

抗 MATSA 单克隆抗体的制备与鉴定

王业荣,李立,刘文明,童德文

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**制备抗鸡马立克氏病肿瘤相关表面抗原(Marek's disease tumor-associated surface antigen, MATSA)的单克隆抗体(Monoclonal antibodies, McAb),为马立克氏病的相关研究及研制以 MATSA 单克隆抗体为载体的抗肿瘤药物提供材料。**【方法】**用纯化的 MATSA 免疫 Balb/c 小鼠,取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞株,并对其染色体进行分析。将阳性杂交瘤细胞株接种 Balb/c 小鼠,制备 McAb 腹水,采用硫酸铵盐析法粗提 McAb,并鉴定其所属亚类。**【结果】**获得了 3 株能稳定分泌 MATSA McAb 的杂交瘤细胞株 B3、H6 和 D6,其培养上清液抗体效价为 $2^6 \sim 2^7$, Balb/c 小鼠接种细胞制得的腹水效价为 $2^{10} \sim 2^{11}$ 。染色体分析结果显示,3 株杂交瘤细胞染色体数目均为 52 ± 2 对。3 株杂交瘤细胞株所分泌的 McAb 均为 IgG 2b 亚类,可与 MSB1 细胞反应。**【结论】**获得了 MATSA 的 McAb。

【关键词】 马立克氏病肿瘤相关表面抗原;单克隆抗体;杂交瘤细胞株

【中图分类号】 S859.8

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)06-0025-04

Preparation and identification of monoclonal antibodies against MATSA

WANG Ye-rong, LI Li, LIU Wen-ming, TONG De-wen

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shannxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research was to obtain monoclonal antibodies against Marek's disease tumor-associated surface antigen(MATSA) to provide material for further studies on anti-tumor drugs of Marek's disease. **【Method】** Balb/c mice were immunized with purified MATSA. The spleen cells of mice were isolated and fused with SP2/0 cells. Then the positive masculine hybridoma cells were screened by indirect ELISA and its Karyotype was analysed. Finally, Balb/c mice were injected positive Hybridoma cells and the monoclonal antibody in the ascites was purified by ammonium sulfate salting-out and identified for its subtypes. **【Result】** Three hybridoma cell strains named B3, H6, D6 were obtained, and they could secrete monoclonal antibody (McAb) against MATSA steadily. McAb titers were $2^6 - 2^7$ in culture media and $2^{10} - 2^{11}$ in ascites. The isotyping analysis showed that these McAb all belonged to IgG 2b, and all reacted to MSB1 cell. Chromosome analysis showed that chromosome hybridoma cells numbered 52 ± 2 . **【Conclusion】** McAb against MATSA was obtained.

Key words: MATSA; monoclonal antibody; hybridoma cell strain

马立克氏病(Marek's disease, MD)是鸡的一种淋巴组织增生性疾病,由鸡马立克病病毒(Marek's disease virus, MDV)引起,以外周神经、虹膜、皮肤、

肌肉和各种内脏器官发生淋巴样细胞浸润、增生和形成肿瘤为特征。MD 常引起鸡的早期死亡和后期的肿瘤,同时感染鸡产生严重的免疫抑制,对其他疾

* [收稿日期] 2008-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371067);西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目(11241)

[作者简介] 王业荣(1975—),女,河南光山人,在读硕士,主要从事动物病理学研究。

[通信作者] 童德文(1967—),男,安徽太湖人,教授,博士生导师,主要从事动物病理学与毒理学研究。

E-mail:tdw4114@nwsuaf.edu.cn

病的易感性升高,是严重危害养禽业的重要传染病之一^[1]。疫苗免疫是控制 MD 发生的最重要手段,但近年来,世界上越来越多的超强毒株(vvMDV),特别是超超强毒株(vv+MDV)的出现,使得传统疫苗(如 HVT 疫苗)已经不能很好地预防 MDV 感染^[2]。Rispiens 等^[3]制备了 CVI988/Rispiens 疫苗,对 vv+MDV 野毒的免疫力十分可靠,但由于其安全性在各国评价不同,许多国家在此基础上又研制了新型疫苗,如 CVI988/C/R6、R2/23 等,这些疫苗在我国尚未推广。随着分子生物学技术的发展及对 MDV 基因组结构与功能研究的深入,MDV 基因工程疫苗的研发取得了一定进展,目前的研究主要集中在重组亚单位疫苗、基因缺失苗、基因疫苗和重组活病毒载体疫苗上,尚没有能广泛应用于生产中的可有效预防 MDV 感染的疫苗^[4]。

