

人红细胞生成素单克隆抗体的 制备、鉴定及应用研究

施水良 曾 怡 金以丰 谢 弘*

(南京大学生物化学系 南京 210008)

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)*

摘 要 用 rhEPO 作为抗原,免疫 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与 X63Ag8.653 小鼠骨髓瘤细胞融合,用碱性 PAGE 方法进一步分离并纯化的 rhEPO,包被 PVC 板,对杂交瘤用 ELISA 方法进行筛选,获得两株稳定分泌抗 hEPO 单抗的杂交瘤细胞株。经鉴定分别属于 IgG₁、IgG_{2b},轻链均为 k 链, K_d 分别为 5.53×10^{-10} mol/L 和 1.34×10^{-10} mol/L。用 Western blot 方法证明两者对 hEPO 具有高度的专一性,能特异地识别 rhEPO 和尿源 hEPO。所制备单抗可作为亲和层析的配体,用于再生障碍性贫血病人尿中 EPO 及哺乳类工程细胞所表达的 hEPO 的分离、纯化,并可用于 hEPO 的定量检测。

关键词 人红细胞生成素 (hEPO), 单克隆抗体

红细胞生成素 (EPO) 是调节红系前体细胞增殖、分化,并保持血液红细胞和血红蛋白处于正常生理水平的最重要的细胞因子^(1,2)。EPO 的研究已有近 100 年的历史,直至 1975 年才从再生障碍性贫血患者尿液中分离到 SDS-PAGE 纯的 EPO⁽³⁾。1985 年克隆到 hEPO 基因组基因⁽⁴⁾,并在 CHO-DHFR⁻细胞中表达。1989 年,美国 FDA 批准 rhEPO 投放市场用于治疗肾衰后引起的贫血。但在 EPO 的活性中心、作用机制及 EPO 基因的表达调控等许多方面还不完全了解。

1975 年 Kohler 和 Milstein 创建了杂交瘤技术制备单克隆抗体以来,单抗已成为研究、检测、分离纯化生物大分子所不可缺少的工具,并发挥着越来越大的作用。本文以 rhEPO 为抗原,研制了两株小鼠抗 hEPO 单抗,并对它们进行了鉴定,在 hEPO 检测及亲和层析等方面的应用作了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

rhEPO Amgen 公司产品(每毫升含 rhEPO 为 10 000u、人血清白蛋白 2.7mg 左右, hEPO 只占总蛋白 2%~3%)。DMEM 培养液为美国 GIBCO BRL 公司产品。聚乙二醇(M. W. 4000) Merck 公司产品。HAT、HT 为美国 Sigma 公司产品。小鼠骨髓瘤细胞株 X63Ag8.653 中国科学院上海细胞生物学研究所提供。羊抗小鼠 IgG 辣根过氧化物酶标记抗体为美国 Sigma 公司产品。人血清白蛋白为上海生物制品研究所产品(经 SDS-PAGE 检测,大部分为人血清白蛋白,还含有十多种其他血清蛋白)。二氨基联苯

1.2.10 再生障碍性贫血患者尿液中的 hEPO 及转染 COS-7 细胞培养液上清 rhEPO 的测定: 以小鼠抗 hEPO 单抗包被 PVC 板, 清洗, 加待测 EPO 样品, 再加兔抗 rhEPO 血清, 加羊抗兔 IgG-HRP 抗体, 进行双夹心酶联免疫法测定 EPO 含量。

1.2.11 用 Western blot 方法对单克隆抗体特异性进行鉴定: 按照文献[6]的方法, 用 Amgen 公司 rhEPO 产品和美国 Genzyme 公司抗 hEPO 单抗 (AE7A5) 产品为阳性对照, 以正常人血清白蛋白为阴性对照。

2 结果

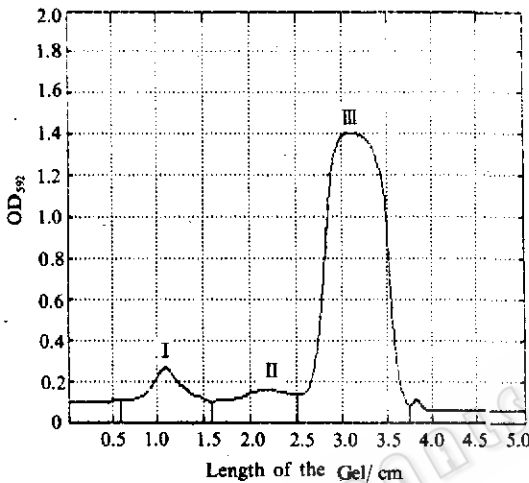


图 2 抗原 rhEPO 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (非变性, 非还原状态) 扫描图

Fig. 2 Gel scanning of rhEPO on PAGE (non-denaturing, non-reducing conditions)

Note: N. C.: Normal human serum albumin

对四个阳性克隆分别用有限稀释法进行克隆, 第四孔在第一次克隆后丢失, 第一孔经二次克隆阳性率仍然很低, 故弃之。第二和第三阳性孔经二次克隆后, 单克隆的阳性率几乎达 100%, 并经连续 5 次克隆, 分别命名为 CNAE1 和 CNAE2。

