

DEN2 重组 E 蛋白单克隆抗体的制备及其生物学活性

曾祥凤^{1,2}, 江丽芳¹, 方丹云¹, 汤云霞¹, 魏惠永¹, 晏辉钧¹

(1. 中山大学基础医学院微生物学教研室, 广东 广州 510080;

2. 暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室, 广东 广州 510632)

摘要:【目的】研制登革病毒 E 蛋白特异性单克隆抗体, 鉴定其各种生物学特性。【方法】用纯化的 *Pichia pastoris* 酵母表达的 DEN2 重组 E 蛋白作为抗原, 免疫 Balb/c 小鼠, 采用传统的细胞融合、有限稀释法克隆化杂交瘤细胞, 制备稳定分泌 McAbs 的细胞株。采用硫酸铵沉淀法纯化腹水中的 McAbs, 用 ELISA、IFA、Western Blot 和空斑减数中和实验等鉴定 McAbs 的各种生物学活性。【结果】用 ELISA、IFA 检测证实 5 株杂交瘤细胞产生的 McAbs 与 DEN2 重组 E 蛋白和 DEN 全病毒均有较高的亲和力; Western Blot 分析发现其中 3 株杂交瘤细胞(3G3, 6G11, 4E3)分泌的 McAbs 能与其相对分子质量 $M_r = (66\sim 69)\times 10^3$ 的 DEN2 重组 E 蛋白结合。空斑减数中和实验证实所获得的单克隆抗体具有中和登革病毒感染 C6/36 细胞的作用。【结论】成功地制备了 5 株抗登革病毒 E 蛋白特异性的 McAbs, 为进一步研究 E 蛋白的结构和功能及临床诊断试剂盒研发打下了基础。

关键词: 登革病毒; 病毒包膜糖蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: R373.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)01-0056-05

Preparation and Biological Activations of Monoclonal Antibodies Against DEN Envelope Proteins

ZENG Xiang-feng^{1,2}, JIANG Li-fang¹, FANG Dan-yun¹, TANG Yun-xia¹, WEI Hui-yong¹, YAN Hui-jun¹

1. Department of Microbiology, Prclinical Medical School, Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080 China;

2. Key Laboratory of Ministry of Education for Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University,

Guangzhou 510632, China)

Abstract: 【Objective】To obtain monoclonal antibodies (McAbs) against DEN envelope proteins. 【Methods】In the first place, Balb/c mice were immunized using the antigens of purified recombinant E protein form DEN2 virus expressed in yeast *Pichia pastoris*. Then, the splenocytes of one of the immunized mice were fused with myeloma cells SP2/0 to produce hybridoma cell line, which could secrete anti-DEN envelope protein antibodies. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence assay (IFA), and Western blot analysis were applied to identify specificity of antibodies. Plaque reduction neutralization test (PRNT) were performed to study the protective effect of McAbs. 【Results】Five established strains of hybridoma cell lines (3G3, 4E3, 6G11, 6G12, 9D9) could steadily secrete antibodies of E protein. These antibodies had characteristics of specific binding to DEN and E protein. PRNT indicated that the McAbs could reduce the plaque of DEN infecting C6/36 cells. 【Conclusion】The monoclonal antibodies against DEN Envelope protein with high activity and specificity had been established successfully. These results could provide a potential value for vaccine researches and diagnosis of DEN.

