doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2023.09.01

鸡传染性支气管炎病毒特异性单克隆抗体的制备与鉴定

薛 麒,侯力丹,黄小洁,秦义娴,毛娅卿,孔冬妮,王 嘉,吴华伟,刘 丹*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2023 - 04 - 23　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 - 1280 (2023) 09 - 0001 - 06　[中图分类号] S858.3

[摘　要]　为获得鸡传染性支气管炎病毒(Avian infectious bronchitis virus,IBV)N 蛋白的单克隆抗体,通过原核表达 IBV N 蛋白,纯化后作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠,并按常规方法制备杂交瘤细胞。经 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞,经过 3 次亚克隆获得 3 株杂交瘤细胞株,命名为 1#、18#、19#,并进行了抗体亚类的鉴定、Western - blot 和 IFA 检测。结果显示:制备的 3 株单克隆抗体亚型均为 IgG1,Western - blot 和 IFA 试验结果表明单克隆抗体均能与 IBV 发生特异性反应而与其他禽病常见病毒均无交叉反应。本研究成功制备了 IBV 单克隆抗体,为进一步建立 IBV 检测方法和深入研究 IBV 的生物学特性奠定了基础。

[关键词]　鸡传染性支气管病毒;N 蛋白;单克隆抗体

Preparation and Identification of Monoclonal Antibody against N Protein of Avian Infectious Bronchitis Virus

XUE Qi, HOU Li - dan, HUANG Xiao - jie, QIN Yi - xian, MAO Ya - qing, KONG Dong - ni, WANG Jia, WU Hua - wei, LIU Dan*

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

Corresponding author: *LIU Dan*, *E - mail*: *liudan*813@163.*com*

Abstract: In order to obtain the monoclonal antibody against N protein of Avian infectious bronchitis virus, the N protein of IBV was expressed in prokaryotic cells, purified and used as immunogen to immunize BALB/c mice, and the hybridoma cells were prepared according to the conventional method. Three hybridoma cell lines, named 1#, 18# and 19# were obtained by ELISA. The antibody subclasses were identified, Western - blot and IFA were detected. The results showed that the three monoclonal antibodies were IgG1 subtype. Western - blot and IFA results showed that the monoclonal antibodies could specifically react with IBV and had no cross - reaction with

基金项目:公益性专项——禽源制品外源病毒检验新方法及标准物质的研究(GY202105)

作者简介:薛 麒,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:刘 丹,E - mail:liudan813@163.com

other common avian viruses. In conclusion, the monoclonal antibody against N Protein of IBV was successfully prepared, which laid a foundation for further establishment of IBV detection methods and in - depth study of the biological characteristics of IBV.

Key words: avian infectious bronchitis virus; N protein; monoclonal antibody

鸡传染性支气管炎(Avian infectious bronchitis)是一种由鸡传染性支气管炎病毒(Avian infectious bronchitis virus)引起的急性高度接触性呼吸道疾病。该病常发生于鸡或火鸡,4 周龄内的雏鸡最易发病,死亡率可高达 90%,给养鸡业造成了巨大经济损失[1-3]。我国 IBV 的主要流行毒株有呼吸型和肾型,由于 IBV 基因易发突变等因素给该病的防控带来较大压力[4-6]。IBV 血清型众多且不同血清型缺乏交叉保护,其中 N 蛋白在病毒复制中起到重要作用,其编码的基因序列是 IBV 进化最为保守的基因[7]。IB 常规的检测方法有病毒分离鉴定、血清学方法和分子生物学方法等,也是《中国兽药典》规定必须检测的外源病毒之一,通过鸡胚接种,以鸡胚死亡或感染发病作为判定依据作初步鉴定,也可用鸡检查法检测 IBV 的抗体[8]。单克隆抗体技术已广泛应用于禽源病毒的抗原变异分析和检测方法建立[9-10],本研究旨在采用原核表达系统表达纯化 IBV N 蛋白,并结合杂交瘤技术制备 IBV 特异性单克隆抗体,为鸡传染性支气管炎病毒的检测方法研究和生物学特性研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、毒株和实验动物 pET30a - N 重组质粒,由中国兽医药品监察所构建及鉴定;IBV H120 株、M41 株等由中国兽医药品监察所制备和保存;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 表达菌株 BL21 购自北京全式金公司;SDS - PAGE 凝胶制备试剂盒购自上海百赛生物技术有限公司;Protein Marker、兔抗鼠 IgG - HRP、一抗稀释液、膜封闭液、HRP 抗体稀释液、增强型 DAB 显色试剂盒、TBST 均购自索莱宝生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯;HAT 为 Sigma 公司产品。

