

• 基础实验研究 •

感染性阴道疾病 3 种病原体单克隆抗体的制备*

马东礼, 王红梅[△], 马 岚

(广东省深圳市儿童医院检验科 518026)

摘要:目的 研发感染性阴道疾病(细菌性阴道炎、滴虫性阴道炎和霉菌性阴道炎)的特异性单克隆抗体。方法 分析感染性阴道疾病病原体的基因谱,扩增特异蛋白的基因序列,基因工程重组抗原 AP33,免疫 Balb/c 小鼠,运用杂交瘤技术得到特异性单克隆抗体;采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)进行抗血清效价测定及抗体的亚类及轻链型鉴定;采用 BCA 法、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分析纯品抗体的蛋白浓度、纯度和相对分子质量。结果 杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体纯度均达到了 90% 以上,抗体浓度 2.41~5.68 mg/mL,抗体效价在 $1:10^5 \sim 1:10^7$ 之间;抗体类别均为 IgG₁, κ 型。结论 本研究获得了 3 种感染性阴道疾病纯度高、特异性强的单克隆抗体,将为药理学、诊断学及相关学科提供研究材料,具有广阔的市场前景和巨大的经济效益。

关键词:单克隆抗体; 加德纳菌; 滴虫性阴道炎; 霉菌性阴道炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-1964-03

Preparation of monoclonal antibodies specific for three pathogens of infectious vaginosis*

Ma Dongli, Wang Hongmei[△], Ma Lan

(Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Shenzhen, Shenzhen Guangdong 518026, China)

Abstract: Objective To develop monoclonal antibodies specific for infectious vaginosis (bacterial vaginosis, trichomonas vaginalis and fungal vaginitis). **Methods** The genes of pathogens in infectious vaginosis were analyzed and gene sequences, encoding specific proteins, were amplified to construct recombinant antigen AP33. Then Aalb/c mice were immunized by AP33 and specific monoclonal antibodies were prepared by hybridoma technology. The tilter, subtype and the light chain of acquired antibodies were analyzed by indirect enzyme linked immunosorbent assay, and the concentration, purity and molecular weight of purified antibodies were analyzed by bicinchoninic acid (BCA) method and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **Results** The purity of monoclonal antibody, produced by hybridoma cell line, reached 90%, with concentration of 2.41-5.68 mg/mL and titers of $1:10^5 - 1:10^7$. Produced antibody was IgG1 and with light chain of κ -type. **Conclusion** Monoclonal antibodies, specific for infectious vaginosis, were successfully produced, with high purity and specificity, could be used for pharmacology, diagnostics and related scientific researches, and showed tremendous marketing potential in future.

Key words: monoclonal antibody; gardnerella vaginitis; trichomonas vaginitis; fungal vaginitis

感染性阴道疾病包括细菌性(加德纳菌)阴道炎(bacterial vaginosis, BV)、滴虫性阴道炎(trichomonas vaginalis, TV)和霉菌性阴道炎(fungal vaginitis, FV),是育龄期妇女最常见的阴道感染性疾病^[1-2]。长期以来由于得不到高纯度、高亲和力的单克隆抗体,临床鲜有针对上述病原体的免疫诊断试剂和相关免疫学研究^[3-5]。本项目通过基因工程重组抗原 AP33 免疫 Balb/c 小鼠,再采用杂交瘤技术制备单克隆抗体,用亲和层析、酶联免疫吸附试验(ELISA)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳等技术对单克隆抗体进行纯化、性能评价,获得满意效果,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 白色念珠菌标准菌株 ATCC60193,由中国微生物菌种保藏管理委员会医学真菌中心提供;加德纳菌标准株 29106,由中国药品生物制品检定所提供;NS-1 骨髓瘤细胞株、Balb/c 鼠,源自北京实验动物中心;牛血清清蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自上海生工;DMEM 高糖培养基、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、HAT、HT 均为 Gibco 产品;聚乙二醇为 Fluka 公司产品;山羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体为 Pierce 产品;山羊抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM、IgA 以及 κ 、 λ 轻链型的 HRP 标记抗体均为晶美生物公司产品;SDS-PAGE 蛋白 Marker 14~97 $\times 10^3$ 购自 Pharma-

