[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610070899.X

[51] Int. Cl.
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 101041820A

[51] Int. Cl. (续)
A61P 29/00 (2006.01)
[22] 申请日 2006.3.21
[21] 申请号 200610070899.X
[71] 申请人 胡川闽
地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号第三军医大学临床生化教研室
共同申请人 黄洪涛 王 建
[72] 发明人 胡川闽 黄洪涛 王 建 易维京 李 鹏 高利宏

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 5 页

[54] 发明名称

一种巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及生物医药工程技术领域，是包括涉及抗人巨噬细胞转移抑制因子(hMIF)单克隆抗体制备及其氨基酸序列获得的方法。本发明经逆转录聚合酶链式反应从人乳腺癌细胞株 MDA－MB453 和人乳腺癌组织扩增出 hMIF 基因，构建 pET－11b/hMIF 重组质粒，在大肠杆菌 BL21(DE3)表达并纯化后免疫 Balb/c 小鼠，通过杂交瘤技术获得小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞融合的抗 hMIF 单克隆抗体高表达高效价杂交瘤细胞株，即 $2D_{10}$，再经抗体亚类鉴定和抗体的特异性实验，杂交瘤单克隆细胞株 $2D_{10}$ 分泌的单克隆抗体属于 IgG，轻链是 K 型，其轻链可变区的氨基酸序列为：CRASGRNNAWYKGADGWYKGKAKRYAASSSGVSRSGSGSGTTTSSDATYYCHNDAVYSYGTKVKR，重链可变区的氨基酸序列为：VWSGGSTVKGGRSCGYYASGTSTYSMGMNWVRAGKGWVSSSTSVDTYYYADSVKGRTSRDNAKNSYDYDVSRADTAVYYCARDGASSGWGVDATGSRVSCYWGGTVSSWMSAT。本发明通过上述技术方案获得的抗 hMIF 单克隆抗体，为进一步的人源化改造提供有效的依据，可用于检测动物和人体中巨噬细胞转移抑制因子含量，为进一步的临床治疗全身性炎症反应综合征奠定基础。

1．一种人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体及其制备方法，其特征在于：

a．重组人巨噬细胞转移抑制因子的原核表达：经逆转录聚合酶链式反应，应用上游引物 CGCGGATCCTGCGGCTCTTAGGCGAAGG 和下游引物 CGCCATATGCCGATGTTCATCGT AAACAC，从人乳腺癌细胞株 MDA-MB453 和人乳腺癌组织扩增出人巨噬细胞转移抑制因子基因，构建 pET11b/hMIF 重组质粒，转化大肠杆菌 BL21（DE3）进行重组人巨噬细胞转移抑制因子的表达；

b．重组人巨噬细胞转移抑制因子纯化：用阳离子交换介质和疏水层析介质分离纯化；

c．抗重组人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体的制备：用纯化的人巨噬细胞转移抑制因子免疫小鼠，通过杂交瘤技术经多次细胞融合获得杂交瘤细胞，经抗体亚类鉴定和抗体的特异性实验筛选出分泌抗人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体的杂交瘤细胞株 $2D_{10}$，对杂交瘤细胞克隆化和分泌抗体亚类的鉴定，$2D_{10}$ 分泌的单克隆抗体属于 IgG，轻链是 κ 型；

d．抗人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列为：CRASGRNNAWYKGADGWYKGKAKRYAASSSGVSRSGSGSGTTTSSDATYYCHNDAVYSY GTKVKR，重链可变区的氨基酸序列为：VWSGGSTVKGGRSCGYYASGTSTYSMGMNWVR AGKGWVSSSTSVDTYYYADSVKGRTSRDNAKNSYDYDVSRADTAVYYCARDGASSGWG VDATGSRVSCYWGGTVSSWMSAT。

2．根据权利要求 1 所述的重组人巨噬细胞转移抑制因子纯化，其特征在于以阳离子交换介质是 SP Sepharose Fast Flow，疏水层析介质是 Hitrap butyl Fast Flow。

3．根据权利要求 1 所述的抗重组人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体的制备，其特征在于获取的杂交瘤细胞株 $2D_{10}$ 分泌出 IgG 单克隆抗体亚类属于 IgG_1。

4．根据权利要求 1 所述的抗人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列，其特征在于该氨基酸序列被用于原核细胞和真核细胞表达纯化获得，以及人工合成。

5．根据权利要求 1 所述的抗人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体重链可变区的氨基酸序列，其特征在于该氨基酸序列被用于原核细胞和真核细胞表达纯化获得，以及人工合成。

6．一种人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体，用于人源化改造。

7．根据权利要求 6 所述的人源化改造，其特征在于利用人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体氨基酸序列进行计算机模建改造和其它方式的同源改造。

8．一种人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体，用于检测动物和人体中巨噬细胞转移抑制因子含量。

9. 根据权利要求 7 所述的检测动物和人体中巨噬细胞转移抑制因子含量，其特征在于应用人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体，通过抗体和抗原之间的特异性免疫学反应方法检测动物和人体的血清和组织中的巨噬细胞转移抑制因子含量。

10. 一种人巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体，主要用于临床治疗创伤引起的全身性炎症反应综合征。

一种巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体及其制备方法

技术领域

本发明涉及生物医药工程技术领域，是包括涉及抗巨噬细胞转移抑制因子（MIF）单克隆抗体制备及其氨基酸序列获得的方法。

背景技术

创伤性休克的治疗是临床需要解决的重要问题。以往的研究大多把创伤性休克归因于低血容量，但许多创伤性休克病人是在受伤数天之后由于发生多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome , MODS)而死亡，死亡时血容量正常。目前认为，严重创伤可引起严重的全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome ,SIRS)，而SIRS是MODS发病机理的中心环节，预防与纠正SIRS的发生将大大提高创伤性休克的存活率，参见Baue AE, Shock.1995,4(1):39- 40;Lee CC 等, Ann Emerg Med,2001,38(2):170 - 176。

SIRS是机体创伤后产生的过度炎症、凝血以及被削弱的纤溶过程之间复杂的相互作用结果，参见Cunneen J等,AACN Clin Issues.2004,15(1):18244; Riewald M等, Crit Care.2003,7(2):123-129。创伤激活机体网状内皮系统的效应细胞，产生多种细胞因子（如TNF-α、IL-1，IL-6、IL-8、IFN-γ）。这些细胞因子进一步促进更多炎症介质产生，各种介质互相作用，引发级联反应，增强炎症过程。不断增强的炎症、凝血过程导致大量炎性细胞和内皮细胞凋亡，血栓形成，微循环功能破坏，同时大量二级介质释放，如花生四烯酸代谢产物、氧自由基、氮氧化合物等，直接导致生理紊乱，造成严重的临床后果，参见Ely EW 等,Am J Crit Care.2003,12(20:120-133; 毛一雷等,中国实用外科杂志.2000,20(12):748-775.由于各种促发炎症反应的早期细胞因子在SIRS中发挥着不同作用，在上世纪90年代的研究中，许多学者针对这些细胞因子在SIRS中的作用提出了抗细胞因子疗法治疗SIRS，如TNF单克隆抗体、可溶性TNF受体、IL-1受体拮抗剂、抗IL-6 单克隆抗体、抗IL-8 单克隆抗体、PAF拮抗剂TCV-309和PAF受体拮抗剂BN52021，但由于这些靶分子对SIRS的发生不具有关键性的作用，临床试验的结果令人失望，参见Minneci P等,Eur J Clin Microbiol Infect Dis.2003,22(1):1-9; Bloom B 等,Science.1966(1530:80 - 82。进入本世纪后，一种新的凝血酶抑制剂人活化C蛋白（Drotrecogin alfa）被美国FDA批准作为第一个治疗严重败血症的药物而进入临床。它能同时降低血浆中凝血标记物(D-dimers)和炎症标记物(IL-6)的水平，提高严重败血症患者的生存率，提示阻断炎症前介质释放的关键上游分子能够治疗SIRS。虽然Drotrecogin alfa 疗效确切，但作为一种天然的抗凝药物，出血是其难以回避的不良反应，使其在SIRS治疗中难以普遍应用，所以寻找更好的炎症前介质阻滞靶点越来越受到重视。

