

分类号_____

U D C_____

学 号 MZ120211601

密 级_____



硕 士 学 位 论 文

(全日制专业学位)

16 种动物 IgG 单克隆抗体制备及初步应用

学 院： 兽医学院

专 业 学 位 类 别： 兽医硕士

专 业 学 位 领 域： 不分领域

研 究 生： 苏思元

校 内 指 导 教 师： 刘文博 副教授

校 外 指 导 教 师： 吴金凤 副研究员

南京警察学院警犬研究
所

答 辩 委 员 会 主 席：

答 辩 日 期： 年 月 日

**Development and Application of Monoclonal
Antibodies against IgGs of 16 Different Species of
animals**

A thesis submitted to

Yangzhou University

in partial fulfillment of the requirements

for the

Master of Professional Degree in Veterinary Medicine

By

Candidate: Siyuan Su

Supervisor: Associate Prof. Wenbo Liu

Co-supervisor: Associate R. Jinfeng Wu

Professional Degree in Veterinary Medicine

June 2024

16 种动物 IgG 单克隆抗体制备及初步应用

本论文研究得到

江苏高校优势学科建设工程项目资助（2020）

目 录

文献综述 动物 IgG 单克隆抗体及应用	1
1 免疫球蛋白概述.....	1
1.1 免疫及免疫球蛋白.....	1
1.2 免疫球蛋白的结构和功能.....	2
2 杂交瘤技术.....	3
3 基于单克隆抗体的检测方法	5
3.1 酶联免疫检测技术及其应用	5
3.2 免疫胶体金技术及应用.....	6
3.3 荧光免疫分析技术及应用.....	7
4 抗不同动物源性 IgG 单克隆抗体的研究	7
5 本研究的目的地及意义.....	8
第一章 抗 16 种动物 IgG 单克隆抗体的制备	9
1 材料.....	9
1.1 生物材料.....	9
1.2 主要试剂.....	10
1.3 主要仪器.....	10
2 方法.....	11
2.1 免疫原制备.....	11
2.2 动物免疫.....	13
2.3 细胞融合.....	15
2.4 “混免分筛”策略的确立	17
2.5 阳性细胞株的筛选及亚克隆.....	17
2.6 单克隆抗体的大量制备及效价检测.....	18
2.7 建株杂交瘤生物学特性鉴定.....	18
3 结果与分析.....	19
3.1 免疫原制备与检测.....	19
3.2 免疫后小鼠阳性血清间接 ELISA 效价检测	23
3.3 抗原抗体最佳工作浓度的确认.....	24
3.4 杂交瘤细胞株的筛选及建株.....	25
3.5 建株杂交瘤细胞的生物学特性鉴定.....	28
4 讨论.....	33
第二章 抗鸡、鸭、鹅 IgG 单克隆抗体的初步应用	36
1 材料.....	36
1.1 生物材料.....	36

1.2 主要试剂.....	36
1.3 主要仪器.....	37
2 方法.....	37
2.1 酶标抗体的制备.....	37
2.2 酶标抗体效价及非特异性检测.....	38
2.3 鸡、鸭、鹅 H5 AIV 血清中抗体间接 ELISA 方法的建立.....	38
2.4 鸡、鸭、鹅 H5 AIV 阳性血清检测.....	40
3 结果与分析.....	40
3.1 腹水中抗体的粗提与纯化.....	40
3.2 酶标抗体效价测定.....	41
3.3 鸡、鸭、鹅 H5 AIV 血清中抗体间接 ELISA 方法检测.....	42
3.4 血清样本检测.....	46
4 讨论.....	47
全文结论.....	49
参考文献.....	50
附录.....	57

摘要

B 淋巴细胞产生的免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 是机体适应性免疫和体液免疫的重要组成部分, 与抗原相对应, 被称为抗体 (Antibody, Ab)。其中免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 比重最大, 约占所有免疫球蛋白的 70%~80%, 在血液及组织中广泛存在, 发挥重要的免疫作用。人体和动物血液中特异性 IgG 的存在及滴度, 常作为疫苗接种, 是否暴露于病原体的重要判断指征。我国动物疫病防控机构对免疫接种效果评价非常重视, 每年都对重大动物疫病病原体及其抗体进行检测和监测, 以了解动物健康状况及相关病原体存在情况, 为疫病防控提供预警预测信息。检测抗体存在需要特异性的抗 IgG 抗体, 而单克隆抗体具有特异性好、灵敏度高等优点, 辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体是必要的免疫学试剂, 但是目前我国此类单克隆抗体不多, 且标记用于商业化的产品更少。因此, 本实验纯化了 16 种动物的血清 IgG, 并成功研制出了针对这些免疫球蛋白的单克隆抗体。

通过饱和硫酸铵法粗提了 16 种动物 (鸡、鸭、鹅、猪、兔、猫、绵羊、山羊、犬、梅花鹿、塔里木马鹿、马、食蟹猴、羊驼、鸽子、大鼠) 血清中的 IgG, 免疫亲和层析进一步纯化。SDS-PAGE 鉴定无杂条带作为免疫原, 按照“混免分筛”的策略, 分为五组进行免疫。经过多次免疫后, 取小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合。矩阵法确认抗原与血清之间的最佳工作比例, 建立了 16 种动物的 IgG 的间接 ELISA 检测方法应用于杂交瘤细胞的筛选。经过有限稀释法连续 2~3 次亚克隆筛选后, 共获得了 37 株杂交瘤细胞株, 其中鸡 2 株、鸭 2 株、鹅 3 株、猪 1 株、兔 2 株、猫 4 株、羊 4 株、犬 1 株、鹿 8 株、马 1 株、食蟹猴 1 株、羊驼 2 株、大鼠 4 株、鸽子 2 株。其中 1A2B9C3-C, 3D2F8C5-C 为抗鸡 IgG 抗体, 1D6B5E2-D, 1B4G2G11-D 为抗鸭 IgG 抗体, 3C1B11A8-G, 2D4A3D4-G、1C1B3G2-G 为抗鹅 IgG 抗体。3G12F3E9D10-Sw 为抗猪 IgG 抗体, 2G9B9F9-R, 1H4G6G8-R 为抗兔 IgG 抗体, 4D3G3E3-F、1B6A5B8-F、1E10B6D7A5-F、2A7B9B3C9-F 为抗猫 IgG 抗体。1B8B5D5-Ca 为抗犬 IgG 抗体, 6G2D2F8B7-H 为抗马 IgG 抗体。2B9C6D2D7-Rat、2C12G3F5F4-Rat、2F12C3E3C5-Rat、2G8F4F3G5-Rat 为抗大鼠 IgG 抗体。4E4A9E1G3-A、3F8A9F1E8-A 为抗羊驼 IgG 抗体, 6D9D4D7F8-P、6H1F5G3C8-P 为抗鸽子 IgG 抗体。4E7E10H9-Cy 为抗食蟹猴 IgG 抗体,

1D7A5F7B7-S/G、4B8B3F12E2-S/G、4E11A9C12C3-S/G、3F7B9G7F1-S/G 为抗绵羊、山羊 IgG 抗体。4D5C6C2-S/T、4F5C2H11-S/T、6C5C7G1D7-S/T、5F11E5E10F2-S/T、6A6G2F10G8-S/T、7B8E6C9C6-S/T、5D10D4D1F6-S/T、5F8F3H6E9-S/T 为抗梅花鹿、塔里木马鹿 IgG 抗体。经检测，以上杂交瘤细胞均能稳定分泌抗体。选取不同种类的单抗各 1~2 株共 27 株单克隆抗体进行腹水制备，以 $OD_{450} \geq 0.5$ ，并且阴性血清对照 < 0.1 作为最大稀释倍数，通过间接 ELISA 检测细胞上清效价最高可达 25,600，粗提腹水的效价最高可达 3,276,800，亚类鉴定结果显示 37 株杂交瘤细胞株均为 IgG1。采取间接 ELISA 和 Western-blot 对其进行特异性检测，结果显示单抗 1A2B9C3-C、1C1B3G2-G、2D4A3D4-G、4E7E10H9-Cy、3G12F3E9D10-Sw、2F12C3E3C5-Rat、2C12G3F5F4-Rat、2B9C6D2D7-Rat、5F8F3H6E9-S/T、7B8E6C9C6-S/T 仅与目的蛋白的轻链或重链发生反应，与其他动物抗原不发生交叉反应。本研究制备的 3C1B11A8-G 同时与鸡、鸭、鹅的轻链发生交叉反应，可以作为一株常见家禽通用抗体，为接下来针对禽类 IgG 单克隆抗体建立间接 ELISA 方法、进行疫苗效果评估等快速检测方法提供的生物材料，应用于临床检测。

HRP 标记 3C1B11A8-G，初步建立鸡、鸭、鹅 H5 AIV 抗体检测的间接 ELISA 检测方法。以灭活的 H5 AIV 抗原为包被抗原，鸡、鸭、鹅 H5 AIV 阳性血清为一抗，HRP 标记的 3C1B11A8-G 为抗抗体，建立了检测鸡、鸭、鹅 H5 AIV 抗体水平的间接 ELISA 方法，与 HI 效价进行对比。并对 150 份样本进行检测，阳性符合率在 100%，初步证明 HRP-3C1B11A8 具有一定的应用潜能，可以用于鸡、鸭、鹅 H5 AIV 抗体检测。

关键词：IgG；单克隆抗体；HRP；间接 ELISA

Abstract

Humoral and adaptive immunity depend on the production of immunoglobulin (Ig) by B-lymphocytes in human and animal bodies, which is a protein that binds to antigens and is known as an antibody (Ab). Immunoglobulin G (IgG) is the most abundant of them all, making up roughly 70% to 80% of total immunoglobulin. It is present in blood and tissues and is essential to immune function. Animal disease prevention and control agencies pay attention to the evaluation of the effects after vaccination, and the antibodies specific to major pathogens of animal diseases are monitored annually to learn about the health status of the animals and the presence of relevant pathogens. So those data provide early warning and prediction information for the prevention and control of infectious disease. The presence or absence of specific IgG in human and animal sera is frequently used as an important indicator of vaccination and exposure to pathogens. The entities that regulate animal disease play an important on the assessment of vaccination efficacy. Specific anti-IgG antibodies are needed to detect the presence of IgG, and monoclonal antibodies have the advantages of good specificity and high sensitivity. Horseradish peroxidase-labeled monoclonal antibodies are essential immunological reagents, but currently, there are few of these and even fewer labeled products for commercialization. Consequently, in this experiment, we purified the serum IgG of sixteen animal species and successfully developed monoclonal antibodies against these immunoglobulins.

The saturated ammonium sulfate method was used to extract IgGs from the sera of 16 different animals respectively, including chicken, duck, goose, swine, rabbit, feline, sheep, goat, canine, sika deer, tarim red deer, horse, cynomolgus monkey, alpaca, pigeon, and rat. The IgG was then further purified using immunoaffinity chromatography. These IgGs, with the pure bands identified by SDS-PAGE serving as immunogens were divided into 5 groups by taking the "mixed immunization, separate screening" strategy while immunizing the mice. SP2/0 cells and spleen cells were fused following several vaccinations. The optimal concentrations of antigens and sera were verified using the matrix approach, and indirect

ELISA methods were developed to screen hybridoma cells using IgGs of sixteen different animals. Following two to three successive subcloning with the series dilution approach, 37 hybridoma cell lines were obtained in total. Two strains for chicken IgG, two strains for duck IgG, three strains for goose IgG, one strain for swine IgG, two strains for rabbit IgG, four strains for felines IgG, four strains for sheep/goat IgG, one strain for canine IgG, eight strains for sika deer/tarim red deer IgG, one strain for horse IgG, one strain for cynomolgus monkey IgG, two strains for alpaca IgG, four strains for rat IgG, and two strains for pigeon IgG among them. The McAb against chicken IgG was designated as 1A2B9C3-C. The McAbs against duck IgG were designated as 1B4G2G11-D and 1D6B5E2-D respectively. The McAbs against goose IgG were designated as 3C1B11A8-G, 2D4A3D4-G, and 1C1B3G2-G respectively. The McAb against swine IgG was designated as 3G12F3E9D10-Sw. The McAbs against rabbit IgG were designated as 1H4G6G8-R and 2G9B9F9-R respectively. The McAbs against feline IgG were designated as 4D3G3E3-F, 1B6A5B8-F, 1E10B6D7A5-F and 2A7B9B3C9-F respectively. The McAbs against canine IgG was designated as 1B8B5D5-Ca. The McAb against horse IgG was designated as 6G2D2F8B7-H. The McAbs against rat IgG were designated as 2C12G3F5F4-Rat, 2F12C3E3C5-Rat, 2G8F4F3G5-Rat and 2B9C6D2D7-Rat respectively. The McAbs against alpacas IgG were designated as 4E4A9E1G3-A and 3F8A9F1E8-A respectively. The McAbs against pigeon IgG were designated as 6D9D4D7F8-P and 6H1F5G3C8-P respectively. The McAb against cynomolgus IgG was designated as 4E7E10H9-Cy. The McAbs against sheep/goats IgGs were designated as 1D7A5F7B7-S/G, 4B8B3F12E2-S/G, 4E11A9C12C3-S/G and 3F7B9G7F1-S/G respectively. The McAbs against sika deer and tarim red deer IgGs were designated as 5F11E5E5E10F2-S/T, 6A6G2F10G8-S/T, 7B8E6C9C6-S/T, 5D10D4D1F6-S/T, 4F5C2H11-S/T, 6C5C7G1D7-S/T, 4D5C6C2-S/T and 5F8F3H6E9-S/T respectively. The hybridoma cells mentioned could produce antibodies continuously. A total of 27 hybridoma cells specific to different animal IgG were chosen for preparing ascites. With $OD_{450} \geq 0.5$ and negative serum control < 0.1 as the cutoff point, the titer of supernatant could reach up to 25600, while crude extract of ascites could reach up to 3276800 in indirect ELISAs. All antibodies from these 37 hybridoma cell lines were IgG1. The monoclonal antibodies 1A2B9C3-C, 1C1B3G2-G, 2D4A3D4-G, 4E7E10H9-Cy, 3G12F3E9D10-Sw, 2F12C3E3C5-Rat, 2C12G3F5F4-Rat, 2B9C6D2D7-Rat,

5F8F3H6E9-S/T, and 7B8E6C9C6-S/T just reacted with the IgG from its own and could not react with the IgGs of other animals. The result was confirmed by Western-blot and indirect ELISA tests. The 3C1B11A8-G had cross-reactivity with the light chains of chicken, duck, goose and pigeon, and could be used to test the sera IgGs from these kinds of birds, which can be applied as a tool for the establishment of an indirect ELISA method against different avian IgGs, and for the evaluation of vaccination for clinical testing.

HRP-labeled 3C1B11A8-G was used to establish an indirect ELISA assay for H5 AIV antibody detection in chickens, ducks and geese. Inactivated H5 AIV antigen was used as the coated antigen, H5 AIV positive serum of chickens, ducks and geese as the primary antibody, and HRP-labeled 3C1B11A8-G as the anti-antibody, we established an indirect ELISA method for detecting the antibody level of H5 AIV in chickens, ducks and geese, and compared it with the HI titers. 150 samples were tested, and the positive compliance rate was at 100% with the HI test, which preliminarily proved that HRP-3C1B11A8 could be a potential tool for the detection of H5 AIV antibodies in chickens, ducks and geese.

Key words: IgG; monoclonal antibody; HRP; indirect ELISA

符号说明

符号	英文全称	中文名称及说明
A	Aminopterin	氨基喋呤
AIV	Avian influenza virus	禽流感病毒
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依赖性细胞毒性作用
ADCP	Antibody-dependent cellular phagocytosis	抗体依赖性细胞吞噬作用
BSA	Albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
C 区	Constant region	恒定区
CIAV	Chicken infectious anemia virus	鸡传染性贫血病毒
CDC	Complement dependent cytotoxicity	补体依赖性细胞毒性
CDR	Complementary determining region	互补结构区
DNA	Deoxyribonucleotide acid	脱氧核糖核苷酸
DDW	Deionized distilled water	去离子水
DIGFA	Dot- immunogold filtration assay	快速斑点免疫金渗透法
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FIA	Fluorescent Immunoassay	荧光免疫分析
FR	Framework region	框架区
Fab	Antigen-binding fragment	抗原结合片段
Fc	Fragment crystallizable	可结晶片段
GPV	Goose parvovirus virus	小鹅瘟病毒
H	Hypoxanthine	次黄嘌呤
H 链	Heavy chain	重链
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HCG	Human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
h	Hour	小时
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
IgA	Immunoglobulin A	免疫球蛋白 A
IgD	Immunoglobulin D	免疫球蛋白 D

符号说明

续表符号说明

符号	英文全称	中文名称及说明
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgM	Immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
KLH	Keyhole limpet hemocyanin	血蓝蛋白
KDa	Kilodalton	千道尔顿
L 链	Light chain	轻链
McAB	Monoclonal antibody	单克隆抗体
mg	Milligram	毫克
mL	Milliliter	毫升
min	Minute	分钟
NK 细胞	Natural killer cell	自然杀伤细胞
OVA	Ovalbumin	鸡卵清蛋白
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PBST	Phosphate-buffered saline tween-20	磷酸盐吐温-20 缓冲液
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻病毒
PRV	Pseudorabies virus	猪伪狂犬病毒
r/min	Rotation per minute	转/分钟
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	逆转录聚合酶链式反应
SP 2/0	SP 2/0 cell	小鼠骨髓瘤细胞株
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
T	Thymine	胸腺嘧啶
TK	Thymidine kinase	胸腺嘧啶核苷激酶
V 区	Variable region	可变区
WB	Western-blot	蛋白质免疫印迹
μL	Microliter	微升
μg	Microgram	微克

文献综述 动物 IgG 单克隆抗体及应用

在脊椎动物的防御系统中，获得性免疫作为机体免疫系统的组成部分，发挥着举足轻重的地位。免疫球蛋白作为在体液免疫中发挥作用的重要的效应分子，参与抗原结合、激活补体系统、进行免疫调节等一系列活动。各类抗体中以免疫球蛋白 G (IgG) 为主，此种蛋白出现于免疫球蛋白 M (IgM) 之后，出现后长时间存在于机体中，并发挥重要的免疫功能，是动物机体免疫系统重要的组成部分，该抗体的水平也代表机体的免疫机能和免疫状态及抗原暴露的证据。

预防为主是我国动物疫病防控的重要原则，疫苗接种是一种重要的预防措施，目前，我国大多传染病均进行疫苗免疫。疫苗接种后的效果评价是一个重要的工作，除少数疫病外，大多数动物疫病的免疫均是以体液免疫应答为主，疫苗接种后抗体水平的高低是重要的衡量指标。免疫后的动物需要检测抗体的高低和整齐度，其中主要是以检测 IgG 为主。因此，研制一些高通量的抗体检测方法用于诊断和免疫水平评估至关重要。这些检测方法的建立需要一些生物材料，尤其是抗 IgG 的抗体，与常规免疫血清相比，单克隆抗体具有同质性好、可大量生产、特异性更强、亲和力更高等优势。下面对我国动物生产领域 IgG 及其抗体的研制与应用情况进行综述。

