

[文章编号] 1000-2782(1999)05-0034-05

ARIS 的信号放大系统研究

周 乐¹, 史远刚², 李 键², 王建辰²

(1 西北农业大学基础科学系; 2 西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨陵 712100)

[摘 要] 研究了葡萄糖氧化酶(GOD)、 β -D-葡萄糖(β -D-G)、辣根过氧化物酶(HRP)、色原物(CS)及 pH 值等因素对放大系统的影响。结果表明, 放大系统的最佳 pH 值为 6.4, 理想色原物是联大茴香胺, 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)和邻苯二胺(OPD)不宜作为放大系统的色原物。GOD, β -D-G, HRP 和 CS 在不同程度上均极显著($P < 0.01$)地影响试验结果, 其主次关系为 GOD > β -D-G > HRP > CS。反应时间对试验结果有显著($P < 0.05$)影响。适当增加反应物浓度和延长反应时间对放大系统是有利的。

[关键词] 信号放大系统; 连串反应; ARIS

[中图分类号] Q 554.6 [文献标识码] A

ARIS(Apoenzyme reactivation immunoassay system)是根据辅基和主酶能够快速再生出活性全酶的性质, 以辅基作为待测半抗原的标记物而设计出来的一种先进的均相酶免疫测定方法^[1]。ARIS 的信号放大系统(SAS)是 1 个三步连串反应体系, 由 2 个酶(GOD 和 HRP)促反应和 1 个化学反应组成。SAS 决定着 ARIS 测定结果的灵敏度、准确度和极限, 因此, SAS 对 ARIS 是非常重要的^[2,3]。目前, 关于 ARIS 和 SAS 反应条件及影响因素的研究还未见报道, 本研究试图通过试验, 对 ARIS 的放大系统进行研究, 以期 ARIS 的准确测定提供参数。

1 试剂与仪器

GOD EC: 1.1.3.4, Type , 20 000 u · g⁻¹; A. niger, HRP EC: 1.1.11.7, Type VI, RZ ≥ 3.0, 250 ~ 330 u · mg⁻¹; β -D-G, 纯度 97%; TMB(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺)为美国西格玛(Sigma)化学公司产品。OPD(o-phenylene diamine, 邻苯二胺), ODA(o-dianisidine, 邻联大茴香胺), 化学纯。

40 孔聚苯乙烯酶标硬板为浙江黄岩拱东实验塑料厂生产, DG-5030 酶联免疫检测仪系华东电子集团产品。

2 试验方法

2.1 色原物对 SAS 的影响

取 100 μ L 40 mmol · L⁻¹的 β -D-G, 50 μ L 0.5 g · L⁻¹的 HRP, 50 μ L 40 mmol · L⁻¹

[收稿日期] 1998-08-11

[基金项目] 高等学校博士点基金(4397); 陕西省杨陵科研基金资助项目(06B5)

[作者简介] 周乐(1968-), 男, 副教授, 博士

的色原物(TMB, OPD 或 ODA) 和 800 μL $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液(PBS)(pH 7.0) 进行混合, 得 3 种相应的反应液(RS)。

分别取每种 RS 各 $3 \times 0.1\text{ mL}$ 加入酶标板孔, 然后每孔加入 0.1 mL GOD ($0.1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 每隔 1 min 测 1 次吸光度(OD)。测定波长(nm) 分别为: $\lambda_{\text{TMB}} = 630\text{ nm}$, $\lambda_{\text{TMB}} = 450\text{ nm}$, $\lambda_{\text{OPD}} = 490\text{ nm}$, $\lambda_{\text{ODA}} = 450\text{ nm}$ 。

2.2 $\beta\text{-D-G}$ 浓度对 SAS 的影响

取 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 μL $\beta\text{-D-G}$ 溶液($40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别加入 9 支试管, 然后向每支试管各加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ HRP ($0.4\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 $100\text{ }\mu\text{L}$ ODA ($40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 最后用 PBS($0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0) 将每支试管稀释至 1.0 mL 。每管各取 $3 \times 0.1\text{ mL}$, 加入酶标板孔, 每孔各加 0.1 mL GOD($0.04\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别于 5 和 10 min 时各测 1 次 OD_{450} 。

2.3 pH 值对 SAS 的影响

用 $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 和 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸分别配制 pH 为 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0 的缓冲液。分别取各缓冲液 1.9 与 0.1 mL ($1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 混合得相应 pH 值的 GOD 溶液。

取 1.0 mL $\beta\text{-D-G}$ ($40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $50\text{ }\mu\text{L}$ HRP ($1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $100\text{ }\mu\text{L}$ ODA ($40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 3.85 mL H_2O 进行混合, 得反应液。

取各 pH 值下的 GOD 溶液 $3 \times 0.1\text{ mL}$ 入酶标板孔, 每孔分别加入反应液 0.1 mL , $30\text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应 5 min , 测定每孔 OD_{450} 。

2.4 4 种主要因素的正交试验

GOD, $\beta\text{-D-G}$, HPR 和 ODA 是影响三步连串反应的主要因素, 通过具体分析, 选出各因素的 3 个水平, 用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交表安排试验, 每个试验重复 3 次(表 1)。

