

## 单克隆抗体双位点夹心 ELISA 测定

### 人血清载脂蛋白 E 的研究

河南医科大学病理生理教研室 张东升 夏辉明 赵明耀 张春艳 刘淮生 吕新跃<sup>①</sup> 夏富臻

**摘要** 利用自制的抗人载脂蛋白 E (apoE) 单克隆抗体, 建立了单克隆抗体双位点夹心 ELISA 测定 apoE 的方法, 并对该方法的特异性、准确度、精密度和灵敏度进行了评价。载脂蛋白 A I、A II、B、C I、C II、C III 不干扰测定, 检测下限 10ng, 回收率 101.2%, 批内变异系数 CV=5.9%, 批间 CV=8.1%。并测定了 1048 例正常人和各种疾病患者血清 apoE 含量。

**关键词** 单克隆抗体; ELISA; 载脂蛋白 E

apoE 在人血清中的含量变化与疾病的关系研究很多, apoE 与动脉粥样硬化发生发展及脂蛋白代谢紊乱有密切关系<sup>①</sup>。因此寻找一种简单可靠的方法测定 apoE 含量已成为临床研究需要解决的问题。国外建立了数种测定人血清 apoE 的方法, 如免疫电泳<sup>②</sup>, 免疫比浊<sup>③</sup>, 放射免疫法<sup>④</sup>和酶联免疫法<sup>⑤</sup>。这些方法所用的抗体是多克隆抗体(抗血清), 各自所测定的 apoE 正常值差别较大, 其中各自所使用的抗血清不同是造成这种差别的主要原因之一。本研究利用自制的 apoE 单克隆抗体 (McAb)<sup>⑥</sup>建立了双位点夹心 ELISA 测定 apoE 方法, 并着重探讨了主要实验条件, 并对该方法的特异性、精密度、准确度进行了实验评价, 测定了正常人和病人血清 apoE 含量。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 材料与试剂

1.1.1 固相载体: 聚苯乙烯微量反应板 (4×10), 天津塑料制品厂产品。

1.1.2 包被缓冲液: 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液。

1.1.3 洗涤液: 含 0.05% 吐温-20 的 0.01mol/L PBS (pH7.2)。

1.1.4 封闭液: 含 10% 小牛血清的 0.01mol/L PBS。

1.1.5 稀释液 (用于稀释样本和酶标记物):

含 4% PEG 的洗涤液。

1.1.6 底物溶液: 邻苯二胺 4mg 加入 pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液 10ml, 临用前加入 30% H<sub>2</sub>O 10μl。

1.1.7 酶结合物: McAb 与辣根过氧化物酶 (HRP) 用改良的过碘酸钠法交联而成。

1.1.8 apoE、A I、A II、B 由中国医学科学院基础医学研究所生化研究室提供。apo C I、C II 由卫生部北京老年医学研究所提供。

1.1.9 apoE 参考定值血清: 由华西医科大学生化教研室提供, apoE 含量为 3.8mg/dl。

1.1.1 抗人 apoE McAb: 本室应用淋巴细胞杂交瘤技术建立了多株持续分泌抗体的细胞株, 特异性测定与其它载脂蛋白没有交叉反应。

##### 1.2 实验方法

1.2.1 将微量反应板各孔中加入含有 11μg/ml, McAb (E6C3) 包被溶液 0.1ml, 37℃1 小时, 然后 4℃过夜。

1.2.2 去掉板内溶液, 用洗涤液洗 4 遍, 每次浸泡 3 分钟, 拍干。

1.2.3 各孔中加入封闭液 0.2ml, 37℃30 分钟。

1.2.4 洗涤方法同上。

1.2.5 各孔分别加稀释 10、20、40、80、160 倍

<sup>①</sup> 中国人民武装警察部队医学专科学校

的参考定值血清 0.1ml,各孔 apoE 浓度分别为 0.380、0.190、0.095、0.047、0.024mg/dl,其余各孔分别加入稀释 20—60 倍的待测血清 0.1ml,37℃ 1 小时。

