

学校代码 84506

密级_____

武汉生物制品研究所
硕士学位论文

人 IL-4R α 的真核表达、鼠源及嵌合单克隆抗体的制备和鉴定

申 请 人：陈莹

指 导 教 师：潘勇兵 副研究员

学 位 类 别：医学硕士

专 业 名 称：免疫学

研 究 方 向：单克隆抗体

论文起止时间：2018年9月~2021年6月

二〇二一年六月

**A dissertation submitted to Wuhan Institute of Biological
Products for the Degree of master of Medicine**

**Eukaryotic expression of human IL-4R α , preparation and
identification of murine-derived and chimeric monoclonal
antibodies**

D.Candidate	Ying Chen
Major	Immunology
Supervisor	Yongbing Pan

Wuhan Institute of Biological Products

Wuhan, Hubei 430207, P. R. China

June, 2021

目录

英文缩略词表.....	1
摘要.....	3
Abstract	6
前言.....	9
技术路线.....	11
第一章 人 IL-4R α 蛋白的真核表达、鼠源单抗的制备及鉴定	13
1 实验材料.....	13
1.1 细胞及动物.....	13
1.2 载体.....	13
1.3 试剂.....	13
1.4 仪器.....	15
1.5 主要试剂的配制.....	16
2 实验方法.....	20
2.1 IL-4R α 表达质粒构建.....	20
2.2 转化感受态细胞.....	20
2.3 提取质粒.....	20
2.4 酶切.....	21
2.5 琼脂糖电泳验证.....	21
2.6 瞬时转染 Expi293F 细胞.....	22
2.7 镍柱纯化.....	23
2.8 分子筛.....	23
2.9 BCA 法测蛋白浓度.....	23
2.10 SDS-PAGE 检测蛋白纯度.....	24
2.11 WB 鉴定蛋白特异性.....	24
2.12 IL-4R α 的糖基化酶切验证.....	25
2.13 动物免疫.....	25
2.14 ELISA 检测免疫后小鼠血清效价.....	26
2.15 取小鼠腹腔巨噬细胞.....	27
2.16 取免疫后小鼠脾细胞.....	27
2.17 细胞融合.....	28
2.18 杂交瘤细胞的筛选.....	28
2.19 阳性细胞亚克隆.....	29
2.20 细胞冻存.....	30
2.21 细胞复苏.....	30
2.22 腹水制备.....	31
2.23 鼠源单抗的纯化.....	31
2.24 单抗亚类（型）的鉴定.....	32
2.25 SDS-PAGE 检测单抗纯度.....	32
2.26 WB 检测单抗特异性.....	32

2.27 SEC-HPLC 检测单抗纯度	33
2.28 cIEF 检测单抗等电点	34
2.29 ELISA 检测单抗的结合活性	34
2.30 ELISA 检测单抗的阻断活性	35
2.31 流式检测单抗的阻断活性	35
2.32 细胞增殖抑制法检测单抗的生物学活性	36
3 实验结果	37
3.1 质粒的构建与鉴定	37
3.2 IL-4R α 的纯化与鉴定	38
3.3 鼠源单抗的制备与鉴定	41
3.4 单抗的鉴定	42
4 小结	47
第二章 抗 IL-4R α 人鼠嵌合单抗的构建、表达与初步鉴定	48
1 实验材料	48
1.1 实验细胞	48
1.2 载体	48
1.3 试剂	48
1.4 仪器	49
1.5 主要试剂的配制	49
2 实验方法	49
2.1 6-G2 单克隆细胞总 mRNA 提取	49
2.2 RNA 产物琼脂糖凝胶电泳	50
2.3 反转录合成第一链 cDNA	50
2.4 单抗重轻链可变区基因序列 PCR 扩增	52
2.5 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳	53
2.6 电泳产物胶回收	53
2.7 序列比对	53
2.8 质粒转化	53
2.9 提质粒	54
2.10 重组质粒双酶切验证	54
2.11 转染	54
2.12 亲和纯化	54
2.13 SDS-PAGE 检测 ch6-G2 单抗纯度	55
2.14 ELISA 检测 ch6-G2 单抗结合活性	55
3 实验结果	55
3.1 单克隆杂交瘤细胞总 RNA 提取	55
3.2 6-G2 单抗可变区序列 PCR 扩增	55
3.3 对单抗进行核苷酸序列分析	56
3.4 ch6-G2 单抗基因序列	65
3.5 ch6-G2 单抗重组表达质粒双酶切验证	69
3.6 ch6-G2 单抗的亲和纯化	69

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

3.7 ch6-G2 单抗的 SDS-PAGE 验证	70
3.8 ch6-G2 单抗结合活性检测	70
4 小结	71
总结和讨论	72
1 全文总结	72
2 讨论	72
2.1 IL-4R α 蛋白的表达与糖基化修饰	72
2.2 抗 IL-4R α 单抗阻断活性的评价	73
2.3 人鼠嵌合改造对抗体结合活性的影响	74
3 课题不足之处及下一步的工作计划	74
参考文献	75
硕士研究生在读期间发表论文	78
致谢	79

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
WB	Western Blot	蛋白质印迹实验
DB	Dot Blot	蛋白质斑点杂交实验
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
SEC-HPLC	Size exclusion HPLC	分子排阻色谱法
kD	Kilodalton	千道尔顿
CFA	Complete Freund's adjuvant	弗氏完全佐剂
IFA	Incomplete Freund's adjuvant	弗氏不完全佐剂
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
CBS	Carbonate buffer solution	碳酸盐缓冲液
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
TMB	etramethylbenzidine	四甲基联苯胺
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
FCS	Fetal calf serum	胎牛血清
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
cDNA	Complete DNA	互补 DNA
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
CH	Constant region of heavy chain	重链恒定区
CL	Constant region of light chain	轻链恒定区

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

VH	Variable region of heavy chain	重链可变区
VL	Variable region of light chain	轻链可变区
EC ₅₀	50% Effective concentration	半数有效浓度
IBR	inhibit binding rate	抑制率
ORF	Open reading frame	开放阅读框
RD	Rhabdomyomas	横纹肌瘤
mAb	monoclonal antibody	单抗

人 IL-4R α 的真核表达、鼠源及嵌合单克隆抗体的制备和鉴定

摘要

研究表明, IL-4 受体 (Interleukin-4 Receptor, IL-4R) 分为两型, I 型受体由 IL-4R α 亚基和 γc 亚基组成, II 型受体由 IL-4R α 亚基和 IL-13R $\alpha 1$ 亚基组成^[1]。其中, IL-4 可以与 IL-4RI 型受体和 II 型受体结合, IL-13 可以与 IL-4RII 型受体和 IL-13R $\alpha 2$ 亚基结合, 二者均可通过与相应受体结合后激活 STAT6 信号通路从而发挥生物学效应^[2,3]。而 IL-4 和 IL-13 的受体复合物有一个共同的组成部分 IL-4R α , 所以, 阻断 IL-4R α 可以同时阻断 IL-4 和 IL-13 通过 I 型受体和 II 型受体发挥作用, 从而阻断辅助型 T 细胞 (T helper 2 cell, Th2) 扮演关键角色的炎症通路。

本课题首先从 NCBI 上获取人源 IL-4R α 全长氨基酸序列 (NP.000409.1), 使用 Uniprot 数据库和 TMHMM Server v. 2.0 膜外段分析软件分析出 IL-4R α 胞外段, 将获取的目的序列添加相应的酶切位点、信号肽和 His 标签, 并克隆至 pcDNA3.1 (+) 表达载体, 将得到的重组表达质粒进行双酶切验证。取酶切验证正确的 IL-4R α 重组表达质粒瞬时转染 Expi293F 细胞, 当细胞活率降至 65%~75% 时收获细胞上清并纯化。将纯化后的蛋白使用 Pierce[®] BCA 蛋白定量分析试剂盒检测蛋白浓度, 采用十二烷基硫酸钠凝胶电泳法 (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 分析蛋白纯度, 蛋白质免疫印迹法 (Western Blot, WB) 检测蛋白特异性。

将经过纯化和鉴定后的 IL-4R α 胞外段作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 并加入促融合剂聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 制备杂交瘤细胞。再通过 ELISA 筛选出具有结合活性和阻断活性的杂交瘤细胞株, 再对细胞株进行连续 3 次亚克隆。

选取结合活性和阻断活性最高的 1 株杂交瘤细胞进行扩大培养, 通过体内法制备单抗腹水, 再采用辛酸-硫酸铵法对腹水中的单抗进行纯化。使用 ELISA 试剂盒检测单抗的亚类和亚型, SDS-PAGE 和分子排阻色谱法 (Size exclusion HPLC,

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

SEC-HPLC) 分析单抗的纯度, WB 检测单抗特异性, ELISA 检测单抗结合活性和阻断活性, 流式细胞法和细胞增殖抑制法检测单抗的阻断活性。

最后, 提取杂交瘤单克隆细胞总 mRNA, 将 mRNA 反转录成第一链 cDNA, 根据单抗的亚类和亚型设计 PCR 引物并进行 PCR 扩增, 并将 PCR 产物送测序, 将测序结果经过同源性及 CDR 区分析后, 将钩取的鼠源单抗重轻链可变区序列与人的恒定区序列分别进行拼接, 并克隆至 pcDNA3.4 表达载体。双酶切验证质粒构建正确后, 瞬时转染 Expi293F 细胞, 收获细胞上清并纯化, 得到抗 IL-4R α 人鼠嵌合单抗。将纯化后的抗体使用 SDS-PAGE 分析纯度, ELISA 检测结合活性和阻断活性。

本课题成功构建了 IL-4R α /pcDNA3.1 (+) 重组表达质粒, 瞬时转染了 Expi293F 细胞后, 对上清中的蛋白经镍柱进行亲和纯化。经 BCA 法检测蛋白浓度约为 2 mg/mL, SDS-PAGE 和 WB 分析结果显示在相对分子质量 40 000~55 000 大小处出现明显特异性条带, 糖基化酶切的蛋白在相对分子质量约 30 000 大小处出现均一的条带, 与蛋白理论分子量一致, 证明蛋白成功表达, 表达量约为 66 mg/L。

经过小鼠免疫和细胞融合后, 通过 ELISA 筛选出 2 株具有结合活性和阻断活性的单克隆细胞株, 分别命名为 6-G2 和 2-E10, 其中, 6-G2 单抗具有相对较高的结合活性和阻断活性。

经亚类(型)鉴定试剂盒检测 6-G2 单抗的亚类为 IgG1, 轻链为 κ 链。cIEF 检测结果显示该单抗的等电点约为 5.9。SDS-PAGE 后使用 AlphaView SA 软件扫描, 结果显示, 单抗的还原型纯度在 95% 以上, 非还原型纯度大于 93%。WB 检测结果显示, 6-G2 单抗在理论分子量处出现明显条带, 表明该单抗结合的是 IL-4R α 上的线性表位

ELISA 检测结果显示 6-G2 单抗结合活性半数有效浓度 (50% Effective concentration, EC₅₀) 为 10 ng/mL; ELISA 阻断活性实验结果显示 6-G2 单抗对 IL-4 的最高抑制率为 27%; 流式细胞法检测结果显示 6-G2 单抗可以完全阻断 IL-13 与横纹肌瘤 (Rhabdomyomas, RD) 细胞的结合; 细胞增殖抑制实验结果显示, 6-G2 单抗可完全阻断 IL-4 和 IL-13 与 IL-4R 的结合, 进而抑制细胞的增

殖。

提取了 6-G2 单抗杂交瘤细胞总 mRNA 并逆转录后,我们成功钓取了抗体重量轻链序列,比对结果显示,其为典型的鼠源单抗序列。酶切及测序验证结果表明,成功构建了人鼠嵌合单抗(ch6-G2)重组表达质粒。转染后的细胞上清鉴定结果表明, ch6-G2 单抗成功表达。

SDS-PAGE 结果显示, ch6-G2 单抗的还原型纯度在 95% 以上,非还原纯度在 93% 以上。ELISA 结合活性结果显示, ch6-G2 与 IL-4R α 的结合活性 EC₅₀ 为 117 ng/mL。

综上,本课题表达并制备了纯度大于 95% 的 IL-4R α , 筛选制备了抗 IL-4R α 的鼠源单克隆杂交瘤细胞株,并对一株具有较高结合与阻断活性的鼠源单抗进行了全面鉴定及人鼠嵌合改造,为后续开发针对抗 IL-4R α 的人源化治疗性单抗药物奠定了基础。

关键词: IL-4R α ; 真核表达; 阻断活性; 人鼠嵌合单抗

Eukaryotic expression of human IL-4R α , preparation and identification of murine-derived and chimeric monoclonal antibodies

Abstract

Studies have shown that the interleukin-4 receptor (IL-4R) is divided into two types: the first type consists of the IL-4R α subunit and the γ_c subunit; the second type consists of the IL-4R α subunit and the IL-13R α 1 subunit. Among them, IL-4 can bind to type 1 and type 2 receptors of IL-4R, and IL-13 can bind to type 2 receptor of IL-4R and subunit of IL-13R α 2. The receptor complex of IL-4 and IL-13 has a common component, IL-4R α . Therefore, blocking IL-4R α can block the function of IL-4 and IL-13 through type I receptor and type II receptor at the same time, thus blocking the inflammatory pathway which Th2 cell plays a key role in.

In this project, the full-length amino acid sequence of human IL-4R α (NP.000409.1) was obtained from NCBI. Then the extracellular domain of IL-4R α was analyzed by Uniprot database and TMHMM server v. 2.0 software. The target sequence was added with corresponding restriction sites, signal peptide and His tag, and then cloned into pcDNA3.1(+) expression vector. The recombinant expression plasmid was verified by double restriction enzyme digestion. Then transiently transfected into Expi293F cells for culture. When the cell viability decreased to 65%-75%, the cell supernatant was harvested and purified. The purified protein was detected by Pierce[®] BCA protein quantitative analysis kit and its purity was analyzed by SDS-PAGE, and the protein specificity was detected by WB.

The purified and identified extracellular segment of IL-4R α was used as immunogen to immunize BALB/c mice, and the hybridoma cells were prepared by adding polyethylene glycol (PEG). The hybridoma cell lines with binding activity and blocking activity were screened by ELISA, and then subcloned three times in a row.

One of the hybridoma cell lines with higher binding and blocking activity was expanded and cultured. Mouse ascites was prepared by *in vivo* method, and then purified by octanoic acid ammonium sulfate method to obtain mouse mAb. The subclasses and subtypes of mAbs were detected by ELISA kit, the purity was analyzed by SDS-PAGE and SEC-HPLC, the specificity was detected by WB, the binding and blocking activities were detected by ELISA, and the blocking activities were detected by flow cytometry and cell proliferation inhibition.

Finally, The total mRNA was extracted and then reverse transcribed into the first strand cDNA. PCR primers were designed and amplified according to the subclasses and subtypes of mAbs. The PCR products were sent for sequencing. After homology and CDR analysis, the heavy/light chain variable region sequence of mouse mAb and human constant region sequence were spliced and cloned into pcDNA3.4 expression vector. After the constructed plasmid was verified by double enzyme digestion, Expi293F cells were transiently transfected, and the cell supernatant was harvested and purified to obtain anti-IL-4R α human mouse chimeric mAb. The purity of purified samples was analyzed by SDS-PAGE, and the binding activity and blocking activity were detected by ELISA.

In this project, the recombinant expression plasmid of IL-4R α /pcDNA3.1(+) was successfully constructed and transfected into Expi293F cells. After purification of the protein in the supernatant by nickel column, the protein concentration detected by BCA method is about 2 mg/mL. The results of SDS-PAGE and WB analysis showed that there were obvious specific bands at the relative molecular weight of 40 000-55 000, and glycosylation enzyme digestion showed that there were obvious linear bands at the relative molecular weight of 30 000, which was consistent with the theoretical molecular weight, proves that the protein was successfully expressed. The expression level of IL-4R α was about 66 mg/L.

After protein immunization and cell fusion, two monoclonal cell lines with binding activity and blocking activity were screened by ELISA, named 6-G2 and

2-E10 respectively. 6-G2 mAb had higher binding activity and blocking activity.

The subclass of 6-G2 mAb detected by subclass (type) identification kit was IgG1, and the light chain was κ chain. The results of cIEF showed that the isoelectric point of mAb was about 5.9. After SDS-PAGE, Alphaview SA software was used to scan and the results showed that the purity of the reduced mAb was more than 95%, and the purity of the non-reduced mAb was more than 93%. WB analysis of 6-G2 mAb showed obvious bands at the theoretical molecular weight, indicating that the monoclonal antibody was bound to the linear epitope of antigen.

ELISA assay showed that the EC_{50} of 6-G2 mAb was 10 ng/mL. The results of ELISA showed that the highest inhibition rate of 6-G2 mAb on IL-4 was 27%; flow cytometry showed that 6-G2 mAb could completely block the binding of IL-13 to RD cells; cell proliferation inhibition test showed that 6-G2 mAb could completely block the binding of IL-4 and IL-13 to IL-4R, in turn, inhibit cell proliferation.

After the total mRNA of 6-G2 hybridoma cells was successfully extracted and reverse transcribed, the comparison results of the heavy/light chain showed that it is a typical murine antibody sequence. Restriction digestion and sequencing verification results showed that the recombinant expression plasmid of ch6-G2 was constructed, and the mAb of ch6-G2 was successfully expressed and purified.

SDS-PAGE showed that the purity of ch6-G2 mAb was more than 95% in reducing type and 93% in non-reducing type. ELISA binding activity results showed that the EC_{50} of ch6-G2 and IL-4R α binding activity was 117 ng/mL.

In conclusion, IL-4R α with a purity of more than 95% was harvested. Anti-IL-4R α mouse derived monoclonal hybridoma cell line were prepared. And a mouse mAb with high binding and blocking activity was fully identified and human-mouse chimeric transformation was carried out. It lays a foundation for the development of therapeutic mAb against IL-4R α .