1 免疫球蛋白概述

1.1 免疫及免疫球蛋白

人类通过免疫的手段进行传染病预防早已有较长的历史，在我国，宋朝时期就已经应用天花病人的痂皮接种来预防天花^[1]。据医书记载，较为安全的人痘“种苗”在我国 17 世纪就已经开始了广泛的应用，先后传到日本、俄国、途经黑海海峡远至英国。18 世纪末的英国医生 Edward Jenner 发明了牛痘苗预防天花的方法^[2]，至此拉开了抗感染免疫发展的序章。自 1937 年 Tiselius 提出 γ -球蛋白就是抗体以来，随着各种新兴实验技术的发展，人们逐步意识到 γ -球蛋白是一组蛋白质的复合体，而并非独立的一种，因此提出了需要含义更为精确的术语^[3,4]。在 1968 和 1972 年的国际学术的探讨下，将

具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白统一命名为免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig)^[5]。现代免疫学认为, 抗体与免疫球蛋白属于同一物质, 免疫球蛋白强调其化学结构, 而抗体侧重于对其生物活性的描述。

1.2 免疫球蛋白的结构和功能

在结构上, 免疫球蛋白由两条相同的 50 kDa γ H 链 (重链) 和两条相同的 25 kDa 的 κ 或者 λ L 链 (轻链) 共同构成一个多肽链, 之间通过二硫键进行连接^[6,7]。免疫球蛋白的多肽链可以分为 N 端和 C 端, 重链和轻链均可分为可变区 (V 区) 和恒定区 (C 区) 两个部分, 抗体分子中轻链和重链靠近 N 端的氨基酸序列变化较大, 其形成的结构域被称为可变区, 可变区发挥着抗原结合的作用。靠近 C 端的氨基酸不论在数量、排列顺序以及种类上变化较小相对稳定, 被称为恒定区, 恒定区则主要进行着下游的信号转导^[8]。每条重链由一个变量 (V_H) 域和 3 个常量 (C_H1 、 C_H2 和 C_H3) 域组成, 而每条轻链由变量 (V_L) 和一个常数 (C_L) 域组成。各个功能域的功能分别为: V_H 和 V_L 结合抗原; C_H1 含有遗传标志; C_H2 具有补体结合位点, 参与活化补体反应; C_H3 、 C_H4 等可与细胞膜表面的可结晶片段 (Fc) 受体结合, 介导调理吞噬、细胞毒作用及超敏反应^[9]。V 区存在部分高度可变的氨基酸序列, 这几个特殊的功能域被称为高变区 (Hypervariable region, HVR) 或互补决定区 (Complementary determining region, CDR)。H 链 V 区中存在四个高变区: 31~37 位 (CDR1)、50~55 位 (CDR2)、86~91 位 (CDR3) 和 101~109 位 (CDR4), L 链 V 区有 3 个高变区: 24~34 位 (CDR1)、50~55 位 (CDR2)、89~97 位 (CDR3)^[10]。高变区以外的其他部分, 其氨基酸组成和排列顺序相对不易变化, 称为骨架区 (Framework region, FR), 起支撑作用。在键间二硫键的连接作用下, 轻链 (L 链) 的 C 区与重链 (H 链) 的 C_H1 形成了免疫球蛋白 Y 型的底部, 重链 C 区的其余部分构成了抗体分子的主干。即抗原结合片段 (Fab) 由轻链可变区 (V_L)、重链可变区 (V_H)、轻链恒定区 (C_L)、以及一个重链恒定区的 C_H1 构成^[11]。抗体分子的主干部分因其具有可结晶性, 故又称为可结晶片段 (Fc)^[12]。可结晶片段 (Fc) 由重链恒定区的 C_H2 、 C_H3 构成, 这两个域在其铰链区域相连并发挥重要的功能^[13,14]。这些片段源于 Porter 在 1959 年发现木瓜蛋白酶能水解 IgG1 而获得^[15]。H 链 C 区氨基酸序列稳定, 用于决定免疫球蛋白的类型, 有脊椎动物一共有五种重链基因, 分别为 μ 、 γ 、 α 、 δ 、 ϵ 链, 以及两种轻链基因即 κ 链和 λ 链。不同的重链和轻链之间交错组合形成完整的抗体分子, 其类型分别为 IgG、IgM、IgA、IgE

以及 IgD^[16]。

作为获得性免疫系统的重要效应分子，伴随着颌口类脊椎动物的现世，免疫球蛋白大约出现在五亿年前^[17]。获得性免疫系统的一个重要特征是能够记忆特定的病原体，在机体遭遇二次攻击时能迅速做出更快的反应，相较单细胞生命体而言，这是免疫系统的一种进化^[18]。获得性免疫系统具有两种代表性的淋巴细胞，即 B 细胞和 T 细胞，它们表达多种抗原受体，几乎能识别无限范围的抗原，并把其产生的抗体经由血液扩散到全身^[19]。免疫球蛋白作为由 B 淋巴细胞产生的一种糖蛋白，与抗原结合后产生生物学活性，同时参与到机体的免疫应答反应中。其中免疫球蛋白 G 是脊椎动物血清中含量最丰富的蛋白质，也是五类免疫球蛋白中占比最多的一种，约占血浆蛋白的 10%~20%^[20]，约占血清中抗体总量的 70%~80%，同时也是体液免疫中发挥重要作用的效应分子。免疫球蛋白的功能与结构紧密相关，在抗原结合和发挥效应方面表现出协同作用，V 区主要负责特异性抗原结合，C 区则与细胞膜表面的 Fc 受体结合，与效应细胞（单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤（NK）细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和树突状细胞）结合 Fcγ（FcγR），或与补体 1q（C1q）结合，并引发免疫效应功能，如抗体依赖性细胞吞噬作用（ADCP）、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）和补体依赖性细胞毒性（CDC）^[21-23]。

2 杂交瘤技术

1975 年 8 月 5 日，Kohler 和 Milstein 在著名杂志《Nature》上发表了名为“分泌具有特异性抗体的融合细胞的持续培养”的文章^[24]，以小鼠骨髓瘤细胞与 B 淋巴细胞通过融合剂融合在一起，由此诞生了淋巴细胞杂交瘤技术。这种融合成功的杂交瘤细胞具有在体外无限繁殖，且兼具 B 细胞能分泌抗体的能力^[25,26]，经过一定的筛选手段之后能稳定生长的单个克隆细胞的后代产生的抗体被称为单克隆抗体（Monoclonal antibody, McAb），属于鼠源性抗体^[27]。杂交瘤技术的问世在抗体研发领域具有划时代的意义，通过这种方式，McAb 产生可以针对绝大多数的抗原的抗体。自 1986 年诞生了第一个鼠源性单抗药物以来，经过三十多年的发展，单抗药物势头迅猛，在肿瘤、自身代谢与免疫、病毒感染等多个生物领域大放异彩，展示了其独特的优势与良好的前景^[28]。近年来已经开发了多种新型 McAb 生成技术，如单 B 细胞扩增和培养技术、抗体库技术、转基因及新型动物模型等^[29]，与最传统的杂交瘤制备相比，其各有优劣

之处。

细胞融合技术制备杂交瘤目前仍是单克隆抗体的首选，美国食品药品监督管理局（FDA）批准的抗体中有 90%以上是通过传统的杂交瘤技术产生的^[30]。杂交瘤的生成一共需要五步，第一阶段涉及到免疫原性抗原的制备及纯化，第二阶段对动物进行免疫，利用抗原激活动物体内的免疫系统刺激 B 细胞成熟。第三阶段取脾脏并分离出其中的 B 细胞与骨髓瘤细胞进行融合，产生杂交瘤细胞。第四阶段，经过多次的筛选选择出最佳的细胞株，最后对选定的抗体进行扩增培养以及纯化^[31]。经过以上步骤最终得到的单克隆抗体来源稳定，保持高度的特异性，但其应用往往会受到来自宿主动物的局限^[32]。免疫原的制备根据实验设计及目的有多种选择，半抗原的小分子物质需要与牛血清蛋白（BSA）、血蓝蛋白（KLH）或卵黄蛋白（OVA）等进行偶联才能产生免疫原性^[33]。虽然去除抗原杂蛋白使其均一化非常关键，但并不是所有的免疫原都必须为单一的抗原，因为 B 细胞分泌抗体的特异性会在筛选过程中展现出来^[34]。但如果是进行体内或者是高剂量研究时，往往对抗原纯度具有高要求，需把纯度提高至 95% 以上^[35]。

对动物采取适当的免疫策略也是单抗制备的重要一环，免疫佐剂作为一种能调节机体免疫状态的药剂，通常与抗原搭配使用以增强动物免疫机能^[36]。兽医临床常用油乳佐剂苗，弗氏佐剂是常见的油乳佐剂，除此之外还有一些细菌源性的佐剂，如脂多糖类及一些无机盐佐剂等^[37]。通过融合技术能够获得既能分泌抗体又能大量繁殖的杂交瘤，目前常用的细胞融合技术主要有 3 种，仙台病毒诱导细胞融合虽然融合率较高，但因其病毒的不稳定性所以对于应用有较大的局限性；聚乙二醇（PEG）诱导细胞融合操作简单被广泛使用，但不同批次 PEG 对细胞影响不同，浓度过高也会对细胞产生损伤；细胞电融合也是近年来的一种新兴融合手段，能够规避化学试剂的污染及病毒的不稳定性，但设备昂贵^[38,39]。B 细胞与小鼠骨髓瘤细胞是否融合成功通过选择培养基的筛选来判定，选择培养基中添加的氨基嘌呤（A）是二氢叶酸还原酶的抑制剂，是阻断细胞 DNA 合成的内源途径，融合成功的杂交瘤细胞则通过次黄嘌呤（H）及胸腺嘧啶（T）合成次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT）和胸腺嘧啶核苷激酶（TK），可为核苷酸的合成提供一条应急通路，从而存活下来^[40,41]。杂交瘤细胞克隆成团一般需要两星期左右的时间，对细胞分泌的抗体进行筛选的这一过程通常也被称为阳性孔的筛选，常用的筛选方法有酶联免疫吸附试验（Enzyme Linked-Immunosorbent Assay, ELISA）、蛋白免疫印迹（Western-blot, WB）、荧光抗体技术（Immune Fluorescence, IF）等^[42]。能否采取快速且有效的方法筛选出针对预定特异性抗体的杂交细胞是细胞

建株成败的关键^[43]。在细胞融合初期阶段，部分阳性孔生长不稳定，为了获得稳定分泌抗体的阳性细胞，对杂交瘤细胞群进行克隆是非常有必要的。克隆是指一个细胞经特定条件下培养、扩增而产生的细胞群，细胞克隆技术又称为单个细胞培养技术。常用的克隆方法通常以有限稀释法为主，操作简单且便捷^[44]。

3 基于单克隆抗体的检测方法

通过利用精准、便利、快速的检测方法与合适的生物试剂相结合，能节省实验时间提高工作效率。以抗 IgG 单抗作为基础建立多种检测方法，可以应用于动物免疫接种后水平的检测的监控、免疫学预防与检测、动物疫病的诊断等。实验室常用的有 ELISA 酶联免疫检测技术、免疫胶体金技术以及荧光免疫分析技术等。

3.1 酶联免疫检测技术及其应用

ELISA 技术自本世纪 70 年代兴起之后，因其适应性强、准确度高、适用范围宽广、使用便捷迅速等诸多优点在医学生物等领域受到广泛应用。伴随单抗技术的兴起，使得 ELISA 检测技术在灵敏度、准确性及客观性等方面有了大幅提升^[45]。1971 年，Engvall 等人^[46]将酶与抗体偶联，用于组织中抗原的组织化学检测。同年，Van Weemen 等人^[47]还通过将抗原人绒毛膜促性腺激素（HCG）与辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase, HRP）偶联，提高了酶免疫测定的高灵敏度。酶联免疫检测技术其原理是将抗原或抗体吸附在固相载体表面与检测样本形成抗原抗体复合物，通过 HRP 标记的抗体与其结合，底物和酶发生催化反应进行显色，再通过测量 OD 值来读取结果^[48]。目前常用的测定方法分别为间接法测定抗原，双抗体夹心法测抗原以及竞争法测抗原^[49]，与传统抗原抗体检测相比，ELISA 技术操作便捷，可以同时检测多个样本，不仅节约时间也提升效率^[50]。ELISA 检测技术在畜禽养殖中的免疫程序制定、免疫防疫、疫病诊断方面的应用对于改善疫病防控和诊断的准确性和时效性发挥了良好的作用，魏天^[51]等通过对非洲猪瘟病毒 p10 蛋白的原核表达，成功建立了检测非洲猪瘟病毒的 ELISA 检测方法，并与商品化试剂盒结果进行了对比，符合率在 90.38%，具有较好的临床应用价值。马莉^[52]通过杆状病毒表达系统对鸡传染性贫血病病毒的 VP1/VP2/VP3 蛋白进行了共同表达，建立了基于重组杆状病毒表达蛋白的抗体检测间接 ELISA 方法，并与国外商品化试剂盒进行对比，两者符合率在 96.67%。王淑洋^[53]通过对鸭源沙门氏菌的重组

串联蛋白 PrgH-PagN 为抗原为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法, 对 87 份样本进行了临床检测, 符合率在 93.10%。张文劲等^[54]通过建立的间接 ELISA 方法对恒河猴血清 SARS-CoV-2 变异株特异性 IgG 抗体进行检测, 阳性符合率为 93.6%。蒋凤娇等人^[55]通过对鸡白痢沙门菌中的脂多糖进行提纯, 以此作为包被抗原, 成功建立了 D 群沙门菌间接 ELISA 检测方法, 与商品化检测试剂盒结果相比, 总体阳性率在 98.59%。

3.2 免疫胶体金技术及应用

胶体金免疫技术是免疫标记技术之一, 1971 年 Faulk 和 Taylor 将胶体金引入免疫化学^[56], 之后免疫胶体金技术 (Immunocolloidal gold, ICG) 作为一种新兴的免疫学方法在医学生物等领域得到了广泛的应用。胶体金免疫层析 (Colloidal gold-based immunochromatographic assay, GICA) 技术及快速斑点免疫金渗透法 (Dot-immunogold filtration assay, DIGFA) 是目前兽医领域常用的两种临床样本检测方法^[57], 两种方法的基本原理是以条状纤维层析材料—硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose filter membrane, NC 膜) 为固相载体, 待测样本借助毛细作用在层析条上泳动。同时, 样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体 (抗原或抗体) 发生高特异性、高亲和性的免疫反应, 层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域 (检测带), 通过可直接目测的标记物—胶体金颗粒在短时间内 (5~10 min) 聚集而得到直观的实验结果^[58]。

相较其他检测方法而言, 免疫胶体金技术便捷迅速, 缩短结果出现时间, 高度灵敏, 无需额外仪器的辅助, 对外界因素不受影响且安全简单, 技术也日趋成熟。贾宇旻^[59]等制备了猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 单克隆抗体并利用该抗体制备了胶体金免疫层析法, 并与 115 份 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, 逆转录聚合酶链式反应) 结果进行比对, 阳性符合率在 93%, 该方法的建立为 PEDV 胶体金免疫层析试纸条的快速检测奠定了一定的基础。于相龙^[60]利用鹅细小病 (GPV) 单克隆抗体建立了免疫胶体金层析法, 通过对 38 份组织上清液样本及 54 份尿囊液样本的 PCR 结果对比, 总体阳性率在 91.9%, 为基层快速筛检 GPV 提供了新的方法及技术支持。郭力伟等^[61]利用猪伪狂犬病病毒 (PRV) gE 单克隆抗体成功建立了胶体金免疫层析检测试纸条, 对其试纸条的敏感性重复性特异性进行了检测, 应用于临床检测, 与 PCR 结果一致率为 92.59%, 为今后鉴定 PRV 野毒株提供了新的方法及思路。赵肖等^[62]研制了可同时检测猪肺炎支原体 (MHP) 血清及黏膜抗体的 MHP 抗体胶体金免疫层析试纸条, 与商品化试剂检测符合率为 96.1%, 为 MHP 的进一步快速检测提供了生物

材料。

3.3 荧光免疫分析技术及应用

荧光免疫分析 (Fluorescence immunoassay, FIA) 是免疫技术中发展最早的一种检测方法, 于 1941 年 Coons 利用利用荧光素标记抗体在小白鼠的组织中成功的检测出可溶性肺炎双球菌多糖抗原, 建立了此种方法^[63]。荧光免疫技术主要分为两大类: 荧光抗体和荧光免疫分析, 其基本原理是将荧光素标记在抗体上, 再通过这种荧光标记抗体作为分子探针检查待检样本的抗原, 从而对其进行定性、定量及定位分析, 待检样本多为细胞及组织切片^[64]。这项技术在兽医临床上应用较为普遍, 可用于炭疽、猪丹毒、布氏杆菌病、猪气喘病及其他禽类传染病的快速诊断^[65]。一直以来, 荧光免疫技术是对细胞内抗原或抗体进行定位检测的“金标准”, 通过追踪抗原-抗体复合物上的荧光素标记, 能更为直观地展示病原微生物感染机体后在组织中的聚集场所, 为病原微生物的发病机制提供证据及参考。

刁有详等^[66]通过分离鸡轮状病毒免疫家兔提取高免血清并以此为基础建立了鸡轮状病毒的荧光免疫快速诊断技术。胡清海等^[67]通过制备鸡传染性贫血病毒 (CAV) CuX-1 毒株, 建立了检测 CAV 的间接免疫荧光方法, 并利用此方法检测 CAV 基因工程亚单位苗首免、二免和三免后鸡体内的 CAV 抗体, 结果显示鸡血清中的 CAV 抗体滴度随着时间的增长而逐步升高, 该种检测方法对 CAV 流行病学调查奠定了一定的基础及意义。罗玲等人^[68]以新城疫病毒多克隆抗体作为一抗, 抗鸡 IgG 作为二抗, 建立了检测新城疫病毒含量的间接免疫荧光方法, 与常规细胞病变检测法相比, 在检测弱毒株时其敏感性更高, 且结果可靠。

4 抗不同动物源性 IgG 单克隆抗体的研究

免疫球蛋白作为一个糖蛋白家族, 根据其化学结构上的差异一共可以分为五类, 这五类被称为同种型, 分别为 IgM、IgG、IgE、IgA 以及 IgD。IgG 是血清 Ig 中含量最多的, 也是唯一能通过胎盘的球蛋白。血清中 IgG 的测定常常作为动物免疫接种后的水平监测指标, 其中主要是 IgG 检测为主。由单克隆抗体制备产生的抗抗体, 其特异性强、同质化高, 可以作为一种动物检测及免疫学试验中的生物试剂。

王永山等^[69]在 1989 年成功研制出五株针对鸡 IgG 的单抗, 进行 HRP 酶标后建立

了间接 ELISA 检测方法并对副鸡嗜血杆菌抗体及鸡新城疫病毒抗体进行了检测，取得了良好的检测效果。Mockett 在 1986 年制备了针对鸡 IgG 及 IgM 的单抗，其 IgM 是针对鸡、火鸡以及鸭的共同抗原决定簇。魏云玲等^[70]通过对抗鸡 IgG 抗体进行 HRP 标记后建立了针对鸡传染性腔上囊病（IBD）的双抗体夹心 ELISA 检测技术，经过多次重复，验证了其有效性。赵勇等^[71]对鸡卵黄中的 IgG 进行提取并与鸡全血中的 IgG 进行了比对，验证了从卵黄中分离 IgG 的方法比常规血清中分离纯度更高且更便利。

