

• 生物技术与方法 •

# 赤羽病病毒 N 蛋白原核表达及单克隆抗体的制备

林永玉<sup>1,2</sup>, 石正旺<sup>2</sup>, 罗俊聪<sup>2</sup>, 朱昱茜<sup>1,2</sup>, 席韬<sup>2</sup>, 周静<sup>2</sup>, 张帆<sup>2</sup>, 石鑫泰<sup>2</sup>,  
王川<sup>1\*</sup>, 田宏<sup>2\*</sup>

1 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000

林永玉, 石正旺, 罗俊聪, 朱昱茜, 席韬, 周静, 张帆, 石鑫泰, 王川, 田宏. 赤羽病病毒 N 蛋白原核表达及单克隆抗体的制备[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1548-1558.

LIN Yongyu, SHI Zhengwang, LUO Juncong, ZHU Yuqian, XI Tao, ZHOU Jing, ZHANG Fan, SHI Xintai, WANG Chuan, TIAN Hong. Prokaryotic expression of N protein of akabane disease virus and preparation of monoclonal antibody[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1548-1558.

**摘要:** 为制备赤羽病病毒(akabane virus, AKAV) N 蛋白的单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 本研究利用原核表达系统表达了 AKAV N 蛋白, 纯化后免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合获得杂交瘤细胞, 采用间接酶联免疫吸附方法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)筛选获得阳性杂交瘤细胞。经 3 次亚克隆筛选得到两株特异性针对 AKAV N 蛋白的杂交瘤细胞株, 分别命名为 2C9 与 5E9。通过 ELISA、免疫印迹(Western blotting)、间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA)对其进行鉴定。结果显示, 成功筛选到特异性针对 AKAV N 蛋白的单克隆抗体。IFA 发现其与 AKAV N 蛋白具有良好的反应性, 亚型鉴定试剂盒鉴定 2C9 mAb 重链为 IgG2b 型, 轻链为  $\kappa$  链; 5E9 mAb 重链为 IgG1 型, 轻链为  $\kappa$  链; ELISA 检测效价均为 1:4 096 000。本研究成功制备了两株特异性针对 AKAV N 蛋白的单克隆抗体, 为赤羽病诊断方法的开发、疾病的防控以及 AKAV N 蛋白功能的研究奠定了基础。

**关键词:** 赤羽病病毒; N 蛋白; 原核表达; 单克隆抗体

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800704-02); 甘肃省科技重大专项(22ZD6NA001, 22ZD6NA012); “十四五”广东省揭榜挂帅项目(2023SDZG02); 学科交叉创新团队建设项目(lzujbky-2022-ct02)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800704-02), the Gansu Provincial Science and Technology Major Project (22ZD6NA001, 22ZD6NA012), the “Fourteenth Five-year Plan” Guangdong Province Unveiled the List of Marshal Project (2023SDZG02), and the Discipline Cross-innovation Team Building Project (lzujbky-2022-ct02).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Chuan, wangchuan@gsau.edu.cn; TIAN Hong, xibeitian0931@163.com

Received: 2023-10-23; Accepted: 2024-01-13; Published online: 2024-01-19

# Prokaryotic expression of N protein of akabane disease virus and preparation of monoclonal antibody

LIN Yongyu<sup>1,2</sup>, SHI Zhengwang<sup>2</sup>, LUO Juncong<sup>2</sup>, ZHU Yuqian<sup>1,2</sup>, XI Tao<sup>2</sup>, ZHOU Jing<sup>2</sup>, ZHANG Fan<sup>2</sup>, SHI Xintai<sup>2</sup>, WANG Chuan<sup>1\*</sup>, TIAN Hong<sup>2\*</sup>

1 School of Animal Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 State Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control, College of Animal Medicine and Biosecurity, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

**Abstract:** In order to generate monoclonal antibodies against the akabane virus (AKAV) N protein, this study employed a prokaryotic expression system to express the AKAV N protein. Following purification, BALB/c mice were immunized, and their splenocytes were fused with mouse myeloma cells (SP2/0) to produce hybridoma cells. The indirect ELISA method was used to screen for positive hybridoma cells. Two specific hybridoma cell lines targeting AKAV N protein, designated as 2C9 and 5E9, were isolated after three rounds of subcloning. Further characterization was conducted through ELISA, Western blotting, and indirect immunofluorescence assay (IFA). The results confirmed that the monoclonal antibodies specifically target AKAV N protein, exhibiting strong reactivity in IFA. Subtype analysis identified the heavy chain of the 2C9 mAb's as IgG2b and its light chain as  $\kappa$ -type; the 5E9 mAb's heavy chain was determined to be IgG1, with a  $\kappa$ -type light chain. Their ELISA titers reached 1:4 096 000. This study successfully developed two monoclonal antibodies targeting AKAV N protein, which lays a crucial foundation for advancing diagnostic methods for akabane disease prevention and control, as well as for studying the function of the AKAV N protein.

