

# 犬瘟热病毒 F 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

焦金波 黄娟 秦晓冰 陈丽 温海燕 单虎\* (青岛农业大学动物科技学院病毒实验室, 山东青岛 266109)

**摘要** [目的] 获得犬瘟热病毒 F 蛋白特异性单克隆抗体。[方法] 用纯化的大肠杆菌 BL21 表达的犬瘟热病毒重组 F 蛋白作为抗原, 免疫 BALB/c 小鼠, 采用传统的杂交瘤技术制备单克隆抗体。用 ELISA、IFA、Western-blot、细胞中和试验鉴定各株单抗的生物学特性。[结果] 获得 7 株稳定分泌犬瘟热 F 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株(2D6, 3E10, 3A2, 5B7, 5F6, 6H8, 9B6); 单抗亚类鉴定结果分别为 IgG2a, IgG1, IgG2b, IgG1, IgG1, IgG2a 和 IgG1; 细胞中和试验初步证实 2 株单抗(5B7, 9B6) 具有中和犬瘟热病毒感染 Vero 细胞的作用, 中和效价分别为 1 320 和 1 640; 经 ELISA 相加试验证实 7 株单抗的作用位点不同, 其中 2D6, 5F6 的作用位点非常相近。[结论] 该研究成功制备了 7 株抗犬瘟热 F 蛋白特异性单抗, 为进一步研究犬瘟热病毒 F 蛋白和临床诊断打下良好的基础。

**关键词** 犬瘟热病毒; F 蛋白; 单克隆抗体; 鉴定

中图分类号 S858.292 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10899-03

## Preparation and Identification of Monoclonal Antibodies against Canine Distemper F Protein

JIAO Jin bo et al (Virus Lab, College of Animal Science and Technology, Qingdao Agriculture University, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract** [Objective] The study aimed to obtain the special monoclonal antibodies against canine distemper F protein. [Method] BALB/c mice were immunized by using the immunogen of purified recombinant fusion protein of canine distemper virus (CDV) expressed in Escherichia coli BL21. The monoclonal antibodies were produced by using the traditional hybridoma technique, then the biology characteristic of each monoclonal antibody was identified by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western blot analysis and Immunofluorescence (IFA), western blot and cell neutralization test. [Result] Seven cell strains of hybridoma (2D6, 3E10, 3A2, 5B7, 5F6, 6H8 and 9B6) which secreted the anti-CDV F M Abs were obtained. The subtypes of monoclonal antibodies were identified as IgG2a, IgG1, IgG2b, IgG1, IgG1, IgG2a and IgG1. Neutralization test indicated that 5B7 and 9B6 had certain neutralizing ability to CDV infecting Vero cells, with the neutralizing titres of 1 320 and 1 640. The results of epitope analysis with addition ELISA revealed that 7 M Abs could recognize the different epitopes, in which, the epitopes of 2D6 and 5F6 were very close. [Conclusion] The CDV fusion protein M Abs were successfully prepared, which provide a good foundation for further research on the fusion protein and clinical diagnose.

**Key words** Canine distemper virus; Fusion protein; Monoclonal antibody; Identification

犬瘟热(Canine distemper, CD)是由副粘病毒科副粘病毒亚科麻疹病毒属的犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)引起的一种高度接触性的急性病毒病,常导致全身性包括呼吸系统、胃肠道、中枢神经系统(CNS)等的疾病,而且容易继发其他细菌、病毒的混合感染和二次感染,死亡率高达80%。犬瘟热感染广泛的陆生和水生肉食动物,包括食肉目所有8个科、偶蹄目猪科、灵长目的猕猴属和鳍足目海豹科等多种动物<sup>[1-2]</sup>。近几年,随着宠物犬养殖数量的增多,犬瘟热的发病率也在增加。犬瘟热病毒(CDV)外面被覆一近似双层轮廓的膜,膜上排列有由H和F2种糖蛋白组成的杆状纤突。在麻疹病毒属中F蛋白是保守性较强的免疫原性蛋白,同时是产生中和抗体的重要抗原之一。它所诱导的免疫反应能阻止病毒的感染,并且在有病毒增殖的情况下抑制症状的发生<sup>[3-4]</sup>,对于机体抵抗病毒感染具有重要意义。因此,笔者进行了犬瘟热病毒F蛋白单克隆抗体的制备及鉴定研究,旨在获得特异性单克隆抗体,为建立特异性强,敏感性高,简便快速的CDV抗原诊断方法,及治疗用抗体的开发等奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株与病毒。**菌种与病毒CDV F基因工程重组菌株由青岛农业大学动物科技学院病毒实验室构建保存;CDV疫苗株、犬细小病毒疫苗株、犬腺病毒疫苗株均由该实验室保存。

