

# CD58 抗体的制备及其检测方法的建立

秦新喜, 盛宏霞, 靳亚平, 宋毓民, 席丽, 苏圣华, 李倩, 杨艳

(西北农林科技大学 动物医学院, 农业部家畜内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】建立 CD58 特异性抗体的制备方法, 及检测 CD58 抗体的间接 ELISA 方法。【方法】用 CD58 混合弗氏佐剂和兔淋巴细胞吸附 CD58 的方法免疫家兔获取 CD58 的抗体, 双向免疫扩散试验检测抗体特异性, 间接 ELISA 检测抗体水平。【结果】两种方法都能够使动物机体产生免疫应答; 双向免疫扩散试验证实, 弗氏佐剂法获得 2 种抗体, 淋巴细胞吸附法制备抗原可获得 1 种抗体; 间接 ELISA 检测法 CD58 的最适包被浓度为 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 最佳封闭液为 10 g/L 明胶, 辣根酶标记的羊抗兔 IgG 工作浓度为 1 : 2 000。【结论】兔淋巴细胞吸附法可制备针对 CD58 的单一抗体, 间接 ELISA 检测方法可以用于 CD58 抗体水平的检测。

**【关键词】** CD58; ELISA; 抗体

**【中图分类号】** S852.4<sup>+</sup>3

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2008)10-0061-05

## Preparation of CD58 antibody and the establishment of its detection method

QIN Xin-xi, SHENG Hong-xia, JIN Ya-ping, SONG Yu-min, XI Li,  
SU Sheng-hua, LI Qian, YANG Yan

(Key Open Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Engineering of the Ministry of Agriculture,  
College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】The study was to develop the method of preparation of specificity CD58 antibody with the purification CD58 from sheep, and to establish the indirect ELISA method of testing CD58 antibody. 【Method】The unique antibody can be obtained by CD58 antigen and the mix Freund's adjuvant and CD58 antigen obtained by rabbit lymphocyte absorption. The double immunodiffusion tests the specificity, and indirect ELISA tests the antibody level. 【Result】The immunologic response can be made by two methods. The double immunodiffusion test indicated that two antibodies can be obtained by the mix Freund's adjuvant, as one antibody can be obtained by another method. The most suitable concentration of coating antigen was 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the most suitable block liquid 10 g/L Gelatin, and the working concentration of enzyme labeled goat-anti-rabbit antibody 1 : 2 000. 【Conclusion】The rabbit lymphocyte absorption can obtain the unique CD58 antibody, and the indirect ELISA can be used to detect the antibody level of CD58.

**Key words:** CD58; ELISA; antibody

CD58 又称淋巴细胞功能相关抗原-3 (lymphocyte function-associated antigen-3, LFA-

3), 分子质量为 55~70 ku, 广泛分布于体内多种细胞及血小板表面。CD58 与红细胞免疫有直接关

\* [收稿日期] 2007-11-09

[基金项目] 西北农林科技大学青年骨干教师支持计划项目(01140305)

[作者简介] 秦新喜(1982-), 男, 山东潍坊人, 在读硕士, 主要从事家畜生殖内分泌研究。E-mail: qinxinxi@163.com

[通讯作者] 靳亚平(1966-), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医产科学和家畜生殖内分泌研究。E-mail: yapingjin@163.com

系,是红细胞发挥免疫黏附能力的分子基础,在机体非特异性免疫中占有重要地位。有研究证实,CD58 对子宫局部细胞因子网络形成及调节具有潜在作用,与早孕因子(EPF)之间存在抗原交叉性<sup>[1-2]</sup>,这为通过对 CD58 的测定进行早期妊娠诊断提供了可能。目前,对 CD58 检测主要是通过玫瑰花环抑制试验,该法程序繁琐,影响因素多,缺乏统一的标准。因此,建立一种灵敏特异的检测 CD58 的 ELISA 方法具有重要意义。本试验利用纯化的 CD58 获取特异性抗体,并据此建立了检测 CD58 抗体的间接 ELISA 方法,以期获取特异性抗体提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 绵羊和家兔由西北农林科技大学实验动物中心提供,常规饲养。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基、弗氏佐剂、二甲基亚砷(DMF)、吐温-20(Tween-20)、兔 IgG(北京鼎国生物技术有限责任公司),辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG(北京中山试剂公司),300 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(北京化工厂),3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Amresco),其他试剂均为分析纯。包被缓冲液、稀释液、洗涤缓冲液、封闭液、底物液和终止液均按文献<sup>[6]</sup>的方法配制。

