文章编号:1000-5404(2009)20-1973-04

论著

晚期氧化蛋白产物抗体的制备和鉴定

田 梅[1],易维京[2],吴雄飞[1],余荣杰[1] (第三军医大学:[1]西南医院肾科,[2]医学检验系暨药学院,临床生物化学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 制备和鉴定抗人晚期氧化蛋白产物(AOPPs)单克隆抗体(McAb)。**方法** 用次氯酸(HOCl)和纯化的人血白蛋白(HSA)孵育获得AOPPs-HSA,取凝胶层析纯化后的第1峰免疫BALB/c小鼠,采用杂交瘤技术制备抗AOPPs-HSA的McAb,用间接ELISA、Western blot鉴定其特异性及亚类。**结果** 成功筛选出3株稳定分泌抗AOPPs,1株既抗HSA又抗AOPP的McAb杂交瘤细胞株,其分泌抗体亚类3株为IgG1,1株为IgG2b,间接ELISA和Western blot证明制备的抗体可以特异地和天然或体外制备的AOPPs结合。**结论** 获得抗人AOPPs-HSA的McAb细胞株4株,为进一步研究AOPPs生物学活性及其相关疾病的诊断和预后奠定基础。

关键词: 晚期氧化蛋白产物;单克隆抗体;制备和鉴定
中图法分类号: R392-33;R392.11;R392.7 **文献标识码:** A

Preparation and identification of monoclonal antibody against advanced oxidation protein products

TIAN Mei[1], YI Wei-jing[2], WU Xiong-fei[1], YU Rong-jie[1] ([1]Department of Kidneys, Southwest Hospital, [2]Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare and identify the monoclonal antibodies (McAb) against advanced oxidation protein products (AOPPs). Methods BALB/c mice were immunized with purified AOPPs-human serum albumin (HAS), and then McAbs against AOPPs-HSA was produced by hybridoma technique. Indirect ELISA and Western blot analysis were used to identify the immunoglobin specificity and subtype. Results Three novel McAbs only against AOPPs-HSA and one against both AOPPs-HSA and HSA were harvested. The subclass of 3 McAbs were determined as IgG1 and 1 McAb as IgG2b. McAbs reacted strongly and specifically to protein of nature and HOCL-treated AOPPs by Western blot analysis. Conclusion The 4 McAbs against AOPPs are prepared and identified successfully, which provide an important tool for biological properties of AOPPs and for its detection clinical laboratory.

Key words: advanced oxidation protein products; monoclonal antibody; preparation and identification

晚期氧化蛋白产物(Advanced oxidation protein products,AOPPs)是Witko-Sarsat等于1996年由尿毒症血液透析(hemodialysis, HD)患者血浆中分离出的含有双酪氨酸的蛋白交联产物,系因患者体内过高的氧化应激导致各种蛋白质氧化损伤所形成的终末产物的总称[1]。是HD患者免疫功能紊乱、加速性动脉粥样硬化、透析相关性淀粉样变等长期并发症的重要致病环节[2]。目前的研究认为AOPPs还参与了多种生理及病理过程,如衰老、肥胖、老年性白内障、动脉粥样硬化、肾脏纤维化、糖尿病肾病等[3-7]。本研究拟以AOPPs-HSA纯化后第1峰作为抗原免疫小鼠,通过淋巴细胞杂交瘤技术制备抗AOPPs单克隆抗体,并对其进行纯化和鉴定,为AOPPs临床与科研应用提供有利工具,同时为建立ELISA方法检测血清AOPPs奠定基础。

基金项目: 国家自然科学基金(30470807)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470807)
作者简介: 田 梅,女,贵州省赫章县人,博士研究生,副教授,主要从事慢性肾脏病和血液净化方面的研究。E-mail:zyyxy1998@yahoo.com.cn
通信作者: 吴雄飞,电话:(023)68754188, E-mail: wuxfei@126.com
收稿日期: 2009-05-13;**修回日期:** 2009-07-22

1 材料与方法

1.1 材料

6~8周龄BALB/c清洁级雌鼠购自第三军医大学实验动物中心,SP2/0细胞为第三军医大学临床生物化学教研室提供。主要试剂:HAT和HT、福氏完全佐剂和不完全佐剂、细胞融合剂PEG 2000、次氯酸钠(NaOCl)均为Sigma公司产品,人血白蛋白购自于成都容生公司,胎牛血清、1640培养基为Gibco公司产品。

