



铁蛋白分析技术的研究进展

张敬礼* 陈泮藻

(解放军总医院, 北京)

铁蛋白是含铁蛋白质, 1943 年 Cranick 用硫酸铵沉淀、超滤、硫酸镉重结晶、凝胶层析等技术, 获得铁蛋白, 经免疫电泳、等电聚焦电泳和离子交换层析鉴定, 血清铁蛋白由含铁单体, 二聚体和多聚体组成, 并表现出同样的免疫学性质。

正常人血清内含有微量的铁蛋白。铁蛋白的含量能反映肝脏贮铁量, 体贮铁总量及机体铁的营养状态, 已成为衡量体内缺铁及铁负荷过多的有效指标。业已证实, 某些体内含铁总量不增多的, 如恶性血液病、感染及肿瘤等疾病其铁蛋白均显著增多, 且与疾病的活动及严重程度呈正相关。大量研究证明, 铁蛋白作为一种灵敏、微量、有实用诊断价值的指标, 已受到血液、肿瘤、营养等临床学科的重视, 取得了卓有成效的研究及应用。在诊断、鉴别诊断、观察某些疾病活动, 估计预后及复发, 均具有一定的意义。随着免疫实验技术的发展, 原发性肝癌的特异性抗酸性铁蛋白异构体及人人心脏铁蛋白单克隆抗体已用于临床, 可对肿瘤等疾病的实验诊断提供更有意义的指标, 本文就目前常用的铁蛋白测定方法作简要评述。

一、核素掺入试验和免疫单扩散技术

1977 年 Sarciono 根据细胞合成铁蛋白时需一定量的 L-亮氨酸, 将已知量的 ^{14}C -L-亮氨酸掺入到细胞培养液中和细胞一起孵育。再用三氯醋酸沉淀总蛋白, 硫酸镉沉淀铁蛋白, 在液闪仪上测沉淀物的计数率 (cpm 数), ^{14}C -L-亮氨酸掺入量与铁蛋白生成量呈直线关系, 从而算出铁蛋白的相对合成量。结果证实, 何杰

金氏病患者外周淋巴细胞铁蛋白合成量比正常人高 4.2 倍, 从淋巴细胞释放铁蛋白的速度也比正常人快 4.2 倍。方法虽特异、准确, 但操作繁琐, 不能精确定量, 使用上受到一定的限制。

免疫单扩散技术是一种半定量试验, 原理是用已知的抗血清测定未知量的抗原。Reissman 用免疫沉淀法测定正常人铁蛋白为零, 而 9 例肝细胞疾病铁蛋白增高至 200—8630 ng/ml, 5 例何杰金氏病铁蛋白 320—6860 ng/ml。沈新义^[1]等 1984 年建立了人乳铁蛋白免疫单扩散测定法, 测定 116 例正常产妇产后 1—3 天初乳铁蛋白含量, 均值为 685 mg/ml, 且有随产后时间的增加而下降的趋势。其检测范围 5—300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $CV = 6.54\%$ 。免疫单扩散虽具有操作简便, 无需特殊设备, 易于普及等优点, 但灵敏度和精确性均较差。

二、铁蛋白的免疫电泳技术

免疫电泳技术是研究免疫组化的一项新技术。用铁蛋白标记抗体的免疫电泳法来检测和识别抗原抗体的部位。以后有人将铁蛋白引入细胞免疫化学, 建立了新的杂交瘤抗体免疫电泳法, 这种免疫电泳技术广泛应用于细胞抗原成分定位和抗原成分的识别, 以及观测细胞形态和功能的研究。但该项技术设备昂贵, 不适宜推广应用。

三、自动无焰原子吸收光谱分析技术

原子吸收光谱是 60 年代发展起来的一种

* 科研进修生。

具有快速、灵敏、简便和准确的分析方法,灵敏度可达 ppm-ppb 级水平,1979 年 Selden 首先把自动无焰原子吸收光谱一步法,应用于穿刺取人肝活组织,分别测定总铁蛋白、转铁蛋白、铁蛋白、血红蛋白等含铁成分。此法检测范围大(2—400 ng/ml),一份标本可得到多种不同指标。对临床应用价值较大,但设备昂贵,推广使用受到限制。

