

碱性成纤维细胞生长因子生物活性的 ELISA 检测

安 全^{1*}, 李校¹, 赵 文¹, 项 琪², 孟 娟²⁽¹⁾暨南大学医药生物技术研究开发中心, 广州 510632; ⁽²⁾国家教育部基因组药物工程研究中心, 广州 510632)

【摘要】 目的: 寻找一种简便、经济、灵敏度高而不需使用放射性同位素或 MTT 的生物活性检测方法, 对碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) 进行活性检测。方法: 运用多克隆抗体 ELISA、单克隆抗体 ELISA 和 MTT 法分别对 bFGF 进行生物活性检测, 并对结果和重现性进行比较。结果: ELISA 测得结果与 MTT 法相比无显著差异, 且其精密度明显优于 MTT 法。结论: 用 ELISA 检测 bFGF 生物活性, 简便准确, 值得推广应用。

【关键词】 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF); ELISA; MTT; 生物活性检测

【中图分类号】 R392.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2005)05-0457-04

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 是一种重要的促创伤愈合因子。它不但能促进创面的愈合, 而且对血管和神经的再生有很强的促进作用, 因此是当今研究的热点之一^[1,2]。随着对其纯度和生物活性要求的不断提高, 生物活性的检测手段也需要不断进步。目前, bFGF 的生物活性检测手段以³H-TdR 和 MTT 法为主。³H-TdR 法因使用放射性同位素, 受设备限制, 检测费用高, 不易推广应用。而 MTT 法影响因素多, 重现性差, 操作繁琐, 也具有应用上的局限性。因此迫切需要一种操作简单、准确、快速的新方法来测定 bFGF。由于 ELISA 是一种灵敏度高, 操作简便且经济的检测方法, 我们用多克隆抗体 ELISA、单克隆抗体 ELISA 和 MTT 法同时检测 5 种不同浓度的 bFGF 原液, 考察三种方法测定结果与原始浓度之间的对应关系及重现性。此外, 使用这三种方法分别检测不同失活程度的 bFGF, 并进行结果比较。在 bFGF 的生物制品活性检测的新方法进行了初步的探讨。

1 材料

bFGF 母液、96 孔酶标板、96 孔细胞培养板、兔抗人 bFGF 多克隆抗体(上海申能博彩生物科技有限公司); 兔抗人 bFGF 单克隆抗体(Promega 公司); 羊抗兔 IgG-HRP 抗体(博士德生物工程有限公司); 1640 培养基(Sigma 公司); 胎牛血清(FBS, Gibco 公司)。

2 方法

2.1 多克隆抗体 ELISA 检测线性范围的确定^[3-5]

包被: 以 0.05 mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.5)稀释 bFGF 母液(3.01×10⁵ IU/mL)分别至 1507 IU/mL, 758 IU/mL, 379 IU/mL, 188 IU/mL, 94 IU/mL, 49 IU/mL 和 24 IU/mL, 包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μL, 4℃放置过夜。洗涤: 倒尽板中包被液, 以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBST, pH 7.4, 含 0.05% 吐温-20)为洗涤液, 洗涤 3 次, 每次 3 min。加一抗(兔抗人 bFGF 多克隆抗体): 用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(含 3% 脱脂奶粉)为稀释液, 1:200 稀释一抗, 每孔 100 μL, 同时作空白对照, 37℃孵育 1 h。加二抗: 用 PBST 洗涤 3 次, 加 1:1000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 抗体, 每孔 100 μL, 37℃孵育 1 h。显色: 用 PBST 洗涤 3 次, 加新鲜配制的邻苯二胺溶液, 每孔 100 μL, 37℃避光 20 min。终止反应: 加入 2 mol/L H₂SO₄, 每孔 20 μL。用酶联免疫检测仪记录 492 nm 处的吸收度, 以活性对吸收度作图。

2.2 多克隆抗体 ELISA 检测标准曲线的制作

将 3.01×10⁵ IU/mL 的 bFGF 母液分别稀释至 301.4 IU/mL, 150.7 IU/mL, 75.4 IU/mL, 37.7 IU/mL 和 18.9 IU/mL, 依照“2.1”所述方法测定各溶液 ELISA 检测的吸收度, 制备标准曲线。

*【收稿日期】 2005-01-21 【*通讯作者】 Tel: 020-85565109-306 Fax: 020-85565109-801 E-mail: a9740614@etang.com

【基金项目】 广东省科技攻关计划资助项目(No. 2004B10401019)

