

抗口蹄疫病毒分泌型 IgA 抗体的构建表达及特性分析

刘锋^{1,2}, 李坤^{1,2}, 马雪青^{1,2}, 欧阳一凡^{1,2}, 孙普^{1,2}, 章兴赟^{1,2}, 曹轶梅^{1,2},
白兴文^{1,2}, 袁红^{1,2}, 李凤娟^{1,2}, 刘在新^{1,2}, 卢曾军^{1,2}, 李平花^{1,2*}

- 1 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学 动物医学与生物安全学院, 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州
- 2 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州

刘锋, 李坤, 马雪青, 欧阳一凡, 孙普, 章兴赟, 曹轶梅, 白兴文, 袁红, 李凤娟, 刘在新, 卢曾军, 李平花. 抗口蹄疫病毒分泌型 IgA 抗体的构建表达及特性分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 3992-4000.

LIU Feng, LI Kun, MA Xueqing, OUYANG Yifang, SUN Pu, ZHANG Xingze, CAO Yimei, BAI Xingwen, YUAN Hong, LI Fengjuan, LIU Zaixin, LU Zengjun, LI Pinghua. Construction, expression, and characterization of secretory IgA antibody against foot-and-mouth disease virus[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 3992-4000.

摘要: 【目的】制备抗口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)分泌型 IgA (secretory IgA, sIgA) 抗体, 为口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)的综合防控提供新思路 and 前期基础。【方法】以实验室前期筛选的一株抗 O 型和 A 型 FMDV 的 IgG 型中和抗体 POA-8 为模板, 用猪 IgA 重链的恒定区基因(经密码子优化)替换 IgG 重链的相应区域, 构建抗 FMDV IgA 抗体的重链真核表达质粒; 同时分别构建含猪源 J 链和分泌片(secretory component, SC)的真核表达质粒, 以及同时含 IgA 抗体的重链、轻链和 J 链基因的真核表达质粒。采用 4 质粒(重、轻、J 和 SC)或 2 质粒(重+轻+J 和 SC)分别瞬时共转染 CHO-S 悬浮细胞, 进行抗 FMDV sIgA 抗体的组装表达。表达的 sIgA 抗体经纯化后, 通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行鉴定, 并利用间接 ELISA 和微量病毒中和实验评价 sIgA 抗体与 FMDV 的结合活性和中和活性。【结果】4 质粒或 2 质粒共转染 CHO-S 细胞后均能成功组装表达抗 FMDV 的 sIgA 抗体, 且 sIgA 抗体对 O 型和 A 型 FMDV 的结合能力及中和能力均强于 IgG 抗体。【结论】本研究成功构建了抗 FMDV sIgA 抗体的表达系统, 为未来 FMD 黏膜疫苗和抗病毒药物的开发奠定了基础。

关键词: 口蹄疫病毒; 分泌性 IgA 抗体; 构建表达; 特性研究

资助项目: 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-CSLPDCP-202402); 国家重点研发计划(2021YFD1800300)

This work was supported by the Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-CSLPDCP-202402) and the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300).

*Corresponding author. E-mail: lipinghua@caas.cn

Received: 2025-02-21; Accepted: 2025-04-09; Published online: 2025-06-03

Construction, expression, and characterization of secretory IgA antibody against foot-and-mouth disease virus

LIU Feng^{1,2}, LI Kun^{1,2}, MA Xueqing^{1,2}, OUYANG Yifang^{1,2}, SUN Pu^{1,2}, ZHANG Xingze^{1,2}, CAO Yimei^{1,2}, BAI Xingwen^{1,2}, YUAN Hong^{1,2}, LI Fengjuan^{1,2}, LIU Zaixin^{1,2}, LU Zengjun^{1,2}, LI Pinghua^{1,2*}

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, China

2 Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou, Gansu, China

Abstract: [Objective] To prepare secretory IgA (sIgA) antibody against foot-and-mouth disease virus (FMDV) and provide a new idea and basis for the comprehensive prevention and control of foot-and-mouth disease (FMD). **[Methods]** We constructed an eukaryotic expression plasmid harboring the heavy chain of IgA antibody by replacing the constant region gene of heavy chain of IgG with the codon-optimized corresponding region of IgA based on POA-8, a previously screened IgG neutralizing antibody capable of neutralizing both type O and type A FMDV. At the same time, the eukaryotic expression plasmids harboring the J chain and secretory component (SC) of pigs as well as the eukaryotic expression plasmid containing heavy chain, light chain, and J chain genes were constructed respectively. CHO-S cells were transiently co-transfected with 4 plasmids (heavy, light, J, and SC) or 2 plasmids (heavy+light+J and SC) for assembling and expression of sIgA antibody. sIgA antibody was purified and identified by SDS-PAGE and Western blotting. The binding activity and neutralizing activity of sIgA antibody against FMDV were evaluated by indirect ELISA and virus neutralization assay. **[Results]** sIgA antibody against FMDV could be successfully assembled and expressed after transfection of CHO-S cells with 4 or 2 plasmids. The binding and neutralizing abilities of sIgA against type O and type A FMDV were stronger than those of IgG. **[Conclusion]** This study established an efficient expression system for sIgA against FMDV, laying a foundation for the development of mucosal vaccines and antiviral drugs against FMDV in the future.

