

# ELISA 定量测定单克隆抗体方法改进<sup>①</sup>

陈瑞川 卢方 卢玉英

(抗癌研究中心)

**摘要** 本文介绍了以亲和层析纯化的兔抗鼠 IgG 类抗体及其酶标物作为捕获及检测抗体进行鼠杂交瘤培养上清及腹水中 IgG 类单克隆抗体的 ELISA 定量测定方法。结果表明,小牛血清(BS)、兔血清(RS)、马血清(HS)、人血清(HuS)及非抗体产生细胞的培养上清对本项 ELISA 实验无干扰,使测定的结果较可靠。测定的鼠 IgG 各亚类的标准曲线的线性范围均在 5~100 ng/ml 之间。因此这个快速、可靠的方法可为鼠 IgG 类单克隆抗体的定量测定提供一种实用的手段。

**关键词** ELISA, 定量测定, 单克隆抗体

单克隆抗体(McAb)在科学研究及临床上已得到广泛的应用。McAb 的生产一般是先纯化 McAb 再测定其浓度及纯度<sup>[1]</sup>,这一程序的缺点是难于对纯化的得率、纯化方法的优劣进行评估。另外,在杂交瘤筛选过程中,如能对克隆后的杂交瘤培养上清中 McAb 含量再进行一次定量测定,也有助于筛选出 McAb 分泌率较高的杂交瘤株。

酶联免疫吸附测定(ELISA)目前已广泛应用于各种抗原的定量测定<sup>[2,3]</sup>。我们在研究过程中用亲和层析法制备了兔抗鼠 IgG 抗体(R×MIgG Ab)及其酶标物,并建立了鼠 IgG 类 McAb 的 ELISA 定量方法。

## 1 材料及方法

兔抗鼠 IgG 抗体(R×MIgG Ab)及其酶标物(R×MIgG Ab-HRP)的制备,以鼠 IgG 纯品(本室自制,电泳纯)按常规方法免疫健康成年大耳白兔子,制备兔抗鼠 IgG 抗血清(双扩散测定其效价为 1:128),抗血清经 DEAE-S2(Whatman 进口分装)离子交换柱纯化<sup>[4]</sup>,再经鼠抗体亲和层析柱<sup>[5]</sup>进一步纯化出 R×MIgG Ab,以高碘酸氧化法<sup>[6]</sup>制备辣根过氧化物酶(HRP,上海生化所产品,RZ~3.0)标记的 R×MIgG Ab。

R×MIgG Ab 对鼠 IgG 各亚类抗体的捕获能力鉴定 参照鼠抗体亚类鉴定试剂盒(Zymed 公司产品)使用说明书进行;包被抗体改为 R×MIgG Ab。实验重复三次。

**ELISA 实验** 于 12 孔条(Immunol 1, Dynatech 公司产品)中,每孔加 100 μl R×MIgG Ab,于 4℃ 包被过夜,扣干,加 1% 牛血清白蛋白(BSA,本室自制)200 μl,37℃ 封闭 1 h,以 0.01 mol/l, pH7.2 的磷酸盐-吐温-20 缓冲液(PBST)洗三次,加鼠抗体或其它待测样品 50 μl,37℃ 温育 20 min,扣干,PBST 洗三次,加 R×MIgG Ab-HRP(以 1% 小牛血清稀释)50 μl,37℃ 温育 20 min,扣干,PBST 洗四次后,加 HRP 底物 OPD(邻苯二胺,Lecco 公司产品)100 μl,反应 10 min 后以 50 μl 2mol/l HCl 中止反应,于 MINIREADER I 型酶标读数仪(Dynatec 公司产品)读取 490 nm 处 OD 值。实验重复三次。

① 1990-12-1 收到

鼠杂交瘤培养上清及腹水中 McAb 的纯化 以蛋白 A-葡聚糖凝胶(Protein A-Sepharose, Sigma 公司产品)亲和层析柱反复纯化<sup>[7]</sup>鼠杂交瘤培养上清(50 ml)及腹水(2 ml)中的 McAb. 杂交瘤株为: 抗人绒毛膜促性腺激素(Anti-HCG)杂交瘤<sup>①</sup>(分泌 IgG<sub>1</sub> McAb), 抗人胃癌 McG803<sup>②</sup>(Anti-McG803)杂交瘤(分泌 IgG<sub>2a</sub>McAb), 抗乙肝表面抗原(Anti-HBsAg)杂交瘤<sup>③</sup>(分泌 IgG<sub>2b</sub>McAb), 抗乙肝核心抗原(Anti-HBc)杂交瘤<sup>④</sup>(分泌 IgG<sub>3</sub> McAb). 纯化后的 McAb 以 SDS-PAGE 鉴定其纯度(>95%), 以紫外分光光度计(DU-65, Beckman 公司产品)测定其浓度, 并换算成原培养上清或腹水中 McAb 的浓度. 重复测定三次.

