

· 基础研究 ·

## 抗组氨酸标签单克隆抗体的制备、鉴定及应用\*

戚大梁, 王 强, 易维京<sup>△</sup>

(解放军第八二医院一四九临床部, 江苏连云港 222042)

**摘要:**目的 制备特异性抗组氨酸标签(His-tag)的单克隆抗体(mAb)并进行鉴定。方法 以合成的 15 个组氨酸的多肽耦联牛血清清蛋白(BSA)为抗原免疫 Balb/c 小鼠,按常规方法进行细胞融合。采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选阳性克隆及有限稀释法进行克隆化,用 Protein G 柱亲和纯化抗体及 ELISA 检测纯化抗体的效价、相对亲和力及抗体亚类,用 ELISA 及 Western blotting 对 mAb 的特异性进行鉴定,并与含 His-tag 的重组蛋白特异性抗体配对建立双抗夹心 ELISA 定量检测对应的重组蛋白。结果 筛选出 5 株能稳定分泌抗 His-tag 的杂交瘤细胞株,抗体亚类均为 IgG1( $\kappa$ ),其中 1-G2 亲和力最高( $1.27 \times 10^{10}$ ),并且 1-G2 在 ELISA 及 Western blotting 中能与不同类型的含 His-tag 的重组蛋白结合,能与降钙素原(PCT)抗体构建双抗夹心 ELISA 定量检测含 His-tag 的 PCT 重组蛋白,灵敏度达到 4.6 ng/mL。结论 成功制备了特异性好、亲和力高、能稳定分泌抗 His-tag 的 mAb,该抗体能应用于 ELISA 及 Western blotting 等多种 His-tag 的检测方法,为蛋白质研究检测、定位、相互作用等提供了工具。

**关键词:**抗体,单克隆;酶联免疫吸附测定;印迹法,蛋白质;组氨酸标签

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)32-3918-03

## Preparation identification and application of monoclonal antibodies against histidine-tag\*

Qi Daliang, Wang Qiang, Yi Weijing<sup>△</sup>

(No. 149 Clinical Division, 82th Hospital of People's Liberation Army, Lianyungang, Jiangsu 222042, China)

**Abstract: Objective** To prepare and identify monoclonal antibodies (mAb) against histidine-tag (His-tag). **Methods** Balb/c mice were immunized with polypeptides containing 15 histidine(His)-coupled BSA and this fusion was prepared according to conventional methods. Indirect ELISA was used to screen the positive clones and limited dilution for further cloning. After purified with Protein G affinity chromatography, these antibodies for His-tag were detected for antibody titer, relative affinity as well as subtypes by using ELISA. The specificity of these mAb was identified by ELISA and Western blotting analysis. Double-antibody sandwich ELISA was composed of these mAb paired with the corresponding recombinant protein of specific antibody, which was used to detect the recombinant protein quantitatively. **Results** 5 hybridoma cell lines stably secreting anti-His-tag IgG1( $\kappa$ ) were screened. Among these antibodies, 1-G2 was of the highest affinity, reaching  $1.27 \times 10^{10}$ , which could combine with different recombinant proteins containing His-tag in the experiment of ELISA and Western blotting. 1-G2 also could be used to detect recombinant PCT protein containing His-tag quantitatively by using double-antibody sandwich ELISA with antibody of PCT, the sensitivity of detection reached 4.6 ng/mL. **Conclusion** The mAb against for His-tag with high specificity, affinity and secreted stably are successfully prepared. This prepared antibody could be used in ELISA and Western blotting to detect a variety of His-tag.

