

## 质粒 DNA 单次脾内注射制备单克隆抗体 \*

# Preparation of Monoclonal Antibody Based on Single Intrasplenic Immunization of Plasmid DNA

郑 泓, 韩双艳, 林 影\*, 王小宁

ZHENG Hong, HAN Shuang-Yan, LIN Ying\* and WANG Xiao-Ning

华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510640

School of Bioscience and Technology, SCUT, Guangzhou 510641, China

**摘 要** 探索一种新的快捷有效 DNA 免疫制备单克隆抗体的方法 辅助实现构建高通量无蛋白纯化体系单克隆抗体制备和筛选。分别通过“重叠 PCR”和“无模板 PCR”在 pVAX1 真核载体中分别引入 IL-2 信号肽、IgG kappa 链信号肽构建分泌型真核表达载体 将代表抗原基因的 profilin 1 基因克隆到经改造带有信号肽基因的表达载体上 构建重组质粒 pVAX-IL2-profilin 和 pVAX-Igk-profilin 单次脾内注射重组质粒 DNA 免疫 BALB/c 小鼠。经过细胞融合、ELISA 筛选 获得两株抗 profilin 1 的单克隆抗体。单抗亚型分别为 IgM 和 IgG3。单次脾内质粒 DNA 免疫便捷有效 是制备单克隆抗体的有效方法。

**关键词** 脾内 DNA 免疫, 单克隆抗体, profilin 1

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0710-05

**Abstract** To set up a new rapid and efficient way for the preparation of specific monoclonal antibodies (MAbs) with plasmid DNA immunization. Methods The fusion gene of IL-2 signal peptide and profilin 1 by ‘overlapping PCR’ was obtained and inserted into the vector pVAX1 to construct the recombinant plasmid pVAX-IL2-profilin. Another fusion gene of IgG kappa chain signal peptide and profilin 1 by ‘no template PCR’ was obtained and inserted into the vector pVAX1 to construct the recombinant plasmid pVAX-Igk-profilin. BALB/c mice were single intrasplenic immunized with plasmid DNA. Results After cell fusion and hybridomas screening by indirect ELISA, we characterized two mAbs (1D8A2B4 and 4B12A5E3) against profilin 1. The MAbs isotype were determined as IgM and IgG3. Conclusion A single intrasplenic plasmid DNA immunization is rapid and efficient and can be used as a helpful tool for the production of specific mAb.

**Key words** intrasplenic DNA immunization, monoclonal antibody, profilin 1

单克隆抗体不仅可用于鉴定病原体、准确诊断传染病、肿瘤的诊断和分型,而且在纯化抗原、分析和探查抗原结构、分析抗原决定簇分子的功能起着重要作用。随着蛋白质组学研究的深入发展,传统的利用纯化蛋白制备单抗的技术因对蛋白纯度要求高,用量大等已经成为单抗生产的瓶颈。如何高效

快捷地获得针对特定蛋白、多肽、结构域的特异性抗体,成为人们研究的热点。

profilin 是一类广泛存在的结合肌动蛋白( actin )并影响细胞骨架结构的蛋白,分子量约 12 ~ 15kD, 基因定位于 17p13.3。Profilin 1 属于 profilin 家族,是 profilin 家族中最重要的蛋白质。它可受细胞外信号

Received: December 18, 2006; Accepted: January 29, 2007.

This work was supported by the grant from the National Key Technologies R&D Program for the 10th Five-year Plan (No. 2004BA711A20).

\* Corresponding author. Tel: +86-20-87112748; E-mail: feylin@scut.edu.cn

国家科技攻关计划项目( No. 2004BA711A20 )

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

影响而调节 actin 的聚合,在高浓度时,profilin 1 会抑制肌动蛋白的聚合作用;而在低浓度下则增强这种聚合作用<sup>[1]</sup>。通过结合磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2),profilin 1 阻止肌醇三磷酸(IP3)和 DG 的合成。Profilin 1 可参与 actin 为基础的细胞骨架涉及的多种细胞功能,包括细胞黏附和运动、细胞生长和分裂、信号转导,以及依赖于超分子构成状态的细胞表型的形成和维持<sup>[2]</sup>。目前还发现,Profilin 1 mRNA 和蛋白质的低水平表达与肝癌、乳腺癌的发生发展相关<sup>[3,4]</sup>。

