

一种测定 CuZn-SOD 总量的新方法 ——化学发光免疫分析法*

田亚平 沈文梅 刘智峰 陈吉中 方允中

(解放军总医院,北京)

(军事医学科学院,北京)

提 要

通过探索,用 ABEI 发光剂标记人 CuZn-SOD,用液相竞争结合法测定样品中 CuZn-SOD 含量。此法试剂稳定,结果重复性好,批内 $CV = 2.6 \sim 6.0\%$,批间 $CV = 6.9 \sim 7.9\%$,回收率 $97.7 \sim 106.1\%$,可测范围为 $1 \sim 500 \text{ ng}$,适合测定血清及体液中微量 CuZn-SOD。

化学发光免疫分析 (Chemiluminescent immunoassay, CLIA) 是近年来发展的一项新技术。从一个化学反应(一般是氧化反应)中获得能量,使反应物或产物之一激发,形成电子激发态,当其弛豫返回基态时,以发射光子的形式释放能量,这一过程称为化学发光。常用的发光剂如鲁米诺及其衍生物 N-氨基丁基-N-乙基异鲁米诺 (简称 ABEI) 等,在有氧化剂如 H_2O_2 等存在时,可以被氧化,产生一个电子激发态的中间物,当其返回基态时,即向外发光,可以用发光检测仪定量测定。把发光剂加入到一个免疫反应体系中,取代放射性同位素,最终以发光强度来计算表征待测物质的量,这就是 CLIA 的基本原理。用发光剂取代放射性同位素的优点是避免了放射性污染,标记物可长期保存,而 CLIA 在灵敏度和特异性上均可与放射免疫分析 (RIA) 相媲美^[1]。CLIA 技术在短短几年已广泛应用于多种物质的分析测定^[2-4],但国内外尚未见用此法测定铜锌超氧化物歧化酶 (简称 CuZn-SOD) 的报道。我们用 ABEI 发光剂标记 CuZn-SOD,成功地用液相竞争法测定了血清和体液中的微量 CuZn-SOD。

材 料 和 方 法

人 CuZn-SOD: 系从人血中提取,其聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中无杂蛋白,比活性为每毫克蛋白的酶活力高于 3000 单位 (按 McCord-Fridovich 法计算)。

抗人 CuZn-SOD 抗血清: 系兔抗人 CuZn-SOD 的抗血清,其免疫双扩散的效价为 1:32,达到了免疫学实验要求。

标记人 CuZn-SOD: 以 ABEI (系军事医学科学院基础医学研究所合成)作发光剂,用 EDC 方法标记人 CuZn-SOD^[5],透析后用葡聚糖凝胶 G-25 分离纯化,收集标记的 CuZn-SOD,适度稀释后分装, -20°C 保存。其标记率为 $3.2 \text{ mol/ABEI/mol SOD}$ 。

稀释液: 用 pH 7.4, 10 mmol/L PBS 缓冲液配制 2 g/L 明胶溶液,其防腐剂为 1.5 mmol/L NaN_3 。

分离剂: 用 pH 7.4, 10 mmol/L PBS 配制含 50 g/L 的聚乙二醇-6000 (PEG) 溶液。以此溶液按 1:100 稀释羊抗兔 IgG 的抗血清(二

* 国家自然科学基金资助的课题。

抗),并用稀释的二抗溶液作为分离剂。

氯化血红素 (Hemine) 液: 用 pH 7.4, 10 mmol/L PBS 将 Hemine 配制成 $15 \mu\text{mol/L}$ 。

H_2O_2 液: 取 30% H_2O_2 用双蒸馏水稀释至 30mmol/L 。

化学发光免疫分析: 测定管 (B) 中含标记人 CuZn-SOD (发光值约 $5000 \text{mV}/100 \mu\text{l}$), 1:4000 稀释的兔抗人 CuZn-SOD 的抗血清和样品或标准液各 $100 \mu\text{l}$; 特异结合管 (B_0) 中含标记人 CuZn-SOD、稀释的兔抗人 CuZn-SOD 的抗血清和稀释液各 $100 \mu\text{l}$; 非特异结合管 (NSB) 中则只含 $100 \mu\text{l}$ 标记 CuZn-SOD, 再加稀释液至 $300 \mu\text{l}$ 。然后各管均加入 $500 \mu\text{l}$ 分离剂, 充分混合, 4°C 放置过夜, $2000 \times g$ 离心 20 min, 弃去上清液, 用 2mol/L NaOH $200 \mu\text{l}$ 溶解沉淀, 在 50°C 保温 3h, 取出置室温平衡后, 加 Hemine 液 $800 \mu\text{l}$, 充分混匀。把管子放在 WDD-I 型发光测试仪 (北京第二光学仪器厂生产) 的测试位置上, 用原位加样器加入 H_2O_2 $200 \mu\text{l}$, 起动发光, 该仪器自动记录发光峰值。将样品管的发光峰值与标准曲线相比较, 计算出样品中 CuZn-SOD 含量。

