

• 检验技术与方法 •

非对称二甲基精氨酸单克隆抗体的制备与鉴定*

刘培^{1,2}, 周建平³, 温新宇¹, 田亚平^{1△}

(1. 中国人民解放军总医院生化科, 北京 100853; 2. 南开大学医学院, 天津 300071; 3. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:目的 制备抗非对称二甲基精氨酸(ADMA)的单克隆抗体并对其临床检验应用做进一步研究。方法 应用固相合成技术人工合成免疫抗原短肽, 免疫 Balb/c 小鼠, 取其脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞进行融合, 用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选杂交瘤细胞, 有限稀释法进行亚克隆, ELISA 和蛋白质印迹法对抗体的特异性进行鉴定。结果 获得 2 株能稳定分泌抗 ADMA 抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 22-1-1 和 38-1-6, 这 2 株单克隆抗体均能够与 ADMA 特异性结合。结论 成功制备抗 ADMA 单克隆抗体, 为进一步应用到临床检验奠定了基础。

关键词:非对称二甲基精氨酸; 抗原合成; 杂交瘤; 单克隆抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-1034-03

Preparation and identification of antibodies against ADMA*

Liu Pei^{1,2}, Zhou Jianping³, Wen Xinyu¹, Tian Yaping^{1△}

(1. Department of Biochemistry, 301 Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To prepare and identify the monoclonal antibody against asymmetric dimethylarginine (ADMA) and to do further research on clinical application. **Methods** The short immune peptide antigen was synthesized by solid phase technology. Splenocytes from the Balb/c mice immunized by synthesized antigen were fused with myeloma cells SP2/0 for producing hybridoma. Hybridoma cell line secreting antibodies against ADMA was sifted by indirect ELISA and limiting dilution assay. The specificity of monoclonal antibodies against human ADMA were evaluated with Western blot and ELISA. **Results** Two hybridoma cell lines stably secreting monoclonal antibodies against ADMA were developed and named 22-1-1 and 38-1-6 respectively. By applying Western blot and ELISA, the results indicated that all monoclonal antibodies raised could specifically react with ADMA. **Conclusion** The success in the production of ADMA monoclonal antibody establishes foundation for application in the practice of clinical laboratory.

Key words: asymmetric dimethylarginine; synthetic antigen; hybridoma; monoclonal antibody

非对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)由蛋白内精氨酸残基胍基氮原子经蛋白精氨酸甲基转移酶催化生成^[1]。ADMA 主要代谢途径经二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)水解成瓜氨酸和二甲胺^[2-3]。现已证明,体内存在 ADMA 调节一氧化氮(NO)生成的内源性机制,即 ADMA 能竞争性抑制一氧化氮合成酶(NOS)活性,减少 NO 生成,造成血管内皮功能紊乱并导致多种血管疾病的发生^[3-4]。血浆中 ADMA 水平的变化与多种心血管疾病之间存在密切关系,被认为是心血管疾病新的标志物。因此,建立有效监测体内 ADMA 水平变化的方法至关重要。

因血浆中 ADMA 水平较低,因此检测较难。现在主要采用反向高相液相色谱(HPLC)联合荧光^[5-6]和质谱(MS)^[7-8]检测的方法。虽然这 2 种方法精确性、特异性高,但缺点是分析时间较长、样品处理复杂、机器昂贵,无法进行大样本分析,更不能应用到临床。作者预采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清或血浆中 ADMA 水平。ELISA 法主要优点是可以高通量对样本进行检测,符合临床要求。

1 材料与方

1.1 实验动物 SPF 级雌性 Balb/c 小鼠由维通利华公司提供,4~6 周龄小鼠用于免疫,8 周龄以上小鼠用于杂交瘤的腹

腔积液制备。

1.2 仪器与试剂 小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞来源于北京正旦国际公司, Jurkat 细胞购自北京协和医学院基础学院, 抗原肽-KLH 由北京中科亚光生物科技有限公司合成, 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司, 蛋白质印迹试剂购自 Thermo Scientific 公司, 其他试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

