

大菱鲆免疫球蛋白 M(IgM)单克隆抗体的制备与特性鉴定

王蔚芳¹, 李青梅², 柴书军², 甘玲玲³, 洪磊¹,
郭军庆², 雷霖霖¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东青岛 266071;
2. 河南省农业科学院, 河南省动物免疫学重点实验室, 郑州 450002; 3. 四川省富顺县水产渔政局, 四川富顺 643200)

[摘要] 应用细胞工程技术研制大菱鲆免疫球蛋白 M(immunoglobulin M, IgM)的单克隆抗体并分析其免疫学特性。小鼠骨髓瘤细胞 NS0 与经 IgM 免疫的 BALB/C 小鼠脾细胞融合, 经过反复有限稀释法克隆, 筛选获得 4 株抗大菱鲆 IgM 的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 分别为 B1D1、D5C2、E1B2 和 F4A1。经小鼠腹水扩大生产后, 单抗效价为 $1:1.024 \times 10^6$ 检测灵敏度为 32 ng/mL。Western blot 分析表明, 获得的单抗与 IgM 重链区特异性结合。交叉结果显示, 单抗与大菱鲆血清呈强阳性反应, 与褐牙鲆、红鳍东方鲀、许氏平鲷、六线鱼、鲈鱼均呈微弱阳性反应, 而与半滑舌鳎、鲤鱼、鲫鱼、草鱼、鳙鱼的血清无交叉反应。本研究制备的大菱鲆 IgM 单克隆抗体效价高、灵敏度高、特异性强, 适合用于大菱鲆免疫学相关研究和生产实际应用。

[关键词] 大菱鲆; 免疫球蛋白 M; 单克隆抗体; BALB/C 小鼠

[中图分类号] Q8 **[文章标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2014)09-0016-05

1 前言

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是 20 世纪 90 年代由欧洲引进我国的名贵鱼种, 在突破繁育、创建“温室大棚+深井海水”养殖模式的基础上, 如今历经 20 年风雨的大菱鲆养殖产业已经展现出强大的生命力和发展潜力, 并成为我国工厂化养殖的样板工程, 带动了沿海其他养殖鱼类产业的提升与转型。然而在其工业化发展进程中, 循环水、高密度的养殖模式对疾病防控技术的要求亟待提升。在当前日益增长的环保理念和食品安全意识的要求下, 以疫苗等为主要代表的免疫病害防控技术受到重视, 通过免疫防控途径能有效增强鱼体主动防御

能力, 减少疾病的发生概率^[1]。然而对大菱鲆免疫学的研究报道有限, Kofod 等^[2]分离纯化了大菱鲆免疫球蛋白 M(immunoglobulin M, IgM), Estévez 等^[3]制备了大菱鲆免疫球蛋白单克隆抗体, 王贤丽等^[4]从大菱鲆脾脏 cDNA 文库中筛选得到了免疫球蛋白 L 轻链的全长 cDNA 片段, 冯守明等^[5]对大菱鲆免疫相关组织中免疫球蛋白阳性细胞进行了检测, 丁冰洁等^[6]首次得到了大菱鲆多聚免疫球蛋白受体完整的 cDNA 序列。未见大菱鲆 IgM 单克隆抗体相关研制和应用的报道。

单克隆抗体具有均一性、高效性、特异性、生物活性单一性及可无限供应等特点, 将单克隆抗体技术应用于大菱鲆免疫球蛋白结构和功能分析、病原

[收稿日期] 2014-06-25

[基金项目] 现代农业产业技术体系资金(CARS-50)

[作者简介] 王蔚芳, 1980 年出生, 女, 吉林通化市人, 博士, 助理研究员, 研究方向为鱼类免疫学; E-mail: wangwf@ysfri.ac.cn

和抗体检测、疫苗研制及免疫应答规律研究等方面具有科学理论意义和生产应用价值。因此,本研究将纯化的大菱鲂 IgM 免疫 BALB/C 小鼠,利用细胞工程技术生产融合的杂交瘤细胞,筛选分泌大菱鲂 IgM 的单克隆抗体杂交瘤细胞,制备并生产大菱鲂 IgM 单克隆抗体。

2 材料与方法

2.1 免疫原制备

纯化的大菱鲂血清 IgM 由本实验室制备并保存^[7]。将纯化的大菱鲂 IgM 分别与等体积的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(Pierce, USA)混匀乳化后免疫小鼠。

