

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.02.06

牛支原体 NM001 株单克隆抗体的制备与鉴定

刘莹,王静文,张敏,陈小云,王磊*,杨承槐*

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心),北京 100081)

[收稿日期] 2023-09-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 02-0034-06 [中图分类号] S852.62

[摘要] 为获得抗牛支原体 NM001 株单克隆抗体,并评价其特性,以牛支原体分离株 NM001 作为抗原免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠,利用杂交瘤技术和间接 ELISA 方法筛选到 2 株能稳定分泌抗牛支原体的单克隆抗体细胞,命名为 2C5 和 7G3。其细胞上清的间接 ELISA 抗体效价分别为 6.4×10^3 和 1.2×10^4 。经亚型测定,单抗 2C5 和 7G3 均属于 IgG1 类,轻链均是 λ 型。制备腹水并对单抗进行纯化和特性鉴定,两株单抗的间接 ELISA 抗体效价分别为 1.02×10^5 和 4.09×10^5 ,且两株单抗与无乳支原体、山羊支原体山羊肺炎亚种、丝状支原体山羊亚种、绵羊肺炎支原体、牛巴氏杆菌均无交叉反应。Western Blot 结果显示,2 株单抗均能特异性识别牛支原体全菌蛋白中的相应蛋白。试验表明,单抗 2C5 和 7G3 能够与牛支原体发生特异性反应,从而为牛支原体血清学检测提供一定的物质基础。

[关键词] 牛支原体;单克隆抗体;特异性

Preparation and Identification of the Monoclonal Antibodies against *Mycoplasma bovis* Strain NM001

LIU Ying, WANG Jing-wen, ZHANG Min, CHEN Xiao-yun, WANG Lei*, YANG Cheng-huai*

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

Corresponding authors: WANG Lei, E-mail: sdsfdxwl@163.com; YANG Cheng-huai, E-mail: ychenghuai@163.com

Abstract: This study was conducted to obtain the monoclonal antibodies against *Mycoplasma bovis* strain NM001 and to evaluate the characterization of the monoclonal antibodies. Six-week-old BALB/c mice were immunized with *Mycoplasma bovis* strain NM001, two hybridoma cell strains stably secreting antibodies against NM001, separately named as 2C5 and 7G3, were obtained by hybridoma technology and indirect ELISA. The antibody titers in cell supernatant of 2C5 and 7G3 were 6.4×10^3 and 1.2×10^4 , respectively. Both monoclonal antibodies 2C5 and 7G3 were determined to be IgG1 category, and all light chains of 2C5 and 7G3 were belonged to λ chain. The monoclonal antibodies 2C5 and 7G3 were purified with antibody titers of 1.02×10^5 and 4.09×10^5 ,

基金项目: 中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心)所级课题(201809)

作者简介: 刘莹,硕士,助理研究员,从事病原微生物血清学检测方法研制工作。

通讯作者: 王磊, E-mail: sdsfdxwl@163.com; 杨承槐, E-mail: ychenghuai@163.com

respectively. Moreover, results of indirect ELISA showed that both 2C5 and 7G3 can react with *Mycoplasma bovis*, but not react with the *Mycoplasma agalactia*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma ovipneumoniae* or *Pasteurella multocida*. The result of Western Blot showed that both monoclonal antibodies 2C5 and 7G3 can specifically recognize proteins of *Mycoplasma bovis*. These data suggest that monoclonal antibodies 2C5 and 7G3 can react specifically with *Mycoplasma bovis*, which would provide a basis for serological detection of *Mycoplasma bovis*.

