抗传染性法氏囊病病毒 VP5 蛋白单克隆抗体的制备与初步应用

Preparation and Primary Analysis of Monoclonal Antibodies against VP5 protein of chicken Infectious Bursal Disease Virus

张 宁[1,2],高宏雷[1],高玉龙[1],李俊山[1,3],王晓艳[1],冉多良[1],王笑梅[4*]

ZHANG Ning[1,2], GAO Hong-Lei[1], GAO Yu-Long[1], LI Jun-Shan[1,3], WANG Xiao-Yan[1], RAN Duo-Liang[2] and WANG Xiao-Mei[4*]

1 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 禽传染病研究室,哈尔滨 150001
2 新疆农业大学动物医学院,乌鲁木齐 830052
3 东北农业大学动物医学院,哈尔滨 150036
4 黑龙江省农业科学院 博士后科研工作站,哈尔滨 150001

1 *Division of Avian Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin* 150001, *China*
2 *Department of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumchi* 830052, *China*
3 *Department of Veterinary Medicine, Northeast Agriculture University, Harbin* 150036, *China*
4 *Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Post-Doctorate Scientific Mobile Station, Harbin* 150001, *China*

摘 要 原核表达的 IBDV Gx-VP5 蛋白经纯化后免疫 8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠,三次基础免疫后,融合前加强免疫,取脾细胞在 PEG(MW1500)的作用下与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合,经过三次亚克隆筛选,获得稳定分泌抗 VP5 蛋白的杂交瘤细胞,分别命名为 4B4、6D12、3E8,以三株杂交瘤细胞制备的腹水 ELISA 效价分别为 5×10^4、3.5×10^4、3×10^4,特异性实验表明三株单抗能与 IBDV Gt 株反应。以单抗介导的间接免疫荧光检测表达 Gt-VP5 的 Vero E6 细胞,可以见到特异的荧光,能做为特异性的检测 VP5 蛋白的工具,为今后 IBDV VP5 蛋白的研究打下基础。

关键词 IBDV,VP5 蛋白,单克隆抗体,Vero E6 细胞

中图分类号 TQ93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2007)04-0719-05

Abstract Infectious bursal disease virus (IBDV), the causative agent of a highly contagious disease in chickens, carries a small nonstructural protein (NS). In this study, vvIBDV Gx-VP5 genes were cloned into plasmid pET30a(+) and expressed in *E. coli* with IPTG inducing. BALB/c mice were immunized with the purified recombinant fusion protein. SP2/0 myeloma cells and spleen cells of BALB/c mice were fused by PEG(MW1500), three hybridoma cell lines were examined by indirect ELISA and clone for three times by limited dilution, and were named as 4B4, 6D12, 3E8. The subtype of the monoclonal antibodies were IgG1 with a subtype identified ELISA kit, and light chains were kappa. The ascites titers of monoclonal antibodies were 5×10^4, 3.5×10^4, 3×10^4 by indirect ELISA, respectively. Indirect ELISA and Western blot results showed that the monoclonal antibodies only acted with VP5 protein, IF analysis indicated that three monoclonal antibodies acted with IBDV Gt.

Received: December 12, 2006; Accepted: January 4, 2007.

This work was supported by a grant from the National Basic Research Program of China(No. 2005CB523202).

* Corresponding author. Tel: +86-451-85935047; Fax: +86-451-82733132; E-mail: XMW@hvri.ac.cn

国家 973 重点基础研究发展规划项目(No. 2005CB523202)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

There were specific fluorescence in detected Vero E6 cells which transient expressed VP5 protein by IFA. Therefore, monoclonal antibodies specific to IBDV VP5 proteins are specific method for detected VP5 proteins, and base on establish stabilize expressed VP5 protein Vero cell lines to research IBDV VP5 protein function.

