



# 小鼠抗食蟹猴 IgG 单克隆抗体的制备

张段玲, 张彦龙, 白素英

(东北林业大学, 哈尔滨 150040)

**【摘要】** 目的 制备抗食蟹猴、恒河猴等非人灵长类实验动物免疫球蛋白二级抗体, 开展对其传染病血清学快速诊断方法的建立。方法 采用饱和硫酸铵盐析、Agarose-Protein G 亲和层析技术, 从食蟹猴血清中提纯 IgG。经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 采用常规法免疫 C57BL/6 小鼠, 三次免疫后取脾细胞与 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞通过 PEG4000 融合制备杂交瘤细胞, 利用间接 ELISA、Western blot 等方法进行筛选、鉴定。结果 得到 5 株阳性杂交瘤, 分别命名为 2B<sub>6</sub>、2B<sub>7</sub>、2D<sub>9</sub>、3B<sub>2</sub>、5E<sub>4</sub>, 并且 5 株杂交瘤分泌的抗体均与恒河猴的 IgG 或血清发生交叉反应, 而与其他物种如东北虎、犬等动物的 IgG 或血清无交叉反应。结论 5 株杂交瘤产生的单克隆抗体 (McAb) 具有较好免疫活性, 且能长期、稳定地分泌抗体。此项研究作为后续研究食蟹猴、恒河猴传染病血清学诊断方法奠定基础。

**【关键词】** 食蟹猴; IgG; 单克隆抗体; 亲和层析

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0068-04

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.05.015

## Preparation Monoclonal Antibodies Of Mice Against *Macaca fascicularis* IgG

ZHANG Duan-ling, ZHANG Yan-long, BAI Su-ying

(Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**【Abstract】 Objective** In order to prepare immunoglobulin G (IgG) secondary antibody of non-human primates such as *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta* and establish a quick serological method to diagnose their diseases. **Methods** *Macaca fascicularis* IgG was isolated and purified from *Macaca fascicularis* serum by precipitated use saturated ammonium sulfate and affinity chromatography technology with Agarose-Protein G. After identified by SDS-PAGE electrophoresis murine monoclonal antibody (McAb) were produced by conventional immune method and hybridoma technology. Monoclonal antibody was produced when C57BL/6 mice was immunized three times and its spleen cells were fused with SP2/0-Ag14 myeloma cells. Indirect ELISA and Western blot methods were used for identification. **Result** 5 strains of myeloma cells acquired which were named 2B<sub>6</sub>, 2B<sub>7</sub>, 3B<sub>2</sub>, 5E<sub>4</sub>, 2D<sub>9</sub>. The antibodies they secret can all react well with both IgG and their serum of *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*. There are no cross reaction with other species such as east-northern tigers and dogs. **Conclusion** The 5 strains of monoclonal antibodies can secrete antibody chronically and steadily. The study can be valuable in establishing a quick serological method in diagnosing the infectious disease.

**【Key words】** *Macaca fascicularis*; IgG; Affinity chromatography; Monoclonal antibody

[基金项目] 国家林业局疫源疫病监测项目《我国境内不同种属猴免疫球蛋白同源性分析及其单克隆抗体的制备》。

[作者简介] 张段玲(1988-), 女, 硕士, 研究方向: 动物传染病。

[通讯作者] 张彦龙(1968-), E-mail: zhangynlg@yahoo.com.cn。

食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 属于灵长目 (primates) 猴科 (Cercopithecidae) 猕猴属。现阶段我国养殖的实验猴主要是猕猴属的食蟹猴和恒河猴, 其中食蟹猴为外来种, 两者均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约 (CITES)》附录 II 中<sup>[1]</sup>。猕猴属动物亲缘关系上和人类比较接近, 与人类遗传物质有 75% ~ 98.5% 的同源性, 是研究人类疾病的理想动物模型, 被广泛的应用于传染病、遗传性疾病、心血管疾病、内分泌疾病、药理学和毒理学等研究领域<sup>[2-4]</sup>。但是食蟹猴及其他非人类灵长类患病种类繁多, 如 B 病毒、猴痘、猴结核、猴副流感、麻疹病毒病、肝炎病毒病等<sup>[5-8]</sup>。因此需要建立相应的诊断方法, 以便对所用实验猴进行彻底的检查, 排除疾病个体。目前我国虽然已建立一些诊断方法, 但仍没有一个完善的方法满足实验猴疾病的排查和筛选, 血清学方法是诊断疾病的有效手段之一, 制备免疫球蛋白二级抗体是开展血清学诊断研究工作的前提。

