

## JSRV 衣壳蛋白单克隆抗体的制备及免疫学鉴定\*

罗军荣<sup>1, 2)</sup> 斯日古楞<sup>1)</sup> 刘霄卉<sup>1)</sup> 周建华<sup>3)</sup> 马学恩<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018; <sup>2)</sup>江西农业大学动科院, 南昌 330045;

<sup>3)</sup>中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

**摘要** 经纯化的 JSRV-CA 融合蛋白乳化后免疫 Balb/c 小鼠, 四免后, 取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞经杂交瘤技术进行融合. 最终获得了三株稳定分泌单克隆抗体的细胞系. 同时, 分段克隆绵羊肺腺瘤病毒 *ca* 基因并构建原核表达质粒, 在 *E. coli* BL21 中诱导表达. 以获得的三株抗 JSRV-CA 蛋白的单克隆细胞分泌的 McAb 为一抗, 应用 Western blot 对分段表达的 CA 蛋白进行肽探针扫描, 初步鉴定了三株单抗识别的线性表位, 并应用非竞争性 ELISA 法测定了三株单抗的功能性亲和常数. 为建立特异性的病原诊断方法、分析 CA 蛋白的功能及疫苗设计奠定了基础.

**关键词** 绵羊肺腺瘤病毒, 表位, 衣壳蛋白, 抗体亲和力, 单克隆抗体

**学科分类号** Q7, S852.4.3

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00339

绵羊肺腺瘤病(ovine pulmonary adenomatosis, OPA)又名“驱赶病”(Jaagsiekte), 是引起绵羊肺脏肿瘤的一种接触性传染病, 也发生于山羊. 绵羊肺腺瘤病病毒(Jaagsiekte retrovirus, JSRV)为病原, 属于  $\beta$  反转录病毒, 为线性单股正链 RNA, 全长 7.4 kb, 编码相互重叠的 *gag*、*pro*、*pol*、*env* 基因<sup>[1]</sup>. 该病最早于 1825 年报道于非洲, 主要病征为患羊咳嗽、呼吸困难、消瘦、大量浆液性鼻漏、II 型肺泡上皮细胞和无纤毛细支气管上皮细胞肿瘤性增生<sup>[2~4]</sup>. OPA 与人的细支气管-肺泡癌(bronchiolo-alveolar carcinoma, BAC)在临床症状、影像学及病理组织学特征方面极为相似, 为人类这一常见癌症提供了研究模型<sup>[5]</sup>.

OPA 主要发生于欧洲、美洲、非洲、东南亚等地区, 几乎所有的养羊业发达的国家和地区, 包括我国新疆、内蒙古等地都有该病的发生和流行, 严重影响着世界各国养羊业的发展. 目前, 国内外对 OPA 的诊断主要依靠临床症状检查和病理组织学检查, 但 OPA 的自然感染潜伏期为 2~4 年<sup>[6]</sup>, 常规诊断方法不能及早发现本病, 难于胜任对 OPA 快速诊断的需要. 最近发现, 感染羊的肺脏分泌物以及肿瘤组织中含有一种分子质量为 26 ku 的蛋白质——衣壳蛋白(CA)p26, 而非肿瘤组织中却检测不到此蛋白质. 因此 JSRV p26 被广泛认为

是 JSRV 的标准抗原<sup>[7,8]</sup>. 更令人惊讶的是, 人类肺癌与 JSRV 相关蛋白的抗体有抗原交叉反应, 30% 的 BAC 病例及 26% 的肺腺癌病例的病料能被抗 JSRV-CA 的血清所识别<sup>[9]</sup>. 并且, Morozov 等<sup>[10]</sup>发现与 JSRV 相关的序列存在于非洲健康人群及 HIV 阳性人群的基因组中, 但调查的几例肺癌患者中没有发现相关的序列.

鉴于以上情况, 本研究以纯化的 CA 蛋白为抗原, 筛选制备稳定分泌抗 JSRV-CA 单克隆抗体的细胞系, 并应用 Pepsan 技术, 通过表达连续的重叠短肽, 与特异性单克隆抗体反应, 经 Western blot 检测, 确定阳性反应片段, 从而初步鉴定了三株单抗识别的线性表位, 并应用非竞争性 ELISA 法测定了三株单抗的功能性亲和常数. 此项研究将有助于分析 CA 蛋白的分子特性及生物功能, 为今后了解 OPA 与人类肺癌的关系及应用抗 CA 蛋白的单克隆抗体建立特异性血清学诊断方法和肽疫苗的研制奠定基础.

