

# Preparation and Application of Monoclonal Antibodies against Porcine Circovirus Type 2 Cap Protein

Xiaomei Pan Lanling Cheng Zunbao Wang Liping Mao Sun He\*

Tiankang Biopharmaceutical Co., Ltd., Urumqi, Xinjiang, 830032, China

## Abstract

This study aims to prepare monoclonal antibodies against the cap protein of porcine circovirus type 2 (PCV2), and detect, verify and preliminarily apply them using serological methods. Mice were immunized with purified PCV2 viral fluid as an immunogen, and then a cell line prepared and obtained by using hybridoma cell technology. The results showed that the hybridoma cells grew well and were stably passaged, and the antibody titer of the culture supernatant could reach above 1:1024. Western-Blot and indirect immunofluorescence assays showed that the prepared secretory monoclonal antibody could specifically detect the cap protein. Both immunohistochemistry and colloidal gold detection applications were able to specifically detect samples. This has laid a foundation for clinical diagnosis and pathogenic mechanism research PCV2 infection.

## Keywords

Porcine Circovirus Type 2; Immunohistochemistry; colloidal gold

## 猪圆环病毒2型 Cap 蛋白单克隆抗体制备和应用

潘晓梅 程兰玲 王遵宝 毛丽萍 贺笋\*

天康生物制药有限公司, 中国·新疆乌鲁木齐 830032

## 摘要

本研究旨在制备猪圆环病毒2型(PCV2) cap的单克隆抗体, 利用血清学方法进行检测验证与初步应用。用纯化的PCV2病毒液为免疫原免疫小鼠, 然后利用杂交瘤细胞技术筛选, 制备获得1株细胞株。结果显示, 杂交瘤细胞生长良好、稳定传代, 培养上清液抗体效价可以达到1:1024以上。Western-Blot与间接免疫荧光试验表明, 制备分泌的单克隆抗体能特异性的识别cap蛋白。免疫组化及胶体金检测应用均能特异性检测样品。为PCV2感染的临床诊断及致病机理研究打下基础。

## 关键词

猪圆环病毒2型; 免疫组化; 胶体金

## 1 引言

猪圆环病毒(PCV Porcine circovirus)是迄今发现的最小动物病毒之一<sup>[1]</sup>。现已知PCV有四个血清型, 即PCV1<sup>[2]</sup>、PCV2、PCV3、PCV4。PCV1为非致病性的病毒, PCV2为致病性的病毒。PCV3是一种新发病原, 多见于患

有皮炎肾病综合征(PDNS)和繁殖障碍症状猪群。PCV2主要侵害猪体的免疫系统, 导致免疫抑制及动物机体免疫抵抗力下降, 同时影响猪对其他疾病免疫抗体的产生和维持, 与多种疾病的继发感染相关<sup>[3]</sup>。PCV2导致的疾病对养猪业产生严重危害<sup>[4]</sup>, PCV2诊断和预防尤为重要。免疫检测技术可以有效的检测PCV2或PCV2的有效抗原。对于免疫检测技术, 能够与病毒抗原有效结合的抗体是关键。目前, 市场上的PCV2抗体用于识别原核表达系统的, 无法有效识别天然构象PCV2 cap蛋白, 因此, 提供一种能够和PCV2或其抗原高效结合的抗体是亟待解决的问题。制备能够有效识别天然构象cap的单抗, 为病毒抗原表位分析、致病机理研究、鉴别诊断检测方法的开发奠定基础, 提供更多更有效的应用价值<sup>[5]</sup>。

## 2 材料

细胞 PK-15细胞由天康生物制药有限公司传代与保存。细胞培养液和血清: DMEM和胎牛血清购自Gibco

**【基金项目】**乌昌石国家自主创新示范区科技发展计划项目(项目编号: 2022LQ03022); 新疆维吾尔自治区创新环境(人才、基地)建设专项—自然科学基金项目(项目编号: 2022D01A324)。

**【作者简介】**潘晓梅(1979-), 女, 中国江苏南通人, 硕士, 高级实验师, 从事动物疫苗研发与分子病毒学研究。

**【通讯作者】**贺笋(1980-), 男, 硕士, 高级兽医师, 从事动物疫苗研发与管理。

公司。

抗体: FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 购自 BETHYL 公司。

主要试剂与耗材: 小鼠 IgG- 免疫组化试剂盒 SABC 即用型购自博士德生物工程有限公司, DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司, BSA 购自 aMResco 公司; 石蜡、二甲苯、梯度乙醇、苏木素染液、柠檬酸、柠檬酸三钠、盐酸、酒精、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液、PBS、免疫组化笔、中性树脂等为国产试剂。

