

聚合酶活性信号检测地高辛方法的建立

袁 矜¹, 夏东元^{2△} (1. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433; 2. 苏州博泰安生物科技有限公司, 江苏昆山 215325)

【摘要】 目的 建立以聚合酶活性信号为检测对象的反应体系, 使用具有高灵敏度和精密度的均相分析方法, 实现地高辛血药浓度的自动化检测。**方法** 设计特异的 DNA 模板及其引物, 引物上特定位点连接有 Digoxigenin-11-dUTP(Dxin), 使得样品中地高辛(Dig)与引物上的 Dxin 在抗 Dig 抗体存在时形成竞争反应, 影响 DNA 聚合酶与引物结合, 从而根据合成的双链量即可检测出样品 Dig 浓度。**结果** 选择 D2p 作为 Dxin 在引物上的结合位点, 17 nmol/L 模板及引物浓度、33 nmol/L 的抗 Dig 抗体浓度。试剂可报告范围为 0.3~39.0 ng/mL, CV<10%。**结论** 聚合酶活性信号检测技术可以实现高灵敏度的地高辛均相分析。

【关键词】 地高辛; DNA 聚合酶; 均相反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.05.022 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)05-0633-02

Establishment of a digoxin detection method by polymerase Activity signal YUAN Jin¹, XIA Dong-yuan² (1. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Suzhou Botaian Biological Scientific Technology Co., Ltd., Kunshan, Jiangsu 215325, China)

【Abstract】 Objective To establish a reaction system with the polymerase activity signal as the detection object and to realize the automatic detection of digoxin(Dig) blood concentration by using the homogeneous phase assay method with high sensitivity and high precision. **Methods** The specific DNA template and its primer which conjugated with Digoxigenin-11-dUTP(Dxin) at specific site were designed. Dig in serum sample was formed the competing reaction with Dxin on the primer when anti-Digoxin antibody existed, which influenced the combination of DNA polymerase with primer, thus the dig content in the sample could be detected according to the synthesized double chain amount. **Results** D2p as the binding site of Dxin on the primer, 17 nmol/L template, primer concentration and 33 nmol/L anti-Dig concentration were selected. The reportable range of reagent was 0.3—39.0 ng/mL, CV<10%. **Conclusion** The polymerase signal detection technology can realize the Dig homogeneous phase analysis with high sensitivity.

【Key words】 digoxin; DNA polymerase; homogeneous reaction

地高辛是临床上治疗充血性心力衰竭的经典药物, 对室上性心动过速、心房颤动、心房扑动等病症疗效明显^[1-3]。该药物治疗指数窄, 治疗量与中毒量非常接近, 治疗剂量为中毒剂量的 60%; 用药个体差异大, 容易发生过量中毒或剂量不足。此外, 地高辛又是一种长期服用的药物, 经常会出现与其他药物联合应用的现象。因此监测地高辛体内药物浓度对于临床个体化给药方案的实施具有特别重要的意义, 有利于及时根据监测结果及临床症状调整剂量, 以保证患者安全、有效地使用地高辛^[4]。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 药物地高辛, 也可称作异羟基洋地黄毒苷(Dig), 分子式: C₄₁H₆₄O₁₄, 相对分子质量: 0.781×10³; Digoxigenin-11-dUTP, 用于标记探针 DNA 的地高辛标记物(Dxin), 甾族半抗原; 地高辛标记试剂盒; 抗-Dxin 抗体 Fab 片段; DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow 片段); dNTP、PicoGreen; VIC-TORTM X3 多标记微孔板检测仪。

1.2 反应体系原理 反应体系的基本成分包含 DNA 模板及其引物, 引物上的特定位点结合有 Dxin。Dxin 具有较强抗原性, 其与 Dig 结构相似的特点使得它在抗 Dxin 抗体存在时与 Dig 产生竞争性抑制。当体系中有 DNA 多聚酶及 dNTP 存在时, 即合成 DNA 双链。当体系中有抗 Dig 抗体 Fab 片段存在