2.2 免疫动物

选用 6 周龄 BALB/C 雌性小鼠进行免疫,免疫程序见表 1。

表 1 免疫程序

Table 1 The immunization schedule

免疫次数	IgM 剂量/ (mL·只 ⁻¹)	佐剂	注射方式
基础免疫	0.1	弗氏完全佐剂	皮下注射
加强免疫	0.1	弗氏不完全佐剂	皮下注射
二次加强免疫	0.1	弗氏不完全佐剂	皮下注射
融合前三天超免	0.1	—	腹腔及尾静脉各注射一剂

2.3 饲养细胞制备

脱颈椎处死正常 BALB/C 小鼠,无菌条件下剪开腹部皮毛,用注射器吸取 5 mL RPMI-1640 培养基(含 10% 新生牛血清和 1% 次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷溶液)后注射到小鼠腹腔内,同时轻压小鼠腹腔,然后将培养基吸入注射器内并移出;将吸出的腹腔液转移到 24 孔细胞培养板中,放入二氧化碳培养箱中培养,待用。

2.4 细胞融合

1) 脱颈椎处死免疫小鼠,无菌取出脾脏,过 100 目筛网后用 GNK(葡萄糖、NaCl、KCl、酚红及磷酸盐)溶液洗涤 2 次,然后溶于 10 mL GNK 溶液,吹打形成单细胞悬液。

2) 取 10^5 个处于对数生长期的 NS0 骨髓瘤细胞(由英国国家动物健康研究院惠赠),1 000 r/min,离心 10 min,弃上清液,用 40 mL GNK 溶液重悬沉淀物。

3) 将脾细胞悬液和骨髓瘤细胞悬液混合均匀后,1 000 r/min,离心 10 min,完全吸除上清液,轻弹离心管底,打散细胞,放入 37 °C 水浴中;加入 37 °C 预热好的聚乙二醇溶液 1 mL,在 1 min 内滴加完,然后在 37 °C 水浴中缓慢转动 90 s。

4) 加入已经预热到 37 °C 的 GNK 溶液 15 mL(开始缓慢滴加,后来逐渐加快速度),然后继续缓慢滴加 GNK 溶液至 40 mL,并在 37 °C 水浴中静置 5 min。

5) 1 000 r/min,离心 10 min,用预热好的 RPMI-1640 培养基(含 10% 新生牛血清和 1% 次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷溶液)稀释沉淀的细胞,然后加到 96 孔含饲养细胞的细胞培养板中。

6) 将培养板放入二氧化碳培养箱(二氧化碳 5%, 37 °C)中培养,并在倒置显微镜下观察细胞生长情况,大概 5~7 天后进行换液,吸出 100 μ L 培养液,更换等量含次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷溶液的培养液。

2.5 阳性杂交瘤细胞株的筛选

细胞融合后 10 天左右,观察细胞生长状态良好并开始检测筛选,将筛选的阳性杂交瘤细胞转移到 24 孔细胞培养板中进行扩大培养。酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测筛选步骤如下:以 0.05 mol/L (pH=9.6) 碳酸盐溶液稀释大菱鲂免疫球蛋白至 2 μ g/mL,取 50 μ L 稀释液加入酶标板孔中,置于 4 °C 冰箱中过夜包被,次日以 0.01 mol/L (pH=7.4) 磷酸盐-吐温溶液(PBST, 0.05% Tween-20)洗涤 3 次,每次 3 min;用 5% 猪血清于 37 °C 封闭 1 h,封闭结束后以 PBST 同法洗涤;加入杂交瘤细胞培养上清,每孔加入 50 μ L,阴性对照为细胞培养基,阳性对照为免疫小鼠血清,于 37 °C 反应 15 min 后以 PBST 同法洗涤;然后每孔加入 50 μ L 羊抗鼠 IgG-HRP(1:1 000 稀释),于 37 °C 反应 30 min 后洗涤;每孔加入新配制的 50 μ L 显色液 TMB(四甲基联苯胺)显色 5 min 后,加入 2 mol/L 硫酸溶液 50 μ L 终止反应;结果判定用自动酶标仪读取 OD₄₅₀ 值(P/N \geq 2.1 时判定为阳性)。

