

# 人转铁蛋白纯化制备及其抗原活性验证\*

武 强, 史定刚, 章玉胜

(美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315104)

**摘 要:**目的 采用非亲和纯化方法从人血清中制备获得高纯度转铁蛋白(TRF),并用此为免疫抗原免疫新西兰大白兔,验证 TRF 蛋白的免疫原性。方法 首先采用两步硫酸铵沉淀法从血清中粗纯 TRF 蛋白,再用两步阴离子交换层析柱进行纯化,最终得到 TRF。结果 TRF 蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)纯度与外购纯品相当,且高效液相色谱(HPLC)纯度达到 96.8%,纯化回收率为 78.6%。对于同一批 TRF 样品,TRF 检测试剂盒(免疫法)测得的活性浓度与紫外分光光度计法测得的蛋白浓度比值(Rc)约为 0.95,说明制备的 TRF 与免疫检测试剂盒中的 TRF 抗体具有良好的抗原反应性。最后用纯化样品免疫新西兰大白兔,经过 4 次免疫后的抗血清效价滴度达到 1:128 000,说明制备的 TRF 具有良好的免疫原性。结论 制备的高纯度 TRF 具有良好的抗原反应性及免疫原性,可用于动物免疫以制备抗 TRF 抗体,为配制 TRF 检测试剂(免疫法)提供良好的原料基础。

**关键词:**转铁蛋白; 硫酸铵沉淀法; 阴离子交换层析; 抗原反应性; 免疫原性

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.004

**中图法分类号:**R977.6

**文章编号:**1673-4130(2018)07-0779-05

**文献标识码:**A

## Preparation of human transferrin and verification of the antigenic activity\*

WU Qiang, SHI Dinggang, ZHANG Yusheng

(Medicalsystem Biotechnology Limited Company, Ningbo, Zhejiang 315104, China)

**Abstract: Objective** Non-affinity methods were used to purify transferrin(TRF) with high purity from human serum, and the immunogenicity of TRF was evaluated by immunizing New Zealand rabbits. **Methods** Firstly, TRF was extracted from serum by precipitation with ammonium sulfate and then purified by two-step anion exchange chromatography. **Results** SDS-PAGE purity of the prepared TRF was similar with the control pure product, and the HPLC purity reached to 96.8% with a yield of 78.6%. For the same batch of TRF sample, the ratio between the activity concentration determined using TRF kit(immunoturbidimetry method) and the protein concentration determined using uv-spectrophotometric method was about 0.95, which indicated that the prepared TRF for antigen could react well with the TRF antibody included in the TRF kit. Finally, New Zealand rabbits were immunized using the purified TRF, and the titer of the rabbit anti-serum could reach 1:128 000 after four time immunization, which also indicated that the prepared TRF had good immunogenicity. **Conclusion** The TRF with high purity had good antigen reactivity and immunogenicity to prepare anti-TRF antibody by immunizing rabbits, which could provide qualified materials for the production of TRF kit(immunoturbidimetry method).

**Key words:** transferrin; ammonium sulfate precipitation; anion exchange chromatography; antigen reactivity; immunogenicity

转铁蛋白(TRF)是一种肝脏合成的单链糖基化蛋白,电泳分类为 $\beta$ -球蛋白,由 676 个氨基酸残基组成,相对分子质量约为  $79 \times 10^3$ <sup>[1-2]</sup>。近年来的研究表明,人体血清 TRF 水平的变化对许多疾病具有鉴别诊断价值,如肝肾疾病、全身感染、糖尿病、癌症、创伤等<sup>[3-5]</sup>。因此建立灵敏、特异、准确、简便的人血清

TRF 水平测定方法对进一步探讨 TRF 的功能及其在临床诊断中的应用具有重要意义。目前临床上检测人血清 TRF 水平灵敏可靠、简便易行的方法,主要有酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫比浊法(TIHA)等免疫检测方法<sup>[6-7]</sup>。用于配制免疫诊断试剂的抗体原料主要是采用抗原免疫动物产生相应抗体的方式制备

\* 基金项目:宁波市生命健康重大项目(2017C110014)。

作者简介:武强,男,高级工程师,主要从事抗原抗体的研发制备研究。

本文引用格式:武强,史定刚,章玉胜.人转铁蛋白纯化制备及其抗原活性验证[J].国际检验医学杂志,2018,39(7):779-783.

