



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101231288 B

(45) 授权公告日 2011. 08. 10

(21) 申请号 200810030614. 9

(22) 申请日 2008. 01. 31

(73) 专利权人 丁克祥

地址 510515 广东省广州市白云区广州大道北 1838 号南方医科大学东院 B 栋 A 门 0406 室

(72) 发明人 丁克祥 吴朝阳 刘卫国 费定宇 刘莉 丁宇

(74) 专利代理机构 岳阳市科明专利事务所 43203

代理人 彭乃恩

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1414017 A, 2003. 04. 30, 全文.

AU 2006220500 A1, 2006. 09. 14, 全文.

US 2002073441 A1, 2002. 06. 13, 全文.

WO 2005077065 A3, 2005. 12. 22, 全文.

审查员 杨冀川

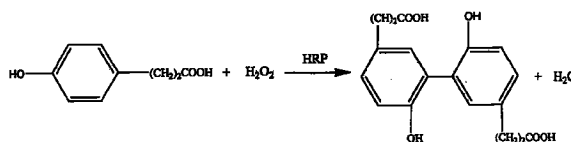
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种基于磁性纳米微粒的人胸苷激酶荧光免疫分析新方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于磁性纳米微粒的人胸苷激酶荧光免疫分析新方法。本发明建立一种快速简便的高通量人胸苷激酶 (hTK1) 免疫检测技术, 用于 hTK1 的临床检测。主要通过戊二醛将 hTK1 共价固定于氨基硅烷化的超顺磁性纳米颗粒固定化载体表面, 采用竞争性免疫分析方法, 以辣根过氧化物酶为酶标记、对羟基苯丙酸为荧光底物, 实现了对 hTK1 的测定。本方面采用的硅烷化的核壳型磁性纳米颗粒可均匀分散在液相中, 具有固定均匀、特异性高、重现性好、反应速度快等特点, 在外加磁场的作用下, 可快速有效地实现核壳型磁性纳米颗粒的免疫复合物与反应液的分离与富集, 分析方法操作简单、准确、灵敏、快速, 易于实现自动化检测, 可完成大批量的测试任务。



1. 一种基于磁性纳米微粒的人胸苷激酶荧光免疫分析方法,其特征在于,人类 I 型胸苷激酶包被的核壳型磁性颗粒的制备包括以下步骤:

1) 磁性纳米颗粒的制备:采用液相共沉淀方法,分别将一定浓度的 $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 在氨性溶液中共沉淀,静止分层并去掉上层清液后,立即加入浓度为 20-30% 的四甲基氢氧化铵溶液,再用超声法分散后,再用砂漏斗过滤,除去其中较大的磁性纳米颗粒,即可得到颜色为灰褐色、且磁性纳米颗粒大小均匀一致的溶液;

2) 磁性纳米颗粒的氨基硅烷化:吸取一定剂量的磁性纳米颗粒溶液、并加入至在 100-200ml 异丙醇溶液中;用超声法将磁性纳米颗粒进行分散;同时,边搅拌边加入 3-6g 聚乙二醇 4000,继续搅拌 10-20min 后加入适量蒸馏水,然后加入 0.1-0.3ml 正硅酸乙酯水解形成硅壳层;在磁场作用下,用无水乙醇和蒸馏水分别洗涤干净后,分散于无水乙醇中;再加入适量蒸馏水后,在不断搅拌下加入 0.1-0.3ml 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,形成氨基化硅烷壳层;在磁场作用下,分别用无水乙醇和蒸馏水洗涤干净后,分散于 pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液中,所得物质即为氨基硅烷化的磁性纳米颗粒;

3) 磁性纳米颗粒标记人类 I 型胸苷激酶:将上述氨基硅烷化的磁性纳米颗粒用戊二醛活化,用 pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液洗涤干净后,再分散于相同的磷酸盐缓冲溶液中;然后,直接在此磷酸盐缓冲溶液中加入一定剂量的人类 I 型胸苷激酶,在一定条件下反应 0.5-1.5h,即可将人类 I 型胸苷激酶共价固定于磁性纳米颗粒上,得到人类 I 型胸苷激酶包被的磁性纳米颗粒;

4) 封闭:在人类 I 型胸苷激酶-核壳型磁性颗粒分散溶液中加入甘氨酸溶液反应 1h,即可封闭磁性纳米颗粒表面的活性醛基;最后,用 pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液洗涤干净后,再分散于相同的磷酸盐缓冲溶液中;

5) 保存:将人类 I 型胸苷激酶包被的磁性纳米颗粒保存在 4℃ 的冰箱中备用。

2. 一种基于磁性纳米微粒的人胸苷激酶荧光免疫分析方法,其特征在于,人类 I 型胸苷激酶酶催化荧光检测包括以下步骤:

采用竞争免疫分析方法,将待测人类 I 型胸苷激酶与辣根过氧化物酶标记的人类 I 型胸苷激酶单克隆抗体反应 30-60min,再加入同体积的人类 I 型胸苷激酶包被的核壳型磁性颗粒,在 37℃ 下竞争反应 30-60min,用 pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液洗涤干净后,在磁场作用下分离,并分散于 pH7.0-7.6 磷酸盐缓冲溶液中,加入一定浓度的对羟基苯丙酸、过氧化氢和磷酸盐缓冲溶液,反应 0.5-1h,在磁场作用下分层;移取上层清液、并置于荧光比色皿中,用紫外光激发,测量可见光处的荧光强度;测试溶液的荧光强度随着试样中的人类 I 型胸苷激酶的浓度增加而减弱,荧光响应与人类 I 型胸苷激酶在 0.01-1ng/ml 之间成线性关系,从而实现对人类 I 型胸苷激酶的准确测定,其检测下限可达到 0.008ng/ml。

一种基于磁性纳米微粒的人胸苷激酶荧光免疫分析新方法

技术领域

[0001] 本发明涉及临床医学测定方法和检测分析,特别指一种基于磁性纳米微粒的人胸苷激酶荧光免疫分析新方法,即采用磁性纳米技术和现代荧光免疫分析技术结合,对人类 I 型胸苷激酶 (hTK1) 血液和组织液实施准确检测的新方法。

背景技术

[0002] 关于人胸腺嘧啶脱氧核苷激酶 I 型 (hTK1) 的技术背景:

