

γ-干扰素时间分辨免疫荧光分析方法的建立

额尔敦 郭美香 韩玲¹⁾ 其其格 刘士山 张丽民¹⁾ 陈杞¹⁾ 张庆荣²⁾

(解放军第二五三医院免疫中心, 呼和浩特 010051)

摘要 采用生物素-Eu³⁺ 标记链亲和素双抗体夹心时间分辨免疫荧光分析技术 (TRIFMA), 建立新的 γ-干扰素检测技术, 提高 γ-干扰素检测方法的灵敏度. 用固相包被的兔多抗捕获样品中 IFN-γ, 以具有中和 IFN-γ 抗病毒活性的生物素化单抗作为二抗体, 再加 Eu³⁺ 标记链亲和素并荧光检测. 已知不同浓度标准 IFN-γ CPS 值的标准曲线, 判断待检样品中 IFN-γ 量. 本方法最低检测值为 0.02 μg/L, 检测范围为 0.02~400 μg/L, 而 TNF-α, IL-2 和 IFN-α 等细胞因子无交叉反应. 对基因工程 IFN-γ 的生产, 纯化过程中定性, 定量监控以及对培养细胞上清中 IFN-γ 量的检测等都有实用价值.

关键词 γ-干扰素, Eu³⁺ 标记链亲和素, 时间分辨免疫荧光分析技术

学科分类号 R371-33

γ-干扰素 (IFN-γ) 是由 Th1 型细胞产生的. 它在调节免疫应答反应中起主要作用. 过去, IFN-γ 的检测主要依靠它的生物学活性, 尤其是 IFN-γ 对病毒 RNA 合成的抑制作用的检测^[1,2] 或者 IFN-γ 诱导靶细胞对进攻病毒的细胞病理变化的抵制作用的检测^[3] 来获得 IFN-γ 对病毒的抑制作用. 然而这些实验中涉及到有潜在感染能力的病毒, 并且对非病毒学专业人员进行操作起来较困难. 随着单克隆抗体的发展, 很多较可靠的定量检测 IFN-γ 方法, 如放射免疫检测方法, ELISA 方法等相继建立^[4]. 但是, ELISA 方法的灵敏度不高, 而放射免疫方法的稳定性差, 易衰减, 并有放射性危害等缺点. 所以, 有必要改进检测 IFN-γ 方法的灵敏度, 不仅对临床诊断而且对基因工程生产 IFN-γ 的监控及 LAK 细胞培养产生的低水平 IFN-γ 的研究都有很大意义.

为此, 我们建立了 IFN-γ 时间分辨免疫荧光分析检测技术, 并初步测定了培养白细胞上清和血清中 IFN-γ 量.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

IFN-γ 单克隆抗体, 多克隆抗体, IFN-γ 以及 ABC-ELISA 药盒均第二军医大学微生物教研室产品. 酯化生物素 (BNSH) 和 ABC 复合物, 海军医学研究所流行病研究室程振球研究员惠赠. 链亲和素, BSA, Sigma 产品. Eu³⁺ 标记药盒, Wallac 产品. 条排酶标板, Wallac DELFIA 产品. 时间分辨

荧光计, Arcus1234 及配套装置. 酶联检测仪, STL340ATC 生产.

1.2 HBsAg 阳性和阴性血清

取 HBsAg 阳性和阴性 (正常人) 肝素抗凝血, 离心取血清, -20℃ 保存. 测定其 IFN-γ 量.

1.3 生物素标记 IFN-γ 单抗

按缪晓辉等^[5] 方法标记. IFN-γ 单抗, 选择了五种 BNSH 与标记蛋白 (IgG) 量比进行标记, 以 700 mg/g 作为常规标记比值. 标记品用 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 适当稀释, 加等量甘油, 分装, 在 -80℃ 保存.

