

肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)单克隆抗体制备及检测方法的建立

管楷丽¹ 朱华结^{2*} 程华^{3*}

(¹河北大学药学院, 保定 071002; ²河北省药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 保定 071002;

³河北省科学院生物研究所, 石家庄 050000)

摘要 该文通过制备出特异性高的单克隆抗体, 初步建立了双抗夹心ELISA定量测定CK-MB的方法, 为CK-MB试剂和原料的国产化奠定重要的基础。以购入的CK-MB抗原为免疫原, 对随机选取的5只6~8周龄Balb/c健康雌性小鼠进行免疫。采用有限稀释法、间接ELISA、捕获ELISA方法, 最终筛选出了3株能够稳定分泌抗体的细胞株, 分别命名为2F6、2H3和2H9, 其分泌的单克隆抗体亚型均为IgG3, 腹水效价分别为1:102 000、1:51 200和1:102 000。采用亲和层析法对3株杂交瘤细胞产生的小鼠腹水进行纯化, 分光光度计测定纯化后的单克隆抗体2H3、2F6、2H9的浓度分别为5 mg/mL、6 mg/mL、6 mg/mL, SDS-PAGE结果表明, 成功纯化了单抗腹水, 能够清晰地观察到轻链和重链两条带。Western blot结果表明, 单克隆抗体2F6、2H3和2H9均能特异性识别CK-MB蛋白。间接ELISA及捕获ELISA方法检测显示, 单克隆抗体2H3只与CK-MB及CK-BB发生捕获ELISA方法反应; 单克隆抗体2H9只与CK-MB及CK-BB发生捕获ELISA方法反应; 单克隆抗体2F6只与CK-MB及CK-MM发生捕获ELISA方法反应。稳定性实验表明, 3株杂交瘤细胞都能稳定分泌抗CK-MB单克隆抗体。高质量单克隆抗体的获得, 为建立CK-MB检测方法奠定了基础。

关键词 肌酸激酶同工酶MB(CK-MB); 单克隆抗体; ELISA; 特性鉴定

Preparation of Creatine Kinase Isoenzyme MB (CK-MB) Monoclonal Antibody and Establishment of Detection Method

GUAN Kaili¹, ZHU Huajie^{2*}, CHENG Hua^{3*}

(¹School of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China;

²Hebei Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnostics, Ministry of Education, Baoding 071002, China;

³Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract In this paper by preparing monoclonal antibodies with high specificity, a double antibody sandwich ELISA method for quantitative determination of CK-MB was preliminarily established in the present paper, which laid an important foundation for the domestication of CK-MB reagents and raw materials. Five randomly selected Balb/c female mice (6~8 weeks old) were immunized by using the purchased CK-MB as immunogen. By limited dilution method, indirect and capture ELISA method, three cell lines which could secrete antibodies stably were screened, named as 2F6, 2H3 and 2H9, respectively. The monoclonal antibody subtypes secreted by these

收稿日期: 2019-12-12 接受日期: 2020-03-27

河北省科学院科技计划(批准号: 2019031276)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13933137792, E-mail: 13933137792@139.com; Tel: 15930489182, E-mail: hjzhu2017@163.com

Received: December 12, 2019 Accepted: March 27, 2020

This work was supported by the Science and Technology Program of Hebei Province Academy of Sciences (Grant No.2019031276)

*Corresponding authors. Tel: +86-13933137792, E-mail: 13933137792@139.com; Tel: +86-15930489182, E-mail: hjzhu2017@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5270>

three cell lines were all IgG3, with ascites titers of 1:102 000, 1:51 200 and 1:102 000, respectively. The ascites of mice produced by three hybridoma cells was purified by affinity chromatography. The concentrations of monoclonal antibodies 2H3, 2F6 and 2H9 determined by spectrophotometer were 5 mg/mL, 6 mg/mL and 6 mg/mL, respectively. The results of SDS-PAGE showed that the ascites of monoclonal antibody was purified successfully and two bands of light chain and heavy chain could be clearly observed. Results of Western blot showed that monoclonal antibodies 2F6, 2H3 and 2H9 could specifically recognize CK-MB protein. Indirect and capture ELISA detection showed that monoclonal antibody 2H3 reacted only with CK-MB and CK-BB capture ELISA; monoclonal antibody 2H9 reacted only with CK-MB and CK-BB capture ELISA; and monoclonal antibody 2F6 reacted only with CK-MB and CK-MM capture ELISA. The stability test showed that all the three hybridoma cells could secrete anti-CK-MB monoclonal antibodies stably. The acquisition of monoclonal antibodies in high quality lays a foundation for the establishment of CK-MB detection method.

Keywords creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB); monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; characterization

近几年,在经济社会快速发展的同时,人类疾病谱也发生了较大的改变。进入21世纪后,心血管疾病对人类生命安全造成了严重威胁,冠心病已导致许多患者失去了生命,预防工作已成为公共卫生领域的重点^[1]。冠心病在我国的发病率逐年上升,从卫生部公布的信息来看,每年我国心脏病致死的人员在五十万以上,位于全球排名第一位^[2],其发病与冠心病的一些危险因素和生活方式密切相关。冠状动脉心脏病(coronary heart disease, CHD)是临床上常见的心血管病,简称冠心病。当冠状动脉处于闭塞状态时,无法保障心肌充分供血,使得机能发生障碍,或者出现器质性病变,也可被称为缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)对冠心病进行分类,其中包括急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)。引发AMI的原因是错综复杂的,主要诱因包括吸烟、失眠、情绪压抑、暴饮暴食、机体过度劳累、糖尿病及高血压等,导致交感神经出现兴奋,机体在形成儿茶酚胺之后,儿茶酚胺经过释放,存在于血液中,严重损害心肌细胞^[3-4]。虽然AMI发病凶险,但如果能在AMI患者症状出现早期给予相应的干预治疗,挽救濒死的心肌细胞,就可以有效控制AMI死亡率以及病残率。目前有很多诊断AMI的方法和检查,临床上常通过病史与体征、心电图、血清心肌标志物、血清miRNA的分子诊断,还有近年来包括冠状动脉造影在内的影像学等综合检查进行判断^[5-9]。到目前为止,对AMI进行诊断时,冠状动脉造影仍是金标准,尽管如此,它对斑块稳定性诊断的敏感性不高,此外,该

方法同时具有一定的危险性和侵入性。对存在心肌缺血症状的病人进行心电图检测时,ST-T会发生一定程度的变化,但特异性不够明显,这往往是拖延诊断结果及治疗情况的主要原因。对于ST段抬高的情况只是发生在胸痛后的几个小时内,一旦错过这个诊断时间则错过了诊断的最佳时机,使得漏诊的可能性明显增加。从这些层面上来看,可以用心肌损伤标志物对AMI进行准确检测,成为AMI早期诊断的重要依据^[10],尤其对临床表现不典型的非ST段抬高型AMI及不稳定型心绞痛等具有重要意义。其中肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB)作为AMI早期标志物,能够实现快速诊断,是当前心肌损伤诊断中最常见的一种标志物。当人体心肌细胞发生损伤或者坏死时,4~6 h在血中即可检测出CK-MB,并且血清CK-MB水平会迅速升高,但在8~12 h才有更高的检测灵敏度。通常在患者AMI发生24 h后,血清CK-MB的水平会达到一定的峰值,可增高至正常水平的10~25倍,超过CK总活力的10~12倍^[11-12],经过48~72 h后会逐渐降低并恢复至正常水平。CK-MB几乎只存在于心肌中,在AMI发生后6~36 h内,其在心肌损伤中的敏感性达92%~96%,在心电图阴性患者中其敏感性为79.7%^[13]。且CK-MB是溶栓治疗效果评估的首选标志物,可早期显示AMI冠脉再通,对评估心肌梗塞面积的大小、发生时间、梗死是否扩展也具有一定的价值^[14-15]。