获得。因此,从人血清中分离纯化得到天然的 TRF 是制备 TRF 抗体的首要关键步骤。本文主要研究了用非亲和柱方法从人血清中分离纯化 TRF 的工艺流程,并验证了 TRF 纯化成品的抗原反应性及免疫原性,为制备合格的 TRF 抗原抗体原料提供了优良工艺基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人血清(经灭活处理)来源于本地医院体检血清;Q Spharose HP 强阴离子预装柱购自美国 GE Healthcare 公司;MD34 透析袋购自美国 Union Carbide 公司;TRF 检测试剂盒(含校准品)购自美康生物公司;人 TRF 纯品购自美国 Sigma-Aldrich 公司;ELISA 96 孔板购自美国 Corning 公司;HRP 酶标记羊抗兔二抗购自美国 Rockland 公司;TMB 显色液购自英创生物公司;新西兰大白兔(4~6 月龄)来源于浙江省动物实验中心;福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Bio SEC-3 凝胶色谱柱购自美国 Aglient 公司。

**1.2 仪器** ÄKTA pure 蛋白质快速纯化仪:GE Healthcare;GL21M 离心机:长沙湘智离心机仪器有限公司;FE20 pH 计:梅特勒-托利多;7180 生化分析仪:日立;Mutiskan-go 酶标仪:Thermo-Fisher;DYY-8C 电泳仪:六一仪器;SC805 凝胶成像仪:上海山富;MXR-C350 乳化器:上海沐轩;1260 型 HPLC 色谱仪:Aglient;紫外分光光度计:日本岛津。

## 1.3 方法

**1.3.1**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀法粗制人血清 TRF 取适量经灭活处理[加入 0.3% 的磷酸酯(TNBP)和 1% 的曲拉通 100]的人血清,搅拌条件下缓慢添加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  固体粉末,至  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和度为 40%。离心后保留上清液,再向上清液中添加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  固体粉末至终饱和度为 70%。离心后保留沉淀,用 HAC-NaAC 缓冲液(10 mmol/L, pH=5.5)按 1:10(w/v)固液比例复融沉淀,然后将沉淀复融液透析于 HAC-NaAC 缓冲液(10 mmol/L, pH=5.5)中,期间更换 3~5 次透析液。

**1.3.2** 两步 Q 强离子柱纯化精制血清 TRF 在 ÄKTA pure 系统上预先用 HAC-NaAC 缓冲液(10 mmol/L, pH=5.5)平衡 Q Spharose HP 预装柱,将透析完全的沉淀复融液离心取上清液,并用 0.45  $\mu\text{m}$  膜过滤后上样,收集洗脱液,再依次用 pH 分别为 4.5、4.0 的 HAC-NaAC 缓冲液进行洗脱,收集各步洗脱液,待进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。最后用 2 mol/L NaCl 洗涤 Q 离子柱。

将收集的第 1 步离子柱样液透析于 PB 缓冲液(20 mmol/L, pH=7.4)中,期间更换 3~5 次透析液。透析完全的样液经 0.45  $\mu\text{m}$  膜过滤后,再次上样至 Q Spharose HP 预装柱[预先用 PB 缓冲液(20 mmol/L, pH=7.4)平衡],上样完毕后,依次用含 75、

150、500 mmol/L NaCl 的 PB 缓冲液(20 mmol/L, pH=7.4)进行梯度洗脱,并收集各步洗脱液,待进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。最后用 2 mol/L NaCl 洗涤 Q 离子柱。

