

基玻璃连结,肽链中N端的 α -氨基及赖氨酸的 ϵ -氨基将与载体共价偶合,经Edman降解后仍将留在载体上,因此胰岛素B链的N末端苯丙氨酸与第29位的赖氨酸不能测定。此外,第30位的丙氨酸位于29位的赖氨酸之后,不再与载体连结,也不属测定范围。其余全部PTH氨基酸层析点清晰。图4a及4b为第25—28位PTH氨基酸的层析图谱。

肌红蛋白N末端附近32个氨基酸残基的顺序测定如下:

[Val]-Leu-Ser-Glu-Glu-Glu-Trp-Glu-Leu-Val-Leu-His-Val-Trp-Ala-[Lys]-Val-Glu-Ala-Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Asn-Ile-Leu-Ile-Arg-Leu

N末端的Val及第16位的Lys情况与胰岛素B链相同,不能检测。图5列举第29、30、32位肌红蛋白中PTH氨基酸的层析图谱。至32步顺序测定时,仍可辨认出层析点位置为PTH-Leu。之后层析点变浅,杂点也相应增多。第31位系PTH-Arg,用溶剂系统III另作检

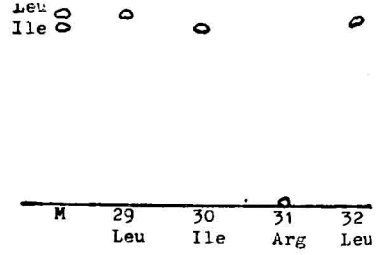


图5 肌红蛋白29、30、32位PTH氨基酸层析图谱

测。

目前,我们正在配合有色异硫氰酸苯酯试剂进一步设法提高分析灵敏度,以便测定超微量(确10nm)的蛋白质样品。

此仪器试制过程中,罗珊珊、张耀时、俞鹤年等同志提出宝贵意见;慕见凤同志作部分PTH氨基酸层析鉴定;王如棠等同志配合加工零件;特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Laursen, R. A., Horn, M. J. and Bonner, A. G., *FEBS Letters*, 21, 67, 1972.

[本文于1981年1月23日收到]

快速而稳定的放射免疫试剂——抗体覆盖的含A蛋白金色葡萄球菌

陈一新 曹和贇 梅志寿 李 萍
(江西省工业卫生研究所)

沈森局 孟福珍 王小丹
(江西省医学科学研究所)

放射免疫分析所用抗体吸附剂,品种很多,各有利弊。近几年陆续报道含A蛋白的Cowan I型葡萄球菌是良好的抗体吸附剂^[1-3]。经过筛选,我们找到了含有丰富的A蛋白“799”型金色葡萄球菌。用北京化工厂产皮质醇放射免疫试剂和上海生物制品研究所产HCG放射免疫试剂为模板,将热灭活甲醛处理的菌体,以非离子型去污剂处理之后,用它吸附抗原-抗体复合物,使复合物与游离抗原分离。我们参照Matali的方法^[4],用处理了的细菌和抗血清混合,将抗体覆盖在葡萄球菌菌体A蛋白上,再将其与待

测抗原和标记抗原结合,进行放射免疫分析取得成功,反应可在30分钟内完成。这种抗体覆盖的葡萄球菌制备很容易,且性能稳定,易保存。

材 料 和 方 法

一、抗原和抗血清 ¹²⁵I-皮质醇,皮质醇标准品和兔抗皮质醇血清是北京化工厂生产。¹²⁵I-HCG, HCG标准品是上海生物制品研究所生产,抗HCG血清是北京动物研究所赠送。

二、“799”型金色葡萄球菌应用液的制备

1. 葡萄球菌吸附剂的制备 在固体培养基上, 37℃ 孵 18—24 小时之后, 菌苔刮落在生理盐水中。菌液在 4℃ 8000g 离心 10 分钟, 按 Jons-son^[2] 的方法, 用含 0.04M NaN_3 的 pH7.4 磷酸缓冲液洗涤两次, 洗涤后的沉淀, 按 10% 的浓度悬浮于含 1.5% 甲醛的上述缓冲液中; 在 23℃ 搅拌 90 分钟, 再离心; 离心后的沉淀物重新悬浮于不含甲醛的同一缓冲液中, 并倒于合适大小的三角烧瓶中, 使液面深度小于 1.5 厘米; 放 80℃ 水浴中快速振摇 5 分钟, 再迅速移置于冰水浴中冷却。经此处理的菌液再悬浮于 0.04M pH7.2 磷酸缓冲液, 离心洗涤 2 次。最后, 将沉淀物仍悬浮于磷酸缓冲液中, 用红血球比积管测定菌液浓度, 并使其浓度调至 10% (V/V), 置 4℃ 贮存备用。

