DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.004

抗肺炎衣原体种特异性单克隆抗体的制备及其免疫学特性的研究

朱 瑾* (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 400038
俞树荣 张 雪 饶贤才 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 研究肺炎衣原体(Cpn)保护性抗原组分。方法: 利用杂交瘤技术制备了2株能稳定分泌抗Cpn单克隆抗体的杂交瘤细胞株。经间接免疫荧光法和免疫印迹法鉴定单抗效价和特异性,并作单抗2G5的体外中和实验。结果:单抗2G5和4F5效价分别为1∶102400、1∶51200(ELISA),且均为识别 Mr 98×10³蛋白的种特异性单抗。体外中和实验表明,单抗2G5具有明显的补体依赖中和作用,其中和效价为1∶130(0.04 mg/ml)。结论: Cpn种特异性单抗2G5对 Cpn Mr 98×10³蛋白具有中和作用。这对进一步研究 Cpn的抗原性,研制有效疫苗具有重要意义。

关键词 肺炎衣原体;单克隆抗体;中和作用
中图法分类号 R374

肺炎衣原体(Chlamydia peumoia, Cpn)是1989年定名的衣原体属内的第三个种,主要引起人的呼吸道感染。由于 Cpn为专性细胞内寄生的微生物,分离培养十分困难,因此阻碍了对其抗原性及致病机理的进一步研究,目前尚无适用的疫苗问世。Cpn种特异性单抗的研制不仅对 Cpn分离物的鉴定具有实用价值,而且进一步对 Cpn的抗原分析,研究其保护性抗原组分,为研制有效疫苗也奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及传代细胞

Cpn AR-39株购自美国华盛顿研究基金会,沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis, Ctr) C型株由上海医科大学李子华教授惠赠,鹦鹉热衣原体(Chlamydia psittaci, Cps) B1100株购自中国兽药监察所,解脲脲原体(Ureaplasma urealyticum, Uu)由首都儿科研究所提供,肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae, Spn)由本室保存, Hep-2细胞购自上海卫生防疫站。

1.2 抗原制备

Cpn培养方法参照文献[1],原体(Elementary bodies, EB)用泛影葡胺密度梯度法纯化,纯化后的 EB经冻融和超声粉碎,用 Lowry法测蛋白浓度后用作检测抗原。

1.3 Cpn EB的定量(包涵体形成单位 IFU)

测定方法按文献[2]进行。

1.4 细胞融合和克隆化

按文献[3]的方法,克隆筛选和腹水单抗效价测定用间接 ELISA法。

1.5 单抗鉴定

1.5.1 间接免疫荧光法(IFA)鉴定单抗特异性 AR-39感染72 h的 Hep-2细胞,滴片自然干燥后冷丙酮固定,同法制备 Hep-2细胞作阴性抗原对照, Ctr、Cps、Uu、Spn作抗原对照,二抗是猪抗鼠荧光抗体。

1.5.2 免疫印迹法鉴定单抗特异性 SDS-PAGE按文献[4]的方法,染色采用蛋白质银染法,免疫印迹实验按常规法。

1.5.3 单抗免疫球蛋白亚类鉴定采用免疫双扩法。

1.6 单抗的体外中和实验

1.6.1 $TCID_{50}$的确定 按文献[5]的方法。

1.6.2 腹水单抗的纯化 按辛酸硫酸胺法,紫外、可见分光光度计测纯化后蛋白浓度,将纯化的单抗1∶5稀释后作为原浓度,过滤除菌分装冻存备用, SP2/0腹水同法制备作为抗体对照。

1.6.3 补体制备 取无包涵体性结膜炎的豚鼠新鲜血清(GPS)作为补体,除菌分装冻存,临用前用灭菌 Hanks液稀释成5%浓度。

1.6.4 中和率测定 在加有12 mm×12 mm小玻片的24孔板上滴加2×10⁵ Hep-2细胞/孔,待长成单层,制备1000 $TCID_{50}$ Cpn悬液。将已1∶5稀释的 McAb2G5和 SP2/0腹水先经56℃,30 min灭活。再以此为原浓度用灭菌 Hanks液作系列10倍稀释。然后分成3个组。A组取每个稀释度的 SP2/0腹水、Cpn悬液、5% GPS各0.2 ml于试管中, B组取每个稀释度 McAb2G5、Cpn悬液、5% GPS各0.2 ml于试管中, C组取每个稀释度的 McAb2G5、Cpn悬液各0.2 ml于试管中,不加 GPS。所有试管均补充灭菌 Hanks液至2 ml, 37℃孵1 h,取孵育混合液加入24孔板,每孔0.3 ml,每一稀释度加4孔。将24孔板2000 r/min离心1 h, 37℃孵2 h,换标本培养基, 35℃孵72 h,取出玻片甲醇固定, May-Grunwald Giemsa染色,计数30个(×400)视野包涵体数,每一稀释度的中和率为:

* 朱 瑾,女,29岁,助理研究员,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$\frac{SP_2/0\text{腹水}30\text{个}(\times\ 400)\text{视野包涵体数} - \text{单抗}\ 30\text{个}(\times\ 400)\text{视野包涵体数}}{SP_2/0\text{腹水}30\text{个}(\times\ 400)\text{视野包涵体数}} \times 100\%$$

若包涵体减少大于 50%,则判为中和实验阳性,计算中和率大于 50%的腹水最高稀释度,作为中和抗体效价。每一实验重复 2~ 3次。

2 结果

根据包涵体计算公式得出 Cpn的浓度为 4.5× 10^5 IFU/ml.本实验获得了 2株单抗 $2G_5$, $4F_7$效价分别为 $2G_5$, 1: 102400; $4F_7$, 1: 51200(ELISA法)。用 IFA法鉴定单抗特异性。单抗 $2G_5$, $4F_7$与 Cpn均呈阳性反应,效价分别为 1: 5120, 1: 1280,见图 1,且与 Ctr、Cps等无交叉反应。

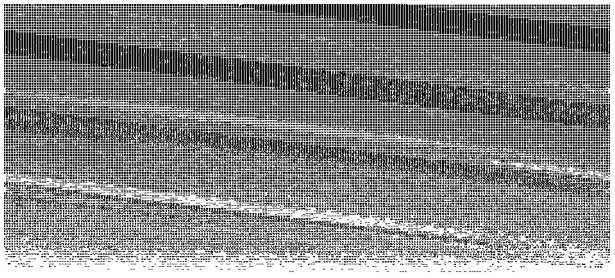


图 1　IFA法检测 McAb2G_5与包涵体的反应　(× 200)

Fig 1　Cpn inclusions can be recognized by McAb2G_5 in IFA (× 200)

Cpn AR-39和 Hep-2细胞的 SDS-PAGE图谱显示,AR-39的主要蛋白带有 Mr(98 70 67 60 56 53 50~ 46 43 40)× 10^3带,免疫印迹分析表明单抗 $2G_5$, $4F_7$只与 Cpn抗原 Mr 98× 10^3蛋白呈较强反应,而与 Hep-2细胞无蛋白带,说明 2株单抗均为针对 Cpn Mr 98× 10^3蛋白抗原的抗体。鼠多价血清主要识别 AR-39抗原的 Mr(98 78 73 43)× 10^3带。另外,McAb2G_5与各种抗原的免疫印迹图谱显示,McAb2G_5只与 Cpn有一条 Mr 98× 10^3反应带,说明 McAb2G_5为 Cpn种特异性单抗,见图 2 经免疫双扩法证实,2株单抗免疫球蛋白亚类均为 IgG$_1$。

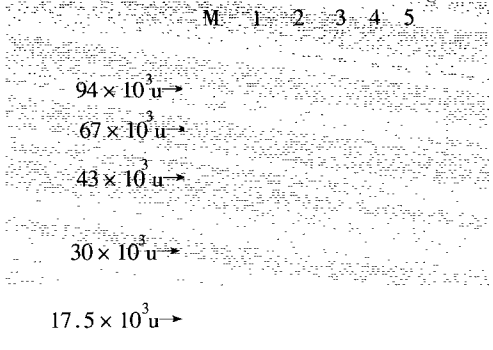


图 2　Western-blot分析 McAb2G_5的特异性

Fig 2　Western-blot analysis of specificity of McAb2G_5

lanes 1: Ctr; lanes 2: Cpn; lanes 3: Cps; lanes 4: Uu; lanes 5: Spn; M: Marker

McAb2G_5中和实验中,$TCID_{50}$= 67 IFU/ml,中和组包涵体数显著减少,只有在 Gps存在时,McAb2G_5原浓度、10^{-1}稀释,中和率大于 50%,中和实验阳性;无 GPS存在时中和实验阴性。McAb2G_5中和率测定结果见表 1。按 Reed-Muench法计算其中和效价为 1: 26,实际效价 1/26× 1/5,即 1: 13(0.04 mg/ml)。

表 1　McAb2G_5在有无补体存在时的中和率

Tab 1　Neutralization rate of McAb2G_5 with or without GPS

	McAb2G_5 diutions				
	× 10^0	× 10^{-1}	× 10^{-2}	× 10^{-3}	× 10^{-4}
With GPS	70	61	35	0	0
Without GPS	18	0	0	6	0

