

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.10.01

一株针对猪繁殖与呼吸综合征病毒 NADC30-like 毒株 GP5 蛋白的单克隆抗体制备及鉴定

秦义娴, 刘丹, 邓永, 高金源, 苏佳, 朱真, 吴华伟*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-06-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 10-0001-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为获得针对猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) NADC30-like 毒株 GP5 蛋白的单克隆抗体, 采用表达纯化的 PRRSV NADC30-like 毒株的 GP5 蛋白按常规方法免疫小鼠, 采用间接免疫荧光方法筛选出 1 株阳性杂交瘤细胞 (命名为 3E10), 经 3 次亚克隆后制备腹水并进行纯化鉴定。结果显示: 该杂交瘤细胞连续传代 20 代后细胞上清液的 IFA 效价仍不低于 1:40。纯化后的单克隆抗体腹水浓度为 0.204 mg/mL, 亚类鉴定为 IgM。特异性检测显示 3E10 单克隆抗体能与 2 株 PRRSV NADC30-like 毒株发生荧光反应, 而与 4 株高致病性 PRRSV 疫苗毒株、2 株经典株 PRRSV 疫苗毒株以及 CSFV、PCV2、BVDV 及 Marc-145 细胞均无荧光反应, 显示出较好的应用前景。针对 PRRSV NADC30-like 毒株 GP5 蛋白的单克隆抗体的成功制备, 为 PRRSV NADC30-like 诊断试剂的研制提供了坚实基础。

[关键词] 猪繁殖与呼吸综合征病毒; NADC30-like 毒株; GP5 蛋白; 单克隆抗体

Preparation and Identification of a Monoclonal Antibody against GP5 Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus NADC30-like Strain

QIN Yi-xian, LIU Dan, DENG Yong, GAO Jin-yuan, SU Jia, ZHU Zhen, WU Hua-wei*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: WU Hua-wei, E-mail: 314174205@qq.com

Abstract: In order to obtain monoclonal antibody against GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) NADC30-like strain, mice were immunized with GP5 protein of PRRSV NADC30-like strain by conventional method. A positive hybridoma cell (named 3E10) was screened by indirect immunofluorescence method, which was prepared and purified after three subclones. The results showed

基金项目: 中国兽医药品监察所所级课题 (201802)

作者简介: 秦义娴, 助理研究员, 从事兽用生物制品的检验和研究工作。

通讯作者: 吴华伟。E-mail: 314174205@qq.com

that the IFA titer of the cell supernatant was not less than 1:40 after 20 passages. The concentration of purified monoclonal antibody in ascites was 0.204 mg/mL, and the subclass was identified as IgM. Specific detection showed that 3E10 monoclonal antibody could react with 2 PRRSV NADC30-like strains, but not with 4 highly pathogenic PRRSV vaccine strains, 2 classical PRRSV vaccine strains, CSFV, PCV2, BVDV and Marc-145 cells, showing a good prospect of application. The successful preparation of monoclonal antibody against GP5 protein of PRRSV NADC30-like strain provides a solid foundation for the development of PRRSV NADC30-like diagnostic reagent.

Key words: PRRSV; NADC30-like strain; GP5 protein; monoclonal antibody

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的猪的一种以母猪繁殖障碍及仔猪出现严重呼吸道症状的疾病^[1]。该病毒于 1991 年由荷兰学者首先分离报道^[2]。我国于 1996 年首次分离出病原^[3],并在 2006 年爆发了由 PRRSV 经典毒株突变株引起的高致病性猪繁殖与呼吸综合征,2012 年以来 PRRSV NADC30-like 毒株已逐步成为我国的 PRRSV 优势流行毒株。