cia; BCA 法蛋白浓度确定试剂盒购自 Pierce 公司; rProteinA 亲和层析柱(5 mL)购于 GE;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器 采用 CO₂ 细胞培养箱(Forma Scientific);生物安全柜(Heal Force);倒置显微镜(Nikon);液氮罐(CMR-3500, Forma);超低温冰箱(Forma);高压灭菌锅(ASA040, As-tell Scientific);酶标仪 720A(TECAN);可见光-紫外分光光度计 DU640(Beckman);冷冻高速离心机(Beckman);蛋白纯化系统(AKTA) Explore100(GE);Milli-Q 超纯水(Millipore);PAGE 电泳(Pharmacia)。

1.3 方法

1.3.1 Balb/c 鼠免疫及检测 加德纳菌 ATCC29106 株在血琼脂培养基增菌培养 48 h 后,用 0.01 mol pH7.4 PBS 刮洗菌落,3% 甲醛处理 1 h,洗涤后制成 2×10^9 /mL 菌悬液免疫 3 只雌性、6~8 周龄 Balb/c 鼠,每只 0.2 mL 腹腔注射。每间隔 10 d 免疫一次,共免疫 3 次^[6-8]。

白色念珠菌标准菌株 ATCC60193 在使用前经重新培养、分离、鉴定后转种于沙氏固体培养基,置于 4℃ 冷藏备用;再经沙氏固体、液体培养基各培养 1 d 后的白色念珠菌采用 GSB 培养基 25℃ 振荡培养,即得静止相白色念珠菌孢子;用菌浓度为 2×10^5 /mL 活的静止相孢子免疫 3 只雌性、6~8 周龄 Balb/c 鼠,每只 0.2 mL 腹腔注射。每间隔 10 d 免疫一次,共免疫 3 次。

* 基金项目:广东省深圳市科技计划资助项目(200902111)。 △ 通讯作者, E-mail: niaomei@126.com。

阴道毛滴虫免疫采用 0.5 mmol/L IPTG 37 °C 诱导构建的重组 pET32a-ap33-BL21(DE3) 表达, 诱导产物超声破碎离心后, 用 Ni-NTA 树脂亲和层析法纯化收集表达的目的蛋白; 用纯化的重组 AP33 蛋白皮下多点注射免疫 3 只雌性、6~8 周龄 Balb/c 鼠, 首次为福氏完全佐剂乳化的重组 AP33 蛋白(抗原含量 100 μg), 15 d 后用福氏不完全佐剂乳化的重组 AP33 蛋白(抗原含量 50 μg), 30 d 后用 50 μg 重组 AP33 蛋白不加佐剂腹腔注射。

上述 3 种病原菌, 在第 3 次免疫结束的第 7 天, 自鼠尾取少量血液, 分离血清, 采用 ELISA 分析血清中抗体的滴度以及抗体与病原菌的反应性。

1.3.2 单克隆抗体细胞株的建立 在细胞融合前 3 d, 分别用加德纳菌液、白色念珠菌静止相孢子、阴道毛滴虫重组 AP33 融合蛋白免疫 Balb/c 鼠脾脏, 以加强免疫。融合时, 将分离的脾细胞与培养至对数期的 NS-1 骨髓瘤细胞按 1:5 的比例, 在终浓度为 3% 的聚乙二醇作用下进行细胞融合; 杂交瘤融合细胞经 HAT、HT 筛选培养基进行筛选培养, 采用间接法 ELISA 分析细胞培养上清液中的抗体特异性, 并采用有限稀释法对筛选的阳性细胞株进行单克隆化培养、筛选和检测。

1.3.3 间接法 ELISA 测定抗体效价^[9] 以加德纳菌液、白色念珠菌液、阴道毛滴虫重组 AP33 融合蛋白包被酶标板, 采用常规的间接法 ELISA 测定免疫血清及阳性杂交瘤细胞株的抗体效价。

1.3.4 抗体的亚类及轻链型鉴定^[10-11] 分别以加德纳菌液、白色念珠菌液、阴道毛滴虫重组 AP33 融合蛋白包被酶标检测板, BSA 封闭包被板, 间接法 ELISA 检测对应单抗细胞株的培养上清, 酶标记二抗为山羊抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM、IgA 以及 κ、λ 轻链型的 HRP 标记抗体。