1.2 方法

1.2.1 AOPPs-HSA的制备与纯化 AOPPs-HSA的制备采用Witko-Sarsat等[1]介绍的方法。将无内毒素经纯化后的HSA溶液(200 mg/ml)与NaOCl(200 mmol/L)混合,室温放置30 min。将经上述处理后的AOPPs-HSA上样于Hitrap 26/60 sephacryl S-300 high Resolution凝胶层析柱(GE Healthcare)进行纯化。分别收集蛋白洗脱后各峰,蛋白定量后,分装冷冻保存于-80 ℃。

1.2.2 动物免疫 选6~8周龄雌性BALB/c小鼠10只,以纯化的AOPPs-HSA第1峰免疫3次,每次间隔3周,第1次抗原加等量弗氏完全佐剂,后2次加等量弗氏不完全佐剂,100 μg/只皮下和肌肉多点注射。融合前3 d加强免疫用不含佐剂的等量抗原腹腔注射,3 d后取其脾细胞进行融合。

1.2.3 杂交瘤制备和筛选 以正常BALB/c小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞,取对数生长期的骨髓瘤细胞SP2/0与免疫脾细胞按常规方法用PEG 2000进行融合,经HAT和HT培养基选择性培养,用纯化的AOPPs-HSA和HSA分别作为筛选抗体的检测源,用间接ELISA法检测培养上清液,选择与HSA反应呈阴性而与AOPPs-HSA反应呈强阳性的克隆,同时也选择与AOPPs-HSA和HSA反应均呈强阳性克隆,用有限稀释法连续克隆化阳性率达100%的细胞,扩增培养后用于制备腹水并液氮冻存。

1.2.4 抗体特异性鉴定

1.2.4.1 效价的测定 将纯化后的单克隆抗体倍比稀释,以1∶100稀释的正常小鼠血清作为阴性对照,应用间接ELISA方法测定D(492)值,以P/N≥2.1为阳性。分别于冻存后3个月复苏细胞,间接ELISA方法检测效价,同时观察杂交瘤细胞冻存复苏前后抗体分泌情况。

1.2.4.2 抗体纯度鉴定 SDS-PAGE用4%浓缩胶,12%分离胶,电流强度为30 mA/板,胶板大小为8 cm×10 cm,电泳时间为40 min,考马斯亮蓝染色。凝胶扫描用Doc2000TM凝胶成像仪。

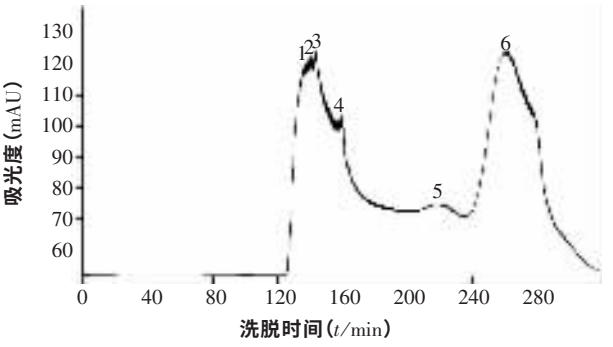
1.2.4.3 Western blot鉴定抗体特异性 采用正常人血清、HD患者血清、HSA、AOPPs纯化第1峰、AOPPs-BSA、AOPPs-RSA蛋白进行Western blot鉴定。将上述蛋白经非变性电泳后转移到PVDF膜上;5%脱脂奶粉室温封闭2 h;洗涤后与适度单克隆抗体4 ℃反应过夜;洗涤后加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠IgG室温反应1 h;洗涤后ECL显色。

1.2.4.4 间接ELISA鉴定抗体特异性 用包被液(50 mmol/L pH 9.6碳酸盐缓冲液)将AOPPs-HSA纯化后第1峰、HSA、牛血清白蛋白(BSA)、NaOCl处理的牛血清白蛋白(AOPPs-BSA)、CD26等蛋白采用同一蛋白浓度包板,用含0.5%牛血清白蛋白的PBS封闭,用10 μg/ml的各株单抗与包被上述各种抗原的酶标板孔反应,以只含0.5%牛血清白蛋白的PBS封闭孔作阴性对照,AOPPs-HSA包被孔作阳性对照。

