

乔绪稳, 张元鹏, 陈 瑾, 等. 猪圆环病毒 2 型荧光抗体的原核表达及初步应用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 610-617.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.018

猪圆环病毒 2 型荧光抗体的原核表达及初步应用

乔绪稳¹, 张元鹏¹, 陈 瑾¹, 张浩明¹, 侯立婷¹, 杨 利¹, 郑其升¹, 侯继波^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009)

摘要: 本研究旨在利用原核大肠杆菌系统表达 1 株猪圆环 2 型病毒(Porcine circovirus type 2, PCV2)小分子荧光抗体, 以及该荧光抗体用于 PCV2 病毒直接免疫荧光(Direct immunofluorescence assay, DIF)检测。选取 1 株筛选到的 PCV2 特异性纳米抗体基因 V²², 按照 *E. coli* 原核表达系统进行密码子优化重新合成, 与荧光蛋白基因融合后插入 pET28(a) 中, 20 ℃ 条件下诱导表达 16 h, 利用 SDS-PAGE、Western-blot 技术鉴定蛋白是否表达及其可溶性, 并对可溶荧光抗体蛋白进行镍柱亲和层析纯化, 纯化蛋白用于建立 PCV2 特异性 DIF 检测方法, 同时对其工作条件、工作浓度、特异性以及稳定性进行验证, 并与 PCV2 经典间接免疫荧光检测方法进行比较, 验证其灵敏度。结果表明, PCV2 荧光抗体基因在 *E. coli* 原核表达系统中表达, 可溶蛋白占目的蛋白的 60% 左右; 纯化后荧光抗体蛋白呈现明显绿色, 具有良好的荧光活性, 不同批次表达及纯化的荧光抗体效果一致, -20 ℃ 保存 6 个月后抗体效价不变; PCV2 特异性 DIF 试验结果表明该荧光抗体只对 PCV2 病毒感染细胞具有良好的反应原性, 利用该抗体建立的直接免疫荧光法能够用于 PCV2 病毒滴度的测定, 滴度测定结果与间接免疫荧光法检测结果一致。说明, 在原核系统中成功表达 PCV2 的小分子荧光抗体, 该荧光抗体蛋白具有良好的特异性、灵敏度及稳定性, 用该抗体建立的 PCV2 特异性 DIF 操作简单, 且具有较好的特异性和敏感性, 对 PCV2 的检测有潜在应用价值。

关键词: 猪圆环病毒 2 型(PCV2); 荧光抗体; 原核表达; 直接免疫荧光检测

中图分类号: S852.65⁺9.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0610-08

Prokaryotic expression and preliminary application of fluorescent antibody against porcine circovirus type 2

QIAO Xu-wen¹, ZHANG Yuan-peng¹, CHEN Jin¹, ZHANG Hao-ming¹, HOU Li-ting¹, YANG Li¹, ZHENG Qi-sheng¹, HOU Ji-bo^{1,2}

(1. National Research Center of Veterinary Biological Engineering and Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

收稿日期: 2016-10-25

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303046); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1604]

作者简介: 乔绪稳(1988-), 女, 江苏徐州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事猪用新型疫苗与技术研究。

通讯作者: 郑其升, (Tel) 025-84392088; (E-mail) njevc1302@163.com。侯继波, (Tel) 025-84392008; (E-mail) houjibo@jaas.ac.cn

Abstract: Our experiment was to express recombinant antibody fused with EGFP fluorescent in *E. coli* for detecting porcine circovirus type 2 (PCV2) in direct immunofluorescence assay (DIF). The plasmid pET28a-V²²-EGFP vector was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and V²²-EGFP protein was induced by IPTG. Expression and solubility of recombinant V²²-EGFP protein

was analyzed by SDS-PAGE and Western blot and purified by Ni-NTA His · Bind Resin. The purified V²²-EGFP protein was used to establish PCV2 direct immunofluorescence assay. SDS-PAGE and Western blot results revealed that recombinant V²²-EGFP protein was successfully expressed with 60% soluble protein. With a obviously green appearances the purified V²²-EGFP protein showed great and stable fluorescence activity, even stored at -20 °C for 6 months. The DIF assay based on V²²-EGFP showed good specificity to PCV2-infected PK-15 cells only. Compared to the conventional PCV2 IFA method, the PCV2 DIF based on recombinant V²²-EGFP was more stable, sensitive and specific, so it enjoys a great potential application in PCV2 research.