**Key words:** monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; blotting, western; histidine tags

抗组氨酸标签(histidine-tag, His-tag)是由 6 个或 6 个以上组氨酸组成的短肽,其主要用途是用于表达分子构建融合蛋白的快速分离及纯化,与其他标签相比具有相对分子质量小、免疫原性弱,不影响目的分子空间构型等优势。利用 His-tag 亲和镍离子螯合物的特性,采用固定化金属离子亲和层析即可一步快速纯化获得较高纯度的重组蛋白,是目前蛋白纯化融合标签中使用最为广泛的一种<sup>[1-2]</sup>。

His-tag 抗体可用于与 His 标签融合表达蛋白的表达和细胞内定位的检测,以及纯化、定性或定量检测 His 融合表达蛋白等<sup>[3-4]</sup>。目前商品化 His-tag 的单克隆抗体种类较多,价格虽然不十分昂贵,在 Western blotting、免疫组化、直接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测等用量少的实验中,购买抗体可以满足实验。但在用 His-tag 抗体进行免疫亲和层析及双抗夹心 ELISA 检测等抗体需求量较大的实验中,购买抗体则成本非

常高。因此,满足实验室大规模 His-tag 抗体的需求,稳定生产 His-tag 单克隆抗体具有重要意义及经济价值。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 材料** 聚组氨酸 15 肽由上海吉尔生化合成并耦联 BSA;免疫用 Balb/c 小鼠来自第三军医大学动物中心;Sp2/0 细胞和实验涉及各类重组蛋白及相应抗体均由第三军医大学检验系临床生物化学教研室提供。

**1.1.2 试剂** Chelating Sepharose Fast Flow, rProteinG Sepharose Fast Flow 等纯化所用层析柱及填料均购自 Amersham 公司;RPMI-1640 培养基、新生胎牛血清(FBS)为 Gibco 公司产品;免疫佐剂及抗体亚类试剂盒购自 Sigma 公司;HRP 标记的羊抗小鼠购自北京中杉金桥生物技术有限公司;标记用 HRP 购自北京鼎国生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯,

\* 基金项目:全军医药卫生科研资助项目(11MA048)。 作者简介:戚大梁(1962~),副主任技师,本科,主要从事临床检验诊断工作。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: yiweijing149@163.com。

实验用水为去离子双蒸水。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫及免疫效价测定 取耦联好 BSA 的聚组氨酸 15 肽与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,注射入健康 Balb/c 小鼠四肢及腹腔内,0.2 mL/只,抗原量每只为 100 μg;首次免疫 14 d 后,改用弗氏不完全佐剂与同体积的抗原量充分乳化进行第 2 次免疫,抗原量不变;第 28 天,按照每只 100 μg 抗原量对小鼠进行第 3 次免疫;3 次免疫后 7 d 对小鼠尾静脉采血,用含 His-tag 的重组蛋白包板,采用 ELISA 方法检测免疫效价。每 2 周 1 次持续免疫直到效价达到 1:128 000 以上时准备融合;融合前 3 d,再用每只 100 μg 的抗原量进行加强免疫。

1.2.2 杂交瘤细胞株的建立及抗体制备 在细胞融合后的第 10~14 天,用含有 His-tag 的重组蛋白包板,采用间接 ELISA 的方法筛选阳性克隆,阳性克隆经 3~4 次克隆化后,检测阳性率接近 100%,即可冻存细胞,并进行扩大化培养。向健康雌性 Balb/c 小鼠腹腔内注射高压灭菌后的石蜡油,每只 0.4 mL。1 周后,再向其腹腔注射能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞,每只 0.5 mL(细胞数约为 2×10<sup>6</sup> 个)。10~14 d 后,开始收集腹腔积液,采用二氧化硅去除脂肪和石蜡油,收集澄清腹腔积液,并用间接 ELISA 测定腹腔积液效价。将腹水采用 Protein G 柱亲和纯化获得抗体并采用 Lowry 法测定蛋白浓度。

1.2.3 抗体亚类及亲和力测定 采用抗体亚类鉴定试剂盒(Sigma)测定抗体亚类,严格按照说明书操作步骤进行测定。抗体亲和力测定参照以下方法:分别用 1、2、5 mg/L 的耦联好 BSA 的聚组氨酸 15 肽包被酶标板,与不同稀释度的单抗孵育后,加入一定稀释度的 HRP 标记的羊抗鼠二抗,洗板显色后测定各孔的 A<sub>450</sub> 值。然后以各孔稀释抗体的浓度为横坐标,以其相应的 A 值为纵坐标,绘制 3 条测定曲线,以各曲线上部趋于平坦的 A 值为 100%,计算 A 值为 50% 时的单克隆抗体的浓度 [Ab]<sub>t</sub>,这样每份被检样品可得 [Ab]<sub>t1</sub>、[Ab]<sub>t2</sub>、[Ab]<sub>t3</sub> 3 个值,然后根据文献公式计算出其亲和常数<sup>[5-6]</sup>。选择亲和力最高的 1 株进行 ELISA 及 Western Blotting 鉴定。

