

• 论 著 •

近红外荧光标记-免疫磁珠偶联法定量检测结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白

陈 晨¹, 周艳容¹, 明宏艳¹, 王小晋², 廖凤兰¹, 朱云枫¹, 王 劲¹

(1. 广东国际旅行卫生保健中心, 广东广州 510623; 2. 淮安出入境检验检疫局, 江苏淮安 223021)

摘要:目的 建立定量检测结核分枝杆菌早期分泌抗原靶-6(ESAT-6)的近红外荧光标记-免疫磁珠偶联法。方法 以近红外荧光染料(Dylight 800)标记靶向 ESAT-6 的单克隆抗体, 靶向 ESAT-6 的多克隆抗体包被在纳米磁珠表面。采用双抗体夹心法, 磁性分离结合物和游离物, 采用便携式高灵敏度低噪声激发式荧光检测仪检测磁性结合物的荧光强度, 从而检测待检样品中 ESAT-6 水平。结果 该方法的检测线性范围为 2.4~750.0 ng/mL, 最低检测限为 0.48 ng/mL; 10 ng/mL 水平加样回收率为 96%, 50 ng/mL 水平加样回收率为 95%; 批间变异系数(CV)为 5.8%, 批内 CV 为 4.3%。该方法检测胸腔积液标本 ESAT-6 的特异度为 80%, 灵敏度为 95%。结论 该方法检测 ESAT-6 的线性范围广、灵敏度高、稳定性好。

关键词:近红外荧光; 免疫磁珠; 结核分枝杆菌早期分泌抗原靶-6; 定量检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)05-0623-03

Study on quantitatively detecting *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen by using near-infrared fluorescent dye-immunomagnetic beads coupling method

Chen Chen¹, Zhou Yanrong¹, Ming Hongyan¹, Wang Xiaojin², Liao Fenglan¹, Zhu Yunfeng¹, Wang Jin¹

(1. Guangdong International Travel Health Care Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China;

2. Huai'an Entry-exit Inspection And Quarantine Bureau, Huai'an, Jiangsu 223001, China)

Abstract: Objective To establish a near-infrared fluorescent dye-immunomagnetic beads coupling method for quantitative detection of *Mycobacterium tuberculosis* early secretory antigenic target-6(ESAT-6). **Methods** Near-infrared fluorescent dye, dylight 800, was used to mark ESTA-6-targeting monoclonal antibodies, and the surface of nano-magnetic beads were coated with ESAT-6-targeting polyclonal antibodies. Double antibody sandwich method was used for magnetic separation of conjugates and dissociants. Portable high-sensitivity and low-noise excitation fluorescence detector was used to detect the intensity of magnetic combination, so as to test the ESAT-6 content in test samples. **Results** The detecting linear range of this method was 2.4—750.0 ng/mL, and the minimum detection limit was 0.48 ng/mL. The recovery rate was 96% at a concentration of 10 ng/mL, and at a concentration of 50 ng/mL the recovery rate was 95%. The between-run coefficient of variation(CV) value was 5.8%, and the within-run CV value was 4.3%. The specificity and sensitivity of this method for detecting ESAT-6 in clinical pleural effusion samples were 80% and 95%, respectively. **Conclusion** This method might have wide linear range, high sensitivity and good stability in the detection of ESAT-6.

Key words: near-infrared fluorescent; immunomagnetic beads; *Mycobacterium tuberculosis* early secretory antigenic target-6; quantitative detection

