

· 论 著 ·

## 2 型猪链球菌谷氨酸脱氢酶单克隆抗体的制备与鉴定

李先富, 潘秀珍, 赵华梅, 王长军, 唐家琪

**[摘要]** 目的 制备抗猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)的单克隆抗体。方法 分别以 2 型 *S. suis* 全菌细胞和重组 GDH 蛋白为免疫原免疫 BALB/c 小鼠;采用淋巴细胞杂交瘤技术将免疫后的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合;酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选分泌抗 GDH 单克隆抗体的杂交瘤细胞株并克隆化;免疫印迹(Western blot)鉴定 GDH 单克隆抗体的特异性;制备小鼠腹水并进行抗体效价测定。结果 细胞融合后经 ELISA 筛选获得分泌的阳性细胞株,经过有限稀释克隆化筛选,获得 4 株能稳定分泌抗 GDH 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。单抗腹水的抗体效价均在 1:102 400 以上。结论 本研究获得了 4 株能稳定分泌抗体且其分泌的抗体能够与 GDH 蛋白进行特异性反应的单克隆抗体细胞株,所获得特异性单克隆抗体能用于猪链球菌结构和功能的研究,也能够进一步用于猪链球菌感染血清学诊断方法研究。

**[关键词]** 猪链球菌;谷氨酸脱氢酶;单克隆抗体

中图分类号: R378.1<sup>+</sup>2 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)05-0385-04

### Preparation and identification of monoclonal antibodies against GDH of *Streptococcus suis* serotype 2 highly virulent strain isolated from china

Li Xian-fu, PAN Xiu-zhen, ZHAO Hua-mei, WANG Chang-jun, TANG Jia-qi. Centers for Disease Control and Prevention of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

**[Abstract]** **Objective** To prepare monoclonal antibodies (McAbs) against glutamate dehydrogenase (GDH) protein of *Streptococcus suis* (*S. suis*). **Methods** *S. suis* isolates and the GDH recombinant protein were used as antigen to immunize female BALB/c mice respectively. The immunized splenic cells of mice were fused with murine myeloma SP2/0 cells. The hybridoma cell strains secreting McAb against GDH were screened with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The specificity of the secreted GDH McAbs was confirmed by Western blot. The ascites were harvested and the antibody titer was measured. **Results** Four hybridoma cell lines secreting McAb against GDH were obtained by fusion of mouse myeloma cells SP2/0 with splenic cells from BALB/c mice immunized with the purified expression product of GDH. Titers of McAbs in ascites were higher than 1:102 400. **Conclusion** The McAbs against GDH were successfully prepared and identified, which would be useful for the detection of *S. suis* infection.

**[Key words]** *Streptococcus suis*; glutamate dehydrogenase; monoclonal antibody

猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)是一种重要的人畜共患病原菌,可引起人和猪患脑膜炎、关节炎、肺炎、败血症甚至急性死亡<sup>[1-2]</sup>。*S. suis* 根据

其荚膜抗原性不同,可分为 35 个血清型,其中 2 型 *S. suis*(*S. suis* 2)是最常见、致病力最强的血清型。本课题组对 1998 及 2005 年分别在我国江苏省和四川省人群中发生 *S. suis* 2 感染暴发流行的突发公共卫生事件进行了报道,引起了全世界的广泛关注<sup>[3,4]</sup>。尽管对 *S. suis* 2 毒力因子的研究已开展了多年,但其具体的致病机制目前仍不明确,惟一被普遍认同的是荚膜多糖具有抗吞噬作用。随着相关研究的不断深入,近年来新的毒力因子不断报道<sup>[5]</sup>,谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)就是其中之一<sup>[6]</sup>。课题组前期的研究工作中已经制备

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(30730081,81071317);江苏省自然科学基金项目(BK2007013);南京军区医学科技创新课题(07Z045);南京军区卫生专业人才培养“122 工程”资助项目

**作者简介:** 李先富(1962-),男,安徽全椒人,本科,实验师,从事单克隆抗体研制工作

**作者单位:** 210002 江苏南京,南京军区疾病预防控制中心流行病微生物学研究所

出基因工程重组 GDH<sup>[7]</sup>, 本研究以重组 GDH 和全菌细胞为抗原, 制备抗 GDH 的单克隆抗体。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶脱氧核苷为德国 Sigma 公司产品; 聚乙二醇 (PEG) 1500 为 Roche 公司产品; 辣根过氧化物酶标羊抗鼠 IgG 为北京生物技术有限公司产品; 二甲基亚砜为 Sigma 公司产品; 1640 培养基为美国 GIBCO 公司产品; 小牛血清为杭州四季青生物制品公司产品; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂为德国 Sigma 公司产品。二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。96 孔酶标板为美国康宁公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。GDH 重组蛋白、溶菌酶释放蛋白 (MRP) 重组蛋白和胞外因子 (EF) 重组蛋白为本研究室制备。

1.1.2 菌株、细胞和实验动物 *S. suis* 2 分离株 ZY05719 为本室保存。SP2/0 骨髓瘤细胞本室保存。7 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 体重 (20 ± 2) g, 无特定病原 (SPF) 级, 购自中科院上海分院实验动物中心。