1.2.6 洗涤同上。

1.2.7 各孔加入酶标记 McAb(HRP-E4C2) 0.1ml,37℃ 1 小时。

1.2.8 洗涤同上。

1.2.9 各孔加底物溶液 0.1ml,37℃ 10—15 分钟后每孔加入 2mol/L 硫酸 0.1ml。

1.2.10 用空白对照孔调零,在 492nm 波长处测定 OD 值。

1.2.11 用半对数坐标纸作图,画出标准曲线(图 1),用图解法根据各样品的吸光度求出相应的浓度值。

## 2 实验结果

### 2.1 实验条件的选择

2.1.1 包被 McAb(E6C3)最适浓度的选择:将 McAb(E6C3 浓度为 4.5mg/ml)用包被液稀释 1:100,1:200,1:400,1:800,1:1600 等浓度,包被反应板 4℃ 过夜,以双抗体夹心法测定,根据结果绘制曲线(图 2),结果以 11μg/ml 浓度包被的吸光度最高,为最适包被浓度。

2.1.2 酶结合物(HRP-E4C2)工作稀释度的选择:用 apoE(5μg/ml)包被,将 HRP-E4C2 系列稀释加入反应板中,最后加底物测定 OD 值,绘制反应曲线(图 3),选 OD 为 1.0 的稀释度为工作浓度,即 1:3500。

2.1.3 样品处理方法的选择:分别以 0.01mol/L PBS、PBS—吐温 20—PEG、PBS—TritonX100—PEG 和生理盐水四种溶液稀释同一样本,比较反应曲线(图 4),结果以 PBS—吐温—20PEG 效果最好。

2.1.4 反应时间的选择:抗原抗体反应时间分别以 0.5 小时、1 小时、2 小时三个不同反应时间,测定同一样品的反应曲线(图 5)。OD 值随反应时间延长而增加,但线性斜率基本不变,选用 1 小时为反应时间。

### 2.2 实验方法的评价

2.2.1 特异性:用本方法测定 apoE、AⅠ、AⅡ、B、CⅠ、CⅡ、CⅢ的反应性,结果表明,反应强度随 apoE 浓度增高而升高,与其它载脂蛋白没有交

叉反应。

2.2.2 准确度:用回收试验检验本方法的准确度,平均回收率为 101.2%。

2.2.3 重复性试验:结果见表 1、2,平均批内误差 CV=5.9%,平均批间误差 CV=8.1%。

2.2.4 灵敏度:本方法测定范围 0.24~3.80mg/L,相当于稀释测定前血清 apoE 实际含量在 4.8~225.0mg/L 范围内。检测下限 10ng。

2.2.5 正常人和病人血清 apoE 含量测定结果:用本方法测定了 106 例正常人,血清 apoE 含量为 37±11mg/L,测定了冠心病病人 134 例,血清 apoE 为 53±18mg/L,高血压病患者 128 例,血清 apoE 为 53±16mg/L,糖尿病人 135 例,血清 apoE 为 51±18mg/L,高脂血症患者 545 例,血清 apoE 为 57±23mg/L,结果显示上述病人血清 apoE 水平高于正常人(P<0.01)。

## 3 讨论

目前载脂蛋白 E 免疫测定是用多克隆抗体,由于来自不同动物或不同批次多抗之间存在很大差异,结果使得各自测定的结果之间难以进行比较,并且使测定方法难以标准化,这样就为 apoE 的临床研究和测定方法的广泛应用带来了诸多不便,apoE 杂交瘤细胞株的建立<sup>①</sup>,能够提供大量,均一的抗 apoE McAb,用于 apoE 的免疫测定,这无疑将有助于 apoE 测定方法的标准化。

血清中 apoE 有三种主要表型,即 apoE<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、E<sub>4</sub>,是由于其一级结构中个别氨基酸不同所致<sup>②</sup>。由于这种遗传因素关系,有些人血清中只含有其中一种,而另一些则可能含有其中两种或三种,因此用于测定血清 apoE 总量的抗体必须能与三种表型都发生反应<sup>③</sup>,即能够识别三种 apoE 的共同抗原决定簇。用 Western-blotting 的方法<sup>④</sup>测定了我们制备的 apoE McAb,结果显示 McAb 与 apoE<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、E<sub>4</sub> 均发生良好的免疫反应。我们选出两株分别识别 apoE 两个不同抗原决定簇的 McAb 建立了 McAb 双位点夹心 ELISA 测定 apoE 方法,用于血清 apoE 含量的测定。

由于酶免疫测定灵敏度较高,所以实验的适宜条件很重要,我们通过实验选择了最适的抗体浓度、反应时间,反应温度,样本血清处理等各项条件,保证了测定系统的稳定性。测定了正常人血清 apoE 含量,为 3.7±1.1mg/dl,与国外报告的参考

值相近似<sup>⑥</sup>。初步测定了一部分冠心病、高脂血症和糖尿病病人,发现患者血清 apoE 含量高于正常人,但更为确定的结果尚需进一步深入研究才能得出。