本文针对食蟹猴 IgG 制备其单克隆抗体, 并鉴定此抗体与恒河猴免疫球蛋白抗原相关性, 为以后开展非人灵长类动物疾病血清学诊断及诊断试剂盒的研制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 食蟹猴血清、细胞及实验动物

食蟹猴血清由东北林业大学野生动植物检测中心白素英老师惠赠 [SCXK (琼) 2004-0001]。SP2/0 骨髓瘤细胞, 本实验室保存。C57BL/6 小鼠, 购自哈尔滨医科大学肿瘤防治研究所 [SCXK (黑) 2005-2007]。

### 1.2 试剂

鉴定 McAb 的亚型诊断试剂盒为 SBA Clonotyping™ System /HRP, SouthernBiotech, Cat. No. 5300-05; RPMI-1640 培养基, GIBCO, Cat. No. 3180022; HAT Media Supplement (50 ×) Hybri-Max™, Sigma, Cat. No. H0262; HT Media Supplement (50 ×) Hybri-Max™ Sigma, Cat. No. H0137; Anti-Mouse IgG, Sigma, Cat. No. A4416; Freund's complete adjuvant (FCA) Sigma, Cat. No. F5881; O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD), Sigma, Cat. No. P9187。

### 1.3 IgG 制备及纯度鉴定

采用饱和硫酸铵盐析和 Agarose-Protein G 亲和

层析分离纯化, 按文献<sup>[9]</sup>的方法, 取 10 mL 食蟹猴血清和 40 mL 冷的 50 mmol/L PBS (pH7.2) 缓冲液, 在冰上加入硫酸铵粉末, 边加边搅拌, 最终浓度在 22%, 离心去除沉淀, 上清液继续加入硫酸铵粉末终浓度 55%, 在 4 °C 下放置 4 h, 离心回收沉淀, 并溶解在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中, 透析在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中, 中间三次换液并过夜透析。次日回收透析液, 离心除去不溶物。上清液加入硫酸铵粉末至终浓度 33%, 在 4 °C 下搅拌并静止 4 h, 离心收集沉淀, 透析于 20 mmol/L 磷酸盐中, 换液 3 次并过夜, 回收透析液, 并 12000 rpm 离心 10 min, 去掉不溶性蛋白备用。层析法是将 Agarose-PreoteinG 在超纯水中膨胀 30 ~ 60 min 后装柱, 经 5 ~ 10 倍体积的 20 mmol/L 磷酸盐平衡后, 上柱、洗脱, 并收集洗脱液定量。用 SDS-PAGE 对提纯的 IgG 纯度进行鉴定, 纯化后的 IgG - 80 °C 保存。

### 1.4 小鼠免疫及细胞融合

取 6 ~ 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠, 初次免疫为 FCA 乳化抗原, 皮下多点注射, 抗原用量为 250 ug/只, 间隔 2 周, 进行 FIA 加强免疫 1 次, 第 3 次用纯化的 IgG 腹腔直接免疫, 4 d 后取脾脏, 分离细胞, 骨髓瘤细胞  $1 \times 10^7$  个/mL 与已免疫的小鼠脾细胞  $1 \times 10^8$  个/mL 混合, 用 50% 的 PEG4000/RMPI-1640 进行融合制备杂交瘤。

### 1.5 杂交瘤细胞的筛选

按常规间接 ELISA 方法, 融合 10 d 后, 以 100 ng/孔纯化后的食蟹猴 IgG 作检测抗原包被 ELISA 板, 3% BSA 封闭 1 h, 取融合细胞上清液进行检测, 并以 SP2/0 培养上清和免疫小鼠血清分别做阴阳性对照, 加二抗, 显色, ELISA 读数, 判定标准为 P/N > 2.1 为阳性。采用有限稀释法对所选择阳性杂交瘤细胞进行连续 3 次克隆, 3 次克隆化后结果均为阳性者, 判断为能稳定分泌抗食蟹猴 IgG 抗体的杂交瘤细胞株。扩大培养并分批冻存杂交瘤细胞。

### 1.6 单克隆抗体 (McAb) 的免疫原性检测

McAb 的免疫原性通过 Western blot 检测, 取纯化后及粗提的食蟹猴 IgG 进行 SDS-PAGE; 通过半干转移法转移到 PVDF 膜上, 3% BSA 37 °C 封闭 1 h; 在摇床上用 PBST 洗膜 5 次, 然后分别与杂交瘤 2B<sub>6</sub>、2B<sub>7</sub>、2D<sub>9</sub>、3B<sub>2</sub>、5E<sub>4</sub> 上清 37 °C 作用 1 h, 清洗; 再与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 37 °C 作用 1 h, 清洗; ECL-Kit 显色后, 立即暗室曝光、洗相。