1.3 N 蛋白的原核表达及纯化 将重组质粒 pET30a - N 转化至 BL21 感受态细胞,挑取单克隆,接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37 ℃摇床培养过夜。将上述菌液以 1∶100 的比例再转接含氨苄青霉素 LB 液体培养基培养至 $OD_{600\ nm}$ 为 0.6 ~ 0.8,加入 IPTG 诱导置 37 ℃摇床 200 r/min 培养 6 h。取诱导后的菌液进行 SDS - PAGE 电泳检测。

1.4 重组 N 蛋白的可溶性分析及纯化 将活化的菌液加到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,培养至 $OD_{600\ nm}$ 为 0.6 ~ 0.8,IPTG(0.5 mM)16 ℃诱导过夜。将诱导菌液、未诱导菌液、裂解菌液上清及沉淀分别进行 SDS - PAGE 电泳检测。采用 GST 柱对重组 N 蛋白进行纯化。

1.5 单克隆抗体的制备 按照常规方法进行小鼠免疫、细胞融合和杂交瘤细胞筛选。将纯化后的 N 蛋白作为免疫原,于背部皮下多点注射免疫小鼠,每次免疫接种间隔 2 周,第 3 次免疫 1 周后采血,分离血清检测 ELISA 抗体效价,第 3 次免疫后 2 周腹腔注射免疫原加强免疫 1 次。3 d 后融合,于融合后第 10 d 取细胞培养上清进行阳性克隆筛选,分别以 N 蛋白和 His 蛋白作为包被抗原,通过间接 ELISA 方法进行筛选,共进行 3 次亚克隆。

1.6 单克隆抗体的鉴定

1.6.1 单克隆抗体的亚类鉴定 取经亚克隆定株后的杂交瘤细胞培养上清,根据小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒说明书进行,测定单克隆抗体的亚类。

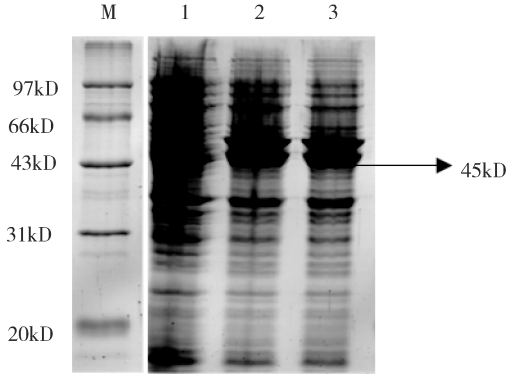
1.6.2 Western - blot 检测杂交瘤细胞 将灭活后的 IBV H120 株和 M41 株经处理后,进行 SDS - PAGE 电泳分离并转至 PVDF 膜上;用适当稀释的杂交瘤细胞上清作为一抗于室温孵育 1 h,用 1∶10000稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗于

室温孵育 1 h 并用增强型 DAB 显色试剂盒进行显色。

1.6.3　IFA 方法检测杂交瘤细胞　将 IBV H120 株、M41 株以及 IBDV、ILT、EDSV 和 ND 等常见的禽类病毒以 200EID_{50}/0.1 mL 接种 CEK 细胞培养 5 d,经甲醇固定后,以杂交瘤细胞上清作为一抗于 37 ℃孵育 1 h,用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗于 37 ℃孵育 1 h,置于荧光显微镜下进行观察,以评价单抗与 IBV 的反应性和单克隆抗体的特异性。

