

范昊宇, 蒋蔚, 汪萍, 等. 牛冠状病毒单克隆抗体制备及亚型鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 116-123.

FAN H Y, JIANG W, WANG P, et al. Preparation and subtypes identification of monoclonal antibodies against *Bovine coronavirus* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 116-123.

牛冠状病毒单克隆抗体制备及亚型鉴定

范昊宇^{1,2}, 蒋蔚³, 汪萍^{2,4}, 官震^{2,4}, 韩翔舒^{1,2}, 白航飞^{1,2}, 刘姝悦^{2,5}, 李月^{2,6}, 张立雪^{2,5},
付修龙^{2,5}, 杜玮⁷, 阿依江·木合塔尔², 平继辉⁶, 朱启运⁸, 蒋松^{1*}, 夏俊^{2,4*}

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003;

2. 新疆畜牧科学院兽医研究所(新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心), 新疆 乌鲁木齐 830000;

3. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241; 4. 新疆动物疾病防控工程技术研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830000;

5. 新疆农业大学动物医学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 6. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014;

7. 新疆畜牧科学院畜牧研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000; 8. 兰州大学动物医学与生物安全学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 旨在制备牛冠状病毒 (*Bovine coronavirus*, BCoV) 单克隆抗体 (MAb), 为 BCoV 疫苗制备和建立免疫胶体金等特异性检测方法奠定基础。使用原核表达系统制备重组 BCoV N 蛋白, BCoV 灭活全病毒液免疫 BALB/c 小鼠; 以 N 蛋白和全病毒为抗原, 通过间接 ELISA 法检测抗体效价。经细胞融合与 5 轮亚克隆, 筛选出分泌目标抗体的单克隆细胞株。采用腹水法制备单克隆抗体并纯化, 通过间接免疫荧光试验 (IFA) 和 Western blot 验证抗体反应性与特异性。结果: 筛选出 3 株针对 BCoV N 蛋白的杂交瘤细胞株 (2D12C、3D6E、4D1F), 分泌的单克隆抗体轻链均为 Kappa 链, 2D12C 与 4D1F 重链为 IgG2a 亚型, 3D6E 重链为 IgG1 亚型; IFA 试验表明 3 株单克隆抗体均能与 BCoV 发生特异性结合; Western blot 证明 3 株单克隆抗体与 BCoV 和重组表达 BCoV N 蛋白均反应良好, 且 3 株单克隆抗体与感染牛轮状病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛病毒性腹泻病毒及牛副流感病毒 3 型的细胞均不发生特异性反应。综上, 制备了 3 株特异性较高、生物学活性良好的 BCoV 单克隆抗体, 为后续疫苗制备及检测方法研究奠定了基础。

关键词: 牛冠状病毒; N 蛋白; 单克隆抗体; 间接 ELISA

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)12-0116-08

Preparation and subtypes identification of monoclonal antibodies against *Bovine coronavirus*

FAN Haoyu^{1,2}, JIANG Wei³, WANG Ping^{2,4}, GONG Zhen^{2,4}, HAN Xiangshu^{1,2}, BAI Hangfei^{1,2},
LIU Shuyue^{2,5}, LI Yue^{2,6}, ZHANG Lixue^{2,5}, FU Xiulong^{2,5}, DU Wei⁷, Ayijiang Muhetar²,
PING Jihui⁶, ZHU Qiyun⁸, JIANG Song^{1*}, XIA Jun^{2,4*}

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

2. Veterinary Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830000, China;

3. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China;

4. Xinjiang Animal Disease Prevention and Control Engineering Technology Research Center, Urumqi 830000, China;

5. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China;

6. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

7. Animal Husbandry Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830000, China;

8. College of Veterinary Medicine and Biosafety, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: This study aimed to prepare *Bovine coronavirus* (BCoV) monoclonal antibodies (MAbs) to lay a foundation for preparation of

收稿日期: 2025-07-27; 修回日期: 2025-11-03

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项 (2023A02007); 新疆维吾尔自治区天山英才青年科技拔尖人才项目 (2022TSYCCX0046); 新疆维吾尔自治区肉牛产业技术体系项目资助项目 (XJARS-10); 自治区西门塔尔 (安格斯) 牛群体改良体系经费资助项目 (2025XM-14)

第一作者: 范昊宇, 男, 硕士研究生。

* 通信作者, 蒋松, 博士, 副教授, 研究方向为牛羊健康养殖与疫病防控技术, E-mail: jsshzu@126.com; 夏俊, 博士, 研究员, 研究方向为动物疫病防控, E-mail: 1065291747@qq.com。

BCoV vaccines and for establishment of specific detection methods such as colloidal gold. Recombinant BCoV N protein was prepared using a prokaryotic expression system, and BALB/c mice were immunized with inactivated whole BCoV virus. The antibody titer was determined by indirect ELISA. After cell fusion and five rounds of sub-cloning, a monoclonal cell line secreting the target antibody was screened. Monoclonal antibodies were produced via the ascites method and were purified. Finally, the reactivity and specificity of the antibodies were validated by indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blot. The results were that three hybridoma cell lines targeting BCoV N protein were selected. The monoclonal antibodies secreted by these hybridomas had Kappa light chains. The heavy chains of 2D12C and 4D1F were of the IgG2a subtype, while 3D6E had an IgG1 subtype. The indirect immunofluorescence assay showed that all three monoclonal antibodies could specifically bind to BCoV. Western blot confirmed that the three monoclonal antibodies reacted well with both the BCoV and recombinant expressed BCoV N proteins. Furthermore, no specific reaction occurred with cells infected by bovine rotavirus, bovine infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine viral diarrhea virus, and bovine parainfluenza virus type 3. To sum up, three monoclonal antibodies with high specificity and good biological activity against BCoV were successfully prepared here, laying a foundation for subsequent BCoV vaccine development and for research on specific detection methods, such as colloidal gold.

