

## 基于亲和素-生物素双夹心体系测定外源性蛋白血清动态浓度的非抗体依赖新方法\*

余颖欣<sup>1)</sup> 刘艳君<sup>1)\*\*</sup> 焦德龙<sup>1)</sup> 文李艳<sup>1)</sup> 徐江平<sup>2)</sup> 富宁<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 南方医科大学免疫学教研室, 广州 510515; <sup>2)</sup> 南方医科大学药学院, 广州 510515)

**摘要** 建立一种非抗体依赖的检测外源性蛋白多肽分子代谢动力学血清浓度及动态变化的新方法。链亲和素为捕获分子, 加入待测生物素标记蛋白或合成肽, 辣根过氧化物酶标记链亲和素为检测分子, 构成链亲和素-生物素标记大分子-酶链亲和素的双夹心体系, 并进行特异性、敏感性、准确性及稳定性评价。本检测体系灵敏度高, 可达 0.3125  $\mu\text{g/L}$ , 且可通过改变亲和素包被浓度调整检出敏感度与检测范围。准确性回收率为 97.82%~107.92%, 批内、批间变异系数分别 < 5.76% 和 < 8.42%, 并成功应用在生物素标记人血清白蛋白(biotin-HSA)与生物素标记鸡卵黏蛋白(biotin-OVM)的小鼠血清浓度动态检测。本方法不依赖抗体与放射性核素, 可望在外源性蛋白多肽大分子及其药物的体内定量检测和代谢动力学研究中广泛应用。

**关键词** 生物素, (链霉)亲和素, 外源性蛋白, 动态血清浓度

**学科分类号** R969.1, R392

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00175

外源性蛋白多肽分子的体内有效浓度动态监测对蛋白质类新药的药代动力学研究与生物大分子的基础研究均至关重要。其体内浓度及动态监测与传统小分子药物不同的是, 蛋白质多肽分子生物半衰期短、血浆浓度低( $\text{ng/L}$  或  $\mu\text{g/L}$ )、易受机体内源性物质干扰, 影响其体内定量检测和药物代谢动力学研究<sup>[1-2]</sup>。目前用于蛋白质多肽类生物分子及其药物的体内定量监测方法主要有两类: 免疫学分析法<sup>[3]</sup>, 特异性强、灵敏度高、操作相对简便, 但要求必备特异性抗体, 甚至需具备能够构成双抗体夹心的抗体对(antibody pair); 放射性同位素标记示踪法, 也具有灵敏度高、特异性强等优点, 但需要特殊的设备与环境条件以避免放射损伤及同位素放射性污染<sup>[1-2]</sup>。

生物素(biotin), 亦称维生素 H, 分子质量约 244.31 u, 作为小分子可偶联在许多蛋白质多肽大分子上, 而不对其理化性质、生物学活性产生明显影响。亲和素, 包括源于卵清蛋白的亲和素(avidin)和链霉菌的链亲和素(streptavidin, SA), 分子质量约 65 000 u, 1 分子亲和素可与 4 分子生物素结合, 两者间的亲和力极强且不可逆, 亲和素-生物素复合物的解离常数为  $10^{-15}$  mol/L。由于上述

特点, 亲和素-生物素系统在分子识别、相互作用、纯化、检测、固定、标记、病毒载体及非放射性药物靶向系统等研究中发挥着重要作用<sup>[4-5]</sup>。但在多数情况下是将生物素标记抗体或抗原, 与相应的抗原或抗体反应后, 以酶或荧光素标记亲和素作为检测信号。而本研究利用亲和素-生物素的结合特点, 建立了一种不依赖抗体、无需放射性核素标记、简便、新型的外源蛋白多肽分子的血清浓度动态检测方法, 即包被亲和素-生物素标记蛋白-检测亲和素的双夹心体系, 简称 SA 双夹心体系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 试剂** Sulfo-NHS-LC-biotin(SNHSB)为 Pierce 公司产品; 人血清白蛋白(HSA)、鸡卵黏蛋白(OVM)及鼠血清白蛋白(MSA)为 Sigma 公司产品;

\* 国家自然科学基金面上资助项目(30671970)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 020-61648220, E-mail: yanjun@fimmu.com

收稿日期: 2012-04-09, 接受日期: 2012-11-13

牛血清白蛋白(BSA)为 Roche 公司产品; BCA 蛋白质浓度测定试剂盒为碧云天公司增强型; 酶联板条购自广州洁特公司; SA 购自广州天宝颂原公司; 酪蛋白封闭液由本教研室常规配制; 辣根过氧化物酶标记的链亲和素 (HRP-SA) 为 Jackson ImmunoResearch 公司产品; 1×磷酸盐缓冲液购自武汉博士德生物工程有限公司; 2E9 抗体由本教研室制备的抗-人血清白蛋白的单克隆抗体<sup>[6]</sup>.

