

8 尚成祖, 李广善, 张吟庵, 等 (Shang C Z, Li G S, Zhang Y A, *et al*). 一种快速简便的人干扰素微量板染色测定法. 中华微生物学和免疫学杂志 (Chinese Journal of Microbiology and Immunology), 1985, 5 (3): 181~183

Purification and Characterization of Recombinant Human Interferon- γ from Chinese Han Nationality. WANG Qing-Ming, BI Jian-Jin, FAN Guo-Cai, CHEN Hui-Peng, JIANG Zhong-Hua, WEI Han-Dong, HE Fu-Chu (*Institute of Beijing Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Recombinant human IFN- γ from Chinese Han nationality, overexpressed in *E. Coli*, was found to accumulate in cytoplasmic inclusion bodies. After washing, the inclusion bodies were dissolved in 8 mol/L urea. Under the denatured states, the recombinant

human IFN- γ from Chinese Han nationality was purified by size-exclusion chromatography and ion-exchange chromatography. The final yielded product was of high purity (96.87%) and exhibited the mass of molecule 17.32 ku analyzed by mass spectrometry. The renatured IFN- γ , which was refolded by diluting, had specific antiviral activity of 5.5×10^5 U/mg. The sequence of 16 amino acid residues from NH₂ terminus of the protein was determined and was found to agree with that of hIFN- γ reported by Gray. The composition of amino acids of the protein was analyzed. The result had good agreement with that deduced from cDNA of IFN- γ from Chinese Han nationality.

Key words interferon- γ (IFN- γ), human IFN- γ from Chinese Han nationality, inclusion body, urea, renaturation

化学发光双抗夹心酶免法测定血清 IV 型胶原

王天成 姚敏捷¹⁾ 刘向²⁾ 寇丽筠

(北京医科大学第三临床教学医院, 北京 100083)

摘要 以免疫家兔制备的抗人 IV 型胶原多抗包板, 采用改良过碘酸钠法辣根过氧化物酶标记抗人 IV 型胶原单抗, 建立了一种血清 IV 型胶原的增强化学发光双抗夹心酶免测定法. 实验结果表明方法较为灵敏、准确、稳定、特异, 其最低检测限为 30 $\mu\text{g/L}$, 平均回收率为 94.5%, 批内和批间变异系数分别 $\leq 6.0\%$ 和 11.6%. 测定 60 例健康人, 其参考值为 160 $\mu\text{g/L}$, 与进口的日本试剂盒相关性良好, 因此可以作为临床血清 IV 型胶原放免测定法的参考替代方法.

关键词 IV 型胶原, 化学发光酶免法, 肝纤维化

学科分类号 R392.33

IV 型胶原 (C IV) 是基底膜的主要成分, 近来研究结果表明血清 IV 型胶原水平与肝纤维化程度密切相关^[1], 因此血清 IV 型胶原被认为是肝纤维化的早期诊断指标. 当前测定血清 IV 型胶原含量多为放免法, 但该法有放射污染等缺点. 1989 年以来国外相继建立了测定血清 IV 型胶原含量的酶免检测法^[1~3], 我们使用自制的标记有辣根过氧化物酶抗人 IV 型胶原单

抗和兔抗人 IV 型胶原 IgG, 以多抗包板, 单抗标酶, 过氧化氢 (H₂O₂) 和化学发光信号试剂 (含鲁米诺和发光信号增强剂) 为底物, 建立了一种化学发光双抗夹心酶免 (CLEIA) 血清 IV 型胶原测定方法.

¹⁾ 沈阳军区空军医学专科学校.

²⁾ 首都医科大学附属同仁医院检验科, 北京.

收稿日期: 1997-09-01, 修回日期: 1998-01-16

1 材料与方法

1.1 材料

发光免疫分析仪 (Amersham ZLE100), Bio-Rad Model 450 酶标仪, 37℃ 振荡孵育器 (Amersham ZLE164), 平底微孔板条 (Dynatch Laboratory chantilly VA22021).

人 IV 型胶原 (Sigma 公司); I、III、V 型胶原和变性 IV 胶原、兔抗人 IV 型胶原 IgG 和 HRP-抗人 IV 型胶原单克隆抗体 (本室自行提取和制备^[4,5]); ELISA 法人血清 IV 型胶原检测试剂盒 (日本东京第一化学株式会社).

