中国畜牧兽医 2017,44(3):868-878
China Animal Husbandry & Veterinary Medicine
doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2017.03.035

牛支原体 HB0801 株 VspX 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

陈 曦,朱洪梅,赵 刚,胡长敏,陈颖钰,郭爱珍*
(华中农业大学动物医学院,农业微生物国家重点实验室,武汉 430070)

摘 要:为获得牛支原体(*Mycoplasma bovis*,*M. bovis*) VspX 蛋白单克隆抗体,将编码该蛋白的基因克隆、表达并纯化,作为免疫原,以 QuickAntibody-Mouse 5W 为免疫佐剂,免疫 BALB/c 小鼠。经 3 次免疫后,将小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,经 3 次亚克隆筛选后,共获得 5 株能稳定分泌抗 VspX 蛋白抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 1A8、3A3、3C12、3H9 及 4D11。亚型鉴定表明,3C12 重链为 IgG2b,其余 4 株为 IgG1,轻链均为 κ 链。间接 ELISA 结果表明,5 株细胞培养上清的抗体效价在 $1:1\times10^4\sim1:2\times10^5$,腹水效价在 $1:1\times10^5\sim1:8\times10^5$。选其中两株杂交瘤细胞株 3H9 和 4D11 的腹水纯化,进行亲和力测定,解离常数分别为 6.3×10^9 和 7.8×10^9,属高亲和力抗体。Western blotting 结果显示,5 株单抗均能与牛支原体发生特异性反应,而单抗 4D11 与羊无乳支原体标准株 PG2 和丝状支原体丝状亚种标准株 PG3 均不反应。流式细胞术结果表明,单抗 4D11 与牛支原体表面的 VspX 的结合呈剂量依赖性。间接免疫荧光结果表明,单抗 4D11 可以识别黏附到胚胎牛肺细胞上的重组 VspX 蛋白。本试验成功制备的单克隆抗体为 VspX 蛋白功能的研究奠定基础。

关键词:牛支原体;VspX 蛋白;单克隆抗体;特异性
中图分类号:S852.62 文献标识码:A 文章编号:1671-7236(2017)03-0868-11

Preparation and Identification of the Monoclonal Antibodies against VspX Protein in *Mycoplasma bovis* strain HB0801

CHEN Xi, Zhu Hong-mei, ZHAO Gang, HU Chang-min, CHEN Ying-yu, GUO Ai-zhen*
(*State Key Laboratory of Agricultural Microbiology*, *College of Veterinary Medicine*, *Huazhong Agricultural University*, *Wuhan* 430070, *China*)

Abstract: To obtain the monoclonal antibody (McAb) against VspX protein of *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), *VspX* gene was amplified, expressed and purified. Then, BALB/c mice were immunized subcutaneously three times with the purified recombinant VspX (rVspX) mixed with QuickAntibody-Mouse 5W adjuvant. Three days after the last injection, spleen cells were collected aseptically, and fused with SP2/0 myeloma cells in the presence of polyethylene glycol. By the clone selection, five stable hybridomas against VspX protein were obtained, separately named as 1A8, 3A3, 3C12, 3H9 and 4D11. Antibody titers in cell supernatant were from $1:1\times10^4$ to $1:2\times10^5$, while from $1:1\times10^5$ to $1:8\times10^5$ in ascites of mice by indirect ELISA. The subtypes were determined to be IgG1 and IgG2b class, and all light chains were κ chain. The affinity constant of McAb 3H9 and 4D11 were 6.3×10^9 and 7.8×10^9, respectively, and they belonged to high-affinity antibodies. Western blotting results showed that all of five McAbs could specifically react with *M. bovis*, however, McAb 4D11 could not react with *Mycoplasma arginini* PG2 and *Mycoplasma mycoides* subsp. PG3. Flow cytometry showed that McAb 4D11 reacted with surface VspX of

收稿日期:2016-08-20
基金项目:国家自然科学基金(31302111、31272587);中央高校基本科研业务费专项资金(2013QC001)
作者简介:陈 曦(1974-),女,黑龙江汤原人,硕士,讲师,研究方向:牛支原体病,E-mail:chenxi@mail.hzau.edu.cn
*通信作者:郭爱珍(1965-),女,湖南沅江人,教授,研究方向:动物疫病防制,E-mail:aizhen@mail.hzau.edu.cn

M. bovis in a dose-dependent manner. Indirect immunofluorescence assay demonstrated that 4D11 McAb was able to detect rVspX protein binding to embryonic bovine lung cells. In the present study, McAbs against rVspX protein had been successfully prepared, which provided a basis for future researches about the function of VspX protein and the pathogenesis of *M. bovis*.

