

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白中和性单克隆抗体的制备与免疫学特性测定

马苏, 戴建君, 李玉峰, 段舒怡, 姜平\*

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 利用重组真核质粒 pcDNA3-GP5 免疫 BALB/c 小鼠, 取脾细胞和骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 经间接 ELISA 筛选和 3 次有限稀释法克隆, 得到 3 株能稳定分泌抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) GP5 蛋白的单克隆抗体 (McAb) 杂交瘤细胞株, 分别命名为 4C9、5D10、5F12, 其中 5D10 的 Ig 亚类为 IgM。ELISA 检测杂交瘤细胞培养上清液抗体的效价为 1:64 ~ 1:1 024, 腹水的效价为 1:3 200 ~ 1:10 240, IFA 和 IPMA 的检测结果均为阳性。Western-blot 检测证明, 这 3 株 McAb 均针对 PRRSV 的 GP5 蛋白。中和试验表明, 5D10 和 5F12 具有病毒中和活性, 中和效价分别为 1:40 和 1:80。5D10 相对亲和力大于 5F12, 3 株细胞连续培养 20 代后仍能稳定分泌抗体, 表明抗 GP5 蛋白中和性 McAb 制备成功。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV); GP5 蛋白; 单克隆抗体; 中和抗体

中图分类号: S852.4<sup>+</sup>3 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 01-0072-05

## Development and biological characterization of monoclonal antibody with neutralization activity against GP5 protein of porcine reproduction and respiratory syndrome virus

MA Su, DAI Jian-jun, LI Yu-feng, DUAN Shu-yi, JIANG Ping\*

(Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To prepare monoclonal antibodies (McAb) against GP5 protein of porcine reproduction and respiratory syndrome virus (PRRSV), the plasmid encoding GP5 gene of PRRSV-S1 strain was used. BALB/c mice were immunized by subcutaneous injection. The induced spleen cells were fused with SP2/0. The McAbs anti-GP5 were obtained by screening with indirect ELISA and subcloned 4 times, and were preliminarily characterized. Three hybridoma cell strains steadily secreting monoclonal antibodies against GP5 protein of PRRSV were obtained, which were separately named 4C9, 5D10 and 5F12. The isotype of the 5D10 was IgM. The ascites titers of PRRSV-specific ELISA antibodies obtained by mice were 1:3 200 to 1:10 240. Relative affinity of 5D10 was tighter than that of 5F12. It indicated that these McAbs were against different regions of GP5 protein of PRRSV. Moreover, the McAbs 5D10 and 5F12 had PRRSV-specific neutralization activity. The titers of the neutralizing antibodies were 1:40 and 1:80. Two monoclonal antibodies having virus neutralizing activity to GP5 protein of PRRSV were made in this study. It should be very useful to diagnose and prevent PRRSV infection.

**Key words:** porcine reproduction and respiratory syndrome virus (PRRSV); GP5 protein; monoclonal antibody (McAb); neutralization antibody

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 是重要的猪传染病之一, 主要表现为妊娠母猪发热、厌食和流产、死胎、木乃伊胎、弱仔等繁殖障碍, 仔猪发热、呼吸困难、腹泻、消瘦及高死亡率; 病猪在耳、腹侧及阴部皮肤出现蓝紫色斑块; 少数猪出现神经症状。目前 PRRS 作为世界性流行病广泛传播于许多国家。自 1996 年此病在我国华北地区爆发以来, 已蔓延到我国大部分地区, 造成严重经济损失。

PRRSV 属动脉炎病毒科, 动脉炎病毒属, 为有囊膜的单股 RNA 病毒。PRRSV 按血清型不同可分为美洲型和欧洲型。病毒含有 9 个开放式阅读框, 其中 ORF 1a、1b 编码非结构蛋白, ORF 2a~7 编码

收稿日期: 2006-04-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471288, 30270990); 新世纪优秀人才资助计划 (NCET-04-0502); 教育部高等学校博士点基金项目 (20060307007)

作者简介: 马苏, 硕士研究生。\* 通讯作者: 姜平, 教授, 主要从事畜禽传染病诊断与免疫防控研究, E-mail: jiangp@njau.edu.cn。

病毒的结构蛋白。其中, ORF5 编码糖基化膜蛋白 GP5<sup>[1-3]</sup>。GP5 蛋白为病毒的主要糖基化结构蛋白, 参与病毒入侵宿主细胞过程, 并诱导产生中和抗体。GP5 具有 6 个抗原决定簇, 其中有一个有血清特异性的线性决定簇, 能在体外中和病毒的感染, 与病毒免疫保护作用有关。

