

# 尖吻蝮蛇蛇毒纤溶因子单克隆抗体的制备<sup>①</sup>

邱鹏新 黎明涛 苏兴文 陈家树 颜光美

(中山医科大学药理教研室; 广州, 510089)

**摘要** 目的: 制备从尖吻蝮蛇蛇毒中分离的纤溶因子的单克隆抗体, 为克隆基因提供特异性的探针。方法: 将纤溶因子免疫 Balb/C 小鼠, 取脾细胞与 SP 2/0 骨髓瘤细胞融合, 筛选稳定分泌抗体的细胞株。采用血纤维蛋白平板法, 观察单克隆抗体能否抑制纤溶因子的纤溶作用。结果: 获得 2 株稳定分泌单克隆抗体的细胞株。Western 印迹显示该单克隆抗体能特异地与纤溶因子结合, 与其它蛋白无交叉反应, 此外, 这 2 株单克隆抗体具有抑制纤溶因子溶解人血纤维蛋白的作用。结论: 这 2 株抗体不仅能特异地与纤溶因子结合, 而且具有抑制纤溶的作用, 为克隆纤溶因子基因及其功能表达提供了特异性的研究工具。

**关键词** 响尾蛇毒液类/分离和提纯; 纤维蛋白溶解; 纤溶酶; 抗体, 单克隆

**中图分类号** R 392.11

## Preparation of Monoclonal Antibody for the Fibrinolytic Factor From the Venom of Agkistrodon Acutus

Qiu Pengxin Li Mingtao Su Xingwen Chen Jiashu Yan Guangmei

(Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

**Abstract Objective:** To prepare a monoclonal antibody (McAb) for the fibrinolytic factor from the crude venom of Deinagkistrodon acutus in order to provide a specific probe for the isolation and cloning of the gene. **Methods:** The fibrinolytic factor was used to immunize Balb/C mouse. Then the splenocytes taken from the mouse were fused with SP 2/0 myeloma and then the stable hybridoma clones were screened. The method of plasmin plate was used to determine if the McAb can inhibit the fibrinolysin action of the fibrinolytic factor. **Results:** Two stable hybridoma clones were obtained. Western blot indicated that the two clones could bind specifically to the fibrinolytic factor, and no cross-reaction with other venom proteins was observed. Also, they could inhibit the fibrinolytic action of the fibrinolytic factor. **Conclusion:** Two stable hybridoma clones were obtained which secrete McAb against fibrinolytic factor. The McAb not only bind specifically to the fibrinolytic factor, but also has an inhibitory effect on its fibrinolytic activity so that McAb can be used as a specific tool for the cloning and functional expression of the fibrinolytic factor gene.

**Subject headings** crotalid venoms/isolation & purification; fibrinolysis; plasmin; antibodies, monoclonal

血栓可引起病死率极高的栓塞性疾病如脑血栓形成和心肌梗塞<sup>[1]</sup>。目前临床使用的抗栓药主要是链激酶、尿激酶、组织型纤溶酶原激活物(tPA)<sup>[2]</sup>。它们的作用机制是将内源性的无活性纤溶酶原激活为纤溶酶, 后者水解血栓中的纤维蛋白而起到溶栓作用<sup>[3]</sup>。这类药物的共同特点是间

接作用, 所以起效慢, 作用弱。tPA 虽然选择性溶解纤维蛋白, 但由于价格昂贵而限制广泛应用。因此, 寻找作用快、作用强的新一类溶栓药显得很有必要。本课题组从尖吻蝮蛇蛇毒中分离和纯化出一种纤溶因子, 具有直接的溶栓作用<sup>[4]</sup>。但尖吻蝮蛇来源较少, 取蛇毒具有危险性, 更加重要的是粗

<sup>①</sup> 国家杰出青年科学基金资助课题, No. 39625022

毒纯化较困难,极少量其它成分的残留也可能产生致命反应。基因工程技术是解决上述问题的有效方法。本课题组用纯化的尖吻蝥蛇毒纤溶因子为抗原,成功地制备了2株特异性单克隆抗体,并且证明其结构与功能特点,为克隆基因提供了有效的工具。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

