

减蛋综合征 1976 病毒单克隆抗体的制备及其初步鉴定*

孔德迎 蓝乃洪 辛朝安 杨克军

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 采用经层析方法提纯的减蛋综合征 1976(EDS'76) 病毒免疫 BLAB/c 小鼠。最后一次加强免疫后第 3d 制备脾脏细胞, 然后用 50% 的聚乙二醇(PEG, 分子量 4000)融合脾脏细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞。通过选择培养、特异性抗体检测、筛选和克隆, 最后制备出 5 株分泌抗体的细胞株, 命名为 M2, M3, M10, M14 和 M15。微量血凝抑制试验(HI)证明 M15 单克隆抗体具有血凝抑制活性, HI 价为 $6(\log_2)$ 。对单克隆抗体进行测定显示 5 株均对 EDS'76 病毒有很强的特异性, 与传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、甲型流感病毒(Influenza A virus)、鸡胚致死性孤儿病毒(CELO)、新城疫病毒(NDV)和传染性囊病病毒(IBDV)无交叉反应。

关键词 鸡减蛋综合征病毒; 单克隆抗体; 鉴定

中图分类号 S858.310.43

减蛋综合征于 1976 年首次报道于荷兰(Eck et al, 1976), 简称为 EDS'76, 现在该病呈世界性分布。该病是由家禽腺病毒引起的, 以产蛋量减少和产软壳蛋、薄壳蛋、无壳蛋为特征。这种病毒类似于其他腺病毒, 具有血凝活性, 能凝集家禽红血球, 但不能凝集哺乳类动物的红血球。琼脂扩散试验说明该病毒与常规禽腺病毒(I 群禽腺病毒)无直接的关系(McFerran et al, 1978a; Baxendale, 1978), 但用免疫荧光试验证实它们又有共同的抗原性(McFerran et al, 1978a)。以前感染过常规腺病毒的鸡群, 到抗体水平消失时接种 EDS'76 病毒, 在产生抗 EDS'76 病毒抗体的同时也刺激产生抗常规腺病毒的抗体(McFerran et al, 1978b), 由此也说明它们有一定的抗原相关性。因此在血清学试验中, EDS'76 病毒和常规腺病毒会有一定程度的交叉反应。要建立高特异性、高敏感性的 ELISA 检测方法, 克服潜在的交叉反应, 必须制备抗 EDS'76 病毒的单克隆抗体。本研究旨在制备该病毒的单克隆抗体和进行初步的鉴定。

1 材料和方法

1.1 病毒

试验用病毒是由美国加州大学戴维斯分校的 R.A.Bankowski 博士提供。该病毒通过接种鸭胚的尿囊腔在鸭胚内繁殖。

1.2 病毒的提纯

鸭胚接种后 72 h 收获尿囊液, 6 000 r/min 离心 30 min 去除其中的细胞碎片。用 50% 的饱和硫酸氨 4℃处理过夜, 然后经 6 000 r/min 离心 30 min 得到病毒沉淀, 沉淀物溶于 10 mL

1994-10-21 收稿

* 广东省自然科学基金(1991~1994)资助项目

PBS(0.01 mol/L, pH 7.2)缓冲液中,再经3 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀物。病毒悬液加于 Sephadex G-200 层析柱上(d 20 mm $\times$ 800 mm),层析柱预先用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.2)缓冲液平衡。收集第一峰,在电子显微镜下证实是纯的病毒,此份病毒液用于小鼠的免疫。

1.3 小鼠的免疫

试验用小鼠是 BALB/c 系小白鼠。取 2 mL 病毒悬液(蛋白含量为 4.79 g/L)与 2 mL 弗氏完全佐剂混合成油乳剂,每只小白鼠腹腔内接种 0.1 mL。2 周后用弗氏不完全佐剂制备抗原进行加强免疫。再过 3 个月后,在进行融合前 3 d 经腹腔接种 0.1 mL 病毒悬液。

