

应用时间分辨荧光免疫层析技术建立HBP定量检测的方法

郭金双^{1,2*}, 赵玉川³, 刘凤林¹, 夏文龙¹

¹山东省食品药品审评查验中心, 山东 济南

²中国科学院福建物质结构研究所结构化学国家重点实验室, 福建 福州

³山东省环科院环境检测有限公司, 山东 济南

收稿日期: 2022年4月18日; 录用日期: 2022年5月13日; 发布日期: 2022年5月20日

摘要

本文建立了一种肝素结合蛋白(Heparin-binding protein, HBP)的定量检测方法, 并检验该方法的性能。主要通过以时间分辨荧光纳米微球作为荧光标记物, 结合双抗体夹心法原理和免疫层析技术, 实现HBP的定量检测。本检测方法在5~1000 ng/mL线性范围内线性关系良好, 方程为 $y = 0.0324x - 0.0971$, $R^2 = 0.9975$ 。本试剂的批内精密度 $CV \leq 5.21\%$, 批间精密度 $CV \leq 7.06\%$ 。本试剂与中翰盛泰生物技术股份有限公司的肝素结合蛋白测定试剂盒(免疫荧光干式定量法)相关性较好, 二者的阳性符合率与阴性符合率分别为96.23%和95.0%, 本试剂的假阳性率和假阴性率分别为5.0%和3.77%, 诊断符合率为94.52%。本研究建立了HBP定量检测方法, 并且该方法具有操作简单、检测快速、结果准确的优点。

关键词

肝素结合蛋白, 时间分辨荧光纳米微球, 免疫层析法, 双抗体夹心法

Using Time Resolved Fluorescence Immunochromatography to Establish a Quantitative Detection Method for HBP

Jinshuang Guo^{1,2*}, Yuchuan Zhao³, Fenglin Liu¹, Wenlong Xia¹

¹Shandong Center for Food and Drug Evaluation and Inspection, Jinan Shandong

²State Key Laboratory of Structural Chemistry, Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, Chinese Academy of Sciences, Fuzhou Fujian

*通讯作者。

文章引用: 郭金双, 赵玉川, 刘凤林, 夏文龙. 应用时间分辨荧光免疫层析技术建立 HBP 定量检测的方法[J]. 临床医学进展, 2022, 12(5): 4337-4344. DOI: 10.12677/acm.2022.125628

Abstract

In this paper, a quantitative detection method for Heparin Binding Protein (HBP) was established and its performance was tested. The quantitative detection of HBP was achieved by using time-resolved fluorescent nanospheres as fluorescent markers, combined with the principle of double antibody sandwich method and immunochromatography technology. The linearity of the detection method was good in the linear range of 5~1000 ng/mL, and the equation was $y = 0.0324x - 0.0971$, $R^2 = 0.9975$, intra-batch precision $CV \leq 5.21\%$, inter-batch precision $CV \leq 7.06\%$. The reagent has a good correlation with Heparin Binding Protein (HBP) Detection Kit (fluorescence immunochromatography) developed by Zhonghanshengtai Biotechnology Limited Co., Ltd. The positive coincidence rate and negative coincidence rate were 96.23% and 95.0%, respectively. The false positive rate and false negative rate of this method were 5.0% and 3.77%, respectively, and the diagnostic coincidence rate was 94.52%. This study established a quantitative HBP detection method, and the method has the advantages of simple operation, rapid detection and accurate results.

Keywords

Heparin-Binding Protein, Time-Resolved Fluorescent Nano-Microspheres, Immunochromatography, Double Antibody Sandwich Methods

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝素结合蛋白(Heparin-Binding Protein, HBP), 是机体内出现炎症反应后最早被释放的炎症因子, 因此 HBP 成为多种临床感染性疾病的诊断指标[1] [2]。HBP 由 Shafer 教授等[3]于 1984 年首次分离成功。肝素结合蛋白是预先储存于中性粒细胞中, 当机体内出现炎症或病变时由迁移的中性粒细胞释放, 并通过激活巨噬、单核细胞, 调节机体炎症反应的发生[4] [5]。HBP 在检测细菌感染方面具有良好的预后和区分性, 具有很高的敏感性和特异性。HBP 可通过促进细胞因子的释放及提高吞噬细菌能力的作用, 从而使得入侵机体的微生物细菌被更有效地清除[6] [7]。除了感染性疾病 HBP 也可作为其他疾病的临床诊断的指标, 如 Zhou 等[8]研究发现在慢性阻塞性肺疾病发展过程中伴随 HBP 水平的升高, 并证实肝素结合蛋白对慢性阻塞性肺疾病急性加重有诊断和预测价值。HBP 作为一种有价值的诊断标记物, 在疾病早期其含量检测在临床上具有重要意义。

