

抗腺病毒五邻体单克隆抗体的制备及双抗夹心 ELISA 方法的建立

陈平¹, 杜惠芬², 李克生²

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省医学科学院医学生物中心, 甘肃 兰州 730050)

摘要:为获得稳定性好、特异性强、效价高的抗腺病毒五邻体单克隆抗体,用腺病毒五邻体基因工程表达抗原免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,以腺病毒五邻体为筛选抗原对融合后的杂交瘤细胞间接 ELISA 进行筛选。结果表明:试验获得 5 株杂交瘤细胞,标记为 3C4、4C4、4D7、4F2 和 4H3,4D7 免疫球蛋白亚类为 IgG_{2a},其余 4 株为 IgG₁;对 5 株细胞连续 3 个月体外传代试验和小鼠腹水连续传代试验,5 株细胞都能持续稳定分泌单克隆抗体,对细胞上清和腹水采用间接 ELISA 进行效价测定,细胞上清效价稳定维持在 2 000 左右,腹水效价稳定维持在 200 000 以上,且与引起腹泻的鼠伤寒沙门氏菌和轮状病毒无交叉反应;对其中可以配对的 2 株单抗 4D7、4F2 建立双抗夹心 ELISA,可以应用于临床检测腺病毒。

关键词:腺病毒;单克隆抗体;杂交瘤细胞;间接 ELISA;特异性;双抗夹心 ELISA

中图分类号:Q 813.2

文献标志码:A

文章编号:1003-4315(2014)05-0021-08

DOI:10.13432/j.cnki.jgsau.2014.05.005

Preparation of monoclonal antibodies against adenoviral penton and development of a sandwich ELISA

CHEN Ping¹, DU Hui-fen², LI Ke-sheng²

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Center of Medical Biotechnology, Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: In order to obtain fine stability, specificity, better titer of monoclonal antibodies (McAbs) against adenoviral penton, adenoviral penton antigen was used after genetically engineered expressed to immunize BALB/c mice after fused spleen cells of the immunized mice and SP2/0 cells. The results showed that five hybridomas were gotten after using indirect ELISA to screen hybridoma by fusing used adenovirus penton antigen, marked 3C4, 4C4, 4D7, 4F2 and 4H3. The subcategory Ig of 4D7 was IgG_{2a}, the others were IgG₁. Five hybridomas serially passaged experiments in vitro for 3 months and serially passaged mouse ascites, indicating all hybridomas secreted McAb sustaining. Cell titers remained around 2 000 and ascites titers remained 200 000 stabled after indirect ELISA. No cross-reaction was happened with *Salmonella typhimurium* and rotavirus which caused diarrhea. It is suggested that sandwich ELISA with two mated Abs 4D7 and 4F2 can be applied to clinical detection of adenovirus.

Key words: adenoviral; McAb; hybridoma cells; indirect ELISA; specificity; sandwich ELISA

第一作者:陈平(1988-),男,硕士研究生,研究方向为预防兽医学。E-mail:417251228@qq.com

通信作者:李克生,男,研究员,博士,研究方向为医学生物技术。E-mail:lksem@sohu.com

基金项目:甘肃省高层次人才计划项目(1013JHTA005)。

收稿日期:2014-01-09;修回日期:2014-03-24

杂交瘤技术于 1975 年由德国科学家 Kohler 和英国科学家 Milstein 等创造,通过杂交瘤技术利用小鼠骨髓瘤细胞能够与免疫腺病毒五邻体蛋白小鼠的脾脏 B 淋巴细胞融合,形成可无限增殖并且能产生特异性单抗的杂交瘤细胞^[1]. 这种杂交瘤细胞在含有次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶的培养基上进行选择培养时,只有融合了 B 淋巴细胞的骨髓瘤细胞才能继续生长. 经反复克隆、筛选得到的融合细胞所分泌的抗体称为单抗,单抗特异性强、纯度高,可以大规模工厂化生产,从而使免疫分析技术准确性高,重复性好,方法简便^[2]. 在动物免疫过程中,免疫分子的相对分子质量越大,免疫效果越好. 蛋白质的免疫效果高于细菌和 LPS. 本试验拟利用基因工程表达的腺病毒五邻体核衣壳蛋白作为免疫分子,筛选出特异性高的单抗,以期在后期临床上可以利用双抗夹心 ELISA 对腺病毒进行检测^[3-5].

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器及试剂

1.1.1 菌株 菌种于 2010 年 8 月均由珠海出入境检验检疫局提供,为鼠伤寒沙门氏菌(编号:CM-CC(B)50115). 细胞:小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞由甘肃省医学科学研究院医学生物中心保存. 试验动物:8~12 周龄 BALB/c 小鼠购自兰州大学动物中心. 检测交叉性病毒抗原:轮状病毒 VP6 基因工程表达抗原由甘肃省医学科学研究院表达. 筛选抗原:腺病毒五邻体基因工程表达抗原由甘肃省医学科学研究院表达.

