

学校代码: 10385

分类号: _____

研究生学号: _____

密 级: _____



华侨大学
HUAQIAO UNIVERSITY

硕士学位论文

Kallistatin 蛋白的哺乳动物表达、纯化及单克隆抗体制作初探

**Preliminary Study on Mammal Kallistatin protein expression,
purification and monoclonal antibody production**

作者姓名: 孙丹丹

指导教师: 许瑞安

合作教师: _____

学 科: 生物学 (生物化学与分子生物学)

研究方向: 临床诊断试剂盒的研发

所在学院: 生物医学学院

论文提交日期: 二零一六年三月二十八日

摘要

人组织激肽释放酶结合蛋白 (Kallistatin, Kal), 作为一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 在炎症反应、血管生成以及损伤修复等多种生理和病理过程中发挥着重要的作用。本课题组前期研究表明, Kal 具有良好的抗肝纤维化的作用, 可以抑制大鼠肝星状细胞的活化, 下调星状细胞中的 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达, 并且抑制 H_2O_2 诱导的星状细胞活性氧的形成。同时发现 Kal 可以作为肝纤维化诊断指标来对肝脏健康状况进行有效检测, 并申报国家专利。

本研究是在 Kal 确定可以作为肝纤维化诊断试剂研发基础上的自然延伸, 旨在创建一个以 Kallistatin 为指标的肝纤维化分子诊断 ELISA 试剂盒。

本研究根据国家卫生部关于临床诊断试剂盒制作标准来设计、推进。即当前临床上所用试剂盒除了对抗体进行检测外的试剂盒均为是使用双抗体夹心法, 在检测抗体上加入生物素-链霉亲和素系统。

本研究首先采用毕赤酵母发酵法和哺乳动物表达获取 Kal 蛋白。实验结果显示: 毕赤酵母表达的 Kal 蛋白糖基化水平不足, 与天然的蛋白质有一定的差异, 无法采用。故本研究采用酵母发酵和哺乳动物表达系统获得的 Kal 蛋白进一步探索。

本研究结果显示: 通过酵母发酵可获得较高纯度的重组 Kal 蛋白, 使用该蛋白制作抗体时, 发现其 Kal 蛋白免疫原性较差, 所以进行免疫时使用 $40 \mu g/mL$ 的 Kal 与弗氏佐剂 1:1 混合后, 免疫效果呈现最佳效果。使用脾内免疫与皮下免疫方法对比后发现皮下免疫虽然时间较长, 但是效价较高, 适合作为单克隆抗体制作的方法。

在此基础上, 本研究还构建了 Kal 哺乳动物表达载体, 并使用该载体探索在 CHO 细胞里高效表达, 同时进行条件优化。

这对于制作一个高灵敏度临床应用的肝纤维化 Kal 诊断试剂盒提供了参考依据, 为临床应用 Kal-ELISA 试剂盒提供前期基础。

关键词: Kallistatin ;哺乳动物表达; CHO 细胞; 单抗; 临床应用

Abstract

Human tissue kallikrein binding protein (Kallistatin, Kal), as a kind of serine protease inhibitors, plays an important role in inflammation, angiogenesis, and damage repair, and other physiological and pathological process.

Our laboratory previously study showed that Kal was of good resistance to liver fibrosis by inhibiting the activation of rat hepatic stellate cells, cutting stellate cells alpha smooth muscle actin (alpha SMA) expression, and inhibiting the formation of reactive oxygen species stellate cells induced by H₂O₂. In addition, Kal should be an excellent biomarker for monitoring the development of liver fibrosis.

The aim of this study was attempting to establish an ELISA kit for clinical diagnosing liver fibrosis. The design and makeup of the standard ELISA-Kal kit were carried on according to standard regulations of the Ministry of Health, China. That is, in addition to *in vitro* detect antibody kit, the clinical used kit were generally produced by double antibody sandwich method, with a biotin-streptavidin affinity system.

First of all, pichia yeast fermentation and mammalian cells were used for express Kal protein. Nevertheless, the results showed that Kal protein expressed by *Pichia pastoris* was lack of glycosylation in comparison to that of those nature products. Therefore in this study, the Kal protein obtained for this study came from yeast fermentation and mammalian expression system.

The evidences from laboratory experiments also revealed that the high purity recombinant Kal protein could obtained through the yeast fermentation for Kal antibody production. However, it was found that the Kal protein was less immunogenic, thus, the immune dosage of Kal increased to 40 u g / ml with Freund's adjuvant mixed at 1:1 ratio, and the best immune effect was achieved. We found that it was better to use subcutaneous immunization rather than intrasplenic immunization for Kal monoclonal antibody production, although it might be take a much longer time, the high titer monoclonal antibody production could be obtained in comparison to subcutaneous immunization and intrasplenic immunization methods in this study.

The Kal mammalian expression vector was also constructed. The data showed that Kal protein well expressed in CHO cells, and subsequently, the experimental conditions of Kal protein production were optimized in CHO cell lines.

The establishment of standard ELISA Kal kit for clinical application is underway in our laboratory, the present study provided some useful reference for producing a high sensitivity liver fibrosis Kal diagnostic kit and information how to handle Kal biological antibodies for clinical application.

Key Words: Kallistatin; expression; CHO cells , monoantibody , clinical application

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
主要符号对照表.....	VIII
第一章 引言.....	1
第二章 研究目的与意义.....	2
2.1 Kallistatin 概述.....	2
2.1.1 组织激肽释放酶结合蛋白.....	2
2.1.2 肝纤维化.....	4
2.1.3 肝纤维化的诊断.....	6
2.1.4 肝纤维化的治疗.....	6
第三章 Kallistatin 蛋白的毕赤酵母表达及纯化.....	9
3.1 毕赤酵母表达 Kal 蛋白.....	9
3.1.1 实验材料.....	9
3.1.2 实验试剂.....	9
3.1.3 实验仪器.....	9
3.1.4 试剂配制.....	10
3.1.5 实验方法.....	10
3.2 Kal 蛋白的纯化定性及定量.....	11
3.2.1 试剂配制.....	11
3.2.2 目的蛋白的纯化.....	12
3.2.3 SDA-PAGE 电泳检测.....	12
3.2.4 Western Blot 鉴定目的蛋白.....	13
3.2.5 BCA 法测定总蛋白浓度.....	13
3.2.6 Elisa 法测定目的蛋白浓度.....	13
3.3 统计分析.....	13
3.4 实验结果与分析.....	13
3.4.1 重组人组织激肽释放酶结合蛋白的制备.....	13
3.4.2 重组人组织激肽释放酶结合蛋白的纯化.....	15
3.4.3 SDS-PAGE 鉴定.....	15
第四章 Kallistatin 哺乳动物表达载体的构建.....	18
4.1 实验材料.....	18
4.1.1 试剂及耗材准备.....	18
4.1.2 培养基及溶液的配制.....	18
4.2 实验方法.....	19
4.2.1 引物设计.....	19
4.2.2 T 载的构建与鉴定.....	19
4.2.3 大肠杆菌的转化及蓝白斑筛选.....	21
4.2.4 质粒的小量提取.....	21
4.2.5 测序.....	22
4.2.6 双酶切后的目的片段连接到 pcDNA3.1(+)载体.....	22
4.3 实验结果与分析.....	23
4.3.1 pcDNA3.1-Kal 载的构建与鉴定.....	23

4.3.2 重组表达质粒的测序结果.....	24
4.4 讨论.....	25
第五章 Kallistatin 蛋白哺乳动物表达初探.....	26
5.1 实验材料.....	26
5.2 CHO 细胞冻存与复苏的条件优化.....	26
5.1.1 冻存保护液对 CHO 细胞的影响.....	26
5.1.2 冻存条件对 CHO 细胞的影响.....	26
5.1.3 复苏方法对 CHO 细胞存活率的影响.....	27
5.3 PEI 介导的瞬时转染条件优化.....	27
5.3.1 PEI 毒性试验.....	27
5.3.2 细胞转染方法.....	27
5.3.3 转染条件的优化.....	27
5.4 结果.....	28
5.4.1 保存和复苏条件的优化.....	28
5.4.2 转染条件的优化.....	31
5.5 讨论.....	35
5.5.1 宿主细胞的选择.....	36
5.5.2 表达载体的选择.....	37
5.5.3 转染试剂的选择.....	37
5.5.4 转染过程的优化.....	39
5.5.5 质粒的抽提及纯化.....	39
第六章 Kallistatin 蛋白单克隆抗体制作初探.....	41
6.1 实验材料.....	41
6.1.1 实验动物.....	41
6.1.2 试剂与器材.....	41
6.2 实验方法.....	41
6.2.1 脾内免疫.....	41
6.2.2 皮下免疫.....	41
6.2.3 细胞融合.....	41
6.2.4 血清滴度检测.....	42
6.3 实验结果与分析.....	42
6.3.1 脾内免疫与皮下免疫结果对比.....	42
6.3.2 抗原使用量及佐剂优化实验.....	43
6.4 讨论.....	44
6.4.1 细胞融合前的准备.....	45
6.4.2 饲养细胞的制备.....	46
6.4.3 细胞融合的主要方法.....	46
6.4.4 杂交瘤细胞的筛选.....	47
6.4.5 克隆化技术.....	47
6.4.6 单克隆杂交瘤细胞的扩大培养.....	48
6.4.7 无血清培养液在杂交瘤细胞培养中的应用.....	49
6.4.8 杂交瘤细胞的冻存和复苏.....	49
6.4.9 单抗的效价鉴定及纯化.....	49
第七章 讨论与展望.....	50

7.1 毕赤酵母蛋白的表达.....	50
7.2 哺乳动物表达.....	50
7.3 小鼠抗体制作.....	50
7.4 本研究的创新点.....	50
7.5 未来研究计划.....	51
参考文献.....	52
致谢.....	56

主要符号对照表

简称	全称	中文名称
bFGF	Fibroblast growth factor	纤维细胞生长因子
CHO	Chinese Hamster Ovary	中国仓鼠卵巢细胞
ECM	Extra cellular matrix	肝组织内细胞外基质
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	内皮型一氧化氮合酶
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	糖基磷脂酰肌醇
HSPG	Herparan sulfate proteoglycan	硫酸乙酰肝素糖蛋白
IL	Interleukin	白细胞介素
Kal	Kallistatin	组织激肽酶释放酶结合蛋白
KC	Kupffer cells	枯否细胞
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MFB	Myofibroblast	肌成纤维细胞
MMPs	Matrix metalloproteinases	基质金属蛋白酶
NOS	Nitric oxide synthase	一氧化氮合酶
PDGF	Platelet derived growth factor	血小板衍生因子
TGF	Transforming growth factor	转化生长因子
TIMPs	Tissue inhibitor of metalloproteinases	组织金属蛋白酶抑制剂
TK	Tissue kallikrein	组织激肽释放酶
TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子

第一章 引言

Kallistatin 蛋白是一种组织激肽释放酶结合蛋白，该蛋白在抗高血压、抗内皮细胞增殖等活动中具有重要意义。**Kallistatin** 是一种内源性多功能蛋白质，对炎症反应、血管损伤修复、抗肿瘤的作用重大，并且还可以进行多靶点治疗。本实验室有研究证实了 **Kal** 蛋白在不仅肝纤维化的治疗中有较高的价值，并且在肝纤维化的诊断中也具有重要意义。

当前 **Kallistatin** 相关研究所使用的蛋白质一般多是采用重组毕赤酵母来表达纯化后使用的，经过研究具有一定的生物活性，但是其糖基化和磷酸化不足，与人源的蛋白质在结构上有一定的差异，无法用于临床研究及诊断试剂的制备。

如果该蛋白获准用药于临床疾病的治疗，那么哺乳动物细胞表达是必经之路。本前期研究发现，**Kallstatin** 在肝纤维化诊断中具有指标性的作用并已申请了国家专利保护。开发以 **Kal** 蛋白为底物的肝纤维化诊断相关的试剂盒产品，具有针对性强，特异性好，简易方便等等优点。众所周知，血浆中含有大量杂蛋白，临床诊断所使用的试剂盒必须有较高的重复性和灵敏性，因而筛选亲和性强、灵敏度高的 **Kal** 单克隆抗体是成功的第一步。本研究由此进行了哺乳动物细胞表达载体的构建，初步探索哺乳动物细胞表达系统的小量表达，并使用大量获取的 **rhKal** 来进行单克隆抗体制作的初步探索。

第二章 研究目的与意义

2.1 Kallistatin 概述

2.1.1 组织激肽释放酶结合蛋白

Kallistatin 也被人们称为组织激肽酶释放酶结合蛋白, 该蛋白在体内充当丝氨酸蛋白酶抑制剂的角色, Kal 可以在机体中特异性地与 TK 相结合, 并抑制其活性。人源性 Kal 是在 1989 年首次被 Chao 等人纯化, 其纯化来源于正常人的血浆。现代研究发现, Kal 主要合成器官为肝脏^[1]。Kal 蛋白是由 427 个氨基酸组成的糖蛋白, 其等电点在 4.6-5.2 之间, 蛋白末端带有 26 个氨基酸组成的信号肽。Kal 蛋白表面有 4 个糖基化位点, 所以该蛋白的分子量在 58-60KD 之间, 但是使用基因重组的方法将 Kal 基因导入到大肠杆菌中使其表达所得到的蛋白分子量只有 40KD 左右, 使用毕赤酵母所制备的蛋白分子量在 48KD 左右^[2]。随着然们对 Kal 的不断深入研究发现, 该蛋白对于血管生成和组织损伤后的修复、肾损伤、糖尿病、癌症等发生过程发挥重要作用。

2.1.1.1 组织激肽释放酶结合蛋白对于血管生成的作用

相关研究表明 Kal 可以通过肝素结构域与 HSPG 受体相结合, 在机体内与 bFGF、VEGF 等肝素依赖性生长因子有竞争性抑制作用, 并且这些受体对细胞内的信号传递有一定的阻断作用, 可以抑制生长因子激活组织内血管生成^[3]。也有研究者将血管中的平滑肌细胞进行体外培养, 培养适当时间后加入 Kal 蛋白, 并对 PDGF 介导的 MAPK 信号通路中相关蛋白进行检测, 结果显示, Kal 对血管平滑肌细胞的抑制作用是通过竞争性抑制 PDGF 受体来进行的^[4]。

2.1.1.2 组织激肽释放酶结合蛋白与 NOS

Shen 等人研究发现 Kal 蛋白可以与内皮细胞表面的 KLF4 相结合形成复合物, 并激活了 eNOS 的表达, 使大量的 NO 产生。并且细胞会随着细胞中的代谢作用出现应激反应, 在加入 Kal 蛋白后, NADPH 酶的活性被抑制, 使 PI3K-AKT-eNOS 信号通路中 ROS 的产生受到抑制^[5]。如果细胞中含有 AKt 因子, 那么 Kal 可以增加 eNOS 的活性, 抑制内皮细胞的凋亡; 但是如果细胞中不含有 AKt 因子, 则 eNOS 的表达量降低, 但 Kal 蛋白对 Caspase-3 活性的抑制作用显著, 在此基础上, 内皮细胞的凋亡就会减少^[6]。

2.1.1.3 组织激肽释放酶结合蛋白对于纤维化的作用

有学者使用高盐诱导法制作大鼠肾纤维化模型，当使用腺病毒介导的 Kal 基因在大鼠体内表达后，大鼠肾纤维化得到抑制，说明 Kal 对大鼠肾脏纤维化有一定的保护作用。在治疗后对大鼠血清的相关指标进行检测后发现，肾纤维化的大鼠 TGF- β 1、TNF- α 、IL-1、I 型胶原和 III 型胶原的表达水平明显降低，并且在大鼠体内内源性 Kal 蛋白的表达量不断降低。上述研究可以说明 Kal 不仅可以降低纤维化中胶原的表达和沉积，还能够抑制生长转化因子 α 1 的表达^[7]。

有学者研究发现，Kal 蛋白对小鼠的肝纤维化有一定的抑制作用，并且可以保护 CCl₄ 引起的肝损伤。所以 Kal 作为内源性的抗纤维化药物，对其作用机制的研究还有待深入，Kal 蛋白有巨大的临床研究潜力^[8]。

2.1.1.4 Kallistatin在疾病治疗中的应用

(1) 舒张血压、抗炎症、抗纤维化

Kal 具有降血压的功能并且这种作用不依赖于与 Kallikrein 结合。Lee 等研究发现 Kal 蛋白经静脉注射给药后呈剂量依赖引起血压下降，且不受艾替班特（舒缓激肽受体拮抗剂）的影响。Kal 具有促动脉血管和肾脏血管舒张的作用，这种作用也不受艾替班特的影响^[9]。

Kal 有一定的抗炎活性，可减少炎症因子的产生。Wang 等用腺病毒载体介导 Kal 基因治疗胶原诱导的风湿性关节炎，治疗组大鼠的关节炎症状减轻，致炎因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达明显减少^[10]。Hsieh 等人研究发现，Kal 对十字韧带损伤引起的大鼠骨关节炎也有治疗效果，Kal 的基因治疗效果与透明质酸相当，并且两者可发挥协同治疗效应^[11]。Kal 通过抑制炎症因子以及胶原的表达，在心肌缺血和心肌梗塞疾病中也表现出很好的抗炎作用，保护心肌细胞免受缺血性损伤。

Shen 等发现腺病毒介导的 Kal 基因表达对高盐诱导的大鼠肾脏纤维化有保护作用，治疗后肾纤维化大鼠血管细胞黏附因子-1、TGF- β 1、TNF- α 、IL-1、I 型胶原和 III 型胶原的表达水平显著下降。说明 Kal 是通过 TGF- β 1 信号通路发挥抑制纤维化的作用。本实验室用电转质粒的方法介导 Kal 基因的体内表达，或者给予毕赤酵母表达的重组人 kal 蛋白对 CCl₄ 引起的小鼠肝纤维化都有良好的治疗效果，治疗组肝功能指标 ALT、AST、Hyp 和炎症因子 TNF- α 接近正常组^[12]。

2012，Liu 等人通过给予 Kal 抗体，抑制 Kal 在体内发挥作用，并用高盐诱导大鼠高血压来研究内源性 Kal 对肾脏和心血管的生物学作用。研究显示，给予大鼠特异性 Kal 抗体后，大鼠体内 Kal 含量降低但脂质过氧化产物醛酮类物质显著上升，主动脉内超氧化物增多，NO 减少，肾功能损伤加重，炎症细胞聚集、胶原过渡沉积，心脏内肌成纤维细胞增殖，组织纤维化病变，说明内源性 Kal

通过抗炎、抗氧化应激、抗纤维化抑制高盐对肾和心脏的损伤^[13]。

(2) 抗肿瘤及抗血管生成

“肿瘤依赖血管生成学说”在上世纪 70 年代由 Folkman 首次提出，该学说认为实体瘤长到一定大小后需要通过新生的血管提供必要的养分才能持续生长，并且血管增生与肿瘤的转移、浸润密切相关。抗血管生成是肿瘤治疗的关键靶标。

2002 年，Miao^[14]等首次报道 kallistatin 具有抑制血管生成，抑制乳腺癌生长的作用。本实验室之前的研究结果证明，以重组腺相关病毒（Recombinant adeno-associated virus, rAAV）为载体的 Kal（rAAV-Kal 基因药物）有治疗小鼠结肠癌的作用，治疗后的瘤体体积相对减小 78%，肿瘤的增长速率明显降低。利用 rAAV-Kal 基因药物对人 Hep3B 肝癌皮下肿瘤进行治疗，发现 Kal 可以有效抑制原位癌和异位癌的增殖。并且用美洛昔康联合 Kal 治疗肝癌效果更显著。Shiau^[15]等通过静脉注射慢病毒介导的 Kal 基因治疗小鼠肺癌，结果小鼠的肿瘤体积相对较小，肿瘤血管密度较低。

2.1.2 肝纤维化

在肝纤维化发现的初期，相关学者认为肝纤维化是由于肝脏中的肝细胞出现坏死，使肝脏网状支架失去功能，所以肝纤维化过程是不可逆的。但是在 20 世纪 80 年代以后，分子生物学技术发展突飞猛进，细胞培养技术也日渐成熟，人们开始从细胞水平和分子水平对肝纤维化的细胞进行研究。当前肝纤维化的预防和治疗已经成了肝脏疾病研究的热点问题。