Key words infectious bursal disease virus (IBDV), VP5 proteins, monoclonal antibodies, Vero E6 cell

传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus,IBDV)是引起鸡高度接触性传染病——传染性法氏囊病(Infectious bursal disease,IBD)的病原体。此病毒复制于感染细胞的胞浆中,并靶向于法氏囊产生抗体的前体B淋巴细胞,引起B淋巴细胞凋亡及法氏囊萎缩,导致免疫抑制[1]。不同毒株毒力不同,感染鸡的死亡率最高可达95 %以上,由于IBDV引起的免疫抑制造成其他疫苗的免疫失败而导致间接损失则更为严重。IBDV是双链RNA病毒,属于双RNA病毒科(*Bironviridae*)禽双RNA病毒属(*Avibincvirus*),单层衣壳,无囊膜,呈20面体立体对称,其直径55 ~ 65nm。其基因组由大节段A(3.3kb)、小节段B(2.8kb)组成,A节段具有两个相互重叠的开放阅读框架(Open reading frames,ORF)——大ORF和小ORF,大ORF为3036个核苷酸,编码108KDa的NH_2-VP2/VP4/VP3-COOH多聚蛋白前体,并剪切加工为三个成熟的蛋白VP2(45 ~ 50KDa)、VP3(20 ~ 32kD)、VP4(28kD)。小ORF为438个核苷酸,编码145个氨基酸,大小为17kD的非结构蛋白(NS) VP5蛋白。B节段ORF为2795个核苷酸,编码90kD的VP1蛋白。此外A、B节段还存在末端非编码区(non-coding region,NCR)。A、B节段之间通过VPg(VP1的一种形态)蛋白相连。

VP5蛋白富含半胱氨酸,高度碱性,编码VP5蛋白的小ORF与大ORF之间有404bp的重叠区域。Mundt等1995年[2]发现在IBDV感染的细胞中有此蛋白,随后利用反向遗传操作证明VP5在体外IBDV复制中是非必需的。VP2是病毒的主要结构蛋白,与病毒抗原和毒力的变异、细胞凋亡有关,但缺失了VP5后拯救的病毒失去了对鸡的致病性,VP5在体内的表达使细胞病变减轻,复制变慢,细胞上清液中的病毒量降低,诱导了细胞调亡,具有很强的细胞毒性[3],有学者拯救了缺失VP5基因的IBDV ANhe病毒株能在鸡胚成纤维细胞(CEF)和鸡胚上繁殖,其复制速度相对母本(HZ2)只有轻微降低[4]。最新研究认为VP5在病毒感染早期是一个抗细胞凋亡因子,对病毒的早期感染和迅速增殖具有重要意义[5],而dsRNA病毒科另一病毒IPNV,无论是在体内还是在体外其VP5与IPNV细胞凋亡诱导能力均无关[6],目前这种不一致性的分子机制还不清楚。

自1975年Kohler与Milstein建立的杂交瘤技术以来,单克隆抗体技术已广泛应用于基础研究的各个领域,同时在临床疾病的诊断和治疗中也得到了广泛的应用[7]。国外学者Mundt早在发现VP5蛋白后就获得了抗VP5蛋白的单克隆抗体,而在国内还没有相关的报道,本研究利用原核表达的IBDV Gx-VP5蛋白纯化后免疫BALB/c小鼠,运用单克隆抗体技术进行抗VP5蛋白单克隆抗体的研究工作。

1 材料与方法

1.1 菌株、毒株与细胞、试剂

vvIBDV-Gx株(GenBank登陆号AY444873)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所分离鉴定[8],通过鸡胚及鸡胚成纤维细胞连续传代致弱获得了疫苗株IBDV-Gt(GenBank登陆号DQ403248),免疫用表达菌株*E. coli* BL21(DE3)由本实验室保存;SP2/0骨髓瘤细胞,Vero E6细胞系均由本实验室保存;BALB/c小鼠、SPF鸡胚购于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心;Montanide ISA 206佐剂购自法国SEPPIC公司;PEG(MW1500)、HRP-兔抗鼠IgG酶标结合物、FITC-兔抗鼠IgG酶标结合物购自Sigma公司;96孔聚乙烯细胞培养板、优质胎牛血清、HAT、HT及DMEM培养基购自Invitrogen公司;单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购于Persen公司;其他试剂为商业公司购买的分析纯产品。