尖吻蝥蛇毒购自安徽省祁门蛇毒研究所,DEAE-sephadex A-50和sephadex G-50为Pharmacia的产品;低分子标准蛋白为上海生化技术产品,RPMI1640、HAT、HT、聚乙二醇(MW3700)为Sigma产品;尿激酶为珠海丽宝生物化学制药厂产品;人血浆为广东省血液中心提供。

### 1.2 尖吻蝥蛇毒纤溶因子的分离纯化及鉴定

用EDAE sephadex A-50及sephadex G-50分离纯化尖吻蝥蛇毒纤溶因子<sup>[4]</sup>。

按文献[5]进行聚丙烯酰胺电泳,浓缩胶浓度为40 g/L(pH 6.7),分离胶浓度为100 g/L(pH 8.9)。SDS聚丙烯酰胺电泳浓缩胶浓度为50 g/L,分离胶浓度为150 g/L。

### 1.3 纤溶因子的酶活性测定

用血纤维蛋白平板法<sup>[6]</sup>观察纤溶因子对纤维蛋白的溶解作用。吸取0.05 mL纤溶因子溶液,终浓度分别为31.25、62.5、125、250、500、1 000 mg·L<sup>-1</sup>,分别加到预先制备的人纤维蛋白平板,每个浓度点做3个孔。用生理盐水作阴性对照,5×10<sup>5</sup> mol·S<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>尿激酶作阳性对照。在37℃水浴中温育观察18 h。

用分解酪蛋白方法<sup>[7]</sup>观察纤溶因子的蛋白酶活性。每管加400 μg酪蛋白,然后加不同浓度的纤溶因子,37℃反应1 h。加φ=15%三氯醋酸500 μL终止反应,离心取上清,加入3 mL的0.55 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,酚试剂0.6 mL,37℃反应15 min。以分光光度计在680 nm波长比色,根据酪氨酸吸收度标准曲线计算酪氨酸的量。

### 1.4 纤溶因子单克隆抗体的制备及鉴定

1.4.1 免疫与细胞融合及克隆筛选 将纯化和定性的纤溶因子(1 g/L)与等体积的完全佐剂混合乳化后,给予7周龄的Balb/C小鼠皮下注射,每次注射0.2 mL,2周免疫1次,共免疫3次。融合前3

d以0.2 mL纤溶因子(1 g/L)尾静脉注射。

用Koher方法<sup>[8]</sup>,取免疫小鼠脾细胞制备细胞悬液与鼠SP2/10骨髓瘤细胞按10:1比例混合,在φ=50%PEG(u 3700)作用下融合后,分别接种在5块96孔细胞培养板,置于φ=5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。第1天至第4天用含φ=15%胎牛血清的HAT选择培养基,第4天至第10天改用HT培养基。第10天后改用含φ=10%胎牛血清的RPMI-1640。用酶联免疫分析法对单克隆抗体进行筛选及效价测定。

1.4.2 Western印迹 将标准蛋白、纯化纤溶因子和尖吻蝥蛇全毒加入到SDS聚丙烯酰胺凝胶中,电泳后转移到硝酸纤维素膜上,用氨基黑染色<sup>[9]</sup>。另将同样处理载有尖吻蝥蛇全毒的硝酸纤维素膜切成小条,先用φ=1%牛血清白蛋白封闭1 h,再加入按1:20 000稀释的单抗孵育2 h后,用PBS液洗3次,加1:1 000 HRP-兔抗鼠IgG孵育1 h,按免疫组化PAP法进行免疫染色。

