维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0459-04

特异性 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体的制备及抗原表位初步分析

张 娟[1],余晓林[2],陈维贤[1],陶 鹏[1],唐 霓[1],黄爱龙[1],郑 建[1]

(1.重庆医科大学病毒性肝炎研究所感染性疾病教育部重点实验室,重庆 400016;
2.重庆医科大学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:用分段表达纯化的 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)的核衣壳蛋白(nucleocapsid N 蛋白)制备针对该蛋白不同区域抗原表位的高特异性单克隆抗体(McAb),初步定位单克隆抗体识别表位所在区域。方法:用分段表达纯化的 SARS-CoV 的 N 蛋白(分别记为 N1 蛋白、N2 蛋白)分别免疫 Balb/c 小鼠制备 McAb,通过检测其亚类、效价及相对亲和力鉴定 McAb 的生物学特性,以 Western blot 鉴定单克隆抗体特异性,并对 McAb 结合表位进行初步分析。结果:筛选出 7 株抗 SARS-CoV N1 蛋白及 2 株抗 SARS-CovN2 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株,IgG 亚类鉴定 6 株为 IgG_1,2 株为 IgG_{2b},1 株为 IgG_3,腹水效价 10^5 以上;亲和常数达 10^8 以上。Western blot 证实所获的单克隆抗体可与 SARS-CoV N 蛋白发生特异性反应。ELISA 相加实验结果显示 2 株 N1 McAb 识别相同的抗原表位,其余均识别不同的抗原表位。结论:通过分段表达纯化的 SARS-CoV N 蛋白而制备的特异性针对 SARS-CoV N 蛋白不同区域抗原表位的单克隆抗体中,N1 单抗识别 N 蛋白 N 端 (1~549bp),N2 单抗识别 N 蛋白 C 端 (496~1269bp),可初步定位单克隆抗体识别表位所在区域。

【关键词】SARS-CoV;核衣壳蛋白;单克隆抗体;抗原表位
【中国图书分类法分类号】R51 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-22

Preparation of monoclonal antibodies against SARS coronavirus nucleocapsid protein and preliminary analysis of antigenic epitopes

ZHANG Juan, et al

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To prepare monoclonal antibodies with high specificity against different regions of N protein and to analyze antigenic epitopes of SARS-CoV N protein. *Methods:* Balb/c mice were immunized with purified different region N protein to prepare McAb hy hybridoma technique and select by indirect ELISA. Both of these McAbs were characterized for their antibody titre in the culture supernatant as well as ascites, class, subclass and affinity analysis. The antigen specificity for McAb were evaluated and confirmed by Western blot. The binding site and capability of McAb were observed by ELISA additive assay. *Results:* Seven hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against SARS-CoV N1 and two hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against SARS-CoV N2 were obtained. Ahout the immunoglobulin subclass of McAb, six were IgG_1, two were IgG_{2b} and one was IgG_3. Western blot showed that the McAbs reacted specifically with SARS-CoV N protein. ELISA additive assay indicated that two antibodies against SARS-CoV N1 recognized same epitopes, while others recognized distinct epitopes. *Conclusion:* We successfully obtained nine specific McAbs against the different region SARS-CoV N protein after expression and purification of the different part SARS-CoV N protein. It shows that the N1 McAb recognizs the N-terminus of the N protein whereas the N2 McAb recognizs the C-terminus.

