



罗意,马春慧,郑福英,李永清,樊晓旭,储岳峰,周沛,许健. 布鲁氏菌 Bp26 蛋白单克隆抗体制备及生物学鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(07): 139-149.
LUO Yi, MA Chunhui, ZHENG Fuying, LI Yongqing, FAN Xiaoxu, CHU Yuefeng, ZHOU Pei, XU Jian. Preparation and preliminary application of monoclonal antibody against *Brucella* Bp26[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(07): 139-149.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.07.12

布鲁氏菌 Bp26 蛋白单克隆抗体制备及生物学鉴定

罗意¹ 马春慧¹ 郑福英^{2,3} 李永清⁴ 樊晓旭⁵ 储岳峰^{2,3} 周沛^{1*} 许健^{2,3*}

(1. 华南农业大学 兽医学院, 广州 510642;

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, 兰州 730046;

3. 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 兰州 730046;

4. 北京市农林科学院 畜牧兽医研究所, 北京 100097;

5. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

摘要 为制备布鲁氏菌 Bp26 蛋白单克隆抗体并对其进行生物学特性鉴定, 本研究利用原核表达系统制备 Bp26 重组蛋白, 以纯化的 Bp26 蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 通过杂交瘤技术制备针对布鲁氏菌 Bp26 蛋白的单克隆抗体, 采用免疫印迹和间接免疫荧光试验鉴定其特异性, 并通过 ELISA 测定亲和力和常数及阻断活性, 最后采用斑点杂交试验鉴定抗原识别表位。结果表明: 1) 成功表达布鲁氏菌 Bp26 蛋白, 其相对分子质量在 26 ku 左右。2) 获得 2 株 Bp26 单克隆抗体细胞株 (6E8 和 4C4)。免疫印迹显示, 2 株 Bp26 单抗与重组 Bp26 蛋白和布鲁氏菌菌体 Bp26 蛋白均有较强的特异性反应; 间接免疫荧光试验表明, Bp26 单抗能够特异性识别感染巨噬细胞的羊种布鲁氏菌 M5-90 株, 但不能识别感染巨噬细胞的 M5-90 Δ Bp26 株。ELISA 显示, 单抗 6E8 和 4C4 的亲和力常数分别为 2.58×10^{-7} 和 2.34×10^{-7} mol/L, 抗体阻断率均达到 80% 以上。斑点杂交结果显示, 单抗 6E8 识别表位氨基酸序列为 ²³ASPDMAILNL³², 单抗 4C4 为 ⁷³GINIQPIYVYPD⁸⁴。综上, 本研究成功制备了针对布鲁氏菌 Bp26 蛋白不同抗原表位的 2 种单克隆抗体, 其具有较好的特异性、结合力及阻断活性, 不仅为进一步探索布鲁氏菌 Bp26 蛋白的生物学特性奠定基础, 而且为布鲁氏菌诊断技术的建立提供技术支持。

关键词 布鲁氏菌; Bp26 蛋白; 单克隆抗体; 表位鉴定

中图分类号 S852.61

文章编号 1007-4333(2025)07-0139-11

文献标志码 A

Preparation and biological identification of monoclonal antibody against *Brucella* Bp26

LUO Yi¹, MA Chunhui¹, ZHENG Fuying^{2,3}, LI Yongqing⁴, FAN Xiaoxu⁵, CHU Yuefeng^{2,3},
ZHOU Pei^{1*}, XU Jian^{2,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Lanzhou Veterinary Research Institute/College of Animal Medicine and Biosafety of Lanzhou University/National Key Laboratory of Prevention and Control of Animal Diseases, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China;

3. Gansu Province Research Centre for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, China;

4. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China;

5. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

收稿日期: 2025-01-13

基金项目: 甘肃省重大科技专项 (22ZD6NA001)

第一作者: 罗意 (ORCID: 0009-0004-9445-1538), 硕士研究生, E-mail: ly1415926@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 周沛 (ORCID: 0000-0003-2006-9163), 副教授, 主要从事兽医临床疾病防治的研究, E-mail: zhoupei@scau.edu.cn

许健 (ORCID: 0009-0002-3289-3002), 研究员, 主要从事动物疫病防控、免疫调节与致病机制研究, E-mail: xujian@caas.cn

Abstract In order to prepare monoclonal antibodies against *Brucella* Bp26 protein and identify its biological characteristics, Bp26 recombinant protein was prepared by prokaryotic expression system. Balb / c mice were immunized with purified Bp26 protein, and monoclonal antibodies against *Brucella* Bp26 protein were prepared by hybridoma technology. The specificity was identified by western immunoblotting and indirect immunofluorescence assay, and the affinity constant and blocking activity were determined by ELISA. Finally, the antigen recognition epitopes were identified by dot blot hybridization. The results showed that: 1) *Brucella* Bp26 protein was successfully expressed, and its relative molecular mass was about 26 ku. 2) Two Bp26 monoclonal antibody cell lines (6E8 and 4C4) were obtained. Western blotting showed that the two Bp26 monoclonal antibodies had strong specific reactions with recombinant Bp26 protein and *Brucella* Bp26 protein. Indirect immunofluorescence showed that Bp26 monoclonal antibody could specifically recognize *Brucella* melitensis M5-90 strain infected with macrophages, but it could not recognize M5-90△Bp26 strain infected macrophages. ELISA showed that the affinity constants of monoclonal antibodies 6E8 and 4C4 were 2.58×10^{-7} and 2.34×10^{-7} mol / L, respectively, and the antibody blocking rates were more than 80%. The results of dot blot hybridization showed that the amino acid sequence of the epitope recognized by monoclonal antibody 6E8 was ²³ASPDMAILNL³², and that of monoclonal antibody 4C4 was ⁷³GINIQPIYVYPD⁸⁴. In summary, two monoclonal antibodies against different epitopes of *Brucella* Bp26 protein were successfully prepared in this study, which had good specificity, binding ability and blocking activity. It not only laid a foundation for further exploration of the biological characteristics of *Brucella* Bp26 protein, but also provided technical support for the establishment of *Brucella* diagnostic technology.