1.2.4 ELISA 法鉴定抗体的特异性 包被稀释液稀释 9 种不同重组蛋白(2 个不含 His-tag;2 个表达后用胰凝乳酶切除 His-tag;5 个含有 His-tag,其中 2 个 His-tag 位于 N 端,2 个位于中间,1 个位于 C 端),稀释浓度为 5 μg/mL,每孔加入 100 μL,4 ℃ 包被过夜。取纯化的单抗用抗体稀释液稀释成不同浓度,37 ℃ 孵育 1 h,每孔加工作浓度的酶标二抗 100 μL,37 ℃ 1 h。洗板 TMB 显色后测定其 A<sub>450</sub>。

1.2.5 Western Blotting 鉴定抗体的检测效果 将上述的 9 种不同重组蛋白稀释相同浓度进行 SDS-PAGE 电泳,常规转膜、封闭、孵育抗 His-tag 抗体、洗涤,以山羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体为二抗(1:3 000 稀释),室温下孵育 1 h,PBST 洗涤,常规曝光。取其中 1 种含 His-tag 的重组蛋白稀释一系列浓度进行 Western blotting 测定其检测灵敏度。

1.2.6 双抗夹心 ELISA 检测方法的建立及评价 将制备的抗 His-tag 单抗采用改良的高碘酸法标记 HRP 后,与 PCT 特异性单克隆抗体配对,建立双抗体夹心法检测含有 His-tag 的 PCT 重组抗原。方法如下:按 5 μg/mL 包被 PCT 单克隆抗体,用含 1% 的小牛血清 PBS 溶液封闭后,与不同稀释浓度的 PCT 重组抗原在 37 ℃ 孵育 1 h,洗板后与抗体稀释液稀释的 HRP 标记的 His-tag 单抗反应,洗板 TMB 显色后测定 OD<sub>450</sub>,

评价测定效果。

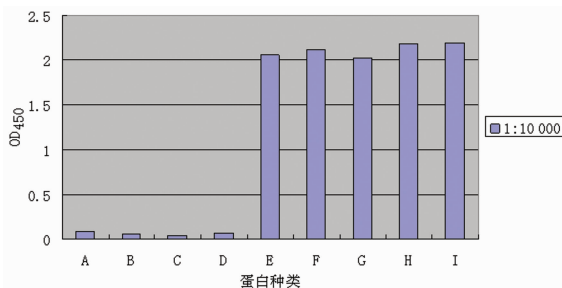
2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立及抗体制备 按常规方法将耦联好 BSA 的聚组氨酸 15 肽免疫小鼠后进行细胞融合,使用含 His-tag 的重组蛋白共筛选出 24 个强阳性及大量弱阳性克隆,保留 8 株强阳性克隆进一步克隆化后,最终 5 株抗体稳定建株,另外 3 株克隆化丢失,见表 1。经 Sigma 抗体亚类鉴定试剂盒测定抗体亚类均为 IgG1(κ)。其中 1-G2 亲和力最高,达到 1.27×10<sup>10</sup>,平均每 mL 腹腔积液抗体产量为 6.5 mg/mL。

表 1 5 株抗 His-tag 单克隆抗体的特性

| 细胞株号  | 抗体亚类    | 腹水抗体产量    | 抗体亲和力                 |
|-------|---------|-----------|-----------------------|
| 1-B7  | IgG1(κ) | 5.9 mg/mL | 5.23×10 <sup>9</sup>  |
| 1-G2  | IgG1(κ) | 6.5 mg/mL | 1.27×10 <sup>10</sup> |
| 2-D11 | IgG1(κ) | 7.5 mg/mL | 2.55×10 <sup>9</sup>  |
| 3-E3  | IgG1(κ) | 5.6 mg/mL | 8.36×10 <sup>8</sup>  |
| 3-D4  | IgG1(κ) | 3.5 mg/mL | 5.69×10 <sup>8</sup>  |

