

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720081152662

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

大鼠单克隆抗体平台的初步建立及应用

Establishment of method for preparing rat monoclonal antibodies and its primary application

吴兴容

指导教师姓名: 史维国 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩日期: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

大鼠-大鼠杂交瘤是继小鼠杂交瘤之后发展起来的另外一种单克隆抗体制备技术, 其与小鼠杂交瘤技术相比, 具有独特的优势, 如抗原识别谱广、抗体产量高、可用于小鼠抗原的研究等, 故其作为小鼠杂交瘤技术的良好补充, 具有极大的科研价值和良好的应用前景。

在小鼠单克隆抗体制备过程中, 对于小鼠免疫效果的评价, 目前采用的方式均为检测免疫小鼠的抗血清滴度, 其结果仅能够反映小鼠常规免疫阶段的体液免疫应答, 而不能反映小鼠细胞免疫应答及最后一次加强免疫(尾静脉注射、脾免)的效果, 但最后一次加强免疫对杂交瘤制备时的融合阳性率及后期所得单抗亲和力性质等方面均有着至关重要的影响, 因此, 有必要对此种免疫评价方式加以完善。IFN- γ 是主要由激活的 T 淋巴细胞分泌的一种细胞因子, 研究表明, 内源性 IFN- γ 水平的高低在很大程度上可以反映机体的细胞免疫状态, 所以通过对小鼠脾细胞经免疫原刺激后分泌 IFN- γ 水平的定量检测, 可以更加准确地评价小鼠的免疫效果。

本研究从国外引进 Lou/C 大鼠鼠种, 并对大鼠免疫、细胞融合、细胞株克隆化、腹水生产及纯化等一系列实验条件进行摸索, 成功建立基于大鼠-大鼠杂交瘤技术的大鼠单克隆抗体制备平台, 并利用该平台制备了大鼠抗小鼠 IFN- γ 单克隆抗体, 进而建立起定量检测小鼠 IFN- γ 的双抗夹心 ELISA 方法, 用于小鼠细胞免疫效果的评价。

首先, 利用重组蛋白作为抗原, 以不同的免疫方式(皮下注射、腹腔注射)对 Lou/C 大鼠进行常规免疫, 通过抗血清滴度跟踪检测初步评价免疫效果进而确定免疫方式; 对大鼠淋巴瘤细胞系 YB2/0 进行 Lou/C 腹水诱导验证, 确定其可用于大鼠杂交瘤细胞制备, 同时对其与大鼠脾细胞的融合条件进行一系列摸索, 初步确定了最佳融合方案, 保证细胞融合率; 采用有限稀释计数法对杂交瘤细胞进行连续克隆化得到稳定杂交瘤细胞株, 并尝试进行 Lou/C 大鼠腹水诱导; 摸索并确定从大鼠腹水中纯化单抗的方法, 对所得单抗进行初步评价, 最终成功建立起完整的大鼠单克隆抗体制备平台。

其次, 采用 RT-PCR 方法从小鼠脾脏细胞中扩增出小鼠 IFN- γ 全长 cDNA 序列, 以该产物为模板, 进一步 PCR 得到编码小鼠 IFN- γ 成熟蛋白的 DNA 片段, 将其亚克隆至原核表达载体 pET-22b⁺上, 转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达并利用离子交换层析纯化得到纯度>90%的目的蛋白。用商品化的 mIFN- γ ELISA 检测试剂盒对目的蛋白进行检测, 结果显示目的蛋白与单抗具有良好的反应性, 可作为免疫原用于大鼠免疫及抗体制备。

最后, 利用重组表达 mIFN- γ 免疫 Lou/C 大鼠, 制备得到 5 株大鼠单抗, 并进行 HRP 标记; 利用方正滴定法筛选出可用于 mIFN- γ 检测的最佳单抗配对 8H7/14C9-HRP, 建立 mIFN- γ 双抗夹心 ELISA 定量检测方法; 用该方法对 mIFN- γ 标准品进行检测, 绘制标准曲线, 结果显示其线性范围为 6400~200pg/ml ($R^2=0.986$), 检测灵敏度为 200pg/ml; 与同类商品化试剂盒同时检测 mIFN- γ 重组蛋白, 结果显示二者灵敏度相当, 检测结果无显著差异。

总之, 本研究初步建立了大鼠单克隆抗体制备平台, 并利用该技术制备得大鼠抗小鼠 IFN- γ 单克隆抗体, 建立了夹心 ELISA 检测小鼠 IFN- γ 的方法, 可应用于小鼠细胞免疫效果的评价。

关键词: 大鼠杂交瘤; 单克隆抗体; 小鼠 IFN- γ ; ELISA

Abstract

Rat×rat hybridoma technique is another method for preparing monoclonal antibodies. It possesses several advantages over the mouse hybrids, for example, the yield of serum and ascitic fluid is higher, rats may respond better than mice to antigenic stimulation, and rats are required for the production of monoclonal xenogenic anti-mouse antibodies. So, it has great value and Application Prospect in biological research, as a supplement for mouse hybrids.