精准诊断是防控 PRRS 的基础。国内外已建立了许多可鉴别诊断 PRRSV NADC30-like 毒株的检测试剂,绝大多数为 RT-PCR 方法^[4],但尚未有可特异性用于 PRRSV NADC30-like 毒株鉴定用单克隆抗体的报道。GP5 蛋白作为 PRRSV 毒的主要糖基化结构蛋白,可诱导机体产生中和抗体,常用于单克隆抗体制备和诊断试剂研制的靶标。本研究以原核表达纯化的 GP5 蛋白^[5]作为抗原免疫小鼠,通过间接免疫荧光筛选,获得 1 株针对 PRRSV NADC30-like 毒株 GP5 蛋白的单克隆抗体,为 PRRSV NADC30-like 诊断试剂的研制提供了坚实基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株、GP5 蛋白及实验动物 SP2/0 细胞、Marc-145 细胞、PRRSV 46D(NADC30-like 毒株)、PRRSV 30D(NADC30-like 毒株)、猪瘟病毒(CSFV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV),由中国兽医药品监察所保存;

PRRSV CH-1R 株、TJM-F92 株、HuN4-F112 株、GDr180 株、R98 株、JXA1-R 株均为商品化疫苗;GP5 蛋白由中国兽医药品监察所制备保存;8 周龄 Balb/c 雌性小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要试剂 Protein Marker 购于 TaKaRa 公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购于碧云天生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为 Invitrogen 公司产品;FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 为 Sigma 公司产品;Mouse 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒为 proteintech 公司产品;QuickAntibody-Mouse3 W 佐剂为北京博奥龙免疫技术有限公司产品。

1.3 动物免疫 将 GP5 蛋白与 QuickAntibody-Mouse3 W 佐剂等体积混匀,通过后腿肌肉注射免疫小鼠,每只小鼠注射 100 μ L,此后第 14 天按相同剂量、相同途径加强免疫,共免疫 2 次。融合前 3 日使用 200 μ L 抗原加强免疫一次。

1.4 细胞融合及筛选 无菌条件下取免疫小鼠的脾细胞,与处于对数生长期的 SP2/0 细胞采用常规方法(50% PEG 法)进行细胞融合,并将融合的细胞分置于 96 孔板中,放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱内培养。10 d 后收集杂交瘤细胞上清采用间接免疫荧光方法(IFA)进行检测,具体方法如下:将处于对数生长期的 Marc-145 细胞消化后分散至 96 孔细胞培养板,长成良好单层后(24 h 左右)加入 PRRSV 46D,每孔 100 μ L,放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱内继续培养。当细胞出现 30%~50% 病变时,加入预冷的无水乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定细胞。每孔加入 50 μ L 杂交瘤细胞上清,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h, PBS 洗 3 次,

加入 1:100 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG, 37 ℃ 作用 1 h, PBS 洗涤 3 次。荧光显微镜下观察结果。将筛选出来的阳性杂交瘤细胞, 按有限稀释法进行亚克隆, 连续克隆 3 次获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。

1.5 杂交瘤细胞的鉴定

1.5.1 效价测定 用 PBS 将杂交瘤细胞上清分别稀释为 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 后按照 1.4 项间接免疫荧光方法进行检测, 可观察到特异性荧光的最高稀释度即为杂交瘤细胞上清的效价。

1.5.2 类及亚类的鉴定 采用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒测定单克隆抗体类及亚类, 操作方法按试剂盒说明书进行, OD 值最高孔对应的即为相应亚型。

1.5.3 稳定性检测 将杂交瘤细胞株体外连续培养 20 代, 分别取其第 5、10、15 和 20 代细胞上清, 按照 1.4 项间接免疫荧光方法测定效价。

1.5.4 Western blot 鉴定 将 GP5 蛋白经 SDS-PAGE 后进行 Western blot, 一抗采用 1:5 稀释的杂交瘤细胞上清, 二抗采用工作浓度的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG。以经诱导的 pCold-TF 空载体作为对照。