Key words: Dengue virus; viral envelope glycoprotein; monoclonal antibodies

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26 (1): 56-60]

收稿日期: 2004-09-03

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (021036)

作者简介: 曾祥凤 (1968-), 女, 江西上犹人, 硕士生, 讲师; 江丽芳, 教授, 通讯作者, 主要从事病毒致病与免疫的分子生物学研究. E-

mail: zengxf868@sohu.com

登革病毒 (Dengue virus, DEN) 是黄病毒科 (Flaviviridae) 成员, 它的 4 个血清型构成黄病毒属的一个抗原亚组。登革病毒感染可引起登革热 (DF)、登革出血热 (DHF) 和登革休克综合征 (DSS)。DHF/ DSS 病情严重, 病死率高, 其发病机制至今尚未阐明, 同时由于缺乏有效的登革病毒疫苗, 加上控制蚊媒困难等原因, 登革病毒感染在世界范围内呈蔓延趋势^[1]。E 蛋白(envelope glycoprotein, Egp) 是登革病毒最大的结构蛋白和主要包膜糖蛋白, 已经知道 E 蛋白有多种重要的生物学活性及复杂的 T、B 细胞抗原表位^[2], 其结构和功能的深入研究对阐明 DEN 的致病机制及疫苗研制均有重要意义。本研究用基因工程技术获得 DEN 的重组 E 蛋白建立了特异性的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 并对这些细胞产生的 McAbs 进行鉴定及生物学特性的研究。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

DEN2-E 蛋白基因工程重组菌由本室构建保存 (菌号 X14)。登革病毒 I~IV 型毒株, 流行性乙型脑炎病毒 (JEV) 均为本室保存毒株。小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0-Ag14) 和白纹伊蚊 C6/36 细胞为本教研室传代保存。DEN2 全病毒免疫腹水由本室制备。HRP 及 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 均购自北京鼎国生物技术公司产品。HAT、HT 和 PEG 均购自 Sigma 公司(美国), 金属螯合亲和层析 (MCAC) 柱为 Amersham Pharmacia 公司产品。昆明鼠和 BABL/c 鼠均为本校实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 DEN2-E 蛋白的表达与纯化 将分泌 DEN2-E 蛋白的酵母重组菌 (X14) 进行规模诱导培养, 低温离心收集上清进行超滤浓缩, 再用金属螯合亲和层析法过柱纯化, SDS-PAGE、WB 鉴定纯化蛋白, 分光光度计测定纯化蛋白含量^[3]。

1.2.2 动物免疫 取健康 4~6 周龄的雌性二级 BALB/c 小鼠 6 只, 背部皮内多点注射 (4~6 点) 和腹腔注射 E 蛋白 (100 μg /mL) 与等量完全弗氏佐剂的充分乳化物, 0.5 mL/鼠。间隔 3 周后, 进行第 2 次免疫, 背部皮内注射 2~3 点, 0.1 mL/点和

腹腔注射 (0.2 mL), 共 0.5 mL / 鼠。然后进行第 3、第 4、第 5 次加强免疫, 每次间隔 3 周, 腹腔注射 E 蛋白 (100 μg /mL), 0.5 mL / 鼠。融合前 3 d, 再腹腔注射 E 蛋白 (100 μg /mL) 0.5 mL / 鼠。融合前 1 d, 于免疫小鼠尾静脉取血, 分离血清, 用纯化 E 蛋白 ELISA 法检测抗体产生情况。取抗体效价高者用于制备免疫脾细胞悬液。

1.2.3 细胞融合 按文献[4]方法进行。收集免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞按 10:1 的比例用 500 g/L PEG (用 1640 完全培养基配制) 进行融合。HAT 培养基选择培养。待融合细胞长至占孔底 1/4~1/3 时吸取培养上清用 ELISA 筛选。

1.2.4 I~IV 型登革病毒的培养及其抗原片的制备 按我室建立的常规方法进行。

1.2.5 阳性克隆的筛选及克隆化 分别用纯化的重组 E 蛋白 (0.1 μg /孔) 和 4 型 DEN 病毒细胞培养上清液包被 96 孔板 所有的包被抗原均先用 DEN2 全病毒颗粒免疫腹水方阵滴定法确定 ELISA 检测的最适抗原浓度)。用 E 蛋白免疫小鼠血清作为阳性对照, 正常小鼠血清和 SP2/0 培养上清为阴性对照, 用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法筛选阳性克隆。E 蛋白和 DEN 病毒检测均阳性者即扩大培养, 并用有限稀释法进行克隆 4~6 次, 最后抗体分泌稳定者建株保存。