When preparing mouse monoclonal antibodies, a normal way to evaluate immune effects of mice is testing the antiserum by ELISA. It possess disadvantage that the result of ELISA can not reflect cellular immunity responses, and effects of the last booster to mice, which have significant influences on the fusion rates and ever the affinity of the monoclonal antibodies. IFN- γ is a kind of cytokine released mainly by T cells stimulated by antigen, and assays that accurately detect and quantify antigen specific T cell-mediated immune responses are essential for the understanding of immune situation. So, quality analysis of IFN- γ released by protein-reactive T cells can help us evaluating the immune effects of mice more accurately and comprehensive.

We introduced Lou/C rats from abroad, and explore the experimental conditions including rat immunization, cell fusion, hybrids cloning, et al. Then we establish the method for preparing rat monoclonal antibodies from rat×rat hybridoma successfully. Base on this method, we prepared rat anti mouse IFN- γ mAbs and establish a high-sensitivity mouse IFN- γ quantifiable ELISA, which can be used for evaluating the cellular immune effects of mice.

First of all, rats were immunized by hypodermatic or intraperitoneal injection with many kinds of recombinant protein, the antiserum titer of rats was tested by ELISA and the best immune method was determined. The rat myeloma cell line YB2/0 was grown as tumours in Lou/C rat and make sure it could induce ascitic. Production of hybridoma by the fusion of the cell line YB2/0 with rat spleen cells,

explore the experimental conditions and ensure the fusion rate. Hybrids are cloned with limited dilution assay and grown as tumours in Lou/C rats for preparation of mAb in vivo, then the method for purifying rat mAbs from ascetic was established.

Secondly, the total RNA was isolated from spleen cells isolated from Balb/c mouse, and the mouse IFN- γ gene cDNA was amplified by RT-PCR and cloned into pET-22b⁺ to obtain the expression plasmid, which then was transformed into competent E.coli BL21 cells and a 15kD recombinant protein as expected was expressed after IPTG induction. The antibody reactivity of the recombinant mIFN- γ was evaluated by ELISA using BD IFN gamma ELISA TEST KIT.

Purified recombinant mIFN- γ was used as antigen and based on rat lymphocyte hybridoma technique, 5 rat mAbs were purified from ascetic fluid of Lou/C rats, the mAbs 8H7 and 14C9 were selected to develop the sandwich ELISA. The reliable correlation ($R^2=0.986$) was obtained between testing value (OD_{450}) and the concentration of mIFN- γ . The linearity fell in the range of 6400~200 pg/ml, and the sensitivity was 200 pg/ml. In testing of recombinant mIFN- γ , this assay performed well and correlated comparably with a commercial Biotin Rat Anti-Mouse IFN- γ ELISA kit.

In conclusion, we established a method for preparing rat monoclonal antibodies from rat \times rat hybridoma successfully, and prepared rat anti mouse IFN- γ mAbs base on the method. Then we established the sandwich ELISA, which is an accurate, reliable, quantifiable assay for detection of high-sensitive mIFN- γ , and can be used to test the content of mIFN- γ secreted by T lymph cells cultured with the antigen stimulation. It is a method for mouse cellular immunity evaluation.

KeyWords: Rat hybridoma; Monoclonal antibody; Mouse IFN- γ ; ELISA

目 录

摘 要	I
Abstract	III
缩略语	X
第一章 前言	1
1.1 大鼠杂交瘤技术研究进展	3
1.1.1 实验动物及淋巴瘤细胞系	3
1.1.2 大鼠-大鼠杂交瘤技术的特点	4
1.1.3 大鼠-大鼠杂交瘤技术的优势	6
1.2 小鼠 IFN- γ 及其与机体免疫的关系	10
1.2.1 IFN- γ 简介	10
1.2.2 IFN- γ 的免疫调节作用	11
1.2.3 IFN- γ 的免疫学检测	13
1.3 本论文的研究意义及主要研究内容	16
第二章 材料与方法	18
2.1 主要仪器	18
2.2 主要耗材	19
2.3 主要试剂与实验动物	19
2.4 常用溶液和培养液的配制	21
2.5 实验方法	24
2.5.1 大鼠单克隆抗体制备平台的建立	24
2.5.2 小鼠 IFN- γ 的基因克隆与原核表达	30

