维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol. 19 No. 4
1994 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

单克隆抗体ELISA法测定血清免疫球蛋白G亚类

儿童医院 张远维 蒋利平 杨锡强

提 要 采用单克隆抗体(单抗)和WHO67/97标准血清建立ELISA法测定人血清免疫球蛋白G(IgG)亚类浓度。结果表明:本法敏感(最低可测值为2.1ng/ml,可测范围为100倍),精确(不同批测定平均变异系数≤8.06%)。所用单抗特异性强,反应性好,IgG亚类之和与常规单扩法所测总IgG值密切相关($r=0.96$, $P<0.01$)。强调将单抗包被于经BSA—戊二醛处理的微孔板上,能明显提高单抗吸附力和反应性;两种单抗混合包被可增加IgG亚类同种异型覆盖面。

关键词 单克隆抗体;ELISA;IgG亚类
中图分类号 R392—33

鼠抗人IgG亚类单克隆抗体的问世,使IgG亚类定量测定已广泛用于基础和临床医学,但至今还无一种公认的满意的检测方法。本文采用鼠抗人IgG亚类单克隆抗体和WHO67/97标准血清以酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定血清IgG亚类浓度。

材料和方法

1. 试剂来源及配制

(1)单克隆抗体:鼠体人IgG亚类单克隆抗体HP6001、HP6069(抗IgG),HP6002、HP6014(抗IgG_2),HP6047、HP6050(抗IgG_3),HP6020、HP6025(抗IgG_4)(Reimer博干赠送,Center for Disease Control,Atlanta,Georgia 30333),用时以PBS稀释到合适浓度。

(2)标准血清:采用WHO67/97参考血清(Skvaril博干赠送,WHO/IUIS,Switzerland)绘制各种IgG亚类标准曲线,用人血清免疫球蛋白参考血清作为质控血清(上海生物制品研究所)。

(3)其他试剂及仪器设备 辣根过氧化物酶标记羊抗人IgG抗体(北京生物制品研究所)。邻苯二胺、过氧化氢、牛血清白蛋白(BSA)、戊二醛(上海化学试剂站);聚苯乙烯55孔微孔板、酶标光度计Gxm—201(四川分析仪器厂),pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)、pH5枸橼酸盐缓冲液、pH7.4PBS—Tween20清洗液、2M硫酸均为自配。

2. 血清标本来源 静脉血采自重庆市某产婴室、托儿所、小学0月~13岁的211名正常儿童,20名健康成人献血员。标本储于−20℃冰箱备用。

3. 血清IgG测定 采用多克隆抗体单向免疫扩散法(单扩法)。

4. 血清IgG亚类测定 采用Papadea酶免疫吸附试验[1],略去改良。(1)加0.02%BSA于聚苯乙烯55孔微孔板上,37℃至完全干燥;(2)加0.20%戊二醛,37℃30分钟后倾去,以蒸馏水冲洗5次,37℃至完全干燥,密封备用(可放置半年)。(3)加适当稀释的鼠抗人IgG亚类单克隆抗体(单抗),37℃至完全干燥;(4)加入1%BSA,37℃湿盒孵育1小时;(5)加适当稀释度的WHO67/97标准血清、标本血清和质

维普资讯 http://www.cqvip.com

控血清(以含1%BSA的pH7.4PBS稀释),37℃湿盒孵育2小时;(6)加适当稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗人IgG抗体(以含1%BSApH7.4PBS—Tween20稀释),37℃2小时;(7)底物液(邻苯二胺10mg+过氧化氢38ul+底物缓冲液25ml)。以上各步骤除注明者外,均用pH7.4PBS稀释,每孔加0.1ml。3～7各步间均需倾去孔中液,以pH7.4PBS—Tween20清洗液冲液5次。(8)每孔加入2mol硫酸0.05ml,5分钟后在酶标光度计上以λ=492nm测光密度(OD)。每块板均作一条标准曲线和两个稀释度的质控血清。每一稀释度血清均作双孔测定。以已知IgG亚类浓度WHO67/97作标准曲线,质控血清控制结果的准确性,计算出标本血清IgG亚类浓度。