1.2.6 杂交瘤细胞株的鉴定 ①染色体核型分析: 阳性杂交瘤细胞培养后按常规方法制成染色体片, 计数 20 个细胞染色体平均数。②稳定性检验: 取各成株阳性杂交瘤细胞体外培养 3 个月, 连续监测其分泌抗体的滴度。

1.2.7 免疫腹水的制备和抗体的纯化 将阳性杂交瘤细胞株分别免疫 BABL/c 鼠, 免疫腹水经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 初步提纯后进行抗体的免疫学特性分析和生物活性功能测定。

1.2.8 抗体特异性和免疫学特性 ①特异性鉴定: 按常规的 ELISA 和 IFA 方法检测。②蛋白印迹 (Western blot): 按常规免疫印迹方法将纯化的重组 E 蛋白进行电转印。将转印的 NC 膜用 50 g/L 脱脂奶粉-TBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 4 h, 洗涤液洗后, 分别加入封闭液 1:100 稀释的初步纯化的 5 种单克隆抗体腹水, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗涤液洗 10 min \times 3 次。加封闭液 1:1 000 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵

育 2 h, 洗涤 3 次后, 用 DAB/ NiCl₂ 显色。③抗体效价测定: 杂交瘤细胞免疫腹水用 PBS 倍比稀释, 用纯化的重组 E 蛋白 ELISA 检测和 DEN2 抗原 IFA 检测其抗体效价。

1.2.9 空斑减数中和实验——抗体的生物学活性测定 DEN 微量空斑试验按本室建立的方法^[9]进行。①首先确定 1~4 型 DEN 病毒的空斑形成单位 (PFU)。②空斑减数中和实验: 将初步纯化后的杂交瘤腹水以 1:5、1:10、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1 280 稀释。病毒按空斑实验结果稀释到 50~100 pfu /0.2 mL。不同稀释度免疫腹水 (SP2/O 腹水作正常对照) 与固定病毒等量混合, 37℃水浴 1 h; 然后接种于培养 24 h 的 C6/36 细胞单层 (24 孔细胞培养板), 每孔 0.2 mL; 每个稀释度接种 2 孔。空斑中和滴度以产生 50% 空斑抑制的抗体最高稀释度的倒数为终点。

2 结果

2.1 DEN-E 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

用 DEN2 重组 E 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 取抗体滴度高的一只 BALB/c 小鼠的免疫脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞用 500 g/L PEG 融合后接种了 11 块 96 孔细胞培养板, 融合率 85%。用 E 蛋白间接 ELISA 法进行反复筛选, 最后获得了 5 株分泌特异性 E 蛋白 McAbs 的杂交瘤细胞株, 分别命名为

