

红细胞的凝集特征相同。但是，它们对 ConA 的反应性不一样，HL60 和 MLA 对 ConA 的反应性最大，其次是 Molt-4 和 L1210，再次是 K562，反应性最小的是人扁桃体细胞，结果示于表 2。

表 2 肿瘤细胞和人扁桃体细胞对 ConA 的反应性

| 细 胞    | 凝 集 力 |
|--------|-------|
| HL60   | 256   |
| L1210  | 128   |
| K562   | 64    |
| Molt-4 | 128   |
| MLA    | 256   |
| 人扁桃体细胞 | 32    |

### 3 讨 论

中性红染色的小鼠不同细胞和不同的肿瘤细胞以及人扁桃体细胞都能够用于凝集素的检测，这说明中性红染色法是可行的。

凝集活性检测时，需要完整分散的细胞。因

此，任何能够制备成完整分散的无色细胞，都有可能用中性红染色法进行凝集检测。

中性红染色的小鼠胸腺细胞、脾细胞和红细胞的凝集特征相同，提示这些细胞膜表面具有类似的结构。小鼠肝细胞和肾细胞的凝集特征与前述细胞的表现相反，可能是由于其组织起源不同所致。

对 ConA 的反应性肿瘤细胞大于人扁桃体细胞，提示肿瘤细胞对 ConA 的亲合力发生了变化，该结果与文献 [6] 报道一致。

本院科研处李治淮处长对本工作给予了大力支持和帮助，特此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 Nicolson GL. *Exp Cell Res*, 1984; 150: 3
- 2 Bur M, Franklin WA. *Am J Pathol*, 1985; 119: 279
- 3 Miyauchi T *et al. Gann*, 1982; 73: 581
- 4 Barondes SH. *TIBS*, 1988; 13: 480
- 5 Wang WC, Cummings RD. *Analy Biochem*, 1987; 161: 80
- 6 孙册. *中华医学杂志*, 1986; 10: 597

## 不受纤维蛋白溶酶原干扰的脂蛋白 (a) 酶联免疫吸附测定法

汪俊军 庄一义 朱建民 许平

(南京军区南京总医院全军医学检验中心生化科, 南京 210002)

### 提 要

实验证实脂蛋白 (a) 和纤维蛋白溶酶原之间具有免疫同源性，据此建立了不受 Pg 干扰的酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 Lp(a)。a. 根据 Lp(a) 含有 apo(a)、apoB 两种抗原位点，设计了抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apoB 法；b. 抗 apo(a) 经 Pg 亲和层析柱吸附处理后的抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apo(a) 法。同时以火箭电泳为参考，经比较后，方法间相关性良好。

**关键词** 脂蛋白 (a)，纤维蛋白溶酶原，酶联免疫吸附法，免疫同源性

脂蛋白 (a) [Lp(a)] 和低密度脂蛋白 (LDL) 结构相似，均含有载脂蛋白 B (apoB)，但 Lp(a) 还含有一个独特的 apo(a) 成分，通

过二硫键和 apoB 相连，apo(a) 的分子量从

280000 到 700000 不等<sup>[1,2]</sup>。已经证实 Lp(a) 是心、脑血管硬化性疾病的独立危险因素<sup>[3-5]</sup>最近报道 apo(a) 与纤维蛋白溶酶原 (Pg) 间结构非常相似, 都含有丝氨酸的蛋白酶区域及被称为“Kringle”的结构<sup>[6,7]</sup>。我们的实验证实了 apo(a) 与 Pg 间具有免疫交叉反应性, 并且建立了不受 Pg 干扰的酶联免疫吸附 (ELISA) 检测法。根据 Lp(a) 同时含有 apo(a)、apoB 两种不同抗原位点, 建立了抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apoB 双抗体夹心法; 经 Pg 亲和层析的抗 apo(a) 血清, 建立了抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apo(a) 双抗体夹心法, 并同火箭电泳法结果进行了比较, 方法间相关性良好。

## 1 材料和方法

**1.1 实验对象** 本院体检工厂、机关正常的工作人员。取早晨空腹血, 分离血清, -40℃ 冰箱保存。

**1.2 Lp(a) 和 LDL 的分离提取及抗血清制备<sup>[8,9]</sup>** 取高 Lp(a) 含量的新鲜血清, 用 Beckman L8-80M 制备型超速离心机提取密度为 1.055—1.110kg/L 的脂蛋白成分, 再经 Sepharose 6B 柱层析, 获得纯 Lp(a)。提取密度为 1.025—1.045kg/L 的脂蛋白成分为 LDL。以上产品均经 PAGE 电泳和免疫学鉴定为纯品, 分别免疫绵羊, 得到免疫血清。