四、铁蛋白酶免疫分析技术

酶免疫分析是 60 年代发展起来的一项新技术,它把抗原抗体的特异性免疫反应和酶的高效催化作用有机的结合起来,具有免疫荧光分析和放免分析法(RIA)的双重优点。最早人们创建了酶联免疫吸附试验(ELISA)接着又建立铁蛋白 ELISA 分析,以辣根过氧化物酶(HRP)标记铁蛋白抗体。结果表明,696 例成人铁蛋白浓度为: 男性为 $91.3 \pm 1.7 \mu\text{g/L}$, 女性为 $49.2 \pm 2.9 \mu\text{g/L}$, 与 RIA 比较, $r = 0.964$ 。随后 Tanaka 等^[2]以 β -D-半乳糖苷酶标记铁蛋白抗体,采用聚苯乙烯珠为固相载体,增加有效吸收面积,提高了灵敏度。陈丙莺^[3]等用过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记兔抗人脾铁蛋白抗体,建立了 ELISA,灵敏度为 1ng/ml,检测范围 1—40ng/ml, $CV = 4.35\%$ 。本法仅需 10 μl 血清,且快速简便,当日可出结果。余芒等^[4]应用人肝癌组织铁蛋白 Fab'-HRP 交联物作铁蛋白-ELISA 夹心法,灵敏度提高 100 倍以上(1.2 pg/管)。用亲和层析制备 IgG 的 Fab',完全除去了杂抗体并使用高活性的 β -Gal 使得人铁蛋白夹心 ELISA 灵敏度高达 0.023pg/管。

ELISA 与 RIA 相比较,具有简单易行,成本低,安全、灵敏度高,标记品稳定并省略了离心步骤。适于大批标本的普查和边远地区的使用。

五、铁蛋白免疫放射分析技术

免疫放射分析(IRMA)是一项微量分析技术,与常规的 RIA 比较,快速简便,试剂稳定,

不必使用分离剂,省略了离心,减少了操作步骤所带来的误差。某些大分子物质,如铁蛋白、甲胎蛋白等,因有多个抗原决定簇,特别适用 IRMA 测定,1972 年 Addison 等首先建立了单位点铁蛋白-IRMA 测定法,以与铁蛋白和纤维素偶联作为免疫吸附剂。本法最小检出值为 0.22ng/ml。随后 Mario 等^[5]应用抗人心脏酸性铁蛋白单克隆抗体,建立了对 60% 以上 H 亚基有高度特异性和灵敏度的双位点 IRMA,克服了多克隆抗体不能区别铁蛋白亚单位的弱点。Aipert 认为 H 亚基可能是一种癌胚铁蛋白,测定结果对早期肿瘤的诊治具有很高的参考价值,其测定方法也优于单个位点 IRMA。乔宏庆等^[6]用人肝铁蛋白单克隆抗体包被在聚苯乙烯管壁上,然后加入铁蛋白标准或待测样品,在 37℃ 温育 60 min,洗涤三次后,测每管放射性强度,绘制标准曲线,计算待测样品铁蛋白浓度。方法灵敏度为 5ng/ml,与 RIA 比较,相关系数 $r = 0.63$ ($p < 0.01$)。本方法洗涤简便,试剂稳定时间长。

六、铁蛋白放射免疫分析技术

铁蛋白是一种分子量为 44 万的蛋白质,有较强的免疫活性,易被放射性同位素所标记。七十年代已广泛应用 RIA 分析来检测体液中铁蛋白的含量。1977 年 Allan W. Luxton 测定正常人铁蛋白的含量为 18—330 $\mu\text{g/l}$, Parry 及 Jacobs 分别测定了急性粒细胞白血病及未经治疗的何杰金氏病患者铁蛋白,结果比正常人高 16—25 倍。1982 年汪月增等建立了铁蛋白-RIA^[7],测定结果 100 例正常人男性血清铁蛋白浓度为 $104 \pm 58 \text{ ng/ml}$, 99 例女性 $30.5 \pm 17 \text{ ng/ml}$ 。与法国 CEA-Sorin 和英国 Amersham 药盒作了比较,相关系数 $r = 0.963$,此方法灵敏度比较高,稳定性好,操作简便,目前已广泛应用于科研和临床常规检查。

