

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):423-427; 4 March 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

东北虎免疫球蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

张彦龙¹, 张段玲¹, 周明², 薛原¹, 华育平¹, 马建章^{1*}

(¹ 东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040)

(² 黑龙江东北虎林园, 哈尔滨 150028)

摘要:【目的】提纯东北虎免疫球蛋白并制备其单克隆抗体(McAb), 为东北虎传染性疾病诊断试剂盒研制、疫苗免疫效果评估及基础免疫学研究奠定基础。【方法】以饱和硫酸铵和重组的 Protein G 相结合, 提纯东北虎免疫球蛋白作为抗原, 免疫 C57BL/6 小鼠, 和骨髓瘤细胞系 Sp2/0-Ag14 相融合制备杂交瘤细胞, ELISA 和蛋白免疫印迹筛选及鉴定阳性克隆, 应用杂交瘤产生的 McAb 鉴定提纯免疫球蛋白及制备的 McAb 免疫学活性, 非竞争性 ELISA 法测定了其亲和常数。【结果】得到 3 株稳定分泌抗东北虎免疫球蛋白 McAb 的杂交瘤细胞, 产生的抗体全部识别免疫球蛋白的重链, 通过对猫泛白细胞减少症病毒株(FPV-HLJ)灭活疫苗免疫东北虎的抗体消长的检测, 证明提纯的免疫球蛋白及其 McAb 的免疫活性。【结论】Protein G 能够用于东北虎免疫球蛋白的提纯, ATD11 杂交瘤产生的 McAb 与抗原有较强的结合能力和免疫学活性, 为今后开展东北虎传染病的诊断方法及疫苗研究奠定基础。

关键词: 东北虎; 免疫球蛋白; 杂交瘤; Protein G; McAb

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0423-05

快速进化的病原微生物, 特别是近年来流行于大型的猫科动物的结核、禽流感等传染性疾病不断挑战动物和人类的健康^[1-5]。为防治大型猫科动物传染病的发生, 减少传染病对濒危动物的危害及对人的公共卫生安全的威胁, 血清学方法是防治和诊断动物传染病的重要手段。免疫球蛋白作为血清学的诊断指标之一, 无论是在体内还是体外(免疫组化和血清学反应), 可用于血清流行病学研究、动物体液免疫血清学的分析及对病原微生物的诊断等, 并且具有排除补体结合反应中的非特异性血清反应等优点。

尽管多克隆抗体作为第一抗体或第二抗体被广泛应用, 但是单克隆抗体能够克服背景比较高等问题, 而且特异性的单克隆抗体更是首选的诊断试剂,

纯化的单克隆抗体可被用于抗体本身特性的分析等优点^[6]。然而野生动物种类繁多, 针对某一物种免疫球蛋白的单克隆抗体产品十分匮乏, 限制了将其作为同种型标记抗抗体的使用, 所以制备抗虎免疫球蛋白单克隆抗体, 作为将来开展野生动物传染性血清学检测方法的一个开端。

猫瘟热(FPV)是细小病毒属成员, FPV 能导致所有的猫科动物产生致死性肠炎, 特别在年轻的幼虎、幼狮等具有很高的传染性, 并且 FPV 普遍流行于虎群, 病毒在没有免疫的虎群中具有高发病率和致死率^[7-11]。采集大型猫科动物东北虎的血清, 用 Protein G 和饱和硫酸铵沉淀处理, 提纯免疫球蛋白并制备其单克隆抗体。实验中获得多株可稳定分泌抗东北虎免疫球蛋白 McAb 的杂交瘤细胞株, 并对

基金项目: 中国博士后基金东北林业大学林学博士后流动站(74224)

