抗 O 型口蹄疫病毒单克隆抗体的制备及其生物学特性鉴定

赵 磊[1,2],魏建忠[1],周国辉[2],于永忠[2],李 万[2],于 力[2]

(1 安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036;2 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 大动物病研究室,黑龙江 哈尔滨 150001)

[摘 要] 【目的】针对 O 型口蹄疫病毒(Foot-and-mouth Disease Virus,FMDV)制备特异性的单克隆抗体,为进一步研制 O 型口蹄疫诊断方法提供物质基础。【方法】用纯化的 O 型口蹄疫病毒免疫 Balb/c 小鼠,取脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合,结合间接 ELISA 和间接免疫荧光(IFA)筛选,有限稀释法克隆,建立稳定的阳性杂交瘤细胞株,并对制备的单克隆抗体进行生物学特性鉴定。【结果】获得了 2 株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 2B9 和 5F7,抗体亚类鉴定其均为 IgG1/κ 类型;IFA 结果显示,2 株单克隆抗体仅与 O 型 FMDV 反应,不与 Asia1 型 FMDV 反应,推测其均为抗 O 型 FMDV 的型特异性单克隆抗体;Western blot 结果显示,2 株单克隆抗体均无特异性条带出现,表明其所针对的抗原表位均为构象型表位;相加 ELISA 试验表明,2B9 与 5F7 两株单克隆抗体识别的抗原表位相近或相同;经硫氰酸盐洗脱法测定,2B9 和 5F7 的相对亲和力指数均为 1.5 mol/L;中和试验显示,2 株单克隆抗体都不具有中和活性。【结论】2 株单克隆抗体的获得及其生物学性质的鉴定,为 O 型口蹄疫诊断方法的建立提供了基础材料。

[关键词] O 型口蹄疫病毒;单克隆抗体;生物学特性鉴定

[中图分类号] S852.65+9.6;S852.4+3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2008)11-0035-05

Production and characterization of monoclonal antibodies against Foot-and-mouth Disease Virus serotype O

ZHAO Lei[1,2], WEI Jian-zhong[1], ZHOU Guo-hui[2],
YU Yong-zhong[2], LI Wan[2], YU Li[2]

(1 *College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui* 230036, *China*; 2 *Division of Livestock Infectious Diseases, The National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang* 150001, *China*)

Abstract: 【Objective】 Specific monoclonal antibodies (mAbs) against FMDV O was prepared so as to provide materials for the study of diagnostic method of FMD. 【Method】 By fusing SP2/0 myeloma cells and spleen cells of Balb/c mice immunized with purified virus preparations with the standard hybridomas technique, indirect ELISA, indirect immunofluorescence assay (IFA) and limited dilution for cell cloning were performed to screen positive hybridomas, then the biological characteristics of the mAbs were identified. 【Result】 Two stable hybridoma cell strains, named 2B9 and 5F7, were established. These mAbs were IgG1/κ isotype and contained kappa light chains. IFA showed that they reacted with FMDV serotype O, but not with FMDV serotype Asia1. Western blot analysis suggested that the epitopes they recognized were

* [收稿日期] 2007-12-05
[基金项目] 黑龙江省"十一五"重大项目(GA06B202)
[作者简介] 赵 磊(1982—),男,安徽南陵人,硕士,主要从事家畜传染病防制研究。E-mail:zhaolei918673@yahoo.com.cn
[通讯作者] 于 力(1962—),男,内蒙古扎兰屯人,研究员,主要从事偶蹄动物病防制研究。E-mail:yuli1962@gmail.com

conformational since any specific band didn't appear. The additive ELISA showed that antigen epitopes recognized by 2B9 and 5F7 could be close to each other. Their relative affinity index were 1.5 mol/L, which was indicated by thiocyanate elution measurement. Neutralization test showed that they didn't show any neutralizing activity to O serotype FMDV strains.【Conclusion】 These two mAbs could be used as experimental materials for the establishment of the diagnostic method of FMD.