2.3 单克隆抗体 ELISA 检测标准曲线的制作

将 3.01×10^5 IU/mL 的 bFGF 母液分别稀释至 2.4 IU/mL, 1.2 IU/mL, 0.6 IU/mL, 0.3 IU/mL 和 0.15 IU/mL, 依照“2.1”所述方法, 以兔抗人 bFGF 单克隆抗体为一抗, 则定各溶液 ELISA 检测的吸收度, 制标准曲线。

2.4 ELISA 与 MTT 法分别检测不同活性 bFGF

选用 5 种不同浓度的 bFGF 溶液, A: 8.54×10^5 IU/mL; B: 1.46×10^5 IU/mL; C: 2.12×10^6 IU/mL; D: 1.39×10^5 IU/mL; E: 3 000 IU/mL。分别应用单克隆抗体 (mAb) ELISA、多克隆抗体 (pAb) ELISA 和 MTT 法测定。ELISA 操作见“2.1”所述方法。其中, 多克隆抗体 ELISA 检测各 bFGF 溶液均稀释至 100 IU/mL, 单克隆抗体 ELISA 检测各 bFGF 溶液均稀释至 1 IU/mL。

MTT 法^[6,7]: 收集对数生长期的 BALB/c 3T3 细胞, 悬浮于含 10% FBS 的 1640 培养液, 调整细胞浓度为 8×10^5 个/mL 左右, 接种至 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ L, 于孵箱 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 培养 24 h 后, 换含 0.4% FBS 的 1640 培养液 100 μ L, 饥饿培养 24 h。吸去上清, 以含 0.4% FBS 的 1640 培养液为空白对照, 并以此为稀释液分别稀释上述 5 个样品, 以 100 IU/mL 为起始浓度, 以 1:2 的梯度稀释, 共 7 个浓度, 每孔 100 μ L, 做 3 个复孔, 于孵箱培养 48 h; 每孔加入 20 μ L 的 MTT 溶液, 放入孵箱培养 4 h 吸去上清, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μ L, 室温放置 30 min 后, 用酶标仪测吸收度 (测定波长 570 nm, 参比波长 630 nm)。

将上述 5 种 bFGF 溶液分别用 ELISA 单克隆抗体、ELISA 多克隆抗体及 MTT 法重复测定 5 次。

2.5 ELISA 与 MTT 法测定不同失活程度的 bFGF 母液

将 bFGF 溶液 A 放置于室温 (24 $^{\circ}$ C), 分别于 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 7 h, 8 h 取样, 用单克隆抗体 ELISA、多克隆抗体 ELISA 及 MTT 法分别测其活性。

3 结果与结论

3.1 多克隆抗体 ELISA 线性范围的确定

图 1 中显示多克隆抗体 ELISA 法在 20 ~ 300 IU/mL 内线性关系良好。

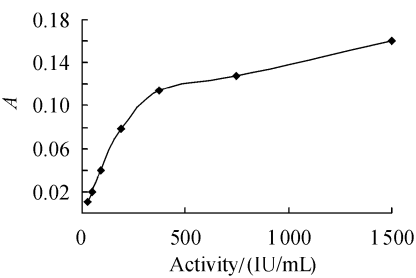


Fig. 1 Determination of the range of linearity by ELISA (pAb)

3.2 多克隆抗体 ELISA 标准曲线的制作

应用多克隆抗体 ELISA 分别测定活性为 301.4 IU/mL, 150.7 IU/mL, 75.4 IU/mL, 37.7 IU/mL 和 18.9 IU/mL 的 bFGF 溶液, 重复 3 次, 其吸收度均值分别为 0.120 445, 0.060 333, 0.030 778, 0.014 667 和 0.007 333。经线性回归得其标准曲线为: $A = 0.000\ 4c - 0.000\ 2$, $r = 0.999\ 9$, 检测灵敏度为 18.9 IU/mL。

3.3 单克隆抗体 ELISA 标准曲线的制作

应用单克隆抗体 ELISA 分别测定活性为 2.4 IU/mL, 1.2 IU/mL, 0.6 IU/mL, 0.3 IU/mL 和 0.15 IU/mL 的 bFGF 溶液, 重复 3 次, 其吸收度均值分别为 0.166 667, 0.083 333, 0.041 544, 0.020 445 和 0.011 433。经线性回归得其标准曲线为: $A = 0.069\ 4c + 0.000\ 2$, $r = 0.999\ 9$ 。其检测灵敏度为 0.15 IU/mL, 高于多克隆抗体 ELISA。

