中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 6 期: 542 ~ 548
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

抗牛 PrP 多肽单克隆抗体的制备及其在牛 PrP 检测中的应用

赵丽[①], 侯星生[⑤], 计融[②], 韩春卉[②], 于修平[③], 洪涛[④⑤*]

① 山东大学公共卫生学院微生物检验研究所, 济南 250012;
② 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021;
③ 山东大学医学院微生物学研究所, 济南 250012;
④ 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052;
⑤ 北京交通大学理学院生物科学和技术研究所, 北京 100044
* 联系人, E-mail: hongt@cae.cn

收稿日期: 2009-03-05; 接受日期: 2009-05-04

摘要 为获得广谱抗哺乳类动物 PrP 单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb), 用牛朊蛋白(prion protein, PrP)多肽(209~228 aa)与匙孔槭血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)偶联物免疫 Balb/C 小鼠. 经细胞融合和克隆后获得针对上述多肽的杂交瘤细胞株. 分别用 Western blot 和免疫组化(immunohistochemistry, IHC)的方法检测这些 McAbs 与重组人(human, Hu)、牛(bovine, Bo)、仓鼠(hamster, Ha)PrP 蛋白、牛脑组织中的正常朊蛋白(cellular PrP, PrP^{c})和致病性朊蛋白(scrapie of prion, PrP^{Sc})的反应性. 本文为制备高效价抗 PrP McAb 提供了一个简单、易行的方法. 制备的抗体可用于研究哺乳类 PrP 生物学特性, 检测可传播性海绵样脑病, 特别是对牛海绵样脑病的诊断具有重要意义.

关键词
朊蛋白
单克隆抗体
免疫印迹
免疫组织化学
酶联免疫吸附实验

可传播性海绵样脑病(transmissible spongiform encephalopathies, TSE)又称朊病毒病(prion diseases), 是一类由细胞朊蛋白(cellular prion, PrP^{c})构象改变引起的中枢神经系统退行性、致死性疾病. 致病因子(scrapie of prion, PrP^{Sc})理化特性及生物学特性不同于其他微生物, 包括病毒[1,2]. 它主要或完全由宿主编码的糖蛋白组成, 对蛋白酶具有抗性. PrP^{Sc} 主要在中枢神经系统沉积, 导致神经细胞空泡样变, 并出现一系列临床症状, 如共济失调、痴呆等. PrP^{c}→PrP^{Sc} 构象的转变和错误折叠是该病的主要原因. α螺旋为主的构象向β-折叠的构象的转变是导致 PrP^{c} 获得致病性, 引起 TSE 的结构基础. 人类 TSE 包括克-雅氏病 Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、新型变异克-雅氏病(new variant CJD, nvCJD)、GSS 综合征(Gerstamann Straussler syndrome, GSS)和致死性家族性失眠(fetal familial insomnia, FFI)等. 在动物中, 近年来出现的牛海绵样脑病(bovine spongiform encephalopathy, BSE), 200 年前出现的致死性羊瘙痒病(scrapie of goat or sheep)都属于这种疾病[3]. 该病可通过多种途径传播, 如消化道、神经外科手术、器官移植、其他医源性传播(如输血)等[4]. 该病的特征是潜伏期很长, 一般为 5(动物)~15 年(人类), 一旦发病, 100%的感染者在数月内死亡[5]. 目前对于 TSE 的发病机理还不清楚, 也无有效的治疗方法. 特异性诊断主要依靠脑组织中 PrP^{Sc} 检测, 检测方法主要是免疫组化(Immunohistochemistry, IHC)、Western blot、ELISA 等免疫学

引用格式: 赵丽, 侯星生, 计融, 等. 抗牛 PrP 多肽单克隆抗体的制备及其在牛 PrP 检测中的应用. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(6): 542—548

方法. 所有这些方法都需要高度敏感和特异的抗体[6].

