

• 检验试剂评价 •

抗人免疫球蛋白 G 的制备及其在免疫比浊中的应用

岳菊香¹, 杨锦云²

(1. 四川省西昌市疾病预防控制中心 615000; 2. 四川省凉山州第一人民医院, 四川西昌 615000)

摘要:目的 纯化人 IgG, 制备兔抗人 IgG 多克隆抗体, 用于配制 IgG 的免疫比浊定量诊断试剂。方法 用 PEG-6000、辛酸沉淀、DEAE-Sephrose F. F 离子交换层析纯化人 IgG。纯化后的 IgG 免疫新西兰大白兔, 并用相同方法纯化兔抗人 IgG, 配制 IgG 的免疫比浊定量诊断试剂并进行性能验证。结果 纯化的 IgG 纯度 97%, 收获率 68.4%, 配制试剂批内、批间 CV 分别为 1.04%、2.62%, 线性范围上限可达 60.15 g/L, 最大干扰率为 4.8%。结论 该纯化方法简单易行, 收获率高, 配制的试剂品质优良, 精密度、准确度高, 抗干扰能力强。

关键词:免疫球蛋白 G; 纯化; 多克隆抗体制备; 免疫比浊

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.11.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)11-1227-02

人血清免疫球蛋白 G(IgG)透射免疫比浊定量测定试剂中, 抗人 IgG 来源多采用硫酸铵分级沉淀, 亲和层析人血清纯化、免疫制备。硫酸铵分级沉淀需要透析耗时且大量抗体变性极度影响最终收获率。亲和层析纯化虽然能得到令人满意的纯度抗体, 但这一方法会丢失抗血清中高亲和力的抗体, 影响制备血清的亲和力及效价。本实验探讨采用 PEG-6000 沉淀初提、浓缩; 辛酸沉淀、DEAE-Sephrose F. F 离子交换层析对人血清 IgG 进行精细纯化。免疫新西兰大白兔, 用 PEG-6000 沉淀、DEAE-Sephrose F. F 离子交换层析纯化兔血清, 制备兔抗人 IgG。配制 IgG 透射免疫比浊定量测定试剂, 并对配制的试剂性能进行探讨。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 Beckman J-20 XP 高速冷冻离心机; ITA-CHI 7170 全自动生化分析仪及配套 Mini protein 3 Cell; BIO-RAD 公司电泳仪; Thermo multiskan MK3 酶标仪; PEG-6000 为进口分装分析纯其他试剂为国产分析纯试剂; UnicoTM UC-2102 PC 紫外可见分光光度计; Q-Sephrose FF: Amer-sham Biosciences。

1.2 方法

1.2.1 人 IgG 纯化 取健康人血清, 调整 pH6.5, 逐渐滴加 40% 的 PEG-6000, 至终浓度为 13%, 室温静置 30 min, 然后以离心半径 8 cm, 10 000 r/min 离心 10 min, 去上清^[1]; 用 pH4.8 100 mmol/L 醋酸盐缓冲液少量多次加入至沉淀完全溶解, 再加 2 倍缓冲液稀释, 用醋酸调整 pH4.8, 计量总体积。滴加辛酸至沉淀完全, 每毫升样品中需 25 μ L 辛酸, 同时用力搅拌, 室温下继续搅拌 30 min, 以离心半径 8 cm, 10 000 r/min 离心 10 min, 保留上清^[2]。上清液调整 pH6.5 加入 40% 的 PEG-6000, 至终浓度为 13% 得沉淀, 沉淀用 pH7.5 5 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解。制备 DEAE-Sephrose F. F 柱^[3], 以 pH7.5 5 mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡。第一步纯化的 IgG 用 pH7.5 5 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱, 收集洗脱峰蛋白液为 IgG。最后用 50×10^3 的中空超滤浓缩至所需浓度。

1.2.2 IgG 浓度的测定 纯化收获 IgG 采用 Bradford 法, 以 BSA 为标准蛋白对照。

1.2.3 纯度鉴定 纯化蛋白用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定^[3]。

1.2.4 兔抗人 IgG 制备 配制福氏佐剂, 完全佐剂加入卡介

苗 3 mg/mL; 取成年雄性新西兰大白兔, 体质量 2.0~2.5 kg, 用人 IgG 1 mg/kg 配以等体积弗氏完全佐剂进行基础免疫; 以后每隔 2 周免疫 1 次, 剂量为 0.5 mg/kg 配以等体积弗氏不完全佐剂进行免疫。第 3 次免疫后 10 d 开始采血测效价, 直到琼脂双扩法测效价达到 32, 再次加强免疫 3 d, 颈动脉放血, 分离血清, 除脂-70 $^{\circ}$ C 保存^[4]。

