论著

文章编号:1000-5404(2008)08-0698-04

肠出血性大肠杆菌O157:H7志贺毒素ⅡA1亚单位单克隆抗体的制备和生物学特性鉴定

罗 萍[1],陈洪章[1],曾 明[2],郭 鹰[1],张卫军[1],毛旭虎[1],刘 璐[1],曾 浩[1],邹全明[1] ([1]第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038;[2]中国药品生物制品检定所,北京 100000)

摘 要:目的 制备出高效价的抗志贺毒素ⅡA1亚单位(STX2A1)的单克隆抗体。**方法** 以重组GST-STX2A1融合蛋白作为免疫抗原,免疫BALB/c小鼠,运用细胞杂交瘤技术制备,以天然STX2毒素为筛选抗原,采用间接ELISA法筛选产生针对STX2A1的单克隆抗体细胞株;以体内诱生法产生腹水,并采用Protein A-Sepharose柱对其纯化,快速定性试纸鉴定McAb的Ig亚类,采用间接ELISA相加实验鉴定抗原识别表位。**结果** 获得3株产生针对STX2A1的单克隆抗体细胞株STX2-1A3、STX2-1E10、STX2-3A7,Ig亚类分别为IgG1λ型、IgG1κ型和IgG3κ,亲和力常数分别为5.76×10^9、1.21×10^9和3.97×10^8。**结论** 成功制备3株稳定分泌抗STX2A1的杂交瘤细胞株,产生的单克隆抗体特异性好,亲和力高,能与天然STX2A亚单位反应。

关键词: O157:H7; STX2A1;单克隆抗体;生物学特性

中图法分类号: R378.21;R392-33;R392.11 **文献标识码:** A

Preparation and biological characterization of monoclonal antibody against shiga toxin Ⅱ A1 subunit of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7

LUO Ping[1], CHEN Hong-zhang[1], ZENG Ming[2], GUO Ying[1], ZHANG Wei-jun[1], MAO Xu-hu[1], LIU Lu[1], ZENG Hao[1], ZOU Quan-ming[1] ([1]Laboratory of Clinic Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100000, China)

Abstract: Objective To prepare high-titer monoclonal antibodies against STX2A1 subunit of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7. **Methods** BALB/c mice were immunized with GST-STX2A1 fusion protein and the spleen cells of BALB/c mice which were not immunized were used as feeder cells. Hybridoma technique, natural STX2A protein and ELISA test were used to prepare and screen the hybridoma cell lines of monoclonal antibodies against STX2A1. The ascites developed by injecting the hybridoma cells into abdominal cavity of the BALB/c mice and was purified with Protein A-Sepharose. The subclasses and isotypes were identified by mouse monoclonal antibody isotyping kit. The antigenic epitopes that can be recognized by STX2-1A3, STX2-1E10 and STX2-3A7 were analyzed by the ELISA additivity test. **Results** Three hybridoma cell strains were obtained and named as STX2-1A3, STX2-1E10 and STX2-3A7, respectively, all of which produced monoclonal antibodies specifically against STX2A1. The isotypes of the monoclonal antibodies were IgG1λ, IgG1κ, and IgG3κ and the affinity constant was 5.76×10^9, 1.21×10^9 and 3.97×10^8, respectively. **Conclusion** We have successfully prepared three hybridoma cell strains which secrete high-titer and highly specific monoclonal antibodies against STX2A1. Our study provides a basis for researching the early diagnosis, prevention and cure of the disease induced by EHEC O157:H7.

Key words: O157:H7; STX2A1; monoclonal antibody; biological character

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)(2006AA02Z405);全军医学科研"十一五"科技攻关项目(06G078)

Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2006AA02Z405) and the Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (06G078)

作者简介: 罗 萍,女,湖北省荆州市人,满族,博士研究生,实验师,主要从事抗体工程方面的研究。电话:(023)68771569,E-mail:lp@mail.tmmu.com.cn

通信作者: 邹全明,电话:(023)68752316, E-mail: quanmingzhou@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2007-07-11;**修回日期:** 2007-10-08

肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)O157: H7自 1982 年被确认为致病菌以来的 20 多年中,其引发的食物中毒在世界各地包括中国都有不同规模的暴发流行。感染该菌可使人患腹泻、出血性结肠炎(hemorrhagic colitis, HC),还可引发溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)及血栓性血小板减少紫癜(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)等严重并发症,严重者可导致死亡,致死率达 5%~10%,该菌的感染已经成为一个全球性的公共卫生问题,极有可能作为未来军事斗争的细菌武器和生物恐怖战剂,然而目前对其感染尚缺乏有效的防治方法。研究证明:抗生素可促使 O157 菌释放致死性志贺毒素Ⅱ(Shiga toxin Ⅱ, STX2),从而使患者并发 HUS 的危险性增加[1]。STX2 为 1A5B 结构。A 亚单位由 A1 和 A2 两个片段组成,毒性位点位于 A1 片段,B 亚单位为受体结合单位,前期本室制备了 STX2 A 亚单位蛋白作为 STX2 单克隆抗体的抗原[2]。因该蛋白为包涵体表达,不利于中和性 STX2 单抗的筛选。因此本研究采用含毒性位点的可溶表达的 STX2 A1 蛋白为免疫抗原。天然 STX2 毒素为筛选抗原,制备了针对 STX2 的单克隆抗体。

1　材料与方法

1.1　动物及细胞株

8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,体质量 18~22 g,购自第三军医大学实验动物中心。SP2/0 细胞为本室冻存标准细胞株。

1.2　主要试剂

RPMI1640 干粉、HAT、HT、8-AG 等购自 Gibco 公司; HEPE 为上海生工进口分装;小牛血清购自成都哈里公司;细胞融合剂购自 Sigma 公司;HRP-羊抗小鼠 IgG 为北京中衫进口分装;鼠抗体亚类鉴定试剂盒购自美国 Roche 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3　免疫抗原与筛选抗原

可溶表达的 GST-STX2A1 融合蛋白,为本室基因工程构建相对分子质量约为 56 000,纯度达 95%;筛选抗原为天然志贺毒素Ⅱ(STX2),纯度为 98%,由江苏省疾病控制中心惠赠。

1.4　免疫方法

首次用弗氏完全佐剂与抗原乳化后腹腔加皮内多点注射,100 μg/只,3 周后,用弗氏不完全佐剂与抗原乳化后腹腔加皮内多点注射, 100 μg/只,2 周后断尾采血测抗体效价,选择 ELISA 血清抗体效价检测达 $1:4\times10^5$ 以上的 BALB/c 小鼠用于融合,融合前 3 d,不加佐剂抗原腹腔加强免疫注射 1 次,100 μg/只。

1.5　杂交瘤制备和筛选

以正常 BALB/c 小鼠脾细胞为饲养细胞(2×10^4/孔),常规收集免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞按 10:1的比例,采用购自 Sigma 公司的细胞融合剂进行融合。HAT 培养液选择培养,融合后 10~14 d 取上清行 ELISA 筛选,选择强阳性克隆,用有限稀释法连续克隆化 3~4 次,将克隆化后阳性率达 100% 的细胞扩增培养后液氮冻存[3]。

1.6　杂交瘤细胞的核型鉴定

参照文献[4]的方法进行。

1.7　抗体纯化

每只小鼠腹腔注射 2×10^5 个杂交瘤细胞制备腹水,用 Protein A-Sepharose 柱纯化腹水 IgG。

1.8　抗体生物学活性鉴定

Ig 亚类鉴定采用美国 Roche 公司 Mouse Mono-clonal Antibody Isotyping Kit ,操作按说明进行;抗体特异性采用鉴定 Western blot 方法[5];单克隆抗体亲和力常数的测定参照文献[6]:将抗原分别以 0.5, 1 μg/ml 包被,加入倍比稀释的单克隆抗体(McAb),再加入标记羊抗小鼠抗体,OPD 显色测吸光度值,以抗体浓度的对数为横坐标,以吸光度值为纵坐标,每种 McAb 得出 2 条反应曲线,以每条曲线上部平坦段作为 100%,在曲线上找出 50% 吸光度值时相对应的抗体浓度(mol/L),按推导公式计算亲和常数,推导公式:$Kaff=(n-1)/2(n[ab']t-[ab]t)$。单克隆抗体识别抗原表位的初步分析按文献[6]采用间接 ELISA 相加实验。

