

网络出版时间:2016-09-07 09:02

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.10.002

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160907.0902.004.html>

鸭瘟病毒 gB 蛋白单克隆抗体的制备

赵丹丹,刁有祥,杨国平,陈 浩,提金凤,张 璐

(山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018)

【摘 要】 【目的】制备鸭瘟病毒(DPV)gB 蛋白单克隆抗体,为建立 DPV 快速诊断及进一步鉴定 DPV 的抗原表位奠定基础。【方法】克隆 DPV gB 基因,构建其表达载体并进行原核表达,纯化 DPV gB 蛋白,以其作为抗原免疫 8 周龄 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合,进行间接 ELISA 及亚克隆筛选,并对单抗亚类及抗原性进行鉴定。【结果】PCR 扩增出 915 bp 的目的基因,成功连接于 pET-28a 载体,并转化大肠杆菌 Rosetta 进行诱导表达,获得 4 株稳定分泌抗 DPV gB 蛋白的杂交瘤细胞株,分别命名为 A8D7、E6C3、H11F8、H6F6,间接 ELISA 检测其腹水效价分别为 $1:10^3$ 、 $1:10^3$ 、 $1:10^5$ 、 $1:10^3$,亚类鉴定结果分别为 IgG2b、IgG2a、IgG2b、IgG1,轻链均为 kappa 链。Western blot 结果显示 4 株单抗均能与 DPV gB 蛋白特异性结合,IFA 结果表明 4 株单抗是针对 DPV 产生的。【结论】成功获得了特异性针对 DPV gB 蛋白的单克隆抗体。

【关键词】 鸭瘟病毒;gB 蛋白;单克隆抗体

【中图分类号】 S852.65⁺7

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)10-0007-05

Preparation and identification of monoclonal antibodies against gB protein of duck plague virus

ZHAO Dandan, DIAO Youxiang, YANG Guoping, CHEN Hao, TI Jinfeng, ZHANG Lu

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: 【Objective】 This study prepared monoclonal antibodies against gB protein of duck plague virus to provide basis for establishing diagnosis method of DPV infection and identifying antigen epitope of DPV. 【Method】 The DPV gB gene was cloned to establish its expression vector and conduct prokaryotic expression. DPV gB protein was purified and used to immunize 8 weeks old BALB/c mice, whose splenocytes were fused with SP2/0 myeloma cells for indirect ELISA and sub-clone screening. 【Result】 PCR amplification obtained the aim gene of 915 bp and it was connected to pET-28a vector before being transformed to Rosetta for expression. Four hybridoma cell lines that stably secreted monoclonal antibody against gB protein of DPV named A8D7, E6C3, H11F8, and H6F6 were obtained with indirect ELISA determined ascitic fluid titers of $1:10^3$, $1:10^3$, $1:10^5$, and $1:10^3$, respectively. The immunoglobulin subtypes of the monoclonal antibodies were IgG2b, IgG2a, IgG2b, and IgG1, with the light chain of kappa. Western blot showed the four monoclonal antibodies were able to specifically recognize gB protein of DPV and IFA showed that the four monoclonal antibodies were specific to DPV. 【Conclusion】 Specific monoclonal antibodies against gB protein of duck plague virus were obtained.

Key words: duck plague virus; gB protein; monoclonal antibody

【收稿日期】 2015-04-20

【基金项目】 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-43)

