

centrifugation ultrafiltration for desalting and cold acetone method was used for SDS removal. The result shows that the method is feasible at least for some proteins (e. g. pro-urokinase and bovine serum

albumin).

Key words pro-urokinase, SDS-PAGE, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF)

一种简易的免疫 PCR 方法的建立

徐平西 肖华胜 鞠 躬

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 免疫 PCR 为一种高敏感度检测抗原的新技术, 操作程序大多沿袭 ELISA 方法. 用戊二醛作连接剂, 将蛋白质高效率包被在普通 PCR 管内壁, 使免疫及 PCR 反应用普通 PCR 仪得以在管中连贯地进行. 实验结果表明, 标准曲线的线性关系好, 与 ELISA 方法比较敏感度高出约 10^5 . 这一改良法的建立, 可望促进免疫 PCR 的普及应用.

关键词 免疫 PCR, 包被, 戊二醛, PCR 管

学科分类号 O523

免疫 PCR 由 Sano 等^[1]首创, 本质上是一种以 PCR 代替酶反应来放大显示抗原抗体结合率的改进型 ELISA. 其突出的特点是指数级的扩增效率带来了极高的敏感度, 能检出浓度低至 2 ng/L 的抗原物质^[2], 为现行任何一种免疫定量方法所不及. 然而由于操作技术和设备上的问题, 限制了这一技术在普通实验室中的应用.

目前, 在免疫 PCR 的操作流程中抗原抗体的结合反应操作与 ELISA 相同, 在塑料 ELISA 平板上进行; 而后半程的 PCR 操作则有两种途径: a. 将平板孔内结合的报告 DNA 模板精确地转移至 PCR 管反应体系中, 再插入普通 PCR 仪^[3]; b. 将平板直接置于 PCR 仪中进行扩增反应, 但这需要专用平板 PCR 仪器^[4]. 显然前者繁琐, 后者昂贵. 本文介绍了一种利用普通 PCR 管进行全程操作, 以普通 PCR 仪进行扩增反应的新方法, 并成功地检测了去肾上腺大鼠垂体前叶中 IL-6 的微量变化.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: 牛血清白蛋白组分 V (华美生化试剂公司); 吐温-20、鲑鱼精 DNA (美国 Sigma 公司); 过氧化酶底物 2, 2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸) (ABTS, 加拿大 Sangon 公司); 25% 戊二醛 (美国 Structure probe 公司).

1.1.2 抗原抗体: 牛 S-100 蛋白标准品、小鼠抗

牛 S-100 蛋白 β 亚基单克隆抗体、生物素化羊抗兔 Ig 抗体、链霉卵白素、(HRPO)-酶连卵白素 (美国 Sigma 公司); 小鼠抗人 IL-6 多克隆抗体 (军事医学科学院沈倍奋教授赠送); 兔抗牛 S-100 蛋白多克隆抗体 (美国 DAKO 公司).

1.2 仪器

PCR 扩增仪 PTC-150 (美国 PE 公司); 凝胶成像系统 GDS-8000 (英国 UVP 公司); 超声破碎仪 Soniprep 150 (日本 SANYO 公司).

1.3 方法

1.3.1 样品提取液的制备: 雄性 SD 大鼠 (上海产) 10 只, 体重 (200 ± 20) g. 随机分成两组: 一组为正常对照; 一组为处理组, 行肾上腺切除术, 术后 4 d 取垂体前叶和血清. 将每只垂体样品置于 100 μ l 的 1% Triton X-100 0.05 mol/L PBS (pH 7.4), 匀浆后以 10 kHz 5 s $\times$ 3 超声破碎, 离心 10 000 r/min, 10 min, 取上清紫外分光光度法定量. 稀释提取液使蛋白质浓度达到 1 g/L. 另取血清样品作 1 000 倍稀释备用.

1.3.2 ELISA 夹心法: 参照常规方法^[5]将牛 S-100 蛋白质标准品用稀释液 (PBS 含 1% BSA) 从 1 mg/L 浓度始, 10 倍稀释 7 次, 依次加入孔中进行抗原抗体操作. 显色用 ABTS 为过氧化酶底物, 反应 15 min 终止后在 ELISA 光密度仪上测定 A 值.

1.3.3 免疫 PCR:

a. 引物的合成和生物素化 DNA 模板及连接体的制备. ① 引物: 用 PCR 引物设计软件 (GOLDKEY) 以 pUC19 质粒为模板设计出一对引物, 它们能扩增从第 1 500 至 1 750 位共 250 bp 的 DNA 片段. 将其中一引物 5' 端生物素化. PC1: 生物素-5'-TAG ACT GGA TGG AGG CGG AT-3' (20 bp)、PC2: 5'-GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A-3' (22 bp), 赛百盛公司合成. ② 5' 末端生物素单标的报告 DNA 模板: 用合成好的引物以 pUC19 质粒为模板进行 PCR 扩增, 将产物回收后鉴定、定量. ③ 卵白素-DNA 复合体: 将链霉卵白素与生物素化的模板 DNA 按 1 μ g: 33 pmol 比例迅速混合, 置 4 $^{\circ}$ C 10 h 以上.

