

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2012.10.013

· 免疫学技术与方法 ·

自制 NSE 单抗的鉴定及其双抗夹心 ELISA 方法的建立^①丁焕弟 林志妙 杨 赟 于占娇 龚慧婷 李晓彤^②

(厦门大学生命科学学院杂交瘤抗体中心, 厦门 361005)

中国图书分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2012)10-0922-05

[摘要] 目的: 制备并鉴定 NSE(Neuron-specific enolase) 单克隆抗体, 建立可检测 NSE 蛋白的双抗夹心 ELISA 方法。方法: 用本实验室已表达纯化的 NSE 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 采用杂交瘤技术制备单克隆抗体。采用 WB、IP、IF、IHC 等方法对获得的 NSE 单抗进行鉴定及亚型检测。利用辣根过氧化物酶标记纯化后的 NSE 单抗, 建立一个可检测 NSE 蛋白的双抗夹心 ELISA 法。结果: 通过分析和鉴定, 选定 2 株可稳定分泌抗 NSE 抗体的杂交瘤细胞株, 效价达 $4.2 \times 10^7 \sim 6.5 \times 10^7$, 亚型为 IgG2b。免疫印迹结果显示, 该抗体不仅能识别细胞内源 NSE 蛋白, 还能识别分泌到细胞培养上清液中的 NSE 蛋白, 此外还可用于免疫荧光及免疫组化检测。文中所建立的双抗夹心 ELISA 法, 最低检测极限为 8.85 ng/ml。结论: 成功获得了效价高、灵敏度好及特异性强的 NSE 单抗, 建立了一个双抗体夹心 ELISA 检测系统, 具有良好的临床应用前景。

[关键词] 神经元特异性烯醇化酶(NSE); 单克隆抗体; 鉴定; 双抗体夹心 ELISA

Characterization of NSE monoclonal antibodies and establishment of a double-antibody sandwich ELISA assay

DING Huan-Di, LIN Zhi-Miao, YANG Yun, YU Zhan-Jiao, GONG Hui-Ting, LI Xiao-Tong. Hybridoma and Antibody Center, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] **Objective:** Preparation and characterization of monoclonal antibodies against NSE protein, and establishment of a double-antibody sandwich ELISA assay. **Methods:** BALB/c mice were immunized by using purified recombinant NSE, and monoclonal antibodies were generated by hybridoma technique. These antibodies were characterized with ELISA, Western blot, Immunofluorescent and Immunohistochemical staining. The isotypes of these antibodies were determined with an antibody isotyping kit. With Horseradish Peroxidase labelled NSE monoclonal antibody, we were able to establish a double-antibody sandwich ELISA to detect NSE protein. **Results:** Two positive hybridoma cell lines were selected for test, the titers of these two monoclonal antibodies could reach $4.2 \times 10^7 - 6.5 \times 10^7$, and their isotypes were IgG2b. Our NSE antibodies could detect not only endogenous NSE protein from cells, but also secreted NSE protein from cells in culture medium by Western blot, in addition, they could be used for immunofluorescent and immunohistochemical staining. The minimum amount of NSE protein could be detected by this double-antibody sandwich ELISA was 8.85 ng/ml. **Conclusion:** Our NSE monoclonal antibodies achieved good sensitivity and specificity with high titers, and we established a double-antibody sandwich ELISA assay which could be used for clinical test in future.

[Key words] Neuron-specific enolase(NSE); Monoclonal antibody; Identification; Double-antibody sandwich ELISA

神经元特异性烯醇化酶(Neuron-specific enolase, NSE) 是烯醇化酶的一种同工酶, 烯醇化酶是普遍存在于生物体内的糖酵解代谢酶, 它催化中间产物磷酸烯醇式丙酮酸的生成。目前已发现 5 种烯醇化酶的同工酶, 由 3 种免疫性质不同的亚基(α 、 β 、

