

[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 200610089800.0

[51] Int. Cl.

*C12N 5/18 (2006.01)*  
*C07K 16/40 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*  
*C12Q 1/34 (2006.01)*

[43] 公开日 2007 年 1 月 3 日

[11] 公开号 CN 1888057A

[22] 申请日 2006.7.18

[21] 申请号 200610089800.0

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院野战  
输血研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 章扬培 徐莉娟 李素波 季守平  
刘至玄 高红伟 宫 锋

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
代理人 鲁 兵

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称

杂交瘤细胞株及其产生的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 单克隆抗体

[57] 摘要

本发明公开了杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 及其产生的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 单克隆抗体。此外,本发明还提供了一种人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 水平的 ELISA 检测方法,该方法包括以下步骤:1)用抗  $\alpha$ -GalA 多抗血清或纯化的  $\alpha$ -GalA 抗体包被酶联板,洗板;2)封闭经包被的酶联板,洗板;3)加待测样品,洗板;4)加单克隆抗体  $\alpha$ -GalA McAb,洗板;5)加酶标二抗,洗板;6)加底物显色;7)终止反应;8)测定 OD<sub>450</sub> 值。本发明不仅为进一步研究人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的生物学功能及其作用机理奠定了基础,而且将在布莱氏病疾病的临床诊断中发挥重要作用。

1、杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731。

2、权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 产生的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的单克隆抗体。

3、一种制备权利要求 2 所述单克隆抗体的方法，包括以下步骤：

1) 合成具有序列 SEQ ID No: 2 氨基酸残基序列的多肽；

2) 将多肽与载体蛋白联结得到半抗原；

3) 将半抗原免疫动物；

4) 取免疫动物的脾细胞，将其与骨髓瘤细胞融合，得到杂交瘤细胞；

5) 培养杂交瘤细胞，得到单克隆抗体。

4、根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 1) 中多肽的合成方法为固相合成法；步骤 2) 中的载体蛋白联结于所述多肽的氨基端或羧基端，所述载体蛋白为钥孔虫戚血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白或卵清白蛋白；步骤 3) 中用于制备单克隆抗体的免疫动物为小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、猪、驴或马；步骤 4) 中的骨髓瘤细胞为小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0。

5、根据权利要求 3 或 4 所述的制备方法，其特征在于：继续用 Protein G-Sepharose 亲和层析法对步骤 5) 获得的单克隆抗体进行纯化。

6、权利要求 2 所述的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的单克隆抗体在检测人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 水平中的应用。

7、根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于：所述人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 水平的检测方法为酶联免疫吸附法。

8、根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于：所述用酶联免疫吸附法检测人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 水平包括以下步骤：

1) 用抗  $\alpha$ -GalA 多抗血清或纯化的  $\alpha$ -GalA 抗体包被酶联板，洗板；

2) 封闭经包被的酶联板，洗板；

3) 加待测样品，洗板；

4) 加权利要求 2 所述的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的单克隆抗体，洗板；

5) 加酶标二抗，洗板；

6) 加底物显色；

7) 终止反应；

8) 测定 OD<sub>450</sub> 值。

---

9、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于：所述步骤 5) 中的二抗为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的抗鼠或抗兔抗抗体。

10、一种检测人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 水平的试剂盒，包括权利要求 2 所述的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的单克隆抗体。

## 杂交瘤细胞株及其产生的抗人 $\alpha$ -半乳糖苷酶A单克隆抗体

### 技术领域

本发明涉及杂交瘤细胞株及其产生的抗人 $\alpha$ -半乳糖苷酶A ( $\alpha$ -GalA) 单克隆抗体。

### 背景技术

法布莱氏病 (Fabry Disease), 又称 Anderson-Fabry 病或弥漫性躯体血管角质瘤。该病是一种罕见的 X 染色体连锁遗传的鞘糖脂类代谢疾病, 是因定位于 Xq22 的  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因 A 突变致使其底物酰基鞘氨醇三己糖苷 (Gb3) 和酰基鞘氨醇二己糖苷的末端半乳糖酰基不能被降解在体内蓄积导致的, 是自 Gaucher 病后发现的第 2 种溶酶体贮积病 (Lysosomal storage diseases, LSDs)。

法布莱氏病在男性中的发病率为 1/40000-1/60000, 分为典型和非典型两类, 发病年龄约为 10 岁。典型的法布莱氏病早期症状为四肢感觉异常、灼烧感, 耳鸣、听力受损、角膜静脉迂曲等; 非典型症状为心脏肥厚和 (或) 轻度蛋白尿。随着病情发展, 年龄增加, 器官老化, 将出现心衰、肾衰、出血等并发症, 若不及时治疗, 患者一般在 40 岁左右就会死于肾衰、局部缺血、出血或心肌梗死等。在女性中, 该病大多是由 X 染色体的随机失活和  $\alpha$ -GalA 基因突变引起的。一般女性比男性的发病时间晚 2-5 年。研究表明大多数患者体内  $\alpha$ -GalA 的活性是正常人的 1-10%, 但是约有 1/3 的女性携带者与正常人相当, 一般在 40-50 岁时才表现出典型的法布莱氏病症状。

