

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

车小燕¹袁立文¹袁玉先¹袁华¹袁卫¹袁志勇¹袁亚波¹袁丽娅¹袁卓越²袁国勇³袁震⁴第一军医大学珠江医院中心实验室袁东 广州 510282 广东省疾病预防控制中心袁东 广州 510300 香港大学微生物系袁香港 第一军医大学珠江医院袁东 广州 510282 冤

摘要 目的 探讨制备和鉴定 SARS 冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体 mAb 的快速免疫方法。方法 用基因重组 SARS 冠状病毒 N 蛋白和足垫免疫 2 周的 BALB/c 小鼠制备 mAb 并采用 ELISA 间接法、免疫荧光和免疫印迹进行筛选和鉴定。结果 筛选出 4 株抗 SARS 冠状病毒 N 蛋白 mAb 杂交瘤细胞株。ELISA 间接法和免疫荧光证实这组单克隆抗体仅与 SARS 冠状病毒特异性反应，与其他病原体无交叉反应。IgG 亚类鉴定 2 株为 IgG1，2 株分别为 IgG2a 和 IgG2b。株抗体亲和常数分别为 $4.14 \times 10^9 \text{ M}$ 和 $3.19 \times 10^9 \text{ M}$ 。结论 获得特异性针对 SARS 冠状病毒的单克隆抗体，为 SARS 的早期诊断、蛋白组学和发病机制的研究奠定了基础。

关键词 严重急性呼吸道综合征 SARS 冠状病毒 N 核壳蛋白 单克隆抗体

中图分类号 R373.1;R392-33 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2003)07-0640-03

Rapid and efficient preparation of monoclonal antibodies against SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein by immunizing mice

CHE Xiao-yan¹, QIU Li-wen¹, PANYu-xian¹, XUHua¹, HAOWei¹, LIAOZhi-yong¹, MEI Ya-bo¹, ZHANG Li-ya¹, WAN Zhuo-yue², YUANGuo-yong³, HUANGZhen⁴

¹Central Laboratory, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Disease Control and Prevention Center of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China; ³Department of Microbiology, University of Hong Kong, Hong Kong, China; ⁴Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To develop a rapid and efficient method for preparing monoclonal antibodies (mAb) against SARS-associated coronavirus (SARS-Cov) nucleocapsid (N) protein. Methods BALB/c mice were injected with the recombinant N protein of SARS-Cov into the foot-pads for the immunization, and the popliteal lymph nodes were isolated 15 d later for mAb-producing hybridomas, from which the mAbs against the N protein of SARS-Cov were screened. The identification of the mAb against the N protein of SARS-Cov was performed using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent-antibody assay (IFA), and Western immunoblotting. Results Four strains of hybridomas were obtained that produced the mAb specific to the N protein without detectable cross-reactivity with other pathogens. Of the 4 strains, 2 were identified as the immunoglobulin G1 (IgG1) isotype, 1 IgG2a, and the other IgG2b, with affinity constants (K_a) of 2 of the strains being $4.14 \times 10^9 \text{ M}$ and $3.19 \times 10^9 \text{ M}$ respectively. Conclusion This is the first report on the preparation of mAb that is specific to the SARS-Cov, and the high-specificity and high-affinity mAb produced by the 4 strains of hybridomas provide a basis for further researches on the pathogenesis and early diagnosis of SARS.

Key words: severe acute respiratory syndrome; SARS-associated coronavirus; nucleocapsid protein; monoclonal antibody

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。

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；弗氏佐剂为 MPL+TDM 佐剂，0% PEG 分子质量为 1450 溶液，AT 为 Sigma 产品；IRP 标记羊抗小鼠 IgG、G1、G2a、G2b、G3 为 ITC 标记羊抗小鼠 IgG、EC、minioethyl carbazole 底物显影剂为 ZYMED 产品；PMI1640 培养基和胎牛血清 Gibco-

收稿日期 2003-06-15

基金项目 广东省防治非典型肺炎科技攻关项目 (粤科社字院 003-80 号文)