Key words: *Mycoplasma bovis*; monoclonal antibody; specificity

牛支原体 (*Mycoplasma bovis*, *M. bovis*) 是一种能引起牛的肺炎、关节炎、结膜炎以及乳腺炎等多种疾病的微生物^[1]。由于其没有细胞壁,对常规的抗菌药物青霉素不敏感,且对其他的抗菌药物易产生耐药性,导致感染后很难治疗^[2-3],严重危害养牛业的健康发展^[4]。我国自 2008 年分离到牛支原体证实该病原存在以来^[5-6],全国多个地区均有报道,且已给我国的养牛业造成了重大的经济损失^[7]。近期我国牛支原体血清流行病学调查结果显示,我国云南省内牛血清样本的牛支原体抗体阳性率可达到 36.32%^[8],说明我国牛支原体的诊断和防控急需加强。

目前,分离培养仍然是支原体最传统的鉴定和诊断方法,但该方法耗时长且敏感度很低。梁月梅等人的研究结果表明,支原体分离培养的敏感度仅为 PCR 检测方法的 1/9.5,说明聚合酶链式反应的诊断更高效,特异性和敏感性更强^[9]。荧光 PCR (探针法) 方法的应用使牛支原体检测的敏感度进一步提高,但是上述检测方法需要特殊的仪器设备,不易在基层的养殖场使用^[10]。可视化环介导等温扩增法可在一定的程度上克服上述检测方法的难题,但该方法容易因环境污染出现假阳性^[11-12],急需建立快速和准确的诊断方法来预防和控制牛支原体,而基于特异性高的单克隆抗体的抗原检测方法的建立是一种重要的解决方案。本研究利用前期分离获得的牛支原体内蒙分离株 NM001^[13] 作为免疫原并结合无乳支原体等病原来筛选和制备牛支原体单克隆抗体,从而为后期牛支原体快速、准确诊断方法的建立提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 SP2/0 骨髓瘤细胞株、牛支原体 NM001 株均为本实验室保存;支原体 EZH 液体培养基为本实验室制备;SPF 级雌性 6 周龄 BALB/c 小鼠、经产 BALB/c 雌鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;蛋白 Marker、Western Blot Marker,均购自南京金斯瑞生物科技有限公司;MEM 培养液购自 Gibco 公司;马血清购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 PAN 公司;聚乙二醇 (PEG 1450)、弗氏佐剂、HAT 和 HT 选择性培养基均购自 Sigma 公司;Mab 亚类鉴定试剂盒均购自于北京博奥龙公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自宝生物工程 (大连) 有限公司;细胞培养板、细胞培养瓶均购自 Corstar 公司。

1.2 免疫原的制备 牛支原体 NM001 株在 1000 mL EZH 培养基 37 ℃ 培养 72 h 后,取适量作计数用,剩余用终浓度为 0.4% 的甲醛灭活 48 h,9000 r/min 离心 45 min 收集菌体,再用灭菌 PBS 洗涤 5 次,用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,于 -80 ℃ 冻存。

1.3 动物免疫 以牛支原体 NM001 株灭活菌体用等体积弗氏佐剂乳化,皮下多点注射免疫 5 只雌性 BALB/c 小鼠,每只小鼠每次免疫抗原剂量为 100 μg。每隔 14 d 免疫 1 次,三免后 7~10 d,眼眶采血适量,用间接 ELISA 法测定血清效价,若血清效价达到融合要求 (效价高于 12800),则在融合前三天加强免疫,直接用菌体蛋白腹腔注射,剂量为 50 μg/只。免疫程序如表 1。

表 1 小鼠的免疫程序

Tab 1 The vaccination strategy of mice			
免疫次数	免疫途径	抗原剂量/ μg	佐剂
首免	颈背部多点皮下注射	100	弗氏完全佐剂
二免	颈背部多点皮下注射	100	弗氏不完全佐剂
三免	颈背部多点皮下注射	100	弗氏不完全佐剂
加强免疫	腹腔注射	50	不加佐剂

1.4 细胞融合 取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞 (10:1) 在 PEG1450 的作用下融合。具体方法:取 50 mL 离心管将细胞混合离心,弃上清,加入 1 mL 37 ℃ 预热的 PEG1450,轻轻旋动离心管,缓慢加入 10 mL 无血清 DMEM 培养基,离心后弃上清;用含 20% 胎牛血清的 HAT 培养基重悬细胞,铺布在含有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,细胞培养板放入培养箱中培养。

