

- [11] Frenkel N., et al., 1976, *J. Virology*, 18: 885—893.
- [12] 陈敏海, 蒋文俊等。1979。中华肿瘤杂志, 1(4):255~258。
- [13] Van Duuren B. L., 1965, *Cancer Res*, 25: 1871—1875.
- [14] 杨简等。1962。肿瘤研究论文集, 202—203。上海科学技术出版社。
- [15] Berenblum I., 1941, *Cancer Res*, 1: 44—48
- [16] Berenblum I., 1954, *Cancer Res*, 14:471—447.
- [17] Berenblum I., 1957, *Brit. J. Cancer*, 11: 85—87.
- [18] Goerttler K., et al., 1980, *Cancer Res*, 40: 155—161.
- [19] Rapp F., et al., 1976, *Cancer Res*, 36: 800—806.
- [20] Sever J. I., 1973, *Cancer Res*, 33:1509—1510.
- [21] Rapp F., 1977, *Cancer*, 40:419—429.
- [22] 余澍等。1983。医学微生物学, 784—787。人民卫生出版社。
- [23] William C., et al., 1981, *N. Engl. J. Med*, 305:315—319.

酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 小鼠抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体的研究*

季永镛

(中国科学院 上海细胞生物学研究所)

检测小鼠 IgE 类抗体的经典方法是被动皮肤过敏试验(PCA)^[1,2], 这是一种生物测定, 因而在应用上受到一定限制, 并且也受动物本身变化的影响。1973年 Hoffman^[3]首次报道了用 ELISA 检测血清 IgE。此后有不少工作者相继报道了应用 ELISA 检测 IgE 或抗原特异的 IgE 类抗体^[4-8]。为研究对天花粉蛋白的免疫应答的性质及其调节机制, 我们建立了一种较为简便的检测小鼠抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体的 ELISA, 并对其检测的特异性进行了研究。

材料和方法

一、小鼠抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体的诱发

1. 动物 纯种小鼠 C 3 H/He、C 57 BL/6, B 10 和 BALB/C, 体重均为 20克左右, 由本所动物房提供。

2. 免疫 将精制天花粉蛋白加铝矾制成抗原制剂, 小鼠腹腔注射 0.2 毫升(相当于 5 微克天花粉蛋白和 4 毫克铝矾)进行免疫。10 天后取血, 分离血清, 为小鼠抗天花粉蛋白抗血清。若进行第二次免疫, 则在首次免疫后 4 周进行, 抗原制剂和免疫途径与首次免

疫相同。用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法从上述抗血清中分离免疫球蛋白(Ig), 称为抗天花粉蛋白抗体。以终饱和度为 33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分离得到的抗体不含有 IgE; 若以终饱和度为 55% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分离得到的抗体含有 IgE^[9]。

二、被动皮肤过敏试验(PCA)^[2]

将小鼠抗天花粉蛋白抗血清(或抗体)倍比稀释后, 在剃去毛的 Wistar 大鼠背部进行皮内致敏, 每点 0.1 毫升。24—48 小时后, 从尾静脉注射含有 4 毫克天花粉蛋白的 1% Even's 蓝溶液 1 毫升。30 分钟后, 根据致敏部位出现蓝色斑点与否来判定结果。

三、羊抗小鼠 IgE(SAMiGE)的制备

1. 小鼠 IgE(MiGE)的来源 本工作使用的 MiGE 系小鼠抗二硝基苯(DNP)的 IgE 类单克隆抗体^[10], 为美国 Dr. Metzger, H. 所赠。

2. 绵羊的免疫 以 0.6 毫克 MiGE 溶于 1.5 毫升磷酸缓冲生理盐水, 加等体积 Freund 佐剂, 多点注射在绵羊皮下、肌肉和尾部。3 周后以不完全 Freund 佐剂配制的 MiGE 再免疫一次。在第二次免疫后 6 周进行回忆刺激。免疫后 1 周取血, 分离血清为 SAMiGE 抗血清。