b. PCR 管包被: 取洁净 0.5 ml 规格的聚乙烯 PCR 管若干, 每管加入 0.8% 戊二醛溶液 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 3~5 h. 双蒸水洗净后, 加入捕捉抗体即鼠抗牛 S-100 蛋白单抗或上述稀释样品液, 每管 20 μ l, 空白对照管以 1% BSA 替代, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 用洗涤液 (1% 吐温 20-PBS) 洗涤 2 次, 每次 3 min.

c. 免疫 PCR 夹心法: 用小鼠抗 S-100 蛋白 β 亚基单抗 (40 mg/L) 以戊二醛法包被小管, 依次加入牛 S-100 蛋白质标准品 20 μ l (从 100 ng 始, 作 10 倍连续稀释 6 次), 4 $^{\circ}$ C 过夜. 洗涤液洗涤 2 次, 每次 3 min; 加入兔抗 S-100 蛋白多抗 20 μ l (1: 6000) 室温 3 h. 洗涤液洗涤 3 次, 加入 1: 500 稀释度的生物素化羊抗兔抗体 20 μ l, 室温下 2 h, 洗涤液洗涤 4 次, 链霉卵白素-DNA 复合体 20 μ l, 置室温 1 h, 洗涤液充分洗涤 5~7 次, 再以无离子水洗涤 2 次, 除尽残液. 每管加入 20 μ l 标准 PCR 反应液 (10 mmol/L Tris pH 8.3, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 50 mmol/L KCl, 200 μ mol/L dNTP $\times$ 4, 1 pmol/L 引物, 0.5U Taq 聚合酶), 以矿物油覆盖. 聚合反应的温度参数为起始变性 (94 $^{\circ}$ C, 2 min); 20 个 PCR 循环: 变性 (94 $^{\circ}$ C, 30 s), 退火 (56 $^{\circ}$ C, 40 s), 延长 (70 $^{\circ}$ C, 40 s); 后置延长 (72 $^{\circ}$ C, 5 min). 取管内 PCR 产物 5 μ l, 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色. 凝胶成像系统 (GDS 8 000) 反转成像, 扫描灰度, 分析结果.

d. 免疫 PCR 直接法: 样品液包被的管中加入 1: 5 000 稀释度的兔抗 IL-6 多克隆抗体 20 μ l, 室温下孵育 3 h, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min; 加入 1: 500 稀释度的生物素化羊抗兔抗体 20 μ l, 其余操作同 c.

2 结 果

2.1 标准曲线

以 10 倍系列稀释的牛 S-100 蛋白标准品作免疫 PCR 检测, 重复测试 3 次, 所得产物浓度均呈较好的线性梯度; 对照管 (C) 几乎无产物, 表明操作中无明显非特异性吸附 (图 1). 与同步所作的夹心 ELISA 对比, 免疫 PCR 敏感性高出 10^5 倍数量级.

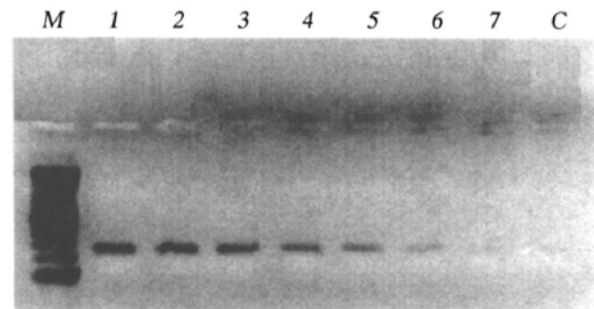


图 1 牛 S-100 蛋白标准品免疫 PCR 测定电泳图谱
1~7: S-100 标准抗原浓度为 1 、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} μ g/L; C: 空白抗原对照; M: λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III 分子质量标准.

2.2 样品测定

来自 10 只大鼠垂体和血清样品, 用阿拉伯数字编号, 序号 1~5 为正常对照组样品, 6~10 为切除肾上腺组样品, C 为空白包被对照管. 免疫 PCR 产物显示两组间的血清样品中 IL-6 浓度无显著改变 (图 2b), 而垂体样品中表示出差, 其中处理组的 2~4 号样品的 IL-6 增加明显 (图 2a), 提示去除肾上腺后可能会引起垂体前叶内 IL-6 的变化.

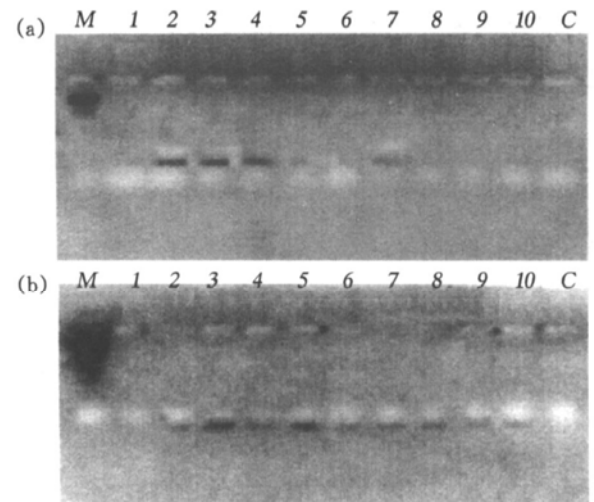


图 2 大鼠样品免疫 PCR 直接法测定
去肾上腺 4 d 后大鼠体内 IL-6 含量测定. (a) 垂体提取液; (b) 血清样品. 1~5: 处理组; 6~10: 对照组; C: 空白抗原对照; M: λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III 分子质量标准.