**1.1.2 细胞及试验动物。**Vero、SP2/0细胞均由青岛农业大学动物科技学院病毒实验室保存;6~8周龄BALB/c小鼠购

自山东大学实验动物中心。

**1.1.3 主要试剂。**Hs-Bind-Resins蛋白纯化柱(购自Novagen公司);弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、单克隆抗体亚型鉴定试剂盒(ISO2)、HAT、HI培养基(均购自Sigma公司);胎牛血清(购自杭州四季青);RPM-1640培养基;HRP羊抗鼠IgG(购自北京中杉金桥生物技术有限公司);聚乙二醇4000(购自MERCK公司);其他常规用试剂为国产或进口分析纯。

### 1.2 方 法

**1.2.1 抗原的制备。**包涵体的制备参照袁小远<sup>[5]</sup>方法进行。将表达CDV F蛋白的E.coli BL21基因工程重组菌用终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导表达。超声波裂解表达菌液,离心后洗涤沉淀包涵体,浓度8 mol/L尿素裂解包涵体取上清液进行透析复性。Hs-Bind-Resins亲和层析柱纯化蛋白,紫外分光光度计测定浓度并冻干保存。

**1.2.2 动物免疫。**取6~8周龄BALB/c小鼠,腹腔注射免疫抗原(重组蛋白加等体积弗氏完全佐剂乳化)进行免疫,100 μg/只;2周后改用弗氏不完全佐剂,抗原剂量为200 μg/只;三免、四免同前;摘取脾脏3 d前腹腔注射不加佐剂抗原200 μg/只加强免疫1次。

**1.2.3 杂交瘤细胞系的建立。**细胞融合、筛选与克隆参照文献方法<sup>[6]</sup>,细胞融合后,用纯化的CDV抗原包被酶标板,常规间接ELISA方法检测杂交瘤细胞生长孔上清液。用有限稀释法对分泌抗体阳性的细胞生长孔进行亚克隆,经过若干次亚克隆至所有单克隆孔上清液抗体阳性率为100%,将细胞扩大培养,腹腔注射BALB/c小鼠每只约5×10<sup>5</sup>/0.5 ml无菌收集腹水,用饱和硫酸铵盐析法纯化腹水单抗,分装后置-70℃保存备用。

**1.2.4 单克隆抗体的鉴定。**

**1.2.4.1 Ig亚类鉴定。**用Sigma公司的ISO2抗体亚类鉴定

作者简介 焦金波(1982-),男,河南洛阳人,硕士研究生,研究方向:动物传染病与生物制品。\*通讯作者,E-mail:hush@qau.edu.cn。

试剂盒鉴定单抗亚类,按说明书中间接ELISA方法操作。

#### 1.2.4.2 特异性鉴定。

(1) 交叉试验。通过间接ELISA方法,将腹水单克隆抗体与犬细小病毒(CPV)、犬腺病毒(CAV)及大肠杆菌进行交叉反应。

(2) MAbs的间接免疫荧光检测。将Vero细胞接种于96孔细胞培养板内,同时接种CDV;待细胞病变50%时,倾去培养液,用PBS洗涤3次;预冷的甲醇4℃固定20min;以所获得的7株MAbs为一抗,HTC-羊抗鼠IgG为二抗,应用间接免疫荧光法(IFA)检测其特异性,以免疫小鼠血清为阳性对照,未免疫小鼠血清为阴性对照,同时设空白对照,37℃作用1h;PBS洗涤后加入1:10 FITC-羊抗鼠IgG,37℃作用1h。移去荧光抗体,同上洗涤,荧光显微镜下观察并照相记录结果。

(3) Western blot分析。将病毒液浓缩纯化后,常规处理上样,以Vero细胞为阴性对照。经SDS-PAGE电泳分离病毒蛋白。半干转膜后加入封闭液(浓度3% BSA)4℃轻摇封闭过夜。在杂交袋中加入腹水单抗,以HRP-羊抗鼠IgG为二抗,用DAB显色试剂盒对膜进行显色,进行Western blot鉴定。

1.2.4.3 细胞微量中和试验。采用固定病毒稀释抗体的方法。将Vero细胞消化,接种于96孔细胞板中,每孔0.1 ml。将2倍系列稀释的各株单抗腹水0.1 ml分别与等体积的200 TCID<sub>50</sub> CDV悬液混合均匀,37℃作用1h,取该病毒-抗体混悬液每孔0.1 ml接种于上述96孔细胞板中。每一稀释度做4孔,同时设立CDV及正常Vero细胞对照。37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下培养,观察记录结果。

