

载脂蛋白C₁单克隆抗体研制及酶联免疫测定法研究

空军石家庄医院

赵满仓 刘菊林 贾艳岩

卫生部北京老年医学研究所

黎健 蒋雷 李健斋

摘要 本文主要采用载脂蛋白(apo)C₁免疫 Balb/C 小鼠,采用鼠与鼠杂交瘤技术制备出了两株抗人血清 apoC₁单克隆抗体(McAb),建立了 ELISA 双抗体夹心法,并对其中实验条件进行了选择。

关键词 载脂蛋白 C₁; 单克隆抗体; ELISA 双抗体夹心法

载脂蛋白(apo)C₁主要分布在富含甘油三酯的脂蛋白中,具有抑制脂蛋白脂酶(LPL)和 apoE 的摄取作用^①,当其含量升高时,便会使富含甘油三酯(TG)脂蛋白的水解代谢受阻,从而引起高甘油三酯血症(HTG)。为了探明 apoC₁在动脉粥样硬化中的发病机理,制备出了两株抗人血清 apoC₁单克隆抗体(McAb)^②,通过对实验条件的选择建立了 ELISA 双抗体夹心法,此方法的建立,对于脂类代谢的研究有重要意义。

1 材料与方法

1.1 apoC₁抗原的分离、纯化

取甘油三酯含量较高的混合血清。采用超速离心,凝胶过滤层析,高效液相色谱分离出 apoC₁,经等电聚焦电泳,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,氨基酸组成分析,免疫双扩散等鉴定,使其纯度达到免疫纯和电泳纯。

1.2 动物免疫和细胞融合

按常规法免疫 Balb/C 小鼠,三次免疫后取其脾细胞悬液用于融合,骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞的比例为 1:5,在 50%PEG 作用下进行融合,十天后用 ELISA 法检测上清阳性孔,选择特异性好阳性强的细胞集落,采用有限稀释法克隆化,待阳性率达 100%时扩大培养、制备腹水。

1.3 apoC₁McAb 鉴定

1.3.1 腹水效价测定:以 apoC₁抗原包被,4℃过夜,次日洗三次,加入不同稀释倍数的 McAb,37℃30min,加入 HRP-羊抗鼠 IgG,37℃30min 加底物显色。

1.3.2 特异性测定:分别用 apoA₁、B、C₁、

C₂、C₃、E、Lp(a)抗原包被,4℃过夜,次日洗三次,加入 apoC₁McAb,37℃30min,加入 HRP-羊抗鼠 IgG,37℃30min,加底物显色。

1.3.3 Ig 及亚类测定:用免疫扩散鉴定。

1.4 实验方法的选择

1.4.1 固相载体的预处理和包被:分别以① pH9.5 碳酸盐缓冲液;② 6mol/L 盐酸胍溶液;③ pH7.2 0.02molPBS、0.05%吐温-20;④ pH9.5 碳酸盐缓冲液 0.005%牛血清白蛋白 0.2%戊二醛溶液进行包被。

1.4.2 包被抗体浓度的选择:把抗体稀释成不同浓度(1:100、200、400、800)包被,以 ELISA 法进行测定。

1.4.3 样本及标准曲线的选择:将选择好的抗体浓度包被,加入不同稀释倍数的参考标准血清,根据曲线选择曲线稀释倍数和样本浓度。

1.4.4 反应时间选择和稀释液选择:分别用① pH7.2PBS 吐温-20 和② pH7.2PBS 吐温-20 4%PEG 于 30、60、90min 做曲线,选择最佳时间内的反应曲线。

1.4.5 实验方法的评价^③:利用竞争抑制试验和准确度检验本方法的精密度。

2 结果

2.1 apoC₁分离、纯化

纯化后的 apoC₁经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,只呈现一条带,而等电聚焦电泳和免疫双扩散也证实了这一点。

