

## 技术与方法

## 时间分辨免疫荧光分析测定人血清铁蛋白

魏文清 王仁芝 蒋中华

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

## 提 要

用一种新型非放射性免疫分析——时间分辨荧光免疫分析法测定人血清铁蛋白含量。方法灵敏度达 2ng/ml; 测量范围 5—1500ng/ml; 批内、批间变异系数分别为  $7.1 \pm 0.8\%$  和  $10.0 \pm 1.3\%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ); 回收率为  $98.4 \pm 7.4\%$ 。测定值与 RIA 法测定值比较,相关性良好。

**关键词** 非放射性免疫分析,时间分辨荧光分析,时间分辨免疫荧光分析,铁蛋白

铁蛋白 (ferritin) 是一种可溶性储铁蛋白,广泛分布于机体组织中。血清铁蛋白能有效地反映体内铁营养状态,临床上用于诊断缺铁性贫血,一些恶性疾病,如白血病、急性淋巴瘤、某些癌症,病人血清铁蛋白含量明显增高。现在临床检测血清铁蛋白常用的方法为 RIA<sup>[1,2]</sup>,其灵敏度高,操作简便,但使用放射性物质,标记物 (<sup>125</sup>I) 保存期短需经常制备。相应的非放射性免疫分析日益受到人们重视,在原有 FIA 基础上,人们利用某些稀土元素及其络合物独特的荧光性质及时间分辨技术,建立起时间分辨荧光免疫分析技术 (time-resolved fluorimmunoassay, TrFIA)。

本文采用 TrFIA 检测血清铁蛋白含量,具体方法采用双位点免疫荧光分析 (IFMA) 法,为二步法 (图 1): a. 固相兔抗人铁蛋白抗体

与血清铁蛋白抗原反应; b. 镧标记兔抗人铁蛋白抗体与结合于固相抗体上的抗原反应。

## 1. 材料与方 法

## 1.1 试剂与仪器

## 1.1.1 试剂

三氯化镧 (EuCl<sub>3</sub>, Fluka)。用 0.1mol/L pH 6.0 柠檬酸缓冲液配制成浓度为 1200 μmol/L 的 EuCl<sub>3</sub> 溶液。

环二乙烯三胺五醋酸酐 (cDTPA)。

洗涤液:每升含 NaCl 9g, Tween20 1 ml 的高纯度去离子水溶液。

荧光增强液:β-萘酰三氟丙酮(自制) 3.990 mg, 三-辛基氧化磷 (Fluka) 19.675mg, Triton X-100 (Farco) 1 ml, 邻苯二甲酸氢钾(北京化工厂) 1.39g, 冰醋酸(北京化工厂) 5.9ml, 溶于 1000ml 去离子水。pH 3.2, 4℃ 避光保存。

分析缓冲液: 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.75), 含 0.1% BSA, 0.9% NaCl 和 0.02% NaN<sub>3</sub>。

抗体: 用人铁蛋白抗原常规免疫家兔得兔抗人铁蛋白血清。用辛酸沉淀及 DEAE-纤维

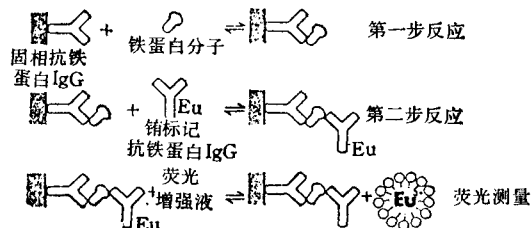


图 1 TrIFMA 铁蛋白原理示意图 (二步法)

收稿日期: 1991-06-17

修回日期: 1991-09-06

离子交换层析法提纯 IgG.

