

王兴童,孟兴,佟相慧,等. 主要组织相容性复合体单倍型鸭抗原处理相关转运体单抗的制备[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 200-207.

Wang XT, Meng X, Tong XH, et al. Preparation of a monoclonal antibody against transporter associated with antigen processing in MHC haplotype SPF ducks [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 200-207.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.012

# 主要组织相容性复合体单倍型鸭抗原处理 相关转运体单抗的制备

王兴童,孟兴,佟相慧,陈洪岩,韩凌霞\*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物与比较医学团队,兽医生物技术国家重点实验室,  
黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室,哈尔滨 150069)

【摘要】 目的 制备鸭抗原处理相关转运体(TAP)特异性单抗,为深入利用实验鸭开展免疫学研究提供实验材料。方法 利用大肠埃希菌诱导表达主要组织相容性复合体(MHC)单倍型HBW-SPF鸭TAP蛋白肽结合区片段,表达产物经镍柱纯化后免疫BALB/c小鼠,采用ELISA技术筛选特异性单抗分泌杂交瘤细胞株。将阳性细胞株制备小鼠腹水,作为一抗,与多次截短表达TAP蛋白肽结合区进行蛋白免疫印迹试验,鉴定单抗针对的抗原表位。通过间接免疫荧光试验比较该单抗对实验鸭和鸡外周血淋巴细胞的反应性,利用免疫组织化学技术检测对SPF鸡、SPF鸭、鹌鹑、鹅和SPF猪的特异性。结果 获得一株鸭TAP单抗1A6,抗原表位位于<sup>297</sup>NARHQLQQAVALDATAAGTMVVQEAI<sup>322</sup>,对鸡和鸭外周血淋巴细胞具有免疫荧光反应性;在鸡和鸭的肠黏膜固有层检测到大量特异性信号,在猪、鹌鹑和鹅没有检测到信号。结论 获得了一株具有鸡和鸭反应性的抗原转运相关体特异性的单抗,可运用于禽类实验动物在禽病学和禽免疫学方面的研究。

【关键词】 主要组织相容性复合体单倍型鸭;抗原处理相关转运体;单克隆抗体;特异性

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2019)02-0200-08

## Preparation of a monoclonal antibody against transporter associated with antigen processing in MHC haplotype SPF ducks

WANG Xingtong, MENG Xing, TONG Xianghui, CHEN Hongyan, HAN Lingxia\*

(Division of Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology,  
Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Heilongjiang Provincial Key  
Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin 150069, China)

Corresponding author: HAN Lingxia. E-mail: hanlingxia@caas.cn

【Abstract】 **Objective** A monoclonal antibody (Mab) against transporter associated with antigen processing (TAP) was prepared to study the function of TAP protein in the immunogenetics of ducks. **Methods** BALB/c mice were immunized with fused *Escherichia coli* expression products containing peptide-binding region of TAP protein of major histocompatibility complex (MHC) haplotype SPF ducks. Specific monoclonal antibodies were screened by ELISA, and truncated expression method was used to identify the antigenic epitope. An indirect immunofluorescence assay was used to compare the reactivity of Mab against the peripheral blood lymphocytes of ducks and chickens. Immunohistochemistry was used to identify the specificity of the Mab was detected against SPF chickens, SPF ducks, SPF pigs, common quails and geese. **Results** A duck TAP-specific monoclonal antibody was obtained and named as "1A6". The antigenic epitope against 1A6 was identified

【基金项目】黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2016006)。

Funded by Natural Science Foundation of Key Projects of Heilongjiang Province(ZD2016006)。

【作者简介】王兴童(1991—),女,硕士研究生,研究方向:兽医微生物和免疫学。Email: 827203295@qq.com

【通信作者】韩凌霞(1971—),女,副研究员。Email: hanlingxia@caas.cn

roughly at <sup>297</sup>NARHQMLQQAVLDATEAGTMVVQEAI<sup>322</sup> by a trimmed expressed fusion protein. Chicken and duck peripheral-blood lymphocytes were tested positive for 1A6 in this indirect immunofluorescence assay. Immunohistochemistry of the duodenum from SPF chickens, SPF ducks, SPF pigs, Corturnix and geese by 1A6 was undertaken. Specific strong signals in immunohistochemistry assay were detected in the duodenum of chickens and ducks, but not detected in the pigs, quails, geese or negative-control jejunum. **Conclusions** A monoclonal antibody specific to the TAP protein of chickens and ducks is obtained. It provides a useful material for studies of avian diseases and immunology of poultry.

**[Keywords]** major histocompatibility complex (MHC) haplotype duck; transporter associated with antigen processing; TAP; monoclonal antibody; specificity

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

抗原处理相关转运体(transporter associated with antigen processing, TAP)是由 TAP1 和 TAP2 亚基形成的异二聚体跨膜转运蛋白,负责将内源性抗原肽转运给主要组织相容性抗原(major histocompatibility complex, MHC) I 类分子,最终引发细胞免疫应答<sup>[1-2]</sup>。Tap 基因位于多种动物基因组的 MHC 核心区域,鸡<sup>[3]</sup>和鸭<sup>[4]</sup>的 Tap 基因均与 MHC I 类分子毗邻。Tap 基因具有高度多态性,是影响机体免疫遗传学特征的关键分子,例如不同人群对黑色素瘤<sup>[5]</sup>或鼻咽癌<sup>[6]</sup>的易感性可能与 Tap 基因的等位基因型相关。

