维普资讯 http://www.cqvip.co

文章编号:0253 - 3626(2005)01 - 0092 - 03

包裹碱性磷酸酶免疫脂质体的制备

黄锦江[1], 黄文方[2], 刘小琦[2], 杨明清[2], 涂植光[1]

(1. 重庆医科大学医学检验系,重庆 400016;2. 四川省人民医院检验科,成都 610072)

【摘 要】目的:制备包裹碱性磷酸酶的免疫脂质体并评价实验方法。方法:采用逆相蒸发法、薄膜分散法制备包裹碱性磷酸酶的脂质体,应用戊二醛交联法、抗体衍生化法将脂质体与兔抗人 IgG 结合,使脂质体既包裹酶又具有免疫活性。对制备方法进行了分析比较。结果:应用逆相蒸发法制备的脂质体数量多,圆整均匀,具有较高的碱性磷酸酶活性;以戊二醛为交联剂结合抗体方便、高效、实用。结论:通过选择适当的实验方法,制备了具有酶和抗体活性的免疫脂质体。

【关键词】碱性磷酸酶;免疫脂质体;抗体;制备

【中国图书分类法分类号】R392.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 05 - 24

Preparation of immunoliposomes encapsulating alkaline phosphatase

HUANG Jinjiang, et al

(*Faculty of Clinical Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare immunoliposomes encapsulating alkaline phosphatase and to evaluate the methods. *Methods*: The liposomes containing alkaline phosphatase were prepared by reverse phase evaporation or film dispersion. Liposomes and rabbit anti - human IgG were conjugated by glutaraldhyde or deriving antibody. Not only did the liposomes encapsulate alkaline phosphatase but also they had immune activity. All methods were analyzed and compared. *Results*: Many liposomes prepared by reverse phase evaporation had perfect shape and high bioactivity of alkaline phosphatase. The glutaraldhyde method conjugating antibody was convenient, efficient and practical. *Conclusion*: Immunoliposomes with bioactivity of enzyme and antibody are prepared through reasonable methods.

【Key words】Alkaline phosphatase; Immunoliposome; Antibody; Preparation

脂质体(liposome)是由一层或多层类脂质双分子层形成的超微型球状封闭小囊,作为药物、基因、抗原、免疫佐剂的载体制剂得到广泛研究[1]。脂质体还可以作为染料、酶的载体,利用脂质体与蛋白质偶联获得免疫脂质体,建立脂质体免疫试验(liposome immunoassay, LIA),用于体外检测诊断[2]。通过实验条件优化,一个大单层脂质体囊泡能包被上百个辣根过氧化物酶分子,结合数个抗体分子。包被后的酶保留较高活性,极大地提高反应的灵敏度。脂质体还可以连接多种抗原或抗体制备多价诊断试剂。本文利用脂质体包裹碱性磷酸酶,对免疫脂质体的制备及其相关影响因素进行了探讨,成功地制备了既具有免疫反应的特异性,又具有酶反应的放大性的免疫脂质体,为临床相关物质的检测提供了一条新途径,具有较高的实用价值。

作者介绍:黄锦江(1977 -),女,硕士研究生,
主要研究方向:临床检验诊断学。

1 材料与方法

1.1 材料

卵磷脂、胆固醇、磷脂酰乙醇胺、N - 羟琥珀酰亚胺棕榈酸酯(NHSP)、碱性磷酸酶(AKP)均为进口原装 SIGMA 试剂;兔抗人 IgG、对硝基酚磷酸盐(pNPP)购自华美生物工程公司;25% 的戊二醛水溶液为 E. Merck 进口分装;去氧胆酸钠、Triton x - 100 购自上海化学试剂公司. RE52 - 99 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);日立 H - 600 型透射电子显微镜;BECKMAN 超速低温离心机。

1.2 方法

1.2.1 碱性磷酸酶脂质体的制备

改良逆相蒸发法:将一定比例的卵磷脂、胆固醇、磷脂酰乙醇胺溶于氯仿、乙醚混合有机溶剂中,减压旋转蒸发形成薄膜。再加入有机溶剂和含 AKP 的 Tris - HCl 缓冲液,短时超声处理后,在 30℃ 恒温水浴中旋转蒸发至粘性凝胶状,再继续减压蒸发凝胶转相呈液态,补充一定量的 Tris - HCl 缓冲液,超声处理即得 AKP 脂质体。