2.3 抗体的分类

CNAE1 为 IgG₁, 轻链为 k 链; CNAE2 为 IgG_{2b}, 轻链为 k 链。

2.4 腹水的效价及纯化

用 ELISA 法测定, CNAE1 的滴度达 10^{10} , CNAE2 的滴度达 10^{11} , 经硫酸铵盐析结合 DEAE-cellulose-DE52 层析, 纯度用 SDS-PAGE 检验, 结果在 25 及 55kDa 处出现两条带, 几乎不含其它杂带, 经计算 CNAE1 腹水单抗含量为 7.4mg/ml, CNAE2 腹水单抗含量为 13.2mg/ml。

2.5 单抗专一性初步鉴定

用 Western-blot 方法分析, 结果表明两株单抗能专一识别 rhEPO, 而与人血清白蛋

2.1 rhEPO 的纯化

粗品 EPO 进行 PAGE, 用考马斯亮蓝 R-250 染色, 并在 Bechman Du-70 分光光度计对 λ_{592} 扫描, 见图 2。用 AE7A5 单抗通过 Western-blot 方法证明峰 2 为 rhEPO, 将含 rhEPO 的条带的胶切下, 电泳洗脱, 以供杂交瘤筛选之用。

2.2 杂交瘤的筛选

对杂交瘤培养液上清用 ELISA 方法筛选, 获得 4 个阳性克隆, 结果见表 1:

表 1 杂交瘤筛选结果

Table 1 The result of screening hybridoma

Hybridoma	OD ₅₉₂	
	Supernatant	N. C.
1	1.440	0.286
2	7.451	0.740
3	5.977	0.620
4	0.455	0.136

白均无反应。

2.6 hEPO 双抗夹心酶联免疫检测

经测再生障碍性贫血患者尿中 EPO 的含量为 $6.25 \pm 0.36 \text{ u/ml}$ ($n=6$)。用 Amgen 公司 rhEPO 产品为标准品, 并以空载体转染 COS-7 细胞的培养液上清为阴性对照, PBS 为空白对照, 测得 hEPO 基因转染的 COS-7 细胞培养液上清中 rhEPO 含量为 $251 \pm 7 \text{ u/ml}$ 。见表 2。

表 2 双夹心酶联免疫检测 rhEPO

Table 2 Two-antibody sandwich ELISA of recombinant human erythropoietin expression by COS-7 cells transfected with PSV2-epo

	OD ₄₉₂									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.937 (500u)	0.806 (250u)	0.603 (125u)	0.451 (62.5u)	0.352 (31.3u)	0.235 (15.8u)	0.201 (7.8u)	0.187 (3.9u)	0.121 (2.0u)	0.082 (1.0u)
B	0.902 (500u)	0.789 (250u)	0.631 (125u)	0.470 (62.5u)	0.326 (31.3u)	0.254 (15.8u)	0.198 (7.8u)	0.174 (3.9u)	0.115 (2.0u)	0.079 (1.0u)
C	0.0 (blank)	0.808 (psv2E)	0.792 (psv2E)	0.805 (psv2E)	0.780 (psv2E)	0.053 (N. C.)	0.062 (N. C.)	0.0 (blank)	0.0 (blank)	0.063 (N. C.)
D	0.0 (blank)	0.821 (psv2E)	0.815 (psv2E)	0.811 (psv2E)	0.832 (psv2E)	0.043 (N. C.)	0.053 (N. C.)	0.0 (blank)	0.0 (blank)	0.058 (N. C.)

Notes: ELISA is performed in 40-well PVC plate.

Wells of A and B lines are for standard curve, each number in brackets denotes the concentration of standard rhEPO (u/ml).

Wells of C and D lines are for samples, blank is PBS,

psv2E means the supernatant of COS-7 cells transfected with psv2-EPO,

N. C. means negative control (the supernatant of COS-7 cells transfected with psv2-dhfr).

2.7 rhEPO 的免疫沉淀

以 EPO 单抗为配体作亲和层析, 能特异性地吸附转染 COS-7 细胞培养液上清中的 rhEPO。经 SDS-PAGE, 从电泳图谱 (图 3) 中可清晰地看到转染 COS-7 表达的 rhEPO 条带。用双抗夹心酶联免疫法未能测到穿过峰中存在 rhEPO, 说明 hEPO 单抗将培养液上清中的 rhEPO 吸附完全。

图 3 免疫沉淀 rhEPO 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE of rhEPO immuno-precipitated with anti-hEPO-IgG binding to protein A-Sepharose column

A. rhEPO immuno-precipitated from supernatant of COS-7 cells transfected with PSV2-EPO.

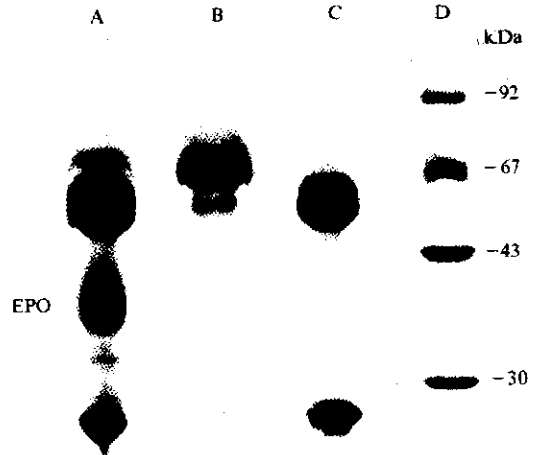
B. Supernatant of COS-7 cells transfected with PSV2-EPO.

