

密级：无

论文编号：82110-2020-02



中国兽医药品监察所

China Institute of Veterinary Drug Control

硕士学位论文

犬种布鲁氏菌单克隆抗体的制备及应用

**Preparation and Application of Monoclonal
Antibodies Against Brucella Canis**

(课题来源：“十四五”国家重点研发计划 2022YFD1800703)

研究生：刘铭赫
指导教师：王楠 正高级兽医师
申请学位类别：农学硕士
学科专业：预防兽医学
研究方向：生物制品学
学位授予单位：中国兽医药品监察所

2023年5月

摘要

布鲁氏菌病 (Brucellosis) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 引起的人畜共患传染病。犬可感染羊种、牛种等光滑型布鲁氏菌和粗糙型犬种布鲁氏菌。犬感染布鲁氏菌后会出现流产、睾丸炎等生殖系统疾病, 并出现较长时间的菌血症, 传播风险大, 人通过直接接触带菌犬的流产胎儿、胎盘等也有可能受到感染。若犬感染光滑型布鲁氏菌, 可通过间接 ELISA 等检测光滑型布鲁氏菌的血清学方法检出。而若感染的是犬种布鲁氏菌, 由于犬血清中在凝集类实验中存在抗原自凝现象, 使得试验结果中常会有假阳性出现, 而目前还缺乏针对犬种布鲁氏菌的 ELISA 检测方法。因此, 建立科学准确的诊断方法是有效防控犬感染犬种布鲁氏菌的前提和关键。犬种布鲁氏菌病竞争 ELISA 抗体检测方法由于使用了针对犬种布鲁氏菌的特异性单克隆抗体, 使得该方法可以实现多种动物的犬种布鲁氏菌病的诊断, 并具有良好的敏感性和特异性。

本研究使用犬种布鲁氏菌 RM6/66 作为免疫原免疫小鼠, 经过四次亚克隆, 获得针对犬种布鲁氏菌的单克隆抗体。通过噬菌体展示技术和免疫蛋白质组学两种方法鉴定单克隆抗体识别的抗原表位。以获得的单克隆抗体建立竞争 ELISA 抗体检测方法, 优化反应条件, 并对该方法的特异性、敏感性进行验证, 同时进行临床样本的检测。获得以下研究结果:

1. 成功筛选获得了 4 株针对犬种布鲁氏菌分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞 1B2、1C5、1D2 及 2E6, 四株杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体均为 IgG2b 亚型, 分泌稳定性好。其中单克隆抗体 1C5 仅与犬种布鲁氏菌发生特异反应, 与牛种、羊种布鲁氏菌流行株、A19 株、S2 株不发生反应。

2. 利用噬菌体展示技术经过四次淘选, 获得单克隆抗体 1C5 的模拟线性表位为“R-D-FGE”; 利用双向电泳分离蛋白, 并通过蛋白质谱进行分析, 初步鉴定单克隆抗体 1C5 可能针对的蛋白为 OMP31, 将该蛋白进行了原核表达, 进一步确认了其与单抗的反应性。

3. 以单克隆抗体 1C5 作为竞争抗体, 成功建立了犬种布鲁氏菌的竞争 ELISA 抗体检测方法。以犬种布鲁氏菌 OMP31 蛋白作为包被抗原, 确定抗原包被浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 包被条件为 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h; 封闭液为 5% BSA, 条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h; 单克隆抗体的稀释倍数为 1: 12000, 待检血清稀释倍数为 1: 50, 反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 酶标二抗稀释度为 1: 20000, 反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。确定阻断率临界值为 26.07%。进一步对该方法的敏感性及特异性进行了验证, 结果表明该方法与小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清、大肠杆菌 O157 阳性血清之间无交叉反应; 当犬种布鲁氏菌阳性对照血清稀释倍数为 1: 1200 时, 仍可检测出阳性结果; 本方法与犬种布鲁氏菌微量试管凝集试验符合率达 99.30%。

本研究获得了一株仅与犬种布鲁氏菌存在特异性反应的单克隆抗体, 识别了该单克隆抗体所针对的抗原表位, 建立了针对犬种布鲁氏菌的竞争 ELISA 抗体检测方法, 有望为犬种布鲁氏菌的诊断提的敏感性好、特异性高的检测方法。

关键词: 犬种布鲁氏菌; 单克隆抗体; 竞争 ELISA; 噬菌体展示; 双向电泳

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic infection caused by *Brucella* spp. Dogs can be infected with the smooth type of *Brucella* such as *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* as well as the rough type of *Brucella canis*. Dogs infected with *Brucella* can develop reproductive disorders such as miscarriage and orchitis. A longer period of bacteraemia also occurs, with a high risk of transmission. People may also be infected through direct contact with aborted fetuses and placentas of infected dogs. If a dog is infected with *Brucella smootha*, it can be detected by indirect ELISA and other serological methods for detecting *Brucella smootha*. In the case of *Brucella canis* infection, the presence of antigen self-agglutination in canine sera in agglutination-type tests often results in false-positive tests. Currently, there is no ELISA test for *Brucella canis*. Therefore, the establishment of scientific and accurate diagnostic methods is the prerequisite and key to the effective prevention and control of *Brucella canis* infection in dogs. The competitive ELISA antibody test for canine brucellosis uses monoclonal antibodies specific for *Brucella canis*, making it possible to diagnose canine brucellosis in a variety of animals with good sensitivity and specificity.

In this study, monoclonal antibodies against *Brucella canis* were obtained using *Brucella canis* RM6/66 as the immunogen in immunized mice after four subclonations. The antigenic epitopes recognized by the monoclonal antibodies were identified by both phage display techniques as well as immunoproteomics. A competitive ELISA method was established with the obtained monoclonal antibodies, reaction conditions were optimized, and the specificity and sensitivity of the method were validated, while clinical samples were tested. The following study results were obtained:

1. Four hybridoma cells 1B2, 1C5, 1D2 and 2E6 secreting monoclonal antibodies against *Brucella canis* were successfully screened and obtained. The monoclonal antibodies secreted by the four hybridoma cells were all of IgG2b subtype and had good stability of secretion. Among them, monoclonal antibody 1C5 reacted specifically with *Brucella canis* only, and did not react with prevalent strains of *Brucella abortus*, prevalent strains of *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* A19 strain and *Brucella suis* S2 strain .

2. After four rounds of selection by phage display technology, the mock linear epitope of monoclonal antibody 1C5 was obtained as "R-D-FGE"; the protein was separated by bi-directional electrophoresis and analyzed by protein profiling, and the possible protein targeted by monoclonal antibody 1C5 was initially identified as OMP31, which was expressed in prokaryotic form. Its reactivity with the monoclonal antibody was further verified, and the results showed a positive reaction.

3. A competitive ELISA assay for *Brucella canis* was successfully established using monoclonal antibody 1C5 as a competitive antibody. The antigen concentration was determined to be 1 $\mu\text{g/mL}$, and the coating condition was 4 $^{\circ}\text{C}$ for 12 h. The closure solution was 5% BSA, and the condition was 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. The dilution of the monoclonal antibody was 1:12000, and the dilution of the serum to be tested

was 1:50, and the reaction condition was 37 °C for 30 min. The threshold value of blocking rate was determined to be 26.07%. The sensitivity and specificity of the method were further verified, and the results showed that there was no cross-reactivity between the method and *Yersinia pestis* O9 positive serum, *E.coli* O157 positive serum and smooth *Brucella* positive serum; when the *Brucella canis* positive control serum was diluted to 1:1200, positive results could still be detected; the method and *Brucella canis* micro-serum agglutination The compliance rate was 99.30%.

In this study, we obtained a monoclonal antibody that reacted specifically with *Brucella canis* only, identified the antigenic epitopes targeted by the monoclonal antibody, and established a competitive ELISA antibody assay for *Brucella canis*, which is expected to provide a sensitive and specific assay for the diagnosis of *Brucella canis*.

Key Words: *Brucella canis*; monoclonal antibody; competitive ELISA; phage display; 2-DE

目 录

第一章 引言.....	1
1.1 犬种布鲁氏菌概述.....	1
1.1.1 流行病学.....	1
1.1.2 临床症状.....	1
1.1.3 诊断技术.....	2
1.1.4 预防.....	4
1.2 噬菌体展示技术概述.....	5
1.2.1 噬菌体展示技术的原理.....	5
1.2.2 噬菌体展示技术的发展.....	5
1.2.3 噬菌体展示系统的分类.....	5
1.2.4 噬菌体肽库筛选抗原表位.....	6
1.3 本研究的的目的和意义.....	7
第二章 犬种布鲁氏菌 RM6/66 单克隆抗体的制备.....	9
2.1 引言.....	9
2.2 材料.....	9
2.2.1 菌株、细胞.....	9
2.2.2 主要试剂.....	9
2.2.3 实验动物.....	10
2.3 方法.....	10
2.3.1 免疫用抗原的制备.....	10
2.3.2 小鼠免疫.....	10
2.3.3 血清效价的测定.....	10
2.3.4 细胞融合.....	11
2.3.5 阳性杂交瘤细胞的筛选与克隆.....	12
2.3.6 杂交瘤细胞的冻存与复苏.....	12
2.3.7 单克隆抗体亚型鉴定.....	12
2.3.8 单克隆抗体特异性鉴定.....	13
2.3.9 杂交瘤细胞抗体分泌稳定性的检测.....	14
2.3.10 单克隆抗体腹水制备.....	14
2.3.11 腹水纯化.....	14
2.4 结果.....	15
2.4.1 小鼠血清抗体效价的测定.....	15
2.4.2 阳性杂交瘤细胞株的确定.....	15
2.4.3 单克隆抗体亚型鉴定.....	16

2.4.4 单克隆抗体特异性鉴定.....	16
2.4.5 杂交瘤细胞分泌抗体稳定性的鉴定.....	17
2.4.6 腹水纯化效果.....	18
2.4.7 腹水纯化前后效价测定.....	18
2.5 讨论.....	19
2.6 小结.....	20
第三章 抗原表位的鉴定.....	21
3.1 引言.....	21
3.2 材料.....	21
3.2.1 主要试剂配制.....	21
3.2.2 主要试剂.....	22
3.3 方法.....	22
3.3.1 噬菌体随机十二肽库筛选单抗模拟表位.....	22
3.3.2 双向电泳及质谱鉴定.....	25
3.3.3 蛋白的原核表达及鉴定.....	26
3.4 结果.....	27
3.4.1 噬菌体随机肽库淘选产率.....	27
3.4.2 间接 ELISA 方法筛选噬菌体阳性克隆.....	28
3.4.3 阳性噬菌体克隆的测序及结果比对.....	28
3.4.4 竞争 ELISA 检测结果.....	29
3.4.5 多肽验证.....	29
3.4.6 双向电泳及 Western blot 试验结果.....	30
3.4.7 抗原蛋白质谱结果.....	31
3.4.8 原核表达载体的构建.....	37
3.4.9 OMP31 蛋白原核表达结果.....	37
3.4.10 OMP31 蛋白特异性验证结果.....	38
3.4.11 OMP31 的初步纯化.....	38
3.5 讨论.....	39
3.6 小结.....	41
第四章 基于单抗 1C5 的竞争 ELISA 抗体检测方法的建立.....	42
4.1 引言.....	42
4.2 材料.....	42
4.3 方法.....	42
4.3.1 竞争 ELISA 方法的建立.....	42
4.3.2 犬种布鲁氏菌阳性血清的效价测定.....	43
4.3.3 抗原最佳包被浓度、血清最佳稀释度及酶标二抗最佳工作浓度的确定.....	43
4.3.4 单克隆抗体最佳工作浓度的确定.....	44

4.3.5 包被时间的确定.....	44
4.3.6 封闭液及封闭时间的确定.....	44
4.3.7 阴阳性临界值的确定.....	44
4.3.8 特异性试验.....	45
4.3.9 敏感性试验.....	45
4.3.10 临床样本检测.....	45
4.4 结果.....	45
4.4.1 抗原最佳包被浓度、血清最佳稀释度及酶标二抗最佳工作浓度的确定.....	45
4.4.2 单克隆抗体最佳工作浓度的确定.....	46
4.4.3 包被时间的确定.....	46
4.4.4 封闭液及封闭时间的确定.....	46
4.4.5 阴阳性临界值的确定.....	47
4.4.6 特异性试验.....	47
4.4.7 敏感性试验.....	47
4.4.8 临床样本检测.....	48
4.5 讨论.....	48
4.6 小结.....	49
第五章 结论.....	50
第六章 创新点.....	51
参考文献.....	52

缩略词表

缩写	英文名称	中文名称
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
DNA	DeoxyriboNuclec Acid	脱氧核糖核酸
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetie Acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HAT	Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine Medium Supplement	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷添加剂
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
HT	Hypoxanthine-Thymidine Medium Supplement	次黄嘌呤-胸苷添加剂
IEF	Isoelectric Focusing	等电聚焦
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
LB	Luria-Bertani	溶菌肉汤
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
OD	Optical Density	吸光度
OMP	Out Memberane Proteins	外膜蛋白
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸缓冲盐溶液
PEG	Polyethylene Glycol	聚乙二醇
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
TBS	Tris Buffered Saline	三乙醇胺缓冲盐水溶液
Tet	Tetracyclines	四环素
TMB	3, 3',5 ,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
TSA	Soybean Casein Digest Agar	胰酪大豆胨琼脂培养基
TSB	Tryptone Soy Broth	胰酪大豆胨液体培养基
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

第一章 引言

1.1 犬种布鲁氏菌概述

布鲁氏菌病 (Brucellosis) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 引起的人畜共患传染病。布鲁氏菌经典种包括马耳他布鲁氏菌 (*B.melitensis*)、流产布鲁氏菌 (*B.abortus*)、猪布鲁氏菌 (*B.suis*)、绵羊布鲁氏菌 (*B.ovis*)、犬布鲁氏菌 (*B.canis*) 和沙林鼠布鲁氏菌 (*B.neotomae*)。1966 年 Carmichael 在美国首次在犬体内发现并分离出犬种布鲁氏菌^[1], 随后世界上其他国家和地区也相继发现了犬种布鲁氏菌的流行。犬种布鲁氏菌最开始被认为是猪种布鲁氏菌的一个生物型^[2], 后由于其被发现具有对犬和野生犬科动物独有的致病性并在犬科动物之间有自然传染性, 同时具有对其他动物致病性较低的特点, 该菌被重新定名为犬种布鲁氏菌, 成为布鲁氏菌属中一个独立的种^[3]。

1.1.1 流行病学

犬种布鲁氏菌的主要传染源是处于发病或带菌状态的犬。传播途径主要是易感动物经口鼻黏膜、生殖道或结膜接触到带菌犬的精液、流产胎儿、胎盘或阴道分泌物等。有研究表明, 受感染的母犬在发情期及流产后六周内, 阴道分泌物会排出大量细菌; 而在非发情期时, 其阴道分泌物也会持续排出少量细菌^[4]。受感染的公犬在感染后 6~8 周会通过精液排出大量细菌, 而后再也会一直持续性排出少量细菌^[5]。即使犬已经绝育, 犬种布鲁氏菌也可存在于感染犬的前列腺和淋巴组织中^[6-7], 通过其唾液、鼻腔分泌物和尿液进行传播^[8]。除此之外, 易感动物通过直接接触感染犬的粪便、被污染的注射器、阴道镜、人工授精设备等也可能受到感染^[9]。

与常见并可感染多种动物的羊种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌相比, 犬种布鲁氏菌可感染的宿主主要只有犬及野生的犬科动物。通过对牛、羊和猪进行口服及黏膜感染犬种布鲁氏菌的试验结果显示, 这些动物对犬种布鲁氏菌有很强的抵抗力^[10]。而猫在口服感染犬种布鲁氏菌后, 会出现菌血症, 但血清中的抗体滴度低^[11]。小鼠、大鼠和非人类灵长类动物通过实验证实也会出现感染^[12]。其中, 兔子比其它实验动物更易感, 在通过腹腔接种高剂量犬种布鲁氏菌后, 会出现睾丸炎和腹膜脓肿的症状^[13]。人类若直接接触受感染的犬以及其生殖分泌物或血液也可能被感染^[14-15]。

1.1.2 临床症状

犬感染犬种布鲁氏菌一般多为隐性感染, 临床感染的症状主要集中于生殖器官方面。公犬感染犬种布鲁氏菌会引起附睾炎、前列腺炎和睾丸炎^[8], 其中慢性睾丸炎和附睾炎可导致单侧或双侧睾丸萎缩和不育^[6]。在发生慢性附睾炎的公犬中, 大约 90% 的精子在感染后 20 周内呈现异常状态^[1]。母犬感染犬种布鲁氏菌的典型症状是流产和不孕, 受感染的母犬会在怀孕的中期或晚期出现自然流产, 并在其后的 1~6 周内流出呈棕黄色黏液状的阴道分泌物。而孕前期的母犬感染后可

能出现胎儿死亡并被母体吸收的现象,使得母犬呈现假的无法受孕现象^[10]。有些母犬流产后还可正常怀孕,有些会间歇性出现不孕症状。流产出的死胎可能出现皮下水肿、出血或充血现象并存在支气管肺炎、心肌炎、肾出血、淋巴结炎、肝炎的症状^[16]。感染的母犬也可能诞下胎儿,但幼犬出生后会较为衰弱,死亡率高^[17]。

除此之外,感染犬种布鲁氏菌的犬还可能会出现眼部和骨骼方面的病变。眼部方面的病变包括轻度至中度的葡萄膜炎、虹膜色素沉着、玻璃体炎症浸润等^[18]。而骨骼方面的病变主要是椎间盘炎,感染犬会出现跛行、脊柱疼痛、神经功能障碍、肌肉无力等症状^[19-21]。

1.1.3 诊断技术

1.1.3.1 临床诊断

犬种布鲁氏菌导致的犬种布鲁氏菌病通过临床诊断通常很难被诊断出来。一般来说如果没有观察到犬流产或不孕不育,该病就很难被发现。一些常规诊断,例如全血细胞计数、血清生化分析和尿液分析通常都会呈现正常结果。偶尔会发现一些支持炎症表现的非特异性结果,如白细胞增多、中性粒细胞增多、高球蛋白血症、低蛋白血症等,这通常可能是在提示有菌血症的出现^[21]。

1.1.3.2 细菌分离培养

犬种布鲁氏菌检测的金标准是细菌的分离培养。通常可以从受感染犬的血液、阴道分泌物、胎盘和胎儿组织、尿液、精液、乳汁以及尸检样本,例如淋巴结、脾脏、前列腺、附睾、子宫、骨髓、眼睛、椎间盘中分离培养出布鲁氏菌^[15,22]。一般情况下会从犬的血液中进行细菌的分离培养,有实验证明,若犬一直没有接受过抗生素治疗,那么其在感染犬种布鲁氏菌的7天后会开始出现菌血症^[23],在感染后2~3周,血液中的细菌就已经可以分离培养出来作为确诊的依据。同时,犬感染布鲁氏菌后的菌血症持续时间长,通常会持续6个月至2年^[11]。国外也曾有文献报道通过试验感染的犬在感染5年半后依旧可以从血液中分离出布鲁氏菌^[7]。

除此之外,当犬出现脑膜炎的临床症状,可选择抽取脑脊液进行细菌分离和培养;若犬出现葡萄膜炎等眼部病变,则可以抽取眼部的玻璃体液进行细菌培养;若出现椎间盘炎,也可从椎间盘收集样本。若患病犬已经死亡,可以从其淋巴结及脾脏进行细菌的分离培养^[24]。

通过对上述样本的细菌分离培养,若有菌落生长,则可确定是布鲁氏菌阳性。但样本的运输和储藏时间、处理及操作手法都会对布鲁氏菌是否可以成功分离有很大的影响^[25],例如运输或储藏的时间越长,样本中存活的布鲁氏菌的量就越少,分离成功的可能性也就越低。故细菌的分离培养作为犬种布鲁氏菌诊断方法的敏感性较低,培养阴性结果的出现也并不能代表彻底排除犬种布鲁氏菌的感染。

1.1.3.3 血清学诊断

血清学诊断方法比细菌学诊断更加简便快捷,常用的犬种布鲁氏菌血清学检测方法包括虎红平板凝集试验、琼脂糖免疫凝胶扩散试验、试管凝集试验、荧光偏振试验、补体结合试验和酶联免疫吸附试验等^[26]。犬感染犬种布鲁氏菌的5~8周后,血清中的抗体会到达一个较高的滴度,且抗体滴度在之后的4~6个月依旧维持在可检出的水平^[11]。