1.1.3 仪器 CO<sub>2</sub> 培养箱(TE-HER Water-Jackat),洁净工作台(北京半导体设备一厂),生物倒置显微镜(Conic XDS-1B),酶标分析仪(SUNRISE),电子分析天平(Denver),低温高速离心机(德国 Hermle 公司),普通离心机(北京医疗仪器厂),微量可调移液器(NICHIRYO),酶标板(96 孔, Costar)。

### 1.2 CD58 抗原的制备

以绵羊为试验动物,参照靳亚平等<sup>[3-5]</sup>的方法,用酶消化、柱层析法制备 CD58 抗原,SDS-PAGE 检测其纯度,玫瑰花环抑制试验检测其活性。

### 1.3 动物免疫

取 6~8 周龄、质量约 1 kg 的健康家兔,按弗氏佐剂法和淋巴细胞吸附法免疫家兔<sup>[6]</sup>。

1.3.1 弗氏佐剂法 用弗氏完全佐剂与等体积 PBS 稀释的 CD58 混合液充分乳化后制备免疫原,按每只家兔 1 mg CD58 的剂量免疫,分 3 点颈背部皮下注射<sup>[7-8]</sup>。用弗氏不完全佐剂与 CD58 制备的免疫原加强免疫,每次免疫间隔 2 周,共免疫 2 次。

第 2 次加强免疫后 7 d 采血,检测抗体水平<sup>[9]</sup>。再用弗氏不完全佐剂与 CD58 制备的免疫原加强免疫 1 次后 7 d,检测抗体水平,心脏采血,分装血清,-20 ℃ 储存备用。

1.3.2 淋巴细胞吸附法 无菌采取待免疫家兔新鲜抗凝血液 5 mL,用淋巴细胞分离液常规密度梯度离心,收集淋巴细胞,加 PBS 5 mL 于 1 500 r/min 离心 10 min,洗涤 3 次,再用 RPMI 1640 洗涤 1 次,计数细胞。用 RPMI 1640 调细胞浓度至  $5.0 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>,按每 2 mL 细胞悬液加入 1 mL 含 1 mg/mL CD58 的 PBS 的比例,向细胞悬液中加 CD58,37 ℃ 作用 30 min,洗涤 3 次弃去上清,分 3 点颈背部皮下注射免疫家兔。免疫 3 次后,检测抗体水平<sup>[9]</sup>,并加强免疫 1 次后,分离血清保存备用。

### 1.4 CD58 抗体特异性的检测

采用双向免疫扩散试验,检测两种免疫方法获得的抗 CD58 抗体的特异性<sup>[10]</sup>。

### 1.5 CD58 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

1.5.1 酶标抗体最适稀释度的确定 用 1.0 μg/mL 的兔 IgG 包被酶标板,37 ℃ 孵育 2 h,洗涤。将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(二抗)用稀释液稀释为 1:1 000,1:1 500,1:2 000,1:3 000,1:4 000 和 1:5 000 共 6 个不同稀释度,进行 ELISA 检测,取 OD 值接近 1.0 时的二抗稀释度作为酶标抗体的工作浓度。

### 1.5.2 CD58 抗原包被最适浓度及封闭剂的确定

采用棋盘滴定法<sup>[11-13]</sup>确定包被抗原(CD58)的工作浓度:用包被缓冲液将 CD58 稀释至 10.0,1.00 和 0.10 μg/mL,以每孔 100 μL 分别包被酶标板。用不同封闭剂(50,10,5 和 1 g/L 的明胶、OVA 和 BSA)封闭,同时做阳性血清、阴性血清和空白对照。用 1.5.1 确定的酶标抗体工作浓度对免疫获得的血清与阴性血清进行检测,于 450 nm 处测定 OD 值,计算 P/N 值(阳性血清 OD<sub>450 nm</sub> - 空白 OD<sub>450 nm</sub>) / (阴性血清 OD<sub>450 nm</sub> - 空白 OD<sub>450 nm</sub>),并确定抗原最适包被浓度和封闭液及其浓度。