**Keywords:** akavirus; N protein; prokaryotic expression; monoclonal antibody

赤羽病(akabane disease, AKAD)是由赤羽病病毒(akabane disease virus, AKAV)引起的一种虫媒性传染病,要通过吸血昆虫叮咬易感反刍动物进行传播,具有季节性。据流行病学调查,孕期的牛、绵羊、山羊对 AKAV 最易感,当感染发生在妊娠中期时,发病率和致死率极高。临床上以流产、早产、死产、积水性无脑和关节弯曲积水性无脑综合征为特征<sup>[1-3]</sup>。妊娠牛羊感染 AKAV 初期,胎龄较短的母牛易发生流产、死产,胎龄较长的母牛易发生早产;母牛多不能站立。由于 AKAV 可直接侵害胎儿致其畸形<sup>[4]</sup>,妊娠牛

羊感染中期分娩的胎儿多体型异常,如关节、脊柱弯曲等,分娩时还可能由于胎势不正而引起难产,进而造成产道损伤、胎衣不下、子宫炎等;即便顺产,新生犊牛也不能站立,哺乳困难。感染后期,还会出现无生活能力或瞎眼的犊牛,造成生产量下降,影响食品质量安全,从而给世界畜牧业带来巨大的经济损失。

AKAD 多发于热带和亚热带地区<sup>[5-7]</sup>,我国正处于此地理位置。根据血清中和试验对国内牛羊血清中 AKAV 中和抗体水平调查显示<sup>[8]</sup>,全国大范围内都存在 AKAD 感染情况,AKAD 已经

在我国广西、安徽、云南地区呈区域性流行<sup>[9]</sup>。所以,对 AKAV 的研究以及对 AKAD 的诊断防控技术研究已刻不容缓。

AKAV 于 1959 年从日本群马县赤羽村的畜舍内采集的金色库蚊和三带喙库蚊中首次分离<sup>[10]</sup>,属于布尼亚病毒科、布尼亚病毒属、辛波病毒群成员,为单股负链 RNA 病毒<sup>[11]</sup>。AKAV 基因组由 S、M、L 三个片段组成<sup>[12-14]</sup>,其中,S 基因编码的 N 蛋白呈四聚体结构,是 AKAV 主要的核衣壳蛋白<sup>[15]</sup>,含量最高且具有较高的免疫原性,能够诱导机体产生抗体,是诊断 AKAD 的靶标蛋白<sup>[16]</sup>。而单克隆抗体是由单一 B 细胞产生的针对特定表位的抗体,具有高度良好的特异性、均一性,可广泛应用于疾病的诊断、治疗等方面。AKAV N 蛋白是诊断和防控的重要靶标,本研究通过原核表达系统表达、纯化 AKAV N 蛋白,用制备好的 N 蛋白免疫小鼠制备 AKAV N 蛋白的特异性单克隆抗体,为 AKAV 感染后诊断方法的建立、AKAD 疾病的防控及 AKAV N 蛋白相关功能的研究奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 质粒、实验动物及细胞

pET-30a-AKAV-N 和 pcDNA3.1-AKAV-N 重组质粒均由武汉金开瑞生物工程有限公司构建;BALB/c 小鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心,动物实验方案严格遵守相关实验动物福利规定,并获得中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会批准(批准号:LVR1AEC-2023-081);BL21(DE3)感受态细胞购于北京索莱宝科技有限公司;SP2/0 细胞、BHK-21 细胞、O 型口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus serotypes O, FMDV-O)和 A 型口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus serotypes A, FMDV-A)灭活抗原来自国家口蹄疫参考实验

室;布鲁氏杆菌(*Brucellosis*)、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhoea virus, BVDV)、牛结节性皮肤病病毒(lumpy skin disease virus, LSDV)灭活抗原均由中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室保存。

### 1.2 主要试剂

BCA 蛋白定量试剂盒、PBS、卡那霉素、IPTG 和脱脂奶粉均购自北京索莱宝科技有限公司;弗氏完全佐剂、不完全佐剂、HT 和 HAT 均购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司;Ni 柱亲和层析树脂购自 Omega Bio-Tek 公司;HRP 标记山羊抗鼠二抗、山羊抗牛二抗均购自 abcam 公司;单抗亚类鉴定试剂盒购自 Proteintech 公司;LIP3000 购自 Thermo Fisher 公司;酶标板购自 Costor 公司。

### 1.3 AKAV-N 重组蛋白表达及可溶性分析

从 NCBI 查找到的 AKAV N 蛋白基因序列(GenBank 登录号:AY383717.1),由武汉金开瑞生物工程有限公司合成并构建至 pET-30a 载体。将 pET-30a-AKAV-N 重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,涂板温箱孵育后挑取单克隆菌落于含卡那霉素的 LB 培养基中培养,待  $OD_{600}$  至 0.6-0.8 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG,诱导表达 6-8 h。收集菌体,用 PBS 缓冲液重悬细菌沉淀,超声破碎后分离上清和沉淀,通过 SDS-PAGE 分析可溶性。选取合适的蛋白表达条件大量表达蛋白,并通过 Ni 柱对蛋白进行纯化。

### 1.4 AKAV-N 重组蛋白的纯化

用缓冲液(pH 7.4)对菌体沉淀进行重悬并超声,重复 3 次后,4 °C、8 000 r/min 离心 30 min,收集上清。将上清加入用平衡液平衡后的 Ni 柱中结合 3-5 min,分别用含 50、80、100、250 mmol/L 咪唑的缓冲液洗涤杂带 2 次,最后用含 500 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱目的蛋白,SDS-PAGE 分析纯

化结果。

### 1.5 AKAV-N 重组蛋白反应活性鉴定

用 Western blotting 鉴定 AKAV N 重组蛋白与 AKAV 阳性血清的反应活性, 将 AKAV N 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 并转印至 PVDF 膜上, 5%脱脂乳室温封闭 2 h; 用 AKAV 阳性血清(1:500) 4 °C 过夜孵育; TBST 洗涤 10 min, 重复 3 次。用 HRP 标记的牛二抗(1:15 000)室温孵育 1 h; 同上洗涤, 显色液曝光, 使用高分辨图像采集系统(Chemdoc MP)拍照。