目前 HBP 的检测方法主要有酶联免疫吸附法、化学发光法、免疫层析法等。但酶联免疫吸附法酶活性易受到反应体系中各种因素影响, 导致该方法重复性较差, 灵敏度不高等问题[9]; 化学发光法则成本较高, 需要购买大型仪器设备而且需配备专业人员操作, 不利于普及; 免疫层析法中有胶体金[10]、上转换发光[11] [12]、荧光胶乳微球[13] [14]等均可作为标记物被制作成 HBP 检测检测卡, 但这些方法都分别存在不同缺陷, 如: 线性范围较窄, 灵敏度不够等。时间分辨荧光免疫层析技术是用含有镧系稀土元素

物作为荧光物质的高分子材料作为标记物, 偶联蛋白抗体后形成抗体结合物, 结合双抗体夹心法原理和免疫层析技术, 可对目标抗原进行定量检测。由于镧系元素独特的荧光特性, 结合时间延迟和光谱分辨等技术, 使得该方法具有低背景、高特异性、高灵敏度等特点[15] [16]。

本研究通过应用镧离子时间分辨荧光纳米微球作为标记物的方法, 获得一种操作简单、价格低廉、检测快速、结果准确的 HBP 定量检测试剂。

2. 材料和方法

2.1. 材料与试剂

本 HBP 重组抗原、HBP 鼠源抗体 HBP-2H6、HBP 鼠源抗体 HBP-1E2 (珠海博美生物科技有限公司); 羊抗鼠 IgG 抗体(购自奥创生物技术有限公司); 镧离子时间分辨荧光纳米微球(苏州为度生物技术有限公司); 硝酸纤维素膜(德国 Sartorius 公司); PVC 板、玻璃纤维、吸水纸(上海金标生物科技有限公司); N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)(上海晶纯生化科技股份有限公司); 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)(德国 sigma 公司); 其余化学试剂(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。临床样本来自山东省立医院的儿科门诊、呼吸内科门诊及住院患者, 临床诊断为炎症、肺炎。

2.2. 仪器设备

划膜喷金仪(HGS510)、可编程切条机(HGS201)、HGS802 型压壳机(杭州峰航科技有限公司); CTS300 型数控裁条机(上海金标生物科技有限公司); 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); JS1000 型荧光免疫分析仪(中翰盛泰生物技术股份有限公司)。

2.3. HBP 标准品

将 HBP 重组抗原稀释为 5、10、100、250、500、1000 ng/mL 浓度的标准品。

2.4. 检测卡制备与使用方法

2.4.1. 荧光微球与 HBP 抗体(HBP-2H6)偶联

取 100 μ L 荧光微球, 加入 900 μ L 标记缓冲液(50 mM MES, Ph = 6.0)进行稀释, 取 10 μ L 的 NHS (20 mg/mL), 快速混匀, 然后加入 5 μ L EDC (20 mg/mL)快速混匀, 室温孵育 20 min。17,000 rpm, 离心 20 min, 去掉上清, 沉淀用 100 μ L 标记缓冲液(20 mmol/L MES 溶液, pH 6.5)重悬, 加入 0.1 mg HBP-2H6 抗体, 快速混匀, 室温孵育 2 h。加入 100 μ L 20% BSA 室温封闭 1 h。离心后, 去除上清液, 沉淀用 1 mL 结合物稀释液(50 mmol/L Tris, 10%蔗糖, 2.5%海藻糖, 0.5%酪蛋白, 0.5% PVP10, pH 8.0)重悬, 获得荧光微球 HBP-2H6 结合物备用。

