

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)08-0834-04

人成纤维细胞生长因子-21 单克隆抗体的制备及抗原表位的确定

郝智超, 徐黎明, 白银, 王琪, 王文飞, 李德山*

(东北农业大学生命科学学院生物制药教研室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

[摘要] 目的 制备小鼠抗人成纤维细胞生长因子(hFGF)-21 单克隆抗体(mAb), 通过细菌展示确定该 mAb 的抗原表位。方法 用 hFGF-21 作为检测和免疫抗原, 间接 ELISA 筛选分泌抗人 hFGF-21 mAb 的杂交瘤细胞株; 用 FITC 标记该 mAb, 并克隆 hFGF-21 的不同片段到展示载体 Apex 上, 通过流式细胞仪筛选其抗原表位。结果 成功筛选出 1 株抗 hFGF-21 抗体的细胞株, 其分泌抗体重链的亚型为 IgG 2b, 轻链为 Kappa 链; 该杂交瘤细胞株腹水的效价为 $1:4.096 \times 10^6$; 传 30 代及液氮中保存 3 个月, 该细胞株能稳定分泌抗 hFGF-21 mAb, 且效价稳定; Western blot 法检测证明该抗体与人 FGF-21 有很好的特异性; 该 mAb 与小鼠 FGF-21 有交叉反应; 通过流式细胞仪对抗原表位的筛选, 该 mAb 可与 hFGF-21 下游的第 107~121 个氨基酸反应。结论 成功的制备出特异性、高稳定性的小鼠抗 hFGF-21 mAb, 确定了该 mAb 的抗原表位在第 107~121 位氨基酸。

[关键词] 人成纤维细胞生长因子-21; 单克隆抗体; 细菌展示; 流式细胞术

[中图分类号] R392.12, R392.11, Q813.2 **[文献标志码]** A

Preparation of monoclonal antibodies against hFGF-21 and identification of epitope

HAO Zhichao, XU Liming, BAI Yin, WANG Qi, WANG Wenfei, LI Deshan*

Department of Biopharmaceutics, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

[Abstract] **Objective** To prepare monoclonal antibodies (mAbs) against human fibroblast growth factor 21 (hFGF-21), and identify the epitope of hFGF-21 mAb through bacterial display. **Methods** With hFGF-21 as an immunogen and detective antigen, we screened hybridoma cell lines secreting anti-hFGF-21 mAbs using indirect ELISA. The different fragments of hFGF-21 were cloned into bacterial display vector (Apex) to identify the epitope by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using FITC-labeled mAbs. **Results** We obtained a stable hybridoma cell line secreting mAbs against hFGF-21; the heavy and light chains of the mAb were IgG 2b and Kappa, respectively. The ascites titer of the hybridoma cell line was $1:4.096 \times 10^6$. The cell line was stable after 30 passages or when stored in liquid nitrogen for 3 months. Western blotting showed the mAbs could bind to hFGF-21 specifically, and could cross-react with murine FGF-21. FACS indicated that this antibody could bind to downstream 107-121 amino acids of hFGF-21. **Conclusion** The mAbs against hFGF-21 we prepared showed high specificity and stability; the epitope of the mAbs was 107-121 amino acids of hFGF-21.

[Key words] hFGF-21; monoclonal antibody; bacterial display; FACS

成纤维细胞生长因子-21 (fibroblast growth factor-21, FGF-21) 是成纤维细胞生长因子家族的一名新成员, 具有降低血糖、降低甘油三酯、升高高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)、降低低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 等功能, 并且可以维持人体血糖稳定, 避免高胰岛素血症、体重增加, 水肿等常规降糖药物所带来的副作用^[1]。

细菌展示技术又称以细胞内膜为基础的细胞周

质表达技术 (anchored periplasma expression technology, APEX)。该技术特点是利用细胞间质膜脂蛋白的信号肽 NlpA leader 将目的蛋白运送到细菌间质腔, 从而与其融合的抗原/抗体片段展示于细菌内膜外侧, 当细菌外膜被溶菌酶消化后成原生质球后, 孵育液中的抗体 (抗原) 可进入细菌周质与锚定在细胞内膜外侧的抗原 (抗体) 片段结合, 然后将其与荧光标记的抗体进行共孵育, 阳性克隆可被流式细胞分离

