

# 高灵敏、高特异性心钠素放射免疫测定方法及应用

汪家瑞 徐宝钢 何士大 温绍君 于仲元\* 陈建军 王宏燕

(首都医学院宣武医院高血压实验室,北京 100053)

## 提 要

本法应用戊二醛连结  $\alpha$ -人心钠素 ( $\alpha$ -hANF) 和牛血清白蛋白,产生的复合物免疫家兔,获得抗  $\alpha$ -hANF 血清,其最终效价为 1:35 万,亲和常数  $K_a = 4.94 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ .  $\alpha$ -hANF 应用氯胺-T 氧化法进行  $^{125}\text{I}$  标记,再经 DEAE-Sephadex A25 柱层析纯化,得到单碘  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -hANF,比放射性为  $300 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  左右.最小检出量为  $1.8 \text{pg}/\text{管}$ .与 8 种肽交叉反应为: $\alpha$ -rANF 98%、心房肽 III 40%,其它 6 种元交叉反应.样品变异系数,批内: 4.4%,批间: 16.3%.

**关键词** 心钠素,抗血清,放射免疫分析

$\alpha$ -人心钠素 ( $\alpha$ -human atrial natriuretic factor,  $\alpha$ -hANF) 是由 28 个氨基酸(99—126) 所组成立的一种肽类激素,主要储存在心房心肌细胞中,它对体液电解质平衡,血压调节有着密切的关系<sup>[1]</sup>. 建立测定心钠素 (ANF) 的放射免疫分析方法 (radioimmunoassay, RIA),

基,故所得的标记探针的序列并未改变,仍与靶 DNA 序列完全互补,而 [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dATP 标记 3'-末端则是在脱氧核糖核苷酸末端转移酶催化下,在 3'-OH 端随机连接一串核苷酸的反应,所以探针的放射比活性往往因在每分子探针上接上了多个 [ $^{32}\text{P}$ ]-dAMP 分子而增高,但是接上的标记核苷酸数目多,虽然增加了探针的放射比活性,却因这段 poly(dA) 的序列与样品中靶基因的相应序列没有互补关系,在较高漂洗温度下,杂交体稳定性降低,导致检出灵敏度的降低.而漂洗温度的提高在许多情况下是必要的甚至是必须的,它既能有效地降低探针的非特异吸附,还能除去探针非特异杂交本底,从而提高信噪比,增强探针的特异性.从本实验结果看到,在  $55^\circ\text{C}$  下漂洗,基本上能消除非特异杂交本底,此时,  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -探针的检出灵敏度显著地高于  $3'$ - $^{32}\text{P}$ -探针.

首先需制备较理想的抗血清.国内虽已有报道<sup>[2,3]</sup>,但由于其抗血清的效价及灵敏度均不高,影响了测定的准确性.另外,血浆 ANF 的测定,目前国外一般都采用样品前处理法,步骤

\* 现于北京人民医院内科.

此外,标记  $5'$ -端用的 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP 与被标记的探针以等克分子比例进行反应,比标记  $3'$ -端用的 [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dATP 的量少得多,因而成本较后者便宜.所以,当实验需要高灵敏度的寡聚核苷酸探针时,建议采用  $5'$ -末端标记的方法.

## 参 考 文 献

- Wallace R B *et al.* *Nucl Acids Res*, 1981; 9: 879
- Gough N M *et al.* *Nature*, 1984; 309: 763
- Conner B J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 278
- Landegren U *et al.* *Science*, 1988; 241: 1077
- Coussens L *et al.* *Science*, 1986; 233: 859
- Collins M L *et al.* *Anal Biochem*, 1985; 151: 211
- Maxam A M *et al.* *Methods Enzymology*, 1980; 65: 499
- 王吉伟. 生命的化学, 1988; 8(6): 31
- Walter E *et al.* *Hepatology*, 1987; 7(3): 557
- Albretsen C *et al.* *Anal Biochem*, 1988; 170: 193

【本文于1990年7月25日收到,11月14日修回】

复杂,影响因素较多。我们建立了一种高效价、高灵敏、高特异性及重复性好的 ANF 抗血清制备及放射免疫测定方法,并已初步应用于临床和基础研究。

## 材料与方 法

### 一、标准品

$\alpha$ -hANF, 美国 Peninsula Lab. 产品。

### 二、牛血清白蛋白 (BSA)

电泳单点纯。中国科学院生物物理所生化厂产品。

### 三、抗 $\alpha$ -hANF 血清的制备

1. ANF 免疫原制备: 以戊二醛为偶联剂, 使 ANF 与 BSA 结合成具有全抗原性的偶联物。

取 BSA 4mg, 溶于 0.1 mol/L pH7.4 磷酸缓冲液 (PBS) 4ml 中, 再加入 ANF 1.5mg, 置 4°C 冰水浴中, 磁力搅拌, 滴加 1% 戊二醛 0.4ml, 连续搅拌反应 2h, 置于 -30°C 保存。