1.5 杂交瘤细胞的筛选 筛选用间接 ELISA,所用包被抗原的制备方法是:分别收集牛支原体培养物、无乳支原体培养物、山羊支原体山羊肺炎亚种培养物,反复冻融 8 次后超声波破碎,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,分装保存于 -20 ℃,包被浓度经滴定确定为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。采用间接 ELISA 法筛选与牛支原体反应阳性、与无乳支原体反应阴性、与山羊支原体山羊肺炎亚种反应阴性的杂交瘤细胞,有限稀释法分别亚克隆、建株、扩大培养,并置于液氮中长期保存。

1.6 杂交瘤细胞分泌抗体的亚型鉴定 按照北京博奥龙公司单抗亚型鉴定试剂盒所附带的说明书操作流程,用 2 株杂交瘤细胞培养上清分别检测单抗亚型。

1.7 牛支原体单抗腹水的制备与纯化 选取经产的健康 BALB/c 小鼠,腹腔注入 0.5 mL 弗氏不完全佐剂。10 d 后再向小鼠腹腔内注射杂交瘤细胞,每只小鼠注射约 10^6 个细胞。当小鼠腹围明显膨大,行动不便时,无菌抽取腹水。选用 Protein A (GE Healthcare 17-5079-01) 亲和柱纯化方法进行纯化。

1.8 单抗特异性分析

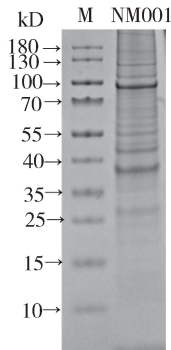
1.8.1 单抗间接 ELISA 效价的测定 用 PBS 做稀释液,杂交瘤细胞培养上清、纯化后的腹水从 1:10 开始做倍比稀释,按上述建立的牛支原体间接 ELISA 方法测定效价,测定 OD_{450 nm} 后以阳性值/阴性值 > 2.1 的最大稀释度为样品抗体效价。

1.8.2 ELISA 检测单抗特异性 将无乳支原体、山羊支原体山羊肺炎亚种、丝状支原体山羊亚种、绵羊肺炎支原体、牛巴氏杆菌的全菌蛋白以及马血清按照 1.5 项方法处理,包被 ELISA 板,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以间接 ELISA 方法测定各株单抗的特异性。

1.8.3 Western Blot 鉴定单克隆抗体反应性 将牛支原体和马血清进行 SDS-PAGE 电泳并转印 (50 V, 2 h) 至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶封闭 90 min。用不同种类的纯化后单克隆抗体 (1:1000 稀释) 与不同的牛支原体泳道分别孵育 (37 ℃, 1 h),用单克隆抗体的等量混合物 (最终稀释度为 1:1000) 与马血清泳道在相同条件下反应, PBST 洗涤后,与 HRP-羊抗鼠 IgG (1:5000 稀释) 室温作用 0.5 h,洗涤后,化学发光检测仪检测。

2 结果

2.1 免疫原的制备 通过培养、灭活、洗涤,获得浓度为 1.2 mg/mL 的牛支原体 NM001 株,SDS-PAGE 鉴定结果如图 1 所示。



M: 蛋白 Marker; NM001: 牛支原体分离株 NM001

M: protein Marker; NM001: The strain of *Mycoplasma bovis* NM001

图 1 牛支原体分离株 NM001 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig 1 The identification of the strain of *Mycoplasma bovis* NM001 by SDS-PAGE

2.2 杂交瘤细胞的筛选和分泌抗体的亚型鉴定

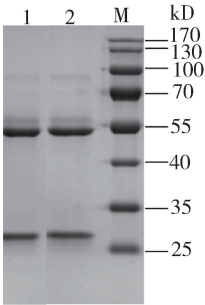
细胞融合后,经间接 ELISA 筛选出与牛支原体反应阳性、与无乳支原体和山羊支原体山羊肺炎亚种反应阴性的杂交瘤细胞阳性克隆,经过 3 次亚克隆后,得到两株能稳定分泌抗牛支原体单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别为 2C5 和 7G3,杂交瘤细胞上清的间接 ELISA 效价可达 6.4×10^3 和 1.2×10^4 。如表 2 所示,抗体亚型鉴定结果表明,2 株分泌的单克隆抗体均属于 IgG1 亚型,轻链均是 λ 型。