1.1.2 主要仪器设备 酶标检测仪(Thermo Lab-systems),洗板机(Thermo Lab-systems),CO₂ 恒温细胞培养箱(Shel LAB),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),高速冷冻离心机(Beckman),蛋白浓度检测仪(Eppendorf),Sephacryl S-300 填料和全自动蛋白纯化仪(Armashia),倒置显微镜和光学显微镜(Olympus),电泳仪,垂直板槽(Bio-rad),Aquaplust 系列实验室超纯水机(Aquapro).

1.1.3 主要试剂 弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、HT 母液(胸腺嘧啶核苷、次黄嘌呤)、A 母液(氨基蝶呤)、聚乙二醇(PEG-1000)、鼠源单克隆抗体同型试剂盒(Sigma)、新生胎牛血清(兰州民海生

物公司)、DMEM 培养基干粉(Gibico)、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(羊抗鼠 IgG-HRP)(北京博奥森生物制品有限公司)、二甲基亚砜(Gibico)、辣根过氧化物酶(HRP)、过碘酸钠、硼氢化钠、乙二醇.

1.2 单克隆抗体制备及稳定性、特异性和效价分析

1.2.1 动物免疫 选取 6~8 周龄、18~20 g 雌性健康 BALB/c 小鼠腹股沟皮下注射卡介苗进行致敏. 1 周后取热灭活(65 °C, 30 min)的腺病毒五邻体基因工程表达蛋白抗原与等量弗氏完全佐剂充分乳化,腹股沟皮下注射免疫,每只小鼠注射 0.2 mL(抗原量 20 μg/只),每间隔 3 周后用弗氏不完全佐剂使用同样方法加强免疫 2 次,抗原浓度每次加倍,腹股沟皮下、背颈部皮下、足垫多点注射免疫. 三免后小鼠尾尖采血通过间接 ELISA(用腺病毒五邻体基因工程表达抗原包板)测小鼠效价,当效价大于 1:12 800 准备融合,融合前 3 d 取腺病毒五邻体基因工程表达抗原(生理盐水稀释),于腹腔注射加强免疫,每只小鼠注射 0.2 mL(抗原量 160 μg/只)^[6],小鼠于融合前一天禁食不禁水.

1.2.2 细胞融合与杂交瘤细胞筛选

1.2.2.1 饲养细胞的制备 取雌性小鼠断颈处死,75% 酒精中浸泡体表消毒,将其外皮扒开,用 5 mL 的注射器抽取 5 mL DMEM 注入小鼠腹腔,反复冲洗几次吸出培养液,细胞计数,细胞数量为 1.6×10^5 个/mL. 将饲养细胞接种于 96 孔培养板中(100 μL/孔),置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中备用^[7].

1.2.2.2 脾细胞的制备 取加强免疫后小鼠,眼眶取血,收集阳性血清,75% 酒精中浸泡体表消毒,剥皮无菌取出脾脏,去除结缔组织,用 DMEM 培养基冲洗后放入 200 目灭菌铜丝网中,置小烧杯上,用眼科剪将脾脏充分剪碎后,用玻璃注射器针芯轻轻研磨脾脏,用 DMEM 培养液冲洗^[8]. 收集脾细胞悬液,转移到 10 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,重悬于 5 mL DMEM 培养液中,计数为 1.1×10^8 个.

1.2.2.3 细胞融合 选择形态良好且呈对数生长的 SP2/0 细胞,将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来并转移到离心管中,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 5 mL DMEM 悬浮,计数为 1.45×10^7 . 按脾细胞:

SP2/0为5:1~10:1的比例将SP2/0细胞和脾细胞悬液混匀,1 000 r/min离心10 min,弃上清.轻轻振动使细胞沉淀松动,用滴管往玻璃管中缓慢加入1 mL 37 °C预热的50% PEG(1 000),2 min内加完,静置1~2 min,2 min内缓慢加入10 mL 37 °C预热的DMEM.混匀后800 r/min离心5 min,弃上清液^[9].用HAT培养液重悬细胞,移入HAT培养液中混匀,按100 μ L/孔转入加有饲养细胞的96孔细胞培养板中,置于CO₂培养箱中培养.

