

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.05.034

恒河猴犬瘟热病毒基因疫苗单克隆抗体的制备

邱 薇, 王文博, 胡挺松, 郭 平, 周卫国, 张富强, 郑 颖, 范泉水
(成都军区疾病预防控制中心, 昆明 650118)

摘要: 从感染犬瘟热病毒死亡的恒河猴肝脏组织中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增 H 全基因并克隆到真核表达质粒 pVAX 中, 构建了基因疫苗 pVAX-H. 用制备的基因疫苗免疫 Balb/c 小鼠, 小鼠可以产生免疫应答, 免疫鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合后, 经间接 ELISA 法筛选, 获得 5 株稳定分泌抗 CDV H 蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞株. 该 5 株单抗对应不同的病毒抗原表位, 且均不与 CPV 和 MV 发生反应, McAb 诱生的腹水可体外中和犬瘟热病毒, 其中 2 株中和效价大于 1 : 256. 结果表明, CDV H 基因疫苗可制备具有一定中和效价的抗 CDV 的单克隆抗体.

关键词: 恒河猴; 犬瘟热病毒; 基因疫苗; 单克隆抗体

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)05-1089-05

Preparation of monoclonal antibody against canine distemper virus of rhesus monkey using gene vaccine

QIU Wei, WANG Wen-Bo, HU Ting-Song, GUO Ping, ZHOU Wei-Guo,
ZHANG Fu-Qiang, ZHENG Ying, FAN Quan-Shui

(Center for Disease Control and Prevention, Chinese PLA Cheng Du Military Command, Kunming 650118)

Abstract: To prepare the monoclonal antibody of Canine distemper virus which infect rhesus monkey, the H gene of the virus was amplified by RT-PCR and cloned into pVAX. The DNA vaccine pVAX-H was injected into Balb/c mice and induced a strong immunity. The spleen cells were fused with SP2/0 cells and 5 hybridoma strains secreting monoclonal antibodies against CDV H gene were achieved. The five different McAbs didn't react with CPV and MV but could neutralize CDV in vitro. Two of them had high neutralization antibody above 1 : 256. The result import that the CDV H gene vaccine can be used to prepare monoclonal antibody.

Keywords: Rhesus monkey ; Canine Distemper virus; Gene vaccine; Monoclonal antibody

1 引言

犬瘟热病毒(Canine parvovirus, CDV)属副粘病毒科麻疹病毒属成员,其引起的犬瘟热是当前对我国养犬业、毛皮动物养殖业和野生动物保护业危害最大的传染病,经常引起大批犬、貂、狐等动物发

病,病死率 30%~80%,雪貂高达 100%,经济损失惨重. CDV 自然感染的动物范围在不断扩大,特别是恒河猴等灵长类动物的 CDV 感染^[1,2],使 CDV 的危害更加突出.

犬瘟热病毒为负链单股不分节段的 RNA 病毒,其基因组全长 15690 个核苷酸,编码 6 种蛋白,

收稿日期: 2016-11-15

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研重大专项(201303042)

作者简介: 邱薇(1971-),女,云南昆明人,主要从事动物病毒学、分子生物学研究. E-mail: qiuwei1971@126.com

通讯作者: 范泉水. E-mail: fqs168@126.com

其中 H 蛋白是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白之一,是 CDV 感染细胞过程中侵袭宿主所必须的,决定着病毒感染细胞嗜性.近年来国内外许多研究发现野毒株与疫苗株的 H 蛋白基因存在较大差异,认为可能与犬瘟热频繁爆发有一定的联系^[3].H 蛋白也是抗 CDV 免疫的很重要的抗原,抗 CDV H 蛋白单克隆抗体(McAb)具有中和病毒活性,对实验鼠的保护力强于抗 F 蛋白的 McAb^[4].抗 CDV H 蛋白 7 个抗原决定簇中的 6 个 McAb 能中和 CDV,阻止 CDV 的感染.H 蛋白基因序列的系统发生分析表明 CDV 存在不同基因型,新分离病毒 H 蛋白基因的遗传变异可能是近来爆发 CD 的重要原因^[5-10].

