

免疫球蛋白 G 的免疫共振散射光谱分析

邓俊耀^{1,3}, 孙双娇¹, 蒋治良^{1,2*}, 梁爱惠²

- 1. 广西师范大学资源与环境学系, 广西 桂林 541004
- 2. 桂林工学院材料与化学工程系, 广西 桂林 541004
- 3. 桂林市妇幼保健院, 广西 桂林 541001

摘要 在 pH 7.0 Tris-HCl 缓冲溶液中及聚乙二醇-20000 存在下, 羊抗兔 IgG 与兔 IgG 的免疫复合物可聚集形成疏水的免疫复合物微粒, 在 330, 400, 520 nm 处有三个共振散射峰, 在 470 nm 有一个同步散射峰。IgG 浓度在 1.33~133.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与 470 nm 处的散射强度呈线性。借此用于定量分析血清 IgG, 结果满意。方法检出限为 0.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

主题词 IgG; 免疫复合物微粒; 共振散射

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2006)08-1487-03

引言

免疫球蛋白 G(IgG)是血清中一类重要的免疫球蛋白, 具有中和毒素和病毒, 激活补体, 凝集等功能。目前测定 IgG 主要有化学发光法、电化学法等^[1,2]。共振散射(RS)光谱分析具有灵敏度高和简便等特点, 已用于蛋白质分析、生化和纳米微粒研究等^[3-9]。在蛋白质的 RS 分析中, 所用试剂多为磺酸基和羧基的酸性染料, 如酸性三苯甲烷类染料、酸性占吨染料、酸性偶氮染料, 其灵敏度较高。但该类方法主要基于小分子的缔合作用, 其选择性不好。因此, 将高选择性反应与 RS 检测结合是提高其选择性的重要途径之一。目前免疫-RS 法和催化反应-RS 法的研究较少^[10]。免疫反应虽然在光散射分析中的应用已有研究, 但免疫复合物微粒的 RS 光谱研究及其分析应用很少见报道。本文将灵敏度较高的 RS 检测技术与免疫反应的特异性反应相结合, 建立了一种定量分析检测 IgG 的新方法。该法的操作简便, 效果较好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

兔 IgG(上海午立生物技术公司), 羊抗兔 IgG(GAR-IgG, 上海午立生物技术公司), Tris-HCl 缓冲溶液, 聚乙二醇 20000(PEG), 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸

馏水。RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津), TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

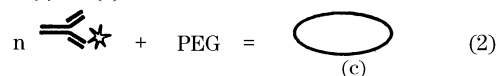
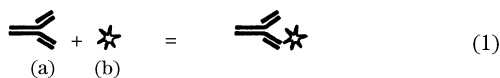
1.2 实验方法

依次移取 0.50 mL pH 值为 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 0.30 mL 100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PEG 溶液, 0.3 mL 的 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GAR-IgG 溶液, 一定量的兔 IgG 溶液于 10 mL 比色管中, 用蒸馏水定容至 3 mL, 混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中温育 30 min, 取适量于石英池中, 置于荧光分光光度计上, 用低灵敏档, 纵坐标为 6, 同步扫描($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$), 得到体系的同步散射光谱。测定 470 nm 处的共振散射光强度 I_{RS} 。另外, 不加 IgG, 做空白 I_b 。计算 $\Delta I = I_{\text{RS}} - I_b$ 值。

2 结果与讨论

2.1 GAR-IgG 与兔 IgG 的特异性反应及颗粒的形成

GAR-IgG[以(1)式中的(a)表示]与兔 IgG[以(1)式中的(b)表示]特异性结合是二者之间存在结构和空间上的互补性和亲和性, 它们通过电荷引力, 范德华力, 氢键结合力, 疏水作用力等进行结合形成免疫复合物。该免疫复合物与 PEG 之间存在较强的分子间作用力和疏水作用力而自动聚集形成



收稿日期: 2005-03-28, 修订日期: 2005-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(20365001)和广西高校百名中青年学科带头人计划项目资助

