

## 抗腺激酶单克隆抗体的研制

杨太成\* 陈 勇 孙瑛勋 贺永怀 白 炎

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

用杂交瘤技术获得了7种抗人腺激酶单克隆抗体。这些抗体仅与腺激酶反应, 而不与结构上类似于腺激酶的胰酶、胰凝乳蛋白酶反应, 与正常人血清也无明显反应。免疫电转印实验及酶活力抑制实验表明, 除 N30 识别腺激酶分子及 18kd 轻链外, 其他6种抗体均识别腺激酶54kd分子及33kd重链, 所有7种抗体均不抑制酶活力。本文也探讨了这组抗体用于腺激酶结构功能研究, 纯化腺激酶以及对某些肿瘤诊断的可能性。

**关键词** 单克隆抗体; 腺激酶

人肾脏合成并释放到尿液中的腺激酶是一种纤维蛋白溶酶原的激活剂。它在纤维蛋白溶解中起重要作用, 也常被用于治疗血栓栓塞。为研究腺激酶本身结构与功能, 或用亲和层析法获得供临床或研究使用的腺激酶纯品, 常需要特异性抗腺激酶的抗体。为此, 我们利用杂交瘤技术, 制备了7个抗腺激酶单克隆抗体。现报道分泌抗体杂交瘤株的建立及抗体特异性鉴定结果。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 动物免疫及抗体制备

用上海生物化学制药厂供应纯化腺激酶免疫8—12周龄雌性 C<sub>57</sub> 鼠, 免疫程序如下: 于第0天将含腺激酶 100 $\mu$ g 的 PBS 0.25ml 与等体积完全佐剂充分混合, 并给小鼠进行皮下多点及腹腔注射。第30天重复上述程序, 但将佐剂换成不完全佐剂。第60天每鼠再经腹腔接受含 250 $\mu$ g 腺激酶的 PBS 溶液 0.25ml, 第90天每鼠经静脉接受含腺激酶 1mg 的 PBS 溶液 0.25ml。三天后选用血清抗体滴度高的小鼠, 脱颈处死

后取脾脏, 按常规方法<sup>[1]</sup>在 PEG 作用下将 NS-1 或 SP 2/0 骨髓瘤细胞分别与免疫鼠脾细胞融合。融合后将细胞直接悬浮于含 20% 小牛血清的 HAT 选择培养液中, 并以  $2.5 \times 10^5$  细胞/孔及  $2.5 \times 10^6$  细胞/孔分别置于 24 及 96 孔培养板各孔。对筛选后获得的阳性杂交细胞, 用有限稀释法进行克隆化培养, 直至克隆化为止。杂交细胞最终培养于含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液, 或注射给经 Pristane 处理及 400 Rad  $\gamma$  线照射的 BALB/c 小鼠。经测定表明细胞培养上清及腹水中均含有特异性抗体。

#### (二) ELISA 测定

将高度纯化腺激酶 (日本 Godo Shusei 公司供应) 或其他抗原成分溶于碳酸缓冲液 (20mM、pH9.6) 后, 包被 PVC 板, 每孔抗原含量为 100ng。按常规方法进行 ELISA 测定, 并于 Titertek Multiska 读数仪中读数。

#### (三) 亚类测定

将小鼠腹水按常规方法用 Protein A-

本文于1986年9月3日收到。

\* 广州军区总医院检验科进修生。

sepharose CL-4B 亲和层析柱纯化后,用琼脂双扩散方法测定纯化单克隆抗体与兔抗小鼠 Ig 亚类抗血清 (Miles) 的反应性,从而判定小鼠抗体亚类。

#### (四) 免疫电转印 (Immunoblotting)

##### 测定

按常规方法将脲激酶粗制品在还原条件下(样品缓冲液中含 2.8%  $\beta$ -巯基乙醇)经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,用 Bio-Rad 电转移系统将凝胶蛋白区带转印至硝酸纤维素膜上,并用抗脲激酶单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 Ig 进行染色。

