

蒋丹, 林佳琦, 胡鹏程, 等. 猪调节性 T 细胞分子标记物 FoxP3 单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 43-49.

JIANG D, LIN J Q, HU P C, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies of porcine regulatory T cells molecular markers FoxP3 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 43-49.

猪调节性 T 细胞分子标记物 FoxP3 单克隆抗体的制备与鉴定

蒋丹[#], 林佳琦[#], 胡鹏程, 郭博伦, 林新, 马燕梅^{*}

(福建农林大学动物科学学院/福建省畜禽病原感染与免疫学重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 调节性 T 细胞 (Treg) 是具有免疫调节活性的淋巴细胞, 通过抑制各种效应性淋巴细胞来诱导自身免疫耐受。FoxP3 是 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞重要的转录因子, 对其分化发育和功能维持有着重要的调控作用, 因此联合 FoxP3 抗原可以更好地识别 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞。为了制备出特异性的猪 Treg 细胞表面标记物 FoxP3 的单克隆抗体, 本研究选择抗原性较强的基因编码片段, 构建了 FoxP3 抗原表位区段 (1~840 bp) 的原核表达质粒, 诱导表达并纯化后, 用目的蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 取免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合, 通过间接 ELISA、Western blot 和间接免疫荧光的方法筛选能稳定分泌抗体的阳性杂交瘤细胞。结果: 筛选到了 5 株效价较高的 FoxP3 单克隆抗体产生细胞 (F4B9、F4A9、F1E12、F1A11 和 F4A10), 均具有良好的特异性, 能识别内源性和外源性 FoxP3 蛋白, 且能稳定地分泌抗体, 为定性或定量检测猪 Treg 细胞以及验证 Treg 细胞的功能奠定了基础。

关键词: 猪; Treg 细胞; FoxP3; 抗体制备; 单克隆抗

中图分类号: S852.4 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)01-0043-07

Preparation and identification of monoclonal antibodies of porcine regulatory T cells molecular markers FoxP3

JIANG Dan[#], LIN Jiaqi[#], HU Pengcheng, GUO Bolun, LIN Xin, MA Yanmei^{*}

(College of Animal Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University/Key Laboratory of Animal Pathogen Infection and Immunology of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Regulatory T cells (Tregs) are a type of lymphocyte that has immunomodulatory activity, and they induce autoimmune tolerance by inhibiting various effector lymphocytes. FoxP3 gene is an important regulatory gene in the differentiation, development and function maintenance of CD4⁺CD25⁺ Treg cells, and it is an important transcription factor. The combination of FoxP3 antigen on the basis of CD4⁺CD25⁺ can better recognize CD4⁺CD25⁺ Treg cells. In order to produce specific monoclonal antibody against porcine regulatory T cell surface marker FoxP3, a prokaryotic expression plasmid of FoxP3 epitope (1-840 bp) was constructed here by selecting a gene coding fragment with strong antigenicity. After induction and purification, BALB/c mice were immunized with the target protein, and spleen cells of the immunized mice were fused with myeloma cells, and positive hybridoma cells that could secrete antibodies stably were screened using the indirect ELISA, Western blot and indirect immunofluorescence methods. The results showed that five FoxP3 monoclonal cells with high titer (F4B9, F4A9, F1E12, F1A11 and F4A10) were finally screened and they had good specificity; all of the cells could recognize endogenous and exogenous proteins and secrete antibodies stably, which laid a foundation for qualitative or quantitative detection and verification of the function of Tregs in pigs.

Keywords: porcine; Treg cells; FoxP3; antibody preparation; monoclonal antibodies

收稿日期: 2024-01-30; 修回日期: 2024-10-28

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2021J01082); 福建农林大学科技创新专项基金项目 (Kfb22066XA); 福建农林大学 2022 年校级大学生创新创业训练计划项目 (X202210389094)

第一作者: 蒋丹, 女, 硕士; 林佳琦, 女, 硕士。[#]共同第一作者

^{*} 通信作者: 马燕梅, 博士, 副教授, 研究方向动物微生物与免疫学, E-mail: mayanmei@fafu.edu.cn.

