

海鱸免疫球蛋白單株抗體之製備

報告人：邱芮瑜 約聘研究助理（生物研究組）

壹、緒言

海鱸生長於熱帶及亞熱帶水域中，為主要的海上箱網養殖魚種之一。養殖一年內可成長至 6-8 公斤，生長速度快且肉質鮮美，可媲美歐洲海上箱網養殖之大西洋鮭魚，為台灣箱網養殖中最有前景之魚類。與哺乳類動物相比，魚類的免疫系統較原始，目前已知存在於硬骨魚類的免疫球蛋白主要以 IgM 為主。但因商品化且高特異性的抗海鱸 IgM 標示抗體不易取得，使得在疫苗效力評估或疫病血清學診斷及研究上均受限制。本實驗目的即在於研製具高特異性的抗海鱸免疫球蛋白單株抗體以供相關研究使用。

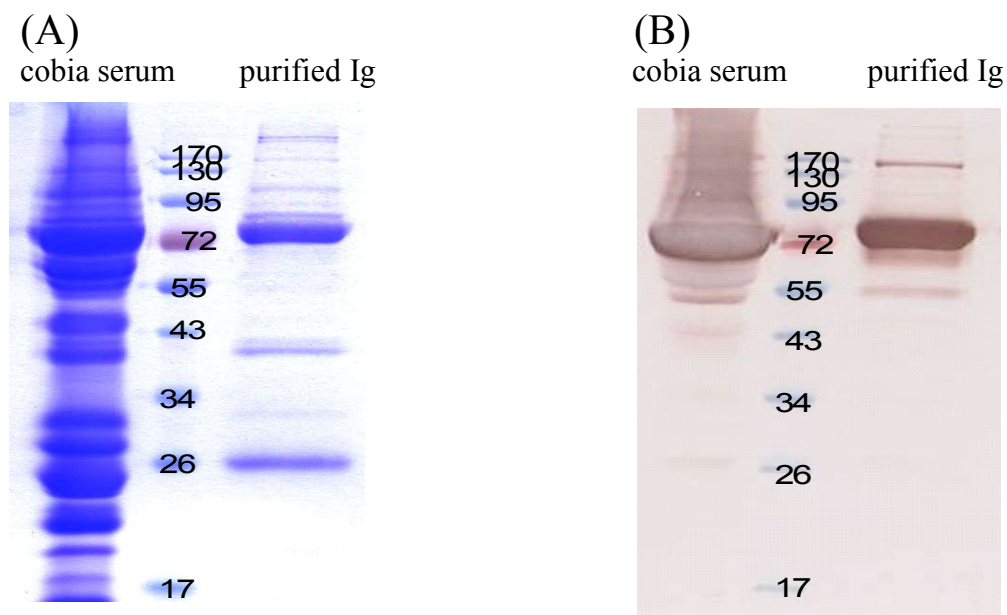
貳、材料方法

以 protein A 親和性管柱套組(PIERCE 44667)由海鱸血清純化出免疫球蛋白，將樣品加入等體積 SDS gel-loading buffer 後煮沸變性，注入堆積凝膠的孔中進行電泳，當染料跑出分離凝膠後停止。將膠片以 coomassie blue 溶液進行染色 30-60 分鐘，接著以退染液退染 3-4 次，當背景退掉時，以年糕紙封緊乾燥保存判讀。將純化之球蛋白片段免疫 BALB/c 小鼠，每劑 50 μ g，每劑間隔 2 週，三劑後取脾臟細胞與小鼠骨髓瘤細胞株 NS-1 進行細胞融合。進行前採 2 隻 4-6 週齡 BALB/c 小鼠之胸腺研磨成單細胞，懸浮於含 HAT 篩選藥物(sigma H0262)及 20%胎牛血清的 RPMI-1640 培養液中，平均鋪在 4 個 96 孔組織培養盤中，作為培養層；免疫小鼠的脾臟也研磨成單細胞，計數 108 個脾臟細胞與 4×10^7 個 NS-1 細胞，以 50% PEG 溶液(1 g PEG-1500 滅菌後以 1 ml RPMI-1640 培養液稀釋)進行細胞融合。