Keywords: IL-4R α ; Eukaryotic expression; Blocking activity; Human mouse chimeric mAb

前言

现有研究表明, 2 型炎症通路诱导 2 型免疫反应, 在过敏性疾病发生发展过程中发挥着重要作用, 表现为高浓度的 IgE 和嗜酸性粒细胞^[4]。其中, IL-4 可以诱导 Th0 细胞分化增殖^[5], 产生大量的 IL-4、IL-5 和 IL-13, IL-4、IL-5 和 IL-13 可诱导嗜酸性粒细胞转移, IL-4 和 IL-13 还可以促使 B 细胞的血清型转变, 产生大量的 IgE。所以, 2 型免疫反应过度激活会引发严重的过敏性疾病, 如特异性皮炎和哮喘等^[6-8]。

据统计, 全球约有超过 2.35 亿的哮喘患者, 中国成人哮喘患病率达到 4.2%, 其中大约有 10%-20% 的患者不能由现有药物有效控制病情^[9], 且每年约有 2.5 万人死于哮喘, 该疾病已经成为亟需解决的公共卫生和医疗保健问题之一。特异性皮炎影响全球范围内 10%-20% 的儿童及 1%-3% 的成人^[10], 其中大约 20% 的患者为中重度特异性皮炎, 临床并没有确切有效的治疗药物。且我国近年来特异性皮炎的患病率也在逐步上升。鉴于以上两种疾病的发病率高, 且目前现有的广谱免疫抑制剂治疗具有明显的局限性—无法有效抑制病情且副作用大, 所以, 亟需研发更为安全有效的特异性治疗药物。

近年来, 单抗药物技术的快速发展和免疫疗法的广泛运用为以上两种疾病的治疗提供了新的策略^[11-14]。免疫疗法主要通过阻断信号传导, 抑制 2 型炎症通路过度激活而发挥作用, 该方法对患者的疗效显著且副作用较小。

其中 IL-4 和 IL-13 被认为是治疗哮喘和特异性皮炎的重要靶点^[15-19]。IL-4 和 IL-13 主要通过与细胞表面细胞因子受体结合, 发挥相应的生物学效应。而 IL-4 与 IL-13 在信号传导方面存在一定的协同补偿机制^[20, 21], 且 IL-4 和 IL-13 的受体复合物有一个共同的组成部分 IL-4R α , 所以, 能同时阻断 IL-4 与 IL-13 与相应细胞因子受体结合的抗 IL-4R α 抗体可能对免疫调节具有更好的效果。

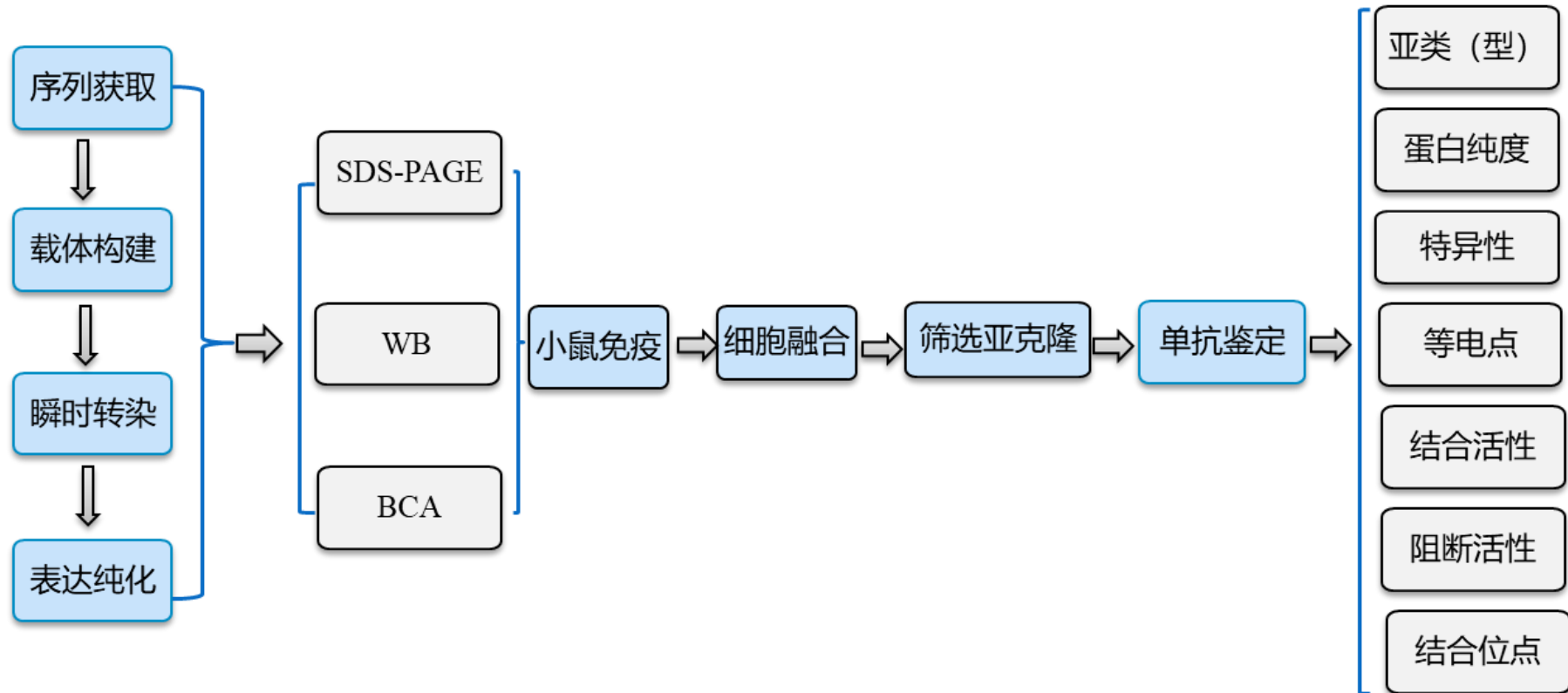
2017 年, 由赛诺菲和再生元公司合作研发的第一个抗 IL-4R α 单抗药物 Dupixent 在美国成功上市, 已被证实在哮喘和特异性皮炎的治疗方面具有显著的疗效^[22, 23], 且表现出良好的市场潜力。

除此之外, 研究还表明, IL-4R 在多种肿瘤细胞如乳腺癌^[24-26]、肝癌^[27]和横纹肌肉瘤^[28]等表面过量表达。其可能与肿瘤的免疫逃逸机制有关。Hosoyama 等

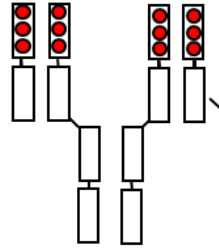
^[28]研究发现,虽然 IL-4R 并非胚胎型 RD 细胞的生存所必须,但该信号传导能够促进 RD 细胞增殖,抑制 IL-4R 信号通路可以阻止肿瘤的生长,提示抗 IL-4R α 单抗还具有治疗肿瘤的潜力。

本课题通过表达 IL-4R α , 并采用传统鼠源杂交瘤技术制备具有较高结合活性与阻断活性的抗 IL-4R α 单抗,并对鼠源单抗进行人源化改造,以期能为抗 IL-4R α 治疗性抗体药物的开发奠定一定的基础。

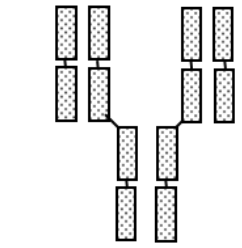
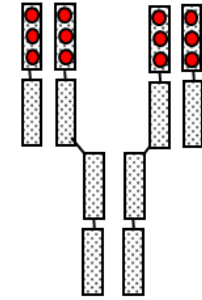
技术路线



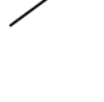
鼠源单抗序列



人鼠嵌合单抗



人源单抗序列



构建表达载体

转染表达

单抗鉴定

理化性质分析

活性鉴定

第一章 人 IL-4R α 蛋白的真核表达、鼠源单抗的制备及鉴定

1 实验材料

1.1 细胞及动物

E.coli DH5 α 细胞购自 TaKaRa 公司，货号：636763。

Expi293F 细胞、小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0 细胞)、RD 细胞、TF-1 细胞：本实验室保存。

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠，4~6 周龄，由本公司实验动物中心提供，动物合格证号：NO.42000400009930。

1.2 载体

pcDNA3.1 (+) 表达载体：本实验室保存。

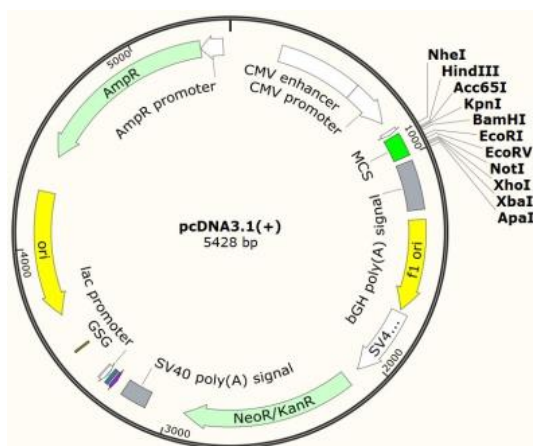


图 1.1 pcDNA3.1 (+) 表达载体图谱

Fig 1.1. pcDNA3.1 (+) expression vector map

1.3 试剂

名称	厂家及货号
氨苄青霉素	天根生化科技 (RT501)
胰化蛋白胨	上海生工 (A110859)
酵母提取物	上海生工 (A110850)
琼脂	上海生工 (A600010)

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

DNA Fragment Purification Kit	Takara (9761)
QuickCut™ Kpn I 限制性内切酶	Takara (1618)
QuickCut™ Xba I 限制性内切酶	Takara (1634)
RNase Free H ₂ O	Takara (9012)
Gold View 核酸染料	北京博大泰克生物
DL2000 DNA Marker	北京博奥龙 (BDIT0039)
DL8000 DNA Marker	北京博奥龙 (BDIT0041)
ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit	Gibco (A14524)
Expi293™ 表达培养基	Gibco (A1435101)
Opti-MEM I 低血清培养基	Gibco (31985062)
Pierce® BCA 蛋白定量分析试剂盒	Thermo Fisher (23235)
弗氏完全佐剂	SIGMA (F881)
弗氏不完全佐剂	SIGMA (F5506)
胎牛血清	Gibco (10099-141)
PEG1450	SIGMA (P7181)
HAT 培养基添加物	SIGMA (H0262-10VL)
HT 培养基添加物	SIGMA (H0137-10VL)
牛血清白蛋白 (BSA)	北京元亨圣马 (160608)
IL-4R, Human, Recombinant (His Tag)	北京义翘神州 (10402-H08H)
Human IL-4 Protein biotinylated	北京义翘神州 (GMP-11846-HNAE-B)
IL-4R Antibody, Mouse Mab	北京义翘神州 (10402-MM01)
HRP-山羊抗小鼠 IgG	北京博奥龙 (BF03001X)
HRP-Streptavidin	南京金斯瑞 (M00091)
TMB Substrate Reagent Set	BD BIOSCIENCES (555214)
12%的 SDS-PAGE 预制胶	南京金斯瑞 (M00667)
270kD 预染蛋白 Marker	南京金斯瑞 (M00624)
180kD 预染蛋白 Marker	Thermo Fisher (26616)
PNGase F (Glycerol-free)	New England Biolabs
X-Stain SDS-PAGE 极速染色液	普健生物 (ATO00033)

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

Magnetic Beads 磁珠	南京金斯瑞 (L00695)
二水磷酸二氢钠	国药化试 (20040718)
磷酸二氢钾	国药化试 (10017618)
氯化钠	国药化试 (10019318)
氯化钾	国药化试 (10016318)
小鼠单抗 Ig 类/亚类/鉴定试剂盒	洛阳佰奥通 (C060101)
HRP-山羊抗小鼠 Ig λ	北京博奥龙 (BF03073)
HRP-山羊抗小鼠 Ig κ	北京博奥龙 (BF03072)
HRP-山羊抗人 IgG Fc	abcam (ab97225)
cIEF 凝胶	Beckman
cIEF 标志物	Beckman
SEC-HPLC 色谱柱	TOSOH (G3000SWXL)
PE anti-human IL-13	Biolegend (501903)
IL-13 protein, human	南京金斯瑞 (Z03020)
IL-4 protein, human	南京金斯瑞 (Z03150)
GM-CSF, Human	南京金斯瑞 (Z02983)
CellTiter 96 [®] Aqueous (MTS)	Promega (G3582)

1.4 仪器

名称	厂家及货号
微量紫外可见分光光度计	Thermo Fisher (Nanodrop ND1000)
紫外凝胶成像系统	BioTop Biosens (SC805)
酶标仪	BioTeK (ELX800)
蛋白电泳仪	北京六一仪器厂 (DYY-III)
核酸电泳仪	北京六一仪器厂 (DYY-6C)
桌面台式离心机	Eppendorf (5417R)
大容量低温高速离心机	Beckman (J6-MI)
倒置显微镜	OLYMPus (OLYMPus CKX41)

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

恒温水浴锅	恒丰中欣生物 (CU-600)
二氧化碳摇床	Kuhner (ISF1-XC)
pH 计	Sartorius (PB-10)
电子天平	上海光正医疗 (VP20002)
恒温水浴箱	恒丰中欣生物 (CU600)
超净工作台	苏净安泰 (VS-1300L-U)
二氧化碳培养箱	Thermo (Forma Series)
倒置显微镜	重庆奥特光学 (BDS200)
洗板机	BioTeK (ELX50)
高速离心机	Eppendorf (5417R)
细胞计数仪	Bio-Rad (TC-20)
Waters 液相色谱仪	Waters 公司 (2489)
毛细管电泳仪	Agilent 公司 (7100CE)
紫外凝胶成像系统	BioTop Biosens 公司 (SC805)

1.5 主要试剂的配制

1.5.1 培养基的配制

1) LB (Luria-Bertani) 液体培养基

称取 10 g 的 NaCl, 5 g 的 yeast extract, 10 g 的 tryptone, 加适量的注射用水充分溶解, 调 PH 至 7.0 后, 定容至 1 L。高压灭菌后置于冰箱 4 °C 保存。

2) LB (Luria-Bertani) 固体培养基

取配制好的 LB 液体培养基, 每 100 mL 中加入琼脂粉 1.5 g, 高压灭菌后置于冰箱 4 °C 保存。

3) RPMI 1640 完全培养基

取适量的 FBS, 与无血清 RPMI 1640 培养基按照 1: 9 的体积比例充分混匀, 即制成 10% 的 FBS 培养基, 置于冰箱 4 °C 保存。

4) HAT 选择培养基

开封 HAT 粉末瓶后加入无血清 RPMI 1640 培养基 10 mL, 摇晃至完全溶解, 即制成 50×HAT 溶液。使用时吸取 10 mL 至 390 mL 的 RPMI 1640 无血清培养基

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

中, 再加入 100 mL 的 FBS, 充分混合均匀制成 1×HAT、20% 的 FBS 选择培养基溶液。

5) HT 培养基

开封 HT 粉末瓶后加入无血清 RPMI 1640 培养基 10 mL, 摇晃至完全溶解, 即制成 50×HT 溶液。使用时取 10 mL 至 415 mL 的 RPMI 1640 无血清培养基中, 加入 75 mL 的 FBS, 充分混匀制成 1×HT、15% 的 FBS 培养基溶液。

1.5.2 His 柱纯化缓冲液

1) 上样缓冲液 (50 mM 的 PBS)

称取 11.48 g 的 Na_2HPO_4 , 2.62 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$, 35.12 g 的 NaCl , 加适量的注射用水搅拌至充分溶解, 调 PH 至 7.4 并定容至 2 L。

2) 淋洗缓冲液 (20 mM 的咪唑缓冲液)

取配制好的 His 柱上样缓冲液 (配方同上), 每 500 mL 中加入咪唑 0.68 g, 充分溶解后调 PH 至 7.4。

3) 洗脱缓冲液 (100 mM 的咪唑缓冲液)

取配制好的 His 柱上样缓冲液 (配方同上), 每 500 mL 中加入咪唑 3.4 g, 充分溶解后调 PH 至 7.4。

4) 再生缓冲液 (MES 缓冲液)

称取 1.975 g 的 MES, 8.78 g 的 NaCl , 取适量注射用水搅拌至充分溶解后, 调 PH 至 5.0, 定容至 500 mL。

1.5.3 ELISA 相关溶液配制

1) 包被液 (0.05 M 的碳酸盐缓冲液)

用分析天平称取 1.59 g 的 Na_2CO_3 , 2.93 g 的 NaHCO_3 , 加适量注射用水搅拌至充分溶解, 调 PH 至 9.6 并定容至 1 L。

2) 磷酸盐缓冲液 (0.01 M 的 PBS)

分析天平称取 80.0 g 的 NaCl , 29.0 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-12H}_2\text{O}$, 2.0 g 的 KCl , 2.0 g 的 KH_2PO_4 , 加适量的注射用水充分溶解, 调 PH 至 7.4 并定容至 10 L。

3) PBST 洗涤液 (0.05% 的 Tween-20)

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

每 10 L 的 PBS 缓冲液（配方同上）中加入 5 mL 的 Tween-20，充分混合均匀。

4) 封闭液（1%的 BSA+5%的蔗糖）

取配制好的 PBS 缓冲液（配方同上），每 10 mL 分别加入 0.1 g 的 BSA 和 0.5 g 的蔗糖，充分震荡以混匀，现配现用。

5) 样品稀释液（1%的 BSA）

取配制好的 PBS 缓冲液（配方同上），每 10 mL 加入 0.1 g 的 BSA，充分震荡混匀，现配现用。

6) 终止液（6 M 的 H_2SO_4 ）

取注射用水 445.75 mL，逐滴加入 54.25 mL 的浓 H_2SO_4 ，容器加盖后轻轻摇晃至混合均匀。

1.5.4 亲和层析缓冲液

1) 亲和层析上样缓冲液

使用分析天平称取 3.02 g 的 Na_2HPO_4 ，0.52 g 的 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ，8.18 g 的 NaCl，取适量的注射用水充分溶解后，调 PH 至 7.4，定容至 1 L。

2) 亲和层析洗脱缓冲液

称取 2.65 g 的枸橼酸钠，4.41 g 的枸橼酸，5.18 g 的 NaCl，取适量的注射用水充分溶解后，调 PH 至 3.4，定容至 1 L。

1.5.5 cIEF 相关溶液配制

1) cIEF 阳极电泳液（200 mM 的磷酸）

称取 0.685 mL 的磷酸加适量注射用水充分溶解后，定容至 50 mL。

2) cIEF 阴极电泳液

称取 0.6 g 的氢氧化钠加少量适量注射用水充分溶解后，定容至 50 mL。

3) cIEF 迁移电泳液（350 mM 乙酸）

称取 1 mL 的乙酸加适量注射用水充分溶解后，定容至 50 mL。

4) cIEF 清洗溶液（4.3 M 的尿素）

称取 10.8 g 的尿素加适量注射用水充分溶解后，定容至 42 mL。

5) cIEF 阴极稳定剂 (500 mM 的 ARG)

称取 0.87 g 的 ARG 加适量注射用水充分溶解后, 定容至 10 mL。

6) cIEF 阳极稳定剂 (200 mM 的 IDA)

称取 0.27 g 的 IDA 加适量注射用水充分溶解后, 定容至 10 mL。

7) cIEF 样品置换缓冲液 (20 mM 的 Tris-HCl)

称取 0.48 g 的 Tris 加适量注射用水充分溶解后, 调 pH 至 8.0, 定容至 200 mL。

8) cIEF 含 3 M 尿素的 cIEF 凝胶

称取 0.9 g 的尿素, 加入适量 cIEF 凝胶, 涡旋混匀 15 min 后, 定容至 5 mL。

1.5.6 50×TAE 电泳缓冲液

称取 37.2 g 的 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 242 g 的 Tris, 加适量的注射用水搅拌至充分溶解后, 加入 57.1 mL 的乙酸, 混合均匀。用乙酸调 PH 至 8.0, 定容至 1 L。使用时加注射用水稀释成 1×TAE 电泳缓冲液。

1.5.7 电转缓冲液

分析天平称取 5.8 g 的 Tris, 2.9 g 的甘氨酸, 10 g 的 SDS, 取适量的注射用水充分溶解后调 PH 至 7.4, 定容至 1 L 即成 10×电转缓冲液, 用时取 100 mL 加 700 mL 注射用水和 200 mL 无水甲醇, 混合均匀后预冷使用。

1.5.8 红细胞裂解液

使用分析天平称取 0.829 g 的氯化铵, 0.1 g 的 KHCO_3 , 3.72 mg 的 Na_2EDTA , 取适量的注射用水充分溶解后调 PH 至 7.4, 定容至 100 mL。

1.5.9 SEC-HPLC 流动相溶液

称取 14.2 g 的 Na_2SO_4 , 6.9 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 17.9 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g 的 NaN_3 , 加 800 mL 注射用水充分溶解后, 用氢氧化钠溶液调 pH 至 6.7, 定容至 1 L, 0.22 μm 膜过滤。

2 实验方法

2.1 IL-4R α 表达质粒构建

从 NCBI 上获取全人源 IL-4R α 全长氨基酸序列，并使用 Uniprot 数据库和 TMHMM Server v.2.0 膜外段分析软件分析出 IL-4R α 胞外段，在目的氨基酸序列的 N 端起始密码子前引入 Kozak 序列和酶切位点，在起始密码子后加入信号肽；在目的氨基酸序列的 C 端加上 His 标签，并在终止密码子后加入酶切位点。随后将拼接好的目的序列经过密码子优化后进行全基因合成，克隆至 pcDNA3.1 (+) 表达载体上。

2.2 转化感受态细胞

2.2.1 将 IL-4R α 重组表达质粒冻干粉 4 μg ，瞬时离心后加入 40 μL 的 RNase Free H₂O，充分混合均匀。

2.2.2 取 1 μL 的上述质粒溶液和 20 μL 的 *E.coli* DH5 α 感受态细胞混合均匀置于无菌离心管中，冰浴 10 min。

2.2.3 将上述菌液均匀涂布在含氨苄青霉素钠盐 (Ampicillin, Amp) 的 LB 固体琼脂培养基上，将平皿室温静置至菌液被充分吸收后，倒置平皿，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 16~20 h。

2.2.4 挑取平皿中的单个白色菌落至 30 mL 的含 Amp 的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，180 rpm，培养 16~20 h，至菌液浑浊。

2.3 提取质粒

2.3.1 收获菌液：取 6 支 1.5 mL 的无菌 EP 管，将培养好的菌液转移至 EP 管中，室温 12 000 rpm 离心 1 min，弃上清，重复 3 次至菌液全部被收获。

2.3.2 重悬：每管加入 250 μL 的 Solution I (含 RNase)，使用移液枪吹打至菌体被充分重悬。

2.3.3 裂解：加入 250 μL 的 solution II 并立即上下翻转，使菌体充分裂解形成透明溶液。

2.3.4 沉淀：加入 250 μL 的 solution III 并立即充分混匀，直至形成白色沉淀。

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

室温静置 2 min 后，设置离心机至 4 °C，12 000 rpm 离心 10 min。

2.3.5 吸附：将试剂盒中的 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，并将步骤 2.3.4 中的上清移至 Spin Column 中，12 000 rpm 离心 1 min，弃滤出液。