如果法布莱氏病患者能在发病初期或者发病前期得到确诊与治疗, 就可以预防肾脏、心脏和神经系统的并发症; 此外, 随着年龄的增加, 病情的恶化, 晚期治疗只是起到阻止鞘糖脂在肾脏、心脏和神经系统累积的作用, 因此该病的早期诊断尤为重要。

目前, 对该病的早期诊断存在较大障碍。这是因为在发病早期, 特别是儿童阶段, 没有明显症状, 常被误诊为其它疾病, 如风湿热、神经机能病、急性阑尾炎、生长痛等, 因而, 过去只有在出现典型的临床症状后, 再根据家族病史、临床症状和病理切片, 并借用生物化学诊断法, 即测定血浆、尿和外周血白细胞中的  $\alpha$ -GalA 活性及蛋白含量进行确诊。但是, 用  $\alpha$ -GalA 酶活测定法进行诊断存在一定局限性, 因为约有 1/3 的女性携带者被漏诊。

随后, 研究人员又用分子生物学方法进行了  $\alpha$ -GalA 基因突变的研究。根据  $\alpha$ -GalA 多肽上突变位点的位置, 分为破坏酶活性位点的突变和影响蛋白折叠的突变两

类。 $\alpha$ -GalA 基因的突变具有家族特异性，研究还发现了突变的热点—CpG 二核苷酸，是由于甲基胞嘧啶去氨基形成胸苷而发生突变。目前认为用分子生物学方法可以更精确的诊断法布莱氏病，但是近来发现一例  $\alpha$ -GalA 基因没有任何突变却失去活性的法布莱氏病患者。

采用免疫化学方法即抗原抗体特异反应检测人体内的  $\alpha$ -GalA 蛋白是一种简单、快捷的诊断方法。Maria 等采用单抗与干全血斑点 (Dried whole blood spots) 相结合的方法来诊断法布莱氏病，结果发现此法也适合于新生儿筛选项目 (Newborn-screening programs) 诊断的法布莱氏患者和高危人群 (Maria 等, *Immunoquantification of  $\alpha$ -Galactosidase: Evaluation for the Diagnosis of Fabry disease*. *Clinical Chemistry*, 2004, 50(11):1979-1985.)。同时还发现，新生儿的  $\alpha$ -GalA 活性及含量比成年人高 2.5 倍，这也证明了新生儿筛项目序诊断法布莱氏病是可行的 (*Fuller M, Lovejoy M, Broks DA, et al, Immunoquantification of  $\alpha$ -galactosidase: Evaluation for the Diagnosis of Fabry Disease*[J].*Clin Chem*, 2004, 50(11):1979-1985.)。Peter 等从正常人尿液中纯化出  $\alpha$ -GalA，用此酶免疫兔子获得抗血清，然后将抗血清分别与正常人的尿及法布莱氏患者的尿温浴、离心，检测上清，结果发现法布莱氏患者的标本与  $\alpha$ -GalA 单抗不发生反应 (*Rietra PJ, Molenaar JL, et al. Investigation of the  $\alpha$ -Galactosidase Deficiency in Fabry's Disease Using Antibodies against the Purified Enzyme* [J].*Eur J Biochem*, 1974, 46(1):89-98.)。根据 Beutler and Kuhl 命名法，正常人尿中的  $\alpha$ -Gal 活性可以分成两部分， $\alpha$ -GalA 活性和  $\alpha$ -GalB 活性，进一步研究发现在法布莱氏患者体内的  $\alpha$ -GalB 具有弱的  $\alpha$ -GalA 活性，因而检测出  $\alpha$ -GalA 活性并不能对该病进行确切诊断，还需要测定  $\alpha$ -GalA 含量，只有二者相结合才能更好地对法布莱氏病进行鉴定。

因此，为了对布莱氏病患进行确诊，迫切需要一种用人  $\alpha$ -GalA 优势抗原表位合成多肽制备的人  $\alpha$ -GalA 抗体，但是目前国内尚无此方面的报道，更无可与有活性的人  $\alpha$ -GalA 特异反应的单克隆抗体的报道。

### 发明内容

本发明的目的是提供一株可产生抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

本发明所提供的可产生抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 单克隆抗体的杂交瘤细胞株，名称为 AHGA6，该细胞株已于 2006 年 6 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No. 1731。

由上述杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 产生的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的单克隆抗体也属于本发明的保护范围，将其命名为  $\alpha$ -GalA McAb。

所述单克隆抗体可与  $\alpha$ -GalA 上具有序列表中 SEQ ID No: 1 氨基酸残基序列的优势抗原表位特异性结合。

本发明的另一个目的是提供一种所述单克隆抗体  $\alpha$ -GalA McAb 的制备方法，包括以下步骤：

- 1) 合成具有序列表中 SEQ ID No: 2 氨基酸残基序列的多肽；
- 2) 将多肽与载体蛋白联结得到半抗原；
- 3) 将半抗原免疫动物；
- 4) 取免疫动物的脾细胞，将其与骨髓瘤细胞融合，得到杂交瘤细胞；
- 5) 培养杂交瘤细胞，得到单克隆抗体。

在上述构建方法中，步骤 1) 中的多肽是在具有序列表中 SEQ ID No: 1 氨基酸残基序列的  $\alpha$ -GalA 抗原表位的氨基末端再添加一半胱氨酸，以提供巯基，用于与载体蛋白连接。可用固相合成法合成多肽，如叔丁氧（酰）羰基（t-BOC）化学法或 9-氟甲氧羰基（FMOC）化学法。

