

## 抗EB病毒LMP2A单克隆抗体的制备及免疫学特性分析

徐鑫<sup>1</sup>,唐小军<sup>2</sup>,熊林<sup>3</sup>,王欢<sup>1</sup>,李文杰<sup>3</sup>,高畅<sup>2</sup>,熊四平<sup>2</sup>,仇镇宁<sup>2</sup>,Tan Min Han<sup>4</sup>,Vo Jess Honganh<sup>4</sup>,冯振卿<sup>1,2\*</sup>,陈仁杰<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>江苏大学基础医学与医学技术学院,江苏 镇江 212013;<sup>2</sup>南京医科大学病理学系,卫生部抗体技术重点实验室,江苏 南京 210029;<sup>3</sup>南京医科大学第二附属医院病理科,江苏 南京 210011;<sup>4</sup>新加坡生物工程和纳米技术研究院生物医疗器械和诊断中心,新加坡 138669)

**[摘要]** 目的:利用杂交瘤技术制备抗EB病毒潜伏膜蛋白2A(LMP2A)单克隆抗体并分析其免疫学特性。方法:以LMP第2和第5胞外区表位串联制备的融合蛋白免疫BALB/c小鼠,取免疫后小鼠脾细胞与SP2/0细胞融合,制备抗LMP2A的单克隆抗体。通过ELISA、Western blot、免疫荧光、免疫组化、流式细胞术等方法鉴定单抗的免疫学特性。结果:获得1株稳定并持续分泌抗LMP2A单克隆抗体的稳定杂交瘤细胞株,所分泌的单克隆抗体5C12-C4-A6能够特异性识别鼻咽癌细胞膜表面的LMP2A蛋白。结论:本文制备了能够特异性识别鼻咽癌细胞膜表面LMP2A蛋白的单克隆抗体,为进一步进行鼻咽癌临床早期诊断和分子靶向治疗奠定了基础。

**[关键词]** EB病毒;LMP2A;单克隆抗体;免疫学特性

**[中图分类号]** R392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)07-875-08

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140705

## Preparation and identification of immunologic characterization of a monoclonal antibody against latent membrane protein 2A of EBV

Xu Xin<sup>1</sup>, Tang Xiaojun<sup>2</sup>, Xiong Lin<sup>3</sup>, Wang Huan<sup>1</sup>, Li Wenjie<sup>3</sup>, Gao Chang<sup>2</sup>, Xiong Siping<sup>2</sup>, Qiu Zhenning<sup>2</sup>, Tan Min Han<sup>4</sup>, Vo Jess Honganh<sup>4</sup>, Feng Zhenqing<sup>1,2\*</sup>, Chen Renjie<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; <sup>2</sup>Department of Pathology, Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; <sup>4</sup>Institute of Bioengineering and Nanotechnology, Division of Biodevices and Diagnostics, Singapore 138669)

**[Abstract]** **Objective:** To produce a monoclonal antibody (mAb) against latent membrane protein 2A (LMP2A) with hybridoma technology and characterize its immune specificity. **Methods:** The spleen cells from BALB/c mice immunized with epitope fusion protein LMP2A were fused with SP2/0 cells to produce a monoclonal antibody against LMP2A. We further determined immunospecificity of the purified antibody by various immunological assays such as ELISA, Western blotting assays, immunofluorescence, immunohistochemistry and FACS. **Results:** We successfully produced a hybridoma cell line, which continuously and stably secreted anti-LMP2A mAb. Moreover, this mAb can effectively recognize the transmembrane glycoprotein LMP2A over-expressed in nasopharyngeal carcinoma cells and tissues. **Conclusion:** We successfully obtained mouse anti-LMP2A mAb that can specifically recognize the transmembrane glycoprotein LMP2A in nasopharyngeal carcinoma cells. It can be potentially applied to early stage clinical diagnosis and some tumor targeted therapy.

**[Key words]** EBV; LMP2A; monoclonal antibody; immune specificity

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07): 875-882]

**[基金项目]** 江苏省临床医学科技专项(BL2013038);江苏省普通高校研究生科研创新基金(CXZZ12\_0563)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; renjiechen@aliyun.com

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)属人类 $\gamma$ 疱疹病毒,在全球广泛分布,约95%以上的成人携带该病毒,与鼻咽癌、Burkitt淋巴瘤、胃癌等多种肿瘤的发生、发展相关<sup>[1-2]</sup>。在EBV潜伏感染的细胞中,表达的EBV基因有十多种,表达产物包括EBV核抗原(EB nuclear antigen, EBNA)1、2、3A、3B、3C和LP,潜伏膜蛋白(latent membrane protein, LMP)1和2,EBV编码的小RNA(EBER)1和2以及BamHI的转录产物<sup>[3]</sup>。LMP2包括LMP2A和LMP2B,均含12个疏水跨膜区<sup>[4]</sup>。近年来研究表明,EBV潜伏感染的B细胞中均有LMP2A的表达,鼻咽癌和其他EBV相关恶性肿瘤中能持续检测到LMP2A的转录物(mRNA),LMP2A可在没有BCR提供信号的情况下促进B细胞的增殖和存活<sup>[5]</sup>,并且LMP2A是鼻咽癌、淋巴瘤等肿瘤细胞稳定表达的EBV保守抗原,它在病毒的潜伏感染和细胞转化过程中发挥重要作用,并参与调节跨膜信号的转导<sup>[6-7]</sup>。目前认为LMP2A是鼻咽癌等EB病毒相关肿瘤免疫治疗的理想靶抗原<sup>[8]</sup>,因此制备针对LMP2A的单克隆抗体对于鼻咽癌的早期诊断及靶向治疗具有重要意义。本文应用杂交瘤技术,制备抗LMP2A的特异性单克隆抗体,为进一步进行鼻咽癌早期诊断和分子靶向治疗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株和动物

