

重组恶性疟原虫 DNA 质粒免疫小鼠制备单克隆抗体*

谢文凯¹ 钟 平² 潘卫庆³ 陈启宇⁴ 汪群斌⁴ 陆德如⁵

(¹中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

(²卫生部上海生物制品研究所 上海 200052)

(³第二军医大学寄生虫学教研室 上海 200433)

(⁴上海复星高科技(集团)有限公司 上海 200042)

(⁵第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所 上海 200433)

摘 要 :用恶性疟原虫 MSP1-31 基因片段的重组质粒 DNA 直接免疫 BALB/c 小鼠 ,诱导产生体液 免疫后取脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞在 PEG1450 作用下进行融合 ,获得了 2 株能分泌抗恶性疟原虫 MSP1-31 单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株 9H9 和 8A2。用酶联免疫吸附试验检测 ,小鼠腹水抗体滴度最高为 1:10 000。经免疫球蛋白类型和亚类鉴定 ,2 株杂交瘤细胞株均为 IgG₁。蛋白免疫印迹试验表明 ,此单克隆抗体与 MSP1-31 蛋白抗原具有特异免疫反应 ,证明通过质粒 DNA 直接免疫小鼠可制备特异性单克隆抗体。

关键词 恶性疟原虫 ,DNA 疫苗 ,单克隆抗体 ,杂交瘤 ,基因免疫

中图分类号 : R392.13 文献标识码 : A 文章编号 : 0001-6209(2000)04-0389-93

单克隆抗体的制备往往受制于免疫抗原的分离和纯化 ,1975 年 Kohle 和 Milstein 创建淋巴细胞杂交瘤技术以来 ,作为一项成熟的手段 ,单抗制备必须经历免疫原分离纯化(或化学合成)免疫小鼠、脾细胞与骨髓瘤细胞融合、筛选和克隆化及鉴定等过程 ,其中影响免疫应答的因素除了动物种类和动物遗传因素外 ,关键在于抗原的物理状态、免疫原性、抗原量、抗原纯度和免疫途径 ,它们是诱导产生高效专一免疫应答的因素 ,同时也决定着单抗制备的顺利程度。90 年代以来 ,DNA 疫苗作为传染与非传染疾病乃至肿瘤的免疫防治手段已越来越受到重视^[1] ,其应用范围也不限于传染病预防和免疫治疗 ,还能用于制造免疫球蛋白。通过带有目的基因的质粒 DNA 注射小鼠 ,使其表达外源目的蛋白 ,并以此蛋白为抗原诱导产生特异性体液免疫 ,从而制备多克隆抗血清。若免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合 ,则只需获得少量免疫原 ,就可制备特异性单克隆抗体。本文报告了这方面的一些实验结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞由卫生部上海生物制品研究所诊断试剂研究室提供。以 BALB/c 小鼠的腹腔细胞作为培养时的滋养细胞。

* 上海复星高科技(集团)有限公司资助

作者简介 :谢文凯(1969 -) ,男 ,上海市人 ,中国科学院上海植物生理研究所博士研究生 ,导师是该单位的赵国屏研究员和第二军医大学的陆德如教授

收稿日期 :1999-05-18 ,修回日期 2000-03-02

1.1.2 基础培养基 :1640 培养液(GIBCO)公司产品),含 15%灭能小牛血清。

1.1.3 选择性培养基(HAT):1640 培养基中含有次黄嘌呤(H)13.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氨基喋呤(A)1.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$,胸腺嘧啶核苷(T)3.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 15%灭能小牛血清。

1.1.4 实验动物 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠,购自上海市计划生育研究所。

1.1.5 试剂 小鼠标准 IgG 和酶标羊抗鼠 IgG 由卫生部上海生物制品研究所提供。

1.1.6 抗原 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*) MSP1-31 重组抗原的大肠杆菌表达菌株由第二军医大学寄生虫教研室提供,表达产物经 Ni-chelate 层析柱亲和纯化。

1.1.7 免疫用重组质粒 DNA 恶性疟原虫 MSP1-31 基因(约 720bp)片段克隆于载体质粒 pTRE²(购自 Clontech 公司)中,获 pTRE-31,该载体带有高表达的 CMV 启动子并受四环素调控^[3],与辅助质粒 pTet-off(tTA)(购自 Clontech 公司)共同免疫小鼠。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫^[4]:TE 溶解的重组质粒 pTRE-31 和 pTet-off DNA 溶液在免疫之前混合,共 500 μL (每 100 μL 含 pTRE-31 100 μg 和 pTet-off 400 μg),注射 5 只小鼠,在每只小鼠两侧股四头肌注射 100 μL ,不加佐剂,不作加强免疫。对照组 2 只小鼠采用无目的基因的 pTRE 和 pTet-off 以相同方式肌肉注射。

