

抗体夹心酶联免疫吸附法测定重组溶葡萄球菌酶研究

Detection of Recombinant Lysostaphin Using Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay

黄青山¹ 张继恩^{2*} 吴宏宇² 莫云杰²

HUANG Qing-Shan¹ ZHANG Ji-En^{2*} WU Hong-Yu² and MO Yun-Jie²

1 复旦大学生命科学学院 遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

2 上海高科联合生物技术研发有限公司, 上海 201206

1 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

2 Shanghai Hi-Tech United Bio-technological Research & Development Co. Ltd, Shanghai 201206, China

摘 要 用重组溶葡萄球菌酶免疫家兔获得抗血清,经亲和层析纯化后用 HRP 标记,以双向免疫扩散法确定抗血清效价,以 Western blot 鉴定抗体的特异性,建立双抗夹心法标准曲线,鉴定其最小检出限、精确度、回收率。实验显示多克隆抗体能与溶葡萄球菌酶特异性结合,双抗夹心 ELISA 法检测抗原的最小检出限为 0.98ng/mL,标准曲线在 0.98 ~ 500ng/mL 范围内线性良好。3 份同批样本分别重复 6 次测定,平均批内变异系数为 6.4%;3 份不同批样本分别重复 6 次测定,平均批间变异系数为 6.5%。血清中加入已知量的标准抗原,测得平均回收率为 98.6%。此法检测重组溶葡萄球菌酶的可测范围广,灵敏度和精密度高,变异系数较小。结果证实建立的检测血清中重组溶葡萄球菌酶含量的双抗夹心酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)灵敏、准确、可靠。

关键词 溶葡萄球菌酶,多克隆抗体,酶联免疫吸附测定法

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)01-0117-05

Abstract The double-antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of rLysostaphin in humans had been developed and established through this study. rLysostaphin of high purity (>95%) produced in Shanghai Hi-Tech United Bio-Technological Research & Development Co., Ltd (SHUBRD) was used to produce a rabbit anti-rLysostaphin polyclonal antibody. The standard curve of rLysostaphin polyclonal antibody that was constructed showed that the lowest range of detection was found at 0.98 ng of rLysostaphin/mL, and the curve exhibited linearity preferably from 0.98 to 500 ng of rLysostaphin/mL. When three serum samples of the same batch were assayed for 6 replicates, and more 3 samples from different batches for 6 replicates, the average intra-assay and inter-assay coefficient variances (CV) were 6.4% and 6.5%, respectively. The relative recovery rate was 98.6% when quantitative standard antigens were added to the serum. The present method for detection of rLysostaphin in serum is specific, highly sensitive, highly precise, and exhibited a low CV and will be helpful in the further study of rLysostaphin pharmacokinetics and holds promise in clinical applications.

Key words lysostaphin, polyclonal antibody, ELISA

溶葡萄球菌酶(Lysostaphin)最早是由 schindler 等人^[1]于 1964 年从模仿葡萄球菌 *Staphylococcus*

simulans NRRLB-2628 株的培养物中发现并分离。该酶是一种含 Zn^{2+} 的金属蛋白酶,能特异性裂解金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖的“五肽甘酰胺”,对耐药性金黄色葡萄球菌 MRSA 具有很强的杀菌作用,国内外均有生物制药公司在进行此酶重组产品的临床试验,具有较好的应用前景^[2]。国内上海高科联合生物技术股份有限公司申报的重组溶葡萄球菌酶已经取得国家食品药品监督管理局的治疗用第 1 类生物制品临床试验批文(批件号 2005L03961),目前正在进行临床试验,有望应用于临床。

对重组溶葡萄球菌酶(rLysostaphin)的检测一般采用生物学活性测定^[3,4]和主要蛋白质含量测定^[5],但最低检出限均在 μg 级水平,且影响因子较多,方法的特异性较差,无法对临床上人血清中的微量溶葡萄球菌酶进行检测,放射性同位素标记也不适应于人体。目前,国内外对临床上人血清中重组溶葡萄球菌酶的测定方法还没有相关的文献报道。为寻找一种灵敏度更高、更能准确检测溶葡萄球菌酶临床药代动力学的方法,用纯化的重组溶葡萄球菌酶免疫家兔制备了抗溶葡萄球菌酶多克隆抗体,并建立了测定血清中微量溶葡萄球菌酶的双抗体夹心 ELISA 法,以期为该产品的临床药代动力学研究提供方法学依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

