

生物素-亲和素系统试剂及其应用的研究

I. 试剂的制备和鉴定

章谷生 李绍康 顾克家 严咏棠 叶美娣

(卫生部上海生物制品研究所, 中日血液学免疫学研究中心, 免疫研究室, 上海)

本文报道生物素-亲和素系统(BAS)成套试剂的制备及其鉴定结果。活化生物素BNHS由生物素与羟基丁二酰亚胺脱水缩合而成。亲和素用CMC柱二次梯度层析法从鸡蛋清中提取。生物素化羊抗兔(b-SARG)和生物素化过氧化物酶(b-HRP)分别由SARG和HRP与BNHS反应获得。经鉴定, 上述四种试剂均符合要求。通过ABC ELISA法检测兔抗人Ig表明, 用全套自制的BAS试剂所得结果与进口产品一致, 其灵敏度可达1:256000以上, 超过常规ELISA水平。现正进行BAS免疫酶法与其它免疫酶测定法的对比试验, 并用BAS检测其它免疫反应体系, 同时将研制成套BAS试剂盒。

关键词 生物素-亲和素系统

近年来, 利用生物素(Biotin)与亲和素(Avidin)之间罕见的亲和作用, 以及它们既可偶联抗体等大分子生物活性物质, 又可被酶等多种材料所标记的特性, 研制成一种新型生物反应放大系统, 即生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin System, BAS), 并建立了多种高灵敏度、高特异性、高度稳定, 方便、经济和快速的生物反应检测和分离纯化手段。BAS目前已用于细胞表面组分的测试定位, 可溶性抗原(细菌、病毒和肿瘤抗原)及其相应抗体特别是单克隆抗体的测定, 细胞和分子的分离纯化, 肿瘤的免疫治疗, 免疫学理论研究以及核酸研究等。越来越多的资料显示, BAS有着巨大潜力和广阔的应用前景^[1,2]。鉴于这类试剂目前多由国外进口, 价格昂贵, 为满足国内需要, 我们进行了BAS试剂的研制, 已获得良好结果, 并作了预报^[3]。本文报道我们研制的BAS成套试剂, 包括活化生物素BNHS, 生

物素化羊抗兔免疫球蛋白, 亲和素以及生物素化酶等产品, 以及用亲和素-生物素化酶复合物(ABC)-ELISA试验鉴定BAS试剂的详细结果。

材料和方法

(一) BAS试剂

1. 活化生物素(生物素酰羟基丁二酰亚胺, BNHS): BNHS采用脱水缩合法制备。选取优质生物素(d-Biotin, Sumitomo, Japan)与羟基丁二酰亚胺(Fluka AG, CH-9470 Buchs, Switzerland)反应。脱水剂采用二环己基碳二亚胺(DCC, 上海佘山化工厂)^[4]。经鉴定, 本制品熔点为200~202°C, 在N-二甲基甲酰胺(DMA)中具有良好的溶解度。

2. 生物素化羊抗兔免疫球蛋白抗体(b-SARG): 取绵羊抗兔Ig血清(本实

本文于1984年9月10日收到。

许辛同志参加亲和素制备工作。

实验室制备), 经DE52纤维素(Whatman, England)柱纯化制取IgG(SARG)后^[5], 在0.1M NaHCO₃ (pH8.2)中透析过夜, 并将浓度调到10mg/ml。取SARG溶液2ml, 加114 μ l BNHS的DMF溶液(34.1mg/ml), 混匀后, 置22 $^{\circ}$ C 2h, 再在4 $^{\circ}$ C中对PBS(0.05M, pH7.2)透析24h, 继加等体积甘油, 贮于-30 $^{\circ}$ C^[6]。其蛋白浓度为3.75mg/ml。

3. 亲和素(Av): 参照Green的方法^[7], 并作适当修改。将新鲜来亨鸡蛋清用去离子水稀释并搅匀, 调pH至7.0。离心取上清, 用Na型CMC二次梯度层析, 即得Av制剂。经鉴定, 其结合生物素的活性为12~14u/mg。用双向免疫扩散和SDS-PAGE法分析, 证明其为纯一样品。Av制剂浓度为0.7mg/ml。

