

· 方法技术 ·

人血清载脂蛋白 E 酶联免疫吸附测定方法的建立

郭刚 刘欣^① 郭善一^② 解用虹^②

(天津医科大学代谢病防治中心, ①基础医学部, ②内分泌研究所, 天津 300070)

Development of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Human Serum Apolipoprotein E

GUO Gang, LIU Xin, GUO Shan-Yi and XIE Yong-Hong

(Prevention and Control Center of Metabolic Disease, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of human serum apolipoprotein E was developed with rabbit polyclonal antibodies and horseradish peroxidase labelled mouse monoclonal antibodies against human apolipoprotein E. The established method has been evaluated to have the following advantages: high specificity and sensitivity, easy operation and good reproducibility with 5.17% intraassay CV and 8.62% interassay CV. The developed method can be widely used in basic medical research and clinical laboratory.

KEY WORDS Apolipoprotein E; Enzyme linked immunosorbent assay

摘要 利用由纯化的人血浆载脂蛋白 E 制备获得的小鼠抗人载脂蛋白 E 单克隆抗体和兔抗人载脂蛋白 E 多克隆抗体, 建立了测定人血清载脂蛋白 E 浓度的抗体双夹心酶联免疫吸附测定方法。该方法具有特异性强、灵敏度高、操作简便和重复性好等优点, 可广泛地应用于基础研究和临床检验。

关键词 载脂蛋白 E; 酶联免疫吸附测定

载脂蛋白 E 是人体血液中最重要载脂蛋白成份之一, 由 299 个氨基酸残基组成, 分子

量为 34 kDa。它几乎存在于所有的血浆脂蛋白组分, 既可与乳糜微粒残基受体(又称载脂蛋白 E 受体)结合, 又可与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体(又称载脂蛋白 BE 受体)结合, 因此是影响机体血脂水平和动脉粥样硬化易患性的重要因素之一。此外载脂蛋白 E 还可能参与了机体免疫系统的调节和神经组织的再生等许多生理和病理过程。最近的研究资料显示, 载脂蛋白 E 与早老性痴呆(alzheimer disease)的发病密切相关, 载脂蛋白 E₂ 可能是早老性痴呆的遗传易患因子^[1]。基于上述认识, 载脂蛋白 E 的研究正在成为血浆脂蛋白研究的重要内容之一, 而血清载脂蛋白 E 水平的测定则是有关载脂蛋白 E 研究的组成部分。本文报告人血清载脂蛋白 E 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)方法的建立。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

兔抗人载脂蛋白 E 抗体及辣根过氧化物酶标记的鼠抗人载脂蛋白 E 单克隆抗体均为自行制备; 标准血清为 Omega 质控血清(其载脂蛋白 E 浓度由作者等在美国实验室测定^[2]); 载脂蛋白 A I、A II、B 100、C I 和 C II 为卫生部北京老年医学研究所惠赠; 96 孔聚苯乙烯微量反应板(本组自行处理)为天津有机玻璃制品厂产品。

1.2 方法

1.2.1 兔抗人载脂蛋白 E 抗体血清的制备及抗体的纯化 利用自行纯化的人血浆载脂蛋白 E 作为抗原^[3], 常规免疫新西兰大白兔, 获得高效价的兔抗人载脂蛋白 E 的抗体血清。抗体血清经 Protein A-Sepharose CL-4B 亲和层析分离, 可获得纯化的兔抗人

载脂蛋白 E 抗体^[4]。该纯化的抗体可作为抗体双夹心的包被抗体。

1.2.2 抗人载脂蛋白 E 单克隆抗体的制备及辣根过氧化物酶的标记

利用杂交瘤技术建立了分泌抗人载脂蛋白 E 单克隆抗体的细胞株,常规方法制备小鼠腹水。利用 Protein A-Sepharose CL-4B 亲和层析分离纯化抗人载脂蛋白 E 单克隆抗体^[5],用改良的过碘酸法与辣根过氧化物酶交联^[6],并作为测定反应的酶标抗体。

