

# 一种单克隆抗体酶免疫测定法的建立及其 在检测家畜促滤泡激素中的应用

邹岳奇 刘玉翠 阎静辉

(河北省科学院生物研究所, 石家庄)

邹翔

(河北工学院机二系, 天津)

以牛促滤泡激素(bFSH)为抗原, 制备出对 bFSH 特异的单克隆抗体(McAb)并进行了抗体的纯化和特性分析。以方阵交叉匹配试验挑选出最佳抗体配对, 建立了一种可测定微量促滤泡激素的双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(DAS-ELISA), 用IBM-PC微机对 DAS-ELISA 测出的数据进行了分析。本DAS-ELISA 法已成功地应用于家畜血清促滤泡激素水平的检测。

**关键词** 促滤泡激素; 单克隆抗体; 酶免疫测定法

促滤泡激素 (Follicle-stimulating hormone, FSH) 是哺乳动物脑垂体前叶分泌的一种糖蛋白促性腺激素, 它与另一种垂体促性腺激素——促黄体激素 (Luteinizing hormone, LH) 在理化性质上极为相似, 它们的分子结构相似, 由 $\alpha$ -和 $\beta$ -两个亚单位组成, 其中 $\beta$ -亚单位决定各自特有的生物活性。FSH的主要生物学作用是刺激卵巢内滤泡的生长和发育<sup>[1]</sup>。检测家畜血清FSH含量在了解家畜的卵巢功能, 监控家畜的生殖周期, 诊断家畜不孕症等生殖系统疾病方面具有重要意义。测定FSH活性的传统方法是 Steelman 等提出的生物学测定法<sup>[2]</sup>, 但该法样品用量大, 灵敏度和特异性低, 不能用于微量FSH的检测。其他如放射性受体测定法<sup>[3]</sup>和改进的体外生物测定法<sup>[4]</sup>, 虽然灵敏度和特异性都较高, 但由于制备受体和培养Sertoli's细胞手续繁杂, 应用受到限制。目前, 国内外检测微量促性腺激素大都采用放射免疫测定法 (RIA)<sup>[5-7]</sup>。RIA灵敏度高, 准确性和特异性好。但是,

它需要昂贵的仪器设备, 放射性同位素对人和环境易造成危害, 因而难以普及推广。随着单克隆抗体技术的产生和发展, 出现了一种使用两个抗相同抗原上不同决定簇单克隆抗体的, 适用于检测微量生物物质的酶免疫测定新技术, 即双抗体夹心酶联免疫吸附测定法 (DAS-ELISA)。由于该法具有 RIA 的优点, 而无 RIA 的主要缺点, 因此近年来获得了相当大的发展和应用<sup>[8-11]</sup>。

本文介绍可检测家畜血清中微量FSH的DAS-ELISA的方法, 迄今国内尚未见这方面的工作报道。

## 材料与 方法

### (一) 试剂

高纯度高活性的牛促滤泡激素

本文于1991年5月3日收到。

用RIA测定8个猪血清中FSH含量由中国农业科学院畜牧研究所蔡正华副研究员完成, 该所张继全参加了单抗亲和测定工作, 特此致谢。

(bFSH), 牛促黄体激素(bLH), 猪促滤泡激素(pFSH)和猪促黄体激素(pLH)均由中国科学院动物研究所内分泌室激素组提供。Sp2/0-Ag14 小鼠骨髓瘤细胞由军事医学科学院五所提供。DMEM、NCTC-135 培养基, 次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷(HAT), 以及辣根过氧化物酶(HRP,  $\gamma$ 型)均系 Sigma 公司产品, 由美国依阿华州立大学 D. 斯旺森教授赠送。BALB/c 纯种小白鼠引自卫生部药品生物制品鉴定所, 自繁。牛血清采自河北省农科院奶牛场。猪血清由中国农业科学院畜牧研究所繁殖室提供。其余试剂均为国产分析纯。

## (二) McAb 的制备、纯化和酶标记

McAb 制备方法与文献〔12〕大致相同。用于免疫的小鼠为 5 周龄雌鼠。二次基础免疫均为皮下注射用弗氏完全佐剂乳化的各 100 $\mu$ g bFSH, 间隔期为一个月, 细胞融合前 4 天, 每日 1 次腹腔内注射 0.5ml 含 100 $\mu$ g bFSH 的生理盐水。以 0.7 ml 50% 聚乙二醇(MW1000)为促融合剂。融合细胞在含 HAT 的 DMEM-NCTC 135 培养液中作选择培养。以间接 ELISA 法〔13,14〕筛选分泌抗 bFSH 单克隆抗体的杂交瘤细胞。在 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.5ml 石蜡油致敏, 5 天后腹腔内接种  $2 \times 10^6$  个杂交瘤细胞以诱生单克隆抗体腹水。

