

抗鳃弧菌独特型单克隆抗体的制备及鉴定*

夏永娟¹ 黄威权¹ 黄宝成² 金晓航¹ 李别虎³

(第四军医大学¹ 组织学与胚胎学教研室;² 细胞工程研究中心;³ 微生物学教研室 西安 710032)

摘 要: 利用具有中和活性的抗鳃弧菌单克隆抗体 4A6 作为免疫原, 通过单克隆抗体技术制备出 7 株分泌抗独特型单抗的杂交瘤细胞。以 ELISA 竞争抑制实验及诱导 Ab_3 的功能实验证实, 其中 4 株属于 $Ab_2\beta$, 有可能用于疫苗生产。

关键词: 鳃弧菌, 独特型, 单克隆抗体

中图分类号: Q812.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 04-0447-05

鳃弧菌感染是养殖及野生海水鱼的重要疾病之一, 大面积发病会给养殖渔业带来巨大经济损失。目前, 对鳃弧菌感染的鱼病防治主要是利用抗生素及减毒、灭活疫苗。抗生素的长期使用易使鱼体产生免疫耐受; 减毒疫苗的安全性较难把握; 灭活疫苗由于是利用物理、化学方法制备, 抗原的生物学活性易遭破坏, 并且制备过程中残存的杂质还会使鱼体出现炎症甚至死亡^[1]。

本研究利用具有中和活性的抗鳃弧菌单克隆抗体制备抗独特型抗体并对其特性进行鉴定。为鱼类鳃弧菌疾病的防治提供一种新的候选疫苗。

1 材料和方法

1.1 菌种

鳃弧菌 ATCC19019 由青岛海洋大学海洋生命学院提供。

1.2 细胞株

SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞由第四军医大学细胞工程研究中心惠赠。抗鳃弧菌单克隆抗体杂交瘤细胞株(4A6)为本教研室自制。

1.3 动物

8 周龄 Balb/c 雌性小鼠购自第四军医大学动物中心。

1.4 动物免疫和细胞融合

以纯化和未纯化的 4A6 腹水分别免疫 Balb/c 雌性小鼠, 具体免疫方法见表 1。

细胞融合、克隆化、腹水制备采用常规法^[2]。

1.5 抗独特型抗体 mAb_2 的检测-双抗夹心 ELISA 法

用纯化后的兔抗鳃弧菌抗血清(本室自制)包被酶标板($20\mu\text{g/mL}$), 检测时依次加入待测培养上清和羊抗鼠 HRP-IgG, OPD 显色, H_2SO_4 终止后测 OD_{492} 值。

* 国家“863”计划资助项目(819-02-06)

作者简介: 夏永娟(1970-), 女, 甘肃高台人, 第四军医大学, 博士, 主要从事细胞免疫学研究。

收稿日期: 2000-07-24, 修回日期: 2000-09-30

表 1 Balb/c 小鼠免疫方案
Table 1 measure of immunizing Balb/c mice

Time before cell confusion	Dose of antigen (mAb ₁)/μg	Adjuvant	Method of injection
7W	100	FCA	Intraperitoneal
5W	150	FIA	Intraperitoneal
3W	150	saline	Intraperitoneal
2W	200	saline	Intraperitoneal
3d	200	saline	Intraperitoneal

1.6 抗独特型抗体 mAb₂ 的性质鉴定

1.6.1 亚类鉴定:双抗夹心 ELISA 法。

1.6.2 ELISA 竞争抑制实验:鳎弧菌菌液(Ag)以 1×10^6 个/mL 的浓度包被酶标板,4℃ 过夜;将腹水型 mAb₂ 以 1:10、1:100、1:1000 三个浓度稀释后分别与纯化过的兔血清(Ab₁, 20μg/mL)混合后加入酶标板(体积比 1:1),37℃,湿盒,1h;加羊抗兔 IgG-HRP(1:1000 稀释),37℃,湿盒,1h;OPD 显色,H₂SO₄ 终止后测 OD₄₉₂ 值。

抑制率计算公式为:

抑制率(%) = $\frac{\text{基点对照 OD 值} - \text{相关对照 OD 值}}{\text{基点对照 OD 值}} \times 100\%$

基点对照 OD 值代表 Ab₁ 不与 mAb₂ 共同温浴所测的 OD 值,相关对照 OD 值代表 Ab₁ 与不同浓度 mAb₂ 共同温浴所测的 OD 值。

1.7 以 mAb₂ 为免疫原诱导产生 Ab₃ 的功能实验

1.7.1 以腹水型 mAb₂ 为免疫原免疫 Balb/c 小鼠:免疫方法同前。第四次免疫 5d 后,摘除小鼠眼球放血,收集抗血清(Ab₃)。间接 ELISA 法测阳性及效价。