**1.1.2 设备.** 磁力搅拌器、摇床、紫外分光光度仪 (SHIMADZU UV-1800)、洗板仪 (BIOTEK ELX50/8)、酶标仪 (Perkin Elmer victorX4)、37℃ 恒温孵育箱 (金怡 HH-W600)、玻璃匀浆器购自江苏海门百得福实验器材有限公司; 离心机为 Eppendorf 公司产品及 Sigma 公司产品.

**1.1.3 实验动物.** 昆明小鼠, 雌性, 20~25 g, 购自南方医科大学动物实验中心.

## 1.2 生物素标记蛋白质/多肽分子

待生物素标记的蛋白质溶于 0.01 mol/L PBS, 终浓度为 1~2 g/L. 临用前 SNHSB 溶于双蒸水, 终浓度为 20 g/L. 按 1 mg 蛋白质: 10  $\mu$ l SNHSB 的比例, 将 SNHSB 溶液加入蛋白质溶液. 混合溶液室温、摇床孵育 1.5 h 后, 在 0.01 mol/L PBS 4℃ 透析 72 h, 去除游离生物素. 生物素标记后的蛋白质浓度由 BCA 试剂盒定量.

带有生物素标记的多肽 MAP-P27 (multiple-valence antigen peptide, MAP), 系四分枝抗原多价肽, 分子质量约 7 000 u, N 端标记生物素, 由深圳翰宇药业股份有限公司合成.

## 1.3 SA 双夹心检测体系的建立及优化

SA 以终浓度 0.1~10 mg/L 包被 (0.01 mol/L PBS, pH 7.4 稀释), 100  $\mu$ l/孔, 4℃ 过夜, 加入酪蛋白封闭, 200  $\mu$ l/孔, 37℃ 2 h. 加入系列稀释或特定稀释度的生物素标记蛋白或多肽 (PBST) 作为标准曲线或样品测定, 并设立空白对照, 50  $\mu$ l/孔, 37℃ 孵育 1 h. 加入 HRP-SA 稀释液 (PBST), 50  $\mu$ l/孔, 37℃ 孵育 30 min. 所有步骤间均充分洗板 5 次. 最后加入 TMB 底物缓冲液显色, 50  $\mu$ l/孔, 室温避光显色. 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ l/孔终止反应. 以波长 450 nm 测定 A 值. 所有样品均为 3 复孔.

## 1.4 常规 ELISA 的标准曲线建立

抗 HSA 单克隆抗体 2E9 按浓度 5 mg/L 包被 (0.01 mol/L PBS, pH 7.4 稀释), 50  $\mu$ l/孔, 4℃ 过

夜, 加入酪蛋白封闭, 200  $\mu$ l/孔, 37℃ 2 h. 加入系列稀释或特定稀释度的 Bio-HAS (PBST) 作为标准曲线或样品测定, 并设立空白对照, 50  $\mu$ l/孔, 37℃ 孵育 1 h. 加入 0.025 mg/L HRP-2E9 稀释液 (PBST), 50  $\mu$ l/孔, 37℃ 孵育 30 min. 所有步骤间均充分洗板 5 次. 最后加入 TMB 底物缓冲液显色, 50  $\mu$ l/孔, 室温避光显色. 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ l/孔终止反应. 以波长 450 nm 测定 A 值<sup>[6]</sup>. 所有样品均为 3 复孔.

## 1.5 小鼠肝匀浆的制备

小鼠摘眼球处死, 取肝脏, 用预冷 0.01 mol/L PBS 漂洗, 去除筋膜后剪碎组织, 按 1 g 组织: 5 ml 0.01 mol/L PBS 的比例, 于冰上用匀浆器匀浆制成 20% 肝匀浆液, 置 -20℃ 保存备用, 检测前用 PBST 稀释.