由于 PrP^c 在所有哺乳动物细胞中都表达, 其氨基酸序列同源性高达 90%[7], 所以抗朊蛋白(prion protein, PrP)抗体的制备受免疫耐受的影响, 采用 $PrP^{0/0}$ 基因敲除的小鼠使制备单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)和多克隆抗体变得可行[8,9]. 识别单一表位的 McAb 被用于分析种属特异性表位和 PrP 构象的转变. 另外, McAb 被用于人类及动物 TSE 的诊断及治疗, 体内和体外实验均证实 McAb 可抑制 PrP^{Sc} 的形成[10,11]. 所以识别特殊位点的 McAb 的制备对 PrP 结构研究、诊断和治疗 TSE 具有重要意义.

本文用细胞融合的方法制备抗牛 PrP(209~228)的 McAb, 该抗体在 Western blot 和 IHC 检测牛 PrP 方法中具有较好的反应性, 此抗体对 PrP^{Sc} 的免疫学诊断和 BSE 致病机理研究具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 多肽-匙孔槭血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)偶联物的制备

牛 PrP 多肽(BoPrP 209~228 aa, MERVVEQMCITQYQRESQAY) 由中国军事医学科学院生化室合成. 用戊二醛将其与 KLH 偶联.

1.2 动物免疫

选 6 周龄 Balb/c 鼠进行腹腔内免疫, 初次免疫用 50 μg 多肽偶联物加福氏完全佐剂(Sigmag 产品), 2 周后, 用 30 μg 多肽偶联物加福氏不完全佐剂(Sigmag 产品)强化免疫至少 2 次, 每次间隔 2 周, 最后一次用多肽偶联物采用静脉注射强化免疫(不含佐剂), 3 天后尾部采血, ELISA 检测血清抗体效价.

1.3 杂交瘤细胞及抗体的制备

ELISA 检测血清抗体阳性的小鼠用于细胞融合. 融合前 4 天小鼠强化免疫, 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 比例为 10: 1, PEG(分子量 4000)融合, 选择培养基为含 HAT(Sigma 产品)的 RPMI1640 培养液. 10 天后, ELISA 筛选杂交瘤细胞上清, 用有限稀释法对抗体分泌阳性的杂交瘤细胞进行克隆, 用抗小鼠 IgG1, IgG2a, IgG2b 和 IgG3 进行琼脂扩散法鉴定单克隆抗体的亚类. 腹水诱生法制备抗体, 正辛酸和硫酸铵沉淀法进行抗体纯化.

1.4 正常牛脑组织匀浆的制备和 BSE 延髓组织切片来源

正常牛脑组织取材于北京市卓宸畜牧有限公司. 10%延髓匀浆的制备如下: 裂解液 1 mmol/L $NaHCO_3$, 1 mmol/L $MgCl_2$, 0.5 mmol/L KCl, 0.32 mmol/L 蔗糖, 用研磨器研磨, 制成 10%匀浆, 1500×g, 离心 10 min, 取上清, –80℃保存备用. BSE 标准阳性切片由农业部动物检疫所提供, 该阳性切片从瑞士引进, 为经国际动物卫生组织瑞士 TSE 参考实验室根据临床和组织病理学检测确诊为 BSE 病牛的脑闩.

1.5 Western blot 检测 McAbs 与正常牛脑组织 PrP^c 和重组人、牛、仓鼠 PrP 的反应性

取 500 μL 10%正常牛脑组织匀浆, 加入终浓度为 50 μg/mL 的蛋白酶 K(Protease K, PK), 37℃, 作用 2 h, 该样品为 PK(+)样品. 未经 PK 消化的样品称为 PK(–)样品. 将正常牛脑组织匀浆、重组人(human, Hu) PrP(23~231 aa)-GST 融合蛋白, 牛(bovine, Bo)PrP (25~242 aa)-GST 融合蛋白和仓鼠(hamster, Ha)PrP(23~231 aa)-GST 融合蛋白[12]分别用上样缓冲液; 100℃, 处理 10 min; 取 20 μL 上样, 13%分离胶 SDS-PAGE, 100 V, 电泳 1.5 h. 将电泳条带转移到硝酸纤维素膜(Sigma-Aldrich 产品)上, 常规 Western blot 方法检测 McAb 反应性. 5%BSA 封闭 1 h, 加入 McAbs(稀释度: B_4: 1: 25600, B_8: 1: 10000, F_8: 1: 1000), 同时设 F89/160.1.5(Sigma American 产品, 1: 5000 稀释)或 3F4 (DAKO Corp, 1: 4000 稀释)阳性对照, 37℃, 1 h. 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 二抗. ECL 化学发光系统(Pierce 公司产品)检测反应条带.

