

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.006

· 基础研究 ·

## 肿瘤相关抗原 OVA66 单克隆抗体的制备和鉴定

荣婷婷<sup>1</sup>, 陈惠娟<sup>1</sup>, 张惠珍<sup>1</sup>, 刘争春<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 王树军<sup>1,2</sup>, 王颖<sup>1,2</sup>, 葛海良<sup>1\*</sup> (1. 上海交通大学医学院基础医学院免疫学教研室, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院上海市免疫学研究所, 上海 200025)

[摘要] 目的: 制备和鉴定人卵巢癌 cDNA 文库筛选到的肿瘤相关抗原 OVA66 的单克隆抗体, 为研究其生物学功能提供手段。方法: 采用基因重组方法构建 pET32b-OVA66 重组表达质粒, 经大肠杆菌诱导表达 OVA66 融合蛋白, 利用 Ni-TED 亲和层析技术分离纯化 His-OVA66 融合蛋白; 采用经典的杂交瘤技术制备 OVA66 单克隆抗体; ELISA 和 Western blotting 鉴定单克隆抗体的生物学和免疫学特性, 并对 OVA66 单克隆抗体在细胞免疫荧光法、流式细胞术和免疫组化等方法中进行了初步应用。结果: 成功构建重组表达载体 pET32b-OVA66, 并诱导表达和纯化 OVA66 融合蛋白。制备获得两株小鼠 OVA66 单克隆抗体杂交瘤细胞株 5F4 和 4G9。两株细胞分泌的抗体亚类均为 IgG1, 轻链为  $\kappa$  型, 亲和力常数  $K_a$  分别为  $2.96 \times 10^{10}$  和  $0.4 \times 10^{10}$  L/mol, 初步表位分析结果显示两者针对不同的抗原表位; 两株抗体均可以采用细胞免疫荧光和流式细胞术检测 OVA66 的表达, 5F4 还可通过免疫组织化学检测肿瘤组织中 OVA66 的表达。结论: 成功制备两株特异性的小鼠 OVA66 单克隆抗体杂交瘤细胞株, 为进一步研究 OVA66 的生物学特性和临床应用奠定了基础。

[关键词] 肿瘤相关抗原; OVA66; 单克隆抗体; 原核表达; 蛋白纯化; ELISA

[中图分类号] R392.11; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)04-0347-06

## Preparation and identification of monoclonal antibody against tumor-associated antigen OVA66

RONG Ting-ting<sup>1</sup>, CHEN Hui-juan<sup>1</sup>, ZHANG Hui-zhen<sup>1</sup>, LIU Zheng-chun<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, WANG Shu-jun<sup>1,2</sup>, WANG Ying<sup>1,2</sup>, GE Hai-liang<sup>1\*</sup> (1. Department of Immunology, Basic Medical Science College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare and characterize monoclonal antibody against tumor-associated antigen OVA66, so as to provide effective method for further studying the biological function of OVA66. **Methods:** Recombinant pET32b-OVA66 plasmid was constructed and transfected into *E. coli* BL21 (DE3). His-OVA66 fusion protein was induced by IPTG and purified through Ni-TED affinity chromatography. Hybridoma cells stably secreting anti-OVA66 monoclonal antibodies were prepared by hybridoma technology. Biological and immunologic properties of monoclonal antibodies were determined by ELISA and Western blotting. The prepared antibody was applied in immunofluorescence, flow cytometry and immunohistochemistry procedures. **Results:** Recombinant pET32b-OVA66 plasmid was successfully constructed, and OVA66 fusion protein was induced and further purified. Two hybridoma cell strains secreting OVA66 monoclonal antibodies were established by hybridoma technology and named as 5F4 and 4G9, respectively. These monoclonal antibodies were characterized as IgG1 subclass and kappa subtype with affinity constant  $k_a$  being  $2.96 \times 10^{10}$  and  $0.4 \times 10^{10}$  L/mol, respectively. Preliminary data showed that these antibodies acted against different antigenic epitopes. These antibodies could be used for the detection of OVA66 expression in immunofluorescence and flow cytometry assay, whereas 5F4 could also be used in immunohistochemistry assay. **Conclusion:** Two hybridoma cell strains secreting monoclonal antibodies against OVA66 have been successfully established, which facilitates further studies on biological functions of OVA66 and its potential in clinical application.