**1.3.3** TRF 蛋白纯度鉴定 (1)SDS-PAGE:将纯化流程中各步骤的 TRF 样品与对照的 TRF 纯品(Sigma-Aldrich)同时进行 SDS-PAGE 分析,对比判定制备的 TRF 蛋白纯度;(2)高效液相色谱(HPLC)法:在 Agilent 1260 型 HPLC 色谱系统上,以 1.0 mL/min 流速的 PB 缓冲液(150 mmol/L, pH=7.2)平衡 Agilent Bio SEC-3 凝胶色谱柱,将纯化的 TRF 样品与对照 TRF 纯品(Sigma-Aldrich)用 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤后,采用自动进样泵分别上样 20  $\mu\text{L}$  样液于色谱柱,待运行完毕后,对色谱图中各峰进行面积积分,将 TRF 蛋白的响应峰面积与色谱图中所有峰面积的百分比定义为 HPLC 纯度。

**1.3.4** TRF 浓度测定及抗原反应性验证 (1)TRF 检测试剂盒(免疫比浊法)测定:通过测定样品(抗原)和试剂(抗体)反应过程的吸光度变化值,参照试剂盒校准曲线计算出 TRF(活性)浓度。将 TRF 制品依次进行 0.8、0.6、0.4、0.2 倍梯度稀释,在试剂盒的检测线性范围内分别测定各稀释点的对应浓度,以稀释梯度与测定浓度为变量采用最小二乘法拟合直线,拟合的线性程度反映 TRF 抗原与 TRF 抗体(TRF 检测试剂盒中的主要组分)的反应性;(2)紫外分光光度计法测定:适当稀释 TRF 蛋白样品,采用紫外分光光度计分别测定样品的  $OD_{280}$  与  $OD_{260}$  值,按 Warburg-Christain 公式<sup>[8]</sup>计算得到 TRF 样品的蛋白浓度。TRF 样品用检测试剂盒(免疫法)测得的活性浓度与紫外分光光度计法测得的蛋白浓度的比值(Rc)表示能与 TRF 抗体良好反应的活性 TRF 量占总的 TRF 量的比例。

**1.3.5** TRF 的免疫原性验证 取适量 TRF 抗原与等量完全福氏佐剂混合并充分乳化,对新西兰大白兔进行皮下多点注射免疫。3 周后将抗原与不完全佐剂等量混合乳化后进行第 1 次加强免疫,每隔 2 周再进行 2 次加强免疫后取血,分离得到 TRF 抗血清,采用间接 ELISA 法对 TRF 抗血清效价进行评价。间接 ELISA 法的具体操作步骤如下:(1)包被抗原,将适量 TRF 抗原包被在 96 孔板上,37 °C 温育反应 1 h;(2)无关蛋白封闭,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  5%脱脂奶粉,37 °C 封闭 1 h;(3)加一抗,将兔抗血清按一定比例梯度稀释,纵向加入 96 孔板中(每份样本对应板上一列,并用 PBS 缓冲液和阴性兔血清替代抗血清样本分别作为空白和阴性对照组),37 °C 反应 1 h;(4)加二抗,将适量 HRP 酶标记的羊抗兔 IgG 抗体加入 96 孔板中,37 °C 反应 1 h;(5)TMB 显色,加 TMB 试剂避光反应 3 min,加入适量 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应,酶标仪读数(波长 450 nm),测定每孔 OD 值,分析结果。以上

每步骤间均用洗涤缓冲液(20 mmol/L PBS, pH = 7.4, 0.05% Tween-20)洗涤酶标板。根据 ELISA 的数据结果,首先计算阴性对照组的 OD 平均值( $OD_{\text{平均}}$ )及标准差( $SD$ ),再按公式计算实验组内发生抗原抗体阳性反应的临界 OD 值( $OD_{\text{临界}} = OD_{\text{平均}} + 3 \times SD$ ),其对应的兔抗血清的稀释比例,即表示抗血清的效价滴度<sup>[9]</sup>。

