

牛传染性鼻气管炎病毒 gC 蛋白单克隆抗体的制备与初步应用

马 辉¹, 边传周^{1*}, 王永芬¹, 王鲜萍², 郑宝亮¹, 赵绪永¹

(1. 郑州牧业工程高等专科学校 生物工程系, 郑州 450011; 2. 河南大学 生命科学学院, 开封 475001)

摘 要: 为制备牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)gC 蛋白的特异性单克隆抗体, 并分析其免疫学特性, 以原核表达并纯化的重组 gC 蛋白为免疫原注射免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与骨髓瘤细胞融合。建立间接 ELISA 方法筛选分泌 gC 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞, 获得 1 株能稳定分泌 gC 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 3D6。3D6 的亚类为 IgG1 型, 轻链为 κ 链; 上清、腹水抗体效价分别为 6.4×10^3 、 1.28×10^5 ; Western blot 和间接免疫荧光试验表明该单克隆抗体能识别牛 gC 蛋白。利用 3D6 细胞株分泌的单克隆抗体建立了检测 IBRV 的双抗体夹心 ELISA 方法, 结果证明, 该方法特异性和敏感性良好, 为快速诊断 IBRV 和研究 gC 蛋白功能奠定了基础。

关键词: 牛传染性鼻气管炎病毒; gC 蛋白; 单克隆抗体; ELISA

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)10-1637-08

Development and Preliminary Application of Monoclonal Antibody against IBRV gC and Identification of Its Biological Characteristic

MA Hui¹, BIAN Chuan-zhou^{1*}, WANG Yong-fen¹, WANG Xian-ping²,
ZHENG Bao-liang¹, ZHAO Xu-yong¹

(1. Department of Bioengineering of Zhengzhou College of Animal Husbandry and Engineering, Zhengzhou 450011, China; 2. College of life Science, Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: The objective of this study was to prepare monoclonal antibody against glycoprotein C (gC) protein of infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) and to analyze its biological characteristic. BALB/c mice were immunized with purified recombinant gC protein expressed by *E. coli* and the spleen cells of immunized mouse were fused with SP2/0 myeloma cells. An indirect ELISA using the purified gC protein was developed to screen positive antibody-producing cells. A hybridoma stably secreting MAb designated as 3D6 was obtained against gC protein. The monoclonal antibody belongs to IgG1, and the light chain was κ . The titers of supernatant and ascites were 6.4×10^3 and 1.28×10^5 as detected by ELISA, respectively. The result of western blot assay and IFA suggested that the MAb could recognize IBRV. A sandwich ELISA was established by using 3D6 secreted monoclonal antibody. The results indicated that the ELISA possessed good specificity and higher sensitivity. The monoclonal antibody could be used to diagnose IBRV and further research gC protein function.

Key words: IBRV; gC protein; monoclonal antibody; ELISA

牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis, IBR)是由牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)引起的急性、以呼吸道炎症为主的病毒性传染病。IBR 具有高发病率和死亡率,可影响乳牛的产奶量、公牛的繁殖力及役用牛的使役力,对养牛业危害很大^[1]。IBRV 可侵袭多种器官和组织,在临床上表现呼吸困难、鼻炎、高热等症状,可引起严重的呼吸道疾病和生殖道疾病,导致动物产奶量降低、全身性感染及流产等。病牛及其分泌物、病变组织是 IBR 的主要传染源,可通过接触、飞沫和交配传播^[2-3]。中国自 20 世纪 70 年代首先在进口种牛中发现该病,近年来调查显示部分省市各牛场牛中血清阳性率平均可达 56%,给畜牧业带来了很大的损失^[4-5]。