### 1.6 AKAV N 蛋白单克隆抗体的制备

#### 1.6.1 动物免疫及单克隆抗体细胞株的融合和筛选

用 BCA 蛋白定量试剂盒将纯化的重组 N 蛋白进行定量, 以 50 μg/只的剂量经背部皮下多点注射免疫 6-8 周龄 BALB/c 雌鼠 4 只, 每间隔两周免疫一次。首次免疫将重组 N 蛋白与弗氏完全佐剂 1:1 比例混合乳化, 二次免疫和三次免疫与弗氏不完全佐剂 1:1 比例混合乳化。第三次免疫后一周尾静脉采血, 采用间接 ELISA 方法检测血清抗体效价, 选择血清效价最高的小鼠进行试验, 于融合前 3 d 腹腔注射 100 μg N 蛋白加强免疫, 取其脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合。采用间接 ELISA 方法, 以 AKAV N 蛋白作为包被抗原, 杂交瘤细胞上清作为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1:10 000)作为二抗, 筛选与 AKAV N 蛋白反应的阳性杂交瘤细胞株, 通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞株进行 3 次亚克隆后扩大培养, 冻存备用。

#### 1.6.2 腹水制备及纯化

将筛选到的阳性杂交瘤细胞腹腔注射预先腹腔注射 0.5 mL 弗氏不完全佐剂致敏的小鼠, 待小鼠腹部出现膨胀现象, 用注射器抽取腹水, -80 °C 保存备用。应用饱和硫酸铵沉淀法对腹水

进行纯化<sup>[17]</sup>: 将腹水与 0.06 mol/L (pH 4.8)的醋酸盐缓冲液按 1:2 混合, 混匀后加入适量的正辛酸, 边加边混匀, 有少量白色颗粒出现, 置于摇床 30 min 后于 4 °C 静置 2 h; 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清, 用铜网过滤, 收集滤液。按收集液总体积的 1/10 加 PBS, 用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.4; 冰浴条件下逐滴加入等体积的饱和硫酸铵, 边加边混匀, 置于 4 °C 静置 2 h; 12 000 r/min 离心 30 min, 弃去上清; 用适量 PBS 重悬沉淀, 剪 3-5 cm 长度的透析袋, 放于水浴锅 100 °C 煮沸 10 min, 将重悬沉淀后的溶液转至透析袋中, PBS 透析过夜。

### 1.7 AKAV N 蛋白单克隆抗体生物学特性鉴定

#### 1.7.1 效价的测定

应用间接 ELISA 方法检测纯化好的单克隆抗体效价, 以 AKAV N 蛋白为包被蛋白, 倍比稀释单克隆抗体为一抗, 山羊抗鼠 IgG-HRP (1:15 000)作为二抗进行检测, 以 P/N>2.1 所对应的最大稀释比例作为单克隆抗体的效价。

#### 1.7.2 单克隆抗体的亚型鉴定

根据 Proteintech 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒说明书操作, 对 AKAV N 蛋白单克隆抗体进行抗体亚型的鉴定。

#### 1.7.3 单克隆抗体叠加 ELISA 试验

为验证获得的两株单克隆抗体针对的是否为 N 蛋白的同一抗原表位, 用低浓度重组 N 蛋白包被酶标板, 加入单种或两两组合的特定浓度单克隆抗体为一抗; 将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗; 用间接 ELISA 测定  $OD_{450}$  值。按照下列公式计算叠加系数(additivity index, AI),  $AI=[2A(1+2)/(A1+A2)-1] \times 100$ 。当 AI 大于 40% 时, 判定两株单克隆抗体结合不同的抗原结合位点。

#### 1.7.4 IFA 鉴定

将 pcDNA3.1-AKAV-N 重组质粒转染至

BHK-21 细胞,同时设置阴性对照与阳性对照;培养 48 h 后加入 4%多聚甲醛室温固定 30 min;PBS 溶液洗 3 次,加入 0.1% Triton,室温通透 10 min;PBS 溶液洗 3 次,加入 5% BSA,室温封闭 1 h;PBS 溶液洗 1 次,分别加入单克隆抗体(1:500)为一抗,阳性对照组加入 AKAV 阳性血清为一抗;阴性对照组加入阴性血清为一抗;4 °C 过夜孵育;PBS 溶液洗 3 次,加入 FITC 标记的鼠二抗(1:500),室温孵育 1 h;PBS 溶液洗 3 次,用 DAPI 染核 10 min,置于激光共聚焦显微镜与荧光显微镜下观察,拍照。

### 1.7.5 单克隆抗体特异性检测

将 AKAV N 蛋白、FMDV-O、FMDV-A、Brucellosis、BVDV 和 LSDV 进行 SDS-PAGE 电泳,转印至 PVDF 膜上,5%脱脂乳室温封闭 2 h;用单克隆抗体(1:2 000)4 °C 过夜孵育;TBST 洗涤 10 min,重复 3 次,用 HRP 标记的山羊抗鼠二抗(1:15 000)室温孵育 1 h;同上洗涤,显色液曝光,使用 Chemdoc MP 拍照。

### 1.7.6 单克隆抗体亲和力检测

用间接 ELISA 对稳定分泌抗 AKAV N 蛋白单克隆抗体的 2C9、5E9 杂交瘤细胞上清与纯化后的腹水抗体效价进行测定,检测单克隆抗体的相对亲和力。

## 1.8 双抗体夹心 ELISA 方法的建立及最佳反应条件的优化

以纯化好的 5E9 mAb 为包被抗体,2C9 mAb 为检测抗体,运用棋盘法对双抗体夹心 ELISA 反应条件进行确定。当样品  $OD_{450}$  值在 2.0 左右,且样品孔与阴性孔  $OD_{450}$  差值最大时为最佳反应条件。