结核病是一种古老的传染性疾病, 目前全世界约有 1/3 的人口感染结核分枝杆菌, 每年有近 800 万人死于肺结核^[1]; 耐药和多重耐药菌株的大量出现, 又为结核病的控制带来更大的困难。此外, 更多的研究还证实结核分枝杆菌能增强人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)的复制, 因此在艾滋病患者中双重感染者众多, 成为导致患者死亡的主要原因。目前对于结核分枝杆菌感染的实验室诊断主要是基于涂片抗酸染色、细菌培养、核酸检测及相关抗体的检测, 以上方法存在着灵敏度低、特异性差、耗费时间或检测成本高的缺点。近年来随着蛋白质组学研究的深入, 多种与结核分枝杆菌相关的蛋白被发现, 这些蛋白是是否能够成为结核分枝杆菌感染诊断的特异性抗原标志物激发了大家的兴趣。结核分枝杆菌早期分泌抗原靶-6(ESAT-6)是结核分枝杆菌在感染早期的分泌性抗原, 也是结核分枝杆菌短期培养物的过滤后蛋白质中具有免疫保护力的抗原。既是重要的 T 淋巴细胞抗原, 也具有刺激 B 淋巴细胞反应的抗原决定簇。它只存在于结核分枝杆菌复合群和少量致病性分枝杆

菌中, 且在卡介苗中缺失^[2]。李新玲等^[3]曾建立了基于时间分辨荧光的方法来检测 ESAT-6、CFP100 融合蛋白, 取得了满意的结果。本文建立了一种定量检测结核分枝杆菌 ESAT-6 的方法, 将纳米磁珠偶联与近红外荧光标记法结合起来, 利用纳米磁珠表面羧基活化后可与抗体表面的氨基共价结合, 从而将抗体固定到纳米磁珠表面, 发挥了纳米磁珠比表面积大, 吸附性强, 悬浮稳定性好, 有利于抗原抗体反应顺利进行的优点; 同时, 近红外荧光染料具有灵敏度高、选择性好的优点, 它的激发光及发射光谱均在近红外区域, 可最大限度减少环境中杂散荧光物质的干扰。

1 材料与方法

1.1 标本来源 临床胸腔积液标本搜集自广州市胸科医院, 其中结核性胸腔积液标本 20 份, 恶性胸腔积液标本 20 份, 均采集自临床明确诊断病例, 符合相关诊断标准。

1.2 仪器与试剂 便携式流动进样荧光检测器(中科院理论物理所制备的样机, 该设备固化为激发光波长 777 nm, 发射光

波长 790 nm); Dylight 800 购自美国 Thermofisher 公司; 鼠抗 ESAT-6 单克隆抗体(100 μg/100 μL)、兔抗鼠 ESAT-6 多克隆抗体(1 mg/mL)均购自美国 Pierce 公司; 纳米磁珠购自武汉哇哇噻纳技术开发有限公司北京生物技术研究; ESAT-6(全片段重组蛋白, 1.5 mg/mL)购自杭州启泰生物公司; 结核分枝杆菌标准株(H37Rv ATCC27294)、牛分支杆菌卡介苗(BCG)株、牛结核分枝杆菌株、偶然分枝杆菌株、耻垢分枝杆菌株为临床分离株, 均来自于淮安市疾病预防控制中心。

1.3 方法

1.3.1 制备近红外荧光染料标记的 ESAT-6 单克隆抗体 按照产品说明书要求, 将 Dylight800 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释 10 倍, 取 1.4 μL 与 20 μg 鼠抗 ESAT-6 单克隆抗体(1 mg/mL)轻柔混合均匀后于室温避光反应 2 h; 反应结束后, 将标记产物放入透析袋中, 4 °C, PBS 透析 4 h。标记好的抗体溶液中添加终浓度为 1.5% 胎牛血清(BSA)、0.1% 吐温 20(Tween-20)及 0.1% 叠氮化钠(NaN₃), 4 °C 保存; 使用前将标记产物以 PBS 稀释 2 000 倍。