1.4.3 抗体对纤溶因子酶活性的抑制作用 用血纤维蛋白平板法<sup>[6]</sup>,观察抗体对纤溶因子溶解人纤维蛋白的抑制作用。将抗体稀释成等体积的不同浓度,分别为1:1、1:3、1:9、1:27、1:81、1:243。纤溶因子终浓度为1 000 mg·L<sup>-1</sup>。将上述纤溶因子及不同浓度抗体的混合液50 μL,滴入预先制备的人纤维蛋白板,37℃孵育18 h,测量溶解面积,以尿激酶作阳性对照。

用分解酪蛋白方法<sup>[7]</sup>,观察单克隆抗体对纤溶因子分解酪蛋白的抑制作用。各管酪蛋白400 μL(10 g/L)加纤溶因子20 μg,然后加不同浓度的抗体。

### 1.5 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Student's *t*检验。

## 2 结 果

### 2.1 尖吻蝥蛇毒纤溶因子蛋白质纯度

聚丙烯电泳结果显示,纯化前的尖吻蝥蛇粗毒有15条蛋白带。先后经EDAE-sephadex A-50和sephadex G-50分离纯化的纤溶因子,在聚丙烯电泳中显示为1条带。以低分子标准蛋白为对照,SDS聚丙烯酰胺电泳显示纯化的纤溶因子为单一肽链,相对分子量为25 ku。

### 2.2 尖吻蝥蛇毒纤溶因子直接溶解纤维蛋白的证据

①纤溶因子对人纤维蛋白具有溶解作用,溶解

面积随着纤溶因子浓度的增加而增大(图 1)。尿激酶作阳性对照。②纤溶因子分解酪蛋白产生酪氨酸,它的产生随着反应体系中纤溶因子浓度的增高而增加(图 2),表明纤溶因子确实具有纤溶酶样作用。相反,尿激酶不能分解酪蛋白。

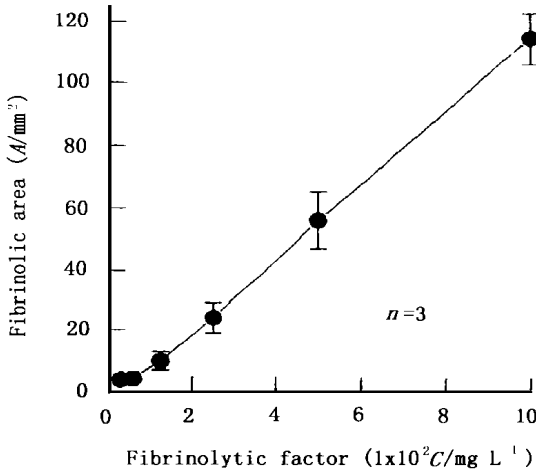


图 1 纤溶因子分解酪蛋白生成酪氨酸的作用

Fig. 1 Fibrinolytic action of the fibrinolytic factor on fibrin

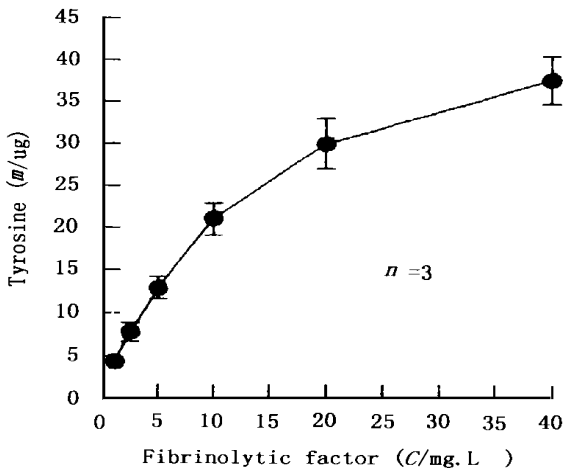


图 2 纤溶因子分解纤维蛋白的作用

Fig. 2 Fibrinolytic factor disintegrate casein into Tyrosine

2.3 杂交瘤细胞系的建立

通过 2 次融合筛选到 20 株抗纤溶因子细胞株,其中 2 株特异性高(命名为 C1、C4)。用 IgG 分类试剂盒检测表明 2 株杂交瘤分泌的单克隆抗体均为 IgG1。