2 结果

2.1 AOPPs-HSA的纯化

用Hitrap 26/60 sephacryl S-300 high Resolution凝胶层析分离AOPPs-HSA,其洗脱曲线呈6个峰,见图1。PAGE及SDS-PAGE结果表明纯化后的1、2、3、4峰表现为胶顶部的复合物(箭头所示),但非变性电泳胶顶部的条带比变性电泳明显的多,而在变性电泳中,1、2、3、4峰在(55~72)×10^3处出现了比较明显的条带。泳道7为纯化的白蛋白,无论在变性及非变性电泳中均表现为(55~72)×10^3间的一条条带,说明我们在制作AOPP的过程中用的白蛋白是比较纯的,而经过NaOCl处理后白蛋白发生了结构上的变化,变成了一个大分子的结构,故出现在胶的顶部。而此大分子的结构在变性的条件下会有部分解聚,变成(55~72)×10^3间的蛋白,估计是白蛋白的单体,但大部分仍没有解聚,这与文献[1]报道的稍有不同。第五个峰在PAGE和SDS-PAGE中,在(55~72)×10^3间和130×10^3处都出现了条带,但PAGE中130×10^3处的条带比SDS-PAGE中明显,(55~72)×10^3间条带比SDS-PAGE中暗淡,130×10^3处出现的条带估计是白蛋白的二聚体,在变性的条件下二聚体部分解聚为单体。峰6无论是在PAGE还是在SDS-PAGE中,仅表现为在(55~72)×10^3间的一条条带,估计是AOPPs形成过程中没有聚合的白蛋白。见图2。



1~6:收集的蛋白质各峰。流率1 ml/min,280 nm监测吸收峰,加样后136 min出现洗脱1峰

图1 AOPPs-HSA凝胶层析洗脱结果

2.2 杂交瘤细胞株的建立

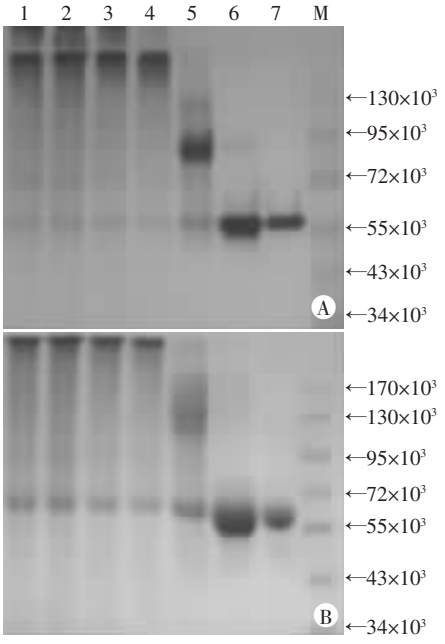
HAT选择性培养第5天可见融合的细胞克隆。经3次融合,有限稀释法对阳性克隆进行3~5次克隆,共获得3株能稳定分泌特异性抗AOPPs-HSA的单克隆杂交瘤细胞株,分别命

名为 1-C6、1-H1、3-A10,1 株既抗 HSA 又抗 AOPPs-HSA,命名为 1-C5。所建立的杂交瘤细胞株经数次冻存、复苏,体外传代培养 3 个月以上仍能生长良好,稳定分泌高效价单克隆抗体。

2.3　纯化单抗的鉴定

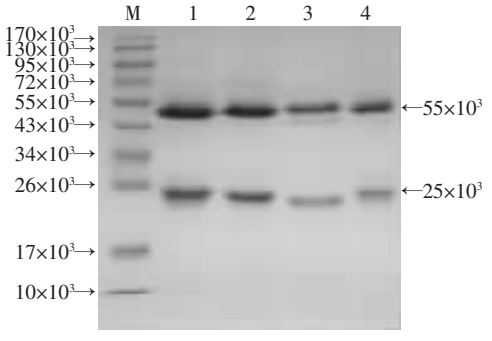
2.3.1　ELISA 测定小鼠腹水中单克隆抗体效价　　间接 ELISA 法测定 3 株 1-C5、1-C6、1-H1 腹水纯化后效价为 1∶128 000,3-A10 为 1∶8 000。

2.3.2　抗体纯度鉴定　　纯化后的单抗仅呈现明显的 2 条带,相对分子质量分别为重链约 50×10^3 和轻链约 25×10^3;McAb 的相对分子质量约为 150×10^3,与 IgG 的相对分子质量一致(图 3)。



