

用多抗原肽(MAP)免疫制备单克隆抗体的研究

丛进阳 盖晓东

(清华大学 北京 100084)

目前制备单克隆抗体杂交瘤细胞株的传统方法是用纯度很高的天然蛋白作为抗原来免疫动物。此方法虽然成功率很高,但提取和纯化作为抗原用的高纯蛋白确非常困难,在某些情况下甚至是不可能的。为了克服以上不足,近年来发展起用合成多肽作为抗原制备单克隆抗体^[1,2]。这个技术的难点是用合成多肽作为抗原来免疫动物不易获得与天然蛋白呈特异反应的抗体^[3-5]。近年来国外科学家发明了一种称为“多抗原肽”(Multiple antigenic peptide, MAP)物质用作抗原^[6,7]。它是一个由赖氨酸核和多个由同一多肽分子构成的具有免疫原性的大分子。这个大分子的多肽部分组成了造成动物免疫应答的多个相同抗原决定簇,而赖氨酸核部分只起连接多肽的作用,它本身没有免疫原性。实验证明多抗原肽和佐剂配合使用会引起动物强烈的免疫应答。

本文介绍的是从 Calpain [EC 3.4.22.17] 28kDa 小亚基上选取的一段氨基酸序列 AAQYNPEPPP-PRTH(氨基酸从 73 到 86)与赖氨酸核偶联形成多抗原肽来制备单克隆抗体。Calpain 的水解蛋白活性依附于钙离子浓度。它有两种异构酶:在 $\mu\text{mol/L}$ 钙离子浓度下被激活的称为 $\mu\text{-calpain}$,而在 mmol/L 钙离子浓度下被激活的称为 m-calpain 。这两种异构酶都由两个亚基组成。其大亚基的分子量为 80 kDa,它包括酶的活性区和与钙离子结合区。两种酶的大亚基氨基酸序列各不相同。其小亚基的分子量为 28 kDa,这两种酶具有完全相同的小亚基氨基酸序列。有关 Calpain 的详细资料可参阅文献[8]。

1 材料及方法

合成后的多抗原肽是水溶性的白色粉末。每次用 $50\mu\text{g}$ 多抗原肽配合佐剂注射 4 周令 BALB/c 雌鼠。每次注射相隔 3 周,注射后 7d 取静脉血测其抗体效价和各抗体亚类在血清中的比分。细胞融合后用 ELISA(OD_{405})法进行阳性杂交瘤细胞的筛选。杂交瘤细胞经多次克隆后建成细胞株。抗体对天然蛋白反应的特异性用免疫印迹(Western blotting)法测定。抗体的亚类用 Bio-Rad 公司出品的鼠抗体亚类检测试剂盒测定。

2 结果及讨论

2.1 多抗原肽免疫小鼠结果

共对 3 只 4 周龄 BALB/c 雌鼠进行了免疫。2 次注射后即获得很强的免疫应答。其血清抗体效价达 1.28×10^4 以上。对 3 只小鼠血清中各抗体亚类的百分比分进行了测定,其结果列于表 1。

由表 1 可见,经两次注射后,在小鼠血清中 IgG 亚类已占据主要比分,它们超过 70% 以上。说明小鼠免疫成功。

为了验证小鼠血清中的抗体能识别天然的 $\mu\text{-calpain}$ 和 m-calpain ,特进行了免疫印迹实验。实验结果由图 1 所表示。

表 1 用多抗原肽免疫小鼠后血清中抗体亚类的百分比

抗体亚类	右耳标记小鼠		左耳标记小鼠		无标记小鼠		未免疫小鼠
	OD ₄₀₅	%	OD ₄₀₅	%	OD ₄₀₅	%	OD ₄₀₅
IgG1	1.547	16.5	1.329	15.9	1.386	16.8	0.004
IgG2a	1.549	16.2	1.518	18.2	1.302	15.7	0.008
IgG2b	1.949	20.4	1.891	22.6	1.897	22.7	0.012
IgG3	1.828	19.1	1.658	19.8	1.657	20.0	0.001
IgM	1.812	19.0	1.468	17.6	1.460	17.7	0.015
IgA	0.870	9.1	0.493	5.9	0.583	7.1	0.000
κ chain	1.262	60.8	1.335	73.3	1.250	72.5	0.002
λ chain	0.812	39.2	0.487	26.7	0.474	27.5	0.001