马立克氏病肿瘤相关表面抗原(Marek's disease tumor-associated surface antigen, MATSA)是 MD 肿瘤细胞和 MD 成淋巴细胞系表面存在的特异性抗原,其可刺激机体产生对 MD 免疫非常重要的抗肿瘤免疫应答^[5],并可用于 MD 的鉴别诊断^[6]。目前,关于 MATSA 单克隆抗体的研究,国外 Lee 等^[7]报道了 1 种,即 RPH-6; Ikuta 等^[8]报道了 2 种,即 MT1 和 MT4; Liu 等^[9]报道了 4 种,即 A35、B94、EB29 和 C152;国内研究较少,崔治中等^[10]报道了 1 种,即 14B367。上述单克隆抗体均是用 MD 成淋巴细胞系——MSB1 细胞免疫动物获得的^[11],其与 MSB1 细胞的反应性和兔抗 MATSA 血清与 MSB1 细胞的反应性相同,但均未见广泛应用。本研究用从 MSB1 细胞中纯化得到的 MATSA 免疫 Balb/c 小鼠,制备抗 MATSA 的单克隆抗体(McAb),并对 McAb 进行鉴定,以期对 MD 的诊断和治疗提供理论依据和试验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,25 只,购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 细胞及试剂 SP2/0 细胞系,购自第四军医大学;MSB1 细胞系、MATSA 和兔抗 MATSA 血清,由西北农林科技大学动物医学院动物病理学课题组提供;HAT(50×)、HT(100×)、弗氏完全佐剂(Freund complete adjuvant, FCA)和弗氏不完全佐剂(Freund incomplete adjuvant, FIA),均购自 Sigma 公司;羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-FITC、聚乙

二醇(PEG 4000)、邻苯二胺(OPD),购自北京鼎国生物技术有限公司;DMEM 培养基、马血清,购自 Gibco 公司;其他试剂均为国产分析纯级。

1.2 小鼠脾细胞悬液的制备

取 Balb/c 小鼠 10 只,随机均分为试验组和对照组。取纯化的 MATSA,用 PBS 配制成 1 mg/mL 的溶液,再与等量 FCA 充分混匀腹腔注射试验组小鼠,剂量为 0.2 mL/只,对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水。14 d 后,2 组小鼠腹腔注射相同剂量的 MATSA 抗原(佐剂为 FIA),以后每隔 14 d 注射相同剂量的抗原 1 次,佐剂均为 FIA,共免疫 6 次。每次免疫后第 3 天,小鼠尾静脉采血,ELISA 检测抗体效价,血清抗体效价达 2^{10} 后加强免疫 1 次,3 d 后取 Balb/c 小鼠脾脏制备脾细胞悬液备用。

1.3 细胞融合及杂交瘤细胞的制备

将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按数目比 5:1 融合。融合细胞接种 HAT 培养基,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,7 d 后改用 HT 培养基培养^[12]。用 20 μg/L 的 MATSA 包被聚苯乙烯微板,以对照组小鼠血清为阴性对照,兔抗 MATSA 血清为阳性对照,采用间接 ELISA 法检测杂交瘤细胞培养上清液 MATSA McAb 效价,筛选阳性杂交瘤细胞。选取阳性孔中 OD₄₉₀ 值高、生长状态好的细胞,用有限稀释法进行克隆化培养,直至克隆生长孔阳性率达 100%。将获得的杂交瘤细胞用液氮冻存,备用。

