

[研究快报]

以 pH 敏感相分离高分子为载体的酶联 荧光免疫分析法测定人 IgG

林 鹏^{1,2}, 郑 洪¹, 杨黄浩¹, 杨 薇¹, 张长弓³, 许金钩¹

(1. 厦门大学化学系, 分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005; 2. 集美大学水产学院, 厦门 361021;

3. 厦门大学抗癌研究中心, 厦门 361005)

关键词 pH 敏感相分离高分子; 酶联荧光免疫分析; 人 IgG

中图分类号 O657.3

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2003)07-1198-03

pH 敏感高分子因其独特的 pH 敏感性质而在药物的控制释放^[1,2]、分子分离^[3]以及生物传感器^[4]等方面得到应用. 应用于免疫分析时, 要求 pH 敏感高分子在溶液 pH 7.4 左右波动时做出响应, 过多偏离生理 pH 会对免疫反应生成的抗原-抗体复合物造成不同程度的破坏. 目前, pH 敏感高分子并未在免疫分析中广泛应用, 这主要是由于高分子的相转变 pH 大多在 4 或 10 左右^[5,6]. 我们^[7]曾合成了 37 °C 下相转变 pH 在 5.6 左右的 pH 敏感高分子, 并将其作为免疫反应载体, 建立了乙肝表面抗原的分析系统, 虽然其相转变 pH 比以往的高分子更接近于中性^[5], 但并没有达到生理 pH 值 7.4 范围, 分离时仍可能对免疫复合物造成一定的损害.

pH 敏感高分子均含有酸性基团(如羧酸、磺酸)或碱性基团(如铵盐), 可通过接收或释放质子响应外界环境变化, 使溶解度发生改变^[8]. 据文献[9,10]报道, 温度敏感高分子的单体 *N*-异丙基丙烯酰胺(NIP)可与含有酸性基团或碱性基团的单体聚合, 由于引入了可电离或可质子化基团, 使得生成的共聚物在温度敏感的基础上, 又增加了 pH 敏感的特性, 其相转变 pH 值与单体配比及引入基团的电离或质子化常数有关. 研究发现, 将 NIP 与含有氨基的 *N,N'*-二甲基氨基丙基甲基丙烯酰胺(DMAPM)共聚^[11], 可合成出 37 °C 下相转变 pH 在 7.4 左右的敏感高分子[P(NIP-DMAPM)]. 我们首次将这种含有碱基的 pH 敏感高分子用作免疫分析的载体, 当溶液 pH < 7.4 时, 高分子呈透明溶液, pH > 7.4 时, 高分子很快从溶液中沉淀出来. 这可与含有酸性基团的敏感高分子^[5,7]互为补充, 适用于酸性条件下不稳定物质的测定. P(NIP-DMAPM)用于人 IgG 含量的酶联荧光免疫分析时, 由于其相变 pH 为中性, 使分离时对抗原-抗体复合物的损伤达到最低, 且反应温度的提高使反应达到平衡只需 4 min.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 NIP, *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(TEMED)和对-羟基苯乙酸(*p*-HPA)(分析纯, Kasei 公司); DMAPM(Aldrich 公司), 用前经减压蒸馏; *N*-羟基琥珀酰亚胺丙烯酸酯(NAS)按文献[12]方法合成; 过硫酸铵(APS)(分析纯, 上海爱建试剂厂); 牛血清白蛋白(BSA)(电泳单点纯, 上海长阳生化制药厂); 人 IgG, 羊抗人 IgG 多克隆抗体(Ab)和辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 抗体(HRP-Ab)(北京中山生物科技有限公司); H₂O₂(30%, 上海桃浦化工厂); 650-10S 型荧光光度计(Hitachi 公司).

1.2 pH 敏感高分子 P(NIP-DMAPM)的制备 将不同配比的 NIP 和 DMAPM 溶于 5 000 μL pH = 7.0 的磷酸盐生理盐水(PBS, 0.01 mol/L)中, 再加入 5 mg APS 和 10 μL TEMED, 混合均匀, 置于 25 °C 水浴中恒温振荡 2 h, 通过加入 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 使高分子沉淀出来, 于 37 °C 空气中高速

收稿日期: 2003-04-01.

基金项目: 教育部博士学科点基金(批准号: 2000038404)和福建省自然科学基金(批准号: D0110002)资助.

