

· 论著 ·

小鼠 Metrnl 单克隆抗体的制备及鉴定

曲 艺,李志勇,缪朝玉(第二军医大学药学院药理学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的 制备抗小鼠 Metrnl 单克隆抗体,并进行初步筛选鉴定。方法 分别制备小鼠 Metrnl 多肽片段和全长蛋白作为免疫小鼠抗原,取免疫后小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选阳性杂交瘤细胞,并亚克隆获得稳定细胞株,制备腹水。用 ELISA 方法检测腹水抗体效价;用 Western blot 方法鉴定抗体。结果 由 14 种多肽抗原制备的 56 株单克隆抗体中,未筛选出可用于 Western blot 识别 Metrnl 的抗体;由全长蛋白制备的 25 株抗体中,有 12 株可识别 Metrnl 蛋白。结论 本实验成功制备了 12 株单抗,可用于识别检测小鼠 Metrnl 蛋白。

[关键词] Metrnl;杂交瘤技术;单克隆抗体

[中图分类号] R580

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)02-0126-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.007

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against mouse Metrnl

QU Yi, LI Zhiyong, MIAO Chaoyu (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To prepare monoclonal antibodies (mAb) against mouse Metrnl and identify its specificity. **Methods** Mouse Metrnl polypeptide fragments and full-length protein were prepared as antigens to immunize mice. Then mice spleen cells were fused with SP2/0 myeloma cells to obtain hybridoma cells which were screened for positive clone in order to subclone for stable cell lines. After ascites were prepared, ELISA method was used to detect the antibodies titer. Western blot method was applied to identify their specificity. **Results** No effective antibodies were identified from the ascites derived from 14 polypeptide antigens. Among the 25 antibodies derived from the full-length protein, 12 monoclonal antibodies can be used to identify the recombinant Metrnl protein. **Conclusion** 12 monoclonal antibodies were successfully prepared to identify mouse Metrnl protein.

[Key words] Metrnl; hybridization technique; monoclonal antibody

Metrnl 又称 Subfatin、Cometin、Interleukin 39,是本实验室(缪朝玉课题组)近年来发现的一个新型脂肪因子,其在皮下脂肪组织、肠道上皮组织等部位高表达,与 Meteorin 是同源蛋白,但表达分布与功能却大不相同^[1-3]。目前,关于 Metrnl 蛋白功能的研究较少,有限的研究表明,Metrnl 在胰岛素敏感性、神经轴突生长、白色脂肪棕色化、软骨细胞分化等方面具有功能活性^[4-7]。由于缺乏有效的抗体工具,制约了人们对 Metrnl 新功能的进一步探索和对其作用机制的深入阐明,因此,本研究拟制备抗 Metrnl 单克隆抗体,并进行初步筛选鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 雌性 Balb/c 小鼠:6~8 周龄,SPF 级(上海西普尔-必凯实验动物有限公司);完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、titermax 佐剂(SIGMA 公司);铝佐剂(Abmart 公司);SP2/0 骨髓瘤细胞(Abmart 公司);HT、HAT(SIGMA 公司);带 His 标签的小鼠 Metrnl 全长重组蛋白(Abmart 公司制备);His-Tag 小鼠单抗(Abmart 公司);96 孔酶标板(THERMO 公司);其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 酶标仪(TECAN 公司);细胞培养箱(SANYANG 公司);凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);蛋白垂直电泳槽(北京六一仪器厂);湿法转膜仪(上海天能科技有限公司);摇床(上海琪特分析仪器厂);Odyssey 红外荧光显像系统(Li-Cor

[基金项目] 国家自然科学基金(81130061,81202572,81373414);上海市科学技术委员会科研项目(16JC1405100)

[作者简介] 曲 艺,硕士研究生。E-mail: quyi9009@sina.com

[通讯作者] 缪朝玉,教授,博士生导师。研究方向:心脑血管药理学与代谢。E-mail: cymiao@smmu.edu.cn

公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 Metrnl 多肽抗原表位的设计与合成
自国家生化技术中心(NCBI)获取小鼠 Metrnl 蛋白序列,采用晶体结构分析软件,分析靶点蛋白的结构信息,其表面的环状区域具有较好的亲水性、暴露于天然蛋白的表面,针对靶点蛋白结构表面的环状区域设计了14条多肽抗原。委托凯靖公司进行多肽合成。将合成的多肽与类病毒颗粒 VLP、BSA 偶联,分别作为免疫原和检测原。