1.3 方法**1.3.1 ADMA 免疫原的设计合成**

1.3.1.1 ADMA 免疫原的设计 根据文献报道, 富含甘氨酸、精氨酸重复序列蛋白内的精氨酸易被甲基化修饰, 作者通过此线索设计合成多肽序列, 并利用同源模建等计算机虚拟技术模拟构建抗体的空间构象, 进而通过柔性分子对接技术合理判定抗原-抗体相互结合的动态作用模式, 确定抗体识别的功能抗原表位; 借助抗原表位的结构特征设计含有 8~10 个 ADMA 肽段。最终确定免疫抗原的序列 KLH-nADMA[nGR-GnP-nGR(n<8)], 采用 Fmoc/tBu 策略进行合成, 并利用蛋白质印迹和 ELISA 法对多肽产生的抗体进行特异性分析。

1.3.1.2 ADMA 免疫原的合成 采用 Fmoc/tBu 策略进行合成。具体过程如下: (1) 0.70 g H-CTC 树脂, 用 10 mL DMF 溶

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划, 2011AA02A111)。 作者简介: 刘培, 女, 研究员, 主要从事诊断试剂原料开发研究。

△ 通讯作者, E-mail: tianyp@301hospital.com.cn.

体出现阴性的情况最高,其次是抗 Jo-1 抗体、抗 PM-SCL 抗体,抗 PCNA 抗体、抗 AMA M2 抗体、抗 SCL-70 抗体,国内邓学新等^[8]、吴庆等^[11]、魏方等^[12]也有类似报道。本研究发现,间接免疫荧光法检测 ANA 的荧光模型与特异性 ANA 之间没有绝对的规律可言,尽管荧光模型具有一定的提示作用,但一种自身抗体可以出现不同的荧光模型,不同的自身抗体可以出现不同的荧光模型,仅依靠荧光模型很难推断特异性 ANA 的种类。蛋白质印迹法所使用的包被抗原必须是纯化的抗原,才能保证被测定抗原的准确性和特异性,但目前许多自身抗体的确切抗原尚不明确,许多抗原不易被纯化,故仅有少部分抗原有纯化的产品能用于特异性检测^[2];另外,一条检测膜条也很难做到包被所有特异性抗原,膜条检测项目的增加引起的成本增加,也会相应加重患者负担,因此,临床应根据患者的实际情况选择针对性的初筛试验与确认试验检测组合,在保证实验质量的情况下尽量减少患者的负担。

自身免疫性疾病的诊断除依赖于临床症状、体征及相应辅助检查外,很大程度取决于免疫学诊断,特别是自身抗体的检测结果,目前新的自身抗体还在不断涌现,各种新的检测方法被用于自身抗体的检测,这些变化一方面为医务工作者提供了更多的选择和诊断指标,另一方面也带来困惑,如何根据患者的病情选择针对性的自身抗体的检测组合十分必要。检验工作者应在了解各种测定方法的特性情况下尽量向临床宣传解释有关自身抗体及各种技术在临床检测的价值与优缺点,为临床合理地选择自身抗体及检测方法提供帮助。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 南京:

(上接第 1035 页)

抗体是检测的重要工具,虽然现在国内市场有许多 ADMA 试剂盒在出售,但抗体都是依靠进口,成本较高。本文设计了 3 种抗原,包括:免疫原(KLH-nADMA)和两种筛选抗原(BSA-nADMA 和 BSA-ADMA)。在筛选杂交瘤细胞株的过程中,首先经过间接 ELISA 双筛,免疫原为 KLH-nADMA,利用 BSA-nADMA 包板进行 ELISA 阳性筛选的同时,还用 BSA 蛋白包板进行阴性筛选,这样得到的杂交瘤细胞株只是针对 nADMA 多肽段,再用 BSA-ADMA 和 BSA 进行筛选,最后得到的杂交瘤细胞只是针对单个 ADMA。Jurkat 细胞株属急性 T 细胞白血病细胞系,含有 ADMA 蛋白。

