

猪弓形虫重组 MIC3 蛋白单克隆抗体的制备及其初步应用

白 昀^{1,2}, 王海燕¹, 王占伟^{1,2}, 纪 燕³, 吴叙苏¹, 刘冬霞¹, 邵国青^{1*}

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所·农业部兽用生物制品工程技术重点实验室·国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014; 2. 南京天邦生物科技有限公司, 南京 211102; 3. 南京农业大学, 南京 210095)

摘要: 为获得针对猪弓形虫 MIC3 蛋白的单克隆抗体, 为进一步研制免疫金标试纸条提供材料, 作者以纯化的重组 MIC3 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 运用杂交瘤技术制备单克隆抗体(McAb)。经 ELISA 筛选阳性克隆和亚克隆建株, 体内诱生腹水法制备 McAb, 测定其亚类、效价, 进行 Western blot 分析, 并利用胶体金颗粒标记的 McAb 制备免疫金标试纸条。成功制备了 2 株稳定分泌抗 MIC3 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株 B7 和 D3, 2 株 McAb 的免疫球蛋白亚类均为 IgG2a, 其 ELISA 腹水效价分别为 1:64 万和 1:192 万, Western blot 结果表明, 2 株 McAbs 腹水均能分别与纯化的重组 MIC3 蛋白和猪弓形虫全虫蛋白中大小为 56 和 38 ku 左右的蛋白发生特异性反应; 用纯化后 McAb 标记的胶体金颗粒制备的免疫金标试纸条可以检测到最低浓度为 4×10^4 CFU \cdot mL⁻¹ 的弓形虫速殖子。本研究为猪弓形虫病的现场诊断提供了有效的方法, 显示出很好的临床应用前景。

关键词: 岗地弓形虫; MIC3 蛋白; 单克隆抗体; 胶体金

中图分类号: S852.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)10-1622-07

Preparation and Preliminary Application of Monoclonal Antibodies against rMIC3 of *Toxoplasma gondii*

BAI Yun^{1,2}, WANG Hai-yan¹, WANG Zhan-wei^{1,2}, JI Yan³, WU Xu-su¹,
LIU Dong-xia¹, SHAO Guo-qing^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology of Ministry of Agriculture · National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Nanjing Tianbang Bio-industry Co. Ltd, Nanjing 211102, China; 3. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: MIC3 has high immunoreactivity, and plays an important role in recognition, adhesion and invasion for *Toxoplasma gondii* to host cells. To prepare the monoclonal antibody (McAbs) against recombinant MIC3 (rMIC3) of *T. gondii*, we expressed rMIC3 in *Escherichia coli*, and purified rMIC3 was immunized to BALB/c mice. B lymphocytes hybridization technique was applied to prepare the aimed McAb. Positive clones were screened with ELISA, and then were subcloned to establish stable cell lines. Ascites were induced to produce the McAbs, and its specificity was identified by Western blot analysis. The gold immunochromatographic lateral flow assay system was developed. The results indicated that two stable hybridoma cell lines (B7 and D3) were obtained. The McAbs subclasses all belong to IgG2a and their ELISA titers of the ascite

收稿日期: 2013-04-19

基金项目: 江苏省科技支撑计划(社会发展)项目(BE2010758)

作者简介: 白 昀(1980-), 男, 陕西华阴人, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物流行病学研究, E-mail: sunnybaiy@sina.com

* 通信作者: 邵国青, Tel: 025-84391973, E-mail: 84391973@163.com

fluid were 1:640 000 and 1:1920 000, respectively. Western blotting analysis confirmed that the two McAbs all can identify the protein MIC3 from lysed tachyzoites and purified rMIC3. Purified polyclone antibody D3 was labeled with colloidal gold particle, and the minimum detectable limit of tachyzoite was 4×10^4 CFU \cdot mL⁻¹. This study laid the foundation for further study on related applications.

