

生物传感器对抗戊型肝炎病毒单克隆抗体部分特性的研究

顾颖, 张军, 李少伟, 葛胜祥, 何志强, 朱子恒, 鲜阳凌, 李益民, 夏宁邵*

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

关键词: 生物传感器; 戊型肝炎病毒; ORF2; 单克隆抗体

中图分类号: R392.11

文献标识码: B

摘要: 目的 应用生物传感器对新制备的抗戊型肝炎病毒单克隆抗体(mAb)的亲合力、Ig亚类(型)及抗原结合的动力学进行研究。方法 用HEV ORF2区基因工程重组蛋白NE2, 免疫BALB/c小鼠, 经杂交瘤技术制备mAb, 采用ELISA、Western blot和生物传感器鉴定其有关特性。结果获得12株可稳定分泌抗NE2 mAb的杂交瘤细胞系。用ELISA及生物传感器等鉴定各株mAb, 分别为IgM和IgG1、IgG2a, 轻链均为 κ 型。其中在用ELISA法对mAb 3F5亚类鉴定过程中, 发现其与HRP-GAM IgG2a和HRP-GAM IgM均有反应, 生物传感器鉴定其为IgM。Western blot验证各株mAb的特异性, 同时各株mAb对于不同聚合形式的NE2蛋白的反应性有一定的差别。应用生物传感器测定了4株mAb的 K_D 值, mAb 8C11为 4.36×10^{-7} , mAb 8H3为 1.53×10^{-5} , mAb 13D8为 1.21×10^{-6} , mAb 16D7为 8.03×10^{-7} 。从生物传感器测得的各株mAb与NE2的结合、解离过程中发现, mAb 8H3与NE2可快速结合、快速解离, 其它3株mAb结合稳定。结论 经多种方法鉴定, 所获得的12株杂交瘤细胞分泌的抗体, 为抗HEV ORF2区段的特异性抗体。

Characterization of the anti-HEV ORF2 monoclonal antibodies by biosensor

GU Ying, ZHANG Jun, LI Shaowei, GE Shengxiang, HE Zhi-qiang, ZHU Zi-heng, XIAN Yangling, LI Yi-ming, XIA Ning-shao

The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Key words: biosensor; hepatitis E virus; ORF2; monoclonal antibody

收稿日期: 2002 - 01 - 28; 修回日期: 2002 - 05 - 13

作者简介: 顾颖(1977-), 女, 辽宁抚顺市人, 硕士。

厦门市思明南路422号, Tel. (0592)2184110

通信作者. Email: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

Abstract: **Aim** To prepare the anti-HEV ORF2 monoclonal antibodies (mAbs), and identify their partial properties by biosensor. **Methods** The BALB/c mice were immunized with purified recombinant protein NE2 of HEV ORF2. Anti-HEV ORF2 mAbs were prepared by hybridoma technique, and the relative properties of the mAbs were identified by ELISA, Western blot and biosensor. **Results** 12 hybridoma cell lines steadily secreting the anti-NE2 mAbs were obtained. Of these mAbs, mAb 3F5 was IgM, and the others were IgG (IgG1, IgG2a or IgG2b), and the isotype of their light chains were kappa (κ). MAb 3F5 cross-reacted to HRP-GAM IgG2a and HRP-GAM IgM in ELISA, but this mAb was proved to be IgM by biosensor. The results of the Western blot showed that 12 mAbs reacted to NE2 protein. Reactivities of mAbs 1F6, 8C10, 10D4, 12G8, 2C9, 8C11, 8H3 and 13D8 to NE2 dimer and polymer were stronger than that to NE2 monomer, while mAbs 3F5, 7E8, 15B2, and 16D7 had the same reactivities to monomer, dimer or polymer of NE2. The K_D of four mAbs (8C11, 8H3, 13D8 and 16D7) were calculated through binding curve of coupled NE2 to varying concentrations of mAbs. And from the curve of the binding and dissociation, we found that the binding of mAb 8H3 to NE2 and dissociation from it were much faster than that of the other three. **Conclusion** Twelve hybridoma cell lines secreting mAbs to recombinant HEV ORF2 protein were obtained and characterized.