用提取的 LDL 组分和硫酸葡聚糖-镁沉淀除去含 apoB 脂蛋白的血清成分 (含有足量 Pg), 制成 Sepharose 4B 免疫亲和层析柱纯化抗 Lp(a) 血清, 除去抗 apoB, 抗 Pg 及其他杂抗体, 获得纯抗 apo(a)。抗 LDL 血清无需处理。上述两种抗血清经免疫电泳和免疫双向扩散法鉴定均只与各自相应抗原产生专一沉淀线, 效价分别为 1:16, 1:512。

**1.3 Pg 及抗血清** 上海生物制品研究所产品。

**1.4 Lp(a), Pg 和抗 apo(a), 抗 Pg 相互之间的免疫反应性** Lp(a), Pg 用包被缓冲液 (0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液) 稀释成 50 μg/ml, 分别加入到国产的 40 孔聚苯乙烯

酶标微量比色板, 0.1 ml/孔, 37℃ 2h 后, 用洗涤液 (含 0.05% 吐温 20 的 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液) 洗 3 次; 每孔加封闭液 (含 10% 小牛血清的洗涤液) 0.1ml, 37℃ 1h 后, 洗涤 3 次; 加辣根过氧化物酶标记的抗 apo(a) 或抗 Pg (含 5% 小牛血清的洗涤液为稀释液稀释成不同倍数), 0.1ml/孔, 37℃ 2h 后, 洗涤 3 次; 加底物溶液 (邻苯二胺、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 0.1ml/孔, 37℃ 避光放置 15min, 每孔加 1mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1ml 终止反应; 用酶标仪 (华东电子管厂, DG3022) 于 490nm 处比色。

**1.5 ELISA 法检测 Lp(a)** 将抗 apo(a) IgG [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 盐析] 用包被液稀释成 24 μg/ml, 加到 40 孔聚苯乙烯反应板中, 0.1 ml/孔, 37℃ 2h 后, 放置 4℃ 过夜, 洗涤 3 次; 加 1:2000 稀释的被检样品、倍比稀释的标准液或空白管 (稀释液), 0.1ml/孔, 37℃ 2h 后, 洗涤 3 次; 加入 1:4000 的辣根过氧化物酶标记的抗 apoB 或 1:6000 的酶标抗 apo(a), 0.1ml/孔, 37℃ 2h 后, 洗涤 3 次; 每孔加 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1ml 终止反应; 即刻用酶标仪于 490nm 处比色, 建立标准曲线 (图 1), 根据测定管吸光度在标准曲线上查出相应样品的 Lp(a) 含量。

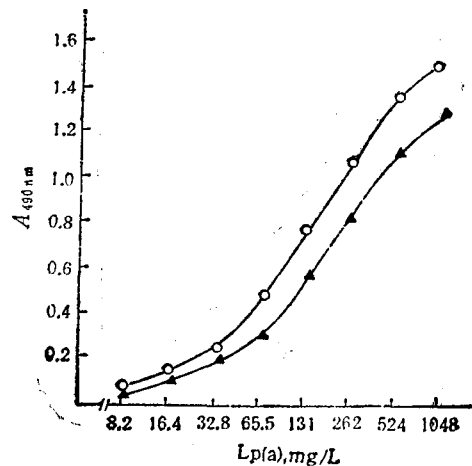


图 1 标准曲线  
○ 为 HRP-抗 apo(a); ▲ 为 HRP-抗 apoB

**1.6 火箭电泳** 0.8% 琼脂糖、pH8.2, 离子强度为 0.025, 2% 聚乙二醇、巴比妥缓冲液

10ml 加热溶解后, 当温度为 50—56℃ 时加入 40 $\mu$ l 抗 apo(a) 铺板, 打孔后加样品及系列标准各 6 $\mu$ l, 7V/cm 下电泳 9h, 测量峰高, 绘制标准曲线并查得样品的 Lp(a) 含量。

**1.7 Lp(a) 标准** IMMUNO AG Vienna 公司产品(冻干血清)为第一标准; 自制第二标准, 取混合的高 Lp(a) 献血员血清, 加入 EDTA, NaN<sub>3</sub> 和蛋白水解抑制剂, 过滤后定量分装冻干, 每瓶加 1ml 蒸馏水复溶, 经多次的 ELISA 法定值为 423mg/L, -40℃ 保存。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Lp(a), Pg 及其抗体间的交叉反应性