McAb 技术已达 20 多年,可以说其各个方面都已经较完善,但它对抗原质量要求较高^[11],否则,如果抗原纯度不高,则杂交瘤的阳性率低,筛选工作困难,因而不易克隆到较多的 McAb,而那些针对非优势抗原表位的 McAb 又更难筛选到.应用基因疫苗制备单抗为免疫学研究及疾病治疗提供了一个全新的方法.Barry A 报道了利用基因疫苗制备抗人生长激素单克隆抗体,从而首次证明了基因免疫制备单克隆抗体的可行性^[12].以基因疫苗作免疫原只须克隆得到该抗原蛋白基因,然后构建成真核表达质粒即可,简单省时,并且基因疫苗产生的抗原蛋白绝对纯净,且其存在状态与天然的完全一致^[13],容易研制得到高质量的 McAb.

恒河猴感染 CDV 引起的疫病在部分养猴场、野生动物园及动物实验中心等造成了严重的影响,本研究针对猴源 CDV 进行了通过构建 H 基因的基因疫苗来制备单克隆抗体的研究,以期能获得可用于治疗或检测的单克隆抗体.

2 材料与方法

2.1 材料

E. coli JM109、BL21(DE3)pLysS、真核表达载体 pVAX、Vero 传代细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞由本室保存. Balb/c 小鼠购自昆明医学院实验动物中心.

病毒总 RNA/DNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒(小量)柱式提取试剂盒及其它试剂均购自 TaKaRa 生物技术有限公司.引物合成及测序由上海生物工程技术服务有限公司完成.

2.2 方法

2.2.1 引物合成 根据已发表 CDV Onderstepoort 株的序列,设计合成了一对引物,在其 5'端引物引入 *Bam*H I 酶切位点,3'端引物引入 *Eco*R I 酶切位点.用 ddH₂O 按 20pM 稀释,-20℃ 冻存.引物序列:P1:5'-GCAGGATCCAT-GCTCTCCTACCAAGACAAG-3',P2:5'-GCCGATTTCATCTAAGTCCAATTGAGAT-3'

2.2.2 猴源 CDVH 基因的克隆 按病毒总 RNA/DNA 提取试剂盒说明书提取发病死亡猴肝组织的总 RNA,以总 RNA 为模板,应用合成的特异引物进行 RT-PCR.反应体系为 10×one step RNA PCR Buffer 5μL,dNTP(各 10mM)5μL,MgCl₂(25mM)10μL,上下游引物各 1μL,RNase Inhibitor(40U/μL)1μL,Amv XL 酶 1μL,Amv Taq 酶 1μL,总 RNA 模板 2μL,加 RNase Free H₂O 至总反应体积为 50μL.扩增条件:50℃ 反转录 45min,94℃ 变性 2min,35 个循环为 95℃ 15s,50℃ 30s,70℃ 30s;72℃ 延伸 10min,4℃ 保存.取 5μL 进行凝胶电泳,紫外灯下观察结果.电泳回收 H 蛋白基因片段并与用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后与回收的 pVAX 载体进行连接,然后转化大肠杆菌,筛选阳性克隆并测序.

2.2.3 单克隆抗体的制备 将阳性克隆质粒制成基因疫苗后免疫 Balb/c 小鼠.选择 8~12 周龄 Balb/c 小鼠,每只鼠两后肢胫前肌各注射 50μL 乳化的质粒,两周后加强免疫同样剂量的质粒,融合前 10d 最后一次免疫.第一次免疫后第 3 周和第 5 周分别采血,测定抗体水平.将免疫鼠的脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞的(SP2/0)融合并将融合细胞加入到含有饲养细胞的 96 孔培养板中,每孔 50μL,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养.用间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞,阳性杂交瘤细胞经 3~4 次克隆纯化.