联系人简介: 许金钩(1937 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事分子发光分析研究. E-mail: jgxu@xmu.edu.cn

(4 000 r/min) 离心 5 min, 以除去未反应的单体, 最后将沉淀溶于 5 000 μ L PBS 中。

1.3 P(NIP-DMAPM)-Ab 偶联物的制备 将 1 mg Ab 加入到 1 700 μ L pH= 7.0 的 PBS 溶液 (0.01 mol/L) 中, 再加入 200 μ L NAS 的二甲亚砷溶液 (0.1%), 混合后在 37 $^{\circ}$ C 水浴中温育 1 h. 将该溶液透析过夜后, 加入 950 μ L 1 mol/L NIP, 500 μ L 0.1 mol/L DMAPM, 再加入 5 mg APS 和 10 μ L TEMED, 混合均匀, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中恒温振荡 1 h, 加 0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH= 8.7) 250 μ L, 继续振荡 5 min, 于 37 $^{\circ}$ C 空气浴中高速离心 5 min, 倾去上清液, 加入 PBS 溶解, 再加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液, 然后振荡、离心, 重复 3 次, 最后将沉淀溶于 5 000 μ L PBS 中。

1.4 夹心型酶联荧光免疫分析人 IgG 移取 30 μ L P(NIP-DMAPM)-Ab 溶液于 1 000 μ L 离心管中, 加入 50 μ L 5% BSA, 然后加入一定量的人 IgG, 用 pH= 7.0 的 PBS (0.01 mol/L) 定容, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中振荡 5 min, 使溶液发生特异性免疫反应, 加入 50 μ L pH= 8.7 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (0.2 mol/L) 缓冲溶液, 将溶液置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中温育 5 min, 使聚合物沉淀出来. 将沉淀于 37 $^{\circ}$ C 空气浴下离心 5 min, 倾去上层清液, 将沉淀溶于 1 000 μ L PBS 溶液, 再加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液, 温育并离心, 倾去上层清液, 重复 3 次, 最后在沉淀中加入 80 μ L HRP-Ab 溶液 (1 : 500 稀释), 用 PBS 溶液定容至 1 000 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中振荡温育 5 min, 随后如同以上步骤调节 pH, 控温离心, 得到沉淀, 最后在沉淀中加入 500 μ L 0.05 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液 (pH= 5.8), 200 μ L 9.0×10^{-5} mol/L H_2O_2 和 200 μ L 0.01 mol/L *p*-HPA, 于室温温育 15 min 后, 加入 100 μ L 0.2 mol/L NaOH, 以 320 nm 为激发波长, 在 410 nm 处测量体系的荧光强度, 以荧光强度对人 IgG 浓度做工作曲线。

2 结果与讨论

2.1 pH 敏感高分子 P(NIP-DMAPM) 的相转变 pH 值

pH 值的变化情况, 透光率突变处的 pH 值即为相转变 pH. 由图 1 可见, 相转变 pH 随着共聚物中 DMAPM 摩尔分数的增加而增大, 当 DMAPM 的摩尔分数达到 5% 时, 相转变 pH 正好达到生理 pH 值 7.4, 在此 pH 值附近出现的沉淀与溶解的变化对抗原-抗体复合物的损害最小, 适合于免疫分析. 文献[13]报道, 共聚物的相转变 pH 与高分子链的亲水性/疏水性平衡密切相关, 亲水基和疏水基达到固定的比例时, 才会出现沉淀-溶解的突变. 聚 NIP 在临界溶解温度 (约 31 $^{\circ}$ C) 之上表现为完全疏水性, 出现沉淀^[14], 而 DMAPM 的质子化无疑可增加其亲水性. DMAPM 含量越高, 为达到产生突变所要求的亲水基和疏水基的固定比例, 质子化程度必须减小, 这样其在沉淀-溶解突变处的 pH (即相转变 pH) 便相应提高。

2.2 免疫分析原理 采用“夹心型”的免疫分析模式进行人 IgG 的测定, 高分子在活性酯 NAS 作用下与 Ab 偶联, 加入人 IgG 后, 再加入过量 HRP-Ab, 于是形成夹心化合物 Ab/人 IgG/HRP-Ab, 经分离后再通过加入 HRP 的荧光底物以产生荧光信号来进行人 IgG 抗原的定量. 采用 pH 敏感高分子作为免疫反应载体代替传统载体, 可以在 37 $^{\circ}$ C 的生理温度下进行反应, 进一步提高了免疫反应的速度和效率。

2.3 免疫条件的优化 对于 1 : 500 稀释的标记复合物, HRP-Ab 的适宜用量为 40 ~ 300 μ L, 本文选择为 80 μ L. P(NIP-DMAPM)-Ab 的最佳用量为 30 μ L. 免疫反应可在生物体的生理温度 37 $^{\circ}$ C 下进行, 升高温度 4 min 即可达平衡, 本实验选择为 5 min.

2.4 工作曲线及样品测定 在最佳免疫反应条件下, 人 IgG 质量浓度在 0 ~ 1 700 ng/mL 范围内, 与体系的相对荧光强度呈良好线性关系, 线性方程为 $F = -4.56 + 0.13c$, 相关系数 $r = 0.991$, 以 3 倍空

图 1 示出了 37 $^{\circ}$ C 时共聚物溶液的透光率随

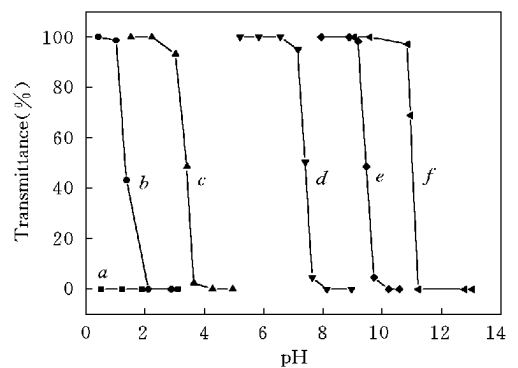


Fig. 1 pH dependence of transmittance at 450 nm for a series aqueous solutions with different initial molar ratio of DMAPM to P(NIPAAm-DMAPM)s $n(\text{DMAPM}) : n[\text{P}(\text{NIPAAm-DMAPM})_s]$: a. 0.010; b. 0.030; c. 0.040; d. 0.050; e. 0.075; f. 0.100.