Keywords: foot-and-mouth disease virus; secreted IgA antibody; construction and expression; characterization

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是侵害猪、牛和羊等偶蹄动物的烈性传染病,是我国动物疫病防控中长期规划中重点防控的动物疫病之一。该病自 1897 年确定病原以来仍未在全球范围内得到控制和根除,且一直威胁着世界畜牧业的发展。我国是 FMD 流行较为严重的国

家之一,疫情常年不断,其暴发和流行对我国畜牧业的健康发展构成了严重威胁。

FMD 的病原是口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV),主要通过呼吸道和消化道进入易感动物。黏膜是机体抵抗病毒入侵的第一道防线,分泌型 IgA (secretory IgA, sIgA)是黏

膜表面广泛存在的免疫球蛋白,也是黏膜免疫的主要抗体,在抗病毒感染中发挥着极为重要的作用^[1],包括中和病毒、抑制病毒吸附、清除病毒以及调节黏膜免疫反应等^[2-3]。sIgA 分子由 2 个 IgA 单体、1 条 J 链和 1 条分泌片(secretory component, SC)构成^[4]。sIgA 的特殊结构使其不仅具有高稳定性,还具有非特异性的病原体结合活性以及更高的抗病毒活性^[4],在黏膜抗感染领域展现出巨大的应用潜力。近年来,随着抗体工程技术的快速发展,体外表达组装完整 sIgA 的研究受到国内外学者越来越多的关注^[5-10],尤其是在人类传染性疾病的抗体药物开发中^[9]。

FMD 灭活疫苗的免疫接种是预防和控制该病的主要手段。疫苗免疫虽能有效防止动物的临床发病,但无法阻止免疫动物再次感染并形成持续带毒,从而成为疾病传播的主要传染源。为了发展更有效的抗 FMDV 策略,实现对疾病的精准防控,本研究以实验室前期筛选的 1 株抗 O 型和 A 型 FMDV 的 IgG 型中和抗体 POA-8 为模板,体外构建并表达 sIgA,并检测其与 FMDV 的结合活性和中和活性,以期为未来 FMD 黏膜疫苗和抗病毒药物的开发提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和病毒

抗 O 型和 A 型 FMDV 的 IgG 型中和抗体 POA-8 的重链和轻链表达质粒 pcDNA3.4-pOA-8H 和 pcDNA3.4-pOA-8L^[11]、CHO-S 和 BHK-21 细胞均由中国农业科学院兰州兽医研究所保存;O 型 FMDV (O/HN/CHA/93、O/HK99、O/GSLX 和 O/XJ/CHA/2017)和 A 型 FMDV (A/WH/09 和 A/F72)均由国家口蹄疫参考实验室分离保存。

1.2 主要试剂

质粒大量提取试剂盒、大肠杆菌 JM109 感受态细胞、蛋白质相对分子质量 marker,宝生

物工程(大连)有限公司;ExpiCHO™ Expression System、MEM 细胞培养基、胎牛血清, Gibco 公司;HiTrap TALON 亲和层析柱填料, Pierce 公司;HRP 标记的抗 His 鼠源标签抗体,南京金斯瑞生物科技有限公司。

1.3 抗 FMDV sIgA 抗体相关表达载体的构建

以实验室构建保存的抗 O 型和 A 型 FMDV 的 IgG 型中和抗体 POA-8 的重链表达质粒 pcDNA3.4-pOA-8H 为模板,构建 IgA 抗体的重链表达质粒。首先将密码子优化(按照中国仓鼠的密码子)的猪源 IgA 抗体的恒定区编码基因(IMG: AB699687)委托苏州金唯智生物科技有限公司全基因合成,并替换 pcDNA3.4-pOA-8H 质粒中相应的区域,构建 IgA 抗体的重链表达质粒 pcDNA3.4-IgA-8H。同样地,将密码子优化的猪源 J 链编码基因(GenBank 登录号为 XM003356961)和猪源 SC 编码基因(GenBank 登录号为 NM214159)的末尾分别加入 HA 和 6×His 标签,并在每个序列的两端分别添加 *Not* I 和 *Eco* R I 酶切位点,委托苏州金唯智生物科技有限公司全基因合成后分别克隆至 pcDNA3.4 载体中,构建重组表达载体 pcDNA3.4-J 和 pcDNA3.4-SC。此外,将抗 FMDV IgA 抗体的重链、轻链和 J 链基因(每个基因末端加入 6×His 标签)之间插入猪捷申病毒自我裂解的 P2A 短肽(ATNFSLLKQAGDVEENPGP)基因,然后在序列两端添加 *Nhe* I 和 *Eco* R I 酶切位点,全部基因参考中国仓鼠密码子优化后,委托苏州金唯智生物科技有限公司全基因合成,并克隆至 pcDNA3.4 质粒中,构建重组质粒 pcDNA3.4-IgA-H-L-J。