【Key words】SARS coronavirus; Nucleocapsid protein; Monoclonal antibodies; Antigenic epitopes

严重急性呼吸综合症 (severe acute respiratory syndrome, SARS)是 2002 年 11 月爆发流行的一种新的传染病,其病原体为一种新型冠状病毒(SARS coronavirus, SARS-CoV)[1]。尽管目前 SARS 疫情已得

作者介绍:张 娟(1971-),女,博士,
主要研究方向:重大传染性疾病检测芯片的研发。

基金项目:国家"863"高科技发展计划项目资助(2002AA215015)和重庆市科委项目资助(7673)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

到控制,但对它的认识如起源、宿主、致病机理等仍不完全清楚,对人类的威胁依然存在[2,3]。因此,我们对 SARS 应常备不懈。

研究表明,SARS-CoV 的几种结构蛋白中,核衣壳蛋白(nucleocapsid protein,N 蛋白)是一种重要的结构蛋白[4]。在成熟的病毒颗粒中,N 蛋白和 RNA 结合位于病毒颗粒的核心。N 蛋白与病毒的致病性密切相关,具有很强的免疫原性,在病毒感染过程中大量表达,这些特性使 N 蛋白成为抗体诊断和疫苗研制的良好靶点[5],在 SARS 致病机理及诊断试剂研制中有极为重要意义。因此,分析其抗原表位为 SARS 临床诊断试剂及疫苗的研究提供了有力的依据。

本研究根据抗原性预测分析,将 SARS-CoV N 蛋白分段表达纯化,制备出针对该蛋白不同区域抗原表位的高特异性单克隆抗体,初步定位单克隆抗体识别表位所在区域,为 SARS-CoV 早期快速诊断试剂的开发和发病机理的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 蛋白 根据抗原性预测分析将 N 蛋白分成两部分表达(以 TOR2 为模板,GenBank 序列号为 AY274119),N 端(1~549bp)命名为 N1,C 端(496~1269bp)命名为 N2,通过全基因合成分别克隆至原核表达载体 pET32a(+),以 IPTG 诱导表达并纯化(详见另文),并通过 SARS 确诊患者血清中相应抗体检测,证明 N1 和 N2 蛋白均可作为 SARS 患者血清抗体检测的特异性抗原[6,7]。

1.1.2 实验动物、细胞 Balb/c 小鼠由本校动物中心提供;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),胎牛血清购自 Hyclone。PEG4000 购自天津天泰公司。HAT、HT 培养液按常规配制。化学发光检测试剂盒 ECL 购自 Pharmacia 公司。McAb 亚类检测试剂盒购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫 选用 8 周多的 Balblc 雌小鼠按剂量 10μg、25μg、50μg 分为 3 组,免疫 4 次:初次免疫前取眼血作为阴性对照,免疫时重组抗原加福氏完全佐剂皮下多点注射;以后每隔 2 周以福氏不完全佐剂与等体积重组抗原混合后皮下多点注射加强免疫 2 次,同时用间接 ELISA 测定小鼠血清的抗体效价;融合前 3 天对抗体效价高的(达 10^{-6})小鼠尾静脉注射加强免疫(50μg)。

1.2.2 细胞融合与筛选 冲击免疫后 3 天取小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 5∶1 的比例与 50% PEG 按常规方法进行融合[8],将融合后的细胞转移到预先种植小鼠巨噬细胞的 96 孔培养板中培养,融合 7~10 天左右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,筛选出只针对 N1 蛋白或 N2 蛋白的单抗细胞株:即用 N1、N2 蛋白包被 96 孔酶标板(10μg/ml),封闭后,每孔加阳性杂交瘤细胞培养上清(100μl/孔),以免疫小鼠阳性血清为阳性对照、RPMI-1640 培养液为阴性对照,37℃孵育 1h,充分洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1∶10000 稀释)100μl/孔,37℃孵育 30 min,TMB(四甲基联苯胺)100μl/孔显色 15min,1 N H_2SO_4 50μl/孔终止反应后于波长 450nm 测定 OD 值。对强阳性的细胞株采用有限稀释法亚克隆 3 次,将获得具有稳定分泌抗 SARS-CoV N1、N2 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[8]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,用间接 ELISA 法检测 9 株阳性杂交瘤细胞的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 Beatty[9]的方法,即用纯化 N1、N2 蛋白分别以 1.25、2.5、5 和 8μg/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 显色于 450nm 测 OD 值,以抗体浓度的对数为横座标,以 OD 值为纵座标,每种 McAb,得出 4 条反应曲线,以每条曲线上部平坦段的 OD 值作为 100%,在曲线上查出 50%OD 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 采用免疫印迹法:将原核表达纯化的 SARS-CoV N1、N2 蛋白、作阴性对照的正常小鼠血清、作阳性对照的小鼠阳性血清行 10%SDS-PAGE 电泳后,于 4℃ 20V 条件下转膜过夜;硝酸纤维素膜(NC 膜)以封闭液室温封闭 2h;PBS 洗膜后分别加入各株单抗培养上清(1∶1000 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,分别以 DAB 及化学发光法显色。

