



## 鸡 Toll 样受体 21 单克隆抗体的研制及其初步应用

张鹏池<sup>1,2,3</sup>, 陈小雅<sup>1,2,3</sup>, 王航<sup>1,2,3</sup>, 李林<sup>1,2,3</sup>, 蒋路遥<sup>1,2,3</sup>, 吴佳炎<sup>1,2,3</sup>, 黄恩赐<sup>1,2,3</sup>,  
高崧<sup>1,2,3,4\*</sup>, 刘秀梵<sup>1,2,3</sup>

- 1 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009
- 2 农业农村部禽用生物制剂创制重点实验室, 江苏 扬州 225009
- 3 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009
- 4 扬州大学农业科技发展研究院, 江苏 扬州 225009

张鹏池, 陈小雅, 王航, 李林, 蒋路遥, 吴佳炎, 黄恩赐, 高崧, 刘秀梵. 鸡 Toll 样受体 21 单克隆抗体的研制及其初步应用. *微生物学报*, 2022, 62(7): 2824–2834.

Zhang Pengchi, Chen Xiaoya, Wang Hang, Li Lin, Jiang Luyao, Wu Jiayan, Huang Enci, Gao Song, Liu Xiufan. Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies against chicken Toll-like receptor 21. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2824–2834.

**摘要:**【目的】研制鸡 Toll 样受体 21 (chTLR21)单克隆抗体, 考察禽致病性大肠杆菌(APEC)及高致病性禽流感病毒(HPAIV)感染鸡组织中的 chTLR21 蛋白的表达情况。【方法】以人工合成的多肽免疫原 chTLR21 (203–225 aa)与 KLH 偶联蛋白免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠, 以多肽免疫原 chTLR21 (203–225 aa)与 BSA 偶联蛋白作为检测抗原, 通过间接 ELISA 技术筛选阳性杂交瘤细胞株, 同时, 采用间接免疫荧光技术(IFA)检测单克隆抗体的荧光反应性; 上述单克隆抗体用于 chTLR21 在鸡巨噬细胞(HD11)中的定位; 在 APEC O1 血清型 E516 菌株、HPAIV H5N6 亚型毒株感染 35 日龄 SPF 鸡模型中, 应用获得的单克隆抗体以免疫印迹(Western blotting)和免疫组化(IHC)方法检测感染鸡组织中 chTLR21 的表达情况。【结果】建立了间接 ELISA 检测方法, 确定最适抗原包被浓度为 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 最适血清稀释度为 1:6 400。经 ELISA、IFA 筛选, 获得 4 株阳性杂交瘤细胞株, 分别命名为 1G3、2C10、3B6 和 4F11。上述单克隆抗体亚类分别为 IgG2b、IgG1、IgG2b 和 IgG2a 型, 其中 3B6 具有较强的荧光反应性; 制备单克隆抗体 3B6 腹水, 其 ELISA 效价为

**基金项目:** 国家自然科学基金(31972711); 国家重点研发计划(2021YFD1800404); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31972711), by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800404) and by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

\*Corresponding author. Tel: +86-514-87972117; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received: 29 November 2021; Revised: 10 January 2022; Published online: 18 January 2022

1:102 400; IFA 结果表明, chTLR21 存在于 HD11 细胞质内; APEC 感染鸡组织中 chTLR21 Western blotting 和 IHC 检测结果表明, 感染鸡肝、脾、肺、肾、法氏囊中 chTLR21 表达量显著上升, 而胰腺中表达量显著下降; HPAIV H5N6 感染鸡上述组织中 chTLR21 的表达量均未见明显变化。

**【结论】**本研究成功研制出针对鸡 chTLR21 受体的单克隆抗体, 单克隆抗体 3B6 可用于检测鸡体内 chTLR21 表达情况, 为 chTLR21 在病原体感染及天然免疫应答中的机制、功能研究提供了重要生物材料。

**关键词:** chTLR21; 单克隆抗体; 细胞定位; 免疫印迹; 免疫组化

## Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies against chicken Toll-like receptor 21

ZHANG Pengchi<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xiaoya<sup>1,2,3</sup>, WANG Hang<sup>1,2,3</sup>, LI Lin<sup>1,2,3</sup>, JIANG Luyao<sup>1,2,3</sup>, WU Jiayan<sup>1,2,3</sup>, HUANG Enci<sup>1,2,3</sup>, GAO Song<sup>1,2,3,4\*</sup>, LIU Xiufan<sup>1,2,3</sup>

1 Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Avian Bioproducts Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

3 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

4 Institutes of Agricultural Science and Technology Development, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

**Abstract: [Objective]** To develop monoclonal antibodies (MAbs) against chicken Toll-like receptor 21 (chTLR21) and determine the expression of chTLR21 in chicken tissues challenged by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) or highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV). **[Methods]** The 6-week-old BALB/c mice were immunized with the synthetic polypeptide chTLR21 (203–225 aa) conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH). The chTLR21 (203–225 aa) conjugated with bovine serum albumin (BSA) was employed as the coating protein in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The positive hybridoma cells were screened by indirect ELISA. The MAbs selected by ELISA were detected by indirect immunofluorescence assay (IFA) and then used to trace the localization of chTLR21 in chicken macrophages (HD11) and determine the expression of chTLR21 in tissues of the chickens infected with APEC O1 serotype E516 strain and HPAIV H5N6 strain. **[Results]** An indirect ELISA method was established, with the optimal antigen coating concentration of 2.5 µg/mL and serum dilution of 1:6 400. Four positive hybridoma cell strains were obtained and named 1G3, 2C10, 3B6, and 4F11, which belonged to the IgG2b, IgG1, IgG2b, and IgG2a subclasses, respectively. The MAb 3B6 had a robust fluorescence reactivity. The results of IFA demonstrated that chTLR21 was localized in the cytoplasm of HD11 cells. Compared with that in mock birds, the expression of chTLR21 was up-regulated in liver, spleen, lung, kidney, and bursa of Fabricius while down-regulated in pancreas of the 35-day-old specific pathogen-free (SPF) chickens infected with APEC E516 strain while exhibited no changes in the tissues of the chickens challenged with HPAIV H5N6 strain. **[Conclusion]** We developed the MAbs against chTLR21, among which the MAb 3B6 can

be used to probe the localization and expression of chTLR21 in both chickens and macrophages, providing a tool for studying the effect of chTLR21 on the pathogenesis of bacterial or viral infections in chicken.

