第 11 卷 第 25 期 2011 年 9 月
1671—1815(2011)25-6019-05
科 学 技 术 与 工 程
Science Technology and Engineering
Vol. 11 No. 25 Sep. 2011
© 2011 Sci. Tech. Engrg.

抗人 FXYD3 单克隆抗体的制备与初步鉴定

马焕先[1] 高丽杰[2] 张爱群[2] 周宁新[3]*
(解放军总医院肝胆外科[1],北京 100853;解放军总医院野战外科研究所[2],北京 100853;第二炮兵总医院肝胆胃肠病研究所[3],北京 100088)

摘 要 制备抗人 FXYD3 单克隆抗体(McAb)并鉴定其生物学特性,以固相合成法获得的 FXYD3 合成多肽与载体蛋白 KLH 偶联后免疫 BALB/c 小鼠,采用杂交瘤技术制备抗人 FXYD3 McAb。用 ELISA 、Western Blot、免疫组化技术对抗人 FXYD3 McAb 的亚型、效价、亲和力及特异性进行鉴定。筛选出两段较好的优势抗原表位,分别为 NDLEDKNSPFY 和 KFGQKSGHH-PGETPPLITPGSA。获得四株可稳定分泌抗人 FXYD3 McAb 的杂交瘤细胞株 02A12C4、02F1E8、02E6B10 与 03A10E11,亚型鉴定重链均为 IgG1,轻链为 kappa 链。间接 ELISA 法测定效价均在为 1∶ 10^4 以上。其中 02F1E8 效价为 1∶ 10^5 以上,亲和常数为 3.11×10^8 L/mol。免疫组化分析显示了 FXYD3 均匀分布于肝癌细胞与人胰腺癌 Bxpc-3 细胞系细胞的胞膜上。结果成功制备了四株抗人 FXYD3 McAb,其中 02F1E8 纯度好、效价高及特异性强。为进一步研究 FXYD3 在肿瘤组织及细胞系中的表达及临床意义奠定了基础。

关键词 离子通道调节子 FXYD3 杂交瘤细胞 单克隆抗体
中图法分类号 R392.4; **文献标志码** B

近年来小分子单跨膜蛋白在细胞水平的重要调节作用逐渐得以认识及进一步深入的研究。其中 FXYD 蛋白是新近研究的焦点。FXYD 家族具有由 35 个氨基酸组成的信号序列,包含位于跨膜区周围的 7 个恒定氨基酸以及信号序列始端恒定的基序 PFXYD(脯氨酸-苯丙氨酸-X-酪氨酸-天冬氨酸)。Sweadner 与 Rael[1] 于 2000 年根据 FXYD 基序及其结构特点将 FXYD 家族进行了界定。FXYD3(MAT-8, 乳腺肿瘤标志物)[2] 以其独特的双跨膜结构区域区别于家族其他成员。Briggs W. Morrison[3] 等学者研究发现 FXYD3 可能是 c-neu 或 v-Haras 癌基因转化所必需的组成部分,Grzmil 等认为 FXYD3 蛋白与细胞增殖和抗增殖过程有关[4]。因此利用 FXYD3 单克隆抗体研究其在消化系统肿瘤组织的表达情况及临床意义显得尤为重要。本课题组采用杂交瘤技术制备抗人 FXYD3 单克隆抗体,并对其生物学特性进行初步鉴定,为进一步研究 FXYD3 与肿瘤的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

(6 ~8)周雌性 BALB/c 小鼠由解放军总医院实验动物中心提供,SP2/0 骨髓瘤细胞由北京赛驰生物有限公司提供,人胰腺癌细胞系 BxPc—3 购自上海中科院细胞所,乳腺癌组织来自解放军总医院普通外科手术标本,弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂(GIBCO BRL),100 × HAT 及 100 × HT 培养基(GIBCO BRL),RPMI—1640 培养基(GIBCO—BRL),辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体,酶标二抗(北京中杉金桥有限公司),匙孔虫戚血蓝蛋白(KLH)交联试剂盒(Sigma),抗体亚类鉴定试剂(Pharmacia),96 孔酶标板,24 孔细胞培养板(Bio-Rad),酶标仪(Thermo electron corporation USA),Protein G Sepharose 亲和层析柱(Pharmacia)。