1.4 sIgA 的表达与纯化

采用 ExpiCHO™ Expression Medium 培养的 CHO-S 悬浮细胞用于 sIgA 抗体的表达。将 3×10^6 个/mL 的 CHO-S 细胞培养 18 h 后进行细胞计数,并在室温下 1 000 r/min 离心 10 min 后

收集细胞, 用预热的培养基吹散并将细胞密度调整为 6×10^6 个/mL。取 2 个洁净的离心管, 分别加入 1 000 μ L OptiPRO™ SFM 培养基, 一管中加入 60 μ g 的轻链、重链、J 链和 SC 表达质粒(4:4:1:1)的混合液, 或者加入 50 μ g pcDNA3.4-IgA-H-L-J 和 pcDNA3.4-SC 质粒(4:1)的混合液; 另一管中加入 80 μ L 转染试剂 ExpiFectamine™ CHO, 混匀后室温静置 2 min。将 2 管混合液合并, 上下轻轻颠倒 4–5 次后室温静置 5 min。将上述混合液缓慢加入细胞中, 边加边轻轻摇动, 加完后将细胞置于 37 °C 恒温培养箱中悬浮培养。转染 20 h 后加入 150 μ L ExpiCHO™ Enhancer 和 6 mL ExpiCHO™ Feed 的预混液继续培养。培养 7 d 后收集表达上清, 用 HiTrap TALON 柱进行抗体纯化, 咪唑梯度洗脱下来的抗体置于 PBS 中透析 3 次, 每次 3 h。透析后的抗体用聚乙二醇 8000 (PEG 8000) 进行浓缩, 并用 0.22 μ m 过滤器过滤除菌后分装, 测量浓度后于 -80 °C 保存备用。

1.5 sIgA 抗体的 SDS-PAGE 鉴定

取纯化的抗体各 30 μ L 分别加入离心管, 一管加入 10 μ L 含有还原剂 β -巯基乙醇的 4 $\times$ loading buffer, 置于 100 °C 金属浴中加热 10 min。另一管加入 10 μ L 不含还原剂的 4 $\times$ loading buffer, 不进行煮样处理。装配好电泳设备, 加入电极缓冲液, 将准备好的样品加入胶孔中, 每孔 15 μ L, 同时设置蛋白 marker 作为对照, 每个样品跑 2 块 PAGE 胶, 1 块用于染色判定目标蛋白的表达情况, 1 块用于 Western blotting 分析。

1.6 sIgA 抗体的 Western blotting (WB) 鉴定

SDS-PAGE 结束后取下电泳胶直接进行 WB 鉴定。取还原性和非还原性胶进行转膜, 转膜前切除胶孔裁取与胶面积大小相近的 PVDF 膜, 用甲醇浸泡 30 s, 按照黑胶白膜的顺序在转印夹从下到上(滤网-海绵-蛋白胶-PVDF 膜-海绵-滤

网)依次排放置于转移槽中, 接通电源 200 mA 运行 2 h 后非还原性样品转膜电流调整为 350 mA 继续运行 4 h。转印结束后取下 PVDF 膜, 置于 5% 脱脂奶粉中, 室温摇床封闭 2 h。PBST 漂洗膜 3 次后将 PVDF 膜放入稀释好的 His 标签抗体(1:10 000 稀释)溶液中, 室温孵育 1 h。一抗孵育完成后 PBST 洗膜 3 次, 除去表面未结合的抗体。取清洗好的 PVDF 膜浸泡在显影液中反应 30 s 后拍照保存。

1.7 sIgA 抗体的反应性分析

取已灭活的 O 型和 A 型 FMDV 作为包被抗原检测纯化 sIgA 抗体的反应性。将纯化灭活的 O/HK99 与 A/WH09 抗原用 PBS 稀释至 1 μ g/mL 后加入酶标板, 每孔 100 μ L, 4 °C 过夜。第 2 日弃包被抗原, PBST 洗 5 次, 每孔加入 100 μ L 封闭液(1% BSA+5% 蔗糖+PBS), 37 °C 封闭 2 h, PBST 洗 5 次后吹干。将同一浓度的待检抗体(两质粒共转表达纯化的 sIgA 抗体和实验室纯化的 IgG 抗体 POA-8) 2 倍系列稀释后加入酶标板, 每孔 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h 后 PBST 洗 5 次并拍干, 每孔加入 HRP 标记的 His 标签抗体(1:10 000) 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h 后 PBST 洗 5 次拍干, 同时设 PBS 阴性对照。加入 100 μ L TMB 显色液, 37 °C 恒温培养箱显色 15 min 后加入终止液, 用酶标仪测定 450 的吸光值, 结果用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析, 按 S/C.O 方式统计, S 为样本 OD_{450} 值, C.O 即 cut-off 值(阳性判定值), 如公式(1)计算。

$$C.O = 2.1 \times N \quad (1)$$

式中: N 为阴性对照 OD_{450} 值, 当 N 不足 0.05 时按 0.05 计算, $S/C.O \geq 1$ 判定为阳性, $S/C.O < 1$ 判定为阴性。根据 cut-off 值对应的抗体浓度作为判定数值, 数值越小, 反应性越强。

