

有限稀释法制备 RecQ 解旋酶单克隆抗体 1C1 及鉴定*

张荣红^{1,2}, 贾铁文^{1,2}, 何志旭¹, 刘杰麟^{1,2,*}

(1. 贵州医科大学 组织工程与干细胞中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 通过有限稀释法制备抗 RecQ 单克隆抗体(mAb), 鉴定其生物学特性。方法: 以纯化鉴定后的重组大肠杆菌 RecQ 解旋酶免疫 Balb/c 小鼠, 融合免疫小鼠的脾细胞及 SP2/0 骨髓瘤细胞, 有限稀释法筛选杂交瘤细胞, 制备 mAb; 使用间接 ELISA 法鉴定单克隆抗体亚型、效价, Western-Blot 法测定单克隆抗体特异性; 将 mAb 与 RecQ 解旋酶结合后, 观察 mAb 对 RecQ 解旋酶活性的阻断作用。结果: 获得 1 株能稳定分泌抗 RecQ 解旋酶单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1C1, 该杂交瘤细胞染色体数目在 94 ~ 104; 1C1 分泌的单克隆抗体类型为 IgG1 型, 1C1 株所得上清液和腹水中抗体效价分别为 1×10^{-3} 和 1×10^{-5} , 该单克隆抗体可特异性结合 RecQ, 并可抑制 RecQ 解旋酶的结合 DNA 活性。结论: 成功制备 1 株抗 RecQ mAb, 效价高、特异性强。

[关键词] RecQ 解旋酶; 单克隆抗体; 制备; 鉴定; 有限稀释法

[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)02-0130-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.02.001

Preparation and Identification of Monoclonal Antibody 1C1 against RecQ Helicase by Limiting Dilution Method

ZHANG Ronghong^{1,2}, JIA Tiewen^{1,2}, HE Zhixu¹, LIU Jieli^{1,2}

(1. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare monoclonal antibodies (mAb) against RecQ helicase, and characterize their biological properties. **Methods:** By limiting dilution method, the mAb was generated by immunizing BALB/c mice with purified recombinant RecQ helicase from *E. coli*. Splenocytes derived from immunized mice were fused with SP2/0 myeloma cells to generate and screen hybridoma. Colchicine blocking was used to analyze the chromosome karyotype of hybridoma named by 1C1 cells. 1C1 hybridoma cells were intraperitoneally injected to BALB/C mice for producing ascites which are in rich mAb against RecQ helicase. Indirect ELISA methods were used to determine Ig subtype and titer mAb in ascitic fluid. Western blotting was used to determine the biological sizes of mAb. Fluorescence polarization immunoassay (FPIA) was used to detect the interactions of mAb with RecQ helicase. **Results:** 1C1 hybridoma stably expressing anti-RecQ mAb was obtained. 1C1 hybridoma has chromosomes ranging from 94 to 104, and its Ig subtype was IgG1. The titer of 1C1 in supernatant and ascitic fluid was 1×10^{-3} and 1×10^{-5} , respectively. The mAb could specifically recognize *E. coli* RecQ helicase and thus inhibit its DNA binding activity. **Conclusion:** The mAb against RecQ helicase was successfully prepared with high titer and specificity.

[Key words] RecQ helicase; monoclonal antibody; preparation; identification; limiting dilution analysis

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81360349); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目[黔省专合字(2006)57]; 贵州省国际科技合作计划[黔科合外 G 字(2011)7012]; 贵州省应用基础研究计划重大专项子课题[黔科合 J 重大字(2015)2003]; 贵州省教育厅青年科技人才成长项目[黔教合 KY 字(2018)174]

** 通信作者 E-mail: 779713773@qq.com

网络出版时间: 2019-02-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190228.2130.001.html>

