

of the assay is 0.02 $\mu\text{g/L}$. The standard curve is linear from 0.02 $\mu\text{g/L}$ to 400 $\mu\text{g/L}$. The time-resolved immunofluorometric IFN- γ assay is quick, sensitive and suitable for testing large numbers of

samples, and may be useful in both industrial producing and clinical studies.

Key words IFN- γ , Eu³⁺-labeled streptavidin, time-resolved immunofluorometric assay

碱性磷酸酶标记链霉亲和素*

赵启仁 李美佳 刘洁 宋娜玲 庄湘莲 陈艾

(中国医学科学院 放射医学研究所, 天津 300192)
(中国协和医科大学)

摘要 碱性磷酸酶标记链霉亲和素 (AP-SA) 是酶放大时间分辨荧光免疫分析 (EATRFIA) 通用的、最关键的试剂。报告了 AP-SA 的戊二醛二步标记方法。用自行研制的荧光发展溶液和 AP 的底物 5-氟水杨酸磷酸酯测定了标记物 AP-SA 的特性, AP 的标记回收率为 38.7%; AP-SA 稀释 200~12 800 倍时, 稀释倍数和 T_b 的信/噪比呈线性关系; 至少在两个月内, AP-SA 的酶活性是稳定的。

关键词 酶放大时间分辨荧光免疫分析, 碱性磷酸酶, 链霉亲和素

学科分类号 R371-33

酶放大时间分辨荧光免疫分析法 (enzyme-amplified time-resolved fluoroimmunoassay, EATRFIA) 是时间分辨荧光免疫分析的一种最新的分析方法。它把生物素-亲和素系统的高亲和力和生物放大作用、镧系元素螯合物的固有优点 (Stokes 位移大、荧光寿命长和窄发射峰等) 以及时间分辨和波长分辨测量技术集于一体, 成为一种灵敏、精密、快速和不用放射性核素的全新的免疫分析方法^[1-3]。基本原理如下: 抗原 (标准或样品) 与固相单克隆抗体₁ (McAb₁) 和生物素化 McAb₂ 同时反应, 洗涤, 再与碱性磷酸酶标记链霉亲和素 (AP-SA) 反应, 洗涤, 这时经 SA 与生物素连接, 形成了最终的免疫反应复合物。再加入 AP 的底物 5-氟水杨酸磷酸酯 (5-FSAP), 生成产物 5-氟水杨酸 (5-FSA)。最后加入 EDTA-Tb (铽) 高 pH 溶液, 生成荧光寿命长、荧光产额高的 5-FSA: EDTA: Tb 三元复合物^[4]。测荧光强度可确定抗原的量。

标记物 AP-SA 是 EATRFIA 中的最关键的通用试剂。本文报告了 AP-SA 的制备方法及其特性的测定。

1 材料和方法

1.1 材料

5-FSAP 和荧光发展溶液: 本所研制合成^[5,6]。

Tb₄O₇: 上海跃龙有色金属公司。碱性磷酸酶 (AP) 和链霉亲和素 (SA): 均为 Sigma 公司产品。戊二醛: 25%~28%, 上海化学试剂采供站。12 孔微滴定板条: 芬兰 Labsystem 公司出品。

1.2 仪器

LKB-wallac Arcus-1230 时间分辨荧光仪。LKB-1296-001 板振荡器。ADIL 公司自动微滴定板洗涤器。Olivetti M₂₄₀ 微机及 LKB 1230-308 FIACAL 软件。

1.3 AP 标记 SA

用戊二醛二步法。称 2.5 mg AP (50 IU/mg), 加入 0.2 ml 含 1.25% 戊二醛的 0.1 mol/L PB (pH 6.8) 中, 混匀, 置室温 (22℃) 下, 反应过夜。4℃ 下, 电磁搅动, 把反应液对 0.05 mol/L PBS (pH 7.2) 透析 12 h, 换透析液 4 次。把 1.5 mg SA 溶于 0.1 ml 1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5), 然后把上述反应液加入, 混匀, 4℃ 下反应 24 h。加入 10 μl 0.2 mol/L 赖氨酸溶液, 混匀, 22℃ 下, 反应 2 h。在 4℃ 下, 电磁搅动, 把反应液对 0.05 mol/L PBS (pH 7.2) 透析过夜, 其间换透析液 4 次。把反应液离心 (4 000 r/min, 15 min)。上清液用 AP-SA 的稀释缓冲液 (见下)

* 国家自然科学基金资助课题 (39770216)。

收稿日期: 1998-05-05, 修回日期: 1998-08-24

稀释 10 倍, 以加入载体蛋白和防腐剂, 分成小管, -20℃下保存备用. 这就是 AP-SA 储备液.

1.4 标记物 AP-SA 的特性试验

1.4.1 溶液制备

AP-SA 的稀释缓冲液: 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), 每升含 6 g BSA 和 0.5 g NaN₃.