步骤 2) 中的载体蛋白可为任意一种常用的载体蛋白，如钥孔虫凝血蓝蛋白 (KLH)、人血清白蛋白 (HSA)、牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清白蛋白 (OVA) 等；所述联结方法可采用常规的戊二醛法或 N-琥珀酰亚胺法等；所述载体蛋白既可以联结于所述多肽的氨基端 (N 端)，也可以联结于其羧基端 (C 端)。

步骤 3) 中用于制备单克隆抗体的免疫动物可为小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、猪、驴、马等哺乳动物。

步骤 4) 中的骨髓瘤细胞可为小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0，可用常规方法制备杂交瘤细胞，如聚乙二醇 PEG 法等。

为提高单克隆抗体的纯度，可用 Protein G-Sepharose 亲和层析法对其进行纯化。

本发明的单克隆抗体可用于人  $\alpha$ -GalA 水平的免疫检测中。

所述人  $\alpha$ -GalA 水平的免疫学检测方法可为放射免疫法、酶联免疫吸附法 (ELISA)、夹心式免疫法、免疫沉淀或荧光免疫法等。

上述检测方法中，待测样品的选择可以是多样的，如对于实体瘤患者，可为来自患者肿瘤组织的活检物、组织切片等，对于非实体瘤患者，可为来自患者的血清、淋巴液、尿液等，此外，还可使用细胞系作为标本来源。

所述单克隆抗体与样品发生相互作用的条件，可依据检测方法进行确定。

本领域技术人员知晓，对于固相反应而言，可以将本发明所述单克隆抗体固定于

固相载体，也可以将待测样品固定于固相载体上。反应通常在室温下进行，检测过程中需要洗涤不与本发明所述单克隆抗体结合的样品的步骤。

对于液相反应而言，通常可以向处在特定缓冲体系中的待测样品中直接加入本发明的单克隆抗体，然后在适于抗原抗体发生相互作用的温度下（如室温）进行反应。

所述检测方法中第二抗体的选择取决于本发明单克隆抗体的来源。本领域技术人员知晓如何根据单克隆抗体的来源选择相应的第二抗体。所述第二抗体可以是放射性同位素标记的，包括但不限于使用选自： $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $\text{S}$ 、 $^2\text{H}$ 等；也可以是非放射性同位素标记的，包括但不限于使用选自：辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、生物素、链霉亲和素等标记。本发明所述检测方法中使用的检测剂，取决于检测过程使用的第二抗体的标记物，本领域技术人员知晓如何选择合适的检测试剂。

所述用 ELISA 法检测细胞中的  $\alpha$ -GalA 水平，可包括如下步骤：

- 1) 用抗  $\alpha$ -GalA 多抗血清或纯化的  $\alpha$ -GalA 抗体包被酶联板，洗板；
- 2) 封闭经包被的酶联板，洗板；
- 3) 加待测样品，洗板；
- 4) 加单克隆抗体  $\alpha$ -GalA McAb，洗板；
- 5) 加酶标二抗，洗板；
- 6) 加底物显色；
- 7) 终止反应；
- 8) 测定  $\text{OD}_{450}$  值。

上述检测方法中的反应条件及试剂均可按照常规方法进行选择。

步骤 5) 中的二抗可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的抗鼠或抗兔抗体。

此外，也可以使用本发明单克隆抗体  $\alpha$ -GalA McAb 的 Fab 片段（恒定区）测定样品中的  $\alpha$ -GalA 水平，因为  $\alpha$ -GalA McAb 的 Fab 片段也可特异性结合  $\alpha$ -GalA 上具有序列表中 SEQ ID No: 1 氨基酸残基序列的抗原表位。因此，可以用常规方法构建出具有不同来源  $\alpha$ -GalA McAb 的 Fab 片段的嵌合抗体，以构建用于检测  $\alpha$ -GalA 的抗体。

本发明还提供了一种检测人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 水平的试剂盒。

本发明所提供的检测人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 水平的试剂盒，可包括由上述杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 产生的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的单克隆抗体。

所述试剂盒还可包括与上述杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 产生的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的单克隆抗体发生相互作用的第二抗体。

所述第二抗体可为羊抗鼠 IgG 或兔抗鼠 IgG 等。

所述第二抗体可为经过辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶等标记酶标记的，优选

为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗体上。

试剂盒中还可包括显色液 A 液和显色液 B 液，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲溶液，所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺溶液。

为方便使用，所述试剂盒还可包括检测用的洗涤液，如 PBST 等常规的洗涤试剂；封闭液，如 10% 小牛血清等；抗体稀释液，如 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 等。

本发明提供了一种抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的单克隆抗体  $\alpha$ -GalA McAb。该抗体可与人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 上的表位“LGKQGYQLRQGDN (324-336)” (序列表中的 SEQ ID No: 1) 特异结合，从而可用于科研和临床上，如病人血清、肿瘤组织中  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的定性及定量检测，为布莱氏病疾病的临床确诊提供参考。该抗体制备方法简单，可由杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 直接分泌产生。用本发明的单克隆抗体及其制备的人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 表达水平的检测试剂盒进行人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 表达水平的检测具有灵敏度高的优点。本发明不仅为进一步研究人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 的生物学功能及其作用机理奠定了基础，而且将在布莱氏病疾病的临床诊断中发挥重要作用。