调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是一群具有负调节机体免疫反应的淋巴细胞, 通常起着维持自身耐受和避免免疫反应过渡损伤机体的重要作用^[1]。调节性 T 细胞表达 FoxP3 等核内转录因子, 也表达 CD127、CD25、CD45RB^{low}、CD103 和 CD62L 等表面标志^[2-5]。调节性 T 细胞亚群需要转化生长因子 β (TGF- β) 的刺激而进行分化, 受转录因子 FoxP3 调节, 对于维持自我耐受和调节免疫至关重要^[6]。FoxP3 是叉头/翼螺旋转录抑制因子家族的成员, 该蛋白在 Treg 细胞内特异性表达, 是其重要的转录因子, 也是 Treg 细胞发育和功能的主要调节因子^[7-8]。

目前, 市场上可用于检测猪淋巴细胞的相关商品化抗体较少, 缺乏理想的特异性标记物是研究和利用 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的最大阻碍。因此, 本研究主要通过杂交瘤技术制备出高效价的特异性猪 FoxP3 抗体, 为研究分析猪 Treg 细胞亚群提供分析抗体, 为进一步研究 FoxP3 转录因子的表达和功能提供必要的工具, 也为进一步探究猪抗病性状与免疫机制间的关系打下基础, 对深入了解 T 淋巴细胞发育进程、细胞因子的互作机制及其在免疫系统中的生物学功能等方面具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购于全式金生物有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、HAT 添加剂、HT 添加剂购于 Coolaber 公司; RPMI 1640 培养基购于 Gibco 公司; 镍柱购于 SenhuiMicrosphere Tech (Suzhou) 公司; His 标签单克隆抗体购于 4A Biotech 有限公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购于赛默飞公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购于 Sigma 公司; 聚乙二醇 (PEG) 4000 溶液购于 Leagene 公司; 小鼠骨髓瘤 (SP2/0) 细胞、HEK-293T 细胞、菌株 DH5 α 、菌株 BL21 (DE3)、pET-28a 表达载体和 pEGFP-C1 表达载体由本实验室保存; SPF 级 BALB/c 小鼠购自闽侯县吴氏实验动物贸易有限公司。

1.2 猪 FoxP3 蛋白抗原表位选择

从 GenBank 中获取猪 FoxP3 基因的碱基序列 (NM_001128438.1) 及其蛋白质序列 (NP_001121910.1), 用 DNASTAR 软件中的 Protean 软件作抗原表位分析, 选择抗原性较强的抗原表位区的基因编码片段为目的基因。

1.3 重组质粒的构建与鉴定

从猪脾脏组织中提取总 RNA 并反转录得到的

cDNA 作为模板, 参照猪 FoxP3 碱基序列的主要抗原表位区段 (1~840 bp) 设计特异性引物, 上下游引物中添加 2 个酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I, F: 5'-ATGAATTCATGCCCAACCCAGGCCAGCCAAGC-3'; R: 5'-ATCTCGAGGCAGGAACCCCTGTTCAGATGATGCGG-ATGG-3', 用于扩增设计的猪 FoxP3 基因。将目的基因及 pET-28a 空载体分别进行双酶切后连接, 再将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 经双酶切鉴定正确的重组质粒送至 Tsingke 公司进行测序, 若测序验证未发生突变, 说明重组质粒 pET-28a-FoxP3 构建成功。

1.4 蛋白的诱导表达及纯化

将重组质粒 pET-28a-FoxP3 转化至感受态 BL21 (DE3) 中, 挑菌鉴定为阳性的菌落扩大培养, 在 37 °C、0.5 mmol/L IPTG、160 r/min 的条件下诱导 7 h 后获得重组蛋白 FoxP3, 置于冰水混合物中, 用超声波细胞破碎仪进行破碎, 超声 10 min, 4 °C 8 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液和沉淀, 通过 SDS-PAGE 进行重组蛋白 FoxP3 的可溶性分析。一抗使用 6 \times His 标签的鼠单抗, 二抗使用羊抗鼠 HRP, 通过 Western blot 鉴定重组蛋白 FoxP3-6 \times His 表达是否正确。验证蛋白表达成功后将重组蛋白 FoxP3 进行镍柱亲和层析纯化。

1.5 动物免疫

将纯化后的重组蛋白 FoxP3 与佐剂混合, 注射身体健康状态良好的 8 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 注射剂量为 100 μ g/只。首次免疫使用弗氏完全佐剂, 二免与三免使用弗氏不完全佐剂, 加强免疫不使用佐剂, 每次免疫时间间隔 2 周, 前 3 次注射部位为背部皮下, 加强免疫采用腹腔注射。

