

羊抗人 IgG 和出血热单抗(E_s)在 辐射改性的硅橡胶膜上固定化研究

高金辉 哈鸿飞 张钰华

(北京大学技术物理系, 北京)

摘要 本文用 γ 辐射技术, 在硅橡胶膜(Silastic)上接枝丙烯酸胺单体(AAM), 用不同接枝率的 Silastic-AAM 膜通过叠氮化后对羊抗人 IgG 和出血热单克隆抗体(E_s)进行了偶联固定化。同位素 ^{125} 碘标记方法对固定在 Silastic-AAM 膜上的羊抗人 IgG 量与接枝率的关系, 以及抗体量与其免疫活性的关系进行了测定, 得到了适于固定化的抗体偶联反应液最适浓度和最佳接枝率范围; 用 ELISA 法对 Silastic-AAM 膜固定化的出血热(E_s)单抗进行了免疫活性实验, 得到了在某一实验条件下具有明显的阳性反应。结果表明, 经适当改进, 本法对临床诊断有一定应用价值。

关键词 辐射接枝, 固定化, ^{125} I 标记, ELISA 法, 羊抗人 IgG, 出血热单克隆抗体 (E_s), 免疫活性

引 言

生物活性物质(酶、抗体、细胞以及各种药物等)的固定化技术, 一方面应用于生物化学过程, 如利用固定化酶、酵母等进行各种酶促反应和发酵过程; 另一方面是应用于生物医学上, 利用固定化酶、药物、抗体及组织细胞等制备慢释放药物, 进行免疫分析等^[1,2]。

利用辐射技术进行生物活性物质的固定化, 方法简单, 且不引入任何化学杂质, 产物纯净, 近年来发展较快, 已进入临床阶段^[3-5]。

单克隆抗体有很高的特异性, 可广泛应用于临床诊断和治疗。流行性出血热是我国常见病和多发病, 死亡率高, 将出血热单抗(E_s)固定在高分子膜上, 制成类似免疫“试纸”将有利于直接和快速临床诊断, 可能具有很高实用价值。

考虑到 γ 射线对多数生物活性物质的失活作用。本文采用先在硅橡胶膜上辐射接枝丙烯酸胺, 提供进一步固定化抗体的活化基团, 在整个固化过程中抗体不会受到辐射损伤。

本文通过 ELISA 法对 Silastic-AAM 膜上固定化出血热单克隆抗体(E_s)的条件, 进行了初步研究, 免疫活性实验表明, 这一固定化方法是可行的。因为单克隆抗体价格昂贵, 所以为探索固定化条件, 较多的实验是用多克隆抗体羊抗人 IgG 进行的。通过 ^{125} I 同位素标记法对羊抗人 IgG 的固定化量与膜上单体接枝率, 以及固定抗体量与其免疫活性的关系等进行了研究, 得到了单体接枝率、抗体固定化量、抗体偶联反应液浓度等因素的相互关系, 为提高单克隆抗体固定化条件提供了实验基础。经适当改进后, 本法有可能应用于临床诊断。

实 验 部 份

1. 材料与试剂

(1) 硅橡胶膜 美国 Dow corning 公司产, 厚 0.1 mm。先用非碱性肥皂液加热洗涤, 再用热水漂洗多次, 最后用蒸馏水浸泡过夜, 50℃真空干燥恒重后贮于保干器中备用, 用时剪成 $1 \times 2 \text{ cm}^2$ 长方形片。

(2) 丙烯酰胺 C.P 级, 购自中国医药公司北京采购供应站, 用丙酮重结晶三次。

(3) 抗体 羊抗人 IgG 诊断血清, 兰州生物制品所提供, 单向扩散稀释度 1:400。采用溴化氰活化琼脂糖法提纯。所用人血丙种球蛋白(γ 球蛋白)纯度不低于 96.5%, 上海生物制品所提供。人 IgG 球蛋白的提纯是采用硫酸铵沉淀法。以上提纯法详见文献[6]。

