

刘蓓蓓, 韦艳娜, 陈 蓉, 等. 半固体培养法制备非洲猪瘟病毒 pA104R 蛋白的单克隆抗体[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(4): 682-689.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.04.012

半固体培养法制备非洲猪瘟病毒 pA104R 蛋白的单克隆抗体

刘蓓蓓^{1,2}, 韦艳娜^{1,2}, 陈 蓉^{1,2}, 谢 星^{1,2}, 倪 博^{1,2}, 郝 飞^{1,2}, 张珍珍^{1,2},
白 昀^{1,2}, 袁 厅^{1,2}, 冯志新^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 兽用生物制品<泰州>国
泰技术创新中心, 江苏 泰州 225300)

摘要: 为了快速、高效制备非洲猪瘟病毒 (ASFV) 单克隆抗体, 本研究通过大肠杆菌系统表达并纯化了 ASFV 重组蛋白 pA104R。以 ASFV 重组蛋白 pA104R 为抗原, 分别比较了 CpG ODN 联合氢氧化铝佐剂和常规弗氏佐剂两种免疫策略, 并重点比较半固体培养法和常规有限稀释法来制备 ASFV pA104R 单克隆抗体的效率。结果显示, 本研究获得了相对分子质量为 3.5×10^4 的 ASFV 重组可溶性蛋白 pA104R, 通过其与 CpG ODN 联合氢氧化铝佐剂免疫小鼠, 在第 21 d 即可达到融合要求, 本试验方法 (重组蛋白 pA104R 与 CpG ODN 联合氢氧化铝佐剂免疫) 较重组蛋白 pA104R 与常规弗氏佐剂免疫节省 14 d 时间。通过半固体培养法筛选单克隆的试验周期比有限稀释法缩短 28 d, 并减少了亚克隆的工作量。半固体培养法获得 5 株阳性杂交瘤细胞, 挑选效价较高的 3 株 (9A4、9H6、11F5) 进行鉴定, 重链均为 IgG, 轻链均为 KAPPA。纯化后的 3 株单克隆抗体针对 pA104 蛋白和全病毒蛋白质的效价分别达 $1:160\,000 \sim 1:320\,000$ 和 $1:200 \sim 1:400$ 。本研究优选了 CpG ODN 联合氢氧化铝佐剂结合半固体培养法筛选 pA104R 的单克隆抗体, 为单克隆抗体制备提供了快速高效的新策略。

关键词: 非洲猪瘟病毒; pA104 蛋白; 单克隆抗体; 半固体培养法

中图分类号: S852.65⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)04-0682-08

Preparation of monoclonal antibody against pA104R protein of African swine fever virus by semi-solid culture method

LIU Bei-bei^{1,2}, WEI Yan-na^{1,2}, CHEN Rong^{1,2}, XIE Xing^{1,2}, NI Bo^{1,2}, HAO Fei^{1,2},
ZHANG Zhen-zhen^{1,2}, BAI Yun^{1,2}, YUAN Ting^{1,2}, FENG Zhi-xin^{1,2}

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China; 2. GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China)

Abstract: In order to prepare the monoclonal antibodies against African swine fever virus (ASFV) rapidly and efficiently, the recombinant pA104R protein of ASFV was systematically expressed and purified by *Escherichia coli* in this study.

收稿日期: 2023-03-30

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项 (2019YFE0107300); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(22)2037]

作者简介: 刘蓓蓓 (1989-), 女, 江苏徐州人, 本科, 助理研究员, 主要从事单抗制备研究。 (E-mail) liubei2012203@163.com

通讯作者: 冯志新, (E-mail) fzjjaas@163.com

The recombinant pA104R protein of ASFV was used as antigen to compare the two immune strategies of CpG ODN combined with aluminum hydroxide adjuvant and conventional Freund's adjuvant, respectively, and the efficiency of semi-solid culture method and conventional limited dilution method in the preparation of monoclonal antibody against ASFV pA104R was compared. The results showed

that the recombinant pA104R soluble protein of ASFV with a relative molecular weight of 3.5×10^4 was obtained, and the fusion requirement was achieved on the 21st day after the mice were immunized with CpG ODN and aluminum hydroxide adjuvant. Compared with routine Freund's adjuvant immunization and recombinant pA104R protein, CpG ODN combined with aluminum hydroxide adjuvant and semi-solid culture method in this experiment saved 14 days. The semi-solid culture method shortened the test period of monoclonal screening by 28 days compared with the limited dilution method, and saved a lot of subclonal workload. Five positive hybridoma cell lines were obtained by semi-solid culture method, and three high titer hybridoma cell lines (9A4, 9H6, 11F5) were selected for identification. The heavy chain was IgG, and the light chain was KAPPA. The titers of three purified monoclonal antibodies against pA104 protein and whole virus protein were 1 : 160 000–1 : 320 000 and 1 : 200–1 : 400, respectively. In this study, monoclonal antibodies were screened by CpG combined with aluminum hydroxide adjuvant and semi-solid culture method, providing a new rapid and efficient strategy for monoclonal antibody preparation.