Keywords: *Bovine coronavirus*; N protein; monoclonal antibody; indirect ELISA

牛冠状病毒病是由牛冠状病毒 (*Bovine coronavirus*, BCoV) 引起的一种危害性极大的传染病, 严重威胁着全球养牛业健康发展。BCoV 属冠状病毒科、冠状病毒属, 其病毒基因组为单股正链 RNA, 全长约 31 kb, 编码多种结构蛋白和非结构蛋白^[1-2]。该病毒主要传播途径包括呼吸道气溶胶传播及粪口传播, 同时还可通过直接接触和间接接触进行传播, 因其多样化传播途径和较强环境抵抗力, 导致其防控难度极大^[3]。感染 BCoV 的病牛主要表现为急性或慢性腹泻、冬痢、呼吸道综合征等多种临床症状, 发病牛机体免疫力大幅下降, 继发感染风险增加, 严重病例可导致死亡^[4-5]。该病发生不仅影响牛只的生长发育和生产性能, 每次暴发还对当地养殖业造成重大经济损失, 给养殖户带来巨大经济负担。

BCoV 广泛分布于世界各地, 在亚洲、欧洲、北美洲、南美洲、大洋洲等五大洲的许多国家和地区均呈现不同程度的流行趋势^[6], 已成为影响全球养牛业发展的重要因素之一。在我国, 该病毒分布范围也在不断扩大^[7], 目前在新疆、内蒙古、山东、广西、黑龙江、河北、吉林等多个省份均已检测出该病毒存在^[8-14], 且有进一步扩散的趋势, 对我国畜牧业的健康发展构成了严重威胁。

面对 BCoV 的严峻流行形势, 快速准确的检测技术显得尤为重要。然而, 目前国际市场上针对 BCoV 的商业化检测产品相对匮乏, 现有检测方法主要包括病毒分离培养、电镜检查、逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)、血清学检测等^[15-16]。我国在 BCoV 检测技术方面起步较晚, 目前仍缺乏自主研发的商业化检测试剂盒, 主要依赖进口产品或实验室自建检测方法, 这不仅增加了检测成本, 也制约了基层兽医诊断能力的提升^[18-19]。

灭活全病毒液作为抗原能更全面地模拟病毒的自然感染状态, 激发针对多种病毒结构蛋白的免疫反

应, 从而大幅增加获得具有广谱反应性、高中和活性及高亲和力单克隆抗体的概率。本研究以灭活全病毒液作为抗原, 通过使用全病毒和重组 N 蛋白作为包被抗原, 运用间接 ELISA 筛选技术, 成功筛选出能够同时特异性结合 2 种抗原的高效价杂交瘤细胞株, 并最终制备获得了高特异性黏附能力的单克隆抗体 (monoclonal antibodies, mAbs), 为推进 BCoV 快速诊断试剂盒的产业化开发和深入开展 N 蛋白结构功能研究提供了坚实的试验基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 主要材料

BCoV 毒株 XJ-SHZ-37 (GenBank 登录号: OR750853), 人回盲肠癌细胞 (HRT-18), 重组质粒 pET30a-N 来自新疆畜牧科学院兽医研究所实验室。小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 来自中国农业科学院上海兽医研究所实验室。牛轮状病毒 (BRV)、牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV)、牛副流感病毒 3 型 (BPIV3)、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 保存于实验室。70 只 6 周龄雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司 (生产许可证号: SCXK (沪) 2023-0004) 与新疆疾病预防与控制中心实验动物中心 (生产许可证号: SCXK (新) 2023-0001)。胎牛血清 (FBS) 由苏州依科赛生物科技股份有限公司提供; 细胞融合剂聚乙二醇 (PEG)、HT 选择培养基补充剂及 HAT 筛选培养基补充剂均购自 Sigma-Aldrich 公司; 抗体纯化所需试剂盒与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗来源于碧云天生物技术有限公司。亚型鉴定试剂盒购自 SouthernBiotech 公司。

1.2 重组 BCoV-N 蛋白诱导表达与纯化

将含有重组质粒 pET30a-N 的菌悬液接种至添加卡那霉素 (终浓度 100 mg/L) 的 LB 液体培养基中,

置于 37 ℃ 恒温摇床内以 190 r/min 的转速进行振荡培养。待菌液 OD_{600} 值达到 0.4~0.6 时, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 mmol/L, 16 ℃, 诱导表达 21 h。随后, 将培养液于 4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min, 得到菌体沉淀。将沉淀重悬后转移到冰水浴中并实施菌体超声破碎。单独采集破碎液, 离心处理 20 min。利用 0.22 μ m 滤膜进行过滤以去除杂质, 然后转移到镍亲和层析柱中进行蛋白纯化。用不同浓度的咪唑 (分别是 10、15、20、30、40、60、80、100、120、150、200、250 mmol/L) 依次过层析柱, 每个浓度洗脱 1 mL, 并收集各个洗脱组分, 通过 SDS-PAGE 检测目的蛋白的纯化效果。取纯化后的 N 蛋白进行 Western blot 鉴定, 取 5% 脱脂乳封闭 2 h, BCoV 多克隆抗体 4 ℃ 孵育过夜, 后使用 1:2 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗工作液, 37 ℃ 孵育 1 h。最后, 进行 3 次洗涤, 并添加 ECL 化学发光液, 将样本放置在化学发光仪内充分曝光以验证 N 蛋白。