1.7.2 Ab₃ 的 ELISA 抗原竞争抑制实验:鳎弧菌菌液包被酶标板后,将 Ab₃(鼠抗)分别以 1:10、1:100、1:1000 三个浓度稀释后与 Ab₁(兔抗)共同温浴,加羊抗兔 IgG-HRP,测 OD₄₉₂ 值,计算抑制率。

2 结果

2.1 分泌抗独特型单克隆抗体的杂交瘤细胞系的建立

分别用纯化和未纯化的单抗 4A6 免疫后的小鼠脾脏进行融合,两次融合均获得成功,融合率分别为 50.2% 和 45.6%,阳性检出率分别为 12.8% 和 10.3%。共筛选获得 7 株分泌抗独特型单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 1E10、1H12、2H12、1H5、1D1、2B12、2F12(图 1)。

2.2 mAb₂ 的性质鉴定

2.2.1 亚类及效价鉴定结果:见表 2。

2.2.2 ELISA 竞争抑制实验结果:从表 3 可看出,1D1、1E10 和 1H5 抗独特型单克隆抗体能有效抑制抗原与 Ab₁ 的结合,抑制率 > 70%,并且抑制率随着 Ab₂ 浓度的下降而降低。

说明这三株抗体与抗原识别相同的 Ab_1 表位,能有效地与抗原竞争 Ab_1 结合位点;其它四株抗体(1H12、2H12、2B12 和 2F12)可能与抗原识别部分相同的 Ab_1 表位(30% <抑制率>70%)。此结果说明这 7 株单抗属于 $Ab_2\gamma$ 或 $Ab_2\beta$ 。

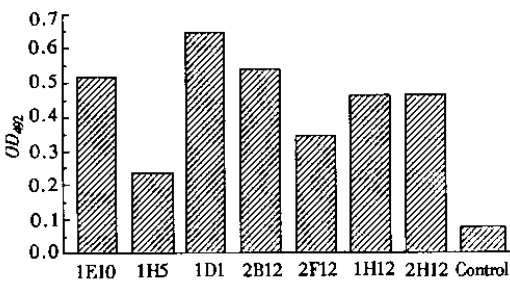


图 1 mAb₂ 的 ELISA 测定结果(OD₄₉₂)

Fig.1 Screening for positive clones of mAb₂ by ELISA(OD₄₉₂)

表 2 mAb₂ 的亚类、效价鉴定结果

Table 2 Identification of subgroup and titres for mAb₂

	1E10	1H5	1D1	2B12	2F12	2H12	1H12
Subgroup	IgG ₃	IgG _{2b}	IgG _{2b}	IgG _{2b}	IgG _{2b}	IgG _{2a}	IgG _{2a}
Titres of ascites	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴

表 3 mAb₂ 的 ELISA 竞争抑制实验结果

Table 3 Inhibition of mAb₂ on binding of Ab₁ to Ag

mAb ₂	Inhibition/%		
	1:10	1:100	1:1000
1D1	75.7 ± 2.76	38.6 ± 1.05	14.2 ± 0.75
1E10	87.9 ± 1.05	57.1 ± 0.13	37.2 ± 1.18
1H5	84.3 ± 0.76	65.7 ± 4.50	37.2 ± 0.19
1H12	57.6 ± 0.78	40.5 ± 1.12	13.8 ± 2.87
2F12	55.7 ± 3.57	50.1 ± 0.15	30.6 ± 1.56
2B12	36.8 ± 0.28	32.3 ± 0.43	22.3 ± 0.98
2H12	64.2 ± 1.32	37.5 ± 2.15	14.5 ± 0.10

2.3 以 mAb₂ 为免疫原诱导 Ab₃ 产生的功能实验结果

2.3.1 Ab₃ 的阳性检测结果:见图 2。



图 2 Ab₃ 的 ELISA 测定结果(OD₄₉₂)

Fig.2 Screening for positive clones of Ab₃ by ELISA(OD₄₉₂)

分别获得由 7 株 mAb₂ 诱导产生的免疫鼠血清 (Ab_3), 以 ELISA 实验证实其中 4 株(1E10、1H5、1D1、1H12)mAb₂ 诱导产生的免疫鼠血清 (Ab_3) 具有与原始抗原结合的能力, ELISA 测定结果为阳性,效价范围为 1:100 ~ 1:1000。

2.3.2 Ab_3 的抗原竞争抑制实验结果:从表 4 可以看出,1E10、1H5、1D1 和 2H12 mAb₂ 诱导产生的 Ab_3 能够抑制鳃弧菌与 Ab_1 的结合,也

就是说它们与 Ab_1 识别相同的抗原表位,竞争相同的抗原结合位点,属于 $Ab_2\beta$ 。

表 4 Ab_3 与 Ab_1 竞争抗原结合位点的竞争抑制实验结果

Table 4 Inhibition of Ab_3 on binding of Ab_1 to Ag

Ab_3	Inhibition/ %		
	1:10	1:100	1:1000
1D1	70.8 ± 1.02	64.9 ± 0.75	50.6 ± 1.22
1E10	79.2 ± 0.78	57.8 ± 1.38	51.3 ± 0.78
1H5	63.6 ± 0.16	55.2 ± 2.15	48.3 ± 0.15
2H12	77.9 ± 3.02	64.1 ± 0.12	49.3 ± 2.09

