

生物素-亲和素体系测定雌酮

王永成^a 李元宗^a 常文保^a 郭振泉^b 慈云祥^a

(^a北京大学化学与分子工程学院 ^b北京大学生命科学中心 北京 100871)

摘要 雌酮与牛血清白蛋白共价结合,合成雌酮的完全抗原.利用此抗原免疫小鼠,通过细胞融合技术制备了雌酮的单克隆抗体.经纯化表征知,抗体是IgG1型,相对分子量为164 000,与固定抗原的亲合常数为 8.2×10^8 L/mol.以生物素化的羊抗鼠免疫球蛋白及辣根过氧化物酶标记的链亲和素为标记体系,通过竞争抑制的方式测定游离的雌酮,结果表明:雌酮在10~10 000 pg/ml内呈线性关系.

关键词 雌酮,单克隆抗体,酶联免疫吸附分析法,生物素,链亲和素

Determination of Estrone Using Biotin-streptavidin Complex

WANG Yong-Cheng^a LI Yuan-Zong^a CHANG Wen-Bao^{a*}

GUO Zhen-Quan^b CI Yun-Xiang^a

(^aCollege of Chemistry and Molecular Engineering,

^bLife Sciences Center, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract Estrone (E_1) was bound to bovine serum albumin (BSA) to get a complete antigen (E_1 -BSA). A monoclonal antibody (McAb) specific for E_1 was then produced by cell fusion after BALB/c mouse had been immunized with E_1 -BSA. Analysis revealed that anti- E_1 McAb (E_1 -McAb) was of the IgG1 type, and its molecular weight was 164 000 daltons. The affinity constant of E_1 -McAb reacting with coated complete antigen was 8.2×10^8 L/mol. Biotin-streptavidin complex was used for the determination of E_1 . The calibration curve of free E_1 covered a range of 10~10 000 pg/mL.

Keywords estrone, monoclonal antibody, competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay, biotin, streptavidin

雌酮(E_1)在体内以结合和游离两种形式存在,结合型占绝大部分,但不具生物活性;游离型只占极少部分,具有生物活性.研究表明,随着年龄的增长,体内的 E_1 的含量降低,肌肉含量减少,骨质变脆^[1].男性过度肥胖,跟血清中 E_1 含量高,睾酮含量低有关,从而影响其生殖与性行为,影响其身体健康^[2].检测 E_1 含量的变化可以诊断某些激素依赖型的疾

病^[3,4],倡导健康向上的生活方式.

因为 E_1 有很强的生理功能,监控其在体内的含量变化意义重大.免疫分析方法^[5-7]测定 E_1 的含量,利用抗原抗体的特异性相互作用,可以直接测试生物样品,避免了传统的分析方法中耗时费力的分离步骤.单克隆抗体针对于单一抗原决定簇,特异性强,亲和性一致,是分析研究 E_1 的物质基础.标记物

* E-mail: dxhx@chem.pku.edu.cn wang_wch@sina.com

收稿日期:2001-05-25,修回日期:2001-07-20,定稿日期:2001-08-20.国家自然科学基金(20075001)资助项目

(Received May 25, 2001. Revised July 20, 2001. Accepted August 20, 2001.)

的多重标记是提高分析灵敏度的有效手段。其中,生物素(Biotin)与链亲和素(streptavidin)的相互作用强烈(亲和常数高达 10^{15} L/mol),反应专一,结合物稳定,共有 4 个结合位点,是目前广泛推崇的多重标记的方法之一。

本文合成了 E_1 的完全抗原(E_1 -BSA),通过细胞融合技术,制备了 E_1 的单克隆抗体(McAb),并对其进行了表征。通过 E_1 与 E_1 -BSA 竞争有限量的 McAb,以生物素-羊抗鼠 IgG 结合物(Biotin-IgG)与链亲和素-辣根过氧化物酶结合物(SA-HRP)作为标记体系,将生物素-亲和素放大体系应用到酶联免疫吸附分析法(ELISA)中,对游离的 E_1 进行了分析测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

