

## 脂蛋白脂肪酶单克隆抗体的制备及特性

侯 泽 刘德文<sup>①</sup> 沃兴德<sup>②</sup> 赵革平<sup>①</sup>

(大同医学高等专科学校生物化学教研室, 大同 037008)

### Mouse Monoclonal Antibodies against Bovine Milk Lipoprotein Lipase: Production and Characterization

HOU Zhe, LIU De-Wen, WO Xing-De and ZHAO Ge-Ping

(Department of Biochemistry, Datong Medical College, Datong 037008, China)

#### ABSTRACT

**Aim** Studies were performed to produce specific monoclonal antibodies to bovine milk lipoprotein lipase (bLPL), to verify the specificity of the monoclonal antibodies for bLPL, and to characterize them.

**Methods** Purified lipoprotein lipase (LPL) from bovine milk-56 kDa was used as an antigen for the production of anti-LPL antibodies in mice. The spleen was removed from the animal having the highest titer of antibodies to LPL and the cells were fused with mouse myeloma cells. After cultured with hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) culture medium, this procedure thus identified only those hybridomas which produced antibodies directed against LPL for supernatants by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). After cloning five monoclonal cell strains were established, named as 2E<sub>5</sub>, 2G<sub>10</sub>, 6D<sub>7</sub>, 8D<sub>2</sub> and 7F<sub>4</sub>. The titration of monoclonal antibodies (McAb) are  $5 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-3}$  for supernatants by ELISA.

**Results and Conclusion** Contitration study showed McAb recognized three different epitopes of LPL: 6D<sub>7</sub> and 8D<sub>2</sub> to a close epitope; 2G<sub>10</sub> and 7F<sub>4</sub> to other close epitope; 2G<sub>10</sub> but recognized a far epitope away from

the two of others. Western blot analysis of bovine milk with the McAb gave a single protein band of 56 kDa; 2G<sub>10</sub> gave two protein bands of 50 kDa and 47 kDa. Dot-blot analysis of bovine milk with the McAb 2E<sub>5</sub>, 8D<sub>2</sub> and 6D<sub>7</sub> showed specific reaction Western blot and Dot-blot analysis of human milk with the McAb, had no cross-reacted.

**KEY WORDS** Lipoprotein lipase; Monoclonal antibody; Western-blotting

**摘要** 为了研究脂蛋白脂肪酶的构效关系及其在动脉粥样硬化中的病理作用机制,用牛奶纯化的脂蛋白脂肪酶免疫 Balb/c 小鼠通过杂交瘤技术建立了 30 余株分泌抗牛脂蛋白脂肪酶单克隆抗体的杂交瘤细胞。对其中 2E<sub>5</sub>、2G<sub>10</sub>、6D<sub>7</sub>、8D<sub>2</sub>、7F<sub>4</sub> 进行特征分析发现:①其抗体类别均为 IgG,亚类分别为 IgG1、IgG 2b 和 IgG 2b、IgG1、IgG1;②抗体效价为  $5 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-3}$ ;③5 种单克隆抗体可认为识别三个不同的抗原表位;④Western-blot 及 Dot-blot 结果显示各单克隆抗体均能识别纯化的脂蛋白脂肪酶,与人奶均无交叉反应,与牛奶显示不同的结合特征。

**关键词** 脂蛋白脂肪酶; 单克隆抗体; 免疫印迹

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)是血浆甘油三酯代谢的限速酶<sup>[1]</sup>,且促进脂蛋白间脂质及蛋白交换<sup>[2]</sup>,在整个脂代谢中发挥极其重要的作用。LPL 的缺陷或 LPL 激活因子载脂蛋白 C II 的缺陷均可引起严重的高甘油三酯血症<sup>[2]</sup>。LPL 在动脉粥样硬化<sup>[3]</sup>的病理作用正引起研究者高度重视及广泛研究。近来发现牛动脉平滑肌层含有 LPL<sup>[4,5]</sup>,巨噬细胞可以合成和分泌 LPL,参与泡沫细胞的形成<sup>[6,7]</sup>,本实验旨在研制一组抗牛 LPL 的单克隆抗体,以用于研究 LPL 的构效关系及探讨其在动脉粥样硬化中的病理作用机制。