\* 国家自然科学基金(30660136)和中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室开放课题基金(NKLV200801)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0471-4310745, E-mail: xueen.ma@163.com

收稿日期: 2008-08-07, 接受日期: 2008-10-20

## 1 材料与方法

### 1.1 抗原、细胞、实验动物与菌株、质粒

抗原为原核表达的 JSRV-NM 株 GST-CA 融合蛋白纯化产物<sup>[1]</sup>; 6~8 周龄 Balb/c 健康小鼠购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所小动物房. 骨髓瘤细胞 SP2/0、293 细胞、pcDNA3.1(+), pET-32a、菌株 *E. coli* BL21 由哈尔滨兽医研究所慢病毒研究室保存.

### 1.2 主要试剂

HAT、聚乙二醇、OPD、辣根过氧化物酶及 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 Sigma 公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清为天津灏洋生物制品公司产品; Lipofectamine™2000 脂质体转染试剂购自 Invitrogen 公司; IPTG、DMSO、0.25%胰酶、2 mmol/L L-谷氨酰胺、青链霉素等均为进口或国产分析纯试剂; Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP Mixture、DNA marker DL2000 购自大连宝生物工程有限公司; Super ECL Plus 超敏发光液购自普利莱基因技术有限公司; QIA quick PCR Purification Kit 购自美国 QIAGEN 公司.

### 1.3 免疫程序

选择与骨髓瘤细胞同源的 6~8 周龄 Balb/c 健康小鼠 4 只, 雌雄不限. 纯化 CA 蛋白与等体积弗氏完全佐剂混合并乳化, 按 50 μg/鼠经腹腔注射, 对 6~8 周龄的 SPF 级 Balb/c 小鼠进行首免, 每 2 周用等量抗原与弗氏不完全佐剂充分乳化后加强免疫 2 次. 选择 ELISA 效价高于 1:10 000 的免疫鼠, 按 100 μg/鼠的量进行冲击免疫, 3 天后进行融合.

### 1.4 杂交瘤细胞系的建立及其鉴定

取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 在融合剂 PEG3350 中按常规方法进行融合. 融合细胞在含 HAT 的培养液中培养 7 天后, 以含 HAT 的培养液半量换液, 10 天后全量换液. 待克隆株长到约占整个孔 1/10 时, 用间接 ELISA 方法进行筛选.

**1.4.1 杂交瘤细胞系的建立.** “方阵法”确定最佳反应条件: 梯度稀释包被抗原(GST-CA 重组蛋白和 GST 标签蛋白)及阳性、阴性血清, 以辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, OPD 显色, 建立间接 ELISA 方法. 以确定的最佳抗原包被浓度包被 ELISA 板, 检测杂交瘤细胞培养上清, 同时以 SP2/0 细胞培养上清作阴性对照, 以免疫小鼠

血清及 GST 抗体为阳性对照. 其中, 把只与 CA 重组蛋白反应, 而不与 GST 标签蛋白反应且 P/N > 2.1 的细胞株初步确定为阳性株. 检出的阳性孔用有限稀释法进行克隆化, 建立单克隆细胞株.

**1.4.2 真核表达质粒的构建.** 为了检测单克隆细胞株分泌的 McAb 能否识别天然 CA 蛋白, 构建了真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-ca-HA. 上下游引物 5'端分别加入 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点, 下游引物 5'端融入 HA-Tag. 上游引物为: 5' CGCGA-ATTCATGTGCTCACAAATACGGTCCTAC 3'; 下游引物为: 5' GACCTCGAGTCACGCGTAGTCCGGACGTCGTATGGGTAAGCGATA 3'. 以 pGEM-T-ca<sup>[1]</sup>为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μl: 10×PCR 缓冲液 2.5 μl, dNTPs(各 2.5 mmol/L)2 μl, Ex Taq DNA 聚合酶 0.5 μl(5U/μl), 引物各 10 pmol, 模板 0.5 μl, 灭菌双蒸水补至 25 μl; 反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 50 s, 57℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环后 72℃ 延伸 5 min, 扩增产物片段大小约为 558 bp. 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 PCR 扩增产物和真核表达载体 pcDNA3.1(+), 酶切产物用试剂盒 QIA quick PCR Purification Kit 回收, 16℃ 连接 2 h, 连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞. 提取重组质粒双酶切鉴定并测序.

**1.4.3 用真核表达蛋白对 McAb 进行鉴定.** 目前, 国内外无有效的 JSRV 体外培养系统, 无法得到大量的纯化病毒粒子, 成为制约 OPA 研究的瓶颈. 因而, 本研究用真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-ca-HA 瞬时转染 293 细胞, 设空载体转染的 293 细胞为阴性对照, 进行 Western blot 及 IFA 检测. 具体方法为: 在含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 293 细胞, 转染前一天, 用胰酶消化细胞, 计数并铺板. 第二天, 在 Lipofectamine™2000 脂质体的介导下按产品说明书进行转染. 转染细胞培养 36 h 后, 弃上清, 用 PBS 洗涤 2 次后行 Western blot 和 IFA. a. Western blot. 用细胞裂解液分别消化并收集转染细胞与阴性对照细胞, 立即进行 SDS-PAGE 分析, 用半干式电转仪(16 V 15 min)转移到 PVDF 膜上, 以杂交瘤细胞培养液上清为一抗, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000 倍稀释)为二抗, 经化学发光法成像仪成像. b. IFA. 洗涤后的细胞用预冷的无水乙醇室温固定 20 min, PBS 再洗涤, 分别以三株 McAb 作为一抗, 室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 遍, 加入 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:100 倍稀释)室温孵育 1 h, PBS 洗