RecQ 解旋酶是 DNA 解旋酶 SF2 超家族中的一个家族^[1],在生物体内起着至关重要的作用,诸如 DNA 复制、转录、重组和修复等^[2]。人类有 5 种 RecQ 解旋酶 (RecQ1, WRN, BLM, RecQL4 和 RecQ5),其中 BLM、WRN 和 RecQ4 基因的突变分别会引起 Bloom 综合征、Werner 综合征以及 Rothmund-Thomson 综合征,这些综合征加速老化症状和癌症发病率^[2-8]。此外,RecQ1、BLM、RecQ4、RecQ5 等在多种肿瘤中均高表达^[9-15],与肿瘤细胞的转移、侵袭、耐药与代谢密切相关。这些研究结果均提示 RecQ 解旋酶与肿瘤关系密切,有望成为肿瘤诊断标志或肿瘤治疗的新靶点。由于大肠杆菌 RecQ 解旋酶的 3 个功能结构域与人 RecQ 解旋酶高度同源,其结构及功能与人类 RecQ 解旋酶极为类似,是研究人类 RecQ 解旋酶的重要模型^[16],文献报道从大肠杆菌中获得了高纯度的 RecQ 解旋酶具有 DNA 结合活性^[17-18]。单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 作为一种高效的生物制品在肿瘤的诊断和治疗方面显示出极大的应用价值,且单克隆抗体的制备技术是一项非常成熟的技术手段^[19]。然而,目前抗 RecQ 解旋酶 mAb 方面的相关报道甚少,本研究使用纯化的重组大肠杆菌 RecQ 解旋酶免疫小鼠,利用杂交瘤技术及有限稀释法制备抗 RecQ 解旋酶的 mAb,并考察其特异性及活性。

1 材料和方法

1.1 材料

8~10 周龄雌性 BALB/c 小鼠,体质量 18~22 g,由贵州医科大学实验动物中心提供。纯化后的重组大肠杆菌 RecQ 解旋酶、SP2/0 骨髓瘤细胞为贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心储存。胎牛血清、超级新生牛血清购自杭州四季青公司,甲基纤维素、Freund 完全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA)、Freund 不完全佐剂 (Freund's incomplete adjuvant, FIA)、PEG4000 购自 Sigma 公司, RPMI1640 培养基 (粉剂) 购自 Gibco 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司, mAb 亚型鉴定试剂盒购自中国洛阳塞尔维公司,考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,秋水仙素溶液购自北京百奥莱博科技有限公司。X 射线胶片购自柯达,超敏 ECL

化学发光试剂盒购自碧云天生物技术研究,96 孔、24 孔、6 孔培养板购自 Costar 公司。

1.2 方法

1.2.1 抗原的鉴定 通过对重组大肠杆菌 RecQ 解旋酶的诱导表达^[17],获得纯度高、活性好的大肠杆菌重组 RecQ 解旋酶,具有 DNA 结合活性、ATP 依赖的 DNA 解链活性等。抗原大肠杆菌重组 RecQ 解旋酶按南京建成生物工程研究所“考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒”说明书操作,检测纯化后重组大肠杆菌 RecQ 解旋酶蛋白浓度,并用 SDS-PAGE 上样测定抗原重组大肠杆菌 RecQ 解旋酶蛋白的纯度。

1.2.2 小鼠免疫及抗体效价检测 以纯化鉴定后的重组大肠杆菌 RecQ 解旋酶免疫 Balb/c 小鼠,参考文献[20]操作。根据方阵滴定试验确定抗原包被浓度,间接 ELISA 测定小鼠血清抗体效价。

1.2.3 细胞融合 取免疫小鼠的脾细胞,并收集处于对数生长期的 SP2/0 骨髓瘤细胞,脾细胞与骨髓瘤细胞按 10:1 的比例混合,1 000 r/min 离心 5 min 洗涤 2 次,弃上清,取 50% PEG 1 mL,1 min 内沿管壁缓缓滴入两种混合细胞中,同时轻轻摇晃,加完后用吸管轻轻搅拌数秒后静置 2 min;用 RPMI-1640 不完全培养基多次分批终止反应,800 r/min 离心 5 min,弃上清,得细胞沉淀。