2 结 果

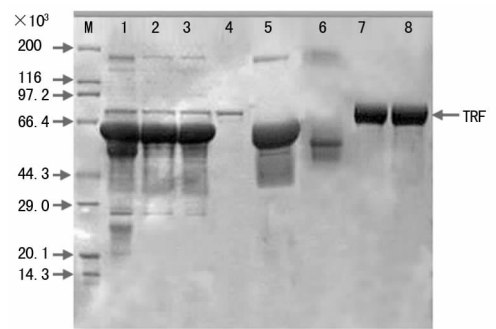
**2.1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀法粗纯 TRF** 本实验血清样本中蛋白种类复杂,首先考虑采用两步(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀法对目的蛋白进行粗纯化,第 1 步利用 40%饱和度的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀血清,将其中大部分的免疫球蛋白等大分子蛋白沉淀去除,由图 1 中可见,泳道 2 上方的大分子杂蛋白较泳道 1 明显减少,且目的蛋白仍保留在沉淀上清液中。继续往上清液中添加(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至终饱和度为 70%,此时目的蛋白发生盐析沉降,复融沉淀并透析至 HAC-NaAC 缓冲液中,由图 1 泳道 3 可见,经过第 2 步(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀,目的蛋白得到进一步纯化并得以浓缩,但样液中仍存在大量以人血清蛋白(HSA)为主的杂蛋白,需进一步精细纯化。

**2.2 Q 强阴离子柱精纯 TRF** 人血清经过(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀粗纯后,样液中除保留了 TRF 目的蛋白外,仍存在大量以 HSA 为主的杂蛋白,人 TRF 与 HSA 的等电点 pI 分别为 5.9 和 4.7,在 pH = 5.5 的 HAC-NaAC 缓冲体系下,TRF 表面带正电荷,而 HSA 蛋白带负电荷,将样液上样于强阴离子柱后,TRF 不与离子填料发生吸附结合从而被洗脱,而 HSA 和其他带负电荷的杂蛋白则吸附在离子填料上,从而实现 TRF 与杂蛋白的分离。从图 1 的泳道 4、5、6 及图 2 可见,目的蛋白 TRF 主要在 Q 柱洗脱液中且纯度较高,而 HSA 和其他杂蛋白主要集中在 pH 为 4.5 和 4.0 的洗脱液中,因此经过第 1 次 Q 柱纯化后,TRF 蛋白纯度得到大大提高,但因在洗脱液中获得 TRF 蛋白的浓度往往较低,因此为了浓缩和进一步提纯 TRF,后续进行第 2 步离子柱纯化。

将第 1 步离子柱纯化的洗脱液透析至 20 mmol/L, pH = 7.4 缓冲体系中,再次上样于 Q 阴离子柱,此时 TRF 蛋白因带负电荷与离子填料发生吸附结合,依次用含 75、150、500 mmol/L NaCl 的 pH = 7.4 缓冲液进行洗脱,每步均出现洗脱峰(如图 3),经 SDS-PAGE 分析,TRF 主要集中在 75 mmol/L NaCl 洗脱液中且纯度较高(如图 1 泳道 7),与 TRF 纯品(Sigma-Aldrich)比较,两者纯度相当。另外,将纯化得到的 TRF 与 TRF 纯品(Sigma-Aldrich)进行 HPLC 纯度分析(如图 4),通过积分峰面积算得两者的 HPLC 纯度分别为 98.6%、99.3%。

综上所述可见,经过两步(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀粗纯和两步 Q 离子柱精纯后,制得 TRF 的纯度与对照纯

品相当,达到 95%以上,且根据每步操作单元的 TRF 收率,最后算得 TRF 的总回收率为 78.6%。



注:M 为蛋白 Marker;1 为人血清;2 为 40%饱和度(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀上清;3 为第 1 步离子柱前液;4 为第 1 步离子柱洗脱液;5 为第 1 步离子柱 pH4.5 洗脱液;6 为第 1 步离子柱 pH=4.0 洗脱液;7 为第 2 步离子柱 75 mmol/L NaCl 洗脱液;8 为 TRF 纯品对照