Key words: *Mycoplasma bovis*; VspX; monoclonal antibody; specificity

牛支原体(*Mycoplasma bovis*, *M. bovis*)属于柔膜体纲，支原体属，无细胞壁，是严重危害养牛业的一种病原菌。它能引起肺炎、关节炎、乳腺炎、角膜炎、耳炎、生殖道炎症、流产、不孕和神经系统功能障碍等多种疾病[1-2]。目前，该病在世界范围内广泛流行，给养牛业造成严重经济损失[1]。自 2008 年湖北省首发该病以来[3-4]，随着动物运输，现已在全国广泛蔓延[5-7]。尽管牛支原体的致病机理和毒力因子仍不十分清楚[8]，然而，GenBank 上提交的牛支原体 PG45、Hubei-1、CQ-W70、NM2012 和 HB0801 菌株全基因组序列，为牛支原体致病机理研究提供了大量的生物学信息。比较基因组分析表明，不同菌株牛支原体具有高度可塑性和非常密切的关系，变化的表面脂蛋白 Vsps (variable surface lipoproteins)广泛分布于各株牛支原体中[9-11]。有研究表明，牛支原体的 Vsps 可能是潜在的致病相关因子，在支原体感染宿主细胞时起黏附作用，同时，Vsps 大小和抗原决定簇可发生高频率变化，使其逃避宿主免疫系统，引起持续慢性感染[12]。此外，Vsps 也与牛支原体生物膜形成有关，表达 VspO 蛋白或 VspB 蛋白的菌株比表达 VspF 蛋白的菌株有更强的生物膜形成能力，抵抗环境应激能力更强[13]。华中农业大学农业微生物国家重点实验室前期对 *M. bovis* HB0801 株测序结果表明，*VspX* 基因编码一种变化的表面脂蛋白[10]，且 Western blotting 结果表明，它是一种免疫原性蛋白，能与人工感染或自然感染牛支原体的血清发生反应。该蛋白目前已在牛支原体 Hubei-1 株确定为一种黏附相关蛋白，命名为变化表面脂蛋白 A (VpmaX)[14]。为深入研究该蛋白的功能及其与致病的相关性，本研究制备了抗 VspX 蛋白的单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试验动物与细胞　SPF 级雌性 6 周龄 BALB/c 小鼠购自湖北省实验动物中心。*M. bovis* HB0801 临床分离株，大肠杆菌 DH5α、BL21 (DE3)、表达载体 pET-30a(+)和小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 均由华中农业大学农业微生物国家重点实验室保存。胚胎牛肺细胞(embryonic bovine lung, EBL)由哈尔滨兽医研究所薛飞研究员惠赠。

1.1.2　主要试剂　QuickAntibody-Mouse 5W 快速免疫佐剂购自北京康碧泉公司；HAT、HT、PEG4000 和 Anti-Mouse IgG-FITC 抗体均购自 Sigma 公司；HRP 标记山羊抗鼠 IgG(H+L)、单克隆抗体亚类鉴定试剂盒均购自 Southern Biotech 公司；改良型 RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司；胎牛血清购自 Gibco 公司；DAPI 购自上海碧云天公司；Protein G 亲和层析柱购自 GE 公司。

1.2　方法

1.2.1　*M. bovis VspX* 基因克隆和载体构建　根据 GenBank 数据库中牛支原体 HB0801 株中 *VspX* 基因序列(登录号：NC_018077.1)，设计突变引物(表 1)，分别引入酶切位点 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ。由于密码子使用的偏好性不同，在牛支原体中编码色氨酸的密码子 TGA 在大肠杆菌表达系统中被作为终止密码子，因此，将 TGA 突变成同义密码子 TGG，这样在大肠杆菌中就可得到编码基因全长表达。通过重叠延伸 PCR 获得突变的基因序列，酶切后与 pET-30a(+)连接，转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，筛选重组子并进行酶切、PCR 和测序鉴定，获得正确重组质粒 pET-30a-VspX。

表 1 克隆 *VspX* 基因所用引物

Table 1 Primers used for cloning *VspX* gene

引物名称 Primers name	序列 Sequence/(5′→3′)	突变位点 Mutant site (A-G)	限制性内切酶 Restriction enzyme
VspX-a1	CCGGAATTCATGAAAAGCATCAATAAAT	474	*Eco*R Ⅰ
VspX-a2	TGGATCTGGTTTTTCAAACCAGTAATCAAAGT		
VspX-b1	CTACACTTTGATTACTGGTTTGAAAAAC	474	
VspX-b2	CGCAAGCTTTTATTTTATAATTTTCTCAAAT		*Hind* Ⅲ

波浪线表示酶切位点;单下划线表示突变位点

Wase lines indicated the restriction enzyme sites; Single underlines indicated the mutant sites

1.2.2 重组 VspX 蛋白(rVspX)表达、纯化 将重组质粒 pET-30a-VspX 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,将阳性菌落接种至 LB 液体培养基,待生长至对数期,加入终浓度为0.8 mmol/L IPTG,在 37 ℃诱导 3 h,离心收集菌体,液压破碎,用 Ni-NTA His 亲和层析法,在 BioLogic LP 层析系统上纯化菌体破碎后上清液。

1.2.3 单克隆抗体的制备 选取 5 只 BALB/c 小鼠,免疫方法按 QuickAntibody-Mousw 5W 免疫佐剂说明书进行,初次免疫将纯化的 rVspX 蛋白(20 μg/只)与等体积的 QuickAntibody-Mousw 5W 佐剂充分混合,在小鼠股部肌肉注射(100 μL/只);21 d 后加强免疫一次;第 35 天采血,间接 ELISA 法检测血清抗体效价。于融合前 3 d,对抗体效价高于 1∶10 000 的小鼠加强免疫一次,然后取免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞(10∶1)在 PEG4000 的作用下进行融合。单克隆抗体的筛选、克隆化和腹水制备按常规方法进行[15]。

1.2.4 单克隆抗体效价测定 采用间接 ELISA 法测定单抗效价,将纯化的 rVspX 蛋白 100 ng/孔包被酶标板,4 ℃过夜,用含 Tween20 的 PBS(PBST)洗涤 3 次,并用含 5%脱脂奶的 PBST 在 37 ℃封闭 1 h,将杂交瘤细胞注射小鼠腹腔所采集的腹水及杂交瘤细胞培养上清液用 PBS 缓冲液以 1∶100开始稀释,以同等稀释度的仅注射 SP2/0 细胞的小鼠腹水及 SP2/0 细胞上清作为阴性对照,37 ℃孵育 45 min,再次用 PBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记羊抗鼠二抗,37 ℃孵育 30 min,用 PBST 洗涤 5 次,加入 TMB 底物显色 10 min,用 0.025%氢氟酸终止反应后,用酶标仪于 $D_{630\ nm}$ 读数。

1.2.5 单克隆抗体亚型的鉴定 用小鼠单克隆抗体亚型快速鉴定试剂盒测定单克隆抗体亚型,按操作说明进行。

1.2.6 染色体分析 采用秋水仙素阻抑法对杂交瘤细胞的染色体进行分析,选择生长良好的杂交瘤细胞用秋水仙素处理,按常规方法固定、染色,在光学显微镜下进行染色体观察并计数。