【作者简介】 赵丹丹(1989—),女,山东乳山人,硕士,主要从事禽病学研究。E-mail:zhaodandan_0925@163.com

【通信作者】 刁有祥(1962—),男,山东胶州人,教授,博士,主要从事禽病学研究。E-mail:yxdiao@126.com

鸭瘟由 Baudet 于 1923 年首次在荷兰发现,随后陆续在许多养鸭国家暴发和流行,给养鸭业带来严重的经济损失^[1]。鸭瘟病毒(Duck Plague Virus, DPV)又名鸭病毒性肠炎病毒(Duck Enteritis Virus, DEV),是引起鸭、鹅、天鹅等雁形目动物急性、热性、败血性传染病的病原^[2]。近年来,鸭瘟时有发生,迫切需要提供有效的诊断方法。目前针对该病毒建立的检测方法很多,如 PCR、ELISA、间接免疫荧光技术、微量中和试验等^[3],均为该病的诊断和防治奠定了基础。单克隆抗体具有性质均一稳定、特异性高等特点^[4],可以作为病毒诊断方法的一个很好的工具。作为鸭瘟病毒的高度保守性蛋白之一, gB 蛋白的免疫原性良好,高度的特异性和保守性决定了该蛋白能够为检测方法的建立提供优良的材料。本研究制备针对鸭瘟病毒 gB 蛋白的单克隆抗体,旨在为建立具有强特异性、高敏感性的 DPV 诊断方法提供工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、细胞株和实验动物 SP2/0 骨髓瘤细胞、鸭瘟病毒(SD-Y)、鸭呼肠孤病毒(DRV)、减蛋下降综合征病毒(EDS-76V)、H9 亚型禽流感病毒(AIV-H9N2)、坦布苏病毒(TMUV)及原核表达载体 pET-28a、大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta,均由山东农业大学禽病学实验室保存。6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠购自山东省实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 DNA 凝胶回收提取试剂盒、T4 DNA 连接酶、IPTG、pMD18-T 载体等,购自宝生物工程(大连)有限公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HAT、HT、PEG4000,购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG、DMEM 培养基、胎牛血清,购自全式金生物技术(北京)有限公司;Rapid Mouse Isotyping Kit-Gold Series,购自 RayBiotech。

1.2 抗原的制备

1.2.1 gB 基因的扩增 根据 GenBank 发表的 DPV gB 基因序列(GenBank 登录号为:JF999965),通过 Protean 软件分析,选择其抗原表位较多的一段序列,利用 Primer premier 5 软件设计引物,上游引物 gB-f:5'-CCGGAATTCTGGGATTGGATG-CCTAA-3',下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点;下游引物 gB-r:5'-CCGCTCGAGTATTGTACCGCCG-TCTTT-3',下划线部分为 *Xho*L I 酶切位点。

采用酚氯仿法提取病毒 DNA^[5],并以此为模板进行 PCR 扩增,反应体系为:10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP Mixture 4 μ L,上、下游引物 P1、P2 各 1 μ L (25 μ mol/L),HiFi DNA Polymerase 0.3 μ L,模板 2 μ L,ddH₂O 14.2 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳分析,利用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.2.2 目的蛋白的表达及纯化 利用 *EcoR* I 和 *Xho*L I 限制性内切酶对 PCR 产物和 pET-28a 分别进行双酶切,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段,T4 DNA 连接酶连接,构建重组质粒 pET-28a-gB,进行 *EcoR* I 和 *Xho*L I 双酶切鉴定。将重组质粒 pET-28a-gB 转化大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞,加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L,诱导表达 6 h 后构建重组表达载体 pET-28a-gB。按照包涵体纯化法对表达的蛋白进行纯化^[6],备用。

1.2.3 目的蛋白的鉴定 将纯化的 gB 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后,转印至硝酸纤维素膜上,50 g/L 脱脂乳封闭过夜,以鸭瘟阳性血清为一抗,以 HRP 标记的羊抗鸭 IgG(1:5 000)为二抗,用 DAB 试剂盒显色,进行 Western blot 鉴定。

1.3 动物免疫

将纯化好的 gB 蛋白用灭菌生理盐水稀释至 0.5 mg/mL,加入等量的弗氏完全佐剂,乳化完全后腹腔注射 7 周龄 BALB/c 小鼠,0.2 mL/只;2 周后,用同样方法稀释 gB 蛋白,加入等量的弗氏不完全佐剂,腹腔注射进行第 2 次免疫,0.2 mL/只;再过 2 周进行第 3 次免疫,方法同第 2 次免疫;10 d 后,尾静脉采血,分离血清,测定其抗体效价。选取抗体效价高的小鼠进行加强免疫,0.6 mL/只,3 d 后取小鼠脾细胞进行细胞融合。

