论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1444-04

特异性 O1 群稻叶型霍乱弧菌单克隆抗体的制备、筛选及识别抗原表位的分析

张 娟[1],张 君[1],余晓林[2],吴 倩[3],蒋飞龙[3],黄长武[3],李兴禄[3],黄爱龙[1],郑 建[1] (重庆医科大学:[1]感染性疾病教育部重点实验室,[2]检验系实验诊断教研室,重庆 400016,[3]附属第二医院检验科,重庆 400010)

摘 要:**目的** 制备并筛选出高特异性高活性的抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌(Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba)单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb),为霍乱的预防诊断提供有力的抗体工具。**方法** 应用杂交瘤技术,通过灭活的 O1 群稻叶型霍乱弧菌免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞融合制备特异性 McAb,以间接 ELISA 法对所需的杂交瘤细胞株进行了特异性及排除性筛选,对筛选出的特异性 McAb 进行了包括亚型鉴定,效价、亲和常数的测定以及特异性的鉴定与分析,并通过单克隆抗体的位点相加实验、与 O1 群稻叶型霍乱弧菌脂多糖(LPS)的间接 ELISA 和 Western blot 实验对 McAb 识别的抗原表位进行了初步分析。**结果** 融合了 386 株能分泌抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌 McAb 的杂交瘤细胞株,通过用 O1 群小川型、O139 霍乱弧菌及 9 种非霍乱弧菌的细菌进行的筛选,最后得到 4 株能稳定分泌特异性的针对该 McAb 的细胞株,其分泌的抗体亚类分别为 2 株 IgG_1,1 株 IgG_{2a},1 株 IgG_{2b};腹水效价均达 10^{-6};亲和常数达 10^8 以上。间接 ELISA 法及 Western blot 证实所获的 McAb 可与 O1 群稻叶型霍乱弧菌发生特异性反应。ELISA 相加实验结果显示 4 株 McAb 识别不同的抗原表位,与 LPS 的反应表明其中 2 株针对 O1 群稻叶型霍乱弧菌脂多糖,2 株针对非脂多糖抗原位点。**结论** 获得霍乱弧菌 O1 群稻叶型特异性 McAb,初步定位单克隆抗体识别表位所在区域。

关键词:霍乱;O1 群稻叶型霍乱弧菌;单克隆抗体;表位
中图法分类号:R378.3;R392.11;R392.12 **文献标识码**:A

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba and analysis on targeting antigenic epitopes of the monoclone antibodies

ZHANG Juan[1], ZHANG Jun[1], YU Xiao-lin[2], WU Qian[3], JIANG Fei-long[3], HUANG Chang-wu[3], LI Xing-lu[3], HUANG Ai-long[1], ZHENG Jian[1] ([1]Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease, Ministry of Education, [2]Laboratory Diagnostics, Department of Laboratory Medicine, Chongqing 400016, [3]Department of Laboratory Medicine, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To prepare and select monoclonal antibodies (McAbs) with high specificity against Vibrio cholera O1 Serotype Inaba and to provide a potent medical tool for the prevention and diagnosis of cholera. **Methods** BALB/c mice were immunized with Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba were established after cell fusion of mouse splenic cells and SP2/0. Both of these McAbs were characterized for their antibody titre in the culture supernatant as well as ascites, class, sub-class and affinity analysis. The antigen specificity and strain cross reactivity for McAb were evaluated and confirmed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot. The antigen epitope identifying of McAb were observed by ELISA additive assay, indirect ELISA with LPS of cholerae O1 Serotype Inaba and Western blot. **Results** Totally 386 positive monoclonal cell lines were produced; four of them showing high specificity for Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba. As to the immunoglobulin subclass of McAb, two were IgG_1, others were IgG_{2a} and IgG_{2b}, respectively. Indirect proof from ELISA and Western blot showed that the McAbs reacted specifically with Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba.