时, 该片段可以和 Dxin-DNA 引物上的 Dxin 结合, 该结合将会占据 DNA 多聚酶与模板结合位点, 阻止 DNA 多聚酶的活性, 使其无法作用于引物上, 从而无法形成新的 DNA 双链。当反应体系中加入的样品中含有 Dig 时, 样品中的游离 Dig 将与连接在引物上的 Dxin 竞争抗 Dig 抗体, 形成抗原抗体复合物, 从而释放 DNA 引物。则该释放出的 DNA 引物能够重新与 DNA 多聚酶结合, 从而合成新的 DNA 双链。此时, 样品中的 Dig 的浓度即可通过测定新合成的 DNA 双链来测定。反应体系中 DNA 聚合酶活性通过荧光染料 PicoGreen 进行检测。PicoGreen 只与双链 dsDNA 结合, 因此最终获得的荧光强度与反应体系中双链 DNA 的含量成正比, 也即与 DNA 聚合酶活性成正比。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 设计合成一段长度为 85 bp 的模板及其引物, 确保模板序列不与人体可能的血液组份序列产生重合, 因此 AC 含量达 97.6%。模板: 5'-ACC AAC ACC ACA CAC AAC CAA CAC ACA CCA ACC ACA ACA CCA ACC AAC ACC ACA CAC AAC CAA CA; CAC AAT GTC TCT GAC CAC TC-3'; 设计引物: 5'-GAGTGGTCAGAGACAT-3'; 正式引物: 特定位点上结合有 Dxin 的设计引物。

1.3.2 确定合适的 Dxin 结合位点 利用随机引物标记的方

作者简介: 袁矜, 女, 在读硕士, 主要从事体外诊断试剂方面的研究。

△ 通讯作者, E-mail: xiadongyuan@hotmail.com.

法将 Dxin 掺入到设计引物中。标记效率一般为 20~25 bp 插入一个 Dxin。设计引物长度为 16 bp, 因此结合上 Dxin 的设计引物应仅结合有一个 Dxin。因该方法为随机标记, 选择设计引物上不同位点结合有 Dxin 的片段: D1p、D2p、D3p、D4p, 测试片段连接后对 DNA 聚合酶与引物结合效果的影响。因酶的结合空间位阻较大, 需选择对 DNA 聚合酶与双链 DNA 结合影响最小的, 即被保留的聚合酶活性最大的位点。

1.3.3 免洗一步法 ELISA 50 μL 反应体系: 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.9)、50 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂、dNTP 2.5 nmol、1:200 稀释的 PICOGREEN、模板/正式引物、抗体。将反应混合物在室温下孵育 5 min, 加入 1 单位 DNA 聚合酶以启动聚合酶反应。再孵育 5 min 后, 通过产生的荧光来检测 DNA 聚合酶反应生成的双链 DNA。使用 480 nm 激发波长在 520 nm 波长处检测荧光信号。

1.3.4 确定模板/引物及抗体浓度 在 50 μL 反应体系中, 抗体浓度为 50 nmol/L, 梯度稀释 DNA 模板: 68、34、17、8.5、4.3 nmol/L。选择其中反应曲线典型且斜率最大的浓度作为反应体系中的模板/引物浓度。在 50 μL 反应体系中, 加入 17 nmol/L 的 DNA 模板, 梯度稀释抗 Dxin 抗体: 55、44、33、22、11、5.5 nmol/L, 对比各浓度下反应窗口, 将反应度最大的浓度作为反应体系中所加入的抗体浓度。

1.3.5 血清样品确认实验条件 反应体系中分别按梯度加入 Dig 的阴性混合血清作为样品, Dig 最终浓度为 250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9 nmol/L, 验证上述实验条件。

2 结 果

2.1 检测条件建立

2.1.1 Dxin 结合位点 测试 Dxin 结合位点分别为 D1p、D2p、D3p、D4p 的四种引物, 结果显示, Dxin 结合在 D2p 位点上时, 抗 Dxin 抗体的加入对聚合酶活性影响最大。表明在引物该位点上结合 Dxin 之后, 能够对 DNA 聚合酶与引物的结

合形成抑制, 在空间结构上造成阻碍, 使得引物只能与抗 Dxin 抗体或 DNA 多聚酶中的一种相结合。因此选择合成该特定位点上结合有 Dxin 的片段作为 Dig 检测试剂的正式引物。如图 1 所示。

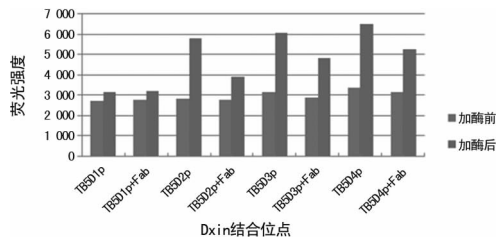


图 1 不同 Dxin 结合位点对聚合酶活性的影响

2.1.2 模板/引物及抗体浓度 经测试, 在 50 μL 反应体系中, 当抗体浓度为 50 nmol/L, 模板/引物浓度为 17 nmol/L 时, 反应曲线呈现典型的 S 型曲线, 且斜率较大。因此, 使用 17 nmol/L 作为反应体系中的模板/引物浓度。经测试, 抗体为 33 nmol/L 时, 用速率法计算, 斜率最大, 即反应度最大, 则测试结果重复性最好。

