

脑钠肽单克隆抗体的制备及临床应用研究

何涛君¹, 陈洲², 邱竹英², 王琼¹, 陆学东^{1*} (1 广东医学院附属深圳市福田区人民医院检验医学部, 广东深圳 518033; 2 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建厦门 361005)

Preparation and selection of the monoclonal antibody used for kits to detect BNP32 which was applied to clinical research

HE Tao-jun, CHEN Zhou, QIU Zu-ying, WANG Qiong, LU Xue-dong*

The Affiliated Shenzhen Futian Hospital of the Medical College of Guangdong, Shenzhen 518033, China

[Abstract] **AM:** To prepare the monoclonal antibody (mAb) used for kits to detect the BNP32 antigen by means of double-antibody sandwich ELISA assay. Comparison differences on detection BNP between double-antibody sandwich ELISA and Roche ECL. **METHODS:** BALB/c mice were immunized with purified recombinant BNP32 protein and by routine hybridoma technique. Then comparison differences on detection BNP between double-antibody sandwich ELISA and Roche ECL. **RESULTS:** 16 hybridoma cell lines secreting potent mAb against BNP32 were obtained. The subtype of these 16 mAb were found to be IgG1, IgG2a and IgM, then their cross-blocking properties were analyzed, when they reacted with the BNP32 protein in direct ELISA in order to offer the valuable data for selecting feasible pair of mAb in the detection of the BNP32 antigen. All the mAbs were used for the detection of BNP32 by double-antibody sandwich ELISA. In addition, the mAbs were purified and HRP-labelled in advance. Finally, we had successfully screened a pair of mAbs, which exhibited a sensitivity of 20 ng/L for the detection of BNP32 antigen. The two detection methods have very good consistency ($\kappa = 0.828 > 0.75$) between double-antibody sandwich ELISA and Roche ECL. There was no statistics significance on differences between these two methods ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** It is evident that this pair of mAb shows excellent detection of BNP32. The double-antibody sandwich ELISA can be good apply to detect BNP level in clinical congestive heart failure patients.

[Keywords] brain natriuretic peptide (BNP); monoclonal antibody; heart failure; ELISA

[摘要] 目的: 制备抗脑钠肽 (BNP32) 单克隆抗体 (mAb), 并利用双抗体夹心 ELISA 法建立 BNP 抗原检测技术, 应用于临床心脏患者脑钠肽水平的检测。方法: 以基因工程原核重组表达 BNP 抗原免疫 BALB/c 小鼠, 利用常规杂交瘤技术制备 mAb, mAb 经纯化和 HRP 标记后, 利用双抗体夹心 ELISA 法筛选检测 BNP32 蛋白的最佳配对 mAb, 以其建立 BNP32 抗原检测技术, 并与临床 BNP 检测的标准实验做平行比较。结果: 成功筛选到 16 株稳定分泌抗 BNP32 mAb 的杂交瘤细胞株, 16 株 mAb 的亚型分别为 IgG1、IgG2a 和 IgM, 并从中筛选出最佳 mAb 配对组合, 该组合对 BNP32 蛋白的检测灵敏度为 20 ng/L。建立的双抗体夹心 BNP 检测 ELISA 法与临床 BNP 检测的标准实验平行比较具有很好的一致性 (κ 值 = 0.828), 两者没有统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 成功地建立了 BNP32 抗原的双抗体夹心 ELISA 法检测技术, 并能够很好地运用于临床心衰患者 BNP 指标的检测。

[关键词] 脑钠肽; 单克隆抗体; 心衰; ELISA

[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** B

心功能衰竭是绝大多数心脏病患者病情发展的最终结果, 如何在心功能衰竭早期开始抗心衰治疗, 延迟心衰终末期的到来, 是医学界非常关注的问题。近年来随着对心衰研究的深入, B 型钠尿肽 (B-type natriuretic peptide, BNP) 在心衰诊治中的地位日渐明确^[1]。BNP 是 1988 年由日本学者 sudoh^[2] 最初由猪脑分离出来的一种由 32 个氨基酸构成的多肽类神经激素, 曾被命名为脑钠肽 (brain natriuretic peptide), 但其主要来自于心室。近来研究表明 BNP 在心血管疾病的诊治中发挥了重要的作用, BNP 是评价无症状心衰及晚期心衰的最佳预后指标, 作为一种心衰标志物在临床逐渐已被接受^[3]。