融合瘤細胞懸浮於含 HAT 篩選藥物及 20%胎牛血清 RPMI-1640 培養液中，平均鋪在 4 個前述之 96 孔組織培養盤中，置於 37°C 二氧化碳培養箱中，7 天後觀察。另準備篩選抗體用之 96 孔酵素分析盤：以 coating buffer 稀釋純化之球蛋白至 100 ng/ml，每 well 注入 100 μ l 抗原於室溫震盪作用一小時，以 wash buffer 200 μ l/well 清洗三次，再注入 200 μ l/well blocking buffer 室溫震盪作用一小時後清洗三次，拍乾存放於 4°C 保存。細胞融合後約 14 天取每孔上清液 100 μ l 作為第一抗體，室溫震盪作用一小時，清洗三次後，加入以 assay buffer 稀釋 3000 倍的 goat anti-mouse IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch lab) 作為第二抗體，每孔注入 100 μ l 室溫震盪作用一小時，清洗三次後，每孔注入 200 μ l o-Phenylenediamine, OPD 呈色劑(sigma P9187)室溫震盪作用 15 分鐘，每孔加入 6 N H₂SO₄

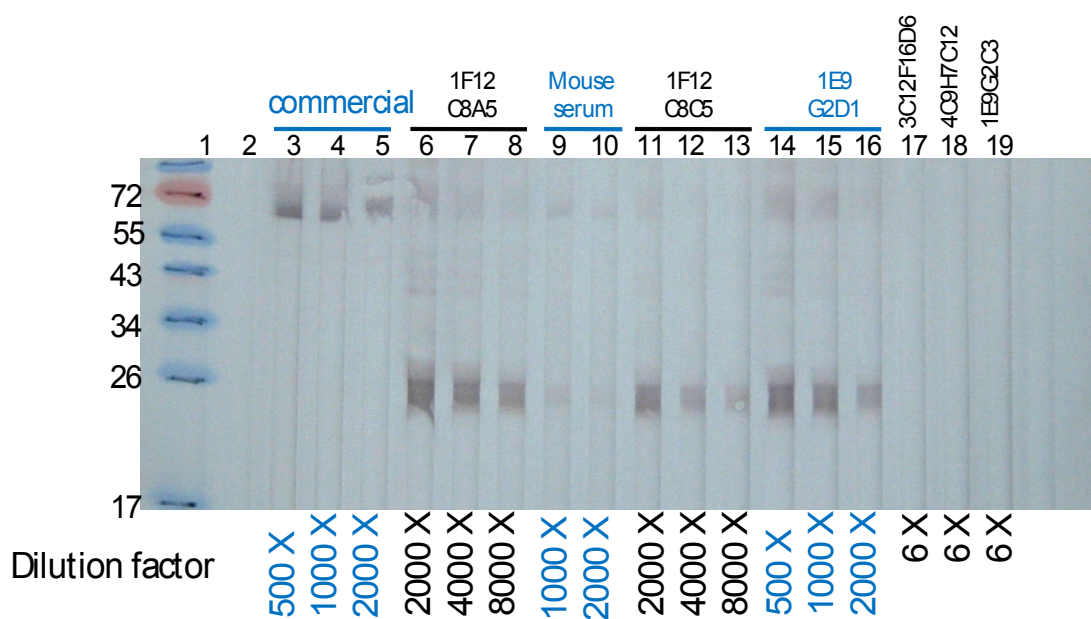
50 μ l 停止呈色反應。最後以 ELISA reader (thermo)讀取 OD 492 nm 數值，其 OD 值與 1000 被稀釋之小鼠高免疫血清相當之融合瘤挑出放大至 48 孔組織培養盤中培養，繼續以 ELISA 監測其抗體，經 2 次單株化後可得單株將融合瘤單株化。最後以西方墨點法分析單株抗體之特異性。