γ) 组成, 分别是 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$, 已经证明这 3 个亚基来自不同的基因位点^[1]。 α 亚基主要存在于肝、肾等组织, 故称其为非神经系统的烯醇化酶(NNE); β 亚基主要存在于骨骼肌和心肌, 故称其为肌肉特异性的烯醇化酶(MSE); γ 亚基主要存在于神经组织, $\gamma\gamma$ 型特异定位于神经元和神经内分泌细胞中, 故命名为神经元特异性烯醇化酶^[2]。

通过研究神经元和神经内分泌细胞起源的肿瘤, 如小细胞肺癌患者血清及脑脊液中 NSE 水平明显升高, 提出通过对这些患者血清 NSE 活性水平变

①本文为福建省科技重点项目(编号项目 No. 2011Y0050) 和厦门市科技计划项目(No. 3502Z20123009)

②通讯作者, E-mail: xltli@xmu.edu.cn

作者简介: 丁焕弟(1985年-), 女, 在读硕士, 主要从事抗肿瘤单克隆抗体及诊断试剂盒的研究, E-mail: dinghuandi1125@163.com。

化的监测,可以达到监测病情发展,评价治疗效果,及早提示复发情况的目的。

本文希望通过制备效价高、特异性好、能识别人体内 NSE 蛋白的单克隆抗体,并用此抗体建立双抗夹心 ELISA 试剂盒。

1 材料与方法

1.1 材料 PEG、HT、HAT、RPMI1640 培养基、抗体亚型鉴定试剂盒、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 以及荧光标记的羊抗鼠 IgG 均购自 Sigma 公司;小牛血清购自 Gibco。辣根过氧化物酶(HRP)购自泰天和生物公司,其他生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 NSE 单克隆抗体的制备及亚型鉴定 取小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 按常规方法进行细胞融合^[3],通过间接 ELISA 法筛选^[4],采用有限稀释法进行数次亚克隆,获得可稳定分泌 NSE 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,按常规方法制备腹水并纯化。采用间接 ELISA 法梯度稀释制备的抗体,测定其效价,并采用免疫球蛋白标准亚型鉴定试剂盒进行抗体亚型鉴定,用山羊抗鼠 IgA、IgM、IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3,检测抗体的亚型,亚型鉴定的具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.2 免疫印迹分析(Western blot, WB) 将收集的细胞裂解液,首先进行 SDS-PAGE 电泳;然后用 5% 的脱脂奶粉进行封闭,室温 2 小时;加一抗,室温孵育 1 小时, PBST 洗涤;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 小时, PBST 充分洗涤;加入显色液显影摄片。

1.2.3 免疫荧光实验 将细胞接种到预先放置有无水乙醇浸泡过的盖玻片的培养皿中,待细胞贴壁后。4% 多聚甲醛固定 10 分钟;加渗透液置冰上渗透 10 分钟;5% 的 BSA 封闭 1 小时;加一抗孵育 3 小时,洗涤;加荧光二抗室温避光孵育 1 小时,洗涤;DAPI 染核 5 分钟,洗涤;封片,镜检拍片。

1.2.4 免疫组化 组织切片脱蜡与水化后,进行抗原修复;再用 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶的活性;用正常山羊血清封闭液封闭。滴加稀释好的一抗,室温静置 1 小时或 4℃ 过夜,洗涤;滴加生物素标记的二抗,洗涤;滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液,洗涤;AEC 显色,在显微镜下观察掌握染色程度,洗涤;苏木素复染,洗涤;封片、镜检拍片。

1.2.5 双抗夹心 ELISA 法检测系统的建立 用活化的辣根过氧化物酶标记抗体试剂盒,对抗体进行标记。按 ELISA 双抗体夹心法测抗原的基本试验

程序^[5],采用棋盘滴定试验。取纯化后的数株抗体分别稀释至 1、2、4、8 mg/ml,包被酶标板。分别与 100、500 ng/ml 的 NSE 融合蛋白反应,以 BRCA1 融合蛋白为阴性对照,0.2% 的 BSA 为空白对照。然后再分别加入不同浓度酶标抗体,稀释度 1:2 000、1:4 000、1:8 000 和 1:16 000。读取 OD450 值。根据 OD 值和 P/N 值,确定包被抗体和酶标抗体的最佳搭配和工作浓度,建立 ELISA 检测系统。