2. 抗血清制备: 选用雄性青紫兰兔, 体重为 2kg, 3 个月龄。在免疫动物前一周, 先注射活卡介苗 20mg (每只), 使其淋巴结肿大, 随后将免疫原与等体积的完全佐剂乳化, 背部皮内多点 (30—40 点) 及淋巴结内注射 2ml 乳剂。之后, 每隔 1 个月强化一次, 共三次。强化剂量减半, 与不完全佐剂乳化, 皮下注射。在第三次强化后 10 天, 颈动脉取血, 血清与甘油 (1:1), 置于 -30°C 保存。

### 四、<sup>125</sup>I-ANF 制备

10  $\mu$ g ANF (溶于 150  $\mu$ l 0.5mol/L pH7.4 PBS) 加入 0.5mCi Na<sup>125</sup>I, 再加 25  $\mu$ g 氯胺-T, 冰水浴中搅拌反应 1min, 再加入 50  $\mu$ g 偏重亚硫酸钠以终止反应, 然后进行纯化, 用 0.1mol/L pH7.4 PBS 溶液在 DEAE-Sephadex A 25 层析柱上洗脱, 取第一个高峰的峰值管为 RIA 应用品。

### 五、血样采集

受试者先静坐 30min, 采血 3ml, 用 0.3 mol/L EDTA·Na<sub>2</sub>, 含抑肽酶 300 KIU 抗凝, 放置冰水浴中冷却, 分离血浆测定或放置

-30°C 保存直至测定。

## 六、样品的 RIA 步骤

### 1. 缓冲液

0.1mol/L pH7.4 磷酸缓冲液 (PBS), 内含 0.003 mol/L EDTA·Na<sub>2</sub>, 0.002% 洗必太, 0.9% NaCl 和 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA)。

### 2. 样品 ANF 的 RIA 步骤 (表 1)

表 1 ANF-RIA 步骤

	T	NSB	S <sub>0</sub>	S	样品
缓冲液 ( $\mu$ l)	—	450	350	250	250
标准 ( $\mu$ l)	—	—	—	100	—
样品 ( $\mu$ l)	—	—	—	—	100
抗体 ( $\mu$ l)	—	—	100	100	100
4°C 保温 6h					
标 记 ( $\mu$ l)	50	50	50	50	50
4°C 保温 16h					
兔血清 ( $\mu$ l)	—	50	50	50	50
双抗体 ( $\mu$ l)	—	50	50	50	50
4°C 保温 5h, 分离测定					

T: 放射性总计数; NSB: 非特异性; S<sub>0</sub>: 不加标准;  
S: 加入不同浓度标准;  $\alpha$ -hANF, 加量为 3.1—400pg。

## 七、标准曲线作图

计算 ANF 标准曲线各管的 B/B<sub>0</sub>% (各标准浓度结合管或样品结合管/零标准浓度结合管) 值与 ANF 浓度作图。

## 八、样品中 ANF 含量计算

计算血浆样品各管的 B/B<sub>0</sub>% 值, 在标准曲线上查得相应的值乘 10 倍, 单位为 pg/ml。

## 结 果

### 一、抗血清滴度测定

家兔免疫一定时间后, 从颈动脉放血, 分离血清, 用 PBS 将抗血清稀释成不同浓度, 用 <sup>125</sup>I-ANF 与其竞争结合, 进行 RIA 检测, B/T (结合管/总放射性管) 结合率在 40% 时, 其工作浓度为 1:70000, 最终稀释工作浓度为: 1:350000。这表明应用小剂量强化免疫, 可获得有较高效价的抗血清 (图 1)。