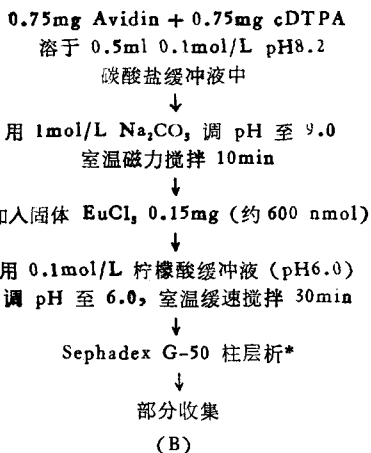
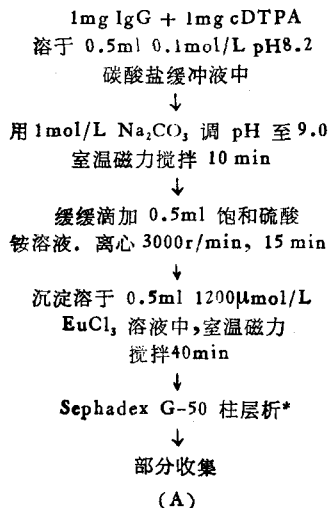
铁蛋白标准物: 经标定的人铁蛋白用分析缓冲液稀释成 5, 20, 100, 500, 1500ng/ml, 4°C 保存.

1.1.2 仪器

紫外分光光度计 (Varian 100 型).

ARCUS-1230 时间分辨荧光计 (LKB pharmacia) 及配套设备: Wallac 1296-001 型振荡器 (慢速、快速两档) 和 12 孔快速手动洗涤器.

12 孔聚苯乙烯免疫反应测定杯 (芬兰 Helsinki).



\* Sephadex G-50 柱层析: 1.1cm × 55cm; 流速: 10ml/h; 流洗液: 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.75 (含 0.9%NaCl).

图 2 铈标记兔抗人铁蛋白 IgG(A) 及亲合素 (B) 的步骤

1.2 方法

1.2.1 Eu 标记抗体及 Eu 标记亲合素

用 EuCl<sub>3</sub> 溶液标记兔抗人铁蛋白 IgG 及亲合素 (Avidin). 具体步骤见图 2.

每管收集洗脱液 0.5ml. 每管取出 10μl 加至免疫反应测定杯中, 加 200μl 增强液, 用 ARCUS-1230 荧光计测量 Eu<sup>3+</sup> 荧光强度, 可得到两个峰. 第一峰为 Eu-cDTPA-IgG 或 Eu-cDTPA-Avidin, 混合第一峰各管洗脱液, 测定 280 nm 下的光吸收值 (A<sub>280nm</sub>). 第二峰为游离铈络合物峰.

标记物中加入终浓度为 50% 甘油和 1mg/ml BSA, -20°C 保存. 使用时, 用分析缓冲液稀释到使用浓度.

1.2.2 抗铁蛋白 IgG 的生物素化

1mg 兔抗人铁蛋白 IgG 加入 1mg 羧基磺酸琥珀酰胺酯生物素 (BNHS), 再加入 1ml 0.1mol/L pH7.4 PB, 混匀, 室温暗处反应 5h. 用上述 PB 透析 20h. 加入甘油终浓度为 50%, -20°C 保存. 使用时, 用分析液稀释到使用浓度.

1.2.3 兔抗人铁蛋白 IgG 的固相包被

用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 配制 5μg/ml 浓度的 IgG 溶液, 取 100μl 加入测定杯中, 振荡混匀, 室温放置 20 h. 用洗涤液

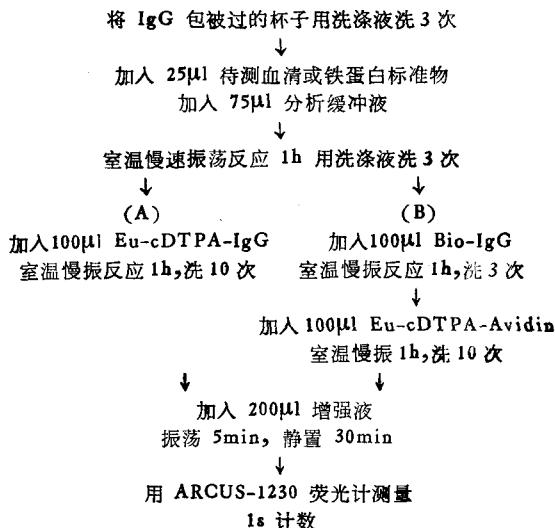


图 3 TrIFMA (A) 和 Tr-AES-IFMA (B) 分析血清铁蛋白的步骤

洗1次.用0.5% BSA(上述碳酸盐 buffer 配制) 200 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 封闭1h, 洗1次, 4 $^{\circ}$ C 密封湿润放置,可保存2—3个月.

