

大鼠淋巴细胞培养上清液总 IgG 含量 ELISA 检测方法的建立 *

单纯筱 王 宇 尹磊森 徐玉东 魏 颖 冉 君 刘晓燕 刘 奇 杨永清[△]

(上海中医药大学上海市针灸经络研究所 上海 200030)

摘要 目的:建立一种定量测定大鼠淋巴细胞培养上清液中总 IgG(免疫球蛋白 G)含量的双抗体夹心 ELISA(酶联免疫吸附试验)检测方法。**方法:**用方阵实验确定包被抗体、检测抗体的最佳工作浓度;绘制标准曲线,确定线性范围;评价标准曲线的可重复性、精密度和可应用性。**结果:**包被抗体和检测抗体的最佳效价分别为 2 μ g/ml 和 1:4000 稀释;检测的线性范围为 0.25-16ng/ml。经方法学评价,可重复性和精密度较高,应用性较强。**结论:**该方法灵敏度高,重复性好,可作为科研过程中检测大鼠淋巴细胞培养上清液总 IgG 含量的一种精确、方便、可靠的方法。

关键词:大鼠淋巴细胞培养上清液;IgG;双抗体夹心 ELISA

中图分类号:Q95-33 R446 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)26-5015-05

Establishment of ELISA for Total IgG Content of Rat Lymphocyte Culture Supernatant*

SHAN Chun-xiao, WANG Yu, YIN Lei-miao, XU Yu-dong, WEI Ying, RAN Jun, LIU Xiao-yan, LIU Qi, YANG Yong-qing[△]

(Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai, 200030, China)

ABSTRACT Objective: To establish a quantitative double-antibody sandwich ELISA detecting method for total IgG content of cultured rat-lymphocyte supernatant. **Methods:** Detect the optimal concentrations of coated antibody and enzyme-antibody with a matrix experiment. Construct a calibration curve and determine the linear rang. Evaluation repeatability, precision and applicability of the calibration curve. **Results:** The optimal concentration of coated antibody is 2 μ g/ml and the optimal dilution ratio of enzyme-antibody is 1:4000. The linear rang of calibration curve is 0.25-16 ng/mL. The repeatability, precision and applicability are excellent. **Conclusion:** This ELISA detecting method is convenient and reliable to detect total IgG content of cultured rat-lymphocyte supernatant.

Key words: Cultured rat-lymphocyte supernatant; IgG; Double-antibody sandwich ELISA

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R446 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)26-5015-05

IgG 是血清中含量最多的一种免疫球蛋白,约占血清总免疫球蛋白量的 80%,在机体的防御系统中发挥着重要的作用^[1]。在科学研究过程中,特别是在一些与免疫系统相关疾病的动物实验研究中,经常要检测大鼠淋巴细胞培养上清液中总 IgG 的含量。由于细胞培养上清液中的 IgG 含量较低^[2,3],有时一毫升上清液中只有几十纳克,甚至几纳克^[4],常规商品试剂盒很难检测得到。所以建立一种特异、灵敏的检测大鼠淋巴细胞培养上清液中总 IgG 含量的方法是十分必要的。本研究旨在建立定量检测大鼠淋巴细胞培养上清液中总 IgG 的双抗体夹心 ELISA 方法,为科学实验中准确地检测大鼠淋巴细胞培养上清液中总 IgG 的含量提供可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠购于中国科学院上海实验动物中心,SPF 级,雄性,体重 220 $\pm$ 10g;大鼠 IgG 标准品(Purified Rat IgG)、包被

IgG 抗体(Anti-rat IgG Antibody)和检测 IgG 抗体(Anti-rat IgG-HRP Antibody) 购于美国 R&D 公司;TMB 底物(SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component)) 购于美国 KPL 公司;淋巴细胞分离液(EZ-sepTMMouse 1X)购于达科为生物技术有限公司;美洲商陆丝裂原(PWM)购于美国 Sigma 公司;1640 细胞培养基、双抗和胎牛血清购于美国 Gibco 公司;牛血清白蛋白(BSA)购于美国 Sigma 公司;96 孔聚丙烯酶标板和 24 孔细胞培养板购于美国 Costar 公司;酶标仪(Bio-rad Model 550 Microplate Reader) 美国 Bio-rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠淋巴细胞培养上清液的制备 大鼠脱颈处死,放入盛有 75%医用酒精的烧杯中浸 2-3min,转入超净工作台中。用 U 型切口打开腹腔,暴露并取出脾脏,用生理盐水清洗干净后将脾脏放入 200 目尼龙网中剪碎,放在培养皿中,加 10mL EZ-sep Mouse 1X 小鼠淋巴细胞分离液,用 20mL 玻璃注射器的活塞进行研磨。收集分离液至离心管中,加入 1mL 1640 培养液覆盖,