1.1.3.3.1 虎红平板凝集试验

犬种布鲁氏菌检测使用的虎红平板凝集试验抗原是将经加热灭活的 *B.canis* 和 *B.ovis* 全菌离心收集,用虎红染料染色后悬浮于碱性缓冲液中制成。待检血清中的抗体与抗原进行结合后会出现凝集反应。与检测光滑型布鲁氏菌所用的酸性缓冲液不同,检测犬种布鲁氏菌等粗糙型布鲁氏菌所采用的是碱性缓冲液,这是因为血清中存在非特异凝集素,会与布鲁氏菌反应出现非特异的凝集反应,其中犬血清在凝集类试验中出现非特异性凝集反应的现象更为普遍,而使用 *Tris-Maleate* 缓冲液体系能有效改善粗糙型布鲁氏菌的自凝状况出现^[27-29]。虎红平板凝集试验检测速度较快,试验操作简便,阳性反应最早可在感染后的三至四周就被检测出来^[22]。该试验的敏感性很高^[11],但由于血清中的抗体与其他光滑型布鲁氏菌及其它细菌之间存在广泛的交叉反应,导致假阳性结果经常出现,使得试验特异性较低^[30]。

为了降低假阳性结果的发生,研究人员在将血清与虎红平板凝集试验的抗原混合前,在血清中加入 2-巯基乙醇,以灭活血清中特异性较差的 IgM 抗体,从而提高试验的特异性,但同时会在一定程度上降低试验的敏感性^[31]。

1.1.3.3.2 试管凝集试验

试管凝集试验的原理是待检血清中的抗体与试管凝集试验抗原发生特异性结合,一段时间后在适量的电解质和一定的温度下,形成抗原抗体复合物并沉淀于试管底部,使得液体的清亮程度发生改变。故可通过液体的清亮程度判断血清中是否存在布鲁氏菌抗体。试管凝集试验可在犬被感染后二至四周检测出阳性结果,但试验所需的检测时间长,需消耗的血清量大。

同时,由于该方法检测的主要是 IgM 和 IgG2 型抗体,故当感染机体后产生的主要是 IgG1 型抗体时,试管凝集试验的阳性检出率会出现一定程度的降低^[32]。与上述虎红平板凝集试验一样,试管凝集试验的敏感性很高,但特异性较差。所以在试验开始前,向血清中加入 2-巯基乙醇,可适当提高试验的特异性。

1.1.3.3.3 琼脂扩散试验

琼脂扩散试验的原理是可溶性抗原与血清中的抗体在琼脂糖凝胶中自由扩散,当抗原抗体结合形成复合物时,会在相遇处形成白色沉淀线。琼脂扩散试验一般采用的抗原是从犬种布鲁氏菌细胞壁提取的抗原或从犬种布鲁氏菌及其他种布鲁氏菌细胞质中提取的抗原^[33]。使用从细胞壁提取的物质作为抗原会出现和上述凝集试验相同的非特异反应,会导致假阳性结果出现。而使用细胞质提取物质作为抗原,可以进一步提高试验的特异性。该试验在犬被感染后的八至十二周才能检测出阳性结果^[22],但可在被感染后的十二个月甚至更长时间都检出阳性结果,故该方法相较感染前期的检测更适用于检测慢性感染。同时,由于该方法所使用的抗原制备和纯化都比较困难,对操作要求较高,故只有少量实验室会使用琼脂扩散试验作为布鲁氏菌病的检测方法。

1.1.3.3.4 ELISA

酶联免疫吸附试验(ELISA)是应用于布鲁氏菌检测中一个成熟、稳定的试验方法,有许多研究建立了各种针对犬种布鲁氏菌的 ELISA 检测方法。ELISA 方法的效果主要取决于抗原以及抗体的选择。一般使用的抗原主要是粗糙型布鲁氏菌的全菌抗原、OPS 或者布鲁氏菌的外膜蛋白。DE 等使用犬种布鲁氏菌的热溶性提取物作为抗原建立了间接 ELISA 方法,该方法的敏感性为 91.18%,特异性为 100%^[34]。ESCOBAR 等使用牛种粗糙型 RB51 株作为全菌抗原建立间接 ELISA 方法,该方法可以检测包括犬种布鲁氏菌的粗糙型布鲁氏菌,其敏感性为 100%,特异性为

98.80%^[35]。Miryani 等通过筛选得出可能应用于犬种布鲁氏菌血清学诊断的 14 个蛋白，并选取了 PdhB 和 Tuf 两个蛋白进行表达，并混合作为包被抗原建立了间接 ELISA 的检测方法，但结果表明该方法更适用于检测人血清中犬种布鲁氏菌的感染，对于犬血清的检测敏感性和特异性都很低^[36]。

现有的血清学检测方法在试验操作、结果准确性、敏感性和特异性方面都各有其优缺点，没有一种检测方法可以适用于所有流行病学情况，每种方法都有它的局限性。虎红平板凝集试验适用于临床的快速大规模筛查，而试管凝集试验、琼脂扩散试验更适用于实验室确诊，酶联免疫吸附试验的操作更为简单、稳定性好，适合大量样本的实验室检测。

1.1.4 预防

虽然大部分犬感染犬种布鲁氏菌都会呈现隐性感染，但同时有部分犬也会出现诸如不孕的临床症状^[22]。有调查显示全国 16 个城市的 1368 份临床宠物犬血清中，光滑型布鲁氏菌阳性率为 0.36%，粗糙型布鲁氏菌阳性率为 0.66%^[37]。且其中昆明市犬血清的阳性率达到 6.90%，成都市、重庆市的阳性率分别为 3.96%和 3.57%，说明犬种布鲁氏菌在国内的部分地区呈地方性流行，加之近年来宠物犬作为伴侣动物越来越受到欢迎，养犬业发展极为迅速，犬跨地区的交易也更加频繁，使得犬种布鲁氏菌感染引起的犬布鲁氏菌病对公共卫生安全及动物福利的威胁渐长。犬种布鲁氏菌的预防和控制也已逐渐引起了更多关注^[38]。但目前还没有任何可用于预防犬布鲁氏菌病的疫苗上市。因此，犬种布鲁氏菌防控的重点应是及时、准确的早期筛查^[39]。

犬舍中的犬应定期进行血清学筛查，如果在犬舍中发现阳性犬，应限制所有犬只的进出，并将所有的犬均视为疑似病例，统一进行血清学检测。可先通过虎红平板凝集试验对所有犬只进行初筛，接受筛查的犬应在取样前三月未接受过任何抗生素的治疗^[22]。第一次检测结果呈阴性的犬只应在至少四周后进行第二次实验室检测，若结果仍为阴性可视为未感染犬种布鲁氏菌。若第一次检测结果为阳性，应先将视为可疑并进行隔离，在至少四周后进行第二次实验室诊断筛查，若结果仍为阳性，应将其先淘汰出犬舍进行隔离，在第二次检测后八周进行血液培养^[24]或第三次实验室检测进行确诊。对于犬舍两次检测均呈阴性的犬应在之后的每四周进行一次血清学测试，直至整个犬舍所有犬只连续两次血清学测试结果均呈阴性^[26]，才可视为该犬舍中无布鲁氏菌流行。

当有新的犬要被引入犬舍时，应先进行一个月左右的隔离，并在间隔一个月的两次血清学检验中确定为阴性时，再将其引入进犬舍^[40]。若隔离中的犬只有阳性出现，应将该犬只移出隔离设施，并对剩下的犬只重新开始进行隔离观察。

由于犬布鲁氏菌病是一种具有高职业风险的人畜共患病，犬主人和犬舍工作人员应进行适当的教育和保护，根据生物安全风险程度选择适当的防护装备，特别是在犬分娩或流产阶段要做好防护，避免接触感染的犬和其分泌物。当阳性犬舍工作人员在协助分娩时，特别是需接触新生幼犬、胎盘、胎膜或可能接触尿液或阴道分泌物时，应佩戴一次性保护手套并适当使用个人防护设备^[41]。

通过消毒从环境中杀灭犬种布鲁氏菌是预防犬种布鲁氏菌病流行的一个重要措施。犬种布鲁氏菌不能在外界环境中长时间生存。大多数消毒剂，包括 1%次氯酸钠、70%乙醇、戊二醛和甲

醛，都能快速杀灭布鲁氏菌^[22]。

1.2 噬菌体展示技术概述

1.2.1 噬菌体展示技术的原理

噬菌体展示技术是将外源蛋白质、多肽的编码基因或目的基因通过基因工程技术插入到编码噬菌体外壳蛋白的基因序列的适当位置。在阅读框正确且不影响噬菌体正常功能的情况下，使外源蛋白质或多肽与噬菌体外壳蛋白融合形成融合蛋白，并随子代噬菌体的重新组装表达在噬菌体表面。融合蛋白保有独立的空间结构和生物活性，能与靶分子进行识别和结合。噬菌体展示技术的最大特点就是通过噬菌体将目的蛋白与基因的克隆偶联在一起，也在筛选过程中将重组蛋白质的筛选与基因的筛选合二为一。

1.2.2 噬菌体展示技术的发展

1985年，George Smith将外源蛋白片段成功地展示在噬菌体表面，并将这一方法称为噬菌体展示技术^[42]。1988年，George Smith又将外源DNA片段插入到丝状噬菌体的次要外壳蛋白基因中，成功地将外源多肽展示在噬菌体表面，并通过抗体进行了相结合噬菌体的亲和纯化^[43]。1990年，Scotthe和George Smith成功地将编码随机外源多肽的DNA插入到丝状噬菌体pIII蛋白基因组中，将随机肽展示在了噬菌体表面，建立了噬菌体肽库^[44]。2018年，Winter和Smith教授因在“多肽及抗体的噬菌体展示（The phage display of peptides and antibodies）”技术方面的开创性工作与应用获得诺贝尔化学奖^[45]。

1.2.3 噬菌体展示系统的分类

1.2.3.1 丝状噬菌体展示系统

丝状噬菌体主要指具有感染革兰氏阴性菌能力的M13、Fd和F1噬菌体，其中M13噬菌体在噬菌体展示技术中应用最广泛^[46]。M13噬菌体为一个丝状长管结构，一个环状单链DNA基因组编码5个外壳蛋白（pIII, pVIII, pVI, pVII和pIX）以及6个组装和复制蛋白^[47]。大多数噬菌体展示系统基于外壳蛋白pIII蛋白与pVIII蛋白。pVIII是M13噬菌体上主要的外壳蛋白，可与6~7个氨基酸大小的外源蛋白融合表达。而pIII的拷贝数较低但可作为表达复杂结构的较大蛋白载体。由于丝状噬菌体的增殖为非裂解增殖，在增殖期间不会裂解宿主菌，因此该噬菌体在实验淘选过程中简化了噬菌体纯化的步骤，减少了试验所需时间。但由于丝状噬菌体的所有成分均需宿主细胞内膜分泌转运，会对表达蛋白的长度、序列和折叠特性有所影响^[48]。

1.2.3.2 T4噬菌体展示系统

T4噬菌体是肌病毒科（*Myoviridae*）的一种烈性噬菌体。T4噬菌体的结构相较于丝状噬菌体更为复杂，其由头部、尾部和尾部纤维组成。T4噬菌体的头部由一个细长二十面体衣壳包裹着一双链DNA组成^[49]。头部与尾部之间有一颈部相连，尾部的蛋白质外壳为一中空的长管，外面

包有可收缩的尾鞘，尾部还有六根长尾纤维（LTF）和六根短尾纤维（STF）分别连接到六角形底座上并折叠在底板下方^[50]。T4 噬菌体常用于融合展示外源蛋白的主要有高度外衣壳蛋白 HOC、小外衣壳蛋白 SOC、衣壳蛋白 gp23、顶端蛋白 gp24、门户蛋白 gp20。其中 HOC 和 SOC 两种蛋白具有很强的抗原性，且这两种蛋白发生改变也对 T4 噬菌体的感染性以及活性没有太大影响，因此这两种蛋白最常被用于融合展示外源蛋白。T4 噬菌体展示系统的一大优势就是其可以在 SOC 和 HOC 两个位点上展示双重外源抗原，从而筛选出双特异性抗体^[51]。

1.2.3.3 T7 噬菌体展示系统

T7 噬菌体是短尾病毒科（*Podoviridae*）的一种烈性噬菌体。T7 噬菌体的头部由一个二十面体的头部包裹着双链 DNA 基因组组成。头部和尾部之间有一个环状连接器，T7 的尾部为短圆锥形带有六根尾部纤维，其尾部不能收缩。T7 噬菌体由主要衣壳蛋白 gp10A、次级衣壳蛋白 gp10B、连接蛋白 gp8、尾部蛋白 gp11 和 gp12 以及尾纤蛋白 gp17 六种主要蛋白质组成^[52]。在 T7 噬菌体展示系统中，用于展示多肽和蛋白的衣壳蛋白主要是 gp10A 和 gp10B。该展示系统可以很好地适应多肽或蛋白质序列的变化，以高拷贝数展示多肽或蛋白质，但随着插入序列大小的增加，拷贝数有逐渐降低的趋势。此外，T7 噬菌体比起丝状噬菌体的增殖速度更快，可节省克隆和筛选的时间^[53]。

1.2.3.4 λ 噬菌体展示系统

λ 噬菌体是长尾病毒科（*Siphoviridae*）的一种温和噬菌体。 λ 噬菌体是双链 DNA 噬菌体，有一个二十面体的头部和一个可弯曲的尾部。 λ 噬菌体中的 GPD 蛋白和 PV 尾蛋白常被用来展示多肽或蛋白^[54]。与 PV 蛋白相比，GPD 蛋白上的拷贝数更多，可展示更复杂的大蛋白，且在其上展示蛋白对噬菌体增殖的干扰更小，因此通常使用 GPD 蛋白的 N-端或 C-端作为展示位点。此外，一些在丝状噬菌体展示系统中很难通过膜分泌的多肽也可以在 λ 噬菌体表面展示。但 λ 噬菌体具有裂解性，增殖过程中滴度较低，较难增殖。此外， λ 噬菌体的基因组大，使遗传操作变得更加复杂困难^[48]。

1.2.4 噬菌体肽库筛选抗原表位

单克隆抗体（monoclonal antibody, mAb）是指由单一 B 细胞克隆产生的高度均一且仅针对某一特定抗原表位的抗体。因此，自单克隆抗体出现以来，如何确定单克隆抗体所针对的特定表位的序列和结构就受到了持续的研究和关注。一般来说，抗原表位可分为连续表位和不连续表位两类。连续表位是由序列上相连或相接近的氨基酸残基构成的，其中一些线性表位可能是一个更大的构象表位的一部分。而不连续表位又称为构象表位，是序列上一些不相连的氨基酸通过蛋白质的空间折叠而聚集在一起形成的抗原表位。通过对单克隆抗体所针对的抗原表位进行分析，可以明确相关表位在抗原分子中的位置，从而进一步确定单抗对靶单位的特异性和交叉反应性。自 1990 年，Scotthe 和 George Smith 成功将噬菌体展示技术应用于抗原表位的筛选，目前，噬菌体随机肽库已经是容量在包含 $10^9 \sim 10^{10}$ 个随机肽段的文库^[55-56]，其已成为筛选单克隆抗体抗原表位的一个重要工具。

1.2.4.1 噬菌体肽库的建立

使用噬菌体随机肽库筛选单克隆抗体抗原表位的第一步就是噬菌体肽库的建立。构建肽库的肽段来源一般分为两类，一类是通过基因合成法，人工合成随机多肽的 DNA 序列，再通过基因工程技术将其插入噬菌体编码外壳蛋白的基因中，从而将随机多肽展示在噬菌体表面。一般来说通过该方法建立的随机肽库，在噬菌体表面展示的短肽序列大多以线性结构出现，故淘选出的抗原表位也基本上为线性表位^[57]。另一类则是将特定基因通过 DNase 进行随机酶切或通过超声进行随机剪切^[58-61]。由于是基因随机剪切成片段，故展示在噬菌体表面的肽段大小不均。同时该方法构建的肽库针对的范围有限，仅适用于使用该基因组制备的单克隆抗体的抗原表位的识别与筛选。该方法更适合筛选单克隆抗体的构象表位并可更有效地筛选已知蛋白质的线性表位^[62-63]。

1.2.4.2 噬菌体的淘选

创建噬菌体肽库后，就可使用固定抗体进行抗体特异性噬菌体的富集^[64]，这一步被称为噬菌体淘洗。淘洗首先需将单克隆抗体固定在固相载体上，加入噬菌体颗粒后，使得表达特异抗原的噬菌体与抗体结合。单抗分子一般是通过亲水或疏水的非共价作用力被动吸附在活化表面上的，这一作用力可以保证单抗分子在整个淘洗过程中被牢牢吸附。另一种常见的固定方法是先将单抗与生物素偶联，再通过与已固定在活化表面的链霉亲和素的相互作用将抗原固定在表面上^[65]。

加入噬菌体随机肽库与单抗进行孵育后，需要使用洗涤缓冲液洗掉未结合的噬菌体，一般会使用处于生理 pH 下、含有吐温-20 的非离子洗涤剂。洗涤的严格性与噬菌体同单抗的孵化时间、洗涤剂的浓度、洗涤缓冲液的 pH 值以及目标单抗的浓度等条件相关^[66]。严格的洗涤条件更有利于展示特异多肽序列的噬菌体富集，但多轮次淘洗过程会使一些亲和力较低的噬菌体被去除，从而导致淘选后的克隆多样性差。故在最初几轮淘洗中，洗涤条件不应设置得过于严格，而是应随着淘选循环的进行不断提升。

洗去未结合的噬菌体后，接下来需要洗脱与单抗结合的高亲和力噬菌体。最常使用的是例如甘氨酸、柠檬酸等酸性或碱性缓冲液^[67]。但需注意要把洗脱噬菌体的 pH 值中和到 8 左右，以避免噬菌体降解或失去感染性。高亲和力的噬菌体也可通过与过量游离的单抗进行竞争达到洗脱的目的^[68]，但若用于竞争的游离单抗浓度或亲和力不够高，则可能会出现洗脱偏向风险。Rothe 使用 CysDisplay™ 技术洗脱高亲和力噬菌体，该技术是通过二硫键将抗体片段连接到 PIII 上，再通过添加二硫苏糖醇以减少二硫键，从而将噬菌体从固定的抗原中释放出来^[69]。

经过几轮淘选后，在分离出的噬菌体池中进行 ELISA 检测，以确定在池中是否有针对特定抗体的噬菌体结合体的富集。通过 ELISA 确定的阳性克隆可通过测序直接识别抗原表位的基因。

1.3 本研究的目的是和意义

布鲁氏菌病是一种人畜共患的传染病，家畜感染布病后会出现流产不孕等症状，严重影响畜牧业的发展^[70]。相较致病性较强的光滑型布鲁氏菌，粗糙型布鲁氏菌虽毒力较弱，但对畜牧业发展和公共卫生安全的危害也不容小觑。且由于粗糙型布鲁氏菌的自凝现象使得常用诊断布鲁氏菌的凝集类试验易出现假阳性，使犬种布鲁氏菌等粗糙型布鲁氏菌的诊断更为困难。而目前建立的

针对犬种布鲁氏菌的 ELISA 方法多为间接 ELISA 方法，具有种属特异性，且敏感性和特异性欠佳，所以建立针对犬种布鲁氏菌的竞争 ELISA 抗体检测方法具有较大的公共卫生学意义。

本研究利用犬种布鲁氏菌 RM6/66 作为抗原，筛选制备针对犬种布鲁氏菌的单克隆抗体，识别单克隆抗体所针对的抗原表位，并建立敏感性和特异性更好的犬种布鲁氏菌竞争 ELISA 抗体检测方法。本研究的意义是建立一个针对犬种布鲁氏菌的敏感性和特异性更好的竞争 ELISA 抗体检测方法，以期对犬种布鲁氏菌的早期诊断提供新方法。

第二章 犬种布鲁氏菌 RM6/66 单克隆抗体的制备

2.1 引言

单克隆抗体(monoclonal antibody, MAbs)是一种用途广泛的生物大分子,能与多种蛋白质和非蛋白质靶标结合,具有较高的特异性。1975年,Köhler和Milstein首次提出了使用杂交瘤技术制备单克隆抗体的方法。他们成功把免疫小鼠的脾脏B淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合,形成了B淋巴细胞-骨髓瘤细胞杂合体,这种杂合体既能在体外培养中无限的快速增殖且存活,又能分泌单克隆抗体^[7]。由于单克隆抗体的稳定性高、特异性强,在生物医药等多个领域的应用已愈加广泛。

目前,犬种布鲁氏菌的诊断主要是依据从血液中进行布鲁氏菌的分离培养,而由于犬种布鲁氏菌在凝集类试验中经常有自凝现象出现,使得使用凝集类试验诊断犬种布鲁氏菌的假阳性居多。而随着ELISA技术的逐渐发展与成熟,现已有许多针对布鲁氏菌病的ELISA检测方法,但针对犬种布鲁氏菌等粗糙型布鲁氏菌的ELISA检测方法较少,且多为间接ELISA方法,目前还没有针对犬布鲁氏菌的商品化竞争ELISA方法。其中获得一株与犬种布鲁氏菌具有高亲和力的单克隆抗体,是建立敏感性和特异性更好得竞争ELISA方法的前提和基础。