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)鸭是目前国内唯一的水禽类实验动物,经过分子遗传学分析<sup>[7]</sup>、组织学分析<sup>[8]</sup>、疫病敏感性试验<sup>[9]</sup>、群体遗传学<sup>[10]</sup>、解剖学数据测定<sup>[11]</sup>和生理生化数据<sup>[12]</sup>等多项生物学特性测定,性能稳定,已广泛用于水禽病的致病机理和防控措施研究。MHC 单倍型是国际上培育近交系禽类动物的主要靶基因<sup>[13]</sup>。其中,以 tap1 和 tap2 基因组序列纯合子为基础选育出的 4 个单倍型 SPF 鸭品系——命名为 HBW-B1、B2、B3 和 B4<sup>[14]</sup>,是研究水禽病中 TAP-MHC I 类分子途径相关免疫遗传机制的良好实验材料。

为了有利于深入研究 TAP 蛋白在抗病毒感染中的作用,本研究以 HBW-B2 系 TAP2 蛋白的肽结合区原核表达产物为免疫原<sup>[15]</sup>,制备特异性单抗,并分析其与其他常见农业实验动物的免疫学反应特异性,以期在水禽病免疫遗传学研究提供材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SP2/0 骨髓瘤细胞由本实验室保存;表达鸭 TAP2 蛋白肽结合区(PBD)保守区域的重组质粒 pET-TAP2PBD 以 pET-30a 为载体,插入了 HBW-B2 鸭的 TAP2 PBD,由本课题组构建<sup>[15]</sup>;SPF 级

BALB/c 雌鼠购自辽宁长生生物技术有限公司【SCXK(辽)2015-0001】,封闭群 HBW-SPF 鸭(2 周龄麻鸭和封闭群 BWEL-SPF 鸡(8 周龄,白来航鸡)【SCXK(黑)2017-005】以及封闭群 SPF 长白猪由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供【SCXK(黑)2015-004】;无异常临床症状的鹌鹑和鹅购自农贸市场。SPF 鸡和鸭的外周血由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所【SCXK(黑)2011-007】提供;鹌鹑、鹅和猪的组织学样品由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物感染实验设施实施【SYXK(黑)2017-009】;十二指肠组织的石蜡切片制备和免疫组化检测由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所病理组完成。动物实验的福利与伦理审批号为 IACUC-2017-0056。

#### 1.1.2 试剂

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(IgG-HRP)、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(IgG-FITC)抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;IR Dye 800CW 标记的驴抗小鼠 IgG 抗体购自 LI-COR 公司;SBA Clonotyping System-HRP Kit 购自 Southern Biotech 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物免疫

以终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达含有重组质粒 pET-TAP2PBD 的大肠埃希菌 BL21(DE3)。表达产物经镍柱纯化,再用 100 mmol/L 咪唑纯化。纯化后的蛋白样品送上海启研生物科技有限公司进行质谱鉴定。经 SDS-PAGE 电泳。0.25 mol/L KCL 溶液染色后,切下含有外源蛋白的胶条,碾碎。腹腔注射 7 周龄 BALB/c 雌性小鼠,每隔 1 周免疫。第 3 次免疫后 1 周加强免疫,按常规方法与 SP2/0 细胞融合、筛选并扩大培养。

#### 1.2.2 杂交瘤细胞筛选、腹水的制备及亚型鉴定

利用纯化的 TAP 蛋白包被 ELISA 板,采用间接 ELISA 法筛选对 TAP 蛋白有强反应性的阳性杂交

瘤细胞。对稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞三次克隆化,筛选稳定表达细胞株。取 10 周龄雌性 BALB/c 小鼠,腹腔注射液体石蜡 0.5 mL/只,7 d 后腹腔注射 0.5 mL 含  $10^5$  个对数生长期的单克隆阳性细胞。每天观察 2 次,及时采集腹水。将腹水 10 000 r/min 离心 5 min,取上清,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。根据 SBA Clonotyping System-HRP Kit 产品说明书,对腹水中的抗体分子进行重链和轻链亚型的鉴定。

### 1.2.3 单抗的 Western blot 鉴定

将 IPTG 诱导前、后的 TAP2 PBD 原核表达产物及 pET-30a 空载体转化菌进行 SDS-PAGE 电泳,半干法转印至硝酸纤维素膜。5% 脱脂乳封闭。以 1A6 腹水(1:100 稀释)为一抗,室温作用 1 h, PBST 洗涤 3 次,5 min/次;以 IR Dye 800CW 标记驴抗小鼠 IgG(1:8000 稀释)为二抗,室温于摇床上避光作用 45 min, PBST 洗涤 3 次,5 min/次。使用奥德赛红外扫描仪显色。

### 1.2.4 单抗对鸡和鸭外周血淋巴细胞的间接免疫荧光抗体试验(IFA)试验

翅静脉分别采集鸡和鸭抗凝血 2 mL,分别用鸡外周血淋巴分离液和鸭外周血淋巴分离液分离淋巴细胞。将分离到的细胞分散到 96 孔细胞板,用 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 洗涤,1000 g 离心 10 min,弃上清。用含 0.1% Triton 100 的 PBS 重悬细胞,  $37^{\circ}\text{C}$  作用 10 min。2000 r/min 水平离心 5 min,弃上清。洗涤 3 次。以 1:100 稀释的腹水为一抗,  $37^{\circ}\text{C}$  作用 1 h。同上洗涤三次。以 1:200 稀释的 FITC 标记山羊抗鼠 IgG 为二抗,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 40 min。洗涤三次。用 200  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞,适量分散于 96 孔细胞板,倒置荧光显微镜观察。