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)(2002AA215015)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China ("863" Program, 2002AA215015)
作者简介:张 娟,女,重庆市人,博士,主管技师,主要从事感染性疾病诊断预防方面的研究。电话:(023)66983949, E-mail:juanmcq@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-11;修回日期:2008-01-29

Results from ELISA additive assay indicated that these McAbs recognized different epitopes. The reaction with LPS indicated that two McAbs were targeted to the LPS of cholerae O1 Serotype Inaba, while others were targeted to the non-LPS sites of cholerae O1 Serotype Inaba. Conclusion Four highly specific McAbs against Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba were obtained successfully. The antigen epitope by combined experimental site was located initially. It provides a fast and exact tool on the early diagnosis and prevention of Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba.

Key words: cholera; Vibrio cholerae O1 Serotype Inaba; monoclonal antibodies; epitope

霍乱仍是全球的一大威胁,是社会发展的关键标志之一[1]。建立针对霍乱的快速反应机制和长期应对策略是最有效、最有前景的措施。通过针对霍乱弧菌的特异性单抗开发的胶体金试纸条,可提高对霍乱爆发流行的快速检测、分析、预测、预报,实现在病原学检测方面建立应急检验技术平台;而基于抗原表位的肽疫苗为研制安全高效的新型霍乱疫苗打开了思路,对建立针对霍乱的长期应对策略具有重要意义。

由于单克隆抗体具有高度的均一性、特异性及来源稳定等特点,使得单克隆抗体在生命科学研究及临床医学诊断中得到极为广泛的应用。本研究通过制备、筛选出高特异性和高活性的单抗,并以此为工具开发检测霍乱弧菌的胶体金试纸条;通过研究其识别的表位,为基于表位的霍乱弧菌模拟多肽疫苗的开发与设计提供必要的依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株　　灭活的 O1 群(稻叶型和小川型),O139 群霍乱弧菌保存在生理盐水中由四川省疾病预防控制中心馈赠。大肠杆菌(ATCC 25922)、沙门氏菌(ATCC 13076)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、宋内氏志贺氏菌(ATCC 25931)、金黄色葡萄球菌(ATCCC 25923)、河弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌以及奇异变形杆菌由重庆医科大学附属第二医院检验科保存。

1.1.2　实验动物与细胞　　BALB/c 小鼠由本校实验动物中心提供;SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞为本所提供。

1.1.3　主要试剂　　酶标羊抗鼠抗体购自北京中山生物技术有限公司。完全、不完全弗氏佐剂(Sigma 分装),RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品,胎牛血清购自 HyClone 公司。PEG4000 购自天津天泰公司。HAT、HT 培养液按常规配制。McAb 亚类检测试剂盒购自 Sigma 公司。SPA-Sepharose CL-4B 购自 Pharmacia 公司。硝酸纤维膜购自北方同正。Silver Quest™ Silver Staining Kit 购自 Invitrogen 公司。

1.2　方法

1.2.1　动物免疫　　用 Bradford 法测定灭活的 O1 群稻叶型霍乱弧菌菌液浓度,选用 8 周的 BALB/c 雌小鼠按剂量 50 μg/只免疫 4 次,初次免疫前取眼血作阴性对照,免疫时菌体抗原加等体积福氏完全佐剂皮下多点注射,以后隔 2 周以福氏不完全佐剂与等体积菌体抗原混合后皮下多点注射,加强免疫 2 次,同时用间接 ELISA 测定小鼠血清抗体效价,融合前 3 d 对抗体效价高的(达 10^{-6})小鼠尾静脉注射加强免疫(50 μg)。

1.2.2　杂交瘤细胞制备与筛选　　冲击免疫后 3 d 取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 5∶1 比例与 50% PEG 按常规方法进行融合,融合 7 ~ 10 d 观察杂交瘤细胞生长情况,用间接 ELISA 法对培养上清液进行检测筛选,采用有限稀释法将强阳性的细胞株亚克隆 3 次,将获得具有稳定分泌抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌单抗能力的杂交瘤细胞系扩大培养后液氮冻存。

