

技术与方法

Eu^{3+} 标记技术的实验研究

陈素娟 李振甲

(解放军总医院, 北京 100853)

提 要

本文探讨了当今较有发展前途的时间分辨荧光免疫分析技术中的关键环节—— Eu^{3+} 标记技术中的 pH 值、螯合剂用量及反应时间等诸因素的影响, 选出了最佳反应条件。

关键词 时间分辨荧光免疫分析, 镧系稀土元素示踪, Eu^{3+} 标记技术

时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoroimmunoassay 简称 TRFIA) 是国外八十年代初, 继 RIA 后在 FIA 技术基础上发展起来的一种新型非放射配基超微量分析技术^[1,2]。这种分析技术具有灵敏度高, 标记物容易制备, 操作简便, 迅速等许多优点, 虽问世较短, 发展却十分迅速。凡 RIA 和 EIA 测定的物质均可采用 TRFIA 法测量。TRFIA 技术和其它配基分析技术基本相似, 仅示踪物和信号测量不同, 因此制备符合标准的 Eu^{3+} 标记物是其关键问题。有关标记物制备技术的方法研究至今尚未见有报告。本文通过对人白蛋白(hAlb)的标记, 对两步标记法有关问题进行了初步的实验研究, 旨在选用最佳的反应条件, 制备优质的标记物。现将实验方法及结果报告如下。

一、试剂和材料

1. EuCl_3 溶液制备 取高纯 Eu_2O_3 (英国 Johnson Matthey 公司产品) 58.9 mg 于试

管中, 加 1mol/L HCl 约 0.8ml 至完全溶解, 加蒸馏水至 5ml, 此时 pH 为 2, 用 0.25mol/L NaOH 调 pH 至 4, 加蒸馏水至 10ml, 浓度为含 EuCl_3 33 $\mu\text{mol/ml}$, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 可长期使用。

2. 增强液 取邻苯二甲酸氢钾 1.39g, 三辛基磷化氢的氧化物 (tri-N-octylphosphine oxide) 19.33mg, 2-萘酰三氟丙酮 (2-naphthoyl trifluoroacetone) 6mg, 冰醋酸 6ml, Triton X-100 1g, 加重蒸水 800ml, 微温至溶后加重蒸水至 1000ml。

3. 50mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液 0.5 mol/L NaH_2PO_4 16ml, 0.5 mol/L Na_2HPO_4 84ml, NaCl 9g, 明胶 1g, NaN_3 0.5g, 加水至 1000ml。

4. 白蛋白抗体 本室免疫家兔制备, 最终滴度 1:12000—1:18000。

5. ^{125}I -白蛋白标记 本室采用 Iodogen 标记技术, 非特异结合 3.7%, 免疫活性 >92%。

神经系统分化”的假说提供了较为直接的证据, 同时也进一步证实神经系统与免疫系统的内在联系, 丰富了神经内分泌免疫系统。此外也为应用 IL-6 治疗神经损伤病人提供了理论依据。我们目前正在应用现代蛋白质纯化技术和

IL-6 基因杂交技术进一步证明人胎脑胶质细胞分泌 IL-6 的生化属性和基因表达状况。

[本文于 1990 年 8 月 29 日收到]

6. 仪器 LKB-1230 时间分辨荧光分析仪。

7. 12 孔聚苯乙烯微量滴定条 LKB 产品。

二、 标 记 方 法

1. 方法 准确称取 hAlb (Sigma 公司产品) 1mg, 加 200 μ l 生理盐水溶解, 加 100 μ l 0.25mol/L NaHCO₃ 混匀, 称 2mg 环化二乙烯三胺五醋酸酐(diethylenetriamine pentaacetic acid 简称 DTPA 酐)加 100 μ l 二甲基亚枫溶解, 取 DTPA 酐液 25 μ l 加到 hAlb 液中混匀, 用 0.25mol/L NaOH 调 pH 8—9, 室温放置 1h, 将反应液移至透析袋内, 生理盐水 4 $^{\circ}$ C 搅拌透析 6—8h, 中间更换生理盐水 2—3 次。将透析的 hAlb-DTPA 液移至反应瓶中, 加 50 μ l 33 μ mol/mlEuCl₃ 液, 室温放置 2h, 装透析袋, 生理盐水 4 $^{\circ}$ C 搅拌透析 24—36h, 中间更换生理盐水数次, 或经 Sephadex G50 柱层析, 紫外检测收集蛋白峰。

