

β_2 微球蛋白的固相放免测定

陈 泮 藻 李 振 甲

(解放军总医院中心实验室生化室, 北京)

β_2 微球蛋白 (β_2 mG) 放射免疫测定方法已成为临床肾功能测定, 预测肾移植成活的一种较可靠的灵敏指标。此法对某些肿瘤、免疫系统疾病、肝脏病诊断也有一定实用价值, 因此在临床和科研中的应用日益广泛。固相放免分析法在国外已经成为很有前途的分析手段, 有相当一部分检测 RIA 药盒由液相改为固相。本文将 β_2 mG 固相测定和初步结果作一介绍。

一、固相抗体包被

利用国产塑料小珠, 经简单处理后, 将它浸泡于 $1:10^3$ 稀释度的 β_2 mG 抗体 IgG 中, 室温放置一天, 4°C 再放置 2 天; 用 PB 缓冲液洗去小珠上多余的抗体。接着用含 BSA 的 PB 再饱和小珠 1—2 天。临用前, 洗出小珠, 用吸水纸吸干。

二、操作步骤

取 0.1ml 标准 β_2 mG 或待测样品于小玻璃

作, 灵敏度高, 所需的设备只是最普通的比色计或可见分光光度计。荧光法、特别是水解后的荧光测定, 是上述方法中灵敏度最高的, 可适用于极微量的样品测定, 但操作比较复杂。上述几种方法, 对不同的蛋白样品反应强度各不相同, 因此最好用标定的样品蛋白制定标准曲线, 或是先用 280/205nm 紫外吸收法推算出该样品的绝对量, 并以此做为基准来制定标准曲线。如果所需要的仅是相对量, 则可以定一种蛋白做为参比标准, 结果也很稳定。

现将五种方法的主要优缺点归结成表 2。将表 2 与图 1 结合使用, 就能选择出测定某一

管中, 加 $100\mu\text{l}^{125}\text{I}-\beta_2\text{mG}$ (比度 $30\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), 充分混匀后, 再向每只小管加入小珠一枚, 轻轻摇动(注意赶走气泡)于 37°C 水浴中温育 2 小时; 4°C 温育 60 小时。用 PB (或蒸馏水) 洗小珠三次。用 γ -计数器直接测小珠的 cpm 数, 以 $B_0\%$ —标准浓度绘制标准曲线。

三、结 果

1. 非特异结合率很低: 先后测定 6 次非特异管, 它与 $^{125}\text{I}-\beta_2\text{mG}$ 结合率小于 2% (比用 PEG 作分离剂要低得多)。故固相 RIA 可以省去非特异管。

2. 八条标准曲线统计结果(表 1) 表明曲线重复性较好。方法灵敏度小于 2.5ng/ml 。

一个月内先后测定 6 次包被小珠的最高结合率, 结果为 44—41.5%, 表明最高结合率相当稳定。

3. 测定方法批内和批间变异系数

测定四个不同浓度 ($2.05—4.4\text{ng/ml}$) 的

蛋白质所应采用的方法。

参 考 文 献

- [1] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [2] Peterson, G. L.: *Methods Enzymol.*, **91**(Part 1); 95, 1984.
- [3] Clark, S.: in "Receptor Biochem. Methodol." Vol. 2, 149—161, 1984.
- [4] Read, S. M. et al.: *Anal. Biochem.*, **116**, 53, 1981.
- [5] Scopes, R. K.: *Anal. Biochem.*, **59**, 277, 1974.
- [6] Viets, J. W. et al.: *Anal. Biochem.*, **88**, 513, 1978.