[0003] 人类 I 型胸腺嘧啶脱氧核苷激酶,中文简称为人类 I 型胸苷激酶;其英文名为 Human thymidine kinase,简称为 hTK1。DNA 在合成之前,胸腺嘧啶脱氧核苷 (TdR) 被摄入细胞并在转化成 TMP 时必须经过磷酸化激酶的催化,而磷酸化反应过程必须有 TK 酶的催化。

[0004] 正常生理状况下,人细胞中的 TK 主要以两种同工酶的形式存在,即 hTK1 和 hTK2。一般地说,hTK1 主要存在于细胞质中,而 hTK2 则主要存在于亚细胞结构的线粒体中。由于其中一种同工酶大量存在于胚胎组织,也有学者分别称它们为胚胎 TK (Fetal TK) 和成人 TK (Adult TK)。有研究发现,胚胎 TK 是与细胞的分裂相关,存在于细胞质中,称之为 hTK1;而成人 TK 存在于线粒体中,它的表达与细胞周期无关,又称之为 hTK2。或者将 hTK1 称为细胞质胸苷激酶,hTK2 称为线粒体胸苷激酶。hTK1 基因定位在于染色体 17q23.2-q25.3,靠近于半乳糖激酶;而 hTK2 基因则定位于染色体 16q22-q23.1。

[0005] 事实上,在上个世纪 80 年代已有学者完成了 hTK1 基因编码区域的 cDNA 分子克隆及其序列分析。研究表明,TK1 全酶分子量为 96000 道尔顿,其分子结构为四聚体,等电点聚焦免疫电泳测得其等电点为 8.3-8.5。TK1 的四聚体中每一单体 α 螺旋/ β 折叠区域组成与 ATP 酶家系类似,其 p-环是 TK1 酶活性调节区域,即底物反应区域。四聚体中 β 折叠区域有一锌原子与 β 折叠区域连接。在这 β -丝状带折叠的底部,干链变宽成为一个套索闭环,是 dTTP 负责 TK1 活性反馈抑制调节的区域,但 TK1 这套索环结构是不同于其它脱氧核苷酸激酶。

[0006] hTK1 是存在于机体中的重要激酶之一,它作为一种胸苷参与 DNA 合成的关键激酶,能可逆性催化胸腺嘧啶脱氧核苷与磷酸脱氧核苷之间的转化,并真实而客观地反映着细胞的增殖状况。正是由于 hTK1 与细胞分裂密切相关,在细胞分裂 G1 期含量较低,到 S 期后逐渐升高,至 G2 期达到最高,因此,编码 hTK1 的 mRNA 及其所表达的蛋白质也就成为细胞增生的标志物。可以说,TK1 水平的高低与 DNA 在细胞周期的 S 期 DNA 合成速度密切相关。一般情况下,所观察到正常增殖细胞 TK1 的水平在细胞周期的 G1 和 S 期交界处开始升高,随着细胞进入 G1 晚期,TK1 酶的水平逐渐急剧上升,直至 S 和 G2 期交界处,但在肿瘤细胞中,这种高 TK1 水平从 S 晚期一直持续到 M 早期。大量离体试验结果表明,TK1 在增殖细胞和肿瘤细胞周期调控代谢过程具有特殊的意义。通常,一些非增殖细胞的 TK1 和健康人血清和组织中 TK1,其含量极微或检测不到,而在异常增殖细胞或恶性肿瘤患者中,TK1 酶伴随着肿瘤细胞数的急剧增殖而升高。不同来组织增殖细胞中细胞周期与 TK1 信使

RNA (TK1mRNA) 的表达关系是复杂的, mRNA 的剪切和翻译也是随细胞生长状态变化的, 推测 TK1 水平主要是通过翻译后调控机制发挥作用。而且, 已有研究表明, 增殖细胞生长的不同时期, TK1 活性的调控则主要是通过 dTTP 反馈抑制途径和底物循环方式进行调节的。

[0007] 按照现有研究, 癌细胞异常或失控的增殖是由于正常细胞的某种或多重突变的与增殖相关的基因引起的, 因此, 正常细胞中生长相关的基因突变最终的导致相关的癌蛋白的过度表达, 抑癌蛋白的缺失或突变蛋白产物表达, 并伴随一系列与细胞生长相关的酶和蛋白质调节失控。由于 TK1 与细胞异常增殖和肿瘤细胞表达密切相关, 即在非增殖细胞和健康人血清中, 含量极微或检测不到, 而在恶性肿瘤患者中伴随着肿瘤细胞的急剧增殖而升高等特征, 使学术界对 TK1 的研究引起了广泛的关注和重视, 并认为 TK1 有可能作为一种有价值的血清学细胞增殖标记物来检测增殖细胞的增殖活性, 适用于恶性肿瘤的细胞增殖度检测。特别是已有文献表明, TK1 的活性在肿瘤细胞大于总量的 95%, 而 TK2 低于 5%, 在正常健康人的血清中检测很低或不可以检测, 因此采用检测血清 TK 活性将评估肿瘤增殖的恶性程度。hTK1 在细胞异常增生时含量或活性增高, 特别是在细胞增生旺盛的早期恶性肿瘤患者的体液或血液中更是显著增高, 且 hTK1 水平的高低与恶性肿瘤的切除和复发呈降低和升高的趋势。曾有学者曾采用 12 种人癌组织进行免疫组化分析, 发现 TK1 均呈现阳性结果, 这初步证明了癌症患者与 TK1 活力或含量增高有关, 且进一步试验也证明, 随着肿瘤细胞增殖速度明显提高, TK1 活力增强, DNA 合成速度加快, 从而促进了肿瘤细胞的进一步增殖, 形成一个病情不断加重的恶性循环。

[0008] TK1 在血清中保存是稳定的, 通常在 -20°C 条件下可保存 5 年以上, 其之所以稳定的可能原因, 被认为是 TK1 在血清中是与其它蛋白质形成一大分子稳定的复合物有关。不过, 关于血清 TK1 的结构和性质仍然是不清楚的, 其中包括这酶在细胞内被破坏或者是由细胞以活性或非活性的状态被分泌出去。

[0009] 目前关于 hTK1 分析测定方法的技术背景:

[0010] 由于体内恶性肿瘤细胞的增殖不是按照正常细胞的 2 倍体分裂方式, 根据这种无休止恶性分裂的肿瘤细胞特征, 建立了肿瘤细胞增殖标志物的理论基础。过去, 通过体外培养细胞, 观察到胸苷 (Thymidine, 简称 Thd) 参与到 DNA 合成。放射性同位素标记的胸苷 (放射自显影) 或胸苷的类似物可以检测肿瘤细胞中 DNA 合成速度, 发现细胞 DNA 的复制仅仅限定在细胞特定周期 (S 期)。这种同位素标记方法检测肿瘤细胞中 DNA 合成速度, 计数细胞周期中 S 期细胞数增殖的比例, 已被应用于检测细胞的增殖速度, 可用于对患者肿瘤细胞增殖度的检测和评估患者预后的十分有意义的参数。S- 期细胞增殖指数高预示患者肿瘤预后差。以后采用胸苷的类似物溴代尿苷 (BrdU) 的摄入量以及它的抗体应用到流式细胞 DNA 检测仪, 定量检测 DNA 合成的速度与 S 期细胞增殖的速率相关性, 但使用这种同位素标记胸苷或 BrdU 的方法需要在活细胞中进行, 仅仅是限于研究工作和有限的患者检测, 且流式细胞计的技术不可能鉴别细胞周期中 G_0-G_1 期的增殖细胞和非增殖细胞, 加之 S 期细胞成分复杂, 也不可能用流式细胞计的技术分离恶性肿瘤细胞和良性肿瘤细胞。后来通过免疫组化技术, 基因组学和蛋白质组学等等技术对组织活检样本分析, 可以检测到肿瘤细胞中许多与生长相关联的蛋白质或酶的水平异常改变, 检测患者肿瘤疾病期中的异常蛋白质或酶升降水平, 将疾病发现或复发风险和后评估提供有意义临床参数。

[0011] 在血清中检测这类异常蛋白或肿瘤标志物的升降水平, 可以帮助评估肿瘤早期发

生,肿瘤全切除术后的效果,疾病复发和预后评估。基于肿瘤细胞增殖标志物的理论基础是由于肿瘤细胞失出正常细胞生长调控导致细胞恶性增殖,这一理论引导研究开发一种准确、无侵害性的血清学检测方法,即在现代仪器可能检测出肿瘤以前,将可能更早期检测已有肿瘤疾病或潜在的恶变,将给患者提供较好的治疗时机。因此,人们一直在寻求与肿瘤细胞增殖生长密切相关的,同时可用于血清学和组织学的肿瘤细胞增殖标志物标记物,如 CEA, CA19-9, CA125, CA15-3, 因其特异性的问题已在临床应用上有争议。当然,通过血液循环类肿瘤标记物不同特性的信息及其对上述标志物的检测,仍为临床提供了许多有价值的参考和辅助诊断。

[0012] hTK1 在生长旺盛的细胞中表达升高,特别是肿瘤细胞,它是一种较为敏感的新的肝癌标志物,它能可逆性催化胸腺嘧啶脱氧核苷与磷酸脱氧核苷之间的转化,它与细胞的分裂和增殖有密切关系。而且, hTK1 是一好的既适用于血清学也适用于组织学的广谱型细胞增殖标记物,已用于人群体检,恶性肿瘤的早期发现,监控肿瘤患者治疗效果和评估预后。人体液中 hTK1 的水平可以间接地反映体内是否有增生活跃的细胞, hTK1 的水平可以判断肿瘤的发生、发展和预后。正如前述,细胞 DNA 合成速度,与其细胞周期 S 期细胞百分比比值关系已经被流式细胞计证实,肿瘤组织中与正常组织比较,低分化的肿瘤与高分化肿瘤比较,低分化肿瘤细胞 TK1 的检测值升高;细胞增殖度缓慢的鼠肾癌细胞中的 TK1 活性高于正常值的 2-5 倍。特别是基于在 TK1 的活性在肿瘤细胞大于总量的 95%,而 TK2 低于 5%,在正常健康人的血清中检测很低或不可以检测,因此采用检测血清 TK 活性将评估肿瘤增殖的恶性程度。而且,采用 hTK1 活性检测,对实体肿瘤细胞增殖度也有许多报导。前列腺癌、胃癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、脑癌、头颈癌、卵巢癌、膀胱癌、肉瘤等恶性肿瘤 TK1 活性较良性肿瘤和正常人明显增高并显示出有统计学意义的差别;而且,TK1 的活性检测同样适用于检测癌组织中细胞中细胞质提取液 TK1 活性,并被认为是一种评估肿瘤细胞增殖度的好方法。有研究从多个乳腺癌患者的癌组织中提取细胞的细胞质组分并进行 TK1 活性检测,结果显示出高的 TK1 活性与肿瘤增殖度差相关。而且,TK1 是一个好的增殖细胞和肿瘤细胞的标记物,它的浓度变化可以被用于监控手术治疗患者的效果。因此,发明一种更加准确、实用和稳定性好、特异性高的方法检测 hTK1 活性或含量,对于肿瘤早期诊断,特别是乳癌的早期诊断具有特别重要的临床意义。

[0013] 在过去的临床和科研工作中,用于检测或监测 hTK1 含量或活性的方法主要有:放射免疫法 (RIA)、酶联免疫法、化学发光法、免疫组化法、western blotting 法、点免疫印迹化学发光法、ELISA 法、免疫增强化学发光法、压电石英晶片免疫传感器法等。虽然,目前这些实验室的检测方法均能较为准确的测定出癌变组织或体液及血液(血清或血浆)中 hTK1 的含量或活性,但过去主要采用的放射免疫法 (RIA) 检测血清 hTK1 的酶活性,即可以通过放射性同位素标记的 ^3H 胸苷的方法检测血清中总量 TK 活性来表示血清 TK1 (简称 STK1) 的活性,但这方法的灵敏度不高,不适应于临床血清中 TK1 的检测;以后又发展了胸苷类似物 ^{-125}I -5-碘-2-脱氧尿苷作为底物,建立一种灵敏度较高的血清 TK1 (STK) 放射性同位素检测方法,应用于人血清学肿瘤细胞增殖标记物检测。尽管国际上已有学者采用 ^{125}I 标记尿嘧啶核苷放射性酶分析法可测定出 hTK1 蛋白的活性和含量,但该方法会部分受到人胸苷激酶 2 活性的影响,测定方法特异性不高,灵敏度、重复性和稳定性均较差,临床用于诊断和鉴别诊断存在着较大的局限性和误差,且无法进行临床的早期诊断,有时甚至出现假阴