**1.7 McAb 腹水制备及效价的测定**

按照常规方法,选 8~10 周龄 C57BL/6 小鼠腹腔每只注射 0.5 mL 液体石蜡。7 d 后,以  $1 \times 10^6$  个杂交瘤细胞/mL,0.5 mL 每只小鼠,腹腔注射。一般 7~10 d 左右,便可以采集腹水。取得腹水后,腹水经离心、硫酸铵沉淀、Protein G-Agarose 亲和层析纯化得到纯度较高的单克隆抗体。然后通过间接 ELISA 方法进行效价测定,100ng/孔包被食蟹猴 IgG,方法同杂交瘤细胞的筛选。

**1.8 McAb 特异性鉴定**

通过间接 ELISA,以犬血清、貉血清、东北虎血清、恒河猴血清各 50 uL/孔以及纯化后的 IgG 各 100 ng/孔作为抗原包被酶标板,以杂交瘤培养上清为一抗,方法同杂交瘤细胞的筛选。同时以纯化后的犬、貉、东北虎、猕猴免疫球蛋白,通过 SDS-PAGE 电泳与 Western blot 鉴定 MAb 的特异性,方法同 McAb 的免疫原性检测。

**1.9 McAb 亚型鉴定**

单克隆抗体的亚型的鉴定,参照 SBA Clonotyping™ System/HRP 说明书所描述方法进行操作。

**2 结果**

**2.1 SDS-PAGE 鉴定 IgG**

经饱和硫酸铵沉淀得粗提食蟹猴 IgG 和经 Protein G-Agarose 亲和层析后食蟹猴 IgG 通过 SDS-PAGE 电泳后,结果如图 1 所示,重链的分子量约  $55 \times 10^3$ ,轻链约  $28 \times 10^3$ ,符合哺乳动物的 IgG 的分子量。

**2.2 McAb 免疫活性检测**

采用 Western blot 法检测 5 株单克隆抗体与粗提、纯化后的食蟹猴 IgG 的结合活性,结果表明

2B<sub>6</sub>、5E<sub>4</sub>、2B<sub>7</sub>、2D<sub>9</sub>、3B<sub>2</sub>均与重链反应,5 株杂交瘤均具有良好的免疫活性。

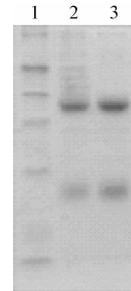


图 1 SDS-PAGE IgG 鉴定

Fig. 1 SDS-PAGE identify the IgG

注:1. 标准蛋白 marker; 2. 饱和硫酸铵粗提食蟹猴 IgG; 3. Protein G-Agarose 亲和层析食蟹猴 IgG

Note: Lane1. Standard protein marker; Lane2. The Macaca fascicularis IgG of saturated ammonium sulfate Coarsely extract; Lane3. Protein G-Agarose purify IgG;

**2.3 McAb 腹水效价**

小鼠腹水经纯化后,2D<sub>9</sub>、3B<sub>2</sub>的腹水效价分别为 1:25600,1:51200。2B<sub>7</sub>、5E<sub>4</sub>、2B<sub>6</sub>的 ELISA 效价为 1:12800,杂交瘤细胞经多次传代冻存复苏,诱生腹水抗体分泌特性稳定。

**2.4 McAb 特异性鉴定**

McAb 与纯化后的食蟹猴、恒河猴 IgG,食蟹猴血清、恒河猴血清均反应,而与东北虎、犬的血清及其 IgG 均不反应。说明食蟹猴与恒河猴 IgG 具有相同的抗原表位,如表 1 可见。

**2.5 McAb 亚型鉴定**

用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒测定杂交瘤细胞培养上清中单克隆抗体的亚型,结果表明 5E<sub>4</sub>、2B<sub>6</sub>、2B<sub>7</sub>为 IgG2b 型,3B<sub>2</sub>为 IgG3 型,2D<sub>9</sub>为 IgG1 型。2B<sub>7</sub>、2B<sub>6</sub>、5E<sub>4</sub>、2D<sub>9</sub>轻链均为 κ 型,3B<sub>2</sub>为 λ 型。