1.2.2 多肽抗原的检测 取偶联好的溶液,加入5×上样缓冲液/loading buffer),加热5 min后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。阴性对照:偶联时,只加激活的载体蛋白,不加多肽;阳性对照:偶联时,加阳性对照多肽与载体蛋白。

1.2.3 以多肽为抗原免疫小鼠制备单克隆抗体
用14条多肽抗原免疫小鼠,每条多肽抗原免疫2只小鼠,四次免疫(简称“四免”)后取小鼠免疫血清,用原偶联多肽包被,间接 ELISA 法检测血清效价^[8]。选取效价>8 000的小鼠,取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞采用 PEG 诱导的 HAT 培养基法进行融合。间接 ELISA 法筛选出光密度(OD)值>0.5的最多93孔细胞株/小鼠,继续培养后进行表位鉴定,偶联多肽0.1、0.01、0.001 μg/ml包被。选取 OD 值>0.5的阳性克隆,进行连续亚克隆。

1.2.4 小鼠 Metrnl 蛋白抗原的表达及检测
Metrnl 全长蛋白分子量大约为35 000,小鼠 Metrnl 重组蛋白由 Abmart 公司表达,由于其与改造的 pET-28a 载体偶联,所以分子量较大,在74 000左右。以 SDS-PAGE 检测蛋白;用 Western blot 方法以 His 抗体检测全长蛋白。

1.2.5 以小鼠 Metrnl 蛋白为抗原免疫小鼠制备单克隆抗体 采用常规免疫方法,蛋白结合以下3种佐剂:弗氏佐剂、titermax 佐剂、铝佐剂(首免与弗氏完全佐剂联用),每种佐剂各免疫2只小鼠,三免后取血,间接 ELISA 法检测血清效价,选取效价最高的2只小鼠进行冲击后融合,剩余小鼠继续四免,选取效价较高的2只小鼠用于融合。按常规进行阳性杂交瘤细胞的筛选与亚克隆^[9,10]。

1.2.6 单克隆抗体的生产与纯化 选取健康成年小鼠,液体石蜡腹腔注射0.6 ml/只,收集生长状态良好的杂交瘤细胞,选取10⁶个细胞,每只小鼠腹腔注射0.6 ml,7~14 d后收集小鼠腹水。用 protein G 进行纯化。

1.2.7 腹水抗体效价的测定 用动物体内诱生法

制备单抗腹水,间接 ELISA 法进行鉴定^[11]。以 OD 值>0.25 且 OD 值大于阴性对照2倍的抗体最高稀释度作为腹水抗体的效价。

1.2.8 单克隆抗体的鉴定 用 Western blot 方法以小鼠全长重组蛋白对所有腹水抗体进行初步鉴定。本实验室近几年发现小鼠结肠中 Metrnl 表达较高^[12],因此,我们取小鼠结肠组织对抗体做进一步的鉴定。

2 结果

2.1 小鼠 Metrnl 多肽片段的设计 Metrnl 蛋白含有311个氨基酸,其中包含N端45个氨基酸的信号肽。我们针对靶点蛋白结构表面的环状区域(图1),共设计了14条多肽序列,见表1。

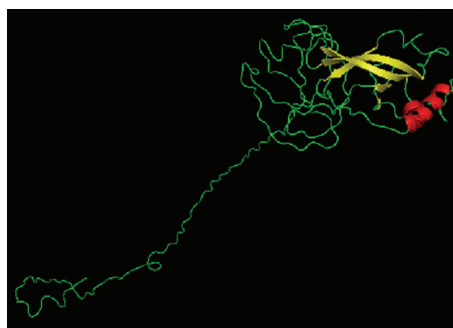


图1 小鼠 Metrnl 蛋白质氨基酸
结构特性分析(推测)