将包被抗体倍比稀释分别包被至酶标板,4 °C 包被 12 h;PBST 洗 4 次并拍干,加入 1% BSA,100  $\mu$ L/孔,4 °C 封闭 10 h;弃液并拍干。

检测 600 ng/mL 的重组 AKAV N 蛋白,同时设置 2 个复孔,37 °C 孵育 30 min;PBST 洗 4 次并拍干,分别加入倍比稀释的检测抗体,37 °C 孵育 30 min;PBST 洗 4 次并拍干,加入 TMB,37 °C 避光显色 12 min;加入终止液,酶标仪读取  $OD_{450}$  值。

根据上述操作步骤,以确定的最佳包被抗体包被浓度和检测抗体稀释度继续对蛋白孵育时间(15、30、45、60 min)、检测抗体孵育时间(15、30、45、60 min)和底物显色时间(5、12、15、20 min)条件进行优化。

## 1.9 双抗体夹心 ELISA 的特异性检测

按照已优化的双抗体夹心 ELISA 方法检测 FMDV-O、FMDV-A、Brucellosis、BVDV 和 LSDV,同时设置 AKAV N 蛋白作为对照,每份样品重复 2 次,评价该方法的特异性。

## 1.10 双抗体夹心 ELISA 的敏感性检测

以不同浓度(1:800–1:102 400)的 AKAV N 蛋白为抗原,用优化好条件的双抗体夹心 ELISA 方法对 AKAV N 蛋白浓度底限进行检测,计算 P/N 值,检测该方法的敏感性。

# 2 结果与分析

## 2.1 AKAV-N 重组蛋白表达及纯化

SDS-PAGE 结果表明,该原核表达的重组 N 蛋白以上清形式表达(图 1A)。亲和层析纯化后经 SDS-PAGE 分析鉴定,以 500 mmol/L 咪唑浓度的缓冲液洗脱蛋白,收集液于 28 kDa 处出现单一目的条带(图 1B),纯度较好。

## 2.2 AKAV-N 重组蛋白反应活性鉴定

经 Western blotting 鉴定,重组 N 蛋白与 AKAV 阳性血清呈阳性反应,于 28 kDa 处出现特异性条带(图 2),表明重组 N 蛋白具有良好的反应活性。

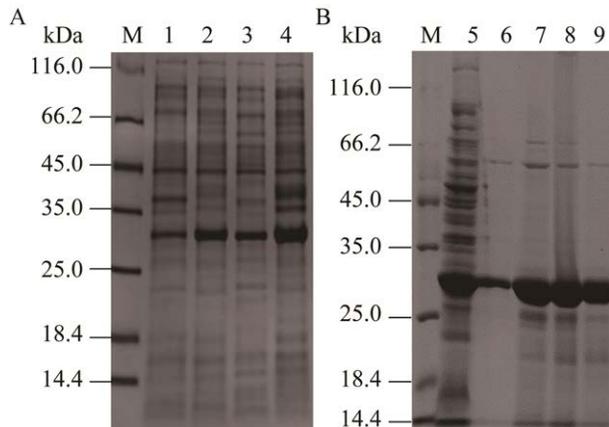


图 1 AKAV N 蛋白 SDS-PAGE 表达鉴定(A)及纯化结果分析(B)

Figure 1 Identification of AKAV N protein SDS-PAGE expression (A) and analysis of purification results (B). M: Molecular mass standard of unprecipitated proteins; 1: Uninduced protein at 16 °C; 2: Induced protein at 16 °C; 3: Protein expression supernatant at 16 °C; 4: Protein expression precipitate at 16 °C; 5: Affinity chromatography flow-through protein after induction at 16 °C; 6: Heterogeneous protein washed with 500 mmol/L imidazole 1 time; 7: Heterogeneous protein washed with 500 mmol/L imidazole 2 times; 8: Protein eluted with 500 mmol/L imidazole 1 time; 9: Protein eluted with 500 mmol/L imidazole 2 times.

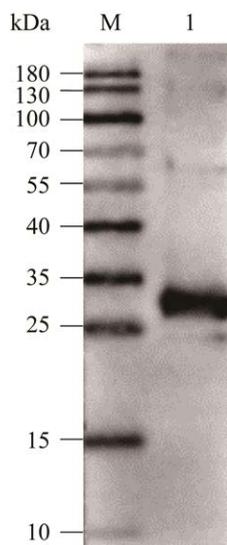


图 2 Western blotting 蛋白反应活性鉴定

Figure 2 Identification of protein reactivity by Western blotting. M: Molecular quality standard of pre-stained proteins; 1: AKAV-N protein.

### 2.3 动物免疫后抗体应答检测

应用间接 ELISA 检测 4 只三免后 BALB/c 小鼠的稀释血清, 发现 2#小鼠的抗体水平最高(图 3), 选取 2#小鼠进行后续试验。

### 2.4 AKAV N 蛋白单克隆抗体的鉴定

将饱和硫酸铵沉淀法纯化好的单克隆抗体通过间接 ELISA 方法检测效价, 结果如图 4 所示, 2C9、5E9 mAb 效价均达到 1:4 096 000。

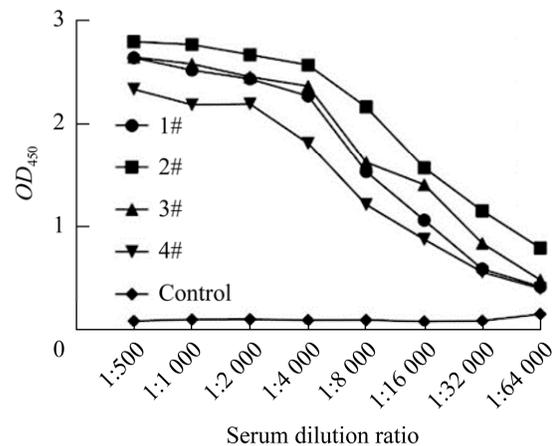


图 3 AKAV N 蛋白免疫小鼠三免后间接 ELISA 检测

Figure 3 Indirect ELISA after triple immunization of mice with AKAV N protein.

