

基于磁微粒的荧光免疫分析法测定人血清中 DNA 甲基转移酶 1

陈怡雪¹, 牛闪闪², 李红萍², 于斐¹, 吴拥军¹, 刘利娥^{1*}

1. 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450001

2. 郑州大学化工与能源学院, 河南 郑州 450001

摘要 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferases1, DNMT1)负责维持 DNA 甲基化遗传稳定性, 其表达量与多种肿瘤的发生发展密切相关, 是一种重要的肿瘤分子标志物。DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的现有检测方法大多基于原核生物酶建立, 且局限于实验室研究, 因此建立一种高灵敏、高通量测定人血清中 DNMT1 含量的荧光免疫分析方法(FLISA), 以期为癌症早期筛查及临床应用提供新思路。以 Fe₃O₄ 磁珠为固相载体, 采用碳二亚胺/N-羟基硫代琥珀酰亚胺(EDC/Sulfo-NHS)键合法分别制备磁性免疫捕获探针 Fe₃O₄@DNMT1 小鼠单克隆抗体(Fe₃O₄@McAb_{DNMT1})及荧光免疫检测探针 5-羧基四甲基罗丹明@DNMT1 兔多克隆抗体(5-TAMRA@PcAb_{DNMT1})。用红外光谱、紫外-可见(UV-Vis)光谱、Zeta 电位、免疫活性分别表征偶联产物的结构与活性。在此基础上, 采用双抗体夹心法, 检测黑色 96 微孔板中反应产物的荧光强度, 根据荧光强度与 DNMT1 浓度的关系进行定量分析, 并进行方法学评价与比较。实验结果显示, 双探针偶联成功, 并保持了原抗体的免疫活性。该方法的线性方程 $y = 222.046 + 48.323x$, 线性范围 0.05~80 ng·mL⁻¹, 相关系数为 0.991 4, 检出限为 0.005 ng·mL⁻¹, 板内、板间的 RSD 分别为 4.7%~8.8%, 1.6%~10.0%($n=6$); 板内、板间的回收率分别为 91.3%~102.4%, 88.0%~98.8%($n=6$); 方法特异性良好。与酶联免疫吸附法(ELISA)和磁酶免疫吸附法(MELISA)相比, FLISA 法的检出限最低, 灵敏度最高, 所需分析时间最短; FLISA 法与商品化 ELISA 试剂盒对 15 例人血清样品进行分析, 差异无统计学意义($p > 0.05$)。表明本研究建立的 FLISA 方法灵敏快速, 适用于大批量人血清样品中 DNMT1 的快速测定, 在临床诊断方面具有重要的应用价值和广阔的应用前景。

关键词 荧光免疫分析; DNA 甲基转移酶 1; 磁性 Fe₃O₄

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)01-0162-06

引言

DNMT1 是人体内含量最多、最重要的甲基转移酶, 它是病灶为靶点负责将亲代 DNA 甲基化信息遗传至子代细胞, 是维持 DNA 甲基化遗传稳定性的关键酶^[1]。研究表明, 其表达水平和活性变化与胃肠癌、肺癌、食管癌等多种肿瘤的发病机制密切相关, 是癌症发生发展重要的分子标志^[2-4]。目前, DNMTs 的检测方法有很多, 如比色法^[5], 高效液相色谱法^[6], 化学发光分析法^[7]及电化学分析法^[8]等。但这些方法大多是以原核细胞的甲基化转移酶如 DNA adenine methylation (Dam) MTase, M. SssI 为测量对象, 只有少数着眼于人类基因的 DNMT1, 并局限于实验室研究, 未应用

于实际样品的检测。因此, 建立一种快速、灵敏度高的 DNMT1 定量新方法具有重要的癌症早筛及临床应用价值。

荧光免疫分析法具备荧光法灵敏度高、线性范围宽、选择性好等优点的同时, 还具备免疫法的高特异性, 在许多领域中应用广泛。磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒是将高分子材料与无机 Fe₃O₄ 粒子结合起来的一种复合微球, 比表面积大, 能够提供更多空间使抗原抗体充分结合, 同时兼具良好的生物相容性与磁分离性能, 通常在生物样品混合物的分离中被用作载体。