### 1.6 CD58 抗体的检测

按本试验 1.5 中确定的条件,将 CD58 稀释至工作浓度,每孔加 100 μL,37 ℃ 孵育 3 h,弃去孔内液体,将 PBS 与 5 mL/L Tween-20(PBST)混合液加入酶标板中,静置 3 min,弃去液体(以下简称洗涤),如此洗涤 3 次;加封闭液 100 μL,37 ℃ 温箱放置 1 h 后洗涤;将阳性血清与阴性血清按一定梯度稀释后每孔加入 100 μL,空白对照孔加入等量的

PBS, 37 °C 温箱放置 1 h 后洗涤; 每孔加入 1 : 2 000 二抗 100  $\mu$ L, 37 °C 温箱放置 1 h 后, 洗涤, 加入新鲜配制的 TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物液 100  $\mu$ L/孔, 37 °C 作用 30 min; 按 50  $\mu$ L/孔加 2 mol/L 硫酸终止液, 15 min 内用酶标仪于波长 450 nm 处测定 OD 值。待检血清的阳性判定标准为:  $(OD_{\text{试验}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \geq 2.1$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 CD58 的纯度与活性

由图 1 CD58 的 SDS-PAGE 检测结果可见, 主要的蛋白条带位于 66.4 ku。玫瑰花环抑制试验检测 Et 花结抑制率为  $(62.01 \pm 2.06)\%$ 。

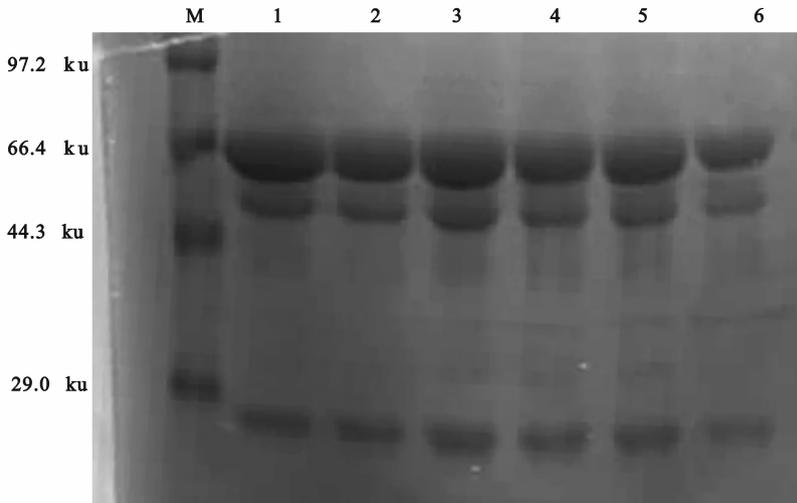


图 1 CD58 的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 低分子量标准蛋白; 1~6. 纯化的 CD58

Fig. 1 Result SDS-PAGE of CD58

M. Protein MW Marker(Low); 1-6. The purified CD58

### 2.2 CD58 抗体的特异性

双向免疫扩散试验表明, 弗氏佐剂法获得的血清与 CD58 之间形成 2 条沉淀带, 抗体琼扩效价为 23; 淋巴细胞吸附法分离的血清与抗原之间形成 1

条沉淀带, 抗体琼扩效价为 22。后一种方法获得抗体形成的沉淀带, 与弗氏佐剂免疫获得抗体形成的 1 条沉淀带之间形成圆滑融合(图 2); 图 2 B 为冻存血清的双向免疫扩散试验结果。

