

文章编号: 1000-7423(2006)-04-0247-04

【论著】

# 恶性疟原虫融合抗原 PfCP-2.9 的单克隆抗体 制备及功能分析

王瑞, 钱锋, 曲莉, 潘卫庆\*

**【摘要】** 目的 制备恶性疟原虫 (FCC1/HN 株) 融合抗原 PfCP-2.9 的单克隆抗体, 分析其生物学特性及功能。方法 用 PfCP-2.9 免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞及 SP2/0 骨髓瘤细胞在聚乙二醇 (PEG1500) 作用下进行融合, 制备单克隆抗体, 并分析其特性。结果 获得 1 株能分泌抗 PfCP-2.9 的小鼠杂交瘤细胞株单克隆抗体 F12D, 经免疫球蛋白类型和亚类鉴定为 IgG1。ELISA 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 显示单克隆抗体 F12D 能与 PfCP-2.9 发生特异性反应, F12D 所识别的 PfCP-2.9 抗原表位不能耐受还原剂巯基乙醇, 表明 F12D 识别的是构象表位。间接免疫荧光试验 (IFA) 显示 F12D 可识别培养的 FCC1/HN。体外抑制试验结果显示, F12D 终浓度为 0.3 mg/ml 时, 对 FCC1/HN 的抑制率为 56%。结论 单克隆抗体 F12D 能与 PfCP-2.9 发生特异性反应, 其所识别表位为构象表位, F12D 可识别体外培养的 FCC1/HN, 并对其生长具有抑制作用。

**【关键词】** 恶性疟原虫; 疟疾疫苗; 单克隆抗体; 免疫显性表位

中图分类号: R382.312, R392.11

文献标识码: A

## Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody Specific to PfCP-2.9 Chimeric Protein of Plasmodium falciparum

WANG Rui, QIAN Feng, QU Li, PAN Wei-qing\*

(Department of Etiologic Biology, the Second Military Medical University, Shanghai, 200043, China)

**【Abstract】** Objective To prepare and characterize monoclonal antibody against a malaria vaccine candidate, PfCP-2.9 chimeric protein of Plasmodium falciparum. Methods BALB/c mice were immunized with PfCP-2.9, and the spleen cells were used for fusion with SP2/0 cells. The monoclonal antibodies were analyzed by ELISA, Western blotting as well as growth inhibition assay. Result A monoclonal antibody was obtained. It interacted with the PfCP-2.9 recombinant protein by ELISA and Western blotting. The interaction of the monoclonal antibody with the protein was reduction-sensitive, indicating that the antibody recognized a conformational epitope. Moreover, the antibody also recognized the cultured parasites of P.falciparum by indirect immunofluorescent antibody test (IFA). When tested by growth inhibition assay, the antibody significantly inhibited parasite growth in vitro of 56% inhibition rate at the antibody concentration of 0.3 mg/ml. Conclusion A monoclonal antibody against PfCP-2.9 malaria vaccine candidate has been obtained, which recognizes a conformational epitope of the protein and natural protein.

**【Keywords】** Plasmodium falciparum; Malaria vaccine; Monoclonal antibody; Immunodominant epitopes

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30430610)

\* Corresponding author, E-mail: wqpan0912@yahoo.com.cn

研制疟疾疫苗是防治疟疾的重要手段。在疟原虫复杂的生活史中, 只有红内期疟原虫可以致病, 因此红内期疫苗的研究备受关注。恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 (merozoite surface protein 1, MSP-1) C 末端 Mr 19 000 片段 (MSP1-19) 和裂殖子顶端膜抗原 1 (AMA-1) 是目前很有希望的红内期亚单位疫苗。本实验室已经构建由 MSP1-19 和 AMA-1 的 III 亚区 [AMA-1 (III)] 通过接点序列连接而成的融合蛋白