1.6 单克隆抗体的制备

1.6.1 细胞融合

细胞融合前 1 d, 制备饲养层, 提供适宜条件以促进融合细胞生长。选择效价最高的 BALB/c 小鼠, 尾部采血, 断颈处死, 无菌取其脾脏制备脾细胞, 按 SP2/0 细胞: 脾细胞 = 1:5 的比例混匀, 使用 40 °C 水浴的 50% PEG 4000 溶液进行细胞融合, 随后使用含 HAT 的 RPMI 1640 选择培养基进行培养。在细胞融合后的第 4 天, 进行半量换液。在细胞融合后第 8、9 和 12 天, 用含 HT 的 RPMI 1640 选择培养基进行半量换液。

1.6.2 杂交瘤细胞的筛选

待小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合 8~12 d 后, 对有杂交瘤细胞存活的细胞培养孔进行细胞上清液检测。先采用间接 ELISA 的方法进行粗筛, 以免疫原为包被抗原, 杂交瘤上清液为一抗。其后, 选取

ELISA 阳性细胞孔中的细胞上清液, 进一步采用间接免疫荧光试验 (IFA), 从 ELISA 检测阳性的克隆中筛选可以识别 FoxP3 蛋白的杂交瘤阳性细胞克隆。

1.6.3 小鼠单抗腹水的诱导

提前 1 d 使用 0.5 mL 不完全弗氏佐剂注射 10 周龄 BALB/c 小鼠。将生长状态良好的杂交瘤细胞吹下, 800 r/min 离心 5 min 后使用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 3 次。调整细胞密度至 2×10^6 个/mL, 每只小鼠注射 0.5 mL。每天观察小鼠状态, 一般注射后 7~10 d 后, 小鼠腹腔膨大, 用碘酒擦拭下腹部皮肤, 用 5 mL 注射器轻轻刺入腹腔收集腹水。收集到的腹水加入离心管中 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液即为腹水, 分装到 1.5 mL 离心管中置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.7 单克隆抗体的鉴定

1.7.1 单克隆抗体反应性鉴定

将纯化的重组蛋白 FoxP3 和诱导的 pET-28a 空载进行 SDS-PAGE, 以确定为阳性的杂交瘤细胞上清液为一抗, 1:5 000 倍稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗, 进行 Western blot 鉴定。

1.7.2 单克隆抗体的交叉反应性鉴定

以间接 ELISA 方法测定 5 株单抗与本实验室保存的 pET-28a 空载、CD127-6×His、CD25-6×His 和牛血清白蛋白 (BSA) 抗原的反应性。

1.7.3 识别外源性和内源性蛋白的鉴定

构建真核表达质粒 pEGFP-C1-FoxP3 并转染至 HEK-293T 细胞, 收集细胞, 细胞裂解液作为外源性蛋白。将猪脾脏、淋巴结及肺脏组织裂解液作为内源性蛋白。将细胞蛋白和组织蛋白进行 SDS-PAGE, 然后利用本研究制备的单抗作为一抗进行 Western blot 鉴定。

2 结果与分析

2.1 猪 FoxP3 蛋白抗原表位选择

用 DNASTAR 软件中的 Protean 软件做抗原表位分析, 结果如图 1 所示, 图中向上突起越高的部分说明抗原表位指数越强。因此, 本研究选择了猪 FoxP3 蛋白抗原性较强的抗原表位区 FoxP3 区段 (1~280 aa) 的基因编码片段 (1~840 bp) 为目的基因。

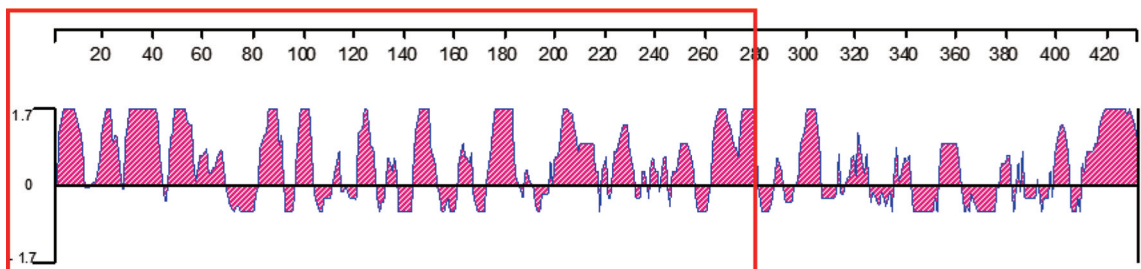


图 1 猪 FoxP3 蛋白抗原表位分析

2.2 FoxP3 基因的扩增及重组质粒的构建

以猪脾脏组织 cDNA 为模板, 用设计的特异性引物扩增出大小为 840 bp 的目的片段 (图 2A)。将 FoxP3 目的基因连接至 pET-28a 载体, 对重组质粒进行双酶切鉴定, 酶切得到的目的片段为 840 bp (图 2B)。目的片段与预期大小符合, 并经测序验证未发生突变, 说明重组质粒 pET-28a-FoxP3 构建成功。