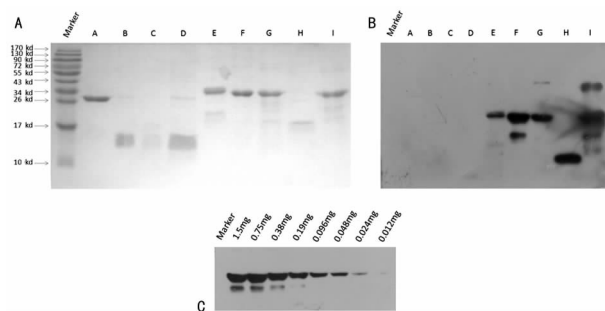
2.2 ELISA 法鉴定抗体的特异性 以下所有鉴定实验均使用 1-G2 抗体株。经 ELISA 法鉴定结果如下:1-G2 与不含及切除 His-tag 的重组蛋白均无结合,与含 His-tag 的重组蛋白均能结合,并且结合与 His-tag 所在的位置无关,证明 1-G2 能特异的识别 His-tag。见图 1。



A、B:不含 His-tag;C、D:切除 His-tag;E、F:N 端含 His-tag;G、H:中间含 His-tag;I:C 端含 His-tag。

图 1 ELISA 法鉴定 1-G2 的特异性

2.3 Western blotting 鉴定抗体的检测效果 Western blotting 鉴定 1-G2 结果与 ELISA 一致,在以上 9 个重组蛋白中,不含以及切除 His-tag 的重组蛋白均无反应,而含 His-tag 的重组蛋白均有很强反应,并且与 His-tag 所在的位置无关,进一步证明 1-G2 能特异的识别 His-tag。将蛋白 E 稀释系列浓度后 Western blotting 测定,在 12 μg/mL 的浓度下有明显条带,具有较好检测灵敏度。见图 2。



A:SDS-PAGE 电泳;B:Western blotting 检测结果;C:Western blotting 检测灵敏度。

图 2 Western blotting 法鉴定 1-G2 的特异性

**2.4 双抗夹心 ELISA 检测方法的建立及评价** 以 PCT 特异性单抗及 1-G2 构建的双抗体夹心 ELISA 检测能有效的测定含 His-tag 重组 PCT 蛋白,对检测数据进行回归分析,得到回归方程为  $Y=0.036\ 13+0.007\ 59X$ ,  $r^2=0.996\ 50$ ,符合线性关系的判断标准,其最低测限为 4.6 ng/mL,最佳检测范围为 10~300 ng/mL。见图 3。

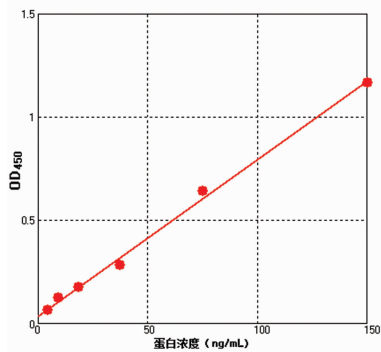


图 3 双抗夹心 ELISA 检测标准曲线

### 3 讨论

融合标签常用于重组蛋白的表达及纯化,通过特异性亲和纯化技术,可以简化重组蛋白的纯化过程,所以适合规模化生产<sup>[7]</sup>。除此之外,在控制蛋白质固定的空间取向及方便检测、使体内生物事件可视化、提高重组蛋白质的产量、增强重组蛋白质的可溶性和稳定性等方面具有的明显优越性,使之成为后基因组时代的重要研究工具<sup>[8-9]</sup>。在众多的融合标签中由于 His-tag 相对分子质量小、免疫原性弱,不影响目的分子空间构型等明显优势,以及利用 His-tag 亲和镍离子螯合物的特性,采用固定化金属离子亲和层析即可一步快速纯化获得较高纯化的重组蛋白,是目前用于纯化的融合标签中使用最为广泛的一种<sup>[10-11]</sup>。

