

## 专一识别甲酯化赤霉素 7,4 的单克隆抗体的制备

郑志富 周 燮 陈金桂

(南京农业大学农学系 南京 210095)

**摘 要** 合成  $GA_3$ -3-O-HSA 免疫原的同时,往往产生  $GA_3$ -7-CONH-HSA 等其它成分,从而有可能通过特定的 ELISA 分步筛选法,在一次单抗研制流程中兼得两类针对不同  $GA_2$  抗原决定簇的单克隆抗体 (MAbs)。交叉反应结果表明,其中的 MAb BG2 对  $GA_{7,4}$  甲酯具有高亲和力和专一性,它与  $GA_{7,4}me$  的亲合力比  $GA_7me$  与  $GA_1me$  分别高出 100 与 200 倍。7 位羧基的甲酯化可显著增加  $GA_7$  与该抗体的结合,而 A 环上双键或  $3\beta$  羟基的缺失,19,10-*r*-内酯环的破坏及 D 环上 13 位羟基的存在却严重降低  $GA_7$  与它的结合。这种高专一性的单抗将可用于高等植物和真菌体内早期非环化途径中的  $GA_7$  与  $GA_1$  的免疫定量与定位研究。用该抗体建立的  $GA_1me$  与  $GA_7me$  ELISAs 具有极高的灵敏度,两者的检测范围分别为  $1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-12}$  mol 与  $2.0 \times 10^{-15} \sim 2.0 \times 10^{-13}$  mol。

**关键词** 赤霉素 (GA), 单克隆抗体, 酶联免疫测定法 (ELISA), 杂交瘤分步筛选法

在费力、费时、费钱的半抗原-植物激素赤霉素 (GA) 单克隆抗体制备研究中,一次性获得针对免疫原中不同抗原决定簇的多种单克隆抗体,实为许多研究者所期望,然而迄今为止,尚未见成功报道。笔者试图利用合成的  $GA_3$ -3-O-HSA 免疫原存在异质性,即含有  $GA_3$ -7-CONH-HSA 等成分这一特性 (图 1),通过特定的杂交瘤细胞筛选方法,在一个单抗研制流程中同时获得针对不同  $GA_2$  抗原决定簇的几类单克隆抗体。针对  $GA_3$ -3-O-HSA (C) 产生的抗体可识别非衍生化 GAs,因而可有效地用于免疫定量分析与亲和纯化研究<sup>[1~6]</sup>;而针对  $HOOCCH_2CH_2COO-13-GA_3-7-CONH-HSA$  (F) 产生的抗体与  $GA_{7,4}me$  可能具有极高的亲和力 (这是因为  $GA_3$  分子的 13-OH 转变为低极性的酯键,使得该  $GA_3$  的 D 环结构可能更接近于 13-H GA 的 D 环结构。),因而特别适用于  $GA_{7,4}$  的免疫定位研究。上述尝试已获成功,识别非衍生化 GAs 的 MAb 已于前文报道<sup>[8]</sup>,在本文中将报道识别 GAs 甲酯的 MAb 的特性,并讨论杂交瘤细胞的筛选方法。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 GA 和 GA 衍生物标准品

$GA_4$ ,  $GA_5$ ,  $GA_7$ ,  $GA_{13}$ ,  $GA_{14}$ ,  $GA_{20}$ ,  $GA_{24}$ ,  $GA_{31}$ ,  $GA_{36}$ ,  $GA_3$ -glucoside 纯品系 Murofushi (日) 教授赠品;  $GA_1$ ,  $GA_3$ ,  $GA_9$  纯品系 Pharis (加) 教授赠品。

#### 1.2 免疫原的合成

免疫原的合成见文献 [8]。在较高温度下,  $GA_3$  分子的 3-OH 与 13-OH 均能与琥珀酸酐反应,形成图 1 所示的 A 与 B 结构。在随后的反应中, A 或 B 中的侧链羧基与 7 位