[Key words] tumor associated antigen; OVA66; monoclonal antibody; prokaryotic expression; protein purification; ELISA

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 347-352]

[基金项目] 上海市教委科研创新项目(No. 08YZ39); 上海市免疫学研究所项目(No. 08A03)。Supported by the Scientific Research and Innovation Program of Shanghai Educational Committee (No. 08YZ39); the Program of Shanghai Institute of Immunology (No. 08A03)

[作者简介] 荣婷婷(1984-), 女, 山东省泰安市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究。E-mail: rtt.com@163.com

\* 通信作者( Corresponding author)。E-mail: Gehailiang@yahoo.com

肿瘤抗原可分为肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原。目前大多数的肿瘤抗原属于肿瘤相关抗原,它们不仅存在于肿瘤,在一些特定的正常组织或发育的特定阶段(如胚胎、睾丸)也有表达,只是在蛋白表达量上有所差异,如 Her2/Neu、糖链抗原 19-9 等,这些抗原蛋白有部分已经成为肿瘤临床诊断和治疗的重要指标分子。

OVA66 是本实验室应用 SEREX 技术筛选人卵巢癌 cDNA 表达文库得到的一种新的肿瘤相关抗原。基因序列比对结果显示,该基因与人慢性粒细胞白血病抗原 CML66 基因高度同源<sup>[1]</sup>。前期研究<sup>[2]</sup>显示,OVA66 在正常组织中主要表达于睾丸,在大部分肿瘤组织中(胃癌、肝癌、卵巢癌等)呈高表达,与 CT 抗原有类似的表达模式。血清学分析结果表明在部分肿瘤患者中存在高滴度的抗 OVA66 抗体;利用 RNA 干扰技术干扰高表达 OVA66 的人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞后,肿瘤细胞增殖明显降低、凋亡增加<sup>[3]</sup>。将稳定转染 OVA66 特异性干扰载体以及对照载体的 HeLa 细胞分别接种于 BALB/c<sup>nu/nu</sup> 小鼠后,发现实验组的肿瘤生长速度明显低于对照组,并且肿瘤细胞体内转移和浸润能力显著降低<sup>[4]</sup>。上述实验结果均提示 OVA66 在肿瘤发生、发展中发挥一定的生物学功能,但是其中的分子机制仍不清楚。

肿瘤抗原特异性的单克隆抗体不仅为研究其生物学功能提供了有力的手段,在临床诊断和治疗中也具有良好的应用前景。为此,本研究通过表达和纯化重组 OVA66 蛋白,制备获得小鼠来源的抗 OVA66 单克隆抗体,并对所获单克隆抗体的免疫学特性和表位进行分析,为研究 OVA66 的生物学功能及和肿瘤发生、发展的关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, pET32b(+) 质粒为 Novagen 公司产品, pcDNA3.1-OVA66 质粒由本室保存,质粒小抽试剂盒购自 Promega 公司。DNA 胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,低分子量蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司,抗 His 小鼠单抗为 Zymed 公司产品,羊抗小鼠 IgG-HRP、ECL PLUS 显色试剂盒均为 GE Healthcare 公司产品, Protino Ni-TED 1000 packed columns 购于 MACHERY-NAGEL 公司, BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司, 4 × 蛋白上样缓冲液购自北京博大泰

克生物科技有限公司,工程菌 BL21( DE3 )由本实验室传代保存, RPMI 1640、DMEM、胎牛血清( FCS )均来自 GIBCO 公司,弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、8-AG( 50 × )、HAT( 50 × )、HT( 50 × )、PEG 1450 购自 Sigma 公司,羊抗兔 IgG-Alexa 488 均购自 Invitrogen 公司,小鼠单抗亚型检测试剂盒为 Roche 公司产品,羊抗鼠 IgG-HRP 购自华美公司, Cytotfix/ Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit 购自 BD 公司,免疫组织化学检测试剂盒购自上海晶美公司。