Key words: porcine circovirus type 2 (PCV2); fluorescent antibody; prokaryotic expression; direct immunofluorescence assay

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 是一种免疫抑制性病毒,感染后可能引发断奶仔猪多系统衰竭综合征、猪皮炎/肾病综合征、猪先天性震颤等疾病,自 1991 年加拿大首次报道以来,该病毒在世界各地迅速蔓延,引发的相关疾病已成为全球公认的危害养猪业的重要传染病,在中国猪群中普遍流行^[1-5]。疫苗免疫预防和及时有效的监测是解决 PCV2 流行问题的关键,而抗原定量是疫苗质量控制的关键因素。PCV2 感染 PK-15 细胞不产生病变,为了配合疫苗研制过程中抗原定量、抗体效价测定,国内外的研究者建立了一系列的基于细胞的血清学检测方法,有用于感染猪抗原检测的 IFA、IPMA 技术,以及用于免疫效果评价的 IFA 和 IPMA 方法。这些方法都是在细胞水平上操作,结果明确直观,但是需要经过 2 次抗体孵育,操作过程繁杂,容易引入非特异反应物质,对结果判定造成干扰。因此简化操作过程、减少试验干扰项对圆环病毒检测方法的研究有实际应用意义^[6-9]。

传统抗体主要通过免疫动物获得高免血清或者通过杂交瘤筛选抗体技术获得,制备周期长,抗体批次间效价和质量不稳定,使其应用受到限制。随着对抗体研究的不断深入,以及 DNA 重组技术和噬菌体抗体库技术特别是噬菌体展示技术的建立,抗体研究已经从传统的细胞工程抗体进入到基因工程抗体阶段^[10-13]。1998 年, Huston 等^[14]在大肠杆菌中表达获得自发折叠成天然构象的单链抗体,该抗体分子量仅为原抗体的 1/6,但保留了其对抗原的亲合活性,是包含原亲代抗体全部抗原结合特异性的最小功能单位。单链抗体的成功研制打开了抗体研究的新局面,也促进了小分子抗体的研究进程^[15-17]。当前小

分子抗体研究热点主要有 Fab 片段、FV、scFV 和纳米抗体等,其中纳米抗体,自从 1993 年被发现以来已经引发多个领域广泛的关注和研究。纳米抗体是自然存在的抗原最小结合片段,分子量小、耐受性强、性质稳定,方便进行基因修饰及融合等操作,易于生产制备和储藏使用;此外纳米抗体的分子较小,能够到达并识别常规抗体无法到达的抗原位点或较为隐蔽的抗原表位,具有较强的抗原亲和能力和更好的抗原靶向性,因此在小分子抗体研究应用中具有较大的潜力^[17-19]。

本研究通过大肠杆菌表达系统将前期筛选获得的 PCV2 的纳米抗体与 EGFP 基因进行融合表达,获得 PCV2 荧光抗体蛋白 (VHH-EGFP),利用镍柱亲和层析的方法对可溶性荧光抗体进行纯化,用于建立 PCV2 特异性直接免疫荧光检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞 DH5 α 感受态细胞购于 Trans Gen Biotech 公司。PCV2 纳米抗体序列为本实验室通过噬菌体表面展示技术筛选,并送金斯瑞公司生物合成 (pUC-V²²)。含有 EGFP 荧光蛋白基因的重组质粒 pET28-EGFP 及表达菌 BL21 (DE3) 为国家兽用生物制品工程技术研究中心保存,EGFP 基因 NCBI 登录号为 GenBank: U55762.1。猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV-2)、猪细小病毒 (Porcine parvovirus virus, PPV)、猪瘟疫化弱毒 (Attenuated lapinized Chinese strain of CSFV, C-strain)、伪狂犬病病毒 (Porcine pseudorabies virus, PRV)、猪蓝耳病毒 (Porcine reproductie and respiratory syndrome vi-

rus, PPRSV)、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)均由国家兽用生物制品工程技术研究中心鉴定、保存。