1.9　统计学分析

实验数据采用 PEMS 统计软件,进行 χ^2 检验。

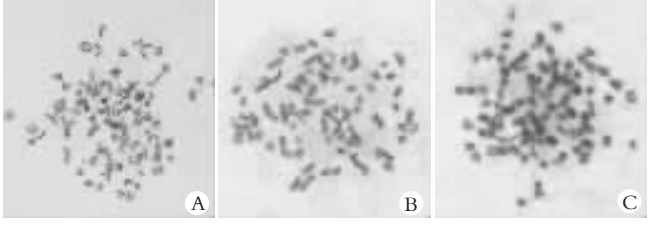
2　结果

2.1　杂交瘤细胞系的建立

以重组可溶表达的 GST-2A1 融合蛋白为抗原,先后免疫 BALB/c 小鼠 5 只,共融合 3 次,成功 3 次,288 孔中有 256 个孔有杂交瘤克隆生长,ELISA 检测阳性孔有 64 孔,融合率达 88.89%,阳性率达 25%,经 3~4 次亚克隆和 ELISA 筛选,得到 3 株稳定的杂交瘤细胞 STX2-1A3 、STX2-1E10、STX2-3A7,体外培养 20 代后上清液效价分别为 1:160、1:80 和 1:40,腹水的效价分别为 $1:6.4\times10^{-5}$、$1:3.2\times10^{-5}$ 和 $1:8\times10^{-4}$。

2.2　染色体组型分析

3 株杂交瘤细胞染色体数目分别为 120、124 和 128 ,说明这 3 株杂交瘤细胞为小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞的融合体(图 1)。

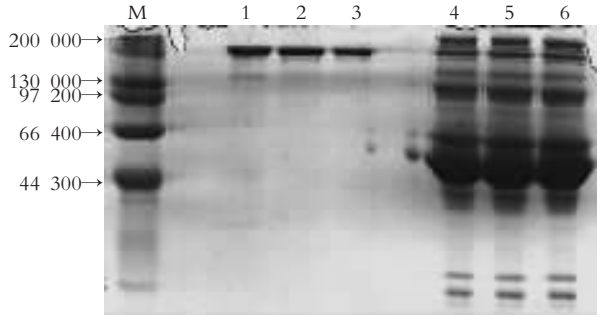


A: STX2-1A3 核染色体; B: STX2-1E10 核染色体; C: STX2-3A7 核染色体

图 1　杂交瘤单克隆细胞株 STX2-1A3 、STX2-1E10 和 STX2-3A7 核染色体分析结果　(Gimesa ×1 000)

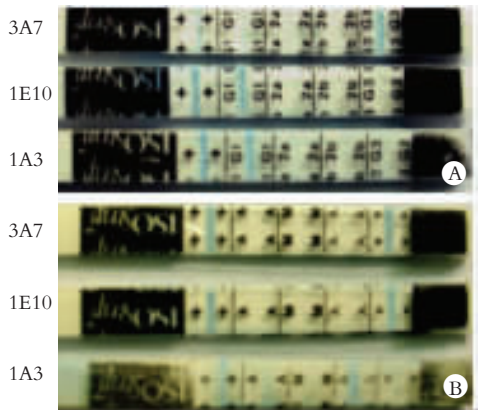
2.3 抗体纯化和亚类鉴定

3 株抗体经 Protein A-Sepharose 柱纯化,SDS-PAGE 电泳鉴定纯度均达 95% 以上(图 2)。STX2-1A3 、STX2-1E10、STX2-3A7 杂交瘤细胞株分泌的抗体亚类分别为 IgG1λ 型、IgG1κ 型和 IgG3κ 型(图 3)。



M: 蛋白分子量标准; 1: STX2-1A3 纯化样品; 2: STX2-1E10 纯化样品; 3: STX2-3A7 纯化样品; 4: STX2-1A3 腹水; 5: STX2-1E10 腹水; 6: STX2-3A7 腹水

图 2 腹水 IgG 纯化后 SDS-PAGE



A: 单克隆抗体 STX2-1A3 、STX2-1E10 和 STX2-3A7 的亚类鉴定;
B: 单克隆抗体 STX2-1A3 、STX2-1E10 和 STX2-3A7 的亚型鉴定

图 3 单克隆抗体的亚型和亚类鉴定结果

2.4 单克隆抗体亲和力常数的测定

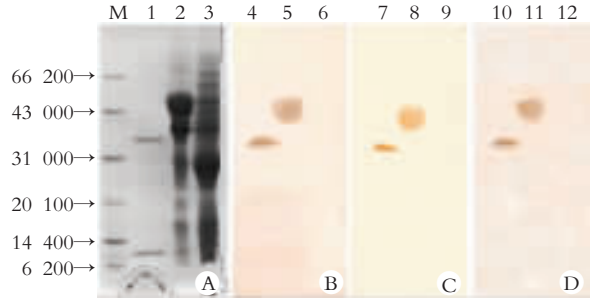
STX2-1A3 、STX2-1E10 和 STX2-3A7 的亲和力常数分别为 5.76×10^{-9}、1.21×10^{-9}和 3.97×10^{-8}。