Key words: African swine fever virus; pA104 protein; monoclonal antibody; semi-solid medium method

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是一种由 ASF 病毒 (ASFV) 引起的一种急性烈性传染病, 是对养猪业具有威胁性的一种疾病, 致死率近 100%^[1]。该病首次报道于 1921 年肯尼亚, 随后陆续在全球各地暴发, 曾在非洲、欧洲和美洲等数十个国家流行。2018 年传入中国沈阳, 短短数月席卷全国, 对中国养猪业造成毁灭性打击^[2]。

ASF 疫情快速蔓延, 其中一个原因就是缺乏快速高效的现场诊断产品, 因此针对 ASFV 的特异蛋白制备单克隆抗体对于开发 ASFV 检测试剂盒至关重要。ASFV 是一种线状、二十面体带囊膜的双链 DNA 病毒, 病毒结构复杂^[3-4]。病毒基因组长 170~190 kb, 含有 150~170 个开放阅读框^[5], 其中 *ORF104R* 编码了一种类组蛋白 (pA104R), 高度保守, pA104R 是唯一由病毒编码的类组蛋白^[6-8]。ASFV 包括基因组和核蛋白, pA104R 是发挥主要功能的核蛋白, 主要出现在感染后期, 有很好的免疫反应性, 是 IgM 和 IgG 抗体反应性较好的靶标蛋白^[9]。有研究结果显示, 无症状猪的抗体反应要高于慢性感染的猪, 并且在细胞水平上敲低 *pA104R* 基因, ASFV 的核酸拷贝量会显著降低, 由此, 针对 pA104R 蛋白的抗体可能有效免疫 ASFV^[6,9]; 二苯乙烯衍生物 SD1 和 SD4 可以剂量依赖性的方式阻断 pA104R 蛋白与 DNA 结合, 抑制 ASFV 在猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 中复制, 提示 pA104R 蛋白在 ASFV 复制过程中具有重要作用, pA104R 蛋白可用于制备 ASFV 疫苗^[10]。

免疫佐剂, 又被称为非特异性免疫增生剂, 如氢氧化铝、明矾、矿物油、脂多糖、CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG oligonucleotide) 等, 其与抗原同时注射到机体可增强免疫原性或改变免疫反应类型。CpG ODN

是在含鸟嘌呤 (Guanine)、胞嘧啶 (Cytosine) 的二核苷酸序列 (CpG) 的基础上, 经非甲基化修饰后的寡聚脱氧核苷酸链。20 世纪 80 年代, Tokunaga^[11] 发现结核分枝杆菌的 DNA 具有抗肿瘤作用, 可升高 NK 活性进而诱导 I 型和 II 型干扰素产生。之后 1995 年发现具有抗肿瘤作用 DNA 中所含的非甲基化 CpG 基序的结构和其免疫刺激特性密切相关^[12], 上述研究结果表明 CpG ODN 能够增强免疫细胞的增值, 诱导其分泌多种细胞因子^[13-14], 和铝佐剂联合应用可以延长其在体内的作用时间^[15]。

自 1975 年 Kohler 和 Milstein 的单克隆抗体制备技术问世, 单克隆抗体在人类和动物疾病的诊断、治疗领域发挥了重要作用。目前很多实验室制备单克隆抗体的方法仍然是传统的有限稀释法, 耗时较长, 工作量较大, 且不分泌抗体的杂交瘤细胞, 影响阳性杂交瘤细胞生长甚至死亡导致阳性克隆丢失, 通过甲基纤维素半固体培养法筛选单个克隆, 一步即可完成单克隆, 无需进行多次亚克隆, 相比较有限稀释法, 缩短试验周期, 可大量节约试验成本^[16-17]。

本研究对非洲猪瘟病毒核蛋白 pA104R 进行可溶性表达, 以 pA104R 蛋白为抗原, 弗氏佐剂和 CpG ODN 氢氧化铝混合佐剂分别为佐剂免疫 4~6 周龄 BALB/c 小鼠, 并利用有限稀释法和半固体培养基法制备单克隆抗体, 建立起较为快速高效的单克隆抗体制备方法。为后期针对 ASFV 抗原抗体的检测提供重要生物材料。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0)、PET-32a、*Escherichia*

coli (*E. coli*) strain BL21 (DE3)-pLysS 感受态均由本实验室保存;4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心。

CpG ODN1826 (CpG oligodeoxynucleotide1826)、氢氧化铝购自 Invivo 公司;弗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant)、弗氏不完全佐剂 (Freund's incomplete adjuvant) 购自 Merck 公司;HAT、HT、聚乙二醇 (PEG4000) 选择培养液添加剂购自 Merck 公司;半固体培养基购自 Molecular Devices 公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;Talon 填料购自美国 Cytiva 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG (HRP-羊抗鼠 IgG) 购自武汉博士德生物工程有限公司;ELC 显色液购自 Thermo Fisher Scientific 公司;亚型鉴定试剂盒购自 Thermo Scientific 公司。灭活的 ASFV 全病毒抗原以及灭活的 ASFV 阳性血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