早在40多年以前，在研究迟发型超敏反应的过程中，从激活的T细胞的培养上清中首次发现具有抑制巨噬细胞移动的作用的蛋白因子，当时将其命名为巨噬细胞迁移抑制因子（macrophage migration inhibitor factor, MIF）。这也是人类发现的第一个细胞因子，由于不能克隆出其编码基因，对其功能的研究长期停滞不前。随着分子生物学的发展，1989年首次成功克隆出MIF基因，近年来重新发现MIF除抑制巨噬细胞移动以外的许多更为重要的功能：①MIF不属于任何细胞因子超家族，从蓝藻、蜱类昆虫、禽类到小鼠等均能发现其同源基因，不但在免疫细胞和内分泌细胞（如垂体细胞）中组成性表达，也可在与外界环境直接接触的上皮细胞中诱导表达，参见Bernhagen J 等, Nature. 1993(365):756－759。②MIF可直接或间接促进炎症前介质（TNF、IL-1β、IL-2、IL-6、IL-8、IFN-γ）、巨噬细胞炎症蛋白2、NO、COX2和花生四烯酸途径产物的生成和表达，参见Thierry C 等, NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY. 2003, (3):791-800。③MIF不但能逃避糖皮质激素的免疫抑制效应，且能逆转糖皮质激素对其他炎症介质的抑制作用，充当糖皮质激素的生理拮抗剂；参见Fingerle-Rowson G 等, Am. J. Pathol. 2003(162):47－56; Beishuizen A 等, Clin Endocrino Meta. 2001, 86(6):1811－1817。④MIF能通过抑制依赖野生型p53的巨噬细胞凋亡而维持其促进炎症的作用，参见Thierry C 等, NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY. 2003, (3):791-800。2003年10月Calandra 与Roger在NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY上撰文指出，MIF是炎症反应不可缺少的成分，是固有性免疫（innate immunity）中枢的调节因子，是宿主抵抗微生物防卫系统和应激反应中不可缺少的成员。正常状况下，当机体应激和严重感染时，下丘脑-垂体-肾上腺系统(HPA轴)激活，血液中ACTH、肾上腺皮质激素水平迅速升高，起到抑制免疫反应、抵抗应激、保护宿主的作用。随着HPA 轴活化，MIF 从垂体细胞中释放(中枢性释放)，同时在感染后，体内存在的细菌内外毒素和细胞因子诱导单核巨噬细胞释放大量MIF(外周性释放)，从而诱导巨噬细胞和活化的T细胞分泌大量细胞因子，极大地促进炎症和免疫反应。

国外在2001年研究了17 例持续SIRS 的患者，将其分为存活组和死亡组，检测血MIF、TNF-α、IFN-γ和皮质类固醇水平。结果显示，在SIRS 死亡组患者中，MIF 和TNF-α水平明显高于SIRS 存活组及对照组，且MIF 和TNF-α水平具有明显相关性，说明了高MIF 和TNF-α水平与SIRS 患者的不良预后密切相关，提示MIF是SIRS中的关键介质，参见Gando S 等, Intensive Care Med. 2001, 27:1187-1193。通过测定危重疾病中MIF和HPA与其它细胞因子、疾病严重程度、ARDS 的发生及最终疾病转归之间的关系，研究了危重疾病中的MIF 在神经内分泌调节网络中的作用，他们发现，在脓毒症休克的患者血清中MIF水平呈持续升高，与皮质醇浓度平行，但与ACTH 水平负相关。脓毒症休克的非存活患者血清MIF 浓度明显高于存活组，脓毒症伴ARDS患者的血清MIF 水平也显著高于无ARDS 者，多元回归分析显示MIF水平升高和ARDS存在

是其预后不良的独立预测因素。Thierry 等在实验中用大肠杆菌进行腹腔内注射，复制细菌性腹膜炎脓毒症休克的动物模型，发现在腹膜渗出液及血液中MIF浓度明显升高。另外，在TNF-α基因敲除型（TNF-α$^{-/-}$）的小鼠动物模型中，运用盲肠结扎穿刺伤引起腹膜炎，立即给予抗MIF的单克隆中和抗体，结果发现其生存率明显提高（由0%上升到62%），参见Calandra T等，Nat Med. 2000(6)：164-170。Marcelo等也发现在实验鼠中用中和性MIF抗体中和MIF作用或将MIF基因敲除（MIF$^{-/-}$）能保护动物，防止致命性的内毒素血症或链球菌毒素性休克，参见Pollak T 等，Immun. 2005;73(10):6488－6492。以上研究均提示MIF可以不依赖其他炎症介质而发挥促进炎症的作用，是全身炎症反应中关键的神经内分泌介质。在美国已经展开利用MIF特异性抗体治疗败血症患者的临床发展策略。综上所述，MIF可能是炎症发生时一个极为关键的上游分子，阻断MIF的作用不但可以抑制其下游炎症前介质的表达，还可通过提高糖皮质激素的免疫抑制作用达到纠正SIRS的目的，参见Al-Abed D 等，J Biol Chem. 2005;280(44):36541-36544。

在生理状态下垂体前叶细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、胃和肠道的粘膜细胞、主细胞、胰腺细胞以及小鼠脂肪细胞均发现 MIF 的高水平表达，提示 MIF 有更广泛的生物学功能。Bucala 等在克隆鼠源性 MIF 时就发现 LPS 能诱导垂体前叶细胞表达 MIF，实验动物给予 LPS 后，血清中的 MIF 明显升高，垂体前叶切除和 T 细胞免疫缺陷小鼠对照研究，证实血清中升高的 MIF 来源于垂体前叶细胞。重组 MIF 能显著提高 LPS 诱导的实验动物的感染性休克致死率，而抗 MIF 单克隆抗体能明显降低动物的死亡率，提示阻断或抑制 MIF 的功能，可能在抗感染性休克中具有良好的应用前景。

从激活的人 T 淋巴细胞中克隆出全长 MIF cDNA，序列分析证实后，在原核表达载体 pET-11b 中可实现 MIF 高效表达，MIF 的表达量占菌体总蛋白量的 20%左右。通过杂交瘤技术，获得的抗人 MIF 的鼠源性单克隆抗体对 LPS 感染性休克动物具有明显的保护性治疗作用。由于该单抗是鼠源性蛋白，不能过渡到人体应用，可广泛用于体外检测血清或组织的 MIF 含量。

近年来单抗药物的研究已取得很大成绩，通过基因工程技术不仅可以对鼠源性单抗实施人源化改造，降低鼠源性单抗人用的免疫原性，还可以通过噬菌体表面呈现和核糖体展示技术提高人源化抗体的亲和力，制备出适合人体应用的抗体药物。此外，还可利用噬菌体抗体库和转基因动物研发人源性抗体。迄今为止，美国 FDA 和欧共体已批准 9 种治疗抗体进入临床使用，年销售额达 20 亿美元。目前全球有 250 家企业致力于治疗用抗体的研究，正在开发中的产品约有 700 种，其中 100 种左右已进入临床研究，单抗药物已占所有开发中的生物技术药品的 25%。

有人对鼠抗肝癌单克隆抗体 HAb25 实施了人源化改造，从分析 HAb25 抗体轻、重链可变区基因结构入手，同源模建法预测 HAb25 抗体可变区的三维结构，以结构数据为基础，采取单个最似框架区替代法对其进行人源化设计，重叠延伸 PCR 法构建 HAb25 人源化单链抗体全基因（hscFv25），重组表达的 hscFv25 抗体基本上保持了亲本抗体的特异性。同时，用 PCR 技术对鼠源性单克隆抗体的轻、重链的 CDR3 区每个氨基酸进行随机突变，再经噬菌体表面呈现筛选出高亲和力的突变体，可将抗体亲和力提高了数十倍。

感染性休克的防治是临床上的一个棘手问题，至今尚无有效的治疗手段。重组 MIF 蛋白能加剧感染性休克的死亡，而抗 MIF 抗体则对感染性休克的动物有显著的保护性治疗作用。利用获得到的鼠源性 MIF 单克隆抗体，在 LPS 诱导的感染性休克动物模型中，显示明确的保护性治疗作用。若在过去鼠源性抗体单克隆抗体人源化改造研究的基础上，通过生物学重组技术高效获得高亲和力的抗 MIF 人源化单克隆抗体，对治疗 SIRS 将具有十分显著的临床意义。

由于hMIF与炎症性、自体免疫性疾病、肿瘤及创伤等疾病的发生发展及预后密切相关，hMIF尤其是抗hMIF中和性抗体的临床应用已成为国内外研究的热点。最新的研究证实，抗MIF单克隆抗体在盲肠结扎穿孔术（CLP）诱导的小鼠感染性休克模型中和抗II型胶原抗体/LPS诱导的小鼠关节炎模型中具有显著的保护作用；此外，抗hMIF单克隆抗体还可抑制小鼠体内肿瘤的生长和血管发生作用。因而抗hMIF单克隆抗体具有广泛的应用前景。

鼠源性单抗由于很容易受到人免疫系统的排斥，半衰期短，且其Fc 段不能有效地激活人体效应系统，故目前只有Muromonab-CD3这一株鼠源性抗体还在临床上使用。目前，嵌合抗体、人源化抗体、药物藕联抗体成为治疗性抗体的主流，而近年来随着抗体库技术和转基因小鼠技术的成熟出现了全人抗体。到2005年为止，FDA批准的18株抗体类药物中，仍以人-鼠嵌合抗体、人源化抗体为主，全人抗体只有Adalimumab一株。本发明成功制备了$2D_{10}$抗hMIF单克隆抗体，为抗hMIF嵌合抗体、单链抗体、人源化抗体制备及其临床应用奠定了基础。

