DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.01.006

抗人C1q单克隆抗体检测方法
——C1q-ELISA的建立

谢佩蓉 冯庆和 赵菲莎 王剑平 朱锡华

（免疫学研究室）

提 要 为检测抗人C1q单克隆抗体，我们建立了固相C1q-ELISA。经取代试验、阻断试验及交叉试验证明本法具有特异性；同时用C1q-ELISA及双向免疫扩散试验检测15份鼠抗人C1q血清抗体滴度，表明C1q-ELISA法较双向免疫扩散法高20156倍；用6份血清试验批内及批间的变异系数范围，分别为1.8～6.5%及6.2～16.5%，说明有较好的重现性。因而，本法适用于杂交瘤细胞上清中抗人C1q单克隆抗体的检测。

关键词 C1q；单克隆抗体；酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验（ELISA）为一特异、敏感、无需特殊设备的免疫血清学方法，已被广泛应用于生物医学各领域中，近年来也成为检测单克隆抗体的主要方法之一。我室为研制抗人C1q单克隆抗体，建立了固相C1q-ELISA，现将试验结果报导如下。

材料和方法

一、人C1q 本室提取[1]的人C1q，再经抗人IgG-Sepharose 4B免疫吸附柱负吸附纯化[2]，鉴定后，测定浓度，稀释分装，贮存于-20℃冰箱备用。

二、人IgG 由本室用盐析法及离子交换层析法相结合的方法提取。

三、试验用血清 1. 鼠抗人C1q血清：由本室制备。取人C1q100～150μg加等量福氏完全佐剂乳化，皮下多点及腹腔接种6周令BALB/C小鼠作首次免疫，以同样剂量的人C1q加等量不完全佐剂如上法追加免疫小鼠2～3次，每次间隔2～3周，最后一次以同样剂量的C1q生理盐水溶液腹腔注射，末次免疫后3～4天放血。分离血清与人C1q作双向免疫扩散试验，抗体滴度1:2～1:32不等，个别小鼠呈阴性结果。血清冻存于-20℃备用。

2. 鼠抗人IgG血清：制备方法同鼠抗人C1q血清，经双向扩散试验测定，抗体滴度为1:16。

3. 阴性血清：为30只正常BALB/C小鼠混合血清，分装后，冻存于-20℃冰箱备用。

四、兔抗鼠IgG酶标抗体 兔抗鼠IgG血清由卫生部成都生物制品研究所惠赠。辣根过氧化物酶标记按Wilson等[3]低pH过碘酸盐法。酶标抗体经方阵滴定，工作浓度采用1:2000。

五、试验用溶液 包被液为0.02 M pH 7.4 PBS，洗涤液为0.02M pH7.4 PBS加0.05%吐温20（PBS-T），稀释液为PBS-T加2%绵羊血清。

六、ELISA实验程序 按常规方法和预备试验结果进行，简述如下。

1. 用包被液稀释人C1q，以1μg/ml（经方阵滴定后确定）C1q包被于55孔聚苯乙烯塑料板，每孔0.1ml，4℃经18～24小时。

2. 空干，用PBS-T洗涤三次，每次3分钟。

3. 加倍比稀释的试验用血清0.1ml/孔，37℃ 2小时。

4. 同上法洗涤后，加兔抗鼠IgG酶标抗体0.1 ml/孔，置37℃，2小时。

5. 洗涤后加底物（邻苯二胺-H_2O_2溶液）0.1ml/孔37℃20分钟，加2M H_2SO_4溶液0.05ml/孔，终止反应。

6. 结果判断：用GKM-201型酶标分光光度计测反应物O.D/492nm，板间比较按常规用校正值公式校正[4]。试验中设阳性血清、阴性血清、包被物及包被液对照。抗体滴度以试验用血清最高稀

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

释度高于阴性血清起始稀释度的0.D均值加2个标准差为准。

实 验 结 果

一、特异性试验

1. 取代试验：以人IgG包被固相载体为试验组，以人C1q包被载体作为对照组，分别与鼠抗人C1q血清进行试验，图1结果表明，人C1q以人IgG取代后，其0.D值明显低于对照组。

2. 阻断试验：取二份鼠抗人C1q血清，一份加适量C1q为试验组，另一份加PBS为对照组，4℃过夜，次日以3000rpm/分离心30分钟，取上清作一系列倍比稀释进行ELISA，结果见图2，试验组0.D值明显低于对照组，说明鼠抗人C1q抗体被C1q所阻断。