牛传染性鼻气管炎病毒属于疱疹病毒科,疱疹病毒亚科,水痘病毒属,为线性双股 DNA 病毒,基因组大小约为 138 kb,可编码 70 多种结构蛋白,如 gB、gC、gD 和 gE 蛋白等。gC 蛋白是病毒粒子表面和病毒感染细胞的主要分子,介导重要的生物学功能^[6-7]。目前国内外对牛传染性鼻气管炎的诊断方法主要有病毒分离、血清学试验、RT-PCR 等,存在着试验周期长、仪器设备要求高、假阳性高等缺点,难以胜任对 IBRV 快速诊断的要求。目前,国内对 IBRV gC 蛋白研究较少,其单克隆抗体也没有相关报道。本研究利用原核系统表达的 IBRV gC 蛋白制备获得了单克隆抗体,进行了生物学特性鉴定,初步建立了检测 IBRV 的双抗体夹心 ELISA 方法,为牛传染性鼻气管炎的快速检测提供了技术保证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物、细胞株及毒株 牛传染性鼻气管炎病毒 IBRV(bartha Nu/67)、牛呼吸道合胞病毒(BRSV)和牛肾细胞系细胞(MDBK)购于中国兽药药品监察所;牛副流感病毒 3 型(BPIV3)、牛腺病毒 7 型(ADV7)、SP2/0 多发性骨髓瘤细胞由郑州牧业工程高等专科学校生物技术实验室保存;BALB/c 小鼠和日本长耳大白兔均购自河南农业大学实验动物中心。

1.1.2 质粒载体与菌株 含有 IBRV gC 全长基因的重组质粒 pMD18-gC 由本实验室构建;pGEX-6P-1 载体、大肠杆菌 BL21 由郑州牧业工程高等专科学校生物技术实验室保存。

1.1.3 主要试剂与药品 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、RNA 酶抑制剂、DL2000 DNA Marker、蛋白质分子量标准、限制内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 和 DNA Ligation Kit 等购自 TaKaRa 公司;高保真酶 KOD-Plus 购自 TOYOBO 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;Glutathione Sepharose 4B 亲和层析树脂购自 Pharmacia Biotech 公司;M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司;HRP-羊抗鼠 IgG、HRP-羊抗兔 IgG、FITC-羊抗鼠 IgG、弗氏佐剂、PEG 4000、DMSO 和 BSA 购自 Sigma 公司;SBA Clonotyping System/HRP 抗体亚类鉴定试剂盒均购自 Southern Biotechnology 公司;引物合成和序列测定由上海生工公司完成;兔抗 IBRV 血清由本实验室制备;其他常规用试剂为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建及鉴定 参照 IBRV gC 基因序列设计引物序列,上游引物 P1:5'-TAAGAATTCAATCCCGGACCACGAAAGCAC-3'(限制性内切酶 *EcoR* I 酶切位点);下游引物 P2:5'-TTGGTTCGACGTCCTCGCTCCTTCGG-CGGG-3'(限制性内切酶 *Sal* I 酶切位点)。以 pMD18-gC 重组质粒为模板,高保真酶 KOD-Plus 扩增 gC 基因片段,琼脂糖凝胶电泳后扫描结果。PCR 产物胶回收后经 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切,克隆于 pGEX-6P-1 载体中,转化入大肠杆菌 BL-21 感受态细胞,涂布平板培养,对长出的菌落进行 PCR 鉴定和酶切鉴定,阳性重组质粒送上海生工公司测序。

1.2.2 重组蛋白的表达及鉴定 将含重组质粒的大肠杆菌接种至含抗生素的 LB 液体培养基中,过夜振荡培养,次日扩大培养,OD_{600 nm} 达到 0.6 时加 IPTG 诱导,菌体破碎后 SDS-PAGE 检测表达情况。使用 Glutathione Sepharose 4B 树脂纯化重组蛋白,SDS-PAGE 检测洗脱上清^[8],BCA 法测定纯化蛋白含量^[9]。

1.2.3 间接 ELISA 检测方法的建立 以纯化的 gC 蛋白作为包被抗原,采用方阵法确定抗原最佳包被浓度和阳性血清的最佳稀释度,建立了间接 ELISA 方法。通过酶标仪读取 OD 值判定结果,以 OD_{待检血清} > 0.4 且 P/N ≥ 2.1 为阳性判定标准^[10-12]。另外检测 30 份阴性血清 450 nm 波长处的 OD 值,并将平均 OD 值与 3 倍的标准差(s)之和作为阴阳