用作免疫吸附剂之前, 菌液以 2,000g 离心 20 分钟, 弃上清液, 沉淀悬浮于含 0.5% Triton X-100, pH7.4 的 NET 缓冲液 (150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris 和 0.02% NaN_3), 再沉淀洗涤一次, 最后, 悬浮于每毫升含卵蛋白 2.0 毫克的 0.05% Triton X-100 NET 缓冲液中, 其浓度配成 10% (V/V)。

2. 抗体覆盖葡萄球菌的制备 用 3 份 10% 葡萄球菌悬液和 1 份用同一缓冲液稀释的兔抗皮质醇抗血清或兔抗 HCG 抗血清混合, 放 4℃ 孵 1 小时。然后, 再用同一缓冲液洗涤 2 次。洗过的抗体覆盖的葡萄球菌配成 10% 浓度, 1 份菌液加 10 份 0.05% 戊二醛水溶液, 在 4℃ 下放 1 小时, 再用含卵蛋白的 0.05% Triton X-100 NET 缓冲液广泛洗涤 2 次。洗涤后的沉淀取一定量配成不同的浓度, 用作合适滴度测定。

三、含 A 蛋白葡萄球菌用作免疫吸附剂 皮质醇放射免疫测定, 如同试剂盒使用说明方法加入试剂, 饱和硫酸铵以制备好的“799”型葡萄球菌悬液 50 微升取代, 加菌液后 30 分钟测定放射性。测定 HCG: 先加入含卵蛋白的 0.05% Triton X-100 NET 溶液 100 微升, 而后依次加入待测样品 100 微升, ^{125}I -HCG 100 微升, 抗血清 100 微升, EDTA 溶液 100 微升,

37℃ 保温 3 小时, 然后加入制备好的菌液 100 微升, 30 分钟后测放射性。

四、抗体覆盖的葡萄球菌作放射免疫分析 皮质醇测定: 加入用醇稀释的稀释液 300 微升, 待测样品和标记皮质醇各 100 微升, 最后加入抗体覆盖葡萄球菌应用液 50 微升, 置室温 30 分钟后, 测放射性。HCG 测定是先加入含卵蛋白的 0.05% Triton X-100 NET 缓冲液 200 微升, 待测样品 100 微升, 标记 HCG 100 微升, EDTA 100 微升, 最后加抗体覆盖葡萄球菌应用液 100 微升。

五、特异性测定 用前述放射免疫法测定的程序加样, 但不加抗血清, 分别检定菌体对皮质醇和 HCG 的非特异吸附。

为观察检测样品中 IgG 含量对 HCG 测定的影响, 备三组测定管, 分别加入用三倍量 10% “799”型葡萄球菌沉淀去除了 IgG 的正常男性血清 100 微升, 未除 IgG 的正常男性血清 100 微升和 200 微升; 如同抗体覆盖葡萄球菌测定 HCG 的方法, 再加入标记抗原和覆盖了抗体的菌液。以下式计算 IgG 对结合的抑制率:

$$\text{抑制率} \% = 100 - \frac{\text{有 IgG 管的抑制率}}{\text{无 IgG 管的抑制率}} \times 100$$

结果与讨论

通过不同浓度菌液沉淀效果的试验, 我们选作吸附剂的葡萄球菌浓度为 10%。图 1 标准曲线 a 是菌液 50 微升沉淀皮质醇抗原-抗体复合物结果, 曲线的斜率比同一条件下用饱和硫酸铵沉淀法 (曲线 b) 略大。图 2 标准曲线 a