2.5.3 小鼠 IFN- γ 大鼠单抗的制备及初步评价	34
2.5.4 小鼠 IFN- γ 夹心 ELISA 检测法的建立	38
第三章 结果与分析	41
3.1 大鼠单克隆抗体制备平台的建立	41
3.1.1 Lou/C 大鼠引种及繁殖	41
3.1.2 大鼠的免疫	42
3.1.3 YB2/0 的培养及腹水诱导	42
3.1.4 YB2/0 染色体计数	43
3.1.5 大鼠脾脏细胞与 YB2/0 融合制备杂交瘤	44
3.1.6 兔抗大鼠 Ig(G+M)多抗制备及 HRP 标记	49
3.2 小鼠 IFN-γ 的基因克隆与原核表达	52
3.2.1 mIFN- γ 基因的克隆	52
3.2.2 重组质粒的测序鉴定	54
3.2.3 重组蛋白的小量诱导表达	54
3.2.4 重组蛋白的大量表达及纯化	55
3.2.5 重组蛋白的活性鉴定	56
3.3 大鼠抗 mIFN-γ 单抗的制备及初步评价	58
3.3.1 大鼠的免疫	58
3.3.2 大鼠杂交瘤细胞的制备	59
3.3.3 大鼠单克隆抗体亚型鉴定	59
3.3.4 从腹水中纯化大鼠单抗	59
3.4 小鼠 IFN-γ 夹心 ELISA 检测法的建立	61
3.4.1 最佳单抗配对的筛选	61
3.4.2 mIFN- γ 夹心 ELISA 标准曲线及灵敏度确定	62
3.4.3 与商品化试剂盒的比较	63
3.4.4 小鼠脾脏淋巴细胞刺激样品的 ELISA 检测	63

第四章 讨论	65
小结与展望	71
参考文献	72
致谢	83
附录	84

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreviations	X
Chapter 1: Preface	1
1.1 Research progress of rat hybridoma	3
1.1.1 Animal and myeloma cell line	3
1.1.2 Features of rat hybridoma	4
1.1.3 Advantages of rat hybridoma	6
1.2 Mouse IFN-γ and connection with immunity	10
1.2.1 Induction of IFN- γ	10
1.2.2 Immunity regulation of IFN- γ	11
1.2.3 Immuno-assays of IFN- γ	13
1.3 The meaning and content of this research	16
Chapter 2: Materials and methods	18
2.1 Instrument	18
2.2 Supplies	19
2.3 Reagents and animals	19
2.4 Solvents and medium	21
2.5 Methods	24
Chapter 3: Results and analysis	41
3.1 Establish of method for preparing rat monoclonal antibody	41
3.2 Mouse IFN-γ gene cloning, expression and purification	52
3.3 Preparation and characterization of rat anti mIFN-γ mAbs	58

3.4 Establish of sandwich ELISA for dection of mouse IFN- γ	61
Chapter4: Discussion.....	65
Brief summary and prospect	71
References.....	72
Acknowledgement.....	83
Appendix.....	84

厦门大学博硕士论文摘要库

缩略语

缩写	英文全称	中文名称
8-AG	8-Azaguanine	8-氮鸟嘌呤
aa	Amino acid	氨基酸
AD	Antigenic determinant	抗原决定簇
bp	Base pair	碱基对
CB	Carbonate buffer	碳酸盐缓冲液
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
ConA	Concanavalin	刀豆凝集素
CTL	Cytolytic T lymphocyte	细胞毒性 T 细胞
DMSO	Dimethylsulphoxide	二甲亚砜
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay	酶联免疫吸附实验
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay	酶联免疫斑点测定法
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
GAM	Goat anti mouse	山羊抗小鼠
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
IL	Interleukin	白介素
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
KD	Kilo Dalton	千道尔顿
Mab	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MHC	Main histocompatibility complex	主要组织相容性复合物
mIFN- γ	Mouse interferon gamma	小鼠干扰素- γ
NP	Nucleoprotein	核蛋白
NPA	Nucleoprotein of influenza A virus	甲型流感病毒核蛋白
NPB	Nucleoprotein of influenza B virus	乙型流感病毒核蛋白
OD	Optical density	光密度
ORF	Open reading frame	开放读码框
P24	HIV-P24 antigen	艾滋病毒 P24 抗原
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PH	Hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
SAS	Saturated ammonium sulfate	饱和硫酸铵
TB	Tris-HCl buffer	Tris 盐酸缓冲液

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库