

• 动物及兽医生物技术 •

分泌抗 PRRSV 抗体的猪源单克隆 B 细胞永生生化方法的建立

王健¹, 张婧¹, 李坤¹, 孙普¹, 李国秀¹, 李娇阳¹, 曹轶梅¹, 赵志荀¹, 袁红¹, 付元芳¹, 李平花¹, 李冬¹, 刘在新¹, 卢曾军^{1,2}

1 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

2 兰州大学 动物医学与生物安全学院, 甘肃 兰州 730046

王健, 张婧, 李坤, 孙普, 李国秀, 李娇阳, 曹轶梅, 赵志荀, 袁红, 付元芳, 李平花, 李冬, 刘在新, 卢曾军. 分泌抗 PRRSV 抗体的猪源单克隆 B 细胞永生生化方法的建立. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2872-2882.

WANG J, ZHANG J, LI K, SUN P, LI GX, LI JY, CAO YM, ZHAO ZX, YUAN H, FU YF, LI PH, LI D, LIU ZX, LU ZJ. A method for immortalizing swine monoclonal B cells secreting anti-PRRSV antibodies. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2872-2882.

摘要: 猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的高度接触性传染疾病, 对社会经济造成重大损失。目前并未获得有效的中和抗体应用于科研及治疗中, 所以建立一种筛选具有中和活性的单克隆抗体的方法, 对 PRRSV 防治及抗原位点筛选具有重要意义。单克隆抗体在人类和动物的众多疾病治疗及诊断中得到广泛应用, 而针对不同病原如何筛选出有效的中和抗体是目前急需解决的问题。在单克隆抗体筛选的众多方法中, B 细胞永生生化方法是一种有效的且大概率能获得单克隆中和抗体的方法。通过将 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 两个基因中间通过 *f2a* 序列连接后构建到一个载体上, 进行逆转录病毒包装。包装成熟的逆转录病毒感染免疫 PRRSV 的猪源淋巴细胞, 并使用加入 CD40L 和 IL21 细胞因子的完全培养基培养, 然后使用 CD21 作为筛选标记通过磁珠法进行 B 细胞筛选, 最后对筛选得到的 B 细胞单克隆化并进行检测, 验证是否有抗体分泌。结果显示, 构建的质粒不论单独转染还是与病毒包装时的两种质粒共同转染, 均可以成功表达, 且包装病毒可成功感染细胞。感染后的淋巴细胞可以检测到抗体分泌, 进一步筛选得到的 B 细胞也可以检测到抗体分泌。因此, 本研究成功建立了一种针对 PRRSV 的单克隆抗体筛选方法。

关键词: B 细胞永生生化; 单克隆抗体; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 磁珠法

Received: November 17, 2021; **Accepted:** March 14, 2022; **Published online:** March 25, 2022

Supported by: Natural Science Foundation of Gansu Province, China (20JR10RA022); The Key Research and Development Program of Gansu Province, China (20YF3NA005)

Corresponding author: LU Zengjun. Tel: +86-931-8343390; E-mail: luzengjun@caas.cn

基金项目: 甘肃省青年科技基金 (20JR10RA022); 甘肃省重点研发计划项目 (20YF3NA005)

A method for immortalizing swine monoclonal B cells secreting anti-PRRSV antibodies

WANG Jian¹, ZHANG Jing¹, LI Kun¹, SUN Pu¹, LI Guoxiu¹, LI Jiaoyang¹, CAO Yimei¹, ZHAO Zhixun¹, YUAN Hong¹, FU Yuanfang¹, LI Pinghua¹, LI Dong¹, LIU Zaixin¹, LU Zengjun^{1,2}

1 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a highly contagious disease caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), which causes great economic losses. At the moment, no effective neutralizing antibody is available for scientific research and treatment. Therefore, developing a method for screening the neutralizing monoclonal antibodies is of great significance for the prevention and treatment of PRRSV and the screening of antigen sites. Monoclonal antibodies have been widely used in the treatment and diagnosis of many human and animal diseases. Therefore, screening effective neutralizing antibodies for different pathogens is an urgent task. Among the methods for monoclonal antibody screening, B cell immortalization is an effective method to obtain neutralizing monoclonal antibody. Specifically, in this study, the *bcl-6* and *bcl-xl* genes were connected by *f2a* and then the yielded product was ligated to a vector for retrovirus packaging. The swine lymphocytes immunized with PRRSV were infected the yielded mature viruses and cultured in the complete medium containing CD40L and IL21 cytokines. Then, CD21 was used as the marker to screen B cells with the magnetic bead method. Finally, monoclonal B cells were obtained and the secretion of antibodies was tested. The results showed that the plasmid, either being transfected alone or with the packaged plasmids, could be expressed, and that the packaged retrovirus could infect the cells. Moreover, the infected lymphocytes secreted antibodies, so did the screened B cells. Therefore, the method for screening monoclonal antibody against PRRSV was successfully established.