罗燕^[72]制备了抗鹌鹑 IgG 单克隆抗体，并以此为媒介建立了 3 种检测鹌鹑体内 NDV 抗体的方法：IFA、间接 ELISA 和胶体金免疫层析试纸条，并通过了灵敏性及特异性检测，填补了国内市场关于鹌鹑试剂检测的空白。吴胜昔^[73]通过对猪初乳及血清中的 SIgA 和 IgM 进行提纯后，成功制备了七株能稳定分泌抗体的细胞株，并建立了相关的 ELISA 检测对疫病的早期诊断提供了一定的理论依据及生物材料。蔡金利^[74]研制的抗鸡 IgM 单克隆抗体对疾病早期的预防及监控有一定的价值。焦红梅等^[75]制备的鸽 IgG 具有良好的特异性，不与其他禽类的蛋白发生非特异性反应，也是国内首次报道的关于鸽 IgG 的单抗，为鸽病的检测提供新的试剂及方法。陈阳等^[76]通过利用单 B 细胞扩增技术，将筛出 3 株线性结合活性最强的抗体基因构建到表达载体上，经过验证，抗体与马 IgG 蛋白具有良好的结合作用，为马的免疫学研究奠定了基础。

5 本研究的目 的及意义

本研究旨在研制出不同动物的单克隆抗体，将其运用于畜禽、实验动物、野生动物的疫病监测、筛检及免疫效果评价为动物疫病的防控提供必要的生物材料。

第一章 抗 16 种动物 IgG 单克隆抗体的制备

目前，我国食品类动物、经济动物、实验动物和野生动物养殖均得到了较快的发展，饲养动物种类的多样性造成了疾病监测与防控的复杂化。在我国，疫苗接种是动物疫病防控的一种重要的举措，疫苗接种后需要抗体评估才能了解免疫效果。因此，建立针对各种动物疫病的快速检测方法不仅能及时规避可能带来的风险，也能巩固养殖业的发展。各类生物材料对于疫病检测是很有必要的，尤其是抗体类的。杂交瘤技术自 1975 年以来，经过近 30 年的发展，其同质性好、特异性强等诸多优点一直被广泛应用于医药生物等各个领域。以杂交瘤技术制备的抗 IgG 抗体能够作为一种基础的生物材料，用于常规的免疫学检测。本实验以 16 种动物 IgG 作为抗原，涵盖了常见家禽、家畜及实验动物及经济动物，采取杂交瘤技术制备出了针对 16 种动物的 IgG 的抗体，以期为今后疫苗接种评价提供必要的生物材料。

1 材料

1.1 生物材料

2022 年至 2024 年期间制备或购买了共 16 种动物血清，分别为鸡、鸭、鹅、猪、兔、猫、绵羊、山羊、犬、梅花鹿、塔里木马鹿、马、食蟹猴、羊驼、鸽子以及大鼠。血清信息见表 1-1。小鼠骨髓瘤细胞（SP 2/0）由本实验室保存。

表 1-1 样品来源

Table 1-1 The sample source

序号	动物种类	血清/血液	制备时间	来源
1	鸡	血清	2022.1	自制
2	鸭	血清	2022.1	自制
3	鹅	血清	2022.1	自制
4	猪	血液	2022.3	自制
5	兔	血液	2022.3	自制

续表 1-1 样品来源

序号	动物种类	血液/血清	制备时间	来源
6	猫	血液	2022.5	自制
7	绵羊	血清	2022.7	自制
8	山羊	血清	2022.7	自制
9	犬	血清	2022.8	自制
10	梅花鹿	血清	2023.2	XX 先生惠赠
11	塔里木马鹿	血液	2023.4	XX 鹿场惠赠
12	马	血清	2023.4	购自 XX 公司
13	食蟹猴	血液	2023.6	XX 医师惠赠
14	羊驼	血液	2023.8	XX 惠赠
15	大鼠	血液	2023.8	XX 医师惠赠
16	鸽子	血清	2022.8	XX 公司惠赠

1.2 主要试剂

HAT、HT、DMEM 培养基购自 Gibco 公司；PEG 1500（货号：42333900）购自 Roche 公司；胎牛血清（FBS）购自 Homeland 公司；酶标抗体（H+L chain）（Goat anti-mouse）pAb-HRP 购自 MBL 公司；亚类鉴定用酶标二抗即用套装（货号：BF06002）购自 Biodragon 生物有限公司；考马斯亮蓝染色液、36 MM 透析袋购自 Biosharp 公司；Protein A+G Agarose（Fast Flow，5 mL）预装柱（货号：011221210303）；6×SDS 凝胶电泳上样缓冲液、BeyoColor™ 彩色预染蛋白分子量标准（6.5~270 KDa）、1.0 M Tris-HCl（pH 8.8）、1.0 M Tris-HCl（pH 6.8）、TEMED 均购自 Beyotime 生物技术有限公司。青霉素-链霉素-两性霉素 B 溶液、TMB 显色液购自 Solarbio 公司；超敏 ECL 化学发光试剂盒（货号：P10100）购自苏州 NCM Biotech 生物科技有限公司；丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 30%溶液（29:1）购自 Sangon Biotech 公司。

1.3 主要仪器

超低温冰箱（905-ULTS），二氧化碳培养箱（150 I），生物安全柜（MCS 1.2）为 Thermo Fisher Scientific 公司；电子天平（FAI204B）为 Yokechina 公司；酶标仪

(Epoch-3) 为 BioTek 公司产品; Onedrop 超微量分光光度计 (Berthold Colibri) 为 Berthold Colibr 公司产品; 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9240A) 为上海精宏实验设备有限公司; 超纯水仪一体机 (DirectQ5UV) 为 Millipore 公司产品; 垂直电泳仪 (Mini-Protein), 半干转印电泳槽 (VE 386) 为伯乐生命医学产品有限公司 (BIO-RAD) 产品; 高压灭菌锅 (SX-50) 为日本 TOMY KOGYO 公司产品; 凝胶成像分析仪 (WD-9413B) 为北京六一生物科技有限公司产品; 电热恒温金属浴 (BL-10A) 为上海比朗仪器有限公司产品; 倒置显微镜 (TS2) 为尼康公司 (NIKON) 产品; 高速冷冻离心机 (5810 R、5430 R) 为艾本德生命科学公司 (Eppendorf) 产品; 涡旋振荡器 (OSE-VX-01) 为天根生化科技 (北京) 有限公司产品; 高转速离心机 (Himac CR21G II) 为日立公司 (HITACHI) 产品; 翘板摇床 (QW-YC-24) 为杭州齐威仪器有限公司产品。

2 方法

2.1 免疫原制备

2.1.1 饱和硫酸铵盐析法粗提血清中的 IgG

(1) 取 40~45 mL 动物血清置于 50 mL 的离心管中, Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 12,000 r/min 离心 15 min 后弃掉大部分的漂浮的脂质物质、细胞碎片及其他杂质。

(2) 饱和硫酸铵的制备: 取硫酸铵粉末 90~95 g 加入热的 100~120 mL 的去离子水, 磁力搅拌器不间断搅拌混匀, 待到降至常温后室温过夜, 次日瓶内有结晶析出表明硫酸铵溶液达到饱和, 取氨水调节 pH 至 7.4, 即为饱和硫酸铵溶液。

(3) 取离心后的血清置于 100 mL 的小烧杯或者锥形瓶中, 放入磁力搅拌棒置于搅拌器上, 取 5 mL 的塑料吸管吸取血清 1/2 量的饱和硫酸铵溶液缓慢加入血清中, 一滴混匀后再加入下一滴, 期间注意尽量避免产生气泡。

(4) 在磁力搅拌器上轻搅一个小时或静置 2~3 h, 使蛋白充分结合沉淀, 将液体转移到 50 mL 的离心管中, 电子天平配平后, Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 12,000 r/min 离心 15 min, 弃掉上清, 沉淀物用适量的 33% 或 50% 的饱和硫酸铵溶液重悬。

(5) 用 33% 的饱和硫酸铵溶液重复 3 次操作之后, 最后一次沉淀用血清与饱和硫酸铵溶液总量 1/10 的 PBS 重悬。

(6) 用剪刀裁取适量长度的 36 MM 透析袋, 置于 DDW 中 100 °C 煮沸 10~15 min

后，再用 DDW 充分洗涤浸泡，使用透析袋时应全程佩戴一次性橡胶手套，避免污染透析袋。

(7) 用透析袋夹夹住透析袋端口，另一端缓慢加入需透析的蛋白液体，排干袋内空气后用透析袋夹另一端口。

(8) 取 1~2 L 的大烧杯，杯内至少放入 120~150 倍透析蛋白液体体积的 PBS (pH 7.4)，将透析袋置于其中，4 °C 静置过夜，期间换液 3~4 次。

(9) 从透析袋中取出蛋白溶液，Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 8,000 r/min 离心 15 min，弃掉沉淀，上清即为粗提的 IgG 液体。紫外分光光度计测定浓度后进行分装，置于 -20 °C 或 -80 °C 可长期保存。

2.1.2 Agarose-Protein G 免疫亲和层析法纯化 IgG

(1) Agarose-Protein G 免疫亲和层析预装柱储存于 4 °C，使用前需提前 0.5 h 左右拿出以便降至室温方可操作。

(2) 折断预装柱的底部，摘掉预装柱顶部的黑色防尘盖，选取合适尺寸的接口与预装柱的上端进行连接，用 10 mL 的一次性医用注射器摘掉针帽及针尖后吸取预装柱 10~15 倍体积的 PBS (pH 7.4) 对预装柱进行清洗与平衡，流速注意控制在 1 mL/min 左右，速度不能过快，并注意避免产生气泡导致预装柱堵塞，在清洗和平衡的过程中需注意勿将预装柱里的液体滴干。

(3) 粗提的 IgG 在上柱之前需用 PBS 按照 1:1 的比例对样品进行稀释，这样做的目的是确保样本溶液拥有合适的离子强度及 pH 值，并将所有液体用 0.45 µm 的滤膜进行过滤防止阻塞预装柱。

(4) 处理掉样本中的气泡，把样本液体从预装柱上端的接口进行注入，流速控制在 1 mL/min 左右，收集预装柱下端的穿流液，可重复此步骤 3~4 次，保证样本内的目的蛋白与预装柱内的琼脂糖凝胶充分结合，并注意收集穿流液，紫外分光光度计检测穿流液浓度查看目的蛋白是否被预装柱内的凝胶吸附。

(5) 样本结合后，吸取 20 倍柱体积的 PBS 对预装柱进行洗涤，目的是去除一些非特异性结合的杂蛋白，流速注意控制在 1 mL/min 左右。注意收集洗涤液进行测定吸光度。

(6) 在上一步洗涤完成后，在收集管中预先加入 100 µL 的 1 M 的 Tris-HCl (pH 8.8) 中和缓冲液，用 5 倍柱体积的 50 mM 的甘氨酸洗脱液 (pH 2.0) 洗脱结合的抗体，注意缓慢洗脱，每管收集 1 mL，并及时进行浓度测定，确定洗脱液的峰值集中在哪几个收集管中。对收集到的抗体进行分装、冻存于 -80 °C，并根据后续使用需要决定是否

需要对蛋白溶液进行透析等。

(7) 用 5 倍柱体积的 100 mM 甘氨酸溶液 (pH 2.0), 5 倍柱体积的 DDW 洗涤预装柱, 最后用 5 倍柱体积的 20%乙醇平衡预装柱, 并旋紧下端口 4 °C保存方便下一次使用。

2.1.3 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 鉴定目的条带大小

经过饱和硫酸铵盐析法、免疫亲和层析法得到了多种动物的粗提、纯化 IgG, 以此作为蛋白样本, 鉴定目的条带的大小。步骤如下:

(1) 配胶: 按照 12%的 SDS-PAGE 分离胶, 5%的 SDS-PAGE 浓缩胶进行凝胶的配置。12%浓度的分离胶配方如下所示: (以两块为例) DDW4.9 mL; 30%Acrylamide 6.0 mL; 1.0 M (pH 8.8) Tris-HCl 3.8 mL; 10%过硫酸铵 (AP) 0.15 mL; 10%SDS 0.15 mL; TEMED 0.006 mL。5%浓度的浓缩胶配方如下所示: (以两块为例) DDW2.7 mL; 30%Acrylamide 0.67 mL; 1.0 M (pH 6.8) Tris-HCl 0.5 mL; 10%过硫酸铵 (AP) 0.04 mL; 10%SDS 0.04 mL; TEMED 0.004 mL。将分离胶加入电泳槽底部, 用 DDW 或乙醇进行封层压实, 待分离胶凝固后弃掉上层的封层液, 加入浓缩胶并将加样槽模板插入浓缩胶内。配好的胶室温或 4 °C静置过夜。

(2) 样本的预处理: 取 50 µg 的蛋白样本加入 PBS 将样本稀释到 100 µL, 加入 6×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液约 16 µL, 金属浴 100 °C煮沸 8~10 min, 冷却至室温后进行加样。

(3) 加样: 轻缓拔掉浓缩胶内的加样模板槽, 选择分子量大小合适的蛋白预染 Marker 点样 5~10 µL, 样本每孔 10 µL。

(4) 电泳: 90 V, 30 min, 待样本通过浓缩胶进入分离胶后, 再 120 V, 1 h。

(5) 考马斯亮蓝染色与脱色: 将经过 SDS-PAGE 电泳后的凝胶切掉其他多余部分, 置于 DDW 中微波煮沸 2 min 左右, 考马斯亮蓝染液微波煮沸染色 2~3 min, 再用 DDW 微波煮沸 2~3 min 进行脱色, 此步骤重复两遍, 最后置于 DDW 中 4 °C静置过夜使脱色完全。次日观察 IgG 重链及轻链在胶上的位置。

2.2 动物免疫

因本实验制备了较多针对不同物种的 IgG 作为动物免疫原, 所以采取“混免分筛”的免疫与筛选策略, 即把 16 种动物抗原进行分组免疫。按照“鸡、鸭、鹅、鸽子”、“猪、兔、猫、犬”、“绵羊、山羊”、“梅花鹿、塔里木马鹿、马”、“大鼠、食

蟹猴”进行混合免疫，羊驼作为一种抗原进行单独免疫。把 2~4 种抗原等量混匀后注入小鼠腹腔内，经过验证，这种新方法进行混免策略与传统免疫策略相比，不仅能大大提高实验效率，节省时间，而且对抗原彼此之间的特异性不会产生较大的影响。具体免疫步骤如下：

购买 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，初次免疫时按照混合免疫的分组吸取不同动物的纯化 IgG 每种各 50~80 μg 在 2 mL 的 EP 管里，与弗氏完全佐剂一起按照等量 1:1 在匀浆机进行快速混匀，并加入适量的小钢珠，加入小钢珠的目的是快速与样本进行混合，达到快速乳化的目的。待乳化成功后，通过腹腔注射的方式把抗原注入小鼠体内。间隔两周后，第二次免疫时采取弗氏不完全佐剂对抗原进行乳化，其余免疫条件均不改变，后续免疫不再使用佐剂。并随时注意观察小鼠免疫后的身体情况以及是否有异常行为出现。第三次免疫后的第 7~10 天对小鼠进行尾静脉采血或眶下窦采血，通过矩阵法建立间接 ELISA 方法测定血清效价，选取效价较高的阳性小鼠吸取双倍抗原不加佐剂进行冲击免疫，3 天后进行细胞融合。免疫剂量和程序如下表 1-2 所示。

表 1-2 BALB/c 小鼠免疫剂量及程序

Table 1-2 BALB/c mice immune dose and program

免疫周龄 (W)	抗原剂量 (50 μg /种抗原)	注射方式
6	150	腹腔注射
8	150	腹腔注射
10	150	腹腔注射
冲击免疫	300	腹腔注射

矩阵法建立间接 ELISA 方法步骤如下：

(1) 用 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液对不同物种的纯化抗原按照 1:500 进行梯度稀释纵向包被 96 孔酶标板，每孔 100 μL ，进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。0.05 M 的碳酸盐包被液配方如下：（以 100 mL 为例）无水碳酸钠 (Na_2CO_3) 0.159 g，碳酸氢钠 (NaHCO_3) 0.293 g，加入 100 mL 的 DDW 至定容后测定 pH。

(2) 隔天弃掉包被液，取 PBST 每孔 300 μL 清洗 3 遍后洗板拍干，用 5% 脱脂奶作为封闭液每孔 200 μL 进行封闭，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育 2 h，洗板拍干。

(3) 小鼠抗不同动物的 IgG 阳性血清、阴性血清按照 1:500 进行梯度稀释横向加样, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育 2 h 后, PBST 每孔 300 μL 清洗 3 遍后洗板拍干。

(4) 酶标二抗 HRP-羊抗鼠 IgG 按照 1:10,000 进行稀释, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育 2 h 后, PBST 每孔 300 μL 清洗 3 遍后洗板拍干。

(5) 避光加入底物 TMB 显色, 每孔 100 μL , 作用 20 min 后, 加入 2 M 的硫酸 (H_2SO_4) 终止液, 每孔 50 μL 终止反应, 酶标仪测定样品 OD_{450} 值。参考抗原和血清的获取难易程度, 根据 OD_{450} 为 1.0 左右的孔的稀释梯度作为抗原最佳包被浓度、最佳阳性稀释浓度、最佳阴性稀释浓度。

2.3 细胞融合

2.3.1 融合预准备, 复苏骨髓瘤 (SP 2/0) 细胞

细胞融合前一周, 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中取出骨髓瘤细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅快速融化后, Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 1,000 r/min 离心 5 min 后, 弃掉上清。在生物安全柜中使用 10% 的 DMEM 培养基轻吹重悬底部细胞并转移到 T 25 细胞培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 次日观察细胞是否污染。待细胞达到最佳生长状态进行一扩二的传代培养。融合当天, 准备 4~6 瓶处于旺盛生长期的骨髓瘤细胞, 弃掉含有血清的培养基, 用普通 DMEM 轻轻清洗 2~3 遍, 去掉死细胞及残余血清成分。取适量普通 DMEM 将贴壁的骨髓瘤细胞用 3 mL 的塑料吸管轻吹下来集中于一个 50 mL 的离心管中, Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 1,000 r/min 离心 5 min 后, 弃掉上清, 适量普通 DMEM 重悬细胞, 放置一旁备用。

2.3.2 融合预准备, 处理饲养细胞

取两个 15 mL 的离心管, 一个置于冰上提前预冷, 一个吸取 6~10 mL 的普通 DMEM 置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 取一只健康的 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠眼科镊摘除眼球收集血液, Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 6,000 r/min, 离心 15 min 后, 吸取阴性血清作为阴性对照使用。脱颈椎处死小鼠后, 其尸体置于 75% 的酒精内消毒浸泡 15 min, 在生物安全柜内把尸体放在泡沫板上, 用针头固定住四肢及躯干, 使用高压灭菌的剪刀和镊子挑起腹部皮肤, 暴露整个腹腔, 用 10 mL 的一次性医用注射器针头吸取预冷的培养基, 从下腹部缓慢进针将培养基注入腹腔内, 注意避开腹腔内的脂肪组织, 同时 75% 的酒精棉球轻