戊型肝炎(HE)是一种主要经消化道传播的疾病, 世界各地均有感染的报道, 在发展中国家如中国、印度等国尤为严重^[1]。近年来, 陆续在猪、鼠和鸡等与人类关系密切的动物中, 发现戊型肝炎病毒(HEV)的感染, 使人们对于戊肝的重要性有了新的认识^[2]。HEV基因组含3个开放阅读框(ORF), 其中ORF2编码病毒的主要结构蛋白, 组成病毒的衣壳, 含有可被感染血清抗体识别的主要表位^[3]。Zhang等^[4]用大肠杆菌表达的HEV ORF2区中一段相对分子质量(M_r)为23 000(394~604 aa)的蛋白, 与恢复期患者血清的反应性良好。用该蛋白免疫猴子再用病毒攻击后, 发现与对照组相比较, 可明显减少猴子的排毒, 且不再表现戊肝的症状, 提示该区段中含有保护性抗原表位^[5]。我们在此基础上, 表达了不含融合蛋白的该区段重组蛋白NE2, 并证实其同样具有良好的免疫保护作用^[6,7]。本研究用NE2蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体(mAb), 并利用生物传感器研究了

这些 mAb 的 Ig 亚类、亲和力及动力学过程, 为进一步研究 NE2 的表位分布及特性奠定了基础, 也为这些 mAb 在戊肝的诊断、治疗中的应用提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 HEV ORF2 重组蛋白 NE2 由本实验室表达。BALB/c 小鼠购自厦门大学抗癌中心。Sp2/0 细胞由兰州生物制品研究所惠赠。PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基嘌呤和 DMSO 等为 Sigma 公司的产品。RPMI1640 基础培养基为 Gibco 公司的产品。胎牛血清为 Hyclone 公司的产品。HRP-山羊抗小鼠 (GAM) IgG 由厦门大学抗癌中心惠赠。AP 标记的 GAM(H+L) 酶标二抗为 Protos 公司的产品。HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 及 GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 为 Serotec 公司的产品。GAM -UNLB 和 GAM -UNLB 为 SBA 公司的产品。酶标自动检测仪为 TECAN 公司的产品。IASys plus 生物传感器为 Affinity System 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 抗重组 HEV ORF2 区蛋白 mAb 的制备 动物免疫: 将 PBS 溶解的重组 HEV ORF2 蛋白 NE2 与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化, 按 5 $\mu\text{g}/\text{只}$ 肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠。首次免疫后 15 d 和 29 d, 分别用同样计量的 NE2 加弗氏不完全佐剂进行加强免疫。融合前 3 d, 再经尾静脉注射纯化 NE2 1 次, 5 $\mu\text{g}/\text{只}$ 。细胞融合^[7]、筛选、克隆化及腹水制备, 均按常规方法进行。

1.2.2 mAb 的纯化及纯度鉴定 用硫酸铵盐析及 DEAE 柱层析依次纯化 mAb 腹水^[8]。纯化的 mAb 的鉴定采用 Western blot。即将 HPLC 纯化的 NE2 蛋白不经煮沸处理, 以 120 g/L 的 SDS-PAGE 分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上。经 50 g/L 脱脂奶封闭后, 分别与各株 mAb 起反应 (根据 ELISA 等结果调整各 mAb 的使用浓度)。最后, 加 AP 标记的 GAM(H+L) 酶标二抗并显色。实验中抗 HBV mAb 作为阴性对照^[9]。

1.2.3 mAb 一般特性的鉴定 Ig 亚类及型 采用间接 ELISA 法进行鉴定。鉴定 mAb 的 Ig 亚类时, 所用二抗为 HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。鉴定 mAb 的型时, 所用二抗为 HRP-GAM -UNLB 和 HRP-GAM -UNLB。杂交瘤细胞培养上清及腹水中 mAb 的滴度 采用间接 ELISA 法检测。

1.2.4 亚类不明确 mAb 的进一步鉴定 蛋白 NE2 与生物传感器 (IASys Plus) 羧甲基葡聚糖 (CMD) 预处理的样品池的偶联, 按照产品手册进行操作。即用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化 CMD 表面后, 偶联蛋白样品, 并通过控制蛋白的浓度和反应时间调节蛋白的包被量, 最后用乙醇胺封闭。将亚类不明确的 mAb 用 PBST 稀释后, 与样品池中包被的 NE2 结合, 再分别加入 GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 或 IgG3 与 mAb 结合, 观察其结合曲线。

