

高效价胰岛素抗体的制备*

刘 忠 陈定中 吕 植

(海 军 总 医 院)

人血液中胰岛素的含量极微，为了提高胰岛素放射免疫分析的灵敏度，必须有高效价的胰岛素抗体。但因胰岛素分子量较小，抗原性差，不易获得高效价抗体。同时在免疫过程中，由于胰岛素的降糖作用，常常造成被免疫动物的死亡。因此制备高效价胰岛素抗体就比较困

难。

1978年5月至12月，我们在制备胰岛素抗血清的过程中，产生高效价抗体的动物比率

* 在抗体制备过程中，承蒙中国科学院动物研究所范果仪同志和解放军总医院李振甲同志热情帮助指导，特此感谢。

较高, 获得大量可用于胰岛素放射免疫分析用的抗血清, 取得了一些初步经验, 现介绍如下:

一、材料和方法

1. 免疫原: 上海生物化学制药厂出品的药用猪胰岛素(针剂, 40 单位/毫升)。

2. 乳剂制备: 用高压灭菌的福氏完全佐剂 30 毫升, 置于乳钵中, 边研边滴加免疫用胰岛素 30 毫升, 使成均匀乳剂, 至乳剂滴入水中呈不散开状态, 制成的乳剂含胰岛素约 30 单位/毫升。

3. ^{125}I -胰岛素: 放射性比强度 120 微居里/微克, 由中国科学院 401 所标记。

4. 动物选择及免疫方法: 取健康豚鼠 39 只 (35♂, 4♀), 体重为 200—800 克, 大多数选用 300—500 克之间的豚鼠, 因免疫时比较敏感。

首次免疫用 0.1 毫升乳剂于豚鼠后脚垫皮下注射 (见表 1)。两周后在腹股沟两侧各注射 0.5 毫升 (30 单位/毫升) 进行第二次免疫, 以后每月免疫一次, 于背部、臀部、腹部等部位交替多点皮下注射, 在第四次免疫注射后, 测得 1 号豚鼠已有 1:4 万抗体 (免疫 106 天), 从而有计划免疫 3 个月左右以后开始对每只豚鼠进行效价测定。

5. 胰岛素抗体效价测定: 均在豚鼠注射后第 10 天陆续从心脏采血进行效价测定, 所得抗血清按不同稀释度 (1×10^{-4} 、 2×10^{-4} 、 4×10^{-4} 、 8×10^{-4} 、 16×10^{-4}) 进行稀释, 然后与 ^{125}I -胰岛素 (每管约 10,000 脉冲/分) 在 4°C 下保温 12 小时, 用聚乙二醇 (PEG) 系统¹⁾ 进行分离, 根据抗体稀释曲线计算效价 (以 B/T 结合 50% 为抗体的效价)。

6. 剂量反应曲线的测定: 按文献¹⁾ 报道的方法作如下的改进: 将稀释的抗血清与不同剂量的标准胰岛素 (0.25—16 微单位) 在 4°C 下反应 12 小时, 然后加入标记胰岛素, 在 4°C 下再反应 12 小时, 仍采用 PEG 系统进行分离。

二、结 果

我们共免疫豚鼠 39 只, 死亡 9 只 (均为 500—800 克重的雄豚鼠), 存活 30 只 (200—400 克重的 26 只雄豚鼠和 4 只雌豚鼠), 存活