1.4 Eu³⁺ 标记链亲和素 (SA)

Eu³⁺ 标记链亲和素是在药盒说明书标记方法进行. 50 mmol/L, pH 8.8, 含 0.9% NaCl 的碳酸缓冲液中异硫酸苯基-EDTA-Eu³⁺ 和链亲和素的摩尔比为 80 倍混合, 在 4℃ 过夜. 加入 Sephadex G-25 柱 (1 cm × 25 cm), 洗脱液淋洗, 收集流出液 (6 min/ (ml·管)), 逐管测量吸光度 (A₂₈₀), 合并峰管, 定出蛋白量, 用 Arcus1234 测定峰管荧光强度. 同时测已知 Eu³⁺ 浓度标准液. 从而获得标记到链亲和素上 Eu³⁺ 的量, 所得标记率 (Eu³⁺ / SA) 约 7, 蛋白质回收率约 70%.

1.5 固相包被

用包被缓冲液将兔抗 IFN-γ 多抗稀释成 20 mg/L 工作液, 分别取 200 μl 加入酶联板孔中,

¹⁾解放军第二军医大学放射医学研究所, 上海 200433.

²⁾上海市岳阳医院中心实验室, 上海 200437.

收稿日期: 1998-04-24, 修回日期: 1998-08-17

室温放置 24~48 h, 洗涤三次; 每孔加封闭液 250 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗涤二次, 室温晾干后装入塑料袋中封闭, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用前冲洗一次。

1.6 分析步骤

取已包被抗体的微量滴定条, 空白、标准、样品均做双孔, 空白管加试验缓冲液 100 μL , 标准曲线加 0.02、0.1、0.5、1、10、25、50、100、200、400 $\mu\text{g/L}$ 标准 IFN- γ 溶液 100 μL 。其中, 靠近灵敏度极限的区域标准浓度设置点较密, 如 0.02~0.1, 而检测值较稳定的中间区域标准浓度设置间隔较大些, 如 1~10 等。样品孔加待测样品 25 μL 后补加试验缓冲液至 100 μL , 室温振荡反应 1 h。用洗涤液洗 4 次, 向每孔加入稀释生物素化抗 IFN- γ 单抗液 100 μL , 室温振荡反应 1 h。洗涤 6 次, 每孔加入 Eu^{3+} 标记稀释链亲和素 100 μL , 室温振荡反应 1 h, 洗涤 10 次, 加增强液 100 μL , 振荡 10 min, 放置 5 min, 即可在 LKB Wallac 1234 时间分辨荧光计上测量荧光强度, 用预先编制的程序绘出标准曲线, 并直接打印出待测样品浓度。

2 结果

2.1 方法学指标

2.1.1 分析范围和灵敏度: 100 μL 不同浓度标准 IFN- γ 分析结果 (图 1) 表明, 线性范围是 0.02 $\mu\text{g/L}$ ~400 $\mu\text{g/L}$ 。以零标准管平均 CPS $\pm 2s$ 的计算, IFN- γ 最小可测值是 0.02 $\mu\text{g/L}$ 以下。

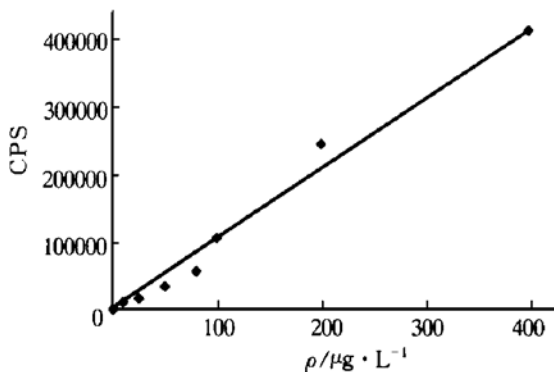


图 1 IFN- γ 标准曲线

$r = 0.99$.

2.1.2 重复性: 一个月内标准曲线重复 6 次, 每次每标准点 3 个重复孔, 批内 CV 是 2.78%~5.1%, 平均 3.94%。批间 CV 为 3.5%~11.3%, 平均 7.4%。

2.1.3 准确性: 小牛血清中分别加入标准 IFN- γ , 使其浓度为 10 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$, 同标准

曲线一起于 3 周内分别实验 3 次。10 $\mu\text{g/L}$ ($n = 9$) 时平均测得值 10.7 $\mu\text{g/L}$, CV 为 5.1%, 回收率 107.0%。50 $\mu\text{g/L}$ ($n = 12$) 时平均测得值 47.5 $\mu\text{g/L}$, CV 为 2.78%, 回收率 95.0%。100 $\mu\text{g/L}$ ($n = 12$) 相对应的数据分别为 99.18 $\mu\text{g/L}$, 5.0%, 99.18%。