1.2.6 封闭条件以及酶标抗体作用时间的优化

以 2% BSA 为封闭液, BRCA1 融合蛋白为阴性对照,0.2% BSA 为空白对照。选择 37℃ 封闭 2 小时、37℃ 封闭 4 小时和 4℃ 封闭过夜,然后进行夹心 ELISA 反应,以确定最适合封闭条件。确定最适封闭条件后,在最适的酶标抗体浓度下,将反应时间设为:37℃,30 分钟、50 分钟、1 小时、1.5 小时和 2 小时,以确定酶标抗体的最佳反应时间。

1.2.7 标准曲线制作及灵敏度的确定 取标准的 NSE 融合蛋白,自 1 000 ng/ml 开始倍比稀释,以 BRCA1 融合蛋白为阴性对照,0.2% BSA 为空白对照。进行双抗夹心 ELISA 检测,重复 3 次,每次设 3 个复孔。以 OD450 值为纵坐标, NSE 融合蛋白浓度的对数为横坐标做标准曲线。

1.2.8 试剂盒特异性检测 我们采用双夹心 ELISA 法来检测,分别用 NSE 融合蛋白、BRCA1 融合蛋白、标签蛋白和 BSA 蛋白做交叉反应来检测双夹心试剂盒的特异性,稀释检测蛋白浓度为 100 ng/ml,进行双夹心 ELISA 检测。

1.2.9 试剂盒重复性和稳定性检测 将我们的抗体包被好酶标板,置于 4℃ 储存 3 个月,重复我们的检测标准蛋白制备标准曲线实验。梯度稀释蛋白分别为 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 ng/ml,每个浓度做 3 个复孔。计算 P/N 值,以 $P/N \geq 2.1$ 所对应的 NSE 融合蛋白的最低浓度,作为该试剂盒检测标准品的最低检测极限,与初始的最低检测极限进行比较。

2 结果

2.1 抗体效价及亚型鉴定 我们采用常规杂交瘤技术得到稳定分泌抗 NSE 抗体的杂交瘤细胞,并制备腹水,将所抽取的腹水使用以 Protein G 进行亲和纯化,采用间接 ELISA 法检测发现 3 号和 4 号抗体效价最高,达到 $4.2 \times 10^7 \sim 6.5 \times 10^7$ 。抗体亚型的测定结果显示,抗体的亚型为 IgG2b(图 1)。