* 林国妹同志参加实验工作。精制天花粉蛋白由武汉生物制品研究所提供; 天花粉蛋白包被工作得到我所许河生同志大力帮助, 谨致谢意。

3. SAMIgE 抗血清的吸收及其抗体的分离 为了得到特异的抗 MIgE, 以两倍体积的偶联小鼠血清 Ig 的 Sepharose 4 B (MIg*-Sepharose 4 B) 于室温吸收 SAMIgE 抗血清, 2 小时后, 用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法分离其中的 Ig, 得到的产物为 SAMIgE 抗体。用 ELISA 检测抗体的效价和鉴定其特异性。

四、酶联免疫吸附试验(ELISA)

除检测 IgE 类抗体时, 待测样品先在包被抗原的小室中过夜 (4 °C), 第二抗体 HRP-SAMiGE (见下文) 的反应时间为 4—5 小时 (4 °C) 外, 基本实验条件见叶敏和季永镛^[11]所述。

结 果

一、SAMiGE 的特异性

以 MIgE 和 MIg 分别为包被物, 作间接 ELISA 检测 SAMiGE 的效价。结果见表 1。

无论两次免疫还是回忆刺激后所得的 SAMiGE 与 MIgE 反应, 均呈现较高的效价。但是, 与小鼠非 IgE 的 Ig (MIg) 也有一定程度的交叉反应。经 MIg-Sepharose 4 B 吸收后, SAMiGE 针对 MIgE 与针对 MIg 的效价比由 4 上升到 32 或 64, 这说明 MIg-Sepharose 4 B 吸收可以明显降低 SAMiGE 与 MIg 交叉反应的程度, 意味着提高了 SAMiGE 的特异性。

表 1 间接 ELISA 检测 SAMiGE 的效价和特异性

	效 价	
	抗 MIgE	抗 MIg*
两次免疫后:		
一次吸收的 SAMiGE 抗血清	327,680	10,240
两次吸收的 SAMiGE 抗血清	327,680	5,120
未吸收的 SAMiGE 抗血清	327,680	81,920
一次吸收的 RabAMiG 抗血清	<80	10,240
未吸收的 RabAMiG 抗血清	20,480	327,680
回忆刺激后:		
一次吸收的 SAMiGE 抗体**	40,960	1,280

* MIg: 不含 IgE 的小鼠血清 Ig。

** SAMiGE 抗体的起始浓度为 1 毫克蛋白/毫升。

将一次吸收的 SAMiGE 抗体标记辣根过氧化物酶 (HRP) 作为第二抗体 (HRP-SAMiGE),

进行间接 ELISA, 来检测小鼠抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体。

二、小鼠抗天花粉蛋白抗体的间接 ELISA 检测

1. 天花粉蛋白的包被 为了阐明天花粉蛋白在 ELISA 检测板上包被的状况和寻求其最适的工作浓度, 用 ^{125}I 标记天花粉蛋白。然后以不同浓度的 ^{125}I -天花粉蛋白按常规进行包被。检测板经洗涤后, 测定其每一小室的放射性强度。据包被于每一小室上的放射性强度与包被时加入的总放射性强度之比, 以及包被时天花粉蛋白的浓度, 可以算出包被在小室上的天花粉蛋白的量。

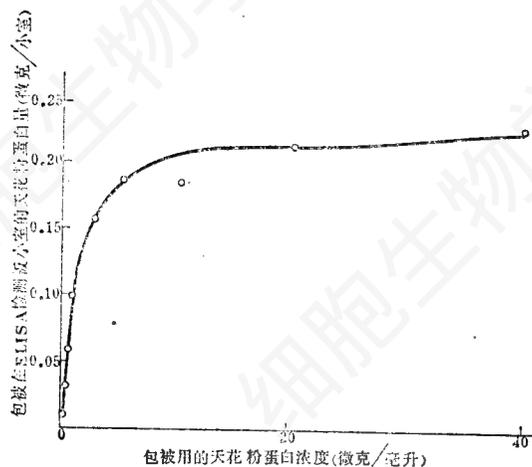


图 1 天花粉蛋白在 ELISA 检测板上的包被情况

从图 1 所示之结果可以看出, 随着天花粉蛋白浓度的上升, 包被在小室表面的天花粉蛋白量也随之上升。天花粉蛋白浓度超过 10 微克/毫升时, 曲线趋向平坦。为保证小室表面有足够的蛋白, 故选用 20 微克/毫升的天花粉蛋白浓度。