1.4 杂交瘤细胞的核型分析

用秋水仙素法^[13]显示筛选出的杂交瘤细胞有丝分裂中期的染色体,分析杂交瘤细胞的染色体数目。

1.5 MATSA McAb 的制备、纯化及效价测定

取 15 只 Balb/c 小鼠,腹腔注射液体石蜡 0.5 mL/只,1 周后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只,7 d 后收集腹水,用饱和硫酸铵盐析法^[14]粗提 McAb, -20℃ 保存。将腹水作梯度稀释后,采用间接 ELISA 法测定 McAb 的效价。

1.6 MATSA McAb 亚类的鉴定

按照鼠源 McAb 亚类鉴定试剂盒说明鉴定 McAb IgG 亚类。

1.7 MSB1 间接免疫荧光染色试验

参考文献[15]的方法,将 MSB1 细胞悬液(5×10^5 mL⁻¹)置 10 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 3 min,弃去培养液,细胞用 10 mL PBS 洗 2 次,每次 3 min;用 2 mL 体积分数 2% 的多聚甲醛重悬细

胞,置冰上固定 30 min;离心(条件同上),弃去固定液,用 PBS 洗细胞(方法同上)。用稀释好的 MATSA McAb(1 mg/mL)200 μ L 重悬细胞,4 $^{\circ}$ C 作用 1 h;离心(条件同上),弃去上清液,用 PBS 洗细胞(方法同上);将细胞重悬于 200 μ L 稀释好的羊抗兔 IgG-FITC(0.1 mg/mL)中,4 $^{\circ}$ C 作用 1 h,再用 PBS 洗细胞(方法同上);用少量 PBS 重悬细胞,将细胞悬液滴于载玻片上,加上盖玻片,立即在荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 小鼠的免疫

用 MATSA 蛋白免疫 Balb/c 小鼠 5 只,在第 6 次免疫后的第 3 天,尾静脉采血检测抗体效价。结果显示,免疫的 5 只小鼠抗体效价均达 2^{10} 以上,其中有 2 只小鼠抗体效价分别达 2^{12} 和 2^{13} ,说明小鼠免疫效果较好,可进行下一步试验。

2.2 杂交瘤细胞株的建立

结果表明,细胞融合效果较好,融合率达 30.2%,经间接 ELISA 法筛选,阳性率为 19.0%。有限稀释法筛选到 3 株能稳定分泌抗 MATSA McAb 的细胞株,分别命名为 B3、D6 和 H6。将 3

株杂交瘤细胞置液氮中冻存,3 个月后复苏培养,杂交瘤细胞生长良好,其培养上清液效价与冻存前相近,证明所获杂交瘤细胞株经液氮冻存后,仍具有稳定分泌 McAb 的能力。

2.3 MATSA McAb 效价的检测

以 MATSA 为抗原,经间接 ELISA 方法,检测 3 株杂交瘤细胞 B3、D6 和 H6 培养上清液及其诱生的小鼠腹水中 McAb 的效价分别为 2^6 , 2^6 和 2^{10} ,符合单克隆抗体制备的要求。

2.4 杂交瘤细胞的核型分析

用秋水仙素阻抑法,对 B3、D4 和 H6 细胞株的核型进行分析,观察 3 株共 20 个细胞的中期分裂相,其染色体的数量为 52 ± 2 对(图 1),Balb/c 小鼠脾细胞和 SP2/0 的染色体数目分别为 20 对和 36 对,结果表明,小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合成功。

2.5 MATSA McAb 的亚类鉴定

测定结果显示,B3、D6 和 H6 所分泌的 MATSA McAb 均为 IgG 2b 亚类。

2.6 MSB1 间接免疫荧光染色试验

MSB1 细胞间接免疫荧光染色试验结果显示,MSB1 细胞表面荧光亮度较强(图 3),表明所制备的 McAb 可与 MSB1 细胞表面抗原反应。

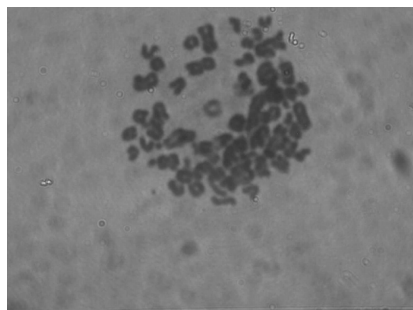


图 1 小鼠脾细胞与 SP 2/0 细胞杂交瘤细胞的染色体(100 $\times$)