2.3.6 洗杂：加入 500 μ L 的 Buffer WA 到 Spin Column 中，12 000 rpm 离心 30 s，弃滤出液。再加入 700 μ L 的 Buffer WB 到 Spin Column 中，12 000 rpm 离心 30 s，弃滤出液并重复一次。

2.3.7 重新将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，12 000 rpm 离心 1 min，以除尽残留洗涤液。

2.3.8 洗脱：将 Spin Column 安置于新的 1.5 mL 的 EP 管中，并在 Spin Column 的膜中央加入 25 μ L (60 °C 预热) 的 RNase Free H₂O，室温静置 1 min，12 000 rpm 离心 1 min 洗脱 DNA。

2.3.9 将洗脱液重新加入到 Spin Column 中重复洗脱一次，以提高洗脱效率。

2.4 酶切

2.4.1 酶切体系如下：

表 1.1 IL-4 α 重组表达质粒酶切验证

Tab 1.1. Enzyme digestion verification of IL-4 α recombinant expression plasmid

QuickCut™ Xba I	1.0 μ L
QuickCut™ Kpn I	1.0 μ L
CutSmart Buffer	3.0 μ L
DNA	1.0 μ g
RNase Free H ₂ O	0-25.0 μ L
Total	30.0 μL

2.4.2 37 °C 水浴 1 h。

2.5 琼脂糖电泳验证

2.5.1 取 1 \times TAE 电泳缓冲液 100 mL 至锥形瓶中，再称取 1 g 的琼脂糖，微波炉加热制成澄清透明溶液后室温保存。用时加热至完全融化，并取适量溶液到已准备好的模具内，加入 2 μ L 的 Gold View 核酸染料，搅拌至混合均匀，冷却

凝固后使用。

2.5.2 拔出梳子，将琼脂糖胶放置在电泳槽中，倒入 1×TAE 电泳缓冲液使胶被完全淹没。

2.5.3 在琼脂糖胶第一孔中加入 10 μL 的 DNA marker，待检样品加入适量的 loading buffer 混合均匀后在余孔依次点样。

2.5.4 接通电泳槽正负极电源，恒压 90 V，电泳 25 min。

2.5.5 取出琼脂糖胶，于紫外灯下观察电泳结果。

2.6 瞬时转染 Expi293F 细胞

2.6.1 复苏 Expi293F 细胞，调整摇床至培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，8% CO_2 ，85% 的湿度，125 rpm。传代 3 次后，控制细胞密度达到 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL，活率超过 95% 时进行细胞转染。

2.6.2 转染当天细胞计数，加入适量提前 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 Expi293TM 表达培养基，调整细胞密度为 3×10^6 cells/mL，细胞悬液体积为 50 mL。

2.6.3 取 60 μg 目的 DNA 溶液，使用 0.22 μm 滤器无菌过滤后备用。

2.6.4 取两个 15 mL 无菌离心管，其中一个加入 3 mL 的 Opti-MEM 低血清培养基和无菌处理过的 DNA，另一个加入 2.8 mL 的 Opti-MEM 低血清培养基和 160 μL 的 Expi FectamineTM 293 Reagent，分别轻轻混合均匀，室温孵育 5 min。

2.6.5 将孵育完成的 Expi FectamineTM 293 Reagent 缓缓加入到孵育好的 DNA 中，一边加一边轻轻摇晃。混合均匀后室温静置孵育 10~20 min 以形成 Reagent/DNA 复合物。

2.6.6 将孵育完成的 Reagent/DNA 复合物溶液缓慢加入到 2.6.2 中的细胞悬液中，边加边缓慢摇晃，加完后将细胞置于摇床中继续培养。

2.6.7 转染 18~22 h 后在细胞悬液中分别加入 500 μL 的 Expi FectamineTM 293 Transfection I 和 5 mL 的 Expi FectamineTM 293 Transfection II。

2.6.8 在适宜条件下继续培养 3~4 d 后，当细胞活率降至 65%~75% 时收获细胞上清。

2.7 镍柱纯化

2.7.1 装填柱料：轻轻上下颠倒摇晃镍柱填料至质地均匀，并将填料快速倒入柱中，静置 30 min 至填料充分沉淀，装好柱头后进行二次压柱。

2.7.2 平衡：取配制好的 His 柱平衡缓冲液，设置流速至 2 mL/min，至基线平稳。

2.7.3 上样：将培养好的细胞悬液 3 000 rpm 离心 30 min，使用 0.22 μm 的滤器过滤后设置上样流速为 2 mL/min。

2.7.4 淋洗：使用配制好的 20 mM 的咪唑淋洗液，流速 2 mL/min，淋洗 3 个柱体积至基线平稳。

2.7.5 洗脱：使用配制好的 100 mM 的咪唑洗脱液，流速 2 mL/min，淋洗 3 个柱体积，收集洗脱峰。

2.8 分子筛

2.8.1 装柱：搅拌分子筛填料至均匀，快速倒入到柱管中，静置 30 min 至填料沉淀后装上柱头，二次压柱。

2.8.2 平衡：取配制好的平衡缓冲液，设置流速为 1 mL/min，走 3 个柱体积至基线平稳。

2.8.3 上样：取经过镍柱纯化后的蛋白，设置流速为 1 mL/min，上样体积为 1 mL。

2.8.4 洗脱收样：使用平衡缓冲液洗脱，分管收集洗脱峰。

2.9 BCA 法测蛋白浓度

2.9.1 参照待测样品所在的缓冲液环境将 Pierce[®] BCA 蛋白定量分析试剂盒中的 BSA 标准品做梯度稀释，稀释后浓度依次为 40 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 2.5 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，并设置空白对照，待用。

2.9.2 将纯化后的目的蛋白（待测样品）稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍共三个梯度，待用。

2.9.3 将试剂盒中的 MA、MB 和 MC 溶液以 25: 24: 1 的体积比例混合配

制成工作液，待用。

2.9.4 将稀释后的标准品和待测样品以 150 μL /孔依次加入到酶标板中，均设置两个复孔。

2.9.5 向上述每孔中分别再加入 150 μL 步骤 2.9.3 中配制好的工作液，轻轻震荡 30 s。

2.9.6 盖上酶标板，并放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中孵育 2 h。

2.9.7 取出酶标板，待孔内溶液温度降至室温后，酶标仪读取 $A_{570\text{nm}}$ 值，使用 GraphPad Prism 软件拟合曲线并计算待测样品的蛋白浓度。

2.10 SDS-PAGE 检测蛋白纯度

2.10.1 取经过纯化和定量的目的蛋白 2 μg ，按 4: 1 的体积比例加入 5 \times SDS 还原型 loading buffer 混合均匀后，100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min。

2.10.2 处理好的样品水浴至室温后，上 12% 的 SDS-PAGE 电泳预制胶，并加入 8 μL 的预染蛋白 Marker。

2.10.3 接通电源后，调节电压至 180 V，恒压电泳至预染蛋白 Marker 条带充分分离，溴酚兰接近蛋白胶底部。

2.10.4 从电泳模具中取出凝胶，置于极速染色液中快速染色。

2.10.5 将染色完成的凝胶拍照扫描。

2.11 WB 鉴定蛋白特异性

2.11.1 取 IL-4R α 制备样品 2 μg ，以购买的 IL-4R α 参照样品为阳性对照，未转染的细胞上清作为阴性对照。

2.11.2 样品处理及 SDS-PAGE 操作方法见本章 2.10。

2.11.3 取 PVDF 膜，剪成凝胶一般大小后，置于无水甲醇中浸泡 1 min 以激活，然后转移到电转缓冲液中平衡。

2.11.4 在电转缓冲液浸泡的环境下组装电转夹，组装顺序依次为：黑孔板——海绵——滤纸——凝胶——PVDF 膜——滤纸——海绵——白孔板。组装过程中尽量赶尽夹层中的气泡。

2.11.5 将电转夹置于电转仪中，加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的电转缓冲液。接通电源后，

设置电流为 350 mA，恒流电转 1 h。

2.11.6 取出 PVDF 膜，以 5% 的脱脂牛奶 4 °C 封闭过夜。

2.11.7 使用 PBST 洗涤液洗膜 3 次，每次置于摇床中温和震荡 10 min。

2.11.8 使用 5% 的脱脂牛奶将抗 IL-4R α 单抗以 1:500 倍稀释，37 °C 孵育 1 h。

2.11.9 重复洗膜 3 次后，使用 5% 的脱脂牛奶将 HRP-山羊抗小鼠 IgG 以 1:1 000 倍稀释，37 °C 孵育 1 h。

2.11.10 重复洗膜 3 次后，配制 DAB 显色液显色，当膜上出现明显条带后将膜取出，清水漂洗后室温晾干并拍照保存。

2.12 IL-4R α 的糖基化酶切验证

2.12.1 取 3 μ g 蛋白加 RNase Free H₂O 稀释至 18 μ L，再加入 2 μ L 的 Glycoprotein Denaturing Buffer，混合均匀后 100 °C 处理 10 min。

2.12.2 取出样品水浴冷却至室温，再加入 4 μ L 的 Glycobuffer 2，4 μ L 的 10%NP-40，2 μ L 的 PNGase F，混合均匀后瞬时离心，置于 37 °C 水浴箱中孵育 1 h。

2.12.3 将制备好的样品按 4: 1 的体积比例加入 5 \times SDS 还原型 loading buffer 混合均匀后，100 °C 处理 10 min。

2.12.4 使用 SDS-PAGE 检测，电泳步骤同本章 2.10。

2.13 动物免疫

将经过纯化和鉴定后的蛋白作为免疫原免疫小鼠，取 5 只 4~6 周龄的 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠，第一次免疫取蛋白 100 μ g 与同体积弗氏完全佐剂乳化充分后采用四肢+皮下多点注射免疫法免疫小鼠，第二次和第三次各取蛋白 100 μ g 与同体积弗氏不完全佐剂充分乳化后以同样的方法免疫小鼠，每次免疫间隔 14 d。三次免疫后采小鼠眼眶血测效价，效价符合要求后。在细胞融合前 3 d 取蛋白 100 μ g 尾静脉注射冲击免疫，免疫完成后摘取小鼠脾脏进行细胞融合。

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

表 1.2 制备抗 IL-4R α 鼠源单抗的动物免疫方案

Tab 1.2. Animal immunization protocol for preparing anti-IL-4R α mouse mAb

	佐剂	剂量 (μg)	方案	
			途径	间隔时间(d)
首次免疫	CFA	100	四肢+皮下	0
第一次加强	IFA	100	四肢+皮下	14
第二次加强	IFA	100	四肢+皮下	14
冲击免疫	/	100	尾静脉	融合前 3 天

2.14 ELISA 检测免疫后小鼠血清效价

2.14.1 包被：使用包被液将 IL-4R α 稀释到 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板中，置于水浴箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

2.14.2 洗板：弃酶标板中孵育液，每孔加入 350 μL 的 PBST，震荡洗涤 5 次后拍干。

2.14.3 封闭：将配制好的封闭液加入到上述酶标板中，200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。

2.14.4 洗板：同 2.14.2。

2.14.5 孵育待检样品：使用样品稀释液将免疫后小鼠血清以 1:800 倍稀释，再依次往下作 2 倍梯度稀释，共稀释 23 个梯度，并取未免疫的小鼠血清作阴性对照，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

2.14.6 洗板：同 2.14.2。

2.14.7 孵育二抗：使用样品稀释液将 HRP-山羊抗小鼠 IgG 以 1:10 000 的比例稀释，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到上述酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

2.14.8 洗板：同 2.14.2。

2.14.9 显色：以 1:1 的体积比例混合显色液 A 和 B，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。

2.14.10 终止：加入配制好的终止液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，轻轻震荡混匀，酶标仪读取 $A_{450\text{nm}}$ 值。以高于阴性对照孔 $A_{450\text{nm}}$ 值 2.1 倍视为阳性。

2.15 取小鼠腹腔巨噬细胞

2.15.1 颈椎脱臼法处死未免疫的小鼠，使用 75% 的酒精浸泡 5 min 以上，实验器具提前高压灭菌。

2.15.2 使用注射器针头将小鼠固定于泡沫板上，使小鼠腹部朝上，双上肢张开，双下肢稍靠近体侧。

2.15.3 镊子夹起小鼠腹腔部皮毛，剪开小口并撕开，充分暴露腹腔腹膜层。

2.15.4 换干净镊子，轻轻提起腹膜层，使内脏自然落下。

2.15.5 吸取 100 mL 的 HAT 选择培养基置于一旁备用，使用注射器取 4 mL 的 HAT 选择培养基注入小鼠腹腔内，使腹腔充分充盈。轻轻摇晃小鼠腹腔约 1 min，使培养基与腹腔内部充分接触。注射器回抽 3~4 mL（注意避开内脏和脂肪组织）混于剩余的 HAT 选择培养基中。

2.15.6 重复操作步骤 2.15.5 一次。

2.15.7 混匀上述 HAT 选择培养基细胞悬液，100 μ L/孔铺于 96 孔细胞板中，将细胞板放置于 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 的细胞培养箱中静置培养过夜。

2.16 取免疫后小鼠脾细胞

2.16.1 颈椎脱臼法处死免疫完成后的小鼠，使用 75% 的酒精浸泡 5 min 以上，实验器具提前高压灭菌。

2.16.2 小鼠仰卧位放置于泡沫板上，使小鼠双上肢张开，下肢向右侧翻转，露出左侧腰腹部，使用注射器针头将小鼠四肢固定。

2.16.3 使用镊子夹起小鼠左侧腰腹部皮毛，剪开小口，顺势撕开小鼠皮毛，暴露小鼠该部位腹膜层。

2.16.4 换干净镊子夹起脾尖端处腹膜，剪开该处腹膜层，暴露小鼠脾脏。

2.16.5 换干净镊子夹起小鼠脾尖端，剪刀剔除脾脏周围黏粘组织，并将脾脏剪成小段置于细胞筛网中。

2.16.6 吸取 10 mL 的 RPMI 1640 无血清培养基浸润筛网，使用细胞研磨器研磨脾脏，并滤去多余组织团块。

2.16.7 将研磨好的细胞悬液转移到新的 50 mL 离心管中，2 000 rpm 离心 5

min, 弃上清。

2.16.8 吸取 10 mL 的 RPMI 1640 无血清培养基洗涤脾细胞, 2 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 重复 1~2 次并使用 RPMI 1640 无血清培养基重悬待用。

2.17 细胞融合

2.17.1 取 0.1 mL 制备好的免疫脾细胞悬液和同体积红细胞裂解液充分混匀后细胞计数, 将 SP2/0 细胞吹打均匀后细胞计数, 将脾细胞和 SP2/0 细胞按细胞量 5: 1 的比例混合, 2 000 rpm 离心 8 min, 弃上清。

2.17.2 保持离心管管口向下, 用枪头吸尽管壁内残留的细胞上清液, 并用指腹轻轻敲打管底细胞沉淀处, 使细胞松动。

2.17.3 37 °C 预热 PEG 溶液, 按每 1×10^8 个脾细胞加入 1 mL 的 PEG 溶液的比例在 90 s 内匀速加入合适体积的 PEG 溶液并轻轻搅拌, 完成后再室温孵育 60 s。

2.17.4 1 min 内缓慢加入 1 mL 的 RPMI 1640 无血清培养基, 并轻轻搅动, 再 2 min 内缓慢加入 4 mL 的 RPMI 1640 无血清培养基, 再 2 min 内缓慢加入 5 mL 的 RPMI 1640 无血清培养基, 轻轻搅拌至混合均匀。

2.17.5 在离心管中补加 20 mL 的 RPMI 1640 无血清培养基, 800 rpm 离心 6 min, 弃上清。

2.17.6 取 100 mL 的 HAT 选择培养基重悬细胞, 100 μ L/孔加入到已铺好饲养细胞的 96 孔细胞板中, 并放置于 37 °C, 5%CO₂ 的细胞培养箱中继续培养。

2.18 杂交瘤细胞的筛选

2.18.1 间接 ELISA 筛选具有结合活性的细胞株

1) 使用包被液稀释 IL-4R α 至 0.2 μ g/mL, 100 μ L/孔包被酶标板, 37 °C 孵育 1 h。

2) PBST 洗板 5 次, 取配制好的封闭液封闭酶标板, 200 μ L/孔, 37 °C 孵育 2 h 后 PBST 洗板 5 次。

3) 将单克隆细胞孔上清与 1% 的 BSA 以 1: 1 的体积比例混合均匀后, 100 μ L/孔加入到上述酶标板中, 37 °C 孵育 1 h, 余实验步骤同本章 2.14。

4) 酶标仪读取 $A_{450\text{nm}}$ 值, 挑取 $A_{450\text{nm}}$ 值高的孔对应的杂交瘤细胞孔做下一步的亚克隆。

2.18.2 竞争 ELISA 筛选具有阻断活性的细胞株

1) 检测 IL-4 结合 IL-4R α

① ELISA 板的包被和封闭步骤同 2.18.1.

② 使用 1% 的 BSA 稀释 IL-4 biotinylated 至 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 余以 2 倍梯度依次往下稀释, 一共稀释 11 个梯度, 并设置空白对照和阳性对照。

③ 将稀释好的样品 100 μL /孔加入到封闭好的酶标板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

④ PBST 洗板 5 次后, 使用 1% 的 BSA 将 Streptavidin-HRP 二抗以 1: 10 000 倍稀释, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

⑤ 配制显色液, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。

⑥ 终止显色, 酶标仪读取 $A_{450\text{nm}}$ 值, 使用 Graphpad Prism 软件使用四参数拟合, 得到 IL-4 结合 IL-4R α 的结合活性 EC_{90} 约为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2) 检测抗体阻断 IL-4 结合 IL-4R α

① ELISA 板的包被和封闭步骤同 2.18.1

② 将单克隆细胞孔上清与 IL-4 biotinylated (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 以 1: 1 的体积比例混合均匀, 100 μL /孔加入到上述酶标板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

③ PBST 洗板 5 次后, 使用 1% 的 BSA 将 Streptavidin-HRP 二抗以 1: 10 000 倍稀释, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

④ 配制显色液, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。

⑤ 终止显色, 酶标仪读取 $A_{450\text{nm}}$ 值, 挑选 $A_{450\text{nm}}$ 值低的孔对应的细胞孔做下一步的亚克隆。

2.19 阳性细胞亚克隆

2.19.1 取饲养层细胞, 操作步骤参照 2.15。

2.19.2 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热配制好的 HT 培养基, 将每只小鼠取出的饲养层细胞分别稀释至 50 mL, 100 μL /孔铺于 96 孔板中, 并放置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中过夜培养。

2.19.3 挑选出具有结合活性和阻断活性、且细胞状态良好的细胞孔，将细胞吹匀后取 5 μL 细胞悬液按一定比例稀释后取适量置于血球计数板中，在显微镜下进行细胞计数。

2.19.4 使用 HT 培养基将挑选出的杂交瘤细胞稀释至 5 cells/mL、10 cells/mL 和 50 cells/mL 共 3 种密度，3 种密度各稀释 10 mL。

2.19.5 将稀释好的细胞悬液 50 μL /孔铺于上述饲养细胞板中，并将细胞板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 的细胞培养箱中继续培养 7~9 d。

2.19.6 在镜下标记出单克隆细胞孔并取细胞上清进行 ELISA 检测，操作步骤同本章 2.18，挑取阳性克隆孔细胞进行下一步的亚克隆。

2.19.7 使用 HT 培养基进行第一次的亚克隆，10%的 FBS 培养基进行第二次和第三次亚克隆，挑取连续三次亚克隆均为阳性的细胞进行扩大培养，并冻存于液氮罐中进行细胞保种。

2.20 细胞冻存

2.20.1 使用移液器将细胞吹匀后，取少量细胞计数，并将细胞悬液移至离心管中，1 000 rpm 离心 5 min，弃上清。

2.20.2 配制细胞冻存液，将二甲基亚砷 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 和 FBS 以 1: 9 的体积比例混合均匀，待用。

2.20.3 取适量的细胞冻存液重悬细胞，调节细胞密度至 3×10^6 cells/mL，混合均匀后以 1 mL/管加入到细胞冻存管中。

2.20.4 将细胞冻存管包好脱脂棉放置于泡沫箱内，并置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内冷冻，3 d 后取出冻存于液氮罐中。

2.21 细胞复苏

2.21.1 取提前配制好的 10%的 FBS 培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热，吸取 9 mL 于无菌离心管中。

2.21.2 从液氮中取出冻存的细胞迅速置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中。

2.21.3 使用移液器吸出冻存管内的细胞悬液转移到步骤 2.21.1 中的离心管中，上下颠倒混匀后，1 000 rpm 离心 5 min。

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

2.21.4 弃上清液，加入 10 mL 的 10%FBS 培养基重悬细胞，并将细胞悬液移至细胞培养瓶中，放置于 37 °C，5%CO₂ 的细胞培养箱中静置培养。