Profilin 1 特异性单抗的获得对于 profilin 1 的功能研究特别是其在肿瘤发生发展过程中的作用研究有着良好的推动作用。本研究构建了携带不同信号肽的两种重组质粒,一种是携带编码 IL-2 信号肽和 profilin 1 融合基因的重组质粒 pVAX-IL2-profl,另一种是携带编码 IgG kappa 链信号肽和 profilin 1 融合基因的重组质粒 pVAX-Igk-profl。单次脾内注射重组质粒 DNA 免疫 BALB/c 小鼠,取脾细胞与骨髓瘤细胞融合,分别获得生产 profilin 1 特异单抗的杂交瘤细胞 1D8A2B4 和 4B12A5E3。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系

小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞系,用含 10% 胎牛血清(FCS, Hyclone)的 RPMI-1640(Invitrogen)培养,置于湿润的含 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 培养箱。

### 1.2 质粒构建

质粒 pICAS-profilin1 为本实验室保存。真核表达载体 pVAX1,含有人巨细胞病毒(CMV)高效启动子及增强子序列,购自 Invitrogen 公司。

**1.2.1 重组质粒 pVAX-IL2-profl 的构建:**小鼠 IL-2 信号肽序列由 GENE BANK 获得(gi:124326),序列如下:5'-ATGTACAGCATGCAGCTCGCATCCTGTGTCA CATTGACACTTGTGCTCCTTGTCAACAGC-3'。将 IL-2 信号肽基因和 profilin1 拼接用于克隆的引物设计如下,P1(A):5' ATTAAGCTTATGTACAGCATGC AGCTCGCATCCTGTGTGCACATTGACACTTGTGC 3'; P2(A):5' TGTACATTGACACTTGTGCTCCTTGTCAA CAGCGCCGGGTGGAACGCCTAC 3'; P3(R):5' AATGG ATCCTCACTACTGGGAACGCCGAAG 3'。其中,P1、P2 为上游延伸的外、内引物,两引物之间的重叠碱基以双下划线标出,P1 和 P3 分别含有 Hind III 和 BamH I 酶切位点,以单下划线标明。

**1.2.2 重组质粒 pVAX-Igk-profl 的构建:**鼠源 IgG

kappa 链信号肽序列由 GENE BANK 获得(gi:1255634),序列如下:5'-ATGGAGACAGACACAC TCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC ACTGGT-3'。(1)利用无模板 PCR 获得 IgG kappa 链信号肽基因,引物如下:P1(F):5' TA TAAGCTTAATATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGT ACTGCTGCTCTG 3'; P2(R):5' ATAGGATCCGTCAC CAGTGAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGTACCCATA 3'。两引物之间的互补碱基以双下划线标出,同时 P1、P2 分别引入 Hind III 和 BamH I 酶切位点。(2)扩增 profilin 1 基因时在上游引物 P3 中引入 BamH I 酶切位点同(P2),引物 P4 引入 Xho I 酶切位点,实现同步双基因共克隆,设计如下:P3(F):5' ATTGGATCCGCCGGGTGG AACGCCTACAT 3'; P4(R):5' ATTCTCGAGTCAGTA CTGGGAACGCCGAAGG 3'。引物中的酶切位点均以单下划线标明。

### 1.3 其他试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 连接酶、主要限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品。脾内注射用质粒采用无内毒素质粒提取试剂盒(QIAGEN endo-free GIGA Kit)制备。

### 1.4 测序

重组质粒 pVAX-IL2-profl 和 pVAX-Igk-profl 委托 Invitrogen 公司测序鉴定。

### 1.5 单克隆抗体的生产

**1.5.1 脾内 DNA 免疫:**7 周龄雌性 BALB/c 小鼠先行腹腔注射戊巴比妥(75mg/kg)麻醉后,于左腹位,消毒皮肤、剔毛。自左肋下 0.5cm 开一小切口,依次剖开腹部皮肤、肌肉和腹膜,暴露腹腔肠系膜,钳夹肠系膜根部将整个脾脏牵拉出腹腔外。沿脾脏长轴方向用微量注射器缓慢注入 100μL(100μg)质粒 DNA/生理盐水溶液,注射时尽量避免局部渗漏、出血,可见脾脏注射局部区域变白。注射完毕后将脾脏放回腹腔,仔细缝合腹膜、皮肤。手术完毕,小鼠置于 37℃ 温箱保暖促苏醒,给小鼠特别看护。