图 1 转铁蛋白纯化流程各样品的 SDS-PAGE 电泳

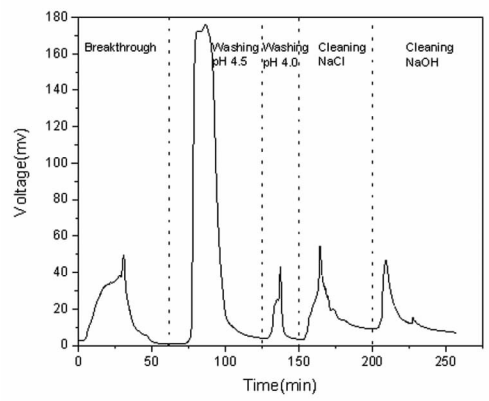


图 2 第 1 步 Q 离子柱纯化谱图

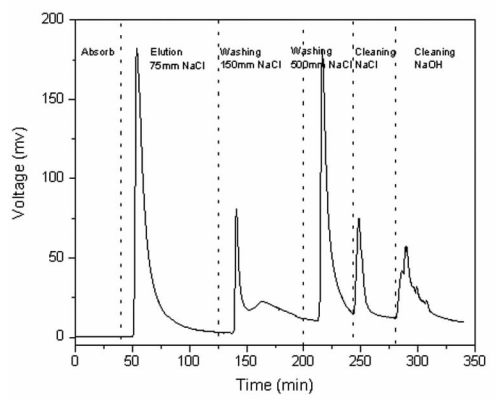


图 3 第二步 Q 离子柱纯化谱图

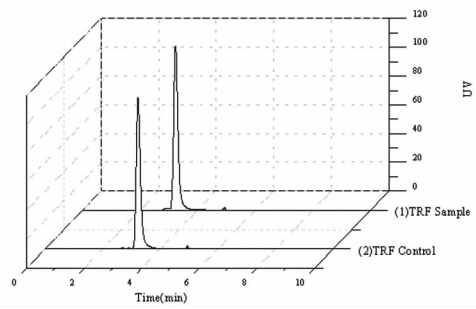


图 4 自制 TRF 与 TRF 对照纯品的 HPLC 谱图

**2.3 TRF 蛋白免疫反应性** 将三批次 TRF 制品依次进行 0.8、0.6、0.4、0.2 倍梯度稀释,分别测定各稀释点的对应浓度,以稀释梯度与测定浓度为变量采用最小二乘法拟合直线(如图 5 所示),3 组拟合直线的线性程度良好( $r^2$  均大于 0.995),说明纯化的 TRF 与检测试剂盒中 TRF 抗体反应良好,即 TRF 具有较好的抗原反应性。另外,采用检测试剂盒(免疫法)测得的 TRF 样品活性浓度与紫外分光光度计法测得的蛋白浓度的比值(Rc)均在 0.95 左右(如表 1 中所示),即 TRF 总蛋白中能 与 TRF 抗体反应的 TRF 抗原量占比达 95% 以上,说明纯化制得的 TRF 保持了良好的生物活性,也由此可见,本文采用的 TRF 纯化制备工艺条件温和,能够很好地保持天然蛋白生物活性。

| 表 1 TRF 蛋白抗原反应性验证 (mg/mL) |      |       |       |       |
|---------------------------|------|-------|-------|-------|
| 方法                        |      | 样品一   | 样品二   | 样品三   |
| 试剂盒                       | 0.8  | 1.265 | 1.525 | 1.155 |
|                           | 0.6  | 0.995 | 1.180 | 0.870 |
|                           | 0.4  | 0.655 | 0.800 | 0.585 |
|                           | 0.2  | 0.320 | 0.310 | 0.275 |
|                           | 平均浓度 | 1.580 | 1.910 | 1.440 |
| 分光光度法                     | 平均浓度 | 1.640 | 2.000 | 1.530 |
|                           | Rc   | 0.964 | 0.953 | 0.944 |