本研究用 Fe₃O₄ 磁性纳米球代替聚苯乙烯板作为固相载体, 负载 DNMT1 单克隆抗体作为捕获探针, 捕获并富集复杂基质中的目标物。磁分离具有分离速度快、不影响待测物的活性, 能够简化操作流程并减少复杂样品中基质对测定

收稿日期: 2018-12-13, 修订日期: 2019-04-02

基金项目: 河南省科技攻关项目(172102210006), 国家自然科学基金项目(81402721, 81573203)资助

作者简介: 陈怡雪, 女, 1997 年生, 郑州大学公共卫生学院硕士研究生 e-mail: CYXZZU@outlook.com

* 通讯联系人 e-mail: zzdxxle66@zzu.edu.cn

的干扰^[9]。在此基础上,捕获探针与抗原及荧光检测探针形成“三明治”夹心结构,建立荧光免疫分析法,并将其用于血清样品中 DNMT1 含量的高灵敏检测。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

DNMT1 抗原(OriGene 公司); DNMT1 小鼠单克隆抗体(McAb_{DNMT1}, abcam 公司); DNMT1 兔多克隆抗体(PcAb_{DNMT1}, abcam 公司); 5-羧基四甲基罗丹明琥珀酰亚胺酯荧光染料(5-TAMRA, 淄博昀辉生物化工技术有限公司); DNMT1 商品化 ELISA 试剂盒(武汉云克隆科技有限公司); 羧基化磁性 Fe₃O₄ 纳米球(50 mg · mL⁻¹, 百运纳米科技有限公司); N-羧基琥珀代琥珀酰亚胺钠盐(Sulfo-NHS, 分析纯, 阿拉丁公司); 碳二亚胺盐酸盐(EDC, 分析纯, 阿拉丁公司); Millipore 超纯水(18.2 MΩ · cm); PBS 磷酸盐缓冲液(0.01 mol · L⁻¹, pH 7.4); PBST 缓冲液(0.05% Tween20)。

纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(Zetasizer Nano-zs 90, 英国 Malvern), 红外光谱仪(PE-1710, 德国 PE), 荧光分光光度计(F-4500, 日本日立), 紫外-可见分光光度计(UV-1601, 日本岛津), 磁分离板(百运纳米科技有限公司)。

1.2 磁性 Fe₃O₄ 免疫捕获探针的制备

取 100 μL Fe₃O₄ 溶液, 磁分离, 用 PBS 清洗 3 次; 加入 100 μL McAb_{DNMT1} (0.1 mg · mL⁻¹) 混匀, 分别加入 100 μL Sulfo-NHS 和 EDC, 涡旋 20 min, 于 25 °C 偶联 2 h; 磁分离, 取上清用于计算偶联效率, 用 PBS 清洗 2 次。加入 300 μL PBS(含 0.5% BSA) 震荡 30 min 封闭未活化基团, 分散于 300 μL PBS 中, 4 °C 保存。

1.3 免疫荧光检测探针的制备

取 100 μL PcAb_{DNMT1} (0.25 mg · mL⁻¹) 于装有 1.0 mL PBS 的离心管中, 混匀后加入 5.0 μL 5-TAMRA 稀释液(27.4 nmol), 涡旋 3 h 偶联。取 400 μL 偶联物于预冷的超滤管(30KDa)中离心, 最后将超滤管倒置于离心管中, 离心回收检测探针。