1.2.7 Western blotting 验证单克隆抗体反应性 将培养至对数期的 *M. bovis* 离心收集,PBS 洗涤后裂解菌体,经凝胶电泳分离,然后转印至 PVDF 膜,各株单抗(1∶1 000 稀释)分别与膜在 4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤后,与山羊抗鼠的 IgG-HRP 为二抗(1∶4 000 稀释)室温作用 1 h,洗涤后,化学发光检测仪检测。

从 5 株中选取杂交瘤细胞生长速度较快,且细胞培养上清和腹水效价相对高,抗体反应性良好的两株(3H9 和 4D11)进行纯化和亲和力测定。

1.2.8 单克隆抗体的纯化 用 Protein G 亲和层析柱纯化抗体,按说明书进行,柱子先用 20 mmol/L Na_3PO_4 (pH 7.0)平衡,然后加入用 PBS 稀释的腹水,再用 0.1 mol/L glycine-HCl (pH 2.7)洗脱,收集管中预先加入适量1 mol/L Tris-HCl (pH 9.0)以中和洗脱液,最后用 Millpore 超滤管离心替换成 PBS 缓冲液。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定抗体浓度。

1.2.9 单克隆抗体亲和力测定 用间接 ELISA 方法测定单克隆抗体相对亲和力。将 rVspX 蛋白以 100 ng/孔包被在酶标板上,将 2 株纯化的单克隆抗体倍比稀释后作为一抗,以 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 为二抗,酶标仪 $D_{630\ nm}$ 测吸光值。数据处理分析参照文献[16],将 $D_{630\ nm}$ 平坦区的值视为 100%,曲线上 $D_{630\ nm}$ 为 50%的值所对应的单抗浓度(mol/L)的倒数就是亲和常数。

选其中亲和力较高的单抗 4D11 再进一步验证。

1.2.10 Western blotting 验证单克隆抗体特异性

单抗 4D11 与 *M. bovis* HB0801 株、羊无乳支原体标准株 PG2 和丝状支原体丝状亚种标准株 PG3 进行免疫印迹反应，检测单抗的特异性，方法同 1.2.7。

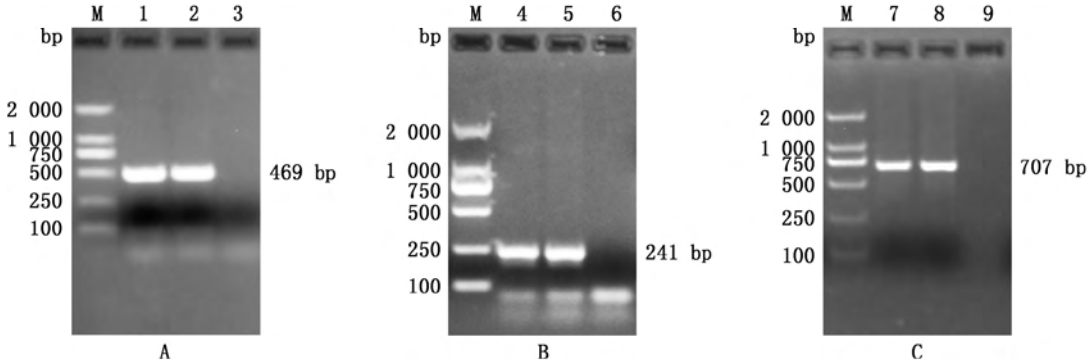
1.2.11　流式细胞术(FACS)检测单克隆抗体的反应性　　根据平板菌落计数结果，将培养的 *M. bovis* 调整浓度为 1×10^8 个 CFU/mL，重悬于 1% BSA 的 PBS 中，加入不同稀释浓度的单抗 4D11，于 4 ℃作用 1 h；PBS 洗 3 次，加入 1∶300 倍稀释的 FITC 标记的山羊抗鼠二抗，于 4 ℃避光作用 1 h；PBS 洗 3 次后，用 300 μL PBS 将细胞重悬后，用流式细胞仪分析，同时设定小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 诱导产生的腹水为阴性对照。

1.2.12　激光共聚焦显微镜检测单克隆抗体的反应性　　将胰酶消化的 EBL 细胞接种 24 孔板爬片，培养 20 h 后，PBS 洗涤 2 次；每孔加入 50 μg 纯化的 rVspX 蛋白，4 ℃黏附 1 h；4% 的甲醛室温固定 15 min；PBS 洗涤 2 次；1%BSA 的 PBS 溶液室温封闭 1 h 后，PBS 洗涤 2 次，每孔加入单抗 4D11 (1∶300)，室温 1 h；PBS 洗涤后加入 FITC 标记的山羊抗鼠抗体(1∶300)，室温避光作用 1 h；PBS 洗 3 次后，DAPI 染色细胞核15 min，PBS 洗 3 次，激光共聚焦显微镜下观察荧光信号。不加蛋白孔作为阴性对照。

2　结　果

2.1　*VspX* 基因的克隆

Oligo 7.0 软件分析 *VspX* 基因序列，发现在 474 位有一个编码色氨酸的 TGA 密码子，设计两对突变引物，将其突变为 TGG，结果分别扩增出含 496 bp 的 *VspX* 基因 A 片段(图 1A)和 241 bp 的 B 片段(图 1B)，再用重叠延伸 PCR 法将 A 片段和 B 片段连接在一起，获得含 707 bp 的 *VspX* 全长基因，与预期大小一致(图 1C)。



M，DL2000 DNA Marker；1、2，*VspX* 基因 A 片段的 PCR 产物；3，阴性对照；4、5，*VspX* 基因 B 片段的 PCR 产物；6，阴性对照；7、8，*VspX* 基因全长的 PCR 产物；9，阴性对照

