

## 抗人肺鳞癌单克隆抗体的制备和纯化

王红明<sup>1)</sup>, 唐睿珠<sup>2)</sup>, 马丽菊<sup>2)</sup>, 郝萍<sup>2)</sup>

(1) 昆明医科大学第一附属医院中医科; 2) 临床实验研究中心, 云南昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 制备并纯化前期工作建立的杂交瘤细胞株 C5 所分泌的抗人肺鳞癌单克隆抗体, 为研究该单抗对应肺癌相关抗原的生物学功能奠定基础. **方法** 常规培养前期工作建立的 C5 杂交瘤细胞, 有限稀释法进行克隆化培养, ELISA 法检测培养上清, 挑选检测阳性细胞继续克隆化培养, 直至 3 次检测亚克隆均呈阳性. 收集阳性培养上清, 利用 Protein A-sepharoseCL-4B 亲和层析法纯化抗体, Western-Blot 法对纯化后的抗体进行鉴定. **结果** 得到了来源相同的亚克隆杂交瘤细胞株, 克隆阳性率达 100%. 成功纯化出了目的单克隆抗体, 并证实纯化产物系目的单抗, 纯化后的 C5 杂交瘤细胞单克隆抗体重链分子量约为 75 kDa. **结论** 成功纯化出抗人肺鳞癌单克隆抗体, 该单抗可能在肺癌的早期诊断、靶向治疗和肿瘤疫苗的研制等方面具有重要意义和潜在应用价值.

**[关键词]** 单克隆抗体; 抗体纯化; 杂交瘤细胞; 有限稀释

**[中图分类号]** R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 07 - 0017 - 03

## Preparation and Purification of the Monoclonal Antibody for Anti-human Lung Squamous Carcinoma

WANG Hong - ming<sup>1)</sup>, TANG Rui - zhu<sup>2)</sup>, MA Li - ju<sup>2)</sup>, HAO Ping<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Traditional Chinese Medicine; 2) Experimental Research Center of Clinical Medicine, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To subclone C5 hybridoma cells and purify the monoclonal antibody (McAb) by the immunoaffinity chromatography so as to provide with purified McAb the future research, the early diagnosis of lung cancers and targeted therapy and to study the lung cancer associated with antigen and the antigen associated with vaccine. **Method** C5 hybridoma cells were thawed from liquid nitrogen. The culture of hybridoma cells was subcloned for 3 times, and the culture's supernatant from each clone was tested by ELISA assay. Positive clones underwent culture expansion and the McAb was purified from its supernatant using ProteinaA - SepharoseCL - 4B column affinity chromatography procedure. The specificity of the McAb protein expression was measured using SDS-PAGE and Western-Blot assay. **Results** the McAb was purified from C5 lung cancer hybridoma cell line using affinity chromatography technique. SDS-PAGE and Western Blot assay of the McAb showed one single band was specifically against the second antibody and the molecular weight of which was about 75KDa. **Conclusion** The McAb against lung cancer cells can be successfully purified from C5 hybridoma cells by limited dilution and affinity chromatography using ProteinaA - SepharoseCL - 4B column. This McAb may play an important role in the early diagnosis and targeted therapy of human lung cancer and may contribute to the development of tumor vaccine.

**[Key words]** Monoclonal antibody; Purification; Hybridoma cell; Limited dilution

肺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发生率呈逐年上升趋势<sup>1)</sup>. 预计到 2025 年, 我国肺癌患者将达到 100 万人, 成为世界第一肺癌大国<sup>2)</sup>.

目前肺癌的确诊多依据细胞学和组织病理学检查, 虽特异性极高, 但由于组织块和脱落细胞的取材不当, 以至于阳性率不高, 对早期无症状或 X 线

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30260103)

**[作者简介]** 王红明 (1975 ~), 女, 云南玉溪市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事中西医结合临床及科研工作.

隐性肺癌及周围型肺癌难以查获, 80%的肺癌患者就诊时已属于中晚期, 治疗效果差, 而早期肺癌的 5 a 生存率超过 70%<sup>[3]</sup>. 鉴于肺癌现状, 寻找有助于肺癌早期诊断和有助于提高治疗效果的方法显得尤为重要, 探索一条肺癌诊治的新途径, 已迫在眉睫. 近些年, 分子靶向治疗脱颖而出, 成为肺癌治疗的新热点<sup>[4]</sup>. 大量的实验和临床研究表明, 以单克隆抗体为主的肿瘤免疫诊断和治疗显示了良好的应用前景<sup>[5-7]</sup>. 昆明医科大学第一附属医院实验中心前期工作已利用 YTMLC-90 作为免疫原, 通过细胞融合技术, 运用骨髓瘤细胞株 SP2/0 与免疫脾细胞进行融合、筛选, 得到一株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株并命名为 C5. 它可特异性分泌单克隆抗体, 其腹水效价为 1:1 000, 属 IgG1、 $\kappa$  亚型, 染色体数目 89-112, 约为脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞染色体数目之和. 本实验从 C5 杂交瘤细胞入手, 利用免疫亲和层析技术进行抗人肺鳞癌单克隆抗体的纯化, 为进一步明确该单抗对应抗原在肺癌组织水平和细胞水平上的表达定位, 以及其抑制肺癌生长的能力奠定基础. 同时下一步将用其纯化得到肺癌相关抗原之天然蛋白, 以深入了解该蛋白的结构和生物学功能, 促进本课题研究向更深层次进展.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