重组溶葡萄球菌酶标准品(rLysostaphin),SDS-PAGE 分析为一条带,经扫描仪扫描纯度 > 95%,用 Lowry 法标定蛋白含量,上海高科联合生物技术股份有限公司生产部提供。溶葡萄球菌酶(Lysostaphin from *Staphylococcus staphylolyticus*),SDS-PAGE 纯度 > 97%,购自 Sigma 公司。辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP),完全福氏佐剂与不完全福氏佐剂,购自 Sigma 公司。HRP-羊抗兔 IgG,购自华美生物工程公司。邻苯二胺 OPD,购自中国医药集团上海化学试剂公司。其他试剂均为国产分析纯或生化试剂。

96 孔酶标板,美国 Becton Dickinson Labware Europe 公司。550 型酶标仪,BIO-RAD 公司。AKTA explorer、HiTrap Protein A 亲和层析预装柱,Pharmacia 公司。

1.2 实验动物

健康新西兰白兔,雄性,2 只,2.3 ~ 2.5 kg,第二军医大学实验动物室提供。动物购买后饲养 7d 用

于实验,环境温度(20 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 50% ~ 65%,开灯 12h,黑暗 12h,自由进食和饮水。

1.3 兔抗 rLysostaphin 血清的制备

取新西兰白兔,标记 1[#]、2[#]。将 2.0mg 重组溶葡萄球菌酶免疫抗原用 2.0mL 磷酸缓冲盐溶液(PBS 缓冲液)溶解,与 2.0mL 福氏完全佐剂按 1:1 比例混合均匀,用注射器反复抽吸制成乳剂,按照常规方法于背部皮下多点注射进行初次免疫^[6],每只兔子注射约 1.7mL。3 周后进行第 1 次加强免疫,免疫抗原的浓度同前,每只兔子皮下注射 1.5mL。第 1 次加强免疫 2 周后进行第 2 次加强免疫,每只兔子注射 1.0mL,免疫抗原的浓度同前。第 2 次加强免疫前取静脉血 1.0mL,分离血清,用免疫双扩散法测定兔血清抗重组溶葡萄球菌酶的效价。

第 2 次加强免疫 2 周后,用生理盐水配制免疫抗原使成 1.0mg/mL 浓度,兔耳静脉注射 1.0mL/只,进行第 3 次加强免疫。同时取静脉血 1.0mL,分离血清,测定兔血清抗重组溶葡萄球菌酶的效价。第 3 次加强免疫 1 周后,颈动脉放血,收集血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

用琼脂糖免疫双扩散法测定抗血清的效价:制备 1% 琼脂糖,铺板,打孔,每只兔测定 2 份,中心孔分别加 1.0、0.5mg/mL 免疫抗原,10 μL /孔;周边孔加倍比稀释的抗血清,分别为 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、10 μL /孔,放湿盒中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。将出现沉淀线的琼脂糖载玻片放入考马斯亮蓝 R250 中染色后,脱色,拍照保存。

1.4 兔抗 rLysostaphin 血清的纯化及 HRP 酶标抗体的制备

多抗的纯化采用 HiTrap Protein A 亲和层析柱。将 1.0 mL 的 HiTrap Protein A 亲和层析预装柱,与 AKTA explorer 相连接,用 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液(含 0.15mol/L NaCl, pH 7.5)充分洗涤平衡后上样,以相同缓冲液洗去未结合的杂蛋白质后,用 0.1mol/L Gly-HCl 缓冲液(含 0.15mol/L NaCl, pH 2.8)洗脱,收集洗脱峰,用 SDS-PAGE 分析多抗的纯度。

