

# 抗人 $\alpha_2$ 微球蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

杜惠芬, 李克生, 连晓雯, 袁明, 叶文华

(甘肃省医学科学研究院医学生物技术中心, 甘肃兰州 730050)

[摘要] 目的: 制备抗人  $\alpha_2$  微球蛋白( $\alpha_2$ -microglobulin,  $\alpha_2$ -MG)单克隆抗体并对其进行鉴定。方法: 用高纯度的  $\alpha_2$ -MG 免疫 BALB/C 小鼠, 按常规技术制备针对  $\alpha_2$ -MG 不同抗原表位的单克隆抗体, 并对其进行纯化, 测定抗体亚类、抗原表位分析等。结果: 筛选出 10 株抗人  $\alpha_2$ -MG 杂交瘤细胞株, ELISA 间接法证实这组单克隆抗体仅与  $\alpha_2$  微球蛋白反应, 而与其他蛋白无交叉反应, IgG 亚类鉴定 6 株为 IgG1, 2 株为 IgG2a, 1 株为 IgA, 1 株为 IgM。结论: 获得特异性的抗人  $\alpha_2$  微球蛋白单克隆抗体, 为试剂盒的开发研究奠定基础。

[关键词]  $\alpha_2$  微球蛋白; 单克隆抗体; 制备; 鉴定

[中图分类号] R392.1

[文献标识码] B

[文章编号] 1673-7210(2008)06(a)-036-02

## Production and identification of monoclonal antibodies against $\alpha_2$ -microglobulin

DU Hui-fen, LI Ke-sheng, LIAN Xiao-wen, YUAN Ming, YE Wen-hua

(Medical Biotechnology Center, Gansu Medical Research Institute, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] Objective: To prepare and identify monoclonal antibodies (McAb) against  $\alpha_2$ -microglobulin. Methods: Balb/c mice were injected with recombinant  $\alpha_2$ -microglobulin, and the filtration and identification of the mAb against the  $\alpha_2$ -microglobulin was performed using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results: Ten strains of hybridomas were obtained that produced the mAb specific to the  $\alpha_2$ -microglobulin without detectable cross-reactivity with other pathogens. Of the 10 strains, 6 were identified as the immunoglobulin G1 (IgG1) isotype, 2 as IgG2a, and the other as IgG2b. Conclusion: These specific against the  $\alpha_2$ -microglobulin may provide a basis of further researches on the pathogenesis, proteiology, and early diagnosis.

[Key words]  $\alpha_2$ -microglobulin; Monoclonal antibodies; Preparation; Identification

$\alpha_2$  微球蛋白( $\alpha_2$ -MG)<sup>[1]</sup>是由 100 个氨基酸组成的单链多肽, 分子量为 11.8 kD, 存在于除红细胞和胎盘滋养层细胞以外的所有有核细胞中, 尤其在淋巴细胞和单核细胞存在丰富, 在其免疫应答中起重要作用。已报道的测定  $\alpha_2$ -MG 的方法有多种, 包括放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫吸附分析法(ELISA)、时间分辨荧光免疫分析法、免疫透射比浊法、胶乳免疫散射比浊法等, 其中有的测定方法检测灵敏度低, 检测方法繁琐, 需要专门的仪器设备, 本研究采用简单、快速、有效的免疫方法, 获得了高效价、特异性的抗人  $\alpha_2$ -MG 单克隆抗体, 为金标试剂盒的开发研究奠定基础。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料

1.1.1  $\alpha_2$ -MG 抗原  $\alpha_2$ -MG 抗原购自 Sigma 公司。

1.1.2 动物与试剂 Balb/c 小鼠(8~10 周龄, 雌性)由甘肃省医科院实验动物中心提供; 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞购自中科院细胞库; 弗氏佐剂、聚乙二醇(PEG)、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基蝶呤均为 Sigma 产品; 优质胎牛血清为中美合兰州民海生物工程有限公司产品; DMEM 培养基为 Gibco 产品。

#### 1.2 动物免疫

首先用卡介苗致敏小鼠, 1 周后将  $\alpha_2$ -MG 与弗氏完全佐

剂等量混匀, 按 10  $\mu$ g/只免疫小鼠, 初次免疫后每间隔 3 周再免疫 2 次, 抗原量翻倍加不完全佐剂等量混匀, 在小鼠颈背部皮下分次多点注射免疫小鼠, 细胞融合前 3 d 腹腔加强免疫 1 次。