涤3遍。倒置荧光显微镜下观察、成像。

**1.4.4 杂交瘤细胞分泌稳定性检测。**对建立的三株单克隆细胞株进行传代12次，每传3代进行一次细胞的冻存与复苏，并对细胞上清进行检测。

**1.5 ELISA 相加法预测 McAb 识别表位**

以CA重组蛋白为包被抗原，采用间接ELISA相加法鉴别McAb识别的表位是否相同：三株杂交瘤培养上清两两相配，等量混合，取混合液100 μl作为一抗，同时设未混合的三株杂交瘤培养上清为参照，每样品设4个复孔。以辣根过氧化物酶标

记的山羊抗小鼠IgG为二抗，OPD显色，测定A<sub>490</sub>值。

**1.6 重叠短肽的引物设计**

应用Oligo6.0生物学软件，对质粒pGEM-T-ca<sup>[11]</sup>中的ca基因序列进行分析，将其分为相互重叠的4个片段：ca1、ca2、ca3、ca4，并设计了相应的4对引物。在上下游引物中分别引入BamH I、Not I两个酶切位点，并加了保护碱基，同时保证阅读框架没有移码。引物由大连宝生物工程有限公司合成，序列如表1。

**Table 1 Sequences of oligonucleotide primers used in PCR amplification**

Primer	Sequence
G1a/G1b	5' ATAGGATCCATGTGCTCACAATACGGTCT 3'/ 5' GCGCGGCCGCTTCCATAGTAAATAATC 3'
G2a/G2b	5' TAAGGATCCATGGGGGAGATTATTTACTA 3'/ 5' GCGCGGCCGCTGCATATGCACCAGGTTAA 3'
G3a/G3b	5' GCGGGATCCATGACTCAACTTAATTCTTA 3'/ 5' ATAGCGGCCGCTGTTCATCTGACATTAT 3'
G4a/G4b	5' ATAGGATCCATGGATAGTATAGGTAAGATA 3'/ 5' GCGCGGCCGCACAAATGCGAATAAAAATC 3'

**1.7 JSRV 衣壳蛋白基因的 PCR 分段扩增及表达**

以pGEM-T-ca为模板，分4段对衣壳蛋白基因分别进行PCR扩增。反应条件为：反应总体积25 μl，包括Ex Taq酶0.25 μl，10×缓冲液2.5 μl，dNTP 2 μl，20 μmol/L的上游引物和下游引物各1 μl，模板0.5 μl，双蒸水补至25 μl。PCR反应扩增参数为：95℃预变性3 min，94℃变性30 s，56℃退火30 s，72℃延伸30 s，30个循环后，再72℃延伸3 min。分段扩增的PCR产物用试剂盒QIA quick PCR Purification Kit回收。将表达载体pET-32a及4个片段的PCR产物进行BamH I/Not I双酶切，酶切产物用试剂盒QIA quick PCR Purification Kit回收。PCR酶切产物分别与载体pET-32a酶切产物16℃连接2 h。连接产物按常规方法转化感受态BL21细胞。以PCR方法鉴定目的基因的插入，并挑选阳性菌送上海生工生物技术公司测序。将4个测序正确的含重组质粒pET-ca1、pET-ca2、pET-ca3、pET-ca4的BL21菌种接种于含氨苄的LB培养液中，于37℃空气摇床中培养至A<sub>600</sub>为0.4~0.6时，加入诱导剂IPTG至终浓度为0.8 mmol/L，同时设空白菌及空载体诱导菌为对照。继续培养6 h，经5 000 r/min离心收获细菌。

**1.8 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析**

将诱导的表达菌体用0.1 mol/L PBS洗涤2次，然后0.1 mol/L PBS悬浮细胞，经超声波裂解后，取适量诱导产物加入等体积的2×SDS电泳上样缓冲液裂解细胞，在沸水中煮沸5 min，然后用15%的SDS-PAGE分析，经0.25%考马斯亮蓝染色过

夜，脱色液脱色观察电泳结果。

**1.9 重叠短肽的表位分析**

将表达蛋白经SDS-PAGE后，用半干式电转仪(16 V 15 min)转移到PVDF膜上进行Western blot分析：以杂交瘤细胞培养液上清为一抗，HRP标记的山羊抗小鼠IgG为二抗，工作浓度为1:5 000，经化学发光法成像仪成像。