2. 免疫活性测定 采用 Alb RIA 方法^[3]。非特异结合管 (NSB) 和最高结合管 (S₀) 分别加磷酸盐缓冲液 (PBS) 200 μ l、100 μ l。样品管加 100 μ l Eu³⁺-Alb 标记物 (1:200)。向 S₀管、样品管各加 Alb 抗体 100 μ l (1:2000)。NSB、S₀、样品管各加 100 μ l ¹²⁵I-Alb 液 (40000 cpm 左右), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次晨加 100 μ l 二抗, 100 μ l 2% 正常兔血清, 100 μ l 25% 聚乙二醇 (PEG, MW 6000), 充分振荡, 4 $^{\circ}$ C 放置 30min, 4 $^{\circ}$ C 离心, 去上清, 按常规方法测放射性, 计算结合率。

3. 比活度测量 用 25 μ g—2mg/ml hAlb 液在 Unicam SP 1800 紫外分光光度计 280

nm 0.5cm 比色杯做标准曲线, 透析标记物稀释至 1ml, 在紫外分光光度计上测量光密度, 从标准曲线上查出浓度, 除以分子量, 得出每 ml 所含 mol 数。Eu³⁺-标记物稀释 500—1000 倍, 在聚苯乙烯微量滴定条中, 每孔加 200 μ l 增强液, 20 μ l 标记物, 振荡 15min, 在 1230 时间分辨仪上测荧光强度, 同样从 EuCl₃ 制备的标准曲线上得出每 ml Eu³⁺ 的 mol 数, 两者之比即为比活度。

三、 结 果

1. 不同 pH 值对标记物的影响 称取四份 hAlb, 在加入 DTPA 酐后用 0.25 mol/L NaOH 分别调 pH 为 6、7、8、9, 按本文方法标记, 标记物分别稀释 500 倍, 测荧光强度。结果见表 1。

表 1 Alb 和 DTPA 在不同 pH 值条件标记物的荧光强度

pH 值	⁽¹⁾ pH6	⁽²⁾ pH7	⁽³⁾ pH8	⁽⁴⁾ pH9
荧光强度 (cps)	1.1 $\times 10^6$	3.0 $\times 10^6$	5.6 $\times 10^6$	5.3 $\times 10^6$
	1.2 $\times 10^6$	2.9 $\times 10^6$	5.8 $\times 10^6$	5.3 $\times 10^6$
	1.2 $\times 10^6$	3.1 $\times 10^6$	5.9 $\times 10^6$	6.0 $\times 10^6$
		3.2 $\times 10^6$	5.6 $\times 10^6$	
pH 间差异		(1)与(2) P<0.01	(2)与(3) P<0.01	(3)与(4) P>0.05

表 2 DTPA 酐用量不同的影响

DTPA 酐用量	⁽¹⁾ 250 μ g	⁽²⁾ 500 μ g	⁽³⁾ 1000 μ g
荧光强度 (cps)	2.2 $\times 10^6$	3.0 $\times 10^6$	3.8 $\times 10^6$
	2.8 $\times 10^6$	3.1 $\times 10^6$	4.0 $\times 10^6$
	2.6 $\times 10^6$	3.2 $\times 10^6$	4.2 $\times 10^6$
DTPA 间差异		(1)与(2) P>0.05	(1)与(3), (2)与(3) P<0.01

表 3 加DTPA 后不同反应时间比较

时间	⁽¹⁾ 15min	⁽²⁾ 30min	⁽³⁾ 1h	⁽⁴⁾ 1.5h	⁽⁵⁾ 2.5h
荧光强度 (cps)	2.4 $\times 10^6$	3.2 $\times 10^6$	4.2 $\times 10^6$	3.5 $\times 10^6$	2.1 $\times 10^6$
	2.5 $\times 10^6$	3.4 $\times 10^6$	4.3 $\times 10^6$	4.0 $\times 10^6$	2.9 $\times 10^6$
	2.8 $\times 10^6$	3.3 $\times 10^6$	4.3 $\times 10^6$	4.4 $\times 10^6$	2.9 $\times 10^6$
加 DTPA 后不同时间差异	(1)与(5) P>0.05	(1)与(2) P<0.01	(2)与(3) P<0.01	(3)与(4) P>0.05	(4)与(5) P<0.01