**Keywords:** chTLR21; monoclonal antibody; subcellular localization; Western blotting; immunohistochemistry

机体的免疫系统分为先天免疫和适应性免疫。先天免疫系统是宿主抵御病原体侵袭的第一道防线，它的启动是宿主被微生物感染或组织损伤引发急性炎症的主要因素，先天免疫系统包括物理、化学屏障以及模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)<sup>[1]</sup>。Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)属于模式识别受体家族，参与识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)，是先天免疫系统中最关键的组分之一，在动物抵抗病原体感染的天然免疫反应中起重要作用<sup>[2]</sup>。目前已发现禽类有10种TLRs，包括：TLR1La、TLR1Lb、TLR2a、TLR2b、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR15和TLR21<sup>[3]</sup>。1988年，Hashimoto等首次证明果蝇背腹侧胚胎 *Toll* 基因结构是一种I型跨膜蛋白，所有TLRs共有的特征结构包括：胞外区、跨膜区和胞浆区<sup>[4]</sup>。当病原体感染宿主时，它们发挥识别作用并向下游分子发出信号，经过一系列信号传导作用使机体产生细胞因子、干扰素等效应分子抵御病原体侵害<sup>[5]</sup>。

已证明chTLR21和哺乳动物的TLR9之间存在生物学相似性，尤其是对含有特定DNA基序的识别方面，且TLR9和chTLR21细胞定位的比较表明，两者都是细胞内受体<sup>[6]</sup>。ChTLR21广泛识别未甲基化的CpG DNA分子，甚至对细菌染色体DNA产生免疫应答作用，激活下游NF- $\kappa$ B信号通路<sup>[7]</sup>。有研究表明，具有囊膜包裹的双链环状DNA杆状病毒(baculovirus, BV)诱导炎症因子的产生依赖于chTLR21表达<sup>[8]</sup>。

De Zoete等比较了4株弯曲杆菌(*Campylobacter* spp.)对人与鸡体内各TLRs的激活作用，发现分离的弯曲杆菌基因组DNA不能激活人hTLR9，而鸡chTLR21可以被所有受试的弯曲杆菌的DNA激活<sup>[9]</sup>。这些结果表明chTLR21在鸡体内可能参与多种免疫反应，需要进一步研究。

禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)可引起家禽严重的呼吸道和全身疾病，是导致世界各地养殖业经济损失的主要原因之一<sup>[10]</sup>。APEC的致病机制仍未明确，其治疗主要依赖于抗生素，但多重耐药菌的产生使治疗陷入瓶颈<sup>[11]</sup>。高致病性禽流感病毒(highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV) H5N6亚型，是我国近年来优势流行的亚型，给我国养禽业带来重大经济损失<sup>[12]</sup>。为了定位chTLR21在HD11细胞中的分布，阐明APEC及HPAIV H5N6感染鸡体内chTLR21的表达情况，本研究研制了chTLR21单克隆抗体(以下简称单抗)，为进一步研究chTLR21在宿主抵御病原体感染过程中发挥的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 免疫原、实验动物、细胞、菌株和病毒

chTLR21-KLH、chTLR21-BSA偶联多肽蛋白由上海优宁维生物科技股份有限公司合成；6–8周龄BALB/c母鼠及ICR小鼠均购自扬州大学比较医学中心；无特定病原体(specific pathogen free, SPF)鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司，自行孵化并饲养至35日

龄备用; 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0、鸡巨噬细胞 HD11 均由本实验室保存。APEC O1 血清型 E516 菌株由本实验室分离保存<sup>[13]</sup>; 新型重组 HPAIV H5N6 毒株, A/goose/Guangdong/Y6/2015 (Y6)由本实验室于2015年在活禽交易市场的流行病学调查中分离获得。凡是涉及HPAIV操作、动物试验均在农业农村部畜禽传染病学重点开放实验室动物生物安全三级实验室(ABSL-3)中进行。

## 1.2 主要试剂

高糖 DMEM 粉末、RPMI Medium 1640 培养基、0.25% Trypsin-EDTA、HAT 培养基(50×)和 HT 培养基(100×)均购自 Gibco 公司; FBS 胎牛血清购自上海 Lonsera 公司; 无血清细胞冻存液购自新赛美生物科技有限公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、聚乙二醇 1500 (PEG-1500)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司; TMB 显色液购自碧云天公司; 单抗亚类鉴定试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

## 1.3 抗原序列的确定

根据 chTLR21 基因的 GenBank 登录号 NP\_001025729, 在 Bepipred 抗原表位预测网站 (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) 预测其抗原表位区域。

