技术方法

文章编号:1000-5404(2008)09-0878-02

一种高度敏感检测C肽的磁分离酶联免疫荧光法

白 洁[1,2],陈 庆[1,2],赵 伟[2],刘进洲[2],薛 建[2],刘雅诚[2] ([1]中国科学院研究生院,北京 100049;[2]北京市公安局刑侦总队法医检验鉴定中心,北京 100192)

摘 要:目的 建立一种低成本、高敏感性检测人血清C肽(C-Peptide,C-P)的磁分离免疫荧光方法(magnetic separation enzyme immunofluorescence,MEIF)。方法 用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AP)标记的抗C肽特异性单克隆抗体(monoclonal antibody,mAb),与异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)偶联的另1个抗C肽mAb配对构成双抗体夹心免疫结合,用抗FITC的多抗免疫磁珠作为固相分离载体,用4-甲基磷酸伞型酮(4-methylumbelliferyl-phosphoric acid,4-MUP)为荧光底物建立磁分离酶联免疫荧光分析法。结果 方法灵敏度0.033 ng/ml,批内变异系数(*CV*)为4.4%~5.9%,批间*CV*为4.3%~8.6%,稀释回收率为82.4%~119.4%,加标回收率为94.1%~113.0%。将实际样品测定与磁分离免疫发光系统检测的结果相比较有较好的相关性。结论 MEIF定量测定C肽的方法成本低、灵敏度及特异性高、稳定性好,具有较好的应用前景。

C肽(C-Peptide,C-P)又称连接肽,是胰岛β细胞的分泌产物,它与胰岛素有一个共同的前体——胰岛素原。在胰岛β细胞分泌颗粒中,胰岛素原经蛋白酶裂解,形成等物质的量的由AB链组成的胰岛素和C肽,然后分泌并进入血液。由于C肽没有胰岛素的生理作用,与胰岛素抗体无交叉反应,所以测定血循环中C肽水平能反映β细胞合成与释放胰岛素功能。胰岛素进入肝、肾等组织,一方面受胰岛素酶的灭活,另一方面在周围血循环中胰岛素每次循环将有80%被破坏,其半衰期只有4.8 min,而C肽作为胰岛素等分子的肽类物质,体内半衰期为10~11 min,且血液C肽水平不受外源性胰岛素的影响,因此血中C肽浓度可更好地反映胰岛β细胞的贮备功能[1]。

本法采用双抗体夹心法,用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AP)作为酶标记物,以磁性微粒作为固相分离载体,同时结合4-甲基磷酸伞型酮(4-MUP)为底物的荧光分析技术,旨在建立用磁分离免疫荧光方法(magnetic separation enzyme immunofluorescence,MEIF)对人C肽进行定量检测的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

可识别C肽抗原不同表位的2株单克隆抗体,购自Biodesign公司;AP购自英国Biozyme公司;C肽抗原、FITC及底物溶液4-MUP购自Sigma公司;活化剂N琥珀酰亚胺3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)和二硫苏糖醇(DTT)购自Pierce公司;磁分离试剂、洗液购自北京倍爱康生物公司产品;C肽质控血清、人胰岛素、牛胰岛素均购自中国药品生物制品检定所;蛋白质纯化系统AKTA purifier 100购自安玛西亚公司;victor³荧光检测仪为PerKinElmer公司产品。

1.2 方法

1.2.1 mAb标记FITC[2] 抗体与FITC按1∶6(物质的量的比)室温避光反应4 h,然后用PD10柱子去除游离的FITC,并根据公式计算F/P比率:$F/P = [2.87 \times D(495)]/[D(280) - 0.35 \times D(495)]$。mAb与FITC连接物(mAb-FITC)的工作液用0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)的缓冲液稀释。

1.2.2 mAb的AP标记与纯化[2] 活化AP和另1株mAb,将两者按1∶1物质的量的比混合,室温反应4 h。然后通过Superdex 200凝胶层析柱分离纯化,除去游离的mAb和AP,收集蛋白峰。使用时,将收集的Ⅰ峰、Ⅱ峰按1∶1体积比混合,用含1 mmol/L $MgCl_2$的0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液进行稀释。

