维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0267-03

抗 HBsAg 单克隆抗体的制备与生物学特性的鉴定

王雪梅[1],赖梅梅[1],张晓丽[2],张祯祯[1],陈 婧[1],张 君[1],黄爱龙[1]

(1.重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016;
2.第三军医大学附属西南医院肿瘤科,重庆 400038)

【摘 要】目的:制备分泌抗 HBV S 蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并鉴定其特性,为建立快速诊断 HBV 感染的方法奠定基础。方法:以重组乙肝疫苗免疫 BALB/c 小鼠,通过细胞融合建立了能稳定分泌抗 HBsAg 单抗的杂交瘤细胞株,利用间接 ELISA 技术和 Western blot 进行单抗特异性的鉴定,同时采用间接 ELISA 方法鉴定 mAb 的 Ig 亚类,检测 mAb 的效价及相对亲和力。结果:获得 1 株可分泌特异性 mAb 的杂交瘤细胞 4D2,其抗体亚类为 IgG_1 型,腹水效价为 $1:10^6$,相对亲和力在 10^5 以上。结论:成功地制备出抗 HBV S 蛋白的单克隆抗体,为建立快速特异检测 HBV 感染的实验方法提供了有力的工具。

【关键词】乙型肝炎病毒;乙型肝炎表面抗原;单克隆抗体
【中国图书分类法分类号】R392.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-13

Preparation and characterization of monoclonal antibody against S protein of HBV

WANG Xue-mei, et al

(*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease, the Institute for Viral Hepatitis of the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare anti-HBV S protein hybridoma cell line, this will be helpful to the establishment of rapid HBV infection diagnosis assay. *Methods*: BALB/c mice were immunized with the recombinant Hepatitis B vaccine. A hybridoma cell line which consistently secreted monoclonal antibody(McAb)against HBsAg was obtained through cell fusion. The specificity of the McAb was analysed by indirect ELISA and Western blot analysis. The immunoglobulin (Ig) subtypethe ascites titers, and the affinity of the obtained mAbs were determined by indirect ELISA. *Results*: From over hundred positive hybridomas which secreted anti-S protein mAbs, one of hybridomas was screened out, designated 4D2. The subtype of the McAb was IgG_1. The titer of 4D2 mAb produced by ascites fluid was over $1:10^6$. The relative affinity constant of 4D2 mAb was determined as 10^5. *Conclusion*: One of high titer, specific mAb against HBV S protein has been successfully prepared and primarily identified, which may be useful in the development of a rapid and convenient diagnostic kit for detection of HBV infection.

【Key words】Hepatitis B virus; Hepatitis B surface antigen(HBsAg); Monoclonal antibody

乙型肝炎是一种世界范围流行的严重危害人类健康的传染性疾病。乙型肝炎表面抗原(Hepatitis B surface antige, HBsAg)是人体感染乙型肝炎病毒后最先出现的一项血清标志物,它是乙肝病毒的外壳蛋白,本身不具有传染性,但它的出现常伴随乙肝病毒的存在,因此它是已感染乙肝病毒的标志,是乙型肝炎早期诊断的重要指标。临床已确诊的乙肝病人中 HBsAg 检出率介于 50%~98%。一般在乙肝病毒急性感染的潜伏期末,在感染者的血液中就可出现 HBsAg,发病时达高峰。目前,检测 HBsAg 的方法很多,并且已经应用于临床。建立适合临床应用的乙型肝炎快速诊断方法需先制备抗 HBsAg 的杂交瘤细胞株[1,2]。以下介绍了抗 HBsAg 杂交瘤细胞株的建立和对所分泌的单抗进行特异性鉴定的结果。

作者介绍:王雪梅(1981-),女,硕士,研究方向:乙肝病毒感染。
通讯作者:黄爱龙,男,教授,E-mail:ahuang1964@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助(项目号:30400374)。