1-6:分别代表纯化的 1、2、3、4、5、6 峰;7:纯化后的白蛋白;M:分子量标准。上样量均为 40 μg/泳道

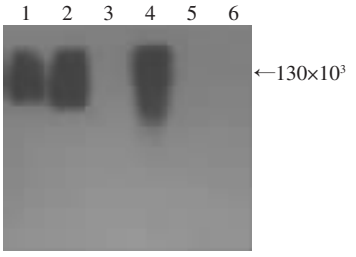
图 2　AOPP-HSA 凝胶层析后非变性(A)和变性(B)电泳结果



M:标准;1-4:纯化的 AOPP 抗体,分别为 1-C5,1-C6,1-H1,3-A10

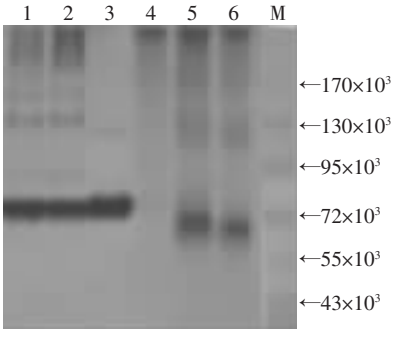
图 3　纯化抗 AOPPs McAb SDS-PAGE 分析

2.3.3　抗体特异性 Western blot 鉴定　　免疫印迹结果表明,1-H1 抗体只与转移至 PVDF 膜上的 AOPPs-HSA 蛋白在膜顶部处形成片状的蛋白质染色带起反应;而与 HSA、AOPPs-BSA、AOPPs-RSA 均无交叉反应,单克隆抗体与正常人血清、HD 患者血清均有反应,与 HD 患者血清强度强于正常人,对应的 AOPPs 水平(分光光度计法测定)标注于图下方,单位为 μmol/L 氯胺 T,见图 4。相对应的非变性电泳结果见图 5。证明该株杂交瘤细胞产生的单抗是针对 AOPPs-HSA 的特异性单克隆抗体。



1:正常人血清;2:HD 患者血清;3:纯化的 HSA;4:纯化后的 AOPPs-hsa;5:纯化后的 AOPPs-BSA;6:纯化后的 AOPPs-RSA

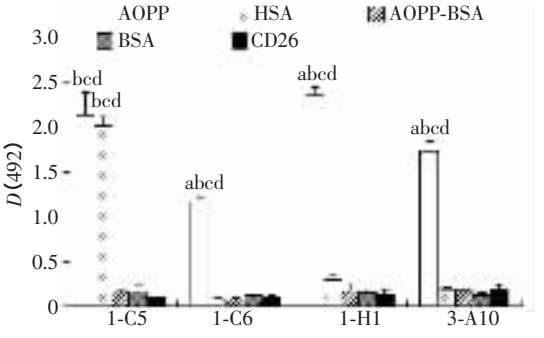
图 4　抗体特导性的 Western blot 分析



1:正常人血清;2:HD 患者血清;3:纯化的 HSA;4:纯化后的 AOPPs-hsa;5:纯化后的 AOPPs-BSA;6:纯化后的 AOPPs-RSA;M:标准

图 5　抗体特导性非变性电泳结果

2.3.4　抗体特异性间接 ELISA 鉴定　　用本室建立的间接 ELISA 检测显示,其中 1-C5 既与 HSA 又与 AOPPs 特异结合,其余 3 株均只与 AOPPs 特异结合,而与 AOPPs-BSA、BSA、CD26 亲和力低,经统计学分析,均有显著性差异($P<0.01$,图 6)。



a:$P<0.01$,与 HSA 比较;b:$P<0.01$,与 AOPP-BSA 比较;c:$P<0.01$,与 BSA 比较;d:$P<0.01$,与 CD26 比较

图 6　单克隆抗体的 ELISA 特异性鉴定

2.3.5　单克隆抗体亚类鉴定　　杂交瘤细胞株 3 株(1-C5、1-C6、1-H1)分泌的 IgG 单克隆抗体亚类属于 IgG1。1 株

(3-A10)属于 IgG2b。

3 讨论

制备高效价的抗体是检测新基因、蛋白、炎症因子、毒素表达和研究其功能的前提。纯化后的单克隆抗体可作为亲和层析中重要的配体纯化抗原、可利用 ELISA 和免疫组化、Western blot 检测相应抗原、可中和抗原以及参与生物靶向治疗而在生物学和医学研究领域中具有极大的应用价值。

