

# 抗组织型纤溶酶原激活剂(tPA)单克隆抗体的制备和鉴定

丁皓 王结义 宋后燕

(上海医科大学分子遗传学研究室, 上海)

用从人黑色素瘤细胞培养液中提纯的tPA为抗原, 通过杂交瘤技术获得TA<sub>1</sub>、TA<sub>2</sub>、TA<sub>3</sub>和TA<sub>4</sub> 4株阳性杂交瘤细胞。经葡萄球菌A蛋白(SPA)亲和层析纯化抗tPA单克隆抗体(tPA McAb)。固相酶联免疫吸附测定(ELISA)诱生含McAb的小鼠腹水, 其效价达1:10<sup>5</sup>。这些tPA McAb均属IgG<sub>1</sub>亚型, 特异地作用于tPA(包括基因工程生产的rtPA), 与尿激酶(UK)无反应。用底物显色法测定表明所有tPA McAb均可抑制tPA的活性。

**关键词** 组织型纤溶酶原激活剂(tPA); 单克隆抗体; tPA活性

组织型纤溶酶原激活剂(Tissue-type plasminogen activator; tPA)属丝氨酸蛋白酶类, 能激活纤溶酶原生成纤溶酶, 后者促使血栓基质中的纤维蛋白降解, 使血栓溶解。因tPA对纤维蛋白有高度亲和性, 并受其激活, 因而tPA是高效特效的溶栓药物。制备抗tPA单克隆抗体(tPA McAb)有众多用途, 如用于大量纯化tPA, 准确地测定血浆中tPA含量, 以及作为探针进行tPA分子结构和功能的研究等。

本文用自人黑色素瘤细胞(B0 es)培养液中提纯的tPA(mtPA)为抗原, 制备了4株分泌tPA McAb的杂交瘤细胞, 并对其分泌的单克隆抗体进行了鉴定。

## 材料和方 法

### (一)tPA 抗原的纯化

按前报方法<sup>[1]</sup>从人黑色素瘤细胞培养液中提纯tPA。

### (二)tPA McAb的制备

纯化的tPA抗原(100μg)与福氏完全

佐剂混合, 每二周皮下注射Balb/c小鼠(7周龄, 雄性), 反复3次。末次静脉注射100μg tPA后第三天按常规方法<sup>[2,3]</sup>取免疫小鼠脾细胞分别与小鼠SP2/0和NS-1骨髓瘤细胞融合。经ELISA筛选和有限稀释反复克隆, 获得4株分泌抗tPA IgG的杂交瘤细胞(TA<sub>1</sub>、TA<sub>2</sub>、TA<sub>3</sub>、TA<sub>4</sub>)。将杂交瘤细胞注入经液体石蜡油预处理的Balb/c小鼠腹腔中, 诱生腹水, 含tPA McAb的腹水或培养液用葡萄球菌A蛋白(SPA)亲和层析法纯化。

### (三)ELISA

100μl tPA溶液(6μg/ml)包被96孔板, 4℃放置18h。用洗涤液(pH7.4 0.1mol/L PBS-0.5% Tween 20)洗涤3次后, 加入150μl, pH7.4 0.1mol/L PBS-1%BSA, 25℃, 2h。洗3次后加入待测培养液, 25℃, 2h。最后加入羊抗鼠IgG辣根过氧化物酶标记抗体(北京生物制品研究所)(1:100)进行反应2h, 加入OPD显色, 于波长490

本文于1989年3月6日收到。

制备和鉴定tPA McAb时得到何球藻、洪锦心等教授的热忱指导和帮助, 特此致谢。

nm处测定。

#### (四)杂交瘤细胞染色体分析

加秋水仙素(终浓度 $0.08\mu\text{g/ml}$ )于杂交瘤细胞培养3h,然后按常规方法<sup>[4]</sup>进行。

#### (五)tPA McAb特性鉴定

1. tPA McAb效价测定:用ELISA法进行。

2. tPA McAb分子量测定:以SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定分子量。参照Laemmli方法<sup>[5]</sup>,用10%分离胶和5%浓缩胶,样品用巯基乙醇还原。