1.2.2 血清抗体检测:免疫后 28d 和 56d 时分别取尾静脉血,ELISA 间接法检测抗体。

1.2.3 细胞融合:检测血清抗体后选取抗体滴度最高(近 1:10000 阳性)的 BALB/c 小鼠,将脾细胞与对数期 SP2/0 骨髓瘤细胞(10:1)在 50% PEG 1450 作用下融合。融合细胞置于含饲养细胞的 HAT 选择培养基中,加入 96 孔培养板,每孔加 100 μL ,放置 50%~70% CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养。

1.2.4 杂交瘤细胞的克隆:融合细胞生长到培养孔的 1/3 时,用间接 ELISA 法筛选阳性孔,包被抗原 MsPI-31 浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔 100 μL 。用有限稀释法克隆,使阳性杂交瘤细胞克隆化直至成为单克隆细胞株。

1.2.5 单克隆抗体腹水的制备:单克隆杂交瘤细胞株扩大培养,预先用石蜡油致敏的同系小鼠每只腹腔接种杂交瘤细胞 10⁶~10⁷ 个。14d 左右穿刺腹腔收集腹水,间隔 3~5d 重复抽取 3~5 次。

1.2.6 抗体球蛋白类型和亚类鉴定:将杂交瘤细胞培养上清浓缩 20 倍以上,用双向免疫扩散法鉴定抗体类型和亚类。

1.2.7 单抗亲和力的测定:先以小鼠标准 IgG 包被微孔板加入羊抗鼠酶标抗体,用 OPD 底物显色,以鼠标准 IgG 浓度的对数为横坐标,吸光度 A₄₉₀ 为纵坐标作 IgG 标准曲线,求得 9H9 和 8A2 细胞株培养上清的 IgG 浓度。再以 MSP1-31 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被微孔板,加入系列稀释的待测 9H9 和 8A2 细胞培养上清液反应后,继续加入羊抗鼠酶标抗体,以上清液稀释度的对数为横坐标,吸光度 A₄₉₀ 为纵坐标,作 9H9 和 8A2 细胞株培养上清的稀释曲线。将接近饱和的吸光度定为 OD₁₀₀,在曲线上找出 50% 吸光度 OD₅₀ 所对应的稀释度。根据此稀释度和 IgG 标准曲线计算 [Ab] 和 [Ab]₀,则: $K_{\text{aff}} = 2(n-1) \sqrt{([Ab] - [Ab]_0) / [Ag] [Ag]_0}$ 其中 [Ab]₀ = 样品抗体浓度 / OD₅₀ 的抗体稀释度 n = [Ag] / [Ag]₀

1.2.8 单抗特异性分析:原核表达的 MSP1-31 抗原在 SDS-PAGE 电泳后转于硝酸纤维素膜上,加 1:1 000 稀释的腹水抗体于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min,加羊抗鼠酶标抗体在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育

45 min, 最后加入底物显色。

2 结果

2.1 质粒 DNA 免疫结果

经一次免疫的 5 只小鼠于 28 和 56d 后均出现抗重组疟疾抗原 MSP1-31 血清阳性, 其稀释度最低为 1:200, 最高为 1:6400, 见图 1。而注射无目的基因的空质粒的对照组小鼠中, 其血清 1:100 稀释呈阴性。

2.2 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

以质粒 DNA 为免疫原免疫小鼠后取其脾细胞, 与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合三次, 融合率依次为 95%、92% 和 82%, 相对应的阳性率分别为 22%、34% 和 65%。用间接 ELISA 法筛选出分泌特异抗体的杂交瘤细胞株。由于克隆过程中抗体效价不断下降, 最终获得 2 株细胞株能稳定分泌特异性抗体, 命名为 9H9 和 8A2。

2.3 细胞株效价测定

采用间接 ELISA 法测得单克隆细胞株 9H9 培养液上清效价为 1:1000, 诱生的腹水效价为 1:10 000, 8A2 则分别为 1:500 和 1:2 500。

2.4 抗体类型和亚类鉴定

经检测两株抗体类型均为 IgG₁。

2.5 杂交瘤腹水特异抗体相加试验

对 9H9 和 8A2 两株杂交瘤腹水进行相加试验, 其相加指数 AI (%) 为 30.5, 表明 9H9 和 8A2 识别同一或非常相近的抗原决定簇。

2.6 亲和常数测定

双抗体夹心 ELISA 法测定杂交瘤细胞培养液上清的 IgG 浓度(图 2), 9H9 株为 3.84 μg/mL, 8A2 为 1.90 μg/mL。由 9H9 和 8A2 细胞株培养上清稀释曲线(图 3)可以推知, OD₁₀₀ 分别为 1.15 和 1.05(9H9), 0.99 和 0.82(8A2), 则 OD₅₀ 所对应的稀释度分别为 220 和 157(9H9), 150 和 130(8A2), 根据算式得 9H9 K_{aff} 值为 1.6×10^{10} mol/L, 8A2 $K_{aff} = 1.9 \times 10^{10}$ (mol/L)⁻¹