1.4 杂交瘤细胞的制备

在融合的前一天,制备小鼠腹腔巨噬细胞作为融合细胞的饲养细胞。骨髓瘤细胞在融合前三天传代一次,使其在融合时处于对数生长阶段,取已免疫的小白鼠,制备脾脏细胞,按 10:1 的比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞混合,用 50%的聚乙二醇(PEG)进行融合操作。方法参考 Zola (1982)。15 d 后用 ELISA 方法检测细胞生长孔是否分泌抗体(Ponser, 1982)。阳性孔用有限稀释法进行克隆操作,重复 3 次直至所有的细胞生长孔均为阳性孔。所得到的杂交瘤细胞进行扩大培养,保存于液氮中待用。

1.5 单克隆抗体的生产

单克隆抗体的生产可通过体外直接培养杂交瘤细胞而获得单克隆抗体,也可将杂交瘤细胞接种于小鼠腹腔内在体内生产单克隆抗体。后者生产的单克隆抗体,滴度高、收获量大,是常用的生产方法。用于生产的 BALB/c 小白鼠预先用液体石蜡致敏(Fazekas, 1980),4 d 后经腹腔内接种约 10^5 个杂交瘤细胞,15 d 后(视腹水形成的情况)收集腹水,保存备用。

1.6 单克隆抗体的鉴定

1.6.1 染色体计数 杂交瘤细胞和 SP2/0 细胞在对数生长期,用含秋水仙素 0.3 mg/L 的 1640 培养液处理 4 h。然后用 0.075 mol/L 的 KCl 低渗液处理,经固定和染色后在显微镜下观察计数(章谷生等, 1987)。

1.6.2 血凝抑制活性 血凝素是该病毒的重要表面抗原,并且与病毒的感染性有关。可用血凝抑制试验(HI)检测各株单克隆抗体的血凝抑制活性(McFerran et al, 1978a),从而确定它是否针对病毒的血凝素。试验采用 0.8% 的鸡红细胞作为指示系统。

1.6.3 特异性测定 采用 ELISA 方法测定获得的单克隆抗体与其它家禽病毒的交叉反应(Ponser, 1982),从而确定单克隆抗体的特异性。用于交叉反应的病毒包括传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、甲型流感病毒(Influenza A virus)、鸡胚致死性孤儿病毒(CELO,即家禽 I 群腺病毒)、新城疫病毒(NDV)和传染性囊病病毒(IBDV)。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞的制备

小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞融合后,分散在细胞培养板的 336 个孔中培养,结果有 200 个细胞生长孔。用 ELISA 方法检测,其中 5 个孔为分泌抗体的阳性孔,经 3 次克隆操作后,获得了 5 株杂交瘤细胞株,分别命名为 M2, M3, M10, M14 和 M15。

2.2 单克隆抗体的生产

小鼠接种杂交瘤细胞 15 d 后,每只小鼠可收获 5~10 mL 的腹水。各株单克隆抗体生

产后, 置 -20°C 保存备用。

2.3 单克隆抗体的鉴定

杂交瘤和 SP2/0 细胞培养物经秋水仙素和低渗溶液处理后, 在光学显微镜下进行计数, 结果 SP2/0 骨髓瘤细胞的染色体数为 50 至 65, 而杂交瘤细胞的染色体数是 92 至 107。正常的小鼠体细胞的染色体数是 40, 由此可见杂交瘤细胞是骨髓瘤细胞和小鼠正常体细胞的杂合体。

血球凝集抑制试验表明, 仅有 M15 株的单克隆抗体表现血球凝集抑制活性, HI 滴价为 2° 。其它 4 株均无血球凝集抑制活性。

特异性试验证明, 所有 5 株单克隆抗体与传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性喉气管炎病毒 (ILTV)、甲型流感病毒 (Influenza A virus)、鸡胚致死性孤儿病毒 (CELO, 即家禽 I 群腺病毒)、新城疫病毒 (NDV) 和传染性囊病病毒 (IBDV) 均无交叉反应, 它们仅与 EDS'76 病毒起强阳性反应。

3 讨论

减蛋综合征 1976 已在我国的一些大型商品化蛋鸡场和种鸡场流行 (孔德迎等, 1991), 在临床应用上有必要建立一种高特异性、高敏感性的诊断方法, 因此就必须制备 EDS'76 病毒的单克隆抗体。

本研究最终建立起 5 株分泌抗体的杂交瘤细胞株。经过融合操作和选择培养后, 用 ELISA 方法筛选出分泌抗 EDS'76 病毒抗体的杂交瘤细胞, 保存阳性反应的杂交瘤细胞并进一步进行克隆, 然后在致敏小鼠内生产腹水单克隆抗体, 最后对单克隆抗体进行初步的鉴定。染色体数的范围表明, 杂交瘤细胞是 SP2/0 细胞和小鼠正常体细胞的杂合体。