* 通信作者。Tel: +86-451-82191025; E-mail: jianzhangma@163.com

作者简介: 张彦龙(1968-), 男, 吉林省公主岭市人, 副教授, 医学博士, 研究方向野生动物传染病; 哺乳动物精原干细胞培养、移植等。

E-mail: zhangynlng@yahoo.com.cn; Tel: +86-451-82192037

收稿日期: 2009-10-22; **修回日期:** 2009-12-07

其产生的 McAb 生物学特性进行评价,应用 ATD11 杂交瘤细胞株的培养上清,鉴定东北虎的猫瘟热病毒(FPV-HLJ)灭活疫苗免疫后的血清抗体消长的变化,证明了提纯免疫球蛋白及其单克隆抗体的生物学活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试材:东北虎血清(一岁龄的 80 只用于研究东北虎谱系鉴定所收集的血清样本);重组 Protein G-Agarose(fluka 83219);C57BL/6 小鼠(购自哈医大肿瘤医院实验动物室);乌苏里貉、银黑狐、犬、家猫、马、羊免疫球蛋白(本室保存)和 FPV-HLJ 毒株及其灭活苗免疫的东北虎血清(于亚丽馈赠)。

1.1.2 主要试剂和仪器:酶标板(Corning Incorporated costor 3590);PVDF 膜(Millipore);鉴定 McAb 的亚型诊断试剂盒为 SBA Clonotyping System/HRP;1640 培养基, GIBICO Cat. No. 31800-22;胎牛血清(FBS) Gibco. Cat. No. 10099-141;HAT Media Supplement (50 ×) Hybri-Max™ Sigma. H0262; HT Media Supplement (50 ×) Hybri-Max™ Sigma. H0137; *o*-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD), Sigma. P1526; ECL-Kit, 北京普利莱基因有限公司; TI-SM 倒置显微镜, Nikon Eclipse TS100; LD5-2A 型低速离心机, 北京京立离心有限公司制造; BCN-1360B 生物洁净工作台, 北京东联哈尔仪器有限公司制造; VXE380-80℃ 冰柜, Thermo; MCO-18AIC(UV) CO₂ 培养箱; SANYO Electric CO. Led made in JAPAN; 99.99% CO₂, 哈尔滨黎明气体有限公司。

1.2 东北虎免疫球蛋白的制备

东北虎免疫球蛋白的提纯方法是采用饱和硫酸铵和 Agarose-Protein G 重组法分离制备^[12]。200 mL 烧杯中加入 10 mL 血清和 40 mL 冷的 50 mmol/L 磷酸盐,在冰上加入硫酸铵粉末,边加边搅拌,最终浓度在 22%,离心去除沉淀,上清液继续加入硫酸铵粉末终浓度 55%,在 4℃ 下放置 4 h,离心回收沉淀,并溶解在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中,透析在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中,中间 3 次换液并过夜透析。次日回收透析液,离心除去不容物。上清液加入硫酸铵粉末至终浓度 33%,在 4℃ 下搅拌并静止 4 h,离心收集沉淀,透析于 20 mmol/L 磷酸盐中,换液 3 次并过夜,回收透析液,并 12000 r/min 离心 10 min,去掉不溶性蛋白备用。层析方法为 Agarose-

Preotein G 在超纯水中膨胀 30 - 60 min 后装柱,经 5 - 10 倍的 20 mmol/L 磷酸盐平衡后,上柱、洗脱,并收集洗脱液定量,存放在 -20℃ 备用。

1.3 提纯东北虎免疫球蛋白纯度的鉴定

用 SDS-PAGE 对提纯的免疫球蛋白纯度进行鉴定。配制 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,提纯的蛋白加入加样缓冲液,经 100℃ 3 min 蛋白变性,在加样孔中加入 20 μg 提纯的蛋白,同时加入蛋白质的标准分子量 Marker,电泳完成后,经考马斯亮蓝 R250 (Coomassie Brilliant Blue R-250) 染色,脱色后拍照。

1.4 杂交瘤细胞的制备

应用纯化的东北虎免疫球蛋白的作为抗原免疫小鼠,免疫程序,共为 3 次,初次使用弗氏完全佐剂,隔 15 d 后,用弗氏不完全佐剂 2 次免疫,间隔 1 个月,应用纯化的蛋白直接免疫,4 d 后采血并分离脾细胞,被分离脾细胞和 Sp2/0-Ag 14 小鼠的骨髓瘤细胞系杂交制备杂交瘤细胞,细胞被分配在 96 孔培养板,培养液是含有 10% FBS 的 HAT 1640 培养基,培养 12 d 后,应用 ELISA 筛选阳性克隆。