2.1.2.1 肝纤维化的发病原因

可以引起肝纤维化的因素有很多，但是不管是什么因素引起，肝脏出现的病理特征都是相似的，都是属于肝脏慢性损伤的一种。只要可能对肝脏造成伤害的因素，都可能导致肝纤维化^[16]。在西方国家，出现肝纤维化一般是由于饮酒过量导致的，但是在东方国家，肝纤维化一般是因为病毒的感染所引起的。

2.1.2.2 肝纤维化的病理过程及形成机制

在医学界，为大部分学者都接受的肝纤维化形成机制是，肝纤维化是机体受到损伤以后，自发的修复性反应，一般是因为 ECM 大量沉积影响到了肝脏的正常功能，导致肝脏慢性损伤后逐渐失去正常的生理功能，最终形成肝硬化。在这个时候，肝脏的结构已经发生了改变，但是站在病例学的角度来看，肝纤维化后的肝窦细胞逐步转化成毛细血管，肝小叶出现纤维化，站在肝脏功能的角度来说，肝纤维化之后肝脏的正常功能不能进行，门静脉的压力会逐渐升高^[17]。

因为肝脏具有特别强的代偿功能，所以肝纤维化患者几乎不存在临床表现，

肝纤维化的病理进程十分缓慢,从肝细胞损伤开始一直到肝纤维化最终形成就需要几年到几十年^[18]。当前医学研究发现,肝纤维化在发病的初期是可逆的,但是如果假小叶形成之后的时期被临床上称为肝纤维化后期,这个时期的纤维化是不能够逆转的。所以肝纤维化如果在早期就发现,对纤维化进行治疗,将外界导致纤维化的因素除去或机制,纤维化则会逆转,对患者疾病的痊愈和将来生活质量的提高都有重要意义。

相关学者通过对肝纤维化进行研究后证明,造成肝纤维化的主要原因是肝细胞外基质代谢出现异常。从其研究中可以发现肝组织内细胞外基质在细胞中的排列是有一定规律的,并且代谢过程也十分活跃,肝组织内细胞外基质对机体有重要的作用,并不是像以前研究结果是作为细胞支架作用。ECM 包括两个种类,一种是纤维,一种是基质^[19]。在正常的肝脏组织中胶原的主要存在形式是纤维状态,每条纤维都是由好几种胶原拧在一起形成的,基质的主要成分是蛋白多糖和粘连蛋白。在肝脏形成纤维化的过程中,肝脏内的 ECM 的总量在不断增加,而且形态和分布也逐渐改变。在肝脏下文化的早期,炎症坏死区域首先出现 III 型胶原的积累,然后是 I 型胶原的积累,逐渐发展后会出现 IV 型胶原的积累,IV 型胶原对血管生成有重要作用。在正常的肝脏组织中,大部分细胞都可以自发产生 ECM,但是 ECM 由于其代谢速度较快,所以不会出现积累现象^[20]。

胶原主要是通过酶促反应来降解的,细胞外的胶原主要通过胶原酶降解,然后其他类型的蛋白质被逐渐分解成单个的氨基酸序列^[21]。肝纤维化细胞主要的来源是肝星状细胞,这个理论已经被学术界广泛认可,肝星状细胞活化促进了肝纤维化的发展。

在肝脏受到了一定外界因素的刺激后,肝细胞会自发释放出一定的细胞因子、过氧化物、生长因子等,这些因素可能会直接或间接对肝细胞造成损害。在上述因素的共同作用下,静息状态下的 HSC 会发生改变,使肝脏中的胶原等成分出现代谢异常或沉积,使肝脏出现纤维化状态。

HSC 的激活和枯否细胞(Kupffer cells, KC)的增殖以及单核细胞浸润程度相平行,KC 分泌的可溶性细胞因子可促进原代培养的 HSCs 的增殖以及 ECM 的合成^[22]。

外界对肝脏的损伤都可能引起肝脏中细胞的自发性死亡,这种死亡机制与肝脏的病变以及 HSC 基因活化有着十分密切的联系。前期细胞凋亡的刺激是由于细胞外信号的刺激,通过该信号引起炎症发生,并诱发肝细胞的自发性死亡。肝脏细胞凋亡之后会被肝脏中的 HSC 以及枯否细胞吞噬,吞噬后前纤维的产生作用会增强,死亡配体的表达也会增加。而激活的 KC 和活化的 HSC 可进一步促进肝细胞的凋亡。

2.1.3 肝纤维化的诊断

目前肝纤维化的诊断方法主要包括：血清学指标检测、病理组织学检查、影像学检查。

传统的肝活检虽然具有创伤性、局部性以及非动态性，但因其直观、且随着彩色图像分析技术的应用，判断肝纤维化程度的客观性得到了提高，故目前还不能为其他检测手段所完全代替。

由于肝脏的组织病理检查需要进行肝脏穿刺，对于患者来说是一个较大的负担；因而找到优良的血清学指标就具有了重要的意义。目前临床上人们主要采用三类血清学指标来检测肝纤维化：细胞外间质成分（ECM）、胶原酶类（脯氨酸羟化酶、脯氨酸肽酶、单胺氧化酶、TIMP-1）和细胞因子（PDGF、TGF- β 1）。肝纤维化血清学检测的标志物主要是 ECM 的代谢成分（例如：透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN））他们的含量与肝纤维化的程度密切相关。在肝脏组织内，纤维化时 HA 主要来自与 HSC 与肝细胞，而 HA 主要是被 HSEC 摄取和降解。当 HSEC 受到损伤后 HA 的摄取和分解就会产生障碍进而沉积在肝内，与此同时血清中 HA 含量可检测到升高，因此 HA 被学界公认为诊疗与判断肝纤维化程度的最佳指标。虽然血清学标志物因为其受到多种因素的影响，单一指标无法准确反应纤维化的程度而不能完全代替肝的病理组织学检查，但是其无创性及可进行动态观察的优点使其成为肝纤维化检测的重要手段，联合不同指标进行检测则可以提高肝纤维化的检测率。

通过各种常用的医学影像手段可以发现：肝脏形态结构的改变，以及门静脉和脾静脉直径改变等肝硬化和门脉高压的特征现象。使用彩超检查或放射性核素扫描可以测定肝脏动脉和门脉的血流量及功能性门体分流情况。

随着基因工程的发展人们开始测定肝组织各项特征标志物的 mRNA 水平，以助于肝纤维化机制的研究及肝纤维化诊断、治疗和预后的分析。

2.1.4 肝纤维化的治疗

肝纤维化的治疗过程一般分为以下两个步骤：第一，在肝纤维化治疗的初期，应首先抑制肝脏纤维化进一步发展；第二步是药物改变肝脏的结构以及功能，延缓纤维化的进程，防止肝硬化的形成，尽可能地将肝纤维化逆转到正常水平。肝纤维化临床上现今仍然没有特效的治疗方法，对其进行治疗的关键，在于早期诊断，并针对病因给予相应的处治，所以应该从病因入手，将发病原因找出并去掉，可以在一定程度上抑制肝纤维化的进一步发展。

现阶段肝纤维化的治疗途径包括：（1）去除肝纤维化的病原；（2）对于成纤维细胞的收缩有一定的抑制作用；（3）阻止肌缓解组织损伤、促进内皮修复；

(4) 成纤维细胞的增殖和新血管生成；(5) 在肝纤维化的形成中会出现促进肝纤维化的细胞因子以及信号传导作用，人们可以使用药物对这些细胞因子进行抑制。(6) 对金属蛋白酶活性具有刺激作用；(7) 增加肌成纤维细胞的凋亡作用。近几年的临床研究显示：肝纤维化患者中，每个患者之间都有着鲜明的不同，相同的致病因素在不同的患者中可以出现相同的结局。因此对于肝纤维化这一疾病，我们提倡基因个体化治疗，但是基因研究尚处在探索研究过程中。

目前抗纤维化症状的药物主要分为四类：1.抑制炎症和脂质的过度氧化（例如：某些固醇类激素、水飞蓟素）它们能减轻氧化应激，抑制 TGF- β 1 介导的胶原合成，起到抑制肝细胞凋亡的作用。2.抑制 HSC 的活化或者诱导其凋亡（此类药物多处于研究状态中，如交感神经系统制剂、INF- γ 、血管紧张素转换酶抑制剂）3.受体与信号通路的阻断剂，（例如吡非尼酮、TGF- β 1 拮抗剂、酪氨酸激酶抑制剂、ET 受体拮抗剂）4.调节肝脏胶原代谢。一种方法是促进 MMPs 的活性，抑制 TIMP 活性，另一种方法是促进胶原的降解并抑制其合成（如马洛替酯、前列素 E 2、肾上腺皮质激、IL-13）但是其作用靶点较为广泛，因而副作用也相应的较大。

中医认为肝纤维化属于“肋痛”、“积聚”、“鼓胀”的范畴，治疗多采用化痰通络、益气活血、软坚散结、滋阴补肾、疏肝理脾类药方。抗纤维化的单味药有丹参、柴胡、冬虫夏草、川芎等。我国药监局批准的抗肝纤维化的中药复方制剂有：复方鳖甲软肝片、扶正化瘀胶囊、复方胎牛肝提取物等。虽然中药复方抗纤维化效果优于单味药或有效单体，但其作用机制尚有待研究。

分子生物学技术得到了不断发展，肝纤维化在分子水平的机制逐渐被人们研究透彻，所以对肝纤维化患者进行基因检测，并对其进行个性化治疗。肝纤维化在基因水平上的治疗主要包括以下几点：阻止纤维化的发展、刺激肝细胞的分裂、促进肝组织结构重建。目前肝纤维化的在分子水平上的治疗主要包括 HGF、PDGF、IFN 以及 TGF- β 1。虽然从目前研究情况来看，基因治疗经过多年发展，在动物试验中取得了很大的成就，但是要等到基因药物真正走上临床，还需要更多的研究：对于在机体中的基因导入、靶向性的基因治疗以及基因治疗的调节性都需要进一步解决。

在肝纤维化药物方面存在了如下的问题：现存的对抗肝纤维化的药物很少，大多数药物都在研究阶段，还未在临床中得到应用。因为 HSC 的激活受到了多种因素的影响，影响机制特别复杂，所以它们的作用机制仍然没有被研究者发现。大多数药物在研究阶段，研究出的药物对肝纤维化有一定的效果，但是这些药物在人体中的安全性等方面都应该得到进一步的验证。临床中想要得到的抗肝纤维化药物耐受程度好、特异性方面比较强，药物可以特异性针对胶原或其他成分

有很大的关系，从目前来看，研究中的抗肝纤维化药物遇到的瓶颈就是缺少特异性。

所以本课题进行了 **Kallistatin** 蛋白的哺乳动物表达，这对于未来使用 **Kallistatin** 用于治疗疾病及使用哺乳动物表达出来的蛋白质进行诊断试剂盒的研发都有重要意义。

第三章 Kallistatin 蛋白的毕赤酵母表达及纯化

1986 年以后, Kallistatin 蛋白被广泛研究, 虽然在这些研究中得到了一定的成果^[23], 但是其功能并没有得到确切认识, 因此科学工作者在体外使用基因重组的办法进行微生物发酵, 得到了大量的有活性的 Kal, 这也是对其深入研究的前提条件。

本章使用毕赤酵母表达系统, 使用发酵罐进行高密度发酵, 然后经过纯化处理, 得到较高纯度的重组 Kal, 并对其进行了定量和定性使用, 为后续的研究提供了足够的样品。

3.1 毕赤酵母表达 Kal 蛋白

3.1.1 实验材料

实验室保存的 pPIC9-Kal 质粒构建的毕赤酵母菌株 GS115。

3.1.2 实验试剂

酵母基本氮源 (YNB)	美国 BD 公司
D-生物素	Sigma-Aldrich
蛋白胨	英国 Oxoid
酵母提取物	英国 Oxoid
牛血清蛋白	上海碧云天生物技术有限公司

氢氧化钠、甘油、甲醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、盐酸、氨水、磷酸、SDS、硫酸钙、葡萄糖、硫酸铵、硫酸钙、无水硫酸镁、氯化钠等试剂均为分析纯级别, 购自国药化学试剂有限公司。

3.1.3 实验仪器

电子天平 (BS224S)	Sartorius 公司
pH 计 (PB-10)	Sartorius 公司
四联磁力搅拌机 (HJ-4)	江苏金坛公司
冰箱	西门子公司
恒温摇床	上海福玛公司
高压灭菌锅 (HVE-50)	Hirayama 公司
高速离心机 (Avanti-J-30I 4750)	Beckman 公司

高速离心机 (Avanti - J - 30I)	Beckman 公司
BioFlo/celigen1157.5L发酵罐	NBS 公司
超净台 (SW - CJ - 1F)	苏州净化公司
生化培养箱 (SHP - 150)	上海精宏公司

3.1.4 试剂配制

MD 培养基 (1L): 葡萄糖 20g、琼脂粉 15g, YNB 13.4g。将葡萄糖和琼脂粉溶于 900mL 蒸馏水中, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min; 将 YNB 溶于 100ml 蒸馏水中, 抽滤; 葡萄糖/琼脂溶液温度降低为 60℃ 时将 YNB 溶液与葡萄糖/琼脂粉溶液混匀后铺板, 冷却凝固后使用。

YND 培养基 (1L): 葡萄糖 20g, 蛋白胨 20g, 酵母提取物 10g。酵母提取与蛋白胨可以进行高压蒸汽灭菌, 葡萄糖由于在高温条件下会出现碳化反应, 所以葡萄糖单独抽滤后与其他成分混合后使用。

10× YNB: YNB 134g/L, 混匀定容后抽滤除菌, 4℃ 保存。

BMG 培养基: 1M 磷酸盐缓冲液 100ml/L, 甘油 10ml/L, 高温灭菌后再加入抽滤过的 YNB 100ml/L, 混匀。

基础盐培养基 (BSM) 1L: 85% 磷酸 13.3ml、CaSO₄·2H₂O 0.93g、K₂SO₄ 18.2g、MgSO₄·7H₂O 14.9g、KOH 4.13g, 甘油 40.0g, 用氨水调 pH 至 5.0。

PTM1 溶液: 1L 含 CuSO₄·5H₂O 6.0g、NaI 0.08g、MnSO₄·H₂O 3.0g、Na₂Mo₄·2H₂O 0.2g、H₃BO₃ 0.2g、CoCl₂ 0.5g、ZnCl₂ 20.0g、FeSO₄·7H₂O 65.0g, H₂SO₄ 5ml, 定容混匀后抽滤除菌, 保存于 4℃ 下。

20% 消泡剂: 1L 含发酵用消泡剂 200ml, 高压灭菌。

0.02% 生物素溶液: 1L 含生物素 0.2g, 4℃ 过夜溶解后, 抽滤除菌并于 4℃ 保存。

3.1.5 实验方法

3.1.5.1 目的蛋白制备

(1) 菌株的复苏与驯化: 菌株的复苏与驯化: 选择含有 pPIC9-Kal 的菌株, 使用 MD 培养基进行培养, 在平板上进行划线后放于 28℃ 培养箱中培养 24 小时, 观察平板上的菌落生长情况, 选择生长状态较好的单菌落, 挑取并接种于 YPD 培养基中, 培养基用量为 5mL, 放于恒温摇床中培养, 培养条件为 28 摄氏度, 转速调至 250r/min 培养 24 小时, 为后面实验做准备。

(2) 二级种子的制备: 将一级种子按 1% 的体积分数, 接种至 250ml BMG 培养基中, 28℃, 250r/min 摇床恒温培养 24h。

(3) 高密度发酵：按照上述配方配制 4L BMS 倒入发酵罐中，将发酵罐各出口处密封，用锡箔纸包好后整体灭菌，灭菌完成后等到发酵罐冷却至室温，连接循环装置、通气装置、冷凝管、搅拌转子等装置。通过 pH=4.00、pH=6.86 的电极校准液校正 pH 电极，淋洗酒精后安装至发酵罐的指定位置。在校正 pH 的同时，将搅拌转速升至 800r/min，通气量设定为 5L/min，搅拌 30min 后，校正溶氧电极并进行安装。最后滴加氨水将培养基 pH 调至 5.0，调整转速为 500r/min，滴加少量消泡剂，待罐体温度达到 28℃ 时即可通过火焰接种的方式接种二级种子。加入微量元素和生物素各 10ml（此后每 24h 补加一次），密切监测发酵液中的溶氧（DO）值。在发酵罐中菌群生长时间达到 22 小时左右，发酵罐的溶氧值会快速上升，上升后的 2h 内不添加任何物质，进行饥饿培养。培养后将菌液的 PH 调节至 6.5 左右时，缓慢滴加甲醇，这时甲醇消耗快速，溶氧值会迅速下降，通过对甲醇滴加速度的控制来控制溶氧值，使溶氧值保持在 20-30% 左右，对诱导开始时间进行记录，每隔 12 小时采样一次，测定菌体湿重，并对样品进行离心，测定上清中总蛋白含量及目的蛋白含量，整个发酵过程大约持续 84 小时。

3.2 Ka1 蛋白的纯化定性及定量

3.2.1 试剂配制

1M Tris - HCl：1L 含 Tris 121.1g，用浓盐酸调 pH 至 6.8，定容到 1L。

1.5M Tris - HCl：1L 含 Tris 181.7g，浓盐酸调 pH 至 8.8，定容到 1L。

5×SDS loading buffer：取 1M Tris - HCl (pH6.8) 1.25 ml，SDS 0.5g，BPB 25mg，甘油 2.5 ml，最终定容至 5ml。

5×SDS - PAGE 电泳缓冲液：1L 含 Tris 15.1g，甘氨酸 94.0g，SDS 5.0g 定容后室温保存。

30%丙烯酰胺溶液：1L 含丙烯酰胺 290g，BIS 10g，定容后 4℃ 避光保存。

10%过硫酸铵：称取过硫酸铵 10g，定容于 100ml 双蒸水中，4℃ 保存。

Wash Buffer 洗液：1L 含 NaCl 8.0g，KCl 0.20g，Na₂HPO₄ 1.43g，KH₂PO₄ 0.26g，加入 800ml 蒸馏水溶解并调 pH 使其至 7.2~7.4，定容后加 0.5ml Tween20 即得。

Regent Dilute 溶液：10ml 含 BSA 0.1g，以 PBS 溶解，现配现用。

终止液：100ml 中含有 5.5ml 浓硫酸。

电转缓冲液：1L 含甘氨酸 2.9g，Tris 5.8g，SDS 0.37g，200ml 甲醇，加水定容后现配现用。

TBST：1L 含 Tris - base 2.42g，NaCl 8.0g，加入 800ml 蒸馏水溶解后用盐

酸调 pH 至 7.6, 定容后加 1ml Tween20 即得。

封闭缓冲液: 100ml 含脱脂奶粉 5g, 以 TBST 溶解, 现配现用。

1M 磷酸盐缓冲液 (pH6.0): 量取 1M NaH_2PO_4 溶液 877ml, 1M Na_2HPO_4 溶液 123ml, 混匀后常温保存。

1×PBS: 称取 NaCl 8.01g、KCl 0.20g、 Na_2HPO_4 1.42g、 KH_2PO_4 0.20g, 加水溶解后调节 PH 为 7.3 左右, 定容保存。

考马斯亮蓝 R-250 染色液 (1L): 考马斯亮蓝 1g、250ml 异丙醇、醋酸 100 ml, 混匀后定容。

考马斯亮蓝染色脱色液 (1L): 量取醋酸 100ml、乙醇 50ml, 加蒸馏水定容到 1L。

1M 磷酸钠缓冲液 (1L, pH6.0): 称取 $12\text{H}_2\text{O}\cdot\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 62.40g, 加双蒸水定容到 1L; 称取 $12\text{H}_2\text{O}\cdot\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 358.14g, 加双蒸水后加热溶解, 定容到 1L; 量取 NaH_2PO_4 溶液 390ml, Na_2HPO_4 溶液 610ml, 将二者混匀即得。

PH=6 的 1.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -50mM 磷酸钠缓冲液 (3L): 称取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 594.63g, 用 50mM 磷酸钠缓冲液稀释, 调节 PH 后定容。

PH=6 的 1.0M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -50mM 磷酸钠缓冲液 (1L): 称取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 132.14g, 用 50mM 磷酸钠缓冲液稀释, 调节 PH 后定容。

PH=6 的 0.2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -10mM 磷酸钠缓冲液 (1L): 称取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 26.428 g, 用 10mM 磷酸钠缓冲液稀释, 调节 PH 后定容。

