

用分光光度法定量检测人血清 巨噬细胞抑制因子 1

成丹 李启富^① 程庆丰 钟立 刘洲君

(重庆医科大学附属第一医院内分泌科 重庆市渝中区医学院路 1 号 400016)

摘要 结合基础酶联免疫吸附技术(ELISA), 用分光光度法检测人血清中的巨噬细胞抑制因子 1 (MIC-1) 的浓度。通过免疫反应将待测物质衍生化, 生成可见光区可检测的复合物。在 450nm 波长处用分光光度法测定该复合物的吸光度, 绘制 MIC-1 浓度-吸光度校准曲线, 方程式为 $y = 2.375 - 2.378 / (1 + 0.001x)^{0.938}$ ($r = 0.999$)。根据样本的吸光度推算血清 MIC-1 的浓度。方法的线性范围为 15.625—500.000 pg/mL。回收率为 98.2%—101.6%, 相对标准偏差为 1.89%—5.10%。

关键词 基础酶联免疫吸附法, 血清巨噬细胞因子 1, 分光光度法。

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2009)01-0114-05

1 引言

巨噬细胞抑制因子 1 (Macrophage Inhibitory Factor-1, MIC-1), 是转化生长因子 β 超家族中的一个分支成员^[1]。在炎症、肿瘤、损伤等病理状态下, MIC-1 作为一种应激反应蛋白, 由脂多糖、前炎症因子等激活巨噬细胞产生, 参与调控机体内多种细胞功能和生物过程, 发挥广泛的保护调节作用, 如: 抗器官功能损害, 抗炎性反应, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞生长, 神经元等^[2]。

现已发现 MIC-1 与人体多种恶性肿瘤, 如前列腺癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、胃癌等密切相关^[3-5], 它可作为一种独立于传统标志物的恶性肿瘤新指标, 用于恶性肿瘤的防治及预后评估。此外, 相关研究还证实 MIC-1 也与心血管疾病相关。作为一种重要的心脏应激保护因子, 它是妇女患动脉粥样硬化等心血管事件的独立危险因素^[6]。最新研究报道, 脂肪细胞也能分泌 MIC-1, 并通过作用于下丘脑中枢抑制食欲, 减轻体重, 参与人体能量平衡的调节^[7], 它可能还与肥胖等代谢性疾病相关。因此, 准确地检测人血清 MIC-1 浓度对于恶性肿瘤、心血管疾病、代谢性疾病等的防治及预后具有重要的临床和科研价值。

目前, 国际上检测血清 MIC-1 浓度的方法主要有基础酶联免疫吸附法(ELISA) 双抗体夹心法^[3]和放射免疫法(RIA)^[8]。由于 RIA 法需要特殊仪器, 且存在放射危害、试剂的污染和有效期等问题, 逐步被 ELISA 法取代。而至今尚无 ELISA 定量检测人血清 MIC-1 浓度的方法报道。本研究将分光光度法运用于 ELISA 中, 建立了准确、可靠且稳定的定量检测血清 MIC-1 浓度的方法。并将该方法运用于临床研究, 了解 2 型糖尿病患者体内血清 MIC-1 的水平特征。

^① 联系人, 电话: (023) 89012890; 手机: (0) 13708319370; 传真: (023) 89012890; E-mail: liqifu815@yahoo.cn

作者简介: 成丹(1981—), 女, 重庆市人, 硕士研究生, 主要从事内分泌基础、临床研究及相关检测工作。

收稿日期: 2008-12-31; 接受日期: 2009-01-05

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Multiskan MK3 酶联免疫检测仪(美国热电公司); Wellwash4 MK2 全自动洗板机(美国热电公司); DW-50W156 低温保存箱(中国海尔); MIR162 孵育箱(日本三洋公司)。96 孔(12×8)高吸附 ELISA 空白板(中国晶美试剂公司)。

PBS 缓冲液(磷酸盐缓冲液):由 NaCl、KCl、Na₂HPO₄ 和 KH₂PO₄ 按常规方法配制而成(pH7.2—7.4),并用滤孔孔径为 0.2mm 的滤膜过滤; Buffer 洗液:取 0.05% Tween 20 与 PBS 溶液配制,调节 pH 至 7.2—7.4; 重组人 MIC-1 粉末(标准品),大鼠抗 MIC-1 抗体粉末(捕获抗体),生物素化的羊抗 MIC-1 抗体粉末(探测抗体),Streptavidin-HRP(辣根过氧化物酶标记链霉亲和素)溶液(反应酶,每次使用前用稀释液按 1+200 倍稀释):以上试剂均购于美国安迪公司;稀释液:1%牛血清白蛋白与 PBS 溶液配制(中国晶美生物试剂公司);显色剂(即底物):H₂O₂ 与四甲基丙胺按 1+1 等体积配制(中国晶美生物试剂公司);终止液:1mol H₂SO₄ 溶液。