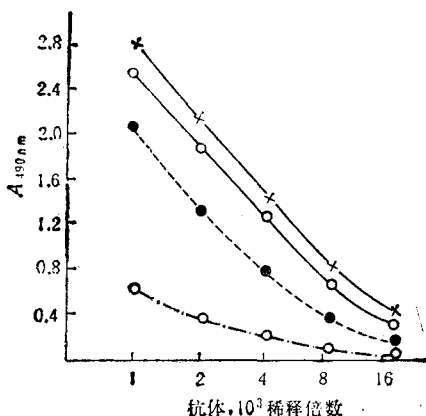


图2 免疫反应性比较

×——×:Pg 包被, HRP-抗 Pg;  
 ○——○:Lp(a) 包被, HRP-抗 apo(a);  
 ●——●:Lp(a) 包被, HRP-抗 Pg;  
 ○——○:Pg 包被, HRP-抗 apo(a)

从图 2 中可见, Lp(a), Pg 同各自抗体间有较强的免疫反应, 但 Lp(a) 和抗 Pg, Pg 和抗 apo(a) 间也存在免疫反应, 其大小不一致。Lp(a), Pg 及其抗体间存在这种免疫交叉反应性, 说明它们之间存在相同的抗原决定簇结构, 而 apoB 与 Pg 间无交叉反应, 这就证实了 apo(a), Pg 间具有免疫同源性。据文献资料报道 Pg 是一种丝氨酸蛋白酶原, 含有 791 个氨基酸残基, 其结构中有 5 个富含半胱氨酸的序列, 每个序列由 80—114 个氨基酸残基组成, 其中含有 3 个内部二硫键, 此结构分别被称为 kri-

ngle1—5。Apo(a) 氨基酸系列分析已表明含有 37 个 kringle4, 1 个 kringle 5 结构<sup>[6,7]</sup>; 而 Pg 仅含有 1 个 kringle4 和 1 个 kringle 5 结构<sup>[6,7]</sup>; 所以 Lp(a) 同抗 Pg 间有较强的反应性; 而 Pg 与抗 apo(a) 间的反应性较弱。据此我们设计了两种除去 Pg 干扰的 Lp(a) ELISA 测定法: a. Lp(a) 含有 apo(a), apoB 两种不同抗原位点, 而 apoB 与 Pg 无交叉反应, 建立了抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apoB 法; b. 用 Pg 亲和层析柱处理抗 apo(a) 除去 apo(a), Pg 相同结构 (kringle 4, 5) 所对应的抗体成分, 建立了抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apo(a) 法。

### 2.2 实验方法的考核

**2.2.1 特异性测定:** 酶标抗 apo(a) ELISA 法, 当 Pg 含量为 1500mg/L 时, 稀释 2000 倍 (标本亦同), 显色后吸光度 < 0.18, 查标准曲线(图 1) 相当于 Lp(a) < 20mg/L, 正常人 Pg 含量  $\bar{X} \pm SD$  为  $219 \pm 27$  mg/L ( $n = 77$ )<sup>[10]</sup>, 即使在病理情况下 (Pg < 350mg/L), 干扰仍小于 5%。

酶标抗 apoB ELISA 法, 因 Pg 和 apoB 无结构相似之处, 故不能同酶标抗 apoB 结合, 无干扰作用。

在一混合血清中分别加入 apoA1, AII, B, CI, CII, CIII 及 apoE (北京老年医学研究所提供) 和白蛋白纯品, 血清对照管加入等量稀释液, 以两种 ELISA 法分别测定各管 Lp(a) 含量, 干扰小于 8%。故本文建立的两种 ELISA 法均有高度特异性。

**2.2.2 精密度:** 取 Lp(a) 含量高低不同的三份样品, 用酶标抗 apoB 法和酶标抗 apo(a) 法分别各测 10 次, 观察本法精密度。批内平均变异系数 (CV%) 分别为 5.7%, 5.2%; 批间平均 CV% 分别为 8.3%, 7.7%。