1.2 方法

1.2.1 抗原表位的分析与多肽合成

根据 Homo sapiens FXYD3(BC005238.1 GI:

2011 年 5 月 20 日收到,5 月 31 日修改
第一作者简介:马焕先(1980—),女,汉族,山西河曲人,博士。E-mail: shania80@ sohu. com。
* 通讯作者简介:周宁新。E-mail:zhounx301@163. com。

13528881,87aa)的氨基酸序列,采用 BioSunV1.0 软件 Epitope Predict 程序中的 Epitope 方案预测人 FXYD3 的优势抗原表位,选取 2 个肽段序列,固相合成法获得多肽 1(NDLEDKNSPFY)和多肽 2(KFGQKSGHHPGETPPLITPGSA)。采用 EDC 法将多肽与载体蛋白 KLH 偶联制备完全抗原。

1.2.2 动物免疫

各取 5 只(6-8)周龄的雌性健康 BALB/c 小鼠同时免疫,首次免疫取 500 μg/mL 的人 FXYD3 抗原肽 1 和 2 各 1 mL 分别与等量弗氏完全佐剂乳化形成油包水乳浊液,皮下多点注射(0.2 mL/点)。之后每隔 2w 以相同剂量的抗原加等量弗氏不完全佐剂免疫两次。两周后静脉注射 50 μg 无佐剂抗原肽进行融合前加强免疫。3d 后无菌取脾,制备脾细胞悬液,用于细胞融合。

1.2.3 细胞融合

融合前一天选取小鼠腹腔巨噬细胞常规制备饲养细胞[5]。取免疫好的 Balb/c 小鼠脾细胞与处于对数生长期的 SP2/0 细胞按 5:1 的比例常规融合后加入含有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,37 ℃ 5% CO_2 孵箱中培养。融合次日加入 HAT 培养液,两周后改换 HTPRMI—1640 培养液继续培养,当细胞布满孔底 >1/10 面积时采用间接 ELISA 法筛选抗体。

1.2.4 阳性杂交瘤细胞株的筛选和克隆化

采用间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞株。将纯化的 FXYD3 合成多肽(200 ng/孔)包被酶标 96 孔板。空白对照为碳酸盐缓冲液,阴性对照为 Sp2/0 细胞培养上清液,阳性对照为免疫小鼠的阳性血清。(样品孔 *OD* 值-空白对照 *OD* 值)/(阴性对照孔 *OD* 值-空白对照孔 *OD* 值)≥2 为阳性标准。选取抗体检测呈强阳性的细胞孔有限稀释法连续 3 次克隆化,杂交瘤上清液均呈阳性,冻存备用。

1.2.5 单克隆抗体的制备及纯化

取 5 只健康的 BaLb/c 小鼠,各腹腔注射 0.5 mL降植烷,1 w 后腹腔注射对数生长期约 5×10^6 个杂交瘤细胞,接种细胞两周后收集腹水,置 37 ℃温箱2 h,4 000 r/min离心10 min,吸取上清液,56 ℃水浴灭活30 min后,分装置 -20 ℃保存备用。应用 G-Sepharose 柱亲合层析法纯化单克隆抗体。

1.2.6 单克隆抗体的鉴定

采用小鼠单克隆抗体免疫球蛋白 Ig 类与亚类检测试剂盒鉴定所获单抗的亚型,间接 ELISA 法测定抗体免疫活性效价和亲和力,SDS-PAGE 鉴定抗体纯度,紫外吸收法测定抗体浓度,免疫组织化学鉴定抗体的特异性。

