ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

抗猪 SIgA 单克隆抗体的制备及纯化操作规程

Operating procedures of anti-SIgA monoclonal antibody preparation and purification

征求意见稿

中国兽医协会
CVMA

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

前　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

引　言

分泌型免疫球蛋白 A（secretory immunoglobulin A，SIgA）是参与黏膜免疫反应的主要效应因子，是机体免疫系统中的重要组成部分，在黏膜免疫中发挥着重要作用。

SIgA 是由 2 个单体 IgA、J 链和分泌片（SC）组成。SC 由黏膜上皮细胞和外分泌腺产生，是 SIgA 的特有成分，是区分 IgA 和 SIgA 的标志。当前，SIgA 的检测在动物疫病（如：猪流行性腹泻、猪气喘病、鸡新城疫、传染性法氏囊、鸭瘟等）的早期诊断和疫苗使用效果评估上都具有很大的应用价值。但是国内尚缺乏针对 SIgA 的检测试剂。且采用直接提取的方式获得的 SIgA 在纯度上和含量上均难以满足临床需求，本文件针对猪源 SIgA 的特有成分 SC 基因进行原核表达载体的构建，通过 pET32a-SC 蛋白的表达、纯化及细胞融合技术及免疫荧光技术等的应用，获得抗猪 SIgA 单克隆抗体。通过抗猪 SIgA 抗体浓度的标定，可以实现对动物血清、粪样或鼻腔粘液等样本中 SIgA 含量的测定。也可以通过 HRP 标记、FITC 标记等方式实现待检样品中 SIgA 定性分析，以满足临床上猪常见的呼吸道、胃肠道类疫病的诊断及应用。

中国兽医协会
CVMA

抗猪 SIgA 单克隆抗体的制备及纯化操作规程

1 范围

本文件规定了利用 Balb/c 雌性小鼠（SPF 级）进行抗猪 SIgA 单克隆抗体的制备、纯化的要求。

本文件适用于抗猪 SIgA 单克隆抗体的制备及纯化。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 14925 实验动物 环境及设施

GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

B 淋巴细胞 B lymphocytes

B 淋巴细胞简称 B 细胞，是由造血干细胞发育而来。通过分化，未发育成熟的 B 细胞迁移出骨髓进入脾脏、淋巴结等外周淋巴器官，进一步发育为成熟的 B 细胞，成熟的 B 细胞遇到抗原的刺激后，激活、分化为浆细胞，浆细胞可合成和分泌抗体。

3.2

饲养细胞 feeder cells

在体外的细胞培养过程中，单个的或数量很少的细胞不容易生存，必须加入其它活的细胞才能使其生长繁殖，加入的细胞即为饲养细胞。

3.3

小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞 mouse myeloma Sp2/0 cells

小鼠骨髓瘤细胞的一种，最初都来源于由矿物油诱导 Babl/c 小鼠产生的浆细胞瘤，在体外经 8-氮杂鸟嘌呤培养和筛选后，获得嘌呤核苷酸补救合成途径中酶缺陷的克隆（HGPRT-），同时也不分泌免疫球蛋白的重链或轻链。这些骨髓瘤细胞在培养基中可以连续生长，在选择试剂存在的情况下，核苷酸的从头合成途径被这些试剂阻断，这些缺乏 HGPRT 酶的杂交瘤细胞由于不能使用核酸合成补救合成途径而无法生存[1]。

3.4

中国兽医协会 CVMA

SIgA secretory immunoglobulin A

一种由 2 个 IgA 单体、一条 J 链和一条分泌片（SC）构成的复合物，是黏膜表面主要的免疫球蛋白。

3.5

抗猪 SIgA 单克隆抗体 monoclonal antibody against porcine SIgA

采用细胞杂交技术，使经猪源 SIgA 相关蛋白免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后，经过筛选，获得抗猪 SIgA 的单克隆抗体。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