## 1.6 生物素标记蛋白的小鼠血清浓度动态监测

取小鼠 15 只, 随机分 3 组, 每组 5 只. 实验前 24 h 内禁食, 不禁水. 蛋白 Bio-HSA 及 Bio-OVM 分别用 0.01 mol/L PBS 稀释为 0.5 g/L, 小鼠尾静脉注射蛋白质溶液 200  $\mu$ l/只, 对照小鼠尾静脉注射等量 0.01 mol/L PBS. Biotin-HSA 实验组于注射后 0、0.5 h、1 h、2 h、3 h 及 4 h 眼眶静脉采血 20  $\mu$ l; Biotin-OVM 实验组于注射后 0、5 min、10 min、20 min 及 30 min 眼眶静脉采血 20  $\mu$ l. 上述 20  $\mu$ l 全血样品加入 140  $\mu$ l 0.01 mol/L PBS (即配成 1:15 血清稀释比例), 离心 300 g×5 min, 取上清. 上清 -20℃ 保存备用, 检测前 PBST 稀释.

# 2 结 果

## 2.1 体系特异性

以 PBST 为样品稀释液, 分别建立各种生物素标记蛋白 (Bio-HSA, Bio-BSA, Bio-OVM) 及其天然蛋白形式 (HSA、BSA、OVM) 的检测曲线, 进行 SA 双夹心体系的特异性分析. 结果显示, 天然蛋白的各浓度 A 值均低于其生物素化蛋白的最低检测下限, 分别为 0.116  $\mu$ g/L (Bio-HSA)、0.250  $\mu$ g/L (Bio-OVM) 及 0.154  $\mu$ g/L (Bio-BSA). 阴性对照 ( $A_{450} = 0.069$ ) 与各梯度浓度的天然蛋白比较, A 值无显著统计学意义 ( $P > 0.05$ , 方差分析). 图 1 表明 SA 双夹心体系特异地识别生物素标记蛋白 (Bio-HSA、Bio-BSA、Bio-OVM), 与非生物素化蛋白不存在非特异性结合.

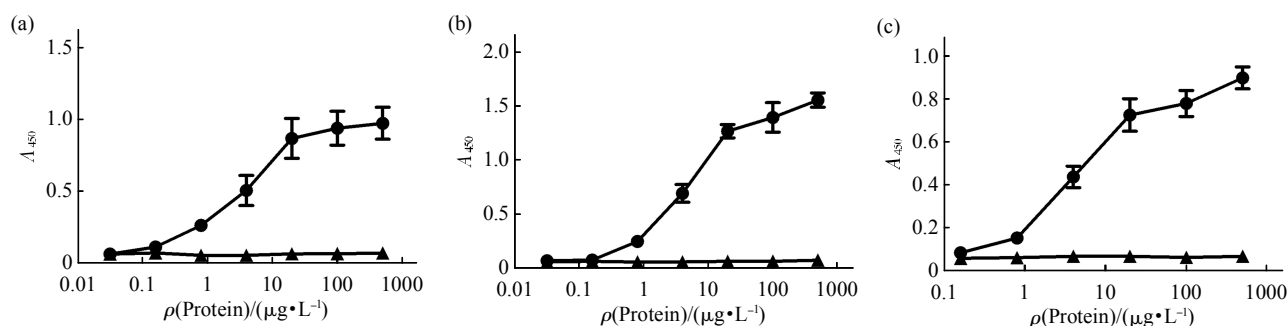


Fig. 1 Specificity of the SA sandwich system

(a) The detecting curves of Biotin-HSA and HSA. ●—●: Bio-HSA; ▲—▲: HSA. (b) Biotin-OVM and OVM. ●—●: Bio-OVM; ▲—▲: OVM. (c) Biotin-BSA and BSA. ●—●: Bio-BSA; ▲—▲: BSA. The graph shows the average values of triplicates in one experiment and the standard deviation ( $\bar{x} \pm s$ ).