## 1.4 动物免疫

将 chTLR21-KLH 作为免疫原, 用 1% 的甲醛 4 °C 过夜固定, 按 80 μg/只等体积添加佐剂乳化后, 背部皮下多点注射 BALB/c 母鼠, 间隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 4 次。其中除首免佐剂为弗氏完全佐剂以外, 二免至四免均为弗氏不完全佐剂。四免后小鼠眼球采血测定血清效价, 取血清效价最高的小鼠进行加强免疫 (150 μg/只)。

## 1.5 间接 ELISA 检测方法的建立

以 chTLR21-BSA 蛋白作为抗原包被酶标板, 采用方阵滴定试验倍比稀释抗原, 横向每孔抗原浓度分别为 20、10、5、2.500、1.250 和 0.625 μg/mL, 每孔加 100 μL。纵向阳性和阴性血清分别以 1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800 和 1:25 600 倍比稀释作为一抗。按常规 ELISA 步骤进行, 碳酸盐缓冲液(CBS)稀释抗原 4 °C 过夜, PBST 洗涤 3 遍, 每次 5 min, 拍干; 5%脱脂奶 37 °C 封闭 2 h, PBST 洗涤 3 遍; 加入一抗, 37 °C 作用 1 h, PBST 洗涤 3 遍; 二抗为 1:5 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, PBST 洗涤 3 遍; 避光加入 TMB 显色液, 37 °C 显色 15 min 后, 加入 ELISA 终止液; 酶标仪读取 OD<sub>450</sub> 数值, 大于 0.8 判定为阳性。

## 1.6 细胞融合、杂交瘤细胞的筛选及克隆化

对血清效价最高的一只小鼠进行最后一次加强免疫, 72 h 后取其脾细胞与 SP2/0 细胞按常规方法进行融合。37 °C 预热的含 HAT 的 DMED 高糖培养基重悬融合细胞, 用滴管滴入提前一天铺好的 96 孔板饲养细胞中, 每孔 2 滴。将细胞上清作为一抗, 3 次间接 ELISA 检测筛选出阳性孔, 同时, 对这些阳性孔进行间接免疫荧光(IFA)检测, 在 ELISA 结果为阳性的基础上挑选出荧光反应较好的细胞株。经过 3 次亚克隆, 获得可稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株。

## 1.7 单抗的生物学特性鉴定

### 1.7.1 Western blotting 检测单抗特异性

以 chTLR21-BSA 以及实验室保存的 chTLR15 蛋白、pET-28a 质粒载体蛋白、鸡脾脏组织全蛋白提取物为待测抗原, 杂交瘤细胞上清作为一抗。将抗原与 2×上样缓冲液等体积混匀, 96 °C 煮样 15 min, 进行 SDS-PAGE, 转印; 用 5%脱脂奶封闭 2 h, PBST 洗涤 3 遍,

加入杂交瘤细胞上清, 4 °C 过夜孵育, PBST 洗涤 3 遍, 每次 15 min; HRP 标记羊抗鼠二抗室温作用 2 h, PBST 洗涤 3 遍后加入 ECL 发光液后使用化学发光成像仪拍照。

### 1.7.2 单抗的荧光反应性检测

将 HD11 细胞均匀铺入 96 孔板, 长至 80% 汇合度后弃去培养液, PBS 洗涤 3 遍; 每孔加入适量冷甲醇(-20 °C)于 4 °C 固定 15 min, PBS 洗涤 3 遍; 用 0.5% Triton-100 透膜打孔, 37 °C 静置 15 min, PBS 洗涤 3 遍; 用 5% BSA 37 °C 封闭 30 min, PBS 洗涤 3 遍; 杂交瘤细胞上清作为一抗, 未免疫小鼠血清作为阴性对照, 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 遍; 避光加入 1:200 稀释的 FITC 羊抗鼠-IgG 二抗, 37 °C 孵育 1 h; 荧光显微镜下观察细胞荧光。

### 1.7.3 单抗的亚类鉴定

按北京博奥龙免疫技术有限公司生产的单抗亚类鉴定试剂盒说明书操作, 用酶标仪测定其  $OD_{450}$ 。

### 1.7.4 制备腹水及腹水效价的测定

取 8 周龄 BALB/c 母鼠, 每只小鼠腹腔注射 500  $\mu$ L 无菌液体石蜡进行致敏反应。1 周后, 将杂交瘤细胞株用不含胎牛血清的 DMEM 培养基吹打计数, 每只小鼠腹腔注射 500  $\mu$ L, 约  $1 \times 10^6$  个细胞。注射后 1 周, 待小鼠的腹部明显隆起时, 用 16 号针头刺入小鼠腹腔并收集腹水。

## 1.8 chTLR21 在 HD11 细胞中的定位

在 12 孔细胞板中放入 20 mm 无菌细胞爬片, 以每孔  $5 \times 10^5$  个细胞铺板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养约 24 h。一抗为 MAb 3B6 细胞上清, 阴性对照加等量 PBS, 方法参照“1.7.2”。在避光条件下用荧光鬼笔环肽染细胞膜, DAPI 染细胞核, PBS 洗涤后取下爬片, 在载玻片中央加

少许 50%甘油, 爬片细胞面倒扣其上, 封片后通过激光共聚焦显微镜观察。

## 1.9 APEC、HPAIVH5N6 感染 SPF 鸡组织中 chTLR21 的检测

### 1.9.1 APEC 感染及样品采集、处理

挑取 APEC O1 血清型 E516 株单菌落在 37 °C 条件下培养至对数期, 加入 PBS 缓冲液将其悬浮并稀释至  $1 \times 10^8$  菌落形成单位(colony forming units, CFU)/mL。35 日龄 SPF 鸡感染组和对照组各 5 羽, 感染组经左胸气囊接种 0.1 mL ( $10^7$  CFU)细菌悬液, 对照组经左胸气囊接种 0.1 mL PBS; 感染 24 h 后扑杀, 取肝、脾、肺、肾、法氏囊、胰腺按 50  $\mu$ g 组织与 500  $\mu$ L 含苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)的蛋白裂解液(PMSF 工作浓度为 1 mmol/L, 现配现用), 放入 1.5 mL EP 管, 加铅珠, 再用匀浆机充分研磨至无沉淀; 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 采用 BCA 试剂盒法测蛋白浓度, 用 PBS 溶液调节蛋白浓度至 2  $\mu$ g/ $\mu$ L, 组织全蛋白提取物置-70 °C 冰箱保存。