SIgA：分泌型免疫球蛋白 A（Secretory immunoglobulin A）

抗 SIgA 抗体：抗猪 SIgA 单克隆抗体（Monoclonal antibody against porcine SIgA）

SPF：无特定病原（Special pathogen free）

DMEM：细胞培养基（Dulbecco's Modified Eagle Medium）

ELISA：酶联免疫吸附测定法（Enzyme-linked immunosorbent assay）

IFA：免疫荧光试验（Immunological fluorescence Assay）

IPMA：免疫过氧化物酶单层细胞试验法（Immunoperoxidase monolayer assay）

Sf9 细胞：草地贪夜蛾细胞（Spodoptera frugiperda cells）

rBV-SC：重组杆状病毒 SC（recombinant Baculovirus-SC）

5 主要试验材料

5.1 实验动物品种与级别

Balb/c 雌性小鼠（SPF 级）

5.2 实验动物日龄

6~8 周龄

5.3 抗原

pET32a-SC 重组蛋白（制备方法见附录 A）

6 SIgA 抗体的制备

6.1 动物免疫

首次免疫：将抗原与弗氏完全佐剂按照 1:1~1:1.1 体积比进行乳化，2~8 ℃静置 16~18 h，未出现分层后，皮下多点注射，50~100μg/只。

中国兽医协会 CVMA

二次免疫：10~15 d 进行加强免疫，将相同批次抗原与弗氏不完全佐剂按照 1:1~1:1.1 体积比进行乳化，2~8 ℃静置 16~18 h，未出现分层后，皮下多点注射，60~120μg/只。

三次免疫：10~15 d 后，眼眶采集小鼠血液，4 ℃静置过夜，600 g 离心处理 10 min，分离血清，用于抗体水平的测定（检测方法见附录 B），通过间接 ELISA 方法进行抗体滴度的测定[2]。当抗体滴度小于 10^5 时，继续加强免疫，当抗体滴度大于 10^5 时，融合前 2~3 d 进行腹腔注射抗原，100μg/只。

6.2 B 细胞的制备

6.2.1 取上述免疫合格的小鼠，消毒处理后，无菌采集脾脏组织，对脾脏用不含血清的 DMEM 液体培养基（以下简称“不完全培养基”）进行简单的润洗后，用一次性注射器内芯进行反复按压至脾完全破碎。

6.2.2 无菌吸取上述处理好的脾细胞，用 200 目的细胞筛进行过滤处理。

6.2.3 将过滤后的细胞进行洗涤，150 g 离心 10 min，重复 2~3 次，进行细胞计数。

6.3 小鼠骨髓瘤 Sp2/0 细胞的处理

将长满单层的小鼠骨髓瘤 Sp2/0 细胞轻轻吹打下来，用不完全培养基洗涤 3 次后，采用细胞计数和台盼蓝染色方法对细胞数量和活率进行测定，要求细胞数量达 10^7，活率 98 %以上。

6.4 杂交瘤细胞的制备

6.4.1 将上述处理好的 B 细胞和小鼠骨髓瘤 Sp2/0 细胞按照 4:1~5:1 的数量比例进行混匀后，150 g 离心 10 min，弃去上清，将细胞沉淀轻轻弹松散，置 37 ℃预温的水杯中，1 min 内加入 0.8~1 mL 的聚乙二醇（50 % PEG1450），静置 90 s。

6.4.2 加入 37 ℃预热的不完全培养基进行终止，前 1 min 内加入 4 mL，并不断摇匀，后 1 min 中内继续加入 2~3 倍体积（8~12 mL）的不完全培养基，最后补充 2~3 倍体积（24~48 mL）的不完全培养基以便完全终止反应。

6.4.3 终止结束后，150 g 离心处理 10 min，小心弃去上清，将细胞沉淀用含 15 %胎牛血清的 HAT 培养基进行重悬，加入到提前铺有饲养细胞（见附录 C）的 96 孔细胞培养板中，100 μL/孔，37 ℃ 5 %CO_2 培养箱培养，于 7~10 d 后采用半量换液法进行 HT 培养基的替换，同时补加饲养细胞（1~2×10^4 个/孔），观察细胞生长情况，并对单个或多个细胞簇分别进行标记。

