



研究报告

血清 2 型鸭疫里默氏杆菌脂多糖单克隆抗体的研制及特性鉴定

张雪梅^{1,2} 王小兰² 任晓梅² 陈宗超² 王桂军^{*1} 于圣青^{*2}

1 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

2 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

摘要:【背景】鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)可感染雏鸭、鹅、火鸡等多种禽类,引起急性或慢性传染病。RA 血清型众多且各血清型之间缺乏有效的交叉保护。细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)位于革兰氏阴性菌细胞壁的外侧,其组成和结构变化决定了细菌表面抗原决定簇的多样性。【目的】制备血清 2 型鸭疫里默氏杆菌 LPS 单克隆抗体并对其特性进行研究。【方法】以血清 2 型 RANJ3 株免疫 BALB/c 小鼠,细胞融合后以 RANJ3 株 LPS 作为包被抗原,筛选出能够稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,通过体内诱生腹水法制备抗体,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测单克隆抗体效价,玻片凝集试验和 Western blot 检测单抗特异性。【结果】获得两株能稳定分泌抗血清 2 型鸭疫里默氏杆菌 LPS 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 8G5 和 8G10;两株单抗的亚型均为 IgM/ κ 链。ELISA 结果表明,8G5 和 8G10 腹水效价分别为 1:32 000 和 1:16 000。Western blot 结果显示,两株单抗仅与血清 2 型 RA 菌株发生特异性反应,而与其他血清型 RA 菌株和禽源致病菌无反应性。【结论】研究获得的单克隆抗体具有良好的反应性和血清型特异性,可用于 RA 致病机制的基础研究和进一步建立 RA 血清型快速检测方法。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌, 单克隆抗体, 免疫学特性, 脂多糖

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500805); National Natural Science Foundation of China (31602069); China Postdoctoral Science Foundation (2016M600153)

***Corresponding authors:** WANG Gui-Jun: E-mail: wangguijun@ahau.edu.cn

YU Sheng-Qing: Tel: 86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: 13-02-2018; **Accepted:** 11-04-2018; **Published online:** 29-05-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500805); 国家自然科学基金(31602069); 中国博士后科学基金(2016M600153)

***通信作者:** 王桂军: E-mail: wangguijun@ahau.edu.cn

于圣青: Tel: 021-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

收稿日期: 2018-02-13; 接受日期: 2018-04-11; 网络首发日期: 2018-05-29

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against lipopolysaccharide from *Riemerella anatipestifer* serotype 2 strain

ZHANG Xue-Mei^{1,2} WANG Xiao-Lan² REN Xiao-Mei² CHEN Zong-Chao²
WANG Gui-Jun^{*1} YU Sheng-Qing^{*2}

1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: [Background] *Riemerella anatipestifer* causes septicemic and exudative diseases of domestic ducks, geese and turkeys, leading to economically devastating to poultry industries. A total of 21 serotypes of *R. anatipestifer* have been identified. Moreover, there is poor cross-protection among these serotypes. Lipopolysaccharide is the important component of outer membrane of Gram-negative bacteria, and provides the diversity of bacterial surface antigen determinants. [Objective] To prepare and characterize monoclonal antibodies (McAbs) against lipopolysaccharide of *R. anatipestifer* serotype 2 strain. [Methods] BALB/c mice were immunized with inactivated *R. anatipestifer* serotype 2 strain NJ3. Spleen cells from immunized mice were fused with murine myeloma SP2/0 cells. The hybridoma cell line that stably secret McAb against LPS of *R. anatipestifer* serotype 2 strain, was obtained through clone selection and screening by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mouse ascites was prepared and identified by Western blot analysis and ELISA. The specificity of these McAbs was tested by slide agglutination assay and Western blot. [Results] We successfully obtained 2 hybridoma cell lines named 8G5 and 8G10 that could stably produce anti-LPS McAbs. The isotype of both McAbs was identified as IgM with κ light chain. The titers of 8G5 and 8G10 were 1:32 000 and 1:16 000, respectively. Western blot results showed that both McAbs specifically reacted with *R. anatipestifer* serotype 2 strains but did not react with *R. anatipestifer* other serotypes strains, avian pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Pasteurella multocida* strains. [Conclusion] We prepared two specific anti-LPS McAbs that can be used for pathogenic mechanism research and development of rapid detection of *R. anatipestifer* serotype 2 strains.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, Monoclonal antibody, Specificity, Lipopolysaccharide