1.2.4 有限稀释法筛选杂交瘤细胞 参照文献[21]进行实验。(1)融合细胞沉淀中加入 HAT 培养基重悬;将细胞悬液以 100 μ L/孔铺于 96 孔培养板中,同时铺适当复孔的 SP2/0 细胞作为 HAT 选择培养的阴性对照。(2)融合 3 d 后,镜下观察细胞克隆生长情况并标记,以后 2 周每隔 2 d 用 HAT 选择培养基半量换液,并收集上清间接 ELISA 法进行检测。在第 2 周后和 4 周分别换成 HT 选择性培养基培养和完全培养基培养,选取最强阳性克隆进行亚克隆。(3)在有限稀释前一天收集未经免疫 Balb/c 小鼠的腹腔细胞作为饲养细胞, HAT 选择性培养基重悬后按 100 μ L/孔铺到 96 孔培养板中培养过夜。(4)亚克隆:用 HT 选择培养基将阳性杂交瘤细胞稀释成 100 个/mL、50 个/mL、10 个/mL 3 个浓度,按 100 μ L/孔分别加入到含饲养细胞的 96 孔细胞培养板中继续培养 7~10 d。(5)第 4 天起开始在显微镜下观察细胞克隆情况,对单细胞克隆孔进行标记;7 d 后用 RPMI-1640 完全培养基进行半量换液,同时收集上清做间接

ELISA 检测。(6)重复多次有限稀释,直到所有仅一个细胞集落生长的培养液上清 ELISA 检测结果均为阳性为止。

1.2.5 腹水制备 mAb (1)小鼠的预处理:选取 10 周龄的健康、雌性 Balb/c 经产鼠数只,在接种杂交瘤细胞前 2 周,每只小鼠腹腔注射医用液体石蜡 0.5 mL;预处理过的小鼠在 2~3 个月内均可使用。(2)收集对数生长期生长状态良好的杂交瘤细胞 1C1,离心,弃上清,用不完全培养基悬浮细胞并调整细胞密度为 4×10^5 个/mL,0.5 mL/只腹腔注射。(3)约 1~2 周后,见小鼠腹部明显膨大,用 12 号无菌针头从腹股沟上缘插入腹腔中,轻轻挤压小鼠腹部,放出腹水,收集于无菌离心管 3 000 r/min 离心 15 min,去除上层油脂,分装保存于 -80 ℃。隔天穿刺一次直至小鼠死亡。

1.2.6 mAb 鉴定及生物学特性的分析 杂交瘤细胞染色体数分析:取杂交瘤细胞,加入秋水仙素液,37 ℃培养 6 h 后收获细胞,低渗处理、固定、制片、染色、镜检、照相,对染色体计数。mAb 类型及亚型的鉴定:按照洛阳塞尔维公司单克隆抗体亚型鉴定试剂盒说明进行操作。mAb 效价的测定:间接 ELISA 测定腹水、杂交瘤细胞上清抗体滴度,以 Sp2/0 培养液为阴性对照。杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性研究:将杂交瘤细胞连续传代培养 3 个月,定期用间接 ELISA 测其培养液中的抗体活性,观察杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性。

1.2.7 mAb 特异性鉴定 参照文献[22]方法鉴定 mAb 的特异性。纯化的 RecQ 解旋酶经 SDS-

PAGE,转膜后用 BALB/c 小鼠腹水 mAb 做一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG(工作浓度 1:5 000)做二抗,DAB 显色。

1.2.8 mAb 功能活性的测定 将 mAb 进行系列梯度稀释 13 个浓度后与定量(10 μL)的纯化 RecQ 蛋白混匀,置 37 ℃水浴中孵育 2 h。采用荧光偏振检测技术^[23]分析不同浓度的 mAb 阻断 RecQ 解旋酶与 DNA 结合的能力。

1.3 统计学分析

SPSS 20.0 软件统计分析数据,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验,计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验;*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RecQ 解旋酶蛋白的纯度

将纯化后的重组 RecQ 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,结果表明,重组 RecQ 蛋白经镍柱层析纯化后无杂带,纯度高,其分子量约为 69 kD,与预期分子量相符,浓度为 1.834 g/L,可作为抗原免疫小鼠。