雌酮(E_1)购自 Sigma 公司,牛血清白蛋白(BSA)购自 B. M. 公司,卵白蛋白(OVA)为中国科学院上海

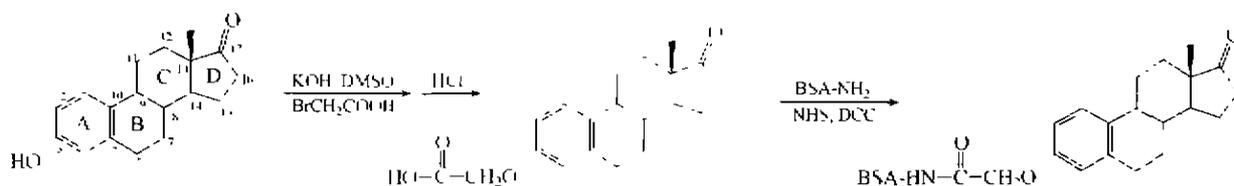
生物化学研究所东风生化技术公司的产品,生物素-羊抗鼠 IgG 复合物(Biotin-IgG)与链亲和素-辣根过氧化物酶(SA-HRP)(原液浓度 1 mg/mL)均购自华美公司,其它试剂均为市售分析纯产品。

3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液:0.1 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液,TMB 储液(30 mg TMB 溶于 5 mL DMSO 中)和 H_2O_2 (30%)按 100:1:0.15 的比例配制而成。

Yamata Model IP-41 二氧化碳恒温培养箱;Bio-Rad 1000/500 电泳仪;Bio-Rad 3550 酶标免疫检测仪。

1.2 雌酮完全抗原的制备

参照 Dhar 等⁸的方法,按如下反应式从 E_1 的 C3 位偶联载体蛋白,最大限度地暴露其特异性的 D 环,合成雌酮-3-羧甲基醚(E_1 -3-CME);利用 N-羟基琥珀酰亚胺和二环己基碳二亚胺将 E_1 -3-CME 活化为活泼酯,然后与载体蛋白偶联,获得完全抗原⁹。考马斯亮蓝法测定 E_1 与 BSA 的偶联率为 E_1 :BSA = 25:1。



1.3 E_1 的单克隆抗体的制备与表征

E_1 -BSA 多次免疫小鼠后,经细胞融合,阳性测定、克隆筛选、扩大培养,得到稳定分泌 E_1 单克隆抗体的阳性细胞株,通过小鼠体内诱生的方法,得到大量的腹水,经纯化得到单克隆抗体,抗体的亚型通过双扩散测定抗体为 IgG1;通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定抗体的分子量;抗体与固定化抗原的亲和常数按照 Beatty 等¹⁰提供的方法确定。

1.4 反应条件的优化

100 μ L/孔包被一定浓度的 E_1 -BSA 溶液到酶标板中,4 $^{\circ}$ C 过夜,次日,洗板 3 次后,加入 200 μ L 明胶溶液,37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,洗板后,加入 100 μ L E_1 的 McAb 于酶标板中免疫反应 1 h,洗板后,每孔加入 1:5 000 稀释的 IgG-HRP 于 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h,加入 100 μ L TMB 显色液后,用 50 μ L 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,用 Bio-Rad 酶标仪测定反应混合物在 450 nm 处的吸光度,确定最佳反应条件。

1.5 工作曲线的制作及交叉反应的考察

包被 100 μ L 最佳浓度的 E_1 -BSA 到酶标板上,经封闭洗板后,将 50 μ L 系列稀释的 E_1 溶液(20 ng/mL,10 倍倍比稀释至 2 pg/mL)与 50 μ L 合适浓度的 McAb 一同加入包被板中,加入 Biotin-IgG, SA-HRP 后,完成整个 ELISA 测定,通过吸光度值与浓度的关系,确定 E_1 测定的拟合曲线,同样,将 E_1 的类似物同抗 E_1 的 McAb 一起反应,做出 E_1 的类似物的竞争抑制曲线,考察 E_1 的类似物在 E_1 的分析测定中引起的交叉反应。

