

小鼠 IgG 亚型与葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 的亲合性

张永平¹ 李 洸² 李德葆¹

葡萄球菌 A 蛋白 (Staphylococcal protein A, SpA) 与猪、狗、兔和小鼠等多种热血动物的 IgG 有亲和性,但对小鼠 IgG 不同亚型的亲和力有差异^[1]。由于 SpA 分子能特异结合 IgG 的 Fc 片段,并且一分子 IgG 能结合多分子 SpA^[2];一分子 SpA 有三个结合 IgG 的位点^[3],所以应用 SpA 检测 IgG 抗体能提高检测灵敏度^[4,5]。近年来,在特异性免疫检测中应用标记的 SpA 作为第二抗体越来越广泛,并逐渐将标记 SpA 应用于小鼠单克隆抗体(简称单抗)的检测中。因此,了解 SpA 与小鼠 IgG 各亚型的亲和力是十分重要的,特别在单抗技术中应用时,可防止丢失阳性杂交瘤细胞。

在多次 ELISA 检测长叶车前草花叶病毒 (RMV) 单抗的试验中^[6],发现标记的 SpA 不能与小鼠 IgG_{2b} 结合。为证实这一现象,应用 ELISA 间接法定性测定 SpA 与小鼠 IgG_{2b} 和 IgG₃ 的亲合性,并用标记的羊抗鼠 IgG 做比较。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 小鼠 IgG_{2b} 和 IgG₃: 所用小鼠 IgG_{2b} 和 IgG₃ 分别来自长叶车前花叶病毒单克隆抗体细胞株 Rm1 和 Rm4^[1]。

2. 标记的 SpA: 采用卫生部上海生物制品所生产的 HRP 酶标记的 SpA (简称 PPA),按使用要求稀释使用

3. HRP 酶标记的羊抗小鼠 IgG: 过碘酸钠法标记羊抗鼠 IgG 抗体(上海生物制品所生产),经 ELISA 测定,效价为 1:6,400。

4. 抗原病毒: 使用 Rm1 和 Rm4 共同特异的烟草花叶病毒北京番茄株 (TMVbc-t) 做为 ELISA 包被抗原。

(二) 方法

1. PPA 酶活性测定 (pH5.0—11.0): 以 PPA 的 10⁻³ 稀释液 (PPA 的最高稀释度为 10⁻⁴) 为待测酶液。用 2N HCl 或 NaOH 将 0.01M pH7.2 PBS

液的 pH 分别调成 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 和 11.0 用此液分别配制 10⁻³ PPA 液。将酶液与底物溶液 (0.7% 邻苯二胺) 按 1:10 在试管中混合,以 PBS 加底物液为对照。37℃ 保温 30 分钟,目测结果。

2. ELISA 测定 SpA 与小鼠 IgG_{2b} 和 IgG₃ 的亲合性: 用 6 单位 (最高稀释度为 1 单位) 浓度的 TMVbc-t 抗原病毒包被酶标板; 杂交瘤细胞株 Rm1 和 Rm4 培养上清液 4 单位浓度为小鼠 IgG 亚型抗体液。标记第二抗体分两组: 一组同时使用 0.01 M pH7.2 PBS 配制的 4 单位 HRP-羊抗鼠 IgG 和 PPA, 进行二者比较试验; 另一组使用 pH5.0—11.0 的十种不同 pH PBS 配制的 4 单位 PPA 液。以瘤系 SP₂/0-Ag14 培养上清液为阴性对照,不加抗体 (PBS 替代) 和完全空白 (包被除外) 两种空白对照。各种处理重复四次,取其平均值。用分光光度计测定反应结果,完全空白对照调满度,以 A_{492nm} 值判断结果。

结 果

(一) HRP 酶在 pH5.0—11.0 的活性

PPA 在 pH5.0—11.0 的范围内反应结果相同。表明在该 pH 范围内 PPA 的 HRP 酶活性不受影响。因此,在此 pH 范围内测定 SpA 与小鼠 IgG 亚型亲和性,就排除了由于 HRP 酶活性不稳定对试验结果的干扰。

(二) HRP-羊抗鼠 IgG 和 PPA 检测鼠 IgG 亚型抗体比较

结果见表 1。HRP 酶标记的羊抗鼠 IgG 与小鼠 IgG_{2b} 和 IgG₃ 均呈现反应,但较弱; PPA 与小鼠 IgG_{2b} 不反应,与 IgG₃ 反应很强;可见 PPA 检测鼠 IgG₃ 的灵敏度比 HRP-羊抗鼠 IgG 高。

本文于 1986 年 6 月 26 日收到。

1. 浙江农业大学植物保护系,杭州。

2. 浙江医学研究院免疫室,杭州。

表 1 PPA 和 HRP-羊抗鼠检测抗体的比较

	IgG _{2b}	IgG ₃	SP ₂ /0	PBS
PPA	-	++++	-	-
HRP-羊抗鼠	++	++	-	-

注:“-” A_{492nm} 值在 0.05 以下;“++”为 0.45—0.80;“++++”为 1.15 以上。

(三) SpA 与小鼠 IgG_{2b} 和 IgG₃ 的亲性和
结果见表 2。在 pH6.0—10.0 范围内,小鼠 IgG₃ 与 SpA 结合良好,且各 pH 间几乎无差异。

表 2 小鼠 IgG 亚型与 SpA 的亲性和

pH	5.0	6.0	6.5	7.0	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	11.0
IgG _{2b}	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgG ₃	±	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
SP ₂ /0	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PBS	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“±”为 A_{492nm} 值在 0.05—0.10 之间。

使低效价的单抗出现阳性反应。这可能是由于一分子 SpA 能结合多分子 IgG₃, 而抗鼠 IgG₃ 的抗体只占第二抗体总量的一小部分, 使所用的实际浓度偏低。因此, 应时 ELISA 检测单抗时, 如已知单抗属于与 SpA 有亲和性的 IgG 亚型, 应尽量采用标记的 SpA, 以增强其阳性反应。从本试验结果得到提示, 应用标记的 SpA 检测其它动物单抗时, 必须了解 SpA 与该动物 IgG 亚型的亲和力, 以便获得阳性融合细胞。

参 考 文 献

[1] Kronvall, G. et al.: *J. Immunol.*, 105: 1116—

而 IgG_{2b} 在同样条件下与 SpA 无亲和性。在 pH11.0 时, SpA 与小鼠 IgG₃ 不结合。PPA 在 pH5.0 时, 部分解离成 IIRP 酶和 SpA。

讨 论

Kronvall 等人^[1]报道 SpA 与小鼠 IgG₁ 不结合, 本试验证实 SpA 对小鼠 IgG_{2b} 无亲和性, 可见 SpA 对检测鼠-鼠杂交瘤单抗范围较窄。应用标记 SpA 筛选小鼠单克隆杂交瘤时, 应同时使用 SpA 和抗鼠 IgG₃, 以免丢失其阳性杂交瘤细胞。

SpA 检测鼠单抗的灵敏度比抗鼠 IgG 高, 能

1123, 1970.

- [2] Forsgren, A. and J. Sjöquist: *J. Immunol.*,
[3] Mackenzie, M. R. et al.: *J. Immunol.*, 120:
97: 822—827, 1966.
1493—1496, 1978.
[4] Hsu, H. T. and R. H. Lawson: *Phytopathology*,
75: 778—783, 1985.
[5] Shukla, D. D. and K. H. Gough: *J. Gen. Virol.*,
45: 533—536, 1979.
[6] 张永平等: 浙江农业大学学报, 12 (4): 451—
453, 1986.