1.5 单克隆抗体(McAb)的筛选

筛选方法是以提纯的东北虎免疫球蛋白作为抗原,4℃ 过液包被在酶标板上,洗液洗涤 3 次后,加入封闭液 200 μL/孔 37℃ 封闭 1 h,洗涤 1 次,加入培养上清 100 μL/孔,37℃ 温浴 1 h,洗涤 3 次后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 100 μL/孔,37℃ 1 h,最后洗液洗涤 4 次,用底物 OPD 显色 15 min 后,加 3 mol/L HCl 终止反应,按着显色时间的长短和强度目测确定阳性克隆(包被抗原 100 - 150 ng/100 μL/孔、封闭液是 3% BSA/PBS、洗液为 0.05% TWEEN-20/PBS,酶标抗体稀释液为 1% BSA/PBS,每次洗涤时间为 5 min)。对检测出的阳性克隆用有限稀释法进行亚克隆,3 轮后全部阳性的单克隆冻存备用。

1.6 Western blot 检测

SDS-PAGE 电泳后,电泳蛋白体积 10 μL,每个样本包括 1.5 μg 的提纯蛋白;5 μg 的饱和硫酸铵粗提蛋白,应用半干转移法转移到 PVDF 膜上,封闭 1 h,洗涤 3 次之后加入单克隆抗体,室温反应 1 h,洗涤 3 次,最后加酶标二抗,最后洗涤 4 次, ECL-Kit 显色(反应缓冲液和条件同单克隆抗体的筛选)。

1.7 McAb 特异性及亚型的鉴定

以乌苏里貉、银黑狐、水貂、犬、马、家猫的免疫球蛋白,按着筛选单克隆抗体的方法,以 Sp2/0-Ag 14 细胞培养上清作为阴性对照,被检抗原和阴性对

照比 ≥ 2.0 判为阳性反应。单克隆抗体的亚型的鉴定,按 SBA Clonotyping System/HRP 说明书所描述的方法进行操作。

1.8 McAb 腹水的制备及效价测定

腹腔注射灭菌液体石蜡,0.5 mL/只,7d 后腹腔注入 1×10^6 个/0.2 mL 的杂交瘤细胞,同时用 Sp2/0-Ag 14 细胞注入另外的小鼠制备阴性腹水。7-10 d后,收集腹水,2000 r/min 离心 10 min,吸取上清,即为腹水抗体,分装,-80℃ 保存备用。腹水的 McAb 应用 Protein G-Agarose 亲和层析纯化。

1.9 McAb 腹水效价测定

按着筛选克隆的方法,用 OPD 底物显色,15 min 后用 3 mol/L HCl 终止反应,用酶标仪读取 A_{562} 值,以与阴性对照 A_{562} 值相比,比值 ≥ 2.0 为阳性。

1.10 McAb 的相对亲和力测定

参照 Beatty 等^[13] 的间接 ELISA 法测定相对亲和力,用纯化的东北虎免疫球蛋白(150 ng/孔)作为抗原包被酶标板,一抗为 2^n 稀释度的稀释提纯单克隆抗体(起始浓度 10 $\mu\text{g/mL}$),并且做重复 3 次,其它反应条件同上,在 A_{562} 酶标仪上读取吸光度值(OD);再以 McAb 浓度为横坐标, A_{562} 值为纵坐标绘制反应曲线,从曲线上找到趋于平坦段 A_{562} 值的 50% 所对应的 McAb 浓度,再求出其倒数,以此表示 McAb 的相对亲和力。

1.11 提纯免疫球蛋白及其 McAb 免疫活性的鉴定

应用间接 ELISA 鉴定 Protein G - Agarose 提纯的免疫球蛋白,FPV 病毒液 50 μL ,过夜包被在 ELISA 板上,次日,封闭、洗涤,加 FPV 灭活疫苗免疫的东北虎血清,作为被检抗体,同时做阳性、阴性对照(阳性血清、阴性血清,作 512 x),其它反应条件和反应液同阳性克隆的筛选,最后加兔抗鼠 HRP 标记的抗体,底物显色后,在 A_{562} 酶标仪上读取吸光度值。