性的临界值,即 $\bar{x} + 3s$ 为确定的阴阳性界限。

1.2.4 小鼠免疫及杂交瘤细胞系的建立 将纯化的 gC 蛋白加等体积弗氏完全佐剂初次免疫 6~8 周龄 BALB/c 小鼠,每隔 2 周再分别注射 2 次,加强免疫。细胞融合前 3 d,再加强免疫一次,按 $100 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$ 腹腔注射抗原。按常规方法进行细胞融合,使用建立的 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞,有限稀释法进行克隆化培养,选择能够稳定分泌、效价高的单个克隆培养。

1.2.5 MAb 腹水制备及效价测定 选取 8~10 周龄的 BALB/c 雌鼠,腹腔注射 0.5 mL 弗氏不完全佐剂,7 d 后将筛选的阳性细胞株对敏化的小鼠进行腹腔注射,约 7 d 后收集腹水,采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化腹水中的 MAb。

1.2.6 MAb 生物学特性的鉴定 (1)采用 SBA Clonotyping System / HRP 抗体亚类试剂盒对制备的 MAb 进行亚类鉴定。(2)将杂交瘤细胞连续传代培养,每传 5 代即收集 1 次细胞培养上清,以已建立的 ELISA 方法检测 F5、F10、F15、F20、F25 代杂交瘤细胞培养上清的抗体效价,对比效价变化情况该细胞株的稳定性。(3)选择生长良好的杂交瘤细胞用秋水仙素处理,按常规方法固定、染色,在光学显微镜下选择 6 个染色体分散良好的细胞观察并计数。

1.2.7 Western blot 鉴定 将纯化后重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,转移到硝酸纤维素膜上,以杂交瘤细胞上清为一抗,用 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体作为二抗,二抗以 1:2 000 稀释,进行免疫印迹检测^[13]。

1.2.8 单克隆抗体特异性的检测 将牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV)、牛呼吸道合胞病毒 (BRSV)、牛肾细胞系细胞 (MDBK)、牛副流感病毒 3 型 (BPIV3) 和牛腺病毒 7 型 (ADV7) 作为包被抗原进行间接 ELISA,检测该单克隆抗体的特异性。

1.2.9 间接免疫荧光 (IFA) 检测 分别用 IBRV、BRSV、BPIV3 和 ADV7 接种 MDBK 细胞,培养 48 h 后固定细胞,加入 MAb 为一抗,以 FITC 标记羊抗鼠 IgG 为二抗进行 IFA 检测,二抗以 1:500 稀释,以正常 MDBK 细胞作为阴性对照。

1.2.10 双抗体夹心 ELISA 方法的建立 最佳反应条件的选择:对单克隆抗体 3D6 包被浓度 (8、4、2、1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),夹心抗体 (兔抗 IBRV IgG) 工作浓度 (12、6、3、1.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行 ELISA 方阵试

验,检测同一阳性样品和阴性样品,测定 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值,并计算 P/N 值,确定单抗 3D6 最佳包被浓度、夹心抗体最佳浓度、酶标抗体工作浓度。用建立的 ELISA 方法测定 20 份阴性样品,计算 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 平均值 (\bar{x}) 和标准差 (s),将 $\bar{x} + 3s$ 设定为阳性临界值。

双抗体夹心 ELISA 操作程序:用包被液适当稀释单克隆抗体 3D6,每孔 100 μL ,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,用洗涤液洗涤 3 次后加入封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。加入待测样品,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤 3 次。加入兔抗 IBRV IgG,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤 3 次,加入 HRP 标记羊抗兔 IgG,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗涤 3 次。每孔加入 100 μL TMB 底物液室温避光反应 10 min,每孔加 50 μL 终止液,室温 5 min 后读取 450 nm 处的吸光值。

1.2.11 夹心 ELISA 法的特异性试验 用建立的双抗体夹心 ELISA 法分别检测 IBRV、BRSV、MDBK、BPIV3、ADV7 及阴性样品,判断该 ELISA 方法的特异性。

