

# 类圆环病毒 P1 VP1 蛋白单克隆抗体的制备及应用

王凤芝<sup>1</sup>, 温立斌<sup>2</sup>, 姚火春<sup>1</sup>, 何孔旺<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院 兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术中心, 江苏 南京 210014)

**摘要:**为了筛选 P1 病毒 VP1 蛋白的特异性单抗, 通过生物信息学软件预测其抗原表位, 然后利用 SEAL<sup>TM</sup> 方法制备针对不同抗原表位的单抗, 再通过免疫组化试验和 Western Blot 对其中 6 株进行分析, 筛选敏感性强、特异性好的单抗。结果显示, 选取的 6 株单抗中有 3 株(mAb1、mAb6 和 mAb9)在免疫组化染色时呈阳性反应, 有 1 株(mAb1)在 Western Blot 中表现强阳性。研究筛选出了 P1 VP1 蛋白的特异性单抗, 为 P1 病毒的检测和疫苗研究奠定了基础。

**关键词:** P1; 单克隆抗体; 免疫组化; Western blot

**中图分类号:** S432.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)03-0101-04

## Preparation and Application of the Monoclonal Antibodies for VP1 Protein of Porcine Circovirus-like Virus P1

WANG Feng-zhi<sup>1</sup>, WEN Li-bin<sup>2</sup>, YAO Huo-chun<sup>1</sup>, HE Kong-wang<sup>2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To select specific mAbs for VP1 protein of P1 virus, epitopes of it were predicted by bioinformatics software, and then mAbs against different epitopes were prepared by the method of SEAL<sup>TM</sup> and applied to immunohistochemistry and Western Blot analysis, respectively, for screening sensitive and specific mAbs. Results showed that there were three positive mAbs (mAb1, mAb6 and mAb9) in immunohistochemical staining and one mAb (mAb1) showed strong hyacinthine in Western Blot. In a nutshell, specific mAbs were screened for VP1 protein of P1 virus, which will contribute to the detection of P1 and its vaccine development.

**Key words:** P1; mAb; Immunohistochemistry; Western blot

猪断奶后多系统衰竭综合征 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 于 1991 年首发于加拿大, 随后世界各地陆续报道, 目前已在全球范围内广泛流行。该病主要发生于 5~12 周龄断奶仔猪, 临床可见进行性消瘦, 呼吸系统疾病等症状, 并可导致患猪免疫抑制<sup>[1-2]</sup>, 给养猪生产造成了严重危害。当前认为该病主要由猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 引起, 但单纯的 PCV2 感染动物很难复制出 PMWS 的典型临床症状<sup>[3-5]</sup>, 江苏省农业科学院兽医所人兽共患病防控研究室在临床诊断 PMWS 过程中, 从患猪血清中分离到一株类圆环病毒 P1。与 PCV2 类似, P1 病毒无囊膜, 具

有环状、单股、负链 DNA 基因组<sup>[6]</sup>, 全长为 648 个核苷酸, 部分与 PCV2 ORF2 高度同源。通过构建 P1 单拷贝和双拷贝串联分子克隆, 进一步研究其生物学特性。结果表明, 只有双拷贝串联分子克隆可在转染的 PK-15 细胞中形成包涵体, 导致转染细胞凋亡; 另外, 还能够使感染动物出现类似 PMWS 的症状, 表现为部分感染猪出现消瘦、皮肤苍白、病毒血症等现象, 并且免疫器官细胞发生凋亡, 以及部分组织中存在病毒核酸<sup>[6-10]</sup>。此外, P1 病毒感染对猪红细胞、外周血 T 淋巴细胞含量和增殖活性、外周血单核细胞中细胞因子 mRNA 转录及外周血单个核细胞抗病毒蛋白 mRNA 转录都有一定的影

收稿日期: 2014-03-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272574; 30972184)

作者简介: 王凤芝 (1987-), 女, 山东曹县人, 硕士, 主要从事兽医微生物学与免疫学研究。

通讯作者: 温立斌 (1967-), 男, 河北宣化人, 研究员, 博士, 主要从事类圆环病毒的研究。

姚火春 (1963-), 男, 浙江湖州人, 教授, 博士, 主要从事动物疫病病原学及免疫学方面的研究。

响<sup>[11-14]</sup>。另外,研究发现自然感染仔猪体内 P1 病毒分布在仔猪的心、肝、肺、胰脏、脑和膀胱等组织,病毒载量以胰脏、脑和膀胱最高<sup>[15]</sup>。在江苏省 6 个市进行的流行病学调查结果显示,P1 病毒感染在江苏省流行率较高(19%,47/248),而且 10~30 日龄仔猪易感性较高<sup>[16-17]</sup>。因此,P1 有可能成为影响我国养猪业健康发展的又一潜在威胁。

