· 基础实验研究 ·

小分子抗原免疫途径和结合数量对抗体效价的影响

宋世军，张　旋

（广东省深圳市龙岗区妇幼保健医院检验科　518172）

摘　要：目的　应用不同结合数量的半抗原载体复合物在不同免疫途径下免疫兔，从而对小分子半抗原的抗体进行探索。**方法**　应用牛血清清蛋白（BSA）和二硝基苯磺酸（DNP）制备不同交联率的免疫原，同时制备酶交联物，通过脊索皮下、肌肉和脚掌皮内 3 种不同免疫途径免疫 48 只新西兰大白兔。应用酶联免疫法分析半抗原抗体滴度。**结果**　DNP_{16} BSA 免疫原脊索皮下、DNP_8 BSA 和 DNP_{16} BSA 脚掌皮内免疫的抗血清效价最高（1∶6 400），DNP_8 BSA 免疫原脊索皮下和 DNP_{35} BSA 免疫的抗血清效价次之（1∶3 200），肌肉免疫途径最差。**结论**　半抗原交联率在 8～16 时通过原脊索皮下和脚掌皮内免疫抗体滴度高。其中以原脊索皮下免疫途径更方便。

关键词：白蛋白类；　抗体；　二甲基苯磺酸；　免疫途径

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.025　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2011)10-1069-02

The effect of immune approach and conjugation quantity of small molecular immunogen on the valence of antibody

Song Shijun, Zhang Xuan

(*Department of Clinical Laboratories, Maternal and Child Health Hospital of Shenzhen, Guangdong* 518172, *China*)

Abstract: Objective　To explore the effect of immune approach and conjugation quantity of small molecular immunogen on the production of antibody in rabbit, immunized in different ways with hapten-carrier complex with different conjugation quantities. **Methods**　48 rabbits were immunized with DNPαBSA (α refers to the qualities of DNP on each BSA molecular) by subcutaneous, intradermal and intramuscular injection. The titers were determined by enzyme linked immunosorbent assay. **Results**　The titers of antibodies produced by DNP_{16} BSA subcutaneous injection, and DNP_8 BSA and DNP_{16} BSA intradermal injection were 1∶6 400, by DNP_8 BSA subcutaneous injection and DNP_{35} BSA intradermal injection were 1∶3 200 and by intramuscular injection were the poorest. **Conclusion**　The conjugated rate of 8－16 would be better for preparing antibody with high titers by subcutaneous and intradermal injection, and subcutaneous injection would be more convenient.

Key words: albumins;　antibody;　DNP;　immune approach

抗原抗体反应是免疫应答的基础，也是临床各种疾病的发病机制和治疗方案的重要理论基础。某些小分子物质不能直接刺激机体免疫系统产生抗体，必须结合到适宜的载体上，形成半抗原复合物，才能刺激机体产生抗体。目前，国内对小分子结合到载体的数量对免疫应答的影响及其在不同免疫途径的免疫效果并没有明确的阐述。本研究进行了相关研究，应用不同结合数量的半抗原载体复合物在不同免疫途径下免疫家兔，从而对小分子半抗原的抗体产生规律进行探索。

1　材料与方法

1.1　免疫原的制备　牛血清清蛋白（BSA）与不同浓度的二硝基苯磺酸（DNP）按照 Eisen[1] 报道的交联过程反应，分别得到 DNP_2 BSA、DNP_8 BSA、DNP_{16} BSA 和 DNP_{35} BSA 交联物。DNP 右下角的数值为每摩尔 BSA 分子上交联的 DNP 分子数。每一种交联物在 1%戊二醛中室温聚集 4 h，然后 4 ℃冰箱中过夜。过剩的戊二醛用大量的 pH4.5 磷酸盐缓冲液透析去除。每种聚集的 DNPαBSA 由 Sephadex G200 层析而获得。

