

ELISA 法分析抗血清中链霉素抗体抗原结合部位的特异性

胡昌勤 赵建西 金少鸿

(中国药品生物制品检定所, 北京)

提 要

用链霉素抗血清对链霉素的亲和力 (K_{SM}) 和链霉素抗血清对二链霉胺的亲和力 (K_B) 之比 (K_{SM}/K_B) 为指标, 表征链霉素抗血清抗原结合部位的特异性; 建立了快速分析该指标的 ELISA (酶联免疫吸附法) 法; 并对链霉素抗体抗原结合部位的特异性进行了分类。

机体的免疫应答具有高度的特异性。对半抗原和蛋白质结合所形成的抗原, 由于半抗原结合位点在载体蛋白上的空间位置的差异, 使得形成的抗原决定簇的空间结构也略有不同, 导致了免疫应答时产生的抗体的不均一性 (Heterogeneity)^[1]。表现为相同半抗原结合蛋白, 在不同个体中产生的抗血清对该半抗原及该半抗原的衍生物有不同的亲和力。由此可以探讨抗体抗原结合部位的特异性^[2]。但有关对某一抗血清抗原结合部位的特异性及其快速分析的报道尚较少见。为研究链霉素过敏反应中链霉素抗体抗原结合部位的特异性和致敏性杂质结构间的关系, 我们用链霉素抗体对链霉素的亲和力 (K_{SM}) 和对二链霉胺 (Bis-(α -hydroxystreptomycle)-amine) 的亲和力 (K_B) 之比 (K_{SM}/K_B) 为指标, 表征链霉素抗体抗原结合部位的特异性, 建立了快速分析链霉素抗血清中该指标的 ELISA 法。

一、材料和方法

1. SM-BSA 结合物的制备

牛血清白蛋白 (BSA) 和链霉素 (SM) 硫酸盐按 1:10 之重量比混合溶解, 调 pH 为 9.2, 37℃ 12 小时后, 装在透析袋中透析 48 小时, 冷冻干燥。

2. 链霉素抗血清的制备

体重 3000 克的健康新西兰白兔 (本所实验动物繁育场提供), 基础免疫二次, 每周一次。每

次膈窝淋巴结中注射 0.2ml 付氏完全佐剂, 含 400 μ g SM-BSA。基础免疫二周后, 加强免疫。付氏不完全佐剂 1 毫升中含 500 μ g SM-BSA, 分别注射于动物肌肉、脚掌及皮下多点, 隔周一次, 加强三次。动物由颈动脉放血, 血清于一 20℃ 冰箱冻存。

3. 链霉素抗血清效价的测定

(1) 间接血凝法: 见文献 [3]。

(2) ELISA 法: 96 孔酶标板, 用 pH9.6 碳酸缓冲液包被链霉素硫酸盐 250 μ g/160 μ l/孔, 或链霉素-破伤风类毒素结合物 (SM-TT) 50 μ g/160 μ l/孔, 4℃ 冰箱过夜; 酶标板洗涤三次后, 加入 $5 \times n$ 倍稀释的抗血清, 37℃ 保温 2 小时; 再洗涤三次, 加入 1:100 稀释的羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶结合物 (北京生物制品研究所), 37℃ 保温 1 小时; 再洗涤三次, 加入含邻苯二胺 40mg/100ml, 30% H_2O_2 100 μ l/100ml 的底物溶液, 室温反应 15 分钟; 加 2mol/L 硫酸 50 μ l/孔终止反应。以没加羊抗兔 IgG 结合物孔为空白, 在 Titertek Multiskan MC-340 型酶标测定仪上测 492nm 的吸光度 (A), $A_{492} > 0.050$ 孔定为阳性。

4. ELISA 法测定 K_{SM}/K_B

包被链霉素硫酸盐 350 μ g/200 μ l/孔; 半抗原抑制物链霉素和二链霉胺 (本室郑昌亮教授合成) 的浓度均为 1.72mmol/L。包被好的酶标板经洗涤后, 加入 100 μ l/孔 1:50 稀释的待测血清和 100 μ l/孔的抑制物或缓冲液, 以后步骤同

效价测定。

当抑制物浓度和包被抗原浓度远大于抗体浓度,且两种抑制物加入的摩尔数相同时,

$$\begin{aligned} K_{SM}/K_B &\approx \frac{[SMAb]}{[AgAb]_{SM}} \bigg/ \frac{[BAb]}{[AgAb]_B} \\ &= \frac{A_N - A_{SM}}{A_{SM}} \bigg/ \frac{A_N - A_B}{A_B} \end{aligned}$$