Key words: *Toxoplasma gondii*; protein MIC3; monoclonal antibody; colloidal gold

弓形虫病是一种呈世界性分布且严重危害人类健康和畜牧业发展的人兽共患寄生虫病。人类可通过食用未煮熟的含有弓形虫包裹的猪肉感染弓形虫病,引起孕妇流产、早产、畸胎、死胎等,存在严重的公共卫生安全问题。目前,弓形虫病的检测虽然早已成为孕妇的常规检查项目之一,但随着食品安全的问题越来越被人们重视,我们希望对生猪进行检测监管,以最大可能降低人们感染弓形虫病的可能性。

微线体蛋白 3(MIC3)是一种由弓形虫微线体产生的排泄分泌抗原,存在于弓形虫速殖子期、缓殖子期和子孢子期等不同时期,持续时间长,非常适合作为弓形虫病的诊断抗原^[1-2]。本研究以纯化的大肠杆菌表达的重组 MIC3 蛋白作为免疫原,经 ELISA 筛选阳性克隆和亚克隆建株,运用杂交瘤技术制备了弓形虫 MIC3 蛋白的特异性单抗,并应用此单抗制备了胶体金检测试纸条,成功检测到了弓形虫,为下一步的诊断检测及研制弓形虫的亚单位疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与蛋白表达系统

弓形虫 NT 株由本实验室保种;表达菌 pET-32a(+)-MIC3/BL21(DE3)由本实验室构建。大肠杆菌 *E. coli* O26、猪霍乱沙门菌、猪囊尾蚴、华支睾吸虫和猪蛔虫的灭活抗原,均由江苏省农业科学院兽医研究所保存。

1.2 实验动物和细胞系

BALB/c 小鼠购自扬州大学动物实验中心。Sp2/0 骨髓瘤细胞和 Vero 细胞为本实验室保存。

1.3 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、HAT、HT、弗氏完全佐剂及不完全佐剂均为 Sigma 产品;蛋白质分子量标准为 TaKaRa 产品;鼠单克隆抗体亚类检测试剂盒为 SANTA CRUZ 公司产品;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;聚乙二醇(PEG4000)购

自 Roche 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG、NC 膜购自 BIO-RAD 公司;氯金酸为上海化学试剂有限公司产品,硝酸纤维素膜、玻璃纤维垫、吸收垫及背衬等层析材料为 Millipore 公司产品,购自上海金标生物科技有限公司;Protein G 亲和层析纯化柱为 GE 公司产品;NANODROP2000 核酸蛋白含量测定仪为 Thermo 公司产品;CO₂ 培养箱为美国 Thermo 公司产品;酶标仪为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.4 免疫抗原的制备及纯化

将实验室保存的重组质粒 pET-32a(+)-MIC3/BL21(DE3)工程菌低温诱导表达 16 h 后,取菌体裂解上清得到可溶性 MIC3 重组蛋白^[3]。经 His 标签蛋白纯化试剂盒过柱纯化,SDS-PAGE 电泳鉴定及核酸蛋白含量测定仪测定蛋白含量后,-20 ℃保存备用。

1.5 BALB/c 小鼠的免疫

用纯化后的重组猪弓形虫 MIC3 蛋白免疫 8~12 周龄的小鼠,首免加弗氏完全佐剂皮下注射,50 μ g \cdot 只⁻¹;2 周后二免,加弗氏不完全佐剂皮下注射,50 μ g \cdot 只⁻¹;2 周后三免,不加佐剂腹腔注射,50 μ g \cdot 只⁻¹;10 d 后采血测定抗体效价,如达到融合条件,不加佐剂进行静脉注射免疫,20 μ g \cdot 只⁻¹,3 d 后无菌取脾脏进行细胞融合。

1.6 间接 ELISA 检测方法的建立

参照文献[4]所述略加改动,简要如下:用 pH9.6 的包被液将纯化的 MIC3 蛋白稀释至 2.5 μ g \cdot mL⁻¹包被 ELISA 板,1%明胶封闭,与 1:80 稀释的待检血清在 37 ℃作用 90 min 后用 PBST(含 0.1% Tween-20 的磷酸盐缓冲液)洗涤 3 次,拍干;再与 1:10 000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP 酶标二抗在 37 ℃作用 30 min,然后加入新配的 TMB(3,4,5-三甲氧基苯甲醛)显色液,避光显色 5 min 后每孔加入 50 μ L 2 mol \cdot L⁻¹的 H₂SO₄ 终止反应,在酶标仪上读取 OD_{450 nm} 值,当 OD_{450 nm} \geq 2.1 \times 阴性血清 OD_{450 nm} 时判为阳性。

1.7 细胞融合及阳性杂交瘤细胞株的筛选

细胞融合按刘秀梵的方法^[5]进行。脾细胞与 SP2/0 细胞融合后,于 96 孔培养板中 37 ℃ 在 CO₂ 培养箱中培养至长满孔底面积的 1/10 时,吸取上清液,经间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞。用有限稀释法对阳性孔进行连续 3 次亚克隆,至所有单克隆孔均为阳性为止。最终将获得的单克隆扩大培养后建株,冻存。