4. 生物素化辣根过氧化物酶(b-HRP): 将HRP(Sigma, RZ=3.1)的NaHCO₃ (0.1M, pH8.4溶液)(2mg/ml) 2ml与BNHS的DMF溶液(34.1mg/ml) 20 μ l混匀后, 置22 $^{\circ}$ C 4h, 再在4 $^{\circ}$ C中对PBS透析24h, 继加等体积甘油, 贮于-30 $^{\circ}$ C^[6]。其蛋白浓度为1.3mg/ml。

5. BAS进口试剂: 生物素化山羊抗兔IgG(b-GARG)、亲和素(Avidin DH)和生物素化过氧化物酶均购自美国Vector实验室^[8]。

(二) ABC ELISA测试体系^[9]

1. 抗原抗体系统: 选用人Ig-兔抗人Ig(RAHlg)反应系统。抗原和抗血清均由本实验室制备。

2. 缓冲和洗涤-稀释系统: 包板和底物缓冲液分别选用碳酸盐缓冲液(pH9.5, 0.05M)和柠檬酸盐缓冲液(pH5.0, 0.1M)。洗涤-稀释液为PBS(pH7.2, 0.01M), 内含0.5% Tween-20和0.25% 胎血清白蛋白(FA, 本所制品), 简称PBST-FA。

3. 酶标滴定板和包板条件: 选用平底96孔微量滴定板(Linbro, FLOW), 或40孔或55孔微量滴定板(重庆, 四川分析仪器厂)。将人Ig用包板缓冲液稀释到1 μ g/ml后, 每孔滴加0.1ml, 继将包板后的滴定板置4 $^{\circ}$ C, 18h。

4. ABC制备: 取适当稀释度的Av溶液和b-HRP溶液, 以等体积混匀后, 放置适当时间^[8,9]。

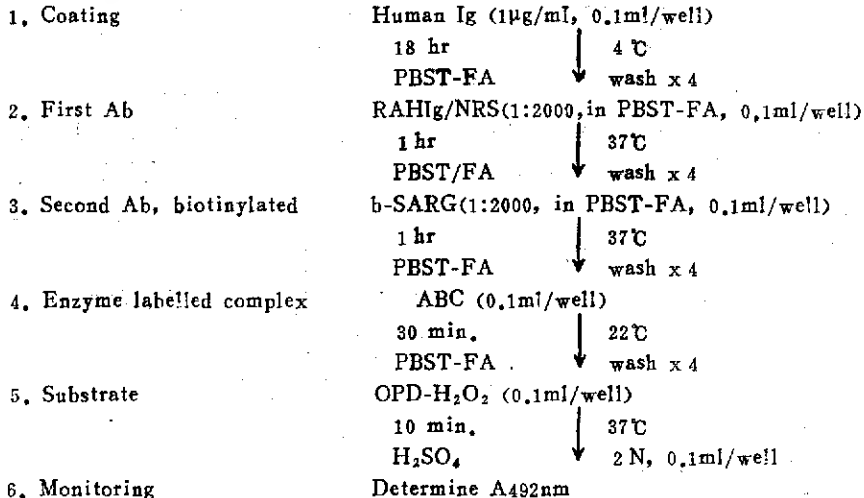


图1 ABC ELISA操作流程示意图

Fig. 1. Diagram of the procedure of indirect ABC ELISA

5. 底物系统 (OPD-H₂O₂): 取邻苯二胺(OPD)5mg 溶于10ml 底物缓冲液, 再加0.15ml H₂O₂ (3%)。

6. 操作流程: 操作流程如前图所示。

(三) 试验项目及结果判断

1. 试验项目: 先用全套进口BAS试

剂进行ABC ELISA测试, 随后分别以 b-SARG、Av 和 b-HRP 制剂取代相应进口试剂, 最后以全套自制的BAS试剂进行对比试验。另外, 还观察了ABC复合时间效应和ABC与b-SARG的反应时间效应。