2 结果

2.1 提纯东北虎免疫球蛋白纯度的鉴定

SDS-PAGE 检测 Protein G 纯化免疫球蛋白的纯度及分子量如图 1 所示,浓缩胶的浓度为 5%,分离胶浓度为 12%。电泳后经考马斯亮蓝 R250 (Coomassie Brilliant blue R-250) 染色,脱色后发现,蛋白质的分子量大小大约在 50 kDa 和 22 kDa 左右,与哺乳动物的免疫球蛋白轻链和重链的分子量基本相符,如图箭所示。

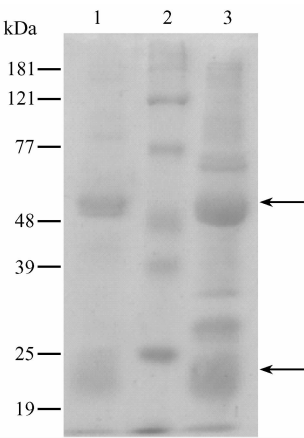


图 1 蛋白电泳检测 Protein G 亲和层析和饱和硫酸铵粗提的东北虎免疫球蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of using protein G affinity chromatography and the crude extraction of saturated ammonium sulphate from Immunoglobulin of Siberian Tiger, 1. Protein G purity; 2. marker; 3. the crude extraction of saturated ammonium sulphate.

2.2 东北虎免疫球蛋白 McAb 的制备

为制备出东北虎免疫球蛋白单克隆抗体,应用纯化的免疫球蛋白作为抗原免疫 C57BL/6 小鼠,制备杂交瘤细胞,经 ELISA 筛选和限定稀释鉴定,得到三株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞,分别命名为 ATD11、ATG11、ATB4,经蛋白免疫印迹鉴定,表明这 3 株杂交瘤细胞产生的抗体均于东北虎免疫球蛋白的重链反应。如图 2 所示蛋白印迹反应的分子量在 50 kDa 左右,1 表示提纯免疫球蛋白的反应带,2 表示饱和硫酸铵粗提免疫球蛋白反应的带,A、B、C 分别表示 ATD11、ATG11、ATB4 三株杂交瘤细胞产生单克隆抗体的蛋白免疫印迹结果。此反应符合免疫球蛋白的分子量大小,说明这 3 株杂交瘤细胞产生

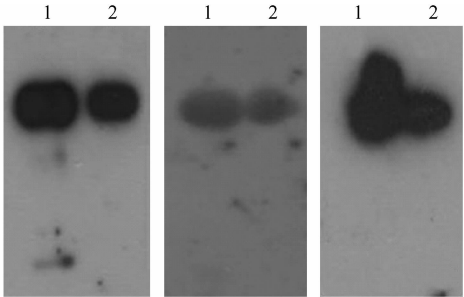


图 2 Western Blot 检测单克隆抗体免疫活性

Fig. 2 Lane 1 Immunoglobulin of the crude extraction of saturated ammonium sulphate ; Lane 2, Immunoglobulin of protein G affinity chromatography; A, hybridama ATD11; B, hybridama ATG11 C, hybridama ATB4. 1 Protein G purity; 2. the crude extraction of saturated ammonium sulphate.

的抗体全部识别免疫球蛋白的重链。

2.3 McAb 的特异性及其亚型鉴定

以东北虎免疫球蛋白作为阳性对照, Sp2/0-Ag14 细胞培养上清作为阴性对照, 被检抗原和阴性对照比 ≥ 2.0 鉴定制备单克隆抗体对乌苏里貉、银黑狐、水貂、犬、马、家猫的免疫球蛋白的特异性(包被免疫球蛋白的量为 100 – 150 ng), 结果表明此 3 株杂交瘤细胞产生的抗体没有和被检测的动物免疫球蛋白发生交叉反应, 具有较好的特异性, 经亚型鉴定, ATD11、ATG11、ATB4 杂交瘤产生抗体重链为 IgG₁、IgG₁、IgG_{2b} 其轻链为 κ 。

2.4 McAb 腹水及上清效价测定

用杂交瘤细胞株 AD11, 制备腹水, 间接 ELISA 法测定抗体效价, 阳性标准为被检抗体与阴性对照在 A₅₆₂ 之比 ≥ 2.0 , 结果表明, 细胞培养上清为 1:10³, 腹水为 1:10⁶, 如表 1 所示:

表 1 杂交瘤 AD11 上清及腹水效价的测定

Table 1 Determination of the AD11 hybridoma supernatants and ascites titer

Dilution factor	Supernatants	Ascites	Negative control
1:10 ¹	2. 1	> 3	0.56
1:10 ²	1. 91	> 3	0.51
1:10 ³	1. 31	> 3	0.49
1:10 ⁴	0. 91	2. 49	0.52
1:10 ⁵	0. 69	2. 04	0.50
1:10 ⁶	0. 49	1. 33	0.47
1:10 ⁷	0. 50	0. 89	0.53

2.5 ATD11 杂交瘤细胞分泌的 McAb 的相对亲和力测定

以 Protein G 提纯 ATD11 杂交瘤细胞腹水检测相对亲和力, 以 McAb 的不同浓度为横坐标, 以相应的 A₅₆₂ 值为纵坐标, 绘出 McAb 亲和力的测定曲线, 从曲线上查出达到最大结合 50%, 3 个重复的平均值为 1.37 × 10⁷, 故该 McAb 的相对亲和力为 10⁷ mol/L。

2.6 水貂免疫球蛋白及其 McAb 免疫活性鉴定

为进一步证明提纯目的蛋白为免疫球蛋白, 包被分离自猫科动物的猫泛白细胞减少症病毒在 ELISA 酶标板上, 应用猫泛白细胞减少症病毒灭活疫苗, 免疫的 4 只东北虎免疫前和免疫后的血清对照(已做过血凝抑制实验鉴定过), 加入第一抗体 ATD11 杂交瘤细胞的 McAb, 检测制备的免疫球蛋白及其 McAb 免疫活性, 结果表明如图 3 所示, 免疫后的血清抗体滴度远远高于免疫前, 说明提纯的蛋白为免疫球蛋白, 制备的 McAb 能够和免疫球蛋白相结合。

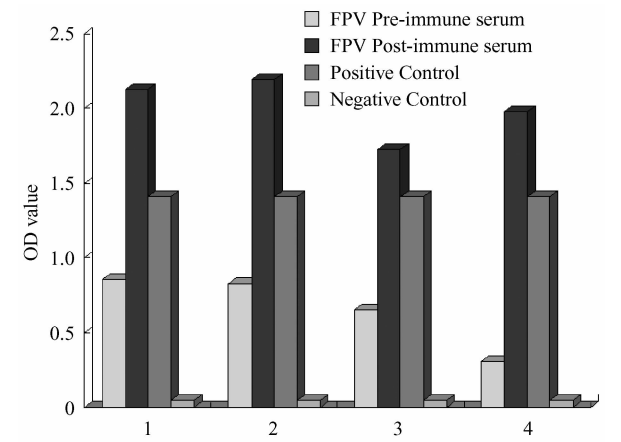


图 3 间接 ELISA 鉴定提纯的东北虎免疫球蛋白及其单克隆抗体的免疫活性

Fig. 3 Indirect ELISA identified purified Immunoglobulin and mAb immunocompetence. fours Siberian Tigers samples of serum that were pre-immune and post immune serum by FPV-HLJ.

3 讨论

免疫球蛋白的提纯方法按着事先已经建立的方法^[12], 应用饱和硫酸铵和重组 Protein G 相结合提纯了东北虎球的蛋白, 发现重组 Protein G 对东北虎免疫球蛋白结合率相对银黑狐、乌苏里貉、水貂比较低, 可能是与其东北虎免疫球蛋白的亚型有关, 今后将进一步研究。

综上所述, 本研究提纯东北虎的免疫球蛋白免疫小鼠, 并制备杂交瘤细胞, 获得多株杂交瘤细胞, 选择三株做初步鉴定, 鉴定的杂交瘤分泌单克隆抗体可全部识别东北虎免疫球蛋白的重链; 应用间接 ELISA 证明提纯的东北虎免疫球蛋白及(ATD11)分泌的单克隆抗体活性, 并可以用于评估疫苗的免疫效果; 在特异性方面没有和狐、貉等动物的免疫球蛋白发生交叉反应, 是否和其它抗体的抗原决定簇反应有待于今后进一步研究。

参考文献

[1] Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, et al. Feline Host Range of Canine parvovirus: Recent Emergence of New Antigenic Types in Cats. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(4): 341-346.

