

丁丽军,陈长春,夏前贤. 环病毒Ⅱ型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备及初步应用[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):44-46.

环病毒Ⅱ型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备及初步应用

丁丽军,陈长春,夏前贤

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:利用 PCV2 病毒免疫 8 周龄 BALB/c 雌性小鼠,取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,以原核表达的 PCV2 病毒 Cap 蛋白作为检测抗原进行 ELISA 检测,获得了 1 株 PCV2 单抗,命名为 2E9。研究证实,用 PCV2 全病毒免疫小鼠,能获得特异性针对 PCV2 病毒的单克隆抗体,为建立特异性强、敏感性高、简便快速的 PCV2 检测方法打下了基础。

关键词:猪圆环病毒Ⅱ型;Cap 蛋白;单克隆抗体

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0044-02

猪圆环病毒(*Porcine circovirus*)属于圆环病毒科圆环病毒属,根据其抗原性可分为 2 种类型,即 PCV1 和 PCV2。PCV1 和 PCV2 的核苷酸序列同源性低于 80%。临床上 PCV1 不表现致病性,而 PCV2 则与猪多种疾病相关,主要引起断奶仔猪多系统衰弱综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)^[1-3]。更为重要的是,PCV2 感染猪后,可使机体免疫功能下降,容易导致其他疾病的继发或并发感染^[2,4-5]。

PCV1 与 PCV2 都含有 2 个主要的开放式阅读框(openreading frames, ORF),其中最大的阅读框 ORF1 编码复制相关蛋白 Rep,同源性较高(85%),具有与典型滚环复制相关的 3 个保守基序及结合 dNTPs 的 P 环结构,这些结构对维持 Rep 蛋白的功能至关重要^[6]。ORF2 编码核衣壳蛋白 Cap,是病毒主要结构蛋白,分子量 28~36 ku,同源性仅为 65%,这说明病毒的基因型是由 Cap 蛋白决定的^[7-9]。研究表明 Cap 蛋白具有较好的免疫原性,能诱导机体产生较强的抗体反应,因此 Cap 基因已成为研究基因工程疫苗的候选基因。本研究利用 PCV2 病毒免疫、原核表达的 PCV2 病毒 Cap 蛋白结合 PCV2 全病毒作为检测抗原,获得了 1 株 PCV2 单克隆抗体,为今后进一步生产 PCV2 检测试剂盒等打下了基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

PCV2 病毒毒株、PCV2 重组衣壳蛋白原核表达产物(pET-28a-PCV2-ORF2)由扬州大学微生物实验室提供;BALB/c 小鼠购自扬州大学实验动物中心;杜多拉细胞、PK-15 细胞由扬州大学传染病实验室提供;荧光标记的羊抗鼠 IgG 抗体、PEG-2000 等均购自 Sigma 公司。

1.2 PCV2 病毒的扩增

在 5% CO₂、37℃ 条件下,利用 10% DMEM 培养液(含 3.7 g 碳酸氢钠、13.4 g DMEM、100 mL 犊牛血清、10 mL 10% 双抗,去离子水加至 1 000 mL,0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌)培养杜多拉细胞。当细胞生长至 80% 时接种 PCV2 病毒,吸

收 2 h 后,去掉病毒液,添加 2% DMEM 培养液(含 3.7 g 碳酸氢钠、13.4 g DMEM、20 mL 犊牛血清、10 mL 10% 双抗,去离子水加至 1 000 mL,0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌)维持生长 48 h,收获接种细胞。冻融 3 次后经超声波裂解细胞,3 000 r/min 离心 10 min,取上清过滤除菌,滤液再进行接种细胞扩增病毒,最后将病毒液于 -20℃ 保存备用。

1.3 单克隆抗体的制备及筛选

将扩增病毒液 80 000 r/min 离心 5 h,取沉淀,利用 PBS 液(8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄ 溶于 800 mL 蒸馏水中,用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4,最后加蒸馏水定容至 1 L;高压蒸气灭菌 15 min,保存于室温或 4℃ 冰箱中备用)按原病毒液进行 200 倍浓缩悬浮,与等体积的弗氏完全佐剂混合并完全乳化后,按 100 μg/只的量在 8 周龄 BALB/c 雌性小鼠腹股沟两侧靠近淋巴结皮下注射进行一免。一免后 20 d 进行二免,用弗氏不完全佐剂,剂量为 200 μg/只,方法途径同一免。二免后 20 d 进行三免,直接用活病毒进行尾静脉注射免疫,剂量为 200 μg/只。三免后 3 d 取小鼠脾脏用于融合。