#### (五) 脲激酶活性抑制测定

将 30u 脲激酶与过量抗脲激酶抗体 4°C 孵育 4h 后,按 Herion 法<sup>[2]</sup>将经过或未经抗体处理的脲激酶与底物 S2444 37°C 反应 30min。反应终止后用分光光度计于 405nm 测定光吸收。

## 结 果

#### (一) 杂交瘤株建立

融合后第 9 天杂交细胞已明显长成细胞集落。用 ELISA 法对杂交瘤细胞培养上清进行脲激酶抗体活性测定,获得 S13、S26、N14、N17-2、N30、N34、N36 等杂交瘤细胞。对上述细胞分别进行 3—5 次克隆化培养,最终建立 7 个分泌抗体杂交瘤株。现将建株情况列于表 1。

由表 1 可见,以 NS-1 及 SP2/0 分别作为融合母本细胞,前者所形成抗体分泌阳性杂交细胞数低于后者,但 NS-1 组最终建株数却高于 SP2/0 组。

#### (二) 抗体效价及亚类测定

将 7 种杂交细胞所产生腹水进行 10 倍系列稀释后,用 ELISA 法测定其滴度。此外,用抗小鼠亚类抗血清测定纯化单克隆

表 1 抗脲激酶单克隆抗体分泌杂交瘤株建立

Table 1 Hybridoma growth and lines established

组别	杂交瘤生长孔数	初筛抗体阳性孔数	建株数
Fusion	Hybridoma growth	Antibody secretion	lines established
NS-1	24/24 43/96	7/67(10.4%)	5
SP2/0	24/24 27/96	10/51(19.6%)	2

表 2 抗脲激酶单克隆抗体的滴度和亚类

Table 2 Titer and Ig subclass of McAbs to urokinase

杂交瘤株	滴度	亚类
Clones	Titer	Subclass
S13	$10^{-5}$	IgG1
S26	$10^{-4}$	IgG1
N14	$10^{-5}$	IgG1
N17-2	$10^{-5}$	IgG1
N30	$10^{-5}$ — $10^{-6}$	IgG1
N34	$10^{-5}$ — $10^{-6}$	IgG1
N36	$10^{-2}$ — $10^{-3}$	IgG1

抗体亚类,结果见表 2。

由表 2 可见,所制备 7 种抗脲激酶单克隆抗体均为 IgG1 亚类。除 N36 外,其他 6 种抗体滴度均较高。

#### (三) 抗体特异性鉴定

为进一步明确所得抗体特异性,除观察此 7 种抗体与高度纯化脲激酶反应性外,也进一步观察了它们同具有类似于脲激酶分子结构的水解酶:胰酶及胰凝乳蛋白酶以及正常人血清的反应性,结果见表 3。

由表 3 可见,上述单克隆抗体均不与所测定的脲激酶以外成分反应。

#### (四) 抗脲激酶抗体对不同脲激酶结构的识别

脲激酶主要由二硫键连接的轻、重链组成。脲激酶分子本身及其轻、重链的分子量分别为 54kd、18kd 及 33kd<sup>[3]</sup>。用免

表 3 抗尿激酶单克隆抗体特异性观察  
Table 3 Specificity of McAbs to urokinase

杂交瘤株 Clones	S13	S26	N14	N17-2	N30	N34	N36
尿激酶 Urokinase	+	+	+	+	+	+	+
胰 酶 Trypsin	-	-	-	-	-	-	-
胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-
正常人血清 Human normal serum	-	-	-	-	-	-	-

疫电转印法测定了这些抗体对尿激酶及其轻、重链的识别特点，结果见图版 I。

由图可见，所有 7 种抗体均与尿激酶分子及其轻或重链反应，与其他杂质无明显反应。用高于酶量 119—313 倍的抗体，在 4℃ 与酶孵育 4h 后，测定等量经或未经抗体处理的酶活性，发现两者活性并无区别。可见此组抗体并非针对尿激酶活力中心。再结合免疫电转印情况，现将这组抗体对尿激酶不同成分反应特点列于表 4。