1.2.5 抗原抗体结合的动力学分析 将每株 mAb 用 PBST 稀释为 5 个以上不同的浓度, 依次分别测定各浓度的 mAb 与偶联于 CMD 样品池上的 NE2 蛋白的结合。通过 FASTfit 软件截取各个浓度结合反应中前 1~2 min 的结合曲线, 来计算各株 mAb 的动力学常数。

2 结果

2.1 抗 NE2 mAb 杂交瘤细胞株的建立 以 NE2 蛋白免疫 BALB/c 小鼠 (5 只) 的脾细胞, 与 Sp2/0 细胞融合 3 次, 融合率依次为 90%、92% 和 95%, 相对应的阳性率分别为 53%、62% 和 61%。用间接 ELISA 法筛选出分泌特异 mAb 的杂交瘤细胞株, 经 4 次克隆化后, 最终获得 12 株细胞株能稳定分泌特异性抗 NE2 蛋白的 mAb, 分别命名为 1F6、2C9、3F5、7E8、8C10、8C11、8H3、10D4、12G8、13D8、15B2 和 16D7。

2.2 mAb IgG 亚类及型的鉴定 用间接 ELISA 法测定表明 12 株 mAb 轻链均为 κ 型; 除 mAb 1F6 为 IgG2b, 2C9 为 IgG2a 外, 6 株 mAb (8C11、8H3、12G8、13D8、15B2 及 16D7) 均为 IgG1。其中 mAb 3F5 与 HRP-GAM IgG2a 和 HRP-GAM IgM 均呈较强的阳性反应, 未能明确定型。为确定 mAb 3F5 的 IgG 类别, 采用生物传感器做了进一步鉴定。即用 NE2 包被 1 # CMD 样品池, 将 mAb 3F5 与结合在 1 # CMD 样品池上的 NE2 蛋白 (包被量为 1011 arc sec, 相当于 5.055 ng/mm²) 反应, 再分别与 GAM IgG2a 和 GAM IgM 反应。结果 mAb 3F5 仅与 GAM IgM 发生明显结合, 而与 GAM IgG2a 未见结合 (图 1), 证明其为 IgM 类抗体。

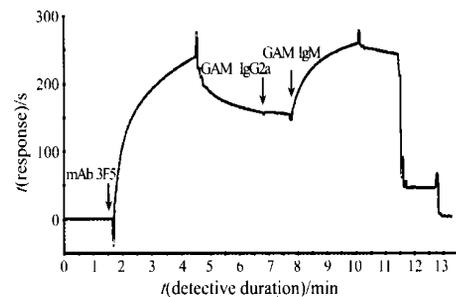


图 1 mAb 3F5 IgG 类别的 IASys Plus 生物传感器鉴定

Fig 1 Identification of Ig class of mAb 3F5 by IASys Plus biosensor

2.3 mAb 的滴度测定 采用间接 ELISA 法, 检测系列稀释的培养上清及腹水中 mAb 的滴度。结果表明, 培养上清中 mAb 的滴度为 $1 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$; 腹水 mAb 的滴度为 $1 \times 10^5 \sim 1.02 \times 10^7$ 。

2.4 mAb 与 NE2 蛋白反应性的检测 采用 Western blot 法, 结果见图 2。各株 mAb 与 NE2 都有较好的特异性反应。由于 NE2 蛋白具有形成聚合体的倾向^[6], 在 SDS-PAGE 上仍可形成二聚体。Western blot 分析表明, 各株 mAb 与 NE2 蛋白单体和聚合体的反应性具有差别: mAb 1F6、2C9、8C10、8C11、8H3、10D4、12G8 和 13D8 与 NE2 蛋白聚体的反应性强于与 NE2 单体的反应性, 尤其是 mAb 1F6、8C10、

10D4 和 12G8, 几乎无法观察到其与单体的反应条带; 相反, mAb 3F5、7E8、15B2 和 16D7 与 NE2 蛋白单体及聚合体的反应性基本相当。