### 1.2 试验方法

1.2.1 全菌免疫 采用甲醛灭活的菌株 ZY05719, 初次免疫菌量约 10<sup>7</sup> cfu/只, 小鼠皮下多点注射, 间隔 3 周以同样途径同样菌量追加免疫 4 次。选择抗体效价较高的小鼠, 在融合前 3 d 腹腔注射加强免疫 1 次, 菌量为 10<sup>8</sup> cfu/只。

1.2.2 基因工程 GDH 蛋白免疫 首次免疫将 GDH 重组蛋白抗原用完全弗氏佐剂乳化作小鼠皮下多点注射, GDH 用量为 50 μg/只; 每间隔 3 周以同样途径同量抗原追加免疫 2 次, 蛋白用不完全弗氏佐剂乳化。在融合前 3 d 经腹腔加强免疫 1 次, GDH 用量为 100 μg/只。

1.2.3 间接 ELISA 方法检测抗 GDH 方法的建立 以基因工程 GDH 为包被抗原, 包被抗原和酶标抗体的最适浓度通过方阵滴定来选择, 阳性对照采用阳性鼠血清 1:10 000 稀释液, 阴性对照用 SP2/0 细胞培养上清。选取阳性对照吸光值为 1.0, 阴性对照吸光值小于 0.2 的最高稀释度。

1.2.4 细胞融合、筛选及克隆化 末次加强免疫 3 d 后, 取免疫小鼠脾细胞, 与骨髓瘤细胞在 PEG1500 作用下进行融合。融合细胞先用 HAT 选择培养基培养, 10 d 后改用 HT 培养基, 20 d 后改用普通 RPMI 1640 培养基 (含 15% 小牛血清) 培养。以纯化的

GDH 重组蛋白为包被抗原, 山羊抗小鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (HRP) 为二抗, 并以免疫小鼠血清为阳性对照和 SP2/0 细胞培养上清为阴性对照, 利用间接 ELISA 法筛选阳性克隆。采用有限稀释法对鉴定出来的阳性克隆细胞连续亚克隆, 至每株细胞亚克隆阳性率达到 100%, 将细胞扩大培养后液氮冻存。

1.2.5 单克隆抗体特异性的检测 将纯化的 GDH 蛋白样品、MRP 蛋白 (对照) 和 EF 蛋白 (对照) 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完毕后电转移至硝酸纤维素膜上, 于 4 ℃ 下转移 1.5 h; 取出硝酸纤维素膜, 加 5% 脱脂奶室温封闭 1 h; TBST 洗 3 次后, 放入杂交瘤细胞培养上清 4 ℃ 孵育过夜; TBST 洗 3 次后, 将膜浸在山羊抗小鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (HRP) 稀释液 (1:10 000) 中, 37 ℃ 孵育 1 h; TBST 洗 3 次后, 以 DAB 显色试剂显色, 待有条带出现, 立即用蒸馏水清洗以终止反应。

1.2.6 腹水的制备 先于健康 BALB/c 小鼠腹腔注射石蜡油 0.2 ml/只, 10 d 后, 再腹腔接种阳性克隆的杂交瘤细胞 1 × 10<sup>6</sup> ~ 5 × 10<sup>6</sup> 个/只, 7 ~ 10 d 后, 抽取腹水, 4 000 rpm, 离心半径 156 mm, 离心 10 min 后取上清, 分装 -20 ℃ 保存。

1.2.7 腹水抗体效价的检测 纯化的 GDH 重组蛋白包被 96 孔酶标板, 4 ℃ 放置过夜; 每孔加入 100 μl 封闭液, 37 ℃ 封闭 1 h; 对 4 株杂交瘤细胞制备的腹水分别从 1:400 开始做倍比梯度稀释, 同时分别以 SP2/0 细胞培养上清作为阴性对照, 1:10 000 稀释的免疫鼠血清作为阳性对照, 每孔 100 μl 加入酶标板, 37 ℃ 孵育 1 h; 山羊抗鼠 HRP-IgG 1:10 000 稀释, 100 μl/孔, 37 ℃ 孵育 1 h; OPD 底物液 100 μl/孔, 反应 10 min, 加入 100 μl 终止液终止反应; 酶标仪检测 A<sub>490</sub> 值, P/N > 2.1 为阳性。

## 2 结果

2.1 ELISA 筛选方法的建立 通过方阵滴定确定包被抗原和酶标抗体的最适浓度, GDH 重组蛋白抗原包被的最适浓度为 0.5 μg/ml, 酶标抗体的最适稀释度为 1:10 000。

2.2 细胞融合及筛选结果 以甲醛灭活的 ZY05719 全菌为抗原免疫的小鼠脾细胞进行融合, 融合率为 60%, 用 GDH 蛋白筛选时阳性率为 1.2%; 以基因工程 GDH 为抗原免疫的小鼠脾细胞进行融合, 融合率达 90%, 筛选时阳性率为 30%。