2.2 抗原包被最佳浓度的确定

用方阵法筛选抗原最佳包被浓度,结果见表 1,根据表中结果可知,抗原包被浓度为 0.2 mg/L,血清稀释度为 1/1 000 时,*OD*₄₉₀ 测定结果接近 0.9,可获得较好的检测结果。因此,抗原包被的最佳工作浓度为 0.2 mg/L。

表 1 不同抗原包被浓度下的 *OD*₄₉₀ 值
Tab. 1 *OD* values at 490 nm under different concentrations of antigen

血清稀释度	抗原包被浓度 (mg/L)						
	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8
1/100	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3
1/500	2.065	2.617	2.918	2.887	>3	>3	>3
1/1 000	0.946	1.346	1.981	2.493	>3	2.964	2.864
阴性对照	0.029	0.030	0.035	0.034	0.015	0.087	0.044

2.3 有限稀释法获得抗 RecQ 解旋酶杂交瘤细胞株 1C1

在细胞融合后第 3 天即可见杂交瘤细胞成集落性生长,11 d 后可见部分培养孔的杂交瘤细胞生长至孔底的近 1/3。杂交瘤细胞镜下呈圆形,比 SP2/0 骨髓瘤略大,细胞透明度高,折光性强,见图 1。第 3 天半量换液时即用间接 ELISA 法对培养上

清液进行检测,此后每次半量换液均进行复测,将反复多次检测为阳性结果的细胞用有限稀释法进行亚克隆。本方法结果得到 1 株阳性克隆,编号为“1C1”,经扩增培养并反复检测,该细胞株在体外连续传代培养 3 月以上仍可稳定分泌抗 RecQ 单克隆抗体,见表 2。

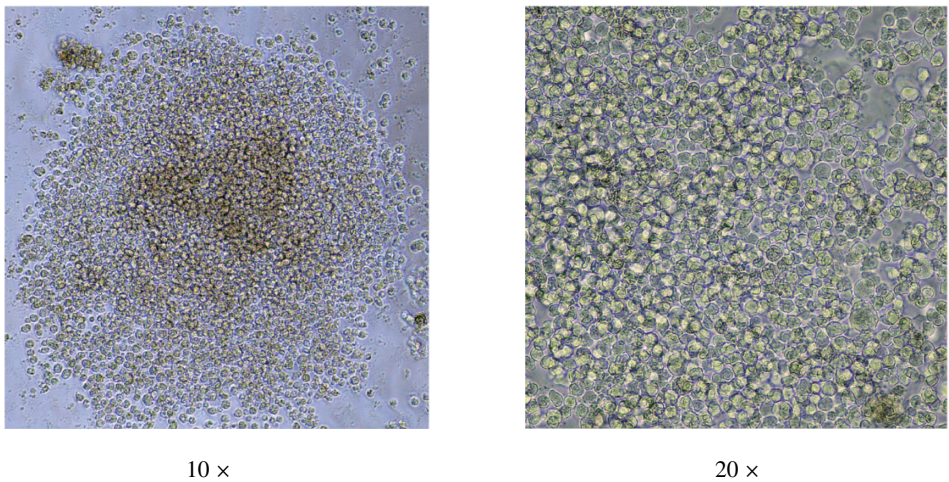


图 1 杂交瘤细胞形态(有限稀释法)

