



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117487009 A

(43) 申请公布日 2024.02.02

(21) 申请号 202410003927.4

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2024.01.03

G01N 33/68 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 45710 2023.09.04

(71) 申请人 北京市农林科学院

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号

(72) 发明人 江波 李永清 曹梦瑶 王晶

程晶 刘文晓 周林宜

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理

有限公司 11129

专利代理师 刘丹

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

抗鸡PML单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及鸡PML的检测,具体涉及一种抗鸡PML单克隆抗体及其应用。提供抗鸡PML单克隆抗体,其由保藏编号为CGMCC No.45710的杂交瘤细胞所分泌。还提供所述抗鸡PML单克隆抗体在检测鸡PML或鸡PML核体中的应用。本发明为研究鸡PML核体的生物学功能,尤其是抗MDV作用机制,提供了全新的技术支持,也为研究新型MDV防控技术提供新的方向。

1. 抗鸡PML单克隆抗体,其由保藏编号为CGMCC No. 45710的杂交瘤细胞所分泌。
2. 分泌抗鸡PML单克隆抗体的杂交瘤细胞,其保藏编号为CGMCC No. 45710。
3. 用于检测鸡PML或鸡PML核体的试剂盒,其包含权利要求1所述的抗鸡PML单克隆抗体。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含用作二抗的抗小鼠IgG抗体。
5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述抗小鼠IgG抗体由荧光基团标记。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含免疫荧光法检测通用试剂。
7. 权利要求1所述的抗鸡PML单克隆抗体在制备用于检测鸡PML或鸡PML核体的产品中的应用。
8. 权利要求1所述的抗鸡PML单克隆抗体在检测鸡PML或鸡PML核体中的应用。
9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述检测为免疫荧光法检测。
10. 一种检测细胞内鸡PML或鸡PML核体的方法,其包括如下步骤:
 - (1) 取待测细胞,用多聚甲醛固定;
 - (2) 去除多聚甲醛,用PBS洗涤细胞后加入表面活性剂进行处理;
 - (3) 去除表面活性剂,用PBS洗涤细胞后加入BSA封闭液进行封闭;
 - (4) 去除BSA封闭液,加入权利要求1所述的抗鸡PML单克隆抗体进行孵育;
 - (5) 去除抗鸡PML单克隆抗体,用PBST洗涤细胞后加入荧光基团标记的抗小鼠IgG抗体进行孵育;
 - (6) 去除抗小鼠IgG抗体,用PBST洗涤细胞后加入DAPI染色液进行孵育;
 - (7) 去除DAPI染色液,用PBST和去离子水依次洗涤细胞,封片后置于激光共聚焦显微镜下观察细胞中荧光的有无和数量。

抗鸡PML单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及鸡PML的检测,具体涉及一种抗鸡PML单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 病毒是严格细胞内寄生微生物,需要依附于宿主细胞实现基因复制和蛋白合成进而完成病毒复制周期。在长期的共同进化过程中,宿主细胞为维持自身稳态而形成了一系列天然抗病毒机制。早幼粒细胞白血病蛋白核体(Promyelocytic leukemia protein nuclear bodies, PML核体或PML NBs)是脊椎动物细胞中普遍存在的一种动态的亚细胞核结构。SUMO化的早幼粒细胞白血病蛋白(Promyelocytic leukemia protein, PML)、可溶性酸性磷酸化核蛋白(Sp100)、死亡结构域相关蛋白(Death domain associate protein, Daxx)是PML NBs的主要组成成分。PML NBs通过招募不同的配体分子发挥多种生物学功能,如抗病毒感染、细胞分化、增殖、凋亡以及DNA修复等。PML基因启动子中含有ISRE和GAS,可以在IFN诱导下上调转录和翻译,导致细胞核内PML NBs数量增加和体积增大,在核内向DNA病毒基因复制区块移动,通过修饰病毒基因组来抑制其复制与转录。

[0003] PML NBs在疱疹病毒的潜伏感染形成以及早期宿主抵抗疱疹病毒复制过程中发挥重要作用。PML NBs的内源性抗病毒活性也最早在研究疱疹病毒感染机制时被发现。单纯疱疹病毒1型(Herpes simplex virus 1, HSV-1)进入宿主细胞后,PML NBs识别并结合裸露的病毒DNA,形成包含病毒DNA的PML NBs(viral DNA-containing PML NBs, vDCP NBs),然后通过PML NBs、组蛋白H3.3、H3.3伴侣分子形成的复合物将其染色质化修饰,沉默HSV-1基因组的复制与转录,形成延迟相关转录本(Latency associated transcripts, LATs),进而抑制病毒的复制,使其进入潜伏感染期。在溶源化感染的初期,宿主的PML NBs也是通过这种方式来抑制病毒基因的复制,从而发挥抗病毒作用。除了疱疹病毒,PML NBs对其他DNA病毒,如腺病毒、人乳头瘤状病毒、细小病毒和RNA病毒也具有广泛的抑制作用。

[0004] 与此同时,研究发现疱疹病毒在感染过程中为了克服PML NBs的这种抗病毒作用实现生产性感染和潜伏感染再活化过程,可以通过自身编码蛋白抑制PML NBs的装配和细胞亚定位,破坏其抑制病毒DNA复制的能力,促进病毒的增殖。例如在细胞感染早期,HSV-1早期蛋白ICP0可以在感染后与PML NBs在细胞核内共定位然后破坏其结构,使病毒DNA从PML NBs上脱落。人巨细胞病毒(Humancytomegalovirus, HCMV)进入生产性感染阶段后其编码蛋白IE1可以通过其CORE区域竞争性地结合在PML的Coil-Coil结构域,导致PML蛋白C端去SUMO化修饰,该位点的去SUMO化可以直接阻断PML入核参与PML NBs装配,进而抑制PML NBs的抗病毒活性。EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)编码蛋白BZLF-1通过本身的SUMO化修饰竞争性地抑制PML分子的SUMO化修饰,抑制其入核参与PML NBs的形成,从而使得EBV可以逃避机体的这种抗病毒反应而维持生产性感染。可见不同疱疹病毒感染过程中立即早期蛋白在抑制宿主PML NBs抗病毒活性,维持病毒生产性复制、潜伏-再活化过程中起到了关键作用,但不同疱疹病毒抑制PML NBs装配的分子机制存在较大差异。

[0005] 马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)属于 α 疱疹病毒亚科,具备疱疹

病毒“潜伏-再活化”的感染特性,感染鸡后诱发淋巴细胞增生性肿瘤并伴随严重的免疫抑制。目前,养殖业中普遍使用MDV弱毒活疫苗控制该病。由于感染过程中MDV逃逸宿主天然抗病毒反应的机制尚不明确,接种常规弱毒疫苗后免疫失败时有发生,而且选择压力导致MDV流行株毒力不断增强,为马立克氏病的防控提出了挑战,威胁养鸡业的健康发展。

[0006] 鸡PML以及PML NBs的功能目前尚未有报道,且鸡PML检测方法的缺失导致目前无法开展鸡PML NBs抗病毒反应的研究工作。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是准确检测细胞内鸡PML或鸡PML核体(PML NBs)。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供一种抗鸡PML单克隆抗体,其由保藏编号为CGMCC No. 45710的杂交瘤细胞所分泌。

[0009] 还提供分泌抗鸡PML单克隆抗体的杂交瘤细胞,其保藏编号为CGMCC No. 45710。

[0010] 还提供用于检测鸡PML或鸡PML核体的试剂盒,其包含所述的抗鸡PML单克隆抗体。

[0011] 优选地,所述试剂盒还包含用作二抗的抗小鼠IgG抗体。

[0012] 优选地,所述抗小鼠IgG抗体由荧光基团标记。

[0013] 优选地,所述试剂盒还包含免疫荧光法检测通用试剂。

[0014] 所述的抗鸡PML单克隆抗体在制备用于检测鸡PML或鸡PML核体的产品中的应用也属于本发明的保护范围。

[0015] 所述的抗鸡PML单克隆抗体在检测鸡PML或鸡PML核体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0016] 上述应用中,所述检测优选为免疫荧光法检测。