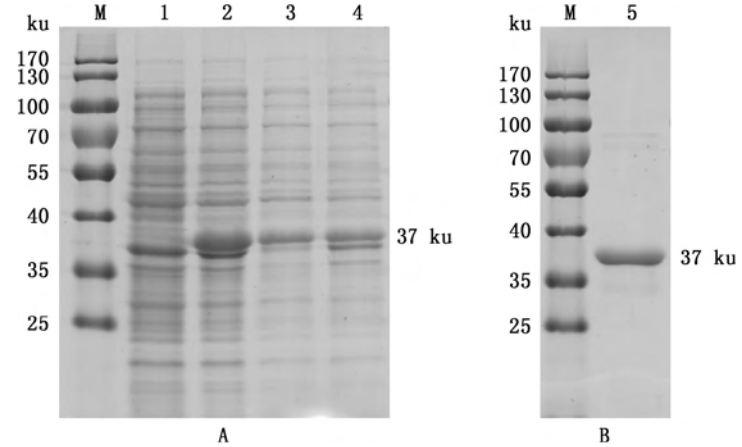
M，DL2000 DNA Marker；1 and 2，PCR products of A fragment；3，Negative control；4 and 5，PCR products of B fragment；6，Negative control；7 and 8，Full length of *VspX* gene；9，Negative control

图 1　***M. bovis VspX*** **基因的扩增**

Fig 1　Amplification of *M. bovis VspX* gene

2.2　rVspX 表达、纯化和鉴定

收集诱导后重组菌，液压破碎后，经 SDS-PAGE 分析，融合蛋白在诱导菌株裂解后的上清和沉淀中均有表达，约 37 ku 处蛋白质的表达量明显升高，与预期的蛋白质相对分子质量大小一致(图 2A)。上清经 Ni-NTA 柱亲和层析法纯化，梯度咪唑洗脱，获得纯化的 rVspX 蛋白(图 2B)，用于小鼠免疫。



M,高分子质量蛋白质标准;1,诱导前菌体蛋白;2,诱导后菌体蛋白;3,菌体破碎后上清;4,菌体破碎后沉淀;5,纯化的 rVspX

M,High Molecular Weight Protein Marker;1,Lysates of the transformed cells before induction;2,Lysates of transformed cells after induction;3,Supernatant of cell lysates;4,Precipitate of cell lysates;5,Purified rVspX

图 2 **rVspX** 蛋白的表达与纯化

Fig 2 Expression and purification of rVspX protein

2.3 单克隆抗体的制备

采用间接 ELISA 方法,用 rVspX 蛋白以 100 ng/孔包被酶标板,将第 2 次免疫后 14 d 采集的血清从 1∶100 倍开始进行倍比稀释,检测血清抗体的效价,测定 $D_{630\ nm}$后以阳性值/阴性值>2.1 的最大稀释度为血清抗体效价。结果表明,在经过 2 次 rVspX 蛋白免疫后的 BALB/c 小鼠,1、4、5 号小鼠的血清效价均较高,且 1 号小鼠的血清效价最高,产生的抗 rVspX 蛋白抗体效价为 $2^{13}\times100$,即8.192×10^5(图 3)。故 1 号小鼠用于后面融合试验。

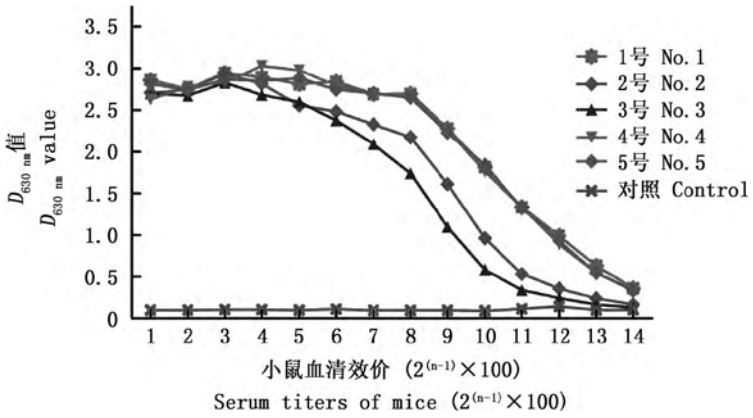


图 3 **rVspX** 蛋白免疫小鼠后血清效价

Fig 3 Serum titers of rVspX immunized mice

2.4 杂交瘤细胞的获得

加强免疫后 3 d,取 1 号小鼠脾脏,分离脾细胞,与 SP2/0 细胞融合后,用间接 ELISA 法对杂交瘤细胞进行筛选,经 3 次亚克隆纯化后,获得 5 株能稳定分泌抗 rVspX 蛋白的杂交瘤细胞株,分别命名为 1A8、3A3、3C12、3H9 和 4D11。

2.5　单克隆抗体效价测定

根据 P/N>2.1 为阳性原则，ELISA 检测 5 株杂交瘤细胞培养上清和腹水效价，结果见表 2。由表 2 可知，除了 4D11，其他单克隆抗体的腹水效价均高于杂交瘤细胞培养上清效价。

表 2　杂交瘤细胞培养上清及腹水抗体效价

Table 2　Antibody titers in cell supernatant and ascites

单抗 McAb	细胞上清 Titer in cell supernatant	腹水 Titer in ascites
1A8	$1:1\times10^4$	$1:4\times10^5$
3A3	$1:5\times10^4$	$1:1\times10^5$
3C12	$1:2\times10^4$	$1:8\times10^5$
3H9	$1:5\times10^4$	$1:4\times10^5$
4D11	$1:2\times10^5$	$1:2\times10^5$

2.6　单克隆抗体亚型的鉴定

按照单克隆抗体亚型鉴定试剂盒操作，用间接 ELISA 法分别对 5 株单克隆抗体进行亚型鉴定，结果显示 1A8、3A3、3H9 和 4D11 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体重链均属于 IgG1，只有 3C12 重链属于 IgG2b，且 5 株单克隆抗体轻链均为 κ 链（表 3）。

