

## 抗牛生长激素单克隆抗体及其免疫亲和 吸附柱的制备

于一民 余慕贞 史瀛仙

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

我们用杂交瘤技术获得了分泌抗牛生长激素单克隆抗体的细胞系(4B-2)。接种此细胞于小鼠所产生腹水的抗体含量达10mg/ml。经免疫亲和层析方法纯化的单克隆抗体, 属IgG<sub>1</sub>型。将单克隆抗体偶联到Sephrose 4B上, 制成了免疫亲和吸附柱, 可以从牛垂体匀浆中一步纯化牛生长激素。偶联有50mg单克隆抗体的亲和柱一次可结合3mg牛生长激素。经单克隆抗体亲和层析纯化的牛生长激素, 保持了与兔肝细胞膜受体结合的能力, 及在去垂体大白鼠中促进胫骨生长板生长的功能。

**关键词** 牛生长激素; 抗牛生长激素单克隆抗体; 免疫亲和吸附柱

自1921年发现生长激素(GH)以来, GH 促生长发育功能, 引起人们广泛兴趣<sup>[1,2,4]</sup>。最近人们对GH分子结构、分子多态性及GH在调节动物机体生长发育中的作用, 又有了很多新的认识<sup>[3]</sup>。由于单克隆抗体(单抗)是抗单个抗原决定簇的均一抗体, 利用单抗可在复杂混合物中测定某一组分; 利用单抗亲和柱可分离纯化蛋白和研究蛋白的结构与功能; 利用单抗作探针可确定激素在细胞内位置; 单抗也被利用作研究激素受体的工具, 尤其用于研究不同种属间受体蛋白的异同及受体分子结构与功能。因而GH单抗的制备将为这些方面的研究提供有力工具。

1980年以来, 已有几个实验室分别制备了抗人生长激素(hGH)的单抗<sup>[5,6]</sup>并应用于分子结构的研究中。1984年, 美国Monsanto公司制备了抗牛生长激素(bGH)的单抗, 并用单抗制备了免疫亲和吸附柱, 用于纯化天然的和用基因工程方法生产的bGH<sup>[7]</sup>。

为进一步研究bGH的生物学功能, 并

探索简便、快速纯化bGH的方法, 我们制备了bGH单抗及免疫亲和吸附柱。

### 材料与 方法

#### (一) 材料

Balb/c 小鼠取自本所动物房, NS-1骨髓瘤细胞由上海细胞所惠赠, 细胞培养基为Sigma公司产品, 酶标羊抗小鼠抗血清购自北京生物制品研究所, Sephadex和Sephrose 4B为Pharmacia产品, PEG-1000和标准分子量蛋白是Sigma产品。

#### (二) 实验方法

1. bGH的制备: 按Ellis方法略加修改<sup>[8]</sup>, 并用SDS-11%PAGE鉴定其纯度。

2. 杂交瘤细胞的培养: 用bGH辅以完全福氏佐剂腹腔注射于8周龄的Balb/c

本文于1988年6月30日收到。

本研究为国家自然科学基金七五攻关“生长激素研制”资助项目。

戴宗汉、王大钧同志参加部份工作, 李建荣同志协助拍照, 特此致谢。

雌性小鼠, 每月注射一次, 共 3 次, 每次抗原量为 50 $\mu$ g, 第三次注射后隔两星期, 每天用 100 $\mu$ g bGH 腹腔注射, 共 3 次, 末次注射后的第三天, 取脾细胞用于细胞融合。

在无菌条件下取出脾脏, 制成细胞悬液, 用 0.85%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液去除红血球, 按 2:1 比例与 NS-1 细胞混合, 经 50% PEG-1000 处理后, 将细胞悬于含 20% 胎牛血清的 HAT-DMEM 培养液中, 于 96 孔培养板中培养。14 天后, 换成 HT-DMEM 培养液, 一周后改用 DMEM 培养液, 血清含量为 10%。用常规 ELISA 检测法挑选能分泌抗体的阳性细胞克隆, 通过 4 次有限稀释法进行单细胞克隆。

### (三) 亲和试剂的制备

以分泌抗体强而稳定的杂交瘤 4B-2 系细胞, 注入 Balb/c 小鼠腹腔中, 得到含高浓度抗体的腹水。按本实验室先前报道的方法<sup>[8]</sup>, 用偶联 bGH 的亲和柱纯化单抗, 并以纯化的单抗偶联到 CNBr 活化的 Sepharose 4B 上制备免疫亲和吸附柱。

