tween-20 的 0.05mol/L Tris-HCl (pH 9.1); 封闭液为含 0.5% BSA 及 0.05% NaN<sub>3</sub> 的 0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.8); 本文中有机试剂或固体药品均为国产分析纯或更高级别。

2 仪器

7500 紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); 1420 Victor<sup>2</sup> Multiple Counter (Wallac 公司)。

3 Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - HBsAb 的制备

羊抗人 HBsAb 溶液(5mg/mL) 对 3L 0.9% NaCl 于 4℃ 透析两次, 每次 24hr。反应液加水调浓度至 1.5mg/mL。取 0.6mL 该抗体溶液, 加入 1mL NaHCO<sub>3</sub> (0.2mol/L), 并用 1mol/L NaOH 调 pH 至 9.1。将 20μL BHHCT 甲醇溶液(30μg/mL) 滴加到搅拌下的抗体溶液中, 并继续搅拌反应 1hr。离心(10000r/min, 10min) 除去不溶物后, 上 Sephadex G-50 柱, 用 0.05mol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.0) 洗脱, 分离标记蛋白质和游离的标记物。紫外/可见分光光度计检测各收集液的 A<sub>330</sub> 值, 合并含有标记抗体溶液。加入终浓度为 0.1% 的 BSA 和 0.05% 的 NaN<sub>3</sub>, 用 1mol/L HCl 调 pH 至 6.2。分装后 -20℃ 储存备用。使用前加入 EuCl<sub>3</sub> 溶液 (BHHCT 与 Eu<sup>3+</sup> 等摩尔浓度), 用稀释液稀释 25 倍使用。

4 Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - BSA - SA 的制备

按文献[6]中的制备过程。使用前加入 EuCl<sub>3</sub> 溶液(BHHCT 与 Eu<sup>3+</sup> 等摩尔浓度), 于 56℃ 下加热 2hr, Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - BSA - SA 用稀释液稀释 500 倍使用。

5 羊抗人 HBsAb 的生物素化

制备过程参照文献[7]。用稀释液稀释 2000 倍使用。

6 Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - HBsAb - TRFIA 法测定 HBsAg

鼠抗人 HBs 单克隆抗体用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至 7μg/mL, 每孔加 100μL, 置 4℃ 包被

24hr。用洗涤液 iv 洗两次, 再用洗涤液 ㊟洗一次, 扣干。每孔加入 150μL 封闭液, 37℃ 封闭 1hr。用洗涤液 iv 洗两次, 洗涤液 ㊟洗一次, 扣干。每孔加入 50μL HBsAg 标准品或血清样品[HBsAg 标准品用含 5% BSA、0.9% NaCl 及 0.1% NaN<sub>3</sub> 的 0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.8) 样品稀释液梯度稀释], 37℃ 温育 1hr。用洗涤液 iv 洗两次, 洗涤液 ㊟洗一次, 扣干。每孔加入 50μL Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - HBsAb 溶液, 37℃ 温育 1hr。用洗涤液 ㊠洗四次, 扣干。于 1420 Victor<sup>2</sup> Multiple Counter 固相测定, 测定条件设为: 340nm 激发, 615nm 荧光测定, 延长时间 200μs, 计数时间 400μs。

7 Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - BSA - SA - TRFIA 法测定 HBsAg

包被、封闭及加 HBsAg 标准品或血清样品的步骤同上。洗板后加入 50μL 生物素标记的 HBsAb 溶液, 37℃ 渐育 1hr。用洗涤液 iv 洗两次, 洗涤液 ㊟洗一次, 扣干后每孔加入 50μL Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - BSA - SA 溶液, 37℃ 温育 1hr。用洗涤液 ㊠洗四次, 扣干。测定方法同上。定性分析时, 若空白孔加抗原稀释液(平均 cps 为 N), 测定孔加待测血清(平均 cps 为 P), 对照孔加阳性血清, 则结果以 Pcps/Ncps ≥ 2.1 时为 HBsAg 阳性。

结果

1 Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - HBsAb - TRFIA 法测定 HBsAg

Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - HBsAb - TRFIA 法标准曲线如图 1 所示。标准曲线范围为 0-100ng/mL, 根据文献[12]公式, 计算 HBsAg 最低检出限为 0.2ng/mL, 检测标准品的批内变异系数(CV) 小于 10%。