**1.2.4 血清铁蛋白 TrIFMA 及 Tr-ABS-IFMA 分析步骤.**

本文除用 TrIFMA 测定铁蛋白含量外,还将亲合素-生物素系统(Avidin-biotin system, ABS)引入 TrIFMA 成 Tr-ABS-IFMA,作为一种补充方法.具体步骤见图3.免疫反应的最终产物为:固相抗体-铁蛋白抗原-生物素化抗体-标记亲合素.

**2 结 果**

**2.1 标准曲线** 图4为人血清铁蛋白 TrIFMA 的标准曲线(均值 $\pm$ 标准差,  $n=5$ ).曲线测量范围5—1500 ng/ml,曲线在0—500 ng/ml 线性关系好,500—1500 ng/ml 曲线渐趋平缓.

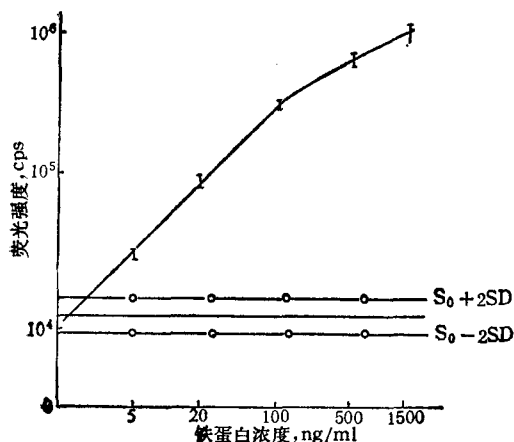


图4 TrIFMA 铁蛋白标准曲线

**2.2 灵敏度** 根据测定10次  $S_0$  的平均值加两倍的标准偏差 ( $\bar{x} \pm 2SD$ ), 从标准曲线上得出相应的铁蛋白浓度为 2.0ng/ml, 即为方法的灵敏度.

**2.3 方法的准确性、精密度及健全性**

用回收实验检验方法的准确性, 向已知铁蛋白浓度的血清中加入低、中、高三种浓度的铁蛋白标准物, 测定回收率为  $98.4 \pm 7.4\%$  ( $n=4$ )

表1 TrIFMA 血清铁蛋白的回收实验

原血清	铁蛋白, ng/ml			回收(%)
	加入值	期望值	测定值	
12.8	5	17.8	16.4	92.1
	50	62.8	60.7	96.6
	100	112.8	120.2	106.6

$n=4$  均值:  $98.4 \pm 7.4$

表2 TrIFMA 血清铁蛋白批内变异系数

样品	铁蛋白, ng/ml		
	( $\bar{x}$ )	(SD)	变异系数 CV%
低值	12.9	0.8	6.2
中值	58.1	4.3	7.4
高值	117.6	9.2	7.8

$n=10$  均值:  $7.1 \pm 0.8$

表3 TrIFMA 血清铁蛋白批间变异系数

样品	测定次数	铁蛋白, ng/ml		变异系数 CV%
		$\bar{x}$	SD	
I	9	12.4	1.4	11.3
II	8	15.3	1.5	9.9
III	8	56.1	6.0	10.7
IV	6	105.4	8.6	8.2

均值:  $10.0 \pm 1.3$

(表1).

表2示方法的批内变异系数为  $7.1 \pm 0.8\%$ . 表3示不同铁蛋白含量的4份血清分别做多次测定所得批间变异系数, 为  $10.0 \pm 1.3\%$ .

方法的健全性用样品稀释倍数与测量值之间的线性关系判定. 取两个样品分别用分析缓冲液稀释为原浓度的 1/2、1/4、1/8、1/10 及 1/20, 测出相应的铁蛋白值, 稀释倍数与铁蛋白浓度呈良好的直线关系(图5).