2 结果与讨论

2.1 纯化 McAb 纯度及相对分子量的确定

在 Bio-Rad 电泳槽中,灌入 12% 分离胶,恒流($I = 12$ mA)预电泳 10 min 后,槽中灌入 3% 浓缩胶,McAb 和低分子量标准蛋白(LMW)分别配成 1 mg/mL 的样品液,每个样品孔加入 10 μ L 溶液,样品在浓缩胶中恒流($I = 20$ mA)浓缩 20 min,然后在分离

胶中分离 170 min. 分离胶经固定、染色、脱色后, 分离结果如图 1 所示. 根据蛋白质的相对迁移率与蛋白质分子量的关系, 测定单抗的相对分子量为 164 000, 其中每条重链为 54 000, 每条轻链为 28 000; 图中单抗经电泳后, 呈现出两条清晰的条带, 没有其它的杂带出现, 证明抗体的纯度是可靠的.

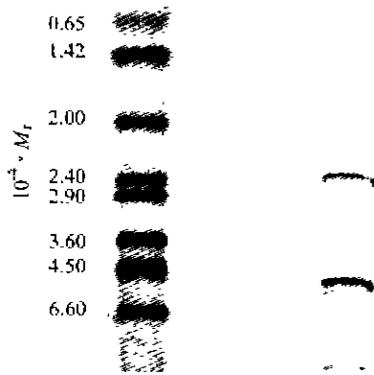


图 1 E₁ 的单克隆抗体(右)与低分子量标准蛋白(左)的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 Graph of anti-E₁ McAb and low molecular weight standard (LMW) proteins in SDS-PAGE
Left, LMW proteins and their molecular weights; right, bands from anti-E₁ McAb.

2.2 亲和常数的确定

系列稀释抗原和抗体, 通过 ELISA 的方法得到抗体的稀释曲线如图 2. 按照 Beatty 等提出的方法, 测定 E₁ 的 McAb 与固定化抗原 E₁-OVA 的亲和常数 (K_{aff}) 为 8.2×10^8 L/mol, 这一亲和常数, 说明固定化抗原与单抗之间的结合能力是很强的. 同时, 当包被 E₁-BSA 时, 测定的 K_{aff} 亦为 8.2×10^8 L/mol, 这也证明 E₁ 的 McAb 与 E₁ 的反应是特异性的, 与载体蛋白无关.

二抗与一抗结合稳定与否, 决定免疫分析的可行性. 视鼠源性的单抗为二抗的抗原, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG (IgG-HRP) 作为二抗, 按照 Beatty 建立的方法确定二抗与固定化一抗的亲和常数为 6.9×10^8 L/mol, 证明二抗与一抗的结合是稳定的, 生物素标记的二抗可以与一抗稳定结合.

2.3 最佳包被抗原及 McAb 反应浓度的选择

将 25.0, 62.5, 125 ng/mL 的 E₁-BSA 分别以 100 μ L/孔包被到酶标板中, 100 μ L/孔 4.8 mg/mL 的 McAb 5 倍倍比稀释后分别与抗原免疫反应. 加入 100 μ L 5 000 倍稀释的 Biotin-IgG 反应后, 加入 100

μ L 500 倍稀释的 SA-HRP, 完成 ELISA. 吸光度值与 McAb 的稀释度的关系如图 3, 比较不同抗原包被浓度时的最大吸收, 吸光度变化范围的大小, 结果表明, 包被浓度为 62.5 ng/mL 时的最大吸收居中, 吸光度变化最大, 结合原料节约的原则, 以 62.5 ng/mL 为 E₁-BSA 的包被浓度是最佳的选择. 同时, 从稀释曲线的趋势看, 当抗体稀释度 3~4 时, 吸光度大小合适, 其变化趋势明显, 故选择 5 000 倍稀释, 即浓度为 0.96 μ g/mL, 作为一抗 McAb 的反应浓度.