目前,CK-MB的诊断原料以及试剂多数进口于国外,导致医院的检测成本居高不下。本文通过

制备出特异性高的单克隆抗体, 构建了双抗夹心ELISA进行CK-MB检测。针对ELISA检测的各个条件分别进行优化, 对建立的CK-MB检测方法进行性能的评价及与同类产品进行方法学对比, 结果显示, 此方法具有较好的特异性和敏感性, 快速方便, 为原料和试剂的国产化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8周龄Balb/c健康雌性小鼠购自河北医科大学实验动物中心; CK-MM、CK-MB、CK-BB抗原均购自美国Lee BioSolutions公司; 主要试剂SP2/0骨髓瘤细胞为本研究室保存; HAT干粉、HT干粉、完全弗氏佐剂、弗氏佐剂、PEG4000、免疫球蛋白亚型试剂盒均购自美国Sigma公司; 细胞培养板、DMEM培养基、胎牛血清均购自GIBCO公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物科技有限公司; 羊抗鼠多抗购自杭州索莱尔博奥生物技术有限公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumen, BSA)、HEPES试剂、青霉素/链霉素双抗、HRP均购自北京索莱宝科技有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 动物免疫及效价测定 CK-MB作为免疫原对随机选取的5只6~8周龄Balb/c健康雌性小鼠进行免疫, 免疫程序见表1, 同时取同种小鼠与免疫小鼠在相同条件下饲养, 作为阴性对照。第三次免疫后, 7~10天小鼠剪尾取血, 小鼠血清效价采用间接ELISA法测定, 选取效价较高且符合融合条件的小鼠进行融合。动物实验经河北大学伦理委员会审查

批准。

1.2.2 阳性杂交瘤细胞的筛选及克隆 3天后对小鼠进行细胞融合, 将小鼠摘眼球取血(作为阳性对照), 断颈处死小鼠, 在75%的酒精中浸泡5 min, 按照文献方法分离小鼠脾细胞^[16], 采用PEG化学融合法, 每孔2滴加至预先铺有饲养细胞(细胞浓度为2×10⁵个/mL)的96孔细胞培养板中, 放置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。融合14天后, 待细胞面积增长至一个视野1/5~1/3时, 取细胞上清液, 用间接ELISA及捕获ELISA^[17-18]方法进行筛选, 选取吸光值高且状态好的杂交瘤细胞, 应用有限稀释法进行克隆。克隆过程中, 逐渐将培养基中的HAT浓度缩小, 用HT来补偿, 最后完全用HAT代替HT, 至100%的孔均为抗体阳性克隆, 待孔内的杂交瘤细胞达到一定的数量, 可转移至培养瓶中进行扩大培养。

1.2.3 单克隆抗体腹水的制备、纯化 将筛选成功并且培养至对数生长期的杂交瘤细胞(1×10⁶个/只)注射入石蜡油致敏的小鼠腹腔, 随时观察小鼠状态, 约7~14天后无菌收集小鼠腹水, 3 000 r/min离心10 min, 取上清。采用蛋白A亲和层析法纯化腹水, 纯化后的单抗用分光光度计测定蛋白浓度, 并进行12% SDS-PAGE纯度分析。

1.2.4 单克隆抗体亚型的鉴定 取3株杂交瘤细胞制备的腹水抗体, 根据抗体亚型试剂盒说明书进行测定。

1.2.5 单克隆抗体亲和力测定 测定亲和常数(K_a)来评价抗体亲和力, 采用捕获ELISA方法, CK-MB抗原选择20 μg/mL、10 μg/mL、5 μg/mL、2.5 μg/mL 4个浓度, 单抗进行系列稀释。绘制S型曲线, 计算K_a值。

$$K_a=(n-1)/2(nAb'-Ab)$$

表1 小鼠的免疫程序
Table 1 Immune procedures for mice

免疫次数 Immunization frequency	免疫时间 Immunization time	免疫剂量 Immune dose	免疫方式 Immunization
The first time	The first week	Fully mixed 50 μg CK-MB antigen and an equal amount of complete Freund's adjuvant	Multi-point injection under the neck and back
The second time	The third week	Fully mixed 50 μg CK-MB antigen and an equal amount of incomplete Freund's adjuvant	Multi-point injection under the neck and back
The third time	The fifth week	Fully mixed 50 μg CK-MB antigen and an equal amount of incomplete Freund's adjuvant	Multi-point injection under the neck and back
The last time	3 d before fusion	25 μg adjuvant-free CK-MB antigen	Intraperitoneal injection

其中公式中Ab和Ab'分别代表抗原倍比稀释中2个不同浓度为Ag和Ag'时产生半数吸光值时对应的抗体浓度(mol/L), n为Ag/Ag'。

1.2.6 细胞稳定性实验 将获取的杂交瘤细胞进行扩大培养, 调整细胞的状态至对数生长期进行冻存。一段时间之后进行复苏, 并进行传代培养, 每隔5代通过捕获ELISA方法检测杂交瘤细胞上清的抗体效价。

1.2.7 单克隆抗体的特异性鉴定 (1)间接ELISA法: 用CK-MM、CK-BB及CK-MB3种抗原包被酶标板, 一抗为阳性杂交瘤细胞培养上清, 二抗为HRP标记的羊抗小鼠IgG, TMB进行显色, 2 mol/L的H₂SO₄终止反应, 测定D₄₅₀值。(2)捕获ELISA法: 用0.05 mol/L、pH7.4的PBS稀释羊抗鼠多抗后包被酶标板, 然后加入阳性杂交瘤细胞培养上清, 最后加入HRP标记的CK-MM、CK-BB及CK-MB进行筛选。(3)Western blot鉴定抗体特异性结合: CK-MB抗原经过SDS-PAGE, 然后转移至硝酸纤维素膜, 用5%的脱脂奶粉于37 °C摇动封闭1 h; 加入用封闭液稀释的纯化后的单抗(使用比例为1:2 000), 37 °C摇动孵育1 h, 洗膜3次, 每次5 min; 加入1:1 000稀释的HRP标记的羊抗小鼠IgG, 于37 °C摇动孵育1 h, 洗膜3次, 每次5 min; 最后加DBA显色, 拍照记录结果。

1.2.8 CK-MB定量检测试剂的初步建立 捕获抗体和检测抗体最佳工作浓度的确定^[19]。采用棋盘法确定捕获抗体和检测抗体的最佳工作浓度, 具体方法如下: 用包被缓冲液将捕获抗体分别稀释为12、6、3、1.5、0.75、0.375、0.186 μg/mL的系列浓度包被