1.2.3 C肽荧光免疫分析方法的建立 分别配制C肽浓度为0、0.29、0.80、2.66、7.31、18.58 ng/ml的溶液作为标准液,取各浓度的标准液及样本各15 μl,加入酶标孔底部,再分别加入mAb-FITC及mAb-AP试剂各30 μl,混匀后37 ℃温育30 min,再加入磁分离剂40 μl,充分混匀后于37 ℃反应10 min,在磁分离器上分离2 min后倾倒上清液,再用洗液清洗3次,加入150 μl 4-MUP工作液,混匀,室温反应15 min,于磁分离器上分离,见所有磁微粒全部沉淀后,检测荧光强度。采用四参数拟合标准曲线,计算样品中C肽的含量(ng/ml)和r^2值。

1.2.4 C肽MEIF法的性能检测 同时测量20次0浓度标准品,计算检测荧光值均数($\bar{x}$)和标准差(s),将$\bar{x} + 2s$值输入拟合的曲线中,求出其浓度为灵敏度。在1次测试中,对高、中、低值血清(其浓度分别为0.5、2.5、10 ng/ml)进行15次重复测试,并计算其批内*CV*;在3次测试中,对上述3个不同浓度的血清进行15次重复测试,并计算其批间*CV*。对高值样本血清(3.0、6.0、15 ng/ml)进行倍比稀释后测试其回收率,对低值

作者简介:白 洁,女,山西省太原市人,硕士研究生,法医师,主要从事法医临床学方面的研究。电话:(010)62908913,E-mail:coubai@sohu.com
通信作者:刘雅诚,电话:(010)62909016,E-mail:yachengliu@163.com
收稿日期:2008-01-11;修回日期:2008-03-06

表 1　不同浓度的抗体标记物组合的荧光值（mAb-FITC/mAb-AP，μg/ml）

C 肽（ng/ml）	0.5/1.0	0.5/1.5	0.5/2.0	1.0/1.0	1.0/1.5	1.0/2.0	1.5/1.0	1.5/1.5	1.5/2.0
0	26 606	28 240	27 117	31 018	35 631	46 877	40 796	40 017	49 957
0.29	28 355	35 287	36 282	50 080	64 476	78 709	45 080	79 757	92 037
18.58	285 186	314 031	344 794	749 783	974 513	1 226 467	486 695	797 395	1 336 052
r^2	>0.990	>0.994	>0.993	>0.991	>0.991	>0.998	>0.996	>0.999	>0.994

样本血清添加一定浓度 C 肽抗原后测试其添加回收率。将人胰岛素和牛胰岛素分别配制成 5、15、20 ng/ml 的浓度，用该法检测，以此测试特异性。同时用建立的磁分离荧光法和磁分离发光法检测 48 例患者血清中 C 肽的含量，计算相关性。

2　结果

2.1　mAb -FITC 的 F/P 比值

F/P = (2.87 × 0.614)/(1.805 − 0.35 × 0.614) = 1.11。

2.2　酶标记 mAb 工作浓度的选择

将 mAb-FITC 配制成 0.5、1.0、1.5 μg/ml 浓度的工作液，将 mAb-AP 连接物配制成 1.0、1.5、2.0 μg/ml 浓度的工作液，按照操作步骤，采用方阵法[3] 选择 2 种标记 mAb 的工作浓度，测定 3 个标准点（0、0.29、18.58 ng/ml）的荧光值，结果显示浓度与荧光值的相关性（r^2）均大于 0.99，通过比较各点荧光值及浓度间落差发现当 mAb-FITC/mAb-AP 的工作浓度分别为 1.0 μg/ml 和 2.0 μg/ml 时，r^2 值最大，表现出了明显的优越性。见表 1。