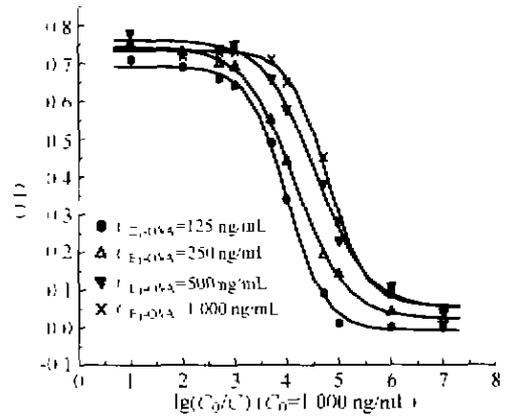


图 2 不同抗原包被浓度时 E₁ 单克隆抗体的稀释曲线

Fig.2 Anti-E₁ McAb dilution curves at different coated antigen concentrations

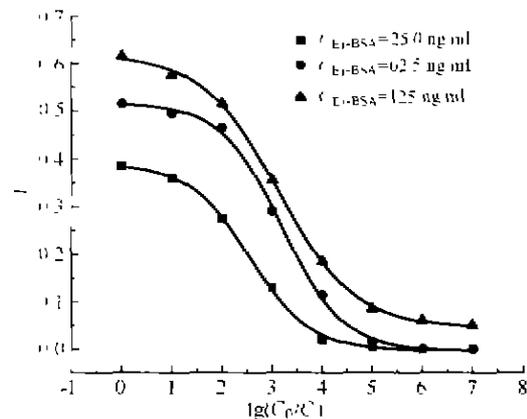


图 3 不同浓度包被抗原时 E₁ 单克隆抗体的稀释曲线

Fig.3 The dilution curves of anti-E₁ McAb reacting with coated E₁-BSA of different concentrations

2.4 Biotin-IgG 与 SA-HRP 最佳浓度及反应时间的选择

将不同 Biotin-IgG 稀释度的吸光度对时间作图, 得到时间曲线如图 4, 从图中可以看出, 稀释度

为 1:10 000 和 1:20 000 时,实验的吸光度值很低,不能满足分析测定的需要;对于其它的稀释度,反应一开始,吸光度就达到一定的值,说明 Biotin 与 SA 反应很快,当时间超过 25 min 时,反应达到平衡,吸光度进入平台区.考虑吸光度的大小及 Biotin-SA 反应的完全性对分析的影响,选择 Biotin-IgG 的稀释度为 1:5 000,与 SA-HRP 反应时间 30 min.

包被 100 μL 62.5 ng/mL 的 E_1 -BSA 到酶标板中,顺序加入 0.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ McAb 和 5 000 倍稀释的 Biotin-IgG,免疫反应完成后,加入 2 倍倍比稀释的 SA-HRP(原浓度 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$),反应 30 min 后,完成 ELISA.制作吸光度与 SA-HRP 稀释度关系图,结果如图 5 所示,选择 1 000 倍稀释,即 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为 SA-HRP 的反应浓度是可取的.

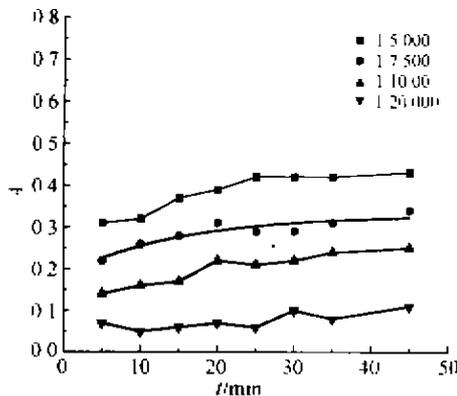


图 4 系列稀释的 biotin-IgG 与 SA-HRP 反应的时间曲线

包被 E_1 -BSA: 125 ng/mL, McAb 0.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fig. 4 Time curves of serially diluted biotin-IgG reacting with SA-HRP in ELISA