2.6 阳性杂交瘤细胞系的建立与克隆

采用有限稀释法对筛选出的阳性杂交瘤细胞进行克隆:在 96 孔细胞培养板各孔中加入 100 μ L 的饲养细胞;然后把要克隆的阳性杂交瘤细胞孔中的细胞用血球计数板进行计数,用培养液以 10 倍梯度进行稀释,取出 100 个杂交瘤细胞;将取出的杂交瘤细胞混匀后,滴加到铺满饲养细胞的 96 孔板中,每

孔加入 100 μL , 平均每孔含有一个杂交瘤细胞; 然后放入二氧化碳培养箱中培养。期间, 定期观察细胞生长状况并记录, 并通过上述 ELISA 法检测各培养孔的上清液(确保阳性率 100%), 把所得阳性克隆孔的杂交瘤细胞按上述方法再克隆一次, 以保证形成单克隆。

2.7 腹水制备(单抗大量生产)

1) 小鼠预处理: 在接种杂交瘤细胞前 1 周, 用 0.5 mL 液体石蜡腹腔注射正常 BALB/C 小鼠。

2) 接种杂交瘤细胞: 将培养的杂交瘤细胞离心, 弃去上清, 杂交瘤细胞用无血清培养液悬浮, 并将细胞数调至 $10^6/\text{mL}$, 每只小鼠腹腔注射 0.5 mL。

3) 采集腹水: 接种杂交瘤细胞后约 7~12 天, 小鼠腹部可见明显膨大。用 75% 酒精棉球消毒腹部皮肤后, 用注射器抽取腹水。每只小鼠抽取腹水 2 mL, 间隔 5 天后, 待腹水再生积聚后, 同法抽取。

4) 腹水处理: 收集的腹水 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.8 单抗特性鉴定

2.8.1 ELISA 法测定单抗效价

以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化大菱鲆免疫球蛋白包被酶标板, 每孔 50 μL , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 封闭后加细胞上清液和腹水抗体, 细胞上清液从 1:100 倍比稀释到 1:12 800, 腹水从 1:1 000 倍比稀释到 1:2 048 000, 每孔 50 μL , 其余步骤同 2.5 节。

2.8.2 单抗灵敏度的测定

纯化的大菱鲆 IgM 起始浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 倍比稀释至 2 ng/mL, 每孔 50 μL , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜包被, 封闭洗涤后滴加单抗(1:25 000), 每孔 50 μL , 其余步骤同 2.5 节。

2.8.3 单抗 Western blot 分析

SDS-PAGE 分离纯化的大菱鲆免疫球蛋白(凝胶由 10% 分离胶和 3% 浓缩胶组成), 将电泳凝胶转印到硝酸纤维素膜(孔径 0.22 μm) 上, 转印完毕将硝酸纤维素膜用脱脂奶粉封闭 1 h, PBST 洗涤后将硝酸纤维素膜置于腹水稀释液中(1:250 000) 缓慢摇动 1 h, 同法洗涤后, 将硝酸纤维素膜置于羊抗鼠 IgG-HRP(1:500 稀释) 缓慢摇动 1 h, 同法洗涤后, 将硝酸纤维素膜放入 HRP-DAB 底物显色液中, 至颜色清晰为止, 然后将硝酸纤维素膜用去离子水冲洗干净后, 置于滤纸间干燥, 拍照记录后暗处保存。

2.8.4 单抗特异性的测定

收集大菱鲆、褐牙鲆、半滑舌鳎、红鳍东方鲀、

鲤鱼、鲫鱼、草鱼、鳙鱼、许氏平鲈、六线鱼、鲈鱼血清, 待检鱼血清用包被液以 1:100 倍稀释后包被于酶标板, 每孔 50 μL , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 封闭洗涤后加单抗(1:25 000), 每孔 50 μL , 其余步骤同 2.5 节。

3 结果

3.1 单抗的筛选

采用上述免疫和细胞融合方法, 用直接 ELISA 法对培养的杂交瘤细胞进行筛选, 获得 4 株阳性杂交瘤细胞, 编号分别为 B1D1、D5C2、E1B2、F4A1。杂交瘤细胞经过 3 次亚克隆筛选, 保证 100% 的阳性率, 经连续传代培养后依然能够稳定分泌抗体。

3.2 单抗特性鉴定

经直接 ELISA 法检测, 4 株单抗的细胞培养上清效价为 1:1 280~1:2 560, 其中 E1B2 的细胞上清及腹水效价分别为 1:2 560 和 $1:1.024\times 10^6$ 。