本文获得的 ADMA 单克隆抗体不仅使 ADMA 抗体国产化,并为 ADMA 的临床检验应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Sedoris KC, Ovechkin AV, Gozal E, et al. Differential effects of nitric oxide synthesis on pulmonary vascular function during lung ischemia-reperfusion injury[J]. Arch Physiol Biochem, 2009, 115(1):34-46.
- [2] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney[J]. J Biol Chem, 1989, 264(17):10205-10209.
- [3] Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology[J]. Br J Pharmacol, 2006, 147 Suppl 1:S193-201.
- [4] Mookerjee RP, Malaki M, Davies NA, et al. Increasing dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome in severe alcoholic hepatitis[J]. Hepatology, 2007, 45(1):62-71.
- [5] Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, et al. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine

东南大学出版社, 2006:655-662.

- [2] 王兰兰. 自身抗体检测的应用与质量保障原则[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 10(28):987-990.
- [3] 仇宁, 陈志强. 抗核抗体和特异性自身抗体检测的临床应用[J]. 国外医学皮肤病学分册, 2001, 4(27):229-231.
- [4] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 3 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 648-704.
- [5] 周厚清, 董敏, 马路. ANA、抗抗 ds-DNA 抗体和 ENA 多肽抗体与自身免疫性疾病的关系[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 12(18): 2675-2676.
- [6] 王兰兰. 临床免疫学及免疫检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003:190-199.
- [7] 赖永才, 毛炜. 自身免疫性疾病中抗核抗体与抗 ENA 抗体的相关性分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 4(8):815-816.
- [8] 邓学新, 曲昌华. 818 例自身免疫性疾病抗 ENA 抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 临床检验杂志, 2005, 4(23):302-303.
- [9] 彭晓东, 王兰兰, 张瑞薇, 等. 抗核抗体荧光免疫检测质量控制方法的建立和应用[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 3(27):190-192.
- [10] 肖艳群, 陈慧英, 叶萍, 等. 上海地区自身抗体检测质量现状调查分析[J]. 检验医学, 2008, 5(23):298-300.
- [11] 吴庆. 抗可提取性核抗原抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 8(27):679-680.
- [12] 魏方. 抗核抗体与抗 ENA 抗体的相关性分析[J]. 实验与检验医学, 2009, 2(27):61-62.

(收稿日期:2013-12-15)

(ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method[J]. Clin Chim Acta, 2007, 384(1/2): 141-148.

- [6] Heresztyn T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of L-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 805(2):325-329.
- [7] Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 692(2):257-262.
- [8] Bishop MJ, Crow B, Norton D, et al. Direct analysis of un-derivatized asymmetric dimethylarginine (ADMA) and L-arginine from plasma using mixed-mode ion-exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 859(2):164-169.
- [9] Tsikas D, Schubert B, Gutzki FM, et al. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography-tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 798(1):87-99.
- [10] Teerlink T. ADMA metabolism and clearance[J]. Vasc Med, 2005, 10 Suppl 1:S73-81.
- [11] Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine[J]. Nature, 1988, 333(6174):664-666.

(收稿日期:2014-01-23)

胀后抽滤。称取 Fmoc-Arg(me₂, as)-OH 0.175 g, 用 2 mL DMF 溶解后加入 3 mmol/L DIEA 0.54 mL, 混合均匀后加入树脂中进行振荡。2 h 后抽滤, 用 DMF 清洗树脂, 用 10 mL DCM/ DIEA/ MeOH=80/15/5 对未反应的活性位点进行封端反应 30 min。DMF 清洗树脂 6 次。(2) 向洗好的树脂中加入 3 mL 20% PIPE/DMF, 摇动反应, 抽滤, 3 mL DMF 洗涤, 再重复此过程一次。将去除 Fmoc 的树脂取少量进行茚三酮检测, 检测结果为深蓝色。(3) 称适量 Fmoc-Ahx-OH、HOBt 和 BOP 溶解于 2 mL DMF 中, 向其中加入 0.80 mL 3 mmol/L DIEA 混合均匀后加入到树脂中, 振荡反应。80 min 后取少量进行茚三酮检测, 现象为亮黄色, 证明反应完全。将反应液进行抽滤, 并用 DMF 洗涤。(4) 重复过程(2)和(3)步骤, 加入 Fmoc-Cys(Trt)-OH。除去 Fmoc 保护基后, 依次用 DMF 洗涤, 甲醇洗 2 次, 抽干。(5) 将切割试剂(5% TIPS/TFA) 加入到待切的树脂中, 振荡 3 h, 将溶液过滤到离心管内, 树脂用少量 TFA 洗 3 次, 洗液并入滤液中, 加入到大量冷的无水乙醚中使多肽沉淀析出, 离心。用乙醚洗涤数次后干燥, 即得到多肽粗品 0.11 g, 粗品回收率 66%。