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)主要感染家鸭、火鸡、鹅和其他多种鸟类,引起接触性高致病性传染病^[1], 1-8周龄雏鸭对RA易感,其中以2-3周龄雏鸭最易感。鸭疫里默氏杆菌感染呈急性败血或慢性过程,临床上主要表现为纤维素性心包炎、肝周炎、干酪样输卵管炎等,慢性感染鸭多成为僵鸭,生长迟缓,胴体淘汰率高,由此造成的经济损失较大,是目前危害养鸭业最严重的传染病之一。

细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)又称为细菌内毒素,是革兰氏阴性菌细胞壁的主要组分之一,由类脂A、核心多糖和O-特异性多糖3部分组成。核心多糖具有属特异性,即同一菌属的核心多

糖基本相同;不同革兰氏阴性菌O抗原的单糖种类、位置、排列顺序和空间构型的不同决定了细菌种或型的特异性^[2]。研究表明^[3-4],完整的LPS对大多数革兰氏阴性菌的致病性是必需的。本研究通过传统的杂交瘤技术,成功获得能稳定分泌抗血清2型鸭疫里默氏杆菌LPS的单克隆细胞株并制备单克隆抗体,为进一步建立RA快速诊断方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞与菌株

5-6周SPF(Specific pathogen free)级BALB/c雌性小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司;SP2/0购自中国科学院细胞库;血清1型RA菌株

(CH3^[5]、GTB1、PB1、GDC-3)、血清 2 型 RA 菌株 (NJ3^[5]、Yb2、GDR-1、GDU-2)、血清 10 型 RA 菌株 (HXb2^[5]、GDO-3、GDO-4、YXL1)、血清型 O1 禽致病性大肠杆菌^[6] (APEC01)、血清型 O2 禽致病性大肠杆菌^[6] (DE719) 和血清型 O78 禽致病性大肠杆菌^[6] (E937) 由本试验分离、鉴定和保存; 沙门氏菌 (CVCC1805、CAU0118) 和禽巴氏杆菌 (CVCC493) 购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心。

1.2 主要试剂和仪器

改良型 PRMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清、青链霉素混合液购自 Gibco 公司; 弗氏佐剂、HT、HAT、聚乙二醇购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG+IgM (H+L)、HRP 标记山羊抗小鼠 IgM 购自 Abcam 公司; TMB 显色液购自上海碧云天生物技术有限公司; 单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购自 Southern Biotech 公司。

SDS-PAGE 电泳槽、转印仪购自 Bio-Rad 公司; CO₂ 恒温培养箱、液氮罐购自 Thermo 公司; 倒置显微镜购自 Leica 公司; 超净工作台购自博迅公司。

1.3 LPS 的提取与鉴定

将 RA 血清 2 型菌株 NJ3 接种到 TSB 培养基中培养至对数生长中后期, 细菌悬液经 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 菌体沉淀依次经乙醇、丙酮、石油醚处理后获得干粉沉淀。将干粉沉淀溶于菌液等体积量的蒸馏水中充分混匀, 加入等体积的 90% 苯酚溶液于 68 °C 加热搅拌 20 min 纯化 LPS。粗提的 LPS 依次经 RNase A、DNase I、蛋白酶 K 酶解作用去除核酸和蛋白污染, 30 000 r/min 超速离心 3 h 获得 LPS 纯化品, 真空冷冻干燥保存备用。

称取纯化的 LPS 配制 1 mg/mL 溶液作为母液, 5 倍比稀释配制不同浓度的 LPS 溶液, 取适量稀释的 LPS 溶液与等体积的上样缓冲液混合, 沸水浴 10 min, 冷却后进行 SDS-PAGE, 分别用考马斯亮蓝染色法和银染法鉴定 LPS 样品的纯度。