维普资讯 http://www.cqvip.com

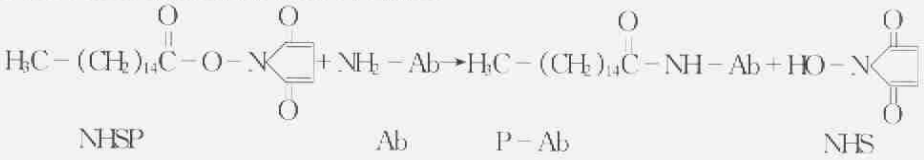
薄膜分散法：将卵磷脂、胆固醇、磷脂酰乙醇胺溶于氯仿、乙醚混合有机溶剂中，减压旋转蒸发制备薄膜。向茄形瓶中加入含 AKP 的 Tris－HCl 缓冲液，旋转洗脱薄膜，待薄膜被完全洗脱下来后，超声处理即得 AKP 脂质体。

1.2.2 碱性磷酸酶脂质体的纯化及酶活性检测

将两种方法制备的脂质体在 2×10^4r/min 转速下，4℃离心 30min，弃去上清液，用 Tris－HCl 缓冲液重复洗涤离心 2 次，弃去上清液，将各管沉淀脂质体重悬于 3ml Tris－HCl 缓冲液中，置冰箱 4℃储存备用。电镜观察脂质体形态大小。为检测脂质体包裹的碱性磷酸酶活性，将已纯化的脂质体溶液定量稀释后取 50μl 与 50μl Triton x－100 反应，再加入 1ml pNPP 底物缓冲液，37℃显色 30min，用 1mol/L NaOH 液终止反应，在波长 405nm 处测定吸光度值。

1.2.3 戊二醛交联法制备免疫脂质体

经过检测分析，选择改良逆相蒸发法制备的大单层脂质



衍生抗体与脂质体偶联：将卵磷脂、胆固醇、磷脂酰乙醇胺溶于氯仿、乙醚混合有机溶剂中，加入含 AKP 的 Tris－HCl 缓冲液，短时超声处理使混合物乳化形成均一相。在旋转蒸发器上去除有机溶剂至凝胶状，加入 1ml Tris－HCl 缓冲液震荡，室温下暴露在空气中 2h，再加入 0.5ml 含衍生抗体的 Tris－HCl 缓冲液，室温放置 2h，4℃透析 2h 除去残留的有机溶剂。超速离心纯化免疫脂质体并检测脂质体偶联抗体的含量。

2 结 果

2.1 脂质体不同制备方法的比较

本研究对改良逆相蒸发法和薄膜发散法制备的脂质体进行了比较。改良逆相蒸发法制备的脂质体为大单层脂质体(LUVs)，数量多，直径较大，分布均匀，电镜结果显示如图 1；薄膜分散法所制备出来的脂质体多为小单层脂质体(SUVs)，直径小，分布较均匀，电镜结果显示如图 2。两种方法制备的脂质体纯化后，检测碱性磷酸酶活性结果如表 1 所示。

2.2 不同交联方法对抗体偶联效率的影响

以戊二醛为交联剂制备免疫脂质体时，随着戊二醛浓度的增加抗体偶联效率也相应提高。但如果戊二醛浓度过大，不仅会引起脂质体之间、抗体之间的相互交联，而且对脂质体的形态破坏很大[5]。因此，试验中选择 1ml 脂质体溶液加入 20μl 戊二醛溶液。戊二醛交联法、抗体衍生化法偶联兔抗人 IgG 体进行进一步研究。取该脂质体溶液 1ml 加入 20μl 25%戊二醛，室温静置 2h。过量的戊二醛经透析除去，透析时间为 2h，中间换液 1 次。加入 1ml 兔抗人 IgG 溶液，0.1ml Tris－HCl 缓冲液，4℃放置 24h。2×10^4r/min 转速下，4℃离心 30min，重复洗涤离心 2 次分离出游离抗体，收集沉淀脂质体重悬于 Tris－HCl 缓冲液中备用。用 Bradford 比色法检测脂质体中的抗体含量[3]，用硫氰酸铵显色法检测脂质体中磷脂含量[4]。蛋白质偶联百分率＝偶联上的蛋白质量/起始蛋白质量。

1.2.4 抗体衍生化法制备免疫脂质体

抗体衍生化：取 1ml 兔抗人 IgG 加 A，2ml Tris－HCl 缓冲液中，加入溶于 2% 去氧胆酸钠 0.1ml 的偶联剂 NHSP100μg，37℃温育 16h，然后用 Tris－HCl 缓冲液 4℃透析 48h。抗体衍生化反应为：

