

## 鼠抗早孕因子单克隆抗体的制备及鉴定

练玉银, 吴晓亮, 王家骥\*, 温志锋, 聂湘辉

**摘要:**目的 制备鼠抗早孕因子(EPF)单克隆抗体, 纯化并进行鉴定。方法 用重组 EPF 免疫 BALB/c 小鼠, 采用杂交瘤技术获得抗 EPF 杂交瘤细胞株, 注入 BALB/c 小鼠腹腔制备腹水型单抗, Protein-G 亲和层析纯化后, SDS-PAGE 电泳鉴定其纯度, 用间接 ELISA 法测抗体效价, ELISA 相加试验测定抗原表位, 用 Western blotting 鉴定其特异性, 并进行类及亚类、细胞染色体核型分析。结果 筛选出 2 株具有较高活性和良好稳定性的分泌抗 EPF 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 其腹水的抗体效价均高于  $2 \times 10^{-5}$ , 2 株单抗均为 IgG 类 IgG1 亚类, 轻链类型均为  $\kappa$ 。细胞核型分析符合杂交瘤细胞特征, 特异性良好, 2 株单抗有不同的抗原表位。SDS-PAGE 电泳显示纯化后抗体有较高的纯度, Western blotting 表明其与 EPF 抗原有特异结合性。结论 成功制备 2 株具有较高活性的鼠抗 EPF 单克隆抗体, 为建立检测 EPF 方法奠定了良好的基础。

**关键词:** 早孕因子; 单克隆抗体; 鉴定

中图分类号: R714.15 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)5-532-03

Preparation and identification of murine monoclonal antibody against EPF. LIAN Yu-yin, WANG Jia-ji, WU Xiao-liang et al. (School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

**Abstract:** Objective To prepare and identify the murine monoclonal antibody (McAb) against early pregnancy factor (EPF). Methods BALB/c mice were immunized with recombinant EPF, based on which the McAb was prepared by hybridoma technique, then purified and determined for titer by indirect ELISA, for antigenic epitopes by additive ELISA, for specificity by Western blotting, and analyzed for class, subclass and chromosome karyotypes. Results Two cell strains secreting McAb against EPF were screened. The McAbs showed high activity. Both two McAbs were IgG1 with  $\kappa$  chain, and their titers were higher than  $2 \times 10^{-5}$  in ascites. The chromosome karyotypes of the 2 cell strains were consistent with those of hybridoma cells. The antigenic epitopes of two McAbs were different. McAbs have high purity and specificity detected by SDS-PAGE and Western blotting respectively. Conclusion The murine McAbs against EPF with high activity were successfully prepared.

**Key words:** Early pregnancy factor (EPF); Monoclonal antibody; identification

早孕因子(Early pregnancy factor, EPF)是哺乳动物受精后最早在血清中检测到的妊娠相关蛋白,是目前最早确认妊娠的生化标志之一<sup>[1]</sup>。EPF 除可作为人类及家畜受精卵着床前的超早期妊娠诊断指标外,还可预测流产及早期胚胎死亡,而且对滋养细胞和睾丸生殖细胞等肿瘤的诊断、疗效判断和预后等都具有重要意义。本文利用本实验室制备的高纯度的重组 EPF 蛋白(rEPF)<sup>[2]</sup>制备出两株高效价、稳定分泌抗 EPF 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,结果报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试剂 重组 EPF 为本实验室制备;骨髓瘤细胞 SP2/0 由本实验室保存;RPMI1640、胎牛血清、HAT 和 HT 购自 GIBCO 公司;HRP 标记的兔抗鼠

IgG 和亚类鉴定试剂盒购自 Sigma 公司;BCA 试剂盒、ECL 荧光底物(货号 37071)购自 Pierce 公司;Western blotting 试剂盒、PVDF 膜购自 GE 公司。

1.1.2 实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,8 周龄,由广东省实验动物中心提供。动物合格证号:SCXK(粤)2009-0011。

#### 1.2 方法

1.2.1 免疫小鼠及杂交瘤细胞株的筛选 将 50% 弗氏完全佐剂与 50% 的 rEPF 充分乳化,免疫 3 只 BALB/c 小鼠,首次免疫采用颈背部皮下注射、两侧腹股沟皮下注射及腹腔注射等多点注射,剂量  $50 \mu\text{g}/\text{只}$ ,间隔 14 d 再次腹腔注射免疫小鼠,以后每两周腹腔注射 1 次,共 4 次。第四次免疫前用间接 ELISA 法检测小鼠血清抗体效价达到要求后,于第四

基金项目 广东省科技计划重点项目(No.2008A030201022)