1.3.5 腹腔积液制备、纯化和鉴定^[12-14] 采用体内诱生法制备腹腔积液, 于 Balb/c 鼠接种杂交瘤细胞前 10 d, 先以石蜡油刺激 Balb/c 鼠, 接种细胞(1.0×10⁶~1.5×10⁶/鼠)7~10 d 后抽取腹腔积液, 并以间接法 ELISA 测定腹腔积液效价。同时采用 Protein A 一步法纯化杂交瘤细胞的腹腔积液抗体, 将腹腔积液用结合缓冲液做倍比稀释、过滤后直接上柱, 再用洗脱液洗脱, 收集抗体峰, 抗体溶液于磷酸盐缓冲液 4 °C 透析过夜, 加 0.1% NaN₃, 分装, -20 °C 保存。采用 BCA 法、SDS-PAGE 法分析纯品抗体的蛋白浓度、纯度和相对分子质量。

2 结果

2.1 加德纳菌杂交瘤细胞株的制备及其单抗的鉴定 对免疫鼠进行鼠尾取血, 采用间接 ELISA 进行检测, 其抗血清效价在 1:10⁵~1:10⁶ 左右(同理得到高效白色念珠菌液、阴道毛滴虫抗体), 可以用于细胞融合, 结果见表 1。

表 1 免疫鼠尾采血经间接 ELISA 检测结果(mg/mL)

抗体稀释比	1号免疫小鼠	2号免疫小鼠	3号免疫小鼠
1:10 ¹	2.534	2.469	2.207
1:10 ²	1.365	1.476	1.426
1:10 ³	1.192	1.255	1.232
1:10 ⁴	0.483	0.541	0.532
1:10 ⁵	0.134	0.122	0.217
1:10 ⁶	0.077	0.068	0.088
1:10 ⁷	0.068	0.059	0.066
1:10 ⁸	0.064	0.057	0.069

上述免疫鼠经采用杂交瘤细胞融合和筛选技术, 细胞培养和 ELISA 测定, 测得细胞的融合率为 91.6%, 选取 4 株强阳性细胞进行保存。经两次单克隆有限稀释, 共获得 8 株阳性杂交瘤细胞, 采用腹腔积液法制备对应单克隆抗体, 亲和柱纯化

抗体, 其结果见图 1、2。

BCA 法测定 8 株抗体浓度, 经过软件分析, 所得到的抗体纯度均达到了 95% 以上。经间接 ELISA 测定其抗体效价都在 1:10⁶~1:10⁷ 之间; 抗体浓度在 2.41~5.13 mg/mL 之间; 抗体亚类都为 IgG₁、轻链型都为 κ 型; 经 Protein A 一步法纯化后的抗体纯度在 95% 以上, 其相对分子质量在 (150~160)×10³, 其中 5D2a 抗体的纯化示意图以及抗体纯度分析, 见图 3、4。