2. 测试分组及结果判断: 测试的样

表 1 生物素化第二抗体效价和特异性比较

Table 1 Comparison of the titers and specificities of biotinylated second antibodies

生物素化二抗** Biotinylated antibodies	观察指标 Items observed	生物素化二抗稀释度倒数 Reciprocal of dilutions of biotinylated second antibodies					
		500	1000	2000	4000	8000	16000
b-SARG 自制 Self produced	S	0.958*	0.878*	1.027	0.690	0.681	0.464
	N	0.006*	0.012**	0.002	0.016	0.011	0.011
	S/N	160.1	73.1	513.5	43.1	61.9	42.2
b-GARG 进口 from abroad	S	0.986	0.894	0.948	0.773	0.567	0.360
	N	0.045	0.045	0.004	0.021	0.018	0.014
	S/N	21.9	19.9	273.0	36.8	31.5	25.7

* A_{492nm}

** 蛋白浓度 Protein concentration 1.5mg/ml

表 2 亲和素和生物素化酶制剂活性比较

Table 2 Comparison of the effects of avidin and biotinylated HRP

制剂来源 Origin of reagents	观察指标 Items observed	RAHIg 稀释度倒数 Reciprocal of dilutions of RAHIg			
		2000	8000	32000	128000
Av b-HRP	S	1.457 ± 0.041*	1.238 ± 0.063	0.547 ± 0.116	0.336 ± 0.049
	N	0.129 ± 0.016*	0.138 ± 0.010	0.0123 ± 0.066	0.073 ± 0.011
	S/N	11.3	9.0	4.4	4.6
SIBP Vec	S	2.356 ± 0.100	2.332 ± 0.132	1.240 ± 0.080	0.840 ± 0.060
	N	0.308 ± 0.064	0.296 ± 0.100	0.252 ± 0.040	0.160 ± 0.032
	S/N	7.6	8.0	4.9	5.3
Vec SIBP	S	1.269 ± 0.037	0.979 ± 0.009	0.338 ± 0.020	0.136 ± 0.012
	N	0.028 ± 0.008	0.030 ± 0.002	0.024 ± 0.005	0.026 ± 0.004
	S/N	45.3	32.6	14.1	5.2
Vec**Vec**	S	2.956 ± 0.304	2.664 ± 0.100	1.612 ± 0.228	0.652 ± 0.032
	N	0.092 ± 0.008	0.096 ± 0.008	0.108 ± 0.012	0.096 ± 0.008
	S/N	32.1	27.8	14.9	6.8

SIBP: 上海生物制品研究所, Shanghai Institute of Biological Products. 自制

Vec: Vector Lab., 进口

(1): 1:40; (2): 1:25;

* A_{492nm}

** 按试剂盒要求稀释 Diluted according to the reagent's kit

品孔(S)中的第1抗体为RAHIg, 对照孔(N)则以相同稀释度的正常兔血清(NRS)替代, 其余同。测试的结果以S和N的吸光度值(A_{492nm})和S/N比值表示。前二者分别代表总反应活性和非特异反应性, 后者代表总反应对非特异反应之比^[9]。