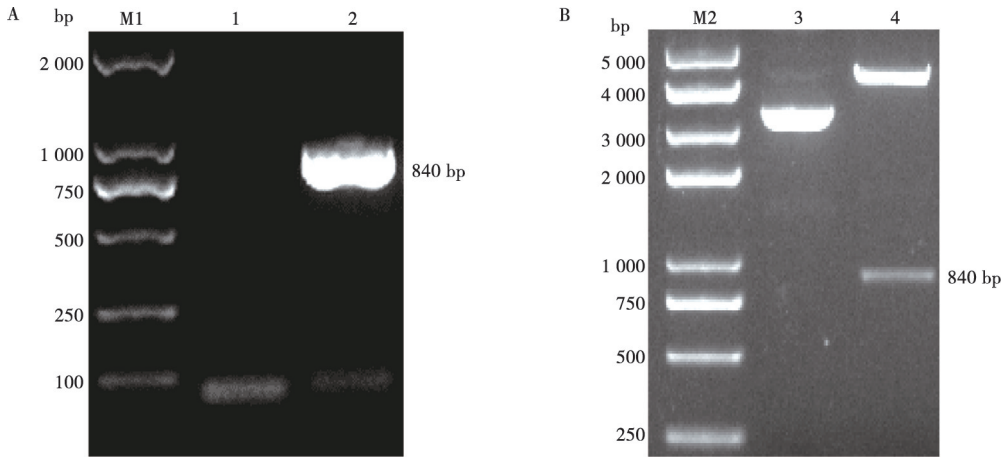
2.3 重组蛋白 FoxP3 的诱导表达及纯化

pET-28a-FoxP3 表达重组蛋白 FoxP3 大小约为 36 kDa, 符合预期, 且重组蛋白 FoxP3 在上清液中以可溶性蛋白的形式表达且表达量较高 (图 3A)。将

重组蛋白 FoxP3 进行镍亲和层析纯化, 纯化后条带单一 (图 3B), 可用作抗原免疫动物。Western blot 结果显示重组蛋白 FoxP3 可与 6×His 标签的鼠单克隆抗体结合 (图 3C), 验证了重组蛋白 FoxP3 表达正确。

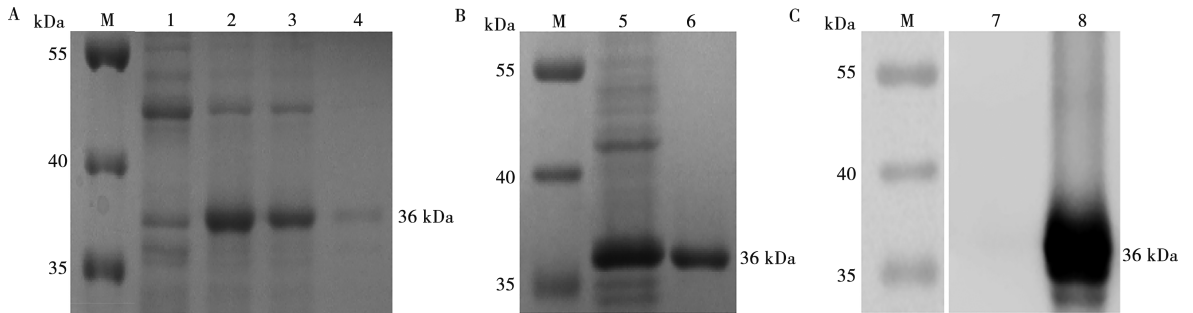
2.4 阳性杂交瘤细胞的筛选

通过间接 ELISA 和 IFA, 经多次筛选排除假阳性孔, 并从中选出 $OD_{450\text{ nm}}$ 数值高且荧光反应性强的阳性细胞孔进行亚克隆, 最终共筛选出 5 株能稳定分泌针对 FoxP3 蛋白的单克隆抗体 (简称单抗) 细胞株, 分别命名为 F4B9、F4A9、F1E12、F1A11 和 F4A10。