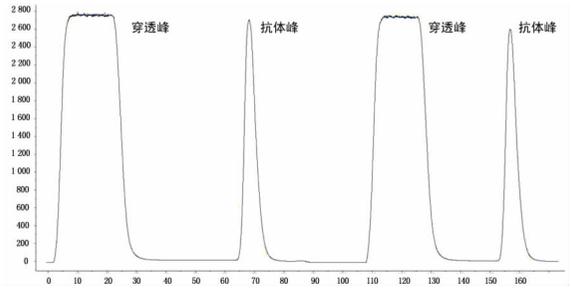


图 1 加德纳菌单抗 2A2a 纯化色谱图

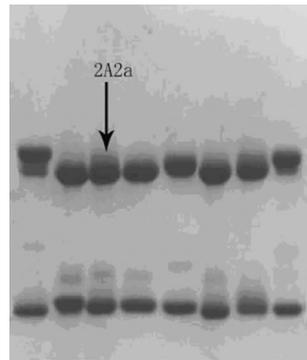


图 2 加德纳菌单克隆抗体 SDS-PAGE 电泳图

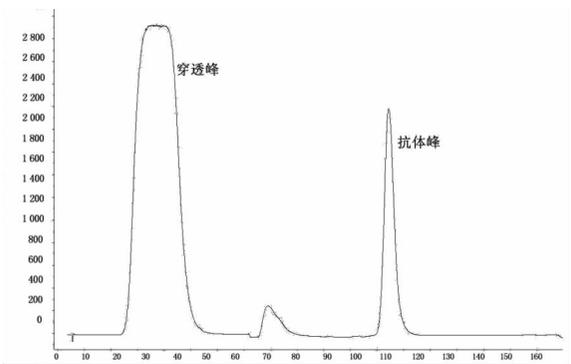


图 3 白色念珠菌单抗 5D2a 的纯化色谱图

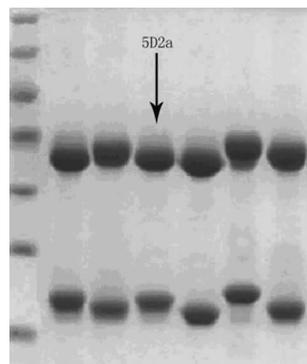


图 4 白色念珠菌 5D2a 抗体 SDS-PAGE 分析

2.2 白色念珠菌杂交瘤细胞株的制备及其单抗的鉴定 经 ELISA 测定, 3 只 Balb/c 免疫鼠的血清抗体滴度都在 $1:10^4 \sim 1:10^5$ 间, 表明免疫效果比较好。3 只免疫鼠分两次进行细胞融合, 融合细胞经筛选培养、有限稀释法单克隆化筛选培养后, 共获得 6 株能稳定分泌抗体、且与白色念珠菌有特异反应的阳性细胞株。获得的 6 株细胞所分泌的抗体经间接法 ELISA 分析, 抗体浓度在 3.12~5.68 mg/mL 之间; 抗体亚类都为 IgG₁、轻链型都为 κ 型。阳性细胞株进行腹腔积液制备和抗体纯化, 抗体的效价都在 $1:10^5 \sim 1:10^6$ 范围内; 经 Protein A 一步法纯化后的抗体纯度在 93% 以上, 其相对分子质量在 $(170 \sim 190) \times 10^3$, 其中 5D2a 抗体的纯化示意图以及抗体纯度分析, 见图 3、4。

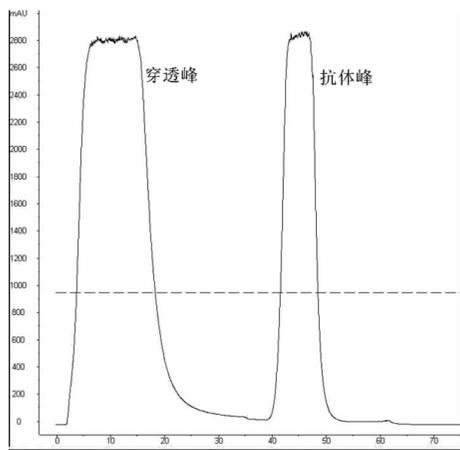


图 5 阴道毛滴虫 9A3a 抗体的纯化色谱图

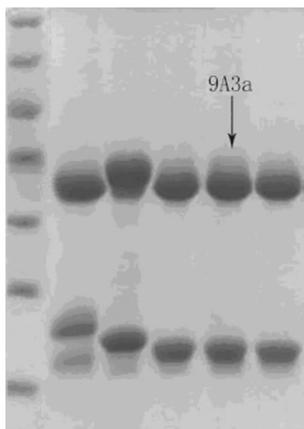


图 6 阴道毛滴虫 9A3a 抗体 SDS-PAGE 分析

2.3 阴道毛滴虫杂交瘤细胞株的制备及其单抗的鉴定 经 ELISA 测定, 3 只 Balb/c 免疫鼠的血清抗体滴度都在 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 间, 表明免疫效果比较好。3 只免疫鼠分两次进行细胞融合, 融合细胞经筛选培养、有限稀释法单克隆化筛选培养后, 共

