

## 双位酶免疫法测定 NT-3cDNA/CHO 细胞上清中 rNT-3 含量\*

季爱民 李 梅 张忠义 邹恒琴(广州 510282 第一军医大学珠江医院药材料)

**摘要** 目的:定量测定 NT-3cDNA/CHO 细胞培养上清中基因重组 NT-3 的含量。方法:利用 NT-3 的 MoAb,建立了双位 EIA 法。结果:该法检测限为 5.0pg/ml,批内差的变异系数为 6.2%~11.4%( $n=6$ ),批间差变异系数为 5.4%~8.2%( $n=6$ )。4 株阳性细胞培养上清中有高水平的目的产物。结论:该 EIA 法简单准确;用该法成功筛选到一最高表达基因重组 NT-3 的单克隆细胞株。

**关键词** 神经营养蛋白-3;抗 NT-3 单克隆抗体 3 W3;双位酶免疫测定法(EIA)

### Determination of the levels of recombinant neurotrophin 3 in the supernatants of NT-3cDNA/CHO cells by two-site enzyme immunoassay

Ji Aimin (Ji AM), Li Mei (Li M), Zhang Zhongyi (Zhang ZY), et al (Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To determine the levels of recombinant neurotrophin-3 (NT-3) in the supernatants of NT-3cDNA/CHO cells. **METHOD:** A two-site enzyme immunoassay (EIA) method was established using the monoclonal antibody 3 W3. **RESULTS:** The limit of detection of the EIA was 5.0pg NT-3/ml. The coefficients of variation for within- and between-assays were 6.2%~11.4% ( $n=6$ ) and 5.4%~8.2% ( $n=6$ ), respectively. Four strains of NT-3cDNA/CHO cells had expressed high levels of recombinant NT-3. **CONCLUSION:** The EIA method was simple and accurate. We successfully obtained a CHO monoclonal strain expressing the highest level of recombinant NT-3.

**KEY WORDS** neurotrophin-3 (NT-3), anti-NT-3 monoclonal antibody 3 W3, two-site enzyme immunoassay (EIA)

神经营养蛋白-3 (Neurotrophin-3, 简称 NT-3) 是神经营养因子家族成员之一。NT-3 能促进中枢及外周神经系统多种神经元的生存与发育<sup>[1]</sup>。由于天然 NT-3 含量少,不能通过纯化获得其天然产物,为此我们利用基因重组技术,建立了能高水平表达基因重组 NT-3 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系;为了定量筛选阳性细胞株,利用 NT-3 的单克隆抗体 3 W3,建立了双位酶免疫分析法(two-site enzyme immunoassay, EIA),测定了四株阳性细胞的表达水平,得到了最高表达目的蛋白的细胞株,也为测定其它生物样品中 NT-3 的含量提供了方法。

#### 1 实验材料与仪器

NT-3cDNA/CHO 细胞株(自建);基因重组大鼠 NT-3 标准品(CHO 细胞表达,日本 Takeya Komiya 博士赠, Takeda Chemical Industries 公司);NT-3 单克隆抗体 3 W3 (日本 Takeya Komiya 博士赠, Takeda Chemical Industries

公司);邻苯二胺(OPD,市售);羊抗鼠-HRP 二抗(华美生物工程公司产品);酶联仪(第四军医大学)。

#### 2 实验方法

**2.1 建立双位 EIA 工作曲线** 用 0.1 M 碳酸钠缓冲液 (pH9.6) 稀释 3 W3,使浓度为 0.5 $\mu$ g/ml;96 孔酶联板每孔中加入 100 $\mu$ l 该溶液包被,4℃孵育过夜;用 PBS 洗板 3 次;加入含 25%脱脂奶粉的 PBS 进行封闭,室温放置 4h;PBS 洗板 3 次;用 PBS + 10%脱脂奶粉稀释 NT-3 标准品,使成系列浓度为 0, 5pg/ml, 10pg/ml, 100pg/ml, 200pg/ml, 500pg/ml, 800pg/ml, 1000pg/ml, 酶联板每孔中分别加入 100 $\mu$ l 样品,4℃孵化 4h;PBS 洗板 3 次;加入用 PBS 稀释的 5 $\mu$ g/ml 的 3 W3,室温孵化过夜;PBS 洗

\* 广东省自然科学基金资助项目(960364)

季爱民,男,32 岁。博士,副主任药师,药剂学专业硕士生导师

涂 3 次;加入用 PBS 按 1:400 稀释的羊抗鼠-HRP 100 $\mu$ l,室温孵化 4h;洗涤后加入 100 $\mu$ l 含邻苯二胺的反应底物,酶联仪上测定吸收度值,检测波长为 492nm。

**2.2 制备样品** 用脂质体法将含大鼠 NT-3cDNA 的表达质粒和空载体分别转染 CHO 细胞后,经抗生素加压培养,得到了四株 NT-3cDNA/CHO 阳性单克隆细胞(I, II, III 及 IV)及一株空载体/CHO 单克隆细胞(V)(另文述)。将这五株细胞同代扩增后,每瓶按  $1 \times 10^6$  细胞数接种,待细胞生长融合后,更换为 8ml 无血清培养基,正常 CHO 细胞按同法培养。等细胞培养 48 及 72h 后,收集培养上清,去离子水充分透析后,再用去离子水稀释至原体积的 1000 倍为样品待测。