2.5 抗体特异性鉴定

Western blot 结果显示 3 株杂交瘤分泌的抗体均能与相对分子质量 56 000 左右的 GST-2A1 融合蛋白和相对分子质量 32 000 的天然 STX2 毒素的 A 亚单位蛋白条带显色,而与 GST 蛋白条带不显色,证明这 3 株杂交瘤分泌的抗体确为特异针对 STX2A1 的单克隆抗体(图 4)。

2.6 单克隆抗体识别抗原表位的初步分析

对 3 株单克隆抗体相加试验结果进行统计学处理,结果显示: STX2-1A3 与 STX2-1E10 相加指数(AI) 值为 70.08%; STX2-1A3 与 STX2-3A7 AI 值为 74.23%;STX2-1E10 与 STX2-3A7 AI 值为 66.87%, 均大于 50%,表明 3 株单克隆抗体分别针对不同抗原决定簇。



A:SDS-PAGE; B:单抗 STX2-1A3 的免疫印迹; C: 单抗 STX2-1E10 的免疫印迹; D: 单抗 STX2-3A7 的免疫印迹; M: 标准; 1: 天然 STX2A 和 STx2B; 2: 表达 GST-STX2A1 工程菌; 3: 表达 GST 工程菌; 4、7、10: 天然 STX2A 分别与单抗 STX2-1A3、STX2-1E10 STX2-3A7 的免疫印迹; 5、8、11: GST-STX2A1 分别与单抗 STX2-1A3、STX2-1E10 STX2-3A7 的免疫印迹; 6、9、12: GST 分别与单抗 STX2-1A3、STX2-1E10 STX2-3A7 的免疫印迹

图 4 STX2-1A3 、STX2-1E10 和 STX2-3A7 单抗的免疫印迹分析结果

3 讨论

近年来,EHEC O157: H7感染在包括中国在内的许多国家均有爆发流行,已经引起了全世界的关注。美国疾病控制中心(CDC)估计其国内每年发病约 1 万例,死亡 250 例。2006 年 9 月在美国爆发的波及 26 个州之“毒菠菜”事件就是 EHEC O157: H7 污染所致。我国江苏、安徽省曾于 1999 年爆发流行大肠杆菌 O157: H7感染性腹泻,患者超过 2 万例,死亡 177 例,流行时间 7 个月。2000 年春夏两季上述地区又发生疫情,并且范围扩大到西部的中原地区,甚至在东北、华北及华东少数地区也发生散发的 O157: H7感染[7]。目前,对 EHEC O157: H7感染多采用支持疗法,抗生素可促使 STX2 的释放,致使患者病情进一步恶化。

EHEC O157: H7分泌产生的 STX2 是引起儿童和老年人发 HUS 的主要毒素,造成该人群的病死率高达 50%。STX2 全毒素首先进入血循环,随血流进入靶器官,通过 B 亚单位与靶细胞上的受体结合,继而通过细胞内吞作用 A 亚单位进入细胞内。A 亚单位在细胞内被弗林蛋白酶裂解为 A1 和 A2 两个片段,A1 片段进入细胞质后毒性位点暴露发挥糖苷酶活性,在宿主细胞 60S 核糖体亚基上的 28SrRNA 的 4324 位腺苷酸残基上裂解 N-糖苷键,最终导致蛋白质合成终止,这种作用会导致肾内皮细胞、肠上皮细胞、Vero 细胞、HeLa 细胞的死亡[8]。

鉴于抗生素治疗 EHEC O157: H7感染可能增加患者并发 HUS 的危险性,研究人员试图研制其他药物来治疗和预防该菌的感染,如抗 Stx 抗体[9]、Stx 特异受体的类似物[10]、Stx 疫苗[11]等。相比之下,针对 STX2