取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞按(5~10):1 的比例混合,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PEG 按常规方法进行细胞融合。用 HAT 选择培养基将细胞重悬并混匀后滴加到 96 孔细胞培养板中,100 μL/孔,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,7 d 后半量换液,待孔中液体变微黄时进行检测并全换液。

利用 pET-28a-PCV2-ORF2 重组蛋白原核表达产物作为检测抗原,用 pET-28a 表达载体转化大肠杆菌表达产物作阴性对照进行 ELISA 检测,用有限稀释法对杂交瘤细胞进行 3 次克隆筛选,直至 100% 阳性。

细胞株的建立与腹水制备:按上述判定标准,将筛选得到的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,取分泌抗体稳定的和 3 次亚克隆后细胞形态良好、生长旺盛的强阳性单克隆细胞命名建株并扩大培养,一部分液氮冻存,一部分用于单抗腹水制备。

1.4 单抗腹水的制备及效价测定

8 周龄雌性 BALB/c 小鼠每只皮下注射 0.5 mL 液体石蜡,7 d 后腹腔注射 5 × 10⁵ 个杂交瘤细胞。每日观察小鼠状态,待小鼠腹部明显增大时收集腹水,用间接 ELISA 法测定腹水效价。

收稿日期:2013-03-29

作者简介:丁丽军(1980—),男,江苏南通人,硕士,讲师,研究方向为兽医临床。E-mail:641042228@qq.com。

1.5 单克隆抗体的初步应用

1.5.1 单克隆抗体介导的 Dot-ELISA 取适当大小的硝酸纤维素膜,压痕标记后,蒸馏水浸泡,取出晾干,分别滴加纯化的 PCV2 病毒、PCV1 病毒,每点 5 μ L,37 $^{\circ}$ C 温箱烘干,用含 1% BSA 的 PBS 溶液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min;然后将其浸入 1:32 稀释的单抗腹水,37 $^{\circ}$ C 作用 60 min,漂洗后浸入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,37 $^{\circ}$ C 作用 60 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,以 DAB 显色,以蒸馏水终止反应。

1.5.2 单克隆抗体介导的间接免疫荧光 利用 10% DMEM 培养液培养杜多拉细胞,当细胞生长至 80% 时接种 PCV2 病毒,然后改为 2% DMEM 培养液维持生长 48 h;用同样的方法在 PK-15 细胞中培养 PCV1 病毒。细胞培养板培养物用预冷的丙酮-乙醇(体积比为 3:2)固定 15 min,用含 10% BSA 的 PBST 室温封闭 60 min,用 1:16 稀释的单抗腹水 37 $^{\circ}$ C 湿盒作用 45 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,加 1:200 稀释的 FITC 荧光标记的羊抗鼠抗体为二抗,37 $^{\circ}$ C 湿盒作用 45 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,荧光显微镜观察。设未接种病毒的杜多拉细胞、PK-15 细胞对照。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞的检测与细胞株的建立

经常规 ELISA 检测,获得 1 株生长状况良好且阳性反应最强的亚克隆细胞株,命名为 2E9,扩大培养后一部分冻存,一部分用于制备腹水。

2.2 单抗腹水的 ELISA 检测及效价

经 ELISA 检测,单抗腹水与 pET-28a-PCV2-ORF2 重组蛋白发生特异性反应,效价为 2^8 。

2.3 单克隆抗体介导的 Dot-ELISA

以 PCV2 病毒为抗原的 3 个点为阳性,以 PCV1 为抗原的点为阴性(图 1)。

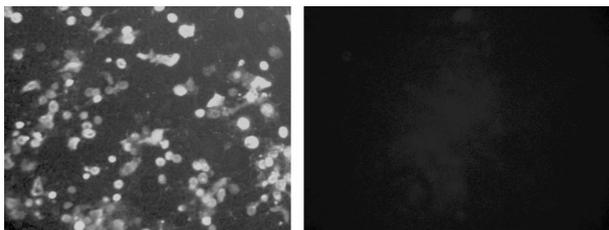


A—单克隆抗体+PCV2; B—单克隆抗体+PCV1

图1 单克隆抗体介导的Dot-ELISA 结果

2.4 单克隆抗体介导的间接免疫荧光

免疫荧光检测结果表明,该单抗能与 PCV2 病毒发生良好的阳性反应,与 PCV1 病毒不发生反应(图 2)。



A. 单克隆抗体+PCV2

B. 单克隆抗体+PCV1

图2 单克隆抗体介导的间接免疫荧光结果

3 讨论

PCV2 Cap 蛋白具有较好的免疫原性,且可以区分 PCV1 和 PCV2^[10-12],可用于两者的鉴别诊断。因此,本研究利用 PCV2 Cap 蛋白基因 ORF2 的原核可溶性表达产物进行检测,极大地方便了检测。