1.3.2 制备 ESAT-6 多克隆抗体包被的纳米磁珠 按照纳米磁珠使用说明书进行处理。(1)预处理: 轻轻混匀磁珠悬浮液, 吸取 0.01 mL 悬浮液(25 mg/mL)加入 1.5 mL EP 管中; 再加入 0.1 mL 双蒸水(ddH₂O), 轻轻混匀并将试管架置于磁板上, 静置 2 min 后吸取上清液; 重复上述步骤 1 次; 加入 1 mL 0.1 mol/L 的 2-N-吗啡啉乙磺酸溶液(MES, pH5.0), 重悬磁珠。(2)活化: 将上述 EP 管置于磁板上, 用 1 mL MES 洗涤 2 次, 弃上清; 临用前配制终浓度为 0.1 mol/L 的 MES, 其内含碳二亚胺(EDC)和 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)的浓度均为 40 g/L(加入上述两种物质后, 置于振荡器上充分混匀 15 min, 待用)。用该 MES 液重悬磁珠, 用磁板吸附磁珠, 弃上清, 重复该步骤 1 次, 即得活化磁珠。(3)磁珠与蛋白的偶联: 在上述已活化的磁珠中加入 50 μL ESAT-6 多克隆抗体(1 mg/mL)和 500 μL 偶合液(pH5.5 PBS), 混匀, 室温, 置于摇床上持续震荡, 孵育 2 h; 用 PBS 缓冲液(pH5.5, 0.05% Tween-20)清洗 3 次, 吸附弃上清; 加入封闭液(1 mL Tris 缓冲液, 0.1 mol/L, 含 0.1% BSA), 混匀, 室温, 置于摇床上持续震荡, 孵育 2 h; 加入 1 mL PBS 缓冲液(pH5.5, 0.05% Tween-20), 静置 2 min, 弃上清, 重复 3 次; 弃上清时, 试管需置于磁板上; 加入 1 mL 保存液(PBS, pH7.4, 含 0.05% Tween-20, 0.1% BSA, 0.05 NaN₃)待用。

1.3.3 检测流程 取 50 μL 待检样品与 50 μL 荧光标记的 ESAT-6 单抗, 于 EP 管中混匀, 37 °C 反应 30 min; 将包被了多抗的磁珠稀释 10 倍后, 取 50 μL 加入该 EP 管, 37 °C 反应 15 min; 再加入 500 μL ddH₂O, 磁板上静置 2 min, 弃上清, 重复该步骤 3 次; 管中加入 100 μL PBS(pH7.4), 混匀, 用便携式流动进样荧光检测器进行荧光强度测定。

1.3.4 ESAT-6 检测的标准曲线 将 ESAT-6 全片段重组蛋白用 PBS 稀释成 0.48、2.40、12.00、60.00、300.00、750.00、1 500.00 ng/mL 的 7 种不同浓度样品, 每个浓度设置两个平行样, 按照 1.3.3 所示方法进行检测, 绘制检测 ESAT-6 的标准曲线。

1.3.5 方法的性能评价 挑取培养基中结核分枝杆菌标准株(H37Rv ATCC27294)、牛结核分枝杆菌株、偶然分枝杆菌株、

耻垢分枝杆菌株、BCG 的单个菌落, 分别溶于 1 mL PBS 中离心取上清进行测定, 以确定检测体系的特异性; 将 ESAT-6 倍比稀释以确定检测限量; 配制 10 ng/mL 和 50 ng/mL 的 ES-AT-6 标准溶液计算回收率, 采用同日内连续 20 次检测和连续 20 d 检测的方法计算批内(批间)变异系数(CV), 评价其准确性、稳定性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理与统计分析, 采用最小二乘法对标准曲线进行拟合。绘制受试者工作特征(ROC)曲线, 计算 ROC 曲线下面积(AUC)。

2 结果

2.1 近红外荧光标记-免疫磁珠偶联法定量检测结核分枝杆菌 ESAT-6 的标准曲线 将 ESAT-6 全片段重组蛋白用 PBS 稀释成浓度为 0.48、2.40、12.00、60.00、300.00、750.00、1 500.00 ng/mL 的样品, 其线性范围为 2.4~750.0 ng/mL, 检测限量为 0.48 ng/mL; 以 ESAT-6 浓度的对数值为纵坐标, 以仪器荧光示数值为横坐标, 绘制标准曲线, 拟合相关系数 $r^2=0.9918$, 函数方程为 $Y=1.2077X+0.2611$ 。见图 1。