2　结果与分析

2.1　pET30a－N 的诱导表达　取 1 mL 诱导表达的 pET30a－N 转化至 BL21 的菌液进行 SDS－PAGE,结果在 45 kD 处可见表达条带,符合预期大小(图 1)。



M:蛋白分子质量标准;1:未诱导对照(pET30a－N 转化至 BL21);2－3:IPTG 诱导(pET30a－N 转化至 BL21)

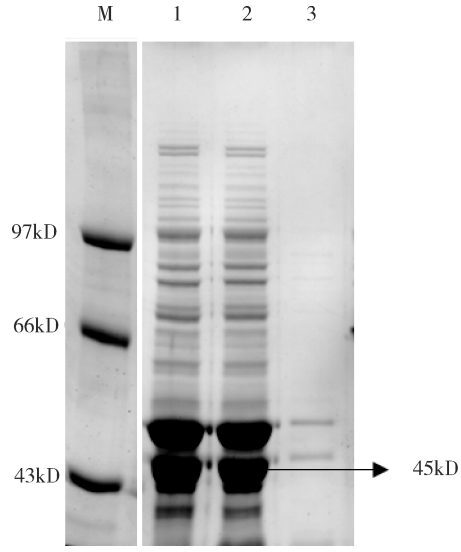
M:Protein molecular weight Marker;1:No induced control(BL21);2－3:IPTG induced(BL21)

图 1　pET30a－N 诱导表达

Fig 1　The induced expression of pET30a－N

2.2　重组蛋白的可溶性分析　超声裂解诱导后的菌液,将菌液上清和沉淀分别进行 SDS－PAGE 电泳,结果显示,pET30a－N 蛋白主要出现在沉淀中,表明该蛋白以包涵体形式表达(图 2)。

2.3　杂交瘤细胞筛选　将杂交瘤细胞培养上清用间接 ELISA 方法在 N 蛋白和 His 蛋白包被板上进行 ELISA 抗体检测,将 3 次筛选均显示阳性的细胞株进行亚克隆及扩大培养定株。共筛选出 3 株 ELISA 阳性杂交瘤细胞株,分别命名为 1#、18#、19#(表 1)。



M:蛋白分子质量标准;1:超声后全菌;2:超声后沉淀;3:超声后上清

M:Protein molecular weight Marker;1:Total bacteria after ultrasound;2:Precipitation after ultrasound;3:Ultrasound supernatant

图 2　pET30a－N 重组蛋白可溶性分析

Fig 2　Soluble analysis of pET30a－N recombinant protein

表 1　杂交瘤细胞株的 ELISA 分析

Tab 1　ELISA analysis of hybridoma cell lines

样品	针对 N 蛋白的 OD 值	针对 His 蛋白包被 OD 值
1#	1.080	0.133
18#	0.807	0.111
19#	1.068	0.117

2.4　单克隆抗体的鉴定

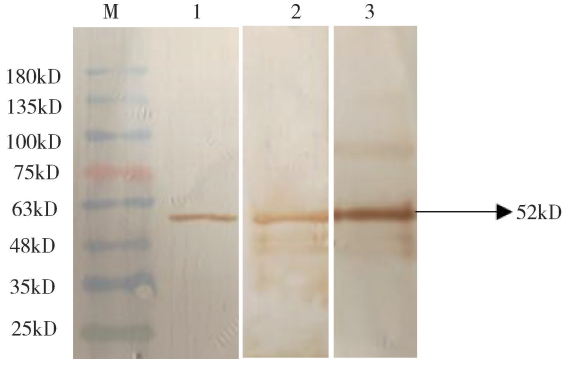
2.4.1　亚类的鉴定　用 ELISA 方法对三株杂交瘤细胞进行鉴定,结果显示 1#、18#、19#重链类型均为 IgG1,轻链类型均为 Kappa(表 2)。