1.4 建立检测 DNMT1 的 FLISA 方法

在黑色 96 孔板中加入 300 μL 封闭液, 37 °C 温育 90 min 后用 PBST 洗板 3 次; 每孔加入 Fe₃O₄@McAb_{DNMT1} 稀释液 100 μL(1:40), 磁分离后 PBST 洗 3 次。加入 100 μL 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 和 80 ng · mL⁻¹ DNMT1 抗原, 37 °C 温育 90 min, PBST 洗板 3 次。加入 100 μL 稀释 20 倍的 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1} 溶液, 37 °C 温育 90 min, PBST 洗板 5 次。加入 200 μL PBST, 测定 96 孔板中各孔的相对荧光强度(RFU), 以浓度为横坐标, 检测信号为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.5 建立 ELISA 与 MELISA 方法

在参考文献[10]的基础上分别建立检测 DNMT1 的 ELISA 方法和 MELISA 方法。

1.6 方法学评价

检出限: 配制 5 个低于线性范围的 DNMT1 试样以及 6

个 DNMT1 空白样, 用 FLISA 检测, 求出 $\bar{x} \pm 3SD$, 低浓度试样中 RFU 大于其所对应的测定值为方法检出限。

精密度: 取一块 96 孔板, 分别配制低、中、高浓度的样品, 每个水平平行 6 份, 按照 1.4 节的方法进行实验, 根据测定结果计算板内精密度; 同上, 取不同的 96 孔板, 计算板间精密度。

准确度: 配制三个浓度的 DNMT1 标准品, 按照 1.4 节中步骤进行测定, 将所得结果与加标浓度进行比较, 计算方法准确度。

特异性: 选取与 DNMT1 性质相似的 DNA 甲基转移酶 DNMT3a 和 DNMT3b 为检测对象, 在与测 DNMT1 相同的条件下测定 RFU, 考察方法的特异性。

方法学比较: 用所建立的 FLISA 检测 DNMT1 含量, 并与 MELISA 和 ELISA 进行比较。

1.7 样品分析

血清样本来自郑州大学第一附属医院呼吸与重症科室。取 15 例肺癌患者的血清样品, 用 FLISA 方法检测 DNMT1 含量, 并将检测结果与商品化 ELISA 试剂盒进行比较。

2 结果与讨论

2.1 FLISA 检测 DNMT1 的实验原理

FLISA 测定 DNMT1 的原理见图 1。采用 EDC/Sulfo-NHS 键合法, 羧基功能化的 Fe₃O₄ 磁珠为固相载体, 与 McAb_{DNMT1} 偶联制备免疫捕获探针, 加入 DNMT1 标准品或待测样品, 待测目标物被探针捕获并富集, 磁分离后加入标记有荧光检测探针 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1}, 此时形成双抗体夹心的“三明治”结构, 磁分离。用 200 μL PBST 对磁性复合物进行悬浮, 于 555 nm 激发光照射下检测 580 nm 处的荧光强度, 根据荧光强度和目标物浓度的关系进行定量分析。

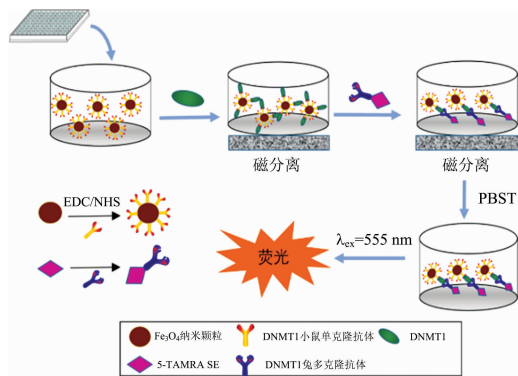


图 1 FLISA 法检测 DNMT1 原理

Fig. 1 The detection of DNMT1 with FLISA

2.2 Fe₃O₄@McAb_{DNMT1} 的表征

2.2.1 Fe₃O₄@McAb_{DNMT1} 的红外光谱

按照 1.2 节中实验方法测定偶联效率, Fe₃O₄ 和 McAb_{DNMT1} 的偶联效率为 76.3%。

图 2 为 Fe₃O₄@McAb_{DNMT1} 的红外图谱, 由图 2 可知: 与 Fe₃O₄ 相比, Fe₃O₄@McAb_{DNMT1} 在 546 cm⁻¹ 处有 Fe—O 的

