

抗猪附红细胞体单克隆抗体的制备

张浩^{1,2}, 吴晓东², 张守富³, 单虎^{1*}, 吴延功^{2*}, 王志亮², 刘佩兰², 朱绍辉^{1,2}

(1. 莱阳农学院动物科技学院, 山东青岛 266109; 2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032;
3. 青岛中仁药业有限公司, 山东青岛 266329)

摘要: 以纯化的猪附红细胞体免疫 BALB/c 小鼠, 运用淋巴细胞杂交瘤技术进行细胞融合, 并用间接 ELISA 方法进行筛选, 经过间接 ELISA 方法、免疫印迹和间接免疫荧光试验进行鉴定, 共获得 5 株分泌抗猪附红细胞体单克隆抗体的杂交瘤细胞, 分别命名为 1H₁、1H₂、3A₅、5B₁ 和 7E₁₁, 其单抗亚类鉴定分别属于 IgG_{2b}、IgG₁、IgG_{2b}、IgG_{2b} 和 IgG_{2b}。这 5 株 McAb 均能与猪附红细胞体全菌蛋白发生特异性反应, 而不与猪肺炎支原体、猪链球菌、大肠杆菌和猪繁殖与呼吸综合征病毒发生反应, 并且 1H₁、3A₅ 和 5B₁ 能识别同一抗原位点, 1H₂ 和 7E₁₁ 识别另一抗原位点。

关键词: 杂交瘤; 猪附红细胞体; 单克隆抗体; 间接 ELISA

中图分类号: S852.43

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2007)10-0814-03

Development of monoclonal antibodies against *Eperythrozoon suis*

ZHANG Hao^{1,2}, WU Xiao-dong², ZHANG Shou-fu³, SHAN Hu^{1*}, WU Yan-gong^{2*},
WANG Zhi-liang², LIU Pei-lan², ZHU Shao-hui^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, Laiyang Agricultural College, Qingdao 266109, China; 2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China; 3. Qingdao Zhong Ren Pharmaceutical Co., LTD, Qingdao 266329, China)

Abstract: Monoclonal antibodies (McAb) were prepared using spleen cells of BALB/c mice immunized with purified *Eperythrozoon suis* according to standard hybridoma protocols. Five hybridoma cell lines secreting McAbs against *E.suis* were obtained following screening by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay. These five McAbs, designated as 1H₁, 1H₂, 3A₅, 5B₁ and 7E₁₁ respectively, were highly specific for *E.suis* and didn't react with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *E.coli*, PRRSV. McAbs 1H₁, 3A₅ and 5B₁ were shown against the same epitope while 1H₂ and 7E₁₁ against another.

Key words: hybridoma; *eperythrozoon suis*; monoclonal antibody; indirect ELISA

*Corresponding author

猪附红细胞体病 (Eperythrozoonosis) 是由猪附红细胞体 (*Eperythrozoon suis*) 寄生于红细胞表面, 游离于血浆或者骨髓中而引起的一种以贫血、黄疸、发热为主要临床特征的人畜共患病^[1]。本病常和其他的猪病混合感染, 表现出多种临床症状, 是严重影响养猪业的传染病之一。目前, 国内大部分研究仅局限于该病的流行病学调查、诊断和治疗,

国外的相关报道也很少。有关病原体分类、分子生物学特性、宿主特异性与交叉感染性、具体生活史过程及其主要致病机理等还不清楚, 生产实践中也未能实施像预防其他传染病一样的行之有效的免疫控制方法, 而且该病的隐性感染很高, 潜在的危害性很大, 所以进行进一步更深入细致的研究是非常必要的。随着附红细胞体病单克隆抗体技术的不断

收稿日期: 2006-12-28

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2004BA514A) 资助

作者简介: 张浩 (1981~), 女, 山东莱芜人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学研究。

* 通讯作者: E-mail: hush@lyac.edu.cn; wuyangong@epizoo.org

发展和完善,为进一步研究附红细胞体病的抗原结构和致病性分析提供了条件。本研究在分离纯化猪附红细胞体的基础上,研制出分泌抗猪附红细胞体单克隆抗体的杂交瘤细胞株,从而为单抗的应用打下了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物、细胞系 BALB/c 小鼠购自济南实验动物中心;骨髓瘤细胞系 SP2/0、Vero 细胞由中国动物卫生与流行病学中心提供,猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 为中国农业大学动物医学院惠赠。