该方法的建立为进一步研究在各种疾病中 apoE 含量变化提供了一种方便的手段。另外,我们制备的抗 apoE McAb 已应用于 Western blotting 中,进行了人血清 apoE 表型的测定,结果良好,省去了传统方法的超速离心步骤,宜于推广使用,因此把测定 apoE 含量和 apoE 表型结合应用,将会为临床研究 apoE 与各种疾病的关系提供更多依据。

### 参考文献

1. Mahley RW, et al. Plasma lipoproteins: apolipoproteins structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25: 1277
2. Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J* 1987; 113: 433
3. Curry MD, et al. Determination of human apolipoprotein E by electroimmunoassay. *Biochem Biophys Acta* 1976; 43: 413
4. Rifai N, et al. A simple immunotechnique for determination of serum concentration of apolipoprotein E. *Clin Chim Acta* 1987; 163: 207
5. Blum CB, et al. Radioimmunoassay studies of human apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1980; 66: 1240
6. Bury J, et al. Apolipoprotein E quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem* 1986; 32: 265
7. Koffigan M, et al. Quantification of human apolipoprotein E in plasma lipoprotein subfractions by a non-competitive immunoassay. *Clin Chim Acta* 1987; 163: 245
8. 赵明耀,等.载脂蛋白 E 单克隆抗体的临床应用—1048 例分析. *河南医科大学学报* 1992; 27(2): 107
9. 张东升,夏辉明,等.抗人载脂蛋白 E 单克隆抗体制备及免疫学特性研究. *中国病理生理杂志* 1992; 8: 125
10. Weisgraber KH, et al. Human apolipoprotein E heterogeneity. Cystein-arginine interchange in the amino acid sequence of the apoE isoforms. *J Biol Chem* 1981; 256: 9077
11. Ehnholm C, et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J Lipid Res* 1986; 27: 227

## Quantification of Human Serum Apolipoprotein E by ELISA Using Anti-apo E Monoclonal Antibodies

Zhang Dongsheng, et al

Dept. of pathophysiology, Henan Medical University

Monoclonal antibodies against human apolipoprotein E were prepared. Double McAbs Sandwich ELISA has been developed to quantitate apoE concentration in human serum. This paper presents the details of analytic procedure, and the evaluation of its specificity, precision, accuracy and sensitivity. The McAbs reacted specifically with apoE, no cross reaction with apoA I, A II, B, C I, C II, C III was observed. The assay could detect 10ng of apoE, average recovery was 101.6%, the coefficients of variation of the intra-assay and inter-assay were 5.9% and 8.1%, respectively. The assay was used to quantitate apoE levels in normal persons and patients.

**Key Words** Monoclonal antibody; ELISA; Apolipoprotein E

Table 1 Statistics of error in groups

specimens	$\bar{x}$ (mg/L)	S(mg/L)	CV(%)
1	21.3	1.3	6.1
2	31.3	1.8	6.0
3	50.4	2.6	5.2

\* 为每份样品分 10 份在一块板上测定结果的均值

Table 2 Statistics of error between groups

specimens	$\bar{x}$ (mg/L)*	S(mg/L)	CV(%)
1	22.5	1.9	8.4
2	34.1	2.8	8.2
3	51.0	4.0	7.8