1.6 单克隆抗体的制备 鼠腹腔注射液体石蜡致敏, 每只 0.5 mL。7 d 后经腹腔注射杂交瘤细胞, 将杂交瘤细胞浓度调整为 2×10^6 /mL, 每只小鼠注射 0.5 mL。待小鼠腹腔膨大时, 收取腹水, 4 ℃ 9500 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 即为单克隆抗体。

1.7 单克隆抗体的纯化与鉴定

1.7.1 单克隆抗体的纯化 采用 HiTrap MabSelect 亲和纯化对腹水进行纯化, 具体方法如下: 将腹水 4 ℃ 10000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用小型滤器过滤后置于冰上; 将样品用冰冷的 20 mmol/L PB 3 mol/L NaCl pH7.4 溶液稀释 5 倍; 用冰冷的 20 mmol/L PB 3 mol/L NaCl pH7.4 溶液平衡 5 mL 的 HiTrap MabSelect 亲和纯化亲和柱 10 个柱体积; 将 25 mL 稀释样品上柱结合; 上样完毕用冰冷的 20 mmol/L PB 3 mol/L NaCl pH7.4 溶液平衡 2.5 mL 的 HiTrap MabSelect 亲和纯化亲和柱 10 个

柱体积; 用 200 mmol/L 甘氨酸缓冲液, pH3.0 溶液洗脱, 收集完毕, 立即加入调节溶液 300 μ L, 轻轻混匀; 收集完毕后, 用冰冷的 20 mmol/L PB 3 mol/L NaCl pH7.4 溶液平衡 HiTrap MabSelect 亲和柱 10 个柱体积; 收集的组分用 SDS-PAGE 检测。

1.7.2 浓度鉴定 采用紫外分光光度计测定纯化后的单克隆抗体浓度。

1.7.3 效价测定 用 PBS 将单克隆抗体稀释为 1:20、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 后按照 1.4 项间接免疫荧光方法进行检测, 可观察到特异性荧光的最高稀释度即为单克隆抗体的效价。

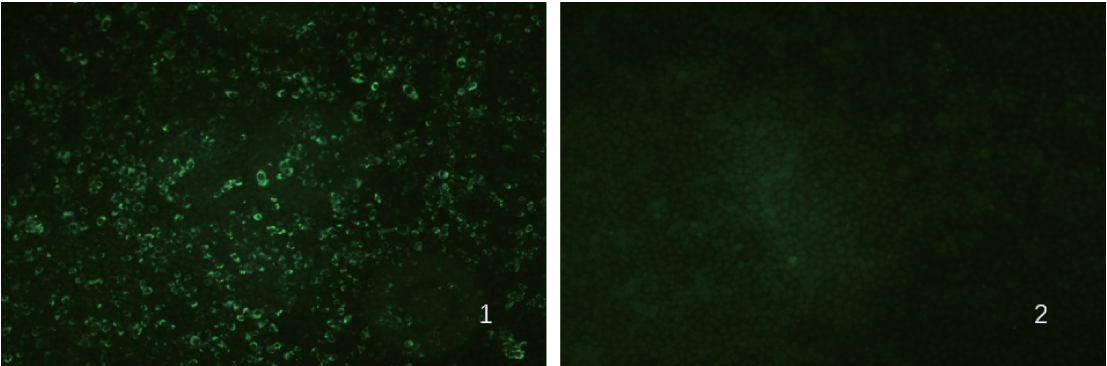
1.7.4 特异性检测 取 PRRSV 活疫苗 CH-1R 株、R98 株、GDr180 株、HuN4-F112 株、JXA1-R 株、TJM-F92 株、PRRSV 46D 和 PRRSV30D 分别接种已长成良好单层的 Marc-145 细胞, 待细胞出现 30%~50% 病变时使用预冷的无水乙醇进行固定, 按 1.4 方法进行单克隆抗体的特异性检测。将 CSFV、PCV2 接种 PK15 细胞, 将 BVDV 接种 MDBK 细胞后, 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 72 h, 经预冷的无水乙醇固定细胞后按 1.4 方法进行单克隆抗体的特异性检测。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的建立及鉴定 采用纯化的 GP5 重组蛋白免疫 8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 免疫 3 次后无菌采集小鼠的脾细胞, 与处于对数生长期的 S/P20 细胞融合, 通过间接免疫荧光方法筛选到 1 株针对 GP5 蛋白的杂交瘤细胞株, 命名为 3E10(图 1)。对 3E10 按有限稀释法进行亚克隆, 连续克隆 3 次获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。