获得 5 株能稳定分泌抗体、且与阴道毛滴虫有特异反应的阳性细胞株。获得的 5 株细胞所分泌的抗体经间接法 ELISA 分析, 其抗体效价都在 $1:10^6 \sim 1:10^7$ 之间; 抗体浓度在 2.86~5.23 mg/mL 之间; 抗体亚类都为 IgG₁、轻链型都为 κ 型。经 Protein A 一步法纯化后的抗体纯度在 90% 以上, 其相对分子质量在 $(160 \sim 180) \times 10^3$, 其中 9A3a 抗体的纯化以及抗体纯度分析, 见图 5、6。

3 结 论

本研究利用重组抗原、杂交瘤技术, 获得了效价高 ($1:10^5 \sim 1:10^7$)、特异性好的加德纳菌、白色念珠菌、阴道毛滴虫杂交瘤细胞株, 批量制备并纯化了加德纳菌、白色念珠菌、阴道毛滴虫单克隆抗体, 其纯度均在 90% 以上, 抗体浓度 2.41~5.68 mg/mL, 抗体亚类都为 IgG₁、轻链型都为 κ 型, 为感染性阴道病的诊断及研究奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Ledger WJ. Historical review of the treatment of bacterial vaginosis[J]. Am J Obstet Gynecol, 1993, 169(2): 474-478.
- [2] 王冬, 王振红, 邸慧明, 等. 胎儿纤维连接蛋白与细菌性阴道病和绒毛膜羊膜炎关系的研究[J]. 中华妇产科杂志, 1999, 34(7): 399-400.
- [3] 黄敏, 许成芳, 彭其才, 等. BV Blue 检测快速诊断细菌性阴道病[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(5S): 59-60.
- [4] 王琦. 三种方法联合检测对阴道炎的诊断意义分析[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(24): 4334.
- [5] 林怀宪, 薛辰, 王颖, 等. 女性阴道混合感染 246 例临床分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2010, 11(3): 173-175.
- [6] 黄湘, 潘华政, 王穗海, 等. 抗 PSM A7 单克隆抗体的制备和初步鉴定[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(2): 180-183.
- [7] 熊友华, 高爱中, 任东明, 等. 罗丹明 B 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(4): 328-341.
- [8] 苏兆亮, 王胜军, 周成林, 等. 人 HMGB1 B box 蛋白的表达、鉴定及其单克隆抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(1): 68-70.
- [9] Chaim W, Mazor M, Leiberman JR. The relationship between bacterial vaginosis and preterm birth. A review[J]. Arch Gynecol Obstet, 1997, 259(2): 51-58.
- [10] 黄莺, 倪爱民, 陈勋, 等. 缺失 PRD 的人 FOXP3 单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(6): 566-568.
- [11] 郝志勇, 曹伟, 马驰, 等. 维抗 RAET1G2 单克隆抗体的研制和初步鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(9): 821-823.
- [12] 马杰, 赵玉新, 广慧, 等. 凝胶色谱法测定比阿培南聚合物的含量[J]. 制剂与技术, 2010, 17(8): 116-117.
- [13] 田桂英. 凝胶色谱分析法在测定 β 内酰胺类抗生素高分子聚合物中的应用[J]. 天津药学, 2010, 22(3): 65-67.
- [14] 胡振华, 陈永井, 王勤, 等. 一株鼠抗人 PD21 功能性单克隆抗体的研制及其生物学特性的鉴定[J]. 现代免疫学, 2010, 30(1): 24-28.

(收稿日期: 2011-06-08)

(上接第 1963 页)

- [6] 张金花, 肖邦, 毛黎, 等. HBV 血清学标志物与 HBV DNA 定量检测的相关性及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(3): 292-294.
- [7] Muhlbacher A, Weber B, Burgisser P, et al. Multicenter study of a new fully automated HBsAg screening assay with enhanced sensitivity for the detection of HBV mutants[J]. Med Microbiol Immunol, 2008, 197(1): 55-64.
- [8] Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and the role of the genetic variability of the S gene

- [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(1): 25-90.
- [9] 马文, 王平平, 吉增军. 3 135 例长期饮酒者血清 γ -谷氨酰转肽酶、甘油三酯、总胆固醇测定结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(1): 87-88.
- [10] 夏志刚. 健康体检人群脂肪肝与血脂、血糖及肥胖的相关性分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(11): 1737-1738.

(收稿日期: 2011-05-20)