

SARS冠状病毒N蛋白单克隆抗体的快速、高效制备的方法研究

SARS是人类在21世纪面临的一种新的传染病,严重危害人民群众身体健康,给社会经济带来巨大影响。尽管SARS疫情已基本控制,但人们至今对它还知之不多,尚有一系列问题需要解决。

本研究率先采用简单、快速、有效的免疫方法,获得了高效价、特异性SARS冠状病毒单克隆抗体,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 6周龄雌性SPF级BALB/C小鼠,购自第一军医大学动物研究所。

1.1.2 主要试剂 谷胱甘肽S-转移酶(GST)融合蛋白纯化试剂盒为Amersham Pharmacia Biotech产品;弗氏佐剂、MPL+TDM佐剂、50%PEG分子质量为1 450溶液、HAT、HT为Sigma产品;HRP标记羊抗小鼠IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、FITC标记羊抗小鼠IgG、AEC(aminoethyl carbazole)底物显影剂为ZYMED产品,RPMI 1640培养基和胎牛血清Gibco-BRL产品;流感病毒、副流感病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体抗体检测试剂盒为康润生物制品公司产品。

1.2 方法

1.2.1 SARS冠状病毒核壳(N)抗原表达和纯化BL21菌种表达GST-N融合蛋白(香港大学微生物系提供),用GST融合蛋白纯化试剂盒提取与纯化,经SDS-PAGE鉴定纯度达95%以上。

1.2.2 动物免疫 3种免疫方法:(1)首次用福氏完全佐剂与抗原乳化注射小鼠足垫,10 μg /只,共5只,以后每隔3 d以弗氏不完全佐剂与抗原乳化后足垫注射,共免疫5次;(2)首次用弗氏完全佐剂与抗原乳化后予小鼠腹腔注射,20 μg /只,共5只,以后每隔10 d以弗氏不完全佐剂与抗原乳化后皮下多点注射,共免疫4次;用MPL+TDM佐剂与抗原乳化后予小鼠皮下2点注射,20 μg /只,共10只,免疫3周后,用同法加强免疫1次,10 d后眼眶采血测抗体效价。

1.2.3 间接ELISA检测血清效价 以纯化GST-N融合蛋白5 μg /ml,4 $^{\circ}\text{C}$ 16 h包被聚苯乙烯微孔板,100 μl /孔;用含3% BSA 封闭液200 μl /孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 16 h封闭;洗涤后,每孔加入各种血清稀释度,100 μl /孔,同时设相同稀释度的正常小鼠血清对照,置37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 m,洗涤后加入HRP标记羊抗小鼠IgG 1:2 000,置37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 m;TMB 100 μl /孔显色10 min;2 M H_2SO_4 100 μl /孔终止反应;BioRad-550型酶联免疫检测仪读取 D_{450} 值。

1.2.4 杂交瘤制备和筛选 取足垫免疫小鼠脾窝淋巴结细胞 1×10^8 个细胞与骨髓瘤细胞株NS-1 1×10^7 个细胞与按常规方法用50%PEG进行融合。用SARS冠状病毒N蛋白建立的间接ELISA检测培养上清,选择强阳性克隆,用有限稀释法连续克隆化,将克隆化后阳性率达100%的细胞扩增培养后液氮冻存。

1.2.5 抗体纯化和免疫球蛋白Ig亚类鉴定 每只小鼠腹腔注射 2.5×10^6 个杂交瘤细胞制备腹水,采用辛酸-硫酸铵方法纯化IgG,并用SDS-PAGE电泳鉴定其纯度。IgG亚类鉴定采用间接ELISA法,包被抗原,封闭后与杂交瘤细胞培养上清孵育,再分别与HRP标记羊抗小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3抗体反应,充分洗涤后TMB显色,测 D_{450} 值。

1.2.6 抗体特异性鉴定 (1)间接ELISA法:用纯化流感病毒、副流感病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体全抗原包被的微孔板与杂交瘤细胞培养上清反应。(2)间接免疫荧光法:用SARS冠状病毒感染Vero E6细胞,5型腺病毒感染293细胞,A组轮状病毒感染MA104细胞,然后将病毒感染的细胞制备成涂片,充分干燥,用丙酮-福尔马林固定,分别与杂交瘤细胞培养上清和FITC标记的羊抗兔IgG孵育,荧光显微镜下观察结果。(3)免疫印迹:用10% SDS-PAGE分离GST-N,转印到硝酸纤维素膜,转印膜在10%脱脂牛奶4℃封闭过夜,分别与杂交瘤细胞培养上清和HRP标记羊抗小鼠IgG孵育,洗涤膜后,用AEC显色。