[2] Ho-Seong Cho, Yong-Hwan Kim, Nam-Yong Park. Disseminated mycobacteriosis due to Mycobacterium avium in captive Bengal tiger (Panthera tigris). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2006, 18(3): 312-314.

[3] Thiry E, Zicola A, Addie D, et al. Highly pathogenic

- avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Veterinary Microbiology*, 2007, 122(1-2): 25-31.
- [4] Alongkorn Amonsin, Salin Chutinimitkul, Nuananong Pariyothorn . et al. Genetic characterization of influenza A viruses (H5N1) isolated from 3rd wave of Thailand AI outbreaks. *Virus Research*, 2006, 122(1-2): 194-199.
- [5] Hall JS, Bentler KT, Landolt G, et al. Influenza infection in wild raccoons. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(12): 1842-1848.
- [6] Arce C, Moreno A, Millán Y, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against dog immunoglobulin isotypes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, 88(1-2): 31-41.
- [7] Songtao Yang, Xianzhu Xia, Jun Qiao, et al. Complete protection of cats against feline. panleukopenia virus challenge by a recombinant canine adenovirus type 2 expressing VP2 from FPV. *Vaccine*, 2008, 26(11): 1482-1487.
- [8] Steinel A, Munson L, van Vuuren M, et al. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *Journal of General Virology*, 2000, 81(Pt2): 345-50.
- [9] 杨松涛, 周明, 王铁成, 等. 猫科动物猫泛白细胞减少症血清抗体调查. 兽类学报 (*Acta Theriologica Sinica*), 2008, 28(1): 101-104.
- [10] 于亚丽, 周明, 张进, 等. 虎源猫泛白细胞减少症病毒灭活疫苗的制备及初步应用. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(5): 643-647.
- [11] Jas D, Aeberle C, Lacombe et al. Onset of immunity in kittens after vaccination with a non-adjuvanted vaccine against feline panleucopenia, feline calicivirus and feline herpesvirus. *The Veterinary Journal*, 2009, 182(1): 86-93.
- [12] 张彦龙, 张洁, 谭婷婷, 等. 兰狐和银黑狐免疫球蛋白的提纯与鉴定. 中国预防兽医学报 (*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2008, 30(12): 981-983.
- [13] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 1987, 100(5): 173-181.

Identification and production of monoclonal antibody of *Siberian tiger's* immunoglobulin

Yaonglong Zhang¹, Duanling Zhang¹, Ming Zhou², Yuan Xue¹, Yuping Hua¹, Jianzhang Ma^{1*}

Abstract: [Objective] To purify immunoglobulin (Ig) of *Siberian Tiger* and prepare monoclonal antibody (mAb) against the Ig, which can be used to develop immunological diagnostic kits for diagnosing infectious disease in *Siberian Tiger*. [Methods] The Ig of *Siberian tigers* was purified with saturated ammonium sulfate combined with recombinant Protein G. The C57BL/6 mice were immunized with the purified Ig. Spleno-cytes of the mice immunized were collected and fused with the mouse myeloma cell line (Sp2/0-Ag14). The positive hybridoma clones were selected by ELISA and were identified by western blot. The sandwich ELISA was used to detect immunocompetence of the purified Ig and the mAb. [Results] We obtained three mouse hybridoma clones that produced mAbs against Ig of *Siberian Tiger*. The derived McAbs could recognize Ig heavy chain of *Siberian Tiger* specifically. The biological activity of the Ig and obtained McAbs also could be identified by detecting the antibody induced by panleukopenia virus (FPV-HLJ) vaccine in *Siberian Tiger*. The antibody also would be useful for assess the vaccine efficacy against the infectious disease on the *Siberian Tiger*. [Conclusion] Protein G can be used in Ig purification of *Siberian Tiger*. The obtained McAbs from the hybridoma ADT11 in this study owned strong ability to bind Ig of *Siberian Tiger* and have a stable immunocompetence. They can be used to develop diagnostic methods for detecting infectious disease in *Siberian Tiger* and vaccine research.

Keywords: *Siberian Tiger*; Immunoglobulin; hybridoma; Protein G; McAb

(本文责编: 张晓丽)