

胶体金免疫比色法测定血清 h-FABP 水平的初步研究*

孙 宇,王 茹,顾李霖,李佳林,王会中[△]

(解放军第 305 医院检验科,北京 100017)

摘要:目的 初步建立一种基于胶体金均相免疫比色技术定量检测血清心脏型脂肪酸结合蛋白(h-FABP)的方法。方法 依据均相比色原理定量测定样本中抗原或抗体水平的免疫学检测技术原理,制备直径为 80 nm 左右的胶体金颗粒并标记抗体,利用胶体金吸附标记物在 540、660 nm 处吸收峰的变化初步建立用于检测血清 h-FABP 水平的方法。结果 制备的胶体金颗粒液相分布均匀,制备的胶体金颗粒标记抗体呈均相分布,符合检测实验要求。通过实验确定反应体系组成为标本用量为 30 μ L, h-FABP 抗体标记量为 100 μ g/100 mL 胶体金溶液,反应时间为 10 min,反应温度为 37 $^{\circ}$ C,以实验确定 h-FABP $\leq$ 3.6 ng/mL 为界限值,对临床标本进行初步分析与免疫比浊的检测结果比较,符合率达 95.09%。结论 初步完成了 h-FABP 的胶体金免疫比色法的建立,与成熟的免疫比浊方法检测结果具有一定的符合性,有必要进行更深一步的研究。

关键词:胶体金; 比色法; 脂肪酸结合蛋白质类; 实验室技术和方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.013

中图法分类号:R446.61

文章编号:1673-4130(2019)01-0048-04

文献标识码:A

**Preliminary study on detection of hard-type fatty acid binding protein in human serum
based on colloidal gold immunological colorimetric assay***

SUN Yu, WANG Ru, GU Lili, LI Jialin, WANG Huizhong[△]

(Department of Clinical Laboratory, the 305th Hospital of PLA, Beijing, 100017, China)

Abstract: **Objective** To establish a colloidal gold colorimetric assay method for detection of hard-type fatty acid binding protein (h-FABP) in serum. **Methods** According the principle of homogeneous colorimetry for quantitative determination of antigen or antibody in a sample, based on the changes of absorption peak of colloidal gold adsorption marker at 540 and 660 nm, we established a method for detecting h-FABP in serum. **Results** The colloidal gold particles were well distributed, and the prepared antibodies labeled colloidal gold particles were homogeneous distribution, which were suitable for the requirements of the test. In the preliminary analysis of the clinical specimens, compared with the Immune Turbidimetry method, the coincidence rate was 95.09%. **Conclusion** A colloidal gold colorimetric assay method for h-FABP in the human serum had been established preliminarily, the results were certain consistent with those obtained by Immune Turbidimetry method, and can be further applied to clinical detection.

Key words: gold colloid; colorimetry; fatty acid-binding proteins; laboratory techniques and procedures

脂肪酸结合蛋白(FABP)于 1971 年被美国学者 OCKNER 等^[1]在肠道黏膜中发现,后续发现了多种组织的 FABP^[2]。心脏型脂肪酸结合蛋白(h-FABP)主要存在于心肌细胞质中,心肌损伤时易于释放入血。有研究表明,发生急性冠状动脉综合征(下称“冠脉综合征”)时,在未发生缺血、缺氧、坏死时即可检出 h-FABP^[3-4],目前,其已被推荐为冠脉综合征的联合测定指标^[5-6]。对 h-FABP 的检测目前常用的有胶乳

凝集比色法、免疫荧光法、酶联免疫吸附试验(ELISA)法、金标示踪法等,国内外均有相关成品试剂用于临床,但这些方法存在价格昂贵、检测耗时长且定量不准确等缺点^[7],不适宜基层医疗机构广泛开展。1980 年 LEUVERING 等^[8]利用免疫学反应时金颗粒凝聚导致颜色减退的原理,建立了均相溶胶颗粒免疫测定法,成功用于人体绒毛膜促性腺激素(HCG)的检测,开启了胶体金均相免疫检测用于临床检测的开

* 基金项目:北京市科委首都特色项目(Z151100004015208)。

作者简介:孙宇,男,主治医师,主要从事临床检验自动化分析方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail: wanghuizhong305@163.com。

本文引用格式:孙宇,王茹,顾李霖,等.胶体金免疫比色法测定血清 h-FABP 水平的初步研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(1):48-52.