2.3　C 肽标准点的浓度梯度与对应荧光值的相关性分析

将浓度分别为 0、0.29、0.80、2.66、7.31、18.58 ng/ml 的 C 肽与相对应的荧光值进行四参数线性拟合，显示在 0 ~ 18.58 ng/ml 的范围内曲线的线性良好，相关系数 r^2 值为 0.998 9。

2.4　对磁分离免疫荧光方法的评价

①灵敏度：3 次实验，可检测到的最小浓度为 0.033 ng/ml。②精密度：对两次实验整理，批内 *CV* 范围是 4.4% ~ 5.9%，批间 *CV* 范围 4.3% ~ 8.6%。③回收率：将 C 肽高值血清分别作 1∶1 ~ 1∶16 稀释后，测定 C 肽的含量，两次实验得到的稀释回收率为 82.4% ~ 119.0%。把一定含量的标准 C 肽抗原加入到 3 份样品中，两次实验测定的加浓回收率为 94.1% ~ 113.0%。④特异性：于血清样品中加入不同浓度的人胰岛素和牛胰岛素后，用该法检测，结果表明无明显的交叉反应，具有特异性。⑤对比试验：分别用该法和发光法同时检测 48 例患者血清 C 肽的含量，显示了较好相关性（$y = 0.922x$，$r^2 = 0.952\ 8$）。

3　讨论

血清 C 肽水平的检测对于指导胰岛素治疗、鉴别各种低血糖原因、糖尿病的分型、判断胰岛瘤手术效果等具有重要的意义[4,5]，因此血清 C 肽含量的测定在临床越来越受到重视。在实际应用中，有的采用灵敏度较高的全自动化学发光检测方法，但价格高昂，目前很难普及；多数使用者采用 ELISA 法，虽然具有简便的优点，但由于检测灵敏度低，线性范围窄，仅能用于定性和半定量检测，容易受实验因素的干扰，使其应用受到了一定的限制。因此人们一直在寻求一种实验操作简便、对仪器要求简单的血清 C 肽检测方法。

本实验方法符合了上述要求，其优点在于：①采用普通的 ELISA 微孔板为反应容器，可用于普通的荧光检测仪器。目前高灵敏的检测方法多采用微粒子作为分离试剂，化学发光试剂作为检测底物，且由于受到全自动仪器的限制，试剂反应容器多为反应管。②本法中采用 4-MUP 作为反应荧光底物，价格较低廉，且许多实验室还能够自行合成，使用方便，而国内检测常用的稳定高效化学发光底物均从国外进口，价格昂贵。③本实验比较了 48 份血清值，相关系数达到了 0.95 以上，显示了该法对实际样本检测有较好的准确性。检测灵敏度的提高，能够更为可靠地监测血清中 C 肽的变化情况，这对于疾病的诊断与治疗具有十分重要的意义。本实验也为其他种类的血清标志探求价廉、简便、灵敏的检测方法积累了实践经验。

关键词：免疫荧光；4-甲基磷酸伞型酮；磁珠；C 肽
中图法分类号：R446　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Crownover B K, Nashelsky J, Lo V. Clinical inquiries: What is the best way to distinguish type 1 and 2 diabetes? [J]. J Fam Pract, 2005, 54(7): 630 – 632.

[2] 刘振世，周　昊，陈海生，等. 人绒毛膜促性腺激素游离 β 亚单位磁分离酶联免疫方法的建立[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2006，22(3)：392 – 394.

[3] 赵丕成，袁大为，祝　润，等. 抗磺胺嘧啶单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测试剂盒的建立[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2004，20(2)：191 – 194.

[4] Wahren J, Ekberg K, Johansson J, *et al*. Role of C – peptide in human physiology[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 278(5): E759 – E768.

[5] Vezzosi D, Bennet A, Fauvel J, *et al*. Insulin, C – peptide and proinsulin for the biochemical diagnosis of hypoglycaemia related to endogenous hyperinsulinism[J]. Eur J Endocrinol, 2007, 157(1): 75 – 83.

（编辑　吴培红）