表4 加 Eu^{3+} 后不同反应时间比较

时间	30min	1h	1.5h	2h	3h
荧光强度 (cps)	2.1×10^6	2.7×10^6	3.4×10^6	5.0×10^6	4.6×10^6
	2.6×10^6	3.0×10^6	3.3×10^6	5.4×10^6	4.6×10^6
	2.0×10^6				
加 Eu^{3+} 后不同时间差异		(1)与(2) $P < 0.01$	(2)与(3) $P < 0.01$	(3)与(4) $P < 0.01$	(4)与(5) $P < 0.01$

2. 螯合剂用量对标记率的影响 标记过程中所用螯合剂的多少, 对抗体免疫活性损伤程度不同, 我们分别采用 DTPA 酞 250 μg 、500 μg 、1000 μg 三种不同用量和蛋白质反应, 测标记物荧光强度, 统计学分析详见表 2。

3. 加 DTPA 酞后不同反应时间对标记率的影响 按本文方法加入 DTPA 酞螯合剂后, 分别放置室温下反应 15min, 30min, 1h, 1.5h, 2.5h, 观察标记物荧光强度, 测定结果见表 3。

4. 加入 Eu^{3+} 后不同时间对标记率的影响 测定荧光强度结果见表 4。

四、讨 论

TRFIA 主要是标记镧系稀土元素为示踪物。稀土元素取材容易, 其荧光激发光波长范围较宽, 有利于提高激发能。而发射光波甚窄, 又有利于降低本底及提高荧光信号和噪声之比。同时激发光与发射光之间有较大的 Stokes 移位^[4]。稀土螯合物经紫外激发后, 不仅荧光强度高, 且半衰期也长^[5,6]。样品中蛋白类自身荧光衰变约为 1—10ns, 而 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 荧光衰变分别为 430 μs 和 41 μs , 因此利用延缓测量时间, 待测样品中短寿命荧光完全衰变后, 所测信号完全为稀土螯合物荧光。

TRFIA 不同于 RIA 或 EIA, 标记技术简便, 标记物稳定, 可长期使用。但示踪物的质量是建立方法成功与否的关键。标记物的制备是利用双功能基团的螯合物, 一端和 Eu^{3+} 联接, 而另一端是和抗体或抗原分子上的氨基相连。文献报导标记方法多采用 Tolonen 等人介绍的直接标记法^[7]。这种方法所用试剂为 N-(对-异硫靛苯基)-二乙烯三胺四醋酸- Eu^{3+} 螯合

物。但此种螯合剂目前国内外均无商品提供, 且实验室自行合成尚有一定难度。有关 ^{111}In , ^{99}Tc DTPA 酞法标记单克隆抗体早有报道^[8,9]。Dechaud 则将此法用于稀土元素标记^[10]。首先将抗体 IgG 先和 DTPA 酞结合, 然后再与 Eu^{3+} 化合物结合。故有人称两步标记法^[1]。国外作者报道此种标记方法是将蛋白质和 DTPA 酞在 pH7 时反应 30min, 加入 EuCl_3 后在室温下再反应 30min, 然后经 Sephadex G50 柱纯化^[11,10]。

我们观察了各种因素对标记技术的影响。在蛋白质和螯合剂反应过程中, pH 值的变化对所制备 Eu^{3+} 标记物的免疫活性影响较大。为防止加入 DTPA 酞 pH 值即刻降低至 pH3 以下, 造成蛋白质变性, 我们在 Dechaud 报告的基础上, 在加入 DTPA 酞前预先向 200 μl 蛋白质液中加 0.25 mol/L NaHCO_3 100 μl , 起到一定缓冲作用。然后再调 pH 至 8—9, 使反应条件趋向温和。这样就保证了标记物的高免疫活性。

本实验结果表明: 在标记物制备中, DTPA 酞和蛋白质的比, 两次反应中的 pH 值, 反应时间等因素对标记物都有一定的影响, 文献报告的反应时间两次均为 30min。但我们的实验结果表明此反应尚未完全。并且 DTPA 酞用量不足, pH 值也偏低。因此我们选用 200 μl 蛋白质液加 DTPA 酞的量为 1mg。经统计学分析: pH8 与 pH9 对标记结果无差异 ($P > 0.05$), pH 值 6, 7, 8 间均有显著差异 ($P < 0.01$)。我们选择了 pH 值在 8—9 间。从加入 DTPA 酞后反应时间方面来看除 1h 与 1.5h 间, 15min 与 2.5h 间无差异外 ($P > 0.05$)。其

