

抗人重组肿瘤坏死因子(rHTNF α) 单克隆抗体的研制

黎燕 赵薇薇 沈倍奋 孙英勋 王文香

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

肿瘤坏死因子(TNF)对许多肿瘤细胞具有细胞毒和抑制生长的作用。为进一步研究TNF α 的结构和功能,并为临床研究提供rHTNF α 纯品。本实验应用杂交瘤技术制备了一组抗rHTNF α 单克隆抗体(T₅、S₃、H₇、B₃、B₅、E₆、Z₁₂、Z₈和Z₂₀)。ELISA结果证实它们与rIL-1、rIL-2、rIFN γ 、rIFN α_1 及E.coli菌裂解液(MM₂₉₄)无交叉反应,仅与rHTNF α 有反应。Western blot结果进一步证实这组抗体对rHTNF α 的特异性。这组抗体具有不同程度中和rHTNF α 细胞毒能力。用抗rHTNF α 抗体制备的亲和层析柱纯化rHTNF α ,可以得到在SDS-PEAG上分子量为17000道尔顿的rHTNF α 纯品。

关键词 重组人肿瘤坏死因子; 单克隆抗体

肿瘤坏死因子(TNF)是一类具有广泛生物学活性的细胞因子。近年来的实验室研究和临床I、II期应用研究已证实TNF对许多肿瘤细胞具有细胞毒和抑制肿瘤细胞生长的作用^[1,2]。为进一步研究TNF分子结构与功能,并为临床研究提供TNF纯品,制备具有特异性抗TNF单克隆抗体(McAb)具有极其重要的意义。本研究应用杂交瘤技术制备了一组抗人重组肿瘤坏死因子(rHTNF α)McAb,并对其性质进行了鉴定。

材料和方法

(一) 材料

rHTNF α 为本实验室研制,经L₉₂₉细胞系测定活性单位为 1.5×10^6 u/mg。重组人白细胞介素-1(rIL-1),由本所马贤凯教授提供。重组人白细胞介素-2(rIL-2),重组人干扰素 γ (rIFN γ),重组人干扰素 α_1 (rIFN α_1)由中国医学科学院病毒所

侯云德先生提供。天然TNF(N-TNF)来源:HL-60细胞 1×10^6 /ml悬浮于10%FCS-1640体系,加TPA(Sigma)20ng/ 10^6 细胞,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养24h,离心取上清测定TNF活性。

(二) 方法

1. 动物免疫:含100 μ g TNF α 的PBS0.2ml与同体积完全佐剂充分混匀后,对BALB/c小鼠免疫,三周后用同样剂量的rHTNF α 在不完全佐剂中对小鼠加强免疫。细胞融合前三天,再次用同样剂量的rHTNF α 对小鼠进行第三次加强免疫。

2. 细胞融合^[3]:按常规方法取小鼠脾细胞在PEG作用下与NS-1小鼠骨髓瘤细胞融合。

3. ELISA测定:rHTNF α 溶于20mol/L pH9.6碳酸缓冲液,包被96孔PVC板上,100ng/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。用含0.1%Tween20PBS洗3遍,用灭活10%

本文于1990年3月18日收到。

兔血清封闭, 37℃孵育1h, 洗3遍, 加待测样品, 室温下孵育1h, 洗3遍, 加辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体, 室温孵育40min, 洗4遍, 加联苯二胺(OPD)底物液, 用MR700自动酶联读数仪测定A_{490nm}。

4. 免疫电转印(Western blot)^[4]: 按常规方法将 rHTNF α 在还原条件下经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 用 Bio-Rad 电转移系统将凝胶上蛋白区带转印至硝酸纤维膜上, 并用抗 rHTNF α 抗体和酶标羊抗鼠 IgG 染色。

5. 细胞毒中和试验^[5]: L₉₂₉ 细胞系悬浮于10%FCS-1640, 取 rHTNF α 和抗 rHTNF α 抗体分别加入96孔培养板, 同时加放链菌素D(0.1 μ g/孔), 加L₉₂₉ 细胞 3 \times 10⁴/孔, 37℃、5%CO₂ 条件下培养18—20h, 用结晶紫染色后, 加入33%乙酸100 μ l/孔, 在MR700自动酶联读数仪测定A_{570nm}。

