

改进双抗夹心 ELISA 用于筛选单抗杂交瘤细胞株*

胡仁建, 范开, 蔡家利

(重庆工学院 化工与生物工程学院, 重庆 400050)

摘要 本文利用改进双抗夹心 ELISA 筛选一种可测定血清样品中与血浆蛋白结合的蛋白质药物的单抗。用兔抗 K102 多抗经亲和层析纯化并包被后, 加入用 10% 猴血浆 PBS 还原后的抗原 K102, 再加入杂交瘤细胞株上清液和 HRP-羊抗鼠 IgG、底物反应液筛选阳性单抗杂交瘤细胞株。结果用改进后的双抗夹心 ELISA 成功地选出 6 株能稳定分泌针对 K102 的单抗杂交瘤细胞株, 分别命名为 1C9、2D7、3E2、5F4、5F6、6B9, 细胞株产生的单抗用 ELISA 法能检测出血清样品中的 K102 的浓度。提示改进的双抗夹心 ELISA 可用于针对与血浆蛋白结合的蛋白质药物的单抗杂交瘤细胞株的筛选。

关键词 单抗; 双抗夹心 ELISA; 杂交瘤细胞株; 筛选; 血浆

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2008)03-0077-04

重组新型人角质细胞生长因子变构体(代号 K102)由天然角质细胞生长因子(KGF)经基因改造而成,由大肠杆菌重组表达而制备,能抑制成纤维细胞增殖和分化,而天然角质细胞生长因子(KGF)不具备此作用。K102 进入血液后,用间接 ELISA 法筛选的抗 K102 单抗无法检测到 K102 的“存在”,后来经实验证实 K102 与血浆蛋白发生了结合,而且,血浆蛋白封住了 K102 与其对应的单抗结合的位点。抗 K102 单抗建立的 ELISA 无法检测到血清样品中的 K102 的浓度。有必要建立一种新的筛选阳性单抗杂交瘤细胞株的方法,使获得的单抗能测定血清样品中与血浆蛋白结合的药物浓度。

1 材料与方 法

1.1 材料

K102、猴血浆和兔抗 K102 多抗由重庆富进生物医药有限公司提供,弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司,酶标板购自 costar 公司,BSA、HRP-羊抗鼠 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司,OPD(化学纯)购自上海五联化工厂,DMEM 购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,胎牛血清购自四季青生物技术公司,BALB/C 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心。SP2/0 骨髓瘤细胞株由本实验室保存。

1.2 方法

1)按常规免疫方案^[1-2]免疫家兔制备抗 K102 多抗,用 protein A 亲和层析^[2]纯化多抗。

2)杂交瘤细胞系的建立。BALB/c 小鼠的免疫:将纯化的 K102 稀释成 0.25 mg/mL,取 0.6 mL 与等量福氏完全佐剂充分乳化后腹腔、皮下和肌肉多点免疫 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,0.4 mL/只;以后每隔 2 周相同剂量抗原与福氏不完全佐剂充分乳化后,皮下和肌肉多点免疫 2 次。融合前 3 天,用加倍量的不加佐剂的抗原,皮下和肌肉多点免疫 1 次。

单克隆抗体检测方法的建立:建立改进的双抗夹心 ELISA,通过方阵滴定确定最佳的兔抗 K102 多抗包被浓度和最佳抗原 K102 的作用浓度以及阴性、阳性血清(S⁻、S⁺)最佳工作浓度。

细胞融合和杂交瘤细胞克隆化:参照 Frank W Fitch^[1,3,4]进行细胞融合和杂交瘤细胞克隆化,阳性杂交瘤细胞的克隆采用有限稀释法。将细胞用含 HT 完全培养基稀释成 0.5 个/mL 1 个密度,分装 96 孔细胞培养板,每孔 0.2 mL,1 周后观察并标记单克隆孔,当单克隆孔长至孔面积的 1/4 ~ 1/2,检测单克隆孔的细胞上清液。阳性单克隆孔再进行 1 ~ 2 次亚克隆,直至整个细胞培养板的单克隆孔均为阳性为止。

* 收稿日期 2008-04-16 修回日期 2008-06-04

资助项目:重庆市自然科学基金资助项目(No. CSTC20075412)