1.4 细胞融合及阳性杂交瘤细胞的筛选

取免疫鼠脾细胞与培养至对数生长期的 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂 PEG4000 作用下,以 5:1~10:1 的比例按照常规方法进行细胞融合^[7]。融合细胞经 HAT 及 HT 选择培养基培养至长满培养孔底面积 1/10 时,用间接 ELISA 对杂交瘤细胞上清进行筛选。筛选出的阳性孔再经过 3 次有限稀释法进行亚克隆^[8],待阳性率达到 100%时扩大培养留待制备腹水并保存于液氮。

1.5 腹水的制备与纯化

取 10 周龄 BALB/c 小鼠,腹腔注射灭菌液体石

蜡 0.5 mL/只,7~10 d 后腹腔注射杂交瘤细胞 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/只,待小鼠腹部膨大抽取腹水,离心取上清,采用辛酸-硫酸铵法对腹水进行纯化^[9]。

1.6 单抗的鉴定

1.6.1 效价的测定 将制备的腹水从 1 : 100 开始倍比稀释,采用间接 ELISA 方法检测腹水效价。

1.6.2 亚类的鉴定 按照 Rapid Mouse Isotyping Kit-Gold Series 说明书对单抗的亚类进行鉴定。

1.6.3 Western blot 鉴定 将纯化的 gB 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后,转印至硝酸纤维素膜上,50 g/L 脱脂乳封闭过夜,以阳性单克隆细胞上清为一抗,以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1 : 5 000)为二抗,用 DAB 试剂盒显色,进行 Western blot 鉴定。

1.6.4 间接免疫荧光(IFA)鉴定 按照常规方法制备鸭胚成纤维细胞(DEF),传代后将其转到 24 孔细胞培养板上继续培养。待细胞长成单层且面积为底部面积的 70%~80%时,用 DPV 感染 DEF 细胞,并设未加病毒的空白对照。待出现细胞病变后,用丙酮-甲醇(体积比 1 : 1)固定,以鉴定为阳性的杂交瘤细胞上清为一抗,1 : 200 稀释的 FITC 标记的

羊抗鼠 IgG 抗体为二抗,荧光显微镜下观察结果。

1.6.5 单抗的稳定性 分别在杂交瘤细胞冻存后 3 个月和 6 个月时,取出冻存的细胞进行复苏,并对细胞培养上清进行间接 ELISA 检测,以确定阳性杂交瘤细胞是否丢失。

1.6.6 单抗的特异性 分别用 DPV、TMUV、AIV-H9N2、EDS-76V、DRV 作为抗原包被酶标板,以杂交瘤细胞上清液为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1 : 5 000 稀释)为二抗,利用间接 ELISA 方法检测单克隆抗体细胞上清。

2 结果与分析

2.1 gB 基因的 PCR 扩增

提取鸭瘟病毒 DNA,PCR 扩增其 gB 基因,凝胶电泳结果(图 1)显示,在约 915 bp 处可见到特异性条带。

2.2 重组表达载体 pET-28a-gB 的鉴定

重组质粒经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后可见到约 915 bp 的目的片段及大于 5 000 bp 的载体片段(图 2)。

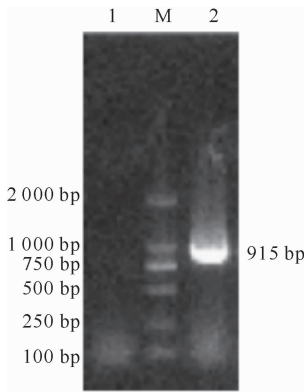


图 1 DPV gB 基因的 PCR 鉴定

M. DL2000 Marker;1. 阴性对照;2. gB 基因

Fig. 1 PCR identification of gB gene of DPV

M. DL2000 Marker;1. Negative control;2. The gB gene

2.3 gB 蛋白的鉴定

将表达及纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,转印到硝酸纤维素膜上,用鸭瘟阳性血清进行 Western blot 鉴定。结果(图 3)显示,表达的蛋白在约 34 ku 处可见特异性条带,而阴性对照无条带,表明表达的蛋白具有良好的反应性。

