

蛋白质芯片技术应用于高通量单克隆抗体制备研究

Protein Array Technology Applied in High Throughput Monoclonal Antibody Generation

宋 凯¹, 叶 赛¹, 周佳菁¹, 彭海林¹, 王升年², 卫 玲², 肖华胜¹, 赵国屏¹, 张庆华^{1*}
SONG Kai¹, YE Sai¹, ZHOU Jia-Jing¹, PENG Hai-Lin¹, WANG Sheng-Nian², WEI Ling²,
XIAO Hua-Sheng¹, ZHAO Guo-Ping¹ and ZHANG Qing-Hua^{1*}

1 生物芯片上海国家工程研究中心/上海生物芯片有限公司, 上海 201203

2 上海华冠生物芯片有限公司, 上海 201203

1 National Engineering Center for Biochip at Shanghai, Shanghai Biochip Co., Ltd., Shanghai 201203, China

2 Shanghai Huaguan Biochip Co., LTD., Shanghai 201203, China

摘 要 针对在传统的单克隆抗体制备过程中进行特异性筛选时大量的人力消耗, 建立了一种联合应用蛋白质芯片进行单克隆抗体制备的方法。用 8 种重组蛋白分别免疫 BALB/c 小鼠, 在传统的细胞融合的基础上, 将 8 种抗原免疫的杂交瘤阳性细胞混合后进行克隆化、蛋白质芯片筛选, 阳性细胞有限稀释克隆化制备相关抗体。实验结果: 混合克隆化共得到单克隆细胞 175 孔, 经蛋白质芯片筛选出阳性孔 119 孔, 选择针对单一抗原阳性的细胞连续 2 轮克隆化, 8 种重组蛋白各获得单克隆抗体细胞株 1 株。与经典的单克隆抗体制备相比, 蛋白质芯片筛选与混合克隆化技术联合应用于单克隆抗体制备, 1 个筛选周期获得了 8 种重组蛋白的单克隆抗体细胞株, 提高了单克隆抗体的制备效率, 节省了在筛选中的抗原用量, 提供了一种经济、快速、简便的方法。

关键词 蛋白质芯片, 单克隆抗体, 克隆化, 筛选

中图分类号 R392 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1116-05

Abstract To reduce the huge labor-cost in the screening in traditional monoclonal antibody generation, We established a new system for monoclonal antibody generation integrating with protein array. BALB/c mice were immunized by eight recombinant proteins respectively, and the positive hybridoma cells were obtained by cell fusion and ELISA screening. All the eight kinds of positive hybridoma cells were mixed, cloned, screened by protein array, and definite dilution cloned. Results: 175 single cell clones were obtained by complex cloning, and 119 of those were positive clones. Then 8 positive cell lines were generated by the following 2 rounds definite dilution cloning. By comparing with the traditional method, we got 8 monoclonal antibodies using the combined protein array screening and multiplex cloning method in 1 cycle, and fewer amounts of antigens were used. As a result, the combined protein array and multiplex cloning method could be used as an economical, rapid and simple tool applying in high throughput monoclonal antibody generation.

Key words protein array, monoclonal antibody, cloning, screen

Received: March 7, 2007; Accepted: March 30, 2007.

This work supported by the Program of Shanghai Subject Chief Scientist(B type X No. 05XDB1414) and the National High Technology Research and Development Program of China(863 Program)(No. 2006AA020704).

* Corresponding author. Tel: +86-21-51320288; E-mail: qinghua_zhang@shbiochip.com

上海市科委优秀学科带头人计划(B类X No.05XDB1414)和国家高技术研究中心研究与发展计划(863项目)(No.2006AA020704)资助 journals. im. ac. cn

随着功能基因组学和蛋白质组学研究的不断深入,对抗体尤其单克隆抗体的需求越来越多,期望在经典的抗体识别的基础上,建立高覆盖的抗体组,来识别所有的人类表达蛋白^[1-4]。在高通量的抗体制备技术方面主要有杂交瘤技术与噬菌体展示肽文库技术^[5-6],而经典的单克隆抗体技术的使用目前仍然最为广泛,易于获得高效价、高亲和力的抗体。本课题针对杂交瘤技术筛选过程的低效率和大量的人力消耗,结合蛋白质芯片技术进行高通量的单克隆抗体制备技术探索。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验动物 6周龄 BALB/c 雌性小鼠,由中科院上海实验动物中心提供。