### (四) 亲和层析

将牛垂体在 pH8.3 的缓冲液 A (0.1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$ - $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH8.3, 0.5 mol/L NaCl) 中于 4 $^{\circ}\text{C}$  均浆 2h, 1000rpm, 离心 20min, 将上清加到单抗亲和柱上。在洗脱 bGH 以前, 先用 20 倍床体积的缓冲液 A 洗去不吸附的杂蛋白; 然后用缓冲液 B (PBS 含 0.2% Triton X-100) 洗去非特异结合的蛋白质; 再用 30 倍床体积的 PBS 洗去 Triton X-100; 最后用缓冲液 C (0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸, pH3.0) 洗脱 bGH。洗脱峰迅速用 2mol/L Tris 溶液中和, 并用等体积的饱和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀蛋白质, 离心后将沉淀溶于 PBS 并对 PBS 透析以除去  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

### (五) bGH 的生物学活性测定

采用经典的胫骨生长板测定法<sup>[9]</sup> 和受体结合的免疫酶标检测法<sup>[10]</sup> 测定 bGH 的生物活性。

## 结 果

### (一) 杂交瘤细胞系的建立

从我们所得到的数株分泌抗 bGH 抗体的杂交瘤细胞中, 将其中一株 4B-2 细胞进行了单细胞克隆培养, 经连续 4 次 100% 的阳性克隆后, 获得稳定分泌抗 bGH 单抗的细胞系, 该系细胞在体外培养 40 余代, 其抗体分泌仍相当稳定。用免疫亲和层析法纯化了 bGH 单抗, 经 SDS-PAGE 鉴定, 达到电泳纯 (图版 I-A)。用免疫双扩散法鉴定, 此单抗为 IgG<sub>1</sub> 亚型 (图版 I-C)。它与猪生长激素 (pGH) 有较强的交叉反应, 与人 (hGH) 羊 (oGH) 生长激素的交叉反应很弱 (图 1)。该单抗在双扩散试验中不与 bGH 形成沉淀线。

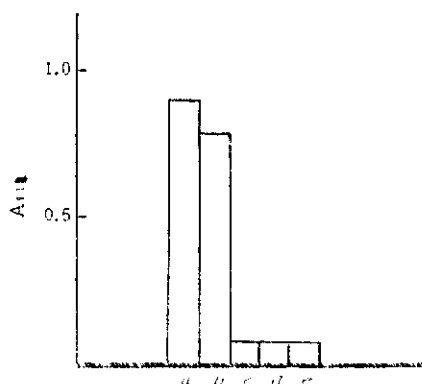


图 1 ELISA 测定 4B-2 单抗与 GHs 的颜色反应示意图  
Fig.1 Cross-reaction of bGH-McAb with GHs from different species assayed by ELISA  
a. bGH; b. pGH; c. hGH; d. oGH; e. control

将 4B-2 细胞注入 Balb/c 小鼠腹腔, 约两周后可收获腹水, 其单抗含量平均约 10mg/ml。

### (二) 免疫亲和层析纯化

将50mg纯化的单抗偶联到 Sepharose 4B上, 制成了一个3ml 的免疫亲和柱, 用于直接从牛垂体匀浆液中纯化bGH, 每次约可纯化3mg的 bGH, 图2为单抗亲和层析法纯化bGH的洗脱曲线。

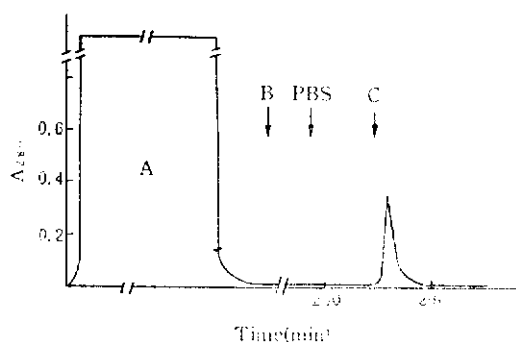


图2 单抗亲和层析法纯化bGH洗脱曲线  
Fig. 2 The purification of bGH from bovine pituitary by McAb-Sepharose 4B affinity chromatography

- A. 缓冲A液洗脱 Eluted by buffer A
- B. 缓冲B液洗脱 Eluted by buffer B
- C. 缓冲C液洗脱 Eluted by buffer C
- PBS洗脱 Eluted by PBS