1.2.7 抗体亲和常数测定 参照Beatty的方法[1],即选用间接ELISA方法测定,将抗原分别以0.625、1.125、2.5和5 μg/ml包被,加入倍比稀释的mAb,再加入HRP标记羊抗鼠IgG抗体,TMB显色测D(λ)值。以抗体浓度的对数为横座标,以D(λ)值为纵座标,每种mAb得出4条反应曲线,以每条曲线上部平坦段的D(λ)值作为100%,在曲线上查出50% D(λ)值时相对应的抗体浓度,按Beatty推导公式: $K_{aff} = (n-1) / (2(n[Ab']_t - [Ab]_t))$ 计算亲和常数。

2 结果

2.1 不同免疫方法小鼠血清效价的比较

ELISA间接法比较3种免疫方法的血清效价,结果显示足垫快速免疫小鼠的血清效价与用弗氏佐剂常规免疫的效价相同,而用MPL+TDM佐剂免疫4周的血清效价比前述的2种方法要低(图1)。

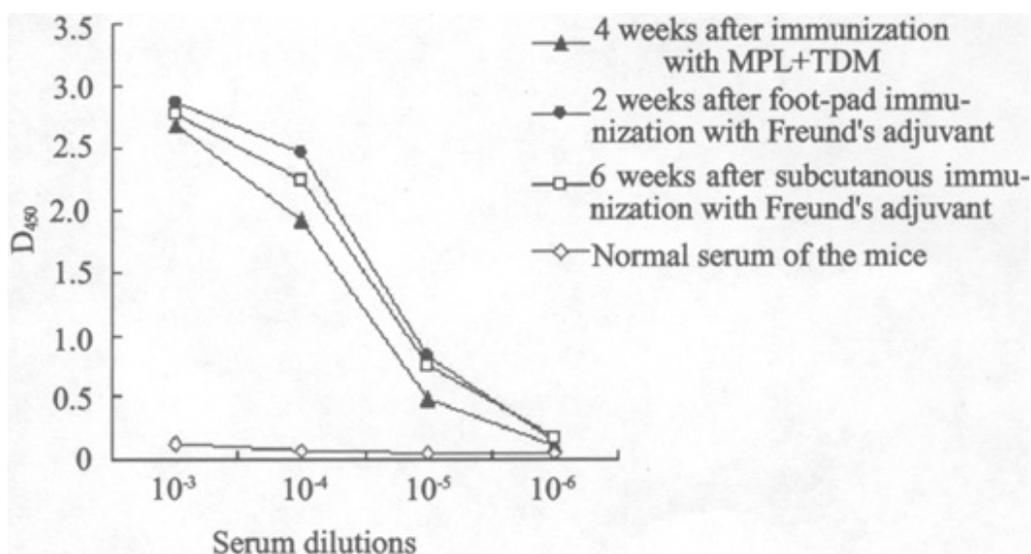


图1 三种免疫方法比较BALB/c小鼠免疫血清效价

Fig.1 Antiserum titer in BALB/c mice by the 3 immunization methods

2.2 杂交瘤细胞株的建立

经细胞融合,共获得11株阳性杂交瘤细胞株,挑选4株培养上清中抗体滴度高的进行亚克隆化,克隆化1次阳性率达100%。IgG亚类鉴定,2株为IgG1、另2株分别为IgG2a和IgG2b。

2.3 抗体的纯度及亲和常数(Ka)

SDS-PAGE蛋白电泳显示采用辛酸-硫酸铵方法所制备抗体纯度达95%以上。测定2株mAb,A7和C7值分别为 4.14×10^{-9} M和 3.17×10^{-9} M(注:至投稿时,尚有另外2株单抗因腹水未形成,没有进行亲和常数测定)。