PH=6 的 0.5M NaCl-10mM 磷酸钠缓冲液 (1L): 称取 NaCl 29.22g, 用 10mM 磷酸钠缓冲液稀释, 调节 PH 后定容。

PH=6 的 0.3M NaCl-10mM 磷酸钠缓冲液 (1L): 称取 NaCl 17.53g, 用 10mM 磷酸钠缓冲液稀释, 调节 PH 后定容。

PH=6 的 0.1M NaCl-10mM 磷酸钠缓冲液 (1L): 称取 NaCl 5.84g, 用 10mM 磷酸钠缓冲液稀释, 调节 PH 后定容。

3.2.2 目的蛋白的纯化

发酵液 4500rpm, 冷冻离心 30min, 取上清液, 加入 1.5M 硫酸铵, 4℃ 过夜。10000rpm 冷冻离心 20min, 取上清液, 平衡疏水层析柱, 调节发酵液加样速度 4ml/min, 平衡 G-25 柱子后以 2ml/min 速度加样后过肝素柱, 最后洗脱蛋白, 超滤后收集并浓缩蛋白, 将蛋白抽滤后 -70℃ 保存。

3.2.3 SDA-PAGE 电泳检测

- (1) 将制胶槽安装好。
- (2) 12% 分离胶灌入制胶槽中, 用清水压平 1 小时。

(3) 清空压平用的清水加入 5%浓缩胶, 插入梳子, 等待 1 小时左右完全凝固。

(4) 样品准备及上样: 将待测样品中加入适量 5×蛋白电泳上样缓冲液, 使其终体积为 25μl, 混匀后将其在沸水中煮沸 3-5min, 离心后即可上样。待测样品每孔上样量为 20μl, 同时在凝胶一侧加入蛋白 Marker。

(8) 通电调节 60V 30min, 调节电压为 110V, 样品跑到底部后关闭电源。

(9) 凝胶取出后考马斯亮蓝染色后脱色观察条带。

3.2.4 Western Blot 鉴定目的蛋白

SDS -PAGE 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 使用封闭液封闭没有蛋白的空白区域, 封闭时间为 1 小时, 封闭完成后使用 TBST 漂洗, 然后放入兔抗人 Kal 抗体中 12 小时, TBST 漂洗后加入羊抗兔抗体孵育 2 小时, 使用 TBST 漂洗, 用显色液显色后曝光拍照保存。

3.2.5 BCA 法测定总蛋白浓度

严格按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书操作, 操作完成后检测习惯值。根据标准品吸光值绘制标准曲线, 计算样品总蛋白浓度。

3.2.6 Elisa 法测定目的蛋白浓度

按照 DY1669 Human Serpin A4/Kallistatin DuoSet, 15 Plate (1 KT)说明书操作后在 450nm 和 540nm 参比波长测定吸光度, 根据吸光度绘制曲线, 计算样品浓度。

3.3 统计分析

所有实验数据用 SPSS11.5 软件统计学处理后结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

3.4 实验结果与分析

3.4.1 重组人组织激肽释放酶结合蛋白的制备

本文采用高密度发酵, 通过监测发酵过程中甲醇诱导后的菌体湿重以及 OD600 两个参数后可以知道酵母在发酵罐中生长状态良好, 发酵条件稳定, 这也是高表达目的蛋白 rhKal 的基础, 如图 2-1。

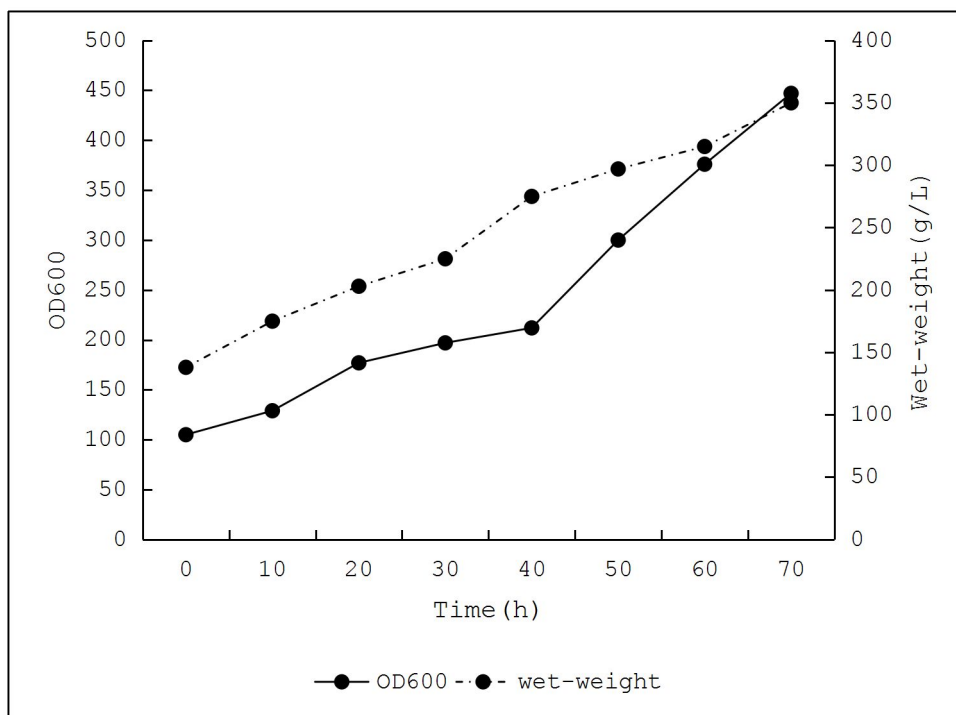


Figure 2-1 Wet weight changes in OD600 and bacteria during fermentation processing

图 2-1 发酵过程中 OD600 以及菌体湿重 (Wet-Weight) 的变化

将发酵过程中取得的样品离心后保存上清，用 BCA 法检测上清中的总蛋白含量，Elisa 法检测其中目的蛋白的表达量，得到含量与诱导时间的变化趋势，如图 2-2 所示。结果发现下罐时发酵上清中目的蛋白的浓度可以达到 40mg/L 左右，这为后续实验提供了坚实的基础。

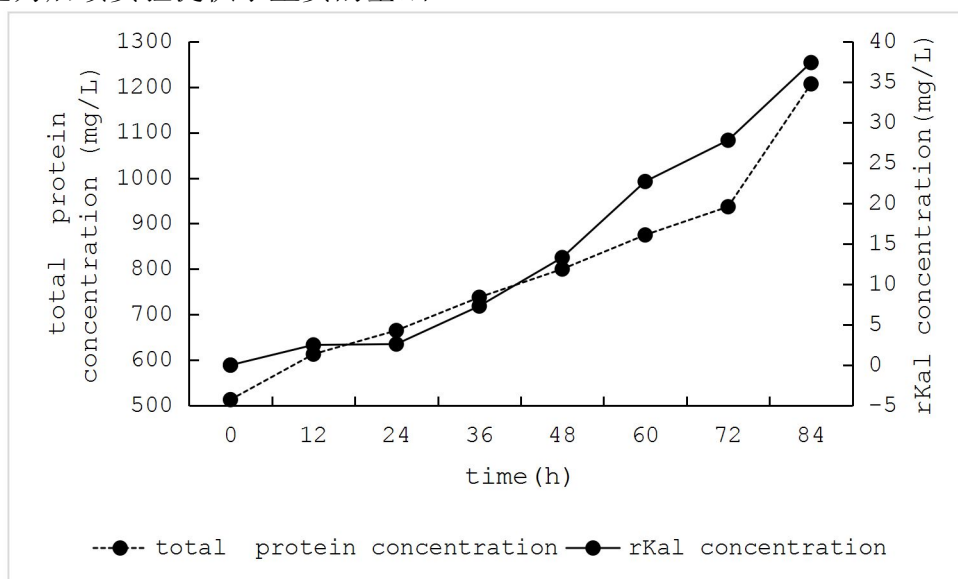


Figure 2-2 Changes in total protein and concentration of the target protein in the fermentation supernatant

图 2-2 发酵上清中总蛋白以及目的蛋白的浓度变化情况

3.4.2 重组人组织激肽释放酶结合蛋白的纯化

发酵上清液经过离心、硫酸铵盐析、疏水柱层析、G-25 柱层析以及肝素层析得到 rhKal，最后采用超滤离心管进行浓缩，并更换缓冲液为 PBS，抽滤除菌，于-20℃保存。通过 Elisa 的方法检测经过纯化，发酵一次能够获得 70mg 左右的蛋白。

3.4.3 SDS-PAGE 鉴定

将诱导过程中，每隔 12h 收集的上清样品进行 SDS -PAGE 检测，以检测发酵过程中的总蛋白以及目的蛋白的含量的变化。如图 2-3 发酵过程中总蛋白的含量在不断增长目的蛋白的含量也在跟着增长。如图箭头处-标出的条带为目的蛋白的条带（40kd 左右），此结果与含量检测结果相一致。

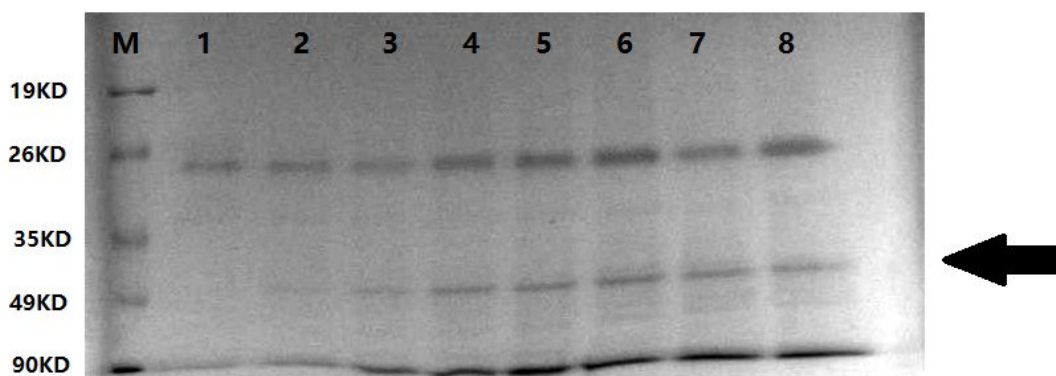


Figure 2-3 Monitoring proteins in the fermented supernatant on the time course of 0-84 h and 84h fermentation precipitation on sds-page

(1: Marker; 2: 0h Clear liquid fermentation; 3: 12h Clear liquid fermentation; 4: 24h Clear liquid fermentation; 5: 36h Clear liquid fermentation; 6: 48h Clear liquid fermentation; 7: 72h Clear liquid fermentation; 8: 84h Clear liquid fermentation)

图 2-3 发酵 0-84h 上清液以及 84h 发酵沉淀的 SDS-PAGE 图

(1: marker; 2: 0h 发酵上清液; 3: 12h 发酵上清液; 4: 24h 发酵上清液; 5: 36h 发酵上清液; 6: 48h 上清液; 7: 72h 发酵上清液; 8: 72h 发酵上清液; 9: 84h 发酵上清液。)

由图 2-4 可以看出随着纯化过程的进行，目的蛋白的条带颜色加深，目的蛋白得到很好的浓缩与分离（图中箭头处为目的蛋白条带）。经过软件分析得出目的蛋白的纯度为 95%。

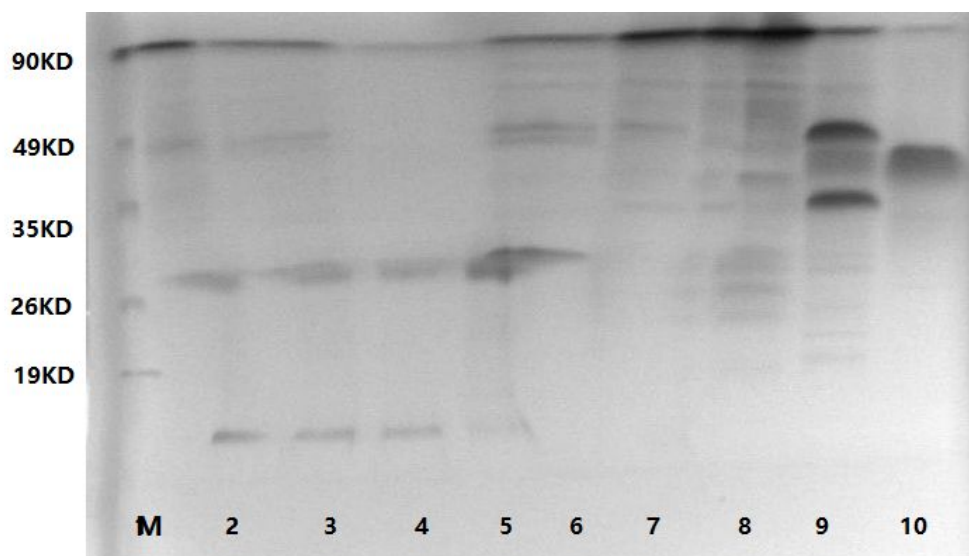


Figure 2-4 Kal protein purification at various stages on SDS-PAGE

(1: On the fermentation supernatant; 4: Fermentation supernatant; 3: Scanty water 0.2 M ammonium sulfate eluent; 4: G-25 column chromatography elution liquid; 5: 0.5 M sodium chloride eluent heparin column; 6: 0.3M sodium chloride eluent heparin column; 7: 0.1 M sodium chloride eluent heparin column; 8: Wild type yeast expression supernatant)

图 2-4 纯化各个阶段 Kal 蛋白 SDS-PAGE 图示

(1. marker; 2. 发酵上清液; 3. 盐析液; 4. 疏水柱穿透峰; 5. 1.0M 硫酸铵洗脱液; 6. 0.2M 硫酸铵洗脱液; 7. G-25 柱洗脱液 8. 0.1M 氯化钠洗脱液 9. 0.3M 氯化钠洗脱液; 10. 0.5M 氯化钠洗脱液)

3.4.4 重组人组织激肽释放酶结合蛋白的 Western Blot 鉴定

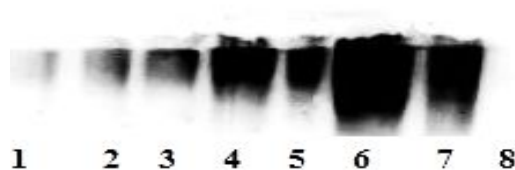


Figure 2-5 rhKal concentrations during various stage of purification processing examined by Western Blot

(1: On the fermentation supernatant; 2: 84h Clear liquid fermentation; 3: Scanty water 0.2M Ammonium sulfate eluent; 4: G-25 column chromatography elution liquid; 5: 0.5M sodium chloride eluent heparin column; 6: 0.3M sodium chloride eluent heparin column; 7: 0.1M sodium chloride eluent heparin column; 8:

Wild type yeast expression supernatant)

图 2-5 采用 Western Blot 检测在纯化过程中 Kal 蛋白含量

(1: 发酵上清液; 2: 84h 发酵上清液; 3: 疏水柱 0.2M 硫酸铵洗脱液; 4: G-25 层析柱洗脱液; 5: 肝素柱 0.5M 氯化钠洗脱液; 6: 肝素柱 0.3M 氯化钠洗脱液; 7: 肝素柱 0.1M 氯化钠洗脱液; 8: 野生型酵母表达上清)

由上图可以看出,在整个纯化过程中目的蛋白的浓度是递增的,表达出的蛋白在 40KD 左右,并且野生型的酵母中并未表达目的蛋白,由此可以确定我们所得到的蛋白为 rhKal 蛋白。

第四章 Kallistatin 哺乳动物表达载体的构建

4.1 实验材料

4.1.1 试剂及耗材准备

电子天平	上海晟冉仪器设备有限公司
-20℃冰箱	西门子
-80℃冰箱	Thermo
凝胶成像仪	Invitrogen
紫外分光光度计	上海菁华
DNA 电泳仪	Invitrogen
蛋白电泳槽	Invitrogen
PCR 仪	Applied Biosystems
恒温摇床	武汉海声达
高速冷冻离心机	Sigma

4.1.2 培养基及溶液的配制

(1) LB 培养基: 蛋白胨 10g/L, 酵母粉 5g/L, 氯化钠 10g/L。固体培养基添加 15g/L 琼脂粉, 121℃, 20min 湿热灭菌。Amp 抗性筛选培养基在灭菌后加入终浓度为 100 μg/mL Amp。

1000×氨苄霉素溶液: 称取氨苄青霉素粉末 1g 溶于 10mL 超纯水中, 经 0.2 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装, -20℃ 保存。

(4) 质粒提取相关溶液

溶液 I: 50mmol/L 葡萄糖; 25mmol/L Tris-Cl (pH8.0); 10mmol/L EDTA (pH8.0), 配好后灭菌置于 4℃, 备用。

溶液 II: 0.2mol/L NaOH, 10g/L SDS, 用时两种溶液等体积混匀, 现配现用。

溶液 III (100mL) : 5mol/L KAc60mL , 冰醋酸11.5mL , 水 28.5mL 。

(5) 核酸电泳相关溶液

50×TAE: 称取 Na₂EDTA·2H₂O₃ 7.2g 和 Tris 242g, 溶于 800mL 蒸馏水, 充分溶解, 量取 57.1mL 醋酸混合, 用蒸馏水定容至 1L。使用时用蒸馏水稀释为 1×TAE 使用。

4.2 实验方法

4.2.1 引物设计

以实验室保存的 rAAV-Kal 质粒为 Kal 模板, 使用 Primer Premier 5 软件设计基因的上游引物和下游引物, 并分别添加酶切位点 *EcoR1* 和 *HindIII* 以及保护碱基。该引物由上海生工合成, 具体序列如下所示:

Kallistatin-L	agaattcatgcatcttatcgactacctg
Kallistatin-R	caagctttggttcgtggggtcgacgac

4.2.2 T 载的构建与鉴定

4.2.2.1 构建T载体

(1)使用高保真酶通过 PCR 方法得到目的片段, PCR 扩增体系如表 1 所示:

表 4-1 PCR 体系的配制

Table 4-1 The configuration of the PCR system

试剂名称	剂量
10×PCR buffer	2.5 μL
Phusion 高保真酶	0.5 μL
上游引物	1 μL
下游引物	1 μL
cDNA 模板	2 μL
dNTP	1 μL
双蒸水	17 μL

(2) PCR 反应条件为

表 4-2 PCR 反应条件

Table 4-2. The PCR reaction conditions

步骤	温度	时间
1	98°C	5min
2	98°C	10s

3	60°C	15s
4	72°C	30s
5	2-4 步循环	35 次
6	72°C	8min
7	4°C	∞

(3) 连接

将得到的 Kal 片段产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳分析取得目的片段后，使用 T4 连接酶将片段连接到 PGEM-Teasy 的克隆载体上，4°C 连接过夜（载体连接体系如下表所示）后，将质粒转化如 DH5 α 感受态细胞中，连接过夜。将转化完成的感受态细胞接种入氨苄青霉素的 LB 培养基中，37°C 200rpm 震荡过夜。

表 4-3 质粒连接体系

Table 4-3 Plasmid connection system

试剂	剂量
PGEM-Teasy	1 μ L
PCR 产物	3 μ L
2 \times Ligase Buffer	5 μ L
T4 连接酶	1 μ L

对培养好的 DH5 α 进行小提质粒，严格按照小提质粒的说明书进行，质粒提取完成后使用 *Hind*III 和 *Bg*III 双酶切 2 小时。

4.2.2.2 鉴定 T 载

(1) 酶切

表 4-4 双酶切体系

Table 4-4 Double enzyme system

试剂	剂量
质粒	3 μ L
<i>Hind</i> III	0.5 μ L
<i>Bg</i> III	0.5 μ L
10 \times Buffer	2 μ L
双蒸水	14 μ L

(2) 琼脂糖凝胶电泳

1%的琼脂糖凝胶：准确称取 0.1g 琼脂糖，溶于 1×的 TAE 中，手动摇匀后放入微波炉中加热溶解，加热过程中注意不要让液体沸腾猛烈，如果沸腾猛烈则拿出手动摇匀后观察琼脂糖溶解情况，若还有肉眼可见的颗粒则重新放回微波炉加热，待琼脂糖充分溶解后，在常温放置，冷却至 65℃时加入 0.5μL EB，轻轻摇动混匀后从凝胶模具的一侧倒入模具，尽量避免倒出气泡。待琼脂糖充分凝固后拔出梳子，将凝胶板放入电泳槽内，电泳液应漫过凝胶。将 DNA marker、目的基因、PCR 产物等与上样缓冲液充分混合后加入到加样孔中。接通电源，调节至电压 120V，待上样缓冲液中的蓝色条带移动到凝胶的 2/3 位置时，停止电源。将凝胶使用凝胶成像仪查看结果，并保存照片。