酶标板, 4 °C过夜, 加入1.0 μg/mL CK-MB抗原溶液, 以PBS作为阴性对照, 37 °C孵育45 min。加入稀释倍数分别为1:300、1:600、1:1 200、1:2 400、1:4 800、1:9 600的检测抗体, 37 °C孵育30 min, TMB显色, 2 mol/L H₂SO₄终止反应, 用酶标仪测定D₄₅₀值。捕获抗体和检测抗体的最佳工作浓度为D₄₅₀值最接近1所对应的孔。

各组分最适工作条件的确定。本实验选取PBS和Tris-HCl样品稀释缓冲液, 离子强度设0.02 mol/L和0.05 mol/L 2个梯度(表2), PBS溶液作阴性对照, 选择最佳离子强度和pH值为样品缓冲液。

最佳酶标抗体作用时间的确定。以最佳捕获抗体浓度和包被条件包被酶标板, 在最佳封闭条件下进行封闭, 加入最佳工作浓度的酶标抗体。37 °C酶标抗体作用时间分别设为30 min、60 min、90 min和120 min, PBS溶液作阴性对照, TMB显色, 2 mol/L H₂SO₄终止反应。通过比较各组的D₄₅₀值和吸光度值阳性值/阴性值(P/N)值, 以确定最佳酶标抗体作用时间。

标准曲线的建立根据前面优化的结果, 确定本实验建立检测方法的最佳操作步骤。对CK-MB标准品进行倍比稀释, 根据建立的双抗夹心ELISA方法对不同浓度的CK-MB标准品测定其D₄₅₀处的值, 以测得的D₄₅₀值与阴性对照的比值小于2.1时对应的最低CK-MB浓度为最低检测限。CK-MB标准品的稀释浓度从1 024 ng/mL起做2倍比稀释至1 ng/mL, 每个浓度设3个平行孔。以CK-MB标准品浓度的自然对数Log(x)为横坐标, 以测定各浓度点的D₄₅₀值为纵

表2 样品稀释缓冲液分组
Table 2 Sample dilution buffer grouping

分组 Group	样品稀释液 Sample diluent	pH	离子强度 Ionic strength
1	PBS	6.0	0.02 mol/L
2	PBS	6.0	0.05 mol/L
3	PBS	6.5	0.02 mol/L
4	PBS	6.5	0.05 mol/L
5	PBS	7.0	0.02 mol/L
6	PBS	7.0	0.05 mol/L
7	PBS	7.4	0.02 mol/L
8	PBS	7.4	0.05 mol/L
9	Tris-HCl	8.0	0.02 mol/L
10	Tris-HCl	8.0	0.05 mol/L
11	Deionized water	7.0	0

坐标, 绘制曲线图。根据绘制的曲线图, 选择线性良好的点进行线性回归, 绘制标准曲线图, 确定检测限。

准确度实验: 将不同浓度的CK-MB抗原(4、16、64 ng/mL)与血清样本CK-MB(1.85 ng/mL)进行1:1稀释。用建立的试剂盒检测稀释后的待测样品, 对比检测值和真实浓度之间的差异, 计算其添加回收率及相对标准差, 计算公式为:

回收率 = $\frac{\text{检测浓度} \times 2 - \text{血清样本原浓度}}{\text{原始样品浓度}} \times 100\%$

精密度实验: 精密度用变异系数(coefficient of variation, CV)表示。

板内精密度: 分别选取低、中、高浓度的3个样本, 按照已经建立的双抗夹心ELISA方法, 每个样本在同一块酶标板上独立重复检测20次, 计算变异系数。

板间精密度: 分别选取低、中、高浓度的3个样本, 按照已经建立的双抗夹心ELISA方法, 每个样本分别在3块酶标板上独立重复检测20次, 计算变异系数。

分析灵敏度实验: 取小牛血清(即0 ng/mL的CK-MB溶液), 应用已经建立的检测方法独立测量20次, 计算出均值和标准偏差, 通过均值加上2倍的标准偏差得到的值代入标准曲线中求出CK-MB的浓度值作为本试剂的最低检测量, 即分析灵敏度。

分析特异性: 取一定浓度的CK-MM、CK-BB分别加入到小牛血清中(0 ng/mL CK-MB)进行检测, 计算交叉反应率=实测值/理论值×100%。

抗干扰性实验: 取一定浓度的甘油三酯、胆红素、类风湿因子及血红蛋白分别加入到小牛血清中

(0 ng/mL CK-MB)进行检测, 计算交叉反应率=实测值/理论值×100%。

稳定性实验: 本实验中的稳定性实验, 采用高温加速破坏实验。将试剂放置于37 °C条件下保存, 分别在第5天、10天、15天取出来检测3个浓度的样本, 记录结果, 进行相关性能评估实验。

方法学对比: 应用初步建立的双抗夹心ELISA定量检测试剂与同类产品(武汉默克沙公司生产的双抗体夹心ELISA定量检测试剂)平行检测40份血清样本(样本来源于河北医科大学第二医院门诊住院病人), 检测的结果通过相关系数*r*进行比较。

2 结果与分析

2.1 免疫小鼠血清效价检测结果

由表3可以看出, 3次免疫后4号老鼠的血清效价最高, 因此选择4号小鼠进行细胞融合实验。

2.2 杂交瘤细胞株的建立

通过间接ELISA及捕获ELISA方法进行阳性孔的筛选, 选取 D_{450} 值较高且状态好的杂交瘤细胞经过至少3次有限稀释法进行亚克隆, 并且确保每个孔内的细胞均是由1个细胞株分裂来的。最终当所有克隆孔的阳性克隆率达到100%时, 将该细胞株进行扩大培养, 如此方法最终得到3株杂交瘤细胞株, 分别命名为2H3、2H9和2F6。对这3株杂交瘤细胞进行冻存, 以用于后续实验。

2.3 单抗腹水的产生及纯化

应用捕获ELISA方法对杂交瘤细胞培养上清及腹水进行效价测定, 结果见表4。应用蛋白A亲和层析法纯化腹水, 收集波峰蛋白, 用分光光度计测定纯化后的单克隆抗体2H3、2F6、2H9的浓度分别为

表3 小鼠血清效价
Table 3 Mouse serum titers

小鼠编号 Mouse number	1	2	3	4	5	6	7
Serum titer	1:12 800	1:6 400	1:12 800	1:51 200	1:25 600	1:25 600	1:12 800

表4 杂交瘤细胞培养上清及腹水效价
Table 4 Supernatant and ascites titer of hybridoma cell culture

单克隆抗体 Monoclonal antibodies	细胞培养上清 Cell culture supernatant	小鼠腹水 Ascites in mice
2H3	1:800	1:51 200
2H9	1:1 600	1:102 000
2F6	1:1 600	1:102 000