EB病毒阳性细胞系B95-8、SUNE、CNE,EB病毒阴性B淋巴瘤细胞系U937及成纤维细胞系NIH3T3和骨髓瘤细胞系SP2/0由本实验室保存。人结直肠腺癌上皮细胞DLD-1、人肾癌7860细胞、结直肠癌患者来源的EBV介导的永生性细胞系(EBV-immortalized patient-derived cell line)由新加坡生物工程和纳米技术研究院构建并提供。5周龄SPF级纯系BALB/c雌性小鼠(扬州大学实验动物中心)。

#### 1.1.2 试剂

RPMI1640培养基、次黄嘌呤(H)、胸腺嘧啶(T)、氨基蝶呤(A)、弗氏完全佐剂、不完全佐剂(Gibco公司,美国),PEG1500(Sigma公司,美国),Protein G(5 ml)亲和柱购于美国GE公司,HRP标记的羊抗鼠IgG抗体、罗丹明荧光标记羊抗鼠IgG抗体、FITC标记羊抗鼠IgG抗体、TMB底物和PVDF膜(Pierce公司,美国),RIPA裂解液(Santa

Cruz公司,美国),EnVision免疫组化试剂盒(上海泽迈生物技术有限公司)。原核表达的LMP2A表位串联蛋白与抗炭疽单克隆抗体由本实验室制备并保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

鼻咽癌EBV阳性细胞系B95-8细胞、SUNE细胞、CNE细胞培养于含有10%胎牛血清(FBS)、1%青链霉素(PS)的RPMI1640培养基中;EBV阴性B淋巴瘤细胞系U937、成纤维细胞系NIH3T3细胞及骨髓瘤SP2/0细胞和杂交瘤细胞均培养于含有10%FBS、1%PS的1640培养基中,杂交瘤筛选时加入HAT选择培养液。培养条件为37℃ 5% CO<sub>2</sub>。

#### 1.2.2 抗原免疫

初次免疫:0.2 ml LMP2A抗原(100  $\mu$ g)与等量福氏完全佐剂混合后,200  $\mu$ l/只颈背部皮下多点注射BALB/c小鼠并做好标记;加强免疫:同剂量的抗原与福氏不完全佐剂混合,隔周免疫,免疫方法同上,加强2次;末次免疫:融合前3 d,眼眶取血,测定小鼠血清抗体效价,对效价高的小鼠进行再次加强免疫,取等量抗原不加佐剂腹腔加强免疫。

#### 1.2.3 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞的融合

融合前2周复苏小鼠骨髓瘤细胞SP2/0,用20%新生牛血清的RPMI1640培养基传代培养,待细胞生长处于对数生长期、形态良好且活力>95%时进行融合。融合前24~36 h调整细胞浓度为 $3 \times 10^5$ 个/ml。

无菌条件下,取末次免疫后3 d的小鼠脾脏,研磨、吹打,收获脾细胞悬液。将 $1 \times 10^8$ 个脾细胞与 $2 \times 10^7$ 个SP2/0细胞混合,在聚乙二醇(PEG)的作用下融合,铺10块96孔板,用HAT选择培养液选择培养。

#### 1.2.4 阳性杂交瘤细胞的筛选以及克隆化培养

以LMP2A蛋白为抗原包板,ELISA法检测杂交瘤细胞上清,挑选阳性克隆。取2次筛选均为阳性的杂交瘤细胞,运用有限稀释法进行2次以上亚克隆,建立稳定分泌抗LMP2A的特异性单克隆抗体的细胞株。扩大培养,部分液氮冻存。

#### 1.2.5 单克隆抗体的制备、亚类鉴定和纯化

取杂交瘤细胞以 $1 \times 10^7$ 个/ml(体积为200  $\mu$ l)注射至预先用石蜡致敏10 d的BALB/c小鼠腹腔,1~2周后收集小鼠腹水,用于抗体的纯化与鉴定。

免疫球蛋白亚类测定试剂盒测定抗体的亚类:将腹水加入已包被LMP2A蛋白的ELISA酶标板

中,室温孵育 1 h,加入针对不同亚类的抗体,37℃孵育 1 h 后,加入 HRP 标记的抗羊二抗,37℃孵育 30 min,TMB 显色,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止,测定 D(450 nm)值。根据读数结果判断抗体的亚类。

根据亚类选择合适的方法纯化腹水。IgG 类抗体用 Protein G 亲和层析柱纯化,纯化后的抗体用 ELISA 和 SDS-PAGE 鉴定。纯化后超滤浓缩,测定抗体浓度,分装标记后于-40℃冰箱保存。

#### 1.2.6 单克隆抗体的效价测定

将纯化后的抗体用 PBS 倍比稀释,用间接 ELISA 法测定 D(450 nm)值。用串联表位蛋白 LMP2A(1 μg/ml)包被 ELISA 板,加入梯度稀释(1:1 000~1:128 000)纯化后的单克隆抗体,以抗炭疽单克隆抗体 IgG 为同型非特异性对照,梯度稀释(1:1 000~1:128 000)。加入 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体孵育 1 h,洗涤后加入 TMB 底物,5~10 min 后加 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,测定 D(450 nm)值,实验设置 3 个复孔。