1.8 sIgA 抗体中和活性的检测

将倍比稀释(1:2–1:128)的 sIgA 抗体置于 96 孔细胞培养板中, 每个稀释度设 2 孔, 每孔 50 μ L。随后, 每孔加入 100 TCID₅₀/50 μ L 的 O

型和 A 型 FMDV。两质粒共转表达纯化的 sIgA 抗体和 POA-8 抗体分别与病毒液混匀后置于 37 °C 培养箱孵育 1 h。接着, 每孔加入 50 μ L BHK-21 细胞(1×10^6 /mL– 2×10^6 /mL), 同时设置 100、10、1 和 0.1 TCID₅₀/50 μ L 的病毒对照, 每个稀释度做 3 个重复。37 °C 培养箱培养 72 h 后, 在显微镜下观察细胞病变情况, 统计结果并计算中和病毒的抗体效价 IC₅₀。IC₅₀ 是指达到 50% 抑制效果时所需的药物或抑制剂的浓度, 通常用于评估药物、抗体或化合物对酶、细胞、受体或微生物的抑制强度。抗体 IC₅₀ 计算如公式(2)所示, IC₅₀ 值越高, 表明抗体中和效率越低^[12]。实验重复 2 次。

$$\text{抗体 IC}_{50} = \text{抗体浓度} / \text{抗体中和效价} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 sIgA 抗体的 SDS-PAGE 鉴定

对 4 质粒和 2 质粒共转表达纯化的 sIgA 抗体进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 1 所示。在还原条件下, 2 种方法表达纯化的 sIgA 抗体均

裂解为重链、轻链、J 链和 SC 分泌片(图 1A、1C)。重链和轻链的大小分别为 55 kDa 和 25 kDa 左右, J 链和 SC 实际分别为 15 kDa 和 66 kDa 左右, 由于糖基化的影响, 这些纯化产物在凝胶上显示的相对分子质量均略高于理论值(图 1A、1C)。在非还原条件下, 2 种方法表达纯化的抗体在 SDS-PAGE 凝胶上均正确组装为大小为 400 kDa 左右的 sIgA 抗体分子(图 1B、1D), 但存在一些不完全组装的中间产物, 可能是由于抗体纯化过程中未使用分子筛所致。

2.2 sIgA 抗体的 WB 鉴定

将 4 质粒和 2 质粒共转染表达纯化的 sIgA 抗体进行 SDS-PAGE 后转膜, 用 WB 检测表达纯化的 sIgA 抗体。结果表明在还原性条件下, 纯化的 sIgA 裂解为重链、轻链、J 链和 SC 分泌片, 由于糖基化的影响, 分子量均略高于理论值(图 2A)。在非还原性条件下, 4 质粒和 2 质粒共转染均正确组装了 sIgA 抗体分子, 相对分子质量符合预期, 但也存在不完全组装的 SC、IgA、dIgA 等分子(图 2B)。