Fig. 1 Chromosome of hybridoma cell fusion by spleen cells of mice and SP2/0 cells (100 $\times$)

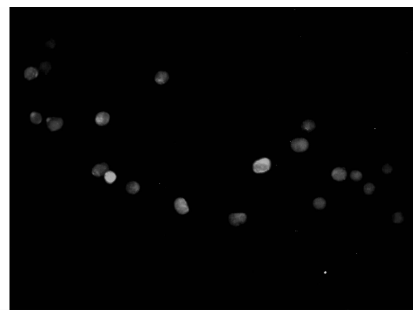


图 2 MSB1 细胞间接免疫荧光试验结果(400 $\times$)

Fig. 2 Immunofluorescence assay of MSB1 cells (400 $\times$)

3 讨论

MD 是世界上第一种用疫苗预防成功的病毒性肿瘤病,对该病的研究不仅有助于促进养禽业的发展,而且可为探索病毒致病机制、预防和控制人类和动物肿瘤性疾病提供参考。目前,MD 研究的热点和关键是,MDV 引起的 T 淋巴细胞潜伏感染及其转化为肿瘤的分子生物学机制。MD 肿瘤细胞系的建立,为 MDV 致肿瘤研究提供了有效手段,许多已经建系的 MD 成淋巴细胞表面均携带 MATSA 和 T 细胞表面分子,其中 MATSA 是细胞转化的标

志。有学者利用 MATSA 研究 MDV 感染后,鸡体内 MATSA 阳性细胞出现的组织器官、时间、数量和转移^[16-17]等,为 MD 肿瘤发生和诊断研究提供了依据。此外,用 MATSA 制备的抗独特型抗体,在诱导鸡抗肿瘤免疫的初步应用中显示出巨大的潜力,其虽然不能抵抗 MDV 的感染,但可以使 86.6% 的鸡不发生马立克氏病^[18]。本研究制备的 MATSA McAb,不仅可用于 MD 的诊断,而且可用于其防治的相关研究。

