

固定化蛋白质 A 在流动注射荧光免疫分析中的应用

任学贞

(山东大学化学系, 济南 250100)

J. N. MILLER

(Department of Chemistry, Loughborough University of Technology, Loughborough, U. K.)

摘要 利用蛋白质 A 在近中性 pH 条件下, 能够与大多数哺乳动物抗体的 Fc 部分结合; 在低 pH 条件下, 又能将抗体洗脱下来的特性, 以一蛋白质 A 固相免疫反应器, 分离与抗体结合及未结合的抗原, 并结合流动注射进样方便的特点建立了一个快速、简便并易于自动化的流动注射荧光免疫分析方法, 研究了各种实验变量对测定的影响, 并用于人体转铁蛋白的测定。

关键词 蛋白质 A, 荧光免疫分析, 流动注射, 转铁蛋白

蛋白质 A 是从金黄色葡萄球菌细胞壁上提取的一种分子量为 4200 的蛋白质, 结合大多数哺乳动物抗体的 Fc 部分^[1], 具有较强的耐 pH 变化及温度变化的能力^[2]。尽管早在 40 年代就发现了这种蛋白质^[3], 直到 60 年代 Forsgren 等人^[4]才首次证明其与抗体的 Fc 部位结合, 而不是与抗原结合的 Fab 部位结合。

抗体与载体以随机方式直接结合会限制其与抗原的结合能力, 此外, 由于固定抗体的专一性, 一个免疫反应器只能用于一种抗原的测定, 而应用固定化的蛋白质 A 免疫反应器可消除这些不利因素。蛋白质 A 与抗体的 Fc 部分结合而抗体与抗原结合的 Fab 部分远离载体而伸向流动相, 提高了与抗原的结合能力。此外, 由于所有免疫球蛋白 (IgG) 在近中性 pH 条件下都能与蛋白质 A 结合, 而在低 pH 条件下又能洗脱下来, 从而保证了蛋白质 A 免疫反应器与抗体的结合效率与使用灵活性。应用固定于琼脂糖凝胶或多孔玻璃微球上的蛋白质 A 免疫反应器进行抗体分离与纯化及标记抗体的分离, 已有较多报道^[5,6]。而应用于流动注射免疫分析的报导却很少。最近, Palmer 等^[7]应

用包含固定化蛋白质 A 的流动注射装置, 建立起了一个电化学酶免疫分析方法, 并探讨了用于小分子药物分析的可行性。

Lucifer Yellow VS (LYVS)^[8]可以在温和条件下标记蛋白质。其 Stokes 位移大, 发射波长较大及在 pH2—10 范围内荧光强度保持不变等优点, 恰能弥补免疫分析中常用荧光探针荧光素的不足, 是一个较理想的标记蛋白的荧光探针。

本文利用竞争抑制免疫分析原理, 以一个蛋白质 A 固相免疫反应器, 分离与抗体结合和未结合的标记人体转铁蛋白 (HTr-LYVS), 并结合流动注射进样方便的特点, 建立了一个快速、简便, 并易于自动化的在线培育, 在线分离的流动注射多相荧光分析方法, 并用于人体转铁蛋白的测定。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人体转铁蛋白 (HTr), 血清和山羊抗-HTr 血清由 Sigma 化学公司生产。固定于多孔玻璃

球珠 (75—125 μ m) 上的蛋白质 A (商品名 PROSEP™-A) 为 Bioprocessing 公司产品. 结合缓冲液 PBS (pH 7.4) 和洗脱缓冲液 0.1 mol/L 柠檬酸-0.15 mol/L NaCl (pH 3.0) 均按 Bioprocessing 说明书配制. 免疫反应器是利用蠕动泵将 PROSEP™-A 填充到一个微型玻璃柱 (50 mm $\times$ 3 mm) 中制得. 标记人体转铁蛋白 (HTr-LYVS) 的制备方法如下: 在摇动下, 将 LYVS 的 0.1 mol/L NaHCO₃ 溶液 (6 g/L) 缓慢滴加到等体积的 HTr 0.1 mol/L NaHCO₃ 溶液 (20 g/L) 中, 室温下放置 2 h 后, 用 PD-10 分离柱 (Pharmacia 产品) 分离 HTr-LYVS 与过量的 LYVS, 并将 HTr-LYVS 转换到结合缓冲液中.