结 果

一、适宜测定条件的选定

1. 发光测定条件 在发光测定体系中 $2.5\text{--}15 \text{mmol/L}$ 的 H_2O_2 , $10.0\text{--}18.7 \mu\text{mol/L}$

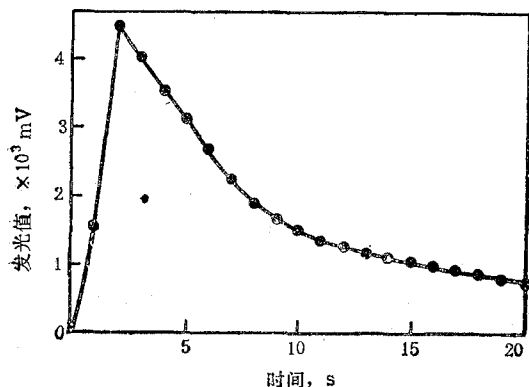


图1 ABEI 的发光曲线

的 Hemine 与 $0.1\text{--}0.5 \text{mol/L}$ 的 NaOH 对 ABEI 的发光峰值影响极微。我们选用 5.0mmol/L H_2O_2 , $10.0 \mu\text{mol/L}$ Hemine 和 0.3mol/L NaOH 为发光测试体系。图 1 示在该发光测试体系实验条件下的发光反应曲线, 结果表明加入 H_2O_2 后 2s 即达峰值, WDD-I 型发光测试仪具有峰值保留的功能, 所以可以准确检测。

2. 抗体稀释曲线 将兔抗人 CuZn-SOD 的抗血清用稀释液依次稀释 1:10—1:40960, 与一定稀释度的标记 CuZn-SOD 结合, 测定其结合相的发光峰值, 再换算成结合率 (B/B_0), 把结合率与抗血清稀释倍数作图。从图 2 可见, 1 号兔抗血清按 1:160 稀释, 2 号兔抗血清 1:40 稀释, 两者均能沉淀标记的 CuZn-SOD 达

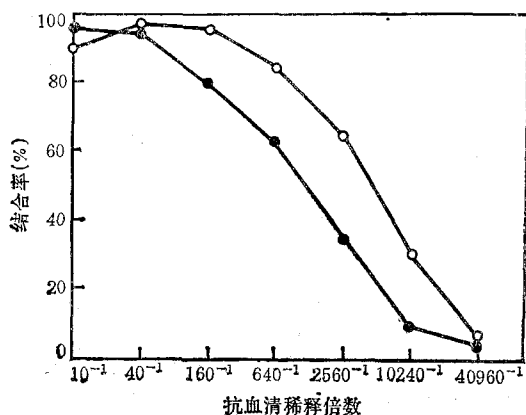


图2 抗人 CuZn-SOD 抗血清的稀释曲线
○—○ 1号兔 ●—● 2号兔

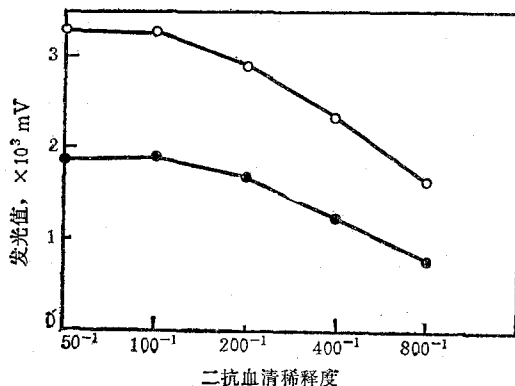


图3 分离剂中二抗血清用量与分离效果的关系
○—○ 特异结合管 ●—● 测定结合管

95% 以上。本法测定时选用抗血清稀释度分别为 1:3200 和 1:1600。

3. 分离剂中二抗用量的选择 取一份混合血清,用含不同浓度二抗的分离剂分离,按上述方法测定结合相的发光峰值。以发光峰值对二抗的稀释度作图。从图 3 可见分离剂中含 1:100 二抗就能很好地沉淀结合相。

