

研究简报

基于微孔板化学发光法检测碱性磷酸酶的研究

王宇 王宗良 崔立国 庄秀丽 陈学思 章培标*

(中国科学院长春应用化学研究所 生态环境高分子材料重点实验室, 长春 130021)

摘要 CDP-Star 能被 ALP 迅速水解,且水解产物能够持续发光。本研究对化学发光法检测 ALP 的反应条件进行了优化。优化后的反应条件为: 125 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDP-Star 在 pH 9.5 缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下与 ALP 反应 10 min。在此条件下, ΔRLU 与 ALP 的活力呈线性关系。因此, 建立了一种基于微孔板化学发光法检测 ALP 的实验方法。结果表明, 本方法检测 ALP 的检测线性范围是 0.05~10 U/L 和 10~1000 U/L, 相对于光吸收法具有速度快、灵敏度高、重复性好等优点。因此, 本方法可以被开发成试剂盒, 应用于高通量全自动生化分析仪的测试分析。

关键词 碱性磷酸酶; CDP-Star; 化学发光

1 引言

CDP-Star 是一个敏感的碱性磷酸酶 (ALP) 化学发光底物, 由于具有迅速和高灵敏度等特点, 通常被用于检测标记有 ALP 的生物大分子。近年来, CDP-Star 化学发光底物已经被广泛的应用于 Northern-blot^[1]、Southern-blot^[1,2]、Western-blot^[3] 等印迹技术和免疫分析技术领域。ALP 是一类水解酶, 主要可去除各种分子的磷酸基团, 其中包括核酸、蛋白、生物碱类, 这种去除磷酸过程即为脱磷酸作用。ALP 在碱性环境中酶活性较高, 主要分布在人或动物的肝脏和骨骼中, 胎盘和肾脏中也有少量分布。ALP 在一些时期内会大量产生, 例如青春期骨骼的发育过程中、骨伤愈合过程中、肝细胞损伤过程中等^[4,5]。在新骨生成过程中, 成骨细胞会大量表达 ALP, 由于 ALP 能够在体内形成一个碱性环境, 碱性环境有利于钙离子沉积以及骨的矿化作用, 从而促进了新骨的生成^[6~9]。因此, 检测 ALP 在血液中的含量可以用于多种临床疾病的诊疗。目前, 检测 ALP 的方法主要有光吸收法^[10~12]、电化学法^[13~15]、荧光法^[16,17] 和化学发光法^[18~20] 等。应用较为广泛的方法是光吸收法, 如 ALP 在碱性条件下, 催化水解对硝基苯磷酸 (*p*-Nitrophenyl phosphate, pNPP), 释放出对硝基苯酚 (*p*-Nitrophenol) 和 H_3PO_4 , 通过分光光度计检测对硝基苯酚 (405 nm), 以定量测定碱性磷酸酶的活性。本实验采用 ALP 化学发光底物 CDP-Star 检测 ALP 的含量。相对于光吸收法及化学发光法具有更高的敏感性和可靠性, 更容易追踪到样品中微量的 ALP 变化。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

全波长酶标仪 Infinite M200 (瑞士 Tecan 公司); 恒温电热培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); 白色 96 孔微孔板 (美国 Corning 公司); 透明 96 孔微孔板和 6 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司); pH 计 (瑞士 METTLER 公司); 微量台式低温冷冻离心机 (美国 Thermo 公司); 二氧化碳恒温培养箱 (日本 Sanyo 公司)。

CDP-Star Substrate (德国 Merck 公司); 对硝基苯磷酸 (*p*-Nitrophenyl phosphate, pNPP, 美国 Sigma 公司); Phosphatase, Alkaline (美国 Sigma 公司); Mc-3T3-E1 小鼠成骨细胞 (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库); DEME 培养基 (美国 Gibco 公司); 标准胎牛血清 (北京元亨金马生物技术有限公司); 细胞

2011-11-14 收稿; 2012-02-08 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 50733003, 50973109) 和科技部国际合作 ((No. 2010DFB50890) 项目资助

