

man SCF (rh SCF) expressed in *E. coli*. By McAb affinity chromatography which prepared by combining an anti-SCF McAb with NCR-Sepharose 4B was performed. At optimum conditions, the purity of rhSCF obtained

was higher than 95%. The biological activity also increased apparently.

Key words McAb affinity chromatography, purification, rhSCF

人肌型特异烯醇化酶放免分析法及初步应用

陈泮藻 金道山* 王录焕 王士雯* 郝秀华 高宇红* 李振甲 韩志涛*

(解放军总医院临床医学基础研究所, 北京 100853)

摘要 建立了人肌型特异烯醇化酶(hMSE)的放免分析法, 抗血清的亲合常数为 $5.1 \times 10^9 \text{ L/mol}$, 采用改良的 BHR 法制备了 ^{125}I -hMSE, 后者非特异结合率为 3%, 与抗血清 ($1:10^3$) 结合率达 50.16%。批内和批间 CV 分别为 8.6% 和 13%。回收率为 95%—105%。标准曲线范围为 5—320 $\mu\text{g/L}$ 。最小检出率为 5 $\mu\text{g/L}$ 。最佳反应条件: 0.1 mol/L pH7.4 PBS (含 5 mmol/L MgSO_4 , 0.1% 吐温-20, 0.1% NaN_3); 反应温度和时间: 37°C 反应 0.5 h 和 4°C, 0.5 h, 作为快速测定; 或选用 4°C 反应 24 h。65 例健康人血清 hMSE 浓度为 $23.9 \pm 10.9 \mu\text{g/L}$ ($\bar{x} \pm s$)。hMSE 超过 57 $\mu\text{g/L}$ ($\bar{x} + 3s$), 为阳性值。测定了 AMI 和肌病患者, 血清 hMSE 明显升高。

关键词 肌型特异烯醇化酶, 急性心肌梗塞, 肌病, 放射免疫分析法

人肌型特异烯醇化酶(hMSE)对急性心肌梗塞(AMI)诊断具有高特异性, 并对病情监视和预报复发有重要临床意义, 深受从事心血管研究的工作者的关注。检测血清 hMSE 的放射免疫分析法(RIA)具有特异性强、灵敏度高及超微量测定等优点。本文介绍了 hMSE 的 RIA 和其初步应用。

1 材料和方法

1.1 试剂

Bolton-Hunter 试剂: 购于 Sigma 公司。 Na^{125}I : 中国原子能研究院产品, 放射性强度 5.55 GBq/ml, 完全(或不完全)福氏佐剂: 购于 Life Technologies 公司。0.1 mol/L, pH7.4 磷酸盐缓冲液 PBS (含 5 mmol/L MgSO_4 , 0.5% NaCl, 0.1% NaN_3 , 0.1% BSA, 0.1% 吐温-20)。hMSE 标准浓度配制: 5、10、20、40、

80、160、320 $\mu\text{g/L}$ 。PR 分离剂: 将二抗: 正兔血清: 聚乙二醇: 水, 按 3.0: 0.6: 20: 60 体积配制。

1.2 仪器

UV250 型紫外分光光度计(日本)。HH6003型Gamma计数器, 电泳仪(北京六一仪器厂)。SCR20AB型高速冷冻离心机(日本)。

1.3 方法

1.3.1 人肌型烯醇化酶提取、纯化鉴定 取死亡 5 h 后人肌肉匀浆, 上清液于 55°C 加热处理, 经滤膜超滤得的粗酶制品。再经 CM-Sephadex、DEAE-Sephadex 和 Sephadex G100 柱层析, 获得比活性为 162.1 U/mg, 纯度高达 15.6 倍的纯化烯醇化酶。再经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 显示单一蛋白区带, 亚基分子

*解放军总医院老年病研究所。

收稿日期: 1994-04-06, 修回日期: 1994-07-10

量为 42 000. 该酶对 2-磷酸甘油酸的 K_m 值为 0.65mmol/L 时, 酶的活性最高. 酶保存在 50% 甘油中, 4℃ 存放 5 个月活性没有下降.

1.3.2 兔抗人肌型烯醇化酶抗体的制备 免疫前一周, 兔双侧腹股沟注射 10mg 卡介苗. 取 1.0mg hMSE 与 3.5ml 福氏佐剂混合, 制成乳剂, 于背部皮下多点免疫. 二周后, 用不完全佐剂和剂量减半免疫原、免疫增强剂 (1ml/只) 加强. 随后每月加强一次. 第 6 次免疫后 10d 放血, 收集抗血清, 分装 -70℃ 保存.