1.2　主要试剂与耗材　牛血清清蛋白（Calbiochen）；二硝基苯磺酸（Sigma-Aldrich）；DNP_{16} BSA 交联物（Pierce）；Sephadex G200（Parmacia）；弗氏完全佐剂（Sigma）；弗氏不完全佐剂（Sigma）；DM-6 透析袋（Sino）；96 孔微孔板（Costar）；新西兰大白兔（中山医科大学）；其他所有无机试剂均为分析纯。

1.3　免疫动物　免疫程序按照参考文献[2-3]进行。各组免疫原溶解在 0.9%生理盐水中，终浓度为 2 mg/mL。与等量弗氏完全佐剂彻底混合，乳化。半抗原-载体交联乳化物在 4 ℃至少维持 4～6 周。但是 2 项分离时常发生，在免疫动物前需再次乳化。选择 48 只 2.5～4.0 kg 的新西兰大白兔，免疫前采血0.5 mL 作为样本对照。3 种不同免疫途径：脊索皮下、肌肉和脚掌皮内。每组 6 只兔，雌雄各半。初次免疫时弗氏完全佐剂乳化抗原 1 mL，分 10 处各注射 100 μL。3 周后耳缘静脉采血0.5 mL，分离血清，冷冻保存。然后进行再次免疫。再次免疫时弗氏不完全佐剂乳化抗原 1 mL，分 10 处各注射 100 μL。2 周后加强免疫 1 次，步骤同再次免疫。1 周后耳缘静脉采血 0.5 mL，检测目的抗体滴度。如果达到满意滴度，放血分离血清冷冻保存。如果滴度不高，2 周后再次加强免疫，直至达到满意滴度。

1.4　抗体效价的测定

1.4.1　DNP 的 HRP 标志　过程参考文献[4]进行。区别之处是标志物制备完成后过 Sephadex G200 层析柱，以除去未交联的单体及多聚体 HRP 部分，浓缩。加入终浓度为 50%的甘油，－20 ℃冰箱备用。

1.4.2　DNP 的 HRP 标志物最适浓度筛选　应用直接 ELISA 法对 HRP 标志物进行最佳反应浓度的筛选，实验过程如下。用 0.05 mol/L 碳酸盐将抗体稀释至 1∶100、1∶500、1∶1 000和 1∶10 000，取每种浓度 0.1 mL 加入 24 孔，4 ℃过夜。

次日，弃去孔内液体，用洗涤液洗 3 次，每次 3 min。用 1% 的明胶 0.2 mL 封闭 2 h，甩干。自制的酶标抗原用 PBS 稀释成 1∶100、1∶500、1∶1 000、1∶10 000，取每种浓度 0.1 mL 加入上述各稀释度的包被抗原。37 ℃孵育 1 h，洗涤 6 次，每次间隔 30 s。于各反应孔中加入 A 液和 B 液各 1 滴，37 ℃孵育 0.5 h。于各反应孔中加入 2 mol/L 硫酸 0.05 mL。于酶标仪 450 nm/630 nm 比色，以 $OD_{450/630}$≥0.1 的最大稀释倍数为此抗体的效价。

1.4.3 免疫血清滴度测定　采用 ELISA 双抗原夹心法，实验过程见文献[2]，实验步骤如下：DNP-L 赖氨酸经 50 mmol/L 碳酸盐缓冲溶液（pH9.6）适当稀释（10 μg/mL）后，包被 96 孔聚苯烯微孔板，每孔 100 μL，4 ℃过夜，洗板 5 次，未结合的位点用 1% 的明胶封闭，37 ℃ 2 h。然后 ELISA 板用包含0.05% 吐温-20（PBST）清洗，最后用 PBS 清洗。每孔加入 100 μL 血清（蛋白浓度为 0.5 μg/mL），37 ℃温育 1 h，然后用 PBST 洗，最后用 PBS 洗。每孔中加入 HRP 标志的 DNP（1∶500 稀释），37 ℃孵育 1 h。洗板后加入 100 μL 四甲基联苯胺（TMB）溶液呈色，在 $OD_{450/630}$ 比色，以 $OD_{450/630}$≥0.1 的最大稀释倍数为此抗体的效价。

