

抗人胱蛋白酶抑制剂 C 单克隆抗体的制备及鉴定

徐杨 杜惠芬 连晓雯 张瑞君 柴丹丹 李克生

甘肃省医学科学院医学生物技术研究中心, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 制备抗人 Cys - C 单克隆抗体并对其生物学特性进行鉴定。方法 用基因工程表达的 Cys - C 抗原免疫 BALB/c 小鼠, 用杂交瘤技术制备抗人 Cys - C 单克隆抗体, 间接 ELISA 法检测单克隆抗体的效价、亲和力, 鉴定单克隆抗体的亚类并检测抗原位点互补关系, SDS - PAGE 鉴定抗体纯度, 秋水仙素抑制法鉴定染色体数目。结果 筛选出 2 株能稳定分泌抗人 Cys - C 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 2H2、3C4, 抗体 Ig 亚类均为 IgG₁, 亲和常数分别为 7.429×10^{-8} 、 1.95×10^{-7} , 2 株单克隆抗体抗原位点不重叠, 染色体鉴定符合杂交瘤细胞的特性。结论 成功制备了特异性的抗人 Cys - C 单克隆抗体, 为 Cys - C 检测试剂盒的研究开发奠定了基础。

关键词: 胱蛋白酶抑制剂 C; 单克隆抗体; 制备; 鉴定

中图分类号: Q784 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8685(2016)17 - 2436 - 04

Production and characterization of the monoclonal antibodies against cystatin C

XU Yang, DU Hui - fen, LIAN Xiao - wen, ZHANG Rui - jun, CHAI Dan - dan, LI Ke - sheng

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

Abstract: Objective To prepare the monoclonal antibody (mAb) against cystatin C (Cys - C) and characterize their biological functions. **Methods** BALB/c mice were immunized with Cys - C antigen expressed by genetic engineering. The mAb against Cys - C was prepared with hybridoma technique. Indirect enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the titers and the affinity of mAbs, and the complementary relationship between the antigen sites was detected; monoclonal antibodies subtypes were identified, and the complementary relationship among antigenic sites were detected. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) was used to identify the purity of antibody. The chromosome number was identified with colchicine inhibition. **Results** Two hybridoma cell strains that could secrete Cys - C stably were obtained, named as 2H2 and 3C4, and its antibody subtypes were all IgG₁. The affinity constant were 7.429×10^{-8} , 1.95×10^{-7} . Two antibodies belonged to different antigen determinants. Chromosome identification was consistent with the characteristics of the hybrid cells. **Conclusion** The monoclonal antibody against Cys - C has been successfully obtained, which established foundations for Cys - C detection kit for research and development.

Key Words: Cystatin - C; Monoclonal antibody; Preparation; Identification

胱抑素 C (cystatin C, Cys - C) 亦称半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C, 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族的成员之一, 其主要生物学功能是细胞外抑制组织蛋白酶家族^[1]。人体内几乎所有的有核细胞均可产生 Cys - C, 生成量非常稳定, 不受年龄、性别、饮食、肌肉量和运动的影响, 仅在使用大剂量糖皮质激素或甲状腺功能异常时会影响 Cys - C 的产生, 1 岁以上儿童血清 Cys - C 浓度就达成人水平^[2-5]。正常人血清和尿液中 Cys - C 含量相对恒定, 当肾小球滤过功能减退时, 血清中的 Cys - C 浓度开始升高, 且与肾小球滤过率

呈显著负相关。因此, 血清 Cys - C 是一种理想地反映肾小球滤过率的灵敏指标^[6-7], 可用于糖尿病、高血压等慢性病早期肾损伤的监测^[8]。目前, 已建立了单向免疫扩散法、放射免疫、荧光免疫、各种酶免疫测定法及免疫比浊法等多种 Cys - C 检测方法^[9]。由于血清和尿液中 Cys - C 浓度较低, 测定方法需较高的灵敏度及特异性, 因此, 研制高性能的 Cys - C 单克隆抗体是提高其检测试剂性能的最佳途径。本试验采用重组 Cys - C 抗原免疫 BALB/c 小鼠, 单克隆抗体技术制备了针对 Cys - C 不同抗原表位的单克隆抗体。

1 材料与方法

1.1 材料 重组人 Cys - C 抗原由本实验室表达纯化, 人 Cys - C 抗原购自桂林英美特生物技术有限公司 (批号: 130114 - S); BALB/c 小鼠 (8 周龄 ~ 10 周