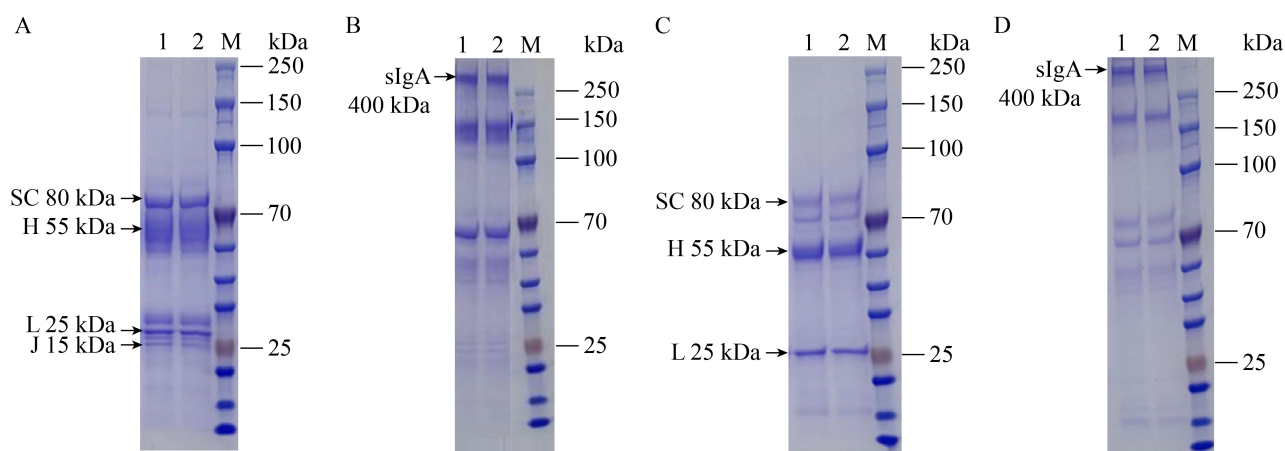


图1 质粒共转染纯化sIgA抗体的SDS-PAGE。A、C: 还原性SDS-PAGE; B、D: 非还原性SDS-PAGE。M: 250 kDa蛋白marker; 1: 4质粒共转染纯化的sIgA抗体; 2: 2质粒共转染纯化的sIgA抗体。

Figure 1 SDS-PAGE of purified sIgA antibodies obtained by transfection with plasmids. A, C: Reductive SDS-PAGE; B, D: Non-reductive SDS-PAGE. M: 250 kDa protein marker; 1: The purified sIgA antibodies were obtained by transfection with four plasmids; 2: The purified sIgA antibodies were obtained by transfection with two plasmids.

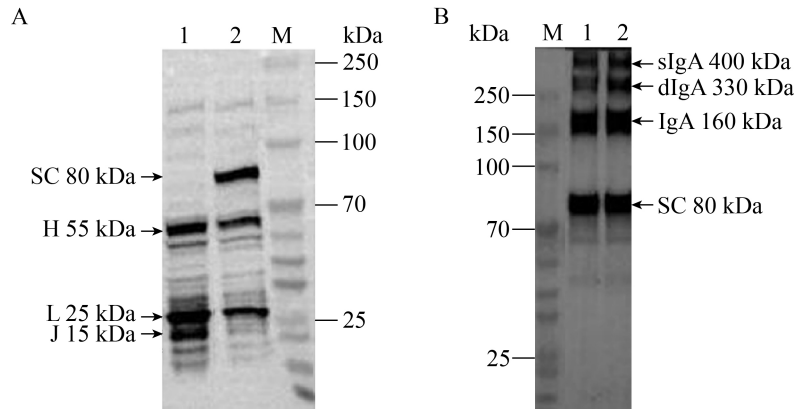


图2 WB鉴定纯化的sIgA抗体。A: 还原性WB; B: 非还原性WB。M: 250 kDa蛋白marker; 1: 4质粒共转染纯化的sIgA抗体; 2: 2质粒共转染纯化的sIgA抗体。

Figure 2 The purified sIgA antibodies were identified by WB. A: Reductive WB; B: Non-reductive WB. M: 250 kDa protein marker; 1: The purified sIgA antibodies were obtained by transfection with four plasmids; 2: The purified sIgA antibodies were obtained by transfection with two plasmids.

2.3 sIgA 抗体反应性的检测

通过间接 ELISA 检测纯化的 sIgA 抗体和 POA-8 抗体与 O 型和 A 型 FMDV 的反应性, 抗体反应性曲线与 cut-off 值相交时(即 S/C.O=1)对应的抗体浓度作为判定数值, 数值越小, 反应性越强(图 3)。根据 GraphPad Prism 拟合, sIgA 抗体与 FMDV O/HK99 和 A/WH09 的反应性曲线与 cut-off 值相交的浓度分别为 0.008 8 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.728 8 $\mu\text{g/mL}$, 而 IgG 抗体的反应性曲线与 cut-off 值相交时的浓度分别为 0.038 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 5.000 8 $\mu\text{g/mL}$, 表明更低浓度的 sIgA 抗体即可与 FMDV 抗原发生反应, 说明 sIgA 抗体与 FMDV 的结合能力显著强于 IgG 抗体。

2.4 sIgA 抗体中和 FMDV 活性的检测

通过微量病毒中和试验测定了 POA-8 抗体和 sIgA 抗体中和 O 型和 A 型 FMDV 的活性。结果表明, 由广谱中和性 IgG 转变得到的 sIgA 抗体中和 O 型和 A 型 FMDV 的能力明显强于 IgG 抗体, 对应的 IC_{50} 值如表 1 所示。