收稿日期: 2013-02-10; 接受日期: 2013-03-15

基金项目: 东北农业大学博士启动基金(2010RCB52)

作者简介: 郝智超(1984-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生

Tel: 0451-55190645; E-mail: haozhichao12345@hotmail.com

*Corresponding author, 李德山, E-mail: deshanli@163.com

仪高通量的检测分离^[2-3]。相比于传统的抗原表位筛选方法,细菌展示技术与流式细胞仪高通量筛选的结合为抗原表位的筛选节省了很多宝贵的时间。

目前研究指出,FGF-21与肥胖、II型糖尿病、冠心病及慢性肾病有密切关系^[4-6],因此可以通过利用此单克隆抗体(mAb)检测体内FGF-21水平的变化来反应疾病的发生情况。迄今国内外尚无相关文献报道hFGF-21 mAb,因此该mAb的制备及其抗原表位的确定可以为今后相关药物的筛选提供必要的帮助。FGF-21在体内的代谢一直是人们研究的热点问题,而机体内的代谢网络是一个极其复杂的系统,已有大量研究证明FGF-21在其中起着重要的作用,但是目前为止,该因子在机体代谢系统中所占的地位还没有完全揭示,此mAb的制备,也为FGF-21的作用机制研究提供工具。

1 材料和方法

1.1 材料 Sp2/0由本实验室保存;Apex细菌展示载体由本实验室构建;hFGF-21-sumo载体由本实验室构建。hFGF-21由本实验室表达和纯化;HRP标记的山羊抗小鼠抗体购自eBioscience公司;抗体亚型鉴定试剂盒购自Southern Biotech公司;FITC试剂盒购自赛默飞世尔科技有限公司。雄性BALB/c小鼠,6~8周龄,购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫 将hFGF-21(100 μg/只)与等量弗氏完全佐剂混合后腹腔注射,2周后使用相同剂量的hFGF-21与弗氏不完全佐剂混合,进行第2次免疫;2周后进行第3次免疫,方法同第2次。第3次免疫后的5~7 d采用尾静脉采血,分离血清,以hFGF-21为检测抗原,进行效价测定,融合前3 d,不加佐剂,等量抗原腹腔加强免疫,3 d后取脾制备细胞悬液进行融合。

1.2.2 杂交瘤细胞的筛选及建立 采用有限稀释法对融合后的杂交瘤细胞进行筛选,并进行了3次亚克隆,成功的筛选出1株稳定分泌抗hFGF-21 mAb的杂交瘤细胞株。

1.2.3 mAb亚型鉴定 采用mAb亚型鉴定试剂盒鉴定mAb的亚型,按照说明书的方法进行操作。

1.2.4 mAb的制备及纯化 采用体内诱生腹水的方法大量制备单克隆抗体,取8~10周龄的雌性BALB/c小鼠,腹腔注射500 μL弗氏不完全佐剂,1周后,杂交瘤细胞离心洗涤2~3次,用不完全培养基将细胞数调至 $5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ 个/mL,每只小鼠200 μL。5~7 d后,待小鼠腹部明显增大,采集腹水,离心后收集上清,采用Protein A Sepharose纯化抗体。

1.2.5 mAb效价检测 采用间接ELISA测定mAb效价,以hFGF-21为检测抗原,腹水从1:250开始做2倍梯度稀释,以Sp2/0为阴性对照,以P/N ≥ 2.1 的最大稀释度为终点。

1.2.6 mAb稳定性鉴定 将阳性杂交瘤细胞体外连续传代30次,每5代测定上清效价。

1.2.7 mAb特异性鉴定 采用Western blot法鉴定mAb的特异性,将hFGF-21以及BSA进行SDS-PAGE电泳,转膜后,将mAb以1:500稀释后进行孵育,HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:7 500稀释)作为二抗,按Western blot步骤操作。