1.2.2.4 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆 融合后根据细胞数量和生长情况第4天或第5天用HAT培养液进行半量换液,第8天,待细胞长到孔底的1/4~1/3时取出细胞上清,用热灭活的腺病毒五邻体基因工程表达抗原(1.22 mg/mL,2 000倍稀释)为包被抗原包被酶标板,间接ELISA检测,以P/N \geq 3作为阳性临界值,用SP2/0细胞上清及正常小鼠血清作阴性对照,对检测为阳性的孔采用有限稀释法进行克隆化培养,第1次亚克隆时换用HT培养液,2周后换为含10%血清DMEM培养液^[9].

1.2.3 杂交瘤细胞的扩大培养及冻存 单克隆细胞株经连续3次亚克隆扩大培养,有细胞孔阳性率连续3次达到100%后开始扩大培养,将细胞从96孔培养板转入24孔培养板,再转入细胞培养瓶培养.选择状态良好且呈对数生长的细胞,收集细胞后计数,1 000 r/min离心10 min,弃上清液,用含10% DMSO的血清将细胞悬浮,液氮罐冻存^[9].

1.2.4 单克隆抗体亚类的鉴定 用小鼠单克隆抗体亚类鉴定同型试剂对每株单克隆抗体进行亚类测定.具体步骤为:将待测细胞上清加入包被腺病毒五邻体基因工程表达抗原的酶标板中,100 μ L/孔,室温作用2 h,PBST洗板3次,同型特异试剂IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgA、IgM分别用0.01 mol/L PBS 1 000倍稀释后,按100 μ L/孔加样,室温作用30 min,PBST洗板3次,辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG,用0.01 mol/L PBS 3 000倍稀释后,按100 μ L/孔加样,室温下作用30 min,PBST洗板3次,加入新配底物,100 μ L/孔,室温下作用10~15 min,用3 mol/L的NaOH终止反应,50 μ L/孔,酶标仪测D₄₅₀值.

1.2.5 腹水的制备与单克隆抗体的纯化 将杂交

瘤细胞每只约 2×10^6 个注射到雌性BALB/c小鼠腹腔,10 d后收集腹水,1 000 r/min离心10 min除去细胞及脂类取腹水上清.5株腹水分别经50%、45%饱和硫酸铵盐析沉淀、Sephacryl S-300凝胶柱层析纯化.具体方法:取5 mL腹水放入50%硫酸铵4 °C 2 h沉淀后6 000 r/min离心30 min,去上清收集沉淀后45%硫酸铵再次沉淀4 °C过夜,6 000 r/min离心30 min后Sephacryl S-300凝胶柱洗脱.之后经紫外吸收法测定蛋白浓度,SDS-PAGE分析抗体纯度及抗体轻链和重链分子量.具体方法:去纯化后腹水16 μ L加入上样buffer 4 μ L后沸水中放置5 min,浓缩胶分离胶(配置新鲜的12%分离胶10 mL和5%浓缩胶5 mL)分别以80 V、120 V电压下进行,再加入考马斯亮蓝R-250染色液2 h后脱色2 h,蒸馏水冲洗,拍照^[10].

1.2.6 染色体分析 取传代培养后2~3 d状态良好的杂交瘤细胞,向培养基内加入终浓度为0.4~0.8 μ g/mL的秋水仙素,37 °C继续培养4~6 h,收集细胞后1 000 r/min离心10 min,加入预温至37 °C的0.075 mol/L KCl低渗溶液,终体积至5 mL.再37 °C水浴20~30 min,缓缓加入1 mL新鲜固定液(固30 mL甲醇和10 mL冰醋酸,临用前配)混匀,再1 000 r/min离心10 min后去除上清,加入新鲜固定液悬浮细胞,终体积至10 mL混匀,室温固定30 min后1 000 r/min离心10 min,收集细胞后再向管中缓缓加入固定液,终体积至8 mL,室温固定30 min,1 000 r/min离心10 min后收集细胞,取固定液2 mL重新悬浮细胞,取-20 °C预冷的载玻片,距离玻片15~20 cm高度,向玻片中央滴加1滴细胞悬液,空气干燥后用新鲜配制的Giemsa染液染色10~20 min,缓慢流水冲洗玻片,晾干后封片.在油镜下进行染色体分析^[11].