1.2.5 兔抗人 IgG 纯化 调整 pH6.5 然后逐渐滴加 40% 的 PEG-6000, 至终浓度为 13%, 得沉淀物, 完全溶解用 DEAE-Sephrose F. F 层析纯化。

1.2.6 试剂配制及检测 抗血清稀释液为 0.1 mol/L, pH7.4 PB; 反应液为 PEG-6000 42.05 g/L, NaF 2.2 g/L, Tris 1.82 g/L, 吐温-200 5 mL; NaN₃ 1 g/L NaCl 9 g/L; 抗血清浓度选择用方阵滴定法确定。反应曲线符合 $Y = a + bX + cx^2 + dx^3$ (Y 为吸光度值、X 为抗原含量), 可以应用仪器的 Spline 定标方式。参考血清由卫生部上海生物制品研究所提供; 仪器为 Hitachi 7170 全自动生化分析仪; 终点法主波长: 340 nm 副波长, 700 nm 反应温度, 37 $^{\circ}$ C 反应时间, 10 min, 将样品 10 倍稀释后操作。

1.2.7 试剂性能验证 标本 50 份分装冰冻待用。取混合血清 1 份重复测定 IgG 20 次, 计算其精密度。取混合血清 1 份分装成 20 小份, 低温保存, 隔日测定共计 20 次, 计算变异系数; 准确度检测: 测定卫生部临检中心免疫球蛋白定值血清。干扰试验: 取 Hb 浓度为 2.5、5.0、10.0 g/L 的溶血各 0.1 mL, 分别加入 1.0 mL 低(12.2 g/L)、高(21.9 g/L)浓度的 IgG 样品中, 进行干扰实验^[5-6]。

2 结果

2.1 纯化结果 调整 pH6.5 时 IgG、IgA、IgM 存在于 0%~13% 的 PEG-6000 溶液中, 同时测得加入 PEG-6000 至 13% 时, IgG、IgA、IgM 已几乎没有, 而清蛋白几乎全在上清中, 因此, 采用加入 13% 的 PEG-6000 对血清进行初步沉淀、纯化; 辛酸可以使大部分非 IgG 蛋白质沉淀, 而对 IgG 没有影响, 辛酸的浓度为 1 mL 样品加入 25 μ L 辛酸, 加入量过高或过低都将导致非 IgG 蛋白沉淀不完全。由 DEAE-Sephrose F. F 层析凝胶预实验得知, 在 pH7.5 的环境中, 酸性蛋白均被 DEAE-Sephrose F. F 吸附, IgG 不被吸附, 故采用 DEAE-Sephrose F. F 层析柱分离蛋白。检测蛋白, 收集流穿蛋白峰。洗脱曲线及计算结果表明, 采用 DEAE-Sephrose F. F 可除去大量的杂

蛋白,提高纯度。纯度鉴定:将制备的人 IgG 进行 SDS-PAGE 和 PAGE(还原条件和非还原条件)检测,电泳结果显示,DEAE-Sepharose F. F 层析后得到的蛋白还原条件为 2 条蛋白条带,非还原条件为 1 条带^[7-8]。对 DEAE-Sepharose F. F 层析得到的样品进行 HPLC 纯度分析,结果表明通过以上分离纯化得到的样品,其纯度可以达到 97%。

2.2 抗人 IgG 多克隆抗体效价及纯度 双向琼脂扩散实验经过 24 h 扩散后,在抗原、抗体孔 1:32 以下一对相应的抗原、抗体形成 1 条清晰白色的沉淀线。可知检测的抗体效价为 1:32,为单一抗体;ELISA 法检测效价为 1:64 000,纯化后的抗体 ELISA 法检测背景干净、清晰。

2.3 实验条件确定 比较研究了免疫透射比浊法测定血清 IgG 的实验条件,用本法测定免疫比浊蛋白成分,重复性、准确性及敏感性较好,操作简单,但应严格控制实验条件,稀释后的血清抗体,勿反复冻融,可根据最小用量分装,-20℃存放。

2.4 试剂性能分析 精密度:IgG 批内、批间 CV 分别为 1.04%和 2.62%。准确度:IgG 参考定值 11.73 g/L,参考范围 8.82~14.70 g/L,自配试剂测定值 11.62 g/L。线性:用高浓度的参考血清作线性测定,速率法的线性范围上限高达 60.15 g/L,最大干扰率 4.8%。

