

学校编码: 10384
学号: 24520131153540

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抗 Neuropilin2 单克隆抗体
的制备鉴定及其初步应用

Preparation and Characterization of Anti-Neuropilin2
Monoclonal Antibody and Its Preliminary Application

杨 芸

指导教师姓名: 颜江华 教授

专业名称: 肿 瘤 学

论文提交日期: 2016 年 04 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

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):

2016年05月18日

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）：

2016年05月18日

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AFP	Alphafetoprotein	甲胎蛋白
CEA	Carcinoembryonic antigen	癌胚抗原
CISH	Chromogenic in situ hybridization	显色荧光原位杂交
DMSO	Dimethyl Sulphoxide	二甲基亚砷
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	酶联免疫吸附试验
FISH	Fluorescence in situ hybridization	荧光原位杂交
HER-2	Human epidermal growth factor receptor-2	表皮生长因子受体 2
HGF	Heparin growth factors	肝细胞生长因子
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
OD	Optical Density	光密度
LEC	Lymphatic endothelial cells	淋巴管内皮细胞
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
NRP2	Neuropilin2	神经纤毛蛋白 2
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PE	Phycoerythrin	藻红蛋白
Sema	Semaphorin	神经导向因子
TGF- β	Transforming growth factor- β	转化生长因子- β
TM	Tumor marker	肿瘤标志物
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮生成因子
xMAP	Luminex Multi Plex Assay	液相芯片

摘要

研究背景和目的

Neuropilin2 (NRP2) 是一种多功能的新型受体, 在神经系统发育、心血管系统、免疫系统及淋巴管生成等过程中发挥重要作用。最新研究表明, NRP2 受体广泛表达于肿瘤细胞表面, 与肿瘤血管形成以及肿瘤的发生发展、凋亡、粘附、侵袭和转移等生物学行为密切相关。多种肿瘤细胞均高表达 NRP2, 提示 NRP2 可能成为一种新型肿瘤标志物。NRP2 通过多种机制调控肿瘤进展, NRP2-b1b2 是其发挥作用的重要结构域, NRP2-b1b2 结构域可以结合配体 III 型 Semaphorin 和 VEGF, 并调控它们介导的相关信号通路。本文旨在通过杂交瘤技术制备抗 NRP2-b1b2 片段的单克隆抗体, 通过鉴定该抗体的特性并探索该抗体在实际中的应用, 为快速准确地分析不同恶性程度的肿瘤细胞或组织中 NRP2 的表达情况提供有利条件, 同时也为进一步研究 NRP2 与肿瘤相关的信号通路奠定理论基础。

实验方法

利用 NRP2 的 b1b2 片段 (NRP2-b1b2) 作为免疫原, 免疫 4-6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 通过细胞融合技术构建可以稳定分泌抗 NRP2-b1b2 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。然后体外扩大培养杂交瘤细胞, 接种于 Balb/c 小鼠腹腔中, 获得含有 NRP2-b1b2 单克隆抗体 (NRP2 mAb) 的腹水。通过 rProtein A 亲和柱纯化抗体; SDS-PAGE 电泳分析抗体的纯度; 间接 ELISA 鉴定抗体的活性。采用流式细胞术、Western blotting、细胞免疫荧光、免疫细胞化学染色实验以及免疫组织化学染色实验分别检测制备的单抗与结肠癌细胞株和移植瘤组织中 NRP2 蛋白的结合情况。免疫组织化学染色方法检测肿瘤组织芯片中 NRP2 蛋白, 分析 NRP2 蛋白在多种人肿瘤组织、配对癌旁组织以及不同分期的人结肠癌组织中的表达情况。利用自制的 NRP2 mAb 建立定量检测 NRP2 的夹心 ELISA 方法, 建立标准曲线, 分析方法的灵敏度和最低检测限, 检测 45 例临床肿瘤血清和 3 例正常血清样本中 NRP2 的表达情况。MTT 实验、集落形成抑制实验、凋亡实验、迁移实验检测 NRP2 抗体对结肠癌细胞生物学行为的作用。

实验结果

我们成功获得了 2 株稳定分泌 NRP2 mAb 的杂交瘤细胞株，分别命名为 E4 和 C3。通过腹腔注射杂交瘤细胞得到的腹水经 rProtein A 亲和柱纯化得到了纯度较高的 E4 mAb（纯度约为 95%，浓度约为 2 mg/ml）；间接 ELISA 结果表明 E4 mAb 的滴度在 5×10^5 左右，具有较高的亲和力。