**1.5.2 细胞融合生产杂交瘤:**一次免疫后第 5 天,来源于免疫小鼠的脾细胞悬浮液与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合。经过次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸腺嘧啶核苷(HAT)的选择培养,杂交瘤细胞培养上清通过间接 ELISA 检测到抗 profilin 1 的抗体。分别获得一株阳性的初级杂交瘤细胞 1D8 和 4B12,经过 2 次有限稀释得到亚克隆 1D8A2B4 和 4B12A5E3。

**1.5.3 制备腹水:**将降植烷(pristane)注入 10 周龄的雄性 BALB/c 小鼠腹腔,一周后腹腔注入单克隆杂

交瘤细胞  $1 \times 10^6$ /只, 2 周后收集小鼠腹水,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

1.6 ELISA 检测

免疫小鼠的抗血清稀释液、杂交瘤上清和腹水均采用间接 ELISA 法检测。包被抗原采用对应 profilin 1 重组蛋白, 由北京华大基因提供。二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG + M( H + L )包被, 用 1-step<sup>TM</sup> Turbo TMB ELISA reagent ( Pierce Chemical Co. )显色。

1.7 抗体亚型鉴定

采用 Sigma Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 鉴定单抗亚型。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

2.1.1 重组质粒 pVAX-IL2-profl 的构建 :以 pICAS-profl 质粒为模板, 通过设计 PCR 引物引入 IL-2 信号肽基因序列, P1, P2, P3 同时添加到 50 $\mu$ L PCR 反应体系中, 同步重叠 PCR( overlapping )获得 IL-2 和 profilin1 的融合蛋白基因。PCR 条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 3min 后, 95 $^{\circ}\text{C}$  45s, 56 $^{\circ}\text{C}$  1min, 72 $^{\circ}\text{C}$  2min, 重复 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10min,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。IL-2-profl 的融合基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 ( 图 1 )。

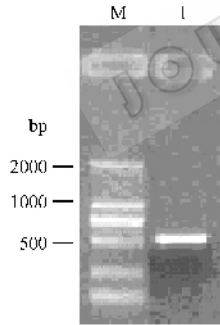


图 1 IL-2-profl 融合基因的 PCR 扩增电泳图  
Fig. 1 PCR amplification of IL-2-profl

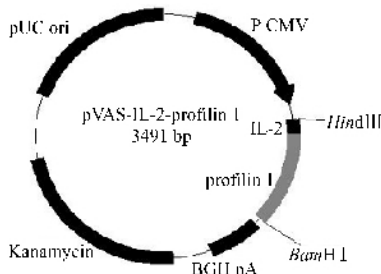


图 2 pVAX-IL2-profl 的质粒图  
Fig. 2 Plasmid pVAX-IL2-profl map

IL-2-profilin 1 PCR 产物经纯化, *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切, 与 pVAX1 载体在体外重组, 构建重

组质粒 pVAX-IL2-profl( 图 2 )。pVAX-IL2-profl 经 *Hind* III 单酶切获得的约 3.5kb 大小的线性 DNA 片段, 大小等于载体 pVAX1( 2999 bp )与目的基因 IL-2-profl( 约 500bp )片段之和。 *Hind* III / *Bam* H I 双酶切后则获得分别相当于载体和 IL-2-profl 大小的片段, 如图 3。重组质粒同时经测序, 证实 IL-2-profl 按设计要求已成功克隆到表达载体 pVAX1 中。

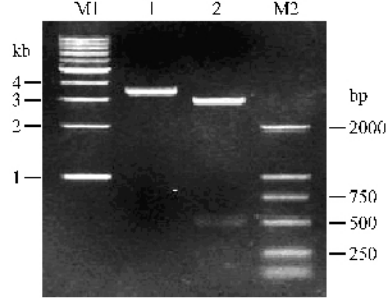


图 3 pVAX-IL2-profl 重组质粒经限制性内切酶酶切鉴定  
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pVAX-IL2-profl with restriction endonucleases analysis  
M1 : TaKaRa 1kb ladder, M2 : TaKaRa DL2000 ladder 1 : pVAX-IL2-profl/*Hind* III, 2 : pVAX-IL2-profl(*Hind* III / *Bam* H I ).