### 1.2 OVA66 融合蛋白的原核表达

利用本室先前构建的 pcDNA3.1-OVA66 质粒<sup>[3]</sup>,通过 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后胶回收 OVA66 目的片段,并与经同样双酶切的原核表达载体 pET-32b(+) 连接,转化入感受态 BL21( DE3 )细胞中,经氨苄青霉素筛选获得阳性克隆,*EcoR* I/*Xho* I 双酶切和测序鉴定后获得可用于诱导表达的工程菌。以终浓度为 1 mmol/L IPTG 为诱导剂,30 °C 诱导 4 h 后收集菌液进行 SDS-PAGE,分析 OVA66 融合蛋白的诱导表达。

### 1.3 目的蛋白的纯化和鉴定

利用 PET32( b )质粒本身携带的 His 标签,采用亲和层析法纯化诱导表达的 OVA66 融合蛋白,主要步骤参照 Protino Ni-TED 亲和层析柱纯化试剂盒的操作说明。用 BCA 法进行蛋白定量(按试剂盒说明书操作)。将纯化的目的蛋白用小鼠抗 His 标签单抗和兔抗 OVA66 多抗作为一抗进行 Western blotting 检测。

### 1.4 杂交瘤细胞株的建立及腹水单抗的制备

采用经典的小鼠杂交瘤细胞株制备方法<sup>[5]</sup>。取 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠[由上海交通大学医学院实验动物中心提供,实验动物使用许可证号为 SYXK(沪)2008-0050],初次免疫采用 OVA66 融合蛋白与等量弗氏完全佐剂混匀,抗原量为 50 μg;再次免疫时均使用 100 μg 抗原和弗氏不完全佐剂的混匀物,皮下多点注射,免疫间隔时间为 2 周。末次免疫 2 周后,间接 ELISA 检测血清效价,达 1:3 200 时即进行小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞 SP2/O-Ag14(本室保存)常规融合,用 ELISA 筛选分泌目的抗体的阳性杂交瘤细胞株,有限稀释法克隆化后建系,ELISA 法检测筛选到两株阳性杂交瘤细胞株,分别命名为 5F4 和 4G9。取健康经产 BALB/c 小鼠,小鼠腹腔注射 0.5 ml 液体石蜡油,1 周后腹腔注射杂交瘤细胞  $1 \times 10^6$ /只,7~10 d 后收获腹水。

### 1.5 单克隆抗体的类型和特异性鉴定

采用小鼠单抗亚型检测试剂盒进行 IgG 亚类和轻链的鉴定,具体操作按照说明书进行。以纯化的

OVA66 融合蛋白及空载体表达蛋白为抗原,将杂交瘤细胞 5F4 和 4G9 的培养上清分别作 10 倍稀释作为一抗,进行 Western blotting 检测。

### 1.6 腹水单克隆抗体的纯化

采用硫酸铵-辛酸沉淀法纯化腹水<sup>[5]</sup>,并经 BCA 法测定纯化抗体的浓度。

### 1.7 抗体亲和力的测定

用包被缓冲液按 1:2:4:8 的倍数稀释抗原(5、2.5、1.25、0.625 mg/L [Ab])包被,用抗体稀释液将纯化后的单抗作系列稀释(250、62.5、15.6、3.9、0.98、0.24、0.06 μg/L)为一抗,进行 ELISA 分析,对所获得的  $D_{450}$  和对应的抗体浓度,绘制曲线。确定不同抗原稀释度下 D-Ab 曲线上  $1/2 D_{max}$  时所对应的抗体浓度([Ab]、[Ab']、[Ab'']、[Ab'''])。  $K = n - 1/2$ 。计算亲和常数( $K_a$ )的公式:  $K_a = (n - 1) / (2 \cdot (n[Ab'] - [Ab]))$ ,其中 [Ab'] 和 [Ab] 分别代表抗原倍比稀释中两个不同浓度 [Ag'] 和 [Ag] 下,在 D 值达到  $1/2 D_{max}$  时对应的抗体浓度, n 代表抗原 [Ag'] 和 [Ag] 间的稀释倍数<sup>[5]</sup>。

### 1.8 抗原表位初步鉴定

将纯化得到的 OVA66 融合蛋白、空载体表达蛋白,以及本实验室构建的 3 个截短的 OVA66 片段 [分别命名为 OVA66 片段 1(1~182 aa),OVA66 片段 2(160~365 aa),OVA66 片段 3(340~583aa)] 进行 Western blotting,所用一抗为杂交瘤腹水纯化抗体,二抗为羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体,经 ECL 显色后初步分析抗体针对的表位。