1.2.12 夹心 ELISA 法的敏感性试验 将 IBRV 病毒从 100 倍起连续二倍稀释,其余条件按最适反应条件进行,检测该 ELISA 方法的敏感性。

1.2.13 与琼脂扩散试验比较 用建立的双抗体夹心 ELISA 检测临床样品 40 份,并与琼脂扩散试验结果进行比较分析。

2 结 果

2.1 pGEX-6P-gC 原核表达载体的构建

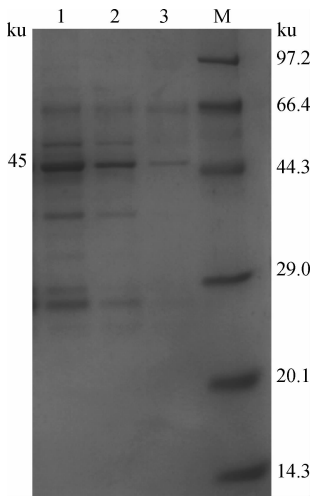
通过 PCR 扩增,得到 552 bp 左右的目的片段。将此片段克隆于 pGEX-6P-1 载体中,重组质粒经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切,出现了预期大小的条带。DNA 测序结果表明成功构建 pGEX-6P-gC 表达载体。

2.2 重组蛋白的表达、纯化与检测

将重组菌培养后,进行 SDS-PAGE 分析,结果显示在 45 ku 处有高表达的蛋白条带,菌体破碎后的上清和沉淀中都存在融合蛋白。利用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析树脂进行亲和纯化,得到了纯度较高的 gC 蛋白,表达量达到 $240 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1)。

2.3 间接 ELISA 方法建立

采用方阵法确定抗原的最佳包被浓度和阳性血清的最佳稀释度,阳性判断标准为 $\text{OD}_{\text{待检血清}} > 0.4$ 且



1、2. 诱导表达后的上清和沉淀；3. 纯化后的 gC；M. 蛋白质相对分子质量标准

1, 2. The supernatant and pellets of induced pGEX-6P-gC;
3. Purified gC protein; M. Molecular weight marker

图 1 pGEX-6P-gC 在 BL21 中表达与纯化

Fig. 1 Expression and purification of pGEX-6P-gC in BL21 (DE3)

$OD_{\text{待检血清}} / OD_{\text{标准阴性值}} \geq 2.1$, 当血清的稀释度为 1 : 80, 抗原的稀释浓度为 1 : 160, 阴性与阳性血清的 $OD_{450\text{nm}}$ 值相差最大 ($P/N=8.959$)。因此, 最终确定抗原最佳包被浓度为 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 血清最佳稀释度为 1 : 80, 建立了筛选 gC 蛋白 MAb 的间接 ELISA 方法(表 1)。

2.4 杂交瘤细胞株的筛选

将纯化的 gC 蛋白免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合, 间接 ELISA 筛选后, 获得 1 株能高效分泌抗 gC 蛋白抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 3D6。间接 ELISA 检测无血清培养上清效价为 $1 : 6.4 \times 10^3$, 腹水效价为 $1 : 1.28 \times 10^5$ 。

2.5 MAb 的亚类鉴定和稳定性检测

鉴定结果表明 3D6 属 IgG1 亚类, 轻链为 κ 链。将 3D6 连续培养 25 代, 检测第 F5、F10、F15、F20、F25 代细胞培养上清的抗体效价, 结果表明此细胞株在连续传代中效价差异不明显, 稳定性较好(表 2)。

表 1 最佳抗原包被浓度及血清稀释度的确定

Table 1 Optimization of coating antigen and dilution of serum with indirect ELISA

