

在工作条件下,对浓度为0.25mmol/L的L-苹果酸溶液连续测定7次,结果如表2所示,重现性非常好。

表2 MDH 电极的重现性

次序号	1	2	3	4	5	6	7
$\Delta I/nA$	390	380	395	410	400	390	395
$\bar{\Delta I}/nA$	394.2						
$\sigma/\Delta I$ (RSD)	2.4%						

本法成功地制备了L-苹果酸的酶传感器,该传感器灵敏度高,响应快,重现性好,而且方法非常简单,在饮料行业中应用,可能是一种很有发展前途的传感器。

参 考 文 献

1 Chemnitiu G C, Schmid R D. L-Malate determination in wines and fruit juices by flow injection analysis, adaptation

of a coupled dehydrogenase/transferase system. *Anal letters*, 1989;22(15):2897

2 Guilbault G G, Sadar S H, Mcqueen R. A fluorimetric enzymic method for the assay of mixtures of organic acids. *Anal Chim Acta*, 1960;45:1

3 Blaedel W J, Engstrom R C. Reagentless enzyme electrodes for ethanol, lactate and malate. *Anal Chem*, 1980; 52:1691

4 Bergmeyer H U. *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edition, 1984;1:169

5 Fumio M, Soichi Y, Michihiko A. L-Malate-sensing electrode based on malate dehydrogenase and NADH oxidase. *Anal Chim Acta*, 1991;245:145

6 Joseph W, Donal L, Mehmet O *et al.* One-step fabrication of glucose sensors based on entrapment of glucose oxidase within poly (ester-sulfonic acid) coatings. *Anal Chim Acta*, 1991;245:139

应用亲和免疫印迹技术检测血清微量单克隆 Ig

阎有功 解兵

(广州军区武汉总医院, 武汉 430070)

提 要

介绍了一种简便、快速、灵敏的检测血清微量 mIg 的新方法——亲和印迹法。首先将特异性 Ab 结合到 NC 膜上,以薄层琼脂糖凝胶区带电泳把蛋白分离,蛋白经毛细印迹到 NC-Ab 膜上与其抗体亲和,再用酶标抗体探测被印迹之蛋白。2h 内可显示出 mIg 的特征。不需任何昂贵特殊设备。其敏感度大约是自然印迹法的 10 倍,是 IF 银染色法的 100 倍。

关键词 亲和, 印迹, 单克隆, 免疫球蛋白

通常认为,在单克隆 Ig (monoclonal Ig, mIg) 的鉴定中,免疫固定电泳 (IFE) 的敏感度优于免疫电泳,然而对低浓度的 mIg 及其轻链则难以检出^[1,2]。1982 年 Reitart 等^[3]运用自然印迹 (native blotting) 法虽然取得了一定效果,但无法克服的困难是所有 Ig 均可非选择性印迹到硝酸纤维素 (NC) 膜上。最近我们将亲和印迹 (affinity blotting) 技术^[2,4,5]用于血清微量 mIg 的检测,排除了其他 Ig 的干扰,使其敏感度明显提高。方法与结果介绍如下。

1 材料与方 法

1.1 检测样品 经醋纤膜电泳,免疫电泳及 IFE 确认为 M 蛋白血症病人的血清。

1.2 蛋白定量 按双缩脲法 (在 ENCORE I 型生化自动分析仪上进行)。Ig 定量用 SRID 法^[7]。

1.3 电泳 采用薄层琼脂糖凝胶电泳,加

40—100 倍稀释的患者血清 1—2 μ l, 电压 100V, 电泳 50min.

1.4 亲和印迹法 操作步骤如下:

1.4.1 将特异性抗体结合到 NC 膜上: 在洁净玻板上加一种抗人 Ig 重链或轻链抗体 (100 倍稀释) 液. 把 1 张 12 \times 2cm 的 NC 膜条置于 Ab 上, 置湿盒中 5min, 然后在热空气下干燥 15min, 即成 NC-Ab 膜. 抗血清用量约为每 cm² 膜 18 μ l (NC 膜 180 μ m 厚). 这种 NC-Ab 膜置 4 $^{\circ}$ C 冰箱内至少可稳定 4 周, 且可预先制备.