1.2.3　单抗纯化、Ig 亚类及效价的测定　　按 5×10^6 个杂交瘤细胞量腹腔注射 BALB/c 小鼠,用常规方法制备腹水。用盐析法及 SPA-Sepharose CL-4B 亲和柱层析纯化腹水中所获得的 McAb,并用 SDS-PAGE 电泳鉴定其纯度。利用 Sigma 公司 Ig 亚类测定试剂盒,检测 4 株阳性杂交瘤细胞的培养上清液。用间接 ELISA 法检测细胞培养上清液和腹水的单抗效价。

1.2.4　抗体亲和常数测定　　选用间接 ELISA 方法测定,参照文献[2]的方法,即用灭活的 O1 群稻叶型霍乱弧菌菌液分别以 1.25、2.5、5、8 μg/ml 包被 96 孔酶标板,加入倍比稀释的 McAb,再加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体,TMB 显色测 D(450)值,以抗体浓度的对数为横坐标,以 D(450)值为纵坐标,每种 McAb 得出 4 条反应曲线,以每条曲线上部平坦段的 D(450)值作为 100%,在曲线上查出 50% D(450)值时相对应的抗体浓度,按 Beatty 推导公式:$Kaff = (n-1)/2(n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算亲和常数。

1.2.5　抗体特异性鉴定　　①间接 ELISA 法:用灭活的稻叶型、小川型和 O139 群霍乱弧菌、大肠杆菌(ATCC 25922)、沙门氏菌(ATCC 13076)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、宋内氏志贺氏菌(ATCC 25931)、金黄色葡萄球菌(ATCCC 25923)、奇异变形杆菌、河弧菌、副溶血弧菌以及嗜水气单胞菌的菌液包被 96 孔酶标板(10 μg/ml),封闭后,一抗分别为阳性杂交瘤细胞培养上清,阳性对照为免疫小鼠阳性血清,阴性对照为 RPMI-1640 培养液,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1∶10 000 稀释),TMB(四甲基联苯胺)显色,1 mol/L H_2SO_4 终止反应后测 D(450)值。②Western blot 分析:用前面灭活的各细菌菌液行 10% SDS-PAGE 电泳后,于 4 ℃ 20 V 条件下转膜过夜;硝酸纤维素膜(NC 膜)以封闭液室温封闭 2 h;PBS 洗膜后分别加入各株单抗培养上清(1∶1 000 稀释)于密封带中 4 ℃ 结合过夜;PBS 洗膜后加 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体(1∶10 000 稀释)在密封带中室温结合 2 h,Supersignal West Pico Chemiluminescent

Substrate Kits 显色,成像。

1.2.6 单克隆抗体的表位分析

1.2.6.1 单克隆抗体的位点相加实验 参照 Friguet 等[3]的 ELISA 相加实验进行测定。即采用竞争 ELISA,用灭活 O1 群稻叶型霍乱弧菌菌液包被 96 孔酶标板(2 μg/ml),一抗分别为 4 株腹水单抗(100 μl/孔)以及每种单抗各取 50 μl 后两两组合形成的抗体混合物,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,TMB 显色后测 D(450)值。相加指数 $AI = [(2A_{1+2}/A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$,式中 A_1、A_2 分别为单独加 1 株单抗的 D(450)值,A_{1+2} 代表 2 株单抗两两组合后所测 D(450)值,AI > 40% 表示 2 株单抗针对不同抗原表位;否则表示 2 株单抗针对相同表位。

1.2.6.2 单克隆抗体识别抗原表位的初步分析 ①依据 Westphal[4]酚-硫酸法,经 Carlson[5]及 Carrrion[6]修改后的方法为主要萃取依据,提取 O1 群稻叶型、小川型及 O139 群霍乱弧菌、大肠埃希菌、伤寒沙门菌、宋内志贺菌、河弧菌、豚鼠气单胞菌的 LPS。②间接 ELISA 试验确定抗原位点:用提取的各细菌的脂多糖分别包被酶标板,一抗分别为 4 株腹水单抗(1∶1 000 稀释),二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1∶10 000 稀释),TMB 显色后测 D(450)值,初步判断 McAb 所针对的抗原成份。③对所提 LPS 做 SDS-PAGE 银染分析:配制 12% SDS-PAGE 分离胶和 5% 的积层胶,用所提各细菌的 LPS 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕行 LPS 银染。④对所提 LPS 做 Western blot 分析:配制 12% SDS-PAGE 分离胶和 5% 层积胶,用所提各细菌的 LPS 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕转膜,再分别加一抗单抗腹水(1∶1 000 稀释),二抗 HRP 羊抗鼠 IgG 抗体(1∶10 000 稀释),DAB 显色扫描保存。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