发明内容

本发明的目的正是为了解决上述问题，提出一种鼠源性 MIF 单克隆抗体的制备方法，并获得氨基酸序列，为其进一步的人源化改造奠定基础。

本发明的技术解决方案：

a.重组人 MIF 基因的获得：根据 GenBank 发表的人 MIF（hMIF）cDNA 序列，即

CCGATGTTCATCGTAAACACCAACGTGCCCCGCGCCTCCGTGCCGGACGGGTTCCTCTC

CGAGCTCACCCAGCAGCTGGCGCAGGCCACCGGCAAGCCCCCCCAGTACATCGCGGTG

CACGTGGTCCCGGACCAGCTCATGGCCTTCGGCGGCTCCAGCGAGCCGTGCGCGCTCTG

CAGCCTGCACAGCATCGGCAAGATCGGCGGCGCGCAGAACCGCTCCTACAGCAAGCTG CTGTGCGGCCTGCTGGCCGAGCGCCTGCGCATCAGCCCGGACAGGGTCTACATCAACTA TTACGACATGAACGCGGCCAATGTGGGCTGGAACAACTCCACCTTCGCCTAAGAGCCGC A，设计了上游引物为 5'- CGCGGATCCTGCGGCTCTTAGGCGAAGG-3'(含 BamhI 位点)；下游引物为 5'-CGCCATATGCCGATGTTCATCGTAAACAC-3'(含 NdeI 位点)，上下游引物 5'端均带有保护碱基,经 RT-PCR 从人乳腺癌细胞株 MDA-MB453、人乳腺癌组织扩增 hMIF 基因，构建 pET11b/hMIF 重组质粒。

b. 重组 hMIF 的原核表达：重组质粒 pET11b/hMIF 构建转化大肠杆菌 BL21（DE3），按 IPTG 的作用时间分组诱导 hMIF 蛋白的表达；Tricine SDS-PAGE 电泳后与未诱导组相比，IPTG 诱导组细菌应有一条分子量约为 12.5 kD 的特异蛋白条带，与 hMIF 蛋白的预计分子量相符；记录诱导时间对蛋白表达量高低的影响，并进一步获取 MIF 蛋白的表达方式。

c. 重组 hMIF 的纯化：将 BL21 重组菌（pET11b/hMIF）诱导发酵，超声破菌，经阳离子交换和疏水层析进行纯化，确定纯化工艺，并用 Western blotting 鉴定纯化的 hMIF 蛋白是否能与鼠抗 hMIF 单克隆抗体进行特异性反应。

d. 抗 hMIF 单克隆抗体的制备：用纯化的 hMIF 蛋白免疫 Balb/c 小鼠，通过杂交瘤技术经多次细胞融合，利用间接 ELISA 法和克隆化筛选出能稳定分泌抗 hMIF 单克隆抗体的杂交瘤细胞株并检测其细胞培养上清的效价。之后对杂交瘤细胞核型分析，明确染色体数目，证实杂交瘤确实是小鼠脾细胞和 SP2/0 融合而成，再进行抗体亚类鉴定和抗体的特异性实验，达到与 hMIF 蛋白反应，与其他蛋白无交叉反应的目的。

e. 抗 hMIF 单克隆抗体氨基酸序列分析：

经过氨基酸序列分析，抗 hMIF 单克隆抗体轻链可变区氨基端 15 个氨基酸序列为：MDMGGAWDVGDRVTT，重链可变区氨基端 15 个氨基酸序列为：VWSGGSTVKGGRSCG，轻链可变区羧基端 3 个氨基酸序列为：VKR，重链可变区羧基端 3 个氨基酸序列为：SAT。经过液质连用氨基酸序列分析，得到抗 hMIF 单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列为：CRASGRNNAWYKGADGWYKGKAKRYAASSSGVSRSGSGSGTTTSSDATYYCHNDAVYSY GTKVKR，重链可变区的氨基酸序列为：VWSGGSTVKGGRSCGYYASGTSTYSMGMNWVR AGKGWVSSSTSVDTYYYADSVKGRTSRDNAKNSYDYDVSRADTAVYYCARDGASSGWG VDATGSRVSCYWGGTVSSWMSAT。

本发明通过上述技术方案，可显著提高抗 MIF 单克隆抗体的产量，为进一步的人源化改造提供有效的依据。

附图说明

图 1 为人 MIF RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果分析图。

其中，1，DNA marker；2，模板来自MDA-MB453细胞株的PCR 产物；3，模板来自乳腺癌组织的PCR产物。

图2为重组质粒pET11b/hMIF的双酶切鉴定图谱。

其中，1，DNA marker；2，pET11b/hMIF质粒经BamH I和Nde I双酶切图谱。

图3为克隆自MDA-MB453细胞的MIF基因测序图。

图4为重组hMIF蛋白诱导表达与纯化SDS-PAGE电泳图。

其中，1，蛋白质分子量 marker；2，pET11b/hMIF/BL21未诱导表达；3，pET11b/hMIF/BL21 IPTG诱导表达；4，SP Sepharose Fast Flow 层析柱初次纯化 hMIF蛋白图谱；5，Hitrap butyl FF 层析柱最终纯化hMIF 蛋白图谱。

图5为SP Sepharose Fast Flow层析柱初次纯化hMIF蛋白的HPLC图谱。

图6为Hitrap butyl FF 层析柱最终纯化hMIF蛋白的HPLC图谱。

图7为纯化产物的免疫印迹鉴定图谱。

其中，1，纯化的hMIF蛋白；2，GST-hMAM对照。

图8为杂交瘤单克隆细胞株$2D_{10}$核染色体Giemsa染色后放大1000时分析图谱。

图 9 为腹水单克隆抗体 $2D_{10}$ 的免疫印迹显色图谱。

具体实施方式

本发明从人乳腺癌细胞株 MDA-MB453、人乳腺癌组织中克隆 hMIF cDNA，构建其原核表达载体，表达纯化 MIF 蛋白，并制备鼠抗人 MIF 单克隆抗体，获得数株分泌高特异性高效价高亲合力抗体的杂交瘤细胞株，为 hMIF 蛋白和抗 hMIF 抗体的应用研究打下基础。

本发明利用 RT-PCR 法从人乳腺癌细胞株 MDA-MB453 和人乳腺癌组织成功克隆到 hMIF cDNA，并构建了原核表达载体 pET11b，测序证实克隆到的 hMIF 序列与 Genebank 报道的完全一致。重组质粒 pET11b/hMIF 在 BL21（DE3）中成功表达出可溶性的 hMIF，重组菌发酵后，通过阳离子交换和疏水层析法得到高纯度的重组 hMIF 蛋白，Lowry 法测定蛋白浓度为 1.145g/l，HPLC 测出终产品 hMIF 的纯度达 95.40%。1g 湿菌可得到 53mg 纯度为 95.40%的 hMIF 蛋白，得率约为 17.7%。运用杂交瘤技术成功建立了 1 株分泌抗 hMIF 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 $2D_{10}$，其染色体数目为 84，接近小鼠脾细胞染色体和 SP2/0 染色体之和，证实是小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞的融合体，细胞株体外培养 3 个月以上仍能稳定分泌抗体。快速定性试纸测定 $2D_{10}$ 细胞株分泌单克隆抗体亚类，为 IgG_1，轻链是 κ 型。 免疫印迹和 ELISA 结果表明：这株单克隆抗体特异性强，只与 hMIF 特异结合，而和其它所测蛋白无交叉反应。本发明

还建立了检测小分子量蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 电泳方法和检测 hMIF 抗体效价的间接 ELISA 法，同时，$2D_{10}$单克隆抗体的成功制备与特性鉴定为该抗体的应用研究奠定了基础。

材料和来源

菌株和质粒：大肠杆菌克隆菌株 DH5α 和大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 均为申请人实验室保存，pET-11b 购自 Novagen 公司。

酶及试剂盒：限制性内切酶 BamH I 和 Nde IRT-PCR 试剂盒和质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司，琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

其它试剂：HRP-羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国公司，GST-hMAM 融合蛋白、抗 hMIF 单克隆抗体均为申请人实验室纯化保存。

PCR 引物：由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物为 5'-CGCGGATCCTGCGG CTCTTAGGCGAAGG-3'；下游引物为 5'-CGCCATATGCCGATGTTCATCGTAAACAC-3'。

实施例

1．RT－PCR 法获得 hMIF 基因

（1）引物设计与合成

根据 GenBank 中已发表的 hMIF cDNA 序列：CCGATGTTCATCGTAAACACCAACGTGCC CCGCGCCTCCGTGCCGGACGGGTTCCTCTCCGAGCTCACCCAGCAGCTGGCGCAGGCC ACCGGCAAGCCCCCCCAGTACATCGCGGTGCACGTGGTCCCGGACCAGCTCATGGCCTT CGGCGGCTCCAGCGAGCCGTGCGCGCTCTGCAGCCTGCACAGCATCGGCAAGATCGGC GGCGCGCAGAACCGCTCCTACAGCAAGCTGCTGTGCGGCCTGCTGGCCGAGCGCCTGC GCATCAGCCCGGACAGGGTCTACATCAACTATTACGACATGAACGCGGCCAATGTGGGC TGGAACAACTCCACCTTCGCCTAAGAGCCGCA，设计了一对特异引物。上游引物为 5'-CGCGGATCCTGCGGCTCTTAGGCGAAGG-3'（含 BamhI 位点）；下游引物为 5'-CGCCATATGCCGATGTTCATCGTAAACAC-3'(含 NdeI 位点)，上下游引物 5'端均带有保护碱基，将上述引物委托上海生工生物工程有限公司进行合成。

