

# 抗独特型抗体对猪繁殖与呼吸综合征病毒感染的免疫作用

胡永浩<sup>1</sup>, 龚振华<sup>2</sup>, 蒋正军<sup>2\*</sup>

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 农业部动物检疫所, 青岛 266032)

**摘要:** 用 PRRSV 感染 SPF 猪, 血清检测结果显示, 机体不仅产生抗 PRRSV 抗原的各种抗体(Ab1), 而且产生针对这些抗体的抗独特型抗体(Ab2)。根据各种蛋白质的等电点不同, 应用 IEF 技术分离纯化出 PRRSV 感染猪血清中的不同 IgG。分别以纯化的抗 PRRSV-GP5 蛋白、抗 PRRSV-M 蛋白的 Ab2 免疫 SPF 猪各 5 头, 7 d 后经鼻腔感染 PRRSV, 定期采集血样进行病毒分离或鉴定试验。抗 PRRSV-GP5 蛋白的 Ab2 免疫的猪, 其血样自感染后 3~7 d 均检出 PRRSV; 3 头猪在感染后 14~63 d 未检出 PRRSV; 2 头猪在感染后 14~35 d 检出 PRRSV, 从 42~56 d 转为阴性, 其中 1 头猪在 63 d 时检出 PRRSV。抗 PRRSV-M 蛋白的 Ab2 免疫的猪, 其血样自感染后 3~7 d 均检出 PRRSV; 2 头猪在感染后 14~63 d 未检出 PRRSV; 3 头猪在感染后 14~35 d 检出 PRRSV, 从 42~56 d 转为阴性, 其中 1 头猪在 63 d 时检出 PRRSV。抗 PRRSV-GP5 和抗 PRRSV-M 蛋白的 Ab2 免疫作用显著, 可作为 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 蛋白的替代抗原产生具有中和效应的抗体, 保护机体免受 PRRSV 的感染。

**关键词:** PRRSV; IgG; 抗独特型抗体; 免疫

**中图分类号:** S852.4; S858.285.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2005)03-0272-06

机体免疫系统是由 T、B 淋巴细胞等免疫活性细胞、免疫辅佐细胞和抗原、抗体之间的反应以及抗体与抗体之间的反应构成的一个复杂的网络系统<sup>[1]</sup>。动物体内抗体成分复杂, 不仅存在针对外来抗原成分的各种类型的抗体(Antibody, Ab1), 而且还存在针对这些抗体的抗独特型抗体(Anti-idiotype antibody, Ab2)<sup>[2]</sup>。猪感染猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)后, 在产生各种 Ab1 的同时, 也产生针对不同 Ab1 的抗体, 诸如抗 PRRSV-GP5 抗体和抗 PRRSV-M 抗体的 Ab2<sup>[3]</sup>。抗体分子可变区, 尤其是超变区, 由于氨基酸组成和序列的多样性而存在差异, 使不同抗体分子在电解质溶液中的等电点不同<sup>[2]</sup>。因此, 运用等电聚焦(Isoelectrofocusing, IEF)等技术可将各种抗体分子或其酶解后的 F(ab')<sub>2</sub> 片段进行分离<sup>[2]</sup>。本试验采用 Bio-Rad 公司的 Rotofor 蛋白质分离系统, 运用 IEF 技术分离纯化猪血清中抗 PRRSV 的不同 IgG 成分, 并以纯化的几种 IgG 分别免疫 SPF 猪, 然后再感染 PRRSV, 通过检测感染猪体内 PRRSV 及各种抗体

消长规律, 探讨 PRRSV 各种抗体的 Ab2 对猪感染 PRRSV 的免疫调节作用, 为猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)的诊断、免疫预防提供理论依据和技术方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 PRRSV 细胞和培养基

PRRSV: 北美 PRRSV-ATCC-VR-2332 株<sup>[4]</sup>; 细胞: MARC-145 细胞(非洲猴肾细胞系 MA-104 克隆细胞); 培养基: DMEM 培养基(Sigma 化学公司)。