注:每组样品测浓度均做两个平行;Rc=试剂盒测得浓度/分光光度计测得浓度

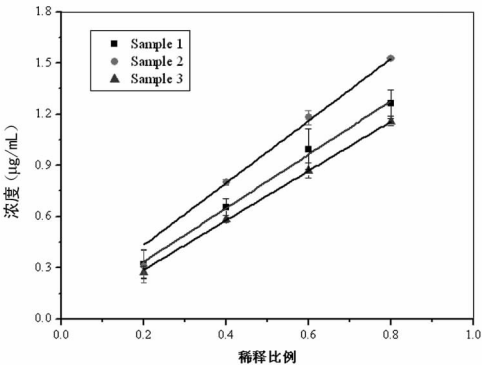


图 5 TRF 检测试剂盒检测蛋白浓度的梯度线性

**2.4 TRF 免疫原性** 以纯化制得的人 TRF 为抗原,对新西兰大白兔进行皮下多点注射免疫。共进行 4 次免疫后取血,分离得到兔抗血清,采用间接 ELISA 法检测 TRF 抗血清效价,根据阴性对照组平均 OD 值及其标准差(SD),算得抗原抗体阳性反应临界 OD 值为 0.166 7,当测得  $OD > 0.166 7$  时表明此时抗原抗体发生了有效(阳性)反应,由此判断 80% 的兔抗血清效价滴度达到 1 : 128 000 (如表 2 所示),说明本文制备的 TRF 对兔免疫具有良好的免疫原性。在此基础上,后续将从高效价兔抗血清中纯化得到 TRF 抗体,为后期用于 TRF 免疫检测试剂的配制提供良好的抗体原料基础。

| 表 2 不同稀释梯度 TRF 免疫兔抗血清效价滴度 |           |           |           |           |            |            |            |             |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|
| 样本                        | 1 : 1 000 | 1 : 2 000 | 1 : 4 000 | 1 : 8 000 | 1 : 16 000 | 1 : 32 000 | 1 : 64 000 | 1 : 128 000 |
| 空白对照                      | 0.061 6   | 0.056 2   | 0.053 3   | 0.052 1   | 0.051 5    | 0.055 5    | 0.053 9    | 0.056 4     |
| 阴性对照                      | 0.112 1   | 0.102 1   | 0.095 6   | 0.099 1   | 0.142 9    | 0.123 8    | 0.131 7    | 0.122 6     |
| 兔编号                       |           |           |           |           |            |            |            |             |
| 1 号                       | 1.301 3   | 1.179 3   | 1.174 0   | 0.942 5   | 0.668 8    | 0.605 8    | 0.401 5    | 0.236 3     |
| 2 号                       | 1.358 9   | 1.299 3   | 1.214 0   | 1.049 6   | 0.796 9    | 0.613 7    | 0.411 8    | 0.234 6     |
| 3 号                       | 1.316 9   | 1.280 3   | 1.111 0   | 0.971 0   | 0.641 5    | 0.628 0    | 0.327 3    | 0.205 3     |
| 4 号                       | 1.476 1   | 1.365 1   | 1.278 9   | 1.081 4   | 0.757 6    | 0.653 6    | 0.443 1    | 0.266 0     |
| 5 号                       | 1.244 1   | 1.177 9   | 1.052 4   | 0.837 4   | 0.565 8    | 0.374 5    | 0.219 0    | 0.134 9     |

