

新技术讲座

生物分子相互作用分析技术应用实例 (一)

——配体垂钓和抗体测定

沈 平

(发玛西亚生物技术(中国)有限公司, 北京 100080)

摘要 BIA 技术 (biomolecular interaction analysis) ——即生物分子相互作用分析技术的应用范围相当广泛. 先介绍利用 BIAcore 分离得到了 ECK-酪氨酸激酶受体的蛋白配体. 另一应用实例是利用 BIAcore 直接从杂交瘤细胞上清液中测定单克隆抗体的活性、亲和力和动态常数.

关键词 受体-配体, BIA 技术, 酪氨酸激酶, 单克隆抗体, 动态常数

1 筛选细胞受体的未知配体

由于 BIA 技术具有在免标记和非纯化的条件下实时测定生物分子结合性的能力, 因此 BIA 技术对于筛选和确定一些孤儿受体 (orphanreceptor) 的未知配体是一必不可少的工具. 这种被称为“配体垂钓” (ligand fishing) 的方法显示利用 BIA 技术可以简便快速地从细胞粗提液或细胞上清液发现及确定细胞受体的配体. 应用发玛西亚生物传感公司发展的 BIA 技术及其仪器 BIAcore 进行“配体垂钓”的优越性和其价值可以从最近发表的多篇文献^[1~3]及下文将简述的由美国 Amersin 药物公司 Bartley 等^[4]发表在“自然”杂志上的论文中得以充分体现.

Bartley 博士带领的研究组利用 BIAcore 具有免标记及快速测定结合力的特点, 发现并确定了一种新的细胞配体. 首先将纯化的受体 ECK 偶联在 BIAcore 的传感片上, 然后用不同细胞株的上清液注射通过传感片表面 (图 1). 这些细胞上清液除经过浓缩和过滤外未经过任何纯化步骤. 一旦得到阳性的结合结果, 与此相应的细胞上清液将用来作为 ECK 亲和层析的材料. 通过这一步纯化 Bartley 研

究组得到足够纯的 ECK 配体用于进行 N 端蛋白质序列分析, 从而确定此配体为 B61. 以前的研究表明 B61 蛋白可被肿瘤坏死因子 (NTF α) 诱导产生, 但从未发现它能和 ECK 类型的酪氨酸激酶受体结合.

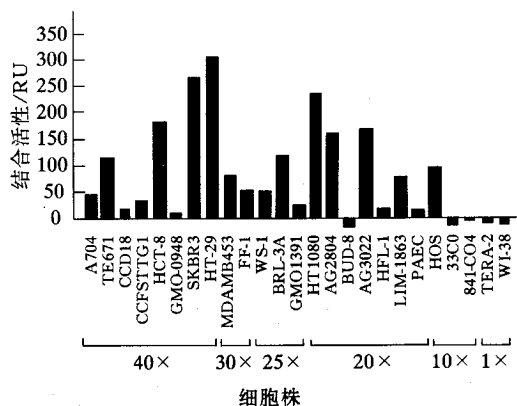


图 1 筛选细胞培养上清液中能 ECK 受体结合活性蛋白

不同细胞株培养上清液经浓缩 10~40 倍 (10 $\times$, 40 $\times$) 后上样流经含 ECK 受体的传感片. 受体结合活性以共振单位 RU 表示. HCT-8 和 SKBR3 细胞株的培养上清液用来进一步纯化配体.

用同样的方法和仪器 BIAcore, 其他研究组发现了 AL-1 蛋白为 EPH 类受体的配体^[2]; 蛋白 S 为 Tyro 受体的配体.

大多数酪氨酸激酶类受体 (孤儿受体) 和细胞的生长, 发育, 特别是和肿瘤的形成及肿瘤基因有关, 因此对它们的研究不仅能得到细胞信号传导、肿瘤发生机理的信息, 而且能发现一些新的蛋白或已知蛋白的新功能, 为肿瘤的治疗提供依据.

BIAcore 还是一个生物活性实时追踪仪, 可通过测定结合活性来追踪复杂的蛋白质纯化过程中所需的具生物活性蛋白存在于哪个组分收集部分及纯化效率.

2 抗原-抗体反应亲和力和反应动态参数测定

测定单克隆抗体与其抗原结合的亲和力和结合过程中的动态参数不仅可研究结构与功能的关系——特别是经过修饰后的抗体或抗原间的结构和功能关系, 并对选择不同的抗体用于不同的用途, 如治疗、检测、诊断等具有非常实用的价值. 利用 BIA 技术进行抗体-抗原的鉴定其优越性表现在: a. 任何样品都无需标记; b. 抗体无需纯化; c. 结合反应能实时追踪; d. 传感片表面能再生, 可在相同条件下比较不同抗体的特性.