#### 1.2.7 Western blot 检测

用含 1% PS,10% FBS 的 RPMI1640 的培养基,培养细胞 B95-8、SUNE、CNE、U937、NIH3T3。培养于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 的孵箱内。每天观察细胞生长状态,定期换液。细胞长满后,胰酶消化细胞,收集到 15 ml 离心管中,PBS 清洗 1~2 次。离心 1 000 r/min,5 min。细胞沉淀用 20 μl PBS 重悬,与 2×loading buffer 等体积混合加热后上样进行蛋白电泳。转 PVDF 膜后用含 5%脱脂奶粉的 PBS 室温封闭 2 h。PBST 洗涤,重复 3 次。加入 1:100 稀释的抗 LMP2A 单克隆抗体,室温下于摇床上小幅度摇晃 30 min 后 4℃过夜。次日,PBST 洗涤 3 次,然后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:2 000 稀释),室温下于摇床上摇晃 1 h。PBST 再洗涤 4 次,加入 HRP 底物冲洗 PVDF 膜,约 45 s 后曝光。

#### 1.2.8 免疫荧光检测

SUNE、NIH3T3、结直肠癌患者来源 EBV 永生细胞系 LCLs、人结直肠癌上皮细胞 DLD-1、人肾癌 7860 细胞分别培养于 96 孔板中(1 × 10<sup>3</sup> 个/孔),细胞生长至 70%时,用预温的 PBS 轻洗 2 遍,3%牛血清蛋白(BSA)室温封闭 1 h 后,加入纯化后的单克隆抗体作为一抗,50 μl/孔 2 h,同时以 SP2/0 骨髓瘤细胞腹水为阴性对照。预冷的 PBS 轻轻洗 3 次后,加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:2 000)作为二抗,避光 37℃孵育 1 h;PBS 小心清洗 6 次后加入 DAPI(1 mg/ml)染细胞核,避光孵育 15 min,PBS

冲洗,荧光倒置显微镜下观察并拍照。

#### 1.2.9 流式细胞术分析

培养 293T 细胞,待细胞密度至 70%左右,转染本实验室制备的 pBaction-LMP2A 真核表达质粒,2 d 后取转染后细胞和未转染的 293T 细胞各 2 × 10<sup>6</sup> 个,4℃预冷的 PBS 清洗后,分别加入纯化后抗体 50 μl 和无关鼠源抗体 50 μl (1:1 000),4℃孵育 45 min,PBS 冲洗后加入 50 μl FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,4℃避光孵育 30 min 后,PBS 冲洗 3 次,流式细胞仪检测,以 SP2/0 骨髓瘤细胞腹水(1:1 000)为阴性对照。

#### 1.2.10 肿瘤组织的免疫组化检测

取 33 例鼻咽癌患者组织石蜡标本,制成 4 μm 厚切片,常规脱蜡水化,蒸馏水洗后用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,于微波炉中高温修复抗原,每次 5 min 共 3 次;滴加 5%小牛血清封闭 30 min 后,加入稀释后终浓度为 0.25 μg/ml 抗 LMP2A 单抗,以 SP2/0 细胞腹水、浓度为 0.25 μg/ml 不相关抗体 Fab 以及 PBS 为阴性对照,4℃过夜,次日在 37℃下复温 45 min,PBS 清洗 3 次,滴加羊抗鼠 EnVision™ 试剂室温下放置 1 h,PBS 洗 3 次各 3 min,滴加 DAB 溶液显色 5~10 min,在显微镜下掌握染色程度。自来水冲洗终止显色,苏木素复染细胞核 45 s,盐酸乙醇分化返蓝;梯度酒精脱水,二甲苯透明中性树胶封片镜检。

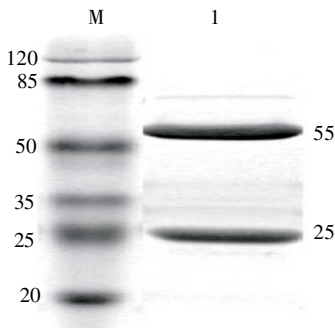
## 2 结果

### 2.1 抗 LMP2A 单克隆抗体阳性细胞株的筛选及抗体的制备

按照常规方法将 LMP2A 蛋白免疫小鼠并将其脾细胞与 SP2/0 细胞融合,待克隆形成 10~14 d 后取细胞上清进行 ELISA 检测。将阳性克隆经有限稀释法连续 2 次亚克隆培养,获得稳定分泌抗 LMP2A 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,所分泌的抗体命名为 5C12-C4-A6。扩大培养后,注射至预先致敏的小鼠腹腔,制备腹水。经免疫球蛋白亚类检测试剂盒鉴定单克隆抗体 5C12-C4-A6 的重链为 IgG<sub>1</sub>,轻链为 κ。再经 ProteinG(5 ml)亲和层析柱纯化,并超滤浓缩,获得抗 LMP2A 单克隆抗体,浓度为 2.70 mg/ml。纯化后的抗体进行 SDS-PAGE 电泳,在 55 000 和 25 000 处出现目的条带,分别为抗体的重链和轻链(图 1)。

