

酶与蛋白质的交联

酶的本质是蛋白质，因此，酶对蛋白抗原、抗体的标记，实质上就是两种不同蛋白质之间的交联。酶与蛋白质之间的交联反应，主要受到蛋白质分子内所具有的适合于偶联的化学功能团类型和数量的限制，大部分交联反应是通过蛋白质分子中的 α -和 ϵ -氨基、亚氨基和巯基的亲核性质，常用的交联方法主要是利用 α -氨基作为交联部位。

如前所述，由于交联双方具有多种不同的反应功能团，故可据此选用不同的交联方法和交联剂。交联剂有多种，如单功能、双功能和多功能试剂。双功能试剂又可分为同型和异型两类，其中多数都可用于酶与蛋白质的交联。戊二醛法和高碘酸钠法是最通用的方法，而又以后者为最佳；二马来酰亚胺、氟二硝基苯砒、苯醌等方法也可采用。当酶与抗体蛋白用同型双功能试剂进行交联时，常常形成不均一的混合物，一有酶与抗体蛋白的结合物，也有酶—酶、抗体蛋白—抗体蛋白自身结合而形成的聚合物同时存在。为克服同型双功能交联剂的这种缺点，可采用一类新型的交联剂——异型双功能试剂，其中，目前应用较多的一种是 N—琥珀酰亚胺基 3—(2—吡啶基二硫)丙酸酯(简称 SPDP)，使用 SPQ 可将酶与抗体蛋通过两者的氨基进行交联，而不会形成酶或蛋白的自身聚和物。新近，生物素—亲和素系统(Biotin—Avidin System, BAS)的引用是标记技术一重大进展，已用于酶对抗原或抗体，以及多种物质的交联标记，它可明显地提高标记效率。利用 BAS 制备的酶标结合物，除具有抗原—抗体专一结合的特点外，

还具有生物素—亲和素系统的特异亲和性，因此，结合物亦具有高度的专一性，同时也就显著地增加了 ELISA 和 EMIT 的测定灵敏度。

以下简要介绍酶标抗体的两种制备方法：

1. 高碘酸(钠)盐氧化法及其发展、改进的三个阶段，酶标抗体结合物是酶免疫分析中的重要试剂，酶结合物的制备是 EIA 或 ELISA 技术中的重要环节。在 ELISA 的研究和应用发展过程中，辣根过氧化物酶(HRP)是最常用和最方便的标记酶，而高碘酸钠氧化制备酶标抗体结合物的方法也是最通用，最易实施的方法。因此，本方法在近 20 年的应用实践中，也得到不断的提高、改进和完善。本方法的三个主要发展阶段：

(1) 1972 年的 Nakane 法，本法需用 FDNB(氟二硝基苯)封闭氨基，但是，在此反应过程中所产生的氟化氢(HF)对酶活性有抑制作用，而且，又不能完全避免自身交联，标记周期需 4、5 天。

(2) 1978 年的 Wilson—Nakane 改良法[22]由于方法(1)存在不少缺点，Wilson 和 Nakane 等人于 1978 年又提出高碘酸钠改良法，本方法的特点是在 $\text{pH}4\sim5$ 条件下，用高碘酸钠直接氧化 HRP，而不需用 FDNB 预先封闭酶的氨基，并在加入抗体(IgG)蛋白之前，反应体系一直保持在低 pH 值条件。利用本方法进行标记的优点是，仅有 5% 的醛化酶(HRP—CHO)发生自身交联，而(1)法发生自身交联率则为 35%，同时，也免除了 FDNB 对酶活性的破坏；其标记周期仅为两天。

(3) 1984 年的 Tussen—Kurstak 改良法[23]Tussen 等在前两个方

法的基础上,进一步改进和简化了用高碘酸钠氧化制备 HRP—Ab 的方法,并对这一标记方法中的关键环节进行了研究。他们指出,高碘酸钠氧化法的中心问题是 NaIO₄ 对酶分子中糖基(严格地说应该是指连二糖基)的氧化。在此氧化过程中,若氧化强度不足,会影响交联标记的效率;但是,如果氧化作用过强,则会导致①氧化结果形成羧基而不是醛基;②酶失活;③形成聚合物,这是因为强氧化所产生的 HRP—CHO 易成为两个 IgG 分子之间的桥分子;④给用 ConA—Sephadex 亲和层析纯化标记结合物带来困难。因此,特别强调要选择最佳氧化条件。由表 2—5 可以看到,高碘酸钠氧化的最佳浓度为 4~8mmol,其结合率可以达到 95%;酶活性可保留 80~90%。由其实验结果表明,高碘酸钠的浓度对于有效的结合和酶活性的保护是非常关键的因素。