2 结　　果

2.1 DNP-HRP 标志物的分子筛　DNP-HRP 分子筛的结果。测定每管的 OD_{280} 值，每管收集 1 mL。收集峰顶的第 19～21 管，用 ELISA 检测标志情况。

2.2 DNP-HRP 最佳工作浓度的优化　上述收集并鉴定好的标志物在应用于实验前需进行最佳工作浓度的优化，以保证最适抗原抗体反应。由 ELISA 结果可见，在包被抗体稀释度为 1∶1 000，DNP-HRP 稀释度为 1∶800 时显色明显，稀释度最大。以后实验可以选用 1∶800 的 DNP-HRP 为其工作的浓度。

2.3 免疫血清抗体的产生状况　在不同免疫组抗体产生的滴度不同，见表 1。表 1 结果显示，DNP_{16} BSA 免疫原脊索皮下、DNP_8 BSA 和 DNP_{16} BSA 脚掌皮内免疫的抗血清效价最高（1∶6 400），DNP_8 BSA 免疫原脊索皮下和 DNP_{35} BSA 免疫的抗血清效价次之（1∶3 200），肌肉免疫途径最差。

表 1　免疫血清抗体产生情况

组别	DNP_2 BSA	DNP_8 BSA	DNP_{16} BSA	DNP_{35} BSA
脊索皮下	1∶800	1∶3 200	1∶6 400	1∶1 600
肌肉	1∶10	1∶40	1∶40	1∶100
脚掌皮内	1∶1 600	1∶6 400	1∶6 400	1∶3 200

3 讨　　论

小分子化合物如 Dig、茶碱、苯妥英以及三碘甲状腺原氨酸（T_3）、甲状腺素（T_4）等与酶的共价结合，除了受参与反应的分子浓度、小分子与酶的分子摩尔比、交联试剂的有效浓度、反应介质的性质、pH 值及离子强度等的支配外，还与小分子的水溶性大小以及酶分子上可用于结合的基团数量有很大关系[5]。由于未经修饰的 HRP 所含的可用于结合的氨基的数量仅有 1～2 个，直接标志 DNP，DNP-HRP 结合物产率偏低（8.7%）。DNP-HRP 反应混合物经 Sephadex G200 柱（1 cm×40 cm）层析，虽不能提高酶标物的特异免疫反应性，去除未结合有 Dig 的游离 HRP，但可去掉合成反应中可能出现的多聚体 HRP，从而改善酶结合物用于 Dig ELISA 测定的本底显色。本文的 HRP 标志物经 ELISA 测定后都具有较高的灵敏度和特异性。

免疫动物的程序，文献报道，一般为第一次加强免疫与初次免疫间隔 2～4 周左右，而且，此后每次加强免疫的间隔也同样为 2～4 周左右[6-7]。考虑到动物机体对外来免疫原产生免疫应答的个体差异，以 2 周的间隔连续监测动物体内特异性抗体的产生状况，再加强免疫。对于上述免疫程序的分析原理如下：当机体免疫系统在免疫原的刺激下，循环抗体水平增加到一定程度后，抗体生成的抑制因素就开始发挥作用。当抗体产生受控后，这些抑制因素又回到沉寂状态，循环抗体水平保持相对恒定。这时，给动物加强免疫，由于回忆反应，抗体生成细胞可呈对数增殖而无任何障碍，直至再次受控于机体的抑制作用。但如果在机体的抑制因素发挥作用时，循环抗体从高峰开始下降，对动物加强免疫，能得到最大的回忆反应。如果免疫过频，当循环抗体水平正上升，还易致免疫原过量，使机体产生免疫耐受。