PfCP-2.9, 该蛋白在毕赤酵母菌表达系统获得极高的表达, 具有很强的免疫原性和对体外培养的恶性疟原虫生长的抑制作用, 现已获准开展临床试验<sup>[1,2]</sup>。为探讨 PfCP-2.9 融合蛋白的强免疫原性及对恶性疟原虫生长抑制作用的内在原因, 作者制备了抗 PfCP-2.9 融合蛋白的单克隆抗体, 并分析其生物学特性和测定体外对疟原虫生长的抑制率。

### 材料与方 法

#### 1 试剂与材料

RPMI1640 干粉为美国 Gibco BRL 公司产品, 胎牛血清 (FBS) 为美国 Hyclone 公司产品, 次黄嘌呤

基金项目: 国家自然科学基金 (No.30430610)

作者单位: 第二军医大学病原生物教研室, 上海 200433

\* 通讯作者, E-mail: wqpan0912@yahoo.com.cn

氨基喋呤胸腺嘧啶核苷 (HAT)、次黄嘌呤胸腺嘧啶核苷 (HT)、聚乙二醇 (PEG1500)、巯基乙醇、Tris、乳酸钠、Triton X-100、3-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸、福氏完全佐剂及福氏不完全佐剂, 均为美国 Sigma 公司产品。新生牛血清、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (IgG-HRP) 及异硫氰酸荧光素标记的羊抗小鼠 IgG (IgG-FITC)、碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG (IgG-AP)、5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸 (BCIP) 及四唑氮蓝 (NBT) 均购自华美生物工程公司。羊抗鼠 IgG1-HRP、IgG2a-HRP、IgG2b-HRP 及 IgG3-HRP 均购自晶美生物工程有限公司。单克隆抗体 5.2、单克隆抗体 G4E 为本实验室保存, G 蛋白为美国 Pierce 公司产品。BALB/c 小鼠及昆明种 (KM) 小鼠由中国科学院上海实验动物中心提供, 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0、海南株恶性疟原虫 (FCC1/HN) 为本实验室自行培养。恶性疟原虫融合抗原 (蛋白) PfCP-2.9 由本室提供, 该抗原在毕赤酵母中表达, 以离子交换层析和凝胶过滤进行纯化获得, 并以十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行纯度分析。

## 2 方法

**2.1 动物免疫** 雌性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重约 20 g。用纯化的融合蛋白 PfCP-2.9 腹部皮下多点注射免疫, 第 1 次用 50  $\mu$ g 加等量完全福氏佐剂, 第 2 次用 50  $\mu$ g 加等量不完全福氏佐剂, 两次免疫间隔 2 周。细胞融合前 3 d 腹腔注射 50  $\mu$ g 融合蛋白, 加强免疫 1 次。

**2.2 细胞融合** 末次免疫 3 d 后, 取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞 (数量比为 5:1) 融合, 以 50% 聚乙二醇 PEG1500 溶液为融合剂, 融合细胞用 HAT 培养基作选择性培养, 10 d 后改用 HT 培养基, 20 d 后改用含 15% 小牛血清的普通 RPMI1640 培养基培养。

**2.3 杂交瘤细胞株的筛选** 采用 ELISA 筛选分泌与 PfCP-2.9 反应的单克隆抗体杂交瘤细胞株<sup>[3]</sup>。

**2.4 亚克隆及腹水的诱生** 采用有限稀释法对阳性孔的杂交瘤细胞株进行克隆化培养, 每株细胞亚克隆至单克隆抗体阳性率达 100%。取提前 1 周注射石蜡油 (0.5 ml/只) 致敏的 BALB/c 小鼠, 腹腔接种已建株<sup>[3]</sup>的杂交瘤细胞约  $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  个, 10 d 后采集腹水, 离心, 取上清备用。

**2.5 抗体纯化** G 蛋白亲和层析柱, 先用 Tris 平衡, 然后上样 (样品用 Tris 按 1:10 稀释的腹水), 用 Tris 洗去杂质, 再用甘氨酸缓冲液 (pH 2.6) 洗脱, 收集洗脱峰, SDS-PAGE 分析结果。