下面结合具体实施例对本发明作进一步详细说明。

## 附图说明

图 1 为杂交瘤细胞 AHGA6 的染色体核型观察结果

图 2 为经纯化的杂交瘤细胞  $\alpha$ -GalA A-GalA McAb 产生的单克隆抗体的 SDS-PAGE 检测结果

图 3 为纯化的单克隆抗体与人  $\alpha$ -GalA 的结合特异性的 Western Blot 检测结果

## 具体实施方式

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

实施例 1、杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 及其产生的抗人  $\alpha$ -半乳糖苷酶单克隆抗体的获得

### 1、人 $\alpha$ -半乳糖苷酶的优势抗原表位分析

人  $\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -GalA) 基因的 mRNA 全长约 1.4kb，编码 429 个氨基酸残基 (NCBI GenBank 号为 NM\_000169)，包含由 31 个氨基酸残基组成的信号肽)。特异性及灵敏度高的抗体应能够与天然抗原表面的表位特异结合。采用 BioSunV1.0 软件分析人  $\alpha$ -GalA 蛋白的空间结构，特别是分析其氨基酸序列的抗原指数、亲水性和表面的可能性三个指标。对上述三个指标进行综合分析，其中自人  $\alpha$ -GalA 氨基酸残基序列的氨基端 (N 端) 第 324-336 位氨基酸残基 (序列表中 SEQ ID No: 1) 为选出的具有较好的抗原抗体结合特性的优势抗原表位。

### 2、人 $\alpha$ -半乳糖苷酶半抗原多肽的合成

采用 Novabiochem 公司生产的 Novasyn KR 树脂, 用固相合成法(潘和平等人, “鲑鱼降钙素及其类似物的合成”, 中国生物化学与分子生物学报, 第 14 卷第 4 期 1998 年 8 月 463-466) 合成步骤 1 获得的具有序列中 SEQ ID No: 1 氨基酸残基序列的人  $\alpha$ -GalA 关键抗原表位, 并在该 13 肽的氨基末端添加一半胱氨酸(C), 以提供巯基, 用于连接载体蛋白(钥孔虫戚血蓝蛋白, KLH)。经检测, 合成多肽的纯度在 90% 以上。

### 3、半抗原多肽与载体蛋白交联

选择钥孔虫戚血蓝蛋白作为半抗原载体蛋白。按照(Sambrook, J. 等人, 分子克隆: 实验指南, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第二版, 856 页) 中的方法, 首先将载体蛋白与 MBS 连接, 形成 MBS/KLH 连接物, 纯化后, 将 MBS/KLH 与步骤 2 合成的含 Cys 的多肽交联。载体蛋白 N 端和 Lys 侧链提供氨基, 合成肽提供游离的巯基(-SH)。

### 4、免疫动物

选取 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 用 30  $\mu$ g 抗原/只免疫 2 个月以上。第一次免疫加福氏完全佐剂(0.10mL/只), 第二次以后加福氏不完全佐剂, 免疫间隔时间为 3 周。细胞融合前 3 天, 取鼠尾静脉血, 用间接 ELISA 法测定效价, 选择效价最高的小鼠尾静脉加强免疫一次。

### 5、细胞融合

#### 1) 免疫脾细胞的制备

将步骤 4 加强免疫三天后的 BALB/c 小鼠处死, 无菌状态下取出脾脏, 去表面包膜及脂肪, 剪碎, 置于平皿中研磨, 加 GKN 溶液(NaCl 8g, KCl 0.4g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.77g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.69g, 葡萄糖 2g, 酚红 0.01g, 溶于 1000mL 水中) 制成单细胞悬液, 用 200 目铜网过滤, 去除大的细胞团块后, 离心, 用 GKN 溶液洗涤并重悬脾细胞, 计活细胞数, 约为  $1 \times 10^8$  个/mL。

#### 2) SP2/0 骨髓瘤细胞的处理

取指数生长期的 SP2/0 细胞, 离心, 用 GKN 溶液洗一次并悬浮于其中, 计活细胞数, 约为  $2 \times 10^7$  /mL。

#### 3) 免疫脾细胞与 SP2 / 0 骨髓瘤细胞的融合

将步骤 2) 的 SP2 / 0 骨髓瘤细胞与步骤 1) 的免疫脾细胞按 1: 5 比例混合均匀, 离心, 尽量倒净上清; 然后在 37 $^{\circ}$ C 水浴条件下, 加入 50% 聚乙二醇(MW1450) 进行细胞融合; 再加入 GKN 溶液洗涤, 用 HAT 选择培养液(向含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中加入 100 $\times$  氨基喋呤储存液(HAT), SIGMA 公司) 重悬, 加入甲基纤维素培养