1.6 免疫组化方法(Immunohistochemistry, IHC)检测正常牛脑组织中 PrP^c 和 BSE 脑组织中 PrP^{Sc}

BSE 脑组织切片常规脱蜡、水化后, 用 50 μg/mL 蛋白酶 K(PK), 37℃消化 15 min, 枸橼酸盐缓冲液中 121℃, 20 min, 进行抗原修复. 室温条件下, 灭活内源性过氧化物酶(含 3% H_2O_2 甲醇)和封闭非特异性吸附位点(5%正常猪血清, 60 min). 加入一抗(稀释度同

Western blot), 4℃过夜; PBS 漂洗后, 加入生物素化的羊抗小鼠 IgG(DAKO Corp)置室温, 10 min; 加入过氧化物酶标记的亲合素(DAKO Corp), 10 min; 加入底物液 AEC/H_2O_2(DAKO Corp)室温反应 5~10 min. 光学显微镜下观察结果, 图像分析系统采集图像.

2 结果

2.1 抗体效价的测定

BoPrP(209~228 aa)-KLH 偶联物免疫的 5 只小鼠均产生强烈的免疫反应, 血清中出现特异性抗体. ELISA 检测抗体效价, 样品 A_{450}≥阴性对照 2 倍 A_{450} 时的最高抗体稀释度为抗体效价. 所有免疫小鼠血清效价从 1∶64000~1∶512000, 结果表明 BoPrP(209~228 aa)-KLH 偶联物抗原性较好, 免疫方案合理可行.

2.2 抗 BoPrP(209~228 aa)单克隆抗体的制备

为获得抗 BoPrP(209~228 aa)McAbs, 将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 经 PEG(MW 4000)融合[13]. 细胞克隆生长率为 59%(57/96). 经含 HAT 的 RPMI 1640 选择, ELISA 筛选抗体分泌阳性的杂交瘤细胞, 抗体分泌阳性率为 81%(46/57). 经 2~3 轮的筛选和克隆后, 建立了能稳定分泌抗体的 3 株杂交瘤细胞 B_4, B_8 和 F_8. 所有 3 株细胞分泌的 McAbs 均为 IgG_{2b} 亚类.

2.3 Western blot 检测 3 株 McAbs 与重组 Hu, Bo, HaPrP 的反应性

Western blot 结果显示, 所有 McAbs 均与原核表达 BoPrP(25~242 aa), HuPrP(23~231 aa)反应, 与原核表达的 HaPrP(23~231 aa)不反应(图 1(A)). 这些 McAbs 与重组 PrP 反应的种属依赖性与 F89/160.1.5[14]相同.

2.4 Western blot 检测 McAbs 与牛脑组织中 PrP^c 的反应性

F89/160.1.5, B_8 和 F_8 与牛脑组织中 PrP^c 的反应性见图 1(B). B_8 和 F_8 识别的条带分子量约为 31 kD, B_4 与牛脑组织中 PrP^c 不反应(图中未显示). 其中 B_8 所识别条带与 F89/160.1.5 所识别的条带相似, F_8 识别的条带比 F89/160.1.5 所识别的条带要弱(图 1(B)).