表 2 单克隆抗体亚型的鉴定

Tab 2 Identification of antibody isotyping to monoclonal antibodies		
单抗	轻链	Ig 亚类
McAb	L chain	Ig subclass
2C5	λ	IgG1
7G3	λ	IgG1

2.3 单克隆抗体 2C5 和 7G3 的制备与纯化

利用经产小鼠制备杂交瘤细胞株 2C5 和 7G3 的腹水,将收集到的腹水用 Protein A (GE Healthcare 17-5079-01) 亲和柱纯化方法进行纯化,结果如图 2 所示,获得纯度较高的单克隆抗体 2C5 和 7G3,其浓度可达 2.1 mg/mL 和 3.2 mg/mL。



M: 蛋白 Marker; 1: 单克隆抗体 2C5;2: 单克隆抗体 7G3

M: protein Marker; 1: Monoclonal antibody 2C5;
2: Monoclonal antibody 7G3

图 2 单克隆抗体的纯化

Fig 2 Purification of 2C5 and 7G3

2.4 单克隆抗体 2C5 和 7G3 的鉴定

2.4.1 单克隆抗体 2C5 和 7G3 的间接 ELISA 效价测定

选用牛支原体作为包被抗原建立的间接 ELISA 方法对单克隆抗体 2C5 和 7G3 进行效价测

定,结果显示单克隆抗体 2C5 和 7G3 的效价可达 1.02×10^5 和 4.09×10^5 ,工作浓度分别为 2.06×10^{-5} mg/mL 和 7.82×10^{-6} mg/mL。

2.4.2 单克隆抗体 2C5 和 7G3 的特异性检测

如表 3 所示,间接 ELISA 结果表明,2C5 和 7G3 与无乳支原体、山羊支原体山羊肺炎亚种、丝状支原体山羊亚种、绵羊肺炎支原体、牛巴氏杆菌以及马血清均不反应。

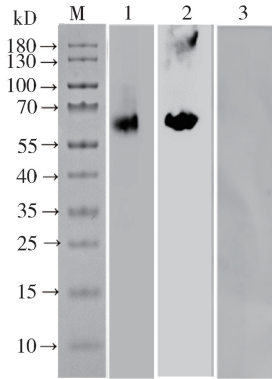
表 3 单克隆抗体特异性鉴定

Tab 3 Specific identification of monoclonal antibodies

菌株	单抗	
	2C5	7G3
牛支原体 NM001 株	+	+
无乳支原体	-	-
山羊支原体山羊肺炎亚种	-	-
丝状支原体山羊亚种	-	-
绵羊支原体	-	-
多杀性巴氏杆菌马血清	-	-

2.4.3 单克隆抗体 2C5 和 7G3 与牛支原体反应的 Western Blot 鉴定

Western Blot 结果表明,单克隆抗体 2C5 和 7G3 均能与牛支原体全菌蛋白发生反应,且两株单抗识别的蛋白大小相近,均在 60 kD 左右,而两株单抗均不与马血清发生反应。



M. 蛋白 Marker;1. 2C5 与牛支原体的反应;2. 7G3 与牛支原体的反应;3. 2C5 和 7G3 等量混合物与马血清的反应

M: Protein Marker; 1: The interaction of *Mycoplasma bovis* with 2C5; 2: The interaction of *Mycoplasma bovis* with 7G3;
3: The interaction of horse serum with mixture of 2C5 and 7G3