除此之外,他们还在以下几方面进行了探讨和改进:

①在标记过程中,试剂系统要使用双蒸水配制,以避免 pH 及水中所含杂质对氧化作用和酶活性产生不良影响;

②在酶与抗体交联时,要加入干燥的 Sephadex G—25,这样可使其迅速吸收反应溶液中的液体,以增加 HRP—CHO 和 IgG 的反应浓度,而小分子交联剂(NaIO₄)则可被分子筛 G—25 吸进微孔中,以借此控制并降低反应系统中 NaIO₄ 的相对浓度。此举有助于加速 HRP—Ab 结合物的形成;

⑤在标记时,所采用的 HRP / IgG 摩尔比应略高于 1 的比例,以

保证 HRP 与 IgG 充分相互结合；

④对 Schiff 氏碱的稳定化作用，是采取类似于还原性甲基化反应的方法进行的，因为硼氢化钠在水溶液中几乎立即水解，所以要重复加入一次，同时孵温时间也缩短许多。

⑥在使用 ConA—Sepharose 亲和层析对结合物进行纯化时，只有在 HRP 的糖基部分没有被 NaIO₄ 过分氧化，即高碘酸钠的浓度低于 15mmol 时，才能进行有效的纯化。

[附]Tussen—Kurstak 改良法简要步骤(时间：1 天)[23]

(1)活化 辣根过氧化物酶(HRP)的活化

①在青霉素瓶中用新鲜配制的 0.5ml[~]0.1mol / L 碳酸氢钠溶液溶解 5mg 纯化的 HRP(用双蒸水配制)；

[配制]0.1mol / L NaHCO₃：16.8mg NaHCO₃ 溶于 2ml 双蒸水中；

(注意：此时溶液颜色呈棕色)

②在上述酶液中逐滴加入新鲜配制的 0.5ml 8[~]16mmol / L NaIO₄(根据 HRP 使用量确定)，加塞，避光，室温(20℃)条件下慢速电磁搅拌反应 2 小时；

[配制]20mmol / L NaIO₄：21.4mg NaIO₄ 溶于 5ml 双蒸水中；

(注意：在滴加 NaIO₄ 的过程中，反应液的颜色应由棕色逐渐变为暗绿色，如无变化，可加少许固体 NaIO₄)

(2)标记 活化 HRP—CHO 与 IgG 交联

①用 0.1mol / L NaHCO₃：pH9.2(1[~]2ml)溶解 15mg 纯化的 IgG；

②将 HRP—CHO 与 IgG 溶液混合，搅拌，把干燥的 5ephadex G—

25 加入其中 (G—25 加入量相当于 HRP 和 IgG 总量的 1 / 6) 室温搅拌反应 2~3 小时,

(3) 稳定化

①从上述交联反应液中离心分离出 Sephadex G—25;

②加入 1 / 20 体积的新鲜配制的 5mg / mlNaBH₄ (在 0. 1mmol / L NaOH 中), 30 分钟后再加入 3 / 20 体积的另外新配制的 NaBH₄ 溶液, 放置一小时, 使 Schiff 氏碱还原成稳定的酶标抗体结合物;

(4) 纯化

用等体积的饱和硫酸铵溶液将结合物和游离的 IgG 沉淀, 收集沉淀物, 用 PBS 溶解并充分透析;

②准备一支小的 ConA—Sepharose 柱, 加入上述溶液, 用 PBS 洗脱游离的 IgG, 吸附的结合物则用含有 0. 01mol / L 甲基— α —D—甘露(糖)吡喃糖苷的 PBS 洗脱;

(说明: 如果 HRP 和 IgG 的纯度较高, 上述纯化过程可以省略);

③在加入等体积的甘油后, 将结合物置于一 20℃ 保存。

2. 异型双功能交联剂 SPDP 制备酶标抗体结合物[17, 18]

