文章编号:1000-5404(2007)08-0685-03

论著

Endoglin结合肽功能性亲和常数的测定

毕仙民,梁志清,侍立峰 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 测定人源Endoglin结合肽的亲和常数。**方法** 采用非竞争性ELISA固相法,经戊二醛偶连法包被多肽,确定最佳多肽包被浓度、最佳多肽包被时间及最佳多肽与Endoglin结合反应时间后,得到了结合肽及抗Endoglin IgG与Endoglin的抗原抗体结合反应曲线,计算出结合肽及抗Endoglin IgG与Endoglin的亲和常数。**结果** 结合肽及抗Endoglin IgG的功能性亲和常数分别为$(2.956 \pm 0.749) \times 10^6$ mol/L和$(7.403 \pm 10.76) \times 10^8$ mol/L。**结论** 该结合肽与Endoglin的结合能力较强。

关键词:酶联免疫吸附测定;rhEndoglin;结合肽;抗体亲和力
中图法分类号:Q503;Q516 **文献标识码**:A

Determination of functional affinity of rhEndoglin conjugated eptide

BI Xian-min, LIANG Zhi-qing, SHI Li-feng (Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To assess functional affinity of rhEndoglin conjugated eptide in order to identify the affinity. Methods We measured the functional affinity of rhEndoglin conjugated eptide with non-competitive ELISA method. After coating the peptide by BSA binding with glutaral couple, affirming the best concentration, best time of peptide to coat the plate and the coating coefficient, and the proper binding time of peptide to Endoglin to reach an equilibrium, we plotted the standard curve of the binding reaction of peptide and Endoglin. Results The affinity constant of peptide and anti-hEndoglin IgG is respectively $(2.956 \pm 0.749) \times 10^6$ mol/L and $(7.403 \pm 10.76) \times 10^8$ mol/L. Conclusion The peptide we got from the peptide liberary can strongly bind to Endoglin, providing a theoretical basis for its clinical use.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay; rhEndoglin; conjugated eptide; antibody affinity

Endoglin又名CD105,是内皮细胞表面与增殖相关的膜抗原,在正常组织中不表达,在有活性血管生成区域及肿瘤组织中特异性高表达[1],与肿瘤进展密切相关,是卵巢癌等恶性肿瘤早期诊断和治疗的理想的分子靶位[2,3]。噬菌体随机肽库技术是将大量的随机肽段以融合形式表达在噬菌体的表面,使用模拟多肽的思想,在对筛选的配体或受体的结构和功能了解甚少的情况下获得其模拟多肽,可作为一个良好的靶向载体[4,5];这种导向治疗是一种重要的抗肿瘤治疗手段,其关键是短肽与靶分子的结合特性。为此我们对噬菌体随机十二肽库技术进行筛选,在获得与rhEndoglin胞外区特异性结合的12肽的基础上,对结合肽的亲和活性进行测定,为进一步研究靶向治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

十二肽(AHKHVHHVPVRL)由上海基因生物工程有限公司合成,纯度>95%;rhEndoglin蛋白、anti-hEndoglin IgG、Biotinylated anti-hEndoglin IgG、Substrate Reagent pack、streptavidin-HRP、Stop Solution均购于R&D公司;PBSN包板液、Wash Buffer(0.05% PBST, pH 7.4)、Diluent(1% BSA PBSN包板液、Wash Buffer(0.05% PBST, pH 7.4)、Diluent(1% BSA/PBS, pH 7.4)均参照《分子克隆》自行配制;Bio-Rad M500自动读板仪。

1.2 方法

1.2.1 多肽的戊二醛偶联 取10.2 mg BSA以pH 10硼酸

基金项目:国家自然科学基金(30271360)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30271360)
作者简介:毕仙民(1977-),女,山西省运城市人,硕士研究生,医师,主要从事妇产科肿瘤方面的研究。电话:13372632797,E-mail:xianmin_bi@163.com
通讯作者:梁志清,电话:(023)68754409
收稿日期:2006-08-20;修回日期:2007-01-29

缓冲液充分溶解，加入2.1 mg合成肽（BSA与合成肽分子比为1∶10），震荡过程中缓慢加入0.3%戊二醛1 ml，37 ℃温箱中作用2 h，加入1 mol/L甘油0.25 ml，温箱中继续反应30 min，以pH 8.5硼酸缓冲液透析24～48 h，换液4次，-20 ℃保存备用。

1.2.2 确定多肽最佳包被浓度 用PBSN梯度稀释多肽至10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 μg/ml浓度包被微孔板，100 μl/孔，同时设置内对照及封阻液、PBS阴性对照；4 ℃过夜孵育，PBST洗板后每孔加入300 μl封阻液，室温孵育1 h；再次洗板后将Endoglin以200 ng/ml向每孔加入100 μl，室温孵育2 h；洗板将Biotinylated anti-hEndoglin IgG以100 ng/ml向每孔加入100 μl，室温孵育8 h；再洗板，每孔加入100 μl streptavidin-HRP，室温孵育20 min；加入显色液避光显色25 min；50 μl/孔硫酸终止反应；读$D(450)$并做出曲线。