* E-mail: zhangpb@ciac.jl.cn

裂解液(上海生工生物工程有限公司); Tris 碱, HCl, MgCl₂, ZnCl₂, 二乙醇胺均为国产分析纯试剂。

ALP 标准品的酶活力是 8407 U/mgP, 18 mg/mL。ALP 标准品用稀释液(10 mmol/L Tris HCl, pH=8.0, 1 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L ZnCl₂, 50% 甘油)分别稀释成 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 和 0.01 U/L 不同的酶活力的 ALP 标准品。CDP-Star Substrate 用底物稀释液(1 mmol/L MgCl₂, 0.1 mol/L 二乙醇胺, pH 9.5)稀释。

2.2 实验方法

在白色 96 孔微孔板中分别加入 200 μL CDP-Star Substrate, 5 μL 不同的酶活力的 ALP 标准品, 将微孔板迅速放入全波长读板机中, 运行预设程序: 振板 10 s, Luminescence 模块检测化学发光光子数 RLU, 检测的整合时间为 1000 ms, 每 10 min 检测一次, Luminescence 检测过程共持续 1 h。同时, 测定仅加入 CDP-Star 底物的阴性对照样品的光子数为 RLU₀, CDP-Star 与 ALP 反应后, 增加的光子数用 ΔRLU 表示, ΔRLU=RLU-RLU₀。

MC-3T3-E1 小鼠成骨细胞用含 90% DMEM 和 10% 标准胎牛血清的培养基培养, 培养条件是 37 °C, 5% CO₂, 100% 湿度。当细胞生长密度达到 80% 时, 用 PBS 洗 3 次, 每孔加入 2mL 细胞裂解液, 37 °C 抚育 30min 后, 用移液器吹打数次, 室温下 12000 g 离心 10 min, 将细胞裂解液上清转移到一个新的离心管中。根据本研究所得到的最适检测条件检测细胞裂解液上清中的 ALP 含量。pNPP 法检测 ALP 的含量参考试剂说明书。

3 结果与讨论

3.1 CDP-Star 浓度对体系化学发光的影响

不同浓度的 CDP-Star 与 ALP 标准品反应 10 min 后, 增加的光子数 ΔRLU 与 CDP-Star 浓度的关系见图 1。当底物浓度小于 60 μmol/L 时, 体系的化学发光光子数 ΔRLU 随底物 CDP-Star 浓度的增加而增大。当底物浓度大于 60 μmol/L 时, 体系的化学发光光子数 ΔRLU 不再增大。米氏方程(Michaelis-Menten equation)表示一个酶促反应的起始速度(v)与底物浓度(C)关系的速度方程。

$$v = \frac{v_{\max} C}{K_m + C} \quad (1)$$

K_m 和 v_{\max} 的测定主要采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 在本体系中 ΔRLU 代表了方程中反应速度 v , CDP-Star 浓度代表方程中 C 。以 $1/\Delta RLU$ 对 $1/C$ 作图, 直线与纵坐标轴的截距等于 $1/v_{\max}$, 直线与横坐标轴的截距等于 $-1/K_m$, 因此可以计算出 $K_m(\text{CDP-Star}) = 10.53 \mu\text{mol/L}$, $v_{\max} = 1.78 \times 10^4$, 米氏方程为:

$$\frac{1}{v} = \frac{5.92 \times 10^{-4}}{C} + 5.62 \times 10^{-5} \quad (2)$$

因此, 本体系采用底物 CDP-Star 浓度为 125 μmol/L ($11.87K_m$) 用于测定 ALP 的酶活力。

3.2 反应温度对体系化学发光的影响

ALP 标准品(10 U/L)在不同的温度下(30~50 °C)与 CDP-Star 反应 30 min 后, 体系增加的光子数 ΔRLU 与反应温度的关系见图 2。ΔRLU 在 30~46 °C 之间呈现缓慢下降趋势, 当反应温度大于 46 °C 后, ΔRLU 下降趋势明显。阴性对照 RLU₀ 在不同反应温度下维持一个相对恒定数值。因此, 根据 ΔRLU 和 RLU₀ 与反应温度的关系, 以及 ALP 最适反应温度, 将 CDP-Star 法检测 ALP 反应体系的温度设定为 37 °C。