AP-SA 不同浓度系列的制备: 用 AP-SA 的稀释缓冲液把 AP-SA 储备液按 200、400、1 600、3 200、6 400 和 12 800 倍 (含制备储备液时稀释的 10 倍) 系列稀释, 制成 AP-SA 不同浓度系列.

底物缓冲液: 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0), 每升含 0.1 mol NaCl 和 1×10^{-3} mol MgCl₂.

5-FSAP 工作液: 把 5-FSAP 溶于 0.1 mol/L NaOH 液中, 制成 1×10^{-2} mol/L 5-FSAP 储备液. 用前用底物缓冲液把储备液稀释 10 倍, 得 1×10^{-3} mol/L 5-FSAP 工作液.

AP 不同浓度系列标准: 用 AP-SA 的稀释缓冲液把 AP 稀释成 5.0×10^{-3} ~ 3.0 IU/ml 标准.

荧光发展溶液制备分二步: 第一步制得 5×10^{-3} mol/L Tb-EDTA 的 1×10^{-2} mol/L HCl 溶液. 第二步, 用前按 5×10^{-3} mol/L Tb-EDTA 的 0.01 mol/L HCl: 2.5 mol/L Tris: 0.05 mol/L NaOH (体积比为 1:1:3), 制成 1×10^{-3} mol/L Tb-EDTA 的 0.5 mol/L Tris 的荧光发展溶液.

1.4.2 制备 AP-SA 时 AP 的回收率

每孔加入不同浓度 AP (5×10^{-3} ~ 3.0 IU/ml) 标准 20 μl (本底孔加入 20 μl AP-SA 的稀释缓冲液), 每个浓度均为平行双孔. 每孔加入 100 μl 5-FSAP 工作液. 室温下, 振荡反应 20 min. 每孔再加入荧光发展溶液 100 μl, 振荡 1 min, 静置 10 min 后测荧光强度, 由样品的计数率 (CPS) 对本底孔计数率 (CPS) 之比求出信噪比. AP 浓度对相应信噪比作图, 得 AP 标准曲线.

每孔加入分别稀释 50、100 和 400 倍的 AP-SA 样品 20 μl, 均为平行双孔. 以下操作全同上. 求出样品的信噪比, 由 AP 的标准曲线, 查得 AP-SA 中的 AP 浓度, 经浓度换算后, 求出制备 AP-SA 时 AP 的回收率.

1.4.3 标记物 AP-SA 的稀释线性

每孔加入不同稀释倍数 (200~ 12 800 倍) 的 AP-SA 20 μl (本底孔加入 20 μl AP-SA 的稀释缓冲液), 每个浓度均为平行双孔. 以下操作与 1.4.2 相同. 由 AP-SA 的稀释倍数对相应信噪比作图,

得 AP-SA 的稀释线性.

1.4.4 标记物 AP-SA 的酶活性的稳定性试验

在标记物 AP-SA 制成后的不同时间, 用 1.4.3 的方法测定其稀释线性. 观察标记物的酶活性的稳定性.

2 结果与讨论

2.1 AP 的标准曲线

图 1 给出 AP 的标准曲线. 图 1 中示出, 信噪比随 AP 浓度的增加而增加, 在近 3 个数量级范围内, 线性良好.

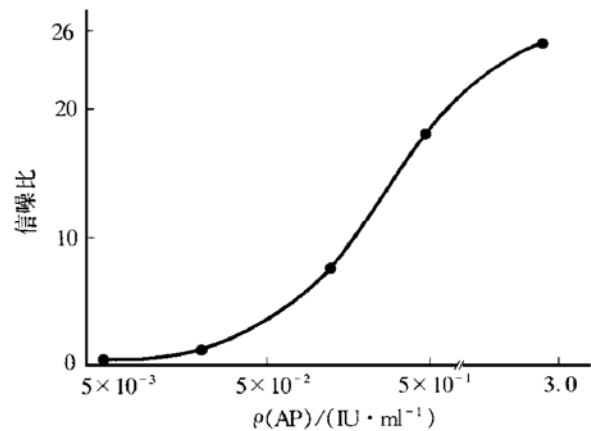


图 1 AP 的标准曲线

2.2 制备 AP-SA 时 AP 的回收率

结果见表 1. 可见, 对于稀释 50、100 和 400 倍的 3 个样品, 测得的标记上的 AP 很接近, 平均为 48.33 IU, 占投入的 125 IU 的 38.7%.

表 1 AP 的回收率

AP-SA 稀释倍数	标记上的 AP/IU	回收率/%
50	47.25	37.8
100	45.75	36.6
400	52.00	41.6
平均	48.33	38.7

2.3 标记物 AP-SA 的稀释线性

结果示于图 2. 图 2 中示出标记物 AP-SA 原液经 200~ 12 800 倍稀释, 其信噪比与稀释倍数成良好线性关系. 而且曲线还未出现饱和趋势.