注:绿色部分表示蛋白结构表面的环状区域;黄色部分表示蛋白结构中的β折叠区域;红色部分表示蛋白结构中的α螺旋区域

表1 小鼠 Metrnl 多肽抗原序列

编号	起始位置	序列
P1	53~66	SWKGSGLTREARSK
P2	76~89	SAGSVEWMYPTGAL
P3	90~103	IVNLRPNTFSPAQN
P4	109~122	KPFRDSSGANIYLE
P5	123~136	KTGELRLLVLRDIRG
P6	144~157	FSLEQGGFLFVEATP
P7	156~169	TPQQDISRRTTGFGQ
P8	169~182	QYELMSGQRGLDLH
P9	212~225	EDVTHVPEQQVSVI
P10	229~242	VNRLHRQKSRVFPQ
P11	242~255	PAPEDSGHWLGHVT
P12	261~274	GVRPGHGFEFLTGH
P13	271~284	FTGHVHFGEAQLGC
P14	295~308	YRKAEMGINPCEI

2.2 多肽抗原的检测 如为合格的偶联,VLP 原本条带应消失或减少,即分子量约17 000处无明显条带,且该区域上方有连续几条条带(呈阶梯状),则

证明偶联成功。经电泳检测,第13号多肽偶联失败,我们重新设计了一条序列(P15),偶联返工后经检测证明成功(图2)。

2.3 小鼠 Metrn1 全长蛋白的检测 SDS-PAGE

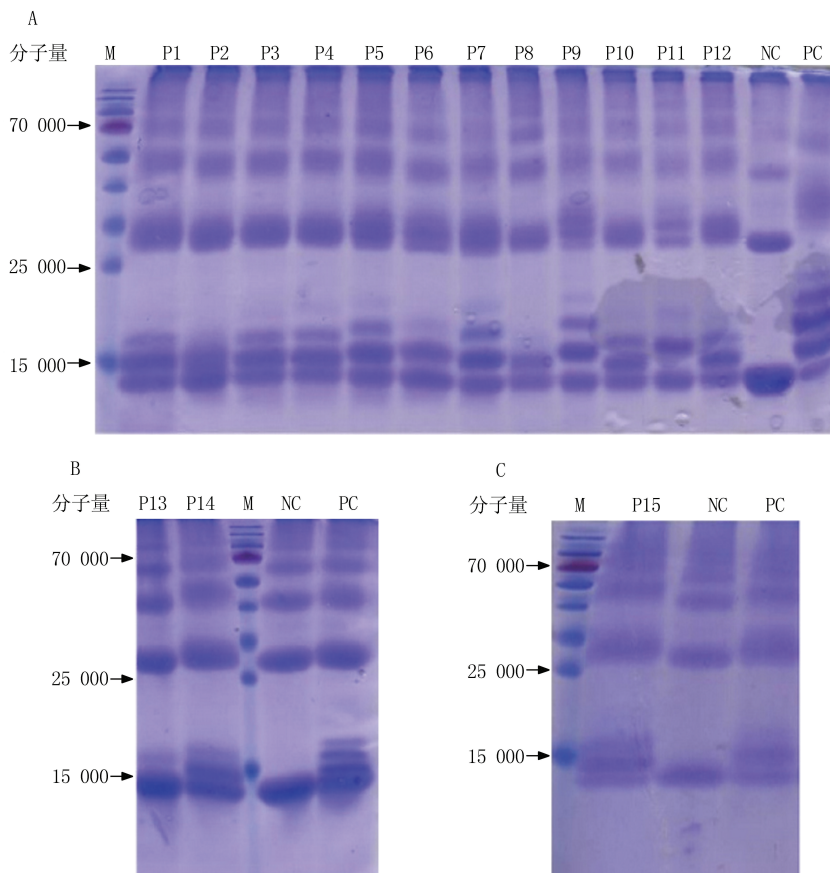


图2 合成小鼠 Metrn1 多肽抗原的 SDS-PAGE 检测

A. 多肽抗原 P1~12; B. 多肽抗原 P13~14; C. 重新设计的多肽抗原 P15;
M: marker; NC: negative control; PC: positive control

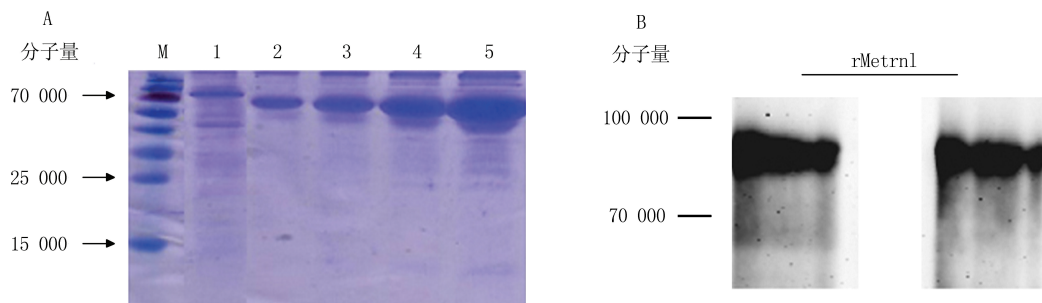


图3 小鼠 Metrn1 重组蛋白的检测

A. SDS-PAGE 与考马斯亮蓝染色检测小鼠 Metrn1 重组蛋白; B. Western blot 方法运用 His 抗体检测小鼠 Metrn1 重组蛋白; M: marker; 1. 重组蛋白; 2. 标准品 0.1 mg/ml; 3. 标准品 0.25 mg/ml; 4. 标准品 0.5 mg/ml; 5. 标准品 1 mg/ml; rMetrn1: 小鼠 Metrn1 重组蛋白(分子量约为 74 000)