1.2.3 确定多肽最佳包板时间 将多肽用PBSN包板液稀释至2.5 μg/ml，100 μl/孔，同时以封阻液及PBS做阴性对照。共设6组，4 ℃孵育每组时间分别为2、8、16、24、48、72 h；其后封闭，加入抗体、酶标抗体及显色过程同1.2.2。

1.2.4 确定最佳抗原抗体反应时间 用PBSN包板液稀释多肽至2.5 μg/ml，100 μl/孔，同时以封阻液及PBS做阴性对照；洗板及封闭后将Endoglin稀释至200 ng/ml，每孔加入100 μl，共设6组，4 ℃孵育每组时间分别为2、8、16、24、48、72 h；其后显色过程同1.2.2。

1.2.5 测定不同浓度多肽包板条件下Endoglin结合反应曲线 用PBSN包板液将多肽稀释为10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 μg/ml 6个浓度后依次加入微孔板，每孔100 μl，同时设置内对照及封阻液、PBS分别做阳性、阴性对照。洗板及封闭后将200、100、50、25 ng/ml的Endoglin加入包被的抗原孔中，100 μl/孔，每浓度2孔，室温孵育8 h，其后显色过程同1.2.2。

1.2.6 测定不同浓度anti-hEndoglin IgG包板条件下Endoglin结合反应曲线 以抗Endoglin IgG倍比系列浓度4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg/ml代替多肽重复实验1.2.5。

1.2.7 抗体亲和常数（affinity constant）的计算公式 经典的质量作用定律（law of mass action）适用的是均一液相体系中抗原抗体反应达平衡时的状况，这种情况下需实验测定反应体系中游离抗原、游离抗体浓度。然而将质量作用定律适当变形后发现，在一定的条件下，抗体亲和常数可由反应体系中总抗体浓度计算得出，从而简化测定程序[6]。

质量作用定律方程如下：

$K = [AgAb] / [Ag] \cdot [Ab]$

其中，[Ag]、[Ab]为反应体系达平衡时游离抗原、游离抗体浓度，[AgAb]为抗原抗体复合物浓度。

经变形、推导后公式如下：

当$[Ag]_{总} = n[Ag']_{总}$时，总有$K = (n-1) / (n[Ab']_{总} - [Ab]_{总})$

由此，经过公式的推导消除了抗原影响因素。因而在采用非竞争性ELISA法测定抗体亲和常数过程中不需知道确切的抗原浓度，仅根据结合反应曲线中$D(450)$的一半时的抗体浓度，便能可靠地计算出抗体的亲和常数。如果考虑IgG双价结合情况，则上述公式中应加入效价影响因素，于是变形为$K = (n-1)/2(n[Ab']_{总} - [Ab]_{总})$。以上是采用非竞争性ELISA法测定抗体亲和常数的理论基础。由于在多肽的包被效率较低，为了计算的准确性，我们设包被系数为D，于是公式变形为$K = D(n-1)/2(n[Ab']_{总} - [Ab]_{总})$。

2 结果

2.1 确定多肽最佳包板浓度

用多肽以倍比稀释浓度10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 μg/ml包板时，其$D(450)$分别为1.581、1.121、0.602、0.346、0.215、0.172，均在0.15～2.5之间，说明该范围内$D(450)$与多肽的包板浓度线性关系良好。我们取此6个浓度测定抗原抗体反应曲线。

2.2 确定多肽最佳包板时间

以2.5 μg/ml多肽包板为代表来确定多肽最佳包板时间。结果提示最佳包板时间为16 h，时间过短或过长包被效率均有所下降。

2.3 确定最佳抗原抗体反应时间

以2.5 μg/ml多肽包板，与200 ng/ml Endoglin反应为代表测定了最佳抗原抗体反应时间。结果表明共同孵育8 h后$D(450)$达最大，随着时间的延长$D(450)$反而降低。

2.4 测定不同浓度包板条件下多肽及抗Endoglin IgG与Endoglin结合反应曲线

以5%递减法确定出4条曲线右侧的结合反应平台期（以200、100、50、25 ng/ml的Endoglin与多肽及抗Endoglin IgG结合），通过做图法取其最大$D(450)$一半处对应的抗体浓度（分别对应图中1、2、3、4点）。多肽在1、2、3、4处浓度分别为：410、430、460、400 ng/ml（图1）。抗Endoglin IgG在1、2、3、4处浓度分别为：80、83、88、79 ng/ml（图2）。