Keywords *Brucella*; Bp26 protein; monoclonal antibody; epitope identification

布鲁氏菌病是全球最常见的人畜共患传染病之一,也是我国亟待防控和净化的两病之一。人类通过直接或间接接触感染动物,或通过食用生肉和未消毒灭菌的乳制品而发生感染^[1]。根据最新统计数据,全球每年新发布鲁氏菌病数为210万例^[2],其主要在非洲、亚洲、拉丁美洲和中东等地区流行^[3]。依据中国疾病预防控制中心数据统计,2023年度我国人间布鲁氏菌病发生70 439例,发病率为4.996 6例/10万人。布鲁氏菌感染人的症状主要包括发烧、盗汗、厌食、多发性关节炎、脑膜炎和肺炎等^[4]。在动物养殖方面,布鲁氏菌主要侵害生殖系统,造成公畜的睾丸炎和不育以及母畜的子宫炎、流产、死胎等^[5]。布鲁氏菌病不仅给我国造成巨大经济损失,而且对我国人民生命健康带来严重威胁。

根据中华人民共和国农业农村部关于印发《畜间布鲁氏菌病防控五年行动方案(2022—2026年)》的通知,全国布鲁氏菌防控实施全面免疫政策,主要是免疫区的免疫剔除和非免疫区的检疫捕杀。因此,利用布鲁氏菌特异性关键抗原靶标研制高效防控制剂,是实现布鲁氏菌有效控制的关键技术环节。研究发现,布鲁氏菌外膜蛋白(Out membrane protein, OMP)是其主要抗原蛋白,包括 OMP10、OMP16、OMP19、OMP2a/2b、OMP25、OMP28 和 OMP31 等^[6]。在这些抗原蛋白中,针对 Bp26(又称 OMP28 或 CP28)的多表

位疫苗能够诱导机体产生强烈的体液和细胞免疫,显著提高小鼠体内 IFN- γ 、IgG、IgG2a、IgG1、IL-2 和 TNF- α 水平,已被证实能够有效抵抗布鲁氏菌野毒的攻击^[7]。此外,Bp26 蛋白在布鲁氏菌6个经典种属高度保守^[8]。更为重要的是,布鲁氏菌弱毒疫苗免疫动物后,血清中的 Bp26 蛋白抗体水平显著低于布鲁氏菌野毒感染动物后的抗体水平。这一特点为布鲁氏菌 Bp26 蛋白作为野毒感染和疫苗免疫的鉴别诊断靶标提供了理论基础^[9]。因此,我国目前已成功研制了 Bp26 蛋白缺失的羊种布鲁氏菌 M5-90△Bp26 疫苗株^[10],并已在内蒙古、河北、新疆等省份进行初步试用,目前已取得了一定成效。这表明布鲁氏菌 Bp26 抗原蛋白是能够广泛用于布病防控制剂研制的较好靶标。然而,迄今为止,针对布鲁氏菌 Bp26 抗原优势表位及生物学研究较少,本研究旨在制备布鲁氏菌 Bp26 蛋白的单克隆抗体,并对其生物学特性进行初步分析,研究成果将为布鲁氏菌 Bp26 蛋白生物学特性及新型鉴别防控技术的研制提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种、质粒、细胞及多肽

布鲁氏菌 M5-90 菌株和 M5-90△Bp26 疫苗缺

失株保存于中国农业科学院兰州兽医研究所P3实验室,pCold I载体、RAW264.7细胞保存于兰州兽医研究所草食动物细菌病团队实验室,SP2/0细胞由北京市农林科学院畜牧兽医研究所畜禽疫病研究中心惠赠,多肽序列委托上海纽普生物公司设计并合成。

1.1.2 主要试剂

高保真2×Prime Star Max酶、T4 DNA连接酶、*Sac* I、*Sal* I限制性内切酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司;细菌基因提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;201VG佐剂购自SEPPIC;HAT培养基添加剂、HT培养基添加剂购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;羊抗鼠HRP-IgG购自武汉三鹰公司;Donkey anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488)购自Abcam。

1.1.3 实验动物

SPF级Balb/c小鼠,雌性,6~8周龄,体重(20±2)g,购至中国农业科学院兰州兽医研究所动物实验中心(生产许可证号:SCXK(甘)2020-0002;动物伦理审查号:LVR1AEC-2022-003)。

1.2 试验方法

1.2.1 Bp26蛋白的生物学信息分析

利用在线软件ProtParam(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)分析Bp26蛋白的分子量大小、等电点(PI)、半衰期等性质;分别利用在线软件ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)、SignalP-5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)和TMHMM Server2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对该蛋白的亲/疏水性、信号肽序列和跨膜结构域进行分析;同时使用在线软件SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)预测并构建该蛋白的三维结构模型。

1.2.2 引物设计

根据Genbank上收录的布鲁氏菌M5-90 *Bp26*基因序列,引入*Sac* I和*Sal* I限制性酶切位点并添加保护碱基,引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列如下:(Bp26-F: 5'-AACGAGCTCATGCAGGAGAATCAGATG-3'; Bp26-R: 5'-ACGCGTCTGACTTACTTGATTTCAAAAAC-3')。

1.2.3 基因组提取及目的片段的扩增

按照细菌基因提取试剂盒说明书抽提布鲁氏

菌M5-90菌株的基因组DNA,以M5-90菌株DNA为模板,Bp26F/R为引物进行*Bp26*基因目的片段的扩增,PCR反应结束后经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,对鉴定成功的目的片段利用胶回收试剂盒进行PCR产物纯化。

1.2.4 重组表达载体构建及鉴定

使用*Sac* I、*Sal* I限制性内切酶对pCold I空载和Bp26目的片段产物进行双酶切,在T4 DNA连接酶的作用下,16℃过夜连接。次日转化至感受态细胞DH5α中,均匀涂抹于含100 μg/mL氨苄青霉素的LB营养琼脂培养基上,筛选阳性克隆并进行质粒提取,随后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行鉴定,对测序鉴定成功的质粒命名为pCold I-Bp26。

1.2.5 重组蛋白的诱导表达及鉴定

将pCold I-Bp26质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞中,构建pCold I-Bp26原核表达载体,取100 μL pCold I-Bp26原核表达载体菌液和pCold I空载菌液各接种于10 mL含100 μg/mL氨苄青霉素的LB肉汤中,37℃,200 r/min摇至OD₆₀₀约0.6~0.8,各取100 μL菌液作为诱导前对照,剩余菌液中加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG,于16℃,180 r/min诱导24 h,结束后进行SDS-PAGE鉴定。

1.2.6 重组蛋白纯化及免疫印迹鉴定

在最佳诱导条件下将10 mL pCold I-Bp26重组表达载体菌液加入至1 L含100 μg/mL氨苄青霉素的LB肉汤中,16℃,180 r/min条件下进行大量诱导表达,结束后离心收集沉淀,用30 mL预冷的PBS重悬后进行超声破碎,离心收集上清,利用Ni-NTA亲和层析柱法纯化蛋白。随后对纯化的Bp26蛋白进行Western blotting特异性鉴定,经5%脱脂奶粉室温封闭1 h,小鼠Bp26阳性血清(1:1 000)作为一抗,羊抗鼠HRP-IgG(1:10 000)作为二抗,结束后将ECL化学发光底物A液和B液1:1混合,随后进行凝胶系统曝光采集图像并分析结果。

1.3 Bp26单克隆抗体的制备

1.3.1 小鼠免疫及其血清抗体效价检测

PBS稀释Bp26蛋白至1 mg/mL,选取6~8周龄的Balb/c小鼠,每只小鼠注射100 μg Bp26蛋白,与等体积的201VG佐剂充分乳化后皮下多点注射,免疫4次后采用间接ELISA检测血清中Bp26抗体效价。

1.3.2 Bp26特异性杂交瘤细胞株的建立

无菌条件下取出血清中Bp26抗体效价高的小

鼠脾细胞,与SP2/0细胞在PEG1450的作用下进行融合,使用含20%FBS,1×HAT选择性培养基的DMEM培养基培养融合细胞,7~10 d后采用ELISA测定细胞上清抗体效价,选取效价高,细胞状态好的进行亚克隆,亚克隆换成含20%FBS,1×HT选择性培养基的DMEM培养基培养细胞,经4次亚克隆筛选可以稳定分泌Bp26蛋白特异性抗体的单克隆细胞株,扩大培养后及时冻存。