### 1.2 单克隆抗体及其 F(ab')<sub>2</sub> 片段

抗 PRRSV-GP5、抗 PRRSV-M、抗 PRRSV-N 蛋白的单克隆抗体(分别简称 Mab-25、Mab-19 和 Mab-15)的腹水由美国爱荷华州立大学兽医学院 Dr. Yang 惠赠。正常鼠 IgG 和来自腹水的单克隆抗体用蛋白 A 亲和层析柱纯化后, 用胃蛋白酶消化, 再用蛋白 A 亲和层析柱纯化 F(ab')<sub>2</sub> 片段, 以 SDS-PAGE 和酶标法检验纯度。

### 1.3 Ab1、Ab2 的纯化、制备及检测

采用 Bio-Rad 公司的 Rotofor 蛋白质分离系统, 运用 IEF 技术分离纯化血清中的 IgG<sup>[5]</sup>, 分别收集 20 个分馏段成分。抗 PRRSV-N 蛋白抗体用间

收稿日期: 2003-12-05

作者简介: 胡永浩(1962-), 男, 甘肃古浪人, 教授, 从事动物传染病学与病原分子生物学研究

\* 通讯作者: 蒋正军, 博士, 副研究员, E-mail: jiangzhengjun@epizoo

接 ELISA 检测, 检测试剂盒由 IDEXX 公司 (Westbrook, MA, USA) 提供。抗 PRRSV-GP5 蛋白和抗 PRRSV-M 蛋白的抗体用竞争 IFA 检测<sup>[6]</sup>。间接 ELISA 检测感染 PRRSV 猪血清中的 Ab2。碳酸盐缓冲液分别稀释 Mab-25-F(ab')<sub>2</sub>、Mab-15-F(ab')<sub>2</sub>、Mab-19-F(ab')<sub>2</sub> 和 N-F(ab')<sub>2</sub> 片段成 2 μg/mL, 以 100 μL/孔分别包被酶标板, 置 4 ℃ 过夜。包被板用含 0.1% Tween 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution-Tween, PBST) 洗涤 3 次后, 用 1% BSA/PBST 封闭 45min。检测血清中的 Ab2, 用 PBST 将血清 1:50 稀释; 检测分离纯化的各个成分, 则将待检的 IgG 用 PBST 稀释成 10 μg/μL。包被板用 PBST 洗涤 3 次, 加入过氧化物酶标记羊抗猪 IgG (H+L) (5 μg/mL, 100 μL/孔) 室温反应 30 min, 再用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入 TMB 底物溶液 (100 μL/孔), 避光室温显色 15min, 加入 50 μL 0.5 mol/L 硫酸终止显色, 用酶标仪读取光密度吸收值。OD<sub>450 nm</sub> 值 < 0.4 为阴性, OD<sub>450 nm</sub> 值 ≥ 0.4 为阳性。

#### 1.4 动物试验

30 头 14 日龄不含 PRRSV 及 PRRSV 抗体的 SPF 断奶仔猪 (美国爱荷华州立大学提供), 编号为 P1、P2、P3……P30, 随机分为 6 组, 每组 5 头。对照组每头猪注射 2 mL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS)。试验组每头猪肌肉接种 2 mL (2 mg/mL) 相应的 Ab2 或 Ab1。试验组 1 免疫 PRRSV-N 蛋白; 试验组 2 免疫 PRRSV-GP5 蛋白; 试验组 3 免疫 PRRSV-M 蛋白; 试验组 4 免疫抗 PRRSV-GP5 的 Ab2; 试验组 5 免疫抗 PRRSV-M 的 Ab2。7 d 后, 经鼻腔感染 2 mL PRRSV (10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL)。免疫接种及感染 PRRSV 前均采血分离血清, 感染 PRRSV 后 3 d 和以后间隔 7 d 采血分离血清, 直至感染 PRRSV 后 63 d 为止。