WB 结果显示 E4 mAb 与 NRP2-b1b2 多肽及两株结肠癌细胞株 LoVo、SW480 总蛋白中的 NRP2 蛋白分别在 34KDa、110KDa 处有一结合条带，说明抗体与线性的 NRP2 可以很好的结合，并具有较高的特异性；流式细胞术、细胞免疫荧光和细胞化学染色实验结果表明，E4 mAb 与结肠癌细胞自然存在的 NRP2 蛋白也可以很好地结合，并具有很高的特异性；免疫组织化学染色结果表明 E4 mAb 可以特异性地结合结肠癌细胞和移植瘤组织中的 NRP2 蛋白。组织芯片免疫组化结果显示，NRP2 在多种肿瘤组织及配对癌旁组织中均有不同程度的表达；在不同分期结肠癌中，NRP2 的表达情况存在着差异。

应用自制的 E4 mAb 和 C3 mAb 通过夹心 ELISA 建立了定量检测 NRP2 的标准曲线，得到的回归方程为 $Y=0.0025x+0.2605$ ，相关系数 $R^2=0.9885$ ，线性检测范围是 12.5–400ng/ml。批内变异系数 CV 为 5.72%，批间变异系数 CV 为 7.33%，说明该检测方法的特异性、重复性、可靠性均较好。利用建立好的夹心 ELISA 方法检测 45 例临床肿瘤血清及 3 例正常血清样本，结果表明不同肿瘤血清中所含的 NRP2 量不同。

MTT 结果显示 NRP2 mAb 能抑制结肠癌细胞 LoVo 和 SW480 的增殖，且抑制作用与剂量正相关。集落形成抑制实验结果表明，不同浓度抗体均可显著抑制 LoVo 集落形成，并呈剂量依赖性。凋亡实验表明 NRP2 mAb 可诱导 LoVo 细胞凋亡。迁移实验表明不同浓度抗体均可抑制 LoVo 细胞迁移，并呈剂量依赖性。

结论

1. 本研究通过杂交瘤技术成功获得了 2 株稳定分泌 NRP2 mAb 的杂交瘤细胞株 E4 和 C3，制备了大量纯度高、亲和力强的 E4 mAb 和 C3 mAb。

2. 经流式细胞术、WB、免疫荧光、细胞化学染色以及组织化学染色鉴定，E4 mAb 能与人结肠癌细胞以及人结肠癌组织中 NRP2 蛋白特异性结合。

3. 用 E4 mAb 验证了 NRP2 蛋白在多种人肿瘤组织芯片的表达情况，发现 NRP2 在一些肿瘤中表达上调，提示可能参与肿瘤的发生发展。

4. 应用 E4 mAb 和 C3 mAb 建立了定量检测 NRP2 抗原的夹心 ELISA 方法。

5. E4 mAb 可抑制结肠癌 LoVo 细胞增殖、迁移，促进凋亡并呈一定的浓度依赖性。

关键词：Neuropilin2；单克隆抗体；夹心 ELISA；结肠癌

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Background and Purpose:

Neuropilin2 (NRP2) is a multifunctional receptor, and plays vital roles in the development of nervous system, cardiovascular system, immune system and lymphangiogenesis. Latest studies illustrated that NRP2 receptor is extensively articulated on the exterior of tumor cells, forming the tumor vessels combined with its ligand VEGF and it is closely related to the natural conduct of tumor angiogenesis, tumor development, apoptosis, adhesion, migration and metastasis. A variety of tumor cells can secrete NRP2, suggesting that NRP2 may become a new tumor marker. NRP2-b1b2 domain is an important domain of its function and can regulate tumor progression through a variety of mechanisms, which mediates signaling pathways combined with its ligands of type III Semaphorin and VEGF. This study aims to develop a monoclonal antibody against NRP2-b1b2 domain by using hybridoma technique, identifying the properties of the antibody and exploring the application of the antibody in practice, which can not only provide favorable conditions for the rapid and precise analysis of the expression of NRP2 in tumor cells or tissues with different degrees of malignancies, but also lay the theoretical basis of further study of NRP2 and tumor related signaling pathways.

Methods:

NRP2-b1b2 domain was used as immunogen to immune 4-6 week old Balb/c mice and establish hybridoma stably secreting NRP2 mAb through the cell fusion technique. Hybridoma was intraperitoneally injected into Balb/c mice to acquire ascites. The obtained ascites was purified by rProteinA affinity column and freeze-dried. The purity of obtained mAb was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and indirect ELISA was used to determine the titer of the mAb. Then, Flow cytometry, Western blotting, immunofluorescence, and immunocytochemical staining and immunohistochemical staining were used to detect the binding of the prepared mAb to

NRP2 protein in colon cancer cell lines and xenografts tissue. The expression of NRP2 protein in tumor tissue microarray was detected by immunohistochemical staining and the expression of NRP2 protein in various human tumor tissues, adjacent tissues and different stages of human colon carcinoma were analyzed. By using the prepared NRP2 mAb to establish a method for quantitative detection of NRP2 in sandwich ELISA, establish the standard curve, analysis the sensitivity and the minimum detection limit of the method, detect the expression of NRP2 by using blood samples of 45 patients who were already diagnosed with cancer and 3 blood samples of normal human. Effect of NRP2 antibody on biological behavior of colon cancer cells was carried out by using MTT assay, colony formation inhibition assay, apoptosis assay and migration assay.