1.3 BCoV 全病毒液免疫 BALB/c 小鼠及血清抗体效价测定

选取 5 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 1、2、3、4 号为试验组, 5 号为阴性对照组。首免时, 将牛冠状病毒全病毒液与弗氏完全佐剂 (FCA) 按 1:1 比例充分乳化, 制备含 180 μ g 抗原的乳剂。将乳剂通过多点注射方式分别注射于 4 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠的背部皮下和四肢足垫, 用相同的注射方式将 PBS 注射于对照组小鼠内。2 周后 2 免, 采用牛冠状病毒全病毒液与弗氏不完全佐剂 (FIA) 1:1 混合乳化, 免疫剂量为 200 μ g 抗原, 多点皮下注射。2 周后以同样方式进行 3 免, 第 3 次免疫 7 d 后, 通过眼眶静脉丛采集小鼠血液样本, 静置离心后测定小鼠血清抗体效价, 选取试验组中血清效价最高的小鼠, 在其腹腔中注入 100 μ g 抗原进行最终的冲击免疫。

1.4 棋盘滴定法建立间接 ELISA 检测体系

将 BCoV 全病毒与 BCoV N 蛋白分别用包被缓冲液稀释为 20、10、5、2.5、1.25、0.625 μ g/mL 这 6 个浓度, 每孔 100 μ L, 将酶标板置于 4 ℃ 条件下孵育过夜。随后使用 200 μ L 1×PBST 洗涤 3~5 次, 每次 5 min, 洗涤后拍干。按照 200 μ L/孔的标准添加 5% 脱脂乳, 37 ℃ 封闭 2h。阳性血清按 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000 倍比稀释, 阴性血清稀释 1:500。各稀释度血清分别加入至不同包被浓度的间接 ELISA 板中, 每孔 100 μ L, 37 ℃ 孵育 1 h。200 μ L 1×PBST 洗涤 3 次、拍干, 将 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗按 1:2 000、1:5 000、1:8 000、1:10 000、1:20 000、

1:40 000 稀释, 分别加入所有孔中, 每孔 100 μ L, 37 ℃ 条件下孵育 1 h。洗涤拍干后转移到无光环境下按照 100 μ L/孔的标准添加 TMB 显色液, 37 ℃ 无光环境下显色 15 min, 按照 50 μ L/孔的标准添加终止液, 利用酶标仪测量 OD_{450} 值。

1.5 细胞融合及亚克隆

冲击免疫 5 d 后采集小鼠血清用于抗体效价测定, 在无菌条件下取脾脏, 用空白 DMEM 培养基冲洗至脾脏变白, 制备脾细胞悬液, 800 r/min 离心 10 min 后收集细胞。将状态良好的 SP2/0 细胞与脾细胞按 1:3 比例混合, 1 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液, 轻拍管底使细胞团松散混合。37 ℃ 水浴预热 3~5 min, 在 45 s 内匀速加入 1 mL 预热的 PEG 溶液, 室温静置 60 s。随后分阶段终止融合: 先于 30 s 内沿管壁缓慢加入 1 mL 预热的空白 DMEM, 再于 30 s 内加入 2 mL, 最后在 2 min 内缓慢加入 12 mL 空白 DMEM (所有试剂均预热至 37 ℃), 缓慢操作以避免打散融合细胞。终止后于 37 ℃、5% CO_2 培养箱静置 10 min, 800 r/min 离心 10 min 弃上清液。用 10 mL 含 HAT 的 20% FBS DMEM 培养基重悬细胞, 轻柔混匀后接种到铺有饲养层细胞的 96 孔板中 (100 μ L/孔), 于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中静置培养, 融合后 3~5 d 内避免振动。培养 7~10 d 后, 96 孔板中部分孔培养基变黄, 吸取细胞上清液进行间接 ELISA 检测。以小鼠阳性血清为阳性对照, SP2/0 细胞上清液为阴性对照, 当孔内 P/N 值 ≥ 2.1 且待测样本 OD 值 ≥ 0.6 时判定为阳性 (P 为待测样本吸光度, N 为阴性对照吸光度)。筛选全病毒与 N 蛋白检测板均阳性的孔, 更换为含 20% FBS 的 HT 培养基 (100 μ L/孔), 继续培养 6~8 d 后进行亚克隆。选择生长状态良好 (形态规则、贴壁紧密) 且 OD 值较高的阳性孔细胞, 重悬后采用有限稀释法将细胞稀释至终浓度 10^4 个/mL, 按 100 μ L/孔接种到铺有饲养层细胞的 96 孔板中, 使每孔理论细胞数为 0.5~1 个。重复亚克隆 3~5 次, 每次均用间接 ELISA 检测上清液抗体效价, 对高效价细胞株进行扩大培养并冻存保种, 最终获得能稳定生长且高效分泌目标抗体的单克隆杂交瘤细胞株。