1.2 免疫原制备及动物免疫

将原核表达的带有His标签的重组VP5蛋白进行大量诱导[9],收集菌体,超声波裂解,电泳纯化,将纯化的目的蛋白经紫外分光光度计定量后与等量的Montanide ISA 206佐剂混合乳化,腹腔及背部皮下多点注射8周龄的BALB/c雌性小鼠,50μg/只,以后每隔14 d用佐剂乳化的蛋白免疫3次,剂量同首免,融合前三天经尾静脉及腹腔加强免疫,剂量加倍。

1.3 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选与纯化

用纯化的原核表达的Gx-VP5蛋白作为抗原包被反应板,用方阵滴定试验确定抗原最佳包被浓度,待检抗体最佳工作浓度等,用于单克隆抗体的筛选。

融合前取正常小鼠的腹腔巨噬细胞作为饲养细胞铺于96孔细胞培养板中,37℃ CO_2培养箱中培养24h,然后取免疫小鼠的脾细胞与SP2/0细胞以1∶10

的比例在融合剂 PEG（MW1500）作用下进行细胞融合，融合过程按文献[10]的方法进行。细胞融合后加入选择培养基 HAT，于 37℃ CO_2 培养箱选择培养约 7～10d，当有融合细胞出现时，更换 HT 培养基继续培养。待 12～14d 克隆长大时即可进行检测。

以纯化的 Gx-VP5 蛋白作为检测抗原，按已建立的间接 ELISA 方法对融合细胞上清液进行检测，筛选阳性细胞克隆株。将初步筛选得到的阳性克隆株用有限稀释法进行三次亚克隆，同时用间接 ELISA 方法进行检测，当其检测率为 100% 阳性时，即得到了能稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞克隆，分别扩大培养，冻存于液氮中长期保存。

1.4　单克隆抗体腹水的制备及效价的测定

取 8w 龄的 BALB/c 雌性小鼠预先 7～10d 注射液体石蜡，0.1mL/只，取对数生长期的阳性杂交瘤细胞分别以 $2～3\times10^5$ cell/0.5mL 的剂量注入小鼠腹腔，约 7～10d 左右，当小鼠腹腔增大时抽取腹水，4000r/min，8min，离心取上清，－70℃保存备用。

以纯化的 Gx-VP5 蛋白为抗原，将杂交瘤上清及腹水分别按原倍、1∶100 开始做倍比稀释，用已建立的间接 ELISA 方法测定其效价，当 P/N 值大于 3 倍时判定为阳性。

1.5　单克隆抗体的特异性鉴定

按文献[11]的方法制作鸡胚成纤维细胞(CEF)，用 IBDV Gt 株感染 CEF，24h 后用 100% 无水乙醇室温固定 20min，分别用抗 IBDV VP5 多抗、抗 IBDV 阳性鼠血清、阴性血清及本试验制备的单克隆抗体为一抗，以 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗，按常规间接免疫荧光(IFA)试验方法进行检测。

用 IBDV Gt 株感染 CEF 12h、24h 后收集的病毒 10 倍稀释液，VP5、VP1、VP2 蛋白包被 ELISA 反应板，以筛选的三株杂交瘤细胞株腹水为一抗 1∶50 开始倍比稀释进行 ELISA 检测；以原核表达的 Gx-VP5、Gt-VP5 蛋白进行 SDS-PAGE 后，转印至硝酸纤维素膜(NC 膜)上，进行 Western blot 分析。

