

抗多房棘球绦虫原头节单克隆抗体的制备

王昕^{1,2}, 刘巧凤¹, 路睿¹, 徐佳楠¹, 李调英³, 孙磊¹,
张亚楼², 孙力杨², 张辉², 陈建平^{1*}

【摘要】 目的 制备抗泡球蚴组织单克隆抗体, 并鉴定其特异性。方法 运用泡球蚴组织粗抗原免疫小鼠制备免疫脾细胞, 运用淋巴细胞杂交瘤技术将其与小鼠骨髓细胞 SP2/0 融合。采用 ELISA 和免疫组化方法筛选抗泡球蚴原头节单克隆抗体的杂交瘤细胞株。检测所获细胞株的染色体数目, 采用 ELISA 和免疫组化法鉴定所获抗体的特异性。结果 获得了一株能稳定分泌的抗泡球蚴原头节单克隆抗体的杂交瘤细胞株 6G2A7F7。染色体数目为 98 条, 为明显的融合细胞核型。所分泌的抗体 McAb P325 能与泡球蚴中的生发层和原头节特异结合, 特别对原头节上的小钩和吸盘表现出很强的结合反应。但与棘球蚴(人源)和水泡带绦虫幼虫(细颈囊尾蚴)组织无特异性结合反应。结论 制备的杂交瘤细胞能稳定分泌 McAb P325, 为泡球蚴的细胞分类、免疫组化和抗原研究提供工具和基础。

【关键词】 多房棘球绦虫; 泡球蚴包囊; 原头节; 单克隆抗体; 免疫组化

中图分类号: R383.33 文献标识码: A

Production of A Monoclonal Antibody Specific to Protoscolex of *Echinococcus multilocularis*

WANG Xin^{1,2}, LIU Qiao-feng¹, LU Rui¹, XU Jia-nan¹, LI Tiao-ying³,
SUN Lei¹, ZHANG Ya-lou², SUN Li-yang², ZHANG Hui², CHEN Jian-ping^{1*}

(1 Department of Parasitology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2 Department of Parasitology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3 Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective To prepare monoclonal antibody (McAb) specific to protoscolex of *Echinococcus multilocularis*. **Methods** BALB/c mice were immunized with crude antigen derived from *E. multilocularis* metacestodes. Spleen cells from immunized BALB/c mice were fused with SP2/0 myeloma cells by using hybridoma technique. ELISA and immunohistochemical staining were used to select hybridomas that secreted McAb P325 which especially against protoscolex. The number of metaphase chromosomes of hybridoma cells was counted. Characteristics of McAb P325 were identified by ELISA and immunohistochemical staining. **Results** One hybridoma cell clone secreting McAb against protoscolex was obtained. The number of metaphase chromosomes found in hybridoma cells was 98, which showed the characteristics of their parents. Immunohistochemical analysis showed that McAb P325 demonstrated binding activity to the germinal layer and protoscolex of *E. multilocularis*, especially to the hooklets and suckers, while did not bind with *E. granulosus* metacestodes and *Cysticercus tenuicollis*. **Conclusion** The McAb is a valuable tool for immunohistochemical analysis, cell classification of *E. multilocularis* protoscolex, and study of specific antigen.

【Key words】 *Echinococcus multilocularis*; Alveolar hydatid cyst; Protoscolex; Monoclonal antibody; Immunohistochemistry

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30660045)

* Corresponding author, E-mail: jpchen007@163.com

泡球蚴病(alveococcosis)是多房棘球绦虫(*Ecchinococcus multilocularis*)幼虫——泡球蚴(alveolar hydatid cyst)寄生于人体所致, 主要流行于我国西部地区^[1-3]。

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30660045)

作者单位: 1 四川大学华西基础与法医学院, 成都 610041; 2 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830054; 3 四川省疾病预防控制中心, 成都 610041

* 通讯作者, E-mail: jpchen007@163.com

为在该病的诊断和治疗上有所发展、突破, 近 10 年运用分子生物学、蛋白质分析和细胞生物学等多种方法寻找有价值的特异性抗原和抗体成为研究焦点之一。国外相继找到或重组的抗原分子有 Em2、II/3-10、EM13、EM16、EM18 和 EmAP^[4,5]。建立的单克隆抗体有 G11^[6]和 Group type I^[7], 其中 G11 针对多房棘球绦虫角皮层上存在的 Em2 抗原^[6], Group type I 针对存