5 mg/mL、6 mg/mL、6 mg/mL。蛋白电泳图(图1)有明显的两条带, 分别为IgG的重链和轻链。

2.4 单抗亚型的鉴定

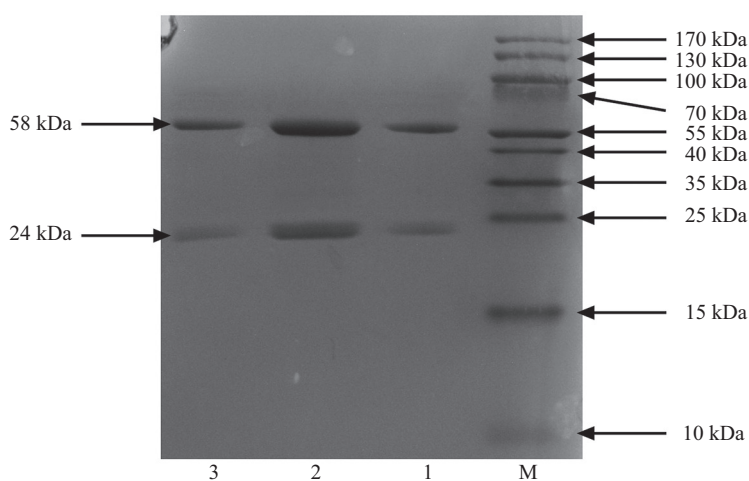
将筛选得到的3株杂交瘤细胞制备的腹水抗体进行亚型鉴定, 测定结果如图2所示, 由测定结果可知, 该3株抗体亚型均为IgG3型。单抗亚型是选择单抗纯化方法的基础, A蛋白对IgG有高亲和力和特异性, 非常适合用于纯化腹水或者细胞培养上清中的单克隆抗体, 因此本实验对单抗的纯化选择蛋白A亲和层析法。

2.5 单抗亲和常数测定

采用捕获ELISA方法测定, 绘制S型曲线, 结果见图3, $K(2H3)=1 \times 10^7$ L/mol, $K(2H9)=1.5 \times 10^7$ L/mol, $K(2F6)=1.28 \times 10^7$ L/mol, 表明3株单克隆抗体的亲和力较高。

2.6 细胞稳定性实验

将杂交瘤细胞复苏, 每隔5代用捕获ELISA方法检测, 其抗体效价与最初的抗体效价差别不大, 表明杂交瘤细胞具有稳定分泌抗CK-MB单克隆抗体的能力。



M: 蛋白低分子量标准; 1: 纯化后的单抗2F6; 2: 纯化后的单抗2H9; 3: 纯化后的单抗2H3。

M: protein low molecular weight standard; 1: purified monoclonal antibody 2F6; 2: purified monoclonal antibody 2H9; 3: purified monoclonal antibody 2H3.

图1 纯化后单克隆抗体的SDS-PAGE图

Fig.1 SDS-PAGE of purified monoclonal antibodies

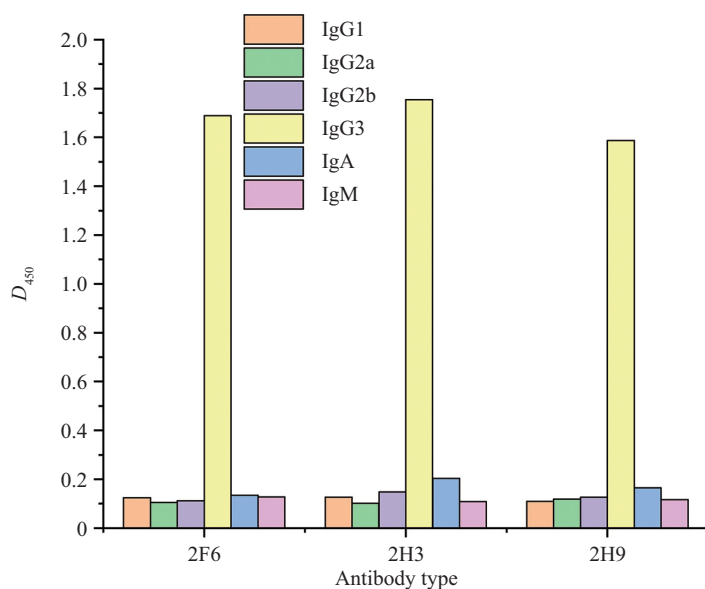


图2 抗体亚型测定

Fig.2 The detection of the subclass of McAbs

2.7 单克隆抗体特异性检测

(1)经间接ELISA及捕获ELISA方法检测, 2H3只与CK-MB及CK-BB捕获ELISA方法反应; 2H9只与CK-MB及CK-BB捕获ELISA方法反应; 2F6只与CKMB及CK-MM捕获ELISA方法反应。综合分析后, 本研究选用CK-MB单克隆抗体2F6及2H9进行配对, 做后续的研究。

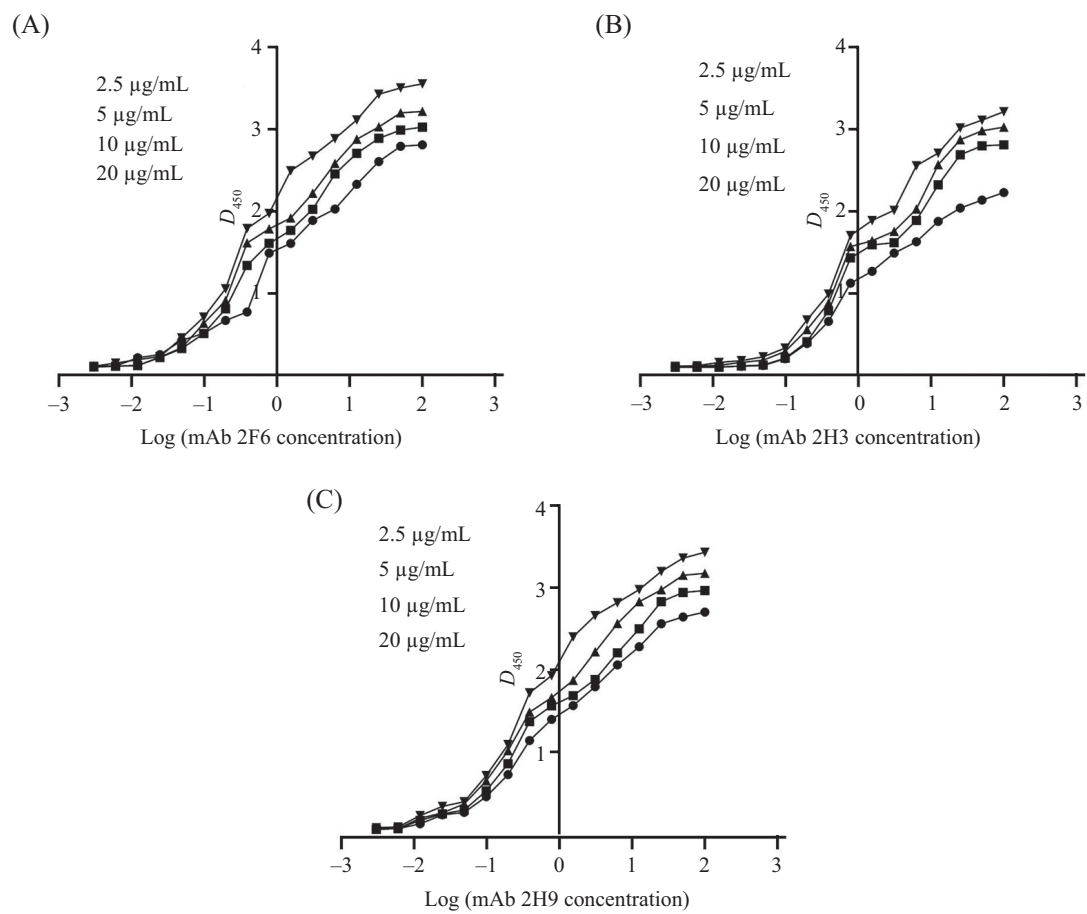
(2)由图4可知, CK-MB抗原的M及N亚单位的分子量均为43 kDa左右。Western blot结果如图5所示, 制备的3株单抗均在43 kDa左右处出现1条特异性的条带, 与预期结果一致, 说明纯化后的3株腹水抗体针对的是CK-MB蛋白。