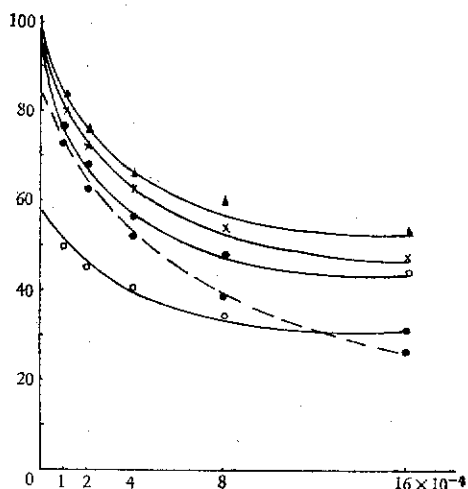


图 1 不同抗体稀释效价曲线

▲—▲ 7号抗体 ○—○ 20号抗体
×—× 27号抗体 - - - 2号抗体
●—● 4号抗体

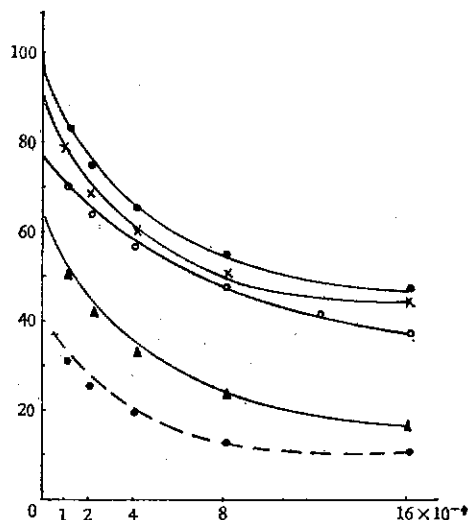


图 2 不同抗体稀释效价曲线

●—● 12号抗体 ○—○ 17号抗体
×—× 21号抗体 - - - 15号抗体
▲—▲ 25号抗体

1) 《放射免疫分析及其它放射体外测定方法》编辑组 放射免疫分析及其它放射体外测定方法 167 原子能出版社, 1976。

表 1 30 只豚鼠抗体产生情况

抗体稀释分组*	1:1 万以下	1:1—2 万	1:3—5 万	1:6—9 万	1:10—18 万
最终稀释度**	2×10^{-4}	$4-8 \times 10^{-4}$	$12-20 \times 10^{-4}$	$24-36 \times 10^{-4}$	$40-72 \times 10^{-4}$
豚鼠只数	1	4	6	13	6
%	2.9	13.7	20.6	44.8	20.6