1.6 腹水制备与单克隆抗体纯化

杂交瘤细胞接种前 30 d, 选取高龄 BALB/c 小鼠进行预处理。对同批次同剂量牛冠状病毒灭活全病毒液免疫后的小鼠腹腔注射石蜡油 (每次 300~500 μ L), 间隔 7~10 d, 共施加 3~4 次。最后 1 次腹腔注射石蜡油 7~10 d 后将杂交瘤细胞用生理盐水稀释到 2×10^6 个/mL, 按照 0.3 mL/只 (即 6×10^5 个细胞) 的标准注入小鼠腹腔中。等待 9~14 d, 小鼠

腹部明显凸起，每天记录小鼠状态，最后采集腹水样本。把腹水放置在离心机中，6 000 r/min 离心15~20 min，可见明显分层，采用无菌操作技术收集抗体后，立即分装至冻存管中，于-80 °C超低温冰箱保存以避免反复冻融导致的活性损失。随后通过间接ELISA法进行腹水效价测定，将腹水样本进行10倍稀释作为一抗工作液，同时设置杂交瘤细胞培养上清液和未免疫BALB/c小鼠血清分别作为阳性和阴性对照。按照蛋白A/G琼脂糖亲和层析柱说明书进行腹水纯化，通过SDS-PAGE验证纯化效果，最终将纯化产物于-80 °C冰箱保存。

1.7 单克隆抗体 Western blot 鉴定

将BCoV接种于HRT-18细胞系，经24 h培养后，采用1×蛋白质变性缓冲液收获感染细胞，将蛋白样本和上样缓冲液混在一起，整体转移到沸水浴环境下，10 min后取出，接着实施SDS-PAGE分离。结束电泳后，通过湿转法对蛋白胶实施转印，在0.33 A恒流下转印2 h。将膜转移到含5%脱脂乳的PBS溶液中，振荡封闭2 h，避免发生非特异性结合。采用PBST缓冲液对膜进行3次漂洗后，加入1:3 000稀释的单克隆抗体，37 °C恒温孵育60 min。随后更换新的PBST缓冲液重复漂洗3次，继而加入1:2 000稀释的HRP标记羊抗鼠IgG二抗工作液。37 °C孵育1 h。最后，进行3次洗涤，并添加ECL化学发光液，并将样本放置在化学发光仪内充分曝光以检测单克隆抗体的表达情况。

1.8 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定及特异性检测

待HRT-18细胞在6孔板中生长至80%~90%汇合后，采用0.1感染复数(MOI)的BCoV病毒悬液接种细胞。感染24 h后，用4%多聚甲醛室温固定细胞15 min。随后，加入含5% BSA的PBS封闭液，37 °C孵育30 min以阻断非特异性结合。最后，加入经1:500稀释的一抗工作液，4 °C孵育过夜。添加1:300稀释的FITC标记的羊抗鼠IgG作为二抗，在37 °C避光条件下孵育30 min。最后，通过共聚焦显微镜观察染色结果，以评估病毒感染的效果。使用MDBK细胞系分别接种BVDV、IBRV及BPIV3，采用MA104细胞系接种BRV，选用筛选到的BCoV单克隆抗体作为一抗，稀释至工作浓度(1:100)，分别采用BRV、BVDV、IBRV和BPIV3的阳性血清设定成阳性对照，使用FITC标记的羊抗鼠IgG荧光抗体作为二抗(1:200稀释)，避光孵育，利用相同方法实施BCoV单克隆抗体特异性检测。

1.9 单克隆抗体亚型鉴定

将重组BCoV-N蛋白(5 mg/L)包被于96孔酶标板中，4 °C孵育过夜。将腹水样本按1:1 000比例

稀释后加入孔板设定成一抗，37 °C孵育1 h。使用HRP标记的羊抗鼠Ig(包含G1/G2a/G2b/G3/M/A/ κ/λ 亚型)设定成二抗，依次孵育抗原，每孔加入TMB显色底物，37 °C避光反应15 min，加入2 mol/L H₂SO₄终止液终止反应。利用酶标仪读取OD₄₅₀值。

2 结果与分析

2.1 重组BCoV-N蛋白的表达与纯化

如图1A显示，成功诱导表达BCoV-N蛋白，其分子量约为55 kDa，与理论预测值相符。Western blot鉴定表明，利用BCoV抗体检测，在约55 kDa位置形成明显的免疫复合物条带(图1B)，说明BCoV-N蛋白成功表达并具备良好的免疫反应性。

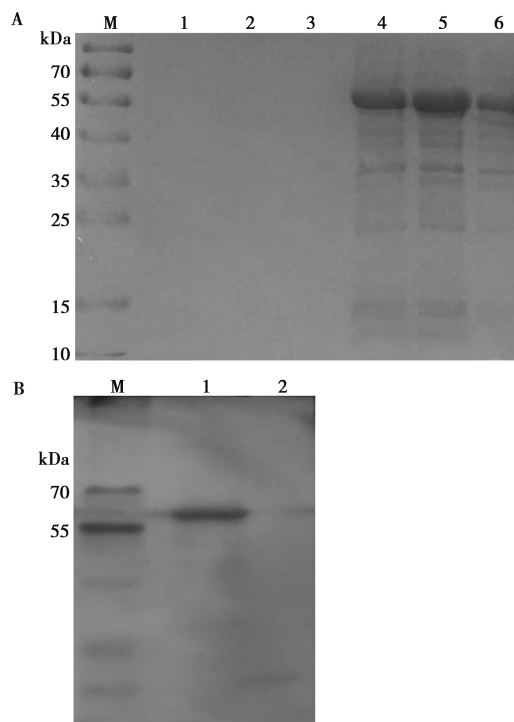


图1 重组BCoV-N蛋白诱导表达和免疫印迹
A. 蛋白诱导表达，M为蛋白Marker，1~3为空白对照，4~6为N蛋白；B. 免疫印迹，M为蛋白Marker，1为N蛋白，2. 空载体对照。