2.8 CK-MB检测方法的建立

2.8.1 捕获抗体最佳包被浓度和酶标抗体最佳稀释浓度的确定 由表5可以得出, 当捕获抗体以3.0 μg/mL包被, 检测抗体以1:2 400稀释为最佳工作浓度。

2.8.2 样品稀释缓冲液的选择 选择不同pH值

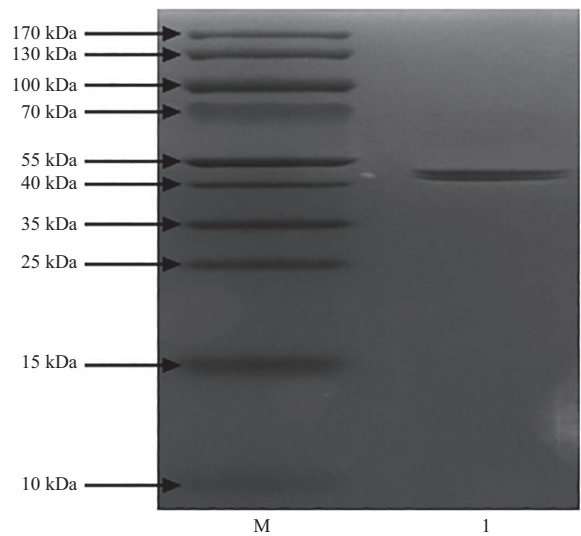
及不同离子强度的样品稀释缓冲液, 其他条件不变, 确定最佳的样品稀释缓冲液。由结果(图6)可知, 选择0.02 mol/L、Tris-HCl、pH8.0为样品缓冲液时P/N值最大。对方差进行齐性检验, Levene统计量为1.199, $P=0.301(P>0.05)$, 因此方差齐, 服从正态分布。11组间的总体均值比较呈显著差异性 [$F=13.532, P=0.000(P<0.05)$]。经单因素方差分析, 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.02 mol/L、pH6.0 PBS组, $P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.05 mol/L、pH6.0 PBS组, $P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.02 mol/L、pH6.5 PBS组, $P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.05 mol/L、pH6.5 PBS组, $P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.02 mol/L、pH7.0 PBS组, $P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.05 mol/L、pH7.0 PBS组, $P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.02 mol/L、pH7.4 PBS组,



A: 单克隆抗体2F6亲和力; B: 单克隆抗体2H3亲和力; C: 单克隆抗体2H9亲和力。
A: affinity of monoclonal antibody 2F6; B: affinity of monoclonal antibody 2H3; C: affinity of monoclonal antibody 2H9.

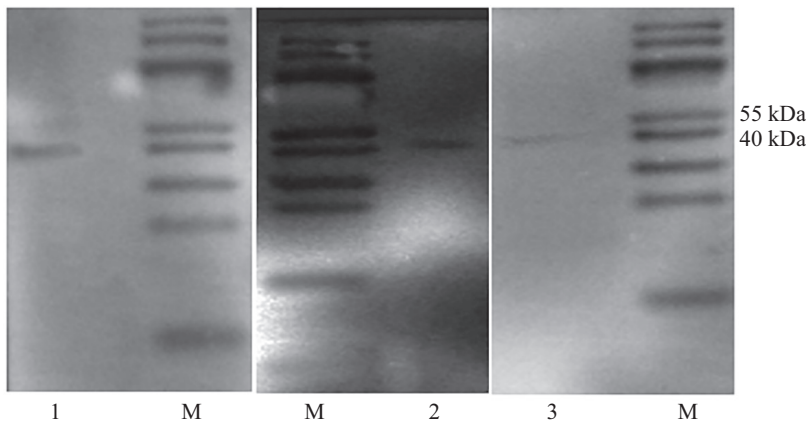
图3 单克隆抗体亲和力的测定

Fig.3 Determination of affinity of monoclonal antibodies



M: 蛋白低分子量标准; 1: CK-MB抗原。
M: protein low molecular weight standard; 1: CK-MB antigen.

图4 CK-MB的SDS-PAGE图
Fig.4 SDS-PAGE of CK-MB



M: 蛋白低分子量标准; 1: 抗CK-MB单抗2F6; 2: 抗CK-MB单抗2H9; 3: 抗CK-MB单抗2H3。
M: protein low molecular weight standard; 1: anti-CK-MB monoclonal antibody 2F6; 2: anti-CK-MB monoclonal antibody 2H9; 3: anti-CK-MB monoclonal antibody 2H3.

图5 纯化单克隆抗体的Western blot分析
Fig.5 Western blot analysis of purified monoclonal antibodies

表5 捕获抗体最佳包被浓度和酶标抗体最佳稀释浓度的确定

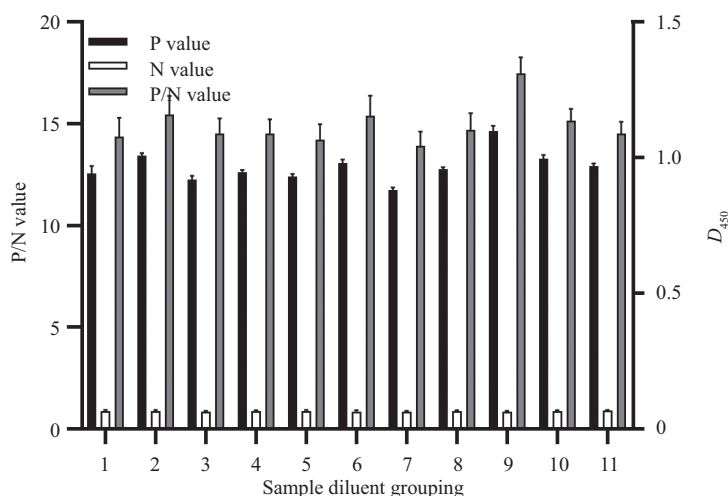
Table 5 Determination of the optimal coating concentration of the capture antibody and the optimal dilution concentration of the enzyme-labeled antibody

单抗2F6包被浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MAb 2F6 coating concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	HRP标记单抗2H9稀释度(1:X) HRP labeled monoclonal antibody 2H9 dilution (1:X)					
	300	600	1 200	2 400	4 800	9 600
12	2.465	2.152	1.786	1.362	0.792	0.424
6	2.246	1.986	1.525	1.274	0.684	0.406
3	2.024	1.874	1.495	1.012	0.589	0.378
1.5	1.878	1.684	1.342	0.948	0.550	0.340
0.75	1.556	1.348	1.125	0.886	0.487	0.335
0.375	1.312	1.165	0.943	0.774	0.405	0.232
0.186	1.105	0.923	0.757	0.548	0.367	0.220

$P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.05 mol/L、pH7.4 PBS组, $P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 0.05 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组, $P=0.000(P<0.05)$; 0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组 vs 去离子水组, $P=0.000(P<0.05)$; 因此,