（2）MDA-MB453 细胞总 RNA 提取

将液氮中冻存的乳腺癌 MDA-MB453 细胞取出，迅速放入 37℃水浴中，并不时摇晃冻存管，直到冻存液完全溶解，在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中，37℃、5% CO_2培养箱中培养后，水平离心 800 rpm 10 min，去上清，1 ml 无血清 RPMI1640 培养基重悬沉淀的细胞，倒置显微镜下记数，将细胞重新离心收集；用 Trizol 试剂提取乳腺癌细胞株的总 RNA：将 Trizol 按体积 1 ml/5×10^6细胞的比例加入到细胞沉淀内，室温放置 5 min，使其充分裂解，12000 rpm 离心 5 min，收集上清，按 200 μl 氯仿/ml Trizol 加入氯仿，振荡混匀后室温放置 15

min，4℃ 12000g 离心 15 min，吸取上层水相，至另一离心管中，按 0.5 ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀，室温放置 5-10 min，4℃ 12 000g 离心 10 min，弃上清，RNA 沉于管底后按 1 ml 75%乙醇/ml Trizol 加入 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀，4℃ 8000g 离心 5 min，尽量弃上清，室温晾干或真空干燥 5-10 min，用 50 μl DEPC 处理的无菌纯水溶解 RNA 样品，55-60 ℃,5-10 min，测 OD 值定量 RNA 浓度和纯度。

（3）乳腺癌组织总 RNA 提取

乳腺癌标本来源：人乳腺癌组织为第三军医大学西南医院普外科手术切除标本，病理分型为早期浸润性导管癌；乳腺癌细胞的收集：将乳腺癌标本置于铜网上，去除脂肪结缔组织，一边研磨一边用 RPMI1640 不完全培养基冲洗细胞，即可得到细胞悬液，再将细胞悬液水平离心 800 ×g 10 min，收集细胞沉淀；提取总 RNA 步骤同 MDA-MB453 细胞总 RNA 的提取。

（4）RT-PCR

RT-PCR按Promega公司的试剂盒说明进行：将1μg（2μl）MDA-MB453细胞总RNA和1 μl Oligo(dT) primer加入到14.2 μl DEPC处理的水中，70℃加热5 min后，冰浴5 min，再依次加入5μl 5×反应buffer、1.25μl dNTP、1μl M-MLV反转录酶、0.55 μlRNA酶抑制剂，终体积为25μl，42℃ 2h,95℃ 变性 5 min,-20℃保存。取上述RT产物 1μl,10×反应buffer 5 μl ,上下游引物各1μl （终浓度为50 pmol）,dNTP 2μl ,Taq酶1μl(2U),25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5μl,ddH20 36.5μl,总体积为50μl。94 ℃预变性4 min,然后94 ℃1 min,55℃1 min,72 ℃ 1 min ,35个循环,最后72℃延伸5 min,反应结束后取PCR产物10μl做1.5%琼脂糖凝胶电泳，证实得到大小为353 bp的特异性片段（图1）。

（5）hMIF 目的基因的回收

紫外灯下切下含特异PCR产物的胶条，放入EP管中称重，加入3倍体积的Buffer QG，50℃水浴10 min直至胶条完全融化，并检查颜色是否是黄色，如为紫色或橙色，加10μl 3 mol/L 醋酸钠(pH5.0),混匀直至颜色恢复，加入等胶条体积的100%异丙醇（如1mg胶加1μl），颠倒混匀，将1个MinElute柱放入提供的2 ml收集管中，并放于架子上，将全部样品移入柱内，离心1min，倒出流过柱子的液体，将MinElute柱放回同一收集管中，加500μlBuffer QG于MinElute柱内，离心1 min，倒出流过柱子的液体，将MinElute柱放回同一收集管中，加750 μlBuffer PE于MinElute柱内洗涤，放置5 min后离心1 min，倒出流过柱子的液体，离心1 min，将MinElute柱放入1个干净的1.5 ml离心管，加10 μlBuffer EB于MinElute柱上的膜中心，洗脱DNA，柱子放置1 min后离心1 min，收集洗脱的DNA。

2. hMIF重组质粒构建

将pET-11b载体用BamH I和Nde I双酶切消化4 h后与回收的PCR产物用T_4 DNA连接酶4℃过

夜连接，取一无菌离心管，加入已制备好的感受态DH5α菌200μl，冰浴，吸取1μl连接产物加入管中，转化DH5α菌，轻拍管壁混匀，冰浴30分钟， 42℃水浴90秒,取出离心管再冰浴2分钟，加入800μl室温的2×YT培养液混匀，37℃摇床220 rpm振荡培养1 h，分别将50 μl、200 μl及剩下的全部转化菌液涂于3个含羧苄青霉素抗性的2×YT培养板上，37℃恒温培养箱过夜培养，次日挑取白色菌落接种于2×YT培养基扩大培养。

3. hMIF重组质粒酶切鉴定

沉淀菌体，12000 rpm，离心1 min，弃上清，尽量吸干，用150 μl预冷的溶液Ⅰ将上述细菌沉淀重悬,剧烈振荡，新鲜配制的溶液Ⅱ300 μl轻轻颠倒混匀5次,冰浴3-5 min,使其澄清，加入预冷的溶液Ⅲ150 μl，轻轻混匀后冰浴10 min，使蛋白质均匀分布于水相中，加入预冷的溶液Ⅳ150 μl，轻轻混匀，12000 rpm离心10 min。小心吸取水相（约400 μl）移于另一1.5 ml离心管中，加入2 μl RNaseA（10 μg/ml），55℃水浴10 min。再加400 μlTris-酚及400 μl氯仿，涡振混匀，12000 rpm离心10 min。取上清至另一装有600 μl异丙醇的1.5 ml离心管中，来回颠倒几次，4℃ 12000 rpm离心10 min，弃上清。用70%乙醇1 ml洗涤DNA 2次，12000 rpm离心3 min，弃上清，室温干燥10-20 min，加入TE 20 μl溶解质粒DNA，-20℃ 保存。

取10μl质粒用BamH Ⅰ Nde Ⅰ双酶切后跑1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定，酶切反应体系为：PET11b/hMIF质粒DNA 10 μl，BamHⅠ1 μl，NdeⅠ1 μl，10× buffer K 2 μl，ddH_2O 6 μl，离心30 s，37℃ 水浴 4h，取酶切产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳，可见切下的一个大小约为353 bp的特异片段，表明pET11b质粒中已插入大小约为353 bp的片段（图2）。

4. hMIF重组质粒插入片断测序

将两个pET11b/hMIF重组质粒送往上海博亚公司测序，并应用Blast软件将测序结果与GenBank的hMIF cDNA进行同源性分析。测序的结果显示，插入片段长度为353 bp，与GenBank中报道的hMIF cDNA序列完全一致（图3）。

5. hMIF蛋白的诱导表达及鉴定

(1) 转化BL21菌

取上次提取的重组pET11b/hMIF质粒转化BL21 (DE3)菌，涂布于含羧苄青霉素抗性的LB固体培养基，37℃培养箱过夜培养,次日挑取白色菌落接种于LB培养基扩大培养,用碱裂解法提取质粒，取质粒用BamHI Nde I双酶切4 h，酶切体系同前，并取酶切产物10 μl行1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定与设计值一致。

(2) hMIF蛋白的诱导表达

将扩大培养的转pET11b/hMIF重组质粒的BL21菌，用LB固体培养基筛选单克隆菌落,将转

化菌扩大培养,测细菌OD值达0.6-0.8时加入终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导，按时间点2、4、6、8、10、12 h收集诱导的细菌。结果表明，IPTG诱导的细菌出现分子量约为12.5 kD的特异性蛋白条带，与预期hMIF的分子量值相符，且6 h时hMIF表达量最高，约占细菌总蛋白的30%。再将IPTG诱导6 h的BL21重组菌用裂菌液破菌，离心后分别取上清和沉淀电泳，未诱导的菌液和诱导6 h的菌液分别做阴性和阳性对照，结果在上清中与阳性对照hMIF蛋白条带相对应的位置发现特异蛋白条带，而沉淀无此蛋白条带，证实hMIF蛋白为可溶性表达。