1.3.3 单克隆抗体腹水制备及纯化

选取6~8周龄的Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡,每只0.5 mL,一周后,取约1×10⁶个单克隆细胞腹腔注射小鼠,7~10 d后收集腹水,5 000 r/min离心10 min收集上清,随后按照Protein A/G琼脂糖珠说明书进行腹水纯化,SDS-PAGE验证后分装保存于-80℃冰箱。

1.3.4 单抗的免疫印迹鉴定

分别制备Bp26蛋白,布鲁氏菌M5-90、M5-90△Bp26、小肠结肠炎耶尔森菌、大肠杆菌O157:H7、大肠杆菌O78、沙门氏菌、李斯特菌的蛋白样品,随后进行Western blotting,经5%脱脂奶粉封闭1 h,单克隆抗体6E8与4C4(1:1 000)作为一抗,羊抗鼠HRP-IgG(1:10 000)作为二抗,结束后将ECL化学发光底物A液和B液1:1混合,进行凝胶系统曝光采集图像并分析。

1.3.5 单抗的间接免疫荧光鉴定

分别用布鲁氏菌M5-90和M5-90△Bp26感染RAW264.7细胞,感染结束后经甲醛固定20 min,

含0.1% TritonX-100的PBST室温透化10 min、5% BSA溶液室温封闭1 h后,分别孵育单克隆抗体6E8和4C4(1:1 000),Bp26多抗血清和PBST分别作为阳性与阴性对照,4℃过夜孵育,洗涤后加入驴抗鼠荧光二抗(1:1 000),室温避光孵育1 h,随后加入DAPI避光染核10 min,加入防淬灭剂后将其固定于载玻片上,置于共聚焦显微镜下观察。

1.3.6 抗体亲和力常数测定

采用非竞争ELISA测定抗体亲和力常数,抗原从5 000 ng/mL开始2倍稀释包被4个浓度梯度,单抗从50 μg/mL开始,3倍稀释8个浓度梯度,空白对照加入等量的PBST,二抗孵育羊抗鼠HRP-IgG(1:10 000),根据测定OD₄₅₀的值,代入公式 $K=(n-1)/2(nAb'-Ab)$ 计算亲和力常数^[11],式中Ab和Ab'分别表示当抗原浓度为Ag和Ag'时产生半数吸光值的抗体浓度(mol/L), $n=Ag/Ag'$,然后两两比较,当n=2时,可得3个K值,n=4时可得2个K值,n=8时可得1个K值,求出6个K值的均数即为抗体亲和力常数。

1.3.7 单抗识别表位鉴定

采用dot-blot试验对单抗识别表位进行鉴定,具体方法是将多肽稀释成1 mg/mL,多肽合成序列见表1,吸取4 μL多肽稀释液滴在经甲醇预处理的PVDF膜上,随后置于37℃烘箱烘干30 min,经5%BSA在室温条件下封闭1 h,6E8和4C4单抗(1:1 000)作为一抗,羊抗鼠HRP-IgG(1:10 000)作为二抗,结束后将ECL化学发光底物A液和B液1:1混合,进行凝胶系统曝光采集图像并分析结果。

表1 布鲁氏菌M5-90 Bp26蛋白多肽序列
Table 1 Peptide sequence of *Brucella* M5-90 Bp26 protein

多肽 Peptide	序列 Sequence	位置 Position	多肽 Peptide	序列 Sequence	位置 Position
P01	MQENQMTTQPAR	1~12	P12	ANVGKILDESVTLG	110~124
P02	RIAVTGEGMMT	12~22	P13	LGVNQGGDLN	122~131
P03	ASPDMAILNL	23~32	P14	LVNDNPSAVINE	132~143
P04	SVLRQAKTARE	33~43	P15	VINEARKRAVANAIA	140~154
P05	AREAMTANNEAMTKV	41~55	P16	ANAIKAKTLADAAG	150~164
P06	AMTKVLDAMKKAGIE	51~65	P17	ADAAGVGLGRVVEIS	160~174
P07	KAGIEDRDLQTGGIN	61~75	P18	EISELSRPPM	172~181
P08	GINIQPIYVYPD	73~84	P19	PMPIARGQFR	182~191
P09	VYPDDKNNLKEPTIT	81~94	P20	FRTMLAAAPDNSVPI	190~204
P10	EPTITGYSVS	90~99	P21	NSVPIAAGENSYNVS	200~214
P11	TSLTVRVRELANVGK	100~114	P22	VNVVFEIK	215~222

同时使用 PDB 蛋白数据库下载布鲁氏菌 Bp26 蛋白三维结构图,使用 PyMOL 软件模拟单抗识别抗原表位的具体区域。

1.3.8 单克隆抗体阻断活性分析

PBS 稀释 Bp26 蛋白至 3 $\mu\text{g/mL}$, 每孔 100 μL 加入酶标板, 布鲁氏菌 M5-90 阳性血清和阴性血清原液作为一抗, 随后加入梯度稀释的 6E8 与 4C4 单克隆抗体竞争结合剩余 Bp26 蛋白位点, 羊抗鼠 HRP-IgG (1:10 000) 作为二抗, 按照阻断 ELISA 方法操作进行, 结束后进行显色反应, 于波长 450 nm 测定吸光值, 使用公式 ((阴性血清 OD₄₅₀ 值 - 阳性血清 OD₄₅₀ 值) / 阴性血清 OD₄₅₀ 值) 计算阻断率。