4.2.3 大肠杆菌的转化及蓝白斑筛选

- (1) 将连接产物加入到 DH5α感受态细胞中，摇匀后放置于冰上 30min；
- (2) 将冰浴完成后的产物放到 42℃预热的水平浴锅中水浴 90s，立即取出置于冰上 3min；
- (3) 在干净的试管中吸入 1ml LB 培养基，将转化后的菌液一起加入到试管中，在恒温摇床上 37℃培养 1h；
- (4) 在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上滴入 40 μL 2%的 X-gal 以及 7 μL 20% IPTG，用涂布棒将其涂抹均匀后放置于 37℃培养箱孵育 2 小时；
- (5) 将在摇床上摇好的菌滴加到含有 X-gal 和 IPTG 的培养基上，使用涂布棒涂抹均匀，倒置培养 14-18h；
- (6) 将长满菌落的 LB 培养基放置于 4℃ 2h，蓝色在这段时间内就会充分显示出来；
- (7) 使用烧过的接种针挑取白色菌落，接种至含有氨苄青霉素的 3ml 液体 LB 培养基中，置于摇床 37℃摇晃过夜。

4.2.4 质粒的小量提取

- (1) 新拆开的试剂盒中的 RNase A 加入到 S1 溶液中，并且在 W2 溶液中加入相应体积的无水乙醇，混合后放置室温。
- (2) 将培养过夜的适量菌液 2ml，放置于离心机中，转速调至 12000rpm，离心 1 分钟后，弃去上清液。
- (3) 在沉淀的菌液中加入 S1 溶液 250 μL，将沉淀的菌块重新悬浮，并震荡摇匀。
- (4) 再加入 250μL S2 溶液，轻轻颠倒混匀，上下翻转多次，知道溶液变成透明，并且该步骤应在 5 分钟以内完成。

(5) 加入 350 μ L S3 溶液，温和颠倒混匀，混匀后放入到离心管中，以 12000rpm 的速度离心 10 分钟，弃废液。

(6) 将上清液吸出并移入制备管中，以 12000rpm 的速度离心 1 分钟，弃废液。

(7) 加入 700 μ L W2 溶液，以 12000rpm 的速度离心 1 分钟后弃废液，重复此步骤。

(8) 不加任何液体，离心去多余的废液，以 12000rpm 的速度离心 1 分钟，打开离心管盖，将乙醇挥发干净后加入 TE 缓冲液洗脱，离心 2 分钟，收集液体。

4.2.5 测序

将目的基因进行测序，保证质粒构建的准确性，该步骤由上海生工完成。

4.2.6 双酶切后的目的片段连接到 pcDNA3.1(+)载体

表 4-5 双酶切后连接体系的配制

Table 4-5 Ligation system preparation after double digestion

试剂	剂量
10 \times T4 连接酶缓冲液	2 μ L
T4 连接酶	2 μ L
T 载切下的目的片段	10 μ L
经过双酶切的 pcDNA3.1(+)	3 μ L
双蒸水	3 μ L

4.3 实验结果与分析

4.3.1 pcDNA3.1-Kal 载的构建与鉴定

使用 *Hind*III 和 *Bgl*II 双酶切双酶切构建完成的 T 载体回收 DNA 片段，对 pcDNA3.1(+)进行同样的处理，使用 T4 DNA 连接酶构建真核表达载体。

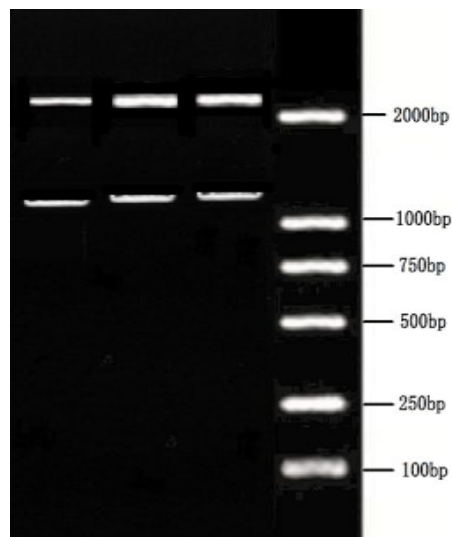


Figure 4-1 Identification of recombinant expression plasmid pcDNA3.1-Kal with enzyme digestion

图 4-1 重组表达质粒 pcDNA3.1-Kal 的酶切鉴定

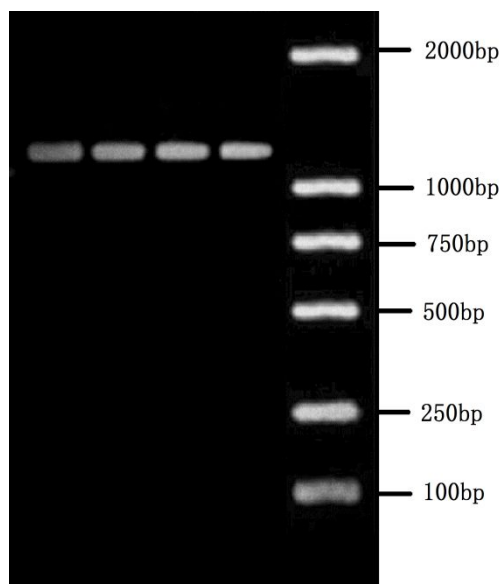


Figure 4-2 The PCR identification of recombinant expression plasmid pcDNA3.1-Kal

图 4-2 重组表达质粒 pcDNA3.1-Kal 的 PCR 鉴定

4.3.2 重组表达质粒的测序结果

本次使用的测序引物为 T7 和 BGH，并且质粒本身带有氨苄青霉素抗性，双向测序后结果一致，说明本次载体在构建的过程中较为成功，没有发生错配。

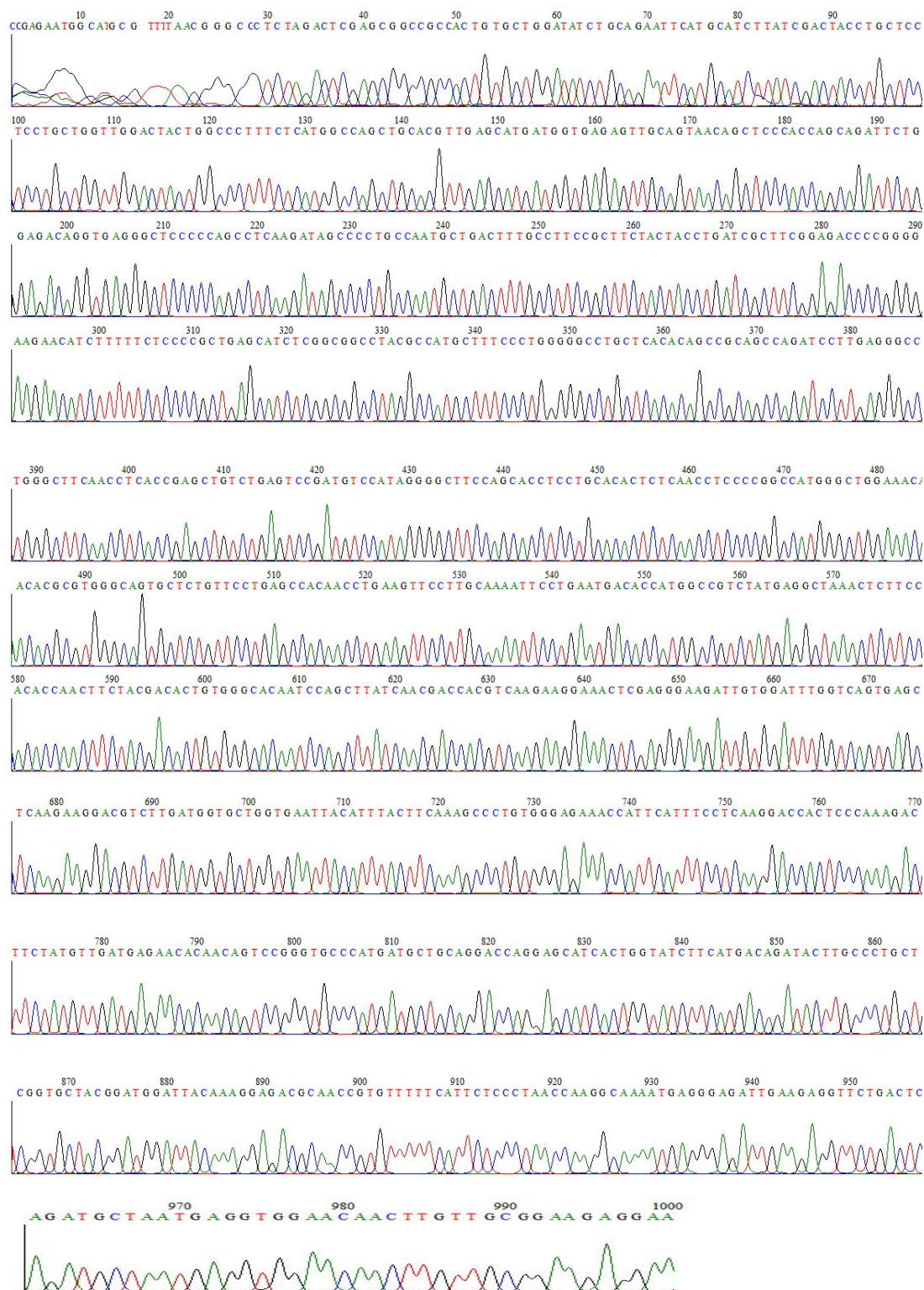


Figure 4-3 The experimental data of Kal gene sequencing

图 4-3 Kal 基因测序结果

4.3.3 质粒图谱

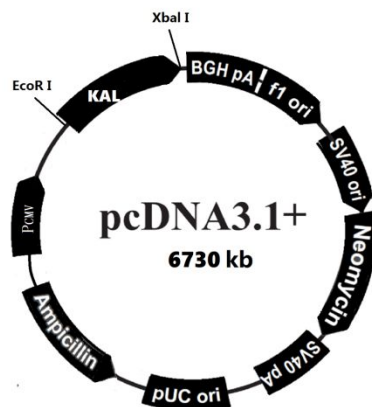


Figure 4-4 pcDNA3.1 plasmid profiles

图 4-4 pcDNA3.1 质粒图谱

4.4 讨论

外源基因的获取一般包括以下几种方法：（1）使用限制性内切酶直接基因酶切得到；（2）使用鸟枪法建立基因文库，从基因文库中筛选得到；（3）通过 mRNA 进行逆转录后得到；（4）人工合成；（5）PCR 扩增目的片段。

当前人工合成 DNA 技术在当前应用较为普遍，如果知道目的片段的序列，就可以不经过 PCR 直接合成片段，但是这种方法对仪器要求较高，并且片段合成仪的价格昂贵。一般是使用化学合成与 PCR 相结合的方法来合成 DNA 片段，并且这种方法可以按照自己的实验思路还加上自己需要的酶切位点，不需要磷酸化的引物；与全基因合成相比之下，这种方法可以不用合成基因的全部序列，节省了大量的合成费用，并且这种结果容易验证，有较强的可操作性。除此之外，还可以使用具有高保真效果的聚合酶，这种聚合酶错配率很低，降低了基因合成中的碱基变异问题。

因为本次需要的目的蛋白是需要哺乳动物表达，所以在蛋白上加了 His 标签，方便转染后的纯化，通过引物直接退火的方式来得到目的片段，然后将其直接连接到 T 载体上，转入到哺乳动物表达载体上，以备日后转染使用。

本次测序结果与 Genebank 中查询的序列结果完全一致，说明载体构建成功。

第五章 Kallistatin 蛋白哺乳动物表达初探

5.1 实验材料

CHO 细胞培养相关溶液

贴壁培养基 (100mL): DMEM/F12 (D/F12) 90mL, 胎牛血清 (FBS) 10mL, 4℃ 保存; 冻存培养基 (10mL): D/F 127mL, FBS 2mL, DMSO 1mL。

PBS: 称取 NaCl 4g, KCl 0.1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.8g, KH_2PO_4 0.12g, 加超纯水溶解后调 pH 至 7.2~7.4, 最终定容至 500mL。

4%台盼蓝母液: 称取 10g 台盼蓝粉末, 加入少量蒸馏水研磨, 最后加超纯水定容至 250mL, 过滤, 4℃ 保存。使用时, 用 PBS 稀释至 0.4%。

5.2 CHO 细胞冻存与复苏的条件优化

5.1.1 冻存保护液对 CHO 细胞的影响

将需要冻存的 CHO 细胞悬液收集到无菌的 50ml 的离心管中, 以 1000r/min 的速度离心 5 分钟后去除上清液, 并将细胞分成三份, 每份细胞中加入不同的细胞冻存液, 具体配方如下:

(1) 方案 1: 含有细胞的培养基: 新鲜培养基: 小牛血清=5:5:1

(2) 方案 2: 含有细胞的培养基与新鲜培养基以 1:1 的比例配好后加入 DMSO, 终浓度为 7.5%。

(3) 方案 3: 在 (1) 的基础上加入终浓度为 7.5% 的 DMSO。

将细胞冻存液和细胞悬液混合均匀, 使混合后的细胞浓度为 0.5×10^7 - 1×10^7 个细胞/ml。

将上述三种细胞悬液冻存液转移至冻存管并贴好相应的标签。首先将三管放在 44℃ 保存 1h, 然后转移至 -20℃ 静置 2h, 之后再放入 -80℃ 冰箱保存 10h, 最后将冻存管保存到液氮中, 在一段时间后按照上述细胞复苏方法进行复苏后, 观察细胞生长情况。

5.1.2 冻存条件对 CHO 细胞的影响

将细胞收集到 50ml 离心管中, 1200rpm 离心 3 分钟, 除去上清液, 并将细胞分成 2 份, 并进行如下操作: (1) 将分好的细胞悬液吸取出来接入到细胞培养瓶中, 并将培养瓶水平放置在 4℃ 冰箱中; (2) 室温 → 4℃ 20min → -20℃ 30min

→-70℃→液氮。

5.1.3 复苏方法对 CHO 细胞存活率的影响

将在液氮中冻存的细胞按照最优的复苏方法复苏后，（1）从液氮中拿出后直接放入 37℃水浴锅中融化，以 1000rpm 的速度离心 5 分钟，弃去上清后使用 10 倍体积的培养基重悬后，接入细胞培养瓶中培养；（2）从液氮中拿出后放入 40℃水浴锅中溶解，按照上述方法培养，培养 48 小时观察细胞生长状态和细胞存活情况，同时计算细胞存活率。

5.3 PEI 介导的瞬时转染条件优化

5.3.1 PEI 毒性试验

将处于对数生长期的 CHO 细胞离心后计数，并将 CHO 细胞悬浮于不同浓度的 DMEM/F12 培养基中，初始接种密度在 1×10^6 细胞/ml，37℃培养 24 小时，后开始每隔 12 小时取样一次，进行细胞计数后进行检测。

5.3.2 细胞转染方法

（1）将处于对数生长期的 CHO 细胞离心后进行计数，并在转染培养基中重新悬浮，调节细胞密度为 7×10^5 个/ml。

（2）将质粒和 PEI 加入到浓度为 150mol/ml 的氯化钠溶液中，使其形成 PEI-DNA 复合物。根据情况使用不同浓度的 DNA 和 PEI，质粒浓度一般控制在 0.02-0.05 μg/ml，PEI 浓度为 0.06-0.16 μg/ml，将质粒与 PEI 等体积混合，室温静置一段时间后，形成 DNA-PEI 复合物，DNA-PEI 复合物的大小与孵育时间有关，一般在 5-30 分钟之间。

（3）将孵育完成的 DNA-PEI 复合物按照体积比为 1:10 的比例加入到转新鲜的准备转染的培养基中，DNA-PEI 复合物带有正电荷，所以会与细胞膜相结合，细胞通过吞噬作用将 DNA-PEI 复合物吞入细胞中，一般这个过程时间为数小时。

（4）转染 3 小时后加入相同体积的 DMEM/F12 完全培养基进行培养，培养条件为 5%CO₂、37℃。

5.3.3 转染条件的优化

在此之前的文献中大多数是针对有血清条件下的贴壁细胞来培养的，所以无血清条件下的转染需要重新优化。

5.3.3.1 细胞密度优化

收集处于对数生长期的 CHO 细胞，离心之后用培养基重悬然后计数，使用转染培养基将细胞分别稀释到 0.5×10^6 、 1×10^6 、 2×10^6 个/ml，将细胞分别放置于 6 孔板中按照上述转染方法进行转染，对转染 24 小时的细胞取上清液，使用 ELISA 方法测量 OD 值，计算目标蛋白浓度。

5.3.3.2 PEI 转染浓度优化

将一定浓度的 pcDNA 溶解于不同浓度的 PEI 盐溶液中，形成复合物，复合物形成时间统一为 10 分钟，然后进行细胞转染，转染后 48 小时取上清液检测细胞蛋白质分泌情况。转染发生时，质粒最终浓度为 $1.5 \mu\text{g/ml}$ ，PEI 使用的最终浓度为 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \mu\text{g/ml}$ 、 $9 \mu\text{g/ml}$ 、 $12 \mu\text{g/ml}$ 、 $15 \mu\text{g/ml}$ 。

5.3.3.3 质粒浓度条件优化

将一定浓度的 PEI 盐溶液与不同浓度的质粒混合称为 DNA-PEI 复合物，复合物形成时间为 10 分钟，复合物形成后进行转染，转染后的 48 小时，取培养基上清液检测质粒表达情况。质粒的最终浓度分别为 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $2 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $3 \mu\text{g/ml}$ 。

5.3.3.4 复合物形成时间优化

从上述最佳方案来进行时间优化，质粒和 PEI 浓度也使用优化的浓度，形成复合物的时间分别为 1 min、5 min、10 min、30 min、60 min、120 min，在到达一定时间后马上转染。转染 48 小时，取上清液检测蛋白分泌情况。

5.3.3.5 复合物盐浓度优化

将质粒和 PEI 溶液采用不同的盐浓度中使其形成复合物，浓度分别为 0mM、50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM 进行配置，其他反应因素使用上述优化方案进行，转染后 48 小时取上清液检测蛋白表达情况。

5.4 结果

5.4.1 保存和复苏条件的优化

5.4.1.1 保护剂对 CHO 细胞的影响

一般会根据冷冻保护剂的作用原理来对冷冻保护剂进行分类，最常用的冷冻保护剂可以穿透细胞膜进入到细胞浆中，如甘油、DMSO、甲醇等^[24]。这类冷冻保护剂的主要原理是在冷冻之前冷冻保护剂进入到细胞内部，使细胞内外渗透压保持平衡，所以细胞得到一定的保护。冷冻保护剂进入到细胞之后，具有保持细胞中的水分不外漏的作用，使细胞保持一定的形态。DMSO 以及甘油对于细胞内部冰晶的形成具有较低的抑制作用，所以在细胞冻存到液氮之前需要一段时

间的预冷，这样就可以使冷冻保护剂充分渗透，起到了细胞保护的作用^[25]。

从实验结果可以看出，方案三的效果是最好的，并且其存活率比其他两种方案更高，而且冻存的效果也更好。

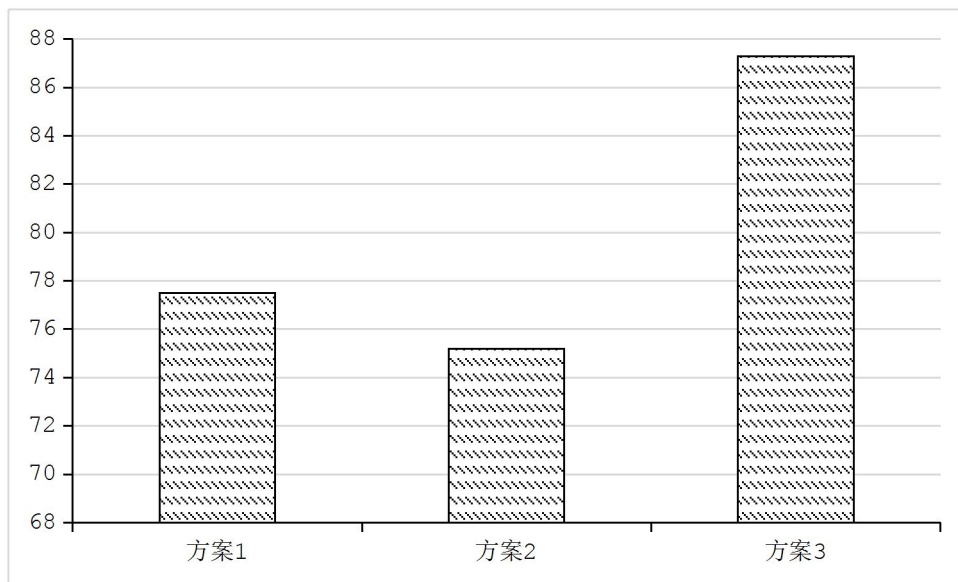


Figure 5-1 The effect of different freeze-stored liquid formula on CHO cell survival rate

