

邓碧华,姚明霞,周明旭,等. 羊抗人载脂蛋白 A1 多克隆抗体的制备及免疫佐剂优化[J]. 江苏农业科学,2021,49(19):180-183.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.19.032

羊抗人载脂蛋白 A1 多克隆抗体的制备及免疫佐剂优化

邓碧华^{1,4}, 姚明霞², 周明旭¹, 卢宇^{1,5}, 徐志伟³

(1. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏省句容市动物疫病预防控制中心, 江苏句容 212400;
3. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏句容 212400; 4. 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;
5. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013)

摘要:载脂蛋白 A1 (ApoA1) 是预测冠心病 (ASCVD) 最有价值的指标之一。从人血浆中通过 PEG 沉淀法提取 ApoA1, 经过纯化和验证后, 选择不同佐剂进行乳化, 以不同免疫程序接种成年湖羊, 制备羊抗人载脂蛋白 A1 多克隆抗体。通过琼脂扩散试验定期检测免疫后羊血清中抗人 ApoA1 多克隆抗体的效价, 比较不同佐剂的免疫效果。结果显示, CV13 佐剂与弗氏完全佐剂结合免疫后, 抗体效价达到或超越弗氏佐剂组, 明显优于 ISA206 佐剂。本研究结果可为国内医药企业自主制备高质量羊抗人 ApoA1 多克隆抗体用于 ApoA1 检测试剂盒提供技术参考。

关键词:载脂蛋白 A1; 多克隆抗体; CV13 佐剂; 冠心病

中图分类号: S852.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)19-0180-03

载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1, 简称 ApoA1) 的监测有助于某些异常脂蛋白血症的特异性诊断。已有大量临床研究表明, ApoA1 是预测冠心病 (ASCVD) 最有价值的指标之一^[1]; 同时, ApoA1 也可作为其他脂代谢紊乱疾病, 如糖尿病、尿毒症、肾病综合征、痛风、激素代谢紊乱等的辅助观察项目^[2-5]。ApoA1 检测试剂盒是临床冠心病诊断的最有效方法之一^[6], 其中, 羊抗人 ApoA1 多克隆抗体是该检测试剂的关键核心原料。

为了获得高效价的羊抗人 ApoA1 多克隆抗体, 在免疫制备过程中选择合适的佐剂和免疫程序是该生产工艺的关键环节。目前免疫效果最佳的商品化佐剂是弗氏佐剂, 其主要免疫程序为首次免疫采用弗氏完全佐剂, 2 周加强免疫采用弗氏不完全佐剂。但弗氏佐剂成本过高、毒性强、乳化工艺及粘度高^[7], 使用时不方便, 不适合医药企业大规模生产时使用。笔者所在实验室前期自主研发的 CV13 佐剂是一种水包油包水佐剂, 与弗氏佐剂油包水型佐剂相比, 既保留了的免疫增强效果, 同时

降低毒性, 注射后更容易被动物吸收。与 CV13 同类型 ISA206 佐剂由法国赛比克公司生产, 广泛应用于兽用疫苗领域。本研究拟比较 CV13 佐剂与弗氏佐剂在羊抗人 ApoA1 多克隆抗体制备中的免疫效力, 并以商品化的 ISA206 佐剂作参照, 以期能获得最优的免疫佐剂和免疫程序, 用于羊抗人 ApoA1 多克隆抗体的工业化生产。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

弗氏佐剂: 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂, 购自 Sigma 公司; 复乳佐剂 1: CV13 佐剂, 由笔者所在实验室制备提供; 复乳佐剂 2: ISA206 佐剂, 购自法国赛比克公司; 琼脂糖, 购自南京生兴生物技术有限公司; 聚乙二醇 (PEG), 购自国药集团化学试剂有限公司; ApoA1 抗体偶联亲和层析柱, 购自美国 GE 公司; 羊抗人 ApoA1 特异性抗体, 购自上海联迈生物工程有限公司; ApoA1 蛋白标准品, 购自上海联迈生物工程有限公司。