Keywords: B cell immortalization; monoclonal antibody; PRRSV; magnetic bead method

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 自 1980 年暴发以来, 在近几年对全世界养猪行业造成了非常严重的经济损失。PRRS 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的, 此病毒属于尼多病毒目、动脉炎病毒科、动脉炎病毒属成员, 具有囊膜结构, 且能形成大小约 55 nm 的

二聚体。基因组为单股正链 RNA, 长约 15 kb, 主要包含 11 个开放阅读框, 共产生 14 种非结构蛋白和 8 种结构蛋白^[1]。PRRSV 在动物体内产生中和活性抗体水平非常低, 即使多次感染也很难获得, 研究发现, 囊膜蛋白 (glycoprotein 5, GP5) 作为中和活性表位, 受到糖基化和上游存在诱饵表位等因素的影响^[2]。因此如何获得中和抗体的方法成为研究重点, 也是今后研制

出准确有效检测方法的基础, 所以获得具有对猪繁殖与呼吸综合征病毒产生中和活性的单克隆抗体方法就成为迫切需要解决的问题。

细胞永生指体外培养的细胞自发的或受外界因素的影响, 生长周期发生改变, 从增殖衰老危机中逃离, 获得无限增殖和长期传代的能力^[3]。使用较多的永生方法有杂交瘤细胞技术、EB 病毒感染、SV40 病毒感染和遗传修饰等。通过将产生抗体的 B 细胞永生进而通过筛选分离, 获得可以分泌抗体且能够稳定传代的永生 B 细胞^[4], 是获得 PRRSV 中和抗体的一种有效方法。Kwakkenbos 等利用逆转录病毒系统感染 B 细胞方法, 成功获得能够分泌抗人呼吸道合胞病毒 (respiratory syncycial virus, RSV) 抗体的永生 B 细胞株^[5]。Goldeck 等也利用逆转录病毒和可进行细胞分选的流式细胞仪相结合的方法, 初步建立了一种分泌 PRRSV 中和抗体永生 B 细胞的方法^[6]。

本研究也将建立适用于 PRRSV 的 B 细胞永生方法, 将维持细胞增殖, 抑制细胞分化基因 *bcl-6*^[7-8] 和抗凋亡基因 *bcl-xl*^[9-10] 通过逆转录病毒系统整合到 B 细胞基因组, 在 CD40L 细胞增殖刺激因子作用下^[11], 使细胞获得稳定传代的能力, 然后在培养基中加入 IL-21 诱导高滴度抗体表达^[12]。利用此方法, 首先经淋巴细胞水平检测发现, 细胞能够存活且有抗体分泌, 然后通过磁珠法进行特异性 B 细胞筛选, 并进行单克隆化, 成功检测到 B 细胞分泌抗体。因此, 此方法用于筛选可分泌抗体的猪源淋巴细胞, 并且通过进一步的筛选检测可获得具有分泌中和活性抗体的永生 B 细胞。

1 材料与方法

1.1 载体和抗体

逆转录病毒包装质粒 pBABE-GFP、pBABE-

vsug 和 pBABE-gag-pol 质粒购于森灵质粒共享平台; Flag 抗体购于 Sigma 公司; CD21 (BB6-11C9.6) PE 标记单克隆抗体购于 Invitrogen 公司; Mouse-FITC 抗体购于 Abcam 公司; Pig-HRP 抗体购于 Abcam 公司; C8 单克隆抗体 (识别 PRRSV N 核衣壳蛋白) 为本实验室制备并保存。

1.2 采血动物、细胞及毒株

采血用猪为经过本实验室分离并保存的 GSWW/15 毒株免疫后的藏麻猪; HEK293T 细胞由本实验室保存; GSWW15 PRRSV 毒株为本实验室分离并保存。

1.3 主要试剂

淋巴细胞分离液 (密度: 1.083 g/mL) 购于 Sigma 公司; 反转录混合液 (PrimeScript™ RT Master Mix) 和 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒购于 TaKaRa 公司; 转染试剂 Lipofectamine® 3000 购于 Invitrogen 公司; Anti-PE Micro Beads 购于 Miltenyi Biotec 公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 大提质粒试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司; RNA 提取试剂盒 RNeasy Plus Mini Kit 与 RNase-Free DNase Set 购自 Qiagen 公司; IMDM 完全培养基 (含 10% FBS、50 μ g/mL CD40L 和 IL-21)、RPMI-1640 完全培养基 (含 10% FBS)、胎牛血清、0.25% 胰酶均购自 Gibco 公司; TMB 底物溶液购自 SURMODICS 公司; PBST 为本实验室配制并保存。

1.4 仪器

实时荧光定量 PCR 仪型号为 QuantStudio5, 购自 Applied Biosystems 公司; Western blotting 仪器购自 BD 公司; 荧光显微镜型号 AMF4300 购自 Life 公司; 荧光共聚焦显微镜 TCS SP8 购自徕卡公司; 细胞计数仪 Countstar 购自上海睿钰生物科技有限公司。

1.5 方法

1.5.1 载体转染及表达鉴定

本实验室设计表达基因片段 *bcl-6-2 \times flag-*

f2a-bcl-xl-2×flag 由金斯瑞生物科技公司合成, 并连接至 pBABE 载体中。将 pBABE-*bcl-6-2×flag-f2a-bcl-xl-2×flag* (简称 pBABE-*bcl-6-xl*) 质粒使用 Lipofectamine[®] 3000 转染至 HEK293T 细胞中表达, 通过 Western blotting、免疫荧光试验和实时荧光定量 PCR 进行外源蛋白表达鉴定。

1.5.2 逆转录病毒包装及感染

将构建好的 pBABE-*bcl-6-xl* 质粒、逆转录病毒包装质粒 pBABE-*vsvg* 和 pBABE-*gag-pol* 质粒共同转染至 HEK293T 细胞中, 共转染 72 h 后提取 RNA 通过实时荧光定量 PCR 检测 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 转录情况, 并通过 Western blotting 在蛋白水平进行验证。

三质粒转染 48 h 后收获培养基上清, 并用 0.22 μm 滤膜过滤后获得成熟病毒, 命名为 Lenti-BCL-6-XL。将病毒感染 HEK293T 细胞 48 h, 重复感染 3 次后提取 RNA 通过实时荧光定量 PCR 检测 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 表达情况, 并通过 Western blotting 和免疫荧光在蛋白水平进行验证。