1.2 仪器装置

实验装置如图 1, 所有的荧光测定均在 Perkin-Elmer LS-2B 型荧光计上进行, 仪器配有 7 μ l 的石英流动池. 激发波长和发射波长分别为 433 nm 和 525 nm.

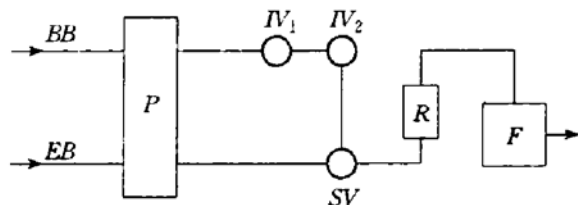


图 1 流动注射荧光免疫分析装置

BB: 结合缓冲液, EB: 洗脱缓冲液, P: 蠕动泵, SV: 缓冲液转换开关, IV₁, IV₂: 进样阀, R: 免疫反应器, F: 荧光计

1.3 方法原理

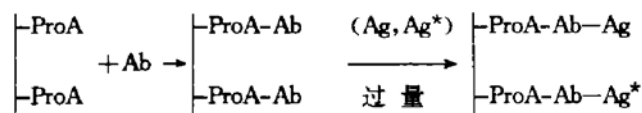
基于在线培育, 在线分离的多相荧光免疫分析法. 其原理如图 2 所示. 首先在结合缓冲液流中, 完成抗体与蛋白质 A 的结合, 免疫反应及结合抗原与未结合抗原的分离. 然后在洗脱缓冲液中, 洗脱抗体-抗原复合物, 进行荧光测量.

1.4 操作步骤

在结合缓冲液流中, 通过注射阀 IV₂ 注入 50 μ l 抗体后, 再通过注射阀 IV₁ 注入 50 μ l HTr-LYVS 和样品的混合物. 当未与抗体结合的 HTr-LYVS 峰流出后, 将开关 S 转换至

洗脱缓冲液, 洗脱抗体-HTr-LYVS 复合物 6 min. 再将 S 转换至结合缓冲液以平衡免疫反应器约 5 min 后进行下一次实验. 测量洗脱峰高以计算血清中转铁蛋白的含量.

在结合缓冲液流中



在洗脱缓冲液中

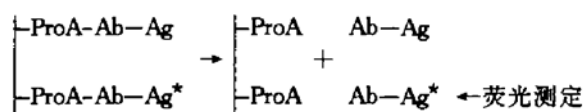


图 2 流动注射荧光免疫分析原理示意图

ProA: 固定化蛋白质 A, Ab: 抗体, Ag: 抗原, Ag*: 荧光标记抗原.

2 结果与讨论

2.1 洗脱曲线

HTr-LYVS 的洗脱曲线如图 3. 图 3 中 1 为未与抗体结合的 HTr-LYVS 峰, 2 为与固定于免疫反应器上的抗体结合部分的 HTr-LYVS 洗脱峰.

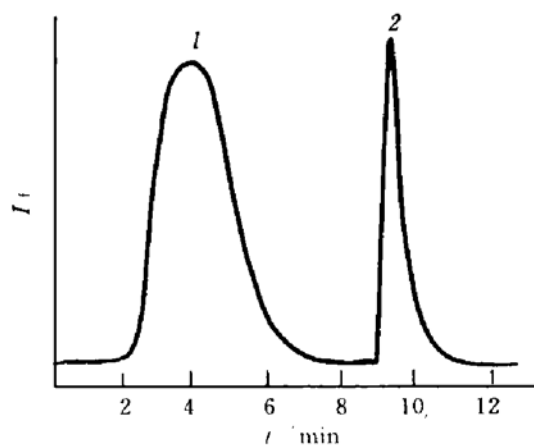


图 3 洗脱曲线

2.2 非专一性研究

在流动体系中仅注射 HTr-LYVS, 没有检测到洗脱峰 (图 2 中峰 2), 表明 HTr-LYVS 不

会结合到蛋白质 A 上去.