1.2 人载脂蛋白 A1 的提取、纯化和验证

采用相关文献报道的 PEG 沉淀法^[8] 从人血浆中提取所含的高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 和极低密度脂蛋白 (VLDL) 并且分离。将 PEG 沉淀血清后的上清 (HDL) 用 -20℃ 预冷乙醇再次沉淀、离心, 沉淀用磷酸盐缓冲液复溶后经多次透析, 再采用亲和层析法, 利用抗原抗体可逆性

收稿日期: 2021-06-17

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金 [编号: CX(20)2009]; 江苏省镇江市科技计划 (编号: SH2020001)。

作者简介: 邓碧华 (1981—), 男, 江苏无锡人, 硕士, 副研究员, 主要从事疫苗佐剂研究。E-mail: dengbihua2000@163.com。

通信作者: 徐志伟, 副研究员, 主要从事畜禽高效养殖等研究。
E-mail: xzw1729@sina.com。

结合的原理,用 ApoA1 抗体偶联亲和层析柱,透析后的上清液多次过柱反应、洗脱、透析,并且用 3 000 ku 的超滤管超滤到需要的浓度,从而得到 ApoA1 天然抗原。将纯化的蛋白样品加入 SDS 上样缓冲液制样,通过 SDS - PAGE 进行分离鉴定。然后,将 SDS - PAGE 结束后的胶转膜,进行 Western - blot。使用羊抗人 ApoA1 特异性抗体,与上述的转印膜进行孵育,ECL 曝光后验证提取的蛋白大小。

1.3 佐剂与抗原乳化

弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂分别与 ApoA1 蛋白 1 : 1 混合,高剪切力搅拌乳化,制备油包水型免疫抗原。CV13 佐剂和 ISA206 佐剂分别与 ApoA1 蛋白 1 : 1 混合,低剪切力搅拌乳化,制备水包油包水型免疫抗原。不同疫苗中使用的 ApoA1 抗原量一致。

1.4 佐剂乳化后性能

将弗氏完全佐剂、CV13 佐剂和 206 佐剂分别与 ApoA1 蛋白乳化后,乳液滴于冷水表面,根据扩散情况,判定剂型。

1.5 动物免疫程序

成年健康湖羊 20 只,于 2019 年 8 月购自徐州市苏羊羊业有限公司,体质量 35 kg 左右,打上耳标标记,随机分为 4 组,每组 5 只。使用上一步中用不同佐剂制备的疫苗分别于 0、7、14、21、28、35、42、49 d 进行免疫,具体分组见表 1。免疫后定期采集湖羊的免后血清。本动物试验在江苏省农业科学院试验动物伦理委员会指导下,在江苏省农业科学院试验动物房开展。试验结束后,所有试验动物按照法律法规进行无害化处理。

表 1 不同试验分组使用免疫佐剂

分组	首次免疫	2~8 次加强免疫
A 组	弗氏完全佐剂 + ApoA1 抗原	弗氏不完全佐剂 + ApoA1 抗原
B 组	弗氏完全佐剂 + ApoA1 抗原	CV13 佐剂 + ApoA1 抗原
C 组	弗氏完全佐剂 + ApoA1 抗原	ISA206 佐剂 + ApoA1 抗原
D 组	CV13 佐剂 + ApoA1 抗原	CV13 佐剂 + ApoA1 抗原

1.6 琼脂扩散试验检测抗体效价

在 100 mL 8% 氯化钠溶液中加入 1.0 g 优质琼脂糖,加热融化后,加入终浓度为 0.01% 硫柳汞防腐,浇制凝胶板(约 3 mm 厚)。按六角形打孔,孔径为 5.0 mm、孔距为 3.0 mm。将血清用生理盐水进行 2 倍系列稀释。中央孔加入 ApoA1 抗原,周围孔分别依次加入各稀释度采集的湖羊血清。加样后置于 35~37 ℃ 湿盒中孵育,出现特异条带判定为阳性,出现条带的最大稀释倍数即为抗体效价。

1.7 多克隆抗体的特异性检测

将不同的浓度的 ApoA1 蛋白标准品与 SDS 上样缓冲液配合制样,SDS - PAGE 后 Western - blot 转印到膜上。使用本研究制备的羊抗人 ApoA1 多克隆抗体进行孵育,最后 ECL 曝光检测制备抗体的特异性。

