

单克隆多克隆抗体酶联免疫吸附法 测定血清脂蛋白(a)的比较

汪俊军 庄一义 张春妮 仇镇宁^① 管小红^①

(南京军区南京总医院生物化学科, 南京 210002)

A Comparison of Lipoprotein (a) Levels Determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay with Monoclonal Antibodies or Polyclonal Antibodies

WANG Jun-Jun, ZHUANG Yi-Yi, ZHANG Chun-Ni, CHOU Zhen-Ning and GUAN Xiao-Hong

(Department of Biochemistry, Jinling Hospital, Medical Institute of Nanjing University, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to human serum apo (a) were produced by lymphocyte hybridoma technique. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determining lipoprotein (Lp) (a) concentration were established with monoclonal or polyclonal antibodies; the first ELISA was performed by using polyclonal antibody to apo (a) as the capture and quantitating antibody, the second by using polyclonal antibody to apo B as the capture antibody and quantitating the bound Lp (a) particles with antibody to apo (a). ELISA by using a single and mixed monoclonal antibodies were established also. We measured and analysed the serum Lp (a) levels, the results indicated that differences between the values obtained by different methods are dependent on the size of the apo (a) isoform in the sample.

KEY WORDS Lipoprotein (a); Monoclonal antibody; Polyclonal antibody; ELISA

摘要 应用淋巴细胞杂交瘤技术,建立了抗人血清

脂蛋白(a)杂交瘤细胞株,对制备的单克隆抗体进行了特异性鉴定和抗原位点测定。建立了多克隆双抗体夹心酶联免疫吸附法、载蛋白(a)、载脂蛋白B双位点酶联免疫吸附法、单克隆单株、混合株双抗体夹心酶联免疫吸附法对脂蛋白(a)进行了检测,并对结果进行了分析。认为样本、参考品间载脂蛋白(a)的多态型不同可引起结果间的差异。

关键词 脂蛋白(a); 单克隆抗体; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附法

脂蛋白(a)由载脂蛋白(a)、载脂蛋白B通过二硫键连接而成,载脂蛋白(a)因含 Kringle IV 结构数目的不同呈显著多态性,且载脂蛋白(a)的分子量与血清脂蛋白(a)浓度呈显著负相关^[1,2]。大量研究证实高脂蛋白(a)是心、脑血管疾病的独立危险因素^[3]。脂蛋白(a)的测定方法较多,首推酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法,如多克隆抗体 ELISA^[4],载脂蛋白(a)、载脂蛋白B双位点 ELISA 法^[5,6]和单克隆抗体 ELISA 法^[7]等。因脂蛋白(a)的分子量较大,抗原位点多,载脂蛋白(a)具多态性,不同来源的抗体对应于不同的载脂蛋白(a)位点,同时参考品中载脂蛋白(a)的多态型分布与待检样本不一致,造成不同方法间结果的差异。本文用自制的多、单克隆抗体建立 ELISA 测定法,对结果进行分析比较。

1 材料和方法

1.1 免疫原

纯化脂蛋白(a)自制^[8]。

1.2 抗载脂蛋白(a)多克隆抗体制备^[8]

常规免疫绵羊,经亲和层析处理得到与载脂蛋白B、纤溶酶原无交叉反应性的抗血清。

^①南京医科大学寄生虫学教研室,南京 210029

1.3 动物免疫及单克隆抗体制备

动物免疫后制备单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)按常规方法^[9]。

1.4 单克隆抗体特性鉴定

1.4.1 单克隆抗体免疫反应性 采用间接 ELISA 法鉴定特异性。

1.4.2 免疫球蛋白类型的鉴定 浓缩后的细胞培养上清液与羊抗鼠 IgG 亚类及 IgM 抗体(上海生物制品研究所)进行琼脂双扩散实验。

1.4.3 双抗体竞争试验测定抗原位点。

1.5 血清脂蛋白(a)的酶联免疫吸附法测定

单株、混合株脂蛋白(a)单抗 ELISA、双抗体夹心法,多抗 ELISA[包被、测定抗体均为抗载脂蛋白(a)],载脂蛋白(a)、载脂蛋白 B 双位点 ELISA[抗载脂蛋白(a)为包被抗体、酶标抗载脂蛋白 B 为测定抗体]。

操作步骤 抗载脂蛋白(a)包被反应板,每孔 0.1 ml, 37℃ 反应 2 h, 4℃ 过夜,洗涤;加入空白管、系列标准品或 2 000 倍稀释的样本,37℃ 2 h 洗涤;加入酶标记抗载脂蛋白(a)或酶标记的抗载脂蛋白 B 抗体,37℃ 反应 2 h,洗涤;加入底物显色。