将免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合后观察,培养孔有杂交瘤细胞生长,融合率达 80%。用间接 ELISA 筛选出 386 株能分泌抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌单抗的杂交瘤细胞株,此后重复进行间接 ELISA 特异性筛选及连续 3 次亚克隆后得到了 4 株能稳定分泌抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌特异性 McAb 的细胞株:稻$_1$B$_7$、稻$_2$H$_8$、稻$_2$D$_9$、稻$_1$A$_6$。

2.2 单克隆抗体性质的鉴定

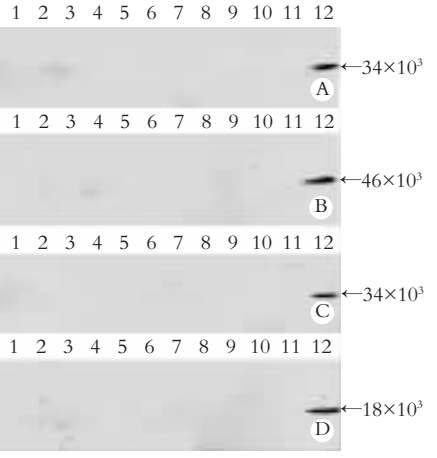
包括 McAb 的效价、Ig 亚类及亲和常数测定。SDS-PAGE 蛋白电泳显示纯化后抗体纯度达 95% 以上,各株的效价、Ig 亚类及亲和常数的结果见表 1。

表 1 抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌 McAb 的免疫学特性结果

杂交瘤细胞株	抗体滴度		抗体亚类	亲和常数 (L/mol)
	上清	腹水		
稻$_1$B$_7$	10^5	10^6	IgG_1	1.12×10^9
稻$_2$H$_8$	10^5	10^6	IgG_1	8.31×10^8
稻$_2$D$_9$	10^5	10^6	IgG_{2a}	2.33×10^9
稻$_1$A$_6$	10^5	10^6	IgG_{2b}	7.96×10^8

2.3 单克隆抗体特异性鉴定

间接 ELISA 法检测 4 株 McAb 特异性:与 O1 群稻叶型霍乱弧菌结合,与 O1 群小川型霍乱弧菌、O139 群霍乱弧菌、河弧菌、副溶血弧菌以及嗜水气单胞菌、大肠杆菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、宋内氏志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、奇异变形杆菌等均无交叉反应。免疫印迹结果(图 1)显示 4 株 McAb 特异地与 O1 群稻叶型霍乱弧菌结合,而与其他细菌无交叉反应。



A 稻$_1$B$_7$ McAb;B 稻$_2$H$_8$ McAb;C 稻$_2$D$_9$ McAb;D 稻$_1$A$_6$ McAb
1:O1 群小川型霍乱弧菌;2:O139 群霍乱弧菌;3:副溶血弧菌;4:河弧菌;5:宋内氏志贺氏菌;6:沙门氏菌;7:嗜水气单胞菌;8:铜绿假单胞菌;9:大肠杆菌;10:金黄色葡萄球菌;11:奇异变形杆菌;12:O1 群稻叶型霍乱弧菌

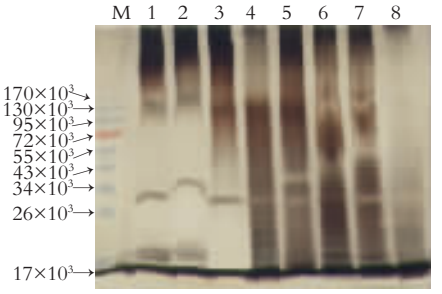
图 1 O1 群稻叶型霍乱弧菌检测 McAb 特异性的 Western blot 分析