端。程黎明等^[9]于 2010 年报道了采用该技术用于胱抑素 C 的定量检测。胶体金均相免疫反应,分析灵敏度优于普通均相免疫比浊试剂,且制作工艺相对简单,原材料来源容易,基于这些优势,本研究建立了一种经济、便捷的 h-FABP 定量检测方法,其基本原理是将抗 h-FABP 抗体用物理吸附方法连接到直径约 80 nm 的胶体金表面,此时在 540 nm 处有最大光谱吸收峰。当吸附有 h-FABP 抗体的胶体金在液相中与 h-FABP 相遇时就会结合、聚集,在 540 nm 处吸光度值会降低,降低幅度与被结合 h-FABP 的量呈反比;同时,在 660 nm 处会出现一个最大吸收峰,峰值与被结合的 h-FABP 量呈正比。通过检测样本溶液在 540、660 nm 处吸光度的变化,实现了对溶液中 h-FABP 水平的测定,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源与采集 阳性标本取自 2016 年 3—9 月本院门诊、住院经确诊为急性心肌梗死(AMI)患者 52 例。健康对照组标本为本院健康体检人员,无相关病史及体征,共 50 例。收集贝克曼检测仪检测结果为临界(Cut-off)值标本 30 份,−80 ℃冻存备用。

1.2 主要试剂与原料 氯金酸、蔗糖、甘氨酸溶液、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠均为国药化学试剂(分析纯),柠檬酸三钠为 Sigma(分析纯),脱脂奶粉为 BD Difco™,吐温-20 为西陇化工产品(分析纯),4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)为 Sigma(分析纯)等。常规配制 50 mmol/L、pH=7.2~7.4 的对苯二甲酸丁二醇酯(PBST)缓冲液;鼠抗人 h-FABP 多克隆抗体为北京博研生物技术有限公司生产(货号 604221C);收集患者血清配制围为 60 ng/mL 的 h-FABP 校准血清备用。胶体金保存液:50 mmol/L Hepes,20%(w/v)蔗糖,1%(w/v)甘氨酸,1%(w/v)。

1.3 主要检测仪器与试剂 北京利德曼生化股份有限公司 h-FABP 检测试剂及标准品、北京普析紫外可见分光光度计 TU1810 型、日本日立 S-4800 电子显微镜等。所有试剂均在有效期内,严格按检测标准操作规程要求进行操作。

1.4 实验方法

1.4.1 胶体金制备 将 10 mL 1%(w/v)氯金酸溶液与 1 000 mL 超纯水在玻璃容器内混合均匀,并加热至沸腾。将 10 mL 1%(w/v)柠檬酸三钠溶液快速加入至容器内,并保持加热状态。当溶液由淡黄色变为红棕色,再变为酒红色后继续保持沸腾加热 20 min 后停止加热。待溶液冷却至室温后加超纯水补足至 1 000 mL,即制得实验所需胶体金颗粒。

1.4.2 标记物制备 取 100 mL 上述胶体金溶液,置于磁力搅拌器上(200 r/min)。缓慢滴加 10% K₂CO₃ 溶液,将胶体金 pH 调至 9.0~9.5,并保持搅拌状态。

将 h-FABP 抗体用 50 mmol/L、pH 7.2 的 PBST 缓冲液稀释至 50~100 μg/mL,取一定量稀释后的抗体缓慢滴加至胶体金溶液中,并保持搅拌状态 2 h。向胶体金溶液中加入 1%(w/v)甘氨酸溶液 1 mL 和 5%(w/v)脱脂奶粉溶液 1 mL,保持搅拌状态,封闭 1 h,转移至离心管内,4 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,沉淀用 20 mL 胶体金保存液复悬,磁力搅拌(300 r/min)2 h。