1.6 脂蛋白(a)参考血清^[4]

在高脂蛋白(a)含量的新鲜供血员混合血清中加入 EDTA、蛋白水解酶抑制剂 Trasylol,过滤后定量分装冻干, -40℃ 保存,用时加定量蒸馏水复溶,以 IMMUNOAG Vienna 公司的参考品为第一标准,经多次 ELISA 法定值(多克隆双抗体夹心法),本品稳定可靠。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

此次融合获 25 株阳性细胞,从中选择效价高、特异性强的 8 株进行克隆培养,最后留 4 株扩大培养制备腹水,经测定效价均达 1×10^6 。

2.2 抗脂蛋白(a)单克隆抗体的特性鉴定

2.2.1 单克隆抗体的免疫反应性 间接 ELISA 法鉴定单克隆抗体特异性表明:McAb 只与脂蛋白(a)反应,而与其他抗原如各类型载脂蛋白、纤溶酶原和人血清白蛋白均无交叉反应。抗原位点测定表明此 4 株 McAb (3H_{1,2}, 4D_{1,2})针对两个不同抗原位点。

2.2.2 免疫球蛋白亚类的鉴定 此四株 McAb 免疫球蛋白亚类均为 IgG₁。

2.2.3 抗原位点测定 当将抗原固定时,用酶标抗体和未标记酶的另一 McAb 竞争结合抗

原,若两株 McAb 是识别同一抗原决定簇,就会出现竞争抑制现象。抑制率 $\geq 50\%$ 者为阳性。结果表明此 4 株 McAb (3H_{1,2}, 4D_{1,2})针对两个不同抗原位点。

2.3 酶联免疫吸附法测定结果

2.3.1 多克隆抗体 ELISA 法(x),载脂蛋白(a)、载脂蛋白 B 双位点 ELISA 法(y)同时测定 40 例正常人血清,脂蛋白(a)均数和标准差分别为 $156 \pm 138 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $122 \pm 110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,相关系数为 0.86,直线回归方程为 $y = 0.72x + 11.4$ 。两均数差别的显著性检验无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3.2 单株(3H₁)和混合株(3H₁, 4D)脂蛋白(a)McAb,多克隆抗体 ELISA 同时测定 50 例高、低脂蛋白(a)含量不同个体(标本来源于体检者及各类住院病人)新鲜血清脂蛋白(a)均数和标准差为:单株 $227.2 \pm 173.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;混合株 $282.5 \pm 84.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;多抗 $323.3 \pm 226.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。单株同混合株间均数相比,差别无显著性 ($P > 0.05$)。单株(y)同多抗(x)相比,相关系数为 0.70, $y = 0.68x + 7.2$,两均数间相比,差别具高度显著性 ($P < 0.01$)。混合株(y)同多抗(x)相比,相关系数为 0.81, $y = 0.66x + 69$,两均数相比差别无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

脂蛋白(a)的检测方法报道较多,如琼脂糖扩散法,火箭电泳法,免疫比浊法,放射免疫法及 ELISA 法等。因脂蛋白(a)在人群分布差异大,从 $0 \sim 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,目前国内外应用最广泛的是灵敏度高、特异性好、检测范围又广的 ELISA 法。

本科在国内首先建立了脂蛋白(a)多抗体 ELISA、双抗体夹心法和载脂蛋白(a)、载脂蛋白 B 双位点 ELISA 法^[5],两法相比双位点结果明显偏低。双位点法能充分地消除纤溶酶原的干扰,但不能检测出游离的载脂蛋白(a)(均无载脂蛋白 B 位点)。载脂蛋白(a)因含 Kringle N 结构数目的不同(12~40,每 Kringle 约 12.7 kDa)呈显著多态性,依据其分子量由小到大、电泳速率不同分为 F、B、S₁、S₂、S₃ 和 S₄,载脂蛋

白(a)的分子量与血清脂蛋白(a)水平呈显著负相关^[2]。多态型不同可导致两种方法结果的差异,如以含小分子量载脂蛋白(a)多态型作标准物(B、S₁型),因脂蛋白(a)分子中 Kingle N 数目相对较大分子量脂蛋白(a)少,载脂蛋白(a)抗原性较载脂蛋白 B 弱,则测定大分子量表型样本时(S₂~S₄),载脂蛋白 B 法结果明显低于载脂蛋白(a)法^[10]。本文使用的参考血清为高浓度混合人血清,载脂蛋白(a)表型主要为 B、S₁,与以上分析相一致。