将单抗亲和层析法纯化的bGH用SDS-PAGE分析, 在电泳图上呈现一条均一的带(图版I-Ba), 而常规酸性提取法制备的bGH在电泳图上则呈现分子量很接近的两条主带(图版I-Bb)。本实验室曾经报道, 进一步用单抗免疫亲和层析纯化后, 并不能将两条带分开, 说明这两种形式的bGH均保留与单抗结合的能力<sup>[11]</sup>。

### (三) 单抗的ELISA检测

在ELISA的抗体检测中, 4B-2 细胞培养上清液稀释 200 倍, 或小鼠腹水稀释到 $10^{-7}$ 时, 都有明显的颜色反应(图3), 说明 4B-2 细胞有很强的分泌抗体能力, 而且抗体与bGH的亲合力也很好。

如用三重抗体夹心的 ELISA 检测, 即用4B-2 单抗包被, 然后依次加bGH、

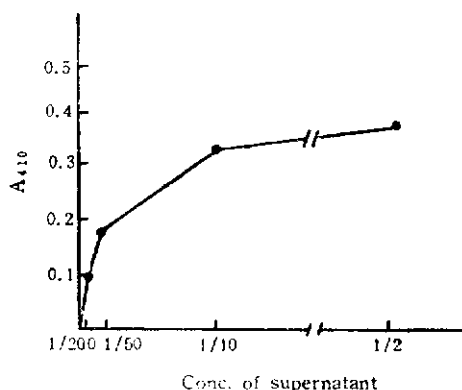


图3 不同浓度4B-2 细胞培养上清液测定曲线  
Fig. 3 Absorbance values at 410nm in the ELISA in different concentration of supernatants

兔抗bGH血清、酶标羊抗兔 Ig 抗体和底物, 结果bGH浓度和 ELISA 反应强度有关(图4), 因而可以通过酶联反应的颜色反应程度对bGH估量。

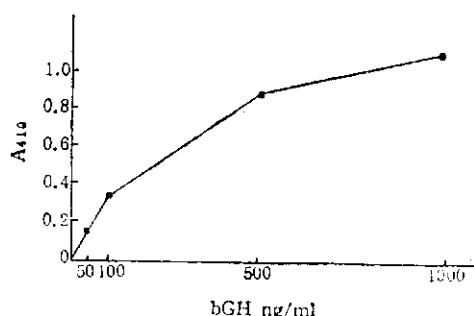


图4 不同浓度bGH的ELISA反应曲线  
Fig. 4 Absorbance values at 410nm in the ELISA in different concentration of bGH

### (四) bGH生物活性的测定

我们用 ELISA 方法测定了经亲和层析纯化的bGH和兔肝细胞膜受体的结合情况, 结果表明, 用这种方法纯化的bGH可以很好地和受体结合。将此 bGH注射给去垂体大鼠, 可以促进大鼠胫骨骺生长板的生长。对照组注射生理盐水的生长板

宽度为 $163 \pm 24 \mu\text{m}$ , 实验组注射的宽度为 $252 \pm 43 \mu\text{m}$  (实验动物每组 4 只,  $t = 5.57$   $P < 0.01$ )。

## 讨 论

1984 年 Krivi 首次报道了 bGH 单抗的制备及用单抗免疫亲和层析法纯化 bGH, 这为分离纯化 bGH 提供一个良好的工具。用单抗制成的免疫亲和柱可以直接从牛垂体匀浆中一步分离制备高纯度的 bGH。和常规方法相比, 它不但快速、简便, 而且可避免由于反复处理对 bGH 活性造成的损失。亲和柱还可反复使用, 其对 bGH 的结合能力相当稳定。从图版 I-Bb 可以看出, 常规酸性抽提法制备的 bGH, 在 SDS-PAGE 中呈现两条很接近的带, 这可能是由于抽提过程中 bGH 降解之故<sup>[11]</sup>。显然用单抗亲和柱纯化 bGH 就可以避免这种降解 (图版 I-Ba)。从我们的实验结果还可以看出, 我们制备的分泌抗 bGH 单抗的 4B-2 细胞系, 其分泌抗体的能力 (10 mg/ml 腹水) 显著高于 Krivi 报道的细胞系 (约 4 mg/ml 腹水), 这对大量地生产单抗是很有利的。

单抗除用以分离纯化 bGH, 还可以用于对 bGH 的估量测定。我们曾用酶标三夹心法进行 bGH 估量测定试验。在适当的抗原抗体比例下, 光吸收值的大小与所加 bGH 浓度有关, 而最低检测度为 50 ng/ml 的 bGH。