血清稀释度 Serum dilution	抗原稀释度 Dilution of antigen						
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640
P(1 : 20)	2.407	2.101	1.898	1.645	1.423	1.208	0.991
N(1 : 20)	0.297	0.238	0.221	0.245	0.183	0.148	0.111
P/N	8.104	8.828	8.588	6.714	7.776	8.162	8.928
P(1 : 40)	2.081	1.988	1.756	1.443	1.213	0.823	0.753
N(1 : 40)	0.268	0.276	0.206	0.233	0.143	0.123	0.123
P/N	7.765	7.203	8.524	6.193	8.483	6.691	6.122
P(1 : 80)	1.654	1.396	1.091	0.887	0.878	0.736	0.616
N(1 : 80)	0.276	0.268	0.191	0.177	0.098	0.096	0.087
P/N	5.993	5.209	5.712	5.011	8.959	7.666	7.080
P(1 : 160)	1.213	0.993	0.872	0.612	0.610	0.534	0.434
N(1 : 160)	0.223	0.223	0.122	0.112	0.082	0.124	0.094
P/N	5.439	4.453	7.148	5.464	7.439	4.306	4.617
P(1 : 320)	0.702	0.631	0.584	0.533	0.567	0.487	0.376
N(1 : 320)	0.202	0.251	0.264	0.183	0.087	0.117	0.076
P/N	3.475	2.514	2.212	2.913	6.517	4.162	4.947
P(1 : 640)	0.556	0.553	0.550	0.449	0.421	0.397	0.221
N(1 : 640)	0.156	0.123	0.110	0.109	0.111	0.106	0.051
P/N	3.564	4.496	5.000	4.119	3.793	3.745	4.333

表 2 3D6 细胞株稳定性检测结果

Table 2 The stability test of 3D6 line

	F5	F10	F15	F20	F25
抗体效价 Titer	1 : 6.4 × 10 ³	1 : 6.4 × 10 ³	1 : 6.4 × 10 ³	1 : 3.2 × 10 ³	1 : 3.2 × 10 ³

2.6 杂交瘤细胞染色体数目

BALB/c 小鼠脾细胞染色体的数目为 40 条, SP2/0 多发性骨髓瘤细胞的染色体众数目为 62~68 条。统计结果表明,该细胞株染色体数目为 98~105 条,大约为小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞染色体数目之和,与预期结果一致(图 2)。

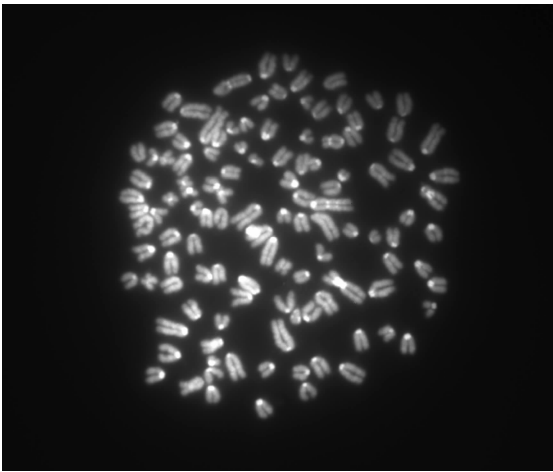


图 2 杂交瘤细胞的染色体分析

Fig. 2 Analysis of the chromosomes of hybridoma cell

2.7 MAb 的 Western blot 分析

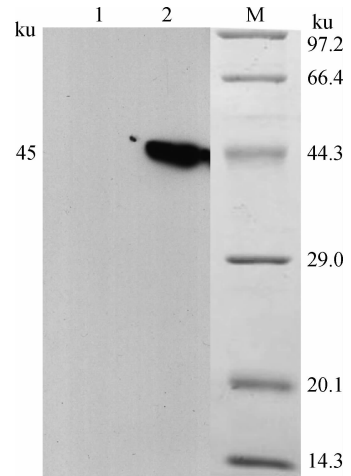
以纯化后的 IBRV 和原核表达的 gC 蛋白进行 SDS-PAGE 后,转印至硝酸纤维素膜上,Western blot 分析结果表明,3D6 能识别并与重组 gC 蛋白发生特异性反应(图 3)。

2.8 MAb 的特异性检测

将 3D6 分别与 IBRV、BRSV、MDBK、BPIV3、ADV7 包被的 ELISA 板反应,结果 3D6 与 IBRV 包被的 ELISA 板可发生阳性反应,与 BRSV、MDBK、BPIV3 和 ADV7 不发生反应,表明 3D6 可与 IBRV 特异性结合。