1.2 表达菌株的构建

从 GenBank 中获得 ASFV ChinaPig/HLJ/2018 株 *pA104R* 基因序列 (GenBank 登录号: MK333180.1), 以该基因序列为模板, 用优化软件 (<http://www.jcat.de/>) 对密码子优化, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成 *pA104R* 全基因序列, 基因长 312 bp, 编码 104 个氨基酸, 编码的蛋白质相对分子质量为 1.15×10^4 。将该基因连接至 pET-32a(+) 载体, 插入酶切位点 *Eco* R I 和 *Hind* III, 构建成 pET-32a(+)-*pA104R* 重组表达质粒。将重组质粒 pET-32a(+)-*pA104R* 转化至感受态细胞 BL21 (DE3), 挑单菌落接种于添加 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨基青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑单菌落接种于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 10 h 以上, 即为重组 *pA104R* 的表达菌株 pET-32a(+)-*A104R E. coli*BL21 (DE3)。

1.3 重组蛋白的表达和纯化鉴定

按 1:100 将重组 *pA104R* 的表达菌株 pET-32a(+)-*A104R E. coli*BL21 (DE3) 接种至 LB 培养基中, 当菌液 OD_{600} 达到 0.8 时, 加入 IPTG 溶液 (终浓度 0.4 mmol/L), 18 $^{\circ}\text{C}$ 恒温诱导过夜, 第 2 d 收集菌体, 超声波裂解后 10 000 g 离心 10 min, 分别收集上清液和沉淀, 上清液用 0.45 μm 滤器过滤。用基础缓冲液洗 Talon 纯化柱 (缓冲液: 30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 的咪唑, 2% 甘油)。将过滤后的含有重组蛋白 *pA104R* 的上清液全部加入 Talon 柱进行充分挂柱, 先用基础缓

冲液冲洗未挂柱的杂蛋白, 再分别用含 50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L 和 400 mmol/L 咪唑的洗脱液梯度洗脱, 收集洗脱液。测定收集到的洗脱液的蛋白质浓度, 进行 SDS-PAGE 电泳。随后用分子筛层析分离 Talon 柱上洗脱下来的蛋白质, 进行下一步的纯化, 最后将重组蛋白 *pA104R* 超滤浓缩, 使其质量浓度在 2 mg/ml 以上。参照实验室前期关于 P10 蛋白的纯化与鉴定方法^[18], 对 *pA104R* 蛋白进行鉴定。重组蛋白 *pA104R* 经 SDS-PAGE 电泳, 用 PVDF 膜进行转印, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。一抗为 1:200 的 ASFV 阳性血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 二抗为 1:10 000 稀释的羊抗猪 IgG-HRP, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。最后用 ECL 显色液曝光检测。

1.4 动物免疫和血清效价检测

将重组蛋白 *pA104R* 作为抗原, 免疫佐剂分 2 组, CpG 和氢氧化铝混合佐剂 (100 μl 氢氧化铝溶解 10 μg CpG 佐剂) 组和弗氏佐剂组, 免疫 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠。CpG 和氢氧化铝混合佐剂采取腹腔免疫方式, 采用 100 μg 抗原+100 μl 混合佐剂, 每 7 d 用混合佐剂免疫 1 次, 共免疫 4 次, 在第 3 次免疫后 7 d (第 1 次免疫后 21 d) 眼眶采血, 分离血清, 用间接 ELISA 方法检测小鼠抗体水平。选取血清效价 $>1 \times 10^5$ 的小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞进行融合, 在细胞融合开始前 3 d 用不加佐剂的 *pA104R* 重组蛋白加强免疫小鼠 (每只 50 μg)。弗氏佐剂组采用皮下注射免疫, 第 1 次用弗氏完全佐剂和等量的 *pA104R* 蛋白进行皮下多点注射免疫, 每隔 14 d 再用弗氏不完全佐剂和等量的 *pA104R* 蛋白加强免疫, 第 3 次免疫后 7 d (第 1 次免疫后 35 d) 眼眶采血, 分离血清, 间接 ELISA 方法检测小鼠抗体分泌水平。具体方法如下: 用包被液 (pH 9.6 的碳酸盐缓冲液) 将纯化后的 *pA104R* 蛋白和 ASFV 全病毒蛋白 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 包被 ELISA 酶标板, 每孔 100 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 加入连续 10 倍稀释的待检小鼠血清, 同时以阳性猪血清作为阳性对照, 未免疫的小鼠血清作为阴性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 加入羊抗鼠 IgG-HRP (1:10 000), 每孔 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h, TMB 显色液避光显色 10 min, 用 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 每孔 50 μl , 测定 OD_{450} 值, Cut-off 值为阴性血清平均值的 2.1 倍, 设定 OD_{450} 值 $>$ Cut-off 值为阳性, 取待检血清对应的最高稀释度作为血清的效价。