表 2　ELISA 法测定单克隆抗体类及亚类

Tab 2　Detection of subclasses of McAbs by ELISA

样品	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	Kappa	Lambda
1#	0.838	0.069	0.067	0.078	0.099	0.071	0.192	0.043
18#	0.664	0.073	0.56	0.093	0.078	0.051	0.165	0.075
19#	0.716	0.050	0.052	0.112	0.072	0.060	0.154	0.062

2.4.2　Western – blot 检测单克隆抗体　将灭活后的 IBV H120 株进行 SDS – PAGE 电泳分离，并转至 PVDF 膜上，用 3 株单抗作为一抗，进行 Western – blot 鉴定，结果显示 3 株单抗均与 H120 株产生特异性反应，在约 52 kD 大小处（N 蛋白分子量）能特异性结合（图 3）。



M：蛋白分子质量标准；1：1#单克隆抗体；
2：18#单克隆抗体；3：19#单克隆抗体

M：Protein molecular weight Marker；1：1# monoclonal antibody；
2：18# monoclonal antibody；3：19# monoclonal antibody

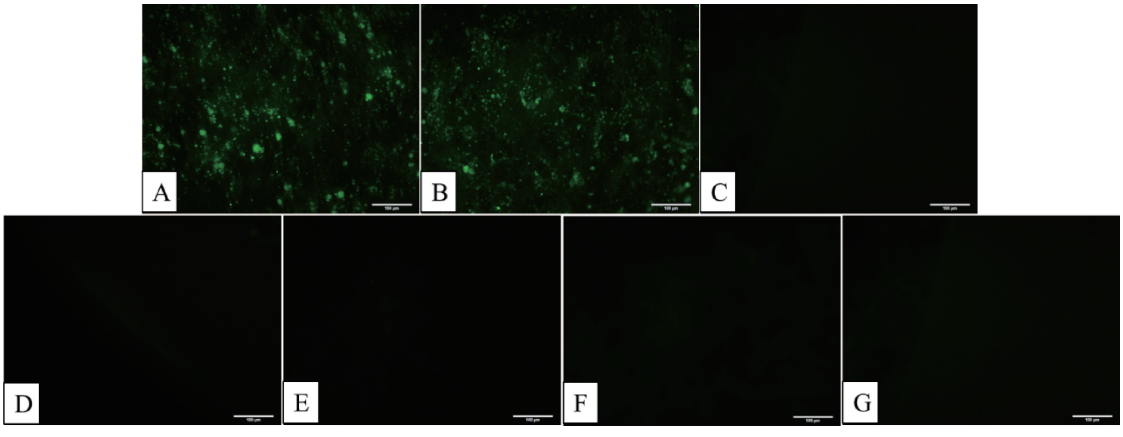
图 3　Western – blot 鉴定单克隆抗体

Fig 3　Western – blot analysis of the monoclonal antibody

2.4.3　IFA 方法检测单克隆抗体　为获得具有广谱反应性的群特异性单克隆抗体，选取 18#单克隆抗体，进行 IFA 方法检测。结果显示单克隆抗体仅与 IBV H120 株、M41 株发生特异性反应，出现特异性绿色荧光，而与 IBDV、ILT、EDSV 和 ND 等常见的禽类病毒均不发生反应（图 4）。说明单克隆抗体的特异性良好。

3　讨　论

鸡传染性支气管炎是危害我国禽类的重大传染病之一，其病毒传染性强、变异性高、血清型和基因型复杂，感染鸡不仅会出现各种呼吸系统的症状，也会影响鸡产蛋地数量和质量，对家禽养殖业造成了严重的损失[11－13]。因此，建立有效的诊断和检测方法对于更快的发现该病有着非常重要的意义。IBV 有 4 种结构蛋白，其中 N 蛋白是 4 种结构蛋白中唯一位于病毒内部的结构蛋白，具有高度的保守性，且 N 蛋白能诱导机体产生免疫应答[14－15]。此外不同 IBV 毒株之间 N 蛋白具有高度的同源性。周景明等针对IBV的N蛋白利用细胞融合法制备