1.4 动物免疫

取对数生长期血清 2 型 RA NJ3 株的菌液,

经甲醛灭活后用生理盐水将其配制为含菌量 2×10^9 CFU/mL, 与弗氏完全佐剂以体积比 1:1 充分乳化后, 经多点皮下注射免疫 BALB/c 小鼠 (免疫剂量为 1×10^8 CFU/只), 此后每隔 2 周取首免相同剂量的免疫原与等体积不完全弗氏佐剂混合乳化后加强免疫 2 次。3 次免疫后 2 周, 小鼠尾静脉采血分离血清, 以 NJ3 LPS 作为包被抗原检测血清抗体效价。选择血清抗体效价最高的小鼠, 腹腔注射加强免疫不含佐剂的 2 倍初免剂量免疫原, 免疫后 72 h 内进行细胞融合。

1.5 细胞融合、亚克隆及稳定性检测

细胞融合步骤参考文献[7]进行, 融合后 5-7 d 置换出一半体积的 HAT 培养基, 同时观察细胞生长情况, 待细胞生长至培养孔面积的 1/10 时, 用间接 ELISA 方法对细胞上清进行检测, 即以提取纯化的 NJ3 LPS 作为包被抗原 (2.5 μg/孔), 以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG+IgM (H+L) 作为二抗, 融合前免疫小鼠血清作为阳性对照, 非免疫小鼠血清作为阴性对照, 检测细胞上清抗体水平, 筛选出对 LPS 呈阳性反应的杂交瘤细胞。将分泌特异性单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞扩大培养及部分冻存, 同时采用有限稀释法进行亚克隆, 至阳性率为 100% 时即可定株。将杂交瘤细胞株在相同的操作下连续传 10 代, 进行间接 ELISA 试验测定每代细胞培养上清原液的抗体水平。

1.6 腹水的制备及效价检测

取 8 周龄 BALB/c 雌鼠, 每只腹腔注射 0.3 mL 液体石蜡, 7 d 后腹腔接种 0.2 mL RPMI 1640 培养基稀释的杂交瘤细胞, 接种剂量为 1×10^6 cells/只。5 d 后, 每天观察小鼠状态, 若腹部明显膨大, 即可收取腹水。腹水以 1:1 000 开始 2 倍比稀释, 采用间接 ELISA 测定效价, 并以实验组 OD₄₅₀ (P) 与阴性对照组 OD₄₅₀ (N) 的比值 (P/N) 不小于 2.1 的抗体最大稀释倍数为该单克隆抗体的效价。

1.7 Ig 类及亚类鉴定

按照小鼠单克隆抗体分型试剂盒说明书的方法, 测定杂交瘤细胞株 8G5 和 8G10 的亚类。

1.8 单克隆抗体的特异性鉴定

采用玻片凝集法和 Western blot 鉴定单克隆抗体的特异性, 玻片凝集试验参考文献[8]操作。Western blot 试验步骤如下: 取 RA 血清 1 型分离株(CH3、GTB1、PB1、GDC-3)、血清 2 型分离株(NJ3、Yb2、GDR-1、GDU-2)、血清 10 型分离株(HXb2、GDO-3、GDO-4、YXL1)、禽致病性大肠杆菌血清 O1 型 APEC01 株、血清 O2 型 DE719 株、血清 O78 型 E937 株、沙门氏菌 CVCC1805 株、CAU0118 株和禽巴氏杆菌 CVCC493 株的细菌培养液, 制备各菌株的全菌蛋白, 对提取的全菌蛋白经 SDS-PAGE 后半干转印至硝酸纤维素膜, 用含 5% 脱脂乳的 PBS 封闭后, 以 1:5 000 稀释的腹水单克隆抗体作为一抗, 以 HRP 标记山羊抗小鼠 IgM 抗体为二抗, 分析单克隆抗体的特异性。

2 结果与分析

2.1 LPS 的提取及鉴定

纯化的 LPS 经 SDS-PAGE 后分别进行考马斯亮蓝染色和银染, 考马斯亮蓝染色结果显示, 纯化的

LPS 无可见蛋白污染条带(图 1A); 银染结果显示: 在 10–15 kD 区域有明显的银染着色, 为 LPS 的聚集条带, 而且随着 LPS 浓度的降低其在 SDS-PAGE 上的聚集条带逐渐变浅(图 1B)。

2.2 阳性杂交瘤细胞的筛选

细胞融合后第 10 天, 利用间接 ELISA 对杂交瘤细胞进行筛选, 获得两株能够分泌抗 RA NJ3 株 LPS 的单克隆抗体, 命名为 8G5 和 8G10。经 3 次亚克隆后具有稳定分泌抗 RA NJ3 株 LPS 抗体的能力, 阳性检出率为 100%。连续传代 10 次后经 ELISA 检测其分泌抗体的能力保持稳定, 表明两株杂交瘤细胞株稳定性良好, 各代次杂交瘤细胞上清液 OD_{450} 值见图 2。