2.22 腹水制备

2.22.1 取 4 只 8~10 周龄的 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠，提前 7 d 注射弗式不完全佐剂，0.5 mL/只。

2.22.2 培养单克隆杂交瘤细胞株至对数生长期，离心去上清，重悬至 4×10⁶ cells/mL。0.5 mL/只注入到准备好的 BALB/c 小鼠腹腔中。

2.22.3 注射单克隆杂交瘤细胞 7~10 d 后，挑选出腹部明显膨隆且活性较差的小鼠以颈椎脱臼法处死。

2.22.4 将小鼠仰卧位固定于泡沫板上，使用无菌镊子和剪刀剪开小鼠皮毛，充分暴露小鼠腹腔腹膜层。

2.22.5 使用 1 mL 移液枪抽出小鼠腹水（注意避开脏器和脂肪组织）至无菌离心管中。

2.23 鼠源单抗的纯化

2.23.1 将收集的腹水 37 °C 静置 2 h 后，5 000 rpm 离心 30 min，收集中层上清液，并使用新华滤纸过滤。

2.23.2 加入 4 倍腹水体积的醋酸盐缓冲液，充分混合均匀后用 NaOH 溶液调 PH 至 4.5。

2.23.3 测量上述溶液总体积，按 0.025 mL/mL 的量缓慢加入合适体积的辛酸，4 °C 缓慢搅拌 30 min。

2.23.4 设置离心机至 4 °C，5 000 rpm 离心 1 h，收集中间液体并使用滤纸过滤。

2.23.5 测量收集到的溶液的体积，加入 1/10 体积的 0.2 M 的 PBS，充分混合均匀后调 PH 至 7.4。

2.23.6 按 0.277 g/mL 的量在上述溶液中加入固体硫酸铵，4 °C 缓慢搅拌 30 min。

2.23.7 设置离心机至 4 °C，8 000 rpm 离心 1 h，弃上清，使用 0.02 M 的 PBS

充分溶解沉淀。

2.23.8 使用超滤浓缩管置换缓冲液，收集上清。

2.24 单抗亚类（型）的鉴定

2.24.1 将单抗亚类（型）试剂盒提前从冰箱中拿出，放置 1 h 至室温。

2.24.2 取 10 mL 试剂盒中的 20 \times 清洗液，加注射用水稀释至 200 mL，即配制成 1 \times 清洗液；取配制好的 1% 的 BSA 将 HRP-山羊抗小鼠 Ig λ 和 HRP-山羊抗小鼠 Ig κ 以 1: 10 000 倍稀释。

2.24.3 填写检测表，将待检样品、阳性对照和阴性对照各设置 8 个孔，并依照检测表在待测样孔中每孔加入 50 μ L 的样品稀释液和 50 μ L 的待检细胞上清；阳性对照和阴性对照孔不加样品稀释液，100 μ L/孔加入到酶标板中。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

2.24.4 弃酶标板中孵育液，加入配制好的 1 \times 清洗液，350 μ L/孔洗涤酶标板，重复洗涤 5 次并拍干。

2.24.5 取试剂盒的酶标二抗、稀释好的 HRP-山羊抗小鼠 Ig λ 和 HRP-山羊抗小鼠 Ig κ ，参照检测表 100 μ L/孔加入到酶标板中，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

2.24.6 重复实验步骤 2.24.4。

2.24.7 加入 50 μ L 的显色液 A 和 50 μ L 的显色液 B，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。

2.24.8 加入 50 μ L 的反应终止液，酶标仪读取 $A_{450\text{nm}}$ 值，对照检测表， $A_{450\text{nm}}$ 值高的孔所对应的酶标二抗亚类（型）即为该单抗的亚类（型）。

2.25 SDS-PAGE 检测单抗纯度

2.25.1 取制备的单抗样品 2 μ g/孔，按 3: 1 的体积比例分别加入还原型和非还原型 4 \times SDS loading buffer，混合均匀后，100 $^{\circ}$ C 处理 10 min。

2.25.2 其余实验步骤同本章 2.10。

2.26 WB 检测单抗特异性

2.26.1 将 IL-4R α 稀释至 0.2 mg/mL，10 μ L/孔，按 3: 1 的体积比例加入还

原型 4×SDS loading buffer, 混合均匀后, 100 °C处理 10 min。

2.26.2 处理好的样品水浴至室温后, 上 12%的 SDS-PAGE 电泳预制胶, 每个样品旁加入 8 μL 的预染蛋白 Marker。

2.26.3 接通电源后, 调节电压至 180 V, 恒压电泳至预染蛋白 Marker 条带充分分离, 溴酚兰染料接近胶底部。

2.26.4 电转步骤同本章 2.11。

2.26.5 取出 PVDF 膜, 使用 5%的脱脂牛奶 37 °C封闭 2 h。

2.26.6 使用 PBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次温和震荡 10 min。

2.26.7 稀释样品: 使用 5%的脱脂牛奶将 6-G2 单抗、阳性对照以及阴性对照分别稀释至 2 μg/mL, 做好标记, 待用。

2.26.8 将 PVDF 膜取出, 沿着 Marker 的一侧剪开, 并分别放置于步骤 2.26.7 稀释好的缓冲液中, 37 °C孵育 1 h。

2.26.9 使用 PBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次温和震荡 10 min。

2.26.10 使用 5%的牛奶将 HRP-羊抗鼠 IgG 以 1: 1 000 倍稀释, 将 PVDF 膜分别 37 °C孵育 1 h。

2.26.11 使用 PBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次温和震荡 10 min。

2.26.12 配制 DAB 显色液显色, 当膜上出现明显条带后将膜取出, 清水漂洗后室温晾干并拍照保存。

2.27 SEC-HPLC 检测单抗纯度

2.27.1 液相色谱仪用水置换系统 20 min 后用配制好的流动相溶液置换 10 min, 低流速接入色谱柱 (Tskgel G3 000 SWXL, 7.8×300 mm, 5 μm) 后缓慢升流速到 1 mL/min, 平衡 30 min 至基线平稳。

2.27.2 待测样品用去离子水稀释至浓度为 1 mg/mL, 进样, 100%流动相等度洗脱。色谱参数设置为: 流速 1.0 mL/min, 运行时间 20 min, 检测波长 280 nm, 柱温箱 30 °C, 上样量 100 μL。

2.27.3 样品分析结束用流动相以 1.0 mL/min 流速平衡色谱柱 30 min, 低流速卸下色谱柱并保存。

2.27.4 将液相系统置换为水后置换为 10%的甲醇溶液进行保存。

2.28 cIEF 检测单抗等电点

2.28.1 样品使用超滤浓缩管置换缓冲液, 5 000 rpm 离心 10 min, 重复 3 次。

2.28.2 样品制备如下:

表 1.3 cIEF 检测混合液

Tab 1.3. cIEF detection mixture

阴极稳定剂	7.5 μL
阳极稳定剂	2.0 μL
Pharmalyte 3-10	4.0 μL
含 3M 尿素的 cIEF 凝胶	100.0 μL
IEF 标志物 pI10.0	0.5 μL
IEF 标志物 pI9.5	0.5 μL
IEF 标志物 pI7.0	0.5 μL
IEF 标志物 pI5.5	0.5 μL
IEF 标志物 pI4.0	0.5 μL
脱盐后样品	2.5 μL
注射用水	6.5 μL
total	125.0 μL

2.28.3 调整检测器为 UV280 nm, 带宽 10 nm, 参比波长 360, 带宽 100; 响应时间 2 s, 毛细管温度: 20 $^{\circ}\text{C}$; 极性: 入口端为阳极, 出口端为阴极; 进样时间: 高压进样 100 s; 聚焦时间: 25 kv, 12 min; 化学迁移: 30 Kv, 32 min。

2.28.4 样品运行前使用清洗溶液冲洗 3 min, 再用纯水冲洗 3 min; 运行完成后纯水冲洗 3 min。

2.29 ELISA 检测单抗的结合活性

2.29.1 包被: 使用包被液稀释 IL-4R α 至 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板中, 置于温箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

2.29.2 洗板: 弃酶标板中孵育液, 每孔加入 350 μL 的 PBST, 洗涤 5 次后拍干。

2.29.3 封闭: 将配制好的封闭液加入到上述酶标板中, 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵

育 2 h。

2.29.4 洗板：同 2.29.2。

2.29.5 孵育待检样品：首先，将制备的鼠源单抗 6-G2 稀释至 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，再依次往下做 4 倍梯度稀释，一共稀释 11 个梯度。同时设置阳性对照和空白对照，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

2.29.6 洗板：同 2.29.2。

2.29.7 孵育二抗：将 HRP-羊抗鼠 IgG 以 1: 10 000 的比例稀释，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到上述酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

2.29.8 洗板：同 2.29.2。

2.29.9 显色：以 1: 1 的体积比例混合显色液 A 和 B，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。

2.29.10 终止：加入配制好的终止液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，酶标仪读取 $A_{450\text{nm}}$ 值，并使用 GraphPad Prism 软件以四参数拟合样品的结合曲线。

2.30 ELISA 检测单抗的阻断活性

2.30.1 制备待检样品：首先使用 1% 的 BSA 将 6-G2 单抗稀释至 1 mg/mL ，再依次往下作 4 倍梯度稀释，共稀释 11 个梯度，并设置阳性对照和阴性对照。将稀释好的样品与 IL-4 biotinylated (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 以 1: 1 的体积比例混合均匀，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到预包被酶标板中（包被及封闭步骤见本章 2.29），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后 PBST 洗板 5 次。

2.30.2 孵育二抗：以 1: 10 000 的比例稀释 Streptavidin-HRP 二抗，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后 PBST 洗板 5 次。

2.30.3 显色：按 1: 1 的体积比例混合显色液 A 和 B，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。

2.30.4 终止显色，酶标仪读取 $A_{450\text{nm}}$ 值，使用 GraphPad Prism 软件以四参数拟合样品的阻断曲线，并计算抑制率（inhibit binding rate, IBR）。

2.31 流式检测单抗的阻断活性

2.31.1 准备细胞：培养横纹肌瘤细胞至对数生长期，计数后取 1.5×10^6 cells/

管加入到无菌离心管中，200×g 离心 5 min，弃上清。

2.31.2 加入一定量的 PBS 洗涤细胞一次，弃去上清后，指尖轻柔弹散细胞。

2.31.3 稀释单抗至 32 mg/mL，再依次往下作 4 倍梯度稀释，一共稀释 6 个梯度。在第 1 至第 6 管细胞悬液中分别加入稀释好的单抗 125 μL，第 7 管中加入无关单抗 125 μL（抗 TNF- α 单抗，32 mg/mL），并设置阳性对照和空白对照，37 °C 孵育 10 min。

2.31.4 稀释 IL-13 至 100 μg/mL，每管细胞悬液中分别加入 40 μL，混合均匀后，37 °C 孵育 25 min。

2.31.5 加入适量的 PBS 洗涤细胞，200×g 离心 5 min，弃上清，重复 3 次。

2.31.6 在上述各管中分别加入 5 μL 的 PE anti-human IL-13，轻轻混匀，室温避光孵育 15 min，染色过程中再混匀一次。

2.31.7 染色完成后加入适量的 PBS 洗涤细胞，200×g 离心 5 min，弃上清，重复 3 次。

2.31.8 指尖轻柔弹散细胞，加入 100 μL 的 PBS 重悬，上机检测并计算 IBR。

2.32 细胞增殖抑制法检测单抗的生物学活性

2.32.1 检测 IL-4、IL-13 促进 TF-1 细胞的增殖作用

1) 将 2.5×10^4 cells/孔 TF-1 细胞接种到具有 100 μL/孔 10% FBS 的 96 孔板中，将细胞板置于 37 °C，5% CO₂ 的细胞培养箱中待用。

2) 准备测试样品的系列稀释液，首先稀释 IL-4 至 80 ng/mL，稀释 IL-13 至 1 μg/mL，再依次分别往下进行 3 倍梯度稀释，一共稀释 10 个梯度。将稀释好的样品 50 μL/孔加入到上述细胞板中。

3) 将细胞板置于 37 °C，5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 72 h。

4) 向细胞孔中添加 22 μL/孔的 CellTiter 96[®] Aqueous (MTS) 溶液试剂，置于 37 °C，5% CO₂ 中继续孵育 4 h。

5) 酶标仪读取 A_{490nm} 值，使用 GraphPad Prism 软件以四参数拟合各样品的增殖曲线。

2.32.2 检测单抗的生物学活性

1) 细胞铺板同 2.32.1。

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

- 2) 准备测试样品的系列稀释液, 首先将 6-G2 单抗稀释至 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 再依次往下做 4 倍梯度稀释。并稀释 IL-4 至 8 ng/mL , 稀释 IL-13 至 160 ng/mL ,
- 3) 将单抗的梯度稀释样品分别与稀释好的 IL-4 和 IL-13 以 1: 1 的体积比例混合均匀, 50 μL /孔加入到上述细胞板中。
- 4) 后续实验步骤同 2.32.1。
- 5) 酶标仪读取 $A_{490\text{nm}}$ 值, 使用 GraphPad Prism 软件以四参数拟合样品的抑制曲线。

3 实验结果

3.1 质粒的构建与鉴定

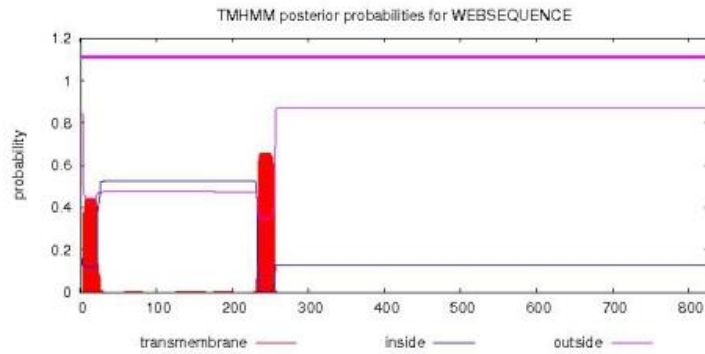
3.1.1 重组表达质粒的构建

从 NCBI 上获取人源 IL-4R α 全长氨基酸序列, 共 825 个氨基酸, 见下图 1.2A, 使用 Uniprot 数据库和 TMHMM Server v. 2.0 膜外段分析软件分析出 IL-4R α 胞外段, 其中第 26 到 232 位氨基酸为胞外段, 233~256 为跨膜段, 257~825 为胞内段, 见图 1.2B。

1	MGWLCSGLLF	FVSCLVLLQV	ASSGNMKVLQ	EPTCVSDYMS	ISTCEWKMG	PTNCSTELRL
61	LYQLVFLLE	AHTCIPENNG	GAGCVCHLLM	DDVVSADNYT	LDLWAGOQLL	WKGSEKPESE
121	VKPRAPGNLT	VHTNVSDTL	LTWSNPYPPD	NYLYNHLYA	VNIWSENDPA	DFRIYNVTYL
181	EPSLRIAAST	LKSGISYRAR	VRAWAQCYN	TWSEWSPSTK	WHNSYREPFE	QHLLLGVSVS
241	CIVILAVCLL	CYVSITKIKK	EWWDQIPNPA	RSRLVAIIIQ	DAQGSQWEKR	SRQEPAKCP
301	HWKNCCLKL	PCFLEHNMKR	DEDPHKAKE	MPFQSGKSA	WCPVEISKTV	LWPESISVVR
361	CVELFEAPVE	CEEEEEVEEE	KGSFCASPES	SRDDFQEGRE	GIVARLTESL	FLDLLGEENG
421	GFCQQDMGES	CLLPPSGSTS	AHMPWDEFPS	AGPKEAPPWG	KEQPLHLEPS	PPASPTQSPD
481	NLICTETPLV	IAGNPAYRSF	SNSLSQSPCP	RELGPDPPLA	RHLEEVEPEM	PCVPQLSEPT
541	TVPQPEPETW	EQILRRNVLQ	HGAAAAVPSA	PTSGYQEFVH	AVEQGGTQAS	AVVGLGPPGE
601	AGYKAFSSLL	ASSAVSPEKC	GFGASSGEEG	YKPFQDLIPG	CPGDPAPVPV	PLFTFGLDRE
661	PPRSPQSSHL	PSSSPEHLGL	EPGEKVEDMP	KPPLPQEAT	DPLVDSLGS	IVYSALTCHL
721	CGHLKQCHGQ	EDGGQTPVMA	SPCCGCCCGD	RSSPPTPLR	APDPSPGGVP	LEASLCPASL
781	APSGISEKSK	SSSSFHPAPG	NAQSSSQTPK	IVNFVSVGPT	YMRVS	

Selection: 26 to 232

A



B

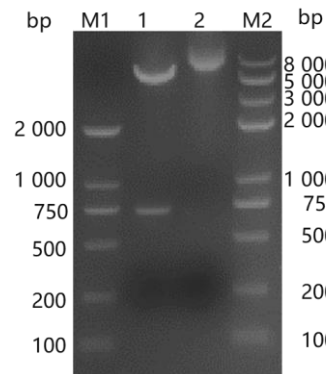
[注]: A: IL-4R α 氨基酸序列; B: IL-4R α 胞外段分析

图 1.2 IL-4R α 胞外段氨基酸序列

Fig 1.2. Amino acid sequence of IL-4R α extracellular segment

3.1.2 重组表达质粒的鉴定

将得到的 IL-4R α /pcDNA3.1 (+) 重组表达质粒进行 Kpn I 和 Xba I 双酶切验证。酶切产物进行 1% 的琼脂糖胶电泳分析, 电泳分析结果显示, 双酶切后, 在约 750 bp 和 6 000 bp 大小处出现明显特异性条带, 与理论分子量一致, 酶切验证正确。



[注]: M1: DL2 000 marker; 1: 质粒双酶切后; 2: 质粒未酶切; M2: DL 8 000 marker

图 1.3 IL-4R α /pcDNA3.1 (+) 重组表达质粒的酶切验证

Fig 1.3. Restriction digestion verification of IL-4R α /pcDNA3.1 (+) recombinant expression plasmid

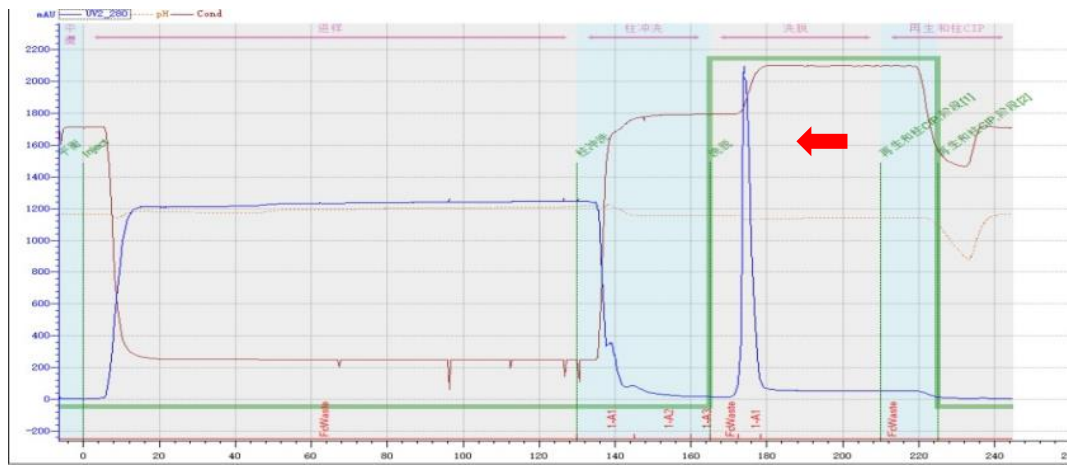
3.2 IL-4R α 的纯化与鉴定

3.2.1 IL-4R α 的纯化

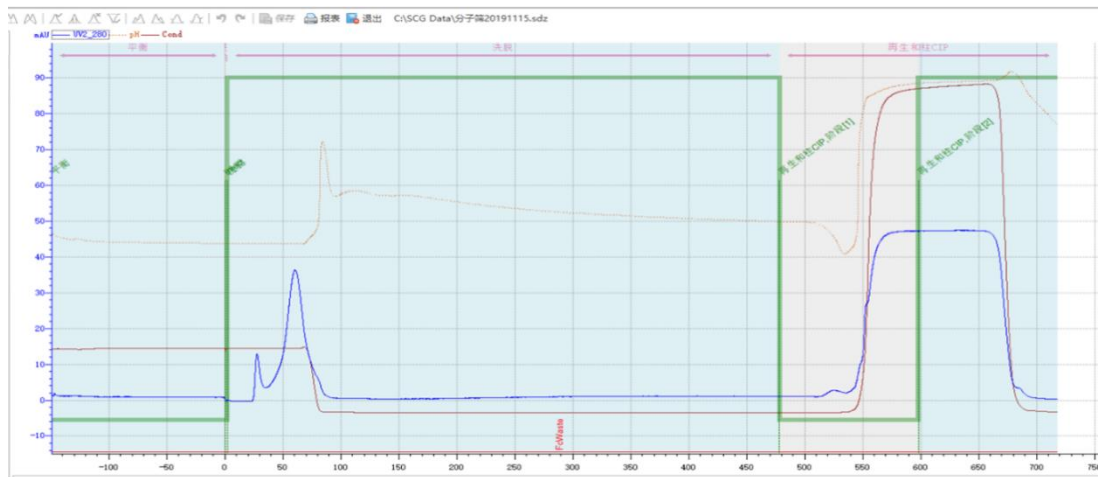
取酶切验证正确的 IL-4R α 重组表达质粒转染 Expi293F 细胞后, 继续培养,