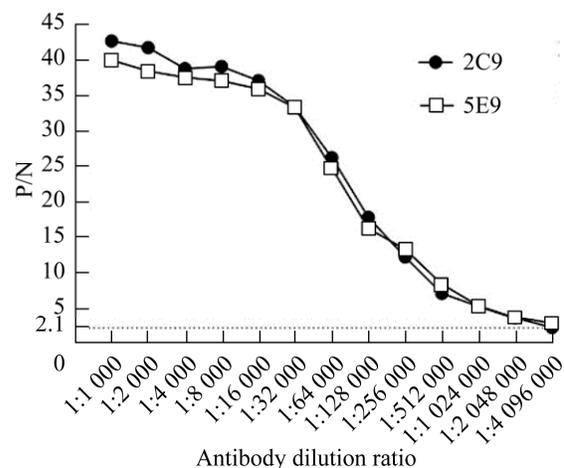


图 4 间接 ELISA 抗体效价检测分析

Figure 4 Indirect ELISA for antibody potency analysis.

用单抗亚类鉴定试剂盒对 2C9、5E9 mAb 亚型进行测定, 结果如图 5 所示, 2C9 mAb 为 IgG2b/ $\kappa$  型, 5E9 mAb 为 IgG1/ $\kappa$  型。

通过叠加 ELISA 验证, 获得的两株单克隆抗体针对的为 N 蛋白的不同抗原表位。结果如图 6 所示, 2C9、5E9 mAb 的 AI 值均在 40% 以上。

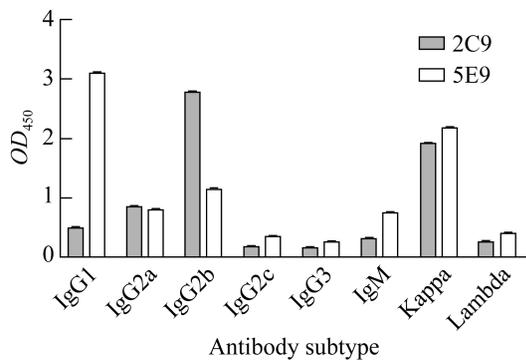


图 5 2C9、5E9 单克隆抗体亚型鉴定  
Figure 5 Identification of 2C9 and 5E9 monoclonal antibody isoforms.

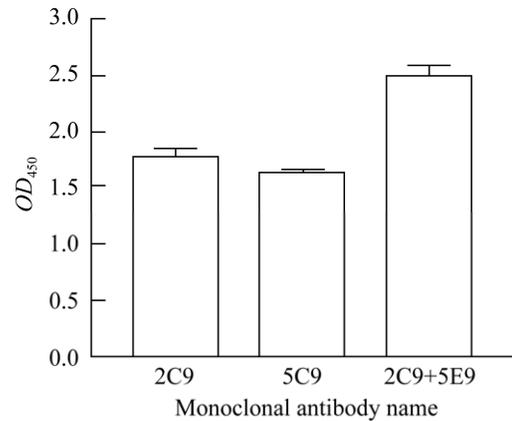


图 6 2C9、5E9 单克隆抗体叠加分析  
Figure 6 2C9 and 5E9 monoclonal antibody overlay.

对 BHK-21 细胞及对照组细胞进行 IFA 检测, 结果如图 7 所示, 2C9、5E9 mAb 与转染了 pcDNA3.1-AKAV-N 重组质粒的 BHK-21 细胞发生阳性反应, 表明 2C9、5E9 mAb 与 AKAV N 蛋白具有良好的反应性。

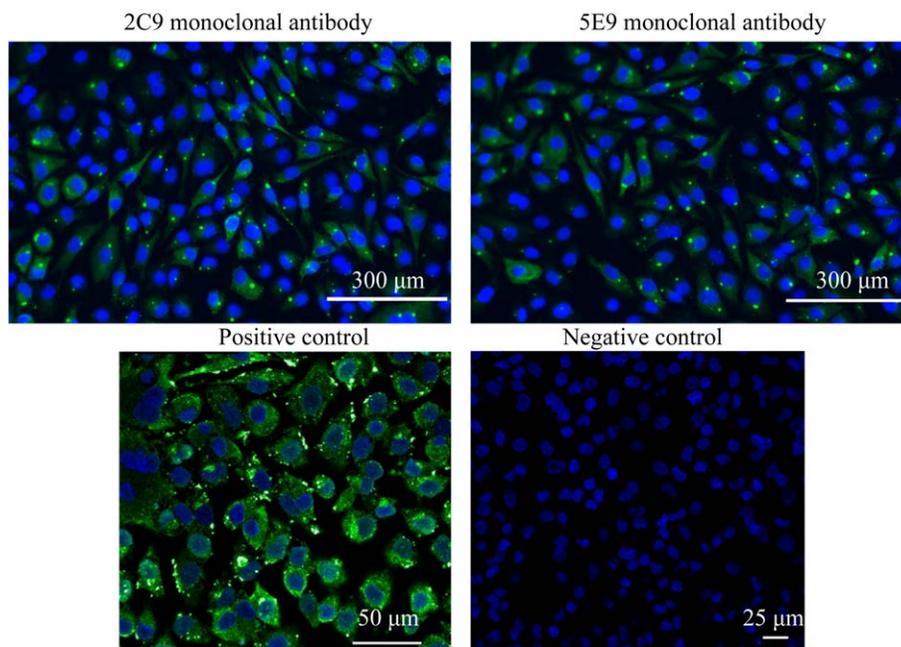


图 7 2C9、5E9 单克隆抗体 IFA 鉴定  
Figure 7 2C9 and 5E9 monoclonal antibody IFA identification.