式中 $[SMAb]$ 、 $[BAb]$ 分别表示反应平衡时链霉素-抗体复合物和二链霉素-抗体复合物的摩尔浓度; $[AgAb]_{SM}$ 和 $[AgAb]_B$ 分别代表反应平衡时链霉素抑制孔和二链霉素抑制孔抗体-包被抗原复合物的摩尔浓度; A_N 、 A_{SM} 、 A_B 分别为没加抑制物孔、链霉素抑制孔和二链霉素抑制孔的吸光度。据此可计算 K_{SM}/K_B 。

5. 间接血凝抑制试验

参照文献[3]。100 μ l 血清加 50 μ l 抑制物及 100 μ l 1% 的链霉素致敏血球,混匀,37 $^{\circ}$ C 2 小时后观察凝集情况。

6. ELISA 法测定链霉素抗血清的滴度-反应曲线

包被链霉素硫酸盐 350 μ g/200 μ l/孔。包被好的酶标板经洗涤后,加入 $2 \times n$ 倍稀释的抗血清;37 $^{\circ}$ C 保温,以后步骤同效价测定。以 A 为纵坐标,血清滴度之对数值为横坐标,求其回归方程,绘制出血清滴度-反应曲线。

二、结 果

1. 链霉素抗血清的血凝效价

5 只抗血清对链霉素致敏的红细胞均有不同程度的凝集作用(见表 1),说明其中均含有链霉素抗体。

表 1 链霉素抗血清的血凝效价

	血 清 号				
	1	2	3	4	5
效价	1:128	1:128	1:4	1:32	1:8

2. 链霉素抗血清的特异性

5 只抗血清抗原结合部位的特异性之结果见表 2。按 K_{SM}/K_B ,可将链霉素抗血清分为

三类:一类以 2 号血清为代表,其 $K_{SM}/K_B < 1$,表示该血清对二链霉胺的亲合力大于对链霉素的亲合力;二类以 3 号、4 号血清为代表, $K_{SM}/K_B > 1$ 表示该血清对链霉素较二链霉胺有较强烈的亲合力;第三类以 1 号、5 号血清为代表, K_{SM}/K_B 近似相等,说明它们对链霉素和二链霉胺的亲合力相似。

表 2 链霉素抗血清抗原结合部位的特异性

血清号	抗血清的 K_{SM}/K_B^*				
	1	2	3	4	5
第一次测定	1.018	0.260	2.726	2.268	0.932
第二次测定	1.158	0.471	6.909	1.484	0.845
第三次测定	1.365	0.585	4.658	1.677	1.147
平均值	1.180	0.438	4.764	1.810	0.975

* 一次测定结果(8 孔数据的平均值)

3. 链霉素抗血清的酶标效价比较

选用有代表性的 2 号、3 号链霉素血清,用 ELISA 法比较其效价(见表 3)。包被链霉素和包被 SM-TT 测得的每支血清的相对效价不同。在包被链霉素的板上,2 号、3 号血清的效价分别为 5^7 和 5^6 ,二者仅差 5 倍;但在包被 SM-TT 的板上,二者的效价分别为 5^9 和 5^6 ,相差了 125 倍。

表 3 ELISA 法比较特异性不同的链霉素抗血清的效价

血清号	K_{SM}/K_B	ELISA 效价	
		包被链霉素	包被 SM-TT
2	0.438	1:5 ⁷	1:5 ⁹
3	4.764	1:5 ⁶	1:5 ⁶

4. 间接血凝抑制试验

链霉素和二链霉胺对 2 号、3 号血清的抑制能力不同(见表 4)。链霉素对 3 号血清的抑制作用大于二链霉胺;而二链霉胺对 2 号血清的抑制作用大于链霉素。

5. 血清滴度-反应回归曲线

1 号、2 号、3 号血清的血清滴度-反应回归曲线见图 1。血清滴度的对数值和反应强度呈直线关系。三条直线的斜率(b)为 $b_3 > b_1 > b_2$ 说明 3 号血清和包被链霉素的作用随

表4 间接血凝抑制试验比较半抗原对特异性不同的链霉素抗血清的抑制作用

血清号	K_{SM}/K_B	稀释	抑制物	剂量(μg)	结果
2	0.438	1:4	链霉素	10 50	不抑制 不抑制
			二链霉素	10 50	抑制 抑制
3	4.764	1:2	链霉素	10 50	抑制 抑制
			二链霉素	10 50	不抑制 不抑制