2 结果与分析

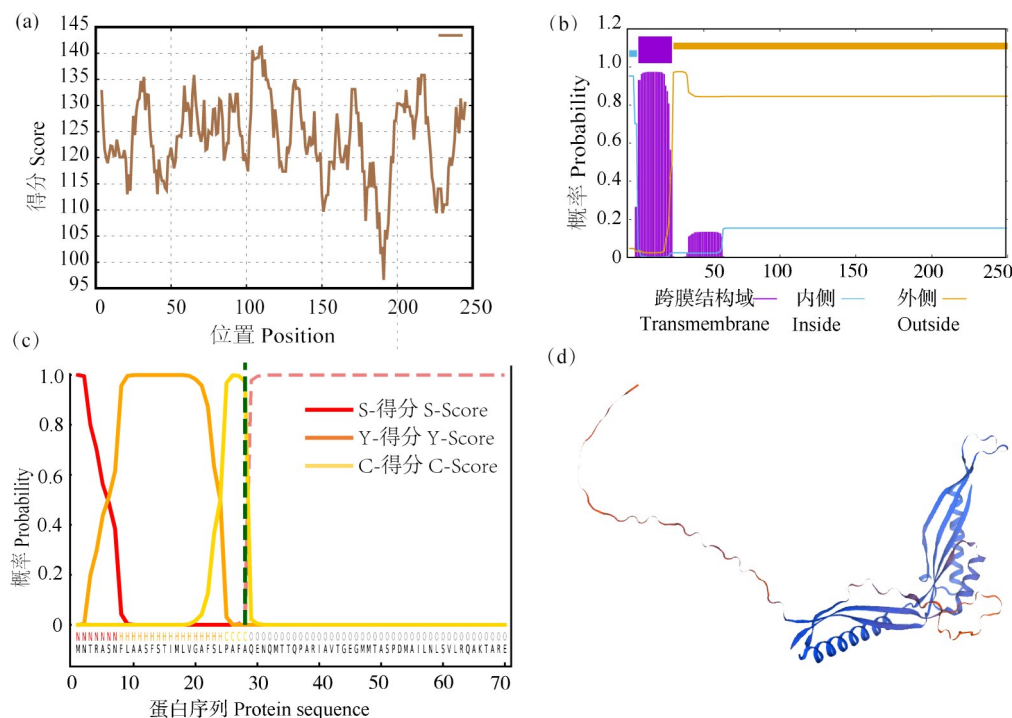
2.1 Bp26 蛋白生物学信息分析

使用 ProtParam 网站分析, 得知 Bp26 蛋白大小为 26 ku, 由 C、N、H、O、S 构成, 分子式为 C₁₁₅₂H₁₈₉₈N₃₂₈O₃₆₄S₁₂, 等电点 PI 为 6.39, 在大肠杆菌中的半衰期大于 10 h。经 ProtScale 分析后, 该蛋白在第 17 位氨基酸

处的数值最大, 为 1.767, 表明此处疏水性最强, 在 116 位氨基酸处数值最小, 为 -0.910, 表示此处亲水性最强 (图 1(a))。THAMM 网站分析发现该蛋白存在跨膜结构域 (图 1(b))。使用 SignalP-5.0 在线网站对 Bp26 蛋白序列进行信号肽预测, 发现其在 0~28 氨基酸位点存在 1 个分泌型信号肽 (图 1(c)), 构建载体时已将其切除。同时使用 SWISS-MODEL 在线网站模拟 Bp26 蛋白的三维结构模型 (图 1(d))。

2.2 原核表达载体的构建与重组蛋白的表达、纯化及鉴定

Bp26 基因片段大小为 672 bp, 琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 扩增条带与目的基因片段大小一致 (图 2(a))。经酶切连接反应后, 成功构建 pCold I-Bp26 原核表达载体。IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 结果显示在 26 ku 附近出现符合目的蛋白大小的条带, 并且 pCold I-Bp26 主要在上清表达 (图 2(b))。经 Ni 亲和层析柱法纯化结果显示良好 (图 2(c)), Western bolt 鉴定结果显示目的蛋白与小鼠 Bp26 阳性血清 (图 2(d)) 之间具有特异性反应, 表明该蛋白具有良好的反应原性。



(a) 亲水性分析; (b) 跨膜结构域预测; (c) 信号肽预测; (d) Bp26 蛋白三级结构预测。

(a) Hydrophilicity analysis; (b) Transmembrane domain prediction; (c) Signal peptide prediction; (d) Prediction of tertiary structure of Bp26 protein.

图 1 Bp26 蛋白的生物学信息分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of Bp26 protein

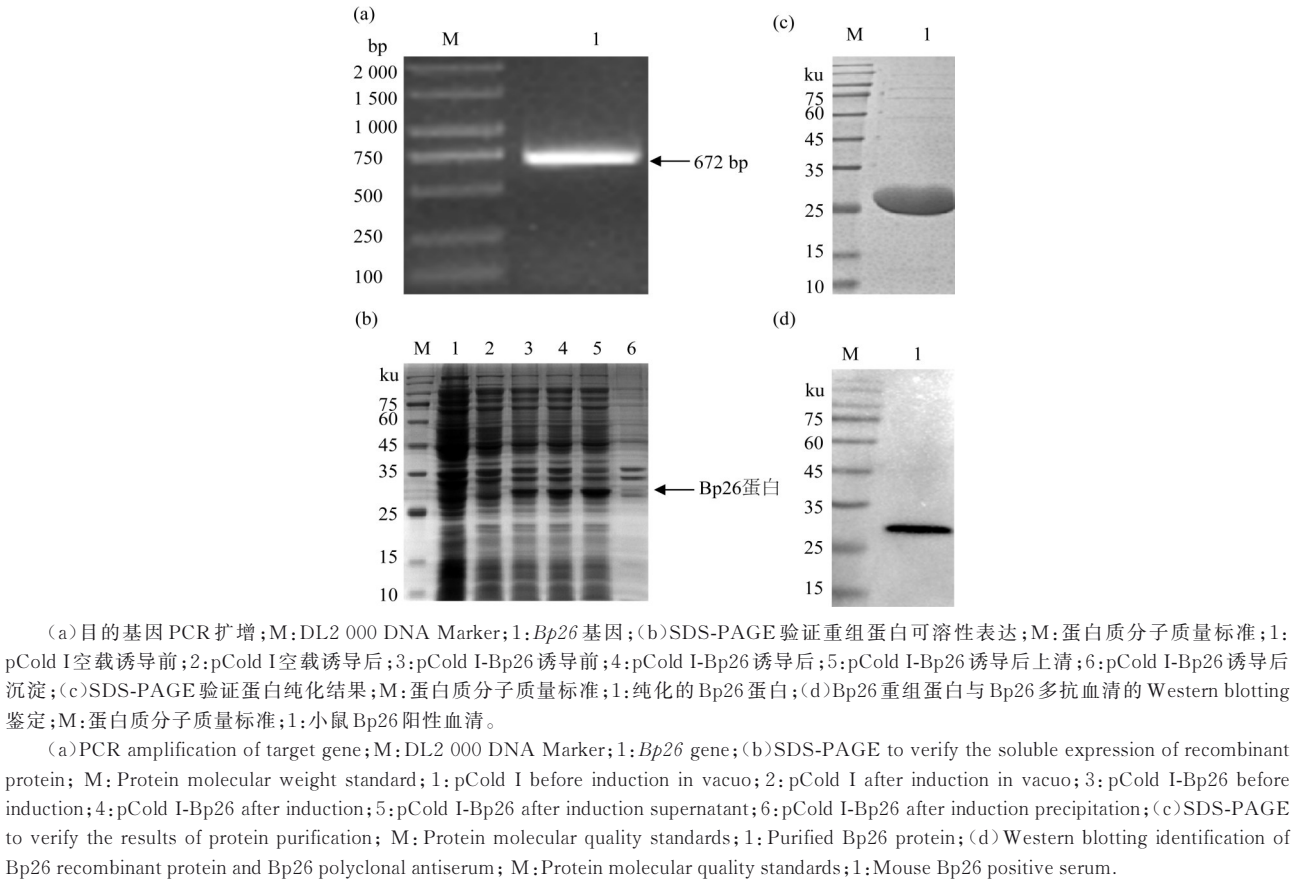


图2 Bp26蛋白的纯化与鉴定

Fig. 2 Purification and identification of Bp26 protein

2.3 Bp26单克隆抗体的制备

2.3.1 小鼠血清效价的测定

Bp26蛋白免疫小鼠4次后,间接ELISA结果显示免疫的7只小鼠血清效价均达到了128 000以上(图3),符合单克隆抗体制备要求。

2.3.2 Bp26单克隆抗体的鉴定

经筛选,共得到2株能稳定分泌Bp26单克隆抗体的细胞株,Western blotting鉴定其与Bp26蛋白、M5-90菌株蛋白均特异性反应,但不与M5-90△Bp26疫苗缺失株及常见革兰氏菌发生交叉反应(图4(a)~(d))。