羧基又能同时参与混合酸酐反应, 从而使得合成的免疫原含有 C、D、E、F 等多种成分。

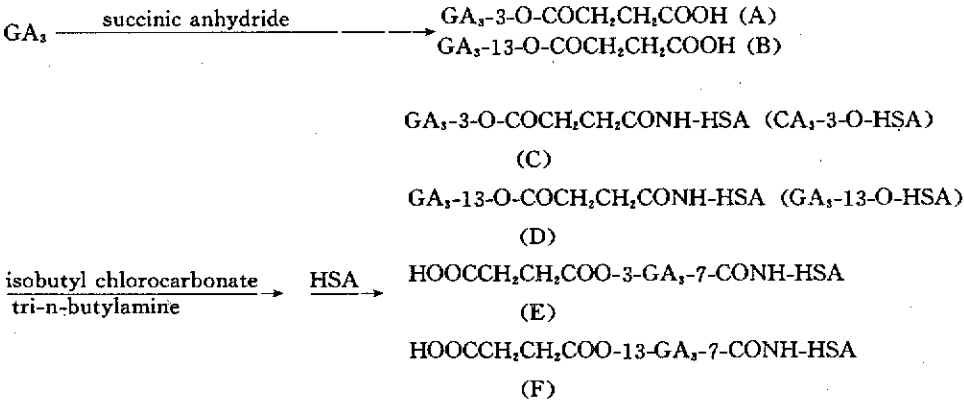


图 1  $\text{GA}_3$  通过羟基或 7 位羧基与载体蛋白 (HSA) 偶联

Fig. 1 Coupling of  $\text{GA}_3$  to carrier protein (HSA) via hydroxyl groups or via C-7 carboxyl group

### 1.3 包被物的合成

包被物的合成与免疫原的相同, 仅将牛血清白蛋白 (BSA) 代替免疫原中的人血清白蛋白 (HSA)。

### 1.4 非竞争性间接 ELISA 和竞争性间接 ELISA

ELISA 的方法参见文献 [8]。

### 1.5 小鼠免疫、细胞融合

免疫、融合的方法参见文献 [8]。

### 1.6 杂交瘤细胞的筛选

采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。该法包括两大步骤, 即先用非竞争性间接 ELISA 从大量杂交瘤中粗选出呈阳性 (指杂交瘤细胞培养上清液的  $\text{OD}_{492\text{nm}}$  比阴性对照高 3 倍以上) 的杂交瘤, 然而再采用双板对比法, 精选这些杂交瘤, 即同时采用竞争性间接 ELISA 与非竞争性间接 ELISA 进行对比检测, 以确认细胞培养上清液中的抗体与  $\text{GA}_3$  结合, 仅将能分泌抗  $\text{GA}_3$  抗体的那些杂交瘤继续培养, 其余的则被淘汰。

### 1.7 杂交瘤细胞的克隆与腹水的制备

采用有限稀释法进行克隆。将克隆后的杂交瘤细胞扩大培养, 并接种于经石蜡油致敏的 Balb/c 小鼠腹腔内, 产生含抗  $\text{GA}_3$  抗体的腹水。

### 1.8 直接 ELISA

参见文献 [8]。

### 1.9 抗体交叉反应的测定

参见文献 [9]。

## 2 结 果

### 2.1 杂交瘤细胞的产生

细胞融合后 5d 观察, 细胞融合率达 100%。在融合后的第 9 天, 采用 ELISA 分步筛选法筛选杂交瘤细胞, 先用非竞争性间接 ELISA 从 5 块 96 孔板中粗选出 136 个呈阳性

的克隆。随后,以  $GA_3$  为竞争性抑制剂,其量为每孔  $1\mu\text{g}$ ,采用双板对比法对这些杂交瘤进行精选,从中选出 20 个能分泌所需抗体的杂交瘤。其中的 AB10 与 BG2 杂交瘤所分泌的单克隆抗体分别针对两类不同性质的抗原决定簇,即 C、F 结构中的  $GA_3$  抗原决定簇。

