

# 人尿中 IgG 的时间分辨荧光免疫分析法 ——以钬标记链亲和素作为标记物

史华红 杨燕生 陈泮藻 李振甲

(中山大学化学系, 广州 510275) (北京解放军总医院基础所)

**摘要** 利用钬标记链亲和素作为标记物, 建立了固相抗体竞争性的人尿中 IgG 的时间分辨荧光免疫分析法, 标准曲线范围 0.625~40.0 mg/L. 检测范围宽, 可以用于检测人尿中的 IgG 含量, 不用对样品进行稀释, 能满足临床检测需要.

**关键词** 免疫球蛋白 G (IgG), 钬, 时间分辨荧光免疫分析法, 链亲和素

**分类号** R446.1

免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 属于中分子蛋白质. 当肾功能正常时, 尿中 IgG 含量极少. 当肾小球病变时, 由于滤膜透性增加, 白蛋白 (ALb) 滤出增多. 随着肾小球基膜损伤加重, 允许更多 IgG 滤过, 致使尿中 IgG 含量增加. 因此, 检测尿中 ALb 和 IgG 含量的改变, 便可准确、可靠地反映肾小球滤膜通透性变化, 是评价肾小球功能受损严重程度的首选指标. 利用 Eu (Ⅲ) 标记链亲和素作为标记物, 建立了固相抗体竞争性人尿中免疫球蛋白 G (IgG) 的时间分辨荧光免疫分析方法.

亲和素 (avidin) 是一种糖蛋白,  $M_w$  约 67000, PI 为 10.5. 每个分子由 4 个亚基组成, 每个亚基都能专一性地结合一个生物素分子, 这种结合作用很强 ( $K_D \sim 10^{-15}$ ), 约是抗原-抗体反应亲和力的  $10 \sim 100$  万倍. 但是, 亲和素分子表面的寡聚糖基可能会导致一些副反应, 人们从一种土壤链霉菌 *Streptomyces avidin* 的发酵液中得到另一种抗生物素蛋白-链亲和素. 它与亲和素具有极相似的理化特性, 尤其是与生物素的专一性结合性质与亲和素相同, 但不含寡聚糖基, PI 为 5.0, 用以代替亲和素能降低非专一性结合, 减少背景, 提高检测的分辨率. 将生物素-链亲和素引入免疫分析中, 可制成通用标记物, 避免每进行一种物质分析都要标记一次. 在国内, 李振甲等首先将生物素-链亲和素系统引入时间分辨免疫分析中, 取得了非常好的效果<sup>[1]</sup>. 在国外, Eu (Ⅲ) 标记链亲和素作为通用标记物倍受重视<sup>[2,3]</sup>. 可用于检测不同类型的生物活性物质.

## 1 实验部分

1.1 主要试剂及仪器 人 IgG 及羊抗人 IgG (双扩滴度为 1:32) (经 4 次饱和硫酸铵提纯, 军事科学院五所李成文副研究员惠赠). N-羧琥珀酰亚胺酯活化生物素 (军事医学科学院五所提供). Eu (Ⅲ) 标记链亲和素的制备及纯化见文献[1, 4]. Arcus 1230 型时间

收稿日期: 1994-08-04 史华红, 男, 30 岁, 博士

分辨荧光仪及其附件(LKB, Wallac, 芬兰), 氙闪光灯作激发光源, 1000 次/s 脉冲, 激发波长 340 nm, 延迟时间 400  $\mu$ s, 测量时间 400  $\mu$ s, 单光子计数器检测 613 nm 的荧光强度. DU-88 分光光度计(美国 Beckman 公司制造). 聚苯乙烯微量滴定条(Flow 公司产品, 芬兰).

1.2 溶液组成 实验缓冲液: 0.05 mol/L pH7.7 Tris-HCl 缓冲液, 0.9% NaCl, 0.1% 明胶,  $2.0 \times 10^{-5}$  mol/L DTPA, 0.02% Tween-20, 0.05% NaN<sub>3</sub>. 包被缓冲液: 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液, 0.05% NaN<sub>3</sub>. 封闭缓冲液: 0.1% BSA, 0.05 mol/L pH 值 7.7 Tris-HCl 缓冲液, 0.9% NaCl, 0.05% NaN<sub>3</sub> 溶解. 洗涤液: 0.01 mol/L pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液, 0.9% NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.02% Tween-20. 荧光增强液: 1.39 g 邻苯二甲酸氢钾, 5.9 mL 冰醋酸, 19.3 mg 三辛基氧磷(TOPO), 6.0 mg  $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮( $\beta$ -NTA), 1 mL Triton X-100, 加双蒸水至 1000 mL.