2.1.3 血清样品确认实验条件 对加入 Dig 的阴性混合血清进行测试, 结果显示, 使用血清作为样品, 反应仍呈现典型的 S 型曲线, 说明正常血清中成分对反应的进行不形成干扰。

2.2 方法学评价

2.2.1 试剂可报告范围及回收率 从一份浓度为 39.0 ng/mL 的样品开始, 用混合的健康者血清系列稀释样品, 重复测定各样品 6 次。结果显示, 试剂可报告范围为 0.3~39.0 ng/mL, 回收率见表 1。

2.2.2 精密性 分别对正常及异常样品连续测定 20 次, 并在不同时间重复测定 20 次, 结果见表 2。

表 1 试剂可报告范围及回收率

项目	39.0 ng/mL	19.5 ng/mL	9.75 ng/mL	4.88 ng/mL	2.44 ng/mL	1.22 ng/mL	0.61 ng/mL	0.30 ng/mL	0.15 ng/mL
测定值 (ng/mL)	37.50	19.16	10.72	4.35	2.38	1.37	0.56	0.33	0.17
相对偏差 (%)	0.69	3.57	6.09	5.54	3.34	7.35	8.93	9.48	14.45
回收率 (%)	96.20	98.30	109.00	89.10	97.50	112.00	88.50	110.00	113.00

表 2 批内及批间精密性

质控	批内精密性				批间精密性			
	n	均值	标准差	相对偏差	n	均值	标准差	相对偏差
正常值	20	1.03	0.071	6.95	10	0.84	0.059	7.01
异常值	20	2.63	0.097	3.68	10	2.44	0.173	7.09

3 讨 论

地高辛是临床上治疗充血性心力衰竭的经典药物, 也是临床上最难掌握的药物之一^[5-6]。临床上正常的血药浓度一般为 0.5~2.0 ng/mL^[7]。高于潜在中毒浓度 2.0 ng/mL 时, 中毒可能性会大大增加^[8]。采用本方法检测地高辛血药浓度, 可报告范围下限达 0.3 ng/mL, 低于一般正常用药时的血药浓度, 而上限则远高于人体内的中毒浓度。对于正常及异常质控的不精密性检测结果显示, 批内精密性分别为 6.95%、3.68%, 批间精密性分别为 7.01%、7.09%。说明该方法可充分满足

监测地高辛在不同个体间血药浓度变化复杂的情况。

目前国内外 Dig 血药浓度测定较普遍的方法是免疫分析法^[9-11]。免疫分析法可分为均相分析和异相分析, 其中异相分析包含固液两相, 而均相分析以单一相进行。异相分析如 ELISA, 操作步骤较均相分析多, 且不能真实地实现自动化。本检测方法提供了一种易于使用的均相分析方法, 耗时少于异相分析, 具有高灵敏度和精密性且能实现自动化。国内测定 Dig 血药浓度大多使用美国雅培公司的全自动血药浓度检测仪 TDxFLx 配套雅培公司专用的 Dig 血药浓度检测试剂盒。该试剂盒采用荧光偏振免疫法, 具有快捷准确、灵敏度、特异性强等优点, 但其价格昂贵, 尚无替代品。且 TDxFLx 的使用大多集中在三甲医院, 对患者而言有诸多不便。本文采用的检测方法, 可使用 Perkins Elmer 公司生产的多标记微孔板检测仪。仪器能够自动完成加样、孵育并进行荧光检测, 不需洗版, 操作便捷。荧光检测酶标仪在各级医院的使用相对于 TDxFLx 要高出不少, 可满足更多地区的患者。如对试剂(下转第 637 页)

果^[15]。最后,还应当注重护士业务能力的学习与培训,如加强护士心理学及与人沟通等方面的知识,提高护士的素质与教育水平,从而使健康教育路径能更好地实施。

本研究结果显示,观察组术后运用健康教育路径后,其并发症发生情况和疾病知识掌握情况、生活自理能力恢复情况及住院时间与对照组比较,均有了很大程度的提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。综上所述,健康教育路径的实施不仅更好地体现了以患者为中心,全心全意为患者服务的宗旨,而且使患者更好地掌握了预防疾病的知识,对患者的预后和康复有明显的影 响。且通过健康教育路径使护士的工作更规范化、制度化,保证了健康宣教在临床各个环节的实施,对提高医疗服务质量、改善医患关系有很很大的意义,值得在临床广泛推广。

参考文献

[1] Jensen ME, Evans AJ, Mathis JM, et al. Percutaneous polymethylmethacrylate vertebroplasty in the treatment of osteoporotic vertebral body compression fractures: technical aspects[J]. Am J Neuroradiol, 1998, 18(10): 1897-1904.