1.5.3 猪淋巴细胞分离及感染

取新鲜的免疫 PRRSV 病毒猪血 5 mL 左右, 向猪血中加入 1 倍体积 1640 培养基进行稀释 (血液稀释后分离效果更佳), 在 15 mL 离心管中使用垫底法加入 3 mL 淋巴细胞分离液, 避免两种液体界面混合, 室温 800×g 离心 20 min。设置较慢的加速度和减速度, 吸出淋巴细胞层, 再加入 10 mL RPMI-1640 培养基, 颠倒洗涤, 室温 250×g 离心 10 min 收集细胞, 若观察沉淀中红细胞较多, 使用红细胞裂解液裂解, 30 s 之内立即加入 1640 培养基定容至 10 mL, 室温 400×g 离心 15 min。倾倒入上清液, 用无血清培养基 (1640) 重悬细胞。将提取的淋巴细胞培养在 IMDM 完全培养基 (含 10% FBS、50 μg/mL

CD40L 和 IL-21) 中, 并进行逆转录病毒 Lenti-BCL-6-XL 转导 48 h, 重复感染 3 次后, 提取淋巴细胞 RNA 通过实时荧光定量 PCR 检测 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 表达情况, 并通过 ELISA 检测淋巴细胞上清中是否有抗体存在。

1.5.4 B 细胞分选及单克隆感染

对感染后的淋巴细胞进行计数, 每个样品为 10⁷ 个细胞。以 4 °C、300×g 离心细胞悬浮液 10 min。弃上清液。将细胞与用 PE 标记的 CD21 抗体孵育, 孵育 10–15 min。标记液洗涤细胞两次, 4 °C、300×g 离心后弃上清。将细胞重悬到 90 μL 的标记液中, 加入 10 μL MicroBeads (结合 PE 标记抗体) 磁珠后 4 °C 孵育 15 min。孵育结束后, 标记液洗涤细胞两次, 4 °C、300×g 离心后弃上清。将细胞重悬于 500 μL 标记液中, 转移至磁力柱中。取 500 μL 标记液洗磁力柱 3 次。将磁力柱移出磁场, 加入 1 mL 标记液洗脱细胞。将收获的细胞在 IMDM 完全培养基中, 并再次进行逆转录病毒 Lenti-BCL-6-XL 感染 48 h, 重复感染 3 次。将感染后细胞进行计数, 然后按照 50 个细胞/孔在 96 孔板中进行培养。培养 1 周后取培养上清, 通过 ELISA 方法检测 B 细胞上清中是否有抗体存在。

1.5.5 免疫荧光试验

将细胞培养基除去, 用 PBS 洗 2–3 次。4% 的多聚甲醛 500 μL 固定细胞 30 min, 弃固定液 PBS 洗 3 次。加 0.1% 的 Triton X-100 溶液 500 μL 通透细胞膜 15 min, 弃 Triton X-100 溶液 PBS 洗 3 次。加封闭液 (1% BSA+0.1% Triton X-100) 37 °C 封闭 1 h。用封闭液配制一抗 (Anti-Flag), 4 °C 过夜孵育。弃一抗, 用 PBS 洗 3 次。加封闭液配制的二抗, 37 °C 避光孵育 1 h。弃二抗 (Mouse-FITC), 用 PBS 洗 3 次。加 DAPI 染液 (1:500 稀释), 室温避光染核 15 min。弃 DAPI 染液 PBS 洗 2 次。加 500 μL 的 PBS, 置荧光显

显微镜或荧光共聚焦显微镜下观察。

1.5.6 ELISA

在 96 孔酶标板中,每孔加入 50 μ L GSWW15 PRRSV 病毒原液和 50 μ L 抗原稀释液 4 $^{\circ}$ C 过夜包被。MARC145 细胞培养基、MARC145 细胞悬液、1640 培养基作为阴性对照。包被好的板子中分别加入筛选后淋巴细胞培养上清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。孵育结束用 1 \times PBST 洗涤液洗板 5 次, 晾干。将 HRP 标记二抗 Pig-HRP 按 1 : 5 000 稀释至 PBS 中,加入酶标板,每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 作用 15 min。然后用 1 \times PBST 洗涤液洗板 5 次, 晾干。每孔加入 100 μ L 的 TMB 底物溶液, 37 $^{\circ}$ C 作用 15 min。加终止液,每孔 100 μ L, 轻振混匀, 于 10 min 内用酶标仪读 450 nm 吸光值 (OD_{450})。

2 结果与分析

2.1 pBABE-*bcl-6-2* \times *flag-f2a-bcl-xl-2* \times *flag* 载体构建及表达鉴定

将 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 两个基因通过 *f2a* 序列串联在一起, 然后共同构建到 pBABE 载体上(图 1), 使其能够共同表达, 并通过 *f2a* 序列形成两个独立表达且功能完整的蛋白 Bcl-6 (90 kDa 左右) 和 Bcl-xl (30 kDa 左右)。结果显示, 本实验成功构建了 pBABE-*bcl-6-2* \times *flag-f2a-bcl-xl-2* \times *flag* 质粒。将质粒转染 HEK293T 细胞 48 h 后收获细胞, 且在基因转录和蛋白翻译水平(图 2 和图 3) 分别检测到质粒的成功表达。

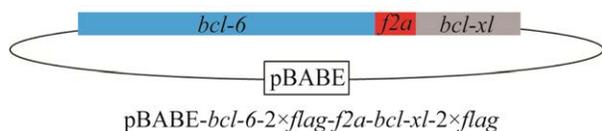


图 1 pBABE-*bcl-6-2* \times *flag-f2a-bcl-xl-2* \times *flag* 载体设计示意图

Figure 1 Schematic diagram of pBABE-*bcl-6-2* \times *flag-f2a-bcl-xl-2* \times *flag* vector design.