1.2.3 ELISA 方法的操作过程

酶标板首先用 100 μ l 兔抗人载脂蛋白 E 抗体包被,抗体浓度为 4 mg/L,4 $^{\circ}$ C 过夜,经洗涤后每孔加入 150 μ l 含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的封闭液封闭,37 $^{\circ}$ C 保温 1 h。洗涤后分别加入稀释的系列标准血清和待测样品血清各 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 保温 2 h。洗涤后每孔加入稀释的酶标抗体 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 保温 2 h。充分洗涤后每孔加入含 0.04% 邻苯二胺、0.1% 过氧化氢的底物液 100 μ l,保温 20~30 min 后适时加入 2 mol/L 的硫酸 50 μ l 终止反应。酶标仪用空白孔调零,测定系列标准孔和样品孔在 492 nm 的光吸收(A_{492})。

1.2.4 待测样品载脂蛋白 E 浓度的计算

以系列标准血清的载脂蛋白 E 浓度(μ g/L)为横坐标,以其相应的 A_{492} 为纵坐标绘制浓度-光吸收标准曲线。根据待测样品血清的光吸收和标准曲线可得到样品的载脂蛋白 E 浓度,再乘以稀释倍数即为样品血清的载脂蛋白 E 浓度。

2 结果

2.1 包被抗体浓度的选择

将纯化的兔抗人载脂蛋白 E 抗体(2.06 g/L)从 1:50 开始用包被缓冲液等比稀释,并分别用稀释获得的抗体包被酶标板,依上述 ELISA 方法进行测定,结果如 Figure 1。当用 1:50 至 1:800 稀释抗体包被时, A_{492} 值无明显改变;当用 1:1600 稀释抗体包被时, A_{492} 值显著降低。因此选用 1:500 稀释的抗体作为最低饱和和包被抗体浓度,如此稀释的抗体浓度为 4 mg/L。

2.2 酶标抗体稀释度的选择

以纯化的兔抗人载脂蛋白 E 抗体(4 mg/L)包被酶标板,酶标抗体按 1:1500、1:3000 和 1:6000 稀释并依上述 ELISA 方法进行测

定,所得结果如 Figure 2。选择 1:2000 为酶标抗体稀释倍数。

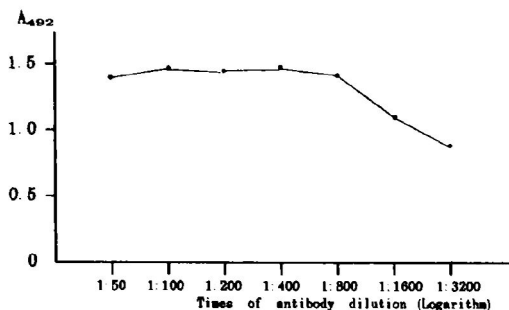


Figure 1. The effect of coating antibody concentration on the ELISA for apo E.

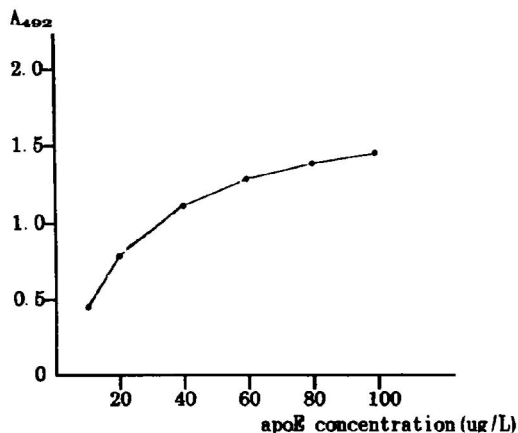


Figure 2. The effect of enzyme labelled antibody concentration on the ELISA for apo E.

