

角蛋白 19 片段单克隆抗体的制备及鉴定

张慧茹¹, 翟晋豫², 刘 珍¹, 王雪琴¹, 孟素香¹

(1. 河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450001; 2. 河南省生物工程技术研究中心, 河南郑州 450001)

摘要:为制备角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)的单克隆抗体(mAb), 采用间接 ELISA 方法检测免疫小鼠的抗体效价, 融合、筛选、克隆化单克隆抗体, 将筛选得到的单克隆细胞株注入小鼠腹腔制备腹水, 采用辛酸硫酸铵法、蛋白 A 柱纯化腹水抗体, 以 SDS-PAGE 凝胶电泳、紫外分光光度法检测抗体纯度和浓度; 利用鼠抗体亚型鉴定试剂盒对单克隆抗体进行亚型鉴定; 采用阻断 ELISA 法测定 mAb 的敏感性(IC₅₀)。结果表明, 筛选获得 4 株分泌角蛋白 19 片段 mAb 的细胞株, 将 4 株细胞株 2F9、3H5、7C3、6F11 注入小鼠腹腔, 分别获得效价为 2.56×10^5 、 5.12×10^5 、 5.12×10^5 、 2.56×10^5 的单克隆抗体, 经纯化, 抗体蛋白浓度为 12.43 mg/mL~16.00 mg/mL, 为 IgG1 型抗体, 其 IC₅₀ 在 1.03 ng/mL~1.53 ng/mL 之间。说明获得了 4 株分泌高效价 CYFRA21-1 单克隆抗体的细胞株, 为建立 CYFRA21-1 的检测试剂盒奠定了基础。

关键词:角蛋白 19 片段(CYFRA21-1); 单克隆抗体; IgG; 鉴定

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2014)12-0005-05

细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK19) 是一类存在于肺泡、腺泡、子宫内膜等组织单层上皮细胞中的酸性蛋白质, 正常状态下为寡聚体, 其分子质量为 40 ku, pI 值为 5.2, 以非可溶的形式存在于细胞骨架中, 当细胞发生癌变后, CK19 会随着细胞的降解以可溶性片段的形式释放到血液中。1992 年, Bodenmuler H^[1] 利用细胞融合技术, 制备出了 2 株单克隆抗体, 即 BM19.21 和 KS19.1, 经免疫学测定, 这两种抗体可特异性地与 CK19 中的某些片段相结合。随后, 将这两种抗体结合的抗原片段命名为 CYFRA21-1, 即目前所指的细胞角蛋白 19 片段。

国内外大量研究报道指出, CYFRA21-1 可作为口腔鳞状细胞癌、宫颈鳞癌、肺癌、胰腺癌等上皮细胞肿瘤性疾病的标志物^[2-3], 通过检测 CYFRA21-1 在血清中含量的变化, 可用于癌症患者上皮细胞癌的生长状况和患者愈后的分析。目前常用德国 Roche、法国 CIS 等国外试剂盒进行检测。与国外产品相比, 国内研发的检测试剂盒存在特异性差、灵敏度低等问题。因此, 制备高效价特异性 CYFRA21-1 单克隆抗体, 可为诊断检测试剂盒的研发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

CYFRA21-1 抗原为美国 Cal Bioreagents 公司产品; 成年雌性 Balb/c 小鼠为郑州大学医学院实验

动物中心饲养; Quick AntibodyTM 免疫佐剂为北京康碧泉生物科技有限公司产品; SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞由河南工业大学动物生理实验室保存; HAT、PEG4000、RPMI-1640 培养基均为 Gibco 公司产品; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为上海尚宝生物科技有限公司产品; HRP-羊抗鼠 IgG 为 Jackson 公司产品; 重组蛋白 A 亲和层析柱为上海工硕生物技术有限公司产品; 小鼠亚型鉴定试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 抗原免疫 取 5 只雌性 Balb/c 小鼠, 按 Quick AntibodyTM 免疫佐剂使用说明, 在每只小鼠大腿肌肉注射抗原与佐剂等体积混合溶液, 初次免疫抗原使用量为 30 μg/只, 2 周后进行 2 次免疫, 抗原使用量为 30 μg/只。7 d 后, 采集尾血, 以间接 ELISA 法检测抗体效价。同时给对照小鼠按照相同免疫程序注射等体积 PBS(pH7.2) 溶液, 获得对照血清。融合前 5 d, 尾静脉注射 50 μg/只的抗原加强免疫。