2.4.2. HBP 检测卡制备

分别用样品垫预处理液(10 mmol/L Tris 溶液, 1% PVP-10, 0.4%酪蛋白, 0.5% NaCl, 0.2% TWEEN20, 0.05% Proclin300, pH8.0)和结合垫预处理液(10 mmol/L 四硼酸钠溶液, 0.2% PEG2000, 0.5% PVP-10, 0.5% 酪蛋白钠盐, 0.5% S9, 0.05% Proclin300, 10%蔗糖, pH 8.0)处理样品垫和结合垫。以浸泡的方式处理 30 min, 并置于 37 $^{\circ}$ C 干燥箱中干燥 6 h。

在 PVC 板上贴上 NC 膜, 并将羊抗鼠抗体稀释至 1 mg/mL, 划在 NC 膜上作为 C 线(质控线), 鼠源 HBP-1E2 抗体稀释至 1.5 mg/mL, 划在 NC 膜上作为 T 线(检测线), 划膜量设定为 1 μ L/cm, 然后置于 45 $^{\circ}$ C 干燥箱中干燥 1 h 后备用。

在结合垫上喷涂荧光微球 HBP-2H6 结合物, 喷量设定为 3 $\mu\text{L}/\text{cm}$, 45 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中干燥 1 h; 在 25% 湿度环境中将结合垫、样品垫和吸水纸贴到 PVC 板对应的位置上, 将组装完成的试纸板切成宽为 4 mm 的试纸条, 装入塑料卡壳中。将组装完成的检测卡和干燥剂放入铝箔袋中密封, 并于室温保存。

2.4.3. 标准曲线的拟合

使用本检测卡检测 5、10、100、250、500、1000 ng/mL 六个浓度标准品。使用 Logistic P4 参数方法将信号值和浓度值拟合成标准曲线, 并将曲线信息录入 ID 卡中。

2.4.4. 检测卡的使用

从铝箔袋中拿出检测卡, 吸取稀释十倍的样本或标准品 100 μL , 垂直滴加至检测卡加样孔处, 层析一段时间后, 通过荧光免疫分析仪读得检测卡的 T/C 值, 再根据对应 ID 卡中的标准曲线, 计算出 HBP 的浓度。

2.5. 检测卡条件优化

2.5.1. T 线包被浓度优化

计划 1: T 线浓度为 0.5 mg/mL; 计划 2: T 线浓度为 1.0 mg/mL; 计划 3: T 线浓度为 1.5 mg/mL; 计划 4: T 线浓度为 2.0 mg/mL; 以此确定合适的 T 线包被浓度。

2.5.2. 结合垫喷膜浓度优化

对 HBP 抗体结合物分别进行 5、6、7 倍稀释, 以此确定合适的喷膜浓度。

2.5.3. 检测时间的选取

选取 HBP 浓度为 10、100、250 ng/mL 的标准品, 分别在加入样本后的 5、7、10、12、15、17、20、22、25 min 对检测卡进行检测, 以此确定合适的检测时间。

2.6. 检测卡性能评估

2.6.1. 线性测试

用浓度为 5、10、100、250、500、1000 ng/mL 的 HBP 标准品检测线性关系。该方法的线性方程为 $y = 0.0324x - 0.0971$, 相关系数 $R^2 = 0.9975$ 。

2.6.2. 精密度测试

选取浓度为 10、100、250 ng/mL 的 HBP 标准品进行批内和批间精密度测定。批内精密度要求 1 天内完成一个批次的检测卡检测, 3 个浓度的 HBP 标准品分别做 5 次重复测试。批间精密度要求为分别取三个批次的检测卡进行检测, 3 个浓度的 HBP 标准品分别做 5 次重复测试。计算检测结果的平均值、标准差和变异系数。

2.6.3. 对比实验

选取不同浓度 HBP 的 73 例临床标本做对比, 样本均由中翰盛泰生物技术股份有限公司河北精硕生物科技有限公司的肝素结合蛋白(HBP)检测试剂盒(荧光免疫层析法)测定。以 10 ng/mL 为临界值(cut-off 值), 计算出阳性符合率、阴性符合率、假阳性率、假阴性率和诊断符合率。率的比较通过 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异, 通过 Kappa 一致性分析得出两种方法一致性。