1.1.2 免疫蛋白 7种人类重组蛋白和1种血吸虫重组蛋白由本实验室克隆、表达、纯化获得(表1)。

1.1.3 试剂与仪器 融合用聚乙二醇(分子量4000,含10%二甲亚砜)、HAT和8-氮杂鸟嘌呤、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠单克隆抗体、生物素标记的羊抗鼠单克隆抗体、交联链霉亲和素的藻红蛋白、TMB显色试剂、制备蛋白芯片的玻片基质均购自Sigma公司,制备蛋白质芯片的微孔板为Millipore公司的MultiScreen 96-Well Plates,蛋白质芯片制备仪为Cartesien AD5000,图像采集使用Epson办公扫描仪,玻片蛋白芯片制备仪为OmniGrid 100,图像采集使用GenePix 4000B扫描仪。

表1 实验中使用的8种重组蛋白抗原

Table 1 The recombinant proteins used in the experiments

Serial number in lab	GeneBank No.	Abbreviation
P22	NM_005574	LMO2
P382	NM_002658	PLAU
P391	NM_007036	ESM1
P399	NM_006117	PECI
P405	NM_002073	GNAZ
P415	NM_002467	V-myc
UGRP	NM_054023	UGRP
K005	AY223463	myophilin

1.2 微孔板蛋白质芯片制备与检测

微孔板按照Millipore的实验手册使用70%甲醇进行活化,PBS平衡后,使用点样仪进行芯片制备,芯片阵列4×4,每种蛋白样品喷点25nL,芯片制备完成后,37℃干燥1h,4℃保存。阳性参考点为未免

疫小鼠血清、阴性参考点为pH7.0,50mmol/L PBS,8种重组蛋白的浓度为0.2~0.6mg/mL。

将待检测细胞培养液50 μ L直接加入芯片中,室温振荡孵育1h后,使用PBST(0.1% Tween20)洗涤芯片3次,每次3min;加入使用pH7.0,50mmol/L PBS稀释的HRP标记的羊抗鼠抗体(1:3000),室温振荡孵育0.5h后,PBST洗涤3次,每次3min;每孔加入30 μ L TMB显色液显色,室温显色1min后,目测或扫描仪进行扫描记录实验结果。

1.3 玻片基质蛋白质芯片制备与检测

玻片基质蛋白质芯片按照参考文献制备^[7],芯片阵列格式12×12,每张芯片上10个阵列,以围栏分割,芯片室温干燥保存。

取20 μ L待检测细胞培养液加入玻片基质蛋白芯片,室温孵育1h后,使用PBST(0.1% Tween20)洗涤芯片3次,每次5min;加入使用pH7.0,50mmol/L PBS稀释的生物素标记的羊抗鼠抗体(1:10000),室温振荡孵育0.5h后,PBST洗涤3次,每次5min;每孔加入10 μ L交联链霉亲和素的藻红蛋白,室温孵育10min,PBST洗涤3次,每次5min,芯片扫描仪记录实验结果。

1.4 免疫与抗体制备

1.4.1 免疫、细胞融合与筛选 按照经典方法使用8种重组蛋白分别免疫BALB/c雌性小鼠,每次免疫使用的蛋白均为40 μ g,3次免疫后加强免疫,3d后无菌取脾脏,与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞融合,以HAT培养基选择培养,细胞融合后第10天,以重组蛋白为抗原,用间接ELISA法检测培养上清液中的抗体,选取吸光度值较高的阳性杂交瘤细胞孔,扩大培养后液氮冻存,每种抗原冻存4管以上。

1.4.2 杂交瘤细胞混合及克隆化 每种抗原取1管冻存的杂交瘤细胞,复苏后,细胞计数,每种杂交瘤各取大约60个细胞,混合在一起共计480个细胞,进行克隆化培养,共分配10块96孔培养板。

1.4.3 微孔板蛋白质芯片筛选与克隆建株 混合后再克隆化的杂交瘤细胞用微孔板蛋白质芯片进行筛选,阳性细胞孔扩大培养,液氮冻存,单一抗原阳性孔有限稀释法克隆制备相关抗体;单一抗原阳性孔克隆化用间接ELISA法检测,每种重组蛋白分别使用50ng/孔(pH9.6碳酸盐缓冲液稀释)包被96孔酶标板,4℃封闭过夜,每孔加入100 μ L细胞培养液,阴性对照为无细胞生长的培养液,按常规操作,显色后于酶标仪读取492nm \pm OD值。