2.4 阳性杂交瘤细胞的筛选

对融合后的细胞进行观察可知,细胞融合率达 90%以上;经间接 ELISA 检测后,对阳性孔进行有限稀释法克隆,阳性率达 100%时,共获得 4 株稳定

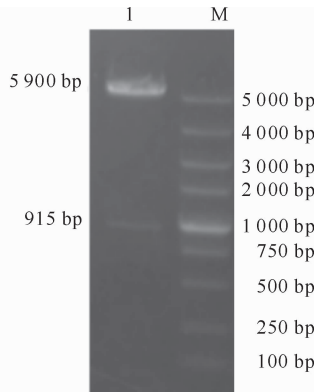


图 2 重组质粒 pET-28a-gB 的双酶切鉴定

M. DL5000 Marker;1. pET-28a-gB

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of pET-28a-gB

M. DL5000 Marker;1. pET-28a-gB

分泌抗 gB 蛋白的杂交瘤细胞株,分别命名为 A8D7、E6C3、H11F8 和 H6F6。

2.5 单抗效价的测定及亚类鉴定

用间接 ELISA 方法测定腹水的效价,结果 A8D7 为 1 : 10³,E6C3 为 1 : 10³,H11F8 为 1 : 10⁵,H6F6 为 1 : 10³。

用 Rapid Mouse Isotyping Kit-Gold Series 测定 4 株单抗的亚类,结果显示 A8D7(IgG2b)、E6C3(IgG2a)、H11F8(IgG2b)、H6F6(IgG1)的轻链均为 kappa 链。

2.6 单抗的 Western blot 检测

图 4 显示,4 株单抗均可特异性识别 gB 蛋白,

在约 34 ku 处出现特异性条带,而不与含空质粒的菌体蛋白反应,表明 4 株单抗均具有良好的反应性。

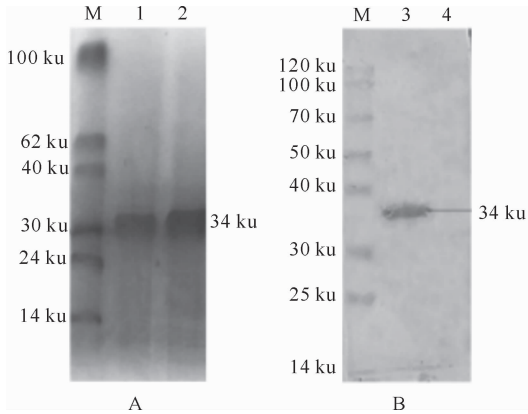


图 3 诱导表达 DPV gB 蛋白的 SDS-PAGE(A)及 Western blot (B)分析

M. 蛋白 Marker;1,2. 纯化的 DPV gB 蛋白;

3. DPV gB 蛋白的 Western blot 分析结果;4. 阴性对照

Fig. 3 SDS-PAGE(A)and Western blot(B) analysis of DPV gB protein

M. Protein Marker;1,2. purified DPV gB protein;

3. Western blot analysis of DPV gB protein;4. Negative control

2.7 单抗的 IFA 鉴定

DPV 感染 DEF 细胞出现病变后,对 4 株单抗进行 IFA 检测,结果(图 5)显示,4 株单抗均可显现

图 4 DPV gB 蛋白 4 株单抗的 Western blot 分析

M. 蛋白 Marker;1. A8D7 单抗;2. E6C3 单抗;

3. H11F8 单抗;4. H6F6 单抗;5. 阴性对照

Fig. 4 Western blot analysis of four monoclonal antibodies against gB protein of DPV