1.5 阳性杂交瘤细胞株的筛选和鉴定

融合前 7 d,将 SP2/0 细胞复苏并扩大培养,融合前 3 d 以不加佐剂的重组 pA104R 蛋白为抗原加强免疫 1 次。融合时,将小鼠腹腔打开,摘出脾脏研磨后过滤,收集脾细胞,将小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞 5:1 融合,利用 PEG 法制备杂交瘤细胞。半固体培养方法:将融合后的细胞接种至恢复培养基中,置于 37 °C 温箱中培养过夜。第 2 d 离心后接种至半固体培养基中,置于 37 °C 温箱中静置培养。7~10 d 形成肉眼可见的克隆团,将单个克隆团移至完全培养基中继续培养扩增,在细胞长至孔底面积的 1/4~1/2 时即可筛选,筛选到的阳性杂交瘤细胞克隆纯化 1 次,利用间接 ELISA 方法确认杂交瘤细胞株的阳性率为 100%。有限稀释培养方法:在融合的前 1 d 准备饲养细胞,将阴性小鼠处死且表面消毒后固定好,剪开并掀起腹部皮肤暴露腹膜,用注射器注射 5 ml 不完全培养基至腹腔内,轻柔按摩腹膜后将培养基吸出离心,将细胞调整至 $1 \text{ ml } 2 \times 10^5$ 个 $1\,000 \mu\text{l}$ /孔接入 96 孔板内,即为饲养细胞。将 PEG 融合后的细胞按每孔 $100 \mu\text{l}$ 接入已接种过饲养细胞的培养板内置于 37 °C 含 5% 二氧化碳的培养箱内培养。5 d 后换出 1/2 的 HAT 培养基,7~10 d 后全部换成 HT 培养基。当孔底的细胞长至孔底面积的 1/4 时即可吸出上清液进行检测。对阳性细胞株进行 2 次检测,去除假阳性和分泌不稳定的细胞,再对剩余的阳性细胞进行 3 次亚克隆,每次亚克隆前准备饲养细胞。将 3 次克隆纯化后筛选的细胞进行扩大培养并冻存,收集细胞上清液,按单克隆抗体亚型鉴定试剂盒说明书操作,取 $800 \mu\text{l}$ 杂交瘤细胞上清液加入检测孔中进行检测。

1.6 单克隆抗体的鉴定

利用 Western blot 方法分别将 ASFV 重组蛋白 pET-32a(+)-pA104R 和 pET-32a 空载体转化大肠杆菌然后用 IPTG 诱导出的全菌蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离,用半干式转印方法转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜。小鼠腹水 1:5 000 稀释作为一抗分别孵育 ASFV 重组蛋白 pA104R 和 pET-32a 空载体转化大肠杆菌后诱导出的全菌蛋白质,37 °C 孵育 2 h。以 1:10 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗 37 °C 孵育 1 h。加入 ECL 避光显色至条带出现,拍照。

1.7 单抗腹水的制备纯化与效价测定

每只经产母鼠腹腔注射 0.5 ml 灭菌液体石蜡,7~10 d 后腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞。5~7 d 后观察到小鼠腹部开始隆起,收集腹水,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,56 °C 水浴灭活腹水中的蛋白质水解酶,待温度降至室温后保存于 -20 °C 备用。

将收集的腹水按辛酸-硫酸铵方法提取腹水中的 IgG 抗体,并透析 24 h 以上保证除去其中的硫酸铵。ASFV 全病毒蛋白和 ASFV 重组蛋白 pA104R 包被的酶标板用材料与方法 1.4 中的 ELISA 方法测定效价。

2 结果与讨论

2.1 重组蛋白 pA104R 的表达

收集阳性菌液进行 IPTG 小量诱导表达(终浓度 0.4 mmol/L),并设置未诱导菌液为阴性对照,18 °C 180 r/min 诱导 12 h 后进行超声波破碎,收集上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 鉴定。在表达菌裂解后的上清液和沉淀中均能检测到重组蛋白 pA104R,表明 pA104R 是可溶性蛋白(图 1A)。与未诱导菌液相比较,诱导后的菌株[pET-32a(+)-pA104R *E.coli* BL21(DE3)]可以成功表达出重组蛋白 pA104R,相对分子质量为 3.5×10^4 。表明重组 pA104R 表达菌株 pET-32a(+)-pA104R *E.coli* BL21(DE3)能表达 pA104R,且上清液和沉淀中均可检测到。