性或假阳性的结果,而且有一定的放射性污染,给临床诊断和鉴别诊断带来了很大困难。尤其值得一提的是,采用¹²⁵I标记脱氧尿嘧啶不仅半衰期短(仅在4周时间),且具有放射性污染,久而久之容易造成对检测者健康损伤和环境污染,而且胸苷类似物-¹²⁵I-5-碘-2-脱氧尿苷并非是TK1活性分析的专一性底物,并且在血清TK1的活性测定中,对pH和温度非常敏感,常产生不准确结果,且需要使用贵重的检测仪器(γ闪烁仪),这种检测需要特别的设备和熟练技术人员操作,因此,该检测技术在临床应用上有很大的局限性,也很难在临床上广泛推广使用。后来,又有学者采用酶法和夹心ELISA方法作血清学TK1鉴定,没有发现健康人血清TK1和癌症患者血清TK1之间有显著性差异,认为是夹心ELISA方法不灵敏所致。以后国外有报道,应用WesternBlotting检测血清中hTK1的含量或活性,且能进行定量分析,在对肿瘤细胞的评估方面远远优于胸腺嘧啶掺入法,因为胸苷激酶1测定直接代表该肿瘤中的胸苷激酶1量而不受体外检测条件的干扰,也免除了影响外源性胸腺嘧啶掺入DNA内的影响,但在临床应用并不适用;点免疫印迹发光法虽然利用了发光技术的高灵敏性,并通过X线片曝光,避免了使用发光检测仪,且可长期保存实验结果,但需通过设立标准品对照,并根据斑点的深浅进行定量分析,但因这些方法操作繁琐,也难以在临床上普及应用。而增强发光-免疫点印迹法主要参考印迹法原理,该方法操作复杂和繁琐,不仅需时长,需要有特异好和灵敏度高的抗TK1抗体作为探测血清或者组织中微量的TK1分子的探针,而且需要大量贵重的仪器设备和经验丰富的专业操作人员,不仅无法在基层医疗单位普及应用,在大型综合性医院也很难临床应用。即使是我们不久前曾研究成功了hTK1压电石英晶片免疫传感器法,且具有较上述方法更多的特点和优势,但也存在着检测时间较长(40-60分钟)、检测难度较大、特别是每次只能测定一个样品,无法同时批量测定样品等,这在临床上应用几乎非常困难。尤其是上述所有检测TK1的方法,基本上都需要较为昂贵和特殊的仪器设备及配套试剂,或者需要专业检测设备,加上操作过程繁琐,检测时间较长,技术要求高,需要一定仪器等,无法在基层医疗单位或家庭普及应用。但是,如果有特异性强、亲和力好和灵敏度高的两种TK1抗体,免疫夹心法仍是很有前途的方法,这也是本发明采用扬长避短的依据之一。

[0014] 由于hTK1目前定量检测体液中的hTK1尚无一个满意的方法,研究和建立及发明一种新型、灵敏、准确、实用的荧光免疫分析和检测技术对于观察和检测体液(特别是血液)中的hTK1含量和水平具有重要的诊断价值和临床意义。

[0015] 目前关于荧光免疫分析测定方法的技术背景:

[0016] 荧光免疫技术是标记免疫技术中发展最早的一种,它是将某抗原或抗体用荧光素进行标记,在与标本中相应的抗体或抗原反应后,测定抗原抗体复合物中荧光素的一种免疫技术,也被称为免疫荧光素技术。很早以来就有一些学者试图将抗体分子与一些示踪物质结合,利用抗原抗体反应进行组织或细胞内抗原物质的定位,而这种以荧光物质标记抗体而进行抗原定位的技术称为荧光抗体技术。荧光抗体技术是抗原抗体反应后,利用荧光显微镜判定结果的检测方法,也是荧光显微镜技术;而免疫荧光测定技术,则是在抗原抗体反应后,利用特殊仪器测定荧光强度而推算被测物浓度的检测方法。实际上,荧光免疫法按其反应体系及定量方法不同,还可进一步分做若干种,但都是利用物质吸收外界能量而进入激发状态,在回复基态时多余的能量以电磁辐射的形式释放,即发出荧光。当停止提供激发能量,荧光现象随即终止。与放射免疫法相比,荧光免疫法无放射性污染,并且大多操作

简便,便于推广。可以说,荧光免疫测定,与酶免疫测定和放射免疫分析一样,在临床检验中应用广泛。

[0017] 荧光免疫技术正是这种先应用致荧光物质对单克隆抗体进行标记,检测相应抗原的方法。目前主要有竞争法和双抗体夹心法。通常,双抗夹心法是将特异性抗体与固相载体连接,形成固相抗体。除去未结合抗体,然后加受检标本,使其中的蛋白抗原与固相抗体形成抗原抗体复合物。洗涤除去未结合物,接着加入荧光标记的抗体,使之与抗原特异性结合,形成抗体-抗原-抗体复合物。最后根据检测产物发出的荧光强度,即可对被测蛋白抗原进行定量。该法重复性好,线性范围宽,具有快速、敏感、准确的特点。

[0018] 荧光免疫分析(FIA)是历史最悠久的一种标记免疫分析,灵敏度很高。它在临床疾病(包括恶性肿瘤)诊断方面有着极为广泛的用途。但是生物样品(如血清)本身的荧光位于400-600nm,与常用的荧光标记物(如FITC)的荧光发射光谱产生重叠,从而,容易对自然本底荧光产生过大的干扰,并直接影响到检测结果的敏感性和准确性。

[0019] 现代荧光免疫分析作为一种高灵敏分析技术已被广泛应用到医学,生物学和环境学等领域,尤其是酶促荧光免疫分析,利用具有潜在荧光的底物作为酶标物催化放大的显示系统,由于累积放大和荧光的高敏感性,使方法学的灵敏度提高很多。但传统的免疫反应都是在酶标板中进行,抗原或抗体分子固定于酶标板孔表面,由于酶标板孔比表面积小,抗原抗体分子固定量有限。酶标板孔反应界面相对较小,抗原抗体分子的免疫反应性和标记酶分子的催化活性均受到影响,造成免疫反应和酶催化反应效率不高,反应不均匀,且耗时长。而微颗粒由于其比表面积大,具有生物分子固定量大、免疫反应快、分离方便等优点,被作为免疫分析的固相载体已得到研究学者和仪器厂家的重视。ABBOTT公司采用多孔的塑料微颗粒作为固相载体,碱性磷酸酶为标记用酶,以4-甲基伞型酮磷酸盐(4-MUP)为酶底物,发展了IMX全自动酶免疫分析系统,其抗原抗体结合反应在塑料微颗粒固相上完成,分析仪需将塑料微颗粒转移至特定的玻璃纤维上,再加入洗涤缓冲液将没有结合的抗原或抗体被洗涤下去,而结合于塑料微粒固相上的抗原抗体则因微粒与玻璃纤维的不可逆结合而保留在玻璃纤维上。这种洗涤分离过程的效果虽然比较好,但是过程较为复杂,时间亦比较长。