**1.10 非竞争性 ELISA 法测定三株单抗的功能性亲和常数**

按文献方法<sup>[12,13]</sup>，确定最佳反应条件。具体方案为：用包被液梯度稀释CA重组蛋白至2.0、1.0、0.5、0.25 mg/L，每孔100 μl加入酶标板后4℃湿盒孵育24 h。洗板后室温封闭2 h，用洗涤液梯度稀释三株纯化单抗(源于自制腹水，经鉴定均为IgG)至10 000、2 500、625、156.3、39.1、9.8、2.5、1.2 μg/L，每孔100 μl，每浓度3个重复，分别加入上述不同浓度抗原包被的酶标板中。抗原抗体于4℃湿盒反应16 h，以辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG为二抗，室温作用2 h，OPD显色。

**2 结 果**

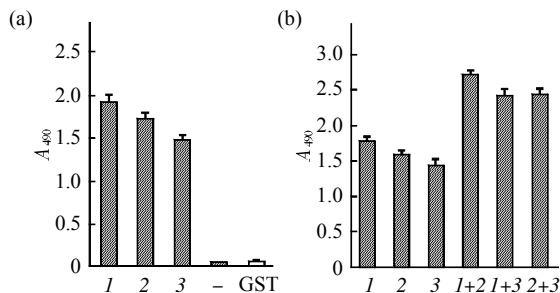
**2.1 杂交瘤细胞筛选及分泌稳定性检测**

运用“方阵法”确立最佳抗原包被浓度，CA重组蛋白约为0.4 mg/L，GST标签蛋白约为0.5 mg/L。经间接ELISA方法检测融合细胞培养上清，有三株杂交瘤细胞培养上清与纯化的CA重组蛋白呈阳性反应，而不与GST标签蛋白反应，分别命名为A1a、F11a、D6c。对建立的三株单克隆

细胞株进行传代 12 次, 每 3 代进行一次细胞的冻存与复苏, 并对细胞上清进行检测. 结果表明, 三株细胞均能稳定分泌单克隆抗体, 其 A 值检测结果如图 1a, 图中斜线柱为 CA 重组蛋白作为抗原对 A1a、F11a、D6c、SP2/0 细胞上清检测的 A 均值, 白色柱为 GST 标签蛋白为抗原对 A1a、F11a、D6c 细胞上清检测的 A 均值. 并且三株杂交瘤细胞培养上清的效价检测结果均稳定为 1:256.

## 2.2 ELISA 相加法预测 McAb 识别表位

如果两株 McAb 针对同一表位, 则混合抗体反应的 A 值与单株 McAb 相比不增高. 如果它们针对的是不同表位, 则其 A 值比单株相比表现为增高. 基于此原理, 设计了 ELISA 相加法, 用于测定三株 McAb 识别的表位是否相互独立<sup>[14]</sup>. 按公式  $AI = [2A_{1+2}/(A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$  计算相加系数, 结果表明 AI 值均大于 50%, 如图 1b. 提示三株 McAb 间没有竞争性抑制现象, 相加试验阳性, 说明了三株 McAb 针对的是不同的三个表位.

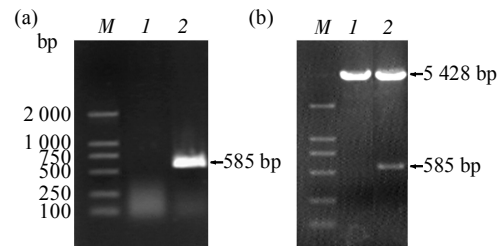


**Fig. 1 Screening anti-JSRV-CA McAbs by indirect ELISA(a) and epitope identification by indirect ELISA(b)**

1: Supernatant collected from hybridoma cell line A1a; 2: Supernatant collected from hybridoma cell line F11a; 3: Supernatant collected from hybridoma cell line D6c; -: Supernatant collected from SP2/0 myeloma cell (negative control); GST: Supernatant collected from hybridoma cell line A1a, F11a, D6c respectively; 1+2: Supernatant collected from hybridoma cell line A1a and D6c in half and half; 1+3: Supernatant collected from hybridoma cell line A1a and F11a in half and half; 2+3: Supernatant collected from hybridoma cell line D6c and F11a in half and half. ■: ELISA plates were coated with GST-CA fusion protein; □: ELISA plates were coated with GST tag.

## 2.3 真核表达质粒的构建与鉴定

以 pGEM-T-*ca*<sup>[11]</sup> 为模板扩增目的片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 符合预期片段大小 585 bp, 见图 2a. 连接 PCR 产物和真核表达载体 pcDNA3.1(+), 连接产物转化感受态细胞, 小提质粒用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 结果如图 2b. 酶切鉴定阳性的菌株命名为 pcDNA3.1(+)-*ca*-HA. 经上海生工生物技术公司测序表明序列完全正确.