作者单位 广州医学院公共卫生学院,广东 广州 510182

作者简介 练玉银(1975-),女,硕士,讲师,主要从事卫生毒理与全科医学研究。E-mail:lianyuyin@126.com

\* 通讯作者 E-mail: wjiaji@163.com

次免疫后取脾按常规技术进行细胞融合, HAT 选择培养基筛选, 用间接 ELISA 法检测细胞上清, 选取强阳性孔细胞克隆化。用有限稀释法进行阳性筛选, 共筛选出 A3 和 A5 株抗 EPF 的杂交瘤细胞株, 于液氮冻存。

1.2.2 单抗腹水的制备及纯化 将 A3、A5 杂交瘤细胞株分别接种于液体石蜡致敏的 BALB/c 小鼠腹腔, 10~14d 后用收集腹水, 腹水上清 12 000×g 离心 10min 取上清进行 Protein-G 亲和层析纯化, 0.01M PBS(pH7.6)平衡, 0.1M 甘氨酸-HCl(pH3.0)洗脱, 收集洗脱峰, 并 1:10, 加入中和缓冲液 1.0M Tris-HCl (pH3.0)使样品处于中性, 防止变性。

1.2.3 单克隆抗体抗的鉴定 以 BCA 法检测蛋白浓度, SDS-PAGE 检测纯度。采用间接 ELISA 法检测单克隆抗体的 ELISA 效价。用 HRP 标记的兔抗鼠 IgA、IgM、IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、 $\lambda$  和  $\kappa$  对 2 株单抗进行亚类鉴定, 方法按试剂盒说明书进行。

1.2.4 抗原表位测定 采用 ELISA 相加试验。抗体之间产生相加效应的程度用相加指数表示。按以下公式计算相加指数 AI。AI =  $[2A_1^{+2}/(A_1+A_2)-1] \times 100\%$ 。式中  $A_1$  和  $A_2$  为两个抗体分别测定的 A 值,  $A_1+2$  为两个抗体相加的 A 值。AI<50% 表明两单抗的抗原表位相同或相似; AI>50%, 表明两单抗的抗原表位不同, 具有相加效应。

1.2.5 细胞染色体核型分析 取对数生长期的杂交瘤细胞株, 加入 0.2 $\mu$ g/ml 秋水仙素溶液, 培养 4~6h, 收集分裂中期细胞, 加入 37℃ 预热的 0.075 mol/L KCl 溶液 5ml, 于 37℃ 孵育 30min, 用醋酸-甲醇(1:3)固定液固定, 滴片后, Gimesa 染色, 10×100 油镜观察并计数、照相。

1.2.6 特异性鉴定 Western blotting 验证单克隆抗体的特异性(实验操作按试剂盒说明书要求进行)取 ECL 荧光底物 A 液和 B 液各 1ml, 混匀后将 PVDF 膜(Amersham)浸泡其中, 室温孵育 3~5min 后, 用滤纸将 PVDF 膜表面液体擦干, 并将其置于暗室, 取医用 X-底片覆盖, 曝光 1min 后, 依次显影、定影。

## 2 结果

2.1 单抗的浓度及纯度 Protein-G 亲和层析纯化得到 2 个蛋白峰, 第 1 峰为非特异性蛋白峰, 收集第 2 峰, BCA 法检测蛋白浓度 A3 5.6mg/ml, A5 4.2mg/ml。SDS-PAGE 显示重、轻链两条蛋白带, 相对分子质量分别为 55 kD 和 25 kD, 其纯度均可达 90%以上, 见图 1。

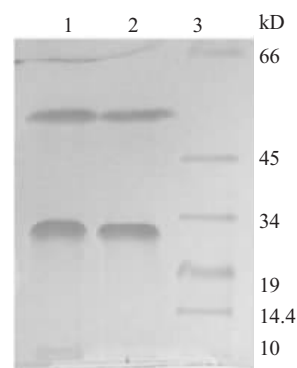
2.2 单抗效价 经间接 ELISA 法检测 2 株杂交瘤

细胞的腹水效价均高于  $2 \times 10^{-5}$ 。

2.3 单抗类型及亚类型 2 株杂交瘤细胞分泌的单抗均为 IgG 类 IgG1 亚类, 轻链类型均为  $\kappa$ 。

2.4 抗原表位 相加试验表明 2 株单抗的相加指数 AI 大于 50%, 为不同抗原表位。

2.5 细胞染色体核型 2 株杂交瘤细胞的染色体数目为 96~108 条, 接近于两亲代细胞的染色体数目之和, 符合杂交瘤细胞染色体核型特征, 见图 2。



1. A3 McAb; 2. A5 McAb; 3. Marker.

图 1 纯化单抗的 SDS-PAGE 分析

Fig 1 SDS-PAGE profile of purified McAb



图 2 EPF 杂交瘤细胞染色体核型( $\times 1000$ )

Fig 2 Chromosome karyotype of hybridoma cells secreting McAb against EPF( $\times 1000$ )