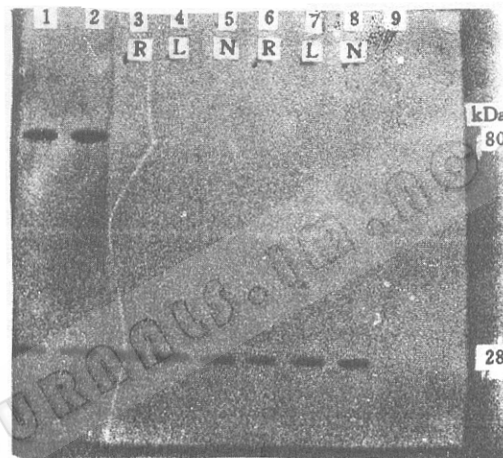


图 1 免疫小鼠血清中抗体特异性的免疫印迹

R、L 和 N. 分别表示右耳、左耳和无标记小鼠；

1 和 2. 用 Naphthol blue black 染色的硝酸纤维素膜, 1 为 μ -calpain 谱带, 2 为 m-calpain 谱带；

3~8. 用 4-chloro-1-naphthol 染色的硝酸纤维素膜, 表示各小鼠血清中抗体只识别

μ -calpain 和 m-calpain 的 28 kDa 小亚基；

9. 不相关抗原(用牛血清蛋白作参考)。

2.2 细胞融合及抗多抗原肽细胞株的建立

共进行了 2 次细胞融合。每次融合前 4d 对小鼠尾部静脉注射 50 μ g 多抗原肽。阳性杂交瘤细胞的筛选是用多抗原肽包被的 ELISA 法。共筛选出了 14 个强阳性孔。在这 14 个阳性孔中有 4 株细胞所分泌抗体属于 IgG 亚类。对这 4 个细胞株进行了多次克隆后建成抗此多抗原肽的杂交瘤细胞株。

用这 4 株细胞的培养上清液所做的免疫印迹实验表明, 其中有两株(2C1 和 7B2)可特异地与 μ -Calpain 和 m-calpain 的 28 kDa 小亚基反应。表 2 列出了这 4 株细胞上清液与两种 Calpain 小亚基呈交叉反应的结果。

图 2 表示用多抗原肽免疫制备的单克隆抗体与 μ -calpain 和 m-calpain 28 kDa 小亚基反应的免疫印迹结果。

用合成多肽作为抗原来免疫动物必须赋予它一很强的免疫原性。为达此目的, 一般的做法是将合成多肽偶联到一个蛋白载体上(如 BSA 或 KLH)。在某些情况下, 特别是用合成多肽作疫苗时, 是不便于用蛋白作载体的。因此多抗原肽就显示了其优越性, 为今后发展无载体多肽类疫苗提供了依据。本

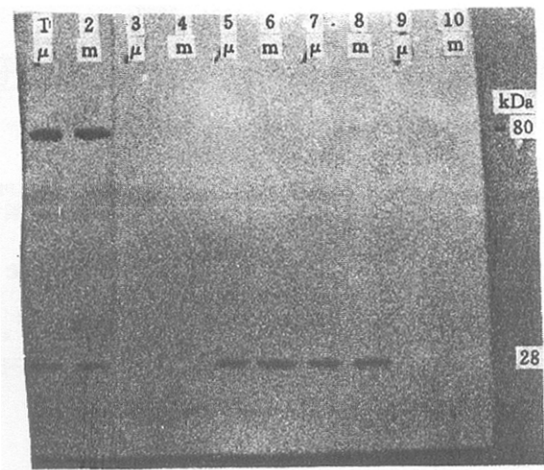


图 2 单克隆抗体与小亚基反应的免疫印迹图谱
1~2. 用 Naphthol blue black 染色的 μ -calpain(μ) 和 m-calpain(m) 大小亚基;
3~10. 8A6、2C1、7B2 和 8E3 细胞株的免疫印迹图谱。