5. 统计学处理　算出同一批重复测定和不同批重复测定质控血清IgG亚类浓度的变异系数,单抗ELISA法所测正常儿童和成人血清四种IgG亚类值之和与其多克隆抗体单扩法所测总IgG值作相关分析和t检验;用多元线性回归、多元线性相关法分析IgG及其亚类之间的相互关系。

结　果

1. 测定211例正常儿童及20名健康献血员的IgG亚类结果如下(见表1),211名不同年龄正常儿童血清IgG亚类均值总趋势与美国[2]、瑞典[3]所测值基本一致,但在个别年龄组存在显著差异。

2. 单克隆抗体的反应性

(1)包被方法对单抗反应性的影响:八种单抗直接包被于微孔板上,置4℃湿盒72小时,尽管其浓度高达1∶200,采用各种浓度的WHO67/97血清及酶标抗体,均无显色反应。而将各种单抗包被于经BSA、戊二醛预处理的微孔板,其稀释度达1∶1200时,WHO67/97血清含IgG亚类仅0.21ng/ml,酶标抗体为1∶200,显色反应良好,OD值与浓度呈线性变化,OD值可达1.2。将单抗包被于用生理盐水蒸馏水预处理的微孔板,虽有显色反应但其浓度梯度变化不大,OD值最高仅为0.62。

(2)不同组合单抗对其反应性的影响(见图1、表2)。分别采用单一和两种单抗混合包

表1　正常儿童血清IgG及其亚类水平(mg/ml)