2.4 单克隆抗体的表位分析

通过单克隆抗体的位点相加实验来证实 4 株单抗是否针对相同的表位,见表 2,从表中可看到它们的 AI 值 > 40%,说明它们针对的是不同表位。

为确定 4 株单抗针对的抗原成份,我们提取了 LPS,银染结果见图 2,结果显示 O1 群霍乱弧菌的 LPS 呈梯型带。

间接 ELISA 结果显示,稻$_1$B$_7$、稻$_2$D$_9$与 O1 群稻叶型霍乱弧菌脂多糖特异结合,免疫印迹结果(图 3)显示它们出现的条带位置和银染的第 1 条一致,进一步证实该株单抗为针对 O1 群霍乱弧菌脂多糖的抗体,而稻$_2$H$_8$、稻$_1$A$_6$未出现阳性结果,提示稻$_2$H$_8$、稻$_1$A$_6$针对的是非 LPS 表位。

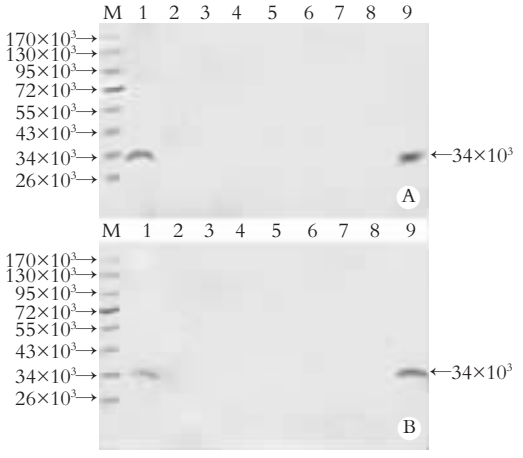


M:标准;1:O1 群小川型霍乱弧菌;2:O1 群稻叶型霍乱弧菌;3:O139 群霍乱弧菌;4:河弧菌;5:豚鼠气单胞菌;6:宋内氏志贺氏菌;7:大肠杆菌;8:沙门氏菌

图 2 O1 群稻叶型霍乱弧菌及其他细菌 LPS 的 SDS-PAGE 银染结果

表 2　表位分析的 ELISA 相加实验结果[D(450)值(AI 值)]

	稻$_1$B$_7$	稻$_2$H$_8$	稻$_2$D$_9$	稻$_1$A$_6$
稻$_1$B$_7$	0.782	1.508(72.4%)	1.278(81.9%)	1.214(67.4%)
稻$_2$H$_8$	–	0.967	1.310(64.8%)	1.451(77.3%)
稻$_2$D$_9$	–	–	0.623	1.153(78.3%)
稻$_1$A$_6$	–	–	–	0.670



A 稻$_1$B$_7$ McAb；B 稻$_2$D$_9$ McAb

M 标准；1 :O1 群稻叶型霍乱弧菌脂多糖；2 :O1 群小川型霍乱弧菌脂多糖；3 :O139 群霍乱弧菌脂多糖；4 :河弧菌脂多糖；5 :豚鼠气单胞菌脂多糖；6 :宋内氏志贺氏菌脂多糖；7 :大肠杆菌脂多糖；8 :沙门氏菌脂多糖；9 :对照(O1 群稻叶型霍乱弧菌全菌液)

图 3　O1 群稻叶型霍乱弧菌及其他细菌的 LPS 与稻叶单抗的 Western blot 分析

3　讨论

单克隆抗体能识别各种生物活性物质如蛋白、多糖、核酸等生物大分子中单一抗原决定簇，并与其特异结合，同时由于单克隆抗体的均质性及易于大量生产，使其在生命科学研究领域中得到极为广泛的应用[7]。对时时威胁人类并带来严重危害的霍乱弧菌而言，针对其开发的单克隆抗体无疑将为霍乱的诊断和预防提供新的手段[8]。