1.3 人 IgG 的生物素化 0.7 mg 人 IgG, 加入 300  $\mu$ L 0.1 mol/L pH 值 9.6 碳酸盐缓冲液; 1.2 mg N-羧琥珀酰亚胺活化生物素溶于 120  $\mu$ L 二甲基甲酰胺中, 取 12  $\mu$ L 加至人 IgG 液. 室温避光反应 4h, 对 0.01 mol/L pH 值 7.6 磷酸盐缓冲液(含 0.9% NaCl) 透析 24 h, 往透析产物加入等体积甘油, -20 $^{\circ}$ C 保存, 备用.

1.4 固相抗体的制备 用包被缓冲液将羊抗人 IgG 配成适当浓度, 加入充分洗涤的聚苯乙烯微量滴定条中, 200  $\mu$ L/孔. 非特异孔为 200  $\mu$ L/孔包被缓冲液, 置 4 $^{\circ}$ C 24 h, 吸出, 用洗涤液洗 2 次, 250  $\mu$ L/孔封闭缓冲液, 封闭过夜, 吸出, 洗涤 2 次. 4 $^{\circ}$ C 湿环境下保存.

1.5 测量方法 取固相抗体微量滴定条, 非特异、标准均为双孔平行, 每孔加入 100  $\mu$ L 人 IgG 标准品和用 50  $\mu$ L 实验缓冲液稀释的 50  $\mu$ L 人尿液, 加入 100  $\mu$ L 生物素化人 IgG. 最高结合加入 100  $\mu$ L 生物素化人 IgG 和 100  $\mu$ L 实验缓冲液. 室温振荡反应 3h, 倾出反应液, 洗涤 4 次, 加入 Eu(III) 标记链亲和素 200  $\mu$ L/孔, 室温振荡反应 1 h, 充分洗涤, 加入荧光增强溶液 200  $\mu$ L/孔, 振荡 15 min, 静置 10 min, 用时间分辨荧光仪测量各孔的荧光计数.

## 2 结果与讨论

2.1 抗体包被量和生物素化抗原稀释度的确定 以不同浓度羊抗人 IgG 包被微量滴定条, 以不同稀释倍数稀释生物素化人 IgG 后, 测量最高结合孔和非特异结合孔的荧光计数( $S_0$  和  $N$ ), 并计算其比值( $S_0/N$ ) 为信噪比, 结果见表 1.

表 1 抗体不同包被量及生物素化人 IgG 的信噪比

Tab. 1 Different amount of buffer solution used in wrapping antibody and the information-noise ratio of Biotinglated human IgG

抗体包被量/ $\text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$	1:800	1:400	1:200	1:100
30.0	5.9	10.8	11.6	13.0
60.0	6.9		17.2	20.6
120.0	9.8	14.5	15.8	15.9

考虑到信噪比值的大小及非特异结合荧光计数的大小, 本实验选择羊抗人 IgG 包被量为 60.0 mg/L, 生物素化人 IgG 稀释度为 1 : 400.

2.2 标准曲线 将各标准孔测量的荧光计数换算成  $B/B_0$  ( $B$  为标准样品孔的荧光计数,  $B_0$  为最高结合孔的荧光计数), 对人 IgG 标准溶液浓度作图(图 1). 生物素化人 IgG 和样品中的人 IgG 竞争有限的固相抗体, 每孔中的生物素化人 IgG 含量一定, 随着样品中人 IgG 含量的增加, 样品孔的荧光计数逐渐减小, 呈 S 型曲线. 标准曲线工作范围是 0.625 ~ 40.0 mg/L, 考虑到尿液往往偏酸性, 尿样品的加入量为 50  $\mu$ L/孔, 再补加 50  $\mu$ L/孔实验缓冲液.

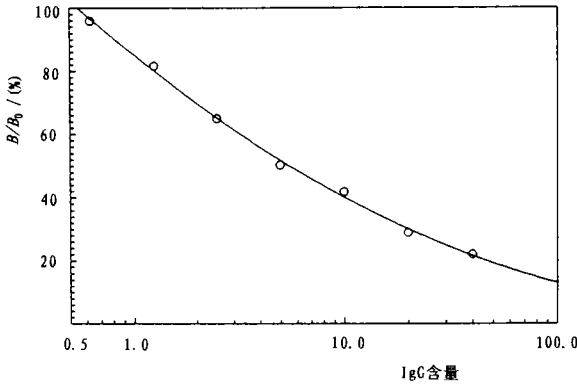


图 1  $B/B_0$ -IgG 含量标准曲线

Fig. 1 The standard curve of  $B/B_0$ -IgG content

2.3 混合人尿的测定结果 已知白蛋白浓度的 3 份混合人尿, 含量经白蛋白放射免疫药盒确定分别为 162, 6.6, 22.7 mg/L. 利用本法测定, 其相应的 IgG 的含量分别为小于 0.625, 0.9, 12.2 mg/L. 结果表明: 尿中白蛋白含量升高, 其 IgG 含量亦随之升高. 取后两份人尿液各 6 份平行测定, 其批内变异系数分别为 13.2% 和 13.6%.