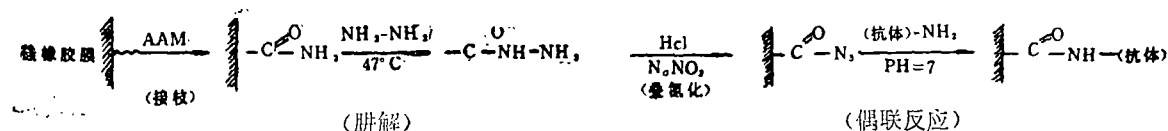
出血热单克隆抗体(E_6), 为出血热病毒(EHFV), 由预防医学科学院病毒所提供的, 用前再经 50%饱和度 $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 纯化一次。牛血清蛋白、酶标试剂亦为该所提供。

2. 实验步骤

(1) 羊抗人 IgG 及 γ 球蛋白 ^{125}I 标记法^[7] 标记 ^{125}I 为无载体 Na^{125}I 溶液, 总强度 $\sim 7.4 \times 10^8 \text{ Bq}$ (20 mCi)。先将医用同位素 Na^{125}I 用氧化剂氯化碘氧化成元素 ^{125}I (或正一价 ^{125}I), 元素碘易于与蛋白质 (及许多有机物) 发生碘化反应而得到碘标记蛋白质。反应体系中残余游离碘用葡聚糖凝胶 G-50 柱从蛋白质溶液中分离, 使标记蛋白质溶液纯化, 最后用 FH-408 自动定标器 (FT-603 井型 γ 闪烁探头) 测定标记物比放射性 (计数/mg 蛋白质)。标记率可达 70% 左右。

(2) AAM 在 Silastic 膜上的辐射接枝 硅橡胶膜与丙烯酰胺单体水溶液的辐射接枝共聚是在室温、氮气气氛下进行的, 剂量率为 4 kGy/h, 重量法计算接枝率 (%)。

(3) 抗体在接枝膜上的固定化^[8] 接枝丙烯酰胺的硅橡胶膜进一步叠氮化, 得到活性偶联基团, 然后在低温下与抗体发生偶联反应, 得到固化抗体的硅橡胶膜, 反应过程示意如下:



(4) 膜上抗体量、活力测定 固定化反应后经过清洗, 测定膜上放射性计数。方法是先用同上条件在膜上固定化未标记的抗体, 然后用 ^{125}I 标记的抗原与固定化抗体的膜进行免疫反应 (37℃ 恒温反应 1 h, 反应后用 PBS 缓冲液清洗)。反应后测定膜上放射性即可算出膜上抗体-抗原复合物量, 以此来代表固定化抗体的免疫活性。

(5) 固定化单抗活性的检测 用酶联免疫吸附分析法 (ELISA)。特异性抗原与固相单抗进行免疫反应, 然后加入同量酶标记的抗体 (4℃ 下反应 23 h) 反应前 37℃ 下用牛血清封闭 4 h, 反应后测定酶作用产物, 目测法定性判断反应程度, 从而检测固定化抗体活性。

结 果 与 讨 论

1. 辐射接枝反应条件对 Silastic-AAM 接枝率的影响

通过共辐射接枝的方法可以方便地在 Silastic 膜上接枝不同量的丙烯酰胺, 为下一步抗体的偶联固定化提供适量的活化基团。调整辐射剂量、剂量率、辐照温度、单体浓度以及阻聚剂 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 浓度等条件, 可以提供固定化抗体所需的接枝率 (见图 1—5)。在本实验中一般选用剂量

率为 4 kGy/h, 单体浓度为 20% (W/V), pH = 4.5, 室温, 阻聚剂浓度为 10^{-2} mol/L, 控制不同剂量可得到所需的接枝率。

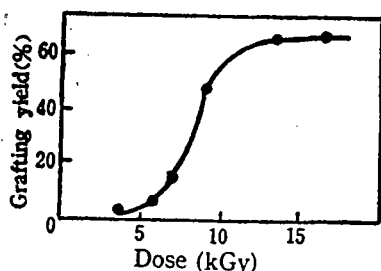


Fig 1. Grafting yield (%) as a function of dose.
Dose rate: 4 kGy/h, Concentration of monomer: 20%.