腹水单克隆抗体的纯化采用羟基磷灰石柱层析法〔15,16〕。小鼠腹水过滤或离心后以 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH6.8)作 10 倍比稀释, 上柱后充分淋洗, 然后用 0.1—0.3 mol/L 的 PBS(pH6.8)作线性梯度洗脱, 在 280nm 波长上对洗脱峰作紫外监测, 以间接 ELISA 测定 McAb 所在峰。

McAb 的 HRP 酶标记基本按郭春祥等

提供的方法〔17〕进行。

## (三) McAb 特性分析

1. 参照 Soos 等报道的方法〔18〕作抗 bFSH 特异性分析。逐一测定每种 McAb 对 bLH、pLH 和 pFSH 交叉反应情况。各种抗原的包被浓度均为 5 $\mu$ g/ml。

2. 按张立新等〔19〕和 Frignet〔20〕的方法分别进行 McAb 相对亲和力和真实亲和力的测定。各种 McAb 间相对亲和力的测定, 按与抗原达到最大结合 50% 所需的抗体浓度来判断(无 K 值); McAb 的真实亲和力根据实验数据和文献给出的计算方程求得(有 K 值)。

3. 抗原决定簇分析采用 Adachi 等报道的方法〔21〕, 即往包被有 bFSH 抗原的检测板上先加入一种 McAb, 保温 2h (37 $^{\circ}$ C) 后再加入 HRP 标记的另一种 McAb, 最终根据显色程度判断两种 McAb 所抗的决定簇是否相同, 或两个决定簇相距的远近。全部 McAb 按所抗决定簇进行分组。

4. 按 Kuo 等人提供的方法〔22〕选择 McAb 最佳配对。该法称为方阵交叉匹配法(Matrix cross-matching method)即以 bFSH 为中心抗原, 各种高亲和力 McAb 分别作为包被固相的抗体, 和每一种 HRP 标记 McAb 逐一进行交叉匹配试验。

## (四) DAS-ELISA 步骤

基本参照 Kuo 的方法〔22〕, 稍有修改。以 96 孔 PVC 酶免疫检测板为固相载体, McAb 用 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液(pH9.5)稀释至 5 $\mu$ g/ml 后加入板孔, 每孔 120  $\mu$ l, 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜。检测时先用含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L PBS (pH7.2)洗涤固相, 然后每孔加入 100  $\mu$ l FSH 样品液, 置 37 $^{\circ}$ C 保温 30min。以上述 PBS 充分洗涤, 每孔加入 100  $\mu$ l 经适当稀

释的HRP-McAb,于37°C保温15min。洗涤后每孔加100 $\mu$ l底物液(含0.04%邻苯二胺和0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的0.1mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲液,pH5.0),置室温10min后每孔加50 $\mu$ l 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止酶显色反应。用酶联免疫检测仪在492nm波长上读出各孔的光密度值(OD)。

#### (五) DAS-ELISA 标准曲线的绘制

以中国科学院动物研究所提供的高纯度高比活bFSH为标准抗原,用自选出的一对最佳McAb分别作为包被固相抗体和HRP标记抗体。经试验,获知当bFSH浓度为100ng/ml时,OD<sub>492nm</sub>接近最大值。在bFSH为0—100ng/ml范围内共设10种浓度,每种浓度均设三份,测试重复三次。待测出全部10组数据后,求得各种浓度的光密度平均值。以bFSH浓度为横坐标(x),OD<sub>492nm</sub>为纵坐标(y),在坐标纸上绘出标准曲线并进行有关数据的统计学运算。

用高级BASIC语言编制程序,在IBM-PC微机上作数据分析,获得曲线图形和曲线方程。设拟合曲线方程为 $F(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2 + \dots + a_nx^n$ ,其中x为OD<sub>492nm</sub>,F(x)为bFSH浓度值。

#### (六) DAS-ELISA应用二例

1. 奶牛血清中FSH含量检测:用DAS-ELISA法检测6个牛血清样品中FSH含量,并进行bFSH定量添加回收试验。检测时各种样品均设三份,测试重复三次。

2. 母猪血清中FSH含量检测:鉴于特异性分析表明,全部抗bFSH McAb皆能和pFSH产生完全的交叉反应。因此,以DAS-ELISA法检测了8个太湖母猪血清中的FSH含量。检测方法同前。并用RIA法进行测定,以便和DAS-ELISA测定结果对照。该RIA为同源双抗非平衡测