表 3　单克隆抗体亚型鉴定

Table 3　Identification of the subtype of antibodies

单抗 McAb	轻链 L chain	Ig 亚类 Ig subclass
1A8	κ	IgG1
3A3	κ	IgG1
3C12	κ	IgG2b
3H9	κ	IgG1
4D11	κ	IgG1

2.7　染色体计数

正常小鼠脾细胞染色体数为 40 条，SP2/0 骨髓瘤细胞染色体数为 62～68 条，杂交瘤细胞的染色体数均高于两亲本细胞的染色体数，表明 5 株均为杂交瘤细胞。1A8 为 100 条，3A3 为 88 条，3C12 为条 98 条，3H9 为 93 条，4D11 为 88 条（图 4）。

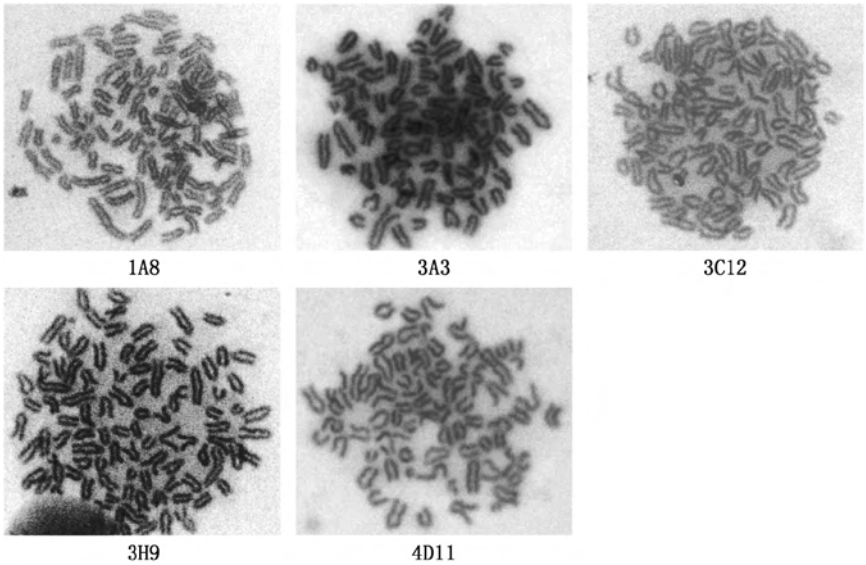
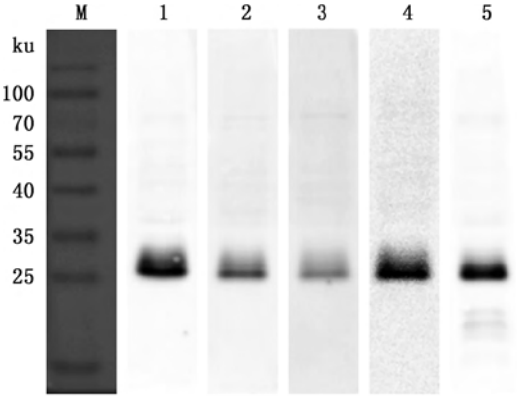


图 4　杂交瘤细胞的染色体计数（Giemsa，1 000×）

Fig 4　Chromosome number of hybridoma cells（Giemsa，1 000×）

2.8　单克隆抗体反应性分析

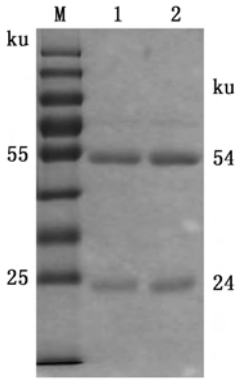
Western blotting 结果显示，5 株单抗均能与牛支原体 HB0801 发生阳性反应（图 5），在约 25 ku 处出现一条特异性条带，表明 5 株单抗均能特异性识别牛支原体中的 VspX 蛋白。



M,高分子质量蛋白质分子标准;1,1A8;2,3A3;3,3C12;4,3H9;5,4D11
M,High Molecular Weight Protein Marker;1,1A8;2,3A3;3,3C12;4,3H9;5,4D11
图 5 **Western blotting** 分析牛支原体 **HB0801** 与不同单克隆抗体反应性
Fig 5 Analysis of *M. bovis* HB0801 stain with different McAbs by Western blotting

2.9 单克隆抗体的纯化

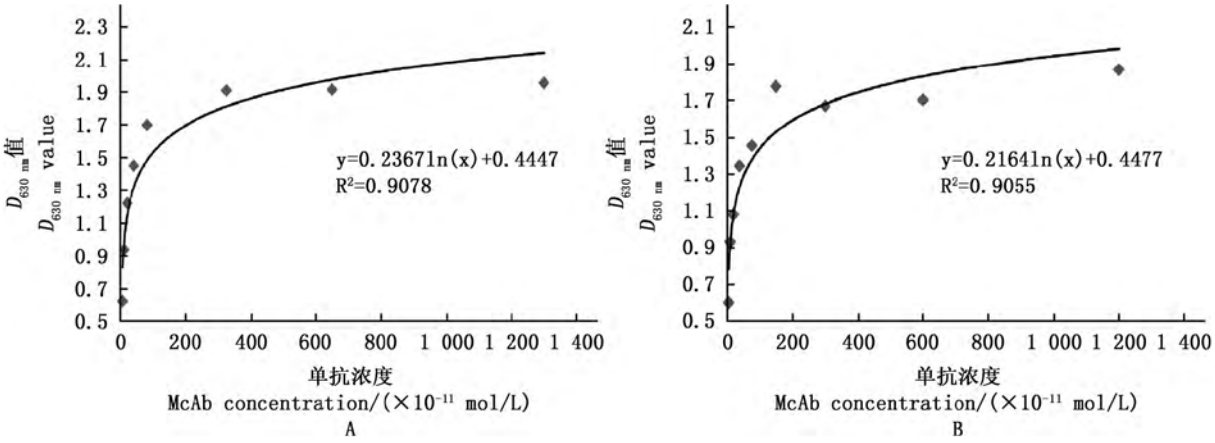
使用 Protein G 亲和层析柱,在非变性条件下通过亲和层析法纯化 3H9 和 4D11 单克隆抗体腹水。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化的单克隆抗体含量,分别为 1.95、1.84 mg/mL,SDS-PAGE 鉴定单克隆抗体纯度,大约在 54、24 ku 处分别可见 IgG 重链和轻链 2 条特异性条带(图 6),与预期结果相符。