发明内容

[0020] 本发明的目的是针对背景技术中存在的缺点和问题加以改进、创新,提供一种基于酶催化反应的高灵敏免疫分析技术,其检测灵敏度可达到pg/ml甚至更低,完全可满足血清中hTK1含量检测的要求,且其使用的酶标记试剂与ELISA所用一样,所用标记物制备简便、储存时间长、无放射性污染、检测重复性好、制备方法成熟、成本较为低廉。而磁性颗粒(MP)性能稳定,功能化后可方便地实现抗原或抗体的固定化,并可均匀分散在液相中与相应的抗体或抗原反应,在外加磁场的作用下,可快速有效地实现免疫复合物与反应液的分离,具有固定均匀、特异性高、分离快、重现性好等特点,为样品的分离、富集和提纯提供了很大方便。针对传统检测方法的不足,本发明结合酶催化荧光免疫分析技术和核壳型超顺磁性纳米颗粒的优点,建立一种快速简便的高通量人胸苷激酶免疫检测技术,用于hTK1的临床检测。

[0021] 本发明的目的通过以下技术方案实现

[0022] 本发明 hTK1 包被的核壳型磁性颗粒 (hTK1-MP) 的制备包括以下步骤:

[0023] 1) 磁性纳米颗粒的制备:采用液相共沉淀方法,分别将一定浓度的 $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 在氨性溶液中共沉淀,静止分层并去掉上层清液后,立即加入浓度为 20-30% 的四甲基氢氧化铵溶液,再用超声法分散后,再用砂漏斗过滤,除去其中较大的磁性纳米颗粒,即可得到颜色为灰褐色、且磁性纳米颗粒大小均匀一致的溶液;

[0024] 2) 磁性纳米颗粒的氨基硅烷化:吸取一定剂量的磁性纳米颗粒溶液、并加入至在 100-200ml 异丙醇溶液中;用超声法将磁性纳米颗粒进行分散;同时,边搅拌边加入 3-6g 聚乙二醇 (PEG-4000),继续搅拌 10-20min 后加入适量蒸馏水,然后加入 0.1-0.3ml 正硅酸乙酯 (TESO) 水解形成硅壳层;在特定磁场作用下,用无水乙醇和蒸馏水分别洗涤干净后,分散于无水乙醇中;再加入适量蒸馏水后,在不断搅拌下加入 0.1-0.3ml 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES),形成氨基化硅烷壳层;在特定磁场作用下,分别用无水乙醇和蒸馏水洗涤干净后,分散于 pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中,所得物质即为氨基硅烷化的磁性纳米颗粒 (MNPs);

[0025] 3) 磁性纳米颗粒标记人类 I 型胸苷激酶 (hTK1):将上述氨基硅烷化的磁性纳米颗粒 (MNPs) 用戊二醛活化,用 pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤干净后,再分散于相同的 PBS 中;然后,直接在此 PBS 溶液中加入一定剂量的 hTK1 (用基因克隆技术,在大肠杆菌中表达 hTK1 基因,制备得到 hTK1 的融合蛋白),在一定条件下反应 0.5-1.5h,即可将 hTK1 共价固定于 MNPs 上,得到 hTK1 包被的磁性纳米颗粒 (hTK1-MNPs);

[0026] 4) 封闭:在 hTK1-MP 分散溶液中加入甘氨酸溶液反应 1h,即可封闭磁性纳米颗粒表面的活性醛基;最后,用 pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤干净后,再分散于相同的 PBS 中;

[0027] 5) 保存:将 hTK1-MNPs 保存在 4°C 的冰箱中备用。

[0028] 本发明 hTK1 酶催化荧光检测包括以下步骤:

[0029] 采用竞争免疫分析方法,将待测 hTK1 与辣根过氧化物酶标记的 hTK1 单克隆抗体 (HRP-Ab) 反应 30-60min,再加入同体积的 hTK1-MP,在 37°C 下竞争反应 30-60min,用 pH7.0-7.6 的磷酸盐缓冲溶液洗涤干净后,在特定磁场作用下分离,并分散于 pH7.0-7.6 磷酸盐缓冲溶液中,加入一定浓度的对羟基苯丙酸 (HPPA)、过氧化氢 (H_2O_2) 和磷酸盐缓冲溶液,反应 0.5-1h,在特定磁场作用下分层;移取上层清液、并置于荧光比色皿中,用紫外光激发,测量可见光处的荧光强度;测试溶液的荧光强度随着试样中的 hTK1 的浓度增加而减弱,荧光响应与 hTK1 在 0.01-1ng/ml 之间成线性关系,从而实现对 hTK1 的准确测定,其检测下限可达到 0.008ng/ml;通常情况下,由于恶性肿瘤 (乳癌) 等血清样品中的 hTK1 浓度约为 ng/ml 水平,所以,采用此灵敏度高的方法可以进行人体血清中 hTK1 浓度的测定。

[0030] 本发明的技术原理:

[0031] 采用竞争免疫分析方法,将待测 hTK1 和 hTK1-MP 共同与辣根过氧化物酶标记的 hTK1 单克隆抗体 (HRP-Ab) 竞争反应,并在磁场作用下分离,将结合了 HRP-Ab 的 hTK1-MP 加至对羟基苯丙酸 (HPPA) 溶液中,催化产生强荧光的二聚体化合物,导致荧光强度增强 (图 1)。待测溶液中 hTK1 浓度越大,结合到 hTK1-MP 的 HRP-Ab 就越少,荧光强度变化也小,因此可以根据荧光强度的变化来定量溶液中 hTK1 的浓度,实现人体血清中 hTK1 浓度的测定。

[0032] 本发明的主要技术特点:

[0033] ①本发明采用液相共沉淀方法进行磁性纳米颗粒的制备,不仅纳米颗粒均匀一致,而且,实际操作容易,方法简单,试剂成本低廉。

[0034] ②本发明应用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷材料,其技术特点是能在该磁性纳米颗粒表面形成生物相容性良好的氨基硅烷化壳层,改善了磁性纳米颗粒的分散性和稳定性,且固定化的 hTK1 分子的免疫反应活性提高,反应速度加快,其整个免疫反应可以在 40min 以内完成。

[0035] ③本发明设计的分析检测方法结合了磁性纳米颗粒富集与酶催化反应的双重效果,其技术特点是发挥了磁性纳米颗粒富集,以提高单位体积内待检物的浓度,以及酶催化反应的高效和特异的特点,从而大大提高了该方法对血清中 hTK1 检测的灵敏度,其检测下限可达到 0.008ng/ml。

[0036] 本发明的主要技术优点:

[0037] ①检测方法简单,通过将 hTK1 抗原事先共价固定于氨基硅烷化的核壳型磁性纳米颗粒上,简化了测定步骤。

[0038] ②氨基硅烷化的核壳型磁性纳米颗粒性能稳定,生物相容性好,固定化 hTK1 抗原具有良好的免疫反应活性,确保了分析方法的高灵敏度。

[0039] ③硅烷化的核壳型磁性纳米颗粒可均匀分散在液相中与相应的抗体或抗原反应,具有固定均匀、特异性高、重现性好等特点,由于反应为近均相反应,反应速度快。

[0040] ④在外加磁场的作用下,可快速有效地实现核壳型磁性纳米颗粒的免疫复合物与反应液的分离,为样品的分离、富集提供了很大方便。

[0041] ⑤方法操作简单,易于实现自动化检测,可完成大批量的测试任务。

[0042] ⑥本方法对 hTK1 具有良好的响应特异性。

[0043] ⑦本方法采用了酶催化方法,利用过氧化物酶催化 HPPA 氧化形成强荧光二聚体,可获得极高的检测灵敏度。

[0044] ⑧本方法结合酶催化技术和核壳型磁性纳米颗粒的高生物相容性、分散性和分离快的特点,可实现 hTK1 的快速检测,可望成为一个 hTK1 新的可靠检测方法,用于肿瘤病人早期诊断的临床检测。

[0045] 本发明的主要创新点:

[0046] ①将 3-氨基丙基三乙氧基硅烷在磁性纳米颗粒用作为 hTK1 的固定化载体材料,确保了 hTK1 分子高免疫反应活性,提高了反应速度。

[0047] ②以辣根过氧化物酶为标记酶,对羟基苯丙酸为底物发展了一种 hTK1 酶催化荧光免疫分析方法。

[0048] ③采用竞争免疫分析方法,并将辣根过氧化物酶标记的 hTK1 单克隆抗体与待测 hTK1 先反应一段时间,再和 hTK1-MP 竞争反应,提高低浓度待测 hTK1 与标记抗体的免疫反应效率。

[0049] ④在磁场作用下,实现血清中 hTK1 的富集,提高了 hTK1 的检测灵敏度。

附图说明

[0050] 图 1 是本发明荧光响应机理示意图

[0051] 图 2 是 hTK1 荧光免疫分析示意图

[0052] 图 3 是荧光响应信号对 hTK1 浓度的校正曲线

具体实施方式

[0053] 实施例一：

[0054] hTK1 包被核壳型磁性颗粒的制备

[0055] ① 磁性纳米颗粒 (MNPs) 的制备：分别准确称取 0.59g $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 0.40g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于 4ml 2M 的 HCl 中，使其浓度分别为 0.82M 和 0.43M。迅速混合于 250ml 三口烧瓶中，再迅速滴加 40ml 1M 的氨水，5min 后加入 0.0202g 抗坏血酸（分析纯），搅拌 30min，静置分层并去掉上层清液，加入 1.5ml 25% 的四甲基氢氧化铵（分析纯）溶液，搅拌 10min，加入蒸馏水使其总体积为 40ml，超声波振荡 15min，用砂漏斗过滤，除去大颗粒即得磁性纳米颗粒，得到灰褐色磁性纳米颗粒溶液。

[0056] ② 磁性纳米颗粒的氨基硅烷化：将 1ml 磁性纳米颗粒与 100ml 异丙醇混合并超声 30min，边搅拌边加入 3g 聚乙二醇（4000，分析纯），继续搅拌 10min 后，加入 9ml 蒸馏水，再搅拌 10min，加入 0.1ml 四乙氧基硅烷（TEOS，分析纯），搅拌 24h（450rpm/min）；在磁场作用下，用无水乙醇和蒸馏水各洗 3 次，每次 3min，分散于 9.5ml 无水乙醇中，加入 0.5ml 水，搅拌下加 0.2ml 3-氨基丙基三乙氧基硅烷，继续搅拌 8h（450rpm/min），在磁场作用下用无水乙醇和蒸馏水各洗 3 次，每次 3min，并分散于 5ml pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液（PB，由 1/30M Na_2HPO_4 和 1/30M KH_2PO_4 成比例配成）溶液中备用，所得物质即为氨基硅烷化的磁性纳米颗粒。

[0057] ③ 磁性纳米颗粒 (MNPs) 标记 hTK1：取 1ml 上述磁性纳米颗粒，加入 100 μl 2.5% 戊二醛活化 90min，用 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次，每次 3min，分散于 1ml

[0058] pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中，加入 20 μl 0.01mg/ml hTK1，反应 1h，得到 hTK1 包被的磁性纳米颗粒。

[0059] ④ 封闭：取 1ml hTK1 包被核壳型磁性颗粒，加 2ml 20mg/ml 甘氨酸封闭 1h，用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次，分散于 1ml 磷酸盐缓冲溶液中。