云锡矿工肺鳞癌细胞系 (YTMLC-90) 及 C5 杂交瘤细胞由昆明医科大学第一附属医院临床医学实验研究中心提供、牛血清白蛋白由北京元亨圣马生物技术研究所提供、新生牛血清由杭州四季青生物公司提供、羊抗鼠 IgG-HRP 由北京中杉金桥生物技术公司提供.

### 1.2 筛选阳性克隆及亚克隆

复苏和培养 YTMLC-90 细胞, 制备抗原板, 当细胞克隆长满孔底的 2/3 时应用间接法筛选分泌抗体的阳性杂交瘤细胞, 有限稀释法进行 3 次亚克隆.

### 1.3 抗体纯化

扩大培养并收集第三次克隆化培养阳性的 C5 杂交瘤细胞上清. 应用 ProteinA-sepharoseCL-4B 亲和层析法纯化 C5 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体并进行纯度和特异性鉴定, 为纯化肺癌相关抗原奠定实验基础.

## 2 结果

### 2.1 克隆及亚克隆

第一次克隆化共检测了 15 个单克隆细胞孔上清, 阳性率达 100% (见图 1). 由图可见: 阴性对照 (A5B5) 几乎无颜色, 阳性对照 (A6B6) 颜色呈黄色, 而 A7-D9 所检 C5 杂交瘤细胞上清均呈黄色, 且颜色比阳性对照孔深, 表明相对应孔的上清中含有目的抗体且滴度较高, 可以进行第二次亚克隆. 第二次亚克隆共检测了 36 个单克隆细胞孔上清, 阳性率达 100%. 第三次亚克隆共检测了 36 个单克隆细胞孔上清, 阳性率达 100%. 经 3 次 ELISA 检测均为阳性, 得到了稳定分泌单克隆抗体的 C5 杂交瘤细胞.

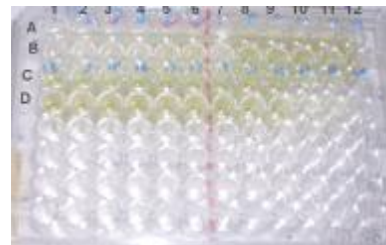


图 1 第一次克隆化培养的 C5 杂交瘤细胞上清检测结果  
Fig. 1 1st examination results of C5 tumor cell cultured by colone

A1B1 ~A5B5 为阴性对照系统 (A1B1 为无细胞空白对照, A2B2 为 PBS, A3B3 为无一抗, A4B4 为无二抗, A5B5 为阴性对照), A6B6 孔为阳性对照, 其余 A7 ~ D9 孔为检测样品.

### 2.2 单克隆抗体的纯度鉴定

经 SDS-PAGE 显示, 纯化后的单抗重链呈清晰的单一条带, 分子量 (Mr) 约为 75 kDa, 而纯化前的杂交瘤培养上清条带多而杂. 纯化效果较好且得到的单克隆抗体纯度较高 (图 2).



图 2 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 Results of SDS-PAGE electrophoresis

泳道 1: marker (标准分子量蛋白), 泳道 2: 杂交瘤细胞 P35 上清, 泳道 3~5: 纯化后的 P35 单抗, 泳道 6: 杂交瘤细胞 C5 上清, 泳道 7~10: 纯化后的 C5 单抗.