M,高分子质量蛋白质标准;1,纯化的 3H9 单克隆抗体;2,纯化的 4D11 单克隆抗体
M,High Molecular Weight Protein Marker;1,Purified 3H9 McAb;2,Purified 4D11 McAb
图 6 **SDS-PAGE** 分析纯化的单克隆抗体
Fig 6 Analysis of purified McAbs by SDS-PAGE

2.10 单克隆抗体亲和力测定

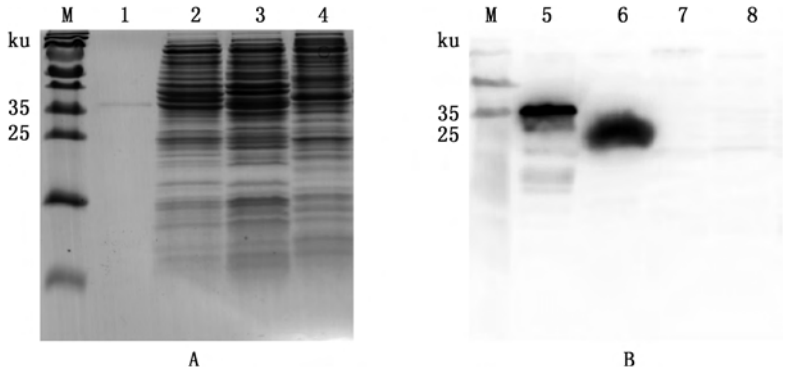
3H9 和 4D11 单克隆抗体的亲和力解离常数分别为 6.3×10^{9} 和 7.8×10^{9},均为高亲和力抗体(图 7)。



A，3H9 株单克隆抗体亲和力测定；B，4D11 株单克隆抗体亲和力测定
A，The binding affinity of 3H9 McAbs；B，The binding affinity of 4D11 McAbs
图 7　单克隆抗体亲和力测定
Fig. 7　Measurement of the binding affinity of McAbs

2.11　单克隆抗体特异性分析

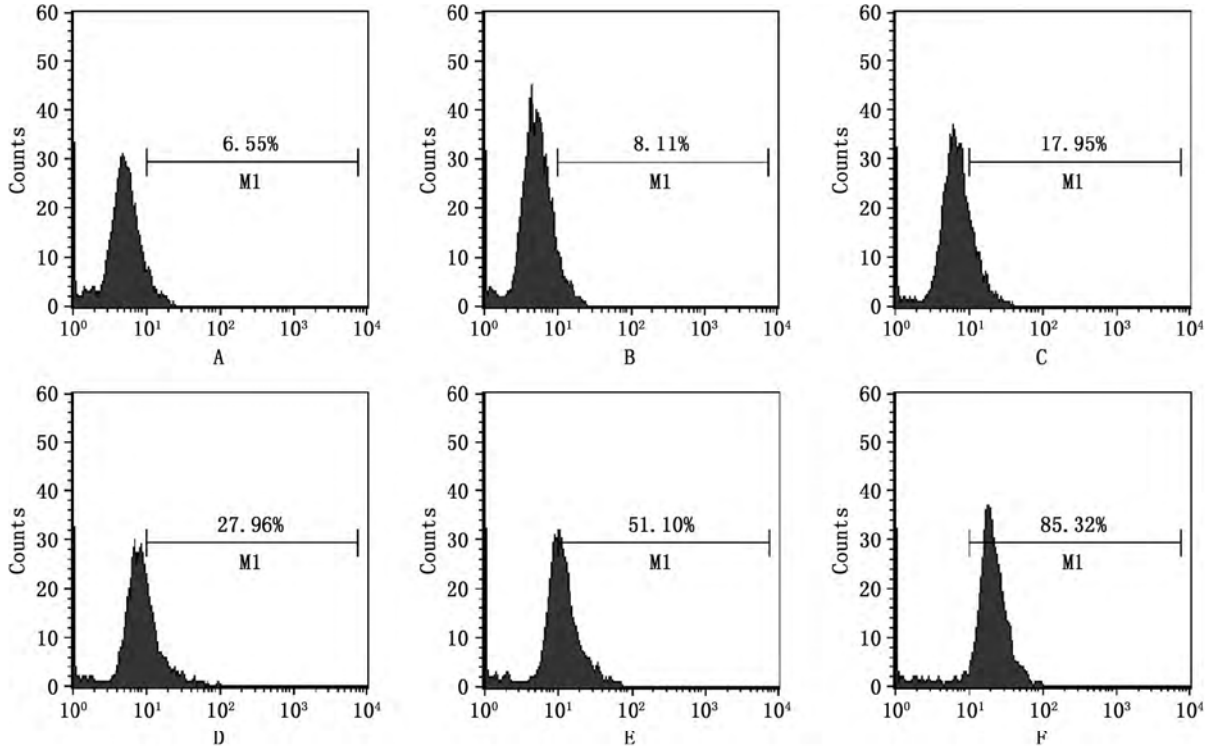
将 4D11 株单克隆抗体分别与纯化的 rVspX 蛋白、*M. bovis* HB0801 菌株、羊无乳支原体标准株 PG2、丝状支原体丝状亚种标准株 PG3 进行 SDS-PAGE 分析（图 8A）和免疫印迹分析（图 8B），结果显示 4D11 与 rVspX 蛋白发生反应，同时与 *M. bovis* HB0801 全菌蛋白在 25 ku 处出现特异性条带，与 *M. bovis* 的 VspX 蛋白理论大小相符，表明 4D11 株单克隆抗体可特异性识别 *M. bovis*；而与羊无乳支原体标准株 PG2、丝状支原体丝状亚种标准株 PG3 均无交叉反应。