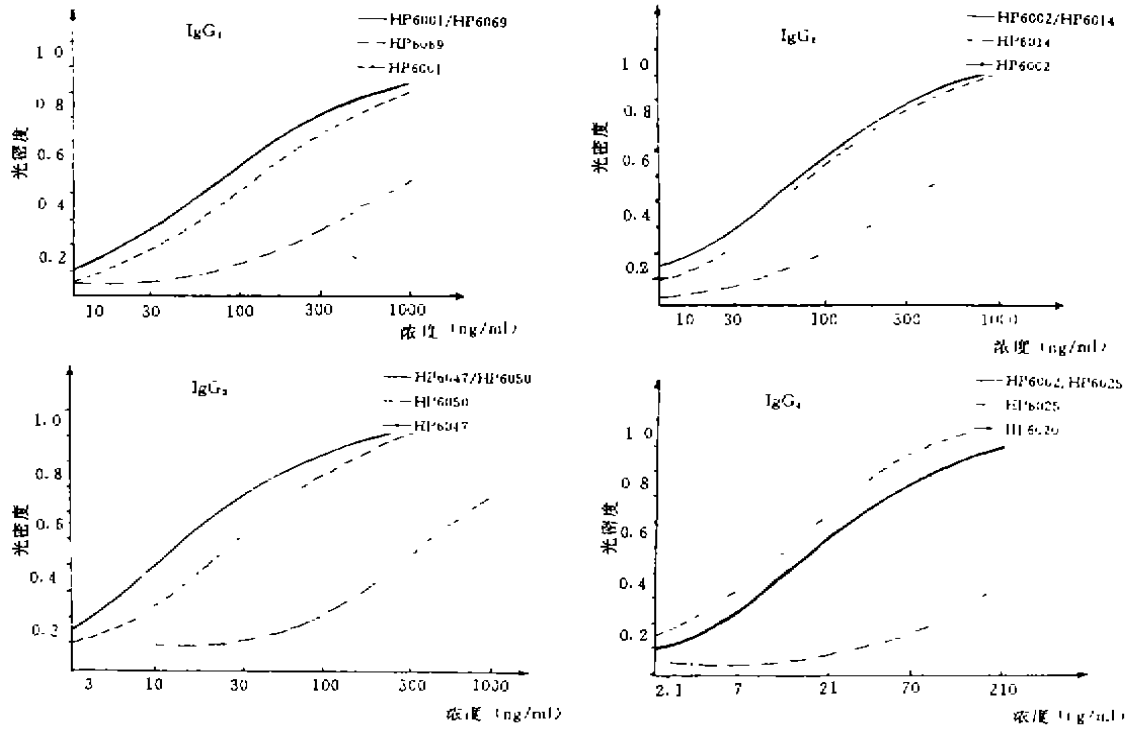
年龄	例数	IgG $\bar{x}$ s (95%范围)	IgG_1 $\bar{x}$ s (95%范围)	IgG_2 $\bar{x}$ s (95%范围)	IgG_3 $\bar{x}$ s (95%范围)	IgG_4 $\bar{x}$ s (95%范围)
0月—24		9.21 0.33 (5.88—13.52)	5.64 0.90 (3.88—7.40)	2.27 0.43 (1.41—3.11)	0.56 0.11 (0.34—0.78)	0.35 0.08 (0.19—0.51)
3月—6		3.39 0.90 (1.63—5.15)	2.28 0.32 (1.65—2.91)	0.69 0.12 (0.45—0.93)	0.27 0.05 (0.17—0.37)	0.16 0.05 (0.06—0.26)
6月—17		5.50 0.61 (4.30—6.70)	3.31 0.51 (2.31—4.31)	1.13 0.16 (0.82—1.44)	0.33 0.06 (0.21—0.45)	0.19 0.05 (0.09—0.29)
1岁—33		5.62 1.14 (3.39—7.85)	3.46 0.77 (1.95—4.97)	1.38 0.40 (0.60—2.18)	0.36 0.08 (0.20—0.57)	0.22 0.07 (0.08—0.36)
3岁—40		6.73 1.31 (4.16—9.30)	4.15 0.79 (260—5.70)	1.74 0.50 (0.76—2.72)	0.39 0.09 (0.21—0.65)	0.23 0.10 (0.03—0.43)
5岁—40		8.12 0.21 (5.15—10.64)	5.00 0.77 (3.49—6.51)	2.11 0.40 (1.33—2.89)	0.50 0.09 (0.32—0.68)	0.31 0.07 (0.17—0.45)
7岁—24		9.13 1.33 (6.52—11.74)	5.62 0.93 (3.80—7.44)	2.44 0.46 (1.54—3.34)	0.57 0.13 (0.31—0.83)	0.31 0.07 (0.17—0.45)
10—13岁	27	10.38 1.64 (7.17—13.59)	6.35 0.94 (4.51—8.19)	2.83 0.44 (1.97—3.69)	0.64 0.11* (0.42—0.86)	0.39 0.10 (0.19—0.59)
成人	20	11.57 1.87 (7.90—15.24)	7.24 1.16 (4.97—9.51)	3.26 0.61 (2.06—4.46)	0.68 0.11 (0.46—0.90)	0.44 0.09 (0.26—0.62)

*　表示与成人比较差异无显著性,$P>0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　鼠抗人 IgG 亚类单克隆抗体 ELIS 法对 WHO67/97 的反应性

单克隆抗体（包被抗体）	特异性[G]	稀释度	测定范围 (ng/ml)	酶标抗体稀释度	光密度 (OD)	反应性
HP6001	IgG1,Fc	1∶1200	10—1000	1∶100	0.06—0.45	差
HP6069	IgG1,Fc	1∶1200	10—1000	1∶200	0.06—0.82	好
HP6001/HP6069	IgG1,Fc/IgG1,Fc	1∶1200	10—1000	1∶200	0.10—0.84	好
HP6002	IgG2,Fc	1∶1200	10—1000	1∶100	0.04—0.62	差
HP6014	IgG2,Fab	1∶1200	10—1000	1∶200	0.10—0.96	好
HP6002/HP6014	IgG2,Fc/IgG2,Fab	1∶1200	10—1000	1∶200	0.17—0.96	好
HP6047	IgG3,交联区	1∶800	10—1000	1∶50	0.09—0.66	差
HP6050	IgG3,交联区	1∶800	3—300	1∶100	0.10—0.94	好
HP6047/HP6050	IgG3,交联区/IgG3,交联区	1∶800	3—300	1∶100	0.16—0.96	好
HP6020	IgG4,Fab	1∶800	3—300	1∶50	0.06—0.42	差
HHP6025	IgG4,Fc	1∶800	2.1—210	1∶100	0.17—1.00	好
HP6020/HP6025	IgG4,Fab/IgG4,Fc	1∶800	2.1—210	1∶100	0.10—0.94	好