2.9 间接免疫荧光 (IFA) 检测

以 3D6 MAb 进行的 IFA 检测表明:接种 IBRV 的细胞中出现绿色荧光,未接种 IBRV 的 MDBK 细胞则未见有荧光,表明 3D6 可与 IBRV 发生特异性结合(图 4)。

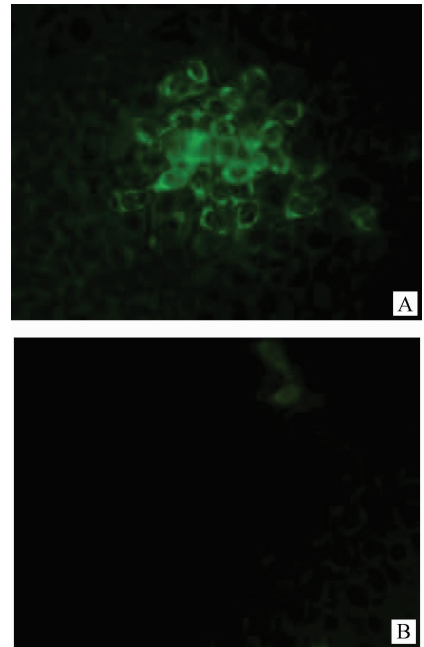


1. 纯化的空载体转染对照蛋白; 2. 纯化后的 gC 蛋白;
3. 蛋白质相对分子质量标准

1. Purified protein encoded by pGEX-6P-1; 2. Purified protein encoded by pGEX-6P-gC; M. Molecular weight marker

图 3 Western blot 结果

Fig. 3 Result of Western blot



A. 接种 IBRV 的 MDBK 细胞; B. MDBK 细胞对照

A. IFA result of the 3D6 MAb on IBRV infected MDBK; B. IFA result of the 3D6 MAb on normal MDBK

图 4 3D6 的 IFA 检测结果

Fig. 4 Identification of 3D6 MAb in IBRV infected MDBK cells

2.10 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

通过 ELISA 方阵试验初步确定了最佳反应条件,当单克隆抗体 3D6 包被浓度为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,兔抗 IBRV IgG 包被浓度为 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, P/N 值为最大(见表 3,表中结果为 P/N 值)。用双抗体夹心 ELISA 法检测 20 份阴性样品的 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值,计算 $\bar{x} + 3s$,该 ELISA 方法阳性临界值为 0.280。

表 3 抗体最佳稀释浓度确定

Table 3 The titration of antibody

3D6 浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) The concentration of 3D6	兔抗 IBRV IgG/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration of rabbit anti-IBRV IgG			
	12	6	3	1.5
8	4.36	4.80	4.97	4.96
4	4.69	5.22	5.08	4.73
2	4.23	4.71	4.64	4.39
1	4.07	3.85	4.09	4.25

2.11 夹心 ELISA 法的特异性试验

特异性试验结果表明,该 ELISA 方法与 BRSV、MDBK、BPIV3 和 ADV7 无交叉反应,表明该方法特异性良好(表 4)。

表 4 双抗体夹心法 ELISA 方法特异性试验

Table 4 The specificity test of double antibody sandwich ELISA

待测样品 Samples	$\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ value	P/N	结果判定 Results
牛传染性鼻气管炎病毒 IBRV	1.092	8.149	+
牛呼吸道合胞病毒 BRSV	0.113	1.345	-
牛肾细胞系细胞 MDBK	0.096	1.055	-
牛副流感病毒 3 型 BPIV3	0.207	1.643	-
牛腺病毒 7 型 ADV7	0.122	1.140	-

2.12 夹心 ELISA 法的敏感性试验

本研究建立的夹心 ELISA 法的敏感性结果表明,IBRV 病毒稀释 1 600 倍时,病毒含量为 1.56

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值为 0.340,大于阳性临界值,而 1:3 200 稀释的阳性血清检测结果低于阳性临界值,表明该方法具有较好的敏感性,其最低检测浓度为 $1.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 5)。