通过 DNAMAN 等生物信息学软件分析,P1 有 3 个开放阅读框(Open reading frame, ORF),其中,ORF1(nt 154~498)编码的蛋白与 PCV2 衣壳蛋白相似度较高,推测可能为 P1 病毒的衣壳蛋白。在先期预测 P1 VP1 蛋白抗原表位<sup>[18]</sup>的基础上,制备多株针对 P1 VP1 蛋白特异性抗原表位的单克隆抗体(Monoclonal antibody, mAb),并分别应用于 Western Blot 和免疫组化试验中,以进一步对 P1 病毒进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 分子克隆、细胞及主要试剂

P1 双拷贝串联分子克隆<sup>[8]</sup>和重组质粒 pET-32a-P1 ORF1<sup>[19]</sup>的构建、保存及无 PCV1、PCV2、支原体和反转录病毒污染的 PK-15 均细胞由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病防控研究室完成传代、保存;SV0001-小鼠 IgG 两步法免疫组化检测试剂盒、AEC 显色试剂盒、蓝色 DAB 显色试剂盒及 HRP-羊抗小鼠 IgG 均购自武汉博士德生物工程有限公司;Lipofectamine™2000 转染试剂盒为 Invitrogen 产品;免疫染色固定液为 Beyotime 产品。

### 1.2 主要仪器与设备

Mini-PROTEAN® Tetra System 为 BIO-RAD 公司产品;Pyxis™ Gel Processor 为南京思普金生物科技有限公司产品。

### 1.3 P1 病毒 VP1 蛋白单克隆抗体的制备

根据前期对 P1 病毒 VP1 蛋白二级结构及 B 细胞表位的预测,选取抗原指数较高的区段,由 Abmart 公司应用表面抗原表位抗体库(Surface Epitope Antibody Library, SEAL™)方法制备单克隆抗体。

### 1.4 免疫组化

1.4.1 转染 将 PK-15 细胞传代至 24 孔细胞培养板,待细胞密度达 90%~95% 融合时,用无血清的 DMEM 培养液漂洗,按照 Lipofectamine™2000 转染试剂盒说明书操作,加入用 OPTI-MEM I Medium 稀释的 P1 双拷贝串联分子克隆和 Lipofectamine™2000 脂质体复合物。在 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养 5 h 后,更换含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养液,继续培养 72 h,用于观察和检测。同时设未转染的 PK-

15 细胞作对照。

1.4.2 免疫组化染色 按厂家提供的使用说明进行,大体步骤如下:用 PBS 洗涤细胞 1 次,加入免疫染色固定液室温固定 20 min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 份 + 纯甲醇 4 份混匀,室温孵育 30 min,以灭活内源性酶。蒸馏水洗 2 次;滴加封闭液,室温放置 10 min。甩去多余液体,不洗;滴加适当稀释的单抗,37℃ 孵育 1 h。0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 2 min;滴加聚合 HRP 标记羊抗小鼠 IgG,37℃ 孵育 30 min,TBS 冲洗 4 次,每次 5 min;按 1 mL 蒸馏水滴加 AEC 显色剂 A、B 各 1 滴,混匀,加至每孔;避光显色 10~30 min,蒸馏水充分冲洗,镜检。

### 1.5 Western Blot

1.5.1 P1 VP1 蛋白的原核表达 应用重组质粒 pET-32a-P1 ORF1,参考文献[20]中建立的方法,原核表达 P1 VP1 蛋白。具体过程如下:将重组质粒 pET-32a-P1 ORF1 转化 *E. coli* BL21(DE3) pLys,涂平板 37℃ 培养过夜;挑取单菌落加入含氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)的 LB 液体培养基中,37℃ 摇菌过夜;取适量菌液按 1% 比例加入新鲜的含 Amp 的 LB 液体培养基中,37℃ 摇床培养 1.5 h(OD<sub>600</sub> 值为 0.4~0.6);取出 1 mL 菌液做阴性对照,向剩余菌液中加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,20℃ 诱导表达 12 h;收集菌液,室温 5 000 r/min 离心 5 min,收集菌体;按 40 μL/mL 菌液高压过的去离子水重悬菌体沉淀,加入 5× 上样缓冲液 10 μL,100℃ 煮沸 10 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,取上清做 12% SDS-PAGE;电泳结束后,用考马斯亮蓝进行染色。