小分子（例如药物、有机物、多肽和糖类）相对分子质量都小于（2～5）×10^3，其免疫血清的制备较完全抗原复杂。为了产生针对这些复合物的免疫应答，有必要把它们连接到复合物上，即载体。小分子免疫原免疫动物制备抗血清的方法很多，究竟哪种途径较好，小分子的交联率是多少，目前还未见报道。本实验通过 3 种不同途径制备抗血清。实验结果表明，DNP_{16} BSA 免疫原脊索皮下、DNP_8 BSA 和 DNP_{16} BSA 脚掌皮内免疫的抗血清效价最高（1∶6 400），DNP_8 BSA 免疫原脊索皮下和 DNP_{35} BSA 免疫的抗血清效价次之（1∶3 200），肌肉免疫途径最差。在免疫过程中，脚掌皮内注射部位出现脓肿，强化免疫后的家兔抵抗力急剧下降，2 只兔在免疫过程中死亡。相比脚掌皮内免疫组，脊索皮下途径免疫组不仅方法简单、操作简便而且免疫效果较好，整个免疫过程中实验动物的免疫反应性较好。脊索皮下免疫途径的优点可能与下列因素有关：含有较多的抗原提呈细胞；树突状细胞提呈抗原起维持免疫反应的作用；表皮内含有较高浓度的脂皮质素 lipcortin。因此，皮内注射不易产生局部炎性反应，并且减轻了长时间表达外源抗原的细胞在局部诱导的免疫应答，有助于抗原的长期表达[8]。肌肉免疫途径抗体效价较低，不适合效价高、特异性强的抗体制备。

对于免疫动物产生抗体来说，并不是载体蛋白上小分子越多越好，而是一定数量的小分子对免疫动物产生抗体来说是最理想的。如使用牛血清清蛋白作为载体蛋白，每分子结合 8～25 个小分子较为合适[9]。本实验以 BSA 为载体交联不同程度的 DNP 分子，用于不同免疫途径的分析。实验发现 DNP_8 BSA 和 DNP_{16} BSA 的交联率分别对脊索皮下和脚掌皮内效价较高。有文献报道，毛花洋地黄交联到 BSA 的分子数为 8.5，与 HAS 的交联率为 6.7[10-11]。如果交联的数量多，就会存在因抗原过量而产生免疫耐受；如果交联的数量少，也会因抗原不足而未有抗体产生。所以，小分子抗原交联到载体的数量要适中，才能产生高效价的抗体。

（下转第 1072 页）

2.2　心力衰竭患者治疗前 BNP 水平为(765±197)pg/mL,治疗后为(269±72)pg/mL。

2.3　心源性呼吸困难患者血浆 BNP 为(653±293)pg/mL,肺源性呼吸困难患者血浆 BNP 水平为(251±197)pg/mL,两者比较,$P<0.01$,差异有统计学意义。

3　讨　　论

BNP 是近年来国内、外研究的热点激素,在 HF 的诊断、治疗和预后评估中受到广泛的重视,2003 年被美国心脏病学会列为医学十大进展之一。BNP 与心血管有关的生物学作用主要是作用于肾脏的肾小管和集合管,增加肾小球的滤过率,抑制肾小管对钠的重吸收,进而增加钠的排泄,参与血压、血容量以及水和电解质平衡的调节,同时抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统的活性,减少肾素、血管紧张素Ⅱ和醛固酮的分泌,拮抗神经内分泌因子,产生扩张血管、利尿、利钠的作用[2]。在多种病理生理状态下均可升高,在 HF 时更为明显,被视为 HF 的 1 个很好的标志物,尤其在临床不易发现的早期 HF、无症状 HF。对那些可疑 HF 但症状、体征不明显或伴有临床表现相似疾病(如慢性阻塞性肺病)的患者应测 BNP 水平以明确诊断。本文结果显示,HF 的严重程度与 BNP 水平呈正相关。有研究提示,仅靠医师经验诊断 HF,敏感性 49.0%,特异性 96.0%;而根据 BNP 水平诊断 HF,敏感性 90.0%,特异性 73.0%;两者结合诊断 HF 的准确率可由 74.0%升至 81.0%[3]。

目前,临床将心功能不全患者按严重程度分为Ⅰ～Ⅳ级,这种分级具有一定的主观性,故临床实践中常发现心力衰竭分级和客观检查结果不符的现象。本文结果显示,BNP 水平与 NYHA 分级有关,并随 NYHA 分级提高明显增加。因此,血液检验 BNP 水平能对充血性心力衰竭进行客观的评价,将会给临床工作带来很大的帮助。这表明 BNP 既与患者的主观感受及医师的主观判断有较好的一致性,同时又能客观、量化地对心功能作出评价。