1 材料与方法

1.1 材料

重组乙型肝炎疫苗(内含乙型肝炎病毒表面抗原 HB-

维普资讯 http://www.cqvip.com

sAg),购自北京天坛生物制品股份有限公司。6～8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,质量 20g 左右,购自重庆医科大学实验动物中心。乙肝病毒表面抗原诊断试剂盒,乙肝病毒表面抗体诊断试剂盒,检测抗 HBeAg、抗 HBcAg 抗体试剂盒均购自上海科华生物技术有限公司。福氏佐剂,PEG (Mr4 000),Protein G 亲和层析柱,HRP 标记的羊抗鼠 IgG,DAB 显色剂,鼠抗体 IgG 亚类 ELISA 试剂盒均购自 Sigma 公司。硝酸纤维膜购自辛创公司。HAT、HT、RPMI1640 培养基为 GIBCO 公司产品,胎牛血清为 Hyclone 公司产品。重组 GST-perS1 蛋白, 重组 GST-perS2 蛋白,Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 BALB/c 小鼠的免疫 用 BCA 法测定重组乙肝疫苗 HBsAg 蛋白的浓度,与等体积的福氏完全佐剂混合至完全乳化,对 BALB/c 小鼠腋下,腹股沟及背部皮下多点注射,剂量为每只 50μg,进行基础免疫。此后,每隔 2 周以 50μgHBsAg 加等体积福氏不完全佐剂完全乳化后加强免疫,共 3 次。最后 1 次加强免疫后 2 周,即在追加免疫前先用乙肝病毒表面抗体试剂盒以间接 ELISA 方法测定免疫小鼠的血清抗体滴度,当达到 $1:10^6$ 后,取 100μg 抗原尾静脉注射追加免疫。

1.2.2 杂交瘤细胞的建立及 mAb 腹水的制备 在追加免疫后的第 5d,用 50%的 PEG4000 作融合剂,取免疫小鼠的脾细胞与 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞按常规方法进行细胞融合[3],用 HAT 培养基进行选择培养,用间接 ELISA 法筛选能分泌特异性抗体的杂交瘤细胞,用乙肝病毒表面抗体诊断试剂盒测定其培养上清 A_{450} 值,其 A_{450} 值大于阴性(以试剂盒内所附阴性对照为阴性对照)值 2.1 倍以上为阳性。通过有限稀释法克隆化培养使杂交瘤细胞 100%呈阳性,共经 3 次克隆化培养。逐级扩大培养冻存,按常规方法制备腹水[3]。用盐析法及 Protein G Sepharose 亲和层析法[4]分离纯化腹水中 HBsAg 蛋白的 mAb,并用 Bradford 法测定 mAb 的浓度。

1.2.3 杂交瘤细胞的染色体计数 将杂交瘤细胞培养至对数生长期,加入终浓度为 0.08mg/L 的秋水仙素,继续培养 6h 后,用 0.075mol/L 的 KCl 低渗处理 30min,甲醇:冰醋酸为 3:1 的固定液固定 3 次,加入少量固定液混匀,滴片,Gimsa 染色,油镜下观察分析细胞分裂中期的染色体核型,并进行显微摄像。

1.2.4 mAb 的免疫反应特异性鉴定 (1)间接 ELISA 方法。用重组 GST-perS1 蛋白,重组 GST-perS2 蛋白分别包被 96 孔酶标板(10mg/L),一抗为抗 HBsAg 阳性的杂交瘤细胞培养上清,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,用 TMB 显色,测定 A_{450} 值。(2)Western blot 分析。取重组 GST-perS1 蛋白,重组 GST-perS2 蛋白,购买的重组乙肝疫苗各 10μl 进行 15% SDS-PAGE 电泳后,转移至 NC 膜上,用 50g/L 的脱脂奶粉 PBS(PBST)4℃封闭过夜,一抗为 ELISA 筛选获得的抗 HBsAg 阳性的杂交瘤细胞培养上清,37℃孵育 2h, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,1:5 000 稀释于 PBS,37℃孵育 2h。DAB 显色成像。(3)用检测抗 HBeAg 和抗 HBcAg 抗体试剂盒确定该杂交瘤细胞分泌的 mAb 是否能与乙肝病毒 e 抗原和核心抗原反应,检测按照说明书进行,加样量为 50μl/孔细胞培养上清。