表 5 双抗体夹心法 ELISA 方法敏感性试验

Table 5 The sensitivity test of double antibody sandwich ELISA

血清稀释度 Serum dilution	$\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ value	
	阳性血清 Positive serum	阴性血清 Negative serum
1:100	1.178	0.202
1:200	1.103	0.187
1:400	1.085	0.158
1:800	0.839	0.136
1:1 600	0.340	0.115
1:3 200	0.190	0.092

2.13 与琼脂扩散试验比较

用建立的双抗体夹心 ELISA 检测临床样品 40 份,共检出阳性样品 12 份,阳性率为 30%;而琼脂扩散试验检测出阳性样品 11 份,阳性率为 27.5%,两者符合率为 91.5%,证明建立的双抗体夹心 ELISA 方法特异性良好,可用于临床检测。

3 讨论

本研究开始用 IBRV gC 全基因与 pGEX-6P-1 载体构建重组表达质粒,结果表达效果不理想,表达量较少;经过生物信息学工具对 gC 全基因序列及编码的氨基酸序列进行分析,预测目的蛋白跨膜区、信号肽序列及抗原表位,找到 gC 蛋白上抗原决定簇较集中、抗原性较强、不含跨膜区和疏水序列的一段区域,扩增表达此氨基酸序列的基因片段,构建了重组表达质粒。通过 SDS-PAGE 电泳检测表明,表达蛋白质相对分子质量与理论值相符,蛋白的表达量和蛋白的溶解性得到了明显提高^[14]。作者以纯化的重组 IBRV gC 蛋白为抗原,多次腹腔注射免疫获得了能够分泌抗 IBRV gC mAb 的小鼠脾细胞。Western blot 和 IFA 结果表明产生的 mAb 只与重组蛋白发生特异性反应,表明此 mAb 能准确识别 gC 蛋白抗原。

牛传染性鼻气管炎具有鼻黏膜充血、呼吸困难、

鼻腔流脓等症状,结合流行病学,可作出初步诊断,但 IBRV 感染后一般发生病毒潜伏,且目前检测 IBRV 及抗体的常规方法一般为病毒的分离和常量血清中和试验等,步骤繁琐,耗时较长。MAb 具有特异性强、敏感性高等优点,因此,制备敏感、特异的抗 IBRV MAb 为建立检测液体中 IBRV 抗原或抗体的血清学方法和实现标准化诊断奠定了基础。本研究应用抗 IBRV 保守的 gC 蛋白的单克隆抗体建立了双抗体夹心 ELISA 方法,特异性良好,有助于 IBR 的快速检测。

IBRV gC 蛋白主要存在于病毒粒子表面和病毒感染的宿主细胞表面,可作为吸附蛋白与细胞表面上糖蛋白受体相互作用,介导起始病毒的吸附,参与病毒多种生物学功能^[15-16];gC 蛋白能诱导细胞介导的免疫应答,是抗原诱导免疫应答的主要靶位,因此 gC 蛋白可作为鉴别诊断的可靠标记。

疫苗免疫接种是目前预防和控制各种传染病的主要措施,但传统疫苗中灭活苗存在着免疫效果差、接种量大、无法区分免疫接种牛和野毒感染牛等缺点,而弱毒苗易出现潜伏感染、毒力回复等情况,因此使用常规疫苗不易预防和根治该病,因此,新型疫苗的研制就非常迫切,随着基因工程的发展和对疱疹病毒研究的深入,目前已有 DNA 疫苗^[17-18]和基因工程缺失苗^[19]陆续问世,如编码 gC 蛋白的 DNA 疫苗可诱导中和抗体的产生和 B 细胞的应答^[17],另外通过缺失 TK 基因研制的牛传染性鼻气管炎病毒减毒疫苗已投放市场,该疫苗不会发生毒力返祖,确实性和可靠性较高,取得了良好的效果,为根除该病提供了新的契机。gC 基因是 1 个非必需基因,在构建基因缺失疫苗时,可以将缺失 gC 基因作为遗传标志,构建 TK⁻/gC 基因工程缺失苗,甚至三基因缺失的减毒苗控制该病,并可使用抗 gC 单克隆抗体鉴别缺失株和野毒株^[20]。