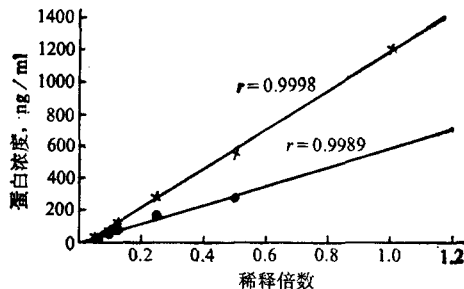


图5 TrIFMA 铁蛋白稀释度曲线

●—●样品1; ×—×样品2

2.4 正常值和部分异常值测定

2.4.1 正常值 测定 96例正常人血清铁

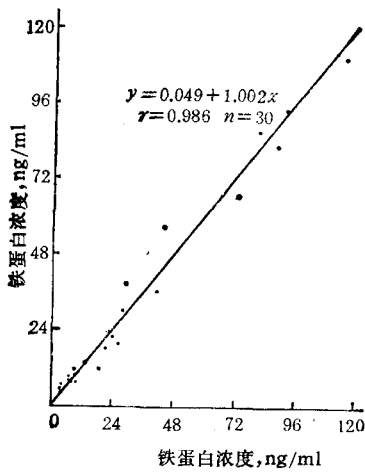


图6 TrIFMA 与 RIA 铁蛋白相关性比较

蛋白数值, 平均值为 46.6ng/ml, 实测范围为 6.1—160.7ng/ml. 其中男性 55 例, 平均值为 50.7 ng/ml, 实测范围为 13.0—160.4ng/ml; 女性 41 例, 平均值为 41.0 ng/ml, 实测范围为 6.1—160.7ng/ml.

2.4.2 异常值 缺铁性贫血 10 例, 平均

值为  $7.2 \pm 3.9$  ng/ml ( $\bar{x} \pm SD$ ), 实测范围为 3.7—13.2 ng/ml. 白血病 5 例, 测定值分别为 204.0, 481.0, 5064.0, 422.9 和 375.6ng/ml, 明显高于正常值.

2.5 TrIFMA 测定值与 RIA<sup>[3]</sup> 测定值相关性比较

30 例血清样品分别用 TrIFMA 和 RIA 分析铁蛋白含量, 结果表明两种方法所测得的结果有良好的相关关系:  $y = 0.049 + 1.002x$ ,  $r = 0.986$  (图 6).

2.6 TrIFMA 和 Tr-ABS-IFMA 相关性比较

用 TrIFMA 及 Tr-ABS-IFMA 分别测定 20 份血清铁蛋白含量, 两种方法测定值经数理统计, 得出方程  $y = 1.063x - 1.892$ ,  $r = 0.987$  ( $n = 20$ ),  $P < 0.01$ , 相关性好.

2.7 标记抗体的保存时间

铁蛋白标记物在有保护剂,  $-20^{\circ}\text{C}$  下观察至第 6 个月. 用保存 6 个月的标记物再次测量同一血清样品, 两次结果基本一致. 结果经成对数据  $t$  检验, 表明无差别(表 4).

表 4 用不同保存时间的 Eu · IgG 测定的人血清铁蛋白浓度

标记物存放时间(月)	Ferritin, ng/ml ( $n = 12$ )											
	0	7.1	9.8	3.7	19.0	3.9	111.5	9.2	3.4	9.5	73.1	92.0
6	6.5	8.8	3.2	18.4	5.2	103.4	11.4	3.2	14.0	64.5	100.8	6.9

$P > 0.05$

3. 讨 论

本文建立了人血清铁蛋白的时间分辨免疫荧光分析. 与相应的放射免疫分析比较: a 测定值相关性良好; b 灵敏度高于相应的 RIA (目

前国内 RIA 的灵敏度为 5ng/ml 或略高); c 可测范围: Ferritin-TrIFMA 可测范围 (5—1500 ng/ml) 比 RIA 可测范围 (5—320 ng/ml) 宽; d 各种质量控制指标均符合要求; e 方法的正常值范围和正常值下限值与已应用