本章主要使用灭活的犬种布鲁氏菌RM6/66作为免疫原免疫小鼠,三免后待小鼠血清效价达到要求后进行细胞融合,使用间接ELISA方法对融合后的细胞进行效价检测并进行多轮亚克隆,以获得可以稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。对所获的杂交瘤细胞分泌稳定性、单克隆抗体的亚型及特异性进行检测,并进行腹水的制备与纯化。

2.2 材料

2.2.1 菌株、细胞

犬种布鲁氏菌RM6/66株、猪种布鲁氏菌疫苗株S2株、牛种布鲁氏菌疫苗株A19株由国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心鉴定保存。犬种布鲁氏菌流行株、牛种布鲁氏菌流行株、羊种布鲁氏菌流行株由本实验室分离保存。骨髓瘤细胞Sp2/0由国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心保存。

2.2.2 主要试剂

DMEM细胞培养基, Gibco, 美国; HAT培养基添加剂、HT培养基添加剂、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、聚乙二醇2000(PEG2000), Sigma-Aldrich, 美国; 胎牛血清, Pan-Biotech, 德国; 青链霉素混合液, 二甲基亚砜(细胞培养级), 单组分TMB显色液, ELISA终止液, ECL Plus超敏发光液, 蛋白上样缓冲液, 索莱宝, 中国; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG,

Jackson ImmunoResearch, 美国; HiTrap rProtein A FF 亲和柱, GE Healthcare, 美国; 12.5% SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒, 三色预染蛋白 Marker, 北京博泰斯生物技术有限公司, 中国; 小鼠单抗 Ig 类亚类鉴定用酶标二抗即用套装, 苏州博奥龙科技有限公司, 中国。

2.2.3 实验动物

6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华试验动物技术有限公司。

2.3 方法

2.3.1 免疫用抗原的制备

将 TSA 平板上的犬种布鲁氏菌 RM6/66 使用 10 mL 灭菌生理盐水洗下, 收集于 50 mL 离心管中。从中取出 100 μ L 菌体悬液, 依据现行《中国兽药典》进行细菌计数。将其余菌液置于 85 $^{\circ}$ C 水浴灭活 1 h。灭活之后, 将菌液 5000 r/min 离心 10 min 以收集菌体, 再使用 10 mL 灭菌生理盐水重悬, 将其置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.2 小鼠免疫

取出 2.3.1 中保存的灭活犬种布鲁氏菌 RM6/66 菌液, 将菌液稀释至 1×10^{10} CFU/mL, 稀释后的菌液与弗氏完全佐剂按照 1: 1 的比例混合乳化均匀。将充分乳化后的菌液背部皮下免疫 6 只 6 周龄的 BALB/c 小鼠, 每只小鼠 0.25 mL。每间隔两周进行一次免疫, 共免疫三次。第二、三次免疫使用弗氏不完全佐剂与相同浓度的灭活 RM6/66 菌液进行等比例混合乳化, 乳化完全后在小鼠背部皮下免疫。三次免疫后, 通过颌下静脉窦采血, 收集血清, 通过间接 ELISA 方法确定小鼠血清效价。选取其中效价最高的一只小鼠, 腹腔注射 0.25 mL、 2×10^{10} CFU/mL 的灭活 RM6/66 菌液加强免疫, 在加强免疫后四天进行细胞融合。

2.3.3 血清效价的测定

2.3.3.1 包被抗原的制备

取 10 mL 2.3.1 中保存的灭活菌液进行超声裂解。将菌液以 200 W 功率, 超声 2 s 停 2 s, 超声 30 min。超声后, 4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 30 min, 取上清, 使用超微量分光光度计测定浓度后, 置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.3.2 间接 ELISA 方法检测小鼠血清效价

采用 2.3.3.1 中超声破碎后的蛋白作为包被抗原, 使用间接 ELISA 方法检测小鼠血清效价, 具体步骤为:

- (1) 使用 ELISA 包被液将蛋白稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，100 μL /孔包被 ELISA 板，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。
- (2) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次。
- (3) 每孔加入 100 μL 10% 脱脂奶粉，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。
- (4) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次。
- (5) 将小鼠血清从 1: 1000 开始进行倍比稀释至 1: 12800，每孔加入 100 μL 稀释好的小鼠血清。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- (6) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次。
- (7) 每孔加入 100 μL 1: 10000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- (8) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次。
- (9) 加入 100 μL TMB 显色液避光显色 15 min，加入 50 μL 终止液终止。
- (10) 使用酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

2.3.4 细胞融合

2.3.4.1 饲养细胞的制备

在融合前一天进行饲养细胞的制备。取一只 4 周龄的 BALB/c 小鼠，眼球取血后脱颈处死，在 75% 的酒精中浸泡 5 min。将小鼠置于无菌平皿内，小心剪开腹部皮肤，分离皮肤与腹膜，充分暴露腹腔。用无菌注射器吸取 10 mL 含有 10% FBS、1 \times HAT 的 DMEM 注入小鼠腹腔，轻轻按摩小鼠腹壁，吸回营养液，注入离心管内。重复冲洗腹腔三到四次。补培养基至 60 mL，混匀后加入 6 块 96 孔细胞版中，置于 CO_2 培养箱内备用。

2.3.4.2 骨髓瘤细胞的准备

融合前 24 h 将 Sp2/0 细胞传代培养。在融合当天，选择形态良好、处于对数生长期的 Sp2/0 细胞，用适量 DMEM 基础培养基将其从瓶壁上轻轻吹下，收集于 50 mL 离心管内，进行细胞计数。将计数后的细胞 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，用适量 DMEM 培养基重悬细胞沉淀备用。

2.3.4.3 脾细胞的制备

取加强免疫后四天的小鼠，摘除眼球放血并分离血清作为抗体阳性对照。将小鼠脱颈处死，置于 75% 酒精中浸泡 5 min。无菌取出小鼠脾脏，用灭菌注射器吸取 DMEM 培养基，将针头插入脾脏的一端轻吹，将脾脏内的细胞冲洗出来，反复冲洗数次。将洗下的脾细胞移入离心管内，进行细胞计数。将计数后的细胞 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，用适量 DMEM 培养基重悬细胞沉淀备用。

2.3.4.4 细胞融合

吸取适量脾细胞和骨髓瘤细胞按 5: 1 的数量比例加入至 50 mL 离心管内进行混合。将混合后的细胞 1000 r/min 离心 10 min，离心后将上清尽量弃去，把管底在橡胶手套上轻轻摩擦，使沉淀细胞均匀分散成糊状。随后一手均匀转动离心管，另一只手使用滴管吸取已提前在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 1 mL PEG2000，将其沿转动的离心管壁缓缓加入，在 60 s 加完，然后将细胞悬液在 30 s 左右

吸入吸管,静置 30 s,再将其在 30 s 左右轻轻吹回至离心管内。加入 25 ml DMEM 液终止 PEG2000 的作用,加入后将其置于 37 °C 温箱中静置 10 min。将静置后的融合细胞 800 r/min 离心 7 min,弃净上清。加入 60 mL 含有 20% FBS、1% HAT 的 DMEM 培养液轻轻吹吸,使沉淀细胞混合均匀。将细胞液加入 6 块铺有饲养细胞的 96 孔板中,每孔 100 μ L。将 96 孔细胞板置 CO₂ 培养箱中培养。融合 5 天后每天观察细胞生长情况。

2.3.5 阳性杂交瘤细胞的筛选与克隆

待融合后的细胞生长至覆盖孔底 1/3 时,使用与 2.3.3.2 中相同的间接 ELISA 方法对所有长有融合细胞的细胞孔的细胞上清的效价进行检测。选取其中阳性值较高的 10 个细胞孔进行亚克隆。

在进行亚克隆的前一天制备饲养细胞。采用有限稀释法对需要进行亚克隆的细胞孔进行稀释,用含有 10% FBS、1 \times HAT 的 DMEM 稀释杂交瘤细胞至 10 个/mL。将稀释后的细胞添加到含有饲养细胞的 96 孔细胞板中。每天观察细胞生长情况。待细胞长至覆盖孔底 1/3 时,使用间接 ELISA 方法对单克隆细胞孔的细胞上清进行检测。选择其中阳性值最高的阳性单克隆细胞孔进行下一次亚克隆。重复亚克隆 3~4 次,第 3、4 次亚克隆使用含有 10% FBS、1 \times HT 的 DMEM 培养基进行稀释和培养。持续亚克隆直至连续两次阳性率达到 100%。将获得的阳性杂交瘤细胞株进行及时扩大培养并冻存。

2.3.6 杂交瘤细胞的冻存与复苏

将阳性杂交瘤细胞扩至六孔板培养后,要及时进行冻存。冻存方法为:用 DMEM 基础培养基将细胞吹下,将细胞悬液加入离心管中,1000 r/min 离心 10 min,弃上清。将 DMEM 培养基、FBS、DMSO 以 6:3:1 的比例进行充分混合,配置成冻存液。使用 1 mL 冻存液重悬细胞加入至冻存管中,将冻存管放入程序冻存盒中。置于 -80 °C 冰箱 24 h 后,移入液氮罐中保存。

复苏方法为:取出冻存的细胞管,将其置于 37 °C 水浴中至完全融化。将冻存管 1000 r/min 离心 10 min。弃净上清,使用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基将细胞进行重悬,转移至细胞板进行培养。

2.3.7 单克隆抗体亚型鉴定

使用小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗即用试剂盒对获得的单抗的抗体亚型进行鉴定。具体操作步骤如下:

(1) 使用与 2.3.3.2 中相同的蛋白与方法包被 ELISA 板。将每株待测杂交瘤细胞上清加 6 个孔,每孔 100 μ L,37 °C 孵育 30 min。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 5 次。

(2) 分别在 6 个孔中加入试剂盒中的 6 种酶标记物,每孔 100 μ L,37 °C 孵育 30 min。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 5 次。

(3) 加 TMB 显色液避光显色 20 min,加入 50 μ L 终止液终止。

(4) 使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值。每株单抗 6 个孔中高 OD 值孔对应所加的酶标二抗即为该株单抗的 Ig 类别。

2.3.8 单克隆抗体特异性鉴定

2.3.8.1 ELISA 方法鉴定

分别用犬种布鲁氏菌 RM6/66 株、犬种布鲁氏菌流行株、牛种布鲁氏菌流行株、羊种布鲁氏菌流行株、S2 株、A19 株经破碎后的灭活全菌蛋白包被 ELISA 板，用间接 ELISA 方法确定单抗的特异性。具体操作步骤如下：

(1) 将灭活后的犬种布鲁氏菌 RM6/66 株、犬种布鲁氏菌流行株、牛种布鲁氏菌流行株、羊种布鲁氏菌流行株、S2 株、A19 株使用与 2.3.3.1 相同的方法进行超声破碎，获得上清。

(2) 使用 ELISA 包被液将上述获得的 5 种布鲁氏菌的蛋白均稀释至 $10 \mu\text{g/mL}$ ， $100 \mu\text{L}$ /孔包被 ELISA 板， 4°C 包被过夜。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次。

(3) 加入 $100 \mu\text{L}$ 10% 脱脂奶粉， 37°C 封闭 2 h。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次。

(4) 在五个 ELISA 板上分别加入 4 株杂交瘤细胞上清， $100 \mu\text{L}$ /孔， 37°C 孵育 30 min。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次。

(5) 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 1:10000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG， 37°C 孵育 30 min。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次。

(6) 加入 $100 \mu\text{L}$ TMB 显色液，避光显色 15 min，加入 $50 \mu\text{L}$ 终止液终止。

(7) 使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值。

2.3.8.2 Western Blot 方法鉴定

为了进一步鉴定单抗的特异性，用犬种布鲁氏菌 RM6/66 株、牛种布鲁氏菌流行株、羊种布鲁氏菌流行株、S2 株、A19 株经灭活破碎后的全菌蛋白进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 反应。

SDS-PAGE 具体操作步骤如下：

(1) 使用博泰斯的一步法 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒制备 2 块 12.5% SDS-PAGE 凝胶。

(2) 将 2.3.8.1 中获得的 5 种蛋白稀释至同一浓度，稀释后各取 $20 \mu\text{L}$ 样品，加入 $5 \mu\text{L}$ $4\times$ 上样缓冲液。在金属浴中 100°C 煮沸 10 min。

(3) 取上述制备好的 2 块凝胶置于电泳槽中，依次分别加入 $10 \mu\text{L}$ 蛋白 Marker 和制备好的样品。

(4) 以恒压 80 V 电泳 30 min 跑浓缩胶，待条带进入分离胶后，改为恒压 120 V 电泳 45 min。

(5) 电泳结束后，取出其中一块凝胶，切除上层浓缩胶。

(6) 将凝胶置于考马斯亮蓝染色液中，在摇床上摇动染色过夜。

(7) 染色后，将胶块置于脱色液中摇动，至凝胶变透明。

Western Blot 具体方法如下：

(1) 取出上述 SDS-PAGE 剩下的一块凝胶，切去上层浓缩胶后，将其置于转膜缓冲液中孵

育 10 min。

(2) 剪出与凝胶同等大小的 PVDF 膜，将膜在甲醇中活化 10 s。

(3) 按照转印电极装置从负极到正极依次放置海绵垫、4 层滤纸、凝胶、PVDF 膜、四层滤纸及海绵垫。注意需排净凝胶与 PVDF 膜之间的气泡。

(4) 恒压 110 V 转印 55 min。

(5) 将转印结束后的 PVDF 膜取出，置于 5%脱脂奶粉中室温孵育 2 h。

(6) 封闭之后使用含有 0.05% Tween 的 PBST 漂洗 5 min。

(7) 用 5%脱脂奶粉以 1:500 的稀释度稀释 4 株杂交瘤细胞上清，将 PVDF 膜置于其中 4 °C 孵育过夜。

(8) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 漂洗 5 次，每次 5 min。

(9) 用 5%脱脂奶粉以 1:8000 的稀释度稀释 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG，将 PVDF 膜置于其中室温孵育 1 h。

(10) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 漂洗 5 次，每次 5 min。再用 PBS 漂洗 5 min。

(11) 根据 PVDF 膜的大小，配置适量的超敏发光液，向 PVDF 膜上均匀滴加。使用化学发光成像仪检测发光信号。

2.3.9 杂交瘤细胞抗体分泌稳定性的检测

将杂交瘤细胞进行连续传代培养，分别在第 5、10、20 代收集细胞上清，使用间接 ELISA 方法检测其抗体效价。将冻存后 6 个月的杂交瘤细胞复苏后培养，收集细胞上清，使用间接 ELISA 方法检测抗体效价。

2.3.10 单克隆抗体腹水制备

准备 6 只经产 BALB/c 母鼠，腹腔注射液体石蜡 0.5 mL。7 天后，使用 DMEM 培养基将扩大培养的杂交瘤细胞吹打下来计数，将细胞浓度调整为 0.5×10^7 个/mL。将杂交瘤细胞株 0.5 ml/只腹腔接种小鼠。7 天后，可见小鼠腹部明显增大，待小鼠行动迟缓，腹部胀大接近饱和时，采集腹水。将腹水 5000 r/min 离心 10 min，收集上清于 -20 °C 保存备用。

2.3.11 腹水纯化

(1) 使用 IgG2b 偶联缓冲液将腹水进行 1:3 稀释，12000 r/min 4 °C 离心 10 min，取上清再使用 0.22 μ m 滤膜过滤，以除去脂肪、细胞残渣及小颗粒物质。

(2) 使用 10 倍柱体积的 IgG2b 偶联缓冲液平衡柱子，保持流速为 2 s/滴。

(3) 用注射器把样品加入至柱子上端接口，将流出液收集于 50 mL 离心管中，保持流速为 4 s/滴。

(4) 用 5 倍柱体积的 IgG2b 偶联缓冲液过柱，保持流速为 2 s/滴。

(5) 在不同 EP 管中加入不同体积的 1 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0)，滴加洗脱液到 1.0 mL，

混匀后检测 pH 值。根据结果调整 Tris-HCl 的量，使中和后溶液 pH 为 7.0。

(6) 取 5 个 EP 管，根据中和调试结果，按量分别加入中和液。

(7) 用 5 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱抗体，收集于上述 EP 管中，保持流速为 4 s/滴。

(8) 用间接 ELISA 方法测定腹水纯化前和纯化后的效价。并将纯化前后的腹水进行 SDS-PAGE，分析单克隆抗体的纯度。

2.4 结果

2.4.1 小鼠血清抗体效价的测定

使用间接 ELISA 方法，以未免疫小鼠血清为空白对照，对 6 只三次免疫后的小鼠血清效价进行测定，结果如表 2.1 所示，1、2、3、4、5 号小鼠血清效价均达到了 1:128000，从中选取了 4 号小鼠进行加强免疫。

表 2.1 三次免疫后小鼠血清抗体效价 ELISA 检测结果

Table 2.1 ELISA results of mouse serum antibody potency after three immunizations

小鼠编号	不同血清稀释倍数测定 OD _{450nm}							
	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000
1	3.005	2.879	2.452	2.387	2.185	1.966	1.618	1.417
2	2.894	2.832	2.554	2.303	2.090	1.900	1.615	1.508
3	2.920	2.924	2.561	2.455	2.156	1.945	1.571	1.356
4	2.935	2.823	2.604	2.472	2.251	2.019	1.632	1.495
5	2.978	2.876	2.632	2.345	1.891	1.919	1.646	1.338
6	2.188	1.643	1.474	1.231	1.019	0.848	0.663	0.532
空白	0.132	0.096	0.084	0.083	0.057	0.052	0.047	0.032

2.4.2 阳性杂交瘤细胞株的确定

将使用 RM6/66 全菌免疫的小鼠脾细胞与 Sp2/0 细胞进行融合，如图 2.1 所示，细胞融合后 7 天，可见成团的杂交瘤细胞。使用同 2.3.3.2 建立的间接 ELISA 方法检测杂交瘤细胞上清效价，筛选阳性杂交瘤细胞孔进行亚克隆。经 4 次亚克隆后，获得 4 株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株，将其分别命名为 1B2、1C5、1D2 和 2E6。

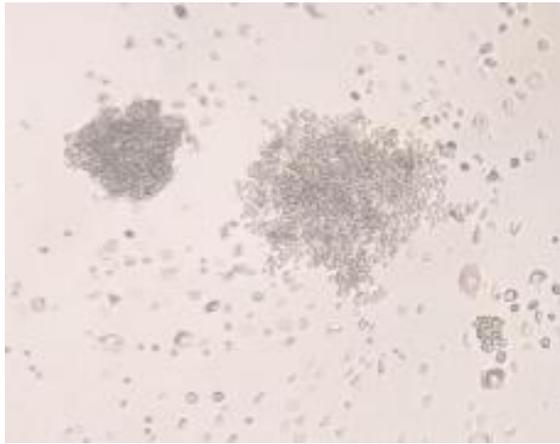


图 2.1 融合后 7 天杂交瘤细胞状态

Figure 2.1 Status of hybridoma cells at 7 days after fusion

2.4.3 单克隆抗体亚型鉴定

采用小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗即用试剂盒，鉴定结果如表 2.2 所示，1B2、1C5、1D2 和 2E6 的抗体亚型均为 IgG2b 亚型。

表 2.2 四株单克隆抗体亚型鉴定结果

Table 2.2 Identification results of four monoclonal antibody subtypes

杂交瘤细胞株	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
1B2	0.223	0.067	1.245	0.049	0.094	0.065
1C5	0.047	0.12	0.956	0.05	0.059	0.043
1D2	0.045	0.094	1.304	0.101	0.085	0.045
2E6	0.047	0.065	1.012	0.045	0.069	0.059

2.4.4 单克隆抗体特异性鉴定

4 株单克隆抗体使用间接 ELISA 方法进行特异性检测的结果见表 2.3。由表 2.3 中结果可知单克隆抗体 1C5 与犬种布鲁氏菌 RM6/66 株、犬种布鲁氏菌流行株发生反应。1B2 与犬种 RM6/66 株、犬种布鲁氏菌流行株、牛种流行株有阳性反应，与羊种流行株、牛种 A19 株、猪种 S2 株有弱阳性反应。1D2 与犬种 RM6/66 株、犬种布鲁氏菌流行株、牛种流行株、羊种流行株、牛种 A19 株、猪种 S2 株均有阳性反应。2E6 与犬种 RM6/66 株、犬种布鲁氏菌流行株、牛种流行株、羊种流行株有阳性反应，与牛种 A19 株、猪种 S2 株有弱阳性反应。

为了进一步鉴定单抗 1C5 的特异性，将其与犬种 RM6/66 株、牛种流行株、羊种流行株、牛种 A19 株、猪种 S2 株进行 Western Blot 反应。结果如图 2.2 所示，1C5 与犬种 RM6/66 株的蛋白发生特异性反应，于 23 kDa 处有一清晰条带，而不与其它株布鲁氏菌发生反应。