的单克隆抗体在 EHEC O157:H7感染的紧急治疗中更显优势。据 Sheoran 等[9]报道,针对 STX2 的毒性亚单位 STX2A 和受体结合亚单位 STX2B 的单克隆抗体均能不同程度的发挥中和 STX2 的毒性作用。基于以上认识,本室陈洪章等[12,13]已经制备了抗 STX2B 的单克隆抗体。由毒素的晶体结构解析和其发挥活性作用的机制可以看出:在血液中全毒素的 A2 片段没有暴露出来,因此针对 A2 片段的抗体在血液中不能与 A2 片段结合没有治疗价值,因此本研究以 STX2 的毒性活性中心片段 STX2A1 为靶抗原制备单克隆抗体,以期从中筛选出具有毒性中和活性的治疗性抗体。由于 STX2 全毒素对动物具有毒性,不适合作为免疫原,本研究采用基因重组的 GST-STX2A1 融合蛋白为免疫原,以天然 STX2 为筛选抗原,制备出 3 株针对 STX2A1 不同表位的单抗,Western blot 结果显示:均能特异的与天然 STX2 毒素的 A 亚单位反应,而不与 GST 反应,说明 McAb 特异性好,亲和力高;此外证明在没有 STX2A1 纯品抗原的情况下,采取本实验的免疫筛选策略是可行的。本研究为 EHEC O157:H7感染的早期诊断和防治的研究奠定了物质基础。下一步,我们将对这 3 株单抗的毒素中和作用作进一步的研究,并在此基础上对鼠源单抗进行人源化改造。

参考文献:

[1] Wong C S, Jelacic S, Habeeb R L, *et al*. The risk of the hemolytic – uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157: H7 infections[J]. N Engl J Med, 2000, 342(26): 1930 – 1936.

[2] 马　颖, 毛旭虎, 邹全明, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7去贺样毒素Ⅱ毒素亚单位 Stx2A 的表达与纯化[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(15): 1582 – 1584.

[3] 徐志凯. 实用单克隆技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 274 – 287.

[4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996: 194 – 196.

[5] 奥斯伯 F, 布伦特 E, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指导[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999: 366 – 373.

[6] 罗　萍, 邹全明, 王晓勤, 等. 抗重组人表皮生长因子单克隆抗体的制备及生物学特性鉴定[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(4): 317 – 320.

[7] 詹初航. 为了明天的食品更安全——陈君石教授谈我国食品安全的现状问题[J]. 中国卫生, 2004, (3): 32 – 34.

[8] Fraser M E, Fujinaga M, Cherney M M, *et al*. Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from Escherichia coli O157: H7[J]. J Biol Chem, 2004, 279(26): 27511 – 27517.

[9] Sheoran A S, Chapman S, Singh P, *et al*. Stx2 – specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with Escherichia coli expressing Stx2 variants[J]. Infact Immun, 2003, 71(6): 3125 – 3130.

[10] Nishikawa K, Matsuoka K, Kita E, *et al*. A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin – producing Escherichia coli O157: H7[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99 (11): 7669 – 7674.

[11] Wen S X, Teel L D, Judge N A, *et al*. A plant – based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(18): 7082 – 7087.

[12] 陈洪章, 邹全明, 罗　萍, 等. 抗重组志贺毒素Ⅱ B 亚基单克隆抗体的制备及生物学特性鉴定[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(2): 148 – 151.

[13] 陈洪章, 曾　浩, 毛旭虎, 等. 抗志贺毒素Ⅱ B 亚单位单克隆抗体识别表位的初步鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(19): 1831 – 1833.

(编辑　栾　嘉)

我校高钰琪教授、卞修武教授入选 2007 年“新世纪百千万人才工程”国家级人选

近日,国家人事部公布了 2007 年“新世纪百千万人才工程”国家级人选名单,我校高原军事医学系高钰琪教授、西南医院病理学研究所卞修武教授榜上有名。“新世纪百千万人才工程”是为深入贯彻全国人才工作会议精神,进一步加强高层次专业技术人才队伍建设,促进优秀中青年学术技术带头人的成长,由人事部等 7 部委联合组织实施的。国家级人选每两年选拔一次,每次选拔 500 名左右。在各地、各部门推荐的基础上,经专家评审,并报“工程”领导小组批准产生。该工程的目标是:到 2010 年培养造就数百名具有世界科技前沿水平的杰出科学家、工程技术专家和理论家;数千名具有国内领先水平,在各学科、各技术领域有较高学术技术造诣的带头人,数万名在各学科领域里成绩显著、起骨干作用、具有发展潜能的优秀年轻人才。至此,我校“新世纪百千万人才工程”国家级人选已达 11 名(其他 9 名专家为:粟永萍、曹佳、祝之明、黄跃生、董家鸿、杨辉、张绍祥、吴玉章、蒋建新),位居全军院校前列。

(林　海　供稿)