1.3.3 人肌型烯醇化酶¹²⁵I 标记品制备 取 20μl 含 20μg BHR 的 CH₂Cl₂ 于玻璃瓶底部, 吹干, 加入 25—30MBq 的 Na¹²⁵I, 及新配制的 50μg 氯胺 T, 立即混匀, 反应 40s, 加入 100μg Na₂S₂O₅ 及 200μg KI, 终止反应. 再加入 5μl 二甲基甲酰胺和 200μl 苯, 反复混匀. 抽提上层苯转入另一玻璃管, 吹干. 再加入 20μg hMSE 及 20μl 0.1mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 PB (含 0.05mol/L MgSO₄ 及 0.25% 明胶), 冰浴中搅拌反应 10—15 min, 加入 500μl 0.2mol/L 甘氨酸终止反应. 取出加入预先平衡的 Sephadex G-25 层析柱, 用 0.1mol/L pH 7.4 PB 淋洗, 收集洗脱液, 测量放射性强度. 收集 ¹²⁵I-hMSE 峰.

1.3.4 人肌型烯醇化酶放免分析法 hMSE 放免分析法按液相平衡竞争法进行, 具体操作程序见表 1.

表 1 hMSE-RIA 操作程序

	NSB	标准曲线		U
		S ₀	S ₁₋₇	
0.1mol/L PBS	200	100	—	—
标准液	—	—	100	—
血清样品	—	—	—	100
¹²⁵ I-MSE	100	100	100	100
抗血清	—	100	100	100
混匀后, 37℃ 0.5h, 4℃ 0.5h (或者 4℃ 24h).				
PR 分离剂	500	500	500	500

混匀, 4℃ 30min, 3500r/min 离心 15min, 吸去上清, 用 γ 计数器测沉淀放射性强度.

结果计算: B/B_0 (%) 与浓度对数按 4 参数公式进行拟合. 标准曲线绘制和样品浓度直接由 HH6003 型 Gamma 计数器 RIA 程序打出结果.

标本采集: 空腹采集肘静脉血 2.0ml, 分离血清, -20℃ 保存.

2 结果与讨论

2.1 抗血清质量鉴定

将人肌肉提取纯化的 hMSE 与佐剂乳化, 免疫家兔, 成功地制备了抗血清, 其 1:1000 稀释度的抗血清与 ¹²⁵I-hMSE 结合率 (B_0/T) 达 50.1%. 用不同倍数稀释的抗血清制作抗血清滴度曲线见图 1.

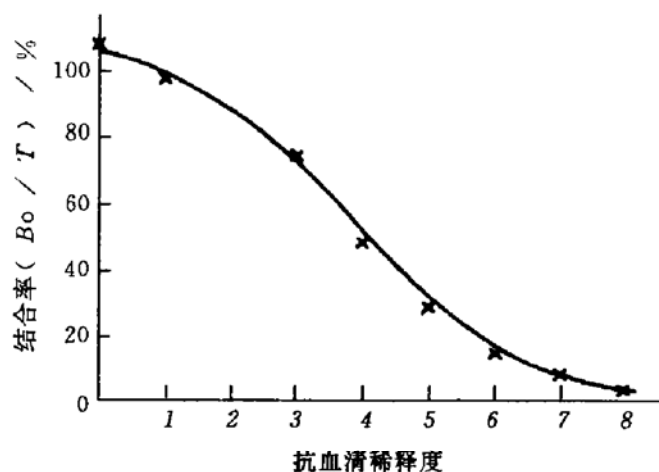


图 1 hMSE 抗血清滴度曲线

1 为 1:100; 2 为 1:200; 3 为 1:400; 4 为 1:800; 5 为 1:1600; 6 为 1:3200; 7 为 1:6400; 8 为 1:25400.

抗血清与肌红蛋白 (Mb)^[1]、免疫球蛋白 (IgG)、神经烯醇化酶 (NSE)^[2]、白蛋白 (A1) 等结构类似物均无交叉反应.

用简化公式计算抗体的亲和常数 K 值为 5.06×10^9 L/mol. 表明抗血清具有高度专一性.

2.2 ¹²⁵I 标记 hMSE 质量鉴定

hMSE 分子中含有供标记的酪氨酸残基极少, 采用常规氯胺 T 法, 制备 ¹²⁵I-hMSE 难以实现. 我们改用 3 (4-羟苯)-丙酸-N 羟基琥珀

酰亚胺脂(BHR)试剂碘化法,制备 ^{125}I -hMSE,经G25柱层析纯化,淋洗曲线和 ^{125}I -hMSE免疫活性关系见图2.建立了放射性配位体的标记法,非特异结合率(NSB)为3%,最高结合率(B_0)达50%,建立了hMSE-RIA.