M1. DL2000 DNA 分子标记; 1. 空白对照; 2. FoxP3 基因 PCR 产物; M2. DL5000 DNA 分子标记; 3. 重组质粒 pET-28a- FoxP3; 4. pET-28a- FoxP3 质粒双酶切产物。

图 2 PCR 扩增 FoxP3 基因 (A) 及重组质粒 pET-28a-FoxP3 的双酶切产物 (B)



M. 蛋白分子量标准; 1. pET-28a-FoxP3 未诱导的表达产物; 2. pET-28a-FoxP3 诱导后的表达产物; 3. pET-28a-FoxP3 诱导后上清的表达; 4. pET-28a-FoxP3 诱导后沉淀的表达产物; 5. pET-28a-FoxP3 诱导后的表达产物; 6. 纯化后的重组蛋白; 7. 空载诱导后的表达产物; 8. 纯化后的重组蛋白。

图 3 重组蛋白 FoxP3 的可溶性分析 (A)、纯化 (B) 和 Western blot 验证 (C)

2.5 单克隆抗体的 ELISA 检测

细胞融合或进行亚克隆之后, 吸取 100 μ L 杂交瘤上清液进行间接 ELISA 检测, 同时使用免疫前的血清作为阴性对照, 细胞融合前采集的小鼠血清作为阳性对照。图 4 为筛选出的 5 株能稳定分泌 FoxP3 蛋白单抗的细胞株间接 ELISA 结果, 以未免疫小鼠血清为阴性对照, 其平均 $OD_{450\text{nm}}$ 值为 0.148, 阴性界限值为 0.16 (平均值+2 \times 标准差), 筛选出 5 株细胞的 $OD_{450\text{nm}}$ 值均大于界限值, 且远高于阴性对照, 表明筛选到的细胞株为阳性杂交瘤细胞。

2.6 单克隆抗体的 IFA 鉴定

IFA 鉴定筛选出的 5 株细胞株, 结果如图 5 所示, 所筛选的细胞株 F4B9、F4A9、F1E12、F1A11 和 F4A10 中杂交瘤细胞分泌的细胞上清液均能与瞬

时表达 FoxP3 的 HEK-293T 细胞发生特异性反应。

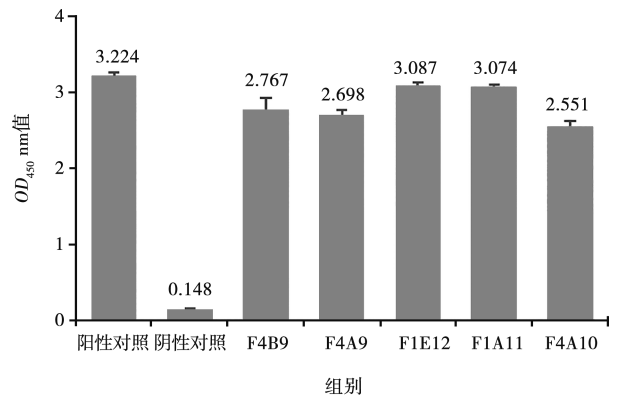
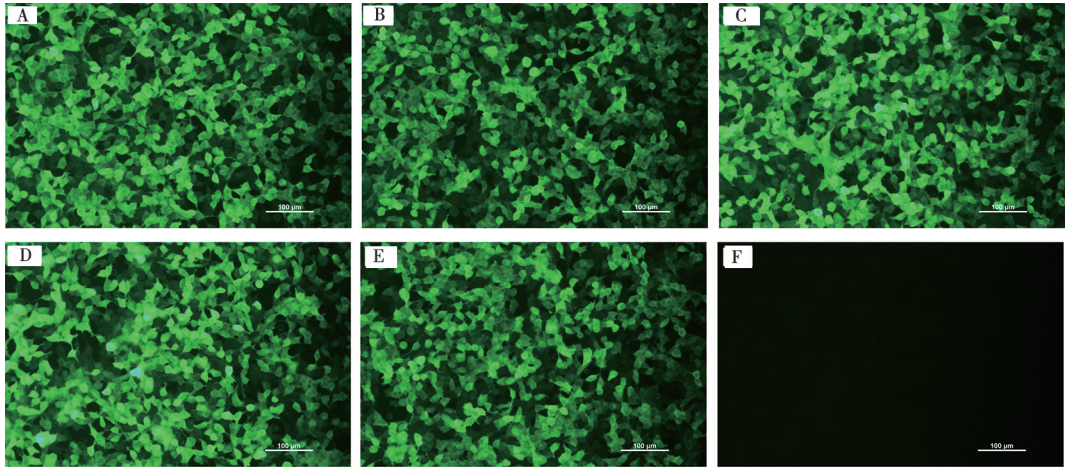