3.4 ELISA 与 MTT 法检测不同活性 bFGF 的比较

Tab. 1 Activity of bFGF ($\times 10^5$ IU/mL) detected by ELISA and MTT

Sample	ELISA		MTT
	pAb	mAb	
A	8.82	8.58	7.38
B	1.47	1.49	2.14
C	2.14	2.10	2.63
D	1.41	1.38	1.24
E	0.03	0.03	0.04

将多克隆抗体 ELISA 和单克隆抗体 ELISA 测定结果分别与 MTT 法进行统计学比较, 均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

分别用以上 ELISA 与 MTT 法在同等条件下对 A、B、C、D、E 样品重复测定 5 次, 结果见表 2。表 3 为 5 次检测重现性的比较。

Tab. 2 Activity of bFGF ($\times 10^5$ IU/mL) detected by ELISA and MTT ($n=5$)

Sample	1			2			3			4			5		
	pAb	mAb	MTT	pAb	mAb	MTT	pAb	mAb	MTT	pAb	mAb	MTT	pAb	mAb	MTT
A	8.82	8.58	7.38	8.61	8.54	6.38	8.75	8.56	10.8	8.61	8.52	9.87	8.61	8.56	10.73
B	1.47	1.49	2.14	1.43	1.49	1.22	1.46	1.48	1.94	1.42	1.47	1.79	1.48	1.47	1.75
C	2.14	2.10	2.63	2.14	2.11	3.06	2.08	2.10	1.48	2.08	2.09	2.03	2.07	2.11	2.50
D	1.14	1.38	1.24	1.36	1.37	1.98	1.41	1.37	1.11	1.41	1.38	1.54	1.36	1.37	1.11
E	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.041	0.03	0.03	0.028	0.03	0.03	0.035	0.03	0.03	0.02

Tab. 3 RSD(%) of different detective methods

Sample	ELISA		MTT
	pAb	mAb	
A	0.12	1.22	23.65
B	0.30	1.77	23.42
C	0.18	1.65	28.30
D	0.18	1.97	26.62
E	0	0	28.63

结果(表 3)表明, ELISA 法的精确度明显高于 MTT 法, 同时, 使用单克隆抗体 ELISA 比多克隆抗体 ELISA 更为精确。

3.5 测定不同失活程度的 bFGF 母液比较

分别用单克隆抗体 ELISA、多克隆抗体 ELISA 和 MTT 法对不同失活程度的 bFGF 母液进行活性检测, 结果见表 4。

Tab. 4 Activity (IU/mL) of heat inactivated bFGF detected by different methods

t (h)	ELISA		MTT
	pAb	mAb	
0.5	1.428	1.443	1.346
1	1.049	1.057	1.013
2	851	864	814
3	564	562	504
4	318	318	296
5	112	113	98
7	58	59	42
8	21	24	0

将所得结果进行统计学分析, 单克隆抗体 ELISA、多克隆抗体 ELISA 和 MTT 法检测所得结果无显著性差异($P>0.05$)。

4 讨 论

随着提取与分离技术的迅速发展, 生物制品的纯度和生物活性也越来越高, 而其检测手段却相对落后。现在采用的基本方法为 MTT 法, 由于该方法考察的是活细胞的增殖情况, 因此受活细生长情况的影响, 准确率低, 操作烦琐, 耗时长, 重现性差, 使 bFGF 在开发成各种剂型后不能对其进行较好的质量控制。ELISA 是在酶联免疫技术基础上发

展起来的一种新型免疫检测技术, 主要利用抗原抗体特异性结合来检测抗原或抗体。因此 ELISA 以其快速、准确、特异性高、重复性好等优点广泛应用于临床抗原或抗体的检测。

bFGF 抗体对 bFGF 促分裂活性具有很强的抑制作用^[8-10], ELISA 可通过抗体和抗原的特异性结合, 间接反映其生物活性。因此用 ELISA 检测 bFGF 的生物活性在理论上是可行的。通过实验, 分别选用兔抗人 bFGF 单克隆抗体和兔抗人 bFGF 多克隆抗体进行 ELISA 检测, 所得的结果与活性都具有良好的对应关系。其中, 用单克隆抗体 ELISA 检测的灵敏度和精确度高于多克隆抗体 ELISA。从 ELISA 和 MTT 法分别检测 bFGF 的结果可看出, 两种方法检测结果无显著差异, 但是 ELISA 精确度明显高于 MTT 法。因此, 在 bFGF 的质量控制方面, ELISA 是一种更为简单、准确和精确的方法。

【参 考 文 献】

[1] 吴晓萍(Wu XP), 冯 辉(Feng H), 李校堃(Li XK), 等. 重组人碱性成纤维细胞生长因子突变体[Ser⁶⁹,87]的表达、纯化及其稳定性研究[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2005, 36(2): 168—172.

