

钙调素抗体的亲和层析和酶联免疫分析

孔令魁¹ 胡卓逸

(生物化学研究室)

摘要 本文利用 CaM-Sepharose CL-4B 免疫亲和层析柱在乙二醇双(α -氨基乙基醚四乙酸)(EGTA)和酸性条件下,从天然猪脑 CaM 与甲基化牛血清白蛋白混悬液抗原免疫家兔产生的抗体中分离出两组抗体,并进行了亲和性分析。对文献中有关钙离子的存在可增加钙调素酶联免疫定量测定敏感性的报道进行了研究,并得出不同结果。

关键词 钙调素; 钙调素抗体; 免疫亲和层析; 竞争酶联免疫

钙调素(Calmodulin, CaM)的含量测定是揭示其含量差异或变化与病理生理关系的重要手段^[1],常用的生化方法有磷酸二酯酶(Phosphodiesterase, PDE)法, DNA 酶法和放免法等。近年来国内有关 CaM 抗体的制备及用酶联免疫(Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)法对 CaM 的定量测定已有报道^[2,3]。有文献报道^[4],钙离子的存在可增加 ELISA 实验中抗体与钙调素结合的亲和力。本文按 Kitajima 方法^[5]用天然猪脑 CaM 与甲基化牛血清白蛋白的混悬液免疫产生了 CaM 抗体,并利用 CaM-Sepharose CL-4B 免疫亲和层析和 ELISA 方法对 CaM 抗体的性质和离子条件对敏感性的影响进行了初步探讨。

1 材料与试剂

甲基化牛血清白蛋白(Methylated Bovine Serum Albumin, Me-BSA)(上海东风生物试剂厂); 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP), 比活力 RZ=3.0(华美生物试剂厂); 新鲜冰冻猪脑(南京肉联加工厂); Phenyl-Sepharose CL-4B 和 DEAE-Cellulose 52(DE-52)分别为 Pharmacia 和 Whatman 公司产品; CaM-Sepharose CL-4B 按叶正华方法由本室制备^[6]。DE-52离子交换层析用缓冲液(B-buffer II)含

0.02 mol/L Tris-HCl, 1 mmol/L 琥珀酰乙醇, pH 6.5; Buffer E 为 B-buffer II 中含 0.15 mol/L NaCl; Buffer F 为 B-buffer II 中含 0.4 mol/L NaCl。乙二醇双(α -氨基乙基醚四乙酸),简写 EGTA, 分析纯,(上海试剂一厂)。BS-100A 自动部份收集器,上海市沪西仪器厂; DG-3022 型酶联免疫检测仪,华东电子管厂。

2 方法和结果

2.1 猪脑 CaM 的制备和纯化

新鲜冷冻猪脑经匀浆、纱布过滤、酸性等电点沉淀(pH 4.3)、加热去除热不稳定杂蛋白和 Phenyl-Sepharose CL-4B 疏水层析,用 1 mmol/L EGTA 洗脱的峰即为 CaM。为进一步纯化,将上述 CaM 上 DEAE-Cellulose 52 离子交换层析柱,由含 0.4 mol/L NaCl 的洗脱液洗脱的一尖峰即纯化的 CaM(图 1),经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)证实为电泳均一纯。制备的 CaM 经超滤后浓缩成 8 mg/ml 的 CaM 蛋白液。

2.2 免疫方法和步骤 Me-BSA 2 g 溶于 0.5 ml 生理盐水中,再加入同体积浓缩 CaM 蛋白液使成絮状混悬液,使用前按 1:3 体积比与福氏完全佐剂(Freund's Complete Adjuvant, FCA)或福氏不完全佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant, FIA)混匀即为 1 mg/ml 钙调素的免疫试剂,分

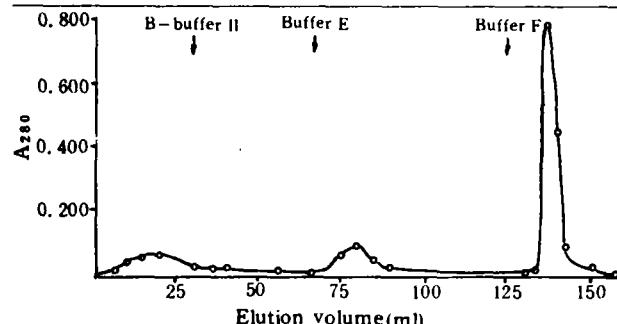


Fig. 1. Purification of porcine brain calmodulin by DEAE-Cellulose 52 ion-exchange chromatography