0.02 mol/L、pH8.0 Tris-HCl组与其他组别都呈显著性差异, 差异具有统计学意义, 确定为实验的样品稀释缓冲液。

2.8.3 酶标抗体作用时间的选择 由图7可知, P值随着酶标抗体作用时间的延长而逐渐增加, 当作

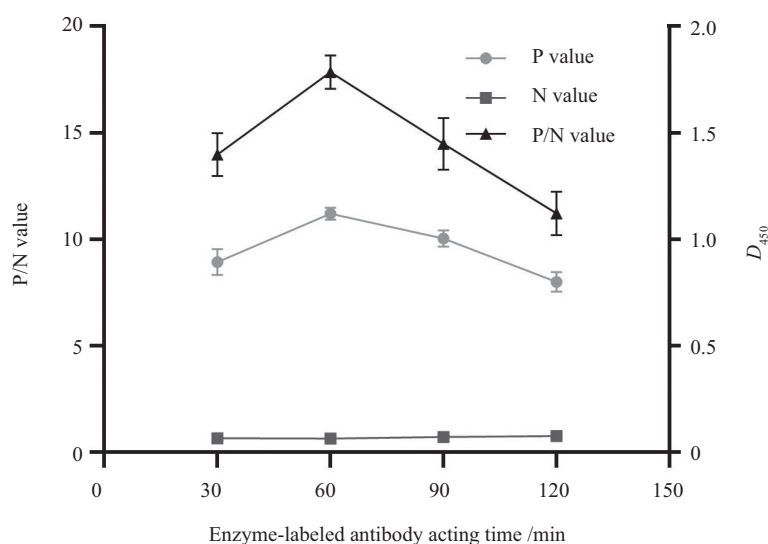


1: pH6.0、0.02 mol/L, PBS样品稀释缓冲液; 2: pH6.0、0.05 mol/L, PBS样品稀释缓冲液; 3: pH6.5、0.02 mol/L, PBS样品稀释缓冲液; 4: pH6.5、0.05 mol/L, PBS样品稀释缓冲液; 5: pH7.0、0.02 mol/L, PBS样品稀释缓冲液; 6: pH7.0、0.05 mol/L, PBS样品稀释缓冲液; 7: pH7.4、0.02 mol/L, PBS样品稀释缓冲液; 8: pH7.4、0.05 mol/L, PBS样品稀释缓冲液; 9: pH8.0、0.02 mol/L, Tris-HCl样品稀释缓冲液; 10: pH8.0、0.05 mol/L, Tris-HCl样品稀释缓冲液; 11: 去离子水。误差线表示重复10次实验得出的标准差。

1: pH6.0, 0.02 mol/L, PBS sample dilution buffer; 2: pH6.0, 0.05 mol/L, PBS sample dilution buffer; 3: pH6.5, 0.02 mol/L, PBS sample dilution buffer; 4: pH6.5, 0.05 mol/L, PBS sample dilution buffer; 5: pH7.0, 0.02 mol/L, PBS sample dilution buffer; 6: pH7.0, 0.05 mol/L, PBS sample dilution buffer; 7: pH7.4, 0.02 mol/L, PBS sample dilution buffer; 8: pH7.4, 0.05 mol/L, PBS sample dilution buffer; 9: pH8.0, 0.02 mol/L, Tris-HCl sample dilution Buffer; 10: pH8.0, 0.05 mol/L, Tris-HCl sample dilution buffer; 11: Deionized water; Error bars indicate the standard deviation obtained by repeating 10 experiments.

图6 样品稀释缓冲液的确定

Fig.6 Determination of sample dilution buffer



误差线表示重复10次实验得出的标准差。

Error bars indicate the standard deviation obtained by repeating 10 experiments.

图7 酶标抗体最佳作用时间的确定

Fig.7 Determination of the optimal action time of enzyme-labeled antibodies

用时间为60 min时, P值达到最大值, 后又随着时间的延长开始减少。当酶标抗体作用时间为60 min时, P/N值最大。对方差进行齐性检验, Levene统计量为0.861, $P=0.470(P>0.05)$, 因此方差齐, 服从正态分布。4组间的总体均值比较呈显著差异性 [$F=60.029$, $P=0.000(P<0.05)$]。经单因素方差分析, 60 min组 vs 30 min组, $P=0.000(P<0.05)$; 60 min组 vs 90 min组, $P=0.000(P<0.05)$; 60 min组 vs 120 min组, $P=0.000(P<0.05)$, 因此60 min组与其他组别都呈显著性差异, 且差异具有统计学意义。故选择酶标抗体最佳作用时间为60 min。

2.8.4 标准曲线的建立 根据图8和图9可知, 在CK-MB抗原浓度为1~128 ng/mL时具有良好的线性

关系, 包括了8个浓度点, 因此确定此范围为该方法的检测范围。对这8个浓度点做线性回归得到标准曲线如图9, 线性方程为 $y=0.4205x+0.1401$, 相关系数为 $r^2>0.99$ 。

2.8.5 准确度实验 为了进一步验证本试剂检测定量检测CK-MB的准确度, 进行回收实验。即在已知浓度的血清样本中加入已知浓度的CK-MB抗原, 通过检测得到添加回收率。结果见表6, CK-MB的回收率为95.45%~102.80%, 回收率相对标准差均低于10%。结果说明, 本研究建立的CK-MB蛋白检测方法的准确度良好, 并且基本没有基质反应。

2.8.6 精密度实验 由表7得知, 从低到高3个浓度(1.85 ng/mL、16.98 ng/mL和52.11 ng/mL)的样本的

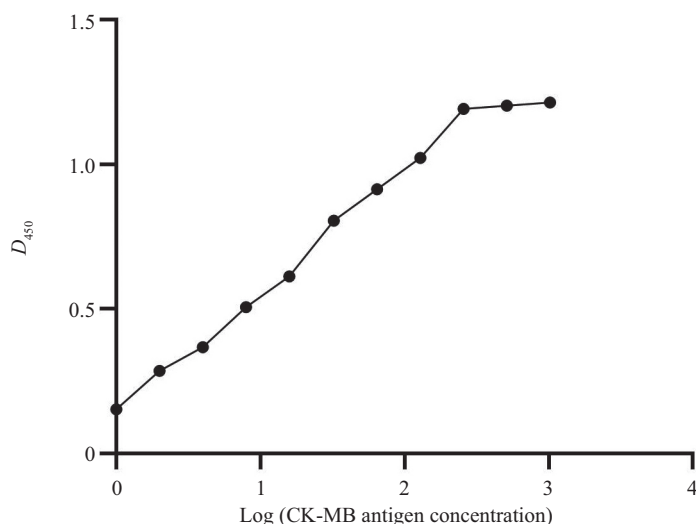


图8 CK-MB抗原浓度的对数与 D_{450} 相应值关系曲线图

Fig.8 Relationship between the logarithm of CK-MB antigen concentration and the corresponding value of D_{450}