轻按摩隆起的腹部，注射器边吸边打充分混匀腹腔内的巨噬细胞，直至 DMEM 由红色变为淡黄色后，将液体转移至预冷的 15 mL 的离心管置于冰上备用。

2.3.3 脾细胞的制备

取最后一次免疫后三天的小鼠，眼科镊摘除眼球，收集血液离心取血清做阳性血清对照，脱颈椎处死后，75%酒精浸泡消毒 15 min 后，在生物安全柜内将小鼠四肢及躯干用针头固定起来。取高温灭菌的镊子轻轻提起下腹部的皮毛，剪刀沿着腹中线剪出一个小口后，一只手固定住尾巴，另一只手用镊子夹住剪开的皮肤顺着头部往上掀开暴露整个腹腔，取另一套干净的剪镊，打开腹腔，找到脾脏后进行钝性剥离。把脾脏置于盛有普通 DMEM 的无菌培养皿中，轻轻洗涤 2~3 遍以去除其中的结缔组织或脂质物质。取另一干净的无菌培养皿，倒入适量的 DMEM，把脾脏置于一次性的细胞筛网中，用研磨棒轻轻挤压研磨，用 DMEM 轻轻浇灌直至研磨充分。研磨成功后将含有脾脏细胞的 DMEM 转移至另一干净的离心管中，Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 1,000 r/min，离心 10 min 后，取适量普通 DMEM 重悬细胞并放置一旁备用。

2.3.4 细胞融合

- (1) 提前准备预热的 30 mL 的普通 DMEM 及 PEG 1500。
- (2) 预先准备好 100 mL 的 HAT 选择培养基。
- (3) 将制备好的脾细胞和骨髓瘤细胞混在同一个 50 mL 的离心管中，Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 1,000 r/min，离心 5 min。
- (4) 离心结束后，弃掉上清液，离心管底部的细胞沉淀用手掌心轻轻摩擦和拍动管壁，使细胞均匀地沉散在管底。取 1 L 大烧杯注入 2/3 40 °C 的温水，将含有骨髓瘤细胞和脾细胞的离心管放置于烧杯中央，用 2 mL 的塑料吸管吸取 1 mL 的预热的 PEG 1500，一边摇晃离心管管壁一边将 PEG 1500 缓缓加入，时间注意控制在 45 s~60 s 之间。
- (5) 加入 PEG 1500 后，静置 30 s~60 s 后，在 90 s 内加完预热的 30 mL 普通 DMEM，以终止 PEG 反应。
- (6) 室温下将离心管静置 10 min 后，Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机 1,000 r/min，离心 5 min，弃掉上清液，用提前制备好的预冷的饲养细胞重悬，并均匀分配在 HAT 培养基中，铺板 6~8 块 96 孔细胞培养板上，每孔约 150~180 μ L，放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

(7) 次日查看细胞是否污染，第 5~6 天用 HAT 选择培养基进行半换液，并注意观察是否有成团的细胞出现，第 10 天左右，用 HT 选择培养基进行全换液，并注意观察细胞状态，待细胞上清变黄后，弃掉上清，用 HT 选择培养基补液，这一步的目的是防止第一次间接 ELISA 检测初筛细胞时出现一些非特异性反应。待细胞上清再次变黄后，吸取细胞上清进行间接 ELISA 检测。

2.4 “混免分筛”策略的确立

因制备了较多的动物 IgG 作为抗原免疫小鼠，所以建立融合后的筛选策略至关重要，制定了“分开筛选”的筛检策略。通过方阵法确定了不同动物的 IgG 作为抗原进行包被的包被浓度，阳性、阴性血清的最佳稀释倍数以及酶标二抗的最佳稀释比例。最终确定了不同动物类型的免疫原与血清之间最合适的间接 ELISA 工作条件。

2.5 阳性细胞株的筛选及亚克隆

以建立的间接 ELISA 筛选方法为主，进行 3 次的连续检测，筛选出能稳定分泌且读值较高的细胞孔作为阳性孔，初步命名后通过有限稀释法进行亚克隆筛出单个阳性细胞。其步骤如下：

- (1) 准备一块 96 孔细胞培养板，铺板每孔 100 μ L 的 15% 的 DMEM。
- (2) 用移液枪吹匀原始阳性孔，取 100 μ L 在铺板的 96 孔细胞板依次倍比稀释。
- (3) 在显微镜下对倍比稀释的细胞孔进行计数，选择稀释到 30~40 个细胞左右的孔作为最佳稀释孔，吸出孔内的细胞，放入 4~4.5 mL 的 15% 的 HT 选择培养基中，混匀后，均匀铺板 3 排 96 孔细胞板，每孔约 100~120 μ L 液体，置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱中进行培养。
- (4) 次日查看细胞是否污染，3 天后观察是否有小的细胞克隆团出现，5 天后标记单个细胞团，每孔补液 120 μ L 的 HT 培养基，并注意观察细胞状态。第 10 天左右，待到细胞上清变黄，收集上清液进行间接 ELISA 检测。
- (5) 经过连续 3 次亚克隆，对持续分泌抗体且阳性值较高的单个细胞孔进行建株并扩大培养，一部分用于保种冻存，一部分用于后续实验。

2.6 单克隆抗体的大量制备及效价检测

(1) 选择经产 BALB/c 母鼠, 每只腹腔注射 0.5 mL 的液体石蜡, 轻揉腹部使石蜡均匀附着于腹腔中。

(2) 一星期后取长势良好的杂交瘤细胞 10^5 个/只进行腹腔注射, 期间注意观察小鼠腹部状态, 7~10 天左右待小鼠腹腔鼓胀, 且有较强的波动感时收集腹水。

(3) 离心后经过饱和硫酸铵沉淀法、亲和层析法得到纯度较高的腹水, 间接 ELISA 测定浓度后分装于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存, 用于效价鉴定、SDS-PAGE 鉴定目的蛋白等后续实验。

2.7 建株杂交瘤生物学特性鉴定

2.7.1 单克隆抗体亚类鉴定

(1) 从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出提前包被好的不同物种的 IgG 酶标条, 吸取细胞上清样本每孔 100 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 2 h。

(2) 弃掉孔内液体, PBST 每孔 200 μL 清洗 3 遍后, 拍板纸拍干。

(3) 在亚类鉴定试剂盒内取出酶标抗体 IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 以及 IgM, 每孔 100 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 1 h。

(4) 弃掉孔内液体, PBST 每孔 200 μL 清洗 3 遍后, 拍板纸拍干。

(5) 避光加入 TMB 显色液, 每孔 100 μL , 作用 20 min 后加入终止液, 每孔 50 μL 。

(6) 显色后, 加入终止液终止显色, 可用肉眼查看或酶标仪读值进行亚类鉴定。

2.7.2 单克隆抗体间接 ELISA 验证特异性反应

取 16 种动物 (鸡、鸭、鹅、猪、兔、猫、绵羊、山羊、犬、梅花鹿、塔里木马鹿、马、食蟹猴、羊驼、鸽子、大鼠) 纯化好的 IgG 按照矩阵法进行最佳的抗原浓度包被 (包被浓度及条件见 3.3), 取建株的杂交瘤细胞上清每孔 100 μL 与不同动物的 IgG 通过间接 ELISA 方法进行交叉反应性测定与其他物种之间是否产生非特异性结合。腹水做 1:1,000~1:50,000 不等的稀释后, 作为样本与其他动物 IgG 通过间接 ELISA 验证交叉反应性。

2.7.3 单克隆抗体 Western-blot 验证特异性反应

以 Agarose-Protein G 免疫亲和层析法得到的纯化 IgG 作为蛋白样本, SDS-PAGE 电泳后, 进行蛋白转膜, 一抗, 二抗孵育后显色曝光查看建株单抗是否与其他 15 种动

物发生非特异性结合，并确定其结合的轻链与重链表位。其步骤如下：

(1) 纯化的 16 种动物（鸡、鸭、鹅、猪、兔、犬、猫、绵羊、山羊、梅花鹿、塔里木马鹿、马、食蟹猴、羊驼、鸽子、大鼠）的 IgG，每种样本取 50 μg 蛋白通过 PBS 稀释到 100 μL 后，上样量为每孔 10 μL ，SDS-PAGE 电泳 90 V，30 min 后，再 120 V，1 h。

(2) 经过 SDS-PAGE 电泳后，取出胶板，揭掉上层小玻璃后切除多余的浓缩胶体，将预先放入转膜液中激活的硝酸纤维素膜（NC 膜）及滤纸与胶充分贴合，放置顺序依次为两层滤纸、NC 膜、胶、两层滤纸的三明治夹心结构，放在半干转膜仪的正极与负极之间，并排走多余的气泡及液体，用 210 mA 恒定电流转膜 35 min，转膜结束后，应注意观察 Marker 是否全部从胶转移到膜上。

(3) 将 NC 膜浸泡在 5% 的脱脂奶中，室温摇晃孵育 2 h。

(4) 封闭结束后，用 PBST 洗涤 3 遍洗掉残余的封闭液，分别以不同动物单克隆抗体细胞上清按照 1:100~200 不等的浓度作为一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12-16 h。

(5) 第二天用适量 PBST 摇床震荡清洗 3~5 遍，每次 5~10 min。

(6) HRP 标记的羊抗鼠作为二抗，室温孵育 2 h，PBST 摇床震荡清洗 3~5 遍，每次 5~10 min。

(7) 清洗结束后，配置显色液，将显色液 A 液和 B 液按照 1:1 等量配置，每张 NC 膜吸取 600 μL 显色液，均匀铺开后放入显影仪进行曝光并查看结果。

2.7.4 遗传稳定性测试

建株杂交瘤细胞传代 40 代左右，冻存后复苏，分泌抗体能力稳定，细胞上清效价依然保持在较高水平。

3 结果与分析

3.1 免疫原制备与检测

经过饱和硫酸铵成功粗提了 16 种动物（鸡、鸭、鹅、猪、兔、猫、绵羊、山羊、犬、梅花鹿、塔里木马鹿、马、食蟹猴、羊驼、鸽子、大鼠）血清中的 IgG，紫外分光光度计测定蛋白浓度后，通过 Agarose-Protein G 免疫亲和层析法对得到的粗提 IgG 进行进一步的纯化，并通过 SDS-PAGE 电泳后考马斯亮蓝染色鉴定，结果显示经过免疫

亲和层析后能够得到纯化效果较好的免疫原，可用作抗原制备及后续实验。结果见表 1-3，图 1-1~1-5。

表 1-3 免疫原粗提及纯化浓度

Table 1-3 The results of crude extract and purified antigen

动物种类	粗提 IgG 浓度 (mg/mL)	纯化 IgG 浓度 (mg/mL)
鸡	17.91	2.35
鸭	19.96	1.24
鹅	11.16	2.01
猪	47.80	1.57
兔	26.40	3.45
猫	22.70	1.65
绵羊	43.60	2.37
山羊	33.14	3.53
犬	19.94	1.18
梅花鹿	43.17	5.56
塔里木马鹿	46.48	6.42
马	14.96	1.02
食蟹猴	38.72	17.94
羊驼	18.30	4.26
大鼠	17.20	2.21
鸽子	5.65	1.33

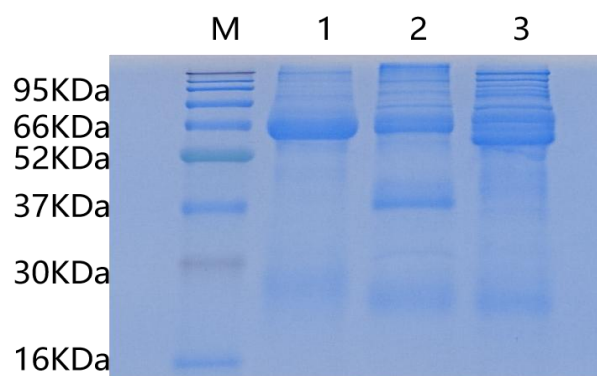


图 1-1 SDS-PAGE 鉴定 IgG

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 纯化的鸡 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 2: 纯化的鸭 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 3: 纯化的鹅 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果。

Fig. 1-1 The results of IgGs fragments in gels in SDS-PAGE

M: Marker of proteins with known mw

1: the result of SDS-PAGE staining in purified IgG protein of chicken

2: the result of SDS-PAGE staining in purified IgG protein of duck

3: the result of SDS-PAGE staining in purified IgG protein of goose

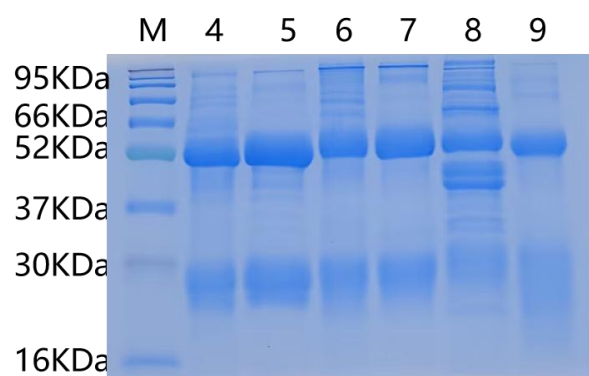


图 1-2 SDS-PAGE 鉴定 IgG

M: 蛋白质分子质量标准; 4~5: 粗提, 纯化的猪 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 6~7: 粗提, 纯化的兔 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 8~9: 粗提, 纯化的猫 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果。

Fig. 1-2 The results of IgGs fragments in gels in SDS-PAGE

M: Marker of proteins with known mw

4~5: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of swine

6~7: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of rabbit

8~9: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of feline

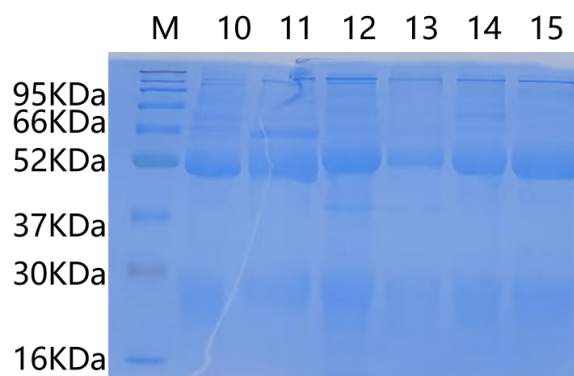


图 1-3 SDS-PAGE 鉴定 IgG

M: 蛋白质分子质量标准; 10~11: 粗提, 纯化的绵羊 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 12~13: 粗提, 纯化的山羊 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 14~15: 粗提, 纯化的犬 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果。

Fig. 1-3 The results of IgGs fragments in gels in SDS-PAGE

M: Marker of proteins with known mw

10~11: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of sheep

12~13: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of goat

14~15: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of canine

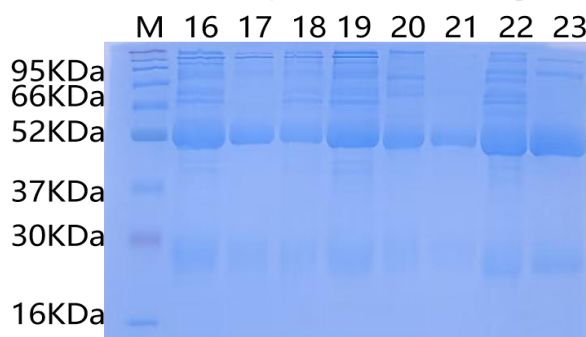


图 1-4 SDS-PAGE 鉴定 IgG

蛋白质分子质量标准; 16~17: 粗提, 纯化的梅花鹿 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 18~19: 粗提, 纯化的塔里木马鹿 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 20~21: 粗提, 纯化的马 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 22~23: 粗提, 纯化的食蟹猴 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果。

Fig. 1-4 The results of IgGs fragments in gels in SDS-PAGE

M: Marker of proteins with known mw

16~17: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of sika deer

18~19: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of tarim red deer

20~21: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of horse

22~23: the result of SDS-PAGE staining in crude extract and purified IgG protein of cynomolgus monkey

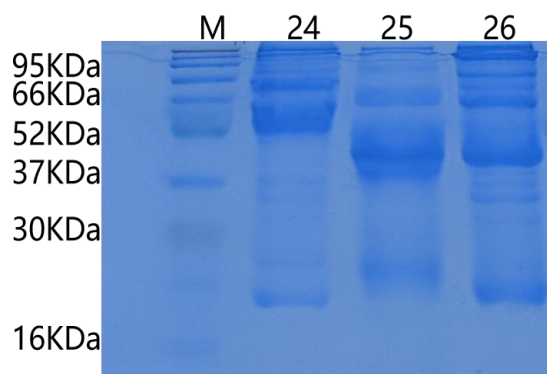


图 1-5 SDS-PAGE 鉴定 IgG

M: 蛋白质分子质量标准; 24: 纯化的鸽子 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 25: 纯化的羊驼 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果; 26: 纯化的大鼠 IgG 的 SDS-PAGE 染色后的结果。

Fig. 1-5 The results of IgGs fragments in gels in SDS-PAGE

M: Marker of proteins with known mw

24: the result of SDS-PAGE staining in purified IgG protein of pigeon

25: the result of SDS-PAGE staining in purified IgG protein of alpaca

26: the result of SDS-PAGE staining in purified IgG protein of rat

3.2 免疫后小鼠阳性血清间接 ELISA 效价检测

小鼠经过第 3 次免疫后的 7~10 天内进行眶下窦采血，制备血清通过间接 ELISA 测定血清效价，以阳性血清 $OD_{450} \geq 0.5$ 且阴性血清 < 0.1 的结果作为免疫成功的判定标准，表明小鼠体内产生了较高滴度的针对 IgG 的抗体，可以进行后续实验。血清稀释比例见表 1-4。

表 1-4 间接 ELISA 检测免疫后小鼠血清效价

Table 1-4 The Results of serums titering tests in immunized mice in I-ELISA

动物种类	血清效价	阴性血清 (OD ₄₅₀)
鸡	3,200	(-) 0.092
鸭	6,400	(-) 0.080
鹅	3,200	(-) 0.094
猪	12,800	(-) 0.056
兔	12,800	(-) 0.057
猫	6,400	(-) 0.072
绵羊	12,800	(-) 0.066
山羊	25,600	(-) 0.046
犬	3,200	(-) 0.058
梅花鹿	6,400	(-) 0.052
塔里木马鹿	6,400	(-) 0.073
马	3,200	(-) 0.061
食蟹猴	12,800	(-) 0.050
羊驼	6,400	(-) 0.574
大鼠	6,400	(-) 0.068
鸽子	25,600	(-) 0.077

3.3 抗原抗体最佳工作浓度的确认

通过矩阵法（见 2.2）确定了抗原最佳包被浓度，阳性血清、阴性血清最佳稀释梯度。参考抗原和血清的获取难易程度，根据 OD₄₅₀ 为 1.0 左右的孔的稀释梯度作为抗原最佳包被比例、最佳阳性稀释浓度。HRP-羊抗鼠最佳工作浓度为 1:10,000。结果见表 1-5。