3G3、4E3、6G11、6G12、9D9。各细胞株经体外连续培养 3 个月, 经 ELISA 证实抗体分泌能力稳定。

2.2 单克隆抗体杂交瘤细胞株的鉴定

(1) 杂交瘤细胞染色体分析 5 株杂交瘤细胞 3G3、4E3、6G11、6G12、9D9 的染色体平均数目分别为 94.52 ± 5.35 、 89.34 ± 3.23 、 92.51 ± 4.65 、 87.5 ± 5.22 、 90.78 ± 6.47 。正常小鼠脾细胞的染色体平均数目为 40, SP2/O 小鼠骨髓瘤细胞染色体的平均数目为 60。此 5 株细胞的染色体数目接近两亲本细胞的染色体之和, 故证实均为融合后的杂交瘤细胞。(2) 抗体的特异性测定 ①ELISA 法测定用纯化的 E 蛋白 (1 μg /孔)、4 型 DEN 病毒和 JEV 病毒的 C6/36 细胞培养病变上清、正常 C6/36 细胞培养上清包被 ELISA 反应板, 再分别与 5 株杂交瘤细胞的培养上清及在 BALB/c 小鼠体内形成的免疫腹水 (初步纯化, 10⁻³ 稀释) 作间接的 ELISA 反应。其结果表明所获得的 McAbs 与 E 蛋白及 DEN 病毒具有较高的亲和力, 与 JEV 反应较弱, 与正常细胞反应阴性 (表 1)。② IFA 法: 将 5 株 E 蛋白杂交瘤细胞上清及初步纯化的免疫腹水 (1:10~1:2 560 稀释) 分别与 4 型 DEN 病毒、JEV 病毒感染 C6/36 细胞抗原片作 IFA 试验, 用正常 C6/36 细胞抗原片作正常对照。比较它们的反应结果, 发现所获得的单克隆抗体能与 DEN 病毒起阳性反应, 不能与正常的 C6/36 细胞反应, 与 JEV 反应较弱 (表 2)。

表 1 5 株杂交瘤细胞免疫腹水与 E 蛋白、4 型 DEN 及 JEV 的 ELISA 反应

Table 1 ELISA results of McAbs reacted with different DEN and JEV strains

Ag types	3G3	4E3	9D9	6G11	6G12	PBS	SP2/O ascites	DEN2 ascites
E-protein	1.043	0.698	0.736	0.823	0.548	0.013	0.130	1.029
DEN1	0.470	0.278	0.454	0.452	0.235	0.020	0.132	0.641
DEN2	0.712	0.405	0.281	0.592	0.273	0.028	0.128	0.976
DEN3	0.413	0.227	0.320	0.419	0.317	0.016	0.119	0.747
DEN4	0.757	0.279	0.342	0.602	0.213	0.030	0.119	0.877
JEV	0.432	0.210	0.276	0.312	0.186	0.018	0.121	0.610
C6/36cell	0.156	0.129	0.117	0.175	0.145	0.017	0.094	0.231

Ag coated: purified envelope protein 1 μg /well ; DEN and JEV 1:100 dilutions; McAbs (purified ascites) were diluted 1:1 000 in PBS

2.3 杂交瘤细胞免疫腹水单抗效价

免疫腹水用 PBS 倍比稀释。ELISA 法以 A=490 nm P/N 值 ≥ 2 的最高抗体稀释度为其效价;

IFA 法以能出现阳性荧光反应的最高抗体稀释度为其效价。用纯化 E 蛋白抗原 ELISA 检测结果: 3G3 为 1:640, 4E3 为 1:320, 6G11 为 1:640, 6G12

表 2 5 株单克隆抗体与 4 型 DEN 及 JEV 的 IFA 反应

Table 2 IFA results of McAbs reacted with different DEN and JEV strains

Virus / McAb	3G3	4E3	9D9	6G11	6G12	SP2/0 ascites
DEN 1	+	±	+	+	±	-
DEN 2	+++	+	+	+++	±	-
DEN 3	++	±	±	++	+	-
DEN 4	+++	±	-	+++	+	-
JEV	+	-	+	+	-	-
C6/36 cell	-	-	-	-	-	-

Note: “+” positive ; “+++” strong positive ; “-” negative

为 1:640, 9D9 为 1:640。用 DEN2 抗原 IFA 检测结果 3G3 为 1:1 280, 4E3 为 1:160, 6G11 为 1:1 280, 6G12 为 1:160, 9D9 为 1:160。

2.4 Western blot

以纯化的重组 E 蛋白作为抗原按常规方法进行电转印后, 将转印的 NC 膜裁成适当大小的小条, 然后分别与 5 株初步纯化的单抗腹水进行 Western blot 反应。结果 3G3, 4E3, 6G11 在相对分子质量 $M_r=(66\sim69)\times 10^3$ 处出现阳性带, 而 6G12 和 9D9 未出现阳性结果 (图 1)。