2.2.4 腹水的制备 将 0.5mL 高压灭菌的石蜡油注射到小鼠腹腔,一周后注入 1×10⁶ 个杂交瘤细胞于小鼠腹腔.7~10d 后当小鼠腹部极度膨胀时,抽取腹水,1500r/min 离心 10min,取上清,加等体积的灭菌甘油,混匀,放-20℃ 冰箱冻存备用.沉淀的细胞可作进一步培养或注射小鼠之用.

2.2.5 杂交瘤细胞上清与腹水效价的测定 将杂交瘤细胞上清用 PBS 分别作 4×、8×、16×、32×、64×、128×、256× 稀释,作间接 ELISA 检测,正常 SP2/0 细胞培养上清作阴性对照,OD 值超过阴性

对照 1 倍即判为阳性,其最大稀释度为杂交瘤细胞上清的抗体效价. 将制备的腹水用 PBS 分别作 6.4×10^2 、 1.28×10^3 、 2.56×10^3 、 5.12×10^3 、 1.024×10^4 、 2.048×10^4 稀释,做间接 ELISA 检测,正常小鼠腹水作阴性对照,每个细胞株腹水 2 孔重复,取其平均 OD 值,OD 值超过阴性对照 1 倍即判为阳性,其最大稀释度为杂交瘤细胞腹水的抗体效价.

2.2.6 单克隆抗体特异性鉴定 用犬瘟热病毒(CDV)、麻疹病毒(MV)、犬细小病毒(CPV)、以及 Vero 细胞分别包被酶标板,加入 1 : 2000 稀释的腹水,进行间接 ELISA,检测制备的 McAb 的特异性.

2.2.7 单克隆抗体对应抗原表位分析 在 CDV 抗原包被的酶标板中,先加入第一株 McAb 与之反应,洗涤后再加入另一株 McAb 与之反应,两株 McAb 均用 1 : 100 稀释的腹水,反应完毕后,再加入兔抗鼠 IgG-HRP 与之反应、洗涤、显色、测定 OD 值. 受试的 McAb 均两两配对,根据相加 ELISA 试验的 OD 值的变化来分析各株 McAb 所对应的病毒抗原表位之间的关系.

2.2.8 单克隆抗体体外中和试验 采用固定病毒稀释抗体的中和试验法分析 McAb 在细胞上对 CDV 的中和能力. 用 MEM 营养液将 CDV 的细胞培养物稀释成 $200\text{TCID}_{50}/0.1\text{mL}$,将无菌采取的各 McAb 腹水分别用 MEM 营养液做 $64 \times$ 、 $128 \times$ 、 $256 \times$ 、 $512 \times$ 、 $1028 \times$ 、 $2056 \times$ 稀释,取每个稀释度的腹水 0.1mL 加入 0.1mL 病毒液,37°C 置 1h,然后同步接种到 Vero 细胞培养孔中,每稀释度重复 4 孔,于 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下继续培养,观察其生长情况. 同时设立病毒、阳性血清、阴性血清(正常 Balb/c 小鼠血清)、腹水和营养液对照.

3 结果与分析

3.1 CDV H 基因疫苗的克隆

用引物 P1-P2 对猴肝组织进行 RT-PCR 扩增,扩增片段的理论值分别为 1859bp,PCR 产物电泳结果与理论值相符(见图 1). 回收扩增片段与载体连接,筛选到的阳性克隆经测序并与 KM-01 株(HM852904)的 H 基因序列和氨基酸序列相比较,同源性均为 100% 且阅读框架正确,将重组质粒命名为 pVAX-H,即为构建的基因疫苗.