结 果

(一) 自制b-SARG的性能

如表1所示, 无论从反应活性或是特异性来看, 自制的b-SARG都已达到进口的b-GARG水平。

(二) 自制Av的性能

用自制Av(1:40)取代相应的进口试剂后, 非特异性反应虽略有增加, 使

S/N比值降低, 但不影响测试的灵敏度(表2)。此外, 自制Av在-30℃保存半年或在4℃放置二个月, 或经反复冻融, 并在30℃放置十天, 仍保持其活性。

(三) 自制b-HRP的性能

表2结果表明, 自制b-HRP(1:25)可代替相应的进口试剂。

(四) 自制全套BAS试剂检测结果

如表3所示, 用自制全套BAS试剂检测RAHIg, 所得的反应活性、灵敏度和特异性均已接近进口试剂水平。

(五) ABC复合和反应时间效应

观察结果表明, ABC复合作用在5min内已基本完成, 25min时即达饱和状态。ABC与b-SARG的最适反应时间为30min(图2)。

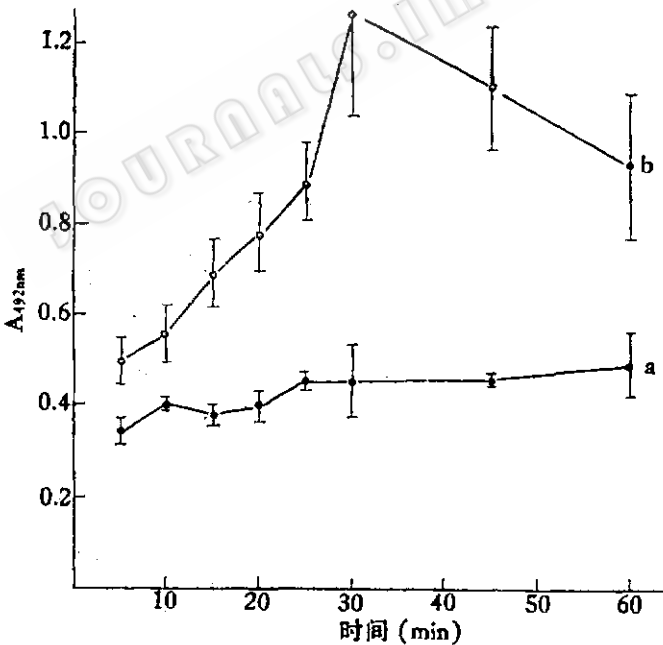


图2 ABC复合时间及其与b-SARG反应时间效应

Fig. 2 Time effects of ABC formation and reaction with b-SARG

a) 复合时间效应, ABC与b-SARG反应20分钟

For ABC formation, the reacting time of ABC with b-SARG was fixed for 20 min.

b) 反应时间效应, ABC复合20分钟

For reaction, the formation time was fixed for 20 min

表 3 BAS全套试剂测试灵敏度和特异性比较
Table 3 Comparison of the sensitivities and specificities of BAS reagent sets

试剂来源 Origin of reagents	观察指标 Items observed	RAHIg 稀释度倒数 Reciprocal of dilutions of RAHIg								
		2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	
SIBP** 自制 Self produced	S	1.489*	1.281	1.059	0.830	0.697	0.525	0.405	0.363	
	N	0.191*	0.190	0.207	0.208	0.178	0.194	0.166	0.168	
	S/N	7.8	6.7	5.1	4.0	3.9	3.6	2.4	2.2	
Vector 进口 form abroad	S	1.526	1.431	0.992	0.711	0.447	0.257	0.158	0.119	
	N	0.173	0.139	0.114	0.101	0.060	0.064	0.041	0.031	
	S/N	8.8	10.3	8.7	7.0	7.5	4.0	3.9	3.8	

*₁A_{492nm}**₁A_v 1:50, b-HRP 1:40, b-SARG 1:2000

讨 论

BAS是70年代发展起来的新颖试剂系统,它与ELISA技术相结合,提供了比常规ELISA和放射免疫测定更为灵敏的免疫反应检测手段^[1,6],其原因是,亲和素有四个生物素结合部位,因此,亲和素通过生物素搭桥,可比抗体连接更多的酶分子。此外,一个抗体分子理论上可偶联90个生物素分子^[10],而由于生物素分子量极小,抗体经适当生物素化后可有极高的生物素:抗体分子比度,而并不影响其生物活性。同理,也可获得高比度的生物素化酶而酶活性不受损害^[11]。高比度生物素化抗体可经由分子上的众多“触手”生物素而“捕获”多个亲和素,再通过亲和素与生物素化酶的反应连接大量酶分子,这是BAS灵敏度高的物质基础。高比度生物素化酶在ABC的形成过程中起桥联作用,可同时连接多个亲和素分子。而亲和素的多价性又进一步加速ABC复合作用^[1,12]。这种亲和素-生物素-酶复合物(ABC)网格结构可网罗数量极其可观的

