

猪链球菌 2 型次黄嘌呤核苷酸脱氢酶单克隆抗体的制备及其识别表位分析

周俊明^{1,2} 何孔旺^{1*} 张雪寒¹ 倪艳秀¹ 陆承平²

(1. 江苏省农科院兽医所农业部畜禽疫病诊断重点开放实验室 南京 210014)

(2. 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘要: 用纯化的硫氧还蛋白-IMPDPH融合蛋白免疫BALB/c小鼠, 取其脾细胞与SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 对杂交瘤细胞及时筛选, 阳性孔经4次有限稀释法克隆, 成功获得1A8、1F2、2D2和2D12共4株能稳定传代并分泌抗IMPDPH的单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞株。4株腹水型单克隆抗体间接ELISA效价分别为 100×2^{11} 、 100×2^{11} 、 100×2^{10} 和 100×2^8 。经Western-blot分析表明, 4株单抗与硫氧还蛋白-IMPDPH融合蛋白均具有特异性反应, 并且通过4种IMPDPH全基因片段缺失表达的融合蛋白, 分析了4株单抗所识别抗原决定簇的差异性, 发现1A8、1F2、2D2识别表位的编码基因集中在IMPDPH基因片段的627 bp~790 bp之间, 2D12识别表位的编码基因则集中在IMPDPH基因片段的411 bp~790 bp之间。猪链球菌2型中IMPDPH单克隆抗体的获得及相应表位分析为研究IMPDPH蛋白的生物学活性及免疫学活性奠定了基础。

关键词: 猪链球菌2型, IMPDPH, 单克隆抗体, 表位

Production and Epitope Studying of Monoclonal Antibody Against IMPDPH in SS2

ZHOU Jun-Ming^{1,2} HE Kong-Wang^{1*} ZHANG Xue-Han¹ NI Yan-Xiu¹ LU Cheng-Ping²

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

(2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Fusion protein Thioredoxin (Trx A)-IMPDPH of *Streptococcus suis* type 2 (SS2) was purified with affinity chromatograph. Spleen cells from BALB/c mice which were immunized with purified fusion protein were fused with SP2/0 myeloma cells in order to product monoclonal antibody against IMPDPH. Four hybridoma cell strains against IMPDPH (named 1A8, 1F2, 2D2 and 2D12 respectively) were developed after four times of limiting dilution assay. The indirect ELISA titers of their ascites were 100×2^{11} , 100×2^{11} , 100×2^{10} , 100×2^8 . The results of Western-blot indicated that the four McAbs only reacted with Trx A-IMPDPH but not reacted with Trx A, that showed their good specificity. Meanwhile, the difference of their recognizing epitopes was analysed by means of four proteins which were respectively produced by deleting specific genes. The results showed that 1A8, 1F2 and 2D2's corresponding epitopes are in 627 bp~790 bp sites of IMPDPH

gene and 2D12's is in 411 bp~790 bp sites. The successful preparation of monoclonal antibodies against IMPDH of SS2 and the analysis of epitopes would facilitate the further research on the biological and immunological activity of IMPDH.

Keywords: *Streptococcus suis* type 2, IMPDH, Monoclonal antibody, Epitope

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)根据荚膜抗原的不同可将之分为 35 个血清型(1~34 及 1/2), 其中, 猪链球菌 2 型(SS2)是毒力最强、流行范围最广、危害最严重的血清型之一^[1,2]。SS2 属于兰氏分群(Lancefield)的R群, 可引起断奶仔猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、支气管炎、败血症和突发死亡, 并且SS2 可引起人感染发病, 严重的可致人死亡, 是一种重要的人畜共患病病原体^[3]。SS2 引起的疫病不仅给养猪业带来严重的经济损失而且给公共卫生和食品安全带来了威胁, 所以引起了全世界范围内对该病的高度重视。溶菌酶释放蛋白(MRP)和细胞外蛋白因子(EF)被公认为是SS2 的两种重要的毒力因子, 但Galina等^[4]报道的表现型为MRP⁻ EF⁻的菌株可致脑膜炎, 充分说明了SS2 毒力因子的复杂性。

本课题组前期工作发现了SS2 江苏分离株中存在一个新型开放阅读框, 与已知的基因无同源性, 经过原核表达获得了该基因的融合表达蛋白, 并证实了表达蛋白具有免疫原性及次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(IMPDH)的生物学活性^[5]。为了更加深入地认识这段基因的免疫学及生物学活性, 本研究制备了SS2 中IMPDH单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb), 并利用基因分片段缺失表达的融合蛋白对所制备的单克隆抗体识别表位进行了初步分析, 确定了所获单克隆抗体识别表位编码基因的集中区域, 识别不同结构域McAb的获得, 为IMPDH功能的研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 抗原和细胞