2.4 Western 印迹

为了证实抗体对纤溶因子特异性反应,而与其它蛋白无交叉反应,采用 Western 印迹,实验表明

该 2 株细胞抗体能特异地与尖吻蝮蛇毒中相对分子量 25 ku 的纤溶因子特异性结合。而与其它带没有反应。

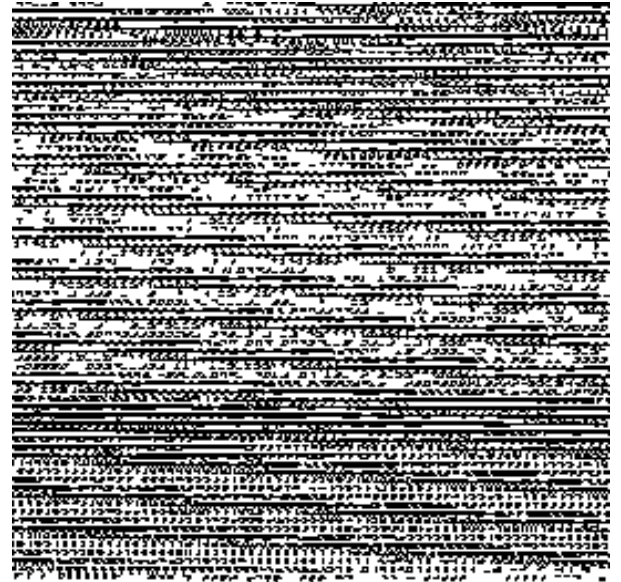


图 3 尖吻蝮蛇毒纤溶因子单克隆抗体免疫印迹

Fig. 3 Western blot analysis of McAb specific for the fibrinolytic factor from the venom of Agkistrodon Acutus

A. C1 McAb B. C4 McAb C. Crude venom  
D. Fibrinolytic factor E. Marker Protein

2.5 单克隆抗体对纤溶因子活性的抑制作用

用纯化的抗体抑制纤溶因子对人纤维蛋白的分解,见图 3,图 5。用纯化的抗体抑制纤溶因子对酪蛋白的分解,见图 4。

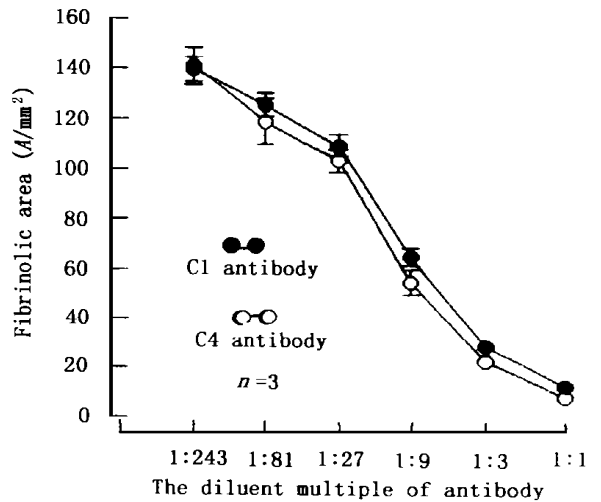


图 4 单克隆抗体对纤溶因子溶解酪蛋白的抑制作用

Fig. 4 inhibitory effect of McAb on fibrin disintegrating of the fibrinolytic factor