由于各种 BNP 检测试剂尚未标准化, 国内检测 BNP 浓度均依赖各种国外的试剂盒, 参考范围和 cut off 值在不同测定方法所得结果亦不同, 而且检测费用昂贵, 在一定程度上限制了临床对 BNP 检测的广泛开展。鉴于 BNP 在心血管领域的重要作用, 我们通过基因工程技术表达 BNP32 成熟肽蛋白, 继而制备高效价的单克隆抗体 (mAb), 应用于检测临床心衰患者血浆中的 BNP 水平。

收稿日期: 2009 - 09 - 30; 接受日期: 2009 - 11 - 12

作者简介: 何涛君 (1981 -), 女, 湖南衡阳人, 检验师, 硕士

* Corresponding author, E-mail: luxuedong2004@163.com

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 *E. coli* ER2566菌株购自 New England Biolabs公司。载体 PGEX-20T、小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/0-Ag14 (Sp2/0)、BALB/c小鼠均由厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心提供。PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基嘌呤、DMSO、HRP等化学药品均购自 Sigma公司。RPMI 1640基础培养基购自 Gibco公司。胎牛血清购自 Hyclone公司。碱性磷酸酶标二抗 (A-P-GAM) 为 Protos公司产品。抗亚型多抗和辣根过氧化物酶标记的抗亚型多抗 (HRP-GAM IgG 及 HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3) 购自 Becton Dickinson公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 PGEX-20T-BNP₃₂的构建及成熟肽蛋白的表达 采用分子生物学的方法自行构建重组质粒 PGEX-20T-BNP₃₂, 并在大肠杆菌 *E. coli* ER2566中通过 IPTG诱导表达脑钠肽成熟肽蛋白。表达产物经饱和硫酸铵沉淀及 HPLC离子交换层析法等纯化。克隆构建及蛋白的表达和纯化依据标准方法操作^[4]。

1.2.2 脑钠肽 mAb的制备 选用 6周龄的雌性 BALB/c小鼠, 分别以表达的两种脑钠肽成熟肽蛋白经皮下注射免疫, 初免与等量福氏完全佐剂混合, 免疫剂量为 100 μg/只, 此后每隔 2周加强 1次, 加强免疫与不完全福氏佐剂混合, 免疫剂量为 50 μg/只, 加强免疫 4次。融合前 3 d再以静脉注射 100 μg BNP₃₂蛋白做最后加强免疫。细胞融合、克隆化、腹水制备及纯化均同常规方法^[5]。

1.2.3 一般特性鉴定 杂交瘤细胞培养上清及腹水中 mAb滴度的测定采用间接 ELISA法。mAb类与亚型的鉴定采用间接 ELISA分析, 将合适稀释度的 mAb腹水加入预包被纯化后 BNP₃₂蛋白的微孔板中反应, 酶标二抗为 HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b和 IgG3。mAb的活性采用 Western blot技术分别检测 16株 mAb与沸水浴处理 10 min的纯化后 BNP₃₂蛋白的反应性。

1.2.4 阻断 ELISA mAb的辣根过氧化物酶 (HRP)标记采用改良过碘酸钠法。PBS (100:1)稀释的 mAb腹水 (对照为 PBS) 100 μL/孔加入预包被纯化后 BNP₃₂蛋白的微孔板中, 37 °C 温育 30 min; PBS T洗板 3次, 扣干后加入各合适浓度的 HRP-mAb 100 μL/孔, 37 °C 温育 30 min; PBS T洗板 5次, 扣干后显色读值。根据以下公式计算阻断率, 阻断率 = (对照孔 A 值 - 反应孔 A 值) / 对照孔 A 值 × 100%, 阻断率大于 50%认为有阻断, 以 “+” 表示; 小于 50%认为无阻断, 以 “-” 表示。