### 1.2.5 不同农业实验动物的免疫组化检测

将 BWEL-SPF 鸡、HBK-SPF 鸭、SPF 长白猪、市售鹌鹑和鹅的十二指肠石蜡组织切片,置于甲醇和 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的缓冲液中去除内源性过氧化物酶,8% 脱脂乳溶液封闭。以 1A6 腹水(1:10)为一抗,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。用 SPF 级 BALB/c 小鼠血清检测 SPF 鸭为阴性对照。次日用 TBS 缓冲液洗涤,以山羊抗鼠 IgG-HRP(1:400)为二抗,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。洗涤,于含  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 DAB 显色液中显色,光学显微镜观察。

### 1.2.6 单抗对鸭肠组织的免疫电镜检测结果

实验材料为 3 周龄 HJD-SPF 鸭免疫鸭瘟疫苗后感染强毒 CSC 株的大肠组织,由本团队赵丽丽老师和牛银杰博士惠赠,免疫电镜的检测由本单位电

镜组完成。简言之,将大肠组织用 2.5% 戊二醛固定 2 h,用 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 15 min。加入 1% 锇酸于  $4^{\circ}\text{C}$  固定 2 h;再次漂洗 3 次;用 50%、70%、90% 和 100% 丙酮于  $4^{\circ}\text{C}$  各脱水 15 min,最后室温脱水 10 min。加入 Epon812 树脂,室温浸透过夜,包埋。 $80^{\circ}\text{C}$  聚合 48 h 后修片,切片厚度为 50~70 nm。醋酸铀 15 min 和柠檬酸铅 10 min 分别染色,室温干燥后观察。用以 1A6 腹水(1:10)为一抗,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。1:200 稀释的 FITC 标记山羊抗鼠 IgG 为二抗,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h。透射电子显微镜(日立 H-7650)观察。

### 1.2.7 单抗抗原表位的鉴定

根据 NCBI 登录的鸭 *Tap2* 基因组序列(MH209635),设计合成三对引物,以 pET-TAP2PBD 质粒为模板,分别 PCR 扩增 *Tap2* 的 1-198、148-327 和 241-429 核苷酸片段,克隆入原核表达载体 pET-32a,诱导表达 TAP2 蛋白的 A<sup>1</sup>-K<sup>66</sup>、F<sup>50</sup>-L<sup>109</sup> 和 F<sup>81</sup>-V<sup>143</sup> 三段。利用 TAP 单抗腹水分别进行 Western blot 分析。根据反应结果,再将 1-198 核苷酸片段按 1-75、46-123 和 94-198 分别扩增、克隆,诱导表达 A<sup>1</sup>-A<sup>25</sup>、N<sup>16</sup>-I<sup>41</sup> 和 G<sup>32</sup>-K<sup>66</sup> 三段,再次进行 Western blot 分析。所用引物序列见表 1。具有 Western blot 反应性的最小氨基酸片段,作为抗原表位。

### 1.2.8 抗原表位序列分析

对得到的表位氨基酸序列与 NCBI 数据库进行 BLAST,并分析序列同源性。

## 2 结果

### 2.1 TAP2 单克隆杂交瘤细胞的筛选、腹水的制备及亚型鉴定

将纯化、回收的 TAP 重组蛋白,经质谱鉴定结果表明,根据 Mascot 算法,得分从 94(EOA93744.1) - 46(XP\_012955427.1) 的蛋白共有 6 个,分值最高的是鸭 TAP2 蛋白序列(AKN20813.1),达 106,均为绿头鸭 TAP2 蛋白序列。经过优化,确定 ELISA 方法的蛋白最佳包被浓度为 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , OD450 值大于等于 1.0 为阳性细胞株。经 3 次亚克隆,获得单克隆杂交瘤细胞株 1A6。腹水的亚型鉴定试剂盒检测结果分别为 IgA 0.224, IgG1 0.246, IgG2a 0.151, IgG2b 0.157, IgM 1.638, lambda 0.176, Kappa 0.7, 因此确定 1A6 重链为 IgM 型,轻链为 Kappa 链。