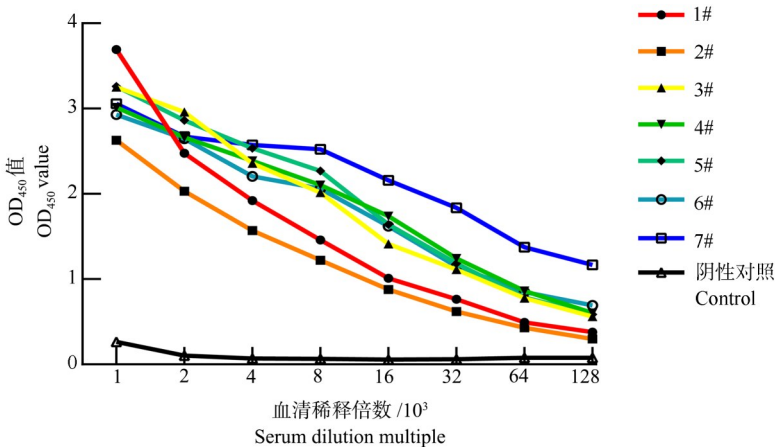
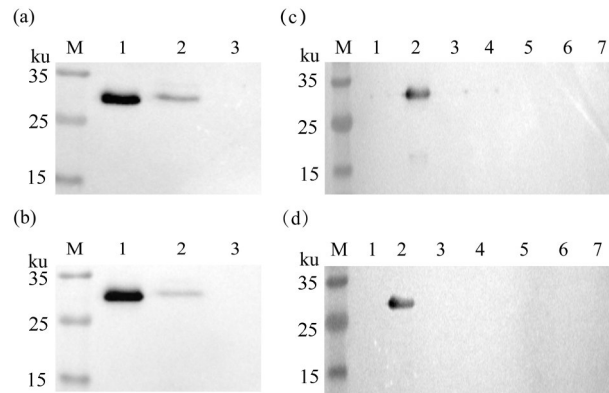


图3 小鼠血清Bp26抗体效价

Fig. 3 Mouse serum Bp26 antibody titer



(a) 单克隆抗体 6E8 免疫印迹分析; M: 蛋白质分子质量标准; 1: Bp26 重组蛋白; 2: M5-90; 3: M5-90 Δ Bp26; (b) 单克隆抗体 4C4 免疫印迹分析; M: 蛋白质分子质量标准; 1: Bp26 重组蛋白; 2: M5-90; 3: M5-90 Δ Bp26; (c) 单克隆抗体 6E8 交叉反应性鉴定; 1: 阴性对照; 2: Bp26 重组蛋白; 3: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 4: 大肠杆菌 O157:H7; 5: 大肠杆菌 O78; 6: 沙门氏菌; 7: 李斯特菌; (d) 单克隆抗体 4C4 交叉反应性鉴定; 1: 阴性对照; 2: Bp26 重组蛋白; 3: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 4: 大肠杆菌 O157:H7; 5: 大肠杆菌 O78; 6: 沙门氏菌; 7: 李斯特菌。

(a) Monoclonal antibody 6E8 Western blotting analysis; M: Protein molecular quality standard; 1: Bp26 recombinant protein; 2: M5-90; 3: M5-90 Δ Bp26; (b) Monoclonal antibody 4C4 immunoblotting analysis; M: Protein molecular quality standard; 1: Bp26 recombinant protein; 2: M5-90; 3: M5-90 Δ Bp26; (c) Monoclonal antibody 6E8 cross-reactivity identification; 1: Negative control; 2: Bp26 recombinant protein; 3: *Yersinia enterocolitica*; 4: *Escherichia coli* O157:H7; 5: *Escherichia coli* O78; 6: *Salmonella*; 7: *Listeria*; (d) Monoclonal antibody 4C4 cross reactivity identification; 1: Negative control; 2: Bp26 recombinant protein; 3: *Yersinia enterocolitica*; 4: *Escherichia coli* O157:H7; 5: *Escherichia coli* O78; 6: *Salmonella*; 7: *Listeria*.

图4 单克隆抗体特异性鉴定

Fig. 4 Identification of specificity of monoclonal antibody

2.3.3 单克隆抗体腹水制备及纯化

收集小鼠腹水后, 利用 Protein A/G 琼脂糖珠的亲合作用进行腹水纯化, SDS-PAGE 验证结果如图 5(a)), 成功纯化得到 2 株单克隆抗体。

2.3.4 单抗的免疫荧光鉴定

分别用布鲁氏菌 M5-90 及 M5-90 Δ Bp26 菌株感染 Raw264.7 细胞, IFA 结果显示(图 5(b)), 单克隆抗体 6E8 和 4C4 在感染布鲁氏菌 M5-90 的细胞呈现特异性绿色荧光, 与 Bp26 多抗(阳性对照)相符合, 而感染布鲁氏菌 M5-90 Δ Bp26 的细胞没有呈现特异性绿色荧光。结果表明, Bp26 单抗能够特异性识别布鲁氏菌感染巨噬细胞表达的 Bp26 蛋白。

2.3.5 抗体亲和力和常数测定

通过非竞争 ELISA 建立 4 个 Bp26 抗原浓度和 8 个梯度浓度的单抗 6E8 和 4C4 的结合反应曲线(图 5(c)和(d)), 计算得出单抗 6E8 的抗体亲和力常数为 2.58×10^{-7} mol/L, 单抗 4C4 的抗体亲和力常数为 2.34×10^{-7} mol/L。

2.3.6 单抗识别表位鉴定

通过 dot-blot 鉴定抗原识别表位, 结果表明, 单抗 4C4 对 P08 肽段特异性反应, 识别表位氨基酸序列为 ⁷³GINIQPIYVYPD⁸⁴; 单抗 6E8 对 P03 肽段特异性反应, 识别表位氨基酸序列为 ²³ASPDMAILNL³²(图 6(a)和(b))。同时使用 PyMOL 软件分析 2 株 Bp26