#### 1.5 病毒分离及鉴定

分别取 100 μL 经 pH7.0 的 PBS 10 倍稀释的感染 PRRSV 的血清样品, 加至在 96 孔微量滴度板中已培养 24h 的单层 MARC-145 细胞。每个样品感染 2 个孔, 置 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 定期观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE), 出现 CPE 者为阳性。7 d 后, 若 CPE 不明显, 用 80% 丙酮固定细胞, 烘干后加入抗 PRRSV-N 蛋白的单克隆抗体 Mab-15, 洗涤, 加入异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠 IgG, 洗涤后置荧光显微镜观察, 出现荧光反

应者为阳性。

## 2 结果

### 2.1 各种 IgG 的纯化与检测

IEF 分离纯化感染 PRRSV 的猪血清中不同种类和性质的 IgG 分子及检测结果见表 1。从表 1 看出, 分离得到的 20 个 IgG 分馏段成分 pH 值不同, 浓度也不一样; 间接 ELISA 检测表明, 抗 PRRSV-GP5 的 Ab2 位于 F15 和 F16 段, 抗 PRRSV-M 的 Ab2 位于 F17、F18 和 F19 段, 各分馏成分未检测到抗 PRRSV-N 的 Ab2; IFA 竞争抑制试验表明, 抗 PRRSV-GP5 的 Ab1 位于 F8 和 F9 片段, 抗 PRRSV-M 的 Ab1 位于 F6 和 F7 段; 应用 IDEXX 公司提供的间接 ELISA 试剂盒检测表明, 抗 PRRSV-N 的 Ab1 位于 F11、F12、F13 和 F14 段。各种 IgG 的含量分别为: 抗 PRRSV-M 抗体 14%, 抗 PRRSV-GP5 抗体 15.75%, 抗 PRRSV-N 蛋白抗体 28.5%, 抗 PRRSV-M 蛋白的 Ab2 为 7.5%, 抗 PRRSV-GP5 蛋白的 Ab2 为 6.25%。不同 IgG 成分中抗 PRRSV-N 抗体含量最高, 各种抗独特型抗体所占比例较小, 未检测到抗 PRRSV-N 蛋白的抗独特型抗体。

表 1 各个分馏段成分的性质

Table 1 Characterization of different purified Ab1 and Ab2

分馏段	pH	含量 /mg	比例 /%	PRRSV	PRRSV	PRRSV	PRRSV	PRRSV	PRRSV
				-N 的 Ab2	-GP5 的 Ab2	-M 的 Ab2	-N 的 Ab1	-GP5 的 Ab1	-M 的 Ab1
1	3	1.2	3	-	-	-	-	-	-
2	3	1	2.5	-	-	-	-	-	-
3	3.5	1.2	3	-	-	-	-	-	-
4	3.5	2.2	5.5	-	-	-	-	-	-
5	4	2.2	5.5	-	-	-	-	-	-
6	4.5	3	7.5	-	-	-	-	-	+
7	5	2.6	6.5	-	-	-	-	-	+
8	5.5	3.7	9.25	-	-	-	-	+	-
9	6	2.6	6.5	-	-	-	-	+	-
10	6	3	7.5	-	-	-	-	-	-
11	7	5	12.5	-	-	-	+	-	-
12	7	2.4	6	-	-	-	+	-	-
13	7	3	7.5	-	-	-	+	-	-
14	7.5	1	2.5	-	-	-	+	-	-
15	7.5	1.2	3	-	+	-	-	-	-
16	8	1.3	3.25	-	+	-	-	-	-
17	8	1	2.5	-	-	+	-	-	-
18	9	1.2	3	-	-	+	-	-	-
19	10	0.8	2	-	-	+	-	-	-
20	11	0.4	1	-	-	-	-	-	-