2.4 免疫小鼠血清效价分析 以多肽免疫的小鼠血清中,选取抗体效价最高的 20 只小鼠用于融合。以蛋白免疫的小鼠血清中,三免后选取效价最大的 2 只小鼠冲击后融合,剩余小鼠于四免后选取效价

检测制备的全长蛋白;用 Western blot 方法以 His 抗体检测 Metrn1 全长蛋白,结果在分子量 70 000~100 000 检测到明显的条带,说明全长蛋白表达成功(图 3)。

最大的 2 只小鼠冲击后融合。

2.5 阳性克隆筛选 根据间接 ELISA 法结果,在以小鼠 Metrn1 多肽抗原制备抗体的过程中选出 56 株阳性杂交瘤细胞,在以小鼠 Metrn1 蛋白制备抗体

的过程中选出 25 株阳性杂交瘤细胞,选出共计 81 株阳性杂交瘤细胞。

2.6 腹水抗体效价的检测 采用间接 ELISA 法对小鼠腹水效价进行测定。在 Metrnl 多肽抗原免疫制备的抗体中,得到 56 株腹水抗体;在 Metrnl 全长蛋白抗原免疫制备的抗体中,得到 25 株腹水抗体。其中,多肽抗原制备的 6 株腹水抗体效价小于 1:50 000,其余均大于 1:50 000。

2.7 单克隆抗体的鉴定 用 Western blot 方法,以小鼠 Metrnl 全长重组蛋白鉴定所有腹水。实验未能从 56 株 Metrnl 多肽抗原制备的抗体中筛选出有效抗体;由小鼠 Metrnl 全长蛋白制备的 25 株抗体中,有 12 株单克隆抗体可识别 Metrnl 重组蛋白(图 4)。但是,以小鼠结肠组织蛋白为样品鉴定这 12 株抗体,结果显示条带较多,抗体特异性较差(图 5)。

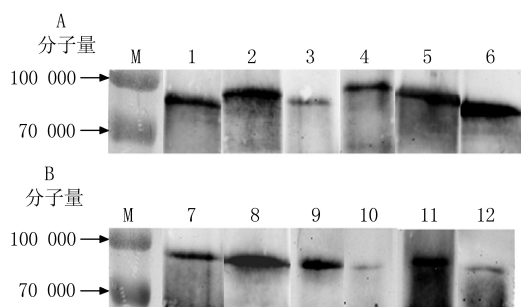


图 4 应用小鼠 Metrnl 重组蛋白鉴定 Metrnl 单克隆抗体

A. 小鼠全长 Metrnl 蛋白制备的单克隆抗体 1~6;B. 小鼠全长 Metrnl 蛋白制备的单克隆抗体 7~12;M: marker

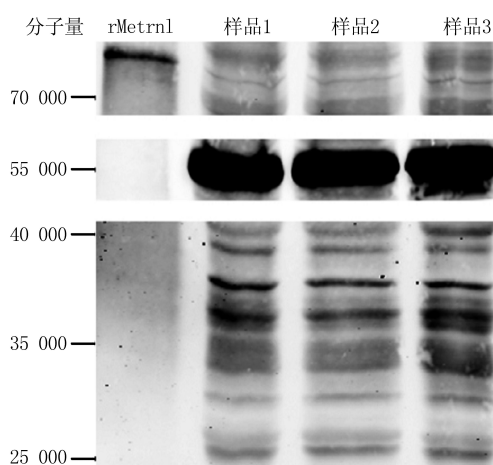


图 5 应用小鼠结肠组织蛋白鉴定 Metrnl 单克隆抗体

rMetrnl: 小鼠 Metrnl 重组蛋白(分子量约为 74 000);样品 1~3.来自 3 只不同 C57 小鼠的肠道组织蛋白,分子量 55 000 处为内参 tubulin