### 二、<sup>125</sup>I-ANF 标记

ANF 应用 <sup>125</sup>I 标记, 氯胺-T 氧化法, 经

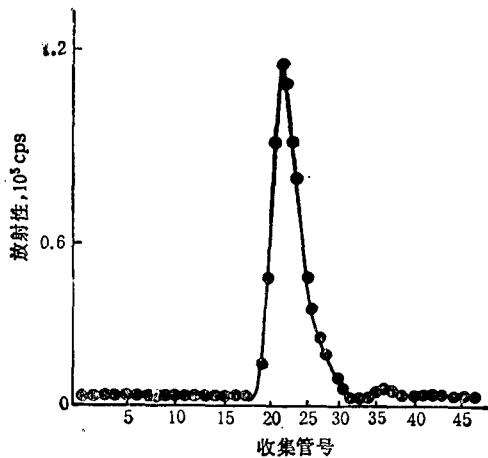


图1 ANF 抗血清滴度曲线

DEAE-Sephadex A25 柱 (1.5 × 50cm) 层析纯化, 可得到高亲和力碘标记物(图 2), 比放射性 > 300 μCi/μg.

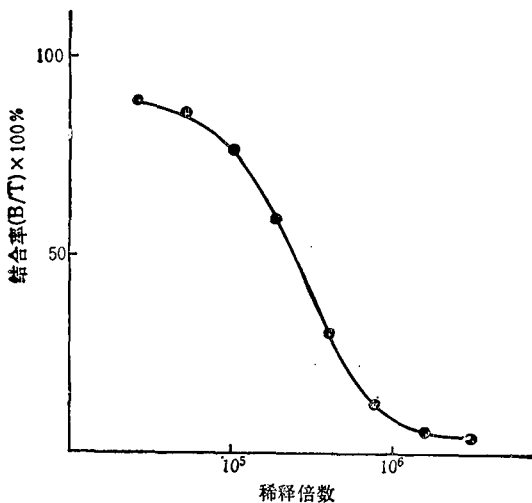


图2 <sup>125</sup>I 标记 α-hANF 经 DEAE-Sephadex A25 柱层析图

表2 ANF 抗体特异性

	交叉率%
α-人心钠素 (α-hANF)	100
α-鼠心钠素 (α-rANF)	98
心房肽 III (ANP III)	40
血管紧张素 I	—
血管紧张素 II	—
神经紧张素肽	—
亮氨酸-脑啡肽	—
甲硫氨酸-脑啡肽	—
血管加压素	—

### 三、抗血清的特异性

抗血清分别与不同的肽类激素进行 RIA 交叉反应, 见表 2. 用 Scatchard 法测得亲和常数为  $K_d = 4.94 \times 10^{-10}$  mol/L.

### 四、标准曲线

应用半对数坐标纸绘制标准曲线, 8 次标准曲线精密度为  $2.2 \pm 0.43\%$ ;  $B/B_0$  值在 95% 时, 检出量为 1.8pg/管, 当  $B/B_0$  值抑制 50% 时为 80pg/管(图 3).

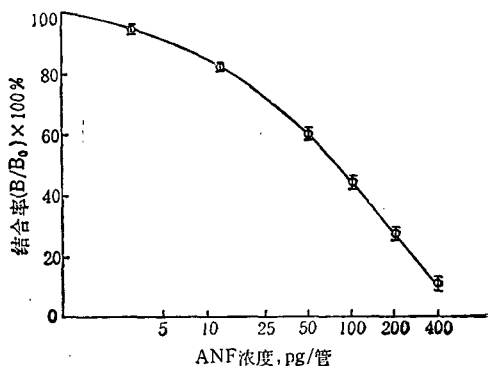


图3 ANF 标准曲线

### 五、ANF 回收试验

在血浆的测定管中(含血浆 100 μl) 各外加不同浓度的 ANF 标准, 作 RIA 测定, 与测得值作回归直线图, 以直线斜率作为 ANF 的回收率. 二份混合血浆的回收率分别为 106.4% 和 107%, 证明 ANF 在血浆 RIA 测定中不受损失和干扰.

### 六、加入不同量的血浆线性关系

二份混合血浆, 分别加入 25 μl—200 μl 血浆, 结果表明, 都具有显著性相关关系,  $r = 0.999$  和  $r = 0.993$ . 即随着血浆加入量的增大, 其测得的 ANF 浓度也增高.

### 七、精密度

本方法血浆批内 CV 为 4.4% ( $n = 8$ ), 批间 CV 为 16.3% ( $n = 10$ ).

### 八、血浆 ANF 正常值

173 例正常受试者, 年龄 20—85 岁, 坐位正常值为  $150.3 \pm 67.6$  pg/ml ( $\bar{X} \pm SD$ ), 范围为 18—283 pg/ml (见表 3). 男女之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ). 60 岁以上组血浆 ANF 低于 40—49 岁组 ( $t = 2.933$ ,  $P < 0.005$ ).