A：IBV（H120 株）；B：IBV（M41 株）；C：正常细胞对照；D：IBDV（J1C7 株）；E：ILTV（ILT/13 株）；F：EDSV（127 株）；G：NDV（La Sota 株）

A：IBV（H120）；B：IBV（M41）；C：normal cell control；D：IBDV（J1C7）；E：ILTV（ILT/13）；F：EDSV（127）；G：NDV（La Sota）

图 4　18#单克隆抗体 IFA 检测

Fig 4　IFA of the 18# monoclonal antibody

筛选出了 8 株能与所有基因型 IBV 结合的单克隆抗体，并对其中 1 株纯化与鉴定，具有良好的特异性和较高的亲和力[16]。杜旭彬等同样针对 IBV 的 N 蛋白制备并筛选出 8 株能与所有基因型 IBV 结合的单克隆抗体，单抗具有良好的广谱性[17]。但周景明等与杜旭彬等仅用 ELISA 方法和 Western – blot 方法鉴定单克隆抗体，均没有使用 IFA 方法鉴定单抗。IFA 方法由于 IBV 不易适应体外细胞培

养存在较大的难度。其病毒在传代细胞系上需要连续数次传代才能使其适应细胞生长,但大多数毒株可以在鸡胚原代细胞(如 CEF 细胞、CEK 细胞)上生长,然而仅在 CEK 细胞上会出现典型的细胞病变[18-19]。单克隆抗体技术广泛地应用于病毒的基因、蛋白的结构和功能研究,在病毒的快速诊断和检测中发挥了重要作用,开展 IBV 单克隆抗体研制十分必要。

N 蛋白在宿主体内产生高水平的抗体,其抗体产生时间和免疫原性均优于其他蛋白,因此,本研究对 IBV H120 株编码 N 蛋白的基因序列进行综合性二级分析及抗原性分析,选择亲水性好且抗原性较好的 41 - 391aa 区域进行后期抗原制备。利用大肠杆菌感受态细胞(BL21)表达并纯化 IBV NP 蛋白,多次免疫小鼠后进行细胞融合,采用 ELISA 方法和 Western blot 方法筛选出 3 株杂交瘤细胞株。可靠的筛选方法在制备单抗的过程中起到关键作用,ELISA 方法筛选时选用表达 NP 蛋白和标签蛋白 His 作为包被抗原,进行 3 轮双筛选,此方法简化了筛选过程并排除标签蛋白在筛选过程中的干扰。3 株单克隆抗体经 Western - blot 鉴定,能与常见基因型的 IBV 特异性结合。同时采用 IFA 方法检测单抗的特异性,筛选出的 3 株单抗均与能 H120 毒株、H52 毒株产生 IFA 反应,但 1#和 19#不与 M41、疫苗株等产生 IFA 反应。18#单抗能与 H120 毒株、H52 毒株 M41、疫苗株等产生 IFA 反应,说明其具有广谱的反应性。因此,后续可以选择群特异性单克隆抗体 18#,以期为 IBV IFA 快速检测方法的建立打下基础。该单克隆抗体仅与 IBV 发生特异性反应而与 NDV、IBD、AIV 等禽类常见病毒均无交叉反应。本研究成功制备了 IBV 单克隆抗体,为下一步开展 IBV 诊断试剂如 IFA 检测试剂盒、ELISA 检测试剂盒等的研制和进行 IBV 生物学特性研究奠定了物质基础。

参考文献:

[1] Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. Vet Res, 2007, 38(2):281 - 297.

[2] de Wit JJS, Cook JKA. Spotlight on avian pathology: infectious bronchitis virus[J]. Avian Pathol, 2019,48(5):393 - 395.

[3] Hoerr FJ. The Pathology of Infectious Bronchitis[J]. Avian Dis, 2021,65(4):600 - 611.

[4] Zhang X, Guo M, Zhao J, *et al*. Avian Infectious Bronchitis in China: Epidemiology, Vaccination, and Control[J]. Avian Dis, 2021, 65(4):652 - 656.