C. Negative control: anti-hEPO-IgG binding to protein A-Sepharose.

D. Molecular weight standard,

* Heavy chain of antibody

** Light chain of antibody



2.8 抗体亲和常数的测定结果

结果为 CNAE1 的 K_d 为 5.53×10^{-10} mol/L, CNAE2 的 K_d 为 1.34×10^{-10} mol/L。

3 讨论

以 Amgen 公司的 rhEPO 产品作为小鼠免疫用抗原,用碱性 PAGE 方法纯化的 rhEPO 对杂交瘤进行筛选,得到了满意的结果。rhEPO 用 PAGE 纯化,采用不含 SDS 及 DTT 或巯基乙醇等的还原剂,这是为了防止 rhEPO 变性,避免产生的单抗只识别 SDS 或还原剂处理过的 rhEPO,而与天然 hEPO 不反应^[6]。

红细胞生成素具有高度保守性,人红细胞生成素与小鼠红细胞生成素氨基酸序列的同源程度高达 82%。这给人红细胞生成素单抗的制备带来了困难,我们采用多部位多点皮下注射,连续加强免疫 4~5 次,且间隔时间 3~4 周,充分调动小鼠免疫系统以产生较强的免疫应答反应。连续多次低剂量的抗原刺激有利于 IgG 类、高亲和力、专一性强的抗体的获得。抗体亲和力和专一性的成熟是靠 H、L 链 V 区的高变区基因片段的体细胞的点突变积累所完成的。尽管突变机制不完全清楚,但它有赖于抗原长时间连续地刺激作用,以对抗体的高变区进行精细地调节。

亲和常数的测定,我们采用 ELISA 方法,这比常规的测定方法简便,又不需要高纯度的抗原和同位素标记的步骤,仅需纯化的抗体,而抗体的纯化很方便,且易定量。从得到的结果来看,此方法可行准确。

我们在 EPO 单抗应用于检测及分离纯化 EPO 方面作了初步的探讨,结果表明亲和力、灵敏度、重复性和专一性方面均令人满意。

人体造血系统极为复杂,它涉及到众多的细胞因子及细胞之间的相互作用。目前人们对它的了解很不完全,因此高亲和力、专一性强的抗红细胞生成素单抗的制备无疑提供了有力的工具,具有一定的研究和开发价值。

参 考 文 献

- (1) Goldwasser E. Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol, 1975, 34: 2285~2292.
- (2) Graber S. E, Krantz S. B. Annu Rev Med, 1987, 29: 51~66.
- (3) Miyake T, Kung C. K-H, Goldwasser E. J Biol Chem, 1977, 252: 5558~5564.
- (4) Lin F K, Suggs S, Lin C H, Proc Natl Acad Sci. USA, 1985, 82: 7580~7584.
- (5) Gelfre G. Nature, 1977, 266: 550~552.
- (6) Ed Harlow, David L. Antibodies, a Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- (7) Beatty J D, Fisher J W, Beru N, et al. Journal of Immunological Methods, 1987, 100, 173~179.
- (8) Shin-ichi Yanagawa, Kumiko Hirade, Hideki Ohnota, et al. J Biol Chem, 1984, 259, 2707~2710.

Preparation, Characterization and Application of Monoclonal Antibodies Against Human Erythropoietin

Shi Shuiliang Zeng Yi Jin Yifeng Xie Hong*

(*Biochemistry Department, Nanjing University, Nanjing 210008*)

(*Shanghai Institute of Cell Biology, Academic Sinica, Shanghai 200031*)*

Abstract Two monoclonal antibodies (Mabs) against hEPO are developed. We used rhEPO as antigen for immunization. The spleen cells of the immunized mice were isolated and fused with myeloma cells X63Ag8.653. Hybridoma cell supernatant were screened for the production of anti-hEPO Mabs with ELISA, using purified rhEPO absorbed to 96-well PVC plates. One Mab is IgG1 with K_d of 5.53×10^{-10} mol/L, while the other is IgG2b with K_d of 1.34×10^{-10} mol/L. Both Mabs can recognize rhEPO and human urine EPO of patients with aplastic anemia. They are proved to be specific to rhEPO by ELISA and Western-blot analysis. They can be used as ligands of immunoaffinity chromatography for the purification of hEPO from urine of aplastic anemia patients or the supernatant media of the transfected mammalian cells.

Key words Monoclonal antibody (Mab), human erythropoietin (hEPO)