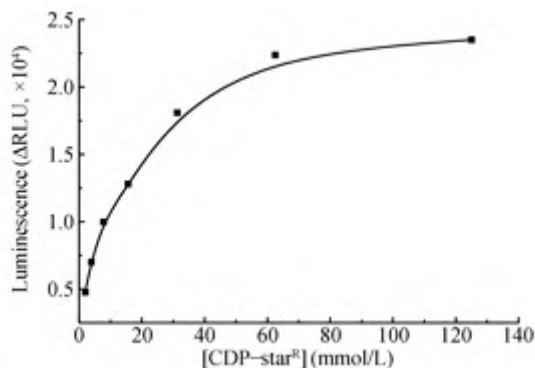


图 1 CDP-Star 浓度对 ALP 反应速率的影响

Fig. 1 Effect of CDP-Star concentration on alkaline phosphatase (ALP) reaction rate

CDP-star 底物浓度为 1.95313~125 μmol/L (Ph 9.5), ALP 酶活力为 1 U/L, 孵育时间为 10 min, 反应温度为 37 °C

The concentration of CDP-star ranges between 1.95313 and 125 μmol/L (pH 9.5), the enzyme activity of ALP 1 U/L, the incubation time 10 min at 37 °C.

3.3 酸度对体系化学发光的影响

ALP 标准品在不同的 pH 值 (pH=8~12) 下与 CDP-Star 在 37 °C 下反应 10 min 后, 体系增加的光子数 ΔRLU 与 pH 值的关系见图 3。当 pH=8~10 时, ΔRLU 缓慢增强; pH=9.5 时, ΔRLU 最大; 当 pH=10~12 时, ΔRLU 随着 pH 值增加呈现快速下降趋势。因此, 根据 ΔRLU 和与反应 pH 的关系, CDP-Star 法检测 ALP 反应体系的 pH 值设定为 9.5。

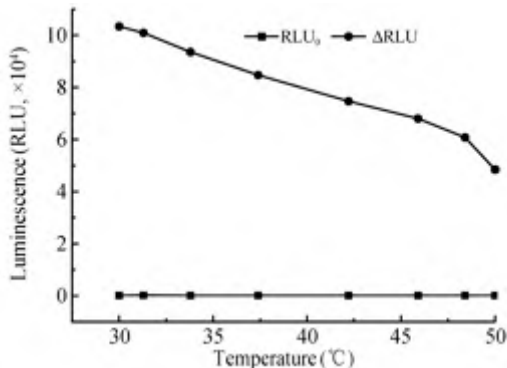


图 2 温度对于反应体系的 ΔRLU 的影响

Fig. 2 Effect of temperature on ΔRLU of reaction system

CDP-star 底物浓度为 125 $\mu\text{mol/L}$ (pH 9.5), ALP 酶活力为 10 U/L, 孵育时间为 10 min, 反应温度为 30~50 °C

The concentration of CDP-star: 125 $\mu\text{mol/L}$ (pH 9.5), the enzyme activity of ALP: 10 U/L, the incubation time: 10 min, the reaction temperature ranges between 30 °C and 50 °C.

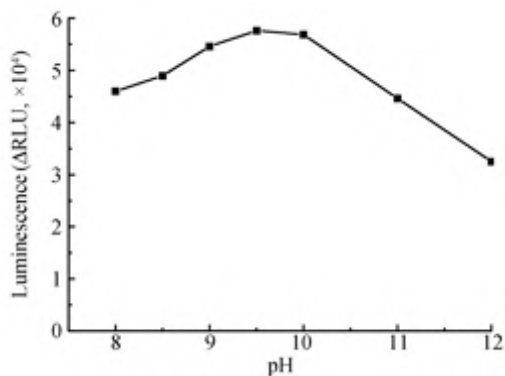


图 3 pH 值对于反应体系的 ΔRLU 的影响

Fig. 3 Effect of pH on ΔRLU of reaction system

CDP-star 底物浓度为 125 $\mu\text{mol/L}$ (pH=8~12), ALP 酶活力为 10 U/L, 孵育时间为 10 min, 反应温度为 37 °C。

The concentration of CDP-star: 125 $\mu\text{mol/L}$ (pH=8-12), the enzyme activity of ALP: 10 U/L, the incubation time: 10 min, at 37 °C.