2.5 免疫组化检测 McAbs 与牛脑组织中 PrP^c 和 PrP^{Sc} 的反应性

免疫组化结果可见, 正常牛脑组织切片中, F89/160.1.5(阳性对照), B_4, B_8 和 F_8 在神经细胞胞浆中均有显色, F89/160.1.5 反应较强, B_4, B_8, F_8 呈弥散性显色, B_8, F_8 具有较强的背景染色. 在 BSE 切片中, F89/160.1.5, B_4, B_8 和 F_8 均检出了与神经原和神经纤维致病有关的颗粒状 PrP^{Sc} 沉淀. 有趣的是, B_8 和 F_8 与 BSE 中 PrP^{Sc} 的反应要比与正常牛脑组织中 PrP^c 的反应强烈(图 2). McAbs 与重组 PrP, 正常牛脑组织

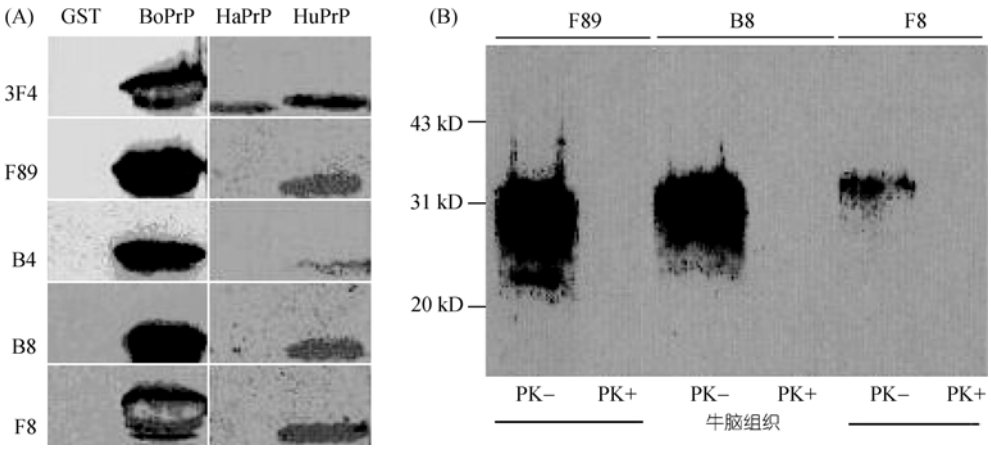


图 1 Western blot 检测 McAbs 与重组 BoPrP(25~242), HuPrP(23~231), HaPrP(23~231)融合蛋白(A)和牛脑组织匀浆(B)的反应性