Supported by the Research Project for SARS Prevention and Treatment Sponsored by Guangdong Province,

作者简介 车小燕 1962 年女，袁北玉田人，袁研究员，袁-mail:linche@pub.guangzhou.gd.cn

BRL 产品 B 流感病毒 A 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 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 首次用福氏完全佐剂与抗原乳化注射小鼠足垫 0.5 ml/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 首次用弗氏完全佐剂与抗原乳化后予小鼠腹腔注射 0.5 ml/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 日用 MPL+TDM 佐剂与抗原乳化后予小鼠皮下 2 点注射 0.5 ml/只 共 10 只 免疫 3 周后 用同法加强免疫 1 次 0 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 包被聚苯乙烯微孔板 0.05 ml/孔 日用含 3% BSA 封闭液 200 μl/孔 包被 1 h 封闭 洗涤后 每孔加入各种血清稀释度 0.05 ml/孔 同时设相同稀释度的正常小鼠血清对照 置 37 ℃ 孵育 30 min 洗涤后加入 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 100 μl 置 37 ℃ 孵育 30 min MB 100 μl/孔 显色 10 min 0.1 M H₂SO₄ 100 μl/孔 终止反应 BioRad-550 型酶联免疫检测仪读取 D₄₅₀ 值

1.2.4 杂交瘤制备和筛选 取足垫免疫小鼠脾细胞 淋巴结细胞 1 × 10⁸ 个细胞与骨髓瘤细胞株 NS-1 1 × 10⁷ 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 × 10⁶ 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 μgG2a μgG2b 和 IgG3 抗体反应 充分洗涤后 TMB 显色 测 D₄₅₀ 值

1.2.6 抗体特异性鉴定 间接 ELISA 法 纯化流感病毒 A 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 间接免疫荧光法 用 SARS 冠状病毒感染 VeroE6 细胞 腺病毒 293 细胞 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 免疫印迹 用 10% SDS-PAGE 分离 GST-N 转印到硝酸纤维膜 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 选用间接 ELISA 方法测定 将抗原分别以 0.625 μg, 1.25 μg, 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 MB 显色 测 D 值 以抗体浓度的对数为横坐标 以 D 值为纵坐标 每种 mAb 得出 4 条反应曲线 以每条曲线上部平坦段的 D 值作为 100% 在曲线上查出 50% D 值时相对应的抗体浓度 按 Beatty 推导公式 $\text{aff} = (n-1)/2(n[Ab']t - [Ab]t)$ 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

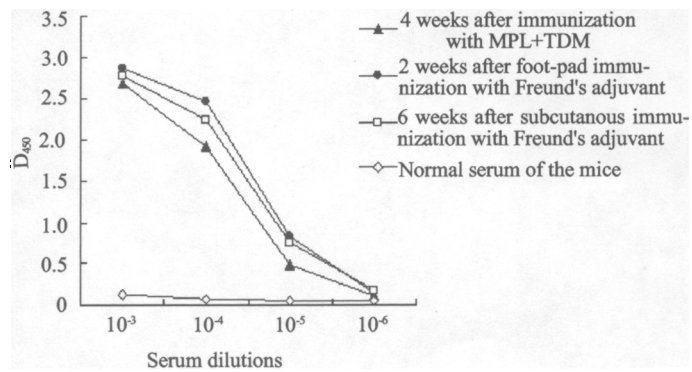


图 1 三种免疫方法比较 BALB/c 小鼠免疫血清效价 Fig.1 Antiserum titer in BALB/c mice by the 3 immunization methods

2.2 杂交瘤细胞株的建立

经细胞融合 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 阳性性率达 100% IgG 亚类鉴定 株为 IgG1 另 2 株分别为 IgG2a 和 Ig2b

2.3 抗体的纯度及亲和常数

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 7 和 C7 值分别为 4.14 × 10⁻⁹ M 和 3.17 × 10⁻⁹ M 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 74000。