1.1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自美国 Axygen, 核酸限制性内切酶、DNA 分子量标准 DL-2000、DL-10000、T4 DNA 连接酶及相关试剂购自宝生物工程(大连)公司, 蛋白分子量标准 Marker 购自 Thermo, *D*-氨基葡萄糖、异丙基- β -*D*-硫代半乳糖苷(Isopropyl β -*D*-1-thiogalactopyranoside, IPTG)购自 Sigma 公司, PCV2 阳性血清购自美国 VRMD 公司, 山羊抗猪 HRP-IgG、FITC-IgG 购自美国 KPL, Ni-NTA His·Bind Resin 纯化树脂购自 GE, 其余常规试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建与鉴定 分别用核酸限制性内切酶 *Nco* I 与 *Bam* H I 对含有荧光蛋白基因 *EGFP* 的质粒 pET28-*EGFP* (*EGFP* 插入位点为 *Bam* H I/*Hin* d III 酶切位点)、pUC-V²² 进行双酶切, 胶回收 pET-*EGFP* 载体片段(约 5 700 bp)和 V²² 目的片段(约 400 bp), 用 T4 连接酶连接, 转化克隆宿主菌 DH5 α , 提取质粒, 用 *Nco* I、*Hin* d III 进行双酶切鉴定, 鉴定正确的重组质粒命名为 pET-V²²*E*。

1.2.2 荧光抗体蛋白表达与可溶性鉴定 将含有荧光抗体基因的重组质粒 pET-V²²*E* 转化 BL21 (DE3)感受态细胞, 分别挑取重组表达菌株 pET-V²²*E*/BL21 和 pET-28 a (+)/BL21 对照菌落, 接种到含有卡那霉素的 LB 液体培养基培养过夜。取 100 μ l 过夜培养物接种于 5 ml 含有卡那青霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下振荡培养约 3 h, 使 OD_{600} 达到 0.8~1.0; 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 20 $^{\circ}$ C 诱导表达 16 h。

离心收集诱导后菌体, 用 PBS 重悬, 进行超声波裂解破碎菌体, 裂解后的悬液, 在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 分离裂解液上清液与沉淀, 沉淀用 PBS 等体积重悬, 然后将诱导后完整的菌体、超声波破碎后的上清液及沉淀各取 100 μ l, 加入 5 \times SDS-Loading Buffer, 充分混匀后 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 10 min, 上样前瞬时离心, 吸取上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 分析 V²²*E* 荧光抗体蛋白的表达水平及可溶性。

1.2.3 荧光抗体蛋白 Western-blot 鉴定 借助序列末端融合的 His 标签, 对超声裂解前后荧光抗体蛋

白进行 Western blot 鉴定。

1.2.4 荧光抗体蛋白的纯化 根据 Ni²⁺-NTA 说明书步骤, 对可溶性表达的荧光抗体蛋白上清液进行亲和层析纯化, 经过不同浓度咪唑多次洗涤, 最后用 500 mmol/L 浓度的咪唑洗脱, 洗脱下来的蛋白经 SDS-PAGE 鉴定纯度, 然后用 BCA 蛋白定量试剂盒定量, 加入 50% 的甘油-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 荧光抗体蛋白的应用

1.2.5.1 PCV2 的培养 将滴度为 1 ml 10^{6.5} TCID₅₀ 的 PCV2 种子毒用 MEM 维持液稀释成 1 ml 10⁴ TCID₅₀, 接种于含 PK-15 细胞单层的 96 孔培养板, 每孔 100 μ l, 同时设立细胞空白对照。置于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h, 倾去病毒液, 换成含 3 mmol/L 的 *D*-氨基葡萄糖盐酸的 MEM 维持液, 继续培养 48 h 后, 弃去维持液, 每孔加入 100 μ l 预冷的固定液(丙酮与乙醇比例为 6:4), 置于-20 $^{\circ}$ C 固定 20 min, 弃去固定液, 用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 洗涤 3 次, 置于 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.5.2 直接免疫荧光试验程序 取出固定好的 96 孔板还原至室温, 每孔加入未稀释的 PCV2 荧光抗体 50 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 荧光显微镜观察结果。

1.2.5.3 荧光抗体特异性试验 将接种 PRRSV 的 Marc-145 细胞、接种 PEDV 的 Vero 细胞、接种 PCV2、CSFV、PRV、PPV 的 PK-15 细胞用同样的方法处理固定, 加入原倍的 PCV2 荧光抗体蛋白 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 弃去孔内液体, PBS 洗涤 5 次后进行荧光显微镜观察, 以此检验表达的 PCV2 荧光抗体的特异性。