### 2.2 抗 LMP2A 单克隆抗体效价检测

以 LMP2A 蛋白作为抗原包板(1 μg/ml),采用间接 ELISA 法测定抗 LMP2A 抗体效价,两种抗体



M: Marker; 1: 纯化后单克隆抗体 5C12-C4-A6。

图 1 纯化抗体的 SDS-PAGE 检测

Figure 1 SDS-PAGE analysis of purified antibody

的起始浓度均为 2.7 μg/ml (1:1 000)。结果显示,在 1:128 000 稀释度时 (21 pg/ml), 单克隆抗体 5C12-C4-A6 仍可特异性结合 LMP2A 抗原表位, *D* (450 nm) 值为 0.462 (图 2)。

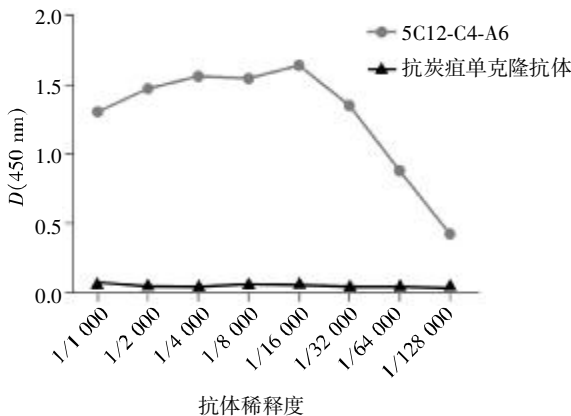


图 2 抗 LMP2A 单克隆抗体效价的检测

Figure 2 ELISA analysis of anti-LMP2A mAb reactivity

### 2.3 抗 LMP2A 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

收集 5 种不同的细胞系 CNE、NIH3T3、U937、SUNE、B95-8 后裂解,煮沸,进行 SDS-PAGE,转至 PVDF 膜上后,用 5C12-C4-A6 进行 Western blot (图 3)。结果提示抗 LMP2A 单克隆抗体 5C12-C4-A6 能够与 EBV 阳性细胞系 CNE、SUNE、B95-8 中的 LMP2A 蛋白特异性结合。

### 2.4 抗 LMP2A 单克隆抗体的细胞免疫荧光检测

在荧光显微镜下观察抗 LMP2A 单克隆抗体与 SUNE 细胞的结合特性及其在 SUNE 细胞中的定位。结果如图 4 所示,绿色荧光信号主要存在于 SUNE 细胞膜和胞质中,表明抗 LMP2A 单抗能够与 EBV 阳性细胞系 SUNE 细胞中 LMP2A 蛋白特异性结合并且定位在细胞膜和胞质中。

纯化后的抗 LMP2A 单克隆抗体作为一抗与

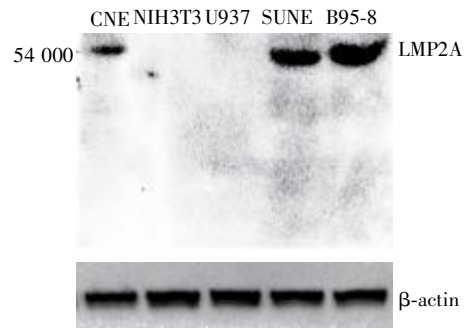


图 3 抗 LMP2A 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

Figure 3 Identification of anti-LMP2A monoclonal antibody by Western blotting

EBV 介导的永生化细胞系作用,同时人肾癌 7860 和 DLD-1 细胞系作为阴性对照,结果提示该单抗能够特异性结合 EBV 介导的永生化细胞系中的天然 LMP2A 蛋白,然而在肾癌 7860 和 DLD-1 2 种细胞系中几乎见不到特异性荧光 (图 5)。

### 2.5 抗 LMP2A 单克隆抗体的流式细胞术检测

如图 6 所示,抗 LMP2A 单克隆抗体 5C12-C4-A6 与转染 pBaction-LMP2A 真核表达质粒的 293T 细胞有良好的结合力,结合率为 57.1%,而阴性细胞 293T 细胞与单抗 5C12-C4-A6 的结合率仅为 1.49%;293T 细胞转染 pBaction-LMP2A 真核表达质粒与不相关抗体的结合率为 10.5%。

### 2.6 抗 LMP2A 单克隆抗体的肿瘤组织免疫组化检测

纯化后的单克隆抗体 5C12-C4-A6 用于免疫组化检测人鼻咽癌患者组织中的 LMP2A 蛋白。棕黄色阳性信号定位于胞膜与胞浆 (图 7),33 例鼻咽癌组织标本中 31 例为阳性,阳性率为 93.94%。

## 3 讨论

LMP2A 是近年来研究 EB 病毒在人类致癌作用中倍受关注的磷酸化膜蛋白,定位于 B 细胞脂筏,脂筏是质膜上富含胆固醇和鞘磷脂的微结构域,是细胞膜上的信号跨膜转导平台<sup>[5]</sup>。LMP2A 由 2.3 kb mRNA 编码,起始于 EBV 线性基因组的第 166 607 位核苷酸,由 U5 区的 1 个外显子和 U1 区的 8 个外显子组成<sup>[9]</sup>。LMP2A 蛋白分子量为 54 000,由 497 个氨基酸组成,包括 12 个高度疏水的跨膜功能区,与 N 端 119 个氨基酸和 C 端 28 个氨基酸共同组成完整的 LMP2A 分子<sup>[10]</sup>。LMP2A 的胞质氨基端含有大量的酪氨酸残基,其中第 74 位和第 85 位酪氨酸 (Y74/Y85),构成免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM) 功能的特征性序列 (YXXL);以及位于第 112