2 结果

2.1 微孔板蛋白质芯片筛选

混合的杂交瘤细胞进行第一次克隆化时,共379孔有细胞的生长,其中单克隆生长的175孔,使

用微孔板蛋白质芯片对单克隆细胞生长的孔筛选,蛋白质芯片杂交结果如图1所示,实验结果见表2。其中对1种抗原呈现阳性80孔,对2种抗原同时呈现阳性35孔,对3种抗原同时呈现阳性2孔,对5种抗原同时呈现阳性1孔。

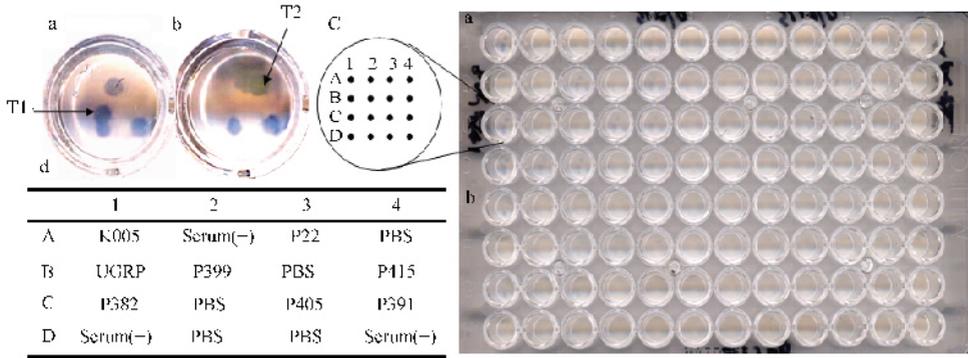


图1 微孔板蛋白质芯片筛选杂交图像

Fig. 1 The sketch map and the hybridization screening results of the micro-well protein array

a: T1 is the positive spot of recombinant protein P382, the other three spots are positive controls; b: T2 is the positive spot of recombinant protein P22, the other three spots are positive controls; c: the sketch map of the single well in micro-well array; d: the antigens printed in the every well.

表2 微孔板蛋白质芯片筛选结果

Table 2 The hybridization screening results of the micro-well protein array

	Positive to single antigen	Co-positive to two antigens	Co-positive to three antigens	Co-positive to five antigens
Numbers	80	35	2	1
Distribution	38 (P22), 19 (P382), 4 (P391), 2 (P399), 4 (P405), 4 (P415), 3 (UGRP), 4 (K005)	21 (P22, P382), 3 (P391, P405), 3 (P22, P405), 2 (K005, P382), 1 (P399, P391), 1 (P22, P415), 1 (P382, P415), 1 (P382, P391), 1 (P22, P391), 1 (P22, UGRP)	1 (P22, P391, P382), 1 (P22, P382, P391)	1 (P22, UGRP, P415, P405, P382)

2.2 克隆建株与分型

单一抗原阳性孔进行克隆化,间接ELISA筛选,连续两轮克隆化后扩大培养液氮冻存,得到8种重组蛋白抗体细胞各1株。使用自制的单克隆抗体分型蛋白质芯片进行分型^[8],分型结果如表3。

表3 单克隆抗体分型检测结果

Table 3 The isotype results of the monoclonal antibodies

Monoclonal antibody No.	Antigen No.	Antigen name	Isotyping results
mAb-01	P22	LMO2	IgG2a
mAb-02	P382	PLAU	IgG2b
mAb-03	P391	ESM1	IgG1
mAb-04	P399	PECI	IgG1
mAb-05	P405	GNAZ	IgG2a
mAb-06	P415	MYC	IgG1
mAb-07	UGRP	SCGB3A2	IgG1
mAb-8	K005	MLP	IgG1

2.3 玻片基质蛋白质芯片筛选实验

8种重组蛋白单克隆抗体细胞株培养液取20μL,

分别加入玻片基质蛋白质芯片反应仓中进行杂交反应,芯片阵列与杂交结果如图2。蛋白芯片阵列中每种蛋白共15个点,为5个浓度,每种浓度3个重复,最高浓度为制备微孔板蛋白质芯片的蛋白浓度,其余四个浓度以最高浓度为标准按照10倍比例梯度稀释。

2.4 抗体交叉反应性检测

制备获得的8种重组蛋白单克隆抗体细胞株,扩大培养后,使用微孔板蛋白质芯片检测交叉反应,芯片阵列(3×3)与杂交结果如图3,芯片上每一行为一种重组蛋白阵列,每一列分别加入8种单克隆抗体培养液。蛋白质芯片检测结果表明,8种单克隆抗体均识别对应抗原,不存在交叉反应,芯片上抗原的量决定了阳性点颜色的差异。