6. 抗体纯化: 含抗 rHTNF α 抗体的腹水对0.1mol/L pH8.0 PB透析后, 上样于Protein A Sepharose CL-4B层析柱, 用相同缓冲液洗脱杂蛋白后, 用pH6.0柠檬酸缓冲液洗脱 IgG₁, 收集洗脱峰并浓缩。

7. 相对亲和力测定: 按 Jew, A. M. 方法测定^[6]。

8. 免疫亲和层析法纯化 rHTNF α : 用抗 rHTNF α 抗体 (T₅、H₇、S₃、Z₈ 和 Z₁₂) 与 CNBr 活化 Sepharose 4B 按常规方法制备成抗 rHTNF α 抗体亲和层析柱, 将含 rHTNF α 的 *E. coli* 裂解液上样于亲和层析柱, 依次用0.05mol/L Tween20 TBS 洗去杂蛋白, 最后用 pH3.0 柠檬酸缓冲液洗脱下 rHTNF α , 同时用 pH8.0mol/L Tris 缓冲液将收集样品 pH 调至7.0左右, 透析、浓缩、测定活性。

结 果

(一) 杂交瘤细胞系的建立

用 ELISA 酶联方法筛选融合的阳性克隆, 经限定性稀释方法亚克隆, 共建立9株分泌抗 rHTNF α McAb 的杂交瘤细胞系: T₅、H₇、S₃、B₃、B₅、E₆、Z₈、Z₁₂ 和 Z₂₀。将杂交瘤细胞分别注射给经降植烷处理的 BALB/c 小鼠, 制备含抗 rHTNF α McAb 的腹水并纯化抗体。

(二) 抗体特异性

用 rIL-1、rIL-2、rIFN γ 、rIFN α_1 、MM₂₉₄ 工程菌裂解液、rHTNF α 和天然 TNF α 为抗原包被96孔板, 测定抗 rHTNF α McAb 与它们的交叉反应性。结果表明(表1) T₅、H₇、S₃、B₃、B₅、E₆、Z₈、Z₁₂ 和 Z₂₀ 抗体与 rIL-1、rIL-2、rIFN γ 、rIFN α_1 、MM₂₉₄ 均无交叉反应, 它们只与 rHTNF α 具有特异性的反应。而且 E₆、B₅、Z₈ 和 T₅ 抗体还与天然 TNF α 有反应。

免疫电转印(Western blot)的结果也进一步证实了这组抗体主要识别分子量为17000道尔顿的 rHTNF α 分子(图1)。

表1 抗 rHTNF α McAb 的特异性反应

Table 1 The specific reaction of anti-rHTNF α McAb

Sample (200ng/well)	McAb									
	T ₅	H ₇	S ₃	B ₃	B ₅	Z ₈	Z ₁₂	Z ₂₀	E ₆	
rIL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rIL-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rIFN γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rIFN α_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MM ₂₉₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rHTNF α	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nTNF α	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+

(三) 细胞毒中和试验

细胞毒中和试验结果表明, 这组抗 rHTNF α McAb 具有不同程度的细胞毒中

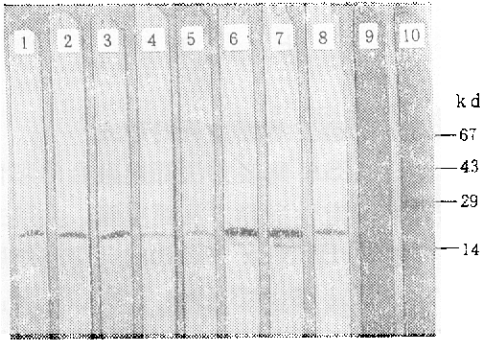


图1 抗rHTNF α McAb的Western blot
Fig.1 Western blot result using anti-rHTNF α McAbs 1. H₇, 2. S₃, 3. T₅, 4. B₅, 5. E₆, 6. Z₈, 7. Z₁₂, 8. Z₂₁, 9. rHTNF α , 10. Standard protein

表 2 抗rHTNF α 单克隆抗体中和rHTNF α 细胞毒
Table 2 The neutralization of rHTNF α cytotoxicity of anti-rHTNF α McAb