#### 1.2.4.4 单克隆抗体抗原识别位点的初步分析。

(1) MAbs饱和曲线的制定。经饱和硫酸铵法提纯后,将各株单抗从1:10开始进行倍比稀释,做3个复孔,间接ELISA方法操作,绘制MAbs饱和曲线。以单抗OD<sub>490</sub>值明显降低的临界点为单抗饱和浓度值。

(2) MAbs叠加试验。在确定各MAbs饱和浓度的基础上,以CDV最适浓度包被酶标板,将受试MAbs两两配对。先加入一种饱和浓度的MAbs(MAbs1),37℃作用1h,洗涤3次,每次3min;然后加入另一种饱和浓度的MAbs(MAbs2),同上孵育洗涤;再加入稀释的HRP标记羊抗鼠IgG,37℃作用1h,洗涤;以底物OPD显色,浓度2 ml/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,于酶标仪上分别测定OD<sub>490</sub>值,按下列公式分别计算7株单克隆抗体相互叠加后的增值指数(AI)。

$$AI = (A_{1,2} - A_1) / A_2 \times 100\%$$

式中,A<sub>1</sub>为MAbs1的OD<sub>490</sub>值;A<sub>2</sub>为MAbs2的OD<sub>490</sub>值;A<sub>1,2</sub>为MAbs1叠加MAbs2的OD<sub>490</sub>值。AI < 10%为针对同一抗原位点;AI > 10%<sup>[7]</sup>为针对不同抗原位点。AI值越大,抗原位点交叉的可能性越小。

## 2 结果与分析

2.1 MAbs细胞株的获得结果 用纯化的CDV包被酶标板,以SP2/0细胞培养上清液作为阴性对照进行亚克隆,经过多次融合及亚克隆化最终获得7株稳定分泌的MAbs:2D6、3E10、3A2、5B7、5F6、6H8和9B6;腹水效价为1:4 000 ~

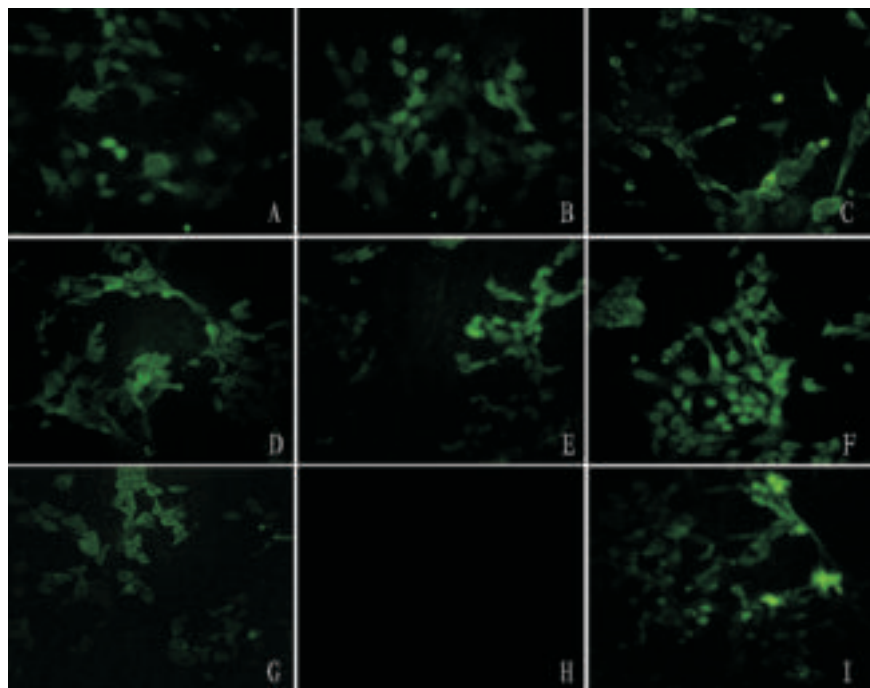
1:16 000。

2.2 Ig亚类鉴定结果 用Sigma公司的ISO2单抗亚类鉴定试剂盒鉴定各株单克隆抗体的亚类结果如下,2D6:IgG2a;3E10:IgG1;3A2:IgG2b;5B7:IgG1;5F6:IgG1;6H8:IgG2a;9B6:IgG1。

#### 2.3 特异性鉴定结果

2.3.1 交叉反应结果。通过间接ELISA方法检测,结果各株单克隆抗体腹水与CPV、大肠杆菌(BL21)、CAV反应均为阴性;与纯化的CDV反应为阳性。说明各株单抗特异性良好。

2.3.2 间接免疫荧光检测结果。由图1可知,7株单抗均能与CDV感染的Vero细胞反应出现明显的绿色荧光,阴性对照无绿色荧光。



注:A为2D6;B为3E10;C为3A2;D为5B7;E为5F6;F为6H8;G为9B6;H为阴性对照;I为阳性对照(×400)。

Note:A, 2D6; B, 3E10; C, 3A2; D, 5B7; E, 5F6; F, 6H8; G, 9B6; H, Negative control; I, Positive control(×400) .