1.6　单克隆抗体稳定性及亚类鉴定

将筛选到的阳性杂交瘤细胞株连续培养 25 代，运用已建立的间接 ELISA 方法及判定标准，取其中的 F5，F10，F15，F20，F25 代细胞上清测定其效价。按亚类鉴定试剂盒说明运用间接 ELISA 方法鉴定所属亚类。

1.7　单克隆抗体染色体分析

将筛选得到的三株杂交瘤细胞用秋水仙素处理，按常规方法[10]进行，收集细胞，观察计数。

1.8　单克隆抗体的初步应用

将已构建的真核重组表达 IBDV Gt-VP5 质粒，按文献[12]中量提取，按转染试剂盒说明书瞬时转染铺有 Vero E6 细胞的 24 孔板，放入 37℃ CO_2 培养箱中培养，48～60h 后取出细胞板，将培养液取出，每孔加入 500μL PBS，洗涤两次，每次 5min，每孔加入 300μL 100% 无水乙醇室温固定 20min，以本实验获得的三株单克隆抗体为一抗按常规方法进行间接免疫荧光检测。

2　结果

2.1　免疫原的制备

目的蛋白 Gx-VP5 以包涵体形式存在，表达量为 34%～44%，将收集的诱导后菌体经超声波裂解，电泳回收目的蛋白，纯化产物进行 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定。结果见图 1。

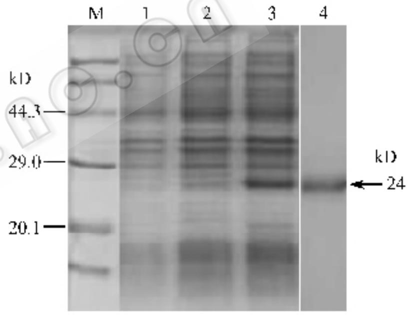

图 1　重组融合蛋白 Gx-VP5 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 1　SDS-PAGE detection of recombinant fusion protein IBDV Gx-VP5

M：protein marker；1：pET30a transformed BL21（DE3）；2：pET30a-GxVP5 transformed BL21（DE3）（before induced with IPTG）；3：pET30a-GxVP5 transformed BL21（DE3）（after induced with IPTG 4 hours）；4：purified recombinant fusion protein.

2.2　单克隆抗体的筛选及单克隆杂交瘤细胞株的建立

细胞融合率为 64%，用建立的间接 ELISA 方法检测出了阳性杂交瘤细胞 38 株，选择其中 10 株经三次亚克隆筛选，共获得三株能稳定分泌单克隆抗体的阳性细胞株，分别命名为 4B4，6D12，3E8。

2.3　单克隆抗体上清及腹水效价的测定

用纯化的重组 VP5 蛋白为抗原包被 96 孔聚乙烯酶标反应板，将杂交瘤细胞上清及腹水分别按原倍、1∶100 开始做倍比稀释，间接 ELISA 检测 4B4、6D12，3E8 株培养液上清及腹水效价分别为 40、3×10^2、1×10^2 和 5×10^4、3.5×10^4、3×10^4，结果见图 2。

2.4　单克隆抗体特异性鉴定

用 IBDV Gt 感染的 CEF 细胞对制备的三株单抗进行间接免疫荧光检测，同时分别用抗 IBDV VP5 多

journals.im.ac.cn

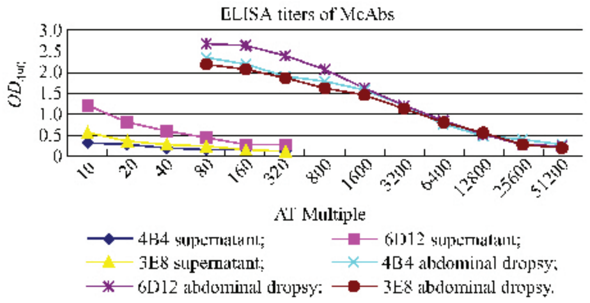

图 2　杂交瘤细胞株 4B4,6D12,3E8 上清及腹水效价测定

Fig. 2　The ELISA titers detection of 4B4,6D12,3E8 McAbs

抗、抗 IBDV 鼠阳性血清、鼠阴性血清做对照,制备的三株单抗对感染细胞均呈现阳性反应,说明其可以与病毒发生反应,并且与全病毒血清比较,具有良好的特异性,结果见图 3(200×)。