[2] 李校堃(Li XK), 黄巨恩(Huang JE), 梁 钢(Liang G), 等. bFGF 对庆大霉素及缺血性肾损伤的保护作用[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2002, 33(4): 316—320.

[3] 赵利淦(Zhao LG), 林 剑(Lin J). ELISA 对样品中微量 bFGF 的快速定量分析[J]. 暨南大学学报(*J Ji'nan Univ*), 1997, 18(3): 108—109.

[4] 任凤琴(Ren FQ), 宋耀虹(Song YH), 冯 涛(Feng T), 等. 尿微量白蛋白 ELISA 测定法最适条件的探讨[J]. 生物化学与生物物理进展(*Prog Biochem Biophys*), 1997, 24(1): 88—90.

[5] 罗 敏(Luo M), 曹文俊(Cao WJ), 陈淑菁(Chen SJ), 等. 人促甲状腺激素(hTSH) ELISA 的建立[J]. 上海免疫学杂志(*Shanghai J Immunol*), 1996, 16(3): 149—151.

[6] 饶春明(Rao CM), 刘 兰(Liu L), 丁有学(Ding YX). 重组牛碱性成纤维细胞生长因子国家标准品的研制[J]. 中国生物制品学杂志(*Chin J Biol*), 2001, 14(2): 94—96.

[7] 叶春婷(Ye CT), 李斯明(Li SM), 邹海燕(Zou HY), 等. 肝素诱导结晶紫比色法检测成纤维细胞生长因子的生物活性[J]. 中

国免疫学杂志(*Chin J Immunol*), 1999, **15**(11): 504—505.

[8] Yayon A, Aviezer D, Saffran M, *et al*. Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library[J] . *Proc Nat Acad Sci USA*, 1993, **90** (22): 10 643—10 647.

[9] Kurokawa M, Doctrow SR, Klagsbrun M. Neutralizing antibodies inhibit the binding of basic fibroblast growth factor to its receptor but not to heparin[J] . *J Biol Chem*, 1989, **264**(13): 7 686—7 691.

[10] Aonuma M, Yoshitake Y, Nishikawa K. Different antitumor activities of anti-bFGF neutralizing antibodies; heparin-binding domain provides an inefficient epitope for neutralization *in vivo*[J] . *Anticancer Res*, 1999, **19**(5B): 4 039—4 044.

Bioassay of Basic Fibroblast Growth Factor by ELISA

AN Quan¹, LI Xiao-Kun¹, ZHAO Wen¹, XIANG Qi², MENG Juan²
(¹*Biopharmaceutical R &D Center of Ji 'nan University, Guangzhou 510632*; ²*Bioengineering Medicine Research Center of National Education, Guangzhou 510632, China*)

【ABSTRACT】 AIM: To establish a convenient, low-cost and highly sensitive activity bioassay method of bioassay method of bFGF without employing radioisotope or MTT. **METHODS:** Using ELISA and MTT assay to detect the activity of bFGF respectively. **RESULTS:** There was no significant difference in the validation between ELISA and MTT assay. But ELISA was markedly sensitive than MTT assay. **CONCLUSION:** ELISA is an easy, sensitive and reliable method for the activity bioassay of bFGF.

【KEY WORDS】 Basic fibroblast growth factor (bFGF); ELISA ; MTT ; Bioassay

This project was supported by the Technology R &D Program of Guangdong Province(No. 2004B10401019)

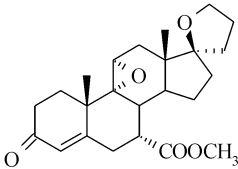
°2004 年世界新药。

依普利酮 Eplerenone

商品名: Inspira[®]
化学式: C₂₄H₃₀O₆
化学名: (7α, 11α, 17α)-pregn-4-ene-7, 21-dicarboxylic acid,
9, 11-epoxy-17-hydroxy-3-oxo-, γ-lactone, methyl ester
相对分子质量: 414. 50
研制单位: 法玛西亚 (Pharmacia) 公司
制剂规格: 片剂, 25 mg, 50 mg

类 别: 选择性醛固酮阻断剂 (SAB), 能够有效控制轻、中度高血压, 患者顺应性好。控制高血压的效果与安体舒通相当, 由于对醛固酮受体具有高度的选择性, 依普利酮没有安体舒通通常出现的不良反应。

性 状: 依普利酮是一种无臭, 白或乳白色的结晶状粉末, 其溶解性不依赖于 pH 值, 微溶于水。油/ 水分配系数大约为 7. 1(pH 7. 0)。



(本刊讯)