表 1-5 间接 ELISA 确认不同种类抗原抗体最佳稀释倍数

Table 1-5 Optimal concentrations for different kinds of antigens and sera in I-ELISA

动物种类	抗原包被 稀释比	阳性血清 稀释比	阳性血清 OD ₄₅₀ 值	阴性血清 OD ₄₅₀ 值
鸡	1:3,200	1:6,400	1.157	0.061
鸭	1:3,200	1:3,200	1.023	0.091
鹅	1:6,400	1:3,200	1.125	0.080
猪	1:4,000	1:6,400	1.106	0.072
兔	1:1,600	1:1,600	0.989	0.038
猫	1:3,200	1:3,200	1.043	0.066
绵羊	1:2,000	1:12,800	1.091	0.035
山羊	1:4,000	1:3,200	1.124	0.077
犬	1:6,400	1:6,400	0.991	0.012
梅花鹿	1:12,800	1:6,400	1.118	0.054
塔里木马鹿	1:6,400	1:6,400	1.004	0.079
马	1:3,200	1:6,400	1.136	0.023
食蟹猴	1:1,600	1:6,400	0.971	0.057
羊驼	1:3,200	1:12,800	1.084	0.086
大鼠	1:12,800	1:12,800	1.311	0.168
鸽子	1:6,400	1:3,200	1.043	0.087

3.4 杂交瘤细胞株的筛选及建株

应用不同抗原（16 种纯化的 IgG）建立的间接 ELISA 进行筛选，有限稀释法连续 2~3 次亚克隆，共得到了 37 株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。其中鸡 2 株、鸭 2 株、鹅 3 株、猪 1 株、兔 2 株、猫 4 株、羊 4 株、犬 1 株、鹿 8 株、马 1 株、食蟹猴 1 株，羊驼 2 株、大鼠 4 株、鸽子 2 株。建株细胞的生物学特性见表 1-6。

表 1-6 建株细胞的生物学特性

Table 1-6 the biological characteristics of hybridoma cell lines

建株名称	亚类 鉴定	细胞上清 效价	粗提腹水 效价	交叉反应性	粗提腹水浓 度 (mg/mL)	纯化腹水浓 度 (mg/mL)
1A2B9C3-C*	IgG1	6,400	512,000	无	17.15	2.48
3D2F8C5-C	IgG1	3,200	512,000	无	12.33	1.56
1D6B5E2-D*	IgG1	1,600	16,000	无	24.56	3.54
1B4G2G11-D	IgG1	6,400	32,000	鸡、鹅	16.67	0.97
3C1B11A8-G*	IgG1	12,800	3,276,800	鸡、鸭	7.21	1.20
2D4A3D4-G	IgG1	3,200	25,600	无	4.87	1.46
1C1B3G2-G	IgG1	6,400	12,800	无	12.75	2.34
3G12F3E9D10-Sw*	IgG1	6,400	51,200	无	19.97	3.65
2G9B9F9-R*	IgG1	3,200	51,200	猪	4.69	0.87
1H4G6G8-R	IgG1	12,800	/	猪	/	/
4D3G3E3-F*	IgG1	3,200	51,200	猪	6.08	0.45
1B6A5B8-F	IgG1	3,200	/	无	/	/
1E10B6D7A5-F	IgG1	3,200	1:51,200	无	11.32	2.88
2A7B9B3C9-F	IgG1	12,800	1,024,000	猪	13.36	3.12
1B8B5D5-Ca*	IgG1	3,200	12,800	无	6.3	0.70
6G2D2F8B7-H*	IgG1	6,400	12,800	马鹿	4.22	1.65
2B9C6D2D7-Rat*	IgG1	6,400	51,200	无	3.71	0.94
2C12G3F5F4-Rat	IgG1	6,400	/	无	/	/
2F12C3E3C5-Rat	IgG1	6,400	/	无	/	/
2G8F4F3G5-Rat	IgG1	6,400	/	无	/	/

续表 1-6 建株细胞的生物学特性

建株名称	亚类 鉴定	细胞上清 效价	粗提腹水 效价	非特异性	粗提腹水浓 度 (mg/mL)	纯化腹水浓 度 (mg/mL)
4E4A9E1G3-A	IgG1	1,600	12,800	猪、大鼠	13.66	4.87
3F8A9F1E8-A	IgG1	1,600	/	猪、大鼠	/	/
6D9D4D7F8-P*	IgG1	3,200	/	无	/	/
6H1F5G3C8-P	IgG1	1,600	12,800	无	15.82	7.19
4E7E10H9-Cy*	IgG1	3,200	12,800	无	5.12	1.48
1D7A5F7B7-S/G*	IgG1	25,600	51,200	马鹿、羊驼	13.44	8.16
4B8B3F12E2-S/G	IgG1	6,400	12,800	马鹿、羊驼	/	/
4E11A9C12C3-S/G	IgG1	6,400	/	羊驼	/	/
3F7B9G7F1-S/G	IgG1	25,600	/	马鹿、羊驼	/	/
4D5C6C2-S/T*	IgG1	6,400	25,600	无	1.60	0.48
4F5C2H11-S/T	IgG1	6,400	51,200	无	12.4	1.67
6C5C7G1D7-S/T	IgG1	25,600	102,400	大鼠	24.06	3.06
5F11E5E10F2-S/T	IgG1	6,400	51,200	无	11.08	3.34
6A6G2F10G8-S/T	IgG1	6,400	25,600	犬、马、食蟹猴、 羊驼	11.16	2.12
7B8E6C9C6-S/T	IgG1	6,400	25,600	无	13.00	2.88
5D10D4D1F6-S/T	IgG1	6,400	102,400	大鼠	35.64	10.78
5F8F3H6E9-S/T	IgG1	6,400	51,200	无	12.16	3.97

注 1: C*: 鸡; D*: 鸭; G*: 鹅; Sw*: 猪; R*: 兔子; F*: 猫; Ca*: 犬; H*: 马; Rat*: 大鼠; A*: 羊驼; P*: 鸽子; Cy*: 食蟹猴; S/G*: 绵羊/山羊; S/T*: 梅花鹿/塔里木马鹿

Note1: C*:chick; D*:duck; G*:goose; Sw*:swine; R*:rabbit; F*:felidae; Ca*:canidae; H*:horse; Rat*:rat; A*:alpaca; P*:pigeon; Cy*:cynomolgus monkey; S/G*:sheep/goat; S/T*:sika deer/tarim red deer

注 2: “/”表示未制备腹水

Note2: "/" denotes an incomplete ascites preparation

3.5 建株杂交瘤细胞的生物学特性鉴定

3.5.1 间接 ELISA 测定建株细胞效价

使用间接 ELISA 测定建株杂交瘤的细胞上清效价和粗提腹水效价,以 $OD_{450} \geq 0.5$, 并且阴性血清对照 < 0.1 作为最终判定标准的稀释倍数,结果可得,细胞上清的效价最高可达 25,600,粗提腹水的效价最高可达 3,276,800,结果见表 1-6。

3.5.2 建株细胞亚类鉴定

根据说明使用亚类鉴定用酶标二抗即用套装,结果显示 37 株单抗抗体亚型鉴定均为 IgG1,结果见表 1-6。

3.5.3 建株细胞的交叉反应性

1、ELISA 交叉反应性

将最终获得的 37 株单克隆抗体分别与其他 15 种动物的 IgG 通过间接 ELISA 进行特异性检测。结果显示,1B4G2G11-D 与鸡、鹅发生交叉反应。3D2F8C5-C 与鸭发生交叉反应。3C1B11A8-G 与鸡、鸭发生交叉反应。6G2D2F8B7-H 与塔里木马鹿发生交叉反应。2A7B9B3C9-F 与猪发生非特异性反应。6C5C7G1D7-S/T, 5D10D4D1F6-S/T 与大鼠发生非特异性反应。6A6G2F10G8-S/T 与犬、马、食蟹猴及羊驼发生不同程度的非特异性反应。2G9B9F9-R 与猪发生非特异性反应,其余建株细胞均拥有良好的特异性。详细结果见表 1-7。

表 1-7 单克隆抗体交叉反应间接 ELISA 结果

Table 1-7 Cross-reactivity of Monoclonal Antibodies by I-ELISA results

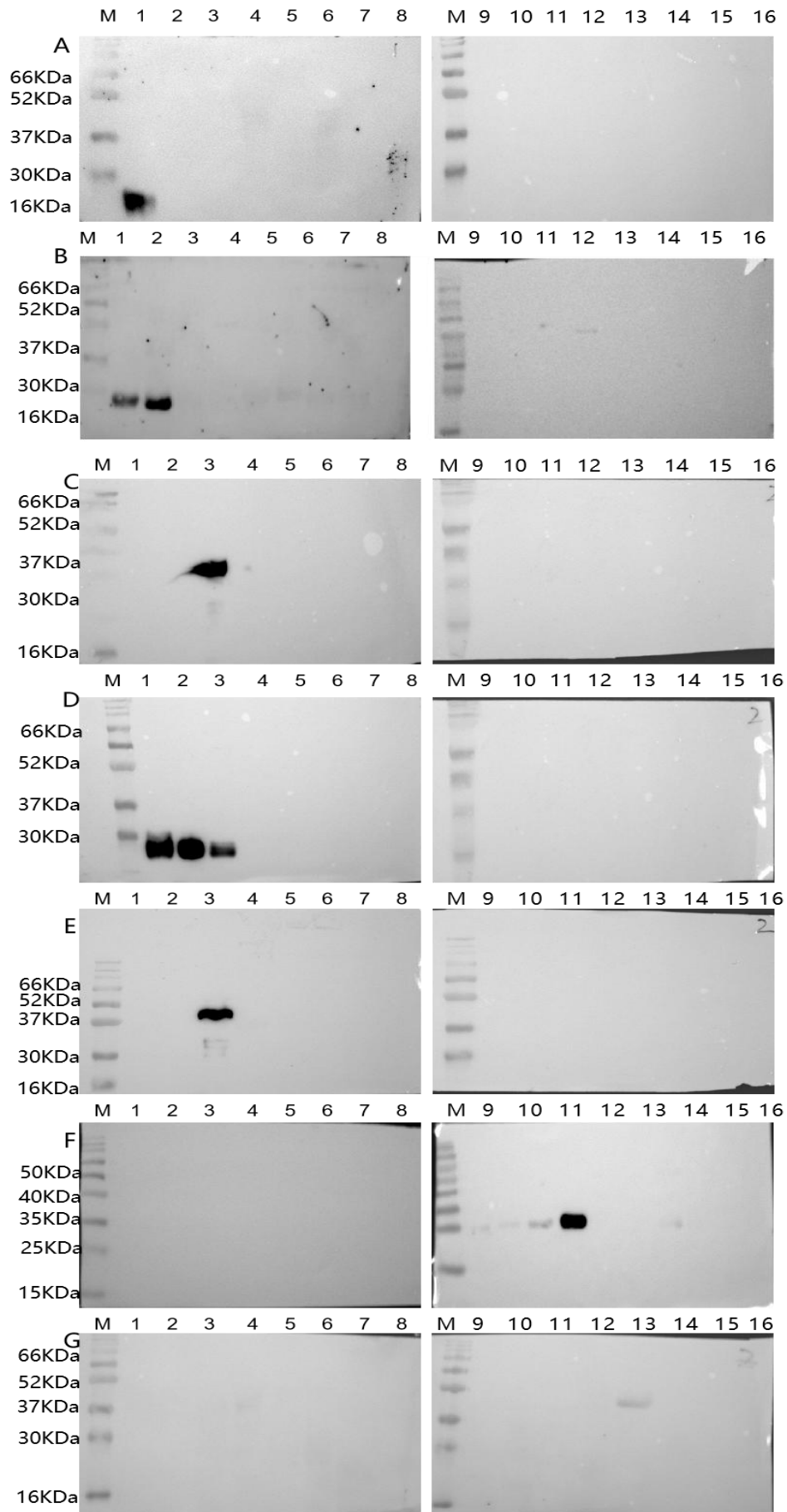
单抗名称	鸡	鸭	鹅	猪	犬	马鹿	马	食蟹猴	羊驼	大鼠
1B4G2G11-D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3C1B11A8-G	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4D3G3E3-F	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2A7B9B3C9-F	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

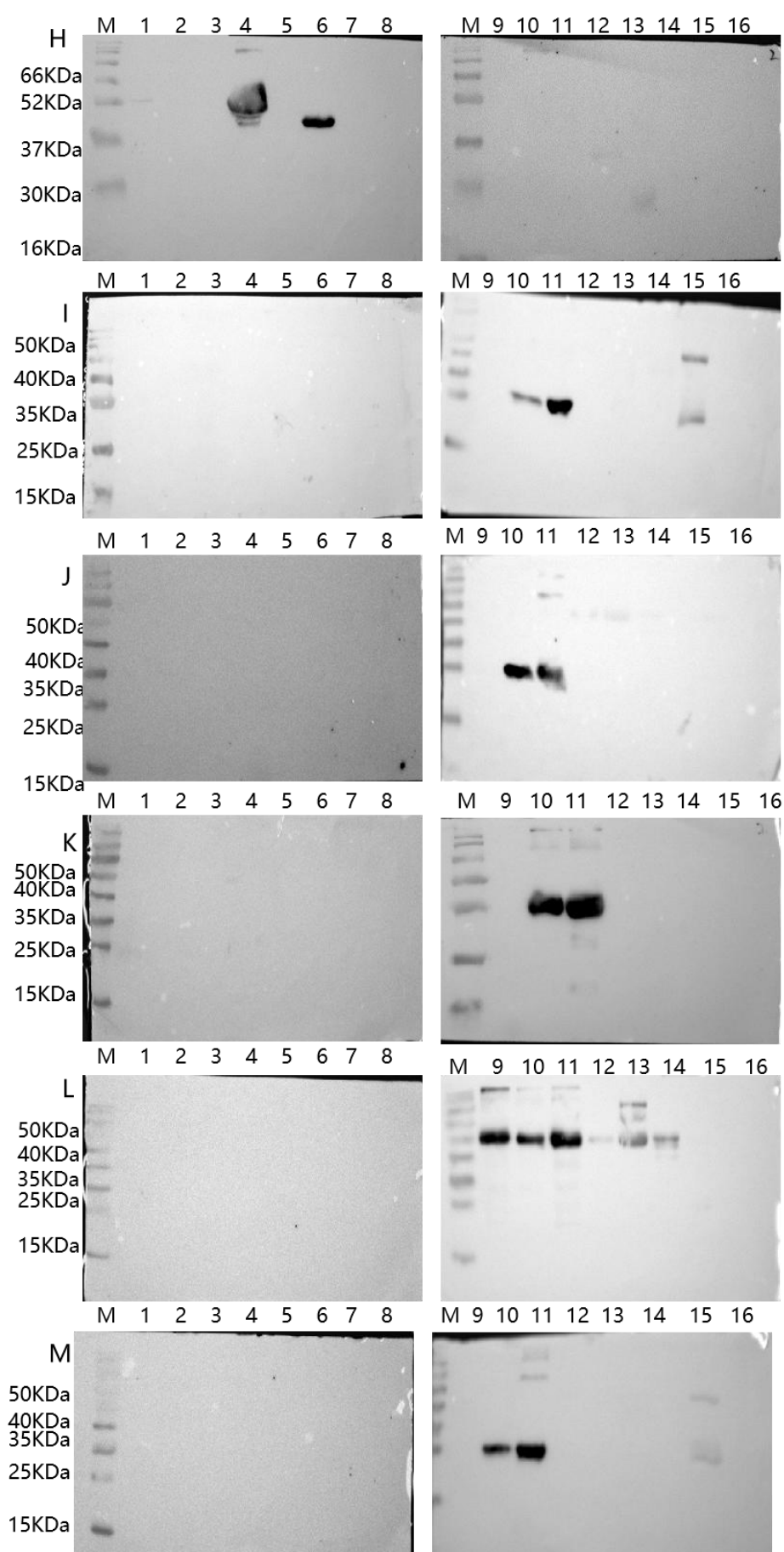
续表 1-7 单克隆抗体交叉反应间接 ELISA 结果

单抗名称	鸡	鸭	鹅	猪	犬	马鹿	马	食蟹猴	羊驼	大鼠
6G2D2F8B7-H*	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4E4A9E1G3-A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
3F8A9F1E8-A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
1D7A5F7B7-S/G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
4B8B3F12E2-S/G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
4E11A9C12C3-S/G	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3F7B9G7F1-S/G	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
6C5C7G1D7-S/T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6A6G2F10G8-S/T	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
5D10D4D1F6-S/T	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
2G9B9F9-R	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1H4G6G8-R	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

2、WB 交叉反应性

将部分建株单克隆抗体与其他 15 种动物的 IgG 通过 WB 进行特异性检测。结果显示, 3D2F8C5-C 与鸭发生交叉反应。3C1B11A8-G 与鸡、鸭发生交叉反应。6G2D2F8B7-H 与塔里木马鹿发生交叉反应。2A7B9B3C9-F 与猪发生非特异性反应。6C5C7G1D7-S/T, 5D10D4D1F6-S/T 与大鼠发生非特异性反应。6A6G2F10G8-S/T 与犬、马、食蟹猴及羊驼发生不同程度的非特异性反应。2G9B9F9-R 与猪发生非特异性反应, 其余建株细胞均拥有良好的特异性。Western-blot 特异性检测结果见图 1-6。