表 2.3 四株单克隆抗体特异性间接 ELISA 鉴定结果

Table 2.3 Four monoclonal antibody-specific indirect ELISA identification results

杂交瘤 细胞株	间接 ELISA 反应 OD 值					
	犬种布鲁氏菌 RM6/66	犬种布鲁氏菌 流行株	牛种流行株	羊种流行株	牛种 A19 株	猪种 S2 株
1B2	2.457	2.332	2.269	1.231	0.853	0.518
1C5	2.081	2.191	0.226	0.163	0.126	0.115
1D2	2.996	2.362	2.715	2.472	2.365	1.729
2E6	2.563	2.014	2.513	1.461	1.069	0.729

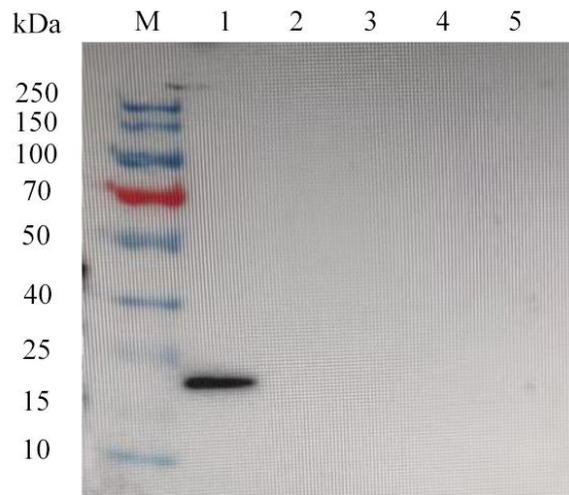


图 2.2 单克隆抗体 1C5 特异性 Western Blot 检测结果

(M.蛋白质 Marker; 1.犬种布鲁氏菌 RM6/66 株灭活破碎蛋白; 2.牛种布鲁氏菌流行株灭活破碎蛋白; 3.羊种布鲁氏菌流行株灭活破碎蛋白; 4.S2 株灭活破碎蛋白; 5.A19 株灭活破碎蛋白)

Figure 2.2 Monoclonal antibody 1C5 specific Western Blot assay results

(M. Protein Marker; 1. Inactivated fragmented protein of Brucella canis strain RM6/66; 2. Inactivated fragmented protein of B.abortus prevalent strain; 3. Inactivated fragmented protein of B.melitensis prevalent strain; 4. Inactivated fragmented protein of strain S2; 5. Inactivated fragmented protein of strain A19)

2.4.5 杂交瘤细胞分泌抗体稳定性的鉴定

将杂交瘤细胞进行连续传代培养, 分别在第 5、10、20 代收集细胞上清, 使用间接 ELISA 方法检测其抗体效价。将冻存后 6 个月的杂交瘤细胞复苏后培养, 收集细胞上清, 使用间接 ELISA 方法检测抗体效价。检测抗体效价的结果见表 2.4, 4 株杂交瘤细胞均具有稳定传代培养并分泌单克隆抗体的能力, 且冻存 6 个月后复苏, 不会影响其分泌单克隆抗体的能力。

表 2.4 四株杂交瘤细胞分泌抗体稳定性检测结果

Table 2.4 Results of stability assay of four antibody secreted by hybridoma cells

杂交瘤细胞株	传代次数					冻存 6 月后复苏
	1	2	5	10	20	
1B2	2.190	2.162	2.265	2.145	2.258	2.132
1C5	2.230	2.148	2.257	2.235	2.139	2.364
1D2	2.278	2.275	2.240	2.268	2.249	2.265
2E6	2.154	2.235	2.180	2.147	2.231	2.260

2.4.6 腹水纯化效果

用 Protein G 亲和柱纯化后的腹水，经 SDS-PAGE 检测后，如图 2.3 所见，纯化后的腹水杂带明显减少，并清晰显示出在 55 kDa 处有一重链和在 23 kDa 附近处有一轻链。

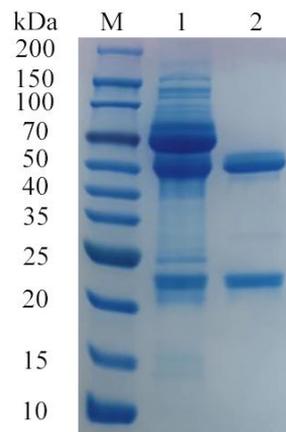


图 2.3 单克隆抗体 1C5 腹水纯化前后效果比较

(M. 蛋白质 Marker; 1. 纯化前腹水; 2. 纯化后腹水)

Figure 2.3 Comparison of the effect of monoclonal antibody 1C5 before and after purification of ascites

(M. Protein Marker; 1. Pre-purified ascites; 2. Post-purified ascites)

2.4.7 腹水纯化前后效价测定

如表 2.5 所示，使用间接 ELISA 方法测定纯化前后腹水效价，结果显示纯化前后的腹水效价均达到 1×10^5 以上。

表 2.5 腹水纯化前后效价测定结果

Table 2.4 Results of potency determination before and after purification of ascites

	腹水稀释倍数									
	1: 1000	1: 2000	1: 4000	1: 8000	1: 16000	1: 32000	1: 64000	1: 128000	1: 256000	1: 512000
纯化前	2.1783	2.0778	2.0783	1.7647	1.2889	0.9395	0.6694	0.5813	0.368	0.2002
纯化后	2.9958	2.8495	2.5716	2.1844	1.8248	1.3112	0.8244	0.5356	0.3629	0.1924

2.5 讨论

布鲁氏菌病是世界上分布最广泛的人畜共患病之一^[72]，不同种布鲁氏菌的宿主嗜性和致病性都各有不同^[73]。LPS 是布鲁氏菌结构的重要组成部分，LPS 由类脂 A、核心多糖以及 O-链多糖组成，根据布鲁氏菌外膜 LPS 是否含有 O-链多糖，将布鲁氏菌分为了光滑型和粗糙型两种，光滑型布鲁氏菌与粗糙型布鲁氏菌在菌落形态、细胞形态、免疫生化反应、毒力等方面均存在一定差异。

常见的羊种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌及猪种布鲁氏菌等均为光滑型布鲁氏菌，它们对动物致病力强，严重影响畜牧业发展和公共卫生安全，对其研究颇为广泛。而粗糙型布鲁氏菌，例如犬种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌，由于它们相较光滑型布鲁氏菌致病力弱，对人类致病力低，所以粗糙型布鲁氏菌的危害常被人们所忽视。目前，犬种布鲁氏菌在国内某些地区呈地方性流行，加上近年来饲养宠物犬的数量不断增多，犬跨地区的交易日渐频繁，犬种布鲁氏菌感染引起的公共卫生安全的问题也不容小觑^[74]。

竞争 ELISA 方法相较常用的凝集类试验方法具有更好的敏感性，更适合布鲁氏菌病的初筛。竞争 ELISA 方法的敏感性更高，主要因为利用了特异性的单克隆抗体与血清中的抗体进行竞争。因此获得一株特异性与竞争性好的单抗尤为重要。单克隆抗体的制备过程中，小鼠脾细胞与 Sp2/0 细胞的融合是最至关重要的一步。融合的成功与否取决于多个因素，例如 Sp2/0 细胞的状态、PEG2000 的滴加速度、PEG2000 的温度、小鼠血清效价等等。通过总结几次融合失败时的问题，发现 Sp2/0 细胞的状态是能否融合成功的关键。融合前，应选择处于对数生长期、大小均一，圆润透亮，未传过多代次的 Sp2/0 细胞。Sp2/0 细胞的数量与脾细胞的数量应按照 5:1 的比例进行添加，若 Sp2/0 细胞过少，可能会导致融合效率低；若 Sp2/0 细胞数量过多，可能会导致培养基中的 HAT 不能及时杀灭掉多余的 Sp2/0 细胞，导致细胞培养基中营养物质消耗过快，从而影响杂交瘤细胞的生长。

细胞融合后，待杂交瘤细胞团长至孔底 1/6 时，可对杂交瘤细胞的上清进行效价检测。在几次融合中，常遇到融合细胞板中的每一个孔，包括确定无杂交瘤细胞生长的孔的上清均呈阳性，OD_{450nm} 值均在 2.5 以上，阴阳性无法区分。这时需要进行两次全换液，并在第二次全换液后两天再次检测细胞上清效价。若细胞生长速度过快，可能需将细胞转至 48 孔板中，待杂交瘤生长至适当数目时，再次检测细胞上清效价，以确定阳性克隆。这种情况出现的原因可能是融合细胞孔中存在没有融合上的脾细胞中分泌抗体的细胞在被 HAT 杀灭之前，仍然分泌了一定量的抗体存

在于细胞上清中，导致出现假阳性。还有可能是阳性孔中有阴性克隆，而阴性克隆的生长速度远远快于阳性克隆，会压制阳性克隆的生长，导致阳性克隆丢失，但其丢失前仍分泌过一些抗体存在于细胞上清之中。

2.6 小结

使用犬种布鲁氏菌 RM6/66 成功制备并筛选出 4 株单克隆抗体 1B2、1C5、1D2、2E6，抗体亚型均为 IgG2b 亚型。其中经过鉴定 1C5 仅与犬种布鲁氏菌发生反应，与牛种、羊种布鲁氏菌流行株、A19 株、S2 株均不发生反应。对单克隆抗体 1C5 进行了腹水制备，并对腹水进行了纯化鉴定。

第三章 抗原表位的鉴定

3.1 引言

单克隆抗体的出现与发展,不仅促进了免疫学、生物学等学科的发展,这一技术也广泛应用于生物医药领域,成为临床诊断和药物治疗的重要组成部分。单克隆抗体与抗原表位结构互补与亲和力决定了抗原和抗体的特异性结合^[75],确定单克隆抗体在抗原上识别的相应表位,也是单克隆抗体筛选中重要的一步。

本章研究首先使用了噬菌体展示技术进行筛选。常用的截短表达、生物酶切法鉴定抗原表位,都需先知道确切的蛋白序列,再合成所需的短肽进行筛选,因此对蛋白序列过于庞大的筛选较为困难。而噬菌体展示技术可通过抗原与抗体的特异性结合,直接从随机肽库中筛选出与抗体反应的抗原表位,并通过噬菌体基因组进行测序,直接获得抗原表位的基因序列。与此同时,利用双向电泳及质谱进行抗原蛋白的筛选。双向电泳技术是将等电聚焦技术和 SDS-PAGE 相结合的电泳技术,该方法可将蛋白依据等电点和相对分子量分离成一个二维分布的蛋白质图。由于全菌中包含的蛋白序列过于庞大,使用双向电泳可将蛋白进行初步分离,并通过单克隆抗体同蛋白质图谱进行 Western-blot 以获得同单克隆抗体反应的蛋白点,再对获得的蛋白点进行质谱分析,以得到相应的蛋白信息。

3.2 材料

3.2.1 主要试剂配制

LB 培养基: 10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 5 g NaCl, 加蒸馏水定容至 1 L, 高压灭菌。

IPTG-Xgal 混合液: 1.25 g IPTG, 1 g Xgal 溶于 25 mL 二甲基甲酰胺。

LB/IPTG-Xgal 平板: 5 g Tryptone, 2.5 g Yeast extract, 2.5 g NaCl, 7.5 g 琼脂粉, 加蒸馏水定容至 500 mL, 高压灭菌, 待降温至 70 °C 时, 加入 1 mL IPTG-Xgal 混合液, 倾倒入平板, 将平板置于 4 °C 避光保存。

顶层琼脂: 5 g Tryptone, 2.5 g Yeast extract, 2.5 g NaCl, 0.5 g MgCl₂·6H₂O, 3.5 g 琼脂粉, 加蒸馏水定容至 500 mL, 高压灭菌, 分成 12 mL 等份。

LB-Tet 平板: 5 g Tryptone, 2.5 g Yeast extract, 2.5 g NaCl, 7.5 g 琼脂粉, 加蒸馏水定容至 500 mL, 高压灭菌, 待降温至 70 °C 时, 加入 0.5 mL 20 mg/mL 的四环素贮液, 倾倒入平板, 将平板置于 4 °C 避光保存。

包被液: 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 加蒸馏水定容至 1000 ml, 调节 pH 为 9.6。

封闭液: 0.84 g NaHCO₃, 0.5 g BSA, 加蒸馏水定容至 100 mL, 过滤除菌, 置于 4 °C 储存。

TBS: 4.388 g NaCl, 25 mL 1M Tris-HCl, 定容至 500 mL, 高压灭菌。

PEG/NaCl: 40 g PEG-8000, 29.2 g NaCl, 定容至 200 mL, 高压灭菌。

碘化物缓冲液: 0.0029 g EDTA, 7.4368 g NaI·2H₂O, 100 μL 1M Tris-HCl, 定容至 10 mL, 避光保存。

3.2.2 主要试剂

噬菌体随机十二肽库, NEB, 美国; HRP 标记的鼠抗 M13 抗体, 义翘神州, 中国; TE buffer, 索莱宝, 中国; His 标签蛋白纯化试剂盒 (耐还原螯合型), 碧云天, 中国。

3.3 方法

3.3.1 噬菌体随机十二肽库筛选单抗模拟表位

3.3.1.1 ER2738 菌株的准备

将试剂盒提供的 ER2738 甘油菌划线接种含四环素抗性的 LB 平板, 将平板置于 37 °C 中倒置过夜。将培养板用封口膜密封, 置于 4 °C 避光保存。

3.3.1.2 噬菌体滴度测定

(1) 在 10 mL LB 培养基中接种 ER2738 单菌落, 在 37 °C 摇床中震荡培养至 OD₆₀₀ 值在 0.5 左右。

(2) 使用水浴锅 80 °C 融化顶层琼脂, 分装 3 mL 至灭菌试管中, 每个噬菌体稀释度一管, 将其置于 45 °C 水浴锅中保温备用。在 37 °C 温箱中预热 LB-IPTG/Xgal 平板, 每个噬菌体稀释度取一个板备用。

(3) 在每只离心管中装入 90 μL LB 培养基, 在第一个离心管中加入 10 μL 噬菌体悬液, 使用涡旋振荡器混匀, 制成 10¹ 稀释度噬菌体。从第一个离心管中取出 10 μL 10¹ 稀释度噬菌体加入第二个离心管中, 用涡旋振荡器混匀, 制成 10² 稀释度噬菌体。以此类推将噬菌体 10 倍倍比稀释。一般未扩增的噬菌体洗脱物稀释至 10⁴, 扩增后的噬菌体培养物上清稀释至 10¹⁰。

(4) 将培养至对数中期的 ER2738 菌液分成 200 μL 等份于离心管中, 每个噬菌体稀释度一管。

(5) 每管菌液中加入 10 μL 不同稀释度的噬菌体, 使用涡旋振荡器快速混匀, 室温温育 5 min。

(6) 将上述温育后的噬菌体菌液混合物加入顶层琼脂中, 每个稀释度一管, 将其与顶层琼脂快速混匀, 立即倒入 LB-IPTG/Xgal 平板上, 适当倾斜平板, 将琼脂均匀铺开。

(7) 将平板置于安全柜中冷却, 确认凝固后, 将其放入 37 °C 培养箱中倒置培养过夜。

(8) 检查平板, 选取其中有 10~100 个噬菌斑的平板进行计数, 使用此数目乘以稀释倍数得到每 10 μL 噬菌体的空斑形成单位 (pfu) 滴度。

3.3.1.3 第一轮淘选

(1) 将纯化后的单抗 1C5 用包被液稀释至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 取 150 μL 加入 96 孔酶标板的一个孔中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

(2) 挑取 ER2738 单菌落于含有四环素抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养过夜。

(3) 将过夜培养的 ER2738 培养物 1: 100 稀释置于 22 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇至对数前期。

(4) 弃净 96 孔板中的包被液, 倒置在纸巾上拍净液体, 在孔中加满封阻液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。

(5) 弃净封阻液, 用含有 0.1% Tween 的 TBST 缓冲液洗板 6 次, 每次均需拍净孔中液体。

(6) 用 100 μL 含有 0.1% Tween 的 TBST 缓冲液稀释 10 μL 的原始文库, 将其加至已包被好的孔中, 在摇床上室温温和摇动 60 min。

(7) 弃去未结合的噬菌体, 倒置在纸巾上拍净液体, 用含有 0.1% Tween 的 TBST 缓冲液洗板 10 次, 每次均需拍净孔中液体。

(8) 用 100 μL TBS 溶液将纯化后的单抗 1C5 稀释至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入孔中, 在摇床上室温温和摇动 60 min。将洗脱液加入灭菌离心管中。

(9) 按 3.3.1.2 的方法测定洗脱液的滴度。

(10) 将剩余洗脱物加入 20 mL 处于对数前期的 ER2738 菌液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 4.5 h。

(11) 将培养物转入 50 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 10 min。将上清液转入另一离心管中, 再次 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 10 min。

(12) 将上清上部的 80% 转入另一离心管中, 加入 1/6 体积的 PEG/NaCl。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置沉淀过夜。

(13) 将上述沉淀物 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 15 min。弃净上清液。

(14) 使用 1 mL TBS 重悬沉淀物, 将其转入新的 1.5 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 5 min。

(15) 将上清转入另一 1.5 mL 离心管中, 加入 1/6 体积的 PEG/NaCl, 冰上静置 60 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 10 min, 弃净上清。

(16) 使用 200 μL TBS 将沉淀重悬, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 1 min, 使残余的不溶物沉淀。将上清转入新的 1.5 mL 离心管中, 即为扩增后的洗脱物。

(17) 按 3.3.1.2 的方法测定扩增后洗脱液的滴度。

3.3.1.4 第二、三、四轮淘选

按 3.3.1.3 的操作步骤进行第二、三、四轮淘选, 加入噬菌体的量均为 1×10^{11} pfu。第二、三、四轮抗体包被浓度分别为 80、60、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 第二轮淘选洗涤液为含有 0.3% Tween 的 TBST 缓冲液, 第三、四轮淘选洗涤液为含有 0.5% Tween 的 TBST 缓冲液。第三、四轮的洗脱时间为 30 min。

3.3.1.5 间接 ELISA 鉴定噬菌体克隆

(1) 挑取 ER2738 单菌落于含有四环素抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养过夜。

(2) 将过夜培养菌液按 1: 100 稀释加入 LB 培养基中, 每个要鉴定的克隆需加入 2 mL 培养基于灭菌试管中。

(3) 在第四轮淘选后, 选取一少于 100 个噬菌体克隆的平板。使用灭菌吸头挑取蓝色噬菌斑至上述含有 2 mL 培养基的试管中。共挑取 30 个噬菌斑。

(4) 置于 37 °C 震荡培养 4.5 h。

(5) 将培养物转入离心管中, 10000 r/min 离心 30 s。将上清转入新离心管中, 即为噬菌体储液。

(6) 将纯化后的 1C5 单抗用 ELISA 包被液稀释至 100 µg/mL 包被 ELISA 板, 4 °C 过夜。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次。加入 100 µL 10% 脱脂牛奶于 37 °C 封闭 2 h。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次。

(7) 每孔加入 100 µL 噬菌体储液, 37 °C 孵育 30 min, 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次。

(8) 每孔加入 100 µL 使用 PBS 稀释至工作浓度的鼠抗 M13 噬菌体, 37 °C 孵育 30 min, 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次。

(9) 加入 100 µL TMB 显色液显色 15 min, 加入 50 µL 终止液终止。测定 OD_{450nm} 值。

3.3.1.6 测序

(1) 选取 3.3.1.5 中的阳性噬菌体克隆, 将其 500 µL 噬菌体储液转入一新鲜离心管中。

(2) 加入 200 µL PEG/NaCl, 颠倒混匀, 置于室温静置 10 min。25 °C 10000 r/min 离心 10 min, 弃净上清液。

(3) 使用 100 µL 碘化物缓冲液重悬沉淀物, 加入 250 µL 乙醇溶液。置于室温静置 10 min。4 °C 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清。

(4) 使用 70% 乙醇重悬沉淀物, 4 °C 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清。开盖静置 10 min, 使多余乙醇挥发。

(5) 使用 30 µL TE Buffer 重悬沉淀, 即获得噬菌体的 DNA 模板。

(6) 将 DNA 模板送生工测序。

3.3.1.7 竞争 ELISA 分析

(1) 将单克隆抗体 1C5 用包被液稀释至 10 µg/mL。96 孔酶标板中每孔加入 100 µL, 4 °C 包被过夜。

(2) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次, 拍净板内液体。

(3) 将 10% 的脱脂奶粉 100 µL/孔加入至酶标板中, 37 °C 封闭 2 h。

(4) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次, 拍净板内液体。

(5) 将 8 株阳性噬菌体克隆进行扩增并计数, 将 8 株噬菌体均稀释至 10⁹ pfu/mL。再将其按照 1:100、1:400、1:1600、1:6400、1:25600、1:102400 的比例稀释, 每孔加入 50 µL。