本研究利用 PCV2 全病毒进行免疫,PCV2 Cap 蛋白基因 ORF2 的原核可溶性表达产物进行检测,成功筛选出 1 株 PCV2 单克隆抗体,并制备单抗腹水,其腹水 ELISA 效价为 2^8 。

经 Dot-ELISA 和间接免疫荧光试验证明,本研究制备的 PCV2 单抗能区分 PCV1 病毒和 PCV2 病毒,与 PCV2 病毒发生特异性反应,为临床快速检测猪圆环病毒病打下了良好的基础。

目前,PCV2 检测已经建立了间接免疫荧光试验(IFA),IFA 快速简单,花费较少,应用非常广泛,但是试验过程中会出现非特异性染色,即所谓的假阳性。免疫组织化学技术(IHC)的优点是可以对携带抗原的细胞及组织的大体形态进行评价,用普通显微镜在日光下即可进行观察,且因颜色稳定,样本保存也较容易。但 IHC 操作比较繁琐,需要时间较长,且必须在试验过程中除去内源过氧化物酶对反应的干扰;病原核酸检测[PCR 方法、原位杂交技术(ISH)]、病原抗体检测[间接 ELIS、免疫过氧化物酶单层细胞实验(IPMA)]灵敏性强,但费时费力。虽然圆环病毒的检测方法有很多种,但是由于种种原因,各种方法都具有其局限性,因此单一检测方法的结果并不能取信于人,即不能对圆环病毒病作出正确的判断。笔者认为将几种方法结合起来且检测结果差异小于 1%,这样的结果才最为可信,才能为圆环病毒病的诊治提供基础。

参考文献:

- [1] Allan G M, Meehan B, Todd D, et al. Novel *Porcine circovirus* from pigs with wasting disease syndromes[J]. *Vet Rec*, 1998, 142(17): 467-468.
- [2] Allan G M, McNeilly F, Meehan B M, et al. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland [J]. *Veterinary Microbiology*, 1999, 66(2): 115-123.
- [3] Hamel A L, Lin L L, Sachvie C, et al. PCR detection and characterization of type-2 *Porcine circovirus* [J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2000, 64(1): 44-52.
- [4] Kennedy S, Segalés J, Rovira A, et al. Absence of evidence of *Porcine circovirus* infection in piglets with congenital tremors [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003, 15(2): 151-156.
- [5] Meehan B M, McNilly F, McNair I. Isolation and characterization of *Porcine circovirus* 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(4): 835-842.
- [6] Mankertz A, Hillenbrand B. Analysis of transcription of *Porcine circovirus* type 1 [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(11): 2743-2751.
- [7] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, et al. Open reading frame 2 of *Porcine circovirus* type 2 encodes a major capsid protein [J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81(9): 2281-2287.

宋刚,沈菲,王庆涛,等. 茅苍术无菌培养体系的构建[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):46-47.

茅苍术无菌培养体系的构建

宋刚,沈菲,王庆涛,杨士虎,谢正林

(江苏农林职业技术学院生物工程系,江苏句容 212400)

摘要:以野生茅苍术种子为外植体,研究不同清水浸泡时间和氯化汞消毒时间对茅苍术种子无菌培养的影响和不同培养基对茅苍术种子的影响。结果表明,清水浸泡0.5 h、0.1%氯化汞消毒15~18 min的消毒处理,污染率最低,与其他处理比较差异达显著水平($P < 0.05$)。MS、1/2MS、1/4MS培养基间发芽率差异不显著。

关键词:茅苍术;种子;无菌培养体系

中图分类号: S567.21⁺1.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0046-02

茅苍术 [*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.] 是菊科苍术属多年生草本植物,以根茎入药,是我国传统中药材。茅苍术性辛、苦、温,归脾、胃、肝经。临床上主要用于治疗脘腹胀满,水肿,脚气痿痹,风湿痹痛,风寒感冒,雀目夜盲等。近年来对茅苍术的综合开发使茅苍术的用途扩大,除药用外可用作各种饮料的添加剂和加工工艺香包^[1]。