2.2 实验方法

2.2.1 标准品、捕获抗体和探测抗体溶液的配制

标准品溶液:取 0.5mL 稀释液加入标准品粉末中配制成初始浓度为 100ng/mL 标准品溶液 0.5mL,分装后放入-70℃冰箱中冻存。每次实验时取出分装的标准品,待其完全冻融后,用稀释液将其进行 2 倍稀释,配成以下 7 种不同浓度的标准品溶液用于制作校准曲线:7.813pg/mL、15.625、31.250、62.500、125.000、250.000、500.000pg/mL。

捕获抗体溶液:取 1.0mL PBS 将捕获抗体粉末配制成浓度为 360μg/mL 的溶液,分装后放入-70℃冰箱中冻存。每次实验时取出分装的溶液,待其完全冻融后,用 PBS 将其稀释至使用浓度为 2.0μg/mL 的捕获抗体溶液。

探测抗体溶液:取 1.0 mL 稀释液将探测抗体粉末配制成初始浓度为 9μg/mL 的溶液,分装后放入-70℃冰箱中冻存。每次实验时取出分装的溶液,待其完全冻融后,用稀释液将其稀释至使用浓度为 50ng/mL 的探测抗体溶液。

2.2.2 样品的采集、分离及稀释

使用真空采血管采集静脉血,经离心后分离出血清。检测前,须用稀释液将其稀释 5 倍。

2.2.3 固相抗体的制作

吸取捕获抗体溶液,按 100μL/孔加至 ELISA 板孔中。用封板胶将板孔密封,并放入 25℃的温育箱中孵育 15h。取出包被后的 ELISA 板,吸净溶液。用全自动洗板机将 Buffer 洗液注入孔中,连续重复洗板 3 次。洗板结束后,轻轻扣拍 ELISA 板,以保证板孔中无余液残留。在每个板孔中分别加入稀释液 300μL 封闭板孔,放入 25℃的温育箱,1h 后取出,洗板 3 次。

2.2.4 衍生化反应

将稀释后的血清样本及 7 种不同浓度的标准品溶液分别加入板孔中,100μL/孔。每块 ELISA 板设空白孔一个,其中加入稀释液作为参比液。放入 25℃的温箱中孵育 2h 取出,洗板 3 次。将探测抗体加入,每孔 100μL,放入 25℃的温箱中孵育 2h 取出,洗板 3 次。将稀释的 Streptavidin-HRP 加入每孔,放至 25℃的温育箱中孵育 20min 取出,洗板 3 次。将显色剂(即底物)加入孔中,100μL/孔,放入 25℃温育箱中孵育 20min。最后,每孔加入终止液 50μL 终止酶反应。

每次孵育检测样本时须用封板胶密封板孔防止液体蒸发。

2.2.5 吸光度测定

将酶标仪波长调至 450nm, 检测各孔的吸光度。以空白孔的吸光度校零。每孔均测定 2 次, 取其平均值乘以血清稀释倍数即为血清样本中 MIC-1 的浓度。

3 结果与讨论

3.1 校准曲线的绘制

用 7 种不同浓度的标准品溶液(浓度分别为:

7. 813、15. 625、31. 250、62. 500、125. 000、250. 000、500. 000pg/ mL) 绘制校准曲线。标准品经衍生化反应后在 450nm 波长下测定吸光度。取标准品 MIC-1 浓度为横坐标(x 轴), 吸光度为纵坐标(y 轴), 用酶标仪的四参数 logistic 拟合程序绘制出校准曲线(如图 1 所示), 并算出拟合方程式为: $y = 2.375 - 2.378 / (1 + 0.001x)^{0.938}$, 相关系数 $r = 0.999$ 。从图可见, 该方法检测血清 MIC-1 浓度的最佳浓度范围为: 15. 625—500. 000pg/ mL。

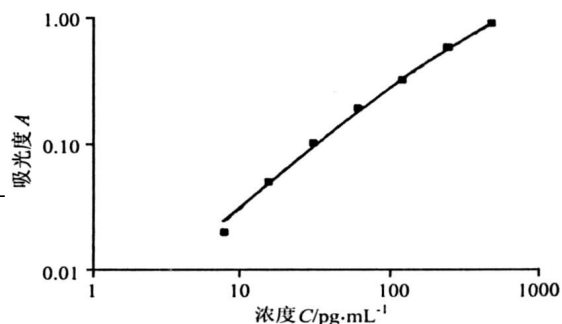


图 1 MIC-1 的校准曲线

3.2 实验条件

3.2.1 样本稀释倍数的选择

用稀释液将血清样本分别按照 2、3、4、5、6 和 7 倍进行稀释, 检测其 MIC-1 浓度。当血清按照 5 倍稀释时, 其浓度均在 15. 625—500. 000pg/ mL 范围内。