## 2.2 不同蛋白质/多肽的检测范围及灵敏度

以 Bio-HSA 和合成多肽 MAP-p27 为检测样本, 观察了不同 SA 包被浓度下, 蛋白质 / 多肽的检测范围和灵敏度. 发现调整 SA 包被浓度

(0.1~10 mg/L)可改变双夹心体系的检测灵敏度和线性范围. 当包被浓度为 0.1 mg/L, 生物素标记蛋白及多肽的检测灵敏度提高, 线性范围变宽 (图 2a~b). 因此在实际应用中, 实验者可根据不

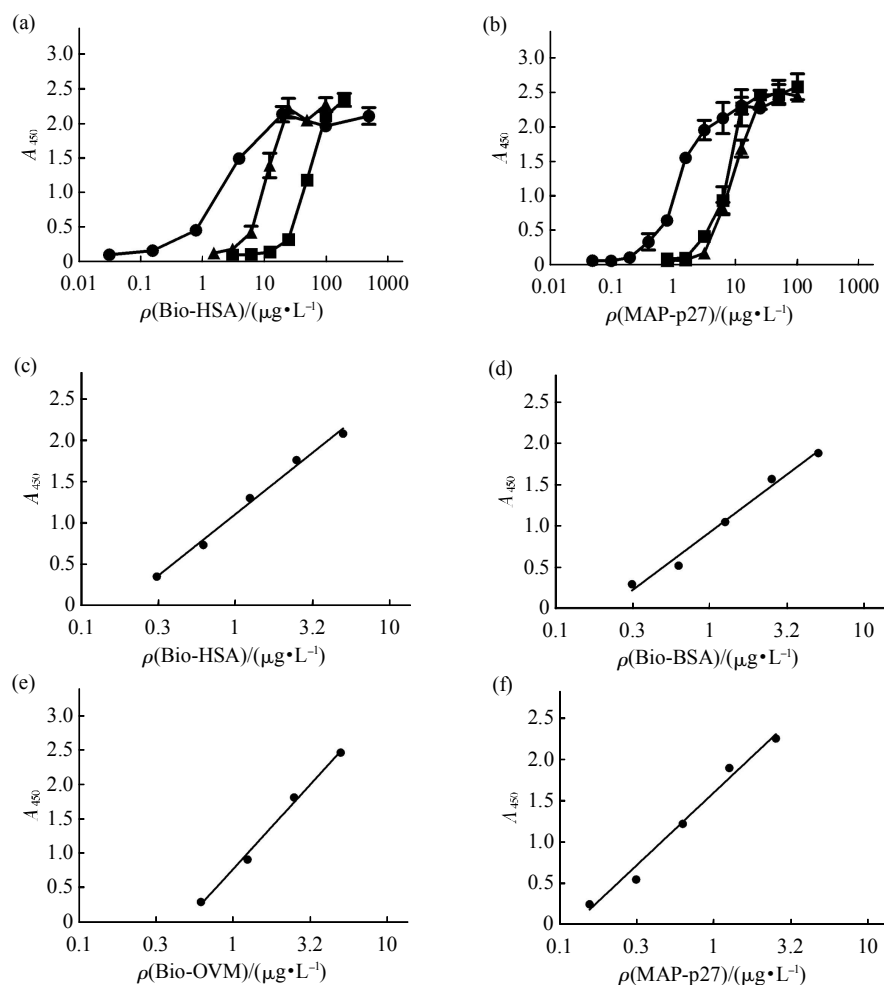


Fig. 2 The detecting curves of various proteins and a polypeptide in the SA sandwich system