### 1.9.2 HPAIV H5N6 攻毒及样品采集、处理

将空斑纯化后的病毒液接种 10 日龄 SPF 鸡胚扩增后收集尿囊液, 通过生物学试验测定其静脉致病指数 IVPI 为 2.85。35 日龄 SPF 鸡感染组和对照组各 5 羽, 取上述尿囊液 10 倍稀释, 翅静脉注射 35 日龄 SPF 鸡, 攻毒剂量为 0.1 mL/羽, 每羽鸡接毒量为  $10^{7-17} EID_{50}$ , 对照组经翅静脉接种 0.1 mL PBS; 攻毒后 24 h 剖杀, 组织采集、处理步骤同“1.9.1”。

### 1.9.3 Western blotting 检测鸡组织中 chTLR21 的表达水平及数据分析

免疫印迹方法参照“1.7.1”。利用 Image J 软件灰度分析结果, 采用 GraphPad Prism 7.00

软件程序进行单向方差分析分析组间差异的显著性,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义, 所有结果均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

### 1.9.4 免疫组化检测 chTLR21 在鸡脾脏、胰腺中的分布

将受试鸡的脾脏、胰腺切成约  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.2 \text{ cm}$  体积大小, 置于 10% 福尔马林中浸泡。采用石蜡包埋法处理,  $5 \mu\text{m}$  切片后烤片, 经内源性过氧化物酶抑制、抗原修复、封闭后, 以 1% BSA 稀释的单抗 3B6 腹水(1:500)为一抗  $4^\circ\text{C}$  作用 12–16 h, 以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照; 以 1% BSA 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG (1:500)为二抗  $37^\circ\text{C}$  作用 1 h, DAB 显色后以苏木素复染, 梯度脱水透明、中性树胶封片后显微镜下观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗原序列的确定

根据网站预测的最佳抗原表位, 选择 chTLR21 的第 203–225 个氨基酸作为目标肽段(图 1)。由上海优宁维生物科技股份有限公司合成 chTLR21-KLH 和 chTLR21-BSA。

### 2.2 间接 ELISA 检测方法的参数

以 chTLR21-BSA 作为包被抗原, 小鼠血清作为一抗, 结果表明, 最适抗原包被浓度为  $2.5 \mu\text{g/mL}$ , 即每孔  $0.25 \mu\text{g}$ , 血清稀释度为 1:6 400。

### 2.3 阳性杂交瘤细胞的获得

在杂交瘤细胞筛选中, 多次取细胞上清进行间接 ELISA 和 IFA 检测, 采用有限稀释法经过 3 次亚克隆最终获得 4 株能分泌抗鸡 TLR21 蛋白的单抗细胞株, 分别命名为 1G3、2C10、3B6 和 4F11 (表 1)。

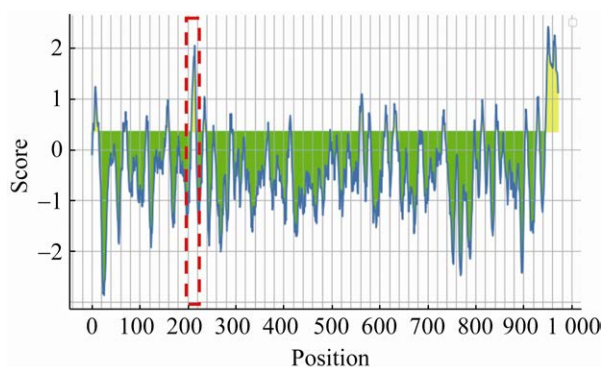


图 1 Bepipred 在线软件预测 chTLR21 蛋白抗原表位

Figure 1 Antigen epitope analysis of chTLR21 protein by Bepipred. The dotted line represents the 203–225 amino acids.

表 1 四株单抗的 ELISA 和 IFA 反应性

Table 1 The reaction of four MAbs with chTLR21 in ELISA and IFA

MAbs	ELISA ( $OD_{450}$ )	HD11
1G3	1.215	–
2C10	1.036	+
3B6	0.822	++
4F11	1.504	–

++: strong fluorescence reaction; +: weak fluorescence reaction; –: no fluorescence reaction.

### 2.4 单抗特异性

杂交瘤细胞上清与 chTLR21-BSA 在 Western blotting 中发生特异性反应, 条带大小为 70–130 kDa, 符合预期; 与实验室已有的 chTLR15 蛋白、pET-28a 质粒载体蛋白均不反应, 表明单抗的特异性良好(图 2)。4 株单抗中, 3B6 杂交瘤细胞培养上清可与鸡脾脏组织中的 chTLR21 蛋白发生特异性反应, 条带大小约在预期的 107 kDa 处(图 3)。

### 2.5 单抗亚类及腹水效价

经单克隆抗体亚类鉴定试剂盒检测, 1G3、2C10、3B6 和 4F11 细胞株重链分别为 IgG2b、IgG1、IgG2b 和 IgG2a 亚型, 轻链均为  $\kappa$  链(表 2)。