[0017] 还提供一种检测细胞内鸡PML或鸡PML核体的方法,其包括如下步骤:

(1) 取待测细胞,用多聚甲醛固定;

(2) 去除多聚甲醛,用PBS洗涤细胞后加入表面活性剂进行处理;

(3) 去除表面活性剂,用PBS洗涤细胞后加入BSA封闭液进行封闭;

(4) 去除BSA封闭液,加入所述的抗鸡PML单克隆抗体进行孵育;

(5) 去除抗鸡PML单克隆抗体,用PBST洗涤细胞后加入荧光基团标记的抗小鼠IgG抗体进行孵育;

(6) 去除抗小鼠IgG抗体,用PBST洗涤细胞后加入DAPI染色液进行孵育;

(7) 去除DAPI染色液,用PBST和去离子水依次洗涤细胞,封片后置于激光共聚焦显微镜下观察细胞中荧光的有无和数量。

[0018] 本发明首次克隆了鸡PML基因,截短表达后制备了高纯度蛋白,并利用淋巴细胞杂交瘤技术制备了抗鸡PML单克隆抗体。基于该单克隆抗体,本发明建立了一种全新的检测鸡PML核体(PML NBs)的荧光检测方法。经实验证明,通过该方法可直观检测鸡源细胞中的PML NBs的形态和亚细胞定位(图8-10)。我们的研究结果表明,在鸡胚成纤维细胞中过表达外源性PML后,细胞核中组装的PML NBs比内源性PML NBs的体积更大(图9),马立克氏病病毒(MDV)感染后细胞核内PML NBs数量比未感染细胞显著减少($P < 0.05$),说明MDV感染后会显著抑制细胞中PML NBs的组装(图10)。因此,鸡源细胞内的PML NBs数量可用作检测细胞被MDV感染的指标。

[0019] 综上,本发明提供的抗体和方法可用于检测细胞中内源性和外源性鸡PML核体以及病毒感染后的细胞中的鸡PML核体,为研究鸡PML核体的生物学功能,尤其是抗MDV作用机制,提供了全新的技术支持。此外,本发明证明了MDV感染后会显著抑制细胞中PML NBs的组装,为研究新型MDV防控技术提供了新的方向。

[0020] 本发明提供的杂交瘤细胞已进行专利保藏,保藏信息如下:

生物材料:ChPML

分类命名:杂交瘤细胞株

保藏日期:2023年09月04日

保藏编号:CGMCC No. 45710

保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)

地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所。

附图说明

[0021] 图1为鸡全长PML基因的PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图;图中PML表示鸡全长PML基因。

[0022] 图2为鸡截短PML基因的PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图;图中PMLs表示鸡截短PML基因。

[0023] 图3为His-PML蛋白的SDS-PAGE图;His-PML蛋白为鸡截短PML基因编码的蛋白,带组氨酸标签。

[0024] 图4为抗鸡PML单克隆抗体的SDS-PAGE图。

[0025] 图5为抗鸡PML单克隆抗体与His-PML蛋白和HA-PML蛋白的免疫印迹实验结果;图中His-PML蛋白为鸡截短PML基因编码的蛋白,带组氨酸标签;HA-PML蛋白为鸡全长PML基因编码的蛋白,带HA标签;Anti-Ch-PML表示抗鸡PML单克隆抗体;Anti-HA表示抗HA标签的鼠源单克隆抗体。

[0026] 图6为抗鸡PML单克隆抗体与His-PML蛋白结合的反应曲线。

[0027] 图7为抗鸡PML单克隆抗体的抗原交叉反应性的检测结果。

[0028] 图8为细胞内源性PML NBs的间接免疫荧光检测结果;图中绿色荧光显示CEF细胞中的PML NBs,蓝色荧光显示细胞核;最右边的图是左边两幅图的合并图。

[0029] 图9为细胞外源性PML NBs的间接免疫荧光检测结果;图中绿色荧光显示CEF细胞中的PML NBs,蓝色荧光显示细胞核。最右边的图是左边两幅图的合并图。

[0030] 图10为经MDV感染后细胞PML NBs的间接免疫荧光检测结果。其中,蓝色荧光显示细胞核,绿色荧光显示CEF细胞中的PML NBs,红色荧光显示CEF细胞感染的MDV。

[0031] 图11为感染MDV的CEF细胞与未感染MDV的CEF细胞的细胞内PML NBs数量的对比图。其中CK表示未感染MDV的CEF细胞,MDV表示感染了MDV的CEF细胞,PML NBs/细胞核表示细胞内PML NBs数量与细胞核数量的比值。

具体实施方式

[0032] 下面结合实施例对本发明的技术方案进行详细描述。需要理解的是,以下实施例仅用于解释和说明本发明,而不适用于限制本发明的范围。

[0033] 生物材料

大肠杆菌DH5 α 感受态细胞、Transetta (DE3) 感受态细胞购买自北京全式金生物技术有限公司。

[0034] 8周龄健康的雌性BLAB/c小白鼠购买自北京维通利华实验动物技术有限公司。

[0035] 骨髓瘤细胞 (SP2/0) 为本实验室保存,该细胞亦可购买获得。

[0036] CEF细胞为鸡胚成纤维细胞的原代细胞,为本实验室按照常规方法制备得到。

[0037] DF-1细胞为鸡胚成纤维细胞的细胞系,为本实验室保存。

[0038] 马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 为本实验室保存。该病毒为已知病毒,记载在文献“《Differential replication and cytokine response between vaccine and very virulent Marek's Disease viruses in spleens and bursas during latency and reactivation》Viruses. 2022Dec 20;15(1):6. doi: 10.3390/v15010006.”中。

[0039] 试剂与耗材

RNA Easy Fast动物组织/细胞总RNA提取试剂盒购买自天根生化科技(北京)有限公司,货号DP451。

[0040] FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂盒购买自天根生化科技(北京)有限公司,货号KR118。

[0041] LA Taq酶、Ex Taq酶、pMD18-T连接试剂盒、Solution I连接缓冲液均购买自宝生物(大连)有限公司。

[0042] 限制性内切酶NdeI、XhoI以及T4连接酶购买自纽英伦生物技术(北京)有限公司。

[0043] pCMV-HA载体为哺乳动物表达载体,购买自北京擎科生物技术有限公司。其启动子为CMV,载体标签为N-HA,载体抗性为Ampicillin(氨苄青霉素)。

[0044] pET-21a(+) 载体为大肠杆菌蛋白表达载体,购买自北京擎科生物技术有限公司。其载体标签为N-T7和C-His,载体抗性为Ampicillin(氨苄青霉素)。

[0045] Western及IP细胞裂解液购买自上海碧云天生物科技有限公司,货号P0013。

[0046] 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记的山羊抗鼠IgG购买自Sigma公司,货号12-349。