**2.6 单克隆抗体反应特异性检测及 Ig 类型与亚类鉴定**

采用间接 ELISA 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测单克隆抗体反应特异性。Ig 类型与亚类鉴定采用间接 ELISA 法。抗原为纯化的融合蛋白 PfCP-2.9。

**2.7 间接免疫荧光试验 (IFA)** 取含成熟裂殖体期恶性疟原虫 (FCC1/HN 株) 血样涂制约 50 mm  $\times$  25 mm 薄血膜作为抗原片, 晾干或 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。自然干燥的抗原片, 用预冷甲醇固定 15 min。10 mmol/L pH 7.4 PBS 洗片 3 次。用含 3% 脱脂奶粉的 PBS 封闭。抗原片血膜于使用前以蜡笔平均分隔成 10 个区域。待检样品 (纯化后的单抗) 用含 3% 脱脂奶粉的 10 mmol/L PBS (pH 7.4) 倍比稀释, 每个稀释度取 20  $\mu$ l。每张抗原片上的 10 个区域内各滴加 20  $\mu$ l 预先稀释的待检样品, 于 37  $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 1 h。同时设已知能识别 MSP1-19 的单克隆抗体 5.2 (mAb5.2) 为阳性对照<sup>[4,10]</sup>, 无关单克隆抗体 G4E 为阴性对照。

用 10 mmol/L PBS 洗片 3 次, 每次 5 min。在抗原片上滴加待检样品的中央区域加入用含 3% 脱脂奶粉的 10 mmol/L PBS (pH 7.4) 稀释的浓度为 0.01 mg/ml 的羊抗鼠-FITC (二抗), 每格 20  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1 h。10 mmol/L PBS 洗 3 次, 暗处晾干后于荧光显微镜下观察结果。

**2.8 体外抑制试验** ①感染 FCC1/HN 的红细胞 (简称: 感染虫血) 及未感染红细胞的制备: 设感染虫血为待检样品, 未感染红细胞 (另取, 并经过同步培养的“正常红细胞”) 为对照组。取同步处理 24 h 后的感染虫血培养物, 1 800  $\times$  g 离心 5 min, 去上清, 涂片, 计数, 计算感染率。用 50% 的红细胞悬液稀释, 使红细胞感染率为 0.3%, 1 800  $\times$  g 离心 5 min, 去上清, 加入 RPMI1640 完全培养基 (含血清), 红细胞压积为 2%。另取未感染红细胞, 用 RPMI1640 不完全培养液同法稀释成相同压积。②取 96 孔培养板, 每孔分别加培养物 75  $\mu$ l 及待检抗体或无关单克隆抗体 G4E (PfCP-2.9 免疫小鼠后制备的单克隆抗体, 但不能与 PfCP-2.9 及培养的疟原虫反应) 25  $\mu$ l (使抗体终浓度为 25%), 分别做 3 个复孔。置 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。40~42 h 后于 4  $^{\circ}$ C 1 800  $\times$  g 离心 10 min, 小心除去上清, 加入 100  $\mu$ l LDH 检测液 (pH 7.5 100 mmol/L Tris 含 40 mmol/L 乳酸钠, 0.25% Triton X-100, 0.5  $\mu$ g 3-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸和 20  $\mu$ g 四唑氮蓝) 检测液, 计时 30 min, 酶标仪检测待检抗体吸光度 (A<sub>650</sub> 值)。经同步处理的未感染红细胞作为空白对照组, 无关单抗 G4E 作为对照样品组, 计算抑制率<sup>[5]</sup>。

抑制率 (%) =  $[1 - (\text{待检样品 } A_{650} \text{ 值} - \text{空白对照组 } A_{650} \text{ 值}) / (\text{对照样品 } A_{650} \text{ 值} - \text{空白对照组 } A_{650} \text{ 值})] \times 100\%$ 。