注:空白和阴性对照组分别用 PBS 缓冲液和阴性兔血清替代兔抗血清样本

3 讨 论

TRF 在人血液中浓度相对较高,为 2.0~3.0 g/L,但血清中水平较高的清蛋白与血红素结合蛋白的相对分子质量及等电点等一些理化性质与 TRF 比较接近,很难将目的蛋白与杂蛋白分开。相关研究报道 affi-gel Blue 或者金属螯合亲和柱对清蛋白或者 TRF 具有强亲和力,一步即可除去绝大部分的清蛋白得到高纯度的 TRF 成品<sup>[10-12]</sup>。但亲和柱存在介质成本高、配基易脱落等弊端,限制了其大规模应用,其他一些方法如乙醇沉淀法、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀法、离子交换层析等也常被用于 TRF 的分离纯化<sup>[13-15]</sup>,但往往制备的蛋白纯度达不到实验要求。本文首先采用两步 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀法从人血清中粗纯 TRF,根据蛋白质盐析沉淀原理,因相对分子质量大小、亲疏水性等

理化性质的差异致使不同种类的蛋白质在不同饱和度的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中发生盐析沉淀的程度不同,蛋白质相对分子质量越大往往发生沉降所需要的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 饱和度越低,选择不同饱和度的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行梯度沉淀可实现 TRF 的初步纯化。再用两步阴离子交换层析柱进行精细纯化,在离子缓冲体系的 pH 下,不同蛋白质因 pI 差异致使蛋白表面带有不同电荷数,从而与离子交换填料的吸附结合能力存在差异,经过 TRF 蛋白与杂蛋白在两步阴离子介质上的吸附情况差异,很好地实现了目的蛋白的分离纯化,制得 TRF 的 SDS-PAGE 纯度与外购纯品纯度相当,且 HPLC 纯度达到 96.8%,纯化回收率为 78.6%。相比较于文献报道中常用的 affi-gel Blue 或者金属螯合亲和柱纯化 TRF,本文所用工艺流程不仅

能纯化制得高性能 TRF,更体现出成本低、操作简单、易于放大等优势。另外,利用 TRF 检测试剂盒(免疫法)测得的 TRF 浓度与分光光度法测得的蛋白浓度比值(Rc)约为 0.95,说明纯化得到的 TRF 与免疫检测试剂盒中的 TRF 抗体具有良好的抗原反应性。最后,用纯化样品免疫新西兰大白兔,经过 4 次免疫后的兔抗血清效价滴度达 1:128 000,说明制备的 TRF 具有良好的免疫原性。综上所述,利用本文纯化工艺流程制备的 TRF 纯度高、回收率高,且具有良好的抗原反应性及免疫原性,可放大工艺规模制备 TRF 用于动物免疫以获得相应的抗 TRF 抗体,为配制灵敏度高、特异性好的 TRF 检测试剂(免疫法)提供良好的原料基础。

# 参考文献

- [1] GOMME P T, MCCANN K B, BERTOLINI J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions [J]. Drug Discov Today, 2005, 10(4): 267-273.
- [2] 秦晓蓉, 易德莲, 张铭金, 等. 鸭血清转铁蛋白的分离纯化 [J]. 膜科学与技术, 2008, 28(4): 31-34.
- [3] 高兰兴. 运铁蛋白的生理功能及临床意义 [J]. 生理科学进展, 1984, 15(1): 59-63.
- [4] 刘洪正. 尿特种蛋白定量在诊断糖尿病早期肾损害中的临床应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(24): 3420-3421.
- [5] 杨丽华. 粘蛋白联合血红蛋白检测粪便潜血的分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(6): 809-810.
- [6] 何涛, 吴明沪, 罗文炽, 等. 人血清转铁蛋白酶联免疫测定