1.2.6 荧光抗体工作浓度优化 利用最适的病毒接种浓度(10⁴ 病毒稀释浓度)接种细胞, 同时设立不接种病毒组作为对照。将荧光抗体(调整浓度为 800 μ g/ml)按照不同比例(1:50、1:100、1:200、1:400、1:600、1:800、1:1 000)稀释, 每个浓度梯度 3 次重复, 不接种 PCV2 的对照组按照 1:50 稀释荧光抗体, 镜检观察, 选取荧光清晰明亮的稀释梯度为最佳工作浓度。

1.2.7 荧光抗体孵育条件的优化 按照上述确定的最佳工作浓度, 进行直接免疫荧光试验, 分别在 37 $^{\circ}$ C 和室温(20~25 $^{\circ}$ C)条件下, 调整荧光抗体孵育时间为 30 min、45 min、60 min, 重复 3 次, 观察孵育温度和时间对抗体荧光效果的影响, 确定最佳的孵育条件。

1.2.8 荧光抗体稳定性试验 取相同批次细胞培养板,用不同批次表达纯化的荧光抗体,调整浓度及其他试验条件一致,进行荧光试验,观察荧光强弱是否改变,检测荧光抗体的制备稳定性。取相同批次的细胞培养板,用同一批的荧光抗体,在 -20°C 条件下保存 1 个月、2 个月……6 个月,其他试验条件相同,进行荧光试验,检测抗体保存稳定性。

1.2.9 与间接免疫荧光试验的比较 将滴度为 $1\text{ ml } 10^{6.5} \text{ TCID}_{50}$ 的 PCV2 种子毒用 MEM 维持液按照 $10^{-7} \sim 10^{-1}$ 稀释,同时接种 2 块含 PK-15 单层细胞的 96 孔培养板,每孔 $100\text{ }\mu\text{l}$,同时设立细胞空白对照。按照方法 1.2.4 的方法培养,丙酮固定备用。其中一起用传统间接免疫荧光法测定滴度,具体方法参照文献[8],在 PCV2 接毒细胞孔和空白细胞孔中分别加入每孔 $50\text{ }\mu\text{l}$ $1:100$ 稀释的 PCV2 血清 (VRMD), 37°C 孵育 1 h,弃去孔内液体,用 PBS 洗涤 5 次,加入 $1:200$ 稀释的 FITC 标记羊抗猪 IgG (KPL),每孔 $50\text{ }\mu\text{l}$, 37°C 孵育 1 h,弃去孔内液体,用 PBS 洗涤 5 次,置于倒置荧光显微镜下观察结果。另一块细胞板用本试验构建的荧光抗体检测,按照方法 1.2.4 中摸索出的最佳抗体浓度稀释荧光抗体,每孔 $100\text{ }\mu\text{l}$, 37°C 孵育 45 min,弃去孔内液体,用 PBS 洗涤 5 次,置于倒置荧光显微镜下观察比较。

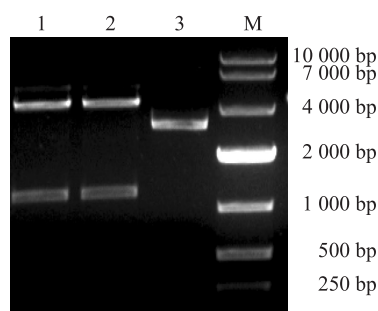
2 结果

2.1 重组质粒 pET-V²²E 的酶切结果

用 *Hin*d III 和 *Nco*I 对重组质粒 pET-V²²E 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示获得 2 条条带,大小分别约为 $5\text{ }000\text{ bp}$ 和 $1\text{ }100\text{ bp}$,分别与预期载体和目的片段大小相符,经鉴定 pET-V²²E 重组质粒构建成功。

2.2 荧光抗体蛋白的表达及可溶性鉴定

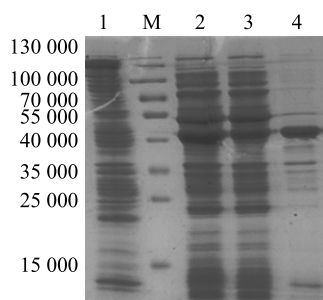
如图 2 所示,SDS-PAGE 显示,与空载体对照菌相比,诱导后重组表达菌株 pET-V²²E/BL21 在 $40\text{ }000$ 左右处多出 1 条明显的条带,与预期目的蛋白大小相符,相应的 Western-blot 鉴定结果(图 3)也证实表达蛋白为目的蛋白。超声破碎后上清液与沉淀中都有抗体蛋白。但大部分在超声处理后的上清液中,离心分离上清液和沉淀,在超声裂解蛋白上清液中可见抗体蛋白呈现明显绿色。