2.3 反应时间的选择

以 4 mg/L 的羊抗人载脂蛋白 E 抗体包被酶标板,酶标抗体浓度按 1:2000 倍稀释,反应时间(抗原与包被抗体反应,抗原与酶标体反应)分别定为 30、60 和 120 min,并以上述 ELISA 方法进行测定,结果如 Figure 3 所示。随反应时间的延长, A_{492} 值明显升高,说明抗原与抗体的反应需要一定的时间才能达到完全,因此选择了 2 h 作为反应时间。

2.4 标准曲线的选择

以 4 mg/L 兔抗人载脂蛋白 E 包被酶标板, 酶标抗体按 1 : 2 000 被稀释, 抗原与包被抗体及酶标抗体反应时间均定为 2 h, 当标准血清的载脂蛋白 E 浓度为 10、20、40、80 和 100 μg/L 时所得的标准曲线如 Figure 4。待测血清样品依 1 : 1 000 稀释时, 绝大多数正处在标准曲线的中部最佳测定范围。

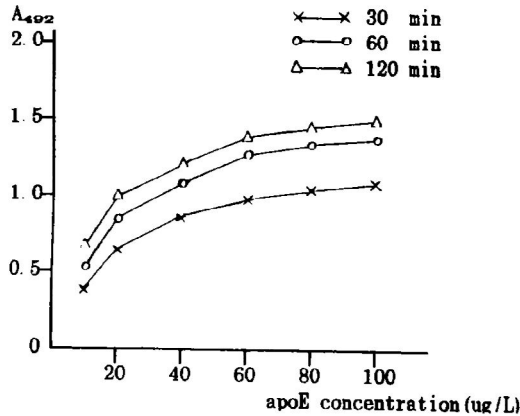


Figure 3. The effect of reaction time on ELISA for apo E.

2.6 重复性检验

将血清样品在同一酶标板进行重复测定, 计算批内变异系数(CV)为 5.17%(n=32); 将该样品连续 5 天测定, 计算批间变异系数(CV)为 8.62%(n=5)。

Table 1. The reaction specificity of ELISA for apo E.

Specimen	concentration (mg/L)	A ₄₉₂
mixed serum	1 : 1000	0.93
apo A I	2.8	0.00
apo A II	4.5	0.00
apo B 100	15	0.00
apo C I	4.0	0.00
apo C II	10	0.00

3 讨论

人血浆载脂蛋白 E 的水平受环境及遗传等多种因素的影响, 据报告正常人载脂蛋白 E 的浓度为 30~70 mg/L。Gabelli 等^[7]报告了一种称之为载脂蛋白 E 缺乏的遗传性疾病, 其患者血浆载脂蛋白 E 的浓度不足正常人的 1%。这些患者具有共同的临床特点: 早发的心血管疾病和皮肤结节性黄色瘤。Mann 等^[8]报告的另一遗传性疾病患者的血浆载脂蛋白 E 水平为正常人的 12~15 倍, 可高达 880 mg/L, 三代 12 人中有 5 人携带病变基因, 均符合 III 型高脂蛋白血症的诊断。上述资料提示载脂蛋白 E 水平的改变是异常脂蛋白血症患者突出的临床特点之一。许多研究证实, 载脂蛋白 E 水平还受载脂蛋白 E 遗传多态性的影响, 与机体的三脂酰甘油水平密切相关。而载脂蛋白 E 的多态性又与异常脂蛋白血症、冠心病及早发性痴呆等疾病的发生和发展密切相关。因此开展人载脂蛋白 E 水平的测定, 并深入探讨其临床应用具有重要的理论和实践意义。

由于血浆蛋白质成分复杂, 而载脂蛋白 E 含量又低, 因此血浆载脂蛋白 E 的浓度测定主要采用免疫学的方法^[9]。如放射免疫法、酶联免

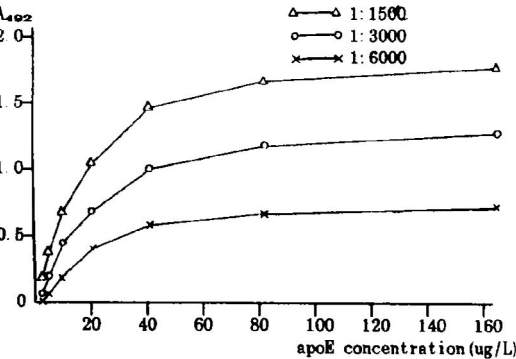


Figure 4. The standard curve of ELISA for apo E.

