

快速检测甲胎蛋白的免疫层析试条的研制

陈季武 范培昌

(华东师范大学生命科学学院,上海,200062)

摘要:研制了可简便、快速检出原发性肝癌标志物——人血清中甲胎蛋白(AFP)的免疫层析试条。为此,研究了用国产试剂和材料制备胶体金、用此胶体金标记抗 AFP 单抗的影响因素以及抗 AFP 抗体固化条件、抗 AFP 抗体与其 AFP 结合能力等。结果表明,自制国产胶体金质量不亚于进口商品;金标单抗和固化抗体活性稳定,能分别显示出结合 AFP 分子不同表位的特异性。所得检测试条的检出速度在 5 至 20 min 内,检测阳性阈值定为 20 ng AFP/mL 血清。

关键词:甲胎蛋白;胶体金;单克隆抗体;免疫层析试条

中图分类号:R392.3; O614.123; Q503 **文献标识码:**A

癌症是严重危害人类健康的疾病,全世界每年死于癌症的人数已达六百多万,而肝癌被称为“癌症之王”,更难于治愈。令人十分忧虑的是我国已成为肝癌高发区,每年肝癌死亡人数竟占全世界肝癌死亡人数的 40% 以上^[1]。由于中晚期肝癌尚无特效治疗方法,生存率低,所以早期诊断、早期发现和早期治疗是降低肝癌死亡率的主要途径。

肝癌诊断一般是进行肝癌特异性标志物检查。迄今为止,肝癌标志物中应用最广泛、最有价值的是甲胎蛋白。所以,检测人血清中甲胎蛋白(AFP)是诊断肝癌等恶性肿瘤的重要措施之一。检测 AFP 方法有多种,以酶联免疫吸附测定法(ELISA)和放射免疫分析法(RIA)最为常用。但 RIA 具有放射性危害,标记物放射性半衰期较短,操作过程繁琐,且需要昂贵的 γ 射线检测仪^[2];ELISA 操作步骤也嫌冗长,还需用酶标仪^[3]。为解决上述方法的不足,国外在几年前研制出检测 hAFP 的免疫层析试条,这是继 ELISA、斑点免疫渗滤法之后出现的检测 hAFP 的第三代产品,国内尚属空白。

为此,我们以国产材料为主,研制出能简便、快速检测 AFP 的免疫层析试条,为肝癌的早期诊断提供适于普查的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

TGLL-18B 台式高速冷冻离心机(江苏太仓县医疗器械厂);DU-7HS 紫外可见分光光度计(美国,贝克曼公司)。

氯金酸和柠檬酸三钠为国产分析纯;AFP 标准品和四株抗 AFP 单克隆抗体(McAb)系由兰州生物制品研究所惠赠;封阻剂(作者研制的植物水解蛋白封阻剂);硝酸纤维素滤膜(NC 膜),孔径 10 μm (德国, S&S 公司)。实验用水均为超纯去离子水。

1.2 胶体金的制备

按 Frens^[4]的柠檬酸钠还原法制备。用此法制备的胶体金平均颗粒直径约 15 nm, pH 值 5.0~5.5, 冷却后加入 0.02% 叠氮化钠防腐,置 4℃ 冰箱保存。制备的胶体金以水为空白,在分光光度计上从 400

~700 nm 扫描,光吸收波长及峰高与胶体金直径和浓度相关,从而可测定其相对颗粒直径和浓度。

1.3 免疫层析试条的制备

1.3.1 胶体金溶液最佳 pH 的选择 用 0.2 mol/L K_2CO_3 仔细调节一系列 pH 值胶体金(pH 5.5、6.0、7.0、7.5、8.0 和 8.2),然后用此系列 pH 值胶体金分别标记抗 AFP 单抗,再检测 AFP,以显色快且颜色深为佳。

1.3.2 稳定点的测定 按文献^[4,5]报道,实验得出剂量响应曲线,曲线拐点对应的浓度为抗 AFP 单抗最小稳定化浓度。

1.3.3 胶体金标记抗 AFP 单抗实验 在文献^[6,7]基础上,经过探索,选用下列方法金标单抗:用 0.2 μm 细菌滤膜过滤抗 AFP 单抗,4℃ 透析滤液 20 h。取出透析后的抗 AFP 单抗做稳定性试验。根据实验数据,以适宜比例混合抗 AFP 单抗和胶体金,持续搅拌 40 min。加入含聚乙二醇(PEG)20 000 和 BSA 的缓冲液,继续搅拌 60 min。4℃ 12 500 r/min 离心 45 min,弃上清,沉淀的金标单抗离心洗涤 2 次后,适当稀释,置 4℃ 冰箱保存备用。

1.3.4 抗 AFP 单抗包被 先把抗 AFP 单抗以区带状点在膜的适当位置,室温下晾干,然后加封阻液作用数小时,以封阻膜上剩余的活性基团。弃去封阻液,用水冲洗干净,再用缓冲液洗膜 2 次,室温晾干,密封备用。如上包被抗 AFP 单抗的包被膜保存期试验:把所制备的包被膜放入密闭的塑料袋中,室温下放置一年,准时取出作试条测定试验。