表 1 ELISA 鉴定结果

Tab.1 Result of ELISA evaluation

单克隆抗体 McAb	食蟹猴 IgG Macaca fascicularis IgG	食蟹猴血清 Macaca fascicularis serum	恒河猴 IgG Macaca mulatta IgG	恒河猴血清 Macaca mulatta serum	东北虎 IgG Siberian tiger IgG	东北虎血清 Siberian tiger serum	犬 IgG Canine IgG	犬血清 Canine serum
2D <sub>9</sub>	>3	0.307	>3	0.386	0.047	0.018	0.073	0.018
3B <sub>2</sub>	>3	0.484	>3	0.463	0.098	0.076	0.054	0.076
2B <sub>7</sub>	>3	0.482	>3	0.590	0.012	0.058	0.061	0.049
2B <sub>6</sub>	>3	0.552	>3	0.451	0.087	0.097	0.033	0.098
5E <sub>4</sub>	1.703	0.209	1.658	0.295	0.096	0.086	0.075	0.075
Sp2/0 上清	0.043	0.041	0.074	0.055	0.049	0.063	0.039	0.066

### 3 讨论

据 2009 年统计,我国实验猴的存栏量 21 万只,其中恒河猴近 3 万只,食蟹猴 18 万余只<sup>[11]</sup>。食蟹猴、恒河猴因与人类有很近的亲源关系,遗传基因相似,广泛应用于人类医学研究,是重要的动物实验模型,但是由于携带多种疾病,因此需要加强非人灵长类的疾病检测,保证实验顺利开展至关重要。

为此,从食蟹猴血清中,通过饱和硫酸铵沉淀和亲和层析技术,由 SDS-PAGE 检测结果表明所得到的食蟹猴 IgG 纯度较高。虽然粗提条带相对于亲和层析有少量杂带,但其纯度仍相当客观,所以在需要制备大量粗提抗体时,加入固体饱和硫酸铵沉淀法从仪器设备、温度、价格、活性、纯度等方面考虑,有很大优势,值得推广使用。而亲和层析法相对于其他提纯方法价格虽比较昂贵,但其可以在简单的试验条件里,快速得到所需高纯度样品。二者联合运用,即经济,效果也客观,在制备各种动物免疫球蛋白二级抗体方面,可优先考虑。

本研究利用细胞融合技术,成功制备了 5 株能稳定分泌抗食蟹猴 IgG 的杂交瘤细胞。从单克隆特异性鉴定结果表明,每孔均包被 100 ng 纯化后的 IgG,这 5 株杂交瘤所分泌单克隆抗体均与食蟹猴、恒河猴纯化后的 IgG、血清反应,差别是血清反应性较纯化的 IgG 弱些,有可能跟血清中 IgG 相对浓度比纯化后的浓度低有关。食蟹猴、恒河猴两个物种的反应强度相似,说明食蟹猴、恒河猴 IgG 具有较高的共同抗原表位。这可能与它们亲缘关系较近有

关。单克隆抗体为以后研究这两种实验动物疾病血清学诊断、人 IgG 特性比对,提供了基础。

#### 参考文献:

- [1] 曾峰波,宋慧刚. 中国实验猴养殖业现状及发展对策初探[J]. 野生动物杂志,2007,28(3):58-59.
- [2] 方喜业. 医学实验动物学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:153-155.
- [3] Martin Ebeling, Erich Küng, Angela See, et al. Genome-based analysis of the nonhuman primate *Macaca fascicularis* as a model for drug safety assessment[J]. *Genome Research*,2011,21:1746-1756.
- [4] Robert B Norgren. Creation of non-human primate neurogenetic disease models by gene targeting and nuclear transfer[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*,2004,2:40.
- [5] 李晓波,贺争鸣. 猴 B 病毒检测技术研究与应用进展[J]. 实验动物科学,2007,24(4):59-62.
- [6] 张正,岳志红. 猴痘病毒研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(8):511-514
- [7] Murray E. Fowler DVM, R. Eric Miller DVM. *Zoo and Wild Animal Medicine (fifth edition)* [M]. St. Louis: Saunders, 2003:334-397.
- [8] 夏咸柱,高宏伟,华育平,等. 野生动物疫病学(第一版)[M]. 北京:高等教育出版社,2011:585-608.
- [9] 张彦龙,张洁,谭婷婷,等. 兰狐和银黑狐免疫球蛋白的提纯与鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2008,30(12):981-983.
- [10] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 EF,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1995:880-885.
- [11] 刘欢,白素英,李晓平,等. 实验猕猴和食蟹猴规模化饲养管理[J]. 野生动物,2010,31(1):3-5.

[修回日期]2012-03-23