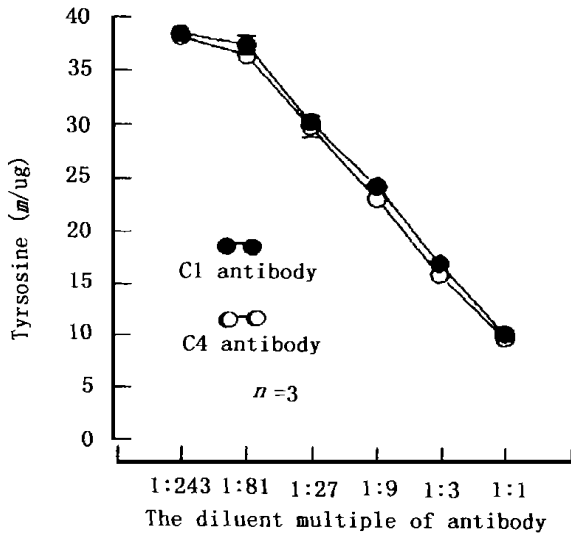


图5 单克隆抗体对纤溶因子溶解纤维蛋白的抑制作用

Fig.5 Inhibitory effect of McAB on casine disintegrating of the fibrinolytic factor

制备的2株单克隆抗体对纤溶因子的纤溶作用和对纤溶因子分解酪蛋白具有抑制作用,提示这2株单克隆抗体能与纤溶因子的酶活性中心或其相关基团结合并产生抑制作用(图5)。

### 3 讨论

链激酶、尿激酶和tPA的溶栓作用是间接的,即通过激活纤维蛋白溶酶原使之成为纤溶酶,从而发挥溶栓作用。已有报道<sup>[10]</sup>,在血栓栓塞性疾病如脑血栓形成和心肌梗塞病人机体,纤溶酶原消耗过度,存量减少,从而在底物水平上限制了纤溶酶的生成,使tPA等3种激酶的生物效应不能完全发挥。我们从尖吻蝮蛇毒中分离和纯化的这种纤溶因子在体外具有纤溶酶样作用,即分解酪蛋白和直接溶解纤维蛋白,证明这种纤溶因子具有直接溶栓作用,正好克服了上述底物的限制作用。

本研究获得的单克隆抗体应该能够与变性抗原特异性结合,为此,我们采用Western印迹法,从

上述20多个细胞株中,鉴定出2株能够与变性抗原呈特异结合抗体的细胞株。这2株单克隆抗体具有抑制纤溶因子的纤溶作用,提示有潜在临床与实验应用价值,将为克隆目的基因及功能表达提供特异性的研究工具。

### 参 考 文 献

- 1 石英. 血栓与血栓性疾病的治疗进展. 新疆医学, 1989, 19(4): 231
- 2 翟治清. 高效溶栓剂的研究 纤溶酶原激活剂的改造及应用前景. 国外医学, 输血及血液学分册, 1993, 16(1): 1
- 3 江明性. 溶栓药研究的发展. 见: 汪 钟, 郑植荃主编. 中国心血管药理通讯第四届全国心血管药理学术会议专辑. 北京: 北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1991. 51 ~ 54
- 4 陈家树. 五步蛇毒纤溶组分II的分离和若干药效学的特征. 中国药理学通报, 1993, 9(1): 22
- 5 张承圭, 吕慧梅. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 见: 何忠效, 张树政主编, 电泳. 北京: 科学出版社, 1990. 12 ~ 74
- 6 刘蔼如. 纤维蛋白溶解试验. 见: 邓家栋, 杨崇礼, 杨天楹主编. 血液病实验诊断. 天津: 天津科学技术出版社, 1985. 266 ~ 268
- 7 甄文莹. 纤维蛋白溶酶原测定. 见: 邓家栋, 杨崇礼, 杨天楹主编. 血液病实验诊断. 天津: 天津科学技术出版社, 1985. 263 ~ 265
- 8 Koher G, Mdstem E, Milsterin C, *et al*. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975, 256(5517): 459
- 9 邱鹏新, 颜光美, 胡本荣, 等. 苯二氮卓受体的提纯及受体亚基单克隆抗体的制备. 中山医科大学学报, 1995, 16(增刊): 42
- 10 易正山, 凌光鑫, 周淑芸, 等. 人血浆纤溶酶原和 $\alpha_2$ 抗纤溶酶原测定的临床应用. 中华血液学杂志, 1994, 15(9): 475

(1998-03-11 收稿 1998-07-21 修回)