用不同浓度的大菱鲆 IgM 包被 96 孔板, ELISA 法测定单抗 E1B2 的敏感性, 结果表明 E1B2 腹水对大菱鲆 IgM 的检测灵敏度为 32 ng/mL。

应用 SDS-PAGE 技术, 对获得单抗进行 Western blot 分析, 结果表明单抗能与大菱鲆 IgM 发生特异性结合, 特异识别 IgM 重链区(见图 1)。

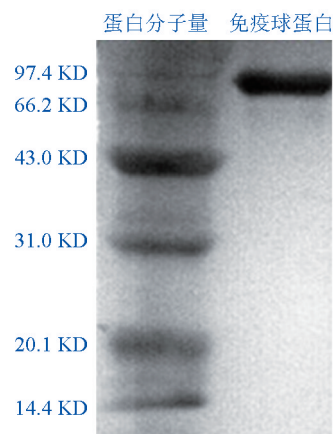
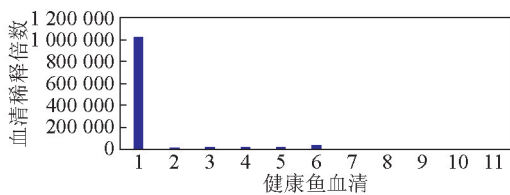


图 1 单抗的 Western blot 图谱

Fig. 1 Western blot analysis of monoclonal antibody against IgM of turbot

3.3 单抗特异性测定

将单抗与不同种类的鱼血清进行 ELISA 反应, 结果表明单抗与大菱鲆血清呈强阳性反应, 与褐牙鲆、红鳍东方鲀、许氏平鲈、六线鱼、鲈鱼均呈微弱阳性反应, 而与半滑舌鳎、鲤鱼、鲫鱼、草鱼、鳙鱼的血清无交叉反应(见图 2)。



1—大菱鲂;2—褐牙鲂;3—红鳍东方鲀;4—许氏平鲈;5—六线鱼;6—鲈鱼;7—半滑舌鲷;8—鲤鱼;9—鲫鱼;10—草鱼;11—鳊鱼

图2 ELISA法检测单抗与各种鱼血清的交叉反应
Fig. 2 The reaction of monoclonal antibody against serum from eleven species of fish by ELISA

4 讨论

单克隆抗体能够特异性识别单一抗原决定簇,且经过多次克隆和筛选获得,从而避免交叉反应带来的假阳性,提高检测的准确性,检测灵敏度可达到纳克水平,是免疫学和血清学研究的重要工具。鱼类是具有细胞免疫和体液免疫系统的最低等的脊椎动物,已报道在鱼类免疫系统中存在4种主要的免疫球蛋白(IgM、IgD、IgT和IgZ)^[8],其中IgM发现最早、研究最多。鱼类免疫球蛋白的单抗不仅可以用于鱼类免疫细胞的鉴定、发生和活性研究,也可用于监测病原感染或疫苗接种过程中的免疫应答反应,是鱼类免疫机理和鱼病免疫防治研究的有力工具。

在大菱鲂IgM单抗制备过程中,免疫原IgM的提纯是关键的一步。通常免疫原越纯,单抗效果越佳。在本研究中,大菱鲂IgM的提取和纯化是建立在实验室已经完成的相关工作基础上进行的,获得的IgM纯度高,经SDS-PAGE检验,大菱鲂血清IgM有两条带,分子质量分别是76 kD和27 kD,代表免疫球蛋白的重链和轻链,条带清晰,无杂带^[7]。在此基础上,将其免疫小鼠,通过细胞融合及多次克隆和筛选,获得了稳定分泌大菱鲂IgM的杂交瘤细胞株。生产的单抗效价高(1:1.024×10⁶)、检测灵敏度高(32 ng/mL),有效保证其在大菱鲂相关免疫学研究中的应用。

本研究通过Western blot方法对制备单抗的特性鉴定分析表明,单抗能特异识别大菱鲂IgM的重链。在草鱼、欧洲鳗、花鲈、南方鲇等鱼血清IgM单抗研究中也发现,大部分单抗仅识别IgM重链^[9-12]。这可能是由于IgM分子重链恒定区的氨基酸序列多、结构复杂,可提供多个抗原表位;而轻链相对简单,其上免疫表位少,所以筛选到的强阳性细胞株