(6) 每孔加入 50 µL 犬种布鲁氏菌 RM6\66 株灭活全菌抗原或 50 µL PBS 对照振荡混匀。置于 37 °C 温箱中孵育 30 min。

(7) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次, 拍净板内液体。

(8) 每孔加入 100 µL 使用 PBS 稀释至工作浓度的鼠抗 M13 噬菌体, 37 °C 孵育 30 min。

(9) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次, 拍净板内液体。

(10) 加入 100 μL TMB 显色液, 避光显色 15 min。加入 50 μL 终止液终止。使用酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 读数, 记录结果。

3.3.1.8 十二肽合成及验证

分析测序结果, 将其翻译成相应的 12 肽序列, 将其委托生工进行与 BSA 偶联的多肽合成。将合成的多肽与单克隆抗体 1C5 和阳性标准血清进行间接 ELISA, 验证其反应性。

(1) 将合成的多肽用 ELISA 包被液分别稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被 ELISA 板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次。加入 100 μL 10% 脱脂牛奶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次。

(2) 每孔加入 100 μL 1: 1000 稀释的纯化后单抗 1C5 或 1: 50 稀释的阳性血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次。

(3) 每孔加入 1: 10000 稀释的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次。

(4) 加入 100 μL TMB 显色液显色 15 min, 加入 50 μL 终止液终止。测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

3.3.2 双向电泳及质谱鉴定

将制备的 RM6/66 蛋白样品及 1C5 单抗送至北京百泰派克生物科技有限公司进行双向电泳及质谱鉴定。具体步骤如下:

3.3.2.1 等电聚焦

(1) 取 1 mg RM6/66 蛋白样品, 使用 2D Clean up kit 处理, 将干燥后的蛋白用 340 μL IEF sample loading solution 溶解。

(2) 将试管以 12000 \times g 离心 10 min, 以去除不溶杂质并避免气泡产生。

(3) 将样品上样至 IPG 胶条槽内。从冰箱取出干胶条复温。吸取样品上清液加到聚焦盘的槽中, 从槽顶端开始, 沿边缘加入, 使样液加成一条细线, 均匀分布在聚焦盘中。撕去胶条保护膜, 将胶面朝下从一端慢慢覆盖在样液上, 避免产生气泡, 若有气泡产生, 可用镊子掀起胶条一角缓慢放下, 以排尽气泡。接着往胶条上加入 1.2 mL 矿物油覆盖在胶条上方, 隔绝胶条与空气。最后将盖子轻轻压在胶条上。

(4) 等电聚焦程序为: S1: 30 V 6 h 水化; S2: 60 V 6 h 除盐; S3: 100 V 1 h 除盐; S4: 500 V 1 h 升压; S5: 1000 V 1 h 升压; S6: 5000 V 2 h 升压; S7: 8000 V 2 h 升压; S8: 8000 V 64000 vhr 聚焦; S9: 500 V 10 h。

3.3.2.2 SDS-PAGE

(1) 将聚焦好的胶条用镊子拿出, 用纯水小心冲去矿物油后分别用平衡液 I 和 II 各平衡 15 min, 结束后用水轻轻冲去平衡液。

(2) 配制 12.5% 的丙烯酰胺凝胶一块, 室温凝固 40 min 后, 将 Marker 放在滤纸上, 并将滤纸放入大胶中, 胶条裁取合适长度后放入大胶, 小心倒入琼脂糖封胶液以避免产生气泡。

- (3) 将电压设定为 70 V，运行 40 min。然后将电压设定在 200 V，运行至结束。
- (4) 将转膜后的胶取出，考马斯亮蓝染色过夜，用水脱色 30 min，拍照。

3.3.2.3 Western Blot

- (1) 使用半干转膜法对电泳后的胶进行转膜。
- (2) 完成转膜电泳后，小心取出 PVDF 膜，放置在清洗容器中，用 PBST 清洗膜表面两次，每次 5 分钟。
- (3) 配制 5% 的脱脂奶粉，放置在水平摇床上摇匀封闭 2 h。
- (4) 完成封闭后，弃去脱脂奶粉，用含有 0.05% Tween 的 PBST 清洗 3 次 PVDF 膜，每次 10 min。
- (5) 用 5% 脱脂奶粉 1: 1000 稀释单抗 1C5，4°C 孵育过夜。
- (6) 用含有 0.05% Tween 的 PBST 清洗 3 次 PVDF 膜，每次 10 min。
- (7) 用 5% 脱脂奶粉 1: 8000 稀释山羊抗鼠酶标二抗，放置在水平摇床上慢摇常温孵育 1 h。
- (8) 用 PBST 清洗 3 次，每次 10 min。
- (9) 用 PBS 清洗 1 次。
- (10) 将显色液 A、B 等体积均匀混合。滴加至 PVDF 膜上，显色，拍照。
- (11) 对应 WB 显色图和凝胶显色图，在胶上切取胶点。

3.3.2.4 质谱

对切取的胶点进行洗涤、脱色、脱水、干燥以及酶切，将处理好的胶粒用质谱仪进行 LC-MS/MS 分析。液相色谱条件为：分析柱为 150 μm i.d. \times 150 mm，packed with Acclaim PepMap RPLC C18, 3 μm , 100 \AA ；流动相 A 为 0.1% 甲酸；流动相 B 为 0.1% 甲酸，80% ACN；流速为 600 nL/min；每个组分分析时间为 66 min。一级质谱参数为 Resolution: 70000; AGCtarget: 3e6; MaximumIT: 100 ms; Scanrange: 300 to 1800 m/z。二级质谱参数为 Resolution: 17500; AGCtarget: 1e5; MaximumIT: 50 ms; TopN: 20; NCE/steppedNCE: 28。将质谱原始文件使用 MaxQuant (2.1.4.0) 分别检索目标蛋白数据库。

3.3.3 蛋白的原核表达及鉴定

3.3.3.1 原核表达质粒的构建

根据 GenBank 上犬种布鲁氏菌 *Omp31* 基因序列 (AF366073.1)，在序列两端加入 *EcoRI* 和 *XhoI* 的酶切位点，将该基因交由北京六合华大公司进行基因合成。将其构建至 pColdII 表达载体上。

3.3.3.2 质粒的克隆

将质粒使用常规化学转化方法转化进 BL21 感受态细胞，挑取单菌落送测序，使用 SnapGene 软件比对测序结果，保存测序正确的阳性克隆。

3.3.4.3 蛋白的原核表达

将测序正确的阳性克隆 1:100 接种与含有氨苄霉素的 LB 液体培养基中, 15 °C 150 r/min 震荡培养至对数期。在其中加入 IPTG, 使其终浓度为 1.0 mmol/L。在 15 °C 摇床上继续震荡培养 18 h。将培养基倒入 50 mL 离心管中 4 °C 5000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀。将沉淀使用灭菌的生理盐水重悬。将菌液以 200 W 功率, 超声 2 s 停 2 s, 超声 45 min。将超声后的溶液 4 °C 12000 r/min 离心 30 min。将上清和沉淀分别收集, 保存于 -80 °C。

3.3.4.4 蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

按与 2.3.8.2 相同的方法将原核表达出的蛋白进行 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定。在 Western blot 中分别使用单抗 1C5 和抗 His 标签的抗体作为一抗, 以鉴定单抗与蛋白的反应性。

3.3.4.5 蛋白的纯化

按 His 标签蛋白纯化试剂盒进行操作, 具体步骤为: 取 1 mL 混合均匀的 50% BeyoGold™ His-tag Purification Resin, 1000 g 4 °C 离心 10 s, 弃去液体, 再向凝胶中加入 0.5 mL 非变性裂解液, 混合均匀以平衡凝胶, 1000 g 4 °C 离心 10 s, 弃去液体, 再重复平衡 1~2 次。将 4 ml 3.3.4.3 中收集的上清加入凝胶, 将凝胶置于冰盒中, 在水平摇床上缓慢摇动 60 min。将裂解液和 BeyoGold™ His-tag Purification Resin 的混合物装入试剂盒提供的亲和层析柱空柱管中。将纯化柱底部的盖子打开, 在重力作用下使柱内液体流出, 收集约 20 μ L 流穿液。使用非变性洗涤液洗柱 5 次, 每次加入 1 mL 非变性洗涤液, 并在每次均收集约 20 μ L 流下的洗涤液。再用 0.5 mL 非变性洗脱液洗脱目的蛋白 8 次, 将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中, 收集获得的洗脱液即为纯化的 His 标签蛋白样品。取流穿液、洗涤液及每次的洗脱液进行 SDS-PAGE 鉴定。

3.4 结果

3.4.1 噬菌体随机肽库淘选产率

每一轮淘选中加入噬菌体的量为投入量, 洗脱下的噬菌体数量为产出量, 富集率=噬菌体产出量/噬菌体投入量 \times 100%。由表 3.1 可知, 噬菌体的富集率随着淘选轮次的增加而逐渐升高, 说明与单克隆抗体 1C5 特异性结合的噬菌体得到了富集。

表 3.1 噬菌体随机肽库淘选富集率

Table 3.1 Enrichment rate of phage random peptide library panning

轮次	噬菌体投入量 (pfu)	噬菌体产出量 (pfu)	富集率
1	2×10^{11}	1.2×10^3	6.0×10^{-9}
2	2×10^{11}	2.3×10^3	1.15×10^{-8}
3	2×10^{11}	6.9×10^5	3.45×10^{-6}
4	2×10^{11}	3.0×10^6	1.5×10^{-4}

3.4.2 间接 ELISA 方法筛选噬菌体阳性克隆

从第四轮淘选测定洗脱噬菌体滴度的平板上随机挑选 30 个克隆进行扩增，用其噬菌体储液进行间接 ELISA 反应。如图 3.1 所示，间接 ELISA 共显示有 28 个阳性噬菌体克隆，其中有 17 个噬菌体克隆与单克隆抗体 1C5 有强阳性反应 ($OD_{450nm} > 1.5$)。

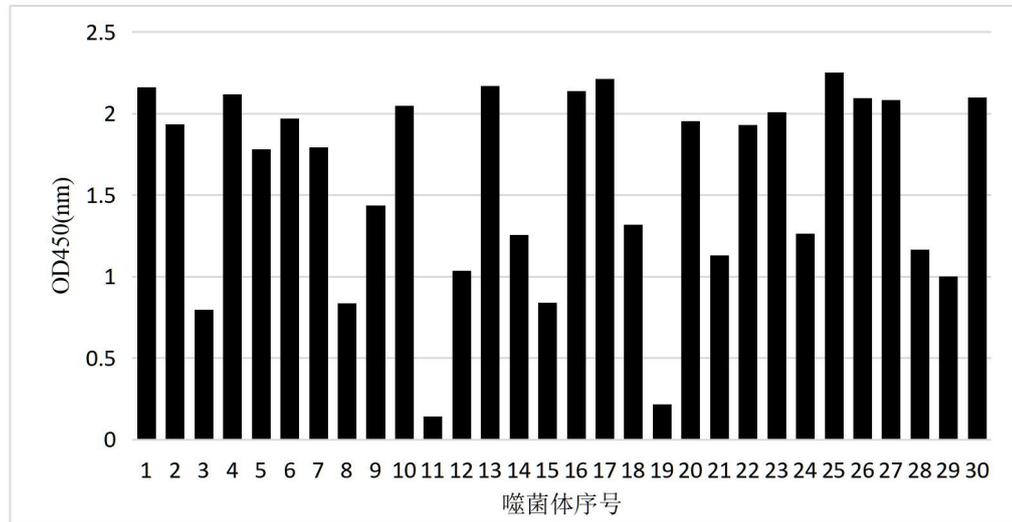


图 3.1 间接 ELISA 方法检测噬菌体阳性克隆结果

Figure 3.1 Results of phage-positive clones detected by indirect ELISA method

3.4.3 阳性噬菌体克隆的测序及结果比对

将 28 个阳性噬菌体克隆送至生工生物公司进行测序。将测序结果按照噬菌体随机肽库的遗传密码子表翻译为氨基酸序列，如表 3.2 结果显示，共得到 8 种不同的多肽序列。将 8 个序列分别通过 DNASTAR 与 6/66 的氨基酸序列进行比对，未发现有 4 个或 4 个以上氨基酸与 6/66 的氨基酸序列相同。推测单克隆抗体 1C5 针对的抗原表位可能是构象依赖性表位。综合 8 个序列，其共有的序列为 R-D-FGE，推测该序列可能模拟一不连续的结合位点。

表 3.2 阳性噬菌体克隆的测序及结果比对结果

Table 3.2 Sequencing of positive phage clones and comparison of results

阳性噬菌体克隆	氨基酸序列
1、4、5、7、13、17、22、23、25、30	G S T T T R W L D F G E
2、6、9、10、16、20、27、28	A P L Y D R A D A F G E
14、15、21	F Y L P R E D E P D F G
18、29	G V L K L F D E P D F G
21、24	T L R D Q M L D M F G E
12	G F Y N T R C L D F G E
8	Q D H Y G R N Q M F G E
3	E T T C S M F G C S R N

3.4.4 竞争 ELISA 检测结果

以 RM6/66 的单克隆抗体 1C5 作为包被，加入 8 株被命名为 A 至 H 的展现不同表位的噬菌体，以 RM6/66 全菌抗原作为噬菌体模拟表位的竞争剂，PBS 作为空白对照。结果如图 3.2 所示，在噬菌体稀释至 1.5×10^5 PFU 时，8 株展现不同表位的噬菌体与单克隆抗体 1C5 之间的结合，可被 RM6/66 全菌抗原所抑制，且随噬菌体浓度的降低，抑制率逐渐升高。说明所筛选出的表位均可与单克隆抗体特异性结合并具有竞争活性。选取表位 GSTTTRWLDFGE、APLYDRADAFGE 进行与 BSA 偶联的十二肽的合成。

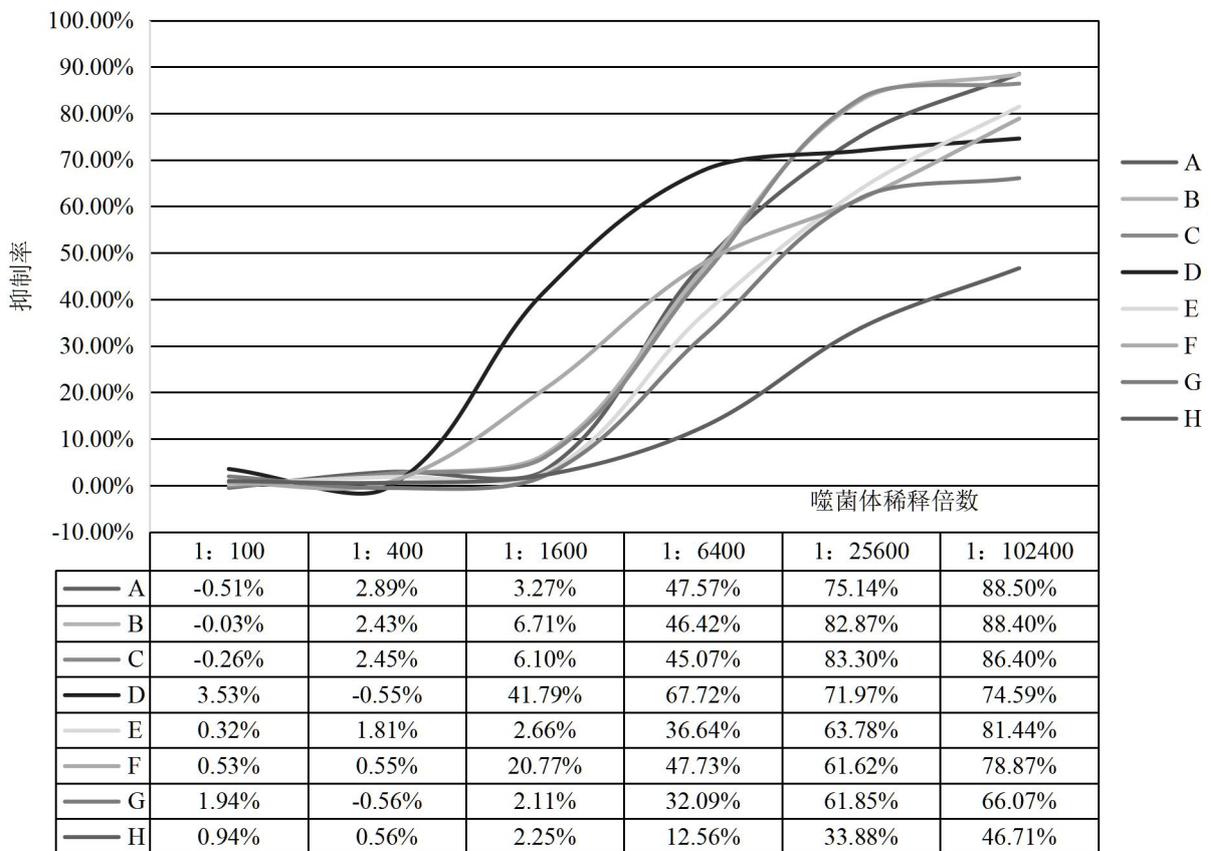


图 3.2 噬菌体阳性克隆与全菌抗原进行竞争 ELISA 试验结果

Figure 3.2 Results of ELISA test for competition between phage-positive clones and whole bacteria antigens

3.4.5 多肽验证

将两条合成多肽 BSA-GSTTTRWLDFGE、BSA-APLYDRADAFGE 以不同浓度包被 ELISA 板，分别与 RM6/66 阳性血清、空白血清和单克隆抗体 1C5 进行间接 ELISA 反应，结果如表 3.3 所示，阳性血清及单克隆抗体 1C5 均可与两条多肽进行特异性结合。

表 3.3 阳性血清及单克隆抗体 1C5 与多肽特异性结合验证结果

Table 3.3 Positive serum and monoclonal antibody 1C5 with peptide specific binding verification results

蛋白包被 浓度	BSA-GSTTTRWLDFGE			BSA-APLYDRADAFGE		
	1: 50 阳性血清	1: 50 空白血清	1: 1000 单抗 1C5	1: 50 阳性血清	1: 50 空白血清	1: 1000 单抗 1C5
1 ug/mL	0.8732	0.1257	1.8631	0.9932	0.1034	2.0876
2 ug/mL	1.2059	0.1439	2.1375	1.2464	0.1456	2.8529
5 ug/mL	2.8521	0.2177	3.0594	2.581	0.2154	3.3385
10 ug/mL	3.1923	0.2521	3.2103	2.8892	0.2537	3.2941

3.4.6 双向电泳及 Western blot 试验结果

图 3.3 为将犬种布鲁氏菌 RM6/66 全菌蛋白进行双向电泳分离后，使用考马斯亮蓝染色后的结果。图 3.4 为将全菌蛋白进行双向电泳分离转膜后，以纯化后的单克隆抗体 1C5 为一抗，HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗，进行 Western blot 的结果图。结果显示蛋白在多个大小及 pH 区间都有分布。将两张图进行叠合，如图 3.5 所示，并结合 2.4.4 中的 Western blot 结果，选取在 25 kDa 附近，pH 在 3~5 区间，阳性反应最强的 5 个蛋白点作为疑似反应蛋白点。

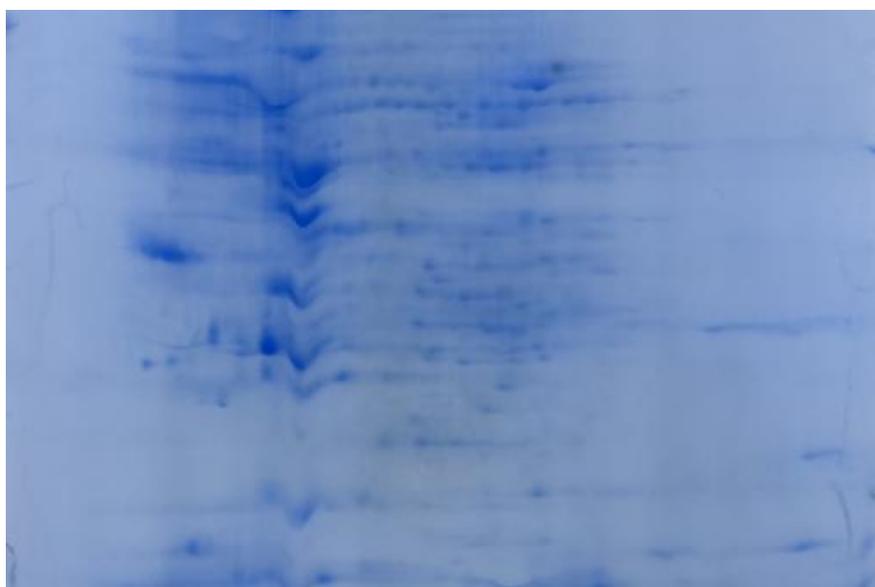


图 3.3 犬种布鲁氏菌 RM6/66 蛋白双向电泳考马斯亮蓝染色结果

Figure 3.3 Results of bi-directional electrophoresis of the whole bacteriophage protein of *Brucella canis* RM6/66 by Komasa Brilliant Blue staining