McAb	Neutralization (%)	McAb	Neutralization (%)
B ₃	46.3 ± 4.5	Z ₁₂	86.7 ± 11.6
B ₅	85.7 ± 9.3	H ₇	23.9 ± 16.3
S ₃	39.1 ± 13.8	T ₅	42.3 ± 4.5
Z ₈	80.6 ± 19.7	Z ₂₀	85.1 ± 19.1
E ₆	12.2 ± 23.6		

rHTNF α 0.1 μ g/McAb 10 μ g

NF α 不同部位抗原决定簇有关。B₅、Z₈、Z₁₂和Z₂₀抗体所识别的部位位于rHTNF α 分子的活性中心部位。

(四) 抗体相对亲和力比较

用Jew, A. M. 方法测定的结果表明Z₁₂、T₅抗体的亲和力最强, S₃、H₇、Z₈、B₃抗体的亲和力较Z₁₂、T₅抗体的差。B₅和E₆抗体的亲和力则更差(图2)。

和能力(表2)。10 μ g的B₅、Z₈、Z₁₂和Z₂₀抗体可以中和1.9 × 10⁶—2.08 × 10⁶ u的rHTNF α 细胞毒性。T₅、H₇和S₃抗体的中和能力较差,这可能与抗体识别rHT-

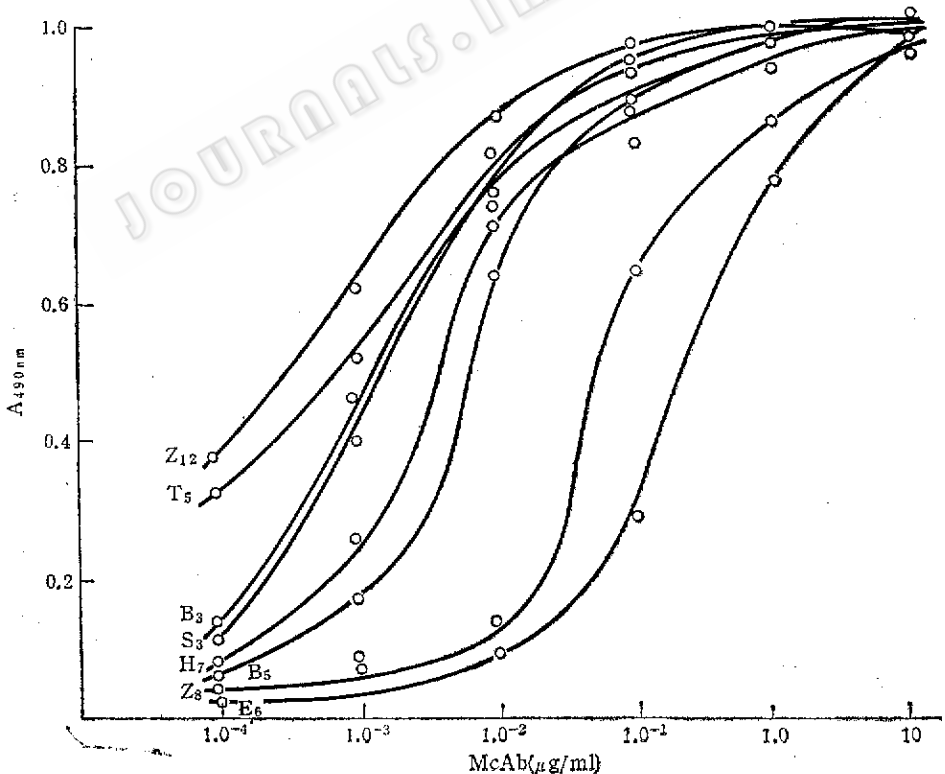


图2 抗rHTNF α 抗体亲和力比较(rHTNF α 1.0 μ g/ml)
Fig.2 The comparison of the relative affinity of anti-rHTNF α McAbs (rHTNF α 1.0 μ g/ml)

(五) 抗rHTNF α 抗体亲和层析法纯化 rHTNF α

选用 T₅、S₃、H₇、Z₈ 和 Z₁₂ 抗体制备亲和层析柱。含 rHTNF α 的 *E. coli* 菌裂解液上清于亲和层析柱, 经洗脱后, 收集样品, 测定蛋白含量和比活性(表 3)。

表 3 rHTNF α 的免疫亲和层析纯化

Table 3 Immunoaffinity purification of rHTNF α

Procedure	Protein Specific ac- (mg/L)	tivity(u/mg)	Purification factor
<i>E. coli</i> lysate Antibody(TNF α)	840.0	7.1×10^5	
Sepharose	80.6	4.0×10^7	56.3