3. tPA McAb亚类鉴定:将4株杂交瘤细胞培养液浓缩20倍,用兔抗鼠各种Ig及亚类抗血清(上海生物制品研究所)作琼脂双扩散。

4. tPA McAb特异性鉴定:将基因工程生产的rtPA(Boehringer Mannheim公司提供)和纯化的尿激酶(上海生化制药厂),以及从Boes细胞培养液中纯化的mtPA作抗原包被,对纯化的tPA McAb进行测定(ELISA法)。

5. tPA McAb对tPA活性影响:纯化的tPA McAb( $0.5\text{mg/ml}$ )用TB缓冲液(pH 8.8  $0.1\text{mol/L}$  Tris-HCl,含0.01% TritonX-100)稀释后,与等体积的含tPA( $0.05\mu\text{g/ml}$ )TB缓冲液混匀, $4^{\circ}\text{C}$ 放置18h,取 $100\mu\text{l}$ 上述反应液用底物显色法<sup>[6]</sup>测定残余的tPA活性。以抗胃癌SGC单克隆抗体和抗刀豆蛋白ConA单克隆抗体(上海肿瘤研究所洪锦心先生惠赠)作为对照。

## 实验结果

### (一)细胞融合及克隆化

分别用SP2/0和NS-1与免疫小鼠脾细胞融合,共346孔。320孔有克隆细胞生长,融合率为92.5%。用ELISA法筛选出

51孔阳性,阳性率15.9%。挑选20个强阳性孔进行克隆,经3次有限稀释后获得四株稳定分泌抗tPA单克隆抗体杂交瘤细胞。经染色体分析其染色体数为97,符合杂交瘤细胞特征。

### (二)tPA McAb效价及Ig亚类鉴定

4株杂交瘤诱生的小鼠腹水的抗体效价均大于 $10^5$ ,都属于IgG<sub>1</sub>亚类。

### (三)tPA McAb分子量测定

纯化的tPA McAb进行SDS-PAGE分子量测定显示两条蛋白条带,分别为2万及5万左右,符合IgG的轻链和重链的分子量。

### (四)tPA McAb特异性鉴定

纯化的tPA McAb只与从人黑色素瘤细胞培养液提纯的mtPA和基因工程生产的rtPA发生免疫反应,与纯化的尿激酶(UK)作用未见免疫反应(表1)。

### (五)tPA McAb对tPA活性的影响

纯化的tPA McAb( $3.1 \times 10^{-6}\text{mmol/L}$ — $1.5 \times 10^{-10}\text{mmol/L}$ )与tPA( $4 \times 10^{-12}\text{mmol/L}$ )作用,用底物显色法测定残余的tPA活性。所有tPA McAb均显著地抑制tPA活性,其中TA<sub>1</sub>和TA<sub>2</sub>稀释至20000倍仍有抑制作用。而与tPA无关的McAb(抗SGC和抗ConA的McAb)则不抑制tPA活性(图1)。

## 讨 论

制备tPA McAb可用于研究tPA分子结构和功能;用于大量制备和纯化tPA;建立特异性测定tPA的免疫学方法,正确反映血浆中tPA浓度的变化以及抗tPA纤维蛋白结合位点的McAb可以用于监测tPA治疗中纤维蛋白原的降解情况等<sup>[7]</sup>。我们以从人黑色素瘤细胞培养液纯化的mtPA作为抗原,免疫Balb/c小鼠,构建