## 2 结果

R×MIgG Ab 对鼠 IgG 各亚类抗体的捕获能力 结果(Tab. 1)表明: R×MIgG Ab 对鼠 IgG 各亚类均有捕获能力, 但对 IgG<sub>3</sub> 的捕获能力稍弱, 在制作标准曲线时也显示对 IgG<sub>3</sub> 的灵敏度较其它亚类低(见后文).

Tab. 1 The capture ability of R×MIgG Ab to murine IgG subclasses

| Murine IgG subclasses | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>2a</sub> | IgG <sub>2b</sub> | IgG <sub>3</sub> | Negative control |
|-----------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                       | 1.30             | 1.35              | 1.32              | 1.10             | 0.02             |
| OD490nm               | ±0.02            | ±0.03             | ±0.03             | ±0.02            | ±0.01            |

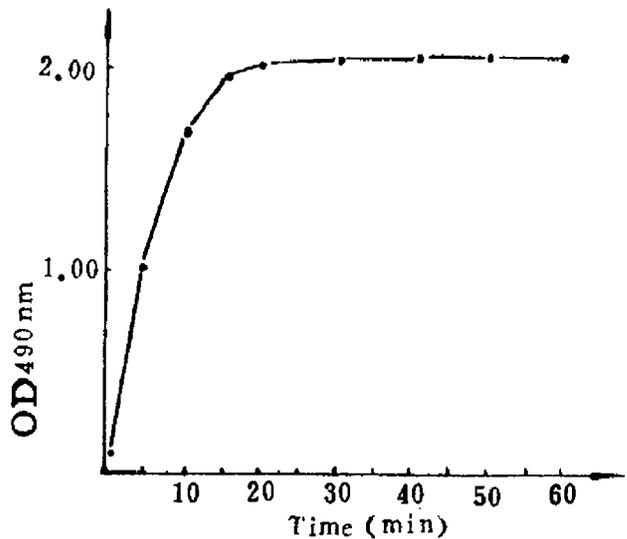
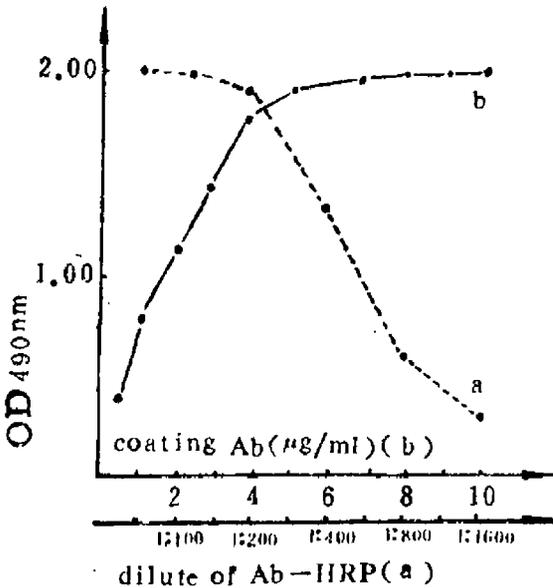


Fig. 1 The optimization of coating Ab concentration (b) and R×MIgG Ab-HRP dilution (a)

Fig. 2 The reaction time curve of R×MIgG Ab-HRP to murine IgG

① 所用杂交瘤株为本单位细胞室培养  
② 所用杂交瘤培养上清为上海细胞所吴筱清赠送

ELISA 最佳条件的选择 按不同的 R×MIgG Ab-HRP 稀释度及 R×MIgG Ab 包被浓度进行组合,结果显示(Fig. 1):随酶标物稀释度的提高,OD 值下降,但在酶标物稀释度过低时,( < 1:100)阴性对照(本底)的 OD 值也会提高,随包被抗体浓度的提高,鼠 IgG 捕获量增加,OD 值上升,在超过 5 μg/ml 时趋于平缓,故选择酶标物稀释度为 1:200,包被抗体浓度为 5 μg/ml. R×MIgG Ab-HRP 与鼠抗体的反应时间曲线(Fig. 2)显示:37℃温育 20 min 后即可达到完全,故选择酶标温育时间为 20 min.