维普资讯 http://www.cqvip.com

被微孔板，对 WHO67/97 呈现不同反应：HP6001、HP6002、HP6047、HP6020 反应差；HP6069、HP6001/HP6069、HP6014、HP6002/HP6014、HP6050、HP6047/HP6050，HP6025、HP6020/6025 反应好；以混合单抗包被所测得的 IgG 亚类结果更稳定，其总和更接近于单扩法所测的总 IgG 值。

(3)不同浓度单抗及酶标抗体对其反应性的影响：经方阵滴定确定，测定 IgG_1、IgG_2 的酶标抗体最适浓度为 1∶200，测定 IgG_3、IgG_4 为 1∶100。HP6001/HP6069，HP6002/HP6014 浓度为 1∶200，HP6047/HP6050、HP6020/HP6025 为 1∶800 时剂量反应曲线的线性关系好，有效范围大。

3. 建立标准曲线及确立方法的敏感性

用 WHO67/97 标准血清制作的各种 IgG 亚类剂量反应曲线(S 曲线)，IgG_1、IgG_2 在 10～1000ng/ml，IgG_3 3～300ng/ml，IgG_4 2.1～210ng/ml 时呈较好的直线关系，浓度变化范围为 100 倍(图 1)。

4. 本法的精确度、特异性及可靠性：同批测定变异系数(CV)＜2.2%，不同批测定 CV＜8.06%(表 3)。本法所测 211 名正常儿童和 20 名正常成人血清四种 IgG 亚类浓度之和与常规单扩法所测总 IgG 值密切相关($r=0.96$，$P<0.01$)，前者的值略高于后者，两者作 t 检验，无显著性差异($P>0.05$)。将所有 231 例正常血清 IgG 及其亚类浓度作多元线性相关、多元线性回归分析。得出 IgG 与四种 IgG 亚类均相关，与 IgG 关系最密切($r_1=0.95$，$P<0.01$)，与 IgG_2、IgG_3 关系其次($r_2=0.90$，$P<0.01$，$r_3=0.87$，$P<0.01$)与 IgG_4 关系最次($r_4=0.80$，$P<0.01$)。IgG_1 与 IgG_3 关系密切($r=0.86$，$P<0.01$)。此与其它报道结果一致[1]。

讨　论

目前尚无公认满意的 IgG 亚类测定方法，建立测定 IgG 亚类单抗 ELISA 法除需考虑单抗的特异性和反应性外，尚要求方法的敏感性、可测范围和重复性，干扰因素和实用性[5]。

1. 方法的感性性、可测范围和重复性

同一标本同批与不同批测得的结果非常接近，变异系数小，表明本方法精确可靠，重复性好。其敏感性于 IgG_1 和 IgG_2 为 10ng/ml、IgG_3 为 3ng/ml，IgG_4 为 2.1ng/ml，可测范围达 100 倍，能满足 IgG 亚类临床及其基础研究的要求。

2. 影响单抗 ELISA 测定 IgG 亚类的因素

(1)单抗包被过程中可能出现的干扰：

①包被失败：单抗对不同原料微孔板的吸附力差别极大。本文采用 BSA—戊二醛处理微孔板，形成亲水表面，可能阻止单抗变性，戊二醛使单抗与固相等价结合形成交联点，增强了单抗在微孔板上的吸附，故可防止