4. 离心时间与分离效果 2000×g 离心 20 min 沉淀接近完全,增加离心时间,沉淀发光值不再增高(图 4)。

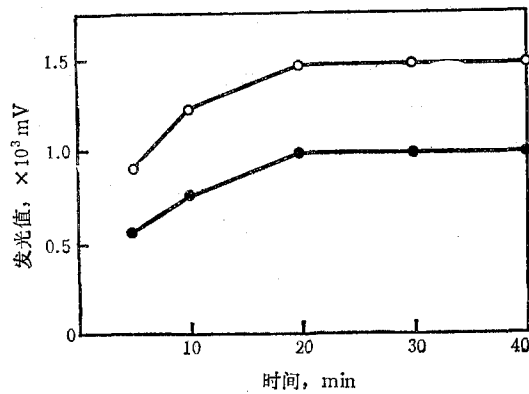


图 4 离心时间与分离效果的关系
○—○ 样品 1 ●—● 样品 2

5. 消除样品中蛋白质抑制发光作用的条件 在实验过程中观察到血清蛋白能影响样品发光值的测定。表 1 显示了 100 μ l ABEI 溶液加

表 1 BSA 对发光值的影响

加入 BSA 量 (μ l)	发光值 (mV)	抑制发光率(%)
0	3279.0	0.0
10	2480.0	24.4
50	234.0	92.9
100	47.5	98.6

入不同量 40 g/L 牛血清白蛋白(BSA)后发光受影响的程度。在探索方法的过程中发现沉淀物中的蛋白质可使发光值 3200 mV 降至 1500—1700 mV。为此,试验筛选了消除蛋白质抑制发光作用的试剂及其应用条件。结果发现将结合相(即沉淀)用 2 mol/L NaOH 200 μ l 溶解后 50℃ 保温一定时间,其发光值开始随时间的延长而增加,160 min 后即达平衡,发光值

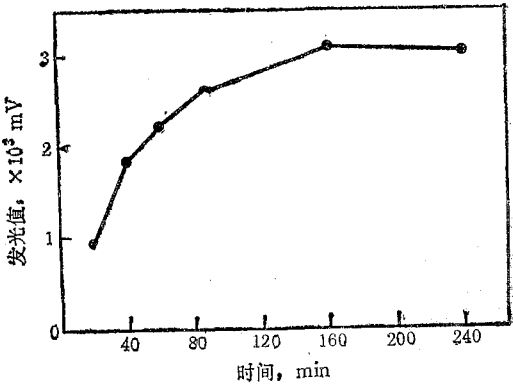


图 5 2 mol/L NaOH 50℃ 保温对蛋白质抑制发光的消除作用

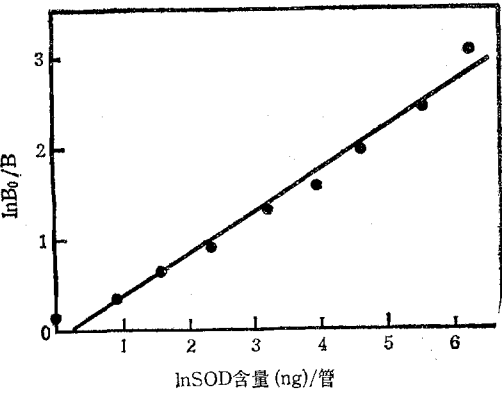


图 6 人 CuZn-SOD 测定的标准曲线
 $r = 0.9896 \quad x = \frac{y + 0.0606}{0.4556}$

保持恒定(图 5)。我们又平行比较了不含 BSA 和含有 BSA (40 g/L) 100 μ l 的特异结合管中加入 2 mol/L NaOH 200 μ l 50℃ 保温 3h 后的发光值,两者无明显差异,以上结果表明在选定条件下 NaOH 确实可以消除蛋白质的抑制发光作用,这样保证了测试结果的可靠。

二、标准曲线和检测范围

以不同量标准 CuZn-SOD 按前述分析条件进行测定,最后用 B₀/B 值的自然对数对每管含 SOD 量的自然对数绘制标准曲线(图 6)。按 5% 抑制发光为最小可测量,95% 抑制发光为最大可检测量,本方法可检测范围为 1—500 ng。

三、批内和批间变异系数 (CV)