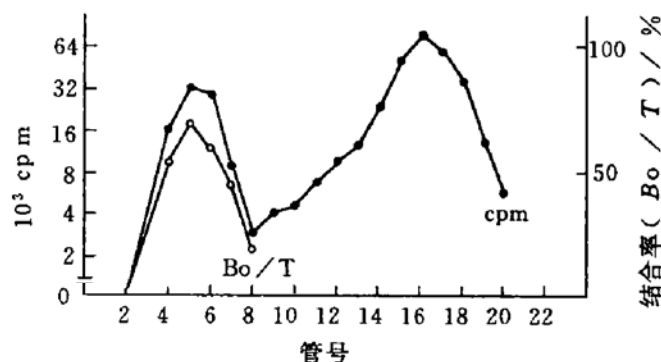


图2 ^{125}I -hMSE 脱洗曲线

2.3 标准曲线绘制

用本法测定的hMSE标准曲线的范围为5—320 $\mu\text{g/L}$,最小检测值为5 $\mu\text{g/L}$,hMSE标准抑制曲线见图3.

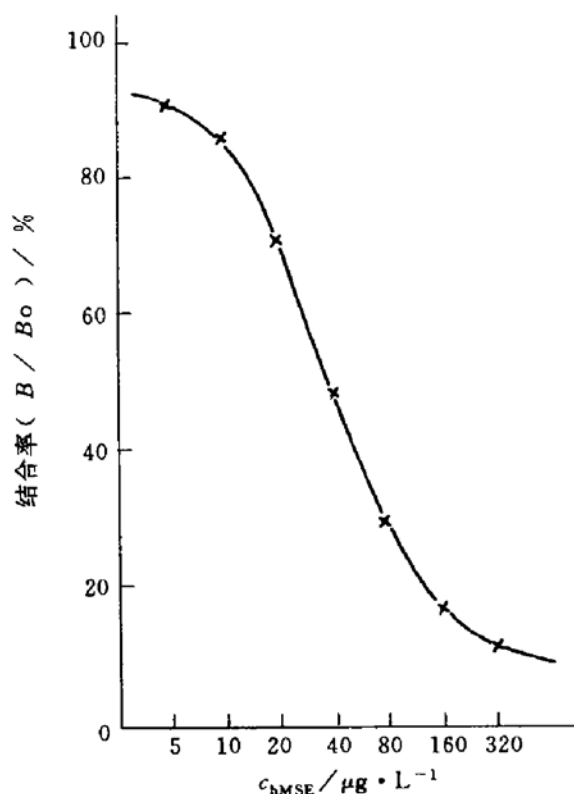


图3 hMSE 标准浓度抑制曲线

和0.15mol/L磷酸盐缓冲液(含0.1% BSA, 0.1% NaN_3)进行实验,结果表明第一种缓冲体系(NSB为2.8%, B_0 为50%)比第二种(NSB为5%, B_0 为25.4%)为佳,选用第一种缓冲体系.

2.4.2 反应温度与时间选择 采用4种反应温度与时间进行实验,结果表明37 $^{\circ}\text{C}$ 反应0.5h,4 $^{\circ}\text{C}$ 再反应0.5h(NSB为3%, B_0 为37%)比37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1h,4 $^{\circ}\text{C}$ 再反应0.5h(NSB为2.3%, B_0 为27.3%)更好;4 $^{\circ}\text{C}$ 反应24h(NSB为1.4%, B_0 为44.8%)比37 $^{\circ}\text{C}$ 反应4h,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应10h(NSB为2.3%, B_0 为29.8%)更好,因此37 $^{\circ}\text{C}$ 反应0.5h,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应0.5h,作为快速测定条件.也可以采用4 $^{\circ}\text{C}$ 反应24h的测定条件.

2.5 方法学鉴定

2.5.1 精密度 批内 $\text{CV} < 8.6\%$ ($n=10$);批间 CV 为13% ($n=5$).

2.5.2 回收率 分别在95%—106%.

2.6 正常值

65例健康人,年龄20—65岁,血清hMSE浓度为 $23.9 \pm 10.9 \mu\text{g/L}$ ($\bar{x} \pm s$),范围6—38.9 $\mu\text{g/L}$,落在标准曲线直线部位,男性hMSE为 $24.8 \pm 16.6 \mu\text{g/L}$,而女性为 $23.6 \pm 11.1 \mu\text{g/L}$,男女性别无明显差别.推荐以正常参考值的99%可信限,即57 $\mu\text{g/L}$ 作为诊断AMI和肌病的阳性值.