1、2 为重组质粒 pET-V²²E 双酶切产物; 3 为未酶切质粒 pET-V²²E 对照; M 为 DNA 分子量标准 (DL2000)。

图 1 重组表达质粒酶切鉴定

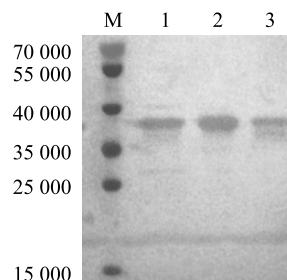
Fig.1 Identification of the recombinant plasmid



1: 诱导对照菌; M: 预染蛋白分子量标准; 2: 诱导后重组蛋白 V²²E 全菌; 3: V²²E 表达菌超声裂解液上清液; 4: V²²E 表达菌超声裂解液沉淀。

图 2 荧光抗体蛋白 V²²E 原核表达及可溶性 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the protein V²²E expression in *E. coli*



M: 预染蛋白分子量标准; 1: V²²E 表达菌超声裂解液上清液; 2: 诱导后重组蛋白 V²²E 全菌; 3: V²²E 表达菌超声裂解液沉淀。

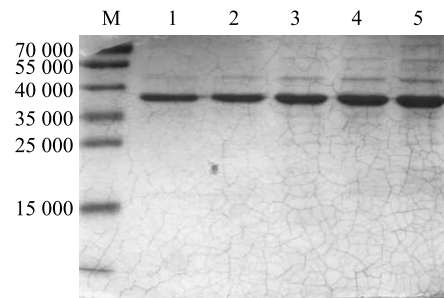
图 3 荧光抗体蛋白 Western-blot 鉴定

Fig.3 Western-blot identification of protein V²²E

如图 4 所示,荧光抗体蛋白 V²²E 在 500 mmol/L 咪唑浓度条件下可以从镍柱上被洗脱下来,洗涤下来的蛋白溶液呈现肉眼可见的绿色,SDS-PAGE 分析发现纯化后去除了绝大部分杂蛋白条带,纯化效果较好。

2.3 荧光抗体蛋白特异性试验

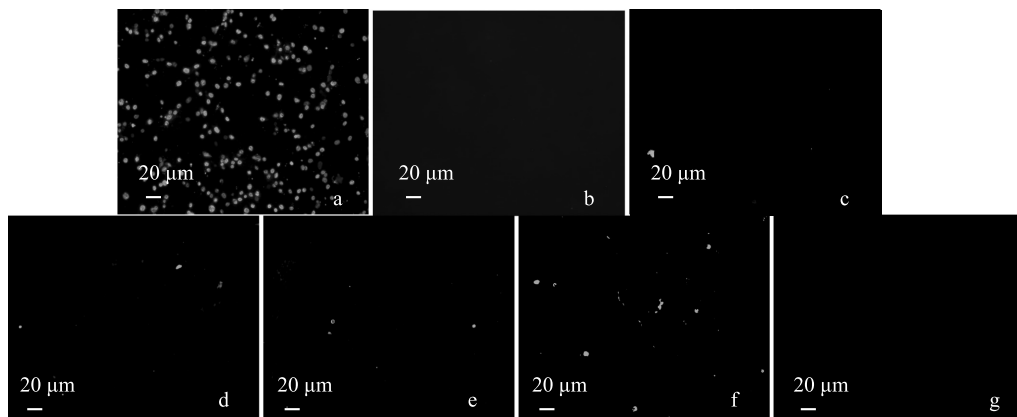
抗体特异性结果(图 5)表明,表达的荧光抗体 V²²E 只与 PCV2 特异性结合,与其他几种病毒不结合或出现少许非特异染色。



M: 预染蛋白分子量标准; 1~5: 500 mmol/L 咪唑蛋白洗脱液。

图 4 荧光抗体蛋白 V²²E 镍柱纯化 SDS-PAGE 鉴定

Fig.4 SDS-PAGE analysis of protein V²²E purified with Ni-sepharose



a~d: 分别为感染 PCV2、PPV、PRV、CSFV 的 PK-15 细胞($\times 100$); e: 感染 PEDV 的 Vero 细胞($\times 100$); f: 感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞; g: PK-15 细胞($\times 100$)。