茅苍术,茎直立,上部分枝,株高一般30~80 cm,性喜凉爽较干燥气候,耐寒,幼苗最低能耐-15℃低温,最适生长温度15~22℃,怕高温高湿,茅苍术主要分布在海拔40~400 m的丘陵山区,对土壤要求不高,喜丛生在疏松的砂质土壤和富含腐殖质的土壤中。根际土壤多为酸性,pH在5左右,极少弱碱性(pH值7.5),向阳山坡疏林下及少见阳光的密林下皆可生长。现代《中药志》记录“茅苍术主产于湖北、江苏及河南”。至今茅苍术主要分布于长江流域的江苏、安徽、湖北、四川、浙江、江西等省,江苏茅山一带是茅苍术地道药材的产区^[2]。但长期以来,茅山野生茅苍术被掠夺性采挖,野生资源面临枯竭。根据中国中医研究院中药研究所孙宇章博士的遥感监测,茅山大茅峰、二茅峰和小茅峰的茅苍术生物量为12.17~10.08 kg,大约10 000余株^[3],茅山苍术面临濒危和枯竭^[4]。繁殖上茅苍术既可以用种子繁殖也可用根茎繁殖,但种子的生命力较差,种子繁殖的繁殖系数低,用根茎繁殖则需要大量根茎材料,而且品质易退化。通过组培快繁技术能在短期内获得大量无菌苗,解决茅苍术种苗问题,为大规模繁殖种苗提供有效途径。通过组培不仅能提供优质

茅苍术种苗,还可以在此基础上选育出高产优质的新品种。

本研究试图以种子为材料建立茅苍术无菌培养体系后深入开展茅苍术组培快繁奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

试验所用茅苍术种子于2011年11月采自句容茅山野生苍术植株。

1.2 外植体预处理

首先在培养皿中放入大小适宜的滤纸,选取粒大饱满的种子,用洗衣粉清洗后,放在滤纸上,加入适量清水浸泡^[5-6](以刚好浸没种子为宜)。浸泡结束后,用流水反复冲洗,再用蒸馏水冲洗2次,备用。

1.3 无菌播种形成无菌苗

1.3.1 种子无菌处理 种子清水浸泡时间设置0.5、5.0、12.0 h 3个水平;茅苍术种子消毒灭菌采用常规的先70%乙醇浸泡后0.1%氯化汞浸泡的2次消毒方法。0.1%升汞浸泡时间设置9、12、15、18、21 min 5个水平。接种时每瓶培养基接入1粒种子,每处理组合接10~15瓶,培养25 d后,统计污染率。

1.3.2 种子最优发芽培养基筛选 以“1.3.1”节试验筛选出的最佳灭菌组合进行种子灭菌处理,接入MS、1/2MS、1/4MS 3种发芽培养基^[5],每瓶培养基接入1粒种子,每处理接10~15瓶,培养36 d后,统计发芽率。发芽培养基均添加琼脂7.5 g/L,白砂糖30.0 g/L,培养基pH值调至5.8~6.2。

1.4 培养条件

光照度:2 000~2 500 lx;光照时间:12 h/d;培养温度:(22±2)℃。

收稿日期:2013-04-07

基金项目:江苏农林职业技术学院2011年科研课题。

作者简介:宋刚(1978—),男,江苏盐城人,硕士,讲师,研究方向为植物资源利用。E-mail:sgdxxx@126.com。

[8] Pogranichnyy R M, Yoon K J, Harms P A, et al. Characterization of immune response of young pigs to *Porcine circovirus* type 2 infection [J]. *Viral Immunology*, 2000, 13(2): 143-153.

[9] Liu Q, Tikoo S K, Babiuk L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by *Porcine circovirus* type 2 [J]. *Virology*, 2001, 285(1): 91-99.

[10] Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul P S, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 *Porcine circovirus* (PCV2) by using

chimeric PCV1 and PCV2 [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(15): 8135-8145.

[11] Grierson S S, King D P, Wellenberg G J, et al. Genome sequence analysis of 10 Dutch *Porcine circovirus* type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case - control study [J]. *Research in Veterinary Science*, 2004, 77(3): 265-268.

[12] Segalés J, Olivera A, Grau - Roma L, et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature [J]. *Vet Rec*, 2008, 162(26): 867-868.