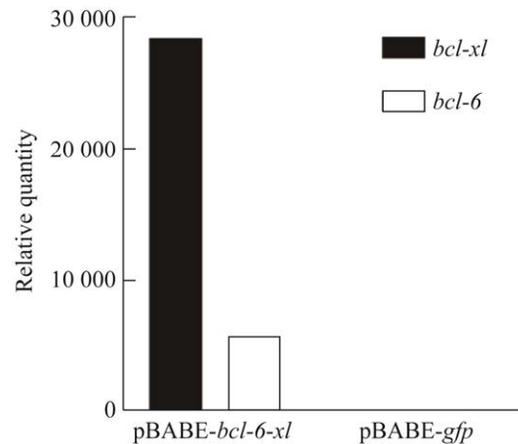


图 2 pBABE-*bcl-6-2* \times *flag-f2a-bcl-xl-2* \times *flag* 质粒转染 HEK293T 细胞后转录水平检测

Figure 2 Transcription levels in HEK293T cells after pBABE-*bcl-6-2* \times *flag-f2a-bcl-xl-2* \times *flag* plasmids transfection.

2.2 BCL-6-XL 逆转录病毒包装及感染后表达情况鉴定

将 pBABE-*bcl-6-2* \times *flag-f2a-bcl-xl-2* \times *flag* 质粒、包装质粒 pBABE-*vsvg* 和 pBABE-*gag-pol* 质粒按照 1 : 1 : 1 的比例, 共转染至 HEK293T 细胞中。72 h 后收获细胞, 通过 qRT-PCR, 在基因转录水平检测到 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 的转录(图 4A), 且在基因转录和蛋白翻译水平分别检测到质粒的成功表达(图 4B)。

转染 48 h 后收获细胞上清并过滤获得成熟病毒颗粒 (Lenti-BCL-6-XL), 将收获的病毒液按照 10% 的比例 (1 mL 培养基接 100 μ L Lenti-BCL-6-XL) 感染 HEK293T 细胞, 感染 48 h, 且重复转导 3 次后收获细胞, 且在基因转录和蛋白翻译水平分别检测到质粒的成功表达(图 5)。感染 72 h 后, 通过免疫荧光检测蛋白表达情况(图 6), 与阴性对照相比能够观察到荧光, 说明蛋白正常表达, 但荧光比例不高, 可能是由病毒感染效率低所导致。

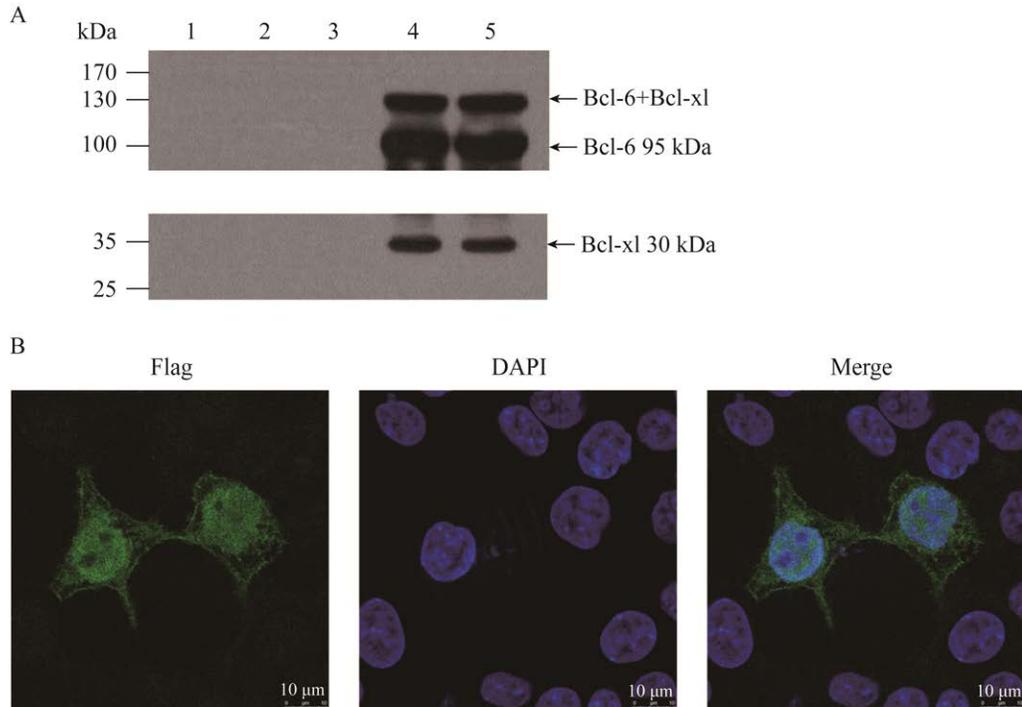


图 3 pBABE-*bcl-6-2×flag-f2a-bcl-xl-2×flag* 质粒转染 HEK293T 细胞蛋白表达结果

Figure 3 Protein expression of HEK293T cells transfected with plasmid. (A) The expression of Bcl-6 and Bcl-xl. Lane 1: HEK293T whole cell lysate; lanes 2–3: after transfection with pBABE-*gfp*; lanes 4–5: after transfection with pBABE-*bcl-6-2×flag-f2a-bcl-xl-2×flag*. (B) Immunofluorescence results (Flag: Bcl-6 and Bcl-xl, DAPI: Nucleus, Merge: Bcl-6 and Bcl-XL are expressed in cells).

