

抗兔低密度脂蛋白受体单克隆抗体的制备及生物学特性*

沈建根 单沁茵¹ 楼定安¹ 沈奇桂²

(浙江医科大学免疫研究室,¹病理学教研室,²生物化学教研室 杭州 310006)

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Low Density Lipoprotein Receptor of Rabbit

SHEN Jian-Gen SHAN Zhi-Yin¹ LOU Ding-An¹ SHEN Qi-Gui²

(Immunology Research Unit, ¹Department of Pathology, ²Department of Biochemistry, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT In this study, the partially purified low density lipoprotein (LDL) receptor from rabbit liver was used as an antigen, and two monoclonal antibodies were obtained, designated as ZMRE6 and ZMRF7 respectively, both of them can react specifically to rabbit LDL receptor with a high titer and belong to the subgroup of IgG1. Tested with indirect immunofluorescent staining, no cross reaction was found between these two monoclonal antibodies and the cultured human fibroblasts and rhesus endothelial cells, so it is considered that ZMRE6 and ZMRF7 have a genus-specificity.

KEY WORDS Low density lipoprotein receptor; Monoclonal antibody

摘要 以 DEAE 纤维素部分纯化的家兔肝低密度脂蛋白 (LDL) 受体为抗原, 制备了两株抗兔 LDL 受体单克隆抗体 (ZMRE6、ZMRF7)。两者均能与兔 LDL 受体特异性结合, 并且有较高的抗体效价, 均为 IgG1 亚类。间接免疫荧光试验表明: 两者都与培养的人胚肺成纤维细胞、人包皮成纤维细胞、猴内皮细胞无交叉反应, 具有种属特异性。

关键词 低密度脂蛋白受体; 单克隆抗体

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein,

LDL) 受体是细胞质膜上含量极微的一种脂蛋白, 在调节细胞内和血浆胆固醇浓度、保持体内胆固醇代谢平衡中起着重要的作用。各种因素引起的受体数目减少或功能障碍, 都将造成血浆 LDL 的异常升高, 诱发动脉粥样硬化^[1,2]。Brown 等^[3]对胆固醇代谢的 LDL 受体介导途径的发现和近年来分子生物学技术的应用, 使人们对脂质代谢和动脉粥样硬化发病机理的认识深入到细胞和分子水平^[4]。为了有利于对 LDL 受体的功能、调节机制的进一步研究, 本文以兔肝 LDL 受体为抗原, 制备了两株抗兔 LDL 受体的单克隆抗体 (McAb) 细胞株, 并对其分泌的 McAb 作了某些生物学特性的鉴定和研究。

1 材料和方法

1.1 抗兔肝 LDL 受体 McAb 的制备

1.1.1 小鼠免疫 以 DEAE 纤维素部分纯化的兔肝 LDL 受体为抗原^[5], 给 balb/C 小鼠免疫。首次免疫以福氏完全佐剂乳化抗原注射于大腿内侧皮下, 每鼠 115 μ g, 间隔二、四周分别以不完全佐剂乳化抗原及 LDL 受体液同法重复注射一次, 并于作细胞融合前 3~4 天, 以倍量抗原尾部静脉注射加强免疫。

1.1.2 细胞融合及克隆化培养 按常规取免疫小鼠脾细胞与 NS1 小鼠骨髓瘤细胞在 50% 聚乙二醇-6000 (PEG, MW 4 000, Sigma) 作用下融合。用含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养液培养。以 ELISA 二步法筛选抗体, 测得 P/N 值最大的特异性抗体阳性孔细胞予以有限稀释克隆培养, 直至克隆化细胞抗体阳性率为 100%, 对最后筛选出的阳性单克隆细胞进行扩大培养, 接种于同种小鼠腹腔, 诱生腹水。

1.1.3 抗体的检测 以 DEAE 纤维素柱层析, Sepharose G25 过柱纯化的兔肝 LDL 受体为抗原,

* 卫生部科技项目

用 ELISA 二步法检测杂交瘤特异性抗体。第一步以 0.01 mol/L 、 $\text{pH } 7.4$ 、PBS 稀释抗原 ($5 \mu\text{g/ml}$) 包被酶标板, 与杂交瘤细胞培养上清液 ($200 \mu\text{l}$) 孵育, 洗涤后加羊抗鼠 IgG-HRP, 筛选出能分泌抗体的杂交瘤细胞孔。第二步用 LDL ($5 \mu\text{g/ml}$) 包被, 再加上抗原, 使 LDL 与受体特异性结合, 而后依次加入待测杂交瘤细胞培养上清液、羊抗鼠 IgG-HRP, 每次加样前均用 PBS 洗涤三次, 加样后经 37°C 孵育 1 h , 对照为抗牛肾上腺皮质 LDL 受体 McAb (IgG-C₇)^[6] 培养液, 以比色结果 $P/N \geq 2.5 \sim 3.0$ 倍的分泌特异性抗体的细胞孔作扩大培养后进行有限稀释克隆化。