特征吸收峰, $1\ 620\ \text{cm}^{-1}$ 是 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收峰, $3\ 360\ \text{cm}^{-1}$ 左右处是 $\text{O}-\text{H}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 的伸缩振动吸收峰, $1\ 000$ 和 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 之间具有肽链的特征吸收谱带, 由此判断 Fe_3O_4 和 $\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 偶联成功。

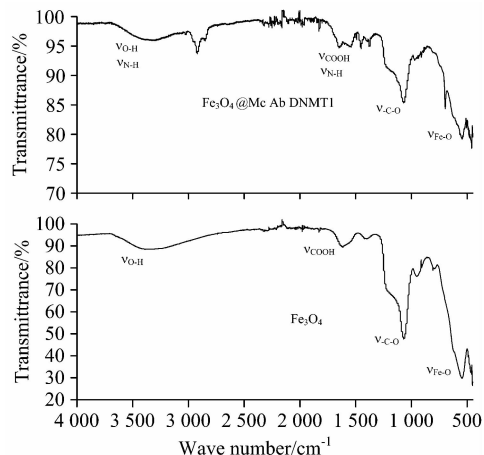


图 2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 和 Fe_3O_4 红外吸收光谱
Fig. 2 The infrared absorption spectra of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ AND Fe_3O_4

2. 2. 2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 的 Zeta 电位

捕获探针的 Zeta 电位分析结果见图 3(a)。从图 3(a) 数据可以看出, 羧基化的 Fe_3O_4 的 Zeta 电位 $-10.8\ \text{mV}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 的 Zeta 电位 $-8.45\ \text{mV}$, $\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 的 Zeta 电位 $-4.47\ \text{mV}$, 羧基 Fe_3O_4 与抗体偶联引起电位发生变化, 提示 $\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 成功偶联到 Fe_3O_4 上。

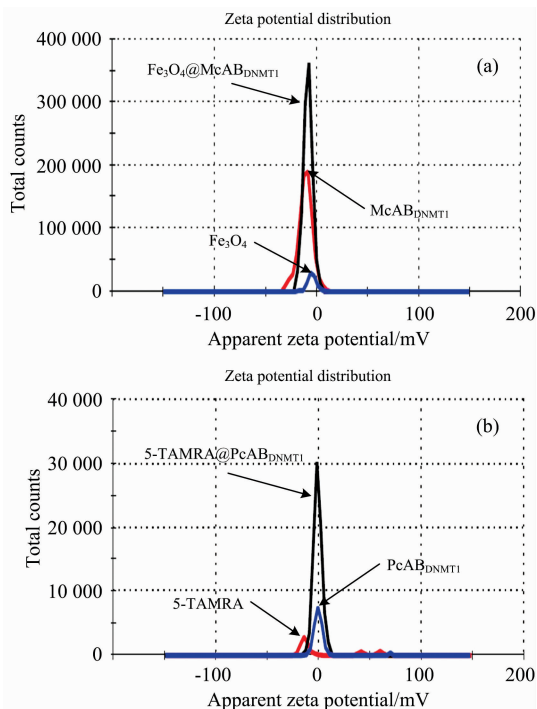


图 3 偶联物的 Zeta 电位
Fig. 3 Zeta potential of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ and $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$

2. 2. 3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 免疫活性

用 ELISA 检测 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 的免疫活性的实验结果见图 4。图中显示 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释比相同的情况下, 随着抗原浓度的增加吸光度逐渐增大; 在抗原浓度相同的情况下, 随着 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 稀释比的增大吸光度逐渐减小, 表明在羧基化 Fe_3O_4 表面成功修饰了 $\text{McAb}_{\text{DNMT1}}$, 并保持了抗体的活性。