基（购买自 Sigma 公司，配方：称取 2g 甲基纤维素，加入 50ml 去离子水，高压灭菌，4℃放置 12-24 小时后加入双倍体积的 RPMI1640 培养液）后，加入到 35cm 培养皿中，在 5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。自第七天开始观察杂交瘤细胞生长情况，当细胞生长至肉眼可见时，在显微镜下将杂交瘤细胞转移至含 HT 选择培养液（含 2%HT 的 RPMI-1640 培养基）的 96 孔板上，在 CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养。约 3 天后可用 ELISA 法检测培养上清中抗体活性的高低，对杂交瘤细胞进行筛选。

## 6、杂交瘤细胞的筛选

采用 ELISA 法筛选抗人  $\alpha$ -GalA 抗体的杂交瘤细胞，具体方法为：

1) 用 50mM 碳酸盐缓冲液（pH 9.5）稀释步骤 2 的合成多肽至 5mg/L，加入到 96 孔酶联板（上海华美生物公司）中进行包被，每孔 100 $\mu$ l，4℃ 12-24 小时，用 PBS-T 缓冲液（800mL 蒸馏水中溶解 8g NaCl，0.2g KCl，1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，用 HCl 调节 pH 至 7.4，然后加 1mL Tween-100，用水定容到 1L，室温保存）洗三遍；

2) 用 10% 小牛血清进行封闭，每孔 100 $\mu$ l，37℃ 30 分钟，用 PBS-T 缓冲液洗三遍；

3) 向 96 孔板中添加步骤 5 的杂交瘤细胞上清，每孔 100 $\mu$ l，37℃ 1 小时，用 PBS-T 缓冲液洗三遍；

4) 向 96 孔板中添加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠第二抗体（购自军事医学科学院），每孔 50 $\mu$ l，37℃ 30 分钟，用 PBS-T 缓冲液洗三遍；

5) 加碱性磷酸酶底物溶液（0.2M Tris 液 50mL，0.1N 盐酸 40mL，MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2g，左旋咪唑 2mg，1% 叠氮钠 5mL，调 pH 至 8.3，加水至 100mL），37℃ 显色 15 分钟，加 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应，测定 OD<sub>450</sub> 值，OD<sub>450</sub> 值为阴性对照 2.1 倍的为阳性杂交瘤细胞。

## 7、阳性杂交瘤细胞的克隆化及细胞库的建立

### 1) 阳性杂交瘤细胞的克隆化

用有限稀释法（Kohler G 和 C. Milstein., 1975, Nature 256 :495）对步骤 6 筛选出的阳性孔的杂交瘤细胞进行多次亚克隆，使分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞单克隆化，从而使其能分泌均一的单克隆抗体，同时也避免了不分泌抗体的杂交瘤细胞过度生长而使分泌抗体的杂交瘤细胞丢失。反复克隆化至所有单个克隆的阳性率为 100%，选取强阳性克隆扩大培养，大量冻存作为原始细胞库。部分细胞连续传代培养 3 个月以上，用下述步骤 8 的方法检测杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性。

### 2) 细胞库的建立

在对阳性杂交瘤细胞进行克隆化过程中，由融合细胞、一次亚克隆、二次亚克隆及体外连续培养 3 个月以上稳定分泌抗体的三次亚克隆细胞组成原始细胞库。取原始

细胞库中三次亚克隆的杂交瘤细胞株全面检定，大量培养冻存，建立主细胞库。取主细胞库的细胞大量培养，经抗体活性及支原体复查合格后，冻存，每批不少于 20 管，建成工作细胞库。每次生产时取 1 管复苏，用于制备腹水抗体。

## 8、杂交瘤细胞的鉴定

### 1) 抗体分泌稳定性检测

对经筛选获得的其中一株强阳性单克隆细胞株(命名为 AHGA6)进行扩大培养，取部分细胞用生理盐水调整浓度为  $2 \times 10^6$  个 / mL，将其接种于小鼠腹腔，接种细胞数为  $1 \times 10^6$  / 只。约 7-10 天形成腹水，至腹水增多，腹部特别膨隆时，处死小鼠，取腹水，离心后取上清并用 ELISA 法测腹水效价。另取部分细胞，连续传代培养 3 个月后，用与上述同样的条件对小鼠进行腹腔接种，取腹水，离心后取上清并测腹水效价，结果二次 ELISA 测定结果均达到  $1 : (10^5 - 10^6)$ ，表明该强阳性单克隆细胞株 AHGA6 具有较好的抗体分泌稳定性。

### 2) 杂交瘤细胞染色体分析

对细胞株 AHGA6 传代培养 36-48 小时后加入秋水仙素，继续培养 4-6 小时后收集细胞，加入已预温至  $37^\circ\text{C}$  的 0.075M KCl 溶液悬浮细胞， $37^\circ\text{C}$  水浴 15-20 分钟作低渗处理；将细胞用甲醇/冰醋酸固定液三次固定后，悬浮在固定液中， $4^\circ\text{C}$  12-24 小时，然后离心，去上清，留少许固定液将细胞悬浮，混匀后滴在刚从冰水中取出的载玻片上，吹散，通过火焰数次，自然干燥，用 10%Giemsa 染色液染色 10-20 分钟，洗去染液，自然干燥，镜下观察杂交瘤细胞的染色体核型，显微拍照。杂交瘤细胞的染色体核型观察结果见图 1，杂交瘤细胞 AHGA6 平均染色体数目为 104 条左右，接近 SP2/0 细胞和脾细胞染色体数目之和 (BALB/c 小鼠脾细胞染色体数目为 40 条，SP2/0 细胞的平均染色体数目为 64 条左右)，证明该杂交瘤细胞株是由 SP2/0 细胞和小鼠脾细胞融合而来的，且传代后的杂交瘤细胞呈现相同的染色体检测结果，证明杂交瘤细胞在传代过程中携带抗体染色体产生基因，没有丧失抗体分泌能力，并能将这种能力遗传给子细胞。