* 基金项目:国家自然科学基金(81001548,81173341,81173332,30873286);上海市教委和上海市教育发展基金会“晨光计划”资助项目(10CG45);上海市卫生局青年基金(2009Y096);国家中医药管理局、上海市重点学科建设项目(S30304)

作者简介:单纯筱(1981-),男,医学博士,主要研究方向:针灸效应物质基础,

电话:021-54592134 E-mail: scx095@126.com

[△]通讯作者:杨永清,博士生导师,电话:021-54592134 E-mail: dryqyang@163.com

(收稿日期:2012-03-05 接受日期:2012-03-30)

常温 800g 离心 30min。小心吸出悬浮在 1640 培养液和 EZ-Sep 分离液之间的淋巴细胞层中的淋巴细胞悬液,加入 10mL 1640 培养基洗涤,250g 离心 10min。倾倒入上清液,加 1640 培养液 10mL 重新悬浮淋巴细胞,细胞计数。根据细胞计数结果,将适量细胞悬液以 1mL 胎牛血清、100 μ L 双抗、需要量的 PWM(除空白组)和 1640 培养液混合成 10mL,使最终细胞浓度为 5×10^5 /mL。用不同浓度的 PWM 与淋巴细胞共培养,分为 PWM 25 μ g/mL 组 PWM 5 μ g/mL 组 PWM 1 μ g/mL 组 PWM 0.2 μ g/mL 组和 Blank(空白对照)组 6 个组,植入 24 孔板,每孔 1mL,加盖,置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中,湿润环境培养 7 天。培养结束,将培养板内细胞培养液吸入 1.5mL 离心管中,1000g 离心 10min。取无细胞上清液,20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 双抗体夹心法 ELISA 的操作步骤 包被缓冲液(0.01mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.2)稀释 Anti-rat IgG Antibody,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜(16 小时以上)包被酶标板。磷酸缓冲液(PBS,含 0.05%吐温 20)洗板 3 次。以含 1%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 溶液为封闭液,每孔 350 μ L,室温封闭 1h。封闭结束后,弃去封闭液,洗板,加入待测样品(制作标准曲线以标准 Purified Rat IgG 代替样品)100 μ L,室温(25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)温育 2h。一抗温育结束后,洗板,每孔加入 Anti-rat IgG-HRP Antibody 100 μ L,室温温育 2h。酶标二抗温育结束后,洗板,每孔加入 TMB 底物溶液 100 μ L,室温避光显色 30min 后,每孔加入 2mol/L H₂SO₄ 50 μ L 终止反应。用酶标仪在 450nm 处检测 OD 值。绘制标准曲线,通过标准曲线计算样品浓度。

1.2.3 包被抗体浓度的确定 利用方阵实验确定包被抗体的工作浓度。具体步骤:用包被液对包被抗体从 1:250(2 μ g/mL)进行 3 个连续 2 倍稀释。用封闭液将检测抗体按照试剂公司的建议作 1:8000 稀释,对不同浓度的大鼠 IgG 标准品进行 A450 值检测,其他步骤均按照 1.2.2 中 ELISA 操作程序。以阳性孔 A450 值在 1.0 左右,空白孔 A450 值小于 0.1 且 A450 值范围较宽的条件作为最佳包被抗体工作浓度。

1.2.4. 检测抗体稀释度的确定 在包被抗体工作浓度确定后,在

标准品的浓度在 0.5-32ng/mL 的范围之间的条件下,对检测抗体做 1:8000 和 1:4000 的稀释,按照 1.2.2 中 ELISA 操作程序进行实验。选择 A450 值范围较宽的条件作为最佳检测抗体工作浓度。