2.3 缓冲液组成及 pH 影响

分别利用 PBS (pH7.4) 和 0.1mol/L 硼酸-0.5mol/L NaCl (pH8.5) 作为结合缓冲液, 洗脱峰高不变. 用 0.1mol/L 柠檬酸-0.15mol/L NaCl (pH3.0) 和 0.1mol/L 氨基乙酸-HCl (pH3.0) 作洗脱缓冲液, 洗脱峰高也无变化. 研究了不同 pH 柠檬酸-0.15mol/L NaCl 缓冲液对洗脱峰高的影响. 结果表明, 在 pH2.5—3.0 范围内, 洗脱峰高不变, 而在 pH 高于 4.0 时不能将抗体-HTr-LYVS 从蛋白质 A 上洗脱下来. 为保证免疫反应器的活性, 实验选用 PBS 和 0.1mol/L 柠檬酸-0.15mol/L NaCl (pH3.0) 分别作为结合和洗脱缓冲液.

2.4 流速的影响

在 0.2—0.6ml/min 范围内研究了流速对洗脱峰的影响. 结果表明洗脱峰高随洗脱液流速的增加略有减小, 而结合液流速的变化对峰高无影响. 实验选用流速均为 0.25ml/min.

2.5 校正曲线及人血清中转铁蛋白的测定

校正曲线如图 4 所示. B 为在所对应转铁蛋白浓度下洗脱峰高, B_0 为转铁蛋白浓度为零时的洗脱峰高.

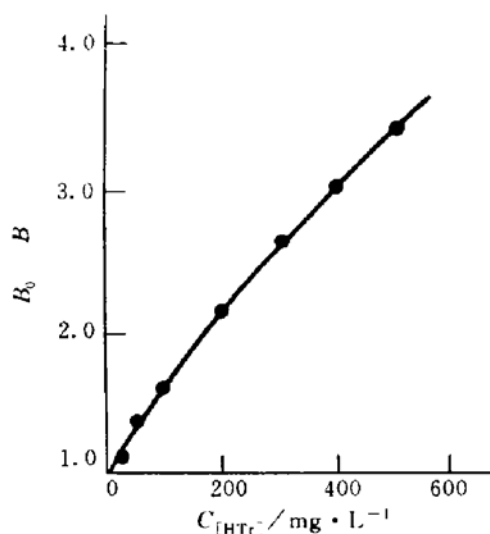


图 4 测定人体转铁蛋白的校正曲线

血清稀释 20 倍和 10 倍时测定结果分别为 102mg/L 和 208mg/L, 8 次测定的相对标准偏

差分别为 10.6% 和 9.4%. 5d 连续测定的日间隔 (inter-day) CV%, 分别为 11.3% 和 9.8%. 50mg/L 和 100mg/L 的标准人体转铁蛋白, 在稀释 20 倍的人血清中的回收率分别为 96.8% 和 102.7%. 一个反应器最少可用 3 周, 130 次以上仍保持抗体的结合活性.

2.6 结论

利用蛋白质 A 的特性, 建立了一个测定人血清中转铁蛋白的流动注射荧光免疫分析方法. 该技术实质上是一种竞争免疫分析方法. 即定量分析的基础是过量的抗原和标记抗原竞争有限抗体的免疫反应. 在固定抗体和标记抗原含量的条件下, 随着待测抗原含量的增加, 与抗体结合的标记抗原的量减少, 测量信号降低. 表现在图 3 中, 峰 1 增加, 峰 2 减弱.

蛋白质 A 具有能够与各种哺乳动物 IgG 结合的特性, 利用流动注射免疫分析方法, 在同一个蛋白质 A 免疫反应器上可以进行多种物质的测定. 由于采用在线分离结合与未结合抗原, 不需洗涤步骤, 使得该法操作较为简单, 并易于实现自动化.