1.2.5 杂交瘤细胞培养上清和腹水 mAb 的效价及 Ig 亚类的鉴定 (1)腹水 mAb 的效价测定:将腹水标本进行梯度稀释,采用间接 ELISA 方法进行测定。(2)mAb Ig 亚类的鉴定:按照试剂盒说明书进行。

1.2.6 mAb 相对亲和力的测定 采用间接 ELISA 方法测定相对亲和力[5,6]。待测样品为不同稀释度的抗 HBsAg 的 mAb,用乙肝病毒表面抗体诊断试剂盒于波长 450nm 测定 A_{450} 值。再以 mAb 的不同浓度为横坐标,以其相应的 A 值为纵坐标,绘制 mAb 的测定曲线。以各曲线上部趋于平坦段的 A 值为 100%,找出 A 值为 50%的点对应的 mAb 的浓度,即为相应 mAb 的相对亲和力。

2 结 果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

细胞融合后,经间接 ELISA 筛选获得能分泌抗 HBsAg 特异性 mAb 的细胞株共 128 株,经 3 次连续克隆化及多次间接 ELISA 进行特异性筛选后得到了 1 株分泌抗 HBsAg 特异性 mAb 的杂交瘤细胞株 (4D2)。将杂交瘤细胞液氮保存 3 月后复苏细胞,连续 3 个月传代,该细胞株仍能稳定分泌特异性的 mAb。

2.2 杂交瘤细胞染色体计数

4D2 细胞核型分析染色体数目接近 2 种亲本细胞的染色体数目之和, 即小鼠脾细胞的染色体数目(40 条)与 Sp2/0 骨髓瘤细胞染色体数目(2n:54～64)之和。4D2 细胞的染色体数目为 99 条。显微镜下观察, 这株细胞的染色体核型主要为端着丝粒,少数为中着丝粒。

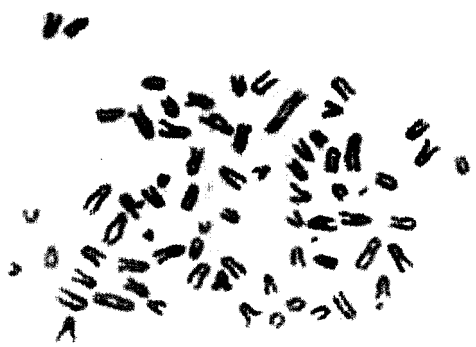


图 1 杂交瘤细胞株 4D2 染色体分析

2.3 mAb 的特异性鉴定

经间接 ELISA、Western blot 和试剂盒检测,所

维普资讯 http://www.cqvip.com

得 mAb 与前 S1、前 S2 蛋白、乙肝病毒 e 抗原和核心抗原之间均无交叉反应，说明所得的 mAb 特异性良好。



图 2 HBsAg mAb 特异性的 Western blot 分析

2.4 腹水 mAb 的效价及 Ig 亚类的鉴定

用乙肝病毒表面抗体检测试剂盒，通过间接 ELISA 检测，此杂交瘤细胞株诱生的小鼠腹水效价较高，腹水的效价为 10^{-6}。用细胞培养上清与羊抗鼠 IgG 及其亚类进行间接 ELISA 反应，结果显示 4D2 的 mAb 与羊抗鼠 IgG，IgG_1 反应，A_{450} 值为 0.945，与 IgG 的其他亚类均不反应。由此表明，4D2 单抗属于 IgG_1 亚类。