30—39 岁组 ( $t = 3.811, P < 0.001$ ) 和 20—29 岁组 ( $t = 2.325, P < 0.05$ ), 与 50—59 岁组无显著性差异 ( $t = 0.892, P > 0.05$ ).

表 3 正常人血浆 ANF 值 ( $X \pm SD$ )

年龄 (岁)	血浆值 (pg/ml)		
	男	女	合并
20—	119.4 ± 74.1(9)	165.9 ± 75.8(19)	151.0 ± 14.8(28)
30—	155.4 ± 48.8(20)	197.5 ± 70.1(21)	176.9 ± 63.4(41)
40—	180.8 ± 61.6(15)	153.7 ± 61.0(19)	165.7 ± 61.8(34)
50—	138.8 ± 48.8(12)	131.3 ± 58.6(20)	134.1 ± 53.3(32)
60—	131.1 ± 70.8(22)	106.8 ± 62.0(16)	120.9 ± 67.2(38)
计	146.7 ± 62.7(78)	153.2 ± 71.4(95)	150.3 ± 67.6(173)

### 九、血浆 ANF 含量与年龄间关系

男 78 例, 年龄 20—85 岁, 女 95 例, 年龄 20—85 岁. 共计 173 例. 从统计结果看, 年龄与 ANF 含量呈负相关,  $r = -0.215, P < 0.005$ .

### 十、患者血浆 ANF 含量

17 例原发性高血压病及 18 例肺心病患者, 均经临床确诊. 其 ANF 含量都高于正常对照组见表. 高血压病及肺心病组中分别有 29.4%、33.3% 患者的血浆 ANF 值与正常对照组值交叉.

表 4 正常人与患者的 ANF 比较 ( $X \pm SD$ )

	对照组	高血压组	肺心病组
ANF (pg/ml)	150.3 ± 67.6 (n = 173)	394.9 ± 235.1 <sup>1)</sup> (n = 17)	304.9 ± 238.2 <sup>1)</sup> (n = 18)

1) 与对照组比较  $P < 0.001$

## 讨 论

$\alpha$ -hANF 为 28 个氨基酸组成的小肽, 分子量仅为 3081, 欲获得这样小分子肽的满意抗血清是较为困难的. 因此, 我们首先应用戊二醛作偶联剂, 联接 BSA 与 ANF, 制备成大分子免疫复合物, 免疫动物. 在免疫动物前一周, 先用活卡介苗致敏淋巴系统, 增加淋巴结炎症反应, 扩大免疫应答, 再用小剂量的免疫原在皮内和淋巴结中多点注射. 获得了高效价的抗血清 (1:35 万),  $K_m = 4.94 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ , 并取

得了一定经验.

$^{125}\text{I}$ -ANF 标记物的质量是保证测定灵敏性、可靠性的重要条件. 我们用改进的 Nielsen 氏法制得单碘化  $^{125}\text{I}$ -ANF<sup>[4]</sup>. 目前国外对  $^{125}\text{I}$ -ANF 的分离纯化方法不一致, 较好的方法是采用高压液相 (HPLC) 分离纯化, 可得到高纯度的 ANF 碘标记物, 以保证 RIA 测定的灵敏性与准确性. 我们应用 DEAE-Sephadex A25 分离纯化  $^{125}\text{I}$ -ANF, 同样也能得到较满意结果.

我们所获得 ANF 抗血清, 经过 RIA 证实, 其灵敏度、精密度、准确度均较好, 最小检出量为 1.8 pg/管,  $\text{ED}_{50}$  为 80 pg, 精密度为  $2.2 \pm 0.43\%$ . 特异性好, 与  $\alpha$ -rANF、ANP III 各交叉反应为 98% 和 40%, 与其余 6 种肽类激素无交叉反应. ANF 抗血清的制备, 国内虽已有报道, 但由于制备方法不同以及标记抗原质量、抗血清的效价和灵敏度均不高, 故不能准确地测定出人体内血浆 ANF 的真实含量, 与国外文献报道的血浆 ANF 直接测定值差距相当大<sup>[5]</sup>. 应用本方法进行人血浆 ANF 直接 RIA 测定, 与国外文献报道结果相似<sup>[5-7]</sup>, 见表 5.