1.2 试剂 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG+IgM、融合用 PEG (MW4000)、单抗亚类鉴定试剂盒均为 Sigma 公司产品;次黄嘌呤、胸腺嘧啶核苷和氨基嘌呤为 Gibco 公司产品;显色底物 DAB 为华美公司进口分装;其余常规试剂为国产分析纯级产品。

1.3 免疫原的制备与鉴定 在山东部分地区选择有苍白、贫血、黄疸等临床症状的猪,无菌采集血液,血液加入 3.8% 的柠檬酸钠抗凝。按 1:1 比例加 0.01 M、pH7.4 PBS 缓冲液,2 000 r/min 离心 10 min,分离出红细胞,同法洗涤 2 次。然后加入 5 倍体积的 0.01 M、pH7.4 PBS 缓冲液置于水浴锅中,56 °C 水浴 3 min。镜检,观察红细胞上的附红细胞体是否完全脱离。若完全分离,2 000 r/min,离心 10 min,取上清液,再经 12 000 r/min 低温离心 60 min,收集沉淀物即为附红细胞体病的抗原,经 PCR 鉴定后制备免疫用抗原。

免疫用抗原的处理:将上述病原体用 0.4% 甲醛,37 °C 灭活 24 h,并经超声波破碎处理,-20 °C 保存备用。

1.4 动物免疫 按文献[2]介绍的方法进行。

1.5 阳性杂交瘤的筛选 采用间接 ELISA 方法筛选阳性克隆。具体方法参照文献[3~5]。

1.6 腹水的制备 取 BALB/c 小鼠腹腔注射灭菌液体石蜡,0.5 mL/只,7 d 后腹腔注入 5×10^5 个/0.2 mL 的杂交瘤细胞,同时用 SP2/0 细胞注入另外的小鼠制备阴性腹水。7 d~10 d 后,当小鼠腹部极度膨胀时收集腹水,所得腹水经离心去除沉淀,加抗生素保存于 -70 °C。

1.7 单克隆抗体生物学特性的鉴定

1.7.1 单克隆抗体亚类的鉴定: 用 Sigma 公司的免疫球蛋白亚类鉴定试剂盒进行鉴定。

1.7.2 单克隆抗体 Western blot 分析: 按文献[6]介绍的方法进行。

1.7.3 间接免疫荧光试验: 按常规方法制备 Vero 细胞飞片,并接种猪附红细胞体全菌,出现细胞病变时取出,同时设未感染的正常 Vero 细胞作为对照。经 0.01 M pH7.4 PBS 洗涤后,用 -20 °C 预冷的丙酮:乙醇 (3:2) 室温固定 5 min; PBS 洗涤 5 次,空气干燥;分别滴加 1:200 稀释的 5 株腹水单抗,37 °C 作用 30 min; PBS 洗涤 5 次,以工作浓度的羊抗鼠 IgG-FITC 37 °C 作用 30 min;经 PBS 洗涤 5 次后,在荧光显微镜下观察。

1.7.4 单克隆抗体的特异性反应: 以 Western blot 法检测单克隆抗体与猪附红细胞体、猪肺炎支原体、猪链球菌 2 型、致病性大肠杆菌和猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的反应情况,以测定附红细胞体单克隆抗体的特异性。

2 结果

2.1 阳性杂交瘤细胞筛选结果 与猪附红细胞体反应呈阳性,同时与对照抗原反应为阴性的杂交瘤细胞孔判为阳性。经间接 ELISA 方法检测,共筛选出 5 株能稳定分泌针对猪附红细胞体的特异性单抗杂交瘤细胞株,分别命名为 1H₁、1H₂、3A₅、5B₁ 和 7E₁₁。