表 1 表位鉴定所用引物序列

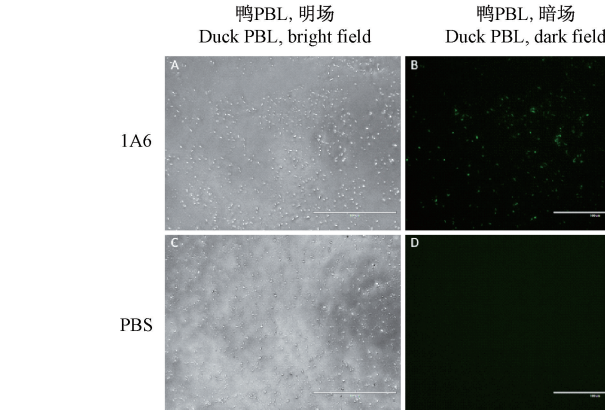
| Table 1 Primer sequences used for epitope identification |                                               |                                     |                                   |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 引物名称<br>Primer names                                     | 引物序列(5'-3')<br>Primer sequences               | 碱基位置(nt)<br>Location of nucleotides | 氨基酸位置<br>Location of amino acids  |
| TAP2F1                                                   | GGAATTCGCGCTGCTTGAGGTGCCCCCTT( <i>Eco</i> RI) | 1-198                               | A <sup>1</sup> -K <sup>66</sup>   |
| TAP2R1                                                   | CCGCTCGAGCTTGGTCACTGCCTGGCCGTA( <i>Xho</i> I) |                                     |                                   |
| TAP2F2                                                   | GGAATTCCTTCGCTGGGGAGGAGAGGAA( <i>Eco</i> RI)  |                                     |                                   |
| TAP2R2                                                   | CCGCTCGAGGAGGCTCCCTCACGGAGCTG( <i>Xho</i> I)  | 148-327                             | F <sup>50</sup> -L <sup>109</sup> |
| TAP2F3                                                   | GGAATTCCTTCCTCCTCATCCGGCGGCA( <i>Eco</i> RI)  |                                     |                                   |
| TAP2R3                                                   | CCGCTCGAGTTACACATTGCTCAGCAGGTC( <i>Xho</i> I) |                                     |                                   |
| TAP2F4                                                   | GGAATTCGCGCTGCTTGAGGTGCC( <i>Eco</i> RI)      | 1-75                                | A <sup>1</sup> -A <sup>25</sup>   |
| TAP2R4                                                   | CCGCTCGAGGGCCTGCTGCAGCATCTG( <i>Xho</i> I)    |                                     |                                   |
| TAP2F5                                                   | GGAATTCATGCCCCGGCACCAGATG( <i>Eco</i> RI)     |                                     |                                   |
| TAP2R5                                                   | CCGCTCGAGGATGGCCTCCTGCGCC( <i>Xho</i> I)      | 46-123                              | N <sup>16</sup> -I <sup>41</sup>  |
| TAP2F6                                                   | GGAATTCGGCACTGGGATGGTGGC( <i>Eco</i> RI)      |                                     |                                   |
| TAP2R6                                                   | CCGCTCGAGCTTGCTCAGTGCCTGGCC( <i>Xho</i> I)    |                                     |                                   |

2.2 单抗的 Western blot 检测

以 1A6 为一抗,对 pET-TAP2PBD 表达蛋白进行 Western blot 检测。见图 1, SDS-PAGE 结果显示,与诱导的 pET-30a 载体菌蛋白(1)和未诱导的重组菌蛋白(3)相比,重组菌在 22×10<sup>3</sup> 处出现明显外源条带(2),分子量 22×10<sup>3</sup>,大小与理论值符合。Western blot 检测结果表明,腹水能特异性地与重组菌诱导蛋白反应(2),与载体对照菌(1)和未诱导重组菌无特异性反应(3)。

2.3 对鸭和鸡外周血淋巴细胞的 IFA 结果

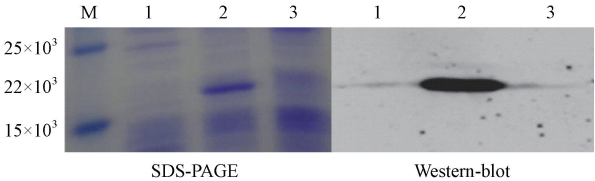
对鸭和鸡外周血淋巴细胞的 IFA 检测结果显示,在明场下观察,同视野中的细胞数量和形态较好;在暗视野下,1A6 可以在两种淋巴细胞上检测到特异性绿色荧光,荧光强度没有明显差异;PBS 对两种细胞都没有显色。见图 2。



注:A, B:1A6 检测鸭 PBL;C, D: PBS 检测鸭 PBL;E, F:1A6 检测鸡 PBL;G, H: PBS 检测鸡 PBL。

图 2 外周血淋巴细胞 IFA 检测结果

Notes. A, B: Duck peripheral blood lymphocytes tested with 1A6; C, D: Duck peripheral blood lymphocytes tested with PBS; E, F: Chicken peripheral blood lymphocytes tested with 1A6; G, H: Chicken peripheral blood lymphocytes tested with PBS.



注:M: 蛋白质标准;1. 诱导的 pET-30a;2. 诱导的重组菌;3. 未诱导的重组菌。

图 1 pET-TAP2PBD 重组菌 Western blot 检测结果

Note. M: Protein marker. 1, Induced pET-30a bacteria. 2, Induced pET-TAP2PBD recombinant bacteria. 3, Non-induced pET-TAP2PBD bacteria.