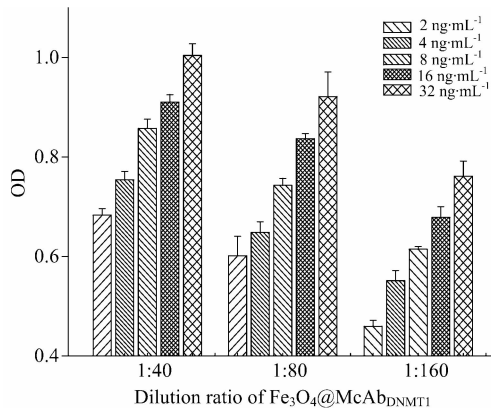


图 4 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ 的免疫活性
Fig. 4 The immunocompetence of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$

2. 3 $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 的表征

2. 3. 1 $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 的紫外-可见吸收光谱

分别绘制 5-TAMRA , $\text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 及 $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 的紫外-可见吸收光谱, 如图 5 所示。从图 5 中可以看出, 5-TAMRA 的最大吸收峰为 $551\ \text{nm}$, $\text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 在 $280\ \text{nm}$ 处有最大吸收峰, $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 在 $280\ \text{nm}$ 处和在 $555\ \text{nm}$ 均有吸收峰, 表明偶联成功。

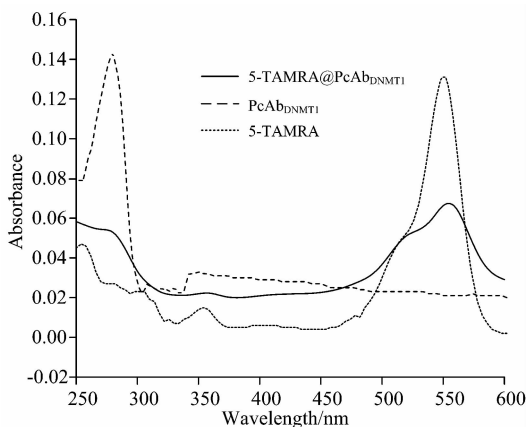


图 5 $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 的紫外-可见吸收光谱
Fig. 5 The UV-Vis absorption spectra of $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$

2. 3. 2 $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 的 Zeta 电位

检测探针的 Zeta 电位测量结果见图 3(b)。从图 3(b) 可以看出, 5-TAMRA , $\text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 和 $5\text{-TAMRA}@ \text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 的 Zeta 电位分别为 -1.950 , 1.320 和 $-0.968\ \text{mV}$ 。 5-TAMRA 与抗体偶联后形成了偶联物导致 Zeta 电位发生变化, 提示 $\text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ 与 5-TAMRA 偶联成功。

2.3.3 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1} 的激发光谱与发射光谱

5-TAMRA@PcAb_{DNMT1} 的激发光谱与发射光谱分别见图 6(a)和(b)。由图 6(a)可知, 5-TAMRA 及其偶联物的最大激发波长为 555 nm。由于 5-TAMRA 在偶联的过程中有所损失, 所以偶联物的荧光强度与 5-TAMRA 相比有所减弱。由图 6(b)可知, 5-TAMRA 的最大发射波长是 575 nm, 而偶联物的最大发射波长为 580 nm, 发生了红移, 表明 5-TAMRA 与 PcAb_{DNMT1} 生成了新的偶联产物。