## 3 方法

### 3.1 杂交瘤细胞的制备

#### 3.1.1 小鼠免疫

利用纯化的 PCV2 病毒液为免疫原, 皮下多点注射 6~8 周龄的雌性 Balb/C 小鼠, 剂量 200 μg/ 只, 三至四次免疫: 颈背部皮下多点注射。小鼠尾静脉采血用间接 ELISA 方法测定血清抗体效价, 选择效价高的小鼠在细胞融合前 3 天, 腹腔注射 200 μg 的 PCV2 纯化病毒液加强免疫。原核表达的 PCV2-rCap 蛋白作为 ELISA 包被抗原检测免疫小鼠的血清抗体效价, 并设立未免疫的小鼠血清为阴性对照。最后以 P/N > 2.1 的最大血清稀释度为小鼠的血清效价。

#### 3.1.2 细胞融合、杂交瘤细胞筛选与克隆

无菌采集免疫小鼠脾细胞, 与 SP2/0 细胞按一定比例进行混合, 再用 PEG4000 按常规方法进行细胞融合。分别用纯化的原核表达的 PCV2-rCap 蛋白和原核表达载体蛋白包被聚苯乙烯板, 收取融合后 10 天的细胞培养上清进行间接 ELISA 筛选阳性细胞克隆。最后选择与 PCV2 反应为阳性, 与原核表达载体蛋白反应为阴性的杂交瘤细胞孔采用有限稀释法进行亚克隆。

### 3.2 杂交瘤细胞制备单克隆抗体

细胞培养: 将上述稳定分泌的杂交瘤细胞系在含有 20% ( 体积百分含量 ) 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中继续进行培养、传代, 培养到 25 代后, 进行抗体效价检测。

单克隆抗体的纯化: 杂交瘤细胞的培养上清, 在 4℃, 12000g 条件下离心 15 分钟, 以除去细胞碎片。应用 Protein A 亲和层析法纯化单克隆抗体, AKTA 进行监测。

### 2.3 单克隆抗体的鉴定

#### 2.3.1 Western-blot 鉴定单克隆抗体的反应性

蛋白在 SDS-PAGE 分离, 取一片胶片置于转膜仪上, 350mA 条件下转膜 1 小时。PVDF 膜用 5% 脱脂奶室温封闭 1 小时。PBST 洗 3 次之后, 加入单克隆抗体作为一抗, 4℃ 缓慢振荡反应过夜。PBST 洗三次之后, 用标记 HRP 的羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 1 小时, 最后 AEC 显色。

#### 2.3.2 单抗与 PCV2 的间接免疫荧光试验

PK-15 细胞长至 80% 左右融合度时, 接种 PCV2 病毒液, 37℃ 孵育 1 小时, 加入 2% DMEM 继续培养, 同时设立未接毒的 PK-15 细胞为对照。37℃ 继续培养 72 小时后,

预冷 80% 丙酮室温固定细胞 10 分钟, 弃固定剂, 置室温下干燥, PBST 洗涤 3 次拍干, 感染 PCV2 及正常的 PK-15 细胞孔分别加入杂交瘤细胞培养上清, 同时设定 SP2/0 上清阴性对照, 抗 PCV2 猪血清为阳性对照。37℃ 孵育 1 小时后, PBST 洗涤 3 次拍干, 加入羊抗小鼠的 IgG-FITC, 37℃ 均孵育 2 小时后, PBST 洗涤 3 次拍干, 荧光显微镜下观察结果。