2.6 Western blotting 鉴定特异性 结果显示 A3 抗体、A5 抗体分别与 EPF 蛋白在相对质量 10 kD 左右处有一条蛋白条带, 说明与 EPF 有良好的抗原抗体匹配性, 见图 3。



图 3 EPF 单克隆抗体 Western blotting

Fig 3 EPF-McAb Western blotting

## 3 讨论

本课题组在前期研究中已分别从人流血及肿瘤

血中分离出 EPF<sup>[3,4]</sup> 并用其制备出 EPF-McAb<sup>[5]</sup> 并计划用此抗体建立检测 EPF 的方法。但在实验操作过程中,发现之前通过天然抗原制备得到的 EPF-McAb 效价不高,降解较快,严重的影响与阻碍了后续检测 EPF 方法学建立的研究。究其原因是纯化过程繁琐,蛋白获取率不高,且当时鉴定 EPF 活性用的是玫瑰花结抑制试验(RIT),该方法实验条件难以控制,操作复杂,判断结果欠客观,检测 EPF 的剂量反应曲线呈钟形,高浓度和低浓度一样呈阴性。因此,在纯化过程中,EPF 最具活性的片段有可能被忽略,而得到的有可能仅是一些低活性或完全没有活性的片段<sup>[6]</sup>。此问题很可能是导致前一 EPF-McAb 效价不高的重要原因。

针对此问题,本实验室在后期的研究工作中通过基因工程方法制备了 rEPF,经检测证实其与 EPF 抗体有特异结合性且有良好的 EPF 生物活性。在此基础上,本研究利用纯化的 rEPF 免疫 BALB/c 小鼠,经过杂交瘤技术成功建立了 2 株分泌 EPF 抗体的杂交瘤细胞株。两腹水单抗经纯化后纯度均 >90%,蛋白浓度高,且抗原表位分析证实两株单抗不同抗原表位,两单抗效价均高于  $2 \times 10^{-5}$ ,这非常有利于下一步检测 EPF 方法如酶联免疫双抗体夹心法等方法的建立,从而取代 RIT 实验使 EPF 得到更深入的研究与更广阔的应用。

#### 参考文献:

(上接第 531 页)

与宿主的免疫功能变化是否存在内在联系有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Chen PH. Experimental technique of human parasitology [M]. Beijing People's Medical Publishing House, 1988 27. (In Chinese)  
(陈佩惠. 人体寄生虫学实验技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988 27.)
- [2] Liu CJ, Yu HB, Yan L et al. Distribution of Trichinella spiralis larva in natural infected dog muscle[J]. Meat Hygiene, 1997, 8: 9-11. (In Chinese)  
(刘长军, 于洪彬, 闫玲, 等. 自然感染条件下的旋毛虫幼虫在犬体内的分布[J]. 肉品卫生, 1997, (8): 9-11.)
- [3] Li LH, Tang HW, Zhao XH et al. Distribution of Trichinella spiralis larvae in Striped Muscles experimental infected rabbits[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2003, 19(1): 95-96. (In Chinese)  
(李立宏, 唐宏伟, 赵旭辉, 等. 旋毛虫肌幼虫在实验感染兔横纹肌内的分布[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(1): 95-96.)
- [4] Yan YW, Li P, Xing J et al. In vitro cytotoxic activity of neutrophils on the muscular larvae of Trichinella spiralis[J]. Journal of Tropical Medicine, 2006, 6(4): 379-381. (In Chinese)  
(闫玉文, 李鹏, 邢杰, 等. 中性粒细胞体外杀伤旋毛虫肌幼虫的实验观察[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(4): 379-381.)
- [5] Li LH, Chen LF, Shi YW et al. Dynamic variation of eosinophil count in rabbits infected with Trichinella Spiralis[J]. China Tropical Medicine, 2011, 11(9): 1074-1075. (In Chinese)  
(李立宏, 陈立峰, 石永威, 等. 感染旋毛虫兔免疫嗜酸性粒细胞计数的动态变化[J]. 中国热带医学, 2011, 11(9): 1074-1075.)
- [6] Yan XX, Xu XF, Ma YX et al. Changes in T lymphocytes and their subpopulations and IgG in peripheral blood from mice infected with Trichinella Spiralis [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1992, 10(1): 62-65. (In Chinese)  
(阎旭霞, 徐秀芬, 马云祥. 感染旋毛虫小鼠外周血 T 淋巴细胞及其亚群和血清 IgG 抗体的变化 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1992, 10(1): 62-65.)
- [7] Li P, Xing J, Yan YW et al. The neutrophil and monocyte-mediated ADCC effects in immune mechanism of trichinosis [J]. Journal of Pathogen Biology, 2006, 2(3): 193-196. (In Chinese)  
(李鹏, 邢杰, 闫玉文, 等. 嗜中性粒细胞及单核细胞介导的细胞毒效应在旋毛虫病免疫机理中的作用 [J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 2(3): 193-196.)

收稿日期 2012-03-02 编辑 符式刚

收稿日期 2012-02-18 编辑 崔宜庆