1.2.8 mAb与鼠FGF-21的交叉反应 将人、鼠FGF-21以10 μg/mL包被96孔板,4℃过夜,50 g/L脱脂奶粉,封闭2 h,加入mAb(2.5 μg/mL),每孔100 μL,37℃ 1 h,加入HRP标记的山羊抗小鼠二抗(1:7 500)每孔100 μL,37℃ 1 h, TMB显色,37℃ 5 min。

1.2.9 hFGF-21不同片段的扩增 hFGF-21全长为181个氨基酸,首先将hFGF-21分成上下2部分(1~91位氨基酸为上半段P_U,92~181位氨基酸为下半段P_N),进行初步筛选。然后再将确定的FGF-21下游再分成3个截断体,通过相互重叠片段,共将下游分成5个片段。(92~121位氨基酸位第1段P_{D1},122~151位氨基酸为第2段P_{D2},152~181位氨基酸为第3段P_{D3},107~136位氨基酸为第4段P_{D4},137~166位氨基酸为第5段P_{D5}),进行下一步的筛选。扩增引物如下(表1)。

表1 hFGF-21不同片段扩增引物

引物编号	引物序列(5'-3')	起始/终止位置
P _U	GGCCAGCGGGCCACGCCATCCCTGACTCC	1-91aa
P _N	GGCCCGGAGGCTTACTCAGGGTCAAAGTGGAGCGAT	
P _{D1}	GGCCAGCGGGCCGCTCCAGCTCCGGGAG	92-181aa
P _{D2}	GGCCCGGAGGCTCAGGAAGCGTAGCTGGGGC	
P _{D3}	GGCCAGCGGGCCGCTCCAGCTCCGGGAG	92-121aa
P _{D4}	GGCCCGGAGGCTTACTCCCTGGCAGCTCCAGC	
P _{D5}	GGCCAGCGGGCCAACTCCCAAGCGGG	122-151aa
P _{D6}	GGCCCGGAGGCTTACTCCGCTGGCTCCGGGAG	
P _{D7}	GGCCAGCGGGCCATCTGGCCCCAGCC	152-181aa
P _{D8}	GGCCCGGAGGCTCAGGAAGCGTAGCTGGGGC	
P _{D9}	GGCCAGCGGGCTACCACTCCGAAGGCCAGC	107-136aa
P _{D10}	GGCCCGGAGGCTTAGAAGCGAGCTGGCTCC	
P _{D11}	GGCCAGCGGGCTGCCACTACCAAGCGCTCC	137-166aa
P _{D12}	GGCCCGGAGGCTTACAGAGGCTCCGAGGAGC	

下划线处为Sfi I酶切位点。

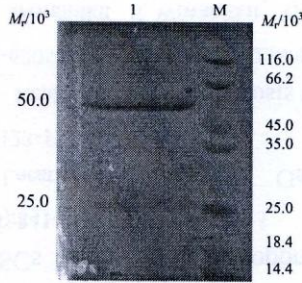
1.2.10 流式细胞仪筛选不同hFGF-21片段 将克隆出的不同片段连接至Apex载体转化至DH5α,诱导表达后,将E. coli DH5α用溶菌酶-EDTA法破壁处理,获得表面展示有不同抗原肽段的原生质体,然后用流式细胞仪进行分选。具体方法如下:吸1 mL菌液于Ependorf管中,7 000 r/min离心3 min, PBS(pH7.4)洗涤1次,加入350 μL蔗糖-Tris(0.75 mmol/L蔗糖/0.1 mol/L Tris pH8.0)重悬,加入35 μL 10 g/L冰冷的溶菌酶(100 mg溶菌酶加入到10 mL蔗糖-Tris缓冲液中,提前1 h配制),混匀后逐滴加入700 μL 1 mmol/L EDTA,冰上放置15 min后,加入50 μL 0.5 mol/L MgCl₂,冰上放置10 min。12 000 r/min 1 min弃上清,沉淀即为原生质体。PBS(pH7.4)洗涤1次,用90 μL PBS重悬原生质体,加入10 μL 10 g/L BSA贮存液和4 μL FITC标记的抗hFGF-21 mAb,4℃避光孵育1 h, PBS洗涤3次后,用500 μL PBS重悬。样品经流式细胞仪在488 nm激光下检测其荧光强度^[7]。