2 结果

2.1 抗原多肽的合成

本实验采用固相合成法获得多肽 1(NDLEDKNSPFY)和多肽 2(KFGQKSGHHPGETPPLITPGSA),优势抗原表位分析如图 1 所示,质谱图如图 1 和图 2 所示。

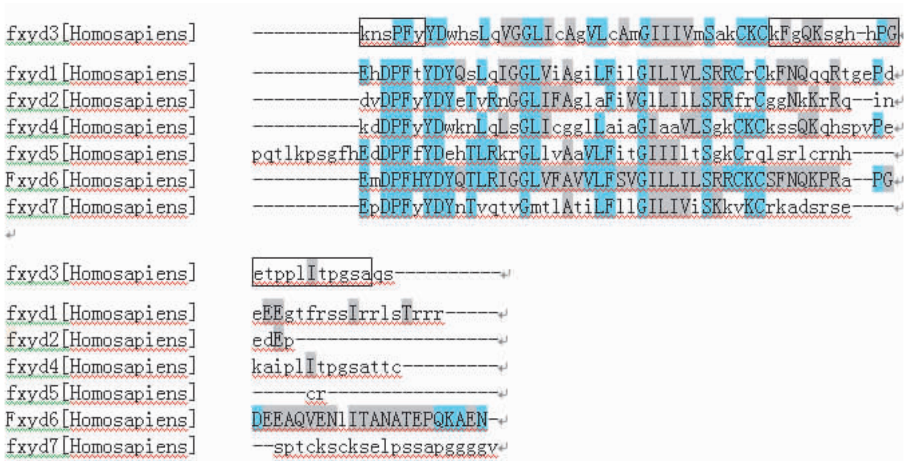

图 1 优势抗原表位分析图

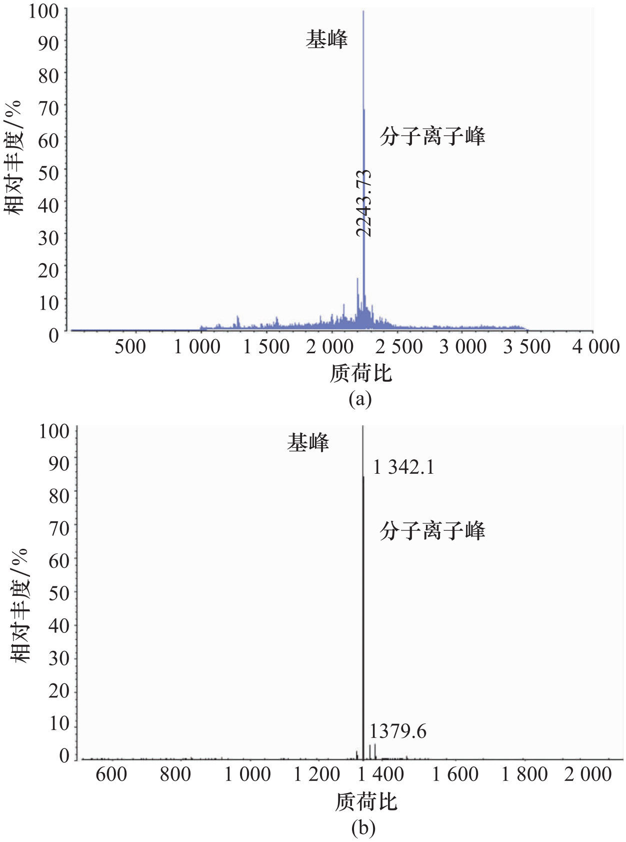

图 2　(a)抗原肽 KFGQKSGHHPGETPPLITPGSA 质谱图,(b)抗原肽 NDLEDKNSPFY 质谱图

2.2　杂交瘤细胞株的建立

将免疫后小鼠的脾细胞与 Sp2/0 细胞按常规方法进行融合,共融合 10 块 96 孔培养板,融合率约为 93.9%(901/960),每孔克隆数约为(2—6)个。融合板阳性克隆检出率为 5.88%(53/901),选取 10 个强阳性孔进行克隆化,同时通过胰腺癌细胞 Bx-pc—3 裂解物对培养上清进行检测鉴定分析,其中 4 个克隆对该细胞裂解物反应达到 1.0(OD_{495} nm)以上。这四株细胞以 5×10^6 细胞/mL 冻存液冻存,分别命名为 02A12C4、02F1E8、02E6B10、03A10E11。阳性克隆经连续 3 次克隆化均能稳定分泌抗体,从第二次克隆化后克隆阳性率为 100%。

