

经验交流

共价连接的多肽酶联免疫测定法的研究

何涛¹⁾ 陈曼玲

(华西医科大学基础医学院, 成都 610041)

摘要 采用紫外线照射及戊二醛活化处理聚苯乙烯酶标板后再包被八肽胆囊收缩素 (CCK-8), 以此为基础进行酶联免疫吸附试验 (ELISA), 通过不同的洗涤过程对 CCK-8 与酶标板相互作用的性质进行研究. 结果表明, 该包被方法可使 CCK-8 通过共价交联的方式稳定地结合于固相载体上, 该方法适用于不同来源的酶标板, 处理后的酶标板性质稳定, 可储存使用, 测定的批内及批间变异系数分别为 4.75% 和 7.80%, 方法稳定可靠, 重复性好, 便于推广应用.

关键词 多肽, 共价连接, 酶联免疫测定法, 胆囊收缩素

学科分类号 R392-33

多肽酶联免疫测定法的建立对于肽类物质含量的测定、抗血清效价的检测以及抗原表位的分析等研究具有重要的意义. 本文在已建立八肽胆囊收缩素 (octapeptide cholecystokinin, CCK-8) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 的基础上^[1], 进一步深入探讨其机理, 以期为该方法的完善和应用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

CCK-8 标准品: 硫酸化型, Sigma 公司生产; 兔抗 CCK-8 抗血清: 用纯化的猪脑组织 CCK-8 与牛血清白蛋白偶联后免疫家兔制备; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (HRP-IgG): 华西医科大学基础生化载脂蛋白研究室提供; 25% 戊二醛: AR, Sigma 公司生产; 乙醇胺: AR, 上海试剂三厂生产. 其余试剂均为国产分析纯. 包被缓冲液为 pH 9.6, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (内含 0.02% NaN₃); 洗涤液为 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, 含 0.05% 吐温-20); 底物液为含 0.04% 邻苯二胺, 0.15% H₂O₂ 的 pH 5.6, 0.01 mol/L 柠檬酸磷酸盐缓冲液; 终止液为 2 mol/L 硫酸. 聚苯乙烯酶标板 (55 孔, 四川分析仪器厂生产). DG3022 型酶联免疫检测仪 (国营华东电子管厂生产).

1.2 方法

1.2.1 抗原包被: 聚苯乙烯酶标板先经紫外线照射后, 再将含有 0.025% 戊二醛的 PBS 加入酶标板

中, 反应数小时, 洗涤, 干燥, 逐孔加入 CCK-8 溶液 (10 mg/L, 100 μ l/孔), 室温放置过夜, 洗涤液洗涤, 备用.

1.2.2 酶联免疫吸附试验: 上述方法包被的酶标板, 用 0.33 mol/L 的乙醇胺溶液封闭处理后, 逐孔加入兔抗 CCK-8 抗血清, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 洗涤液洗涤 3 次, 3 min/次, 以未免疫的兔血清为空白对照. 然后加入 HRP-IgG (1:4000 稀释), 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 3 h, 按上法洗涤. 逐孔加入新鲜配置的底物液 (100 μ l/孔), 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后, 用终止液 (50 μ l/孔) 终止反应, 在酶标仪上 ($\lambda=490$ nm) 读取光密度值.

1.2.3 CCK-8 与酶标板相互作用性质的研究: 酶标板经 0.025% 戊二醛 (Glu) 活化、紫外线 (UV) 照射及二者联合采用并包被抗原后, 分别用重蒸水、含吐温的 PBS (PBS-T)、5% 的十二烷基磺酸钠 (SDS) 水溶液进行充分洗涤, 然后按上述 ELISA 程序操作.

2 结果

2.1 CCK-8 与固相载体相互作用性质的研究

结果如图 1 所示: 图 1 中用重蒸水及 PBS-T 洗涤之结果代表了总的结合, 而用较大浓度的强阴离子去污剂 SDS 洗涤之结果代表了抗原肽与固相

¹⁾ 华西医科大学基础医学院生物化学教研室, 成都 610041.

收稿日期: 1998-10-19, 修回日期: 1999-02-05

载体间的共价结合. 戊二醛活化后 CCK-8 的总结合及共价结合均增加, 且以后者为主要成分, 说明此种活化作用主要增加了 CCK-8 与聚苯乙烯载体间的共价连接作用. 单独使用紫外线处理, 虽然增加总结合, 但共价结合的增加不如戊二醛显著, 而联合采用紫外线照射及戊二醛活化则具有累积效应.