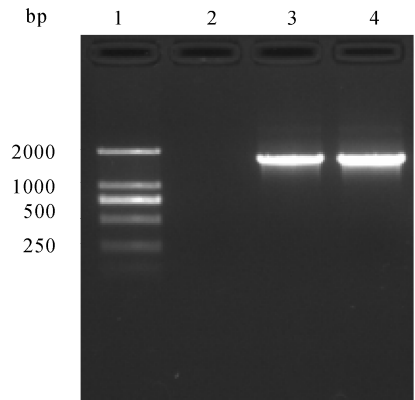


图 1 犬瘟热病毒 H 基因 RT-PCR 扩增结果
1. DNA Marker(2000, 1000, 750, 500, 250, 100),
2. 阴性对照,3. 阳性对照,4. 猴 CDV H 基因扩增结果

Fig. 1 The results of RT-PCR of CDV H gene

3.2 单克隆抗体的制备

基因疫苗免疫 Balb/c 小鼠后,分别在第 3 周和第 5 周对经基因疫苗免疫的小鼠采血,血清按 1 : 200 稀释,间接 ELISA 检测抗体水平,检测结果见表 2. pVAX-CDV H 基因疫苗免疫小鼠可诱导免疫应答,第二次免疫后血清中抗体水平明显高于第一次免疫. 其中 2 号和 6 号小鼠抗体水平较高,选其脾脏做细胞融合.

表 1 基因免疫 Balb/c 小鼠血清抗体检测结果

Tab. 1 Detection of the antibody of genetic immunized Balb/c mouse

采血时间	免疫小鼠序号								对照
	1	2	3	4	5	6	7	8	
免疫前	0.068	0.076	0.065	0.049	0.063	0.082	0.053	0.058	0.021
第 3 周	0.105	0.152	0.096	0.067	0.081	0.198	0.068	0.089	0.052
第 5 周	0.200	0.265	0.160	0.142	0.163	0.286	0.158	0.188	0.055

融合后的杂交瘤细胞经间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞,阳性杂交瘤细胞经 4 次克隆纯化,获得了 5 株稳定分泌抗犬瘟热病毒 H 蛋白的杂交瘤细胞株.

3.3 杂交瘤细胞上清与腹水效价的测定

将杂交瘤细胞上清用 PBS 分别作 $4 \times$ 、 $8 \times$ 、 $16 \times$ 、 $32 \times$ 、 $64 \times$ 、 $128 \times$ 、 $256 \times$ 、 $512 \times$ 稀释,正常 SP2/0 细胞培养上清作阴性对照,每个细胞株上清做 2 孔

重复,间接 ELISA 检测,结果见表 3;将制备的腹水用 PBS 分别作 3.2×10^3 、 6.4×10^3 、 1.28×10^4 、 2.56×10^4 、 5.12×10^4 、 1.024×10^5 稀释,正常小鼠

腹水作阴性对照,每个细胞株腹水做 2 孔重复,间接 ELISA 检测,结果见表 4.

表 2 杂交瘤细胞株上清效价测定(OD 值)

Tab. 2 Detection of the titer of supernatant of hybridomas

McAb	稀释倍数								N	效价
	4×	8×	16×	32×	64×	128×	256×	512×		
McAbH-1	0.432	0.310	0.256	0.120	0.096	0.073	0.069	0.068	0.065	3.2×10^{-1}
McAbH-2	0.455	0.319	0.267	0.151	0.112	0.097	0.092	0.086	0.084	6.4×10^{-1}
McAbH-3	0.511	0.467	0.402	0.353	0.212	0.171	0.114	0.093	0.092	2.56×10^{-1}
McAbH-4	0.462	0.403	0.357	0.208	0.145	0.098	0.087	0.085	0.081	6.4×10^{-1}
McAbH-5	0.452	0.304	0.248	0.148	0.106	0.085	0.085	0.084	0.082	6.4×10^{-1}
SP2/0	0.116	0.102	0.097	0.090	0.085	0.078	0.067	0.063		

表 3 小鼠腹水效价的测定(OD 值)