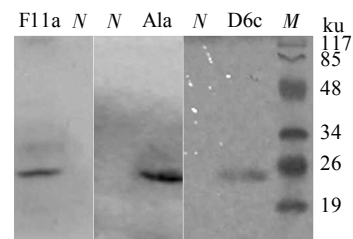


**Fig. 2 The construction of pcDNA3.1(+)-*ca*-HA(a) and identification by restriction enzyme digestion(b)**

M: DNA marker (DL2000). (a) 1: Negative control; 2: PCR product of gene *ca*. (b) 1: pcDNA3.1(+) digested by *EcoR* I and *Xho* I; 2: pcDNA3.1(+)-*ca*-HA digested by *EcoR* I and *Xho* I.

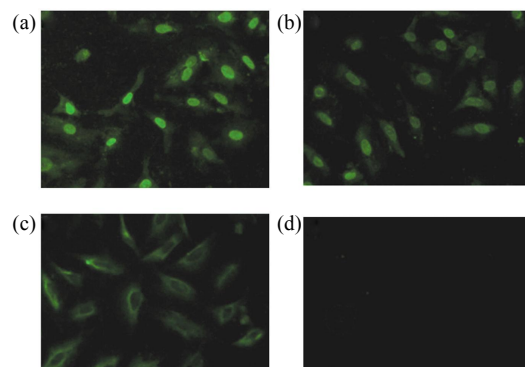
## 2.4 真核表达蛋白对 McAb 进行鉴定

用细胞裂解液分别消化并收集转染细胞与阴性对照细胞(图 3), Western blot 检测结果显示, 转染细胞有一条与预期大小相符的约 25 ku 的特异性条带, 而阴性对照均未出现条带, 表明三种单克隆抗体均能识别真核细胞表达的 CA 蛋白. IFA 检测结果也表明三株 McAb 能与真核表达的蛋白质反应并呈现特异性荧光, 而阴性对照未见荧光(图 4).



**Fig. 3 Specific reaction between eukaryotic expression protein and McAb detected by Western blot**

A1a, F11a, D6c:293 cells infected by pcDNA3.1(+)-*ca*-HA; N: Negative control (293 cells infected by pcDNA3.1(+)); M: Prestained protein molecular mass marker.

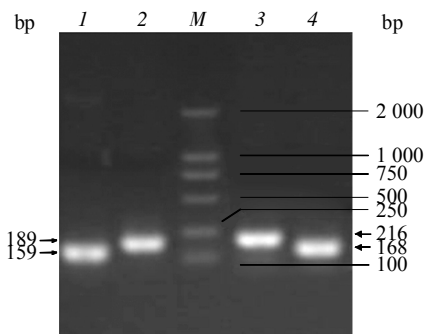


**Fig. 4 Specific reaction between eukaryotic expression protein and McAb detected by IFA(400×)**

(a) Supernatant collected from hybridoma cell line A1a. (b) Supernatant collected from hybridoma cell line F11a. (c) Supernatant collected from hybridoma cell line D6c. (d) Supernatant collected from SP2/0 myeloma cell.

### 2.5 *ca* 基因的分段扩增

各基因片段预测大小分别为 *ca1* 159 bp, *ca2* 189 bp, *ca3* 216 bp, *ca4* 168 bp. 用含 EB 替代染料的 10 g/L 琼脂糖凝胶对各基因片段的 PCR 产物



**Fig. 5 PCR products of *ca* gene fragment**

1: PCR product of *ca1*; 2: PCR product of *ca2*; M: DNA marker DL2000; 3: PCR product of *ca3*; 4: PCR product of *ca4*.

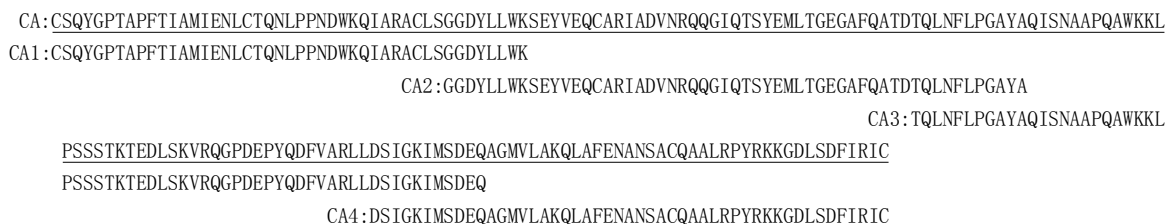
进行电泳, 结果表明各目的基因均与预测的大小相符(图 5).

### 2.6 阳性表达菌的鉴定

挑转化后的克隆菌接种 LB 培养液, 37°C 震荡培养过夜. 分别取 3  $\mu$ l 菌液于 96°C 变性 10 min 作为模板进行菌液 PCR 鉴定, PCR 产物与预期大小一致的菌株为阳性菌, 经上海生工生物技术公司测序, 结果表明, 送检的 4 个样品核苷酸序列与 *ca* 基因的对应片段完全一致, 插入方向正确, 读码框没有移位, 保证了表达的多肽片段的正确性.