表 1 正交因子水平表

水 平	因 子			
	GOD 质量浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\beta\text{D-G}$ 浓度/ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	HRP 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	ODA 浓度/ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	0.02	3.0	12.5	2.0
2	0.01	1.5	6.25	1.0
3	0.005	0.75	3.125	0.5

每个反应在 $27\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 5, 10 和 15 min 时各测 1 次 OD_{450} 值。

3 结果与分析

3.1 色原物对 SAS 的影响

光度法测定结果如表 2 所示。由表 2 中数据可以看出, 惟有 $\lambda_{\text{ODA}} = 450\text{ nm}$ 时, 系统随着时间的延长, OD 值增加。这种正相关性反映了放大系统随着时间的延长, 生成的有色物质的量或产生的信号在不断增加。因此, ODA 是该系统比较理想的色原物。 $\text{OD}_{630}^{\text{TMB}}$, $\text{OD}_{450}^{\text{TMB}}$ 和 $\text{OD}_{490}^{\text{OPD}}$ 随着时间的延长开始表现增加, 然后很快降低, 最后基本保持不变。这说明 TMB 和 OPD 反应后生成的有色物质在 SAS 中是不稳定的。因此, TMB 和 OPD 不宜用作该 SAS

的色原物。

表 2 不同色原物对放大系统的影响($\overline{OD}$ 值)

反应物	λ/nm	t/min											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TMB	630	0.677	0.650	0.534	0.421	0.323	0.267	0.222	0.171	0.173	0.173	0.163	0.171
TMO	450	0.695	0.741	0.698	0.648	0.589	0.519	0.469	0.430	0.415	0.417	0.390	0.377
OPD	490	0.334	0.399	0.402	0.323	0.269	0.230	0.219	0.216	0.223	0.209	0.209	0.220
ODA	450	1.456	1.634	1.718	1.757	1.787	1.824	1.871	1.931	2.021	2.086	2.136	2.173

3.2 β -D-G 浓度对 SAS 的影响

从试验结果(表 3)可以看出, $\overline{OD}$ 值随着 β -D-G 浓度的增大而增大, 当 β -D-G 浓度 $< 6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $\overline{OD}$ 值随浓度的变化而变化很快; 当 β -D-G 浓度 $> 6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $\overline{OD}$ 值则随 β -D-G 浓度的变化基本保持不变。这说明 β -D-G 浓度为 $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 已基本上使 GOD 的底物结合位点达到饱和, 此时, 反应速度达到最大, β -D-G 和 GOD 的配比为 $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}/0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 即 $300\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 。整个曲线的形状与单酶促反应曲线极其相似, 这暗示三步连串反应的限速步为 GOD 催化反应, 后两步反应的速度则极快。

表 3 β -D-G 浓度对 SAS 的影响

β -D-G 浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\overline{OD}_{450}$	β -D-G 浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\overline{OD}_{450}$	β -D-G 浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\overline{OD}_{450}$
0	0.144	3	1.542	6	1.850
1	0.779	4	1.688	7	1.863
2	1.281	5	1.765	8	1.878

3.3 pH 值对 SAS 的影响

由表 4 可以看出, 放大系统的最佳 pH 值为 6.4, 在 $\text{pH}=7.0$ 时, 三步连串反应仍保持较高的反应速度, 相当于最大速度的 96.6%, 这就为 ARIS 的放大系统和免疫反应系统(最适 $\text{pH}=7.0\sim 7.2$)的嵌接提供了有利条件。

表 4 pH 值对放大系统的影响

pH 值	$\overline{OD}_{450}$	pH 值	$\overline{OD}_{450}$	pH 值	$\overline{OD}_{450}$
4.6	0.825	5.6	1.245	6.6	1.341
4.8	0.913	5.8	1.282	6.8	1.339
5.0	1.019	6.0	1.308	7.0	1.311
5.2	1.108	6.2	1.325	7.4	1.203
5.4	1.184	6.4	1.349		

3.4 4 因素的正交试验

对不同时间下的试验结果进行方差分析^[4], 结果表明, 5, 10 和 15 min 时各处理间有极显著的差异($F_{5\text{ min}}=2\,394, F_{10\text{ min}}=2\,374, F_{15\text{ min}}=6\,552, P<0.01$)。对不同时间下的处理结果进行 LSD 多重比较(表 5), 结果显示, 除反应 5 min 时, 试验 3 和试验 5 之间未达到显著性差异($P>0.05$)外, 其他各处理间均表现出极显著的差异($P<0.01$)。由表 5 可以看出, 4 个因素的最佳结合为试验 1, 在该组合中, 各因素均处于最高水平。以上结果暗示 4 因素对结果均有显著影响。