表 5 RIA 法与 TrIFMA 法的人血清铁蛋白正常值

方 法	组 别	测定例数	铁蛋白 $\bar{x} \pm SD$	ng/ml 测定值范围
汪月增 <sup>[4]</sup> (RIA)	城市: 男性(18—73岁)	100	104.3 ± 5.8	19.0—295.0
	女性(18—49岁)	99	30.5 ± 1.7	4.4—88.0
	农村: 男性(20—45岁)	30	25.6 ± 4.0	4.8—120.0
	女性(20—43岁)	24	20.2 ± 1.9	5.8—42.0
本法 TrIFMA	男性	55	50.7	13.0—160.4
	女性	41	41.0	6.1—160.7

的 RIA 分析结果是相吻合的(表 5)。

Tr-ABS-IFMA 作为一种补充方法, 其中 Eu-cDTPA-Avidin 为通用标记物, 对于方法的普及是有一定意义的。

TrFIA 使用非同位素标记物, 标记方法简便快速。标记物在一定条件下, 观察 Eu · IgG 至少可存放 6 个月, 保留了原有的生物活性和荧光强度。测量速度快, 每测一个样品只需 1s。

总之, TrFIA 优点很多, 如能解决仪器的国产化, 这是一项很有发展前景的免疫分析技术。

### 参 考 文 献

- 1 Lipschitz D A *et al.* *The New England J of Med.* 1974; 290 (22): 1214
- 2 Walters G D *et al.* *J clin path.* 1973; 26: 770
- 3 军事医学科学院放射医学研究所免疫室铁蛋白放免试剂盒
- 4 汪月增等, 中国人民解放军军医进修学院学报, 1981; 2(2): 172

## 一种工程二硫键设计的计算机辅助程序\*

邓巧临 来鲁华 徐筱杰

(北京大学化学系物理化学研究所, 北京 100871)

### 摘 要

通过理论预测蛋白质中潜在的合理突变位点是蛋白质分子设计的一个重要方面。根据目前已知晶体结构的二硫键的立体化学规律, 从空间几何关系出发, 编制了辅助工程二硫键引入的程序, 并对 150 个已知结构的二硫键进行检验, 取得了令人满意的结果。

**关键词** 计算机辅助设计, 工程二硫键, 立体化学, 蛋白质工程

二硫键是蛋白质中广泛存在着的一类共价连接, 它对于稳定蛋白质的结构、使其保持正确的构象起重要的作用。通过定点突变技术在天然蛋白质中引入工程二硫键, 改善蛋白质的性能, 例如提高酶的热稳定性, 已成为目前蛋白质工程中一个十分活跃的领域<sup>[1]</sup>。人们就此已经进行了一些有益的尝试, 例如对枯草杆菌蛋白酶, T4 溶菌酶等引入工程二硫键, 取得了一些成功的例子, 但也留下了不少失败的记录。如何在实验之前筛选可能的或是较好的突变位点, 已成为分子设计中的一个令人关注的问题。

目前, 已获得了四百多个蛋白质的晶体结构数据, 其中对于二硫键的结构进行统计分析得到了不少立体化学上的规律。根据这些规律, 利用计算机模拟来确定合理的突变位点已成为可能<sup>[2-4]</sup>。

### 1 方法和程序

二硫键的几何关系如图 1 所示。

程序的计算过程为: 首先输入原子坐标, 通过几何方法产生 S 原子位置, 然后对二硫键分级, 并检验合理性。

程序需要输入蛋白质的 C<sub>α</sub> 和 C<sub>β</sub> 坐标, 坐标可以从蛋白质晶体结构数据库 (PDB) 中获得。对于甘氨酸, 由于 β 位的氢原子坐标无法从 X 射线晶体结构中得到, 需要通过 C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub>

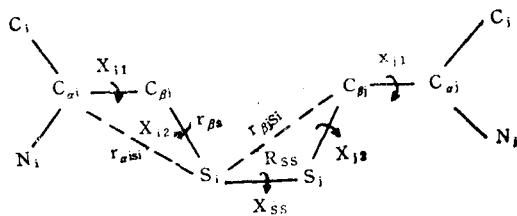


图 1 二硫键几何关系

N 原子位置, 根据几何关系确定引入 C<sub>β</sub> 的位置<sup>[5]</sup>。

对于已知蛋白质中的二硫键的立体化学分

\* “863”蛋白质工程资助项目。

收稿日期: 1991-07-22 修回日期: 1991-10-16