2.7. 统计学分析

数据采用 prime 8.0.2 统计软件进行分析。相关分析采用 Pearson 线性相关分析法。用 ROC 分析法分析诊断效能, 并计算诊断符合率。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3. 结果

3.1. 工艺条件的优化

3.1.1. 最适捕获抗体包被浓度

T 线包被浓度分别为 0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL 和 2.0 mg/mL。由图 1 可以看出，包被浓度为 1.0 mg/mL 时梯度和线性最好。

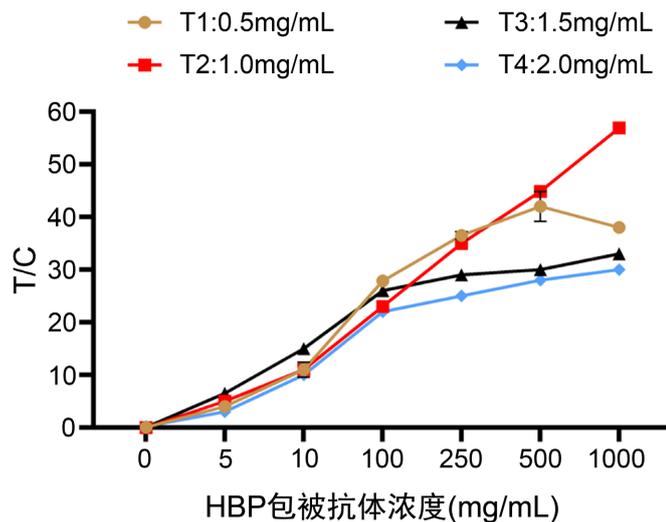


Figure 1. Screening of the HBP antibody concentration
图 1. HBP 包被抗体浓度筛选

3.1.2. 最适喷膜浓度

最适稀释浓度结果如图 2 所示，当 6 倍稀释时梯度变化和线性关系最好。

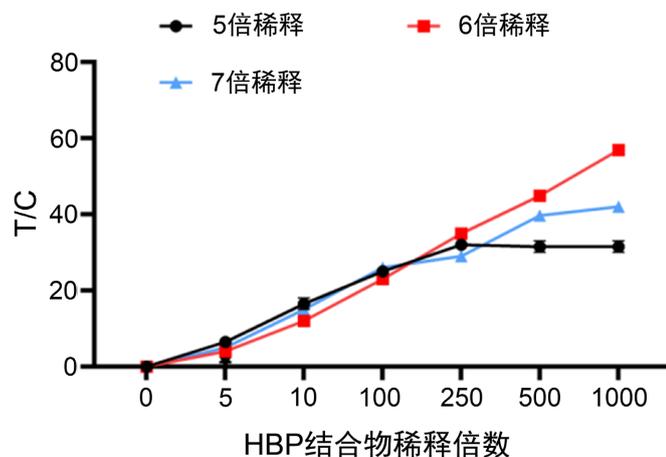


Figure 2. Dilution multiple screening
图 2. 稀释倍数筛选

3.1.3. 最佳检测时间

检测结果如图 3 所示，浓度为 10 ng/mL 和 100 ng/mL 的标准品在 12 min 时 T/C 值就已经趋于稳定状态，而浓度 250 ng/mL 标准品的 T/C 值在 15 min 时才较为稳定，因此本方法的最佳检测时间选为 15 min。

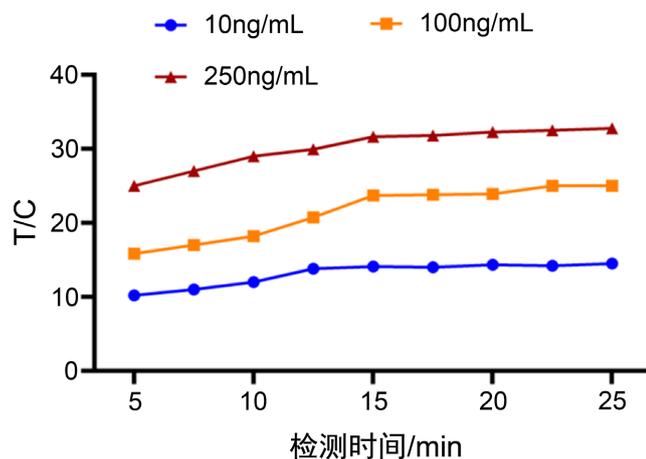


Figure 3. Detection time optimization

图 3. 检测时间优化

3.1.4. 线性

结果如图 4 所示, 该方法在 5~1000 ng/mL 范围内线性关系良好, 方程为 $y = 0.0324x - 0.0971$, $R^2 = 0.9975$ 。