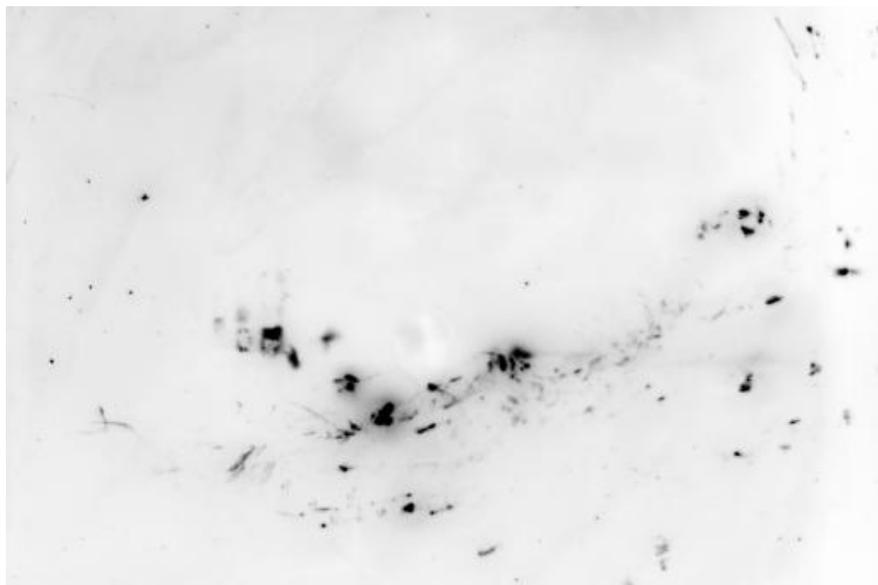


图 3.4 犬种布鲁氏菌 RM6/66 蛋白 2D-Western blot 结果
Figure 3.4 2D-Western blot results of *Brucella canis* RM6/66 protein

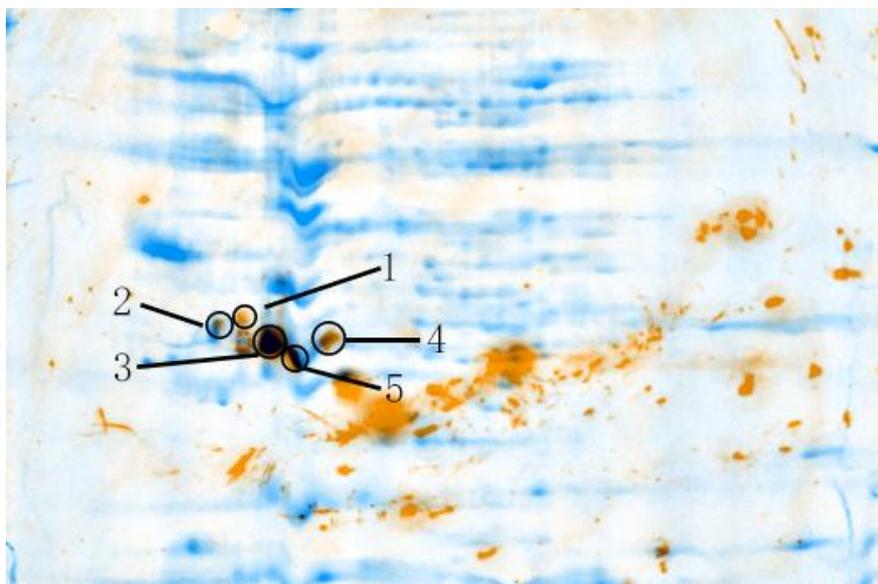


图 3.5 犬种布鲁氏菌 RM6/66 蛋白双向电泳分析
Figure 3.5 Bi-directional electrophoresis analysis of *Brucella canis* RM6/66 protein

3.4.7 抗原蛋白质谱结果

从双向凝胶电泳的结果中选取了 5 个蛋白点进行质谱分析，将蛋白点分别命名为 1、2、3、4、5，各蛋白肽指纹图谱如图 3.6 所示。对 5 个蛋白点的质谱结果进行分析总结，将每个蛋白点质谱

结果中得分最高几个预测蛋白汇集在表 3.4。在 UniPort 蛋白质数据库中搜索所获预测蛋白，选取了其中在三个蛋白点质谱结果重复出现，大小在 25 kDa 左右且在犬种布鲁氏菌与其他布鲁氏菌中有差异的蛋白 OMP31 进行表达。

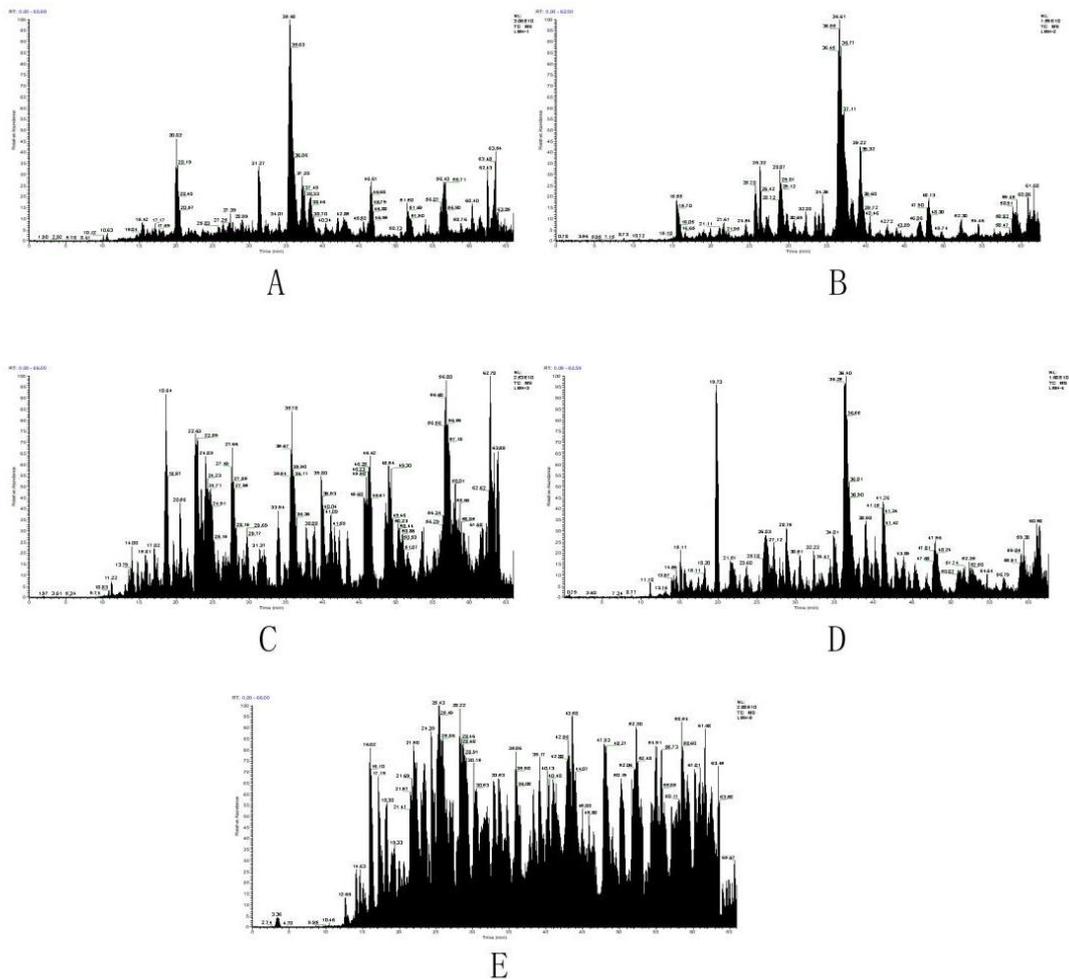


表 3.4 五个蛋白点质谱结果预测蛋白汇总

Table 3.4 Summary of predicted proteins from five protein spot mass spectrometry results

Majority protein IDs	Fasta headers	Number of proteins	Unique peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Sequence length	Score	Intensity
A9M843	sp A9M843 TAL_BRUC2 Probable transaldolase OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=tal PE=3 SV=1	1	22	79.7	23.359	217	323.31	9925200000
Q075Q3; A9M5Q2	tr Q075Q3 Q075Q3_BRUCA Elongation factor Tu OS= Brucella canis OX=36855 GN=tuf-2 PE=3 SV=1; sp A9M5Q2 EFTU_BRUC2 Elongation factor Tu OS=Br ucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX= 483179 GN=tuf2 PE=3 SV=1	2	4	10.5	42.604	391	283.32	753580000
A9M866	tr A9M866 A9M866_BRUC2 Carbonic anhydrase OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_A1866 PE=3 SV=1	1	8	42.3	23.315	213	178.36	8512900000
A0A7T8G420	tr A0A7T8G420 A0A7T8G420_BRUCA 25 kDa outer-membrane immunogenic protein (Fragment) OS=Brucella canis OX=36855 GN=omp25 PE=4 SV=1	1	6	24.4	21.314	197	113.83	439120000
A9MB71; Q93E87	tr A9MB71 A9MB71_BRUC2 Porin OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN= BCAN_B0426 PE=4 SV=1; tr Q93E87 Q93E87_BRUCA Outer membrane protein Omp31 OS=Brucella canis O X=36855 GN=omp31 PE=4 SV=1	2	12	39.6	25.333	240	259.5	3143200000

续表

Majority protein IDs	Fasta headers	Number of proteins	Unique peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Sequence length	Score	Intensity
A9M5Q0	sp A9M5Q0 RL3_BRUC2 50S ribosomal protein L3 OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=rpL3 PE=3 SV=1	1	9	37.6	25.077	237	162.96	4464600000
A9MA57	tr A9MA57 A9MA57_BRUC2 Chaperone surA OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=surA PE=4 SV=1	1	12	37.7	35.22	318	154.17	352870000
A9M973	tr A9M973 A9M973_BRUC2 ATP synthase subunits region ORF 4 OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_A2031 PE=4 SV=1	1	12	44.8	28.885	259	129.76	760560000
A9M5S5	tr A9M5S5 A9M5S5_BRUC2 Serine acetyltransferase OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=cysE PE=3 SV=1	1	13	51.8	29.826	274	125.31	685530000
A9MB71; Q93E87	tr A9MB71 A9MB71_BRUC2 Porin OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_B0426 PE=4 SV=1; tr Q93E87 Q93E87_BRUCA Outer membrane protein Omp31 OS=Brucella canis OX=36855 GN=omp31 PE=4 SV=1	2	16	41.2	25.333	240	323.31	16150000000
A9M736	tr A9M736 A9M736_BRUC2 Sorbitol dehydrogenase OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=polS PE=4 SV=1	1	18	75.1	26.444	257	297.89	14343000000

续表

Majority protein IDs	Fasta headers	Number of proteins	Unique peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Sequence length	Score	Intensity
蛋白点 3	tr A9M6E2 A9M6E2_BRUC2 26 kDa periplasmic immunogenic protein OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_A1512 PE=4 SV=1	1	22	58.4	26.552	250	288.58	108860000000
	sp A9M5P4 RS3_BRUC2 30S ribosomal protein S3 OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=rpsC PE=3 SV=1	1	23	70.8	26.629	236	242.7	29326000000
	tr Q075Q3 Q075Q3_BRUCA Elongation factor Tu OS=Brucella canis OX=36855 GN=tuf-2 PE=3 SV=1; sp A9M5Q2 EFTU_BRUC2 Elongation factor Tu OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=tuf2 PE=3 SV=1	2	23	50.9	42.604	391	233.77	24330000000
蛋白点 4	tr A9M6E2 A9M6E2_BRUC2 26 kDa periplasmic immunogenic protein OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_A1512 PE=4 SV=1	1	17	45.6	26.552	250	323.31	78463000000
	tr A9M736 A9M736_BRUC2 Sorbitol dehydrogenase OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=polS PE=4 SV=1	1	16	58	26.444	257	323.31	49154000000
	tr A9M8Y7 A9M8Y7_BRUC2 Guanylate kinase OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=gmk PE=3 SV=1	1	10	37.7	25.222	220	323.31	16845000000

续表

Majority protein IDs	Fasta headers	Number of proteins	Unique peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Sequence length	Score	Intensity
蛋白点 4	tr A9MB25 A9MB25_BRUC2 Ribose-5-phosphate isomerase A OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=rpiA PE=3 SV=1	1	11	55.2	24.264	232	200.82	4742800000
	tr A9MB71 A9MB71_BRUC2 Porin OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_B0426 PE=4 SV=1;tr Q93E87 Q93E87_BRUCA Outer membrane protein Omp31 OS=Brucella canis OX=36855 GN=omp31 PE=4 SV=1	2	12	38.8	25.333	240	196.57	30301000000
A9M837	sp A9M837 ATPB_BRUC2 ATP synthase subunit beta OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=atpD PE=3 SV=1	1	1	2.7	54.79	521	9.4469	51245000
A9M5K3	tr A9M5K3 A9M5K3_BRUC2 Propionyl-CoA carboxylase beta chain OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=pccB PE=4 SV=1	1	1	2.4	27.523	251	6.2196	0
蛋白点 5	tr A9MDH6 A9MDH6_BRUC2 Type IV secretion system protein OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_B0062 PE=3 SV=1	1	1	1.9	40.726	361	1.6699	27294000
	tr A9M848 A9M848_BRUC2 Usg family protein OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_A1848 PE=4 SV=1	1	1	7.4	11.069	95	1.1551	13749000
	tr A9M604 A9M604_BRUC2 Periplasmic binding protein OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) OX=483179 GN=BCAN_A1373 PE=4 SV=1	1	1	2.5	30.346	279	0.6394	103880000

3.4.8 原核表达载体的构建

使用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切重组质粒,如图 3.7 所示,琼脂糖凝胶电泳显示在 4300 bp 附近和 723 bp 附近处出现电泳条带,与预期大小一致,说明原核表达载体构建成功。

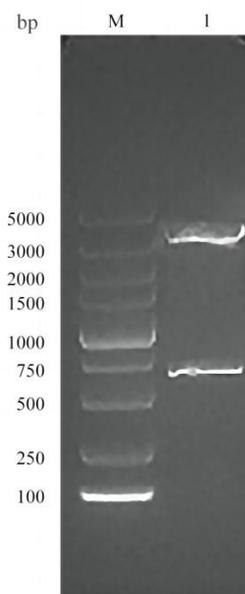


图 3.7 重组质粒双酶切鉴定结果

(M. DNA Marker; 1. 双酶切后的重组质粒)

Figure 3.7 Recombinant plasmid double digestion identification results

(M. DNA Marker; 1. recombinant plasmid after double digestion)

3.4.9 OMP31 蛋白原核表达结果

将构建的表达载体转化至 pColdII 感受态细胞,选取阳性克隆进行 IPTG 诱导表达,收集菌体超声破碎,取离心后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE,使用抗 His 标签的单克隆抗体作为一抗进行 Western blot 验证。结果如图 3.8 所示,上清和沉淀均有特异性反应条带,表明蛋白成功表达。

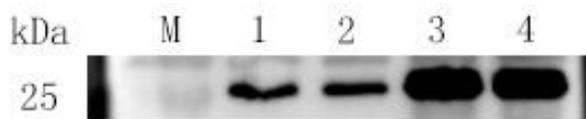


图 3.8 OMP31 蛋白原核表达验证

(M. 蛋白质 Marker; 1-2. 破碎蛋白离心沉淀; 3-4. 破碎蛋白离心上清)

Figure 3.8 Validation of protein OMP31 prokaryotic expression

(M. Protein Marker; 1-2. Centrifuged precipitate of crushed protein; 3-4. Centrifuged supernatant of crushed protein.)

3.4.10 OMP31 蛋白特异性验证结果

以表达的 OMP31 蛋白上清以及沉淀作为抗原，以纯化后的单克隆抗体 1C5 作为一抗，HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗，进行 Western blot 验证。结果如图 3.9 所示，单克隆抗体 1C5 与表达的 OMP31 蛋白出现了特异性反应条带，说明 OMP31 是单克隆抗体 1C5 的抗原表位蛋白。



图 3.9 OMP31 蛋白与单克隆抗体 1C5 的特异性反应验证

(M. 蛋白质 Marker; 1.破碎蛋白离心上清; 2.破碎蛋白离心沉淀)

Figure 3.9 Validation of the specific reaction of OMP31 with monoclonal antibody 1C5

(M. Protein Marker; 1. Centrifuged supernatant of crushed protein; 2. Centrifuged precipitate of crushed protein)

3.4.11 OMP31 的初步纯化

将经 IPTG 诱导后的菌体超声裂解，将其于 4 °C 离心后取上清，使用 His 标签蛋白纯化试剂盒进行纯化，将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，结果如图 3.10 所示，成功获得了纯度较高的 OMP31 蛋白。

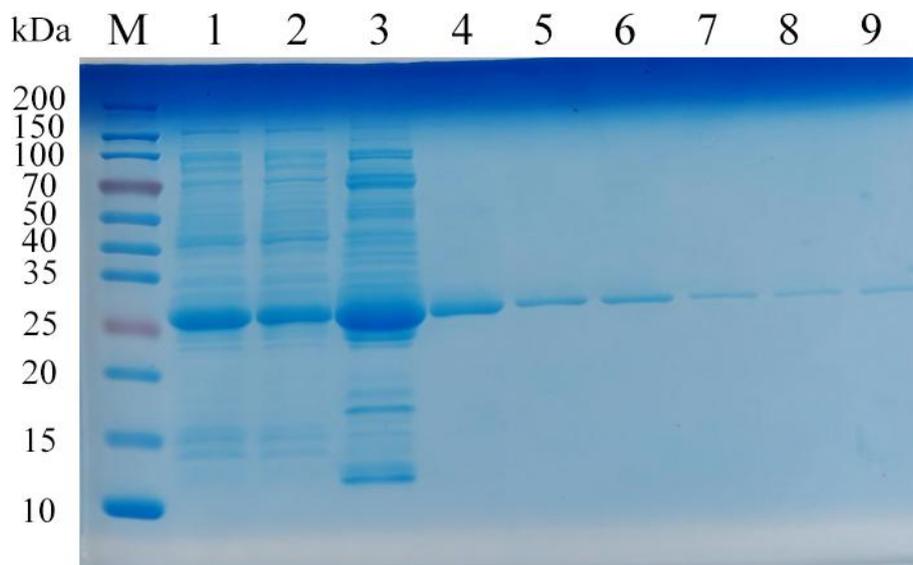


图 3.10 OMP31 蛋白纯化结果

(M.蛋白质 Marker; 1.蛋白流穿液; 2.蛋白洗涤液; 3~9.蛋白洗脱液)

Figure 3.10 Protein OMP31 purification results

(M. Protein Marker; 1. Protein Flow-through Solution; 2. Protein Wash Solution; 3~9. Protein Elution Solution)

3.5 讨论

噬菌体展示技术是一种体外筛选技术，该技术是通过将编码外源多肽或蛋白质的 DNA 插入噬菌体 DNA 中，从而将外源多肽或蛋白质文库展示在噬菌体表面，通过和单克隆抗体的淘选，筛选出所需多肽序列。噬菌体展示技术的基本步骤包括：将单克隆抗体等靶分子包被在平板上，加入噬菌体随机肽库进行孵育，洗去未结合的噬菌体，再洗脱与单克隆抗体特异结合的噬菌体，将上述噬菌体进行扩增，并重复淘选步骤。经过 3 至 4 轮淘选后，通过 ELISA 方法及测序，获取淘选出的序列。

试验设计中本想选择使用噬菌体随机肽库筛选出的表位作为包被抗原，但在试验过程中遇到了两个问题。一是合成的十二肽的长度太短，用常规的包被液和包被方法很难将其包被到 ELISA 板上，若想确保多肽可以包被，需将多肽偶联到大的载体蛋白上再进行包被。而与 BSA 偶联的造价很高，很难大批量生产。二是在将多肽与 BSA 偶联后的结合体包被在 ELISA 板后，出现了阳性血清与该序列反应性大大弱于单抗的问题。由于该两段多肽序列是由单克隆抗体在噬菌体随机肽库中筛选四轮后得到的，所以多肽序列与单抗的反应性极强。而阳性血清中的抗体针对的是布鲁氏菌菌体的多个表位，针对该多肽的抗体可能少之又少。所以无论是再降低单克隆抗体的浓度，抑或是先加入阳性血清与多肽进行反应，都无法解决血清中的抗体无法与单克隆抗体进行竞争这一问题。