别称为 FCA 抗原和 FIA 抗原。四只家兔进行了免疫,途径为皮下多点注射,每只注射量为 1 ml/次。每次免疫注射前抽取少量血检测抗体产生情况。首次免疫给予 FCA 抗原,间隔 14 d 后以同样方法再次免疫。其后改为 FIA 抗原每周注射一次,连续四周。第 7 周起每隔两周进行一次加强免疫,用各含 0.5 mg 的 CaM 和 Me-BSA 的生理盐水混悬液 1 ml 直接作耳静脉注射。四只家兔分别于第 12 至 14 周放血(图 2)。

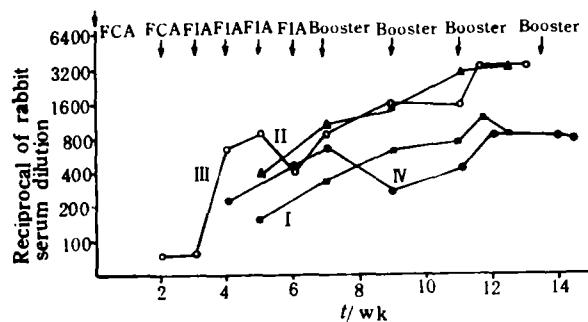


Fig. 2. Time course of anti-calmodulin antibody production

2.3 CaM 抗体免疫亲和层析纯化 将混合兔血清经硫酸铵沉淀并透析去除铵离子后的抗 CaM 抗体粗提液上 CaM-Sepharose CL-4B 免疫亲和层析柱。柱事先经硼酸-硼酸钠缓冲液(硼酸盐 125 mmol/L, NaCl 75 mmol/L, pH 8.4)平衡。用含 0.2 mol/L 甘氨酸的 Glycine-HCl 缓冲液(pH 2.7)洗脱即得免疫亲和层析纯的 CaM 抗体。

2.4 CaM 抗体性质分析 为了分析是否有钙离子依赖性的和非钙离子依赖性抗体的存在,本实验将上述经免疫亲和层析获得的抗钙调素

抗体重新上 CaM-Sepharose CL-4B 柱,平衡后用含 1 mmol/L EGTA 的硼酸缓冲液和 0.2 mol/L Glycine-HCl 缓冲液分别洗脱出两个峰(峰 1 和峰 2),峰面积比值约为 1:1.6。

在 Ca^{2+} 和 EGTA 分别存在的条件下,用酶联免疫的方法对这两组抗体与包被在聚苯乙烯上的 CaM 的免疫亲和性进行了测定。结果显示:峰 1 抗体在 EGTA 存在的情况下与包被 CaM 不反应,在有钙离子存在的情况下有弱反应;峰 2 抗体无论是在 EGTA 或钙离子存在的情况下与包被 CaM 都有强反应,抗体效价大于 1000。

2.5 不同条件对 ELISA 敏感性的影响 用间接 ELISA 试验分别比较了包被条件和离子条件对其敏感性的影响。ELISA 反应时离子条件有:存在 1 mmol/L 钙离子(D1);存在 1 mmol/L EGTA(D2);和两者均不存在(D3)。CaM 包被条件有:由 pH 9.6 碳酸盐包被(A);包被前经 1% 蔗糖预处理(B);和由 0.2% 戊二醛预处理后再经 pH 8.0 碳酸盐包被(C)。所有实验条件都设缺乏 CaM 的阴性对照。各种条件下的反应结果在可见光 490 nm 处测得吸收值见表 1。

Tab. 1. Effects of three CaM-coated conditions and two ion factors on indirect ELISA test

A_{490}	A			B			C		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Positive	1.53	1.01	1.49	1.54	1.08	1.48	1.81	1.01	1.63
Negative	0.34	0.14	0.24	0.29	0.18	0.28	0.29	0.14	0.23
Pos./Neg. ^a	4.50	7.21	6.21	5.31	6.00	5.29	6.24	7.21	7.04

^aAbsorbance was described as $D_{p/n}$ in paper, e.g. in group A

$D1p/n = 4.50$.