利用转化有pET-IMPDH的*E. coli* BL21(DE3) (本室构建和保存)诱导表达的硫氧还蛋白-IMPDH融合蛋白, 并以镍柱亲和层析纯化后作抗原用^[5]; 骨髓瘤细胞SP2/0, 为本室保存。

1.2 试剂及仪器

PEG-4000、HAT、HT、DMSO(Sigma 公司); DMEM、小牛血清(Gibico 公司); 羊抗鼠 IgG-HRP (博士德生物技术公司); 明胶(Sunshine 公司);

His-Bind Purification Kit (Novagen 公司); 复日 RF-980 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

1.3 动物免疫

选用 4 只 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠(南通大学实验动物中心提供, 清洁级)进行免疫。免疫程序为: 皮下注射弗氏完全佐剂乳化的抗原 100 μ g/只, 2 周后皮下注射弗氏不完全佐剂乳化的等量抗原, 再间隔 2 周后, 以等量抗原皮下注射, 融合前 3 d 尾静脉注射抗原 50 μ g/只加强免疫。

1.4 细胞融合

按常规方法进行^[6]。SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫 BALB/c小鼠脾细胞按 1:5~1:10 的比例混合, 在 50% PEG4000 介导下融合, 然后用含有HAT成分的DMEM培养基悬浮, 分装于 4 块 96 孔培养板中, 于 37°C、5% CO₂培养箱中培养。

1.5 杂交瘤细胞的筛选与亚克隆

1.5.1 检测程序: 按常规的间接ELISA法进行。包被液为 0.05 mol/L、pH 9.6 碳酸盐缓冲液, 封闭液为 1% BSA, 酶标二抗为 HRP-羊抗鼠, 底物为 TMB-H₂O₂。

1.5.2 最佳抗原包被浓度和抗体稀释度的确定: 包被液稀释抗原至 20 μ g/mL, 倍比稀释出 10 μ g/mL、5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL、0.625 μ g/mL 浓度的抗原溶液, 将 6 种浓度的抗原溶液 100 μ L/孔包被 96 孔 ELISA 板, 每个浓度重复两列, 采自融合用 BALB/c 小鼠的阳性抗血清作 1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:6400、1:12800 稀释, 健康 ICR 小鼠血清 1:100 稀释作阴性血清, 阴性血清与同一稀释度的阳性血清横向间隔加样, 酶标二抗作 1:20000 稀释, 进行方阵 ELISA 试验。结果判定: 以阴性值小于 0.2, 且阳性值/阴性值(P/N)最大时为包被抗原最佳浓度, 该点对应的阳性血清稀释度为最佳阳性血清稀释度。

1.5.3 抗体阳性孔的检测及筛选: 融合后, 待细胞生长到培养孔面积的 1/4 时, 用间接 ELISA 对其培养上清进行筛选, 即以大肠杆菌表达的硫氧还蛋白

-IMPDH 融合表达产物和空白载体的产物硫氧还蛋白, 分别对细胞培养上清进行检测, 筛选出对大肠杆菌表达的硫氧还蛋白-IMPDH 融合表达产物呈阳性, 而对空白载体产物反应呈阴性的杂交瘤细胞。

1.5.4 抗体阳性孔细胞的亚克隆: 用有限稀释法^[6]进行。

1.5.5 阳性单克隆细胞的扩大培养与冻存: 将阳性克隆细胞从 96 孔细胞培养板转到 24 孔细胞培养板, 长满后转到 6 孔细胞培养板, 最后转到细胞瓶培养, 按照常规方法冻存细胞。

1.5.6 单克隆抗体培养上清和腹水制备: 阳性克隆细胞扩大培养时, 收集细胞培养上清, 检测其 ELISA 反应效价, -4°C 保存。用 8 周龄 BALB/c 小鼠, 常规方法制备腹水, 检测其 ELISA 反应效价, -70°C 保存。

1.6 单克隆抗体反应特异性的鉴定

转化有 pET-IMPDH 的大肠杆菌表达的融合蛋白、空白载体的产物硫氧还蛋白(Trx A)分别做亲和层析纯化处理后, 进行 SDS-PAGE, 继而转印到 NC 膜, Western-blot^[7] 的方法鉴定各株单克隆抗体反应特异性。