3.4 反应时间对体系化学发光的影响

与其它的酶促反应相同, ALP 催化底物 CDP-Star 的水解反应速度受时间的影响很大。由图 4 可见, 不同酶活力的 ALP 标准品与 125 $\mu\text{mol/L}$ CDP-Star 反应后, 化学发光光子数 ΔRLU 随着反应时间的延长而增强。当反应时间 10 min 内时, 体系的化学发光光子数 ΔRLU 与反应时间呈线性关系; 当反应时间大于 10 min 后, 体系的化学发光光子数 ΔRLU 随着反应时间的增加变化较小, 基本到达一个平台期。因此, ALP 与底物 CDP-Star 的反应时间优化选择为 10 min, 此时化学发光光子数 ΔRLU 较强, 能够提高检测的灵敏度。

3.5 线性范围与灵敏度

在优化的反应条件下, 使用的 CDP-Star 底物浓度是 125 $\mu\text{mol/L}$, 样品和 CDP-Star 底物的反应时间是 10 min。化学发光法检测 ALP 酶活力分别在 0.05~10 U/L (图 5a) 和 10~1000 U/L (图 5b) 两个范围内有良好的线性关系, 线性方程分别为 $\Delta\text{RLU} = 20459.92C - 1757.94$ 和 $\Delta\text{RLU} = 7167.72C + 38188.75$, 相关系数分别为 0.9914 和 0.9918。本研究采用的是 96 孔板, 配合使用辅助自动进样系统, 能够实现高通量 ALP 检测。

3.6 细胞裂解液上清中 ALP 检测

为了检测培养在 6 孔板中的 MC-3T3-E1 细胞中 ALP 的活力, 按照上述优化的化学发光法检测 ALP 的实验条件直接测量细胞裂解液上清液中 ALP 的酶活力。同时用常规的 pNPP 比色法进行对比实验。

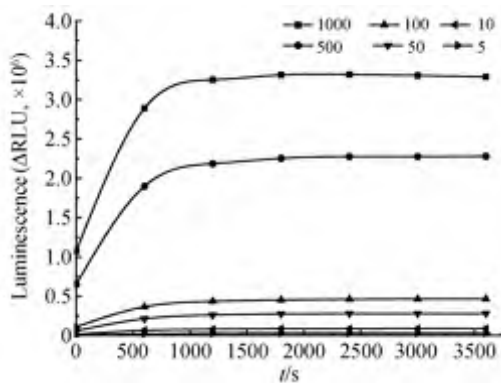


图 4 反应时间对化学发光光子数 ΔRLU 的影响

Fig. 4 Effect of reaction time on ΔRLU

CDP-star 底物浓度为 125 $\mu\text{mol/L}$ (pH=9.5), ALP 酶活力为 5~1000 U/L, 孵育时间为 0~3600 s, 反应温度为 37 °C。

The concentration of CDP-star: 125 $\mu\text{mol/L}$ (pH=9.5), the enzyme activity of ALP ranges between 5 U/L and 1000 U/L, the incubation time ranges between 0 s and 3600 s, at 37 °C.