由表 1 可以看出,与缺乏离子的 D3 条件相比较,在 A、B 和 C 三组中钙离子条件下(D1)的阳性和阴性的吸收值均有提高;而 EGTA 条件下(D2)的阳性和阴性的吸收值均有减少。但 D1 的阴性吸收值的上升幅度比阳性吸收值的要大;同样 D2 的阴性吸收值的下降幅度比阳性吸收值的要大。其结果是:钙离子条件下的阳性和阴性的吸收比值 $D1p/n$ 在 $D3p/n$ 的基础上下降,而 EGTA 条件下的 $D2p/n$ 则上升;三种包被条件下的比值之和分别为 $\sum D2p/n =$

$20.42 > \sum D3p/n = 18.52 > \sum D1p/n = 16.05$ 。这说明在 ELISA 分析中存在 EGTA 时, 可以提高抗体与 CaM 结合的特异性; 反之, 存在 Ca^{2+} 时, 其特异性反而下降。

三种不同的包被条件下阳性和阴性的光吸收比值之和分别为 $\sum Cp/n = 20.49 > \sum Ap/n = 17.92 > \sum Bp/n = 16.60$, 说明用戊二醛交联 CaM 的包被条件最为理想。

2.6 竞争性 ELISA 抑制试验 将不同稀释浓度的 CaM 与定量的经免疫亲和层析纯化的抗 CaM 抗体温育使抗原抗体结合, 再将其加入酶联板中使剩余游离抗体与包被 CaM 结合, 其后加入由 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体, 及含 DAP (3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐) 的枸橼酸盐缓冲液显色后在 490 nm 处测定吸收值。以吸收值 ($A_{490 \text{ nm}}$) 作纵座标和 CaM 的稀释倍数作横座标, 绘制 CaM 定量测定的竞争性 ELISA 抑制试验的标准曲线(图3)。

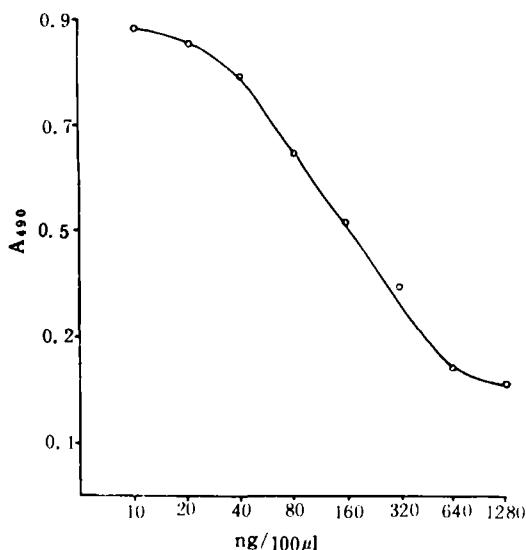


Fig 3. Standard curve of competitive ELISA assay

3 讨论

3.1 CaM 是一种在进化上高度保守的多功能低分子蛋白, 种属差异小。作为免疫原, CaM 属低特异性和低抗原性的分子, 其产生抗体的能力很弱。早期 CaM 抗体的免疫制备多采用抗原

的化学修饰法, 如钙调素的过甲酸氧化法^[7]和二硝基苯基化法^[8]。用修饰抗原免疫制备出的抗体的最大缺点是其与天然 CaM 结合的亲和力明显比与未经化学修饰的 CaM 结合的亲和力弱^[5]。本实验用天然猪脑 CaM 和 Me-BSA 混悬液作抗原免疫四只家兔都有抗 CaM 抗体产生, 说明天然 CaM 混悬于 Me-BSA 中可以较好地克服 CaM 弱抗原性的缺点。

3.2 由于 CaM 的构象变化为钙离子依赖性的, 因此有作者^[2]提出可能存在两种抗体, 一种是钙离子依赖性的针对游离 CaM 抗体, 另一种是非钙离子依赖性的可用于测定总 CaM 的抗体。本文将经硫酸铵沉淀法粗提的 IgG 和经 CaM-Sepharose CL-4B 免疫亲和层析纯化的 CaM 抗体再次上 CaM-Sepharose CL-4B 柱, 平衡后加入 1 mmol/L EGTA 可以洗脱下一个峰, 其后在 pH 2.7 的条件下洗脱第二个峰。实验提示: 峰2组份为单一特异性的非钙离子依赖性的抗 CaM 抗体; 峰一可能为亲和力较弱的钙离子依赖性的抗体。