## 3.4 应用

### 3.4.1 检测猪圆环病毒 2 型抗原的免疫组化检测方法

切片进行脱蜡和水化。将染色架浸入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 30 分钟, 以阻断内源性过氧化物酶。将玻片浸入盛有 1L 柠檬酸缓冲液的烧杯中, 放入微波炉中加热抗原热修复。用 5% BSA 溶液覆盖组织, 室温作用 30 分钟, 以封闭非特异性抗原。将猪圆环病毒 2 型单克隆抗体用 1% PBA 稀释, 滴加覆盖整个组织, 避光 4℃ 孵育过夜。次日早晨去掉一抗溶液, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。每张切片上滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG 覆盖组织, 室温避光孵育 30 分钟。之后滴加 SABC 覆盖组织, 室温作用 2 分钟, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。显色液滴加覆盖各个组织, 室温避光显色、苏木素复染, 将玻片浸入盐酸酒精分化, 后进行脱水、透明、封片、烘片、镜检。

### 3.4.2 检测猪圆环病毒 2 型抗原的胶体金检测方法

将抗体加入胶体金溶液中反应, 后加入 BSA, 室温反应数分钟。离心收集沉淀, 用 BSA 缓冲液重悬, 恢复至原体积再离心。将标记好的金标复合物喷洒在玻璃纤维素上, 在烘箱中烘干。将样品垫处理液涂在玻璃纤维素上, 在烘箱中烘干。将玻璃纤维素贴在 PVC 地板上, 将印模机的 T、C 线调整搭配合适的距离, 然后进行印模, 在烘箱中烘干。将吸水垫、制备好金垫、样品垫裁切至合适宽度, 与印好的 T、C 线玻璃纤维素膜贴在 PVC 地板位置。根据检测卡槽的宽度, 将组装好的大板切成切成一定宽度的检测条, 检测条压入卡壳内。使用前放置室温回温 30 分钟, 根据需要稀释样品, 滴加样品反应 20 分钟。结果观察: 若测试卡的 C 线显示试验成立, T 线显示有猪圆环病毒 2 型抗原。

## 4 结果

### 4.1 抗体鉴定结果

#### 4.1.1 抗体效价检测

经过 2 次亚克隆和间接 ELISA 筛选, 得到 1 株针对 PCV2-rCap 蛋白的稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 1A6。杂交瘤细胞生长良好、稳定传代, 培养液上清效价仍然可以达到 1:1024 以上。

#### 4.1.2 单克隆抗体的纯化

应用 Protein A 亲和层析法纯化单克隆抗体, 杂交瘤细胞的培养上清、纯化的抗体取样进行蛋白电泳分析, 结果显示纯化抗体只有 2 条条带 50kDa 的重链、25kDa 的轻链, 纯化效果较好 ( 图 1 )。

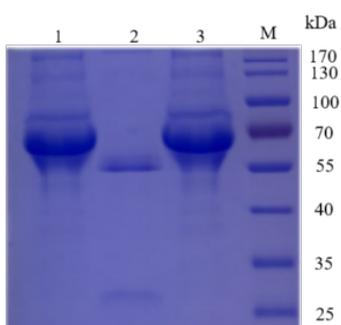


图1 抗体样品 Western-Blot 分析

1、3: 杂交瘤细胞的培养上清; 2: 纯化的抗体; M: 蛋白分子质量标准

#### 4.1.3 单克隆抗体的鉴定

Western-Blot 分析结果发现有目的条带, 表明 PCV2 单克隆抗体能够与 PCV2-rCap 蛋白发生特异性免疫反应 (图2)。

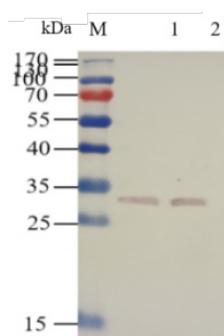
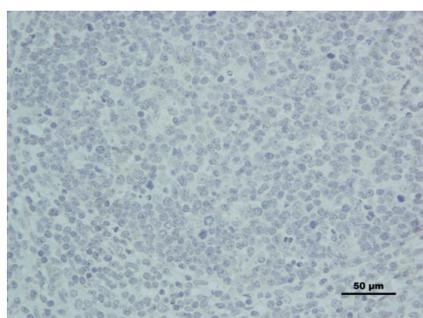
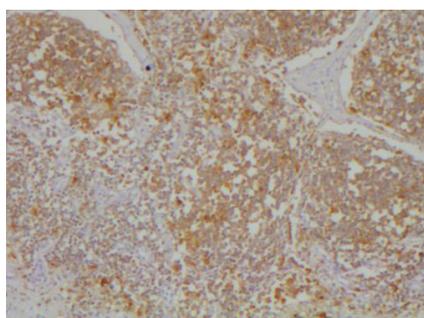