选用 AKAV N 蛋白、FMDV-O、FMDV-A、*Brucellosis*、BVDV 和 LSDV 对单克隆抗体特异性进行鉴定,结果如图 8 所示,单克隆抗体仅特异性识别 AKAV N 蛋白,于 28 kDa 处出现特异性条带,不与 FMDV-O、FMDV-A、*Brucellosis*、BVDV 和 LSDV 反应,具有较好的特异性。

将稳定分泌抗 AKAV N 蛋白单克隆抗体的 2C9、5E9 杂交瘤细胞上清经间接 ELISA 方法测定,结果如图 9 所示,发现 2C9 杂交瘤细胞上清的效价为 1:1 600,5E9 杂交瘤细胞上清的效价为 1:6 400,由于 2C9、5E9 腹水抗体效价均达到 1:4 096 000,腹水中抗体效价明显高于杂交瘤细胞上清,证明了两株单克隆抗体的相对亲和力良好。

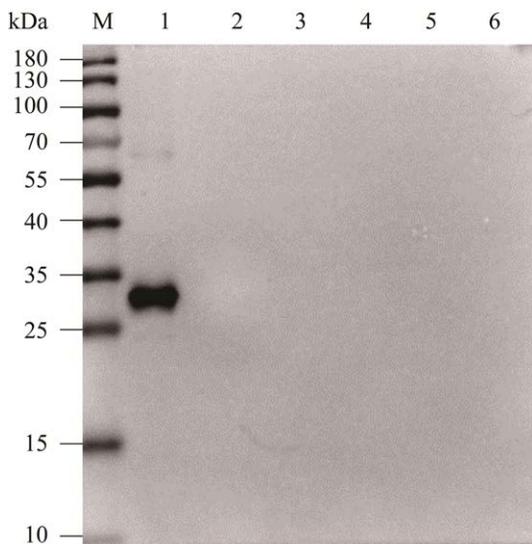


图 8 Western blotting 抗体特异性鉴定

Figure 8 Western blotting antibody specificity identification. M: Molecular quality standard of pre-stained proteins; 1: AKAV N protein; 2: LSDV; 3: FMDV-O; 4: FMDN-A; 5: BVDV; 6: *Brucellosis*.

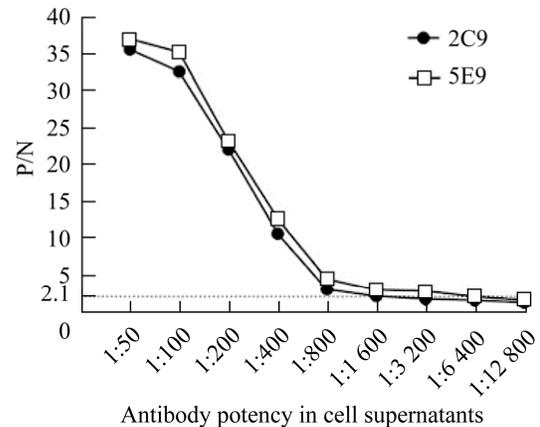


图 9 2C9、5E9 杂交瘤细胞上清效价检测

Figure 9 2C9 and 5E9 hybridoma cell serum potency assay.

## 2.5 双抗体夹心 ELISA 方法最佳反应条件的确定

经条件优化,确定了双抗体夹心 ELISA 方法包被抗体最佳包被稀释比例如图 10 所示为 1:800 (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ),检测抗体最佳稀释比例为 1:24 000,蛋白及检测抗体最佳孵育时间为 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min;底物溶液最佳显色时间为 37  $^{\circ}\text{C}$  下避光显色 12 min。

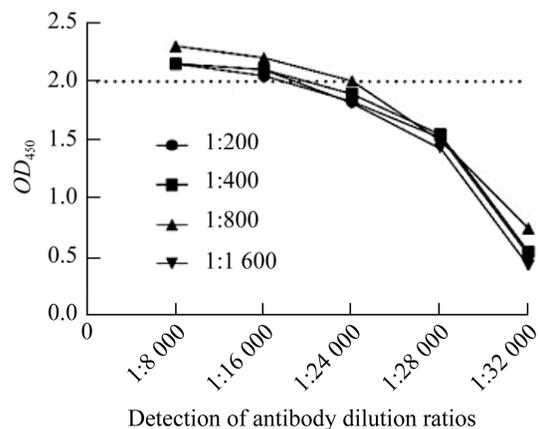


图 10 包被抗体及检测抗体最佳工作浓度测定结果分析

Figure 10 Determination of optimal working concentration for encapsulated and detected antibodies.