各种血清及非抗体产生细胞培养上清对 ELISA 的影响

Tab. 2 The effect of various sera and non-antibody producing cell culture supernatants(c. s.) on ELISA

| Sera    | Bovine | Rabbit | Hores | Human | Goat  | McG803* | Gc7911* | D6+   | RPMI1640 |
|---------|--------|--------|-------|-------|-------|---------|---------|-------|----------|
| or      | serum  | serum  | serum | serum | serum | c. s.   | c. s.   | c. s. | culture  |
| c. s.   |        |        |       |       |       |         |         |       | medium   |
| OD490nm | 0.01   | 0.01   | 0.02  | 0.01  | 0.24  | 0.00    | 0.01    | 0.01  | 0.00     |
|         | ±0.00  | ±0.00  | ±0.01 | ±0.01 | ±0.03 | ±0.00   | ±0.01   | ±0.00 | ±0.00    |

\* Stomach cancer cell lines, +Lung cancer cell line

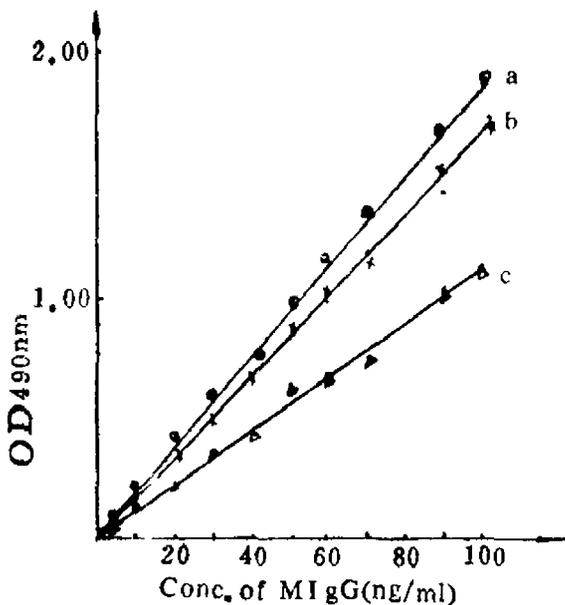


Fig. 3 Standard curves showing the relationship between OD490nm and murine IgG concentration in ELISA  
a. murine IgG<sub>2a</sub>, b. murine IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2b</sub>, c. murine IgG<sub>3</sub>

将 ELISA 实验过程中加鼠 IgG 这一步改为加各种血清(1:5 稀释)及非抗体产生细胞培养上清以考察其对 ELISA 的影响,结果表明(Tab. 2):除羊血清外,其它血清及上清对 ELISA 无干扰,但由于杂交瘤培养过程中一般不用羊血清作培养液添加剂,故羊血清的干扰不致对杂交瘤培养上清 McAb 含量的 ELISA 测定造成妨碍.

ELISA 测定鼠 IgG 各亚类抗体标准曲线

骨髓瘤 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub> 亚类标准为 Sigma 公司产品,各亚类抗体标准品均以 RPMI 1640 培养液(GIBCO 实验室产品,另加 10%小牛血清)配制,结果见 Fig. 3:各曲线在 5~100 ng/ml 内均呈较好的线性,其中 IgG<sub>1</sub> 及 IgG<sub>2b</sub> 二条标准曲线十分接近,而 IgG<sub>3</sub> 的标准曲线斜率较小,即 ELISA 对 IgG<sub>3</sub> 的灵敏度较低.

杂交瘤培养上清及腹水中 McAb 含量的测定

经 ELISA 方法测定的各杂交瘤培养

上清及腹水中 McAb 的浓度,与由 ProteinA-Sepharose 纯化、紫外吸收法测定的 McAb 浓度比较 (Tab. 3). 由表中结果可见,以 ELISA 法测定的 McAb 浓度稍高于 ProteinA-Sepharose 纯化、紫外吸收法测定的 McAb 浓度. 这可能是由于 ProteinA-Sepharose 纯化法未能将 McAb 完全回收所致<sup>[4]</sup>.

Tab. 3 The comparison of IgG concentration determined by UV absorbance and ELISA

| Monoclonal antibody         | IgG determination     |               | Number of ELISA determination | CV of ELISA (%) |
|-----------------------------|-----------------------|---------------|-------------------------------|-----------------|
|                             | UV absorbance (mg/ml) | ELISA (mg/ml) |                               |                 |
| anti-HCG<br>(in c. s.)      | 0.021<br>±0.005       | 0.022         | 10                            | 8.3             |
| anti-MGC803<br>(in c. s.)   | 0.015<br>±0.003       | 0.016         | 10                            | 10.2            |
| anti-HBsAg<br>(in c. s.)    | 0.030<br>±0.006       | 0.033         | 10                            | 7.5             |
| anti-HBC<br>(in c. s.)      | 0.025<br>±0.03        | 0.027         | 10                            | 7.8             |
| anti-HCG<br>(in ascites)    | 2.510<br>±0.006       | 2.591         | 10                            | 4.1             |
| anti-MGC803<br>(in ascites) | 3.653<br>±0.008       | 3.701         | 10                            | 3.1             |
| anti-HBC<br>(in ascites)    | 2.805<br>±0.005       | 2.900         | 10                            | 3.5             |