图1 重组BCoV-N蛋白诱导表达和免疫印迹

2.2 间接ELISA检测体系的建立

经棋盘滴定试验，酶标仪450 nm测定，能使固相载体吸附饱和的灭活全病毒抗原包被最佳稀释浓度为5 μg/mL，在该包被浓度下，选取阳性OD值达标且阴性背景最低的稀释度，确定血清稀释浓度为1:8 000，此时HRP标记的羊抗鼠IgG二抗最佳稀释浓度为1:5 000。能使固相载体吸附饱和的N蛋白抗原包被最佳稀释浓度为7 μg/mL，在该包被浓度下，选取阳性OD值达标且阴性背景最低的稀释度，确定

血清稀释浓度为 1 : 8 000, 此时 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗最佳稀释浓度为 1 : 4 000。

2.3 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆试验

眼眶静脉丛采血法采集第 3 次免疫后 5 只小鼠的血清样本。利用间接 ELISA 方法测定血清抗体效价, 发现 3 号小鼠的抗体效价水平高于其他小鼠 (图 2), 对其实施冲击免疫, 5 d 后细胞融合。细胞融合第 5 天出现了小细胞集落。融合细胞继续生长, 可明显观察到孔内培养基由红色转变为黄色, 表明细胞状态较好且代谢活跃。细胞各时间段生长状况见图 3。经细胞计数后, 挑选细胞数量及状态均适宜的孔进行上清液抗体效价检测。统计结果显示, 12 块 96 孔板的融合率达到 72.8% (839/1 152)。选取抗体水平较高的孔 (阳性孔且 OD 值 > 1, 共 25 个), 亚克隆后得到 3 株可以稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 依次编号

2D12C、3D6E 和 4D1F, 间接 ELISA 法检测 3 株细胞上清效价均达到 1 : 25 600, 表明 3 株单克隆抗体均与 N 蛋白有良好的结合。

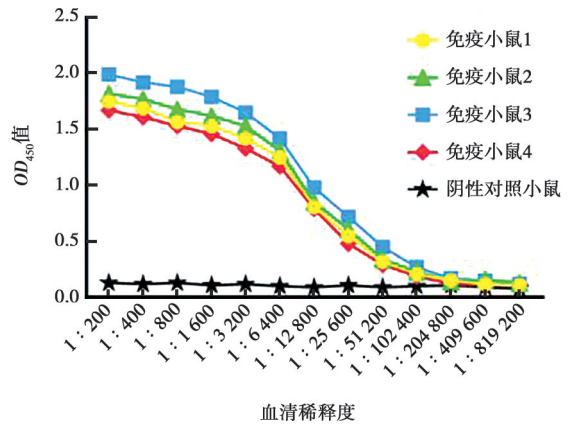


图 2 间接 ELISA 检测小鼠血清抗体效价

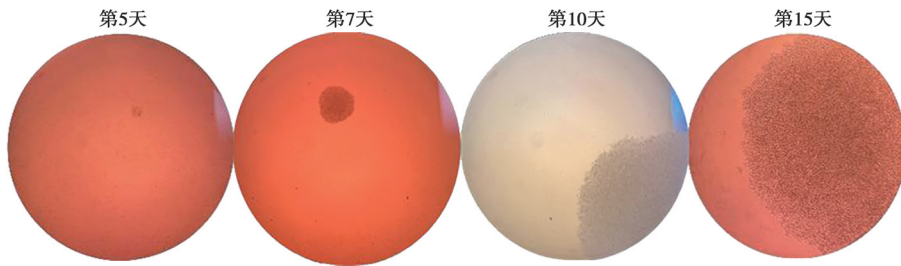


图 3 显微镜下融合细胞生长状态

2.4 单克隆抗体腹水制备与纯化

3 株杂交瘤细胞株注入小鼠腹腔 9~14 d 后, 小鼠腹腔明显膨大。利用间接 ELISA 法测量腹水抗体效价, 发现 2D12C、3D6E、4D1F 的抗体效价依次是 1 : 320 000、1 : 400 000 和 1 : 640 000。4D1F 单克隆抗体的腹水效价显著高于其他株系, 因此选择该株进行后续的 Protein A 亲和层析纯化。SDS-PAGE 图谱显示, 在 55 kDa 附近可见明显条带 (图 4), 与 IgG 重链的理论分子量相符。通过比较发现, 纯化后的抗体样品中非特异性条带明显减少, 说明获得了较高纯度的目标抗体。

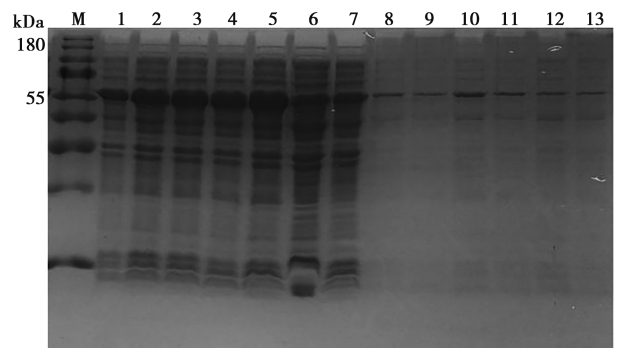
2.5 单克隆抗体的 IFA 鉴定

由图 5 可知, 2D12C、3D6E、4D1F 都能够和 BCov 反应并释放出特异性荧光, 而阴性血清对照组中没有观察到荧光, 说明筛选到的 3 株单克隆抗体均能与 BCov 发生特异性结合。