The primary concentration of coated E_1 -BSA was 125 ng/mL.
The primary concentration of McAb against E_1 was 0.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

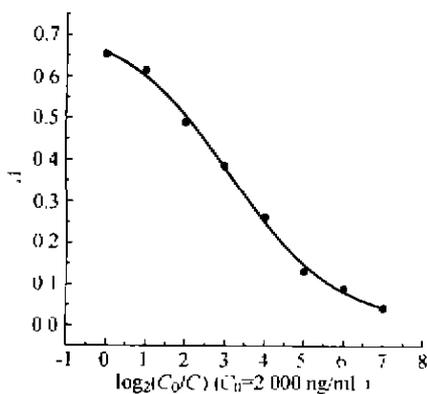


图 5 SA-HRP 的 2 倍倍比稀释图

Fig. 5 Two-time serial dilution curve of SA-HRP in ELISA

2.5 工作曲线的制作

系列浓度的 E_1 溶液 (20 ng/mL, 10 倍倍比稀释至 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 与等体积的 2 500 倍稀释的 McAb (浓度为 1.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 混合后, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入包被有 E_1 -BSA (100 $\mu\text{L}/\text{孔} \times 62.5$ ng/mL) 的酶标板中, 进行竞争免疫反应. 在最佳条件下, 完成 ELISA, 将吸光度与 E_1 的稀释度作图, 得到工作曲线如图 6. 从图中可知: 生物素-亲和素放大体系测定 E_1 的线性范围为 10 000 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检测限为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (空白值的 2 倍标准偏差), 系内误差 (intra-assay RSD) 为 1.2% ~ 12.2%, 系间误差 (inter-assay RSD) 为 0.5% ~ 12.5%.

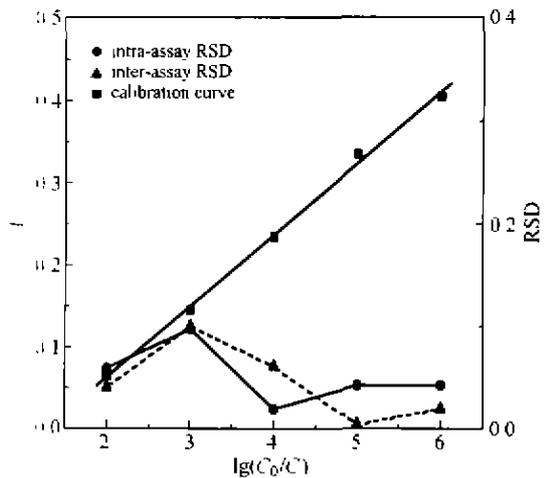


图 6 生物素-亲和素复合物 ELISA 测定游离 E_1 的拟合曲线与标准偏差曲线 ($n=5$)

Fig. 6 Calibration and RSD curves for free E_1 using biotin-streptavidin complex in ELISA ($n=5$)

2.6 E_1 类似物交叉反应的测定

将 50 μL 系列浓度 (200 ng/mL, 10 倍倍比稀释至 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 E_1 , 雌二醇 (E_2), 雌三醇 (E_3) 和孕酮 (P) 溶液, 同 50 μL 1.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 McAb 混合, 然后加入包被有 E_1 -BSA (100 $\mu\text{L}/\text{孔} \times 62.5$ ng/mL) 的孔中, 在所优化的最佳条件下, 完成比色测定, 测定各个系列的吸光度值. E_1 类似物的交叉反应按两种方法给出^[11], 即 50% - 替代法 (50% - D) 和 10% - 误差法 (10% - E), 并将结果列于下表 1 中.