图 4 FoxP3 单抗的间接 ELISA 检测结果



A. F4B9; B. F4A9; C. F1A11; D. F1E12; E. F4A10; F. 阴性对照。

图5 FoxP3 单抗的间接免疫荧光检测结果 (比例尺=100 μm)

2.7 细胞上清液和腹水的效价

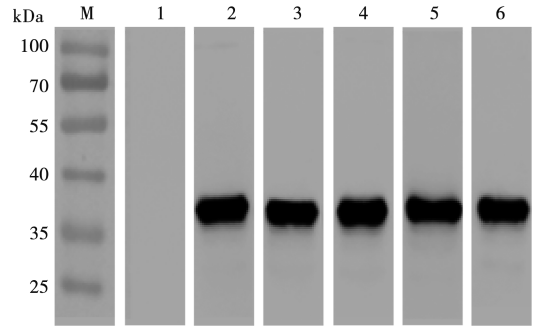
FoxP3 单抗的细胞上清液和腹水分别以 1 : 400 和 1 : 1 000 倍开始倍比稀释。间接 ELISA 检测结果显示, 单抗 F4B9、F4A9 和 F4A10 的细胞上清液效价为 1 : 6 400, 单抗 F1E12 和 F1A11 的细胞上清液效价为 1 : 12 800; F4B9 的腹水效价为 1 : 1 024 000, F4A9 的腹水效价为 1 : 256 000, F1E12 的腹水效价为 1 : 512 000, F1A11 的腹水效价为 1 : 2 048 000, F4A10 的腹水效价为 1 : 512 000 (表 1)。

表 1 5 株单抗细胞上清液及腹水的效价

单抗	细胞上清液效价	腹水效价
F4B9	1 : 6 400	1 : 1 024 000
F4A9	1 : 6 400	1 : 256 000
F1E12	1 : 12 800	1 : 512 000
F1A11	1 : 12 800	1 : 2 048 000
F4A10	1 : 6 400	1 : 512 000

2.8 单抗特异性 Western blot 鉴定

如图 6 所示, 经 Western blot 鉴定, 获得的 5 株单抗与 pET-28a 空载体不反应, 与重组蛋白 FoxP3 均有阳性反应, 证明 5 株单抗均与重组蛋白 FoxP3 反应性较好。



M. 蛋白分子量标准; 1. 阴性对照; 2. F4B9; 3. F4A9; 4. F1E12; 5. F1A11; 6. F1F11。

图 6 5 株单抗的 Western blot 鉴定结果

2.9 交叉反应性试验

经间接 ELISA 方法测定, 5 株单抗均与 FoxP3 反应明显, 而与 pET-28a 空载、CD127-6×His、CD25-6×His 和 BSA 抗原均不发生反应, 说明获得的单抗特异性良好 (表 2)。

表 2 单抗特异性鉴定结果 (OD_{450 nm})

单抗	pET-28a	FoxP3-His	CD127-His	CD25-His	BSA
F4B9	0.073 5	3.832 9	0.049 8	0.052 4	0.053 0
F4A9	0.099 3	3.967 3	0.049 6	0.055 3	0.051 3
F1E12	0.041 2	3.667 2	0.053 8	0.054 9	0.098 3
F1A11	0.064 1	3.586 6	0.048 8	0.050 7	0.056 9
F4A10	0.064 5	3.764 9	0.049 9	0.051 4	0.049 9

2.10 识别内源性和外源性蛋白的鉴定

用得到的 FoxP3 单抗 F4B9 株作为一抗, 将真核表达质粒 pEGFP-C1-FoxP3 转染至 293T 细胞后, 收集细胞培养物的蛋白样品进行反应, 出现目的条带 (图 7A)。用获得的 FoxP3 单抗 F4B9 株作为一抗, 将猪脾脏、淋巴结及肺脏组织研磨裂解后, 收集蛋白样品进行反应, 出现目的条带 (图 7B), 在内源性蛋白中制备的单抗识别出 FoxP3 全长, 约 55 kDa, 符合预期。以上结果说明制备的 FoxP3 单抗既可识别 FoxP3 内源性蛋白, 也可识别 FoxP3 外源性蛋白。