[5] Bande F, Arshad SS, Omar AR, *et al*. Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review[J]. Anim Health Res Rev, 2017, 18(1):70 - 83.

[6] Lian J, Wang Z, Xu Z, *et al*. Distribution and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in southern China[J]. Poult Sci, 2021,100(7):101169.

[7] Quinteros JA, Noormohammadi AH, Lee SW, *et al*. Genomics and pathogenesis of the avian coronavirus infectious bronchitis virus[J]. Aust Vet J, 2022, 100(10):496 - 512.

[8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2020 年版[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Ⅲ 2020 Edition[S].

[9] Wan Z, Ye J, Xu L, et a1. Antigenic mapping of the hemagglutinin of an H9 N2 Avian influenza virus reveals novel critical amino acid positions in antigenic sites[J]. J Virol,2014, 88(7):3898 - 3901.

[10] Zhu Y, Yang D, Ren Q, *et al*. Identification and characterization of a novel antigenic epitope in the hemagglutinin of the escape mutants of H9 N2 avian influenza viruses[J]. Vet Microbiol, 2015, 178(1 - 2):144 - 149.

[11] Kato A, Oguro S, Kurihara Y, *et al*. Repeated avian infectious bronchitis virus infections within a single chicken farm[J]. J Vet Med Sci, 2019, 81(4):636 - 640.

[12] Ren G, Liu F, Huang M, *et al*. Pathogenicity of a QX - like avian infectious bronchitis virus isolated in China[J]. Poult Sci, 2020, 99(1):111 - 118.

[13] Lv D, Dong ZH, Fan WS, *et al*. Identification of a novel avian coronavirus infectious bronchitis virus variant with three - nucleotide - deletion in nucleocapsid gene in China[J]. J Vet Med Sci, 2021, 83(10):1608 - 1619.

[14] Qin Y, Tu K, Teng Q, *et al*. Identification of Novel T - Cell Epitopes on Infectious Bronchitis Virus N Protein and Development of a Multi - epitope Vaccine[J]. J Virol,2021,95(17): e0066721.

[15] Yilmaz H, Faburay B, Turan N, *et al*. Production of Recombinant N Protein of Infectious Bronchitis Virus Using the

Baculovirus Expression System and Its Assessment as a Diagnostic Antigen [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 187 (2): 506 – 517.

[16] 周景明,耿 玥,马文利,等. 抗传染性支气管炎病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 郑州大学学报(理学版),2018,50(04):75 – 79.

Zhou JM, Geng Y, Ma WL, *et al*. Preparation and Identification of Monoclonal Antibody Against Nucleoprotein of Infectious Bronchitis Virus[J]. J. Zhengzhou Univ. (Nat. Sci. Ed.), 2018,50(04):75 – 79.

[17] 杜旭彬,赵 佳,郭梦娇,等. 传染性支气管炎病毒 N 蛋白广谱单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国家禽,2021,43(05): 27 – 32.

Du XB, Zhao J, Guo MJ, *et al*. Preparation and Identification of Broad – spectrum Monoclonal Antibodies Against Infectious Bronchitis Virus N Protein[J]. China Poultry, 2021,43(05): 27 – 32.

[18] 周雪雁,李琼毅,曹 欣,等. 禽冠状病毒 IBV 细胞适应性及其相关机制研究进展[J]. 病毒学报,2019,35(05):836 – 846.

Zhou XY, Li QY, Cao X, *et al*. Research Progress in Cellular Adaptation to the Avian Coronavirus IBV and Its Mechanisms of Action [J]. Chinese Journal of Virology, 2019, 35 (05): 836 – 846.

[19] 王娜娜. 传染性支气管炎病毒体外细胞培养体系的初探[D]. 中国农业科学院,2018.

Wang NN. Preliminary Exploration on the Conditions for the Production of Infections Bronchitis Virus from Cell Culture[D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2018.

(编 辑:侯向辉)