Tab. 3 Detection of the titer of ascites of Balb/c mouse

McAb	稀释倍数						N	效价
	3.2×10^3	6.4×10^3	1.28×10^4	2.56×10^4	5.12×10^4	1.024×10^5		
McAbH-1	0.456	0.348	0.275	0.189	0.163	0.152	0.130	2.56×10^{-4}
McAbH-2	0.531	0.403	0.321	0.257	0.172	0.165	0.152	5.12×10^{-4}
McAbH-3	0.589	0.453	0.387	0.298	0.191	0.172	0.168	1.02×10^{-5}
McAbH-4	0.527	0.411	0.215	0.169	0.153	0.143	0.142	5.12×10^{-4}
McAbH-5	0.528	0.498	0.314	0.239	0.168	0.157	0.148	5.12×10^{-4}
SP2/0	0.306	0.249	0.197	0.189	0.175	0.138		

3.4 单克隆抗体对应抗原表位分析

对 5 株 McAb 两两配对进行 ELISA 相加试验,两抗体相加后的 OD 值均明显升高,表明这 5 株 McAb 所对应的病毒抗原表位不同(表 5).

表 4 单克隆抗体相加 ELISA 试验(OD 值)

Tab. 4 Results of additivity ELISA for the monoclonal antibodies

细胞株	细胞株				
	McAbH-1	McAbH-2	McAbH-3	McAbH-4	McAbH-5
McAbH-1	0.650	0.982	1.26	1.07	0.968
McAbH-2	0.967	0.683	1.21	1.16	0.983
McAbH-3	1.27	1.19	0.662	1.08	1.18
McAbH-4	1.05	1.15	1.05	0.659	1.06
McAbH-5	0.964	0.986	1.12	1.08	0.665

3.5 单克隆抗体的特异性鉴定

间接 ELISA 结果表明,5 株 McAb 只与 CDV 发生反应,均不与试验中的 CPV、MV 及 Vero 细胞抗原发生反应(见表 6).

3.6 单克隆抗体中和试验

在病毒中和试验中,McAbH-2 和 McAbH-3 两株单抗对病毒有较强的中和能力,腹水的中和效价分别为 1:256 和 1:512,而其它 3 株 McAb 腹水的中和效价小于 1:128.

表 5 单克隆抗体的特异性鉴定结果

Tab. 5 Specificity of monoclonal antibodies

细胞株	病毒株			
	CDV	CPV	MV	Vero
McAbH-1	+	-	-	-
McAbH-2	+	-	-	-
McAbH-3	+	-	-	-
McAbH-4	+	-	-	-
McAbH-5	+	-	-	-

“+”阳性结果 The result was positive

“-”阴性结果 The result was negative

4 讨论

单克隆抗体技术已经 20 多年,可以说其各方面都已较完善,但它要求抗原质量较高,因而,一些稀有抗原、不易纯化或纯化后易失效的抗原,均不易研制出高质量的单抗.但以基因疫苗作免疫原只需克隆得到该抗原蛋白基因,然后构建成真核表达质粒即可得到特异性单抗.应用基因疫苗制备单抗为免疫学研究及疾病治疗提供了一个全新的方法.人们可以根据需要,将针对任何抗原表位的基因克隆到真核表达载体中,免疫小鼠制备所需的抗体.可以将具有某种病原体属、型、群特征的基因克隆

至真核表达载体中,制成基因疫苗免疫小鼠,得到可用于鉴别目的的的单抗.对那些难以制备和纯化的抗原以及在纯化过程中结构易被破坏的抗原来说尤为适用.对于一些烈性传染病,应用基因疫苗制备单抗,比直接用病原体作抗原要安全得多.

到目前为止,已有基因免疫制备单抗的报道.

Barry等(1994)以人生长激素(hGH)的基因疫苗免疫 Balb/c 小鼠,一次融合,即克隆筛选到 20 株抗 hGH 的单抗,这是最早以基因疫苗制备单抗的报道,从而首次证明了基因免疫制备单抗的可行性. Schmolke 等(1998)以人乙型肝炎病毒(HGV)E2 糖蛋白基因疫苗研制出 8 株抗 HGV 的单抗,用于鉴定 HGV 病毒粒子,这为基因疫苗及其单抗的研制提供了强有力的技术支持.