酶分子,因而比一般BAS法灵敏度更高。我们采用自制BAS试剂作ABC ELISA法检测RAHIg,灵敏度可达1:256000以上(表3),经初步比较,已超过常规ELISA试验。

我们还体会到,由于亲和素和生物素与其它反应物质无明显的相互作用,ABC ELISA法本底较底,对照孔的吸光度值一般不超过0.2。另外,由于亲和素与生物素的结合反应快而稳定,既可节省操作时间,又经得起多次洗涤。除此以外,BAS各类试剂均可高度稀释,不但明显减少了非特异性,而且使成本大幅度下降。

总之,本文结果表明,无论从测试灵敏度方面,还是从反应特异性等方面考察,我们的各种BAS制剂性能已接近相应的进口试剂。用全套自制BAS试剂取代进口试剂的尝试也已获成功。这就为研制国产BAS试剂盒创造了条件。目前,我们正在对ABC ELISA、常规ELISA和PAP ELISA进行对比,并将BAS制剂用于AFP-抗AFP和HBsAg-抗HBs等免疫反应系统的检测,均获得良好结果,进一步拟研制供应成套BAS试剂盒。

参 考 文 献

- [1] 李绍康等: 国外医学 生物制品分册, 第7卷, 第3期, 1984, p.97.
- [2] 严泳棠等: 国外医学 生物制品分册, 第7卷, 第4期, 1984, p.145.
- [3] 章谷生等: 上海免疫学杂志, 4(5), 1984, 封二.
- [4] Bayer EA, et al., in *Methods in Enzymology*, Vol.62, D. p.308, 1979.
- [5] Hudson L, et al., in *Practical Immunology*, 7(3):1, 1976.
- [6] Kendall C, et al., *J. Immunol. Meth.*, 56:329, 1983.
- [7] Green NM, et al., *Biochem. J.*, 118:67, 1970.
- [8] Vector Laboratories, in *Product Specifications*.
- [9] Yolken RH, et al., *J. Immunol. Meth.*, 56:319, 1983.
- [10] Habeeb AFSA, *Anal. Biochem.*, 14:328, 1966.
- [11] Gueston J-L, et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 27:1131, 1979.
- [12] Hsu SM, et al., *J. Histochem., Cytochem.*, 29:577, 1981.

STUDY OF REAGENTS OF BIOTIN-AVIDIN SYSTEM AND THEIR APPLICATIONS

I. PREPARATION AND IDENTIFICATION OF THE REAGENTS

Zhang Gusheng Li Shaokang Gu Kejia Yan Yongtang Ye Meidi
(Shanghai Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Sino-Japanese Collaboration Center for Hematology and Immunology)

The preparation and identification of the reagents required for the biotin-avidin system (BAS) were presented in this paper. Biotin-nyl-N-hydroxysuccinimide (BNHS) was produced by dehydration procedure of a mixture of biotin and n-hydroxysuccinimide. Avidin was purified from egg white through CMC gradient chromatography. Biotinylated sheep anti-rabbit globulin IgG (b-SARG) and biotinylated horseradish peroxidase (b-HRP) were obtained by the reaction of BNHS with SARG and HRP, respectively. All of these 4 chemicals were qualified as suitable BAS reagents. The results of the dete-

ction of rabbit anti-human Ig antibody by means of ABC ELISA showed the concordance of BAS reagents mentioned above with those imported, and the sensitivity of the assay reached to more than 1:25600, a level higher than conventional ELISA. The comparison of BAS ELISA with other immunoenzymatic methods, as well as the determination of other antigen-antibody reaction systems using BAS are now being performed, and the BAS kits are under investigation and preparation.

Key words

Biotin-avidin system