2.2 pA104 的原核表达、纯化和鉴定

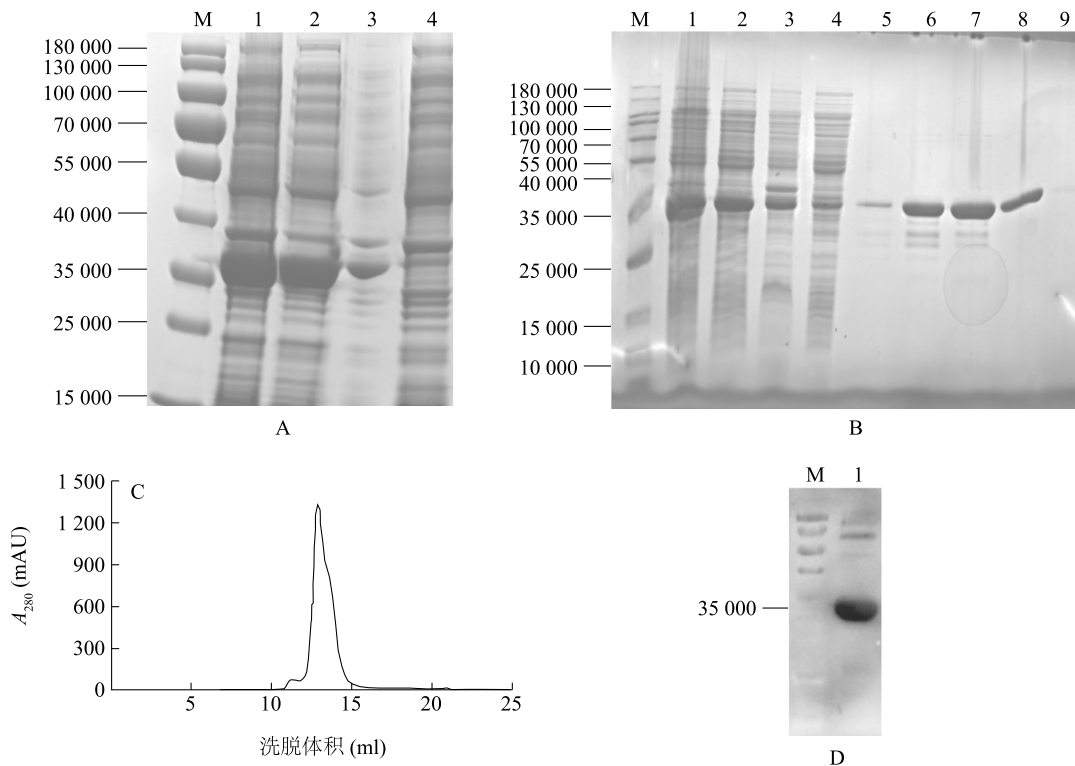
重组蛋白 pA104R 采用 Talon 亲和层析柱进行纯化,用 20 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L 和 400 mmol/L 浓度咪唑洗脱 pA104R 蛋白,结果发现 pA104R 主要在 50 mmol/L、100 mmol/L 和 200 mmol/L 的咪唑中被洗脱(图 1B),随后用分子筛层析分离 Talon 柱上洗脱下来的蛋白质,进行下一步的纯化,通过软件 Image J 分析重组蛋白 pA104R 的纯度,纯度大约为 85%(图 1C)。经免疫印迹 Western blot 分析,表明重组蛋白 pA104R 能与 ASFV 阳性血清发生反应(图 1D),说明表达的重组蛋白 pA104R 具有良好的免疫原性。

2.3 融合前小鼠效价检测

采用材料与方法 1.4 中的方法免疫小鼠,利用 ELISA 方法分别对弗氏佐剂组在第 1 次免疫后 21 d(第 2 次免疫后 7 d)、第 1 次免疫后 35(第 3 次免疫

后 7 d)、第 1 次免疫后 42 d(第 3 次免疫后 14 d)和 CpG 联合氢氧化铝佐剂组第 1 次免疫后 14 d(第 2 次免疫后 7 d)、第 1 次免疫后 21 d(第 3 次免疫后 7 d)、第 1 次免疫后 35 d(第 4 次免疫后 14 d)检测小鼠抗体水平,本研究将不同时间点采集的小鼠血清按 1 : 100 000 倍稀释后进行抗体检测,结果显示弗氏佐剂组需在第 1 次免疫后 42 d 小鼠抗体才达到

1 : 100 000 以上(图 2A),而 CpG 联合氢氧化铝佐剂组小鼠抗体在第 1 次免疫后 21 d 即可达到 1 : 100 000 以上(图 2B),比弗氏佐剂组早 21 d。在总免疫程序上 CpG 联合氢氧化铝佐剂免疫组在第 1 次免疫后 28 d 小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞开始融合,比弗氏佐剂免疫组(第 1 次免疫后 42 d 小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞融合)缩短 14 d。



A: 表达的重组蛋白 pA104R, M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 诱导后的重组 pA104R 大肠杆菌工程菌菌液; 2: 诱导后的重组 pA104R 大肠杆菌工程菌裂解后的上清液; 3: 诱导后的重组 pA104R 大肠杆菌工程菌裂解后的沉淀; 4: 未诱导的重组 pA104R 大肠杆菌工程菌菌液。B: IPTG 诱导后大肠杆菌工程菌, M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 全菌超声波裂解产物; 2: 全菌超声波裂解后的上清液; 3: 全菌超声波裂解后的沉淀; 4: 挂柱 3 次后的液体; 5: 20 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白质; 6: 50 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白质; 7: 100 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白质; 8: 200 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白质; 9: 400 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白质。C: pA104R 蛋白的分子筛纯化。D: ASFV 阳性猪血清鉴定重组蛋白 pA104R, M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 重组蛋白 pA104R。