2.2 类及亚类的鉴定 采用 Mouse 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对 3E10 杂交瘤细胞进行鉴定, 结果显示重链类型为 IgM, 轻链类型为 Kappa(表 1)。

2.3 效价测定 将 3E10 杂交瘤细胞上清进行 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 稀释后按照 1.4 项间接免疫荧光方法进行检测。结果 1:10、1:20、1:40 均可观察到特异性荧光, 3E10 杂交瘤细胞上清效价为 1:40。



1. 3E10 杂交瘤细胞上清;2. 正常细胞对照

1. The supernatant of 3E10 hybridoma cells; 2. Normal cell control

图 1 3E10 杂交瘤细胞的间接免疫荧光鉴定 (100 ×)

Fig 1 Indirect immunofluorescence identification of hybridoma cells of 3E10 (100 ×)

表 1 ELISA 法测定单克隆抗体类及亚类

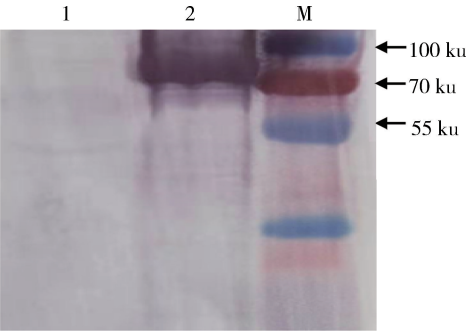
Tab 1 Detection of subclasses of McAbs by ELISA

样品	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	Kappa	Lambda
3E10	0.0601	0.0575	0.0552	0.0566	0.0541	2.3062	2.0083	0.0609

2.4 稳定性检测 使用间接免疫荧光方法对 5 代、10 代、15 代、20 代杂交瘤细胞上清进行检测,结果效价均不低于 1:40,表明已获得能够稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

2.5 Western blot 鉴定 图 2 结果显示,3E10 可与纯化的 pCold - TF - GP5 发生特异性结合,在 72 ku 的位置上出现特异性条带,阴性对照没有条带出

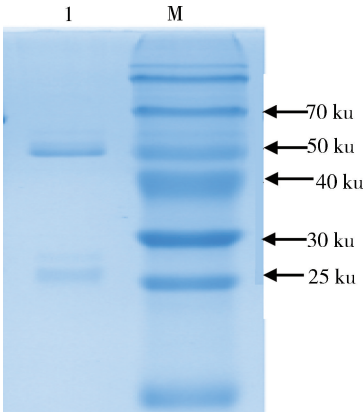
现,这进一步表明单抗是针对 GP5 蛋白。
2.6 腹水的纯化 待小鼠腹腔膨大时采集腹水,采集三次后对小鼠安乐死处死。将三次采集的腹水混合后采用 HiTrap MabSelect 亲和纯化方法进行纯化,SDS - PAGE 检测结果表明单抗由 2 条清晰的带(轻链、重链各 1 条)组成,而无其他杂带(图 3)。



M. 蛋白分子质量标准;1. 诱导的 pCold - TF 空载体;2. GP5 蛋白
M. Protein molecular weight Marker;
1. Induced pCold - TF control; 2. GP5 protein