**2.2.3 灵敏度:** 两种 ELISA 法均可检测出 0.4—50ng/孔的 Lp(a) 量, 样本稀释 2000 倍时, 对应于人血清中 8—1000mg/L 的 Lp(a) 水平。

### 2.3 三种方法测定结果比较

表1 三种方法测定正常人 Lp(a) 的均值,标准差(n=140)

|     | 火箭电泳    | 酶标抗 apo(a)法 | 酶标抗 apoB 法 |
|-----|---------|-------------|------------|
| 均值  | 171mg/L | 156mg/L     | 122mg/L    |
| 标准差 | 159mg/L | 138mg/L     | 110mg/L    |

表2 三种方法间回归方程、相关系数

| 方 法                         | 回归方程               | 相关系数 |
|-----------------------------|--------------------|------|
| 酶标抗 apo(a) 法对<br>火箭电泳       | $y = 0.75x + 31.7$ | 0.86 |
| 酶标抗 apoB 法对<br>火箭电泳         | $y = 0.70x + 2.6$  | 0.93 |
| 酶标抗 apoB 法对<br>酶标抗 apo(a) 法 | $y = 0.72x + 11.4$ | 0.86 |

从表1,2可见,3种方法测定结果相关良好,相关系数为0.86—0.93;酶标抗 apoB 法较酶标抗 apo(a) 法结果偏低,可能的原因有:  
a. 游离的 apo(a) 因不含有 apoB 位点,此法不能检测出。b. 因 Lp(a) 抗血清纯化前含有大量的抗 apoB, 抗 Pg, 抗 HDL 等杂抗体,经亲和层析柱吸附后还会含有极微量杂抗体,对于酶标抗 apo(a) 法,因包被、酶标记抗体一致,多种杂抗体会引起微量干扰;而酶标抗 apoB 法,酶标抗体为较纯的抗 apoB, 所以能消除干扰。火箭电泳结果较高于 ELISA 法,原因主要是我们应用的 Lp(a) 标准为冻干血清,在电泳行为上与新鲜血清有差异;同时方法间也可

能存在差异。Kostner 采用经 Pg 吸附处理过的抗 apo(a) 建立的抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apo(a) 法,使用 IMMUNO AG 公司的 Lp(a) 定值血清,同我们方法测定的正常值非常吻合,均值为 157mg/L<sup>[11]</sup>; Fless 建立的抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apoB 法,其结果以 Lp(a) 中蛋白质含量表示  $\bar{X} \pm SD$  为  $32.0 \pm 34.3$  mg/L,乘以 3.7 (Lp(a) 中蛋白质含量以 27% 计) 结果与本文相应方法相近<sup>[12]</sup>。

由于不同方法间具有良好的相关性,因此只要建立各自方法的参考值,均适用于临床应用。

## 参 考 文 献

- 1 Gaubatz J W *et al.* *J Bio Chem*, 1983; 258: 4582
- 2 Fless G M *et al.* *Jr Lipid Res*, 1985; 26: 1224.
- 3 Jügens G *et al.* *Neurology*, 1987; 37: 513
- 4 Hoefler G *et al.* *Arteriosclerosis*, 1988; 8: 398
- 5 Mclean J W *et al.* *Nature*, 1987; 330: 132
- 6 Karadi I, Kostner G M. *Biochim Biophys Acta*, 1988; 960: 91
- 7 Eaton D L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 3224
- 8 许平等. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17(3): 216
- 9 黎健等. 中华医学检验杂志, 1987; 10(4): 198
- 10 刘红等. 临床检验杂志, 1989; 7(4): 190
- 11 Kostner G M *et al.* *Clin Chim Acta*, 1990; 188: 193
- 12 Fless G M *et al.* *J Lipid Res*, 1989; 30: 651

## 《全国自然科学期刊便览》出版

为方便广大自然科学工作者订购、查询、投稿以及学术交流的需要,《全国自然科学期刊便览》将向您展示全国 1400 多家自然科学期刊、杂志的名称、主办单位、通讯地址、邮政编码、统一刊号、电话、主编、副主编姓名、主要栏目以及订购事宜等。全书 420 页(压膜封面),单价 5.20 元(邮资另加 0.80 元)。便览一书的特点是:体积小、内容新、准确、简明、方便、实用。预购

者可汇款:大连海军政治学院图书馆陈志安,邮政编码:116001。银行汇款:大连海军政治学院。帐号:030-08700375(注明《便览》书款)。开户行:大连工商银行青泥洼桥办事处。

《全国社会科学期刊便览》定价 4.40 元(邮资另加 0.60 元)。《中国医学卫生期刊便览》定价 4.00 元(邮资另加 0.60 元)。现已出版,欢迎订购,地址同上。