2.2 PRRSV 感染动物的免疫反应

对照组猪 (P1 ~ P5) 所有血清均未检出 PRRSV-N 蛋白的 Ab2。检测结果见表 2、表 3(表中 DPI 为免疫后的天数, DPC 为感染后的天数)。对照组猪自感染后 3~ 35 d 均检出 PRRSV, 42~ 56 d 期间, 均未检出 PRRSV, 在 63 d 从 2 头猪的血样中检出 PRRSV, 而另外 3 头猪仍为阴性; 间接 ELISA 和竞争 IFA 检测表明, 抗 PRRSV-N 抗体在感染后 14~ 63 d 均为阳性, 抗 PRRSV-GP5 和抗 PRRSV-M 蛋白的抗体均在感染 PRRSV 后 28 d 检

出, 至 63 d 仍为阳性(表 2)。P1、P2、P4、P5 针对 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 蛋白的 Ab2 均出现在感染后 56~ 63 d 之间, P3 未检出 Ab2(表 3)。

2.3 免疫 Ab1 对 PRRSV 感染猪的作用

免疫 PRRSV-N 的 Ab1 组猪感染后自 14 d 起抗 Mab-15-F (ab') 2 的 Ab2 均呈阳性; 免疫 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的 Ab1 组猪抗 Mab-15-F (ab') 2 的 Ab2 均为阴性。病毒分离或鉴定及 Ab1、Ab2 检测结果见表 2、表 3。

表 2 接种不同抗体制剂后机体对 PRRSV 的免疫学反应

Table 2 Immune response against PRRSV in pigs immunized with different Ab1 or Ab2

组别	PIG	0DPI	7DPI	3DPC	7DPC	14DPC	21DPC	28DPC	35DPC	42DPC	49DPC	56DPC	63DPC
		VI/N/ GP5/M <sup>①</sup>	(0DPC) VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M	VI/N/ GP5/M
对照组	P1	-/-/-/②	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P2	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P3	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P4	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P5	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
试验组 1	P6	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P7	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P8	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P9	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P10	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
试验组 2	P11	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P12	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	-/+/-/	-/+/-/	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P13	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	-/+/-/	-/+/-/	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P14	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P15	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
试验组 3	P16	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P17	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	-/+/-/	-/+/-/	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P18	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P19	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P20	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/+/-/	+/+/-/	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
试验组 4	P21	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P22	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P23	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/++/+	+/++/+	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+
	P24	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P25	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/++/+	+/++/+	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
试验组 5	P26	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P27	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/++/+	+/++/+	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P28	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P29	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/++/+	+/++/+	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+
	P30	-/-/-/	-/-/-/	+/-/-/	+/-/-/	+/++/+	+/++/+	+/++/+	+/++/+	-/++/+	-/++/+	-/++/+	+/++/+

①VI 为病毒分离或测定; N 为抗 PRRSV-N 蛋白抗体; GP5 为抗 PRRSV-GP5 蛋白抗体, M 为抗 PRRSV-M 蛋白抗体; ②+ 为阳性; - 为阴性; ③DPI 为免疫后天数; DPC 为感染后天数

①VI. virus isolation or identification; N. anti-PRRSV-N antibody; GP5. anti-PRRSV-GP5 antibody; M. anti-PRRSV-M antibody; ②+ . positive; - . negative; ③DPI. days post immunization; DPC. days post infection

表 3 免疫接种 PBS 和不同抗体蛋白后 PRRSV-GP5 蛋白和 PRRSV-M 蛋白的 Ab2 检测

Table 3 Detection of Ab2 to anti-PRRSV-GP5 and anti-PRRSV-M in pigs immunized with PBS, different Ab1 and Ab2

组别	PIG	0DPI	7DPI	3DPC	7DPC	14DPC	21DPC	28DPC	35DPC	42DPC	49DPC	56DPC	63DPC
		GP5/M <sup>①</sup>	(ODPC) GP5/M	GP5/M	GP5/M	GP5/M	GP5/M	GP5/M	GP5/M	GP5/M	GP5/M	GP5/M	GP5/M
对照组	P1	-/- <sup>②</sup>	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P2	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P4	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P5	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
试验组 1	P6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P7	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P8	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
试验组 2	P11	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P13	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
	P14	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P15	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
试验组 3	P16	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P17	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P18	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P19	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
	P20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+
试验组 4	P21	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P22	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P23	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-
	P24	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P25	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
试验组 5	P26	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P27	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
	P28	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	P29	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
	P30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