图1 MAbs的间接免疫荧光检测结果

#### Fig.1 The detection results of MAbs by indirect immunofluorescence assay

2.3.3 Western blot分析结果。将CDV进行SDS-PAGE,转膜后进行Western blot单抗,2D6、5B7、5F6和6H8均可特异地识别CDV约62 kD左右亚单位多肽,即F(F0)蛋白所在蛋白条带。而单抗3E10、3A2和9B6在Western blot中反应为阴性(图2)。

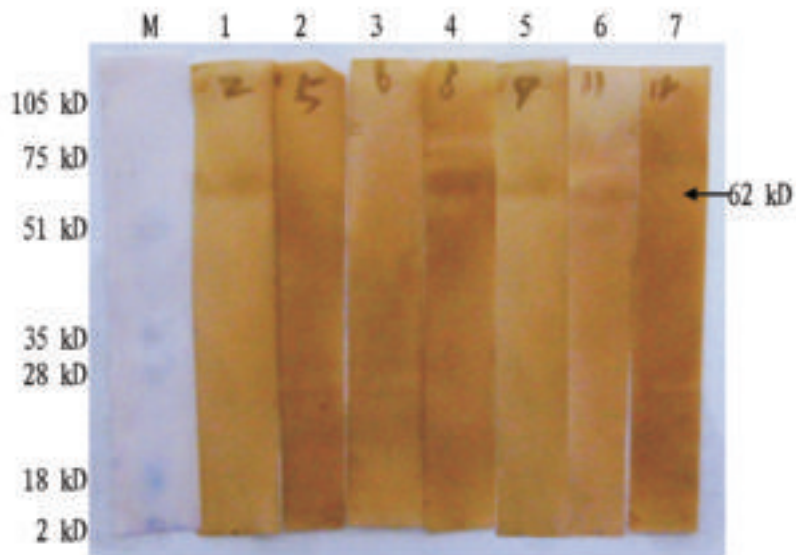
2.4 细胞微量中和试验结果 试验结果表明,5B7和9B6具有中和CDV感染Vero细胞的作用,中和效价分别为1:320和1:640,其他各株中和效价小于1:20。

#### 2.5 单克隆抗体抗原识别位点的初步分析结果

2.5.1 MAbs饱和曲线的制定结果。当MAbs的浓度在一定水平时,其反应曲线较为平缓,当稀释度逐渐加大时其OD<sub>490</sub>值开始下降,在曲线开始下降前的MAbs的稀释度就是该株抗体的饱和浓度值。2D6、3E10、3A2、5B7、5F6、6H8和9B6单克隆抗体的饱和浓度分别为:1:160、1:80、1:160、1:40、1:160、1:160和1:160。

2.5.2 MAbs叠加试验结果。ELISA检测7株单克隆抗体相互叠加后的AI值见表1。可见,各株单抗两两配对相互叠加后的AI都大于10%,其中2D6叠加5F6的AI为8.49%,5F6叠加2D6后的AI为12.70%,接近10%,表明2株杂交瘤细

胞分泌的单抗识别的表位交叉程度很大。



注:M为预染蛋白质 Marker; 1为2D6; 2为3E10; 3为3A2; 4为5B7; 5为5F6; 6为6H8; 7为9B6。

Note: M, Prestained protein Marker; 1, 2D6; 2, 3E10; 3, 3A2; 4, 5B7; 5, 5F6; 6, 6H8; 7, 9B6.

图2 各株单克隆抗体与CDV反应性的Western blot分析结果  
Fig 2 The analysis results of the reactivity of each strain of monoclonal antibody with CDV by Western blot

表1 单克隆抗体A值

Table 1 A value of monoclonal antibody

单克隆抗体 Monoclonal antibody	2D6	3E10	3A2	5B7	5F6	6H8	9B6
2D6	-	20.51	23.93	59.16	12.70	22.96	37.51
3E10	5.53	-	18.14	55.12	5.33	17.83	40.88
3A2	3.38	17.93	-	56.01	5.38	15.51	30.80
5B7	6.82	8.94	12.94	-	12.47	24.94	15.53
5F6	8.49	17.91	22.58	60.44	-	17.40	36.84
6H8	3.71	14.02	15.77	54.54	1.65	-	31.96
9B6	1.22	14.63	12.50	49.54	7.32	18.75	-