图 5-1 不同冻存液配方对 CHO 细胞存活率的影响

5.4.1.2 保存条件对 CHO 细胞的影响

为了在瞬时转染过程中使细胞保持最佳状态，避免出现污染造成细胞状态不稳定，就应及时更换细胞种子，如果要大量培养，就应当建立健全一种快速的细胞复苏方法，来更换衰老的细胞。通常的做法是将细胞冻存在液氮罐中，然后进行复苏再进行扩大培养，这样可以有效降低老化的细胞状态，但是这个过程需要较长的时间才能达到要求，一般需要 1-20 天的时间才能达到大规模生产的需要，在此期间需要传代 5 次左右，并且复苏周期比较长。为了找到传代次数更少而且复苏周期较短的细胞冻存方法，所以笔者对 CHO 细胞的保存条件进行了探索性研究。

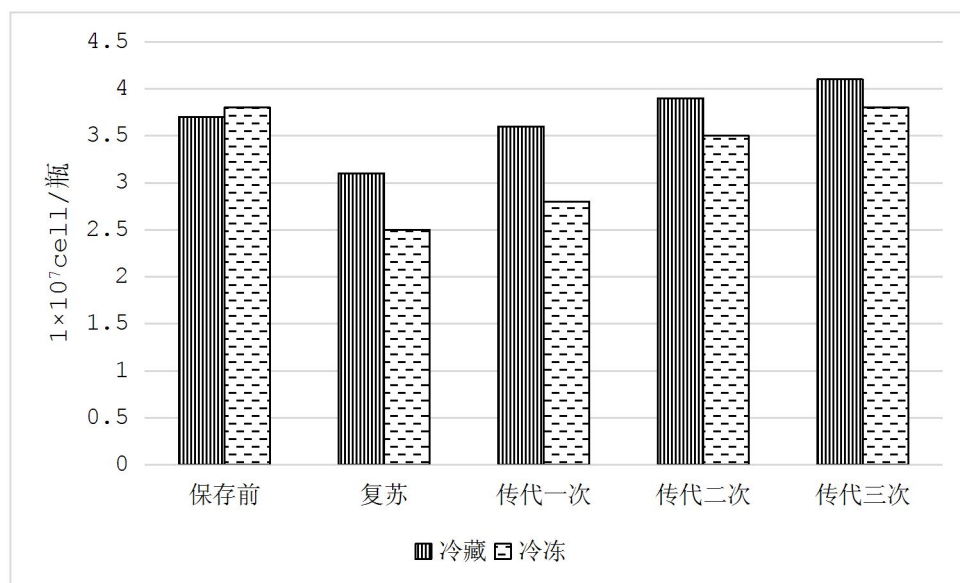


Figure 5-2 The numbers of recovery cells under different conditions for each generation with cell counting

图 5-2 不同条件下复苏细胞各代次细胞计数结果

从上图中我们可以看到,在 2-8℃ 条件下冷藏的细胞经过 10 天的保存后再进行复苏,细胞基本恢复原来的存在状态,传统的液氮保存虽然适合长期保存,但是传统液氮保存的方法在复苏后细胞至少需要传 4 代才能够达到保存之前的状态。

2-8℃ 冷藏虽然在保存时间上不存在任何优势,但是与常规液氮相比来看,2-8℃ 保存的细胞悬液可以在短时间内恢复到细胞生长活跃的状态,这样就可以在生产或实验循环周期较为紧张的情况下使用这种方法来保存,这种方法可以作为辅助保存法来保障生产或实验的持续性。

5.4.1.3 复苏方法对 CHO 细胞的影响

在超低温的条件下,细胞中的生化反应速率一般接近于 0,细胞以及培养基中含有大量的水分,水在 0℃ 以下会结冰,细胞在没有冻存之前经过处理的悬浮状态,随着温度的缓慢降低,细胞内的水以及细胞周围环境中的水都会结冰,如果不加入任何保护剂,细胞中水分所凝结成的冰晶可以刺破细胞,引起细胞坏死,这是一种细胞内结冰造成的物理损伤。但是如果将细胞悬浮于培养液中,随着温度的不断下降,细胞外的水会先凝结成冰,造成没有结冰的培养液电解质浓度增加,如果细胞在这种高电解质溶液中保存时间较长,则细胞膜会受到破坏,温度升高后,水融化,使水分大量进入细胞中,也会出现细胞死亡的现象。这种由于电解质浓度过高而造成的损伤被称为溶质损伤。如果继续降低温度,细胞内和细

胞外都可能结冰，如果培养液中含有一定的冷冻保护剂，那么细胞就不会被溶质和冰晶损伤，这是由于冷冻保护剂可以与水分子相结合，使溶液的冰点下降，减少冰晶产生，使细胞几乎不受到损伤，所以细胞在很低的温度下长期保存。

在细胞复苏时，一般要求快速升高温度，在 2 分钟之内从液氮中恢复常温状态，细胞内和细胞外就不会产生较大的冰晶，也不会处于电解质溶液中有较长的停留时间，所以对细胞起到了较好的保护作用，经过冷冻保存的细胞经过复苏过程依然可以有正常的生理功能。与此同时，冷冻保护剂的保护效果也受到冷冻速度、复苏时间有关。所以选择不同的冷冻保护剂对细胞有不同的冷冻效果。

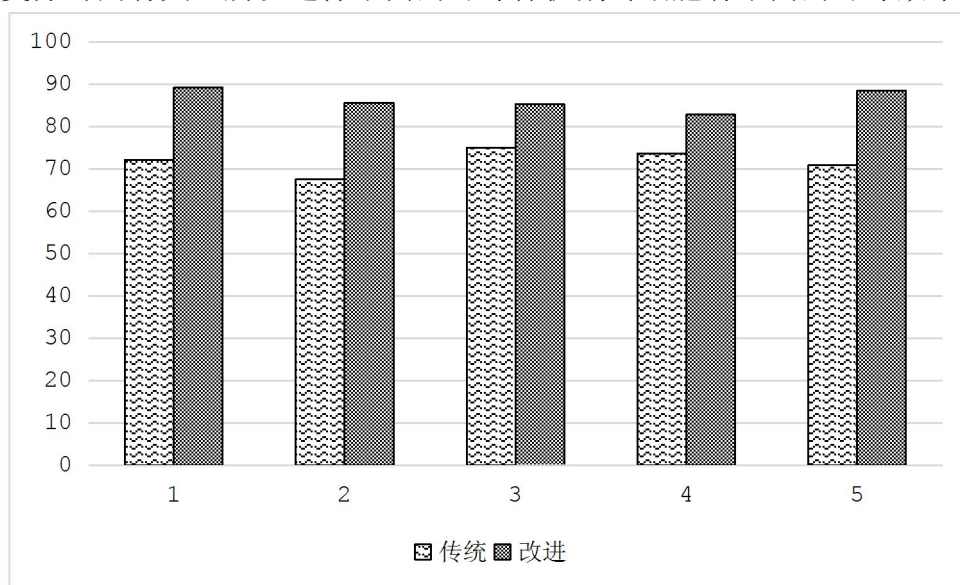


Figure 5-3 The effect of different recovery methods on the cell survival rate

图 5-3 不同复苏方法对细胞存活率的影响

细胞在复苏过程中经历的时间越短越好，这样就可以使细胞从超低温快速恢复到生长温度，细胞在-5~0℃的条件下最容易受损，如果可以快速度过这个时期，细胞受到的损伤可以忽略不计，还可以正常生长^[26]。本次研究选用了两种不同的复苏方法来进行细胞复苏，进行了两组平行试验，复苏后对细胞的存活率进行检测，检测结果说明。先在 40℃ 条件下将细胞迅速溶解后再放入到细胞生长温度中复苏，加快了解冻所需时间，该方法比传统复苏方法存活率有所提高。较传统方法存活率提高了一半以上。

5.4.2 转染条件的优化

5.4.2.1 细胞密度的影响

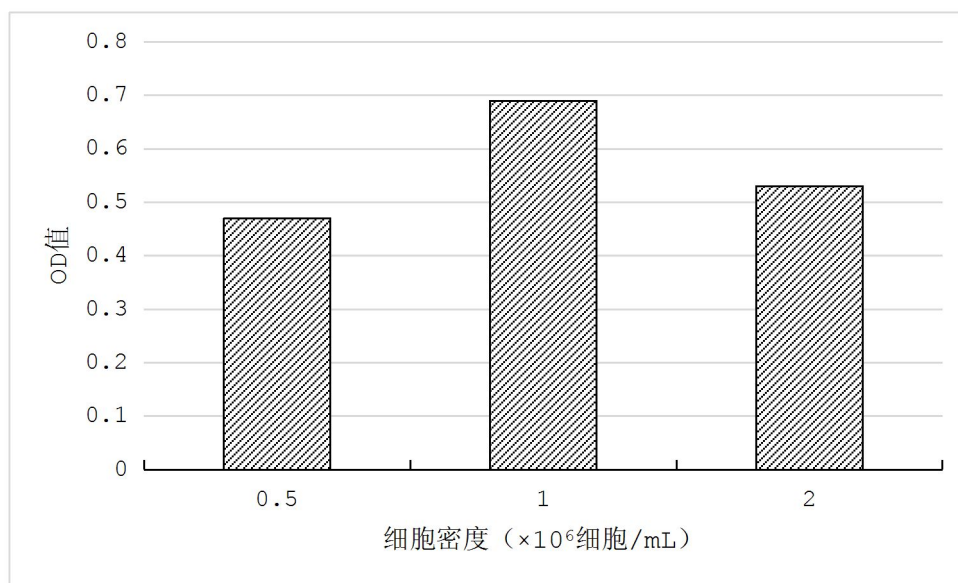


Figure 5-4 The effect of cell density on the quantity of protein expression

图 5-4 不同细胞密度对蛋白表达量的影响

为了确定最佳的细胞转染密度,本次使用同样的转染方法来对不同密度的细胞进行转染,转染后对蛋白的表达量进行 ELISA 检测,从上图的数据中可以明显看出,当细胞密度为 1×10^6 个/mL 的密度时,转染效果最好。在下面几种因素的研究中,以 1×10^6 个/mL 来检测下面几项因素。

5.4.2.2 PEI 转染浓度

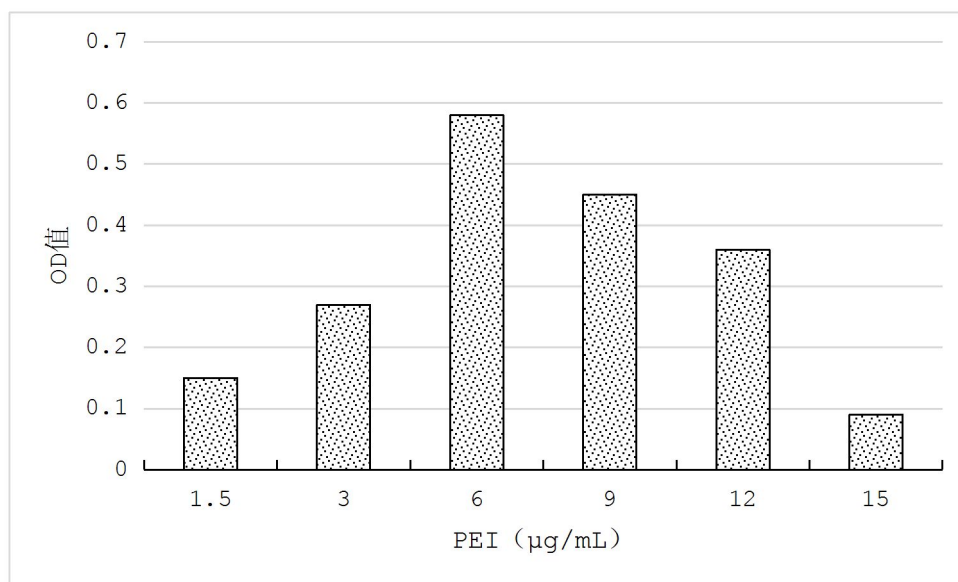


Figure 5-5 The effect of different concentrations of PEI on protein expression

图 5-5 不同浓度的 PEI 对蛋白表达的影响

本次实验是查阅文献所得的质粒 DNA 固定浓度为 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 时,使用不同

的 PEI 来与其形成复合物，48 小时进行 ELISA 实验检测蛋白表达浓度。由以上数据可以看出，PEI 浓度为 $6 \mu\text{g/ml}$ 时表达效果最好，过低的浓度可能造成转染效率降低，所以蛋白表达量也较低，而过高的浓度可能对细胞产生了较高的毒性，使蛋白表达水平降低。

5.4.2.3 DNA 浓度

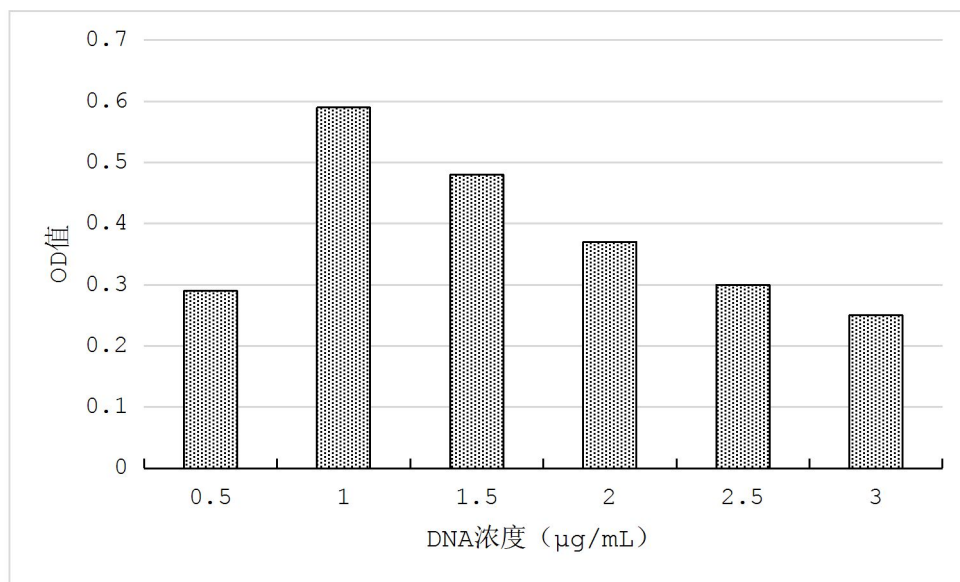


Figure 5-6 The influence of different concentration of DNA on protein expression

图 5-6 不同浓度的 DNA 对蛋白表达的影响

上面的数据得到了 PEI 最佳转染浓度为 $6 \mu\text{g/ml}$ ，将此浓度固定后改变 DNA 浓度，使其形成复合物后转染细胞表达结果如图 18 所示，当 DNA 浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 时蛋白表达效率最高，细胞的表达效率并没有随 DNA 浓度的增加而上升，其原因可能由于高浓度的质粒与 PEI 形成的复合物不稳定，并且过高的浓度可能导致较高的细胞毒性，所以随着 DNA 浓度的增加，蛋白表达量降低。

5.4.2.4 复合物形成时间

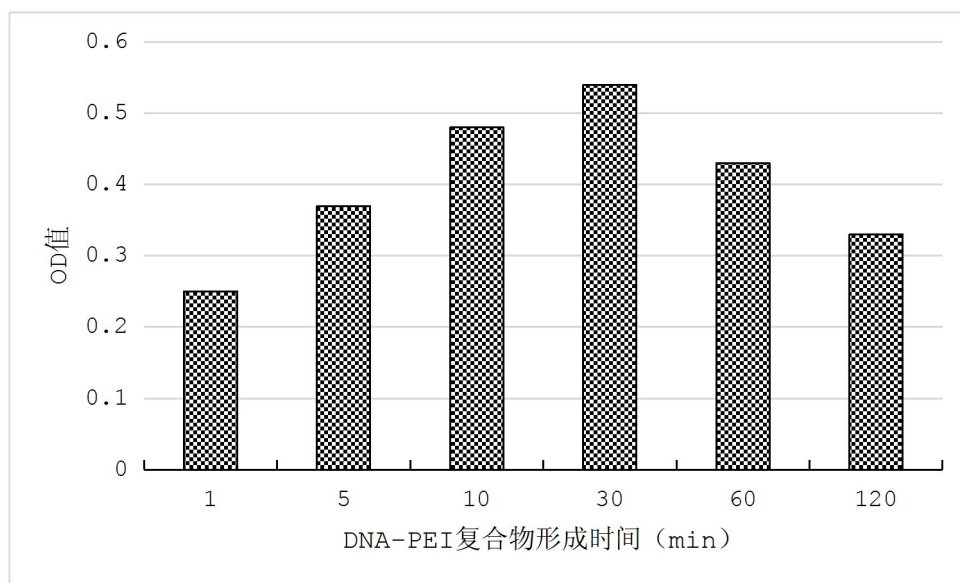


Figure 5-7 The effect of cell compounds formation time on the quantity of protein expression

图 5-7 细胞复合物形成时间对蛋白表达量的影响

PEI 带有氨基与 DNA 分子上含有磷酸基团, 这两种大分子是为正负电荷相吸引, 所以混合在一起可以形成较为稳定的复合物, 在一定的游离氨基酸比例中, 形成复合物的大小和形状与反应的时间有较大关系, 所以本实验对复合物形成最佳时间进行探索, 探索结果显示在反应 30 分钟时, 细胞表达效果较好。

5.4.2.5 NaCl 浓度的影响

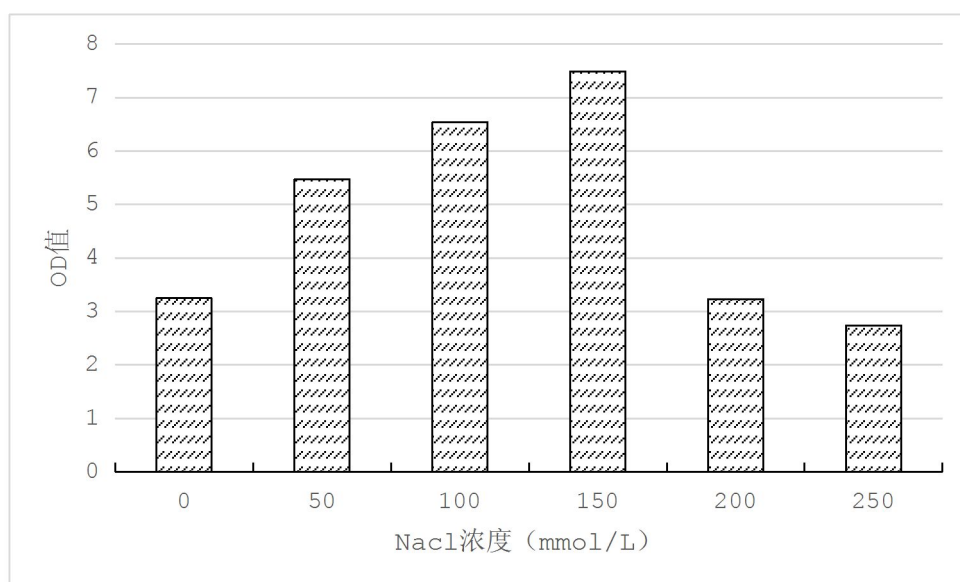


Figure 5-8 The effect of different concentrations of NaCl solution on the quantity of protein expression

图 5-8 不同浓度的 NaCl 溶液对蛋白表达量的影响

PEI 与 DNA 形成复合物的前提是在含有不同 NaCl 浓度的条件下反应的, 所以本实验在上述反应优化的基础上, 对复合物反应中使用的 NaCl 浓度进行研究, 研究发现在 NaCl 为 150mmol/L。