图 2 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

Fig 2 Western blot identification of McAb



M. 蛋白分子质量标准;1. 纯化的 3E10 单克隆抗体
M. Protein molecular weight Marker;
1. Purified monoclonal antibody 3E10

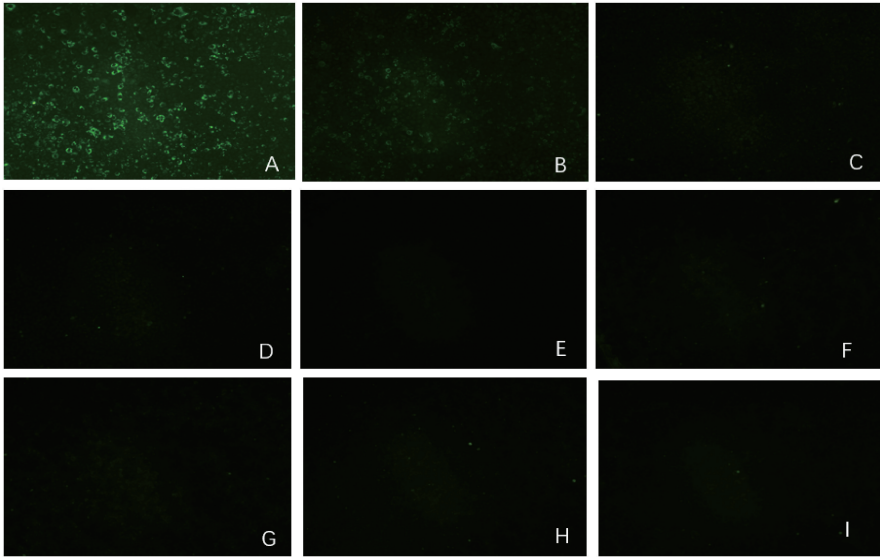
图 3 3E10 的纯度鉴定

Fig 3 The purity identification of 3E10

2.7 腹水浓度及效价的测定 采用紫外分光光度计检测抗体纯度为 0.204 mg/mL。将单克隆抗体进行系列稀释后进行间接免疫荧光检测,结果表明单克隆抗体效价为 1:200。

2.8 单克隆抗体的特异性检测 图 4 结果表明,

3E10 仅与 PRRSV 46D、PRRSV30D 反应,与 PRRSV CH - 1R 株、R98 株、GDr180 株、HuN4 - F112 株、JXA1 - R 株、TJM - F92 株其他分离株无荧光反应,与 CSFV、PCV2、BVDV 及正常 Marc - 145 细胞无荧光反应。



A. PRRSV 46D; B. PRRSV 30D; C. CH - 1R; D. R98; E. GDr180; F. HuN4 - F92;
G. JXA1 - R; H. TJM - F92; I. Normal Marc - 145 cell

图 4 单抗的特异性检测

Fig 4 Specific detection of McAb

3 讨论

目前 PRRSV 的诊断有间接免疫荧光、免疫组化、RT - PCR 等方法,通常采用 RT - PCR 方法用于 PRRSV 经典株、高致病性毒株和 NADC30 - like 毒株的鉴别检验^[4]。相较于其他方法,间接免疫荧光方法具有操作简单、准确性高、特异性好的特点。此外,基于 GP5 蛋白的单抗也有用于中和试验的价值,国内已有成功制备具有中和活性 IgM 亚类单抗的报道^[6]。本研究制备的 3E10 单克隆抗体,亚类鉴定为 IgM,效价仅为 1:200,可能与纯化的方式不合适、腹水浓度较低有关。IgM 抗体以五聚体结构存在,纯化难度极大,需要结合盐析及 IEC 或者 SEC 的多步操作,不仅繁琐且预期产量低。据报道,采用蛋白质 L 亲和层析和山羊抗鼠 IgM 抗体亲和层析效果较好^[7],可以作为下一步 3E10 单克隆