1.5.2 Western Blot 分析 将诱导表达的菌液经上述处理后进行 12% SDS-PAGE,电泳结束后用 Pyxis™ Gel Processor 快速转印系统进行转印,具体方法按照仪器操作说明进行,转印时间设为 11 min。

将转印完毕的 PVDF 膜在 TBST 中漂洗一下,用 4% 脱脂奶粉进行 4℃ 过夜封闭;TBST 洗膜 5 min,共洗 3 次;将膜浸在 1:200 稀释的 P1 ORF1 单克隆抗体中,平放于摇床上室温孵育 2 h;TBST 洗膜 5 min×3 次;将膜放入 1:3 000 稀释的 HRP-羊抗小鼠 IgG 中,平放于摇床上,室温作用 2 h;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入蓝色 DAB 显色液,观察结果。同时设置 pET-32a 空载体诱导表达产物作为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 单克隆抗体的制备

Abmart 所制备的 11 株单克隆抗体效价均为

1:100 000,其对应抗原表位的氨基酸序列如表 1。从表中可知,mAb1 和 mAb2,mAb3 和 mAb4,mAb5 和 mAb8,mAb9、mAb10 和 mAb11 分别针对相同的抗原表位,所以在后续试验中,针对同一抗原表位的单抗只选做其中一株,即选取 mAb1、mAb3、mAb5、mAb6、mAb7 和 mAb9 进行免疫组化和 Western blot。

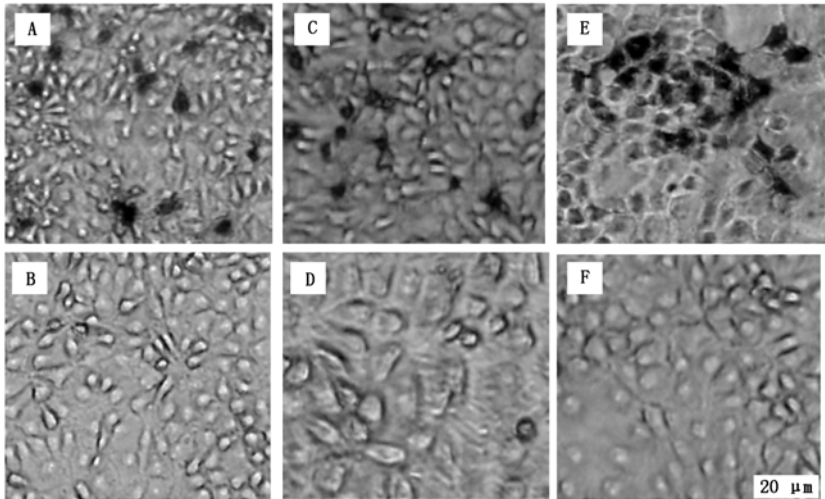
2.2 免疫组化染色

P1 双拷贝串联分子克隆转染 PK-15 细胞后,用已制备的单抗进行免疫组化试验,AEC 显色结果表明,选取的 6 株单抗中有 3 株(mAb1、mAb6 和 mAb9)能与 P1 蛋白发生特异性显色反应,表现为在转染 P1 双拷贝串联分子克隆的细胞中出现红色反应,而对照细胞中未出现颜色反应(图 1),另外 3 株(mAb3、mAb5 和 mAb7)染色呈阴性。

表 1 11 株单抗对应抗原表位的氨基酸序列

Tab.1 Amino acids sequence of the corresponding epitopes of the 11 mAbs

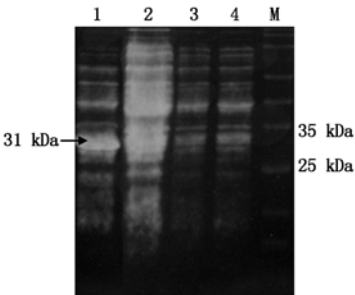
单抗编号 Number	氨基酸序列 Amino acids sequence
mAb1	TTPPAIQSPNPS
mAb2	TTPPAIQSPNPS
mAb3	SPTTPVTSHPNL
mAb4	SPTTPVTSHPNL
mAb5	TTPPAIQSPNPS
mAb6	SPTTPVTSHPNL
mAb7	DDFVPPEGGTNK
MAb8	TTPPAIQSPNPS
MAb9	PYVTTTPPAIQSP
mAb10	PYVTTTPPAIQSP
mAb11	PYVTTTPPAIQSP