1.3.1.3 ADMA 多肽纯化及结构表征分析 采用 HP1100 型(美国安捷伦公司)反相 HPLC 仪对粗品进行纯化。并采用 MALDI-TOF MS 技术对纯化的多肽纯度和表征进行分析。

1.3.2 免疫动物 取 4 只 4~6 周龄雌性清洁级纯种 BALB/c 小鼠对其进行免疫。初次免疫, 取 100 g 免疫多肽与等量弗氏完全佐剂充分乳化, 对小鼠进行皮下多点注射免疫。3 周后用相同剂量的免疫原与等量弗氏不完全佐剂充分乳化免疫小鼠, 方法同前。2 周后独立免疫原免疫。在第 3 次免疫 2 周之后, 尾静脉采血测效价, 效价达到 32 000 时使用 100 g 免疫多肽进行小鼠腹腔加强免疫。

1.3.3 细胞融合 取完成免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞与处于对数生长期的 SP2/0 细胞按 10:1 的比例混合, 在 1 min 内加入预热的 PEG1500, 边加边轻轻搅拌, 滴加完后静置 60 s。用吸管每隔 2 min 加入 1、2、3 和 5 mL 预热至 37℃ 的不完全培养基, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。加入 5 mL HAT 培养基, 轻轻吹吸沉淀细胞, 使其悬浮并混匀, 然后以 100 μL/孔加入 96 孔细胞培养板中, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 1 周后观察并换 HT 培养液继续培养。

1.3.4 阳性克隆的筛选及克隆化 用间接 ELISA 法对杂交瘤细胞培养上清双筛。BSA-nADMA 作为初筛抗原, BSA-ADMA 进行二次筛选。筛选抗原包被板的 A₄₅₀ 值高于阴性对照(正常小鼠血清)2.1 倍为阳性, 将此阳性孔杂交瘤细胞用有限稀释法克隆化培养, 至所有杂交瘤上清液均呈阳性则建株。

1.3.5 单克隆抗体腹腔积液的制备和纯化 先给 BALB/c 小鼠腹腔内注射液体石蜡 0.5 mL, 1 周后腹腔注射能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞 0.5 mL(细胞数约为 2×10⁶ 个), 10~14 d 后收集小鼠腹腔积液, 用 ProteinG 纯化抗体, 纯化后的抗体加入等体积甘油混匀, 放置 -20℃ 保存。

1.3.6 单克隆抗体性质的鉴定 取细胞培养上清或纯化抗体, 直接用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试纸条进行抗体免疫球蛋白类鉴定, 该鉴定试纸基于胶体金免疫分析技术, 结果直观可肉眼判读。采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体的效价, Bradford 法测定抗体浓度。

1.3.7 抗体亲和力的测定 参照文献[9]所建立的间接 ELISA 法进行检测。以 3 种不同浓度(5、2.5、1.25 mg/L) BSA-ADMA 包板, 加入倍比稀释的抗体, 加二抗, TMB 显色后测 A₄₅₀ 值。以抗体浓度的对数为横坐标, 以 A₄₅₀ 值为纵坐标,