## 9、单克隆细胞株 AHGA6 的抗体的大量制备及特异性鉴定

### 1) 获取抗体腹水

选取 10 周龄 BALB/C 小鼠(军事医学科学院实验动物中心提供)，接种细胞前 7-10 天，预先腹腔注射液体石蜡 0.5mL / 只。收集处于对数生长期的杂交瘤细胞 AHGA6，用生理盐水调整细胞浓度至  $2 \times 10^6$  / mL，腹腔接种杂交瘤细胞，接种细胞数为  $1 \times 10^6$  个 / 只，约 7-10 天形成腹水，至腹水形成增多，使得腹部特别膨隆时，处死小鼠，取腹水，离心后取上清并用 ELISA 法测腹水效价，结果符合要求，分装， $-20^\circ\text{C}$  冻存

备用。

## 2) 抗体亚型鉴定

采用单克隆抗体亚型检测试剂盒 (ImmunoType™ Kit, Sigma) 剂对步骤 1) 获得的杂交瘤腹水进行免疫球蛋白亚型的鉴定, 具体方法为: 用 PBS 以 1:1000 比例稀释各类抗体 (按常规方法制备的抗小鼠 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgA 及 IgM), 然后用稀释抗体包被 96 孔酶联板 (每孔 0.1mL, 每类抗体两个孔), 37°C 温育 1 小时后, 弃包被液, 洗涤 3 次, 按 0.1mL/孔的量加入单克隆细胞株  $\alpha$ -GalA McAb 的培养上清, 室温温育 1 小时后洗涤 3 次, 按 0.1mL/孔的量加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (购自邦定生物公司), 室温温育 30 分钟后, 洗涤 3 次, 按 0.1mL/孔的量加入辣根过氧化物酶底物反应液 (1mg/ml TMB), 室温 10-15 分钟, 出现褐色即为阳性结果, 最后按 0.05mL/孔的量加入 3N NaOH 终止反应。结果, 杂交瘤细胞 AHGA6 分泌的抗体为 IgG<sub>1</sub> 亚类。

## 3) 抗体的纯化

### A、初步处理

将步骤 1) 腹水于 4°C、10000rpm 离心 10 分钟, 取上清, 准备进行下一步纯化。

### B、Protein G-Sepharose 亲和层析纯化

用 Pharmacia Biotech. 公司的 AKTA FPLC 蛋白层析仪对经初步纯化的单克隆抗体进行亲和纯化, 具体方法为: 先用 3 倍柱体积的 0.02M PBS (pH7.0) 冲洗 HiTrap® Protein G 层析柱 (1mL, Amersham 公司) 填料中的乙醇, 然后用 5 倍柱体积的 0.02M PBS (pH7.0) 平衡层析柱, 将 2mL 经硫酸铵初步纯化的抗体溶液加入层析柱, 用 5 倍柱体积的 0.02M PBS (pH7.0) 冲洗层析柱, 收集流出液, 当紫外线检测器出现 Ig G 洗脱峰时, 迅速用已加入 60-100 $\mu$ l 0.05M Tris-HCl 缓冲液 (pH9.5) 的离心管收集, 最后用 5 倍体积的 0.02M PBS (pH7.0) 冲洗平衡层析柱, 收集流出液, 将纯化的抗体分装, -20°C 保存。

## 4) 抗体纯度及浓度测定

分别将单克隆抗体腹水及经 Protein G-Sepharose 亲和层析纯化后的抗体按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳检测, 检测结果见图 2 (泳道 M: 低分子量蛋白标准, 泳道 1: 纯化前腹水, 泳道 2: 上样流出液, 泳道 3: 平衡流出液, 泳道 4: 纯化单抗), 结果抗体腹水中含大量杂蛋白, 而经亲和层析纯化后的抗体的电泳图谱呈现二条区带, 为抗体的轻链和重链, 分子量约为 24KD 和 53KD。经扫描测定, 经亲和层析后的抗体纯度达 98% 以上, 获得了纯度较高的单克隆抗体。将 20 毫升单克隆腹水抗体用上述方法提纯后, 用 PBS 调整至原体积, 以 PBS 为空白对照, 测定抗体溶液的 OD<sub>280nm</sub> 值, 计算出抗体

浓度约为8.0mg/mL。

#### 5) 单克隆抗体特异性鉴定

##### a、与多肽抗原及 KLH 的结合特异性鉴定

用 ELISA 法测定上述纯化的单克隆抗体与上述步骤 2 合成的多肽半抗原及 KLH 的结合特异性，即分别用 KLH 和步骤 2 合成的多肽半抗原包被 96 孔酶标板，50 $\mu$ g/板，4 $^{\circ}$ C 12-24 小时，其余步骤与常规的 ELISA 法相同，一抗分别采用鼠抗人  $\alpha$ -GalA 抗血清和纯化的单克隆抗体，二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG，同时设空白对照组和阴性对照组（只加二抗），结果用上述步骤 2 合成的多肽半抗原包板的鼠抗人  $\alpha$ -GalA 抗血清组和纯化的单克隆抗体组检测结果均为阳性，用 KLH 包板的检测结果为阴性，表明本发明的单克隆抗体只与合成的多肽抗原特异结合，而与 KLH 不结合。