2 结果

2.1 mAb亚型的鉴定 用鼠源mAb亚型检测试剂盒检测杂交瘤细胞培养上清,结果显示该株细胞分泌的抗体重链为IgG 2b型,轻链为Kappa型。

2.2 腹水的制备及纯化 待小鼠腹部明显增大后,

收获腹水,将收获的腹水以 12 000 r/min 离心,去除杂质后经蛋白 A 琼脂糖纯化后得到抗体。该 mAb 的 SDS-PAGE 显示,其分子重链的相对分子质量(M_r)为 50 000,轻链为 25 000(图 1)。



1: 小鼠腹水; M: 蛋白 M_r marker.

图 1 纯化 mAb 的 SDS-PAGE 分析

2.3 mAb 腹水效价 采用间接 ELISA 测定腹水的效价为 $1:4.096 \times 10^6$ (图 2)。

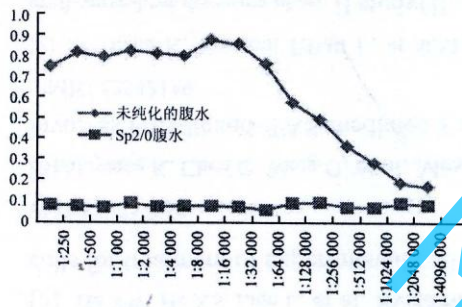
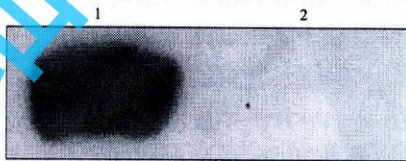


图 2 ELISA 检测 mAb 效价

2.4 mAb 稳定性 将杂交瘤细胞传代 30 次后及在液氮中保存 3 个月,间接 ELISA 检测其效价,结果其效价基本保持不变,表明该杂交瘤细胞有很好的稳定性。

2.5 Western blot 法检测 mAb 与 hFGF-21 结合的特异性 以 hFGF-21 和 BSA 为抗原,进行 Western blot 法检测,结果显示该 mAb 可与 hFGF-21 特异性反应(M_r 20 000 处有特异性反应条带),BSA 处无任何反应(图 3)。



1: hFGF-21; 2: BSA.

图 3 mAb 的 Western blot 分析

2.6 mAb 可与鼠 FGF-21 的交叉反应 将人、鼠

FGF-21 以 $10 \mu\text{g/mL}$ 包被 96 孔板,间接 ELISA 检测该 mAb 与 2 种 FGF-21 的反应。结果为该 mAb 可与人、鼠 FGF-21 发生交叉反应但是与人 FGF-21 反应较强,鼠 FGF-21 反应较弱,与阴性对照蛋白无交叉反应(图 4)。

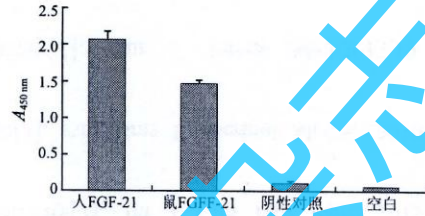
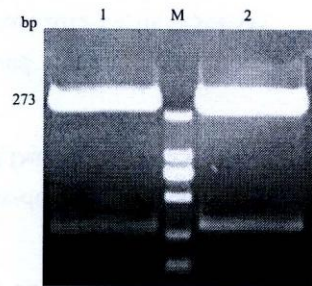