2.3　杂交瘤细胞染色体核型分析

染色体核型分析显示:4 株杂交瘤细胞的染色体数目在(102—108)之间,基本为小鼠细胞的染色体(40 条)和 SP2/0 细胞染色体(62—68 之间)之和,由此可见所获得的抗体分泌细胞为小鼠细胞和 SP2/0 细胞的融合体。

2.4　单克隆抗体的制备及纯化

采用腹水制备法生产单克隆抗体,腹水形成的阳性率为 97%,腹水的产量平均为5.48 mL。腹水抗体经蛋白 G-Sepharose 柱亲合层析法分离纯化,根据亲和层析洗脱各管的 OD_{280} 绘制曲线(图 3)。纯化后的蛋白含量为0.75 mg/mL,纯度为 87.3%。10% SDS-PAGE 电泳结果显示纯化的抗人 FXYD3 McAb 用 DTT 处理后,在约 25 kDa 和 50 kDa 处得到一条轻链和一条重链带,未处理的纯化抗体在约 200 kDa 处只有一条带,与抗体分子的特性相符。

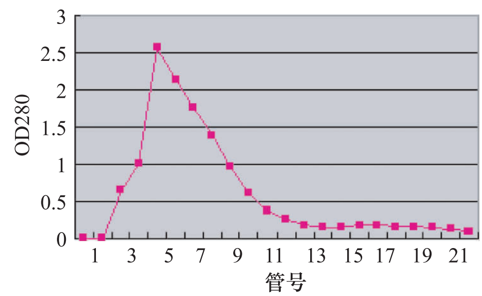

图 3　Protein G-Sepharose 柱亲合层析纯化腹水单抗的洗脱曲线

2.5　单克隆抗体的 Ig 类与亚类的鉴定

经小鼠单克隆抗体免疫球蛋白 Ig 类与亚类检测试剂盒鉴定显示:所获四株单抗重链均为 IgG1 型,轻链为 κ 链。

表 1　四株单克隆抗体亚型测定结果(OD_{450})

	02A12C4	02F1E8	02E6B10	03A10E11	阳性对照	阴性对照
AntiIgG1	0.521	0.336	0.319	0.473	0.504	0.092
AntiIgG2a	0.076	0.102	0.062	0.192	0.393	0.028
AntiIgG2b	0.069	0.118	0.104	0.021	0.457	0.161
AntiIgG3	0.122	0.109	0.083	0.071	0.438	0.053
AntiIgM	0.086	0.043	0.029	0.051	0.394	0.032
AntiIgA	0.052	0.078	0.016	0.099	0.507	0.079
AntiIgLκ	0.810	0.544	0.672	0.407	0.461	0.025
AntiIgLλ	0.097	0.103	0.118	0.053	0.557	0.034

2.6　单克隆抗体效价的测定

采用间接 ELISA 方法测定抗体效价。以 SP2/0

上清为阴性对照,同等稀释,结果显示,单抗的 *OD* 值明显大于阴性对照,以 *OD* 值≥阴性对照平均 *OD* 值 ±2S 者为阳性标准,出现阳性的最高稀释倍数为腹水的效价,4 株抗体 02A12C4、02F1E8、02E6B10、03A10E11 的效价分别为 1∶10^4 以上,其中 02F1E8 可以到 1∶10^5。