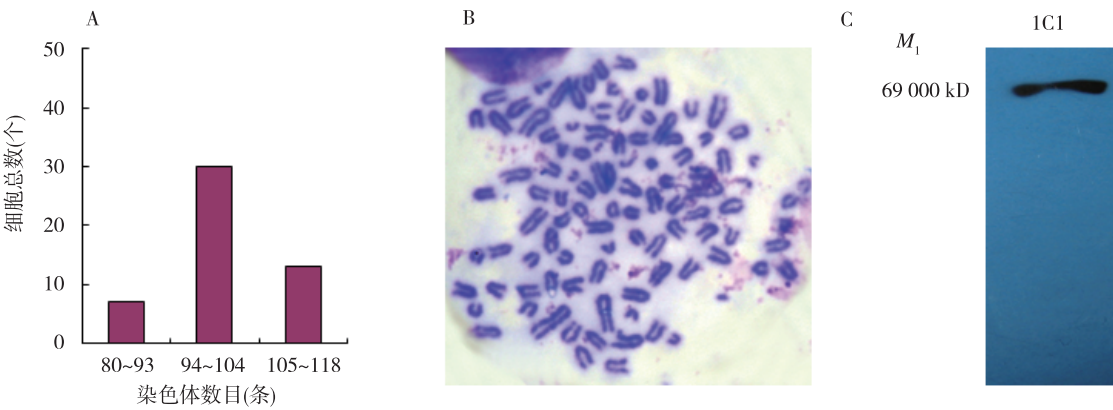
Fig. 1 The morpha of a hybridoma colony (limited dilution)

表 2 杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性				
Tab. 2 The stability of the hybridoma-secreting mAb				
编号	RecQ 单抗活性			
	第 1 月	第 2 月	第 3 月	
1C1	0. 827	0. 881	0. 775	
阴性	0. 046	0. 055	0. 023	

2. 4 抗 RecQ 解旋酶 mAb 生物学特性及鉴定

所获得 1C1 阳性杂交瘤细胞株的染色体数目为 94 ~ 104 条(图 2A),是两种亲本细胞的染色体

数目之和。染色体核型主要为端着丝粒,少数为中着丝粒(图 2B)。通过洛阳赛尔维公司生产的单克隆抗体亚型鉴定试剂盒鉴定所得 mAb 的亚类为 IgG1(见表 3)。间接 ELISA 法检测 1C1 培养上清的抗体效价为 1×10^{-3} ,诱生的腹水抗体效价为 1×10^{-5} 。Western blot 可观察到 69 000 kD 处有清晰特异性条带图 2C,表明抗 RecQ 解旋酶 mAb 能与 RecQ 解旋酶产生特异性反应。



注:A 为杂交瘤细胞染色体数目, B 为杂交瘤细胞株染色体分析(100 ×), C 为 Western blot 检测抗 RecQ 解旋酶

图 2 抗 RecQ 解旋酶 mAb 的鉴定

Fig. 2 Identification of RecQ helicase mAb

表 3 间接 ELISA 法鉴定单克隆抗体亚类						
Tab. 3 mAb subtype determined by indirect ELISA assay						
编号	抗体类型					
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
1C1	1. 114	0. 013	0. 008	0. 003	0. 009	0. 005
阴性	0. 116	0. 085	0. 096	0. 013	0. 010	0. 026

2.5 单克隆抗体对 RecQ 解旋酶活性抑制的结果

本研究结果显示,当抗 RecQ 解旋酶 mAb 的稀释度在1:800时,RecQ 蛋白结合 DNA 的活性明显降低,并随抗体稀释浓度的增加,RecQ 蛋白的 DNA 结合活性逐渐恢复(图3)。表明制备的抗 RecQ 解旋酶 mAb 具有抑制 RecQ 蛋白结合 DNA 的活性,且在1:800稀释度时活性最佳。

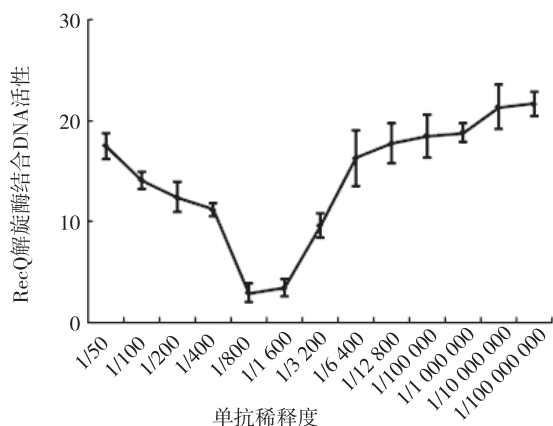


图3 不同浓度 mAb 对 RecQ 蛋白结合 DNA 活性的影响

Fig.3 The effect of different concentration of mAb on DNA binding activity of RecQ