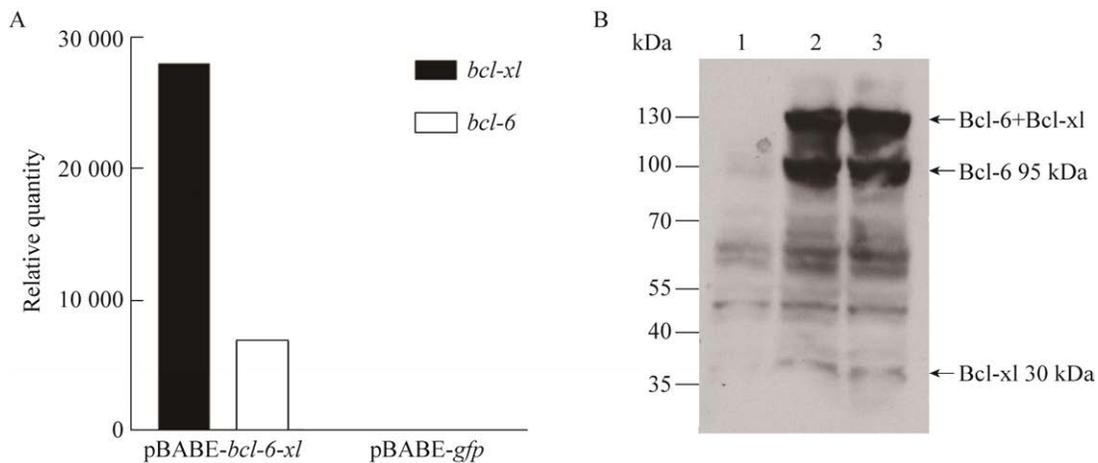


图 4 逆转录病毒包装三质粒共转染 HEK293T 细胞基因转录及蛋白表达结果

Figure 4 Gene transcription and protein expression of HEK293T cells after the transfection of three plasmids. (A) The transcription of *bcl-6* and *bcl-xl*. (B) The expression of Bcl-6 and Bcl-xl. Lane 1: transfected with pBABE-*gfp*; lane 2–3: transfected with pBABE-*bcl-6-2×flag-f2a-bcl-xl-2×flag* and two packaged plasmids.

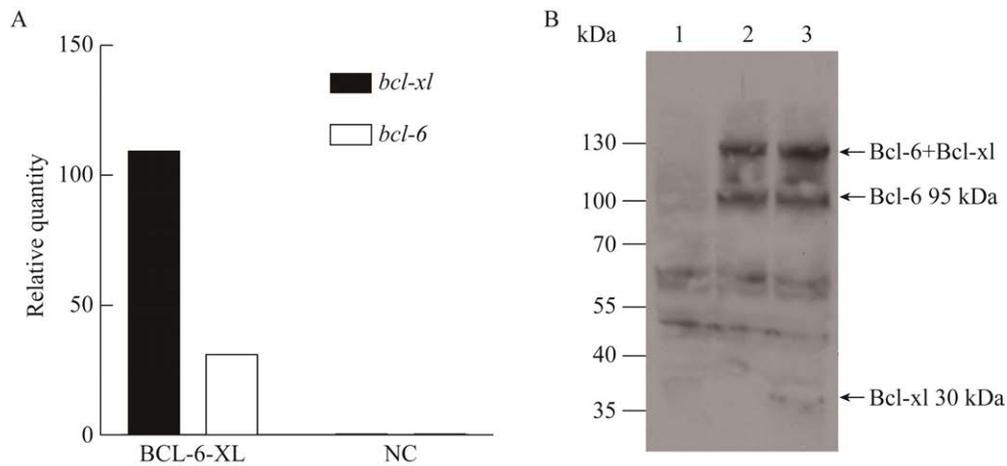


图 5 逆转录病毒感染 HEK293T 细胞基因转录及蛋白表达结果

Figure 5 Transcription and protein expression of HEK293T cells after being transfected. (A) The transcription of *bcl-6* and *bcl-xl*. (B) The expression of Bcl-6 and Bcl-xl. Lane 1: transfection negative control virus; lanes 2–3: transfection with Lenti-BCL-6-XL lentivirus.

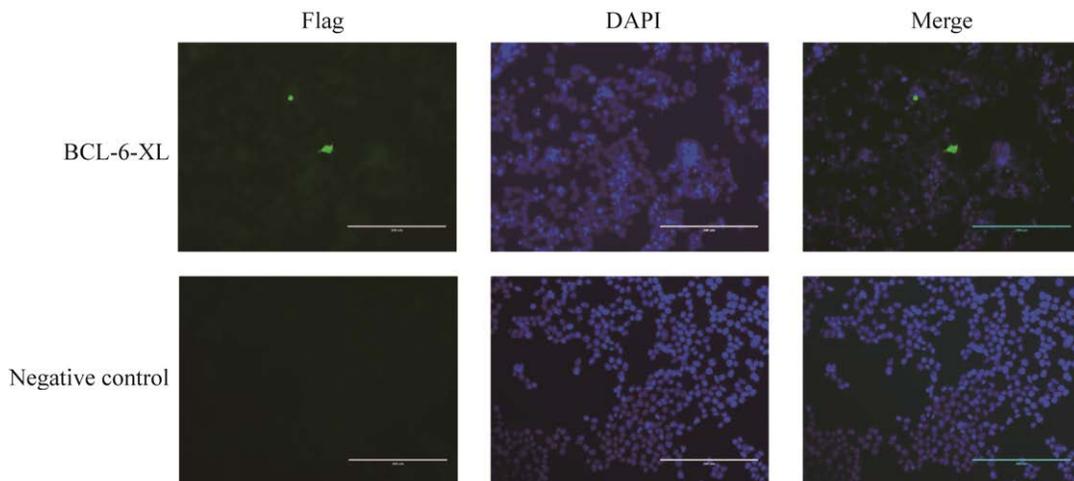


图 6 HEK293T 感染后荧光观察

Figure 6 Fluorescence observation of HEK293T cells after transduced. Flag: Bcl-6 and Bcl-xl; DAPI: nucleus; Merge: Bcl-6 and Bcl-XL are expressed in cells.