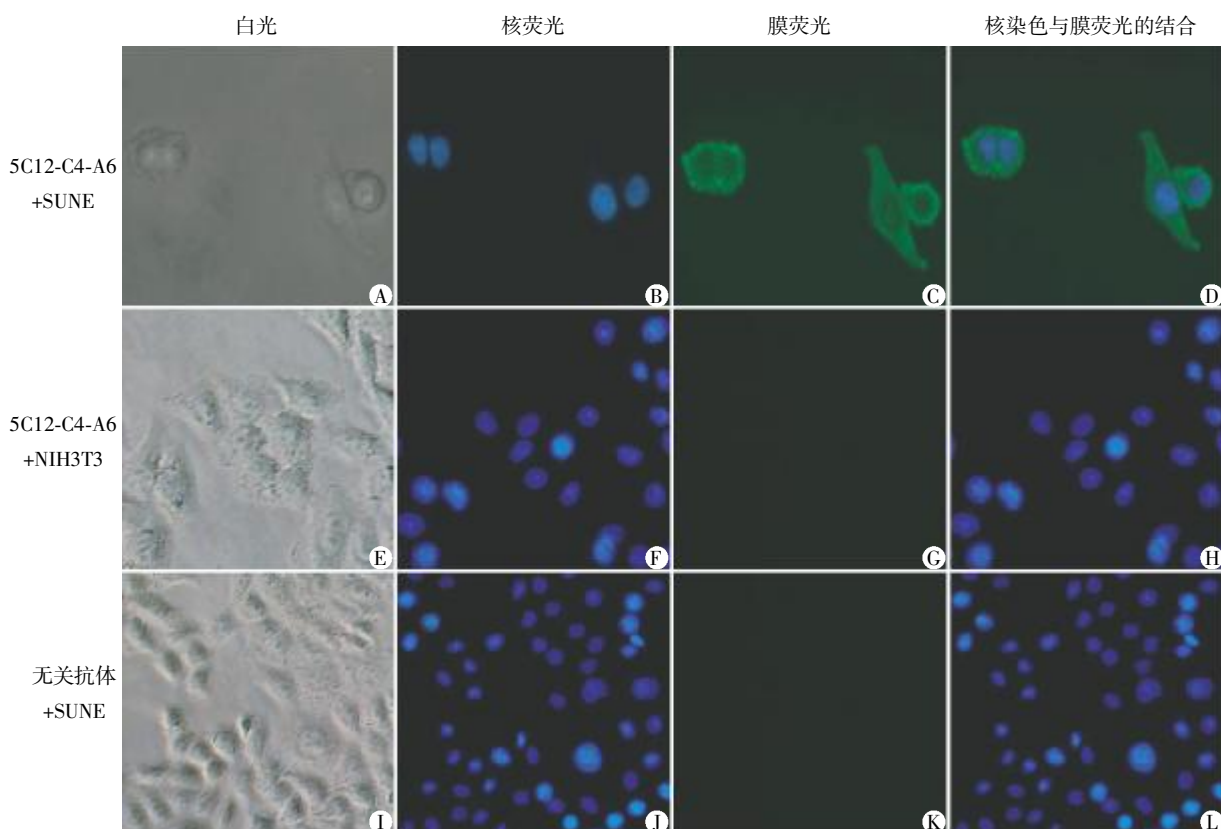


图 4 抗 LMP2A 单克隆抗体免疫荧光法检测 LMP2A 蛋白在 SUNE 细胞以及 NIH3T3 细胞中的表达与定位

Figure 4 Immunofluorescence detection of expression and localization in SUNE cells and NIH3T3 cells using anti-LMP2A monoclonal antibody