1.5 反应体系建立 将标记 h-FABP 抗体按标记物制备过程进行梯度标记,并用校准血清进行验证,确定最佳标记量、样本用量、反应体积等。利用建立的反应体系,自制标准品建立标准反应曲线用于定量检测血清标本。将校准 h-FABP 抗原用抗原稀释液倍比稀释(空白、1/16、1/8、1/4、1/2、无稀释分别为 0、3.75、7.50、15、30、60 ng/mL)制得检测胶体金标记物校准品。将标准物各稀释浓度点分别取 5、10、20、30、40 μL 作为待检样本用量。以 100 mL 胶体金为标记单位,参照标记物制备步骤进行小样标记物制备,h-FABP 抗体标记量为 20、50、100、150、200 μg。反应体系见表 1。确定最佳校准品用量和最佳标记梯度。

表 1 反应体系

项目	试剂空白	样本反应
样本类型	生理盐水	梯度稀释校准物
样本用量(μL)	5/10/20/30/40	5/10/20/30/40
PBST 缓冲液用量(μL)	800	800
标记物用量(μL)	200	200
反应温度(℃)	37.0±0.5	37.0±0.5
反应时间(min)	10	10
记录吸光度	OD ₅₄₀ BK、OD ₆₆₀ BK	OD ₅₄₀ BK、OD ₆₆₀ BK
计算公式	ΔA=(OD ₅₄₀ T-OD ₅₄₀ BK)-(OD ₆₆₀ T-OD ₆₆₀ BK)	

1.6 Cut-off 值确定 以利德曼试剂检测 Cut-off 值标本 30 份为样本,采用建立的反应体系及标准曲线,重复测定 2 次取均值,30 份样本均值再次取均值作为本检测体系的 Cut-off 值。

1.7 检测性能初步验证 用制备的胶体金试剂检测临床样本值并与利德曼公司检测方法进行比较,验证检测体系的有效性。

1.8 统计学处理 采用 Excel2007 软件 CORREL 函数法计算对照试剂与该实验方法测定值的相关系数(r);比较胶乳凝集比色法与本实验方法阳性标本检出的符合率。

2 结果

2.1 胶体金颗粒鉴定

2.1.1 光谱扫描结果 将胶体金溶液用去离子水 1:3 稀释,用紫外可见光分光光度计以去离子水调零,扫描胶体金溶液 400~700 nm 吸收峰,胶体金溶

液在 540 nm 左右有最大吸收峰。见图 1。

2.1.2 电镜检测结果 胶体金颗粒样本经电子显微镜检测,平均颗粒大小(80.4±10.4)nm。见图 2。

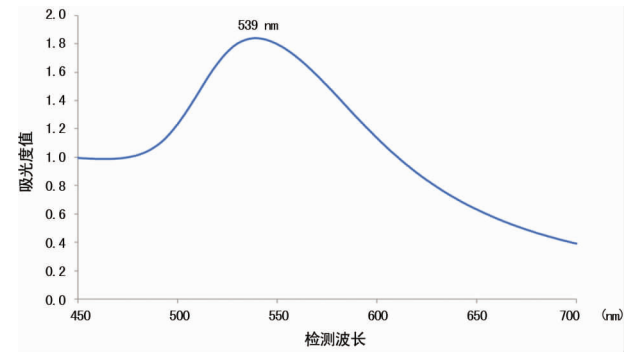


图 1 胶体金光谱扫描图

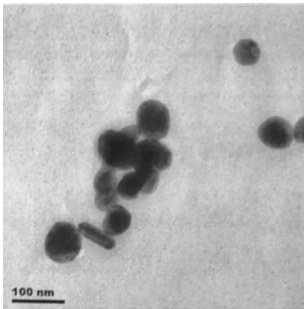


图 2 胶体金颗粒电镜检测结果

2.2 标记量确定 样本用量与标记量实验结果见图 3。比较不同样本的用量和标记物用量间的关系,确定标本用量为 30 μL, h-FABP 抗体选择标记量为 100 μg/100 mL 胶体金溶液。