1.8 单抗腹水的制备

按 J. W. Golding^[6]报道的方法进行。取 12 周龄 BALB/c 小鼠腹腔注射灭菌石蜡油(每只注射 0.5 mL),10 d 后将生长状态良好的杂交瘤细胞以每只约 1×10^6 个细胞腹腔注射 BALB/c 小鼠。7 d 左右小鼠腹部开始明显膨大,反复抽取腹水,以 $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 除去细胞成分和其他沉淀,收集上清,分装, -70 ℃ 保存。

1.9 McAb 特性鉴定

1.9.1 McAb 效价测定 将 McAb 腹水用 PBS 做 3 倍递增稀释,以纯化的弓形虫重组 MIC3 蛋白 ($2.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 包板,间接 ELISA 法测定培养上清和腹水的抗体效价。

1.9.2 亚型鉴定 单抗亚型鉴定按照亚型鉴定试剂盒(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)操作说明,对以上试验中得到的单克隆抗体进行亚型鉴定。

1.9.3 McAb 的 Western blot 分析 采用蛋白质技术手册方法^[7]。纯化的重组 MIC3 蛋白、弓形虫全虫裂解蛋白及空载体菌体蛋白经 SDS-PAGE 电泳后以恒流转膜 1.5 h。一抗为腹水上清,以 1 : 200 稀释;二抗为羊抗小鼠 IgG-HRP,以 1 : 5 000 稀释。其他步骤按文献 [4] 方法进行。

1.9.4 McAb 的抗原表位分析 采用相加指数法^[8]。以最适抗原浓度包被酶标板,洗涤后分别加入饱和浓度的单抗 B7 和 D3,每株 6 个孔,37 ℃ 孵育 1 h,洗板后每株分别取 3 个孔加入羊抗鼠 HRP-IgG,37 ℃ 孵育 1 h,洗板后显色,分别测定 OD_{450 nm} 值。在每株剩余 3 个孔中分别加入另外一株饱和浓度的单抗,37 ℃ 孵育 1 h,洗板后加入羊抗鼠 HRP-IgG,37 ℃ 孵育 1 h,洗板后显色,分别测定 OD_{450 nm} 值。按如下公式分别计算 2 株单抗叠加后的 AI 值, $AI = (A_{1.2} - A_1) / A_2 \times 100\%$; 其中 A_{1.2} 表示 2 株单抗叠加后的 OD_{450 nm} 值; A₁ 表示第 1 株单抗的 OD_{450 nm} 值; A₂ 表示第 2 株单抗的 OD_{450 nm} 值。当 AI > 10% 时,表明这 2 株单抗所识别的抗原位点不

同,若 AI ≤ 10% 时,表明这 2 株单抗所识别的抗原位点相近或相同。

1.10 20~30 nm 胶体金颗粒的制备

采用柠檬酸三钠还原法制备金溶液。取 0.01% 氯金酸水溶液 100 mL 加热至煮沸,搅动下准确加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 1.8 mL,继续煮沸 10 min,冷却后加入蒸馏水使其恢复至原体积,测定金溶液的吸收峰波长,避光 4 ℃ 保存。

1.11 胶体金标记单克隆抗体玻璃纤维素膜的制备

1.11.1 抗体标记最适 pH 的选择 用 0.2 mol · L⁻¹ 碳酸钾溶液和 0.2 mol · L⁻¹ 盐酸溶液将 1 mL 胶体金溶液的 pH 分别调为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,每支管加入 50 μL 1.0 mg · mL⁻¹ 的抗弓形虫单克隆抗体 D3,迅速振荡混匀,室温下放置 20 min 后每管分别加入 100 μL 10% NaCl 溶液,振荡混合,室温下放置 4 h,观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低 pH,最佳 pH 确定为最低 pH 的基础上增加 0.5。

1.11.2 抗体最适标记量的选择 取 1.5 mL 离心管,分别加入最佳 pH 的胶体金 500 μL,各管依次加入不同量的抗体,使其终浓度达到每毫升含有抗体 40.0、20.0、10.0、5.0、2.5 和 1.3 μg,振荡混合后室温下放置 10 min。然后每管加入 100 μL 10% NaCl,振荡混合后室温下放置 4 h。颜色仍保持红色的最小抗体用量即为最小抗体浓度,抗体与胶体金结合的最佳浓度确定为最小抗体浓度的 120% ~ 130%。