Results:

We successfully established two hybridoma stably secreting NRP2 mAb, named respectively as E4 and C3. Though intraperitoneally injecting hybridoma, we obtain the ascites containing NRP2 mAb. After processing by rProteinA affinity column and freeze-drying, the purity of NRP2 mAb is as high as 95% and the concentration is 2mg/mL, indirect ELISA showed that NRP2 mAb was high affinity and got a high titer of 2×10^6 . In addition, Western blotting showed the bands of 34 KDa, 110KDa respectively, indicating E4 mAb could bind to both recombinant NRP2-b1b2 domain and full-length NRP2 in colon cancer cells, Flow cytometry, immunofluorescence staining, immunocytochemistry and immunohisto-chemica staining results indicated that NRP2 mAb could specifically combine NRP2 expressed in colon cancer cells lines and xenografts tissue. Tissue microarray immunohistochemistry results showed that NRP2 was expressed in various tumor tissues and adjacent tissues, and the expression of NRP2 was different in different stages of colon cancer. With E4 and C3 mAb, we successfully established a sandwich ELISA method for detection of NRP2 and obtained standard curve. The regression equation of the curve is $Y=0.0025x+0.2605$, the relative coefficient $R^2=0.9885$. MTT results showed that NRP2 mAb could inhibit the proliferation of colon cancer cells LoVo and SW480,

and the inhibition was dose dependent. Colony formation inhibition assay results showed that different concentrations of mAb could significantly inhibit LoVo colony formation, and in a dose-dependent manner. Apoptosis assay showed that NRP2 mAb induced the apoptosis of LoVo cells. Migration assay showed that different concentrations of mAb can inhibit migration of LoVo cells, and in dose dependent.

Conclusions:

1 We successfully produce NRP2 mAb E4 and C3 with high purity and high titer.

2 By flow cytometry, WB, immunofluorescence, cell chemical staining and histochemical staining, NRP2 mAb E4 was able to bind to human colon cancer cells and NRP2 protein in human colon cancer tissues.

3 NRP2 mAb E4 was used to verify the expression of NRP2 protein in a variety of human tumor tissues. It was found that NRP2 was up-regulated in some tumors, suggesting that it may be involved in the occurrence and development of tumors..

4 We preliminarily developed a sandwich ELISA method for quantitative detection of NRP2.

5. NRP2 mAb E4 could inhibit the proliferation, migration and apoptosis of colon cancer cells, and showed in dose dependent.

Key words: Neuropilin2; Monoclonal antibody; Sandwich ELISA, Colon cancer

目录

英文缩略词表.....	I
摘要.....	I
Abstract.....	IV
目录.....	1
前言.....	1
一、NRP2 概述.....	1
1 NRP2 的基因结构和蛋白结构.....	1
1.1 NRP2 的基因结构.....	1
1.2 NRP2 的蛋白结构.....	1
2 NRP2 的表达.....	3
3 NRP2 的配体和共受体.....	4
3.1 VEGF 和 VEGFR.....	4
3.2 Semaphorin 和 Plexins.....	5
3.3 TGF- β 和 TGF α	7
3.4 HGF 和 c-met.....	7
4 NRP2 的功能.....	8
4.1 NRP2 与淋巴管生成.....	8
4.2 NRP2 与肿瘤粘附、转移.....	10
4.3 NRP2 与免疫.....	11
4.4 NRP2 与相关肿瘤.....	12
5. 靶向 NRP2 的策略.....	14
二、肿瘤诊断标志物概述.....	15
1.1 胚胎性抗原.....	15
1.2 糖类、蛋白质类抗原.....	16
1.3 癌基因、抑癌基因及其产物.....	17
2 肿瘤标志物的常见检测技术.....	18