山西省科委、山西省教委资助课题

①山西医科大学生物化学教研室、血脂研究室

②浙江中医学院分子医学研究所

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

由牛奶纯化的 LPL, 奥地利格拉兹大学 Kostner 教授惠赠, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳呈单一一条带, 分子量为 56 kDa。小鼠骨髓瘤细胞(NS-1), 中国科学院上海细胞生物化学研究所产品。Balb/c 小鼠, 雌性, 8~10 周龄, 浙江医学科学院实验动物室。单克隆抗体分型试剂盒, 羊抗小鼠 IgM、IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3, 中国科学院上海生物化学研究所免疫室。聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG) 分子量 2 kDa, Fluka Chemic AG 公司产品。次黄嘌呤(hypoxanthine, H), 上海试剂二厂产品。脱氧胸腺嘧啶核苷(thymidine, T), 中国科学院上海生物化学研究所产品。氨基喋呤(aminopterin, AP, Fluka Chemic Ag)。

### 1.2 抗脂蛋白脂肪酶抗体的制备

用纯化的 LPL 免疫 Balb/c 小鼠, 共 3 次, 每次间隔 3 周, 腹腔注入 LPL 30  $\mu$ g/次。第三次免疫后 7 天, 小鼠尾端取血, 用酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测其抗体活性。选择抗体滴度高的两只小鼠于融合前 3 天分别静脉、腹腔联合加强免疫一次。取免疫小鼠脾细胞与 NS-1 骨髓瘤细胞在 50% PEG 作用下融合<sup>[8]</sup>, 融合后细胞多孔接种(每只小鼠脾细胞接种 1 000 孔), 次黄嘌呤-氨基喋呤-脱氧胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT)培养液选择培养。采用间接 ELISA 法对杂交瘤细胞培养上清液进行筛选, 以零克隆孔(无细胞克隆生长孔)上清液作阴性对照, 选出阳性的杂交瘤细胞孔, 观察其克隆数。在显微镜下, 用弯头毛细吸管吸取单个细胞集团, 进一步扩增、检测, 阳性孔用有限稀释法进一步克隆化, 建立稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞系。采用无血清培养液培养细胞, 收集上清液, 进行透析、浓缩, 得到较纯的单克隆抗体; 并将杂交瘤细胞接种于 Balb/c 小鼠腹腔制备腹水。

### 1.3 单克隆抗体分型及效价测定

常规免疫双扩散法, 试剂采用中国科学院上海生物化学研究所的羊抗小鼠 IgM、IgG、IgG 1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。

对 5 株单克隆细胞培养上清液分别进行倍比稀释, 用间接 ELISA 法测其吸光度值, 绘制稀释曲线。

### 1.4 脂蛋白脂肪酶抗原表位分析

用 ELISA 相加试验, 分析 LPL 抗原表位。用 LPL 包被, 每孔 100  $\mu$ l(含 LPL 200 ng)。5 株单克隆细胞培

养上清液按其稀释曲线的最大饱和稀释浓度稀释: 2E<sub>3</sub>(1:32)、2G<sub>10</sub>(1:16)、6D<sub>7</sub>(1:4)、8E<sub>2</sub>(1:8)、7F<sub>4</sub>(1:2)。相加方法是先加入一株细胞培养上清液 100  $\mu$ l, 37℃, 反应 2 h, 弃去; 再按 5 株细胞不同组合加入另一株细胞上清液稀释液 100  $\mu$ l, 37℃, 反应 2 h。此后步骤同常规 ELISA, 显色后测吸光度。