基金项目: 甘肃省科技厅项目 (1204FKCA178)

作者简介: 徐杨 (1981 -), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事生物技术方面的工作。

通讯作者: 李克生, E - mail: shwjshzhx@163.com

龄(雌性)由兰州大学实验动物中心提供;小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞购自中科院上海细胞库; HAT、HT、TMB、mAb 亚类检测试剂盒均购自 Sigma 公司;小牛血清购自兰州民海生物工程有限公司(批号: 2013-0128); DMEM 培养基购自 Gibco 公司(批号: 1183-136); 山羊抗小鼠 IgG-HRP 购自北京博奥森生物技术有限公司; 细胞培养板购自 Corning 公司; 酶标条购自深圳市金灿华实业有限公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫^[10] 取体重为 18 g~22 g BALB/c 雌性小鼠 5 只 初次免疫采用 Cys-C 重组抗原(20 μg/只)加弗氏完全佐剂经腹股沟多点注射; 以后采用 Cys-C 重组抗原(40 μg/只 80 μg/只)加弗氏不完全佐剂经颈背部皮下多点注射进行第 2 次、第 3 次免疫, 每次免疫间隔 3 周; 间接 ELISA 法检测鼠尾血效价, 以未免疫小鼠血清作为阴性对照, 以最大抗血清稀释倍数作为该小鼠尾血效价, 超过 1:1 万效价的 BALB/c 小鼠可用于融合。用于融合的小鼠在融合前 3 d 腹腔加强免疫一次。

1.2.2 间接 ELISA 检测抗体^[11] 重组人 Cys-C 抗原按 3.4 ng/孔, 天然人 Cys-C 抗原按 5 ng/孔包被聚苯乙烯微孔板 37 °C 2 h 4 °C 过夜, 用含 2.5% 的 BSA 封闭液封板 37 °C 2 h 封闭 25 °C 过夜干燥, 装入铝箔袋加干燥剂封口 4 °C 保存备用。使用时, 每孔加 100 μl 细胞培养液或 100 μl 样品稀释液倍比稀释的样品 37 °C 0.5 h, 洗涤 4 次后加入羊抗鼠 IgG-HRP 37 °C 0.5 h 洗涤 4 次, 加底物显色后用 2 mol/L 的硫酸终止反应, 用酶标仪测定 A_{450} 值。阳性孔 OD 值/阴性对照 OD 值 ≥ 3 为阳性, 否则为阴性。

1.2.3 细胞融合及筛选^[12-13] 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 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 振荡细胞, 使 2 种细胞尽量混合均匀, 然后缓慢滴加预热的 50% PEG1000 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 800 r/min 离心 5 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 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下培养, 第 6 d 换液, 第 10 d 开始检测筛选。2 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, 筛选用自制重组人 Cys-C 抗原包被酶标板和人天然 Cys-C 抗原包被酶标板进行抗体筛选。将阳性孔用有限稀释法进行亚克隆, 克隆阳性率达到 100% 后建株, 进行杂交瘤细胞扩大培养、冻存和制备腹水, 同时建株细胞经连续传代 10 代, 测定各代培养上清, 确定抗体效价的稳定性。

1.2.4 腹水制备和纯化 选取正常雌性 BALB/c 小

鼠腹腔注射 0.5 ml 液体石蜡进行预处理, 1 周后将杂交瘤细胞以 2×10^6 个/只接种于小鼠腹腔, 待腹部鼓起后收集腹水并进行纯化, 采用间接 ELISA 法测定腹水及纯化抗体效价。具体过程: 取腹水用 PBS 4 倍稀释 50% 饱和硫酸铵沉淀 4 °C 2 h 8 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 沉淀再用 45% 饱和硫酸铵沉淀 4 °C 过夜, 10 000 r/min 离心 30 min, 沉淀溶于 PBS, Sephacryl S-300 凝胶柱洗脱, 收集抗体, 分装, 保存备用。

1.2.5 纯化抗体的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 取纯化抗体 2 μl, 用 0.01 mol/L PBS 稀释至 16 μl, 再加入 4 μl 的 5×SDS 上样缓冲液, 混匀后水浴煮沸 10 min。配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 等胶凝固后上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶和分离胶分别以恒压 80 V 和 120 V 进行。电泳完毕后, 用考马斯亮蓝 G-250 染色液染色 2 h, 用脱色液脱色 2 h~3 h, 三蒸水漂洗, 拍照。