七、铁蛋白发光免疫分析

发光免疫分析(LIA),首先由 Halman 等提出,它将具有高灵敏的化学发光反应与抗原

抗体高度特异性免疫反应相结合,即增加反应的特异性又保留发光法的高度灵敏性,是继RIA和EIA之后,一种崭新的微量体外检测技术,并成为这两种方法强有力竞争者。人们认为LIA能增加检测的灵敏度,最小检出值可达到 10^{-12} — 10^{-15} mol。应用范围越来越广泛,可测定的物质包括蛋白质、多肽、激素、酶、脂肪酸、维生素药物等。LIA按其所用发光材料的不同,又分为化学发光免疫分析和生物发光免疫分析^[4],前者以氨基苯二酰肼及其衍生物标记抗原或抗体,后者以萤火虫、细菌等生物材料提取的荧光素酶标记抗原或抗体,是定量检测待测抗原或抗体的方法^[8,10]。1984年Weeks^[9]等采用微晶氨基纤维素作羊抗人铁蛋白-IgG的固相载体,以吡啶酯标记兔抗人铁蛋白-IgG,建立了双位点铁蛋白-免疫化学发光分析法。此方法灵敏度为0.8ng/ml,曲线有效范围5.5—467 ng/ml,工作范围5—5000ng/ml $CV = 15\%$ 。同时用铁蛋白-RIA对51例病人与该法做比较, $r = 0.99$ 。铁蛋白发光免疫分析法,以它的标记品比较稳定,标记一次可供半年至一年使用,毋需经常标记,有利于消除不同批标记物对测定结果的影响。不用同位素,比较安全,无防护和污物处理等问题。具有一定推广应用价值,颇受人们的重视。

八、铁蛋白时间分辨荧光免疫分析

时间分辨荧光免疫分析是1977年Sonini和Koyla提出的。原理是根据稀土金属铕(Eu),钐(Sm),铽(Tb)和镨(Nd)能产生斯托克斯荧光,当稀土原子吸收适当波长的光之后,能以光子的形式放出能量,利用时间分辨荧光计测量法,消除样品中非特异性荧光的干扰。这是时间分辨荧光测量最突出特点,最大限度地提高了测定方法的灵敏度^[11,12]。根据上述原理建立了铁蛋白时间分辨荧光免疫分析^[13],采用多克隆抗铁蛋白抗体包被的双位点夹心固相法,只需温育一次,标准曲线浓度2—1500 ng/ml。测得女性正常值为10—111ng/ml ($n = 33$),男性14—173 ng/ml ($n = 44$),灵

敏度为2.0ng/ml,批内 $CV = 8\%$,批间 10% ,回收率 $103 \pm 5\%$,与RIA法呈高度相关 $r = 0.98$,回归方程为 $y = 1.10x - 3.27$ 。该方法灵敏度高达fmol级水平,操作方法简便快速,检测曲线量程宽,有不受自然荧光干扰等其他免疫分析所无法比拟的优点,加之标记物的制备简便,稳定性好,没有放射自身分解和半衰期短的问题。因而该项技术已成为当前最有发展前途的一项生化超微量的分析技术。

九、小结

本文就目前常用的铁蛋白检测方法作简要评述和比较。铁蛋白自动无焰原子吸收光谱分析法与RIA及IRMA分析法灵敏度较高,是目前开展最为普遍的检测方法,但所需设备复杂昂贵。免疫单扩散技术操作简便,易于普及,但灵敏度低。核素掺入试验不适于大量的临床常规检查。从临床实用角度,以铁蛋白的LIA及TRFIA^[13]分析法是目前最有发展前途的分析技术,它保留了免疫反应的特异性和光学反应的高度灵敏性,又克服了RIA等方法所固有的缺点,虽问世不久,发展十分迅速,并有取代上述方法的趋势。然而各实验室尚可根据各自实验条件及研究角度和观察目的,选用不同的分析方法。

本文承蒙李振甲主任指导,特此感谢。

参考文献

- [1] 沈新义等:《上海免疫学杂志》,1984,4(5),292.
- [2] Tanaka, M. et al.: *Cancer*. 1983, 5(1), 61.
- [3] 陈丙葛等:《江苏医药》,1985,11(12), 19.
- [4] 余芒等:《上海免疫学杂志》,1986,6(3), 1.
- [5] Mario, Cazzole. et al.: *British J. Haematology*, 1985, 61, 445.
- [6] 乔宏庆等:《中华核医学杂志》,1986,6(3), 131.
- [7] 汪月增等:《解放军医学杂志》,1982,7(3), 152.
- [8] Etkola, J. et al.: *Clin. Chem.*, 1983, 29, 1777.
- [9] Weeks, L. et al.: *Clin. Chem.*, 1983, 29(8), 1474.
- [10] 陈嘉等:《中国免疫学杂志》,1987,2(1), 64.
- [11] Pettersson, K. et al.: *Clin. Chem.*, 1983, 29, 60.
- [12] Baeor, R. et al.: *Clin. Chem.*, 1987, 33, 48.
- [13] Pharmacia-LKB; *Ferritin-Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay*. 1988.
- [14] 陈泮藻等:《解放军医学情报》1989,3(1), 22.
- [15] 李振甲等:《中华医学检验杂志》1988,11, 368.

【本文于1988年6月6日收到】