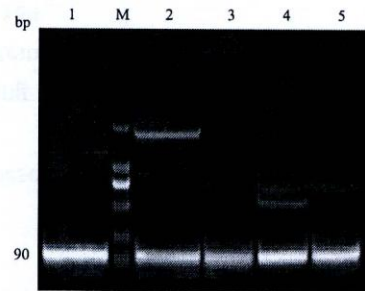
图 4 mAb 与人、鼠 hFGF-21 的交叉反应

2.7 hFGF-21 片段的扩增 用引物 P_{UF} 、 P_{UB} 和 P_{DF} 、 P_{DB} 扩增 hFGF-21 的上、下游 2 个部分,可以分别扩增出 273 bp 的片段(图 5);用引物 P_{D1F} 和 P_{D1B} 、 P_{D2F} 和 P_{D2B} 、 P_{D3F} 和 P_{D3B} 、 P_{D4F} 和 P_{D4B} 、 P_{D5F} 和 P_{D5B} 扩增 hFGF-21 下游的 5 个部分,每个片段的大小为 90 bp (图 6)。



1: P_U -hFGF-21; M: DNA maker; 2: P_D -hFGF-21.

图 5 hFGF-21 上、下半段的克隆



1: P_{D1} hFGF-21; M: DNA maker; 2: P_{D2} hFGF-21; 3: P_{D3} hFGF-21; 4: P_{D4} hFGF-21; 5: P_{D5} hFGF-21.

图 6 hFGF-21 下半段 5 个部分的克隆

2.8 流式细胞仪的筛选 通过流式细胞仪对不同 hFGF-21 片段的筛选,在第 1 次筛选过程中该株 mAb 和 hFGF-21 的下游有较强的反应,遂又将 hFGF-21 的下游分成 5 个部分,在进行第 2 次筛选的过程中,该

株 mAb 与 FGF-21 下游的第 1 段和第 4 段反应, 且不与第 2、3、5 段反应。由此可以确定该株 mAb 所对应的 hFGF-21 的抗原表位在第 107-121 个氨基酸(图 7)。

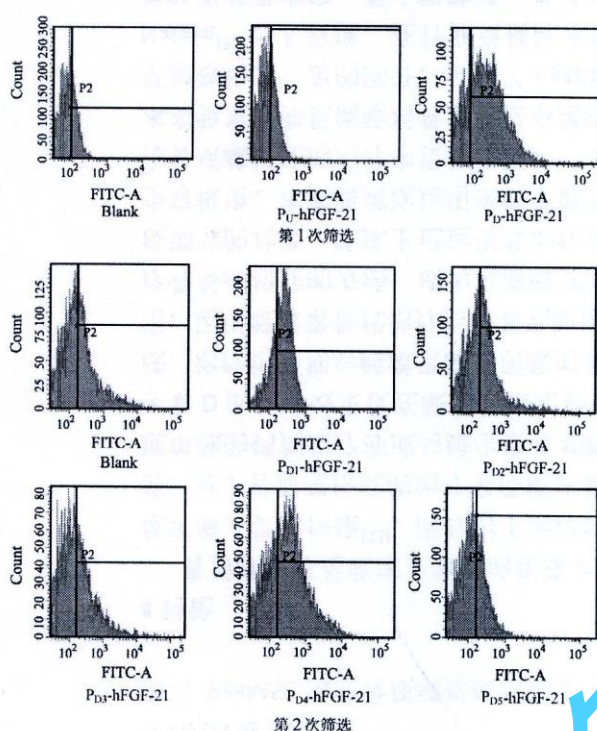


图 7 hFGF-21 不同片段的流式细胞仪筛选

3 讨论

筛选抗原表位传统的方法是应用化学和酶法裂解蛋白质, 获得多肽片段, 再用 mAb 或多克隆抗体通过 Western blot 或 ELISA 检测其反应性来确定。目前常用的筛选方法主要有抗原的裂解、固相多肽扫描、噬菌体肽库筛选等^[8], 但这些方法都比较耗时。本实验应用细菌展示载体 Apex 及流式细胞仪进行高通量的筛选, 与传统的抗原表位筛选方法相比, 该方法更加快速、准确。