參、結果與討論

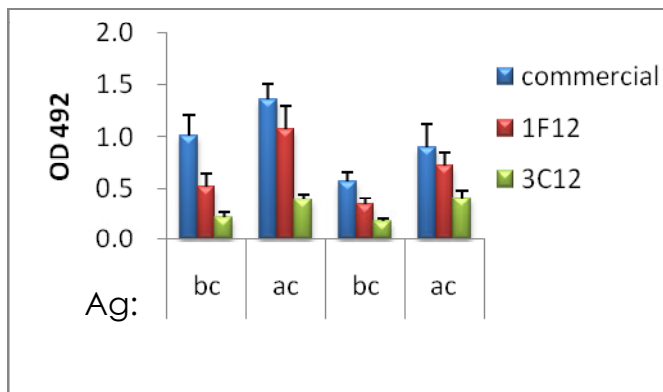
利用 protein A 親和性管柱由海鱸血清純化出免疫球蛋白，純化之樣品以 SDS-PAGE 分析可得約 72、26 kDa 之免疫球蛋白片段，推測為免疫球蛋白之重鏈與輕鏈（圖一 A）。以市售之海鱸 IgM 單株抗體利用西方墨點法測試，可確定 72 kDa 之片段為免疫球蛋白之重鏈（圖一 B）。將純化之球蛋白片段免疫 BALB/c 小鼠進行細胞融合後，經 ELISA 篩選融合瘤細胞之上 液，所得之單株抗體以西方墨點法分析可辨識單一約 26 kDa 之免疫球蛋白輕鏈（圖二），可知所研製之單株抗體具高特異性。另將市售之海鱸 IgM 單株抗體與自製之單株抗體同時測試海鱸發光菌攻毒前後一週之血清，在 ELISA 之測試中，不論以全菌為抗原、或是以發光菌細胞外產物為抗原，相同稀釋倍數之血清，在不同二抗作用下，皆可見相同之趨勢（圖三）。另以發光菌細胞外產物為抗原之西方墨點法分析力價最高之海鱸血清，可見市售與自製之二抗皆有相同之結果呈現（圖四）。未來將本實驗所開發之單株抗體標示上過氧化酶、FITC 等蛋白，可使各種免疫實驗步驟縮短，協助海鱸免疫學相關研究之進行。



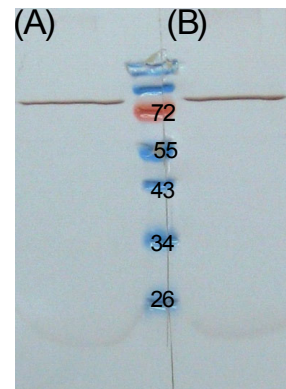
圖一、海鱸血清免疫球蛋白之純化。(A)左 lane 為純化前之海鱸血清之總蛋白，右 lane 為 protein A 親和性管柱純化後之蛋白，經 SDS-PAGE 分離後，以 coomassie blue 染色分析。(B) 左 lane 為純化前之海鱸血清之總蛋白，右 lane 為 protein A 親和性管柱純化後之蛋白，以市售之海鱸 IgM 單株抗體利用西方墨點法測試，可確定 72 kDa 之片段為免疫球蛋白之重鏈。



圖二、海鱸免疫球蛋白單株抗體之篩選。各株融合瘤細胞之上清液以西方墨點法分析可辨識單一約 26 kDa 之免疫球蛋白輕鏈。



圖三、海鱸發光菌攻毒前後血清之 ELISA 測試。bc: 攻毒前之血清，ac: 攻毒後一週之血清。以市售及 1F12、3C12 二株單株抗體測試不同二抗之作用，皆可見相同之趨勢。



圖四、以西方墨點法分析發光菌細胞外產物。以力價最高之海鱸血清為一抗，海鱸免疫球蛋白單株抗體為二抗。可見市售(圖 B)與自製(圖 A)之二抗皆有相同之結果呈現。