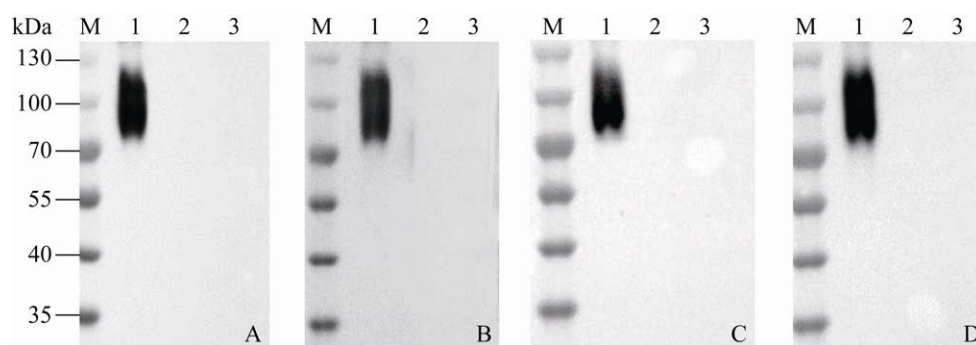


图2 单抗特异性的 Western blotting 鉴定

Figure 2 Specific identification of monoclonal antibodies by Western blotting. M: standard molecular weight of protein; lane 1: chTLR21-BSA; lane 2: chTLR15; lane 3: pET-28a; A: MAb 1G3; B: MAb 2C10; C: MAb 3B6; D: MAb 4F11.

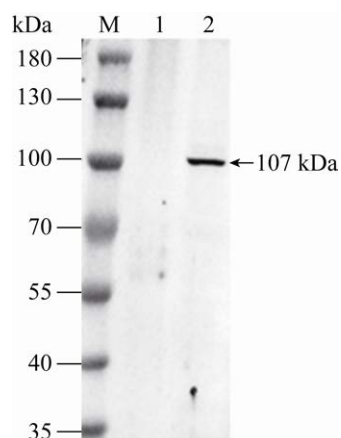


图3 单抗3B6与鸡脾脏组织中chTLR21蛋白的反应

Figure 3 Reactivity of MAb 3B6 with chTLR21 protein in chicken spleen. M: standard molecular weight of protein; lane 1: PBS; lane 2: spleen tissue of chicken.

通过间接ELISA法检测制备的3B6腹水效价为1:102 400(表3)。

## 2.6 激光共聚焦显微镜观察 chTLR21 定位于 HD11 细胞的细胞质

细胞核为蓝色,细胞骨架肌动蛋白为红色,绿色为chTLR21, chTLR21位于细胞质中(图4)。

## 2.7 chTLR21 在 APCE 及 HPAIV H5N6 感染鸡组织中表达的免疫印迹检测结果

以制备的chTLR21单抗3B6为一抗,用Western blotting方法检测健康对照组和感染组鸡的肝、脾、肺、肾、法氏囊和胰腺中chTLR21的表达情况,结果在预期的107 kDa处有特异性条带。在APEC感染模型中,肝、脾、肺、肾和法氏囊中chTLR21的表达量显著上升,而

表2 单抗的亚类鉴定( $OD_{450}$ )

Table 2 Isotypes of MAbs ( $OD_{450}$ )

MAbs	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA	Kappa	Lambda
1G3	0.107	0.099	<b>0.826</b>	0.105	0.105	0.105	<b>0.614</b>	0.102
2C10	<b>0.756</b>	0.068	0.063	0.065	0.473	0.061	<b>0.599</b>	0.068
3B6	0.046	0.045	<b>0.791</b>	0.041	0.047	0.042	<b>0.549</b>	0.035
4F11	0.031	<b>0.663</b>	0.018	0.021	0.023	0.019	<b>0.533</b>	0.025

\*: the bold indicates type of heavy chain and light chain corresponding to MAbs.

表 3 单抗 3B6 腹水效价测定( $OD_{450}$ )Table 3 Determination of MAb 3B6 ascites titer ( $OD_{450}$ )

MAb	Dilution ratio of ascites				
	1:12 800	1:25 600	1:51 200	1:102 400	1:204 800
P	1.976	1.816	1.201	1.120	0.675
N	0.063	0.054	0.055	0.051	0.066

\*: MAb 3B6 ascites (P); PBS (N).

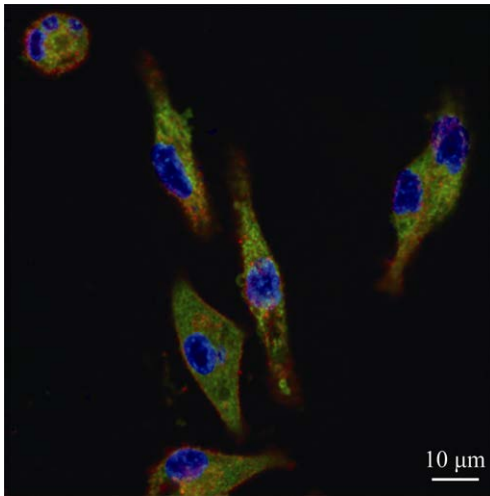


图 4 激光共聚焦示踪 chTLR21 蛋白亚细胞定位 (10×100 倍)

Figure 4 The subcellular localization of chTLR21 protein traced by laser confocal microscope (10×100).