- 法的研究 [J]. 泸州医学院学报, 1999, 22(2): 99-101.
- [7] 孙永杰. 胶乳增强免疫比浊法测定尿液转铁蛋白试剂 [P]. CN 102128924, 2011.
- [8] 程宁宁, 单艳菊, 潘志明, 等. 破伤风毒素 C 片段基因的克隆及在大肠杆菌中的高效表达 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(6): 439-441.
- [9] 霍宁宁, 朱伟英, 高洋, 等. 羊伪结核抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(10): 12-17.
- [10] 窦后松, 森下宗夫, 矢岛毅彦. 螯合亲和色谱法分离转铁蛋白的四种分子形式 [J]. 色谱, 1996, 14(3): 176-178.
- [11] 张敏林, 应启龙, 梁植权. 分离纯化人血清转铁蛋白的一种简便快速方法 [J]. 中国医学科学院学报, 1985, 7(2): 154-157.
- [12] WEMER PAM, GALBRAITH R M, AMAUD P. DEAE-Affi-Gel Blue chromatography of human serum: use for purification of native transferrin [J]. Arch Biochem Biophys, 1983, 226(1): 393-398.
- [13] 王革新, 孙南翔, 王者鹏, 等. 人血浆转铁蛋白的分离与纯化 [J]. 化学试剂, 1991, 13(4): 244-247.
- [14] 秦晓蓉, 张铭金, 伍林, 等. 转铁蛋白的制备方法及其应用前景 [J]. 化学与生物工程, 2006, 23(10): 5-57.
- [15] ASCIONE E, MUSCARIELLO L, MAIELLO V, et al. A simple method for large-scale purification of plasma-derived apo-transferrin [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2010, 57(3): 87-95.

(收稿日期: 2017-09-12 修回日期: 2017-11-02)

(上接第 778 页)

- [3] 王佳丽, 赵国厚, 袁开芬. D-二聚体在老年肺癌合并肺栓塞的研究进展 [J]. 中国老年保健医学杂志, 2016, 14(9): 85-87.
- [4] 刘勇, 代丽, 甘辞海. 凝血及纤溶指标在弥散性血管内凝血产妇中的临床应用 [J]. 检验医学与临床, 2014, 11(2): 181-182.
- [5] 解学龙, 曾梅. DD、FDP 和 AT-Ⅲ联合检测对 DIC 实验诊断及治疗监测的价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(1): 134.
- [6] 周熙琳, 梁辉, 黄洁杰. 急性脑梗死患者血栓弹力图与血小板聚集率和 D-二聚体相关性研究 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 33(4): 459-462.
- [7] 潘静玲, 王小娟, 吴萍, 等. 化疗对胃肠道肿瘤患者凝血功能的影响 [J]. 中国综合临床, 2012, 28(2): 1245-1249.
- [8] 高彤, 郭燕, 王筠, 等. 不同剂量三维适形放疗对恶性肿瘤患者凝血功能的影响 [J]. 中国疑难病杂志 2013, 12(6): 446-449.
- [9] 周炜, 陈曼华. D-二聚体在主动脉夹层中的临床意义 [J]. 心血管疾病进展, 2012, 33(2): 234-236.
- [10] 焦小四. 血浆 D-二聚体测定在诊断 2 型糖尿病并发症中的意义 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(1): 34-35.

- [11] 丛玉龙, 尹一兵, 陈瑜. 检验医学高级教程 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2013: 37-40.
- [12] 黄淑, 孙小成, 杨显福, 等. 正常凝血质控血浆质量考察 [J]. 中国输血杂志, 2007, 20(2): 118-120.
- [13] 顾敏敏. D-二聚体质控品制备方法学研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(1): 154-157.
- [14] 周丽艳, 张志国, 曲灿华, 等. D-二聚体质控品的制备 [J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(7): 600.
- [15] 刘小勇, 冯金. D-二聚体质控品复溶后稳定性及复融方式的研究 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(2): 168-169.
- [16] 蔡瑜, 戎国栋, 徐婷, 等. 自制室内质控血浆在罗氏 Cobas AmpliPrep/TaqM an48 超敏 PCR 检测系统的应用 [J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2014, 8(5): 20-24.
- [17] 黄炳坤, 华建江, 陈艳敏, 等. 病理水平 D-二聚体室内质控品的制备及应用评价 [J]. 中国城乡企业卫生, 2017, 6(6): 8-10.
- [18] 闻平, 俞晓丽, 庄建伟, 等. 血清作为 D-二聚体质控品的可行性研 [J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(17): 1410-1413.

(收稿日期: 2017-09-23 修回日期: 2017-11-13)