Key words: foot-and-mouth disease virus serotype O; monoclonal antibody; identification of bilolgical characteristic

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的各种偶蹄动物均易感的一种急性、热性、高度接触性和可快速远距离传播的动物传染病。该病被世界动物卫生组织(OIE)列入A类传染病,为必须申报的动物传染病,我国也将其列为一类动物传染病。口蹄疫病毒可分为A、O、C、SAT1、SAT2、SAT3和Asia1 7个血清型,型与型之间无交叉免疫保护力,而且同型病毒的变异同样能使疫苗效力下降,这无疑给口蹄疫的诊断和免疫增加了难度[1-2]。

O型口蹄疫呈世界性广泛分布,严重威胁着畜牧业的健康发展和正常的畜产品贸易。控制口蹄疫的关键是快速准确地诊断和使用有效疫苗。因此,研发快速诊断试剂和高效疫苗,对口蹄疫的防制具有十分重要的现实意义。口蹄疫常用的诊断方法有补体结合试验、病毒中和试验、反向间接血凝试验、RT-PCR技术等,这些方法虽在实践中应用较多,但仍然存在诊断周期长、仪器昂贵、不易推广等不足。由于单克隆抗体的最大优点是对抗原具有高度特异性,因此在国内外生物医学领域得到了广泛的研究和应用。目前,为获得快速、特异、敏感的诊断口蹄疫方法,大多数研究都试图将针对不同抗原表位的单克隆抗体进行混合,用来开发诊断试剂。本试验研制了抗O型FMDV的单克隆抗体,旨在为O型口蹄疫的诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 细 胞、毒株与试验动物 乳仓鼠肾细胞(BHK-21)和SP2/0骨髓瘤细胞均为中国农业科学院哈尔滨兽医研究所大动物病研究室保存,O型和Asia1型FMDV由本所生物安全三级(P3)实验室保存,雌性Balb/c小鼠和昆明白鼠购于本所实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 HAT盐(50×)、HT盐(50×)、PEG/DMSO(Mw,1450)、HRP-羊抗鼠IgG、FITC-羊抗鼠IgG、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂,均为SIGMA公司产品;DMEM高糖培养基,GIBCO公司产品;国产优级胎牛血清(FBS),购自天津灏洋生物工程公司;抗体亚类鉴定试剂盒,购自Southern Biotech公司。所用其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 FMDV抗原的制备 口蹄疫病毒血清型的鉴定,采用RT-PCR鉴别诊断方法[3]。用O型FMDV细胞适应毒接种BHK-21细胞,培养约10 h后,收集出现75%以上发生细胞病变的细胞,反复冻融3次并灭活,经差速离心和PEG沉淀纯化病毒,然后超声波裂解,紫外分光光度计测定蛋白含量,用作动物免疫抗原和ELISA包被抗原。

1.2.2 动物免疫 取纯化的O型FMDV抗原,按1 μg/mL的200 μg病毒抗原加等体积弗氏完全佐剂,充分乳化后经背部皮下注射6周龄雌性Balb/c小鼠;2周后进行第2次免疫,佐剂采用弗氏不完全佐剂;间隔2周后,以不加佐剂的等量抗原进行第3次免疫。为刺激小鼠快速产生强烈免疫反应,于融合前3 d采用尾静脉和脾脏注射相结合的免疫方式,进行加强免疫,注射2倍量抗原。

1.2.3 抗O型FMDV单克隆抗体的制备 细胞融合杂交瘤细胞、阳性克隆的筛选和有限稀释法克隆、腹水的制备及单克隆抗体效价的测定,均按常规方法[4-5]进行。

1.2.4 抗O型FMDV单克隆抗体亚类的鉴定 按照Southern Biotech公司的SBA Clonotyping™ System/HRP抗体亚类鉴定试剂盒操作说明,对所获得的单克隆抗体进行抗体亚类鉴定。

1.2.5 免疫印迹分析 按常规方法对纯化的O型FMDV衣壳蛋白进行SDS-PAGE电泳和电转印。转印后用含2.5 g/L白明胶的PBS 4 ℃封闭过夜,充分洗涤后加入1∶1 000倍稀释的腹水单克隆抗体,37 ℃轻摇作用1 h,充分洗涤后加入1∶5 000倍稀释的HRP-羊抗鼠IgG,室温轻摇作用1 h,充分洗涤后用DAB显色。