目前,国内尚无 IBRV gC 单克隆抗体制备的报道;本研究通过分析目的蛋白的跨膜区,原核表达 gC 蛋白并获得了敏感性较高、稳定性较好的抗 gC 单克隆抗体,并建立了双抗体夹心 ELISA 方法,为牛传染性鼻气管炎的检测和研究 gC 蛋白的功能奠定了基础。

4 结 论

本研究利用原核系统表达的 IBRV gC 蛋白制备获得了单克隆抗体,进行了生物学特性鉴定,初步

建立了检测 IBRV 的双抗体夹心 ELISA 方法,为检测牛传染性鼻气管炎和研究 gC 蛋白的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 石建平,牛德料,孟日增.牛传染性鼻气管炎的研究概况[J].上海畜牧兽医通讯,2008,5:49-51.
- [2] NARDELLI S, FARINA G, LUCCHINI R, et al. Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) [J]. *Prev Vet Med*, 2008, 85(1-2): 68-80.
- [3] JONES C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16(1):79-95.
- [4] 邹世颖,何倩妮,刘 蕾,等.中国北方六省市牛传染性鼻气管炎病流行病学分析[J].中国兽医杂志,2012,48(2):47-48.
- [5] YAN B F, CHAO Y J, CHEN Z, et al. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 127(1-2): 136-141.
- [6] LEARY T P, GAO Y, SPLITTER G A. Constitutively expressing cell lines that secrete a truncated bovine herpes virus-1 glycoprotein (gpI) stimulate T-lymphocyte responsiveness [J]. *Immunology*, 1992, 76(3): 367-372.
- [7] MANOJ S, BABIUK L A, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S. Immunization with a dicistronic plasmid expressing a truncated form of bovine herpesvirus-1 glycoprotein D and the amino-terminal subunit of glycoprotein B results in reduced gB-specific immune responses[J]. *Virology*, 2003, 313(1): 296-307.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1479-1484.
- [9] 汪家政,范 明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000.
- [10] 颜邦芬,陈 程,张书环,等.牛传染性鼻气管炎病毒 gG 蛋白的表达及 gG-ELISA 的建立 [J]. *生物工程学报*, 2007, 23(5): 806-811.
- [11] ISA G, SCHELP C, TRUYEN U. comparative studies with three different bovine blood sample BHV-1 ELISA tests: indirect ELISA and bG-blocking-ELISA [J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2003, 116(5-6): 192-196.

- [12] 李兆利, 薛 飞, 朱远茂, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 gB 基因的截短表达与间接 ELISA 诊断方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(12): 1328-1333.
- [13] COLIGAN J E, KRUISBEEK A M, MARGULIES D H, et al. Current Protocols in Immunology[M]. John Wiley & Sons Inc, 2003.
- [14] VILLAVERDE A, CARRIO M. Protein aggregation in recombinant bacteria; biological role of inclusion bodies[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(17): 1385-1395.
- [15] LIANG X P, BABIUK L A, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, et al. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV[J]. *J Virol*, 1991, 65(3): 1124-1132.
- [16] LIANG, X BABIUK L A, ZAMB T J. An *in vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase; evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization[J]. *Virology*, 1992, 189(2): 629-639.
- [17] GUPTA P K, SAINI M, GUPTA L K, et al. Induction of immune responses in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus-1[J]. *Vet Microbiol*, 2001, 78(4): 293-305.
- [18] CASELLI E, BONI M, DI LUCA D, et al. combined bovine herpesvirus 1 gB-gC DNA vaccine induces immune response in mice[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2005, 28(2): 155-166.
- [19] KAASHOEK M J, MOERMAN A, MADIC J, et al. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation[J]. *Vaccine*, 1995, 13(4): 342-346.
- [20] BEER M, KONIG P, SCHIELKE G, et al. Diagnostic markers in the prevention of bovine herpesvirus type 1; possibilities and limitations[J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2003, 116(5-6): 183-191.

(编辑 白永平)