通过双向电泳技术将 RM6/66 全菌蛋白进行分离，考马斯亮蓝染色结果显示，蛋白主要集中在 15~100 kDa 区间，而 Western blot 的结果显示，与单克隆抗体发生特异性反应的区域主要集中在 20~40 kDa 区间内。将双向电泳凝胶图谱与 2D-Western blot 反应图谱结合进行比对，加之考虑前期做 Western blot 单克隆抗体与蛋白反应条带在 25 kDa 附近，选取了在 25 kDa 附近 5 个着色点深且反应性最强的点位进行质谱鉴定。质谱结果显示所选的 5 个蛋白点均有信号，但根据鉴定出的肽段比对出的蛋白结果有很多，特别是反应最强的蛋白点 3 和蛋白点 5。这可能是由于以下几个原因，首先可能是蛋白进行等电聚焦或 SDS-PAGE 分离时分离的不够完全，在同一位置可能依旧存在多个蛋白；且在从凝胶上将蛋白点挖取下来的过程中，会存在不可避免的误差，可能挖取的范围过大；除此之外，在全菌中，可能存在多个表位与单克隆抗体反应的特异性表位具有相似性，使得存在的反应点较多。

将 5 个蛋白点获取的质谱结果进行整合，先从中筛选出重复次数最多，大小在 23~30 kDa，肽链长度在 210~260 的蛋白，在 UniPort 蛋白质数据库中进行搜索，查找蛋白的信息、在不同种布鲁氏菌中是否存在差异等等。最终选择了大小在 25.33 kDa，肽链长度在 240 的 OMP31 进行表达验证，验证结果显示单克隆抗体 1C5 与 OMP31 蛋白有特异性反应。下一步试验可将 OMP31 与筛选出得构象表位进行进一步比较，对单克隆抗体 1C5 所针对的表位进行进一步分析。

在布鲁氏菌中除 LPS 外，布鲁氏菌的主要外膜蛋白（outer membrane proteins, OMP）被认为具有很强的免疫原性和抗原保护作用^[76]。OMP31 蛋白由 240 个氨基酸组成，其是布鲁氏菌的膜孔蛋白，主要作用是维持布鲁氏菌外膜的结构完整及稳定。除牛种布鲁氏菌外，其他所有种布鲁氏菌都含有 OMP31 蛋白^[77]，虽然 OMP31 蛋白在不同种的布鲁氏菌之间相对保守，但还是存在一些差异。Nieves 分别将羊种布鲁氏菌 1 型 16M 株、羊种布鲁氏菌 3 型 Ether 株、猪种布鲁氏菌 2 型 Thomsen 株、猪种布鲁氏菌 4 型 40 株、犬种布鲁氏菌 RM6/66 株以及绵羊附睾种布鲁

氏菌 63/290 株的 OMP31 蛋白的核苷酸序列进行比较^[78]。结果如图 3.9 所示,与羊种布鲁氏菌 16M 株的 OMP31 蛋白相比,羊种布鲁氏菌 Ether 株、猪种布鲁氏菌 40 株和犬种布鲁氏菌 RM6/66 株有 1 个氨基酸的差异,与猪种布鲁氏菌 Thomsen 株有两个氨基酸的差异,而与绵羊附睾种布鲁氏菌 63/290 株有 7 个氨基酸的差异。Cloeckart 已经证明在布鲁氏菌的一些基因中,不同种布鲁氏菌之间微小的核苷酸序列差异会导致编码出蛋白存在一些差别^[79]。故筛选出的单克隆抗体 1C5 可能恰巧针对犬种布鲁氏菌 OMP31 蛋白与其他种布鲁氏菌 OMP31 蛋白这一核苷酸的微小差异,使得单克隆抗体 1C5 在特异性检测中呈现只针对于犬种布鲁氏菌的结果。

M1	MKSVILASIAAMFATSAMAADVWSEPSAPTAAPVDITFSWIGGYIGINAGYAGGKFKHPF	60
M3	MKSVILASIAAMFATSAMAADVWSEPSAPTAAPVDITFSWIGGYIGINAGYAGGKFKHPF	60
S2	MKSVILASIAAMFATSAMAADVWSEPSAPTAAPVDITFSWIGGYIGINAGYAGGKFKHPF	60
S4	MKSVILASIAAMFATSAMAADVWSEPSAPTAAPVDITFSWIGGYIGINAGYAGGKFKHPF	60
C	MKSVILASIAAMFATSAMAADVWSEPSAPTAAPVDITFSWIGGYIGINAGYAGGKFKHPF	60
O	MKSVILASIAAMFATSAMAADVWSEPSAPTAAPVDITFSWIGGYIGINAGYAGGKFKHPF	60
M1	SSFDKEDNEQVSGSLDVTAGGFVGGVQAGYNWQLDNGVVLGAETDFQGSSVTGSI SAGAS	120
M3	SSFDKEDNEQVSGSLDVTAGGFVGGVQAGYNWQLDNGVVLGAETDFQGSSVTGSI SAGAS	120
S2	SSFDKEDNEQVSGSLDVTAGGFVGGVQAGYNWQLDNGVVLGAETDFQGSSVTGSI SAGAS	120
S4	SSFDKEDNEQVSGSLDVTAGGFVGGVQAGYNWQLDNGVVLGAETDFQGSSVTGSI SAGAS	120
C	SSFDKEDNEQVSGSLDVTAGGFVGGVQAGYNWQLDNGVVLGAETDFQGSSVTGSI SAGAS	120
O	SSFDKEDNEQVSGSLDVTAGGFVGGVQAGYNWQLDNGVVLGAETDFQGSSVTGSI SAGAS	120
M1	GLEGKAETKVEWFGIVRRARLGYTATERLMVYGTGGGLAYGKVKSAFNLGDDASALHIWSDK	180
M3	GLEGKAETKVEWFGIVRRARLGYTATERLMVYGTGGGLAYGKVKSAFNLGDDASALHIWSDK	180
S2	GLEGKAETKVEWFGIVRRARLGYTATERLMVYGTGGGLAYGKVKSAFNLGDDASALHIWSDK	180
S4	GLEGKAETKVEWFGIVRRARLGYTATERLMVYGTGGGLAYGKVKSAFNLGDDASALHIWSDK	180
C	GLEGKAETKVEWFGIVRRARLGYTATERLMVYGTGGGLAYGKVKSAFNLGDDASALHIWSDK	180
O	GLEGKAETKVEWFGIVRRARLGYTATERLMVYGTGGGLAYGKVKSAFNLGDDASALHIWSDK	180
M1	TKAGWTLGAGA EYA INNNWTLKSEYLYTDLGKRNLVDV D NSFLESKVN FHTV RVGLNYKF	240
M3	TKAGWTLGAGA EYA INNNWTLKSEYLYTDLGKRNLVDV D NSFLESKVN FHTV RVGLNYKF	240
S2	TKAGWTLGAGA EYA INNNWTLKSEYLYTDLGKRNLVDV D NSFLESKVN FHTV RVGLNYKF	240
S4	TKAGWTLGAGA EYA INNNWTLKSEYLYTDLGKRNLVDV D NSFLESKVN FHTV RVGLNYKF	240
C	TKAGWTLGAGA EYA INNNWTLKSEYLYTDLGKRNLVDV D NSFLESKVN FHTV RVGLNYKF	240
O	TKAGWTLGAGA EYA INNNWTLKSEYLYTDLGKRNLVDV D NSFLESKVN FHTV RVGLNYKF	240

图 3.9 不同种型布鲁氏菌 OMP31 蛋白核苷酸序列比较

Figure 3.9 Comparison of nucleotide sequences of OMP31 proteins of different Brucella species

(M1: 羊种布鲁氏菌 1 型 16M 株; M3: 羊种布鲁氏菌 3 型 Ether 株; S2: 猪种布鲁氏菌 2 型 Thomsen 株; S4: 猪种布鲁氏菌 4 型 40 株; C: 犬种布鲁氏菌 RM6/66 株; O: 绵羊附睾种布鲁氏菌 63/290 株)

(M1: Brucella melitensis 16M (biovar 1); M3: Brucella melitensis Ether (biovar 3); S2: Brucella suis Thomsen (biovar 2); S4: Brucella suis 40 (biovar 4); C: Brucella canis RM6/66; O: Brucella ovis 63/290)

3.6 小结

利用噬菌体展示技术获得单克隆抗体 1C5 的模拟线性表位为“R-D-FGE”。利用双向电泳及蛋白质谱技术获得单克隆抗体 1C5 所针对的蛋白可能为 OMP31。

第四章 基于单抗 1C5 的竞争 ELISA 抗体检测方法的建立

4.1 引言

布鲁氏菌的分离鉴定是诊断布鲁氏菌病的金标准，但是该方法所需时间长，对试验场地的需求高，同时还存在一定的生物安全风险，因此该方法不适合在临床使用。而常用的检测布鲁氏菌的血清学方法，例如虎红平板凝集试验（RBT）、试管凝集试验（SAT）等，这些方法快速简便，适合临床大量样本的初筛。但由于犬血清中存在非特异性的凝集素，使得在凝集类试验中常有自凝现象，使得假阳性结果经常出现。因此使用凝集类试验检测犬血清时需要使用特殊的缓冲液体体系或对预先对血清进行处理，使得凝集类方法在临床上使用较为困难。因此，亟须建立一个易于操作且敏感性和特异性更高的血清学检测方法。由于竞争 ELISA 方法使用了针对特定抗原的特异性单克隆抗体，使该方法具有更好的敏感性与特异性，适合布鲁氏菌病的大规模初筛。本章研究使用了上述筛选出犬种布鲁氏菌 RM6/66 单克隆抗体及纯化出的 OMP31 蛋白建立竞争 ELISA 抗体检测方法，优化条件，并对临床血清进行检测，以期为犬种布鲁氏菌临床诊断提供一新的快速、简便的检测方法。

4.2 材料

ELISA 包被液，单组分 TMB 显色液，ELISA 终止液，索莱宝，中国；辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠 IgG，Jackson ImmunoResearch，美国。

犬种布鲁氏菌病试管凝集试验抗原、犬种布鲁氏菌阳性血清、犬种布鲁氏菌阴性血清、光滑型布鲁氏菌标准阳性血清、小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清、大肠杆菌 O157 阳性血清由本实验室制备保存。

4.3 方法

4.3.1 竞争 ELISA 方法的建立

使用单克隆抗体 1C5 及原核表达的犬种布鲁氏菌 OMP31 蛋白建立犬种布鲁氏菌竞争 ELISA 抗体检测方法，具体操作步骤如下：

（1）包被：将纯化后的犬种布鲁氏菌 OMP31 蛋白用包被液稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。100 μL /孔加入至 96 孔酶标板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。

（2）洗板：用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次，拍净板内液体。

（3）封闭：将 10%的脱脂奶粉 100 μL /孔加入至酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。

(4) 洗板: 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 1 次, 拍净板内液体。

(5) 加待检血清: 将待检血清在血清稀释板上 1: 100 稀释, 每孔加入 50 μL 稀释后的待检血清。

(6) 加单克隆抗体: 将单克隆抗体 1C5 1: 4000 倍稀释, 每孔加入 50 μL 稀释后的单抗。振荡混匀。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 30 min。

(7) 洗板: 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次, 拍净板内液体。

(8) 加酶标二抗: 每孔中加入 100 μL 1: 10000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 30 min。

(9) 洗板: 用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 3 次, 拍净板内液体。

(10) 显色: 加入 100 μL TMB 显色液, 避光显色 15 min。

(11) 终止: 加入 50 μL 终止液终止。

(12) 读数: 使用酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 读数, 记录结果。

(13) 计算: 抑制率 (PI) = (阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ - 样品血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$) / 阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ $\times 100\%$ 。

4.3.2 犬种布鲁氏菌阳性血清的效价测定

将实验室预先制备的犬种布鲁氏菌阳性血清使用犬种布鲁氏菌病微量试管凝集抗原测定犬种布鲁氏菌阳性血清效价。具体步骤为: 将阳性血清用稀释液以 1: 100、1: 200、1: 400、1: 800、1: 1200、1: 1600、1: 2000、1: 2400、1: 2800、1: 3200、1: 3600、1: 4000、1: 4400、1: 4800、1: 5200 进行稀释, 在 U 型板中每孔加入 100 μL 稀释好的血清, 再将犬种布鲁氏菌试管凝集抗原进行 1: 20 稀释, 每孔加入 100 μL 。将加样后的 U 型板用塑料薄膜密封后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 18 h, 取出读取结果。根据试管凝集试验的结果将阳性血清稀释至效价 1: 1000, 即得犬种布鲁氏菌参考阳性血清。

4.3.3 抗原最佳包被浓度、血清最佳稀释度及酶标二抗最佳工作浓度的确定

使用棋盘法对竞争 ELISA 抗体检测方法的抗原最佳包被浓度、血清最佳稀释度及酶标二抗最佳工作浓度进行确定。

分别使用包被液将纯化后的犬种布鲁氏菌 OMP31 蛋白稀释至 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个稀释度包被 4 条酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。PBST 洗板 1 次。将 10% 的脱脂奶粉 100 μL /孔加入至酶标板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。将阳性血清和阴性血清在血清稀释板上分别使用 PBS 进行 1: 10、1: 20、1: 40、1: 80、1: 100、1: 160、1: 320、1: 640 稀释, 按浓度自高至低由上至下分别加入, 每孔加入 50 μL 。再在每孔中加入 50 μL 1: 4000 稀释的单克隆抗体 1C5, 振荡混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 30 min。用 PBST 洗板 3 次。在两块酶标板中分别加入 100 μL 1: 10000、1: 20000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 30 min。用 PBST 洗板 3 次。每孔加入 100 μL TMB 显色液, 避光显色 15 min。每孔加入 50 μL 终止液终止。使用酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 读数, 记录结果, 计算抑制率。

4.3.4 单克隆抗体最佳工作浓度的确定

按已确定的抗原包被量对 ELISA 反应板进行包被, 4 °C 包被过夜。PBST 洗板 1 次。将 10% 的脱脂奶粉 100 μL/孔加入至酶标板中, 37 °C 封闭 2 h。将阳性血清和阴性血清在血清稀释板上进行 1: 50 稀释, 每个单抗稀释度加一个孔, 每孔加入 50 μL。再将单克隆抗体 1C5 进行 1: 100、1: 500、1: 1000、1: 2000、1: 4000、1: 6000、1: 8000、1: 10000、1: 12000、1: 15000 稀释, 在对应的孔中加入 50 μL 稀释后的单克隆抗体, 振荡混匀。37 °C 温箱孵育 30 min。用 PBST 洗板 3 次。在每孔中加入 100 μL 1: 20000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 37 °C 温箱孵育 30 min。用 PBST 洗板 3 次。每孔加入 100 μL TMB 显色液, 避光显色 15 min。每孔加入 50 μL 终止液终止。使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值, 读数, 记录结果, 计算抑制率。

4.3.5 包被时间的确定

按已确定的抗原包被量对 ELISA 反应板进行包被, 分别进行 4 °C 包被过夜、37 °C 包被 1 h、37 °C 包被 2 h。PBST 洗板 1 次。将 10% 的脱脂奶粉 100 μL/孔加入至酶标板中, 37 °C 封闭 2 h。将阳性血清和阴性血清在血清稀释板上进行 1: 100 稀释, 每孔加入 50 μL。再将单克隆抗体 1C5 进行 1: 12000 稀释, 每孔中加入 50 μL, 振荡混匀。37 °C 温箱孵育 30 min。用 PBST 洗板 3 次。在每孔中加入 100 μL 1: 20000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 37 °C 温箱孵育 30 min。用 PBST 洗板 3 次。每孔加入 100 μL TMB 显色液, 避光显色 15 min。每孔加入 50 μL 终止液终止。使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值, 读数, 记录结果, 计算抑制率。

4.3.6 封闭液及封闭时间的确定

按已确定的抗原包被量对 ELISA 反应板 4 °C 包被过夜。分别用 2% 脱脂奶、5% 脱脂奶、10% 脱脂奶、5% BSA、10% BSA、15% BSA、0.5% 明胶、1% 明胶 8 种封闭液在 37 °C 封闭 1h、1.5h、2h。将阳性血清和阴性血清在血清稀释板上进行 1: 100 稀释, 每孔加入 50 μL。再将单克隆抗体 1C5 进行 1: 12000 稀释, 每孔中加入 50 μL, 振荡混匀。37 °C 温箱孵育 30 min。用 PBST 洗板 3 次。在每孔中加入 100 μL 1: 20000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 37 °C 温箱孵育 30 min。用 PBST 洗板 3 次。每孔加入 100 μL TMB 显色液, 避光显色 15 min。每孔加入 50 μL 终止液终止。使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值, 读数, 记录结果, 计算抑制率。

4.3.7 阴阳性临界值的确定

取经由虎红平板凝集试验、试管凝集试验检测均为阴性犬血清 200 份, 按试验确定的方法进行竞争 ELISA 反应, 测定 OD_{450nm}, 计算抑制率 $(PI) = (阴性血清 OD_{450nm} - 样品血清 OD_{450nm}) / 阴性血清 OD_{450nm} \times 100\%$ 。计算出血清样品的平均抑制率 (\bar{X}) 和标准差 (SD)。当 $PI \geq \bar{X} + 3SD$ 时, 判断该血清为犬种布鲁氏菌抗体阳性, 当 $PI \leq \bar{X} + 2SD$ 时, 判断该血清为犬种布鲁氏菌抗体阴性, 当 $\bar{X} + 2SD < PI < \bar{X} + 3SD$ 时, 判断该血清为可疑。

4.3.8 特异性试验

使用已建立优化的竞争 ELISA 抗体检测方法分别检测与布鲁氏菌存在一定交叉反应的小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清、大肠杆菌 O157 阳性血清、光滑型布鲁氏菌阳性血清，并加入犬种布鲁氏菌阳性血清、犬种布鲁氏菌病阴性血清作为对照，确定建立的竞争 ELISA 抗体检测方法的特异性。

4.3.9 敏感性试验

将犬种布鲁氏菌参考阳性血清以 1: 50、1: 100、1: 200、1: 400、1: 800、1: 1000、1: 1200、1: 1400 进行稀释，使用已建立优化的竞争 ELISA 抗体检测方法进行试验，确定竞争 ELISA 抗体检测方法的敏感性。

4.3.10 临床样本检测

通过粗糙型微量试管凝集试验以及本试验建立优化的竞争 ELISA 抗体检测方法对实验室收集的来自北京市的 300 份犬血清进行检测，统计其符合率。

4.4 结果

4.4.1 抗原最佳包被浓度、血清最佳稀释度及酶标二抗最佳工作浓度的确定

使用棋盘法对竞争 ELISA 抗体检测方法中的抗原最佳包被浓度、血清最佳稀释度及酶标二抗最佳工作浓度进行了确定。结果如表 4.1 所示，当抗原包被浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；血清稀释倍数为 1: 50；二抗稀释倍数为 1: 20000 时抑制率最高。故选定竞争 ELISA 抗体检测方法的抗原最佳包被浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，血清稀释倍数为 1: 50，HRP 标记的羊抗鼠 IgG 稀释倍数为 1: 20000。

表 4.1 竞争 ELISA 方法抗原包被浓度、血清稀释度及酶标二抗工作浓度的确定

Table 4.1 Determination of antigen coating concentration, serum dilution and working concentration of enzyme-labeled secondary antibody for Competition ELISA

二抗稀释 倍数	血清稀释 倍数	抗原包被浓度					
		2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1: 10000	1: 10	93.36%	95.27%	94.34%	94.08%	94.02%	94.28%
	1: 20	94.14%	95.24%	93.03%	93.15%	94.66%	93.06%
	1: 50	92.89%	94.33%	92.24%	92.65%	95.22%	93.73%
	1: 80	91.98%	93.56%	90.52%	92.53%	95.47%	94.34%
	1: 100	92.02%	93.49%	91.61%	92.92%	95.57%	94.10%
	1: 150	89.89%	91.40%	89.85%	90.76%	95.03%	94.60%
	1: 200	77.95%	78.29%	75.04%	83.92%	94.56%	93.99%
	1: 400	62.52%	60.02%	55.52%	71.45%	91.00%	88.29%

续表

二抗稀释 倍数	血清稀释 倍数	抗原包被浓度					
		2 $\mu\text{g/mL}$	1.5 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.3 $\mu\text{g/mL}$	0.1 $\mu\text{g/mL}$
1: 20000	1: 10	90.09%	96.53%	94.30%	94.77%	91.01%	90.17%
	1: 20	92.65%	93.55%	94.31%	94.64%	91.05%	88.98%
	1: 50	93.11%	93.67%	95.59%	94.26%	87.95%	92.19%
	1: 80	92.87%	93.41%	94.99%	93.33%	94.27%	93.01%
	1: 100	92.52%	93.72%	95.18%	94.13%	90.58%	94.21%
	1: 150	92.45%	92.28%	93.84%	94.05%	92.88%	94.41%
	1: 200	86.08%	84.53%	88.40%	89.97%	92.07%	94.44%
	1: 400	63.19%	62.86%	70.37%	76.35%	85.52%	91.07%