1.2.6　抗 O 型 FMDV 单克隆抗体抗原识别位点的分析　参照文献[6],采用相加 ELISA 试验进行。单克隆抗体两两叠加后,AI 值的计算公式为:$AI=(A1.2-A1)/A2\times100\%$(其中 A1.2 表示 2 株单克隆抗体叠加后的 OD_{492} 值;$A1$ 表示第 1 株单克隆抗体的 OD_{492} 值;$A2$ 表示第 2 株单克隆抗体的 OD_{492} 值)。

1.2.7　抗 O 型 FMDV 单克隆抗体的型特异性鉴定　按照间接免疫荧光方法,检测各株单抗与 O 型、Asia1 型 FMDV 的反应性。用 O 型和 Asia1 型 FMDV 感染单层 BHK-21 细胞,同时以正常细胞作为阴性对照,冰冷无水乙醇固定细胞 15 min,风干后加入 Balb/c 小鼠阳性血清、阴性血清、SP2/0 细胞培养上清及待检杂交瘤细胞上清,37 ℃孵育 40 min,PBS 洗涤后加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,37 ℃孵育 40 min,PBS 洗涤后于荧光显微镜下观察。

1.2.8　抗 O 型 FMDV 单克隆抗体相对亲和力常数的测定　采用硫氰酸盐洗脱法[7]测定各抗体的相对亲和力常数。分别用 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5 和 5.0 mol/L 的 NaSCN,对单抗腹水和 SP2/0 腹水进行洗脱,测定抗体与抗原反应的 OD_{492} 值,当 OD_{492} 值下降至不经洗脱时 OD_{492} 值的 50%时,所对应的 NaSCN 浓度即为该抗体的相对亲和力常数,以 mol/L 表示。

1.2.9　单抗腹水中和活性的测定　参照文献[1]的方法,运用微量细胞中和试验对单抗腹水进行中和活性鉴定,以中和效价大于等于 1∶32 判为阳性,小于 1∶32 判为阴性。

2　结果与分析

2.1　杂交瘤细胞株的建立

杂交瘤细胞培养上清的间接 ELISA 和间接免疫荧光检测结果表明,以细胞培养上清对 FMDV 抗原的 OD_{492} 值,与正常 Balb/c 小鼠血清、SP2/0 细胞上清对 FMDV 抗原的 OD_{492} 值之比均大于 2.1,且杂交瘤细胞上清对正常 BHK-21 细胞的免疫荧光结果为阴性,判为阳性杂交瘤细胞。经筛选和有限稀释法亚克隆,获得了 2 株阳性杂交瘤细胞,分别命名为 2B9 和 5F7。

2.2　2 株杂交瘤细胞培养上清及腹水效价的测定

将杂交瘤细胞培养上清和腹水分别进行系列稀释,然后用间接 ELISA 法测定 OD_{492} 值,同时设立阳性、阴性血清对照。杂交瘤细胞培养上清或腹水的 OD_{492} 值与阴性血清的 OD_{492} 值之比大于 2.1 时的最大稀释度即为其 ELISA 效价。经间接 ELISA 测定,2 株阳性杂交瘤细胞培养上清及腹水效价见表 1。

表 1　2 株杂交瘤细胞培养上清及腹水的抗体效价

Table 1　Titers of antibody in cell supernatant and ascites of Mabs

单克隆抗体 Mab	2B9	5F7
细胞培养上清 Cell supernatant	1∶256	1∶512
腹水 Ascites	1∶800 0	1∶16 000

2.3　单克隆抗体 2B9 和 5F7 的亚类鉴定

鉴定结果显示,2B9 和 5F7 细胞株分泌的单克隆抗体的重链类型均为 IgG1,轻链类型均为 κ。

2.4　免疫印迹分析

免疫印迹分析结果显示,2 株单克隆抗体与 O 型 FMDV 均未出现特异性反应条带。结合间接 ELISA 和间接免疫荧光试验结果可知,其所针对的抗原表位均为构象型表位。