## 2.6 双抗体夹心 ELISA 方法的特异性检测

用建立的双抗体夹心 ELISA 方法同时检测 FMDV-O、FMDV-A、Brucellosis、BVDV、LSDV 和 AKAV N 蛋白,结果如图 11 所示,只有 AKAV N 蛋白有明显的  $OD_{450}$  值。表明该方法的特异性良好,与其他抗原无交叉反应。

## 2.7 双抗体夹心 ELISA 方法的敏感性检测

用建立的双抗体夹心 ELISA 方法对 AKAV N 蛋白浓度底限进行检测,结果如图 12 所示,最低检测至 1:12 800,说明建立的双抗体夹心 ELISA 方法具有良好的敏感性。

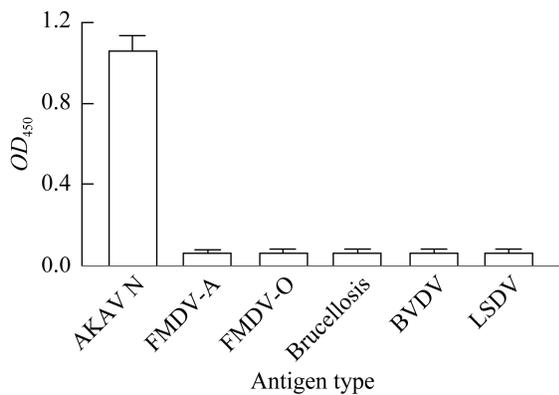


图 11 双抗体夹心 ELISA 方法的特异性检测结果  
Figure 11 Specific detection results of double antibody sandwich ELISA method.

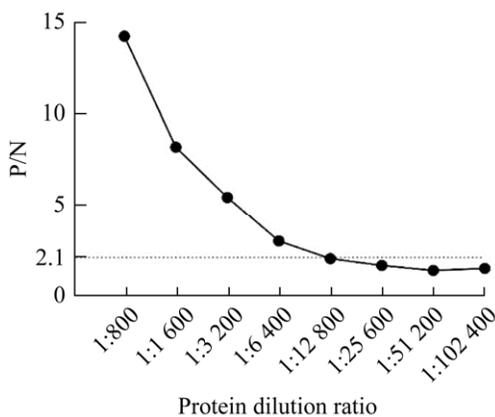


图 12 双抗体夹心 ELISA 方法的敏感性检测结果  
Figure 12 Sensitivity test results of the double antibody sandwich ELISA method.

## 3 讨论与结论

赤羽病在我国被列为二类进境动物疫病<sup>[18]</sup>,是目前对养牛业和养羊业危害较为严重的疫病。在感染妊娠中期发病率和致死率极高,目前世界范围内也暂时没有疫苗防控。由于我国处于赤羽病多发的地理位置,流行风险较大,一旦暴发将会对我国畜牧业造成严重的经济损失<sup>[19]</sup>。因此,要加强对赤羽病毒、赤羽病诊断监测及防控技术的研究。在此过程中,特异性高反应性强的检测抗体为赤羽病诊断技术的建立提供了高效的基础材料。

在免疫学检测方法中,应用单克隆抗体高纯度、高特异性、制备成本低和易重复等特点,建立结果准确、反应时间快速、敏感性高及特异性强的检测方法已相当普遍。先前的研究表明,大多数 AKAV 特异性单克隆抗体针对其他蛋白,而不是 N 蛋白<sup>[20-21]</sup>。本研究用原核系统表达出 AKAV N 蛋白,通过 SDS-PAGE 分析,AKAV 重组 N 蛋白以上清形式表达,500 mmol/L 咪唑洗脱纯化后纯度最好。经 Western blotting 方法鉴定 AKAV 重组 N 蛋白与 AKAV 阳性血清反应性较好,表明重组 N 蛋白反应性良好。用其免疫小鼠对效价最高的小鼠加强免疫后进行细胞融合,利用间接 ELISA 与有限稀释法筛选出两株可稳定分泌抗 AKAV 重组 N 蛋白单克隆抗体的阳性细胞株 2C9 与 5E9。经间接 ELISA 检测,2C9、5E9 mAb 效价均达到 1:4 096 000。单克隆抗体亚型鉴定结果显示,2C9 mAb 重链为 IgG2b 型,轻链为  $\kappa$  链;5E9 mAb 重链为 IgG1 型,轻链为  $\kappa$  链。IFA 以及 Western blotting 验证结果表明,纯化出的单克隆抗体不仅能与转染了 pcDNA3.1-AKAV-N 重组质粒的 BHK-21 细胞发生反应,还能通过 Western blotting 检测识别 AKAV 重组 N 蛋白,这对 AKAV 感染后检测方法的研究与建立具有重

要意义。Western blotting 检测还显示所纯化的单克隆抗体仅与 AKAV 重组 N 蛋白发生阳性反应而与其他抗原不存在交叉反应,具有良好的反应性与较高的特异性;并且应用纯化出的单克隆抗体所建立的双抗体夹心 ELISA 方法经验证也具有较好的特异性与敏感性。

综上所述,本研究针对 AKAV N 蛋白制备的 2C9、5E9 mAb 特异性强、反应性高,能够为 AKAV N 蛋白功能的进一步研究和 AKAV 抗原检测研究提供技术支撑,为 AKAD 监测及防控奠定了一定的基础。