(3) hMIF蛋白的鉴定

取诱导产物做15%Tricine-SDS PAGE电泳检测，分析细菌hMIF的表达情况。将各时间点诱导菌12000 rpm离心10 min，收集沉淀，按分离胶浓度15%、浓缩胶6%配胶，取各收集管的液体与2×加样缓冲液等体积混合，100℃煮沸5-10 min，按凝胶每孔上样20μl样品,同时以中分子量蛋白质标准作对照，按120 V恒压电泳2 h，80V 30 min行垂直电泳，电泳完溴酚蓝已出胶，取下凝胶，用考马斯亮兰R-250染液室温下染色6h，从染色液中取出凝胶，脱色液多次脱色至背景无色后置去离子水中观察，扫描凝胶并摄像。

（4）hMIF 重组蛋白可溶性鉴定

将 10 mlIPTG 诱导 6 h 的菌液加入到离心管中，5000 rpm 离心 10 min，收集细菌，1 mlGTE 液重悬细菌,5000 rpm 离心 5 min,弃上清,1 ml GTE 重悬细菌,加入 100μl 溶菌酶(10 mg/ml)，混匀，冰浴 20 min，再依次加入 20μl 脱氧胆酸钠（40 mg/ml)、10μl $MgCl_2$（1mol/L）和 5μl DNase Ⅰ（1 mg/ml)，室温下颠倒混匀使溶液由稠变稀，12000 rpm 离心 10 min，分别取上清和沉淀电泳，未诱导的菌液和诱导 6 h 的菌液分别作为阴性对照和阳性对照，观察电泳结果。

6. hMIF重组蛋白的纯化及免疫印迹鉴定

（1）hMIF重组蛋白的纯化

挑取单克隆重组LB菌，将高表达菌株在发酵罐内扩大培养并诱导，将得到的表达菌用20 mmol/L pH 5.8的PBS混匀后超声破菌，10000 ×g离心30 min取上清，初纯化选择装填SP Sepharose Fast Flow 的阳离子交换柱，缓冲液（20 m mol/L PBS，pH 5.8）平衡后将上清上柱，用0～50%梯度的洗脱液(1 mol/L NaCl，20 mmol/L PBS，pH 5.8)洗脱10个柱床体积，100%的洗脱液再洗脱5个柱床体积;得到的初纯品上样于用缓冲液（0.75 mol/L $(NH_4)_2SO_4$20 mmol/L PBS，pH 5.8）平衡好的Hitrap butyl FF疏水层析柱，0～100%梯度的洗脱液(20 mmol/LPBS，pH 5.8)洗脱10个柱床体积，100%的洗脱液再洗脱10个柱床体积，收集得到成品蛋白，然后分别取样行Tricine SDS-PAGE电泳，IPTG未诱导的重组菌作阴性对照，诱导6h的重组菌为阳性对照，纯化后纯度达到95％以上（图4）。

（2）hMIF重组蛋白的免疫印迹鉴定

配制8%Tricine SDS-PAGE分离胶和6%浓缩胶。电泳80V 30 min，120 V1 h。电泳结束后，取下凝胶，一块用考马斯亮兰R-250染液快速染色，另一块置于转印缓冲液中平衡20 min-60 min，剪下凝胶大小的PVDF膜和厚滤纸，将PVDF膜在100%的甲醇中浸泡1 min后与滤纸一起置于转印缓冲液中浸泡5 min，22V恒压电转印1 h，取下PVDF膜，丽春红S室温染色5 min，观测结果，蒸馏水洗膜5 min×3次，TBST洗涤10 min×3次，室温下5%脱脂奶粉封闭膜过夜，TBST洗涤10 min×3次，加入用3%BSA/TBS稀释至1:1000的鼠抗人MIF单克隆抗体，37℃孵育4 h，TBST洗涤10 min×3次，加入3%BSA/TBS稀释至1：5000的羊抗鼠IgG，37℃孵育2 h，TBST洗涤10min×3次，配制底物缓冲液，5 mg DAB溶于10 mlTBS中，再加入10 μl30%H_2O_2混匀，膜浸泡于缓冲液中，轻轻摇动直至显色，蒸馏水终止反应，将膜取出晾干，扫描存档。结果显示，BL21转化菌表达纯化的蛋白能与抗hMIF抗体发生反应，而阴性对照GST-hMAM融合蛋白则与上述抗体无反应（图7）

7. hMIF重组蛋白浓度、纯度鉴定

(1) Lowry法(Folin酚法)测定hMIF蛋白质含量

制备标准曲线：

	空白管	标准管1	标准管2	标准管3	标准管4	标准管5
标准蛋白液(ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水(ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
试剂甲(ml)	5.0(室温放置10 min)					
试剂乙(ml)	0.5(迅速混匀，反应30 min)					

在650 nm波长下，以空白管为对照调零，分别测定各管的吸光度，以蛋白浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，只作标准曲线。

将待测蛋白稀释后，紫外分光光度计测定A_{260}值和,A_{280}值。根据公式，蛋白浓度C＝(1.45×A_{280}- 0.75×A_{260})×稀释倍数，计算出待测蛋白的粗略浓度，然后将蛋白样品用蒸馏水稀释至25-250μg范围，按照上表的操作程序反应，测定出650 nm吸光度值，然后在标准曲线上查出相应的浓度，在乘以稀释倍数计为待测蛋白的浓度，多管计算平均值，测得浓度为1.145 g/ml。

(2) 纯化产物用高效液相色谱法（HPLC）进行纯度测定和hMIF得率计算。

将纯化的蛋白用HPLC分析其纯度，可知经SP Sepharose Fast Flow阳离子交换柱初纯化后hMIF蛋白的纯度达92.62%以上（图5），再次Hitrap butyl FF疏水层析纯化后hMIF纯度可达95.40%（图6）。经计算，1g湿菌可得到53mg纯度为95.40%的hMIF蛋白，得率约为17.7%。

8. hMIF免疫Balb/c小鼠

将纯化的 hMIF 蛋白从-80℃冰箱取出，溶解后过滤，Lawry 法测定蛋白含量，pH5.8 的 20mmol/LPBS 将其稀释到 0.5mg/ml。选取 15 只 6 周龄、体重约 20g 的雌性 Balb/c 小鼠，分为 A、B、C 三组免疫。抗原乳化选用双注射器互推法。首次免疫时，将 hMIF 与等体积的弗氏完全佐剂乳化混合，每只小鼠按 100μg hMIF 的量皮内多点加腹腔注射。第 14 和第 28 天分别进行第二次第三次免疫，佐剂改用不完全弗氏佐剂，抗原量、注射体积和途径不变，第 3 次免疫后间接 ELISA 法测定效价。融合前 3 天进行加强免疫，每只小鼠腹腔注射不加佐剂的 100μghMIF，3 天后细胞融合。

9. 被 hMIF 免疫的 Balb/c 小鼠血清效价测定

第 3 次免疫后 10 天从小鼠尾静脉取血检测血清抗体效价。将新购酶标板用双蒸水浸泡过夜，晾干后备用；用包被液将抗原稀释为最佳工作浓度 5μg/ml，每孔加 100μl 抗原液，37℃温育 1 小时后，以胶带封口，于 4℃过夜，倒尽板孔中液体，吸干孔内残余反应液，加满洗涤液过一次，再注满洗涤液缓缓晃动 2min，倾去，反复五次，最后将反应板倒置在吸水纸上，使孔中洗涤液流尽。自然干燥后以胶带封口，此为已知抗原包被的酶标板，加封闭液 300μl，37℃孵育 1-1.5 小时，洗涤 5 次；采血及稀释血清：捏住鼠尾，75%酒精消毒后用剪刀在尾静脉剪一缺口，取血 20μl，2000rpm 离心 30min,取上清 1μl 加入 999μl 抗体稀释液混匀，并进行倍比稀释,从 1:100 至 1:3200，将稀释的被检血清每孔加入 100μl，同时取小鼠免疫前血清 1：100 稀释做阴性对照，抗体稀释液做空白对照。37℃孵育 1-1.5 小时，洗涤 5 次；将辣根过氧化物酶羊抗小鼠 IgG 稀释到 1:10000，每孔加 100μl，37℃孵育 1-1.5 小时,洗涤 5 次；加邻苯二胺溶液 100μl/孔，室温暗处 10--15 分钟，每孔加终止液 100μl 观察结果,OPD 氧化后的产物呈橙红色，用酶联免疫检测仪记录 492nm 读数，以空白对照孔调零后测各孔 OD 值大于阴性对照 OD 值的 2.1 倍，即为阳性。血清效价达到 1:3200，可用于细胞融合。

10. 小鼠脾细胞悬液和 SP2/0 细胞悬液的制备

取一只免疫好的 Balb/c 小鼠，摘除小鼠眼球放血处死，眼血离心后收集血清作 ELISA 的阳性对照,无菌操作取出脾脏，放入盛有 10ml 不完全培养基的玻璃皿中，洗涤，小心剥去周围的结缔组织和脂肪组织,换一玻璃皿，将脾脏捞出，置于 200 目不锈钢网中，用注射器的内芯研磨，同时不时用不完全培养基冲洗，使脾细胞穿过网孔进入溶液中,将脾细胞移至 10ml

玻璃离心管中，800rpm 水平离心 10min，去上清。同法用不完全培养基 10ml 洗涤细胞 1 次，离心收集沉淀的细胞,将细胞用 10ml 不完全培养基重悬混匀，细胞计数约为 1×10^8 个细胞。