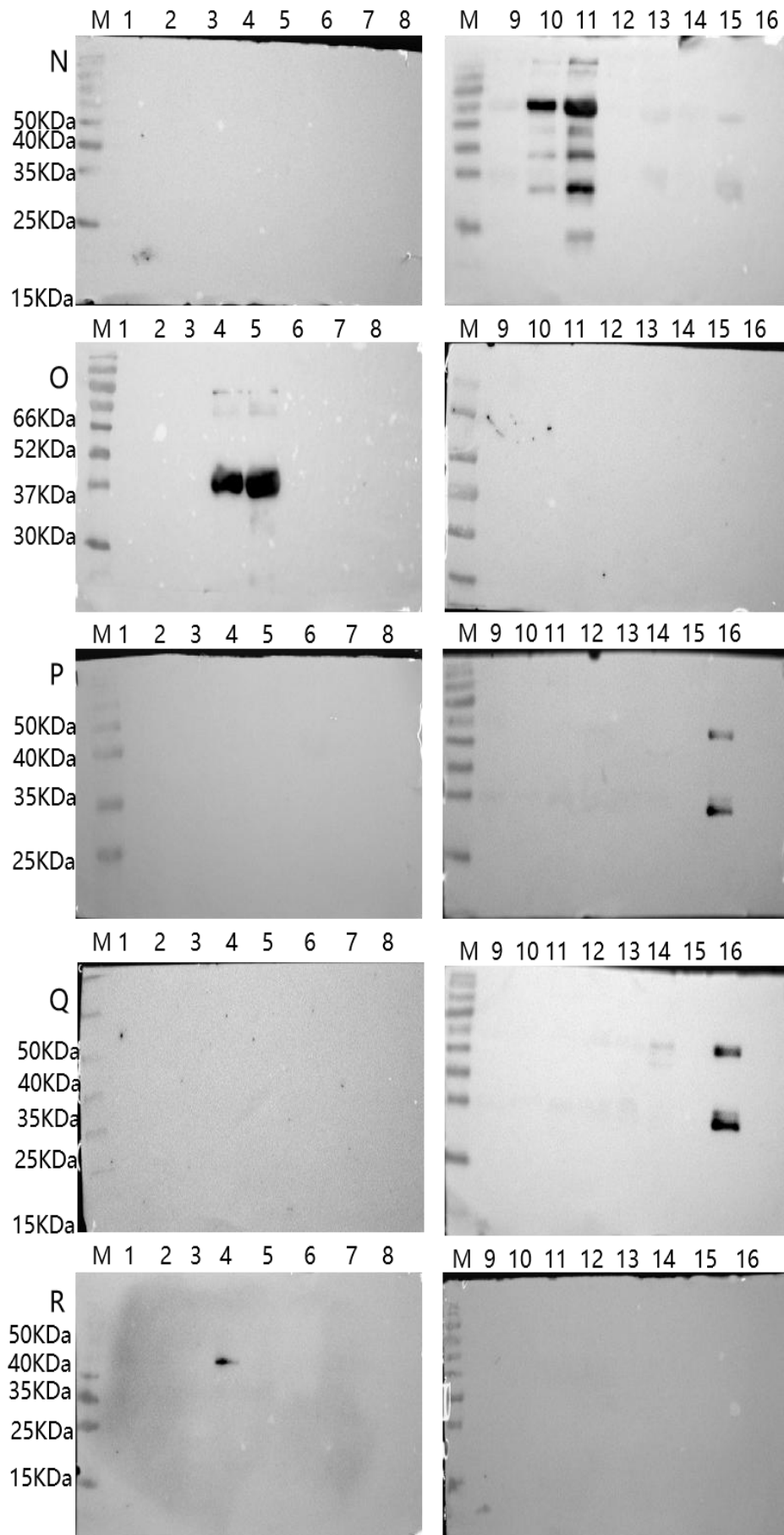


图 1-6 单抗 Western-blot 特异性检测结果

A:1A2B9C3-C B:3D2F8C5-C C:1C1B3G2-G D:3C1B11A8-G E:2D4A3D4-G
 F:6G2D2F8B7-H G:4E7E10H9-Cy H:2A7B9B3C9-F I:6C5C7G1D7-S/T J:5F11E5E10F2-S/T
 K:7B8E6C9C6-S/T L:6A6G2F10G8-S/T M:5D10D4D1F6-S/T N:5F8F3H6E9-S/T
 O:2G9B9F9-R P:2C12G3F5F4-Rat Q:2F12C3E3C5-Rat R:3G12F3E9D10-Sw
 M: 蛋白质分子质量标准; 1~16 分别为鸡、鸭、鹅、猪、兔、猫、绵羊、山羊、犬、梅花鹿、塔里木马鹿、马、食蟹猴、羊驼、鸽子、大鼠纯化 IgG

Fig. 1-6 Western-blot results of McAbs specificity detection

A:1A2B9C3-C B:3D2F8C5-C C:1C1B3G2-G D:3C1B11A8-G E:2D4A3D4-G
 F:6G2D2F8B7-H G:4E7E10H9-Cy H:2A7B9B3C9-F I:6C5C7G1D7-S/T J:5F11E5E10F2-S/T
 K:7B8E6C9C6-S/T L:6A6G2F10G8-S/T M:5D10D4D1F6-S/T N:5F8F3H6E9-S/T O:2G9B9F9-R
 P:2C12G3F5F4-Rat Q:2F12C3E3C5-Rat R:3G12F3E9D10-Sw

M: Marker of proteins with known mw

Sequence numbers 1-16 represent different purified IgG:chick; duck; goose; swine; rabbit; felidae; sheep; goat; canidae; sika deer;tarim red deer; horse; cynomolgus monkey;alpaca;pigeon;rat

4 讨论

作为构成免疫球蛋白家族的抗体中的其中一种, IgG 以单体的形式存在, 在出生后的 3 个月之内体内便开始合成, 游走于血管和间质组织之间, 是体内最主要的抗体。在我国各类常见的, 重要的传染病主要是通过疫苗免疫来进行防治, 疫苗接种后机体是否产生体液免疫, 此时抗体水平的高低可以作为一个重要的衡量指标, 约占免疫球蛋白家族 70%~80%含量的 IgG 成为了免疫效果检测和评估的标准。1975 年自单克隆抗体问世以来, 其技术日趋成熟, 因其同质性好、特异性强等诸多优点成为最常用的生物材料。针对不同动物免疫球蛋白的单克隆抗体作为间接试剂应用非常广泛, 国内外实验室已成功研制畜禽免疫球蛋白的单抗高达数十种^[77], 为传染性疾病的早期快速诊断提供了有利的帮助。目前畜禽类单克隆抗体作为抗原蛋白的诊断和治疗工具已经取得了长足的发展, 尤其是在疫病的研究和诊断领域中作为生物分子的高效体外免疫检测手段^[78], 自 2010 年起, 生产 IgG 产品的公司数量在急剧增加, 专利数量以及正在进行的临床试验的数量呈显著上升趋势。IgG 在专利申请领域的使用主要涉及在四大领域: 治疗和预防、作为一抗或二抗的研究试剂、IgG 提取和纯化方法以及诊断试剂盒

[79]。

本试验共制备了鸡、鸭、鹅、鸽子四种家禽，猪、绵羊、山羊、马四种常见家畜，犬、猫两种伴侣动物以及食蟹猴、大鼠两种实验动物，兔、梅花鹿、塔里木马鹿、羊驼四种特种经济动物的血清作为生物材料。以饱和硫酸铵盐析法粗提蛋白，能够得到浓度较高的 IgG，之后通过免疫亲和层析法对得到的蛋白进行进一步的提炼纯化，应用 SDS-PAGE 电泳后进行考马斯亮蓝染色。结果对比显示，纯化后的 IgG 与粗提时相比，减少了很多杂带，且轻链与重链的大小与相关动物 IgG 分子量相对应，用作抗原对小鼠免疫减少了筛选时非特异性的产生。

常规单克隆抗体技术操作流程中，一般只对小鼠进行一种抗原的免疫，但是考虑到本试验制备的多种抗原，单免不仅时间周期长，且工作效率低，所以在衡量之下，对动物抗原按照种类进行了一个粗略的分类，将“鸡、鸭、鹅、鸽子”作为家禽一组，“绵羊、山羊”作为家畜一组，“梅花鹿、塔里木马鹿、马”作为家畜二组，“猪、兔、猫、犬”作为家畜三组，“大鼠、食蟹猴”作为实验动物一组进行抗原混合免疫，而羊驼作为后期得到的抗原进行单独分组免疫。将 2~4 种抗原按照等量浓度对小鼠进行腹腔注射，相较每种抗原单独免疫而言，这样节约了时间成本。细胞融合成功之后，再按照不同抗原之间应用间接 ELISA 进行分开筛选，在理想情况下，一次融合就能得到针对不同动物的 2~4 种抗 IgG 的单克隆抗体。在后续免疫小鼠阳性血清效价检测结果显示，虽然混合免疫有出现不同抗原之间免疫效果的混杂，但未产生待检血清无法测出抗 IgG 抗体的状况，这表明，不同动物的 IgG 混合免疫策略能够产生相应的免疫效果，这种免疫方法可以应用于小鼠。

本实验通过制定的“混免分筛”的免疫策略，一共制备了 37 株能够稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。间接 ELISA 进行特异性检测发现，部分建株细胞分泌的抗体在不同程度上会出现一定的交叉反应。

进一步应用 Western-blot 进行特异性检测时发现，单抗 1A2B9C3-C、1C1B3G2-G、2D4A3D4-G、4E7E10H9-Cy、3G12F3E9D10-Sw、2F12C3E3C5-Rat、2C12G3F5F4-Rat、5F8F3H6E9-S/T、7B8E6C9C6-S/T 仅与目的蛋白的轻链或重链发生反应，与其他动物抗原不发生交叉反应。间接 ELISA 结果与 Western-blot 两者结果相符，表明这几株单抗拥有良好的特异性。单抗 3C1B11A8-G 同时能与鸡、鸭的轻链发生交叉反应。单抗 6G2D2F8B7-H 能与塔里木马鹿的轻链发生反应，2A7B9B3C9-F 能与猪的重链发生反应。单抗 6C5C7G1D7-S/T 能与大鼠的重链发生反应，单抗 6A6G2F10G8-S/T 能与犬、马、食蟹猴及羊驼的重链发生反应。本研究制备的禽类单抗不与其他哺乳动物类单抗

发生交叉反应,哺乳类动物之间发生的交叉反应也仅限于哺乳类动物的 IgG。究其原因,可能是因为哺乳动物之间的种属及亲缘关系更为接近,邵红霞等^[80]在抗鹅 IgG 单克隆抗体的研制中也出现了其制备 6 株的单抗能与鸭的轻链发生反应的情况。张段玲等^[81]制备的 5 株小鼠抗食蟹猴 IgG 单抗经过特异性检测,其目的蛋白也能够与种属关系接近的恒河猴的血清发生反应。王平等^[82]制备的抗牛 IgG 单抗的制备中也出现了部分建株细胞能够与山羊血清发生反应。蒋媛媛等^[83]制备的抗猪 IgG 单抗中出现了哺乳动物与禽类 IgG 发生反应的情况。蒋磊^[84]通过进化树分析得出,鸭和鹅拥有最近的亲缘关系,对鹅、鸡、小鼠、水貂、犬、猪、兔等同源建模的方式预测了其三级结构,发现水貂、犬、猪、牛与人类的相似性在 69%~75%左右。其中水貂与犬的氨基酸同源性高达 80%。以上种种数据证明,不同物种的 IgG 存在其结构上的相似性以及 Fc 片段上氨基酸同源性,即便通过繁琐程序得到的抗血清,对亲缘关系相近的抗原仍然有可能出现若干程度上的交叉反应^[85],这或许源于它们在线性表位及空间表位上可能针对相同或相似的抗原结合靶点。本研究的特异性反应仅针对 16 种动物的 IgG,在种类上仍然有所欠缺,之后可以进一步增加动物类型深入探讨不同种类 IgG 产生交叉反应的原因。

有研究表明,低温对 IgG 影响较小,能在 -20 °C 储存数年,在 4 °C 及 37 °C 保存数月对其活性不产生影响。但高温对 IgG 有较大影响,大于 70 °C 变形明显加快, IgG 变性时,肽链展开二硫键断裂, Fab 片段中的 C_{H1} 区域对热稳定敏感性较差,遇热时最先展开,继而构像发生变化失去活性^[86-88]。在 pH 4.0-11.0 时, IgG 依然保持活性,但过酸或过碱会使其变性失活。孙天松^[89]对猪体外免疫球蛋白稳定性研究表明, pH 4.0-11.0 范围内, IgG 结构十分稳定, pH<4.0 或 pH>11.0 时,稳定性则会下降。本研究尚未对影响抗体活性的各种因素进行进一步的探索分析,今后可以开展这类研究。

最终,本研究成功制备出 37 株单克隆抗体,这些抗体可用于后续检测方法的建立。其中 3C1B11A8 与鸡、鸭、鹅轻链均发生反应,可以用于建立通用的禽类 IgG 检测方法。

第二章 抗鸡、鸭、鹅 IgG 单克隆抗体的初步应用

我国是禽类生产和消费大国，近年来养禽业发展迅速，养殖量稳步上升，禽类疾病的早期预防诊断及筛查尤为重要。禽类血清中 IgG 含量测定是临床免疫学检验及体液监测的常用指征，然而检测和诊断用的试剂和试剂盒还不够完善，有一些方法，如 HI 试验属于劳动密集型，需要大量的人力，但同时也受到禽血红细胞的限制和影响，当样本量很大的时候无法完成。因此，研制一些高通量的抗体检测方法用于诊断和免疫水平评估至关重要。本研究在抗鹅 IgG 3C1B11A8-G 单克隆抗体的基础上对其进行酶标，并以其建立了检测鸡、鸭、鹅 H5 AIV 血清中抗体的间接 ELISA 方法，并与 HI 试验进行了比较。

1 材料

1.1 生物材料

抗鹅 IgG 单克隆抗体 3C1B11A8-G 及其他 15 种动物 IgG（鸡、鸭、猪、兔、猫、绵羊、山羊、犬、梅花鹿、塔里木马鹿、马、食蟹猴、羊驼、大鼠、鸽子）由本实验室制备并保存，H5 AIV 灭活抗原（Re-13，血凝价为 1:1,024）由 XX 有限公司惠赠，H5 AIV 鸡、鸭、鹅阳性血清（血凝抑制价为 1:128）由 XX 大学 XX 老师惠赠，150 份鸡、鸭、鹅的血清样本（鸡血清 60 份，鸭血清 50 份，鹅血清 40 份）由 XX 惠赠，鸡、鸭、鹅 H5 AIV 阴性血清由 XX 大学 XX 老师惠赠，经产 BALB/c 母鼠由 XX 有限公司惠赠。

1.2 主要试剂

脱脂牛奶、考马斯亮蓝染色液、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、1.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、HAT、HT 培养基均购自北京索莱宝有限公司；TEMED Substitute、Protein G Agarose (Fast Flow, 5 mL) 预装柱 (Lot: 091523230919)、6×SDS 凝胶电泳上样缓冲液均购于碧云天生物技术有限公司；酶标抗体 (H+L chain) (Goat

anti-mouse) pAb-HRP 购自博尔迈公司；过硫酸铵购自麦克林；丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 30%溶液 (29:1) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司；超敏 ECL 化学发光试剂盒购自苏州新赛美生物科技有限公司；NC 膜购于德国罗氏公司；胎牛血清 (FBS) 购自广兰生物公司；HRP 标记试剂盒 (Lot: KLB3114495) 购自北京博奥龙生物技术有限公司；彩色预染蛋白分子量标准 (10~180 KDa) 购自赛默飞世尔科技公司 (Lot: 2575332)。

1.3 主要仪器

超低温冰箱 (905-ULTS)，二氧化碳培养箱 (150 I)，生物安全柜 (MCS 1.2) 为 Thermo Fisher Scientific 公司产品；酶标仪 (Epoch-3) 为 BioTek 公司产品；Onedrop 超微量分光光度计 (Berthold Colibri) 为 Berthold Colibr 公司产品；超纯水仪一体机 (DirectQ5UV) 为 Millipore 公司产品；垂直电泳仪 (Mini-Proten)，半干转印电泳槽 (VE 386) 为伯乐生命医学产品有限公司 (BIO-RAD) 产品；高压灭菌锅 (SX-50) 为日本 TOMY KOGYO 公司产品；凝胶成像分析仪 (WD-9413B) 为北京六一生物技术有限公司产品；电热恒温金属浴 (BL-10A) 为上海比朗仪器有限公司产品；倒置显微镜 (TS2) 为尼康公司 (NIKON) 产品；高速冷冻离心机 (5810 R、5430 R) 为艾本德生命科学公司 (Eppendorf) 产品；涡旋振荡器 (OSE-VX-01) 为天根生化科技 (北京) 有限公司产品；高转速离心机 (himac CR21G II) 为日立公司 (HITACHI) 产品；翘板摇床 (QW-YC-24) 为杭州齐威仪器有限公司产品。

2 方法

2.1 酶标抗体的制备

2.1.1 饱和硫酸铵粗提腹水中的蛋白

将收集的腹水经过 8,000 r/min 离心 15 min 去掉上层多余的脂质及其他杂质后通过饱和硫酸铵盐析法对其进行粗提，详细步骤见第一章 2.1.1。

2.1.2 Agarose-Protein G 免疫亲和层析对腹水进行纯化

采用免疫亲和层析柱的方法对粗提后的腹水进行下一步纯化，详细步骤见第一章 2.1.2。

2.1.3 HRP 标记单克隆抗体

(1) 裁剪出合适长度的 36 MM 的透析袋, DDW 煮沸洗涤后, 取出纯化的腹水, 放入透析缓冲液 (0.01 M 的 CB, pH 9.6) 中 4 °C 透析静置过夜, 中途换液 2~3 次。

(2) 从 4 °C 冰箱中取出试剂盒, 冷却至室温后进行操作。

(3) 待标记抗体与活化 HRP 的质量按照 1:1, 用移液器充分混匀后, 加入 HRP 标记启动液 (每 10 μ L 抗体与 HRP 混合液加入 1.8 μ L 启动液), 避免气泡, 充分混匀后避光放入 37 °C 培养箱偶联反应 3~4 h。

(4) 取标记终止冻干粉末加入 1 mL 的去离子水配成标记终止液, 按照 1 mg HRP 加入 50 μ L 终止液的比例, 充分混匀 (终止液不稳定, 需现用现配), 4 °C 放置 2 h。

(5) 终止标记后, 加入与液体等量的保存液, 充分混匀后, 分装放置于 -20 °C 保存。

2.2 酶标抗体效价及非特异性检测

2.2.1 直接 ELISA 测定酶标二抗效价

采取直接 ELISA 方法对酶标二抗 3C1B11A8-G 进行效价测定, 具体操作步骤如下:

(1) 取预先包被好的鸡、鸭、鹅 IgG 酶标条 (详细工作浓度见表 1-5), 酶标二抗经 PBST 稀释后按照 1:100 倍比稀释到 1:204,800, 37 °C 恒温培养箱孵育 2 h, 设置空白对照。

(2) 弃掉酶标条内的液体, 用 PBST 每孔 300 μ L 洗涤 3 遍, 吸水纸拍干后, 每孔加入 100 μ L 显色液, 避光作用 20 min。

(3) 显色后, 加入终止液每孔 50 μ L 终止反应, 将酶标板放入酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

(4) 结果判定, 空白对照 OD₄₅₀ 值 < 0.1, OD₄₅₀ 值 $\geq$ 0.5 判为阳性孔, 该孔的稀释倍数为其最大效价。

2.2.2 直接 ELISA 对酶标二抗进行非特异性检测

直接 ELISA 方法对酶标二抗 3C1B11A8-G 进行特异性检测, 除将包被 IgG 酶标条更换为其余 14 种动物之外, 其余条件皆不变, 具体步骤参考以上 2.2.1。

2.3 鸡、鸭、鹅 H5 AIV 血清中抗体间接 ELISA 方法的建立

2.3.1 抗原, 阴、阳性血清最佳稀释比例的测定

通过矩阵法对 H5 AIV 阴阳性血清、HRP 鼠抗鹅二抗的最佳工作浓度进行探索,

碳酸盐缓冲包被液将抗原按照 1:500 倍比稀释到 1:4,000, 将鸡、鸭、鹅 H5 AIV 阳性血清按照 1:10 二倍比稀释到 1:160, HRP 鼠抗鹅按照 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000 的工作浓度进行稀释。根据 OD₄₅₀ 接近 1.0 的孔的稀释梯度作为抗原最佳包被比例、最佳阳性血清稀释浓度以及 HRP 鼠抗鹅二抗的最佳稀释比例。

2.3.2 最佳血清、酶标抗体工作时间的确定

H5 AIV 阳性血清 37 °C 恒温箱分别孵育 1 h、1.5 h、2 h 共 3 组, 其余条件按常规 ELISA 试验进行, 以此确定在不改变其他条件的情况下最佳血清作用时间。酶标抗体 3C1B11A8-G 37 °C 恒温箱分别孵育 1 h、1.5 h、2 h 共 3 组, 其余条件按常规 ELISA 试验进行, 以此确定在不改变其他条件的情况下最佳血清作用时间。