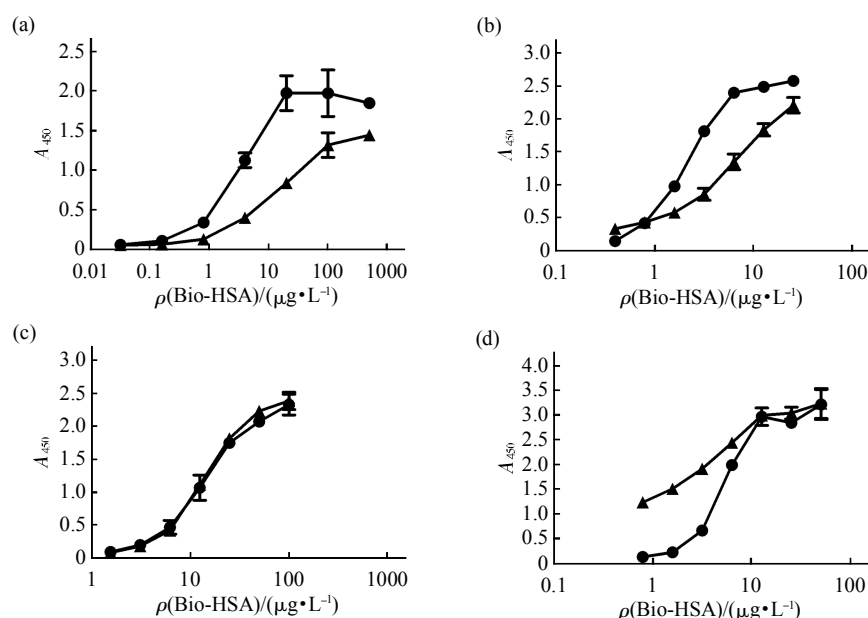
(a, b) The detecting curves of Biotin-HSA and MAP-p27 in different coating concentrations of SA, respectively. ●—●: 0.1 mg/L; ▲—▲: 1 mg/L; ■—■: 10 mg/L. (c~f) The detecting curves of various proteins and a polypeptide in 0.1 mg/L coating concentration of SA: (c) Biotin-HSA, (d) Biotin-BSA, (e) Biotin-OVM and (f) MAP-p27. The graphs show the average values of triplicates in one experiment and the standard deviation ( $\bar{x} \pm s$ ).

同的蛋白质检测体系选择合适的 SA 包被浓度, 以达到理想的检测范围和灵敏度. 在 0.1 mg/L SA 包被条件下, 3 种生物素标记蛋白与多肽 MAP-27 均显示出良好的检测灵敏度和线性范围(图 2c~f): Biotin-HSA: 0.3125~5  $\mu\text{g/L}$  ( $r^2=0.989\ 0$ ); Biotin-BSA: 0.3125~5  $\mu\text{g/L}$  ( $r^2=0.978\ 9$ ); Biotin-OVM: 0.625~5  $\mu\text{g/L}$  ( $r^2=0.984\ 2$ ); MAP-p27: 0.15625~2.5  $\mu\text{g/L}$  ( $r^2=0.983\ 1$ ).

### 2.3 体系平行性

SA 双夹心体系用于检测生物素标记外源性蛋白的体内动态浓度, 需排除或降低内源性生物素或其他成分的干扰. 本研究发现小鼠血清及组织匀浆

中存在内源性成分可干扰外源性蛋白在双夹心体系的检测. 以 0.5% PBST、1:20 稀释比例的小鼠血清及 1:100 稀释比例的 20% 小鼠肝匀浆为样品稀释液, 分别建立 Bio-HSA 的检测曲线进行体系平行性分析. 结果表明, 在 0.1 mg/L SA 包被条件下血清及肝匀浆稀释液可抑制曲线的  $A$  值(图 3a, b), 提示血清及肝匀浆存在抑制双夹心体系反应的内源性成分. 而提高 SA 包被浓度后, 血清内源性成分对双夹心体系的抑制影响消除, 1 mg/L SA 包被条件的 2 条曲线接近且平行性好(图 3c), 但仍不能减弱肝匀浆内源性成分的干扰(图 3d), 提示目前该体系不适于检测组织匀浆样本.



**Fig. 3 The effect of endogenous components can be eliminated by increasing coating concentration of streptavidin**

(a, c) 0.1 mg/L, 1 mg/L streptavidin was coated respectively. The detecting curves were prepared by PBST, 1:20 dilution of blank mouse serum spiked with Bio-HSA. ●—●: PBST; ▲—▲: 1:20 serum. (b, d) 0.1 mg/L, 1 mg/L streptavidin was coated respectively. ●—●: PBST; ▲—▲: 1:100 liver. The detecting curves were prepared by PBST and 1:100 dilution of 20% blank liver homogenate spiked with Biotin-HSA. The graphs show the average values of triplicates in one experiment and the standard deviations ( $\bar{x} \pm s$ ).