1.4.2 封闭 NC-Ab 膜多余的蛋白结合位点: 将上述 NC-Ab 膜浸于含牛血清白蛋白 (BSA) 30% 的 PBST 液 (PBST 即含有 Tween-20 的磷酸盐缓冲生理盐水, pH 7.5, 10mmol/L: Na₂HPO₄ · 2H₂O 1.4956g, NaH₂PO₄ · H₂O 0.2208g, NaCl 4g, Tween-20 1ml 加蒸馏水至 1L) 中, 至少 30min, 最多不要超过 2h.

1.4.3 把特异性 Ig 转移到 NC-Ab 膜上: 被检血清经上述薄层琼脂糖凝胶电泳分离后, 把 NC-Ab 膜贴在电泳凝胶上. 保证使包被 Ab 面接触凝胶面. 避免气泡. 上加数层吸水纸, 再放上一块玻板及 1kg 重的物体, 让这种毛细印迹进行 15min.

1.4.4 探测印迹后的 Ig: 慢慢揭起电泳凝胶上的 NC-Ab 膜条. 用 PBST 洗 3 次, 每次 5min. 放入适量的酶标 Ab 溶液 (用 PBST 稀释 500—1 000 倍) 中, 室温下 30min. 再以 PBST 洗 3 次. 把 NC 膜条放入 HRP 染色液中 5—10min. 待区带显示清晰可见时, 用蒸馏水浸泡终止反应. (HRP 染色液: 10mmol/L, pH7.4 PBS 含 0.03% 4-氯-1-萘酚, 0.03% H₂O₂ 及 10% 甲醇. PBS: Na₂HPO₄ · 2H₂O 1.4422g, NaH₂PO₄ · H₂O 0.2622g 加蒸馏水至 1L).

1.5 自然印迹法 按 1.4.3 及 1.4.4 进行.

1.6 免疫固定法 (IF 法) 见参考文献 [6]

2 结 果

2.1 亲和印迹时间的观察: 样品经琼脂糖

凝胶电泳分离后, 在本实验条件下, 分别印迹 5, 10, 15, 20 及 25min. 结果显示毛细印迹 15min 即达到满意效果.

2.2 显色基质比较: HRP 的显色底物有 4-甲氧基-1-萘酚, 4-氯-1-萘酚, 邻苯二胺及 3', 3' 二氨基联苯胺等. 虽然这些基质均能使异常蛋白带染色, 但停止反应后退色速度有很大差异. 我们选择 4-氯-1-萘酚进行染色, 停止反应后退色速度慢且颜色鲜艳.

2.3 显色反应时间: 在室温下观察显色反应, 一般在 5—10min 染色带已清晰可见.

2.4 mIgM 鉴定后区带电泳谱 见图 1. 含有低浓度 mIgM (<0.2g/L) 的患者血清以区带电泳分离后分别用酸固定、免疫固定及亲和印迹. 结果显示, IF 法仅显示出 mIgM 区带, 未见轻链带. 而用亲和印迹法两者区带均清晰可见, 且不受其他 Ig 的影响 (例 1 为 mIgM- λ , 例 2 为 mIgM-K, γ 球蛋白浓度分别为 3.0 及 13.0g/L, 后者还含有 mIgG- λ 11.0g/L).

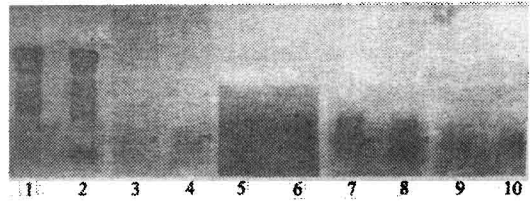


图 1 mIgM 鉴定后区带电泳谱

1, 3, 5, 7, 9 为例 1; 2, 4, 6, 8, 10 为例 2. 1, 2 用酸固定; 3, 4 用 IF (以抗人 IgM); 5—10 用亲和印迹法 (5, 6 以抗 λ ; 7, 8 以抗 IgM; 9, 10 以抗 K)

2.5 亲和印迹法、自然印迹法及 IF 法敏感度试验结果 见图 2. 以单克隆 IgG 标准品 (Behringwerk AG, OTRD 03, 26.4U/ml) 进行 mIgG 检测最低限度试验, 结果 3 种方法分别为: IF 法 30mU (相当于 mIgG 63.6ng); 自然印迹法 3mU (相当于 mIgG 6.36ng); 亲和印迹法 0.3mU (相当于 mIgG 0.636ng).