包被液 (0.05 mol/L、pH 9.5 的碳酸盐缓冲液), 洗涤液 (0.05% Tween 20, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液), 稀释液 (0.1% BSA 的磷酸盐缓冲液), 封闭液 (2% BSA 的包被液), 发光信号增强试剂 (Amersham 公司).

血清样品来自北京医科大学第三医院的住院患者及健康查体者.

1.2 方法

1.2.1 用包被缓冲液稀释兔抗人 IV 型胶原多抗至 10 mg/L, 于微孔板条中每孔加入此液 100 μ l, 室温放置 2 h 后于 4℃ 过夜. 次日用洗涤液清洗 3 次, 以封闭液 37℃ 水浴 2 h 封闭, 洗板后待用, 以上述方法包被的微孔板条于 4℃ 干燥保存 (有效期 > 3 个月).

1.2.2 在包被好的微孔板条中加入系列稀释的 IV 型胶原标准或待测血清, 每孔 100 μ l, 37℃ 振荡孵育 1 h, 洗板后各孔加入 HRP-单抗 (1:500) 100 μ l, 37℃ 振荡孵育 1 h, 洗板.

1.2.3 加发光信号增强试剂每孔 250 μ l, 在 2~20 min 内于发光免疫分析仪上读数. 每份标本均作双孔, 取其均值为测定值.

1.2.4 ELISA 法人血清 IV 型胶原测定按试剂盒说明书操作.

2 结果

2.1 工作曲线

用稀释液倍比稀释成的 1 000、500、250、125、62、31、15、0 μ g/L IV 型胶原标准液, 发

光免疫分析仪以其中自备的曲线拟合软件完成工作曲线的拟合 (5 参数非线性曲线拟合法), 同时可自动计算和打印样品或质控物的浓度.

2.2 检测能力

测定 30 份标准曲线的零标准, 其测定的均值为 18.6 μ g/L, 标准差为 3.9 μ g/L, 如以均数加 3 个标准差为检测下限, 则其数值约为 30 μ g/L.

2.3 方法的精确性

该方法检测 IV 型胶原的批内变异和批间变异如表 1 所示.

表 1 化学发光法检测 IV 型胶原的批内和批间变异

IV 型胶原		均值/ μ g·L ⁻¹	标准差	CV/%
批内变异 (n = 30)	低	91.5	5.5	6.0
	中	193.8	8.8	4.5
	高	312.3	12.8	4.1
批间变异 (n = 8)	低	90.2	9.6	10.6
	中	184.5	21.4	11.6
	高	294.3	28.9	9.8

2.4 方法的准确性

按回收实验来考查其准确性, 测得平均回收率为 94.5% (表 2).

表 2 化学发光法检测 IV 型胶原的回收率

IV 型胶原 / μ g·L ⁻¹	加入值 / μ g·L ⁻¹	测定值 / μ g·L ⁻¹	回收值 / μ g·L ⁻¹	回收率 /%
105.4	64.5	175.0	69.6	107.9
	123.0	216.8	111.4	90.6
215.8	64.5	270.8	55.0	85.3
	123.0	331.5	115.7	94.1

2.5 方法的特异性

按干扰试验的方法, 在血清中加入 I、III、V 和变性的 IV 型胶原和血红蛋白 (Hb)、胆红素、甘油三脂, 结果表明其对本法无明显干扰.

2.6 化学发光法对酶免法的相关分析

使用化学发光 (CLEIA) 法和酶免 (EIA) 法同时测定 50 份血清标本 (包括溶血和黄胆等标本), 得到相关方程为: CLEIA 测定值 = ELISA 测定值 \times 0.8326 + 26.3567, $r = 0.9686$ ($P < 0.001$).

2.7 CLEIA 方法参考值

检测 60 份健康人 (男 34 例, 女 26 例) 血清 IV 型胶原含量, 其均值为 88.5 μg/L, 标准差为 36.2 μg/L, 按均值加上 2 个标准差 (一般作法) 作为健康人血清 IV 型胶原含量参考值, 其数值为 160 μg/L. 统计分析表明男、女血清 IV 型胶原含量无显著性差异 ($P > 0.05$).