1.2.6 免疫球蛋白 Ig 亚类测定 按照 mAb 亚类检测试剂盒说明书进行操作。

1.2.7 抗原位点叠加试验^[14] 先将各株单克隆抗体的细胞上清做间接 ELISA(100 μl/孔加样), 每孔所测的 A_{450} 值即为 A_1 或 A_2 值, 再按两两叠加的原则间接 ELISA 分析各单抗之间抗原位点叠加效果。具体步骤: 先向酶标孔加入一种单抗的细胞上清(100 μl/孔), 即为 mAb1, 37 °C 作用 30 min, 洗涤后加入需要混合的另一种单抗细胞上清(100 μl/孔), 即为 mAb2, 同样孵育洗涤; 加入 1:40 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 同样孵育洗涤; 加入底物溶液显色 10 min, 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定 A_{450} 值, 即为 $A(1+2)$, 按下列公式计算叠加率(AI): $AI = [2 \times A(1+2) \div (A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$ 。式中: A_1 为 mAb1 的 A_{450} 值; A_2 为 mAb2 的 A_{450} 值; $A(1+2)$ 为 mAb1 叠加 mAb2 的 A_{450} 值。AI > 50% 说明被测的 2 株单抗的抗原结合位点不同, AI < 50% 说明被测的 2 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。

1.2.8 抗体亲和常数的测定^[15-16] 参照 Beatty 的方法, 即选用间接 ELISA 的方法测定, 用 4 种浓度分别为 136 μg/L、68 μg/L、34 μg/L、17 μg/L 的天然 Cys-C 抗原包被酶标板, 将每株单抗做倍比系列稀释后加入酶标孔, 做间接 ELISA, 测定每孔 A_{450} 值。以抗体浓度的对数为横坐标, 以 A_{450} 值为纵坐标, 每种抗体得出 4 条反应曲线, 以每条曲线上部趋于平坦段的 A_{450} 值作为 100% 在曲线上查出 50% A_{450} 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。其中, $[Ab']_t$ 、 $[Ab]_t$ 表示抗原浓度为 $[Ag']_t$ 和 $[Ag]_t$ 时 $A = 1/2 A_{max}$ 对应的抗体浓度; $[Ag']_t$ 、 $[Ag]_t$ 表示包被的抗原浓度; n 为抗原浓度 $[Ag']_t$ 与 $[Ag]_t$ 间的稀释倍数。

1.2.9 染色体分析 采用秋水仙素阻抑法对杂交瘤细胞染色体进行分析。将筛选得到的杂交瘤细胞用秋水仙素处理,制备有丝分裂中期细胞,操作按说明书进行 Giemsa 染色后观察,计数杂交瘤细胞的染色体数目。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立及稳定性测定 杂交瘤细胞株建立过程中共进行了 15 次细胞融合,融合率为 60%~98%。细胞融合 7 d~9 d 后,用重组人 Cys-C 包被酶标板进行间接 ELISA 检测,共筛选出 5 株杂交瘤细胞,分别是 2H2、5F5、4F1、6B4 和 3C4。5 株经亚克隆后,100% 的检测孔保持了分泌抗重组人 Cys-C 抗体的能力。5 株杂交瘤细胞株用人天然 Cys-C 包被酶标板进行复筛,结果仅 2H2 和 3C4 细胞与人天然 Cys-C 抗原无反应,其余株均与人天然 Cys-C 抗原无反应。2H2 和 3C4 克隆细胞经连续传代 10 代和腹水连续传代 5 代,分别测定培养上清和腹水抗体效价,结果 2 株单克隆细胞株在体外和小鼠腹水传代抗体效价均保持稳定。

2.2 腹水纯化及纯化抗体的 SDS-PAGE 分析 2 株 mAbs 腹水的纯化抗体经 SDS-PAGE 鉴定,结果显示 2 株单抗都可明显看到 2 条条带,1 条重链,1 条轻链。重链约为 50 kD,轻链约为 26 kD(图 1)。