2.2 NSE 单克隆抗体的 WB 检测 我们采用过表达系统检测 NSE 单克隆抗体,将带有 HA 标签的

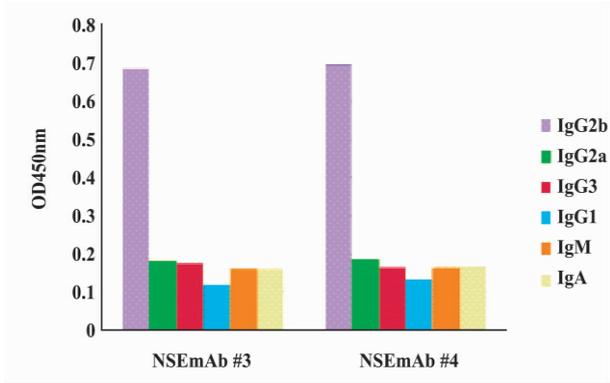


图 1 单克隆抗体亚型鉴定
Fig.1 The isotype identification of NSEmAbs

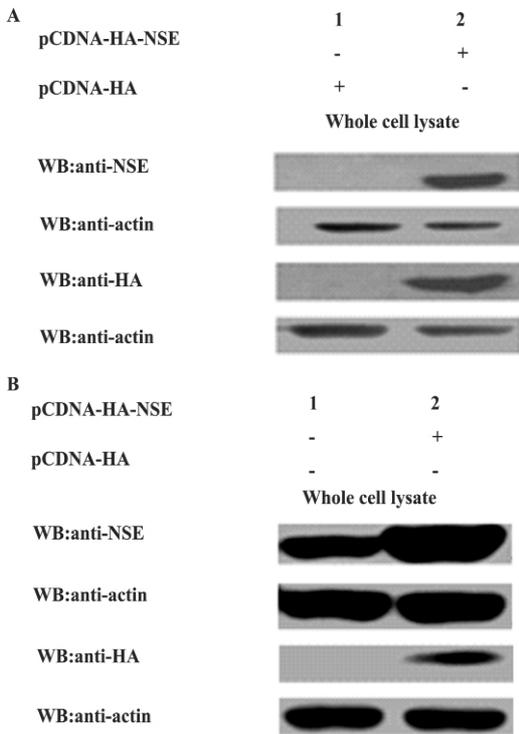


图 2 NSE 单克隆抗体的 WB 检测
Fig.2 Western blot with our NSEmAb

NSE 真核表达载体转染 HeLa 细胞,进行 WB 检测。结果在 50 kD 左右检测到了目的蛋白 NSE(图 2A)。接着我们用自制的 NSE 抗体,进行了细胞内源 NSE 蛋白的检测,结果显示,未转染的 293T 细胞中,可检测到细胞内源 NSE 蛋白的表达(图 2B),以转染了 NSE 真核表达载体的 293T 细胞作为阳性对照指示 NSE 的位置。

然后将带 HA 标签的 NSE 真核表达载体梯度转染 293T 细胞,转染前各盘细胞换等量的细胞培养基。转染带 HA 标签的 NSE 真核表达载体 DNA 分别为 0、1、2、4 μg ; 转染空载体的 DNA 分别为 4、3、2、0 μg 。转染 36 小时后,收集细胞上清,并

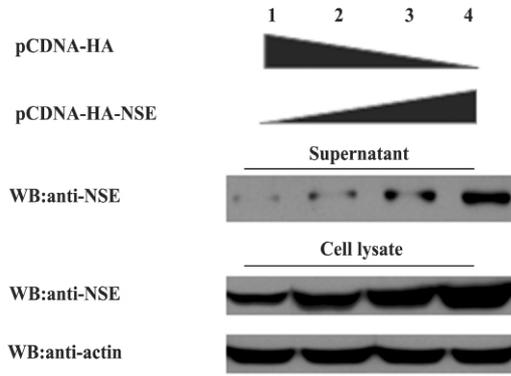


图 3 检测分泌到细胞培养上清中的 NSE 蛋白
Fig.3 Detection of secreted NSE protein in cell culture medium

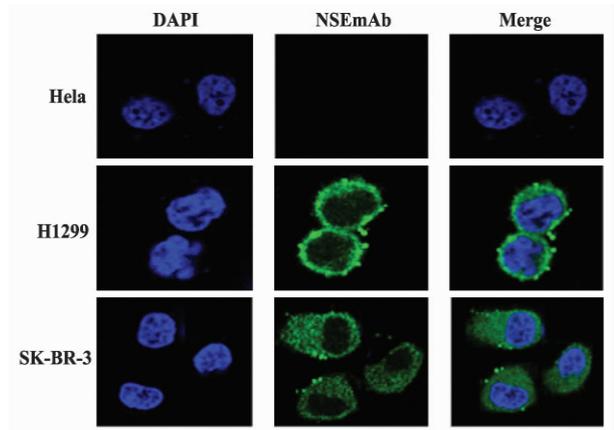


图 4 内源免疫荧光检测 NSE(×100)
Fig.4 Immunofluorescence detection of NSE (×100)

将细胞裂解,进行 WB 检测。结果表明,我们的抗体可在细胞培养上清液中检测到目的蛋白 NSE,与细胞裂解液中 NSE 的位置相同,而且随着我们转染质粒的量增加而增多(图 3)。

2.3 NSE 抗体免疫荧光检测 WB 检测表明在许多不同癌细胞株中都有 NSE 的大量表达(结果未在本文显示),用免疫荧光方法对图 4 中的 3 株细胞进行检测,结果表明在肺癌细胞 H299,乳腺癌细胞 SK-BR-3 中可检测到目的蛋白 NSE,其定位于细胞质中,而在 HeLa 细胞中则未检测到 NSE(图 4)。