[0047] DMEM培养基、胎牛血清购买自Gibco公司。

[0048] 聚乙二醇溶液 (PEG 1450) 购买自Sigma公司,货号P5402。

[0049] HAT培养基补充物购买自Sigma公司,货号H0262。

[0050] HT培养基补充物购买自Sigma公司,货号H0137。

[0051] Protein A/G琼脂糖购买自Thermo Fisher公司,货号20424。

[0052] Protein A/G IgG Binding buffer购买自Thermo Fisher公司,货号54200。

[0053] IgG Elution buffer购买自Thermo Fisher公司,货号21004。

[0054] 抗HA标签的鼠源单克隆抗体购买自Sigma-Aldrich公司,货号SAB2702196。

[0055] 山羊抗鼠IgG-FITC购买自Thermo Fisher公司,货号A16085。

[0056] 山羊抗鸡IgG-TRITC购买自Thermo Fisher公司,货号A11042。

[0057] 小鼠单抗亚型鉴定用ELISA试剂盒购买自北京博奥龙免疫技术有限公司。

[0058] 以下实施例中,未特别说明的试剂均为本领域常规试剂,可商购获得或按照本领域

域常规方法配制而得,规格为分析纯级即可;未特别说明的实验方法和条件均为本领域常规实验方法和条件,可参考相关实验手册、公知文献或厂商说明书。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。

[0059] 实施例1.抗鸡PML单克隆抗体的获得

1.抗原的制备

取鸡的肝脏组织并使用匀浆机进行研磨。采用RNA Easy Fast动物组织/细胞总RNA提取试剂盒(TIANGEN)提取鸡的肝脏组织的RNA,并采用FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂盒(TIANGEN)反转录成cDNA。根据GenBank中鸡PML基因的序列(XM_040680515)设计用于扩增鸡PML基因全长核苷酸序列(SEQ ID NO:1)的引物。引物的核苷酸序列如下:

PML-F:5'-ATGCCGGCCAGGAGCCCG-3'(SEQ ID NO:3);

PML-R:5'-TCAGCAGTCTTGCTTGGTCTTC-3'(SEQ ID NO:4)。

[0060] 以上述反转录获得的cDNA为模板,使用引物PML-F和PML-R按照如下PCR体系和程序进行基因扩增。

[0061] PCR体系:LA Taq酶(Takara)1 μ L,dNTP Mixture 8 μ L,10 \times 缓冲液 5 μ L,PML-F和PML-R各2 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 30 μ L。

[0062] PCR程序:98 $^{\circ}$ C 5 min;(95 $^{\circ}$ C 30 sec,60 $^{\circ}$ C 30 sec,72 $^{\circ}$ C 2.5 min)35个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

[0063] 反应结束后,通过琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,结果如图1所示。将PCR产物进行切胶回收后连接到pMD18-T载体中。连接体系:pMD18-T载体1 μ L,目的基因 2 μ L,Solution I 5 μ L,ddH₂O 2 μ L。连接条件:16 $^{\circ}$ C 孵育30 min。

[0064] 通过热激法将连接产物转入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,并将菌落PCR鉴定正确的阳性克隆送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序鉴定,测序结果显示载体构建成功。摇床培养序列正确的阳性克隆并提取质粒,得到的重组质粒命名为pMD18-T-Ch-PML。

[0065] 将鸡PML基因进行截短以用于后续蛋白表达纯化,截短PML基因命名为PMLs,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。设计用于扩增PMLs的引物,引物的核苷酸序列如下:

PMLs-F:5'-CATATGGCTCTGCTGGACGC-3'(SEQ ID NO:5);

PMLs-R:5'-CTCGAGGGCAAAGTCCTCGTG-3'(SEQ ID NO:6)。

[0066] 以重组质粒pMD18-T-Ch-PML为模板,使用引物PMLs-F和PMLs-R按照如下PCR体系和程序进行基因扩增。

[0067] PCR体系:Ex Taq酶(Takara)1 μ L,dNTP Mixture 7 μ L,10 \times 缓冲液 5 μ L,PMLs-F和PMLs-R各2 μ L,pMD18-T-Ch-PML质粒 2 μ L,ddH₂O 31 μ L。

[0068] PCR程序:98 $^{\circ}$ C 5 min;(95 $^{\circ}$ C 30 sec,60 $^{\circ}$ C 30 sec,72 $^{\circ}$ C 45 sec)35个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

[0069] 反应结束后,通过琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,结果如图2所示。将PCR产物进行胶回收,通过酶切和连接反应将PMLs基因导入pET-21a(+)载体中。酶切体系:NdeI(NEB)1 μ L,XhoI(NEB)1 μ L,10 \times 缓冲液 5 μ L,PCR产物 20 μ L或pET-21a(+)载体 1 μ L,ddH₂O补至50 μ L。酶切条件:37 $^{\circ}$ C 孵育4 h。连接体系:T4连接酶(NEB)1 μ L,10 \times 缓冲液 2 μ L,酶切后的PMLs基因片段 7 μ L,pET-21a(+)线性化载体3 μ L,ddH₂O 7 μ L。连接条件:16 $^{\circ}$ C 孵育

过夜。

[0070] 通过热激法将连接产物转入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,并将菌落PCR鉴定正确的阳性克隆送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序鉴定,测序结果显示载体构建成功。摇床培养序列正确的阳性克隆并提取质粒,得到的重组质粒命名为pET-21a-Ch-PMLs。

[0071] 通过热激法将重组质粒pET-21a-Ch-PMLs转入大肠杆菌Transtetta (DE3) 感受态细胞中。经菌落PCR鉴定后,挑选阳性菌落进行小量的蛋白诱导表达。将菌液培养至对数生长期(OD_{600} 值为0.6-0.8),加入IPTG诱导PMLs蛋白的表达。结果显示,pET-21a-Ch-PMLs质粒在Transtetta (DE3) 细胞中表达的蛋白为可溶性蛋白。取阳性菌进行大量的蛋白诱导表达,并通过His镍柱纯化系统进行蛋白纯化,得到His-PML蛋白,用作制备抗鸡PML单克隆抗体的免疫原。His-PML蛋白的SDS-PAGE结果如图3所示。

[0072] 参照上述重组质粒pET-21a-Ch-PMLs的构建方法,将鸡PML全长基因(SEQ ID NO: 1) 导入pCMV-HA载体中,得到的重组质粒命名为pCMV-HA-PML。将DF-1细胞(鸡胚成纤维细胞)按照适当密度铺在12孔细胞培养板中,待细胞完全贴壁后,通过脂质体转染法将重组质粒pCMV-HA-PML转入DF-1细胞,然后置于37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$ 细胞培养箱中培养,24 h后取出细胞,弃细胞上清后用PBS洗涤一遍,轻轻将液体吸净后每孔加入300 μ L含蛋白酶抑制剂的Western及IP细胞裂解液,4 $^{\circ}$ C裂解30 min,将细胞吹下并装入1.5 mL离心管中,4 $^{\circ}$ C、12000 rpm条件下离心15 min,收集上清用于后继Western Blot验证制备抗体对HA-PML蛋白的反应活性。

[0073] 2. 小鼠的免疫

取8周龄健康的雌性BLAB/c小白鼠5只,使用纯化后的His-PML蛋白作为免疫原按照表1所示的小鼠免疫程序进行免疫,首免后两周进行第二次免疫,之后每次免疫时间间隔两周。第四次免疫后一周眼窝静脉采血,收集血清,使用间接ELISA方法测定小鼠血清效价,评价免疫效果,若血清效价合格,细胞融合前三天进行加强免疫。结果显示,小鼠1号的血清效价最高,达到 2.56×10^5 (表2)。

表1 小鼠免疫程序

免疫次数	免疫原	免疫途径	免疫原剂量 (μ g)	佐剂
首免	His-PML 蛋白	颈背部多点皮下注射	100	等体积弗氏完全佐剂
[0074] 二免	His-PML 蛋白	颈背部多点皮下注射	100	等体积弗氏不完全佐剂
三免	His-PML 蛋白	颈背部多点皮下注射	100	等体积弗氏不完全佐剂
四免	His-PML 蛋白	颈背部多点皮下注射	100	等体积弗氏不完全佐剂
加强免疫	His-PML 蛋白	腹腔注射	100	不加佐剂