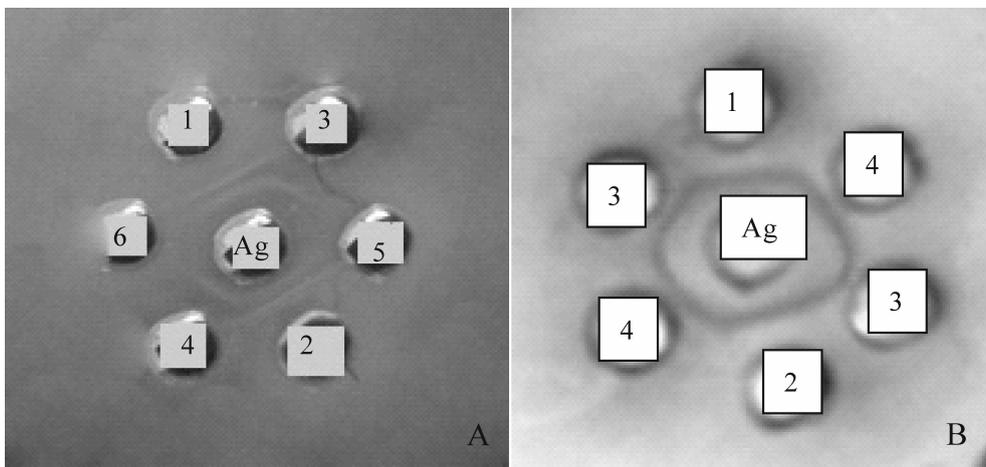


图 2 CD58 抗体的双向免疫扩散试验

A. 新鲜血清; B. 冻存后的血清; 1, 2. 混合弗氏佐剂法获得的血清; 3, 4. 淋巴细胞吸附法获得的血清; 5, 6. 阴性血清; Ag. CD58

Fig. 2 Double immunodiffusion test of CD58-antibody

A. Fresh serum; B. Frozen serum; 1, 2. The serum of mix Freund's adjuvant; 3, 4. The serum of rabbit lymphocyte absorption; 5, 6. The negative serum; Ag. CD58

## 2.3 CD58 间接 ELISA 的最适条件

试验结果(表 1)表明,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 抗体稀释度为 1 : 2 000 和 1 :

3 000 时,OD<sub>450 nm</sub> 值最接近 1.0,1 : 2 000 时其 OD<sub>450 nm</sub> 值为 1.117,而 1 : 3 000 时,OD<sub>450 nm</sub> 值为 0.896。故选择 1 : 2 000 作为工作浓度。

表 1 HRP-山羊抗兔 IgG 的工作浓度

Table 1 Working concentration of HRP-goat-anti-rabbit antibody

吸光度 Absorbance	酶标抗体稀释度 The concentration of enzyme labeled antibody					
	1 : 1 000	1 : 1 500	1 : 2 000	1 : 3 000	1 : 4 000	1 : 5 000
OD <sub>450 nm</sub>	1.574	1.331	1.117	0.896	0.793	0.345

由表 2 可知,当抗原 CD58 浓度为 10 μg/mL 包被酶标板,封闭液为 10 g/L 的明胶时,P/N 值最

表 2 抗原 CD58 工作浓度与封闭液及其浓度的确定

Table 2 Detection of CD58 antigen and block liquid working concentration

封闭液 Confining	含量/(g · L <sup>-1</sup> ) Content	试验组 CD58 浓度/(μg · mL <sup>-1</sup> ) Experimental groups content of CD58			对照组 CD58 浓度/(μg · mL <sup>-1</sup> ) Control groups content of CD58		
		10.0	5.0	1.0	10.0	5.0	1.0
明胶 Gelatin	50	1.396	0.439	0.108	0.065	0.058	0.053
	10	1.545	0.436	0.115	0.064	0.076	0.063
	5	1.634	0.513	0.140	0.085	0.091	0.079
	1	1.784	0.511	0.107	0.075	0.082	0.059
BSA	50	1.162	0.270	0.077	0.056	0.061	0.065
	10	1.339	0.482	0.382	0.094	0.108	0.104
	5	1.268	0.260	0.130	0.090	0.105	0.109
	1	1.367	0.417	0.196	0.078	0.127	0.110
OVA	50	1.012	0.249	0.095	0.074	0.082	0.072
	10	1.210	0.311	0.099	0.076	0.116	0.088
	5	1.449	0.442	0.133	0.094	0.119	0.129
	1	1.632	0.494	0.111	0.080	0.091	0.086

## 2.4 CD58 抗体水平的检测

利用确立的间接 ELISA 方法检测 CD58 的抗体效价,弗氏佐剂法(试验组 1)免疫家兔获得的血

清抗体效价为 1 : 1 × 10<sup>6</sup>;淋巴细胞吸附法(试验组 2)免疫家兔分离的血清抗体效价是 1 : 1 × 10<sup>5</sup>(表 3),与双向免疫扩散试验结果相符。