图 3 2C5 和 7G3 与牛支原体反应的 Western Blot 鉴定

Fig 3 The identification of *Mycoplasma bovis* with 2C5 and 7G3 by Western Blot

3 讨 论

单克隆抗体的制备是建立优良抗原检测方法的基础,而免疫原的选择是单克隆抗体制备的关键。虽然研究者通过基因组学以及蛋白组学分析技术已经鉴定出了许多相对保守的抗原蛋白(如 P26、P48、P81、HSP60、 α -烯醇化酶、GAPDH、EF-Ts、MilA 以及 TrmFO 等)^[14],但很多蛋白的免疫保护作用(如 Vsps、PMB67 以及 GAPDH)^[15-16]未得到确认,导致单一的蛋白很难作为免疫原来制备牛支原体的单克隆抗体。为了制备出优良的抗牛支原体单克隆抗体,选择以牛支原体全菌体作为免疫原。为了保证灭活彻底且免疫原性不被破坏,选择终浓度为 0.4% 的甲醛灭活 48 h。

已有的研究表明牛支原体和无乳支原体 PG2 同源性很高^[17-18],以牛支原体为免疫原制备的单抗,易产生与无乳支原体发生交叉反应的克隆株。任泽民等以牛支原体全菌体制备的 6 株单克隆均能够与无乳支原体发生交叉反应^[19]。为此,本研究在杂交瘤细胞株的筛选阶段,用牛支原体包被 ELISA 板做阳性筛选,用无乳支原体、山羊支原体山羊肺炎亚种包被 ELISA 板做阴性筛选,从源头淘汰发生交叉反应的克隆株,从而保证筛到特异性高的牛支原体单抗。此外,为了排除马血清对单克隆抗体筛选的干扰,本研究采用灭菌 PBS 将灭活后的牛支原体洗涤了 5 次,同时通过 ELISA 和 Western Blot 方法证实了单克隆抗体与马血清无反应性。

ELISA 和 Western Blot 结果均表明本研究制备的两株单克隆抗体与牛支原体能够发生很好的特异性结合,但两株单抗针对的抗原表位还未知。本研究前期分别通过原核表达系统获得了 3 种常见的重组牛支原体蛋白,但均未能与获得的两株单抗发生特异性的反应,这可能是由于牛支原体抗原复杂,未获得单克隆抗体的靶标蛋白,或者是由于原核表达的重组蛋白丧失了单克隆抗体针对的天然表位。上述获得的牛支原体单克隆抗体一方面可与灭活的支原体结合,建立牛支原体抗体阻断 ELISA 方法;另一方面可将获得的单克隆抗体作为包被抗原建立用于双抗夹心检测牛支原体病原。

为了将抗牛支原体单克隆抗体更好地运用到牛支原体的抗原/抗体血清学检测以及牛支原体 NM001 株的致病性研究,后期需要投入更多的研究来分析获得这两株特异性单克隆抗体针对的抗原表位信息。

参考文献:

- [1] Perez - Casal J. Pathogenesis and virulence of *Mycoplasma bovis* [J]. The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, 2020, 36(2): 269 - 278.
- [2] Askar H, Chen S, Hao H, et al. Immune Evasion of *Mycoplasma bovis* [J]. Pathogens, 2021, 10(3): 297.
- [3] Gelgie A E, Korsa M G, KerroD ego O. *Mycoplasma bovis* mastitis [J]. Current research in microbial Sciences, 2022, 3: 100123.
- [4] Dudek K, Nicholas R A J, Szacawa E, et al. *Mycoplasma bovis* infections - occurrence, diagnosis and control [J]. Pathogens, 2020, 9(8): 640.
- [5] 辛九庆,李 媛,郭 丹,等.国内首次从患肺炎的犊牛肺脏中分离到牛支原体[J].中国预防兽医学报,2008(9): 661 - 664.
Xin J Q, Li Y, Guo D, et al. First isolation of *Mycoplasma bovis* from calf lung with pneumoniae in China [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008(9): 661 - 664.
- [6] 石 磊,龚 瑞,尹争艳,等.肉牛传染性牛支原体肺炎流行的初步诊断[J].华中农业大学学报,2008, 27(4): 572.
Shi L, Gong R, Yin Z Y, et al. Preliminary diagnosis of cattle infectious *mycoplasma bovine pneumonia* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(4): 572.
- [7] 张建华,曹希亮,刘 超,等.我国奶牛牛支原体流行情况调查[J].中国奶牛,2017(3): 23 - 26.
Zhang J H, Cao X L, Liu C, et al. Prevalence investigation of *Mycoplasma bovis* in China [J]. China Dairy Cattle, 2017(3): 23 - 26.
- [8] 李 媛,闫 磊,刘 桐,等.中国西部和北部边境 4 省区牛支原体血清流行病学调查及分析[J].中国预防兽医学报,2021, 43(07): 717 - 721.
Li Y, Yan L, Liu T, et al. Seroprevalence and analysis of *Mycoplasma bovis* infection in four provinces of Western and Northern China [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(07): 717 - 721.
- [9] 梁月梅,杨 乐,吴翠兰,等.牛支原体检测方法初探[J].特种经济动植物,2022, 25(11): 4 - 6.
Liang Y M, Yang L, Wu C L, et al. Preliminary study on the

- detection method of *Mycoplasma bovis* [J]. Special Economic Animals and Plants, 2022, 25(11): 4–6.
- [10] 陶攀, 东笑, 罗昌俊, 等. 牛呼吸道疾病多重荧光 PCR(探针法)检测方法的建立及应用[J]. 中国动物传染病学报, 2023. Doi: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230120.002
- Tao P, Dong X, Luo C J, *et al.* Establishment application of multiplex fluorescent PCR (Probe) for detection of bovine respiratory diseases [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2023. Doi: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230120.002
- [11] 吴微. 检测牛呼吸道病原 IBRV、BRSV、M. bovis 可视化环介导等温扩增法的建立[D]. 河北科技师范学院, 2023.
- Wu W. Establishment of visualized loop-mediated isothermal amplification method for the detection of IBRV, BRSV and *M. bovis* [D]. Hebei Normal University of Science and Technology, 2023.
- [12] 汪梦竹, 蒲飞洋, 赵泽阳, 等. 牛支原体诊断技术的研究进展[J]. 中国农学通报, 2023, 39(16): 118–123.
- Wang M Z, Pu F Y, Zhao Z Y, *et al.* Research progress in diagnostic techniques of *Mycoplasma bovis* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2023, 39(16): 118–123.
- [13] 刘莹, 杨承槐, 陈小云, 等. 一株牛支原体的分离鉴定及致病性初步研究[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(3): 5–10.
- Liu Y, Yang C H, Chen X Y, *et al.* Identification of a *Mycoplasma bovis* and the initial virulence analysis in cattle[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(3): 5–10.
- [14] Khan F A, Rasheed M A, Faisal M, *et al.* Proteomics analysis and its role in elucidation of functionally significant proteins in *Mycoplasma bovis*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 111: 50–59.
- [15] Prysliak T, Vanden D M J, Perez-casal J. Vaccination with recombinant *Mycoplasma bovis* GAPDH results in a strong humoral immune response but does not protect feedlot cattle from an experimental challenge with *M. bovis* [J]. Microbial Pathogenesis, 2013, 55: 1–8.
- [16] 任泽民, 姜勇, 巴晓亮, 等. 牛支原体单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(07): 58–61.
- Ren Z M, Jiang Y, Ba X L, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibodies against *Mycoplasma bovis* [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(07): 58–61.
- [17] Kumar A, Srivastava N C, Singh V P, *et al.* Electrophoretic analysis of indian isolates of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by SDS-PAGE and immunoblotting [J]. Vet Med Int, 2014, 892421.
- [18] El Tigani-Asil E T A, Abdelwahab G E, Veedu J T V P, *et al.* Gangrenous mastitis in dromedary camels in UAE caused by *Streptococcus agalactiae*[J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1): 174.

(编辑:李文平)