目前国外已研制出分别针对 PRRSV 各种蛋白的多个单克隆抗体 (McAb), 我国也已研制成功多个 McAb, 但尚未见中和性 McAb 的报道。本试验采用 GP5 基因免疫小鼠, 研究制备了 2 株抗 GP5 中和性 McAb, 为该病诊断和免疫防治奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

猪繁殖与呼吸综合征病毒 S1 株 (PRRSV-S1)、Marc145 细胞、SP2/0 细胞由南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室保存。BALB/c 纯系小鼠购于上海实验动物中心。

重组质粒 pcDNA3-GP5 由蒋文明等<sup>[4]</sup>构建保存。羊抗鼠 IgG-HRP 购自武汉博士德公司。化学发光显色试剂盒购自 PIERCE 公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 检测抗原的制备及纯化** 按文献 [5] 的方法, 略作修改。待 Marc145 细胞长成单层后, 接种 PRRSV, 37 °C 吸附 1 h。加入含 2% FCS (胎牛血清) 的 DMEM 营养液, 37 °C 培养 2~3 d。待细胞病变 (CPE) 达 70% 时, 收获病毒细胞。反复冻融 3 次, 2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min (4 °C)。取上清液于 90 000 g 离心 2 h (4 °C)。弃上清液, 加入原体积 1% 的 PBS, 4 °C 悬浮过夜; 取悬浮液, 经 30%~60% 蔗糖梯度, 120 000 g 离心 3 h, 收获病毒带于 -20 °C 保存备用。

**1.2.2 小鼠免疫及细胞融合** 用基础法免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠, 具体免疫程序如下: pcDNA3-GP5 重组质粒 DNA 背部皮下多点注射, 不加佐剂直接免疫, 免疫剂量为每次每只 100~200 μg。首免 3 周后同样方法进行第 2 次免疫。2 周后再进行第 3 次免疫。7 d 后采鼠尾血检测血清效价。抗体效价达一定滴度后取其脾细胞用于融合。取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞按常规 PEG 法进行融合<sup>[6]</sup>。7~14 d 后观察杂交瘤细胞生长情况, 并取上清液测定抗 PRRSV 的活性。取阳性孔细胞计数后, 按每孔 2 个细胞有限稀释法进行第 1 次克隆, 小鼠腹腔细胞作饲养细胞, 7~10 d 后观察细胞生长情况并取上清液测定抗体活性。取长成单个克隆的阳性细胞孔进行第 2 次克隆, 7~10 d 后观察并取样检测。检测所有单个杂交瘤细胞生长孔抗体活性, 如阳性率不到 100%, 需继续克隆至 100%。

**1.2.3 间接 ELISA 方法的建立** 用纯化的 PRRSV 作为抗原, 按常规方法建立间接 ELISA 法, 通过方阵滴定确定抗原包被浓度和阴性、阳性血清 (S<sup>-</sup>、S<sup>+</sup>) 最佳工作稀释度。

**1.2.4 腹水的制备** 取 10 周龄 BALB/c 小鼠经腹腔注射灭菌液体石蜡, 每只 0.5 mL。10 d 后经腹腔注射杂交瘤细胞, 每只 2×10<sup>6</sup> 个。1 周后小鼠腹部增大, 收集腹水, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 收集上清液, 分装, -20 °C 冻存。

**1.2.5 间接免疫荧光 (IFA) 试验** 将 PRRSV 病毒接种于长满单层的 Marc 145 细胞, 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养 24~48 h; 弃去上清液, 用 PBS 洗涤 1 次, 以冷的无水乙醇 4 °C 固定 45 min, PBS 洗涤 3 次后加入 100 μL 待检单克隆抗体 (无血清培养上清液), 37 °C 作用 1 h; PBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入 1:100 稀释的羊抗鼠 IgG 荧光抗体, 37 °C 作用 1 h; 洗涤 3 次, 于荧光显微镜观察。

**1.2.6 免疫过氧化物酶单层试验 (IPMA)** 按 1.2.5 方法将 PRRSV 接种于 Marc 145 细胞, 固定后加入待检 McAb, 37 °C 作用 1 h, 用 0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 和 0.5% Tween-80 洗涤 3 次; 加入 1:100 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 37 °C 作用 1 h; 洗涤 3 次, 加入 50 μL 化学发光显色底物溶液, 室温作用 20~30 min; 弃去 AEC, 加入 50 μL 的 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠 (pH 5.0), 于光学显微镜下观察。