### 1.9 OVA66 单克隆抗体的初步应用

以上述鉴定和纯化获得的单克隆抗体为第一抗体,分别采用免疫荧光细胞组织化学法、流式细胞术和 Western blotting 检测 OVA66 高表达的 HeLa 细胞中 OVA66 的表达;采用免疫组织化学的方法检测肿瘤组织来源的石蜡切片中 OVA66 的表达,并以免抗 OVA66 多抗(1:100 稀释)为阳性对照,非特异性杂交瘤细胞小鼠腹腔注射制备的腹水(1:200 稀释)为阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 OVA66 重组表达质粒的成功构建和 OVA66 融合蛋白的诱导表达

通过基因重组方法获得的 OVA66 重组表达质粒经双酶切和测序鉴定正确,进一步转化表达大肠杆菌 BL21(DE3)后获得 3 个单克隆阳性克隆工程菌。通过 D 值、诱导时间和 IPTG 浓度的优化,确定  $D_{600}$  为 0.75, IPTG 为 1 mmol/L 和诱导时间为 3 h 为最佳诱

导条件。选取其中的一株阳性工程菌,经上述诱导条件诱导,SDS-PAGE 结果显示在 85 000 附近有明显的诱导条带(图 1),蛋白相对分子质量大小与预期一致,密度扫描发现目的蛋白占总蛋白的 15%。

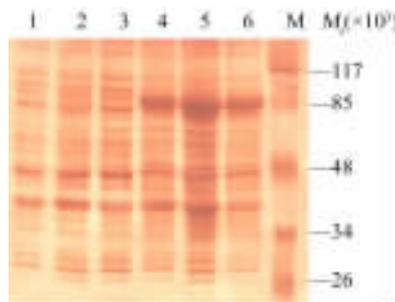


图 1 OVA66 融合蛋白的诱导表达

Fig.1 Induced expression of OVA66 fusion protein in *E. coli* BL21

1-3: Three different clones before induction; 4-6: Three different clones after induction; M: Marker

### 2.2 目的蛋白纯化和鉴定

含重组 pET32b-OVA66 质粒的细菌按上述最佳优化条件诱导表达后经裂解所得上清和包涵体,包涵体洗涤后变性裂解,然后 2 次上清进行 SDS-PAGE 检测,蛋白电泳显示 pET32b-OVA66 重组蛋白以包涵体表达为主。

将细菌诱导后的菌体裂解上清进行 Protino Ni-TED 亲和层析柱纯化中,分别用含 5、250、500 mmol/L 咪唑的变性裂解缓冲液洗脱。蛋白凝胶分析结果显示 500 mmol/L 咪唑洗脱时收集的蛋白纯度可达 90% 以上。1 L 培养基中细菌表达的 OVA66 融合蛋白(180 mg)纯化并复性后得到的蛋白量为 1 mg(经 BCA 法定量),可知纯化的目的蛋白得率为 0.56%。纯化的目的蛋白的 Western blotting 结果显示,在 85 000 处有结合条带,表明重组蛋白为目的蛋白(图 2)表达为主。

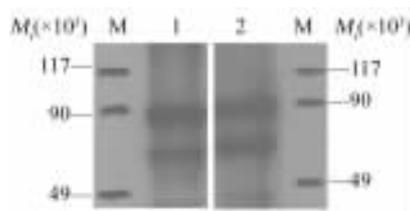


图 2 纯化后 OVA66 融合蛋白的鉴定

Fig.2 Identification of purified OVA66 fusion protein

1: Anti-His antibody; 2: Rabbit polyclonal antibody; M: Marker

### 2.3 抗单克隆抗体杂交瘤细胞株的成功建立

按照经典方法通过细胞融合和 ELISA 筛选得到的阳性克隆, 经 3 次单细胞分离培养至 ELISA 检测抗体阳性的单克隆细胞培养孔达到 100%, 得到 2 株稳定分泌特异性抗 OVA66 抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 5F4 和 4G9。