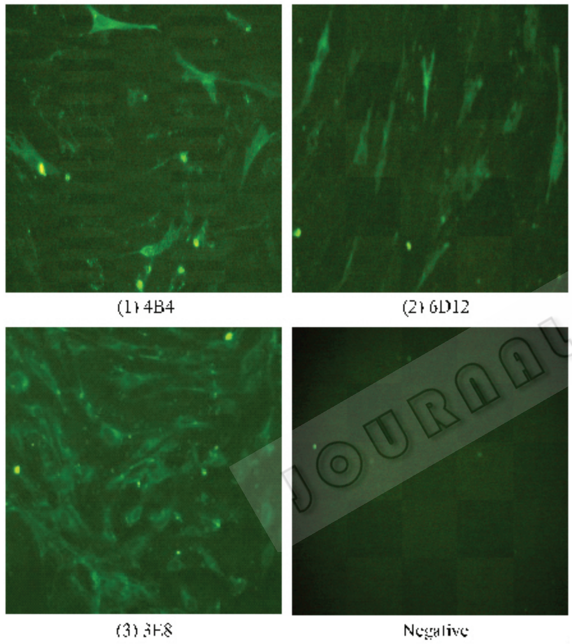

图 3　IBDV Gt 感染的 CEF 细胞 24 h 间接免疫荧光实验

Fig. 3　IFA testing on IBDV Gt infected CEF cells

用 IBDV Gt 株感染 CEF 12h、24h 后收集的病毒 10 倍稀释液,VP5、VP1、VP2 蛋白包被 ELISA 反应板,分别以 4B4,6D12,3E8 的腹水与其反应,实验结果表明三株单抗与 IBDV Gt 有反应,其中 4B4 反应性较好;另外三株单抗只与 VP5 蛋白发生反应,无交叉反应。

以原核表达的 Gx-VP5、Gt-VP5 蛋白进行 SDS-PAGE 后,转印至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,Western blot 结果显示本实验制得的三株单克隆抗体均能与其发生特异性反应。

2.5　单克隆抗体稳定性及亚类鉴定

将 4B4,6D12,3E8 连续培养 25 代,取其中的 F5,F10,F15,F20,F25 代细胞培养上清液用间接 ELISA 方法测定其效价,结果表明细胞株在连续传代中的效价差异不明显,其稳定性较好,结果见表 1。三株单抗 4B4,6D12,3E8 亚类鉴定结果均为 IgG1 型,且轻链为 k 链。

表 1　杂交瘤细胞株 4B4,6D12,3E8 稳定性检测

Table 1　The stability detection of 4B4,6D12,3E8 McAbs

	4B4	6D12	3E8
F5	1.692	1.466	1.183
F10	1.311	1.814	1.173
F15	1.281	1.108	1.531
F20	1.231	1.083	1.460
F25	1.415	0.912	1.279

2.6　单克隆抗体染色体分析

阳性杂交瘤细胞用秋水仙素处理后镜下观察计数,三个细胞平均染色体数为 97 条,基本符合脾细胞与 SP2/0 细胞染色体数目之和。

2.7　单克隆抗体的初步应用

瞬时表达 Gt-VP5 的 Vero E6 细胞用单抗介导的间接免疫荧光检测,在 Vero E6 细胞的胞浆内有 VP5 蛋白的表达,可以看到特异性的荧光,说明本实验获得的三株单克隆抗体能与 VP5 蛋白发生特异性反应,但由于蛋白表达量很少故荧光较微弱,结果见图 4。