用 4 份不同浓度 CuZn-SOD 血清样品,

表 2 批内变异系数

样品号	CuZn-SOD (ng/ml, $\bar{X} \pm SD$)	CV (%)
1	59.6 $\pm$ 2.2	3.7
2	120.6 $\pm$ 3.1	2.6
3	550.5 $\pm$ 22.0	4.0
4	986.8 $\pm$ 59.1	6.0

注: $n = 10$ 。

每份重复测定 10 次,其批内 CV 为 2.6—6.0% (表 2)。

另取 2 份混合血清,每日按本法双管测定,连续测定 10 日,结果均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 分别为 292.5 $\pm$ 20.1 和 192.9 $\pm$ 15.2 ng/ml,批间的 CV 分别为 6.9% 和 7.9%。

四、回收试验

取一混合血清,准确定值后,加入一定量标准人 CuZn-SOD,再次按本法测定,计算出回收率。本方法回收率为 97.7—106.1% (表 3)。

表 3 标准人 CuZn-SOD 加入混合血清中的回收率

加入量 (ng/ml)	测得量 (ng/ml)	回收率(%)
50.0	49.6	99.2
100.0	100.6	100.6
500.0	530.5	106.1
1000.0	976.8	97.7

注: ①混合血清中 CuZn-SOD 定值均为 86.1 ng/ml。

②测得量系扣除混合血清中的定值。

五、正常人参考值

用本法测定 57 例男性和 51 例女性献血员 (年龄 20—45 岁) 血清中 CuZn-SOD 含量,其 $\bar{X} \pm SD$ 分别为 36.9 $\pm$ 21.7 和 36.9 $\pm$ 19.6 ng/ml。男性与女性血清中 CuZn-SOD 含量无差别。

讨 论

众所周知 CuZn-SOD 可清除超氧化物自由基 (O_2^-),防御 O_2^- 及其衍生物对机体的损伤。在组织中其含量的改变常与多种疾病有关^[6-8]。测定 CuZn-SOD 可用酶活力^[9-11]和酶蛋白定量两种方法,其中酶活力最常用,但酶蛋白的变化近来颇受重视,而且多用 RIA^[12,13]或酶联免疫分析法 (ELISA)^[14]。我们成功地

用 ABEI 发光剂标记 CuZn-SOD,建立了用液相竞争法测定血清和体液中微量的 CuZn-SOD 的方法。这样,我们首先把 CLIA 技术用于 CuZn-SOD 酶蛋白定量分析。本法曾用于 CuZn-SOD 与病毒性肝炎肝损伤关系的研究,发现患者血清中 CuZn-SOD 总量与肝炎病程有明显的相关性,其详细结果另文报道。同时,还用于其他有关疾病的研究,也获得较好结果。

液相竞争结合法与固相法相比,具有不需固相材料,节省抗血清和操作简便等优点。但蛋白质对发光体系有抑制作用,这可能是液相竞争结合法未被用于 CLIA 测定大分子蛋白质的主要原因。为此,我们筛选了消除抑制发光的试剂和应用条件,结果发现 2 mol/L NaOH 200 μ l 溶解沉淀后 50 $^{\circ}$ C 保温 3 h 以上,可基本消除对发光的影响,保证了测试结果的可靠性。

CLIA 与 RIA 相比,具有标记物稳定的特性。实验证明 ABEI 标记的 CuZn-SOD (5000 mV/100 μ l) 用过量抗血清沉淀可达 95% 以上,若将标记的 CuZn-SOD 于 -20 $^{\circ}$ C 保存 6 个月,仍能被过量抗血清沉淀 95% 以上,这表明用发光剂标记 CuZn-SOD 及标记物保存过程中该酶的抗原性未发生明显变化。同时,ABEI 的发光峰值也不随时间延长而改变。本法的试剂稳定价格便宜为今后制备试剂盒,推广应用于临床检验及实验研究提供了有利的条件。

本文承蒙军事医学科学院蒋滋慧教授大力帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Weeks, I. et al.: *Clin. Sci.*, 1986, 70, 403.
- [2] Weeks, I. et al.: *Clin. Endocrinol.*, 1984, 20, 489.
- [3] Kohen, F. et al.: *Steroids*, 1980, 36, 405.
- [4] Weeks, I. et al.: *Clin. Chem.*, 1983, 29, 1480.
- [5] Cheng, P.J. et al.: *J. Immunol. Methods*, 1982, 48, 159.
- [6] Pyenchitsomanus, Pwasi: *J. Clin. Pathol.*, 1983, 36, 329.
- [7] 坂井田,功. 等:《肝脏》,1987,28,1211.
- [8] Marklund, S.L. et al.: *Clin. Sci.*, 1986, 71, 57.