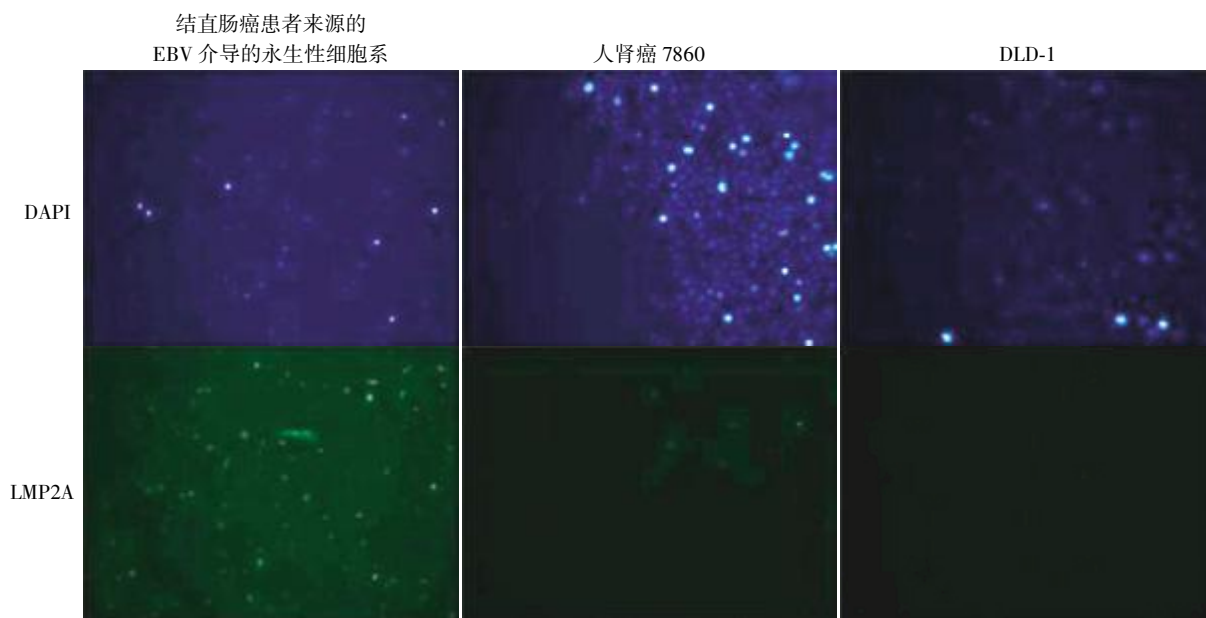


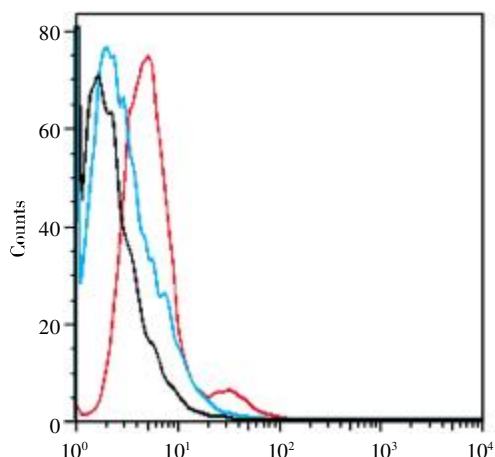
图 5 患者来源的 EBV 介导的永生性细胞系的免疫荧光检测

Figure 5 The immunofluorescence analysis of EBV-immortalized patient-derived cell line

位的 LMP2A 酪氨酸有一个 c-Src 结合位点,能够结合 Src 家族酪氨酸激酶 Lyn 的 SH2 结构域。LMP2A 在癌变过程中的作用倍受关注,它也可能参与了

鼻咽癌的转移与复发过程<sup>[11]</sup>,是目前公认的病毒癌蛋白<sup>[12]</sup>。LMP2A 本身并非转化基因,但是 LMP2A 的氨基 N 末端含有 2 个富含脯氨酸基序(PPPPY)以



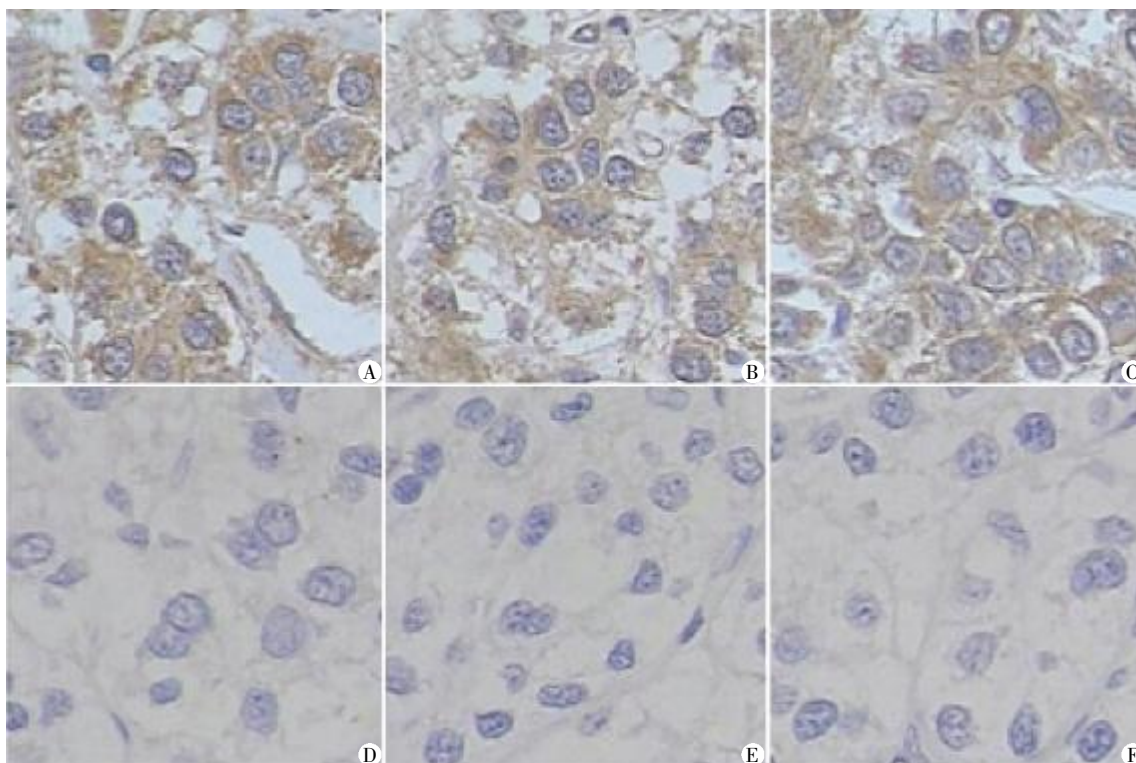


293T 细胞本底(黑色);293T 转染 pBaction-LMP2A 质粒+无关抗体(蓝色);293T 转染 pBaction-LMP2A 质粒+单抗 5C12-C4-A6(红色)。