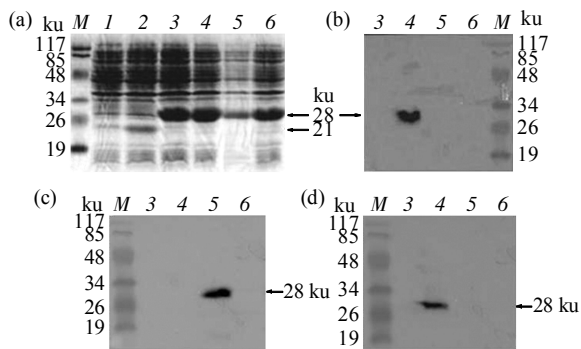
### 2.7 CA 蛋白的分段表达

CA 蛋白全长 183 个氨基酸, CA1 编码第 1~45 位氨基酸, CA2 编码第 38~92 位氨基酸, CA3 编码第 81~145 位氨基酸, CA4 编码第 134~183 位氨基酸. 各片段在全长蛋白中对应的位置如图 6 所示.



**Fig. 6 The locations of overlapping proteins in the CA sequence**

用 IPTG 对测序正确的重组表达菌进行诱导表达, 经 SDS-PAGE 分析结果为: 空载体诱导菌表达出约 21 ku 的标签蛋白, 各重组表达菌表达出约 28 ku 的融合蛋白, 均与理论大小相符. 结果见图 7a.



**Fig. 7 Expression of plasmid pET-*ca1*, pET-*ca2*, pET-*ca3*, pET-*ca4*(a) and epitopes analysis by Western blot(b: A1a, c: D6c, d: F11a)**

M: Prestained protein molecular mass marker; 1: BL21 bacteria; 2: Induced pET-32a (GST tag); 3: Induced pET-*ca1* (CA1); 4: Induced pET-*ca2*(CA2); 5: Induced pET-*ca3*(CA3); 6: Induced pET-*ca4*(CA4).

### 2.8 三株单抗 Western blot 表位鉴定

将经 SDS-PAGE 分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 分别以杂交瘤细胞株 A1a、D6c、F11a 培养上清作为一抗, 进行 Western blot 试验. 结果表明, A1a、F11a 分泌的单抗均与 CA2 蛋白发生特异性反应(图 7b, 7d), 而 D6c 分泌的单抗与 CA3 蛋白发生特异性反应(图 7c). 分析图 6 各段多肽的重叠区域并结合 Western blot 试验结果可知: A1a、F11a 分泌的单抗识别同一段多肽, 初步鉴定的线性表位氨基酸序列为 SEYVEQCARIADVNRQQ-GIQTSYEMLTGEGAFQATD, ELISA 相加法表位预测结果表明, A1a、F11a 识别的表位是相对独立的, 即它们识别多肽 CA2 的不同区域. 而 D6c 分泌的单抗识别的线性表位氨基酸序列为 QISNAARQAWKKLPSSSTKTEDLSKVRQGPDEPYQDFVARLL.

### 2.9 三株单抗的抗原抗体结合反应曲线及抗体亲和常数的推导

参照 Beatty 等<sup>[12]</sup>建立的方法, 不同浓度抗原包

被条件下, 一定范围内  $A$  值与包被的抗原浓度呈良好的线性关系. 以 5% 递减法确定各曲线的结合反应平台期, 取  $A$  值在 0.15~2.5 间的数值建立抗原抗体结合反应曲线(图 8). 通过作图法取最大  $A$  值一半(即  $A$  50%)处对应的抗体浓度, 按经典的质量作用定律推导的公式  $K=(n-1)/2(nAb'-Ab)$  计算亲

和常数, 式中  $Ab'$  和  $Ab$  分别为抗原浓度为  $Ag'$  和  $Ag$  时,  $A$  50% 的抗体浓度,  $n=Ag/Ag'$ . 经两两比较, 可得  $K$  值. 如:  $n$  为 2、4、8 时分别可得 3、2、1 个  $K$  值, 取其均值为最终结果. 经计算三株单抗 A1a、D6c、F11a 的亲亲和常数分别为  $1.52 \times 10^8$ 、 $6.7 \times 10^7$ 、 $6.5 \times 10^7$  L/mol.