**1.2.7 Western-blot 检测** 将提纯的 PRRSV 和重组 GST-GP5 蛋白<sup>[4]</sup>进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 再用半干法将蛋白带转印到硝酸纤维素膜上, 具体方法按文献 [7] 进行。

**1.2.8 病毒中和试验 (VN)** 采用固定病毒稀释抗体法。将待检 McAb 腹水 1:5 稀释后进行连续倍比稀释, 与等量 200TCID<sub>50</sub> PRRSV 病毒液混合; 同时, 设立 SP2/0 细胞上清液对照和阴、阳性血清对照。37 °C 作用 1 h, 接种 Marc 145 细胞, 每孔 100 μL, 每个稀释度接种 5 个孔, 37 °C 培养 5 d, 观察细胞病变, McAb 的病毒中和效价为能完全保护细胞不发生病变的最高稀释度。

**1.2.9 McAb 的亚型鉴定** 采用鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒,按说明书进行 McAb 的亚型鉴定。

**1.2.10 McAb 相对亲和力的测定** 按文献 [8] 方法进行。以纯化的 PRRSV 作为包被抗原,将 McAb 进行倍比稀释,进行 ELISA 试验,测定  $D_{450}$  值,绘制 McAb 稀释度与  $D_{450}$  曲线图。以曲线趋于平坦时的  $D_{450}$  值作为 100%,即抗原与 McAb 的结合已达到饱和状态,取曲线上 50% 饱和度所相对应的 McAb 浓度,即为该株 McAb 的相对亲和力。亲和力越大,所需 McAb 的量越低。

**1.2.11 McAb 结合位点分析** 按文献 [9] 方法进行。用 ELISA 相加试验测定  $D_{450}$  值,抗体之间产生相加效应的程度用 AV (additivity value) 表示。

$$AV = McAb_{a+b} / (McAb_a + McAb_b) \times 100\%$$

式中  $McAb_a$ 、 $McAb_b$  表示不同 McAb 分别单独与抗原作用时的  $D_{450}$  值;  $McAb_{a+b}$  表示 2 种 McAb 混合后与抗原作用时的  $D_{450}$  值。当 AV 值小于 50% 时,证明 a 和 b 两种 McAb 识别同一个抗原位点,AV 值大于 50% 时,证明 a 和 b 两种 McAb 识别不同的抗原位点。

**1.2.12 杂交瘤细胞稳定性测定** 将杂交瘤细胞连续培养传代 60 d 以上,每隔 5 代检测 1 次细胞培养上清液的 ELISA 抗体效价,以正常培养液为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞株

根据棋盘法,确定提纯后 PRRSV-S1 包被质量浓度为  $0.82 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。小鼠免疫 4 次后血清抗 PRRSV 抗体效价达 1:6 400;取其脾细胞进行常规细胞融合,细胞融合率为 90%,杂交瘤阳性率为 0.6%。经 4 次亚克隆后,得到 3 株能稳定分泌特异性 McAb 的杂交瘤细胞株,分别命名为 4C9、5D10、5F12。间接 ELISA 法检测结果表明,3 株 McAb 的无血清细胞上清液效价分别为 1:64 ~ 1:1 024。3 种细胞分别注射小鼠,制备的腹水 ELISA 抗体效价为 1:3 200 ~ 1:10 240。

### 2.2 IFA 与 IPMA 检测结果

用 3 种 McAb 腹水分别进行 IFA 和 IPMA 检测,结果表明,4C9、5D10、5F12 都是 IFA 和 IPMA 阳性(图 1),PRRSV 阳性细胞呈明显的棕黄色。