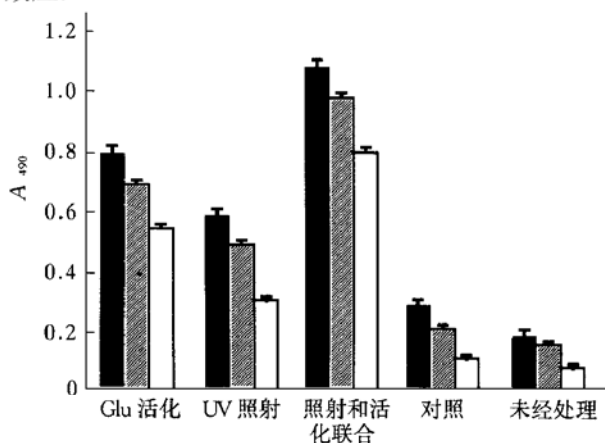


图 1 紫外线照射及戊二醛活化后 CCK-8 与酶标板结合性质的研究

■: 重蒸水洗涤; ▨: PBS-T 洗涤; □: SDS 洗涤.
 $\bar{x} \pm s, n=3$.

2.2 重复性及稳定性试验

该酶联免疫反应进行批内及批间测定, 其变异系数分别为 4.75%、7.80%.

酶标板经紫外线及戊二醛处理后密封保存, 放置 1~4 个星期, ELISA 结果表明, 其共价结合多肽的能力不受影响, 说明该法处理的酶标板具有良好的稳定性, 可批量处理及储存使用. 经此法处理的酶标板包被抗原后放置 3 个月内保持其免疫反应性不变.

2.3 不同种类酶标板的测试

用不同的聚苯乙烯酶标板 (55 孔, 四川分析仪器厂; 40 孔, 湖北黄岩; 96 孔, Nunc, Dynatech, Sigma 公司) 进行上述 ELISA 试验, 可得到相似的实验结果, 表明该方法适用于不同来源的酶标板.

3 讨论

多肽尤其是短肽由于其分子小, 分子中缺乏疏水区且含较少的反应基团, 导致其与固相载体如聚苯乙烯塑料间的相互作用力 (通常为范德华力及疏水键^[2]) 很弱, 因而很难稳定地结合在这类载体上, 且由于小分子肽与抗体结合易发生的空间位阻

及与抗体结合的“单价”特性, 使得传统的被动吸附及双抗夹心的 ELISA 难于应用于这类物质. 建立适合于多肽的酶联免疫测定法已成为急待解决的问题. 我们曾报道了通过活化聚苯乙烯酶标板使小分子肽 (CCK-8) 包被于固相载体上, 再进行 ELISA 测定的方法. 结果表明: 传统的被动吸附不能使 CCK-8 有效地包被, 而采用紫外线照射及戊二醛活化处理酶标板后再进行包被的方法则可使 CCK-8 牢固地吸附于固相载体上, 并且不影响 CCK-8 的免疫反应性. 本研究在此基础上对这一方法的机理、稳定性等作了进一步的探索.

从实验结果可看出, CCK-8 主要通过共价连接的方式结合于聚苯乙烯固相载体上. 这种交联作用的机理为: 戊二醛分子两端各具有一个活性的醛基, 在一定的条件下其一端的醛基可与酶标板中的聚苯乙烯反应而固定在酶标板表面. 抗原包被时, 戊二醛分子中另一端的醛基再与抗原分子中的氨基发生共价交联从而使抗原分子牢固地结合于载体表面. 且戊二醛分子本身具有一定的长度, 在抗原分子与固相载体的连接中可以起到一“桥接臂”的作用, 使得小分子抗原肽易与抗体作用. 此外由于戊二醛只与抗原分子中的特定基团反应, 因而就保证了抗原分子在固相载体上具有较好的空间定位及其定位的一致性, 可提高检测的效率. 为消除酶标板经戊二醛活化后未被抗原结合的游离醛基所造成的非特异性结合, 须进行包被后封闭处理, 本研究采用了乙醇胺作为封闭剂, 由于其分子小, 化学性能稳定, 且价廉, 故为一较理想的封闭剂. 另一方面在有空气存在的条件下, 紫外线辐射产生的单线态氧使聚苯乙烯发生开环氧化作用并形成具有化学反应性的己二烯二醛, 同时在光氧化的过程中, 聚苯乙烯碳链上也可产生多烯结构, 这些由紫外线诱导的过氧化反应基团可以使多肽牢固地结合在固相载体表面^[3]. 基于戊二醛及紫外线可通过不同的途径提高聚苯乙烯酶标板的反应性及对抗原的吸附能力, 本研究将以上两种方法联合使用, 结果表明二者的协同作用又可进一步增加 CCK-8 在固相载体上的吸附. 该方法的特点为抗原分子与载体的共价连接, 该交联方法目前尚未见其他作者报道.

该方法的重复性及稳定性试验结果显示, 由于抗原肽能牢固地共价连接于固相载体表面, 减少 ELISA 各洗涤及温育过程中抗原及抗原-抗体复合