### 2.3 单克隆抗体的特异性鉴定

经 Western-Blot 显影可见, 纯化后的 C5 单抗和对照 P35 单抗均显现出清晰的条带, 其中分子量为 75 kDa 左右者为 IgG 分子的重链, 分子量为 42 kDa 左右者系 IgG 分子的轻链 (泳道 3~5), 而未经纯化的杂交瘤细胞 P35 上清显影浅淡、未纯化的杂交瘤细胞 C5 上清未显影, 说明纯化前的杂交瘤培养上清中抗体含量比较低, 经纯化后不但获得了目标单克隆抗体, 而且得到了有效浓缩 (图 3)。

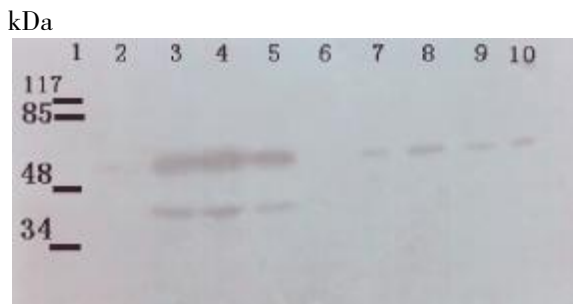


图 3 纯化单克隆抗体的 Western-Blot 显影

Fig. 3 Image of Western-Blot purifying monoclonal antibody

泳道 1: marker (标准分子量蛋白), 泳道 2: 杂交瘤细胞 P35 上清, 泳道 3~5: 纯化后的 P35 单抗, 泳道 6: 杂交瘤细胞 C5 上清, 泳道 7~10: 纯化后的 C5 单抗。

### 3 讨论

完成了 C5 杂交瘤细胞的克隆化培养. 用亲和层析法成功纯化 C5 杂交瘤细胞单克隆抗体, 该抗体重链分子量约为 75 kDa, 纯度较高, 且具有很好的免疫活性。

由于小鼠杂交瘤含有其免疫球蛋白的基因, 所分泌的单抗类型与正常小鼠血清中免疫球蛋白相同. 常见的小鼠单抗免疫球蛋白的类型是 IgG、IgM、IgA, 其中 IgG 包括 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 4 个亚类. 为了满足其结构与功能研究及其他方面研究的需要, 应将抗体纯化. 单抗纯化常用的方法大部分是基于正常小鼠血清免疫球蛋白的纯化衍化而来的, 由于单抗与正常小鼠免疫球蛋白的理化性质不完全相同, 所以单抗的纯化方法存在特殊性。

首先, 二抗的稀释比例不能太低, 否则容易导致非特异性的结合. 笔者采用的是 1:2 500 的二抗,

结果满意. 其次, 为进行有效对比, 同时复苏和培养了本实验研究中心前期制备的能稳定分泌抗体的 P35 杂交瘤细胞株, 3 次克隆化培养后收集上清, 纯化出的 P35 抗体和 C5 杂交瘤细胞纯化的抗体同时做 SDS-PAGE 和 Western-Blot, 最终 X 片显示 P35 纯化后的抗体条带更清晰, 原因可能如下: (1) C5 杂交瘤细胞检测扩大培养时, 收集上清的时机掌握不好; (2) C5 杂交瘤细胞纯化出的抗体浓度过低. (3) P35 杂交瘤细胞分泌抗体能力较 C5 杂交瘤细胞强. 这些问题都有待于进一步研究. 最后, 因为时间关系, 未能将 C5 纯化出的单抗与溴化氢活化的 ProteinA-sepharoseCL-4B 制备免疫亲和柱, 将 YTLMC-90 裂解液通过此柱从而纯化肺癌相关抗原. 也尚未完成 C5 杂交瘤细胞纯化的单克隆抗体与全身各肿瘤组织和正常组织的交叉反应, 尚不能完全确定其专一性. 本次实验工作为上述未完成实验部分奠定了坚实的基础。

### [参考文献]

- [1] BUYUKCELIK A, YALCIN B, UTKAN G. Multidisciplinary management of lung cancer [J]. N Engl J Med, 2004, 350 (4):379 - 392.
- [2] PETO R, DARBY S, DEO H, et al. 1950 年以来英国的吸烟、戒烟和肺癌状况: 全国统计和两项病例对照研究的综合报告 [J]. 英国医学杂志 (中文版), 2000, 3:169.
- [3] 肖旭阳, 宋庆平, 王晓东. 肺癌早期诊断方法研究进展 [J]. 山东医药, 2010, 50(3):111 - 112.
- [4] PHILIP S, HODKINSON, MBCH B, et al. Targeting growth factors in lung cancer [J]. Chest, 2008, 133 (5):1 209 - 1 216.
- [5] DASTJERDI M H, AL-ARFAJ K M, NALLASAMY N, et al. Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study [J]. Arch Ophthalmol, 2009, 127 (4): 381 - 389.
- [6] FRANCO T H, KHAN A, JOSHI V, et al. Takot-subo cardiomyopathy in two men receiving bevacizumab for metastatic cancer [J]. Ther Clin Risk Manage, 2008, 4 (6):1 367 - 1 370.
- [7] HAGEMeyer C E, VONZUR MUHLEN C, VONELVER-FELDT D, et al. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents [J]. Thromb Haemost, 2009, 101 (6):1 012 - 1 019.

(2013-03-19 收稿)