5.5 讨论

当前, 临床实验需要的基因工程药物一半是通过转基因的微生物表达来得到的, 也有很少一部分是通过动物细胞培养获得的^[27]。微生物发酵由于价格低廉所以比较符合药物大批量生产的需要, 但是大多数的蛋白由于其来源是哺乳动物, 因此使用微生物发酵后其糖基化位点及翻译后修饰不足导致蛋白的活性不够, 所以人们开始考虑动物细胞培养产生所需的基因工程药物, 其主要的优点是蛋白折叠更接近于人源化、糖基化和磷酸化使其结构更加符合临床需要^[28]。

在动物细胞培养生产过程中, 最常用的方法是稳定的重组表达系统, 也就是将所需的蛋白基因整合进入宿主细胞的染色体上, 经过相关的筛选, 找到蛋白表达量较高的细胞株^[29]。如在单克隆抗体的生产过程中最常用的是 CHO 和 NSO 两种细胞作为载体。如果需要大量的重组蛋白, 构建一个稳定的细胞株是非常重要的。但是在药物的研发阶段, 一般会用到少量的不同类型的蛋白药物进行临床评价, 稳定细胞株的筛选可能耗费大量的人力、物力和财力, 并且需要较长的时间^[30]。从目前情况来看, 大部分蛋白药物在走向临床之前的评价并没有预想的效果那样好, 所以之前筛选稳定细胞株的过程是没用的^[31]。但是随着人类基因组研究的不断发展, 科学家找到了十几种基因编码蛋白作为候选药物, 但是怎样能够在短时间内得到这些蛋白, 对药物筛选等工作有重要意义。最近几年来, 大规模细胞瞬时转染技术逐渐兴起, 该技术可以在较短的时间内得到大量的蛋白, 目前许多研究团队在实验室进行小规模瞬时转染生产优化工作。动物细胞瞬时表达一般要经过以下步骤 (如图 5-9 所示) ^[31]。

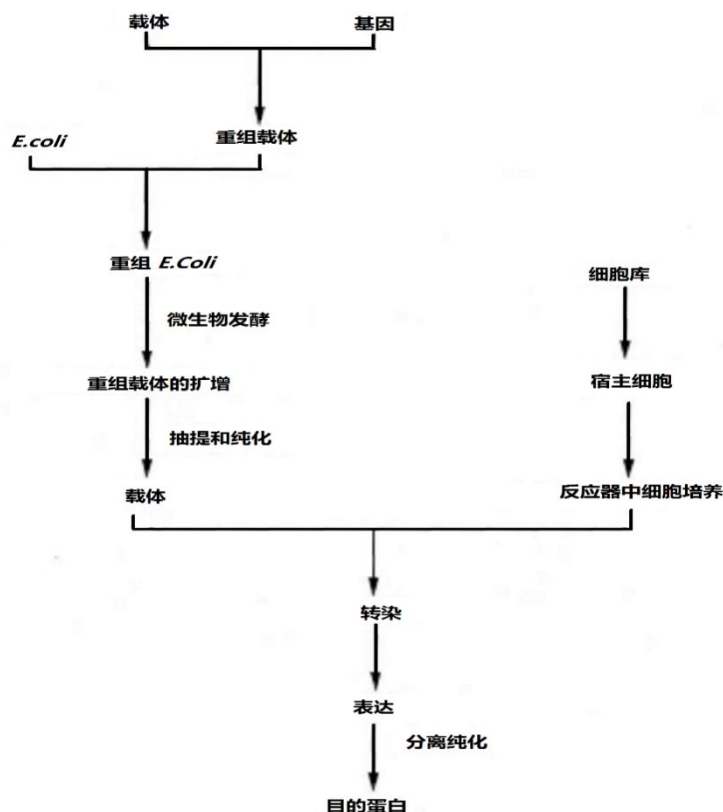


Figure 5-9 The general steps for mammalian transient expression

图 5-9 哺乳动物瞬时表达实验步骤

5.5.1 宿主细胞的选择

从当前情况来看,比较常用的瞬时表达宿主主要有 CHO、COS-7、HEK 293、PKO 等,但是相关文献报道中也存在其他的用于瞬时转染的细胞,但是一般很少大批量使用^[32]。一般在研究中表达的蛋白主要用于模型的研究或实现较高的产量。

在瞬时表达系统中,宿主细胞的选择应当适合大规模生产。大规模瞬时表达蛋白所首选的培养基是无血清培养基,这是因为培养基中加入的血清其成分不明,且每批血清都不稳定,对后面的蛋白纯化步骤造成影响,使用了血清后细胞容易贴壁,所以规模化生产受到阻碍,因此现在瞬时表达所选用的培养基是无血清培养基,一般适合于无血清培养的细胞有 CHO、COS-7 等^[33]。目前,无血清培养应用非常广泛,细胞悬浮培养技术也越来越成熟和简单。但是宿主细胞质粒摄取效率是瞬时表达的第一步,多种因素都可能影响到宿主细胞摄取质粒的效率,如转染试剂、载体的类型等^[34]。相同的条件下,宿主细胞的种类不同,其对载体的摄取能力也不同。如使用磷酸钙来转染 HEK 293 和 CHO 细胞时,HEK 393 细胞摄取质粒的效率较高^[35],但是目前临床上使用的大多数蛋白类药物都是使用 CHO 细胞表达出来的,所以建立 CHO 细胞瞬时表达系统有更广泛的应用价值。

5.5.2 表达载体的选择

在瞬时表达系统中，目的基因的载体既可以使用质粒也可以使用病毒。一般来说，病毒载体转染效率较高，并且细胞毒性很低。但是使用病毒作为载体，经常会有很多不安全的因素在里面，并且病毒的制备过程相对复杂，对细胞的种类也有很高的要求，所以在实验室中使用较少^[36]。实验室最常使用的是瞬时基因表达系统的质粒。

使用质粒转染的方式来实现蛋白质的瞬时表达，启动子的效率以及质粒的拷贝数是非常关键的。一般来说，实验是都倾向于选择转录活性较强的启动子，这样可以增加蛋白的表达量。启动子的转录效率与宿主细胞的类型有密切关系，如 CMV 启动子在 HEK293 细胞中的效率较高。

除此之外，载体的结构与蛋白的产量也有显著关系。有相关文献称，使用加强型的 CMV 启动子作为瞬时表达的启动子，其蛋白表达量是常规启动子的 1-2 倍。一般认为，如果载体具有自我扩增的功能和附加的复制功能，在瞬时基因表达系统中就更合适。比如说，含有 SV40 启动子的质粒在 293T 细胞中的表达量比原始的 293 细胞高许多。有文献报道，HCMV 启动子在 293T 或 Neuro-2 α 细胞中比其他细胞中高出几倍，但是在 CHO 细胞中 HCMV 启动子转录能力就较弱。

实际上来说，影响转染最大的瓶颈问题是质粒从细胞质转移到细胞核的过程，相关文献研究表明，质粒小的更容易进入到细胞核中，也具有更高的转染效率。

5.5.3 转染试剂的选择

将外源基因导入到细胞的方法有多种，但是总体上可以分为 3 中类型，包括化学介导、物理介导、生物介导三种。化学介导法有脂质体转染、阳离子化合物介导、磷酸钙共沉淀。物理法主要有基因枪法、电穿孔法等。生物介导主要是使用病毒。

当前市面上出现了很多高效转染实际，但是大部分都只适合进行基础性研究，并不适合大规模生产，只有很少部分的转染试剂适用于到规模转染^[37]。大规模转染细胞所使用的试剂要求操作方便，对细胞毒性较小，并且适合转染悬浮培养的细胞，转染试剂与 DNA 可以结合成密度较大的颗粒物质，这样有利于转染颗粒与细胞表面相互作用，使细胞的内吞能力更强^[38]。同时，转染试剂将 DNA 包裹起来，使 DNA 进入细胞后不会受到核酶的剪切，提高了转录效率。因为转染试剂与 DNA 混合后保存条件较为复杂、难以保存，所以复合物必须在转染之前新鲜制备^[39]。

磷酸钙介导的转染主要是通过磷酸钙与 DNA 形成复合物，该复合物与细胞膜具有吸附作用，之后细胞通过其流动性或内吞作用进入到细胞内^[40]。因为这

种方法比较简单,并且可操作性较强所以在哺乳动物转染中较为常用,但是随着转染试剂不断研发,磷酸钙也具有较大的缺陷,所以逐渐被淘汰^[41]。磷酸钙介导的转染主要有以下几种缺点:(1)共沉淀的过程必须有效控制,复合物混合时间和混合强度对转染效率有很大影响,如果共沉淀时间过长会造成转染效率很低;(2)磷酸钙转染以后会剩余较多的钙,在对进行细胞转染以后,会对细胞活性造成较大影响;(3)在使用磷酸钙方法进行转染以后应当更换培养基,随意调整培养基会造成转染效率降低^[42]。最近几年来,Lindell 等人发明了一种 Calfection 的方法,首先将 DNA 溶于氯化钙中,然后再将质粒转染到细胞中。如果将氯化钙和 DNA 分别加入到转染的细胞中,并不会产生绿色荧光蛋白,但是两者混合后再加入就可以产生绿色荧光蛋白。除此之外,氯化钙和 DNA 的复合物在常温条件下可以放置 2 个月而不会出现变化,这种方法已经在 100L 规模的细胞转染中使用,但是这种方法存在一定的缺点,就是细胞需要在含有血清的培养基中生长,并且血清在转染过程中具体起到什么作用尚不明确。因此,在以后的研究中要是可以找到代替血清的已知成分或者是半已知成分,氯化钙转染的应用可能更加广泛^[43]。

在阳离子聚合物转染试剂中,对聚赖氨酸是最早报道出来的,多聚赖氨酸可以将质粒 DNA 包裹在中间,进入真核细胞后可以表达。在此之后,鱼精蛋白、多聚赖氨酸、精氨酸等相关产品不断出现。一直到 1995 年以后,Boussif 等人提出,可以使用聚乙烯亚胺(PEI)来介导质粒 DNA 的转染^[44],随后,聚乙烯亚胺成了多聚化合物研究的热点。聚乙烯亚胺具有较高的阳离子密度,并且每隔两个碳原子就有一个质子化的氨基氮原子,所以 PEI 在任何 PH 条件下都能保持其形态不变。PEI 不仅具有效率较高的基因转染效率,而且该物质毒性较低^[45]。PEI 有线性和分支两种类型,其分子量分布较为广泛,并且 PEI 分子量的大小和结构以及与 DNA 混合的比例及形成的 PEI-DNA 复合物的粒子大小与表面构造有很高的相关性,PEI-DNA 复合物的形状决定了转染效率^[46]。研究显示 25kDa 的 PEI 与 DNA 形成的复合物更容易进入细胞中,因此 25kDa 的 PEI 是有效的转染试剂^[47]。目前,PEI-DNA 从细胞膜进入细胞质的转运机制尚无人研究清楚^[48]。但是有类似的文献层提出 DNA 在多阳离子的保护下进入细胞,避免受到核酶的降解。PEI 作为一种有效的转染试剂,对和定位也有一定的作用。

电穿孔转染法是一种效率较高并且速度较快的方法,所以现在较为常用的方法是使用电转仪来进行转染,其原理是使用外电场来改变细胞膜的通透性,使用低强度的电磁脉冲会造成细胞膜微孔扩张,扩张后的小颗粒物质可以顺利进入微孔。但是在强电场力作用下细胞膜商店蛋白质和细胞骨架蛋白会崩解,最终导致细胞死亡,所以电穿孔法应当首先确定实验条件,并且只适合在实验室操作,对

于大规模细胞转染来说，是不实用的。

5.5.4 转染过程的优化

瞬时转染体系中出了要选择合适的细胞，找到适宜的表达载体和合适的转染试剂，瞬时转染表达也受到转染过程和细胞培养的影响，主要包括载体的纯化以及转染前后细胞培养过程和培养基的选择。

5.5.5 质粒的抽提及纯化

DNA 的纯度对于转染效率有很大影响。一般的转染技术都是在电荷吸引的基础上建立起来的，但是如果 DNA 纯度较低，并且含有一定量的盐粒子或其他的无关蛋白，其转染的效率就会显著降低。通常实验室中质粒提取都是使用一般的试剂盒，但一般是小量或微量提取，价格较高，只适合在实验室中使用，并不适合大规模瞬时转染使用^[49]。所以建立一个方法简单、快速、成本低的质粒提取法是非常有必要的。Wright 等人设计了一种质粒提取方法，该方法只需要三步，但是提取后可能残留大量的 RNA，但是对磷酸钙介导的转染并无影响。Wright 等人研究认为，在一些情况下质粒中带有一定量的 RNA 对外源基因的表达有促进作用^[50]。虽然这种方法较为简单且花费较低，但是使用 PEI 作为转染试剂时，RNA 对 PEI-DNA 复合物的形成影响较大。不同的转染试剂对质粒纯度要求不同，所以在转染时应根据不同的转染试剂来选择不同的质粒提取方法。目前主流的质粒抽提法是层析法和沉淀法^[51]。层析法过程较为复杂，介质对质粒捕获相关的影响因素较多，只要操作不当，就可能造成大量质粒的损失。

但是几种质粒纯化方法相比较来说，沉淀法纯化质粒步骤更加简单，但是大量抽提时会出现体积过大的问题。

在瞬时基因表达过程中，目的蛋白的产量与转染效率相关性最高，有多少细胞摄入了多少量的质粒，并且质粒有多少概率被运输到细胞核并参与了转录过程。在这些因素中排除质粒质量、宿主细胞、转染剂等问题，还存在其他问题，如细胞的状态、细胞培养的密度、抗生素的浓度等^[52]。

Grosjean 等人研究发现，在使用磷酸钙介导转染的过程中，CHO 细胞在 DG44 的细胞周期时间段内转染能力最强，也就是如果转染前，细胞处于生长的间期阶段，对质粒的摄取有更好的效果^[53]。但是，细胞周期对转染效率有一定影响的概念具有一定的普遍性，有学者研究指出，在使用 PEI 转染细胞时，转染效率在不同的细胞周期并不会会有明显的差异性^[54]。所以目前细胞周期与转染效率方面的研究十分有限，所以在以后的工作中应当更深入的对细胞周期和转染效率之间的关系进行研究，为后续人们的实际工作具有重要意义。

细胞密度对于转染的效果也有很大的影响。转染试剂不同，对细胞的密度也

有不同的要求,即便是相同的转染试剂,也可能由于细胞类型不同或细胞密度不同而使用不同量的转染试剂。转染试剂使用浓度过高或过低都会对转染效率造成很大影响,造成表达产物水平过低,所以选择细胞系以及转染试剂以后,首先要做的就是使用条件的优化,包括细胞的密度和细胞培养时间等^[55]。

在商业化的瞬时基因表达过程中,无血清培养基较为常用。这些无血清培养基与血清型培养基效果类似,但是在瞬时基因表达时效果却并不如血清型培养基好^[56]。培养基中含有一定量的肝素或硫酸葡聚糖,这些物质都会对转染效率产生较大影响,因此,必须选择合适的用于转染的培养基。在使用有血清培养基进行转染时,转染的产量经常是无血清培养基几倍之多,但是培养基中含有血清成分^[57],有部分血清成分并未明确,所以为目的蛋白纯化过程影响较大,所以目前常用的办法是使用化学成分限定的或半限定的多肽化合物来代替血清。当前常用的血清代替物是 GPN3,在某些化学成分限定的培养基中加入牛血清蛋白来替代血清会造成蛋白表达的抑制,但是如果培养基中脂类物质浓度为 0.1%左右时,细胞会处于生长较快并且有较高的转染效率的状态^[58]。如果将培养基中脂类物质的含量提高到 0.5%,其转染效率会有所提高,但是目标蛋白产生量却会减少。所以有学者提出,在转染细胞以后加入甘油,对重组蛋白的表达有一定的提高作用,所以选择一种适合瞬时表达的无血清培养基是非常重要的^[59]。

在细胞培养的过程中,尤其是大批量细胞培养时,一般会在培养基中加入一定量的抗生素,防止细菌或霉菌的污染,但是这些抗生素对转染效果可能造成不良影响。如青霉素和链霉素对转染有较大的影响,在细胞培养的正常状态下,加入青霉素和链霉素对于真核细胞没有毒性,并且可以防止污染,但是在转染过程中,细胞膜的通透性会增加,加入这些抗生素后会通过细胞膜进入细胞,给细胞带来较大影响,甚至引起细胞死亡。所以在细胞的瞬时转染中尽量避免抗生素的使用。

转染过程中,转染试剂的比例对细胞转染效率也有较大影响,DNA 的最佳用量取决于 DNA 的类型和需要转染的目标细胞。有学者对 PEI 和 HEK293 细胞转染进行研究发现,瞬时转染所表达的目标蛋白产量与 DNA 的用量有密切关系,DNA 用量较低时,PEI:DNA=9:1 时,可以获得较高的转染效率,如果 DNA 用量较高,那么 2:1 的比例较为合适。

第六章 Kallistatin 蛋白单克隆抗体制作初探

6.1 实验材料

6.1.1 实验动物

Balb/c 小鼠，8 周龄，10 只，购自福州吴氏实验动物中心；SP2₀ 细胞，购自上海细胞库。

6.1.2 试剂与器材

6.1.2.1 试剂

胎牛血清(FBS)；HAT 培养基及 HT 培养基购自博奥龙公司；戊巴比妥钠由华侨大学提供。

6.1.2.2 器材

细胞培养瓶、细胞培养皿、96 孔板、24 孔板、48 孔板、六孔板；手术器械；各类型号的医用无菌注射器；超净工作台；冰箱等。

6.2 实验方法

6.2.1 脾内免疫

选择 8 周龄左右的 Balb/c 健康小鼠，按照小鼠体重注射相应剂量的戊巴比妥钠对小鼠进行麻醉，在注射后的 7 分钟左右，小鼠会失去意识，这个时候将小鼠在手术台上固定，将脾脏部位的毛剔除干净，使用乙醇进行充分消毒后切开 1 厘米左右的小口，用镊子轻轻将脾脏拉出，使用 20 ml 纯抗原进行脾内注射，注射完成后将脾脏放回原来位置，缝合腹腔皮肤，小鼠在 1 小时左右会逐渐苏醒。

6.2.2 皮下免疫

抗原蛋白使用 PBS 或生理盐水稀释到合适的浓度，并使抗原溶液与弗氏佐剂按照 1:1 的比例充分混合。弗氏佐剂与抗原形成稳定的乳状液体，在低温条件下将混合好的免疫剂在小鼠皮下进行多点注射。一般每次注射 4 个点为宜。

6.2.3 细胞融合

首先将小鼠处死，放入 75%的酒精中浸泡 10 分钟左右，将小鼠脾脏取出后

放入细胞网筛中，用注射器的橡皮塞柄将小鼠脾脏在细胞筛网上磨碎，用无血清的 1640 培养基冲洗细胞网筛，使单个的细胞流入 50 ml 试管中后 1000 rpm 离心 10 分钟，弃去大部分上清液后加入新的无血清 1640 培养基将脾脏细胞重悬，用玻璃吸管不断吸打，一方面可以使细胞呈单细胞状态，另一方面脾脏中的结缔组织会粘附在吸管壁上，如果杂质较多，则更换新的玻璃吸管，直至肉眼看不到吸管壁上粘有异物；收集对数生长的 SP2/0 细胞离心后更换新鲜的 1640 培养基，两种细胞分别计数，计数后将 SP2/0 细胞与脾脏细胞混合在一起，充分吸打后 1000 rpm 离心，离心完成后尽可能吸走多余的培养基，加入 PEG 后混匀 2 min，使两种细胞尽可能融合后，加入一定量的 1640 培养基，计数后加入到 96 孔板中，使用含有 20% 小牛血清的选择培养基培养细胞。

6.2.4 血清滴度检测

使用 ELISA 方法检测

6.3 实验结果与分析

6.3.1 脾内免疫与皮下免疫结果对比

为了检测脾脏免疫与皮下免疫血清抗体产生的效果，所以脾内免疫小鼠每隔 5 天采血一次，总共采血 5 次，免疫时间为 25 天，使用 ELISA 法对各时期的血清滴度进行检测；皮下免疫的小鼠由于作用时间较长，所以每隔 7 天采血一次，总共 21 天。从检测结果来看，脾内免疫后的第五天，对血清进行 1:800 浓度稀释 OD 值为 2.376，在进行脾脏免疫后的 20 天以内，血清效价都较高，从第 20 天开始，血清效价显著降低，在第 25 天时，1:800 浓度稀释 OD 只有 1.376，为峰值的 1/2；皮下免疫后的第 7 天，将血清以 1:100 的浓度进行稀释，这时候测得的 OD 值为 1.275 但是随着时间的推移，第 14 天是第 7 天的 2 倍之多，到第 21 天时，血清的 OD 值为 2.894。皮下免疫第 5 天的血清效价与脾内免疫第 7 天的血清效价相当，但是脾内免疫在 5 天后效价会急速下降，皮下免疫随着免疫时间的推移，效价越来越高，一般在免疫后的 20 天达到高峰。但是脾内免疫使用的是纯蛋白注射，并没有添加任何佐剂，而皮下免疫是添加了弗氏佐剂来使用的。