PK+: 样品经 PK 消化; PK–: 样品未经 PK 消化

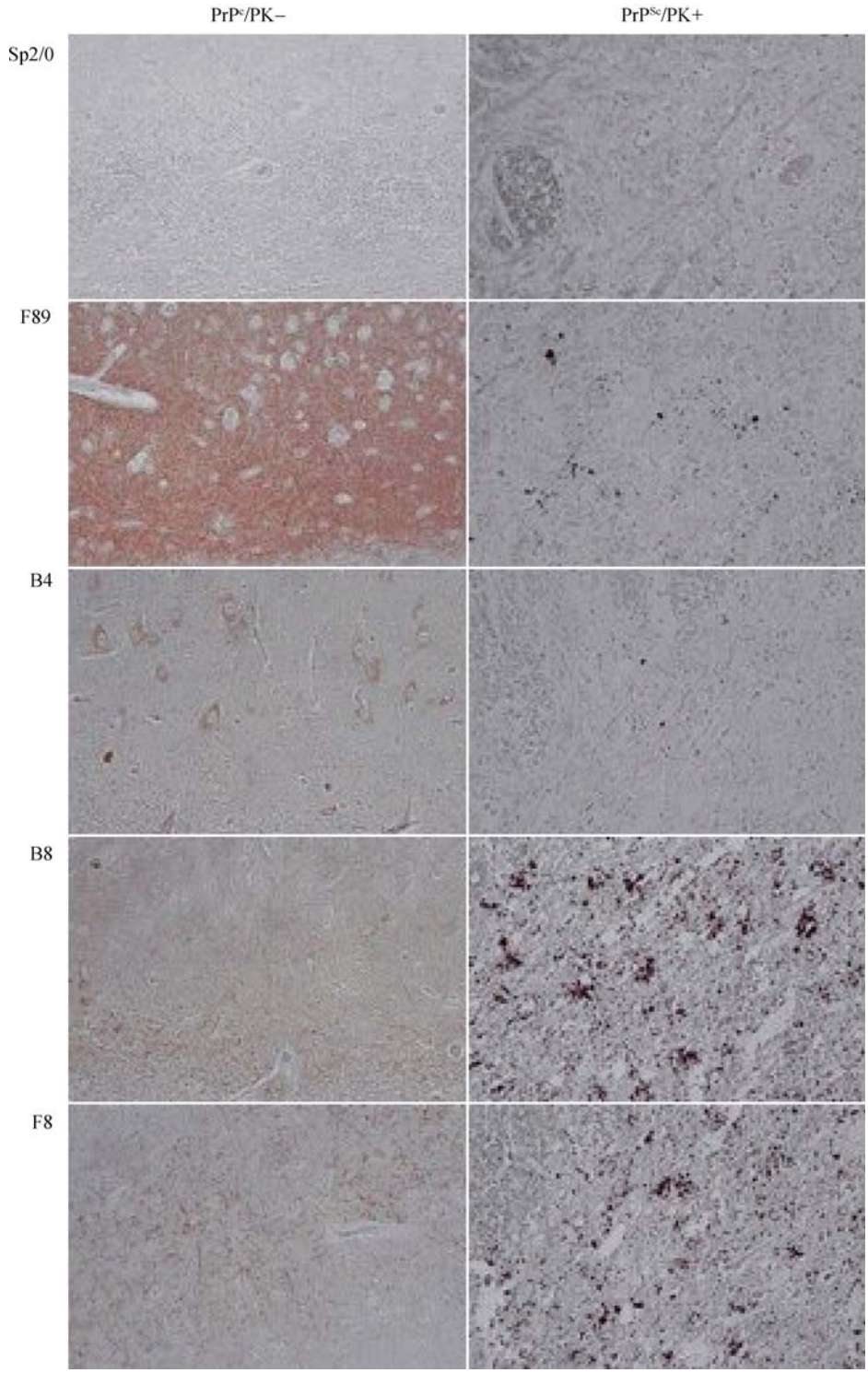


图 2 免疫组化检测正常牛脑组织中 PrP^c 和 BSE 脑组织中 PrP^{Sc}

F89/160.1.5 能识别 PrP^c, B8 和 F8 与 PrP^{Sc} 反应比与 $PrPS^c$ 反应要强烈(F89/160.1.5 为阳性对照, Sp2/0上清液为阴性对照)

中 PrP^c 和 BSE 中 PrP^{Sc} 的反应总结于表 1.

由表 1 可见, IHC 实验中, B_4 既能与正常牛脑组织中 PrP^c 反应, 又能与 BSE 牛脑组织中 PrP^{Sc} 反应, 但是在 Western blot 实验中, B_4 不能与 PrP^c 反应. 在 IHC 实验中, B_8 和 F_8 既能与正常牛脑组织中 PrP^c 反应, 又能与 BSE 牛脑组织中 PrP^{Sc} 反应. 在 Western blot 实验中, B_8 和 F_8 也能与 PrP^c 反应. 这表明, 同一株 McAb 对同一种抗原在不同的检测方法中有不同的反应性.