检测的结果见表 1。与传统的 pNPP 比色法相比,化学发光法具有良好的准确度和重复性。

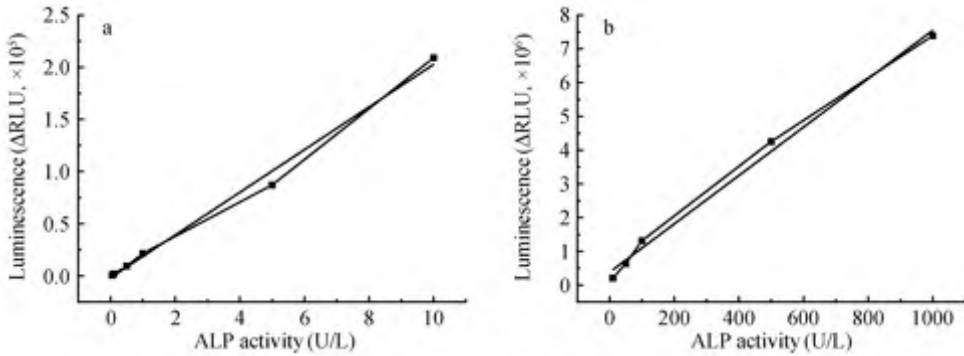


图 5 CDP-Star 化学发光法检测 ALP(a)0.05~10 U/L 标准曲线 ;(b)10~1000 U/L 标准曲线

Fig. 5 Calibration curve for ALP measured by chemoluminescence method of CDP-Star. (a) 0.05~10 U/L, (b) 10~1000 U/L

CDP-star 底物浓度为 125 $\mu\text{mol/L}$ (pH=9.5), ALP 酶活力为 0.05~1000 U/L, 孵育时间为 10 min, 反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

The concentration of CDP-star is 125 $\mu\text{mol/L}$ (pH=9.5), the enzyme activity of ALP ranges between 0.05 U/L and 1000 U/L, the incubation time is 10 min, the reaction temperature is 37 $^{\circ}\text{C}$.

表 1 体外培养的 MC-3T3-E1 细胞裂解液上清中 ALP 活性的检测 ($n=4$)

Table 1 Determination of activity of ALP in lysate of MC-3T3-E1 cells cultured in vitro ($n=4$)

细胞裂解液 Cell lysate	比色法 Colorimetric method (U/L)	化学发光法 Chemoluminescence method (U/L)	相对偏差 Relative error (%)
1	54.04	53.92	0.22
2	53.66	52.47	2.22
3	61.66	62.17	-0.83
4	57.39	57.62	-0.40
5	63.58	62.79	1.24
6	55.43	56.12	-1.24

References

- Mendes B M J, Cardoso S C, Boscaroli-Camargo R L, Cruz R B, Mourão Filho F A A, Bergamin Filho A. *Plant Pathology*, **2010**, 59(1): 68~75
- Andres C, Belloni B, Puchta U, Sander C A, Flaig M J. *Journal of Cutaneous Pathology*, **2010**, 37(1): 28~34
- Kobayashi K, Takahashi E, Miyagawa Y, Yamanaka H, Noguchi K. *Neuroscience Letters*, **2011**, 504(1): 57~61
- Salvatore F, Sacchetti L, Castaldo G. *Clin. Chim. Acta*, **1997**, 257(1): 41~58
- D'Amico E, Paroli M, Fratelli V, Palazzi C, Barnaba V, Callea F. *Dig. Dis. Sci.*, **1995**, 40(10): 2113~2116
- Gyurcsanyi R, Bereczki A, Nagy G, Neuman M, Lindner E. *Analyst*, **2002**, 127(2): 235~240
- Christenson R H. *Clin. Biochem.*, **1997**, 30(8): 573~593
- Fishman W. *Clin. Biochem.*, **1987**, 20(6): 387~392
- Hoshino H, Kushida K, Takahashi M, Kawana K, Denda M, Yamazaki K, Inoue T. *Endocr. Res.*, **1998**, 24(1): 55~64
- Ishikawa E. *Clin. Biochem.*, **1987**, 20(6): 375~385
- Wilkinso J H, Vodden A. *Clin. Biochem.*, **1966**, 12(10): 701~708
- Hirata S, Kitamura C, Fukushima H, Nakamichi I, Abiko Y, Terashita M, Jimil E. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2010**, 111(6): 1445~1452
- Ito S, Yamazaki S, Kano K, Ikeda T. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 424(1): 57~63
- Togari A, Sakai J, Matsumoto S, Nagatsu T. *J. Chromatogr. B*, **1987**, 417(1): 41~46
- Takeda M, Shiku H, Ino K, Matsue T. *Analyst*, **2011**, 136(23): 4991~4996
- ZHANG Na, BIAN Wei-Wei, LI Yao-Hui. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(5): 721~724
- 张娜, 边玮玮, 李耀辉. *分析化学*, **2009**, 37(5): 721~724