### 2.4 体系准确性与稳定性

用 PBST 以 1:20 及 1:200 稀释小鼠血清, 加入检测蛋白 Bio-HSA(终浓度为 10  $\mu\text{g/L}$ 、5  $\mu\text{g/L}$ ), 在 SA 双夹心体系进行准确性分析(回收率/% = 蛋白质实测值 / 理论值). 1:20 小鼠血清回收率为 100.30%~103.05%, 变异系数 6.19%~6.89%; 1:200 小鼠血清回收率为 97.82%~107.29%, 变异系数 2.10%~2.99%. 用 PBST 稀释检测蛋白

Bio-HSA(终浓度为 10  $\mu\text{g/L}$ 、5  $\mu\text{g/L}$ ), 在 SA 双夹心体系进行稳定性分析. 批内变异分析为每种浓度进行 6 次重复测定(每次测定设立 2 复孔, 取其平均值为一个实验数据, 即每种浓度同时做 12 孔); 批间变异分析为连续 3 天检测相同样品 6 次(2 复孔). 结果表明, 批内变异系数为 4.96%~5.76%, 批间变异系数为 5.61%~8.42%(表 1).

**Table 1 Recovery\* and reproducibility\*\* of the SA sandwich system**

| Bio-HSA Spiking<br>concentration/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 1 : 20 dilution   |      | 1 : 200 dilution  |      | Intra-assay | Inter-assay |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------|------|-------------------|------|-------------|-------------|
|                                                                      | Recovery/%        | CV/% | Recovery/%        | CV/% | CV/%        | CV/%        |
| 10                                                                   | 100.30 $\pm$ 6.21 | 6.19 | 97.82 $\pm$ 2.06  | 2.10 | 5.76        | 8.42        |
| 5                                                                    | 103.05 $\pm$ 7.10 | 6.89 | 107.29 $\pm$ 3.21 | 2.99 | 4.96        | 5.61        |

\* Recovery is calculated as the ratio of Biotin-HSA content predicted by the standard curve and the amount of Biotin-HSA spiking into the blank diluents. Values represent the average of triplicate in one experiment and are reported as mean  $\pm$  S.E.M. \*\*Samples were repeated six times in an intra-assay run and tested in triplicate analyses in an inter-assay run.

## 2.5 与常规 ELISA 方法的比较

SA 双夹心检测体系作为不依赖抗原 - 抗体反应的新型体系是否能够达到传统免疫学方法的检测水平, 以 Bio-HSA 为检测蛋白, 在体外, 比较 SA 双夹心体系与 2E9 双单克隆抗体夹心 ELISA 的检测灵敏度和线性范围, 结果显示前者的检测灵敏度

更好, 但线性范围较窄(表 2); 在体内, SA 双夹心体系与 2E9 双单克隆抗体夹心 ELISA 测定同一小鼠同一时间点采集的血清样品(时间点取注射后即刻及注射后 1 h、3 h), 两体系的血清 Bio-HSA 定量结果相近(表 2).

**Table 2 Comparison of SA sandwich system and sandwich ELISA in measurement of Biotin-HSA\***

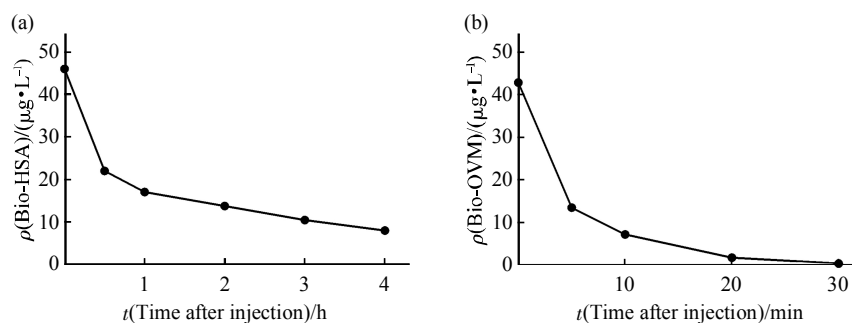
|                      | Detecting<br>range         | Biotin-HSA concentration in mouse serum at different time after injection |            |            |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
|                      |                            | Immediately after injection                                               | 1 h        | 3 h        |
| SA sandwich system** | 3.90~15.63 $\mu\text{g/L}$ | 68.17 mg/L                                                                | 32.70 mg/L | 21.30 mg/L |
| Sandwich ELISA       | 31.25~500 $\mu\text{g/L}$  | 67.15 mg/L                                                                | 28.25 mg/L | 19.67 mg/L |

\*Values represent the average of triplicate in one experiment. \*\*Coating concentration of streptavidin was 1 mg/L.