2.1.2 重组质粒 pVAX-Igk-profl 的构建 :鼠源 IgG kappa 链信号肽通过“无模板 PCR”的方法合成。将 P1 和 P2 添加到 50  $\mu$ L PCR 反应体系中, 无模板 PCR ( no template PCR )获得 IgG kappa 链信号肽基因。PCR 条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 3min 后, 95 $^{\circ}\text{C}$  45s, 60 $^{\circ}\text{C}$  1min, 72 $^{\circ}\text{C}$  2min, 重复 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10min,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。IgG kappa 链信号肽的基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 ( 图 4 )。

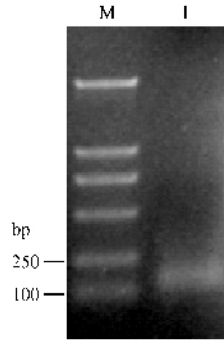


图 4 IgK-profl 融合基因的 PCR 扩增电泳图  
Fig. 4 PCR amplification of IgK-profl  
M : TaKaRa DL2000 ladder, 1 : IgG kappa PCR product.

同时以 pICAS-profl 质粒为模板, 通过常规 PCR 获得 profilin1 的蛋白基因。IgG kappa 链信号肽和 profilin1 蛋白的基因 PCR 产物经纯化, 分别用 *Hind* III / *Bam* H I 和 *Bam* H I / *Xho* I 双酶切, 同时与 pVAX1 载体在体外共连接, 构建重组质粒 pVAX-Igk-profl( 图 5 )。pVAX-Igk-profl 经 *Hind* III 单酶切获得

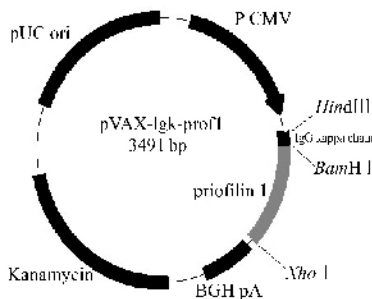


图 5 pVAX-IgK-profilin 的质粒图  
Fig. 5 Plasmid pVAX-IgK-profilin map

的约 3.5kb 大小的线性 DNA 片段,大小等于载体 pVAX1( 2999 bp )与目的基因 Igk-profilin( 约 500 bp )片段之和。HindIII/Xho I 双酶切后则获得分别相当于载体和 Igk-profilin 大小的片段,如图 6。重组质粒同时经测序,证实 Igk-profilin 按设计要求已成功克隆到表达载体 pVAX1 中。

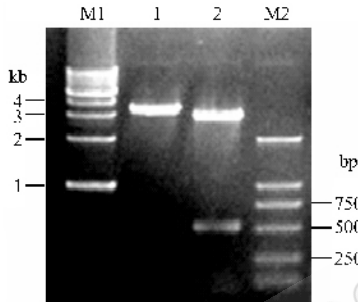


图 6 pVAX-IgK-profilin 重组质粒经限制性内切酶酶切鉴定  
Fig. 6 Identification of recombinant plasmid pVAX-Igk-profilin with restriction endonucleases analysis  
M1 : TaKaRa 1kb ladder , M2 : TaKaRa DL2000 ladder 1 : pVAX-IgK-profilin/HindIII 2 : pVAX-IgK-profilin( HindIII/Xho I ).

2.2 ELISA 检测单克隆抗体

间接 ELISA 检测免疫小鼠的 DNA 免疫抗血清 ( d3 d5 d7 ) 杂交瘤上清和腹水。未免疫的小鼠血清或杂交瘤生长培养基分别为阴性对照。阳性对照采用 profilin1 蛋白免疫的抗血清(效价为 10<sup>-6</sup>)1000 倍稀释。ELISA 结果见图 7。结果表明 1D8 和 4B12 培养上清和腹水中的单抗均可以特异性识别蛋白 profilin 1。

2.3 抗体亚型鉴定

采用 Sigma Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 试剂对杂交瘤细胞株 1D8A2B4、4B12A5E3 生产的单克隆抗体进行鉴定,结果见图 8。因此,杂交瘤细胞 1D8A2B4 所产单抗被确定为 IgM, 4B12A5E3 所产单抗被确定为 IgG3。