1.2.5 双抗体夹心 ELISA 纯化 mAb预先溶解于 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (PB, pH 7.4) 融解, 按 100 ng/孔包被于微孔板, 4 °C 过夜, PBST洗板 1次, 封闭 2 h (方法同上); 再加入含有纯化后 BNP₃₂蛋白, 37 °C 温育 30 min; PBST洗 5次, 扣干后加入合适浓度的 HRP-mAb, 37 °C 温育 30 min; PBST洗板 5次, 扣干后显色读值。

1.2.6 统计学分析 应用 SPSS11.0软件进行统计分析, 计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 *t*检验, 临床评价的配对四格表资料采用 χ^2 检验, 两种方法的检测一致性分析采用 kappa值 (取值在 0 - 1之间, kappa > = 0.75说明两者的一致性较好)。

2 结果

2.1 重组 BNP₃₂蛋白的表达、存在状态分析及纯化 将重组蛋白未诱导和诱导同时跑胶比较显示 IPTG诱导后均能表达目的蛋白, 存在状态分析 PGEX-20T-BNP₃₂ (M_r 29 500), 并且表达的重组蛋白存在于超声裂菌的上清中 (图 1)。

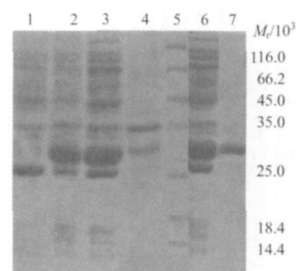


图 1 重组 BNP₃₂蛋白表达的存在状态分析及纯化的 SDS-PAGE结果

1: 重组质粒未诱导; 2: 重组质粒诱导 (IPTG 1.0 mmol/L); 3: 重组质粒诱导后裂解的上清; 4: 重组质粒诱导后裂解的沉淀; 5: 蛋白分子质量标准; 6: 重组质粒诱导后裂解的上清; 7: 上清纯化后的重组蛋白。

2.2 杂交瘤细胞株的建立 利用常规杂交瘤制备技术和间接 ELISA法筛选到 16株稳定分泌抗 BNP₃₂ mAb的杂交瘤细胞, 分别命名为: 2E7、4A12、5D1、7E9、8B10、8D5、9A3、9H12、12C8、13C5、13C7、14D10、16F5、17C7、17F10、19B3。上述 mAb分别经腹腔诱导法制备高滴度特异性的 mAb腹水。

2.3 mAb滴度和亚型 采用间接 ELISA法检测系列稀释的杂交瘤培养上清及腹水中 mAb的滴度。结果培养上清滴度为 $10^3 \sim 10^4$, 腹水滴度为 $10^5 \sim 10^7$ 。分型结果显示: 13株 mAb (4A12、7E9、8B10、8D5、9A3、9H12、12C8、13C5、13C7、16F5、17C7、17F10、19B3)属于 IgG1, 2株 mAb (5D1、14D10)属于 IgG2a, 只有 1株 mAb 2E7属于 IgM。

2.4 mAb的活性 16株 mAb对热处理变性后的 BNP₃₂蛋白 (BNP₃₂蛋白在电泳前经沸水浴热处理 10 min)均有特异性反应, 表明这 16株 mAb的识别表位是一种不依赖于 BNP₃₂蛋白空间结构的线性表位。值得注意, 不同 mAb对 BNP₃₂蛋白的聚体带和降解带的反应存在差别, 说明不同 mAb识别的表位结构性质可能有别 (图 2)。

2.5 mAb间相互阻断情况 利用阻断 ELISA分析 16株不同 mAb间的相互阻断情况 (表 1), 结果显示, 12C8和 5D1能阻断 14株, 2E7和 13C5能阻断 13株, 14D10和 16F5能阻断 12株, 9A3、4A12、19B3和 7E9能阻断 5株, 8B10、8D5和 9H12能阻断 4株, 13C7、17C7和 17F10能阻断 6株提示后 6株 mAb更适宜建立检测 BNP蛋白的双抗体夹心 ELISA (表 1)。

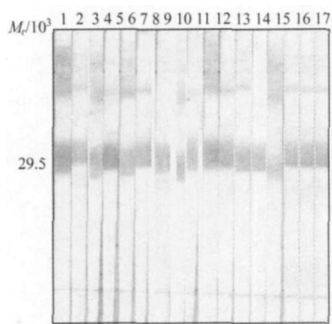


图 2 mAb分别与 BNP32抗原的 Westem bbt分析

1: 12C8; 2: 5D1; 3: E7; 4: 13C5; 5: 14D10; 6: 16F5; 7: 9A3; 8: 4A12; 9: 19B3; 10: 7E9; 11: 8B10; 12: 8D5; 13: 9H12; 14: 13C7; 15: 17C7; 16: 17F10; 17: PBS对照.