3 讨论

BSE 的流行以及对人类造成的危害迫切需要对动物 TSE 进行监控[15]. 对 BSE 监控的主要依据有 TSE 临床体征的动物死后的神经系统检测, BSE 的诊断主要依靠大脑切片的组织学检测, 包括海绵样变、免疫组化检测到的朊蛋白沉积或者通过 Western blot 检测到的蛋白酶抗性的 PrP^{Sc} 的存在, 或者通过电子显微镜观察到羊瘙痒病相关纤维(scrapie-associated fibrils, SAF)[16~18]. 目前研究表明, PrP^c 在所有哺乳动物中表达, 其氨基酸序列有 90%的同源性. 所以, 抗 PrP 抗体的制备受免疫耐受制约. 从动物脑内提取纯化 PrP^c 比较困难, 而且效率低, 这使得人们选择 PrP^c 重组表达系统来进行其生化和结构研究. 以前报道中, 有不同表达系统, 但是表达的成熟的 PrP^c 量较低[19~21], 例如大肠杆菌、杆状病毒、Cos-7 细胞、小鼠 C127 细胞和痘病毒表达系统. GST 融合蛋白表达明显增加了 PrP^c 的溶解性和稳定性, 为 PrP^c 的表达提供了一个简单的方法[22]. 抗原的另一个来源是合成多肽, 由于多肽合成长度有限, 其长度又非常重要. 用戊二醛将合成的覆盖羊 PrP^c 全部氨基酸序列的 16 段多肽与 KLH 偶联, 制备抗原免疫小鼠, 所有小鼠均产生了抗多肽的抗体, 用 ELISA 检测抗体滴度. 抗体滴度 1∶200~1∶102400. 有些抗体在免疫印迹中与 PrP^c 或 PrP^{Sc} 反应[23]. 另有研究表明, 人 PrP 106~126 和牛 PrP 103~121 aa 能激发小鼠强烈的免疫反应, 其抗体能与其他种属的 PrP 反应[24~28]. 尽管 PrP 序列在进化上高度保守, 但仍有一些序列在种属间存在差异, 这些氨基酸之间的小差异能诱导小鼠免疫反应, 证明用 PrP 多肽制备抗体是可行的, 其方法经济、简单、可行.

抗 PrP McAb 具有灵敏度高, 特异性强的特点, 在 TSE 诊断中具有重要作用. 迄今为止, 很多抗 PrP McAb 一般是用基因敲除的小鼠($PrP^{0/0}$)制备的, 抗原来源于羊瘙痒因子感染的动物、重组 PrP、合成 PrP 多肽, 或者 PrP 表达质粒. 这些抗体被广泛应用于 PrP^{Sc} 的免疫学检测. 多数研究获得的 McAbs 是杂交瘤细胞分泌的抗羊瘙痒因子、抗羊 PrP 多肽、抗牛 PrP 多肽、抗人 PrP 多肽的或者是通过噬菌体展示技术制备的. 根据这些报道以及不同种属 PrP 序列的差异, 本实验选择牛 PrP(209~228 aa, MERVVEQM-CITQYQRESQAY)多肽为半抗原, KLH 为载体, 作为大分子的 KLH 能增加半抗原的抗原性, 可用于制备抗小分子的 McAb [29]. 牛 PrP(209~228 aa)多肽对应于牛 PrP 的第 3 个α-螺旋, 将其与 KLH 偶联后在 Balb/c 小鼠中诱导出强烈的免疫反应. 表明该段多肽能越过 PrP 在小鼠中的免疫耐受, 通过脾细胞融合制备 McAb. PrP(209~228 aa)多肽氨基酸序列在羊、人和牛之间, 有 1 个氨基酸的差异, 在小鼠、仓鼠和水貂之间有 2 个氨基酸差异. 用 BoPrP(209~228 aa)偶联物免疫小鼠, 取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合制备杂交瘤细胞, McAb 分泌阳性率为 81%, 远远高于文献[23]报道的 2%.

Western blot 结果显示, 所有 McAbs 均能与重组

表 1 McAbs 与 PrP^c 和 PrP^{Sc} 的反应性

McAbs	PrP^{Sc}	PrP^c	
	IHC(PK+)	Western blot	IHC
$F_{89/160.1.5}$(阳性对照)	+	+	++
Sp2/0 细胞上清液(阴性对照)	–	–	–
B_4	+	–	+
B_8	++	++	+
F_8	++	+	+