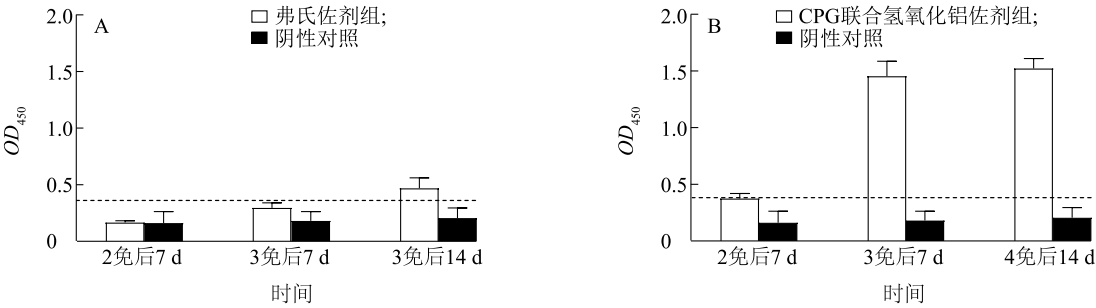
图 1 表达重组蛋白 pA104R 及其纯化结果

Fig.1 Expression and purification of recombinant protein pA104R

2.4 阳性杂交瘤细胞株的筛选及鉴定

在融合后 7 d, 半固体培养基法培养的克隆团大小肉眼可见(图 3)。吸取单个克隆接种于含有完全培养基的 96 孔板内, 3 d 后培养基颜色由橙红色变成橘黄色或黄色吸取上清液进行 ELISA 检测。有限稀释法在 7 d 换成 HT 培养液, 2 d 后营养液由橙红色变成橘黄色或黄色, 此时吸取上清液进行 ELISA 检测。通过间接 ELISA 方法共筛选

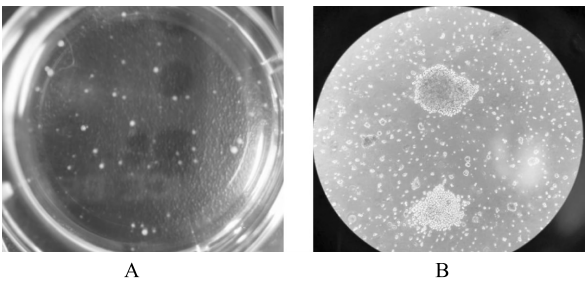
到 9 株杂交瘤细胞株, 其中有限稀释法筛选到 4 株, 半固体培养基法筛选到 5 株。共挑选效价较高的 3 株(均来自半固体培养基法)进行亚型鉴定, 结果显示 3 株杂交瘤细胞株重链均为 IgG, 轻链均为 KAPPA。对这 3 株杂交瘤细胞上清液进行 Western blot 检测, 结果显示, 从这 3 株杂交瘤细胞分别获得的单克隆抗体 9H6、9A4、11F5 均能特异性地识别 pA104R 蛋白(图 4)。



A: 弗氏佐剂组不同免疫时间小鼠抗体水平变化(抗体1:100 000稀释);B: CPG 联合氢氧化铝佐剂组不同免疫时间小鼠抗体水平变化(抗体1:100 000稀释)。Cut-off 值为阴性血清平均值的 2.1 倍。

图2 弗氏佐剂组和 CPG 联合氢氧化铝佐剂组免疫小鼠后抗体水平比较

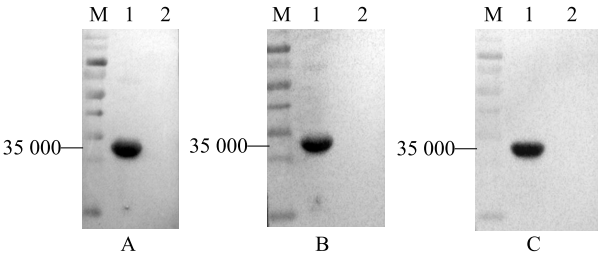
Fig.2 Comparison of antibody levels in mice immunized with Freund's adjuvant and CPG combined with aluminum hydroxide adjuvant



A: 肉眼可见融合后的细胞克隆团;B: 融合后 7 d 显微镜下细胞克隆团($\times 40$)。

图3 融合后 7 d 半固体培养基上生长的克隆团

Fig.3 Clonal clusters grown on semi-solid medium at seven days after fusion



A: 单克隆抗体 9A4;B: 单克隆抗体 9H6;C: 单克隆抗体 11F5。M: 蛋白质相对分子质量标准;1: pA104R 蛋白;2: 空载体转化大肠杆菌然后用 IPTG 诱导出的全菌蛋白。

图4 Western blot 检测单克隆抗体 9A4、9H6、11F5 特异性

Fig.4 Western blot for specificity of monoclonal antibodies 9A4, 9H6, 11F5

2.5 小鼠腹水制备及效价测定

将 3 株杂交瘤细胞分别注射至提前注射了液体石蜡的小鼠腹腔内,使小鼠产生腹水,收集腹水进行效价检测。9A4 细胞株针对 pA104R 效价为 1:

320 000,针对 ASFV 全病毒蛋白质效价为 1:200,9H6 和 11F5 细胞株针对 pA104R 效价为 1:160 000,针对 ASFV 全病毒蛋白质效价为 1:400。