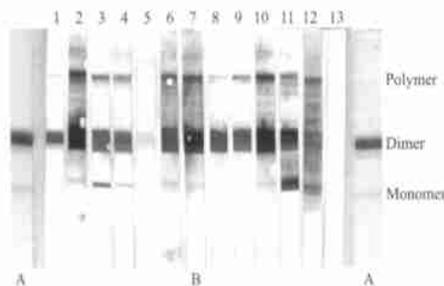


图 2 各 mAb 与 NE2 蛋白单体、多聚体反应性的 Western blot 分析

Fig 2 Analysis of reactivities of mAbs to monomer and polymer of NE2 protein by Western blot

A region: 120 g/L SDS-PAGE of NE2; B region: Western blot of mAbs. 1: mAb 1F6; 2: mAb 2C9; 3: mAb 3F5; 4: mAb 7E8; 5: mAb 8C10; 6: mAb 8C11; 7: mAb 8H3; 8: mAb 10D4; 9: mAb 12G8; 10: mAb 13D8; 11: mAb 15B2; 12: mAb 16D7; 13: Anti-HBV mAb.

2.5 mAb 与 NE2 结合的动力学常数测定 用 NE2 包被 2 # CMD 样品池, 其过程与 1 # 样品池的包被过程相同, 只是控制了 NE2 蛋白的用量和包被时间, 使 NE2 最终的包被量为 209arc sec (相当于 1.045 ng/mm²), 以适于各株 mAb 的动力学分析。我们选择了滴度较高的 mAb 8C11、8H3、13D8 和 16D7 进一步纯化后, 以生物传感器观察其与 NE2 结合的动力学过程。图 3 显示了各株 mAb 典型的结合、解离过程。从图中可见, mAb 8C11、13D8 及 16D7 均未见明显解离, 提示其与抗原结合牢固, 而 mAb 8H3 则可迅速解离。我们以 mAb 8C11 为例, 显示了经 FASTplot 软件分析后, 生物传感器检出的 mAb 在不同浓度时, 与偶联于 CMD 样品池中的 NE2 蛋白结合的动态变化曲线 (图 4)。从所得动态曲线中, 采集反应初始阶段的数据, 经 FASTfit 软件分析计算, 得出各株 mAb 的 K_D 分别为 4.36 × 10⁻⁷ (8C11)、1.53 × 10⁻⁵ (8H3)、1.21 × 10⁻⁶ (13D8) 和 8.03 × 10⁻⁷ (16D7)。其中各偶合曲线的相关系数 (r) 都超过了 99% (表 1)。

表 1 FASTfit 计算出的 mAb 8C11、8H3、13D8 和 16D7 的动力学相关常数

Tab 1 Analysis of the kinetic correlation constant of mAbs 8C11, 8H3, 13D8 and 16D7 by FASTfit software

	8C11	8H3	13D8	16D7
k _{ass}	10916.1	2852.98	8364.41	5210.99
k _{diss}	0.00475656	0.0435215	0.0100895	0.00418202
K _D	4.36 × 10 ⁻⁷	1.53 × 10 ⁻⁵	1.21 × 10 ⁻⁶	8.03 × 10 ⁻⁷
K _A	2.29 × 10 ⁶	6.56 × 10 ⁴	8.29 × 10 ⁵	1.25 × 10 ⁶
r	0.999949	0.99965	0.999993	0.998783