3 讨论与结论

近年来, 随着抗体工程的快速发展, 单克

隆抗体在科学研究和疾病(包括病毒传染性疾病)治疗领域得到了广泛的应用^[13-14]。sIgA 分子具有极高的稳定性和极强的抗病毒活性, 体外组装表达 sIgA 对于传染性疾病的治疗、黏膜疫苗的开发等具有重要意义。因此, 国外学者已建立了多种 sIgA 的表达系统^[5-10]。例如 Berdoz 等^[5]将人鼠嵌合的重链、轻链、人类 J 链和 SC 片段表达载体转染 CHO 细胞, 成功建立了有效表达人鼠嵌合 sIgA 抗体的系统。Ma 等^[6]将包含兔子的 SC 及鼠源 kappa 链、重链和 J 链转入转基因植物, 成功表达了 sIgA 抗体。Johansen 等^[10]则通过哺乳动物细胞成功组装表达了 sIgA 分子。这些研究表明, 利用抗体工程手段在单个非免疫细胞中组装表达具有天然结构和功能的 sIgA 分子是完全可行的。然而, 体外重组表达全分子 sIgA 是一个非常复杂的过程, 一方面天然 sIgA 由 2 分子 IgA、J 链和 SC 分泌片组成^[4], 这在一定程度上限制了体外重组 sIgA 的有效组装; 另一方面 sIgA 的分子量较大, 约为 400 kDa, 组装起来较为困难。尽管已有报道成功组装表达了完整的 sIgA, 但其表达成本高、表达量低, 一直制约着 sIgA 抗体的应用和发展。

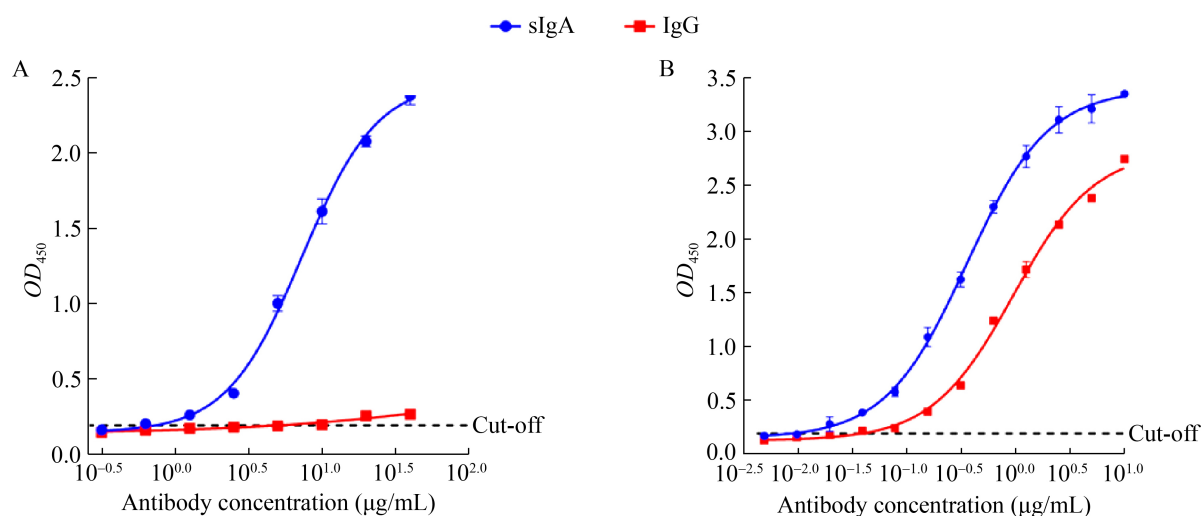


图3 间接ELISA检测纯化抗体与FMDV的反应性。A: A型FMDV与抗体的反应性; B: O型FMDV与抗体的反应性。

Figure 3 The reactivity of the antibodies with FMDV were detected by indirect ELISA. A: The reactivity of the antibodies with type A FMDV; B: The reactivity of the antibodies with type O FMDV.

表1 IgG和sIgA抗体中和FMDV的 IC_{50}

Table 1 The IC_{50} of IgG and sIgA neutralizing FMDV

Antibody	O/HK99	O/GSLX	O/HN/CHA/93	O/XJ/CHA/2017	A/WH09	A/GDMM/CHA/2013
IgG	19.156a	14.367a	38.313b	7.766c	38.313b	28.734b
sIgA	6.406c	1.602d	12.813a	1.602d	12.813a	12.813a

IC_{50} (抗体浓度/抗体中和效价)用于评价抗体的中和作用, IC_{50} 值越低表明抗体的中和能力越强, IC_{50} 值越高说明抗体的中和活性越弱^[12]。a代表抗体浓度在10–25 $\mu\text{g/mL}$ 之间的 IC_{50} ; b代表抗体浓度在25–50 $\mu\text{g/mL}$ 之间的 IC_{50} ; c代表抗体浓度在0–5 $\mu\text{g/mL}$ 之间的 IC_{50} ; d代表抗体浓度在1–5 $\mu\text{g/mL}$ 之间的 IC_{50} 。

IC_{50} (antibody concentration/the titer of antibody neutralization) is used to evaluate the neutralizing activity of antibodies, Antibody with lower IC_{50} value exhibits superior neutralizing activity, antibody with higher IC_{50} value demonstrates inferior neutralizing efficacy^[12]. a representing IC_{50} value of 10–25 $\mu\text{g/mL}$ of antibody neutralization; b representing IC_{50} value of 25–50 $\mu\text{g/mL}$ of antibody neutralization; c representing IC_{50} value of 5–10 $\mu\text{g/mL}$ of antibody neutralization; d representing IC_{50} value of 5–10 $\mu\text{g/mL}$ of antibody neutralization.