\* 为每份样品在 6 块板上测定结果的均值。

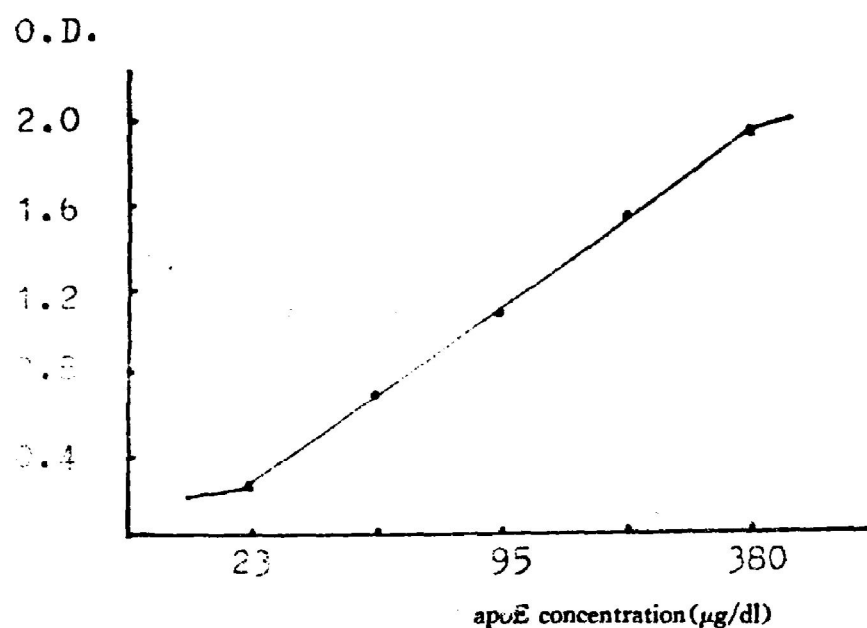


Fig 1 Standard Curve

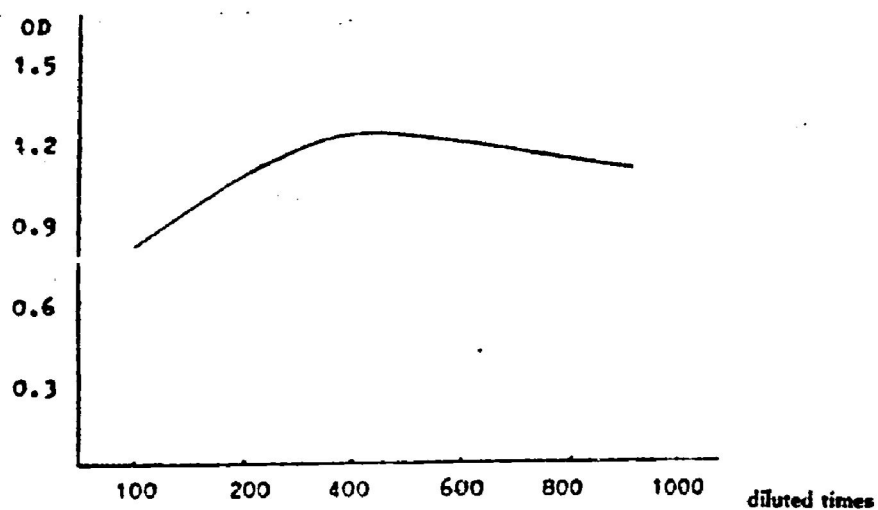


Fig 2 Effect of different coated concentration of monoantibody on measurement

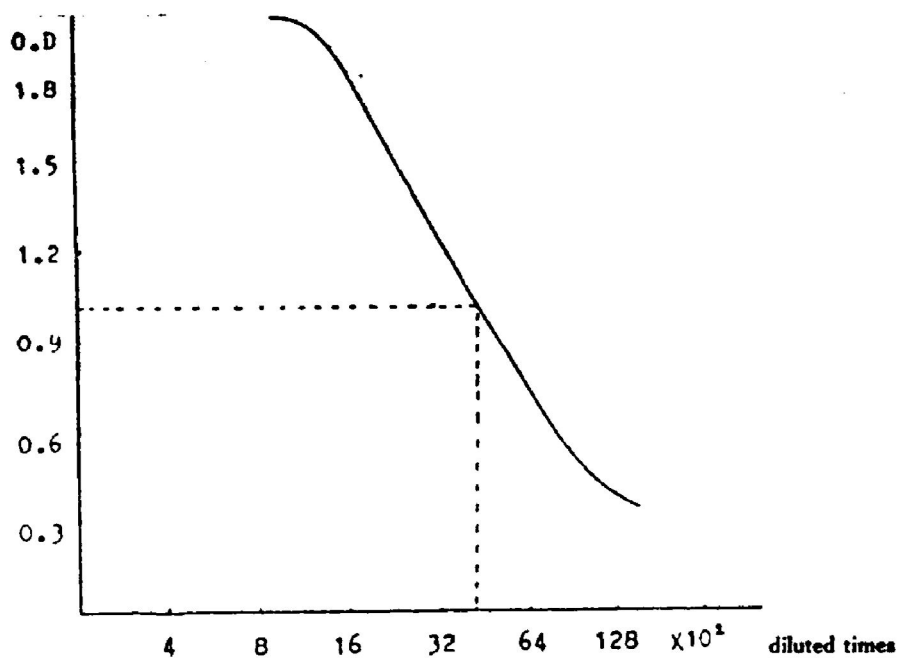


Fig 3 measurement of the best suitable diluted degree of enzyme labeling monoantibody