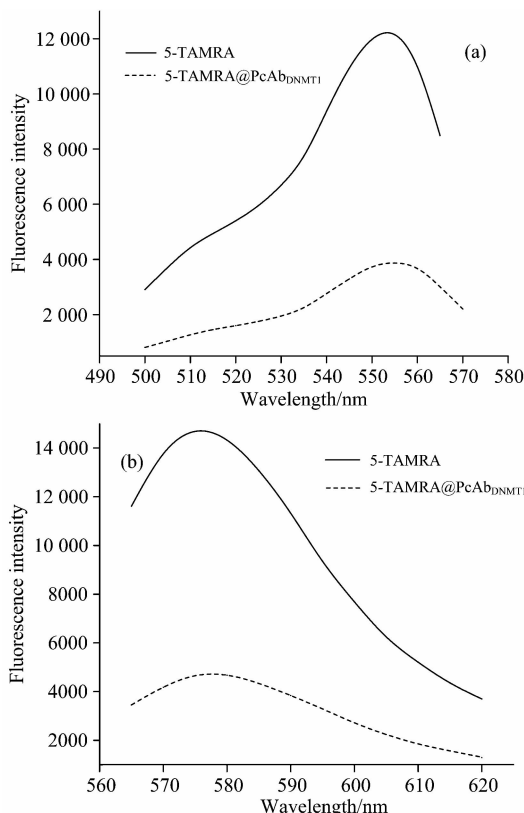


图 6 (a) 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1} 的激发光谱;
(b) 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1} 的发射光谱

Fig. 6 (a) The excitation spectra of 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1} ;
(b) The emission spectra of 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1}

2.3.4 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1} 的免疫活性

利用抗原抗体的特异性结合进行免疫活性分析, 结果见图 7, 随着抗原浓度的逐渐增加, 荧光强度随之增大, 表明 5-TAMRA 与 PcAb_{DNMT1} 形成了偶联物, 并保持了抗体的免

疫活性。

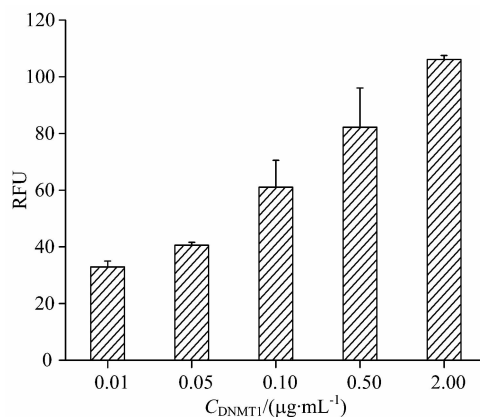


图 7 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1} 的免疫活性

Fig. 7 The immunocompetence of 5-TAMRA@PcAb_{DNMT1}

2.4 方法学的评价与比较

2.4.1 FLISA 标准曲线

方法的标准曲线如图 8 所示。

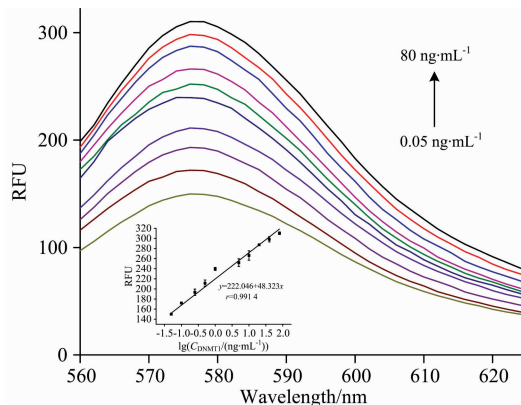


图 8 DNMT1 的标准曲线

Fig. 8 Standard curve of determination DNMT1

2.4.2 FLISA 检出限、精密度、准确度及方法学比较

FLISA, MELISA 和 ELISA 检测 DNMT1 的方法学见表 1、所需时间见表 2。从表 1 数据可以看出, FLISA 方法的检出限最低, 板内与板间精密度好、准确度符合要求。表 2 数据显示, 不同分析方法所需分析时间从短到长的顺序为: FLISA<MELISA<ELISA。

表 1 三种分析方法的线性范围、相关系数和检出限

Table 1 Linear range, correlation coefficient and detection limit of the three analysis methods