2.5　单克隆抗体抗原识别位点的分析

用相加 ELISA 法对单克隆抗体抗原识别位点进行分析,结果(表 2)显示,当 $A1$ 为 2B9、$A2$ 为 5F7 时,叠加后的 AI 值为 8.32%;当 $A1$ 为 5F7、$A2$ 为 2B9 时,叠加后的 AI 值为 7.69%,均小于 10%,说明这 2 株单克隆抗体识别的位点可能相近或相同。

表 2　2 株单克隆抗体相加 ELISA 法抗体抗原的识别位点

Table 2　Additive ELISA to detect cross-reaction between the two Mabs　%

单克隆抗体 Mab	2B9	5F7
2B9	—	8.32
5F7	7.69	—

2.6　单克隆抗体 2B9 和 5F7 血清型的特异性鉴定

将 2 株单克隆抗体分别与感染 O 型和 Asia1 型 FMDV 的 BHK-21 细胞进行间接免疫荧光试验(IFA),结果显示,6 株 O 型 FMDV 感染的 BHK-21 细胞中可见特异性荧光,5 株 Asia1 型 FMDV 感染的 BHK-21 细胞和正常的 BHK-21 细胞均无特异性荧光,表明 2 株单克隆抗体均只与 O 型 FMDV 反应,而不与 Asia1 型 FMDV 发生反应。其部分试验结果见图 1。

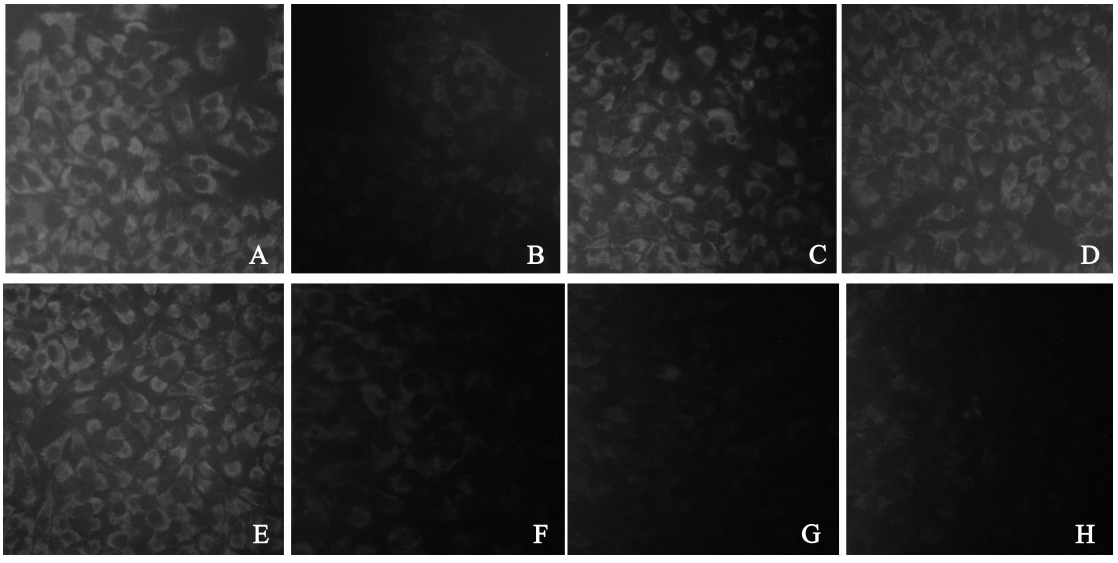

图 1 2B9 和 5F7 单克隆抗体与 O 型和 Asia1 型 FMDV 的反应结果

A～D. 感染 O 型 FMDV 的 BHK-21 细胞与鼠抗 O 型 FMDV 的阳性血清、阴性血清、2B9 腹水、5F7 腹水的反应结果；

E－H. 感染 Asia1 型 FMDV 的 BHK-21 细胞与鼠抗 Asia1 型 FMDV 的阳性血清、阴性血清、2B9 腹水、5F7 腹水的反应结果

Fig. 1 Immunofluorescence staining of BHK-21 cells infected FMDV serotype O and FMDV serotype Asia1 with mouse polyclonal antiserum and Mabs 2B9 and 5F7

A－D. BHK-21 cells infected FMDV serotype O, stained by positive serum of FMDV serotype O, negative serum, 2B9 and 5F7;