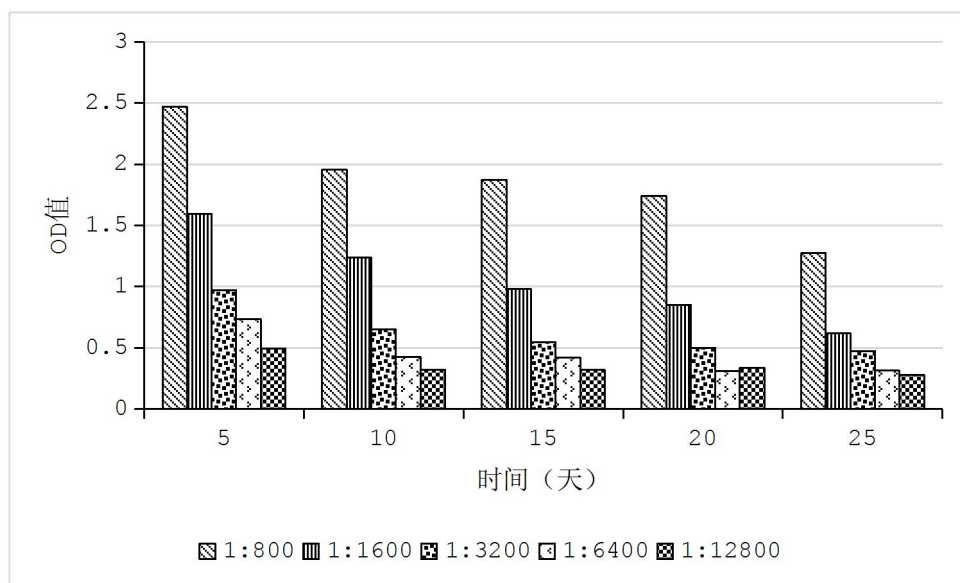


Figure 6-1 OD value of immune serum titer in mice spleen determined by indirect ELISA

图 6-1 间接 ELISA 检测脾脏免疫小鼠血清效价 OD 值

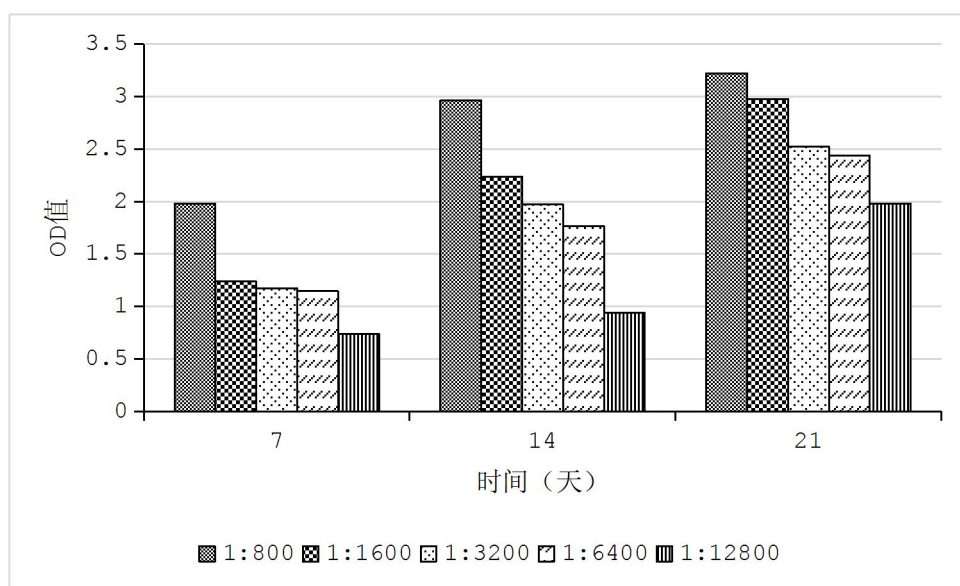


Figure 6-2 Variations on subcutaneous immunization in mice serum antibody degrees within a 21-days timing course

图 6-2 皮下免疫小鼠 21 天内血清抗体滴度变化情况

6.3.2 抗原使用量及佐剂优化实验

将 10 只小鼠平均分为 5 组，每组 2 只

表 6-1 小鼠分组及抗原使用量

Table 6-1 Mice grouping and antigen usages

分组	小鼠数量 (只)	抗原用量	佐剂
A 组	2	20 μ g	QuickAntibody

B 组	2	40 μ g	QuickAntibody
C 组	2	20 μ g	弗氏佐剂
D 组	2	40 μ g	弗氏佐剂
空白对照组 A	2	0 μ g	QuickAntibody
空白对照组 B	2	0 μ g	弗氏佐剂

在对上述小鼠按照其指定浓度及佐剂注射研究，第一次免疫 14 天后检测其效价，采血方法为尾静脉取血，按照 1:12.5、1:31.5、1:78.125、1:195、1:488、1:1220、1:3015 的比例对血清进行稀释，稀释后进行 ELISA 检查得到以下结果：

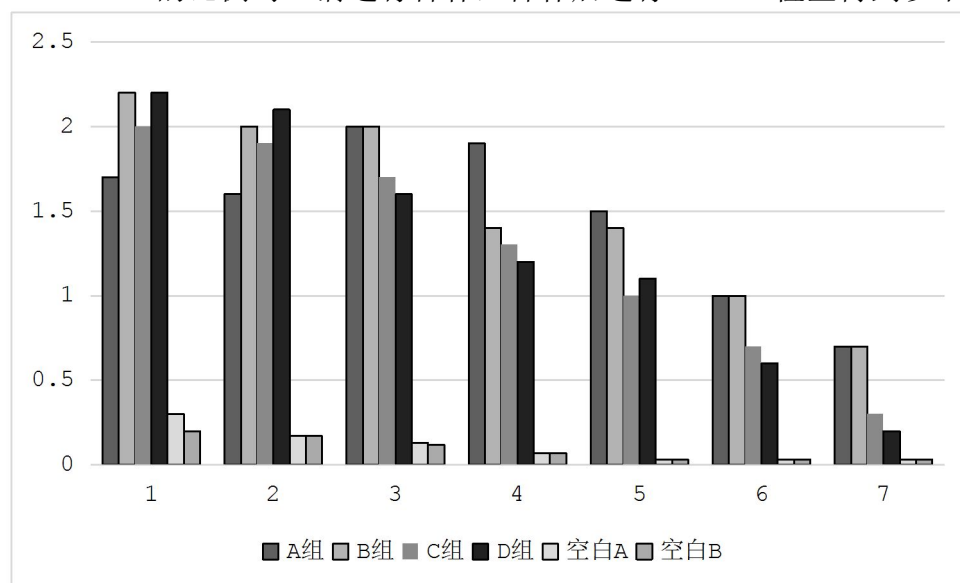


Table 6-3 Different diluted concentrations of antigen titer in mice

表 6-3 不同稀释浓度的小鼠抗原效价

小鼠皮下免疫浓度条件优化，从上述结果中可以看出，D 组小鼠免疫结果较好，在同样的条件下有较好的免疫效果。所以在抗体制作过程中可使用的量为：Kal 40 μ g+弗氏佐剂。

6.4 讨论

1975 年学者发明了细胞融合技术来制备单克隆抗体，从此单克隆抗体在医学检验领域和生物技术领域得到了大面积使用。随着科技发展，人们对蛋白质组研究更加深入，单克隆抗体在蛋白质研究领域发挥了举足轻重的作用^[60]。最近几年分子生物学技术和细胞生物学技术快速发展，人们逐渐建立了各种抗体生产技术，从根本上解决了抗体的人源性问题，使抗体在临床上使用成为了可能，但是这类抗体成本较高，所以用于诊断和科研的抗体一般来源于传统的杂交瘤技术所制备，该制备方法成本低、特异性较强，所以传统的杂交瘤细胞制备抗体的技

术可能长期存在^[61]。杂交瘤细胞制备单抗的过程较为负责，一般是经过动物免疫、细胞融合、筛选等几个步骤，至少需要 3-6 个月的时间，在每个环节都需要详细计划，不管哪个环节出现问题，都会影响到最后的结果^[62]。

6.4.1 细胞融合前的准备

6.4.1.1 免疫动物选择

实验动物的选择在单抗的制备中非常重要，也是单抗是否制作成功的重要前提条件。在杂交瘤细胞制备过程中，首先要对动物进行免疫，其免疫的主要目的是刺激 B 淋巴细胞分化并增殖，产生针对抗原的特异性抗体，B 淋巴细胞增殖和分化的数量与融合形成特异性分泌抗体的杂交瘤细胞成功率有很密切的关系^[63]。一般来说 6-8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠比较适合作为脾细胞供应的动物，一般使用的骨髓瘤细胞大多也来自 BALB/c 小鼠。当前最常用的骨髓瘤细胞株有 SP2/0、p3、NS-1 等^[64]。

6.4.1.2 免疫抗原

当前常用的方法制备单克隆抗体，一般是使用生化法将天然的蛋白质纯化后作为抗原来免疫小鼠，小鼠免疫后待 B 细胞分泌抗体达到一定的数量后就可以将小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合，然后将稳定分泌目标抗体的融合细胞筛选出来^[65]。但是一般生化法提出的天然蛋白质表达量少，纯化难度大耗费的成本也较高，所以现在使用较少。分子生物学技术发展起来以后，人们开始尝试使用基因工程技术来得到目的蛋白，该但是使用基因工程技术制备的蛋白质周期很长，并且与天然蛋白质在结构上有一定差异，所以制备出来的抗体亲和力较差。一般基因工程制备蛋白只使用的是大肠杆菌，大肠杆菌是一种原核生物，当使用大肠杆菌表达哺乳动物来源的蛋白质时，蛋白经常出现糖基化不足、磷酸化不足等现象^[66]。实验证明很多原核细胞制备出来的哺乳动物的蛋白抗血清只能与变性后的蛋白反应，却不能与天然的蛋白反应，在杆状病毒表达的蛋白中也经常出现这样的情况。即使这样的抗体可以在 Western Blot 实验中使用，但是对天然蛋白的结构和功能研究就受到了很大的限制。但是真核细胞表达系统实验周期较长，并且蛋白产量很低，所以在蛋白生产技术方面存在较大的问题。当前分子生物学和免疫学技术的发展让人们弥补了蛋白生产的不足，最具发展潜力的方法有以下几种

(1) DNA 免疫

基因免疫也被人们称为 DNA 免疫，主要免疫的原理是首先使用质粒转染细胞，质粒上含有强启动子，在强启动子的作用下，细胞快速转录出 mRNA 并且

合成我们所需要的蛋白^[67]。然后将目的蛋白直接转移到抗原呈递细胞中。

基因免疫后的细胞表达受到各方面的因素影响,包括转染细胞时所用的质粒,还有给药的方式和所使用的器具^[68]。增强 DNA 反应性的方法有很多种,如增加 DNA 的稳定性,提高 DNA 在组织中分散程度,增加抗原的呈递效果,或对细胞因子和免疫刺激因子进行共表达,增强免疫反应性。IL-12 因子在获得性免疫及先天免疫中有重要的作用,IL-12 可以使 T 细胞以及 NK 细胞激活,这两种细胞激活后会产生大量的 IFN- γ ,所以经常在免疫佐剂中加入 IL-12 来增加 DNA 的反应效果^[69]。

(2) 新型免疫佐剂的应用

当前,在单克隆抗体制备的动物免疫阶段,最常用的加强免疫的佐剂是弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂^[70]。弗氏佐剂与液体中的抗原充分混合较为困难,并且佐剂也具有一定的毒性,所以在操作的过程中应当避免弗氏佐剂沾到皮肤上。当前人们已经研究出了较多新型复佐剂,这些佐剂水溶性较高,佐剂与抗原容易混合,并且比弗氏佐剂有更好的效果^[71]。

6.4.2 饲养细胞的制备

在融合细胞培养过程中,人们会使用选择培养基来筛选脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合的细胞,所以人们通常使用 HAT 培养基来选择细胞,在经过该培养基筛选后没有融合或同种融合的细胞会慢慢死去^[72],在融合效率比较低的情况下就会出现杂交瘤细胞密度极低、不容易存活的现象,为了提高细胞的密度,人们经常会加入其他种类的细胞来共同培养,这些额外加入的细胞称为饲养细胞。但是对于饲养细胞促进杂交瘤细胞生长的机理现在尚未明确^[73],学术界普遍认为饲养细胞可以释放出促进细胞生长的因子,又或者是细胞生长与细胞密度有较高的相关性,加入饲养细胞增加了细胞的密度,促进杂交瘤细胞生长。

6.4.3 细胞融合的主要方法

用于杂交瘤技术制备单抗的融合方法和融合剂主要有以下几种:

6.4.3.1 病毒融合法

当前,人们发现的具有细胞融合功能的病毒有许多种,但是融合效果较好的病毒较少,病毒在细胞液中容易存活,并且病毒位置如果处于两个细胞之间,病毒表面就会分泌降解细胞膜糖蛋白的酶,细胞膜表面的蛋白被降解后细胞就会逐渐向病毒靠近,病毒体积比细胞小很多,细胞膜也具有一定的流动性,所以细胞在这种情况下易发生融合^[74]。

6.4.3.2 聚乙二醇融合法

人们使用聚乙二醇（PEG）进行细胞融合实验，其主要作用机理是 PEG 具有较强的水分子结合能力，细胞表面的水分子被 PEG 所结合，细胞与细胞之间的水分子被 PEG 取代，然后处于不稳定状态的细胞膜极性较低，所以细胞开始逐渐融合起来。PEG 本身有一定的毒性，所以在进行细胞融合时应严格控制融合的时间，这样不仅提高融合效率，还可有提高融合的效果^[75]。

6.4.3.3 电融合技术

细胞电融合技术在杂交瘤细胞融合中的使用是在 1987 年 Zimmermann 最先报道的。在细胞密度比较大的电场中，加入高脉冲的电场后细胞膜表面会形成较多的小孔，这个状态下的细胞膜有很高的通透性，使细胞容易融合。电融合的方法由于是一种物理作用，比细胞融合剂的毒性小，并且操作简单，有一定的可控性^[76]。有学者通过使用生物素-链霉亲和素与电融合技术相结合来进行单克隆抗体的制作，得到了大量的杂交瘤细胞，该方法出现后有人通过该技术得到了特异性 100% 的单克隆抗体阳性细胞株^[77]。

6.4.4 杂交瘤细胞的筛选

杂交瘤细胞的筛选是单克隆抗体制备中最重要的环节，怎样才能从众多的融合细胞中筛选出亲和力及特异性都较高的杂交瘤细胞是主要问题。杂交瘤细胞筛选所使用的培养基最经典的方法是使用 HAT 培养基来进行筛选。最常用的杂交瘤细胞制作方法是脾细胞与骨髓瘤细胞融合后使用 HAT 培养基筛选后找出融合的细胞，然后再通过克隆化的方法找到稳定分泌抗体的细胞^[78]。

当前细胞生物技术快速发展，所以人们使用流式细胞仪技术进行杂交瘤细胞的筛选，该方法省去了杂交瘤细胞培养基筛选的时间，具有较好的发展前景。

6.4.5 克隆化技术

细胞的克隆化一般指的是将细胞群体的细胞挑选出来后，使单个细胞通过不断的生长分裂来得到同种细胞的细胞培养技术。细胞克隆化最主要的目的是将可以不断分泌目的抗体的细胞与其他无关的细胞分离，最终得到可以不断分泌同种抗体的细胞株，也就是说单克隆抗体细胞株^[79]。在单克隆抗体制作过程中，阳性的细胞孔应当尽快克隆化处理，这是因为分泌抗体的细胞生长速度比不分泌抗体细胞的生长速度慢，所以克隆化工作应尽早进行，避免非抗体分泌细胞过度生长使分泌抗体的细胞死去^[80]。在细胞融合后培养的初期，融合细胞的生长情况并不稳定，所以要连续进行多次克隆化。除此之外，即便是已经克隆化的较为稳

定的杂交瘤细胞也需要在一定时间后进行克隆化处理,因为细胞自然分裂过程中会出现基因突变或染色体丢失的现象,这些现象都可能导致细胞失去不断分泌抗体的能力^[81]。

6.4.6 单克隆杂交瘤细胞的扩大培养

大量生产单克隆抗体的方法有体内法和体外法两种,体内法即体内诱生腹水法,是目前最常用的方法,另一种是杂交瘤细胞体外培养。

6.4.6.1 体内诱生腹水法

最传统最经典的方法是将骨髓瘤细胞株注射入小鼠腹腔,使其在小鼠腹腔中产生大量的单克隆抗体,小鼠腹腔中产生的单克隆抗体在诊断试剂的制备和实验研究中经常使用^[82]。其主要的优点是腹水中含有浓度较高的目标抗体,并且这种方法价格低廉,适合大量生产,但是该方法也同样存在许多缺点,最重要的是在小鼠腹水中含有大量的未知蛋白质,所以抗体需要经过提纯后才能使用^[83]。有的杂交瘤细胞株在小鼠腹水中产生的抗体效价不稳定,与小鼠自身的体质也有一定关系,在小鼠体内时间过长,许多原来具有稳定抗体分泌能力的细胞株也可能出现分泌能力降低的情况,所以建议在实验期间冻存一定数量的杂交瘤细胞,并且定时定期进行细胞株的克隆化检查,克隆化检查不仅可以在抗体生产过程中快速发现问题,也可以快速解决问题。在杂交瘤细胞注射进入小鼠腹腔之前,应提前在小鼠腹腔中注射液体石蜡或 IFA 等^[84]。也有相关报道称,降植烷可以导致小鼠的致敏性增加,注射以后对杂交瘤细胞的增殖有重要作用,促进含有抗体的腹水形成,还可以增加杂交瘤细胞生长因子的释放,该方法操作简单,并且有较好的效果。

6.4.6.2 体外扩大培养法

SP2/0 细胞属于半贴壁细胞,该细胞与脾脏细胞融合以后也属于一种半贴壁细胞,所以杂交瘤细胞在体外进行培养不仅可以进行悬浮培养,也可以使用单层贴壁培养的方法^[85]。通常而言,在体外进行杂交瘤细胞的培养,就应当严格控制细胞密度和培养时间。杂交瘤细胞的高密度培养一种是使用细胞发酵罐或转瓶进行使用固定化的培养系统。体内培养和体外培养所产生抗体质量相当,但是由于体内培养含有较大量的天然物质,抗体纯化较为困难,抗体每个批次质量不同,存在大量不可控因素,体外培养解决了以上问题,可控性强,适合大批量抗体生产,在动物伦理学方面有积极影响,但是此方法比体内培养成本高^[86]。

6.4.7 无血清培养液在杂交瘤细胞培养中的应用

当前杂交瘤细胞培养所使用的培养基多为 1640 培养基+20%左右的小牛血清。但是含有血清的培养可能存在较大问题,如血清成分不能明确,血清中含有的成分可能抑制杂交瘤细胞的增殖^[87];在蛋白纯化过程中,血清中含有大量的杂质蛋白,使抗体纯度降低;每个批次之间的血清情况并不一致,所以生产出的抗体可能造成一定的差异。由于以上原因,人们开始发展无血清培养杂交瘤细胞,无血清培养细胞克服了上述缺点,还可以对培养基成分进行一定的优化^[85]。目前市场上并未出现适用于杂交瘤细胞培养的无血清培养基,所以在实验室研究无血清培养基培养杂交瘤细胞时,首先要对无血清培养基添加的成分以及各成分的浓度组合进行优化,杂交瘤细胞也要不断驯化,使其适应无血清培养基。

6.4.8 杂交瘤细胞的冻存和复苏

细胞融合以后,在杂交瘤细胞株的筛选过程中,进行阳性孔检测时一般会有很多个阳性,但是由于实验条件的限制,人们并不能将所有的阳性孔都进行处理,但是阳性孔的存在又是非常重要的,所以为了避免意外情况的发生,人们通常会将临时用不到的细胞冻存起来,以备日后所用。