1.2.7 抗原表位配对分析 采用叠加试验分析单抗抗原表位.将杂交瘤细胞的细胞上清分别加入到腺病毒五邻体基因工程表达抗原酶标板中,100 μ L/孔,37 °C作用30 min后PBST洗板4次,加入配对细胞株的细胞上清,100 μ L/孔,37 °C作用30 min后PBST洗板4次,再加入1:20 000倍稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG,50 μ L/孔,37 °C作用30 min后PBST洗板5次,加入TMB底物100

$\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 显色 10 min, 最后 $2\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ 终止反应, 酶标仪测定 D_{450} 值。

结果按照以下公式计算叠加率:

$$AI(\%) = [2 \times A_{1+2} \div (A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$$

式中, A_1 表示单抗 1 的 D_{450} 值, A_2 表示单抗 2 的 D_{450} 值, A 表示单抗 1 叠加单抗 2 的 D_{450} 值. 如果测得 $AI < 50\%$ 说明被测两株单抗识别的抗原结合位点相同, 而如果测得 $AI > 50\%$ 说明被测两株单抗识别的抗原结合位点不同, AI 在 0 到 1 单位内越大, 其抗原识别位点重叠的可能性就越小。

1.2.8 单克隆抗体的特异性鉴定 用热灭活法灭活鼠伤寒沙门氏菌按 10^7 CFU/mL 包被酶标板, 轮状病毒 VP6 蛋白 (1.26 mg/mL) 按 1 000 倍稀释包板, 采用间接 ELISA 法检测杂交瘤细胞株细胞上清及纯化腹水抗体, 以正常小鼠血清做阴性对照、阳性小鼠眼球血做阳性对照, $P/N \geq 3$ 判定为有交叉反应, 否则判定为无交叉反应. 具体方法: pH 9.6 碳酸盐包被液稀释抗原, $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 弃去孔内液体后加入封闭液, $120\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 后弃去孔内液体, 加入细胞上清及纯化腹水 $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, 同时设阳性、阴性对照, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBST 洗板 4 次, 加入 1:2 000 倍稀释的酶标二抗羊抗鼠 IgG-HRP, $50\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBST 洗板 5 次, 加入新鲜配制的 TMB 底物显色液, $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光显色 10 min 后加入 $2\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ 终止反应, $50\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ 用酶标仪读取 D_{450} 值^[11].

1.2.9 单克隆抗体的稳定性及其效价测定

1.2.9.1 细胞体外传代试验 取稳定分泌抗体的 5 株细胞株在 96 孔培养板连续传代培养 3 个月, 每传 1 代即收集细胞培养上清液, 间接 ELISA 法测定杂交瘤细胞培养上清液的抗体效价, 对比传代前后效价变化情况以分析该细胞株的稳定性, 间接 ELISA (腺病毒五邻体基因工程表达抗原为包被抗原) 加样时将细胞上清按首孔 100 倍稀释, 2、3 孔后依次倍比稀释至第 11 孔, 并加阳性血清对照, 我们取最大稀释倍数 D_{450} 值 > 0.100 时的稀释倍数为其效价, 其余操作步骤同 1.2.8.

1.2.9.2 腹水连续传代试验 取 5 株杂交瘤细胞, 按 2×10^6 个/只接种于小鼠腹腔, 采用体内诱生法

生产腹水, 收集腹水后, 对腹水杂交瘤细胞进行计数, 再按 2×10^6 个/只接种于小鼠腹腔, 连续传代 5 次, 间接 ELISA 测定 (腺病毒五邻体基因工程表达抗原为包被抗原) 小鼠各代腹水上清的效价, 间接 ELISA 加样时将腹水上清按首孔 1 000 倍稀释, 2、3 孔后依次倍比稀释至第 11 孔, 并加阳性血清对照, 我们取最大稀释倍数 D_{450} 值 > 0.100 时的稀释倍数为其效价, 其余操作步骤同 1.2.8, 并将这些结果进行比较^[11].

1.3 双抗夹心 ELISA 方法的建立

1.3.1 单克隆抗体的浓缩 选取纯化后效价高、纯度好的单抗 4F2, 用蛋白浓缩过滤离心管, $3\text{ }000\text{ r/min}$ 离心浓缩至 10 mg/mL , 分装后 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 酶标抗体制备 称取 5 mg 辣根过氧化物酶 (HRP), 溶于 $0.5\text{ mL ddH}_2\text{O}$ 中, 加入新鲜配制 0.06 mol/L 的 NaIO_4 溶液 0.5 mL , 混合均匀 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应 30 min, 加入新鲜配制 0.16 mol/L 乙二醇溶液 0.5 mL , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 30 min 后终止氧化, 再加入浓缩后的单抗 4F2 0.5 mL , 混匀加入透析袋内, 置于 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 透析过夜, 收集透析后液体, 加入 1/10 体积新鲜配制的 NaBH_4 溶液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 30 min, 再新加入 1/10 体积新鲜配制的 NaBH_4 溶液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h 后, 加入等体积的饱和硫酸铵溶液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 静置 2 h, $3\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 30 min, 收集沉淀, 用 PBS 悬浮至原体积。