将 SP2/0 细胞从液氮中取出，迅速放入 37℃水浴中，不断摇晃，直至细胞溶液完全溶解，将细胞转移到 10ml 离心管中，800rpm 水平离心 10min，弃上清，10ml 完全培养液重悬沉淀，把细胞悬液转移到 50ml 培养瓶中，置 37℃、5%CO2 培养箱中培养。待细胞生长良好后用含 8-AG 的选择培养基筛选细胞一周；融合前 2 天，将 1 瓶细胞传至 4 瓶，则融合当天细胞正处于对数生长期，活力正好，细胞大小均匀，圆而透亮，融合当天，用弯头滴管将 SP2/0 细胞从管壁上轻轻吹下，收集于离心管中，离心，弃上清，沉淀用不完全培养基洗涤后，10ml 不完全培养基重悬，细胞计数，约为 5×10^7。

11.滋养细胞的制备

取一只未免疫的 Balb/c 小鼠，摘眼球放血处死，75%乙醇浸泡消毒 5min，剪开小鼠皮肤，用镊子提起腹膜，用剪刀剪一小口，弯头滴管吸取预冷的不完全培养基冲洗腹腔，将洗液吸至 50ml 离心管中。同法用不完全培养基冲洗腹腔 3 次，收集洗液，室温下 1000rpm 水平离心 10min，去上清，10ml 不完全培养基重悬细胞并计数。

12. 骨髓瘤细胞和脾脏 B 淋巴细胞融合

融合前将 PEG1500 置于 37℃培养箱中预温，吸取 1×10^7 个骨髓瘤细胞悬液和 1×10^8 个脾脏 B 淋巴细胞悬液（细胞数 1：10）至一个 50ml 离心管中，补加 30ml 不完全培养基，充分混匀，1000rpm 离心 10min，弃上清，轻弹管底，使细胞团松散成糊状，将离心管 37℃水浴，用滴管吸取 0.8ml 预温的 50%PEG1500 溶液，在离管底约 2cm 处沿管壁慢慢加入细胞中，边加边转动离心管，在 1min 左右加完，然后静置 90s，逐滴加入 37℃预温的不完全培养基 30ml 终止融合，3min 之内加完，速度先慢后快，动作轻柔，将离心管在 37℃培养箱中静置 5min，取出离心管，1000rpm 离心 5min，弃去上清，加入 10ml HAT 培养基重悬细胞，轻轻吹打，混匀，将融合细胞接种至已铺有滋养细胞的 96 孔细胞培养板，按 100μl/孔，每块培养板留 6 孔接种 SP2/0 细胞，作为 HAT 选择的阴性对照，置 37℃，5%CO_2 培养箱中培养。

13.融合细胞的选择性培养

融合后第 5 天即可在倒置显微镜下观察细胞的生长情况，并补加 HAT 培养基 100μl，第 10 天可用间接 ELISA 法测杂交瘤效价，第 14 天换 HT 培养基培养。

14. 杂交瘤细胞的筛选

融合后 10～14 天，待细胞长到满培养孔的 1/4-1/2 孔底时，采用间接 ELISA 法检测培养上清，筛选阳性克隆；以 hMIF 抗原包被酶标板（0.5ug/孔），4℃过夜，洗涤缓冲液洗涤 5 次，每次 5min，拍干液体，每孔加入封闭液 300μl，37℃孵育 2h，加入 100μl 细胞培养上清，阳

性对照选小鼠的免疫血清，阴性对照选 SP2/0 培上清，空白对照用洗涤液，37℃孵育 2h；洗涤酶标板：每孔加入 100μl1：10000 稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠 IG 抗体，37℃孵育 2h；洗涤，拍干液体，加新鲜配制的邻苯二胺溶液 100μl /孔，室温暗处反应 10--15 分钟，加终止液每孔 100μl 终止反应，酶标仪检测 492nm 吸光度值。

结果为以重组人巨噬细胞移动抑制因子为抗原，先后免疫 BALB/C 小鼠 15 只，共融合 5 次，成功 3 次，经 3 次克隆化和 ELISA 筛选后，得到 1 株分泌抗 hMIF 抗体的杂交瘤细胞株 $2D_{10}$，其细胞培养上清效价达到 1:6400,这株杂交瘤细胞经数次冻存，体外传代培养 3 个月以上均能稳定分泌抗体。

15. 阳性杂交瘤细胞的克隆化

筛选出阳性克隆后，即应立即采用有限稀释法将阳性杂交瘤细胞进行克隆化培养，制备饲养细胞，用 10ml 不完全培养基重悬，收集阳性克隆细胞并计数，用不完全培养基将阳性克隆细胞稀释到 100 个/20ml，取一块预先已加有滋养细胞的 96 孔细胞培养板，加入 200μl 细胞悬液，将剩下的阳性克隆细胞转移到 24 孔板中扩大培养，收集细胞液氮冻存，同时将培养板在 37℃，5%CO_2 培养箱培养，第 3 天后显微镜下观察细胞生长情况，10 天后可用 ELISA 法检测效价，并将最强的阳性克隆再次克隆化，直至细胞阳性率达 100%，即可定株；测取定株的杂交瘤细胞株培养上清的效价后再将定株的杂交瘤细胞扩大培养并冻存于液氮中。

16. 杂交瘤细胞的核型分析：

将定株的杂交瘤细胞培养至对数生长期后，取 1 瓶细胞制作染色体标本，新鲜 Giemsa 染色液染色，400 倍油镜下观察染色体形态和数目，选择染色体分散、无重叠的视野，数码相机摄像存档。

将摄取的的染色体结果计数，$2D_{10}$ 染色体数目在为 84，接近小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞染色体数目的总和，说明该株杂交瘤细胞为小鼠脾细胞与 Sp2/0 细胞的融合体。大多数染色体为端着丝点染色体，并有中部和亚中部着丝点染色体，可知该细胞是由小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合而成（图 8）。

17. 抗 MIF 单克隆抗体亚类的鉴定

采用美国 Roche 公司 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit 操作按说明书进行。取新鲜的杂交瘤细胞培养上清，用 0.01M pH 7.4 的 PBS 稀释至 1：10，取 150μl 已稀释的培养上清加入反应管中，室温静置 30s，然后涡振 10s 使反应管底的乳胶完全溶解，将试纸条插入至反应管，使试纸条底部的黑色端完全浸入在液体里，室温静置 5～10min，出现蓝色条带的区域所对应的亚类即为 IgG 的亚类。经单抗亚类鉴定试纸条测定，杂交瘤单克隆细胞株 $2D_{10}$ 分泌的 IgG 单克隆抗体亚类属于 IgG_1，轻链是 κ 型。

18. 抗 MIF 单克隆抗体的免役印迹鉴定

取最后纯化的 hMIF 蛋白行 8%Tricine SDS-PAGE 电泳，电泳结束后取下凝胶，一块用考马斯亮兰 R-250 染液快速染色，另一块置于转印缓冲液中平衡 20min-60min，22V 恒压电转移 1 小时，转移后的 PVDF 膜在丽春红 S 中染色 5min，再用蒸馏水脱去红色，将转移膜置于封闭液中，室温封闭过夜，弃去封闭液，用 1×TBST 漂洗膜 3 次，每次 10～15min，加入以 1:10 稀释的杂交瘤培养上清，37℃孵育 4h，1×TBST 漂洗膜 3 次，每次 10～15min，加入以稀释到 1:5000 的 HRP-羊抗小鼠 IgG，37℃孵育 2h，1×TBST 洗涤 3 次，每次 10～15min，加入 DAB 显色液，轻摇至显色，蒸馏水漂洗终止反应，观察分析结果并摄像。免疫印迹结果表明，该株单抗的培养上清能与转移至 PVDF 膜上的 hMIF 蛋白形成单一的蛋白质染色带，证明该株单抗是针对 hMIF 的特异性单克隆抗体（图 9）。

19. ELISA 鉴定抗 MIF 单克隆抗体的特异性

将 hMIF、IL-11、Insulin 、IBP、GST-hMaM 按每孔 0.5μg 分别包被 ELISA 酶标板，一抗用抗 hMIF 杂交瘤细胞株的培养上清，按间接 ELISA 法检测该株细胞分泌的单抗对上述抗原的交叉反应情况。下表是用 ELISA 鉴定该株抗 hMIF 单抗特异性的结果，可知该株抗体具有较强的特异性，只与 hMIF 反应，与其他所测蛋白无交叉反应。