2.3 感染淋巴细胞表达情况

从免疫 PRRSV 病毒猪血中分离得到淋巴细胞，用收获的病毒液 Lenti-BCL-6-XL 感染 48 h，重复感染 3 次后，收获淋巴细胞，结果显示，能够在转录水平检测到 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 基因表达 (图 7)。随后收获培养上清，通过 ELISA 方法检测上清中是否有抗体分泌，分别以 GSWW15

抗原、Marc145 细胞、Marc145 细胞培养基和 1640 培养基为包被抗原，用感染后淋巴细胞培养上清为检测抗体，C8 单克隆抗体 (特异性识别 GSWW15 抗原) 为阳性对照进行实验。结果显示，淋巴细胞培养上清与 C8 单克隆抗体一样可以识别 GSWW15 抗原，而不与其他抗原反应 (图 8)，说明淋巴细胞中有可以分泌抗体的 B

细胞,且分泌的抗体可以与 GSWW15 PRRSV 抗原相互反应。

2.4 B 细胞分选及单克隆细胞感染

将转导 3 次的淋巴细胞通过磁珠法进行 B 细胞分选,获得 B 细胞并计数后,按照 50 个细胞/孔在 96 孔板中进行培养,并进行再次感染后 7 d,收获 B 细胞培养上清,通过 ELISA 方

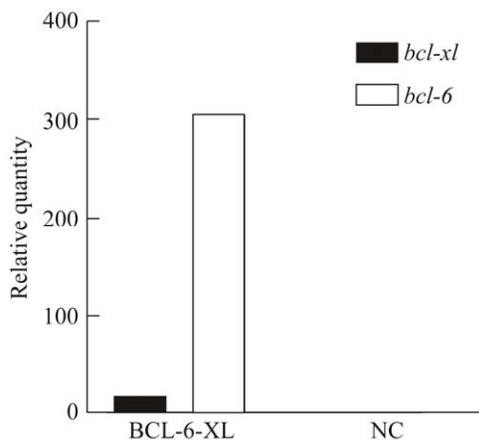


图7 逆转录病毒 Lenti-BCL-6-XL 转导淋巴细胞后转录水平检测

Figure 7 Transcription levels in the lymphocytes cells transduced with the lentivirus Lenti-BCL-6-XL for 72 h.

法检测每孔中培养上清是否有抗体分泌,如有抗体分泌可将此孔中的细胞继续单克隆化。结果显示,以阳性对照 (C8 单克隆抗体) 为参照,136 个孔中只有一个孔为阳性,说明此孔中有抗体分泌,可进行下一步单克隆化 (表 1)。

2.5 分选后 B 细胞培养及细胞状态观察

将分离并筛选后的 B 细胞使用 IMDM 完全培养基 (含 10% FBS、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD40L 和 IL-21)

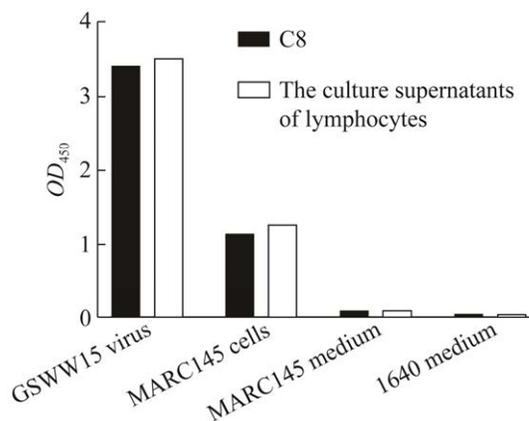


图8 ELISA 检测转导后淋巴细胞培养上清中抗体分泌情况

Figure 8 ELISA of antibody secretion in supernatant of lymphocyte culture after transduction.

表 1 ELISA 检测转导后 B 细胞培养上清中抗体分泌情况

Table 1 ELISA of antibody secretion in supernatant of B cell culture after transfection

ELISA result											
1.440	1.498	1.414	1.377	0.196	0.205	0.202	0.204	0.202	0.189	0.215	0.207
0.193	0.217	0.193	0.184	0.185	0.181	0.185	0.193	0.182	0.211	0.212	0.220
0.206	0.231	0.197	0.203	0.175	0.183	0.191	0.212	0.182	0.192	0.180	0.223
0.180	0.189	0.180	0.177	0.180	0.176	0.182	0.176	0.176	0.202	0.189	0.218
0.168	0.192	0.185	0.188	0.165	0.175	0.178	0.177	0.186	0.176	0.221	0.202
0.219	0.239	0.213	0.217	0.198	0.209	0.213	0.227	0.228	0.184	0.321	0.236
1.313	1.467	1.552	1.346	0.207	0.167	0.189	0.158	0.161	0.225	0.283	0.267
0.272	0.220	0.222	0.165	0.149	0.143	0.133	0.147	0.130	0.136	0.292	0.179
0.246	0.206	0.175	0.145	0.139	0.139	0.146	0.135	0.127	0.163	0.223	0.183
1.036	0.192	0.183	0.145	0.130	0.111	0.137	0.107	0.120	0.103	0.262	0.196
0.248	0.189	0.188	0.152	0.155	0.159	0.159	0.157	0.158	0.154	0.337	0.195
0.309	0.169	0.220	0.223	0.227	0.259	0.326	0.285	0.204	0.188	0.155	0.207

The four well in the black box are all positive control, and the red box is the positive well.