图 5 荧光抗体特异性试验

Fig.5 Specificity of fluorescent antibody V²²E

2.4 荧光抗体使用浓度优化

如图 6 所示,使用不同的抗体浓度孵育相同病毒接种滴度的细胞,镜检观察到各个稀释度的荧光蛋白都能与 PCV2 病毒反应,呈现明显荧光,而且各稀释梯度间没有明显荧光数量差异,但是在荧光强度上,低稀释度抗体荧光强度较好,抗体稀释度高于 400 倍以后荧光强度渐弱,1 000 倍时已经有荧光数量轻微减少现象,而 50 与 100 2 个稀释度虽然荧光强度较强,却因为浓度较高,出现稍多的非特异性染色,因此最佳荧光抗体活性使用稀释度为 400 倍,即抗体浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

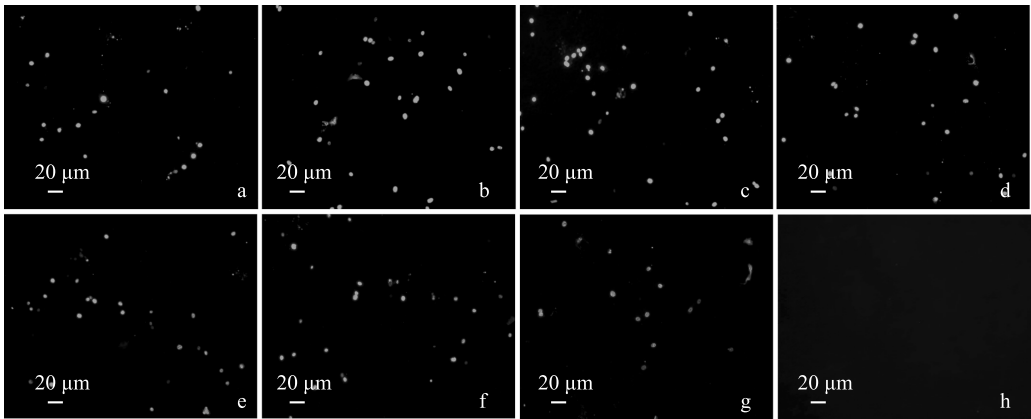
2.5 荧光抗体孵育条件优化

试验结果表明,荧光抗体 V²²E 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$

时,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 45 min 与室温条件下孵育 1 h 荧光效果差异不明显,并且 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育试验结果较稳定。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,抗体孵育 30 min 细胞荧光强度与孵育 45 min、1 h 相差明显,但是荧光数量略有减少,而孵育 45 min 与 1 h 在强度和荧光点数量上几乎没有差异,因此选定抗体孵育条件为: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。

2.6 稳定性试验

相同批次抗原细胞板在不同批次抗体条件下的检测结果完全一致,说明本试验制备荧光抗体的方法具有可重复性。抗体保存试验结果显示,保存 1 至 6 个月的荧光抗体检测效果与新鲜制备的抗体基本一致,说明本试验制备的荧光抗体具有良好的稳定性。



a~g:50、100、200、400、600、800、1 000倍稀释荧光抗体孵育接种 PCV2 的 PK-15 细胞;h:50 倍稀释荧光抗体孵育的 PK-15 细胞。