2.4 标记物 AP-SA 的酶活性的稳定性

结果由表 2 示出. AP-SA 是 1996-05-23 制备的. 可见, 标记物 AP-SA 的酶活性至少在 2 个月内是稳定的. 但是到第 6 个月, 就明显下降.

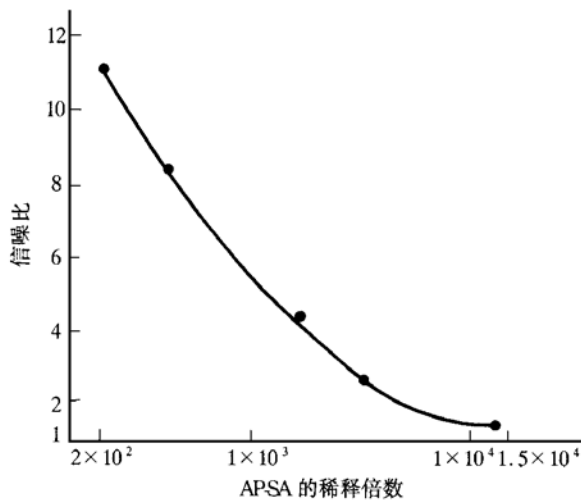


图2 AP-SA 的稀释线性

表2 AP-SA 的信噪比的稳定性

测量日期	AP-SA 的稀释倍数				
	4000	2000	400	100	50
1996-05-27	2.16	2.42	6.76	15.30	20.59
1996-07-24	1.19	2.63	8.19	11.79	14.87
1996-11-06	-	1.55	3.08	6.71	8.90

本文用戊二醛二步法, 用 AP 标记 SA. 先以戊二醛处理 AP, 形成 AP 与戊二醛结合物, 经透析除去过量戊二醛. 第二步, 活化的 AP 与 SA 上的游离氨基作用. 本法质量均一, 活性高. 本法比文献报道一步法的活性至少高 10 倍. 本文报道的研究内容, 国内未见报道.

参 考 文 献

- 赵启仁 (Zhao Q R). 时间分辨荧光免疫分析及其应用前景. 国外医学放射医学核医学分册 (Foreign Medical Sciences, Radiation Medicine and Nuclear Medicine), 1992, **16** (4): 182 ~ 188
- Diamandis E P, Kitching R, Christopoulos T K. Enzyme amplified time-resolved fluoroimmunoassays. Clin Chem, 1991, **37** (6): 1038
- Bobrow N M, Harris T D, Shaughnessy K J, et al. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Method, 1989, **125** (1/2): 279~ 285
- Evangelista R A, Pollak A, Gudgir-Templeton E F. Enzyme amplified lanthanide luminescence for enzyme detection in bioanalytical assays. Anal Biochem, 1991, **197** (1) 213~ 224
- 李美佳, 赵启仁, 庄湘莲, 等 (Li M J, Zhao Q R, Zhuang X L, et al.). 酶放大时间分辨荧光免疫分析酶底物试剂 5-氟水杨酸磷酸酯的研制. 中国医学科学院学报 (Acta Academiae Medicinae Sinicae), 1997, **19** (2): 106
- 赵启仁, 李美佳, 刘洁, 等 (Zhao Q R, Li M J, Liu J, et al.). 酶放大镧系元素发光法测定碱性磷酸酶. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1998, **25** (1): 71~ 74

Study of Alkaline Phosphatase-labelled Streptavidin.

ZHAO Qi-Ren, LI Mei-Jia, LIU Jie, SONG Na-Ling, ZHUANG Xiang-Lian, CHEN Ai (Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China).

Abstract Alkaline phosphatase (AP)-labelled streptavidin (SA) is the most important general reagent in enzyme-amplified time-resolved fluoroimmunoassay. A two step method of AP-labelled SA using glutaraldehyde was described. Characteristics of the labelled product AP-SA were measured using the self prepared fluorescence developing solution and the substrate 5-fluorosalicyl phosphate. The labelled recovery of AP is 38.7%. The relationship between diluting times of the AP-SA and signal/noise ratio of Tb³⁺ is linear when diluting the AP-SA 200~ 12 800-fold. Enzyme activity of the AP-SA is stable during two months at least.

Key words enzyme-amplified time-resolved fluoroimmunoassay, alkaline phosphatase, streptavidin

一种 SDS-PAGE 与 MALDI-TOF 质谱联用的方法*

潘晓宇 赵晖 胡美浩¹⁾

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 以尿激酶原为材料, 探索一种从 SDS-PAGE 胶上回收蛋白质做 MALDI-TOF 质谱的方法. 所用的回收方

* 北京大学与美国惠普公司实验室合作项目资助.

¹⁾ 通讯联系人. 收稿日期: 1998-05-12, 修回日期: 1998-11-06