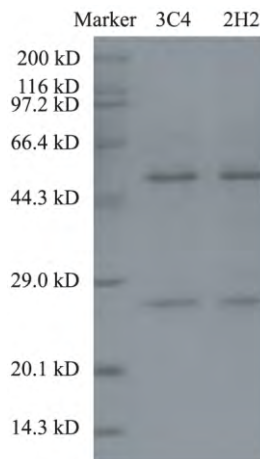


图 1 腹水纯化及纯化抗体的 SDS-PAGE 鉴定

2.3 抗体亚类 5 株杂交瘤细胞株分泌的 Ig 亚类均为 IgG1 抗体。

2.4 抗原位点叠加分析 与天然人 Cys-C 抗原反应的 2H2、3C4 杂交瘤细胞株的 AI 值为 83.7%,说明 2 株单抗抗原位点重叠的可能性小。

2.5 亲和常数测定 对 2H2 和 3C4 杂交瘤细胞株进行亲和常数的测定,分别为 7.429×10^{-8} 和 1.95×10^{-7} 。

2.6 染色体分析 正常小鼠脾细胞染色体数目为 40 条,SP2/0 染色体数目为 62 条~68 条,所得 2H2、3C4 杂交瘤细胞株的染色体数目为 92 条~108 条,符合杂交瘤细胞的特性(图 2)。

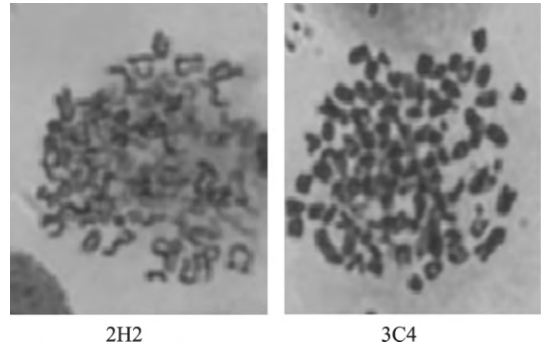


图 2 杂交瘤细胞的染色体分析(Giemsa, ×400)

3 讨论

“双抗体夹心”法诊断试剂产品的特异性和敏感性取决于所用抗体的质量,实践中虽然单抗的效果优于多抗,但单抗的生物活性效价、抗原位点互补关系、亲和常数及稳定性等生物学性能会直接影响诊断试剂的性能。由于受诸多随机因素的影响,在单抗制备过程中取得高性能的单克隆细胞株有一定难度。本文报道了抗人 Cys-C 单克隆抗体研制结果,成功获得了 5 株稳定分泌抗重组人 Cys-C 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其中只有 2 株与天然人 Cys-C 抗原和重组人 Cys-C 抗原均反应,另外 3 株只与重组人 Cys-C 抗原反应而与天然人 Cys-C 抗原不反应,这说明重组人 Cys-C 和天然人 Cys-C 在蛋白结构上存在差异,重组人 Cys-C 的某些抗原表位在天然人 Cys-C 蛋白结构上没有暴露在外面,重组蛋白免疫小鼠制备的部分单抗是针对这部分未暴露抗原表位的。通过本研究获得的 2 株与天然人 Cys-C 抗原和重组人 Cys-C 抗原均反应的单抗经鉴定特异性好,抗体分泌稳定,在生物活性效价、抗原位点互补关系、亲和常数及稳定性方面均达到了较佳水平,本研究为 Cys-C 诊断试剂产品的研制与开发奠定了较好的基础。

参考文献

- [1] Angelidis C, Deftereos S, Giannopoulos G, et al. Cystatin C: an emerging biomarker in cardiovascular disease [J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(2): 164-179.
- [2] 刘海燕,李伟娜,肖波,等. 胱抑素 C 临床检验及在肾脏疾病应用中的研究进展[J]. *河北医药*, 2015, 37(21): 3311-3315.
- [3] Randers E, Erlandsen EJ. Serum Cystatin C as an endogenous marker of the renal function: A review[J]. *Clin Chem Lab Med*, 1999, 37: 389-395.
- [4] Kkenkamp A, Domanetzi M, Zinck R, et al. Cystatin C - A new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height [J]. *Pediatrics*, 1998, 101: 875-881.
- [5] Ving E, Lindergrd B, Nilsson-Ehle P, et al. Relationships among serum cystatin C, Serum creatinine, lean tissue mass and glomerular filtration rate in healthy adults [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 1999, 59: 587-592.