2.3 单克隆抗体 Ig 类及亚类测定

利用小鼠单克隆抗体分型试剂盒测得杂交瘤细胞株 8G5 和 8G10 的亚类均为 IgM/ κ 链。

2.4 单抗腹水的效价检测

间接 ELISA 法测定所收集的单克隆腹水效价, 结果表明杂交瘤细胞株 8G5 和 8G10 抗体效价分别达到 1:32 000 和 1:16 000。

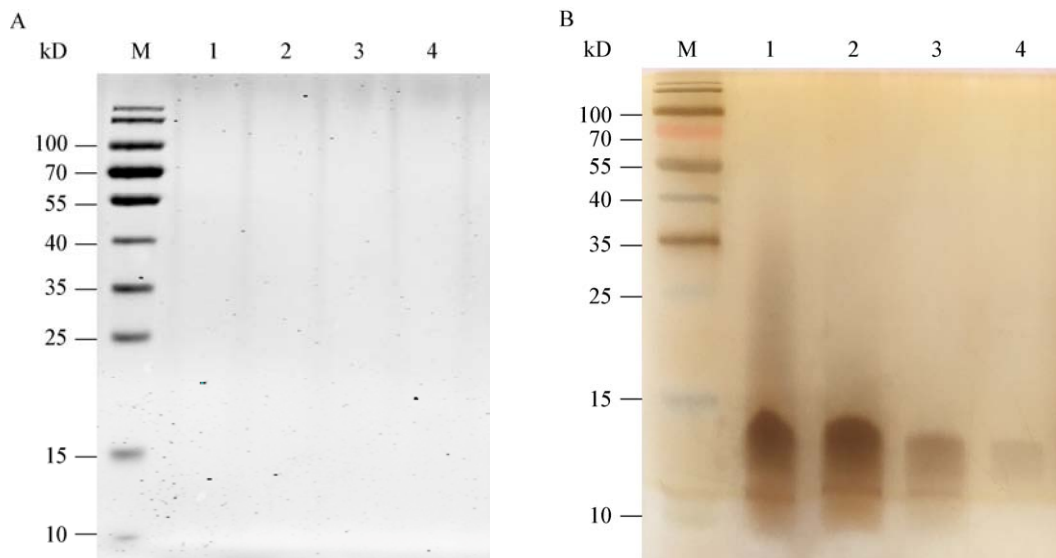


图 1 血清 2 型 RA NJ3 株 LPS 的考马斯亮蓝染色(A)和银染(B)胶图

Figure 1 LPS patterns on SDS-PAGE followed by comassie blue (A) and silver staining (B) from *R. anatipestifer* serotype 2 strain NJ3

注: M: 蛋白分子量标准; 1–4: LPS 的加样量分别依次为 10 µg、2 µg、400 ng 和 80 ng.

Note: M: Protein ladder; 1–4: LPS at 10 µg, 2 µg, 400 ng and 80 ng, respectively.

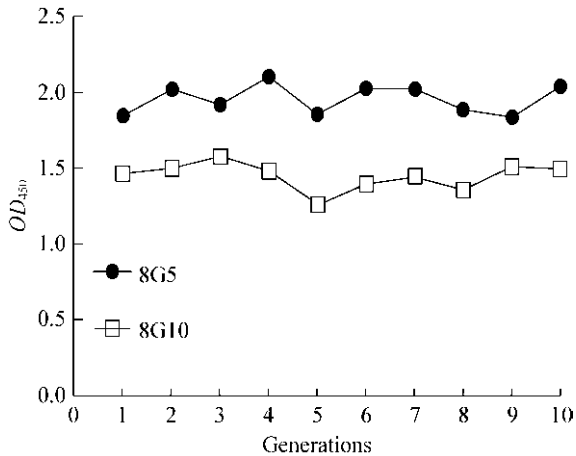


图 2 杂交瘤细胞稳定性检测
Figure 2 The stability of hybridoma cell with different generations