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

待细胞活率降至 65%~75%时收获细胞上清，使用镍柱纯化，镍柱纯化图见下图 1.4A；再用分子筛进行二次纯化，分子筛纯化图见下图 1.4B。



A



B

[注]：A：镍柱纯化图；B：分子筛纯化图

图 1.4 IL-4R α 的纯化

Fig 1.4. Purification of IL-4R α

3.2.2 IL-4R α 的浓度测定

使用 Pierce[®] BCA 蛋白定量分析试剂盒检测纯化后收获的蛋白浓度，再通过 GraphPad Prism 软件以二参数拟合曲线并计算出目的蛋白的浓度，线性拟合 $R^2=0.999$ ，计算得到蛋白浓度为 2 mg/mL，蛋白总量约为 12 mg。见图 1.5。

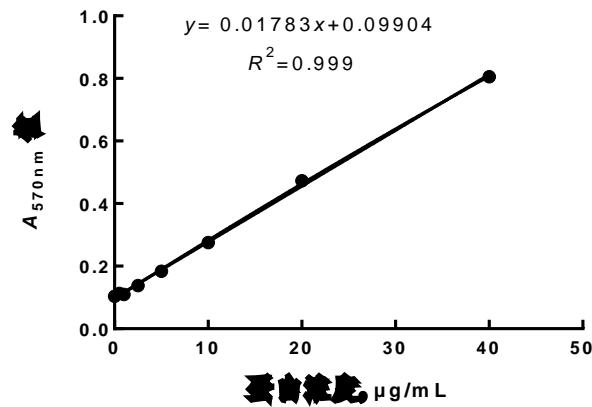
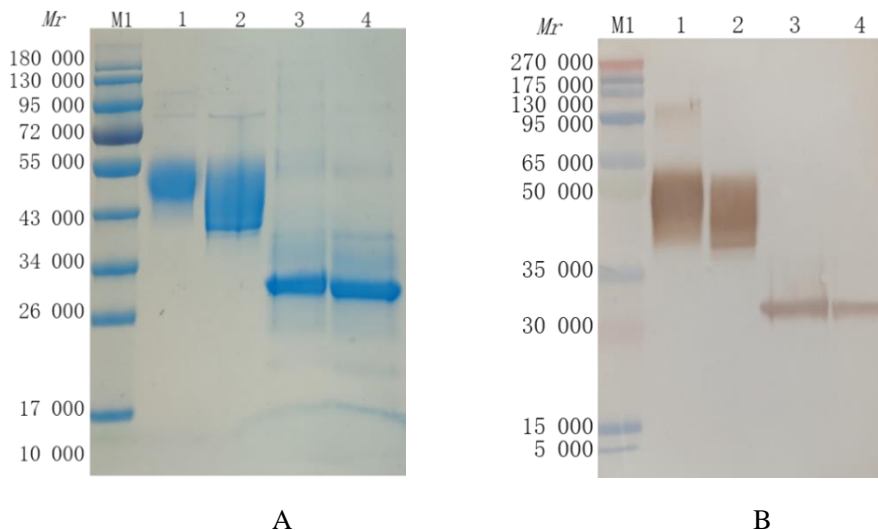


图 1.5 Pierce® BCA 蛋白定量分析拟合

Fig 1.5. Pierce® BCA protein quantitative analysis fitting

3.2.3 SDS-PAGE 与 WB 检测

SDS-PAGE 分析结果显示,于相对分子质量 40 000~55 000 大小处出现明显条带, AlphaView SA 软件分析结果显示,蛋白纯度较高,达到 95%以上。鉴于 IL-4R α 条带较为弥散,因此采用 N 端糖基化酶切的方法验证。糖基化酶切后于相对分子质量 30 000 大小处出现明显线性条带,与理论分子量一致,酶切验证正确,见下图 1.6。



[注]: A: IL-4R α 的 SDS-PAGE 分析 (M1: 180 000 预染 marker; 1: 参照蛋白阳性对照; 2: 制备的蛋白; 3: 参照蛋白糖基化酶切后; 4: 制备的蛋白糖基化酶切后) B: IL-4R α 的 WB 分析 (M1: 270 000 预染 marker; 1: 参照蛋白阳性对照; 2: 制备蛋白; 3: 参照蛋白糖基化酶切后; 4: 制备蛋白糖基化酶切后)

图 1.6 IL-4R α 在 Expi293F 细胞中的表达及鉴定

Fig 1.6. Expression and identification of IL-4R α in Expi293F cells

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

3.3 鼠源单抗的制备与鉴定

3.3.1 小鼠血清效价检测

经过 3 次免疫后, 采免疫后小鼠眼眶血, 以 ELISA 检测小鼠血清效价, 所有小鼠免疫后血清效价均较高。其中一只小鼠检测结果如下表 1.4 所示, 以高于未免疫小鼠血清 $A_{450\text{nm}}$ 值 2.1 倍视为阳性, 可知免疫后小鼠血清效价达到 10^6 以上, 免疫效果较好, 满足细胞融合需要。

表 1.4 免疫后小鼠血清效价检测

Tab 1.4. Detection of serum titer in mice after immunization

免疫后小鼠血清			未免疫小鼠血清
稀释倍数	$A_{450\text{nm}}$ 值	评价	
1: 10^3	3.448	+	0.045
1: 10^4	3.399	+	
1: 10^5	2.342	+	
1: 10^6	0.531	+	
1: 10^7	0.082	-	

[注]: +: 阳性; -: 阴性

3.3.2 细胞融合

取免疫后小鼠脾细胞与同源 SP2/0 细胞融合制备杂交瘤细胞, 融合后第 9 d 在显微镜下标记出杂交瘤细胞孔。经计算得融合孔数达 648 孔, 融合率为 67.5%。

3.3.3 杂交瘤的筛选和亚克隆

1) 杂交瘤细胞的筛选

在显微镜下观察, 挑选出细胞状态良好的单克隆细胞孔, 取细胞上清进行 ELISA 检测, 筛选出其中具有结合活性的细胞孔, 然后对初步筛选结合活性为阳性的细胞孔进行阻断活性的二次筛选。其中, 具有结合活性的细胞孔数为 576 孔, 具有阻断活性的细胞孔数为 32 孔, 见表 1.5。

表 1.5 阳性细胞孔的筛选
Tab 1.5. Screening of positive cell wells

	孔数	占比
结合阳性	576	60%
阻断阳性	32	3.30%

2) 杂交瘤细胞亚克隆

将上述挑选出的杂交瘤细胞孔在显微镜下复筛，挑选出其中阳性值高且细胞状态好的 2 株细胞 2-E10 及 6-G2 进行连续 3 次亚克隆，其余细胞扩大培养并冻存于液氮罐中，见表 1.6。

表 1.6 杂交瘤细胞亚克隆的阳性克隆率
Tab 1.6. Positive clone rate of hybridoma cell subclones

	第一次	第二次	第三次
2-E10	87.50%	100%	100%
6-G2	100%	100%	100%

3.4 单抗的鉴定

3.4.1 单抗的亚型（类）鉴定

将筛选出的 6-G2 单克隆细胞株扩大培养，取细胞上清使用单抗亚类（型）鉴定试剂盒检测单抗的亚类（型），结果显示，6-G2 单抗的重链亚类为 IgG1，轻链亚型为 κ 链，见图 1.7。

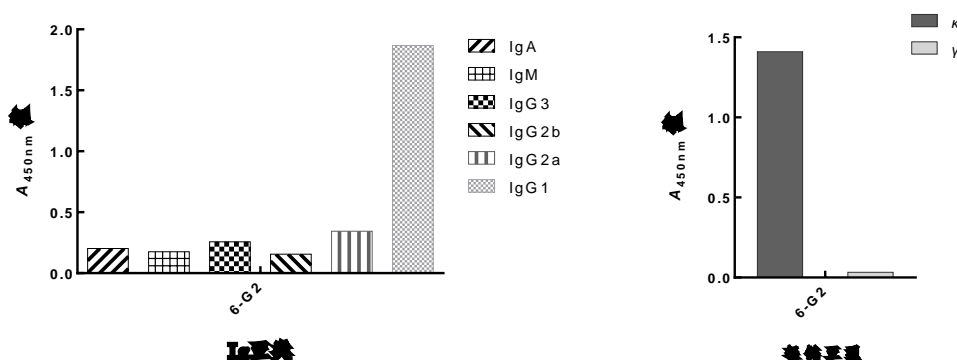
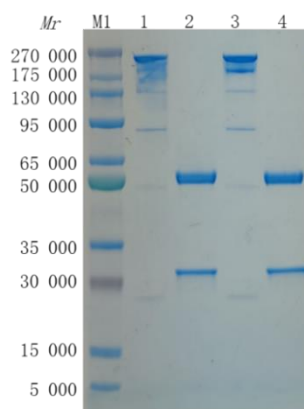


图 1.7 单抗的亚类（型）鉴定
Fig 1.7. Subclass (type) identification of mAb

3.4.2 SDS-PAGE 检测单抗的纯度

将经过纯化后的蛋白使用 Nanodrop 超微量紫外分析仪检测蛋白的浓度，取 2 μg 分别与还原型和非还原型 loading buffer 混合处理后上 12% 的 SDS-PAGE 蛋白凝胶进行纯度验证，实验结果如图 1.8，收获的目的单抗纯度较高，经 AlphaView SA 软件扫描显示，6-G2 单抗还原型电泳纯度大于 95%，非还原型电泳纯度大于 93%，且重轻链大小与理论分子量一致。



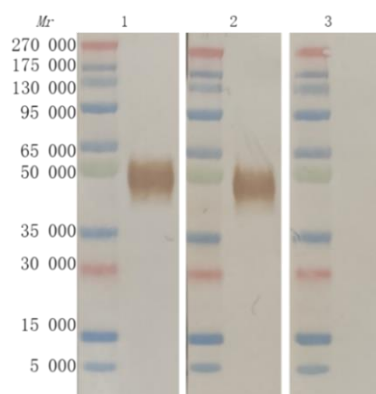
[注]: M1: 270 000 预染 marker; 1: 6-G2 单抗非还原; 2: 6-G2 单抗还原; 3、4: 参照单抗对照

图 1.8 单抗的 SDS-PAGE 验证

Fig 1.8. SDS-PAGE verification of mAb

3.4.3 WB 检测单抗特异性

WB 检测结果显示，6-G2 单抗在理论分子量大小处出现明显条带，而阴性对照无条带，表明 6-G2 单抗结合的是 IL-4R α 上的线性表位，结果如图 1.9。



[注]: 1: 阳性对照; 2: 6-G2 单抗; 3: 阴性对照

图 1.9 单抗的特异性验证

Fig 1.9. Specificity verification of mAb

3.4.4 SEC-HPLC 检测单抗单体纯度

SEC-HPLC 检测结果显示, 6-G2 单抗单体纯度约为 99.4%, 纯度较高。结果见下图 1.10。

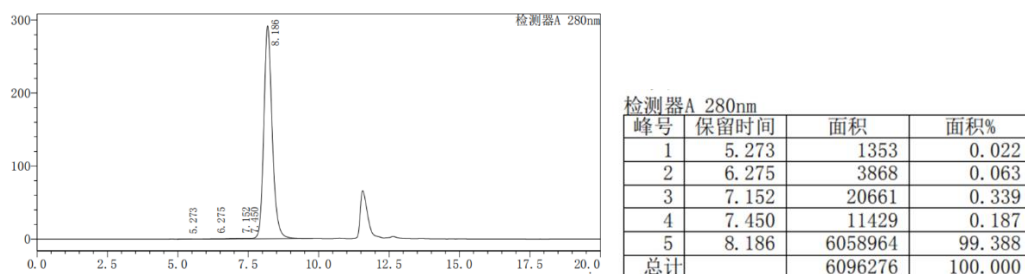


图 1.10 单抗的单体纯度检测

Fig 1.10. Monomer purity detection of mAb

3.4.5 cIEF 等电点检测

cIEF 检测等电点结果显示, 6-G2 单抗的迁移时间为 28.649 min, 根据等电点计算公式为 $PI = -0.344641 \times 28.649$ (迁移时间) + 15.748128。6-G2 单抗等电点约为 5.9, 见下图 1.11。

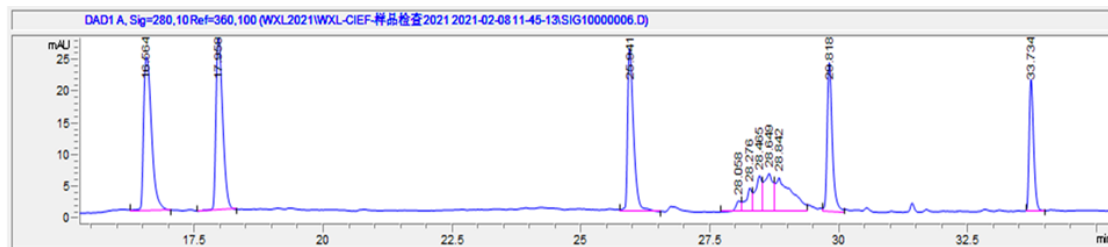


图 1.11 单抗的等电点检测

Fig 1.11. Isoelectric point detection of mAb

3.4.6 ELISA 检测单抗的结合活性

6-G2 单抗梯度稀释后以 ELISA 检测单抗的结合活性, 结果显示, 6-G2 单抗结合活性 EC_{50} 为 10 ng/mL, 使用 GraphPad Prism 软件以四参数拟合 $R^2=1$, 表明 6-G2 单抗对 IL-4R α 具有良好的结合活性, 见下图 1.12。

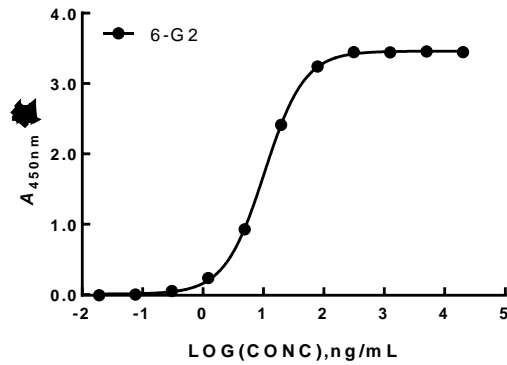
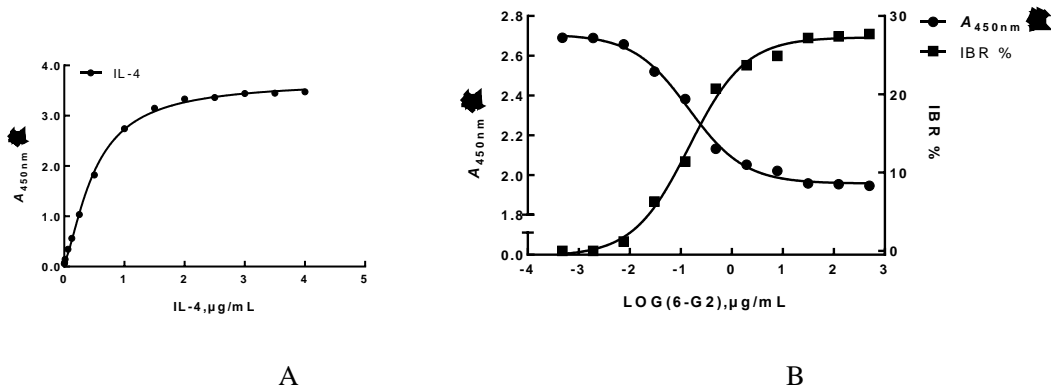


图 1.12 单抗的结合活性检测

Fig 1.12. Detection of binding activity of mAb

3.4.7 ELISA 检测单抗的阻断活性

ELISA 阻断活性检测结果显示, IL-4 与 IL-4R α 的结合活性 EC₉₀ 约为 2 μ g/mL, 见下图 1.13A; 6-G2 单抗梯度稀释后与 2 μ g/mL 的 IL-4 共孵育, 以检测 6-G2 单抗的阻断活性。实验结果显示, 6-G2 单抗浓度达到 10 μ g/mL 时达到最高抑制率, 约为 27.3%, 其阻断效率与单抗的浓度呈明显量效关系, 见下图 1.13B。



A

B

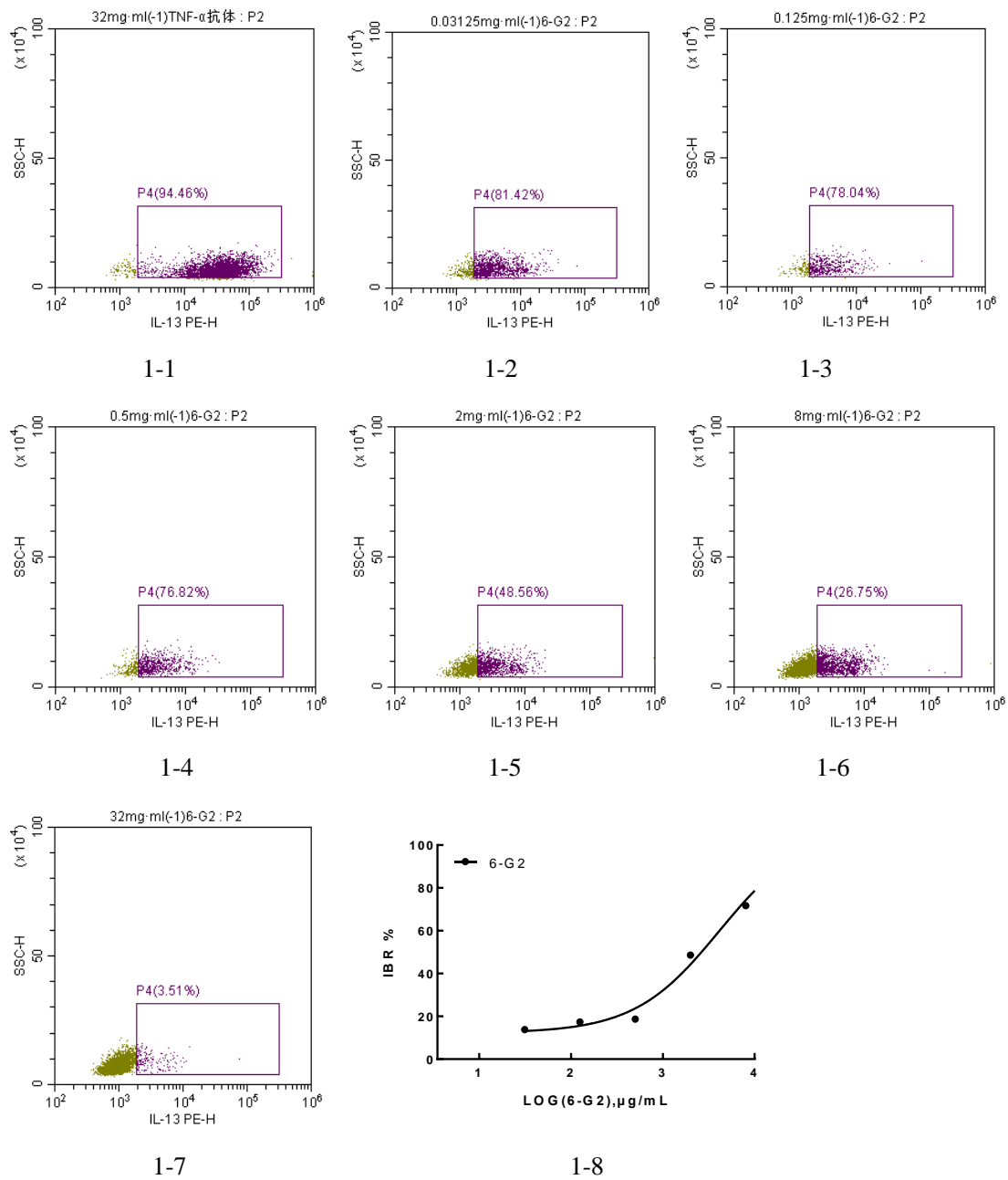
[注]: A: IL-4 结合 IL-4R α ; B: 6-G2 单抗阻断 IL-4 与 IL-4R α 的结合