2.6 BNP32检测试剂的建立 将 16株进行一一配对建立检测 BNP32的双抗体夹心 ELISA 法, 结果发现, 9A3、4A12、19B3和 7E9等 4株的多数配对组合检测 BNP32的灵敏度可达 100 ng/L。其中 8D5、17C7、8B10、9H12、13C7和 17F10等 6株组成的配对组合较好, 对 BNP32蛋白的检测灵敏度均可达 20 ng/L; 而 12C8、2E7、5D1、14D10、13C5、16F5等 6株配对组合较差, 部分组合检测 BNP32蛋白的灵敏度仅达 3 000 ng/L。

2.7 BNP32检测试剂的临床评价 双抗体夹心 ELISA 法建立 BNP检测试剂与临床 BNP检测的金标准平行比较具有很好的-致性 (kappa值 =0.828 >0.75), 两者差别没有统计学意义 (P >0.05, 表 2)。

表 1 抗 BNP32 mAb的交叉阻断 ELISA

mAb	Anti-Bnp32 mAb-HRP															NO	
	12C8	5D1	2E7	13C5	14D10	16F5	9A3	4A12	19B3	7E9	8B10	8D5	9H12	13C7	17C7		17F10
12C8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	14
5D1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	14
2E7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	13
13C5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	13
14D10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	12
16F5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	12
9A3	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	5
4A12	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	5
19B3	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	5
7E9	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	5
8B10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
8D5	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	4
9H12	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	4
13C7	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3
17C7	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3
17F10	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3

NO: 16株 mAb阳性阻断某一特定 mAb的个数; +: 有阻断效果; -: 无阻断效果.

表 2 两种方法检测血浆脑钠肽水平的结果

金标准 (罗氏法)	ELISA法 (双抗体夹心法)		合计
	+	-	
+	49	3	52
-	1	13	14
合计	50	16	66

3 讨论

本研究采用基因工程方法, 将目的片段克隆到原核表达载体中从而获得重组蛋白。原核表达系统表达相对简单, 具有产量高、易操作、稳定性好等优点, 另外, 它也是目前了解最深入全面的基因工程表达系统, 现在开发出来基因工程产品中 80% ~ 90%采用的是原核表达系统, 所以我们决定选用原核系统制备 BNP蛋白。

首先登录 GenBank获得 BNP基因, 通过 PCR 技术特异性扩增目的片段 BNP32, 然后将其分别定向

克隆到 PGEX-20T载体上, 在大肠杆菌 BL21中表达 BNP成熟肽蛋白。将其作为抗原按 mAb制备的常规操作制备出抗脑钠肽 mAb 16株, 将这些 mAb进行一一配对建立检测 BNP32的双抗体夹心 ELISA 法。再从深圳市心血管病医院中收集标本对 BNP32检测试剂做临床评价, 结果表明双抗体夹心 ELISA 法建立 BNP检测试剂与临床 BNP检测的金标准平行比较具有很好的-致性 (kappa值 =0.828 >0.75), 两者差别没有统计学意义 (P >0.05)。说明我们的双抗体夹心法能很好地运用于临床心脏患者 BNP水平的检测。

BNP在心血管疾病领域中的地位日渐明显^[6]。BNP不仅在诊断并判断心功能衰竭的程度上为临床诊治提供良好的参考, 尤其在鉴别呼吸困难病因时更是独树一帜, 近来对 BNP与高血压、急性冠脉综合征、心律失常因等心血管疾病的研究越来越广