单克隆抗体的特异性分析

McAb	hMIF	GST-hMam	IL-11	Insulin	IBP
MIF-A_2	+++	—	—	—	—
MIF-D_5	+++	—	—	—	—

其中抗体－抗原结合反应随－、±、＋、＋＋、＋＋＋而递增。

20. 抗 hMIF 单克隆抗体氨基酸序列分析：

经过氨基酸序列分析，抗 hMIF 单克隆抗体轻链可变区氨基端 15 个氨基酸序列为：MDMGGAWDVGDRVTT，重链可变区氨基端 15 个氨基酸序列为：VWSGGSTVKGGRSCG，轻链可变区羧基端 3 个氨基酸序列为：VKR，重链可变区羧基端 3 个氨基酸序列为：SAT。经过液质连用氨基酸序列分析，得到抗 hMIF 单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列为：CRASGRNNAWYKGADGWYKGKAKRYAASSSGVSRSGSGSGTTTSSDATYYCHNDAVYSYGTKVKR，重链可变区的氨基酸序列为：VWSGGSTVKGGRSCGYYASGTSTYSMGMNWVRAGKGWVSSSTSVDTYYYADSVKGRTSRDNAKNSYDYDVSRADTAVYYCARDGASSGWGVDATGSRVSCYWGGTVSSWMSAT。

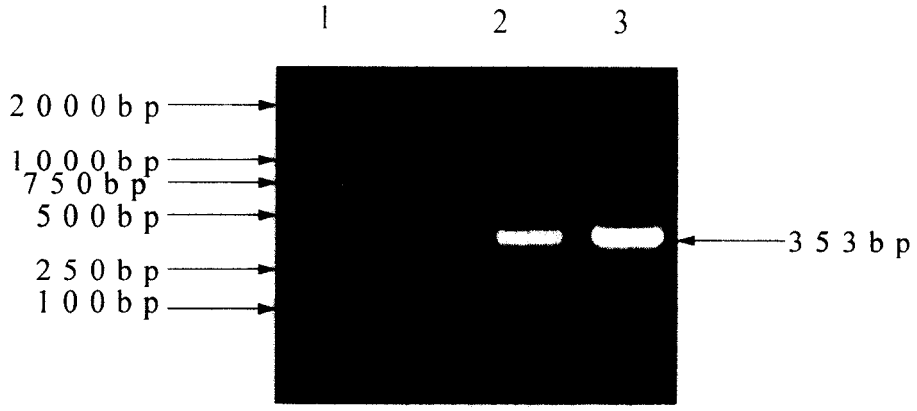
1
2
3
2000bp
1000bp
750bp
500bp
250bp
100bp
353bp

图 1

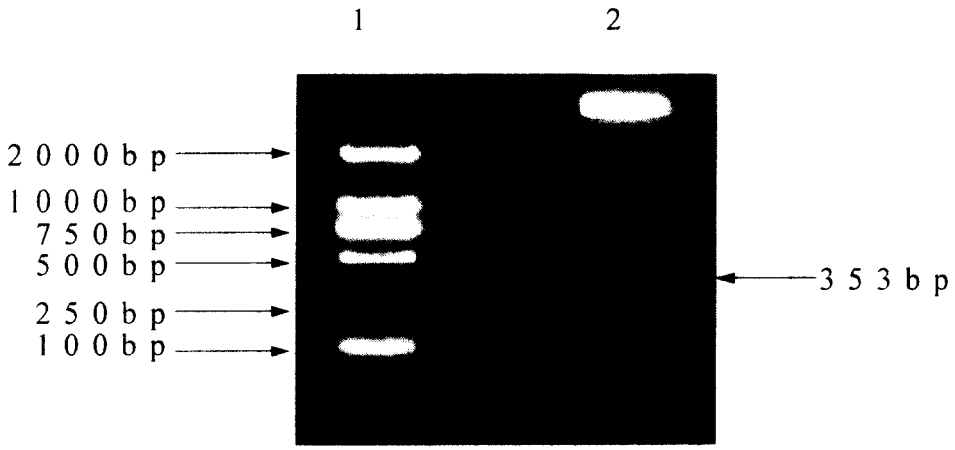
1
2
2000bp
1000bp
750bp
500bp
250bp
100bp
353bp

图 2

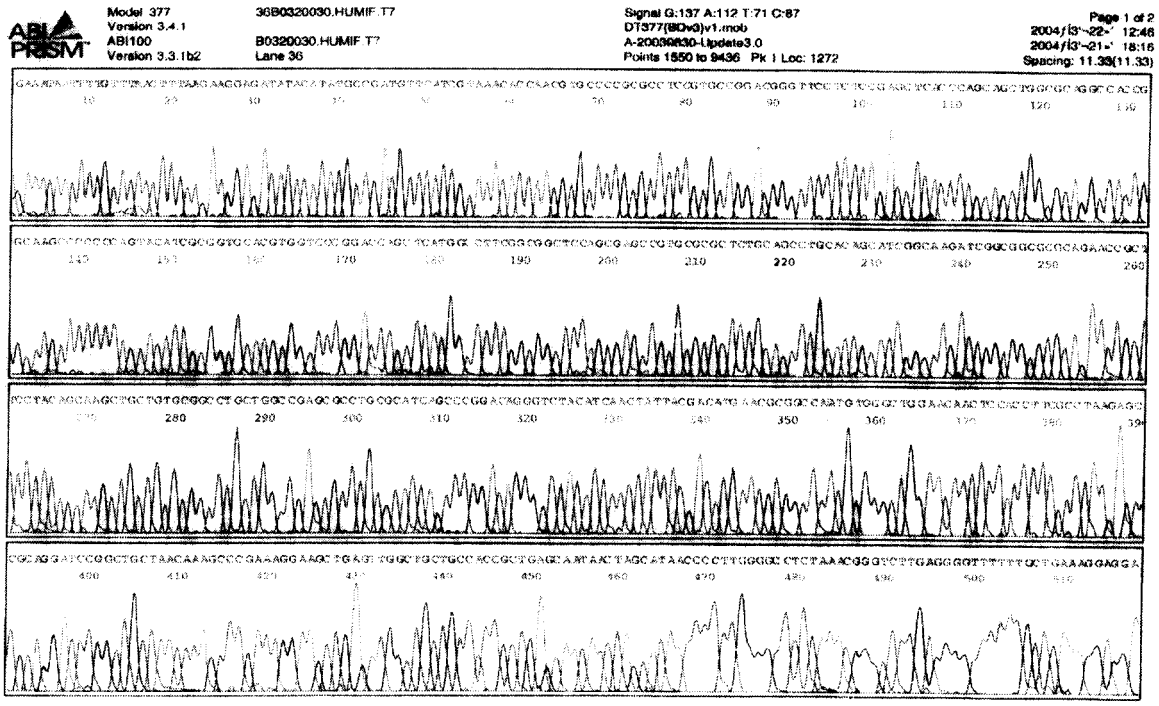
Model 377
Version 3.4.1
ABI100
Version 3.3.1b2
36B0320030.HUMIF.T7
B0320030.HUMIF T7
Lane 36
Signal G:137 A:112 T:71 C:87
DT377(BDv3)v1.mob
Points 1550 to 9436 Pk 1 Loc: 1272
Page 1 of 2
Spacing: 11.33(11.33)

图 3

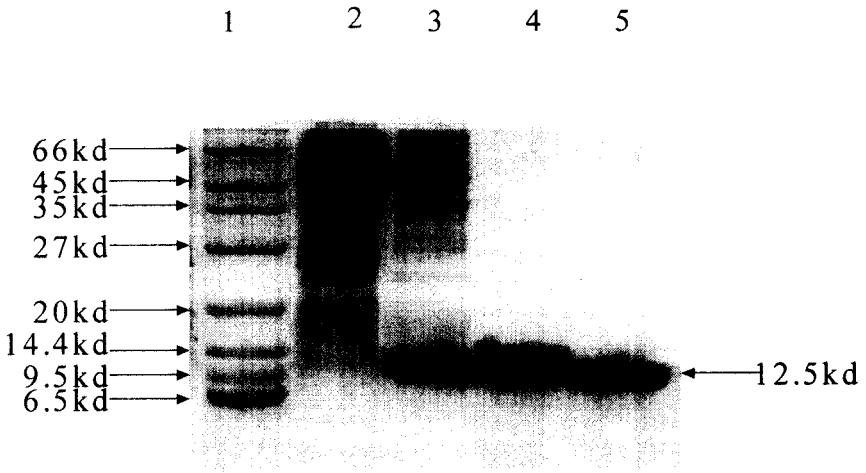
1
2
3
4
5
66kd
45kd
35kd
27kd
20kd
14.4kd
9.5kd
6.5kd
12.5kd