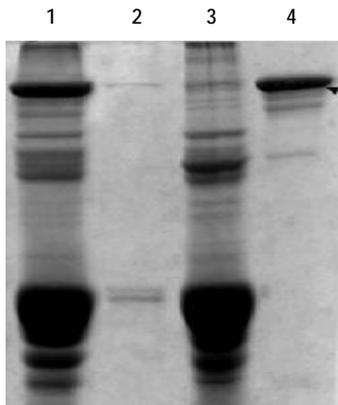
## 结 果

### 1 杂交瘤细胞株的建立

用纯化的融合蛋白 PfCP-2.9 免疫小鼠，取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合 1 次，其融合率约为 90%。用纯化的 PfCP-2.9 融合蛋白进行 ELISA 筛选，得到 8 株分泌只与 PfCP-2.9 融合蛋白反应的单克隆抗体杂交瘤细胞株，经 3~4 次亚克隆后抗体分泌稳定。挑取其中的 F12D 克隆进行扩大培养后的杂交瘤细胞株，经液氮冻存、复苏后细胞株仍保持分泌抗体的能力。

### 2 单克隆抗体 F12D 的纯化

含有单克隆抗体 F12D 的腹水，经蛋白 G 柱纯化。SDS-PAGE 电泳显示柱层析前后腹水和纯化后的单抗。纯化后的抗体经 ELISA 检测其滴度均在  $1 \times 10^5$  以上 (图 1)。



1: 柱层析前腹水, 2: 洗涤液, 3: 柱层析后腹水, 4: 洗脱液中的抗体。

1: Ascitic fluid before purification, 2: Washing buffer, 3: Ascitic fluid after purification, 4: Purified antibody.

图 1 腹水中的单克隆抗体经 G 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the purified monoclonal antibodies in ascitic fluid

### 3 单克隆抗体 F12D 的特性分析

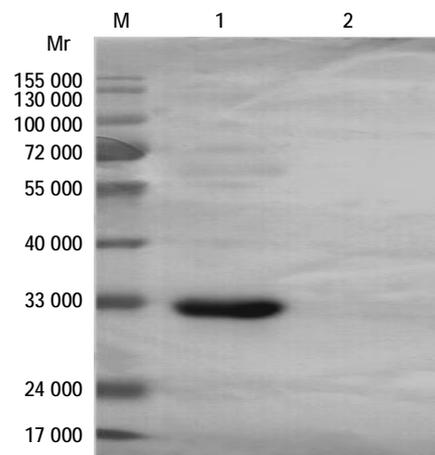
采用 ELISA 法测得单克隆细胞株 F12D 培养上清效价为 1:1 000, 腹水效价为 1:10 000。Western blotting 分析显示该抗体能与融合蛋白 PfCP-2.9 特异性反应, 但当用还原剂巯基乙醇处理 PfCP-2.9 蛋白后, 此特异性反应消失, 表明该单克隆抗体能识别构象表位 (图 2)。

### 4 IFA

IFA 检测单克隆抗体 F12D, 结果显示 F12D 对 FCC1/HN 虫体表面抗原原有强阳性反应 (图 3)。

### 5 体外抑制实验

用 FCC1/HN 检测单克隆抗体 F12D 的体外抑制效力。结果显示, F12D 单克隆抗体对 FCC1/HN 虫体生长有明显抑制作用, 其终浓度为 0.3 mg/ml 时抑制率为 56%, 而阴性对照组 G4E 单克隆抗体对恶性疟原虫无抑制作用。