定,所用抗体为美国USDA提供的pFSH抗血清(USDA-398-049),pFSH标准品和<sup>125</sup>I标记pFSH(比利时UCB公司产品)相当于80—100NIH标准FSH-P<sub>2</sub>。

## 结果与讨论

### (一) McAb制备、纯化和酶标记

取免疫反应良好的小鼠脾细胞与Sp2/0-Ag14小鼠骨髓瘤细胞进行了四次细胞融合。总计接种在16块细胞培养板的1536孔中,其中约60%孔(912孔)有杂交瘤细胞克隆生长。经过以ELISA检测筛选和多次再克隆,最终建立21株能稳定分泌高效价抗bFSH单克隆抗体的杂交瘤细胞株。对杂交瘤细胞的染色体组型分析显示,染色体数目均在90—110条范围内,符合杂交瘤细胞特征。21株杂交瘤细胞均已制备小鼠腹水,经ELISA法检测,McAb的效价在10<sup>5</sup>—10<sup>7</sup>之间。

用羟基磷灰石柱层析法从10种腹水分离纯化McAb取得相似结果,McAb纯度达90—95%,McAb活性回收率为70—80%(详细资料略)。

共进行7次McAb的HRP标记试验,均获得满意的结果,经ELISA法测定HRP-McAb的效价为1:6000—1:12000。

### (二) McAb特性分析情况

1. McAb特异性分析结果:21种抗体中有8种与bLH、pLH和pFSH发生完全交叉反应,说明它们不是对bFSH特异的McAb。其它13种抗体与bLH和pLH不发生交叉反应,而与pFSH发生完全交叉,可见它们是对FSH特异的McAb,但不具有种族特异性。

2. 对13种抗FSH特异的McAb进行了相对亲和力测定:结果表明有7种McAb(代号为:1H<sub>5</sub>,2E<sub>4</sub>,2E<sub>12</sub>,2H<sub>10</sub>,

3G<sub>11</sub>, 4G<sub>9</sub>和 5E<sub>10</sub>)具有较高亲和力, 其中3G<sub>11</sub>亲和力最高。

对2E<sub>4</sub>和3G<sub>11</sub>两种 McAb作了真实亲和力测定, 这是一种非同位素的竞争型 ELISA。测定中 McAb 浓度 10<sup>-10</sup> mol/L, bFSH 浓度在 10<sup>-9</sup>—3×10<sup>-10</sup> mol/L 之间。结果显示, 2E<sub>4</sub> 的亲和力常数 K = (1.14±0.28)×10<sup>-9</sup> mol/L; 3G<sub>11</sub> 的亲和力常数 K = (6.32±0.96)×10<sup>-10</sup> mol/L。

3. 上述 7 种高亲和力 McAb 的抗原决定簇分析: 结果见表 1。7 种抗体可分为三组, 它们分别抗 FSH 分子 β-亚单位上的三个不同的抗原决定簇。

表 1 七种 McAb 的抗原决定簇分析  
Table 1 Epitope analysis of the seven McAbs

Group	HRP-McAb	Test McAbs	
		Colorless, anti-same epitope	Brown, anti-dissimilar epitope
1	HRP-2E <sub>12</sub>	2E <sub>12</sub>	1H <sub>5</sub> , 2E <sub>4</sub> , 2H <sub>10</sub> , 3G <sub>11</sub> , 4G <sub>9</sub> , 5E <sub>10</sub>
2	HRP-3G <sub>11</sub>	1H <sub>5</sub> , 2H <sub>10</sub> , 3G <sub>11</sub> , 4G <sub>9</sub>	2E <sub>4</sub> , 2E <sub>12</sub> , 5E <sub>10</sub>
3	HRP-2E <sub>4</sub>	2E <sub>4</sub> , 5E <sub>10</sub>	1H <sub>5</sub> , 2E <sub>12</sub> , 2H <sub>10</sub> , 3G <sub>11</sub> , 4G <sub>9</sub>

4. 方阵交叉匹配试验结果: 2E<sub>4</sub> 抗体(用作包被固相)和 3G<sub>11</sub> 抗体(作 HRP 标记)配对能获得最佳 DAS-ELISA 检测效果(见表 2)。