2.6 单克隆抗体特异性检测

由图 6 可知, BVDV、IBRV、BPIV3 和 BRV 等 4 种病毒阳性血清均与相应病毒感染细胞反应出现特异

性荧光, 而 3 株单克隆抗体组均没有观察到荧光, 说明筛选到的 3 株单克隆抗体均不与这 4 种病毒发生特异性反应。



M. 蛋白 Marker; 1. 流穿液; 2~3. 2D12C; 4~5. 3D6E; 6~7. 4D1F; 8~9. 纯化后 2D12C; 10~11. 纯化后 3D6E; 12~13. 纯化后 4D1F。

图 4 腹水纯化情况

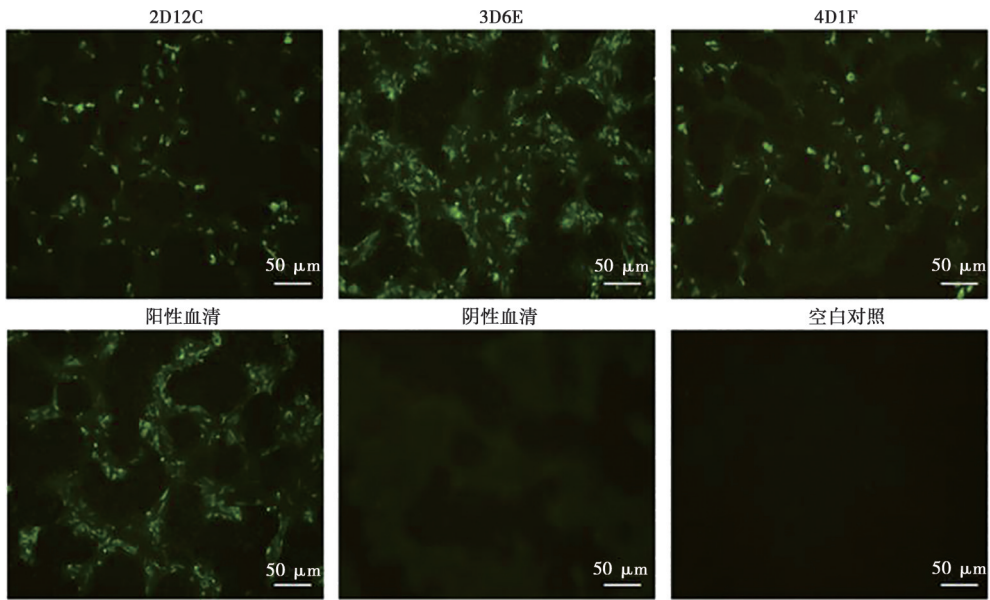


图5 单克隆抗体 IFA 鉴定

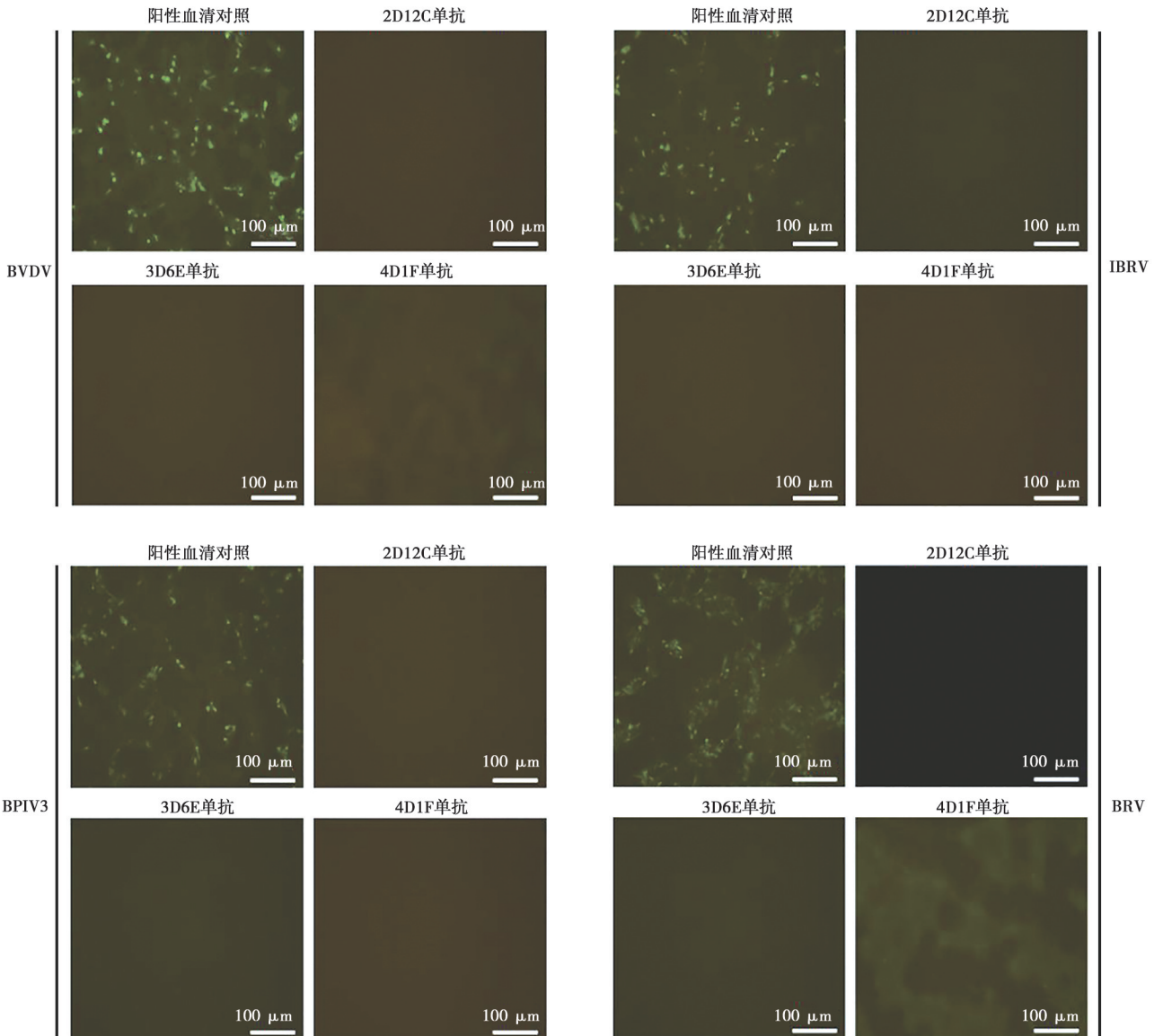


图6 单克隆抗体特异性检测

2.7 单克隆抗体的亚类鉴定

3D6E 重链为 IgG1, 2D12C、4D1F 重链为 IgG2a。

表 1 显示 3 株单克隆抗体轻链均为 Kappa 链,

表 1 抗体亚类鉴定

细胞株	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgG M	IgG (H+L)	Kappa	L
2D12C	0.127	0.124	1.766	0.138	0.121	0.086	1.721	1.257	0.169
3D6E	0.171	1.824	0.962	0.156	0.095	0.094	1.866	1.346	0.151
4D1F	0.113	0.989	1.913	0.102	0.088	0.078	1.839	1.388	0.138

3 讨论

BCoV 在全球范围内对牛群健康构成严重威胁, 其中在西班牙的血清流行病学调查显示分布广泛, 在腹泻粪便中的检出率为 3.4%~69%, 在出现呼吸道症状的牛中的检出率为 11.8%~74.6%^[20] BCoV 可导致呼吸道疾病、腹泻等多种临床症状, 给畜牧业造成显著经济损失。