免疫毒素的纯化

贺永怀 陈 兴 汲言山 赵薇薇 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提 要

本文采用 Ultrogel AcA 34 凝胶柱纯化单克隆抗体和蓖麻毒素的结合物。结合物与游离毒素的分离较 Sephadex G150 柱好。继而利用蓖麻毒素 B 链能与半乳糖基结合的特性, 用酸化 Sepharose 4B 柱进一步纯化结合物; 达到完全除去游离抗体, 使免疫毒素对靶细胞的特异性毒性提高 20 倍。

关键词 免疫毒素, 蓖麻毒素, 单克隆抗体

抗体与毒素的结合物称为免疫毒素。常用的毒素是蓖麻毒素。它的分子量为 65000 道尔顿, 由 A 链和 B 链通过二硫键连接而成。B 链上含有二个能与半乳糖基结合的部位, 当蓖麻毒素与单克隆抗体以 1:1 连接后形成的免疫毒素分子量为 21—22 万, 往往与游离的抗体(15—16 万)不能完全分开。而游离抗体的存在会影响免疫毒素对靶细胞的杀伤效力。因此, 免疫毒素的纯化是十分重要的。

本文采用 Ultrogel AcA 34 凝胶过滤柱和酸化 Sepharose 4B 柱纯化由蓖麻毒素组成的免疫毒素, 获得较好结果。使免疫毒素对靶

细胞蛋白质合成抑制 50% 的浓度从 1×10^{-9} mol/L 降到 5×10^{-11} mol/L。

材 料 和 方 法

Ultrogel AcA 34, Sephadex G150, Sepharose 4B 均购自 Pharmacia 公司。

Molt-4 细胞系为人 T 淋巴母细胞系, 引自英国皇家肿瘤研究所。按常规方法培养在含 10% 小牛血清, 10mmol/L Hepes, 50 单位/ml 庆大霉素的 1640 培养液中。

H65 单克隆抗体是抗人全 T 细胞的抗体, 属 CD5 系统。由白炎同志提供。

它各组间差异较显著 ($P < 0.01$)。以 1h、1.5h 标记率最高。加入 Eu^{3+} 后不同时间相比, 各组结果差异均显著 ($P < 0.01$)。而以 2h Eu^{3+} 的标记率最高。

文献报告, 在 IgG-DTPA 反应液加入 EuCl_3 后要经特殊处理过 Sephadex G50 柱子分离, 以除去游离的 Eu^{3+} , 通过实验对比, 我们发现不经过柱, 采用透析的方法可以达到同样的目的。

每个 IgG 或其它蛋白分子上标有几个 Eu^{3+} 为好, 国外多数作者认为 1:10—15 灵敏度最高, 但从生物样品中浓度来看, 过分要求更高的灵敏度似无必要。因此本法每个 hAlb 分

子上标记 3~4 个 Eu^{3+} , 其标记率或产物免疫活性均已能达到 TRFIA 技术所要求的质量。

参 考 文 献

- 1 李振甲等. 中华医学检验杂志, 1988; 11: 368
- 2 Sonin, E, Kojila H. *Clin Chem.* 1983; 29: 65
- 3 陈泮藻等. 同位素, 1989; 2: 47
- 4 胡天喜. 生物化学与生物物理进展, 1987; (5): 8
- 5 Pettersson K *et al.* *Clin Chem.* 1983; 29: 60
- 6 Eskola J *et al.* *Clin Chem.* 1983; 29: 1777
- 7 Tolvonon E *et al.* *Clin Chem.* 1986; 32: 637
- 8 Khaw B *et al.* *J Nucl Med.* 1982; 11: 1011
- 9 Layne W *et al.* *J Nucl Med.* 1982; 23: 627
- 10 Dechaud H *et al.* *Clin Chem.* 1986; 32: 1323
- 11 Rene B *et al.* *Clin Chem.* 1987; 33: 48

[本文于 1989 年 9 月 23 日收到]