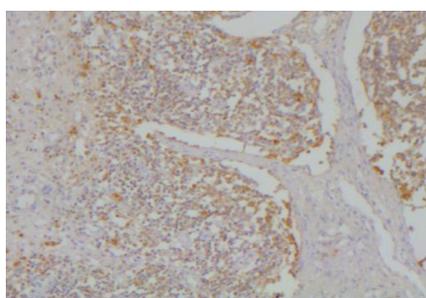
图2 PCV2 蛋白 Western-Blot 分析



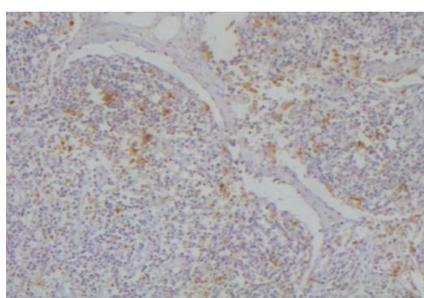
阴性对照



单抗 1:2000



单抗 1:4000



单抗 1:8000

图4 免疫组化检测结果

M: 蛋白分子质量标准; 1-2: PCV2cap 单抗反应目的条带

#### 4.1.4 间接免疫荧光检测

间接免疫荧光试验, 病毒与阳性血清、PCV2 单克隆抗体发生特异性抗原抗体反应, 视野下出现明显的特异性荧光, 空白对照孔无荧光 (图3)。

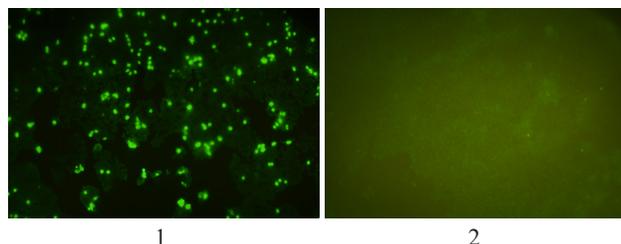


图3 间接免疫荧光试验分析

1.PCV2 单克隆抗体; 2. 阴性抗体

#### 4.2 单克隆抗体的应用

##### 4.2.1 免疫组化检测

试验猪剖检后取腹股沟淋巴结固定后样品进行免疫组化检测, 结果显示 PCV2 单克隆抗体各浓度阳性样品猪腹股沟淋巴结 PCV2 抗原为阳性感染细胞呈棕黄色着色, 1:4000 以上稀释浓度背景色深, 优选 1:8000 稀释浓度作为检测浓度; 阴性对照猪腹股沟淋巴结 PCV2 抗原均为阴性 (图4)。

##### 4.2.2 胶体金应用检测

用 PCV2 单克隆抗体制备的胶体金试纸条, 样品进行连续稀释时, 结果呈梯度下降, 待检样品稀释至 1000 倍仍能被识别, T 线显示有猪圆环病毒 2 型抗原。