1.2.2 间接 ELISA 检测方法的建立 参照河南工业大学动物生理实验室常规 ELISA 检测体系, 采用棋盘法建立间接 ELISA 检测方法。调整 CYFRA21-1 抗原浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、

收稿日期: 2014-05-28

基金项目: 河南省攻关项目(132102310169); 河南省重点攻关项目(102102310093)

作者简介: 张慧茹(1967-), 女, 河北鹿泉人, 博士, 主要从事疾病诊断检测技术研究。

0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h, 洗涤 1 遍, 每孔加入含 10 g/L BSA 的 PBST 溶液 150 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h 后, 拍干。将 1 000 倍稀释的抗原免疫小鼠血清作为阳性、注射 PBS 的小鼠血清作为阴性分别加入, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后, PBST 洗涤 5 遍、拍干, 将 HRP-羊抗鼠 IgG 稀释 4 000、5 000、6 000、7 000、8 000 倍, 按每孔 100 μL 加入, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, PBST 洗涤 5 遍、拍干, 加入 TMB 显色剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 20 min, 用 2 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应, 测定各孔 450 nm 的吸光值, 依据 P/N 值最大原则确立间接 ELISA 检测方法的条件。

1.2.3 细胞融合及 mAb 筛选 挑选 CYFRA21-1 抗体效价高的小鼠作为融合用鼠进行细胞融合。培养 SP2/0 骨髓瘤细胞至对数生长期, 同时制备免疫小鼠的脾脏细胞悬液, 分别计数后, 以 1:5~1:10 的比例混合, 用 50% PEG 4 000 进行细胞融合。将融合细胞以 2.0×10^6 个/孔铺在含饲养层的 96 孔板中, 加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HAT 筛选培养液培养杂交瘤细胞。在培养第 3 天半量换液, 6 d 以后全量换液, 培养 10 d 后, 观察杂交瘤细胞形成的克隆团数目, 统计融合率; 第 11 天取含克隆团细胞的培养上清液, 采用间接 ELISA 法检测克隆团上清中的抗体效价。将抗体阳性孔的细胞以有限稀释法进行细胞的单克隆化, 统计克隆率及阳性率, 细胞单克隆化以所有细胞孔呈现 100% 阳性率为止。

1.2.4 小鼠腹水 mAb 的制备及纯化 将筛选得到的单克隆细胞株以 10^6 个细胞/只注入小鼠腹腔制备腹水。待小鼠腹水生成至最大量, 脱颈处死小鼠,

收集腹水, 以间接 ELISA 法检测腹水抗体效价。采用辛酸硫酸铵法、蛋白 A 柱对腹水中的抗体进行纯化。

1.2.5 mAb 的鉴定 以 SDS-PAGE、紫外分光光度法检测抗体纯度和浓度; 利用鼠抗体亚型鉴定试剂盒对单克隆抗体进行亚型鉴定; 采用阻断 ELISA 法^[2]测定 mAb 的敏感性 (IC_{50})。

1.2.6 特异性鉴定 参考孙敏华等^[3-4]的研究方法建立双抗体夹心 ELISA 检测方法, 分别检测 CK8、CK18、人绒毛促性腺激素 (HCG)、人促卵泡素 (FSH) 是否与 CYFRA21-1 之间存在交叉反应, 检验检测方法的特异性。

2 结果

2.1 间接 ELISA 检测方法的确立

采用棋盘法筛选, 将包被抗原与酶标抗体进行倍比稀释, 按照 P/N 值最高、阳性的吸光度大于阴性对照 2 倍以上的原则, 确定抗原包被浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、HRP-羊抗鼠 IgG 抗体稀释 6 000 倍时为最佳的间接 ELISA 检测条件。