单克隆、多克隆抗体 ELISA 法间结果显示多克隆抗体 ELISA 法明显高于单克隆抗体 ELISA 法,而单位点 ELISA 法又较双位点 ELISA 法结果低,单株 McAb 针对单位点,多克隆抗体针对多位点,可否引起结果间差异有待进一步证实。

本文结果表明,脂蛋白(a)浓度 < 200 mg · L⁻¹ 时单克隆抗体法结果高于多克隆抗体法; 200~400 mg · L⁻¹ 时,结果相近; ≥ 400 mg · L⁻¹ 时,多克隆抗体法结果明显高于单克隆抗体法。可能的原因是,一方面,低浓度血清脂蛋白(a)表型一般为大分子载脂蛋白(a)(S₂、S₃、S₄),抗原位点相对较多,能结合更多的抗体;另一方面,因所选用的参考品脂蛋白(a)表型为低分子量 B 和 S₁ 型,与低脂蛋白(a)含量样品[载脂蛋白(a)为大分子量]比较,脂蛋白(a)中所含的载脂蛋白(a)比例低,同样程度的抗原抗体反应,换算出脂蛋白(a)含量较高。

我们报道多克隆双抗体夹心 ELISA 法测定 1 266 例中国人群脂蛋白(a)参考值均数和标准差为 146.2 ± 109.2 mg · L⁻¹^[4]; Akira Abe 等^[11]运用此法检测 820 例日本人群脂蛋白(a)均数和标准差为 141.0 ± 97.9 mg · L⁻¹,结果非常吻合; Fless GM 等^[12]建立的载脂蛋白(a)、载脂蛋白 B 双位点 ELISA 法检测了 84 例美国人群脂蛋白(a)中蛋白质含量,均数和标准差为 32.0 ± 34.3 mg · L⁻¹,乘以 3.7(脂蛋白(a)中蛋白质含量,以 27% 计)结果与本文相应方法相近;为了便于不同方法间的比较,本文单克隆抗体 ELISA 法测定的样本不是来源于健康人群,

结果肯定高于参考值。谢玉才等^[7]报道了 40 例正常人群 ELISA 法测定结果,脂蛋白(a)均数和标准差为 190.4 ± 172.2 mg · L⁻¹。

多克隆抗体稳定,载脂蛋白(a)和 B 双位点法不受纤溶酶原干扰。单克隆抗体来源比较一致,易于标准化,但稳定性差,单抗 ELISA 法应采用多株混合。由于各方法间具良好相关性,建立各自参考值,均适用于临床。脂蛋白(a)的测定及标准化较复杂,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Seman LJ, Breckenridge WC. Isolation and partial characterization of apolipoprotein(a) from human lipoprotein(a). *Biochem Cell Biol*, 1986, 64: 999.
- 2 Gavish D, Azrolan N; Breslow JL. Plasma Lp(a) concentration is inversely correlated with the ratio of Kringel N / Kringel I encoding domains in the apo (a) gene. *J Clin Invest*, 1989, 84: 2 021.
- 3 庄一义,汪俊军,许平, et al. 心脑血管疾病患者脂蛋白(a)测定及其临床意义. *中华医学杂志*, 1992, 72: 162.
- 4 汪俊军,庄一义,许平, et al. 血清脂蛋白(a)的 ELISA 测定法及参考值. *中华医学检验杂志*, 1991, 14(4): 198.
- 5 汪俊军,庄一义,许平, et al. 不受纤维蛋白溶酶原干扰的脂蛋白(a)酶联免疫吸附测定法. *生物化学与生物物理进展*, 1992, 19(4): 290.
- 6 蒋雷,黎健,李健斋. 排除纤溶酶原干扰的脂蛋白(a) ELISA 测定法及初步应用. *中华医学检验杂志*, 1993, 16(4): 211.
- 7 谢玉才,丁怀翌,蔡维菁, et al. 血清脂蛋白(a)双单抗夹心 ELISA 测定方法. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20(5): 374.
- 8 许平,庄一义,汪俊军. 人血清脂蛋白(a)的分离纯化及其抗血清制备. *中华医学检验杂志*, 1991, 14(4): 194.
- 9 Kohler GS, Milten C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495.
- 10 Albers JJ, Marcovina SM. Standardization of Lp(a) measurements. *Chim Physiol Lipid*, 1994, 67/68: 257.
- 11 Akira Abe, Satoshi maeda, Kazuhiko Makino, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of lipoprotein (a) in serum and cord blood. *Clin Chim Acta*, 1988, 177: 31~40.
- 12 Fless GM, Snyder ML, Scanu AM. Enzyme-linked immunoassay for Lp(a). *J Lipid Res*, 1989, 30: 651.

(本文 1994-12-27 收到, 1995-08-24 修回)