作者简介:胡仁建(1968-)女,实验师,研究方向为微生物与生化药学。

3)改进的双抗夹心 ELISA 方法。首先用兔抗 K102 多抗于碳酸盐缓冲液中 4 °C 下过夜包被聚苯乙烯等固相,形成固相抗体。第 2 日用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min 拍干,洗涤去除未与固相结合或结合不紧的抗体后,用牛血清白蛋白封闭,37 °C 恒温湿盒内作用 2 h,洗涤去除未结合的部分及杂质。加入用含 10% 的猴血浆 PBS 稀释的 K102,37 °C 恒温湿盒内作用 1 h,此时,抗原就会与固相上特异兔抗 K102 多抗反应而吸附于固相上。再加入杂交瘤细胞的上清液 37 °C 恒温湿盒内作用 1 h 洗板,此时,在固相上即形成双抗体与特异抗原的夹心产物。

加入 HRP-羊抗鼠 IgG,37 °C 恒温湿盒内作用 1 h 洗板。加入酶底物,温育显色测定 OD 490 nm。设定 BALB/C 鼠免疫后的血清为阳性对照,其 OD 值为 S,SP2/0 骨髓瘤细胞上清液为阴性对照,OD 值为 N,设置 PBS 为空白对照, $S/N \geq 2.1$ 判定为阳性。

4)改进的双抗夹心 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞。

5)改进的双抗夹心 ELISA 测定阳性单克隆杂交瘤细胞上清液和腹水效价。

6)用 K102 包被后,用间接 ELISA 法和改进的双抗夹心 ELISA 筛选杂交瘤细胞。间接 ELISA 筛选的单抗杂交瘤细胞株有 4B4 和 2A8,改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗杂交瘤细胞株有 1C9、2D7、3E2、5F4、5F6、6B9。

7)将 K102 用含 10% 猴血浆的 PBS 稀释后包被,用间接 ELISA 法测定传统方法和改进的双抗夹心 ELISA 筛选单抗的效价。间接 ELISA 筛选的单抗杂交瘤细胞株有 4B4 和 2A8,改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗杂交瘤细胞株有 1C9、2D7、3E2、5F4、5F6、6B9。

8)单抗的特异性鉴定。以 2D7 单抗为例,其他 4 株 1C9、3E2、5F4、5F6、6B9 的单抗特异性鉴定结果与 2D7 单抗特异性鉴定相似。用间接 ELISA 方法做如下交叉反应进行 2D7 单抗的特异性鉴定:以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被 KGF、K102、TNHH 和尿酸酶,4 °C 下过夜;次日用 1% BSA 封闭,37 °C 恒温湿盒内作用 2 h,洗涤去除未结合的部分及杂质;将 2D7 单抗用 Biotin 标记 K102-2D7 单抗,以 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400 倍稀释,每孔加入 100 μL ,37 °C 恒温湿盒内作用 1 h,PBST 洗涤 3 次,每次 5 min 拍干,加入 1:4 000 倍稀释的 Avdin-HRP,每孔加入 100 μL ,37 °C 恒温湿盒内作用 1 h,PBST 洗涤 3

次,每次 5 min 拍干;加入酶底物,温育显色测定 OD490nm,设定 BALB/C 鼠免疫后的血清为阳性对照,其 OD 值为 S,SP2/0 骨髓瘤细胞上清液为阴性对照,OD 值为 N,设置 PBS 为空白对照, $S/N \geq 2.1$ 判定为阳性。

9)将杂交瘤细胞株 1C9、2D7、3E2、5F4、5F6、6B9 制备的单抗腹水用辛酸-硫酸铵法和 protein A 亲和层析纯化。

10)以 2D7 单抗为例,用间接 ELISA 方法测定还原到 10% 猴血清中的 K102 浓度:以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 ng/mL 、62.5 ng/mL 、15.6 ng/mL 、3.9 ng/mL 、0.97 ng/mL 和 0.24 ng/mL 7 个浓度包被用 10% 猴血清稀释的 K102,4 °C 下过夜;次日用 1% BSA 封闭,37 °C 恒温湿盒内作用 2 h,洗涤去除未结合的部分及杂质;将 2D7 单抗用 Biotin 标记 K102-2D7 单抗,以 1:400 倍稀释,每孔加入 100 μL ,37 °C 恒温湿盒内作用 1 h,PBST 洗涤 3 次,每次 5 min 拍干;加入 1:4000 倍稀释的 Avdin-HRP,每孔加入 100 μL ,37 °C 恒温湿盒内作用 1 h,PBST 洗涤 3 次,每次 5 min 拍干,加入酶底物,温育显色测定 OD490nm,设定 BALB/C 鼠免疫后的血清为阳性对照,其 OD 值为 S,SP2/0 骨髓瘤细胞上清液为阴性对照,OD 值为 N,设置 PBS 为空白对照, $S/N \geq 2.1$ 判定为阳性。