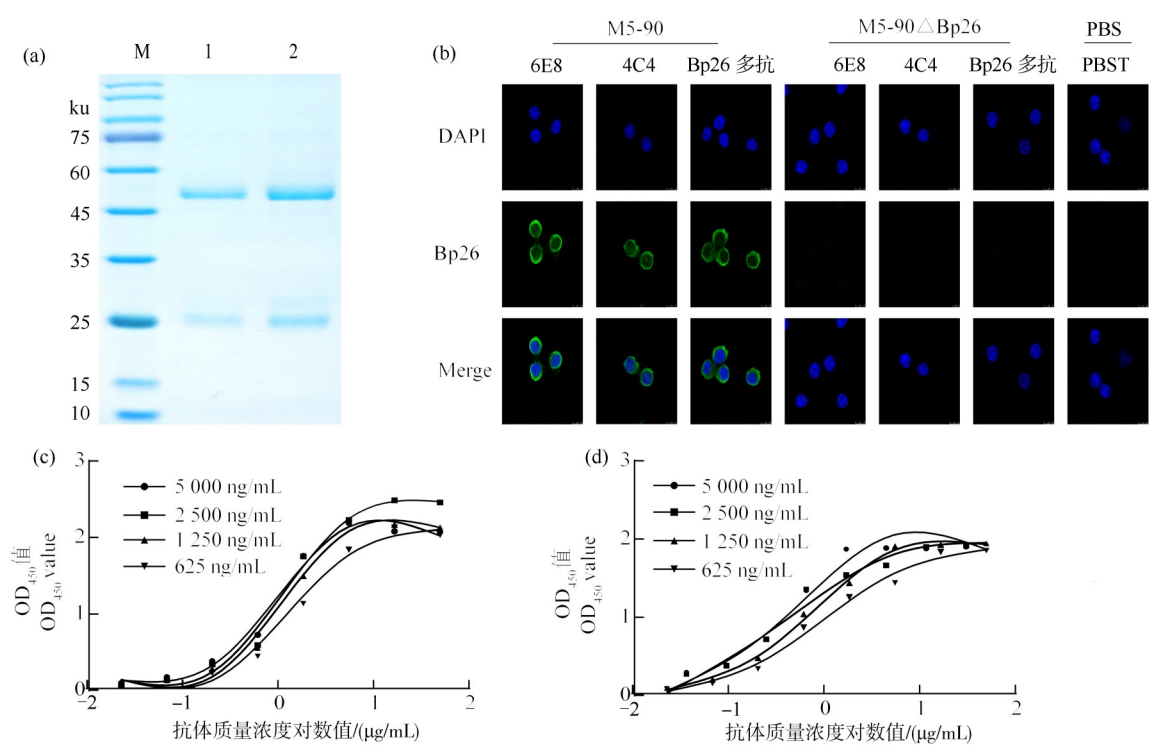
单克隆抗体识别表位在在单体 Bp26 蛋白中的结构(左)和三聚体结构(右)中的位置(图 6(c)和(d))。

2.3.7 单克隆抗体阻断活性分析

阻断 ELISA 初步应用检测结果显示, 2 株单克隆抗体对布鲁氏菌 M5-90 阳性血清均显示出了良好的阻断活性(图 7)。

3 讨论

布鲁氏菌是感染人和动物的危害巨大的病原体, 目前已严重危害人类生命健康和动物健康养殖。尤其近几年, 布鲁氏菌病已在世界范围内广泛流行, 不仅造成了巨大经济损失, 而且对公共安全造成巨大威胁^[12]。近 10 年来, 我国布鲁氏菌病在人间和畜间广泛流行且趋势持续增强, 我国农业农村部也出台相关政策进行积极防控, 从源头治理人兽共患布鲁氏菌的流行和发生。研究发现, 人间布鲁氏菌病的发生和畜间布鲁氏菌病的发生呈现正相关, 人间布病主要来源于畜间布病的流行, 阻断畜间布病的流行是防控人间布鲁氏菌病流行的关键与核心^[13]。在目前已发现的布鲁氏菌种属中, 羊种布鲁氏菌对人和家畜的感染能力最强, 也是目前人间布鲁氏菌病发生的主要源头^[14]。因此, 实现羊种布鲁氏菌病的防控与净化是布病防控技术中的重要任务。



(a)SDS-PAGE 鉴定单克隆抗体纯化效果;M:蛋白质分子质量标准;1:6E8 单抗浓缩液;2:4C4 单抗浓缩液;(b)单克隆抗体与布鲁氏菌反应特异性的免疫荧光鉴定(100×);(c)单克隆抗体 6E8 抗体亲和力常数;(d)单克隆抗体 4C4 亲和力常数。

(a) SDS-PAGE identification of monoclonal antibody purification effect; M: Protein molecular weight standard; 1: 6E8 monoclonal antibody concentrate; 2: 4C4 monoclonal antibody concentrate; (b) Immunofluorescence identification of the specificity of monoclonal antibody to *Brucella* (100×); (c) Affinity constant of monoclonal antibody 6E8; (d) Affinity constant of monoclonal antibody 4C4.

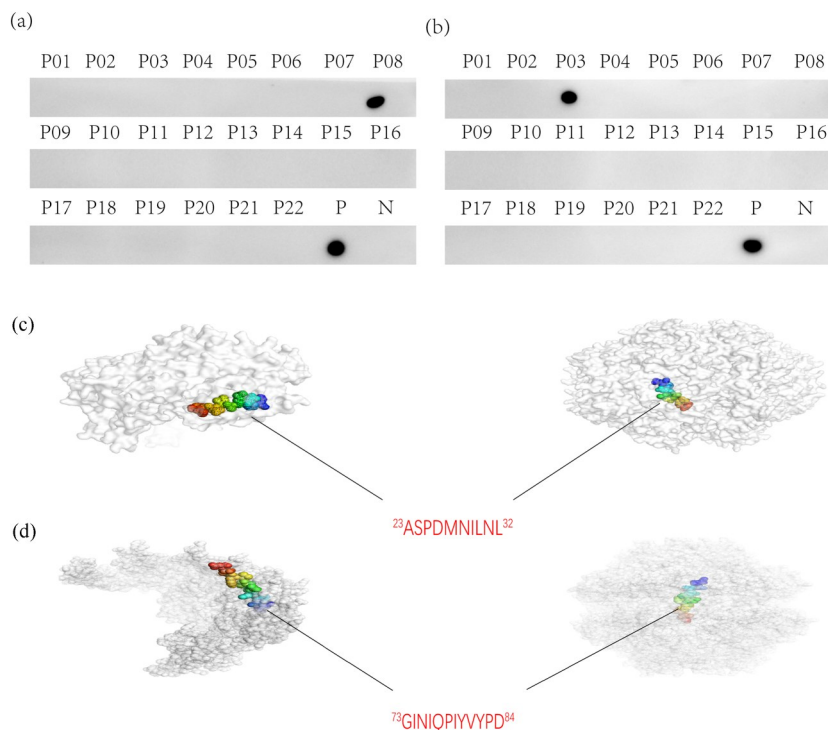
图 5 Bp26 单克隆抗体的纯化与特性分析

Fig. 5 Purification and characterization of Bp26 monoclonal antibody

在当前我国布鲁氏菌病防控策略中,免疫与净化相结合是关键。其中,疫苗免疫配合鉴别诊断技术是实现布病有效防控的重要手段。通过利用具有鉴别诊断特征的抗原蛋白研发标记疫苗并配合优良的鉴别诊断技术,从而为布病的净化工作提供有力支持,最终完成布病净化的主体任务。布鲁氏菌 Bp26 蛋白是目前能够鉴别野毒感染与疫苗免疫血清抗体水平的关键靶标^[15],该蛋白能够较好的诱导产生免疫反应,且在羊种布鲁氏菌强弱疫苗株免疫的动物中抗体水平有较大差异,是一个良好的疫苗免疫与野毒感染的鉴别诊断靶标。目前我国已成功研制了羊种布鲁氏菌 M5-90ΔBp26 株缺失疫苗,且已初步在我国部分地区试用。然而,迄今为止,虽然有基于布鲁氏菌 Bp26 建立布鲁氏菌诊断方法建立的报道,如布鲁氏菌 Bp26 抗原胶体金检测技术和间接 ELISA 检测方法^[16-17],但尚未在临床上广泛使用及推广。实际上,现行布鲁氏菌的血清学诊断方法,依然无法满足我国羊种布鲁氏菌病疫苗免