3 讨 论

免疫 PCR 是一门借助于 PCR 极高的扩增效率, 脱胎于 ELISA 的抗原测定技术. 目前大部分操作步骤还是在塑料微滴定平板上进行, 用普通 PCR 仪作 PCR 扩增时需要转移至 PCR 管中, 因此费时费力、影响测定精确性. 市面上虽已开发出适用于在平板上扩增的专用 PCR 仪, 但价格昂贵, 广泛使用尚需时日. 我们建立的在管中进行全程操作是一种理想的解决途径, 它至少有下列优点: a. 结合反应和扩增反应空间连贯, 降低系统误差; b. 被结合的报告 DNA 模板能全部被扩增, 因而能减少样品需要量; c. 减少操作步骤; d. 所需样品量少 (仅需 20 μ l), 适用于样本来源受限的实验, 同时节省试剂消耗.

与聚苯乙烯材料制得的 ELISA 平板不同, PCR 管通常采用聚乙烯材料, 很难经碱性法固定蛋白. 戊二醛是实验室常用的组织固定剂, 该分子两端为化学性质活泼的羰基, 易与其他分子产生共价结合. 我们首次在免疫 PCR 中利用戊二醛作为包被剂, 经适当步骤对普通 PCR 管进行了成功的包被. 多次用连续稀释样品包被后作免疫 PCR 试验, 产物浓度与抗原滴度间均呈现线性相关, 表明这一技术稳定可靠.

垂体前叶能表达 IL-6, 但由于表达 IL-6 的细胞数量太少 ($< 1\%$)^[6], 一般方法难以检出. 我们用这种改良的方法测定了切除肾上腺大鼠的垂体前叶和血清中的微量细胞因子 IL-6, 结果垂体中有三个样品浓度增加, 而血清中无改变. 这一结果, 为论证垂体中参与调节垂体功能的 IL-6 主要来源于自身的设想提供了初步依据.

免疫 PCR 的出现是免疫检测技术的一个新阶段, 它使以前测不出的抗原物质得以显现. 这不仅扩大了临床诊断的范围, 也深化了生物科学的微观研究领域. 遗憾的是, 由于设备等条件的限制, 阻碍了该技术的推广应用. 自 1992 年建立免疫 PCR 以来, 涉及到此项技术的文献, 国际仅有数十篇, 国内更是寥寥可数. 我们着眼于一般实验室常用仪器和试剂, 对方法进行了改良, 希望对推广这项技术能有所帮助.

致谢 感谢赵玉峰、金卫林及黄文晋同志的协作.

参 考 文 献

- 1 Sano T, Smith C L, Cantor C R. Immun σ -PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 1992, **258** (5079): 120~ 122
- 2 Numata Y, Matsumoto Y. Rapid detection of α -human atrial natriuretic peptide in plasma by a sensitive immun σ -PCR sandwich assay. *Clinica Chimica Acta*, 1997, **259** (1~ 2): 169~ 176
- 3 Sanna P P, Weiss F, Samson M E, *et al.* Rapid induction of tumor necrosis factor alpha in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immun σ -PCR assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (1): 272~ 275
- 4 Niemeyer C M, Adler M, Blohm D. Fluorometric polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immun σ -PCR products in microplates. *Anal Biochem*, 1997, **246** (1): 140~ 145
- 5 Sperl J, Paliwal V, Ramabhadran R, *et al.* Soluble T cell receptor: detection and quantitative assay in fluid phase via ELISA or immun σ -PCR. *J Immunol Methods*, 1995, **186** (2): 181~ 194
- 6 Allaerts W, Jeucken P, Dehets R, *et al.* Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function *in vitro*. *J Neuroendocrinology*, 1997, **9** (1): 43~ 53

A Simplification of the Immun σ -PCR Assay. XU Ping-Xi, XIAO Hua-Sheng, JU Gong (*Institute of Neurosciences, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

Abstract The Immun σ -PCR antigen detection system has been developed for several years as a modification of the ELISA method. But only a few of laboratorise applied this high sensitive quantitative assay, since it needs special apparatus or complicated operations. A new procedure of Immun σ -PCR was established, which coats antibody or antigen on PCR tubes with 0.8% glutaraldehyde instead of on the wells of titer plates with alkine carbonate buffer. The assay could be conducted with simple handlings and ordinary apparatus, and a high sensitivity is obtained up to 10^5 times higher than that of ELISA in S-100 antigen detection.

Key words immun σ -polymerase chain reaction (Immun σ -PCR), coating, glutaraldehyde, PCR tube