

技术与方法

表皮生长因子的发光免疫测定法—— 吡啶酯标记抗体的应用

刘农乐 蒋滋慧 赵明 王会信 赵强 周延冲

(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

提 要

介绍了吡啶酯标记抗体应用于表皮生长因子的发光免疫测定法。吡啶酯类发光剂标记抗体的优点是标记方法简便、抗体用量少、发光强度大。所述方法其标准曲线范围是 400pg/ml—25ng/ml。表皮生长因子浓度与发光值之间的线性关系良好。批内及批间变异系数分别为 7.3% 及 11%。灵敏度与使用 ^{125}I 标记同一抗体的放免法同属 pg 水平。加入保护剂低温保存,使标记物的使用期由原来的 1 个月延长到 6 个月。

关键词 表皮生长因子、吡啶酯,发光免疫测定法

表皮生长因子(EGF)是由 53 个氨基酸组成的多肽,它能刺激各种细胞生长^[1-4]。在分离纯化、基因表达、临床检查及其它有关生长因子的研究工作中均需 EGF 的微量测定方法。目前放射免疫及酶联免疫法已有报道^[5,6]。本文采用吡啶酯(AE)标记抗体的固相发光免疫测定 EGF 属首次报道。发光免疫法是继酶联免疫法后发展起来的非同位素标记的方法。国内常用的发光剂是氨基丁基乙基异鲁米诺(ABEI)。AE 作为发光剂标记抗体国内极少报道^[7]。该试剂有不少优于 ABEI 之处,值得进一步研究以达到推广应用的目的是本室自制;其它试剂均为分析纯。固相免疫珠由北京免疫试剂研究所提供。

是

1.2 仪器 LKB 1250 型发光仪。

1.3 IgG 纯化 抗血清过 DEAE 纤维素 DE52 柱及硫酸铵沉淀,经 10mmol/L 磷酸缓冲液(10mmol/L PB, pH7.0)透析后,测定 A_{280} 值以确定 IgG 含量。

1.4 吡啶酯标记 参考文献[7]进行。取 IgG 200 μg 加在 600 μl 0.1mol/L, pH8.0 的 PB 中,然后加 150 μl 0.5mmol/L AE (溶于二甲基甲酰胺中),混匀,室温避光反应 20min,加赖氨酸溶液(8mg 赖氨酸溶于 200 μl pH8.0 PB)放置 15min。然后在 10mmol/L pH6.5 的 PB 中透析过夜,次日用葡聚糖凝胶 G25 柱纯化。柱用含 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)和 0.002% 人 IgG 的 10mmol/L pH6.5 PB 平衡并用此液洗脱,分部收集,测每管之发光强度,取发光值

1 材料与方 法

1.1 材料 吡啶酯由中国医科院放射医学研究所提供;EGF 是本室从小鼠颌下腺中提取纯化,其理化性质均与 Cohen 实验室赠送的标准 EGF 相同^[8]。并根据标准 EGF 用放免法对纯化后的 EGF 定量;兔抗 EGF 抗体

最高部分在 4℃ 冰箱保存或加甘油低温保存。

1.5 发光测定 参考文献[7]进行。将 100 μl AE 溶于 100ml 稀 HCl 中,取 100 μl,然后加 NaOH-H₂O₂ 试剂(每 100ml 中含 2mol/L NaOH 2ml, 30% H₂O₂ 20 μl),在发光仪上测定并记取 30s 累积发光值 (mV)。

1.6 固相发光免疫分析 参考文献[7]进行。固相包被液中 IgG 浓度为 10 μg/ml。配制标准及样品的稀释均用 GF 缓冲液 [0.1mol/L pH 7.4PBS (0.1mol/L 磷酸缓冲液, 0.9% NaCl), 内含 0.1%BSA, 1mmol/L MgCl₂, 0.1%NaN₃]。反应体系为 200 μl 标准液或样品,加固相抗体珠一枚,4℃ 过夜,洗涤后加标记 IgG 200 μl,4℃ 过夜,洗涤后各管加稀 HCl 100 μl,再加入 NaOH-H₂O₂ 试剂,立刻测定并读数。