BoPrP(25~242 aa), HuPrP(23~231 aa)蛋白反应, 但是与重组 HaPrP(23~231 aa)蛋白不反应, 表明 McAb 识别的 PrP 残基包括第 223 位的精氨酸, 不包括赖氨酸. 尽管 PrP^{Sc} 和 PrP^{c} 一级结构相同, 但是 PrP^{Sc} 的生化和生物物理特性不同于 PrP^{c}, 例如 β-折叠结构较多, 对蛋白酶具有抗性, 不溶于非离子化去污剂. 所以, 几乎所有抗 PrP 抗体既能与 PrP^{Sc} 反应, 又能与 PrP^{c} 反应. 鉴定 PrP^{Sc} 是基于用蛋白酶去除 PrP^{c}, McAb 与 PrP 的反应性还取决于分析方法和变性作用. 本研究表明, 抗 BoPrP(209~228 aa)McAbs 具有线性表位, 它们既能与 PrP^{Sc} 反应又能与 PrP^{c} 反应, 二者构象不同. 但是, 在不同的检测方法中, 对抗原的处理过程不同可以导致一些构象依赖性表位的暴露, 影响抗原抗体的亲和力. 例如 Western blot 实验中, 样品是用十二烷基磺酸钠(SDS)和二硫苏糖醇(DTT)或 2-巯基乙醇(2-ME)处理, 100℃煮沸后, 分子变成长棒状, 并带有负电荷, 直径为 18 Å, 但是分子长度与分子量呈线性关系. 在免疫组化实验中, 切片的制备要求组织尽量保持原有的结构, 固定和包埋过程可能影响组织的反应性, 特别是在抗原修复的过程中. 据报道, Western blot 实验中, 氧化-还原反应可以影响抗原抗体的反应, 在免疫组化实验中, 蛋白酶消化能使隐藏的抗原位点更易于与抗体反应[28,30]. 所以, 能与不同抗原位点反应的 McAbs 是否能用于 TSE 诊断仍然需要进一步研究.

McAb B_4, McAb B_8, McAb F_8 与 PrP^{c} 和 PrP^{Sc} 的反应性不同. B_4 在免疫组化实验中与 PrP^{c} 和 PrP^{Sc} 都反应, 而在 Western blot 实验中与 PrP^{c} 反应较弱, 表明 B_4 的反应表位是不稳定的, 它易于受样本处理过程的影响, 很可能是由于样本制备过程中造成的假象影响了这一脆弱的表位; 免疫组化实验中 B_8 和 F_8 与 PrP^{c} 和 PrP^{Sc} 都反应, 在 Western blot 实验中与 PrP^{c} 也反应, 表明 B_8 和 F_8 的识别表位比较稳定, 抗原的处理过程和实验方法没有对其产生影响. 牛 PrP(209~228 aa)与羊 PrP(209~228 aa)具有相同的序列. 以前的研究者[23]所获得的 2 株抗棉羊 PrP(209~228 aa)McAbs, 1 株具有广谱的种属间反应性, 与山羊、牛、人、猪、水貂、兔 PrP^{c} 有交叉反应. 另一个报道[28], 用重组牛 PrP 免疫 PrP 基因缺陷的小鼠制备的单抗, 命名为 15B3, 能特异性地识别 PrP^{Sc} 特异的构象表位, 其中有一个表位位于牛 PrP(214~226 aa)上. 本研究表明, B_8 和 F_8 在免疫组化实验中与 PrP^{Sc} 反应强烈, 但是与 PrP^{c} 反应较弱. 该结果可用于 PrP^{Sc} 检测, 特别是 BSE 诊断.

参考文献

1 Harman J L, Silva C J. Bovine spongiform encephalopathy. J Am Vet Med Assoc, 2009, 234(1): 59—72[DOI]

2 龚祖埙. 病毒的分子生物学及防治策略(第一版). 上海: 上海科学出版社, 2006. 44—68

3 Rezaei H. Prion protein oligomerization. Curr Alzheimer Res, 2008, 5(6): 572—578[DOI]

4 Llewelyn C A, Hewitt P E, Knight R S, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. Lancet, 2004, 363(9407): 417—421[DOI]

5 Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. Cell, 2004, 116(2): 313—327[DOI]

6 Kübler E, Oesch B, Raeber A J. Diagnosis of prion diseases. Br Med Bull, 2003, 66: 267—279[DOI]

7 Wopfner F, Weidenhöfer G, Schneider R, et al. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. J Mol Biol, 1999, 289(5): 1163—1178[DOI]

8 Hosokawa T, Tsuchiya K, Sato I, et al. A monoclonal antibody(1D12) defines novel distribution patterns of prion protein(PrP) as granules in nucleus. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 366(3): 657—663[DOI]