疫与野毒感染的鉴别诊断巨大缺口,这给羊种布鲁氏菌病的防控带来了挑战。因此,基于布鲁氏菌 Bp26 是目前被发现唯一已用于布鲁氏菌疫苗免疫与野毒感染的良好靶标,研究其抗原特性并筛选其优势表位,对研制针对 Bp26 抗原的布鲁氏菌防控新技术研究具有重要意义。

本研究通过制备布鲁氏菌 Bp26 单克隆抗体,对单抗特性进行分析,为进一步分析布鲁氏菌 Bp26 蛋白的生物学特性奠定基础,也为开发针对现行羊种布鲁氏菌 M5-90ΔBp26 株缺失疫苗的高特异性和高灵敏度的诊断方法提供前期基础。本研究利用布鲁氏菌 Bp26 蛋白免疫小鼠后,通过 4 轮亚克隆筛选获得 2 株特异性识别 Bp26 蛋白的单克隆抗体 6E8 和 4C4。先前的研究发现,耶尔森菌和大肠杆菌 O157:H7 与布鲁氏菌在血清学方面存在较强的交叉反应^[18],是干扰布鲁氏菌诊断方法建立的关键因素,然而,本研究所制备的 2 株布鲁氏菌 Bp26 单抗与耶尔森菌和大肠杆菌 O157:H7 等常见革兰氏



(a)~(b) P01~P22: Bp26 蛋白截短肽段; P: 阳性对照 (Bp26 蛋白); N: 阴性对照 (PBS)。 (a) 单克隆抗体 4C4 识别表位; (b) 单克隆抗体 6E8 识别表位。 (c)~(d) PyMOL 模拟单克隆抗体识别的表位在单体 Bp26 结构 (左) 和三聚体结构 (右) 中显示为彩色。 (c) 单克隆抗体 6E8 识别表位在 Bp26 蛋白结构中的位置; (d) 单克隆抗体 4C4 识别表位在 Bp26 蛋白结构中的位置。

(a)~(b) P01-P22: Bp26 protein truncated peptide; P: positive control (Bp26 protein); N: Negative control (PBS). (a) Monoclonal antibody 4C4 recognition epitope; (b) Monoclonal antibody 6E8 recognizes epitope. (c)~(d) PyMOL simulation of the epitope recognized by mAb in the monomer Bp26 structure (left), and trimer structure (right) is shown in colour. (c) The position of the epitope recognized by monoclonal antibody 6E8 in the structure of Bp26 protein; (d) The position of epitope recognized by monoclonal antibody 4C4 in the structure of Bp26 protein.

图 6 单抗识别表位鉴定和 Bp26 蛋白的 3D 结构

Fig. 6 Identification of epitope recognized by monoclonal antibody and 3D structure of Bp26 protein

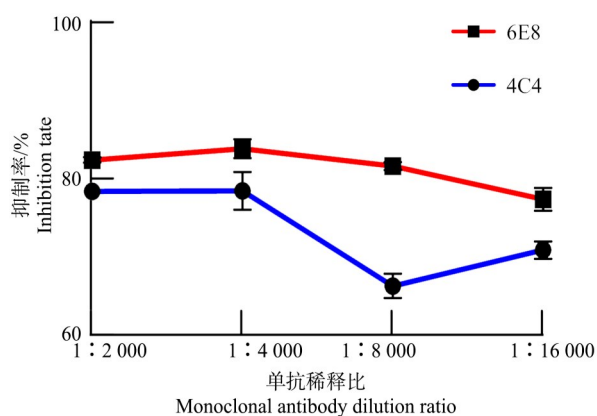


图 7 单克隆抗体阻断活性分析

Fig. 7 Analysis of monoclonal antibody blocking activity

菌均无交叉反应,这显示了本研究筛选的 Bp26 优势性单抗高度特异性,间接免疫荧光结果进一步证实了 2 株单抗特异性识别细胞感染过程中布鲁氏菌所产生的 Bp26 蛋白,而在抗体亲和力方面,2 株单克

隆抗体的亲和力常数均达到 nmol/L 水平,高亲和力抗体在诊断和治疗应用中具有显著优势,因为它们能够更有效地结合目标抗原,减少非特异性结合^[19]。此外,抗体的稳定性也是影响其实际应用的重要因素。研究表明,抗体高亲和力与其稳定性密切相关,高亲和力抗体通常在复杂的生物环境中表现出更好的稳定性^[20]。本研究发现 2 株单克隆抗体具有较好的抗体阻断活性,同时还鉴定其抗原识别表位,其中单抗 4C4 识别的表位氨基酸序列为⁷³GINIQPIYVYPD⁸⁴,与先前报道的表位一致^[7],而单抗 6E8 识别的表位氨基酸序列为²³ASPDMAILNL³²,是一个全新的优势表位。阻断活性分析显示,2 株单抗对羊种布鲁氏菌 M5-90 阳性血清均具有较好的阻断活性。以上研究结果表明,该单抗不仅具备识别布鲁氏菌 Bp26 蛋白,而且能够用于针对 Bp26 蛋白的布鲁氏菌疫苗免疫与野毒感

染鉴别诊断方法建立,可以避免以往因血清学交叉反应导致布鲁氏菌病诊断出现假阳性的技术瓶颈,为后续基于单抗建立诊断方法提供了有力支持。

综上,本研究通过制备Bp26单克隆抗体,对其生物学特性进行解析,为布鲁氏菌Bp26蛋白生物学特性分析、鉴别诊断防控技术的研发提供了重要科学依据与研究基础。

4 结 论

本研究获得了2株针对布鲁氏菌Bp26蛋白的单克隆抗体,其具有良好的特异性和较强的结合力,同时具有较好的阻断活性,并可识别Bp26蛋白不同的抗原表位。本研究成果将为布鲁氏菌Bp26蛋白生物学特性及新型鉴别防控技术的研发提供科学依据。