1.3.3 双抗夹心法建立

1.3.3.1 捕获抗体及酶标抗体最适工作浓度的确定 采用方阵滴度法确定最适捕获抗体及酶标抗体工作浓度. 具体如下: 将最佳配对单抗 4D7 作为作为捕获抗体, 分别稀释浓度为 1、0.5、0.33 $\mu\text{g/mL}$ 包被酶标板, 将 4F2-HRP 分别做 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000 倍稀释, 间接 ELISA 法检测倍比稀释的待检菌液 (抗原浓度 1.22 mg/mL), 确定捕获抗体包被浓度和酶标抗体最佳工作浓度, 建立双抗体夹心法。

1.3.3.2 双抗夹心法步骤 将单抗 4D7 用包被液按捕获抗体的最佳稀释倍数包被酶标板, $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温浴 2 h 后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 甩干加入封闭液, $120\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 2 h, 甩去封闭液, 加入

待检菌液,37 °C 水浴 1 h, PBST 洗板 4 次,加入稀释后的 4F2-HRP, 100 μL/孔, 37 °C 水浴 30 min, PBST 洗板 5 次,加入底物 A、B 各 50 μL/孔,37 °C 反应 20 min,加入终止液终止反应,测定 D_{450} 。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的建立与单抗 Ig 亚类鉴定

用腺病毒五邻体基因工程表达抗原为包被板筛

选阳性杂交瘤细胞,并经过 3 次亚克隆,间接 ELISA 检测细胞上清效价,得到 5 株分泌腺病毒单抗的杂瘤细胞,分别命名为:3C4、4C4、4D7、4F2、4H3,阳性率均能达到 100%,杂交瘤细胞株的建立见表 1。一次融合共铺 6 块 96 孔板,472 孔有杂交瘤细胞生长,融合率为 82%。分泌特异性抗体的杂交瘤细胞 31 孔,其阳性率为 5.38%,各单克隆抗体亚类的鉴定结果见表 2。

表 1 杂交瘤细胞克隆检测结果

Tab. 1 Results of clone ratio and positive ratio of cloning in three turns of hybridoma

指标	杂交瘤细胞株					
	3C4	4C4	4D7	4F2	4H3	
第 1 次亚克隆	克隆率	68.8% (33/48)	87.5% (28/32)	43.8% (21/48)	75% (24/32)	45.8% (11/24)
	阳性率	90.9% (30/33)	96.4% (27/28)	76.2% (16/21)	100% (24/24)	27.3% (3/11)
	D_{450}	0.752	0.194	1.532	0.933	0.308
第 2 次亚克隆	克隆率	100% (48/48)	93.6% (30/32)	100% (48/48)	50% (16/32)	100% (24/24)
	阳性率	100% (48/48)	100% (30/30)	100% (48/48)	100% (16/16)	100% (24/24)
	D_{450}	0.449	0.600	1.438	0.816	0.468
第 3 次亚克隆	克隆率	100% (32/32)	81.3% (26/32)	100% (48/48)	75% (24/32)	100% (48/48)
	阳性率	100% (32/32)	100% (26/26)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (48/48)
	D_{450}	0.997	0.758	0.796	0.658	0.505

表 2 单克隆抗体亚类

Tab. 2 Isotype of McAbs

单克隆抗体	3C4	4C4	4D7	4F2	4H3
抗体亚类	IgG ₁	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG ₁	IgG ₁

2.2 单克隆抗体的纯化

采用饱和硫酸铵沉淀法和 Sephacryl S-300 凝胶柱层析纯化对 3C4、4C4、4D7、4F2、4H3 杂交瘤细胞经小鼠体内诱生法所采集到的腹水进行纯化(图 1~5)。