2 结果与分析

2.1 人载脂蛋白 A1 提取物的检验

对本研究中方法提取的 ApoA1 天然抗原进行检测。SDS - PAGE 结果显示,提取纯化的蛋白条带单一,大小约 28 ku,与目标蛋白 ApoA1 大小一致(图 1 - A)。Western - blot 通过 ApoA1 特异性抗体检测本试验提取物为 ApoA1(图 1 - B)。

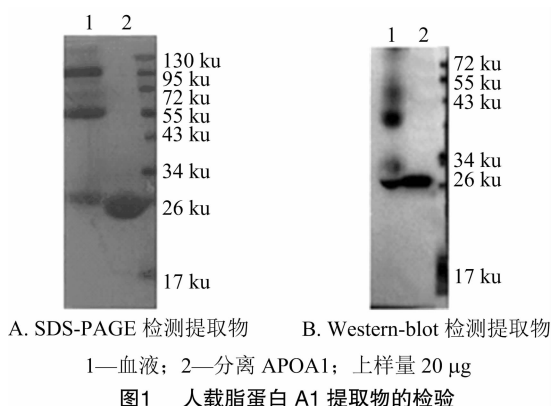


图 1 人载脂蛋白 A1 提取物的检验

2.2 佐剂乳化性状

弗氏完全佐剂与 ApoA1 抗原乳化后,乳液滴于冷水表面,液滴呈圆点状浮于水表面,可判定为油包水剂型(图 2 - A);CV13 佐剂和 206 佐剂分别与 ApoA1 抗原乳化后,乳液滴于冷水表面,液滴呈云雾状扩散,可判定为水包油包水剂型(图 2 - B、C)。

2.3 琼脂扩散试验检测抗体效价

采集免疫后羊血清,选择不同浓度稀释后进行琼脂扩散试验,结果显示,制备的羊抗人 ApoA1 抗体对 ApoA1 抗原呈阳性反应(图 3)。

2.4 不同佐剂和免疫程序抗体效价对比

从图 4 可见,2、4、6 免后,A 组血清的琼扩效价最高,达到 1 : 2⁴;B 组血清抗体效价次之,达到 1 : 2^{3.8};C 组、D 组免后的羊血清抗体效价最低。8 免后,A 组、B 组的血清抗体效价明显高于 C 组、D 组。

2.5 抗体的特异性检测

Western - blot 结果显示,制备的羊抗人 ApoA1 多克隆抗体可以特异性结合 ApoA1 标准品蛋白,抗体结合量依赖 ApoA1 标准品蛋白的浓度增加(图 5)。