白测定的标准偏差($n=9$)除以工作曲线的斜率得方法的检测限为 2.2 ng/mL. 利用上述方法对 3 份人血清中的人 IgG 浓度进行测定, 将人血清样品用 PBS 逐级稀释 1 000 倍, 每次取样 50 μ L, 所得结果列于表 1, 测得值均在正常人血清中人 IgG 含量(10 ~ 14 mg/mL) 范围内^[15], 同时用加标回收实验进行验证, 结果令人满意.

Table 1 Determinative data of human IgG in human sera

No.	Human IgG levels/ (mg · mL ⁻¹) [*]	Added/ ng	Found/ ng	Recovery (%)	RSD (%)
1	13.9	300	314	104.7	6.1
2	13.9	300	296	98.7	3.4
3	13.0	300	321	107.0	5.6

* Mean of six times of determinations.

参 考 文 献

- [1] Siegel R. A., Falamarzian M., Firestone B. A. *et al.* J. Controlled Release[J], 1998, **8**: 179—182
- [2] Ghandehari H., Kopeckova P., Kopecek J. Biomaterials[J], 1997, **18**: 861—872
- [3] Sassi A. P., Shaw A. J., Han S. M. *et al.* Polymer[J], 1996, **37**(11): 2 151—2 164
- [4] Healey B. G., Walt D. R. Anal. Chem.[J], 1995, **67**(24): 4 471—4 476
- [5] ZHOU Ping(周平), DENG Yan-Zhuo(邓延倬), ZENG Yun-E(曾云鹄). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 1998, **19**(2): 198—200
- [6] Carmen A. L., Angel C. J. Controlled Release[J], 2002, **80**: 247—257
- [7] YANG Huang-Hao(杨黄浩), ZHU Qing-Zhi(朱庆枝), LI Dong-Hui(李东辉) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2000, **21**(10): 1 498—1 500
- [8] Qiu Y., Park K. Adv. Drug Deliv. Rev.[J], 2001, **53**: 321—339
- [9] Brazel C. S., Peppas N. A. Macromolecules[J], 1995, **28**: 8 016—8 020
- [10] Feil H., Bae Y. H., Feijen J. *et al.* Macromolecules[J], 1992, **25**: 5 528—5 530
- [11] Park T. G. Biomaterials[J], 1999, **20**: 517—521
- [12] Liu F., Zhuo R. X. Biotechnol. Appl. Biochem.[J], 1993, **18**: 57—65
- [13] Kang S. I., Bae Y. H. J. Controlled Release[J], 2002, **80**: 145—155
- [14] Zhu Q. Z., Liu F. H., Xu J. G. Analyst[J], 1998, **123**: 1 131—1 134
- [15] LIN Yan-Xue(林颜学). Immunology Foundation(免疫学基础)[M], Fuzhou: Science and Technology Press of Fujian, 1980: 30

Enzyme-linked Fluorescence Immunoassay for Human IgG by Using a pH-Sensitive Phase Separating Polymer as Carrier

LIN Peng^{1,2}, ZHENG Hong¹, YANG Huang-Hao¹, YANG Wei¹,
ZHANG Chang-Gong³, XU Jin-Gou^{1*}

- (1. Key Laboratory of Analytical Science of MOE, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Aquaculture College, Jimei University, Xiamen 361021, China;
3. Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Poly (*N*-isopropylacrylamide-*N*, *N*'-dimethyl aminopropyl methacrylamide) [P(NIP-DMAPM)], a novel linear water-soluble pH-sensitive polymer whose phase transition pH is about 7.4 at 37 °C, was synthesized. P(NIP-DMAPM) polymer precipitated out of water above a critical pH 7.4 at 37 °C and redissolved at pH below 7.4. P(NIP-DMAPM) was used as a novel separation carrier for the reactants in immunoassay and a enzyme-linked fluorescence immunoassay for human IgG was built. The linear range of determination was 0 ~ 1 700 ng/mL and the limit of detection was 2.2 ng/mL. The sensitivity of this method was close to that of traditional ELISA by using same reactants. However, the assay was much faster. This method has been applied to the determination of the human IgG levels in human serum with satisfactory results.

Keywords pH-sensitive phase separating polymer; Enzyme-linked fluorescence immunoassay; Human IgG (Ed.: K, G)