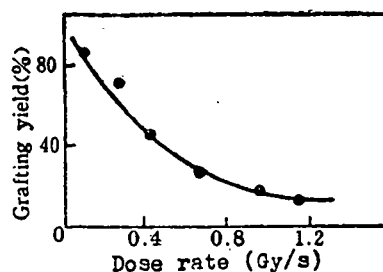


Fig 2. Effect of dose rate on grafting yield.
Total dose: 10 kGy, Concentration of monomer: 20%.

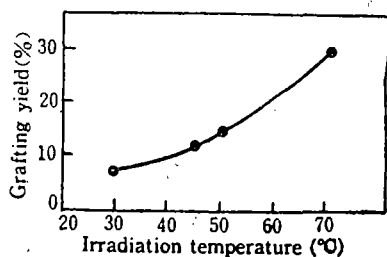


Fig 3. Effect of radiation temperature on grafting yield.
Total dose: 7 kGy, Dose rate: 4 kGy/h, Concentration of monomer: 20%.

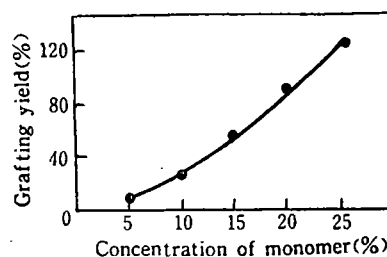


Fig 4. Effect of monomer concentration on grafting yield.
Total dose: 10.0 kGy, Dose rate: 0.43 kGy/h

2. 羊抗人 IgG 的固定化

先选择不同浓度的抗体溶液, 与一固定面积但不同接枝率的 Silastic-AAM 膜, 按上述实验部分的方法发生固定化作用(见图 5)。

从图 5 可以看出对于同一浓度的抗体溶液, 随着膜上接枝率的增加而使膜上抗体量不同程度的逐渐增加; 对于同一接枝率的膜, 要增加膜上蛋白质量, 更有效的办法是增加抗体溶液的浓度, 一般将蛋白质浓度选择在 2—3 mg/ml 即可, 不必过高。

免疫交叉反应是这样进行的, 先用同上的 Silastic-AAM 膜与未标记的抗体进行固定化反应, 从标记抗体的固定化实验结果可测定未标记抗体的固定化量。然后用 3 mg/ml 的鸡蛋清溶液封闭待测的固定化未标记的抗体膜, 以清除膜上多余的活性反应基团。最后与不同浓度的标记抗原在 37°C 恒温反应 1.5 h。交叉免疫反应后测定膜上放射性计数, 再由标记抗原的放射性比活度计算出反应抗体的量(见图 6)。

由图 6 可以看出抗体与抗原反应与抗原稀释度的比例有关。当抗原反应液浓度为 2.5 mg/ml 及 5.0 mg/ml 时, 出现了参加免疫反应的抗原量的最大峰值, 即该二种浓度时抗体—抗原反应最完全。抗原液浓度过低(如 1 mg/ml)或过高(如 10.0 mg/ml)均未出现明显峰值。所以, 选择适当浓度的抗原反应液才能获得最佳固定化抗体免疫活性。

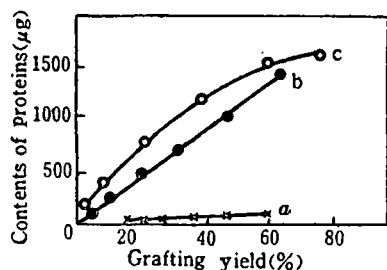


Fig 5. Contents of proteins (IgG) on the Silastic-AAM film as a function of their grafting yield.
Concentration of protein in solutions (mg/ml): (a) 0.94, (b) 2.5, (c) 10.5.

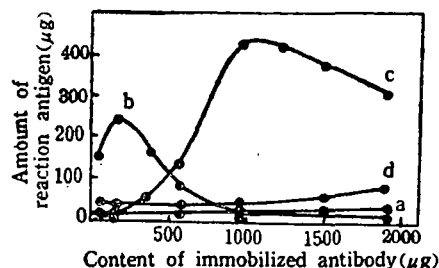


Fig 6. Curve for immunoacrossreaction of antibody-antigen.
Concentration of antigen (mg/ml): (a) 1.0, (b) 2.5, (c) 5.0, (d) 10.0.