1.3.5 筛选抗 AFP 单抗的配对实验 把 4 株抗 AFP 单抗分别制成包被单抗或金标单抗,然后两两配对,分别制成试条进行测定,能显色的一对则为配对单抗。

1.3.6 金标单抗玻璃纤维冻干垫 把液态金标单抗与自制均相剂混匀后冻干在玻璃纤维(0.5×0.5 cm)上备用。

1.3.7 免疫层析试条的装配 按吸水滤纸、金标单抗玻璃纤维冻干垫、包被有检出区带的 NC 膜和吸水滤纸的顺序用透明胶纸使其首尾相互衔接,便制成了 0.5×6.5 cm 大小的免疫层析试条。

2 结果与讨论

2.1 胶体金

胶体金因其颗粒大小不同而呈不同的光散射作用,并因此呈红色、紫红色或棕色。所以扫描胶体金的吸收光谱,是一种简单易行的胶体金质量鉴定方法。本实验所制备的 15 nm 直径胶体金最大吸收波长在 518 nm 处,峰值为 0.79。进口的 16 nm 直径胶体金的最大吸收光谱波长在 520 nm 处,峰值为 0.52,二者峰位几乎重叠,且前者峰值高于后者,说明自制胶体金完全可与商品胶体金相媲美。

分别保存 2 个月和 4 个月经浓缩 0.2 和 5 倍的胶体金,目测判断皆为均相。用 DU-7HS 紫外可见分光光度计扫描各浓度吸收光谱,峰位仍为 518 nm,只是随着浓缩倍数增大,吸收峰值相应增大。说明自制胶体金在 4℃ 冰箱内可至少保存 4 个月。

2.2 免疫层析所需的最佳条件

2.2.1 胶体金标记单抗的最适 pH 值与稳定性 从 pH 5.0 至 pH 7.5,随 pH 值增大试条显色加深;从 pH 7.5 至 pH 8.2,随 pH 值增大试条显色变浅。所以,用胶体金标记抗体的最佳 pH 为 7.5。

按实验结果得出的剂量响应曲线,曲线拐点浓度为 7.5 $\mu\text{g/mL}$,由此确定,在 1 mL 胶体金中至少应滴加 2.5 mg/mL 的抗 AFP 单抗 3 μL 。

试验表明,分别用保存 0、3、6 和 10 个月的金标单抗制备的免疫层析试条检测 AFP,其免疫活性无明显变化,所标记的金标单抗可保存很长时间,如表 1 所示。

Table 1 The preserving term of colloidal gold-labeled monoclonal antibodies

| The preserving term of colloidal gold-labeled monoclonal antibodies (months) | 0 | 3 | 6 | 10 |
|--|---|---|---|----|
| Reactivity (strip developing colour is "+") | + | + | + | + |

2.2.2 包被与封阻 根据胶体金颗粒与单抗分子是通过异性电荷之间存在的范德瓦耳引力相结合的特点,用物理吸附法把抗 AFP 单抗以区带形式包被在 NC 膜上,再用封阻剂封阻,检测效果良好。说明物理吸附包被法简单易行。如此处理的包被膜密闭放在室温下存放一年后检测,显色变浅,但肉眼仍能清楚辨别。

2.2.3 关于筛选配对抗 AFP 单抗的实验结果 把四株抗 AFP 单抗一分为二,分别如表 2 所示组合进行包被或金标,然后制成试条检测 AFP,能显色者为配对成功,以“+”表示;不显色者为不能配对,以“-”表示。结果表明,只有单抗 2(作金标单抗)和单抗 3(作包被抗体)配对。这说明,单抗 2 和单抗 3 与 hAFP 反应的表位相异,所以有利于三者相结合。其余抗 hAFP 单抗之所以不能配对,可能是两株单抗作用于 hAFP 的表位相同,或者二者作用于 hAFP 的表位相距太近以至形成不可接近的空间位阻的缘故。

Table 2 Screen out mating anti-AFP monoclonal antibodies

| Coating McAb | Colloidal gold-labeled McAb | | | |
|--------------|-----------------------------|-------|-------|-------|
| | McAb1 | McAb2 | McAb3 | McAb4 |
| McAb1 | | - | - | - |
| McAb2 | - | | - | - |
| McAb3 | - | + | | - |
| McAb4 | - | - | - | |

2.2.4 免疫层析试条 用免疫层析试条检测 0.1 mL AFP 标准品,对强阳性样品(≥ 400 ng AFP/mL)只需 3 min 就能显出肉眼可见的红色区带,5 min 时已显色很深;而弱阳性样品(≥ 20 ng AFP/mL)显现红色区带则需要 5 min,20 min 时显色最深,从而成功地把检测阳性阈值定为 20 ng AFP/mL(如图 1 所示)。