2.2 apoC₁McAb 制备 次融合共分配 384 孔,其中 319 孔有克隆细胞生长,生长率为 83%,阳

性4孔,占生长率的1.3%,4株阳性孔在亚克隆时两株停止分泌抗体,余两株亚克隆三次阳性率达100%。

2.3 抗体效价测定 用ELISA法检测上清效价为1:256,腹水效价为 3.0×10^{-6} 。

2.4 特异性测定 两株C₂McAb与apoA₁、A₁、B、C₁、C₁、E、Lp(a)、白蛋白没有交叉反应,只与apoC₁抗原反应。

2.5 Ig亚类测定 一株为IgG_{2a},一株为IgG_{2b}。

2.6 实验方法的选择

2.6.1 酶标板的预处理:分别用4种处理液预处理,结果见图1。

结果证明:1、2、3号稀释液曲线低平,无斜率,只有4号稀释液斜率大,线性好。

2.6.2 包被抗体浓度的选择:见图2。

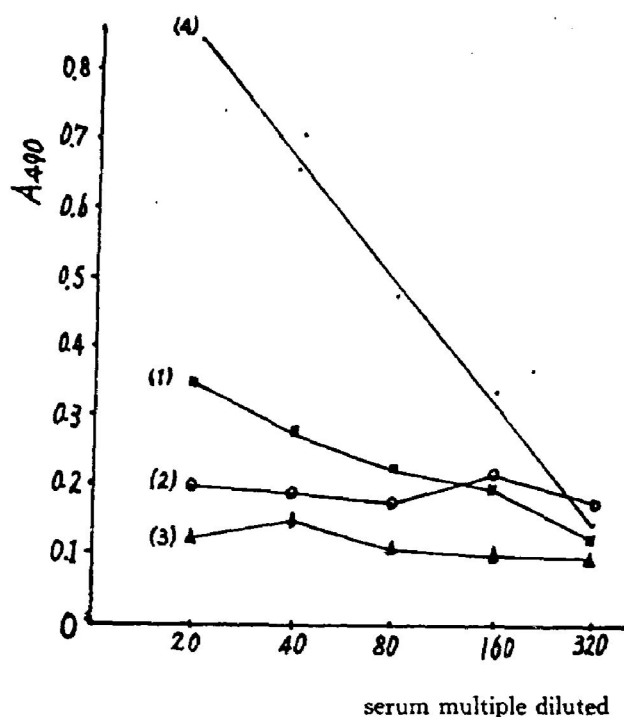


Fig 1 Pro-treatment of enzymatic labeling plate

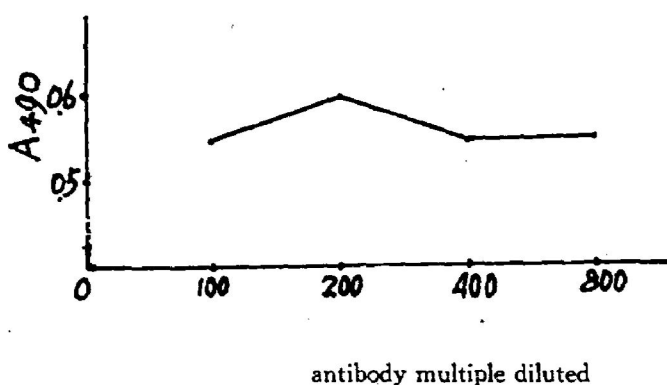


Fig 2 Selection of coated antibody concentration

结果显示,1:200倍稀释包被抗体吸光度值最高,故选择为最适包被浓度。

2.6.3 参考标准曲线的选择:见图3。

结果说明:1:20-320倍稀释曲线OD值在0.2-0.8之间,而且曲线斜率好,标本以1:80倍稀释作为工作浓度。

2.6.4 反应时间的选择:见图4。

结果说明:时间越长吸光度值越高,但上升幅度不大,而且斜率基本呈平行,故选择30min作为本试验的测定时间。

2.6.5 实验方法的评价:①竞争抑制试验:标出抑制率分别为93%、90%、85%。②准确度,用回

收试验检验本方法的准确度,其回收率为94%、97%、104%。③精密度:对本试验的重复性进行了测定,平均批内误差CV=9.6%,平均批间误差CV=10.8%。

3 讨论

apoC₁分子量8500,分子较小,抗原性弱,这给制备McAb带来了困难,通过数次杂交才制备出4株杂交瘤细胞株,在克隆化过程中,由于染色体丢失有两株停止分泌抗体,余两株经液氮冻存复苏后仍分泌抗体,这为测定方法的建立打下了基础,此株McAb的建立经检索国内外文献未见报道。

在试验方法建立过程中,由于酶标板的吸附性

能的差异,在直接包被抗体时吸附率较低,经过反复试验才找出一种比较理想的处理液,即可用于处理又用于直接包被,大大减少了手续,在以往的ELISA测定中,一般需7-8h才出结果,而经改良后的稀释液2h即可。既缩短了时间又提高了灵敏度。此McAb研制及测定方法的建立对于脂类代谢的研究具有重要意义。