3　讨论

一般来说,良好的免疫原接种动物将会诱发典型的抗体反应,此后的免疫或加强免疫诱生的 IgG 亲和力会提高。颗粒性蛋白抗原是良好的免疫原,

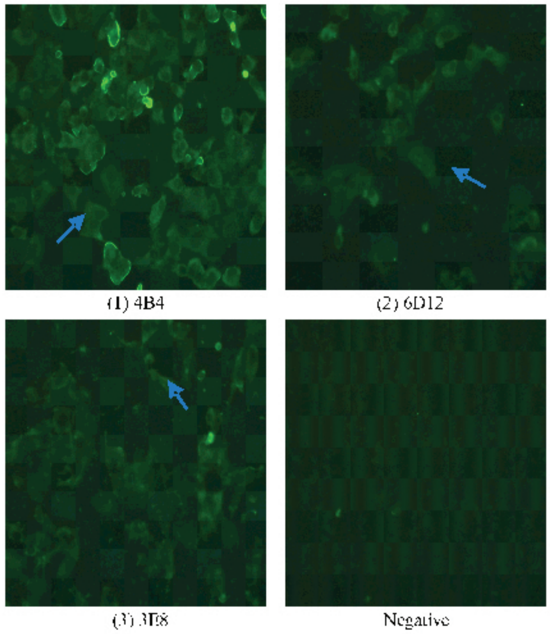

图 4　单抗介导的 IFA 检测瞬时表达 Gt VP5 的 Vero E6 细胞

Fig. 4　IFA testing by McAbs on transient expressed IBDV Gt VP5 on Vero E6 cells

而可溶性抗原能通过自身聚合而转变为颗粒性抗

原。本实验使用原核表达经纯化的重组 VP5 蛋白做为免疫原，其纯度及免疫原性均较好，且为颗粒性抗原，能诱发机体较高的抗体分泌能力。采用常规免疫方案进行免疫，融合前加强免疫时采取尾静脉和腹腔同时注射来增强机体的抗体水平，提高 B 淋巴细胞的抗体分泌能力，ELISA 检测血清结果表明小鼠抗体水平较高，证明这种免疫方法效果确实，机体的抗体水平明显提高，从而获得了高效价的单克隆抗体。诱导可溶性抗原的抗体反应必须科学的使用佐剂，福氏佐剂是研究工作中最常用的佐剂，其主要缺点是造成持续性肉芽肿，本实验选择法国 SEPPIC 公司生产的 Montanide ISA 206 佐剂等量与蛋白混合进行免疫，机体能够长时间地产生抗体，且没有明显的副作用，保证了机体持续性产生高效价的抗体。

细胞融合成功与否是单克隆抗体制备的关键一步，选择合适的骨髓瘤细胞对获得阳性杂交瘤细胞的影响很大。SP2/0 、P3.653、NS-1 是常用的小鼠骨髓瘤细胞，SP2/0 骨髓瘤细胞易培养，融合率高，自身不分泌 IgG，是目前最理想的融合细胞[13]，因此本实验选择 SP2/0 骨髓瘤细胞。SP2/0 细胞对培养条件的变化较敏感易产生返祖现象，因此在细胞融合前用 20μg/mL 的 8-杂氮鸟嘌呤（8-AG）处理，防止缺乏 HGPRT 酶的细胞发生逆转，达到遏制或去除返祖细胞和增强细胞对 HAT 的敏感性的目的。另外本实验选择对细胞损害较小且融合效率较高的 PEG（MW1500）为融合剂，有利于细胞的融合。