1.2.6 单克隆抗体的表位分析 参照 Friguet[10]等的 ELISA 相加实验进行测定。即用竞争 ELISA,将原核表达纯化的 SARS-CoV N1、N2 蛋白包被 96 孔酶标板(2μg/ml),一抗分别为 9 株腹水单抗(100μl/孔)以及每种单抗各取 50μl 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 显色后于波长 450nm 测定 OD 值。相加指数 $AI=[(2A_{1+2}/A_1+A_2)-1]\times100\%$,式中 A_1、A_2 分别为单独加一株单抗的 OD 值,A_{1+2} 代表两株单抗两两组合后所测 OD 值,AI>40%表示两株单抗针对不同抗原表位;否则表示两株单抗针对相同表位。

2 结 果

维普资讯 http://www.cqvip.com

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 60%。用间接 ELISA 筛选及连续 3 次亚克隆后得到了 7 株能稳定分泌抗 N1 单抗、2 株能稳定分泌抗 N2 单抗的杂交瘤细胞株，分别为 N1Ⅰ A6、N1Ⅰ B1、N1Ⅰ D7、N1Ⅰ H2 及 N1Ⅱ C5、N1Ⅱ D3、N1Ⅱ F6 和 N2Ⅰ C4、N2Ⅰ H6。

2.2 单克隆抗体质的鉴定

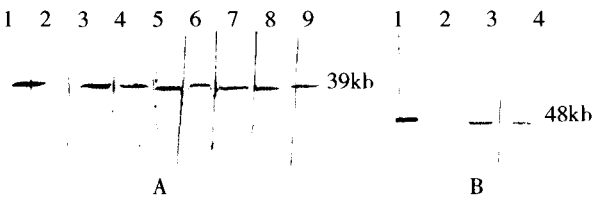
包括 McAb 的效价、Ig 亚类及亲和常数测定。各株的效价、Ig 亚类及亲和常数的结果见表 1。

表 1 抗 SARS-CoV N 蛋白 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 (mol/L)
	上清	腹水		
N1Ⅰ A6	10^5	10^6	IgG_3	3.16×10^9
N1Ⅰ B1	10^5	10^6	IgG_{2b}	8.52×10^8
N1Ⅰ D7	10^5	10^5	IgG_1	1.37×10^9
N1Ⅰ H2	10^6	10^7	IgG_1	5.63×10^9
N1Ⅱ C5	10^5	10^7	IgG_1	2.28×10^9
N1Ⅱ D3	10^5	10^6	IgG_1	9.43×10^8
N1Ⅱ F6	10^6	10^7	IgG_1	1.07×10^9
N2Ⅰ C4	10^6	10^7	IgG_{2b}	3.88×10^9
N2Ⅰ H6	10^5	10^6	IgG_1	1.65×10^9

2.3 单克隆抗体的特异性及识别表位的初步定位

应用 Western blot 对获得的单抗进行检测，可以看到单克隆抗体具有很高的特异性。7 株抗 N1 单抗能与纯化 SARS-CoV N1 蛋白特异性结合，识别 N 蛋白 N 端；2 株抗 N2 单抗能与纯化 SARS-CoV N2 蛋白特异性结合，识别 N 蛋白 C 端。见图 1。



