

体变性、复性后测定其活性,结果发现约  $1\mu\text{g}$  初步纯化的蛋白与阴性对照组相比,可使人骨髓体外 GM-CFU 数量增加 2 倍左右,并且集落增大,这表明在大肠杆菌中表达的 SCF 蛋白具有 SCF 的生物学活性。

目前国外对 SCF 的临床前期研究表明,SCF 在治疗各种贫血、恢复放化疗后的骨髓造血机能以及辐射防护等方面具有广泛的应用前景. 本研究工作为在国内开展 SCF 的基础研究和应用研究奠定了较好的基础。

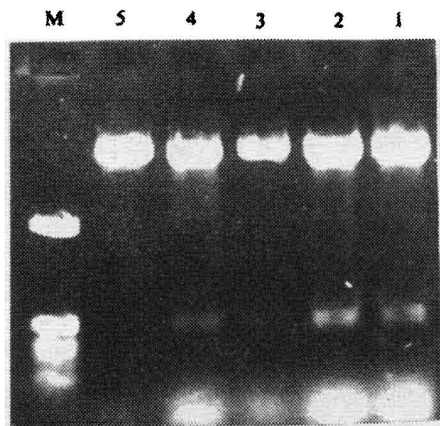


图 1 pET-SCF 经 Nde I 和 BamH I 酶切后的电泳图

1—4: 4 个阳性克隆中的重组质粒

5: pET3a

M: pBR322/Hinf I.

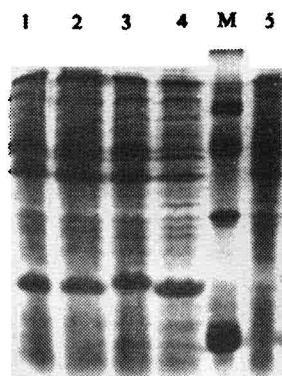


图 2 pET-SCF 在 BL-21 ( $\text{DE}_3$ ) 中的表达

1—4: 4 个 pET-SCF 重组质粒

5: pET3a 作为空载体对照

M: 蛋白质标记, 分子量自上而下为: 67 000, 43 000, 31 000, 14 400

## 参 考 文 献

- 1 Zsebo K M, Wypych J, McNiece I K *et al.* Identification, purification and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell*, 1990; **63**:195
- 2 Martin F H, Sidney V S, Keith E L *et al.* Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*, 1990; **63**:203
- 3 朱元晓, 王建安, 沈倍奋等. 人 SCF 基因 cDNA 克隆及分析. 中华流行病学杂志, 1992; **13**(特刊 2 号):407

## 血清脂蛋白 (a) 双单抗夹心 ELISA 测定方法

谢玉才 丁怀翌 蔡伟菁 吴春芳 戚文航 龚兰生

(上海第二医科大学瑞金医院心内科, 上海 200025)

**关键词** 脂蛋白 (a), 单克隆抗体, ELISA

脂蛋白 (a) [Lp (a)] 是不同于低密度脂蛋白 (LDL) 的一种独立脂蛋白, 其血清浓度的增高是动脉粥样硬化的独立危险因子. 制备 Lp (a) 单克隆抗体 (单抗) 和建立测定方法将为开展冠心病和动脉粥样硬化研究提供重要手

段.

**1 单抗制备及特性** 利用 Fless 和 Scanu 教授惠赠的人 Lp (a) 纯抗原, 应用淋巴细胞杂

交瘤技术,获得六株稳定分泌特异 Lp (a) 单抗杂交瘤细胞株  $a_1$ — $a_6$ , 其酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 效价分别为  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ , 亲和力常数分别为  $6.1 \times 10^{-9}$ ,  $2.0 \times 10^{-9}$ ,  $1.1 \times 10^{-10}$ ,  $2.6 \times 10^{-9}$ ,  $2.5 \times 10^{-10}$ ,  $3.3 \times 10^{-10}$ ,  $a_1$ ,  $a_2$  免疫球蛋白亚类为 IgG<sub>2a</sub>,  $a_3$ — $a_6$  为 IgG<sub>1</sub>, 除  $a_1$  外, 其余五株与 LDL, 载脂蛋白 B (apo B), 纤溶酶原 (Plg) 无交叉反应。

**2 测定方法** 经过选择, 将  $a_2$  单抗以 1:10 000 稀释, 包被到 40 孔聚苯乙烯塑料板中 (浙江黄岩化塑厂), 每孔 0.1ml, 4℃ 过夜; 洗涤后, 加入系列稀释的标准品及 1:2000 稀释的血清标本, 每孔 0.1ml, 37℃ 1h; 洗涤后, 加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的  $a_3$  单抗, 每孔 0.1ml, 37℃ 1h; 洗涤后, 加入邻苯二胺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物溶液, 每孔 0.1ml, 37℃ 20min; 加入 2mol/L 硫酸 0.05ml 终止反应, 在  $\lambda_{492}$  (浙江省建德生化仪器厂 MB-5000) 处测得光密度值, 在标准曲线上查得相应测值。

### 3 方法考核

a. 特异性: 在一混合血清中分别加入 5mg/ml 的 LDL, apo B 和 Plg (Sigma) 纯品, 以建立的方法检测各管 Lp (a) 含量, 结果增加率分别为 -2.16%, -2.16% 和 -2.50%, 提

示本法特异性强。

b. 重复性: 3 份不同标本, 用本法测 10 次, 批内变异系数平均为 2.6%, 在不同检测日测 5 次, 批间变异系数平均为 8.1%。

c. 灵敏度: 本法最低可检测出 Lp (a) 0.15—0.30ng/孔, 标本稀释 2000 倍, 相当于原血清 Lp (a) 浓度 0.3—0.6mg/dl。

d. 回收试验: 在已知 Lp (a) 含量 (瑞典 Biopool AB 试剂盒 ELISA 测值) 的三份血清中, 分别加入 2.5, 40.0mg/dl 的参考血清进行回收试验, 结果回收率在 85.9%—108.7%, 平均 98.6%。

e. 相关性: 本法标准曲线与瑞典 Biopool AB 试剂盒 (灵敏度 0.08ng/孔) 标准曲线形态一致, 两种方法测值 ( $n=80$ ) 相关系数  $r=0.848$ 。

**4 初步应用** 应用本法检测 40 位正常人和 40 例冠心病患者, 测值分别为  $19.04 \pm 17.22$ mg/dl 和  $30.26 \pm 25.38$ mg/dl, 差别显著 ( $P<0.05$ )。

总之, 利用自制单抗, 在国内首次建立的 Lp (a) 双单抗夹心 ELISA 测定方法具有特异, 准确, 灵敏度高, 重复性好, 可以与国外同类试剂盒相比, 适宜在国内推广应用。

(上接第 387 页)

- 10 Schlegel J, Zurbriggen B, Wyss M *et al.* Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. *J Biol chem*, 1988; **263**: 16942—16953
- 11 姚启智, 邹承鲁. pH-比色法测定肌酸激酶活力. 生物化学与生物物理进展, 1981; (3): 52—56
- 12 Blum H E, Deus B, Gerok W. Mitochondrial creatine kinase from human heart muscle: purification and characterization of the crystallized isoenzyme. *J Biochem*, 1983; **94**: 1247—1257
- 13 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; **227**: 680—685
- 14 Wallimann T, Kuhn H J, Pelloni G *et al.* Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. *J Cell Biol*, 1977; **75**: 318—325
- 15 Hall N, Addis P, Deluca M. Mitochondrial creatine kinase: physical and kinetic properties of purified enzymes from beef heart. *Biochemistry*, 1979; **18**(9): 1745—1751