1.11.3 胶体金探针的制备和纯化 根据测得的胶体金标记的最适 pH 值与最佳抗体浓度,取 20 mL 胶体金溶液室温磁力搅拌下缓慢加入待标记的单克隆抗体 D3,室温搅拌 30 min。加入终浓度为 0.1% 的 BSA,室温搅拌 5 min,继续加入终浓度为 0.2% 的 PEG(MW20000),室温搅拌 5 min,10 000 r · min⁻¹ 离心 60 min,小心吸弃上清,加 2 mL 保存液悬浮沉淀,用 0.45 μm 滤膜过滤,获得单克隆抗体标记的胶体金探针。

1.11.4 金标垫的制备 用工作液将胶体金探针原液按 4 : 1 进行稀释混匀,均匀地喷涂在玻璃纤维素膜上,制成胶体金标记单克隆抗体玻璃纤维素膜(金标垫)。自然干燥后,加入干燥剂密封保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.12 硝酸纤维素膜的处理

用 0.01 mol · L⁻¹ pH7.0 的 PBS 分别稀释猪

抗弓形虫多克隆抗体 IgG 和羊抗鼠 IgG,以不同的蛋白浓度分别作为检测和质控捕获抗体包被在硝酸纤维素膜上。选择显色效果最优的一组作为猪抗弓形虫多克隆抗体 IgG 使用浓度(T 线)和羊抗鼠 IgG 抗体使用浓度(C 线)。

1.13 试纸条的组装

在 PVC 底板上分别将包被有猪抗弓形虫多克隆抗体 IgG 和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜、包被有胶体金标记单克隆抗体玻璃纤维素膜(金标垫)与玻璃纤维素膜制成的样品垫、滤纸制成的吸水垫依次组装、用切刀裁成 0.4 cm 宽的试纸条,即为弓形虫抗原胶体金免疫层析检测试纸条成品。与干燥剂一起密封,于 4 ℃ 贮存。

1.14 检测与结果判读

将试纸条恢复至常温、开封,将检测端浸泡在样品检测液中(液面不可超过箭头线),取出水平放置 3~5 min 后观察结果,如试纸条上仅 C 线出现紫红条带为阴性;C 线、T 线均出现紫红色带为阳性;C 线没有条带,则试纸条失效。

1.15 猪弓形虫胶体金试纸条适用性评价

1.15.1 敏感性试验 收集 Vero 细胞培养的猪弓形虫速殖子计数,用 PBS 将其分别稀释为 4×10^6 、 4×10^5 、 4×10^4 、 4×10^3 、 4×10^2 CFU · mL⁻¹ 的猪弓形虫阳性标准样品,同时以 PBS 作为阴性对照,以试纸条检测到的猪弓形虫阳性标准样品最低含虫浓度定为试纸条的灵敏度。

1.15.2 特异性试验 用胶体金免疫层析检测试纸条对大肠杆菌 *E. coli* O26、猪霍乱沙门菌、猪囊尾蚴、华支睾吸虫和猪蛔虫的灭活抗原进行检测,并设弓形虫为阳性,PBS 为阴性对照。

1.15.3 稳定性试验 将制备好的试纸条密闭包装,分别保存于 4 ℃ 和室温(25 ℃)条件下,每隔 30 d 取出进行外观及功能检验。

2 结果

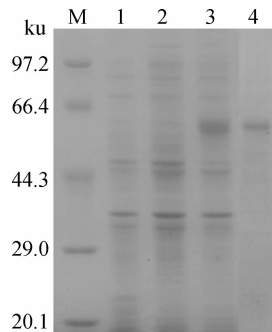
2.1 重组 MIC3 蛋白的表达与纯化

表达的重组 MIC3 蛋白经 PAGE 电泳显示大小为 56 ku 左右,与设计的目的条带相符;纯化后的蛋白中杂蛋白较少(图 1),经蛋白含量测定仪检测得到蛋白的浓度为 225 μg · mL⁻¹。

2.2 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

以纯化的重组 MIC3 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合,用 HAT 选

择性培养液筛选。通过以纯化的 MIC3 蛋白作为检测抗原的间接 ELISA 筛选,阳性孔杂交瘤细胞株经 3 次亚克隆,最终获得 2 株能稳定分泌抗重组 MIC3 蛋白的杂交瘤细胞株,命名为 B7 和 D3。