### 2.4 单克隆抗体的类型和特异性

经快速定性试纸法鉴定, 2 株单克隆抗体 5F4 和 4G9 均为小鼠 IgG1 亚类, 且为  $\kappa$  型。Western blotting 检测结果可见, 纯化的 OVA66 融合蛋白在 85 000 处均有清晰的条带, 而空载体表达蛋白无明显条带。由此说明这两株杂交瘤细胞分泌的单抗均能与 OVA66 蛋白特异性结合(图 3)。

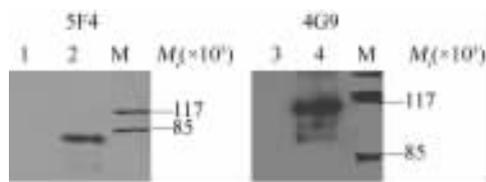


图 3 Western blotting 法检测杂交瘤培养上清抗体的特异性

Fig. 3 Specificity of antibody in supernatant of hybridomas as detected by Western blotting

1, 3: Empty vector; 2, 4: OVA66 fusion protein; M: Marker

### 2.5 单克隆抗体的亲和力

采用 ELISA 法测定单克隆抗体 5F4 和 4G9 亲和力常数, 并利用软件 OriginPro7.5 绘制曲线, 在 4 个不同抗原稀释度下, 对应 4 个不同的  $1/2 D_{450max}$ ; 同时对应 4 个抗体浓度,  $n$  值也有 4 个: 1, 2, 4, 8, 根据公式计算得到 5F4 的亲和力常数  $K_a$  为  $2.96 \times 10^{10}$  L/mol, 4G9 的亲和力常数  $K_a$  为  $0.40 \times 10^{10}$  L/mol。

### 2.6 抗原表位初步鉴定

以本室制备的 3 个截短的 OVA66 片段及纯化的 OVA66 融合蛋白为基础, 通过 Western blotting 法分析两株单克隆抗体分子所结合的表位片段。结果发现, 5F4 可以同时检测 OVA66 融合蛋白和 OVA66 片段 1, 4G9 则与 OVA66 融合蛋白和 OVA66 片段 2 同时起反应, 表明 5F4 和 4G9 针对 OVA66 的不同抗原决定簇(图 4)。

### 2.7 单克隆抗体的初步应用

在细胞免疫荧光法检测中, 5F4 和 4G9 单克隆抗体为一抗时, HeLa 细胞中的绿色荧光主要分布在细胞质中(图 5), 与之前本实验室观察到的 OVA66 蛋白在 HeLa 细胞中的定位一致。将两株单克隆抗体应用于流式细胞检测的结果(图 6)显示, OVA66

表达阳性的 HeLa 细胞中 OVA66 的阳性检测率分别为 97.82%(5F4) 和 98.44%(4G9); 表明两株单抗均可应用于流式细胞术中检测 OVA66 蛋白的表达。免疫组织化学方法的检测中, 当以 5F4 为一抗时, 癌细胞被染成深棕色, 并分布于细胞质中(图 7)。Western blotting 检测 HeLa 细胞中 OVA66 蛋白的表达结果显示, 使用两种纯化的腹水单克隆抗体时, 在 66 000 处出现目的条带; 而阴性对照在相应位置无条带, 表明 5F4 和 4G9 均能够用于蛋白印迹检测真核细胞中 OVA66 蛋白的表达(图 8)。

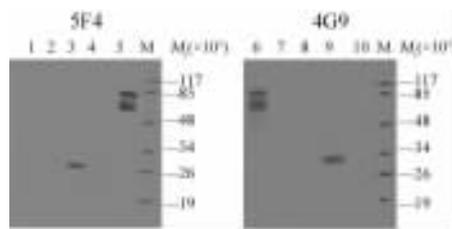


图 4 单克隆抗体 5F4、4G9 与其对应表位的鉴定

Fig. 4 Identification of antigenic epitopes of 5F4 and 4G9 McAb

1, 10: OVA66Fr3; 2, 9: OVA66 Fr2; 3, 8: OVA66 Fr1; 4, 7: Consensus protein; 5, 6: OVA66 fusion protein; M: Marker