##### b、与人 $\alpha$ -GalA 的结合特异性鉴定

用免疫印迹反应(Western Blot)检测上述纯化的单克隆抗体与人  $\alpha$ -GalA 的结合特异性。将上述纯化的单克隆抗体进行常规 SDS-PAGE 后，转移到硝酸纤维素膜上，再分别以人的  $\alpha$ -GalA、咖啡豆的  $\alpha$ -GalA、大豆的  $\alpha$ -GalA 为二抗进行免疫印迹反应，具体方法可参考文献(Sambrook, J., 等人, 分子克隆: 实验指南, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第二版, 888 页), 结果见图 3(泳道 1: 咖啡豆的  $\alpha$ -GalA, 泳道 2: 人的  $\alpha$ -GalA, 泳道 3: 大豆的  $\alpha$ -GalA), 表明所制备的单克隆抗体只与人  $\alpha$ -GalA 特异结合, 而不与咖啡豆和大豆的  $\alpha$ -GalA 结合。

上述实验结果表明本发明的单克隆细胞株 AHGA6 产生的单克隆抗体具有较好的结合特异性，将该抗体命名为  $\alpha$ -GalA McAb。该杂交瘤细胞株 AHGA6 已于 2006 年 6 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No. 1731。

#### 10、 $\alpha$ -GalA McAb 与 $\alpha$ -GalA 的亲和力测定

采用非竞争性 ELISA 法测定  $\alpha$ -GalA McAb 与  $\alpha$ -GalA 的亲和力，具体方法为：用 0.05mol/L、pH9.6 碳酸盐缓冲液将  $\alpha$ -GalA 抗原稀释至浓度分别为 1000、500、250、125ng/mL，然后加入酶标板，100 $\mu$ l/孔，4 $^{\circ}$ C 包被 12-24 小时；弃去抗原溶液，用 PBS (含 0.05% Tween20) 洗板 3 次；每孔加入 150 $\mu$ l 含 1% 牛血清白蛋白的 PBS，37 $^{\circ}$ C 封闭 0.5 小时，加入系列稀释的纯化单克隆抗体  $\alpha$ -GalA McAb (从 1:1000 开始按 10<sup>2</sup> 倍比进行稀释)，100 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，洗板 3 次；加入 HRP 标记的二抗羊抗鼠 IgG (1:2000)，100 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 小时，洗板 3 次；加入底物 1mg/mL TMB，用底物缓冲液 (0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 稀释，100 $\mu$ l/孔，室温避光放置 5-10min；最后用 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应，测定各孔 450nm 的 A 值，绘制测定曲线 4 条，读出每一包被抗原的最大吸光度 (A 值) 1/2 所

对应的抗体浓度，利用Beatty计算公式 (Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG, et al. Measurement of monoclonal antibody by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Med, 1987, 100(1-2):173-178.) 确定纯化后的 $\alpha$ -GalA McAb的亲合常数K值，结果K值为 $9.14 \times 10^9 \text{mol}^{-1}$ ，与 $\alpha$ -GalA也具有较高的亲和力。

上述实施例中的检测结果表明本发明杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 产生的单克隆抗体 $\alpha$ -GalA McAb 与人 $\alpha$ -半乳糖苷酶具有较高的结合特异性及亲和力。

#### 实施例 2、人 $\alpha$ -半乳糖苷酶水平的检测

现用 ELISA 法用杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 产生的单克隆抗体 $\alpha$ -GalA McAb 对人 $\alpha$ -半乳糖苷酶水平进行检测，包括以下步骤：

(1) 包被酶联板：用 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 将用常规方法制备的抗 $\alpha$ -GalA 多抗血清稀释至浓度为 1mg/mL，每孔 100 $\mu$ l，4 $^{\circ}$ C 放置 12-24 小时，然后用 10mM PBS-0.05% Tween 20 (pH7.4) 洗三遍；

(2) 封闭已包被的酶联板：用 10% 的小牛血清封闭包被的酶联板，100 $\mu$ l / 孔，37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟；

(3) 在酶联板上加待测病人血清 100 $\mu$ l / 孔，37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时，然后用 10mM PBS-0.05% Tween 20 (pH7.4) 洗三遍。

(4) 在酶联板上加如浓度为 0.2mg/L 单克隆抗体 $\alpha$ -GalA McAb，100 $\mu$ l / 孔，37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时，然后用 10mM PBS-0.05% Tween 20 (pH7.4) 洗三遍；

(5) 加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG，50 $\mu$ l / 孔，37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟，然后用 10mM PBS-0.05% Tween 20 (pH7.4) 洗三遍；