His-tag 抗体可以用于检测和 His 标签融合表达蛋白的表达、细胞内定位,以及纯化、定性或定量检测 His 融合表达蛋白等<sup>[12]</sup>。为了满足大规模 His-tag 抗体使用的需要,必须制备可以稳定分泌抗 His-tag 的单克隆细胞株。按常规方法采用含有 His-tag 的蛋白免疫小鼠,由于 His-tag 相对分子质量小,免疫原性弱的原因很难制备高亲和力的抗体。为此,合成含 15 个聚组氨酸的多肽耦联 BSA 制备的人工抗原免疫原性好,能使机体产生较强的免疫应答。在抗体筛选上采用含 His-tag 的重组蛋白筛选,保证得到的抗体能直接识别重组蛋白上的 His-tag,保证抗体的特异性及检测效果。最终成功的制备效价高、特异性强、亲和力高的抗 His-tag 单克隆抗体。

His-tag 抗体种类繁多,应用途径也十分广泛,因此抗体的质量直接影响检测的效果。作者使用不同的重组蛋白对制备的抗体进行检测,除了鉴定其特异性外,还必须保证制备的抗体能识别在重组蛋白不同位置的 His-tag,同时也保证抗体能在不同的检测方法中有效的识别 His-tag。在 His-tag 抗体的应用上,与常规双抗夹心 ELISA 需一对配对特异性抗体不同,作者仅采用一个特异性抗体,利用 His-tag 抗体标记 HRP 与其配对,即可检测重组蛋白。进一步还可以建立竞争体系检测天然蛋白分子,开辟了一条新的免疫检测途径<sup>[12-13]</sup>。

本研究成功制备了能稳定分泌抗 His-tag 的单克隆细胞株,制备的抗体特异性好,亲和力高,并能用于多种免疫检测,为蛋白质研究中检测、定位、相互作用等提供了强有力的工具。

### 参考文献:

- [1] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60(5): 523-533.
- [2] Vallina-García RM, García-Suárez M, Fernández-Abedul MT, et al. Oriented immobilization of anti-pneumolysin Fab through a histidine tag for electrochemical immunosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23(2): 210-217.
- [3] Loughran ST, Walls D. Purification of poly-histidine-tagged proteins[J]. Methods Mol Biol, 2011, 681(3): 311-335.
- [4] Caswell J, Snoddy P, McMeel D, et al. Production of recombinant proteins in escherichia coli using an N-terminal tag derived from sortase[J]. Protein Expr Purif, 2010, 70(2): 143-150.
- [5] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 33-102.
- [6] Loomans EE, Roelen AJ, Van Damme HS, et al. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(2): 207-217.
- [7] Thorn KS. A novel method of affinity-purifying proteins using a bis-arsenical fluorescein[J]. Protein Sci, 2009, 23(2): 213-217.
- [8] Rogov VV, Rozenknop A, Rogova NY, et al. A universal expression tag for structural and functional studies of proteins[J]. Chembiochem, 2012, 13(7): 959-963.
- [9] 李永进, 陈媛媛, 毕利军. 融合标签技术及其应用[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 523-527.
- [10] Pryor KD, Leiting B. High-level expression of soluble protein in Escherichia coli using a His6-tag and maltose-binding protein double-affinity fusion system[J]. Prot Expr Purif, 1997, 10(3): 309-319.
- [11] Inouye S, Aoyama S, Miyata T, et al. Overexpression and purification of the recombinant Ca<sup>2+</sup> binding protein, apoaequorin[J]. J Biochem, 1989, 105(3): 473-477.
- [12] Gao B, Zhang SD, Hu Y, et al. Expression and secretion of functional recombinant  $\mu$ O-conotoxin MrVIB-His-tag in Escherichia coli[J]. Toxicon, 2013, 10(1): 81-89.
- [13] Huang Y, Shi RN, Zhong XF, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for insulin-like growth factor-I using six-histidine tag fused proteins[J]. Anal Chim Acta, 2007, 596(1): 116-123.