

生物素亲合素的免疫化学

李 成 文

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

提 要

生物素-亲合素系统的免疫化学及与之相关的技术,已逐渐完善,其应用日益广泛。它几乎同当代所有的标记物质相结合,形成了八十年代敏感特异的标记技术。同时,国外早已有齐全的试剂出售,国内也开始有几种试剂盒提供。当前,这一技术已成为医学和生物学等基础学科中,较有发展前景的技术之一。

关键词 生物素,亲合素,链亲合素,免疫化学

生物素同亲合素这对具有高度亲合力的物质,自七十年代以来被引入免疫化学之后,形成了较有发展前途的生物素-亲合素系统(Biotin-Avidin System, BAS)。出现了一系列的所谓八十年代免疫化学标记技术,其主要进展如下。

一、生物素与亲合素的生物化学

1. 生物素 生物素是生化界早已熟知的常以羧化酶形式存在的维生素之一,其分子结构、理化性质都较清楚。随着它在免疫化学上广泛与深入的应用,对其结构也得到了更细致的研究。生物素分子中有两个环状结构,其中 I 环为咪唑酮环,是亲合素结合的主要部位; II 环为噻吩环, C₂ 上有一戊酸侧链,末端羧基是结合抗体和其它酶蛋白的唯一结构(见图 1)。

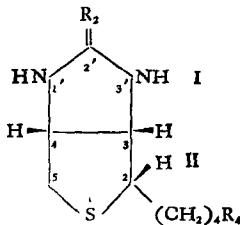


图 1 生物素的结构式
R₂ = O R₄ = COOH

C₂ 侧链有 α、β 二型, α-型在卵黄中, β-型

在肝组织中。生物素分子上的 R₂ 和 R₄ 基团,可被其它基团所取代,利用生物素分子的衍生物,除研究其分子的立体化学和它同亲合素及其它物质相结合的关系等外,研究更多的则是生物素与亲合素复合物的稳定性和光学特征,生物素分子的活化及同各种蛋白、糖基和 DNA 的结合方法等。

2. 亲合素 亲合素是一种对生物素具有高度亲合力(10¹⁵L/mol)的小分子量的碱性糖蛋白,它有抗生素或卵白素、链霉亲合素和卵黄亲合素(或类亲合素)之分。每种亲合素的分子内都是由二硫键相连成四个亚基组成。Chai^[1]和 De-Lange^[2]等先后测定了亲合素(Avidin)和链霉亲合素(Streptavidin)的亚基氨基酸组成和序列,并了解到每个亚基结合一个生物素分子,即每个亲合素分子可与四个生物素分子结合。

Chairt^[3]等在链球菌(S. S. Avidinil, ATCC27419)的培养液中发现类亲合素(Avidin-like),对生物素有特异的高度亲合力,对革兰氏阴性菌有抑菌作用,后称为链霉亲合素,也叫抗生蛋白链菌素。它是一个不含糖基、亚基共有 130 个氨基酸残基构成, ε₂₈₀ (亚单位)为 56000, E₂₈₀ (1%) 为 34。Edward 等^[4]详细研究了 Streptavidin 菌株的生产周期,用亲合层

析法可从 10 升培养液中获得 400 mg 纯的链霉亲合素。

Meslar^[5] 首先从卵黄中分离出结合生物素蛋白 (Biotin-binding protein, BBP), 也称维生素载体。该蛋白在低离子浓度溶液中不稳定, 低温下可稳定几个月, 分子也是一个四聚体构成。

亲合素蛋白的最大吸收波长为 280nm, 但与生物素结合后则移至 233 nm, 利用这一光学特征, 可作为亲合素与生物素结合后的测定指标。

二、生物素与亲合素的标记技术

生物素与亲合素的标记技术是 BAS 的关键, 它包括有:

1. 生物素的活化及其结合物

据文献报道, 按生物素活化后结合功能的不同可分为: (1) 同蛋白质的氨基相结合的羧基琥珀酰亚胺酯-生物素^[6]和生物胞素^[7], (2) 与蛋白质的巯基特异结合的有马来酰亚胺生物素等, (3) 同 DNA 或糖基能结合的有胍化生物素^[8]和光生物素, 以及其它活化臂的生物素等。上述的生物素活化物, 目前即有成熟方法介绍, 也有产品出售^[9]。