HRP 酶标抗体的制备参照文献 [7] 进行。

1.5 兔抗 rLysostaphin 多抗特异性的初步鉴定

用 Western Blot 法检测兔抗 rLysostaphin 多克隆抗体的特异性。将 rLysostaphin 纯品经 SDS-PAGE 后,电转移至 NC 膜上,经 1% 牛血清白蛋白室温封闭 1h 后,将 NC 膜置于兔抗 rLysostaphin 多抗溶液中,密封,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,经洗涤后,加入 HRP-羊抗兔 IgG, 中

室温 1h 洗涤后加底物,室温显色 30min,冲洗干净晾干后拍照。

1.6 棋盘法确定包被抗体和酶标抗体工作浓度

将兔抗 rLysostaphin 多抗用 PBS 溶液稀释成 8、4、2、1 μ g/mL,加入酶标板中,每个浓度加 2 横排,100 μ L/孔 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。PBS-Tween 20 洗涤液洗板 3 次后,用 1% 牛血清白蛋白封闭,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 2h。同法洗板 3 次后,加入 500、50、5ng/mL 的 rLysostaphin 标准品,100 μ L/孔,每个浓度分别加 3 竖排,同时加 1 竖排的 PBS 对照,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h。洗板后加入 1:500、1:1000、1:2000 稀释的 HRP-兔抗 rLysostaphin 多抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h。洗板 10 次后,加底物 OPD 溶液,37 $^{\circ}$ C 温浴 30min,用 2mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应,酶标仪 490nm 测 A 值。选择合适的试剂工作浓度。

1.7 标准曲线的绘制

取兔抗 rLysostaphin 多抗,用 PBS 稀释至 4 μ g/mL,100 μ L/孔加入 96 孔酶标板,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,洗涤后加 1% BSA,37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,洗板后加入用 PBS 稀释的 500、250、125、62.5、31.2、15.6、7.8、3.9、1.95、0.98ng/mL 的 rLysostaphin 标准品,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h 后洗板,加入用 PBS (含 4% PEG6000)按 1:1000 稀释的 HRP-兔抗 rLysostaphin 多抗,温浴洗板后,加入底物液,显色反应 30min 后终止,检测 A 值,绘制标准曲线。

1.8 回收率试验

用正常人血清配制成浓度为 125、15.6、1.95 ng/mL 的 rLysostaphin 标准品溶液各 6 份作为样品,以不含标准品的空白血清为对照,用双抗夹心 ELISA 法检测,根据其与传统曲线相应点的 A 值之比计算回收率。

1.9 精密度试验

在同一块 96 孔酶标板中,分别加入用 PBS 稀释至 250、31.2、3.9ng/mL 浓度的 rLysostaphin 标准品溶液各 6 份,用双抗夹心 ELISA 法检测出每个浓度的

变异系数(CV),即为板内的 CV。另外,在 6 块 96 孔酶标板中分别加入 250、31.2、3.9ng/mL 浓度的 rLysostaphin 标准品溶液各 6 份,于不同时间分别进行检测(每天检测 1 块,连续 6d),求出每个浓度的 CV,取平均值即为板间的 CV。

1.10 样品稳定性试验

用正常人血清将 rLysostaphin 标准品配制成浓度为 200、100、50、2ng/mL 的溶液,分别置于 4 $^{\circ}$ C 和 -20 $^{\circ}$ C,于第 0 周、3 周、5 周取样,以空白血清为对照,用双抗夹心 ELISA 法进行检测,以考察样品在不同温度下贮存不同时间的稳定性。

同时,将上述样品分别冻融 0、1、5、10 次后,同法测定,以考察样品反复冻融的稳定性。

2 结果

2.1 兔抗 rLysostaphin 血清效价的测定及多抗的纯化与特异性鉴定

用 1% 的琼脂糖免疫双扩散法检测 2 只兔抗 rLysostaphin 血清的效价。第 1 次加强免疫 2 周后,免疫双扩散效价 1 $^{\#}$ 为 1:8 2 $^{\#}$ 为 1:16。第 2 次加强免疫 2 周后,效价 1 $^{\#}$ 为 1:16 2 $^{\#}$ 为 1:32。第 3 次加强免疫 1 周后,颈动脉放血,收集血清,1 $^{\#}$ 兔收集 35mL 2 $^{\#}$ 兔收集 26mL,效价 1 $^{\#}$ 和 2 $^{\#}$ 均为 1:32,见图 1。