在于角皮层上的糖蛋白抗原。在国内也制备了抗多房棘球绦虫角皮层多糖抗原的单克隆抗体^[8]。本研究将建立分泌抗多房棘球绦虫终宿主感染阶段——原头节的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

材料与方法

1 实验动物和细胞

雌性 BALB/c 小鼠, 9 周龄, 购自四川大学华西医学中心试验动物中心。骨髓瘤 SP2/0 细胞购自四川大学华西医学中心临床免疫实验室, 试验前经过 8-氮鸟嘌呤筛选, 扩大培养。

2 主要试剂和设备

福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、HAT 储备液(包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶脱氧核苷)、HT 储备液(包括次黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷)、四甲基联苯胺(TMB)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(HRP-IgG)均购自美国 Sigma 公司, 小牛血清购自兰州民海生物公司, 聚乙二醇(PEG4000)购自美国 Merck 公司, 3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自武汉博士德公司。组织匀浆机(XHF-D)和细胞超声波粉碎仪(JY92-II)为宁波新芝生物科技股份有限公司产品, 酶标仪(Sunrise)为瑞士 Tecan 公司产品。

3 方法

3.1 抗原制备 麻醉处死感染泡球蚴 6 个月的沙鼠(购自大连医科大学实验动物中心), 无菌条件下从腹腔取出 20 g 生长良好的泡球蚴组织, 清除宿主组织和血管。用组织匀浆机破碎组织 2 800 r/min 3 min, 660×g 离心 10 min, 收集沉淀。加入 25 ml 0.9%氯化钠溶液混匀, 660×g 离心 10 min, 收集沉淀, 重复 3 次。冰浴条件下超声粉碎细胞(600 W, 破碎 15 s, 间隔 10 s, 共 20 min), 提取蛋白。考马斯亮蓝法测定所获混悬液蛋白浓度。

3.2 动物免疫 参照文献^[9]的方法操作, 将 100 μg 制备好的泡球蚴囊壁抗原混悬液与等体积福氏完全佐剂混合, 充分乳化, 背部皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠。此后将 50 μg 抗原混悬液与等体积福氏不完全佐剂混合, 乳化后背部皮下多点注射免疫小鼠, 每隔 3 周免疫 1 次, 共免疫 3 次。末次免疫后 7 d, 取血, 分离血清, ELISA 检测抗体水平。抗体水平 >1:10⁵ 的小鼠, 融合前 3 d 腹腔注射 100 μg 抗原混悬液加强免疫。

3.3 杂交瘤细胞株的制备 按文献^[10]的方法, 取

1 只加强免疫小鼠, 眼眶采血后引颈处死, 无菌条件下取脾脏, 研磨成细胞悬液后, 漂洗 2 次, 与骨髓瘤 SP2/0 细胞按 10:1 的比例混合。漂洗 1 次, 350×g 离心 8 min, 弃上清。于 37 °C 水浴中, 在 30 s 内缓慢滴入预热的 1 ml 50% PEG4000, 作用 90 s。用预热的 RPMI 1640 培养液终止 PEG 作用。310×g 离心 6 min, 弃上清。补 HAT 培养液至 120 ml。将融合后细胞悬液接种于含 BALB/c 小鼠腹腔细胞(即饲养细胞)的 96 孔板中, 100 μl/孔, 共计 12 板, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养^[10]。融合后第 3 天开始观察, 记录细胞的生长状态和每孔克隆数。培养 5 d 后更换 HAT 培养液 1 次, 10 d 后改用 HT 培养液, 20 d 后改用 RPMI 1640 完全培养液培养。

3.4 克隆细胞株的筛选培养

3.4.1 ELISA(直接法)初步筛选分泌抗体的杂交瘤细胞 参照文献^[10,11]方法, 调整上述制备的抗原浓度为 20 μg/ml, 用包被液 1:1 混合后取 100 μl 加入酶标板, 4 °C 过夜。加入 10% 小牛血清, 37 °C 封闭 1 h, 洗涤 3 次。加入 100 μl 细胞培养上清液, 以完全细胞培养液为阴性对照, 阳性对照为免疫小鼠阳性血清, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤 3 次。加入 100 μl 羊抗小鼠 HRP-IgG (1:8 000 稀释), 37 °C 孵育 1 h, 洗涤 4 次。加入 100 μl TMB, 37 °C 避光显色 15 min。加入 50 μl 终止液。测定吸光度(A₄₅₀ 值), 凡 A₄₅₀ 值大于阴性对照者, 初步判为阳性克隆, 进行免疫组化试验。