6.4.4 10~15 d 后，将含 15 %血清的 HAT 培养基逐渐替换成含 15 %血清的 HT 培养基，补充饲养细胞，继续培养。根据杂交瘤细胞的生长情况（一般细胞铺满孔的 1/3~1/2）进行杂交瘤细胞的鉴定及亚克隆。将筛选鉴定为阳性的克隆细胞再按照半量换液法逐渐替换成含 10 %血清的 DMEM 液体培养基扩大培养、冻存。

6.5 抗 SIgA 阳性杂交瘤细胞的筛选

采用免疫荧光试验（以下简称“IFA”）对上述标记的细胞簇（杂交瘤细胞）上清进行测定，细胞出现绿色荧光判定为阳性，未出现绿色荧光判定为阴性（检测方法见附录 D）。

6.6 抗 SIgA 阳性杂交瘤细胞的亚克隆

中国兽医协会 CVMA

对仅由 1 个细胞簇筛选出来的抗 SIgA 阳性杂交瘤细胞需要用含 15 %血清的 HT 培养基进行 1 次稀释后克隆培养、筛选。对于 2 个或多个细胞簇的抗 SIgA 阳性杂交瘤细胞要进行 3 次及以上的亚克隆。

6.7 抗 SIgA 阳性杂交瘤细胞的鉴定

将上述抗 SIgA 阳性亚克隆细胞进行培养，取相应的细胞上清进行倍比稀释后，加入提前接种重组杆状病毒 SC（以下简称“rBV-SC”）的细胞培养板中，采用免疫过氧化物酶单层细胞试验法（以下简称“IPMA”）进行测定。当细胞着色呈棕红色判定阳性，细胞不着色的判定为阴性（见附录 E）。

6.8 抗 SIgA 阳性杂交瘤细胞的判定标准

采用 IFA 对获得的克隆细胞进行测定，细胞出现绿色荧光，且采用 IPMA 进行测定，细胞呈现棕红色着色，判定为阳性；否则，判定为阴性。

6.9 动物致敏

Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡，0.5mL/只。

6.10 细胞接种

动物致敏后 10 d，注射生长状况呈现对数生长期的抗 SIgA 阳性杂交瘤细胞，10^5-10^7 个/只，每日观察小鼠的活动情况。

6.11 抗 SIgA 抗体的收集、处理

待小鼠腹部膨大、行走较为困难时，5 mL 注射器小心刺入腹部皮肤（注意避开肠道），小心采集腹水，150 g 离心 10 min，取上清，16000 g，继续离心 10 min，收获的上清即为抗 SIgA 抗体。0.22 μm 滤器过滤除菌，-20 ℃保存备用。

7 抗 SIgA 抗体的纯化

对上述处理好的抗 SIgA 抗体样本进行蛋白浓度的测定，依据亲和层析柱使用说明书中的动态载量填充填料后进行亲和纯化。用含 20mmol/L 柠檬酸（pH 3.0）进行洗脱，洗脱液立即用 1mol/L Tris-HCL（pH 9.0）按照 15：1 的体积比进行中和，收获洗脱液即为抗 SIgA 纯化的抗体。根据应用需求，可采用 10~20 kDa 超滤管进行浓缩置换处理，抗体浓度≥1mg/mL，无菌过滤后，-80 ℃保存，保存期 1 年。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（资料性）
免疫用抗原的制备

A.1　实验材料

质粒 pET-32a(+)

菌株：DH5α、Rosetta(DE3)