进行培养,与 1640 完全培养基 (含 10% FBS) 培养的 B 细胞进行对比,且对 IMDM 完全培养基培养的细胞进行病毒转导。通过显微镜观察,及细胞计数可知,未转导 Lenti-BCL-6-XL 的 B 细胞随着培养时间延长,细胞状态明显变差,大量细胞死亡,而完全培养基培养并转导

Lenti-BCL-6-XL 的细胞状态较好,死细胞较少,说明 IMDM 完全培养基及 Lenti-BCL-6-XL 病毒转导对维持 B 淋巴细胞状态效果非常明显 (图 9)。通过细胞计数结果可以看到,培养过程中细胞数量随时间延长,细胞数量略有减少 (图 10)。

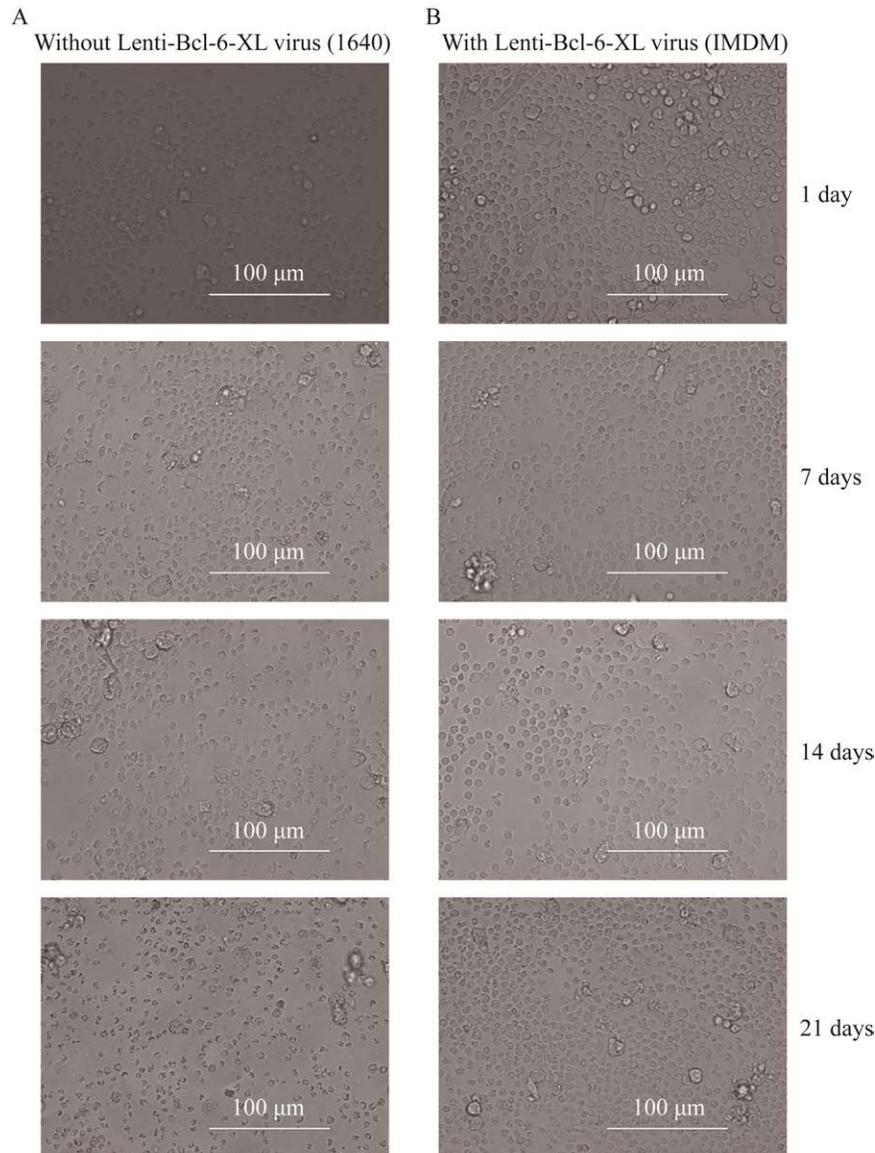


图 9 分选后 B 细胞培养与细胞转态观察

Figure 9 B cells culture and observation after sorting. (A) B cells without Lenti-Bcl-6-XL virus transduction in 21 days. (B) B cells transduced with Lenti-Bcl-6-XL virus in 21 days.

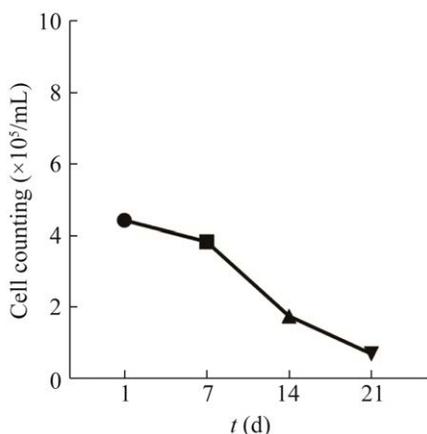


图 10 分选后 B 细胞计数
Figure 10 B cells count after sorting.