E－H. BHK-21 cells infected FMDV serotype Asial, stained by positive serum of FMDV serotype O, negative serum, 2B9 and 5F7

2.7 单克隆抗体 2B9 和 5F7 相对亲和力常数的测定

相对亲和力常数的测定结果如图 2 所示。由图 2 可知，2B9 和 5F7 的相对亲和力指数均为 1.5 mol/L，具有中等强度的亲和力。

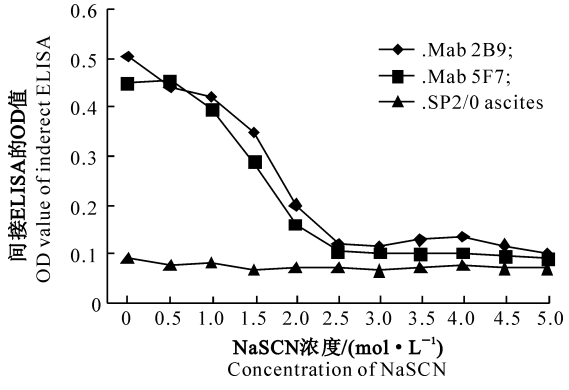

图 2 2B9 和 5F7 相对亲和力常数的测定

Fig. 2 Relative affinity index of mAbs 2B9 and 5F7

2.8 单克隆抗体 2B9 和 5F7 中和活性的检测

中和活性检测结果显示，阳性血清、牛正常血清、细胞和病毒对照均成立，单克隆抗体 2B9 和 5F7 的中和效价均小于 1∶32，判定其不具有中和活性。

3 讨 论

自 1514 年意大利发生口蹄疫(FMD)以来，几乎所有的国家或地区都曾经发生过口蹄疫病，给畜牧业带来了巨大的经济损失。尽管各国对口蹄疫均给予了足够的重视，但是由于 FMD 易感动物种类繁多、病原变异性强、传播方式多样和感染途径并存等因素，致使 FMD 仍是目前威胁大多数发展中国家畜牧业的最重要的传染病，每年用于预防接种、治疗、扑杀的费用数以亿计，因其影响畜产品的贸易所造成的间接损失更是不可估量。控制口蹄疫的关键是快速准确地诊断和使用有效的疫苗。本研究制备的 2 株单克隆抗体，不但可用于 O 型 FMD 的诊断研究，而且也可用于鉴定 FMDV 的抗原表位。

在制备抗原进行动物免疫时，本研究使用的抗原是经过初步提纯的，其中含有较多细胞蛋白，因此在筛选和检测抗体时采用间接 ELISA 和 IFA 相结合的方法，有效地排除了非特异反应性单克隆抗体，验证了这 2 株单克隆抗体的特异性。常规的基础免疫途径，一般是颈背部皮下或腹腔内注射抗原，加强免疫时多数采用尾静脉注射抗原，本研究在加强免疫时采用了尾静脉与脾脏内注射相结合的方式。Hong 等[8]利用脾脏内注射抗原，对免疫器官给予直接刺激，能够显著提高特异性单克隆抗体的筛选几率。Cheng 等[9]在制备 O 型 FMDV 单克隆抗体时，也采用了脾脏内注射方法，结果获得了 25 株特

异性单克隆抗体。脾脏内注射的免疫效果显著,但是操作相对繁琐,为确保抗原注入脾内,必要时需麻醉动物。在利用单克隆抗体进行诊断方法的研究时,首先要求单克隆抗体具有特异性,同时要求其识别表位非常保守,这对于所建立诊断方法的特异性、敏感性和准确性是必要的。本研究筛选的 2 株单克隆抗体,均能与 O 型 FMDV 不同分离株反应,但不能与 Asia1 型 FMDV 反应,其识别表位存在于 O 型 FMDV 中,可用于区分这两种血清型 FMDV 的鉴别诊断方法研究。