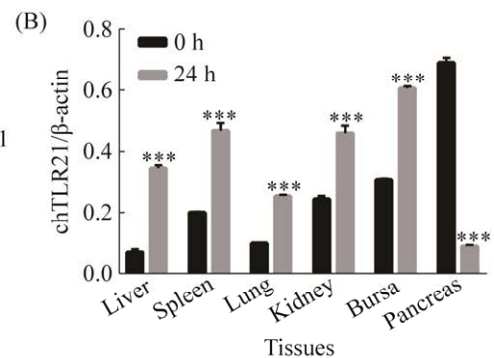
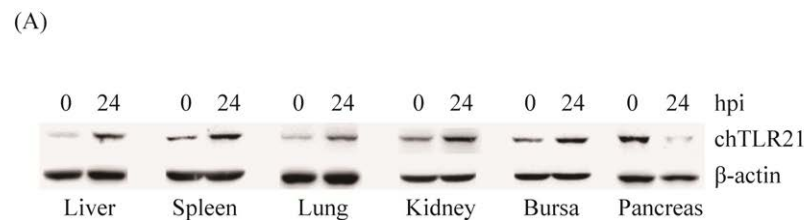


图 5 蛋白印迹检测 chTLR21 在 APEC 感染鸡组织中的表达

Figure 5 The expression of chTLR21 in APEC challenged chicken tissues determined by Western blotting. A: reactivity of MAb 3B6 with chTLR21 protein in chicken tissues, samples were taken at 0 and 24 h, respectively; B: analysis gray value of the image. The error bar indicated mean±SD. \*\*\* means significantly different at 0.001 level ( $P < 0.001$ ).

胰腺中的表达量显著下降(图 5A–B); 在 HPAIV H5N6 感染模型中, 上述组织中 chTLR21 的表达量均未见明显变化(图 6A–B)。

## 2.8 chTLR21 在 APCE 及 HPAIV H5N6 A/goose/Guangdong/Y6/2015 (Y6)株感染鸡脾脏、胰腺中表达的免疫组化检测结果

chTLR21 在健康对照组鸡脾脏组织呈弱阳性, 胰腺组织呈强阳性。APEC 感染鸡脾脏阳性信号变强, 而胰腺组织阳性信号转弱; 而 HPAIV H5N6 A/goose/Guangdong/Y6/2015(Y6)株感染鸡感染前后上述组织的染色信号未见明显变化(图 7)。

## 3 讨论

本文研制出 chTLR21 单抗, 旨在研究 APEC、HPAIV H5N6 入侵鸡体时 chTLR21 受体对 PAMPs 的应答情况, 为阐明 chTLR21 在鸡天然免疫系统中的功能奠定基础, 特异性高的单抗是理想的工具。

多肽免疫原免疫可以增强所获抗体对抗原多肽区域结合的特异性, 但由于多肽属半抗原, 刺激机体产生抗体水平低, 因此需要结合载体蛋白以提高其免疫原性, 典型的载体蛋白包括



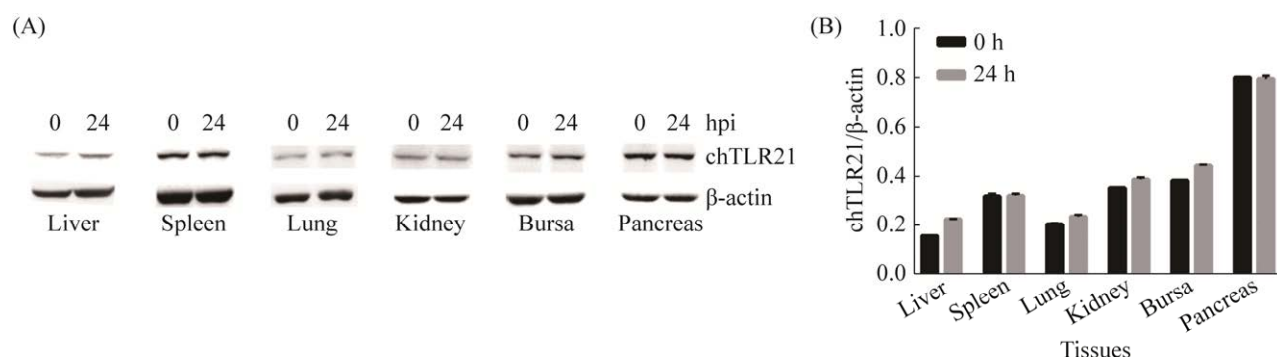


图 6 蛋白印迹检测 chTLR21 在 HPAIV H5N6 感染鸡组织中的表达

Figure 6 The expression of chTLR21 in HPAIV H5N6 challenged chicken tissues determined by Western blotting. A: reactivity of MA b 3B6 with chTLR21 protein in chicken tissues, samples were taken at 0 and 24 h, respectively; B: analysis gray value of the image. The error bar indicated mean $\pm$ SD.

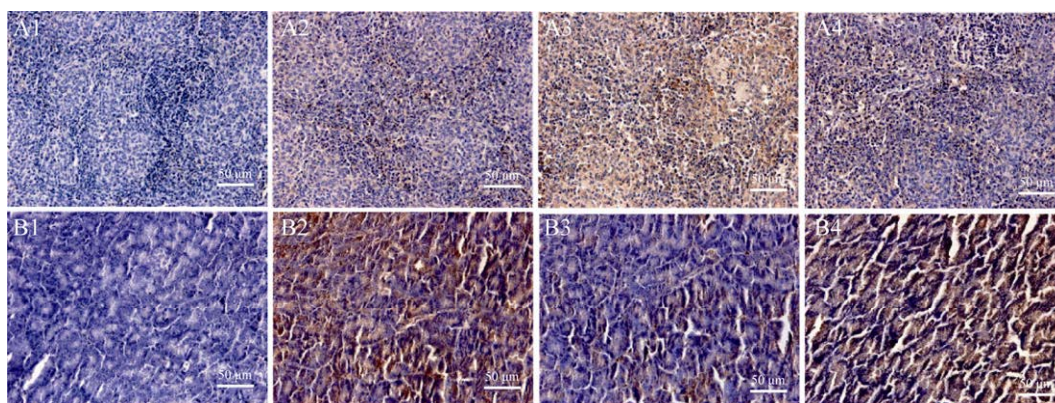


图 7 APEC 及 HPAIV H5N6 感染鸡脾脏和胰腺中 chTLR21 的免疫组织化学检测(10 $\times$ 10 倍)