3 讨论

单抗生产的第一步往往是用纯化的、较大量的

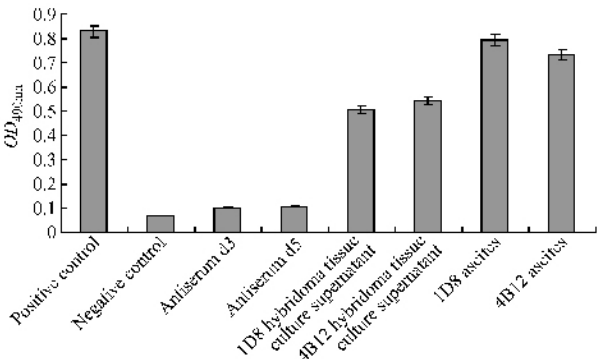


图 7 ELISA 检测抗血清、杂交瘤上清、腹水结果  
Fig. 7 Assay of Abs in antiserum , hybridoma tissue culture supernatant and ascites with ELISA

Positive control : antiserum by profilin 1 protein immunization ; Negative control : normal mouse serum or hybridoma tissue culture supernatant .

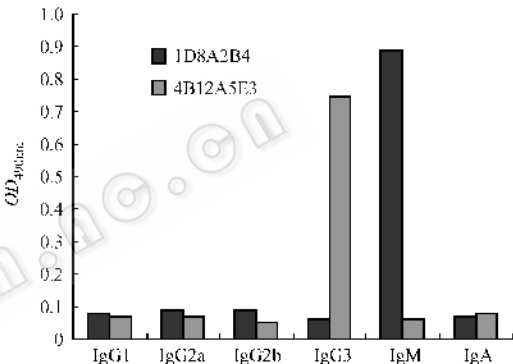


图 8 抗体 1D8A2B4 和 4B12A5E3 亚型鉴定  
Fig. 8 Assay of mouse monoclonal antibody 1D8A2B4 and 4B12A5E3 isotype

蛋白免疫。然而对于低丰度蛋白或者缺少后翻译修饰的重组蛋白,获得纯抗原尤其是具有天然结构的纯抗原有很大难度。DNA 免疫,作为一种 90 年代兴起的以核酸为基础的全新免疫接种技术,已被证实进入机体的 DNA 能在宿主细胞内表达具有天然构象的蛋白,激发抗体反应<sup>[5,6]</sup>。本实验室已经成功建立了 yeast-ELISA 技术,用表面展示了抗原的重组酵母细胞做为“天然抗原”细胞,可代替蛋白抗原,直接应用于检测单克隆抗体和抗血清<sup>[7]</sup>。若 DNA 免疫可成功生产单克隆抗体,结合本实验室利用酵母展示抗原技术建立的 yeast-ELISA 检测技术,不仅可绕开重组蛋白的制备纯化困难的瓶颈,解决常规蛋白免疫时因机体对某些蛋白的免疫耐受无法获得单抗的问题,更可实现高通量、短周期的无蛋白单克隆抗体制备体系。

传统的蛋白免疫制备杂交瘤和生产单抗均有以下的共同点:如末次免疫最好采用静脉注射;末次免疫的三到四天,必须取脾细胞融合;血清中能检测到高滴度特异性的抗体的小鼠脾细胞用于融合才可产

生最好的杂交瘤等。实验中,我们单次脾内注射编码外源蛋白的质粒 DNA 免疫小鼠,在 d5 取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 S/P20 融合,经筛选获得了可生产 profilin 特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1D8A2B4。与传统方法不同的是,在取脾细胞融合前,小鼠血清内均检测不到抗 profilin 1 抗体。这与 Velikovsk 等的报道一致<sup>[8]</sup>。DNA 单次脾内注射同时缩短了免疫时间,预试验中,在 d3、d5、d7 均可取免疫脾细胞进行融合,但考虑到提高融合率和阳性率,我们选择在 DNA 免疫后的 d5 取脾融合。上述结果提示短时间免疫且不依赖动物的抗体反应同样有可能获得产单抗的杂交瘤细胞株。

采用 DNA 免疫制备抗体近几年来也陆续有报道。Chen 等采用电刺激法辅助肌肉注射 DNA 获得抗 CKLF1 的单抗<sup>[9]</sup>;Ni 等报道了间隔两周肌注免疫小鼠股四头肌,免疫三次后于 6 周进行脾免疫获得了 HBV M 蛋白单抗<sup>[10]</sup>;Yu 等脾免疫在 d7 融合获得单抗<sup>[11]</sup>。Velikovsk 等采用与我们一致的单次脾内注射,在 d3、d5、d10 融合均可获得单抗,亚型更是包括 IgM、IgG2b 和 IgG1<sup>[8]</sup>。