自 1982 年 McCullogh 等[10]首次研制出抗 O 型 FMDV 单克隆抗体以来,世界许多国家先后研制出多株针对各型 FMDV 的单克隆抗体,我国也有研究制备 O 型 FMDV 单克隆抗体的报道[6,11-12]。但由于 FMDV 具有多个抗原位点,每个位点又含有许多表位,因此获得更多的 O 型 FMDV 单克隆抗体,对于寻求具有诊断价值的单克隆抗体,以及鉴定保护性抗原表位是十分必要的。1990 年,van Maanen[13]用针对 A、O 和 C 型 FMDV 不同表位的单克隆抗体(各 2 株),建立了一种复合捕获阻断 ELISA,用于检测 A、O、C 型 FMDV,应用试验结果显示,该方法具有敏感、特异、快速等优点,可用于牛 FMD 疫苗免疫效力试验中免疫应答效果的评价。Smitsaart 等[14]以 6 个血清型 12S 蛋白亚单位单克隆抗体和羊抗鼠抗体酶结合物作为诊断试剂,通过抑制 ELISA 检测 FMD 水疱组织中是否存在 12S 亚单位,以此来检测动物是否感染 FMD。目前,间接夹心 ELISA 是 OIE 的世界口蹄疫参考实验室检测 FMDV 抗原和病毒血清型时推荐使用的方法。然而 FMDV 单克隆抗体多应用于研究和确定目标的检测,尚未在诊断和检疫中得到广泛应用,因此需要利用单克隆抗体开发更简便、更廉价、更准确的诊断方法。

4　结　论

本研究利用杂交瘤技术,成功地获得了 2 株针对 O 型 FMDV 的单克隆抗体,均识别构象型表位,且在 O 型 FMDV 中均很保守,培养细胞上清和腹水均具有较高的抗体效价,这为开发诊断试剂、建立诊断方法建立了试验基础。

[参考文献]

[1] 谢庆阁. 口蹄疫 [M]. 北京:中国农业出版社,2004.
Xie Q G. Foot and mouth disease [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004. (in Chinese)

[2] 殷　震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997.
Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 1997. (in Chinese)

[3] 涂亚斌,周国辉,张亚科,等. O 型和 Asia1 型口蹄疫病毒感染 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报,2007,29(7):561-564.
Tu Y B, Zhou G H, Zhang Y K, et al. Establishment of a RT-PCR method for differential diagnosis of foot-and-mouth disease virus infection by O and Asia1 serotypes [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(7): 561-564. (in Chinese)

[4] Liddell J E, Cryer A. A practical guide to monoclonal antibodies [M]. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley and Sons Press, 1991.

[5] Yang M, Clavijo A, Suarez-Banmann R, et al. Production and characterization of two serotype independent monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 115(1-2): 126-134.

[6] 鲁会军,金宁一,韩　松,等. O 型口蹄疫泛亚毒株单克隆抗体的制备及抗原表位差异分析 [J]. 中国兽医学报,2005,25(5):494-496.
Lu H J, Jin N Y, Han S, et al. The preparation of monoclonal antibody against FMDV type O/PanAsia and differential recognition of antigenic epitopes [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2005, 25(5): 494-496. (in Chinese)

[7] 王　刚,王　琰,李春英,等. 用硫氰酸盐洗脱法直接测定噬菌体抗体的相对亲和力[J]. 生物工程学报,2004,20(3):429-433.
Wang G, Wang Y, Li C Y, et al. Thiocyanate elution measurement of relative affinity of phage antibodies [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(3): 429-433. (in Chinese)

[8] Hong T H, Chen S T, Tang S C, et al. The production of polyclonal and monoclonal antibodies in mice using novel immunization methods [J]. J Immunol Methods, 1989, 120(2): 151-157.

[9] Cheng I C, Liang S M, Tu W J, et al. Study on the porcinophilic foot-and-mouth disease virus I production and characterization of monoclonal antibodies against VP1 [J]. J Vet Med Sci, 2006, 68(8): 859-864.

[10] McCullough K C, Butcher R. Monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus 146S and 12S particles [J]. Arch Virol, 1982, 74(1): 1-9.

[11] 段舒怡,姜　平,李玉峰,等. O 型口蹄疫病毒 VP1 单克隆抗体的制备与生物学特性鉴定[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(3):240-243.
Duan S Y, Jiang P, Li Y F, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against VP1 protein of O type foot-and-mouth disease virus [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2007, 23(3): 240-243. (in Chinese)

(下转第 46 页)