

以溶解性可调节高分子为载体的酶免疫分析*

周 平 曾云鄂

(武汉大学化学系, 武汉 430072)

邓延倬¹⁾

(武汉大学分析测试科学系, 武汉 430072)

摘要 将单克隆抗体与溶解性受酸度或温度调节的高分子共价连接, 研究了共聚物的溶解性可调节特征, 建立了以溶解性可调节高分子为载体酶免疫分析方法, 对血清样品中 HBsAg 进行了检测, 灵敏度 0.5 $\mu\text{g/L}$, 对 43 例样品检验的结果与 ELISA 方法相符.

关键词 溶解性可调节高分子, 免疫分析, HBsAg

学科分类号 R392.33

调节溶液的温度或 pH 值可使某些合成的水溶性高分子发生相变, 从溶液中沉淀出来. 溶解性受温度调节的高分子, 具有较低临界溶液温度 (lower critical solution temperature, LCST). 在高于此温度时, 高分子从溶液中沉淀出来; 在低于此温度时, 高分子又能溶解于溶液中^[1]. 溶解性受酸度影响的高分子具有一个敏感 pH 临界值, 在此 pH 值附近发生溶解-沉淀的可逆性变化^[2]. 这些高分子较多地应用于固定化酶^[3,4], 也可用于在细胞培养、生物大分子的分离^[5].

1 材料与方法

1.1 材料

单克隆鼠抗人乙肝表面抗原抗体, 辣根过氧化物酶标记抗乙肝表面抗原抗体, 乙肝表面抗原阳性、阴性血清由武汉市第七医院肝病研究室提供, 乙肝表面抗原定值血清系卫生部生物制品检定所产品.

N-羧基琥珀酰亚胺丙烯酸酯 (NAS) 按文献 [6] 合成, 重结晶两次, 甲基丙烯酸用前减压重蒸. N-异丙基丙烯酰胺 (NIP) 系日本 TCI 公司产品, 丙烯酰胺系 GIBCO BRL 公司产品, 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 系 Sigma 公司产品.

1.2 高分子与抗体的连接

在 4 ml 含单克隆抗体 (200 g/L) 的磷酸

缓冲液 (0.1 mol/L , pH 8.0) 中加入 50 μl 含 0.1% NAS 的二甲基亚砷溶液, 室温反应 2 h. 加入 40 mg NIP、50 mg 牛血清白蛋白 (BSA) 以及适量过硫酸铵及 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED), 引发聚合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 调节溶液温度至 37 $^{\circ}\text{C}$, 离心收集沉淀, 用 PBS (0.05 mol/L , pH 7.4) 洗涤, 最后将沉淀溶于冰冷的 PBS 中, 得到温度敏感高分子连接的抗体 (PNIP-Ab). 用丙烯酰胺 41.2 mg 及甲基丙烯酸 50 μl 代替 NIP 共聚合形成溶解性受酸度影响的高分子抗体复合物, 调节 pH 值使高分子沉淀, 离心, 用醋酸缓冲液 (pH 3.8) 洗涤, 沉淀溶解于 PBS 中.

1.3 血清中 HBsAg 的检测

取 50 μl 高分子抗体复合物, 加入 50 μl 血清, 50 μl 酶标抗体, 150 μl PBS 缓冲液 (含 0.5% BSA), 室温反应 30 min, 升高温度或调节 pH 值使溶液中高分子沉淀, 离心收集沉淀, 将沉淀用 PBS 溶解, 调节溶解性再离心收集沉淀, 如此洗涤三次, 加入 200 μl PBS 溶解沉淀. 取此溶液 20 μl , 加入底物溶液 100 μl (含 TMB 0.1 g/L , H_2O_2 0.03%), 反应 15 min, 用 50 μl SDS 溶液终止反应, 于 630 nm 测量光度值.

* 国家自然科学基金资助课题 (29375207).