图 1.13 单抗的阻断活性检测

Fig 1.13. Detection of blocking activity of mAb

3.4.8 流式细胞法检测单抗对 IL-13 与 IL-4R α 结合的阻断活性

流式细胞法检测单抗阻断活性的结果显示, 当 IL-13 的浓度达到 100 μ g/mL 时, 细胞荧光率约为 94.46%。将 6-G2 单抗梯度稀释后与 100 μ g/mL 的 IL-13 共孵育, 实验结果显示, 6-G2 单抗浓度达到 32 mg/mL 时几乎可以实现完全阻断, 其阻断效率与单抗的浓度呈明显量效关系。结果见下图 1.14。



[注]: 1-1: 无关对照; 1-2: 0.03125 mg/mL 的 6-G2 单抗; 1-3: 0.125 mg/mL 的 6-G2 单抗; 1-4: 0.5 mg/mL 的 6-G2 单抗; 1-5: 2 mg/mL 的 6-G2 单抗; 1-6: 8 mg/mL 的 6-G2 单抗; 1-7: 32 mg/mL 的 6-G2 单抗; 1-8: 6-G2 单抗阻断率

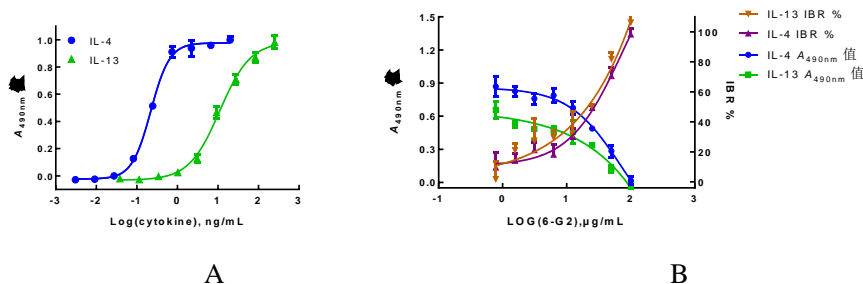
图 1.14 单抗的阻断活性检测

Fig 1.14. Detection of blocking activity of mAb

3.4.9 细胞增殖抑制法检测单抗的阻断活性

细胞增殖抑制法检测单抗的阻断活性结果显示,当 IL-4 的浓度达到 4 ng/mL, 或 IL-13 的浓度达到 80 ng/mL 时,其对 TF-1 细胞的促增殖作用达到平台期。6-G2

单抗梯度稀释后分别与 8 ng/mL 的 IL-4 或 160 ng/mL 的 IL-13 共孵育, 实验结果显示, 6-G2 单抗浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 IL-4 和 IL-13 均可以达到完全阻断, 且其阻断效率与单抗的浓度呈明显量效关系。见下图 1.15。



[注]: A: 增殖曲线; B: 6-G2 单抗抑制曲线

图 1.15 单抗的阻断活性检测

Fig 1.15. Detection of blocking activity of mAb

4 小结

4.1 成功构建了 IL-4R α /pcDNA3.1 (+) 重组表达质粒, 在 Expi293F 细胞中成功表达, 纯化后, 经检测目的蛋白浓度为 2 mg/mL, 共收获总蛋白约 12 mg。

4.2 SDS-PAGE 检测结果显示于相对分子质量 40 000~55 000 处出现明显条带, 且蛋白纯度较高, 糖基化酶切后于相对分子质量 30 000 处出现明显线性条带, 与理论分子量一致。WB 结果证明 IL-4R α 成功表达。

4.3 经小鼠免疫、细胞融合、杂交瘤筛选后, 获得 1 株具有较高结合活性和阻断活性的单克隆细胞株 6-G2。

4.4 将 6-G2 细胞接种小鼠腹腔, 制备腹水, 纯化后经鉴定, 该单抗的亚类为 IgG1, 亚型为 κ 链; SDS-PAGE 检测结果显示, 单抗的纯度较高, 重轻链大小与理论分子量一致; WB 检测结果显示 6-G2 单抗结合的是抗原的线性表位; SEC-HPLC 检测结果显示, 单抗的单体纯度较高; cIEF 检测结果显示, 单抗的 PI 约为 5.9。

4.5 ELISA 结合活性检测结果显示, 6-G2 单抗结合活性 EC₅₀ 为 10 ng/mL; ELISA 阻断活性结果显示, 6-G2 单抗浓度达到 10 $\mu\text{g/mL}$ 时对 IL-4 与 IL-4R α 的结合达到最高抑制率, 约为 27.3%; 流式细胞法检测结果显示, 6-G2 单抗浓度达到 32 mg/mL 时对 IL-13 几乎可以实现完全阻断; 细胞增殖抑制法检测结果显示, 6-G2 单抗对 IL-4 和 IL-13 与相应受体结合均可以实现完全阻断, 从而抑制细胞的增殖。

第二章 抗 IL-4R α 人鼠嵌合单抗的构建、表达与初步鉴定

1 实验材料

1.1 实验细胞

杂交瘤细胞株：本实验室制备。

1.2 载体

pcDNA3.4 表达载体：本实验室保存。

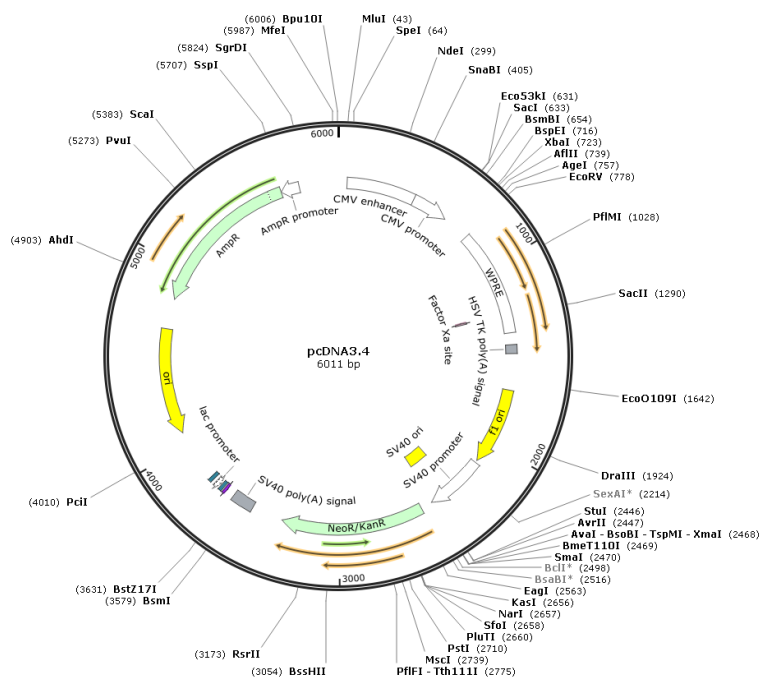


图 2.1 pcDNA3.4 表达载体图谱

Fig 2.1. pcDNA3.4 expression vector map

1.3 试剂

名称	厂家及货号
RNA 提取试剂盒	TakaRa (9761)
SMARTer RACE 5'/3' kit User Manual	TaKaRa (634858)

其他：同第一章 1.3。

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

1.4 仪器

名称	厂家及货号
梯度 PCR 仪	Thermo Fisher (Vapo.protect™ Mastercycler pro)

其他：同第一章 1.4。

1.5 主要试剂的配制

同第一章 1.5。

2 实验方法

2.1 6-G2 单克隆细胞总 mRNA 提取

2.1.1 培养 6-G2 单克隆细胞至对数生长期, 使用移液器轻轻吹匀细胞并将细胞悬液转移至无菌离心管中, 3 000 rpm 离心 5 min, 弃上清。

2.1.2 配制细胞裂解液, 取 343 μL 的 buffer RL 并加入 7 μL 的 50 \times DTT solution, 轻轻混合至均匀, 待用。

2.1.3 取适量的 1 \times PBS 重悬细胞后, 3 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 轻敲离心管底部使细胞沉淀松散。

2.1.4 使用上述步骤中配制好的细胞裂解液缓慢重悬细胞, 轻轻吹匀至无明显沉淀后, 室温静置 2 min。

2.1.5 将 gDNA Eraser Spin Column 安放到 2 mL 的 Collection Tube 上, 并将上述细胞裂解悬液转移到 gDNA Eraser Spin Column 中, 12 000 rpm 离心 1 min。

2.1.6 将得到的滤液以 1: 1 的体积比例加入 70% 的乙醇, 并快速混合均匀。

2.1.7 立即将上述混合液全部转入到 RNA Spin Column 中, 设置离心机至 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 rpm 离心 1 min, 弃滤出液。

2.1.8 在 RNA Spin Column 中加入 500 μL 的 buffer RWA, 12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 30 s, 弃滤出液。

2.1.9 在 RNA Spin Column 中加入 600 μL 的 buffer RWB, 12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 30 s, 弃滤出液。

2.1.10 配制 DNase I 反应液, 取 41 μL 的 RNase Free H_2O , 5 μL 的 10 \times DNase

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

I Buffer, 4 μL 的 Recombinant DNase I 到新的 1.5 mL DNase Free Tube 中, 轻轻混合均匀。

2.1.11 将上述反应液缓慢滴在 RNA Spin Column 的膜中央, 室温静置 15 min。

2.1.12 向 RNA Spin Column 中加入 350 μL 的 buffer RWB, 12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 30 s, 弃滤出液。

2.1.13 重复步骤 2.1.9 一次。

2.1.14 将 RNA Spin Column 重新放置于 Collection Tube 中, 12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 2 min。

2.1.15 将 RNA Spin Column 放置到新的 1.5 mL DNase Free Tube 中, 并在 RNA Spin Column 的膜中央加入 50 μL 的 RNase Free H_2O , 室温静置 5 min 后, 12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 2 min。

2.1.16 将洗脱液重新加入到 RNA Spin Column 的膜中央, 室温静置 5 min 后, 12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 2 min, 收集洗脱液。

2.2 RNA 产物琼脂糖凝胶电泳

2.2.1 取 3 μL 的 RNA, 使用 Nanodrop 超微量紫外分析仪检测浓度。

2.2.2 取 1 \times TAE 电泳缓冲液 20 mL 至锥形瓶中, 再称取 0.4 g 的琼脂糖, 微波炉加热制成澄清透明溶液, 并将溶液倒入到已准备好的模具内, 加入 1 μL 的 Gold View 核酸染料, 搅拌至混合均匀, 冷却凝固后即制成质量分数为 2% 的琼脂糖胶。

2.2.3 取 2 μg 的 RNA 加入适量的 loading buffer 混合均匀, 在琼脂糖胶第一孔中加入 10 μL 的 DL2 000 marker, 余孔依次点样。

2.2.4 接通电泳槽正负极电源, 恒压 90 V, 25 min。

2.2.5 取出琼脂糖胶, 于紫外灯下观察电泳结果。

2.3 反转录合成第一链 cDNA

2.3.1 取一只 0.2 mL 的 EP 管, 依次足量加入以下缓冲液混合物, 轻轻混匀后, 瞬时离心, 于室温静置, 待用。

表 2.1 缓冲液配方

Tab 2.1. Buffer formulation

5×First-Stand Buffer	4.0 μL
DTT (100 mM)	0.5 μL
dNTPs (20 mM)	1.0 μL
Total Volume	5.5 μL

2.3.2 另取一只新的 0.2 mL 的 EP 管, 依次加入下列试剂, 轻轻混匀后离心。

表 2.2 5' -RACE cDNA 反应

Table 2.2. 5'-RACE cDNA reaction solution

RNA	1.0 μl
5'-CDS Primer A	1.0 μl
0-9 μl Sterile H ₂ O	9.0 μl
Total Volume	11.0 μl

2.3.3 将上述步骤中的反应液置于 PCR 仪中, 72 °C 孵育 3 min, 然后降温至 42 °C 孵育 2 min, 快速将 EP 管拿出置于冰上冷却后, 14 000×g 离心 10 s。

2.3.4 在上述 5'-RACE cDNA 反应体系中加入 1 μl 的 SMARTer II A Oligonucleotide。

2.3.5 在室温条件下依次加入以下试剂, 混匀配制 Master Mix。

表 2.3 Master Mix 反应液

Tab 2.3. Master Mix reaction solution

Buffer Mix from Step 1	5.5 μL
RNase Inhibitor (40 U/ μL)	0.5 μL
SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U)	2.0 μL
Total Volume	8.0 μL

2.3.6 将上述步骤中配制好的 Master Mix 缓慢加入到步骤 2.3.4 中的反应液中, 轻轻混匀并离心。

2.3.7 将 EP 管置于 PCR 仪中 42 °C 孵育 90 min, 然后升温至 72 °C 孵育 10 min。

2.3.8 加入 80 μL 的 Tricine-EDTA 缓冲液稀释第一链 cDNA 合成反应产物。

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

2.4 单抗重轻链可变区基因序列 PCR 扩增

2.4.1 设计引物如下:

表 2.4 6-G2 单抗 3'RACE PCR 特异性引物

Tab 2.4. 6-G2 monoclonal antibody 3'RACE PCR specific primers

引物名称	序列
MOCMFOR	AATTTTCTTGTCACCTTGGTGC
CKMOsp	ATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG

2.4.2 取一只 0.2 mL 的 EP 管, 依次加入以下试剂并轻轻混匀, 配制成 PCR Master Mix 反应液。

表 2.5 PCR Master Mix 反应液

Tab 2.5. PCR Master Mix reaction solution

PCR-Grade H ₂ O	15.5 μ L
2X SeqAmp Buffer	25.0 μ L
SeqAmp DNA Polymerase	1.0 μ L
Total Volume	41.5 μL

2.4.3 按下表依次加入下列试剂, 制备 PCR 反应液。

表 2.6 PCR 反应液

Tab 2.6. PCR reaction solution

重链		轻链	
Master Mix(step1)	41.5 μ L	Master Mix(step1)	41.5 μ L
5'-RACE-Ready cDNA	2.5 μ L	5'-RACE-Ready cDNA	2.5 μ L
10 \times UPM	5.0 μ L	10 \times UPM	5.0 μ L
MOCMFOR (10 μ M)	1.0 μ L	CKMOsp (10 μ M)	1.0 μ L
Total Volume	50.0 μL	Total Volume	50.0 μL

2.4.4 PCR 条件如下:

94 $^{\circ}$ C	30 s	} 25 cycle
68 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	2 min	
4 $^{\circ}$ C	∞	

2.5 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

方法同第一章 2.5。

2.6 电泳产物胶回收

2.6.1 对照 DNA marker, 在紫外灯照射下切下目的条带, 装入无菌离心管中, 计算出切下凝胶的重量。

2.6.2 每 100 mg 胶体中加入 300 μ L 的 Buffer QG, 轻轻摇晃, 使凝胶被完全融化。

2.6.3 按胶回收试剂盒的提示将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 将凝胶溶液加入至 Spin Column 中, 10 000 rpm 离心 30 s。

2.6.4 将滤出液重新倒回到 Spin Column 中, 10 000 rpm 离心 30 s, 以提高胶回收效率。

2.6.5 弃滤出液, 加入 700 μ L 的 buffer WB, 10 000 rpm 离心 30 s。

2.6.6 重复步骤 2.6.5 一次。

2.6.7 将 Spin Column 重新安置于 Collection Tube 上, 10 000 rpm 离心 1 min, 以除尽残留洗液。

2.6.8 在 Spin Column 的膜中央加入 30 μ L 的 RNase Free H₂O, 并将其安置于新的无菌 EP 管中, 室温静置 2 min 后, 10 000 rpm 离心 1 min, 收集洗脱液并送至上海生物工程有限公司测序。

2.7 序列比对

将测序得到的序列在 NCBI 和 IMGT 软件上比对, 分析序列的同源性, 并标注出序列的 CDR 区。

2.8 质粒转化

2.8.1 将比对正确的序列取其可变区碱基序列, 与人的 IgG 恒定区序列拼接, 再加上相应的信号肽, 酶切位点等, 由南京金斯瑞生物科技有限公司进行密码子优化和全基因合成, 并克隆至 pcDNA3.4 表达载体。

2.8.2 质粒转化步骤方法同第一章 2.2。

2.9 提质粒

实验步骤同第一章 2.3。

2.10 重组质粒双酶切验证

2.10.1 质粒双酶切体系如下：

表 2.7 重组表达质粒酶切验证

Tab 2.7. Enzyme digestion verification of recombinant expression plasmid

QuickCut™ Xba I	1.0 μL
QuickCut™ EcoR V	1.0 μL
CutSmart Buffer	3.0 μL
DNA	1.0 μg
RNase Free H ₂ O	0-25.0 μL
Total	30.0 μL

2.10.2 37 °C水浴 1 h。

2.10.3 琼脂糖凝胶电泳步骤同第一章 2.5。

2.11 转染

按照第一章 2.6 的方法将验证正确的质粒瞬时转染 Expi293F 细胞，待细胞活率降至 65%~75%时收获细胞上清。

2.12 亲和纯化

2.12.1 装填柱料：搅拌纳微填料至质地均匀，并将填料快速倒入柱中，静置 30 min 至填料充分沉淀。装好柱头后进行二次压柱。

2.12.2 平衡：取配制好的平衡缓冲液，设置流速至 2 mL/min，至基线平稳。

2.12.3 上样：将培养好的细胞悬液 3 000 rpm 离心 30 min，使用 0.22 μm 的滤器过滤后设置上样流速为 2 mL/min。

2.12.4 淋洗：取配制好的平衡缓冲液，流速 2 mL/min，淋洗 5 个柱体积至

基线平稳。

2.12.5 洗脱：使用配制好的枸橼酸洗脱液，流速 2 mL/min，洗脱 3 个柱体积，收集洗脱峰。将得到的人鼠嵌合单抗命名为 ch6-G2。

2.13 SDS-PAGE 检测 ch6-G2 单抗纯度

实验步骤同第一章 2.10。

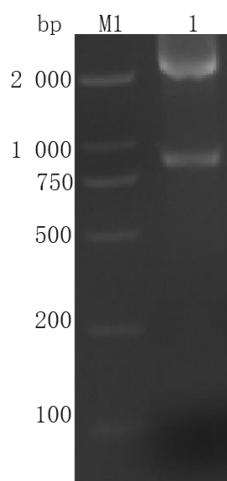
2.14 ELISA 检测 ch6-G2 单抗结合活性

实验步骤同第一章 2.29。

3 实验结果

3.1 单克隆杂交瘤细胞总 RNA 提取

使用 RNA 提取试剂盒提取 6-G2 细胞总 mRNA，上 2% 的琼脂糖胶，核酸电泳检测结果显示，在约 800 bp 大小处出现明显条带，表示 RNA 提取成功，见下图 2.2。



[注]：M1：DL2 000 marker；1：6-G2 总 mRNA 电泳

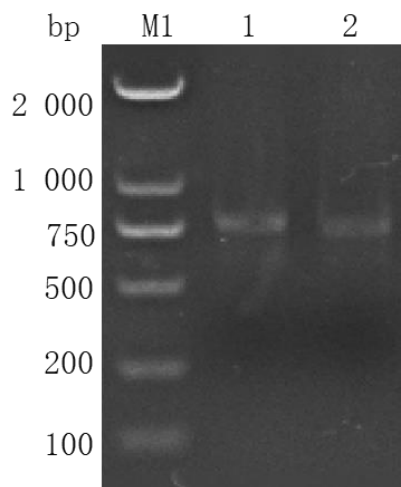
图 2.2 单克隆杂交瘤细胞总 mRNA 电泳

Fig 2.2. Total mRNA electrophoresis of monoclonal hybrida cells

3.2 6-G2 单抗可变区序列 PCR 扩增

设计重轻链引物，使用 RACE PCR 试剂盒扩增单抗的可变区序列，将 PCR

产物上质量分数为 1% 的琼脂糖胶，结果如下图所示，6-G2 单抗重轻链在约 750 bp 大小处均出现明显条带，见下图 2.3。



[注]：M1：DL2 000 marker；1：6-G2 单抗重链 PCR；2：6-G2 单抗轻链 PCR

图 2.3 单抗可变区序列 PCR 产物电泳

Fig 2.3. PCR product electrophoresis of mAb variable region sequence

3.3 对单抗进行核苷酸序列分析

将 PCR 产物送测序，将测序结果通过 NCBI 和 IMGT 数据库进行序列比对分析，为了保护单抗序列，故将单抗的 CDR 区用“×”表示，比对分析结果显示如下：