表 4 单克隆抗体对尿激酶不同结构的识别  
Table 4 Binding of McAbs to different subunits of urokinase

杂交瘤株 Clones	S13	S26	N14	N17-2	N30	N34	N36
尿激酶分子 Urokinase molecule (54kd)	+	+	+	+	+	+	+
重 链 Heavy chain (33kd)	+	+	+	+	-	+	+
轻 链 Light chain (18kd)	-	-	-	-	+	-	-
活力中心 Active site	-	-	-	-	-	-	-

### 讨 论

尿激酶虽非小分子蛋白，但抗原性不强，实验表明短期免疫效果欠佳（内部观察），故本文采用 3 月 4 次免疫方案。免

疫时除用佐剂外，所用抗原剂量也递增。为获得较好免疫效果，选择免疫反应性强的动物也很重要。据报道<sup>[2]</sup>，BALB/c 鼠对尿激酶抗原免疫反应不强，故本文选用了 C<sub>57</sub> 鼠免疫。NS-1 及 SP2/0 虽均为融合时常用的小鼠骨髓瘤细胞，但却各有其特点：NS-1 细胞仍可合成或分泌其自身 K 链，因而可使杂交细胞分泌无活性抗体分子，这可能是造成本实验中 NS-1 组初筛抗体分泌阳性杂交细胞产率低的原因。但 NS-1 细胞染色体相对稳定，阳性杂交细胞容易建株。SP2/0 为无分泌型骨髓瘤株，因而分泌抗体的杂交细胞生成率较高，但又因其染色体相对不稳定，获得抗体分泌稳定细胞株较困难（见表 1）。为得到明确答案，尚需进一步观察。

为获得抗尿激酶单克隆抗体，我们除用较纯抗原免疫外，又用高度纯化的尿激酶作抗原来进行筛选。获得抗体后又观察了这些抗体与具有在结构上类似尿激酶的抗原的反应性（见表 3）。此外，用这批抗体制备的亲和层析柱可从粗尿激酶制品或胎儿肾提取液中纯化出 54kd 及 33kd 尿激酶分子或其重链（待发表资料），从而表明，本实验所获得 7 种抗体为抗尿激酶的单克隆抗体。

这批单克隆抗体虽不针对酶活力中心，但仍可用于研究尿激酶分子有关位点的结构及功能，如有关位点对酶活力中心的影响等。此外，也可用这批抗体制备亲和层析柱，并获得纯化的尿激酶（待发表资料）。据文献报道<sup>[4]</sup>，某些肿瘤细胞可分泌大量尿激酶，这类抗体是否在肿瘤诊断中价值，也很值得探讨。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Kohler, G. and Milstein, C.: *Eur. J. Immunol.*, 6:511, 1976.  
[ 2 ] Herion, P. et al.: *Bioscience Reports*, 1:885, 1981.  
[ 3 ] Salerno, G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:110, 1984.  
[ 4 ] Herion, P. et al.: *Bioscience Reports*, 3:381, 1983.

## MONOCLONAL ANTIBODIES TO UROKINASE

Yang Taicheng Chen Yong Sun Yingxun He Yonghuai Bai Yan

(*Institute of Basic Medical Sciences, Military Academy of Medical Sciences, Beijing, China*)

7 McAbs S13, S26, N14, N17-2, N30, N34 and N36 were obtained by hybridoma technique. These McAbs bound to highly purified urokinase, but not to trypsin, chemotrypsin and human normal serum tested. Except N30 which recognized 54kd and 18kd urokinase fragments, all other McAb recognized 54kd and 33kd urokinase fragments by the technique of immunoblotting. None of these McAbs inhibited the enzymatic activity of urokinase. The potential value of these McAbs in studying the structure and functions and purifying this enzyme as well as the detection of tumour secreting urokinase was also discussed.

## Key words

McAbs; urokinase