A. 费氏佐剂



B. CV13



C. ISA206

图2 不同佐剂与抗原乳化后形状对比

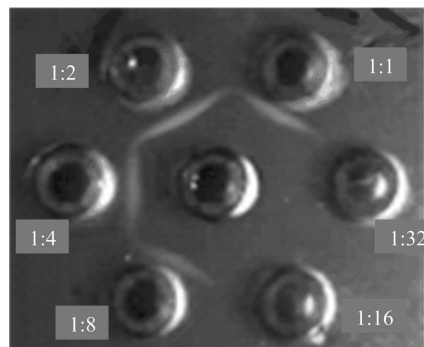


图3 琼脂扩散试验测定多克隆抗体效价

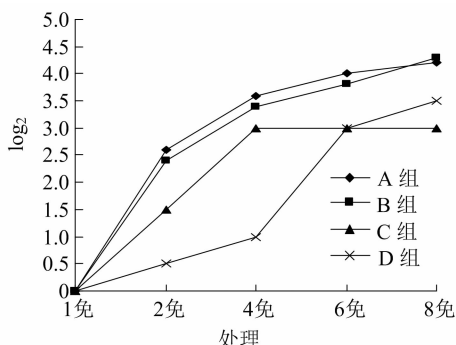


图4 不同试验组免疫后的羊抗人 ApoA1 多克隆抗体效价变化比较

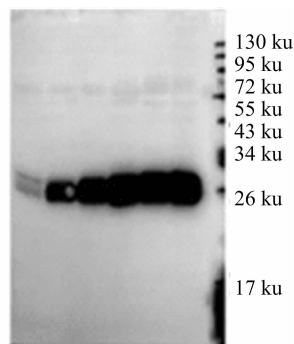


图5 羊抗人 ApoA1 多克隆抗体的特异性检测

3 讨论

ApoA1 是 ApoA 族中占比最多的一种组分。ApoA1 为单一多肽链,由 243 个氨基酸残基组成,分子量为 28.3 ku,是高密度脂蛋白 (HDL) 的主要载脂蛋白。HDL 具有防止动脉粥样硬化的作用,因此,测定血清(浆)中 ApoA1 的含量已成为防止心脑血管疾病的常规检测项目^[9-10]。羊抗人 ApoA1 多克隆抗体是该检测试剂的关键核心原料,目前 80% 依赖进口,核心问题是缺乏产业化的人 ApoA1 的规模化、快速提取工艺和高活性、高纯度的多克隆抗体制备工艺技术^[11-12]。此外,前期的研究表明,佐剂的选择是影响多克隆抗体的产量和抗体效价的关键技术,因此如何提高免疫效果,提高产品质量也是目前需要解决的关键问题。

笔者所在团队专门从事疫苗佐剂研究,对复乳佐剂及其他佐剂进行了大量研究,已获得了一个复乳佐剂 CV13 佐剂。该配方以矿物油为基础油相,加入适宜的表面活性剂和助溶剂,使佐剂能与水相快速乳化,形成 W/O/W 型佐剂。该佐剂可一步乳化,工艺简单,适合工业生产使用。制备的疫苗粒径比较均一,大小在 100 ~ 200 nm,更易被机体抗原提呈,激活宿主免疫系统。前期已通过多次动物试

验检验,均有良好的安全性和免疫效果^[13]。CV13 佐剂与弗氏佐剂比较,由于 W/O/W 剂型比 O/W 剂型容易吸收,更加安全,成本也相对便宜。本研究中,制备羊抗人 ApoA1 多克隆抗体时可选择首次免疫使用弗氏完全佐剂,2 ~ 8 加强免疫使用 CV13 佐剂的免疫程序,抗体效价略高于弗氏佐剂组,但鉴于 CV13 价格低、乳化工序简便和弱毒性的特点,较弗氏佐剂存在较大优势,从而可降低总生产成本,值得在企业生产中推广。该工艺技术可为我国医药企业自主制备高质量的羊抗人 ApoA1 多克隆抗体,生产廉价、稳定的 ApoA1 检测试剂盒提供技术支撑;同时减少羊抗人 ApoA1 多克隆抗体的进口依赖,降低我国该领域被国外“卡脖子”的潜在风险。

参考文献:

- [1] 姜伟超,张德太,张 科,等. 糖尿病及急性冠状动脉综合征患者 ApoB 与 ApoA1 比值测定的临床意义[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版),2013,26(12):837-840.
- [2] 陈保生. 载脂蛋白的结构和功能与病毒病的预防和治疗[J]. 中国医学科学院学报,2007,29(3):448-451.
- [3] 刘晓辉,吴 鹤,孙玉兰. 急性心肌梗死早期的血脂分析[J]. 中国医师进修杂志,2006(10):52-53.
- [4] Martin I, Dubois M C, Saermark T, et al. Apolipoprotein A-1 interacts with the N-terminal fusogenic domains of HIV (simian immunodeficiency

徐 彬,张敬峰,卢凤英,等. 基于特有基因 *VY93_RS02885* 为靶标的滑液支原体 qPCR 检测方法建立[J]. 江苏农业科学,2021,49(19):183-189.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.19.033