M，高分子质量蛋白质标准；1，纯化的 rVspX 蛋白；2，*M. bovis* HB0801 株全菌蛋白；3，羊无乳支原体标准株 PG2 全菌蛋白；4，丝状支原体丝状亚种标准株 PG3 全菌蛋白；5，纯化的 rVspX 蛋白；6，*M. bovis* HB0801 株全菌蛋白；7，羊无乳支原体标准株 PG2 全菌蛋白；8，丝状支原体丝状亚种标准株 PG3 全菌蛋白
M，High Molecular Weight Protein Marker；1，Purified rVspX；2，*M. bovis* HB0801 total protein；3，*M. agalactiae* PG2 total protein；4，*M. mycoides* subsp. *mycoides* PG3 total protein；5，Purified rVspX；6，*M. bovis* HB0801 total protein；7，*M. agalactiae* PG2 total protein；8，*M. mycoides* subsp. *mycoides* PG3 total protein
图 8　**SDS-PAGE**（A）和免疫印迹检测（B）
Fig. 8　SDS-PAGE（A）**and Western blotting assay**（B）

2.12　流式细胞术（FACS）检测单克隆抗体的反应性

用流式细胞术检测不同稀释浓度的 4D11 株单抗与牛支原体表面的 VspX 的结合情况，结果表明 4D11 株单抗与牛支原体表面的 VspX 的结合呈剂量依赖性，随着抗体浓度的增加，结合的 VspX 也相对增加，采集到的荧光信号值也越高，而阴性对照组无信号（图 9）。



A,无一抗和二抗的空白对照;B,一抗为 SP2/0 腹水;C,一抗为 4.6 μg/mL 4D11;D,一抗为 9.2 μg/mL 4D11;E,一抗为 18.4 μg/mL 4D11;F,一抗为 36.8 μg/mL 4D11

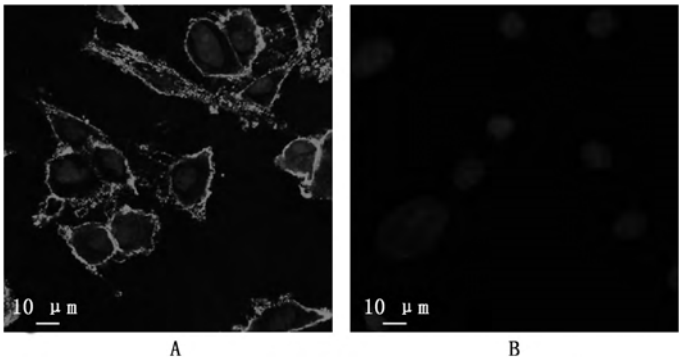
A,Blank control without primary and second antibodies;B,SP2/0 ascites used as primary antibodies;C,4.6 μg/mL 4D11 used as primary antibodies;D,9.2 μg/mL 4D11 used as primary antibodies;E,18.4 μg/mL 4D11 used as primary antibodies;F,36.8 μg/mL 4D11 used as primary antibodies

图 9 FACS 检测单克隆抗体 4D11 与 VspX 的反应性

Fig 9 Detection the reaction of 4D11 and VspX by FACS

2.13 激光共聚焦显微镜检测单克隆抗体的反应性

利用荧光标记和激光共聚焦显微镜相结合的方法,观察单抗与蛋白的反应性。rVspX 蛋白与 EBL 细胞作用组,在 4D11 株单克隆抗体作为一抗,羊抗鼠 IgG-FITC 为二抗,DAPI 染色后,可观察到明显的绿色荧光(图 10A);而不加蛋白的 EBL 细胞组,染色后仅看到蓝色的细胞核,未见到绿色荧光(图 10B),这表明单克隆抗体能特异性识别黏附到 EBL 细胞上的 rVspX 蛋白。



A,黏附到 EBL 细胞上的 rVspX 与 4D11 单克隆抗体反应;B,不加 rVspX 蛋白阴性对照组

A,The reaction of McAb 4D11 with rVspX binding to EBL cells;B,Negative control without rVspX proteins

图 10 激光共聚焦法检测单克隆抗体反应性

Fig 10 Assay of McAb reaction by Confocal scanning microscopy

3 讨　论

支原体是一种能自我复制的原核病原菌，基因组很小，缺乏一些基本代谢所需的酶类，因此，它必须通过黏附宿主细胞，与宿主细胞膜发生融合，以从宿主细胞中获得生存所需营养物质[17]。此外，支原体没有细胞壁，分布在细胞表面的分子直接与宿主细胞接触，在感染中发挥重要作用[18]。VspX 蛋白是分布在牛支原体表面的一种变化脂蛋白，且与黏附相关[14]，为了深入研究该蛋白质在致病中的作用，本研究制备了 VspX 蛋白的单克隆抗体。

本试验采用一种新型的免疫佐剂 QuickAntibody-Mouse 5W，与传统的弗氏佐剂相比具有多种优点[19]。它是一类水溶性佐剂，蛋白和佐剂无需乳化，只要充分混匀即可用于肌肉注射，操作简单；免疫针次少；抗体产生快，抗体滴度高，抗体亲和力高；该免疫佐剂与少量抗原免疫后即可达到很好的免疫效果，从而节约成本。本研究中小鼠免疫 2 次后，血清中抗 VspX 蛋白抗体效价达 $1:8\times10^5$ 以上，因此，本研究为快速获得抗体提供一种新的尝试。