表2 小鼠血清效价

血清稀释度	小鼠 1 号	小鼠 2 号	小鼠 3 号	小鼠 4 号	小鼠 5 号	阴性血清
1 : 2000	3.432	3.433	3.388	3.377	3.362	0.073
1 : 4000	3.506	3.392	3.240	3.191	3.249	0.063
1 : 8000	3.278	3.215	2.754	2.583	2.740	0.058
[0075] 1 : 16000	3.107	2.653	1.860	1.623	1.801	0.055
1 : 32000	2.229	1.710	1.067	0.947	1.038	0.068
1 : 64000	1.403	0.985	0.569	0.518	0.576	0.056
1 : 128000	0.778	0.522	0.337	0.298	0.313	0.051
1 : 256000	0.421	0.302	0.192	0.183	0.188	0.053

[0076] 3. 间接ELISA方法的建立

间接ELISA方法如下:

1) 用包被液将纯化的His-PML蛋白进行系列倍比稀释(0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$), 然后包被96孔酶标板, 100 $\mu\text{L/孔}$, 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;

包被液为0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液, 配方: 碳酸钠1.59 g, 碳酸氢钠2.93 g, 蒸馏水950 mL, 调pH值到9.6, 定容至1000 mL。

[0077] 2) 使用BIO-RAD洗板机洗涤酶标板, 每孔300 μL PBST, 洗涤5次。

[0078] 3) 加入封闭液(5%脱脂乳), 200 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h。

[0079] 4) 重复步骤2)。

[0080] 5) 阴性血清和阳性血清分别用PBS做适当的稀释(从1:1000开始倍比稀释到1:32000)后作为一抗, 100 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h; 其中阴性血清为未进行免疫的雌性BLAB/c小鼠血清, 阳性血清为使用His-PML蛋白进行免疫的雌性BLAB/c小鼠血清。

[0081] 6) 重复步骤2)。

[0082] 7) 用5%脱脂乳将HRP标记的山羊抗鼠IgG(Sigma)按工作浓度(1:10000)稀释后作为二抗, 100 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。

[0083] 8) 重复步骤2)。

[0084] 9) 每孔加底物显色溶液(Tetramethylbenzidine, TMB)100 μL , 避光显色15 min。

[0085] 10) 每孔加入50 μL 2M H_2SO_4 终止反应, 使用酶标仪测定各孔 OD_{450} 值。

[0086] 采用方阵法确定最佳抗原包被浓度和血清的稀释度。利用上述间接ELISA方法测定各孔 OD_{450} 值及P/N值的结果。如表3所示, 最佳抗原包被浓度为0.5 $\mu\text{g/mL}$, 阳性血清稀释度为1:8000, P/N数值为17.054。

表 3 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定

抗原浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	血清稀释度					
	1 : 1000	1 : 2000	1 : 4000	1 : 8000	1 : 16000	1 : 32000
0.25 (+)	1.692	1.437	0.976	0.649	0.387	0.252
0.25 (-)	0.053	0.049	0.04	0.047	0.047	0.047
P/N	27.113	19.918	13.957	8.223	5.409	3.439
0.50 (+)	2.893	2.650	2.094	1.331	0.785	0.493
[0087] 0.50 (-)	0.062	0.052	0.046	0.046	0.047	0.056
P/N	43.081	40.650	28.935	17.054	10.602	4.982
1.00 (+)	3.266	3.218	2.835	2.049	1.251	0.743
1.00 (-)	0.067	0.056	0.051	0.048	0.052	0.063
P/N	48.391	50.625	40.167	26.326	14.288	6.714
2.00 (+)	3.330	3.217	3.048	2.287	1.479	0.823
2.00 (-)	0.076	0.063	0.055	0.052	0.050	0.054
P/N	42.603	48.381	41.582	28.718	16.450	9.852

[0088] 注: (+) 表示阳性血清, (-) 表示阴性血清。

[0089] 阴性/阳性临界值的确定: 选择未进行免疫的雌性BLAB/c小鼠阴性血清8份, 通过以上建立的间接ELISA方法测定阴性血清的 OD_{450} 值, 并根据公式: 阴阳临界值=阴性样本 OD_{450} 平均值+3 \times 标准差(SD), 计算阴阳临界值。测定结果如表4所示, 计算阴阳临界值=0.077375 +3 \times 0.011275=0.1112。

表 4 阴性/阳性临界值的确定

[0090]	阴性血清							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$OD_{450\text{ nm}}$	0.101	0.076	0.081	0.065	0.076	0.066	0.081	0.073

[0091] 4. 杂交瘤细胞株的获得

1) 骨髓瘤细胞的培养

融合前一周, 复苏骨髓瘤细胞(SP2/0), 使用10%胎牛血清的DMEM培养基进行培养。将细胞扩大培养, 保证融合时细胞处于对数生长期, 状态最佳; 融合当天用移液管将细胞轻轻吹下, 收集于50 mL离心管中, 800 g离心10 min, 弃上清, 用DMEM培养基重悬后计数备用。

[0092] 2) 饲养细胞的制备

将小鼠眼球摘除放血致死, 浸泡于75%的乙醇中10 min进行体表消毒; 将小鼠置于超净工作台中, 固定, 剪开腹部皮肤, 分离皮肤与腹膜, 充分暴露腹壁; 用无菌的剪刀和镊子在腹膜上剪一小口, 用注射器吸取适量的培养基反复冲洗腹腔, 以获取足量的饲养细胞。将

饲养细胞充分混匀后加入96孔细胞培养板中,每孔100 μL ,饲养细胞的量约为 2×10^4 个细胞/孔,置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。在融合前一天准备好饲养细胞,备用。

[0093] 3) 免疫小鼠脾细胞的制备

取His-PML蛋白免疫效价最好的BLAB/c小鼠(小鼠1号),采血致死小鼠,分离阳性血清,留作筛选时的阳性对照;将小鼠浸泡于75%的乙醇中进行体表消毒,置于超净工作台固定。剪开小鼠右侧皮肤,腹膜,可见小鼠脾脏;用灭菌过的剪刀和镊子,无菌取出脾脏,放入含有DMEM培养基的无菌平皿中漂洗几次;将脾脏转入细胞筛中,用研磨器进行研磨同时用DMEM培养基冲洗,反复操作数次,直至脾脏变成透明的薄膜为止;将小鼠脾细胞800 g离心10 min,弃上清,用DMEM培养基重悬后计数备用。

[0094] 4) 细胞融合

分别取 1×10^8 个小鼠脾细胞和 2×10^7 个骨髓瘤细胞加入50 mL离心管中,轻轻混匀,800 g离心10 min;弃上清,将离心管倾倒,尽可能除去剩余液体,用手指轻弹管底,避免细胞贴在管壁上;缓慢向离心管中加入PEG 1450融合剂,约在60 s内加完,静置1 min;沿着离心管壁缓慢滴加1 mL DMEM培养基,约1 min,然后在5 min之内缓慢加入25 mL DMEM培养基,终止PEG 1450融合剂的作用;将融合细胞800 g离心10 min,弃上清,加入40 mL HAT选择培养基悬浮沉淀细胞,将悬浮细胞加入提前培养好的饲养细胞中,每孔100 μL ,置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养;7-10天后更换HT培养基,14-17天后换成正常10%胎牛血清的DMEM培养基。

[0095] 5) 阳性杂交瘤细胞株的筛选

待融合的细胞克隆生长到覆盖细胞板孔底1/2时,用建立的间接ELISA方法对杂交瘤细胞培养孔上清进行检测,将检测为阳性孔的杂交瘤细胞通过有限稀释法进行多次亚克隆,挑选既可以分泌抗体,又是单个细胞团的阳性孔细胞进行扩大培养并冻存。最终得到1株稳定分泌抗鸡PML单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为ChPML。杂交瘤细胞ChPML于2023年09月04日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),其保藏编号为CGMCC No. 45710。