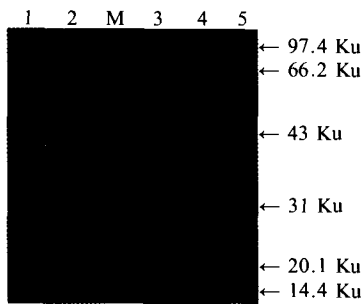
2.2 单克隆抗体生物学特性的鉴定

2.2.1 单抗亚类鉴定: 1H₁、3A₅、5B₁ 和 7E₁₁ 属于 IgG_{2b}; 1H₂ 属于 IgG₁。

2.2.2 单克隆抗体 Western blot 分析: 免疫印迹结果显示,1H₁、3A₅ 和 5B₁ 这 3 株单克隆抗体针对猪附红细胞体 54.6 Ku 的蛋白,1H₂ 和 7E₁₁ 针对 27.4 Ku 的蛋白 (见图 1)。

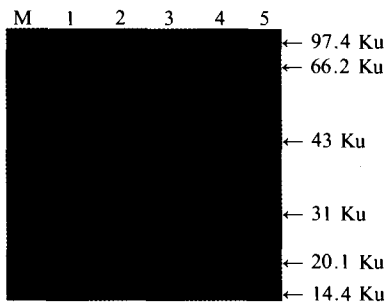
2.2.3 间接免疫荧光试验: 试验结果显示,接种猪附红细胞体全菌的 Vero 细胞出现特异性的荧光;而空白对照无特异性荧光出现,结果为阴性。

2.2.4 单克隆抗体的特异性反应: 结果显示,单抗与猪肺炎支原体、猪链球菌、猪大肠杆菌和 PRRSV 均不反应,只与猪附红细胞体病抗原发生反应 (见图 2)。



M: Prestained protein Marker; 1: 1H₁; 2: 1H₂; 3: 3A₃; 4: 5B₁; 5: 7E₁₁

图1 猪附红细胞体单克隆抗体 Western blot 分析结果
Fig.1 Western blot of monoclonal antibodies against *E.suis*



M: 预染蛋白标准; 1: 猪附红细胞体; 2: 猪肺炎支原体;
3: 猪链球菌; 4: 猪大肠杆菌; 5: PRRSV
M: Prestained protein Marker; 1: *E.suis*; 2: *Mycoplasma hypopneumoniae*; 3: *Streptococcus*; 4: *E.coli*; 5: PRRSV

图2 猪附红细胞体单抗特异性 Western blot 分析结果
Fig.2 The specificity result of monoclonal antibodies against *E.suis* by Western blot

3 讨论

McAb 技术的发展和运用使得人们在病原学、免疫学、分子生物学等领域的研究增添了强有力的手段^[7]。目前, 尚无猪附红细胞体 McAb 制备的有关报道, 一般都采用镜检、ELISA 和 PCR 等方法进行检测。

本试验应用猪附红细胞体抗原免疫 BALB/c 小

鼠, 其脾细胞与 SP2/0 细胞在 PEG 作用下融合, 应用间接 ELISA 检测筛选, 经有限稀释法克隆 2 次, 获得 5 株分泌抗猪附红细胞体 McAb 的杂交瘤细胞株, 这 5 株杂交瘤细胞在传代期间能稳定地分泌猪附红细胞体的 McAb, 并能诱生 BALB/c 小鼠产生高效价的 McAb, 该 McAb 对猪附红细胞体抗原具有良好的特异性, 而与猪肺炎支原体、猪链球菌病、猪大肠杆菌病和 PRRSV 不发生反应, 应用这 5 株单抗建立检测猪附红细胞体血清抗体的 ELISA 方法是下一步工作的重点。这 5 株杂交瘤的建立, 为猪附红细胞体的诊断、免疫等方面的深入研究提供了物质基础。

参考文献:

- [1] 李昕, 张学军, 王近香, 等. 猪附红细胞体病[J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32(11): 54-57.
- [2] 董昕欣, 郭鑫, 杨汉春, 等. 猪脑心肌炎病毒 VP1 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(01): 24-28.
- [3] 胡茂志, 焦新安, 潘志明, 等. 猪肺炎霉形体单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(12): 60-63.
- [4] Holbrook M R, Shope R E, Barrett A D T. Use of recombinant E protein domain III -based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of Tick-Borne encephalitis serocomplex flaviviruses from Mosquito-Borne flaviviruses [J]. Clin Microbiol, 2004, 42: 4101-4110.
- [5] 刘秀梵, 主编. 单克隆抗体在农业上的应用[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994, 220-240.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2002, 16.

(本文编辑: 付朝阳)