3.3 吴承军认为^[4], 钙调素 ELISA 法测定中, Ca^{2+} 浓度与吸收值呈正相关, 可提高 CaM 抗体与包被 CaM 结合的亲和力。本文的离子条件对 ELISA 测定钙调素敏感性影响的试验表明: 虽然在有钙离子存在时 ELISA 实验的吸收值升高, 但并不表明其敏感性有所提高, 因为其阴性对照的吸收值升幅更大, 结果使得 Dp/n 比值下降, 表明了 ELISA 特异敏感性实质上是下降而不是提高; 同理, 在有 EGTA 存在时其阴性对照吸收值的降幅比阳性的更大, 因而其 Dp/n 升高, 表明其特异敏感性得以提高而不是下降。

3.4 对 CaM 的三种不同包被条件的试验结果表明, CaM 以 0.2% 戊二醛交联的方法进行包被其敏感性最好。

3.5 CaM 定量测定的磷酸二酯酶法是目前较常采用的方法之一^[8,9], 但尚存在不少缺点。例如, 若待检样品中含有较多的 ATP 时将对 PDE 的酶活性产生抑制作用, 含有较多的无机磷会使测定的 $A_{660 \text{ nm}}$ 值的背景增加, 以及 CaM

结合蛋白和外源性的 CaM 拮抗剂等都会影响到 PDE 测定的准确性。竞争性 ELISA 法的 CaM 定量测定由于是一种免疫测定, 在一定程度上可弥补 PDE 法的上述缺点, 但 ELISA 法本身也有其不足。例如, 待测样品中含有较多杂质时同样对测定有干扰; 此外, 由于 CaM 的低种属特异性和低抗原性, 用 ELISA 法对 CaM 进行定量测定的重复性和敏感性尚不理想, 有待改进。

参 考 文 献

- 1 李家旭, 孙大业. 生物细胞中钙调素分布研究及其意义. *细胞生物学杂志*, 1991; 13(1): 1
- 2 赵升皓, 于宏林, 张明志. 钙调素的酶联免疫测定法. 徐州医学院学报, 1988; 8: 117-54
- 3 张明志, 于宏林, 张光毅等. 钙调素抗体的制备和鉴定. 徐州医学院学报, 1989; 9(3): 176
- 4 吴承军, 吴建国, 孙大业. 钙调素特异抗体的制备及 ELISA 定量法的建立. *中华医学检验杂志*, 1990; 13(2): 94
- 5 Kitajima S, Seto-ohshima A, Sano M, et al. Production of Antibodies to Calmodulin in Rabbits and Enzyme Immunoassay for Calmodulin and Anti-Calmodulin. *J Biochem*, 1983; 94: 559
- 6 叶正华, 孙大业, 郭秀芳. 钙调素亲和层析柱的制备及其应用. *生物化学与生物物理学进展*, 1988; 15(5): 394
- 7 Van Eldik L J, Watterson M. Reproducible Production of Antiserum against Vertebrate Calmodulin and Determination of the Immunoreactive Site. *J Biol Chem*, 1981; 256: 4205
- 8 Wallace R W, Cheung W Y. Calmodulin. *J Biol Chem*, 1979; 254: 6564
- 9 Wallace R W, Tallant E A, Cheung W Y. *Methods in Endocrinology*. New York: Academic Press, 1983; 102: 39

Analysis of Calmodulin Antibody by Affinity Chromatography and ELISA

Kong Lingkui, Hu Zhuoyi

Division of Biochemistry

Two groups of antibodies raised by immunization to natural porcine-brain Calmodulin (CaM) mixed with MethylatedBovine Serum Albumin were eluted from a CaM- Sepharose CL- 4B immunoaffinity chromatography column by EGTA and acidic solution respectively and the assay of their affinity was performed. Our re-consideration comes to an opposite result from the documented conclusion that existence of calcium could increase ELISA sensitivity in CaM quantitative analysis.

Key words Calmodulin; Antibody to Calmodulin; Immunoaffinity chromatography; Competitive ELISA

【文摘017】玉米花粉钙调素及钙调素结合蛋白 张虞安, 胡卓逸. 生物化学与生物物理学报, 1992; 24(1): 83-7

钙调素(CaM)在动植物中参与许多基本的生理过程。研究了玉米花粉 CaM 及 CaM 结合蛋白的分离纯化和性质, 为探讨 CaM 在植物生殖生理方面的作用提供

信息。

【文摘018】炮制及其同义词释义 刘成基, 曾 诠. 中药材, 1992; 15(2): 24-6

古代医药文献中“炮制”的同义词有炮炙、修事、修制等10余种, 本文对炮制及其同义词进行了归纳及释义, 为更好地学习和研究中药炮制提供理论基础。