1. 经 IPTG 诱导的空载体重组菌;2. 未诱导的重组菌;3. 经 IPTG 诱导后的重组菌上清;4. 纯化的表达蛋白;M. 蛋白质分子质量标准

1. Negative control; 2. Fusion protein before induce; 3. Fusion protein after induce; 4. Purified His-MIC3; M. Protein molecular weight marker (low)

图 1 猪弓形虫重组 MIC3 蛋白原核表达 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of MIC3 protein of *Toxoplasma gondii* expressed in *E. coli*

2.3 McAb 的特性鉴定

2.3.1 McAb 效价测定 结果显示,2 株杂交瘤细胞上清和腹水与重组 MIC3 蛋白均具有较强的反应性,且可以与全虫蛋白发生反应,效价见表 1。

2.3.2 McAb 的亚型鉴定 抗体亚类鉴定结果表明,所获得的两株单克隆抗体分泌类型均为 IgG2a 亚类,轻链为 κ 链。

2.3.3 McAb 的 Western blot 结果 2 株单抗的 Western blot 鉴定结果(图 2)表明,单抗 B7 和 D3 均可与 56 ku 的重组 MIC3 蛋白发生特异性反应,其中单抗 D3 与重组 MIC3 蛋白的反应较强,而 B7 反应较弱;2 株单抗均可与大小为 38 ku 左右的弓形虫全菌裂解蛋白发生微弱反应,可能是由于虫体中天然的 MIC3 蛋白表达量很小所致,这与 O. Cereda 等的报道相一致^[2]。

2.3.4 McAb 的抗原表位分析 经相加 ELISA 测定,单克隆抗体 B7 和 D3 两两叠加后的 AI 值分别为 23.9% 和 16.7%,均大于 10%,说明它们分别识别不同的抗原位点。

2.4 胶体金的制备

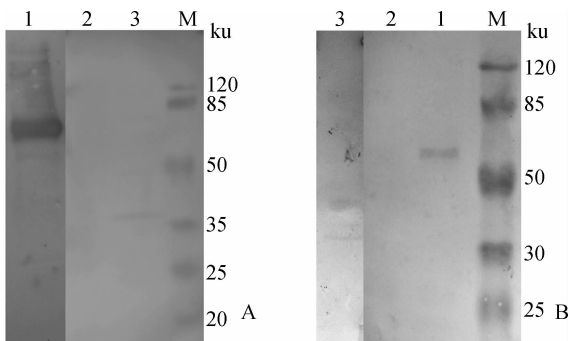
经紫外可见光分光光度计对胶体金颗粒的扫描观察,测定其吸收曲线在 521 nm 处为吸收峰,峰值

的扫描结果为 $D_{521\text{ nm}}=0.857$, 其对应的颗粒直径为 20~30 nm。

表 1 杂交瘤细胞培养上清及腹水抗体效价

Table 1 Titers of antibody in cell supernatant and ascites of McAbs B7 and D3

抗原 Antigen	细胞上清 Cell culture medium		腹水 Ascite	
	B7	D3	B7	D3
重组 MIC3 蛋白 rMIC3 protein	1 : 900	1 : 2 700	1 : 640 000	1 : 1 920 000
全虫蛋白 Whole proteins of <i>Toxoplasma gondii</i>	1 : 100	1 : 300	1 : 3 000	1 : 24 000
空载体蛋白 Empty vector protein	0	0	0	0



A. 单克隆抗体 B7; B. 单克隆抗体 D3; 1. MIC3 纯化蛋白; 2. pET-32a(+)空载体蛋白; 3. 全虫裂解蛋白; M. 蛋白质 Marker

A. McAb B7; B. McAb D3; 1. His-MIC3; 2. pET-32a; 3. Total proteins of *Toxoplasma gondii*; M. Prestained protein molecular weight marker

图 2 2 株纯化单克隆抗体的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of purified McAbs vs tachyzoite antigen and MIC3 of *Toxoplasma gondii*

2.5 胶体金标记单克隆抗体玻璃纤维素膜的制备

在胶体金标记的最适 pH 值测定试验中, 当 pH2.0~6.0 时, 免疫胶体金溶液颜色逐渐由酒红色转变为紫黑色, 并出现了凝集沉淀现象; 当 pH 7.0~9.0 时, 免疫胶体金溶液颜色始终保持酒红色, 故将最适 pH 值设为 7.5。