2.4 NSE 抗体免疫组化检测 取乳腺癌的组织切片,进行染色。结果显示:自制的 NSE 单克隆抗体可在乳腺癌组织中检测到 NSE 蛋白,其中蓝色部分为苏木素染核的颜色,红褐色为我们的抗体着色部位,主要位于胞浆(图 5)。

2.5 双抗夹心 ELISA 法检测系统的建立 抗体效价检测结果表明#4 抗体的效价最高,因此对其进行了 HRP 标记。棋盘滴定实验结果显示,#3 抗体和

表 1 棋盘滴定实验结果

Tab.1 The result of Checkboard ELISA

Coating NSEmAb	HRP labeled NSEmAb	Dilution of HRP-NSEmAb	Concentration of coating NSEmAb(μg/ml)			
			1	2	4	8
=3	=4	1: 2 000	4.272 727	4.301 282	1.097 561	4.120 482
=3	=4	1: 4 000	7.584 906	8.150 943	4.517 241	7.576 271
=3	=4	1: 8 000	7.538 462	7.576 923	7.471 698	7.471 698
=3	=4	1: 16 000	5.571 429	5.5	5.52	5.52

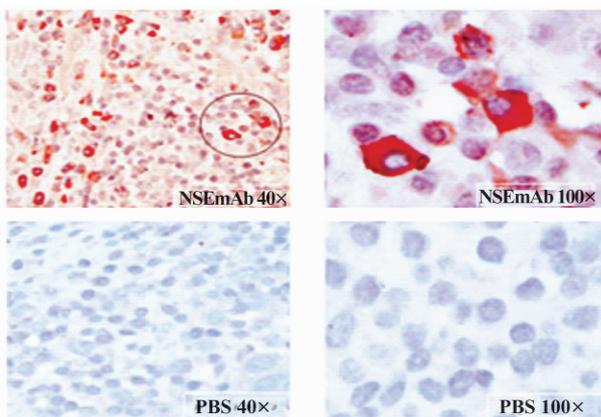


图 5 NSE 单克隆抗体的免疫组化染色

Fig.5 Immunohistochemical staining with NSE anti-body

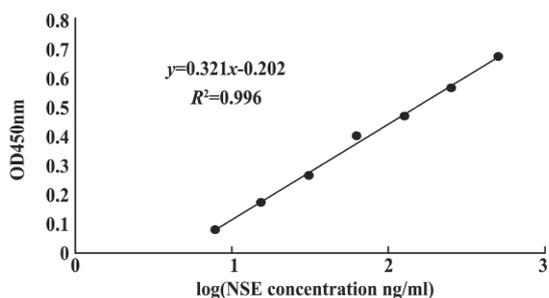


图 6 双抗夹心 ELISA 法的标准曲线

Fig.6 Standard curve of double-antibody sandwich ELISA

酶标#4 抗体配对效果最好, #3NSE 抗体包被浓度为 2 μg/ml, 酶标抗体稀释度为 1:4 000 时效果最佳。在蛋白标准品浓度为 100 ng/ml 时, #3 和酶标#4 抗体各组合的 P/N 值见表 1。

2.6 双抗夹心 ELISA 法的优化 在检测蛋白浓度为 300 ng/ml 时, 以 OD450 值和 P/N 值为优化标准。不同封闭条件下的结果显示, 4℃ 过夜时阳性和阴性值都稍微偏高, 37℃ 封闭 4 小时和 2 小时差别不大。酶标抗体在作用时间 50 分钟、1 小时、1.5 小时时 OD 值之间差异不明显。在作用 30 分钟和 2