在血清学检测方面, 目前已建立多种基于不同抗原的间接 ELISA 方法用于 BCoV 抗体检测, 包括以原核系统表达的 N 蛋白为包被抗原的 ELISA、以原核表达的 S 蛋白为包被抗原的 ELISA 以及采用完整病毒颗粒的 ELISA。这些方法通过检测抗体应答间接反映病毒感染状况^[21]。然而, 目前尚未有直接检测粪便样本中 BCoV 抗原的 ELISA 方法^[22]。

从疫苗研发角度来看, N 蛋白因其特有的 RNA 结合特性成为潜在靶点^[23]。以 N 蛋白为免疫原设计的疫苗可通过以下机制发挥作用: 干扰 N 蛋白与病毒基因组的正常结合, 或诱导 N 蛋白发生异常聚合, 使核糖核蛋白复合体 (RNP) 的组装出现错误, 由此阻碍病毒子代的复制过程。

由于来自不同 BCoV 毒株的 N 蛋白氨基酸序列具有高度同源性, 并且 N 蛋白具有高度免疫原性, 因此 N 蛋白是最适用于诊断 BCoV 感染的抗原标记物。本研究采用了灭活病毒直接免疫, 全病毒和 N 蛋白分别作为间接 ELISA 包被抗原, 筛选出对 2 种抗原效价均高的单克隆抗体制备方法。在保留病毒表面蛋白的天然构象从而诱导更具特异性的免疫应答的同时, 筛选出了 3 株针对 N 蛋白高效价的单克隆抗体。这一方法与 Ou 等^[24]在 SARS-CoV-2 研究中采用的方法类似, 他们同样发现保持病毒蛋白天然构象有助于获得高特异性抗体。

从细胞融合到成功制备单抗需经历多个筛选环节, 最终只筛选到 3 株针对 N 蛋白的单抗, 分析原因如下: 细胞融合效率低, PEG 化学融合法本身具有随机性和毒性, 且骨髓瘤细胞与脾细胞的比例、细胞状态及操作条件不佳会进一步降低有效杂交瘤的形

成率; 筛选过程严苛, HAT 选择培养基仅允许成功融合的杂交瘤存活, 但其中仅部分细胞分泌目标抗体, 且初筛阳性克隆可能因检测方法灵敏度或特异性问题包含假阳性; 杂交瘤细胞具有不稳定性, 杂交瘤细胞在传代培养中易发生染色体丢失而丧失抗体分泌能力, 或受支原体污染影响其健康与稳定性; 筛选合格抗体标准严苛, 需同时满足高特异性、高亲和力、预期免疫球蛋白类型、良好稳定性及适用特定应用场景等多重要求, 多数候选抗体难以全面达标。

本研究的局限性在于尚未确定单克隆抗体的精确靶点。未来计划通过质谱分析、表位映射等技术进一步鉴定抗体识别的具体病毒蛋白及表位。此外, 还将评估这些抗体在病毒中和、诊断检测等应用方面的潜力。