2.5 单克隆抗体的特异性鉴定

采用玻片凝集法(图 3)和 Western blot 检测(图 4)所得单抗与不同血清型 RA 菌株及其他禽源致病菌的反应性,结果显示:玻片凝集试验和 Western blot 结果呈现高度一致性,单克隆抗体 8G5 和 8G10 均仅与血清 2 型 RA 菌株 NJ3、Yb2、GDR-1、GDU-2 发生特异性反应,与血清 1 型菌株(CH3、GTB1、PB1、GDC-3)和血清 10 型菌株(HXb2、

GDO-3、GDO-4、YXL1)无交叉反应,而且与其他禽源致病菌如禽致病性大肠杆菌血清 O1 型菌株 APECO1、血清 O2 型菌株 DE719、血清 O78 型菌株 E937、沙门氏菌菌株 CVCC1805、CAU0118 和禽巴氏杆菌菌株 CVCC493 均无反应,表明制备的两株抗体具有较高的特异性。

3 讨论与结论

本研究应用血清 2 型鸭疫里默氏杆菌 NJ3 株灭活全菌作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠,热酚水法提取的 LPS 作为筛选抗原,制备了两株鸭疫里默氏杆菌 LPS 的单克隆抗体 8G5 和 8G10。Western blot 结果表明两株单抗均仅与血清 2 型 RA 菌株(NJ3、Yb2、GDR-1、GDU-2)发生特异性反应,而与血清 1 型、血清 10 型 RA 菌株及其他禽源致病菌均无反应,表明 8G5 和 8G10 为血清 2 型 RA 特异性单抗。获得的两株杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体均为 IgM 亚类。机体感染病原体后,血液中 IgM 不但出现早,而且具有较高的结合效价;既是高效能的抗生物抗体,具有强的杀菌、溶菌、促吞噬和凝集作用^[9],又可用于疾病的早期诊断或其他研究,对于鸭疫里默氏杆菌的预防和诊断具有现实意义。

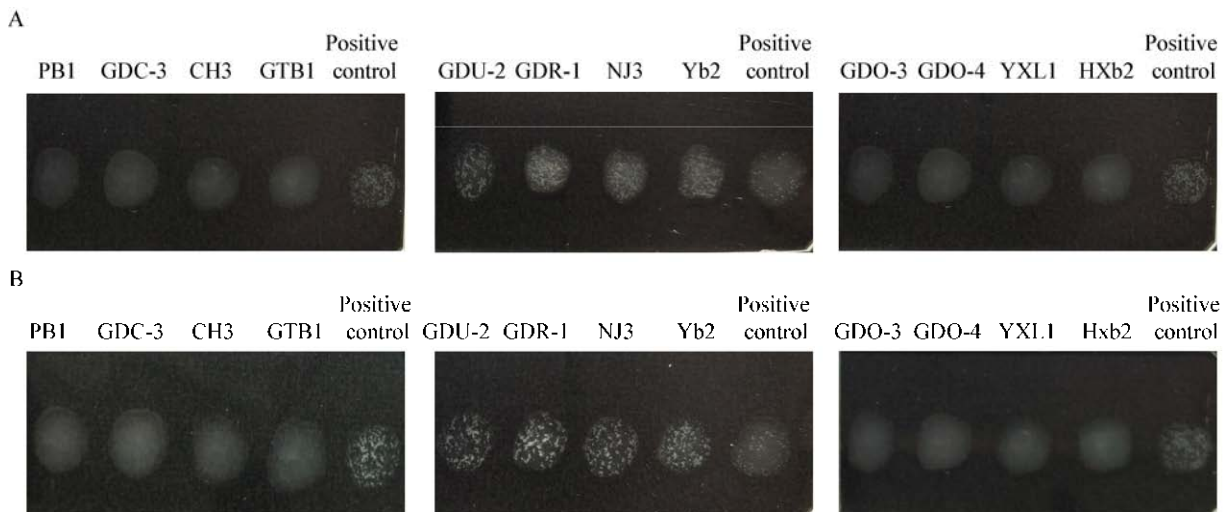


图 3 玻片凝集反应鉴定单克隆抗体的特异性
Figure 3 Specificity of McAbs identified by slide agglutination
Note: A: 8G5; B: 8G10.