3 讨论

本研究探索了将蛋白质芯片技术应用于单克隆抗体制备的研究。与经典的单克隆抗体制备相比,

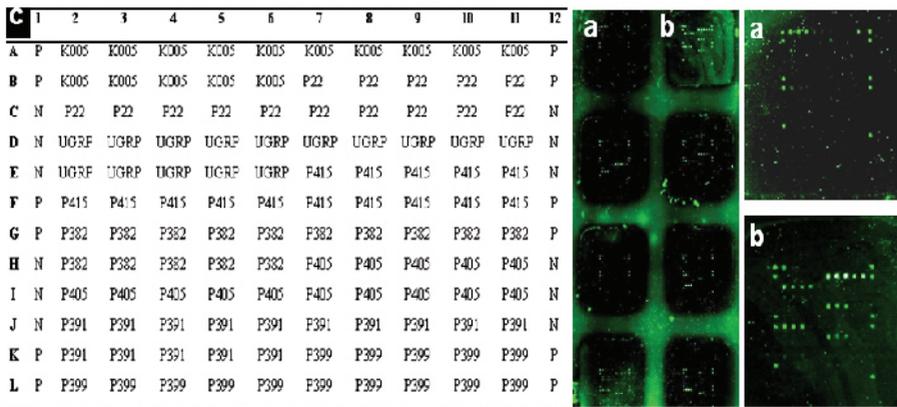


图 2 玻片蛋白质芯片杂交实验结果

Fig. 2 The distribution map and the hybridization screening results of the glass slide protein array

a : the hybridization results of the cell medium of the recombinant protein K005 antibody ;
 b : the hybridization results of the mixture of the cell medium of the recombinant protein P22, P415, P382, P405 antibody ;
 c the distribution map of the glass slide protein array ,12 × 12 ,P is the biotin conjugated goat anti-mouse monoclonal antibody ,N is pH7.0 50mmol/L PBS.

蛋白质芯片筛选与混合克隆化技术应用于单克隆抗体制备 ,1 个筛选周期获得了 8 种重组蛋白的单克隆抗体细胞株 ,提高了单克隆抗体的制备效率 ,节省了在筛选中的抗原用量。

混合克隆化共得到单克隆细胞 175 孔 ,其中对单一抗原阳性 80 孔 ,占 45.71% ,对多种抗原阳性 38 孔 ,占 21.71% ,其中两种抗原阳性为 92.11%。对多种抗原阳性的细胞在继续培养 7d 后 ,基本只保留了对 1 种抗原的抗性 ,这种多抗原阳性细胞可能为多克隆细胞 ,经过培养 ,具有其中一种抗体分泌能力的细胞占据优势而存活。

研究中使用的微孔板蛋白质芯片阵列包括了待

检测的目的蛋白、未免疫小鼠血清、PBS 溶液 ,其中未免疫小鼠血清作为阳性参考 ,PBS 溶液作为阴性参考。实验结果表明 ,蛋白质芯片杂交反应后 ,阳性参考点与阴性参考点均正常工作(图 1) ,证明了芯片的有效性。对于芯片筛选得到的阳性克隆 ,将所有 8 种抗原以及重组蛋白表达宿主菌大肠杆菌 BL21 的菌体破碎蛋白分别包被 96 孔板 ,使用 ELISA 方法对细胞培养液进行了检测 ,检测结果与芯片结果一致(数据量太多 ,实验结果未展示) 。克隆化筛选的过程使用 ELISA 方法 ,得到的单克隆细胞株的培养液使用芯片进行交叉反应性检测 ,检测结果与 ELISA 方法一致。因此 ,微孔板蛋白质芯片应用于

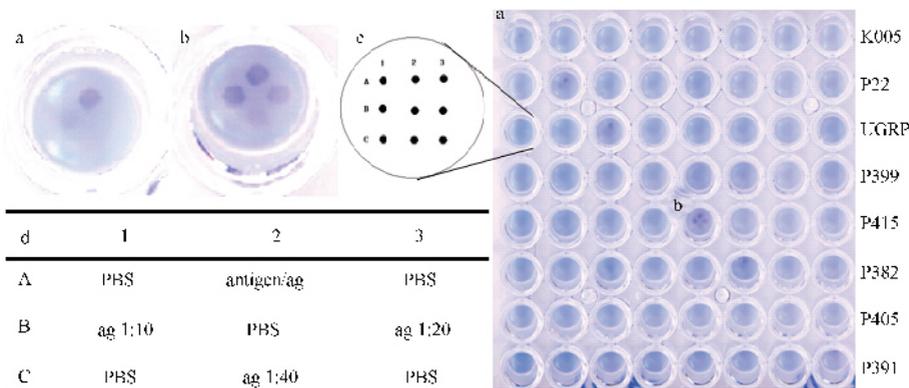


图 3 8 种单克隆抗体使用芯片方法进行交叉反应检测

Fig. 3 The sketch map and the cross reactions between the 8 monoclonal antibodies detected by micro-well protein array