1.2 抗兔肝 LDL 受体 McAb 特性鉴定

1.2.1 杂交瘤细胞染色体检查 待杂交瘤细胞培养 48 h 后, 向培养液中加入秋水仙素, 使终浓度为 $0.1 \mu\text{g/ml}$, 收集细胞按常规方法制备染色标本, 镜检染色体形态并计数。

1.2.2 免疫球蛋白类型的鉴定 浓缩后的细胞培养上清液与羊抗鼠 IgG 亚类及 IgM 抗体 (上海生物制品研究所) 进行琼脂双扩散试验。

1.2.3 细胞-ELISA 测定兔 LDL 受体活性 参照朱伟民等^[7]方法。将兔成纤维细胞以 5×10^4 /孔接种于 96 孔微量培养板培养三天, 待细胞长满孔底形成单层, 然后用 D-Hanks 液洗二次, 再以 1% BSA-RPMI1640 作无脂诱导二天, 洗三次后加入 1% 多聚甲醛室温固定 30 min , PBS 洗三次, 4% BSA-RPMI1640 封闭 $37^\circ\text{C } 2 \text{ h}$, PBS 洗三次, 与抗兔 LDL 受体 McAb 孵育 2 h , 对照加入 IgG-C₇ 培养液, 再依次加入兔抗鼠 IgG-HRP, 37°C 孵育 1 h , 加入底物 37°C 继续孵育 30 min , 用 1 mol/L 硫酸终止显色, 测 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 值。

1.2.4 LDL 受体免疫荧光检测 兔成纤维细胞、人胚肺和包皮成纤维细胞、以及猴内皮细胞培养于盖玻片上, 三天后无脂诱导二天, 或加入 LDL, 使含胆固醇终浓度为 $250 \mu\text{g/ml}$, 培养二天, 丙酮固定 10 min , PBS 漂洗三次, 于每张玻片上分别依次加入抗兔 LDL 受体 McAb 或 PBS 或抗牛肾上腺皮质 LDL 受体 McAb, $37^\circ\text{C } 1 \text{ h}$, PBS 洗三次, 每次 $5 \sim 10 \text{ min}$, 然后与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 作用, $37^\circ\text{C } 30 \text{ min}$, 洗涤三次后缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 抗兔肝 LDL 受体 McAb 的制备

2.1.1 细胞融合 在融合试验的 384 孔中获杂交瘤 314 孔, 杂交瘤形成率为 81.77% 。经过 ELISA 二步法检测其中分泌特异性抗体的杂交瘤 212 孔, 占杂交瘤的 67.51% , 将 OD 值大于对照孔 5 倍以上定为强阳性, 共 16 孔。

2.1.2 杂交瘤细胞的克隆化培养 从 16 个强阳性孔中随机取 8 孔, 经 5 次有限稀释克隆化培养, 最后发现能稳定分泌抗兔肝 LDL 受体 McAb 的杂交瘤细胞株为两株, 其抗体被定名为 ZMRE6 和 ZMRF7, 其余 8 孔暂时用液氮保存。

2.1.3 杂交瘤细胞染色体核型分析 观察杂交瘤细胞有丝分裂相, 染色体均可见到端着丝点和亚中着丝点染色体, 细胞染色体数介于 $90 \sim 105$, 众数为 $95 \sim 98$, 具有杂交瘤染色体的特征。

2.1.4 McAb 效价测定 经 ELISA 测定 ZMRE6、ZMRF7 的细胞培养上清液和诱生的小鼠腹水抗体效价分别为 1.36 、 0.99 和 1.15×10^5 、 1.07×10^5 。

2.2 抗兔肝 LDL 受体 McAb 的特性鉴定

2.2.1 McAb 与兔 LDL 受体的特异性结合

ELISA 法结果表明: ZMRE6 和 ZMRF7 均能与兔 LDL 受体特异结合, 呈一饱和曲线。即受体浓度增加, 受体结合抗体的量也递增。当受体到一定浓度时, 结合量不再增加, 呈饱和状。对照抗牛肾上腺皮质 LDL 受体 McAb (IgG-C₇) 则为非特异性结合, 呈一低平直线, 如图 1 所示。