表 3 CD58 抗体检测的间接 ELISA 法试验结果

Table 3 Results of CD58 -antibody by indirect ELISA

血清稀释度 Serum dilution	OD <sub>450 nm</sub>				P/N	
	试验组 1 Group 1	试验组 2 Group 2	阴性血清 Negative serum	空白对照 Blank control	试验组 1 Group 1	试验组 2 Group 2
1 : 1 × 10 <sup>3</sup>	2.522	1.317	0.094	0.037	44.00	22.46
1 : 5 × 10 <sup>3</sup>	1.469	0.643	0.090		27.02	11.43
1 : 1 × 10 <sup>4</sup>	1.022	0.405	0.092		17.91	6.69
1 : 2 × 10 <sup>4</sup>	0.853	0.255	0.075		21.47	4.95
1 : 5 × 10 <sup>4</sup>	0.775	0.192	0.073		20.50	4.31
1 : 1 × 10 <sup>5</sup>	0.569	0.136	0.083		11.57	2.15
1 : 2 × 10 <sup>5</sup>	0.393	0.096	0.069		11.13	1.84
1 : 5 × 10 <sup>5</sup>	0.244	0.094	0.070		5.67	1.73
1 : 1 × 10 <sup>6</sup>	0.176	0.090	0.074		3.76	1.43
1 : 2 × 10 <sup>6</sup>	0.127	0.076	0.080		2.09	0.91
1 : 5 × 10 <sup>6</sup>	0.102	0.078	0.075		1.71	1.08

## 3 讨论

CD58 的分子质量为 55~70 ku,试验中参考靳亚平等<sup>[3-4]</sup>的方法,制备绵羊源 CD58,SDS-PAGE 显示 66.4 ku 的蛋白条带为主要蛋白质,玫瑰花环

抑制试验表明其有很高的活性,说明分子质量为 66.4 ku 的蛋白为目的蛋白,但 SDS-PAGE 显示除目的蛋白外,还有分子质量大约为 44.3 和 29.0 ku 的蛋白存在,推测可能是 CD58 在制备过程中降解的产物。说明该法制备的 CD58 还不够纯,直接用

其制备抗体可能会出现非特异性抗体,因此,需要在以后的试验中进一步改进方法,提纯出单一蛋白质。

CD58 是淋巴细胞表面分子 CD2 的天然配体。CD2 与 CD58 的结合,是体外进行玫瑰花环试验的理论依据。本试验利用家兔自身淋巴细胞表面分化抗原 CD2 与绵羊源的配体 CD58 相互作用获取抗原,免疫家兔,ELISA 抗体水平达到  $1 \times 10^5$ ,琼扩试验显示为单一沉淀线。说明利用细胞表面配体与受体之间的相互作用,不加免疫佐剂免疫动物的方法是完全可行的,同时为制备抗体提供了新的思路。

本试验用两种方法免疫动物,其中弗氏佐剂法免疫家兔,机体抗体水平更高;而淋巴细胞吸附法免疫家兔,使抗原 CD58 更单一,免疫家兔后,抗体效价达到了较高的水平。试验证实,抗原 CD58 混合弗氏佐剂的免疫方式得到的抗体与 CD58 形成 2 条沉淀线,淋巴细胞吸附的方式得到的抗体,与 CD58 形成 1 条沉淀线。说明淋巴细胞吸附法获取了单一性抗原,免疫家兔所获抗体水平低于弗氏佐剂法,推测可能是吸附在淋巴细胞表面的抗原 CD58 的免疫剂量不足,这有待于在今后试验中进一步探讨。这也说明本试验制备的 CD58 单一抗原的方法与理论依据相符,完全可以在试验研究中用来制备单一抗体。

本试验还对间接 ELISA 检测方法中的抗原 CD58 的包被浓度、封闭液及其浓度等条件进行了筛选,确立了检测 CD58 抗体的最佳工作条件,建立了快速、灵敏的检测 CD58 抗体的间接 ELISA 方法,为检测 CD58 提供了理论依据。