1.7 EGF 含量计算 从系列标准 EGF 测得相应 mV 值,以 EGF ng/ml 为 x,相应管的 mV 值为 Y,求得回归方程式。样品中的 EGF 含量由方程式求得。

2 结 果

2.1 兔抗 EGF 抗体的特异性 双扩试验指出,该抗体只与纯化的 EGF 及 Cohen 所赠送的 EGF 能形成沉淀线,而对 DNA 酶、胰蛋白酶、免疫球蛋白、酸性成纤维细胞生长因子(酸性 FGF)、人绒毛膜促性腺激素等无沉淀线(见图 1)。另外在发光免疫测定中,对 25 μg/ml、2.5 μg/ml 及 0.25 μg/ml 的神经生长因子及酸性 FGF 均不能检出,说明与这两种因子

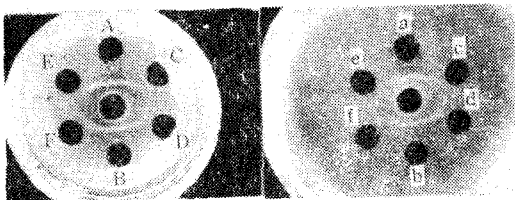


图 1 兔抗 EGF 抗体的双扩试验
中间孔为兔抗 EGF 抗体; A,a: 纯化的 EGF B,b: 标准 EGF; C: DNA 酶; D: 胰蛋白酶 E: IgG, IgA, IgM; F: 溶菌酶; c: 酸性 FGF; d: 胰岛素; e: 人绒毛膜促性腺激素; f: BSA

无交叉反应,故该抗体的特异性较强。

2.2 AE-IgG 的标记率 用发光法测定标记物的 AE 含量,并根据反应时 IgG 的投入量计算标记率(因反应物上柱后洗脱时洗脱液中含有 BSA 及人 IgG,不能直接测定 IgG 的准确含量,故只能按 IgG 的投入量计算)。AE 浓度的测定如下:取不同浓度的 AE 溶液制作标准曲线,根据标记物的发光值从标准曲线中求得标记物所含 AE 浓度。标记率=标记物中 AE 浓度/标记物 IgG 浓度。本批标记率为 1.227 (摩尔比值)。

2.3 标准吡啶酯溶液的发光测定 AE 浓度为 1×10^{-10} — 1×10^{-8} mol/L,其浓度的对数对发光强度 mV 的对数间的回归方程式为 $y = 0.989x + 11.36, r = 0.999$ 。这是发光反应的定量基础。

2.4 标准曲线 EGF 在 25—0.2ng/ml 之间的浓度与发光值之间的相关系数 $r = 0.99$,线性关系良好(见图 2)。

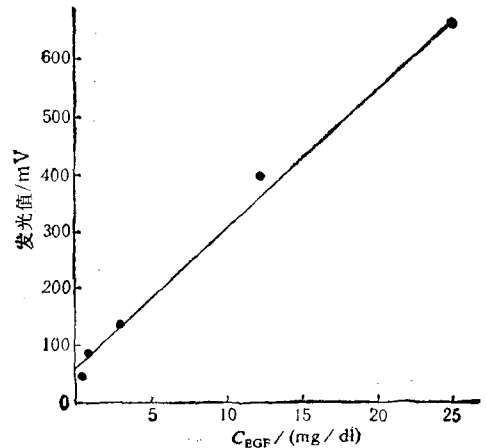


图 2 EGF 的标准曲线

2.5 灵敏度 设 EGF (0.4ng/ml) 平行管 10 支,测得 mV 值为 $82.6 \pm 11.5 (n = 10)$,空白管(即 EGF 浓度为 0 的管)发光值为 $39.7 \pm 8.4mV (n = 5)$,用 EGF (0.4ng/ml) 管的 mV 值减去 3 倍 SD 的 mV 值 ($82.6 - 3 \times 11.5$) 之差(48)仍大于空白管的 mV 值,故本法的灵敏度为 0.4ng/ml,即每管 80pg。