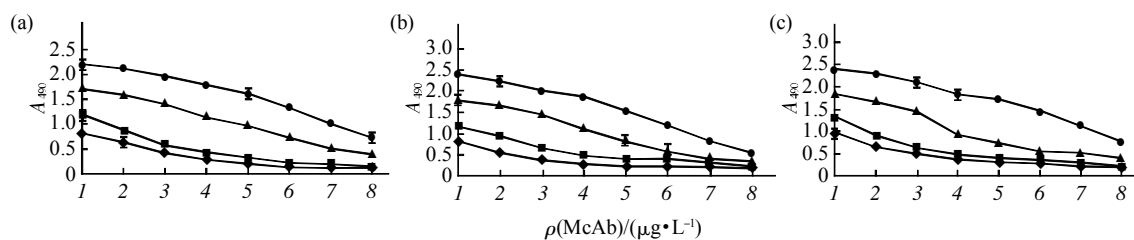


Fig. 8 Binding curve of three McAbs (A1a, D6c, F11a) to JSRV-CA (coated antigen)

1: 10 000  $\mu\text{g/L}$ ; 2: 2 500  $\mu\text{g/L}$ ; 3: 625  $\mu\text{g/L}$ ; 4: 156.3  $\mu\text{g/L}$ ; 5: 39.1  $\mu\text{g/L}$ ; 6: 9.8  $\mu\text{g/L}$ ; 7: 0.6  $\mu\text{g/L}$ ; 8: 0.15  $\mu\text{g/L}$ . ●—●: 2  $\mu\text{g}$ ; ▲—▲: 1  $\mu\text{g}$ ; ■—■: 0.5  $\mu\text{g}$ ; ◆—◆: 0.25  $\mu\text{g}$ . (a) A1a. (b) D6c. (c) F11a.

### 3 讨 论

JSRV 感染羊后, 形成整合有外源性前病毒 DNA(exJSRV)的肺肿瘤细胞. 有趣的是, 健康羊基因组携有 15~20 拷贝, 与 JSRV 密切相关的内源性病毒 DNA(enJSRV). enJSRV 是几百万年前, JSRV 形成前病毒 DNA 整合入羊生殖细胞, 在羊与病毒漫长的共进化过程中固定下来, 随宿主细胞基因组遗传复制并发挥一定的生理功能<sup>[5]</sup>. 健康羊体内, enJSRV 表达的蛋白与 JSRV 病毒粒子的蛋白高度一致, 能与 JSRV 的受体结合竞争性阻断 JSRV 的感染, 并导致免疫耐受, 使得感染羊无针对 JSRV 的循环性抗体. 因此, 无论是该疾病的诊断还是免疫, 均需另辟蹊径.

绵羊肺腺瘤(OPA)作为人类肺癌的研究模型被广泛认同, 尤其与人的细支气管-肺泡癌(BAC)的相关性研究得到了国际上的极大关注. OPA 与 BAC 均为鲜有转移扩散的慢性肿瘤, 临床上表现为咳嗽及进行性呼吸困难. BAC 不同于其他的非小细胞肺癌: 在流行病学上, BAC 与吸烟无明显的相关性, 且在妇女和年轻人群中发生率呈上升趋势, 较其他类型的非小细胞肺癌有相对良好的预后(五年存活率: 60%较 7.3%). 基于两种肿瘤的相似性, 长期以来人们一直假定 BAC 是由某一种病毒引起的肿瘤性疾病(约 15%~20%的人类肿瘤被认为与相关的病原相关联). 临床学及分子学两个层面上, 支持两种肿瘤相关性的证据主要有: 症状及流行病学特征, 人类细胞表面广泛存在有 JSRV 的受体 Hyal2, JSRV 囊膜蛋白致人类细胞恶性转化

的可能性, 一定比例的抗原交叉性反应, 非洲人群有 JSRV 相关序列. 而不支持两者相关性的证据主要有: 无从羊群传播 JSRV 感染人的证据, 迄今为止, 在肺癌病人中没检测到 JSRV 的相关 DNA 或 RNA<sup>[6]</sup>. 因而, 关于两种疾病的相关性研究还有很漫长的探索之路.

近年来, 单克隆抗体在研究蛋白质结构及功能方面, 以及抗原表位的分析和精确定位方面都起到了促进作用. 抗原表位的获得在新一代疫苗的研制和诊断抗原的设计过程中都是至关重要的. Western blot 法表位鉴定及 ELISA 相加法表位预测的结果表明, 本研究获得的三株单克隆抗体分别识别不同的三个表位, 其亲和常数约在  $10^8$  水平, 与目的蛋白具有较高的亲和力, 可应用于免疫学检测, 并可望在以后的研究工作中发挥一定的作用: 鉴定人肺癌病例中与 JSRV-CA 呈抗原交叉反应的特异性蛋白及编码该蛋白的 DNA 序列; 探测人肺癌病例中与 JSRV 相关的 DNA 序列和反转录病毒. 我们初步建立的双夹心 ELISA 捕获抗原法, 表明它们均能与自然感染病例的鼻液及肺肿瘤组织匀浆液发生阳性反应, 进一步说明三株单抗均可识别天然病毒粒子.