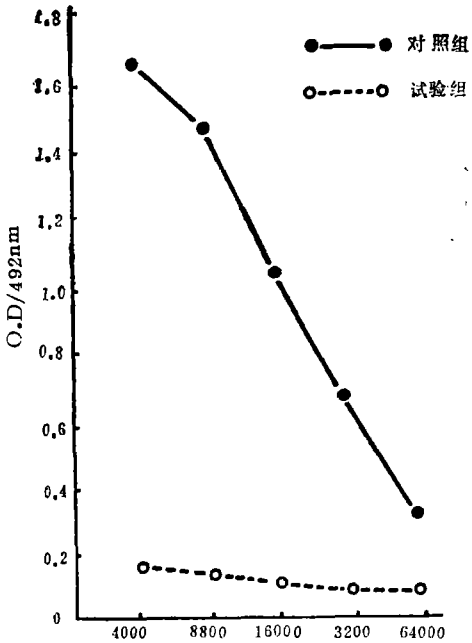


图1 取代试验

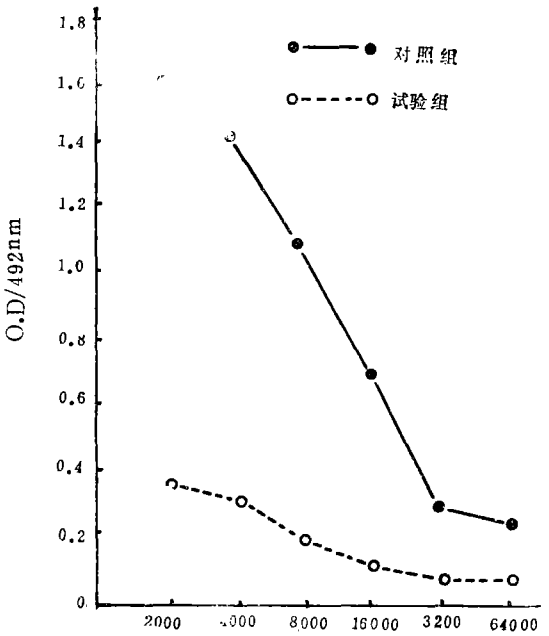


图2 阻断试验

3. 交叉试验：以人IgG或人C1q包被固相载体后，分别与一系列倍比稀释的鼠抗人C1q及鼠抗人IgG血清进行交叉试验，表1结果表明两者均无交叉反应。

二、敏感性试验 15份鼠抗人C1q血清分别用ELISA及双向免疫扩散试验检测，结果血清抗体滴度的几何均数ELISA为179400，而双向免疫扩散法为8.9，前法较后法高20156倍（表2）

三、试验的重复性

取6份鼠抗人C1q血清，在同一条件下同一天内进行测定，每份血清做5孔，计算批内变异系数；同样的血清一周内测定三次，每次每份血清做5孔，计算批间变异系数。结果批内变异系数范围为1.8～6.5%，而批间变异系数为6.2～16.5%。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1 人C1q、人IgG与鼠抗人IgG、鼠抗人C1q的ELISA交叉试验

包被抗原	免疫血清	血清稀释倍数 8000	16000	32000	64000	128000	256000	512000
人C1q	鼠抗人C1q	1.47 *	1.03	0.64	0.32	0.12		
	鼠抗人IgG	0.06	0.06	0.03	0.01	0.02		
人IgG	鼠抗人IgG			>1.67	1.67	1.1	0.61	0.41
	鼠抗人C1q			0.06	0.07	0.11	0.08	0.02

注：* 为O.D/492nm

表2 C1q-ELISA与双向免疫扩散法检测15份鼠抗人C1q血清的结果

血清号	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ELISA ($10^3\times$)	512*	2048	512	1024	2048	8	64	2	512	128	256	1024	512	512	—
双向扩散	16	32	16	16	32	2	4	—	16	4	16	32	8	16	—

注 *数字的倒数为血清抗体的滴度

讨 论

ELISA筛选单克隆抗体，国内外已广为应用。但用C1q-ELISA检测单克隆抗体，国内尚未见有报导。为研究免疫复合物的致病机理，制备抗人C1q单克隆抗体，我们建立了C1q-ELISA，试验证明本法具有高度特异性和敏感性，而且有较好的重复性，解决了从杂交瘤细胞上清中筛选抗人C1q单克隆抗体的有效可行的方法。在实验过程中我们有以下几点体会。

一、人C1q纯化较困难，我室以往提取的C1q，纯度为免疫电泳纯，但用高度敏感的ELISA测定，仍发现有微量IgG的污染，因此本法包被用的人C1q进一步采用了抗人IgG-Sepharose 4 B免疫吸附柱纯化，纯化后的C1q与抗人IgG抗体在ELISA测定中并未发现有交叉反应。该试剂在-20℃至少可保存半年不影响试验结果。

二、一般ELISA系统中多用碳酸盐缓冲液作为包被液，而洗涤液与稀释液则以PBS为基础。在我们的C1q-ELISA系统中，包被液也用PBS，从而既简便，且稳定性也较碳酸盐缓冲液好。

三、ELISA检测单克隆抗体，据文献报导[5]需用1%BSA封闭，以防止非特异性反应的出现。我们则省略这一步骤，而是在PBS-T液中加2%绵羊血清作为稀释液，同样获得满意效果，而且比较方便、经济。

本法已应用于抗人C1q单克隆抗体的检测，获满意结果[6]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献

1. 谢佩蓉等：人补体C1q的分离与鉴定。第三军医大学学报 1984；6:345

2. Pohl DA, et al. Isolation and purification of human C1q from plasma. J Immunol Meth 1980; 36:12

3. Wilson MB, et al. Recent Developments in the Periodate Method of Conjugating Horseredish Peroxidate to Antibodies In. Immunofluorescnce and Related Staining Techniques pp215, 1978

4. 石连发：酶联免疫吸附试验在脊髓灰质炎血清学诊断上的应用。云南医药 1981；2:47

5. Stocker JW. Enzyme Immunoassay for the Detection of Hgbridoma Products In: Immunology methods vol Ⅰ pp299, 1981

6. 谢佩蓉等：分泌抗人C1q单克隆抗体杂交瘤细胞的建立。免疫学杂志 1986；1:1

Establishment of C1q-ELISA for Detection of Antihuman Clq Monoclonal Antibodies

Xie Peirong, et al

(Department of Immunology, Third Military Medical College)

The technique of C1q-ELISA has been established in this laboratory for the detection of antihuman C1q monoclonal antibodies(McAb). This technique, as verified by displacement test, blocking test, and cross titration test, possesses high specificity. It is more sensitive than double immunodiffusion as verified by the tests of 15 specimens of mouse antihuman C1q serum and has better reproducibility. It is concluded that this technique is very useful for the detection of anti-C1q McAb in the supernatant of hybridoma culture.

Key words: C1q; Monoclonal antibodies; ELISA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net