2.7 单克隆抗体特异性检测

蛋白免疫印迹结果(图 4)显示所获单克隆抗体与重组抗原 MSP1-31 有特异性免疫结合(图 4-A, B), 而与大肠杆菌宿主中的蛋白无交叉反应(图 4-C)。

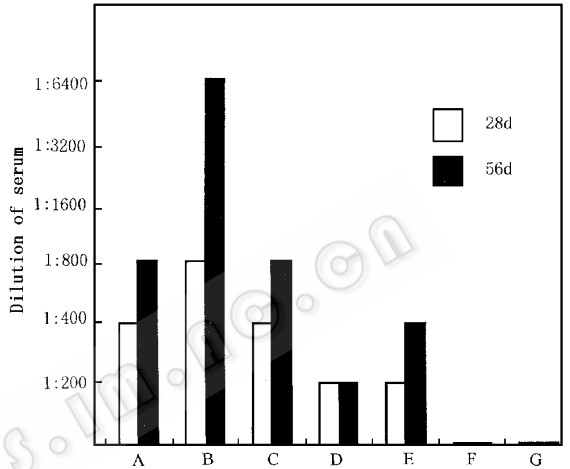


图 1 质粒 DNA 免疫小鼠后血清抗体 ELISA 检测结果

Fig. 1 Result of ELISA for serum antibody after immunization of mice with plasmid DNA

A~E represent the immunized mice which resulted serum antibody positive; F and G represent the control mice which kept negative in 56 days.

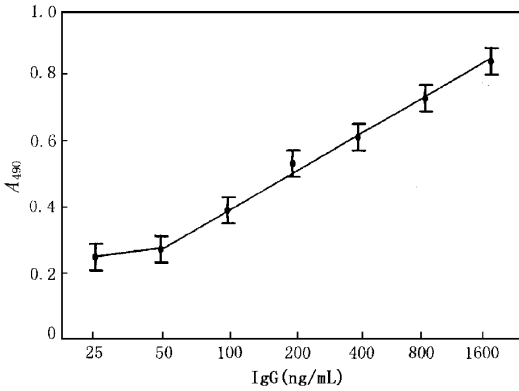


图 2 小鼠标准 IgG 抗体稀释曲线
Fig. 2 Dilution curve of standard mouse IgG

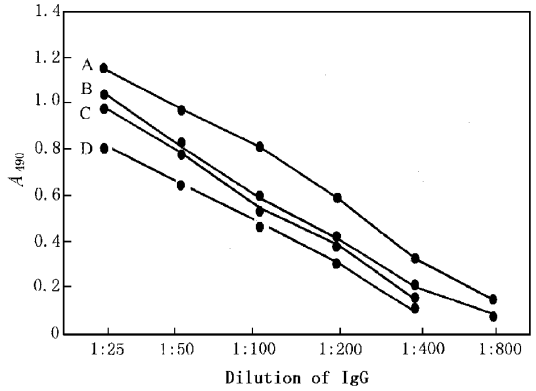


图 3 9H9 和 8A2 细胞株培养上清的稀释曲线
Fig. 3 Dilution curve of culture supernatant of 9H9 and 8A2 strains

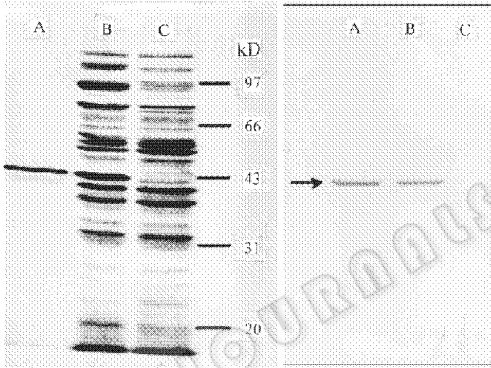


图 4 单克隆抗体 9H9 的蛋白免疫印迹检测
Fig. 4 Western blot analysis of McAB 9H9

A. Purified antigen MSP1 - 31 ;
B. Antigen MSP1 - 31 in host bacteria lysate(before purification) C. host bacteria lysate control with no MSP1 - 31 induced(left :SDS-PAGE ; right :Western blot).

A and C use 4 μ g/mL MSP1 - 31 which was coated for 9H9 and 8A2 testing β and D use 2 μ g/mL MSP1 - 31 for 9H9 and 8A2 testing.