## 2.6 生物素标记蛋白的小鼠血清浓度动态监测

经小鼠尾静脉注射外源性蛋白 Bio-HSA、Bio-OVM, 进行体内血清浓度动态监测. 结果显示, Bio-HSA 的小鼠血清清除率在 1 h 内最高, 半

衰期约 30 min(图 4a); Bio-OVM 的小鼠血清清除率在 10 min 内最高, 半衰期约 3 min(图 4b). 半衰期为外源蛋白注射后 0 h 起血清浓度下降一半所需的时间.

**Fig. 4 The dynamics observation of Bio-HSA and Bio-OVM in mouse serum**

(a) Serum clearance of Bio-HSA in mice. (b) Serum clearance of Bio-OVM in mice. The lines represent the mean data obtained from five mice sampled at each time point.

### 3 讨 论

由于外源性蛋白多肽分子的体内代谢有其特殊性,其动态浓度检测方法应具备下列条件:a.特异性强,能避免其他成分的干扰;b.灵敏度高,最低检测限能满足测定3~5个半衰期后的生物分子浓度;c.重复性好,其精密度试验的变异系数(CV)应小于15%;d.在人和动物体内外试验都能适用;e.操作较简便,易于推广应用<sup>[1-2]</sup>。目前测定外源性蛋白多肽体内动态浓度的方法主要依赖特异性抗体或放射性核素。

已知亲和素-生物素系统常规用于ELISA及免疫组化等免疫学技术<sup>[4-5]</sup>,均基于抗原-抗体反应,这意味着必须首先制备特异性抗体,甚至是双抗体夹心体系的建立。不依赖抗原-抗体反应的亲和素-生物素系统,在外源蛋白多肽定量方法中的应用尚未报道。本研究建立的SA双夹心体系能够特异地检测血清中生物素标记蛋白(Bio-HSA、Bio-BSA及Bio-OVM),而不受未标记HSA、BSA及OVM的干扰。蛋白质检测灵敏度可达0.3125  $\mu\text{g/L}$ 水平,体系准确性、重复性及稳定性良好。相比传统的免疫学分析法和放射性同位素标记示踪法,本方法不需制备相应特异性抗体、不易受体内内源性物质的干扰、无放射性污染、具有简便、安全的特点,有望在蛋白质多肽分子及其药物的体内代谢动力学研究中广泛应用。

当检测同一小鼠同一时间点采集的血清样品,SA双夹心体系的血清Bio-HSA定量结果与双单克隆抗体2E9夹心ELISA方法相近,说明生物素标记在体内循环稳定<sup>[7]</sup>,不影响蛋白质本身的血清浓度动态分析。另一方面,与夹心ELISA方法比较,SA双夹心体系的线性范围较窄,但检测灵敏度接近甚至优于前者。因此,在实际应用中,对微量血清样品的检测,SA双夹心体系的灵敏度更显其优越性,但当检测蛋白质的血清浓度较高时,为避免高稀释倍数导致的系统误差,实验者可通过改变SA包被浓度,以获得较低检测灵敏度。

基于本方法主要用于检测外源性蛋白多肽的体内动态浓度,我们注意到小鼠的血清和肝组织存在一些内源性干扰因素,可抑制SA双夹心体系的检测敏感性。分析其原因主要是血清中存在多种形式的亲和素结合物质——游离型生物素及其衍生物,而生物素衍生物与亲和素的结合力较其本身弱<sup>[8-9]</sup>,因此推测血清的干扰主要源于内源性游离型生物

素。我们采用提高链亲和素的固相包被浓度,有效消除了血清中游离型生物素对体系的抑制性影响,并且提供了检测小鼠血清样品时的SA包被浓度参考值,即1 mg/L。而在实际应用中,实验者需根据具体的血清来源进行体系平行性评价,以获得合适的SA包被浓度。另一方面,提高SA包被浓度,改变封闭条件等均不能消除肝组织内源性成分对本体系的影响。究其原因可能是线粒体富含内源性生物素结合蛋白,而肝、肾组织的线粒体含量丰富<sup>[9]</sup>,我们推测这种内源性成分可参与SA双夹心复合物的形成。因此,本方法可用于检测血清标本但不适用于组织匀浆标本。