这里例举对艾滋病毒单克隆抗体的检测: 首先将抗单克隆抗体的 RAMFc 偶联于传感片上, 然后加入产生单抗的杂交瘤细胞培养上清液. 使单抗以捕获的方式结合在传感片上, 再上样加入 HIV 表面抗原 P24 (图 2). 图 3 显示了 P24 与四种不同单抗反应的传感图. 从图 3 中很直观的可以看出各单抗与 P24 抗原结合的强弱和快慢. 如果控制实验条件使各种单抗结合在传感片表面的量相当, 那么四种单抗与艾滋病毒抗原结合的亲和力依次为 MAb18 > MAb25 > MAb28 > MAb1. 利用仪器配备的评估软件还可精确地计算出抗体抗原反应动力学参数 (表 1). 即使不计算, 直接从传感图中也能半定量地估计四种不同单抗的结合与解

离情况. 如从图 3 可知 MAb18 和 MAb28 与抗原的结合要快于其他的单抗; MAb28 的

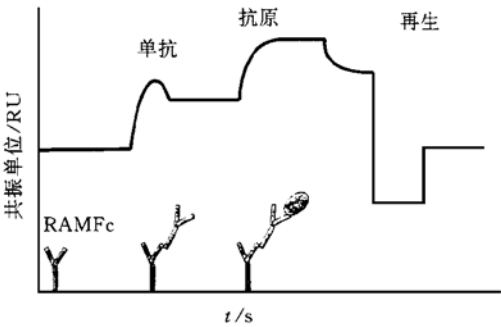


图 2 抗原-抗体在传感片上结合的示意图

抗单抗的抗体 RAMFc 首先偶联于传感片上, 然后将未经纯化的单抗 (细胞上清液) 流经传感片表面, 从而将单抗捕获在传感片上. 加入抗原以测定其与抗体的反应. 最后用洗脱液将结合的单抗与抗原洗脱. 再生的传感片可进行下一轮测定.

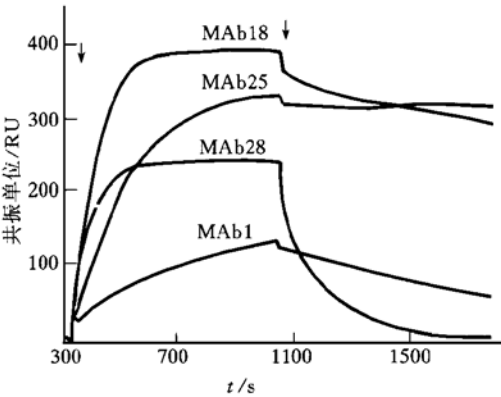


图 3 HIV 抗原与四种不同单抗的结合

此传感图显示了结合在传感片表面的四种单克隆抗体与 P24 抗原的结合和解离情况. 箭头所指为加样开始及结束.

离相当快, 而 MAb25 的结合非常稳定, 解离过程很慢. 从实用情况来说, MAb18 有高亲和力用于治疗或诊断试剂盒的制备. MAb25 与抗原结合稳定可用于需要反复冲洗过程的免疫测定或亲和层析. 所有这些信息都可从直接测定未经任何纯化的杂交瘤培养细胞上清液而得到.

表 1 四种不同单克隆抗体和抗原 P24 的反应动力学常数

MAb	k_a	k_d	k_a/k_d
	$/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$/\text{s}^{-1}$	$/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1	2.8×10^4	9.3×10^{-4}	3.0×10^7
18	2.7×10^5	2.5×10^{-4}	1.1×10^9
25	1.2×10^5	n. d.	n. d.
28	1.4×10^5	5.3×10^{-3}	2.7×10^7

注: k_a : 结合常数; k_d : 解析常数; k_a/k_d : 亲和常数 (K).

参 考 文 献

1 Stitt T N, Conn G M, Lai B J *et al.* The anticoagulation factor protein S and its relative Gas6, are ligands for the Tyro3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 1995, **80**: 661~ 670

2 Lackmann M, Bucci T, Mann R J *et al.* Purification of a ligand for EPH-like receptor HEK using a biosensor based affinity detection approach. *Proc Natl Sci Acad USA*, 1996, **93**: 2523~ 2527

3 Easty D J, Guthrie B A, Maung K *et al.* Expression of B61 and upregulation of its receptor epithelial cell kinase during melanoma progress. *Cancer Research*, 1995, **55**: 2528~ 2532

4 Bartley T D, Hunt R W, Welcher A A *et al.* B61 is a ligand for ECK receptor proteir tyrosine kinases. *Nature*, 1994, **368**: 558~ 560

5 Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L *et al.* Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new Biosenor based analytical system. *J Imm Meth*, 1991, **145**: 229~ 240

Application of Biomolecular Interaction Analysis Technology: Ligand Fishing and Antibody Analysis. SHEN Ping (*Pharmacia Biotech (China) Ltd. Beijing* 100080, China) .

Abstract BIA Technology now is widely used in all kind of Bio-research. It will be found how BIA have been used for ligand fishing to detect and purify the unknown ligand. The other application is to detect the affinity and kinetic information of monoclonal antibody directly from hybridoma supernatant.

Key words receptor-ligand, BIA-technology, tyrosin kinase, monoclonal antibody, kinetic parameter

敬告读者

我刊电子邮箱现已开通，地址如下：

prog @ sun5. ibp. ac. cn

欢迎广大读者和作者通过电子邮件与我们联系或向我刊投稿。