A,B. mAb1 及其阴性对照; C,D. mAb6 及其阴性对照;E,F. mAb9 及其阴性对照。  
A,B. mAb1 and its negative control; C,D. mAb6 and its negative control; E,F. mAb9 and its negative control.

图 1 三株阳性单抗的免疫组化结果

Fig.1 The immunohistochemical staining results of three positive mAbs



1. 重组质粒 pET-32a-P1 ORF1 的诱导表达产物;2. 未加诱导剂的重组质粒 pET-32a-P1 ORF1 的表达;3. 诱导前样本;4. pET-32a 空载体的诱导表达;M. Marker。  
1. The expressed production of recombinant plasmid pET-32a-P1 ORF1 with IPTG;2. The expressed production of recombinant plasmid pET-32a-P1 ORF1 without IPTG;3. The sample before IPTG addition;4. The expressed production of the pET-32a;M. Marker.

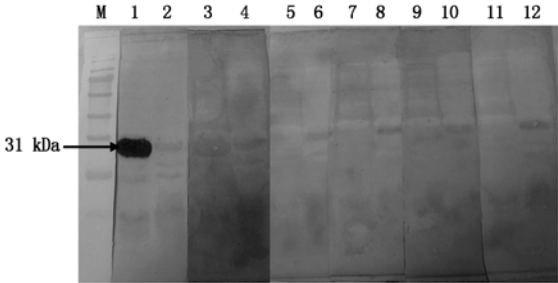
图 2 P1 VP1 蛋白的原核表达

Fig.2 The prokaryotic expression of VP1 protein of P1

2.3 Western Blot 分析

2.3.1 P1 VP1 蛋白的原核表达 通过 IPTG 诱导重组质粒 pET-32a-P1 ORF1 表达,经 SDS-PAGE 后,

进行考马斯亮蓝染色显示,该融合蛋白得到很好地表达,表达量较高(图 2)。



M. Marker;1. 2. mAb<sub>1</sub>;3. 4. mAb<sub>6</sub>;5. 6. mAb<sub>7</sub>;7. 8. mAb<sub>9</sub>;9. 10. mAb<sub>3</sub>;11. 12. mAb<sub>5</sub>;2. 4. 5. 7. 9. 11. pET-32a 空载体诱导表达产物。  
M. Marker;1. 2. mAb<sub>1</sub>;3. 4. mAb<sub>6</sub>;5. 6. mAb<sub>7</sub>;7. 8. mAb<sub>9</sub>;9. 10. mAb<sub>3</sub>;11. 12. mAb<sub>5</sub>;2. 4. 5. 7. 9. 11. Expression products of pET-32a.

图 3 单抗 Western blot 结果

Fig.3 The Western blot results of the mAbs

2.3.2 Western Blot 选取 6 株单抗分别进行 Western blot,蓝色 DAB 染色结果显示,有 1 株(mAb1)呈鲜艳的紫蓝色,即表现强阳性,其他单抗

则染色较弱,甚至呈阴性(图3)。

### 3 讨论

由于 mAb 生产程序复杂而且成本高,传统方法通常采用单一抗原、单一免疫方法、单一融合及有限的克隆筛选,这样很可能不会产生任何有用的抗体。而且,这种方式生产的抗体多样性通常受到限制,在流式细胞术和免疫沉淀反应等高效应用或表达膜受体等难表达蛋白时,很可能失败。本研究中制备单抗应用的 SEAL™ 法是一种新型的“文库”方法,它通过在单抗生产的关键步骤中设置冗余步骤来确保产生针对所有靶位点的抗体。与传统方法相比,其生产单一抗原抗体的成功率提高了 10 倍,生产多抗原抗体的成功率提高了 100 倍,大大拓宽了单抗在生产实践中的应用。