①GP5 为抗 PRRSV-GP5 蛋白的 Ab2; M 为抗 PRRSV-M 蛋白的 Ab2; ②+ 为阳性; - 为阴性

①GP5. Ab2 to anti-PRRSV-GP5; M. Ab2 to anti-PRRSV-M; ②+ . positive; - . negative

2.3.1 免疫 PRRSV-N 的 Ab1 组猪(P6~ P10) 自感染后 3~ 35 d 均检出 PRRSV, 42~ 56 d 期间均未检出 PRRSV, 63 d 从 3 头猪血样中检出 PRRSV, 另外 2 头仍为阴性。感染 PRRSV 后 14~ 63 d 其抗 PRRSV-N 抗体均为阳性; 抗 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的抗体 P10 在 21~ 63 d 呈现阳性, 其余 4 头猪均在感染后 28 d 检出, 至 63 d 仍为阳性(表 2)。针对 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 蛋白的 Ab2 的检测表明, 仅其中 P10 在 28~ 49 d 为阳性, 而其它 3 头猪的 Ab2 出现在 56~ 63 d 之间, P9 未检出 Ab2(表 3)。

2.3.2 免疫 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的 Ab1 组

猪(P11~ P20) 自感染后 3~ 7 d 均检出 PRRSV; PRRSV-GP5 组的 P12、P13 和 PRRSV-M 组的 P17 在 14~ 56 d 病毒检测为阴性; 其余感染动物在 14~ 35 d 时均检出 PRRSV, 自 42~ 56 d, 均未检出 PRRSV; 63 d 时每组有 3 头猪为阳性(其中 P12 为感染后 14~ 56 d 期间呈现阴性的猪)。PRRSV-N 的抗体均在感染后 14 d 检出, 至 63 d 时均为阳性。PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的抗体除其中 PRRSV-GP5 组的 P13 在 21 d 出现阳性外, 其余动物均自感染后 28 d 检出, 至 63 d 时均为阳性(表 2)。免疫 PRRSV-GP5 的 Ab1 组猪(P11~ P15), 抗 PRRSV-GP5 和抗 PRRSV-M 的 Ab2, 1 头猪(P14) 为阴性,

P13 在 28~ 49 d 为阳性; 3 头猪(P11、P12、P15) 在 56~ 63 d 期间抗 PRRSV-GP5 的 Ab2 为阳性; 2 头猪(P11、P12) 在 56~ 63 d 期间抗 PRRSV-M 的 Ab2 为阳性, 其中 P11 的 Ab2 出现在 63 d(表 3)。免疫 PRRSV-M 的 Ab1 组猪(P16~ P20), 3 头猪在 56~ 63 d 期间抗 PRRSV-GP5 的 Ab2 为阳性, 其中 P20 的抗 PRRSV-GP5 的 Ab2 出现在 63 d, 另外 2 头猪为阴性; 3 头猪在 56~ 63 d 期间 PRRSV-M 的 Ab2 为阳性, 其中 P19 的 Ab2 出现在 63 d, 另外 2 头猪为阴性(表 3)。