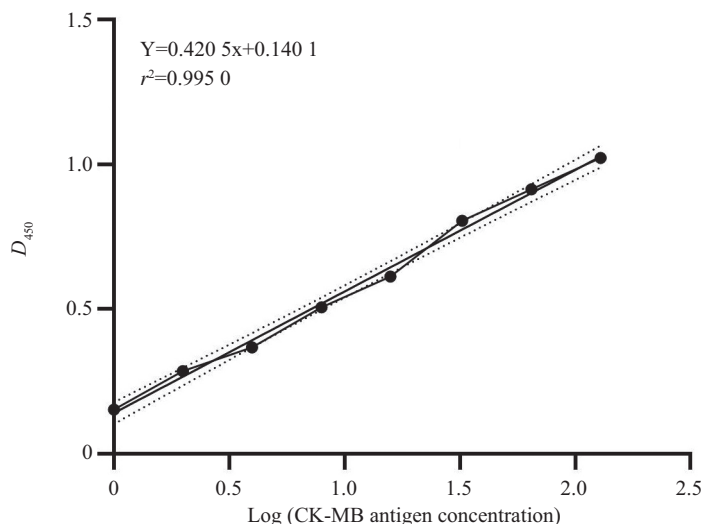


图9 双抗体夹心ELISA检测CK-MB标准溶液标准曲线

Fig.9 Standard curve of CK-MB standard solution detected by double antibody sandwich ELISA

表6 准确度实验
Table 6 Accuracy experiments

样本 sample	CK-MB (1.85 ng/mL), n=5		
Add concentration /ng·mL ⁻¹	64.00	16.00	4.00
Result /ng·mL ⁻¹	65.09	17.61	5.96
Recovery rate /%	99.08	95.45	102.80
Standard deviation /%	2.05	6.95	3.03

表7 不同浓度CK-MB样本的精密度实验
Table 7 Precision experiments of CK-MB samples with different concentrations

CK-MB样本/ng·mL ⁻¹ CK-MB sample /ng·mL ⁻¹	批内精密度/ng·mL ⁻¹ , $\bar{x}\pm s$, n=20 In-batch precision /ng·mL ⁻¹ , $\bar{x}\pm s$, n=20	CV /%	批间精密度($\bar{x}\pm s$, n=20) Batch precision ($\bar{x}\pm s$, n=20)	CV /%
1.85	2.10±0.19	9.04	2.29±0.29	12.70
16.98	19.80±1.43	7.20	19.62±1.25	6.37
52.11	58.64±2.98	5.08	55.17±2.15	3.90

表8 试剂的特异性分析
Table 8 Specific analysis of reagents

干扰物 Interferer	浓度/ng·mL ⁻¹ Concentration /ng·mL ⁻¹	实测值/ng·mL ⁻¹ , n=10 Measured value /ng·mL ⁻¹ , n=10	交叉反应率/% Cross reaction rate /%
CK-MM	800	2.20±0.129	0.28
CK-BB	400	1.62±0.111	0.40

表9 CK-MB干扰性结果
Table 9 CK-MB interference results

干扰物 Interferer	浓度 Concentration	实测值/ng·mL ⁻¹ , n=10 Measured value /ng·mL ⁻¹ , n=10	交叉反应率/% Cross reaction rate /%
Triglyceride	500 mg/dL	1.27±0.064	<0.001
Bilirubin	30 mg/dL	1.16±0.108	<0.001
Rheumatoid factor	500 IU/mL	1.19±0.053	/
Hemoglobin	300 mg/dL	1.39±0.080	<0.001

批内精密度的CV为5.08%~9.04%(小于10%), 批间精密度的CV为3.9%~12.7%(小于15%), 表明本研究初步建立的双抗夹心ELISA的精密度良好。

2.8.7 分析灵敏度实验 取小牛血清(即0 ng/mL的CK-MB溶液), 应用已经建立的检测方法独立测量20次, 通过均值加上2倍的标准偏差得到的值代入标准曲线中求出CK-MB的浓度值, 获得本试剂盒的分析灵敏度为0.68 ng/mL。

2.8.8 分析特异性 取400 ng/mL CK-BB、800 ng/mL CK-MM分别加入到小牛血清中(0 ng/mL CK-MB)进行检测, 每个干扰物重复实验10次。结果显示, 交叉反应率均小于0.5%(表8)。因此, 本试剂盒特异性良好。

2.8.9 抗干扰性实验 取500 mg/dL的甘油三酯、

30 mg/dL的胆红素、500 IU/mL的类风湿因子及300 mg/dL的血红蛋白分别加入到小牛血清中(0 ng/mL CK-MB)进行检测, 每个干扰物重复实验10次。结果显示(表9)交叉反应率均小于0.001%, 高浓度类风湿因子的检测结果接近标准品1 ng/mL的浓度值, 对于检测基本没有影响。因此, 本试剂盒的抗干扰性强。

2.8.10 稳定性实验 由表10可知, 3个浓度的样本分别在第5天、第10天取出的试剂盒检测结果与第0天的结果进行比较, 经t检验分析, P均大于0.05, 表明结果无显著性差异, 则无统计学意义。第15天的检测结果与第0天的对比, 经t检验, P<0.05, 表示结果有显著性差异, 有统计学意义。因此, 试剂盒在37 ℃下能保存10天。

2.8.11 初步建立的定量检测试剂盒与同类产品的

表10 稳定性试验
Table 10 Stability test

标准品 /ng·mL ⁻¹ Standard /ng·mL ⁻¹	实测值/ng·mL ⁻¹ Measured value /ng·mL ⁻¹			
	Day 0	Day 5	Day 10	Day 15
3.48	3.81±0.27	3.73±0.26	3.62±0.27	2.38±0.29
16.98	19.50±1.20	18.80±0.98	18.44±0.99	10.72±1.11
52.11	58.70±1.72	57.90±1.68	57.07±1.65	44.44±2.52

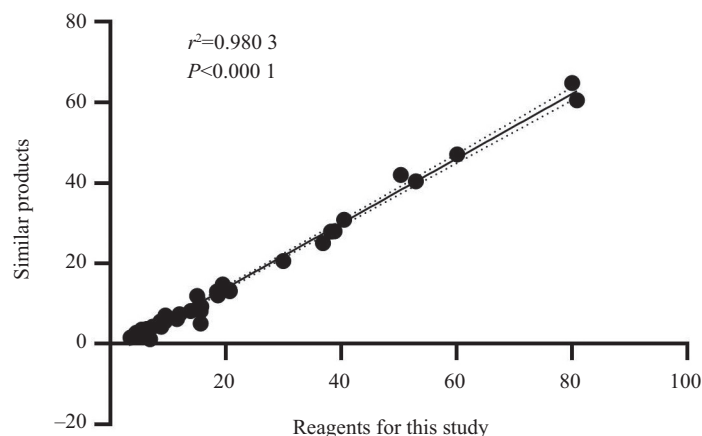


图10 与同类试剂比较

Fig.10 Comparison with similar reagents

比较 应用初步建立的双抗夹心ELISA定量检测试剂与同类产品(武汉默克沙公司生产的双抗体夹心ELISA定量检测试剂)平行检测40份血清样本(样本来源于河北医科大学第二医院门诊住院病人),检测结果经线性回归分析(GraphPad Prism统计软件进行分析),图10显示两者之间的检测结果没有显著差异,且二者具有很好的相关性。