文以 Calpain 为例,实验证明用多抗原肽制备与天然蛋白呈特异性反应的单克隆抗体是可能的。我们所选的这段氨基酸序列是位于 Calpain 小亚基中部靠近 N-端的位置。根据文献[5]所计算的这段氨基酸序列的亲水值(Hydrophilicity index)为 2.2,属于亲水性的可溶性物质。在此段多肽上富含脯氨酸(P)和一个带有 3 个电荷的谷氨酸(E),由此可推论在 Calpain 小亚基上的这段氨基酸很可能暴露于分子的表面,所合成的这段多抗原肽有与其相类似的空间构象。这是用人工合成多肽制备的抗体能与天然蛋白有特异反应的先决条件。根据我们的实验,在所获的 4 株 IgG 亚类中有两株杂交瘤细胞只能识别 ELISA 96 孔板上所包被的天然蛋白,而不能识别在硝酸纤维素膜上的 Calpain 蛋白谱。而别外两株(2C1 和 7B2)所分泌的抗体即能与天然 Calpain 小亚基在 96 孔板上反应,又能与它在硝酸纤维素膜上反应。

表 2 杂交瘤细胞株分泌抗体的亚类与 μ -calpain 及 m-calpain 交叉反应

细胞株	亚 类	ELISA		免疫印迹法			
		μ -calpain	m-calpain	μ -calpain		m-calpain	
				28 kDa	80 kDa	28 kDa	80 kDa
2C1	IgG1	3.079	3.250	×	-	×	-
7B2	IgG1	0.997	1.818	×	-	×	-
8A6	IgG1	1.281	1.363	-	-	-	-
8E3	IgG1	0.876	0.934	-	-	-	-

在免疫印迹图谱上有反应(×),无反应(-)。

以上实验说明,用多抗原肽免疫动物来制备单克隆抗体是可行的。这种方法为制备各种各样具有和天然蛋白呈特异反应的单克隆抗体提供了一个新的途径,有广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] Briand J P, Muller S, Van Pegenmortal M H V. J Immunol Methods 1985, 78(1):59~63.

- [2] Henry L, Richard A *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, 80:4946~4953.
[3] Hopp T P, Woods K R. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981, 78:3824~3827.
[4] Chou P Y, Fasman G D. Ann. Rev Biochem, 1978, 47:251~255.
[5] Kyle J, Doolittle R E. J Mol Biol, 1982, 157:105~109.
[6] Tam J P, Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85:5409~5413.
[7] Posanett D N, McGrath N, Tam J P. J Biol Chem, 1988, 263:1719~1725.
[8] Ronald L M, Takashi M. Intracellular Calcium-dependent Proteolysis CRC Press, 1990, pp. 3~35.

Making Monoclonal Antibodies Specific for Native Proteins by Synthetic Multiple Antigenic Peptide

Cong Jinyang Gai Xiaodong
(Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract A method for making hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies specific for native protein by immunization of mice with synthetic multiple antigenic peptides (MAP) has been introduced. Fourteen amino acid sequence AAQYNPEPPPPRTH was selected from the small subunits of calpains according to its hydrophilicity index, and linked to lysine core with 8-branching sites to form a MAP. The MAP was used as an antigen for immunization of BALB/c mice. The mice strongly responded in two months after 3 injections. The antisera taken from the mice showed specific reaction with 28 kDa small subunits of calpains in Western blotting assay. Two fusions were made. As a result, four cell lines belonging to IgG subclasses were obtained. The investigation of these 4 cell lines by ELISA and Western blotting indicated that two cell lines (2C1 and 7B2) had specific reactions with 28 kDa subunits of both μ -calpain and m-calpain. Making monoclonal antibodies against native proteins by immunization of mice with synthetic MAP has showed usefulness of this method. The principles for selection of peptides suitable for making monoclonal antibodies against the native protein from which the peptide was selected, and the advantages of MAP were discussed briefly.

Key words Monoclonal antibodies, multiple antigenic peptides, calpains