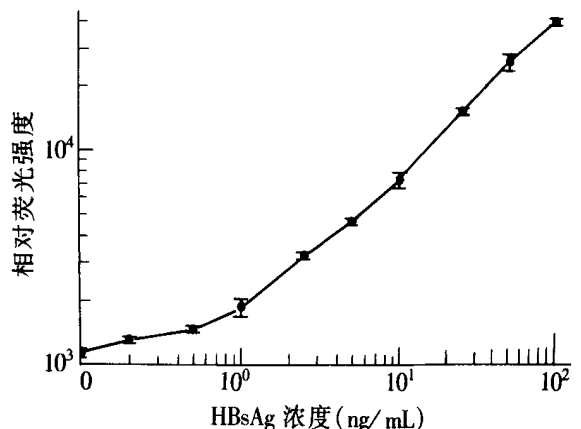


图 1 Eu<sup>3+</sup> - BHHCT - HBsAb - TRFIA 测定 HBsAg 标准曲线

2  $\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT - BSA - SA - TRFIA 法测定 HBsAg

$\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT - BSA - SA - TRFIA 法标准曲线见图 2。标准曲线范围为 0- 100ng/mL, 计算 HBsAg 最低检出限为 0.05ng/mL, 测定 HBsAg 阳性血清的批内 CV 小于 10%, 回收率范围为 85% - 115%。

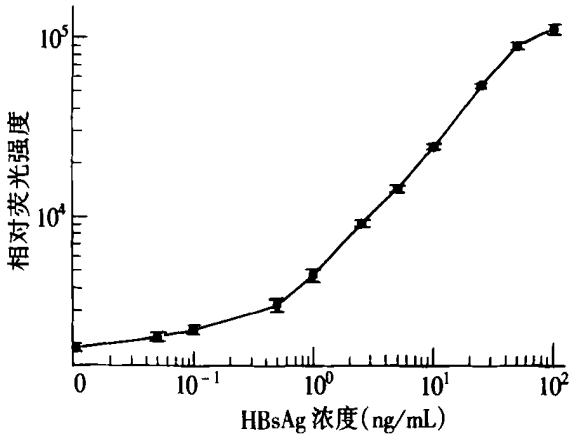


图 2  $\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT - BSA - SA - TRFIA 测定 HBsAg 标准曲线

HBsAg 标准品与 HBsAg 阳性血清倍比稀释的测定曲线见图 3, 从图中结果可见两者基本平行, 在稀释范围内均反映出良好的 HBsAg 定量关系。

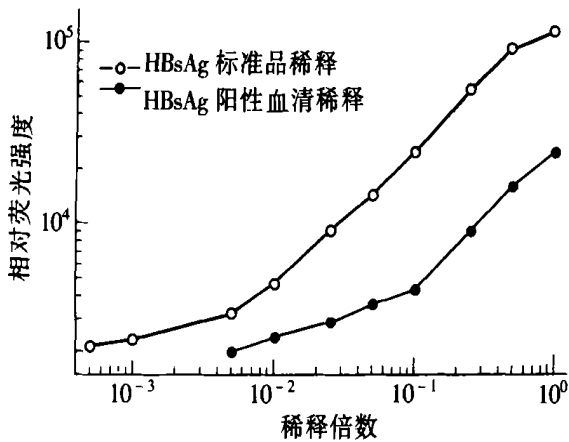


图 3  $\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT - BSA - SA - TRFIA 测定 HBsAg 标准品与 HBsAg 阳性血清倍比稀释曲线

### 3 与 ELISA 法测定 HBsAg 比较

用  $\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT - BSA - SA - TRFIA 法与 ELISA 法同时检测 118 份人血清样品 HBsAg。其中有 25 份两种方法检测结果均为阳性, 但用

ELISA 检测 HBsAg 93 份为阴性的血清中, 有 4 份用 TRFIA 检出 HBsAg 为阳性, 这 4 份血清经临床诊断确实为 HBsAg 患者。可见 TRFIA 法检出率高于 ELISA 法。

### 讨 论

BHHCT 是一种新型多齿  $\beta$ - 二酮型络合剂<sup>[5]</sup>, 和传统的  $\beta$ - 二酮型络合物相比, 荧光效率更高, 特别是 BHHCT 和  $\text{Eu}^{3+}$  的络合常数(约  $2 \times 10^{10} \text{L/mol}$ )大, 络合物十分稳定, 荧光寿命达 400ps 以上, 而且可以在温和条件下通过其磺酰氨基与蛋白质的氨基共价结合, 因此, 可直接用于固相测定。

本文采用  $\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT - HBsAb - TRFIA 法检测 HBsAg 的灵敏度为 0.2ng/mL, 高于 DELFIA 系统直接标记 HBsAb 检测 HBsAg 灵敏度(约 0.5ng/mL)<sup>[13]</sup>, 说明采用  $\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT 直接固相测定方式, 灵敏度可超过 DELFIA 系统。

将 BSA - SA 引入到 TRFIA 测定系统中, 与  $\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT - HBsAb - TRFIA 法相比,  $\text{Eu}^{3+}$  - BHHCT - BSA - SA - TRFIA 法测定 HBsAg 的灵敏度又有进一步的提高。这是因为 BSA - SA 分子可以偶联更多的 BHHCT 分子, 构成一个多重标记系统。Diamandis 等<sup>[14]</sup>曾报道, 在 TRFIA 中使用  $\text{Eu}^{3+}$  标记 SA - TG (甲状腺球蛋白) 比单标记 SA 在灵敏度上将大大提高, 但是 SA - TG 复合物制备复杂, 价格昂贵。相比之下, 本文实验中使用戊二醛制备 BSA - SA 复合物, 操作更为简单。