这里,我们采用了单次脾内注射编码外源蛋白的质粒 DNA,免疫小鼠的抗体反应决定于转染脾细胞内抗原的表达,而抗原的表达受编码抗原的特性和表达载体限制。我们选用符合 FDA 规范的 DNA 疫苗专用载体 pVAX1,同时在构建免疫质粒 DNA 时,考虑到信号肽可介导蛋白质分泌及可在不同蛋白质间互通使用,引入鼠源的 IL-2 和 IgG kappa 链信号肽序列,使 profilin1 以分泌形式暴露受转染的 B 细胞或抗原提呈细胞外。抗原得以聚集在脾细胞内,以外源性抗原的形式诱导体液免疫应答,引发更强的抗体反应<sup>[8]</sup>。细胞融合后,获得了 34 株杂交瘤细胞克隆。其中,细胞株 1D8A2B4 和 4B12A5E3 被亚克隆,分泌的单克隆抗体亚型分别被确认为 IgM 和 IgG3 型。在 ELISA 检测中,培养上清和腹水都可以特异性地识别融合蛋白 profilin 1。杂交瘤细胞株 3d 传代 1 次,体外传代培养 6 个月以上,ELISA 检测抗体滴度无明显降低。

这些数据表明,单次脾内注射编码抗原的真核表达质粒,提供了一个获得特异性单克隆抗体的快捷有效途径。虽然,在实施单次脾注射 DNA 免疫时,因操作手法、融合效率、动物的个体差别等差异,

难以将单抗生产和 DNA 免疫的关系量化。但我们的实验证实了单次脾 DNA 免疫可成功获得特异性单抗,这鼓励了我们进一步在激发免疫反应、提高选择效率和获得高滴度单抗的方面继续深入研究。

致 谢 感谢广州泰默生物技术有限公司全体员工对本研究的支持和帮助。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Goldschmidt-Clermont PJ, Janney PA. Profilin, a weak Cap for actin and Ras. *Cell*, 1991, **66**(3): 419–421.
- [2] Ayscough KR. *In vivo* functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, **10**(1): 102–111.
- [3] Wu X 吴楠, Zhang W(张文), Liang YI(梁玉龙), et al. All-trans retinoic acid Up-regulate profilin 1 protein that showed lower expression in hepatocarcinoma cell. *Fudan Univ J Med Sci*(复旦学报(医学版)), 2006, **33**(2): 171–174.
- [4] Janke J, Schluter K, Jandrig B, et al. Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med*, 2000, **191**(10): 1675–1686.
- [5] Han SY(韩双艳), Guo Y(郭勇), Yang HL(杨慧兰), et al. Construction of new DNA vaccine and study of protective effect in mice. *Acta Laser Biology Sinica*(激光生物学报), 2004, **13**(2): 97–100.
- [6] Peter F Ertl, Lindy L Thomsen. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. *Methods*, 2003, **31**(3): 199–206.
- [7] Ye M(叶茂), Han SY(韩双艳), Lin Y(林影), et al. Study on the establishment of yeast surface display-ELISA for the detection of the monoclonal antibody. *Progress in Biochemistry and Biophysics*(生物化学与生物物理进展) in press.
- [8] Velikovsk CA, Cassataro J, Sanchez M, et al. Single-shot plasmid DNA intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies Persistent expression of DNA. *J Immunol Methods*, 2000, **244**(1–2): 1–7.
- [9] Chen YY, Zhang T, Li T, et al. Preparation and characterization of a monoclonal antibody against CKLF1 using DNA immunization with *in vivo* electroporation. *Hybridoma*, 2005, **24**(6): 305–308.
- [10] Jing N, Yi N, Xiaohua W, et al. A rapid and simple approach to preparation of monoclonal antibody based on DNA immunization. *Cell Mol Immunol*, 2004, **1**(4): 295–299.
- [11] Yu XF, Liang LH, She M, et al. Production of a monoclonal antibody against SARS-CoV spike protein with single intrasplenic immunization of plasmid DNA. *Immunology Letters*, 2005, **100**(2): 177–181.