收集的血清,上样于 HiTrap Protein A 亲和层析柱充分洗涤后进行洗脱,收集洗脱峰,立即加入 0.1 mol/L Tris-HCl (pH8.0)缓冲液进行稀释,取样用 Lowry 法测定蛋白含量,用 SDS-PAGE 检测纯化多抗的纯度,其余分装,-20 $^{\circ}$ C 冻存,见图 2。

Western Blot 检测结果显示,rLysostaphin 经 15% SDS-PAGE 分离后,在蛋白质相对分子质量 27kD 处有一条蛋白带,转至 NC 膜上后,用所制备的兔抗 rLysostaphin 多克隆抗体进行免疫结合,经显色后可见明显棕色条带,说明多抗能和 rLysostaphin 抗原特异性结合,见图 3。

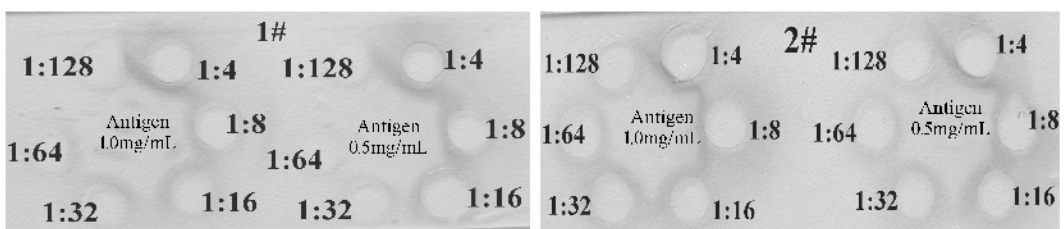


图 1 兔抗 rLysostaphin 血清效价的测定

Fig. 1 Potency of rabbit anti-rLysostaphin serum

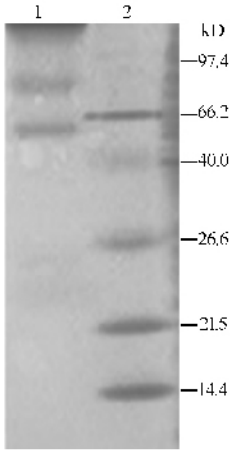


图2 兔抗 rLysostaphin 多抗的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Analysis of rabbit anti-rlystostaphin IgG by SDS-PAGE

1 : pure rabbit anti-rlystostaphin IgG , 2 : protein marker.

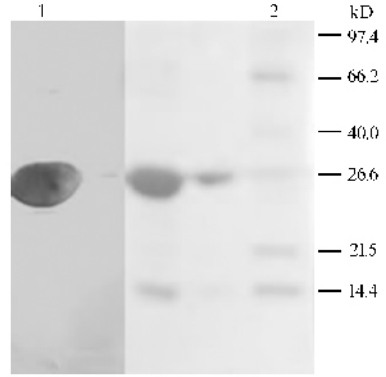


图3 rLysostaphin 的 Western Blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of rabbit anti-rlystostaphin IgG

1 : Western blot ; 2 : SDS-PAGE.

2.2 不同包被浓度和不同酶标抗体稀释度检测结果

抗原抗体各稀释度棋盘式组合采用双抗夹心 ELISA 法检测,结果证明当抗原浓度和酶标抗体稀释度固定时, A 值随包被抗体浓度的增加而明显增大;当包被抗体和抗原浓度固定(500ng/mL),而酶标抗体稀释度变化时, A 值随酶标抗体稀释度增加而

迅速下降。当包被抗体浓度和酶标抗体稀释度固定而抗原浓度变化时, A 值随抗原浓度的降低而下降,根据表 1 中结果可以发现,当 A 值接近 1.0 时,包被抗体的浓度为 4μg/mL,酶标抗体的稀释度为 1:1000。故确定第一和第二抗体的最佳浓度分别为 4μg/mL 及 1:1000。