Figure 7 The expression of chTLR21 in APEC and HPAIV H5N6 challenged chicken tissues determined by Immunohistochemistry (10 $\times$ 10). A: spleens; B: pancreases; 1: PBS instead of MA b 3B6 detection in mock birds; 2: mock birds; 3: APEC challenged birds; 4: HPAIV H5N6 challenged birds.

匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)等<sup>[14]</sup>。BSA 具有理化性质稳定、不变性、成本低以及溶解性强等优点,是最常用的载体蛋白;KLH 作为载体蛋白广泛应用,它是软体动物和节肢动物的血淋巴中发现的一种游离的蓝色呼吸色素,由于其分子量较大,相比其他载体蛋白会引发更强的免疫应答<sup>[15-16]</sup>。本研究通过合成的 chTLR21 (203–225 aa)多肽偶联 KLH 作为免疫原,可强烈刺激小鼠体内

免疫应答,产生高水平抗体。将 chTLR21 (203–225 aa)多肽偶联 BSA 作为包被蛋白,由于 KLH、BSA 种属关系相距较远,故可避免筛选过程中非特异性的抗原抗体反应。

单抗技术由 Kohler 和 Milstein 在 1975 年率先研发,其产生的抗体具有特异性强、均一性高和无限量产等优点,因而单抗在医学领域和工业上具有重要的应用价值,且单抗技术日趋成熟<sup>[17]</sup>。邹琴利用人工合成的 TRPC3 多肽偶联

KLH 免疫小鼠, 用非偶联 KLH 的多肽抗原包板筛选出单抗, 建立了双抗体夹心 ELISA 体系并应用于临床检测<sup>[18]</sup>。本研究成功研制出 4 株抗 chTLR21 受体的单抗, 均可与包被蛋白 chTLR21-BSA 特异性结合, 在 Western blotting 中的 70–130 kDa 处出现特异性条带, 说明上述单抗可与人工合成的 chTLR21 多肽反应。已知 chTLR21 序列 GenBank 登录号为 NP\_001025729, chTLR21 开放阅读框含 2 919 bp, 其编码的蛋白由 972 个氨基酸残基构成<sup>[19]</sup>, 单抗 3B6 可与鸡组织中的 chTLR21 天然结构蛋白进行免疫印迹反应, 目的条带大小约 107 kDa, 且所检测的鸡 6 种脏器中均有 chTLR21 的表达, 进一步说明该单抗特异性良好。已有报道 chTLR21 为存在于胞质中的受体, 本研究通过间接免疫荧光试验验证了这一结果, 进一步明确了 chTLR21 定位于 HD11 细胞的胞质中<sup>[20]</sup>。

TLR21 可感知未甲基化的 CpG 基序 DNA, 而 CpG 基序的 DNA 广泛存在于病原体的基因组中<sup>[21]</sup>。Cheng 等明确了鸭 TLR21 特异性识别 CpG 寡核苷酸并介导 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 在鸭感染鸭瘟病毒(duck plague virus, DPV)后的 24 h 和 48 h, TLR21 在鸭外周血、脾脏、法氏囊和盲肠中表达均上调<sup>[22]</sup>。Qi 等比较了雏鹅新型病毒性肠炎病毒(new type gosling viral enteritis virus, NGVEV)和禽流感病毒(avian influenza virus, AIV) H9N2 对鹅 TLR21 的激活作用, 发现 AIV H9N2 病毒不引起鹅胸腺、法氏囊、脾脏、小肠和肺组织中 TLR21 转录水平的显著变化, 而 NGVEV 可以引起上述组织中 TLR21 的显著上调, 说明鹅 TLR21 在识别入侵的 DNA 病毒中起着重要作用<sup>[19]</sup>。本研究构建 APEC 感染模型时采用气囊接种途径, 禽大肠杆菌病的自然感染途径主要为呼吸道, 因此, 在实验室感染模型中常采用气管或气囊接种,

且气囊接种更能保证精确接种入鸡体的细菌数量<sup>[23]</sup>。HPAIV H5N6 感染 SPF 鸡不能引起鸡受检组织中 chTLR21 表达量变化, 而 APEC O1 血清型菌株感染 SPF 鸡会导致其肝、脾、肺、肾和法氏囊中 chTLR21 表达量上调, 表明 chTLR21 可感知病原体 DNA 信号, 为进一步探究 chTLR21 在宿主防御中信号通路提供了参考。

本研究成功制备了与 chTLR21 天然结构蛋白具有良好反应性的单抗, 可应用于免疫印迹、免疫荧光、免疫组化等试验, 跟踪 chTLR21 在细胞中的定位和在部分脏器中的表达情况, 为研究 chTLR21 受体功能和禽类天然免疫调节机制奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124(4): 783–801.
- [2] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, 140(6): 805–820.
- [3] Cormican P, Lloyd AT, Downing T, Connell SJ, Bradley D, O'Farrelly C. The avian Toll-like receptor pathway—subtle differences amidst general conformity. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(9): 967–973.
- [4] Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 1988, 52(2): 269–279.
- [5] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, 34(5): 637–650.
- [6] Brownlie R, Zhu JZ, Allan B, Mutwiri GK, Babiuk LA, Potter A, Griebel P. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Molecular Immunology*, 2009, 46(15): 3163–3170.
- [7] Keestra AM, De Zoete MR, Bouwman LI, Vaezirad MM, Van Putten JPM. Unique features of chicken Toll-like receptors. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(3): 316–323.
- [8] Han Y, Niu MS, An LJ, Li WL. Involvement of *TLR21*