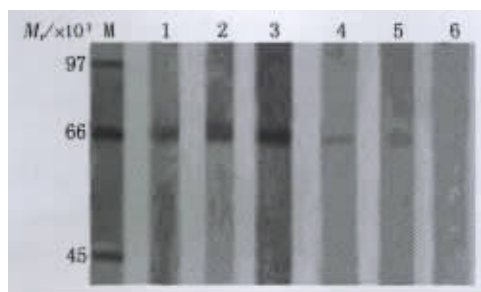


图 1 重组 E 蛋白单克隆抗体的免疫印迹

Fig.1 Western blot analyses of the recombinant E protein McAbs

M: Protein molecular weight markers 1,2: 3G3; 3: 6G11; 4: 4E3; 5: 6G12; 6: 9D9

表 3 各株 McAb 对 1-4 型 DEN 病毒的中和效价

Table 3 PRNT titers of McAbs reacted to different DEN strains

McAb/Virus Type	DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4
3G3	320	640	160	160
4E3	20	80	40	20
6G11	160	320	160	320
9D9	40	40	80	20

2.5 抗体的生物学活性功能测定

1~4 型 DEN 病毒的空斑形成单位 (pfu / mL)

分别为 25×10^{-3} , 32.5×10^{-6} , 60×10^{-4} , 17.5×10^{-5} 。4 株单抗腹水对 1-4 型 DEN 病毒的中和效价 (表 3)。

3 讨论

E 蛋白特异的单克隆抗体是研究 E 蛋白的结构和功能及进行 E 蛋白抗原表位定位研究的重要工具。目前, 国内已经成功制备了登革病毒 1~4 型特异性单克隆抗体^[6], 在登革病毒诊断和鉴别分型中发挥了非常重要的作用。但特异性针对登革病毒 E 蛋白的单克隆抗体国内未见有报道, 目前国内使用的 E 蛋白特异性 McAb 一般从国外进口。用传统方法从登革病毒颗粒中直接提取 E 蛋白及制备 E 单抗, 困难较多。用基因工程重组 E 蛋白作抗原, 制备登革病毒 E 蛋白特异性的单克隆抗体, 可以省去从病毒颗粒中提取 E 蛋白的复杂过程, 同时也不受 DEN 的其他蛋白质的干扰, 能够确保是针对 E 蛋白特异性的单克隆抗体。

用重组蛋白作为抗原制备单抗首先要保证动物免疫要成功: 本研究根据预实验结果选择了长程多次加强免疫, 能确保 E 蛋白特异性抗体的产生。在筛选阳性克隆时, 先用纯化的 E 蛋白用间接 ELISA 方法, 结果筛选到阳性孔有 15 个, 考虑到重组 E 蛋白与天然 DEN E 蛋白可能存在差异, 而且所用蛋白只是初步纯化, 因此在重组 E 蛋白筛选后, 又用 4 型登革病毒细胞培养上清液混合抗原进行 ELISA 筛选, 结果只发现 8 个阳性孔, 均包含在 15 个重组 E 蛋白阳性孔内, 此 8 孔再用 IFA (DEN 感染细胞抗原) 检测也显示为阳性。从实验结果可以看出, 5 株 McAbs 与重组 E 蛋白和 DEN 病毒有较强的反应性。IFA 证实得到的

McAbs 能与 DEN 病毒结合, 不能与正常细胞结合, 与 JEV 结合较弱; Western blot 分析其中 3 株 6G3, 6G11, 4E3)McAbs 能与重组 E 蛋白结合。空斑减数中和实验表明获得的单克隆抗体具有中和登革病毒感染的作用。以上结果表明我们成功地制备了 DEN 的 E 蛋白特异性单克隆抗体, 而且此抗体具有保护作用。本研究研制的登革病毒 E 蛋白特异性单克隆抗体为深入研究登革病毒 E 蛋白的结构与功能和登革病毒诊断试剂盒的研制, 以及蚊媒昆虫的检测技术的开发提供了基础。

参考文献:

[1] Kurane I, Takasaki T. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large [J]. *J Rev Med Virol*, 2001, 11(5): 301-11.