作者简介: 邓俊耀, 1964 年生, 桂林市妇幼保健院主管技师 * 通讯联系人

免疫复合物—PEG 颗粒[以(2)式中的(c)表示]和固液界面(如反应 1 和 2),从而使体系的散射信号增强。

2.2 共振散射光谱(RSS)

兔 IgG, GAR-IgG 和 PEG 都为高分子蛋白质,但由于其水溶性较好,界面不清晰,故同步散射(即 Rayleigh 散射)较弱(图 1a)。当兔 IgG, GAR-IgG 和 PEG 三者共存时同步散射急剧增强。故在 470 nm 处出现了强同步散射峰,330,400 和 520 nm 的三个共振散射峰系由于该免疫复合物微粒共振散射效应所致。实验选取波长为 470 nm。

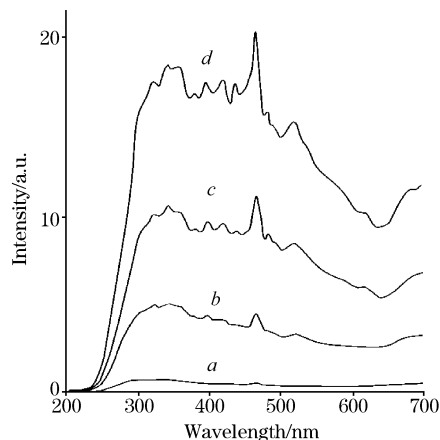


Fig. 1 RSS of rabbit IgG-GAR-IgG system

- a: 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GAR-IgG;
 b: a-10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rabbit IgG;
 c: a-20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rabbit IgG;
 d: a-40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rabbit IgG

2.3 pH 值、缓冲溶液种类及用量的选择

体系 pH(6~8.5)影响实验结果表明,随着体系 pH 的增加, I_{RS} , I_{b} 都减弱。当 pH 值为 7.0 时, ΔI 相对较大。用三种不同 pH 值为 7.0 的缓冲溶液(Tris-HCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, 巴比妥钠-HCl)进行实验。结果表明, Tris-HCl 缓冲溶液的灵敏度最高, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液的效果最差。本实验选取 Tris-HCl 缓冲溶液。缓冲溶液用量影响的实验表明,用量为 0.5 mL 时, ΔI 有最大值。实验选取缓冲溶液的用量为 0.50 mL, Tris 浓度为 0.017 mol · L⁻¹。

2.4 PEG 浓度的影响

一定量 PEG 存在会加快免疫复合物微粒的形成。图 2 表明, PEG 的用量在 5~20 mg · mL⁻¹ 范围内较好,实验过程中选取 10.0 mg · mL⁻¹ PEG。

2.5 GAR-IgG 用量的影响

考察了 GAR-IgG 用量对 ΔI 的影响。实验结果表明,当 GAR-IgG 的浓度较低时, I_{b} 和 I_{RS} 均较小;当 GAR-IgG 的浓度较高时,体系的共振散射强度较大,但其 I_{b} 也较大。本文选取的 GAR-IgG 用量为 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GAR-IgG。

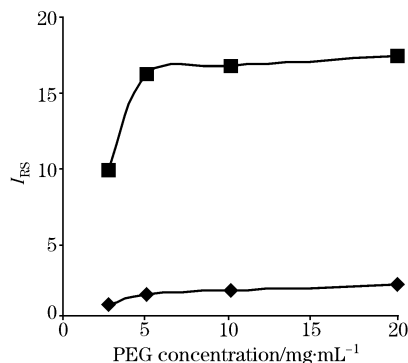


Fig. 2 Effect of PEG concentration on the I_{RS} at pH 7.0

- a: 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GAR-IgG
 b: a-30.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rabbit IgG

2.6 温度与时间的影响

在 37 °C 水浴条件下,反应能较快地进行,反应时间短,结果比较稳定。在室温(25 °C)条件下,反应时间相对较长,且温度易受气候的影响,实验结果不太稳定。本实验选择 37 °C 水浴条件,考察了反应时间对 ΔI 的影响。实验表明,当反应时间为 30 min 时,反应已进行完全, ΔI 值趋于稳定。实验选择反应时间为 30 min。