表 5 文献报道的 ANF 正常值

作者	血浆 ANF 范围	方法
本法	18—283 pg/ml	直接 RIA
Richards <sup>[5]</sup>	5—123 pg/ml	直接 RIA
Herrmann <sup>[6]</sup>	67—394 pg/ml	直接 RIA
Juppner <sup>[6]</sup>	50—166 pg/ml	直接 RIA
陈泮藻 <sup>[5]</sup>	100—880 pg/ml	直接 RIA
钱忠豪 <sup>[4]</sup>	男: 300—820 pg/ml 女: 21—870 pg/ml	直接 RIA

应用本方法可观察到人体在发生一些疾病时, 血浆 ANF 值产生变化. 我们另外的研究工作也已证实, 大鼠心脏中的 ANF 样物质含量随年龄增长而降低<sup>[9]</sup>. 进一步证明了此方法的灵敏度、特异性、精密度与正确性, 此方法操作简单、快速, 与国外文献报道较优者相近. 如稍予方法改良即可扩大到脑脊液、尿液及其它组织中 ANF 的定量, 可更广泛应用于临床及基础研究中.

# 亲和层析法纯化人绒毛膜促性腺激素

王顺友 戚少然 唐玉钗 朱忠勇

(南京军区福州总医院,福州 350001)

## 提 要

本文介绍了一种应用抗 hCG  $\beta$  亚单位单克隆抗体亲和层析提纯 hCG 的方法。结果表明,该法具有简便、快速、经济、产品活性高等优点。hCG 回收率为 96%,免疫学活性 17000IU/mg 蛋白,生物学活性(小鼠子宫称重法)达到 10 000U/mg 蛋白以上。

**关键词** 人绒毛膜促性腺激素 (hCG), 亲和层析, 提纯

人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 是分子量约 40kD 的糖蛋白,主要从早孕妇女尿中提取。传统的提取方法包括乙醇、丙酮沉淀及多次、复杂的层析过程<sup>[1]</sup>;或采用高效疏水色谱法<sup>[2]</sup>,需要昂贵的设备及特殊的色谱柱,且 hCG 的得率不高。本实验采用抗 hCG  $\beta$  亚单位单克隆抗体与 Sepharose 4B 偶联的亲和层析法,简便、快速地从孕妇尿中提取到纯化的 hCG。

## 材料与 方法

### 一、仪器和试剂

抗 hCG  $\beta$  亚单位单克隆抗体 D<sub>9</sub>: 由本室制备<sup>[3]</sup>。溴化氰活化的 Sepharose 4B Pharmacia 产品。聚乙二醇 (PEG) 20 000: 上海化学试剂厂产品。ELISA hCG 免疫活性测定试剂盒 Syntro Biosearch 公司产品。hCG 含量测定放免药盒 上海生化制品研究所产品。超滤浓缩器及滤膜(截留值 10kD): 系上海瑞

丽分析仪器厂产品。

平衡液 0.01mol/L Tris-HCl (pH7.2), 0.15mol/L NaCl。

解离液 0.1mol/L 甘氨酸-HCl (pH2.5), 7mol/L 脲。

### 二、方法

1. 抗 hCG  $\beta$  亚单位单克隆抗体亲和层析柱的制备 取纯化的单克隆抗体 D<sub>9</sub> 5ml (5.6 mg/ml), 按产品说明,与 2g Sepharose 4B 干胶偶联。淋洗装柱后用解离液模拟洗脱,平衡液平衡后将层析柱置 4°C 保存。收集全部流出液,测定  $A_{280}$ , 按消光系数  $\epsilon = 0.74$  计算免疫球蛋白含量,得偶联率为 84%。

### 2. hCG 测定

免疫活性 按 Syntro Biosearch 公司产品说明书的方法,ELISA 显色后,根据光密度从标准曲线计算 hCG 免疫活性,单位为 mIU/ml。

生物活性 参照 Koyama 等的方法<sup>[4]</sup>,选

## 参 考 文 献

- 1 Genest J *et al.* *Br Heart J*, 1986; 56: 302
- 2 孙雅贤等. 河北医药, 1987; 9(3): 185
- 3 陈泮藻等. 中华核医学杂志, 1986; 6(3): 147
- 4 Nielsen MD *et al.* *Acta Endocr*, 1971; 67: 104
- 5 Richards A M *et al.* *J Hypertension* 1987; 5(2): 227

- 6 Juppner H *et al.* *Biochem Biophys Res Comm.* 1986; 139(3): 1215
- 7 Herrmann H C *et al.* *Am Heart J*, 1988; 115 (6): 1213
- 8 钱志豪等. 第二届全国心肺内分泌学术会议汇编 1988; 68
- 9 温绍君等. 首都医学院学报, 1990; 11(1): 48

[本文于1990年7月3日收到,12月19日修回]