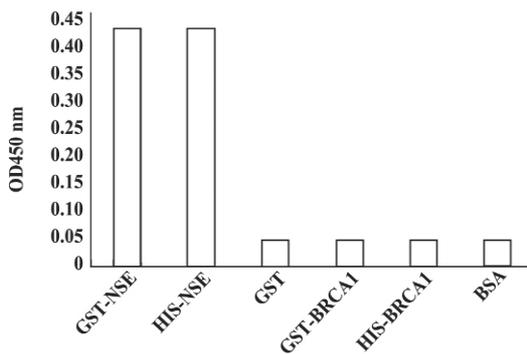


图 7 双抗夹心 ELISA 特异性检测

Fig.7 Specificity detection of double-antibody sandwich ELISA

小时时与其它组之间 OD 值差异明显, 但作用 30 分钟时阳性 OD 值偏低; 在 2 小时时阴性值偏高, P/N 值偏低, 易出现假阳性反应。最后考虑到时间和 OD 值问题, 我们选择封闭条件为 37℃, 2 小时, 酶标抗体作用时间为 1 小时。

2.7 标准曲线的建立 标准蛋白浓度在 500 ~ 7.81 ng/ml 检测范围内, 曲线趋近直线, 线性关系最佳, 以 OD450 值为纵坐标, NSE 融合蛋白浓度的对数为横坐标做标准曲线(图 6)。通过计算 9 个阴性孔的平均值(\bar{x}) 为 0.485 56, 以 $P/N \geq 2.1$ ($P = 0.101 968, N = 0.048 556$) 的最低 NSE 融合蛋白浓度为标准, 计算试剂盒的最低检测极限为 8.85 ng/ml。标准差(SD) 为 0.01 007 135, 吸收值 $\bar{x} + 2SD = 0.058 627 35$, 根据标准曲线的回归方程 $y = 0.321x - 0.202, R^2 = 0.996$, 其相对应的浓度为 6.49 ng/ml, 即该方法的检测灵敏度为 6.49 ng/ml。

2.8 试剂盒的特异性的鉴定 以检测蛋白浓度为 100 ng/ml 对试剂盒的特异性进行鉴定, 结果显示, NSE 双夹心试剂盒与 NSE 融合蛋白结合的 OD450 值, 显著高于与其它蛋白结合的 OD450 值(图 7)。

2.9 双单抗夹心 ELISA 法的可重复性及稳定性鉴定 用 #3NSE 抗体包被好的酶标板, 置于 4℃ 储存 (下转第 935 页)

- 9 Matthews K, Wilkinson K A, Kalsdorf B *et al.* Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis [J]. *Tuberculosis*, 2011; 91(6): 587-593.
- 10 Peng M Y, Wang Zh H, Yao Ch Y *et al.* Interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis [J]. *细胞与分子免疫学·英文版*, 2008; 5(3): 203-208
- 11 Walrath J, Zukowski L, Krywiak A *et al.* Resident Th1-like effector memory cells in pulmonary recall responses to mycobacterium tuberculosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005; 33(1): 48-55.
- 12 Huster K M, Koffler M, Stemberger C *et al.* Unidirectional development of CD8⁺ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2006; 36(6): 1453-1464.
- 13 范艳, 杨利桃, 李丽 *et al.* 人外周血卡介苗 (BCG) 特异性中央型和记忆型 CD4⁺ 细胞的特 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006; 22(5): 403-406.
- 14 Wang X, Cao Z, Jiang J *et al.* Association of mycobacterial antigen-specific CD4(+) memory T cell subsets with outcome of pulmonary tuberculosis [J]. *Infect*, 2010; 60(2): 133-139.
- 15 孙丽. 关于 CD8 细胞在结核病免疫治疗效果评价中的意义之我见 [J]. *中国防痨杂志*, 2002; 24(1): 65-66.
- 16 Jeyanathan M, Mu J, McCormick S *et al.* Murine airway luminal antituberculosis memory CD8 T cells by mucosal immunization are maintained via antigen-driven in situ proliferation, independent of peripheral T cell recruitment [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010; 181(8): 862-872.
- 17 Scriba T J, Kalsdorf B, Abrahams D A *et al.* Distinct, specific IL-17 and IL-22 producing CD4⁺ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response [J]. *J Immunol*, 2008; 180(3): 1962-1970.
- 18 项杰, 章晓联, 席淑红. 结核病人血清 IL-27、TNF- α 、IFN- γ 的检测及其免疫学意义 [J]. *数理医学杂志*, 2009; 22(2): 148-151.
- 19 Villarino V, Larkin J, Sarisc J *et al.* Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation [J]. *Immunol*, 2005; 174(12): 76842-76911.
- 20 Holscher C, Holscher A, Ruckerl D *et al.* The IL-27 receptor chain WSX2-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis [J]. *Immunol*, 2005; 174(6): 35342-35441.
- 21 Villarino A V, Larkin J 3rd, Saris C J *et al.* Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation [J]. *Immunol*, 2005; 174(12): 76842-76911.
- 22 Holscher C, Holscher A, Ruckerl D *et al.* The IL-27 receptor chain WSX2-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis [J]. *Immunol*, 2005; 174(6): 35342-35446.
- 23 Batten M, Li J, Yi S *et al.* Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17 producing T cells [J]. *Nat Immunol*, 2006; 7(9): 9292-9361.
- 24 Stumhofer J S, Laurence A, Wilson E H *et al.* Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17 producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system [J]. *Nat Immunol*, 2006; 7(9): 9372-9451.