1.7 单克隆抗体识别抗原表位差异分析

IMPDH 全基因序列和全基因片段缺失形成的 4 个缺失序列, 分别进行原核表达, 所获 5 种融合蛋白纯化后进行 SDS-PAGE, 转印到 NC 膜, 分别与 4 株单抗进行 Western-blot 分析, 初步比较了 4 株单抗针对的抗原决定簇的差异性。

2 结果

2.1 空载体表达蛋白及 pET-IMPDH 融合表达蛋白的表达、纯化

SDS-PAGE 电泳结果显示(图 1, 图 2), 可溶性的空载体表达蛋白及 pET-IMPDH 融合表达蛋白, 经过亲和层析纯化后, 纯化效果较好。单克隆抗体制备(IMPDH-Trx A)所用的抗原即图 2 中 6 号泳道中的蛋白, 蛋白分子量 48 kD, 蛋白质浓度 1.24 mg/mL, ELISA 筛选假阳性杂交瘤细胞所用的包被抗原(Trx A)即图 1 中 7 号泳道中的蛋白, 蛋白分子量 23 kD, 质量浓度 0.86 mg/mL。

2.2 细胞融合率、阳性率与细胞克隆

免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合后, 经 HAT 培养液选择性培养, 在第 3

天开始出现融合细胞, 384 个培养孔中有 320 个孔内有杂交瘤细胞生长, 融合率为 83.5%, 融合 10 d 后换用 HT 培养基, 当每孔杂交瘤细胞覆盖孔底 5%~30% 时, 采用间接 ELISA 方法检测细胞培养上清中抗体的分泌情况。经间接 ELISA 方法检测 320 个杂交瘤细胞生长孔培养上清液, 有 56 个孔表现阳性反应, 阳性率为 17.5%。经过假阳性筛选, 得到 16 个阳性杂交瘤细胞进行 4 次有限稀释法克隆后, 获得 4 株能稳定分泌 IMPDH 特异性抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 1A8、1F2、2D2、2D12。经 2 个月以上体外传代, 4 株细胞株均能良好生长, 并稳定分泌抗体。

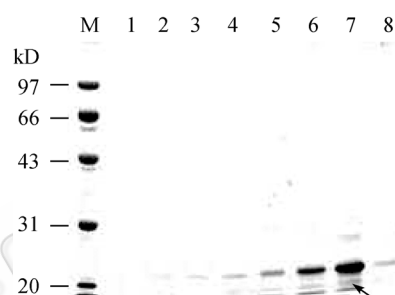


图 1 纯化的空载体表达蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified Trx A

1-8: Different collections of outflow from purifying Trx A; M: Marker protein

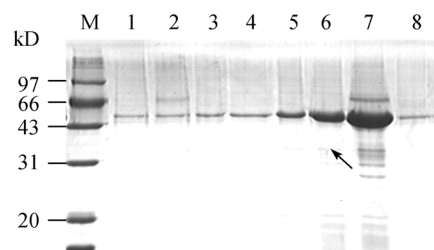


图 2 纯化的 pET-IMPDH 融合表达蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified pET-IMPDH

1-8: Different collections of outflow from purifying pET-IMPDH; M: Marker protein

2.3 腹水抗体制备及其效价的测定

注射杂交瘤细胞进入液体石蜡致敏的 BALB/c 小鼠腹腔, 约 7 d~10 d 后小鼠腹部膨大, 16 号针头采集腹水, 每只小鼠一次可取 3 mL 左右腹水, -70°C 保存。4 株腹水型单抗间接 ELISA 效价较高(表 1)。

表 1 4 株杂交瘤细胞诱导腹水的 ELISA 效价
Table 1 ELISA titers of the ascite fluids by the 4 hybridomas

4 株杂交瘤 4 Hybridomas	1A8	1F2	2D2	2D12
腹水效价 Titers of the ascite	1:204800	1:204800	1:102400	1:25600

2.4 单抗的特异性鉴定

4 株单抗对硫氧还蛋白-IMPDH 融合蛋白、硫氧还蛋白的 Western-blot 分析结果表明, 4 株单抗均能与硫氧还蛋白-IMPDH 融合蛋白特异性反应, 与硫氧还蛋白没有任何反应条带出现, 表明 4 株单抗是特异性针对 IMPDH 的(图 3)。