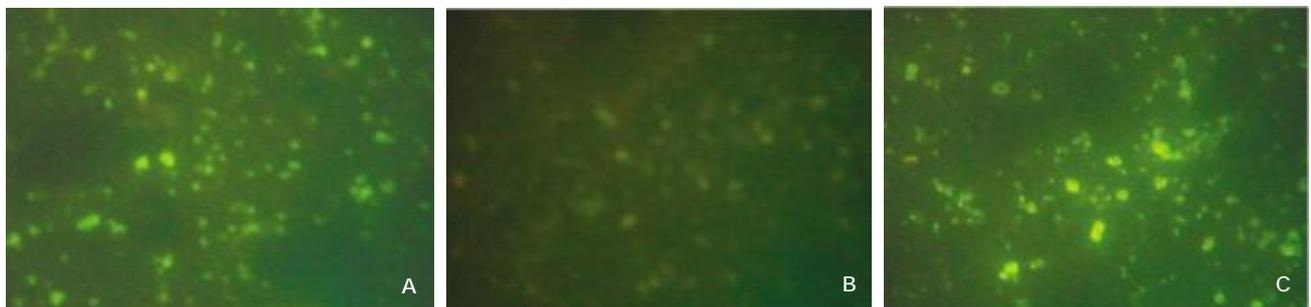


M: 预染蛋白质标志物, 1: 未还原, 2: 还原。

M: Marker, 1: Non-reduced, 2: Reduced.

图 2 单克隆抗体 F12D 与融合蛋白 PfCP-2.9 的蛋白质印迹反应

Fig.2 Western blotting analysis of mAb F12D reacted with PfCP-2.9



A: mAb5.2 阳性对照, B: mAbG4E 阴性对照, C: mAb F12D。

A: mAb5.2 positive control, B: mAbG4E negative control, C: mAb F12D.

图 3 IFA 检测 F12D 与 FCC1/HN 株疟原虫反应性

Fig.3 Reactivity of mAb F12D with malaria parasites (FCC1/HN isolate of *P. falciparum*) by IFA

## 讨 论

在疟原虫生活史中,唯有红内期原虫能致病。研制有效的红内期疫苗可降低疟疾发病率和死亡率。世界卫生组织提出发展针对红内期原虫的疟疾疫苗,以降低疟区 5 岁以下儿童的疟疾死亡率<sup>[4,6]</sup>。红内期疟原虫大部分存在于成熟的红细胞,当裂殖体成熟破裂时,裂殖子从红细胞内释放出来暴露于机体免疫系统中。红内期原虫裂体增殖时,裂殖子入侵红细胞是引起人体致病乃至致命的关键的一步,阻止裂殖子入侵红细胞便成为红内期疟疾疫苗研究的重要靶点<sup>[5,8]</sup>。裂殖子表面有两个蛋白被认为是当今领先的疟疾疫苗候选抗原,即裂殖子表面蛋白 1 (MSP1) 和顶端膜抗原-1 (AMA-1)。目前这两个抗原的功能尚不甚清楚,但普遍认为二者参与裂殖子入侵红细胞过程。

现已知道,裂殖子入侵宿主红细胞是由受体和配体介导的相当复杂的过程,涉及的多种蛋白在裂殖子入侵宿主细胞过程中可能相互作用,形成利于其入侵的蛋白复合物。MSP1 和 AMA-1 两个蛋白不仅与裂殖子入侵密切相关,并且在裂殖子入侵过程中均发生酶解。研究显示抑制两个蛋白的酶解可抑制裂殖子入侵<sup>[7-10]</sup>。文献报道,在裂殖子入侵过程中,两个蛋白发生酶解,最后只有 C-末端区域[MSP1-19 和 AMA-1(Ⅲ)]位于裂殖子表面,并随裂殖子入侵进入新的红细胞,这可能是由于酶解使这两个蛋白的 C-末端功能区暴露,进而参与受体-配体介导的裂殖子入侵;或者酶解有利于这两个蛋白 C-末端功能区暴露并在构象上发生作用,形成裂殖子入侵所需要的蛋白复合物<sup>[1]</sup>。