#### 2.4 免疫 Ab2 对 PRRSV 感染猪的作用

各组猪抗 M ab-15 F(ab')<sub>2</sub> 的 Ab2 均为阴性。病毒分离或鉴定及 Ab1、Ab2 检测结果见表 2、表 3。免疫抗 PRRSV-GP5 的 Ab2 组猪(P21~ P25) 自感染后 3~ 7 d 均检出 PRRSV; 其中 P21、P22、P24 从感染后 14~ 63 d 均未检出 PRRSV; P23、P25 在 14~ 35 d 检出 PRRSV, 从 42~ 56 d 转为阴性, 至 63 d 时 P23 检出 PRRSV, P25 仍为阴性。PRRSV-N 抗体均在感染后 14~ 63 d 检出。PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的抗体(或 Ab2 作为替代 PRRSV-GP5 抗原产生的 Ab3), 自 14~ 63 d 均为阳性(表 2)。P21、P22、P24 的抗 PRRSV-GP5 和抗 PRRSV-M 的 Ab2 均为阴性; P25 的抗 PRRSV-GP5 和抗 PRRSV-M 的 Ab2 出现在感染后 28~ 49 d; P23 的抗 PRRSV-GP5 和抗 PRRSV-M 的 Ab2 出现在 42~ 56 d 之间(表 3)。免疫抗 PRRSV-M 的 Ab2 组猪(P26~ P30) 自感染后 3~ 7 d 均检出 PRRSV; P26 和 P28 从 14~ 63 d 时, 均未检出 PRRSV; P27、P29、P30 在 14~ 35 d 均检出 PRRSV, 从 42~ 56 d 均转为阴性, 63 d 时仅 P30 检出 PRRSV。抗 PRRSV-N 抗体均在 14~ 63 d 检出。抗 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的抗体自 14~ 63 d 均为阳性(表 2)。P26、P28 和 P30 的 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的 Ab2 均为阴性; P27、P29 的 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的 Ab2 出现在 28~ 49 d 之间(表 3)。

### 3 讨论

**3.1 猪感染 PRRSV 后, 机体不仅产生抗 PRRSV 抗原的各种抗体, 也产生针对这些抗体的抗独特型抗体。采用 IEF 技术分离纯化出 PRRSV 感染猪血清中的针对不同抗原、抗体成分的不同 IgG。血清样品中以 PRRSV-N 的抗体成分最高, 而针对具有中和特性的 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的抗体及其**

**抗独特型抗体所占比例相对较低。由于抗 PRRSV-N 的抗体不具有中和 PRRSV 的作用, 难以清除机体内的 PRRSV, 而呈现持续感染状态<sup>[7,8]</sup>。目前诊断猪是否感染 PRRSV, 一般用 ELISA 检测 PRRSV-N, 这样检测出的抗体均为抗 PRRSV-N 抗体。因此, 这种方法仅可诊断猪感染与否, 而不能用于判断疫苗效果或抗体抗病毒的中和状况。**

**3.2 PRRSV-N 的 Ab1 不具有中和病毒的效应, 人工接种 PRRSV-N 的 Ab1 后, 不能保护机体免受 PRRSV 的感染。与对照组比较, 两组的病毒分离或鉴定、PRRSV-N 的抗体、PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的抗体以及抗 PRRSV-GP5 和抗 PRRSV-M 的 Ab2 产生情况基本一致。尽管接种 PRRSV-N 的 Ab1 后, 能产生抗 PRRSV-N 的 Ab2, 但在机体抵抗 PRRSV 感染中不起作用。免疫 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的 Ab1 后, 由于这两种抗体为病毒中和抗体, 在体内可起一定的被动免疫作用, 但发挥作用不明显。这可能是用 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的抗体进行免疫时, 接种量太少的缘故。**

**3.3 机体接种针对 PRRSV-GP5 和 PRRSV-M 的 Ab2 后, 免疫作用显著, 证明该 Ab2 具有 PRRSV 抗原的“内部影像”作用, 可作为 PRRSV-GP5 或 PRRSV-M 的替代抗原产生具有中和效应的抗体。病毒分离鉴定和抗体检测表明, 免疫抗 PRRSV-GP5 的 Ab2 组有 3 头猪自 14~ 63 d 未检出 PRRSV, 另外有 1 头猪的 Ab2 出现在 28~ 49 d 之间, 提示该头猪处于清除感染状态; 免疫 PRRSV-M 的 Ab2 组有 2 头猪自 14~ 63 d 均未检出 PRRSV, 另外 2 头猪的 Ab2 出现在 28~ 49 d 之间, 至 63 d 时未检出 PRRSV。表明上述抗独特型抗体接种机体后, 能起到使机体免受 PRRSV 感染的调节作用。**