[本文于 1985 年 11 月 22 日收到]

表 1 $\beta_2\text{mG}$ 标准曲线

标准浓度 (ng/ml)	$\bar{X}(\%)$	SD(%)
2.5	86.9	5.66
5	71.0	4.75
10	52.9	5.67
20	36.7	4.09
40	26.6	2.66
100	16.4	2.66
200	11.7	1.24

$\beta_2\text{mG}$ 各 10 次,批内变异系数为 14—19.7%;测定五个不同浓度 (1.5—9.0ng/ml) 的 $\beta_2\text{mG}$ 各 8 次,批间变异系数为 15.1—18.4%。

4. 58 例血清样品作 1:200 稀释,同时用液相 RIA 法和固相 RIA 法测定血清中 $\beta_2\text{mG}$,结果经统计处理,表明两者之间明显相关,相关系数 $r = 0.932$,直线回归方程 $y = 0.894x - 0.38 (n = 58)$ 。

四、讨 论

1. 本文采用操作简单的物理吸附法,制备固相免疫吸附剂。它主要吸附的是沉降系数为 7S 的免疫球蛋白 (IgG) 分子。

可作为免疫吸附剂的材料有塑料的球或管,葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、纤维素等。本文选用固相材料有国产塑料珠、进口的塑料珠以及绵布、进口的塑料小珠的抗体包被方法与上述介绍的国产珠一样。而棉布抗体包被之前,先经高碘酸处理,再通过洗涤,除去多余的高碘酸。这三种固相材料都分别浸泡于 1:50、1:150、1:450、1:1350、1:4050 稀释度的 $\beta_2\text{mG}$ 抗体中。室温放置一天,4℃ 再放置二天,接着用 0.1M pH7.4 PB 缓冲液洗涤固相材料三次。再与 $^{125}\text{I}-\beta_2\text{mG}$ 于 37℃ 温育 2 小时,室温 60 小时。另外用 1:20 稀释度的正常免血清包被固相材料,作为非特异结合小珠。实验结果表明,以 1:1000 左右的抗体稀释度包被固相小珠最为适宜(见表 2)。这说明当抗体偏浓时,可能由于抗体分子之间相互作用增加,使抗体分子与吸附表面相互作用减少;当抗体过稀时,吸附于固

表 2 不同固相材料对包被的影响

固相材料	B/T(%)		B/B ₀ (%)	
	NSB	S ₀	S ₃ (10ng/ml)	S ₆ (100ng/ml)
国产珠	2.6	46.0	48	18.7
进口珠	3.5	44.9	34.6	12.8
棉 布	15.5	34.3	52.5	28.3

相表面的抗体过少,直接影响抗原抗体的结合。从表 2 可以看出国产珠和进口珠无论是非特异结合率,还是最高结合率都很接近,包被的进口珠比国产珠的 $\beta_2\text{mG}$ 标准曲线上 S₃(10ng/ml) 和 S₆(100ng/ml) 结合率下降较快,表明曲线斜率较大。但考虑到国产固相材料来源方便,因此采用国产珠。棉布由于非特异结合较高,而最高特异性结合较低(仅为 34.3%),而且标准曲线斜率太小,故不宜采用。

2. 抗原与固相抗体反应要达到充分平衡需要较长温育时间(4℃ 60 小时)。本文曾探讨过缩短温育时间的措施,首先改变温育的温度,即 37℃ 连续温育 20 小时,结果表明抗原抗体反应仍未能达到平衡。在配制 $^{125}\text{I}-\beta_2\text{mG}$ 溶液时,加入适量的聚乙二醇,则可以使反应平衡时间缩短,即 37℃ 4 小时,4℃ 过夜。

总之 $\beta_2\text{mG}$ 固相 RIA 测定不必采用离心的方法即可达到分离之目的,操作简单,便于自动化测定。

固相放免分析技术在国外应用日益广泛,近些年发展很快,特别是磁化固相放免测定。且此技术在国内却开展很少。本文探讨 $\beta_2\text{mG}$ 固相 RIA 测定,目的在于促进此项技术的开展和应用。

参 考 文 献

- [1] 陈泮藻等:《生物化学与生物物理进展》,3,76,1985。
- [2] AL-Shawi, L. A. et al.: *Clin. Chem.*, **30**, 38, 1984.
- [3] W. M. Hunier, et al.: *Immunoassays for Clinical Chemistry* (2nd edition), 163—169, 1983.

[本文于 1985 年 10 月 25 日收到]