3 讨论

本实验分别利用小鼠 Metrnl 多肽片段和全长重组蛋白免疫小鼠,共获得 81 株单克隆抗体,其中,由 Metrnl 全长蛋白制备的 25 株抗体中,有 12 株单克隆抗体可在 Western blot 检测中识别小鼠 Metrnl 重组蛋白,这些抗体有望在今后有关 Metrnl 的研究中发挥作用。但这些抗体在组织中内源性 Metrnl 的检测方面作用如何还需进一步明确。此外,本实验制备的单抗中是否可以挑选出 Metrnl 的其他工具抗体,如可用于免疫共沉淀实验的抗体或者中和性抗体等,还有待进一步筛选。

Metrnl 是一个由 311 个氨基酸组成的分泌蛋白,包含 45 个氨基酸的信号肽序列,无跨膜结构,103 位序列可能是小鼠 Metrnl 潜在的糖基化位点^[1]。人 Metrnl 和 Meteorin 在氨基酸序列上大约有 40% 的同源性,这两个蛋白组成一个新的蛋白家族。Metrnl 高表达于白色脂肪组织、黏膜组织、皮肤等^[1,13]。本实验室前期工作也表达过小鼠 Metrnl 重组蛋白制备多克隆抗体,但只能用于检测过表达细胞的 Metrnl,且特异性差^[1]。Metrnl 作为一个新的蛋白,对其功能的研究还很少,各种检测抗体及中和抗体的缺乏是制约 Metrnl 功能全面研究的瓶颈。

抗体具有多方面的重要作用,如利用其特异性结合的特点在基础研究或临床检验中用于蛋白表达的检测、蛋白功能的中和,以及调取与靶标蛋白相互作用的蛋白等。相对于多克隆抗体,单克隆抗体具有特异性强、效价高、结构单一等特点,用于检测各种分子实验,结果稳定、确切。单克隆抗体药物还可用于临床治疗肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病等^[14],在基础研究和临床应用上都有其重要作用。

【参考文献】

- [1] Li ZY, Zheng SL, Wang P, *et al.* Subfatin is a novel adipokine and unlike Meteorin in adipose and brain expression[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(4): 344-354.
- [2] Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, *et al.* Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension [J]. *EMBO J*, 2004, 23 (9): 1998-2008.
- [3] Zheng SL, Li ZY, Song J, *et al.* Metrnl: a secreted protein with new emerging functions[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(5): 571-579.
- [4] Li ZY, Song J, Zheng SL, *et al.* Adipocyte Metrnl antagonizes insulin resistance through PPAR gamma signaling[J]. *Diabetes*, 2015, 64(12): 4011-4022.

(下转第 192 页)

当。患者自述住院期间初次应用左卡尼汀后曾有短暂的心慌感觉,但静息后症状消失,因而未引起重视,未向医生报告。

癫痫是大脑神经元突发性异常放电导致短暂的大脑功能障碍的一种慢性疾病,病因复杂多样,包括遗传因素、脑部疾病、全身或系统性疾病^[5]。该患者既往有癫痫病史,经系统治疗后近几年未曾发作。患者不良反应发生后急查血生化只有血氯偏低,其他电解质指标无异常,排除低钙血症导致的抽搐。患者为突发意识丧失、全身强直和抽搐,并经地西洋抢救治疗后短时间内缓解,可与尿毒症性脑病区分,考虑与左卡尼汀注射液显著相关。患者既往有心律失常(房性期前收缩)病史,既往口服单硝酸异山梨酯,偶有心慌感觉。本次不良反应发生时,心电监测显示心室率 190 次/min,律不齐,结合心电图为频发房性早搏、短暂房颤。左卡尼汀说明书中未提及心脏方面不良反应,考虑该患者既往有心脏病史,且癫痫亦有可能诱导既往有心律失常病史的患者再次发生短暂的心功能异常。患者自述首日注射左卡尼汀曾有心慌感觉,所以不能明确判断心功能异常和癫痫发病的先后关系,故分析后判断该患者心功能异常与左卡尼汀注射液可能相关。白细胞异常升高临床常见于急性感染、严重的组织损伤、急性中毒、白血病、肿瘤等。患者入院检查血常规正常,住院期间体温正常,腹膜透析后患者无相关感染的临床表现,不良反应发生后未应用抗感染药物可使患者白细胞下降并恢复正常值,中性粒细胞、CRP 等检验指标也未见明显异常,考虑白细胞异常升高与感染无关。心功能异常、癫痫发作导致白细胞应激性异