3 讨 论

1981—1991 年间, 我们共发现单克隆性 γ 球蛋白病 176 例 (包括院外送检病例). 其中多发性骨髓瘤 (MM) 患者占 38%, 恶性淋巴瘤

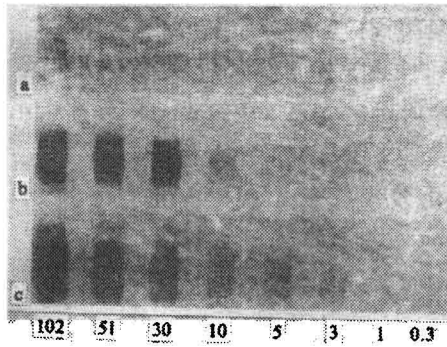


图2 亲和印迹法的敏感度试验 (mIgG)

a. IF 后银染色 b. 自然印迹 c. 亲和印迹

图下方所标数值其单位为 mU

(ML) 患者占 25%。按照这些病人的比例, 需要一种敏感的方法来监测病情。在 MM 患者中有 4 例为 mIgD, 其循环中的 mIgD 浓度大都低于 10g/L, 1 例 < 3.0g/L, 有 2 例长期未发现 mIgD 的存在。在 ML 所致的单克隆性 γ 球蛋白病中有 75% 分泌 mIgM, 而这些单克隆性 IgM 中有 76% 血清 IgM 含量均 < 5.0g/L。对这些低浓度的 mIg 以通常的免疫电泳及 IFE 来确定其 Ig 种类及轻链型别是十分困难的。

来文采用的亲和印迹技术, 首先将特异性抗体结合到 NC 膜上, 以薄层琼脂糖凝胶区带电泳把蛋白分离, 蛋白经毛细印迹到 NC 膜上

与其特异性抗体亲和, 再以酶标抗体探测被印迹之蛋白。其灵敏度大约是自然印迹法的 10 倍, IF 银染色法的 100 倍。不需任何昂贵特殊设备。整个过程仅需 2h (包括电泳分离), 不受其他 Ig 的影响。

参 考 文 献

- 1 小出典男, 他. イムノブロット法によるモノクローナル免疫グロブリンおよびペンスジョーンズ蛋白の微量検出法. 临床病理, 1987; (6): 638.
- 2 Mclachlan R. Monoclonal immunoglobulins; affinity blotting for low concentration in serum. *Clin Chem*, 1989; (3): 478.
- 3 Reinhart M, Malamud D. Protein transfer from isoelectric focusing gels; the native blot. *Anal Biochem*, 1982; 123: 229.
- 4 Brogen CH, Peltre P. Filter affinity transfer an immunospecific immunoblotting system [Abstract]. *J Biochem Biophys Methods*, 1987; 14: (Suppl): 22.
- 5 Mclachlan R, Peltre G. Characterization of monoclonal immunoglobulins by filter affinity transfer [Abstract]. *Clin Biochem Rer*, 1988; (9): 94.
- 6 阎有功, 范纯武. 醋酸纤维素膜原位免疫固定电泳技术及其在应用. 生物化学与生物物理进展, 1987; (5): 72.
- 7 叶应妩, 王毓三主编. 全国临床检验操作规程, 第一版, 江苏: 东南大学出版社, 1991: 295—297.

金属硫蛋白分离纯化过程中简便监测方法

铁 锋 潘爱华 李令媛 王文清* 茹炳根

(北京大学生物学系, 100871)

提 要

动物组织用 pH8.6, 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液匀浆, 经加热处理后, 离心上清经凝胶过滤分离, 洗脱组分用简便、快速的线扫极谱监测, 富含半胱氨酸残基的金属硫蛋白或其类似物在钴氨溶液中产生良好的极谱波, 从而达到准确、简便的监测目的。此法特别适用于从新的动植物体提取由复杂因素诱导合成的金属硫蛋白或其类似蛋白。

关键词 金属硫蛋白, 分离纯化, 线扫极谱

*北京大学技术物理系。

收稿日期: 1992-05-22

修回日期: 1992-7-17