经 ELISA 检测和电泳分析后,第 1 个峰为杂蛋白,第 2 个峰为单抗纯化蛋白。纯化前与纯化后的 5 株效价及蛋白含量见表 3。单抗采用 SDS-PAGE

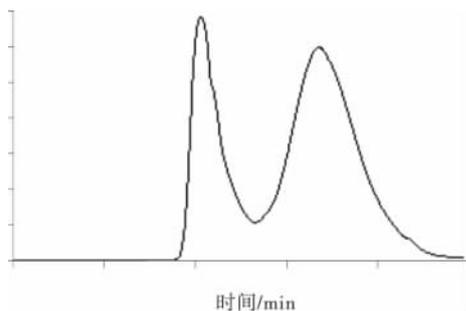


图 1 4F2 腹水纯化

Fig. 1 Purify ascitic fluid of 4F2

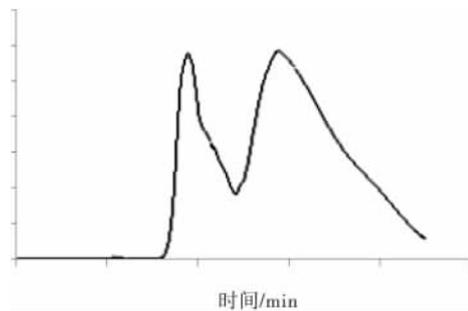


图 2 4H3 腹水纯化

Fig. 2 Purify ascitic fluid of 4H3

鉴定纯化后单抗的纯度及分子量分布如图 6 所示,纯化后单抗主要有 2 条蛋白区带,重链分子量为 50~60 ku 之间,轻链分子量在 23~29 ku 之间。

2.3 杂交瘤细胞的染色体计数

正常 BALB/c 小鼠脾细胞染色体数目为 40, SP2/0 细胞的染色体为 62~68 条,对 5 株单抗细胞株的染色体进行染色体计数,细胞的染色体数为 96

表 3 单抗蛋白效价及浓度

Tab. 3 Titer and concentration of McAb

单克隆抗体	3C4	4C4	4D7	4F2	4H3
纯化前蛋白效价	2.56×10^5	1.02×10^6	5.12×10^5	5.12×10^5	5.12×10^5
纯化后蛋白效价	1.28×10^5	1.02×10^6	2.56×10^5	2.56×10^5	2.56×10^5
蛋白浓度/(mg · mL ⁻¹)	2.290 2	2.137 9	1.917 3	1.808 3	2.160 6

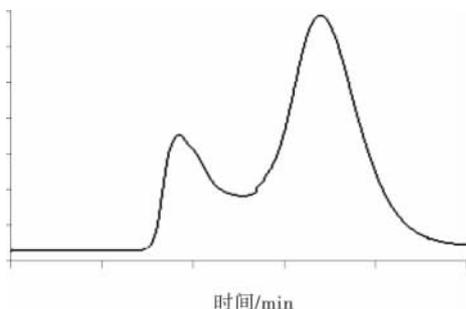


图 3 3C4 腹水纯化

Fig. 3 Purify ascitic fluid of 3C4

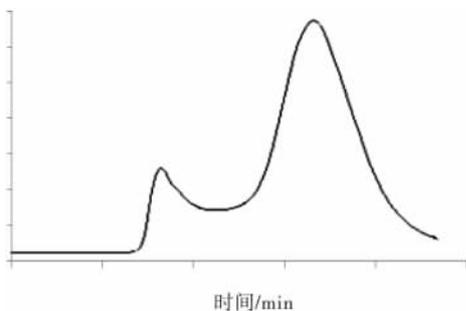


图 4 4C4 腹水纯化

Fig. 4 Purify ascitic fluid of 4C4

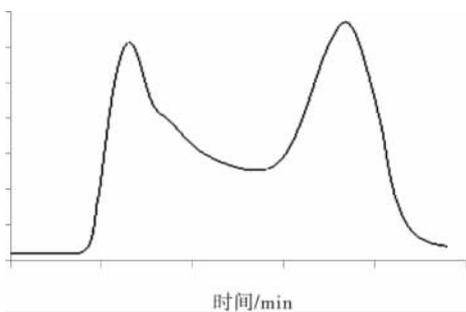


图 5 4D7 腹水纯化

Fig. 5 Purify ascitic fluid of 4D7

~108 条,接近 2 种亲本细胞染色体数目总和,表明获得的杂交瘤细胞是两者的杂交(图 7)。

2.4 抗原表位配对分析

以腺病毒五邻体基因工程表达抗原包被酶标板,采用间接 ELISA 叠加实验对 5 株可产生 IgG 类抗体的杂交瘤细胞株进行配对分析(表 4)。分析

结果显示,单克隆抗体 4F2 与 4D7、4H3 与 4D7、4C4 与 4D7 在 2 种不同包被抗原测定时 AI 值均大于 50%,表明 2 株抗体识别的抗原表位不同,4F2 与 4D7 的 AI 值最高为 89%,说明这 2 株单抗识别

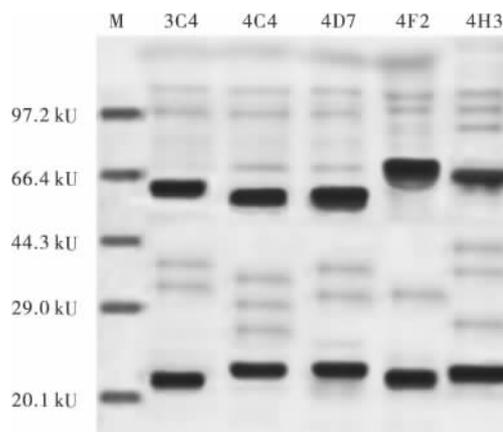


图 6 纯化后单克隆抗体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified ascitic fluid