2.1.4 特异性: 分别测定 IFN- α , TNF- α , IL-2, 结果表明检测物荧光强度值 CPS 均接近阴性对照孔。将 50 $\mu\text{g/L}$ IFN- γ 分别用 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 热变性, pH 2.0 10 min 酸变性和 0.1% 表面活性剂 SDS 10 min 变性处理等不同变性方法处理, 比较 ABC-ELISA 方法和时间分辨荧光分析方法相关性, 两种方法结果基本一致。

表 1 50 $\mu\text{g/L}$ IFN- γ 经变性处理后的测定结果

	65 $^{\circ}\text{C}$ 30 min	pH 2.0 10 min	0.1% SDS 10 min
ABC-ELISA/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0	0.82	1.35
TRIFMA/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0	0.96	1.51

2.2 双抗体夹心 TRIFMA 法最适条件

2.2.1 包被条件: 选择 3 种缓冲液, 即 pH 5.0, 20 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液, pH 7.4, 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 9.6, 20 mmol/L 碳酸盐缓冲液, 结果以磷酸盐缓冲液包被后吸附 IgG 能力最大, 与文献 [5] 报道相同。用包被 IgG 蛋白浓度 20 mg/L 时, Wallac 板条上检测灵敏度最高。

2.2.2 生物素化单抗和 Eu^{3+} 标记链亲和素使用浓度: 用矩阵法, 即固定 IFN- γ 浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, 0.02 $\mu\text{g/L}$ 以多个稀释度的生物素化单抗和 Eu^{3+} 标记链亲和素。当生物素化单抗浓度为 10 $\mu\text{g/L}$, Eu^{3+} 标记链亲和素浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 时, 敏感度最高, 能检测到 0.02 $\mu\text{g/L}$ 水平以下。

2.2.3 最适反应时间: 固相多抗在室温慢振荡 1 h 内能最大限度地捕获待检品中的 IFN- γ 。生物素化单抗加入后室温振荡 1 h 反应最理想。时间过长则本底值增高, 时间短则降低检测 IFN- γ 的高限值。

2.3 HBsAg 阳性和阴性血清中 IFN- γ 测定结果

取 HBsAg 阳性和阴性病人的血, 同时用两种方法进行测定, 结果与阴性对照 CPS 一样。

3 讨论

时间分辨荧光免疫分析技术问世以来, 因其具有灵敏度高, 试剂盒货架寿命长, 操作简便和非放

射性等优点, 故而发展很快^[6-8], 目前 Pharmacia 公司已有近 40 种药盒投放市场, 为此本文应用多抗对单抗建立“夹心”基础上, 再用生物素亲和素放大系统分析 IFN- γ 的 TRIFMA 方法, 从而 IFN- γ 检测灵敏度提高到 0.02 $\mu\text{g/L}$ 水平. 而且, 生物素标记抗体技术比 Eu^{3+} 标记抗体更成熟, 因此也避免了每次标记抗体的不便.

目前国内外未见 IFN- γ 时间分辨荧光分析方法的文献报道, 而国内外已有检测 IFN- γ 药盒中 ABC-ELISA 方法较普遍, 灵敏度也只达到 1 $\mu\text{g/L}$ 水平. 而从本实验结果可见, IFN- γ 浓度在 0.02~400 $\mu\text{g/L}$ 之间与 CPS 呈线性关系, 较 ABC-ELISA 方法宽一个数量级, 而分析灵敏度则较他们的结果约高 100 倍, 而且与其他细胞因子 (包括 IFN- α , IL-2, TNF- α 等) 无交叉反应显示了良好的特异性.

对 HBsAg 阳性血清 76 份标本检测, ABC-ELISA 和 TRIFMA 两种方法都没检测到, 说明血清中 IFN- γ 含量低于 0.02 $\mu\text{g/L}$, 这可能是分泌到外周血清内的 IFN- γ 含量本身低于 0.02 $\mu\text{g/L}$, 或者分泌到外周血清内的 IFN- γ 半衰期很短, 从而很快衰解掉, 使得血清内 IFN- γ 量低于 0.02 $\mu\text{g/L}$ 水平所致.