表 1 抗原抗体各种稀释度棋盘式组合双抗夹心 ELISA 法结果

Table 1 Result of chessboard method for determining the concentration of incubation antibody and HRP-rabbit anti-rlystostaphin IgG by double-antibodies-sandwich-ELISA

| Ab (μg/mL) | HRP-Ab 1:500 | | | HRP-Ab 1:1000 | | | HRP-Ab 1:2000 | | |
|---------------|--------------|-------|-------|---------------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| | 500 | 50 | 5 | 500 | 50 | 5 | 500 | 50 | 5 |
| 8 | 1.618 | 1.286 | 0.407 | 1.331 | 1.126 | 0.346 | 0.536 | 0.134 | 0.056 |
| 4 | 1.216 | 0.936 | 0.376 | 1.056 | 0.804 | 0.281 | 0.456 | 0.122 | 0.084 |
| 2 | 0.882 | 0.683 | 0.339 | 0.707 | 0.500 | 0.149 | 0.351 | 0.099 | 0.068 |
| 1 | 0.728 | 0.508 | 0.210 | 0.579 | 0.318 | 0.106 | 0.242 | 0.084 | 0.048 |

2.3 rLysostaphin 检测的标准曲线和灵敏度

用浓度为 4μg/mL 的兔抗 rLysostaphin 多抗包被 96 孔酶标板,分别加入浓度为 500、250、125、62.5、31.2、15.6、7.8、3.9、1.95、0.98ng/mL 的 rLysostaphin 标准品,再加入 1:1000 稀释的 HRP-兔抗 rLysostaphin 多抗,温浴洗板,加入底物液显色后检测。以样品吸收值的平均值 A 对样品浓度对数做直线回归,得回归方程 $A = 0.1273\text{Lr}(x) + 0.1714$, $R^2 = 0.9885$ 。

读取 3 个空白对照孔的 A 值,计算其平均值 $A = 0.105$ 及标准偏差 $S = 0.0436$ 。按照结果大于 $(A + 3S)$ 判定为阳性,检测下限为 0.98ng/mL。

2.4 相对回收率

用已建立的双抗夹心 ELISA 法测定以血清稀释的 rLysostaphin 标准品各浓度的 A 值,根据其标准曲线对应点的 A 值之比计算,平均回收率为

98.6% 结果见表 2。

表 2 血清中 rLysostaphin 回收率结果

Table 2 The recovery of rlystostaphin in human plasma by double-antibodies-sandwich-ELISA

| rLysostaphin concentration(ng/mL) | Average recovery/% | RSD/% |
|-----------------------------------|--------------------|-------|
| 1.95 | 97.1 | 5.2 |
| 15.6 | 96.3 | 4.6 |
| 125 | 102.3 | 4.0 |

2.5 精密度

用双抗夹心 ELISA 法测定浓度为 250、31.2、3.9ng/mL 的 rLysostaphin 标准品板内和板间的精密度,板内和板间 CV 分别为 6.4% 和 6.5%,结果见表 3。同时,对加入人血清空白对照样品的吸收值与无人血清空白对照样品的吸收值进行方差检验及 t 检验,没有显著性差异($P > 0.05$),说明人血清对样品

的测定无干扰,该方法具有很好的特异性。

表 3 双抗夹心 ELISA 法测定 rLysostaphin 精确度实验结果

| Sample | Within-run(6 times) | | Between-run(6 times) | |
|--------|-----------------------|-----|------------------------|-----|
| | ng/mL | CV% | ng/mL | CV% |
| 1 | 5.49 ± 0.3435 | 6.3 | 5.03 ± 0.3744 | 7.4 |
| 2 | 21.42 ± 1.639 | 7.7 | 21.46 ± 1.560 | 7.3 |
| 3 | 238.24 ± 12.745 | 5.3 | 233.23 ± 11.299 | 4.8 |