2. 用 ELISA 检测小鼠抗天花粉蛋白抗体的特异性

ELISA 检测结果见表 2。从表 2 可以看出, 以 HRP-SAMiGE 为第二抗体的间接 ELISA 可以检测到小鼠抗天花粉蛋白抗血清或抗体中存在的抗原特异的 IgE 类

* 以终饱和度为 33% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析分离的正常小鼠血清 Ig, 其中不含有 IgE。

表2 小鼠抗天花粉蛋白的IgE类抗体的间接ELISA检测和PCA

小鼠品系	样品*	效价	
		ELISA	PCA
C ₃ H/He	正常(S)	<20	-
	免疫(S)	>1208	2560
	正常(33%)	-	-
	正常(55%)	-	-
	免疫(33%)	32	2
	免疫(55%)	>64	>8
C ₅₇ BL/6	正常(S)	<20	-
	免疫(S)	40	320
	正常(33%)	-	-
	正常(55%)	-	-
	免疫(33%)	2	-
	免疫(55%)	8	4
B 10	正常(S)	<20	-
	免疫(S)	160	5120
	正常(33%)	-	-
	正常(55%)	-	-
	免疫(33%)	2	-
	免疫(55%)	16	2
BALB/C	正常(S)	<20	-
	免疫(S)	80	40

* 正常(S): 正常小鼠的血清。

免疫(S): 天花粉蛋白免疫小鼠的血清。

正常(33%)或(55%): 以终饱和度为33%或55%(NH₄)₂SO₄分离得到的正常小鼠的血清的Ig, 其起始浓度为0.13毫克/毫升。

免疫(33%)或(55%): 以终饱和度为33%或55%(NH₄)₂SO₄分离得到的天花粉蛋白免疫小鼠的血清的Ig, 其起始浓度为0.13毫克/毫升。

抗体;但是也可以看到HRP-SAMiGE与非IgE类抗体还有较弱的交叉反应, 因为以终饱和度和为33%(NH₄)₂SO₄盐析法分离的抗体, 在检测中仍呈较弱的阳性。

为去除HRP-SAMiGE与IgE类抗体的弱的交叉反应, 将MIg加到HRP-SAMiGE中, 于4℃放置过夜, 离心后得上清液(中和HRP-SAMiGE), 即可用于检测。结果(见表3)说明中和HRP-SAMiGE所能检测的抗体属IgE类。

为了进一步证明中和HRP-SAMiGE的特异性, 以此检测小鼠抗天花粉蛋白单克隆抗体**。结果见表4。

表3 小鼠抗天花粉蛋白的IgE类抗体的间接ELISA检测(以中和HRP-SAMiGE为第二抗体)和PCA

小鼠品系	样品*	效价	
		ELISA	PCA
C ₃ H/He	正常(33%)	-	-
	正常(55%)	-	-
	免疫(33%)	-	-
	免疫(55%)	32	2
B 10	正常(33%)	-	未做
	正常(55%)	-	未做
	免疫(33%)	-	未做
	免疫(55%)	16	未做

* 见表2。

表4 小鼠抗天花粉蛋白的单克隆抗体的间接ELISA检测(以中和HRP-SAMiGE为第二抗体)

稀释度	OD ₄₉₂ ±SD	
	IgE类单抗	非IgE类单抗
10	0.410±0.006	0.035±0.021
20	0.456±0.149	0.011±0.006
40	0.312±0.105	0.053±0.018
80	0.139±0.013	0.037±0.026
160	0.072±0.005	0.055±0.014
320	0.045±0.023	0.058±0.014

以中和HRP-SAMiGE为第二抗体的间接ELISA检测时, 只有IgE类单克隆抗体呈阳性(OD₄₉₂>0.1), 而非IgE类抗体为阴性, 从而进一步表明上述检测对IgE是特异的。

3. ELISA和PCA检测小鼠抗天花粉蛋白IgE类抗体的比较 从表2和表3所列结果, 可以看出ELISA和PCA的结果基本一致, 也就是ELISA检测为阳性的样品, PCA也呈阳性; 反之, ELISA检测为阴性的样品, PCA也呈阴性。这说明通过上述处理后的第二抗体能正确地反映IgE类抗体的存在。