抗体纯化的参考。

PRRSV 极易变异,这给该病防控工作带来了挑战。自 1996 年郭宝清等首次从我国分离到 PRRSV^[3],该病毒在我国已存在二十余年。根据田间自然分离株的基因组及致病性特征,可人为地将我国 PRRS 的流行大致分为三个阶段:第一个阶段为经典毒株流行阶段,第二个阶段为高致病性变异株的流行阶段,第三个阶段为 NADC30 - like 毒株的流行^[8]。自 2012 年周峰等^[9]首次发现并报道 NADC30 - like 毒株以来,该病毒已在我国猪群内广泛传播。通过对 GP5 氨基酸序列进行比对发现,NADC30 - like 毒株与经典 PRRSV、高致病性 PRRSV 的氨基酸同源性较低,分别为 83.6% ~ 84.9%、83.6% ~ 86.6%^[10],比较适合用于 PRRSV 鉴别用单克隆抗体制备用免疫原。本研究采用纯

化表达的 PRRSV NADC30 – like 毒株 GP5, 成功筛选出一株可有效区分 PRRSV NADC30 – like 毒株与经典株的单克隆抗体, 证明了采用 GP5 蛋白用于 PRRSV 鉴别用单克隆抗体制备的可行性, 也为下一步建立区分类 NADC30 毒株与经典株和变异株的诊断试剂奠定了基础。

参考文献:

- [1] Rossow K D. Porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. *Veterinary Pathology*, 1998, 35(1): 1–20.
- [2] Wensvoort G, Terpstra G, Pol G M, *et al.* Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. *Vet Q*, 1991, 13: 121–130.
- [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(2): 1–5.
- Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, *et al.* Isolation of PRRSV from fetus suspected of PRRS abortion[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 1996(2): 1–5.
- [4] 商佳亮, 腾召剑, 陈立功, 等. 鉴别 PRRSV 经典、高致病性和类 NADC30 毒株 PCR 方法的建立及初步应用[J]. *中国兽医学报*, 2021, 3(41): 445–450.
- Shang J L, Teng Z J, Chen L G, *et al.* Establishment and preliminary application of PCR for identification of classical, highly pathogenic and NADC30 like PRRSV strains [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 3(41): 445–450.
- [5] 秦义娟, 刘丹, 高金源, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白的原核表达及鉴定[J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55(4): 11–16.
- Qin Y X, Liu D, Gao J Y, *et al.* Prokaryotic expression and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein [J]. *China Journal of Veterinary Medicine*, 2021, 55(4): 11–16.
- [6] 马苏, 戴建君, 李玉峰, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白中和活性单克隆抗体的制备与免疫学特性测定[J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(1): 72–76.
- Ma S, Dai J J, Li Y F, *et al.* Neutralization activity of GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus preparation and immunoassay[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2008, 31(1): 72–76.
- [7] G C 霍华德, M R 凯瑟. 抗体制备与使用实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- G C Howar, M R Kaiser. *Making and Using Antibodies* [M]. Beijing: Science Press, 2010.
- [8] 周磊, 丁玉平. 猪繁殖与呼吸综合征病毒类 NADC30 毒株的新近流行[J]. *中国猪业*, 2017, 12(11): 21–23.
- Zhou L, Ding Y P. Recent epidemic of porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30 like strain[J]. *China Swine Industry*, 2017, 12(11): 21–23.
- [9] 周峰, 常洪涛, 赵军, 等. 2012–2013 年猪繁殖与呼吸综合征病毒河南流行株的分离鉴定及分子流行病学调查[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(9): 1398–1404, 1410.
- Zhou F, Chang H T, Zhao J, *et al.* Isolation, identification and molecular epidemiological investigation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Henan Province from 2012 to 2013[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(9): 1398–1404, 1410.
- [10] 安同庆. 我国类 NADC30 猪蓝耳病的流行现状[J]. *中国猪业*, 2017, 12(11): 24–25.
- An T Q. Epidemic status of NADC30 like porcine blue ear disease in China[J]. *China Swine Industry*, 2017, 12(11): 24–25.

(编辑: 李文平)