基于特有基因 *VY93_RS02885* 为靶标的滑液支原体 qPCR 检测方法建立

徐 彬,张敬峰,卢凤英,孙华伟,赵 莎,张晓曦,刘青涛,张小飞

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽医生物工程技术重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:利用 CD-HIT-EST 快速聚类分析和 BLASTN 同源性比对共鉴定出 17 个滑液支原体 (*Mycoplasma synoviae*) 特有基因,并从中选取保守基因 *VY93_RS02885* 作为分子诊断的靶标基因。根据该基因核苷酸序列设计了 1 对引物,建立了滑液支原体的 SYBR green qPCR 检测方法。结果表明,该方法对不同浓度的模板和对应的 C_T 值具有较好的线性关系, R^2 值为 0.998 8;该方法的特异性较好,BLASTN 比对,检测引物对仅能匹配滑液支原体的特有基因 *VY93_RS02885*,结果显示,该方法能特异性地检测滑液支原体,与其他常见的引起禽关节炎的细菌/支原体性病原无交叉反应;该方法的敏感性较好,100% 阳性检测的靶标基因最小拷贝数为 10;该方法的重复性较好,对 3 个不同浓度的模板进行组间和组内重复检测,变异系数 $\leq 1.172\%$ 。此外,该方法对临床样品的检出率与传统检测方法相符。因此,本研究建立的针对滑液支原体特有基因的 SYBR green qPCR 检测方法具有用时短、特异性高、准确性高、敏感性高、可重复性强的优点,可为滑液支原体的快速诊断和流行病学调查提供技术手段。

关键词:滑液支原体;特有基因;qPCR;检测方法

中图分类号:S852.62 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)19-0183-07

滑液支原体 (*Mycoplasma synoviae*) 是一种重要的禽病病原,是 OIE 必通报疫病病原。该病原所致疾病的致死率不高,但能导致鸡关节炎、气囊炎、生长迟缓、产蛋量下降、产畸形蛋并增加鸡对其他病

原的易感性和疾病程度等,疾病发展缓慢,病程长。该病原在鸡群中感染后很难根除,对家禽养殖业造成严重的经济损失^[1-3]。

对滑液支原体的快速诊断对该病原所致疾病的防控非常重要^[4],荧光定量 PCR (qPCR) 相对于常规 PCR 具有反应时间短、更高的敏感性、结果不用跑胶直接获得等优点。现阶段应用最广泛的 qPCR 方法分别是荧光探针法 qPCR (如 TaqMan qPCR) 和核酸染料法 qPCR (如 SYBR green qPCR)。对于单基因检测,SYBR green qPCR 相对于 TaqMan

收稿日期:2021-03-08

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0500706);国家自然科学基金(编号:32002291)

作者简介:徐 彬(1987—),男,河北廊坊人,博士,助理研究员,主要从事动物传染病防治研究。E-mail:xubin9999@foxmail.com。

通信作者:张小飞,博士,研究员,主要从事动物传染病防治研究。

E-mail:xiaofei0804@sina.com。

virus) GP32 and HIV (human immunodeficiency virus) GP41: implications in viral entry[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,1992,186(1):95-101.

[5] Panin L E, Kostina N E, Poteriaeva O N, et al. Immunochemical homology of HIV-1 envelope proteins and human apolipoprotein AI [J]. Voprosy Virusologii,2001,46(5):13-16.

[6] 胡国芳,陈保生,杨晓慧,等. 血浆载脂蛋白 A-I 生理功能的研究:A-I 及其裂解片段对单纯疱疹病毒感染细胞的作用[J]. 中国医学科学院学报,1994,16(2):98-103.

[7] 高泽乾,孙建男,武 炜,等. 兽用免疫佐剂的研究进展[J]. 唐山师范学院学报,2012,34(2):45-48,51.

[8] 王 晶,白 丽,郭利军,等. 一种制备兔抗人 IGG 抗体的简易方法[J]. 大理医学院学报,1999(1):60,63.

[9] 徐志伟,徐一然,陈永霞,等. 优化 ApoB 抗原免疫剂量提高抗体

产生的效果[J]. 农学学报,2018,8(11):58-61.

[10] Owens B J, Anantharamaiah G M, Kahlon J B, et al. Apolipoprotein A-I and its amphipathic helix peptide analogues inhibit human immunodeficiency virus-induced syncytium formation[J]. Journal of Clinical Investigation,1990,86(4):1142-1150.

[11] 邵长玲,孔军伶. 制备免疫血清免疫法改良和效果[J]. 卫生职业教育,2011,29(9):111-112.

[12] 徐志伟,刘 泉,时小艳,等. 利用湖羊生产人 ApoB 多抗血清免疫新方法[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):186-187.

[13] Xu H, Niu Y L, Hong W M, et al. Development of a water-in-oil-in-water adjuvant for foot-and-mouth disease vaccine based on ginseng stem-leaf saponins as an immune booster[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2020,71:101499.