* 抗体稀释度是指 $B/T = 50\%$ 时的抗体稀释倍数即抗体效价。

** 最终稀释度是指抗体在放射免疫分析中的浓度。

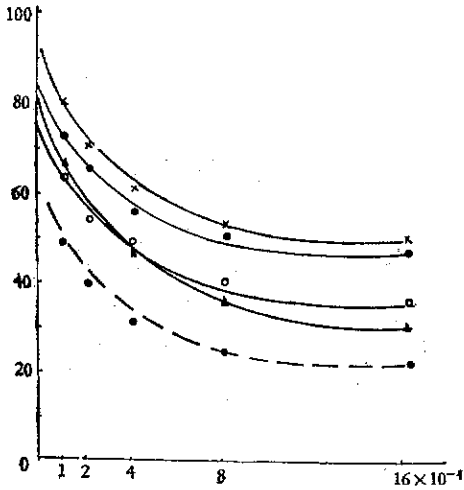


图 3 不同抗体稀释效价曲线

- 18 号抗体
- ×—× 23 号抗体
- ▲—▲ 30 号抗体
- 11 号抗体
- 22 号抗体

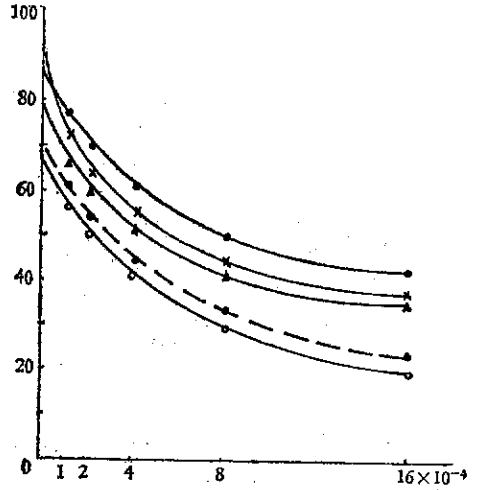


图 4 不同抗体稀释效价曲线

- 1 号抗体
- ×—× 16 号抗体
- ▲—▲ 14 号抗体
- 28 号抗体
- 29 号抗体

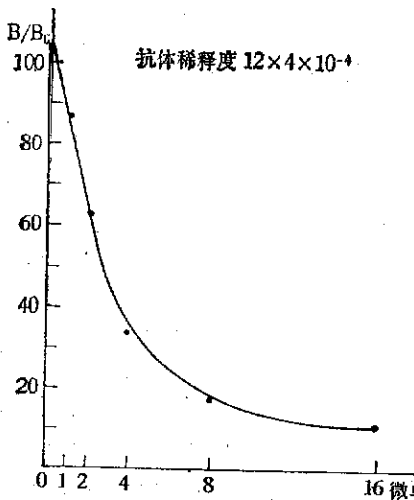


图 5 12 号抗体制作的标准曲线

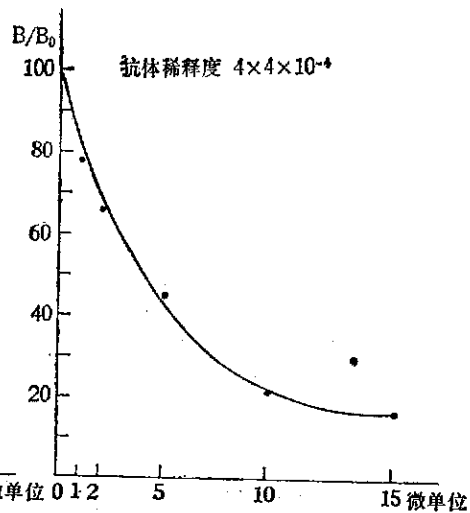


图 6 1 号抗体制作的标准曲线

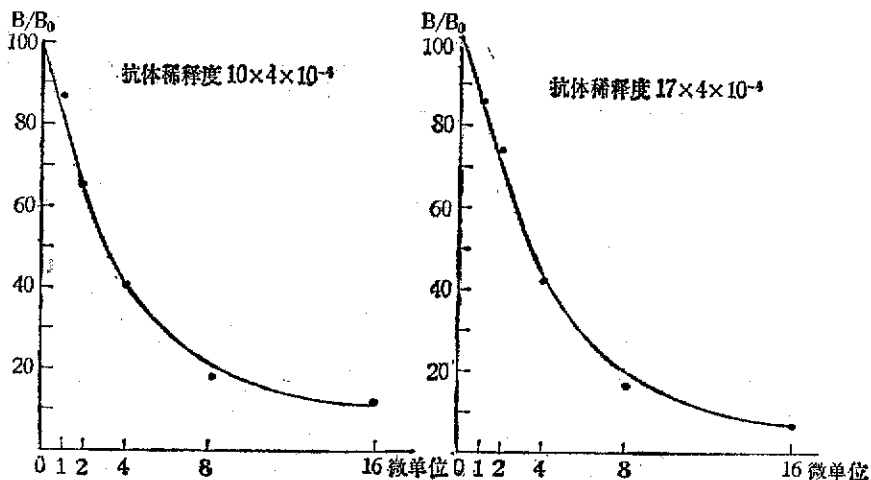


图7 21号抗体制作的标准曲线

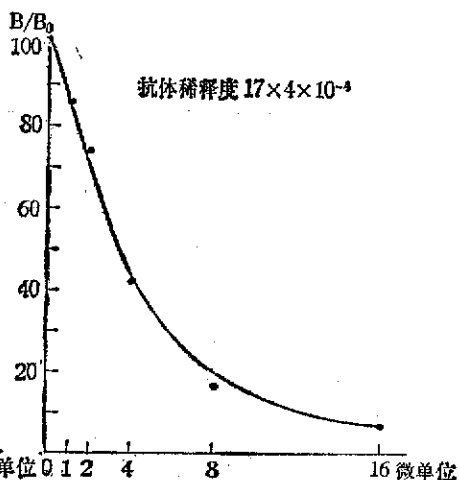


图8 23号抗体制作的标准曲线

率为77%。根据抗体稀释曲线计算其抗体的效价,1:1万以上效价的豚鼠有29只,占存活豚鼠的96.6%(见图1—4)。从剂量反应曲线的斜率分析,这些抗体均可应用于放射免疫分析。从表1可以看到1:6万以上的高效价抗体占多数(65.5%),其中最高效价达1:18万,最终稀释度为 72×10^{-4} 。