3 讨论

在众多永生生化方法中, 杂交瘤细胞技术、SV40 病毒感染和遗传修饰等技术在筛选单克隆抗体方面应用比较成熟, 但也存在自身的不足。而在单克隆抗体获取方面, B 细胞永生生化方法是一种非常值得尝试的方法, 此方法中可以得到永久传代的 B 细胞, 此细胞获取抗体速度快、抗体分泌量大, 所以利用 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 两个基因, 整合至 B 细胞基因组中, 并加以辅助细胞因子刺激, 即可获得稳定传代且分泌抗体的 B 细胞, 极大方便了单克隆抗体的获取。

本研究主要通过建立逆转录病毒包装系统, 并结合磁珠分选 B 细胞方法, 建立能够分泌抗 PRRSV 病毒抗体的永生生化单克隆 B 细胞方法。首先, 通过引入 *f2a* 序列将 *bcl-6* 和 *bcl-xl* 两个基因串联在同一个质粒上, 这样可以在病毒包装转染时减少一种质粒, 增加转染效率。而 *f2a* 序列的存在可以保证表达后 Bcl-6 和 Bcl-xl 两个蛋白独立行使功能, 在实验结果中证明了这种设计的成功。但是 *f2a* 序列在细胞中的酶切效率有限, 所以存在部分融合蛋白, 也可能因为转染后培养时间太短不足以使 F2a

多肽位点充分裂解。

在确定前期构建成功后, 首先进行淋巴细胞分离和转导实验, 对分离得到的淋巴细胞进行 3 次感染, 每次 48 h, 以增加感染效率。感染结束后, 使用含有 CD40L 和 IL-21 细胞因子的 IMDM 培养基进行培养, 培养 1 周后取上清进行 ELISA 检测, 结果显示上清中存在与 GSWW15 PRRSV 病毒抗原反应的抗体, 说明淋巴细胞中存在能够分泌抗体 B 细胞, 且经过 3 周的培养, 淋巴细胞存活率较高。

将转导后培养的淋巴细胞通过磁珠法进行 B 细胞分选, 收获的 B 细胞进行再次转导和培养。在 B 细胞分选后培养过程中, 通过观察发现, 分选得到的 B 细胞相对于使用常规方法培养的 B 细胞, 细胞状态明显优于前者, 且在培养基中存在细胞聚集的情况, 可能是细胞分裂聚集所致。但是通过细胞计数发现, 细胞总数没有明显的升高, 反而略有下降, 造成此结果的原因可能是细胞在培养过程中未转导 BCL-6-XL 基因的 B 细胞死亡, 也有可能是淋巴细胞直径较小, 导致细胞计数仪计数存在误差, 或者是其他原因需要进一步验证。已有结果说明此方法能够顺利进行下一步单克隆筛选阶段。按照 50 个细胞/孔, 在 96 孔板中培养, 通过 ELISA 方法鉴定, 如果哪个孔为阳性, 那么就将此孔细胞稀释, 按照 1 个细胞/孔, 在 96 孔板中培养, 最终获得永生生化单克隆 B 细胞。结果显示, 在 50 个细胞/孔的情况下只有一个孔为阳性, 此孔也将继续稀释进行单克隆筛选, 但是整个过程中细胞生长缓慢。阳性孔数少可能是因为逆转录病毒滴度低等方面原因造成, 需要在逆转录病毒滴度等方面再次进行优化。

本研究建立的逆转录病毒包装系统结合 B 细胞磁珠分选系统的单克隆 B 细胞永生化的方法, 成功检测到分选的 B 细胞中有抗体的分泌,

并且能够进行后续单克隆化实验。为今后获得分泌 PRRSV 病毒单克隆抗体的永生化 B 细胞提供了有效的方法, 具有一定的应用价值。

REFERENCES

- [1] Montaner-Tarbes S, Del-Portillo HA, Montoya M, et al. Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV). *Front Vet Sci*, 2019, 6: 38.
- [2] Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4: 129-154.
- [3] 王省, 李坤, 卢曾军, 等. B 细胞永生化方法的研究进展. *中国兽医科学*, 2018, 48(6): 743-749.
Wang S, Li K, Lu ZJ, et al. Progress in B cell immortalization methods. *Chin Vet Sci*, 2018, 48(6): 743-749 (in Chinese).
- [4] Kwakkenbos MJ, Van-Helden PM, Beaumont T, et al. Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applications. *Immunol Rev*, 2016, 270(1): 65-77.
- [5] Kwakkenbos MJ, Diehl SA, Yasuda E, et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat Med*, 2010, 16(1): 123-128.
- [6] Goldeck D, Perry DM, Hayes JWP, et al. Establishment of systems to enable isolation of porcine monoclonal antibodies broadly neutralizing the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Front Immunol*, 2019, 10: 572.
- [7] Choi J, Diao HT, Faliti CE, et al. Bcl-6 is the nexus transcription factor of T follicular helper cells via repressor-of-repressor circuits. *Nat Immunol*, 2020, 21(7): 777-789.
- [8] Gioulbasani M, Galaras A, Grammenoudi S, et al. The transcription factor BCL-6 controls early development of innate-like T cells. *Nat Immunol*, 2020, 21(9): 1058-1069.
- [9] Petiti J, Lo Iacono M, Rosso V, et al. Bcl-xL represents a therapeutic target in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(18): 10978-10986.
- [10] Wang B, Mai ZH, Du MY, et al. BCL-XL directly retrotranslocates the monomeric BAK. *Cell Signal*, 2019, 61: 1-9.
- [11] Angelou A, Antoniou E, Garmpis N, et al. The role of soluble CD40L ligand in human carcinogenesis. *Anticancer Res*, 2018, 38(5): 3199-3201.
- [12] Davis MR, Zhu ZW, Hansen DM, et al. The role of IL-21 in immunity and cancer. *Cancer Lett*, 2015, 358(2): 107-114.

(本文责编 郝丽芳)