**2.3 测定样品** 方法同工作曲线,上述样品更换 NT-3 标准,空载体/CHO 细胞培养上清为阴性对照。

**3 结果**

**3.1 双位 EIA 方法测定 NT-3 工作曲线** 本方法中,NT-3 标准品的浓度在 10~1000pg/ml 的范围内,经 4 次重复测定结果表明,NT-3 的浓度与吸收度值呈良好的线性关系,线性方程:  $A = 0.00108 C - 0.0166$ ,  $r = 0.986$ ,  $P < 0.01$ 。基因重组 NT-3 的检测限为 5pg/ml。

本文对所建立的双位 EIA 法进行了方法回收率测定,正常 CHO 无血清培养上清充分透析后,加入 NT-3 标准品,使浓度为 100,200,500 及 800pg/ml,每个浓度测 6 次,结果平均绝对回收率为 105.5%,说明本文建立的 EIA 方法测定结果准确。

本文对所建立的 EIA 检测系统进行了精确性评估,测定了 4 个不同的 NT-3 浓度,结果本法批内差的变异系数为 6.2%~11.4% ( $n = 6$ ),批间差变异系数为 5.4%~8.2% ( $n = 6$ ),说明本法的测定是非常可靠的,见表 1。

**表 1 EIA 法测定 NT-3 的批内批间差 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )**

|     | 样 品 | NT-3 含量/pg $\cdot$ ml $^{-1}$ | 变异系数 |
|-----|-----|-------------------------------|------|
| 批内差 | 1   | 19.3 $\pm$ 2.2                | 11.4 |
|     | 2   | 103.4 $\pm$ 9.8               | 9.5  |
|     | 3   | 269.6 $\pm$ 18.3              | 6.8  |
|     | 4   | 524.3 $\pm$ 32.5              | 6.2  |
| 批间差 | 1   | 19.4 $\pm$ 1.6                | 8.2  |
|     | 2   | 102.1 $\pm$ 6.8               | 6.7  |
|     | 3   | 255.7 $\pm$ 14.3              | 5.6  |
|     | 4   | 503.4 $\pm$ 27.2              | 5.4  |

**3.2 NT-3cDNA/CHO 细胞上清中 NT-3 的浓度** 本文用所建双位 EIA 法,测定了 4 株 NT-3cDNA/CHO 单克隆细胞及一株阴性对照 CHO 细胞培养上清中基因重组 NT-3 的水平,各细胞培养上清均稀释 1000 倍,测定结果表明阴性对照 CHO 细胞培养上清中未检测到 NT-

3,阳性细胞培养上清中都有较高水平的 NT-3,而 III 号阳性细胞培养上清中 NT-3 的含量最高,故选择 III 号阳性细胞株为工程细胞株,大量扩增备用,见表 2。

**表 2 不同细胞株上清中 NT-3 的含量 (pg/ml)**

| 细胞克隆 | NT-3 含量 |
|------|---------|
| I    | 262.6   |
| II   | 283.8   |
| III  | 324.3   |
| IV   | 297.5   |
| V    | 0       |

**4 讨 论**

**4.1** 在建立能表达基因重组外源蛋白的细胞系时,往往得到多个单克隆细胞株,因此有必要建立适当的方法筛选到最高表达水平目的蛋白的细胞株;经常利用生物功能的方法筛选,但该法需建立细胞或动物模型,比较麻烦;本文建立的双位 EIA 法测定细胞培养上清中 rNT-3 的含量,方便快捷,灵敏度高,不需要纯化即可直接测定目的蛋白含量,可快速筛选到最高表达水平的细胞株。

**4.2** CHO 细胞分泌基因重组 NT-3 时,NT-3 是以同源二聚体的形式出现的,所以用双位 EIA 法可直接测定其含量<sup>[2]</sup>。

**4.3** 比较人、小鼠及大鼠体内成熟 NT-3 氨基酸序列时发现,三者完全一样<sup>[1]</sup>。用大鼠 NT-3cDNA 表达的蛋白,可以完全代替人体内的 NT-3 蛋白,这为用抗人 NT-3 的单克隆抗体 3W3 来测定鼠 NT-3 蛋白奠定了理论基础。

**4.4** 虽然 NT-3 与家族成员神经生长因子(NGF)及脑源性神经营养因子(BDNF)间氨基酸序列的同源性超过 50%,但用 3W3 为抗体建立的 EIA 法,测定 NT-3 含量时,与 NGF 及 BDNF 无交叉反应性<sup>[3]</sup>。

**参考文献**

- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, et al. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. Science, 1990, 247: 1446.
- Shintani A, Watanabe T, Kuroshima K, et al. Monoclonal antibodies against human Neurotrophin-3. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993; 194(3): 1500.
- Stine Soderstrom, Ted Ebendal. The levels of NT-3 protein in the brain determined by enzyme immunoassay show a pattern distinct from nerve growth factor. Neuroscience Letters, 1995, 189: 5.

收稿日期:1998-11-10