(下转第 2442 页)

续表			
脂肪酸	浓度(μg/ml)	RSD(% n=6)	平均回收率(% n=3)
辛酸	6.25	2.7	102.0
	50.0	2.3	102.0
	200	1.6	103.0

表 3 样品检测结果(μg/ml)

样品	己酸	庚酸	辛酸
餐厨废油 1	ND	ND	6.86
餐厨废油 2	ND	ND	6.87
模拟煎炸老油 1	9.05	12.1	127
模拟煎炸老油 2	7.84	9.32	85.4

注: ND 表示未检出。

3 结 论

通过以上研究, 不仅建立一种简单快速的样品前处理方法, 而且还利用 GC-MS 的优势研究了正常的和经过高温加热后的食用植物油短链脂肪酸的变化情况, 建立了操作简便、快速、准确、检出限低的短链脂肪酸测定方法。期望本方法可以对地沟油的鉴别检测有一定的借鉴作用。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.37—2003 食用植物油卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
 [2] 彭寨玉, 义志忠. 气相色谱-质谱法测定富油食品中饱和脂肪含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(7): 817.

[3] 李英, 王楼明, 刘丽, 等. 用气相色谱-质谱联用法测定植物油中脂肪酸的组成[J]. 山西食品工业, 2000(4): 37-38.
 [4] 许秀丽, 任荷玲, 李娜, 等. 气相色谱-质谱法测定脂肪酸组成鉴别地沟油的方法研究[J]. 检验检疫学刊, 2012, 22(4): 32-35.
 [5] 陈月晓, 马玉霞, 陆颖, 等. 常见食用植物油中特征性脂肪酸的检测及鉴别[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 22(4): 301-305.
 [6] 盛月慧, 黄峥, 王晶. 气相色谱质谱法测定植物油中脂肪酸[J]. 化学分析计量, 2010, 19(2): 35-38.
 [7] 石朝晖, 吴庆洁, 蔡江帆. 气相色谱法检测掺假植物油方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(6): 1341-1346.
 [8] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 17376—2008 动植物油脂: 脂肪酸甲酯制备[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
 [9] 中国计量科学研究院. GB/T 22223—2008 食品中总脂肪、饱和脂肪(酸)、不饱和脂肪(酸)的测定水解提取-气相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社 2008.
 [10] 许斌, 黄亮宇, 李虹, 等. 脂肪酸谱分析在餐饮用油掺兑泔水油检测中的应用[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(8): 886-891.
 [11] 刘凤霞, 薛刚, 高秋华, 等. 高纯度 γ-亚麻酸包合工艺研究 I-皂化值及皂化反应[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 343-346.
 [12] 刘波. 气相色谱-质谱法测定植物油中胆固醇[J]. 现代预防医学, 2013, 40(6): 1094-1096.
 [13] 陈红, 杨梅, 朱蓉, 等. 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定火锅油、泔水油及地沟油中胆固醇含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(5): 429-432.
 [14] AOAC. AOAC Official Method 994.10 Cholesterol in Foods. Direct Saponification - Gas Chromatographic Method First Action 1994 [S/OL]. <http://www.docin.com/p-345253015.html>
 [15] 邓琪, 尹平河, 赵玲. 餐饮业废油脂皂化工艺的探索[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(2): 38-41.

收稿日期: 2016-04-22

(上接第 2438 页)

[6] 孙绍军, 王纪敏, 陈双峰. 胱蛋白酶抑制剂 C 的研究进展[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(8): 1687-1689.
 [7] Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C [J]. N Engl J Med, 2012, 367(1): 20-29.
 [8] Fatemeh G, Faranak K, Esmat G, et al. Comparative assessment of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and Cystatin C as early biomarkers for early detection of renal failure in patients with hypertension [J]. Ira Biom J, 2015, 19(2): 76-81.
 [9] 张玉静. 自制胱抑素 C 免疫诊断试剂的性能评价[J]. 上海医药, 2015, 36(21): 77-79.
 [10] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2004: 320.
 [11] Moreno MJ, Abad A, Pelegri R, et al. Validation of a monoclonal enzyme immunoassay for the determination of caborfuran in fruits and vegetables [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(4): 1713-1719.

[12] Kohler G, Milstein C. Continues cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. Nature, 1975, 256(5517): 495-497.
 [13] Lane RD. A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody secreting hybrids [J]. J Immunol Methods, 1985, 81(2): 223-228.
 [14] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 27-90.
 [15] Loomans EE, Roelen AJ, Van Damme HS, et al. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Immunol Methods, 1995, 184(2): 207-217.
 [16] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1/2): 173-179.

收稿日期: 2016-05-03