1.2.5 标准曲线的建立及线性范围的确定 根据以上确定的条件,以最佳包被浓度的包被抗体包被 ELISA 反应板,抗原标准参考品系列稀释液为样品,浓度从 2000ng/mL 起分别做 2000-31.25 ng/mL、250-3.91 ng/mL 和 32-0.5 ng/mL 3 段 2 倍连续稀释,最小浓度为 0.5ng/mL。按上述 ELISA 实验步骤操作,测定 A450 值,建立标准曲线。以抗原浓度为横坐标,以 A450 值为纵坐标,绘制曲线图,根据曲线图,选择最佳线性范围,绘制标准曲线。

1.2.6 双抗体夹心 ELISA 检测方法的评价

1.2.6.1 批内和批间变异 从 3 批标准曲线中取 1 ng/mL(低)、4 ng/mL(中)和 16 ng/mL(高)3 个浓度点 A450 值,计算批内和批间变异系数。

1.2.6.2 准确度 从 3 批标准曲线中取 1ng/mL(低)、4ng/mL(中)和 16 ng/mL(高)3 个浓度点,计算实测值与理论值的比值,计算回收率。

1.2.6.3 检测方法的初步应用 用所建立的方法分 3 次对 3 批培养的淋巴细胞培养上清液中的总 IgG 含量进行检测,每批样本为 PWM 25 μ g/mL 组 PWM 5 μ g/mL 组 PWM 1 μ g/mL 组, PWM 0.2 μ g/mL 组和 Blank(空白对照)组 6 个组,每组检测 4 个样本。计算批内和批间变异系数。

2 实验结果

2.1 包被抗体浓度的确定

用 1:250、1:500 和 1:1000 三个稀释度作为包被抗体的稀释度时 A450 值如表 1。三个包被浓度的条件下空白孔的 A450 值都小于 0.1,且数值接近,而在 1:250 稀释度的条件下 A450 值的范围较宽,所以选择 1:250 作为包被抗体的稀释度。

2.2 检测抗体稀释度的确定

用 1:8000 和 1:4000 两个稀释度作为检测抗体的稀释度时 A450 值如表 2。在 1:4000 稀释度的条件下 A450 值的范围较宽,所以选择 1:4000 作为检测抗体的稀释度。

表 1 不同包被抗体稀释度的条件下标准品的 A450 值

Table 1 The A450 value of the standard within the different dilution degree of coated antibody

The dilution degree of coated antibody	The dilution degree of enzyme-antibody (1:8000)			
	Blank	0.5 ng/mL	32 ng/mL	250 ng/mL
1:250(2 μ g/mL)	0.056	0.092	1.136	2.886
1:500(1 μ g/mL)	0.058	0.098	1.072	2.312
1:1000(0.5 μ g/mL)	0.057	0.083	0.705	1.373

表 2 不同检测抗体稀释度的条件下标准品的 A450 值

Table 2 The A450 value of the standard within the different dilution degree of enzyme-antibody

The dilution degree of enzyme-antibody		The dilution degree of coated antibody		
	Blank	0.5ng/mL	4ng/mL	32ng/mL
1:8000	0.065	0.092	0.271	1.136
1:4000	0.055	0.112	0.423	1.829

2.3 标准曲线及检测范围的确定

以包被抗体的稀释度在 1:250 和检测抗体的稀释度为 1:8000 的条件下,检测已知浓度的经系列稀释的 IgG 标准品,根据抗原浓度与 A450 值绘制 IgG 标准品在 2000-31.25 ng/mL、250-3.91 ng/mL 和 32-0.5 ng/mL 3 段范围内的曲线如图 1。其中图 1-3 中的曲线为直线拟合,回归方程 $y=0.0338x+0.1101$, $R^2=0.9812$,斜率为 3.2574。又经进一步优化,当 IgG 标准品在 16-0.25ng/mL 的浓度范围内,检测抗体稀释度在 1:4000 的情况下,求得图 2 所示曲线,回归方程 $y=0.1035x+0.1011$, $R^2=0.9891$,斜率为 0.9770。