本实验获得的三株特异型抗 VP5 蛋白的单克隆抗体经 ELISA 检测，其腹水效价均能达到 104 以上。用 IBDV Gt 感染 CEF 细胞，以三株单克隆抗体进行间接免疫荧光检测，结果显示单抗可以与病毒发生特异性反应，瞬时表达 Gt VP5 的 Vero E6 细胞用 IFA 检测有特异性荧光出现，说明了表达的 VP5 蛋白能被特异性的抗 VP5 蛋白的单克隆抗体检出。ELISA 检测显示三株单克隆抗体只与 VP5 蛋白反应而不与 VP1、VP2 等结构蛋白发生反应，表明其有良好的特异性。Western blot 实验也表明三株单克隆抗体与强、弱毒 VP5 蛋白都有特异性反应。将三株杂交瘤细胞连续传代，检测结果表明杂交瘤细胞能保持稳定的分泌抗体能力，冻存后复苏细胞活力仍然较强，其分泌抗体水平与连续传代细胞没有明显差异。

本实验通过经典的融合技术，利用有限稀释法经过三次亚克隆得到三株稳定分泌抗 VP5 蛋白的单克隆抗体，分别命名为 4B4，6D12，3E8。单克隆抗体介导间接免疫荧光实验证明在 IBDV 感染细胞早期（12 ~ 24h）可以检测到 VP5 蛋白，且定位于细胞质，这与国外学者 Eleuterio Lombardo[14] 的实验结果一致。另外获得的单克隆抗体还能够特异性的检测出 Vero 细胞中表达的 IBDV Gt-VP5 蛋白，为建立稳定表达 VP5 蛋白的 Vero 细胞系提供有利的特异性检测工具，为研究 VP5 蛋白的细胞毒性及对病毒毒力的影响做好基础工作，也可为本实验室研究 VP5 缺失疫苗提供检测工具。

REFERENCES（参考文献）

[1] Becht H. Infectious bursal disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1980, **90**:107 – 121.

[2] Egbert Mundt. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *Journal of Virology*, 1997, **71**(7):5647 – 5651.

[3] Kun Yao, Vakharia VN. Induction of apoptosis *in vitro* by the 17kD nonstructural protein of infectious bursal disease virus possible role in viral pathogenesis. *Virology*, 2001, **285**:50 – 58.

[4] Li L（李龙）. Construction of infectious bursal disease virus chimerics with VP5 knock-out and attenuated. *Zhejiang University Ph. D. Dissertation*（浙江大学博士学位论文）, 2006.

[5] Liu M, Vakharia VN, *et al*. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol*, 2006, **80**(7):3369 – 3377.

[6] Santi N, Sandtro A, Sindre H, *et al*. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* independent of VPS expression. *Virology*, 2005, **342**(1):13 – 25.

[7] Milstein C. 25 Years of Monoclonal Antibodies Immunology Today. *Special issue*, 2000, **21**(8):355 – 412.

[8] Wang XM, Fu CY, Gao HL, *et al*. Pathogenic antigenic and molecular characterization of the very virulent strain (Gx) of infectious bursal disease virus isolated in China. *Agricultural Sciences in China*, 2003, **2**(5):566 – 572.

[9] Zhang N（张宁）, Gao HL（高宏雷）, Gao YL（高玉龙）, *et al*. Prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody for IBDV non-structure protein VP5 gene. *China Biotechnology*（中国生物工程杂志）, 2006, **26**(10):30 – 35.

[10] Liu XF（刘秀梵）. Application of Monoclonal Antibody Technology in Agriculture. Hefei: Technology Press, 1994.

[11] Yin Z（殷震）, Liu JH（刘景华）. Animal Virology. 2nd ed. Beijing: Technology Press, 1997.

[12] Joseph S, David WR. Molecular Clong: A Laboratory Manual. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2001:1232 – 1236.

[13] Zhu LP（朱立平）, Chen XQ（陈学清）. Immunology Usually Experiment Method. Beijing: People Medical Press, 2000, 23 – 74.

[14] Eleuterio L, Antonio M. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, 2000, **277**:345 – 357.