2. 亲合素及其标记物

就目前所知, 所有用于标记的物质几乎都可以同亲合素结合, 从小分子的 H³ 和 I¹²⁵、胶体金、荧光素和化学发光物质等, 大分子物质有铁蛋白、荧光蛋白和各种酶类。其中应用广而又较敏感的有异硫氰酸荧光素 (FITC)^[10] 标记亲合素, 15nm 胶体金标记^[11]和酶标记, 所用的酶类主要有辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶和 β-半乳糖苷酶等。

此外, 由于被测物质含有内源性生物素或亲合素, 则引起不易克服的非特异干扰。因而出现了抗生物素与抗亲合素及其标记物的技术, 从而建立了相应的应用方法。1985 年 Ashorn^[12] 等还制成了抗亲合素的单克隆抗体, 提供了更加特异而敏感的试剂。

三、BAS 染色法及其应用

1. BAS 染色法 有酶标生物素、酶标(及其它物标记)亲合素法, 抗生物素与抗亲合素抗体标记法。其方法的反应层次见表 1 和 2。

表 1 生物素亲合素系统测定方法及反应层次

方 法	反 应 层 次
直接法	BA Ag-(Ab-B)-A*
	BAB Ag-(Ab-B)-A-B*
	ABC Ag-(Ab-B)-AB*C
间接法	BA Ag-Ab ₁ -(Ab ₂ -B)-A*
	BAB Ag-Ab ₁ -(Ab ₂ -B)-A-B*
	ABC Ag-Ab ₁ -(Ab ₂ -B)-AB*C

注: A: Avidin 亲合素, B: Biotin 生物素, A*: 酶标亲合素 B*: 酶标记生物素, Ab: Antibody 抗体, Ab₁, Ab₂ 分别为第一抗体和第二抗体 Ab-B 与 Ab₂-B₂ 分别为生物素化抗体和生物素化第二抗体。Ag: Antigen 抗原。

表 2 抗生物素与抗亲合素抗体及其标记物的方法

方 法	反 应 层 次
直接法	(B-Ab) Ag-(Ab-B)-抗 B*
	(A-Ab) Ag-(Ab-B)-A-抗 A*
间接法	(B-Ab) Ag-(Ab-B)-抗 B-Ab ₂ *
	(A-Ab) Ag-(Ab-B)-A-抗 A-Ab ₂ *

注: (B-Ab) 和 (A-Ab) 分别为抗生物素和抗亲合素抗体; 抗 B* 和抗 A*: 分别为抗生物素与抗亲合素的标记抗体; Ab₂*: 为第二抗体的标记抗体。

2. BAS 染色法的优点

(1) 特异性强, BAS 染色法中的生物素化分子及亲合素的标记物中, 各个成分都保持其原有的化学与生物学活性。

(2) 灵敏度高, BAS 的所有方法的灵敏度都在 ng 水平, 生物素化 DNA 探针的测定方法可达 1—5 pg DNA 的含量^[13], 基本上同放射性 P³²-DNA 探针的测定水平。

(3) 稳定性好, 由于生物素与亲合素的亲合力高, 而结合后复合物的解离常数小, 呈不可逆反应, 对一般试剂和环境因素不敏感, 其产物能保持高度的稳定性。

(4) 测定方法多, 由于可制成多种的生物素化物质, 以及采用各种显示物标记亲合素, 因而目前常用而又敏感的免疫标记法, 都可以同

BAS 联结起来,组成各种测定与观察方法。

(5) 操作简便,节省试剂, BAS 的所有方法都不需要特殊设备,观察结果也可视不同实验室的条件进行。BAS 中的多种试剂,像生物素化第二抗体,酶标亲合素和 ABC 等,即可高度稀释,又都是通用试剂。

3. BAS 技术的应用

BAS 技术的建立虽时间不算太长,但发展迅速,应用广泛。就目前来看,几乎覆盖了整个医学和生物学的各个学科,包括:

(1) 用于对抗原、抗体、酶和受体的分离纯化,据报道,除利用抗生物素和抗亲合素抗体制成相应的免疫吸附剂,分别纯化亲合素和生物素之外。生物素与生物胞素-琼脂糖珠吸附剂已有产品出售。其他像卵黄结合生物素蛋白,抗生蛋白链菌素、胰岛素受体等的纯化均取得良好效果。