[0060] ⑤ 保存：将 hTK1 包被核壳型磁性颗粒保存在 4℃ 的冰箱中备用。

[0061] 实施例二：

[0062] hTK1 的检测

[0063] 取 20 μl 不同浓度 (0-2.0ng/ml) 的 hTK1 溶液分别与 10 μl 50ng/ml 辣根过氧化物酶标记的 hTK1 单克隆抗体（通过用大肠杆菌表达和纯化的人胸苷激酶免疫 Balb/C 小鼠，免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合，HAT 选择培养和 ELISA 筛选阳性克隆，阳性克隆杂交瘤注入小鼠腹腔制备腹水，再纯化制得）反应 40min，再加入 10 μl 磁性纳米颗粒标记 hTK (hTK1-MNPs)，在 37℃ 条件下反应 40min，再用磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.4) 洗涤 3 次，在磁场作用下分离后，分散于 10 μl pH = 7.4 磷酸盐缓冲溶液中，依次加入 150 μl pH5.5 磷酸盐缓冲溶液，20 μl $4.4 \times 10^{-4}\text{M}$ HPPA 和 20 μl $8.8 \times 10^{-4}\text{M}$ H_2O_2 ，反应 30min，在磁场作用下，用微量加样器吸取上层清液 200 μl 置于荧光比色皿中，然后用 F-4500 荧光光度仪 (Hitachi High-Technologies Corporation) 进行荧光检测，在 286nm 处激发，测量 407nm 处的荧光强度。荧光增强强度与试样中的 hTK1 的浓度成反比，实验结果见图 3。通过线性回归分析显示，荧光响应与 hTK1 浓度在 0.01ng/ml 到 1ng/ml 之间成线性关系，检测下限为

0.008ng/ml,表明本酶催化荧光免疫分析可以对 hTK1 进行准确的测定。

[0064] 应用实施例

[0065] 对临床血清样品检测:

[0066] 利用本方法对 4 例正常血清样品和 4 例肝癌血清样品,分别进行 4 次平行测定。即用微量加样器分别准确吸取 2 μ l 各种血清样品置于不同的试管中,再用 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液将各种血清样品分别稀释 10 倍至 20 μ l,并彩色记号笔做好标记;然后,分别与 10 μ l 50ng/ml HRP-Ab 反应 40min;再分别加入 10 μ l hTK1-MNPs,在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴的条件下反应 40min,再分别用磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.4) 洗涤 3 次;在磁场作用下进行分离后,将其各自分散于 10 μ l 磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.4) 中,依次加入 150 μ l pH5.5 磷酸盐缓冲溶液、20 μ l 4.4×10^{-4} M HPPA 和 20 μ l 8.8×10^{-4} M H₂O₂,反应 1h,再在磁场作用下,取上层清液 200 μ l 置于荧光比色皿中,用 F-4500 荧光光度仪进行荧光检测,在波长 286nm 处激发,测量波长 407nm 处的荧光强度。4 例正常血清样品的荧光强度分别为 305.9 ± 4.2 、 302.9 ± 5.7 、 299.3 ± 3.9 和 300.6 ± 4.0 ;而 4 例肝癌血清样品的荧光强度则分别为 271.5 ± 3.4 、 268.1 ± 5.5 、 270.5 ± 3.7 和 265.4 ± 4.8 。结果显示,肝癌血清样品经稀释 10 倍后荧光强度约为 270, hTK1 的浓度都高于 2.0ng/ml。正常的血清样品荧光强度约为 300, hTK1 浓度约为 0.1ng/ml。正常的血清样品中的 hTK 含量明显高于正常血清样品,表明本方法可以满足血清中 hTK1 浓度的测定。

[0067] 本发明实施的注意事项:

[0068] ①所用 FeCl₃·H₂O 和 FeCl₂·4H₂O 用量比例应准确;反应过程中添加氨水要迅速。

[0069] ②在进行氨基硅烷化反应前需要加入聚乙二醇;另外,氨基硅烷化反应时,一定要搅拌均匀。

[0070] ③在进行磁性纳米颗粒标记 hTK1 时,其磷酸盐缓冲溶液的 pH 值尽可能控制为 7.4。

[0071] ④磁性颗粒封闭时不需要洗涤,磁性颗粒封闭完后要洗涤干净;hTK1 包被核壳型磁性颗粒保存在 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中,不要冰冻。

[0072] ⑤进行 hTK1 检测时,应先让 hTK1 溶液和辣根过氧化物酶标记的 hTK1 单克隆抗体反应后,再加磁性纳米颗粒标记 hTK1 进行竞争反应。

[0073] ⑥进行 hTK1 检测时,所有酶催化反应时间务必一致,均为 30min;另外,其底物磷酸盐缓冲溶液的 pH 值为 5.5。

[0074] ⑦在进行 hTK1 血清标本检测时,血清样品先用 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液稀释 10 倍再进行检测。

[0075] ⑧同样,在进行 hTK1 血清标本检测时,血清标本稀释液应先与辣根过氧化物酶标记的 hTK1 单克隆抗体反应后再加入磁性纳米颗粒标记 hTK1 进行竞争反应;酶催化反应时间要一致,为 30min;底物磷酸盐缓冲溶液的 pH 值为 5.5。

[0076] ⑨本发明中要求技术保密的部分:先让 hTK1 溶液辣根过氧化物酶标记的 hTK1 单克隆抗体反应时间 10-60min,再加入磁性纳米颗粒标记 hTK1 进行竞争反应;酶催化反应底物磷酸盐缓冲溶液的 pH 值范围 3.5-7.5;血清样品检测前用磷酸盐缓冲溶液稀释倍数 2-100 倍。

[0077] 本发明所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行的描述,并非对本发明

构思和范围进行限定,在不脱离本发明设计思想的前题下,本领域中的学者或工程技术人员对本发明的技术方案作出的各种变型和改进,均应落入本发明的保护范围,本发明请求保护的技术内容,已经全部记在权利要求书中。