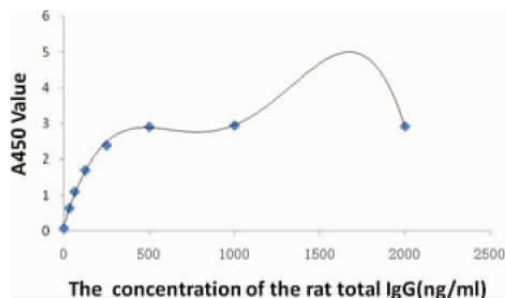


图 1-1

Fig. 1-1

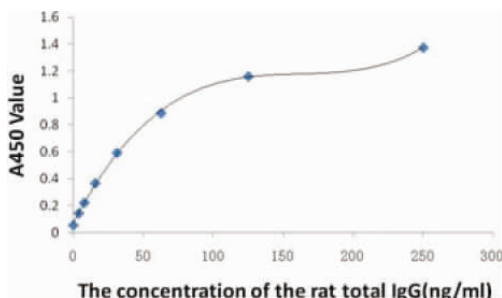


图 1-2

Fig.1- 2

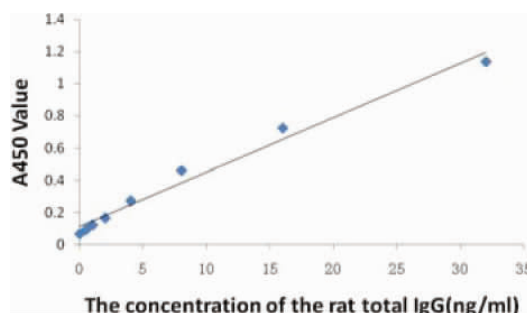


图 1-3

Fig.1-3

图 1 标准品浓度在 2000-31.25ng/mL、250-3.91 ng/mL 和 32-0.5 ng/mL 3 段范围内曲线的对比

Fig.1 The respective curves when the standard concentration within 2000-31.25ng/mL,250-3.91 ng / mL and 32-0.5 ng / mL

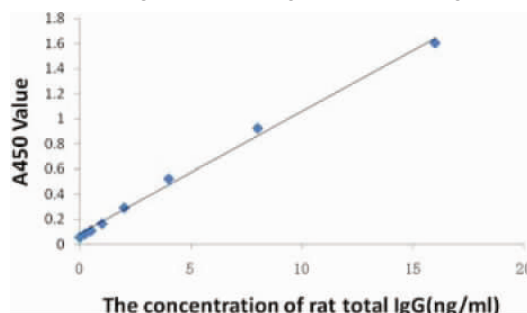


图 2 标准品浓度范围在 16-0.25ng/ml 检测抗体稀释度在 1:4000 的情况下的标准曲线

Fig.2 The curves when the standard concentration within 16-0.25 ng / mL and the dilution degree of enzyme-antibody at 1:4000

2.4 方法学的评价

2.4.1 批内和批间变异 1 ng/mL、4 ng/mL 和 16 ng/mL 3 个浓度点 A450 值的批内平均变异系数为 2.0064%, 批间平均变异系数为 11.8690%(表 3、表 4)。

表 3 标准曲线 A450 值批内变异

Table 3 The within group variation of A450 value of the calibration curve

The concentration of standard ng/mL	Mean (n=3)	SD	CV %	CV %
1	0.2290	0.0046	2.0925	
4	0.6697	0.0060	0.9001	2.0064
16	1.8673	0.0565	3.0267	

表 4 标准曲线 A450 值批间变异

Table 4 The interassay variation of A450 value of the calibration curve

The concentration of standard ng/mL	Mean (n=3)	SD	CV %	CV %
1	0.2079	0.0467	22.4492	
4	0.6588	0.5861	11.9263	11.8690
16	1.8557	0.0229	1.2316	

2.4.2 准确度 1 ng/mL、4 ng/mL 和 16 ng/mL 3 个浓度点的回收率分别为 93.9500± 2.1340、112.2498± 1.2423 和 96.7055± 0.9850(表 5)。

表 5 标准曲线回收率测定

Table 5 The determination of recovery of the calibration curve

Theoretical value ng/mL	Detection value ng/mL	Recoveries %
1	0.9395	93.9500± 2.1340
4	4.4900	112.2498± 1.2423
16	15.4721	96.7055± 0.9850

2.4.3 初步应用 ELISA 方法检测 3 批培养的淋巴细胞培养上清液中的总 IgG 含量,结果如图 3 所示。批内平均变异系数为 11.3387%,批间平均变异系数为 13.1220%(表 6、表 7)。