常规的 sIgA 表达方法是分别构建 IgA 的重链、轻链、J 链和 SC 分泌片的 4 种真核表达质粒^[6], 然后共转染哺乳动物细胞组装表达 sIgA 抗体。然而, 转染质粒的数目会影响 sIgA 抗体的表达产量^[15–17]。一些学者通过将 IgA 抗体的重链、轻链、J 链或将重链、轻链、J 链和 SC 顺序连接在一个载体上, 通过转染 2 个质粒或 1 个质粒组装表达 sIgA, 结果表明表达产量明显高于 4 质粒共转染的组装效率^[16–17]。为了提高

sIgA 的组装表达效率, 本研究除了构建 4 质粒共转的表达方法, 同时也构建了 2 质粒和 1 质粒的表达方法。其中, 4 质粒和 2 质粒共转染 CHO 细胞后均成功组装表达了 sIgA 抗体, 但由于所用试剂成本较高, 未对 2 种方法的表达条件进行优化, 因此未能明确二者表达量的差异。然而, 1 质粒(重链、轻链、J 链和 SC 在一个载体上)转染后未能检测到 sIgA 抗体的表达, 推测可能是插入载体的基因过大(约 5 000 bp)所致。

除了减少共转染质粒的个数以增加 sIgA 的表达量外, 建立 IgA、dIgA 和 sIgA 的稳定细胞系也可提高 sIgA 抗体的表达量^[5,15], 这将使 sIgA 的广泛应用成为可能。本研究还发现不同的培养基和转染试剂也会影响 sIgA 抗体的表达效率。本研究最初使用某国产培养剂和转染试剂反复摸索 sIgA 抗体的表达条件, 遗憾的是 SDS-PAGE 和 WB 一直未能检测到 sIgA 抗体的有效表达, 这可能与所用试剂的转染效率较低有关。后期使用本研究提到的进口转染试剂和培养基后, 一次性成功检测到 sIgA 的表达, 但这些进口试剂成本较高, 限制了对 2 质粒和 4 质粒共转染表达 sIgA 抗体条件的优化和产量的提升。

抗体分子由 2 条相同的轻链(light chain, L)和 2 条相同的重链(heavy chain, H)组成。轻链和重链在结构上均可分为可变区和恒定区, 即轻链可变区(light chain variable region, LV)和轻链恒定区(light chain constant region, LC), 以及重链可变区(heavy chain variable region, HV)和重链恒定区(heavy chain constant region, HC)^[1]。IgA 和 IgG 抗体的区别在于轻链相同, 而重链恒定区不同^[1]。因此, 本研究以前期已鉴定的具有广谱中和活性的抗 FMDV IgG 抗体 POA-8 为基础, 构建抗 FMDV IgA 抗体的重链表达质粒, 同时构建猪源的 J 链和 SC 分泌片的真核表达质粒, 以及 IgA 抗体的重链、轻链、J 链基因在同一载体上的真核表达质粒。利用 ExpiFectamine™ CHO 转染试剂介导转染用 ExpiCHO™ Expression Medium 培养的 CHO-S 细胞, 纯化的抗体通过 SDS-PAGE 和 WB 分析。结果表明, 用 4 质粒或 2 质粒共转染 CHO-S 细胞后均成功组装表达了 sIgA 抗体。病毒中和试验表明, 纯化的 sIgA 抗体中和 O 型和 A 型 FMDV 的能力显著高于 IgG 抗体; 间接 ELISA 的结果表明 sIgA 与 FMDV 的反应性也明显高于 IgG 抗体, 说明 sIgA 通过增强与抗原的亲合力而获得更强的抗病毒作用。