A：1. 抗 N1Ab 阳性小鼠血清；2. 未免疫小鼠血清；3~9 分别为 N1Ⅰ A6、B1、D7、H2 及 N1Ⅱ C5、D3、F6

B：1. 抗 N2Ab 阳性小鼠血清；2. 未免疫小鼠血清；3~4 分别为 N2Ⅰ C4、H6

图 1 9 株单抗分别与纯化重组 N1、N2 蛋白的免疫印迹反应

2.4 单克隆抗体的表位分析

竞争 ELISA 相加实验结果见表 2：可看到 N1Ⅰ B1 与 N1Ⅰ D7 这两株单抗 AI 值 <40%，它们有相同的抗原表位；其他的 AI 值 >40%，说明它们针对的是不同表位。

3 讨 论

表 2 表位分析的 ELISA 相加实验结果

	N1Ⅰ A6	N1Ⅰ B1	N1Ⅰ D7	N1Ⅰ H2	N1Ⅱ C5	N1Ⅱ D3	N1Ⅱ F6	N2Ⅰ C4	N2Ⅰ H6
N1Ⅰ A6	0.86	1.21(68%)	1.27(66%)	1.44(76%)	1.28(70%)	1.25(64%)	1.63(72%)	1.58(75%)	1.40(79%)
N1Ⅰ B1	-	0.58	0.83(33%)	1.15(69%)	0.96(56%)	1.13(82%)	1.45(79%)	1.32(73%)	1.13(77%)
N1Ⅰ D7	-	-	0.67	1.29(78%)	1.19(80%)	1.14(71%)	1.44(68%)	1.45(79%)	1.20(75%)
N1Ⅰ H2	-	-	-	0.78	1.24(73%)	1.22(69%)	1.47(62%)	1.51(75%)	1.28(73%)
N1Ⅱ C5	-	-	-	-	0.65	1.16(77%)	1.36(61%)	1.43(79%)	1.23(82%)
N1Ⅱ D3	-	-	-	-	-	0.66	1.36(60%)	1.46(81%)	1.19(75%)
N1Ⅱ F6	-	-	-	-	-	-	1.04	1.66(67%)	1.53(76%)
N2Ⅰ C4	-	-	-	-	-	-	-	0.95	1.36(65%)
N2Ⅰ H6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.70

注：数值为：OD 值(AI 值)

SARS-CoV N 蛋白是 SARS 冠状病毒主要结构蛋白之一，分子量约 47kD，是一个高度碱性的蛋白，在病毒的包装、复制和表达中有重要作用，并且在冠状病毒间高度保守，具有很强的免疫原性，在病毒感染过程中大量表达，这些特性使 N 编码区成为良好的检测靶位点[4,5]。单克隆抗体因其高度的均一性、特异性及来源稳定等特点使它在临床诊断、治疗及基础研究中有着极重要的价值。抗体识别的抗原表位分析在揭示病毒抗原分子的结构和功能、抗原－抗体反应机制方面具有重要意义，而且对诊断试剂研制及药物设计筛选等具有指导意义。基于此，本研究通过对 SARS-CoV N 蛋白抗原决定簇进行在线预测分析，人为的将 N 蛋白编码基因分成两部分，分别制备针对 N 蛋白不同区域抗原表位的单克隆抗体，初步分析优势抗原表位，为 SARS 的诊断试剂和疫苗的研究提供有力的依据[11]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