所有 5 株单克隆抗体均对 EDS'76 病毒有高度的特异性。与传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性喉气管炎病毒 (ILTV)、甲型流感病毒 (Influenza A virus)、鸡胚致死性孤儿病毒 (CELO, 即家禽 I 群腺病毒)、新城疫病毒 (NDV) 和传染性囊病病毒 (IBDV) 的交叉反应证明, 所有 5 株单克隆抗体与这些病毒均无阳性反应, 而仅对 EDS'76 病毒本身起强阳性反应。

从血球凝集抑制试验的结果推论, M15 株单克隆抗体是特异性对应 EDS'76 病毒纤突上的抗原决定簇。HI 试验结果, 仅有 M15 单克隆抗体表现出血球凝集抑制活性, 而每一种单克隆抗体仅特异性地对应目标抗原的一个决定簇, EDS'76 病毒上纤突是产生凝集作用的抗原, 由此可以认为 M15 单克隆抗体是对应病毒纤突上的抗原决定簇。

在单克隆抗体的制备过程中, 如使用可靠性较差的二氧化碳培养箱或二氧化碳的质量较差时, 应采用碳酸盐和 HEPES 双重缓冲系统, 以确保培养液的 pH 稳定。高分子量的 PEG 融合效果高, 但对细胞的毒性也增大, 选择恰当的融合剂是获得杂交瘤细胞较关键的因素, 一般以 4000 分子量的 PEG 使用效果较好。

制备的 EDS'76 病毒单克隆抗体, 除了建立诊断方法外, 还可用于病毒分子水平的研究, 如用于基因克隆和基因定位, 也可用于 EDS'76 病毒不同分离毒株的鉴定。

参 考 文 献

- 孔德迎,刘福安.1991.减蛋综合征-76病毒在鸡体内的动态分布及其与蛋传递的关系.病毒学报,7(2):148~152
- 章谷生,容秉培.1987.单克隆抗体在医学上的应用.上海:上海科学技术出版社,404~406
- Baxendale W.1978. Egg drop syndrome. Veterinary Record, 102(20):450
- Eck J H H van, Davelear F G. 1976. Dropped egg production, soft shelled and shell-less eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowls. Avian Pathology, 5(4):261~272
- Fazekas S. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J Immunol Method, 35:1
- McFerran J B, McCracken R M. 1978a. Studies on a depressed egg production syndrome in Northern Ireland. Avian Pathology, 7(1):35~47
- McFerran J B, Connor T J, Adair B M. 1978b. Studies on the antigenic relationship between an isolate(127)from the egg drop syndrome 1976 and a fowl adenovirus: Avian Pathology, 7(4):629~636
- McFerran J B. 1979. Egg drop syndrome. Veterinary Quarterly, 1(4):176~180
- Ponser M R. 1982. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells. J Immunol Method, (48):23
- Zola H, Brooks D. 1982. Techniques for production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies. In: John G R Hurrell, eds. Monoclonal hybridoma antibodies: techniques and applications. Florida: CRC Press Inc, 20~25

PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST EGG DROP SYNDROME 1976 VIRUS AND THEIR PRELIMINARY CHARACTERIZATION

Kong Deying Lan Naihong Xin Chao'an Yang Kejun
(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510624)

Abstract

BLAB/C mice were immunized with chromatographically purified EDS'76 virus V205 strain, and splenocytes were prepared three days after the final booster immunization. Fusion of lymphocyte and myeloma SP2/0 cell line was carried out with the fusogen 50% polyethylene glycol (M. W. 4000). Five antibody secreting cell lines, named M2, M3, M10, M14 and M15, were finally obtained after selective cultivation, specific antibody detection and cloning. It was shown that M15 monoclonal antibody had haemagglutination-inhibition activity with a titer of $6(\log_2)$ in microplate HI test. All five McAbs were determined to be strongly specific to EDS'76 virus with no reaction to IBV, ILTV, influenza A virus, CELO virus, NDV and IBDV.

Key words EDS'76 virus; Monoclonal Antibody; Characterization