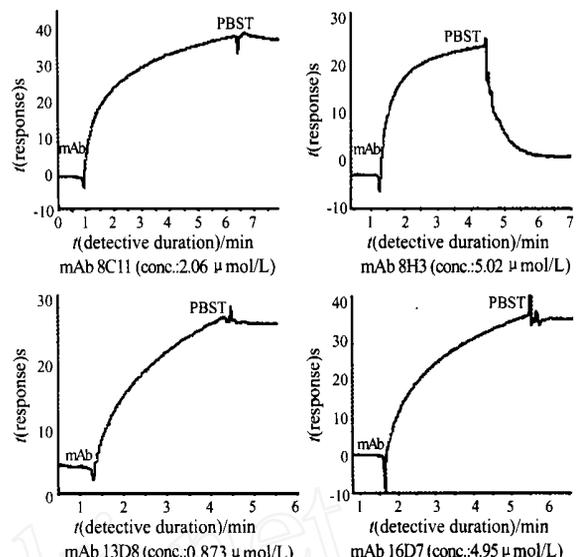


图 3 各株 mAb 的结合与解离反应曲线的生物传感器检测

Fig 3 Detection of binding and dissociation curve of mAbs to NE2 by biosensor

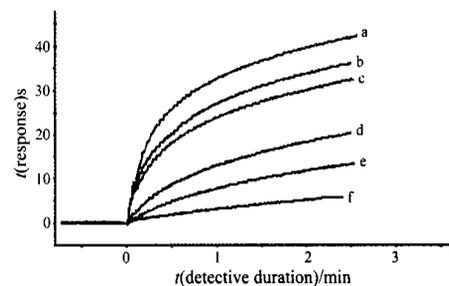


图 4 不同浓度的 mAb 8C11 与结合于 2 # 样品池的 NE2 蛋白的结合曲线

Fig 4 The binding curve of varying concentrations of mAb 8C11 to the immobilized NE2 on the 2 # CMD cuvette (analysis by FASTplot software)

a: 6.18 μmol/L; b: 4.12 μmol/L; c: 2.06 μmol/L; d: 0.515 μmol/L; e: 0.2575 μmol/L; f: 64.375 nmol/L.

3 讨论

本研究采用重组 HEV 的 ORF2 蛋白 NE2 为免疫原, 筛选获得 12 株分泌特异性 mAb 的杂交瘤细胞株。Western blot 鉴定表明, 12 株 mAb 与 NE2 反应的特异性强, 但各株 mAb 与不同聚合形式的 NE2 的反应性差异很大。mAb 1F6、8C10、10D4、12G8、2C9、8C11、8H3 和 13D8 与聚合体 NE2 蛋白的反应性强于与单体的反应性; 其中 mAb 1F6、8C10、10D4 和 12G8, 几乎观察不到与单体的反应带。提示这些 mAb 识别的表位在聚合体 NE2 中才能良好暴露, 而在单体 NE2 蛋白中则否。相反, mAb 3F5、7E8、15B2 和 16D7 对单体 NE2 蛋白的反应性与其聚合体 NE2 蛋白的反应性相当, 说明 NE2 蛋白的聚合与否不会影响这些 mAb 识别的表位的暴露。另外, mAb 16D7 对稍有降解 (M_r 稍小于 NE2)

的 NE2 蛋白也有明显的反应, 说明其识别的表位未被降解。用 mAb 进行 HEV 捕获 PCR 实验证实, mAb 8C11、8H3 和 13D8 具有捕获天然病毒的能力, 提示该 3 株 mAb 可能具有更大的实用价值(另文报道)。另外, 我们对 4 株滴度较高的 mAb 与 NE2 结合的动力学性质, 用生物传感器做了进一步研究, 它们的 K_D 值分别为: 4.36×10^{-7} (8C11)、 1.53×10^{-5} (8H3)、 1.21×10^{-6} (13D8) 和 8.03×10^{-7} (16D7)。从 mAb 与抗原结合的动态曲线上可看出, mAb 8H3 与 NE2 可快速结合、快速解离; 而其它 3 株 mAb 与 NE2 均呈牢固结合状态, 这是常规的分析方法所难以提供的资料。

生物传感器主要用于实时监测生物大分子之间的相互作用。目前, 世界上主要产品为 BIAcore 和 IAsys 两种品牌, 其性能各有千秋。IAsys 系列生物传感器主要利用谐振镜面原理 (resonant mirror (RM) principle)^[10], 以激光为光源, 监测传感平面介质折射率变化所引发的共振角改变。因这种改变与传感片表面结合的生物大分子的量呈正相关, 而溶液中游离的分子不影响共振角的大小。BIAcore 系列生物传感器的原理与 IAsys 系列基本相同, 但其是利用表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 现象来监测传感片表面介质的折射率变化所引发的共振角改变^[11]。两种控制系统都非常特异、灵敏, 可动态观察大分子之间结合与解离的平衡关系, 较为准确地测定分子间相互作用的亲和力。与常规方法相比较, 生物传感器具有实时 (real time)、高效、客观、敏感度高、操作简便等优点, 可广泛用于抗原-抗体相互作用的研究^[12,13], 配体-受体的相互作用的研究, 以及核酸-核酸、核酸-蛋白、细胞、噬菌体, 甚至碳水化合物和脂类分子等相互作用的研究。应用生物传感器研究生物大分子间相互作用的基本的操作流程, 通常都是首先将一种生物大分子结合到传感器的传感片表面, 封闭后用于该大分子与其它相关物质的相互作用, 获得相应的结合曲线, 然后用适当的缓冲系统使样品分子解离, 最后是再生过程。通常包被好的传感片 (样品池) 可多次使用。