酶标抗体结合物的制备, 常使用同型双功能交联剂, 如戊二醛、碳二亚胺等。使用这类交联剂的缺点是在生成结合物的同时, 还不可避免产生酶—酶和抗体—抗体的自身聚合物, 致使结合物产量低, 活性也不高。高碘酸钠法制备的结合物活性虽较高, 但也有一定的自身聚合; 同时由于 Schiff 氏碱的形成, 结合物不稳定, 必需用硼氢化钠还原, 继而又会造成抗体和酶活性的明显丢失, 且此法又仅限于

HRP。Carlsson 等[17]应用异型双功能交联剂 N—琥珀酰亚胺基 3—(2—吡啶基二硫)丙酸酯 (N-SucCinimidyl-3-(2—pyridyldithie)propionate, SPDP) 制备蛋白—蛋白结合物, Nilsson 等[24]应用 SPDP 制备 HRP—IgG 结合物, 中国医学科学院基础医学研究所王世中等[18]SPDP / HRP、SPDP / IgG、HRP / IgG 的不同使用比例对交联标记产物活性的影响进行了研究, 以期获得活性较高的酶标抗体结合物, 同时还研究了从结合物中除去游离 HRP 和游离 IgG 的方法。

SPDP 法制备 HRP—IgG 结合物简要步骤:

1) 用 SPDP 处理 HRP: 5mg HRP, 溶于 0.5ml 0.1mO1 / L PBS (pH7.5) 中, 迅速滴入一定量(表 2—6) SPDP 液(溶于无水乙醇), 在 23~25. C 反应 30 分钟, 同时轻轻搅拌。反应结束后, 将反应液通过 Sephadex G—25 往以除去多余的 SPDP 及副产物, 平衡及洗脱液均为 0.1mO1 / L 醋酸缓冲液; pH4.5 (含 0.1mO1 / L NaCl)。收集酶蛋白部分(简称 HRP—PDP), 必要时进行浓缩。

2) 用 SPDP 处理 IgG: 基本上与 HRP 的处理步骤相同, 仅在用 G—25 分离时, 平衡及洗脱缓冲液是 0.1mO1 / L PBS pH7.5, 收集 IgG 部分(简称 IgG—PDP), 必要时进行浓缩。

3) HRP—PDP 的还原: 取上述 HRP—PDP 溶液, 加入固体 DTT(二硫苏糖醇), 使其终浓度达到 25mmO1 / L, 在 23~25℃ 反应约 25 分钟, 不时搅拌。反应结束后, 过 Se—phadex G—25 柱。平衡及洗脱缓冲液为 0.1mO1 / L PBS pH7.5, 收集酶蛋白部分(简称 HRP—SH), 必

要时进行浓缩。

置 20 小时，不时取出轻摇，再放回 4（℃）冰箱中；反应结束后，将溶液浓缩至 0.5ml。其中产物主要是 HRP—IgG 结合物。

5) HRP—IgG 中游离 HRP 的除去：用 Sephacryl S—200，层析柱为 67×1.3cm，床体积为 88ml，平衡及洗脱缓冲液均为 0.01mol / L PBS pH7.5，收集第一峰，测定各管 A280nm 和 A403nm，第二峰主要是游离的 HRP，呈浅棕色。

6) HRP—IgG 中游离 IgG 的去除：在 HRP—IgG 结合物中可能含有少量游离 IgG，需用 ConA—Affi—Gel 柱除去。

7) 在上述标记过程中，凡涉及 G—25 层析步骤时，均可以透析法代替之。

(五) 酶与半抗原的交联

由于酶标半抗原与人工抗原都是由蛋白质(酶蛋白或载体蛋白)与小分子化合物(药物，毒物，激素等)组成的结合物(表 2—7)。因此，两者的交联制备方法从化学角度来看，是完全相同或基本类似的。所以，用作免疫原的人工抗原(即半抗原与载体蛋白结合物)的制备方法，大体上都可用作酶免疫分析试剂的酶标半抗原结合物的制备。但是，两者亦有差异。

酶标半抗原是作为酶免疫分析(ELISA 或 EMIT)的检测试剂(称检测抗原)，因此，要求此结合物既有酶的活性，又具有抗原活性；而

人工抗原则是作为免疫原的，其中的半抗原只有与载体蛋白结合后才具有免疫原性，在这里，载体蛋白仅仅作为载体，以在被免疫的动物体内诱导产生抗体。所以，在进行化学交联时，对两种交联产物(结合物中蛋白活性的要求差异很大，对于酶蛋白应尽量保持其活性，对于载体蛋白则无严格要求，一般地说，只要不变性即可。