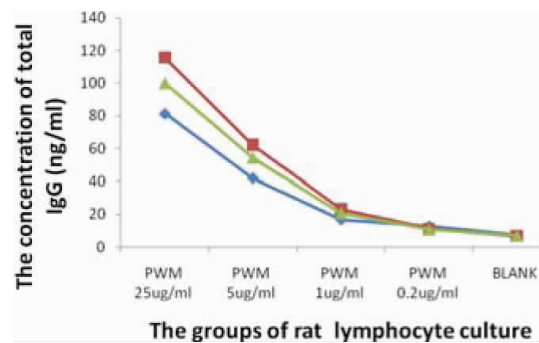


图 3 淋巴细胞培养上清液 IgG 测定结果

Fig. 3 The total IgG content determination results of cultured rat-lymphocyte supernatant

表 6 淋巴细胞培养上清液总 IgG 测定批内变异

Table 6 The within group variation of the total IgG content determination results of cultured rat-lymphocyte supernatant

Group	Mean(ng/mL)(n=4)	SD	CV	CV
PWM 25μg/mL	100.0250	3.1690	3.1682	
PWM 5μg/mL	54.3250	8.4937	15.6349	
PWM 1μg/mL	20.7250	1.6439	7.9321	11.3387
PWM 0.2μg/mL	10.6750	2.7897	26.1331	
Blank	6.8750	0.263	3.8254	

表 7 淋巴细胞培养上清液总 IgG 测定批间变异

Table 7 The interassay variation of the total IgG content determination results of cultured rat-lymphocyte supernatant

Group	Mean(ng/mL)(n=4)	SD	CV	CV
PWM 25μg/mL	98.9625	17.1435	17.3232	
PWM 5μg/mL	52.8563	10.1085	19.1245	
PWM 1μg/mL	16.8938	3.0522	15.1238	13.1220
PWM 0.2μg/mL	12.6813	1.0443	9.0730	
Blank	7.3875	0.3474	4.9656	

3 讨论

IgG 是哮喘^[5-7]、急性肺损伤^[8-10]、类风湿性关节炎^[11-13]、多发

性硬化症^[14,15]和系统性红斑狼疮^[16-18]等炎症和免疫性疾病研究过程中的重要观测指标^[19-21],而 IgG 在各种体液中含量的测定是一个不可避免的步骤。本文建立的双抗体夹心 ELISA 方法

定量检测大鼠淋巴细胞培养上清液中 IgG ,通过包被抗体和检测抗体与大鼠 IgG 抗原形成固相复合物,再加入酶标检测抗体,温育洗涤后加酶反应底物显色,测得的 A450 值的高低对应于样品中 IgG 的含量,得到一条线性较好、较稳定的标准曲线。经方法学评价,重复性好,灵敏度和准确度高。初步应用本方法检测了 3 批淋巴细胞培养上清液中的总 IgG 含量,3 批实验结果趋势一致。PWM 可促进 B 淋巴细胞对 IgG 的分泌^[2],所以随着 PWM 刺激浓度的降低,淋巴细胞培养上清液中的 IgG 含量也降低,符合文献报道。该方法的优点是能定量检测出大鼠淋巴细胞培养上清液等实验样本中含量较低的总 IgG 水平。

现在市场上有多家国内外公司生产的大鼠总 IgG 含量检测 ELISA 试剂盒,但是基本是针对大鼠血清中的总 IgG 含量进行检测的,检测范围约在 25-800ng/mL 之间,而淋巴细胞培养上清液中的总 IgG 的含量往往会低于这个范围,所以很难检测得到。而本文所建立的方法成本较低,且灵敏度高于市场上销售的大鼠总 IgG 含量检测 ELISA 试剂盒,检测范围在 0.25-16ng/mL 之间。在检测淋巴细胞培养上清液中的总 IgG 含量有其独特的优势,不失为一种精确、方便、可靠的方法。

参考文献(References)