2.3 单克隆抗体效价的确定 以全菌为抗原免疫的小鼠脾细胞融合的杂交瘤细胞, 经过筛选, 得到 1 株效价较高的细胞株 4D6; 以基因工程 GDH 为抗原

免疫的小鼠脾细胞融合的杂交瘤细胞,共筛选得到 3 株效价较高的单克隆抗体细胞株,分别为 1D10、2B9 和 3E10。利用 ELISA 法,对获得的腹水的单克隆抗体效价进行测定,效价均在 1:102 400 以上。

**2.4 单克隆抗体 Western blot 检测** Western blot 检测显示,单克隆抗体只与 GDH 重组蛋白发生反应显示单一条带;而与另两种猪链球菌毒力蛋白 MRP 和 EF 均不反应(表 1)。图 1 为 4D6 的 Western blot 结果。结果表明 4D6、1D10、2B9 和 3E10 为 GDH 蛋白特异性单克隆抗体。

表 1 4 株抗 GDH 单克隆抗体的 Western blot 分析

单克隆抗体	GDH	MRP	EF
4D6	+	-	-
1D10	+	-	-
2B9	+	-	-
3E10	+	-	-

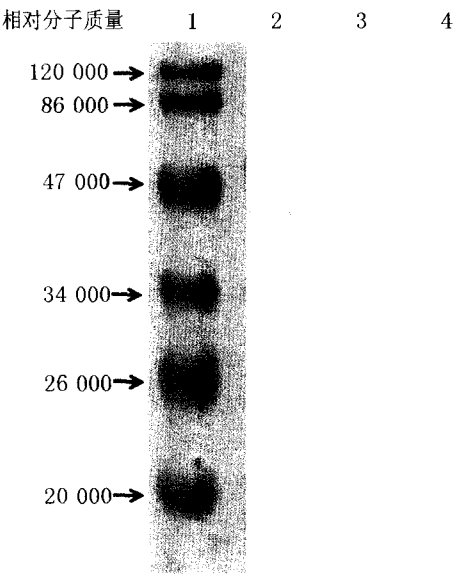


图 1 Western blot 检测单克隆抗体特异性  
1:相对分子质量标准; 2:GDH; 3:MRP; 4:EF

3 讨论

为了探讨 GDH 在猪链球菌致病机理中的作用及在建立检测方法中的应用意义,本课题组自 2004 年起以 GDH 为研究对象开展了相关的研究工作<sup>[7-9]</sup>。首先通过 PCR 扩增国内患者分离株的 *gdh* 基因并对其进行克隆表达,获得了具有酶活性的 GDH 重组蛋白。随后的研究揭示猪链球菌谷氨酸脱氢酶在猪链球菌不同血清型菌株中保守存在,具有免疫原性,有可能作为建立血清学检测方法的候选抗原。

单克隆抗体由于纯度高、特异性强,可以提高各

种血清学方法检测抗原的敏感性及特异性。因此研制 GDH 的单克隆抗体对于 *S. suis* 的检测具有较大的应用价值。本研究以全菌细胞和基因工程蛋白两种免疫原免疫小鼠,筛选出 4 株能稳定分泌抗 GDH 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞。研究结果显示单抗具有较好的特异性及较高的抗体效价。其中以全菌细胞为免疫原免疫小鼠,经融合筛选获得 1 株能稳定分泌抗 GDH 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞(4D6),这个结果从侧面证实 Okwumabua 等<sup>[10]</sup>的研究结论:猪链球菌的 GDH 是分布在细胞表面的。

本研究获得了 4 株能稳定分泌抗体的单克隆抗体细胞株,且其分泌的抗体能够与 GDH 蛋白进行特异性反应,所获得特异性单克隆抗体能用于猪链球菌结构和功能的研究,也能够用于猪链球菌感染血清学诊断方法研究。利用该单克隆抗体进一步建立 *S. suis* GDH ELASA 检测方法的研究工作正在进行中。

【参考文献】

[1] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, et al. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(3): 201-209.

[2] Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the chinese experience and the situation in north america[J]. Anim Health Res Rev, 2007, 8(1): 29-45.

[3] Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Plos Med, 2006, 3(5): 151.

[4] Sriskandan S, Slater JD. Invasive disease and toxic shock due to zoonotic *Streptococcus suis*: an emerging infection in the east[J]. Plos Med, 2006, 3(5): 187.

[5] Baums CG, Valentin-Weigand P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development[J]. Anim Health Res Rev, 2009, 10(1): 65-83.

[6] 赵华梅,潘秀珍,唐家琪. 猪链球菌毒力因子和鉴定方法的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 77-80.

[7] 赵华梅,潘秀珍,王长军,等. 猪链球菌 2 型谷氨酸脱氢酶基因的克隆表达及酶活性测定[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(1): 22-25.

[8] 潘秀珍,赵华梅,葛俊超,等. 信号肽与猪链球菌 GDH 融合的 DNA 疫苗构建及体液免疫研究[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(3): 311-314.

[9] 潘秀珍,赵华梅,葛俊超,等. *gdh* 基因在猪链球菌中的分布及重组 GDH 的抗原性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(6): 522-525.

[10] Okwumabua O, Persaud JS, Reddy PG. Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8(2): 251-257.