理论上讲,一个人 IgG 抗体分子应能结合两个人 IgG 抗原分子,但由于人 IgG 抗体在固定化过程中受到固定化方法、反应条件、空间结构等因素的影响,其免疫活性会受到损伤,降低了对抗原的结合能力。但本实验通过对固定化后羊抗人 IgG 免疫活性测定,证明了用此法可以获得具有生物免疫性的固定化抗体膜,为具有临床诊断意义的单克隆抗体固定化打下了基础。

3. 出血热单抗(E_s)的固定化

将纯化的 E_s 和阴性对照的 JEV(乙型脑炎病毒)腹水配制成不同浓度的反应液,每份体积为 0.5 ml,在 4℃下与 Silastic-AAM 膜(面积 2.5×2.5 cm²)进行固定化反应 23 h,反应后固定化膜用 PBS 缓冲液充分洗涤,在冰箱中保存一天后,每份滴加 0.2 ml OPD 显色,目测判断反应程度,结果见表 1。

Tab 1. Results for immunoassay by using ELISA method

Associated antibody		Purid E _s			Negative contrast for JEV			Unassociated film
Concentration of association solution(mg/ml)		0.02	0.2	2.0	0.04	0.4	4.0	PBS
EHFV	1:50	-	++	+++	+	+	-	-
	1:100	-	-	++++	+	++	-	-
	1:1000	-	-	-	+	+	-	-
PBS		-	-	-	+	-	-	-

从表 1 可以看出,偶联液浓度为 2.0 mg/ml 的纯化 E_s 固定膜,在 EHFV 稀释度为 1:50 和 1:100 时有明显的阳性反应。因此,可以认为使用前述的实验方法对出血热单克隆抗体也是可行的,对偶联液浓度为 0.02 mg/ml 及 0.2 mg/ml 的抗体固定膜并未出现阳性反应,相反,阴性对照的 JEV 腹水却有假的弱阳性反应。这说明偶联后膜的非特异性吸附较强,尚需进一步实验,以求得最佳实验条件。

本工作为国际原子能机构(IAEA)资助项目,预防医学科学院陈伯权教授和李荔同志给予多方帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 袁中一等, 固相酶与亲和层析, 科学出版社, 1975年, 第3—21页。
[2] I. Kaetsu, M. Kumakura et al., Radiat. Phys. Chem., 27, 245 (1986).
[3] G. Wayoe, A. S. Hoffman et al., Radiat. Phys. Chem., 25, 549 (1985).
[4] I. Kaetsu, Radiat. Phys. Chem., 25, 517 (1985).
[5] J. P. Dessaint et al., Radiat. Phys. Chem., 27, 297 (1986).
[6] 王世中主编, 免疫化学技术, 科学出版社, 1980年, 第34—39页。
[7] D. J. Hnatowich, Current Applications in Radiopharmacology Proceeding of the Fouth International Symposium on Radiopharmacology Pergamon Press, 1986. P. 257.
[8] 王光辉, 北京大学技术物理系硕士论文, 1986。

(稿件收到日期: 1989年4月11日)

STUDY ON IMMOBILIZATIONS OF OVINE ANTI-HUMAN IgG AND MCab AGAINST EHF ON RADIATION-MODIFIED SILICONE FILMS

Guo Jinhui, Ha Hongfei and Zhang Yuhua

(Department of Technical Physics, Beijing University, Beijing)

ABSTRACT In this work films of silicone (silastic) were grafted by monomer acrylamide via γ -radiation technology and then the ovine anti-human IgG, Epidemic hemorrhagic fever (EHF)-MCab were immobilized on the silastic-AAM films with different grafting yields passthrough associate reactions. Measurements of relationships between grafting yields, contents of immobilized antibodies and immunoactivities for immobilized silastic-AAM films were performed by using ^{125}I method ELISA method was used to measure the immunoactivities for the immobilized monoantibody. The results showed that the antibodies used can be immobilized on radiation-grafted silicone films and this immobilization method has its potential significance in clinical practice.

KEY WORDS Radiation grafting, Immobilization, ^{125}I label method, ELISA method, Immunoactivity, Ovine antihuman IgG, Epidemic hemorrhagic fever monoantibody (E_s)