(下转第 305 页)

定尿中微量白蛋白。

(2) 用纤维素固相二抗放免法和液相放免法同时测定 28 份尿样, 将两种方法测定结果进行数据相关处理, 相关系数 $r = 0.910$, 回归方程为 $y = 0.947x - 52.93$ (见图 3)。结果提示两种方法具有同样使用价值。

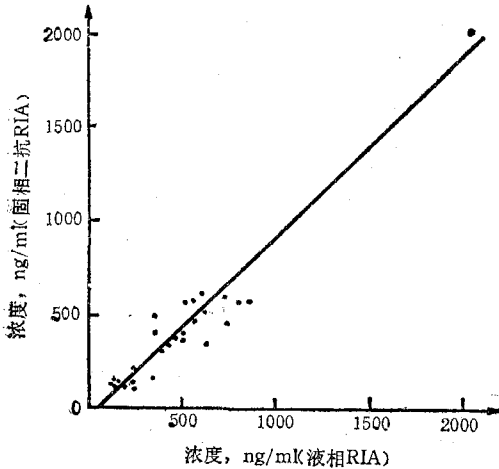


图 3 白蛋白固相二抗 RIA 法和液相 RIA 法的相关比较

讨 论

临床上多种疾病都会累及肾小球滤膜的正常功能, 白蛋白从破坏的滤膜中漏过, 肾小管又不能全吸收, 而引起尿中白蛋白浓度增加。因此建立直接、快速测定尿中白蛋白浓度的方法, 将为临床肾病诊断、分型、治疗等提供有价值的资料。本文在以往液相 RIA 法测定尿中微量白蛋白的基础上, 建立了纤维素固相放免法。使测定方法更简便, 并克服了分离剂对测定结

果的干扰, 同时有利于系列化生产。

本文采用化学联接法, 将抗体联接于微晶纤维素上, 克服物理吸附法的缺点, 抗体与固相材料结合牢固, 提高了抗体的结合容量和稳定性。克服塑料珠反应面积有限和包被不均匀及抗体易脱落的缺点。固相 RIA 灵敏度为 20 ng/ml 比液相 RIA 50 ng/ml 有了进一步提高。本文为大量生产固相抗体, 提供了有益的资料。

选择合适的固相第一抗体用量很重要, 用量过大不但会降低测定灵敏度而且消耗大量的抗体, 给推广应用带来困难。当每管加入 20、15、10、2.5 μg 的纤维素固相时, 与 ^{125}I -白蛋白的 B/T 结合率分别为 74.7、70.9、71.6、63.8 和 59.3%。本文认为采用 2.5 μg /管比较合适。

纤维素固相一抗及固相二抗放免法测定微量白蛋白, 操作简便, 影响因素少, 优于液相白蛋白放免法。具有推广价值。

本工作得到军事医学科学院王仁芝教授大力支持, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Jury, D. R. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 1985, **148**, 63.
- [2] 陈泮藻等: 《中国人民解放军军医进修学院学报》, 1988, **9**(3), 239。
- [3] Woo, J. et al.: *Clin. Chem.*, 1978, **24**(9), 1464.
- [4] 沈荣森等: 《生物化学与生物物理进展》, 1988, **15**(1), 57。
- [5] 陈泮藻等: 《生物化学与生物物理进展》, 1986, (4), 69。

[本文于 1988 年 5 月 27 日收到]

(上接第 313 页)

- [9] Gray, B.H. et al.: *J. Anal. Toxic.*, 1985, **9**, 36.
- [10] Yoshihiko, Oyanagui: *Anal. Biochem.*, 1984, **142**, 290.
- [11] Huu, T.P. et al.: *Anal. Biochem.*, 1984, **142**, 467.
- [12] Baret, A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, **88**, 337.

- [13] Kelly, K. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, **190**, 531.
- [14] Nobuhiko, Nishimura, et al.: *J. Pharm. Dyn.*, 1982, **5**, 394.
- [15] Holt, M.E. et al.: *Br. J. Exp. Path.*, 1984, **65**, 231.

[本文于 1988 年 6 月 29 日收到]