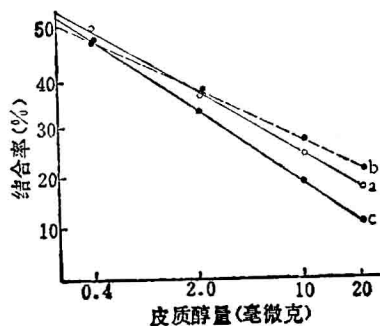


图 1 皮质醇标准曲线

和 b, 分别是用 10% 菌液 50 微升和第二抗体作吸附所得结果, a 的斜率亦略大于 b。图 3 是抗体覆盖的菌体, 稀释不同浓度后, 用其稀释液 50 微升和标记抗原 100 微升结合制成的稀释度曲线, a 和 b 分别为两种抗体覆盖的“799”型葡萄球菌的稀释度曲线, 两者菌体浓度均是 5% 时的结合率在 50% 左右。图 1 和图 2 的 c 线, 分别为 5% 浓度的两种抗体覆盖的葡萄球菌菌液各 50 微升与抗原结合的标准曲线。图 1c 线的斜率大于 b 线, 而图 2c 线的斜率略低于 b 线。图 4a 和 b 分别是两种抗体覆盖的“799”型葡萄球菌与相应的标记抗原在混合后不同时间的结合率。两者均在混合后 30 分钟达最大结合值。

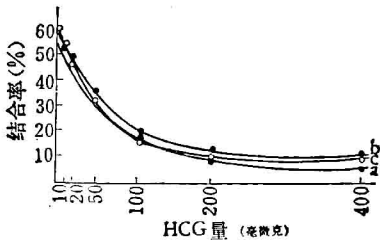


图 2 HCG 标准曲线

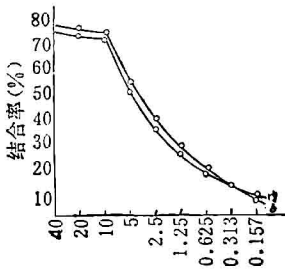


图 3 抗体覆盖“799”葡萄球菌稀释曲线

我们用不同时间出厂的三批皮质醇试剂, 作标记抗原的非特异吸附试验, 发现其对葡萄球菌的吸附分别为 7.58%、15.2% 和 20.3%, 对硫酸铵为 9.1%、18.6% 和 25.1%。从图 4c 线看出, 兔血清覆盖的葡萄球菌在和标记皮质醇

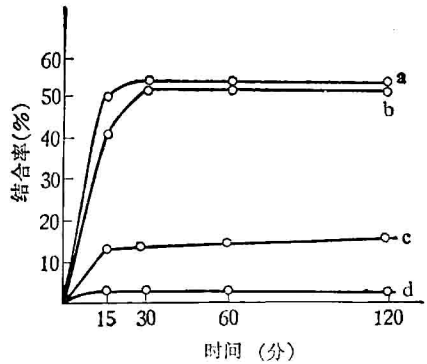


图 4 抗血清和正常兔血清覆盖的“799”葡萄球菌在不同时间与抗原结合效力

混合 30 分钟后, 吸附率为 14.3%。而图 4d 线示兔血清覆盖的葡萄球菌对 HCG 的非特异吸附未超过 4%。这一结果说明, 葡萄球菌对 HCG 的非特异吸附很小, 对皮质醇的吸附较大, 且各批试剂的结果不同, 和硫酸铵沉淀法对比, 后者的非特异吸附远比前者高。全血清做样品测定, IgG 含量的影响必须予以考虑。我们的实验结果是, 含 IgG 的正常人血清 100 微升, 其抑制率为 17.1%, 200 微升其抑制率为 18%。这证明用 10% “799 型” 葡萄球菌 50 微升, 血清 IgG 含量的变化一般不影响测定。

我们将抗皮质醇抗体覆盖的“799 型”葡萄球菌菌液, 置 37℃ 水浴贮存, 把贮存前和贮存后 2、4、6、8 天各取 50 微升, 分别与标记抗原 100 微升混合, 测得结合率分别是 53.3%、52.7%、53.0%、52.4% 和 51.8%, 活性无明显变化。

参 考 文 献

- [1] Folling, I.: *Scand. J. Immunol.*, 2, 316, 1973.
- [2] Figenschau, K. J. et al.: *ACTH Pathol. Microbiol. Scand.*, (Sect. B) 82, 422, 1974.
- [3] Jonsson, S. et al.: *Eur. J. Immunol.*, 4, 29, 1974.
- [4] Nata, P. G. et al.: *J. Immunol. Methods*, 25, 241, 1979.

[本文于 1980 年 8 月 15 日收到]