

猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白 单克隆抗体的制备与鉴定

王志红^{1,2}, 张改平², 郭军庆², 李青梅², 王寅彪², 陈 稳², 王爱萍¹(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室/
河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了制备猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PPRSV) 的单克隆抗体, 利用猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PPRSV) GP5 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 取脾细胞和 NS0 浆细胞瘤细胞进行融合, 经间接 ELISA 和阻断 ELISA 筛选、有限稀释法克隆化获得 3 株能稳定分泌抗 PRRSV GP5 蛋白单克隆抗体的 (mAb) 杂交瘤细胞株, 命名为 4B7、2C5 和 2E4。间接免疫荧光 (IFA) 和免疫过氧化物酶单层试验 (IPMA) 结果显示, 3 株 mAb 均与感染 PRRSV BJ-4 株的 Marc-145 细胞特异性反应, 表明其可识别天然病毒蛋白。mAb 的 Ig 亚类均为 IgG1, 细胞培养上清和腹水的 ELISA 效价分别为 1 : 256 和 1 : 51 200, Western-blot 分析表明, mAb 均特异性识别 PRRSV GP5 蛋白。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; GP5 蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)06-0144-04

Development and Characterization of Monoclonal Antibody against GP5 Protein of Porcine Reproduction and Respiratory Syndrome Virus

WANG Zhi-hong^{1,2}, ZHANG Gai-ping², GUO Jun-qing², LI Qing-mei², WANG Yin-biao²,
CHEN Wen², WANG Ai-ping^{1*}

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/Henan Provincial Key Laboratory
of Animal Immunology, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to prepare monoclonal antibodies (mAbs) against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PPRSV), the recombination GP5 protein of PRRSV was used to immunize BALB/c mouse and the spleen cells were fused with NS0 cells. Three hybridoma cell lines producing mAbs specific to the GP5 protein, designated as 4B7, 2C5 and 2E4, were obtained after identified by indirect and inhibit ELISAs followed by limiting dilution subcloning. All of the mAbs were shown to react specifically with the Marc-145 cells infected with PRRSV BJ-4 strain in indirect immunofluorescence assay (IFA) and immunoperoxidase monolayer assays (IPMA). Ig subclass of the mAbs was determined as IgG1, and the ELISA titers of cell supernatant and ascites were 1 : 256 and 1 : 51 200, respectively. Western-blot analysis showed that the mAbs were specific to the GP5 protein of PRRSV.

Key words: porcine reproduction and respiratory syndrome virus (PPRSV); GP5 protein; monoclonal antibody

收稿日期: 2012-02-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31072122)

作者简介: 王志红 (1983-), 女, 河南濮阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物分子免疫学。E-mail: wangzhibong.0718@163.com

* 通讯作者: 王爱萍 (1970-), 女, 青海西宁人, 教授, 主要从事动物免疫学研究。E-mail: pingaw@126.com

猪繁殖与呼吸综合征(PRRSV)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒引起的一种高度传染性疾病,又称“猪蓝耳病”^[1-2]。该病以怀孕母猪流产、早产、死胎和木乃伊胎等繁殖障碍以及仔猪和育肥猪的呼吸道症状为主要特征。该病自1996年在我国华北地区暴发以来^[3],已蔓延到我国大部分地区,特别是2006年由高致病性(highly pathogenic) PRRSV(HP-PRRSV)引起的高致病性 PRRS,发病率高、死亡率高、传播迅速,给我国养猪业带来了巨大的经济损失^[4]。

PRRSV 是一种套式正链 RNA 病毒,属动脉炎病毒科。PRRSV 按血清型不同可分为美洲型和欧洲型。病毒含有9个开放式阅读框,即 ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b、ORF3、ORF4、ORF5、ORF6 和 ORF7,多数相邻的 ORF 存在部分重叠区^[5]。ORF1 编码病毒的非结构蛋白,其余编码结构蛋白。其中,ORF5 编码糖基化膜蛋白 GP5。GP5 蛋白为病毒的主要糖基化结构蛋白,参与病毒入侵宿主细胞过程,并诱导产生中和抗体。GP5 具有6个抗原决定簇,其中有一个有血清特异性的线性决定簇,能在体外中和病毒,与病毒免疫保护作用有关^[6]。本试验以 GP5 重组蛋白免疫小鼠,利用杂交瘤技术制备抗 GP5 蛋白单克隆抗体(mAb),并获得3株识别天然病毒蛋白的功能性单克隆抗体,旨在为该病快速诊断和免疫防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