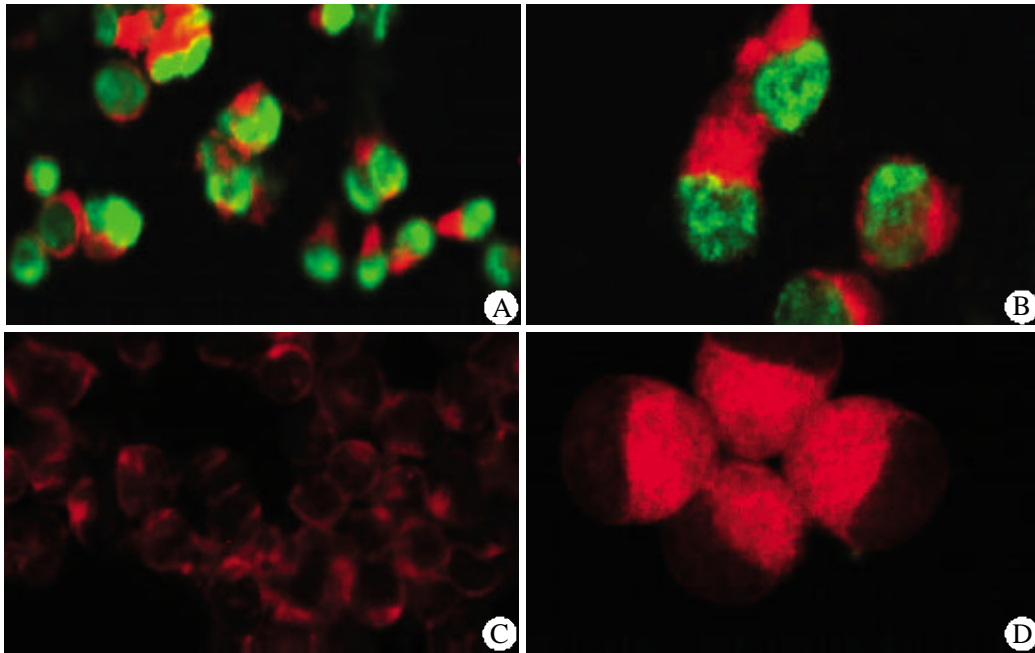


图 2 杂交瘤克隆 A7 培养上清的间接免疫荧光染色结果

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

A: VeroE6cellsinfectedbySARS-Cov(伊00);B: VeroE6cellsinfectedbySARS-Cov(伊00);C:293cellsinfectedby adenovirus(伊00); D:MA104cellsinfectedbyrotavirus(伊00)

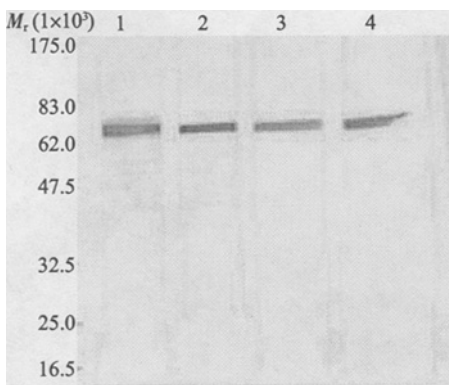


图 3 mAb 特异性结合 N 蛋白的免疫印迹结果

Fig.3 Western blotting analysis of monoclonal antibodies to N protein

Lanes1-4:Differentmonoclonalantibodyclones(A7, C7,E4andE8respectively)

3 讨论

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量快速免疫方法。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。足量快速免疫法具有快速、高效、抗原用量少等优点。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、亲和力和高。达到了抗体用于诊断试剂亲和力的要求。

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。在动物冠状病毒感染的细胞中发现。核蛋白抗原性比病毒 S 蛋白强。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

Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods*, 1983, 100(1-2):173-9.

Deshpande SS. Enzyme immunoassay from concept to product development. New York: Chapman and Hall, 1996. 52-70.

King B, Brian DA. Bovine coronavirus structural proteins. *Virology*, 1982, 42(2):700-7.

Daginakatte GC, Chard-Bergstrom C, Andrews GA, et al. Production, characterization, and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of ELK coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999, 6(3):341-4.