M. Protein Marker;1. Monoclonal antibody of A8D7;

2. Monoclonal antibody of E6C3;3. Monoclonal antibody of

H11F8;4. Monoclonal antibody of H6F6;5. Negative control

特异性的绿色荧光,未感染的细胞不显现绿色荧光。表明这 4 株单抗均可以与 DPV 发生反应。

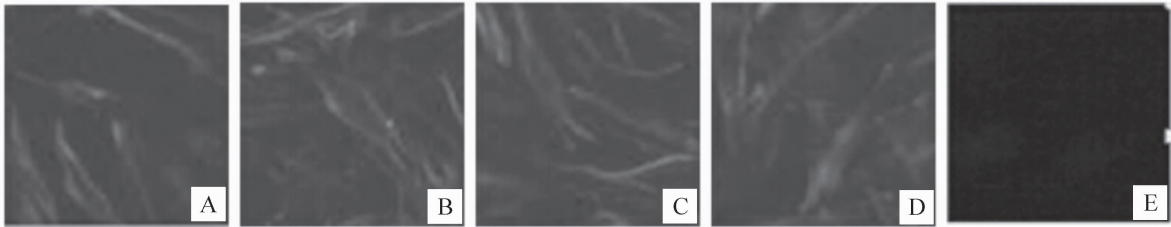


图 5 DPV gB 蛋白单抗与感染 DPV 的 DEF 细胞的 IFA 试验结果

A. A8D7 单抗;B. H6F6 单抗;C. E6C3 单抗;D. H11F8 单抗;E. 阴性对照

Fig. 5 Indirect immunofluorescence assay of DPV in DEF cells with the four monoclonal antibodies against gB protein of DPV

A. Monoclonal antibody of A8D7;B. Monoclonal antibody of H6F6;

C. Monoclonal antibody of E6C3;D. Monoclonal antibody of H11F8;E. Negative control

2.8 单抗的稳定性和特异性检测

在杂交瘤细胞冻存后 3 个月和 6 个月时,取出冻存的细胞进行复苏,并对细胞培养上清进行间接 ELISA 检测,结果显示,冻存后的杂交瘤细胞仍能稳定地分泌抗体。

分别以 DPV、TMUV、AIV-H9N2、EDS-76V、DRV 为抗原对杂交瘤细胞上清进行检测,结果表明,本试验制备的单抗仅与 DPV 反应,而不与 TMUV、AIV-H9N2、EDS-76V、DRV 发生反应。

3 讨 论

本研究成功制备了 4 株针对 DPV gB 蛋白的特异性单克隆抗体,为 DPV 快速检测方法的建立奠定了基础。DPV gB 蛋白是病毒表达的最为保守的囊膜蛋白之一,具有良好的免疫原性及免疫保护性^[10]。单克隆抗体具有高度均一、生物活性单一和与抗原结合的特异性强等优点^[11],可以为建立更加快速、特异性强的检测方法提供有力的工具。因此,

制备针对 DPV gB 蛋白的单克隆抗体,在临床诊断、疾病预防、快速检测方法建立等方面具有重要意义,也为进一步鉴定 DPV 的抗原表位奠定了基础。

董广阔^[12]利用质粒 pGEX-6PI 作为载体,对 DPV gB 和 gC 主要抗原域的编码区进行了克隆与原核表达,研制了针对 gB 和 gC 的单克隆抗体。本研究将 DPV gB 基因连接到原核表达载体 pET-28a 上,并转入大肠杆菌 *E. coli* Rosetta(DE3)进行原核表达,通过对诱导时间及 IPTG 浓度的摸索,成功表达出了 DPV-gB 蛋白。

本研究采用原核表达系统 Rosetta *E. coli* 表达 DPV gB 蛋白,原核表达系统相对于真核表达系统具有成本低、操作简便、表达量高等优点^[13],并且省去了传统方法中的繁琐步骤,可大大节省时间。在载体的选择上,本试验采用了原核表达载体 pET-28a,该载体由 T7 启动子、lac 结构基因和卡那霉素抗性基因等构成,能够表达融合蛋白,性质更加稳定,且能保持表达产物的免疫学活性,使其具备抗原性^[14],为单抗的制备提供了便利。因此,本研究中,先利用生物学软件分析 gB 蛋白氨基酸残基的抗原性、亲水性等,选择了一段抗原性强的区域进行克隆表达,以期得到具有诊断价值的免疫原,结果显示,制备的单克隆抗体具有较好的反应性。