大部分是抗重链的,而在筛选过程中抗轻链的杂交瘤细胞很容易被放弃和丢失。

在交叉实验中,研制的单抗与半滑舌鲷及草鱼、鲤鱼、鳊鱼、鲫鱼4种淡水鱼类的血清无交叉反应,与鲈鱼、六线鱼、许氏平鲈、红鳍东方鲀、牙鲆五种海水鱼类血清有微弱的交叉反应,而与大菱鲂的血清反应是最强烈的,表明该单抗具有较好的特异性。同时,也可以看出,不同鱼类的免疫球蛋白存在特异性抗原位点,但也存在相同的抗原决定簇,这种共同的抗原决定簇会存在于亲缘关系较近的品种之间。

5 结语

单克隆抗体技术在人类及畜牧业的疾病控制与预防中发挥着重要作用,是疾病的检测、预防和治疗的有力武器。单克隆抗体能够在实验室通过细胞培养而得到批量生产,在应用上具有专一性强、重复性好、操作简便等优点,有较高的科研应用价值和生产实际应用前景。本研究制备的大菱鲂IgM单克隆抗体效价高、灵敏度高、特异性强,适用于大菱鲂免疫学相关研究和生产实际应用。

参考文献

- [1] 甘玲玲,王蔚芳,雷霖霖,等. 鲆鲽类渔用疫苗研究现状及展望[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 125-131.
- [2] Kofod H, Pedersen K, Larsen J L, et al. Purification and characterization of IgM-like immunoglobulin from turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 1994, 35(1): 1-10.
- [3] Estévez J, Leiro J, Santamarina M T, et al. Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1994, 41(3-4): 353-366.
- [4] 王贤丽,张玉喜,孟亮,等. 大菱鲂免疫球蛋白轻链IgL全长cDNA的分离、鉴定及表达分析[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(4): 31-37.
- [5] 冯守明,绳秀珍,战文斌. 免疫球蛋白阳性细胞在大菱鲂免疫相关组织中的分布[J]. 武汉大学学报(理学版), 2008, 54(6): 751-756.
- [6] 丁冰洁,绳秀珍,唐小千,等. 大菱鲂多聚免疫球蛋白受体基因的克隆及表达分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 792-801.
- [7] 王蔚芳,柴书军,刘庆堂,等. 大菱鲂疾病早期快速检测方法——胶体金免疫层析试纸的研制与建立[J]. 中国工程科学, 2012, 14(2): 9-14.
- [8] Warr G W. The immunoglobulins and the genes that encode them [J]. Developmental & Comparative Immunology, 1995, 19: 1-12.
- [9] 郝贵杰,沈锦玉,徐洋,等. 草鱼免疫球蛋白单克隆抗体的制备及其特性鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(9): 808-810.

- [10] 林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 532-598.
- [11] 许娜娜, 钱冬, 赵海泉. 花鲈免疫球蛋白的分离纯化及部

- 分特性分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 103-109.
- [12] 张小萍, 魏静, 邱艳. 南方鲇免疫球蛋白单克隆抗体的制备及特性[J]. 水生生物学报, 2012, 36(3): 379-384.

Development and characterization of monoclonal antibody to the immunoglobulin M of *Scophthalmus maximus*

Wang Weifang¹, Li Qingmei², Chai Shujun²,
Gan Lingling³, Hong Lei¹, Guo Junqing², Lei Jilin¹

(1. Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Henan Key Laboratory for Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 3. Fishery Administration Bureau of Fushun, Fushun, Sichuan 643200, China)

[Abstract] Four monoclonal antibodies (mAbs) to immunoglobulin M (immunoglobulin M, IgM) of *Scophthalmus maximus* were produced and characterized. All the mAbs (denominated B1D1, D5C2, E1B2 and F4A1) are showed good anti-turbot IgM reactivity in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. Results of ELISA indicated that the titre of the mAb was $1:1.024 \times 10^6$ and the minimum detectable amount of IgM was 32 ng/mL. Results of immunoblotting showed that the mAb reacted with heavy chain of IgM. The mAb showed specificity for *Scophthalmus maximus*, light specificity for *Paralichthys olivaceus*, *Takifugu rubripes*, *Sebastes fuscescens*, *Hexagrammos otakii*, *Lateolabrax japonicas*, and no specificity for *Cynoglossus semilaevis*, *Cyprinus carpio*, *Carassius cuvieri*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Aristichthys nobilis*. The mAbs characterization should prove to be useful for studying the biology of IgM and its practical application.

[Key words] *Scophthalmus maximus*; immunoglobulin M; monoclonal antibody; BALB/C mice