可得出 3 条反应曲线。以每条曲线上部平坦段的 A₄₅₀ 值作为 100%, 在曲线上查出 50% A₄₅₀ 值时相对应的抗体浓度, 分别为 (Ab)_t、(Ab')_t 和 (Ab'')_t, 当抗原包被浓度为 2.5 mg/L 时, K₁=1/2[2(Ab')_t-(Ab)_t]; K₂=1/2[2(Ab'')_t-(Ab')_t]; 当包被浓度为 1.25 mg/L 时, K₃=3/2[2(Ab'')_t-(Ab')_t]。这 3 个 K 值的平均值为亲和常数 K。

1.3.8 抗体识别特异性测定 采用间接 ELISA 的方法检测单抗与 BSA-ADMA 结合特异性, 并用筛选抗原 BSA-nADMA 作对照。另外采用 Western blot 法对抗体进行特异性鉴定。处理 Jurkat 细胞裂解物后进行 SDS-PAGE 电泳, 将电泳后的样品电转移至硝酸纤维(NC)膜。转移后用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h, 加入 1:1 000 单克隆抗体, 4℃ 过夜, TBS-T 洗膜后加入 1:1 000 的山羊抗小鼠 IgG, 37℃ 放置 1 h, 常规洗膜后, 加入化学发光试剂, 用 X 线片显影、定影。

2 结果

2.1 ADMA 多肽纯化及结构表征测定 从液相图中可见在 15.632 min 时有一个较强的出峰, 且主要为 1 个峰, 未见其他杂峰, 说明得到的物质纯度比较高。六氨基己酸相对分子质量为 131, 半胱氨酸相对分子质量为 121, 衍生产物 ADMA-ACA-CYS 相对分子质量为 454, 在质谱图中可以看到, 正离子液相 1.75 min 出现的峰, 其质谱图中含有 m/z 为 420.41 的碎片, 推测其应为 M+1 峰, 据此可推断抗原 ADMA-ACA-CYS 衍生化成功, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 免疫小鼠效价测定 间接 ELISA 法测定免疫小鼠效价, 选择血清效价大于 32 000 的右前标记的小鼠脾脏用于即将进行的细胞融合, 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 单克隆抗体的性质测定 经过多次双筛亚克隆后得到 2 株能够稳定分泌抗 ADMA 单克隆抗体的细胞株(22-1-1 和 38-1-6)。(1) 抗体亚型: 22-1-1 和 38-1-6 细胞株分泌的抗体亚型为 IgG2a1, 见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。(2) 抗体的效价和蛋白浓度: 间接 ELISA 测得抗体效价为 1:1.024×10⁶, 22-1-1 亚型蛋白浓度为 4.79 mg/mL, 38-1-6 亚型蛋白浓度为 2.86 mg/mL, SDS-PAGE 显示抗体纯度 95% 以上, 见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。(3) 抗体亲和力: 由此测得单抗的亲和常数 K 值为 5.8×10¹⁰ mol/L, 见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.4 抗体特异性测定 抗 ADMA 单克隆抗体不仅可以和 BSA-nADMA 反应, 而且可以和 BSA-ADMA 反应, 以 BSA 为对照时不与 BSA 反应。蛋白质印迹结果显示抗体可以和含有 ADMA 的蛋白反应。见图 6(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

3 讨论

NO 是血管内皮主要的内源性舒张因子, 具有抑制动脉粥样硬化、平滑肌细胞增殖、血小板聚集和黏附、单核细胞黏附等多种功能^[10-11]。ADMA 作为 NOS 的竞争性抑制剂会减少 NO 生成。已有大量文献证明 ADMA 升高是内皮功能障碍和心血管疾病的风险因子。心血管疾病的其他风险因素, 如高血压、糖尿病、高胆固醇血症等都与 NO 生物利用度降低和内皮功能障碍相关, 因此推测 ADMA 可能是血管内皮风险因素的逆向最终调节因子。制备抗 ADMA 单克隆抗体用于 ADMA 检测、纯化的研究, 具有广泛的应用前景。(下转第 1038 页)