2.7 单克隆抗体亲和力的鉴定

根据各孔 *OD* 值,绘制测定曲线。利用 Beatty 计算公式计算纯化后的 FXYD3 单克隆抗体的亲和常数如表 2 所示。一般抗原抗体亲和常数的值大于 10^7 L/mol 时,说明抗原抗体的结合是很稳定的,抗体有很强的结合能力,可以应用到免疫分析中,本研究结果表明制备的单克隆抗体对抗原具有很强的亲和力,具备进行免疫分析的条件。

表 2 四株单克隆抗体亲和常数的测定结果

抗体	02A12C4	02F1E8	02E6B10	03A10E11
亲和常数 /(10^8L · mol^{-1})	1.08	3.11	2.11	1.37

2.8 免疫组化分析

结果显示人胰腺癌细胞系 Bxpc-3 及肝癌组织中四株抗体针对的抗原均位于胞膜,而正常肝脏组织无阳性变化。癌细胞胞膜着色不同,02F1E8 着色效果最好,呈棕红色,着色区和本底对比大,本底低;其他三株本底较高,可能是由于抗体不够纯。图 4—图 6 为抗体 02F1E8 免疫组化的结果图。

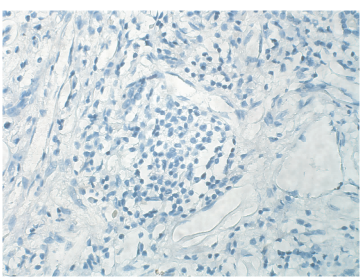

图 4 正常肝脏组织 SABC ×200

3 讨论

FXYD3 作为 FXYD 蛋白家族的一员,既具有家族其他成员的共性,如与 Na^+-K^+-ATP 酶相互作用调节其转运活性,也具有其独特的特点:(1)双跨膜区蛋白;(2)较低的特异性(与 H^+-K^+-ATP 酶作用);(3)对糖基化过程的调节。这些结构及生理功能的特点有可能是 FXYD3 通过调节 Na^+-K^+-ATP 酶的活性改变细胞离子环境从而促发或阻碍细胞增殖的原因。研究表明 FXYD3 在子宫、胃肠及结肠高水平表达[2]。Morrison 等学者通过观察 FXYD3 在非洲蟾蜍的卵母细胞过度表达鉴定 FXYD3 是一种可以诱导产生氯离子流的 phospholemman 样蛋白[2],且在人乳腺肿瘤细胞和由 c-neu 或 v-Haras 癌基因诱导的肿瘤细胞中过度表达,但在 c-myc 诱导的肿瘤细胞中不表达[3]。Grzmil 等学者研究发现 FXYD3 的 si-RNA(small interfering RNA)可抑制前列腺癌细胞的增生[4]。另外人乳腺癌细胞系 MCF-7 经 5-FU 处理后发现 FXYD3mRNA 的表达增加,但 p53 表达是这一激活作用的前提[6]。Ste′phanie Bibert[7] 等研究者证实人类 FXYD3 两个不同的剪接变体在不同分化的人腺癌细胞系 CaCo-2 细胞中有不同程度的表达,在未分化 CaCo-2 细胞中为主要表达成分,而在分化良好的 CaCo-2 细胞则表达明显减少,另外还可见于许多结肠腺癌细胞系。