3 讨论

单克隆抗体技术是现代生命科学研究的重要工具,其在基因和蛋白质的结构与功能研究方面有着不可或缺的作用,在人类和动植物的免疫学诊断方面至今仍有着无可代替的重要作用。Köhler 和 Milstein 于 1975 年利用杂交瘤技术成功建立了单克隆抗体制备技术^[22],据估计在近四年内 mAb 的全球市值超 1 250 亿美元^[23],具有广阔市场和应用前景^[23-24]。

RecQ 解旋酶在维持 DNA 正常代谢及维护染色体稳定性方面发挥着重要作用,虽然 RecQ 解旋酶的作用机制目前仍不十分明确,但研究表明 RecQ 解旋酶的突变、缺失或功能失常与肿瘤的发生密切相关^[9-15],并有望成为新的肿瘤标志物或成为肿瘤治疗的新靶点。骆衡等^[17]通过诱导大肠杆菌体外表达,获得了高纯度的 RecQ 解旋酶,具有 DNA 结合活性、ATP 依赖的 DNA 解链活性以及 DNA 依赖的 ATP 酶活性,相比双链 DNA,该 RecQ 解旋酶更易与单链 DNA 结合。黄振蓉等^[18]通过

PCR 也从大肠杆菌中获得纯度大于 90% 的 RecQ 解旋酶,具有 DNA 依赖性和蛋白浓度依赖性的 ATP 水解活性。目前只有 1 例成功获得抗 RecQ 解旋酶 mAb 的报道^[18],本课题组通过甲基纤维素半固体筛选得到能稳定分泌抗 RecQ 解旋酶 mAb 的杂交瘤细胞株 6H5。文献报道表明,有限稀释法与甲基纤维素半固体法是杂交瘤细胞筛选及克隆化培养的两种常用方法^[25-26]。为了探究不同方法对抗 RecQ 解旋酶 mAb 的分泌是否有影响,本实验选择纯化后重组大肠杆菌 RecQ 解旋酶作为抗原,在阳性免疫应答后,分离脾细胞并与骨髓瘤细胞融合,以产生稳定、长寿的抗体产生细胞系—杂交瘤细胞,并采用有限稀释法对杂交瘤细胞进行筛选及克隆化培养,获得了能稳定分泌抗 RecQ 解旋酶 mAb 的细胞株 1C1,染色体数目为 94~104。该杂交瘤细胞具有持久分泌抗体的能力,其分泌的抗体类型为 IgG1 型,培养上清的抗体效价为 1×10^{-3} ,诱生的腹水抗体效价为 1×10^{-5} ,该 mAb 能特异性地与 RecQ 解旋酶结合,且在 1/800 时可显著抑制 RecQ 解旋酶与 DNA 的结合,与半固体法得到的 6H5 抗体相比,效价稍低,但活性相当,都具有相同的生物活性。

综上所述,有限稀释法作为传统筛选方法,技术成熟,操作简单,成本较低,应用广泛,作为科学研究,目前大多数单克隆抗体的制备仍采用有限稀释法筛选制备。该抗 RecQ 解旋酶 mAb 的成功获得为进一步研究肿瘤的发生发展、肿瘤的诊断及治疗提供了有力的工具。

4 参考文献

- [1] GUO R, RIGOLET P, ZARGARIAN L, et al. Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(10): 3109-3124.
- [2] CHU W K, HICKSON I D. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers[J]. Nature Reviews Cancer, 2009, 9(9): 644.
- [3] CROTEAU D L, POPURI V, OPRESKO P L, et al. Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication[J]. Annual Review of Biochemistry, 2014, 83: 519-552.
- [4] MO D, ZHAO Y, BALAJEE A S. Human RecQL4 helicase plays multifaceted roles in the genomic stability of normal and cancer cells[J]. Cancer Letters, 2018, 413:

- 1-10.
- [5] DE RENTY C, ELLIS N A. Bloom's syndrome: Why not premature aging: A comparison of the BLM and WRN helicases[J]. *Ageing Research Reviews*, 2017, 33: 36-51.
- [6] OSHIMA J, SIDOROVA J M, MONNATJR R J. Werner syndrome: clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions[J]. *Ageing Research Reviews*, 2017, 33: 105-114.
- [7] HUANG L, HU C, DI BENEDETTO M, et al. Induction of multiple drug resistance in HMEC-I endothelial cells after long-term exposure to sunitinib[J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7(12): 2249-2255.
- [8] LU L, JIN W, WANG L L. Aging in Rrmund-Thomson syndrome and related RECQL4 genetic disorders[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 33: 30-35.
- [9] LI L, GAO M, SONG B, et al. Effects of RECQ1 helicase silencing on non-small cell lung cancer cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 1227-1232.
- [10] VIZITEU E, KLEIN B, BASBOUS J, et al. RECQ1 helicase is involved in replication stress survival and drug resistance in multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2017, 31(10): 2104-2113.
- [11] ARORA A, PARVATHANENI S, ALESKANDARANY M A, et al. Clinicopathological and functional significance of RECQ1 helicase in sporadic breast cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(1): 239-250.
- [12] MO D, ZHAO Y, BALAJEE A S. Human RecQ1A helicase plays multifaceted roles in the genomic stability of normal and cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2018, 413: 1-10.
- [13] MAO F J, SIDOROVA J M, LAUPER J M, et al. The human WRN and BLM RecQ helicases differentially regulate cell proliferation and survival after chemotherapeutic DNA damage[J]. *Cancer Research*, 2010, 8: 5467-5472.
- [14] WANG X, HU L. Protein expression of BLM gene and its apoptosis sensitivity in hematopoietic tumor cell strains[J]. *华中科技大学学报(医学英文版)*, 2008, 28(1): 46-48.
- [15] 孟惠惠, 许厚强, 刘金河, 等. 三种癌细胞株中 Bloom 综合征解旋酶 (BLM) 的表达水平高于正常细胞[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(6): 649-651.
- [16] 段丽霞, 许厚强, 陈祥, 等. 丙酸睾酮对大肠杆菌 RecQ 解旋酶结构和功能的影响[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(4): 467-472.
- [17] 骆衡, 陈祥, 段丽霞, 等. 大肠杆菌 RecQ 解旋酶的生物学活性分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(12): 1143-1150.
- [18] 黄振蓉, 吴海丽, 张三军, 等. E. coli RecQ 解旋酶克隆表达纯化及生物学活性检测[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(3): 21-27.
- [19] RAYNARD S, BUSSEN W, SUNG P. A double holliday junction dissolvase comprising BLM, topoisomerase III α , and BLAP75[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(20): 13861-13864.
- [20] 张荣红, 贾铁文, 廉芳, 等. 抗 RecQ 解旋酶单克隆抗体的制备和鉴定及应用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(2): 169-174.
- [21] 张越, 屈会化, 吴婷婷, 等. 甘草酸单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(5): 770-774.
- [22] HANACK K, MESSERSCHMIDT K, LISTEK M. Antibodies and selection of monoclonal antibodies[M]. Berlin: Springer, 2016: 11-22.
- [23] BÖLDICKE, T. Protein targeting compounds: prediction, selection and activity of specific inhibitors[M]. Berlin: Springer, 2016.
- [24] GAO Y, HUANG X, ZHU Y, et al. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays[J]. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2018, 39(4): 351-364.
- [25] 苏玉虹, 刘玲. 用甲基纤维素半固体培养基筛选杂交瘤细胞[J]. *中国免疫学杂志*, 1999, 15(7): 311-311.
- [26] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 2 版. 北京: 世界图书出版公司, 2008: 249-261.
- (2018-12-01 收稿, 2019-02-05 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张启芳