含 rHTNF α 的 *E. coli* 菌裂解液经亲和层析纯化后蛋白回收率可达 9.6%, rHTNF α 的

活性达 4×10^7 u/mg。SDS-PEAG 表明经亲和层析纯化后的样品是分子量 17000 道尔顿的 rHTNF α 纯品(图 3)。

讨 论

我们用 rHTNF α 为免疫原经细胞融合技术建立了 9 株分泌抗 rHTNF α 单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 经半年传代培养后仍可持续分泌抗体。这些 McAb 对 rHTNF α 具有特异性, 与 rIL-1、rIL-2、rIFN γ 、rIFN α_1 以及 MM_{2,9,4} *E. coli* 工程菌裂解液无交叉反应, Western blotting 证实它们仅识别分子量为 17000 道尔顿的 rHTNF α 抗原, 这组抗体中 E₆、B₅、Z₈ 和 T₅ 还具有识别天然 TNF α 的能力, 这对检测正常人和某些疾病患者血清中 TNF α 水平变化与疾病间关系的研究将是有益的。这组抗体对 rHTNF α 表现出不同的亲和力, 为制备免疫亲和层析纯化 rHTNF α 创造了极好的条件。对 rHTNF α 具较高亲和力的 T₅、S₃ 和 H₇ 抗体对 rHTNF α 细胞毒中和能力较 Z₈、Z₁₂ 和 Z₂₀ 及亲和力较低的 B₅ 差, 这可能与抗体作用于 rHTNF α 非活性部位有关, 因此对 rHTNF α 细胞毒中和作用相比较低。由于这类抗体不易损伤 rHTNF α 活性部位, 更适于亲和层析柱的制备, 有利于纯化 rHTNF α 。以上实验结果证实本实验所获得一组抗 rHTNF α McAb 可以成为提取纯化 rHTNF α 的重要试剂, 并可用于 TNF α 的有关研究。

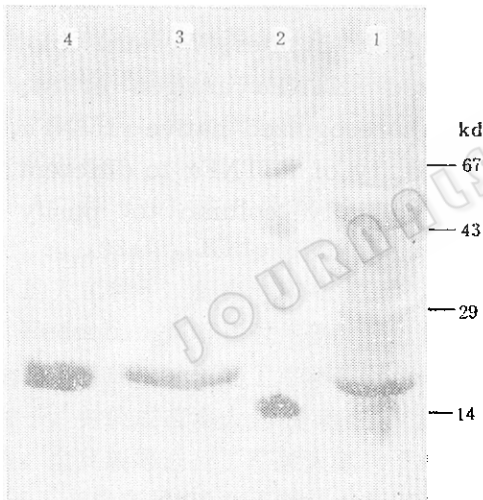


图 3 免疫亲和纯化 rHTNF α 的 SDS-PEAG 电泳图
Fig.3 SDS-PEAG electrophoretic pattern of immunoaffinity purifying rHTNF α
1. rHTNF α 的 *E. coli* 裂解液 *E. coli* lysate of rHTNF α 2. 标准蛋白 Standard protein 3,4. rHTNF α

参 考 文 献

- [1] Fransen, L. et al.: *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.*, 22(4):419-426, 1986.
- [2] Pierangeli, S. S. et al.: *Journal of Interferon Research*, 9:1-9, 1989.
- [3] Shimamoto, Y. et al.: *Immunology Letter*, 17:311-318, 1988.
- [4] Fendly, B. M. et al.: *Hybridoms*, 6(4):359-370, 1987.
- [5] Liang, C. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137(2):847-854, 1986.
- [6] Friguet, B. et al.: *Journal of Immunological Methods*, 77:305-319, 1985.

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α

Li Yan Zhao Weiwei Shen Beifen

Sun Yingxun Wang Wenxiang

(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military
Medical Sciences, Beijing*)

Tumor necrosis factor (TNF α) plays an important role in cytotoxicity and inhibition of tumor cells. Further studies on the structure, function and clinical application of TNF α will be useful. Nine clons of hybridoma secreting monoclonal antibodies against rHTNF α were obtained by using cell fusion technology. None of the monoclonal antibodies cross-reacted with rIL-1, rIL-2, rIFN γ , IFN α_1 , and *E. coli* lysates. Western blot demonstrated that they specifically recognized rHTNF α antigen of M. W. 17000 daltons. Some of the antibodies recognized native rHTNF α , too. These antibodies neutralized the cytotoxicity of rHTNF α to different extents. They will be utilized as immunoaffinity column to purify rHTNF α from recombinant *E. coli* lysates.

Key words

rHTNF α , McAb