在胶体金标记的最适抗体浓度测定试验中, 胶体金稳定的最小抗体浓度为 $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在此基础上增加 20% 为标记单克隆抗体 D3 的实际抗体浓度, 即 $6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 包被抗体硝酸纤维素膜的制备

包被于硝酸纤维素膜上, 分别作为检测线和质

检线的猪抗弓形虫多抗 IgG 和羊抗鼠 IgG 的最佳包被浓度均为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 此时条带清晰, 无拖带, 阴阳性肉眼区别明显。

2.7 敏感性试验

试验结果(图 3)显示随着样品含虫量的降低, 试纸条检测线显色逐渐变淡, 当样品含虫量降低到 $4 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 检测线虽然已有些模糊, 但还是可以与阴性对照相互区分; 当样品含虫量降低到 $4 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 检测线几乎看不到, 与阴性对照没有明显区别, 即该胶体金试纸条检测弓形虫的最低敏感度为 $4 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



1~5. 含虫量为 $4 \times 10^6 \sim 4 \times 10^2 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的弓形虫阳性标准样品; 6. 阴性对照

1-5. Positive samples that contain $4 \times 10^6 \sim 4 \times 10^2$ tachyzoites per milliliter; 6. Negative control

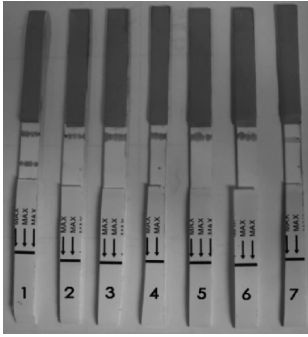
图 3 敏感性试验

Fig. 3 Sensitivity assay results

2.8 特异性试验

用试纸条进行交叉反应检测, 结果表明该试纸

条特异性良好,与大肠杆菌 *E. coli* O26、猪霍乱沙门菌、猪囊尾蚴、华支睾吸虫和猪蛔虫无交叉反应(图 4)。



1. 弓形虫;2. 大肠杆菌 *E. coli* O26;3. 猪霍乱沙门菌;
4. 猪囊尾蚴;5. 华支睾吸虫;6. 猪蛔虫;7. 阴性对照
1. *Toxoplasma gondii*;2. *E. coli* O26;3. *Salmonella choleraesuis*; 4. *Cysticercus cellulosae*; 5. *Clonorchis sinensis*; 6. *Ascaris suum*; 7. Negative control

图 4 特异性试验

Fig. 4 Specific assay results

2.9 稳定性试验

检测结果显示胶体金试纸条在 4 °C 保存有效期为 12 个月,在室温 25 °C 保存有效期为 3 个月。

3 讨论

弓形虫的微线体蛋白(microneme proteins, MICs)是由散布于虫体前端棒状体周围的微线体分泌的多种蛋白^[9],目前发现的微线体蛋白有 15 种以上,包括 MIC1 ~ MIC12、AMA1、SUB1、SUB2 等^[10]。微线体蛋白 3(microneme protein 3, MIC3)是弓形虫微线体分泌至体外的一种蛋白质,是重要的黏附分子,是一种由弓形虫微线体产生的排泄分泌抗原,存在于弓形虫速殖子期、缓殖子期和子孢子期等不同时期,参与虫体对宿主细胞的识别、黏附及入侵过程,还与虫体毒力相关^[2, 9, 11-12]。微线体蛋白 3 在弓形虫病的诊断制剂及其疫苗研制上是很有潜力的候选因子,也是近年来研究的热点之一。

本研究对构建的 pET-32a(+)/MIC3 重组质粒通过优化表达条件,成功得到可溶性上清表达蛋白,并通过亲和层析 Ni 柱,获得纯化的重组 MIC3 蛋白,最大限度地避免了沉淀表达复性之后蛋白结构的改变,从而使重组 MIC3 蛋白在体外能保持最大的活性,以此纯化的重组 MIC3 蛋白作为免疫原,为成功获得特异性好的单克隆抗体提供了保证。作者也曾使用纯化的弓形虫全虫裂解蛋白作为免疫

原,重组 MIC3 蛋白作为检测原来制备单抗,但未检测出阳性克隆,可能是因为 MIC3 蛋白占全虫蛋白的比例非常小,使得针对 MIC3 蛋白的单克隆抗体细胞则更少,不容易被检测到。