6-G2: 6-G2 重链可变区全长 351 bp，共编码 117 个氨基酸，见下图 2.4、2.5，使用 IMGT 网站分析其 CDR 区结果见下表 2.8 和图 2.6；6-G2 轻链可变区全长 336 bp，共编码 112 个氨基酸，见下图 2.7、2.8，使用 IMGT 网站分析其 CDR 区，结果见下表 2.9 和图 2.9。重轻链均具有完整的开放阅读框。

	10	20	30	40	50	60
1	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATC					
1	Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I					
1	R S S W C S L D L S * R S L E R Q S R S					
1	D P V G A V W T * A E E A W R D S Q D					

Signal peptide

```

1      CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC
1      Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile

61     TCC TGC AAG GCT TCT xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT
21     Ser Cys Lys Ala Ser xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx MET Asn Trp Val Lys Gln Ala

121    CCA GGA AAG GAT TTA AAG TGG CTG GGC TGG xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx ACA TAT
41     Pro Gly Lys Asp Leu Lys Trp Leu Gly Trp xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx Thr Tyr

181    GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TAT
61     Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

241    TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT xxx xxx xxx xxx
81     Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys xxx xxx xxx xxx

301    xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA
101    xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
    
```

图2.5 6-G2单抗重链可变区结构分析

Fig 2.5. Structural analysis of the heavy chain variable region of 6-G2 mAb

表2.8 6-G2单抗重链可变区序列核苷酸同源性分析

Tab 2.8. Analysis of nucleotide homology of the heavy chain variable region of 6-G2 mAb

		Score Identity		
AJ851868	Musmus IGHV9-3-1*01 F	1417	99.31%	(286/288 nt)
AJ851868	Musmus IGHV9-1*02 F	1408	98.96%	(285/288 nt)
AJ851868	Musmus IGHV9-3*02 F	1390	98.26%	(283/288 nt)
L14366	Musmus IGHV9-3*03 F	1390	98.26%	(283/288 nt)
Z15022	Musmus IGHV9-1*03 F	1382	99.29%	(278/280 nt)

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

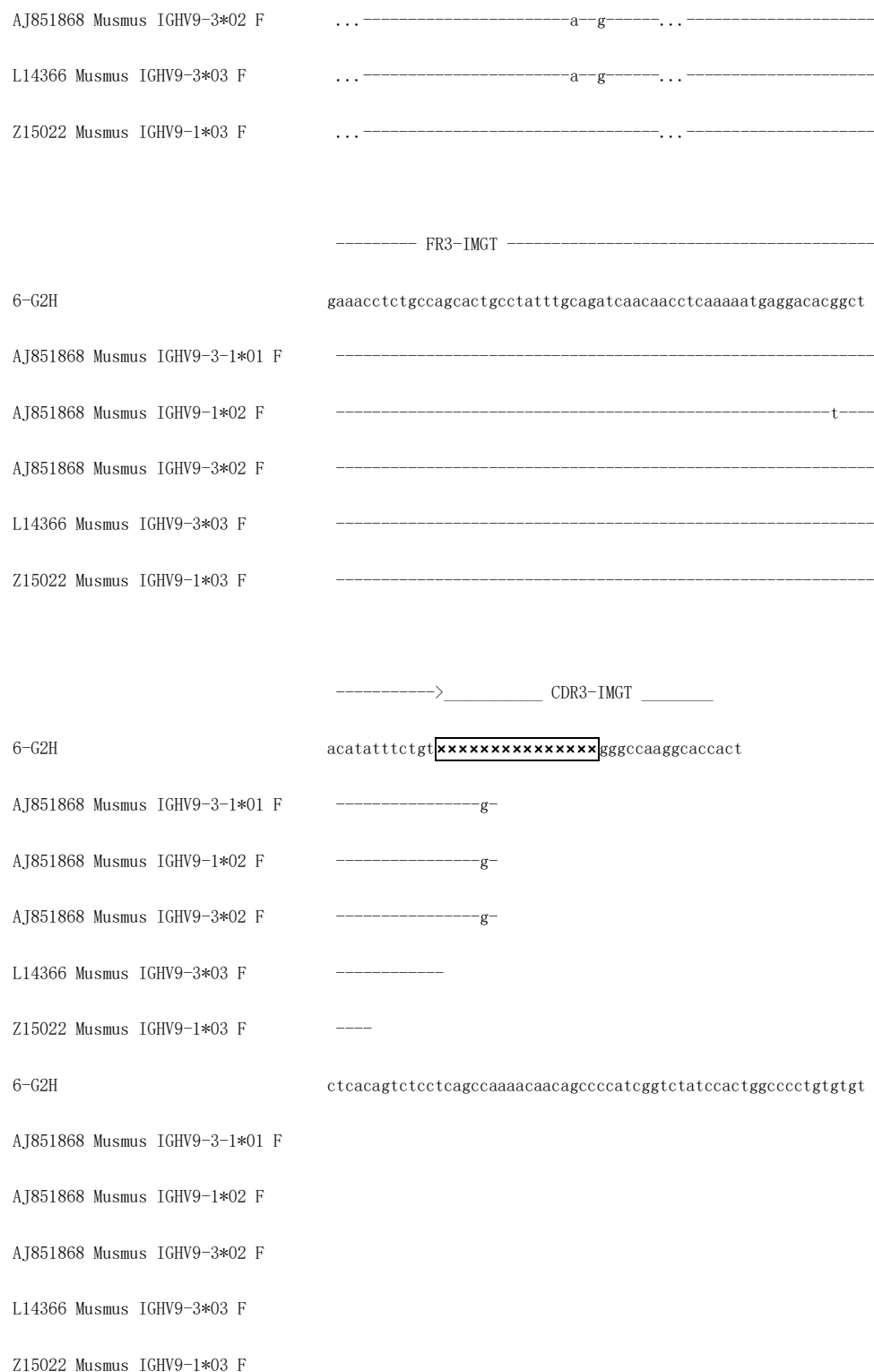


图 2.6 6-G2 单抗重链可变区核苷酸序列同源性比对分析

Fig 2.6. Nucleotide sequence homology analysis of the heavy chain variable region of 6-G2 mAb


```

                310      320      330
301      [xxxxxx]TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
101      R T F G G G T K L E I K
101      G R S V E A P S W K S
100      S D V R W R H Q A G N Q
    
```

图2.7 6-G2单抗轻链可变区开放阅读框分析

Fig 2.7. Open reading frame analysis of the light chain variable region of 6-G2 mAb

```

                                Signal peptide
1      GAT GTT GTG ATG ACC CAG ACT CCA CTC ACT TTG TCG GTT ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCC
1      Asp Val Val MET Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser

61      ATC TCT TGC AAG TCA AGT [xxxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx] TTG AAT TGG
21      Ile Ser Cys Lys Ser Ser [xxxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx] Leu Asn Trp

121     TTG TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC TAT [xxxx xxx xxx xxx] CTG GAC
41      Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr [xxxx xxx xxx xxx] Leu Asp

181     TCT AGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACG CTG AAA GTC
61      Ser Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Val

241     AGC AGA GTG GAG GGT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAT TGC TGG [xxxx xxx xxx xxx xxx xxx]
81      Ser Arg Val Glu Gly Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp [xxxx xxx xxx xxx xxx xxx]

301     [xxxx xxx] TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA
101     [xxxx xxx] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
    
```

图2.8 6-G2单抗轻链可变区结构分析

Fig 2.8. Structural analysis of the light chain variable region of 6-G2 mAb

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

表 2.9 6-G2 抗体轻链可变区序列核苷酸同源性分析
Tab.2.9. Analysis of nucleotide homology of the light chain variable region of 6-G2 mAb

		Score Identity		
Z72384	Musmus IGKV1-135*01 F	1411	97.96%	(288/294 nt)
Z72382	Musmus IGKV1-133*01 F	1321	94.56%	(278/294 nt)
AJ231197	Musmus IGKV1-131*01 ORF	1249	91.84%	(270/294 nt)
AJ231198	Musmus IGKV1-132*01 F	1186	89.46%	(263/294 nt)
AJ231200	Musmus IGKV1-35*01 ORF	1060	84.69%	(249/294 nt)

Alignment with FR-IMGT and CDR-IMGT delimitations

	<----- FR1-IMGT ----->
6-G2L	gatgttgatgaccagactccactcactttgtcggttaccattggacaaccagcctcc
Z72384 Musmus IGKV1-135*01 F	-----
Z72382 Musmus IGKV1-133*01 F	-----t
AJ231197 Musmus IGKV1-131*01 ORF	-----
AJ231198 Musmus IGKV1-132*01 F	-----gt-----t
AJ231200 Musmus IGKV1-35*01 ORF	-c-----a-a-c-----t-----
>----- CDR1-IMGT -----<-----	
6-G2L	atctcttgaagtcaagt XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX...XXXXXXXXXXXX tgaat
Z72384 Musmus IGKV1-135*01 F	-----g-----...-----
Z72382 Musmus IGKV1-133*01 F	-----t-----...a-----a-c-----
AJ231197 Musmus IGKV1-131*01 ORF	-----...a-----
AJ231198 Musmus IGKV1-132*01 F	-----t-----...a-----
AJ231200 Musmus IGKV1-35*01 ORF	g-----g-----t-----...a-----c-----c-----
----- FR2-IMGT ----->----- CDR	
6-G2L	tggttgttacagagccaggccagctctccaaagcgctaatactat XXXXXX.....
Z72384 Musmus IGKV1-135*01 F	-----g-----g-----
Z72382 Musmus IGKV1-133*01 F	-----a-----g-----g-----

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

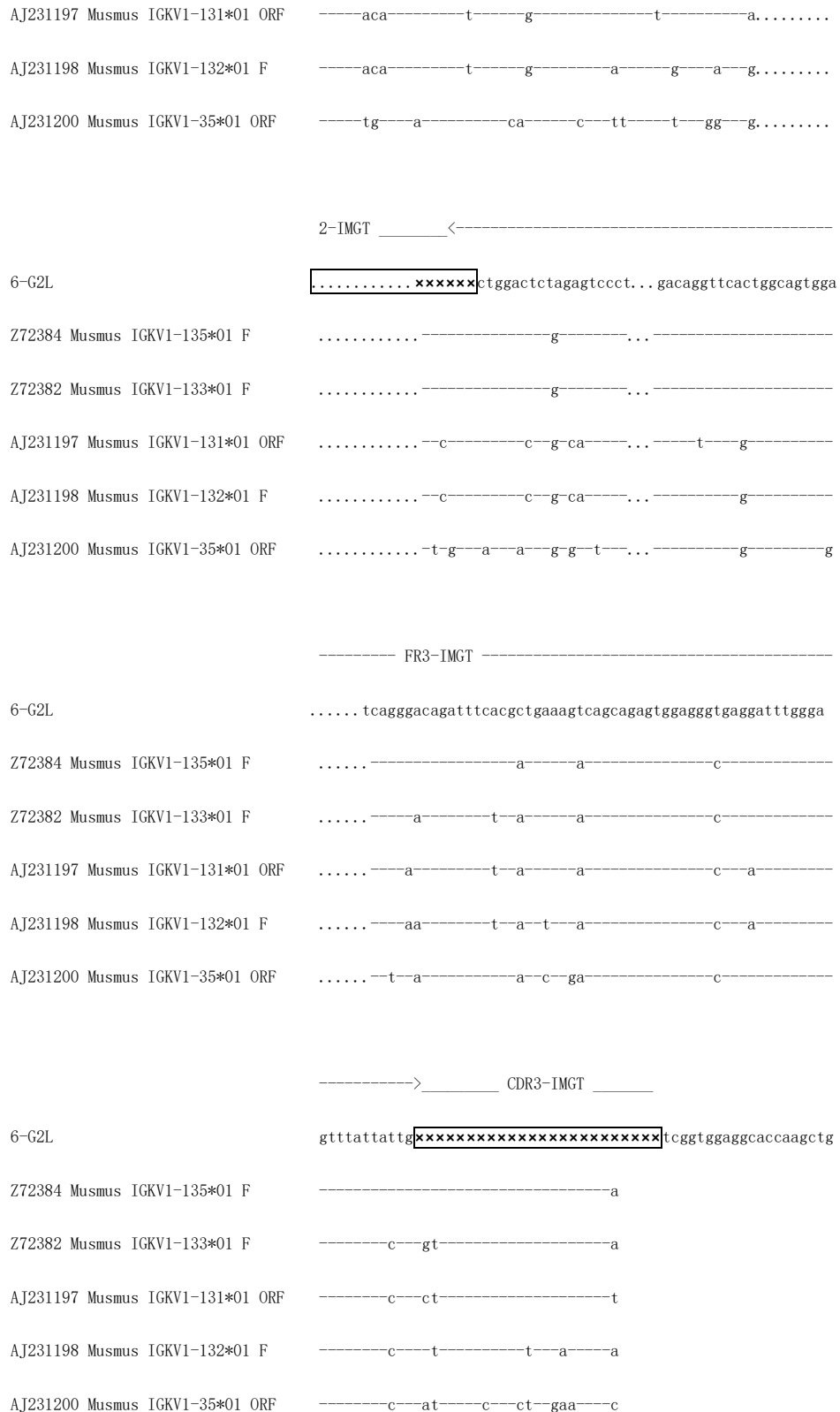


图 2.9 6-G2 单抗轻链可变区核苷酸序列同源性比对分析
Fig 2.9. Nucleotide sequence homology analysis of the light chain variable region of 6-G2 mAb

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

3.4 ch6-G2 单抗基因序列

将6-G2单抗的重轻链可变区序列与人的IgG恒定区序列进行拼接，并加上相应的信号肽和酶切位点等，经过密码子优化后克隆至pcDNA3.4表达载体，构建重组表达质粒。拼接完成后的ch6-G2单抗重链全长1 407 bp，轻链全长726 bp。

Signal sequence-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-Constant region

```
1      TCT AGA GCC ACC ATG GGC TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTC CTG GTG GCC ACA GCT ACC GGC
1      Ser Arg Ala Thr MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

61     GTG CAC AGC CAA ATC CAG CTG GTG CAG AGC GGC CCT GAG CTG AAG AAG CCC GGC GAG ACA
21     Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr

121    GTG AAG ATC TCC TGC AAG GCC AGC [xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx] ATG AAC TGG GTC
41     Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser [xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx] MET Asn Trp Val

181    AAG CAG GCC CCT GGC AAG GAC CTC AAA TGG CTG GGA TGG [xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx]
61     Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Trp Leu Gly Trp [xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx]

241    [xxx] ACC TAC GCC GAC GAC TTC AAG GGC AGA TTC GCC TTC AGC CTG GAA ACC AGC GCT TCT
81     [xxx] Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser

301    ACA GCC TAC CTG CAG ATC AAC AAC CTG AAG AAC GAG GAT ACC GCC ACC TAC TTC TGT [xxx]
101    Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys [xxx]

361    [xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx] GGA CAG GGC ACC ACC CTG ACC GTG TCC TCC
121    [xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx] Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

421    GCC TCC ACC AAG GGA CCT AGC GTC TTT CCT CTG GCC CCT TCT TCT AAG TCT ACC AGC GGA
141    Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
```

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

481 GGA ACA GCC GCC CTC GGG TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCT GAG CCT GTG ACA GTG TCC
161 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

541 TGG AAC TCC GGC GCT CTG ACC TCT GGC GTG CAT ACC TTC CCC GCT GTG CTG CAG TCC AGC
181 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

601 GGC CTG TAT AGC CTG AGC TCC GTG GTT ACC GTG CCT TCC TCG TCT CTG GGC ACC CAG ACC
201 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

661 TAC ATC TGC AAC GTG AAC CAC AAG CCT AGC AAC ACC AAA GTG GAC AAG AAA GTA GAA CCC
221 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

721 AAG TCC TGC GAC AAG ACC CAC ACC TGT CCA CCT TGT CCT GCT CCT GAA CTG CTG GGC GGC
241 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

781 CCA AGC GTG TTT CTG TTC CCA CCT AAG CCC AAG GAT ACT CTG ATG ATC AGC AGA ACA CCA
261 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu MET Ile Ser Arg Thr Pro

841 GAG GTG ACC TGC GTG GTG GTC GAC GTG AGC CAC GAG GAC CCC GAA GTG AAG TTC AAC TGG
281 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

901 TAC GTG GAC GGC GTG GAA GTG CAC AAC GCC AAG ACC AAG CCT AGA GAG GAA CAG TAC AAC
301 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

961 AGC ACA TAC AGA GTG GTG TCT GTG CTG ACC GTG CTG CAC CAG GAT TGG CTG AAC GGC AAA
321 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

1021 GAG TAC AAG TGC AAG GTG TCC AAC AAG GCC CTG CCC GCT CCC ATC GAG AAG ACC ATC TCT
341 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

```
1081   AAA GCC AAG GGC CAG CCT CGG GAA CCT CAA GTG TAC ACC CTG CCT CCT TCT CGG GAC GAG
361   Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

1141   CTG ACA AAG AAT CAG GTG TCC CTG ACC TGT CTG GTC AAG GGC TTC TAC CCT TCC GAC ATC
381   Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

1201   GCC GTG GAG TGG GAG TCT AAT GGC CAG CCC GAG AAC AAC TAC AAA ACC ACC CCT CCC GTG
401   Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

1261   CTG GAC TCT GAT GGC AGC TTC TTC CTG TAC AGC AAG CTG ACC GTG GAT AAA TCC AGA TGG
421   Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

1321   CAG CAG GGC AAC GTG TTC AGC TGC AGC GTG ATG CAC GAG GCC CTG CAC AAT CAC TAC ACA
441   Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val MET His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

1381   CAG AAG TCA CTC TCC CTG AGC CCT GGC TAA GCG GCC
461   Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly *** Ala Ala
```

图2.10 ch6-G2单抗重链全长序列

Fig 2.10. The full-length sequence of the heavy chain of ch6-G2 mAb

Signal sequence-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-Constant region

```
1   AAG CTT GCC ACC ATG GGC TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTC CTG GTG GCT ACA GCC ACC GGC
1   Lys Leu Ala Thr MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

61   GTG CAC AGC GAT GTG GTG ATG ACC CAG ACC CCT CTG ACC TTG TCC GTG ACC ATC GGC CAG
21   Val His Ser Asp Val Val MET Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln

121  CCT GCC TCT ATC AGC TGC AAG TCC AGC xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx
41   Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx
```


武汉生物制品研究所 2021 届硕士学位论文

181 CTG AAC TGG CTG CTG CAG AGA CCT GGA CAA TCT CCA AAG CGG CTG ATC TAC xxx xxx xxx

61 Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr xxx xxx xxx

241 xxx CTG GAC AGC AGA GTG CCC GAC AGA TTT ACA GGC AGC GGC TCT GGC ACA GAC TTC ACC

81 xxx Leu Asp Ser Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

301 CTG AAG GTG TCC CGG GTG GAA GGC GAG GAC CTG GGC GTG TAC TAC TGT TGG xxx xxx xxx

101 Leu Lys Val Ser Arg Val Glu Gly Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp xxx xxx xxx

361 xxx xxx xxx xxx xxx TTC GGC GGC GGA ACC AAG CTG GAG ATC AAG AGA ACC GTG GCC GCT

121 xxx xxx xxx xxx xxx Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

421 CCA TCC GTG TTC ATC TTT CCT CCT AGC GAT GAA CAG CTG AAG TCC GGC ACC GCT TCT GTG

141 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val

481 GTG TGC CTG CTG AAC AAC TTC TAC CCC AGA GAG GCC AAG GTG CAG TGG AAA GTG GAC AAC

161 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

541 GCC CTG CAG AGC GGA AAT AGC CAA GAG AGC GTC ACC GAG CAG GAC TCC AAG GAC AGC ACC

181 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

601 TAC AGC CTG TCT TCT ACA CTG ACC CTG TCC AAG GCC GAC TAC GAA AAG CAC AAG GTG TAC

201 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

661 GCC TGT GAA GTG ACC CAC CAG GGC CTG TCT AGC CCT GTC ACC AAG TCC TTC AAC CGG GGC

221 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly

721 GAG TGC TAA GAA TTC

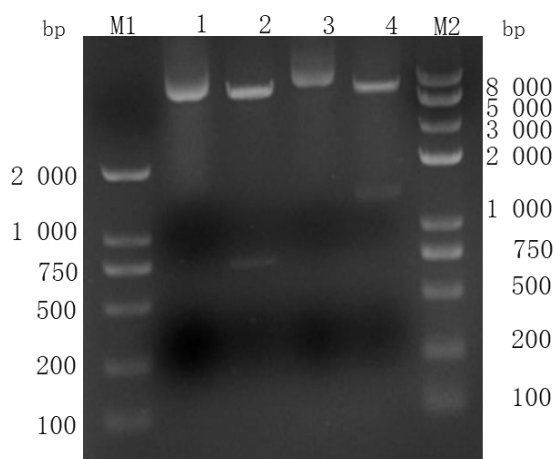
241 Glu Cys *** Glu Phe

图2.11 ch6-G2单抗轻链全长序列

Fig 2.11. The full-length sequence of the light chain of ch6-G2 mAb

3.5 ch6-G2 单抗重组表达质粒双酶切验证

将得到 ch6-G2 单抗重组表达质粒进行 Xba I 和 EcoR V 双酶切验证, 酶切产物进行 1% 的琼脂糖电泳, 结果如下图 2.12 所示, 双酶切后, 重组表达质粒重轻链分别在约 1 400 bp 和 750 bp 大小处均出现明显条带, 酶切验证正确。