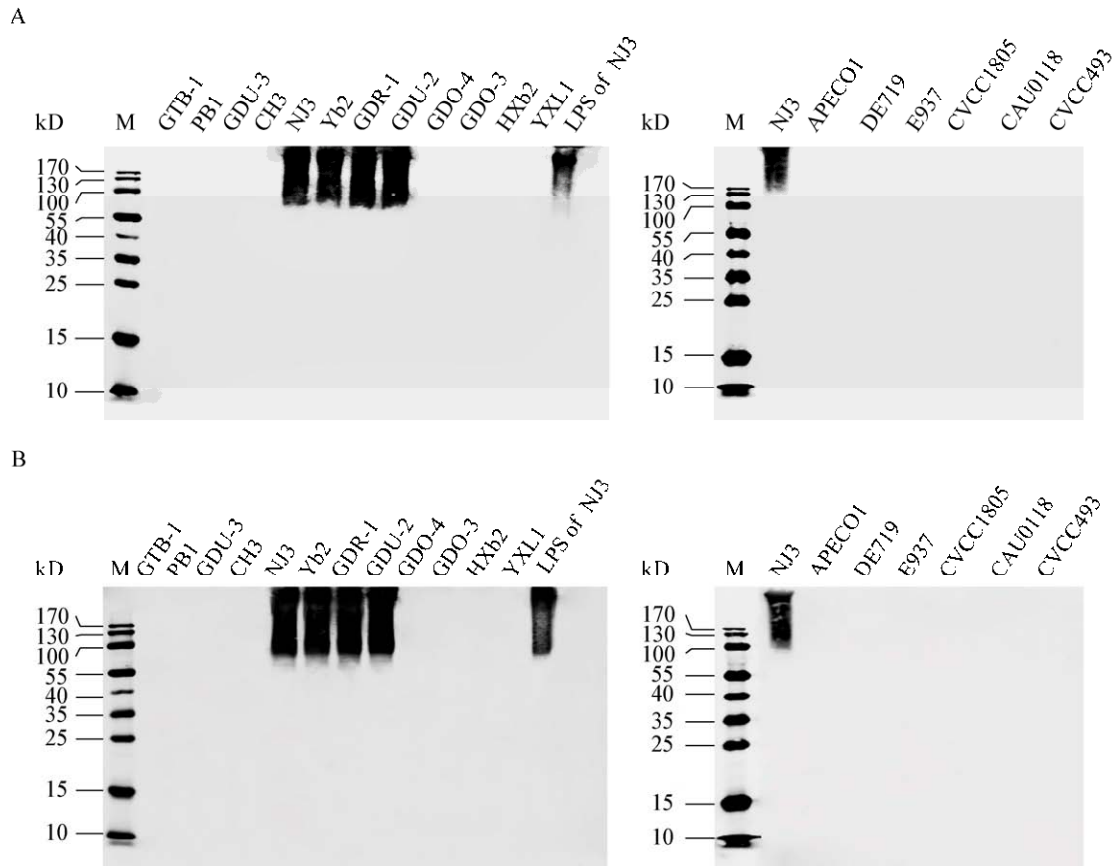


图4 Western blot 鉴定单克隆抗体的特异性

Figure 4 Specificity of McAbs identified by Western blot analysis

Note: M: Protein ladder; A: 8G5; B: 8G10.

革兰氏阴性菌的 LPS 结构由 O-侧链、核心多糖和类脂 A 组成，其中由毒性部分的类脂 A 和核心多糖构成的核心多糖部分相对保守。类脂 A 是 LPS 的毒性中心，是决定细菌致病性的重要因素；O 抗原由数量不等的多个糖分子构成，决定菌株的抗原特异性。本研究结果显示，两株单克隆抗体与 LPS 结合只在大分子量的 LPS 区域出现强阳性反应条带，这与经典光滑型 LPS 的组成成分相吻合，表明所制备的两株单抗结合的可能是 LPS O 抗原表位。同时，玻片凝集反应结果证实这一推论，两株单抗均只能与 RA 血清 2 型菌株发生特异性反应，而与其他血清型 RA 菌株无反应性，即制备的两株单抗是 RA 血清型特异性抗体，该特异性说明 O 抗原也决定 RA 不同血清型之间的抗原性差异，因此 LPS 可以作为检测 RA 不同血清型之间的靶标。