依据表达菌株特性，对 SC 基因序列进行密码子优化，优化序列如下：

GAATTCAAGCTTTTATTTACTGCCACCGCCCTGACCCACACTACTGCCCGGTGCTGCCG
GCACACCACTACCGCTTGCCGGACCTTCGCCATCTTTAACTGCGCGATCTTCTGCAATC
AGACTCGGATCCAGCAGCACTTCATTTTCGGTTTCGCGTGCACGCGGTTCAATGGCATC
TTCTGCAGGGGCCGGGGCTGCATTTGCCAGGCGTGCATCGCCGCTACCTTTTGCTTTCT
GTTCAACTGCAACATACACGGCGCCGGTTTCACCATAATGCAGGCCATCTTTCACACCG
CACCAATACCAACCTTCGTCTTCTTTACGAACCGGATTCAGATTCAGGCTGATGATCTG
AGATTTTTTATCACAATTAACAAAGGCCTGACTCTGACCTTCATCCTGGCTCGGCAGGG
CGCGACAACCGGTATTGCTCCACTTGCACCAATATTTCTGGTAACTATAAAATTTGCAC
GGAAAATGACAGCTCAGTTTCAGGGTTTCGCCAACCCATGCGGTCACATTTTCCGGCA
GTTTCAGATTCGGTTCGCCTTCAACAATTTTCAGTTCAACGGTGCTACGCCAACGACTA
TCTTCATTGGTCAGGCACCAATAAAAGCCTGCATCACGATTGGTCAGCTGATTCAGAAT
AACGGTGAAGGTGCCATTACCCGGTTCTTCATACAGTGCCAGGCGACCTTCATACTGTT
CATTAACCAGACCACTGCTTTCAACCAGCTGCGGACAGCGGCCATTTTCATTTTCTTCC
CAGCGGCACCAATATTTCAGACTATTGGTTTCTTTCGGATTATACGGACAGGTCACTGC
AACGCTACCGCCCACAACGCCACGAACCACACTGCTGCGCGGCGGAATCATGGTATCT
TCATTAATAAACAGCTGCCAGGCCTGCACCGGCCAGCCTTCTTTCGGTTCGCCATCCGG
ATGTGCACCACACAGATAATGACCGGCATCTTCTTTACGCAGGCCGGTGATATGAACGC
TAAAATGACTATTTTCTTTCGGGGTCAGCAGAATGCGACCTTCAAAATCCTGGGCTTTT
TTGCCCAGGGTGTTAATAACCACATTACAGGTTTTACCATTTTTCAGCTGACACAGAAA
TTTTGCCACATTGGCCATTTCCTGACCCAGGGCACAATCAAAGGTCACACTACCGCGC
AGATCGCCATAGATCAGTTCCGGTTCCGGTTTCAGCACCTGCAGATCGGCGCTGCTTTC
TTCATCGCCTGCCTGACAAATATAGATGCCGGCATCGCGCAGCTGAATGCGGTTAATAA

中国兽医协会 CVMA

CAAAACTAAAAACCAGCTGATTGGTGCCCTGAATACTCAGATGGGCGCGGTTGGTAAA
GTTGTTATTCAGATAACCATTGCTATCAATAACCAGCACACGAATCTGACCCAGTTTTTT
ATACACGCTTTTCGGTTTCTGGGCATTTTCGCTTTTAAACGGGCAATTAATGGTCACGGT
ACTACCCAGATCTGCGGTATAAACATGCACATCGCCAATCTGACCCGGGCCCTGACTAA
CTTCCAGGCTCACATCAAAACTCAGGCCGCGGCTACTAATGCCCAGACCACATTTATAC
AGACCGCTGTCACCACGGGTCAGATGACCAATATCCATAACAAAGGTGCCATTTTCCG
GAAAATTGGTCAGATTTGCGCGACCCTTATAATCTTTACTAATATAGCCTTCACTGCTAA
TCAGGGTGGTGCAGCGACCTTTTGCACCAATACGACACCAATATTTGCGGCTATGACGA
TTCACACTGGTGGCCGGATAATAACAACGAATACTCACACTACTACCTTCCACACTGCT
AACATCCTGCGGGCCAAAAATCGGGCTCTTGAATTCTAAAAGCTT