在单抗筛选过程中,作者分别用重组 MIC3 融合蛋白、全虫裂解蛋白和空载体蛋白包被同时进行 ELISA 检测筛选,避免了载体蛋白及其他成分对筛选所造成的干扰,经过 3 次亚克隆,最终获得 B7 和 D3 2 株特异性强、分泌能力高的杂交瘤细胞,培养上清的抗体效价分别达到 1 : 900 和 1 : 2 700,小鼠腹水效价分别达到 1 : 640 000 和 1 : 1 920 000; Western blot 结果显示,2 株杂交瘤细胞的单克隆抗体均能与弓形虫重组 MIC3 蛋白和全虫裂解蛋白发生特异性反应,而不与空载体裂解蛋白发生反应,这为研制弓形虫检测试剂盒提供了条件。

在胶体金免疫层析试纸条的制备过程中,作者对诸多因素进行了优化,如:胶体金颗粒的大小,胶体金标记蛋白的 pH 与蛋白浓度,玻璃纤维素膜及硝酸纤维素膜的选择,以及喷涂检测线 and 对照线使用的抗体浓度等。检测线的包被蛋白原本是 B7 单克隆抗体 IgG,但经试验发现其敏感度较差,只能检测出浓度为 4×10^6 CFU · mL⁻¹ 的弓形虫速殖子,分析原因可能是其针对全虫蛋白的效价较低,只有 1 : 3 000,不能完全拦截住胶体金抗体-抗原结合物。而经 Protein G 亲和层析柱纯化后的猪抗弓形虫高免疫血清 IgG 与弓形虫全虫抗原的 ELISA 反应效价可以达到 1 : 72 000,大大提高了其捕获能力,同时以金标单克隆抗体的高特异性也可以弥补高免疫血清特异性的不足,成为较好的组合。

本研究制备的弓形虫胶体金检测试纸条可以成功地检测到最低浓度为 4×10^4 CFU · mL⁻¹ 的弓形虫速殖子,且与大肠杆菌和猪囊尾蚴等其他病原没有交叉反应,但并没有对弓形虫包囊进行检测。弓形虫感染猪体后通常以包囊的形式存在于肌肉和大脑中,这也是下一步研究亟待解决的问题。

4 结论

成功制备了 2 株针对猪弓形虫重组 MIC3 蛋白的单抗,其中 D3 株单抗与重组 MIC3 蛋白和全虫裂解蛋白均有较强反应,用其制备的胶体金试纸条可以检测猪弓形虫临床样品。

参考文献:

[1] ISMAEL A B, SEKKAI D, COLLIN C, et al. The

- MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(11): 6222-6228.
- [2] CÉRÈDE O, DUBREMETZ J F, BOUT D, et al. The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires propeptide cleavage and dimerization to function as adhesin [J]. *EMBO J*, 2002, 21(11): 2526-2536.
- [3] 白 昀, 刘茂军, 冯志新, 等. 刚地弓形虫 NT 株 MIC3 基因的克隆和原核表达 [J]. *江苏农业学报*, 2011, 27(6): 1295-1299.
- [4] 白 昀, 王海燕, 张 悦, 等. 弓形虫重组 MIC3 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(7): 738-743.
- [5] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用 [M]. 合肥: 安徽科技技术出版社, 1994: 21-23, 32-36.
- [6] GOLDING J W. Monoclonal antibodies: principles and practice [M]. London, New York: Academic Press, 1993: 76-77.
- [7] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 166-184.
- [8] 龙云凤, 周晓黎, 杨俊兴, 等. 小反刍兽疫病毒核蛋白单克隆抗体的制备与初步应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(4): 588-595.
- [9] SOLDATI D, DUBREMETZ J F, LEBRUN M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* [J]. *Int J Parasitol*, 2001, 31(12): 1293-1302.
- [10] DOWSE T, SOLDATI D. Host cell invasion by the apicomplexans; the significance of microneme protein proteolysis [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(4): 388-396.
- [11] GARCIA-REGUET N, LEBRUN M, FOURMAUX M N, et al. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite [J]. *Cell Microbiol*, 2000, 2(4): 353-364.
- [12] CÉRÈDE O, DUBREMETZ J F, SOËTE M, et al. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(3): 453-463.

(编辑 白永平)