## 2.2 $BG_2$ 单克隆抗体的特性

MAB BG2 与不同  $GA_s$  或衍生物交叉反应如表 1 所示。与前文所述的 MAB AB10 相反<sup>(8)</sup>,MAB BG2 对  $GA_7$ ,  $GA_4$  等 13 位非羟化  $GA_s$  有很高的亲和力,而对  $GA_1$ ,  $GA_3$  等 13 位羟化  $GA_s$  的亲和力甚低。7 位羧基的甲酯化可显著降低 MAB AB10 对  $GA_s$  的亲和力,却显著增加 MAB BG2 对  $GA_s$  的亲和力。一般地,7-COOH 的甲酯化可使 MAB BG2 的亲和力提高 40~300 倍。

表 1 MAB BG2 与  $GA_s$  或其衍生物的交叉反应

Table 1. Cross-reactivities of MAB BG2 with  $GA_s$  and their derivatives

Class	Compound	Cross-reactivity/%		
$C_{19}$ - $GA_s$	13-OH	$GA_1$	0.0043	
		$GA_3$	0.019	
		$GA_5$	0.041	
		$GA_{20}$	0.0053	
	13-H	$GA_4$	0.11	
		$GA_7$	0.31	
		$GA_9$	0.034	
	$C_{13}$ - $GA_s$ derivatives	12-OH	$GA_{31}$	0.0062
			$GA_3$ -glucoside	0.059
			$GA_{1me}$	0.43
$GA_3me$			0.78	
$GA_4me$			10.0	
$GA_7me$			100.0	
$GA_9me$			2.08	
$G_{20}$ - $GA_s$	3-OH, 13-H	$GA_{13}$	0.0062	
		$GA_{14}$	0.010	
		$GA_{36}$	0.0016	
	3-H, 13-H	$GA_{24}$	0.019	

Cross-reactivities were measured according to the method of Robins *et al*<sup>(9)</sup>.

如表 1 所示, MAB BG2 对  $GA_{7me}$  甲酯具有很高的专一性和亲和力,它与  $GA_{7me}$  的亲和力比  $GA_3me$  与  $GA_{1me}$  分别高 100 与 200 倍以上。 $GA$  分子 A 环上的双键或  $3\beta$ -OH 的缺失, 19, 10-r-内酯环的破坏及 D 环上 13-OH 的存在均严重降低  $GA_s$  与它的结合, 这表明该抗体既能专一识别 A/B 环, 又能专一识别 C/D 环。

用该抗体建立的  $GA_{4me}$  与  $GA_{7me}$  直接 ELISAs 具有极高的灵敏度, 两者的检测范围分别为 10~1000fmol 与 2~200fmol, 而亦基于该抗体的  $GA_4$  与  $GA_7$  ELISA 的检测灵

敏度则低得多, 两者分别为 2.0~147pmol 与 0.7~50pmol。这一事实进而印证了 MAb BG2 对 GA<sub>7,4</sub> 甲酯的高亲和力特性。