通过抗原决定簇在线预测结果分析显示,N 蛋白抗原决定簇主要集中在蛋白 C 末端。其中,抗原性最强的 3 个部分依次为第 219~288 位氨基酸、第 390~399 位氨基酸、第 157~167 位氨基酸。N 蛋白共有 422 个氨基酸,针对这些部位,人为的将 N 蛋白编码基因分成两部分,N1 包括 N 端 183 个氨基酸即第 1 ~ 183 位氨基酸 (1~549bp),N2 包括 C 端 258 个氨基酸即第 166 ~ 422 位氨基酸(496~1269bp),保证了抗原决定簇的完整。我室蒲丹等[7]用纯化的该重组蛋白作为抗原检测了 88 份 SARS 确诊患者血清中相应抗体,表明 N1 蛋白和 N2 蛋白均可作为 SARS 患者血清抗体检测的特异性抗原。本研究用纯化的该 N1、N2 蛋白分别作为免疫原制备了针对 N1、N2 片段的单克隆抗体,通过用 N1、N2 蛋白作包被抗原筛选后获得稳定分泌的 7 株抗 SARS-CoV N1 蛋白及 2 株抗 SARS-CoVN2 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株,经鉴定 9 株单抗亲和力高、效价高,Western blot 表明 7 株抗 N1 单抗能与纯化 SARS-CoV N1 蛋白特异性结合,识别 N 蛋白 N 端;2 株抗 N2 单抗能与纯化 SARS-CoV N2 蛋白特异性结合,识别 N 蛋白 C 端;经 ELISA 相加实验进行初步位点分析,结果显示 2 株 N1 McAb 针对的是相同抗原表位,识别相同的抗原决定簇;其余则针对的是不同抗原表位,识别不同的抗原决定簇。

目前主要认为 N 蛋白的中部和 C 端是其主要的抗原决定区段,Liu 等通过实验证明 N 蛋白 C 端 371~422 位氨基酸残基具有很强的抗原性,且在鉴别诊断中的特异性较好[12]。本研究的抗原决定簇在线预测结果与之基本相符,与 N1 单抗相比,N2 单抗针对的是 N 蛋白优势抗原表位,这些单抗的获得对 SARS-CoV 结构蛋白功能研究、抗原表位的精确定位及 SARS 的诊断试剂和疫苗的研究有重要意义。但是要充分证明这些单抗是否具有中和病毒感染的生物学活性,仍需要进一步通过病毒中和试验来加以确认。

参 考 文 献

[1] Nassiri, R. M. Severe acute respiratory syndrome[J]. Med Sci Monit, 2003; 96: 25-27.

[2] Wu D. Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates[J]. J Virol, 2005; 79(4): 2620-2625.

[3] Paul A. Rota, M. Steven Oberste, Stephan S, et al. Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome [J]. Science, 2003; 300: 1394-1399.

[4] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[J]. Science, 2003; 300:1399-1404.

[5] Li ST, Lin L, Wang H, et al. The epitope study on the SARS-CoV nucleocapsid protein [J]. Geno Prot. &Bioinfo, 2003; 1(3): 198-206.

[6] 蒲 丹,宋文鑫,闫 歌,等. 重组 SARS-CoV 刺突蛋白基因片段的原核表达及纯化[J]. 重庆医科大学学报,2004;29(4):409-412.

[7] 蒲 丹, 闫 歌, 张秉强, 等. 重组冠状病毒核衣壳蛋白血清抗体检测[J]. 免疫学杂志, 2003;20(5): 397-399.

[8] 司徒镇强.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2001.232-242.

[9] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG.Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. J Immunol Methods, 1987; 100(1-2):173-179.

[10] Friguet B, Diavadi O, Pages J, et al. A convenient enzyme-linked-immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site and application to hybridomes specific for the β 2-subunit of Escherichia coli tryptophan synthase[J]. J Immuno Meth, 1983; 60: 351-354.

[11] He Y, Zhou Y, Wu H, et al. Mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. J Clin Microbiol, 2004; 42(11): 5309-5314.

[12] Guozhen Liu, Shaohui Hu, Yongwu Hu, et al. The C-Terminal Portion of the Nucleocaspid Protein Demonstrates SARS-COV Antigenicity [J]. Gene. Prot. & Biointo, 2003; 1: 19.