### 参 考 文 献

- Demartini J, Bishop J, Allen T, et al. Jaagsiekte sheep retrovirus proviral clone JSRV (JS7), derived from the JS7 lung tumor cell line, induces ovine pulmonary carcinoma and is integrated into the surfactant protein A gene. *J Virol*, 2001, **75**(9): 239~246
- 马学恩主编. 家畜病理学. 第 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2007. 385~386

- Ma X E. Pathology of Domestic Animals. 4th. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2007. 385~386
- 3 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第2版. 科学出版社, 1997. 837~894
- Yin Z, Liu J H. Animal Virology. 2nd. Beijing: Science Press, 1997. 837~894
- 4 Dalefield R, Alley M. An ovine pulmonary tumour of alveolar epithelial type II cells. NZ Vet J, 1988, **36**(3): 25~27
- 5 Mornex J, Thivolet F, De las Heras M, *et al.* Pathology of human bronchioloalveolar carcinoma and its relationship to the ovine disease. Microbiol Immunol, 2003, **275**(3): 225~248
- 6 Sharp J, De Martini J. Natural history of JSRV in sheep. Microbiol Immunol, 2003, **275**(1): 55~79
- 7 Jassim F. Identification and characterization of transformed cells in jaagsiekte, a contagious lung tumour of sheep: [Ph. D dissertation]. UK: University of Edinburgh, 1988
- 8 Denis F, Robert V, Daniel, *et al.* Isolation, identification, and partial cDNA clong of genomic RNA of jaagsiekte retrovirus, the etiological agent of sheep pulmonary adenomatosis. J Virol, 1991, **65**(9): 5061~5067
- 9 Hiatt K, Highsmith W. Lack of DNA evidence for jaagsiekte sheep retrovirus in human bronchioloalveolar carcinoma. Hum Pathol, 2002, **33**(6): 680
- 10 Morozov V, Lagaye S, Lower J, *et al.* Detection and characterization of betaretroviral sequences, related to sheep Jaagsiekte virus, in Africans from Nigeria and Cameroon. Virology, 2004, **327** (10): 162~168
- 11 斯日古楞, 玄宏强, 马学恩, 等. 绵羊肺腺瘤病毒株衣壳蛋白基因的克隆与原核表达. 中国预防兽医学报, 2007, **29**(8): 584~587
- SiRiGuleng, Yao H Q, Ma X E, *et al.* Chin J Preventive Veterinary Med, 2007, **29**(8): 584~587
- 12 Beatty J D, Beatty G B. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. J Immunol Methods, 1987, **100**(6): 173
- 13 Loomans E E M G, Roelen A J M, Van Damme H S, *et al.* Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunol Methods, 1995, **184**(8): 207
- 14 沈关心, 周汝麟主编. 现代免疫学实验技术. 第2版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002. 34~35
- Shen G X, Zhou R L. Modern Immunology Experiment Technology. 2nd. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2002. 34~35
- 15 Carlson J, Bishop J, Lyon M, *et al.* Chromosomal distribution of endogenous Jaagsiekte sheep retrovirus proviral sequences in the sheep genome. J Virol, 2002, **75**(9): 4239~4246
- 16 Caroline L, Nicolas G, Vincent C, *et al.* Jagsiekte sheep retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. Vet Res, 2007, **38**(2): 211~228

## Preparation and Immunological Identification of Monoclonal Antibody Against JSRV-CA\*

LUO Jun-Rong<sup>1,2</sup>, Siriguleng<sup>1</sup>, LIU Xiao-Hui<sup>1</sup>, ZHOU Jian-Hua<sup>3</sup>, MA Xue-En<sup>1</sup>\*\*

<sup>1</sup> College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

<sup>2</sup> College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

<sup>3</sup> Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 100051, China)

**Abstract** Balb/c mice were immunized four times by the purified fusion CA protein which was emulsified with freund's adjuvant. Then, cell fusion was conducted according to standard procedure. Positive hybridoma clones were screened by indirect ELISA and Western blot. Three hybridoma clones that stably secreted specific monoclonal antibody against JSRV-CA were developed. Meanwhile, JSRV *ca* gene was divided into four overlapping fragments and expressed in *E. coli* BL21 respectively. Pepscan technology was employed to screen the antigen epitope through the expressed fusion proteins were detected respectively with three McAbs by Western blot. Then three liner epitopes recognized by three McAbs were preliminary identified, and the functional affinities of anti-CA McAbs were assessed with non-competitive ELISA method. All this may be helpful in understanding molecular properties of JSRV-CA and may be useful for pathogenic diagnosis and vaccine design.

**Key words** JSRV, epitope, capsid protein, antibody affinity, McAb

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30660136) and National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences(CAAS) (NKLVB200801).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-471-4310745, E-mail: xueen.ma@163.com

Received: August 7, 2008 Accepted: October 20, 2008