3 讨论

使用 PEG-6000 沉淀血清中 IgG,较硫酸铵分级沉淀,优点在于沉淀用缓冲液溶解后不必透析,可直接上柱,从而减少了损失,在完成 DEAE-Sepharose F. F 预装的情况下,整个操作过程 1 d 内即可完成,简单易行。辛酸在 pH4.2~4.8,1:3 以

• 检验试剂评价 •

上稀释的标本很少产生或完全不产生 IgG 沉淀,非 IgG 蛋白则完全沉淀。虽然亲和层析法纯化能得到令人满意的纯度抗体。但这一方法会丢失抗血清中高亲和力的抗体,因此,确定选用经济而适宜的 DEAE-Sepharose F. F 层析进一步提高纯化倍数。免疫动物时,纯化的 IgG 用量适中为好,弗氏完全佐剂必须澄清,多点皮内注射多个淋巴结。纯化后的抗体在进行 SDS-PAGE 电泳时出现 2 条带,是由于抗体在进行电泳时经过煮沸等操作使蛋白重链和轻链分离。

用制备兔抗人 IgG,在该实验条件下配制 IgG 免疫透射比浊试剂,重复性、准确性、敏感性及线性好,抗干扰能力强。

参考文献

- [1] 范丽娟,潘道东. 免疫初乳中 IgG 的分离与纯化[J]. 食品科学, 1997,26(8):146-149.
- [2] 白丽. 应用辛酸硫酸铵法提取小鼠腹水和血清中的 IgG 抗体[J]. 大理医学院学报,2000,10(3):2-4.
- [3] 汪家政,范明. 蛋白质手册[M]. 北京:科学出版社,2000:1.
- [4] 王廷花,李官华,Xin FZ. 抗体理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2005:77-87.
- [5] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:360-361.
- [6] 赵娟. 免疫透射比浊法测定血清多种蛋白成分方法学研究[J]. 中国热带医学,2003,3(2):203-204.

(收稿日期:2011-02-01)

在日立 7180 生化仪上使用开放试剂测试肾功能项目的探讨

吴爱成

(广东省深圳市宝安区观澜人民医院检验科 518110)

摘要:目的 探讨在日立 7180 生化仪上是否能够使用上海科华生物工程股份有限公司(下称科华公司)的试剂盒测试肾功能项目。**方法** 选定肾功能测试常用的 3 个项目,尿素氮、肌酐及尿酸,对其进行灵敏度、精密度、线性、对比和干扰实验测试。**结果** 科华公司肾功能 3 个项目试剂盒的灵敏度符合要求;批内变异系数和总变异系数均小于 5.00%;线性范围与罗氏公司原装试剂基本接近;方法学比较的相关系数均大于 0.975;黄疸、脂血与溶血对结果的干扰均小于 10%。**结论** 在日立 7180 生化仪上可以使用科华公司的试剂代替罗氏原装试剂,进行肾功能 3 个项目的测试。

关键词:设备和供应; 灵敏度; 精密度; 线性范围; 方法学比较; 干扰实验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.11.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)11-1228-03

日立 7180 生化仪由于速度快、故障率低、操作简单,一直深受各大、中型医院检验科的青睐^[1]。日立 7180 生化仪与瑞士罗氏公司生产的试剂盒、校准品联合使用成为封闭检测系统之后,其样本结果具有溯源性。但是很多用户认为日立公司提供的原装封闭试剂价格昂贵,从而限制了这款仪器的推广使用。现探讨在日立 7180 生化仪上使用开放试剂进行肾功能测试的可行性,并报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择符合要求的门诊及住院患者的血清标本,-20℃保存。罗氏公司实验室质控血清和校准品,难以获得的高、低值标本可以用质控血清代替。

1.2 仪器及试剂 采用日立 7180 生化仪。BUN、Crea 和 UA

试剂由上海科华公司提供,方法学比较的试剂盒由罗氏公司提供。胆红素纯品和高浓度脂血溶液购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 设置项目信息 在日立 7180 生化仪上的项目信息中填入开放试剂的名称、反应的波长、反应类型、计算单位及精确的小数位、反应方向、定标液的信息、试剂 1 和试剂 2 的加入体积,试剂空白和反应计算的起始时间和终止时间等。

1.3.2 定标与新鲜血清赋值 (1)采用 CFAS 校准品、原装配套试剂在日立 7180 生化仪上对上述 3 个项目分别进行定标。(2)挑选 BUN、Crea 和 UA 浓度分别在 8.0 mmol/L、160 μmol/L、500 μmol/L 附件的新鲜血清标本在分析仪上重复测试 3 次,记录各个项目的均值。(3)使用科华公司的试剂盒,以