本文在研究过程中发现, 检测系统的关键因素有: 第一, 螯合剂. Eu^{3+} 标记链亲和素用的螯合剂质量很重要. 本文曾用国产螯合剂标记链亲和素, 但本底普遍比 Wallac 生产螯合剂标记的高. 因此, 合成螯合剂时必须保护好蛋白质结合基团. 并且, 先与 Eu^{3+} 螯合, 再与蛋白质结合, 并且保证在标记反应体系中稳定. 第二, 生物素标记单抗和 Eu^{3+} 标记链亲和素的量控制非常重要. 它们的量直接影响灵敏度和本底值, 尤其前者的量更为重要. 作者认为, 低浓度生物素标记单抗, 振荡反应和适当延长反应时间, 比 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温, 不振荡反应更有助于提高灵敏度, 降低本底.

综上所述, 本文建立的 IFN- γ TRIFMA 法, 分析范围和灵敏度均较理想, 并且稳定性也很好. 此方法的建立将为 IFN- γ 的基础和应用提供又一个有效和可靠的手段.

参 考 文 献

- Bloom B R, Salgame P, Diamond B. Revisiting and revising Suppressor T cells. *Immunol Today*, 1992, **13** (4): 131~ 136
- Allen P, Giron D G. Rapid sensitive assay for interferon based on the inhibition of MM virus nucleic acid synthesis. *Appl Microbil*, 1970, **20** (4): 317~ 321
- Familletti P C, Rubinstein S, Pestka S. A convenient and rapid cytopathic effect inhibition assay for interferon. *Methods Enzymol*, 1987, **78** (4): 387~ 392
- Oda S, Akinaga S, Kumagai A, *et al.* Generation of a new monoclonal antibody and its application for determination and purification of biologically active human gamma-interferon. *Hybridoma*, 1986, **5** (4): 329~ 338
- Miao X H, Pan W, Wu Q X, *et al.* An ABC-ELISA for human natural and recombinant interferon-gamma. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 1994, **14** (1): 58~ 61
- He G C, Chen Q, Chen K M, *et al.* A time-resolved immunofluorometric assay of human Alpha-Fetoprotein. *Immunological Journal*, 1994, **10** (2): 130~ 132
- Toivonen E, Hemmila I, Marniemi J, *et al.* Two-site time-resolved immunofluorometric assay of human insulin. *Clin Chem*, 1986, **32** (4): 637~ 640
- Hemmila I. lanthanides as probes for time-resolved fluorometric immunoassay. *Scand J Clin Lab Invest*, 1988, **48** (5): 389~ 399

Two-site Time-resolved Immunofluorometric Assay of Human Interferon-gamma. Erdeni, GUO Mei Xiang, HAN Ling¹⁾, QI Qi-Ge, LIU Shi-Shan, ZHANG Li-Min¹⁾, CHEN Qi¹⁾, ZHANG Qing-Rong²⁾ (*The Immunological Detection Center of 253rd Hospital, P L A, Huhhot 010051, China;* ¹⁾*Division of Radiation Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;* ²⁾*Center Laboratory of Yueyang Hospital, Shanghai 200437, China*).

Abstract To establish a highly sensitive time-resolved immunofluorometric assay of human interferon-gamma. A two-site “Sandwich”-type time-resolved immunofluorometric assay for human interferon-gamma is described. It is based on usage of specific polyclonal and monoclonal antibodies. The polyclonal antibody to bind the interferon-gamma in samples are immobilized on the surface of microtiter plate strip wells. Following capture of IFN- γ present in sample. Then monoclonal antibody, which is biotinylated, is added to wells. The second biotin labeled antibody will allow the subsequent specific binding of Eu^{3+} labeled streptavidin. After the immunoreactions completed, the bound fraction of Eu^{3+} -label is quantified by dissociating it in a fluorescence-enhancement solution and measuring its fluorescence with Wallac 1234 fluorometer. The sensitivity

of the assay is 0.02 $\mu\text{g/L}$. The standard curve is linear from 0.02 $\mu\text{g/L}$ to 400 $\mu\text{g/L}$. The time-resolved immunofluorometric IFN- γ assay is quick, sensitive and suitable for testing large numbers of

samples, and may be useful in both industrial producing and clinical studies.