这些高效价抗体的灵敏度(最低可测量)为0.0315—0.0500微单位(见图5—11)。

第一批豚鼠在第四次免疫后,陆续发生死亡,并且均在夜间死亡,其病状均未见到。以后我们就加强观察,发现动物多在每天下午6—9

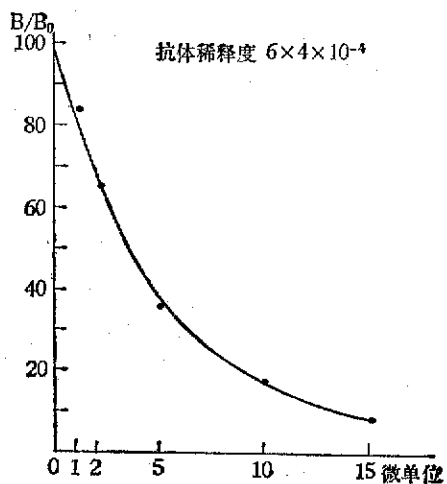


图10 6号抗体制作的标准曲线

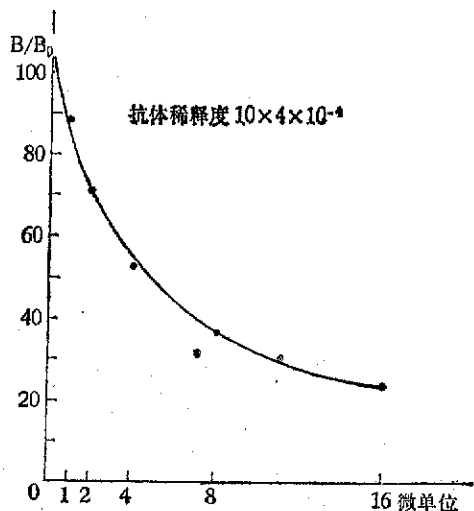


图9 4号抗体制作的标准曲线

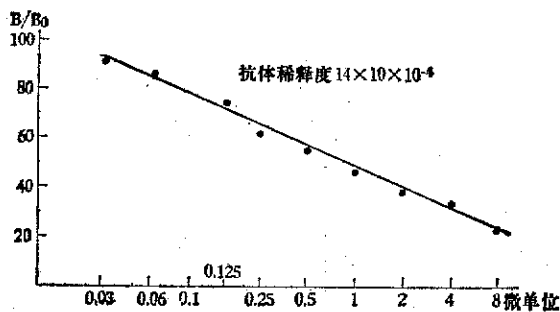


图11 低剂量区标准曲线的直线变换

时发病,其病状大体分四种类型:

1. 豚鼠卧倒、抽搐、吐白沫、腹部松软以至昏迷,处于濒死状态,多在夜间发病,可疑为低

血糖病，立即反复多次喂给浓白糖水，观察 12 小时待豚鼠完全恢复后送回饲养室。这样的豚鼠有 11 只。

2. 有的豚鼠表现明显腹胀，肠鸣音消失，也处于濒死昏迷状态，可能是低血糖伴发低血钾症，立即喂给胃蛋白酶 5 毫升，酵母片 4 片，过 30 分钟后排尿排便，腹胀消失，再喂给麦乳精、浓白糖水多次，直至动物完全清醒为止。这样的豚鼠有 3 只。

3. 还有的豚鼠表现消瘦、体质差、毛色不佳、精神萎靡，食欲差等慢性过程，可能因免疫反应严重所引起。凡此类豚鼠（共有 13 只）都易发生前两种情况，故应精心饲养，一见发病及时救治。

4. 豚鼠注射部位局部脱毛，形成寒性溃疡及窦道等，进行局部处理即可。

根据我们的观察，凡是有上述四种反应而且比较严重的豚鼠，都是产生高效价抗体的豚鼠。相反，凡是健壮豚鼠则不易产生抗体或产生低效价抗体。

对产生抗体的豚鼠进行解剖并作病理切片检查，可见腹腔、胸腔广泛粘连，胰腺组织明显减少，由脂肪组织取代（胰腺脂化）；残余胰腺组织及胰岛未见异常；胰腺间脂肪组织中有淋巴结组织增生，其中有淋巴滤泡及生发中心。肝脾肿大且与胰腺粘连，部分肝索间血窦充血及肝细胞明显肿胀，少数汇管区有较多淋巴细胞

浸润。

对于产生有适用抗体的豚鼠，一般一次采血致死，大约可采 20—30 毫升，有时豚鼠在取血 20 毫升时，只要不发生严重脑缺血抽搐，并得到及时救治，使其渡过濒死状态，仍可存活。经过一定时期恢复后（一般在半个月后）可继续免疫，还可产生更高效价的抗体。例如 8 号豚鼠原抗体效价为 1:7 万，在采 20 毫升血后经救治而存活，经两次免疫后获得 1:16 万的更高效价抗体。这种能进行两次心脏采血的豚鼠有 8 只。

由于大剂量的抗原易引起动物的免疫耐受性，因此近年来一般倾向于用低浓度的抗原致敏（通常在 0.05—0.10 毫克之间）¹⁾，我们则采用大剂量抗原致敏（1.25 毫克），半数以上的动物都能产生高效价抗体。据了解，国内一些单位用低剂量的胰岛素（少于 1 毫克）免疫豚鼠，形成高效价的比例很少。看来用胰岛素作免疫原可能必须用高浓度，这可能与胰岛素分子量较小有关。对这个问题需要进一步研究，以期为一些低分子量蛋白质的抗体的制备提供更有效的途径。当然大剂量的胰岛素常引起动物低血糖休克，容易造成死亡。但如对免疫动物精心饲养，严密观察和积极救治，则可以避免死亡。

1) Felber, J. P. 1976 Methods of Biochemical Analysis Vol. 22, p. 17.