参考文献 References

- [1] Zheng R J, Xie S S, Lu X B, Sun L H, Zhou Y, Zhang Y X, Wang K. A systematic review and meta-analysis of epidemiology and clinical manifestations of human brucellosis in China [J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 5712920
- [2] Laine C G, Johnson V E, Morgan Scott H, Arenas-Gamboa A M. Global estimate of human brucellosis incidence [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2023, 29(9): 1789-1797
- [3] Liu Z G, Gao L P, Wang M, Yuan M, Li Z J. Long ignored but making a comeback: A worldwide epidemiological evolution of human brucellosis [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2024, 13(1): 2290839
- [4] Qin Y Q, Zhou G X, Jiao F Y, Cheng C, Meng C, Wang L J, Wu S P, Fan C L, Li J X, Zhou B, Chu Y F, Jiao H W. *Brucella* mediates autophagy, inflammation, and apoptosis to escape host killing [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2024, 14: 1408407
- [5] 李小明,田波,杨儒爱,祁光宇. 布鲁氏菌病的危害及流行情况概述[J]. 兽医导刊, 2019(5): 29-30
Li X M, Tian B, Yang R A, Qi G Y. An overview of the harm and epidemic of brucellosis [J]. *Veterinary Journal*, 2019(5): 29-30 (in Chinese)
- [6] 辛雪强,佟彤,王玉金,盛宇杰,徐正中,陈祥. 布鲁氏菌主要外膜蛋白研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2024, 40(9): 872-879
Xin X Q, Tong T, Wang Y J, Sheng Y J, Xu Z, Chen X. Research progress on major outer membrane proteins of *Brucella* [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2024, 40(9): 872-879 (in Chinese)
- [7] Wang Y L, Wu A D, Xu Z Y, Zhang H, Li H H, Fu S S, Liu Y J, Cui L J, Miao Y H, Wang Y, Zhumanov K, Xu Y M, Sheng J L, Yi J H, Chen C F. A multi-epitope subunit vaccine based on CU/ZN-SOD, OMP31 and BP26 against *Brucella melitensis* infection in BALB/C mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 127: 111351
- [8] Qiu J L, Wang W J, Wu J B, Zhang H, Wang Y Z, Qiao J, Chen C F, Gao G F, Allain J P, Li C Y. Characterization of periplasmic protein BP26 epitopes of *Brucella melitensis* reacting with murine monoclonal and sheep antibodies [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34246
- [9] Yao L, Wu C X, Zheng K, Xu X J, Zhang H, Chen C F, Liu Z F. Immunogenic response to a recombinant pseudorabies virus carrying bp26 gene of *Brucella melitensis* in mice [J]. *Research in Veterinary Science*, 2015, 100: 61-67
- [10] Li T S, Tong Z X, Huang M L, Tang L Y, Zhang H, Chen C F. *Brucella melitensis* M5-90△bp26 as a potential live vaccine that allows for the distinction between natural infection and immunization [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2017, 63(8): 719-729
- [11] 赵巧林. A型肉毒素抗原表位及抗体研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016
Zhao Q L. Antigenic epitopes and antibodies of botulinum toxin type A [D]. Beijing: Chinese People's Liberation Army Academy of Military Medical Sciences, 2016 (in Chinese)
- [12] Zhang H, Wang Y L, Wang Y F, Deng X Y, Ji T W, Ma Z C, Yang N N, Xu M G, Li H H, Yi J H, Wang Y, Wang Y Z, Sheng J L, Wang Z, Chen C F. Using a relative quantitative proteomic method to identify differentially abundant proteins in *Brucella melitensis* biovar 3 and *Brucella melitensis* M5-90 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 929040
- [13] Yagupsky P, Morata P, Colmenero J D. Laboratory diagnosis of human brucellosis [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 33(1): e00073-19
- [14] Jiang H, O'Callaghan D, Ding J B. Brucellosis in China: History, progress and challenge [J]. *Infectious Diseases of Poverty*, 2020, 9(1): 55
- [15] Guo X H, Sun M J, Guo Y, Wu Y, Yan X, Liu M D, Li J Q, Sun X X, Fan X X, Zhang H B, Sun S F, Wang J L, Yin D H. Production and evaluation of anti-BP26 monoclonal antibodies for the serological detection of animal brucellosis [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2024, 11: 1389728
- [16] 王婷,张正雷,孙田华,张幸子,王彩霞,席仲兴,焦磊. 布鲁氏菌BP26抗原胶体金试剂盒的研制及功能初试[J]. 甘肃畜牧兽医, 2022, 52(10): 56-58, 62
Wang T, Zhang Z L, Sun T H, Zhang X Z, Wang C X, Xi Z X, Jiao L. Development and preliminary functional test of colloidal gold kit for *Brucella* BP26 antigen [J]. *Gansu Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2022, 52(10): 56-58, 62 (in Chinese)
- [17] 吕素芳,胡莉萍,董炳梅,任洪林,莫玲,李峰. 布鲁氏菌BP26抗体iELISA检测方法建立[J]. 家畜生态学报, 2021, 42(10): 69-74
Lv S F, Hu L P, Dong B M, Ren H L, Mo L, Li F. Establishment of a BP26 antibody indirect ELISA detection method for *Brucella suis* [J]. *Chinese Journal of Livestock Ecology*, 2021, 42(10): 69-74 (in Chinese)
- [18] Dadar M, Tiwari R, Sharun K, Dhama K. Importance of *Brucellosis* control programs of livestock on the improvement of one health [J]. *The Veterinary Quarterly*, 2021, 41(1): 137-151
- [19] Tiller K E, Tessier P M. Advances in antibody design [J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2015, 17: 191-216
- [20] Ikeuchi E, Kuroda D, Nakakido M, Murakami A, Tsumoto K. Delicate balance among thermal stability, binding affinity, and conformational space explored by single-domain V_HH antibodies [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 20624

责任编辑: 秦梅



第一作者简介:罗意, 华南农业大学 2022 级硕士研究生, 连续 3 年获得华南农业大学学业奖学金, 目前正在中国农业科学院兰州兽医研究所进行课题研究, 研究内容为布鲁氏菌单克隆抗体的制备及诊断方法的建立, 目前正在申报专利一项, 同时进行布鲁氏菌鉴别诊断试剂盒的研制, 正在准备申报新兽药证书。



通讯作者简介:周沛, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 教研室副主任。从事兽医临床疾病防治的研究, 主持国家自然科学基金、国家重点研发计划子课题和广东省自然科学基金等项目多项。在 *Virologica Sinica*、*Transboundary and Emerging Diseases*、*Veterinary Microbiology* 等杂志发表研究论文十余篇, 获得国家授权专利多件(已技术转让 1 件)。



通讯作者简介:许健, 博士, 中国农业科学院兰州兽医研究所研究员, 博士生导师, 兰州大学动物医学与生物安全学院教授。长期从事动物疫病防控、免疫调节与致病机制研究, 主持国家自然科学基金面上/青年项目、甘肃省自然基金重点项目、甘肃省自然基金联合科研基金重点项目、国家十四五重点研发项目子课题等。相关研究成果以第一作者在 *EMBO Reports*、*PLOS Pathogens*、*International Journal of Biological Macromolecules* 等国际学术期刊发表 SCI 论文 9 篇, 授权发明专利 6 项。入选中国农业科学院“青年英才”及第一批青年创新人才项目。兼任国家奶牛疾病防治科技联盟理事、甘肃省动物微生物耐药减量专家委员会委员、SCI 期刊 AROH 青年编委及中国农业科学院兰州兽医研究所动物生物安全三级实验室布鲁氏菌项目技术负责人。