2.5 4 株单抗抗原表位差异分析

结果显示, 1A8、1F2、2D2 与 1、2、3、5 号缺失蛋白均有反应, 而 2D12 与 1、2、5 号缺失蛋白有反应, 在 3 号缺失蛋白处却没有任何反应条带出现。初步推断 1A8、1F2、2D2 识别表位的编码基因

主要集中在 627 bp~790 bp 之间, 另外 2D12 识别表位表位的编码基因主要集中在 411 bp~790 bp 之间(图 4)。

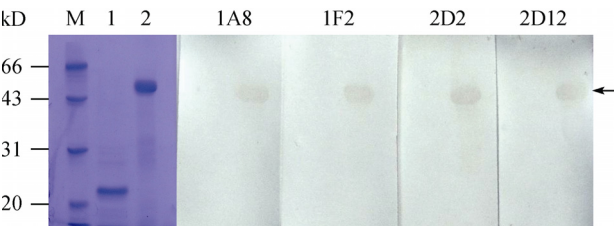


图 3 PET-IMPDH 与空载体蛋白的 SDS-PAGE 及 4 株单抗特异性的分析

Fig. 3 Analysis of the specificity of four McAbs

M: 蛋白 marker; 1: 纯化的硫氧还蛋白; 2: 纯化的融合表达蛋白; 1A8、1F2、2D2、2D12: 分别显示各株单抗与融合表达蛋白反应与硫氧还蛋白不反应

M: Protein marker; 1: Purified Trx A; 2: Purified pET-IMPDH fusion protein; 1A8、1F2、2D2、2D12: Respectively demonstrates four McAbs react with Trx A - IMPDH except for Trx A by Western -blotting

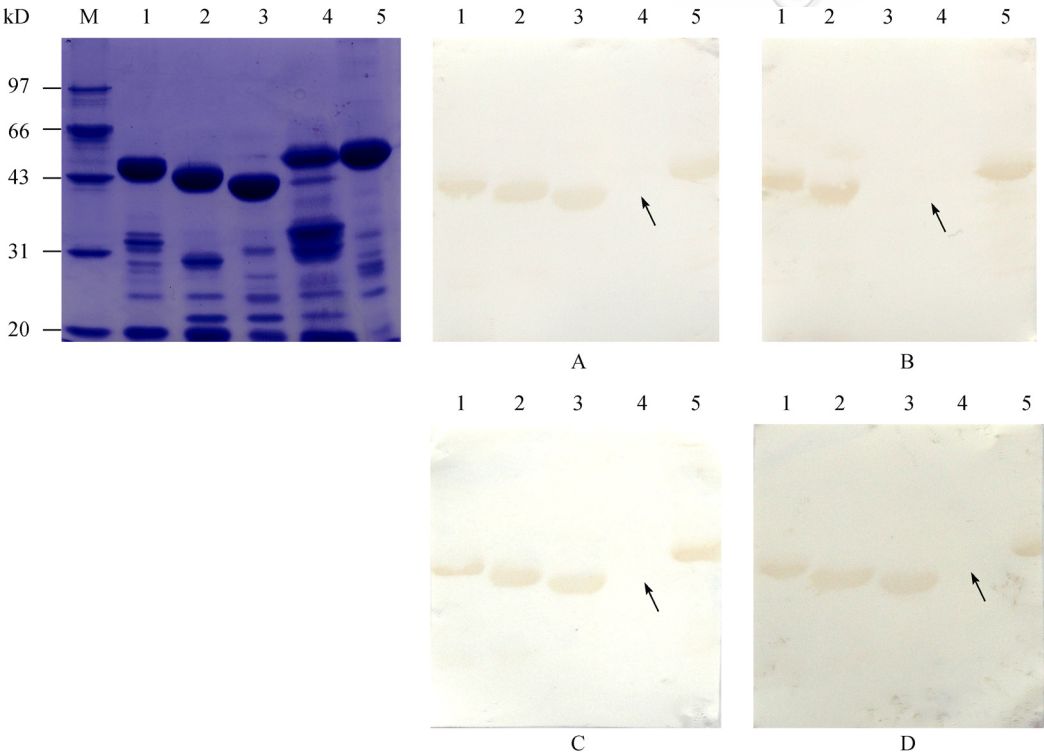


图 4 缺失蛋白的 SDS-PAGE 分析及 4 株单抗抗原表位差异的 Western blot 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of deletion protein and Western -blotting analysis of the difference of four McAbs epitopes