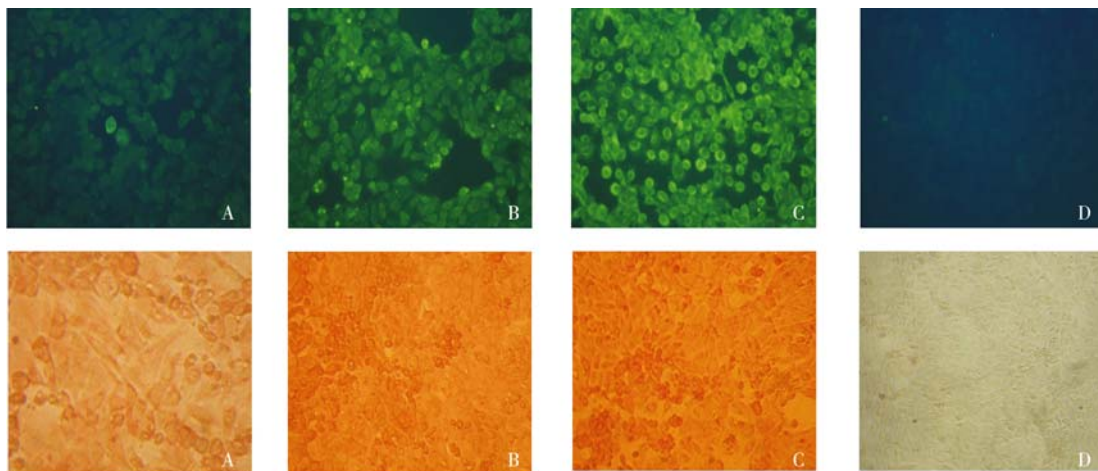


图 1 PRRSV 单克隆抗体 IFA 鉴定(上)和 IPMA 检测(下)结果

Fig. 1 Identification of McAb to PRRSV with IFA (up) and IPMA (down)

A: 4C9; B: 5D10; C: 5F12; D: 阴性对照 Negative control

### 2.3 Western-blot 检测结果

3 株 McAb 均可识别相对分子质量为  $20 \times 10^3 \sim 25 \times 10^3$  的条带,即与 GP5 蛋白发生特异性反应(图 2)。表明这 3 株 McAb 是针对 GP5 蛋白的抗体。

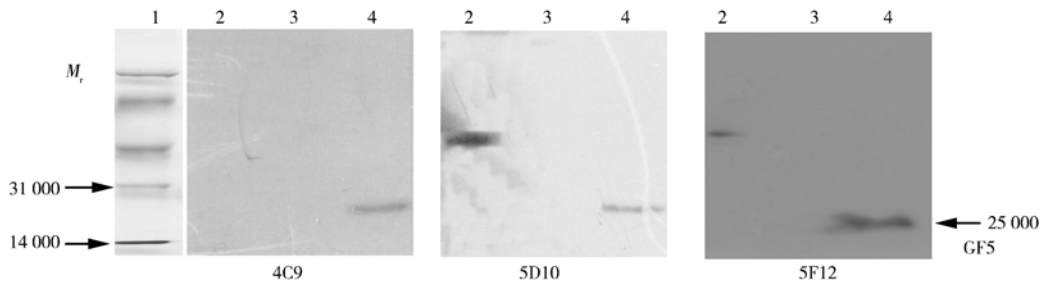


图 2 不同 McAb 与 PRRV 免疫转印电泳结果

Fig. 2 Western-blot of supernatant secreted by different McAb hybridoma cells with PRRSV, Marc 145 and recombinant GP5 protein

1: 蛋白标准品 Marker; 2: 重组 GP5 蛋白 Recombinant GP5 protein; 3: Marc 145; 4: 纯化的 PRRSV Purified PRRSV

### 2.4 病毒中和试验及 McAb 亚型鉴定

对 3 株 McAb 进行病毒中和试验结果表明，5F12 和 5D10 的腹水 McAb 的中和抗体效价分别为 1:40 和 1:80，而 4C9 没有中和活性。

McAb 亚型鉴定检测结果表明，5D10 的亚型为 IgM，轻链为  $\kappa$  型。

### 2.5 McAb 的相对亲和力测定及抗原结合位点分析

相对亲和力的测定结果表明（图 3），5D10 亲和力大于 5F12。

根据相对亲和力的测定，将这 2 株 McAb 分别稀释至相应的饱和浓度，即经 ELISA 相加试验得出加成指数为 79.63%（5D10、5F12、5D10 + 5F12 的  $D_{50}$  值分别是 0.524、0.790 和 1.046），表明这 2 株 McAb 识别的抗原结合位点不同。