本实验共进行了 3 次细胞融合,用纯化的 AOPPs 及纯化的 HSA 筛选,获得分泌稳定的单克隆抗体杂交瘤细胞株 4 株,其中 1-C5 既抗 HSA 又抗 AOPPs,其余 3 株均只抗 AOPPs。考虑抗 AOPPs 和既抗 HSA 又抗 AOPPs 的细胞株分泌的抗体可能是识别不同抗原表位的抗体,可分别用于包被固相载体和制备酶结合物,为建立测定血清中 AOPPs 的夹心 ELISA 试剂盒打下基础,故在杂交瘤细胞的筛选中既保留了对 AOPPs 强阳性的克隆,也保留对 AOPPs 和 HSA 均强阳性的克隆。McAb 纯化的方法较多,常应用的有中性盐沉淀和蛋白 G 亲和色谱法,中性盐沉淀法可进行大批量抗体的纯化,但纯化效果较差且易于引起抗体之间交联形成大分子而失活[8]。亲和层析技术具有高收率、高纯度、能保持生物大分子天然状态等优点,广泛应用于生物大分子的分离纯化。正是因为亲和层析技术的高度特异性,才能制备出高纯度的生物大分子[9,10]。G 蛋白是存在于链球菌 A、C 和 G 群细胞壁的细胞表面蛋白,是一类 S 型 Fc 受体,可与人及几乎所有哺乳动物特异性结合在 IgG 的 Fc 区域。在本研究中我们采用了蛋白 G 柱色谱法纯化。本实验结果表明,用 protein G 柱亲和层析法纯化腹水中单克隆抗体,纯化后经 SDS-PAGE 电泳分析,由于二硫键在 β-琉基乙醇作用下断裂,故形成 2 条相对分子质量约为 50×10^3 的重链(H 链)和 2 条相对分子质量为 25×10^3 的轻链(L 链)。亚类鉴定 3 株(1-C5、1-C6、1-H1)属于 IgG1,1 株(3-A10)属于 IgG2b。间接 ELISA 检测其交叉反应性,发现 1-C5 既与 HSA 又与 AOPPs 结合,其余 3 株均只与 AOPPs 结合,而与 AOPPs-BSA、BSA、CD26 亲和力低。免疫印迹结果表明,1-H1 抗体只与转移至 PVDF 膜上的 AOPPs-HSA 蛋白在膜顶部处形成片状的蛋白质染色带起反应,而与 HSA、AOPPs-BSA、AOPPs-RSA 均无交叉反应,单克隆抗体与正常人血清、HD 患者血清均有反应,与 HD 患者血清强度强于正常人,间接 ELISA 和 Western blot 实验证明我们制备的抗体可以特异性地和天然或体外制备的 AOPPs 结合。

抗人 AOPPs 单克隆抗体的成功研制填补了国内外空白,为进一步研究 AOPPs 的功能及与相关疾病的关系、纯化尿毒症患者体内的 AOPPs、中和封闭 AOPPs、靶向治疗、临床上检测相关疾病血清 AOPPs 含量及在组织细胞的表达分布等提供了有力工具。以及为 AOPP 结合蛋白甚至受体的研究打下坚实的基础。

参考文献:

[1] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, *et al*. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia[J]. Kidney Int, 1996, 49(5): 1304 – 1313.

[2] Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia[J]. Kidney Int, 2001, 60(1): 358 – 363.

[3] Li H Y, Hou F F, Zhang X, *et al*. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(2): 528 – 538.

[4] Liu S X, Hou F F, Guo Z J, *et al*. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(5): 1156 – 1162.

[5] Shi X Y, Hou F F, Niu H X, *et al*. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase[J]. Endocrinology, 2008, 149(4): 1829 – 1839.

[6] Wei X F, Zhou Q G, Hou F F, *et al*. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(2): F427 – F437.

[7] Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Boehm D, *et al*. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction[J]. Clin Biochem, 2008, 41(12): 943 – 949.

[8] Bouvet J P, Pires R, Pillot J. A modified gel filtration technique producing an unusual exclusion volume of IgM: a simple way of preparing monoclonal IgM[J]. J Immunol Methods, 1984, 66(2): 299 – 305.

[9] 陈 勇, 徐 燚, 应汉杰, 等. 亲和层析研究进展[J]. 离子交换与吸附, 2001, 17(3): 276 – 280.

[10] 孙维敏. 抗体纯化中亲和色谱配体的研究进展[J]. 离子交换与吸附, 2005, 21(3): 283 – 288.

(编辑 龙 亮)