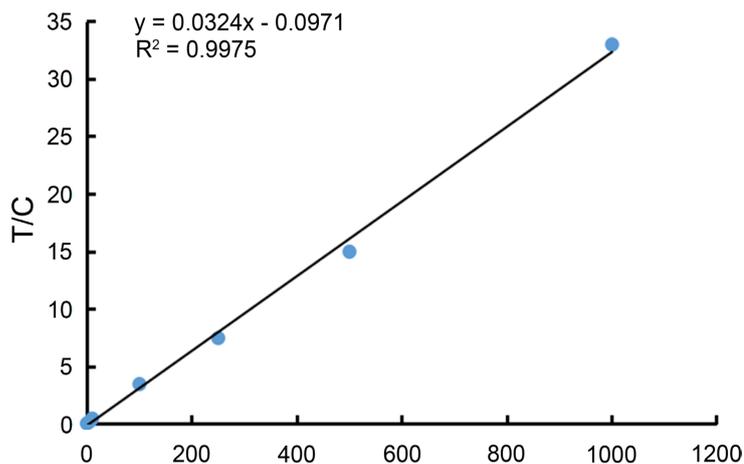


Figure 4. Standard curve

图 4. 标准曲线

3.1.5. 精密度

经计算该方法的三批检测卡的批内精密度 $CV \leq 5.21\%$, 批间精密度 $CV \leq 7.06\%$ 。分析结果见表 1。

Table 1. Precision analysis

表 1. 精密度分析

批次	标准品浓度(ng/mL)	检测次数(次)	均值(ng/mL)	SD	CV(%)
第一批	10	5	4.97	0.20	3.94
	50	5	15.86	0.48	3.00
	250	5	32.00	1.00	3.13

Continued

第二批	10	5	5.63	0.21	3.70
	50	5	17.07	0.81	4.74
	250	5	33.27	1.42	4.27
第三批	10	5	5.47	0.11	2.07
	50	5	16.40	0.85	5.21
	250	5	36.69	1.54	4.19
批间	10	-	5.36	0.33	6.24
	50	-	16.44	0.82	5.00
	250	-	33.99	2.40	7.06

3.1.6. 临床样本比对

两种方法的一致性分析结果见表 2，经计算两种方法的阳性符合率与阴性符合率分别为 96.23% 和 95.0%，符合率较高。本方法的假阳性率和假阴性率分别为 5.0% 和 3.77%，并且诊断符合率为 94.52%。本方案荧光检测卡和中翰盛泰生物技术股份有限公司的肝素结合蛋白(HBP)检测试剂盒(荧光免疫层析法) ($P < 0.05$)，K 值为 0.928。

Table 2. Analysis of the consistency results

表 2. 一致性结果分析

HBP 检测试剂盒	HBP 检测卡(ng/mL)				
	<10	10~20	20~50	50~100	>100
<10	19	1	0	0	0
10~20	2	10	0	0	0
20~50	0	0	9	0	0
50~100	0	0	0	8	0
>100	0	0	0	1	23

4. 结论

本实验使用铈离子时间分辨荧光纳米微球标记 HBP 抗体，该方法在 5~1000 ng/mL 线性范围内，具有良好的线性关系，线性方程为 $y = 0.0324x - 0.0971$ ， $R^2 = 0.9975$ 。也有较好的精密度，批内精密度 $CV \leq 5.21\%$ ，批间精密度 $CV \leq 7.06\%$ ，与中翰盛泰生物技术股份有限公司的肝素结合蛋白(HBP)检测试剂盒(荧光免疫层析法)相关性良好，阳性符合率和阴性符合率分别为 96.23% 和 95.0%，两种方法具有良好的一致性。假阳性率和假阴性率分别为 5.0% 和 3.77%，并且诊断符合率为 94.52%。本产品检测快速，操作简便，15 min 便可出结果；而且成本低，标本用量少，仅需 10 μ L，利于普及和推广使用。