2.4 抗体特异性

间接ELISA法和间接免疫荧光法检4株mAb特异性与SARS冠状病毒结合,与其他呼吸道病毒如流感病毒、腺病毒、肠道病毒如轮状病毒以及肺炎衣原体、肺炎支原体均无交叉反应(图2)。免疫印迹结果(图3)显示4株mAb与GST-N特异性结合,结合蛋白相对分子质量为74 000。

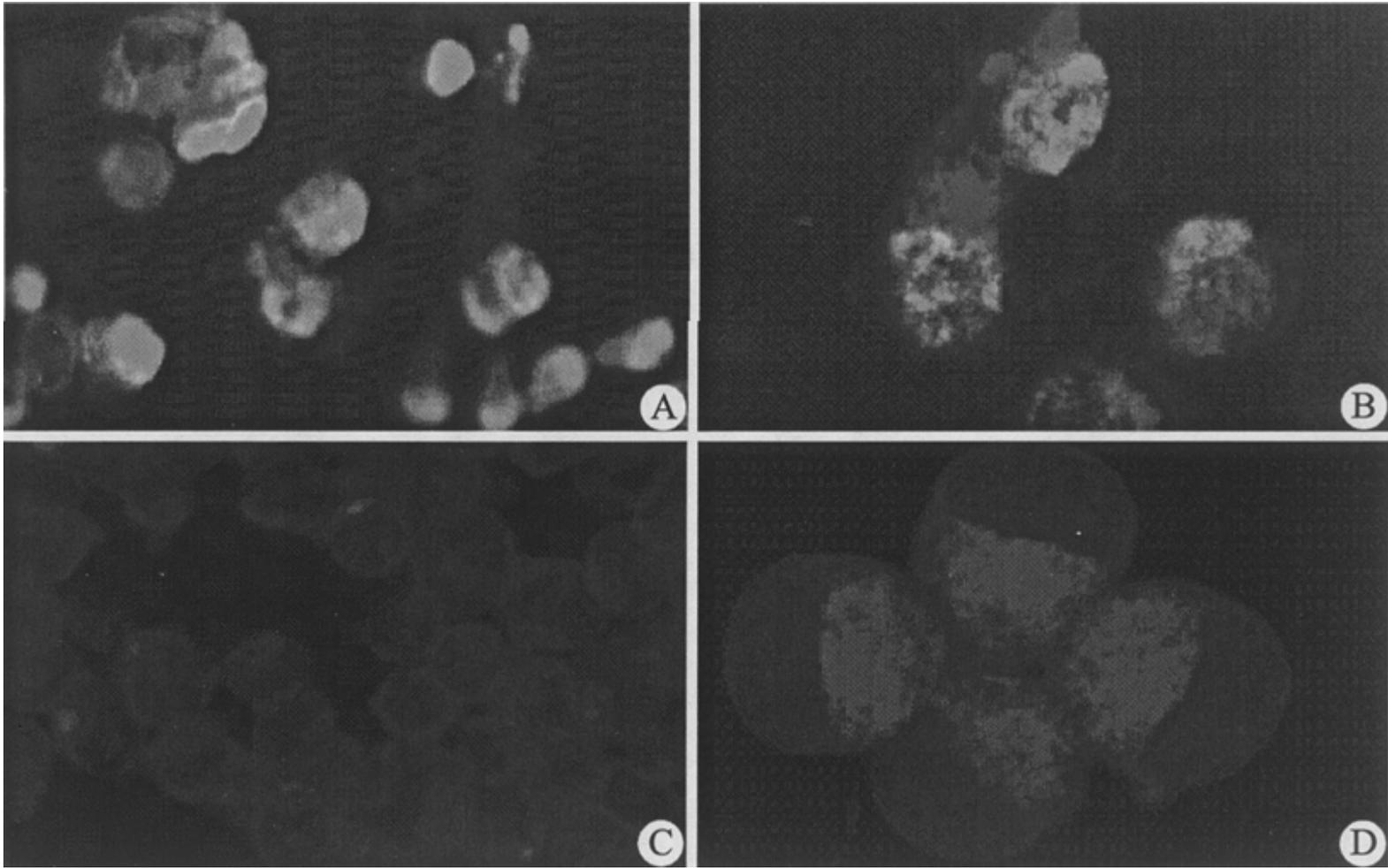


图2 杂交瘤克隆A7培养上清的间接免疫荧光染色结果

Fig.2 Indirect immunofluorescence staining of vero E6 cells, 293 cells and MA 104 cells infected with SARS-Cov, adenovirus and rotavirus respectively