表 1 tPA McAb与不同纤溶酶原激活剂反应

Table 1 Reaction of monoclonal antibody to various plasminogen activators

激活剂 Activators	固相酶联免疫吸附测定法 Enzyme linked immunosorbent assay
mtPA	+
rtPA	+
UK	-

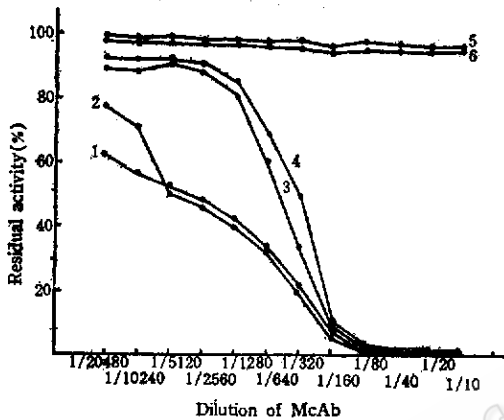


图 1 tPA McAb抑制tPA活性

Fig.1 Inhibition of tPA activity by McAb

1. TA<sub>1</sub>; 2. TA<sub>2</sub>; 3. TA<sub>3</sub>; 4. TA<sub>4</sub>  
5. Anti SGC McAb 6. Anti ConA McAb

了4株分泌tPA McAb的杂交瘤细胞。经ELISA法证实纯化的tPA McAb只与mtPA和rtPA反应,不与UK反应。纯化的tPA McAb是由分子量2万及5万之轻、重链组成,免疫属性为IgG<sub>1</sub>亚型,接种小鼠腹水效价达1:10<sup>5</sup>,均可强烈地抑制tPA

的活性。

tPA分子是由527个氨基酸组成的糖蛋白,含1个信号肽(S)、前肽(P)、1个指形结构(F)、1个上皮生长因子样结构(E)、2个三角区(K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>)和蛋白酶区(L)<sup>[8]</sup>。tPA的活性中心位于蛋白酶区。K<sub>2</sub>区含纤维蛋白结合位点,对tPA的活性和tPA对血栓的特异溶解作用都有十分重要的意义。我们制备的tPA McAb均可抑制tPA的活性,可能它们是作用于tPA分子中含活性中心的轻链结构域,但不能排除识别tPA纤维蛋白结合位点及其他结构域的可能。MacGregor等发现<sup>[9]</sup>,一些既不识别tPA活性中心,也不识别纤维蛋白结合位点的tPA McAb,同样有效地抑制tPA的活性。鉴定tPA McAb特异作用的tPA分子中的不同抗原决定簇最有效方法<sup>[10]</sup>,是用重组DNA技术建立一系列编码tPA不同结构域的cDNA克隆,然后表达和纯化相应tPA分子的片段,运用这些片段作为抗原来鉴定各种tPA McAb特异作用的tPA结构域,即抗原决定簇。这方面的工作我们正在进行。

用基因工程生产的rtPA与从人黑色素瘤细胞培养液提纯的mtPA,其结构和性质几乎完全相同<sup>[11]</sup>。我们制备的tPA McAb对rtPA具有反应,因此可用于纯化和鉴定基因工程生产的rtPA。

## 参 考 文 献

- [1] 王结义等,生物工程学报,4(3):175,1988.  
[2] Kohler, G. and Milstein, C.:*Nature*, 256:495, 1975.  
[3] 何球藻等,上海第一医学院学报,12(6):321,1985.  
[4] 章谷生等主编,单克隆抗体在医学上的应用,上海科技出版社, p.404, 1987.  
[5] Laemmli, U.K. et al.:*Nature*, 227:680, 1970.  
[6] 王结义等,中华医学检验杂志,12(2):120,1989.  
[7] 丁皓等,国外医学分子生物学分册,10(3):114,1987.  
[8] Pannekoek, H. et al.:*Thromb. Haemostasis*, 58(1):253, 1987.  
[9] MacGregor, I.R. et al.:*Thromb. Haemostasis*, 54:45, 1985.  
[10] van Zonneveld, A.J. et al.:*Thromb. Haemostasis*, 57(1):82, 1987.  
[11] Pennica, D. et al.:*Nature*, 301:214, 1983.

## PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR

Ding Hao Wang Jieyi Song Houyan

*(Department of Molecular Genetics, Shanghai Medical University, Shanghai)*

Four hybridoma clones, named TA<sub>1</sub>, TA<sub>2</sub>, TA<sub>3</sub> and TA<sub>4</sub>, producing monoclonal antibodies to tissue-type plasminogen activator(tPA) produced from human melanoma cells were obtained by fusion of mouse myeloma cells (SP2/0 and NS-1) and spleen cells previous immunized with purified tPA. The antibody titers of the four hybridoma ascites were more than  $1 \times 10^5$  determined by ELISA. The double immune diffusion test showed that all hybridoma supernatants contained mouse IgG<sub>1</sub>. These monoclonal antibodies react only with tPA derived from human melanoma cells and rtPA prepared by genetic engineering, not with purified UK. The monoclonal antibodies all inhibited the activity of tPA completely.

### Key words

Tissue-type plasminogen activator; monoclonal antibody; activity of tPA