综上所述,本研究建立了一种新的非抗体依赖性蛋白多肽血清浓度动态分析方法——SA双夹心体系,并成功应用在两种外源蛋白的小鼠血清浓度监测中。该体系为外源性蛋白多肽分子的体内代谢动力学研究提供了一个准确、灵敏、简便的蛋白质多肽血清浓度动态测定方法。

### 参 考 文 献

- [1] 孙会仙,张淑珍,谢剑炜.蛋白多肽类药物的药代动力学分析方法的研究进展.国外医学(药学分册),2006,33(1):63-66  
Sun H X, Zhang S Z, Xie J W. Foreign Medical Science(Section of Pharmacy), 2006, 33(1): 63-66
- [2] 樊 蓉,张 纯,高 申.蛋白多肽类药物的药代动力学研究概况.药实践杂志,2006,24(3):135-138  
Fan R, Zhang C, Gao S. J Pharmaceutical Practice, 2006, 24(3): 135-138
- [3] Ding Y D, Lei J Y, Chen Y, *et al.* A sandwich ELISA for assessment of pharmacokinetics of HSA-(BNP)2 fusion protein in mouse plasma. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51(3): 658-663
- [4] Diamandis E P, Christopoulos T K. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. Clin Chem, 1991, 37(5): 625-636
- [5] Savage M D. Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook. Rockford: PIERCE, 1992
- [6] 马政辉,张丽芸,刘 莹,等.人血清白蛋白单克隆抗体的制备、鉴定与初步应用.中国输血杂志,2010,23(5):351-355  
Ma Z H, Zhang L Y, Liu Y, *et al.* Chin J Blood Transfusion, 2010, 23(5): 351-355
- [7] Bogusiewicz A, Mock N I, Mock D M. Instability of the biotin-protein bond in human plasma. Anal Biochem, 2004, 327(2): 156-161
- [8] Mock D M, Malik M I. Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein. Am J Clin Nutr, 1992, 56(2): 427-432
- [9] Mock D M, Lankford G L, Mock N I. Biotin accounts for only half of the total avidin-binding substances in human serum. J Nutr, 1995, 125(4): 941-946

## A Novel Method for Assessment of Dynamic Concentration of Exogenous Protein in Serum: an Antibody-independent Sandwich System Based on Avidin-biotin Interaction\*

YU Ying-Xin<sup>1)</sup>, LIU Yan-Jun<sup>1)\*\*</sup>, JIAO De-Long<sup>1)</sup>, WEN Li-Yan<sup>1)</sup>, XU Jiang-Ping<sup>2)</sup>, FU Ning<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Immunology of The Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

<sup>2)</sup> Department of Pharmacology of The Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract** For the assessment of the dynamic concentration of exogenous protein or peptide in serum, an antibody-independent sandwich system based on the avidin-biotin interaction was established and validated. The exogenous protein or polypeptide labeled with biotin was added to the microplate coated with streptavidin, and followed by adding HRP-streptavidin to complete the sandwich system. This sandwich system was validated with respect to specificity, sensitivity, accuracy (recovery) and reproducibility. While the sensitivity of detection could reach to 0.3125  $\mu\text{g/L}$ , the sensitivity and the range of detection can also be adjusted by changing coating concentration of streptavidin. Recoveries ranged from 97.82% to 107.29%, and the intra- and inter-assay variation was < 5.76% and < 8.42%, respectively. Thus, the well-validated streptavidin sandwich system was successfully applied to determine dynamic concentrations of Biotin-HAS (human serum albumin) and Biotin-OVM (Ovomucoid) in mouse serum, respectively. Most importantly, this novel method, where generation of antibody or radionuclide is not needed, may provide a new choice for assessment or monitoring of exogenous protein or peptide in pharmacokinetics study.

**Key words** biotin, (Strept) avidin, exogenous protein, dynamic serum concentration

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00175

---

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30671970).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-20-61648220, E-mail: yanjun@fimmu.com

Received: April 9, 2012 Accepted: November 13, 2012