2.7 急性心肌梗塞和肌病患者血清hMSE浓度

测定了10例AMI患者血清hMSE浓度为 $273.9 \pm 206.7 \mu\text{g/L}$,表明AMI患者血清hMSE明显高于健康人组($P < 0.01$).并同时测定血清肌酸激酶(CK)和Mb,实验结果表明hMSE增加与CK、Mb浓度升高是同步的.血清hMSE与CK呈高度相关, $r = 0.878$.与Mb相关性良好, $r = 0.619$,均高于文献报道^[3].AMI是一种危及中、老年人生命的疾病,早期快速诊断,能为该病治疗赢得时间.测定30例肌病患者,血清hMSE浓度为 $249.4 \pm 203.1 \mu\text{g/L}$,也高于正常值.因此用RIA观察

2.4 最佳反应条件

2.4.1 缓冲体系 用0.1mol/L pH 7.4 PBS

血清 hMSE 浓度变化, 可作为 AMI 和肌病诊断指标。

2.8 hMSE 主要分布于心肌和骨骼肌中, 是一种糖酵解酶, 由二个相同分子量的 β -亚基组成的, 又称为 β -烯醇化酶, 分子量为 88 000. 是肌细胞损伤的特异生化指标. 1975 年 Herraez-Dominguez 等^[4]首先用 hMSE 的抗血清, 检测 AMI、缺血性心脏疾病、心律失常、急性心衰等患者 hMSE, 发现 AMI 患者 hMSE 浓度明显升高, 而其他心脏病患者 hMSE 则不升高. 1987 年 Normura 等^[5]建立了固相酶免疫分析法, 测定 AMI、心绞痛、充血性心衰和特发性心肌病等患者的 hMSE 水平, 也发现 AMI 患者 hMSE 升高, 而其他相关心血管病患者, 则不升高. 并观察 AMI 发作后 12—14h, 血清 hMSE 升至峰值, 随病情恢复逐渐下降. 其上升和下降速度都快于 CK. 尤其对 CK 不高的患者, 更为明显.

我们在国内首先建立了 hMSE-RIA, 灵敏度 $5\mu\text{g/L}$, 标准曲线范围为 5—320 $\mu\text{g/L}$. 以 $57\mu\text{g/L}$ 作为诊断 AMI 和肌病的阳性值. 上述结果表明, 用 hMSE-RIA 可作为 AMI 和肌病特异性诊断指标.

参 考 文 献

- 1 Miyoshi K, Saito S, Kawai H *et al.* J Lab Clin Med, 1978; **92**: 341
- 2 Cunningham R T, Johnston C F, Irvine G B *et al.* Clin Chim Acta, 1990; **189**: 275
- 3 Kato K, Okagawa Y, Suzuki F *et al.* Clin Chim Acta, 1983; **131**: 75
- 4 Herraez Dominguez M V, Goldberg D M, Greaves M *et al.* Clin Chim Acta, 1975; **64**: 301
- 5 Normura M, Kato K, Nagasaka A *et al.* Br Heart J, 1987; **58**: 29

Radioimmunoassay of Human Muscle Specific Enolase and Its Application. Chen Panzao, Jin Daoshan, Wang Luhuan, Wang Shiwen, Hao Xiuhua, Gao Yuhong, Li Zhenjia, Han Zhitao (*Institute of Basic Medical Research of PLA General Hospital, Beijing 100853, China*).

Abstract Human muscle specific enolase (hMSE) plays an important role in the diagnosis of acute myomuscle infarction and muscular diseases. A hMSE RIA is developed. An affinity coefficient of antiserum is 5.1×10^9 . ^{125}I -hMSE as the tracer is prepared using improved BHR method and its binding rate with antiserum (1 : 1000) is up to 50.16%. The variable coefficients of intra and inter-assay are 8.6% and 13%, respectively. The recovery rate is 95%—105%. The standards range from 5 to 320 $\mu\text{g/L}$ and the minimum detectable value is 5 $\mu\text{g/L}$. In the assay there is an optimal reaction condition: 0.1mol/L pH7.4 PBS (5mmol/L MgSO_4 , 0.1% BSA, 0.1% Tween-20, 0.1% NaN_3 , 0.5% NaCl); and incubation temperature and times: 37°C, 0.5h and 4°C, 0.5h (as rapid measurement) or 4°C 24h. On the basis of 65 healthy control, the hMSE levels are $23.9 \pm 10.9\mu\text{g/L}$ ($\bar{x} \pm s$). A positive value is higher than $57\mu\text{g/L}$. The hMSE levels are significantly increased in the patients with both acute myocardial infarction and muscular diseases.

Key words muscle specific enolase, acute myocardial infarction, muscular diseases, radioimmunoassay