- 17 Gong H, Little G, Craddock M, Draney D R, Padhye N, Olive D M. *Talanta*, **2011**, 84(3): 941~946
- 18 Albillos S M, Reddy R, Salter R. *Journal of Food Protection*, **2011**, 74(7): 1144~1154
- 19 Kokado A, Arakawa H, Maeda M. *Luminescence*, **2002**, 17(1): 5~10
- 20 Ximenes V F, Campa A, Baader W J, Catalani L H. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 402(1-2): 99~104

Research of Chemiluminescent Assay of Alkaline Phosphatase Based on Microplate

WANG Yu, WANG Zong-Liang, CUI Li-Guo, ZHUANG Xiu-Li, CHEN Xue-Si, ZHANG Pei-Biao*
(Key Laboratory of Polymer Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China)

Abstract Enzymatic dephosphorylation of CDP-Star by ALP leads to CDP-Star decompose and continuously emit light. Optimal conditions for the determination of ALP by chemiluminescent method were investigated in this research. 125 $\mu\text{mol/L}$ CDP-Star reacted with ALP in the buffer solution of $\text{pH}=9.5$ and incubated for 10 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ were selected as the optimal conditions for the determination of ALP. The amount of ΔRLU is proportional to ALP activity. Therefore, the method of chemiluminescent assay of ALP based on microplate was established. The results showed that the linear range for the determination of ALP was 0.05–10 U/L and 10–1000 U/L. This method was more rapid, sensitive and reproducible than that of traditional colorimetric method. Therefore, this method can be developed into a kit used in the high-throughput automatic biochemical analyzer.

Keywords Alkaline phosphatase; CDP-Star; Chemiluminescence

(Received 14 November 2011; accepted 8 February 2012)

《分析化学》参考文献著录格式变更说明

参考文献以引用先后顺序编号(注于正文相应处),文献作者应全部写出。作者需对文献的作者、题目、发表的刊物、年代、卷期页等核实无误,切忌转引二手文献。遇到中文文献,则会如下所示,中英分开排;期刊、专著和译著引用格式及标记如下:

- 1 Aminuddin M, Miller J N. *Talanta*, **1995**, 42(6): 775–778
- 2 LU Xiao-Quan, MO Jin-Yuan. *Chinese J. Anal. Chem.*, **1996**, 24(9): 1100–1106
卢小泉,莫金垣. *分析化学*, **1996**, 24(9): 1100–1106
- 3 DONG Shao-Jun, CHE Guang-Li, XIE Yuan-Wu. *Chemically Modified Electrodes*. Beijing: Science Press, **1995**: 440–483
董绍俊,车广礼,谢远武. *化学修饰电极*. 北京:科学出版社,1995,440–483
- 4 Sucha L, Kotrly S. Translated by ZHOU Xi-Shun, DAI Ming, LI Jun-Yi. *Solution Equilibria in Analytical Chemistry*. Beijing: People's Education Press, **1979**: 25–30
Sucha L, Kotrly S. *分析化学中的溶液平衡*. 周锡顺,戴明,李俊义译. 北京:人民教育出版社, **1979**: 25–30
- 5 Malinowski E R. *Factor Analysis in Chemistry*. 2nd ed., New York: Wiley Interscience, **1991**: 40
- 6 Stevens T M, Miller Jr T E. *U. S. Patent*, 4290775, **1981**
- 7 GB/T 5009.101-2003, *Determination of antimony in polyester resin and products for food containers and packaging materials*. National Standards of the People's Republic of China
食品容器及包装材料用聚酯树脂及其成型品中锑的测定. 中华人民共和国国家标准. GB/T 5009.101-2003
- 8 NATA. *Technical Note # 17-Guidelines for the Validation and Verification of Chemical Test Methods*, <http://www.nata.asn.au/go/publications/technical-publications>, **2006**