

医学生化

生物素-链霉亲和素免疫学法测定地高辛的研究

宋耀虹 冯 涛 林其燧

(中国医学科学院 北京协和医院, 北京 100730)
(中国协和医科大学)

摘要 采用国产链霉亲和素直接包被塑料板孔, 生物素标记抗体, 建立的竞争酶联免疫吸附试验的方法测定血中地高辛浓度. 其测定灵敏度为 $0.0964 \mu\text{g/L}$, 最低检测限为 $0.2251 \mu\text{g/L}$, 测定三份低、中、高浓度的血清标本, 批内变异系数为 8.9%, 5.9%, 2.4%; 批间变异系数为 15.8%, 10.1%, 9.2%, 测定回收率在 89.1%~107.22% 之间, 此法与 FPIA 方法相关良好 ($r = 0.9488$).

关键词 生物素-链霉亲和素, 地高辛, 直接包被法, 竞争酶联免疫吸附试验

几乎所有的塑料都有吸附蛋白质的能力, 鉴于链霉亲和素是由 4 个相同亚基组成的蛋白质, 所以此文将链霉亲和素溶于去离子水作预包板, 置室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) 3 h, 并采用生物素标记抗体, 利用生物素和亲和素之间的强亲和作用和多价反应性, 建立了竞争酶联免疫吸附法来检测地高辛.

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂: 链霉亲和素 (streptavidin, SA) 上海静安区医学化验所; 酯化生物素, 又名生物素酰羟基丁二酰亚胺 (biotinyl-N-hydroxysuccinimide, BNHS) 上海中国人民解放军海军医学研究所; 地高辛 (digoxin, DIG) Sigma 产品; 抗地高辛抗体 (抗 DIG-IgG) 本科自制; 人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) Sigma 产品; 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) Sigma 产品; 二甲基甲酰胺 (dimethylformamide, DMF) 广州医药站化学试剂公司分装.

1.1.2 仪器: ClinioBio 128 型酶标仪 (奥地利); 96 孔酶标板条 (丹麦).

1.1.3 标本来源: 北京协和医院住院及门诊病人, 正常标本来源于血库献血人员.

1.2 方法

1.2.1 BNHS-IgG 的合成: 用 DMF 将 BNHS 制成 1 g/L 溶液, 用 0.1 mol/L pH 9.0 NaHCO_3 把抗体配成 $1 \sim 2 \text{ g/L}$, 以 BNHS: IgG (体积比 1: 8~1: 15, 重量比为 1: 7 左右), 室温搅拌 3 h ($15 \sim 20^\circ\text{C}$), 对 0.05 mol/L pH 7.2 PB 透析过夜, 加等体积甘油, -30°C 保存^[1].

1.2.2 DIG-HSA-HRP 的合成: a. HRP 的修饰: 经 NaIO_4 氧化的 HRP, 可与含多个 $-\text{NH}_2$ 的 HSA 在 pH 9.5 条件下共价结合: 5 mg HRP 溶于 1 ml 无离子水, 加入 0.1 mol/L NaIO_4 0.2 ml, 室温搅拌 20 min, 用 1 mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 4.4) 透析过夜; 5 mg HSA 溶于 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5). 然后将氧化好的 HRP 溶液逐滴加入, 室温 2 h, 加入 NaBH_4 (4 g/L) 0.2 ml, 4°C 1 h, 用 10 mmol/L PBS (pH 7.0) 透析平衡后, 过用相同缓冲液平衡的 Sephadex G200 柱 ($1 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$) 流速 0.2 ml/min , 收集溶液的 HRP, 根据 HRP 在 403 nm 的毫摩尔消光系数为 95 来计算 HRP 的含量^[2]. b. DIG 的间接酶标: 1 mg DIG 溶于 0.2 ml 95% 乙

醇, 滴入 0.1 mol/L NaIO₄ 0.2 ml, 磁力搅拌 30 min, 加 20 μl 1 mol/L 乙二醇, 继续搅拌 5 min, 修饰后的 HRP 2 mg 于 1 ml 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 中, 逐滴加入氧化的 DIG 溶液, 室温 2 h, 加入 NaBH₄ (10 g/L) 0.2 ml, 4℃ 1 h 用 10 mmol/L PBS (pH 7.0) 透析 48 h, 然后过 Sephadex G-200 柱 (1 cm × 40 cm), 最后的 DIG-HSA-HRP 结合物加入终浓度为 50% 的甘油溶液, -20℃ 保存.