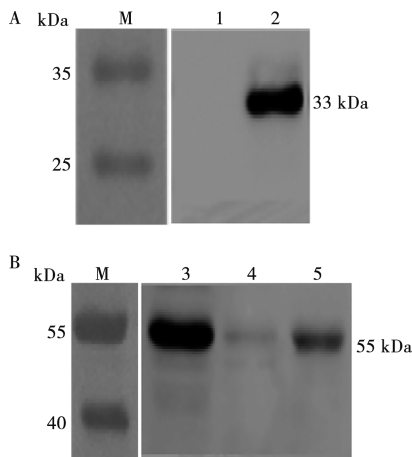


图 7 Western blot 分析外源 (A) 及内源 (B) FoxP3 蛋白与单克隆抗体反应性

图 7 Western blot 分析外源 (A) 及内源 (B) FoxP3 蛋白与单克隆抗体反应性

2.11 杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性鉴定

以间接 ELISA 检测传代培养后杂交瘤细胞分泌抗体的效价, 表 3 结果显示, 5 株杂交瘤细胞分泌的抗体效价稳定。

表 3 单抗稳定性鉴定结果 ($OD_{450\text{nm}}$)

单抗	传至 5 代	传至 20 代
F4B9	3.463 2	3.113 3
F4A9	3.688 0	3.842 2
F1E12	3.563 2	3.662 4
F1A11	3.874 5	3.820 5
F4A10	3.399 7	3.574 5
阴性	0.099 4	0.073 5

3 讨论

FoxP3 通过结合 GATA3、ROR γ t、Eos 和 RUNX1

等核因子调控 Treg 细胞的表达^[9-12]。它在 Treg 细胞的功能和分化等方面不可或缺, 并且能够直接调控很多基因的表达, 包括编码 FoxP3 的相关辅酶因子。FoxP3 也是天然型 Treg 细胞最可靠的分子标记, 为破译 Treg 细胞发育和功能的分子和遗传基础提供了线索^[13-14]。单克隆抗体具有特异性强、效价高、仅识别一个抗原上的单一表位等特点^[15], 现已广泛应用于病原检测、治疗致病机制及抗原性研究等方面^[16], 在疾病治疗、疫苗研制和临床诊断等方面具有很大的应用潜力^[17-18]。调节性 T 细胞作为自身耐受的重要组成部分, 其在自身免疫性疾病、移植、免疫系统中抑制病理免疫反应方面具有较大的影响^[19-21]。然而, 由于缺乏特异性的细胞表面标记物来定义和分离调节性 T 细胞, 相关其研究和应用一直受到阻碍。FoxP3 基因是 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞分化发育和功能维持的重要调控基因, 是其重要的转录因子, 是天然调节性 T 细胞的重要标记物^[22]。因此, 本研究制备了效价较高、特异性较强的猪源 FoxP3 蛋白抗体。

本试验利用原核表达系统成功制备并纯化了猪源 FoxP3 蛋白。为了能得到特异性较高的单克隆抗体细胞株, 免疫小鼠后选取血清效价最高的小鼠进行腹腔加强免疫和细胞融合, 因为此时小鼠体内的抗体水平较高, 易于筛选到高分泌的单克隆抗体细胞株。细胞融合是制备单克隆抗体的关键一步, 而影响细胞融合的因素很多。在细胞融合前 1 周, 复苏 SP2/0 细胞, 调整生长状态, 选择形态好、圆润、有光泽的细胞进行细胞融合。融合前 1 d, 制备好饲养细胞并铺于 96 孔板中, 铺板时需要进行细胞计数并控制好饲养细胞的密度。若铺设的饲养细胞密度过高, 易导致细胞融合时杂交瘤细胞在获取营养上竞争不过饲养细胞, 从而出现杂交瘤细胞死亡以及细胞融合失败的现象。诱导细胞融合的方法有很多, 如生物法 (病毒诱导细胞融合)、化学法 (PEG 诱导细胞融合)、物理法 (脉冲、激光法诱导细胞融合) 和细胞融合芯片法^[23], 其中以化学融合剂诱导融合中的 PEG 诱导细胞融合最为常用。本研究采用 PEG 诱导融合, 通过破坏细胞膜的磷脂双分子层, 使 SP2/0 细胞与脾细胞发生融合。在细胞融合时, PEG 处理时间尽量控制在 1 min 以内, 否则影响融合效率^[24]。杂交瘤细胞在早期很容易因抗体分泌不稳定, 在亚克隆过程中出现丢失现象, 因此筛选是十分重要的一环, 采用 ELISA、IFA 和 Western blot 多种方法进行多次筛选以排除假阳性^[25], 也避免了在筛选过程中因一种筛选方法而丢失具有荧光反应性的单抗。筛选到能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞后, 要对其进行扩大培养, 并进行传代及冻存, 每间隔 3 代进行 1 次检测, 以确保其