本研究共获得 5 株单克隆抗体，4 株亚型为 IgG1，1 株为 IgG2b，任泽民等[15]用牛支原体的全菌蛋白免疫小鼠获得 6 株单克隆抗体，4 株亚类为 IgG2a，2 株为 IgG1。Denes 等[20]以牛支原体为抗原制备的 65 株单克隆抗体中，受检验的 12 株单克隆抗体全部为 IgG1。而 Rasberry 等[21]制备的抗牛支原体的单克隆抗体中 3 株是 IgG1，3 株是 IgM。这表明在小鼠体内，牛支原体蛋白诱导产生抗体的亚类种类很多，有 IgG1、IgG2 和 IgM 等。

另外，Western blotting 结果证实制备的 5 株单克隆抗体都能与牛支原体特异性结合，表明获得的单克隆抗体反应性很好。选取杂交瘤细胞生长速度快，且细胞培养上清和腹水抗体效价相对较高的 3H9 和 4D11 株测定亲和力，发现他们有较高的亲和性。且对亲和力稍高的 4D11 株进一步验证抗体的生物学特性。流式细胞术和间接免疫荧光进一步确定 4D11 株与牛支原体表面分布的 VspX 和 rVspX 蛋白有很好的反应性和特异性，可用于后续研究。

由于牛支原体和羊无乳支原体 PG2 同源性很高[21]，因此，以牛支原体为免疫原制备的单抗，易产生与羊无乳支原体发生交叉反应的克隆株[15, 20]。然而，针对牛支原体特异性蛋白制备的抗体可以避免交叉反应。蛋白序列比对发现，VspX 蛋白在羊无乳支原体 PG2 和丝状支原体丝状亚种 PG3 中均不表达；同时，Western blotting 结果也证实，以 VspX 蛋白为免疫原制备的 4D11 株单抗与羊无乳支原体 PG2 和丝状支原体丝状亚种 PG3 不存在交叉反应，是特异性很高的抗体。

4 结　论

成功制备了 5 株能稳定分泌抗 VspX 蛋白的杂交瘤细胞株，且有较高的特异性和亲和力。该单抗的成功制备可以促进 VspX 功能的深入研究。

参考文献：

[1] Caswell J L, Archambault M. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle[J]. *Anim Health Res Rev*, 2008, 8(2): 161-186.

[2] Caswell J L, Bateman K G, Cai H Y, et al. *Mycoplasma bovis* in respiratory disease of feedlot cattle[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2010, 26(2): 365-379.

[3] 辛九庆，李　媛，郭　丹，等. 国内首次从患肺炎的犊牛肺脏中分离到牛支原体[J]. 中国预防兽医学报，2008，30(9)：662-664.

[4] 石　磊，龚　瑞，尹争艳，等. 肉牛传染性牛支原体肺炎流行的初步诊断[J]. 华中农业大学学报，2008，27(4)：572.

[5] 李　岩，姚永进，范伟兴，等. 新疆地区规模化奶牛场牛支原体流行病学调查[J]. 中国动物传染病学报，2013，21(5)：68-71.

[6] 郭澍强，蒋　万，罗海峰，等. 银川地区某奶牛场牛支原体病的诊断[J]. 中国预防兽医学报，2015，37(4)：203-206.

[7] Fu P, Sun Z, Zhang Y, et al. Development of a direct competitive ELISA for the detection of *Mycoplasma bovis* infection based on a monoclonal antibody of P48 protein[J]. *BMC Vet Res*, 2014, 10(1):1-8.

[8] Burki S, Frey J, Pilo P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179(1-2): 15-22.

[9] Li Y, Zheng H J, Liu Y, et al. The complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* strain Hubei-1[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20999.

[10] Qi J, Guo A, Cui P, et al. Comparative geno-plasticity analysis of *Mycoplasma bovis* HB0801 (Chinese isolate)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38239.

[11] Wise K S, Calcutt M J, Foecking M F, et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC 25523)[J]. *Infect Immun*, 2011, 79 (2): 982-983.

[12] Sachse K, Helbig J H, Lysnyansky I, et al. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(2): 680-687.

[13] Mcauliffe L, Ellis R J, Miles K, et al. Biofilm formation by *Mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival[J]. *Microbiology*, 2006, 152(4): 913-922.

[14] Zou X, Li Y, Wang Y, et al. Molecular cloning and characterization of a surface-localized adhesion protein in *Mycoplasma bovis* Hubei-1 strain[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69644.

[15] 任泽民，姜 勇，巴晓亮，等. 牛支原体单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国畜牧兽医，2012，39(7)：58-61.

[16] 万文徽. 单克隆抗体亲和常数的测定[J]. 细胞与分子免疫学杂志，1993，9(2)：72-75.

[17] Razin S, Jacobs E. *Mycoplasma* adhesion[J]. *J Gen Microbiol*, 1992, 138(3): 407-422.

[18] Sachse K, Grajetzki C, Rosengarten R, et al. Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells[J]. *Zentralbl Bakteriol*, 1996, 284(1): 80-92.

[19] 翟晋豫. 胰腺癌等肿瘤标志物(CA19-9)单克隆抗体制备及检测方法的初步建立[D]. 新乡：河南师范大学，2014.

[20] Denes B, Tenk M, Tekes L, et al. Recognition of multiple *Mycoplasma bovis* antigens by monoclonal antibodies[J]. *Hybrid Hybridomics*, 2003, 22(1): 11-16.

[21] Rasberry U, Rosenbusch R F. Membrane-associated and cytosolic species-specific antigens of *Mycoplasma bovis* recognized by monoclonal antibodies[J]. *Hybridoma*, 1995, 14(5): 481-485.

（责任编辑 秦 彤）