Figure 1 Western blot analysis of pET-TAP2PBD recombinant bacteria

2.4 不同动物的免疫组化检测

1A6 对 SPF 鸭、SPF 鸡、鹌鹑、鹅和猪十二指肠组织的石蜡切片的免疫组化检测结果显示,在鸭

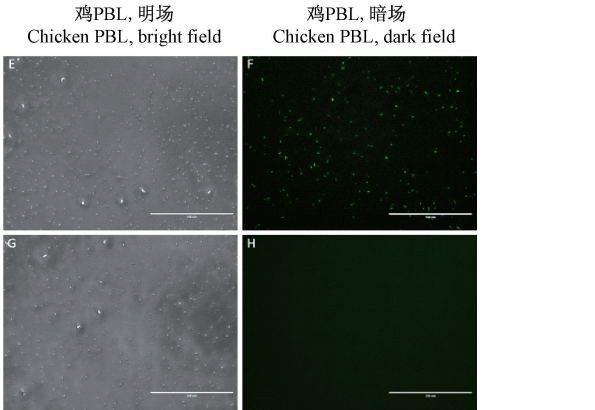
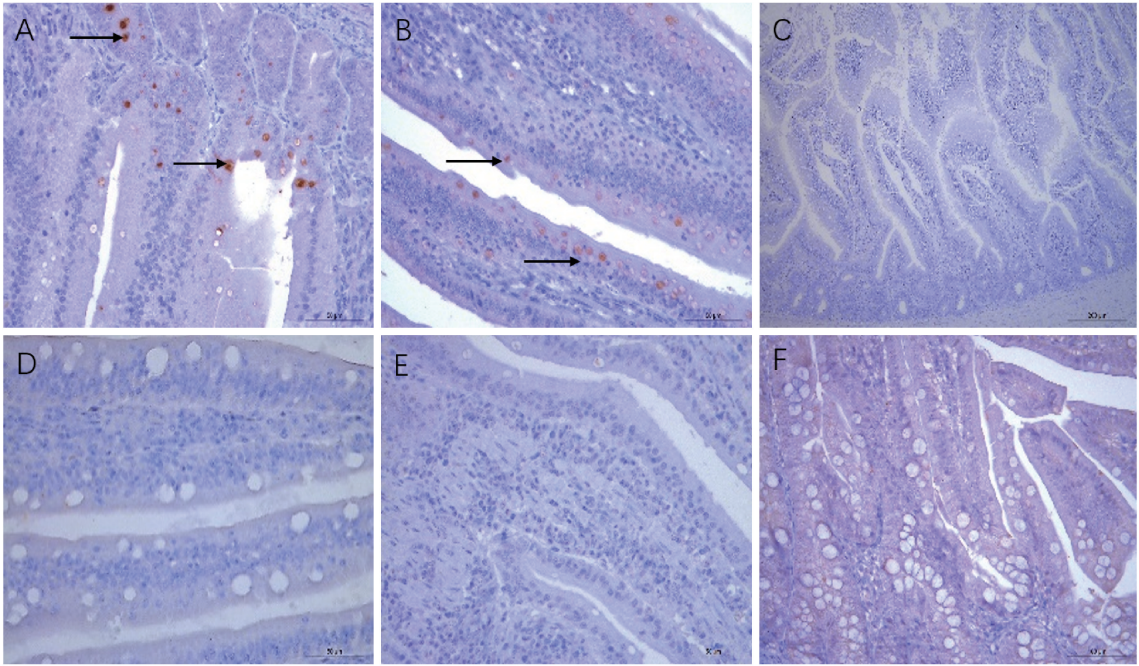


Figure 2 IFA results of peripheral blood lymphocytes

(图 3A)和鸡(图 3B)肠道的固有层检测到强特异性信号,与鹌鹑(图 3D)、鹅(图 3E)和 SPF 猪(图 3F)未出现特异性显色,用 SPF 小鼠血清检测鸭组织作为对照(图 3C)。

2.5 鸭瘟免疫攻毒鸭的免疫电镜检测结果

免疫电镜结果显示,正常鸭和免疫攻毒组鸭大肠组织细胞内均可明显检测到特异的金颗粒,如箭头所示,主要分布在内质网,少量表达在核膜和核内靠近核孔的部位。受到病原刺激的鸭肠组织中金颗粒的数量明显多于正常鸭。见图 4。



注:A:鸭;B:鸡;C:鸭;D:鹌鹑;E:鹅;F:猪。A、B、D、E和F以1A6为一抗,C以小鼠血清为一抗。箭头表示阳性反应位置。

图 3 1A6 对不同农业动物十二指肠的免疫组化检测结果

Notes. A, Duck; B, Chicken; C, Duck; D, Coturnix; E, Goose; F, Swine. A, B, D, E, F were detected using 1A6 as primary antibody. C was used SPF mice serum. Arrows indicate the sites of positive reaction.

Figure 3 Immunohistochemical results of 1A6 in the duodenal tissue of different agricultural animals

2.6 1A6 针对的 TAP2 PBD 抗原表位的鉴定

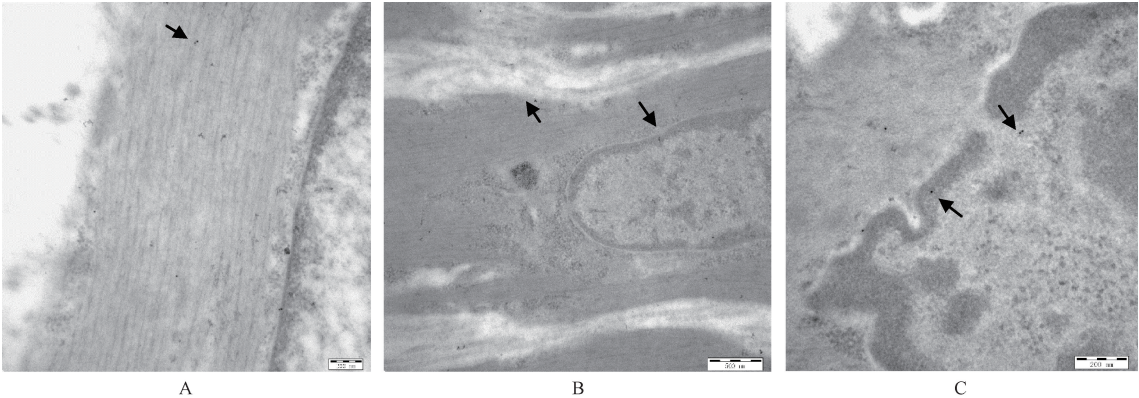
将 TAP2 的 PBD 区域截短为相互重叠的 3 段分别表达,共截短 2 次。SDS-PAGE 结果表明,除 F<sup>81</sup>-V<sup>143</sup>以外,其余片段均成功表达(图 5A 和 5C)。Western blot 分析结果表明,1A6 只与 A<sup>1</sup>-K<sup>66</sup>(图 5B)和 N<sup>16</sup>-I<sup>41</sup>(图 5D)发生特异性反应,其余表达产物均无特异性显色条带。