### 2.6 McAb 的稳定性

将杂交瘤细胞株连续培养 60 d，分别取第 5、10、20 代的培养上清液，检测各个 McAb 效价，结果 ELISA 抗体效价和中和抗体效价基本一致。

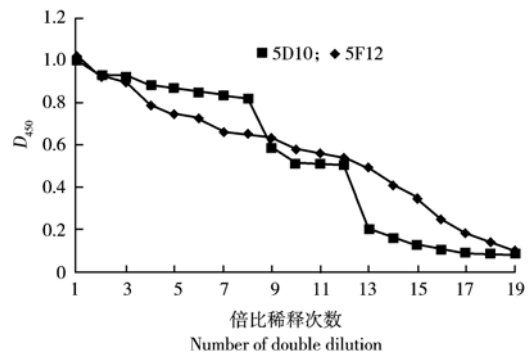


图 3 McAb 腹水相对亲和力的测定

Fig. 3 Relative affinity of the two McAbs

## 3 讨论

PRRSV McAb 的研制国内外早有报道，本实验室也曾制备了 PRRSV N 蛋白的 McAb，但实际使用效果并不理想。采用合适的抗原和抗体筛选方法，避免免疫抗原和检测抗原中杂蛋白的干扰是研制 McAb 的关键因素。由于 PRRSV 纯化工作难度较大，病毒粒子虽经纯化，但其中仍有部分杂蛋白，如采用纯化的 PRRSV 作为免疫原，再用该抗原作为 ELISA 抗原筛选 McAb，就会出现大量假阳性结果。因此，本研究在免疫时采用 DNA 免疫方法，而 McAb 筛选抗原采用纯化的 PRRSV，取得较好效果。

DNA 免疫将目的基因直接注射机体组织，目的抗原可以通过自然途径在细胞中表达，加工成抗原肽后递呈给免疫系统，此途径与病毒感染相似，能够更有效地致敏淋巴细胞，引起广泛的体液免疫和细胞免疫应答。

ORF5 编码糖基化囊膜蛋白 GP5，具有 6 个抗原决定簇，其中至少有 4 个连续表位<sup>[2]</sup>。在这 4 个连续表位中，有 3 个为中和表位，1 个为非中和表位，分别可以被中和性 McAb ISU25C1、IAF-8A8、IAF-1B8，以及非中和性 McAb ISU25A1 和 ISU25B1 所识别<sup>[10-11]</sup>。本试验 Western-blot 结果显示，McAb 4C9 不与重组 GP5 蛋白反应。这与重组 GP5 蛋白片段有关，本试验采用的 GP5 重组蛋白为 5'端缺失 36 个氨基酸的重组蛋白。中和抗体决定簇位于 GP5 蛋白的中部<sup>[12]</sup>。在中和试验中，5D10、5F12 有中和病毒作用，而 4C9 没有。因此 4C9 可能识别 GP5 蛋白 5'端 1~36 氨基酸的某个抗原位点，而 5D10 和 5F12 识别的抗原位点在 36 个氨基酸之后，可能针对 GP5 中部的中和表位，与 Plagemann 等<sup>[12]</sup>报道的一致。

在鉴定 5D10 和 5F12 为中和性 McAb 的基础上，本研究进一步对其亚型、相对亲和力，以及抗原结

合位点进行了着重分析。结果表明这 2 株 McAb 可能针对 GP5 蛋白的不同表位,并具有不同的血清学特性,从而为 PRRSV 抗原表位和诊断方法的研究提供了有用工具。

参考文献:

- [1] Drew T W, Meulenberg J J M, Sands J J. Production characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76(7): 1361 - 1369
- [2] Zhang Y, Rameshwer D S, Prem S P, Monoclonal antibody against conformational dependent epitopes on porcine reproduction and respiratory syndrome [J]. *Vet Microbiol*, 1998, 63: 125 - 136
- [3] Yang L, Frey M L, Yoon K J, et al. Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization [J]. *Arch Virol*, 2000, 145: 1599 - 1619
- [4] 蒋文明, 姜平, 李玉峰. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白 N 端信号肽对其 DNA 免疫应答的影响 [J]. *病毒学报*, 2005, 21(6): 478 - 480
- [5] Yang L, Yoon K J, Li Y, et al. Antigenic and genetic variations of the 15 kD nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates [J]. *Arch Virol*, 1999, 144: 525 - 546
- [6] 刘秀梵. 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: 21 - 23, 32 - 36
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992: 27 - 62
- [8] 白雪帆, 杨为松, 崔运昌, 等. ELISA 方法用于 McAb 亲和常数的测定 [J]. *免疫学杂志*, 1992, 8(2): 126
- [9] Friguet B, Djavadi-Ohanian L, Pages J, et al. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 60: 351 - 358
- [10] Cancel-Tirado S M, Evans R B, Yoon K J, Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection [J]. *Vet Immunol and Immunopathol*, 2004, 102: 249 - 262
- [11] Pirzadeh B, Dea S. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78: 1867 - 1873
- [12] Plagemann P G W, Rowland R R R, Faaberg K S, et al. The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain [J]. *Arch Virol*, 2002, 147: 2327 - 2347

责任编辑: 周广礼