2.6 有限稀释法和半固体培养法的比较

有限稀释法和半固体培养法相比较,半固体培养法在节省时间上优势明显,整个试验周期比有限稀释法缩短 28 d;有限稀释法在亚克隆过程中需要饲养细胞,且需要 3 次亚克隆,步骤繁琐,半固体法不需要饲养细胞,仅需要 1 次亚克隆(表 1),其中半固体法的亚克隆方法同有限稀释法,目的是鉴定克隆团的纯度。

表1 半固体培养法和有限稀释法制备单抗比较

Table 1 Comparison of preparation of monoclonal antibody by semi-solid culture method and limited dilution method

类别	有限稀释法	半固体培养基法
是否需要饲养细胞	是	否
融合后培养时间(d)	10±2	14±2
亚克隆次数	3	1
试验总周期(d)	56	28

3 讨论

单克隆抗体在人类和动物的疾病诊断、治疗领域发挥了重要作用。目前很多实验室制备单克隆抗体使用的方法仍然是传统的有限稀释法,亚克隆工作量大,想得到很纯的单克隆需要进行至少 3 次的亚克隆,而 3 次亚克隆至少需要 20~30 d,使用 5~10 块 96 孔板进行 ELISA 检测,耗时较长,工作量较大。更为重要的是,生长较快的细胞一般是不分泌

抗体的,它的快速生长影响阳性杂交瘤细胞的生长进而导致阳性克隆可能丢失。早在 1991 年国内就有报道,利用甲基纤维素制备半固体培养基,成功培养细胞集落而筛选出单抗细胞株^[19]。采用半固体培养基筛选单个克隆团,相互不混杂,每个克隆团都是独立生长于半固体培养基上,彼此之间不连接,在显微镜下挑选克隆团时同时吸取两个克隆团的几率很小,保证了每个克隆团的纯度。每融合 1 只小鼠,则可以得到几百上千个克隆团,大量的克隆团可增加筛选到高质量克隆团的概率,也可避免阳性克隆团因生长缓慢而被阴性克隆团覆盖导致阳性克隆团丢失的可能,无需进行多次亚克隆,可缩短约一半试验时间,节省培养基血清的消耗,可大量节约人力物力,降低试验成本^[16,20]。半固体培养基法也会出现假阳性,在将克隆团转移至 96 孔板中培养后第 1 次检测中可能会出现很多假阳性,在经过 2~3 次传代后检测得到的阳性克隆即为稳定的阳性杂交瘤细胞株,将得到的阳性杂交瘤细胞株连续培养 10 代仍然可以稳定分泌抗体,这一过程可淘汰掉抗体分泌不稳定的细胞株。本实验室总结分析多次制备单克隆抗体的数据,在抗体效价方面,有限稀释法和半固体培养法未见明显区别,因半固体培养法试验进程较快,遂本试验鉴定所用的 3 株杂交瘤细胞株均来自半固体法。

免疫佐剂作为 1 种增强剂在疫苗的研发和生产中发挥了至关重要的作用。不同的佐剂在动物体内可以产生不同的影响,选择合适的佐剂对提高免疫效果有促进作用。CpG ODN 是人工合成的有免疫刺激活性的 DNA 序列,它有和细菌 DNA 类似的免疫刺激作用,具有促进 Th1 免疫应答的特点,已在动物临床研究中证明其具有免疫活性,能诱导宿主产生细胞免疫和体液免疫应答,增强机体的免疫应答^[21]。CpG ODN 佐剂与氢氧化铝联合使用,可明显增强机体的免疫应答,产生高浓度的抗体^[22]。而不同类型的 CpG ODN 佐剂效应也有一定的差异,例如 GTCGTT 对人淋巴细胞具有良好的刺激活性,是人敏感基序;GACGTT 对鼠淋巴细胞有较好的刺激活性,是鼠敏感基序^[23-24],CpG ODN1826 是小鼠的最佳免疫佐剂。CpG ODN 可通过化学方法大量合成,以冻干粉形式保存,状态稳定便于运输,且具有易于质量控制,成本低等特点被广泛关注和研究,其在肿瘤和传染病等领域具有潜在的应用价值,在人

药和疫苗研发中被广泛应用,例如乙肝疫苗等^[25]。本研究以 ASFV 重组 pA104R 蛋白为抗原,CpG ODN 联合氢氧化铝为佐剂免疫小鼠,全程免疫时间 28 d 即可结束,而使用传统弗氏佐剂需要 42 d 的免疫时间,可节省 14 d 免疫时间。

本研究分别使用 CpG ODN 联合氢氧化铝免疫佐剂和 ASFV pA104R 蛋白、弗氏佐剂和 ASFV pA104R 蛋白免疫小鼠,通过半固体培养法和有限稀释法共得到 9 株阳性杂交瘤细胞,对其中的 3 株进行鉴定,均能和 ASFV 全病毒蛋白以及 pA104R 蛋白发生特异性反应。虽已有研究制备了 ASFV pA104R 蛋白的单克隆抗体,但其使用的佐剂为传统的弗氏佐剂,且使用传统有限稀释法制备单抗^[26]。相比于先前的报道,本研究获得的单克隆抗体 9A4、11F5、9H6 效价高,制备周期短,可节约大量的试验成本。本研究结果为 ASFV pA104R 蛋白功能鉴定和 ASFV 血清学诊断方法的建立奠定了重要基础,还为单克隆抗体制备提供了新的策略。