(三) DAS-ELISA 检测的标准曲线

由 DAS-ELISA 法测得不同浓度 bFSH 对应的 OD<sub>492nm</sub> 值, 绘出 bFSH 的标准曲线(见图 1)。图中给出了检测固相的 OD<sub>492nm</sub> 本底值: 0.139±0.021。对检测数据的统计学运算显示, 批内变异系数(CV)为 3.8—14.5%, 平均 8.1%; 批间 CV 为 6.9—14.3%, 平均 10.3%, 该测定法具有较好的准确性和可重复性。但还有待于进一步改良, 使 CV 值尤其是批内 CV 更小些。

表 2 方阵交叉匹配试验选择最佳单克隆抗体配对

Table 2 Selection of optimal McAb pair by a matrix cross-matching experiment

HRP-McAb	McAb coated on solid-phase						
	1H <sub>5</sub>	2E <sub>4</sub>	2E <sub>12</sub>	2H <sub>10</sub>	3G <sub>11</sub>	4G <sub>9</sub>	5E <sub>10</sub>
HRP-1H <sub>5</sub>	-	-	-	-	-	-	-
HRP-2E <sub>4</sub>	-	-	-	-	+	-	-
HRP-2E <sub>12</sub>	-	-	-	-	-	-	-
HRP-2H <sub>10</sub>	-	-	-	-	-	-	-
HRP-3G <sub>11</sub>	-	+	+	-	-	-	-
HRP-4G <sub>9</sub>	-	-	-	-	-	-	-
HRP-5E <sub>10</sub>	-	-	-	-	-	-	-

(a) 试验中 bFSH 及 McAb 的工作浓度均为 5 μg/ml。

bFSH(5μg/ml) and McAb(5μg/ml) were used in the experiment.

(b) 相对显色(匹配程度)随 -, +, +, +, 而增强。

Relative color intensity (matching degree) increases according to the order -, +, +, +

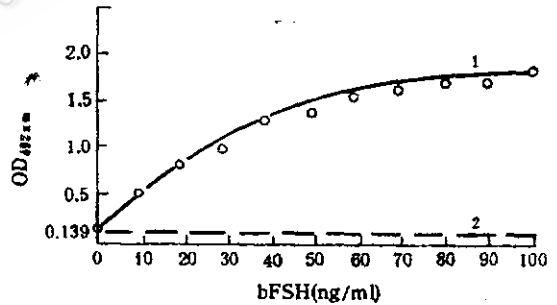


图 1 DAS-ELISA 检测 bFSH 的标准曲线  
Fig.1 Standard curve for bFSH determined by the DAS-ELISA  
---本底值(OD<sub>492nm</sub>) Background value

编制程序后将 DAS-ELISA 检测实验数据输入计算机。运行后屏幕上显示的曲线和图 1 相似, 得出的拟合曲线方程如下:

$$\begin{aligned}
 F(x) = & -4.114 + 30.470x - 8.466x^2 + \\
 & 3.525x^3 + 16.762x^4 \\
 & - 18.107x^5 + 9.222x^6 - \\
 & - 1.972x^7 - 0.750x^8 + \\
 & + 0.548x^9
 \end{aligned}$$

把 $OD_{492nm}$ 在0.140—1.820相对应的FSH浓度值(精确到0.01ng/ml)以表格形式打印出来,使我们今后通过查表即能获得和任一 $OD_{492nm}$ 值相应的FSH浓度值。所编的程序对其它的ELISA检测具有一定的通用性。

#### (四)DAS-ELISA 实测结果

表3 DAS-ELISA测出的六个牛血清中FSH含量以及血清中添加bFSH的回收试验结果

Table 3 FSH measurement of six samples of bovine sera and recovery of bFSH to be added into the sera by the DAS-ELISA

Serum No.	$OD_{492nm}$	FSH in serum (ng/ml)	bFSH added (ng/ml)	bFSH detected in mixed solution(ng/2ml)	Recovery of added bFSH (%)
1	0.551	11.51	20.0	30.48	91.05
2	0.795	19.32	20.0	36.23	84.00
3	0.805	19.67	20.0	37.96	91.31
4	1.220	37.09	20.0	55.28	95.12
5	0.840	20.92	20.0	40.20	96.56
6	0.438	8.26	20.0	29.05	109.56

(a)牛血清均以1:4稀释。

All the sera were diluted in 1:4.