表 3　测定质控血清 IgG 亚类浓度的精确度

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1+IgG2+IgG3+IgG4	IgG
同一批测定($n=5$)						
平均值(mg/ml)	6.63	3.40	0.65	0.45	11.13	11.12
标准差(mg/ml)	0.01	0.01	0.01	0.01		
变异系数(%)	0.15	0.29	1.54	2.20		
不同批测定($n=13$)						
平均值(mg/ml)	6.62	3.39	0.62	0.43	11.08	11.12
标准差(mg/ml)	0.36	0.08	0.05	0.03		
变异系数(%)	5.44	2.36	8.06	6.98		

维普资讯 http://www.cqvip.com

包被失败[1]。

②单抗浓度不当：采用过高浓度单抗包被经预处理的微孔板时，WHO67/97 标准血清对其反应性反而下降，此可能为单抗分子彼此重叠，结合位点相互覆盖之故，因此必须选择最适当的单抗浓度。

(2)单抗同种异型限制性引起的干扰：人类同一 IgG 亚类的重链结构常有轻微差别，引起其抗原性的不同(同种异型)，由于鼠抗人 IgG 亚类单抗特异性特别强，即一种单抗仅能与一种同种异型 IgG 亚类结合(同种异型限制性)。若以单一单抗测定人群中 IgG 亚类浓度，必将漏掉一些同种异型，不能真实地反映 IgG 亚类水平。采用两种单抗混合包被，有助于抓获更多的同种异型[6]，使结果更趋于真实。尽管如此，也不能保证能覆盖全部同种异型，此可能是我们正常人群血清 IgG 亚类值在个别年龄组有别于欧美的原因之一。

(3)标准血清可能引起的干扰：目前尚无测定 IgG 亚类的标准血清。以 WHO67/97 作为 IgG 亚类的参考血清时，因用不同方法测定 IgG 亚类含量，结果略有关差异，若采用不同参考值作标准，必将影响实验实验结果。这也是不同实验室应有自行的血清 IgG 亚类正常值的原因之一。采用人血清免疫球蛋白参考血清，重复测定 13 次，取其平均值作图与 WHO67/97 比较，两条曲线非常近似，故无 WHO67/97 时可用它作为标准血清。

(4)实验过程中的干扰：微孔板清洗不彻底，可能是各 IgG 亚类之和高于总 IgG 的原因之一，加强清洗并使用酶标单抗可减少此干扰。

(5)与目前已采用的 IgG 亚类测定法比较，单扩法由于受方法灵敏度的影响，只能测定 IgG_1、IgG_2，不能测定含量较少的 IgG_3、IgG_4；放免的方法有价格昂贵和同位素危害等缺点；采用多克隆抗体测定 IgG 亚类的灵敏度差。

综上所述，本法测定血清 IgG 亚类具有灵敏高、特异性强、精确、有效范围大，简便易行，用血微量(仅高血清 10ul)，可同时测定大量标本，有推广使用价值。

参 考 文 献

1 Papadea C.et al. Clin Chem. 1985;31:1940.
2 Heiner DC. Pediatr Infect Dis J. 1987;6:235
3 Oxelius V—A. Acta Pediatr Scand. 1979;68:23.
4 蒋利平，杨锡强等。上海免疫学杂志 . 1990;10:159
5 Djurp R. Monogr Allergy. 1988;23:12.
6 Oxelius V—A. Scand J Immunol. 1987;25:169.
7 Klein F,et al. Clinica Acta. 1985;150:119.

(收稿日期 1994—02—06)

MEASUREMENT OF SERUM IgG SUBCLASSESS WITH MONOCLONAL ANTIBODY ELISA

Zhang Yuanwei, et al
Children' Hospital

With monoclonal antibodies (McAbs) and 67/97 Standard sera, Serum concentrations of normal human IgG Subclasses were measured by ELISA. The results showed that our method was sensitive (2.1ng/ml of the lowest detectable value, range 100x) and accurate (≤8.06% of CV in various detectious). McAbs used in our measurement were excellent in the specifity and responsibility. Total values of IgG (下转第 294 页)