2.2 小鼠 pAb 的检测

加强免疫后第 7 天采集小鼠尾血, 采用间接 ELISA 法检测血清的抗体效价。检测结果如表 1 所示。以大于阴性 OD 值 (不足 0.05 按照 0.05 计算) 2.1 倍为效价检测最低水平判断, 结果表明, 2 号、3 号小鼠血清的抗体效价达到 2×10^5 , 较其余小鼠高, 选择这 2 只小鼠为脾细胞的来源鼠。

表 1 小鼠抗血清效价测定

Table 1 Determination of titration of mouse antiserum

小鼠编号 No. of mice	稀释倍数 ($\times 1 000$) Dilution times										阴性 Negative	空白 Blank
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		
1	1.921	1.773	1.483	1.031	0.631	0.379	0.201	0.093	0.062	0.033	0.021	0.007
2	2.344	1.982	1.730	1.278	0.939	0.711	0.461	0.272	0.133	0.082	0.023	0.008
3	2.204	1.976	1.684	1.131	0.815	0.693	0.472	0.211	0.109	0.075	0.022	0.009
4	1.910	1.514	1.396	0.986	0.619	0.311	0.193	0.082	0.061	0.045	0.022	0.008
5	1.975	1.578	1.289	0.844	0.631	0.373	0.114	0.066	0.034	0.022	0.021	0.007

2.3 细胞融合及其克隆化筛选

细胞融合第 10 天, 统计细胞克隆团数目, 融合率达到 84.17%。融合第 11 天检测培养液上清, 筛选得到 4 株分泌高效价抗体的阳性杂交瘤细胞株, 分别命名 2F9、3H5、7C3、6F11。结果如表 2 所示。

3H5 经 4 次克隆化到达 100% 克隆率, 其余经 3 次克隆化达到 100% 的克隆率。

2.4 mAb 效价的检测

将 4 株单克隆细胞株注入小鼠腹腔, 7 d~14 d 收集腹水, 采用倍比稀释法, 用间接 ELISA 方法检测腹水效价, 结果见图 1。

结果显示, 4 株单抗 2F9、3H5、7C3、6F11 腹水中抗体效价分别为 2.56×10^5 、 5.12×10^5 、 5.12×10^5 、 2.56×10^5 。

表 2 杂交瘤细胞株的克隆
Table 2 Cloning of hybridoma cells

细胞株 Cell strain	第 1 次 First		第 2 次 Second		第 3 次 Third		第 4 次 Fourth	
	阳性率/% Positive rate	克隆率/% Colonial rate						
2F9	55.20	41.50	63.54	73.77	42.70	100.00		
3H5	44.79	76.74	57.29	60.00	63.54	86.89	61.46	100.00
7C3	50.00	52.08	38.54	86.49	47.92	100.00		
6F11	69.79	28.36	39.58	71.05	52.08	100.00		

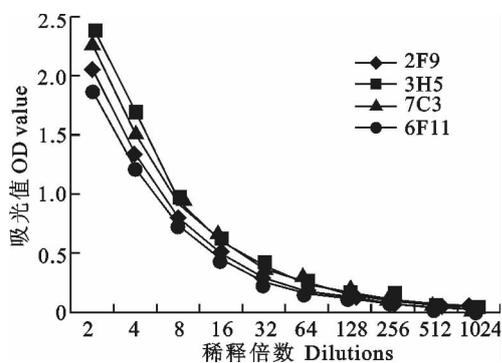


图 1 mAb 腹水效价 (1 000×)

Fig. 1 The titration of monoclonal antibody in ascites (1 000×)

2.5 mAb 的纯化及浓度测定

利用辛酸硫酸铵法、蛋白 A 层析柱纯化腹水抗体。经 SDS-PAGE 证实, 4 株单克隆抗体电泳均形成 2 条大小分别约为 55 ku 和 25 ku 的条带, 符合鼠源抗体特点(图 2)。将纯化后的抗体蛋白稀释 100 倍后, 经紫外分光光度测定吸光度值, 依据蛋白浓度与吸光度值的关系计算抗体蛋白浓度(表 3)。