表 5 各处理间的 LSD 多重比较结果

试号	OD ₄₅₀			差异显著性						LSD 值	
	5 min	10 min	15 min	0.01			0.05			0.01	0.05
				5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min		
1	1.443	1.887	2.057	A	A	A	a	a	a	0.030 (t= 5 min)	0.22
2	0.948	1.359	1.728	B	B	B	b	b	b		
3	0.597	0.901	1.123	D	E	E	d	e	e		
4	0.863	1.264	1.499	C	C	C	c	c	c		
5	0.616	1.013	1.328	D	D	D	d	d	d	0.025 (t= 10 min)	0.018
6	0.393	0.616	0.795	F	G	G	f	g	g		
7	0.545	0.850	1.077	E	F	F	e	f	f		
8	0.363	0.568	0.731	G	H	H	g	h	h	0.025 (t= 15 min)	0.018
9	0.274	0.410	0.553	H	I	I	h	i	i		

进一步对不同时间下各因素的各水平进行 LSD 多重比较, 结果表明各因素的各水平间存在极显著差异(表 6), 这说明 4 因素均为放大系统的主要因素, 这与对 4 个因素的 *F* 检查结果一致。

表 6 4 种因素各水平间的 LSD 多重比较结果

时间/ min	水平	OD ₄₅₀				差异显著性								LSD 值	
		A	B	C	D	0.01				0.05				0.01	0.05
						A	B	C	D	A	B	C	D		
5	1	0.996	0.950	0.733	0.777	A	A	A	A	a	a	a	a	0.018	0.013
	2	0.624	0.624	0.695	0.629	B	B	B	B	b	b	b	b		
	3	0.394	0.421	0.586	0.608	C	C	C	C	c	c	c	c		
10	1	1.394	1.333	1.024	1.103	A	A	A	A	a	a	a	a	0.014	0.010
	2	0.964	0.992	1.023	0.954	B	B	A	B	b	b	a	b		
	3	0.610	0.643	0.921	0.911	C	C	B	C	c	c	b	c		
15	1	1.636	1.544	1.194	1.313	A	A	B	A	a	a	b	a	0.014	0.010
	2	1.207	1.262	1.260	1.200	B	B	A	B	b	b	a	b		
	3	0.787	0.824	1.176	1.117	C	C	C	C	c	c	c	c		

为了进一步了解各因素对试验结果的影响程度和主次关系, 分别计算了不同时间下各因素的 *F*% 值($F\% = \frac{F_i}{F_A + F_B + F_C + F_D} \times 100\%$)(表 7)。

表 7 不同时间下各因素的 *F*% 值

<i>t</i> /min	因 素			
	GOD	βD-G	HRP	ODA
5	52	40	3	5
10	54	42	1	3
15	55	41	1	3

表 7 结果表明, 其主次关系为 GOD> βD-G> > HRP> ODA, 其中 GOD 和 βD-G 的影响占主导地位。这说明三步连串反应中的第一步反应即 GOD 氧化 βD-G 反应是整个系统的限速反应, 而其他两个反应的速度则是相对较快的。这一点说明该放大系统完全满足 ARIS 的需求, 可以用于构建 ARIS。最后, 对反应时间进行方差分析, 结果表明不同反

应时间之间差异显著($F_{1}=3.35^{*}>F_{0.05}=2.26$),进一步的 LSD 多重比较(表 8)表明,只有 5 min 和 15 min 之间达到显著性差异($P<0.05$)。这说明反应时间也是影响放大系统灵敏度的一个重要因素。

表 8 各时间平均数的 LSD 多重比较结果

时间 (min)	$\overline{OD}_{450}$	差异显著性		LSD 值	
		0.01	0.05	0.01	0.05
5	0.671	A	b		
10	0.989	A	ab	0.585	0.431
15	1.210	A	a		

以上结果表明,在不增加其他误差的前提下,适当增加 GOD, β -D-G, HRP 和 ODA 4 因素的浓度和适当延长反应时间,对于该放大系统的信号放大是有利的。

[参考文献]

[1] Morris D L, Eills P B, Carrico R J, et al. Flavin adenine dinucleotide as a label in homogeneous colorimetric immunoassay[J]. Anal Chem, 1981, 53(4): 658 ~ 665.

[2] 周 乐. 17 β 雌二醇——ARIS 方法学研究[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学动物医学系, 1998. 91 ~ 95.

[3] 史远刚. 孕酮-ARIS 构建[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学动物医学系, 1996. 39 ~ 51.

[4] 贵州农学院主编. 生物统计附试验设计[M]. 沈阳: 辽宁出版社, 1981. 168 ~ 182.

Study on signal amplification system of ARIS

ZHOU Le¹, SHI Yuan-gang², LI Jian², WANG Jian-chen²

(1. Department of Basic Science, 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine,
Northwest Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Influences of glucose oxidase (GOD), β -D-glucose (β -D-G), horseradish peroxidase (HRP), chromogeneous substance (CS) and pH value on SAS were studied in this paper. The results show that the optimum pH value for SAS is 6.4 and odianisidine (ODA) as CS fits the SAS of ARIS, but 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine and o-phenylene diamine not. GOD, β -D-G, HRP and CS have significant effects on the SAS on different degrees respectively ($P<0.01$). Their important order is GOD> β -D-G> ODA> HRP. Reaction time also has significant influence on the SAS ($P<0.05$). Increasing reactant concentration and prolonging reaction time benefit the SAS.

Key words: signal amplification system; continuous reaction; ARIS