1.2.3 包被板: 链霉亲和素溶于去离子水中制成浓度 ρ= 6.25 mg/L, 每孔加 100 μl 包被, 室温 (20~25℃) 3 h, 洗板 3 min × 3 次, 用含 0.1% 叠氮钠的 PBS 液保存.

1.2.4 竞争酶联免疫吸附法: 取出链霉亲和素包被好的板, 放至室温. 每孔加入 BNHS-IgG 100 μl (用 0.05% Tween-20 10 mmol/L pH 7.0 PBS 稀释) 室温 (20~25℃) 30 min, 洗板 3 min × 2 次. 每孔加入 DIG 标准或待测血清及 DIG-HSA-HRP (用 0.1% BSA-PBS 稀释) 各 50 μl, 振荡混匀后, 室温 (20~25℃) 30 min, 洗板 3 min × 3 次. 立即加入 OPD 底物溶液, 每孔 100 μl, 室温 (20~25℃) 15 min, 然后每孔加 100 μl 4 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 比色测定.

在测定血清标本的同时, 以 DIG 标准溶液 0、0.5、1、2、3、5 μg/L (用无 DIG 正常人血清配制) 制备标准曲线.

2 结 果

2.1 实验条件的选择

经过摸索, 当 BNHS+ IgG 稀释倍数为 1:667, DIG-HSA-HRP 稀释倍数 1:4800 时所得标准曲线较为理想. 以 $B/B_0\%$ (B_0 为零标准孔的吸光度, B 为各标准孔的吸光度) 为纵坐标, 地高辛浓度为横坐标, 作标准曲线 (图 1).

2.2 测定下限和灵敏度

测定 30 份无 DIG 的正常人血清, 运用四参数曲线拟合法, 均值 $x = 0.1201 \mu\text{g/L}$, 标准差 $s = 0.0350 \mu\text{g/L}$, 如以 $x + 3s$ 最低检测

限, 则为 $0.2251 \mu\text{g/L}$. 对标准曲线的零标准重复 10 次测定, $x = 0.1186 \mu\text{g/L}$, $s = 0.0111 \mu\text{g/L}$, 以 $x - 2s$ 为测定灵敏度, 灵敏度为 $0.0964 \mu\text{g/L}$.

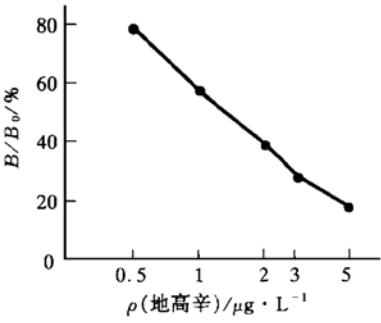


图 1 地高辛测定标准曲线

2.3 精确性试验

取 3 份不同浓度 (均值分别为 $0.5012 \mu\text{g/L}$, $1.5631 \mu\text{g/L}$, $2.9678 \mu\text{g/L}$) 地高辛的血清样品重复测定 20 次, 批内变异系数 (CV) 分别为 8.9%、5.9%、2.4%. 另取 3 份不同浓度 (均值分别为 $0.3722 \mu\text{g/L}$, $1.1867 \mu\text{g/L}$, $3.1726 \mu\text{g/L}$) 的血清样品于不同时间内重复测定 10 次, 批间变异系数 (CV) 分别为 15.8%、10.1%、9.2%.

2.4 准确性试验

在两份含不同浓度 DIG 的血清标本中加入不同量的 DIG 标准, 测得回收率见表 1.

表 1 地高辛测定的回收试验结果

血清标本 DIG 水平/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	加入量 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	测定值 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收值 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 $/\%$
1.8000	1.5000	3.2334	1.4334	95.56
	1.0000	2.7238	0.9238	92.38
	0.5000	2.3267	0.5267	105.34
0.7600	1.5000	2.0961	1.3361	89.07
	1.0000	1.7112	0.9512	95.12
	0.5000	1.2961	0.5361	107.22

2.5 方法的特异性

表 2 可见抗地高辛抗血清与临床几种常用药物无交叉反应.