2.5 mAb 相对亲和力的测定

间接 ELISA 测定，mAb 的相对亲和力大于 10^5。

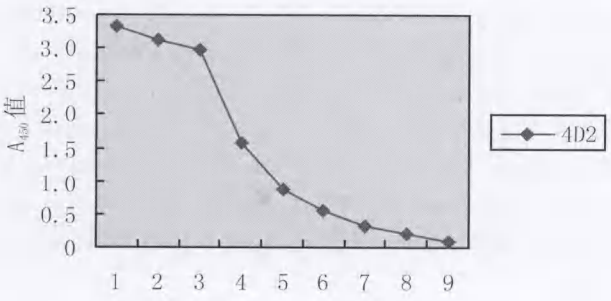


图 3 4D2mAb 相对亲和力分析

3 讨 论

HBV 包膜蛋白含前 S1、前 S2 和 S 基因，分别编码前 S1、前 S2 和 HBsAg，他们是 HBV 包膜的主要成分，可诱导机体产生相应的抗体，这些抗体能保护机体免受 HBV 的感染，产生保护性免疫。检测 HBsAg 是诊断 HBV 感染最简便、最有效的方法之一。目前，制备抗 HBsAg 的单抗多采用乙肝病毒携带者或乙型肝炎患者的血清作为免疫原，其制备程序复杂，且有传播血源性疾病的可能。在本研究中，我们采用重组乙肝疫苗（含 HBsAg）为免疫原制备抗 HBsAg 的单克隆抗体。重组乙肝疫苗相对于人血清具有生产步骤简单，极易扩大产量，且不含有人血清中的其他蛋白成分的优势，用其制备抗 HBsAg 的单抗，不仅可以解决原材料的来源，而且可以有效的提高免疫原的敏感性和特异性，简化单抗制备步骤[7]。实验中，通过对融合的杂交瘤细胞进行特异性筛选，我们获得了一株能稳定分泌抗 HBsAg 特异性抗体的杂交瘤细胞株，并通过间接 ELISA、Western blot 和试剂盒检测等后续实验，证实用重组乙肝疫苗作为免疫原获得的 mAb 与用人血清制备的 mAb 具有相似的特异性和效价，这为进一步制备快速检测乙肝病毒感染的试剂盒提供了有力的工具[2,8]。此外，市面上抗 HBsAg 单克隆抗体试剂供应较少，本实验制备的抗 HBsAg 的单克隆抗体可用于其他科研实验之中，如免疫共沉淀、Western blot 等，具有一定的科研和临床意义及市场推广价值。

参 考 文 献

[1] Tang X, Zhang X, Xu H. Establishment of hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies against hepatitis B virus surface antigens (a, d, and r) and development of sensitive ELISA diagnostic test[J]. Hybridoma, 2001; 20(1): 47–52.

[2] Yucel F, Manav A, Basalp A. Production and characterization of monoclonal antibodies against hepatitis B viruses and application of a quick sandwich ELISA[J]. Hybrid Hybridomics, 2003; 22(3): 173–177.

[3] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 世界图书出版社，1996.232.

[4] 汪家政，范 明. 蛋白质技术手册[M]. 科学出版社，2002.65，238.

[5] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 陕西科学技术出版社，1991. 88.

[6] 苏 谨，张亚莉，尤长宣，等. 抗人 NGF 单克隆抗体的制备及初步鉴定[J]. 细胞与分子免疫杂志，2002; 18(2): 168.

[7] 吴利红，束红强，陈华青. 抗 HbeAg 不同位点的单克隆抗体杂交瘤细胞株的制备及其应用[J]. 检验医学，2006; 21(4): 369.

[8] Acosta C, Baluja I, Amores I, et al. Monoclonal antibodies against hepatitis B s antigen: production, characterization, and use for diagnosis[J]. Hybridoma, 2000; 19(3): 259–262.

（责任编辑：谭乐勤）