3 讨论

载体 DNA 或 DNA 疫苗免疫小鼠制备单克隆抗体这一途径,可以有效地避免大量地分离和纯化抗原。事实上,DNA 介导免疫可以作为一项常规技术,只要有足够的具有免疫原性的抗原,其单克隆抗体的制备过程大同小异,然而通过常规免疫则要获得大量的纯化抗原,需耗费大量的时间和经费^[5]。在成功获得高效真核表达载体系统之后,目的基因序列的克隆与质粒 DNA 构建可以使用常规的分子生物学技术,且质粒 DNA 或 DNA 疫苗的提纯、保存、运输均十分稳定可靠、重复性强。

除了不受蛋白抗原量的限制,DNA 免疫也不受抗原纯度的限制,甚至可以通过基因设计获得单一抗原决定簇的免疫效果^[1],为疫苗设计提供手段^[6]。DNA 免疫所表达的抗原为真核翻译后修饰的天然构型^[7,8],显然所制备的抗体更接近自然免疫;抗原的持续高效表达省却了加强免疫的步骤;化学合成多肽抗原往往需获得多条多肽供选择,或合成长片段以保证免疫原性,相应提高了抗原费用,而 DNA 水平不同序列的克隆则简单得多^[5,8]。以上原因使我们有可能仅通过调节真核表达载体的表达而诱导产生高效特异的免疫^[3],这对于免疫球蛋白的获得无疑是一条有益的新途径。

理论上,载体 DNA 或 DNA 疫苗可以用来制备多种外显子序列所对应的蛋白的抗体,这就为各种基因组计划所获得的序列提供了一条研究其功能的途径,即在获得重组蛋

白抗原之前 利用 DNA 免疫所制备的抗体(多抗或单抗)进行免疫组化定位,了解基因表达产物在组织细胞内的分布、代谢、转运和相互作用,也可以利用相关的系列单抗或多抗开展蛋白组研究,进而达到结构与功能的统一。

参 考 文 献

- [1] Chattergoon M , Boyer J , Weiner D B. *The FASEB Journal* ,1997 ,**11** :753~763.
 [2] Gossen M , Bujard H. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1992 ,**89** :5547~5551.
 [3] 谢文凯 陈启宇 汪群斌,等. *生物工程学报* 2000 ,**16** (1):13~16.
 [4] Hoffman S L , Sedegah M , Hedstrom R C. *Vaccine* ,1994 ,**12** :1529~1533.
 [5] Whalen R G. DNA vaccine for emerging infectious disease : What if ? (downloaded from <http://www.genweb.com/Dnavax/dnavax.html>)
 [6] Hinkula J , Svanholm C , Schwartz S. *J Virol* ,1997 ,**71** :5528~5539.
 [7] Kalinna B H. *Immunol and Cell Biol* ,1997 ,**75** :370~375.
 [8] Donnelly J J , Ulmer J B , Liu M A. *Life Sci* ,1997 ,**60** :163~172.

PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST MALARIA THROUGH IMMUNIZATION OF MICE WITH RECOMBINANT PLASMID DNA

Xie Wenkai¹ Zhong Ping² Pan Weiqing³ Chen Qiyu⁴ Wang Qunbin⁴ Lu Deru⁵

(¹ Shanghai Institute of Plant Physiology , Academia Sinica , Shanghai 200032)

(² Shanghai Institute of Biological Products , Shanghai 200052)

(³ Department of Parasitology , The Second Military Medical University , Shanghai 200433)

(⁴ Shanghai Fortune High-technology(Group) Company , Shanghai 200042)

(⁵ Institute of Medical Biotechnology & Molecular Genetics , The Second Military Medical University , Shanghai 200433)

Abstract : BALB/c mice were immunized by injection of recombinant plasmid DNA carrying MSP1-31 fragment of *Plasmodium falciparum*. After antiserum was induced , McAbs were prepared by fusing SP2/0 myeloma cells with spleen cells. Specific McAbs were detected in hybridoma culture supernatant and mouse ascites by ELISA , positive hybridomas were cloned by technique of limiting dilutions. Two McAbs , 9H9 and 8A2 , against the malaria protein were produced and characterized. The titers of the two McAbs in acites were 1 : 10000 and 1 : 2500 respectively. The Ig subclass of these McAbs was IgG₁. Western blot test showed that the McAb specifically reacted with MSP1 - 31 antigen. These results proved that monoclonal antibodies could be produced by use of immunization of mice with plasmid DNA or DNA vaccine.

Key words : *Plasmodium falciparum* , DNA vaccine , Monoclonal antibodies , Hybridoma , Genetic immunization