表 2 抗地高辛抗血清与临床几种常用药物的反应	
药物名称	交叉反应 / %
地高辛 (digoxin)	100
螺甾内酯 (spironolactone)	< 0.001
皮质醇 (cortisol)	< 0.001
强的松 (prednisone)	< 0.001
孕酮 (progesterone)	< 0.001
甲基-睾酮 (methyl testosterone)	< 0.001

2.6 与荧光偏振免疫测定的相关分析

用此法与荧光偏振免疫测定 (FPIA) 法同时检测 30 份含不同浓度 DIG 的血清标本, 其相关方程为: $Y_{ELISA} = 0.9640X_{FPIA} + 0.1564$. 相关系数 $r = 0.9488$. 本法与 FPIA 法相关分析图见图 2.

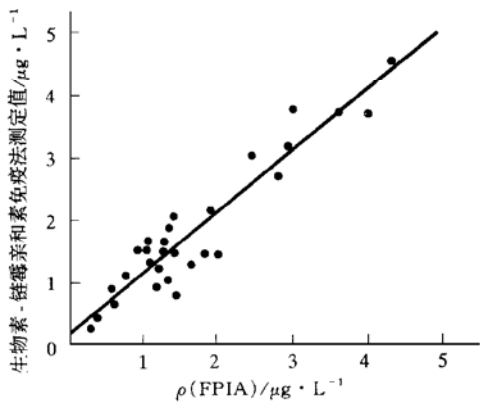


图 2 与 FPIA 法相关分析图

3 讨 论

该文尝试了链霉亲和素快速直接包被方法, 链霉亲和素通过物理性力吸附于疏水性固相载体的表面, 不发生化学反应, 不需特殊条件. 固相包被的质量直接关系到酶免疫测定法的检测结果, 理想的包被应该是: 固相表面应该吸附尽可能多的特异抗体 (或纯抗原物质); 吸附应较牢固能耐受数次洗涤; 非特异性吸附作用要最小^[3], 该文采用的方法将链霉亲和素直接包被于板孔中, 主动吸附生物素化的抗体, 使被动吸附中只有 5% 抗体可以利用变为

有 60% 多抗体可以利用^[4], 同时由于生物素和链霉亲和素的高度亲合力和高度特异性, 使吸附的抗体很牢固, 因此测定结果的重复性和可靠性大为提高.

参 考 文 献

1 李成文. 现代免疫化学技术. 北京: 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 1990. 86~ 87
2 Shannon L M, Kay E, Lew J Y *et al*. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. isolation and physical properties. J Biol Chem, 1966, **241** (9): 2166~ 2172
3 蒋成淦. 酶免疫测定法. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 105~ 106
4 Davies J, Dawkes A C, Haymes Ag *et al*. A scanning tunnelling microscopy comparison of passive antibody adsorption and biotinylated antibody linkage to streptavidin on microtiter wells. J Immun Methods, 1994, **167**: 263~ 269

Determination of Digoxin by Avidin-streptavidin Technology. SONG Yaohong, FENG Tao, LIN Qisui (*Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China*).
Abstract Streptavidin (6.25 μg/ml, sigma) diluted in distilled water was coated for 3 h (100 μl/well) at room temperature to microtiter strips. Anti-digoxin antibody was modified by biotin. The assay with these strips was used for the measurement of digoxin. It provides a sensitivity of 0.0964 μg/L. The assay has an intra-assay coefficient of variation of 8.9% (at 0.5012 μg/L), 5.9% (at 1.5631 μg/L), 2.4% (at 3.9678 μg/L). The inter-assay coefficient of variation is 15.8% (at 0.8722 μg/L), 10.1% (at 1.1867 μg/L), 9.2% (at 3.1726 μg/L). In spiking experiments with serum samples, the mean recovery of added digoxin is 97.45% (range 89.07% ~ 107.22%). The assay was compared with FPIA. A linear regression analysis yielded a slope of 0.9640, an intercept of 0.1564 and a correlation coefficient of 0.9488.
Key words biotin-streptatin, digoxin, direct streptavidin coated wells, ELISA