## [参考文献]

- [1] 马勇江,靳亚平,王爱华,等. CD58 与山羊早孕因子之间关系的研究 [J]. 畜牧兽医学报,2003,34(2):152-156.  
Ma Y J, Jin Y P, Wang A H, et al. Study on the relationship between CD58 and EPF in goat [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2003, 34(2): 152-156. (in Chinese)
- [2] 马勇江,靳亚平,曹斌云,等. CD58 对妊娠早期山羊子宫局部细胞因子的调节 [J]. 中国兽医学报,2003,23(1):90-93.  
Ma Y J, Jin Y P, Cao B Y, et al. Regulation of the local-uterine cytokines by CD58 during early pregnancy in goat [J]. Chin J Vet Sci Jan, 2003, 23(1): 90-93. (in Chinese)
- [3] 靳亚平,王爱华,肖俊杰,等. CD58 对猪 PBMC 活化的作用 [J]. 西北农业大学学报,1998,26(2):62-67.  
Jin Y P, Wang A H, Xiao J J, et al. Activation of pig PBMC induced by CD58 [J]. Acta Universitatis Agricolae Boreali-occidentalis, 1998, 26(2): 62-67. (in Chinese)
- [4] 靳亚平,王爱华,武浩,等. CD58 对山羊妊娠早期子宫 IEL

的活化作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2001,17(4):392-393.

Jin Y P, Wang A H, Wu H, et al. Activation of the uterine IEL induced by CD58 during early pregnancy in goat [J]. J Cell Mol Immunol, 2001, 17(4): 392-393. (in Chinese)

- [5] Richard J Simpson. 蛋白质与蛋白质组学实验指南 [M]. 何大澄,译. 北京:化学工业出版社,2006:776-786.  
Richard J Simpson. Proteins and proteomics: A laboratory manual [M]. He D C, Translation. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 776-786. (in Chinese)
- [6] 焦奎,张书圣,孙伟,等. 酶联免疫分析技术及应用 [M]. 北京:化学工业出版社,2004:96-107.  
Jiao K, Zhang S S, Sun W, et al. Enzyme linked immunosorbent assay techniques and applications [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 96-107. (in Chinese)
- [7] 周光炎. 免疫学原理 [M]. 上海:科学技术文献出版社,2000.  
Zhou G Y. Principles of immunology [M]. Shanghai: Scientific and Technical Documents Publishing House, 2000. (in Chinese)
- [8] 辛华. 细胞生物学实验 [M]. 北京:科学出版社,2004.  
Xin H. Cell's biological experiment [M]. Beijing: Science Press, 2004. (in Chinese)
- [9] 崔贞亮,李红飞,吴庆侠,等. LH 抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 西北农业学报,2007,16(3):26-28.  
Cui Z L, Li H F, Wu Q X, et al. Development of indirect ELISA for detecting LH antibody [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2007, 16(3): 26-28. (in Chinese)
- [10] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1998:75-77.  
Shen G X, Zhou R L. Modern experimental technology of immunology [M]. Wuhai: Hubei Science & Technology Press, 1998: 75-77. (in Chinese)
- [11] 范国英,王建华,朱金凤,等. 抗链霉素杂交瘤细胞株的建立与竞争 ELISA 试剂盒的研制 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(4):46-50.  
Fan G Y, Wang J H, Zhu J F, et al. Filtration of hybridoma lines and development of rapid test competitive ELISA kit for streptomycin [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(4): 46-50. (in Chinese)
- [12] 沈建忠,何方洋,何继红,等. 动物组织中磺胺二甲嘧啶残留检测 ELISA 试剂盒的研制 [J]. 中国兽医杂志,2003,39(6):6-8.  
Shen J Z, He F Y, He J H, et al. Development of an enzyme linked immunosorbent assay kit for sulfmethazine in animal tissues [J]. Chin J Vet Sci Jan, 2003, 39(6): 6-8. (in Chinese)
- [13] 宫慧芝,计融,杨军,等. 伏马菌素 B1 免疫学检测方法的建立 [J]. 中国公共卫生,2006,22(7):840-842.  
Gong H Z, Ji R, Yang J, et al. Establishment of immunoassay for detecting fumonisin B1 [J]. China J Public Health Jul, 2006, 22(7): 840-842. (in Chinese)