2 实验结果

2.1 杂交瘤细胞系的建立

1)最佳抗原包被浓度为 1 ng/mL ,最佳阳性、阴性血清稀释度为 1:8000。细胞融合前,小鼠血清抗体效价为 1:16000,细胞融合率为 85%。双抗夹心法阳性率为 100%。选择阳性值高的 20 孔亚克隆 1 次,得到 51 孔单克隆杂交瘤细胞株。用改进的双抗夹心 ELISA 筛选出 6 株产生针对还原到血浆中的 K102 高效价单抗的杂交瘤细胞株,分别命名为 1C9、2D7、3E2、5F4、5F6、6B9,经多次传代和反复冻融后所产生的单抗都具有高效价,证明获得的杂交瘤细胞株能稳定分泌单抗。结果见表 1。

2)改进的双抗夹心 ELISA 测定阳性单克隆杂交瘤细胞上清液和腹水 OD490nm 值结果见表 2。

3)间接 ELISA 法测定间接 ELISA 和改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗 OD490nm 值结果见表 3。

2.2 单抗特异性鉴定

单抗特异性鉴定的 OD490nm 结果见表 4。结果显示改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗不与

KGF、TNHH 和尿酸酶发生反应, 特异性好。

血清中的 K102 浓度, 结果显示达 ng 级, OD490nm 值见表 5。

2.3 猴血清中 K102 浓度测定

用改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗测定猴

表 1 改进的双抗夹心 ELISA 测定单克隆杂交瘤细胞上清液 OD490nm 值

A	1B2	1B6	1B7	1B8	1C9	2B3	2B5	2D7	2F3	2F6	2D9	2D10
	0.867	0.801	0.901	0.932	2.672	0.672	0.583	2.730	0.685	0.720	0.806	0.903
B	2E10	3E2	3E4	3F3	3G2	3G5	4B10	4C9	4C10	4D10	4E7	4E9
	0.998	2.562	0.482	0.683	0.712	0.842	0.654	0.711	0.667	0.679	0.780	0.823
C	4G7	4G10	4G11	5B6	5C6	5D2	5D4	5D6	5E6	5F2	5F4	5F5
	1.426	1.200	1.306	1.403	1.102	0.909	1.456	1.076	1.273	1.113	2.496	2.408
D	5F6	6A5	6A7	6A10	6B8	6B9	6B11	6C10	6D11	6E9	6E10	6E11
	2.399	1.203	1.726	0.698	1.223	2.483	1.556	1.720	1.530	1.672	1.872	1.413
E	6F8	6F10	6G10	S ⁺	S ⁻	PBS	SP20 上清					
	1.899	1.901	1.920	2.930	0.460	0.102	0.400					

表 2 改进的双抗夹心 ELISA 测定阳性单克隆杂交瘤细胞上清液和腹水 OD490nm 值

阳性杂交瘤细胞株	细胞上清液 OD490nm 值						单抗腹水 OD490nm 值					
	1:100	1:100	1:400	1:400	1:1600	1:1600	1:1000	1:1000	1:4000	1:4000	1:16000	1:16000
1C9	2.068	2.106	1.402	1.318	0.406	0.396	2.829	2.798	2.201	2.302	0.895	0.882
2D7	2.348	2.320	1.812	1.796	0.756	0.749	2.992	2.897	2.569	2.605	1.136	1.129
3E2	1.996	1.989	1.312	1.294	0.395	0.401	2.769	2.762	2.182	2.176	0.756	0.713
5F4	1.592	1.603	1.023	1.008	0.286	0.272	2.303	2.312	1.853	1.806	0.576	0.589
5F6	1.772	1.698	1.198	1.769	0.301	0.298	2.452	2.398	1.963	1.901	0.663	0.638
6B9	1.882	1.803	1.285	1.271	0.316	0.309	2.689	2.629	2.013	2.023	0.701	0.696
S ⁺ (1:8000)		S ⁻ (1:8000)		PBS		SP20 上清						
2.998		0.412		0.103		0.362						