随着生物信息技术的发展,根据蛋白质的氨基酸序列预测其二级结构,并通过一系列分析预测其抗原表位的方法已广泛应用于生产实践。但是 B 细胞抗原表位,特别是其构象表位,主要是通过三维结构来体现其抗原性,所以利用这种方法预测的抗原表位指数较高的区段,还得通过试验来验证其到底是不是真正的抗原表位。由于多肽在形成衣壳蛋白时会发生构象变化,外层的氨基酸残基可能会屏蔽某些抗原指数较高的区段,此外有些区段为疏水性氨基酸。因此,尽管有些区段的抗原指数较高,但是并不一定能成为优势抗原表位。而免疫组化和 Western blot 是目前检测蛋白中应用比较多的、可信度相对较高的方法。本研究在先期预测的基础上,制备 11 株针对 P1 VP1 不同抗原表位的单克隆抗体,然后分别应用免疫组化试验和 Western blot 进行分析。结果显示,这 2 种方法检测得到的阳性单抗并不完全一致,在免疫组化试验检测的 3 株阳性单抗(mAb1、mAb6 和 mAb9)中,只有 mAb1 同样在 Western blot 方法中也呈强阳性,说明同一株单抗在不同方法中的应用效率并不完全相同。所以,制备单抗前,充分考虑好其后续应用也是至关重要的。

同时,应用制备的单抗与 PCV2 进行免疫组化试验及 Western blot 分析,结果均呈阴性(资料未显示);另外,还做了 mAb1 1:500 倍稀释的 Western blot 分析,结果仍呈强阳性显色(资料未显示),说明本次筛选的单抗具有良好的特异性和敏感性。

综上所述,本研究在前期预测的基础上,采用 SEAL™ 方法制备针对 P1 VP1 蛋白不同抗原表位的单抗,然后应用免疫组化和 Western blot,分别筛选出 3 株适合应用于免疫组化试验,1 株适合应用于

Western blot 分析的单抗,为 P1 病毒的检测和疫苗研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Segalés J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases[J]. Anim Health Res Rev, 2005, 6(2): 119–142.
- [2] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(5): 41–43.
- [3] Fenaux M, Halbur P G, Haqshenas G, et al. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions [J]. Journal of Virology, 2002, 76(2): 541–551.
- [4] Muhling J, Raye W S, Buddle J R, et al. Genetic characterisation of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2 [J]. Australian Veterinary Journal, 2006, 84(12): 421–425, 416.
- [5] Raye W, Muhling J, Warfe L, et al. The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd [J]. Australian Veterinary Journal, 2005, 83(5): 300–304.
- [6] 温立斌, 何孔旺, 倪艳秀, 等. 类猪圆环病毒因子 P<sub>1</sub> 核酸链型和极性的研究 [J]. 华北农学报, 2012, 27(3): 120–122.
- [7] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. P1 因子分子克隆的体外感染性分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7): 941–944.
- [8] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 和 P2 诱导 PK-15 细胞凋亡的研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 84–86.
- [9] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 与 P2 株全长基因组 DNA 分子克隆的构建 [J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 579–582.
- [10] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. TUNEL 法检测类猪圆环病毒 2 型因子 P1 诱导猪免疫器官细胞凋亡的研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(22): 88–91.
- [11] Wen L, He K, Xiao Q, et al. A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e41565.
- [12] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 感染对猪红细胞的影响 [J]. 内蒙古农业科技, 2009(2): 46–48.
- [13] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类圆环病毒因子 P1 感染对猪外周血 T 淋巴细胞含量和增殖活性的影响 [J]. 华北农学报, 2009, 24(Z1): 1–4.
- [14] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类圆环病毒因子 P1 感染对猪外周血单核细胞中细胞因子 mRNA 转录的影响 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27(5): 1157–1159.
- [15] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类圆环病毒因子 P1 感染对猪外周血单个核细胞抗病毒蛋白 mRNA 转录的影响 [J]. 华北农学报, 2010, 25(Z1): 7–11.
- [16] 温立斌, 王小敏, 周俊明, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 在自然感染仔猪体内的组织分布 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33(1): 1–3.
- [17] Wen L, He K, Yang H, et al. Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu, China [J]. Virol J, 2011, 8(8): 543.
- [18] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 一株类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定与分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 411–416.
- [19] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 VP2 蛋白二级结构与 B 细胞表位预测 [J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 45–49.
- [20] 郝洪平. 类圆环病毒 P1 因子 ORF2 蛋白的原核表达及其单克隆抗体的制备和鉴定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.