方法	线性方程	线性范围/ (ng · mL ⁻¹)	相关系 数(<i>r</i>)	检出限/ (ng · mL ⁻¹)	RSD/%		回收率/%	
					板内	板间	板内	板间
FLISA	$y=222.046+48.323x$	0.05~80.0	0.991 4	0.005	4.7~8.8	1.6~10.0	91.3~102.4	88.0~98.8
MELISA	$y=0.847+0.235x$	0.05~25.6	0.991 9	0.040	3.7~7.6	4.6~6.2	82.7~96.5	81.5~114.4
ELISA	$y=0.678+0.171x$	0.05~25.6	0.996 5	0.040	5.0~6.4	3.9~5.4	88.0~118.3	96.8~108.8

表 2 三种分析方法的反应时间

Table 2 Reaction time of the three analysis methods

方法	t/min					合计
	包板	封闭	温育抗原	温育检测抗体	显色	
FLISA	—	90	90	90	—	270
MELISA	—	90	90	90	20	290
ELISA	120	90	90	90	20	410

2.4.3 特异性评价

特异性分析结果见图 9。图 9 显示：在 DNMT1, DNMT3a 和 DNMT 3b 浓度相同时，测定 DNMT3b 的信号值约为 DNMT1 的 1/7，DNMT3a 的信号值更低，方法的特异性良好。

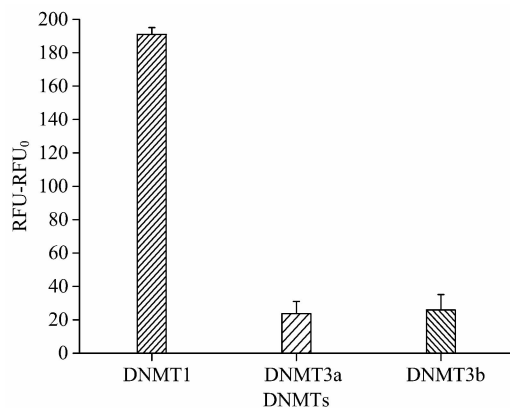


图 9 FLISA 方法检测 DNMTs 的特异性

Fig. 9 The specificity of detection DNMTs with FLISA

2.4 样品分析

分别用 FLISA 和商品化 ELISA 试剂盒检测了 15 例人血清中 DNMT1 含量，并用配对 t 检验对两种分析方法的测

定结果进行了相关分析 ($t=1.906$, $p>0.05$)，差异无统计学意义。相关性分析结果见图 10 所示，说明所建立的 FLISA 法可以用于检测人血清样品中 DNMT1 的含量。

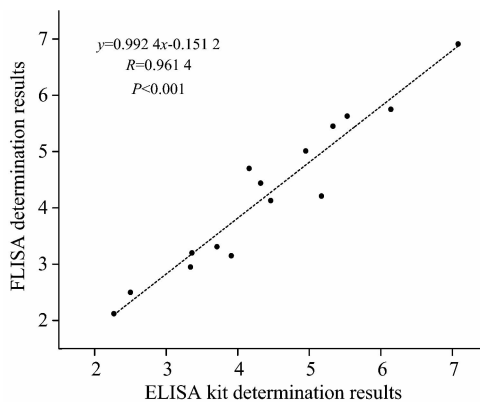


图 10 FLISA 与 ELISA 测定结果的相关性分析

Fig. 10 The correlation analysis of FLISA and ELISA determination results

3 结论

以比表面积大的 Fe_3O_4 纳米颗粒为固相载体固定 DNMT1 单克隆抗体，克服了常规 ELISA 分析中包被的抗原(或抗体)易脱落，固液接触面积小，反应速度慢，分析时间长等不足；结合纳米技术、磁分离技术以及免疫分析技术，建立基于免疫磁性纳米颗粒的荧光免疫分析(FLISA)法，用于人血清中 DNMT1 含量分析。与 ELISA 和 MELISA 法比较，FLISA 法检出限低，灵敏度高，特异性强，操作简单，有望应用于高通量、大样本的检测，可考虑进一步制成试剂盒，提高检测效率。