#### 1.3 细胞融合及筛选<sup>[2-3]</sup>

取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 8:1 混合于融合管内, 1 000 转/min 离心 10 min, 弃去上清, 振荡细胞, 使两种细胞尽量混合均匀, 然后缓慢滴加预热的 50% PEG 溶液, 再缓慢加入无血清的 DMEM 培养基以终止融合, 静置后再以 1 000 转/min 离心 10 min, 弃上清后加入 HAT 培养基, 使细胞悬浮并混匀, 加入适量饲养细胞, 分散于 96 孔培养板在 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养, 第 6 天换液, 第 10 天开始检测筛选。两周后可换为 HT 培养基, 待克隆孔长至 1/3~1/2 时, 取培养上清液进行抗体检测, 用间接法筛选阳性孔。将阳性孔用有限稀释法进行 3 次亚克隆, 建株的杂交瘤细胞再扩大培养、冻存和制备腹腔积液。

#### 1.4 腹腔积液制备和纯化

正常 Balb/c 小鼠于 1 周前腹腔注射 0.5 ml 液体石蜡进行预处理, 再将制备好的杂交瘤细胞注射于预处理过的小鼠, 2  $\times$ 10<sup>6</sup>/只, 约 10 d 后收集腹腔积液, 经 50%、45% 硫酸铵盐析沉淀和 Sephary S-300 凝胶柱分离纯化。

#### 1.5 间接 ELISA 检测<sup>[4]</sup>

用 ELISA 法测不同单抗株的最大稀释度和腹腔积液效

[作者简介] 杜惠芬(1966-), 女, 副研究员, 研究方向: 医学生物技术。

[通讯作者] 李克生(1963-), 男, 研究员, 研究方向: 医学生物技术。

价。用  $\gamma$ -MG 6.25 ng/孔包被聚苯乙烯微孔板, 37 °C 2 h, 4 过夜, 用含 2.5% 的 BSA 封闭液封板, 37 °C 2 h 封闭, 拍干后分别加入倍比稀释待测单抗的细胞上清、腹腔积液及纯化后的单抗, 37 °C 0.5 h, 洗涤后加入羊抗鼠 IgG-HRP, 37 °C 0.5 h 洗涤 3 次, 加底物显色后用 2 mol/L 的硫酸终止反应, 用酶标仪测定 OD<sub>450</sub> 值。P/N  $\geq$  3 为阳性, 否则为阴性。

1.6 免疫球蛋白 Ig 亚类测定

用鼠源单克隆抗体同型试剂 (Sigma) 来测定, 采用抗原介导的方法。用抗原按 1 1 000 包被, 37 °C 作用 2 h, 直接加培养液上清, 室温作用 2 h。同型特定试剂按 1 1 000 稀释, 室温作用 30 min, 洗板。将兔抗羊-HRP 按 1 2 500 稀释, 室温作用 15 min, 加底物反应。

1.7 McAb 叠加试验<sup>[9]</sup>

在确定各 McAb 饱和值的基础上, 在最适抗原包被的 96 孔酶标板内, 加入一种饱和浓度 McAb1, 37 °C 作用 0.5 h, 洗涤后加入另一种饱和浓度的 McAb2, 同样孵育洗涤; 加入 1 1 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 同样孵育洗涤; 加入底物溶液显色, 终止反应, 测定 OD<sub>450</sub> 值, 计算增值指数(AI)。按如下公式计算:  $AI = [2 \times A(1+2) - (A1+A2) - 1] \times 100\%$ 。式中 A1 为 McAb1 的 OD<sub>450</sub> 值; A2 为 McAb2 的 OD<sub>450</sub> 值; A(1+2) 为 McAb1 叠加 McAb2 的 OD<sub>450</sub> 值。AI > 50% 说明被测的两株单抗的抗原结合位点不同, AI < 50% 说明被测的两株单抗抗原结合位点相同。AI 值越大, 抗原位点重叠的可能性越小。

1.8 抗体亲和常数的测定

参照 Beatty 的方法<sup>[6-7]</sup>, 即选用间接 ELISA 的方法测定, 将抗原分别以 50、25、12.5、6.25  $\mu$ g/L 包被, 加入倍比稀释的抗体, 再加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体, TMB 显色测 OD<sub>450</sub> 值。以抗体浓度的对数为横坐标, 以 OD<sub>450</sub> 值为纵坐标, 每种抗体得出 4 条反应曲线, 以每条曲线上部平坦段的 OD<sub>450</sub> 值作为 100%, 在曲线上查出 50%OD<sub>450</sub> 值相对应的抗体浓度, 按 Beatty 推导公式:

$$K_{aff} = (n-1) / 2(n[Ab]_t - [Ab]_t)$$
 计算亲和常数。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