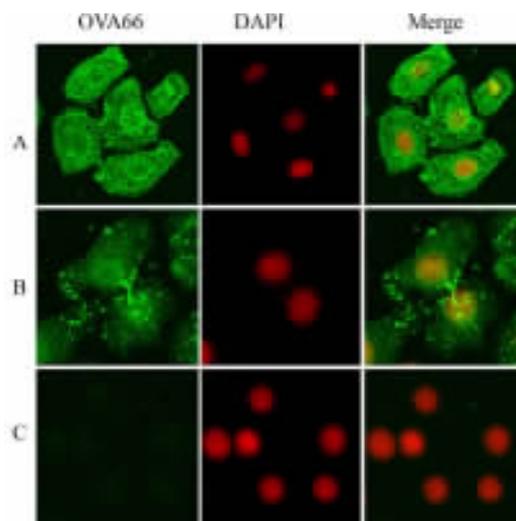


图 5 细胞免疫荧光以 5F4 和 4G9 为一抗检测 HeLa 细胞 OVA66 的表达 (×400)

Fig. 5 Detection of OVA66 expression in HeLa cells by immunofluorescence using 5F4 and 4G9 McAb (×400)

A: 5F4 McAb; B: 4G9 McAb; C: Normal mouse serum

## 3 讨论

目前, 肿瘤免疫治疗已成为继手术治疗、放射治

疗、化学治疗之后的第 4 种肿瘤治疗方法。新的肿瘤抗原的不断发现及克隆成功,不断丰富肿瘤免疫学理论,为肿瘤免疫诊断及治疗提供了新思路。目前筛选鉴定肿瘤抗原的方法主要有以下 4 种:(1) CTL 克隆识别法。这种方法是 1991 年 Boon 等<sup>[6]</sup>首次报道的。(2) MHC 分子结合肽洗脱法。(3) 表位预测法。上述 3 种方法均以特异性 CTL 为筛选条件,获得的抗原/抗原肽属于 T 细胞表位,可以激发有效的细胞免疫应答。(4) 重组 cDNA 表达文库的

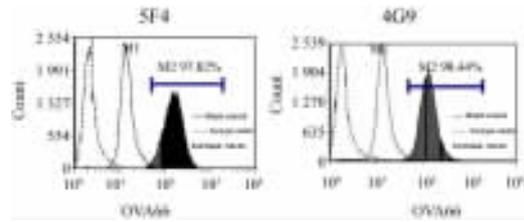


图 6 流式细胞术检测 5F4、4G9 单抗特异性结合 OVA66  
Fig. 6 5F4 and 4G9 McAb specifically interacted with OVA66 as detected by FACS

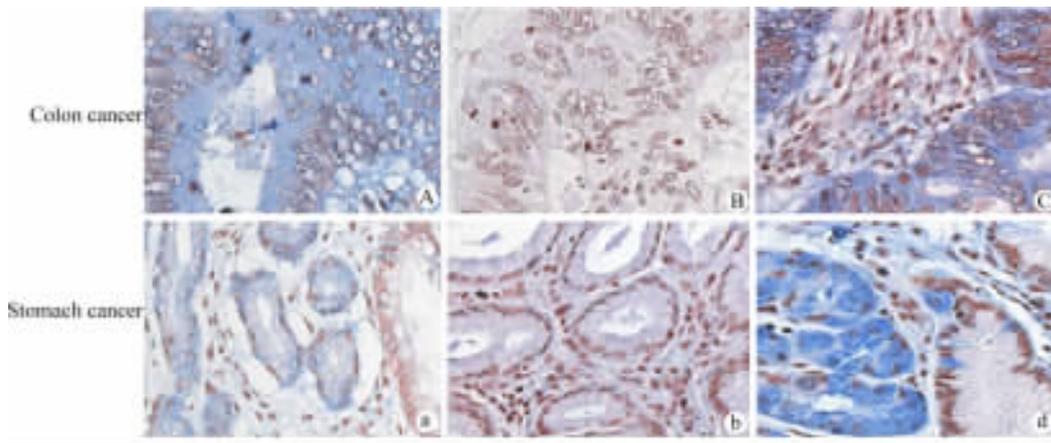


图 7 免疫组织化学法以单抗 5F4 为一抗检测 OVA66 的表达( ×400 )