3 讨论

自 1963 年 Kunkel 等人发现抗体独特型(idiotype,简称 Id)及 1974 年 Jerne 的免疫网络理论问世后,抗独特型抗体的研究日益受到重视。根据 Bona 的理论^[3], Ab_1 上不同的独特型决定可刺激产生不同类型的 Ab_2 ,其中 $Ab_2\beta$ 被称为“内影像”抗独特型抗体,此类抗体由于在三维结构上与抗原表位类似,因而能模拟外来抗原竞争 Ab_1 的结合位点,被认为是抗原的“模拟物”。用于疫苗生产的抗独特型抗体主要是 $Ab_2\beta$ 。抗独特型单克隆抗体具有性质稳定、特异性高、不会对周围环境造成污染等特点,可诱导机体的体液免疫及细胞免疫,被认为是发展疫苗的良好选择,目前为止,已有多种用于预防细菌感染的疫苗产生^[4,5]。鱼用抗独特型抗体疫苗的研究国内外均未见报道。

我们在先前的研究中已制备出了抗鳃弧菌的单克隆抗体^[6],通过以牙鲆幼苗为模型 的动物保护实验筛选出了一株保护率为 80% 的单抗 4A6,此结果说明单抗 4A6 针对的是细菌的中和性表位,具有中和或减弱细菌毒性的作用。在此基础上,本研究设计以单抗 4A6 为免疫原制备抗鳃弧菌独特型单克隆抗体并对其特性进行鉴定。

本实验分别以纯化及未纯化的 mAb_1 腹水免疫 Balb/c 小鼠,均取得了成功,说明只要检测方法合理,可以不必纯化抗原,这样可充分保持 mAb_1 的活性;在利用间接 ELISA 法进行抗体阳性检测过程中,我们事先制备了兔抗鳃弧菌抗血清并对其效价进行了测定,以纯化后的抗血清(Ab_1)包被酶标板,能够快速、准确地检测出抗独特型抗体(mAb_2);针对筛选出的 7 株 mAb_2 ,为了证明它们是否属于 $Ab_2\beta$,本研究进行了 ELISA 竞争抑制实验及诱导 Ab_3 产生的功能实验。结果证实其中 4 株 mAb_2 1D1、1E10、1H5、2H12 能够抑制抗原与 Ab_1 的结合并且能够诱导 Ab_3 的产生。说明这 4 株抗独特型抗体属于 $Ab_2\beta$,具有内影像作用,它们能够模拟鳃弧菌中和性表位,有可能用于疫苗生产。

参 考 文 献

[1] 黄琪琰.水产动物疾病学.上海:上海科学技术出版社,1996.126 ~ 128
[2] 徐志凯.实用单克隆抗体技术.西安:陕西科学技术出版社,1992.27 ~ 102.
[3] Bona C & Kohler H. Anti-idiotypic antibodies and internal image. In: Verter J C, *et al.* eds. Monoclonal and Anti-idiotypic Antibodies. New York: Alan R. Liss, 1984. 141.

- [4] Su S, Ward M N, Apicella M A, et al. *J Immunol*, 1992, **148**: 234 ~ 238.
- [5] Schreiber J R, Nixon K L, Tasi M F, et al. *J Immunol*, 1991, **146**: 188 ~ 193.
- [6] 夏永娟, 黄威权, 李元, 等. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, **16**(1): 81.

PRODUCTION AND DETECTION OF MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPE ANTIBODIES AGAINST *VIBRIO ANGUILLARUM* *

Xia Yongjuan¹ Huang Weiwan¹ Huang Baocheng² Jin Xiaohang¹ Li Biehu³

(¹ Department of Histology and Embryology, ² Cell Engineering Research Center,

³ Department of Micrology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: *Vibrio anguillarum* is the pathogenic bacteria of Vibriosis, which is an infectious disease found in various fish species. Seven monoclonal anti-idiotypic antibodies (mAb₂) were raised against mAb₁ 4A6. Identification of subgroup showed that 1H5, 1D1, 2B12 and 2F12 belonged to IgG_{2b}, 2H12 and 1H12 to IgG_{2a} and 1E10 to IgG₃. The titers of these mAb₂ ascites were $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-6}$. The capacity of the mAb₂ to inhibit the binding between mAb₁ and antigen was investigated with the competitive inhibition ELISA. The results showed that 1D1, 1E10, 1H5 and 2H12 mAb₂ were able to inhibit this binding. Another experiment demonstrated that four mAb₂ (1D1, 1E10, 1H5 and 2H12) might induce Balb/c mice to produce Ab₃ and these Ab₃ competed the same antigen epitopes with Ab₁. These results indicate that mAb₂ (1D1, 1E10, 1H5 and 2H12) are likely to represent internal image of antigen and belong to Ab₂β. They might be employed to induce antibodies against pathogenic epitopes of *V. anguillarum* *in vivo* so as to give the safe and effective vaccine.

Key words: *Vibrio anguillarum*, Idiotypic, Monoclonal antibody

* Project Chinese National Programs for High Technology Research and development (819-02-06)

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《微生物学报》编辑部