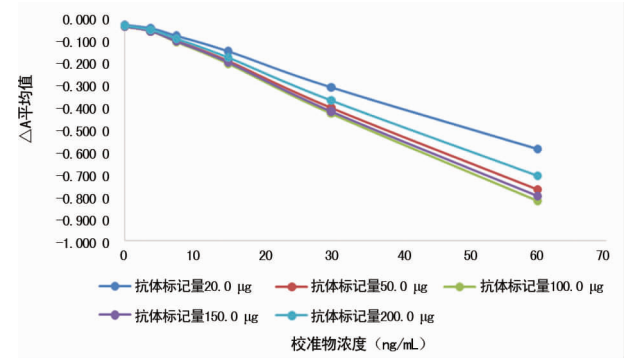


图 3 30 μL 标本不同标记量反应校准曲线

2.3 阳性判定值确定 对利德曼检测试剂检测处于 Cut-off 值的 30 份标本采用本检测体系进行重复测定取平均值以 h-FABP≤3.6 ng/mL 作为界限值。

表 2 2 种检测体系检测结果比较

自建体系	利德曼试剂	
	阳性	阴性
阳性(n)	49	3
阴性(n)	2	48
符合率(%)	95.09	

2.4 临床样本检测比较 按确定的标记量,分别采用利德曼检测方法与本实验检测体系检测临床样本 102 例,对照试剂测值与胶体金标记物呈正相关($r=0.962$),以 h-FABP≤3.6 ng/mL 作为界限值,2 种检测体系检测结果比较见表 2。

3 讨论

随着分析方法自动化、配套试剂商品化,定量免疫分析技术在临床实验室得到越来越广泛的应用,成为诊断疾病、评估疗效的重要手段。对目前临床常用的诸多检测技术,大部分需特殊的检测仪器与试剂,检测成本高,增加了患者的医疗费用;但低成本的酶免疫分析与胶体金快速法又无法满足准确定量的需求。这些存在的问题给基层医疗机构带来了诸多的不便,迫切需要经济实用、便于开展的检测方法。且从经济发展和临床需求看,免疫诊断技术的未来发展也是两种趋势,一是简单化、基层化,该方向适合免疫层析试纸条,如再辅以互联网等信息平台,易于实现个人化、家庭化,但受限于方法学很难精确定量;二是自动化、量化、低成本化,适合该发展方向的目前主要有胶乳增强免疫比浊、均相酶免疫和液相胶体金免疫等,随着相关试剂性能的不断改进,很可能会影响发光免疫目前的主导地位^[10]。

胶体金示踪免疫层析技术广泛用于临床快速检测中,其方法简便快捷,费用低廉,但无法满足规模化、高通量检测要求,液相胶体金免疫比色技术的诞生解决了固相胶体金免疫技术的困扰^[11-12]。

液相胶体金免疫比色技术基本原理是不同粒径、不同颜色的胶体金颗粒可与抗体等蛋白分子非共价结合,包被后的胶体金颗粒与待测样本中的抗原发生凝集反应后在特定波长发生吸光度变化,其变化程度与抗原量成正比,借助普通自动生化分析仪即可准确定量^[13]。该方法具备了胶乳增强比浊的反应模式,其灵敏度、线性范围均优于胶乳增强免疫比浊法,且制作工艺相对简单,不受原材料的限制,具备较好的推广应用基础。

胶体金均相免疫反应中抗原抗体反应后在 540 nm 吸光度降低,同时在 660 nm 吸光度升高,其分析灵敏度比普通均相比浊法高^[12-14]。另外,胶体金均相免疫比色技术减少了免疫反应中的中间洗涤步骤,与免疫发光方法比较,提高了检测效率,降低了检测成本,便于基层医院开展^[15]。

胶体金均相检测技术克服了固相胶体金、免疫荧光层析技术无法准确定量、无法实现高通量检测要求的缺点^[12],研发相对容易,材料成本低,综合多方面的优势,其在实现定量检测分析中拥有较大的应用前景。

近年来, h-FABP 已与肌红蛋白、肌钙蛋白 t/i、肌

酸激酶被推荐为 AMI 联合检测的指标,其在血液中出现时限早(<1 h),灵敏度和特异度高,对早期 AMI 尤其具有诊断价值^[16-19]。

针对 h-FABP 的检测方法很多,但采用胶体金均相免疫检测技术的方法尚未见相关文献报道。本研究采用胶体金均相免疫技术初步建立了 h-FABP 胶体金均相法比色检测体系,在临床标本的检测分析与成熟的化学发光法呈正相关($r=0.962$),以 h-FABP ≤ 3.6 ng/mL 作为界限值,符合率达 95.09%。未能达到胶乳均相免疫检测方法的检出能力原因考虑为检测体系尚不够完善、制备的试剂组分与配比尚未完全达到临床分析的要求、实验过程均为手工操作、误差较大等多种因素。随着后续检测体系的不断完善,检测的灵敏度与准确度会得到进一步的改进与提高。