抗体识别的抗原表位分析在揭示蛋白质分子的结构和功能、抗原-抗体反应机制方面具有重要意义。为了明确该 mAb 与 FGF-21 的结合特点, 拓展其应用, 本研究对该 mAb 的抗原表位区域进行了定位。首先将 FGF-21 分成了 2 个部分, 通过第 1 轮筛选, 鉴定该 mAb 的抗原表位在 FGF-21 氨基酸序列的下游, 遂又将下游分成了 3 个截短体, 通过相互重叠片段, 将 FGF-21 下游分成 5 个片段。细菌展示结合流式细胞仪对 5 个片段进行筛选, 根据 FITC 标记的 mAb 筛选到抗原表位的情况, 该抗体与 FGF-21 下游的第 2、3、5 段均无反应, 而与第 1、4 段有反应, 由此推断该 mAb 的抗原表位位于第 1、4 段的交叉区域, 由于 B 淋巴细胞所能识别的线性抗原表位为 5 ~ 17 个氨基

酸^[9], 进而可以推断该 mAb 所识别的抗原表位区域为第 107 至 121 个氨基酸处。

人源 FGF-21 成熟蛋白与鼠源 FGF-21 成熟蛋白均由 181 个氨基酸组成, 且同源性高达 80%, 通过检测人、鼠 FGF-21 间的交叉反应, 本实验发现该 mAb 所识别的抗原表位位于人源 FGF-21 与鼠源 FGF-21 的共有部分, 且在其所识别抗原表位的 15 个氨基酸中有 3 个不同于鼠源 FGF-21, 由于该 mAb 与人源、鼠源 FGF-21 反应强度的差异, 该 mAb 所识别的抗原表位的具体位置将在今后的实验中进一步确定。研究 β Klotho 在体内是否为 FGF-21 发挥功能所必须的因子时, 一般会采用选择性敲除全身和脂肪组织的 β Klotho 基因的方法^[10-11], 用该方法研究两者之间的作用机制过程费时、费力。通过对本 mAb 抗原表位的筛选, 我们发现该 mAb 的抗原结合部位与 β Klotho 和 FGF-21 的结合部位距离接近, 这也为通过该 mAb 阻断 FGF-21 与 β Klotho 的结合提供了可能性, 因此该 mAb 的制备及其抗原表位的确定为更加方便的研究 FGF-21 与 β Klotho 的作用机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Smith R, Duguay A, Weiszmann J, et al. A novel approach to improve the function of FGF21[J]. *BioDrugs*, 2013, 27(2): 159-166.
- [2] Harvey BR, Georgiou G, Hayhurst A, et al. Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(25): 9193-9198.
- [3] 尹成凯, 徐黎明, 任桂萍, 等. 酵母展示筛选 scFv 方法的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 5(12): 1204-1206.
- [4] Strączkowski M, Karczewska-Kupczewska M, Adamska A, et al. Serum fibroblast growth factor 21 in human obesity: regulation by insulin infusion and relationship with glucose and lipid oxidation[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2013 Feb 19. doi: 10.1038/ijo.2013.10. [Epub ahead of print]
- [5] Lin Z, Wu Z, Yin X, et al. Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile[J/OA]. *PLoS One*, 2010, 5: e15534.
- [6] Lin Z, Zhou Z, Liu Y, et al. Circulating FGF21 levels are progressively increased from the early to end stages of chronic kidney diseases and are associated with renal function in Chinese[J/OA]. *PLoS One*, 2011, 6: e18398.
- [7] 徐黎明, 尹成凯, 任桂萍, 等. 筛选 Fab 抗体库的细菌展示技术的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(10): 1090-1094.
- [8] Obungu VH, Gelfanova V, Huang L. Epitope mapping of antibodies by mass spectroscopy: a case study[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 988: 291-302.
- [9] 金伯泉. 医学免疫学[M]. 5 版, 北京: 人民卫生出版社, 2009: 25-27.
- [10] Ding X, Boney-Montoya J, Owen BM, et al. β Klotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism[J]. *Cell Metab*, 2012, 16(3): 387-393.
- [11] Foltz IN, Hu S, King C, et al. Treating diabetes and obesity with an FGF21-mimetic antibody activating the β Klotho/FGFR1c receptor complex[J/OA]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(162): 162ra153.