基金项目

配位聚合物在临床免疫检验技术中的标记性能研究(项目编号 20200005)。

参考文献

- [1] 赵海鹏, 李俊莹, 张晓红, 等. 肝素结合蛋白、降钙素原、中性粒细胞载脂蛋白联合检测对重症急性胰腺炎患者继发感染的评估作用[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(11): 1816-1818.
- [2] Fisher, J. and Linder, A. (2017) Heparin-Binding Protein: A Key Player in the Pathophysiology of Organ Dysfunction in Sepsis. *Journal of Internal Medicine*, **281**, 562-574. <https://doi.org/10.1111/joim.12604>
- [3] Shafer, W.M., Martin, L.E. and Spitznagel, J.K. (1984) Cationic Antimicrobial Proteins Isolated from Human Neutrophil Granulocytes in the Presence of Diisopropyl Fluorophosphate. *Infection and Immunity*, **45**, 29-35. <https://doi.org/10.1128/iai.45.1.29-35.1984>
- [4] Herwald, H., Cramer, H., Mrgelin, M., et al. (2004) M Protein, a Classical Bacterial Virulence Determinant, for MS Complexes with Fibrinogen That Induce Vascular Leakage. *Cell Press*, **116**, 367-379. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00057-1)
- [5] Gennaro, A.D., Kenne, E., Wan, M., et al. (2009) Leukotriene B4-Induced Changes in Vascular Permeability Are Mediated by Neutrophil Release of Heparin-Binding Protein (HBP/CAP37/Azurocidin). *The FASEB Journal*, **23**, 1750-1757. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121277>
- [6] Linder, A., Johansson, L., Thulin, P., et al. (2010) Erysipelas Caused by Group A Streptococcus Activates the Contact System and Induces the Release of Heparin-Binding Protein. *Journal of Investigative Dermatology*, **130**, 1365-1372. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.437>
- [7] Distasi, M.R. and Ley, K. (2009) Opening the Flood-Gates: How Neutrophil-Endothelial Interactions Regulate Permeability. *Trends in Immunology*, **30**, 547-556. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.012>
- [8] Dong, Y., Zhou, X., Zhang, Y., et al. (2021) Application Value of Blood Heparin-Binding Protein in the Diagnosis of Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Contrast Media & Molecular Imaging*, **2021**, Article ID: 3800211. <https://doi.org/10.1155/2021/3800211>
- [9] 赵鸿翔. 人类免疫缺陷病毒抗体采用酶联免疫吸附法及电化学发光免疫分析法检测的效果[J]. 中国医疗器械信息, 2020, 26(24): 85-86.
- [10] Soria, C.E., Soto, M.E., Guarner, L.V., et al. (2021) The Kidnapping of Mitochondrial Function Associated with the SARS-CoV-2 Infection. *Histology and Histopathology*, **36**, 947-965.
- [11] 洪霞, 薛永来, 袁超, 等. 上转换发光免疫层析法快速检测黄曲霉毒素 B1 的研究[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2018, 2(1): 18+20.
- [12] 姜会聪, 任舒悦, 王瑜, 等. 上转换发光免疫层析法快速检测牛奶中雌二醇[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3): 119-123.
- [13] Shen, L., Zhang, Q.H., Luo, X.L., Xiao, H.L., et al. (2021) A Rapid Lateral Flow Immunoassay Strip for Detection of SARS-CoV-2 Antigen Using Latex Microspheres. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **35**, e24091. <https://doi.org/10.1002/jcla.24091>
- [14] 俞思明, 彭运平, 于淑娟, 等. 胶乳微球与抗体蛋白相互作用机理的荧光光谱法分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(8): 2166-2170.
- [15] Liu, J., Ye, Y., Hu, Z.G., et al. (2013) A Hypersensitive Biotin-Avidin-TRFIA for Quantitative Detection of ANA-Ig (GAM) and Its Clinical Application. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, **34**, 197-207. <https://doi.org/10.1080/15321819.2012.699495>
- [16] 黄德智, 应昊俊, 刘飞, 等. 降钙素原时间分辨荧光免疫层析检测方法的建立及性能评价[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(6): 581-586.