[收稿 2012-06-24 修回 2012-08-13]
(编辑 许四平)

(上接第 925 页)

3 个月后, 重复我们建立标准曲线检测标准蛋白的实验。结果回归方程为 $y = 0.322x - 0.239$, $R^2 = 0.995$, 最低检测极限为 11.45 ng/ml。OD450 值与储存前有一定的区别, 但曲线斜率、最低检测极限与储存前变化不大, 并不影响试剂盒本身的测定, 说明该试剂盒在 4℃ 条件下至少可以保存 3 个月, 我们的试剂盒具有较高的稳定性和可重复性。

3 讨论

神经元特异性烯醇化酶是目前公认的小细胞肺癌高特异性、高敏感性的肿瘤标志物^[6,7], 并与病情的分期密切相关。因此, 开发一种准确、方便和经济的检测方法, 对该指标的进一步临床应用具有重要意义。自从 Reeve^[8] 于 1986 年成功地制作了 NSE 单克隆抗体以来, 其在 APUD 肿瘤中的诊断已得到了广泛的应用。

本实验中自制的 NSE 单克隆抗体效价高、稳定性好, 并对这些单抗进行了 WB、IF、IHC 多种免疫学实验, 证实我们的抗体可特异性地识别细胞的 NSE 蛋白, 特别是该抗体可以很好地识别分泌到细胞培养基上清液中的 NSE 蛋白, 为将来进行临床血液检测打下良好的基础。同时本研究所建立的双抗夹心

ELISA 定量检测方法及其可行性的初步验证, 为相关诊断试剂盒的应用奠定了坚实基础。

4 参考文献

- Jacobi C, Reiber H. Clinical relevance of increased neuron-specific enolase concentration in cerebrospinal fluid [J]. *Clin Chim Acta*, 1988; 177(1): 49-54.
- Schaarschmidt H, Prange H W, Reiber H *et al.* Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases [J]. *Stroke*, 1994; 25(3): 558-565.
- 邱玉华, 张学光. 鼠抗人 sIL-6RmAb 的制备及 sIL-6R 检测方法的建立 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1997; 13(4): 58-60.
- 徐志凯. 实用单克隆抗体技术 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 42-45.
- 鲍建芳, 沈建根. 免疫学实验技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2006: 26-28.
- 李蓉, 李睿. 肺癌肿瘤标志物研究进展 [J]. *国外医学·肿瘤分册*, 1996; 23(2): 98-103.
- 杨德昌, 杨拴盈. 肺癌诊断水平的现状与进展 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2001; 24(8): 450-451.
- Reeve J L, Stewart J, Watson J V *et al.* Neuron specific enolase expression in carcinoma of the lung [J]. *Br J Cancer*, 1986; 53(4): 519-528.

[收稿 2012-05-12 修回 2012-06-07]
(编辑 许四平)