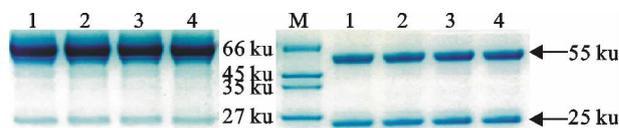


图 2 纯化后抗体 SDS-PAGE 检测

1. 2F9 细胞株抗体; 2. 3H5 细胞株抗体; 3. 7C3 细胞株抗体; 4. 6F11 细胞株抗体; M. 蛋白分子量标准; 左侧为纯化前, 右侧为纯化后

1. Antibody of 2F9 strain; 2. Antibody of 3H5 strain; 3. Antibody of 7C3 strain; 4. Antibody of 6F11 strain; M. Protein molecular weight Marker; Left is pre-purified antibodies

Fig. 2 Detection of purified antibodies by SDS-PAGE

2.6 mAb 的亚型鉴定

用抗体亚型检测试剂盒对 4 株 mAb 的抗体亚型进行鉴定, 4 株 mAb 的亚型均为 IgG1 类。

2.7 mAb 的敏感性测定

采用阻断 ELISA 方法, 测定 4 株 mAb 的 IC_{50} 结果见表 4。绘制各株 mAb 抗体的抑制曲线。

表 3 紫外分光光度测定纯化的抗体蛋白浓度

Table 3 Detection of purified antibody concentration by ultraviolet spectrometry

项目 Item	细胞株 Cell strains			
	2F9	3H5	7C3	6F11
吸光度 OD value	0.213±0.012	0.174±0.006	0.189±0.009	0.224±0.010
蛋白浓度 Protein concentration	15.21±0.86	12.43±0.43	13.50±0.64	16.00±0.71

表 4 mAb 的敏感性测定

Table 4 Sensitivity detection of mAb

细胞株 Cell strains	浓度/(ng·mL ⁻¹) Concentration								阴性 Negative
	0.00	0.15	0.30	0.60	1.20	2.40	4.80	9.60	
2F9	1.045	0.812	0.733	0.648	0.515	0.436	0.265	0.178	0.021
3H5	1.168	0.966	0.766	0.578	0.492	0.293	0.173	0.113	0.033
7C3	1.007	0.898	0.617	0.523	0.364	0.325	0.233	0.169	0.024
6F11	1.190	0.948	0.841	0.746	0.554	0.311	0.212	0.157	0.019

由图 3 计算, 2F9 的回归方程为 $y = -0.3534x + 0.5079$, $R^2 = 0.9897$, 2F9 的 IC_{50} 为 1.03 ng/mL; 3H5 的回归方程为 $y = -0.4198x + 0.5818$, $R^2 = 0.9805$, 3H5 的 IC_{50} 为 1.53 ng/mL; 7C3 的回归方程为 $y = -0.3811x + 0.5596$, 7C3 的

IC_{50} 为 1.40 ng/mL; 6F11 的回归方程为 $y = -0.4125x + 0.5355$, 6F11 的 IC_{50} 为 1.21 ng/mL, 说明 4 株单克隆抗体的敏感性均较好, 满足试剂盒单克隆抗体要求。

2.8 单克隆抗体特异性鉴定

为验证获得的4株单抗特异性,与角蛋白家族CK8、CK18及人血清中存在的CYFRA21-1类似物人绒毛促性腺激素(HCG)、人促卵泡素(FSH)进行间接ELISA法检测后对比显示,筛选获得的4株单克隆抗体与其他各类物质间的交叉反应率均小于0.1%,说明其特异性较好(表5)。