A.2 **实验方法**

A.2.1 合成基因序列

将上述基因序列进行合成并插入到 pET-32a 表达载体中，转入到 DH5a 中进行重组基因的验证。

A.2.2 重组蛋白的大量表达、纯化

挑选测序结果正确的菌株接种到 5 mL 菌液中，180~190r/min 37 ℃摇床过夜培养，次日按照 1:100 的比例进行大量培养，37 ℃ 210r/min 培养 3 h 后，加入终浓度为 0.2mmol/L IPTG，诱导 5 h 后收菌。16000 g 离心 20 min，弃上清，沉淀用预冷的 PBS 洗涤 2 次，16000 g，15 min，弃上清后，将沉淀用超声破碎仪破碎处理（300 W）超 3 s 停 5 s 超声处理 25 min。将残留的沉淀进行 2mol/L 脲洗涤 2 次，16000 g 离心 15 min，弃除上清，沉淀用 8mol/L 脲继续 4 ℃过夜溶解后，离心处理，16000 g 离心 15 min，弃除沉淀，将上清液进行挂镍柱处理（方式按照 NI-NTA 说明书进行）。

中国兽医协会 CSVMA

附　录　B
（规范性）
pET32a-SC 重组蛋白抗体水平的测定

B.1　实验材料

碳酸盐缓冲液（pH 9.6）、磷酸盐缓冲液（PBS）pH 7.2、洗涤液（PBST）：0.5 %tween20-PBS、羊抗鼠 IgG-HRP、TMB 显色液、2mol/L H_2SO_4。

B.2　实验方法

B.2.1　将 pET32a-SC 重组蛋白包被于中等亲和力的聚苯乙烯板中，1..3μg/孔，37 ℃孵育 2 h。

B.2.2　PBST 洗涤 3 次，300μL/孔，2 %BSA~PBST 置 37℃孵育 2 h。

B.2.3　PBST 洗涤 3 次，300μL/孔，吸水纸拍干。

B.2.4　以 PBS 溶液作为样品稀释液，对待检样本按比例进行稀释，同时设置阴性对照和空白对照，100μL/孔，37 ℃孵育 45 min。

B.2.5　PBST 洗涤 3 次，300μL/孔，拍干，加入 1：2000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 抗体，100μL/孔，37 ℃孵育 45 min。

B.2.6　PBST 洗涤 3 次，300μL/孔，拍干，加入 TMB 显色液，100μL/孔，室温（25 ℃，可用水浴或温箱控制）显色 15 min（注意避光放置）。

B.2.7　显色结束后，立即加入 2mol/L H_2SO_4，50μL/孔，酶标仪（450 nm 波长处）测定各孔 $D_{450\ nm}$。

B.3　结果判定

P/N=[（样品孔 D450-空白孔 D450）/(阴性对照孔 D450-空白孔 D450）]

当 P/N≥2.1 判定为阳性，P/N<1.5 判定为阴性，1.5≤P/N<2.1 判定为可疑。

中国兽医协会 CVMA

附　录　C
（资料性）
饲养细胞的制备

C.1　实验动物

6~8 周龄 BALB/c 小鼠（SPF 级）

C.2　实验方法

C.2.1　处死小鼠后，无菌注射 DMEM 液体培养基 5 mL，轻揉小鼠腹部 1~2 min 后，反复抽吸腹腔内液体，直至抽取的腹腔内液体与培养液颜色一致。

C.2.2　150 g ，离心 10 min，将获取的腹腔巨噬细胞用含 20 %血清 HAT 培养基进行重悬，细胞计数，按 8×10^5 个/mL 细胞密度进行铺板， 37 ℃、5 % CO_2 培养箱中进行培养。

中国兽医协会
CVMA

附　录　D
（规范性）
免疫荧光试验（IFA）

D.1　实验材料

长满 sf9 单层的 96 孔细胞培板、0.2 mL 吸头、1 mL 吸头、PBS 缓冲液（pH 7.2）、羊抗鼠 IgG-FITC 标记抗体等。

D.2　实验方法

D.2.1 重组杆状病毒 rBV-SC 接毒后 48 h（MOI=1），PBS 洗板 3 次，200μL/孔，3% H_2O_2 甲醇溶液室温固定 15 min，PBS 润洗 3 次，200μL/孔，拍干。

D.2.2　加入.25 %tritonX-100，100μL/孔，室温作用 10 min，PBS 洗板 3 次，200μL/孔，拍干。

D.2.3　加入待检稀释样本（1:10、1:20、1:40、1:80、1:160）100μL/孔，同时设置阳性对照孔和阴性对照孔，37 ℃作用 1 h，PBS 洗板 3 次，200μL/孔，拍干。