[注]: M1: DL2 000 marker; 1: 轻链未酶切质粒; 2: 轻链酶切后质粒; 3: 重链未酶切质粒; 4: 重链酶切后质粒; M2: DL 8 000 marker

图 2.12 ch6-G2 单抗重组表达质粒的酶切验证

Fig 2.12. Restriction digestion verification of ch6-G2 mAb recombinant expression plasmid

3.6 ch6-G2 单抗的亲纯化

将瞬时转染 Expi293F 细胞所得的细胞上清经过离心和 0.22 μm 滤膜过滤后, 使用 Protein A 亲和层析纯化, ch6-G2 单抗纯化图谱如下图 2.13 所示, 可见明显的洗脱峰, 表明该蛋白表达成功。

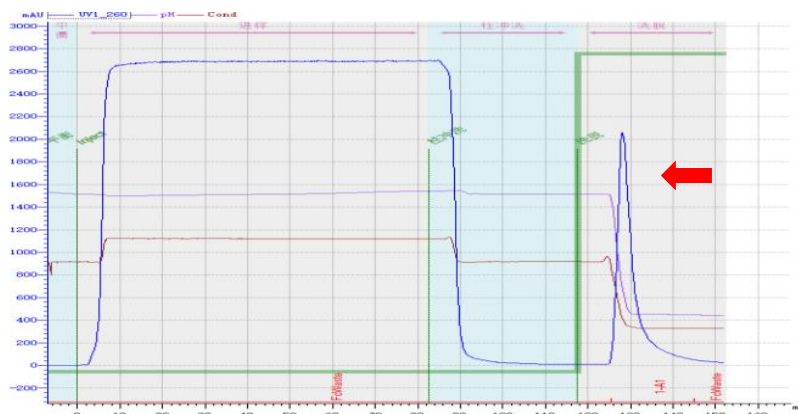
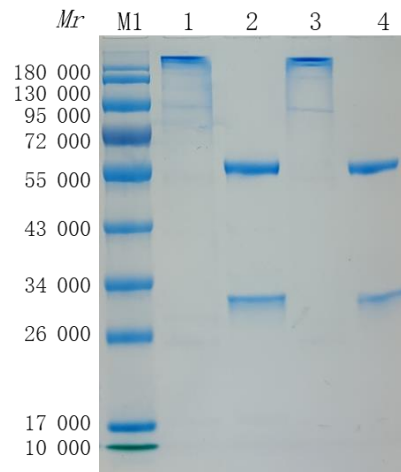


图 2.13 ch6-G2 单抗亲和纯化图谱

Fig 2.13. Affinity purification map of ch6-G2 mAb

3.7 ch6-G2 单抗的 SDS-PAGE 验证

将纯化得到的 ch6-G2 单抗进行 SDS-PAGE 验证,结果显示,单抗纯度较高,经 AlphaView SA 软件扫描显示, ch6-G2 单抗还原型纯度达到 95%以上,非还原型纯度达到 93%以上,单抗的重轻链大小与理论分子量一致。



[注]: M1: 180 000 marker; 1: ch6-G2 单抗非还原; 2: ch6-G2 单抗还原; 3、4: 参照抗体对照

图 2.14 ch6-G2 单抗 SDS-PAGE 验证

Fig 2.14. SDS-PAGE verification of ch6-G2 mAb

3.8 ch6-G2 单抗结合活性检测

ch6-G2 单抗梯度稀释后以 ELISA 检测结合活性,检测结果显示, ch6-G2 单抗与 IL-4R α 结合活性 EC₅₀ 约为 117 ng/mL, 在浓度为 1 250 ng/mL 时达到平台期, 经 GraphPad Prism 软件以四参数拟合 $R^2=0.999$, 见下图 2.15。

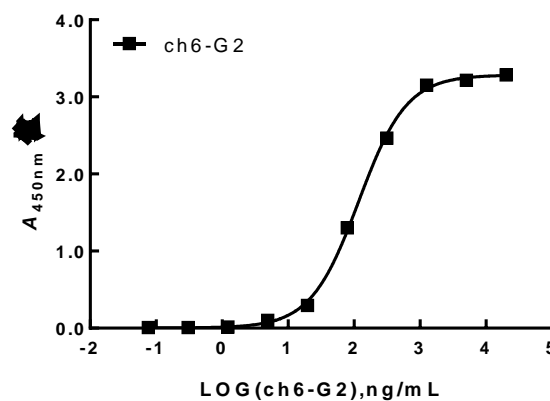


图 2.15 ch6-G2 单抗结合活性检测

Fig 2.15. Detection of binding activity of ch6-G2 mAb

4 小结

4.1 成功从 6-G2 单克隆细胞中提取了细胞总 mRNA，并钓取了 6-G2 单抗的重轻链可变区碱基序列，同源性比对结果显示其为典型的鼠源单抗序列，且重轻链 CDR 区完整。

4.2 成功拼接并构建了 ch6-G2 嵌合单抗表达质粒。

4.3 成功在 Expi293F 细胞中表达了 ch6-G2，经纯化后，SDS-PAGE 检测结果显示 ch6-G2 单抗的纯度较高，且重轻链大小与理论分子量一致。

4.4 ELISA 结合活性检测结果显示，ch6-G2 单抗与 IL-4R α 结合活性 EC₅₀ 约为 117 ng/mL。

总结和讨论

1 全文总结

1.1 本课题成功构建了 IL-4R α /pcDNA3.1 (+) 重组表达质粒, 瞬时转染 Expi293F 细胞后, 经过镍柱和分子筛纯化并经 SDS-PAGE 和 WB 鉴定后, 确定获得了纯度大于 95% 的 IL-4R α 。

1.2 将制备的 IL-4R α 作为免疫原免疫小鼠, 经过细胞融合、筛选和亚克隆得到 2 株具有结合活性和阻断活性的单克隆细胞株, 分别命名为 6-G2 和 2-E10, 并将 6-G2 制备腹水。

1.3 对纯化后的单抗进行了理化鉴定, 结果显示, 单抗的亚类为 IgG1, 亚型为 κ 链; 单抗的纯度在 93% 以上; 6-G2 单抗结合的是 IL-4R α 抗原的线性表位。

1.4 6-G2 单抗生物学活性分析结果显示, 6-G2 单抗与 IL-4R α ELISA 结合活性 EC50 为 10.4 ng/mL, 结合活性较高; 同时对 IL-4 和 IL-13 均具有良好的阻断活性。

1.5 成功提取了 6-G2 单克隆细胞株的总 mRNA, 并钓取了 6-G2 单抗的重轻链可变区碱基序列, 同源性比对结果显示为典型的鼠源单抗序列, 且序列重轻链 CDR 区完整。

1.6 成功构建了人鼠嵌合单抗 ch6-G2 的重组表达质粒, 在 Expi293F 细胞中表达后, 经过纯化获得了 ch6-G2 单抗, 并对该单抗的纯度和结合活性进行了初步鉴定, 为后续抗 IL-4R α 人源化治疗性抗体药物的开发奠定了一定的基础。

2 讨论

2.1 IL-4R α 蛋白的表达与糖基化修饰

蛋白质在生命体内的转化是一个复杂的动态变化过程, 其中存在包括磷酸化、乙酰化、糖基化、泛素化等 20 种以上的翻译后修饰, 而糖基化修饰是最主要的翻译后修饰之一, 50% 以上的蛋白质存在糖基化现象, 根据不同的糖类修饰形式可以把蛋白质糖基化分成 O 位糖基化、N 位糖基化、C 位糖基化和糖基磷脂酰肌醇等四类^[29]。本课题构建的 IL-4R α /pcDNA3.1 (+) 重组表达质粒目的序列全长为 828 bp, IL-4R α 理论分子质量大约为 30 000, 根据 Uniprot 数据库分析显示,

IL-4R α 主要以 N 糖修饰为主, SDS-PAGE 结果显示, 表达的蛋白相对分子质量大约在 40 000~55 000 左右, 酶切后蛋白相对分子质量约为 30 000, 与理论分子量一致, 且糖苷酶酶切前后的蛋白 WB 检测结果显示, 在理论分子量大小处均出现特异性条带, 表明该蛋白表达成功。

另外本课题表达的 IL-4R α 与购买的商品化蛋白相比, 采用的是相同的氨基酸序列, 但表达后从电泳结果看, 条带弥散程度相对更高, 表明两者糖基化修饰有一定差异。研究表明, 蛋白的糖基化修饰与所用的表达体系和培养条件密切相关^[29]。本课题表达的 IL-4R α 采用的是 Expi293F 表达体系, 而购买的商品化蛋白采用的是 HEK293 表达体系; 其次, 本课题 Expi293F 细胞采用的是 Expi293TM 表达培养基悬浮培养, 而 HEK293 细胞采用的是 DMEM 培养基贴壁培养。本课题制备的 IL-4R α 糖基化弥散程度更高可能为以上所用的表达体系及培养条件不同的原因。

2.2 抗 IL-4R α 单抗阻断活性的评价

在阻断性抗体药物开发中, 所筛选的抗体是否具有较强的阻断活性, 是其能否开发成药的基础。在本课题 6-G2 单抗阻断活性的评价上, 我们采用了竞争 ELISA 法、基于高表达 IL-4R 的 RD 细胞^[28]的流式细胞法, 以及基于 TF-1 细胞的细胞增殖抑制法。

在竞争 ELISA 法中, 6-G2 单抗对 IL-4 与 IL-4R α 结合的最高抑制率为 27%, 未能实现完全阻断, 可能与该单抗结合 IL-4R α 的亲合力, 以及单抗结合的表位有关。在流式细胞法, 6-G2 单抗几乎可以完全阻断 IL-13 与 RD 细胞上的 IL-4R 结合, 提示该单抗可能是通过与 IL-4R α 结合, 进而通过空间位阻效应来阻断两者的结合。另外在该方法检测 6-G2 单抗对 IL-4 与 RD 细胞上的 IL-4R α 结合的阻断活性时, 我们将 IL-4 与 RD 细胞共孵育后, 再加入 APC anti-human IL-4 共孵育, 但几乎检测不到 APC anti-human IL-4 的荧光 (实验结果未展示), 可能是由于 APC anti-human IL-4 单抗与 IL-4R α 正好结合的是 IL-4 上的同一位点。

TF-1 细胞也高表达 IL-4R, 细胞因子如 IL-4、IL-13 等能与细胞上 IL-4R 结合, 进而明显促进该细胞增殖^[30]。本研究同时表明, 相同浓度下, IL-4 对该细胞增殖的促进作用要强于 IL-13。我们制备的 6-G2 单抗, 通过结合细胞表面的

IL-4R，从而阻断 IL-4 及 IL-13 与 IL-4R 结合，进而抑制细胞的增殖。

2.3 人鼠嵌合改造对单抗结合活性的影响

人鼠嵌合单抗是将鼠源单抗的可变区 (Variable region, V 区) 与人源单抗的恒定区 (Constant region, C 区) 使用 DNA 重组技术进行拼接, 并构建到表达载体中, 转染哺乳动物细胞表达所得。相较于鼠源亲本单抗而言, 人鼠嵌合改造后的单抗, 理论上保留了该单抗特异性结合抗原的能力, 同时降低了抗体药物用于人体治疗时, 其作为异源性蛋白的免疫原性。

然而, 本课题构建表达的人鼠嵌合单抗 ch6-G2, 与鼠源亲本单抗 6-G2 相比, 与 IL-4R α 结合活性有一定程度的下降。考虑导致这一结果的原因一方面是抗原虽是由单抗的 V 区识别, 但抗体 C 区序列也可能对抗体 V 区的空间构象有一定影响。另一方面, 如前文提及, 不同细胞系表达的蛋白在氨基酸翻译后修饰方面会存在差别, 进而影响蛋白的空间构象及活性^[31]。本课题制备的鼠源亲本单抗 6-G2 由杂交瘤细胞分泌, 而人鼠嵌合单抗 ch6-G2 由 Expi293F 细胞表达, 这可能导致了两者与抗原在结合活性上的差异。

3 课题不足之处及下一步的工作计划

本课题尚存在一些不足之处, 比如筛选到的具有高阻断活性的抗体较少; 改造后的 ch6-G2 单抗亲和力需要进一步提高, 其体外生物学活性也有待进一步鉴定。后续我们将尝试对该嵌合单抗序列进行进一步人源化改造, 并采用氨基酸定点突变、抗体亲和力成熟^[32]等手段提高人源化改造后抗体的亲和力, 以期进一步提高该抗体的阻断活性, 从而增加该抗体的成药可能性。

参考文献

- [1] Holloway J, Holgate S, Andrews A, et al. IL-4 receptor alpha is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets.[J]. The Journal of Immunology, 2006,176(12):7456-7461.
- [2] Sherry L, LaPorte Z, Sean J, et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the Interleukin-4/13 system[J]. Cell,2008,132(2):259-272.
- [3] Vatrella A, Fabozzi I, Calabrese C, et al. Dupilumab: a novel treatment for asthma[J]. Journal of Asthma and Allergy, 2014,7:123-130.
- [4] Hong-Erh L, Jennifer B, Brandon M, et al. Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity[J]. Nature Immunology, 2012,13(1):58-66.
- [5] Komai-Koma M, Brombacher F, Pushparaj P, et al. Interleukin-33 amplifies IgE synthesis and triggers mast cell degranulation via interleukin-4 in naive mice[J]. Allergy, 2012,67(9):1118-1126.
- [6] Michael R, Ardern J, Antony P, et al. Bacterial superantigen facilitates epithelial presentation of allergen to T helper 2 cells[J]. The National Academy of Sciences, 2007,104(13):5557-5562.
- [7] Tachdjian R, Mathias C, Khatib S A, et al. Pathogenicity of a disease-associated human IL-4 receptor allele in experimental asthma[J]. Journal of Experimental Medicine, 2009,206(10):2191-2204.
- [8] Tsoumakidou M, Tzanakis N, Chrysofakis G, et al. Changes in sputum T-lymphocyte subpopulations at the onset of severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respiratory Medicine, 2004,99(5):572-579.
- [9] Kewu H, Ting Y, Jianying X, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study[J]. The Lancet, 2019.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31147-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31147-X).
- [10] Laughter D, Istvan J A, et al. The prevalence of atopic dermatitis in Oregon schoolchildren[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2000,43(4):649-655.
- [11] Hart T K, Blackburn M N, Brigham-Burke M, et al. Preclinical efficacy and safety of pascalizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2010,130(1):93-100.
- [12] Christopher E, Pascal C, Richard L, et al. Efficacy and safety of tralokinumab in patients

with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial[J].

Lancet Respiratory Medicine, 2015. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00197-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00197-6).

[13] Peter M, Dieter M, Brigitte K, et al. Omalizumab therapy in atopic dermatitis: depletion of IgE does not improve the clinical course – a randomized, placebo-controlled and double blind pilot study[J]. Society Dermatology, 2010,8(12):990-998.

[14] Lisa A, Beck M, Diamant T, et al. Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis[J]. The New England Journal Medicine, 2014,371(2):130-139.

[15] Yutaka H, Yasuko A, Peter M, et al. The Th2 cytokine, interleukin-4, abrogates the cohesion of normal stratum corneum in mice: implications for pathogenesis of atopic dermatitis[J]. Experimental Dermatology, 2013,22(1):30-35.

[16] Eri S, Naoki Y, Ayumi S, et al. Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: An implication for the disrupted barrier mechanism in atopic dermatitis[J]. Journal of Dermatological Science, 2012,68(1):25-35.

[17] Todaro M, Lombardo Y, Francipane M G, et al. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4[J]. Cell Death & Differentiation, 2008,15(4):762.

[18] Fernando O. Martinez L H, Gordon A S, et al. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective[J]. Annual Review of Immunology, 2009,27:451-483.

[19] Liangying Z, Liangying Z, Xiang C, et al. M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway[J]. Cell Biology International, 2017,41(9):960-968.

[20] Angela M, Groves C J, Johnston R S, et al. Effects of IL-4 on pulmonary fibrosis and the accumulation and phenotype of macrophage subpopulations following thoracic irradiation[J]. International Journal of Radiation Biology, 2016,92(12):754-765.

[21] Hart T K, Blackburn M N, Brigham-Burke M, et al. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2010,130(1):93-100.

[22] Alessandro V, Immacolata F, Cecilia C, et al. Dupilumab: a novel treatment for asthma[J]. Journal of Asthma and Allergy, 2014,7:123-130.

[23] Beck L A, Thaci D, Hamilton J D, et al. Dupilumab treatment in adults with

- moderate-to-severe atopic dermatitis[J]. The New England Journal of Medicine,, 2014,371(2):130-139.
- [24] Clifffel D E,Venmar K T, Kimmel D W, et al. IL-4 receptor a mediates enhanced glucose and glutamine metabolism to support breast cancer growth[J]. Molecular Cell Research, 2015,1853(5):1219-1228.
- [25] Hetvi G, Remigiusz W, Kristina K, et al. Dynamics and interaction of interleukin-4 receptor subunits in living cells[J]. Biophysical Journal, 2014,107(11):2515-2527.
- [26] Porter H A, Perry A, Kingsley C, et al. IRS1 is highly expressed in localized breast tumors and regulates the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapy, while IRS2 is highly expressed in invasive breast tumors[J]. Cancer Letters, 2013,338(2):239-248.
- [27] Changkuo G, Yuming O, Jing C, et al. High expression of IL-4R enhances proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells[J]. International Journal of Biological Markers, 2017,32(4):e384.
- [28] Hosoyama T, Aslam M I, Abraham J, et al. IL-4R drives dedifferentiation, mitogenesis and metastasis in rhabdomyosarcoma[J]. Clinical Cancer Research, 2011,17(9):2757-2766.
- [29] 陈玉银, 李军, 杜鑫. 蛋白质糖基化修饰研究进展[J]. 科技通报, 2009,25(6).773-783
- [30] Lefort S, Vita N, Reeb R, et al. IL-13 and IL-4 share signal transduction elements as well as receptor components in TF-1 cells[J]. Febs Letters, 1995,366.
- [31] 郭会灿. 蛋白质翻译后修饰研究进展[J]. 生物技术通报, 2011,50(007):18-21.
- [32] 林周, 黎燕, 沈倍奋. 体外抗体亲和力成熟的几种策略[J]. 军事医学, 2004,28(3):292-294.

硕士研究生在读期间发表论文

1. 《抗 HIV 抗体药物研究进展》，陈莹，潘勇兵。《国际生物制品学杂志》，2019，42(6), 284-288。
2. 《IL-4R α 胞外段的真核表达及鼠源单克隆抗体的制备与鉴定》，陈莹，詹珊珊，吴小丽，桂芳，宋刚，潘勇兵。《微生物学免疫学进展》，2021，49(2), 28-34。

致谢

感谢武汉生物制品研究所给我们提供了良好的科研条件和安静的学习环境。

感谢我的导师潘勇兵老师对我的悉心指导，潘老师以他渊博的学识修养，严谨求实的科研态度和谦逊的品格给我树立了良好的精神导向，并在我的论文选题，实验设计和论文修改等方面提出了宝贵的意见。

感谢抗体研究室全体成员，感谢张因老师对我的论文提出指导意见，感谢桂芳、詹珊珊、吴小丽、邓小杰、唐杰、陈琴等师姐和宋刚、王炯、敬兆飞、杨溢民、刘建邦等师兄在实验过程中给予的教导和帮助。

感谢段凯总经理，李新国副总经理，韩会珍老师，成立老师对我们学习和生活上的帮助和关心。

感谢父母及家人，感谢陈子逸同志，纵使工作繁忙，依旧一如既往地关心我的学习和生活，给予我莫大的鼓励和支持。

最后，衷心感谢各位老师百忙之中审阅我的论文并予以指导。