** IgE类和非IgE类小鼠抗天花粉蛋白单克隆抗体由本实验室顾华同志提供, 谨致谢意。

4. 天花粉蛋白致敏的小鼠脾细胞在体外产生 IgE 类抗体的间接 ELISA 检测 将天花粉蛋白加铝矾免疫的 C 57 BL/6 小鼠脾细胞培养在预先已包被天花粉蛋白的检测板的小室里(细胞浓度为 1×10^7 /毫升, 每小室加 0.2 毫升), 于 37°C 培养。次日, 取上清液作 PCA; 检测板洗涤后, 加中和 HRP-SAMiGE 检测抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体。初步结果表明(见表 5), 用间抗 ELISA 可以检测致敏脾细胞在体外产生的 IgE 类抗体, 检测结果与 PCA 一致。

表 5 致敏小鼠脾细胞在体外产生抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体的间接 ELISA 检测和 PCA

小鼠	ELISA ($OD_{492} \pm S.D.$)	PCA
免疫:		
1	0.130 ± 0.027	+
2	0.121 ± 0.028	+
3	0.034 ± 0.018	-
正常:		
1	0.014 ± 0.011	-
2	-0.027 ± 0.016	-
3	0.094 ± 0.010	-

讨 论

本文以小鼠抗 DNP 的 IgE 单克隆抗体为抗原, 免疫绵羊制备 SAMiGE。尽管免疫原是一种单克隆抗体, 理应相当纯^[10]。然而, 如此得到的 SAMiGE 与小鼠非 IgE 类的 Ig 仍有交叉反应。究其原因, 不同类别的 Ig 可以有相同的 κ 或 λ 链, 故有可能具有交叉反应的抗原决定簇^[12]。本文结果也提示了这一可能性的存在。这似乎表明要获得抗 Ig 类别特异的抗体, 并非简单地用某一类别 Ig 作为免疫原即能达到。为此, 在制备特异的 SAMiGE 时, 可用 MIg 进行吸收。本文采用 MIg-Sepharose 4 B 进行固相吸收, 不致将某些成份引入被吸收的样品。但是, 即使两次吸收, 也未能完全除去

其与 MIg 的交叉反应(见表 1)。若进一步采用中和法, 也就是在 HRP-SAMiGE 中加入一定量的 MIg 与之反应, 则效果较好(见表 3 和表 4)。

因为 IgE 类抗体的含量较低, 用 ELISA 检测时, 一般常用较双抗体间接法多一步抗 IgE 抗体反应的 5 步法^[8,13]。这样虽可提高检测的灵敏度, 但也带来步骤多, 引起非特异反应的可能性大等缺点。故本文仍采用一般的双抗体间接法, 但通过延长反应时间收到了满意的效果。

郑珊珊等^[4]以抗天花粉蛋白抗体包被塑料检测板, 再通过抗原-抗体反应将天花粉蛋白结合到检测板上。这样, 天花粉蛋白的结合量便与其抗体的质量密切相关。本文仍采用常规的包被抗原的方法, 并用 ^{125}I 标记天花粉蛋白验证了包被方法的可行性和求得了天花粉蛋白的最适工作浓度, 显然较之前法更为可靠。

PCA 是一种检测 IgE 类抗体的生物测定方法, 关于 PCA 和 ELISA 这两种检测 IgE 类抗体的一致性, 各实验室的结果不太一样; 较好的一致性达 82%; 较差的只有 20%^[8]。本文的实验结果基本一致。但是, 在研制小鼠抗天花粉蛋白的 IgE 类单克隆抗体过程中, 发现对有的阳性克隆来说, 两种检测方法一致; 而对有的阳性克隆来说, 则不然。更为有趣的是, 对某些克隆, ELISA 检测是阴性, 而 PCA 是阳性(未发表资料)。因为在本实验室的大量 PCA 实验中, 仅出现过假阴性, 从未出现过假阳性。对于这一现象, 一方面尚需进一步用标准抗 IgE 抗血清来鉴别, 另一方面可能提示了有不同性质的抗天花粉蛋白的 IgE 类抗体存在, 这是值得深究的一个问题。