[0096] 5. 单克隆抗体的大量制备

使用体内诱生腹水法进行腹水的制备。选择经产BLAB/c的雌性小鼠,腹腔注射灭菌的液体石蜡油0.5 mL/只;待7天后,取处于对数生长期的ChPML杂交瘤细胞 5×10^5 - 1×10^6 个进行腹腔注射。经7-10天后,可见小鼠腹部明显增大,采集腹水。将小鼠腹水3000 rpm离心10 min,收集上清,- 20°C 保存备用。

[0097] 使用Thermo公司的Protein A/G纯化系统进行单克隆抗体的纯化,操作步骤如下:

1) 先取出纯化柱和所有溶液(Protein A/G IgG Binding buffer和IgG Elution buffer)恢复到室温,另准备1M Tris buffer pH8.0和2%的叠氮化钠。单抗纯化步骤在常温下进行即可;

2) 首次填柱时,加入10 mL填料,即5 mL树脂柱。流穿5倍柱体积Protein A/G IgG Binding buffer。若是第二次纯化,从 4°C 中取出填好的柱子,用水流穿之后,用Protein A/G IgG Binding buffer调零至280 nm读数稳定为止;

3) 取5 mL腹水解冻,加入等体积的DMEM培养基颠倒混匀,再于此混匀液之中加入

等体积的Protein A/G IgG Binding buffer,颠倒混匀后12000 rpm离心10 min,再用0.22 μm 过滤器过滤一遍。全部经过纯化柱流穿一遍,并循环数分钟,待280 nm读数稳定;

4) 15倍柱体积Protein A/G IgG Binding buffer除杂,至280 nm读数稳定;

5) 用5倍柱体积的IgG Elution buffer洗脱抗体,280 nm读数上升稳定后开始接样,并加入适量PBS缓冲液中和pH值,保存洗脱的抗体,进行浓缩;

6) 用12倍柱体积清洗柱子,再使用0.02%叠氮化钠水溶液置换数倍柱体积之后,将柱子和溶液置于4°C保存;

7) 纯化后的抗体使用超滤管进行浓缩,4°C 3000 rpm离心,分次将液体离心完,用PBS进行换液,置换3次。将浓缩的抗鸡PML单克隆抗体进行SDS-PAGE,结果如图4所示,图中的两条带分别为重链及轻链。测定抗体浓度为4.2 mg/mL,分装后保存于-80°C。

[0098] 6. 抗鸡PML单克隆抗体的鉴定及特异性分析

1) 抗鸡PML单克隆抗体效价的测定

按照以上建立的间接ELISA方法,用包被液将His-PML蛋白稀释为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包被96孔酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4°C孵育过夜;使用BIO-RAD洗板机洗涤酶标板,每孔300 μL PBST,洗涤5次;加入封闭液(5%脱脂乳溶液),200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37°C封闭2 h;洗涤,方法同上;用PBS将上述浓缩的抗鸡PML单克隆抗体从1:250开始做2倍倍比稀释,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37°C孵育1 h;洗涤,方法同上;用5%脱脂乳将HRP标记的山羊抗鼠IgG(Sigma)按工作浓度(1:10000)稀释,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37°C孵育1 h;洗涤,方法同上;每孔加TMB 100 μL ,避光显色15 min;每孔加入50 μL 2M H_2SO_4 终止反应,酶标仪测定各孔 OD_{450} 值。

[0099] 结果如表5所示,抗鸡PML单克隆抗体的效价达到 1.28×10^5 。

表5 单克隆抗体的效价

单抗稀释倍数	$OD_{450 \text{ nm}}$		
1 : 250	3.251	3.252	3.253
1 : 500	3.125	3.231	3.173
1 : 1000	3.009	3.058	3.061
1 : 2000	2.872	2.947	2.934
[0100] 1 : 4000	2.504	2.633	2.676
1 : 8000	1.953	2.12	2.029
1 : 16000	1.477	1.479	1.441
1 : 32000	1.057	1.125	1.041
1 : 64000	0.65	0.588	0.626
1 : 128000	0.362	0.355	0.361

[0101] 2) 免疫印迹实验鉴定

将制备的His-PML蛋白和HA-PML蛋白按照常规的方法进行SDS-PAGE;将PAGE胶上的蛋白转到PVDF膜上;用5%脱脂乳封闭PVDF膜2 h;用5%脱脂乳按1:1000倍分别稀释上述浓

缩的抗鸡PML单克隆抗体(4.2 mg/mL)和抗HA标签的鼠源单克隆抗体(Sigma-Aldrich)后作为一抗,孵育2 h;用PBST洗涤5次,每次5 min;用HRP标记的羊抗鼠IgG抗体(Sigma)按1:10000稀释后作为二抗,孵育1 h;洗涤之后显色曝光。

[0102] 结果如图5所示,抗鸡PML单克隆抗体可以与His-PML蛋白和细胞内的HA-PML蛋白进行特异性的结合。

[0103] 3) 亲和力的鉴定

将His-PML蛋白稀释为0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 和2 $\mu\text{g/mL}$,并将抗鸡PML单克隆抗体稀释为4 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.125 $\mu\text{g/mL}$ 、0.0625 $\mu\text{g/mL}$ 、0.03125 $\mu\text{g/mL}$ 和0.0156 $\mu\text{g/mL}$,测定这三种抗原浓度包被以及9种抗体稀释条件下的抗体与抗原结合反应曲线(图6)。三种抗原浓度之比为1:2:4,通过作图法取每种抗原浓度最大 OD_{450} 值一半(即50% OD_{450} 值)处对应的抗体浓度,代入公式 $K_{\text{aff}} = (n-1) / 2(n \text{ Ab}' - \text{Ab})$, $K_{\text{d}} = 1 / K_{\text{aff}}$,计算解离常数,式中的Ab和Ab'分别表示当抗原浓度为Ag和Ag'时产生半数吸光值的抗体浓度(mol/L), $n = \text{Ag} / \text{Ag}'$,然后两两比较,当 $n=2$ 时,可得到2个Kd值,当 $n=4$ 时,可得到1个Kd值,求出三个Kd值的平均数作为最终结果。

[0104] 结果显示,抗鸡PML单克隆抗体与His-PML蛋白相互作用的解离常数 $K_{\text{d}} = 3.89 \text{ nM}$,两者具有高亲和力。

[0105] 4) 抗原交叉反应的鉴定

分别用His-Ch-IFN γ 、His-pp38(马立克氏病病毒,MDV)、His-VP2(鸡传染性法氏囊病病毒,Infectious bursal disease virus,IBDV)、His-Ch-CR2、His-Ch-C3d和His-PML蛋白作为抗原(0.5 $\mu\text{g/mL}$)包被96孔酶标板,用抗鸡PML单克隆抗体作为一抗、HRP标记的羊抗鼠IgG抗体(Sigma)作为二抗进行间接ELISA实验,间接ELISA方法同上。上述His-Ch-IFN γ 、His-pp38(MDV)、His-VP2(IBDV)、His-Ch-CR2、His-Ch-C3d为本实验室按照常规方法制备的带His标签的蛋白。其中Ch-IFN γ 为鸡 γ 干扰素蛋白(GenBank号:NM_205149.2);pp38为MDV特有的一种磷蛋白(GenBank号:S76060.1);VP2为IBDV的衣壳蛋白(GenBank号:MN700903.1);Ch-CR2为鸡补体受体2蛋白(GenBank号:MW054860.1);Ch-C3d为鸡补体3分子的裂解蛋白(GenBank号:EF632299.1)。