2.3.3 cut off 值的确定

取 24 份阴性血清按 1:100 稀释后通过建立的间接 ELISA 方法进行 OD₄₅₀ 的测定。根据公式 $\bar{x}+3s$ 计算出阳性判定值, 公式中的 $\bar{x}$ 为 HI 阴性样品的 OD₄₅₀ 的平均值, s 为 HI 阴性样品的标准方差。当待检血清的 OD₄₅₀ 平均值 $\geq \bar{x}+3s$, 则判定为阳性。当 OD₄₅₀ $< \bar{x}+2s$ 则判定为阴性, 介于二者之间则判定为可疑样品^[90]。

2.3.4 重复性试验

取 12 份不同样本的血清, 按照 1:100 稀释后通过间接 ELISA 的方法, 在不改变其他条件的情况下, 选择同一批次包被的酶标条每个样本做 3 个重复, 进行批内重复性检测。在不改变其他条件的情况下, 每份样本在不同批次包被的酶标条上做 3 个重复, 进行批间重复性检测, 最后运用统计学进行整合分析。

2.3.5 间接 ELISA 与血凝抑制实验的对比

取 24 份已接种 H5 AIV 疫苗的鸡、鸭、鹅的阳性血清, 按照 1:100 稀释后分别进行 HI 试验与间接 ELISA 试验, 统计两者的阳性率, 从而进行灵敏度测试。具体步骤如下:

- (1) 将 H5 AIV 纯化抗原以 1:2,000 作为包被浓度, 每孔 100 μ L, 4 °C 包被过夜。
- (2) 弃掉酶标条内的液体, 用 PBST 每孔 300 μ L 洗涤 3 遍, 吸水纸拍干后, 5% 脱脂奶封闭, 每孔 200 μ L, 37 °C 培养箱孵育封闭 1 h。
- (3) 封闭结束后, 用 PBST 每孔 300 μ L 洗涤 3 遍, 吸水纸拍干, 加入待检血清每孔 100 μ L, 37 °C 培养箱孵育 1.5 h。
- (4) 弃掉酶标条内的液体, 用 PBST 每孔 300 μ L 洗涤 3 遍, 吸水纸拍干后将酶标抗体 3C1B11A8-G 按 1:1,000 进行稀释, 每孔 100 μ L, 37 °C 培养箱孵育 1.5 h。
- (5) 弃掉酶标条内的液体, 用 PBST 每孔 300 μ L 洗涤 3 遍, 吸水纸拍干后, 每孔

加入 100 μ L 显色液，避光作用 20 min。

(6) 显色后，加入终止液每孔 50 μ L 终止反应，将酶标板放入酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

2.4 鸡、鸭、鹅 H5 AIV 阳性血清检测

以建立的间接 ELISA 方法检测免疫监测采集的 150 份鸡、鸭、鹅多免血清样本，间接 ELISA 步骤见本章 2.3.5。

3 结果与分析

3.1 腹水中抗体的粗提与纯化

将制备的腹水型单抗经过饱和硫酸铵粗提后浓度为 7.21 mg/mL，经过亲和免疫层析进一步纯化后浓度为 1.20 mg/mL。经过 SDS-PAGE 验证，得到了纯化效果较好的单抗，结果如图 2.1 所示。

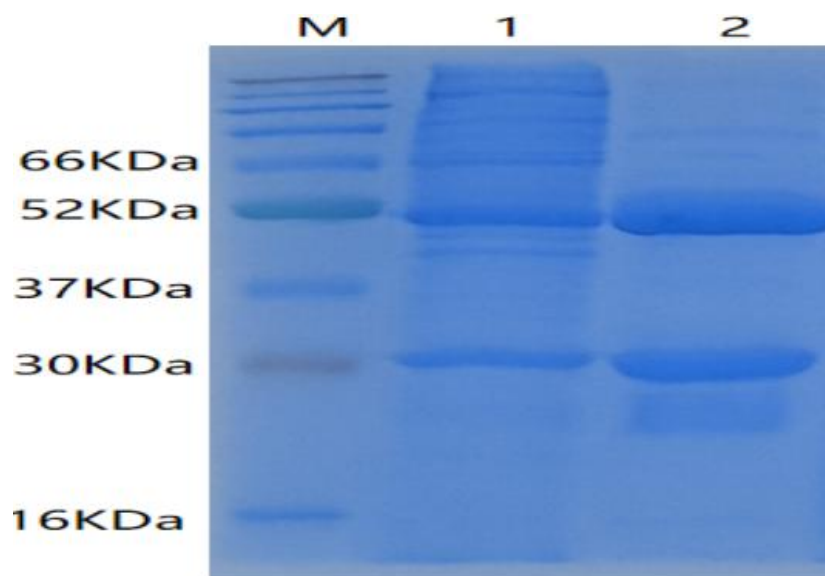


图 2-1 腹水纯化 SDS-PAGE 结果

M: 彩色预染蛋白分子量标准 1: 3C1B11A8-G (粗提) 2: 3C1B11A8-G (纯化)

Fig. 2-1 Purification results of ascites by SDS-PAGE

M: Marker of proteins with known mw

1: 3C1B11A8-G (before purification) 2: 3C1B11A8-G (after purification)

3.2 酶标抗体效价测定

通过直接 ELISA 对酶标抗体 3C1B11A8-G 进行效价测定, 结果显示, 针对鸡 IgG 而言, HRP-3C1B11A8-G 最大稀释倍数为 51,200。针对鸭 IgG 而言, 最大稀释倍数为 51,200。针对鹅而言, 最大稀释倍数为 25,600。结果见表 2-1。直接 ELISA 测定酶标抗体与其他 13 种的动物交叉反应性, 结果见表 2-2, 2-3。

表 2-1 酶标抗体直接 ELISA 检测结果

Table 2-1 The results of enzyme-labeled antibodies in D-ELISA

酶标抗体吸光 值 (OD ₄₅₀)	酶标抗体稀释倍数									
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1,600	1:3,200	1:6,400	1:12,800	1:25,600	1:51,200
3C1B11A8-G										
鸡	3.584	3.293	3.157	3.093	2.996	2.947	2.486	1.838	1.238	0.556
鸭	3.828	3.083	2.920	2.916	2.670	2.505	2.474	1.984	1.238	0.757
鹅	3.588	3.305	3.196	3.032	2.745	2.429	1.685	0.971	0.509	0.325

表 2-2 酶标抗体直接 ELISA 检测交叉反应性结果

Table 2-2 The results of cross-reactivity in enzyme-labeled antibodies in D-ELISA

酶标抗体	动物种类					
	绵羊	山羊	猪	兔	猫	犬
HRP-3C1B11A8-G	(-) 0.085	(-) 0.065	(-) 0.011	(-) 0.063	(-) 0.089	(-) 0.041

表 2-3 酶标抗体直接 ELISA 检测交叉反应性结果

Table 2-3 The results of cross-reactivity in enzyme-labeled antibodies in D-ELISA

酶标抗体	动物种类						
	梅花鹿	马鹿	马	食蟹猴	羊驼	大鼠	鸽子
HRP-3C1B11A8-G	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	0.068	0.032	0.058	0.074	0.092	0.065	0.087

3.3 鸡、鸭、鹅 H5 AIV 血清中抗体间接 ELISA 方法检测

3.3.1 最佳抗原包被比例、血清最佳稀释比例的确定

矩阵法确认 H5 AIV 抗原、H5 AIV 鸡、鸭、鹅阳性血清的最佳工作比例，参考抗原和血清的获取难易程度，根据 OD₄₅₀ 接近 1.0 左右的孔的稀释梯度作为抗原最佳包被比例、最佳阳性血清稀释浓度。结果显示抗原最佳包被浓度为 1:2,000，鸡、鸭、鹅阳性血清最佳稀释倍数为 1:20、1:20、1:40。HRP-3C1B11A8-G 二抗最佳工作浓度为 1:1,000。详细结果见表 2-4。

表 2-4 间接 ELISA 确认抗原抗体最佳工作条件

Table 2-4 Best working conditions for antigen and antibody in I-ELISA

抗原种类	抗原包被 稀释比	阳性血清 稀释比	阳性血清 OD ₄₅₀ 值	阴性血清 OD ₄₅₀ 值	HRP-3C1B11A8 最佳工作浓度
H5 AIV	1:2,000	1:20 (鸡)	1.068	0.085	1:1,000
H5 AIV	1:2,000	1:20 (鸭)	1.010	0.101	1:1,000
H5 AIV	1:2,000	1:40 (鹅)	0.981	0.110	1:1,000

3.3.2 最佳血清、酶标抗体工作时间的确定

H5 AIV 阳性血清 37 °C 恒温箱分别孵育 1 h、1.5 h、2 h 共 3 组，其余条件按常规 ELISA 试验进行，以此确定在不改变其他条件的情况下最佳血清作用时间。结果显示，血清最佳作用时间为 1.5 h。酶标抗体 3C1B11A8-G 恒温箱分别孵育 1 h、1.5 h、2 h 共 3 组，其余条件按常规 ELISA 试验进行，以此确定在不改变其他条件的情况下酶标抗

体最佳作用时间。酶标抗体 3C1B11A8-G 最佳作用时间为 1.5 h。结果见图 2-2, 2-3。

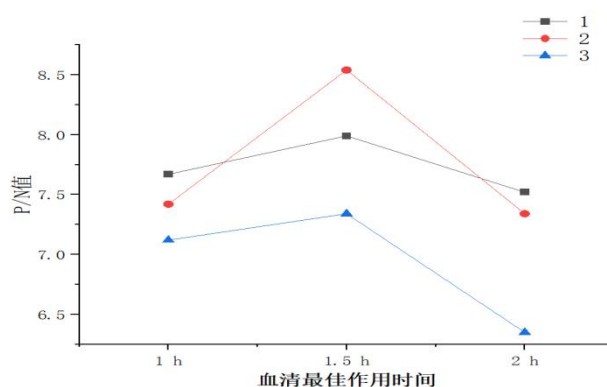


图 2-2 血清最佳作用时间 P/N 值结果

Fig. 2-2 The results of P/N value of serum optimal incubation period

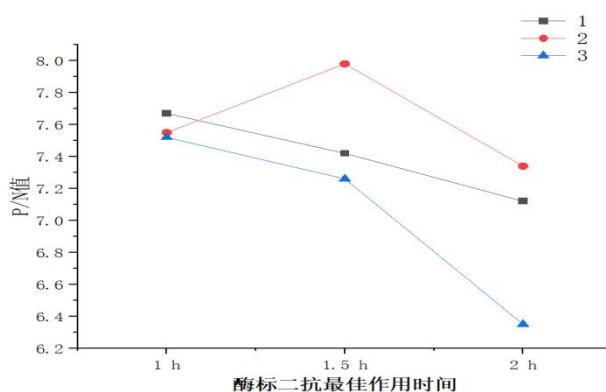


图 2-3 酶标二抗最佳作用时间 P/N 值结果

Fig. 2-3 P/N value of incubation period with enzyme-labelled antibody

3.3.3 cut off 值的确认

取 24 份阴性血清用建立的间接 ELISA 方法对其进行检测，平均值为 0.169，标准差为 0.037。当待检血清的 OD_{450} 平均值 $\geq \bar{x} + 3s$ 时，判定为阳性，当 $OD_{450} < \bar{x} + 2s$ 则判定为阴性。根据公式可得，当 $OD_{450} \geq 0.28$ 判定为阳性， $OD_{450} < 0.24$ 时判定为阴性。结果见表 2-5。

表 2-5 间接 ELISA 确认 cut off 值

Table 2-5 The results of cut off value by I-ELISA

间接 ELISA 确认 cut off 值						
24 份阴性血清 OD ₄₅₀ 值	0.147	0.162	0.132	0.157	0.228	0.210
	0.200	0.084	0.132	0.193	0.164	0.167
	0.230	0.191	0.279	0.122	0.188	0.163
	0.187	0.171	0.139	0.126	0.14	0.147
平均值	0.169					
标准差	0.037					
结果判定	≥0.28 为 (+), <0.24 (-)					

3.3.4 重复性测试

取 10 份血清, 通过间接 ELISA 的方法, 在不改变其他条件的情况下, 选择同一批次包被的酶标条每个样本做 3 个重复, 进行批内重复性检测。每份样本在不同批次包被的酶标条上做 3 个重复, 进行批间重复性检测, 结果显示变异系数控制在 10% 以内, 表明建立的间接 ELISA 方法拥有良好的重复性。结果见表 2-6, 2-7。

表 2-6 间接 ELISA 批内重复性测试结果

Table 2-6 The results of intro-assay reproducibility test in I-ELISA

样品	OD ₄₅₀					
	1	2	3	平均值	标准差	变异系数 (%)
1	0.917	0.965	0.869	1.004	0.080	6.81
2	1.134	1.012	1.123	0.917	0.048	5.23
3	1.247	1.031	1.057	1.089	0.067	6.15
4	1.045	1.091	0.909	1.015	0.094	9.26
5	1.105	1.076	1.14	1.148	0.089	7.75
6	1.195	1.061	1.02	1.107	0.032	2.89
7	1.223	1.061	0.983	1.092	0.091	8.33
8	1.004	0.912	0.897	0.937	0.057	6.08
9	1.125	1.163	1.200	1.005	0.093	9.25
10	0.917	0.965	0.869	1.162	0.037	3.18

表 2-7 间接 ELISA 批间重复性测试结果

Table 2-7 The results of inter-assay reproducibility test by I-ELISA

样品	OD ₄₅₀					
	1	2	3	平均值	标准差	变异系数 (%)
1	1.062	0.999	1.074	1.045	0.040	3.82
2	1.134	0.741	1.177	1.017	0.240	3.59
3	1.188	1.200	1.197	1.195	0.041	3.39
4	1.008	1.011	0.998	1.005	0.006	6.00
5	1.010	0.921	0.882	0.937	0.065	6.93
6	1.003	0.959	1.006	0.989	0.026	2.62
7	0.965	1.065	0.887	0.972	0.089	9.15
8	0.981	1.075	1.089	1.048	0.058	5.53
9	1.091	1.006	0.988	1.028	0.055	5.35
10	0.965	0.991	0.821	0.925	0.091	9.83

3.3.5 间接 ELISA 与血凝抑制实验的对比

取 24 份已接种 H5 AIV 疫苗的阳性血清，通过间接 ELISA 的方法进行检测，与血凝抑制实验结果进行比对。结果显示间接 ELISA 检测均为阳性，与血凝抑制实验结果一致。证明建立的 ELISA 方法与血凝抑制实验能产生较好的相关性。结果见表 2-8。

表 2-8 间接 ELISA 与血凝抑制的比对结果

Table 2-8 The comparable result of I-ELISA and HI

样品	间接 ELISA 结果 (OD ₄₅₀ 值)	血凝抑制效价 (-log ₂)
鹅-1	1.072	2 ⁶
鹅-2	1.065	2 ⁶
鹅-3	1.103	2 ⁶
鹅-4	1.281	2 ⁶
鹅-5	1.038	2 ⁶
鸭-6	1.129	2 ⁶
鸭-7	1.104	2 ⁶
鸭-8	1.008	2 ⁶

续表 2-8 间接 ELISA 与血凝抑制的比对结果

样品	间接 ELISA 结果 (OD ₄₅₀ 值)	血凝抑制效价 (-log ₂)
鸭-9	1.200	2 ⁶
鸭-10	1.069	2 ⁶
鸭-11	0.902	2 ⁶
鸭-12	1.218	2 ⁶
鸭-13	0.911	2 ⁶
鸡-14	1.214	2 ⁷
鸡-15	1.193	2 ⁷
鸡-16	1.204	2 ⁷
鸡-17	1.261	2 ⁷
鸡-18	1.274	2 ⁷
鸡-19	1.072	2 ⁷
鸡-20	1.322	2 ⁷
鸡-21	1.177	2 ⁷
鸡-22	1.302	2 ⁷
鸡-23	1.218	2 ⁷
鸡-24	1.291	2 ⁷
阴性对照	0.108	/

注：“/”代表该样本无法抑制鸡红细胞凝集

3.4 血清样本检测

通过间接 ELISA 方法对 150 份多免血清样本进行了符合性检测。HI 试验按照效价为 2² 以上为判定为阳性 (150 份血清均为阳性, 抗体效价在 2⁴-2⁸), 间接 ELISA OD₄₅₀ ≥ 0.28 判定为阳性。结果显示, 间接 ELISA 共检出阳性样本 150 份, 阴性样本 0 份, 与 HI 试验结果的总体符合率为 100%, 结果见表 2-9。

表 2-9 间接 ELISA 与 HI 方法的检测符合率分析结果

Table 2-9 Assay compliance analysis results for I-ELISA and HI techniques

来源	HI 样本数量	ELISA 检测结果		符合比例	符合率
		阳性	阴性		
阳性样本	150	150	0	150/150	100%
总计	150	150	0	150/150	100%

4 讨论

自 1959 年以来, H5/H7 部分亚型禽流感持续危害养禽业及人类公共卫生安全, 持续的全球性监测是防控禽流感的有效手段^[91], 通过监测网络能够及早发现、鉴定出禽流感的类型并做出及时的应对。作为一种防控措施, 疫苗接种也被应用于该病的防控, 近二十年以来, 灭活疫苗、核酸疫苗及活载体疫苗等相继研发并推广应用于禽流感的防控^[92]。抗体水平被用于评估疫苗接种后的效果, 目前常用的禽流感病毒抗体的检测方法主要有血凝抑制实验、神经氨酸酶抑制试验、ELISA 技术等^[93]。提高检测效率及准确率、降低时间成本是目前亟待解决的问题, 常规的 HI 检测操作繁琐、费时费工, 而 ELISA 作为一种快速便捷的血清学诊断方法, 更适合规模化鸡场的大规模样本检验。然而, 缺乏必要的生物材料, 必要的酶标抗体(直接法)或酶标二抗(间接法)。本研究中制备的单克隆抗体 3C1B11A8-G 经间接 ELISA 检测与 Western-blot 验证, 与常见家禽 IgG 的均发生反应, 经 HRP 标记后对鸡鸭鹅 H5 AIV 阳性血清进行检验, 结果显示在不同种类的样本血清中, HRP-3C1B11A8-G 均能发挥有效作用, 进一步验证了其可以作为一株禽类通用酶标二抗的应用潜能。本实验仅以 H5 AIV (Re-13) 作为抗原建立了间接 ELISA 检测方法并初步进行了评价, 在抗原类别、样本检测数量及品种上仍需进一步进行测试, 并且需要排除其他因素(疫苗批间差异、动物批间差异、样本保存条件等)对试验可靠性、稳定性及可重复性的影响, 最终建立更规范化准确化的检测体系。

本研究中对建立的间接 ELISA 方法与常规的 HI 试验结果进行了符合, 结果表明 HI 结果阳性的样本方法检测结果均为阳性, 但是仍然存在以下问题: 如 HI 试验结果存在 log2 的对数线性关系, 但是建立间接 ELISA 方法是基于酶活性及光信号转化等原