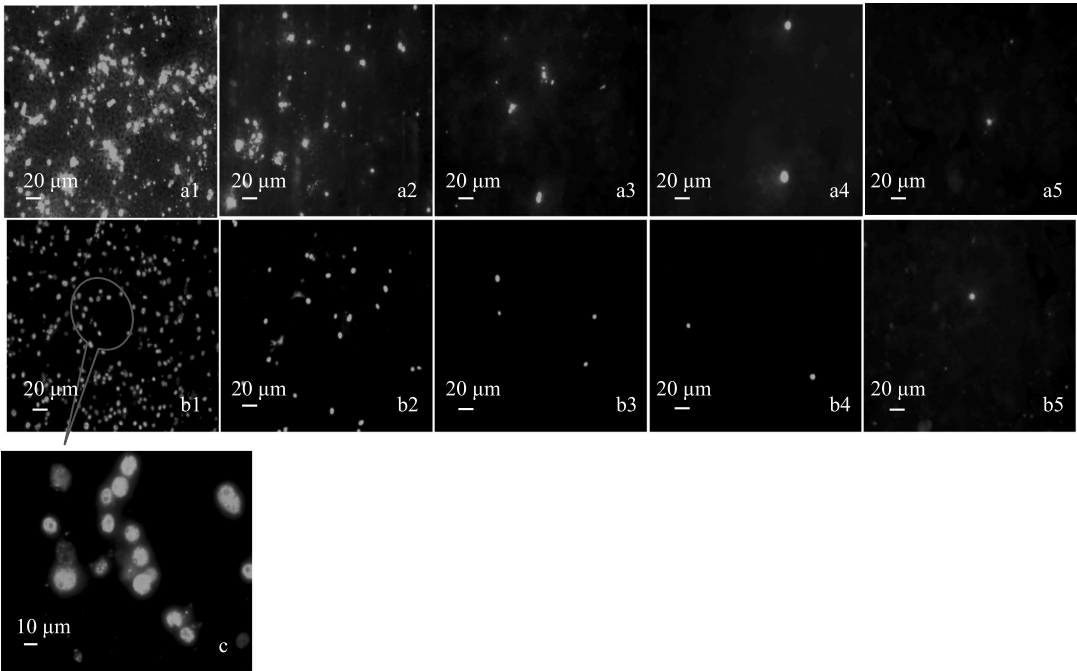
图 6 荧光抗体工作浓度优化试验(×100)

Fig.6 Optimization of working concentration of V²²E

2.7 与间接免疫荧光法的比较

同时用间接免疫荧光法和直接免疫荧光法对实验室滴度为 1 ml 10^{6.5} TCID₅₀ 的 PCV2 病毒进行滴度测定,结果(图 7)显示 2 种方法测出的滴度一致。

但是相对于间接免疫荧光法,用 V²²E 孵育荧光图上显示出较少的非特异着色,且能观察到荧光着染病毒在细胞内的分布。



a1~a5:间接免疫荧光法测定感染 1 ml 10¹~10⁵ TCID₅₀ PCV2 PK-15 细胞滴度(×100);b1~b5:直接免疫荧光法测定感染 1 ml 10¹~10⁵ TCID₅₀ PCV2 PK-15 细胞滴度(×100);c:放大观察 V²²E 抗体在细胞内的荧光着染(×400)。

图 7 间接免疫荧光法和直接免疫荧光法测定 PCV2 滴度比较

Fig.7 Comparison of PCV2 titer between IFA and DIF

3 讨论

PCV2 抗原滴度测定是疫苗生产过程的重要环节之一,当前主要以间接免疫荧光法(IFA)最为常用。间接免疫荧光法需要 2 个检测抗体:病毒特异性抗体和相对应的荧光标记抗体。荧光检测方法需要借助试验人的主观判定,同时使用 2 个抗体很大程度上提高了检测的灵敏度,但是也带来一定程度的非特异性反应,影响结果判定准确性。借助本研究制备的 PCV2 小分子荧光抗体而建立 PCV2 直接免疫荧光检测法(DIF),只需要经过 1 次抗体孵育及洗涤过程,不仅操作简单,且由于抗体特异性较好,对细胞非特异性着色也明显减少,提高结果判定的准确性。

随着基因工程抗体技术的迅速发展,各种基因标记小分子抗体大量出现并应用到各个领域,尤其是各类检测技术。与传统标记的 PCV2 单抗或多抗不同,本试验选用的抗体为圆环病毒纳米抗体,通过基因工程的手段与荧光蛋白基因融合,形成同时具有荧光活性和 PCV2 抗体活性的荧光抗体蛋白。该抗体蛋白保留了小分子纳米抗体的优势:可识别很多常规抗体无法到达的部位或抗原的构造表位,因此比常规抗体具有更加广泛的抗原结合能力和更为精准的靶向性^[20-21]。我们从实验室前期工作中选取的 V²² 纳米抗体,本身具有较好的亲和活性和特异性,与荧光蛋白融合后也能够精准而特异地定位到感染 PCV2 的 PK-15 细胞表面。低倍镜观察,染毒细胞由于荧光特异性附着在镜下形成清晰可辨的轮廓,高倍镜观察可以看到圆环病毒粒子主要集中分布在 PK-15 细胞胞质内,检测结果明晰直观,在一定程度上降低试验操作者主观判定对结果的干扰,提高测定结果的可重复性和稳定性。