浓度变化最大,2号血清的变化最小。

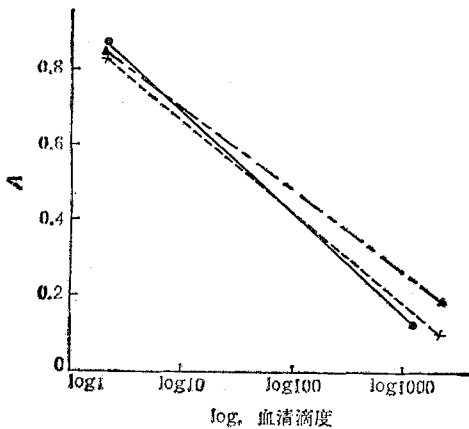


图1 链霉素抗血清的滴度-反应回归曲线

- ×---×: 1号血清 $b = -0.2491$ $r = 0.9812$
 Δ — Δ : 2号血清 $b = -0.2241$ $r = 0.9889$
 $\bullet$ — $\bullet$: 3号血清 $b = -0.2733$ $r = 0.9913$

三、讨 论

根据对链霉素抗血清中抗原结合部位表观特异性的分析,我们认为抗链霉素抗体至少可分为二类:一类对链霉素有较强的亲和力($K_{SM}/K_B > 1$);一类对二链霉素有较强的亲和力($K_{SM}/K_B < 1$)。若 $K_{SM}/K_B > 1$ 类抗体在抗血清中占优势,抗血清的表观特异性为 $K_{SM}/K_B > 1$,如3号、4号血清、若 $K_{SM}/K_B < 1$ 类抗体在抗血清中占优势,抗血清表现出 $K_{SM}/K_B < 1$ 之特性,如2号血清;若二类抗体的比例相近,则抗血清的 K_{SM}/K_B 约等于1,如1号、5号血清。

通常认为链霉素以其醛基和蛋白质的氨基

以 Schiff 碱结构结合^[3,4]。链霉素蛋白结合物之结构和二链霉素的结构更接近^[3]。所以用 ELISA 法测定链霉素抗血清的效价时, $K_{SM}/K_B > 1$ 的3号血清在包被链霉素板上表现出相对较高的效价,而 $K_{SM}/K_B < 1$ 的2号血清在包被 SM-TT 板上表现出相对较高的效价。

间接血凝抑制试验的结果说明,2号血清对二链霉素有较高的亲和力,故少量二链霉素就可抑制由它引起的凝集反应;3号血清对链霉素有较高的亲和力,低剂量链霉素就能抑制由它引起的凝集反应。

根据质量作用定律, $[AgAb] = K[Ag][Ab]$ 。当酶标板中包被等量的抗原时,

$$[AgAb] = c[Ab],$$

c 为常数和 K 呈正相关, $\Delta[AgAb] = c\Delta[Ab]$ 。可见抗原抗体复合物变化的速率和抗体对抗原的亲和力呈正相关。在剂量-反应曲线中, c 以斜率的形式表现。1号、2号、3号血清的血清滴度-反应回归曲线的斜率为 $b_3 > b_1 > b_2$,说明3号血清和包被链霉素的亲和力最强;2号血清最弱,1号血清居中。这亦和 K_{SM}/K_B 所得的结果相符合。

上述实验说明链霉素抗体抗原结合部位的特异性直接影响链霉素抗原-抗体间的反应。同时也说明了 ELISA 法分析抗血清特异性的正确性。

ELISA 法分析抗体抗原结合部位的特异性,方法简单,结果可靠,不仅可以测定链霉素抗体,如果选择合适抑制半抗原即可对其它抗体进行测定。以 K_1/K_2 为指标定量描述某一抗体抗原结合部位的特异性,对表征该抗体的特征,研究抗原-抗体反应的规律,有着重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Rose, Noel R. et al.: *Principles of immunology*, Macmillan publishing Co. INC., New York, P. 107, 1979.
- [2] Nishida, K. et al.: *Immunochemistry*, 1972 9, 1195.
- [3] 赵建西等:《药学报》, 1981, 16(1), 31.
- [4] 赵秀文等:《抗生素》, 1980, 5(6), 30.

[本文于1988年9月3日收到]