4.4.2 单克隆抗体最佳工作浓度的确定

如表 4.2 结果显示, 将单克隆抗体 1C5 以 1: 12000 稀释时, 抑制率最高。故选定竞争 ELISA 抗体检测方法中单克隆抗体的稀释度为 1: 12000。

表 4.2 竞争 ELISA 方法单克隆抗体工作浓度的确定

Table 4.2 Determination of working concentrations of monoclonal antibodies for Competition ELISA

单克隆抗体 1C5 稀释倍数									
1: 100	1: 500	1: 1000	1: 2000	1: 4000	1: 6000	1: 8000	1: 10000	1: 12000	1: 15000
88.23%	89.38%	90.97%	88.14%	91.80%	91.89%	92.41%	92.53%	94.69%	92.19%

4.4.3 包被时间的确定

如表 4.3 所示, 当包被液均为 pH 9.6、0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液时, 包被条件为 4 °C 过夜包被 12 h 时, 抑制率最高, 包被效果最好。

表 4.3 竞争 ELISA 方法包被时间的确定

Table 4.3 Determination of encapsulation time for competitive ELISA

包被时间	阴性血清	阳性血清	抑制率
4 °C 过夜	0.141	2.152	93.45%
37 °C 1 h	0.152	1.513	66.16%
37 °C 2 h	0.149	1.813	91.78%

4.4.4 封闭液及封闭时间的确定

通过棋盘法, 分别选择不同的封闭液以及不同的封闭时间, 固定其余条件进行竞争 ELISA 试验。结果如表 4.4 所示, 当封闭液为 5% BSA, 封闭条件为 37 °C 封闭 2 h, 抑制率最高, 封闭效果最好。

表 4.4 竞争 ELISA 方法封闭液及封闭时间的确定

Table 4.4 Closure fluid and the determination of the closure time for competitive ELISA

封闭液	封闭时间		
	37 °C封闭 1 h	37 °C封闭 1.5 h	37 °C封闭 2 h
10% BSA	93.51%	93.82%	93.69%
5% BSA	93.49%	94.28%	94.72%
1% BSA	93.62%	94.17%	94.71%
10% 脱脂奶粉	91.96%	92.99%	93.37%
5% 脱脂奶粉	91.86%	92.53%	93.01%
2% 脱脂奶粉	90.28%	92.41%	92.47%
1% 明胶	92.22%	91.92%	92.64%
0.5% 明胶	90.86%	91.11%	91.39%

4.4.5 阴阳性临界值的确定

采用上述已优化建立好的竞争 ELISA 抗体检测方法,对 200 份经微量试管凝集试验确定为阴性的临床犬血清样本进行了检测。结果显示,平均抑制率为 1.54%,标准差为 8.17%。根据公式当 $PI \geq \bar{X} + 3SD$ 时,判断该血清为犬种布鲁氏菌抗体阳性,当 $PI \leq \bar{X} + 2SD$ 时,判断该血清为犬种布鲁氏菌抗体阴性,当 $\bar{X} + 2SD < PI < \bar{X} + 3SD$ 时,判断该血清为可疑。可得,当样品抑制率大于 26.07%时,判断该样品血清为犬种布鲁氏菌抗体阳性,当样品抑制率小于 17.89%时,判断该样品为犬种布鲁氏菌抗体阴性;若抑制率在两者之间,重新进行试验,若检测结果抑制率仍小于 26.07%,则判定为阴性。

4.4.6 特异性试验

采用上述已优化建立好的竞争 ELISA 抗体检测方法,分别检测了小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清、大肠杆菌 O157 阳性血清。由表 4.5 的结果可知,使用本研究建立的竞争 ELISA 方法检测上述血清均为阴性,说明该竞争 ELISA 抗体检测方法特异性较好。

表 4.5 竞争 ELISA 方法特异性结果分析

Table 4.5 Results of specificity analysis for competitive ELISA

	小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清	大肠杆菌 O157 阳性血清	犬种布鲁氏菌阳性血清
抑制率	-13.34%	7.16%	96.18%

4.4.7 敏感性试验

将犬种布鲁氏菌阳性血清进行倍比稀释,利用上述已优化建立好的竞争 ELISA 抗体检测方法进行检测。由表 4.6 可知,当犬种布鲁氏菌标准阳性血清稀释至 1:1200 时,竞争 ELISA 方法仍能检测出阳性,说明该竞争 ELISA 抗体检测方法敏感性较好。

表 4.6 竞争 ELISA 方法敏感性试验结果

Table 4.6 Results of sensitivity experiments for competitive ELISA

	阳性血清稀释倍数							
	1: 50	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1000	1: 1200	1: 1400
抑制率	95.67%	93.70%	88.59%	79.29%	61.64%	44.67%	26.20%	10.33%

4.4.8 临床样本检测

将 300 份临床样品和粗糙型微量试管凝集试验的试验结果进行比对, 结果显示, 粗糙型微量试管凝集试验检出阳性样本 8 个, 阴性 292 个。建立的竞争 ELISA 抗体检测方法检测出阳性样本 7 个, 阴性样本 293 个。阳性符合率为 87.50%, 阴性符合率为 99.60%, 总体符合率为 99.30%。

4.5 讨论

目前, 中国还没有商品化诊断犬种布鲁氏菌的试剂盒上市应用。基于 LPS 或全菌的光滑型布鲁氏菌的 ELISA 诊断方法并不能完全适用于犬种布鲁氏菌的诊断。传统的试管凝集试验和虎红平板凝集试验的特异性低, 易有假阳性出现, YAO 使用虎红平板凝集试验对临床的 1220 份犬血清进行了筛查, 结果显示阳性率为 10%, 而使用 PCR 或 qPCR 方法作为验证, 阳性率降至了 2.78%^[80]。PCR 或 qPCR 技术虽具有很高的敏感性和特异性, 但需要在配备专用仪器的实验室使用, 临床使用难度大。故仍需要建立一个敏感性高、特异性好且在临床方便使用的方法来诊断犬种布鲁氏菌病。

近年来, 对犬种布鲁氏菌病的诊断方法研究主要聚焦在间接 ELISA 技术并集中于以布鲁氏菌外膜和胞质蛋白作为为抗原的方法上。YAO 通过原核表达将 OMP31、BP26 以及 OMP25 蛋白进行了表达, 并将 3 个蛋白作为包被原与犬血清进行间接 ELISA 反应, 结果显示以 OMP31 蛋白作为抗原建立的间接 ELISA 方法, 比使用 BP26 和 OMP25 蛋白作为包被原建立的方法具有更好的灵敏性, 且根据特异性试验, 基于 OMP31 的间接 ELISA 方法与其他常见的病原体的阳性血清的交叉反应最弱^[80-81]。

本试验建立的竞争 ELISA 抗体检测方法使用犬种布鲁氏菌 OMP31 蛋白作为包被抗原, 并以筛选出的单克隆抗体 1C5 作为竞争原。通过对临床样品的检测结果显示该方法与粗糙型试管凝集试验的符合率达 99.30%, 证明该方法具有较高的敏感性。且与肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清、大肠杆菌 O157 阳性血清、光滑型布鲁氏菌阳性血清均无交叉反应, 证明该方法具有良好的特异性。说明该方法可用于犬种布鲁氏菌的临床检测。

由于条件以及时间的限制, 在特异性验证方面只选择了与犬种布鲁氏菌有较强抗原交叉反应的菌株进行了实验。故后续可进一步对该方法进行完善, 在特异性验证方面增加犬常见病原体的阳性血清, 并对建立的竞争 ELISA 抗体检测方法的重复性进行进一步验证。

4.6 小结

成功建立检测犬种布鲁氏菌的竞争 ELISA 检测方法，该方法与小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清、大肠杆菌 O157 阳性血清、光滑型布鲁氏菌阳性血清之间无交叉反应；当犬种布鲁氏菌参考阳性血清稀释至 1:1200 时，仍能检测出阳性结果；与犬种布鲁氏菌微量试管凝集试验符合率达 99.30%。

第五章 结论

1. 本研究筛选出了 4 株针对犬种布鲁氏菌 RM6/66 的单克隆抗体, 其中单克隆抗体 1C5 具有良好的亲和力和较好的特异性。
2. 本研究经噬菌体随机肽库筛选出单克隆抗体 1C5 的线性模拟表位“R-D-FGE”, 利用双向电泳及蛋白质谱分离鉴定出单克隆抗体 1C5 与 OMP31 蛋白具有反应性。
3. 本研究成功建立犬种布鲁氏菌竞争 ELISA 抗体检测方法。该方法与小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清、大肠杆菌 O157 阳性血清、光滑型布鲁氏菌阳性血清之间无交叉反应, 特异性、敏感性较好。临床样品检测与粗糙型微量试管凝集试验的符合率达 99.30%。

第六章 创新点

- 1.获得一株与犬种布鲁氏菌有特异性反应，而与光滑型布鲁氏菌不反应的单克隆抗体。
- 2.建立了针对犬种布鲁氏菌的竞争 ELISA 抗体检测方法，该方法可快速准确地检测出犬种布鲁氏感染后的血清抗体，同时与小肠结肠炎耶尔森氏菌 O9 阳性血清、大肠杆菌 O157 阳性血清无交叉反应，证明该方法具有较好的敏感性和特异性。

参考文献

- [1] Carmichael L E , Kenney R M. Canine abortion caused by *Brucella canis*[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1968, 152(6):605-616.
- [2] Meyer M E. *Brucella* organisms isolated from dogs: comparison of characteristics of members of the genus *Brucella*[J]. American Journal of Veterinary Research, 1969, 30(10):1751.
- [3] SNEATH, Ha P, MAIR, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 2[M]. Baltimore: Williams Wilkins, 1986.
- [4] Carmichael L E , Joubert J C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure.[J]. Cornell Veterinarian, 1988, 78(1):63.
- [5] Rao C K . Epizootiology, diagnosis and control of brucellosis in India.[J]. Bulletin-Office International Des Epizooties, 1970, 73(1):5-7.
- [6] Day M J, Peeters D, Clercx C. Infectious diseases of the dog and cat, 4th Edition[M]. Elsevier, 2012.
- [7] Carmichael L E, Zoha S J, Flores-Castro R. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*[J]. Developments in Biological Standardization, 1984, 56(56):371-383.
- [8] Moore J A. *Brucella canis* infection in dogs[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1969, 155(12):2034.
- [9] Hensel M E, Maria N , Arenas-Gamboa A M. Brucellosis in dogs and public health risk[J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(8):1401-1406.
- [10] Cho N. A Simulation study on spread of disease and control measures in closed population using ABM[J]. Computation, 2022, 10(1):2
- [11] Carmichael L E, Nielsen K, Duncan J R . *Brucella canis*[J]. Emerging Infectious Diseases, 1990, 10(1):335-350.
- [12] Carmichael L E , Bruner D W. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions[J]. Cornell Vet, 1968, 48(4):579-592.
- [13] Lawaczeck E , Toporek J, Cwikla J, et al. *Brucella canis* in a HIV-Infected Patient[J]. Zoonoses and Public Health, 2011, 58(2).
- [14] Lucero N E , Corazza R, Almuzara M. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs[J]. Epidemiology and Infection, 2010, 138(2):280-285.
- [15] Ramsey I. Infectious diseases of the dog and cat[J]. Journal of Small Animal Practice, 2010, 49(9):488-488.
- [16] Kevin L Cosford. *Brucella canis*: An update on research and clinical management[J]. Canadian Veterinary Journal: La Revue Veterinaire Canadienne, 2018, 59(1):74-81.
- [17] De Souza T D, De Carvalho T F, Mol J P D S, et al. Tissue distribution and cell tropism of *Brucella*

- canis in naturally infected canine fetuses and neonates[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):7203.
- [18] Ledbetter E C , Landry M P , Stokol T , et al. *Brucella canis* endophthalmitis in 3 dogs: clinical features, diagnosis, and treatment[J]. *Veterinary Ophthalmology*, 2010, 12(3):183-191.
- [19] Kerwin S C , Lewis D D , Hribernik T N , et al. Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991)[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1992, 201(8):1253-1257.
- [20] Hurov L , Troy G , Turnwald G. Diskospondylitis in the dog: 27 cases[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1978, 173(3):275
- [21] Long C , Burgers E , Copple C , et al. *Brucella canis* discospondylitis in 33 dogs[J]. *Frontiers in veterinary science*, 2022, 9:1043610.
- [22] Sykes J E. *Canine and Feline Infectious Diseases*[M]. Saunders Elsevier, 2014:82-160.
- [23] Hollett R B. Canine brucellosis: outbreaks and compliance[J]. *Theriogenology*, 2006, 663:575-587.
- [24] Carmichael L E. Canine brucellosis in infectious diseases of the dog and cat[J]. *Elsevier Health Sciences*, 2012:398-411
- [25] Ortega T M , Feldman E C , Nelson R W , et al. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1996, 209(10):1724-1729.
- [26] Carmichael L E , Greene C E. Canine brucellosis. In *Infectious diseases of the dog and cat 3rd ed*[M]. Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier Saunders, 2006:369-381
- [27] Manthei C A . Current advances in Brucellosis research[J]. *Public Health Reports* , 1964 , 79(12):1074-1080.
- [28] Delpino M V , Fossati C A , Baldi P C. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other alpha-proteobacteria[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, 11(5):868-873.
- [29] Cloeckert A , Tibor A , Zygmunt M S . *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family rhizobiaceae[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1999, 6(4):627-629.
- [30] Badakhsh F F , Carmichael L E , Douglas J A. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology* , 1982 , 15 (2):286-289.
- [31] Godfroid J , Beckmen K , Helena Nymo I. Removal of lipid from serum increases coherence between Brucellosis rapid agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in bears in Alaska, USA[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2016:2015-11-298.
- [32] Keid L , Diniz J , Oliveira T , et al. Evaluation of an immunochromatographic test to the diagnosis of canine Brucellosis caused by *Brucella canis*[J]. *Reproduction in Domestic Animals* , 2015 , 50(6):939-944.
- [33] Zoha S J , Carmichael L E. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *B. canis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 1982, 28:1-4.
- [34] de Oliveira MZ , Vale V , Keid L , et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis

- of canine brucellosis due to *Brucella canis*[J]. *Research in Veterinary Science* , 2011 , 90(3):425-431.
- [35] Escobar GI, Boeri EJ, Ayala SM, et al. The feasibility of using antigens prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucellosis.[J]. *Revista argentina de microbiología*, 2010, 42(1):35-402010.
- [36] MM Sánchez-Jiménez, Zuluaga J, Garcia-Montoya G M, et al. Diagnosis of human and canine *Brucella canis* infection: development and evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *Brucella* proteins[J]. *Heliyon*, 2020, 6(7):e04393.
- [37] 吴洪超, 刘玉秀, 田克恭, 等. 2018 年-2020 年我国部分城市宠物犬布鲁氏菌病血清学调查[J]. *动物医学进展*, 2022(008):043.
- [38] Hensel M E, Maria N, Arenas-Gamboa A M. Brucellosis in dogs and public health risk[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(8):1401-1406.
- [39] Makloski C L. Canine Brucellosis management[J]. *The Veterinary clinics of North America*, 2011, 41(6):1209-1219.
- [40] Johnson C A , Walker R D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection[J]. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 1992, 14(6):763-767.
- [41] Santos R L, Souza T D, Mol J, et al. Canine Brucellosis: an update[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8:594291.
- [42] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705):1315-1317.
- [43] Parmley S F, Smith G P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes.[J]. *Gene*, 1988, 73(2):305-318.
- [44] Scott J, Smith G. Searching for peptide ligands with an epitope library[J]. *Science*, 1990, 249(4967):386-390.
- [45] 曲戈, 张锟, 蒋迎迎, 等. 2018 诺贝尔化学奖:酶定向进化与噬菌体展示技术[J].*生物学杂志*, 2019(1):1-6,19.
- [46] Rohovie M J, Nagasawa M, Swartz J R. Virus-like particles: next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery[J]. *Bioengineering & Translational Medicine*, 2016, 2(1):43-57.
- [47] Jasna, Rakonjac, Nicholas J, et al. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications[J]. *Current Issues In Molecular Biology*, 2011, 13(2):51-76.
- [48] Bao Q, Li X, Han G, et al. Phage-based vaccines[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019, 145:40-56.
- [49] Gamkrelidze, Dabrowska. T4 bacteriophage as a phage display platform[J]. *Archives of microbiology*, 2014, 196(7):473-479.
- [50] Yap M L, Rossmann M G. Structure and function of bacteriophage T4[J]. *Future Microbiology*, 2014, 9(12):1319-1327.
- [51] Wu J, Tu C, Yu X, et al. Bacteriophage T4 nanoparticle capsid surface SOC and HOC bipartite display with enhanced classical swine fever virus immunogenicity: A powerful immunological

- approach[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 139(1):50-60.
- [52] Deng X, Wang L, You X, et al. Advances in the T7 phage display system (Review)[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(1):714-720.
- [53] Wei L, Caberoy N B. New perspective for phage display as an efficient and versatile technology of functional proteomics[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4):909-919.
- [54] Chaudhary V K, Gupta A, Adhya S, et al. Lambda phage display system and the process:US, US0741080/B2[P]. 2003-05-20.
- [55] Vetter S W. Phage display selection of peptides that target calcium-binding proteins[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 963:215-235.
- [56] Wang L F, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics[J]. *Current Drug Targets*, 2004, 5(1):1-15.
- [57] Yip Y L, Ward R L. Epitope discovery using monoclonal antibodies and phage peptide libraries[J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 1999, 2(3):125-138.
- [58] Du Plessis D H, Romito M, Jordaan F. Identification of an antigenic peptide specific for bluetongue virus using phage display expression of NS1 sequences[J]. *Immunotechnology*, 1995, 1(3-4), 221-230.
- [59] Yu M, Wang L F, Shiell B J, et al. Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses[J]. *Virology*, 1996, 222(1):289-292.
- [60] Wang L F, Yu M. Random fragment libraries displayed on filamentous phage[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1996, 66:269-285.
- [61] Jacobsson K, Frykberg L. Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display[J]. *BioTechnique*, 1995, 18(5):878-885.
- [62] Coley A M, Campanale N V, Casey J L, et al. Rapid and precise epitope mapping of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* AMA1 by combined phage display of fragments and random peptides[J]. *Protein Engineering*, 2001, 14(9):691-698.
- [63] Jacobsson K, Frykberg L. Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100% correct clones[J]. *BioTechniques*, 1996, 20(6):1070-1081.
- [64] Di N R, Ana-Marija S, Flavio M, et al. Rapid interactome profiling by massive sequencing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(9): e110.
- [65] Chapman-Smith A, Cronan J E. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(9):359-363.
- [66] Bratkovi T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2010, 67(5):749-767.
- [67] Haque A, Tonks N K. The use of phage display to generate conformation-sensor recombinant antibodies[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(12):2127-2143.
- [68] Meulemans E V, Slobbe R, Wasterval P, et al. Selection of phage-displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody[J]. *Journal of Molecular*

- Biology, 1994, 244(4):353-360.
- [69] Rothe C, Urlinger S, LoHning C, et al. The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 376(4):1182-1200.
- [70] Franco M P, Mulder M, Gilman R H, et al. Human brucellosis[J]. *The Lancet. Infectious diseases*, 2007, 7(12):775-786.
- [71] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256(5517):495-497.
- [72] Schurig G G, Sriranganathan N, Corbel M J. Brucellosis vaccines: past, present and future[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002, 90(1-4):479-496.
- [73] Kurmanov B, Zincke D, Su W, et al. Assays for identification and differentiation of *Brucella* species: A Review[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(8):1584.
- [74] 孙佳丽, 董浩, 彭小微, 等. 犬种布鲁氏菌研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 048(010):3803-3811.
- [75] Blond-Elguindi S, Cwirla S E, Dower W J, et al. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP[J]. *Cell*, 1993, 75(4):717-28.
- [76] Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet J Y, et al. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002, 90(1-4):229-247.
- [77] Nieves Vizcaíno, J. M. Verger, Maggy Grayo, et al. DNA polymorphism at the omp31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers[J]. *Microbiology*, 1997, 143:2913-2921.
- [78] Vizcaíno N, Kittelberger R, Cloeckaert, A, et al. Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(11):7020-7028.
- [79] Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, et al. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: Evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64(6):2047-2055.
- [80] Yao M, Liu M, Chen X, et al. Comparison of BP26, Omp25 and Omp31 and a multi-epitope-based fusion protein in the serological detection of Canine Brucellosis[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2022, 15:5301-5308.
- [81] Yao M, Guo X, Wu X, et al. Evaluation of the combined use of major outer membrane proteins in the serodiagnosis of Brucellosis[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2022, 15:4093-4100.