图 4

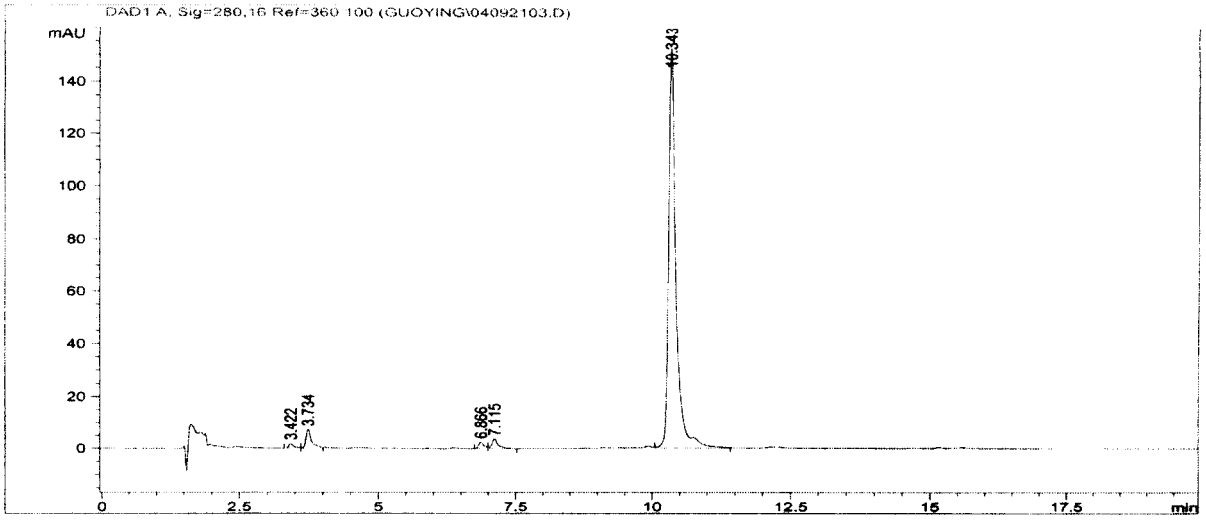
DAD1 A, Sig=280,16 Ref=360,100 (GUOYING\04092103.D)
mAU
140
120
100
80
60
40
20
0
3.422
3.734
6.866
7.115
10.343
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
min

图 5

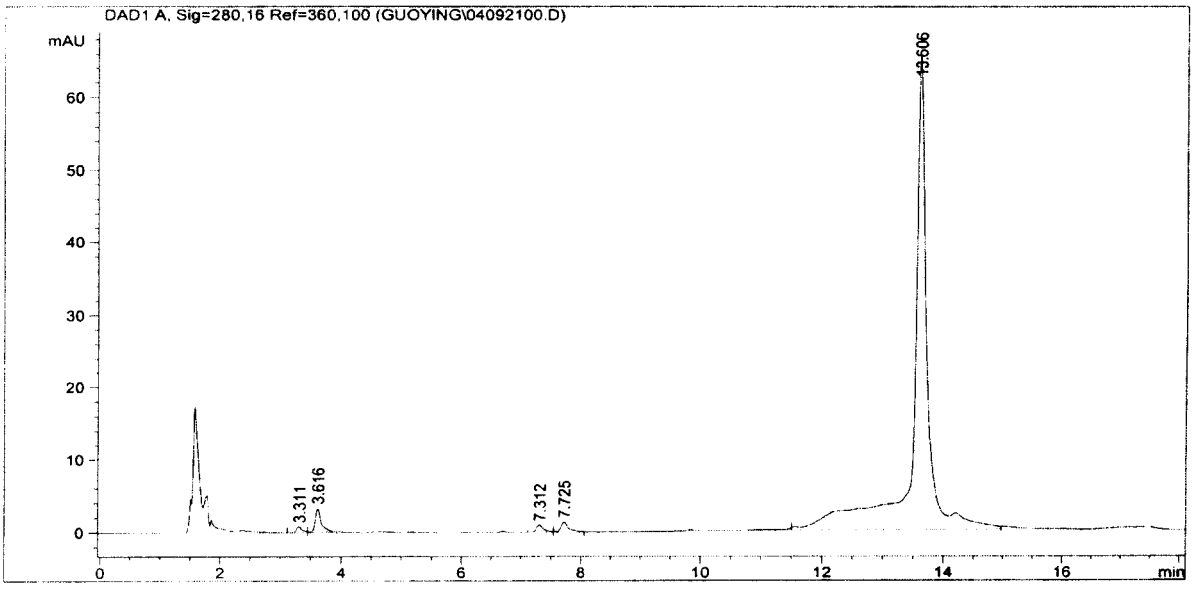
DAD1 A, Sig=280,16 Ref=360,100 (GUOYING\04092100.D)
mAU
60
50
40
30
20
10
0
3.311
3.616
7.312
7.725
13.606
0
2
4
6
8
10
12
14
16
min

图 6

图 7

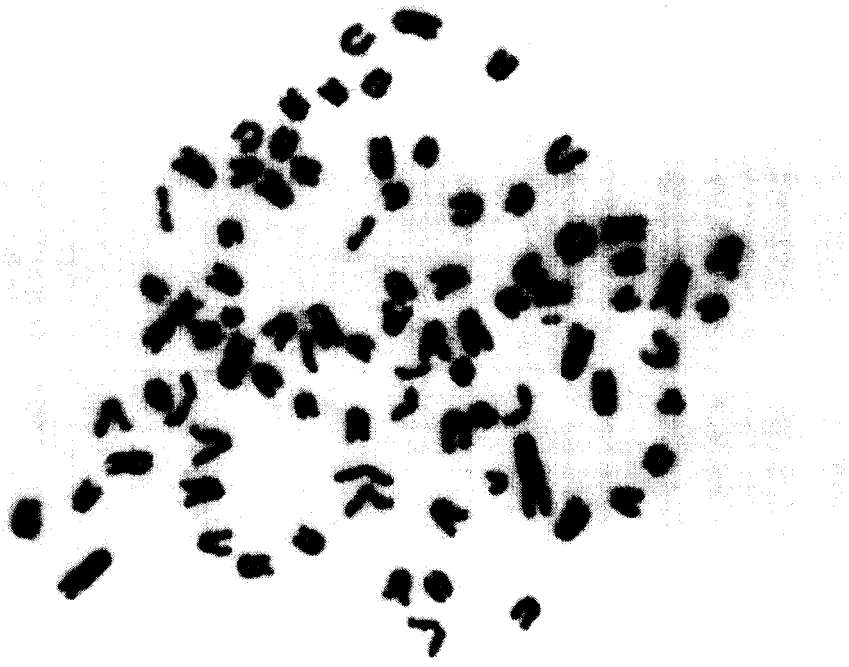

图 8

图 9

专利名称(译)	一种巨噬细胞转移抑制因子单克隆抗体及其制备方法		
公开(公告)号	CN101041820A	公开(公告)日	2007-09-26
申请号	CN200610070899.X	申请日	2006-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	胡川闽 黄洪涛 王健		
申请(专利权)人(译)	胡川闽 黄洪涛 王建		
当前申请(专利权)人(译)	胡川闽 黄洪涛 王建		
[标]发明人	胡川闽 黄洪涛 王建 易维京 李鹏 高利宏		
发明人	胡川闽 黄洪涛 王建 易维京 李鹏 高利宏		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/31 C12N1/21 C07K16/18 G01N33/53 A61K39/395 A61P29/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物医药工程技术领域，是包括涉及抗人巨噬细胞转移抑制因子(hMIF)单克隆抗体制备及其氨基酸序列获得的方法。本发明经逆转录聚合酶链式反应从人乳腺癌细胞株MDA - MB453和人乳腺癌组织扩增出hMIF基因，构建pET - 11b/hMIF重组质粒，在大肠杆菌BL21(DE3)表达并纯化后免疫Balb/c小鼠，通过杂交瘤技术获得小鼠脾细胞和SP2/0细胞融合的抗hMIF单克隆抗体高表达高效价杂交瘤细胞株，即2D10，再经抗体亚类鉴定和抗体的特异性实验，杂交瘤单克隆细胞株2D10分泌的单克隆抗体属于IgG，轻链是K型，其轻链可变区的氨基酸序列为：CRASGRNNAWYKGADGWYKGKAKRYAASSSGVSRSGSGSGTTTSSDATYYCHNDAVYSYGTKVKR，重链可变区的氨基酸序列为：VWSGGSTVKGGRSCGYYASGTSTYSMGMNWVRAGKGWVSSSTSVDTYYYADSVKGRTSRDNAKNSYDYDVSRADTAVYYCARDGASSGWGVDATGSRVSCYWGGTVSSWMSAT。本发明通过上述技术方案获得的抗hMIF单克隆抗体，为进一步的人源化改造提供有效的依据，可用于检测动物和人体中巨噬细胞转移抑制因子含量，为进一步的临床治疗全身性炎症反应综合征奠定基础。

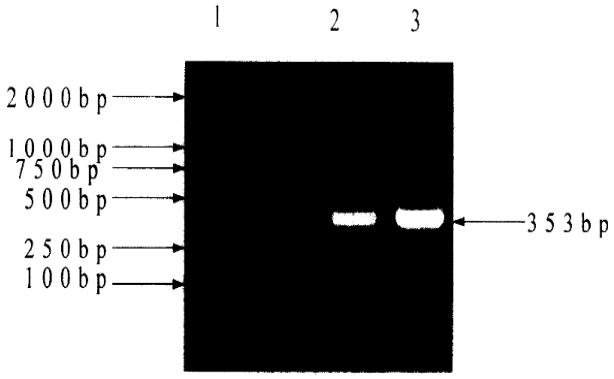

图1