本研究所使用的抗原 MATSA 为可溶性的蛋白,直接免疫 Balb/c 小鼠,抗原很容易被降解,不能

获得相应的抗体。因此,本研究将 MATSA 蛋白与完全、不完全弗氏佐剂乳化后,小剂量多次免疫小鼠,该法有利于增强免疫效果,为 McAb 的制备打下了良好基础。成功筛选高质量的杂交瘤细胞,需要建立可靠的筛选体系和鉴定方法,准确测定细胞培养上清液的效价,鉴定 McAb 并确定其特异性。本研采用间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞,同时用染色体分析和 MSB1 细胞免疫荧光染色试验进行鉴定,获得了 3 株(B3、4D6 和 H6)能够稳定分泌 MATSA 抗体的杂交瘤细胞株,为 MD 的防治研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 韦 平,崔治中,龙进学,等. 马立克氏病病毒 MEQ 蛋白单克隆抗体的制备及应用研究 [J]. 广西大学学报:自然科学版, 2002,27(1):5-9.
Wei P, Cui Z Z, Long J X, et al. The development of monoclonal antibody(McAb) against MEQ protein of Marek's disease virus(MDV) and its applications [J]. Journal of Guangxi University, 2002, 27(1): 5-9. (in Chinese)
- [2] 郑梅竹,潘风光,邹亚学,等. 马立克氏病病毒 L-meq 基因的原核表达及多克隆抗体的制备 [J]. 中国兽医学报, 2007, 11(27):777-778.
Zhen M Z, Pan F G, Zou Y X, et al. Expression and preparation of polyclonal antibody of L-meq gene of Marek's disease virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2007, 11(27): 777-778. (in Chinese)
- [3] Rispens B H, van Vloten H, Mastenbroek N, et al. Control of Marek's disease in the Netherlands I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials [J]. Avian Disease, 1972, 16:108-125.
- [4] 彭大新,刘秀梵. 马立克氏病基因工程疫苗研究现状及发展趋势 [J]. 中国家禽, 2001, 23(24):1-4.
Peng D X, Liu X F. Research status and development trend of the genetic engineering vaccine of Marek's disease [J]. China Poultry, 2001, 23(24): 1-4. (in Chinese)
- [5] 韩文瑜,雷连成,梁焕春,等. 提纯的马立克氏病肿瘤相关表面抗原在鸡体内的免疫应答 [J]. 中国兽医科技, 1995, 25(11):8-9.
Han W Y, Lei L C, Liang H C, et al. The immune response of pure Marek's disease tumor-associated surface antigen in chicken [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1995, 25(11): 8-9. (in Chinese)
- [6] 穆 杨,王玉东,张严明,等. 马立克氏病肿瘤相关抗原间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36(7):538-542.
Mu Y, Wang Y D, Zhang Y M, et al. Development of an indirect ELISA for the detection of MATSA [J]. Veterinary Science in China, 2006, 36(7): 538-542. (in Chinese)
- [7] Lee L F, Liu X, Sharma J M, et al. A monoclonal antibody reactive with Marek's disease tumor-associated surface antigen [J]. The Journal of Immunology, 1983, 130(2):1007-1011.
- [8] Ikuta K, Ueda S, Kato S, et al. Isolation of monoclonal antibodies reactive with Marek's disease tumor-associated surface antigen (MATSA) [J]. Biken Journal, 1984, 27(4):183-188.
- [9] Liu X F, Lee L F. Development and characterization of monoclonal antibodies to Marek's disease tumor-associated surface antigen [J]. Infect and Immunity, 1983, 41:851-854.
- [10] 崔治中, Lee L F. 用单克隆抗体识别一种与马立克氏病肿瘤细胞相关的淋巴细胞表面抗原 [J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(2):139-146.
Cui Z Z, Lee L F. A Lymphocyte surface antigen complex related to Marek's disease tumor cells and recognized by a monoclonal antibody [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 1995, 26(2):139-146. (in Chinese)
- [11] Witter R L, Stephens E A, Sharma J M, et al. Demonstration of a tumor-associated surface antigen in Marek's disease [J]. The Journal of Immunology, 1975, 115:177-183.
- [12] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术 [M]. 西安:陕西科学技术出版社, 1991:88-89.
Xu Z K. Monoclonal antibody technology [M]. Xi'an: Shanxi Science and Technology Press, 1991: 88-89. (in Chinese)
- [13] 章静波. 细胞生物学实用方法和技术 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995:151-152.
Zhang J B. Experimental cell biology technology [M]. Beijing: Beijing Medical University, China Union Medical Joint Press, 1995: 151-152. (in Chinese)
- [14] 马秀丽,冯 涛,于可响,等. 几种提纯鸭病毒性肝炎血清免疫球蛋白 G 方法的比较 [J]. 山东农业科学, 2007, 1:111-113.
Ma X L, Feng T, Yu K X, et al. Comparison of several methods for purifying duck viral hepatitis serum immunoglobulin [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2007, 1: 111-113. (in Chinese)
- [15] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京:科学出版社, 1998: 414-426.
Ausubel F M, Kingston R E, Seidman J G, et al. Short protocols in molecular biology [M]. Translated by Yan Z Y, Wang H L. Beijing, Science Press, 1998: 414-426. (in Chinese)
- [16] Ross L J. Characterization of an antigen associated with the Marek's disease lymphoblastoid cell line MSB1 [J]. Journal of General Virology, 1982, 60:375-380.
- [17] Matsuda H, Ikuta K, Miyamoto H, et al. Demonstration of a Marek's disease tumor-associated surface antigen (MATSA) on six cell lines derived from Marek's disease lymphomas [J]. Biken Journal, 1976, 19(3):119-23.
- [18] Dandapat S, Pradhan H K, Mohanty G C. Anti-idiotypic antibodies to Marek's disease tumor-associated surface antigen in protection against Marek's disease [J]. Veterinary Immunology Immunopathology, 1994, 40:353-366.