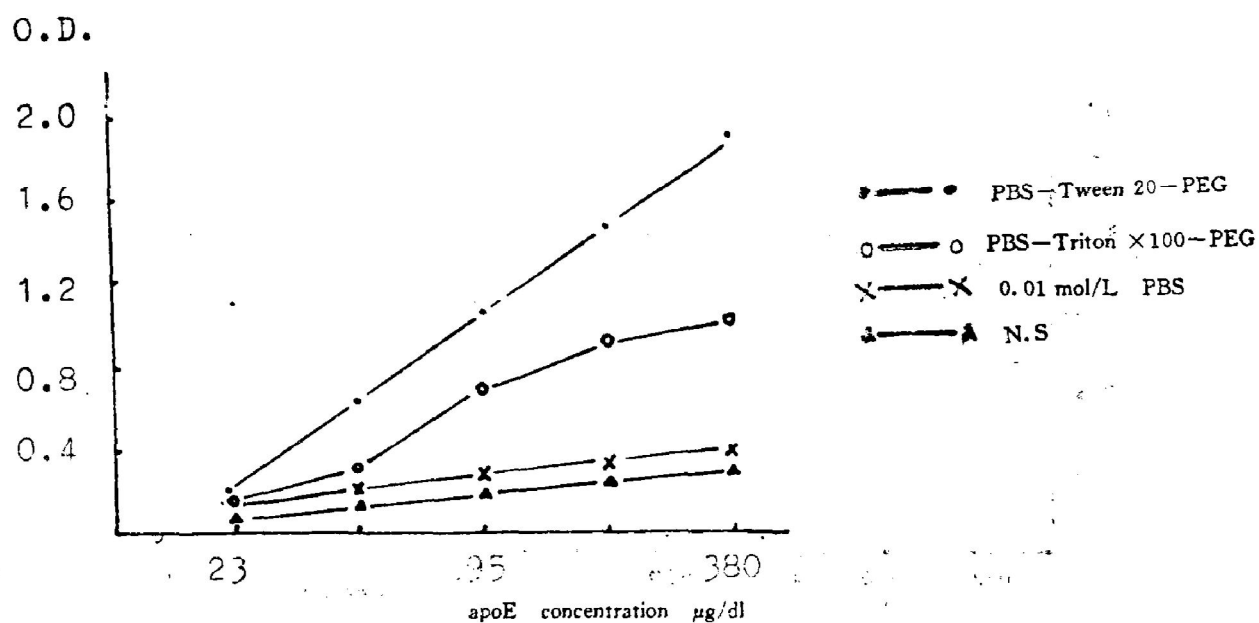


Fig 4 Reaction curves of different diluted solution

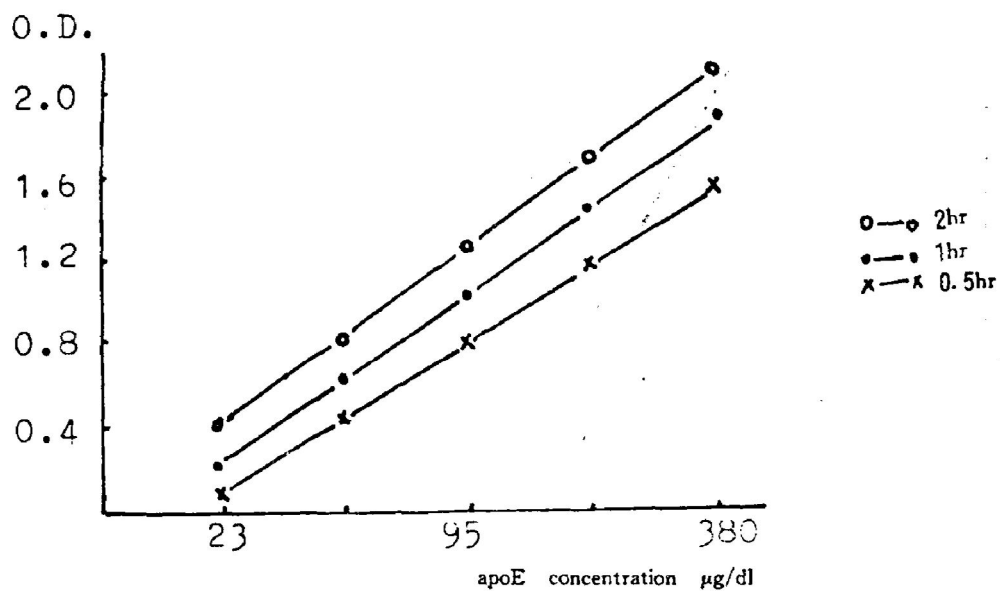


Fig 5 Reaction curves during different reactive time