Fig. 7 Detection of OVA66 expression by immunohistochemistry using 5F4 McAb ( ×400 )

A, a: Rabbit polyclonal antibody against OVA66; B, b: Normal mouse serum against OVA66; C, c: McAb 5F4

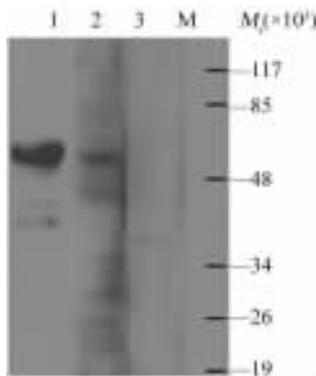


图 8 Western blotting 法以 5F4 和 4G9 为一抗检测 OVA66 在 HeLa 细胞中的表达

Fig. 8 Detection of OVA66 expression in HeLa cells by Western blotting using 5F4 and 4G9 McAb

1: 5F4 McAb; 2: 4G9 McAb; 3: Normal mouse serum; M: Marker

血清学分析( SEREX )。这种方法是 1995 年 Sahin 等<sup>[7]</sup>首先建立的,开创了血清学寻找肿瘤抗原的新时代。通过建立患者的肿瘤组织 cDNA 表达文库,利用患者的血清内存在针对肿瘤抗原的高滴度抗体

来筛选肿瘤抗原。到目前为止,已经筛选了 2 000 多种肿瘤抗原。肿瘤抗原表达的非肿瘤唯一性,表明在对肿瘤抗原的检测中需要特异性和灵敏度高的手段。相比较于多克隆抗体,单克隆抗体具有特异性高、均一性好、产量大等特点。所以单克隆抗体在很大程度上满足了肿瘤抗原检测的需求。如新克隆一个肿瘤抗原基因并获得其表达产物后,需用单克隆抗体经蛋白印迹方法对表达产物进行鉴定;为了解肿瘤抗原在细胞中的表达,可用单抗经蛋白印迹方法、细胞免疫荧光检测其蛋白表达量及在细胞中的定位;用单抗进行免疫组化分析肿瘤抗原在肿瘤组织中的表达情况;可以用单抗通过免疫共沉淀方法获得与肿瘤抗原相互作用的分子,从而了解肿瘤抗原的功能。而在临床应用上,用单抗检测肿瘤抗原的表达水平,是判断肿瘤发生、发展、预后最常用的方法之一。如癌胚抗原升高常作为消化道肿瘤筛查的指标,可利用甲胎蛋白筛选肝癌患者,在前列腺癌患者血液中可观察到前列腺特异抗原( PSA )升高。肿瘤耐药的小细胞肺癌患者中检测到 p53 蛋白高表达,统计学分析发现 p53 蛋白高表达与淋巴结

转移具有相关性,并提示疾病处于进展期<sup>[8]</sup>。标记了放射性核素的单克隆抗体还可应用于肿瘤的影像诊断,如在肿瘤放射免疫显像中,将单克隆抗体 G250 标记放射性核素后,可用于肾细胞癌体内肿瘤显像及淋巴结转移灶的检测<sup>[9]</sup>。20 世纪 70 年代英国学者 Milstein 和德国学者 Köhler<sup>[10]</sup>利用细胞融合技术首次成功地制备出单克隆抗体,这一开创性工作是生物技术发展中重要的里程碑。由杂交瘤产生的单克隆抗体有 3 个特点:特异性、均质性及无限的产量。它在医学、生物学、免疫学等诸多学科中发挥了巨大的作用。