3.2.2 终止反应后测吸光度的时间选择

分别于终止反应后 5、10、15、20、25、30min 测样本吸光度一次。15min 内所测吸光度值较稳定。15min 后所测吸光度开始明显上升($\geq 10\%$)。故终止反应后, 应在 15min 内完成测定。

3.2.3 环境温度的控制

将一块 96 孔的 ELISA 板分为两组, 分别加入等量的浓度为 125pg/ mL 的标准品, 分别在 20℃ 和 25℃ 室温下进行检测。样本所测值无统计学差异。

3.2.4 孵育设备的选择

将一块 96 孔的 ELISA 板分为两组, 分别加入等量的浓度为 125pg/ mL 的标准品溶液, 分别用水浴箱和全自动电脑恒温孵育箱进行等时孵育, 同时用温控器制作这两种孵育设备的升温曲线图。结果提示两种设备孵育效果无统计学差异。

3.3 样品测定结果

采用本方法定量检测 60 名正常人、60 名 2 型糖尿病患者的血清 MIC-1 浓度。其中, 正常人血清 MIC-1 浓度范围为 184. 45—742. 18pg/ mL, 中间值为 241. 33pg/ mL; 2 型糖尿病患者血清 MIC-1 浓度范围为 188. 90—1365. 25pg/ mL, 中间值为 588. 05pg/ mL。统计学分析表明: 2 型糖尿病患者血清 MIC-1 浓度高于正常人, 且具有显著的统计学意义。

3.4 加标回收率

准确加入不同浓度的 MIC-1 标准品溶液, 按照上述方法进行测定, 根据加入量与测定值计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率

样品序号	原有量 (pg/ mL)	加入量 (pg/ mL)	测定总量 (pg/ mL)	测定值 (pg/ mL)	回收率 (%)
1	47. 051	31. 250	77. 723	30. 672	98. 2
2	87. 042	62. 500	150. 572	63. 530	101. 6
3	117. 141	125. 000	242. 613	125. 472	100. 4
4	39. 186	250. 000	286. 995	247. 809	99. 1
5	0. 000	500. 000	500. 849	500. 849	100. 2

3. 5 精密度试验

取 5 个不同浓度的样品, 在相同条件下重复检测 5 次, 计算其相对标准偏差, 结果见表 2。

表 2 方法精密度试验结果

样品序号	测定平均值 (pg/ mL)	RSD ($n= 5$, %)
1 号血清	47. 05	5. 10
2 号血清	61. 79	4. 27
3 号血清	87. 04	2. 58
4 号血清	111. 97	2. 81
5 号血清	138. 85	1. 89

4 结 论

建立了运用分光光度法结合 ELISA 双抗体夹心法定量检测人血清 MIC-1 浓度的方法。方法的最佳测量范围为 15. 625—500. 000pg/mL, 回收率为 98. 0% —101. 6%, 相对标准偏差为 1. 89% —5. 10%。该方法准确可靠, 稳定性好, 灵敏度高。可广泛用于恶性肿瘤(如: 前列腺癌、胃癌、直肠癌、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌等)、冠心病、糖尿病等常见病的临床筛查、治疗和预后评估, 以及肿瘤学、免疫学、心血管学、内分泌学、血液学等多学科的基础研究。

致 谢 重庆医科大学附属第| 医院血液科为本课题提供了技术指导, 在此深表感谢!

参考文献

[1] Bootcov M R, Bauskin A R, Valenzuela S M *et al.* MIC-1, A Novel Macrophage Inhibitory Cytokine, is a Divergent Member of the TGF- β Superfamily Cluster[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , 1997, **94**(21): 11514—11519.

[2] Moore A G, Brown D A, Fairlie W D *et al.* The Transforming Growth Factor- β Superfamily Cytokine Macrophage Inhibitory Cytokine-1 is Present in High Concentrations in the Serum of Pregnant Women[J]. *Clin. Endocrinol. Metab.* , 2000, **85**(12): 4781—4788.

[3] Welsh J B, Sapinoso L M, Kern S G *et al.* Large Scale Delineation of Secreted Protein Biomarkers Overexpressed in Cancer Tissue and Serum[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , 2003, **100**(6): 3410—3415.