理的基础上,很难与 HI 结果的对数线性关系相符合。此次符合试验血清样本均为监测工作收集的高滴度样本,试验结果未能显示 HI 阴性血清样本的符合性。今后在条件允许的情况下,收集更多的不同样本进行符合试验和线性化关系的探索。

另外,本研究建立的间接 ELISA 检测方法可针对多种抗原,HI 试验主要针对血凝素,所以通过两种方法的对比仅在一定程度上具有相关性。有研究显示,如若使用纯化或表达的抗原进行包被,还能在一定程度上减少空间位阻效应,增强酶反应时的催化活性^[94,95]。这也是本试验今后需要重点关注和研究的内容。

此外,通过 HRP 酶标抗体试剂盒制备的酶标二抗在一定程度上存在抗体失活,效价变低的情况。出现这种情况可能是因为透析不完全未能达到最佳标记效果、纯化腹水浓度太低、HRP 未能与抗体充分偶联等因素造成。后续可以通过改良标记技术、提高腹水浓度等来解决。张国中,陈福勇等^[96,97]通过间接 ELISA 和 HI 检测方法对新城疫抗体进行了相关性分析,认为 HI 抗体效价与 OD₄₅₀ 值之间存在一定的线性关系,HI 抗体效价较低时 ELISA 值也相对较低,HI 抗体效价较高时 ELISA 值对应也会升高。HI 效价在 2⁶ 时,本研究建立间接 ELISA,OD₄₅₀ 值主要集中在 0.9 到 1.10 之间,HI 效价在 2⁷ 时,OD₄₅₀ 主要集中在 1.15 到 1.3 之间,也有个别样本存在读值稍高的情况。但是由于样本量不多且 HI 效价不一致的原因,未能对其线性关系进行探究,之后在临床检验可以以此作为探索方向,分析不同 HI 抗体效价和 ELISA 之间的关联性。

全文结论

1. 本研究成功制备了 37 株针对 16 种动物 IgG 的杂交瘤细胞,具有良好的特异性。其中 3G12F3E9D10-Sw、2C12G3F5F4-Rat、7B8E6C9C6-S/T、4E7E10H9-Cy、2D4A3D4-G、1C1B3G2-G、1A2B9C3-C、5F8F3H6E9-S/T 仅与本物种 IgG 发生反应,无交叉反应。对其中 27 株杂交瘤细胞进行了腹水制备,间接 ELISA 检测细胞上清的效价最高可达 25,600,粗提腹水的效价最高可达 3,276,800。

2. 经间接 ELISA 和 Western-blot 验证,鹅 IgG 筛选出的单抗 3C1B11A8-G 与鸡、鸭轻链发生交叉反应。经 HRP 标记后直接 ELISA 检测,对鸡 IgG 效价为 51,200,对鸭 IgG 效价为 51,200,对鸽 IgG 效价为 25,600,对鹅 IgG 效价为 25,600;且不与受试的其他动物 IgG (12 种) 发生非特异性反应,可以作为家禽通用二抗进行检测方法的建立。

3. 建立了酶标抗体 HRP-3C1B11A8-G 介导的鸡、鸭、鹅血清中 H5 AIV 抗体的间接 ELISA 检测方法。对 150 份样本进行检测,结果显示与 HI 试验结果阳性符合率在 100%,初步验证该酶标抗体具有一定实用性,后续可以考虑进一步开发应用。

参考文献

- [1] 谢蜀生.百年回眸:免疫学研究进展与医学[J].医学与哲学, 2000, 21(11): 27-30.
- [2] 龙振洲, 谢蜀生, 童道玉.自然科学学科发展战略研究报告之九:免疫学[J].科技导报, 1993, 03(07): 26-28.
- [3] 赵修竹, 王迪浚.免疫球蛋白[J].生理科学进展, 1965, (02): 146-157.
- [4] 薛小平, 马文煜, 郭照江.对抗体认识过程的不断深化和启示[J].医学与哲学, 1998, 19(09): 3.
- [5] Bellanti J A. Introduction to Immunology[M]. WB Saunders Company. 1978.
- [6] Damelang T, Brinkhaus M, van Osch T, et al. Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1304365.
- [7] Schroeder H J, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2 Suppl 2): S41-S52.
- [8] 高进东, 丁明星.畜禽免疫球蛋白的功能及应用[J].动物保健, 2006, (07): 34-36.
- [9] 郭鑫.抗不同物种动物 IgG 单克隆抗体的制备及初步应用[D].扬州: 扬州大学, 2022.
- [10] 周丽君.浅谈免疫球蛋白 G[J].信息记录材料, 2018, 19(07): 216-217.
- [11] van der Horst H J, Nijhof I S, Mutis T, et al. Fc-Engineered Antibodies with Enhanced Fc-Effector Function for the Treatment of B-Cell Malignancies[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(10): 3041.
- [12] Huse W D, Sastry L, Iverson S A, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda[J]. Science, 1989, 246(4935): 1275-1281.
- [13] Nawab D H. Vaccinal antibodies:Fc-Engineered Antibodies with Enhanced Fc-Effector Function for the Treatment of B-Cell Malignancies[J]. Hum Vaccin Immunother, 2021, 17(12): 5532-5545.
- [14] Chiu M L, Goulet D R, Teplyakov A, et al. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics[J]. Antibodies (Basel), 2019, 8(04): 55.
- [15] Lefranc M P, Lefranc G. Immunoglobulins or Antibodies: IMGT(R) Bridging Genes, Structures and Functions[J]. Biomedicines, 2020, 8(09): 319.
- [16] 陶晓钊, 薄欣宇, 段树楠, 等.哺乳动物免疫球蛋白基因及其表达机制研究进展[J].中国畜禽种业, 2023, 19(08): 61-66.

- [17] 雷逸辰, 王紫腾, 江钧益, 等. 草食动物免疫球蛋白表达谱及其多样性机制研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(08): 3313-3324.
- [18] Hirano M, Das S, Guo P, et al. The evolution of adaptive immunity in vertebrates[J]. Adv Immunol, 2011, 109: 125-157.
- [19] Kaminski W E, Beham A W, Kzhyshkowska J, et al. On the horizon: flexible immune recognition outside lymphocytes[J]. Immunobiology, 2013, 218(03): 418-426.
- [20] Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions[J]. Front Immunol, 2014, 5: 520.
- [21] Yang D, Kroe-Barrett R, Singh S, et al. IgG cooperativity - Is there allostery? Implications for antibody functions and therapeutic antibody development[J]. MAbs, 2017, 9(08): 1231-1252.
- [22] Koenderman L. Inside-Out Control of Fc-Receptors[J]. Front Immunol, 2019, 10: 544.
- [23] Lynch C M, Hart B W, Grewal I S. Practical considerations for nonclinical safety evaluation of therapeutic monoclonal antibodies[J]. MAbs, 2009, 1(01): 2-11.
- [24] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256(5517): 495-497.
- [25] Parray H A, Shukla S, Samal S, et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 8, (85): 106639.
- [26] 顾光磊, 方敏. 单克隆抗体的研究进展及上市药物分析[J]. 生物工程学报, 1-25[2024-04-03].
- [27] 黄小容, 赵卫, 孙九峰. 单克隆抗体制备技术及在重大传染病防治中应用进展[J]. 华南预防医学, 2022, 48(03): 276-280.
- [28] 付志浩, 徐刚领, 黄璟, 等. 单克隆抗体药物研发进展[J]. 中国药事, 2021, 35(11): 1253-1268.
- [29] 林金香, 王心睿. 单克隆抗体制备技术的最新进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(20): 2544-2548.
- [30] Zhang C. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. Methods Mol Biol. 2012, 901: 117-135.
- [31] Zaroff S, Tan G. Hybridoma technology: the preferred method for monoclonal antibody generation for in vivo applications[J]. Biotechniques, 2019, 67(03): 90-92.

- [32] 武瑞君, 桑晓冬, 李治非, 等. 抗体技术的研发现状与展望[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(05): 374-381.
- [33] 方水琴, 刘程, 马俊飞, 等. 小鼠杂交瘤单克隆抗体快速制备技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(07): 2293-2306.
- [34] 王思权. 抗沙门氏菌 Peg 菌毛单克隆抗体制备的一种简捷方法与初步应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [35] 徐梦蔚, 宋武琦, 付治美, 等. 实验室水平单克隆抗体制备方法及相应纯化策略的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(02): 228-232.
- [36] 杜娟. 兽医常用免疫佐剂的研究概况与发展趋势[J]. 今日畜牧兽医, 2020, 36(07): 74.
- [37] 方远穆, 但秉成. 兽医免疫佐剂的研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 1993, (04): 15-18.
- [38] 吴梦, 刘作华, 罗林, 等. 利用改良电融合法制备杂交瘤细胞的试验探索[J]. 四川畜牧兽医, 2016, 43(07): 26-28.
- [39] 谷敬丽, 房娜. 促进细胞融合和杂交瘤细胞过快生长的方法[J]. 黑龙江科技信息, 2013, (29): 101.
- [40] Shulman M, Wilde C D, Kohler G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies[J]. Nature, 1978, 276(5685): 269-270.
- [41] 翁秀芳, 吴雄文, 梁智辉, 等. HGPRT 缺陷型 T 淋巴瘤细胞系的建立与鉴定[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2006, (06): 701-704.
- [42] Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 917: 11-22.
- [43] 杜伟贤. 杂交瘤细胞筛选中三种检测方法的应用[J]. 畜牧兽医科技, 1988, (04): 7-11.
- [44] 汪永和. 杂交瘤细胞克隆化培养及其分泌的单克隆抗体的纯化[D]. 昆明: 昆明医学院, 2004.
- [45] 张也, 刘以祥. 酶联免疫技术与食品安全快速检测[J]. 食品科学, 2003, 24(08): 200-204.
- [46] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G[J]. Immunochemistry, 1971, 8(09): 871-874.
- [47] Van Weemen B K, Schuurs A H. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates[J]. FEBS Lett, 1971, 15(03): 232-236.
- [48] 王嘉宾. 非洲猪瘟病毒 A151R 蛋白单克隆抗体制备及间接 ELISA 检测方法的建立[D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.

- [49] 李玉珍, 林亲录, 肖怀秋. 酶联免疫吸附技术及其在食品安全检测中的应用研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2006, (03): 108-112.
- [50] 贾丽萍. ELISA 技术在畜牧养殖业中的应用进展[J]. 中国动物保健, 2020, 22(12): 65-66.
- [51] 魏天, 王成宇, 张芳毓, 等. 基于非洲猪瘟病毒 p10 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2023, 53(08): 956-963.
- [52] 马莉. 鸡传染性贫血病病毒感染鉴定及其基于杆状病毒表达蛋白的抗体检测间接 ELISA 方法建立[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [53] 王淑洋. 基于串联表达蛋白 PrgH-PagN 的鸭沙门菌抗体间接 ELISA 检测方法的建立及初步应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- [54] 张文劲, 李庆妮, 唐定, 等. 恒河猴血清 SARS-CoV-2 变异株特异性 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36(11): 1341-1346.
- [55] 蒋凤娇, 程伊洛, 汪最, 等. 基于鸡白痢沙门菌 LPS 的 D 群沙门菌抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(12): 2401-2406.
- [56] Faulk W P, Taylor G M. An immunocolloid method for the electron microscope[J]. Immunochemistry, 1971, 8(11): 1081-1083.
- [57] 李雨芮, 刘晓雅, 张文劲, 等. 免疫层析技术及应用的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(01): 192-198.
- [58] 庄金秋, 梅建国, 沈志强. 胶体金免疫层析技术在兽医临床诊断中的应用进展[J]. 中国动物检疫, 2012, 29(09): 70-75.
- [59] 贾宇旻, 徐飞, 边洪芬, 等. 猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(09): 924-928.
- [60] 于相龙. 鹅细小病毒单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析检测方法的建立[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- [61] 郭力伟, 程亚辉, 徐大伟, 等. 猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, (20): 82-87.
- [62] 赵肖, 白昀, 陈蓉, 等. 猪肺炎支原体抗体胶体金免疫层析检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(09): 1693-1698.
- [63] 沈福晓, 程安春, 汪铭书. 免疫荧光技术在家禽传染病研究和诊断中的应用[J]. 中国家禽, 2009, 31(01): 30-34.
- [64] 韩志辉, 贾秉安. 免疫荧光技术在兽医临床中的应用研究[J]. 甘肃畜牧兽

医, 1994, (04): 20-21.

[65] 弭忠祥.免疫荧光技术在兽医学上的应用[J].黑龙江畜牧兽医, 1999, (05): 40-41.

[66] 刁有祥, 陈庆普, 刘悦竹, 等.免疫荧光技术快速检测鸡轮状病毒的研究[J].中国预防兽医学报, 2003, (04): 64-66.

[67] 胡清海, 张知良, 黄建芳, 等.应用间接免疫荧光抗体技术检测鸡传染性贫血病毒抗体[J].中国家禽, 2001, 23(05): 38-39.

[68] 罗玲, 商雨, 汪宏才, 等.间接免疫荧光法测定新城疫病毒滴度的研究[J].中国家禽, 2021, 43(12): 102-105.

[69] 王永山, 郝崇, 侯世宽, 等.抗鸡 IgG 单克隆抗体的研究[J].兽医大学学报, 1989, 9(02): 109-114.

[70] 王红, 魏云玲, 辛颜彬.应用抗鸡 IgG 单克隆抗体快速检测鸡传染性腔上囊病抗体的研究[J].中国兽医科技, 1998, (04): 20-21.

[71] 赵勇, 崔治中, 秦爱建.抗鸡 IgG 单克隆抗体的研制[J].扬州大学学报(自然科学版), 1999, 2, (01): 39-54.

[72] 罗燕.抗鹌鹑 IgG 单克隆抗体的制备与应用[D].扬州: 扬州大学, 2013.

[73] 吴胜昔.抗猪 SIgA、IgM 单克隆抗体及其酶标记抗体的研制[D].南京: 南京农业大学, 2004.

[74] 蔡金利.抗鸡 IgM 单克隆抗体的制备及应用研究[D].重庆: 西南大学, 2007.

[75] 焦红梅, 崔治中.抗鸽 IgG 单克隆抗体的制备及鉴定[J].中国兽药杂志, 2000, 34, (02): 9-13.

[76] 陈阳, 刘彤, 张佳琦, 等.基于单个 B 细胞抗体基因扩增技术筛选马 IgG1 单克隆抗体[J].中国生物工程杂志, 2022, 42(04): 17-23.

[77] 鲍登克, 杨苏珍, 万博, 等.单克隆抗体及其在畜禽传染病诊治中的应用研究进展[J].河南畜牧兽医(综合版), 2009, 30(05): 9-10.

[78] Karachaliou C E, Vassilakopoulou V, Livaniou E. IgY technology: Methods for developing and evaluating avian immunoglobulins for the in vitro detection of biomolecules[J]. World J Methodol, 2021, 11(05): 243-262.

[79] Yakhkeshi S, Wu R, Chelliappan B, et al. Trends in industrialization and commercialization of IgY technology[J]. Front Immunol, 2022, 10(13): 991-931.

[80] 邵红霞, 史荣华, 郭卉, 等.抗鹅 IgG 单克隆抗体的研制及其特性研究[J].中国家禽, 2015, 37(15): 19-22.

- [81] 张段玲, 张彦龙, 白素英. 小鼠抗食蟹猴 IgG 单克隆抗体的制备[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(05): 68-71.
- [82] 王平, 周志军, 施金荣, 等. 抗牛血清 IgG 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及鉴定[J]. 微生物学免疫学进展, 2011, 39(03): 18-23.
- [83] 蒋媛媛, 郭军庆, 颜焰, 等. 抗猪 IgG 单克隆抗体的制备与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, (09): 727-731.
- [84] 蒋磊. 多种动物 IgG(Y)Fc 段基因分析及遗传变异研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [85] 姜天童. 抗牛 IgG 单克隆抗体的制备及其特性[J]. 国外兽医学. 畜禽疾病, 1984, (04): 24-26.
- [86] Dominguez E, Perez M D, Calvo M. Effect of heat treatment on the antigen-binding activity of anti-peroxidase immunoglobulins in bovine colostrum[J]. J Dairy Sci, 1997, 80(12): 3182-3187.
- [87] 罗永康, 董翠霞, 何刚强, 等. 猪血免疫球蛋白的热稳定性及动力学研究[J]. 中国农业大学学报, 2004, (05): 67-70.
- [88] Dias D S W, Tambourgi D V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 135(3-4): 173-180.
- [89] 孙天松. 猪免疫球蛋白体外稳定性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2002.
- [90] 仇薇, 侯力丹, 宋洁, 等. 一种更灵敏的特异性检测 H9 亚型禽流感抗体的间接 ELISA 方法的建立[J]. 生物工程学报, 2017, 33(08): 1253-1264.
- [91] Comin A, Toft N, Stegeman A, et al. Serological diagnosis of avian influenza in poultry: is the haemagglutination inhibition test really the 'gold standard'?[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2013, 7(03): 257-264.
- [92] 曾显营, 田国彬, 陈化兰. 中国 H5/H7 亚型禽流感疫苗研制和应用进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2023, 53(12): 1700-1712.
- [93] 莫一群, 王雅琴, 陆辉, 等. 禽流感病毒检测方法研究进展[J]. 中国家禽, 2023, 45(06): 82-95.
- [94] Xiao Y, Yang F, Liu F, et al. Antigen-capture ELISA and immunochromatographic test strip to detect the H9N2 subtype avian influenza virus rapidly based on monoclonal antibodies[J]. Virol J, 2021, 18(01): 198.
- [95] Jensen T H, Ajjour G, Handberg K J, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay

for detection of avian influenza virus subtypes H5 and H7 antibodies[J]. Acta Vet Scand, 2013, 55(01): 84.

[96] 张国中, 胡旭东, 秦春芝, 等. 间接ELISA和HI方法检测鸡新城疫病毒抗体的相关性分析[J]. 中国家禽, 2007, (04): 14-16+19.

[97] 陈福勇, 吴玉苹, 曹红白, 等. 间接ELISA与HI检测鸡新城疫抗体相关性[J]. 动物医学进展, 2004, (03): 88-89.

附录

常用试剂配置：

PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) : NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ • 12H₂O 3.6 g、KH₂PO₄ 0.24 g, 加去离子水定容至 1 L, pH 调至 7.4。

PBST: 1 L PBS 中加入 0.5 mL 的吐温 20。

5×SDS-PAGE 缓冲液: Tris-base 15.1 g、甘氨酸 (Gly) 94 g、十二烷基硫酸钠 (SDS) 5 g, 加去离子水定容至 1 L。

5%脱脂奶: 5 g 脱脂奶加 100 mL 去离子水定容。

甘氨酸洗脱液 (0.05 mol/L, pH 1.9) : 甘氨酸 (Gly) 0.759 g, 加入 HCl 将 pH 调制 1.9。

透析缓冲液 (0.01M 的 CB, pH 9.6) : NaHCO₃ 0.67 g, Na₂CO₃ 0.21 g 加入去离子水定容至 1 L。

1×转膜缓冲液: 甘氨酸 (Gly) 2.9 g, Tris 5.8 g, SDS 0.37 g, 加 800 mL 去离子水搅拌均匀后再加入 200 mL 甲醇定容。