我们以灭活的 O1 群稻叶型霍乱弧菌为抗原，通过杂交瘤技术制备针对 O1 群稻叶型霍乱弧菌的单克隆抗体，鉴定了生物学特性。研究结果表明，我们成功地获得了能稳定分泌抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌单克隆抗体的 4 株杂交瘤细胞株：稻$_1$B$_7$、稻$_2$H$_8$、稻$_2$D$_9$、稻$_1$A$_6$。经鉴定 4 株单抗特异性好、亲和力高、效价高，达到了抗体用于诊断试剂亲和力的要求[9]。通过单克隆抗体的位点相加实验表明 4 株单抗针对的是不同抗原表位，识别不同的抗原决定簇；经间接 ELISA 和 Western blot 实验证实稻$_1$B$_7$、稻$_2$D$_9$针对 O1 群稻叶型霍乱弧菌脂多糖，而稻$_2$H$_8$、稻$_1$A$_6$针对非脂多糖抗原位点，为下一步研究提供了有力的抗体工具。

抗体的特异性是决定抗体应用价值的关键。由于本研究中的免疫原采用灭活的 O1 群稻叶型霍乱弧菌菌液，全菌体蛋白的抗原成分复杂，不同细菌之间存在一些相似抗原成分，能与抗体发生类似的分子识别作用，相互间可能发生交叉反应。为筛选出只针对 O1 群稻叶型霍乱弧菌的单克隆抗体，我们用了多种包括弧菌科及其他常见细菌在内的菌体抗原进行了间接 ELISA 方法的检测、筛选，并用免疫印迹证实其特异性，筛选出了能用于只针对 O1 群稻叶型霍乱弧菌的高特异性抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌单抗，这意味着这几株单抗在霍乱的诊断上有着重要的应用价值，同时，进一步明确它们针对的抗原表位，筛选出相应的模拟表位，对于研发基于表位的霍乱弧菌模拟多肽疫苗具有重要的指导意义。我国目前在单克隆抗体技术领域中关于 O1 群单抗的研究鲜有报道，在霍乱的快速检测上我国还是空白。因此，本研究为下一步 O1 群稻叶型霍乱早期快速诊断的胶体金试纸条的开发和预防奠定了基础。

参考文献：

[1] Griffith D C, Kelly-Hope L A, Miller M A. Review of reported cholera outbreaks worldwide, 1995 – 2005[J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 75(5): 973 – 977.

[2] Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1 – 2): 173 – 179.

[3] Friguet B, Diavadi-Ohaniance L, Pages J, *et al*. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the beta 2-subunit of Escherichia coli tryptophan synthase[J]. J Immuno Methods, 1983, 60(3): 351 – 358.

[4] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol-water and further applications of procedure[M]//Wistler R L. ed. Methods in carbohydrates chemistry. Vol. 5. New York: Academic Press Inc, 1965: 83 – 91.

[5] Carlson R W, Kalembasa S, Turowski D, *et al*. Characterization of the lipopolysaccharide from a Rhizobium phaseoli mutant that is defective in infection thread development[J]. J Bacteriol, 1987, 169(11): 4923 – 4928.

[6] Carrion M, Bhat U R, Reuhs B, *et al*. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from Bradyrhizobium japonicum[J]. J Bacteriol, 1990, 172(4): 1725 – 1731.

[7] Hajighasemi F, Gharagozlou S, Ghods R, *et al*. Private idiotypes located on light and heavy chains of human myeloma proteins characterized by monoclonal antibodies[J]. Hybridoma (Larchmt), 2006, 25(6): 329 – 335.

[8] 王颖芳，段广才，谢　婧，等. 霍乱弧菌 O139 和 ElTor 菌株毒力岛区域分子特征比较[J]. 郑州大学学报:医学版, 2007, 42(6): 1123 – 1125.

[9] Paulovicova E, Machova E, Hostacka A, *et al*. Immunological properties of complex conjugates based on Vibrio cholerae O1 Ogawa lipopolysaccharide antigen[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 144(3): 521 – 527.

（编辑　汪勤俭）