从表中的结果可以看出: 在研究的几种 E_1 类似物中, P 引起的交叉反应最小, E_2 引起的交叉反应最大, 这是因为 E_1 与 E_2 的结构更类似, 说明交叉反应与分子结构密切相关; 在低浓度范围内, E_1 类似物的交叉反应很小, 不影响 E_1 的分析测定.

表1 生物素-亲和素 ELISA 法测定 E_1 时 E_2 ,
 E_3 和 P 的交叉反应表

Table 1 The cross-reactions of E_2 ,

E_3 and P using biotin-streptavidin complex in ELISA of E_1

Steroids assayed	Cross-reacting steroid	Cross-reaction	
		50% - D	10% - F
E_1	E_2	0.6%	0.2%
	E_3	0.01%	<0.01%
	P	<0.01%	<0.01%

3 结论

抗体的特异性决定了免疫分析的特异性和灵敏度,特异性结合 E_1 的抗体是分析测定 E_1 的物质基础.我们选择在 E_1 的 C3 处偶联,以突出其特异性的 D 环,合成了 E_1 的完全抗原 E_1 -BSA, E_1 与 BSA 的结合率为 25:1.经过动物免疫、细胞融合、克隆筛选、扩大培养、动物体内诱生等过程,最后获得了 E_1 的单克隆抗体(McAb),并对纯化的抗体进行了性质表征.

游离的 E_1 与包被的 E_1 -BSA 竞争、与有限量的 McAb 反应, Biotin-IgG 与抗原抗体复合物免疫后, SA-HRP 与 Biotin-IgG 生物素结合,测定游离的 E_1 .测定 E_1 的线性范围为 10 000 ~ 10 pg/mL,检测限为 2.5 pg/mL(空白值的 2 倍标准偏差).

本文为“庆祝邢其毅教授九十华诞暨执教六十年”征文

References

- 1 Leifke, E.; Gorenor, V.; Wichers, C.; von zur Muhlen, A.; von Bohm, E.; Brahan, G. *Clin. Endocrinol.*, **2000**, *53*, 689.
- 2 Castro-Fernandez, C.; Olivares, A.; Soderlund, D.; Lopez-Alcaranga, J. C.; Zambrano, E.; Veldhuis, J. D.; Ulloa-Aguirre, A.; Mendez, J. P. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2000**, *85*, 4603.
- 3 Pasquini, J. R.; Cortes-Prieto, J.; Chetrite, G.; Talba, M.; Bruz, A. *Int. J. Cancer*, **1997**, *70*, 639.
- 4 Reginster, J. Y.; Derocq, R.; Collette, J.; Albert, A.; Zegels, R. *Calcif. Tissue Int.*, **1997**, *60*, 261.
- 5 Peter, L.; Sabare, H.; Ingrid, S.; Christian, B.; Hagan, H. *Can. Chem. Endocrinol. Metab.*, **1995**, *41*, 564.
- 6 Bakola-Christianopoulou, M. N.; Apazidou, K. K.; Psarros, L. *Appl. Organomet. Chem.*, **1997**, *11*, 205.
- 7 Lim, S. K.; Won, Y. J.; Lee, J. H.; Kwon, S. H.; Lee, E. J.; Kim, K. R.; Lee, H. C.; Huh, K. B.; Chung, B. C. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1997**, *82*, 1001.
- 8 Dhar, P. K.; Samanta, A. K.; Ali, E. *Steroids*, **1988**, *51*, 519.
- 9 Mattox, A. B.; Litwaller, R. D.; Nelson, A. N. *J. Steroid Biochem.*, **1979**, *10*, 167.
- 10 Beatty, J. D.; Beatty, B. G.; Vlahos, W. G. *J. Immunol. Methods*, **1987**, *100*, 173.
- 11 Pratt, I. *J. Clin. Chem.*, **1978**, *24*, 1869.

(Ed. PAN Bing-Feng)

(ZHENG Guo-Cheng)