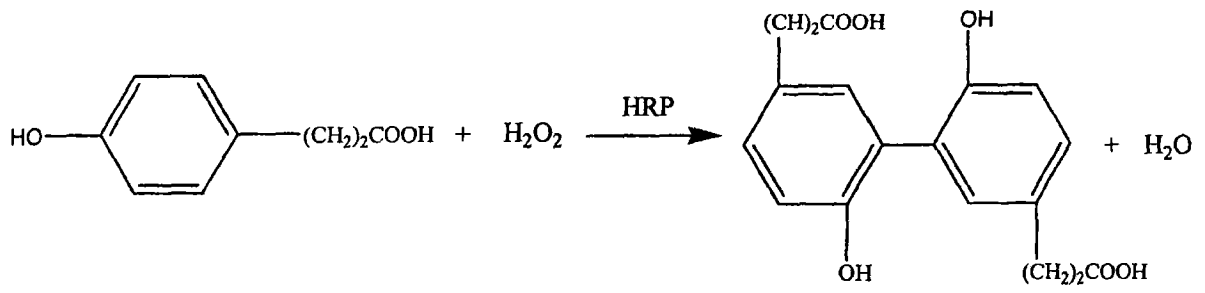


图 1

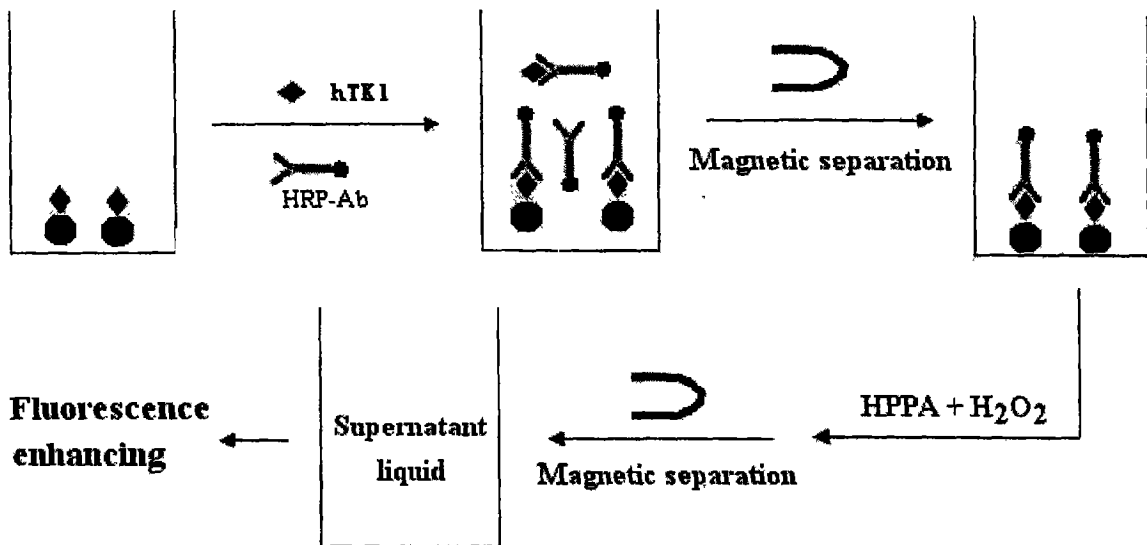


图 2

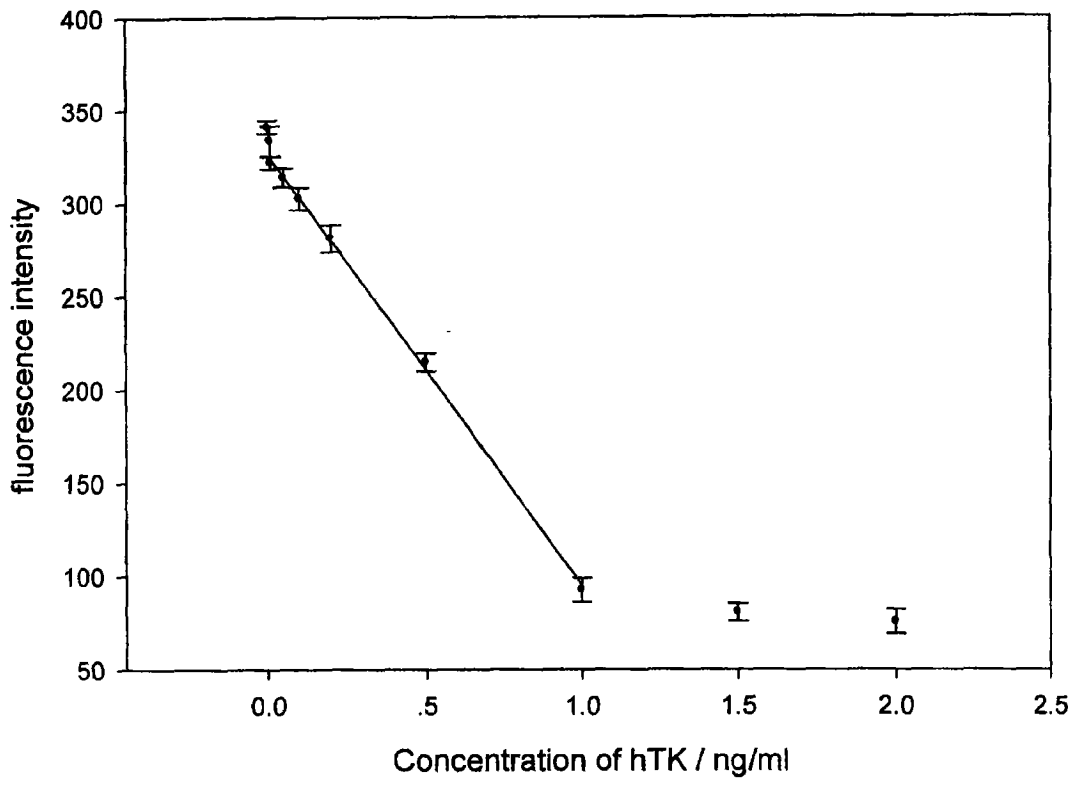


图 3

专利名称(译)	一种基于磁性纳米微粒的人胸苷激酶荧光免疫分析新方法		
公开(公告)号	CN101231288B	公开(公告)日	2011-08-10
申请号	CN200810030614.9	申请日	2008-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	丁克祥		
申请(专利权)人(译)	丁克祥		
当前申请(专利权)人(译)	丁克祥		
[标]发明人	丁克祥 吴朝阳 刘卫国 费定宇 刘莉 丁宇		
发明人	丁克祥 吴朝阳 刘卫国 费定宇 刘莉 丁宇		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/577		
其他公开文献	CN101231288A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于磁性纳米微粒的人胸苷激酶荧光免疫分析新方法。本发明建立一种快速简便的高通量人胸苷激酶(hTK1)免疫检测技术，用于hTK1的临床检测。主要通过戊二醛将hTK1共价固定于氨基硅烷化的超顺磁性纳米颗粒固定化载体表面，采用竞争性免疫分析方法，以辣根过氧化物酶为酶标记、对羟基苯丙酸为荧光底物，实现了对hTK1的测定。本方面采用的硅烷化的核壳型磁性纳米颗粒可均匀分散在液相中，具有固定均匀、特异性高、重现性好、反应速度快等特点，在外加磁场的帮助下，可快速有效地实现核壳型磁性纳米颗粒的免疫复合物与反应液的分离与富集，分析方法操作简单、准确、灵敏、快速，易于实现自动化检测，可完成大批量的测试任务。