参 考 文 献

- 1 Richman D D. *New Devel Diagn Virol*, 1983; **104**: 159
- 2 Sjöholm I. *FEBS Lett*, 1975; **52**: 53
- 3 Verwey W F. *J Exp Med*, 1940; **71**: 635
- 4 Forsgren A, Sjöquist J. *J Immunol*, 1966; **97**: 822
- 5 Goding J W. *J Immunol Methods*, 1976; **13**: 215
- 6 Page M, Audette M, Caron M. *Can J Biochem*, 1979; **57**: 286
- 7 Palmer D A, Edmonds T E, Searn N J. *Analyst*, 1992; **117**: 1679
- 8 Stewart W W. *Nature*, 1981; **292**: 17

Application of Immobilized Protein A in Flow Injection Fluoroimmunoassay. Ren Xuezheng (Department of Chemistry, Shandong University, Jinan 250100, China); J. N. MILLER (Department of Chemistry, Loughborough University of Technology, Loughborough, U. K.).

Abstract A convenient, semi-automated flow injection fluoroimmunoassay method has been developed incorporating the flexibility of sample handling of flow injection system containing a immobilized protein A immunoreactor. Protein A can binds the Fc region of most mammalian antibodies at near neutral pH, and the bound antibodies can be eluted from pro-

tein A at acid pH. This peculiar property of protein was exploited to separate the antigen bound to antibody and the unbound ones. Experimental variables have been studied and the method has been used to determine the transferrin contents in human serum.

Key words protein A, fluoroimmunoassay, flow injection, transferrin

用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法

静天玉 赵晓瑜

(河北大学生物技术研究中心, 保定 071002)

摘要 以二硫苏糖醇 (DTT) 或 *L*-抗坏血酸 (Vit C) 为终止剂改进的经典邻苯三酚法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性. 反应体系: 50mmol/L 邻苯三酚, pH8.20, 总体积 9ml, 25℃, 加一滴 DTT (100mmol/L) 或 Vit C (5%), 约 50μl, 终止自氧化反应. 终止后, 反应体系的 420nm 光吸收在 1h 内保持恒定. 终止剂法的邻苯三酚自氧化率及酶活测定灵敏度与经典法相近, 一个酶活单位相当于纯 SOD 100μg/L.

关键词 超氧化物歧化酶, 邻苯三酚自氧化, 终止反应, O_2^- 清除剂

经典邻苯三酚法 (简称经典法) 是 Marklund 等^[1]于 1974 年发表的一种测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的简便方法. 然而该法的呈色反应与光吸收值 (A_{420}) 的测定必须同步进行, 故样品池必须保持恒温, 且不能同时处理多个样品. 丁克祥等^[2]以浓盐酸为终止剂改进了这个方法, 但由于酸化使反应体系的 A_{420} 明显降低. 为提高自氧化率, 必须增加邻苯三酚的剂量, 从而降低了该法的灵敏度; 此外, 用盐酸终止反应后, 必须在 5—8min 内测定 A_{420} ^[3], 这也限制了该法的应用. 本文用二硫苏糖醇 (DTT) 或 *L*-抗坏血酸 (Vit C) 终止邻苯三酚自氧化反应 (简称终止剂法), 克服了上述缺点. 终止后, 反应体系的 A_{420} 在 1h 内保持恒定.

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 邻苯三酚和二

乙撑三胺基五乙酸均为国产分析纯, 普通 (比活 $\geq 5 \times 10^6$ U/g) 及高纯 (比活 $\geq 1 \times 10^7$ U/g) SOD, 系河北大学生物工程公司产品; 721 分光光度计, 上海第三分析仪器厂; 超级恒温器, 重庆实验设备厂.

1.2 方法

1.2.1 经典法自氧化率的测定 在 20ml 试管中加入 9ml Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L 二乙撑三胺基五乙酸, pH8.20), 于 25℃ 超级恒温水浴中放置 20min. 用微量注射器加入 40μl 25℃ 预热的邻苯三酚溶液 (45mmol/L 邻苯三酚, 于 10mmol/L HCl 中), 立即混匀并倒入 3cm 光径的样品杯中, 对照杯加 9ml Tris-HCl 缓冲液. 室温 25℃, 每隔 30s 测定一次 A_{420} , 自氧化率 (A_0) 控制在 0.06/min.

1.2.2 终止剂法自氧化率的测定 其步骤与