泛^[7]。总之, BNP是反映心室功能改变更敏感、更具有特异性的生化指标, 它在体内参与许多疾病的病理过程, 因此其对心衰的早期诊断、评估、治疗以及心脏疾病缓解过程是非常重要的参考指标, 在心血管疾病方面有着广泛的应用前景^[8]。

参考文献:

- [1] Ray SG. Natriuretic peptides in heart valve disease [J]. *Heart*, 2005, 6: 121 - 131.
- [2] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, *et al*. A new natriuretic peptide in porcine brain [J]. *Nature*, 1988, 332(3): 78 - 81.
- [3] McGrath MF, de Bold ML, de Bold AJ. The endocrine function of the heart [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16(10): 469 - 477.

- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T(金冬雁, 等译). 分子克隆实验指南 [M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1993: 880 - 897.
- [5] 郝贵志, 沈锦玉, 徐洋, 等. 草鱼免疫球蛋白单克隆抗体的制备及其特性鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(9): 808 - 810.
- [6] Li N, Wang JA. Brain natriuretic peptide and optimal management of heart failure [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2005, 6(9): 877 - 884.
- [7] Sullivan DR, West M, Jeremy R. Utility of brain natriuretic peptide (BNP) measurement in cardiovascular disease [J]. *Heart Lung Circ*, 2005, 14(2): 78 - 84.
- [8] Schou M, Gustafsson F, Nielsen PH, *et al*. Unexplained week-to-week variation in BNP and NT-proBNP is low in chronic heart failure patients during steady state [J]. *Eur J Heart Fail*, 2007, 9(13): 68 - 74.

(上接 51 页)

表明, 制备的 mAb 与 MCF7 细胞提取蛋白及转染后 293、293T 在 M_r 约为 20 000 处出现清晰的条带, 表明该 mAb 为抗 AGR2 的抗体。免疫荧光显示, 该 mAb 与 MCF7 细胞的浆蛋白特异性结合 (AGR2 为分泌蛋白, 存在于细胞质)。免疫沉淀表明, 该 mAb 能与天然的 AGR2 蛋白结合, 提示此 mAb 与 AGR2 相结合的抗原表位位于此蛋白的表面, 且有较好的亲和力。

值得一提的是, 此 mAb 对 MCF7 细胞生长的抑制作用, 为后续人源化后产生治疗相关肿瘤的抗体药物提供基础, 也显示了 AGR2 作为新型药物靶标的可能性, 这种以 AGR2 信号通道为抗肿瘤药物靶标的实质性研究在国际还未见报道。这将是我们的重点。

以往研究表明, AGR2 与乳腺癌, 前列腺癌的诊断及治疗有关, 并且与其预后成负相关。因而, 抗 AGR2 mAb 的制备, 对建立检测 AGR2 的方法, 精确分析其在癌症的诊断和治疗中的作用具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Petek E, W inpassinger C, Egger H, *et al*. Localization of the hu-

man anterior gradient-2 gene (AGR2) to chromosome band 7p21.3 by radiation hybrid mapping and fluorescence in situ hybridization [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 89(3-4): 141 - 142.

- [2] Florian RF, Edgar D, Stefan P, *et al*. Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(6): 1728 - 1734.
- [3] Fletcher GC, Patel S, Tyson K, *et al*. hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan [J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(4): 579 - 585.
- [4] Zhang JS, Gong A, Chevillat JC, *et al*. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer [J]. *Gen Chromo Canc*, 2005, 43(3): 249 - 259.
- [5] Zhang Y, Forootan SS, Liu D, *et al*. Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients [J]. *PCPD*, 2007, 10(3): 293 - 300.
- [6] Fritzsche FR, Dahl E, Dankof A, *et al*. Expression of AGR2 in non small cell lung cancer [J]. *Histol Histopathol*, 2007, 22(7): 703 - 708.
- [7] 石晓娟, 毛伟平, 张双全, 等. B 淋巴细胞刺激物单克隆抗体的制备与特性鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(3): 328 - 329.
- [8] 孙中文, 陶然, 陆艳红, 等. 5 株鼠抗人 CD28 单克隆抗体的研制及生物学特性的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(6): 406 - 410.