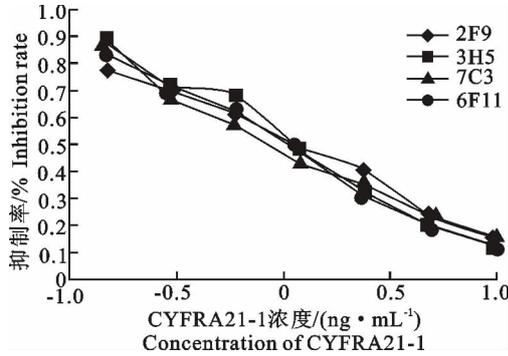


图3 4株mAb的抑制曲线

Fig. 3 Inhibition curves of 4 mAb strains

表5 CYFRA21-1与类似物的交叉反应性

Table 5 The cross-reactivity of CYFRA21-1 with its analogs

抑制物 Inhibitor	IC ₅₀ /(ng · mL ⁻¹)	交叉反应率/% Cross respond rate
CYFRA21-1	14.3 × 10 ⁴	100
CK8	—	<0.1
CK18	—	<0.1
HCG	—	<0.1
FSH	—	<0.1

3 讨论

众多研究表明,细胞角蛋白19(CK19)可作为检测上皮性实体癌血源性微转移的靶基因,血清中CYFRA21-1的含量可作为肺癌、食管癌等相关上皮细胞癌变的诊断参考指标之一[5-6]。但国内针对检测CYFRA21-1的试剂盒报道并不多见[7]。王彪等[8]采用时间分辨荧光免疫法制备CYFRA21-1试剂盒,通过分析比较1057例血清CYFRA21-1浓度发现,正常人血清中CYFRA21-1的浓度在0 ng/mL~4.0 ng/mL;张忠英等[9]随机调查70名正常人血清中CYFRA21-1的浓度,确定其参考值为1.84 ng/mL ± 0.65 ng/mL,因此设定正常人血清CYFRA21-1的均值为3.36 ng/mL,与Roch公司提供的参考值≤3.3 ng/mL接近;闵钟云等[10]在研究喉癌病例时发现,对照组血清CYFRA21-1浓度为2.43 ng/mL ± 1.09 ng/mL,而喉癌组CYFRA21-1的浓度为5.16 ng/mL ± 3.64 ng/mL。从上述研究中可以看出,人血清中CYFRA21-1的含量较低,且随着疾病的发生出现微量的变化,因此,需要制备灵

敏性较高的单克隆抗体才能适用于血清CYFRA21-1的检测。

小细胞肺癌主要表达CK18,有时可有CK8和CK19表达,而肺腺癌发病过程中有CK7、CK8、CK18和CK19的同时表达,鳞癌时也有大量角蛋白因子表达[11],为此检测CYFRA21-1与代表性角蛋白因子CK8、CK18的交叉反应;人绒毛促性腺激素(HCG)、人促卵泡素(FSH)是血清中CYFRA21-1的主要类似物[7]。因此,测定其与CK8、CK18、HCG、FSH的交叉反应,以确定4株单抗的反应特异性。

本研究采用Quick Antibody™免疫佐剂,比常规免疫3次~4次减少了一半,不仅节省抗原、减少免疫乳化的操作,且多克隆抗体产生快、效价高,该佐剂的使用为细胞融合提供了优质的候选小鼠。在高融合率的保证下,通过单克隆化筛选获得4株分泌高效价单克隆抗体的细胞株,将细胞株注入腹腔制备腹水,常规方法纯化抗体后,获得的4株单克隆抗体IC₅₀在1.0 ng/mL~1.5 ng/mL之间,能够满足正常人血清中低水平CYFRA21-1含量检测的需要。