Key words IFN- γ , Eu³⁺-labeled streptavidin, time-resolved immunofluorometric assay

碱性磷酸酶标记链霉亲和素*

赵启仁 李美佳 刘洁 宋娜玲 庄湘莲 陈艾

中国医学科学院
放射医学研究所, 天津 300192
中国协和医科大学

摘要 碱性磷酸酶标记链霉亲和素 (AP-SA) 是酶放大时间分辨荧光免疫分析 (EATRFIA) 通用的、最关键的试剂。报告了 AP-SA 的戊二醛二步标记方法。用自行研制的荧光发展溶液和 AP 的底物 5-氟水杨酸磷酸酯测定了标记物 AP-SA 的特性, AP 的标记回收率为 38.7%; AP-SA 稀释 200~12 800 倍时, 稀释倍数和 T_b 的信/噪比呈线性关系; 至少在两个月内, AP-SA 的酶活性是稳定的。

关键词 酶放大时间分辨荧光免疫分析, 碱性磷酸酶, 链霉亲和素

学科分类号 R371-33

酶放大时间分辨荧光免疫分析法 (enzyme-amplified time-resolved fluoroimmunoassay, EATRFIA) 是时间分辨荧光免疫分析的一种最新的分析方法。它把生物素-亲和素系统的高亲和力和生物放大作用、镧系元素螯合物的固有优点 (Stokes 位移大、荧光寿命长和窄发射峰等) 以及时间分辨和波长分辨测量技术集于一体, 成为一种灵敏、精密、快速和不用放射性核素的全新的免疫分析方法^[1-3]。基本原理如下: 抗原 (标准或样品) 与固相单克隆抗体₁ (McAb₁) 和生物素化 McAb₂ 同时反应, 洗涤, 再与碱性磷酸酶标记链霉亲和素 (AP-SA) 反应, 洗涤, 这时经 SA 与生物素连接, 形成了最终的免疫反应复合物。再加入 AP 的底物 5-氟水杨酸磷酸酯 (5-FSAP), 生成产物 5-氟水杨酸 (5-FSA)。最后加入 EDTA-Tb (铽) 高 pH 溶液, 生成荧光寿命长、荧光产额高的 5-FSA: EDTA: Tb 三元复合物^[4]。测荧光强度可确定抗原的量。

标记物 AP-SA 是 EATRFIA 中的最关键的通用试剂。本文报告了 AP-SA 的制备方法及其特性的测定。

1 材料和方法

1.1 材料

5-FSAP 和荧光发展溶液: 本所研制合成^[5,6]。

Tb₄O₇: 上海跃龙有色金属公司。碱性磷酸酶 (AP) 和链霉亲和素 (SA): 均为 Sigma 公司产品。戊二醛: 25%~28%, 上海化学试剂采供站。12 孔微滴定板条: 芬兰 Labsystem 公司出品。

1.2 仪器

LKB-wallac Arcus-1230 时间分辨荧光仪。LKB-1296-001 板振荡器。ADIL 公司自动微滴定板洗涤器。Olivetti M₂₄₀ 微机及 LKB 1230-308 FIACAL 软件。

1.3 AP 标记 SA

用戊二醛二步法。称 2.5 mg AP (50 IU/mg), 加入 0.2 ml 含 1.25% 戊二醛的 0.1 mol/L PB (pH 6.8) 中, 混匀, 置室温 (22℃) 下, 反应过夜。4℃ 下, 电磁搅动, 把反应液对 0.05 mol/L PBS (pH 7.2) 透析 12 h, 换透析液 4 次。把 1.5 mg SA 溶于 0.1 ml 1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5), 然后把上述反应液加入, 混匀, 4℃ 下反应 24 h。加入 10 μl 0.2 mol/L 赖氨酸溶液, 混匀, 22℃ 下, 反应 2 h。在 4℃ 下, 电磁搅动, 把反应液对 0.05 mol/L PBS (pH 7.2) 透析过夜, 其间换透析液 4 次。把反应液离心 (4 000 r/min, 15 min)。上清液用 AP-SA 的稀释缓冲液 (见下)

* 国家自然科学基金资助课题 (39770216)。

收稿日期: 1998-05-05, 修回日期: 1998-08-24