[4] Cheung P K, Woolcoc K B, Adomat H *et al.* Protein Profiling of Microdissected Prostate Tissue Links Growth Differentiation Factor 15 to Prostate Carcinogenesis[J]. *Cancer. Res.* , 2004, **64**(17): 5929—5933.

[5] 郑佳, 黄智铭. 巨噬细胞抑制因子 1 与消化道肿瘤的研究进展[J]. 医学综述, 2007, **13**(12): 902—904.

[6] Brown D A, Breit S N, Buring J *et al.* Concentration in Plasma of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 and Risk of Cardiovascular Events in Women: a Nested Case-Control Study[J]. *Lancet*, 2002, **359**(9324): 2159—2163.

[7] Ding Q, Mracek T, Gonzalez-Muniesa P *et al.* Identification of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1) in Adipose Tissue and Its Secretion as an Adipokine by Human Adipocytes[J]. *Endocrinology*, 2008, (12), [Epub ahead of print].

[8] Eggers K M, Kempf T , Allhoff T *et al.* Growth-Differentiation Factor-15 for Early Risk Stratification in Patients with Acute Chest Pain[J]. *Eur. Heart. J.* , 2008, **29**(19): 2327—2335.

©1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c

Determination of Human Serum Macrophage Inhibitory Factor-1 by Spectrophotometry

CHEN Dan LI Qi-Fu CHENG Qing-Feng ZHONG Li LIU Zhou-Jun

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Chong Qing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China)

Abstract Combined with a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the spectrophotometry method was applied to determine the serum concentration of human serum macrophage inhibitory factor-1 (MIC-1). After derivatization, the compounds which could be determined in visible region were generated. And the absorbance of them were measured by spectrophotometry at 450nm. Then a standard curve was constructed, with a four parameter logistic equation of $y = 2.375 - 2.378 / (1 + 0.001x)^{0.938}$ obtained ($r = 0.999$). Ultimately, the concentration of human serum MIC-1 were calculated by the standard curve. The best range for determination was 15.625—500.000pg/mL, with average recovery of 98.2%—101.6% and RSD of 1.89%—5.10%.

Key words Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent assay, Serum Macrophage Inhibitory Factor-1, Spectrophotometry.

欢迎您投稿 “高效、保质”期刊

《光谱实验室》

这是您的发明、发现获得“优先权”的可靠保障

发表周期多数(50%—75%)为4—8个月,

少数(20%—45%)为1—4个月,个别(0—7%)为15—30天

及时发表科技论文,是尽早实现其社会效益的前提,也是作者创造性劳动得到尊重、为在世界上取得“优先权”的可靠保障,因为发明、发现的“优先权”通常是以出版时间为准的。因此,本刊把尽快发表作者的论文,视为自己的神圣职责。

确保论文质量是论文早日发表的条件。作者发表论文总是要反映自己在工作中有所发明、有所发现和有所创造的成绩,而不是去暴露自身的“弱点”和“毛病”,换言之,作者发表论文总是要为自己争“光”,而不是自己要出“丑”。因此,作者投稿之前,除了自己要反复检查外,一定要多请您周围的同事、专家挑“毛病”,把“毛病”消灭在投稿之前,再投本刊才能发表得快。如果本刊挑出毛病,再请作者修改,反复“折腾”,不仅消耗双方精力,而且必然延长发表时间。保证质量的基本要求就是论文要做到“齐、清、定”。“齐”即全稿包括表、图和照片等齐全;“清”即文字图片打印(书写)清楚,不得有模糊不清的文字、图片和数字,段落要分明,便于排版和校对;“定”即做到稿件内容完整,在编辑过程中无须增删修改。

来稿请用 Word 或北大方正排版,用电子邮件发到本部电子信箱[E-mail: (1) gpsysh@263.net; (2) gpsysh@public.sti.ac.cn; (3) gpss@chinajournal.net.cn; (4) gpsysh@periodicals.net.cn]。为避免某一电子信箱的服务器发生故障而延误收稿,建议作者向本刊两个或两个以上信箱同时发送电子邮件。

本刊收到作者来稿后,都会在 16 小时(遇公休日顺延)内发出“关于收到稿件的通知”。因此,作者发送稿件后 5 日以上都没有消息,一定要及时来电查询。

一篇论文出版,常常需要反复沟通“作者→编辑部→审者→编辑部→作者”之间的联系,其中与作者的联系是最重要的一环,一旦脱节,必然中断编辑过程。因此作者来稿时,务必将联系人的详细地址、办公室电话、手机号码、传真号码和电子信箱等(通讯方式要尽可能全)告诉编辑部,以便能与您及时联系。否则,由此而耽误出版由作者自己负责。

《光谱实验室》编辑部