图6 抗 LMP2A 单克隆抗体流式细胞术检测

Figure 6 Fluorescence-activated cell sorter analysis of anti-LMP2A mAb

及2个保守的PY基序(Y101、Y112)。PPPPY构成E3泛素连接酶AIP4/Itchy,能够潜在介导细胞蛋白之间的相互作用,因此提示,LMP2A可能在EBV的潜伏感染与转化中发挥一定作用,并且LMP2A是鼻咽癌细胞等肿瘤细胞中能够稳定表达的保守抗原<sup>[13]</sup>。LMP2A负调控B细胞抗原受体(BCR)从而维持EBV潜伏感染。LMP2A通过清除来自脂筏的BCR以及酪氨酸激酶(Lyn、Syk)泛素介导的泛素化降解阻断B细胞信号转导。这种途径可以阻止BCR引起的细胞内钙释放,蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase,PTK)的信号转导,以及转向溶解性复制。LMP2A具有特殊的转化和抗细胞凋亡的特性,并且在某些B细胞中充当至关重要的模拟BCR的角色从而达到干扰B淋巴细胞发育过程中转录因子转录调控的目的<sup>[14-16]</sup>。因此LMP2A可作为鼻咽癌等EBV相关恶性肿瘤免疫治疗的理想靶抗原,用于鼻



A:鼻咽癌病例1;B:鼻咽癌病例2;C:鼻咽癌病例3;D:无关抗体;E:SP2/0细胞腹水;F:PBS阴性对照。

图7 抗 LMP2A 单克隆抗体 5C12-C4-A6 的免疫组化染色(EnVision,×200×)

Figure 7 Immunohistochemistry of anti-LMP2A monoclonal antibody(EnVision,×200)

咽癌等肿瘤的早期诊断和分子靶向治疗。

本文以本实验室制备的LMP2A蛋白作为抗原免疫BALB/c小鼠,制备了1株能够稳定分泌抗LMP2A单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为5C12-C4-A6。经过亲和层析纯化后,用间接ELISA法测定

效价发现在1:128 000的稀释度(抗体浓度为21 pg/ml)时,仍可较好地识别LMP2A抗原表位。采用SDS-PAGE、Western bolt、免疫荧光、流式细胞术(FACS)技术从不同层面对抗LMP2A单克隆抗体5C12-C4-A6的免疫学特性进行了鉴定和分析。免疫

荧光结果提示在EBV阳性细胞系SUNE细胞中,该单抗特异性结合并且定位在细胞膜与胞浆中,并且该单抗也能够与结直肠癌患者来源的EBV介导的永生性细胞系中的天然LMP2A蛋白特异性结合。FACS的结果提示5C12-C4-A6与转染了pBaction-LMP2A真核表达质粒的293T细胞的结合率为50.7%,与无关抗体的结合率为10.5%,而阴参细胞293T与该单抗5C12-C4-A6的结合率仅为1.49%,这些都提示本文制备的单抗5C12-C4-A6能够特异性结合鼻咽癌细胞中的LMP2A蛋白。

本文制备的单抗不仅能与EBV阳性细胞系中的LMP2A蛋白抗原特异性结合,免疫组化结果还表明该抗体能够与鼻咽癌组织中天然构象的LMP2A蛋白特异性结合,结合部位定位在胞浆与胞膜。33例鼻咽癌组织标本中31例为阳性,阳性率为93.94%。该抗体可用于EBV阳性鼻咽癌、淋巴瘤的病理学研究,也为鼻咽癌、淋巴瘤的早期诊断和分子靶向治疗奠定了基础<sup>[19]</sup>。

本文中抗LMP2A单克隆抗体的效价检测结果显示,出现了抗体稀释度在1:16 000的效价反而高于1:1 000~1:8 000时效价的现象。查阅文献后发现,1929年Heidelberger<sup>[20]</sup>利用等量抗体检测浓度递增抗原,当抗原浓度较低,抗体浓度相对较高时,沉淀反应不明显;当抗原浓度增加到与抗体浓度比例合适时,沉淀反应明显;继续增加浓度时,沉淀反应反而减弱。因此间接ELISA结果显示在1:1 000~1:8 000稀释比例下单克隆抗体5C12-C4-A6因浓度过高反而与抗原结合能力受到抑制。

本研究成功制备出抗LMP2A特异性单克隆抗体,为进一步进行LMP2A蛋白的生物学功能、EBV相关肿瘤的组织学诊断以及EBV相关LMP2A作用机制等的研究奠定了基础。单克隆抗体特异性强、稳定性好、专一性高,但是该单克隆抗体为鼠源性,易引起人抗鼠免疫反应。该单抗可运用基因工程技术制备并优化出人鼠嵌合抗体,从而降低免疫原性,更好地应用于EB病毒相关鼻咽癌分子靶向治疗。

#### [参考文献]

[1] Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies [J]. *Int J Exp Pathol*, 2001, 82(3): 149-170

[2] Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes [J]. *Mol Pathol*, 2000, 53(5): 238-247

[3] Konishi K, Maruo S, Kato H, et al. Role of Epstein-Barr

virus-encoded latent membrane protein 2A on virus-induced immortalization and virus activation [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 6): 1451-1456

[4] Fruehling S, Lee SK, Herrold R, et al. Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction [J]. *J Virol*, 1996, 70(9): 6216-6226

[5] Scholle F, Longnecker R, Raab-Traub N. Epithelial cell adhesion to extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2; a role for C-terminal Src kinase [J]. *J Virol*, 1999, 73(6): 4767-4775

[6] Seo MD, Park SJ, Kim HJ, et al. Identification of the WW domain-interaction sites in the unstructured N-terminal domain of EBV LMP2A [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(1): 65-70