本研究成功建立了表达抗 FMDV sIgA 抗体

的方法, 不仅为其他病毒 sIgA 的成功表达提供了借鉴, 而且为未来 FMD 黏膜疫苗和抗病毒药物的开发奠定了前期基础。

作者贡献声明

刘锋: 研究构思和设计, 实验操作, 论文修改; 李坤: 实验设计与指导; 马雪青: 实验操作与数据处理; 欧阳一凡: 实验操作; 孙普: 实验操作与数据处理; 章兴赅: 实验操作与图片处理; 曹轶梅: 协助实验操作, 论文修改; 白兴文: 协助实验操作, 论文修改; 袁红: 数据收集和处理; 李凤娟: 协助实验操作; 刘在新: 协助实验设计和论文指导; 卢曾军: 协助实验设计和论文指导; 李平花: 研究设计、论文指导和全文初稿的撰写。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] SNOECK V, PETERS IR, COX E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species[J]. *Veterinary Research*, 2006, 37(3): 455-467.
- [2] CORTHÉSY B. Recombinant immunoglobulin A: powerful tools for fundamental and applied research[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(2): 65-71.
- [3] OKUYA K, YOSHIDA R, MANZOOR R, SAITO S, SUZUKI T, SASAKI M, SAITO T, KIDA Y, MORI-KAJIHARA A, KONDOH T, SATO M, KAJIHARA M, MIYAMOTO H, ICHII O, HIGASHI H, TAKADA A. Potential role of nonneutralizing IgA antibodies in cross-protective immunity against influenza A viruses of multiple hemagglutinin subtypes[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(12): e00408-20.
- [4] SUZUKI T, AINAI A, HASEGAWA H. Functional and structural characteristics of secretory IgA antibodies elicited by mucosal vaccines against influenza virus[J]. *Vaccine*, 2017, 35(39): 5297-5302.
- [5] BERDOZ J, BLANC CT, REINHARDT M, KRAEHEBUHL JP, CORTHÉSY B. *In vitro* comparison of the antigen-binding and stability properties of the various molecular forms of IgA antibodies assembled and produced in CHO cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(6): 3029-3034.
- [6] MA JK, HIATT A, HEIN M, VINE ND, WANG F,

- STABILA P, van DOLLEWEERD C, MOSTOV K, LEHNER T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants[J]. *Science*, 1995, 268(5211): 716-719.
- [7] CHINTALACHARUVU KR, MORRISON SL. Production of secretory immunoglobulin A by a single mammalian cell[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(12): 6364-6368.
- [8] SHOJI K, TAKAHASHI T, KUROHANE K, IWATA K, MATSUOKA T, TSURUTA S, SUGINO T, MIYAKE M, SUZUKI T, IMAI Y. Recombinant immunoglobulin A specific for influenza A virus hemagglutinin: production, functional analysis, and formation of secretory immunoglobulin A[J]. *Viral Immunology*, 2015, 28(3): 170-178.
- [9] MA JKC, HIKMAT BY, WYCOFF K, VINE ND, CHARGELEGUE D, YU L, HEIN MB, LEHNER T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans[J]. *Nature Medicine*, 1998, 4(5): 601-606.
- [10] JOHANSEN FE, NORDERHAUG IN, RØE M, SANDLIE I, BRANDTZAEG P. Recombinant expression of polymeric IgA: incorporation of J chain and secretory component of human origin[J]. *European Journal of Immunology*, 1999, 29(5): 1701-1708.
- [11] LI FJ, WU SQ, LV L, HUANG SL, ZHANG ZL, ZERANG ZX, LI PH, CAO YM, BAO HF, SUN P, BAI XW, HE Y, FU YF, YUAN H, MA XQ, ZHAO ZX, ZHANG J, WANG J, WANG T, LI D, ZHANG Q, HE JJ, LIU ZX, LU ZJ, LEI DS, LI K. Discovery, recognized antigenic structures, and evolution of cross-serotype broadly neutralizing antibodies from porcine B-cell repertoires against foot-and-mouth disease virus[J]. *PLoS Pathogens*, 2024, 20(10): e1012623.
- [12] 王省. 利用单个B细胞抗体技术研制口蹄疫病毒O型全牛源单克隆工程抗体[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- WANG S. Development of genetically engineered monoclonal antibody from antigen-specific single B cells of cattle against foot-and-mouth disease virus serotype O[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese).
- [13] SIMMONS CP, BERNASCONI NL, SUGUITAN AL, MILLS K, WARD JM, CHAU NV, HIEN TT, SALLUSTO F, HA DQ, FARRAR J, de JONG MD, LANZAVECCHIA A, SUBBARAO K. Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza[J]. *PLoS Medicine*, 2007, 4(5): e178.
- [14] ZANIN M, KECK ZY, RAINEY GJ, LAM CK, BOON ACM, RUBRUM A, DARNELL D, WONG SS, GRIFFIN Y, XIA JM, WEBSTER RG, WEBBY R, JOHNSON S, FOUNG S. An anti-H5N1 influenza virus FcDART antibody is a highly efficacious therapeutic agent and prophylactic against H5N1 influenza virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(8): 4549-4561.
- [15] WESTERHOF LB, WILBERS RHP, van RAAIJ DR, van WIJK CZ, GOVERSE A, BAKKER J, SCHOTS A. Transient expression of secretory IgA in planta is optimal using a multi-gene vector and may be further enhanced by improving joining chain incorporation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 6: 1200.
- [16] JUAREZ P, HUET-TRUJILLO E, SARRION-PERDIGONES A, FALCONI EE, GRANELL A, ORZAEZ D. Combinatorial analysis of secretory immunoglobulin a (*SIgA*) expression in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(3): 6205-6222.
- [17] MOLDT B, SAYE-FRANCISCO K, SCHULTZ N, BURTON DR, HESSELL AJ. Simplifying the synthesis of *SIgA*: combination of dIgA and rhSC using affinity chromatography[J]. *Methods*, 2014, 65(1): 127-132.