综上, 本研究成功制备了针对 BCoV 的特异性单克隆抗体, 为牛冠状病毒病的早期诊断和防控提供了重要工具。这些抗体有望应用于快速诊断试剂开发, 帮助畜牧业及早发现感染并采取防控措施, 减少经济损失。同时, 本研究对冠状病毒单克隆抗体制备技术的优化也为冠状病毒研究相关领域研究提供参考。

参考文献:

- [1] 寇美玲, 谢佳芮, 杨佳萍, 等. 牛冠状病毒的全基因组测序及遗传进化分析 [J]. 动物医学进展, 2022, 43 (10): 1-7.
- [2] 其勒木格, 王旭芬, 侯琳, 等. 内蒙古牛冠状病毒全基因组测序与遗传进化分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51 (11): 4984-4995.
- [3] JIANG Q, MA Z, MIN F, et al. Screening of bovine coronavirus multiepitope vaccine candidates; an immunoinformatics approach [J]. Transbound Emerg Dis, 2024, 2024 (1): 5986893.
- [4] BLAKEBROUGH-HALL C, HICK P, MAHONY T J, et al. Factors associated with bovine respiratory disease case fatality in feedlot cattle [J]. J Anim Sci, 2022, 100 (1). DOI: 10.1093/jas/skab361.
- [5] 聂尔求秀, 简莹娜, 彭毛卓玛, 等. 青海甘德一起犊牛病毒性腹泻病原检测分析 [J]. 畜牧兽医杂志, 2025, 44 (2): 31-36.
- [6] PERFILYEVA Y V, ZHIGAILOV A V, MALYSHEVA A A, et

- al. Occurrence and epidemiology of bovine coronavirus in cattle in Kazakhstan [J]. *Vet J*, 2025, 313: 106371.
- [7] LI Q, BAI H, PAN Y, et al. Genome-wide genomic analysis and evolutionary insights into bovine coronavirus strains in southwest China [J]. *Vet Sci*, 2024, 12 (1): 9.
- [8] 张亮, 张云飞, 蒋仁新, 等. 2017—2018 年山东省奶牛场犊牛腹泻相关病毒病原学检测 [J]. *中国动物检疫*, 2020, 37 (6): 16-20.
- [9] 罗宇航, 刘黄豪, 李德政, 等. 广西河池地区牛肠道病毒和牛冠状病毒流行病学调查及遗传变异分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59 (7): 32-39.
- [10] 朱庆贺, 苏明俊, 李梓健, 等. 黑龙江地区牛冠状病毒流行病学调查及遗传多样性分析 [C] //中国畜牧兽医学动物传染病学会第十九次全国学术研讨会论文集. 长春: 中国畜牧兽医学学会, 2021: 161.
- [11] 孙飞雁, 叶京飞, 魏宇, 等. 吉林省肉牛冠状病毒感染状况调查及分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (2): 673-682.
- [12] 陈柯佳, 谢梦圆, 郭宇, 等. 内蒙古自治区部分地区规模化牛场牛冠状病毒流行病学调查 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023 (14): 77-81.
- [13] 郭晓旭, 张帅, 刘莹, 等. 携带 BCoV 抗原表位的乙型肝炎病毒核心抗原病毒样颗粒的制备及免疫效果评价 [J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45 (2): 178-184.
- [14] 王梦娇, 蒋倩, 马学军, 等. 新疆地区牛冠状病毒的分子流行病学调查 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (12): 5125-5133.
- [15] VERDIÁ-BÁGUENA C, NIETO-TORRES J L, ALCARAZ A, et al. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids [J]. *Virology*, 2012, 432 (2): 485-494.
- [16] ZHANG H, YU Q, GUO R, et al. Integrative transcriptomic and proteomic analyses reveal that carbon metabolism and complement system of Madin Darby Bovine Kidney cells are affected by bovine coronavirus infection [J]. *BMC Vet Res*, 2025, 21 (1): 398.
- [17] SHERWIN G, DOWN P. Calf immunology and the role of vaccinations in dairy calves [J]. *Pract*, 2018, 40 (3): 102-114.
- [18] 蒋倩, 闵芳, 马志刚, 等. 牛冠状病毒 N 蛋白的原核表达及对小鼠免疫原性的初步评价 [J]. *中国兽医学报*, 2024, 44 (12): 2540-2548.
- [19] 靳双媛, 杜家伟, 王雪妍, 等. 牛冠状病毒 S 和 HE 蛋白研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51 (7): 3118-3127.
- [20] CALDERÓN BERNAL J M, FERNÁNDEZ A, ARNAL J L, et al. Cluster analysis of bovine respiratory disease (BRD) - associated pathogens shows the existence of two epidemiological patterns in BRD outbreaks [J]. *Vet Microbiol*, 2023, 280: 109701.
- [21] 胡林杰, 孟野, 周玉龙, 等. 检测牛冠状病毒抗体间接 ELISA 方法的建立与应用 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47 (1): 330-338.
- [22] HULSWIT R J G, LANG Y, BAKKERS M J G, et al. Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9-O-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116 (7): 2681-2690.
- [23] BAKKERS M J G, LANG Y, FEITSMA L J, et al. Betacoronavirus adaptation to humans involved progressive loss of hemagglutinin-esterase lectin activity [J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 21 (3): 356-366.
- [24] OU X, LIU Y, LEI X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 1620.