[7] 赵利容, 罗泊涛, 陈小毅. EB病毒编码的潜伏膜蛋白2A在鼻咽癌中的研究进展 [J]. *山东医药*, 2013, 53(28): 102-103

[8] Straathof KC, Leen AM, Buza EL, et al. Characterization of latent membrane protein 2 specificity in CTL lines from patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma and lymphoma [J]. *J Immunol*, 2005, 175(6): 4137-4147

[9] 朱伟, 罗兵. EB病毒潜伏膜蛋白LMP2A的研究进展 [J]. *国际病毒学杂志*, 2007, 14(4): 120-123

[10] 罗春艳, 甘润良. EB病毒与宿主细胞恶性转化的关系 [J]. *医学综述*, 2009, 15(11): 1613-1617

[11] Kong QL, Hu LJ, Cao JY, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces an epithelial-mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like cancer cells in nasopharyngeal carcinoma [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(6): e1000940-14

[12] Smith C. EBV and nasopharyngeal carcinoma: a target for cellular therapies [J]. *Immunotherapy*, 2013, 5(8): 821-824

[13] Fish K, Chen J, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A enhances MYC-driven cell cycle progression in a mouse model of B lymphoma [J]. *Blood*, 2014, 123(4): 530-540

[14] Fukuda M, Longnecker R. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation [J]. *J Virol*, 2005, 79(13): 8655-8660

[15] Morrison JA, Raab-Traub N. Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and acti-

vation of  $\beta$ -catenin signaling [J]. *J Virol*, 2005, 79 (4): 2375-2382

[16] Fotheringham JA, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 effects on epithelial acinus development reveal distinct requirements for the PY and YEEA motifs [J]. *J Virol*, 2013, 87(24): 13803-13815

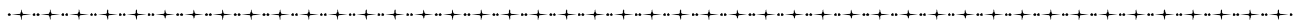
[17] 梁洁, 刘琼琼, 张慧林, 等. 抗人滋养层细胞表面抗原-2 单抗的制备及免疫学特性分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(5): 645-646

[18] 吕洪臻, 唐小军, 熊四平, 等. 抗炭疽毒素保护性抗原单克隆抗体的制备及功能分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(11): 1497-1501

[19] Zhang D, Mao Y, Xiong L, et al. Characterization of human Fab antibody fragments specific to LMP1 (HLEAFab) in nasopharyngeal carcinoma for potential molecular diagnosis and therapeutic applications [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(5): 1694-1698

[20] Heidelberger M, Kendall FE. A quantitative study of the precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody [J]. *J Exp Med*, 1929, 50(6): 809-823

[收稿日期] 2014-03-06



(上接第 869 页)

[4] Lin JC, Wu YY, Wu JY, et al. TROP2 is epigenetically inactivated and modulates IGF-1R signalling in lung adenocarcinoma [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(6): 472-485

[5] Bignotti E, Todeschini P, Calza S, et al. Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(5): 944-953

[6] Fong D, Spizzo G, Gostner JM, et al. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity [J]. *Modern Pathol*, 2008, 21(2): 186-191

[7] Cubas R, Li M, Chen C, et al. Trop2: a possible therapeutic target for late stage epithelial carcinomas [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 309-314

[8] 郑媛媛. 肿瘤的单抗靶向疗法在国内的研究和应用进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(1): 70-73

[9] 王小英, 林红, 张慧林, 等. 人源抗 Trop-2 抗体 Fab 的制备及条件优化 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(1): 35-39

[10] 林红, 梁洁, 张慧林, 等. 人源抗滋养层细胞表面抗原-2 基因工程抗体 Fab 的制备及特性分析 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(10): 1101-1107

[11] 梁洁, 刘琼琼, 张慧林, 等. 抗人滋养层细胞表面抗原-2 单抗的制备及免疫学特性分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(5): 645-650

[12] 朱洁, 王绮如. 单克隆抗体药物在肿瘤靶向治疗中的应用与展望 [J]. *中国医师杂志*, 2007, 9(7): 1006-1007

[13] Kodama Y, Suzuki H, Dohra H, et al. Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 183

[14] Nguyen MT, Koo BK, Thi VTT, et al. Prokaryotic soluble overexpression and purification of bioactive human growth hormone by fusion to thioredoxin, maltose binding protein, and protein disulfide isomerase [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89038

[15] Porowinska D, Wujak M, Roszek K, et al. Prokaryotic expression systems [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, 67: 119-129

[16] Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(21): 3613-3634

[17] 冯宝刚, 朱超, 王会, 等. 中国斗鸡 DJ-1 基因克隆与原核、真核表达研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(5): 70-74

[18] 向军俭, 童吉宇, 王宏. 抗体技术研究进展 (1): 人源抗体技术 [J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2012, 33(5): 524-530

[19] 于长明, 徐静, 童贻刚, 等. 人源抗-HAV 全分子抗体在 CHO 细胞中的表达 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26(3): 176-181

[20] Wang D, Cui Y, Jiang Z, et al. Knockdown expression of eukaryotic initiation factor 5 C-terminal domain containing protein extends lifespan in *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(2): 465-469

[21] Wang PL, Bao Y, Yee MC, et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90859

[22] 贺江, 樊明涛, 梁颖, 等. 抗独特型抗体在小分子物质免疫检测中的应用 [J]. *分析化学*, 2010, 38(9): 1366-1370

[23] 孙逊, 肖冰, 张振书, 等. 小分子抗体在肿瘤诊治方面的应用 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2003, 18(1): 71-75

[收稿日期] 2014-03-17