4 结 论

通过系列研究与实验验证,确立了胶体金试剂制备的基本工艺与流程,初步完成了反应体系与反应条件的建立,与成熟试剂检测结果具有较好的符合率。总体而言,达到了预期目的,初步建立的 h-FABP 胶体金均相免疫比色法方法学简便,成本低廉,可实现生化分析仪的高通量快速分析,节约了大量的仪器与试剂成本,有利于在基层医院开展,在临床标本的定量分析中具有较大的应用前景。

参考文献

- [1] OCKNER R K, MANNING J A, POPPENHAUSEN R B, et al. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues[J]. Science, 1972, 177(443): 56-58.
- [2] FURUHASHI M, HOTAMISLIGIL G S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(6): 489-503.
- [3] YOUNG J M, PICKERING J W, GEORGE P M, et al. Heart fatty acid binding protein and cardiac troponin: development of an optimal rule-out strategy for acute myocardial infarction[J]. BMC Emerg Med, 2016, 16(1): 34.
- [4] VUPPUTURI A, SEKHAR S, KRISHNAN S, et al. Heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) as an early diagnostic biomarker in patients with acute chest pain[J]. Indian Heart J, 2015, 67(6): 538-542.
- [5] 刘相应, 唐良秋, 徐新, 等. 心型脂肪酸结合蛋白在急性心肌梗死中的应用[J]. 中国心血管研究杂志, 2015, 13(7): 588-592.
- [6] PYATI A K, DEVARANAVADAGI B B, SAJJANNAR

- S L, et al. Heart-type fatty acid-binding protein, in early detection of acute myocardial infarction: comparison with CK-MB, troponin I and myoglobin[J]. Indian J Clin Biochem, 2016, 31(4): 439-445.
- [7] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [8] LEUVERING J H, THAL P J, VAN DER WAARTM, et al. Sol particle immunoassay (SPIA)[J]. J Immunoassay, 1980, 1(1): 77-91.
- [9] 程黎明, 朱晓华, 朱耀武, 等. 液相免疫胶体金技术用于检测血浆半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的方法学评价[J]. 检验医学, 2010, 25(3): 214-218.
- [10] 王会中, 徐荣. 定量免疫分析技术的应用现状与展望[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(6): 478-480.
- [11] 张莹, 冯海, 吴秋平, 等. 胶体金免疫层析技术的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(12): 2349-2351.
- [12] 戴婉如, 陈发林, 吴来州. 免疫胶体金技术测定血清胱抑素 C 及其对早期肾损害的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(5): 336-337.
- [13] KYKSE-ANDERSON J, SCHMIDT C, NORDIN G, et al. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate [J]. Clin Chem, 1994, 40(10): 1921-1926.
- [14] FINNEY H, NEWMAN D J, GRUBER W, et al. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II) [J]. Clin Chem, 1997, 43(6): 1016-1022.
- [15] 肖勤, 林金明. 化学发光免疫分析新进展[J]. 分析试验室, 2011, 30(1): 111-122.
- [16] HAMZA M, DEMERDASH S, IBRAHIM M. Heart-type fatty acid-binding protein as a diagnostic biochemical marker for early detection of myocardial infarction[J]. Acta Cardiol, 2016, 71(5): 537-541.
- [17] 刘延青, 冯长州, 孙淑艳. 心型脂肪酸结合蛋白在胸痛 6h 内诊断急性心肌梗死的 meta 分析[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(1): 41-44.
- [18] 刘首明, 夏慧, 江小萍, 等. 急性心肌梗死患者心型脂肪酸结合蛋白水平检测及临床价值[J]. 实验与检验医学, 2015, 33(5): 673-675.
- [19] STIERMAIER T, DE WAHA S, FÜRNAU G, et al. Thrombus aspiration in patients with acute myocardial infarction: Scientific evidence and guideline recommendations[J]. Herz, 2016, 41(7): 591-598.

(收稿日期: 2018-08-24 修回日期: 2018-11-02)