3 讨 论

目前国内外建立有 IV 型胶原放射测定法 (FIA), 此法一般采用多抗, 反应时间比较长, 需要特殊的检测、防护和废物处理设备, 而且有一定的放射污染, 加之同位素半衰期比较短, 不利于储存和运输; 此后国外也相继开发检测 IV 型胶原竞争性 EIA 法和双抗夹心 ELISA 法^[1-3], 但酶免法的灵敏度较 FIA 法为低; 在国内有关酶免法检测 IV 型胶原方面的报道也比较少. 80 年代以来国内外相继报道了化学发光酶免法这一非同位素检测技术; 我们采用这一技术建立了化学发光酶免血清 IV 型胶原测定法, 此法的基本原理与 ELISA 法大致相同, 只是 ELISA 法的底物在本法以发光信号试剂 (含有鲁米诺和发光增强剂) 所取代; 因此样品中 IV 型胶原含量与其发光强度呈正相关, 本法将免疫反应的特异性和化学发光的高灵敏性结合起来, 实验表明本法较为灵敏、准确、稳定和特异. 本法的发光信号试剂和包被好的板条可在较长的时间内保持稳定, 使用方便且无放射性污染; 另外除发光信号增强试剂外, 本方法的其他试剂均为自行配制, 实验成本较低; 而进口 EIA 法试剂盒采用珠式试管法, 操作比较复杂, 且价格昂贵. 因本法符合临床的要求, 在国内可能会有较好的发展前景和实用价值.

参 考 文 献

1 Ueno T, Inuzuka S, Torimura T, *et al.* Significance of serum type IV collagen levels in various liver diseases: measurement with a one step sandwich enzyme immunoassay using monoclonal antibodies with specificity for pepsin-solubilized type IV collagen. *Scand J Gastroenterol*, 1992,

27 (6): 513~ 520
 2 Obata K, Iwata K, Ichida T, *et al.* One step sandwich enzyme immunoassay for human type IV collagen using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta*, 1989, **181** (3): 293 ~ 304
 3 Yokoya Y, Iwata K, Muragaki Y, *et al.* Concentration of serum laminin and type IV collagen in liver disease assayed by a sandwich enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta*, 1992, **210** (12): 109~ 118
 4 姚敏捷, 王天成, 寇丽筠 (Yao M J, Wang T C, Kou L J). 人胎盘 III、IV、V 型胶原蛋白的提取与纯化. *北京医科大学学报 (Journal of Beijing Medical University)*, 1995, **27** (增刊): 200
 5 姚敏捷, 寇丽筠, 王天成 (Yao M J, Kou L J, Wang T C). 人 IV 型胶原蛋白的提纯与其单克隆抗体的制备与鉴定. *细胞与分子免疫学杂志 (Journal of Cellular and Molecular Immunology)*, 1996, **12** (2): 4~ 6
 6 刘向 , 寇丽筠 (Liu X Y, Kou L J). IV 型胶原双抗夹心法的建立和临床应用. *中国实验诊断学杂志 (Chinese Journal of Laboratory Diagnosis)*, 1997, **1** (5): 39~ 40

Measurement of Serum Type IV Collagen by Sandwich Chemiluminescent Enzymimmunoassay. WANG Tian-Cheng, YAO Mir Jie, LIU Xiang-Yi, KOU Li-Jun (*Third Teaching Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract By utilizing imported chemiluminescent reagent, self-prepared rabbit anti-human type IV collagen IgG and a horseradish peroxidase-labeled anti-human type IV collagen monoclonal antibody, a method of sandwich chemiluminescent enzymimmunoassay (CLEIA) was established then evaluated. The results showed the CLEIA has a lower detecting limit of 30 μg/L, the average recovery was 94.5%, CVs of intra-assay and inter-assay were 6.0% and 11.6% respectively, the CLEIA method has a good correlation with Japan kits (ELISA, $r = 0.9686$). the serum reference level by testing 60 cases health is 160 μg/L. It was found that the CLEIA is a sensitive, accurate, stable and specific method, it may be a qualified candidate for serum type IV collagen determination of non-radioactive method.

Key words serum type IV collagen, chemiluminescent enzymimmunoassay (CLEIA), cirrhosis