2.7 表位序列分析

将 2.6 获得的 1A6 所针对鸭 TAP2 表位序列与 NCBI 登录的其他禽类进行 Blast 分析,结果表明,该表位与所有登录的鸭(*Anas platyrhynchos*)序列同源性介于 100% (AAQ62605.1) - 92% (AAZ30019.1) 之间,与家鹅(*Anser cygnoides domesticus*)和山齿鹑(*Colinus virginianus*)的同源性分别为 96% 和 77%,与日本鹌鹑(*Coturnix*

*japonica*)、火鸡(*Meleagris gallopavo*)、红腹锦鸡(*Chrysolophus pictus*)、黑琴鸡(*Lyrurus tetrix*)、金雕加拿大亚种(*Aquila chrysaetos canadensis*)、帝企鹅(*Aptenodytes forsteri*)以及所有 MHC-B 单倍型鸡[B2 (BAG69301.1)、B5 (BAG 69315.1)、B6 (BAG 69329.1)、B9(BAG69357.1)、B13(BAG 69399.1)、B14(AEE25622.1)、B15(BAG 69412.1)、B17(BAG 69426.1)、B19 (BAG 69440.1)、B23 (BAG 69466.1)、B24(BAG 69480.1)]和不同品系的来航鸡的序列同源性均为 69%,与杜洛克猪(*Sus scrofa*, XP\_020954031.1)的同源性为 53%。进化树见图 6。

另外,通过 Mega.alin 分析软件,将表位序列与 HBW-B1、B3 和 B4 鸭的同源序列比对,结果氨基酸同源性分别为 97.0%、97.2%、96%。

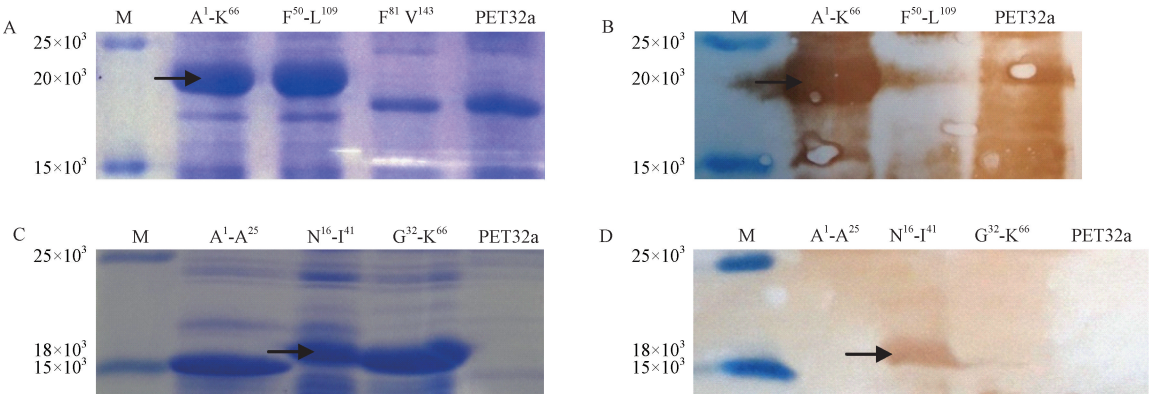


注: A. 免疫-攻毒鸭肠壁细胞的内质网; B. 正常鸭肠组织细胞的细胞核和内质网; C. 免疫-攻毒鸭肠壁细胞的细胞核。箭头表示免疫金颗粒。

图 4 免疫电镜结果

Note. A. Endoplasmic reticulum of duck intestinal wall cells in the immune-challenge group. B. Nucleus and endoplasmic reticulum of normal duck intestinal tissue cells. C. Nucleus of intestinal endothelium cell in the immune-challenged duck. Arrows indicate immunogold particles.

Figure 4 Immunoelectron microscopy results of 1A6



注: 箭头表示特异性反应位置。

图 5 1A6 表位鉴定的 Western blot 结果

Note. Arrows indicate specific reaction.