- [1] Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, et al. Kuby Immunology [M]. 6ed, 2007, W H Freeman & Co (Sd). 574
- [2] Rowley DA, Stach RM. B lymphocytes secreting IgG linked to latent transforming growth factor-beta prevent primary cytolytic T lymphocyte responses[J]. Int Immunol, 1998, 10(3): 355-363
- [3] Yamada K, Hung P, Yoshimura K, et al. Effect of unsaturated fatty acids and antioxidants on immunoglobulin production by mesenteric lymph node lymphocytes of Sprague-Dawley rats[J]. J Biochem, 1996, 120(1): 138-144
- [4] Bird P, Calvert JE, Lowe J, et al. ELISA measurement of IgG subclass production in culture supernatants using monoclonal antibodies [J]. J Immunol Methods, 1987, 104(1-2): 149-158
- [5] Sehra S, Pynaert G, Tournoy K, et al. Airway IgG counteracts specific and bystander allergen-triggered pulmonary inflammation by a mechanism dependent on Fc gamma R and IFN-gamma[J]. J Immunol, 2003, 171(4): 2080-2089
- [6] El SZ, Raafat D, El MA. Relevance of serology for Mycoplasma pneumoniae diagnosis compared with PCR and culture in acute exacerbation of bronchial asthma[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 131(1): 74-80
- [7] Kasaiian MT, Donaldson DD, Tchistiakova L, et al. Efficacy of IL-13 neutralization in a sheep model of experimental asthma [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 36(3): 368-376
- [8] Sun L, Guo RF, Gao H, et al. Attenuation of IgG immune complex-induced acute lung injury by silencing C5aR in lung epithelial cells[J]. FASEB J, 2009, 23(11): 3808-3818
- [9] Kim JH, Chung DH. CD1d-restricted IFN-gamma-secreting NKT cells promote immune complex-induced acute lung injury by regulating macrophage-inflammatory protein-1alpha production and activation of macrophages and dendritic cells[J]. J Immunol, 2011, 186(3): 1432-1441
- [10] Dooley JL, Abdel-Latif D, St LC, et al. Regulation of inflammation by Rac2 in immune complex-mediated acute lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(6): 1091-102
- [11] Yeatts RP, Turner R, Collins R, et al. Soluble and insoluble immune complex-platelet interactions in rheumatoid inflammation [J]. Ann Rheum Dis, 1978, 37(5): 421-427
- [12] Schaller M, Stohl W, Tan SM, et al. Raised levels of anti-glucose-6-phosphate isomerase IgG in serum and synovial fluid from patients with inflammatory arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(5): 743-749
- [13] Anzilotti C, Riente L, Pratesi F, et al. IgG, IgA, IgM antibodies to a viral citrullinated peptide in patients affected by rheumatoid arthritis, chronic arthritides and connective tissue disorders[J]. Rheumatology (Oxford), 2007, 46(10): 1579-1582
- [14] Zephir H, Lefranc D, Dubucquoi S, et al. Serum IgG repertoire in clinically isolated syndrome predicts multiple sclerosis [J]. Mult Scler, 2009, 15(5): 593-600
- [15] Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K, et al. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis[J]. Arch Neurol, 2010, 67(6): 707-714
- [16] Deng GM, Liu L, Kytaris VC, et al. Lupus serum IgG induces skin inflammation through the TNFR1 signaling pathway [J]. J Immunol, 2010, 184(12): 7154-7161
- [17] Bertolaccini ML, Mepani K, Sanna G, et al. Factor XII autoantibodies as a novel marker for thrombosis and adverse obstetric history in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(4): 533-536
- [18] Berkun Y, Zandman-Goddard G, Barzilai O, et al. Infectious antibodies in systemic lupus erythematosus patients[J]. Lupus, 2009, 18(13): 1129-1135
- [19] Lee H, Stapp RT, Ormsby AH, et al. The usefulness of IgG and IgM immunostaining of periportal inflammatory cells (plasma cells and lymphocytes) for the distinction of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis and their staining pattern in autoimmune hepatitis-primary biliary cirrhosis overlap syndrome[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(3): 430-437
- [20] Qvarfordt I, Riise GC, Andersson BA, et al. IgG subclasses in smokers with chronic bronchitis and recurrent exacerbations [J]. Thorax, 2001, 56(6): 445-449
- [21] Safaieian M, Kemp T, Falk RT, et al. Determinants and correlation of systemic and cervical concentrations of total IgA and IgG [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(10): 2672-2676
- [22] Shenker BJ, Vitale LA, Welham DA. Immune suppression induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans: effects on immunoglobulin production by human B cells[J]. Infect Immun, 1990, 58(12): 3856-3862