2.2.2 兔 LDL 受体的细胞 ELISA 测定

兔成纤维细胞经无脂诱导培养后, 1% 多聚甲醛固定 10 min , 与抗兔 LDL 受体 McAb 孵育, 再加羊抗鼠 IgG-HRP, 测其 OD 值。ZMRE6、ZMRF7 均与兔成纤维细胞结合, OD 值明显大于对照组的牛肾上腺皮质 LDL 受体 McAb $3 \sim 7$ 倍。

2.2.3 LDL 受体的荧光免疫检测 在经过无脂培养的兔成纤维细胞中可见许多特异性颗粒状黄绿色荧光, 以核周为多; 而经高

脂培养的兔成纤维细胞, 这种特异荧光明显减弱, 见 Fig 2 和 Fig 3。

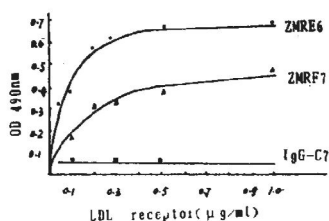


Fig 1. Specific binding curve of the McAb against LDL receptor of rabbit and LDL receptor

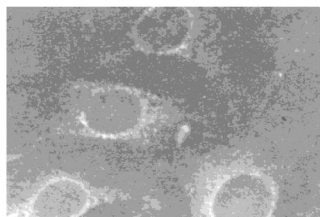


Fig 2. The rabbit's fibroblasts incubated with the McAb (ZMRE6) against LDL receptors, stained by indirect immunofluorescent method.



Fig 3. The rabbit's fibroblasts incubated with IgG-C7; can not be stained by immunofluorescent antibody.

人胚肺成纤维细胞、人包皮成纤维细胞、猴内皮细胞荧光染色均未见特异性荧光。

2.2.4 McAb 的亚类鉴定 琼脂糖免疫双扩散 48 h 后证实, ZMRE6 和 ZMRF7 细胞株分泌的 McAb 均为 IgG1 的亚类。

3 讨论

牛肾上腺皮质和人胚肝细胞 LDL 受体 McAb 的研究, 国内外已见报道。但由于不同动物和人 LDL 受体间存在着种系差异, 因此本研究以家兔肝 LDL 受体为抗原, 建立了二株持续分泌抗兔肝 LDL 受体的 McAb 杂交瘤细胞株 ZMRE6、ZMRF7。二株 McAb 不仅具有较高滴度, 其细胞上清液和诱生的小鼠腹水抗体效价分别为 1.36×10^5 、 0.99×10^5 和 1.15×10^5 、 1.07×10^5 。经琼脂糖免疫双扩散法证明: 二株 McAb 均属 IgG1 亚型。经 ELISA 和细胞 ELISA 检测, 特别是以 LDL (配体)-LDL 受体-McAb-ELISA 法结果表明 ZMRE6 和 ZMRF7 二株细胞分泌的 McAb 与兔肝 LDL 受体的结合具有特异性。用这两种 McAb 对兔成纤维细胞作间接免疫荧光染色显示, 经无脂诱导的细胞呈强阳性反应, 而高脂诱导的细胞免疫荧光明显减弱, 这现象符合 LDL 受体在无脂或高脂培养中的活性变化规律, 同时也表示这二种 McAb 所显示的是 LDL 受体的特异性免疫反应, 而且免疫荧光染色表明: ZMRE6、ZMRF7 分泌的抗体均能与兔 LDL 受体特异性结合, 而对人胚肺成纤维细胞、人包皮成纤维细胞、猴内皮细胞均未见交叉反应, 表明具有种属特异性。

应用这二种 McAb 进一步研究 LDL 受体的工作, 将有另文报道。

4 参考文献

- 1 Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated Pathway for cholesterol, homeostasis. *science*, 1985, 232: 34
- 2 Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *science*, 1984, 225 (5): 52
- 3 Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured

- fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1974, 71 (3): 788
- 4 沈奇桂, 刘子贻, 单泚茵 et al. 低密度脂蛋白受体研究及临床应用. 浙江医科大学学报, 1992, 21 (3): 138
- 5 沈奇桂, 刘子贻, 沈乐翊. 家兔肝低密度脂蛋白受体的提取和初步纯化. 浙江医科大学学报, 1993, 22 (1): 12
- 6 Beisiegel U, Wolfgang J, Schneider et al. Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptormediated endocytosis and genetics of familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, 1981, 256: 11923.
- 7 朱伟民, 楼定安. BA-ELAS 法测定培养细胞的低密度脂蛋白受体活性. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24 (3): 259
- 8 谢崇伦, 蔡海江, 陈秀英 et al. 抗人胚肝低密度脂蛋白受体单克隆抗体的制备及其性质研究. 生物化学与生物物理学报, 1991, 23 (3): 189