2.1 蛋白水平检测技术.....	18
2.2 基因水平检测技术.....	19
三、研究目的和内容.....	20
第一章 NRP2 mAb 的制备、纯化及鉴定.....	21
一、材料和方法.....	21
1 材料.....	21
1.1 细胞株和实验动物.....	21
1.2 主要试剂及耗材.....	21
1.3 主要仪器及设备.....	22
1.4 主要溶液的配制.....	22
2 方法.....	26
2.1 NRP2 杂交瘤细胞的培养.....	26
2.2 抗体亚型的鉴定.....	26
2.3 抗体的生产.....	27
2.4 抗体的纯化.....	27
2.5 抗体的透析和冻干.....	28
2.6 抗体的纯度鉴定.....	28
2.7 抗体的浓度测定.....	29
2.7 抗体的滴度鉴定.....	29
二、结果与分析.....	30
1 抗体亚型分析.....	30
2 纯度测定.....	30
3 滴度测定.....	31
三、讨论.....	32
第二章 NRP2 mAb 检测 NRP2 蛋白在肿瘤细胞和组织 1-表达.....	33
一、材料和方法.....	33
1 材料.....	33
1.1 细胞株和动物.....	33
1.2 组织样本资料.....	33

1.3	主要试剂及耗材.....	33
1.4	主要仪器及设备.....	34
1.5	主要溶液的配制.....	35
2	方法.....	36
2.1	流式细胞术.....	36
2.2	细胞免疫荧光染色.....	37
2.3	蛋白印迹.....	37
2.4	免疫细胞化学染色.....	38
2.5	免疫组织化学染色.....	39
二、	结果与分析.....	41
1	流式细胞术.....	41
2	Western blotting.....	41
3	细胞免疫荧光染色.....	42
4	免疫细胞化学染色.....	43
5	移植瘤免疫组织化学染色.....	43
6	组织芯片免疫组织化学染色.....	44
6.1	结肠癌组织芯片.....	44
6.2	多器官癌组织芯片.....	47
三、	讨论.....	49
第三章	NRP2 mAb 双抗体夹心 ELISA 定量检测 NRP2.....	51
一、	材料和方法.....	51
1	材料.....	51
1.1	主要试剂和耗材.....	51
1.2	主要仪器和设备.....	51
1.3	主要溶液的配制.....	52
2	实验方法.....	53
2.1	酶标记抗体（过碘酸盐法）.....	53
2.2	抗体筛选配对.....	54
2.3	夹心 ELISA 反应条件的优化.....	54

2.4 标准曲线的建立.....	55
2.5 灵敏度及特异性检测.....	55
2.6 批内和批间变异系数.....	56
2.7 血清样品检测.....	56
2.8 磁珠偶联抗体.....	56
二、结果与分析.....	57
1、磁珠偶联抗体.....	57
2、酶标抗体滴度测定.....	58
3、配对抗体的筛选.....	59
4、夹心 ELISA 最佳反应体系.....	59
5 夹心 ELISA 标准曲线的建立.....	62
6 灵敏度及特异性检测.....	63
7 批内批间变异系数.....	63
8.血清样品检测.....	64
三. 讨论.....	65
第四章 NRP2 mAb 对结肠癌细胞生物学行为的作用.....	67
一、材料和方法.....	67
1.材料.....	67
1.1 细胞株.....	67
1.2 主要试剂及耗材.....	67
1.3 主要仪器和设备.....	67
1.4 主要溶液的配制.....	68
2.方法.....	68
2.1 细胞计数.....	68
2.2 细胞生长抑制试验.....	68
2.3 集落形成抑制实验.....	69
2.4 迁移实验.....	69
2.5 凋亡实验.....	69
二.结果分析.....	70

1.细胞增殖抑制实验（MTT）	70
1.1 普通显微镜观察细胞形态改变.....	70
1.2 MTT 法测细胞增殖，	71
2. 集落形成抑制实验.....	72
3.凋亡实验.....	73
4. 迁移实验.....	74
三、讨论.....	75
结论.....	77
本文存在的问题和今后开展的研究.....	78
参考文献.....	79
致 谢.....	86
研究生在学期间发论文表学术论文目录.....	87

Contents

Abstract (Chinese)	错误! 未定义书签。
Abstract	错误! 未定义书签。
Introduction	错误! 未定义书签。
I Summary of NRP2	1
1 The structure of NRP2	1
2 The expression of NRP2	3
3 Ligand and receptor of NRP2	4
3.1 VEGF and VEGFR	4
3.2 Semaphorin and Plexins	5
3.3 TGF- β and TGFR	7
3.4 HGF and c-met	7
4 The function of NRP2	8
4.1 NRP2 in lymphangiogenesis	8
4.2 NRP2 in tumor adhesion and metastasis	10
4.3 NRP2 in immune regulation	11
4.3 NRP2 in related cancer	12
5. Strategies for targeting NRP2	14
II Overview of tumor diagnostic markers	15
1 Classification of common tumor markers	15
1.1 Fetal antigen	15
1.2 Carbohydrate, protein antigens	16
1.3 Oncogenes, tumor suppressor genes and their products	17
2 Common detection techniques of tumor markers	18
2.1 Protein level detection technology	18
2.2 gene level detection technology	19
III The purpose and content of the research	19
Chapter I Production, purification and characterization of NRP2 mAb	21

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.