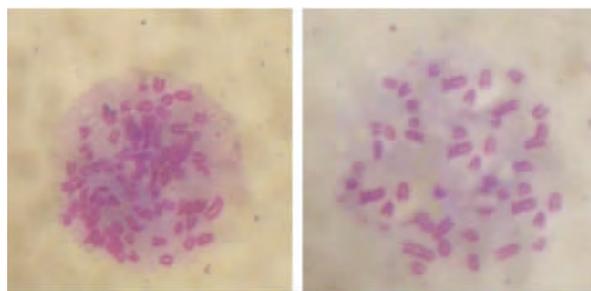


图 7 杂交瘤细胞及 SP2/0 细胞的染色体(×400)

Fig. 7 The chromosomal configuration of SP2/0 and hybridoma cell

表 4 抗原表位叠加试验结果

Tab. 4 The result of superposable epitope test %

表位	3C4	4C4	4D7	4F2	4H3
3C4	—	123	38	137	24
4C4	—	—	69	15	34
4D7	—	—	—	89	88
4F2	—	—	—	—	25
4H3	—	—	—	—	—

的抗原表位差异较大, 而其余配对单抗采用 2 种抗原时的 AI 值均小于 50%, 说明 2 株单抗识别的抗原表位差异不大.

2.5 特异性鉴定

间接 ELISA 检测结果显示 5 株杂交瘤细胞与轮状病毒和鼠伤寒沙门氏菌无特异性交叉反应, 具

体结果见表 5.

2.6 单克隆抗体的稳定性测定及其效价

5 株杂交瘤细胞用 96 孔板体外连续传代培养 3 个月, 各株单抗体外传代后细胞上清抗体效价保持稳定; 5 株杂交瘤细胞腹水连续传 5 代, 腹水效价保持稳定, 如图 8~9 所示.

表 5 单克隆抗体特异性鉴定结果

Tab. 5 Result of specificity of the monoclonal antibodies

受试样品	单克隆抗体									
	3C4		4C4		4D7		4F2		4H3	
	细胞上清	纯化腹水	细胞上清	纯化腹水	细胞上清	纯化腹水	细胞上清	纯化腹水	细胞上清	纯化腹水
轮状病毒	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鼠伤寒沙门氏菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

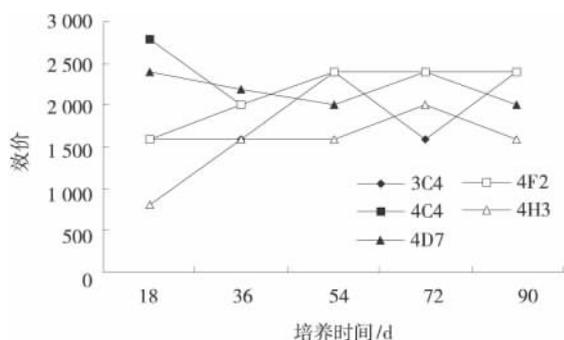


图 8 5 株传代细胞上清效价

Fig. 8 The titers of 5 cells in each generation

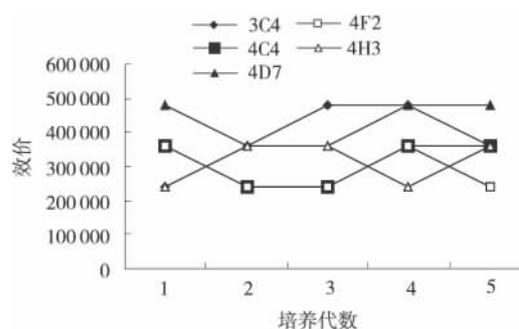


图 9 5 株传代细胞腹水效价

Fig. 9 The ascites titers of 5 cells in each generation

2.7 捕获抗体及酶标抗体最适工作浓度

方阵试验结果确定包被抗体单抗 4D7 最佳稀释度为 1:4 000, 即包被浓度 0.5 μg/mL, 4F2-HRP

最佳酶工作稀释浓度为 1:2 000, 具体 D 值见表 6, 在此条件下进行的双抗夹心法用于初步临床实际检测应用.