OVA66 是本实验室筛选了卵巢癌 cDNA 文库所获得的一个新的肿瘤相关基因,其序列与报道的 CML66 一致<sup>[11]</sup>。为了解 OVA66 的生物学功能和理化性质,抗 OVA66 单克隆抗体是必不可少的研究工具。本研究通过构建 pET32b-OVA66 重组表达载体,并用 IPTG 诱导大肠杆菌表达融合蛋白,发现融合蛋白主要以包涵体形式存在。将融合蛋白变性处理后经 Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化目的蛋白,并经透析部分复性。常规的蛋白复性方法有稀释复性<sup>[12]</sup>、透析复性<sup>[13]</sup>、超滤复性<sup>[14]</sup>、柱上复性<sup>[15]</sup>等。其中,透析复性法简单、方便,在原核表达蛋白包涵体复性研究中应用较广。据报道<sup>[15]</sup>,采用梯度透析的方法,用 8 mol/L 尿素溶解的变性蛋白在尿素浓度为 4 mol/L 左右的溶液中开始复性,于尿素浓度为 2 mol/L 时复性结束。以此为基础,通过免疫 BALB/c 小鼠,采用经典的杂交瘤技术,得到两株稳定分泌单克隆抗体的细胞株。在对这两株单克隆抗体的免疫学特性进行分析后,发现两株抗体的亲和力有所差异,其所针对的表位片段也不相同,提示它们所针对的抗原表位具有不同的免疫原性。此外,在将这两株抗体应用于多个细胞生物学和免疫学的相关检测方法中,也发现一株杂交瘤细胞株分泌的抗体分子(5F4)具有很广泛的应用性,即可以应用到各种实验方法中;但是另外一株(4F9)则只能应用于流式细胞术和蛋白印迹的分析中,这种差别在于在不同实验方法的样品处理可能造成蛋白空间构象的轻微改变。如果改变的部位正好是抗体所针对的表位,那么就有可能限制了抗体的实际应用。所以,在将单克隆抗体应用于实验诊断中,选择合适的抗体在相应的实验方法中也是非常重要的。

综上所述,本研究中成功获得两株抗 OVA66 的单克隆抗体,这不仅为以后研究 OVA66 的生物学功能奠定了基础,在肿瘤的临床诊断方面也有潜在应用价值。

## [参考文献]

- [1] 王颖,葛海良. 从卵巢癌 cDNA 文库中筛选新的肿瘤标志物[J]. 上海免疫学杂志, 2002, 22(6): 371-374.
- [2] 杨振熙,李美星,尤强,等. 新的肿瘤相关抗原(OVA66)的研制和临床初步应用[J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(2): 198-200.
- [3] 李美星,王树军,王颖,等. 肿瘤抗原基因 OVA66 对肿瘤细胞生物学特征的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(2): 185-188.
- [4] 钱呈睿,张惠珍,李美星,等. 探讨干扰 OVA66 基因表达对移植瘤生物学功能影响[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(1): 1-7.
- [5] 董志伟,王琰,等. 抗体工程[M]. 2版. 北京:北京医科大学出版社, 2002: 267, 280-282, 305-308.
- [6] van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma[J]. Science, 1991, 254(5038): 1643-1647.
- [7] Sahin U, Türeci O, Schmitt H, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(25): 11810-11813.
- [8] Kalogiannidis I, Bobos M, Papanikolaou A, et al. Immunohistochemical bcl-2 expression, p53 overexpression, PR and ER status in endometrial carcinoma and survival outcomes[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2008, 29(1): 19-25.
- [9] Brouwers AH, Buijs WC, Oosterwijk E, et al. Targeting of metastatic renal cell carcinoma with the chimeric monoclonal antibody G250 labeled with (131)I or (111)In: an inpatient comparison[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(10 Pt 2): 3953S-3960S.
- [10] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256(5517): 495-497.
- [11] Yang XF, Wu CJ, McLaughlin S, et al. CML66, a broadly immunogenic tumor antigen, elicits a humoral immune response associated with remission of chronic myelogenous leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(13): 7492-7497.
- [12] Willows RD, Beale SI. Heterologous expression of the *Rhodobacter capsulatus* BchI, -D, and -H genes that encode magnesium chelatase subunits and characterization of the reconstituted enzyme[J]. J Biol Chem, 1998, 273(51): 34206-34213.
- [13] Yoshii H, Furuta T, Yonehara T, et al. Refolding of denatured/reduced lysozyme at high concentration with diafiltration[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(6): 1159-1165.
- [14] Middelberg AP. Preparative protein refolding[J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(10): 437-443.
- [15] Shi Y, Jiang C, Chen Q, et al. One-step on-column affinity refolding purification and functional analysis of recombinant human VDAC1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 303(2): 475-482.

[收稿日期] 2009-04-18

[修回日期] 2009-06-19

[本文编辑] 王莹