3 讨论

CK-MB是与肌酸激酶作用较类似的一种催化酶,由分子量均为43 kDa的M亚基和B亚基组成的二聚体,主要存在于心肌及血管平滑肌中。当心肌细胞与血管平滑肌细胞受到损伤时,其可被大量释放入血^[20]。CK-MB常作为诊断AMI早期检测指标之一,对判定梗死发生时间、面积、部位、梗死扩展及有无心肌灌注都有一定价值。

在单克隆的制备中,抗体的特异性和针对抗原表位的多样性是单抗制备的重要原则之一。本文以外购的CK-MB抗原作为免疫原免疫小鼠,试图获得针对多种抗原表位的单克隆抗体。最终获得了3株单抗(2H3、2H9、2F6),其亚型鉴定均为

IgG3,其中单抗(2H3)针对B蛋白、单抗(2H9)针对B蛋白、单抗(2F6)针对M蛋白,效价分别为 5.12×10^{-4} 、 1.02×10^{-5} 和 1.02×10^{-5} ,亲和力 $K(2H3)=1 \times 10^7$ L/mol、 $K(2H9)=1.5 \times 10^7$ L/mol、 $K(2F6)=1.28 \times 10^7$ L/mol。综合分析后,本文选用CK-MB单克隆抗体2F6及2H9进行配对做后续的研究,且与CK-MB反应的特异性和亲和力均符合检测试剂的功能特性要求。ELISA是一种在实践中检测成本低、检测时间短,可以批量化检测并能以试剂盒形式应用的常见检测方法。ELISA方法可以用来检测抗体^[21],也可以用来检测病原。而双抗体夹心ELISA检测方法由于应用了两种针对不同抗原表位的抗体,显著地提升了检测的特异性和灵敏度。

4 结论

本文初步建立了双抗体夹心ELISA检测试剂盒,进行CK-MB的特异性检测,发现此试剂具有较好的敏感性、特异性和精密度,与同类产品比较,结果显示二者无显著性差异,且二者具有很好的相关性,因此,本实验生产的单抗原料初步评价较好。现阶段,我国很多公司经过不断研究和反复摸索,成功

研发了CK-MB双抗夹心检测试剂^[22], 对CK-MB抗体原料存在较大的需求。然而, 我国CK-MB检测试剂主要依托进口原料, 使得试剂成本明显提升。因此, 本文生产的抗CK-MB单克隆抗体极大地提高了本土原料的竞争力。

参考文献 (References)

- [1] THOM T, HAASE N, Rosamond W, et al. Heart disease and stroke statistics-2006 update: a report from the American heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee [J]. *Circulation*, 2006, 113(6): e85-151.
- [2] Members W G, Rosamond W, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics-2008 update a report from the American heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee [J]. *Circulation*, 2008, 121(121): e46-e215.
- [3] Singh R B, Pella D, Neki N S, et al. Mechanisms of acute myocardial infarction study (MAMIS) [J]. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(Suppl 1): S111-5.
- [4] Alexopoulos D, Xanthopoulou I, Davlouros P, et al. Mechanisms of nonfatal acute myocardial infarction late after stent implantation: The relative impact of disease progression, stent restenosis, and stent thrombosis [J]. *Am H J*, 2010, 159(3): 439-45.
- [5] Knowlton K U. Unsolved medical issues and new targets for further research in viral myocarditis and dilated cardiomyopathy [J]. *Ernst S Re F W*, 2006, 55(55): 19-35.
- [6] Wheeler D S, Kooy N W. A formidable challenge: the diagnosis and treatment of viral myocarditis in children [J]. *Critical care clinics*, 2003, 19(3): 365-91.
- [7] Checchia P A, Kulik T J. Acute viral myocarditis: Diagnosis [J]. *Ped critical care medicine*, 2006, 7(6 Suppl): S8-11.
- [8] Smedema J P. Images in cardiovascular medicine:myocardial inflammation in viral peri-myocarditis detected by tissue Doppler echocardiography and magnetic resonance imaging [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2007, 18(4): 238-40.
- [9] Ahmed N, Carrick D, Layland J, et al. The role of cardiac magnetic resonance imaging (MRI) in acute myocardial infarction (AMI) [J]. *Heart Lung&Circ*, 2013, 22(4): 243-55.
- [10] 杨振华, 潘柏申, 许俊堂. 中华医学会检验学会文件心肌梗死标志物的应用准则[J]. *中华检验医学杂志*(YANG Z H, PAN B S, XU J T. Guidelines for the application of markers of myocardial injury by the Chinese Medical Association Examination Society [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*), 2002, 25(3): 185-9.
- [11] Miriam R, Raphael T, Tobias R, et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(11): 1379-89.
- [12] Braunwald E, Aatman E M, Beasley J W, et al. ACC/AHA guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction-2002: summary article [J]. *Am Heart Association*, 2002, 40(7): 1366-74.
- [13] Takagi Y, Yasuhara T, Gomi K. Creatine kinase and its isozymes [J]. *Rinsho Byori*, 2001, Suppl 116: 52-61.
- [14] Jeremias A, Baim D S, Ho K K L, et al. Differential mortality risk of postprocedural creatine kinase-MB elevation following successful versus unsuccessful stent procedures [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(6): 1210-4.
- [15] 姚雯颖. 联合定量检测急性心肌梗死标志物在诊断中的价值 [J]. *检验医学与临床*(YAO W Y. The value of combined quantitative detection of acute myocardial infarction markers in diagnosis [J]. *Lab Medicine and Clinical*), 2007, 4(7): 638-9.
- [16] Sharafi S M, Shirzad H, Khanahmad H, et al. Monoclonal antibodies production against a 40 kDa band of hydatid cyst fluid [J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2018, 12(1): 57-64.
- [17] 陈自敏, 周国梁, 徐伟玲, 等. CK-MB 特异性单抗的制备方法及其应用[J]. *生物工程学报*(CHEN Z M, ZHOU G L, XU W L, et al. Preparation method and application of CK-MB specific monoclonal antibody [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2017, 33(1): 141-50.
- [18] 王丹. 人脑心肌炎病毒IgM捕获ELISA方法的建立及初步应用 [D]. 兰州: 西北民族大学, 2014.
- [19] 沈月雷, 邱平, 王剑锋, 等. 极性小分子抗原包被条件的摸索 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*(SHEN Y L, QIU P, WANG J F, et al. Exploration of the coating conditions of polar small molecule antigens [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*), 1996, 13(1): 59-61.
- [20] 张立, 李晓霞, 杜宇奎, 等. Stanford B型主动脉夹层术前心肌酶谱影响因素的多因素分析[J]. *国际外科学杂志*(ZHANG L, LI X X, DU Y K, et al. Multi-factor analysis of influencing factors of myocardial enzyme spectrum before Stanford B-type aortic dissection [J]. *International Journal of Surgery*), 2014, 41(8): 524-28.
- [21] 张琪, 徐丽美, 周宏超, 等. 基于N蛋白的PEDV间接ELISA检测方法的建立与初步应用[J]. *中国兽医科学*(ZHANG Q, XU L M, ZHOU H C, et al. Establishment and preliminary application of PEDV indirect ELISA detection method based on N protein [J]. *Veterinary Science in China*), 2018, 48(2): 148-54.
- [22] Sadoh W E, Eregie C O, Nwaneri D U, et al. The diagnostic value of both troponin T and creatinine kinase isoenzyme (CK-MB) in detecting combined renal and myocardial injuries in asphyxiated infants [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91338.