### 3 讨 论

Shields 指出<sup>[4]</sup>,在定量的 ELISA 中,亲和层析纯化的包被抗体及酶标抗体对于提高测定的灵敏度及可靠性极重要. 由于抗体经过亲和纯化,使包被的有效抗体量提高,从而使标准曲线的线性范围增宽(5~100 ng/ml),另外也把血清及细胞培养上清内非特异因子的干扰控制在较低的水平,提高测定值的可靠性. 这一点也许也适用于其它定量测定的 ELISA.

与 Shields 的报道相似,我们在实验过程中发现,适当的包被抗体浓度(5 µg/ml)对于增宽标准曲线的线性范围有好处,同时也不会降低测定的灵敏度(可以达到 1 ng/ml,但线性稍差一些). Fleming<sup>[9]</sup>认为,为了提高测定的灵敏度,包被抗体浓度应局限在较狭窄的范围(20~40 ng/ml),但这样其标准曲线的线性范围也狭(1~20 ng/ml). 实际上,杂交瘤培养上清中 McAb 浓度(5~50 µg/ml)或腹水中 McAb 浓度(2~20 mg/ml)<sup>[4]</sup>,往往超出标准曲线的线性范围,测定时需稀释. 因此,在实际测定过程中较宽的线性范围相对来说比灵敏度更重要.

在酶标稀释液中添加适量的正常兔血清或小牛血清,对于进一步降低待测样品中血清非特异因子对 ELISA 的干扰很重要. 因为即使包被抗体及酶标抗体均经亲和纯化,但反应体系中非鼠源血清中的免疫球蛋白对 ELISA 仍有微弱的干扰<sup>[8]</sup>. 这在我们测定羊血清对 ELISA 的

干扰实验中也得到了证实. 当酶标稀释液中只加 1% 小牛血清时, 不能抑制羊血清对 ELISA 的干扰 (OD 达 0.24), 但酶标稀释液改为添加 10% 羊血清时, 可把干扰降低到 OD 0.07. 这说明酶标稀释液中羊血清的加入, 可吸收掉酶标抗体中一些能与羊血清发生交叉反应的组分.

本文所描述的方法虽只是用来定量测定鼠 IgG 及其亚类, 但与定量测定其它种类的抗体的 ELISA 法有相似之处, 故估计应有比较广泛的适用性. 另外如能借助计算机进行结果处理, 可提高结果的准确性和可靠性, 减少人工计算的差错并减轻工作量<sup>[3]</sup>.

### 参 考 文 献

- 1 Manil L et al. *J. Immunol. Methods*, 1986, 90:25~32
- 2 Ferrante A et al. *J. Immunol. Methods*, 1986, 93:207~212
- 3 Slade, H B et al. *J. Immunol. Methods*, 1986, 94:169~179
- 4 Goding J W. *Monoclonal Antibodies Principle and Practice*, Academic Press, NY, 1983, 98~127
- 5 Kohn J et al. *Biochem & Biophys. Res. Commun.*, 1982, 107:878~884
- 6 Hudson L et al. *Practical Immunology*, 2nd Ed, Blackwell Scientific Publications, NY, 1980, 237~250
- 7 Watanabe M et al. *Jap. J. Exp. Med.* 1981, 51:65~70
- 8 Shields J G et al. *J. Immunol. Methods*, 1986, 87:29~35
- 9 Fleming J O et al. *J. Immunol. Methods*, 1988, 110:11~18

## The Quantitation of IgG Monoclonal Antibodies in Hybridoma Culture Supernatants and Ascites by ELISA

Chen Ruichuan Lu Fang Lu Yuying

(*Ca. Res. Cen.*)

**Abstract** An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been investigated for quantitating IgG monoclonal antibodies by using affinity-purified rabbit antimouse IgG antibody and its HRP conjugate for capture and detection. The results proved that the bovin serum, horse serum, rabbit serum, human serum and non-antibody producing cell culture supernatants did not interfere with the ELISA. Therefore, the results were reliable. The linear ranges of standard curves of all mouse IgG subclasses were in the 5~100 ng/ml. This rapid and reliable assay may allow practically applicable in many situations in which quantiting murine monoclonal antibodies is needed.

**Key words** ELISA, Quantitation, McAb