#### 参考文献:

- [1] Jerne N K. Towards a network theory of the immune system[J]. *Ann Immunol(Paris)*. 1974. 125C(1-2): 373~ 389.
- [2] Ayoub A, Ferreira C, Coutinho A. Distinguishable patterns of connectivity in serum immunoglobulin from SLE patients and healthy individuals[J]. *Scand J Immunol*, 1997, 45(4): 408~ 416.
- [3] Jiang Z, Zhou E M, Ameri Mahabadi M, et al. Identification and characterization of auto-antidiotypic antibodies specific for antibodies against porcine reproduc-

tive and respiratory syndrome virus envelope glycoprotein (GP5)[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 92: 125~ 135.

- [4] Kim H J, Kwang J, Yoon J J, et al. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogenesis subpopulation of MA-104 cells[J]. *Arch Virol*, 1993, 133: 477~ 483.
- [5] Bio-Rad. Rotofor system instruction manual[S]. Alfred Nobel Drive Hercules, California 94547, 2000.
- [6] Yoon K J, Wu L L, Zimmerman J J, et al. Character-

ization of the humeral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection[J]. *Vet Diagn Invest*, 1995, 7: 305~ 312.

- [7] Wills R W, Zimmerman J J, Yoon K J, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection[J]. *Vet Microbiol*, 1997, 55: 231~ 240.
- [8] Horter D, Pogranichnyy R, Chang C C, et al. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection[J]. *Vet Microbiol*, 2002, 86 (3): 213~ 218.

### The Immune Response of Anti-idiotype Antibodies against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection

HU Yong-hao<sup>1</sup>, GONG Zhen-hua<sup>2</sup>, JIANG Zheng-jun<sup>2\*</sup>

(1. *College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070;*

2. *Animal Quarantine of Agricultural Ministry, Qingdao 266032, China*)

**Abstract:** The SPF pigs were infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) experimentally. The results indicated that there were not only antibodies (Ab1) to PRRSV, but also the anti-idiotype antibodies (Ab2) to the Ab1 in the serum samples collected from the pigs infected with PRRSV. According to the differences of proteins with different isoelectric point, various kinds of IgG in the serum samples were separated and purified by using isoelectrofocusing (IEF). Ten SPF pigs were immunized with purified Ab2 to anti-PRRSV-GP5 and anti-PRRSV-M respectively, and then they were infected with PRRSV through nasal cavity 7 days after immunization. The serum samples were collected from the pigs infected with PRRSV, and the strains of PRRSV in the serum samples were isolated by using MARC-145 cell or identified with competitive IFA. Five samples collected from pigs immunized with the Ab2 to anti-PRRSV-GP5 were positive from 3 to 7 days post infection; 3 samples were negative from 14 to 63 days post infection; 2 samples were positive from 14 to 35 days post infection and became negative between 42 and 56 days post infection, one of them became positive 63 days post infection. Five samples collected from pigs immunized with the Ab2 to anti-PRRSV-M were positive from 3 to 7 days post infection; 2 samples were negative from 14 to 63 days post infection; 3 samples were positive from 14 to 35 days post infection and became negative between 42 and 56 days post infection, one of them became positive 63 days post infection. The results suggested that the immune response against PRRSV of Ab2 to anti-PRRSV-GP5 and anti-PRRSV-M is obviously, and these Ab2 could be used as substitute antigens of PRRSV-GP5 and PRRSV-M to stimulate swine to produce neutralization antibody providing protection against infection of PRRSV.

**Key words:** PRRSV; IgG; anti-idiotype antibody; immune

\* Corresponding author