采用上述免疫和融合方法, 进行了细胞融合, 共筛选出 10 株杂交瘤细胞。经 3 次亚克隆后, 100% 的检测孔保持了分泌抗人  $\gamma$ -MG 抗体的能力。

2.2 单克隆抗体的效价

利用间接 ELISA 试验对这些单克隆抗体的效价进行了测定。结果见表 1。

表 1  $\gamma$ -MG 单抗效价 (万)

单抗	4G3	5G4	5C7	5F9	5H1	6C1	6E5	6F2	7H5	6E9
细胞上清	0.256	0.128	0.064	0.256	0.256	0.128	0.256	0.106	0.256	0.256
腹腔积液	64	16	8	128	32	100	64	8	128	1
纯化后	64	16	8	128	32	100	128	8	128	1

2.3 抗体亚类

10 株杂交瘤细胞株, 其分泌的 McAb Ig 亚类结果见表 2。

表 2 杂交瘤细胞株分泌的 McAb Ig 亚类

单抗	4G3	5G4	5C7	5F9	5H1	6C1	6E5	6F2	7H5	6E9
McAb	IgG <sub>1</sub>									
Ig 亚类										

2.4 位点分析

通过 ELISA 叠加试验对以上 10 株单抗进行位点分析, 试验发现, 5 株单抗彼此叠加后的增值指数均大于 50%, 说明 5 株单抗的抗原识别位点均不相同。其中 McAb 7H5 和 McAb 6E5 相互叠加的增值指数可达 96.8%, 配对良好。

2.5 亲和常数测定

10 株杂交瘤细胞株, 选取其中 5 株进行亲和常数的测定, 结果见表 3。

表 3 杂交瘤细胞株亲和常数

单抗	4G3	5G4	5H1	6E5	7H5
亲和常数	1.67 $\times 10^7$	1.08 $\times 10^7$	4.17 $\times 10^7$	1.46 $\times 10^7$	4.73 $\times 10^6$

3 讨论

获得高质量的单克隆抗体是检测诊断试剂产品研制中最为基础, 也是最为主要的研究, 单抗的性能直接决定诊断试剂产品的质量。而生物活性效价、抗原位点互补关系、亲和常数及稳定性是衡量一种单抗性能好坏最主要的性能指标, 在单抗研究实践中由于受诸多随机因素影响, 要取得各项性能指标最优难度较大。本文报道了  $\gamma$ -MG 单克隆抗体研究结果, 成功获得了 10 株稳定分泌抗人  $\gamma$ -MG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 经鉴定 10 株单抗特异性好, 亲和力强, 抗体分泌稳定, 其中有 2 株在生物活性效价、抗原位点互补关系、亲和常数及稳定性达到了最佳, 为  $\gamma$ -MG 诊断试剂产品研制奠定了较好的基础。

[参考文献]

- [1] 陈泮藻. 实用放射免疫学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1989:421.
- [2] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256: 495.
- [3] Lane RD. A short duration polyethylene fusion technique for increasing production of monoclonal antibody secreting hybridomas[J]. J Immune Method, 1985, 81:223.
- [4] Mereno, MJ, Abad A, Pelegri R, et al. Validation of a monoclonal enzyme immunoassay for the determination of carbafuran in fruits and vegetables [J]. Agric Food Chem, 2001, 49: 1713- 1719.
- [5] 杨联萍, 易学瑞, 李如冰, 等. 重组人再生增强因子 McAb 的建立与免疫组化定位研究[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2001, 21(1):86.
- [6] Loomans E. Journal of immunological[J]. Methods, 1995, 184:207- 217.
- [7] Beatty JD. Journal of immunological[J]. Methods, 1987, 100:173- 179.

(收稿日期: 2008-02-14)

基础研究栏目介绍

本栏目主要刊登生理学、生物化学与分子生物学、免疫学、药理学、生物物理学、病理学等以机制研究为基础的基础医学研究论文。选题严谨, 论点明确, 数据准确可靠, 表格设计合理, 要求附中英文摘要、题名、作者单位和作者姓名、3-5 个关键词, 并引用近 5 年的国内外参考文献 8-16 篇。

来稿请寄: 北京市朝阳区通惠家园惠润园 (壹线国际) 5-3-601 《中国医药导报》杂志社

邮政编码: 100025 电话: 010-59679061 传真: 010-59679056 E-mail: yyzx99@163.com