(6) 加辣根过氧化物酶底物溶液 (1mg/mL TMB)，50 $\mu$ l / 孔，37 $^{\circ}$ C 显色 15 分钟；

(7) 加 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 $\mu$ l / 孔终止反应；

(8) 测定  $\text{OD}_{450}$  值。

结果  $\text{OD}_{450}$  值为 0.014，与已知浓度的标准样品进行比较，患者血清中的人 $\alpha$ -半乳糖苷酶含量约为 2.0  $\mu$ g/L，低于正常值，与预期结果相符，表明本发明杂交瘤细胞株 AHGA6 CGMCC No. 1731 产生的单克隆抗体 $\alpha$ -GalA McAb 可用于人 $\alpha$ -半乳糖苷酶水平的检测。

---

序列表

<160> 2

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人属人 (*Homo sapiens*)

<400> 1

Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn

1

5

10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 人属人 (*Homo sapiens*)

<400> 2

Cys Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn

1

5

10

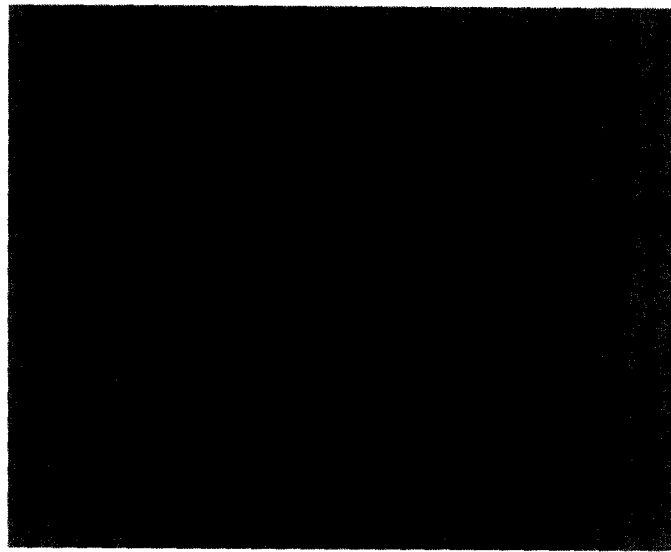


图 1

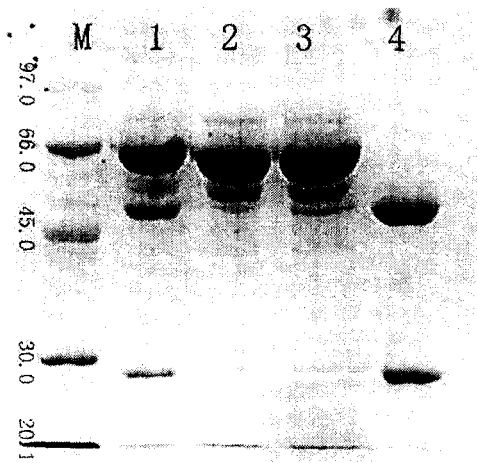


图 2

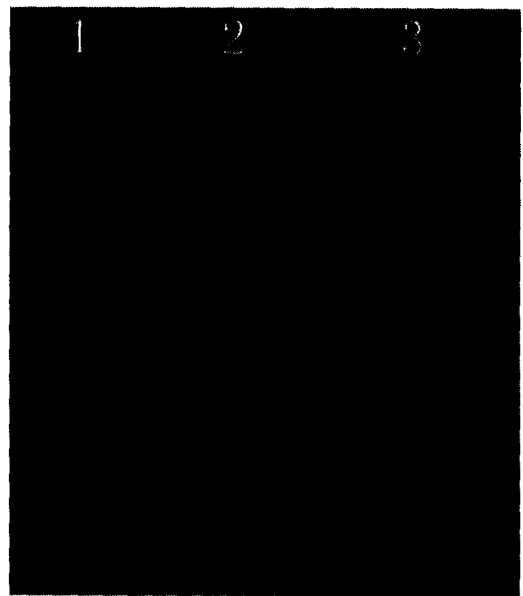


图 3

专利名称(译)	杂交瘤细胞株及其产生的抗人 $\alpha$ -半乳糖苷酶A单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN1888057A</a>	公开(公告)日	2007-01-03
申请号	CN200610089800.0	申请日	2006-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
[标]发明人	章扬培 徐莉娟 李素波 季守平 刘至玄 高红伟 宫锋		
发明人	章扬培 徐莉娟 李素波 季守平 刘至玄 高红伟 宫锋		
IPC分类号	C12N5/18 C07K16/40 G01N33/53 C12Q1/34		
代理人(译)	鲁兵		
其他公开文献	CN100430473C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了杂交瘤细胞株AHGA6 CGMCCNo.1731及其产生的抗人 $\alpha$ -半乳糖苷酶A单克隆抗体。此外,本发明还提供了一种人 $\alpha$ -半乳糖苷酶A水平的ELISA检测方法,该方法包括以下步骤:1)用抗 $\alpha$ -GalA多抗血清或纯化的 $\alpha$ -GalA抗体包被酶联板,洗板;2)封闭经包被的酶联板,洗板;3)加待测样品,洗板;4)加单克隆抗体 $\alpha$ -GalA McAb,洗板;5)加酶标二抗,洗板;6)加底物显色;7)终止反应;8)测定OD450值。本发明不仅为进一步研究人 $\alpha$ -半乳糖苷酶A的生物学功能及其作用机理奠定了基础,而且将在布莱氏病疾病的临床诊断中发挥重要作用。