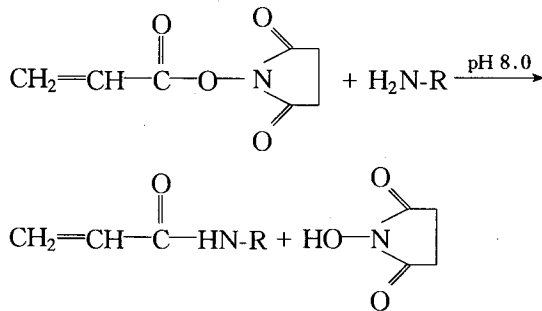
¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-01-24, 修回日期: 1997-06-12

2 结果与讨论

2.1 高分子载体的可调节溶解性

NAS与抗体分子的氨基反应, 形成含有乙烯基的大分子单体,



再与 NIP 或甲基丙烯酸、丙烯酰胺单体共聚合, 实现抗体与高分子载体的共价连接。

PNIP 的温度敏感特征是由于异丙基基团的水合作用引起的高分子链的构象变化所引起的^[7], 图 1 示出 PNIP 在 PBS 缓冲液中的温度敏感相分离特征。一般来讲, 高分子中单体 NIP 所占比例减少, 其 LSCT 增高。在本实验中由于 NAS 及抗体分子等的引入, 采用 37℃

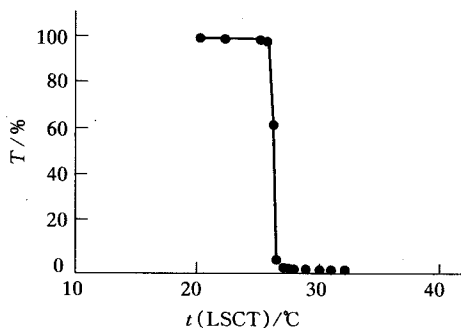


图 1 PNIP 在 PBS 中的温度敏感相分离特征

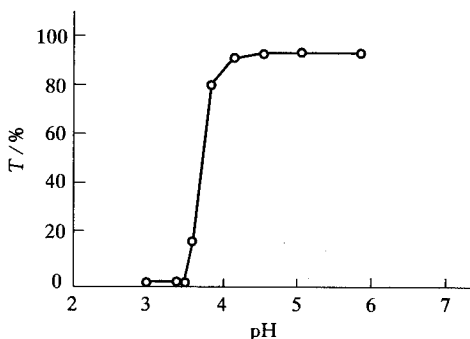


图 2 高分子载体的 pH 敏感相分离特征

温育以沉淀 PNIP 免疫复合物。NAS 与甲基丙烯酸、丙烯酰胺共聚物具有受 pH 调节的相分离特征 (图 2), 在 pH 4.0 时开始沉淀, 3.5 时完全沉淀, pH 值升高后具有良好的再溶解性。溶解性受 pH 调节的高分子相变特征与链间氢键形成有关^[8]。

2.2 酶反应终止剂的选择

辣根过氧化物酶催化 TMB 的显色反应通常是用 H_2SO_4 终止的。用于溶解性受 pH 调节高分子为载体的酶免疫分析, 会因为高分子的沉淀而影响光度测量。为此, 我们使用了新的终止方法: 用 0.1% SDS 使酶变性, 加入适量 Na_2SO_3 还原过量的 H_2O_2 , 能终止酶反应并且稳定性好 (图 3)。同时, 0.1% SDS 可以阻止 PNIP 的温度敏感相变过程, 可以在较高的温度下进行光度分析。新的终止剂较适用于这种相分离高分子为载体的酶免疫分析。

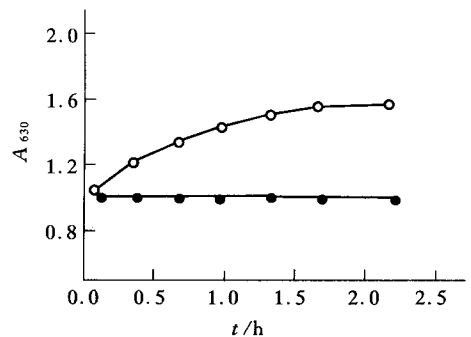


图 3 不同试剂终止显色的稳定性

○—○: 0.1% SDS; ●—●: 0.1% SDS + 1.5×10^{-3} mol/L Na_2SO_3 .