D.2.4　加入羊抗鼠 IgG-FITC（1:200）50μL/孔，37 ℃孵育 1 h（注意避光）

D.2.5　PBS 洗板 3 次，200μL/孔，拍干后，置荧光显微镜观察结果（注意避光）。

D.3　结果判断

当细胞出现绿色荧光时判定为阳性，未出现绿色荧光判定为阴性。

中国兽医协会
CVMA

附　录　E
（规范性）
免疫过氧化物酶单层细胞试验法（IPMA）

E.1　实验材料

长满 sf9 单层的 96 孔细胞培板、0.2 mL 吸头、1 mL 吸头、PBS 缓冲液（pH 7.2）、羊抗鼠 IgA-HRP、AEC 显色液等。

E.2　实验方法

E.2.1 重组杆状病毒 rBV-SC 接毒后 48 h（MOI=1），PBS 洗板 3 次，200μL/孔，3 %H_2O_2 甲醇溶液室温固定 15 min，PBS 润洗 3 次，拍干。

E.2.2　加入 0..25 %tritonX-100，100μL/孔，作用 10 min，PBS 洗板 3 次，200μL/孔，拍干。

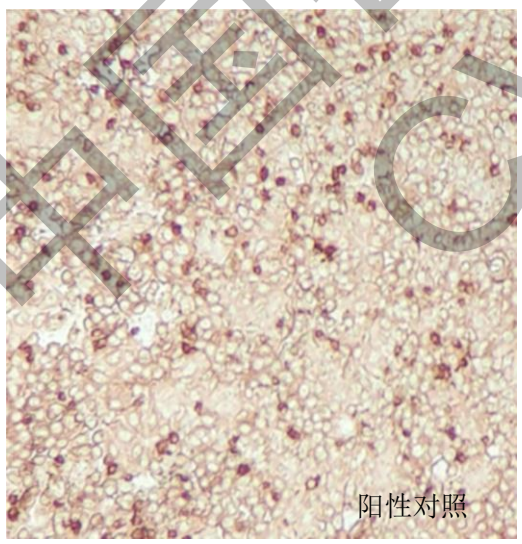
E.2.3　加入待检稀释样本（1:10、1:20、1:40、1:80、1:160）100μL/孔，同时设置阳性对照孔和阴性对照孔，37 ℃作用 1 h，PBS 洗板 3 次，200μL/孔，拍干。

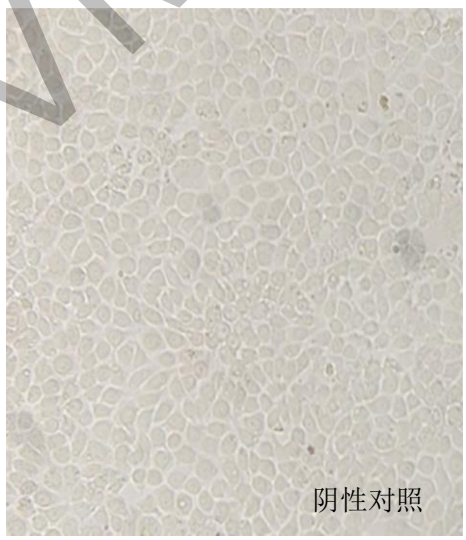
E.2.4　加入 IgA-HRP（1:2000）100μL/孔，37 ℃作用 1 h。

E.2.5　PBS 洗板 3 次，200μL/孔，拍干后，置倒置显微镜观察。

E.3　结果判定

细胞呈现棕红色着色判定为阳性，细胞不着色判定为阴性（见图 E.1）。





中国兽医协会 CVMA

参考文献

[1] 霍德华, 凯瑟.抗体的制备与使用实验指南[M].北京:科学出版社，2010:62.

[2] 赵凯，尹玲玲，赵冬梅，等.白血病干细胞的新型标志蛋白 IL1RAP 杂交瘤细胞的制备及其分泌单克隆抗体的检测[J].中国实验血液学杂志，2013，21（6）：1390-1393.

中国兽医协会
CVMA