6.4.9 单抗的效价鉴定及纯化

目前,市面上出现了许多种抗体纯化方法,这些抗体纯化方法一般是按照抗体的类型来选择相应的纯化方法。抗体也是一种蛋白质,所以硫酸铵沉淀法在抗体纯化中比较常用,但是此方法只是在粗提过程中使用^[88];还有一种提取方法是辛酸提取法,该方法操作时间较长,并且不容易获得纯度较高的抗体,所以一般来说辛酸提取法常与其他提取法联合使用;例子交换层析法有较高的纯化效率,并且回收率高,所以在抗体纯化中作为第一步^[89];凝胶过滤一般作为抗体纯化步骤中的最后一步;疏水层析在当前较少使用,这是由于层析柱对蛋白质的活性影响较大,并且层析柱不能重复利用;当前企业大批量纯化抗体的方法是亲和层析,亲和层析的基本原理是根据天然物质之间所存在的特异亲和力^[90]。

随着人类对基因的研究不断深入,单克隆抗体的研究也不断深入到分子水平,并且抗体的特异性也不断提高,基因工程抗体在以后的蛋白质研究中的作用不断提高。核糖体展示、噬菌体展示技术不断完善,使单抗制备周期不断缩短,也从很大程度上降低了抗体生产的成本,这对诊断试剂的研究及抗体的纯化具有积极作用。

第七章 讨论与展望

7.1 毕赤酵母蛋白的表达

毕赤酵母菌株已经在生物医药广泛使用，对于蛋白的发酵体系也较为成熟，而且产量较高，蛋白经过分离和纯化后有较高的纯度，较为适合单克隆抗体的制作。虽然蛋白获取较为简单，并且具有天然蛋白质的活性，但是其分子量与天然的蛋白质有一定差异性，所以只能进行使用该蛋白来进行基础性试验，临床上一般使用的蛋白质为哺乳动物表达，这是因为蛋白的糖基化和磷酸化比较完全，与天然的蛋白质差距较小，免疫原性较低。Kal 蛋白具有一定的抗癌作用和抗血管生成作用，所以在临床的应用中有较大的发展前景。

7.2 哺乳动物表达

本研究获取基因片段的方法为 PCR，是将在实验室中保存的 rAAV 质粒使用引物 PCR 后得到，然后将基因片段连接到 pcDNA3.1 载体上，用于 CHO 细胞表达。为了制备高灵敏度临床应用的肝纤维化 Kal 诊断试剂首先要做的就是建立 CHO 细胞培养体系，优化培养条件，为以后大量生产 Kallistatin 做好铺垫。

7.3 小鼠抗体制作

在抗体制作中，小鼠免疫方法包括脾脏免疫和皮下两种方式，上述两种方式各有利弊，脾脏免疫在短时间内可以得到价高的效价，而皮下免疫达到较高效价需要较长时间。单克隆抗体筛选杂交瘤细胞的关键因素取决于分泌抗目标蛋白的 B 淋巴细胞数量，所以为了提高目标细胞的融合效率，选用皮下免疫是较好的方案。

7.4 本研究的创新点

Kallistatin 是内源性分泌蛋白，可作为肝脏健康状况的标志物来使用，本文是在此基础上进一步研究，旨在开发一款 ELISA 法诊断肝纤维化的试剂盒。为临床肝硬化和肝纤维化的血液诊断提供了便利的方法。

本研究对 CHO 细胞表达 kal 蛋白进行了探索，可以表达出与内源性蛋白更为接近的蛋白，这不仅对单克隆抗体的制作打下坚实的基础，也对以后更深入的

对 Kal 相关机制进行研究和 Kal 相关药物的研究和临床推广使用做了重要的铺垫。

7.5 未来研究计划

(1) 对 Kallistatin 蛋白进一步扩大培养, 建立 Kallistatin 蛋白的瞬时转染体系及稳定表达体系, 对表达蛋白的活性进行鉴定。

(2) 制备对天然 Kallistatin 具有高亲和力的单克隆抗体, 设计 ELISA 双抗体夹心法试剂盒, 进行临床前期试剂盒稳定性和重复性实验, 实验完成后进行试剂盒的临床申报。

参考文献

- [1] Zhou G X, Chao L, Chao J. Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence[J]. *J Biol Chem*. 1992, 267(36): 25873-25880.
- [2] 陈思伊, 庄贞静, 许瑞安. Kallistatin结构功能与信号通路[J]. *中国生物化学与分子生物学报*. 2012(03): 197-202.
- [3] 邢永梅, 刁勇. 人源性激肽释放酶结合蛋白与内皮细胞功能[J]. *生命科学*. 2012(01): 25-31.
- [4] 董浩, 李亨芬, 赵小峰, 等. Kallistatin的研究进展[J]. *医学研究杂志*. 2009(12): 108-110.
- [5] 邢永梅, 刁勇. 人源性激肽释放酶结合蛋白与内皮细胞功能[J]. *生命科学*. 2012(01): 25-31.
- [6] Shen B, Gao L, Hsu Y T, et al. Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010, 299(5): H1419-H1427.
- [7] 刘洪芳. 重组人Kallistatin蛋白的抗肝纤维化作用研究[D]. 华侨大学, 2012.
- [8] Diao Y, Zhao X F, Lin J S, et al. Protection of the liver against CCl₄-induced injury by intramuscular electrotransfer of a kallistatin-encoding plasmid[J]. *World J Gastroenterol*. 2011, 17(1): 111-117.
- [9] 匡枫, 卿国忠. Kallistatin抗炎作用的研究进展[J]. *临床与病理杂志*. 2016(01): 76-80.
- [10] Wang C R, Chen S Y, Shiao A L, et al. Upregulation of kallistatin expression in rheumatoid joints[J]. *J Rheumatol*. 2007, 34(11): 2171-2176.
- [11] Hsieh J L, Shen P C, Shiao A L, et al. Adenovirus-mediated kallistatin gene transfer ameliorates disease progression in a rat model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection[J]. *Hum Gene Ther*. 2009, 20(2): 147-158.
- [12] Shen B, Smith R J, Hsu Y T, et al. Kruppel-like factor 4 is a novel mediator of Kallistatin in inhibiting endothelial inflammation via increased endothelial nitric-oxide synthase expression[J]. *J Biol Chem*. 2009, 284(51): 35471-35478.
- [13] Liu Y, Bledsoe G, Hagiwara M, et al. Depletion of endogenous kallistatin exacerbates renal and cardiovascular oxidative stress, inflammation, and organ remodeling[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012, 303(8): F1230-F1238.
- [14] Miao R Q, Agata J, Chao L, et al. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Blood*. 2002, 100(9): 3245-3252.
- [15] Shiao A L, Teo M L, Chen S Y, et al. Inhibition of experimental lung metastasis by systemic lentiviral delivery of kallistatin[J]. *BMC Cancer*. 2010, 10: 245.
- [16] 高雁, 高婷. 凯西莱对肝纤维化的影响及机理研究[J]. *当代医学*. 2009(28): 135-136.
- [17] 梁健, 唐艳芳, 邓鑫, 等. 肝纤维化无创性诊断研究进展[J]. *实用中医药杂志*. 2011(11): 799-802.
- [18] 袁利超. 肝纤维化诊断方法Fibrotest与Fibroscan研究进展[J]. *中国实用内科杂志*. 2008(06): 493-495.
- [19] 张昀. 肝纤维化可以治疗[N]. *健康报*, (2).
- [20] 王宇, 高毅, 杨继震. 实验性肝纤维化过程中间质胶原酶表达的研究[J]. *世界华人消化杂志*. 1999(11): 1004-1006.
- [21] 许瑞云, 凌云彪, 汪壮流, 等. 肝纤方治疗乙肝后肝纤维化[J]. *世界华人消化杂志*. 1999(10):

866.

- [22] 卢芹芳, 周娇妹. 新生儿高未结合胆红素血症肝纤维化指标及甘胆酸的变化[J]. 浙江临床医学. 2006(07): 689-690.
- [23] 黄晓平. 组织激肽释放酶结合蛋白细胞膜受体的分离鉴定与其抗肿瘤分子机制的研究[D]. 华侨大学, 2014.
- [24] 杨贝贝, 王秀敏. 重组CHO细胞的冻存与复苏条件研究[J]. 今日科苑. 2015(11): 103.
- [25] 杨苗. 奶牛乳腺上皮细胞低温保存与复苏培养的初步研究[D]. 内蒙古农业大学, 2011.
- [26] 祝益民. 细胞复苏的概念及其意义[J]. 中国危重病急救医学. 1995(04): 253-254.
- [27] 陈晓. 浅析中国基因工程药物的应用及发展状况[J]. 现代养生. 2014(16): 286.
- [28] 李国坤, 高向东, 徐晨. 哺乳动物细胞表达系统研究进展[J]. 中国生物工程杂志. 2014(01): 95-100.
- [29] 沈琦, 胡海红, 曾苏. 转运体稳定表达的验证方法及其研究进展[J]. 中国现代应用药学. 2012(07): 603-609.
- [30] 勾蓝图, 杨金亮. 用于重组蛋白生产的哺乳动物细胞表达新技术[J]. 生物技术通讯. 2012(06): 900-903.
- [31] 赵志文, 张铮, 吴颖. 哺乳动物细胞中重组蛋白瞬时表达技术(TGE)的研究进展[J]. 现代生物医学进展. 2014(03): 593-596.
- [32] 梅建国, 庄金秋, 沈志强. 动物细胞无血清培养技术研究进展[J]. 生物技术. 2010(03): 87-89.
- [33] 张香玲综述李薇审校. Vero细胞无血清培养技术的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展. 2015(02).
- [34] 程腾, 李佳佳, 贺小英, 等. 磷酸钙转染方法的优化[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版). 2014(06): 776-780.
- [35] 黄进, 傅吉强, 张庆华. 一种高效省时的利用磷酸钙转染DNA的改进方法[J]. 湖南师范大学自然科学学报. 2016(01): 18-23.
- [36] 谢宝明, 魏圆圆, 乔自林, 等. 哺乳动物细胞表达外源基因常用病毒载体的研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版). 2015(01): 59-63.
- [37] 黄洋, 靳辉, 吕丽华, 等. 不同转染试剂转染绵羊成纤维细胞效果比较[J]. 山西农业科学. 2011(11): 1202-1204.
- [38] 余孝其. 大环多胺衍生物作为基因转染试剂的研究[Z]. 中国福建厦门: 20101.
- [39] 金焰. 新的转染试剂提高了基因治疗研究的效率[J]. 国外医学.遗传学分册. 2000(01): 50-51.
- [40] 黄进, 傅吉强, 张庆华. 一种高效省时的利用磷酸钙转染DNA的改进方法[J]. 湖南师范大学自然科学学报. 2016(01): 18-23.
- [41] 况野, 房有荣, 刘丽, 等. 一种高效稳定的磷酸钙转染HEK293T细胞的方法[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版). 2015(04): 407-413.
- [42] 李华, 刘维全, 王太一, 等. 基因导入的脂质体转染法和磷酸钙转染法之比较[J]. 中国实验动物学杂志. 2000(02): 4-7.
- [43] Lindell J, Girard P, Muller N, et al. Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells[J]. Biochim Biophys Acta. 2004, 1676(2): 155-161.
- [44] 曹慧玲, 滕凤猛, 汪小蓉, 等. PEI与脂质体介导基因转染的比较研究[J]. 国际检验医学杂志. 2015(03): 328-330.
- [45] 郑蒙. 基于低分子量聚乙烯亚胺的高效低毒基因载体[D]. 苏州大学, 2012.
- [46] 马小魁. 哺乳动物工程细胞悬浮适应—可贴壁亚群(HEK293ar)的获得及其抗失巢凋亡机制研究[D]. 第四军医大学, 2009.
- [47] 郭兆培. 改性聚乙烯亚胺基因载体的制备与研究[D]. 吉林大学, 2008.

- [48] 李经忠, 王青青, 余海, 等. 聚乙烯亚胺转基因影响因素的测定及其优化[J]. 中国生物化学与分子生物学报. 2004(02): 234-240.
- [49] 陈婷, 刘嘉, 王晓, 等. 治疗用质粒DNA纯化工艺的优化[J]. 中国生物制品学杂志. 2013(10): 1502-1507.
- [50] 张平静, 李忠明, 刘庆良. 一种简便易行核酸疫苗质粒纯化工艺的开发[J]. 中国生物工程杂志. 2011(04): 106-112.
- [51] 吴斌华, 李祥勇, 周克元. 一种改良的纯化质粒DNA方法[J]. 检验医学与临床. 2010(17): 1806-1807.
- [52] 邹琦, 马贵军, 李荣秀. 核酸疫苗大规模质粒纯化研究进展[J]. 山东医药. 2011(14): 114-115.
- [53] 滕云. 两种质粒DNA纯化方法的比较[J]. 牡丹江师范学院学报(自然科学版). 2009(01): 28-29.
- [54] 丛艳昭, 鲁承, 金宁一, 等. 治疗用质粒DNA的纯化工艺[J]. 中国生物制品学杂志. 2008(10): 899-902.
- [55] 殷玉和, 孙博, 郭丽姝, 等. 中空纤维超滤和疏水层析大规模纯化质粒DNA[J]. 中国生物制品学杂志. 2007(02): 133-135.
- [56] 张香玲综述李薇审校. Vero细胞无血清培养技术的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展. 2015(02).
- [57] 蔡理全, 赵逸超, 汪艳, 等. 肝细胞C3A的无血清培养研究[J]. 热带医学杂志. 2013(04): 428-432.
- [58] 李雅婷, 窦骏, 赵枫姝, 等. 无血清培养的SP2/0细胞肿瘤学特性的研究[J]. 生物技术通讯. 2008(01): 20-23.
- [59] 潘永英, 彭书, 赵一凡, 等. 大鼠海马神经元的原代无血清培养及鉴定[J]. 实用医学杂志. 2006(07): 758-759.
- [60] 王志明, 高健, 李耿. 治疗性单克隆抗体药物的现状及发展趋势[J]. 中国生物工程杂志. 2013(06): 117-124.
- [61] 王志明, 杨立霞, 贾寅星, 等. 基于新兴技术的单克隆抗体药物的研究进展[J]. 中国新药杂志. 2012(18): 2149-2155.
- [62] 刘萍, 陈苗苗, 刘学荣, 等. 单克隆抗体研究进展[J]. 中国畜牧兽医. 2012(01): 67-70.
- [63] 曹玉丽, 宋佳希, 李芳秋. 单克隆抗体靶向治疗卵巢癌研究进展[J]. 医学研究生学报. 2013(05): 536-540.
- [64] 孔君, 刘箐, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. 免疫学杂志. 2011(02): 170-173.
- [65] 李海存, 王敏, 许培扬. 国际单克隆抗体研究文献分析[J]. 预防医学情报杂志. 2010(04): 298-304.
- [66] 吴永强, 董关木. 人源化单克隆抗体研究进展[J]. 微生物学免疫学进展. 2008(02): 73-77.
- [67] 提金凤, 张艳梅, 李志杰, 等. 用DNA免疫研制鸡白细胞介素2单克隆抗体[J]. 中国预防兽医学报. 2007(07): 537-540.
- [68] 沈继川, 谢奇峰. 真菌DNA免疫的研究进展[J]. 国外医学(流行病学传染病学分册). 2002(01): 24-27.
- [69] 潘娜. 联合应用DNA免疫和细胞加强制备CD55单克隆抗体及抗体生物学活性分析[D]. 中国协和医科大学, 2006.
- [70] 李瑶瑶, 明恒强. 我国免疫佐剂的研究现状[J]. 兽药与饲料添加剂. 2009(05): 11-14.
- [71] 尹荣兰, 李昌, 张乃生, 等. 新型免疫佐剂的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医. 2008(03): 18-20.
- [72] 蒋春雷. 腹腔饲养细胞制备方法的改进[J]. 生物学杂志. 1996(02): 33.

- [73] 韩小虎. 磺胺嘧啶单克隆抗体的制备[D]. 吉林农业大学, 2004.
- [74] 霍乃蕊, 韩克光. 细胞融合技术的发展及应用[J]. 激光生物学报. 2006(02): 209-213.
- [75] 王振宇, 杨军, 胡宁, 等. 细胞电融合芯片技术的发展及展望[J]. 分析化学. 2012(03): 331-338.
- [76] 王玉燕, 华修德, 钱国良, 等. 抗噻菌灵单克隆抗体的制备及异源IC-ELISA检测方法的建立[J]. 南京农业大学学报. 2012(01): 38-44.
- [77] 孙倩旖. 高融合率的DC/肿瘤杂交细胞疫苗抗肿瘤研究[D]. 广西医科大学, 2014.
- [78] 李静姬, 李亚龙, 张俊峰, 等. 猪圆环病毒单克隆抗体制备及检测方法的建立[J]. 吉林农业科技学院学报. 2015(04): 1-4.
- [79] 宋百军, 刘原源, 张桐嘉, 等. 抗犬贾第虫 α -12贾第素单克隆抗体的制备及应用[Z]. 中国黑龙江哈尔滨: 20151.
- [80] 张越, 屈会化, 吴婷婷, 等. 甘草酸单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 药物分析杂志. 2013(05): 770-774.
- [81] 易喻, 汪竹环, 朱克寅, 等. 氯霉素单克隆抗体的制备与纯化[J]. 中国生化药物杂志. 2012(01): 23-26.
- [82] 张元兴, 方宏勋, 容秉培. 杂交瘤细胞培养的优化[J]. 生物工程学报. 1998(03): 93-98.
- [83] 马苏, 姜平, 段舒怡, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒GP5蛋白中和性单克隆抗体研制[Z]. 中国黑龙江大庆: 20064.
- [84] 游晓华. 脑钠肽单克隆抗体的制备及初步临床应用研究[D]. 第二军医大学, 2006.
- [85] 李黎, 蔡宏荣, 张和君, 等. 无血清培养基在杂交瘤细胞培养中的应用[J]. 国外医学.预防.诊断.治疗用生物制品分册. 1990(03): 118-120.
- [86] Hilary Sherman, Mark E. Rothenberg. Corning~ hybrigro SF~(TM)培养基对提高杂交瘤细胞培养密度和抗体产量的研究[J]. 中国医药生物技术. 2014(04): 313-315.
- [87] 宁国伯, 钱军华, 郭明珠. 微囊化杂交瘤细胞培养的基础应用研究[J]. 生物工程学报. 1992(02): 164-168.
- [88] 肖增鸿, 黄昭亮, 林月霞, 等. 腹水型单克隆抗体纯化方法的研究[J]. 中国医药生物技术. 2013(06): 425-428.
- [89] 唐佳佳, 李小兵, 刘国文, 等. 单克隆抗体纯化的研究进展[J]. 中国畜牧兽医. 2011(02): 76-80.
- [90] 陈晓虹, 吴建国, 曹传平, 等. 一种可用于大规模单克隆抗体纯化的新型Protein A填料[J]. 中国生物制品学杂志. 2014(02): 228-234.

致谢

时光飞逝，研究生三年很快过去了，三年的研究生生活给我带来了很多的快乐、烦恼、心酸、惊喜，也使我在这三年中成长了许多。在经过一年工作之后，很荣幸我能再一次接受良好的教育。三年的研究生生涯将我从本科生物化学及细胞生物学方面的理论层次的学习提升到了试剂应用中，在课题进行过程中也暴露了大量的学艺不精。所以从专业方面，应当时刻提醒自己谨慎。

本论文的想法是由我的导师许瑞安教授提出的，并且内容也是在其指导下完成，所以衷心感谢许老师对我的关怀和指导。许老师具严格认真的治学态度、渊博的知识，在各个方面我都受到了较大影响。

同时，对于帮助过我的李招发老师、刘嘉老师以及其他支持我课题的老师由衷感谢，他们在实际的实验过程中帮我克服了大量的困难，使我的工作可以顺利进行下去。感谢我的辅导员周莹莹老师，他在生活及各种学生事务中为我们付出了许多，她谦虚热情地在背后默默的支持着我们，在她的帮助下，我们有了更大的进步。

最后，感谢与我奋斗在同一条战线的师弟师妹们和曾经帮助过我的同学们，谢谢你们的帮助和支持。硕士研究生生涯的结束，代表着我掀开了新的篇章，开启了新的生活。

路漫漫其修远兮，吾将上下而求索！