2.3 HBsAg 的检测

用这两类高分子为载体对 43 例病人及正常人血清中 HBsAg 进行定性分析, 结果与 ELISA 方法相符。对乙肝表面抗原定值血清的分析表明, 以受温度、pH 调节高分子为载体的酶免疫分析分别可检出 0.5 $\mu\text{g/L}$ 及 1 $\mu\text{g/L}$ 的 HBsAg (图 4)。后者灵敏度较低可能与低 pH 影响抗体及酶活性有关。

以溶解性可调节的高分子为载体的免疫分析, 抗原抗体特异性反应发生在均相溶液之

中, 反应速度快, 减少了发生非特异性吸附的机会^[9], 通过载体溶解性的调节可以实现与游离酶标抗体的两相分离. 这种均相反应、异相分离的模式具有均相免疫分析速度快和异相免疫分析灵敏度高的优点, 可望进一步发展为方便准确的免疫分析方法.

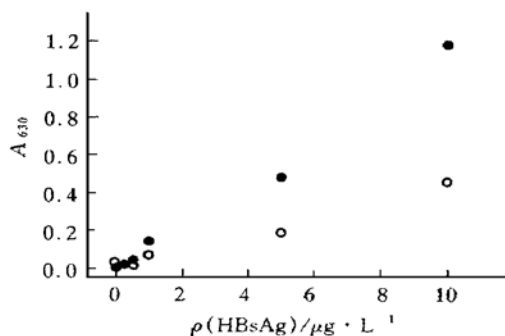


图4 HBsAg的免疫分析检测

●——●: 溶解性受温度调节高分子载体; ○——○: 溶解性受pH调节高分子载体.

参 考 文 献

- 1 Heskins M, Guillet J E, James E S. Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci Chem*, 1968, **A2** (8): 1441~ 1445
- 2 Kopecek J, Vacik J, Lim D. Permeability of membranes containing ionogenic groups. *J Polym Sci A1*, 1971, **9** (10): 2801~ 2815
- 3 Fujimura M, Mori T, Tosa T. Preparation and properties of soluble-insoluble immobilized proteases. *Biotech Bioeng*, 1987, **29** (6): 747~ 752
- 4 Chen G, Hoffman A S. Synthesis of carboxylated poly (NIPAAm) oligomers and their application to form thermoreversible polymer-enzyme conjugates. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1994, **5** (4): 371~ 382
- 5 Matsukata M, Takei Y G, Aoki T *et al.* Temperature modulated solubility-activity alterations for poly (N-isopropylacrylamide) -lipase conjugates. *J Biochem*, 1994, **116** (3): 682~ 686
- 6 Pollack A, Blumenfeld H, Wax M. Enzyme immobilization by condensation copolymerization into crosslinked

polyacrylamide gels. *J Am Chem Soc*, 1980, **102** (20): 6324~ 6336

- 7 Bae Y H, Okano T, Kim S W. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly (N, N'-alkyl substituted acrylamides) in water. *J Polym Sci Polym Phys*, 1990, **28** (6): 923~ 936
- 8 李增吉, 沈家骢, 马 林. 溶解性可调节的酶载体制备和固定化酶的研究. *高等学校化学学报*, 1991, **12** (5): 695~ 698
- 9 Monji N, Hoffman A S. A novel immunoassay system and bioseparation process based on thermal phase separating polymers. *Appl Biochem Biotech*, 1987, **14** (2): 107~ 120

Enzyme Immunoassay Based on Solubility Regulatable Carriers. ZHOU Ping, DENG Yanzhuo¹⁾, ZENG Yurue (*Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072, China;* ¹⁾*Department of Analysis and Testing, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract Soluble-insoluble forms of monoclonal antibody, which can be rendered either soluble or insoluble by simple adjusting the temperature or pH, have been prepared by covalently coupling antibody to poly (N-isopropylacrylamide) or to copolymer of methacrylic acid and acrylamide. These carriers were used in enzyme immunoassay instead of polystyrenes. Some advantages of both heterogeneous and homogeneous immunoassays were achieved. HBsAg was assayed to examine the sensitivity of these methods. A significant difference from the negative serum was obtained for 0.5 $\mu\text{g/L}$. 43 serum samples were assayed, and there was a good correlation between these methods and ELISA.

Key words regulated solubility polymer, immunoassay, HBsAg