A: Vero E6 cells infected by SARS-Cov ($\times 200$); B: Vero E6 cells infected by SARS-Cov ($\times 400$); C: 293 cells infected by adenovirus ($\times 200$); D: MA104 cells infected by rotavirus ($\times 400$)

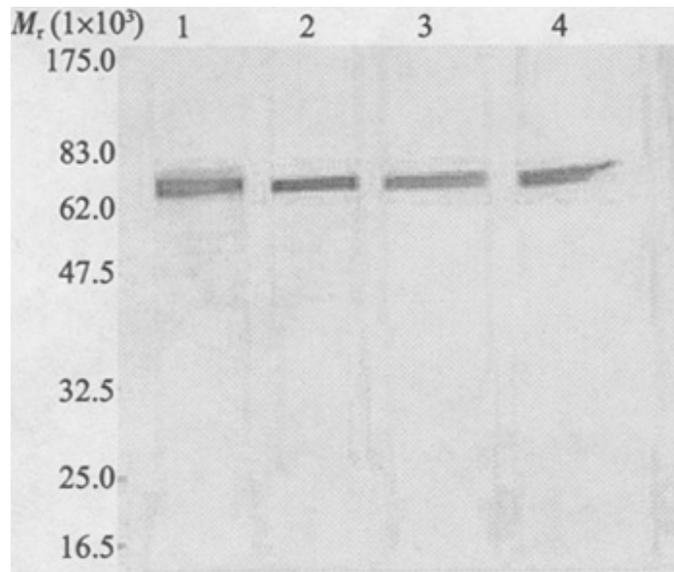


图3 mAb 特异性结合N 蛋白的免疫印迹结果

Fig.3 Western blotting analysis of monoclonal antibodies to N protein
Lanes 1-4: Different monoclonal antibody clones (A7, C7, E4 and E8 respectively)

本文率先报道了针对SARS冠状病毒N蛋白抗原的单克隆抗体研究结果。我们采用多次、少量抗原足垫快速免疫方法，免疫2周获得了高效价的免疫血清，与其他2种常规的免疫方法相比较，足垫快速免疫法具有快速、高效、抗原用量少等的优点，在此基础上用胸腺淋巴结细胞进行细胞融合，成功获得4株稳定分泌抗SARS冠状病毒N蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株，经鉴定4株单抗特异性好、亲和力高，达到了抗体用于诊断试剂亲和力的要求[2]。

以往对动物冠状病毒的结构蛋白的研究发现，冠状病毒的N蛋白在病毒复制和产生的病理反应中起重要的作用[3]，在动物冠状病毒感染的细胞中发现，N蛋白抗原性比病毒S蛋白强[4]，是病毒主要的抗原部分。因此，这组针对SARS冠状病毒N蛋白的单克隆抗体，为进一步研制快速诊断试剂盒，用于早期诊断SARS感染提供一种快速、敏感性高、特异性强的方法，同时为SARS蛋白组学及发病机制的研究奠定了基础。

参考文献：

- [1] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1983, 100(1-2): 173-9.
- [2] Deshpande SS. Enzyme immunoassay from concept to product development[M]. New York: Chapman and Hall, 1996. 52-70.
- [3] King B, Brian DA. Bovine coronavirus structural proteins[J]. J Virol, 1982, 42(2): 700-7.
- [4] Dagainakatte GC, Chard-Bergstrom C, Andrews GA, et al. Production, characterization, and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of ELK coronavirus [J]. Clin Diagn Lab Immunol. 1999, 6(3): 341-4.

参考文献：

- [1] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1983, 100(1-2): 173-9.
- [2] Deshpande SS. Enzyme immunoassay from concept to product development[M]. New York: Chapman and Hall, 1996. 52-70.
- [3] King B, Brian DA. Bovine coronavirus structural proteins[J]. J Virol, 1982, 42(2): 700-7.
- [4] Dagainakatte GC, Chard-Bergstrom C, Andrews GA, et al. Production, characterization, and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of ELK coronavirus [J]. Clin Diagn Lab Immunol. 1999, 6(3): 341-4.