9 Khalili-Shirazi A, Kaisar M, Mallinson G, et al. Beta-PrP form of human prion protein stimulates production of monoclonal antibodies to epitope 91-110 that recognize native PrPSc. Biochim Biophys Acta, 2007, 1774(11): 1438—1450

10 White A R, Enever P, Tayebi M, et al. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. Nature, 2003, 422(6927): 80—83[DOI]

11 Gilch S, Wopfner F, Renner-Müller I, et al. Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrPSc propagation in prion-infected cells. J Biol Chem, 2003, 278(20): 18524—18531[DOI]

12 Zhao L, Wang J W, Ji R, et al. Gene cloning and expression of hamster, human and bovine prion protien PrPc in *Eschrichia coli*. Journal of Shandong University(Health Science), 2004, 42(3): 249—251

13 Bundle D R, Gidney M A, Kassam N, et al. Hybridomas specific for carbohydrates; synthetic human blood group antigens for the production, selection, and characterization of monoclonal typing reagents. J Immunol, 1982, 129(2): 678—682
14 O'Rourke K I, Baszler T V, Miller J M, et al. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. J Clin Microbiol, 1998, 36(6): 1750—1755
15 Schaller O, Fatzer R, Stack M, et al. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy(BSE). Acta Neuropathol, 1999, 98(5): 437—443[DOI]
16 JMartucci F, Acutis P, Mazza M, et al. Detection of typical and atypical bovine spongiform encephalopathy and scrapie prion strains by prion protein motif-grafted antibodies. Gen Virol, 2009, 90(Pt 4): 1048—1053[DOI]
17 Salguero F J, Díaz-San S F, Brun A, et al. Comparison of three monoclonal antibodies for use in immunohistochemical detection of bovine spongiform encephalopathy protease-resistant prion protein. J Vet Diagn Invest, 2006, 18(1): 106—109
18 Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, et al. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy. Anal Biochem, 2007, 370(2): 131—141[DOI]
19 Scott M R, Butler D A, Bredesen D E, et al. Prion protein gene expression in cultured cells. Protein Eng, 1988, 2(1): 69—76[DOI]
20 Caughey B R, Race R E, Vogel M, et al. *In vitro* expression in eukaryotic cells of a prion protein gene cloned from scrapie-infected mouse brain. Prol Natl Acad Sci USA, 1988, 85(13): 4657—4661[DOI]
21 Rogers M, Serban D, Gyuris T, et al. Epitope mapping of the Syrian hamster prion protein utilizing chimeric and mutant genes in a vaccinia virus expression system. J Immunol, 1991, 147(10): 3568—3574
22 Weiss S, Famulok M, Edenhofer F, et al. Overexpression of active Syrian gold hamster prion protein PrPc as a glutathione-S-transferase fusion in heterologous systems. J Virol, 1995, 69(8): 4776—4783
23 Harmeyer S, Pfaff E, Groschup M H, et al. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. J Gen Virol, 1998, 79(Pt 4): 937—945
24 Hanan E, Priola S A, Solomon B. Antiaggregating antibody raised against human PrP 106-126 recognizes pathological and normal isoforms of the whole prion protein. Cell Mol Neurobiol, 2001, 21(6): 693—703[DOI]
25 Takahashi H, Takahashi R H, Hasegawa H, et al. Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. J Neurovirol, 1999, 5(3): 300—307[DOI]
26 Schwarz A, Kratke O, Burwinkel M, et al. Immunization with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. Neurosci Lett, 2003, 350(3): 187—189[DOI]
27 Cernilec M, Vranac T, Hafner-Bratkovic I, et al. Identification of an epitope on the recombinant bovine PrP that is able to elicit a prominent immune response in wild-type mice. Immunol Lett, 2007, 113(1): 29—39[DOI]
28 Korth C, Stierli B, Streit P, et al. Prion(PrPSc)-Specific epitope defined a monoclonal antibody. Nature, 1997, 390(6655): 74—77[DOI]
29 Wang J W, Wang D B, Luo X Y, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to tetrodotoxin. J Hygiene Res, 1996, 25: 168—171
30 Matsuda H, Mitsude H, Nakamura N, et al. A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999, 23(3): 189—194[DOI]