1985;3(1):58。

2. 赵满仓. 抗人载脂蛋白 C₁, 单克隆抗体研制及免疫学特性初步分析. 单克隆抗体通讯 1992;8(3):63
3. 李松泉,等. 应用单克隆抗体 ELISA 法测定人血清载脂蛋白 A₁. 中华医学检验杂志 1989;4(12):194

参 考 文 献

1. 钱永巍. 载脂蛋白与动脉粥样硬化. 世界医学

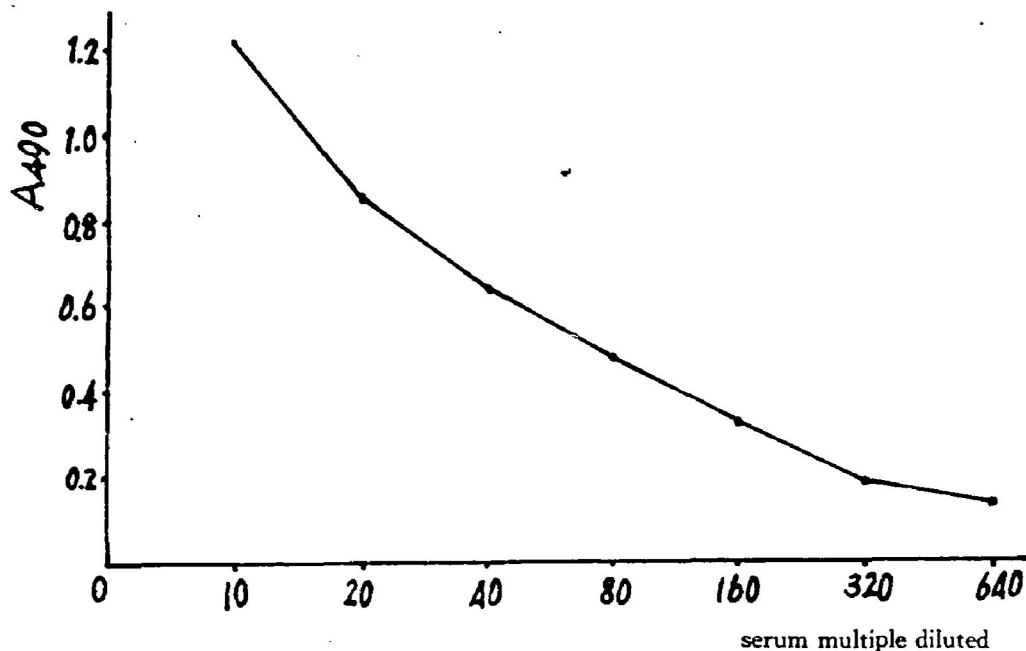


Fig 3 Selection of referential serum curve

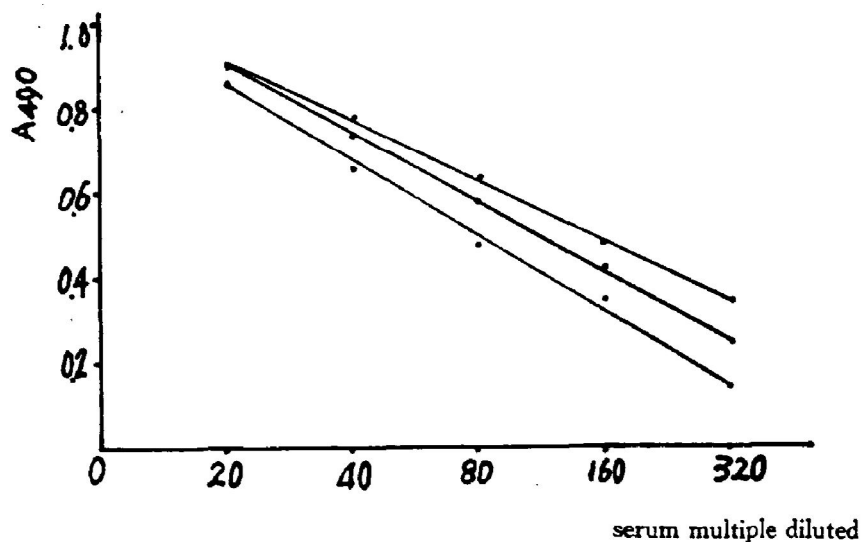


Fig 4 Reaction curve of different time