- in baculovirus-induced interleukin-12 gene expression in avian macrophage-like cell line *HD11*. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144(1/2): 75–81.
- [9] De Zoete MR, Kestra AM, Roszczenko P, Van Putten JPM. Activation of human and chicken toll-like receptors by *Campylobacter* spp.. *Infection and Immunity*, 2010, 78(3): 1229–1238.
- [10] Zhang LY, Yi PF, Guo X, Wu SC, Fu YX, Zhang C, Fu BD, Shen HQ, Wei XB. Astragaloside IV inhibits the inflammatory injury of chicken type II pneumocytes induced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Inflammation*, 2016, 39(5): 1660–1669.
- [11] Antão EM, Glodde S, Li GW, Sharifi R, Homeier T, Laturnus C, Diehl I, Bethe A, Philipp HC, Preisinger R, Wieler LH, Ewers C. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(5/6): 361–369.
- [12] 胡景凯, 金宣讲, 李智贤, 王潇, 戴怡雪, 李晓, 廖明, 贾伟新. 禽流感病毒 H5 亚型一种新分支 (clade2.3.4.4) 的流行概况. *中国兽医科学*, 2019, 49(1): 85–91.
- Hu JK, Jin XJ, Li ZX, Wang X, Dai YX, Li X, Liao M, Jia WX. Overview of the endemic of a new branch (clade2.3.4.4) of H5 subtype avian influenza virus. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(1): 85–91. (in Chinese)
- [13] 高崧, 刘秀梵, 张如宽, 焦新安, 文其乙, 吴长新, 唐一鸣, 朱晓波, 李琮, 陈娟, 崔力兵, 崔洪平. 我国部分地区禽病原性大肠杆菌的分离与鉴定. *畜牧兽医学报*, 1999, 30(2): 164–171.
- Gao S, Liu XF, Zhang RK, Jiao XN, Wen QY, Wu CX, Tang YM, Zhu XB, Li C, Chen J, Cui LB, Cui HP. The isolation and identification of pathogenic *Escherichia coli* isolates of chicken origin from some regions in China. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 1999, 30(2): 164–171. (in Chinese)
- [14] Jones LH. Recent advances in the molecular design of synthetic vaccines. *Nature Chemistry*, 2015, 7(12): 952–960.
- [15] 杨松鑫, 冯建远, 郭旋, 韦柳源, 梁翼莹, 严昊, 张子仪, 陈海兰. 小分子化合物单克隆抗体的制备及其在动物医学领域的应用. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(3): 1121–1131.
- Yang SX, Feng JY, Guo X, Wei LY, Liang YY, Yan H, Zhang ZY, Chen HL. Preparation of monoclonal antibodies for small molecular compounds and their applications in the field of veterinary medicine. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(3): 1121–1131. (in Chinese)
- [16] 谢晶, 叶健强, 余华, 严玉宝, 廖党金, 胡娟, 周岷江, 崔鹏博. 动物性食品中兽药人工抗原合成的研究. *畜牧兽医杂志*, 2011, 30(1): 28–30.
- Xie J, Ye JQ, Yu H, Yan YB, Liao DJ, Hu J, Zhou MJ, Cui PB. Study on the synthesis of artificial antigen of veterinary drugs in animal food. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2011, 30(1): 28–30. (in Chinese)
- [17] 武瑞君, 桑晓冬, 李治非, 敖翼, 范玲. 抗体技术的研发现状与展望. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(5): 374–381.
- Wu RJ, Sang XD, Li ZF, Ao Y, Fan L. Development and prospect of antibody technology. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2021, 35(5): 374–381. (in Chinese)
- [18] 邹琴. 抗 TRPC3 多肽单克隆抗体制备及其初步应用. 广东药科大学硕士学位论文, 2016.
- [19] Qi YL, Yan B, Chen S, Chen HJ, Wang MS, Jia RY, Zhu DK, Liu MF, Liu F, Yang Q, Sun KF, Wu Y, Chen XY, Jing B, Cheng AC. CpG oligodeoxynucleotide-specific goose TLR21 initiates an anti-viral immune response against NGVEV but not AIV strain H9N2 infection. *Immunobiology*, 2016, 221(3): 454–461.
- [20] Kestra AM, De Zoete MR, Bouwman LI, Van Putten JPM. Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *Journal of Immunology: Baltimore*, 2010, 185(1): 460–467.
- [21] Brownlie R, Allan B. Avian Toll-like receptors. *Cell and Tissue Research*, 2011, 343(1): 121–130.
- [22] Cheng D, Wu XD, Jia RY, Wang MS, Chen S, Liu MF, Zhu DK, Zhao XX, Wu Y, Yang Q, Zhang SQ, Zhang L, Liu YY, Yin ZQ, Jing B, Cheng AC. CpG oligodeoxynucleotide-specific duck TLR21 mediates activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway and plays an important role in the host defence of DPV infection. *Molecular Immunology*, 2019, 106: 87–98.
- [23] Pourbakhsh SA, Boulianne M, Martineau-Doizé B, Dozois CM, Desautels C, Fairbrother JM. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Diseases*, 1997, 41(1): 221–233.

(本文责编 张晓丽)