2.4 讨论 时间分辨荧光免疫分析法是 70 年代末期发展起来的超微量检测技术, 这一技术是利用镧系离子  $\text{Eu}(\text{III})$  作为标记物, 替代放射性同位素  $^{125}\text{I}$ . 因这一技术不用操作放射性同位素, 其分析灵敏度、准确度与放射免疫分析法相当, 标记物非常稳定, 所以这一技术倍受青睐<sup>[5]</sup>.

徐永源等利用  $\text{Eu}(\text{III})$  标记来检测人尿 IgG<sup>[6]</sup>, 用 DTPA 二酸酐直接将  $\text{Eu}(\text{III})$  标记在人 IgG 上, 利用 LMA-1 型激光微量物质分析仪(北京第三研究所)测量荧光强度, 以脉冲氮分子激光器为激发源. 免疫反应在液相进行, 需要利用二抗将免疫复合物分离, 分离步骤复杂. 标准曲线范围 0.25 ~ 8.0 mg/L, 常常需将样品进行稀释. 本文利用  $\text{Eu}(\text{III})$  标记链亲和素检测人尿中 IgG, 首先将抗体包被在聚苯乙烯微量滴定条上, 制成固相抗体, 让生物素化抗原与样品中的抗原竞争固相上的有限抗体, 分离步骤简单、易行; 检测范围宽, 标准曲线范围 0.625 ~ 40.0 mg/L. 不用对样品进行稀释, 能满足临床检测需要.

另外,  $\text{Eu}(\text{III})$  标记链亲和素有如下优点: 可作为通用标记物, 用于检测其它生理活性

物质的含量; 标记链亲和素较容易, 且不损伤其生物活性. 直接标记抗体或抗原, 特别是用 DTPA 二酸酐标记时, 通常会损伤它们的免疫反应活性; 链亲和素标记物和生物素化抗原都很稳定.  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存一年以上, 未发现生物活性改变和非特异升高; 能起到一定的放大作用, 扩展工作曲线范围.

### 参 考 文 献

- 1 张安胜, 李振甲. 新型时间分辨荧光免疫分析技术测定癌胚抗原. 中华医学检验杂志, 1991, 14: 90
- 2 Knopf H P, Papoian P. Preparation of europium—streptavidin in a time—resolved fluoroimmunoassay for interleukin—3. J Immunol Methods, 1991, 138: 233
- 3 Suonpaa M, Markela E, Stahiberg T, et al. Europium—labelled streptavidin as a highly sensitive universal label—indirect time—resolved immunofluorometry of FSH and TSH. J Immunol Methods, 1992, 149: 247
- 4 高平, 李振甲, 纪弟. 新型固相竞争性时间分辨荧光免疫检测血清孕酮方法的建立. 中国免疫学杂志, 1992, 8: 369
- 5 陈泮藻, 史华红, 李振甲. 稀土离子荧光及其在免疫分析和核酸探针中的应用. 免疫学杂志, 1993, 9: 207
- 6 徐永源, 赵永刚, 王世诚, 等. 激光时间分辨荧光免疫分析法测定人尿中免疫球蛋白 G. 化学通报, 1992, 6: 38

## A Time—resolved Fluoroimmunoassay for Determination of Human Immunoglobulin (IgG) in Urine —Streptavidin-Eu (Ⅲ) as a label in immunoassay

*Shi Huahong\* Yang Yansheng Chen Panzao Li Zhenjia*

**Abstract** Sheep anti-human IgG antibody was immobilized by adsorption to the walls of polystyrens microtiter strips. Human IgG was biotinylated. Biotinylated human IgG and sample human IgG competed for the limited antibody on solid phase. After the immunoreaction was completed, biotin on solid phase can “catch” SA-Eu(Ⅲ). Eu(Ⅲ) fluorescent counts was measured on a time-resolved fluorometer with addition fluorescent enhancement solution. The range of the assay standard curve is  $0.625 \sim 40.0\text{ mg/L}$ . This method can be used to determine content of IgG in urine. In addition, SA-Eu(Ⅲ) can be used as a general label.

**Keywords** immunoglobulin G, europium, time-resolved fluoroimmunoassay, streptavidin

\* Department of Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275