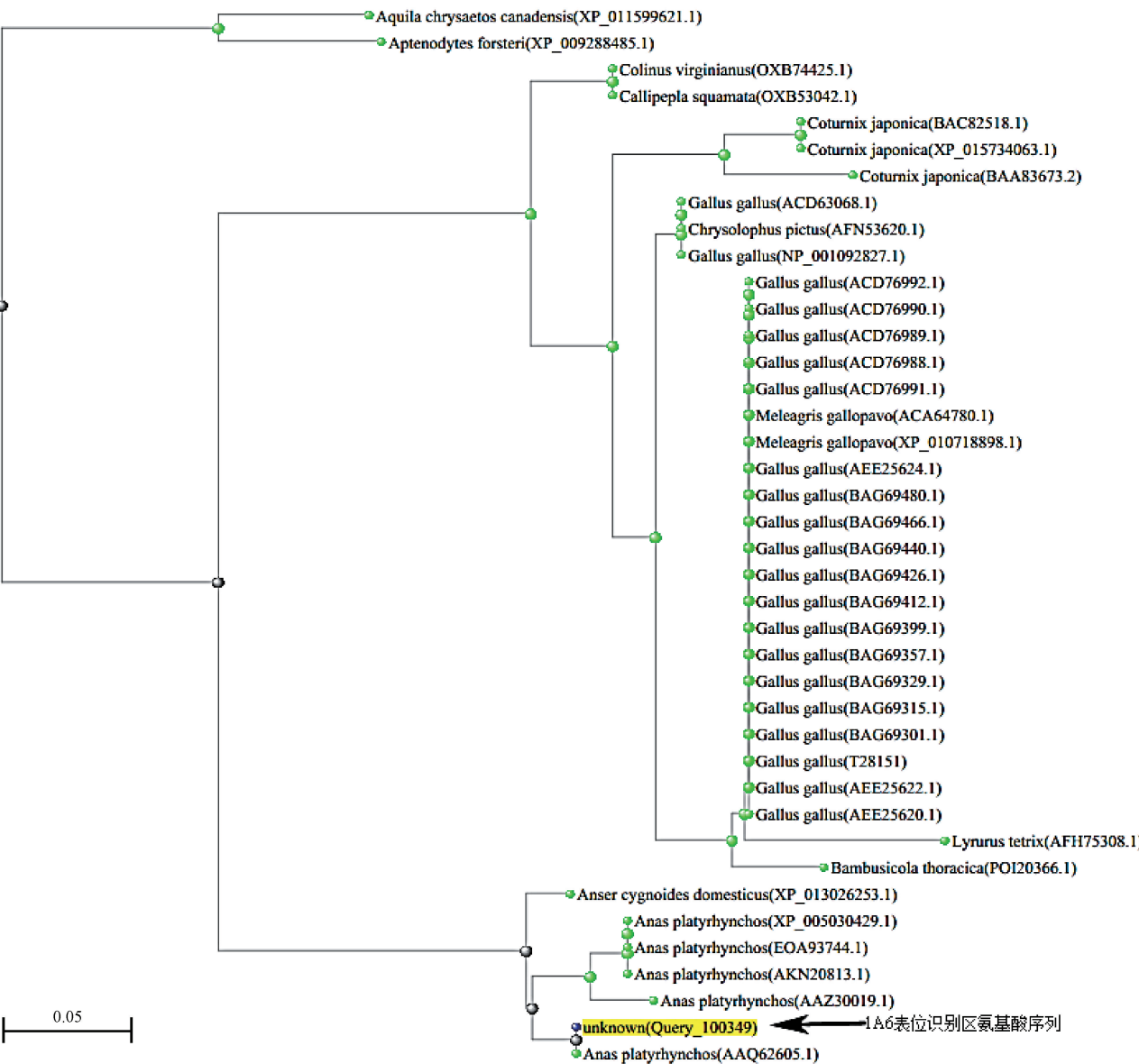
Figure 5 Results of epitope identification of 1A6

3 讨论

随着近年来国家对实验动物学科建设和行业发展的不断重视,我国实验动物种质资源得到迅猛发展,树鼯、长爪沙鼠、多种鱼类和鸭等动物品种品系实现了标准化。在这些新型实验动物资源逐步向生命科学领域深入服务支撑的过程中,一个有别于传统实验动物资源的瓶颈问题愈加凸显,即缺乏新资源所特异性的免疫学分子的检测试剂。SPF 级鸭的研究面临同样的问题。

目前已经培育成功以绍兴麻鸭为基础的 MHC 单倍型 HBW/B1、HBW/B2、HBW/B3 和 HBW/B4 等 4 个 SPF 鸭品系,以金定麻鸭为基础的

4 个封闭群家系,全部饲养于屏障环境或隔离环境。随着 T/CALAS 18-2017 “实验动物 SPF 鸭微生物学监测总则”等实验鸭病原学、遗传学、配合饲料、饲养管理等质量相关的中国实验动物学会团体标准的实施,在中国实验动物信息网数据库发布的实验鸭生物学特性数据越来越丰富,SPF 鸭的应用也越来越广泛。截止 2017 年底,已面向全国提供了 7.3 万枚鸭胚、1.2 万羽雏鸭和 2.3 万毫升鸭血,取得了良好的社会效益和经济效益。然而,由于商品化的鸭免疫学检测试剂的缺乏,使利用 SPF 鸭开展的禽病分子机制研究局限在非常窄的范围。例如,已知 TAP 蛋白负责将病毒感染细胞或肿瘤细胞内的内源性抗原肽转运给经典 MHC I 类分子复合物,



注:箭头表示 1A6 表位识别的氨基酸序列

图 6 1A6 识别的表位序列不同禽类种属间的进化树

Note. Arrow indicates the antigenic epitope against 1A6.

Figure 6 Distance tree of the epitope among various poultries

多种哺乳动物疱疹病毒通过抑制或阻碍 TAP 路径实现免疫逃避<sup>[16-17]</sup>,而鸭疱疹病毒尚无这方面的报道,缺乏特异性的检测试剂无疑是瓶颈之一。

TAP 蛋白在进化过程中具有保守性,人、猪、牛以及小鼠的氨基酸同源性达到 70%~80%<sup>[18]</sup>。本课题组前期利用商品化的人 TAP 和小鼠 TAP 试剂盒检测对鸭 TAP 蛋白的反应性,结果不能满足实验要求。本研究利用鸭 TAP 蛋白的肽结合区保守区域作为免疫原,获得单抗 1A6。免疫印迹结果表明单抗针对的抗原表位序列同源性自高向低依次为家鹅(96%)、鸡(69%)、日本鹌鹑(69%)和猪

(53%),实验检测结果表明 1A6 只对 SPF 鸡有 IFA 和免疫组化反应性,对鹅、猪和鹌鹑的肠组织均为阴性。鹅和鸡的表位同源性分析与实验检测结果不符,可能是因为提供序列数据或检测的动物的个体遗传差异造成的。