3 讨论

1) 角质细胞生长因子(KGF)是皮肤表层的细胞因子, 已经证明有二种类型即 KGF-I 和 KGF-II。KGF 能促进角质细胞增生、保护粘膜细胞和肝细胞。重组人角质细胞生长因子变构体(代号 K102)经基因改造而成, 由大肠杆菌重组表达而制备, 能抑制成纤维细胞增殖和分化, 而天然 KGF 不具备此作用。霍冀琦^[5]等运用 313BALB/c 细胞和大鼠 CcB 肝纤维化模型对 K102 在体内体外的生物活性进行测定, 显示 K102 明显抑制成纤维细胞的生长。

2) 从以上数据结果看出, 1C9、2D7、3E2、5F4、5F6、6B9 等 6 株杂交瘤细胞株的阳性值较高, 后经多次传代培养和反复冻融培养, 诱生小鼠腹水单抗的效价高而稳定, 证明抗 K102 的杂交瘤细胞株成功建立。K102 用 PBS 稀释后包被, 用间接 ELISA 和双抗夹心 ELISA 得到的单抗效价均较高, 但当 K102 还原到血浆后, 检测不到间接 ELISA 筛选的单

抗的效价, 而能检测到双抗夹心 ELISA 得到的单抗效价。改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗不与 KGF、TNHH 和尿酸酶发生反应, 特异性好。

K102 的药代动力学实验显示, K102 进入血液以后, 用间接 ELISA 法筛选的两株单抗 4B4 和 2A8 不能检出血液中的 K102, 可以理解为 K102 与血浆蛋白结合而封闭了 K102 与上述单抗结合的抗原决定簇, 最终使上述单抗无法与 K102 结合。改进的双抗夹心 ELISA 法筛选杂交瘤中, 将 K102 先与猴血浆结合, 使猴血浆蛋白封闭 K102 的抗原决定簇, 再检测杂交瘤细胞上清液的单抗所针对的 K102 抗原决定簇不是 K102 与血浆蛋白结合后的位点。本实验改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗建立了间接 ELISA 法测定猴血清中的 K102 浓度, 证实该方法获得的单抗能与血液中的 K102 结合而检测出血液中 K102 的浓度。本实验也证实, 改进的双抗夹心 ELISA 法可以用于筛选针对与血浆蛋白结合的蛋白质药物的单抗, 用于建立测定蛋白质浓度的 ELISA。

表 3 间接 ELISA 法测定间接 ELISA 和改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗 OD490nm 值

包被的抗原 (10 μ g/mL)	细胞株	单抗 OD490nm 值							
		1:1000	1:1000	1:4000	1:4000	1:16000	1:16000	1:32000	1:32000
K102 + PBS	4B4	2.603	2.598	2.113	2.019	1.103	1.109	0.723	0.698
K102 + 猴血浆		0.201	0.102	0.135	0.251	0.231	0.126	0.115	0.116
K102 + PBS	2A8	2.534	2.506	1.809	1.798	0.956	0.948	0.509	0.518
K102 + 猴血浆		0.311	0.302	0.221	0.226	0.201	0.211	0.215	0.136
K102 + PBS	1C9	2.996	2.999	2.356	2.202	1.523	1.496	0.965	0.896
K102 + 猴血浆		2.988	2.996	2.402	2.368	1.658	1.695	1.002	1.023
K102 + PBS	2D7	2.546	2.496	1.923	1.901	0.897	0.865	0.706	0.712
K102 + 猴血浆		2.605	2.506	2.036	2.102	0.968	0.978	0.856	0.789
K102 + PBS	3E2	2.756	2.803	2.121	2.203	1.426	1.481	0.963	0.898
K102 + 猴血浆		2.806	2.812	2.031	2.123	1.650	1.598	1.023	1.156
K102 + PBS	5F4	2.456	2.501	2.123	2.205	1.658	1.568	1.123	1.203
K102 + 猴血浆		2.562	2.586	2.201	2.225	1.706	1.713	1.206	1.123
K102 + PBS	5F6	2.562	2.605	2.126	2.205	1.706	1.812	1.202	1.204
K102 + 猴血浆		2.605	2.652	2.212	2.216	1.652	1.653	1.235	1.212
K102 + PBS	6B9	2.654	2.658	2.123	2.115	1.501	1.486	0.896	0.902
K102 + 猴血浆		2.756	2.712	2.206	2.108	1.621	1.620	0.902	0.912
S ⁺ (1:8000)	S ⁻ (1:8000)	PBS		SP2/0 上清					
2.998	0.412	0.103		0.362					