### 3 讨 论

#### 3.1 杂交瘤细胞的筛选方法

何以一次性获得针对半抗原-植物激素中不同的抗原决定簇而产生的多种单克隆抗体? 笔者认为, 建立适当的杂交瘤细胞筛选方法, 乃关键之所在。一般地, 用放射免疫法 (RIA)<sup>[1~3, 5]</sup>, 只能筛选出与<sup>3</sup>H-植物激素具有相同或相似性质的抗原决定簇产生的 MAb, 而用本文前述的 ELISA 分步筛选法往往可以一次性获得针对不同抗原决定簇的几类单抗。该法所用的包被物, 其蛋白组分 (BSA) 与免疫原中的蛋白组分 (HSA) 不同, 即无免疫交叉反应, 但两者与 GA<sub>3</sub> 的连接方式则相同 (见图 1)。使用不同的连接蛋白有利于在用非竞争性间接 ELISA 粗选时, 淘汰大量分泌抗载体蛋白 (HSA) 抗体的杂交瘤细胞。而采用相同的连接方式, 则使得包被物中的 GA<sub>3</sub> 结构与免疫原中的 GA<sub>3</sub> 结构具有相同或十分相似的免疫反应性。于是, 采用基于这种包被物的筛选法, 可以筛选到由免疫原中不同的 GA<sub>3</sub> 抗原决定簇所诱发的不同杂交瘤细胞。

需注意的是, 双板对比法中, 用作竞争性抑制剂的 GA 标准品数量, 对筛选结果影响甚大。当 GA<sub>3</sub> 使用量大时, 抗 GA<sub>3</sub> 抗体和抗 GA<sub>3</sub> 与连接键的抗体与板上包被物的结合均很弱, 结果难以区分分泌这两类性质不同抗体的杂交瘤; 而当 GA<sub>3</sub> 使用量小时, 对 GA<sub>3</sub> 亲和力低 (而对衍生化 GA<sub>3</sub> 亲和力高) 的抗体, 如同抗 GA<sub>3</sub> 与连接键的抗体, 与板上包被物的结合亦很强, 结果分泌这两类抗体的杂交瘤亦难以区分。因而, 仅当使用适量 GA<sub>3</sub> 时, 才能同时筛选到针对不同 GA<sub>3</sub> 抗原决定簇的不同杂交瘤细胞。本研究所用的 GA<sub>3</sub> 数量为 1μg/孔, 这一数值较合适, 它能完全抑制识别非衍生化 GAs 的 MAb AB10<sup>[8]</sup> 与 GA<sub>3</sub>-BSA 包被物的结合, 但只部分抑制识别甲酯化 GAs 的 MAb BG2 与包被物的结合。

#### 3.2 免疫原的结构与抗体的识别特性

针对 C 结构中的 GA<sub>3</sub> 抗原决定簇产生的抗体可识别非衍生化 GAs, 且与 13 位羟化 GAs 的亲和力显著高于 13 位非羟化 GAs<sup>[1]</sup>, 前文所述的 MAb AB10<sup>[8]</sup> 即属这类抗体。而针对 F 结构中的 GA<sub>3</sub> 抗原决定簇产生的抗体则与 MAb AB10 的性质颇为不同。在 F 结构中, GA<sub>3</sub> 分子的 7-COOH 与 13-OH 分别转变为酰胺键与低极性酯键, 从而使得针对这类结构产生的抗体与非衍生化 GA<sub>3</sub> 亲和力低, 而与甲酯化 13-H GAs 则可能具有很高亲和力, 本文所述的 MAb BG2 恰属此类抗体。MAb BG2 识别特性与前期以 7-COOH 为偶联位点制备的多克隆抗体 (PAbS)<sup>[10~15]</sup> 不同, 它能专一识别 A/B 环与 C/D 环。Weiler 等<sup>[10]</sup> 以 GA<sub>3</sub>-7-CONH-BSA 为免疫原制得的 PAbS 只能专一识别 A/B 环, 而难以识别 C/D 环; 而 Yang 等<sup>[14]</sup> 制得的 PAbS 则恰好相反。这表明, 以 7-COOH 为偶联位点合成的免疫原所产生的抗体专一性不一。已知 7-COOH 处于 A 环与 C/D 环之间, 且与这些环的间距较短, 这可能是造成抗体专一性多样化的主要原因。

如表 1 所示, MAb BG2 对 GA<sub>7,me</sub> 的亲和力比 GA<sub>3,me</sub> 与 GA<sub>1,me</sub> 的分别高出 100 与 200 倍, 因而, 该抗体用于早期非羟化途径中的 GA<sub>7</sub> 定量与定位研究时, 可消除早期 13 位羟化途径中的 GA<sub>1</sub> 和 GA<sub>3</sub> 的干扰。