PRRSV BJ-4 株由中国农业大学杨汉春教授惠赠,Marc-145 细胞和 NS0 浆细胞瘤细胞均由河南省动物免疫学重点实验室保存,BALB/c 纯系小鼠购于郑州大学医学院实验动物中心,单克隆抗体亚型鉴定试剂盒为 Sigma 公司产品,3-氨基-9-乙基吡唑(AEC)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 抗原制备 按河南省动物免疫学重点实验室 Wang 等报道的方法制备 GP5 重组蛋白^[7]。以异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导含重组表达质粒 pET-GP5 的大肠杆菌 BL21(DE3),超声波裂解诱导表达菌体,用 8 mol/L 的尿素溶解包涵体,经镍螯合亲和层析纯化后,以梯度透析复性 GP5 表达蛋白,用作免疫抗原和检测抗原。

1.2.2 病毒培养 用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基在 96 孔细胞培养板中培养 Marc-145 细胞,

细胞长至 90% 融合度时接种适当稀释的 PRRSV BJ-4 株病毒,37℃ 下作用 1 h,补加 200 mL 含 2% 新生牛血清的 DMEM 培养基,置 37℃ 下培养 24~48 h,弃去培养液,用 PBST 洗涤 3 次,以含 1% H₂O₂ 的冷无水乙醇 4℃ 下固定 20 min,用于间接免疫荧光试验(IFA)和免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)^[8]。

1.2.3 小鼠免疫 选取 8~12 周龄 BALB/c 小鼠,以 GP5 重组蛋白为免疫抗原进行免疫。首免以弗氏完全佐剂乳化抗原,皮下多点注射,200 mL/只,每隔 3 周腹腔注射弗氏不完全佐剂乳化抗原加强免疫,三免后 2 周尾静脉采血,以间接 ELISA 测定免疫小鼠血清抗体效价。细胞融合前 3 d,尾静脉注射 GP5 蛋白进行超强免疫。

1.2.4 细胞融合与抗体筛选 取免疫小鼠脾细胞与 NS0 细胞按常规方法进行细胞融合,以 HAT 选择性培养基进行选择培养,7~14 d 后取杂交瘤细胞培养上清,利用 GP5 重组蛋白为检测抗原以间接 ELISA 进行抗体初筛,再利用猪 PRRSV 阳性血清以阻断 ELISA 对阳性克隆进行进一步抗体筛选;对强阳性细胞克隆进行 3 次有限稀释法克隆化,建立杂交瘤细胞株。

1.2.5 单克隆抗体的制备 将克隆化的杂交瘤细胞株扩大培养,收集细胞培养上清;以 10⁷ 个杂交瘤细胞腹腔注射 BALB/c 小鼠(液体石蜡致敏),1 周后抽取小鼠腹水,测定细胞培养上清和腹水的 ELISA 效价。

1.2.6 ELISA 的筛选 以 GP5 重组蛋白为检测抗原建立间接 ELISA 和阻断 ELISA 方法,用于杂交瘤细胞的抗体筛选。以 2.5 μg/mL 的 GP5 重组蛋白包被酶标板,细胞培养上清为一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 抗体为二抗进行间接 ELISA 检测,以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物进行显色,用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止显色后测定检测孔吸光值(OD₄₅₀),计算 P/N 值=OD 待检/OD 阴性,P/N 值≥2.5 判为阳性。以阻断 ELISA 对阳性克隆进行复检,先将适当稀释的猪 PRRSV 阳性血清加入 GP5 蛋白检测孔,37℃ 下作用 30 min,设猪阴性血清和空白对照,洗涤后加入细胞培养上清同上进行 ELISA 检测,计算阻断率(PD)=(OD 阴性-OD 阳性)/OD 阴性×100%,以 PD≥30% 判为阳性。

1.2.7 间接免疫荧光(IFA)试验 在 96 孔病毒培养板中加入待检杂交瘤细胞培养上清,50 μL/孔,37℃ 下作用 1 h,设小鼠阴性和阳性血清对照;洗涤后加 1:100 稀释的异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗

鼠 IgG 抗体, 37 °C 下作用 30 min, 充分洗涤后在荧光显微镜下观察。

1.2.8 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA) 在 96 孔病毒培养板中同上加入待检杂交瘤细胞培养上清作用, 以 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体为二抗进行检测, AEC 为底物进行显色, 在光学显微镜下观察结果。