2.6 批内及批间变异系数 用小鼠颌

下腺初提物不同浓度 2 个样品各作 10 次平行测定, 批内变异系数分别为 7.8% 和 6.8% ($16.47 \pm 1.28 \text{ ng/ml}$ 和 $10.41 \pm 0.71 \text{ ng/ml}$), 平均为 7.3%; 三个不同浓度的样品在 2—3 个月内测定 3—6 次, 其变异系数为: 高浓度 17%; 中浓度 8%; 低浓度 8%, 平均为 $11 \pm 5.2\%$ ($n=3$).

2.7 回收实验 样品中加入不同量 EGF ($12.5-3.2 \text{ ng/ml}$), 7 次测定, 回收率为 $105.8 \pm 9.2\%$ ($n=7$).

2.8 AE 及 AE 标记物的稳定性 AE 的稀 HCl 溶液无论在 4°C 或 -30°C 保存, 发光计数在 2—3 月内无明显变化. AE-IgG 中加入保护剂于零下低温保存 6 个月, 在测定 EGF 时, 其标准曲线的线性关系良好; 而不加保护剂在 4°C 保存的标记物, 3 个月以后其线性关系即变得较差.

3 讨 论

吖啶酯标记抗体的发光免疫法简便易行, 标记条件温和, 不易损伤被标物质, 且标记率高. 其次由于被标物质用量极少, 因此它可以用来标记不易获得的微量物质. 所以它的应用范围比 ABEI 更为广泛.

本文在 AE-IgG 保存方面也进行了初步尝试. AE-IgG 不稳定^[9], 在 37°C 放置 7d 后发光值即降到原来的 10%. 本文除在 AE-IgG 中加入 BSA 及异种 IgG 外, 另加入甘油, 于

-10°C 低温保存, 可将使用期延长至 6 个月.

标记物的保存期短是吖啶酯标记物的缺点, Law 等报道^[9], 二甲基 AE 的标记物可稳定保存一年以上. 由此可见, 合成吖啶酯的衍生物是一个理想的方向. 但在国内还无衍生物合成的情况下, 则研究 AE-IgG 的保存方法以延长其使用期限是另一重要的研究方向, 尤其是在国内已有 AE 生产的情况下, 研究 AE-IgG 的保存及推广标记物的应用显得更为重要.

参 考 文 献

- Hollenberg M P, Cuatrecasas P. Human fibroblast receptors related to deoxyribonucleic acid synthesis and amino aciduptake. *J Biol Chem*, 1975; 250: 3845
- Rose S P, Pruss R M, Herschman H R. Initiation of 3T3 fibroblast cell division by epidermal growth factor. *J Cell physiol*, 1975; 86: 593
- Carperter G, Cohen S. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *J Cell physiol*, 1976; 88: 227
- Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*, 1962; 237: 1555
- Hayashi T, Sakamoto S. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor-hEGF levels in human body fluids. *J Pharmacobio-Dyn*, 1988; 11: 146
- Hayashi K, Nomoto H, Kurobe M *et al.* A sensitive two-site enzyme immundassay for human epidermal growth factor (Urogastrone). *Biochem Intern*, 1985; 10: 839
- 蒋滋慧, 刘农乐, 王会信. 吖啶酯标记抗体应用于结核病抗体水平的测定. 军事医学科学院院刊, 1991; (5): 314
- 赵明, 邸宝成, 王会信. 小鼠颌下腺表皮生长因子的分离、纯化与鉴定. 生物化学杂志, 1992; 8: 70
- Law S J, Miller T, Piran U *et al.* Novel polysubstituted aryl acridinium esters and their use in immunoassay. *J Biolumin Chemilumin*, 1989; 4: 88

表皮生长因子受体的分离与纯化

刘以民 陆士新

(中国医学科学院肿瘤医院病室, 北京 100021)

提 要

建立了一种从胎盘合体滋养层微绒毛膜蛋白中简单迅速两步纯化 EGFR 蛋