2.6 样品保存的条件和稳定性

用正常人血清将 rLysostaphin 标准品配制成 200、100、50、2ng/mL 浓度的溶液,分别贮存于 4℃ 和 -20℃,于 0、3、5 周取样测定的结果比较:在 4℃ 放置 3 周与 0 周进行 *t* 检验,均没有显著性差异($P > 0.05$) 5 周差异有显著性($P < 0.05$);在 -20℃ 放置 5 周,各浓度测定值与 0 周进行 *t* 检验,均没有显著性差异($P > 0.05$)。

将上述样品分别在 -20℃ 冻融 0、1、5、10 次后同时测定的结果如图 4。可见,生物样品在经过不同的冻融次数后,样品测定的吸收值呈现下降的趋势,但逐渐趋于平稳,说明样品反复冻融 10 次内的稳定性良好。

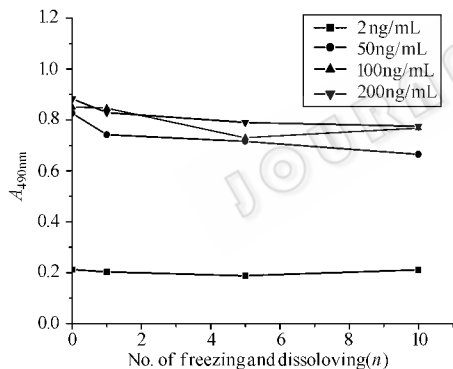


图 4 样品反复冻融的稳定性

Fig. 4 Stability of rlysostaphin after freezing and dissolving

3 讨论

溶葡萄球菌酶是采用基因工程菌大肠杆菌表达,经发酵培养、分离纯化后获得的高纯度的酶,经 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定,并以此做抗原来制

备 rLysostaphin 抗血清奠定了免疫学基础,经棋盘滴定确定各工作液的最佳浓度,建立了定量检测 rLysostaphin 的双抗夹心 ELISA 法,测定方法的线性范围为 0.98 ~ 500ng/mL,灵敏度为 0.98ng/mL,平均回收率为 98.6%,批内 CV 和批间 CV 分别为 6.4% 和 6.5%,未见空白血清对检测的干扰,-20℃ 保存 5 周测定的结果与对照无显著差异,4℃ 只能贮存 3 周,这一点对于临床试验实际操作非常重要,即样本不能及时检测时应冷冻保存,-20℃ 的贮存条件对于不需回顾性检测的样本是适合的,-20℃ 反复冻融 10 次亦影响不大。该方法具有良好的灵敏度、特异性、线性范围、精密度和回收率,且实验步骤简单,容易掌握。其方法学为 rLysostaphin 临床研究及其药代动力学免疫学分析提供了灵敏可靠手段。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Schindler CA, Schuhrardt VT. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, **51** (3):414-421.
- [2] Yang XY(杨信怡), You XF(游雪甫), Jinag JD(蒋建东). Advances in lysostaphin research. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*(中国生化药物杂志), 2005, **26**(6):372-374.
- [3] Zhou RQ(周润琦), Chen SG(陈石根), Recsci PA. The spectrophotometric assay and kinetic properties of lysostaphin. *Chinese Biochemical Journal*(生物化学杂志), 1989, **5**(3):204-208.
- [4] Zhou RQ, Chen SG, Recsci PA. A dye release assay for determination of lysostaphin activity. *Analytical Biochemistry*, 1988, **171**:141-144.
- [5] Mo YJ(莫云杰), Li GD(李国栋), Lu HR(陆海荣), et al. Determination of recombinant lysostaphin content in its final product. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*(中国生化药物杂志), 2006, **27**(3):163-165.
- [6] Li CW(李成文). *Modern Immunological Chemistry Technology*. Shanghai Shanghai Scientific & Technical Press(上海科技出版社), 1992, pp.235-237.
- [7] Mo YJ(莫云杰), Lu M(陆敏), Xu LM(许黎明), et al. Determination of residual *B. sphaericus* protein in recombinant lysostaphin products. *Harmaceutical Biotechnology*(药物生物技术), 2006, **13**(3):197-201.