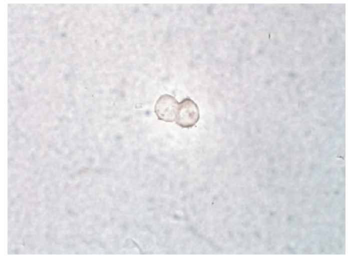

图 5 人胰腺癌细胞系 Bxpc-3 SABC ×200

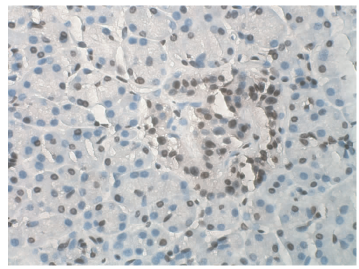

图 6 肝癌组织 SABC ×200

鉴于 FXYD3 在多种肿瘤组织的表达异常,提示我们 FXYD3 与肿瘤的发生发展有关。为进一步了解 FXYD3 是否在其他的消化系统肿瘤中的组织分布及临床意义,本课题组根据 FXYD3 优势抗原表位分析结果固相合成法获得肽段并与 KLH 偶联免疫小鼠,采用杂交瘤技术成功筛选出了 4 株可稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株,其分泌的单克隆抗体效价好,亲和力高,特异性强。免疫组织化学分析结果显示 FXYD3 在肝癌组织及人胰腺癌细胞系 Bxpc-3 中阳性表达,而正常肝脏组织则呈阴性表达。总之,抗人 FXYD3 单克隆抗体的成功制备,为深入研究 FXYD3 与恶性肿瘤的关系提供了有力的工具,在恶性肿瘤的发生发展机制及早期诊断方面有着广泛的应用前景。

参 考 文 献

1 Sweadner K J, Rael E. The FXYD gene family of small Ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. Genomics, 2000; 68 (1): 41—56

2 Morrison B W, Moorman J R, Kowdley G C, *et al*. Mat-8, a novel phospholemman-like protein expressed in human breast tumors, induces a chloride conductance in Xenopus oocytes. J Biol Chem, 1995;270(5): 2176—2182

3 Morrison B W, Leder P. Neu and ras initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in c-myc and int-2-initiated tumors. Oncogene, 1994; 9(12): 3417—3426

4 Grzmil M, Voigt S, Thelen P, *et al*. Up-regulated expression of the MAT-8 gene in prostate cancer and its siRNA-mediated inhibition of expression induces a decrease in proliferation of human prostate carcinoma cells. Int J Oncol, 2004; 24(1): 97—105

5 薛庆善. 体外培养的原理与技术. 北京:科学出版社,2001; 948—950

6 Maxwell P J, Longley D B, Latif T, *et al*. Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling. Cancer Res, 2003; 63(15): 4602—4606

7 Bibert S, Roy S, Schaer D, *et al*. Structural and functional properties of two human FXYD3 (Mat-8) isoforms. J Biol Chem, 2006; 281 (51): 39142—39151

Preparation and Preliminary Identification of Monoclonal Antibody Against Human FXYD3

MA Huan-xian[1], GAO Li-jie[2], ZHANG Ai-qun[2], ZHOU Ning-xin[3*]

(Department of Hepatobiliary Surgery, PLA General Hospital[1], Beijing 100853, P. R. China; Institute of Field Surgery, Chinese PLA General Hospital[2], Beijing 100853, P. R. China; The Second Artillery Hospital of PLA[3], Beijing 100026, P. R. China)

[**Abstract**] To prepare and preliminary identify the monoclonal antibody (McAb) against human FXYD3, dominant epitopes of FXYD3 were analyzed by software BioSunV1.0, two peptides were synthesized and conjugated with KLH. BALB/C mice were immunized with KLH-conjugated peptide to prepare McAb by using hybridoma technique. The immunoglobulin subtype, titer, affinity and specificity of obtained anti-human FXYD3 McAb were evaluated with ELISA, Western blot and immunohistochemistry respectively. It is resulted that four celllines of hybridoma were obtained named 02A12C4, 02F1E8, 02E6B10 and 03A10E11, which were identified that the heavy and light chains were all IgG1 and κ, respectively, with better titer than $1:10^4$. The titer of 02F1E8 was $1:10^5$, the affinity was 3.11×10^8 L/mol. The cell immuno-histochemistry proved that the McAbs could recognize the human FXYD3 located in the cell membrane of mammary adenocarcinoma and pancreatic carcinoma cellline Bxpc-3. It is concluset that success of four anti-human FXYD3 McAbs preparation with 02F1E8 of high titer and specificity provides the basis for further study of FXYD3 expression and Clinical Significance in tumor tissues and celllines.

[**Key words**] ion transport regulator FXYD3 hybridoma monoclonal antibody