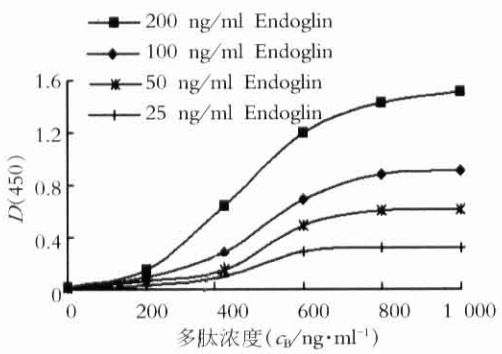


图1 多肽与Endoglin结合反应曲线

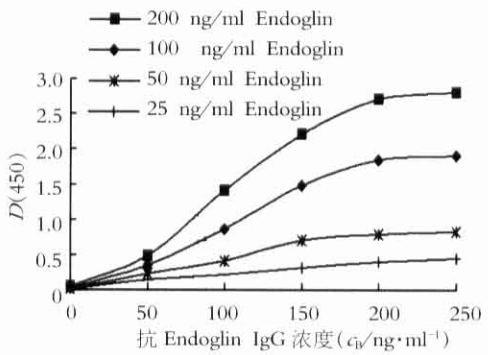


图 2　抗 Endoglin IgG 与 Endoglin 结合反应曲线

2.5　包被系数的计算

分别取两条曲线趋直线部分的抗体浓度计算包被系数[4]：[包被前 $D(280)$ − 未结合液体 $D(280)$]/包被前 $D(280)$，所得的值求算术均数结果分别为：多肽包被系数为 0.308，抗 Endoglin IgG 包被系数为 0.810。

2.6　多肽及抗 Endoglin IgG 的功能性亲和常数

根据上述公式，计算出多肽（相对分子质量 1.4×10^3）及抗 Endoglin IgG（相对分子质量 150×10^3）的功能性亲和常数分别为 $(2.956\pm0.749)\times10^6$ mol/L 和 $(7.403\pm10.76)\times10^8$ mol/L。

3　讨论

卵巢癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一，其病死率已居女性生殖道恶性肿瘤之首，噬菌体展示技术为恶性肿瘤的诊断和治疗提供了新的契机。与完整抗体 IgG 相比较而言，小分子肽具有结构简单，分子质量小，在组织中具有良好的穿透性和扩散性，非常适用于肿瘤的导向治疗。对于小分子肽活性的鉴定，亲和常数的测定是其关键环节[7]。

亲和常数是表示抗原表面单一决定簇与相应抗体的单一结合位点间的结合强度，是对抗原抗体间作用最本质的描述。经典的测定抗体亲和常数的方法是 20 世纪 50 年代左右发展起来的平衡透析法（equilibrium dialysis）[8]。该法的全部抗原抗体反应过程在均一液相体系中完成，基本上符合质量作用定律的前提条件。但该法仅适用于小分子抗原与抗体间亲和常数的测定，且过程繁琐，不易推广。固相法测定亲和常数不受抗原分子量大小的制约，随后 Beatty 及 Loomans 等[9,10]从理论和实验上均证明了该法与平衡透析法测得的亲和常数值相当吻合。

本实验中我们采用的多肽的包板浓度与 $D(450)$ 线性关系良好，为使其包板效果达到最佳，先将小分子肽与戊二醛偶联后包被 ELISA 板，并引入了包被系数，以最大限度的减少实验结果的偏差。对抗原包被时间的影响，我们测定了具体的抗原包被时间与 $D(450)$ 的关系，提示包板 16 h 效率最高。相应地对 IgG 而言，实验条件要求更加严格，在与包被在固相载体上的抗原发应时，相邻的 IgG 分子干扰较大，且测定的结果多反映是 IgG 双价结果的综合结果[11]。

非竞争性 ELISA 法测定亲和常数操作简便易行，结果可靠。实验测得的结果提示，结合肽（AHKHVHHVPVRL）与 rhEndoglin 具有较强的结合力，为进一步的临床应用奠定基础。

参考文献：

[1] Miler D W, Graulich W, Karges B, *et al*. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells [J]. Int J Cancer, 1999, 81(4): 568 − 572.

[2] Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra M R, *et al*. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels[J]. Oncogene, 2003, 22(42): 6557 − 6563.

[3] Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer[J]. J Transl Med, 2004, 2(1): 18.

[4] 侍立峰，梁志清. 利用噬菌体肽库技术筛选卵巢特异的 VEGFR3 亲和肽[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 308 − 310.

[5] 毕仙民，梁志清，侍立峰. 应用噬菌体肽库筛选 Endoglin 的结合肽[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 582 − 584.

[6] Engelmann K, Baldus S E, Hanisch F G. Identification and topology of variant sequences within individual repeat domains of the human epithelial tumor mucin MUC1[J]. J Biol Chem, 2001, 276(30): 27764 − 27769.

[7] 韩焕兴，范列英，胡栋平，等. 人源抗乙肝病毒表面抗原单克隆抗体的抗原结合活性[J]. 中华医学杂志, 1996, 76(6): 467 − 468.

[8] Azimzadeh A, Van-Regenmortel M H. Antibody affinity measurements [J]. J Mol Recognit, 1990, 3(3): 108 − 116.

[9] Beatty J D, Beatty G B, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1 − 2): 173 − 179.

[10] Loomans E E, Roelen A J, Van-Damme H S, *et al*. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(2): 207 − 217.

[11] Bruderer U, Deusinger M, Schurch U, *et al*. Analyses of affinity distributions within polyclonal populations of antigen-specific antibodies. Evaluation of their accuracy in population detection using monoclonal antibodies[J]. J Immunol Methods, 1992, 151(1 − 2): 157 − 164.

（编辑　栾　嘉）