[2] 贾连顺. 现代脊柱外科学[M]. 北京:人民军医出版社, 2007:196.

[3] 丁言雯. 护理学基础[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007: 169.

[4] 刘畅,赵志力. 健康教育路径在颌面部整形手术患者中的应用[J]. 医学临床研究, 2015, 32(5):908-910.

[5] 喻允奎. 量化健康教育与随机健康教育的应用效果研究[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(3):415-416.

[6] Chen AY, Callender D, Mansyur C, et al. The impact of clinical pathways on the practice of head and neck onco-

logic surgery: the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center Experience[J]. Arch Otolaryngol, 2000, 126(3):322-326.

[7] 郑淑敏,刘惠艳. 健康教育在“优质护理服务示范病房”中应用的效果评价[J]. 中国实用护理杂志, 2012, 28(15): 82-83.

[8] 王春梅. 看图对话健康教育工具在冠心病患者健康教育中的应用[J]. 中国医药导报, 2014, 11(31):104-107.

[9] 陈婧,杜慧莹. 健康教育路径在尿道下裂围手术期的应用[J]. 医学临床研究, 2012, 29(8):1600-1601.

[10] 包小燕. 系统化健康教育在降低骨科患者石膏固定术后折断率的应用[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(7): 991-993.

[11] 邱伟,吕莉,张卫红,等. 健康教育处方在骨科患者健康教育中的应用[J]. 护士进修杂志, 2013, 28(12):1105-1107.

[12] 马京华,薛娜娜,纪敬敏,等. 多元化健康教育对老年骨质疏松骨折患者生活质量的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(6):1667-1669.

[13] 付惠杰,张国顺,马宁,等. 临床护理路径在血浆置换患者健康教育中的应用[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2015, 18(3):491-494.

[14] 索茜,孙素丽,孙彩勤. 临床路径在足月阴道分娩孕产妇健康教育中的应用[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2011, 14(8):1179-1180.

[15] 刘静兰,刘琼,刘敏,等. 健康教育路径对择期瓣膜置换手术患者康复的影响[J]. 中华现代护理杂志, 2011, 17(8): 917-919.

(收稿日期:2015-06-25 修回日期:2015-09-25)

(上接第 634 页)

成分做一定的改进,本方法可以有更高的检测灵敏度,更适用于全自动生化分析仪,可普及范围更广。

参考文献

[1] Ahmed A. Digoxin and reduction in mortality and hospitalization in geriatric heart failure:importance of low doses and low serum concentrations[J]. J Gerontol, 2007, 62(3):323-329.

[2] Palacios-Zabalza I, Corcostegui-Santiago B, Peral-Aguirregotia J. Combination treatment with digoxin antibodies and plasmapheresis for the management of digoxin toxicity in a patient with renal failure[J]. Farmacy Hosp, 2013, 37(2):170-172.

[3] Ikeda J, Ichiki T, Matsuura H, et al. Deletion of phd2 in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling[J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(3):18-24.

[4] 林红. 儿童地高辛血药浓度监测及影响因素分析[J]. 儿科药学杂志, 2010, 16(3):31-32.

[5] Gheorghide M, Harinstein ME, Filippatos GS. Digoxin for the treatment of chronic and acute heart failure syndromes[J]. Acute Cardiac care, 2009, 11(2):83-87.

[6] Xu R, Lin G, Wang W, et al. Application of an ELISA-elution assay to dissociate digoxin-antibody complexes in im-

munoaffinity chromatography[J]. Scand J Immunol, 2010, 71(1):55-60.

[7] Wagner AD, Kolb JM, Ozbal CC, et al. Ultrafast mass spectrometry based bioanalytical method for digoxin supporting an in vitro P-glycoprotein (P-gp) inhibition screen[J]. Rapid Commun Mass Spectr, 2011, 25(9): 1231-1240.

[8] 贾欣珠. 地高辛血药浓度监测及分析[J]. 基层医学论坛, 2011, 15(19):584-586.

[9] Omidfar K, Kia S, Kashanian S, et al. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity[J]. Appl Biochem Biotech, 2010, 160(3):843-855.

[10] Yamada T, Suzuki K, Iguchi K, et al. Interference between eplerenone and digoxin in fluorescence polarization immunoassay, microparticle enzyme immunoassay, and affinity column-mediated immunoassay [J]. Ther Drug Monit, 2010, 32(6):774-777.

[11] 乔小云,王羽,王璐璐,等. 均相酶扩大免疫分析法监测地高辛血浓度的质量控制与评价[J]. 中国药师, 2010, 13(3):387-389.

(收稿日期:2015-06-25 修回日期:2015-09-25)