### 1.5 免疫转印(Western blot)

将纯化 LPL、牛奶、人奶及低分子标准品, 按常规方法进行垂直板 5%~20% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离。电泳后从垂直板取出凝胶置于转移电泳槽(BIO-RAD LAB 产品, 硝酸纤维素膜为 Amershan 产品), 8℃, 150 mA 电泳 1 h 取出膜片, 将含有低分子标准品的部分剪下, 用 0.1% 氨基黑染色; 另一部分用 10% 小牛血清封闭, 分别以各株单克隆抗体(monoclonal antibodies, McAb)与膜反应, 常规洗涤, 加酶标二抗(1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG), 洗涤后用 4-氯-1-萘酚(加过氧化氢 3.5 mmol/L)显色<sup>[9]</sup>。

### 1.6 斑点印迹(Dot blot)

用微量注射器吸取纯的 LPL 2  $\mu$ l(含 LPL 30  $\mu$ g)及牛奶、人奶各 2  $\mu$ l, 直接点样在硝酸纤维素膜上, 自然干后与单克隆抗体反应, 方法同 Western blot。

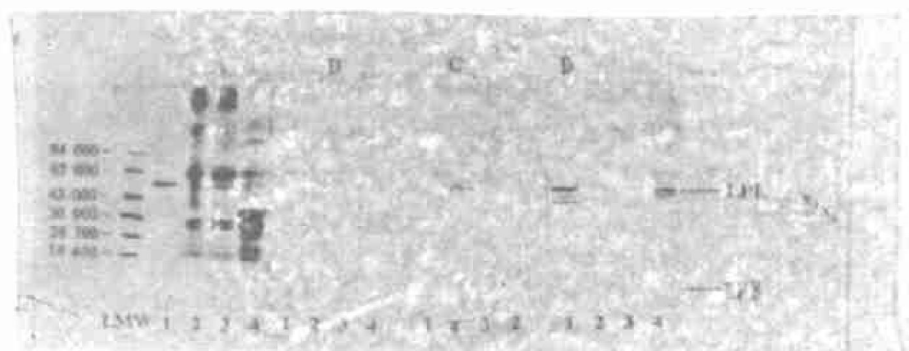
## 2 结果

### 2.1 建立杂交瘤细胞系及细胞特性

采用大孔量选择培养结合显微镜单个细胞集团法获得 32 株分泌抗 LPL 抗体的细胞株, 细胞融合及克隆分布如表 1 (Table 1)。从阳性克隆选其 5 株经反复克隆化培养, 获得 5 株持续分泌高滴度抗 LPL 单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 分别命名为 2E<sub>3</sub>、2G<sub>10</sub>、6D<sub>7</sub>、8D<sub>2</sub>、7F<sub>4</sub>。经细胞特性鉴定, 染色体众数为 94 条, 12 日生长曲线为肿瘤细胞特征。

Table 1. The clone distribution with large screen culture.

	LPL-1	LPL-2
Splenocytes	1.9×10 <sup>8</sup>	1.12×10 <sup>8</sup>
Wells	480	960
Clone wells	1449	1008
Zero clone wells	20	371
Monoclonal wells	63	369
Positive wells	12	20



**Figure 1. Demonstration of the specificity of native anti-bovine milk LPL McAb with Western-blot analysis.** The sample preparations were resolved by slab SDS PAGE with 5%~20% gel and electrophoretically transferred to a NC. A (contain LMW): protein bands stained with 0.1% amino black. B, C and D: protein bands that specifically reacted with 2E<sub>5</sub>(B), 8D<sub>2</sub>(C) and 2G<sub>10</sub>(D) anti-bLPL McAb. In each panel, lane 1, pure bLPL (5  $\mu$ l); lane 2, human skim milk; lane 3, human milk; lane 4, bovine milk.