单抗也可作示踪剂和拮抗剂用于研究 GH 的分子结构与功能的关系。尽管 oGH 一级结构与 bGH 很相似, 但与 4B-2 的单抗的交叉反应却很弱。相反, pGH 一级结构与 bGH 差别稍大, 但与 4B-2 单抗的交叉反应却很强 (图 1), 这可能反映了 GH 的生物活性中心与免疫活性中心并不相同。

单抗以其高度特异性和高纯度的优点, 帮助人们对 GH 的结构与功能间关系作深入的探讨, 目前应用抗 hGH 单抗研究 hGH 的异构体及 hGH 受体结合方面已有很多工作<sup>[12]</sup>。借助于单抗的高度特异性, 可了解异构体在免疫学上的差异, 还可进一步认识不同形式的 GH 存在的生物学意义。我们希望在获得更多的抗 bGH 单抗基础上, 在了解 bGH 的决定簇位置、受体结合区域以及 GH 的生物活性中心做进一步的工作。

## 参 考 文 献

- [1] Li, C. H. and Evans, H. M., *Science*, 99: 183, 1944.
- [2] Wallis, M. et al., *The Biochemistry of the Polypeptide Hormones*, John Wiley & Sons press, pp. 184—222, 1984.
- [3] Lewis, U. J., *Ann. Rev. Physiol.*, 46: 33—42, 1984.
- [4] 宋德秀, 遗传工程, 2: 1—7, 1984.
- [5] Ivanyi and Davis, P., *Mol. Immunol.*, 17: 287, 1980.
- [6] Bundesen, P. G. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 1472, 1980.
- [7] Krivi, G. G. and Rowold, E. Jr., *Hybridoma*, 3(2): 157—162, 1984.
- [8] 戴宗汉, 史惠仙: 生物化学杂志, 3(5): 477, 1987.
- [9] Greenspan, F. S. et al., *Endocrinology* 45: 455—463, 1949.
- [10] 王大钧等: 生物化学杂志, 待发表.
- [11] 戴宗汉等: 生物化学杂志, 待发表.
- [12] Retegui, L. A. et al., *Mol. Immunol.*, 19: 865, 1982.

# PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AND IMMUNOABSORBENT TO BOVINE GROWTH HORMONE

Yu Yimin Yu Muzhen Shi Yingxian

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing)

A stable hybridoma cell line 4B-2 secreting monoclonal antibody (McAb) to bovine growth hormone (bGH) has been established and characterized. Ascites fluid antibody was produced by injecting pristane-primed Balb/c mice with hybridoma cells. The produced immunoglobins were purified from ascites fluid by affinity chromatography on bGH-Sepharose 4B. The specific McAb content of ascites fluid is 10mg/ml. The subclass of McAb determined by immunodiffusion using specific antisera, was found to be IgG<sub>1</sub>.

McAb was used as a reagent in immunoabsorbent chromatography (IAC) of bGH. The capacity of the affinity reagent binding bGH was calculated to be about 1 mg per ml reagent coupled with about 17 mg of pure McAb. bGH purified by IAC retained activity in a rabbit liver receptor assay and in a tibia growth test assay.

## Key words

Bovine growth hormone, monoclonal antibody against bGH, immunoabsorbent chromatography

## 图 版 说 明

Explanation of plate

A. SDS-PAGE 鉴定经亲和层析纯化的bGH单抗

SDS-PAGE of 4B-2 McAb purified by bGH-Sepharose 4B

a<sub>1</sub>: 标准蛋白 Protein marker

b, c: 纯化的单抗 McAb purified by IAC

B. SDS-PAGE 鉴定经单抗免疫亲和层析纯化的bGH

a<sub>1</sub>: 单抗免疫亲和层析纯化的bGH bGH purified by McAb-Sepharose 4B

b: 常规方法纯化的bGH bGH purified by conventional method

c: 标准蛋白质 Protein marker

C. 免疫双扩散法鉴定抗bGH单抗的亚型 Subclass identification of McAb by immunodiffusion

a: 抗IgG<sub>1</sub>血清 Antiserum to IgG<sub>1</sub>

b: 抗IgG<sub>1a</sub>血清 Antiserum to IgG<sub>1a</sub>

c: 抗IgG<sub>1b</sub>血清 Antiserum to IgG<sub>1b</sub>

d: 抗IgG<sub>2</sub>血清 Antiserum to IgG<sub>2</sub>

e: 纯化的抗bGH单抗 Purified McAb to bGH

于一民等：抗牛生长激素单克隆抗体及其免疫和吸附柱的制备

图版 I

Plate I

Yu Yimin et al.: Preparation of monoclonal antibody and immunoabsorbent to bovine growth hormone