表 4 单抗的特异性鉴定 OD490nm 结果

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释度	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	S ⁺	S ⁻	SP2/0	PBS
KGF	0.230	0.219	0.180	0.162	0.158	0.142	0.129	0.112	0.501	0.406	0.396	0.119
K102	2.560	2.430	2.122	1.989	1.903	1.320	0.835	0.646	2.930	0.413	0.380	0.112
TNHH	0.361	0.320	0.301	0.286	0.246	0.202	0.184	0.146	0.511	0.398	0.306	0.113
尿酸酶	0.460	0.443	0.416	0.383	0.328	0.298	0.268	0.202	0.406	0.396	0.380	0.205

表 5 改进的双抗夹心 ELISA 筛选的单抗测定猴血清中的 K102 浓度结果

	K102 - 2D7 单抗 (1:400)	S ⁺	S ⁻	SP2/0	PBS
K102 + 猴血浆 (1000ng/mL)	2.670	2.998	0.462	0.398	0.292
K102 + 猴血浆 (250ng/mL)	2.559	2.903	0.458	0.396	0.203
K102 + 猴血浆 (62.5ng/mL)	2.282	2.682	0.432	0.382	0.200
K102 + 猴血浆 (15.6ng/mL)	1.468	2.002	0.382	0.362	0.189
K102 + 猴血浆 (3.9ng/mL)	0.890	1.408	0.380	0.359	0.124
K102 + 猴血浆 (0.97ng/mL)	0.672	1.008	0.298	0.202	0.112
K102 + 猴血浆 (0.24ng/mL)	0.629	0.827	0.262	0.201	0.110

3)改进的双抗夹心 ELISA 与普通的双抗夹心 ELISA 不同之处是将抗原还原到血浆中,得到的单抗针对的抗原表位既不是 K102 与血浆结合的位点,也不是 K102 与多抗结合的位点。该方法获得的单抗能检测出血清样品中与血浆蛋白结合的药物的浓度,更重要的是提高了单抗的敏感性和特异性,值得大力推广。

参考文献:

- [1] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 309-322, 351-352.
- [2] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 1998. 16-18, 36-37.
- [3] COLIGAN J E, KRUSZBEEK A M, MARGULLES D H, et

- al. Current Protocols in Immunologous[M]. San Francisco :Wiley Interscience Press ,1993.
- [4] 弗雷谢尼 R I. 动物细胞培养-基本技术指南(第 4 版) [M]. 章静波 ,徐存栓译. 北京 :科学出版社 ,2004. 551-554.
- [5] 霍黄琦 ,李新平 ,范开 ,等. 重组人角质细胞生长因子的体内外作用研究[J]. 中国药理学杂志 ,2005 ,40(22) : 1749-1752.

Application of Improved Double-Antibody Sandwich Elisa to Screening Monoclonal Antibody of Hybridoma Line

HU Ren-jian , FAN Kai , CAI Jia-li

(Bioengineering College , Chongqing Institute of Technology , Chongqing 400050 , China)

Abstract Objective : To screen monoclonal antibody against protein drugs bound with plasma protein in blood samples. **Methods :** After coated with rabbit anti-K102 polyclonal antibody purified by affinity chromatography , adding K102 antigen diluted with PBS containing 10% monkey plasma PBS and the supernatant of hybridoma and HRP-goat anti-mouse IgG are added to screen positive hybridoma lines which might produce monoclonal antibodies. **Results :** In use of the method of double-antibody sandwich ELISA screening the six hybridoma lines are successfully screened to be capable of screening stably the antibody against K102 , named as 1C9 , 2D7 , 3E2 , 5F4 , 5F6 , 6B9. The monoclonal antibodies could detect K102 concentration in the blood samples. **Conclusion :** The improved double-antibody sandwich ELISA can be used to screening hybridoma cell lines of monoclonal antibodies against biodrugs bound with plasma protein.

Key words : monoclonal antibody ; anti-double-sandwich ELISA ; hybridoma lines ; screening ; plasma

(责任编辑 李若溪)