## 2.2 抗体类别、亚类及抗体效价

免疫双扩散显示五株细胞分泌的免疫球蛋白均为 IgG; 2E<sub>5</sub>、8D<sub>5</sub>、8D<sub>2</sub> 和 7F<sub>4</sub> 分泌抗体为 IgG1; 2G<sub>10</sub> 和 6D<sub>7</sub> 为 IgG2b。ELISA 检测细胞培养上清液抗体效价为  $5 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-3}$ 。

## 2.3 抗原表位分析

二单克隆抗体相加试验分析表明: 5 株单克隆抗体分别识别 3 个不同的抗原决定簇, 其中 2E<sub>5</sub> 与其它二决定簇相距最远; 6D<sub>7</sub> 和 8D<sub>2</sub> 识别一个相近的抗原表位, 7F<sub>4</sub> 和 2G<sub>10</sub> 识别另一个抗原表位, 其吸光度值如表 2 (Table 2)。

**Table 2. ELISA additivity test of five McAb.**

	2E <sub>5</sub>	2G <sub>10</sub>	6D <sub>7</sub>	8D <sub>2</sub>	7F <sub>4</sub>
2E <sub>5</sub>	0.54	2.10	1.45	1.64	1.57
2G <sub>10</sub>		0.73	1.40	1.32	1.21
6D <sub>7</sub>			0.82	0.92	1.11
8D <sub>2</sub>				0.76	1.03
7F <sub>4</sub>					0.78

## 2.4 免疫转印结果

将牛奶、人奶及 LPL 纯品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳, 采用 Western-blotting 分析 5 种单克隆抗体与抗原的结合特性, 结果发现 5 种

单克隆抗体与人奶样品在分子量约 56 kDa 处均无结合; 除 2E<sub>5</sub> 外, 其它 4 株单克隆抗体与 LPL 纯品及牛奶均发生特异结合, 条带位于 56 kDa 处, 2G<sub>10</sub> 与纯 LPL 及牛奶在分子量 49.86 kDa 和 46.65 kDa 处有两条反应条带, 结果见图 1 (Figure 1)。

## 2.5 斑点印迹结果

从图 2 (Figure 2) 可见, 5 种克隆抗体与人奶均没有交叉反应, 其中 2E<sub>5</sub>、6D<sub>7</sub> 和 8D<sub>2</sub> 与牛奶发生特异性反应, 而 2G<sub>10</sub> 和 7F<sub>4</sub> 在斑点印迹中与牛奶没有特异性结合。

## 3 讨论

牛奶 LPL 亚基的分子量为 56 kDa, 功能形式是同亚基二聚体<sup>[10]</sup>。我们用 SDS-PAGE 测定 bLPL 分子量为 56.18 kDa, 与文献报道一致。比较牛奶 LPL 与人 LPL (human LPL, hLPL, 分子量 58 kDa) 的氨基酸组成, 显示 90% 的同源性<sup>[10]</sup>。然而, hLPL 与 bLPL 的多糖部分有较大差异, 其抗血清仅表现很弱的交叉反应<sup>[10]</sup>。我们用 5 种 McAb 在 Western-blot、Dot-blot 分析中, 与人奶均没有交叉反应。

单克隆抗体在 Western-blot 及 Dot-blot 中表现出不同的反应特性。Western-blot 分析, McAb 与纯 LPL 发生特异性反应; McAb 与牛奶蛋白只有 2G<sub>10</sub>、8D<sub>2</sub>、6D<sub>7</sub> 和 7F<sub>4</sub> 在 56 kDa 处显示特异性免疫反应条带, 2E<sub>5</sub> 却没有反应条