## 参 考 文 献

- [1] Knox J P, Beale M H, Butcher G W *et al.* *Planta*, 1987, **170**: 86~91.
- [2] Knox J P, Beale M H, Butcher G W *et al.* *Plant Physiol*, 1988, **88**: 959~960.
- [3] Nester-Hudson J E, Semenenko F W, Beale M H *et al.* *Phytochemistry*, 1990, **29**: 1041~1045.
- [4] Nakajima M, Yamaguchi I, Kizawa S *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1991, **32**: 505~510.
- [5] Nakajima M, Yamaguchi I, Nagatani A *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1991, **32**: 515~521.
- [6] Yamaguchi I, Nakajima M, Kanazawa K *et al.* In: Karssen CM, Van Loon LC and Vreugdenhil D (eds), *Progress in Plant Growth Regulation*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1992, pp. 874-882.
- [7] Nakajima M, Yamaguchi I, Kizawa S *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1991, **32**: 511~513.
- [8] Zheng Z F, Zhou X. *Acta Botanica Sinica*, 1995, **37** (10): 761~769.
- [9] Robins R J, Morgan M R A, Rhodes M J C *et al.* *Phytochemistry*, 1984, **23** (5): 1119~1123.
- [10] Weiler E W, Wiczorek U. *Planta*, 1981, **152**: 159~167.
- [11] Atzorn R, Weiler E W, *Planta*, 1983, **159**: 7~11.
- [12] Atzorn R, Weiler E W, *Planta*, 1983, **159**: 1~6.
- [13] Yamaguchi I, Nakagawa R, Kuroguchi S *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1987, **28**: 815~824.
- [14] Yang Y Y, Yamaguchi I, Murofushi N *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1993, **57**: 1016~1017.
- [15] 吴颂如, 周 燮. *南京农业大学学报*, 1990, **13**: 24~27.

## Preparation of Monoclonal Antibodies Specific for Methyl Esters of Gibberellins A<sub>7</sub> and A<sub>4</sub>

Zheng Zhifu Zhou Xie Chen Jingui

(Department of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract** According to heterogeneity of immunogen of GA<sub>3</sub>-3-O-HSA which contains other components, such as GA<sub>3</sub>-7-CONH-HSA, in combination with development of two-step screening assay for hybridomas, two kinds of monoclonal antibodies (MAbs) against different antigen determinants of GA<sub>3</sub> were prepared in single process of preparing antibody. The results from the experiment of cross-reactivities show that MAb BG2 has high affinity for and specificity to GA<sub>7/4</sub> methyl esters (GA<sub>7/4</sub>me). It exhibits over 100 and 200 times higher affinity for GA<sub>7</sub>me than for GA<sub>3</sub>me and GA<sub>4</sub>me, respectively. Methylation of the 7-oic acid significantly increases the binding of MAb BG2 with GAs. On the contrary, the absence of double bond or 3β-OH in A cycle and the breakdown of 19, 10-r-lactone as well as the presence of 13-OH in D cycle magnificantly reduce the binding of MAb BG2 with GAs. This antibody with high specificity can be effectively used to quantify and localize main active GA<sub>7</sub> and GA<sub>4</sub> from early non-hydroxylation pathway of GAs metabolism. Based on this antibody, enzyme-linked immunosorbent assay with high sensitivity were developed which display linearity ranges from 1.0×10<sup>-14</sup> to 1.0×10<sup>-12</sup> mol of GA<sub>4</sub>me and from 2.0×10<sup>-15</sup> to 2.0×10<sup>-13</sup> mol of GA<sub>7</sub>me.

**Key words** Gibberellin (GA), monoclonal antibody, enzyme-linked immunosorbent assay, two-step screening assay for hybridomas