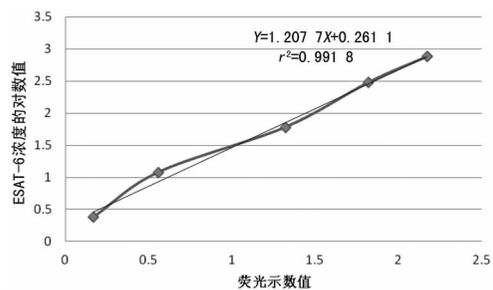


图 1 近红外荧光标记-免疫磁珠偶联法检测 ESAT-6 的标准曲线

2.2 方法的特异性评价 结核分枝杆菌标准株(H37Rv ATCC27294)荧光示数值为 0.76, 牛结核分枝杆菌株、偶然分枝杆菌株、耻垢分枝杆菌株的荧光示数值分别为 0.01、0.01、0.02, BCG 株荧光示数值为 0, 表明采用本方法检测 ESAT-6 与其他结核株无交叉反应。

2.3 方法的回收率评价 将 100 ng/mL 的 ESAT-6 溶液, 加入 ESAT-6 检测为 5.6 ng/mL 的胸腔积液标本中, 制成终浓度为 10 ng/mL 和 50 ng/mL 的两个样品, 进行回收试验测定, 回收率分别为 96% 和 95%。见表 1。

表 1 回收率试验结果

基础浓度 (ng/mL)	目标浓度 (ng/mL)	检测结果 (ng/mL)	回收值 (ng/mL)	回收率 (%)
5.6	10	9.8	4.2	96
5.6	50	47.8	42.2	95

2.4 批内和批间精密度的试验 将上述标准液, 取平行样, 1 d 内连续进行 20 次测试, 结果显示批内 CV 为 4.3%; 连续 20 d 进行重复测试, 结果显示批间 CV 为 5.8%。

2.5 临床标本检测结果 取结核性胸腔积液和恶性胸腔积液各 20 份, 分两组, 检测其 ESAT-6 浓度。结果发现, 结核性胸腔积液 ESAT-6 水平分布在 8.5~217.0 ng/mL 之间, 均值为 119.6 ng/mL; 恶性胸腔积液 ESAT-6 水平分布在 5.3~36.5 ng/mL 之间, 均值为 18.6 ng/mL。绘制 ROC 曲线, AUC 为

0.900,以 9.1 ng/mL 为临界值,该方法的灵敏度为 95%,特异度 80%。见图 2。

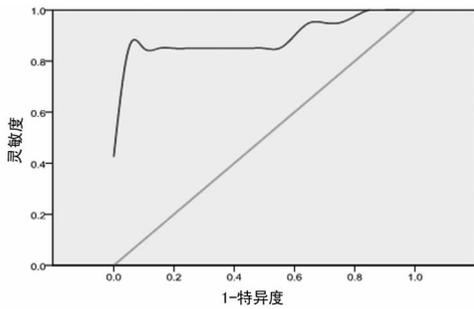


图 2 检测胸腔积液中 ESAT-6 的 ROC 曲线

3 讨 论

传统的免疫学检测方法常采用同位素、荧光素、生物素或者酶作为免疫反应的指示剂,反应支持介质多为聚丙烯孔板、琼脂等,具有一定的局限性,并且部分指示物具有环境污染性,或者宜受环境因素的影响,信号放大能力弱。此外,固体介质作为反应支持物,可能对蛋白质的构象展开有影响,不利于抗原抗体反应的进行。本研究首次采用 Dylight 800 这种新型近红外荧光染料作为免疫反应的高效信号指示剂,利用其荧光强度高、荧光寿命长、稳定性好、生物相容性优的特点^[4-6],同时采用了纳米磁珠作为反应支持平台,将免疫反应的分离和富集连为一体,以 ESAT-6 作为检测对象,建立了定量检测的方法。

Dylight800 标记抗体,操作简便,标记效率高,据试剂盒提供的数据表明,其标记效率约为 87%,优于其他种类的标记物。本方法的批内和批间 CV 分别为 4.3%、5.8%,可以体现 Dylight800 荧光寿命长、稳定性好的特点,因而其在临界值灰区判定可能具有优势。同时,稳定的检测结果可为临床治疗效果的评价及试验结果的判断提供可靠的参考依据。