1.2.9 单克隆抗体亚型鉴定 以单克隆抗体亚型鉴定试剂盒测定单克隆抗体的 Ig 亚型, 操作方法按试剂盒说明书进行。

1.2.10 Western-blot 检测腹水 GP5 重组蛋白 经 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 半干法转印至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶 4 °C 下

封闭过夜, 加 1 : 200 稀释的 mAb 腹水, 37 °C 下作用 1 h, 以 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体为二抗进行检测, AEC 为底物进行显色, 用单蒸水终止显色。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的复检结果

小鼠经 3 次免疫后血清抗体效价达 1 : 6 400, 取免疫小鼠脾细胞与 NS0 浆细胞瘤细胞进行细胞融合, 间接 ELISA 初筛获得 58 个阳性克隆 ($OD_{450} > 0.45$), 对阳性细胞克隆进行阻断 ELISA 复检, 经连续 3 次克隆化后, 建立了 3 株稳定分泌抗 GP5 蛋白 mAb 的杂交瘤细胞株, 分别命名为 4B7、2C5 和 2E4, 其阻断 ELISA 结果见表 1。

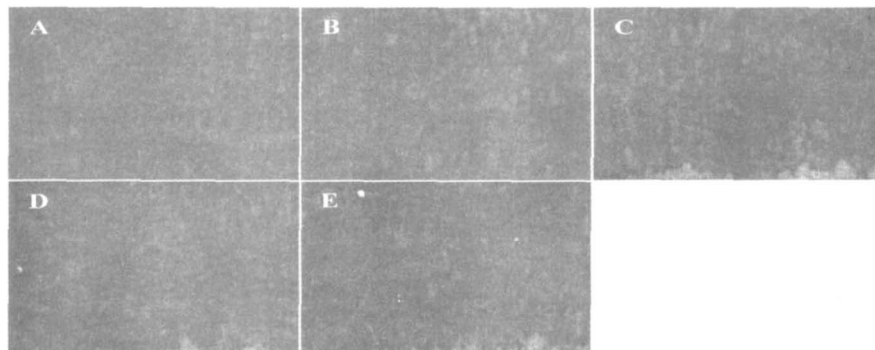
表 1 单克隆抗体的阻断 ELISA 检测结果

单克隆抗体	OD ₄₅₀			阻断率/%
	阳性血清	阴性血清	PBS	
4B7	0.379±0.063	0.573±0.057	0.903±0.144	33.90
2C5	0.485±0.100	0.834±0.178	0.971±0.169	41.91
2E4	0.311±0.088	0.614±0.050	0.718±0.141	49.27

2.2 单克隆抗体的 IFA 与 IPMA 测定

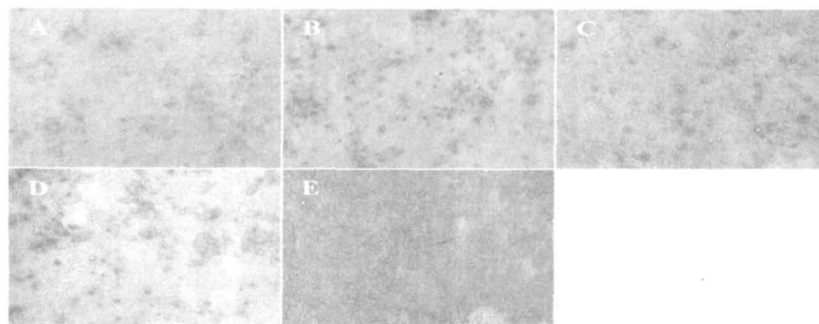
用 PRRSV BJ-4 株感染 Marc-145 细胞, 分别以 IFA 和 IPMA 测定 mAb 4B7、2C5、2E4 与病毒感染细胞的反应性, 结果 3 株 mAb 均可特异结合

PRRSV, 呈现特异性荧光(图 1)和棕红色显色(图 2), 其中 mAb 4B7 的荧光最强, 而 mAb 2E4 的荧光偏弱, 表明该 3 株 mAb 均特异性识别 PRRSV 天然病毒蛋白, 但结合能力存在差异。