2.7 线性关系

在最佳实验条件下,分别取不同浓度兔 IgG 标准液,按实验方法进行测定,并以其共振散射强度 ΔI 与兔 IgG 浓度 c 作图。兔 IgG 浓度在 1.33~133.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与 ΔI 之间存在良好的线性关系。回归方程为 $\Delta I = 0.269c + 0.34$, 相关系数为 0.996 6, 检出限为 0.995 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.8 共存物质的影响

免疫反应具有特异性,干扰其测定的物质较少。按实验方法考察了一些蛋白质对测定 33.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 兔 IgG 的影响。结果表明,当相对误差在 10% 的范围之内, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的人免疫球蛋白, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的人血清白蛋白, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鼠 IgG, 1 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白不干扰测定。由此可见本法具有较高的选择性。

2.9 样品的测定

取一定量(4~400 μg)血清样品,按实验方法进行测定,结果如表 1。本法测定结果与参考值基本一致。

Table 1 Results for the determination of IgG in serum

样品	测得值 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均值 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD /%	参考值 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1 [#]	32.3, 33.7, 32.8, 33.6	33.2	8.8	31.9
2 [#]	53.5, 54.5, 54.0, 55.5	54.4	7.6	50.5
3 [#]	85.7, 86.1, 84.6, 85.5	85.5	6.9	80.0

参 考 文 献

- [1] JIANG Xiong-ping, XU Dan-ke, LIU Yao-qing, et al(姜雄平, 许丹科, 刘耀清, 等). Chem. J. Chin. Univ. (高等化学学报), 2000, 11 (11): 1664.
- [2] WANG Jing-wu, WANG Zhao-xi, YANG Wei-ping(汪敬武, 王兆喜, 杨伟平). Chin. J. Anal. Chem. (分析化学), 2004, 32: 724.
- [3] Huang C Z, Li Y F, Liu X D. Anal. Chim. Acta, 1998, 375: 89.
- [4] Liu S P, Luo H Q, Li N B, et al. Anal. Chem., 2001, 73: 3907.
- [5] WEI Yong-ju, LI Ke-an, TONG Shen-yang(魏永巨, 李克安, 童沈阳). Acta Chim Sinica(化学学报), 1998, 56: 290.
- [6] Guo C X, Shen H X. Anal. Chim. Acta, 2000, 408: 177.
- [7] Wang L Y, Wang L, Chen H Q. Anal. Chim. Acta, 2003, 493: 179.
- [8] LING Shao-ming, JIANG Zhi-liang, BI Xian-shu, et al(凌绍明, 蒋治良, 闭献树, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 819.
- [9] ZHANG Biao-ming, JIANG Zhi-liang, ZHAI Hao-ying, et al(章表明, 蒋治良, 翟好英, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1092.
- [10] Jiang Z L, Liu S P, Liu Q Y. Talanta, 2002, 58: 635.

Immune Resonance Scattering Spectral Method for the Determination of Trace IgG

DENG Jun-yao^{1,3}, SUN Shuang-jiao¹, JIANG Zhi-liang^{1,2*}, LIANG Ai-hui²

1. Department of Resource and Environmental Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

2. Department of Material and Chemical Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China

3. Children-Women Health Hospital of Guilin City, Guilin 541001, China

Abstract In pH 7.0 Tris-HCl buffer solution, goat-anti-rabbit IgG is combined with rabbit IgG specifically, and aggregates to form immune complex particles that exhibit three resonance scattering peaks at 330, 400 and 520 nm respectively, and a synchronous scattering peak at 470 nm, in the presence of PEG-20000. The scattering intensity at 470 nm is linear to the rabbit IgG concentration in the range of 1.33 to 133.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The detection limit is 0.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The method was applied to the quantitative analysis of rabbit IgG, with satisfactory results.

Keywords IgG; Immune complex particle; Resonance scattering

(Received Mar. 28, 2005; accepted Jun. 28, 2005)

* Corresponding author