[2] Thullier P, Demangel C, Bedouelle H, *et al.* Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 8): 1885-92.

[3] 魏惠永, 江丽芳, 薛耀华, 等. 登革 2 型病毒 E 蛋白在酵母中的分泌表达[J]. *中国病毒学*, 2002, 17 (3): 198-202.

[4] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 23-31.

[5] 江振友, 江丽芳, 郭辉玉, 等. 登革病毒速成甲基纤维素半微量空斑试验的建立 [J]. *蚌埠医学院学报*, 1997, 22 (4): 55-6.

[6] 郭辉玉, 刘乐和, 罗瑞仙, 等. 抗登革病毒 I ~ IV 型特异性单克隆抗体的研制[J]. *中山医科大学学报*, 1996, 16 增刊: 6-9.

(编辑 张敏瑞)



(上接第 50 页 from page 50)

素受体及胰岛素受体后的信号传导, 发现胰岛素受体丝氨酸磷酸化增加而酪氨酸磷酸化下降是 PCOS 外周组织 IR 的主要特征。此外, 近年来的研究发现, 胰岛素增敏剂 Troglitazone 的应用可降低 TNF α 对脂肪细胞胰岛素信号通路的抑制作用^[9], 有效恢复 PCOS 者的排卵功能^[10], 提示 TNF α 可能与 PCOS 者 IR 有关。我们通过对不同浓度 TNF α 刺激的体外培养的人脂肪细胞进行研究, 结果表明, TNF α 可降低脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖摄取和 IRS-1 的酪氨酸磷酸化, 并存在一定的量效关系。因此, 我们在细胞水平的病因学探讨提示 TNF α 可能通过抑制 IRS-1 的酪氨酸磷酸化, 阻碍了胰岛素信号在体外培养的人脂肪细胞的受体后传导, 降低了脂肪细胞对胰岛素的敏感性, 诱发 IR, 这是否与 PCOS 发生 IR 的机制有关, 尚须进一步深入研究。

参考文献:

[1] Goodarzi MO, Korenman SG. The importance of insulin resistance in polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(2):255-8.

[2] 王竹晨, 刘建中, 李燕, 等. 人前脂肪细胞的原代培养[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(6):443-6.

[3] Ranganathan S, Davidson MB. Effect of tumor necrosis factor-alpha on basal and insulin-stimulated glucose transport in cultured muscle and fat cells [J]. *Metabolism*, 1996, 45(9):1089-94.

[4] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance[J]. *Science*, 1996, 271(5249):665-8.

[5] Gonzalez F, Thusu K, Abdel-Rahman E, *et al.* Elevated serum levels of Tumor Necrosis Factor Alpha in normal weight with polycystic ovary syndrome[J]. *Metabolism*, 1999, 48(4):437-41.

[6] Sayin NC, Gucer F, Balkanli-Kaplan P, *et al.* Elevated serum TNF-alpha levels in normal-weight women with polycystic ovaries or the polycystic ovary syndrome[J]. *J Reprod Med*, 2003, 48(3):165-70.

[7] Dunaif A, Xia J, Book CB, *et al.* Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(2):801-10.

[8] Li M, Youngren JF, Dunaif A, *et al.* Decreased insulin receptor (IR) autophosphorylation in fibroblasts from patients with PCOS: effects of serine kinase inhibitors and IR activators[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(9):4088-93.

[9] Miles PD, Romeo OM, Higo K, *et al.* TNF-alpha-induced insulin resistance *in vivo* and its prevention by troglitazone[J]. *Diabetes*, 1997, 46(11):1678-83.

[10] Baillargeon JP, Iuorno MJ, Nestler JE. Insulin sensitizers for polycystic ovary syndrome[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2003, 46(2):325-40.

(编辑 张恩健)