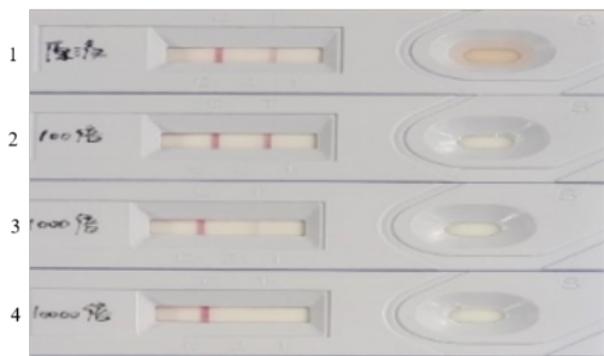


图5 胶体金检测梯度稀释样品结果

1、PCV2 病毒样品原液；2、100×病毒稀释液；3、1000×病毒洗液；4、10000×病毒稀释液

## 5 小结

PCV2 感染动物后会引引起免疫抑制病如猪的繁殖障碍等，还很容易发生细菌与病毒混合感染，对现在的养殖业猪群造成极大经济损失。因此，需要在疾病的预防诊断方面进行研究，从而对 PCV2 的预防与控制产品开发提供理论依据。单克隆抗体具有纯度高、特异性好、可重复性等优点<sup>[6]</sup>，在疾病的预防诊断方面研究中，更成为不可或缺的基础工具。单克隆抗体的制备为后续的 PCV2 抗原性研究、抗体水平的检测等方面奠定了基础，为进一步解析 PCV2 提供了可靠的方法。近年来，有关 PCV2 单克隆抗体的研究逐渐增多<sup>[7]</sup>，使用大肠杆菌表达纯化的重组 Cap 蛋白<sup>[8]</sup>、杆状病毒表达的 Cap 蛋白等作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠，Western-blot、间接免疫荧光试验 (IFA)、线性抗原表位鉴定等分析<sup>[9]</sup>，成功制备出具有高纯度、强特异性、良好反应性的 PCV2 Cap 蛋白单克隆抗体。

本研究运用主要流行 PCV2 细胞毒制备了一种 PCV2 单克隆抗体，Western-blot 试验表明 PCV2 单克隆抗体能与 rCap 蛋白具有良好的反应性；制备腹水应用于 IHC 试验，结果表明它们均能够与 PCV2 临床病猪淋巴结中的病毒抗原反应。间接免疫荧光试验 (IFA) 结果表明该单克隆抗体能够与 PCV2 病毒和 PCV2-rCap 蛋白发生特异性免疫反应，以鉴定 PCV2 病毒、测定 PCV2 病毒含量；该单克隆抗体可广

泛的应用于免疫检测技术中，作为 Western-Blot、间接免疫荧光试验、免疫组化试验、胶体金检测试验中的抗体使用。因此，本研究制备的 PCV2 单克隆抗体为 PCV2 感染的临床诊断及研究 PCV2 的致病、免疫机理提供了有用的工具。

## 参考文献

- [1] Segales J, Kekkarainen T, Cortey M. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 165:13-20.
- [2] Xiaobing Mo, Xiangdong Li, Bo Yin, Junhua Deng, Kegong Tian, Adam Yuan. Structural roles of PCV2 capsid protein N-terminus in PCV2 particle assembly and identification of PCV2 type-specific neutralizing epitope [J]. *PLoS Pathog*. 2019, 15(3): e1007562.
- [3] Yuzhong Zhao, Xinyu Cui, Haotian Sang, Shaodong Wen, Lebin Han, Pingping Yang, Yihong Xiao, Yanmeng Hou. The Prevalence and Genetic Characteristics of Porcine Circovirus Type 2 in Shandong Province, China, 2018-2020 [J]. *Curr Issues Mol Biol*. 2024, 46(12):13542-13553.
- [4] SEGALÉS J, ALLAN G M, DOMINGO M. Porcine Circovirus disease [J]. *Anim Health Res Rev*, 2005, 6(2): 119-142.
- [5] 马中元, 郑君佐, 梁志博, 潘丽, 曾巧英. 利用单B细胞分选技术制备猪瘟疫毒E2蛋白单克隆抗体及其在ELISA中的应用 [J]. *畜牧兽医学报* 2024, 55(10): 4579-4589.
- [6] 宋谦. 基于单个B细胞抗体技术研制PCV2 Cap蛋白特异性单克隆抗体 [D]. 河北工程大学, 2022. DOI:10.27104/d.cnki.ghbjy.2022.000515.
- [7] Guilherme Cezar, Edison Magalhães, Kinath Rupasinghe, etc. Using diagnostic data from veterinary diagnostic laboratories to unravel macroepidemiological aspects of porcine circoviruses 2 and 3 in the United States from 2002-2023 [J]. *PLoS One*. 2024, 19(12): e0311807
- [8] 孙荣航, 容芳, 陈桂娥, 等. 猪圆环病毒2型Cap蛋白的原核表达及其单克隆抗体制备 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2024, (14): 61-67, 73, 126. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2023.07.0103.
- [9] 王鹏, 沈伟桢, 周斌. 猪圆环病毒2型疫苗的应用和研发进展 [J]. *畜牧与兽医*, 2024, 56(4): 139-146.