为了确证 1A6 的特异性,本研究利用受到免疫应答刺激的鸭组织(鸭瘟疫苗免疫后再攻击强毒),选取肠道黏膜进行了免疫电镜检测,结果在细胞内的内质网上观察到明显的金颗粒,与 TAP 蛋白主要在内质网膜表达和发挥功能相符合,而且受刺激的鸭组织细胞内金颗粒数量比未受刺激的正常鸭分

布更多,也说明 TAP 蛋白的表达量受到上调。本研究在细胞核的核膜内和核内核孔处检测到了 TAP 蛋白,这在现有的文献中尚未见报道,究竟有何生物学意义值得深入探究。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Parham P, Moffett A. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction and human evolution [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(2): 133-144.
- [ 2 ] Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(1): 47-59.
- [ 3 ] Kaufman J, Milne S, Göbel TW, et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex [J]. Nature, 1999, 401(6756): 923-925.
- [ 4 ] Moon DA, Veniamin SM, Parks-Dely JA, et al. The MHC of the duck (*Anas platyrhynchos*) contains five differentially expressed class I genes [J]. J Immunol, 2005, 175(10): 6702-6712.
- [ 5 ] Kamarashev J, Ferrone S, Seifert B, et al. TAP1 down-regulation in primary melanoma lesions: an independent marker of poor prognosis [J]. Int J Cancer, 2001, 95(1): 23-28.
- [ 6 ] Vitale M, Rezzani R, Rodella L, et al. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions [J]. Cancer Res, 1998, 58(4): 737-742.
- [ 7 ] Matschulla T, Berry R, Gerke C, et al. A highly conserved sequence of the viral TAP inhibitor ICP47 is required for freezing of the peptide transport cycle [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2933.
- [ 8 ] 肖兵兵,韩凌霞,于海波,等. 无特定病原体 HBK-B 和 HBK-Q 种鸭的遗传多样性分析 [J]. 中国家禽, 2008, 30(18): 23-26.  
Xiao BB, Han LX, Yu HB, et al. Genetic diversity of specific pathogen free HBK-B and HBK-Q duck populations [J]. China Poultry, 2008, 30(18): 23-26.
- [ 9 ] 李淑兰,韩凌霞,甄靓靓,等. 40 周 HBK-SPF 鸭胃肠道 5-羟色胺细胞的免疫组织化学定位 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(01): 27-29.  
Li SL, Han LX, Zhen LL, et al. Immunohistochemical localization of 5-HT cells in gastrointestinal tract of HBK-SPF ducks of 40 weeks old [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(01): 27-29.
- [ 10 ] 牛成明,韩凌霞,司昌德,等. 鸡源 REV 对 HBK-SPF 雏鸭的感染试验 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(09): 738-740.  
Niu CM, Han LX, Si CD, et al. Experimental infection of HBK-SPF ducks by avian reticuloendotheliosis virus [J]. Chin J Prev Vet Med, 2009, 31(09): 738-740.
- [ 11 ] 韩凌霞,武永淑,吴少莲,等. HBK-SPF 鸭 MHC I 区域微卫星标记分析 [J]. 实验动物科学, 2015, 32(3): 6-9.  
Han LX, Wu YS, Wu SL, et al. Analysis of microsatellite markers in MHC I region of HBK-SPF duck [J]. Lab Anim Sci, 2015, 32(3): 6-9.
- [ 12 ] 韩凌霞,刘霄磊,蔡文博,等. HBK-SPF 鸭主要解剖数据的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(04): 66-69.  
Han LX, Liu XL, Cai WB, et al. Determination of values of anatomical parameters in HBK-SPF ducks [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(04): 66-69.
- [ 13 ] 韩凌霞,刘霄磊,蔡文博,等. HBK-SPF 鸭生理生化指标的测定 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(02): 44-46.  
Han LX, Liu XL, Cai WB, et al. Determination of values of physiological and biochemical parameters in HBK-SPF ducks [J]. Lab Anim Sci, 2011, 28(02): 44-46.
- [ 14 ] 武永淑. HBK-SPF 鸭 MHC 单倍型筛选及其 TAP 基因的生物信息学分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.  
Wu YS. MHC haplotype screening of HBK-SPF duck and bioinformatics analysis of TAP gene [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2013.
- [ 15 ] 张晓娜,吴少莲,文辉强,等. 鸭抗原相关转运体 TAP1 和 TAP2 原核表达及多克隆抗体的制备 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, (11): 40-43.  
Zhang XN, Wu SL, Wen HQ, et al. Prokaryotic expressions and polyclonal antibody preparations of duck transporter associated with antigen processing (TAP) 1 and TAP 2 [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2015, (11): 40-43.
- [ 16 ] Wu Y, Wang J, Fan S, et al. Structural definition of duck major histocompatibility complex class I molecules that might explain efficient cytotoxic T lymphocyte immunity to influenza A virus [J]. J Virol, 2017, 91(14): pii: e02511-16.
- [ 17 ] Praest P, Luteijn RD, Brakboer I, et al. The influence of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms on TAP function and its inhibition by viral immune evasion proteins [J]. Mol Immunol, 2018, 101: 55-64.
- [ 18 ] 王兴童,陈洪岩,韩凌霞. 抗原处理相关转运体基因多态性与疾病相关性的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(3): 252-256.  
Wang XT, Chen HY, Han LX. Advances in research on relationship between transporter associate with antigen processing gene polymorphism and diseases [J]. Lab Anim Comp Med, 2017, 37(3): 252-256.

[收稿日期] 2018-10-30