据文献报道,AFP 的分子量约 70 000,是由卵黄囊及胚胎肝产生的糖蛋白,是存在于胎儿组织和体液中的胚胎性蛋白质。胎儿出生一年后就降到正常人值(< 5 ng/mL)。如果成人 AFP 大于 20 ng/mL,则肝脏病变的可能性很大,因而使 AFP 成为大规模普查肝脏病变的检测指标。若发生肝癌时,AFP 将明显地升高,大大超过正常值,高达 400 ng/mL 以上。实践证明,以 AFP 作为肝癌诊断指标,准确率可达 70%~90%^[8,9]。因此,把免疫层析试条检测阳性阈值定在 20 ng AFP/mL。此法不仅可以用于一般人群的筛检,而且可以用于肝癌治疗后的病情监测及术后有无复发转移的预后检测^[10]。

实际上,快速检测人血清 AFP 的免疫层析试条是一种把免疫亲和技术、印渍术和经典的簿层层析技术组合在一起的新技术^[3]。检测时,把试条浸入 100 μ L 被测血清中,若血清中含 2 ng 以上 AFP(即 20 ng AFP/mL 血清),AFP 随血清在毛细作用下向上泳动,首先与金标抗 AFP 单抗结合成二元复合物,然后继续上升,当到达包被膜上检测区带时,该复合物被膜上单抗捕获,形成了“金标单抗/AFP/包被单抗”三元复合物,使该区带显红色而判为阳性。反之,若血清中 AFP 含量远少于 2 ng(如 ≤ 0.5 ng/100 μ L),形成三元复合物太少而不显色,判为阴性。所以,可用肉眼观察直观判断。

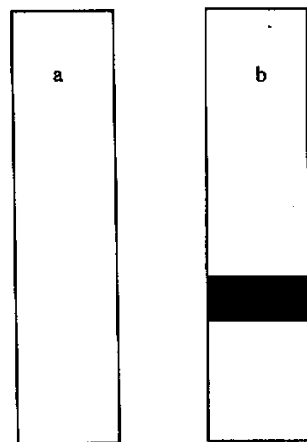


Fig. 1 AFP detected by immunochromatographic strip

The strip developed positive result (b) and negative result (a) in the presence (b) and absence (a) of AFP

3 结论

我们研制的试条主要特点是:(1)使复杂的操作简化为只需加样一步操作;(2)只需微量血清样品,故可采用指血;(3)用肉眼观察试条显色与否即可判断阳性、阴性结果,无需任何仪器,也不受场地限制;(4)检测 2~40 ng AFP/100 μ L 只需 5~20 min 就可知道结果。所以,这种检测 hAFP 的免疫层析试条具有简便、快速、直观、单份测定的优点,不仅适于医院使用,而且适于基层医疗机构和家庭使用,具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] 于育红,叶胜龙,汤钊猷等. 上海医科大学学报[J], 1997, **24**(3): 235.
- [2] 贺广彩,陈 杞,张丽民,陈克明. 上海免疫学杂志[J], 1994, **14**: 226.
- [3] 赵 实,范培昌. 分析科学学报[J], 1999, **15**(2): 162.
- [4] Frens G. Nature Phys. Sci. [J], 1973, **241**: 20.
- [5] 唐伟国主编. 医学检验诊断试剂的制备与应用[M]. 上海:上海科技文献出版社, 1996: 99.
- [6] Wang B L, Scopsi L, Nielsen M et al. Histochemistry[J], 1985, **83**: 109.
- [7] Herranen M, Vuento M. Analytical Biochemistry[J], 1994, **218**: 468.
- [8] 万文徽,李吉友. 中华医学检验杂志[J], 1997, **20**: 49.
- [9] 李春海. 中华医学杂志[J], 1993, **73**: 451.
- [10] Johnson P J. Clin. Liver Dis. [J], 2001, **5**(1): 145.

Study on the Preparation of Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of α -Fetoprotein

CHEN Ji-wu*, FAN Pei-chang

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai, 200062)

Abstract: An immunochromatographic strip for the simple and rapid detection of α -fetoprotein (AFP) in human serum, a marker for primary hepatic carcinoma is developed in this study. The preparation of colloidal gold was accomplished with the reagents and materials made in China. The factors influencing anti-AFP monoclonal antibodies labeled with the colloidal gold were tested. The conditions for the immobilization of the anti-AFP antibodies and the binding ability of the anti-AFP antibodies with AFP were also investigated. The results revealed that the colloidal gold prepared by ourselves was as good as the commercial ones. The activities of the monoclonal antibodies labeled with the colloidal gold and the immobilized antibodies were stable. The monoclonal antibodies labeled with the colloidal gold and the immobilized antibodies showed specificities of binding different epitopes on AFP molecule. The time for the detection with the prepared strips was 5 to 20 min, and the cut-off value for positive result was 20 ng AFP/mL of serum.

Keywords: α -Fetoprotein; Colloidal gold; Monoclonal antibody; Immunochromatographic strip