[0106] 结果如图7所示,抗鸡PML单克隆抗体与His-Ch-IFN γ 、His-pp38、His-VP2、His-Ch-CR2、His-Ch-C3d等抗原反应的 OD_{450} 值均远小于该抗体与His-PML蛋白反应的 OD_{450} 值及阴阳临界值(0.1112),说明抗鸡PML单克隆抗体与其它抗原无交叉反应,对鸡PML具有很强的特异性。

[0107] 5) 抗体亚型的鉴定

使用小鼠单抗亚型鉴定用ELISA试剂盒,按照试剂盒说明书鉴定抗鸡PML单克隆抗体所属的亚型。结果如表6所示,抗鸡PML单克隆抗体为IgG2b亚型,轻链为Kappa型。

表 6 单克隆抗体亚型的鉴定结果

亚型	Ch-PML	阳性对照	阴性对照
IgG1	0.124	0.124	0.054
IgG2a	0.061	3.209	0.061
IgG2b	2.505	3.214	0.046
IgG3	0.218	3.252	0.049
IgA	0.047	3.237	0.078
IgM	0.137	3.251	0.046
Kappa	2.477	3.235	0.055
Lambda	0.042	3.229	0.046

[0109] 6) 抗体稳定性的鉴定

分别在杂交瘤细胞ChPML冻存1个月和3个月时,从液氮罐中取出冻存的杂交瘤细胞ChPML进行复苏,连续传代后按照建立的间接ELISA方法进行鉴定,检测杂交瘤细胞分泌抗鸡PML单克隆抗体的活性。结果表明:两次复苏杂交瘤细胞株ChPML均能稳定生长,且抗鸡PML单克隆抗体的分泌水平不变,说明杂交瘤细胞株分泌单克隆抗体的活性没有降低,具有良好的稳定性。

[0110] 实施例2.检测细胞内鸡PML NBs的方法的建立

使用间接免疫荧光法检测细胞内鸡PML NBs的表达。

[0111] 检测细胞内源性PML NBs:在24孔细胞培养板中加入DMEM培养基并铺入无菌爬片,将CEF细胞(鸡胚成纤维细胞)以 4×10^5 /孔接种于24孔细胞培养板中,然后置于37℃ 5% CO₂细胞培养箱中培养10 h。

[0112] 检测细胞外源性PML NBs:在24孔细胞培养板中加入DMEM培养基并铺入无菌爬片,将CEF细胞以 4×10^5 /孔接种于24孔细胞培养板中,用实施例1中制备的重组质粒pCMV-HA-PML通过脂质体转染法转染CEF细胞,然后置于37℃ 5% CO₂细胞培养箱中培养48小时。

[0113] 检测马立克氏病病毒(MDV)感染后细胞内的PML NBs:在24孔细胞培养板中加入DMEM培养基并铺入无菌爬片,将CEF细胞以 4×10^5 /孔接种于24孔细胞培养板中,用MDV感染CEF细胞,然后置于37℃ 5% CO₂细胞培养箱中培养5天。

[0114] 用PBS洗涤细胞一次;轻轻吸弃PBS,每孔加入300 μL 4℃预冷的4%多聚甲醛,室温固定10 min;吸弃多聚甲醛,用PBS洗涤3次,每次5 min;加入0.1% Triton X-100,室温放置10 min;用PBS洗涤3次,每次5 min;加入5% BSA溶液,室温封闭2 h后弃封闭液;用5% BSA溶液分别按1:500稀释上述浓缩的抗鸡PML单克隆抗体、按1:200稀释鸡抗MDV血清(本实验室按照常规方法使用MDV感染鸡后制备得到的抗血清)后作为一抗,每孔加入300 μL,室温孵育2 h;用PBST洗涤5次,每次5 min;用5% BSA按1:100分别稀释山羊抗鼠IgG-FITC(Thermo Fisher)和山羊抗鸡IgG-TRITC(Thermo Fisher)后作为二抗,每孔加入300 μL,避光,室温孵育1 h;用PBST洗涤5次,每次5 min;加入DAPI染色液,室温孵育2 min;用PBST洗涤3次,每次5 min,最后用去离子水洗涤一次;滴5-10 μL防淬灭剂于载玻片上,取出爬片,将生长有细胞的一面向下置于滴有防淬灭剂的载玻片上,滴加封片剂进行封片,晾干后置于激光共

聚焦显微镜下观察并拍照。

[0115] 细胞内源性PML-NBs的检测结果如图8所示,抗鸡PML单克隆抗体可以和细胞内源性的PML NBs产生特异性的反应,产生较强的荧光,而阴性血清对照则无荧光产生。

[0116] 细胞外源性PML-NBs的检测结果如图9所示,抗鸡PML单克隆抗体可以和细胞外源性表达的PML NBs进行特异性的反应,产生较强的荧光,并且比细胞内源性的PML NBs的形态稍大。

[0117] MDV感染CEF细胞后核内的PML NBs的检测结果如图10和图11所示,抗鸡PML单克隆抗体可以和细胞内的PML NBs产生特异性反应,发出较强的荧光,并且感染了MDV的CEF细胞(具有红色荧光的细胞)内的PML NBs数量与未感染MDV的细胞(不具有红色荧光的细胞)内的PML NBs数量相比明显减少($P < 0.001$),表明MDV感染可以抑制细胞核内PML NBs的组装。

[0118] 因此,本发明的抗鸡PML单克隆抗体可用于免疫荧光法检测鸡细胞内PML NBs的表达。

[0119] 实施例3.用于检测鸡PML或鸡PML核体的试剂盒的制备

1. 试剂盒的制备

培养保藏编号为CGMCC No. 45710的杂交瘤细胞,使用体内诱生腹水法进行腹水的制备并纯化得到抗鸡PML单克隆抗体。将抗鸡PML单克隆抗体装入试剂盒中并在试剂盒外壳上贴上试剂盒标签。该试剂盒中还可以装入荧光基团标记的抗小鼠IgG抗体和免疫荧光法检测通用试剂。

[0120] 2. 检测细胞内鸡PML或鸡PML核体的方法

- 1) 取铺有细胞爬片并且其上培养着待测细胞的细胞培养板,用PBS洗涤细胞1次;
- 2) 轻轻吸弃PBS,每孔加入300 μL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的4%多聚甲醛,室温固定10 min;
- 3) 吸弃多聚甲醛,用PBS洗涤3次,每次5 min;
- 4) 加入0.1% Triton X-100,室温放置10 min;
- 5) 去除Triton X-100,用PBS洗涤3次,每次5 min;
- 6) 加入封闭液(5% BSA),室温封闭2 h;
- 7) 去除封闭液,用5% BSA按1:500稀释抗鸡PML单克隆抗体后作为一抗,每孔加入300 μL ,室温孵育2 h;
- 8) 去除一抗,用PBST洗涤5次,每次5 min;
- 9) 用5% BSA按1:100稀释山羊抗鼠IgG-FITC(Thermo Fisher)后作为二抗,每孔加入300 μL ,避光,室温孵育1 h;
- 10) 去除二抗,用PBST洗涤5次,每次5 min;
- 11) 加入DAPI染色液,室温孵育2 min;
- 12) 去除DAPI染色液,用PBST洗涤3次,每次5 min,最后用去离子水洗涤一次;
- 13) 滴5-10 μL 防淬灭剂于载玻片上,取出爬片,将生长有细胞的一面向下置于滴有防淬灭剂的载玻片上,滴加封片剂进行封片,晾干后置于激光共聚焦显微镜下观察。