a the K005 monoclonal antibody reacted with the K005 antigens diluted in different dilutions ;b :the P415 monoclonal antibody reacted with the P415 antigens diluted in different dilutions ; c :the sketch map of the single well in micro-well array ;d the antigens printed in the well.

抗体制备的筛选过程保证了筛选的准确性与重复性。

已有研究者^[6]用多种抗原混合免疫小鼠,融合后使用蛋白质芯片进行筛选并获得相应阳性细胞株。由于每种抗原具有不同的免疫原性,多抗原同时免疫小鼠存在部分抗原不产生免疫反应的风险,本研究采用分别免疫,杂交瘤细胞混合再克隆化的策略基本避免了抗原间的竞争。在进一步研究中,结合不同抗原分别免疫、多只小鼠脾脏细胞同时与骨髓瘤细胞混合融合、联合蛋白质芯片筛选的方法,可以实现一次融合筛选得到多种针对不同抗原的单阳性杂交瘤细胞克隆的目的,提高免疫与筛选的

效率。

De Masi 等^[6]使用了玻片基质的抗原芯片进行筛选,本研究将制备的单克隆抗体培液用玻片基质蛋白质芯片进行检测,检测结果与微孔板蛋白质芯片检测结果一致。与玻片基质蛋白质芯片相比,微孔板蛋白质芯片在制备、抗原需要量、灵敏度方面缺乏优势(表4)。但是微孔板蛋白质芯片以96孔为反应单位,容易操作,TMB膜显色虽然没有荧光灵敏,但是快速可见,获得的阳性细胞株往往效价较高,便于开展后续的筛选与应用。所以微孔板蛋白质芯片技术更加适合于高通量单克隆抗体制备体系。

表4 玻片基质蛋白质芯片与微孔板蛋白质芯片比较

Table 4 The difference between glass slide protein array and micro-well protein array

	Glass slide protein array	Micro-well protein array
Antigens used	Less	Few(5-15ng)
Throughput	The array matrix is up to 20 × 20, and ten samples can be detected at the same time.	The array matrix in single well is up to 4 × 4, and 96 samples can be detected at the same time.
Array preparation	Faster	Fast
Signal detection	More sensitive using Biotin-PE, and the results should be recorded and analyzed by professional scanner.	The results could be shown by TMB, read by eyes and recorded by routine scanner.
Operation	General protocol for protein array hybridization.	Easy to operate using 96 well plate.

综上所述,本研究建立的单克隆抗体制备技术以经典的单克隆抗体制备技术为基础,通过联合蛋白质芯片技术,实现了对针对不同抗原的多种抗体同时进行筛选,节省了筛选中的抗原用量,1个筛选周期可以获得多株针对不同抗原的抗体,提高了单克隆抗体制备效率,为一种可行的高通量抗体筛选和制备方法。

REFERENCES(参考文献)

- [1] De Wildt RM, Mundy CR, Gorick BD, et al. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat Biotechnol* 2000, **18** (9): 989 - 994.
- [2] Glokler J, Angenendt P. Protein and antibody microarray technology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, **25** (797): 229 - 240.
- [3] Michaud GA, Salcius M, Zhou F, et al. Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol* 2003, **21** (12): 1509 - 1512.
- [4] Bensmail H, Haoudi A. Postgenomics: proteomics and bioinformatics in cancer research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2003, **2003** (4): 217 - 230.
- [5] Chambers RS. High-throughput antibody production. *Curr Opin Chem Biol* 2005, **9** (1): 46 - 50.
- [6] De Masi F, Chiarella P, Wilhelm H, et al. High throughput production of mouse monoclonal antibodies using antigen microarrays. *Proteomics* 2005, **5** (16): 4070 - 4081.
- [7] Afanassiev V, Hanemann V, Wolff S. Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Res* 2000, **28** (12): E66.
- [8] Song K(宋凯), Zhou J(周佳菁), Ye X(叶赛), et al. Micro-well protein array technology applied in monoclonal antibody isotyping. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2007, **27** (6): 56 - 60.