3.4.2 运用免疫组化对抗体结合位置作进一步筛选

用多聚甲醛固定泡球蚴组织, 制作厚 4 μm 石蜡切片, 脱蜡, 梯度乙醇逐级水化。滴加 3% 过氧化氢, 室温静置 10 min 灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗 3 次。煮沸法抗原修复。冷却后, PBS(pH 7.2)洗涤 2 次。10% 小牛血清 37 °C 封闭 30 min。将上述各阳性孔上清滴于组织切片上, 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗 3 次, 每次 3 min。滴加羊抗小鼠 HRP-IgG (1:250 稀释), 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗 4 次, 每次 3 min, 使用 DAB 显色 10~20 min。苏木素轻度复染, 脱水、透明、封片、显微镜观察, 筛选上清液能与泡球蚴组织中原头节顶突结构发生特异结合的细胞孔。

3.4.3 免疫组化筛选得到的阳性细胞株克隆化 采用有限稀释法进行 2 次亚克隆, 至所有杂交瘤细胞上清液均呈阳性时停止, 获得阳性克隆细胞株。

3.5 杂交瘤细胞染色体的检测 将杂交瘤细胞培养至有丝分裂高峰期, 加入终浓度为 0.2 μg/ml 秋水仙素, 于 37 °C 继续培养 6 h 后细胞处于有丝分裂中期, 加入 0.075 mol/L 氯化钾膨胀细胞。甲醇-冰醋酸溶液固定, 制片, 吉氏染色、封片观察^[10]。

3.6 腹水制备、抗体检测 液体石蜡致敏 BALB/c 小鼠 10 d 后, 取 100 万~150 万细胞腹腔接种。1 周后小鼠腹部肿大, 待腹水尽可能多, 于濒临死亡之前处死, 采集腹水^[10]。重复免疫组化试验, 以稀释的腹水作为一抗 (1:250、1:500 和 1:1 000), 测定其效价。以牛带绦虫成节、孕节和棘球蚴(人体标本)囊壁组织中提取的抗原包被试验孔, ELISA(直接法)检测抗体特异性。再用免疫组化法检测水泡带绦虫幼虫(细颈囊尾蚴)和棘球蚴组织切片, 测定其特异性。

结 果

1 McAb 杂交瘤细胞株的建立

经过细胞融合、ELISA(直接法)初筛、免疫组化进一步筛选和细胞克隆化等步骤, 建立了一株分泌抗多房棘球绦虫终宿主感染阶段——原头节的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 6G2A7F7。连续培养 5 个月仍可稳定分泌特异性抗体, 暂命名为 P325。细胞原始孔的 A_{450} 值为 0.541, 阴性对照孔 A_{450} 值为 0.290, 两者比值为 1.86。第 1 次克隆后阳性孔和阴性对照孔的 A_{450} 均值($n=8$)分别为 0.525 和 0.240, 两者比值为 2.19。两次克隆后, 阳性孔和阴性对照孔的 A_{450} 均值($n=8$)分别为 0.904 和 0.371, 两者比值为 2.43。

2 杂交瘤细胞株染色体数目

单克隆细胞株的平均染色体数目为 98 条, 符合融合细胞特点(图 1)。

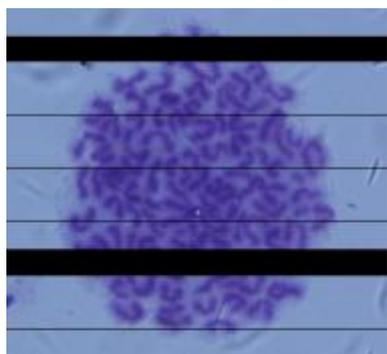
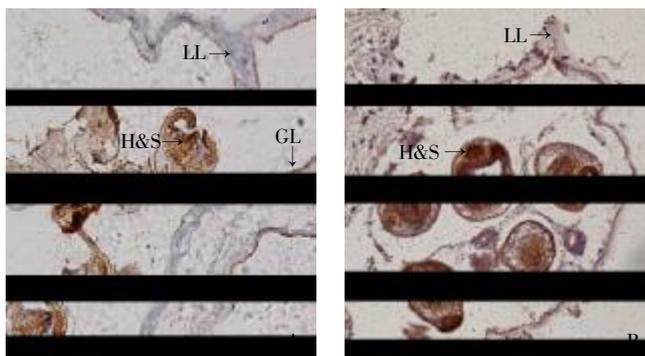