参考文献:

- [1] ALONSO C, GALINDO I, CUESTA-GEIJO M A, et al. African swine fever virus-cell interactions: from virus entry to cell survival [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 42-57.
- [2] 华利忠,冯志新,张永强,等. 以史为鉴,浅谈中国非洲猪瘟的防控与净化[J]. *中国动物传染病学报*, 2019, 27(2): 96-104.
- [3] ALONSO C, BORCA M, DIXON L, et al. ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae [J]. *Journal of General Virology*, 2018, 99(5): 613-614.
- [4] LABROUSSA F, MEHINAGIC K, CIPPA V, et al. In-yeast reconstruction of the African swine fever virus genome isolated from clinical samples [J]. *STAR Protocols*, 2021, 2(3): 100803.
- [5] LI D, ZHANG J, YANG W, et al. African swine fever virus protein MGF-505-7R promotes virulence and pathogenesis by inhibiting JAK1- And JAK2-mediated signaling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 297(5): 101190.
- [6] FROUCO G, FREITAS F B, COELHO J, et al. DNA-binding properties of african swine fever virus pA104R, a histone-like protein involved in viral replication and transcription [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(12). DOI: 10.1128/JVI.02498-16.
- [7] NEILAN J G, LU Z, KUTISH G F, et al. An African swine fever virus gene with similarity to bacterial DNA binding proteins, bacterial integration host factors, and the *Bacillus* phage SPO1 transcription factor, TF1 [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(6): 1496.
- [8] BORCA M, IRUSTA P, CARRILLO C, et al. A structural DNA binding protein of African swine fever virus with similarity to bacte-

- rial histone-like proteins[J]. Archives of Virology, 1996, 141(2): 301-313.
- [9] REIS A L, PARKHOUSE R M, PENEDOS A R, et al. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus[J]. Journal of General Virology, 2007, 88(9): 2426-2434.
- [10] 王兆贵, 赵亚茹, 杨吉飞, 等. 基于非洲猪瘟病毒 pA104R 蛋白的间接 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(4): 403-411.
- [11] TOKUNAGA T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1984, 72(4): 955-962.
- [12] KRIEG A M, YI A K, MATSON S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. Nature, 1995, 374(6522): 546-549.
- [13] 李洁琼. CpGODN 对 Treg 细胞及 Th17 细胞分化的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2015, 44(4): 383-400.
- [14] 秦宏超, 芮程磊, 陈文艳, 等. TLR9 激动剂 CpG ODN 对 B 细胞分泌细胞因子的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2016, 1(2): 17-21.
- [15] 王丽丽, 马 波, 钱 雯, 等. 铝佐剂吸附 CpG ODN 增强重组乙肝疫苗免疫效应[J]. 免疫学杂志, 2015(31): 53-57.
- [16] 王保君, 陈实平. 在甲基纤维素半固体培养基上制备抗人黄体生成素 McAb[J]. 中国医学科学院学报, 1992, 14(5): 382-385.
- [17] 刘 帆, 王 萍, 魏 威, 等. 半固体培养基法制备单抗的可行性研究[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(4): 383-386, 495.
- [18] 陈 蓉, 赵 琳, 王 婉, 等. 非洲猪瘟病毒亲核结构蛋白 p10 的可溶性表达及多克隆抗体的制备[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2021, 42(6): 62-67.
- [19] 陈实平. 在半固体培养基上制备单克隆抗体[J]. 解剖学报, 1991(2): 176.
- [20] 刘 帆, 王 萍, 魏 威, 等. 半固体培养基法制备单抗的可行性研究[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(4): 383-386, 495.
- [21] KAYRAKLIOGLU N, HORULUOGLU B, KLINMAN D M. CpG oligonucleotides as vaccine adjuvants [J]. Methods in Molecular Biology, 2021, 2197: 51-85.
- [22] MANGSBO S M, SANCHEZ J, ANGER K, et al. Complement activation by CpG in a human whole blood loop system: mechanisms and immunomodulatory effects[J]. Journal of Immunology, 2009, 183(10): 6724-6732.
- [23] VOLLMER J, WEERATNA R, PAYETTE P, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities [J]. European Journal of Immunology, 2010, 34(1): 251-262.
- [24] KRIEG A M, HARTMANN G, YI A K. Mechanism of action of CpG DNA[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2000, 247: 1-21.
- [25] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO expert consultation on rabies; second report[R]. Geneva: WHO Press, 2013.
- [26] 王露露, 皇甫皓月, 席 飞, 等. 非洲猪瘟病毒 pA104R 蛋白单克隆抗体的制备与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(11): 1214-1218.

(责任编辑: 成纾寒)