参 考 文 献

- [1] Ovary, Z., 1958, *J. Immunol.*, 81:355—357.
- [2] Ovary, Z., et al., 1975, *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 48:16—21.
- [3] Hoffman, D. R., 1973, *J. Allergy Clin. Im-*

- munol.*, 51:303—306.
- [4] Weltman, J. K., et al., 1976, *J. Allergy*, 58:426—431.
- [5] Eriksson, N. E. & Ahlstedt, S., 1977, *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol* 54:88—95.
- [6] Guesdon, J., 1978, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 61:23.
- [7] 周彤等。1981。中华微生物学和免疫学杂志, 1(1):48—53。
- [8] 宋济范等。1982。中华微生物学和免疫学杂志, 2:74—79。
- [9] Kelly, K. A., et al., 1980, *J. Immunol. Methods*, 39:317—333.
- [10] Liu, F. T., et al., 1980, *J. Immunol.*, 124:2728—2737.
- [11] 叶敏和季永镛。1981。上海免疫学杂志, 1(3):1—5。
- [12] Klein, J., 1982, in "Immunology, The Science of Self-Nonself Discrimination", P. 162.
- [13] Hill, P. N. & Lin F. T., 1981, *J. Immunological Methods*, 45:51—63.
- [14] 郑珊珊等。1984。中华微生物学和免疫学杂志, 4(1):50—54。

人体蜕膜分泌催乳素的研究*

吕淑霞 盛洁漪 周美云

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

马魁榕

(中国科学院动物研究所)

胚泡种植于子宫内膜基质的一些哺乳动物, 子宫内膜的基质细胞都发生蜕膜化, 这些由基质细胞转化而来的蜕膜细胞能不断增生, 并一直维持至妊娠終了。对于它们在整个妊娠过程中的功能意义, 曾有一些评论^[1-3], 但是作为包被胚胎的一种组织, 蜕膜是否如滋养层组织那样分泌激素类物质, 直至1977年 Riddick 和 Kusmik^[4]在探讨妊娠妇女羊水中高浓度催乳素(PRL)的来源时, 才首先提出人体蜕膜细胞有合成 PRL 的功能。他们采用放射免疫技术比较了羊膜、绒毛膜和蜕膜孵育液中 PRL 的含量, 结果发现离体孵育 18 小时的过程中, 只有蜕膜组织仍能继续合成 PRL。随后, 他们以及另外一些学者用离体短期孵育的方法, 相继在妊娠晚期或分娩时^[5-8]以及妊娠 6 周以前^[9]的蜕膜组织孵育液中直接测到 PRL。最近, Hochner-Celnikier, D. 等(1984)^[10]还观察了早孕蜕膜在体外培养条件下 PRL 分泌量的变化。有关妊娠中期蜕膜分泌 PRL 的工作, 尚未见报道。

本文旨在检测经体外培养近一周的人体蜕膜细胞合成和分泌 PRL 的功能; 比较早孕和中孕蜕膜 PRL 的分泌量。为了了解早孕和中孕阶段蜕膜细胞发育程度与 PRL 分泌的关系, 我们还在亚显微结构水平观察了蜕膜细胞的变化。

材料和方法

材料取自临床上流产的新鲜蜕膜, 共 10 例, 孕龄 6—20 周, 其中早孕 5 例(6—12 周), 中孕 5 例(14—20 周)。采用旋转管培养方法。199 培养液含适量青、链霉素, 不加或加小牛血清。取到无菌新鲜蜕膜后, 经选择, 洗净凝血, 剪细(约 1 mm³ 大小), 定量接种于旋转管壁, 培养液(3 ml)直接加于管底, 旋转管先竖放于培养箱中约 3 小时, 待组织块完全贴壁后, 再插入旋转鼓中, 让组织块与培养液充分接触。培养 3—4 天更换培养液一次。一般在接种后约 5 天蜕膜细胞生长旺盛时分组实验, 24 小时后从每个旋转管收集培养液, 低温保存, 备放射免疫测定用。

* 本实验得到 WHO 的小额资助, 特此致谢。
刘爱华同志参加部分工作。