常亦有相关报道,但白细胞异常升高较少见。该患者的白细胞异常变化与左卡尼汀使用有时间相关性,故判断白细胞异常升高可能与左卡尼汀注射液有关。

综上所述,左卡尼汀致癫痫发作的不良反应较少见,导致癫痫发作的原因尚不清楚,而心功能异常和白细胞异常升高不良反应未见报道。而本例患者为老年女性,合并基础疾病较多,不良反应虽与应用左卡尼汀注射液呈相关性,但亦不排除其他因素影响,仍需临床医护人员高度重视。尤其对于既往有癫痫、心功能不全病史的患者使用左卡尼汀注射液时需要高度警惕。除严格按说明书使用外,对于高风险患者在应用左卡尼汀注射液后需观察一段时间,并需常备有心脏抢救药品及抗癫痫药品,一旦发生不良反应,可及时对症抢救治疗。

【参考文献】

- [1] 杨 贤,梁 培,王 娟,等.左卡尼汀在维持性血液透析中的应用进展[J].中国临床药理学杂志,2013,29(5):383-385.
- [2] 杨 贤,方 芸.左卡尼汀治疗血液透析患者肾性贫血的荟萃分析[J].中国临床药理学杂志,2013,29(11):859-861.
- [3] 胡小红,陶 煜,钱一欣,等.左卡尼汀对维持性血液透析患者血脂代谢影响的 Meta 分析[J].中国血液净化,2013,12(3):117-119.
- [4] 邵 欢,徐晓俊,王晓丹.左卡尼汀致癫痫大发作 1 例并文献分析[J].中国药房,2010,21(12):1136-1137.
- [5] 邱文娟,胡小伟,张正春.癫痫发病机制及治疗的研究进展[J].中华临床医师杂志(电子版),2014,8(10):1920-1924.

【收稿日期】 2015-12-11 【修回日期】 2016-11-18

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 129 页)

- [5] Jorgensen JR, Fransson A, Fjord-Larsen L, et al. Cometin is a novel neurotrophic factor that promotes neurite outgrowth and neuroblast migration *in vitro* and supports survival of spiral ganglion neurons *in vivo* [J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(1): 172-181.
- [6] Rao RR, Long JZ, White JP, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1279-1291.
- [7] Gong W, Liu Y, Wu Z, et al. Meteorin-like shows unique expression pattern in bone and its overexpression inhibits osteoblast differentiation [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164446.
- [8] Deng A, Tan W, He S, et al. Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the analysis of jasmonates in plants [J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(8): 1046-1052.
- [9] 户 义,刘雪松,朱 勇,等.抗 Ig 融合蛋白 Fc 段单克隆抗体的制备、鉴定与应用研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*,

2003,19(2):170-171,175.

- [10] 许晓光,朱 勇,刘雪松,等.抗人 CD100 单克隆抗体的制备与初步鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(1): 80-82.
- [11] 杜春红,钟佑宏,陈 平,等. BALB/c 小鼠选择与腹水产量和抗体效价间关系的研究 [J]. *实验动物科学*, 2008, 25(6): 9-11.
- [12] Li ZY, Fan MB, Zhang SL, et al. Intestinal Metrnl released into the gut lumen acts as a local regulator for gut antimicrobial peptides [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(11): 1458-1466.
- [13] Ushach I, Burkhardt AM, Martinez C, et al. METEORIN-LIKE is a cytokine associated with barrier tissues and alternatively activated macrophages [J]. *Clin Immunol*, 2015, 156(2): 119-127.
- [14] Yamada T. Therapeutic monoclonal antibodies [J]. *Keio J Med*, 2011, 60(2): 37-46.

【收稿日期】 2016-11-08 【修回日期】 2016-12-23

【本文编辑】 李睿旻