在对纯化 mAb 的亲合常数的分析中, 利用生物传感器可获得不同浓度的 mAb 对偶联的 NE2 蛋白的结合曲线, 通过 FASTfit 分析软件对结果进行分析和计算。简言之, 即首先将 IAsys 生物传感器测得的实验曲线全部转换到 FASTfit 软件中, 然后分别设定基线、结合曲线和解离曲线。选取适当时间的结合反应 (反应刚开始的结合速率较快, 所受干扰小, 以此时的反应曲线进行计算结果相对准确; 选取的反应时间过长会加大计算量) 进行动力学常数的计算。在此过程中, FASTfit 软件还可分别提供根据理论获得的与反应曲线相对应的一级反应曲线和二级反应曲线, 根据实验结果与理论曲线的误差分析, 选择合适的反应类型 (一级或二级反应), 最终由软件根据所选择的类型计算出抗原抗体反应的动力学常数。

本研究在用 ELISA 法对 mAb 的 Ig 类别进行鉴定的过

程中, 发现 mAb 3F5 与 HRP-GAM IgG2a 和 HRP-GAM IgM 均有反应。经生物传感器进行进一步鉴定证实, mAb 3F5 仅与 GAM IgM 结合, 最后确定其为 Ig M。ELISA 检测中所出现的 IgG 2a 假阳性有可能与 HRP-GAM IgG 2a 的纯度不足有关。

志谢: 对兰州生物制品研究所周旭老师在 mAb 制备中的指导和帮助; 美国热电集团生命科学部叶敏芝、罗凌在生物传感器测定上的大力帮助, 深表感谢!

参考文献:

- [1] Wang YZ, Li H, Gu Z, et al. Detection of sporadic hepatitis E in China using immunoassays based on recombinant ORF2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4 [J]. *J Clin Micro*, 2001, 39: 4370-4379.
- [2] Meng XJ. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis [J]. *J Hepatol*, 2000, 33: 842-845.
- [3] Li F, Torresi J, Locarnini SA, et al. Amino-terminal epitopes are exposed when full-length open reading frame 2 of hepatitis E virus is expressed in *Escherichia coli*, but carboxy-terminal epitopes are masked [J]. *J Med Virol*, 1997, 52: 289-300.
- [4] Zhang JZ, Ng MH, Xia NS, et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein [J]. *J Med Virol*, 2001, 64: 125-132.
- [5] Im S, Zhang JZ, Zhuang H, et al. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 3726-3732.
- [6] 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18(4): 463-467.
- [7] Adler B and Faine S. A pomana serogroup-specific agglutinating antigen in *Leptospira*, identified by monoclonal antibodies [J]. *Pathology*, 1983, 15: 247-250.
- [8] Harlow E and Lane D. Monoclonal Antibodies[M]. In: Harlow E and Lane D editors. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 298-300.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟风, 张德政, 等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 888-898.
- [10] Damien H. Use of Optical Biosensors for the study of mechanically concerted surface adsorption processes [J]. *Anal Biochem*, 2001, 288: 109-125.
- [11] 蔡强, 李翔, 陈裕泉. 基于表面等离子共振的生物传感器的历史、现状与前景 [J]. *国外医学生物学工程分册*, 1999, 22(2): 65-71.
- [12] 刘雪松, 金伯泉, 朱勇. 用生物传感器测定重组人肿瘤坏死因子-单克隆抗体的亲和力及抗原识别表位 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20(3): 240-243.
- [13] 朱勇, 金伯泉, 刘雪松. 用生物传感器测定重组人 2a 干扰素单克隆抗体的亲和力及抗原识别表位 [J]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16(6): 322-328.