图 1 杂交瘤细胞有丝分裂中期的染色体
Fig.1 The metaphase chromosomes in hybridoma cell

3 抗体 McAb P325 的特异性检测

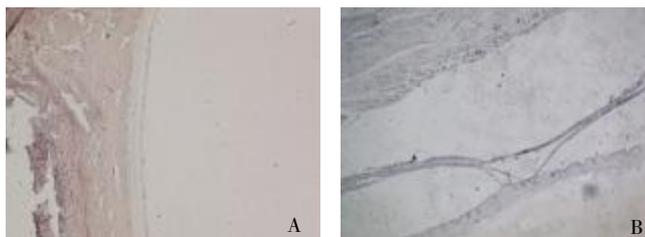
所分泌的抗体 McAb P325 是 IgG 抗体。免疫组化中的抗体稀释浓度可为 1:500~1:1 000。可与泡球蚴囊壁上的生发层细胞特异性结合, 而与角皮层无特异性反应; 可与原头节皮层特异性结合, 特别是与原头节顶突上的小钩和吸盘结合力很强(图 2A、B)。ELISA 结果显示, McAb P325 与提取自棘球蚴(人体

标本)囊壁组织的粗抗原无特异性反应, 棘球蚴和泡球蚴的 A_{450} 值分别为 0.210 和 0.628。但可与肥胖带绦虫成虫的成节和孕节组织提取的粗抗原反应, 肥胖带绦虫和泡球蚴的 A_{450} 值分别为 0.573 和 0.472。免疫组化试验表明, McAb P325 与棘球蚴的角皮层和生发层(图 3A), 及水泡带绦虫幼虫(细颈囊尾蚴)组织均无反应(图 3B)。



A: 抗体稀释倍数为 1:1 000, B: 抗体稀释倍数为 1:500, 泡球蚴生发层(GL)细胞被染色, 但角皮层(LL)和基质细胞不着色。原头节染色不均, 皮层被染色, 小钩和吸盘(H&S)浓染, 体部一些细胞不着色。
A, B: McAb P325 dilution of 1:1 000 and 1:500, respectively. McAb P325 especially reacted with germinal layer (GL), hooklets and suckers (H&S) of protoscolices, but not for laminated layer (LL).

图 2 McAb P325 在泡球蚴石蜡切片的免疫组织化学定位
Fig.2 Immunohistochemical localization of McAb P325 in the paraffin section of *E. multilocularis* metacestodes



A: 棘球蚴组织, 角皮层和生发层均不着色; B: 细颈囊尾蚴组织, 不着色。抗体稀释倍数均为 1:500。
A: *E. granulosus* metacestodes, germinal layer and laminated layer unstained, B: *Cysticercus tenuicollis*, unstained. McAb P325 dilution of 1:500.

图 3 McAb P325 在棘球蚴、细颈囊尾蚴石蜡切片的免疫组织化学定位

Fig.3 Immunohistochemical localization of McAb P325 in the paraffin section of *E. granulosus* metacestodes and *Cysticercus tenuicollis*

讨 论

原头节是多房棘球绦虫终宿主的感染阶段。在感染过程中以顶突的小钩和吸盘吸附在终宿主的肠壁上。本研究制备的针对原头节的特异性抗体有望影响原头节入侵终宿主, 还可利用该抗体进一步筛选出对

应的抗原,探究其在免疫学诊断中的利用价值,并很有希望成为下一步终宿主疫苗的备选物质^[12]。实验结果显示,该单抗特异性结合的抗原分布于生发层和原头节的皮层。佐证了原头节和生发层具有同源性。但对原头节内部细胞染色不均匀,说明了这些细胞具有不同的免疫原性,提示原头节由不同细胞组成。该抗体的成功制备为多房棘球绦虫组织发生学、生物学、遗传学、免疫学和诊断学等研究领域提供了一个新的研究工具。

本试验采用了足够多的细胞板进行融合后铺板,使得融合细胞足够分散,单细胞孔占总细胞生长孔的 70% 左右,大大减轻了后续克隆筛选的工作量(第 1 次克隆后阳性孔率即为 100%),也使所有的阳性克隆尽早的表现,减少了丢失。