2.5 特异性检验

将载脂蛋白 A I、A II、B 100、C I、C II 和混合人血清作为待测样品并依上述 ELISA 方法进行测定所得结果如 Table 1。结果显示所建立的方法仅与人载脂蛋白 E 反应而与人载脂蛋白 A I、A II、B 100、C I 和 C II 无交叉免疫反应, 具有高度的特异性。

疫吸附测定、免疫电泳法、免疫扩散法及免疫沉淀法等。上述方法各具优缺点:放射免疫法灵敏度高,但要用同位素又需特殊设备,不适于临床推广应用;免疫电泳法和免疫扩散法虽操作简便、不需大型设备,但也有灵敏度低、重复性差、较难实现自动化的缺点;免疫沉淀法又可分为光散射测定法和光浊度测定法,二者虽都便于自动化操作,但或重复性差,或消耗抗血清较多限制了其临床的广泛应用。ELISA 灵敏度接近放射免疫法,但无需使用同位素,其准确性和重复性均佳,同时消耗抗体极少,操作也较为简便,因此在载脂蛋白特别是在载脂蛋白 E 的测定中得到了广泛的推广应用。

建立 ELISA 方法的关键是制备高特异性和高免疫活性的抗体。本方法使用的单克隆和多克隆抗体均已证实为高亲和力和高特异的抗体^[4,5]。经使用建立的 ELISA 方法再一次证明与载脂蛋白 A I、A II、B 100、C I 和 C II 没有交叉反应,表明有高度的特异性。经优化测定条件,选用 4 mg/L 的抗体保证了最低包被饱和浓度和抗原与抗体的最大结合。标准曲线的测定范围调整为 10~100 $\mu\text{g/L}$,当待测血清样品 1:1000 稀释时,绝大多数的样品均在测定范围,可一次完成测定。这既达到了较高的灵敏度,又适应了操作简便的要求。所建立的方法重复性好,批内和批间的变异系数分别为 5.17% 和 8.62%,完全符合临床测定的要求。人血清载脂蛋白 E ELISA 方法的建立为基础医学研究和临床检验提供了一个可选择的途径,同时也为进一步开展含载脂蛋白 E 和 B 复合脂蛋白的测定提供了条件和可能,有关工作正在进

行中。

参考文献

- 1 Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993, **261**: 921~923.
- 2 Yang Chao-Yuh, Xie Yong-Hong, Yang Man-Lan, et al. ELISA quantitation of apolipoproteins in plasma lipoprotein fractions, Apo E in apo B-containing lipoproteins (Lp B₁E) and apo B in apo E-containing lipoproteins (Lp E₁B). *J Protein Chem*, 1995, **14**(7): 503~509.
- 3 解用虹, 徐秀双, 郭刚, 等. 人血浆载脂蛋白 E 的分离提纯. *生物化学与生物物理进展*, 1992, **19**(2): 140~143.
- 4 郭刚, 郭善一, 解用虹. 抗人载脂蛋白 E 多抗的制备与纯化. *天津医科大学学报*, 1995, **1**(3): 1~6.
- 5 郭刚, 解用虹, 王维兆, 等. 抗人 ApoE 单克隆抗体细胞株的建立及其性质分析. *生物化学与生物物理进展*, 1991, **18**(6): 455~456.
- 6 Nilsson P, Bergquist NR, Grundy MS, et al. A technique for preparing defined conjugates of horseradish peroxidase and immunoglobulin. *J Immunol Methods*, 1981, **41**: 81~93.
- 7 Gabilli C, Gregg RE, Zech LA, et al. Abnormal low density lipoprotein metabolism in apolipoprotein E deficiency. *J Lipid Res*, 1986, **27**: 326~333.
- 8 Mann WA, Gregg RE, Sprecher DL, et al. Apolipoprotein E-1 Harrisburg: A new variant of apolipoprotein E dominantly associated with type II heperlipoproteinemia. *Biochem Biophys Acta*, 1989, **1005**: 239~244.
- 9 Labeur C, Shepherd J, Rosseneu M. Immunological assay of apolipoproteins in plasma; Method and instrumentation. *Clin Chem*, 1990, **36**: 591~597.

(1996-05-31 收到, 1996-08-27 修回)