结果如表 2 所示。

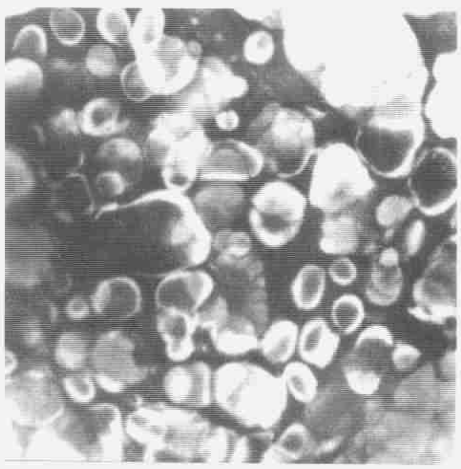


图 1 LUVs 负染电镜照片(×15 000)

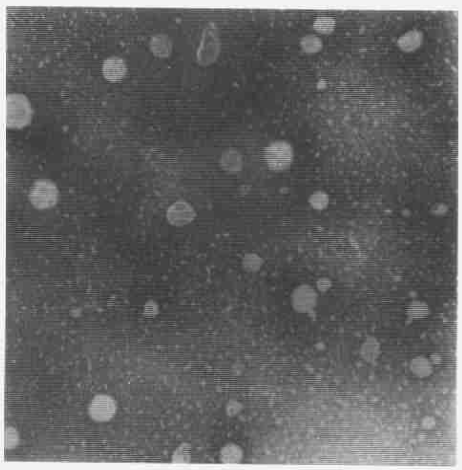


图 2 SUVs 负染电镜照片(×20 000)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 两种脂质体碱性磷酸酶活性比较

项目	大单层脂质体(LUV)						小单层脂质体(SUV)					
	原液	1:5	1:10	1:20	1:40	1:8	原液	1:5	1:10	1:20	1:40	1:8
OD_{405}	1.38	1.38	1.35	1.34	1.27	0.97	1.13	0.74	0.51	0.38	0.21	0.06

表 2 不同交联方法对抗体偶联效率的影响

方法	结合脂质体的蛋白质(mg/ml)	蛋白质:磷脂(mg/mg)	蛋白质偶联百分率(%)
戊二醛交联法	1.06	0.128	23.8
抗体衍生化法	1.61	0.193	35.6

3 讨 论

制备脂质体的方法很多,理想的方法要求既能达到较好的蛋白质包封效果又能维持较高的酶活性。本文对应用最为广泛的两种脂质体制备方法进行了探讨,实验研究表明:虽然薄膜分散法制备脂质体条件温和,易于控制,但它对蛋白质包封效果不理想,脂质体碱性磷酸酶活性不高;在优化条件下应用逆相蒸发法制备的脂质体数量多,分布均匀,具有较高的碱性磷酸酶活性,符合检测诊断试剂的要求。

脂质体与抗体的偶联是制备免疫脂质体的关键,实验比较了戊二醛交联法、抗体衍生化法对偶联效率的影响。戊二醛为一种双功能交联剂,通过其醛基分别与脂质体和免疫球蛋白上的氨基共价结合,形成脂质体-戊二醛-免疫球蛋白结合物。虽然制备免疫脂质体过程中难免存在抗体之间、脂质体之间的相互交联,但选择一定浓度的戊二醛亦能达到较满意的偶联效果。由于该法方便经济,故具有较好的应用前景。值得注意的是所用戊二醛应为新鲜纯品,因为戊二醛储存过久可形成缩和体杂质影响偶联效果。抗体衍生化法利用抗体与脂质通过化学键结合,生成双亲性的衍生化抗体后掺入脂质体膜,较戊二醛交联法偶联效率高,但 N-羟琥珀酰亚胺棕榈酸酯(NHSP)价格较贵,限制了该方法的推广应用。实验通过制备免疫脂质体并探讨其优化条件,为建立体外脂质体免疫试验(LIA)奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Sungsu Park, Richard A. Immunoliposome sandwich assay for the detection of Escherichia coli O157:H7[J]. Anal Biochemistry, 2000;280(1):151-158.

[2] Kim CK, Lim SJ. Liposome immunoassays using phospholipase C or alkaline phosphatase[J]. Methods Enzymol, 2003;373(2):260-277.

[3] 叶伟民,韩焕兴,范列英,等. Bradford 比色法简便、快速测定微量蛋白[J]. 上海医学检验杂志,1996;11(4):207-208.

[4] Roger RC NEW. Liposomes: A practical approach[M]. New York: Oxford University Press, 1990:108-109.

[5] 汪 冰,杨翰仪. 单克隆抗体偶联脂质体的制备及其与胃癌细胞特异结合研究[J]. 沈阳药学院学报,1994;11(1):17-20.