对于阳性细胞的筛选工作,建议根据建立阳性克隆的目的采用针对性强的试验或灵活应用几个试验组合进行筛选。本实验即采用了 ELISA 初筛结合免疫组化进一步筛选的方法,既提高了筛选效率又得到了目的单抗。此外,确定阳性克隆时不能仅以吸光度作为判断标准。由于本实验采用泡球蚴粗提抗原进行免疫和 ELISA 抗原包被,因此,在细胞株融合初期,细胞株孔和阴性对照孔的比值仅为 1.86。如按常用的阳性/阴性比大于 2.1 倍的条件筛选,该细胞株会被剔除。只有综合考虑,灵活应用筛选试验才能尽可能多的得到有意义的细胞克隆。

现阶段绝大多数多房棘球蚴病的诊断分子是从虫体中分离或通过分子生物学手段重组得到的,单克隆抗体的种类报道的并不多。研究较为深入的单抗只有针对 Em2 抗原的 G11。可见抗多房棘球绦虫单克隆抗体的研究工作开展的并不充分^[13]。近年来因分子病原学的快速发展,可以较为方便的获得人们感兴趣的蛋白分子,使得其成为了病原学抗原分子研究的常用手段。但从现阶段的技术手段来看,基因工程制备的分子通常要面临生物活性或免疫活性的检验。大量的表达分子往往因为这两方面的缺陷而无法得到广泛应用。而单克隆抗体技术由于通过了动物体内的免疫应答过程而较好的解决了这些问题。其对应的抗原都具有较强免疫原性。一次单克隆过程可得到数十个阳性克隆,如试验设计得当,可得到几个针对不同抗原决定簇的单克隆抗体。用其作为病原体的免疫原性分子

的筛选手段也不失为一条可行的途径。蛋白质组学和抗体库展示技术的发展为抗体技术和分子生物学技术结合创造了更多的条件。

致谢 感谢新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心柴君杰主任医师、四川省疾病预防控制中心邱加阔研究员、四川大学华西基础与法医学院魏大鹏副主任实验师和胡孝素教授等的支持。

参 考 文 献

- [1] Philip C. *Echinococcus multilocularis* [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2003, 16(5): 437-444.
- [2] Bartholomot B, Vuitton DA, Harraga S, *et al.* Combined ultrasound and serologic screening for hepatic alveolar echinococcosis in central China [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 66(1): 23-29.
- [3] Wilson JF, Raush RL. Alveolar hydatid diseases: A review of clinical features of 33 indigenous cases *Echinococcus multilocularis* infection in Alaskan Eskimos [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1980, 29(6): 1340-1355.
- [4] Gottstein B. Purification and characterization of a specific antigen from *Echinococcus multilocularis* [J]. *Parasit Immunol*, 1985, 7(3): 201-212.
- [5] Ito A, Schantz PM, Wilson JF. Em18, a new serodiagnostic marker for differentiation of active and inactive cases of alveolar hydatid disease [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, 52(1): 41-44.
- [6] Deplazes P, Gottstein B. A monoclonal antibody against *Echinococcus multilocularis* Em2 antigen [J]. *Parasitology*, 1991, 103(1): 41-49.
- [7] Sato C, Kawase S, Yano S. Monoclonal antibodies specific to carbohydrates of *Echinococcus multilocularis* [J]. *Jpn J Infect Dis*, 1999, 52(4): 156-159.
- [8] JING T. Production of a monoclonal antibody hybridoma specific to the laminated layer of alveolar cysts [J]. *Chin J Zoonoses*, 2000, 16(1): 63-65. (in Chinese)
(景涛. 一株抗泡球蚴包囊角皮层单克隆抗体杂交瘤细胞的制备 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(1): 63-65.)
- [9] Wang TH, Li GC, Zhou XF. *Theory and Technology of Antibody* [M]. Beijing: Science Press, 2005: 80-110. (in Chinese)
(王廷华, 李官成, 周欣富. 抗体理论与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 80-110.)
- [10] Zhou ZH. *Technology of Animal Cell Culture* [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2006: 188-242. (in Chinese)
(周珍辉. 动物细胞培养技术 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2006: 188-242.)
- [11] Zhu LP, Cheng XQ. *Methods for General Immunology* [M]. Beijing: People's Military Medical Publisher, 2000: 84-87. (in Chinese)
(朱立平, 陈学清. 免疫学常用试验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 84-87.)
- [12] Mirjam W, Adriana B, Sylvia D, *et al.* Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* metacystodes potentially involved in modulating the host-parasite interface [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(1): 527-536.
- [13] Siles-lucas M, Gottstein B. Review: Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis [J]. *Trop Med Int Hlth*, 2001, 6(6): 463-475.

(收稿日期: 2009-05-31 编辑: 杨频)