A. mAb 4B7; B. mAb 2C5; C. mAb 2E4; D. 阳性血清; E. 阴性血清

图 1 PRRSV 单克隆抗体的 IFA 测定结果

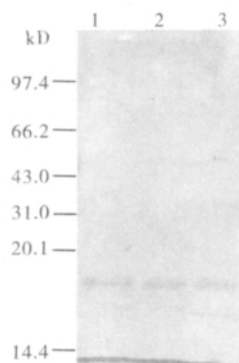


A. mAb 4B7; B. mAb 2C5; C. mAb 2E4; D. 阳性血清; E. 阴性血清

图 2 PRRSV 单克隆抗体的 IPMA 测定结果

2.3 单克隆抗体的鉴定结果

培养杂交瘤细胞并诱生小鼠腹水,以间接 ELISA 测定 mAb 的细胞上清和腹水的抗体效价分别为 1:256 和 1:51 200。单克隆抗体亚型鉴定结果表明 mAb 的 Ig 亚型均为 IgG1。Western-blot 分析可见 16 kD 左右单一蛋白显色条带(图 3),表明 mAb 特异识别 PRRSV GP5 蛋白。



1. mAb 4B7; 2. mAb 2C5; 3. mAb 2E4

图 3 PRRSV 单克隆抗体 Western-blot 分析

3 结论与讨论

采用合适的抗原和抗体筛选方法,避免免疫抗原和检测抗原中杂蛋白的干扰是制备单克隆抗体的关键因素^[9-10]。PRRSV 为有囊膜病毒,其囊膜蛋白容易在病毒纯化过程中丢失,提纯 GP5 病毒蛋白困难较大,另一方面,纯化病毒仍含有大量细胞蛋白,以纯化的 PRRSV 作为免疫原,再用该抗原作为检测抗原筛选单克隆抗体,就会出现大量假阳性结果,严重干扰单克隆抗体筛选。本试验利用高度纯化的 GP5 重组蛋白免疫小鼠,以 GP5 重组蛋白为检测抗原进行间接 ELISA 初步筛选后,利用猪 PRRSV 阳性血清进一步进行阻断 ELISA 筛选,既保证了良好的免疫效果,又通过阳性血清有效控制的无关蛋白的非特异性反应,筛选获得 3 株抗 GP5 蛋白单克隆抗体,证明以重组病毒抗原代替天然病毒抗原制备和筛选功能性单克隆抗体是切实可行的。

原核表达的重组蛋白特别是复性蛋白,在蛋白构象上与天然病毒蛋白存在差异,动物识别重组蛋白的抗原表位与天然病毒蛋白也有所不同。本试验利用 PRRSV 感染细胞对所生产的 3 株 mAb 进行 IFA 和 IPMA 测定,从而确保了单克隆抗体的反应特异性^[11-12]。IFA 和 IPMA 检测发现 3 株 mAb 均可特异结合 PRRSV 感染细胞,表明其识别 PRRSV

天然 GP5 蛋白的抗原表位。本试验获得了特异识别 PRRSV 天然病毒的功能性抗 GP5 蛋白单克隆抗体,为 PRRSV 的免疫识别与快速检测研究提供了有效的技术手段。

参考文献:

- [1] 詹丽娥,乔国锋,乔忠,等.猪生殖与呼吸系统综合症研究进展 II[J].山西农业科学,1999,27(1):73-75.
- [2] 孟帆,姚郝明,吴忻,等.猪群暴发猪瘟与蓝耳病混合感染的诊断与防制[J].山西农业科学,2010,38(6):66-68.
- [3] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等.从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J].中国畜禽传染病,1996,87(2):1-4.
- [4] Tian K, Yu X, Zhao T, *et al.* Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. PLoS One, 2007, 2(6):526.
- [5] Meulenbergh J J, Hulst M M, de Meijer E J, *et al.* Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV[J]. Virology, 1993, 192(1):62-72.
- [6] 周艳君,安同庆,薛强,等.猪生殖与呼吸综合征病毒 CH-1a 株 GP5 蛋白基因的表达及其单克隆抗体的制备[J].中国兽医科技,2005,35(11):859-864.
- [7] Wang Y, Xing G, Guo J, *et al.* Immunogenicity of the glycoprotein 5 truncated trans-membrane regions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Afr J Biotechnol, 2011, 10(79):18266-18273.
- [8] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997.
- [9] 朱立平,陈学清.免疫学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,2000.
- [10] 蔡雪晖,郭宝清,柴文君,等.检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体 ELISA 方法的建立[J].中国预防兽医学报,2000,22(2):122-125.
- [11] Cancel-Tirado S M, Evans R B, Yoon K J. Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 102(2):249-262.
- [12] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology[J]. Am Assoc Swine Pract Newslett, 1989, 1(2):1-9.