基于上述推测分析,作者所在实验室经适当设计将 MSP1-19 和 AMA-1(Ⅲ)融合为 1 个分子,通过加入间隔序列等设计和采用分泌表达,使该融合蛋白功能域维持天然构象,保持其强免疫特性,即 PfCP-2.9 融合蛋白。作者认为,若上述推测成立,即两个 C-末端区域在构象上发生相互作用,形成蛋白复合物并参与裂殖子入侵,则 PfCP-2.9 融合蛋白的生物学活性(包括免疫原性及免疫血清抑制疟原虫体外生长等)将会得到大幅度提高。本实验室的研究结果证实了这种推测,即:将两个区域融合已极大地增强其免疫原性,免疫血清能完全抑制疟原虫体外生长, PfCP-2.9 融合蛋白的稳定性与可溶性也得到提高<sup>[2]</sup>, 这可能是由于该融合蛋白的构象更接近于天然蛋白。

为探讨 PfCP-2.9 融合抗原的免疫原性及抑制疟原虫生长效力提高的内在原因,作者制备了一系列抗 PfCP-2.9 的单克隆抗体,测定了其生物学活性。F12D 是其中 1 株对体外疟原虫生长具有抑制作用的

单克隆抗体,该抗体为 IgG1 亚型,ELISA 与 Western blotting 检测结果显示, F12D 可与融合蛋白 PfCP-2.9 发生特异性反应, F12D 与经还原剂巯基乙醇处理的 PfCP-2.9 蛋白无特异性反应,表明 F12D 所识别的位于 PfCP-2.9 上的表位为空间构象表位。

单克隆抗体 F12D 与 FCC1/HN 虫体表面抗原经 IFA 检测表明具有强阳性反应,提示该单克隆抗体可识别疟原虫表面抗原。体外抑制试验结果也显示, F12D 对疟原虫体外生长具有抑制作用,抑制率达 56%,提示 IFA 检测抗体阳性结果与其对疟原虫生长的抑制作用有一定的关联性。

因为该单抗所识别的为构象表位,故认为 PfCP-2.9 的强免疫原性及对疟原虫生长抑制作用效力的提高,很可能是由于形成的该融合蛋白的空间构象更接近于天然蛋白。通过对其表位在保护性免疫中的作用分析和单抗结合抗原后晶体结构的解析等进一步深入的研究,将有助于阐明 PfCP-2.9 疫苗的作用机制,为疫苗设计提供依据。

**致谢** 在细胞融合实验方面得到本室朱淮民教授和张瑞娟硕士的指导和帮助,周爱国和黄玉富同志在蛋白纯化方面提供帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Pan WQ, Huang DQ, Zhang QF, et al. Fusion of two malaria vaccine candidates enhances product yield, immunogenicity and antibody-mediated inhibition of parasite growth in vitro[J]. J Immunol, 2004, 172: 6167-6174.
- [2] Xue XY, Zhang QF, Xing JH, et al. Immunogenicity of Plasmodium falciparum chimeric protein PfCP-2.9 in various strains of mice[J]. J Second Milit Med University, 2004, 25: 9-13.
- [3] Dong ZW, Wang Y. Antibody Engineering[M]. Beijing Medical University Press, 2002. 52-83. (in Chinese) (董志伟,王琰,主编.抗体工程[M].北京医科大学出版社,2002. 2-83.)
- [4] Patiño JAG, Holder AA, McBride JS, et al. Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies[J]. J Exp Med, 1997, 186: 1698.
- [5] Kennedy MC, Wang J, Zhang YL, et al. In vitro studies with recombinant Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (AMA1): Production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response[J]. Infect Immun, 2002, 12: 6948-6960.
- [6] Kumar S, Van Pelt JF, O'Dowd CA, et al. Effects of hormones and cysteine protease modulators on infection of HepG2 cells by Plasmodium berghei sporozoites in vitro determined by ELISA immunoassay[J]. J Parasitol, 1994, 80: 414-420.
- [7] Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, et al. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites[J]. Science, 1975, 187: 748-750.
- [8] Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles off Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation[J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 117: 11-25.
- [9] Conseil V, Soete M, Dubremetz JF. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by Toxoplasma gondii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43: 1358-1361.
- [10] Dutta S, Haynes JD, Moch JK, et al. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of Plasmodium falciparum merozoites[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 14: 100: 122295-122300.

(收稿日期:2005-09-22 编辑:富秀兰)