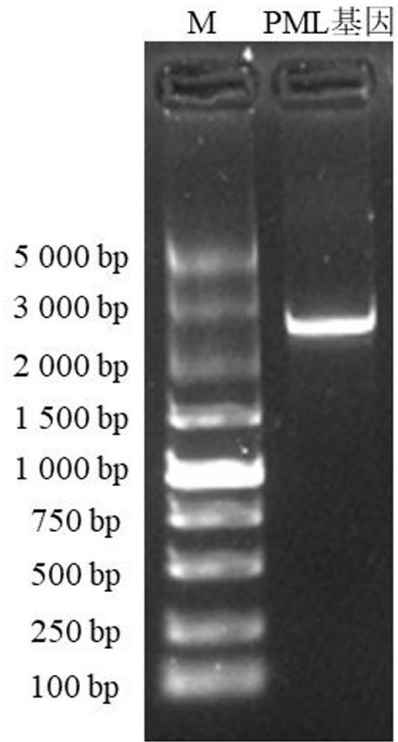


图 1

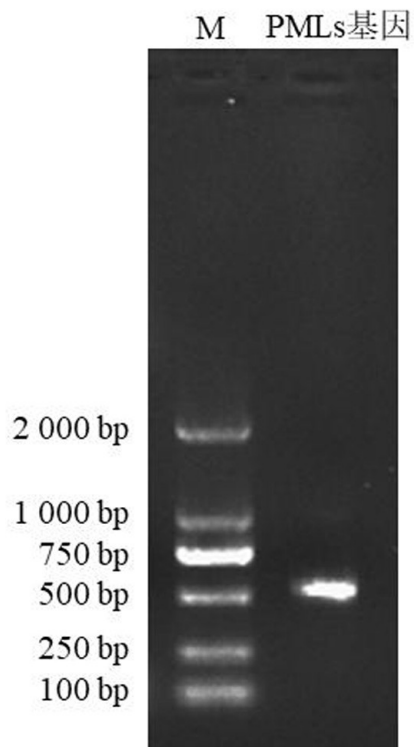


图 2

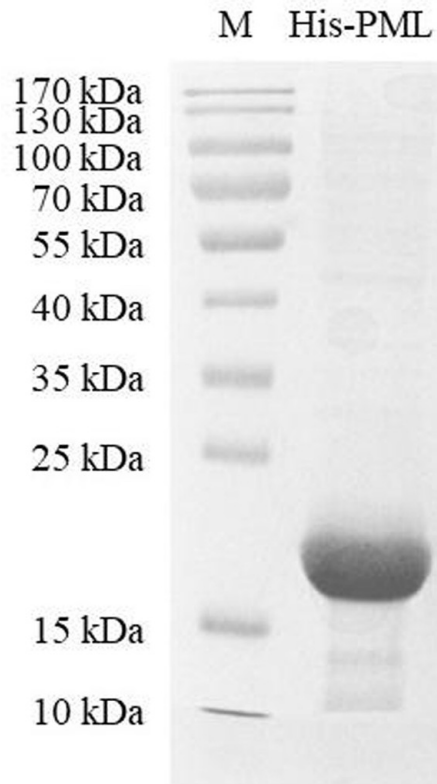


图 3

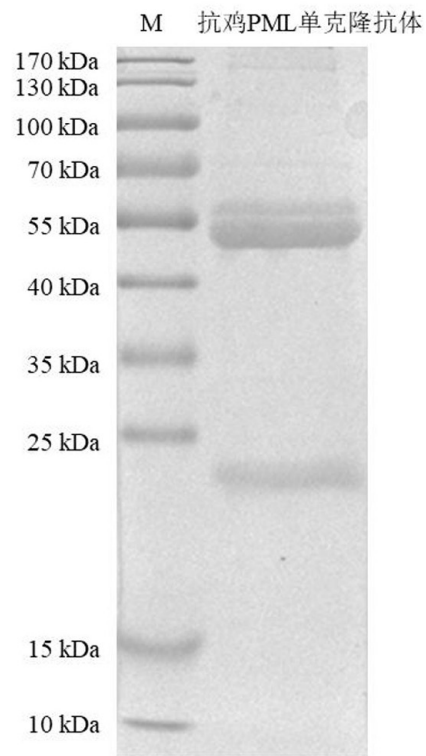


图 4

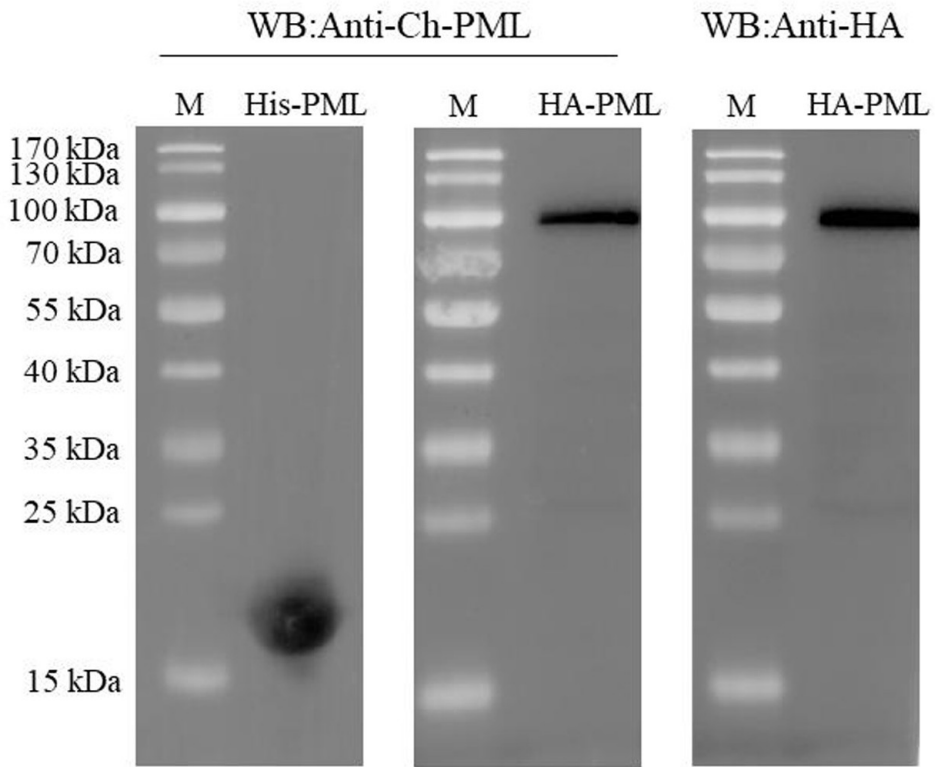


图 5