对犬瘟热病毒单抗的研究也是犬瘟热抗体研究的热点之一,之前已用疫苗株和水貂源犬瘟热病毒分离株制备了单抗,获得了效价较高的 CDV 单抗^[14,15]. 还有以 CDV F 基因原核表达产物为免疫原,制备犬瘟热 F 蛋白单克隆抗体^[16]. 本研究通过基因疫苗免疫制备单抗的方法制备 CDV H 基因的单抗,为 CDV 的快速诊断方法研究与改进及 CDV 的治疗奠定基础. 由于基因免疫抗原的表达有个过程,表达出抗原后,诱导机体产生抗体也需要一段时间,所以在实验中将检测血清抗体的时间较传统的蛋白免疫的检测时间适当延长,即第一次采血是在初次免疫后第 3 周,第二次采血是在第 5 周,使表达的抗原能充分诱导机体产生抗体,才能获得好的杂交瘤细胞株. 本实验在细胞融合后获得了十余株稳定分泌抗犬瘟热病毒 H 蛋白抗体的杂交瘤细胞株,但在多次克隆纯化的过程中,由于污染、效价过低及其他原因,使最终获得的单抗杂交瘤细胞株仅有 5 株,可通过多次融合、筛选的办法来增加获得的杂交瘤细胞株数量. 通过基因疫苗免疫制备单抗的方法研制的单抗效价普遍不够高,但有可能从中发现尽管效价不高但特异性较好的单抗,为下一步研究血清学快速诊断方法奠定基础.

参考文献:

- [1] Sun Z, Li A, Ye H, *et al.* Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 141: 374.
- [2] Qiu W, Zheng Y, Zhang S, *et al.* Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17: 1541.
- [3] Harder T C, Kenter M, Vos H, *et al.* Canine distemper virus from diseased Large felids: biological properties and phylogenetic relationships[J]. *Gen ViroL*, 1996, 77: 397.
- [4] Hirayama-N, Senda-M, Nakashima-N, *et al.* Protective effects of monoclonal antibodies against lethal canine distemper virus infection in mice[J]. *Gen-Virol*, 1991, 72: 2827.
- [5] Haas L, Martens W, Greiser-Wilke I, *et al.* Analysis of the hemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany[J]. *Virus Res*, 1997, 48: 175.
- [6] Iwatsuki K. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs[J]. *Gen Virol*, 1997, 78: 373.
- [7] Bolt G. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus[J]. *Gen ViroL*, 1997, 78: 367.
- [8] Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, *et al.* Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 2936.
- [9] Loffler-S, Lottspeich-F, Lanza-F, *et al.* CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus[J]. *ViroL*, 1997, 71: 42.
- [10] 何洪彬, 李金中, 夏咸柱, 等. 熊猫等动物犬瘟热病毒附着蛋白基因的遗传多样性[J]. *病毒学报*, 2000, 17: 238.
- [11] Schmolke S. Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-specific monoclonal antibodies generated by DNA immunization[J]. *J Virol*, 1998, 72: 4541.
- [12] Barry A. Production of monoclonal antibodies by Genetic immunization [J]. *Biotechniques*, 1994, 16: 616.
- [13] Iwasaki A, Stiernholm B J, Chan A K, *et al.* Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines[J]. *J Immunol*, 1997, 158: 4591.
- [14] 苏建青, 岳妙姝, 王化磊, 等. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及特性鉴定[J]. *吉林农业大学学报*, 2009, 31: 88.
- [15] 史秋梅, 潘素敏, 贺英, 等. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备和鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2013, 45: 81.
- [16] 焦金波, 黄娟, 秦晓冰, 等. 犬瘟热病毒 F 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36: 10899.