表 6 ELISA 确定 4D7 最适包被浓度和 4F2-HRP 最适工作浓度

Tab. 6 Experimental results for proper concentration of 4D7 and 4F2-HRP by ELISA

4D7 浓度/ (μg · mL ⁻¹)	4F2-HRP 稀释倍数及检测抗原稀释倍数											
	1:1 000				1:2 000				1:4 000			
	1:2 000	1:4 000	1:8 000	NC	1:2 000	1:4 000	1:8 000	NC	1:2 000	1:4 000	1:8 000	NC
1	1.704	1.467	1.508	0.102	1.083	1.242	0.924	0.059	0.817	0.501	0.337	0.065
0.5	1.361	0.986	0.954	0.099	1.191	0.539	0.328	0.081	0.374	0.312	0.197	0.073
0.32	0.871	0.679	0.529	0.090	0.669	0.617	0.439	0.078	0.235	0.215	0.162	0.072

3 讨论

腺病毒五邻体为腺病毒核衣壳的重要组成部分, 由五邻体基底部、纤毛突起和结节区组成, 五邻体和纤毛的结节区可与细胞表面的病毒受体结合, 在病毒感染细胞的过程中起到了至关重要的作用.

本试验针对腺病毒五邻体通过基因工程表达出高纯度的蛋白, 以达到免疫的最佳效果. 试验通过杂交瘤技术, 小鼠骨髓瘤细胞能够与来自免疫小鼠的 B 淋巴细胞融合, 形成了可无限增殖并且能产生特异性单抗的杂交瘤细胞, 并最终创立了杂交瘤技术. 这种杂交瘤细胞是在含有次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶

的培养基上进行选择的,在该培养基上只有融合了 B 淋巴细胞的骨髓瘤细胞才能继续生长.根据这种代谢缺陷补偿机制筛选出同时具有这 2 种细胞的克隆,然后经反复克隆、筛选得到的融合细胞所分泌的抗体就称为单克隆抗体,具有特异性强、纯度高、可以大规模工厂化生产等优点,从而提高了免疫分析技术的准确性.现阶段所生产的单抗大部分是通过这种杂交瘤技术得到的鼠源性单抗.

单克隆抗体的应用涉及医学、农业、食品、环境等众多领域,其在基础研究、蛋白纯化、环境与食品监测、疾病诊断、预防及治疗和优生优育等方面均有不可替代的作用^[12].预防方面表现在主动免疫、被动免疫;临床可治疗疾病包括肿瘤、免疫系统疾病及心血管疾病和变态反应;临床诊断及检测方面包括在传染病、免疫性疾病、内分泌性疾病的诊断和早孕诊断方面,大大优于现有的抗血清,具有特异性强、灵敏度高和易标准化的优点.但是本试验产生的单抗为鼠源性单抗,在临床的治疗方面尚有欠缺.

在过去的 30 年里,从鼠源性单抗到全人源性抗体,单抗经历了嵌合抗体、噬菌体抗体库技术、核糖体展示技术、RNA-多肽融合技术、转基因小鼠制备全人抗体等多方面的进步,在制备技术上取得了较大的进展^[13].但是,鼠源性单抗的免疫源性导致药物的功效降低、机体产生一系列的急性反应,因此单抗的人源化是单抗药物的发展趋向.目前,如何提高抗体的生产效率、同时保持其优良特性,且能同时解决免疫原性这一问题,是该领域的热点和难点,相信不久的将来,随着重组 DNA 技术的进一步发展,可以根据不同需要实现人-人、人-植物、人-动物和动物-动物等多种抗体重新组合,借助于杂交瘤细胞产生嵌合抗体、重组型抗体、单链抗体、单区抗体、全套抗体以及抗体酶,将单克隆抗体的生产效率、质量以

及应用提升到一个更高的水平.

参考文献

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2007
- [2] 刘萍, 陈苗苗, 刘学荣, 等. 单克隆抗体研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(1): 67-70
- [3] 程卫霞. 兰州地区婴幼儿病毒性腹泻的流行病学研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2008
- [4] Rocholl C, Gerber K, Daly J, et al. Adenoviral infections in children; the impact of rapid diagnosis[J]. Pediatrics, 2004, 113(1): e51-e56
- [5] 王玥. 1329 例小儿急性呼吸道感染腺病毒基因检测及临床分析[D]. 长春: 吉林大学, 2013
- [6] 彭洪江, 杜惠芬, 李克生, 等. 金黄色葡萄球菌蛋白 A 单克隆抗体的制备[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 47(6): 1-5
- [7] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 2004
- [8] 孔君, 刘箐, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 170-173
- [9] 蔡靛. 抗幽门螺杆菌 UreB 单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013
- [10] 王鹏. 腺病毒 5 型 knob 蛋白的原核表达、纯化及其单克隆抗体的制备[D]. 上海: 上海交通大学, 2008
- [11] 李思袖, 张国成, 许东亮, 等. 具有中和活性抗人类腺病毒单克隆抗体的制备、鉴定及应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(12): 1140-1142
- [12] 孙思凡, 张部昌, 靳彦. 治疗性单克隆抗体研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 258-262
- [13] 吴永强, 董关木. 人源化单克隆抗体研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(2): 73-77

(责任编辑 李辛)