本试验采用Quick Antibody™免疫佐剂与CYFRA21-1抗原混合的方式免疫小鼠,采取产生高效价多克隆抗体的小鼠脾脏与骨髓瘤细胞进行细胞融合,筛选获得4株高效价、敏感性强的IgG1型CYFRA21-1单克隆抗体,为后期制备CYFRA21-1检测试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bodenmuller H. Technical evaluation of a new automated tumor marker assay: The enzyme test CYFRA21-1. In: Hapdor R. Tumor associated antigens, oncogene receptors, cytokines in tumor diagnosis and therapy at the beginning of the 90ths[M]. Zuckschwenlt; Verlag, 1992; 137-147.
- [2] 王玲玲, 职爱民, 杨艳艳, 等. 抗细菌单克隆抗体的研制与鉴定[J]. 中国农业科学, 2013, 46(7): 1509-1515.
- [3] 孙敏华, 董嘉文, 吕殿红, 等. 鸭新城疫病毒单克隆抗体的制备及双抗体夹心ELISA方法的初步建立[J]. 动物医学进展, 2012, 33(12): 54-58.
- [4] 张红绪, 孙青芸, 王继创, 等. 胃蛋白酶原II单抗制备及夹心ELISA的初步建立[J]. 动物医学进展, 2012, 33(4): 56-59.
- [5] Pang Li, Wang Jing, Jiang Yanwen, et al. Decreased levels of serum cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 predict objective response to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. Exp Therap Med, 2013, 6(2): 355-360.
- [6] Liu L, Liu B, Zhu L L, et al. CYFRA21-1 as a serum tumor marker for follow-up patients with squamous cell lung carcinoma and oropharynx squamous cell carcinoma[J]. Biomarker Med, 2013, 7(4): 591-599.

- [7] 刘红, 刘宾, 李瑞娟, 等. 人细胞角蛋白 19 片段单克隆抗体的制备和鉴定[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(6): 430-434.
- [8] 王彪, 崔晓丙, 张国兰, 等. 细胞角蛋白 19 片段时间分辨荧光免疫分析试剂盒的评价及临床应用研究[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(1): 6-9.
- [9] 张忠英, 林永志, 刘莉莉, 等. ECLIA 技术测定 CYFRA21-1 在肺癌鉴别诊断上的应用价值[J]. 中国实验诊断学, 2001, 5(3): 125-126.
- [10] 闵钟云. 血清 CYFRA21-1 在喉癌下咽癌诊断中的临床价值[D]. 辽宁沈阳: 中国医科大学, 2002.
- [11] 张琳, 吴兴平, 丁伟龙. Cyfra21-1 和 CEA 及 CRP 联合检测对食管癌诊断价值的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012(9): 667-670.

Preparation and Identification of Monoclonal Antibodies Against Cytokeratin 19 Fragment

ZHANG Hui-ru¹, ZHAI Jin-yu², LIU Zhen¹, WANG Xue-qin¹, MENG Su-xiang¹

(1. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan, 450001, China;

2. Henan Biotechnology Research Center, Zhengzhou, Henan, 450001, China)

Abstract: Our aim was to prepare monoclonal antibodies against cytokeratin 19 fragments (CYFRA21-1). Antibody titer of immunized mice was detected by indirect ELISA method. Monoclonal cell strains were obtained by cell fusion and screen. Antibody from ascites was produced by peritoneal injection the monoclonal cell strains, and was purified by ammonium sulfate precipitation method and protein A chromatography. Antibody purity was detected by SDS-PAGE gel electrophoresis, and antibody concentration was checked by UV spectrophotometry. The antibody subtype kit was used to identify the subtypes of monoclonal antibodies. The sensitivity of monoclonal antibody was measured by blocking ELISA method (IC_{50}). The results showed that 4 monoclonal cell stains were produced after cell fusion and screen. Antibody titer of 4 strain cells, which were 2F9, 3H5, 7C3, 6F11, respectively were 2.56×10^5 , 5.12×10^5 , 5.12×10^5 , 2.56×10^5 , and the range of concentration of 4 strain cells was 12.43 mg/mL-16.00 mg/mL, which was IgG1 antibody subtype. The inhibitory concentration 50 (IC_{50}) of antibody was in the range of 1.03 ng/mL-1.53 ng/mL. In a word, we obtained 4 monoclonal antibodies with high-titer against CYFRA21-1 to establish CYFRA21-1 detection kit.

Key words: cytokeratin 19 fragment; monoclonal antibody; IgG; identification