(2) 抗原、抗体、受体和激素等定性、定量或定位测定

对于上述几种物质的定性或定位,主要用于免疫病理、组织化学及微生物学等方面的实验。定量测定则对于抗体、部分抗原或受体的含量。最近也有关于脑垂体激素、肾上腺皮质激素的测定,以及单克隆抗体筛选的报道。

(3) 生物素化 DNA 探针的应用

目前,生物素化 DNA 探针已初步地用于微生物学的临床实验诊断和流行病学调查。Yoshiho^[4] 先后建立了微量板法和硝酸纤维膜法,利用生物素化 DNA 探针及 β -半乳糖酶标记亲合素系统,定量测定乙肝病毒 DNA 的含

量,方法简便快速,仅 2 小时可报结果,其灵敏度也和 P^{32} 标记 DNA 探针法近似,二者均可测出 1—5pg 的 DNA。另外, Sethabutr 等^[5] 用生物素化的 17 kb *EcoRI* 探针,与对应的 52 株菌作菌落原位杂交,具有特异反应,而同 16 株非 *EcoRI* 菌都不起反应。

(4) BAS 技术的其它应用

除上述的应用以外,它还有多方面的应用。Della^[6] 用生物素化蛋白作为 Wester blots 的分子量标准。也有人介绍了生物素化瘤细胞,通过亲合素作桥,以促进杂交瘤细胞的生产。

参 考 文 献

- 1 Chaiet L *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1964; 1061
- 2 De-Lange R. J. *J Biol Chem*, 1970; 245: 907
- 3 Chairt L *et al.* *Antimicrob Ag Chemother*, 1963; 3: 28
- 4 Edward A *et al.* *J Biochem Biophys Methods*, 1986; 13: 103
- 5 Meslar H W *et al.* *J Biol Chem*, 1978; 253: 6979
- 6 Bonnard C *et al.* *Immunolabelling for electron microscopy*. Amsterdam: Elsevier Scientific publishers, 1984: 95
- 7 Bodanszky M, Fagan D. *J Amer Chem Soc*, 1977; 99: 235
- 8 Reisfel A *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 142(2): 519
- 9 Sigma: *Immunochemicals, catalog*, 1988: 107
- 10 William A *et al.* *J Histochem*, 1988; 36: 145
- 11 Geohagam N D *et al.* *J Histochem Cytochem*, 1977; 25 (11): 1187
- 12 Ashorn R *et al.* *Comp Biochem Physiol (B)*, 1985; 92 (1): 123
- 13 Yoshiho Nagata *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1986; 868(1): 45
- 14 Yoshiho Nagata *et al.* *FEBS*, 1985; 183(2): 379
- 15 Sethabutr O *et al.* *Lancet*, 1985; 1095
- 16 Della P D *et al.* *Anal Biochem*, 1986; 152(2): 329

[本文于1988年11月7日收到]

(上接第32页)

浊而形成白内障。关于白内障形成的详细机理和过程还有待进一步研究。对晶状体内离子转运及其失调机理的深入探讨,将有助于对白内障全部生化机理的阐明。

参 考 文 献

- 1 Spector A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1984; 25: 130
- 2 Mathias R T *et al.* *Am J Physiol*, 1985; 249: 181
- 3 Iwata S *et al.* *Curr Eye Res*, 1984; 3(5): 717
- 4 Lin Leng, Yi Yang *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci*,

1989; 30(3): 194

- 5 Paterson C A *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983; 24: 1534
- 6 Kobatashi S *et al.* *Curr Eye Res*, 1982/1983; 2(5): 327
- 7 Garner M H *et al.* *J Bio Chem*, 1984; 259(12): 7712
- 8 Garner M H *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 103
- 9 Mizuno G R *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1981; 644: 1
- 10 Sen P C *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1982; 693: 34
- 11 Iwata S: *Curr Eye Res*, 1985; 4(3): 299
- 12 Iimuro A *et al.* *Ophthalmic Res*, 1987; 19: 95
- 13 Hightower K R *et al.* *Curr Eye Res*, 1982/1983; 2(4): 239

[本文于1988年6月30日收到]