2. 用DAS-ELISA和RIA法检测猪血清结果见图2。从图2可见,RIA测出

的FSH值均高于DAS-ELISA的测出值,两者存在一种平行关系。经计算,将DAS-ELISA测出值乘以一比例系数(1.37),所得的修正值即与RIA测出值大致相符。可能由于两种测定法所用的FSH标准品不同及方法本身存在的多种差别引起的不同。

我们建立的DAS-ELISA测定法,由于采用了两个抗FSH- $\beta$ 亚单位上相距较远决定簇的单克隆抗体,特异性高于使用抗血清的常规RIA法。从标准曲线看,检测灵敏度 $<1ng/ml$ ,接近常规RIA。准确性和可重复性也甚好。因而是除RIA外又一种能测定微量FSH的实用方法。该方法操作简便、快速(60min出结果),试剂稳定性好( $4^{\circ}C$ 可存放一年以上),检测成本低,一般实验室均可采用。

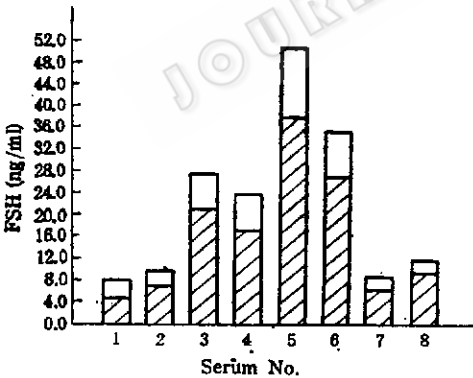


图2 DAS-ELISA和RIA对八个猪血清中FSH含量测定结果的比较

Fig.2 Comparison of FSH contents in eight porcine Sera measured by DAS-ELISA and RIA

□ RIA测, Measured by RIA

▨ DAS-ELISA测, Measured by DAS-ELISA

## 参 考 文 献

- [1] 袁其晓: 家畜的生殖激素, 农业出版社, p. 144, 1985.
- [2] Steelman, S.L. and Pohley, F.M.: *Endocrinology*, 53:604—616, 1953.
- [3] Brotherton, J.: *Sex Hormone Pharmacology*, Academic Press, London, p. 362, 1976.
- [4] Padmanabhan, V. et al.: *Endocrinology*, 121:1089, 1987.
- [5] Niswender, G.D. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128:807, 1968.
- [6] Midgley, A.R. and Jaffe, R.B.: *J. Clin. Endocrinol.*, 33:962, 1971.
- [7] 肖祥熊等: 实用放射免疫分析及其临床意义, 同济大学出版社, p. 141—151, 1985.
- [8] Schurrs, A.H. and Van Weeman, B.K.: *J. Immunoassay*, 1:229—249, 1980.
- [9] Uotila, M. et al.: *J. Immunol. Methods*, 42:11—15, 1981.
- [10] Chow, S.N. et al.: *J. Appl. Biochem.*, 7:114—121, 1985.
- [11] Chen, K.W. et al.: *Biotech. Appl. Biochem.*, 11:83—88, 1989.
- [12] 邹岳奇等: 河北省科学院学报, 6(2):84—88, 1990.
- [13] Douillard, J.Y. et al.: *Methods in Enzymology*, Academic Press, Vol. 92, pp. 168—174, 1983.
- [14] Voller, A.: *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, pp. 181—196, 1980.
- [15] Bukovsky, J. and Kennett, R.H.: *Hybridoma*, 6:219—228, 1987.
- [16] 邹岳奇等: 生物化学与生物物理进展, 18:164—165, 1991.
- [17] 郭春祥等: 上海免疫学杂志, 2:97—100, 1983.
- [18] Soos, M. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 13:263—274, 1983.
- [19] 张立新等: 单克隆抗体通讯, 2:31—37, 1988.
- [20] Frignet, B. et al.: *J. Immunol. Methods*, 77:305—319, 1985.
- [21] Adachi, T. et al.: *J. Immunol. Methods*, 109:93—101, 1988.
- [22] Kuo, C.Y. et al.: *Biotech. Appl. Biochem.*, 11:89—95, 1989.

## The Establishment of An Enzyme Immunoassay Based on Monoclonal Antibodies and Its Application in Detecting Animal Follicle-stimulating Hormone

Zou Yueqi Liu Yucui Yan Jinghui

(Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang)

Zou Xian

(Hebei Institute of Technology, Tianjin)

Using bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) as the antigen, monoclonal antibodies (McAbs) specific to bFSH were generated, characterized and highly purified. A matrix cross-matching experiment was conducted to select the optimum pairing of McAbs. Then, a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) for measuring micro-FSH was established, and the analysis of data from the DAS-ELISA were conducted on an IBM-PC microcomputer. The ELISA has been successfully used for detecting FSH levels in domestic animal sera.

### Key words

Follicle-stimulating hormone; monoclonal antibody; enzyme immunoassay