稳定性。

综上,本研究成功筛选出 5 株杂交瘤细胞,并制备出猪源 FoxP3 单克隆抗体,经过特异性分析和效价检测后得出 5 株杂交瘤细胞所分泌的抗体均比较稳定、特异性好且效价高。

参考文献:

- [1] 李浩然,姚丛,李珊珊,等. 调节性 T 细胞在调控抗结核免疫过程中的研究进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 45 (5): 502-509.
- [2] POWRIE F, LEACH M W, MAUZE S, et al. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice [J]. International Immunology, 1993, 5 (11): 1461-1471.
- [3] MAILER R K W. Alternative splicing of FOXP3—virtue and vice [J]. Front Immunol, 2018 (9): 530.
- [4] PETSIOU A, PASCHOU S A, VARTHOLOMATOS G, et al. A modified flow cytometry method for objective estimation of human CD4⁺ regulatory T cells (CD4⁺ Tregs) in peripheral blood, via CD4/CD25/CD45RO/FoxP3 labeling [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2020, 98 (3): 259-269.
- [5] SHIMIZU J, YAMAZAKI S, TAKAHASHI T, et al. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance [J]. Nature Immunology, 2002, 3 (2): 135-142.
- [6] 张朝莹,文兆海,张玥,等. 旋毛虫钙网蛋白对小鼠巨噬细胞和大鼠 PBMC 免疫功能的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2024, 47 (1): 1-8.
- [7] GONG Z, JIA H, XUE L, et al. The emerging role of transcription factor FOXP3 in thyroid cancer [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2022, 23 (3): 421-429.
- [8] KUMAR P, SAINI S, KHAN S, et al. Restoring self-tolerance in autoimmune diseases by enhancing regulatory T-cells [J]. Cellular Immunology, 2019, 339: 41-49.
- [9] WANG Y, SU M A, WAN Y Y. An Essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells [J]. Immunity, 2011, 35 (3): 337-348.
- [10] DU J, HUANG C, ZHOU B, et al. Isoform-specific inhibition of ROR α -mediated transcriptional activation by human FOXP3 [J]. Journal of Immunology, 2008, 180 (7): 4785-4792.
- [11] PAN F, YU H, DANG E V, et al. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4⁺ regulatory T cells [J]. Science, 2009, 325 (5944): 1142-1146.
- [12] ONO M, YAGUCHI H, OHKURA N, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1 [J]. Nature, 2007, 446 (7136): 685-689.
- [13] HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. Science, 2003, 299 (5609): 1057-1061.
- [14] CIPOLLETTA D. Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential [J]. Immunology, 2014, 142 (4): 517-525.
- [15] 徐梦蔚,宋武琦. 实验室水平单克隆抗体制备方法及相应纯化策略的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35 (2): 228-232.
- [16] 杨凯越,宋彩玲,李彤彤,等. 抗犬细小病毒单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2020, 52 (10): 54-58.
- [17] 任建委,小扎桑. 单克隆抗体技术的基本原理、改进及应用 [J]. 高原科学研究, 2018, 2 (4): 110-115.
- [18] 王志明,高健,李耿. 治疗性单克隆抗体药物的现状及发展趋势 [J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33 (6): 117-124.
- [19] 边飞,徐雯. 应用诱导型调节性 T 细胞进行细胞免疫治疗的最新研究进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2019, 42 (4): 422-426.
- [20] 杨露,全学军. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在同种异体移植免疫耐受中的研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27 (11): 1005-1012.
- [21] 金熙,李虹. 抗原特异性调节性 T 细胞的研究进展及其在临床中的应用前景 [J]. 华西医学, 2018, 33 (5): 616-622.
- [22] 郭净,王菊勇,郑展. 转录因子 Foxp3 与肺癌 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2011, 38 (9): 677-679.
- [23] 刘瑞芳,王傲泽. 优化 PEG 诱导鸡血细胞融合条件的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022 (2): 60-63.
- [24] 钱雯. 一种同时制备两种单克隆抗体的方法: ZL201911040763. 8 [P]. 2021-02-26.
- [25] 田开月,曲信芹,韩城昊,等. 禽腺病毒血清 4 型中国流行株 fiber2 蛋白单克隆抗体制备与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2023, 55 (11): 104-109.