本文采用 BHHCT 所建立的两组 TRFIA 测定血清中 HBsAg 的灵敏度均超过 DELFIA, 工作曲线范围和精密度符合临床要求, 加上固相测定简单, 与 DELFIA 相比优势明显, 适合临床推广应用。

### 参考文献:

- [1] Hemmi I, Dakubu S, Mikkala V M, et al. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays [J]. Anal Biochem, 1984, 137: 335- 343.
- [2] Morton R C, Diamandis E P. Streptavidin- based macromolecular complex labelled with a europium chelator suitable for time-resolved fluorescence immunoassay applications [J]. Anal Chem, 1990, 62: 1841- 1845.
- [3] Christopoulos T K, Diamandis E P. Enzymatically amplified time-resolved fluorescence immunoassay with terbium chelates [J]. Anal Chem, 1992, 64: 342- 346.
- [4] Mathis G. Rare earth cryptates and homogeneous fluorimunoassays with human sera [J]. Clin Chem, 1993, 39(9):

- 1953– 1959.
- [5] Yuan J, Matsumoto K. A new tetradentate  $\beta$ -diketonate-europium chelate that can be covalently bound to proteins for time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *Anal Chem*, 1998, 70: 596– 601.
- [6] Yuan J, Wang G, Kimura H, et al. Highly sensitive time-resolved fluoroimmunoassay of human immunoglobulin E by using a new europium fluorescent chelate as a label [J]. *Anal Biochem*, 1997, 254: 283– 287.
- [7] Yuan J, Wang G, Kimura H, et al. Sensitive time-resolved fluoroimmunoassay of human thyroid-stimulating hormone by using a new europium fluorescent chelate as a label [J]. *Anal Sci*, 1998, 14: 421– 423.
- [8] 徐品. 六种国产乙肝表面抗原 ELISA 诊断试剂盒的对比分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2000, 10(3): 353– 355.
- [9] 徐哲, 孔繁信. 乙肝表面抗原固相放大定量药盒的特性 [J]. *同位素*, 1997, 10(3): 163– 167.
- [10] 周继文, 戎广亚, 杨守纯, 等. 胶体金免疫层析法检测乙型肝炎病毒表面抗原 [J]. *中华医学检验杂志*, 1998, 21(1): 30– 32.
- [11] 纪爱芳, 郭进军, 郭止不. 斑点金免疫渗滤法快速检测乙肝表面抗原 [J]. *长治医报*, 2000, 14(1): 57– 58.
- [12] Kropf J, Quitte E, Gressner A M. Time-resolved immunofluorometric assays with measurement of a europium chelate in solution: application for sensitive determination of fibronectin [J]. *Anal Biochem*, 1991, 197: 258– 265.
- [13] Siitara H, Hemmi E, Soini E, et al. Detection of hepatitis B surface antigen using time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *Nature*, 1983, 301: 258– 260.
- [14] Diamandis E P, Morton R C, Reichstein E, et al. Multiple fluorescence labeling with europium chelators. Application to time-resolved fluoroimmunoassays [J]. *Anal Chem*, 1989, 61: 48– 53.

## Time-resolved Fluoroimmunoassay for Hepatitis B Surface Antigen Using a New Europium Fluorescent Chelate

ZHU Yan-bing<sup>1</sup>, LI Qing-ge<sup>1</sup>, WANG Gui-lan<sup>2</sup>, et al.

(1. The Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering of the Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116012, China)

**Abstract:** A new and stable fluorescent europium chelate  $\text{Eu}^{3+}$ -BHHCT was used as a label to develop two time-resolved fluoroimmunoassays for HBsAg. One was  $\text{Eu}^{3+}$ -BHHCT-HBsAb-TRFIA, another was  $\text{Eu}^{3+}$ -BHHCT-BSA-SA-TRFIA. The detection limits of the two methods were 0.2ng/mL and 0.05ng/mL respectively. The standard curves for both methods were in the ranges of 0–100ng/mL and the within-run coefficient variations were less than 10%. The recovery rates of latter method were within 85%–115%. 118 patient samples were totally detected by  $\text{Eu}^{3+}$ -BHHCT-BSA-SA-TRFIA and compared with a conventional ELISA, the results showed that the former could detect more positive samples than the latter.

**Key words:** Europium fluorescent chelate; Time-resolved fluoroimmunoassay; Hepatitis B surface antigen; Quantitative assay

(许瑞吉 编委审 陈泮藻 编辑)