小分子抗体制备终产物的获得必须通过基因工程表达系统实现,而原核表达系统因其遗传背景清晰、产量高、成本低、易于大规模生产操作,是目前生产和研究中的优势体系,但是因为该系统缺乏基因翻译后修饰功能、稀有密码子缺失等原因,导致对某些结构复杂的蛋白表达受到限制。本研究选择纳米抗体作为荧光抗体蛋白的抗原识别部分,除了其较强的亲和活性和靶向性,还与其易于在原核系统中表达有关。纳米抗体分子量小、结构简单,易于在原核表达系统中获得高效表达,且纳米抗体溶解性好,

对外界环境耐受性强,性质稳定,易于生产制备和保存使用。本试验设计的小分子荧光抗体蛋白经原核表达系统高效表达,可占总蛋白 12%~18%,可溶部分可达目的蛋白的 60% 以上,在未纯化缓冲液中即呈现明显绿色荧光,表明其具有良好的荧光活性,后续试验中我们也证实了蛋白颜色越深表明抗体活性越强,反应也越灵敏。

本试验成功通过大肠杆菌原核表达系统获得 1 株 PCV2 特异性小分子荧光抗体,该抗体蛋白具有较好的抗原亲和活性和荧光活性,特异性强,可用于 PCV2 直接免疫荧光的检测。

参考文献:

- [1] 王李辉,赵明军. 猪免疫抑制性疾病致病机制研究进展[J]. 猪业科学, 2010(4): 80-84.
- [2] 李文洁,李文涛,严伟东,等. 中国部分地区猪圆环病毒 2 型的基因型分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(9): 1358-1362.
- [3] 郭广富,曹军平,朱爱萍,等. 猪圆环病毒 2 型泰州株的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 294-295.
- [4] 赵海坤. 猪圆环病毒 2 型分析流行病学调查及其抗体的 ELISA 检测方法的建立[D]. 扬州:扬州大学, 2009.
- [5] LI L M, YUAN W Z, GUO H Y, et al. Prevalence and genetic variation of porcine circovirus type 2 in Hebei, China from 2004 to 2014[J]. Gene, 2016, 586: 222-227.
- [6] ALLAN G M, MCNEILLY F, KENNEDY S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe[J]. J Vet Diagn Invest, 1998, 10(1): 3-10.
- [7] ELLIS J, HASSARD L, CLARK E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. Can Vet J, 1998, 39(1): 44-51.
- [8] 崔尚金,全滢平,李 曦,等. 猪圆环病毒间接免疫荧光方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(1): 63-66.
- [9] LIU C M, ZHANG C F, WEI Y W, et al. Development and application of an immunoperoxidase monolayer assay based kit for detection of porcine circovirus type 2[J]. Chin J Prev Vet Med, 2007, 29(8): 621-624.
- [10] 刘金凤,吴健敏,覃绍敏,等. 抗猪圆环病毒单链抗体基因的构建及其推导的蛋白质三级结构的分子模拟[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 817-823.
- [11] CARLOSE B, KANG A S, LERNER R. Assembly of combinatorial libraries on phage surfaces: the gene III site[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7978-7982.
- [12] 李晓君,周文吉,周启武,等. ShSAP1 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 43-45.
- [13] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science,

- 1985,228;1315-1317.
- [14] HUSTON J S, LEVINSON D. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 1998, 85: 5879-5883.
- [15] 朱 磊, 张大鹏. 天然小分子抗体研究进展[J]. *药学报*, 2012, 47 (10): 1281-1286.
- [16] 朱振洪, 余 勤, 万海同. 基因工程小分子抗体的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2008(增刊): 59-70.
- [17] 陈丽娟, 张丽华, 李 杰, 等. 小分子抗体制备技术及临床应用进展[J]. *实用医药学杂志*, 2014, 31 (3): 263-265.
- [18] STIJLEMANS B, CONRATH K, CORTEZ-RETAMOZO V, et al. Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies African trypanosomes as paradigm [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1256-1261.
- [19] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, HAMER C, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains [J]. *Nature*, 1993, 363: 446-448.
- [20] STIJLEMANS B, CALJON G, NATESAN SKA, et al. High affinity nanobodies against the Trypanosome brucei VSG are potent trypanolytic agents that block endocytosis [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(6): e1002072.
- [21] TRANSUE T R, GENST D E, GHARROUDI M A, et al. Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate [J]. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 1998, 32 (4): 515-522.

(责任编辑:陈海霞)