## REFERENCES

- [1] KONO R, HIRATA M, KAJI M, GOTO Y, IKEDA S, YANASE T, KATO T, TANAKA S, TSUTSUI T, IMADA T, YAMAKAWA M. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by akabane virus in southern Japan[J]. BMC Veterinary Research, 2008, 4: 20.
- [2] ŞEVIK M. Molecular detection and genetic analysis of akabane virus genogroup Ib in small ruminants in Turkey[J]. Archives of Virology, 2017, 162(9): 2769-2774.
- [3] YANASE T, KATO T, HAYAMA Y, SHIRAFUJI H, YAMAKAWA M, TANAKA S. Oral susceptibility of Japanese Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) species to akabane virus[J]. Journal of Medical Entomology, 2019, 56(2): 533-539.
- [4] KUROGI H, INABA Y, GOTO Y, MIURA Y, TAKAHASHI H, SATO K, OMORI T, MATUMOTO M. Serologic evidence for etiologic role of akabane virus in epizootic abortion-arthrogryposis-hydranencephaly in cattle in Japan, 1972–1974[J]. Archives of Virology, 1975, 47(1): 71-83.
- [5] QIAO J, MENG QL, ZHANG ZC, CAI KJ, ZHANG JS, MA MX, CHEN CF. A serological survey of akabane virus infection in cattle and sheep in northwest China[J]. Tropical Animal Health and Production, 2012, 44(8): 1817-1820.
- [6] KUROGI H, INABA Y, TAKAHASHI E, SATO K, SATODA K. Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with akabane virus[J]. Infection and Immunity, 1977, 17(2): 338-343.
- [7] YANG DK, KIM BH, KWEON CH, NAH JJ, KIM HJ, LEE KW, YANG YJ, MUN KW. Serosurveillance for Japanese encephalitis, akabane, and aino viruses for Thoroughbred horses in Korea[J]. Journal of Veterinary Science, 2008, 9(4): 381-385.
- [8] WANG JD, BLASDELL KR, YIN H, WALKER PJ. A large-scale serological survey of akabane virus infection in cattle, yak, sheep and goats in China[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 207: 7-12.
- [9] ZHANG HL, ZHANG YZ, YANG WH, FENG Y, NASCI RS, YANG J, LIU YH, DONG CL, LI S, ZHANG BS, YIN ZL, WANG PY, FU SH, LI MH, LIU F, ZHANG J, SUN J, LI CW, GAO XY, LIU H, et al. Mosquitoes of western Yunnan Province, China: seasonal abundance, diversity, and arbovirus associations[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77017.
- [10] LEE H, JEONG H, PARK S, YANG MS, KIM J, BAE J, KWON Y, KIM MS, OEM JK, LEE MH, LIM CW, KIM B. Experimental infection of cows with newly isolated akabane virus strain (AKAV-7) causing encephalomyelitis[J]. Veterinary Research, 2016, 47(1): 62.
- [11] OYA A, OKUNO T, OGATA T, KOBAYASHII, MATSUYAMA T. Akabane, a new arbor virus isolated in Japan[J]. Japanese Journal of Medical Science & Biology, 1961, 14: 101-108.
- [12] YANASE T, KATO T, HAYAMA Y, AKIYAMA M, ITOH N, HORIUCHI S, HIRASHIMA Y, SHIRAFUJI H, YAMAKAWA M, TANAKA S, TSUTSUI T. Transition of akabane virus genogroups and its association with changes in the nature of disease in Japan[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(2): e434-e443.
- [13] AKASHI H, KAKU Y, KONG XG, PANG H. Sequence determination and phylogenetic analysis of the akabane bunyavirus S RNA genome segment[J]. The Journal of General Virology, 1997, 78(Pt 11): 2847-2851.
- [14] TZENG HY, TSAI CL, TING LJ, LIAO KM, TU WC. Molecular epidemiology of akabane virus in Taiwan[J]. Veterinary Medicine and Science, 2022, 8(5): 2215-2222.
- [15] FAFETINE JM, DO MINGOS A, ANTUNES S, ESTEVES A, PAWESKA JT, COETZER JW, RUTTEN VG, NEVES L. Generation and

characterization of monoclonal antibodies against Rift Valley fever virus nucleoprotein[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2013, 60(suppl 2): 24-30.

- [16] YOSHIDA K, TSUDA T. Rapid detection of antigenic diversity of akabane virus isolates by dot immunobinding assay using neutralizing monoclonal antibodies[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1998, 5(2): 192-198.
- [17] 杨忠华, 周建芹. 正辛酸沉淀在单克隆抗体纯化中的工艺优化与应用[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(9): 3757-3771.
- YANG ZH, ZHOU JQ. Optimization and application of caprylic acid precipitation in the purification of monoclonal antibody[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(9): 3757-3771 (in Chinese).
- [18] 魏方, 陈冬杰, 林祥梅, 吴绍强. 赤羽病病毒核衣壳蛋白原核表达及单克隆抗体制备[J]. *中国兽医科学*, 2021, 51(11): 1398-1403.
- WEI F, CHEN DJ, LIN XM, WU SQ. Prokaryotic expression of nucleocapsid protein of red feather disease virus and preparation of monoclonal antibody[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2021, 51(11): 1398-1403 (in Chinese).
- [19] 王冰. 赤羽病病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(3): 309-312.
- WANG B. Preparation of the monoclonal antibodies against N protein of akabane virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 41(3): 309-312 (in Chinese).
- [20] AKASHI H, INABA Y. Antigenic diversity of akabane virus detected by monoclonal antibodies[J]. *Virus Research*, 1997, 47(2): 187-196.
- [21] CHEN DJ, WANG JJ, WEI F, JING HL, WANG D, ZHANG Z, LIN XM, WU SQ. Characterization and double-antibody sandwich ELISA application of a monoclonal antibody against akabane virus nucleocapsid protein[J]. *Journal of AOAC International*, 2023, 106(4): 931-938.

(本文责编 陈宏宇)