### 3 讨论

(1) 犬瘟热融合蛋白是病毒表面糖蛋白之一,介导病毒囊膜与感染细胞膜的融合,是感染性病毒粒子进入细胞所必须的,使病毒在宿主体内有扩散的能力。H基因变异比较大。F和H蛋白都是中和抗原,可诱导中和抗体的产生,F蛋白所产生的保护率高于H。国内外均有建株的报道,周洁等报道成功制备CDV N蛋白特异性单克隆抗体,它们在犬瘟热诊断及治疗中发挥了重要作用<sup>[8]</sup>。

(2) 该试验采用基因工程重组F蛋白作为抗原,制备犬瘟热病毒F蛋白特异性的单克隆抗体,可以减少用病毒颗粒免疫给筛选带来的困难。经过多次融合及亚克隆得到7株稳定分泌的单克隆抗体,IFA显示各株单抗均能与感染细胞的CDV结合,产生强染的绿色荧光。F蛋白开始以无活性的

F0前体蛋白形式出现,在细胞蛋白水解酶的作用下裂解为F1和F2蛋白,它们彼此间以二硫键结合<sup>[9]</sup>,F蛋白在变性剂处理后,分解为F1(40 kD)和F2(22 kD)。在Western blot分析中,可能由于病毒浓度限制,只能观察到4株单抗与全病毒62 kD左右蛋白(F0)的反应条带,而未能见到其与F1或F2的反应。另外3株未见到反应条带,结合ELISA与IFA分析,可能是抗原的构象依赖性表位被变性剂破坏,不能被这些单抗识别。经ELISA相加试验初步证实各株单抗识别的抗原决定簇不同,但不同株之间存在抗原位点的交叉或识别的表位相邻存在空间位阻,详细的表位信息有待于结合噬菌体展示技术<sup>[10]</sup>及肽扫描方法进一步研究。

(3) 目前,包涵体检查、病毒分离、电镜技术、琼脂扩散试验、中和试验、免疫荧光抗体技术、免疫组化、酶联免疫吸附试验,分子生物学技术中的核酸探针、原位杂交、RT-PCR等方法已经在犬瘟热的诊断中发挥了作用。但是这些方法各有弊端,包涵体检测特异性较差,常规的病毒分离鉴定及中和试验过程繁琐,耗时较长,电镜技术难以在基层推广应用,琼脂扩散试验敏感性差,分子生物学技术敏感、特异,但技术和设备要求高。ELISA具有特异、敏感、快速、简便、可靠等特点,且能自动化操作,并能迅速地检测大量样品,它不仅可检测抗体还可检测抗原,已经应用到越来越多的疾病诊断中。该研究获得了7株CDV F特异性单克隆抗体,其中2株具有中和作用,为下一步研究血清学快速诊断方法与治疗性抗体的开发应用奠定了基础。

### 参考文献

- [1] CARPENTER MA, APPEL MJ, ROELKE PARKER ME, et al. Genetic characterization of canine distemper virus in Srengeti carnivores[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 65: 259 - 266.
- [2] ORVELL C, SHESHBERADARAN H. Phocine distemper virus is phylogenetically related to canine distemper virus[J]. *Vet Rec*, 1991, 129(12): 267 - 269.
- [3] CHERHILLOD P, BECK K, ZURBRIGGEN A, et al. Sequence analysis and expression of the attachment and fusion proteins of canine distemper virus wild type strain A75/17[J]. *J Virol*, 1999, 73(3): 2263 - 2269.
- [4] NORRBY E, UTIER G, ORVELL C. Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated fusion protein[J]. *J Virol*, 1986, 58(2): 536 - 541.
- [5] 袁小远. 水貂犬瘟热病毒的分离鉴定及其F基因的原核表达[D]. 青岛: 青岛农业大学, 2005.
- [6] HEDDY ZOLA. 单克隆抗体技术手册[M]. 周宗安, 等, 译. 南京: 南京大学出版社, 1991.
- [7] FRIGUET B. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site[J]. *J Immunol Meth*, 1983, 60(3): 351.
- [8] 周洁. 抗犬瘟热病毒重组核衣壳蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(7): 528 - 531.
- [9] VON MESSLING V, MLOSEMC D, DEVAUX P, et al. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoproteins: Partial membrane-proximal ectodomain cleavage[J]. *J Virol*, 2004, 78(15): 7894 - 7903.
- [10] SMITH G P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(2): 1315 - 1317.