M: 蛋白 marker; 1: IMPDH 基因 190 bp~933 bp 表达的融合蛋白; 2: 缺失 216 bp~364 bp 表达的融合蛋白; 3: 缺失 411 bp~601 bp 表达的融合蛋白; 4: 缺失 627 bp~790 bp 表达的融合蛋白; 5: IMPDH 全长表达的融合蛋白; A: 2D2 印迹结果; B: 2D12 印迹结果; C: 1A8 印迹结果; D: 1F2 印迹结果

M: Protein marker; 1: Recombinant protein encoded by 190 bp~933 bp gene of the whole IMPDH gene; 2: Recombinant protein encoded by the whole IMPDH gene with 216 bp~364 bp deleted; 3: Recombinant protein encoded by the whole IMPDH gene with 411 bp~601 bp deleted; 4: Recombinant protein encoded by the whole IMPDH gene with 627 bp~790 bp deleted; 5: Recombinant protein encoded by the whole IMPDH gene; A: The western-blot analysis of 2D2; B: The western-blot analysis of 2D12; C: The western-blot analysis of 1A8; D: The western-blot analysis of 1F2

3 讨论

为了能够深入了解 SS2 中 IMPDH 的免疫学特性, 本研究以纯化的 pET-IMPDH 融合蛋白为抗原, 通过常规的淋巴细胞杂交瘤技术, 成功获得了 4 株特异性分泌 IMPDH 单克隆抗体的杂交瘤细胞系。利用 4 种基因片段缺失表达蛋白, 分析了 4 株单克隆抗体所针对的抗原表位差异性, 结果显示 1A8、1F2、2D2 识别表位的编码基因位于 IMPDH 阅读框的 627 bp~790 bp 之间, 2D12 识别表位的编码基因则集中在 411 bp~790 bp 之间, 完善了对猪 SS2 中 IMPDH 免疫学特性的认识, 由于 IMPDH 在猪体内具有免疫原性, 且其广泛分布于几乎所有的血清型 (1、2、3、4、5、6、7、9、11、14、16、18、19、21、23、25、26、27、29、30 及 31) 内, 故 IMPDH 在作为交叉保护性疫苗的方面很具有吸引力, 通过单克隆抗体表位差异性分析, 得出了 SS2 中 IMPDH 可能的抗原表位区域, 为今后的肽疫苗开发提供了捷径。

IMPDH 通常以四聚体形式存在, 是鸟嘌呤核苷酸 GTP 经典合成途径的限速酶; 这一反应依赖于 NAD^+ 的参加, 对细胞增殖分化的影响十分重要^[8], 由于 SS2 的毒力因子非常复杂, 并且相互之间联系密切, IMPDH 有可能是其不可或缺的一个毒力因子。本研究制备出了 4 株高效价、高特异性的单克隆抗体, 可应用于亲和层析, 获取 SS2 中天然状态的 IMPDH 蛋白, 从而为更加准确地认识猪 SS2 中 IMPDH 的生物学活性提供了条件; 另一方面荧光标记技术配合 IMPDH 的单克隆抗体, 可以很方便地

对该蛋白进行定量分析。猪链球菌 2 型 IMPDH 单克隆抗体的成功制备, 为研究 IMPDH 这一猪链球菌 2 型新型的毒力相关因子奠定了基础。

致谢: 本课题的实施得到了江苏省农业科学院兽医研究所在物资、技术上的有利支持, 在此向兽医所所有的工作人员表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: Past and present. *Vet Res Common*, 1997, **21**(6): 381–407.
- [2] Clifton-Hadley FA. *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br Vet J*, 1983, **139**(1): 1–5.
- [3] Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**: 131–137.
- [4] Galina L, Vecht U, Wisselink HJ, et al. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the USA based on the presence of muraminidase released protein and extracellular factor. *Can J Vet Res*, 1996, **60**(1): 72–741.
- [5] 段志涛, 何孔旺, 张雪寒, 等. 猪链球菌 2 型次黄嘌呤核苷酸脱氢酶基因的克隆与鉴定. *微生物学报*, 2006, **46**(5): 730–733.
- [6] 刘秀梵. 单克隆抗体技术在农业中的应用. 合肥: 安徽科技出版社, 1994, pp.35–36.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2000, pp.166–178.
- [8] Colby Thomas D, Vanderveen K, Strickler, et al. Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implication for ligand binding and drug design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**(7): 3531–3536.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。