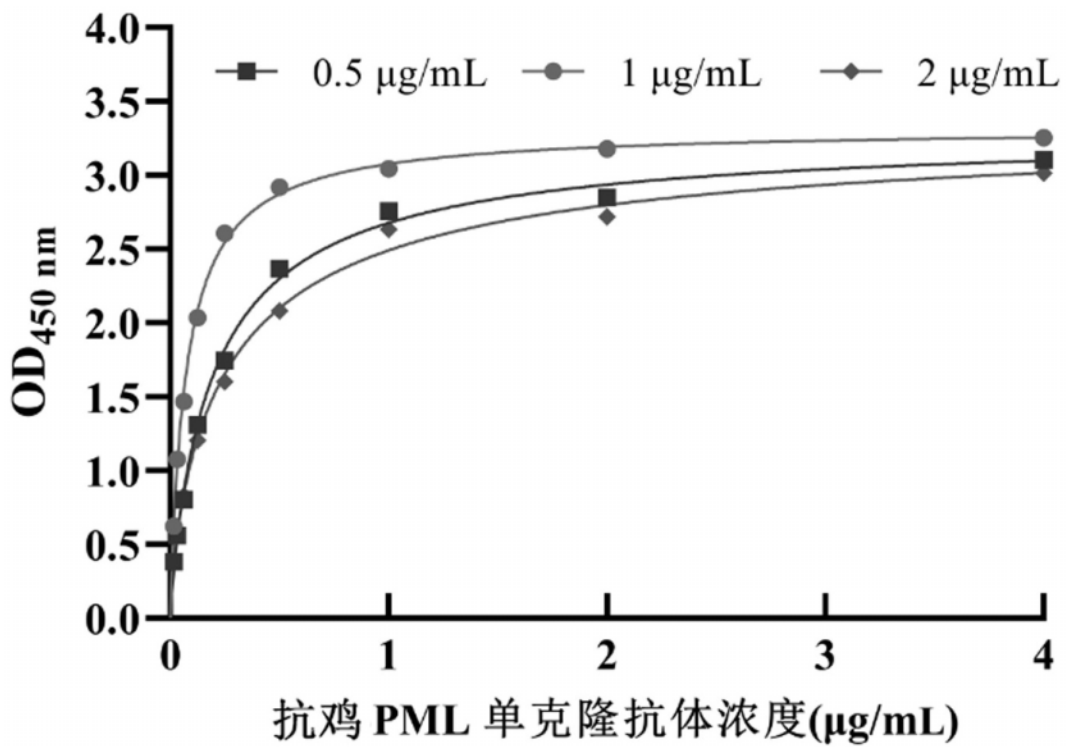


图 6

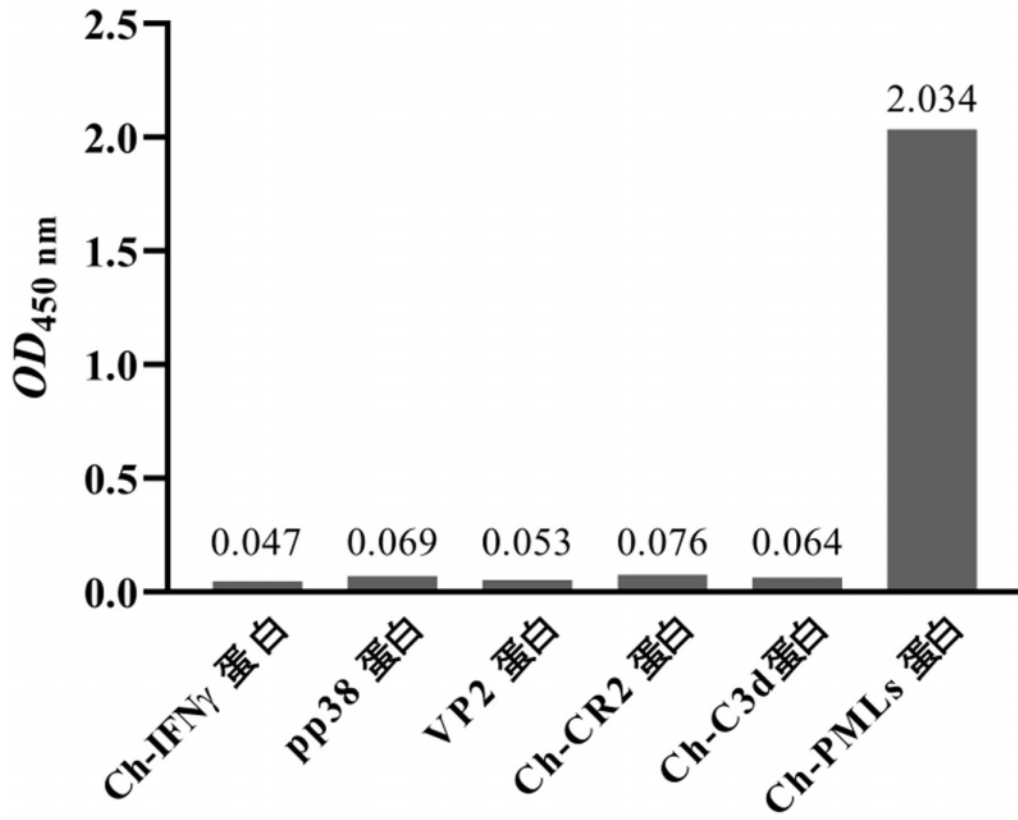


图 7

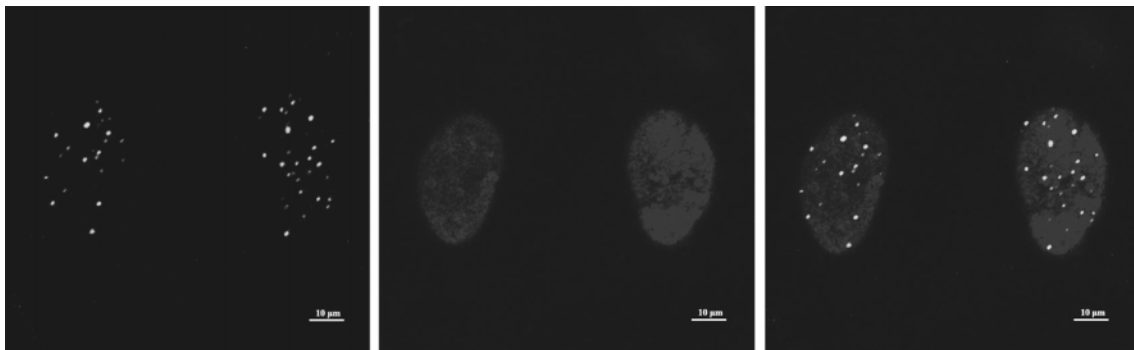


图 8



图 9

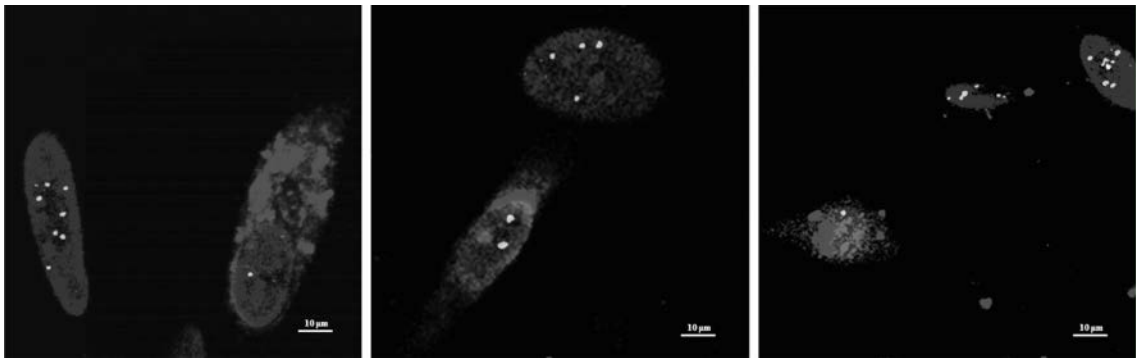


图 10

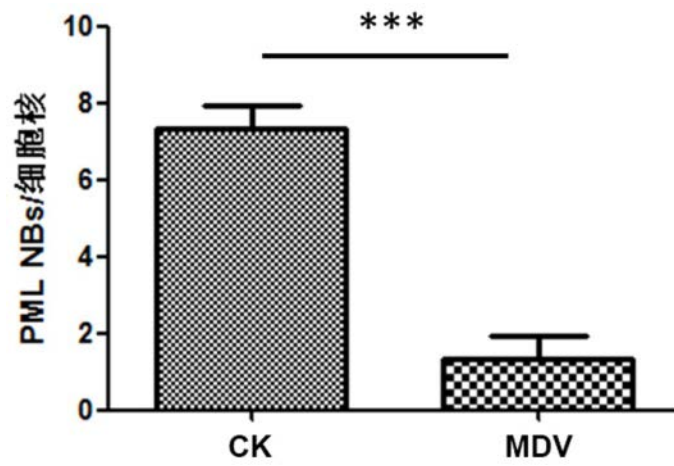


图 11