3 讨论

Cpn是近年来新认识的呼吸系统重要病原菌,且与冠心病存在相关性[6],因而其研究日益受到人们的重视。Cpn的单抗主要用于临床分离物的鉴定和抗原性分析。

国外已有 Cpn属和种特异性单抗,属特异单抗主要是针对 cpn LPS抗原和主要外膜蛋白(MOMP)抗原,如属特异单抗 CF-2、RR-405、TT-304都与 LPS反应,另一株 XC-60单抗是抗 Cpn属特异 Mr 60× 10^3 Hsp的[7]。Cpn种特异单抗主要有 RR-402和 SCP-53。国外还报道抗 Cpn Mr 76× 10^3蛋白的单抗具有体外中和作用[8]。目前,国内外尚无抗 Mr 98× 10^3蛋白单抗的报道。本研究制备的 2株单抗均为抗 Mr 98× 10^3蛋白的单抗。Kanamoto等用人恢复期血清与三种衣原体的免疫印迹分析表明,Cpn Mr 98× 10^3蛋白为 Cpn种特异抗原,本研究结果与此相符。无疑,$2G_5$、$4F_7$单抗对临床分离物的鉴定将具有重要作用。

目前,Cpn尚无适用的疫苗,对于 Ctr、Cps疫苗的研究常以 MOMP作为靶抗原。而 Cpn MOMP抗原复杂性及免疫原性较其它两种衣原体弱,与病人血清和兔多价血清呈较弱的反应带。这与本研究中鼠多价血清与 AR-39抗原的 Mr(98 78 73 43)× 10^3蛋白呈较强反应,而与 Mr 40× 10^3带只有微弱反应相一致,表明 Mr 98× 10^3蛋白具有强免疫原性。因此,对 Mr 98× 10^3蛋白的免疫保护性研究具有重要意义。为此,我们选用抗 Mr 98× 10^3的单抗 $2G_5$进行了中和实验,发现

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

其有明显的中和效应,而且证明其中和作用是补体依赖性的。这与 Cpn抗 MI融合蛋白的单抗中和实验结果一致[8]。McAb2G5是针对 Mr 98× 10^3表面蛋白[9]的种特异单抗,表面抗原可能在衣原体入侵宿主细胞的过程中具有更重要的作用,因而针对表面抗原的单抗更有可能成为中和抗体。补体具有中和溶解病毒的作用已早为人知,其机理可能与衣原体与抗体结合后补体直接导致 Cpn的溶解。阻止衣原体对宿主细胞的吸附和侵入,或干扰其在细胞内的增殖过程有关。McAb2G5对 Cpn Mr 98× 10^3保护性抗原组分,为研制有效疫苗奠定了基础。

参考文献

1 Maass M, Harig U T A. Evaluation of culture conditions used for isolation of chlamydia pneumoniae. Clin Microbiol Infect Dis, 1995, 103(2): 141

2 Furness G, Graham D M, Reeve P. The titration of trachoma and inclusion blennorrhoea viruded in cell culture. J Gen Microbiol, 1960, 23: 613

3 Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975, 256: 495

4 Batteiger B, Newhall W J V, jones R B. The use of Tween-20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. J immunol Methods, 1982, 55: 297

5 Reed J L, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg, 1938, 27: 493

6 Campbell L A, O′ Brien E R, Cappuccio A L *et al*. Detection of chlamydia pneumoniae T W A R in human coronary atherectomy tissues. J Infect Dis, 1995, 172: 585

7 Miyashita N, Kutoba Y, Kimura M *et al*. Characterization of a chlamydia pneumoniae strain isolated form a 57-year-old man. Microbiol Immun, 1994, 38(11): 857

8 Melgosa M P, Kuo C C, Campbell L A. Isolation and characterization of a chlamydia pneumoniae 76-Kilodalton protein containing a species-specific epitope. Infect Immun, 1994, 62(3): 880

9 Iijima Y, Miyashita N, Kishimoto T *et al*. characterization of chlamydia pneumoniae species-specific proteins immunodominant in humans. J Clin Microbiol, 1994, 32(2): 583

(收稿: 1997-03-09;修回: 1997-09-04)

(编辑 冯崇英)

Preparation and immunological characterization of species-specific monoclonal antibodies against chlamydia pneumoniae

Zhu Jin, Yu Shurong, Zhang Xue, Rao Xiancai (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To study the protective antigens of chlamydia pneumoniae (Cpn). Methods: After two strains of hybridoma secreting the monoclonal antibodies (McAbs) specific to Cpn were produced, the titer and specificity of McAbs were determined with IFA and immunoblotting. Meanwhile, McAb2G5 was used in the *in vitro* neutralization test of the cell culture. Results: The titer of McAb2G5 was 1: 102400 and that of McAb4F7 1: 51200. Both of them were the species-specific antibodies which could recognize the Mr 98 × 10^3 protein of Cpn. *In vitro* neutralization test showed that McAb2G5 exerted remarkable complement-dependent neutralization effects and its neutralization titer was 1: 130 (0.04 mg/ml). Conclusion: The species-specific McAb2G5 can exert neutraliztion effects on the Mr 98× 10^3 protein of Cpn. This is important for the study of antigens and the production of effective vaccines of Cpn.

Key words chlamydia pneumoniae; monoclonal antibody; neutralization test

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net