References

- [1] Edwards J R, Yarychkivska O, Boulard M, et al. Epigenetics & Chromatin, 2017, 10(1): 23.
- [2] Ksiaz F, Ziadi S, Dhiab M B, et al. Advances in Medical Sciences, 2015, 60(1): 50.
- [3] Li L, Wu J J, Zheng F, et al. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2016, 35(1): 112.
- [4] Yoon J H, You B H, Park C H, et al. Cancer Letters, 2018, 417: 47.
- [5] Li Z M, Zhong Z H, Liang R P, et al. Sensors & Actuators B Chemical, 2017, 238: 626.
- [6] González T I, Blanco-González E, Montes-Bayón M. Journal of Chromatography B, 2016, 1028: 16.
- [7] Cui W, Wang L, Wei J. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 77: 650.
- [8] Zhang H, Dong H, Yang G, et al. Analytical Chemistry, 2016, 88(22): 11108.
- [9] Yu S, Yu F, Li Y, et al. Food Control, 2016, 60: 500.
- [10] XIONG Ya-min, JIE Ming-sha, LIU Li-e, et al(熊亚敏, 介明沙, 刘利娥, 等). Journal of Henan University of Technology(河南工业大学学报), 2016, 37(2): 59.

Determination of DNA Methyltransferases 1 by a Method of Fluorescence Immunoassay Based on Magnetic Particles

CHEN Yi-xue¹, NIU Shan-shan², LI Hong-ping², YU Fei¹, WU Yong-jun¹, LIU Li-e^{1*}

1. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

2. College of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract DNA methyltransferases1 (DNMT1), a dominant enzyme responsible for maintaining the genetic stability of DNA methylation, is closely related to the occurrence and development of a variety of tumors. However, till now, most of the studies on DNA methyltransferases (DNMTs) detection have focused on prokaryote methyltransferases and been limited to laboratory studies. Therefore, a fluorescence immunoassay (FLISA) for the high sensitivity and high throughput detection of DNMT1 level in human serum samples was established to provide new ideas for early cancer diagnosis and clinical cancer therapy. The functional carboxyl Fe_3O_4 magnetic beads were used as solid phase carriers. 1-chloride-3-dimethylamino-propyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloric acid (EDC) and sulfo-N-hydroxysuccinimide (Sulfo-NHS) were used as coupling agents to prepare immune-magnetic capture probe $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{McAb}_{\text{DNMT1}}$ (monoclonal antibody DNMT1). After that, the immune-fluorescent detective probe 5-TAMRA@ $\text{PcAb}_{\text{DNMT1}}$ (5-carboxytetramethylrhodamine@polyclonal antibody DNMT1) was also made. Their structure and activity were characterized by infrared absorption, UV-Vis spectra, Zeta potential and immunocompetence. Then, the content of DNMT1 in human serum samples was detected based on the double-anti-sandwich method by FLISA with high sensitivity. Finally, methodology evaluation and comparison were conducted. The results showed that the probes conjugated successfully and maintained the immunocompetence of the original antibody. The linear equation was $y = 222.046 + 48.323x$, the linear range was $0.05 \sim 80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the correlation coefficient was 0.991 4, the detection limit was $0.005 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, the intra- and inter-panel RSD was 4.7%~8.8% and 1.6%~10.0% ($n=6$), respectively, intra- and inter-panel recoveries were 91.3%~102.4% and 88.0%~98.8% ($n=6$), respectively. The cross-reactivity rates with other two DNA methyltransferase 3a/3b were lower, and the specificity of FLISA was well. Compared with ELISA and MELISA, FLISA has the lowest detection limit and shortest analysis time. Compared with ELISA kits, the result displayed a high correlation between two methods, and the difference of them was not statistically significant ($p > 0.05$). The result suggests that the FLISA system would be used to detect multiple samples at the same time for the rapid analysis of DNMT1 in human serum samples.

Keywords Fluorescence immunoassay; DNA methyltransferase 1; Magnetic Fe_3O_4

(Received Dec. 13, 2018; accepted Apr. 2, 2019)

* Corresponding author