本研究以原核表达的 DPV gB 蛋白作为抗原,制备 DPV 的单克隆抗体,腹水效价在 $1:10^3 \sim 1:10^5$,其与以全毒免疫小鼠产生的效价^[15]相比较低,可能是全毒引起的免疫应答反应较全面,但是用蛋白进行免疫能够提高反应的特异性。

【参考文献】

- [1] Baudet A E. Mortality in ducks in the Netherlands caused by a filterable virus fowl plague [J]. Tijdschr Diergeneeskde, 1923, 50:455-459.
- [2] Aravind S, Nitin M K, Satish S G, et al. Adaptation and growth kinetics study of an Indian isolate of virulent duck enteritis virus in Vero cells [J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 78:14-19.
- [3] 徐晓娟, 郭霄峰. 鸭瘟病毒研究进展 [J]. 养禽与禽病防治, 2012, 10: 8-12.
Xu X J, Guo X F. The research progress of duck plague virus [J]. Poultry Husbandry and Disease Control, 2012, 10:8-12.
- [4] He J L, Hsieh M S, Chiu Y C. Preparation of monoclonal antibodies against poor immunogenic avian influenza virus proteins [J]. Journal of Immunological Methods, 2013, 387:43-50.
- [5] Li H X, Liu S W, Kong X G. Characterization of the genes encoding UL24, TK and gH proteins from duck enteritis virus (DEV): a proof for the classification of DEV [J]. Virus Genes, 2006, 33(2):221-227.
- [6] 汪家政. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
Wang J Z. The technical manuals of protein [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [7] 王洪海, 苏敬良, 曹 振, 等. 鸭肠炎病毒单克隆抗体的制备 [J]. 中国兽医科技, 2004, 34(11):13-17.
Wang H H, Su J L, Cao Z, et al. Preparation of monoclonal antibodies against duck enteritis virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2004, 34(11):13-17.
- [8] 周艳君, 华荣虹, 王云峰, 等. SARS-CoV 单克隆抗体的制备及抗原表位的初步鉴定 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(2):211-215.
Zhou Y J, Hua R H, Wang Y F, et al. Development of monoclonal antibodies against SARS-CoV and identification of antigenic epitopes [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(2):211-215.
- [9] 张智慧. 鸭肠炎病毒糖蛋白 B 单克隆抗体的制备与鉴定 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
Zhang Z H. Preparation and identification of monoclonal antibodies against glycoprotein B of duck enteritis virus [D]. Harbin: Dongbei Agricultural University, 2009.
- [10] Griffin A M. The nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of infectious laryngotracheitis virus: analysis and evolutionary relationship to the homologous gene from other herpesviruses [J]. J Gen Virol, 1991, 72(2):393-398.
- [11] Zhang A X, Cao B. Generation and characterization of an anti-GP73 monoclonal antibody for immune blotting and sandwich ELISA [J]. Journal of Biomedical Research, 2012, 26(6):467-473.
- [12] 董广阔. 鸭肠炎病毒囊膜蛋白 gB 和 gC 主要抗原域的原核表达和单克隆抗体的研制 [D]. 浙江扬州: 扬州大学, 2012.
Dong G K. Prokaryotic expression and preparation of monoclonal antibodies against envelope protein gB and gC of duck enteritis virus [D]. Yangzhou, Zhejiang: Yangzhou University, 2012.
- [13] 负炳岭, 李德龙, 胡晓亮, 等. 禽白血病毒群特异性抗原单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(10):782-785.
Yun B L, Li D L, Hu X L, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against the group specific antigen of avian leucosis virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 34(10):782-785.
- [14] 程彦丽. 鸭新城疫病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备及应用 [D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2012.
Cheng Y L. Preparation and application of monoclonal antibodies against nucleocapsid protein of duck newcastle disease virus [J]. Taian, Shandong: Shandong Agricultural University, 2012.
- [15] Wang M, Lin D, Zhang S, et al. Prokaryotic expression of the truncated duck enteritis virus UL27 gene and characteristics of UL27 gene and its truncated product [J]. Acta Virol, 2012, 56:323-328.