目前，临床上检测 RA 的方法有病原菌的分离鉴定、凝集试验或琼脂凝胶免疫扩散试验的血清学方法及 PCR 诊断的分子生物学方法等^[10]，以上方法存在程序繁琐、灵敏性低、成本较高等不足；此外，RA 血清型的鉴定主要依靠凝集试验和免疫琼脂凝胶扩散试验，不仅耗时且需要的菌量极大，往往需要增菌培养才能满足检测条件，因此需要建立一种快速、灵敏、特异性强的方法，以同时满足快速诊断检测和血清型鉴定的要求。单克隆抗体具有特性稳定、易于批量生产、效价高等优点，已有报道采用单克隆抗体进行免疫浊度试验进行人血清中 CysC 的检测^[11]。本研究获得的两株单克隆抗体既具有良好的反应性，也具有血清型特异性，可用于 RA 致病机制的基础研究和进一步建立 RA 血清型快速检测试剂盒。

REFERENCES

- [1] Zhu DK, Cheng AC, Wang MS, et al. Construction and immunoscreening of partial genomic library of *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2007, 27(6): 834-837 (in Chinese)
朱德康, 程安春, 汪铭书, 等. 鸭疫里默氏杆菌基因组文库的构建及免疫原性基因初步筛选[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(6): 834-837
- [2] Fang HC, Zhao ZQ, Zhu LP. Lipopolysaccharide: biosynthesis of transmembrane transport and biological functions[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2011, 39(3): 73-77 (in Chinese)
方红春, 赵志强, 朱莉萍. 脂多糖: 生物合成、跨膜转运及生物学功能[J]. 微生物学免疫学进展, 2011, 39(3): 73-77
- [3] Brown DB, Forsberg LS, Kannenberg EL, et al. Characterization of galacturonosyl transferase genes *rgtA*, *rgtB*, *rgtC*, *rgtD*, and *rgtE* responsible for lipopolysaccharide synthesis in nitrogen-fixing endosymbiont *Rhizobium leguminosarum*: lipopolysaccharide core and lipid galacturonosyl residues confer membrane stability[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(2): 935-949
- [4] Holme T, Rahman M, Jansson PE, et al. The lipopolysaccharide of *Moraxella catarrhalis* structural relationships and antigenic properties[J]. The FEBS Journal, 1999, 265(2): 524-529
- [5] Hu QH, Zhang ZL, Miao JF, et al. The epidemiology study of *Riemerella anatipestifer* infection in Jiangsu and Anhui Provinces[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2001, 31(8): 12-13 (in Chinese)
胡青海, 张知良, 苗晋锋, 等. 江苏安徽两省鸭疫里默氏杆菌病的流行病学调查研究[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(8): 12-13
- [6] Chen WJ, Han XG, He L, et al. Characterization of duck pathogenic *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Animal of Infectious Diseases, 2010, 18(2): 34-40 (in Chinese)
陈文静, 韩先干, 何亮, 等. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(2): 34-40
- [7] Hou WW, Han XG, Wang SH, et al. Generation of monoclonal antibodies to GroEL of *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2014, 22(2): 58-64 (in Chinese)
侯湾湾, 韩先干, 王少辉, 等. 鸭疫里默氏杆菌 GroEL 蛋白的原核表达和单克隆抗体制备[J]. 中国动物传染病学报, 2014, 22(2): 58-64
- [8] Zhao BH, Xu B, Fan JH. Isolation and identification of *Riemerella anatipestifer* from geese[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 37(8): 189-191 (in Chinese)
赵宝华, 徐步, 范建华. 鹅源鸭疫里默氏杆菌的分离和鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8): 189-191
- [9] Nguyen TTT, Baumgarth N. Natural IgM and the development of B cell-mediated autoimmune diseases[J]. Critical Reviews in Immunology, 2016, 36(2): 163-177
- [10] Han XG, Ding C, He L, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting the *groEL* gene for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*[J]. Avian Diseases, 2011, 55(3): 379-383
- [11] Chen TM. The preparation of antibody against human Cystatin C, and establishment of immunoassay for human Cystatin C and evaluation on methodology[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Chongqing Medical University, 2007 (in Chinese)
陈婷梅. 人胱抑素 C 抗体制备和检测方法建立及其方法学评价[D]. 重庆: 重庆医科大学博士学位论文, 2007