Dylight 800 作为免疫反应信号指示剂,由于其激发光和发射光波长均在近红外波长区域内,可见光波长范围外,所以在本研究的特异性评价试验中,除了结核分枝杆菌标准株(H37Rv ATCC27294)在测试时可检出反射光以外,其他菌株或产生极其微弱的发射光或未检出光强度,表明其抗外界干扰能力强。

纳米磁珠在本研究中作为反应支持平台,具有比表面积大,吸附性强,悬浮稳定性好的优点。与 Dylight 800 共同搭建起来的免疫反应系统,近似于液体环境,有利于蛋白质空间构

象的完整展开,将免疫反应的分离和富集连为一体,使得抗原抗体反应能够顺利进行。

胸腔积液是一个很好的培养基,结核菌在生长过程中产生的分泌蛋白不可避免地漏于其中,同时胸腔积液也是一个很好的富集环境,适于作为检测样品。在以 ESAT-6 为靶目标的结核分枝杆菌检测临床研究中,多数学者关注患者血清和脑脊液中 ESAT-6 的表达^[3,7],并取得了满意的结果。在本研究中,初步尝试用建立的方法对胸腔积液 ESAT-6 水平进行检测,从而鉴别诊断胸腔积液的性质,结果显示检测的特异度为 80%,灵敏度为 95%。但是,本研究由于缺少足够量的临床标本,因而所得结果具有一定的局限性,其临床意义还需要大量的临床标本检测数据和方法学对比来进行验证。

综上所述,本研究仅对纳米磁珠-近红外荧光标记的免疫反应体系的应用进行了初步研究,结果表明其检测性能满意。

参考文献

- [1] Jones DA, Guha K, Ho TB. Notification of tuberculosis in an area of low TB incidence[J]. Clin Med(Lond), 2008, 8(6): 637.
- [2] 杨华, 张丽婷, 李连青, 等. 结核分枝杆菌 H37Rv 结合肽的筛选研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(3): 192-196.
- [3] 李新玲, 黄怀宇, 吴俊渊, 等. 时间分辨荧光免疫法检测脑脊液结核分枝杆菌特异性抗原的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(18): 4168-4170.
- [4] Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, et al. Longterm multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugate[J]. Nat Biotechnol, 2002, 21(1): 47-51.
- [5] Pellegrino T, Minchew CL, Shumfn S, et al. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals[J]. Nano Lett, 2004, 4(4): 703-707.
- [6] 付志英, 李朝辉, 何晓晓, 等. 水溶性量子点荧光探针用于胃癌细胞相关抗原 CA242 的检测[J]. 分析化学, 2006, 34(12): 1669-1673.
- [7] 石洁, 朱岩昆, 马晓光, 等. 结核分枝杆菌早期分泌靶抗原和抗原 85B 融合蛋白的原核表达及其在血清学检测中的初步应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(5): 389-392.

(收稿日期: 2015-12-19)

(上接第 622 页)

客观难度^[3], 每个实验室的每个检测项目及不同检测系统分别建立参考区间并不现实, 根据 NCCLS C28-A2 文件^[4]及 WS/T 402/2012 文件^[1]的要求进行实验室参考区间验证, 更加方便实验室项目的开展。虽然原卫计委针对我国人群建立了各检测项目相应的参考区间, 形成 WS/T 405/2012 标准^[2], 但是由于各地气候、海拔、民族、饮食存在差异, 加上各实验室使用仪器厂家不同, 在此种情况下, 实验室也有必要对标准中的参考区间进行验证, 以判断该参考区间是否能够用于本地区人群。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. WS/T 402-2012 临床实验室检验项目参考区间的制定[M]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

- [2] 中华人民共和国卫生部. WS/T 405-2012 血细胞分析参考区间[M]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [3] Solberg HE, Stamm D. IFCC recommendation: the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values[J]. J Automat Chem, 1991, 13(5): 231-234.
- [4] National Committee for Clinical Laboratory standards. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2000.

(收稿日期: 2015-12-11)