BNP 是惟一独立的 HF 预测因子,是评价 HF 预后最好的神经激素类标志物[4]。本文结果显示,随着 HF 的控制,BNP 水平改变十分明显。反之,如果 HF 未能控制,则患者的预后不佳。

同时,在临床中,对于不明原因的急性呼吸困难患者,要及时、有效地找到起病原因,进行正确处理。本文显示,心源性及单纯性肺源性呼吸困难时,BNP 水平有明显差异,与文献[5]报道一致,在对呼吸困难病因的鉴别以及诊治中有着重要的临床意义,值得临床推广。

参考文献

[1] 王宏娟,李燕屏. B 型尿钠肽在急诊科的临床应用进展[J]. 岭南急诊医学杂志,2007,12(5):398.

[2] 吕先光,刘朝中. B 型利尿钠肽在冠心病所致慢性充血性心力衰竭的诊断、治疗和愈后评估中的作用[J]. 现代生物医学进展,2007,7(6):930.

[3] Mc Cullough PA, Nowak RM, Me Cord J, et al. B-type natriuretic peptide and clinical judgement in emergency diagnosis of heart failure: analysis from breathing not properly(BNP) multinational study[J]. Circulation, 2002, 106(4): 419-422.

[4] Tsutumoto T, Wada A, Maedak K, et al. Plasma brain natriuretic peptide level as a biochemical marker of morbidity and mortatilyin patients with asymptomatic or minimally symptomatic left ventricular dysfunction. Comparison with angiotensin Ⅱ and endothelin-l [J]. Eur Heart J, 1999, 20(24): 1799-1807.

[5] 齐心. 急诊呼吸困难患者测定 B 型尿钠肽的诊断价值[J]. 中国急救医学,2007,27(6):485.

(收稿日期:2011-03-07)

(上接第 1070 页)

参考文献

[1] Eisen HN. Preparation of purified anti-2,4-dinitrophenyl antibodies[J]. Methods Med Res, 1964, 10: 94-102.

[2] Bulter VP Jr, Tse-Eng D. Immunoassay of digoxin and other cardiac glycosides[J]. Methods Enzymol Immun Tech, 1982, 84: 559-577.

[3] Wognum AW, Lansdorp PM, Eaves AC, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for erythropoietin using monoclonal antibodies, tetrameric immune complexes, and substrate amplification [J]. Blood, 1989, 74(2): 622-628.

[4] Satoh T, Yokozeki H, Katoyama I, et al. Down-regulation of murine contact sensitivity by hapten-amino acid derivatives[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1993, 102(1): 94-100.

[5] Singh KV, Kaur J, Raje M, et al. An ELISA-based approach to optimize elution conditions for obtaining hapten-specific antibodies [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377(1): 220-224.

[6] Chauveau J, Fert V, Morel AM, et al. Rapid and specific enzyme immunoassay of serotonin[J]. Clin Chem, 1991, 37(7): 1178-1184.

[7] Dhar TK, Ali E. Direct microtitre plate enzyme immunoassay of testosterone in unextracted serum[J]. J Immunol Methods, 1992, 147(2): 167-172.

[8] 童明清,赵旺胜,蒋理,等. 不同免疫方法制备抗血清的效果比较[J]. 南京医科大学学报,2000,20(5):342-343.

[9] 李金明. 临床酶免疫测定技术[M]. 北京:人民军医出版社,2005:17.

[10] Pooria G, Mehdi F, Fatemeth R, et al. Production of anti-digoxigenin antibody HRP conjugate for PCR-ELISA dig detection system [J]. J Immunoassay Immunochem, 2006, 27(4): 303-318.

[11] Smith TW, Butler VP Jr, Haber E. Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin [J]. Biochemistry, 1970, 20(2): 331-337.

(收稿日期:2011-02-01)