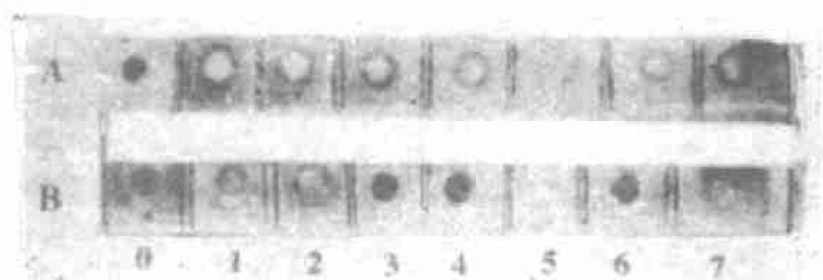


Figure 2. Demonstration of the specificity of native anti-bovine milk LPL McAb with Dot-blot. (A): 0 (30 ng LPL), 1~7 (2  $\mu$ l human milk); (B): 0 (30 ng LPL), 1~7 (2  $\mu$ l bovine milk). Dot 0: any of McAb; 1~2: 2G<sub>10</sub>; 3: 2E<sub>5</sub>; 4: 8D<sub>2</sub>; 5: 7F<sub>4</sub>; 6: 6D<sub>7</sub>; 7: 2G<sub>10</sub>+7F<sub>4</sub>.

带。Dot-blot 分析, McAb 与纯 LPL 产生特异性反应点; 2E<sub>5</sub>、8D<sub>2</sub> 和 6D<sub>7</sub> 与牛奶显示特异反应点, 而 2G<sub>10</sub> 和 7F<sub>4</sub> 却没有此反应点。Western-blot 中牛奶蛋白先进行 SDS-PAGE, 蛋白构象要发生一定改变, 所以有的 McAb 与其不发生反应。Goldberg 等<sup>[11]</sup>及 Cheng 等<sup>[12]</sup>也报道有几株细胞分泌抗 LPL McAb, 在 Western-blot 免疫印迹中不发生反应。Dot-blot 中, 牛奶是直接点样在硝酸纤维膜上, 可以认为酶蛋白是没有发生构象改变的 LPL。因此, 可以认为 2G<sub>10</sub>、7F<sub>4</sub> 只与部分变性后的 LPL 发生反应。正如 Cheng 等<sup>[12]</sup>和 Mao 等<sup>[13]</sup>所报道, 部分 McAb 只与用变性剂处理后的 LPL 发生反应。

我们制备出一组具有不同特征的 McAb, 为 LPL 的进一步研究打下基础。亲和层析纯化抗原, 要求抗体的亲和力适中; 既要易于与抗原结合, 同时又要能够解离, 有利于洗脱。2G<sub>10</sub> 是较好的选择抗体。单克隆抗体用于 ELISA 检测方法的建立, 要求 McAb 必须识别抗原分子不同表位。我们制备的 McAb, 能识别三个不同抗原表位。2E<sub>5</sub> 的抗原位点与 6D<sub>7</sub>、8D<sub>2</sub> 的抗原位点及 2G<sub>10</sub>、7F<sub>4</sub> 的抗原位点相距最远, 2E<sub>5</sub> 与抗原亲和力较大。这样以 6D<sub>7</sub>、8D<sub>2</sub>、2G<sub>10</sub> 和 7F<sub>4</sub> 任一或其混合抗体作为包被抗体; 对 2E<sub>5</sub> 用辣根过氧化物酶标记, 作为检测抗体, 可以建立较理想的夹心 ELISA LPL 检测方法。2E<sub>5</sub>、8D<sub>2</sub>、6D<sub>7</sub> 与直接点样的牛奶 LPL 产生反应, 可用于检测机

体活性状态的 bLPL, 尤其适用于对培养细胞所分泌及结合 bLPL 的检测。具体应用研究将在以后进一步详细报道。

#### 参考文献

- 1 Brunzell JD, Miller NE. Primary lipoprotein lipase deficiency. In: Angel A, Frohlich J (editors). *Lipoprotein deficiency syndromes*. New York, Plenum Press, 1986; 227~239.
- 2 Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, et al. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-I. *N Engl J Med*, 1978; 298: 1 265~273.
- 3 Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res*, 1996; 37(4): 693~707.
- 4 Vance JE, Khoo JC, Steinberg D. Lipoprotein lipase in cultured pig aortic smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 1982; 2: 390~395.
- 5 Jonasson L, Bondjers G, Hansson GK. Lipoprotein lipase in atherosclerosis, its presence in smooth muscle cells and absence from macrophages. *J Lipid Res*, 1987; 28: 437~445.
- 6 Khoo JC, Mahoney EM, Witatum JL. Secretion of lipoprotein lipase by macrophages in culture. *J Biol Chem*, 1981; 256: 7 105~108.
- 7 Wang I, Ungar PA, Blumis J, et al. Human monocytes in culture synthesize and secrete lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982; 104: 923~928.
- 8 Galfve G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth Enzymol*, 1981; 73: 1~10.
- 9 Yasuyuki I, Takagi A, Ohkaruy, et al. A sandwich en-



- zyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human post heparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res*, 1990, 31: 1 911~924.
- 10 Hayashi R, Tajima S, Yamamoto A. Purification and characterization of lipoprotein lipase from human post heparin plasma and its comparison with purified bovine milk lipoprotein lipase. *J Biochem*, 1986, 100: 319~331.
- 11 Goldberg IJ, James R, Paterniti J, et al. Production and use of an inhibitory monoclonal antibody to human lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 878: 168~175.
- 12 Cheng CF, Andre B, Thomas B, et al. Purification and characterization of human lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase. *J Biol Chem*, 1985, 260: 10 720~726.
- 13 Mao SJT, Reichtin AE, Jackson RL. Monoclonal antibodies that distinguish between active and inactive forms of human postheparin plasma hepatic triglyceride lipase. *J Lipid Res*, 1980, 27: 1 023~029.

(1997-03-17 收到, 1997-06-13 修回)

## 关于汉语稿件中名词术语使用外来语缩写的规定

中国动脉硬化杂志编辑部

当一个多汉字的名词术语在汉语稿件中反复出现时,作者往往喜欢用一个外来语缩写词来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,本刊亦不例外。然而在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的外来语缩写时存在以下问题:①同一个英文词,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译成衍化,还有的译成衍生;②缩写不模范,字母大小写不一致,如载脂蛋白(apolipoprotein),缩写为 apo 已不规模,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;③用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,本刊对汉语稿件中名词术语使用外来语缩写词来代替作如下规定,请作者遵照执行。

- 1 名词术语在 3 个(含 3 个)汉字内,一律使用汉语;多于 3 个汉字的,方可使用外来语缩写词来代替;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等都只能用汉语;但冠心病、肺心病等例外。
- 2 文题、摘要和关键词中的名词术语,不得使用外来语缩写词来代替。
- 3 正文中的各级标题不得用缩写词来代替名词术语;段首和句首的名词术语,也不得用缩写词来代替。
- 4 第一次使用外来语缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写:汉语(外来语,缩写词)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)

等,以下行文,可只写缩写词,不必注释汉语。

### 5 名词术语的外来语缩写原则

- 5.1 由两个或两个以上的词构成的名词术语,缩写时一律取实词首字母,全大写;如总胆固醇(total cholesterol, TC)。
- 5.2 由主干词加前缀构成的单词名词术语缩写时,不论主干词和前缀之间是否有连字符,一律取前缀和主干词首字母,全大写,如去甲肾上腺素(noradrenalin, NA)。
- 5.3 组合法构成的单词名词术语,其间若没有连字符,缩写时取首字母和另 1~2 个字母,首字母大写,余小写,如动脉粥样硬化(atherosclerosis, As),但相沿成习的写法例外,如动脉硬化(arteriosclerosis, AS)、甘油三酯(triglyceride, TG)、白细胞介素(interleukin, IL)等。
- 5.4 组合法构成的名词术语,其间有连字符的,按照上述第 5.1 条原则来缩写。
- 5.5 用来代替汉语名词术语的外来语缩写词,在汉语稿件中不用复数。
- 5.6 缩写词各字母之间一般不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1)。
- 6 书写、打字或排版时,名词术语的外来语缩写词不移行。

以上规定,自 1994 年 10 月 1 日起生效;此后,凡文稿中有不符合规定者,本刊将退回作者重写,直到符合本规定为止。

(胡必利起草、修订)