

新城疫病毒单克隆抗体的制备及鉴定

王 琴^{1*}, 罗晶璐^{1*}, 蒋文泓², 聂 飞², 任 涛¹

(1 农业部养禽与禽病防治重点开放实验室 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

2 广东省农业厅, 广东 广州 510500)

摘要:以纯化的新城疫病毒 ND35 免疫 Balb/C 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合. 经筛选, 获得 5 株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株. 特异性试验表明, 7G5 单克隆抗体仅与 ND35 病毒株反应, 而不与禽流感病毒 AIV(H5 亚型)、产蛋下降综合症病毒(EDS-76V)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性法氏囊病毒(IBDV)、马立克氏病毒(MDV)、禽肺病毒(APV)反应. 通过 Western-blot 对 7G5 单克隆抗体进行鉴定, 发现其在相对分子质量 47 500 ~ 62 000 之间出现条带, 表明其与 NDV 抗原具有特异性结合. 这 5 株单克隆抗体属于 IgG1、IgG2b 亚类, κ 轻链.

关键词:新城疫病毒; 单克隆抗体; 单克隆抗体制备; 单克隆抗体鉴定

中图分类号: S852. 659. 5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)02-0112-03

Preparation and Identification of Monoclonal Antibody Against Newcastle Disease Virus

WANG Qin^{1*}, LUO Jing-lu^{1*}, JIANG Wen-hong², NIE Fei², REN Tao¹

(1 Key Laboratory of Poultry Feeding & Diseases Control of the Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Agricultural Department of Guangdong Province, Guangzhou 510500, China)

Abstract: Balb/C mice were immunized with the purified newcastle disease virus ND35. Splenocytes from the immunized Balb/C mice were fused with SP2/0 myeloma cells. Positive hybridoma clones were screened by ELISA, and five monoclonal antibodies against above antigens were produced. Results of specificity test indicated that 7G5 was specific to newcastle disease virus, and was not reacted with H5 subtype AIV、EDS-76V、IBV、IBDV、MDV、APV. 7G5 was identified by Western-blot, and the assay showed that a band was detected between relative molecular mass 47 500 – 62 000. It is supposed that 7G5 monoclonal antibody was specific to the NDV antigen. The five monoclonal antibodies belonged to the IgG1、IgG2b subclass, with κ type light chain.

Key words: newcastle disease virus; monoclonal antibodies; preparation of monoclonal antibodies; identification of monoclonal antibodies

新城疫(Newcastle disease, ND)是一种急性、高 养禽业的重要传染病之一^[1-2]. 其病原为新城疫病毒
度致死性的禽类传染病. 长期以来, ND 一直是危害 (Newcastle disease virus, NDV), 为副黏病毒科腮腺

收稿日期: 2008-09-04

作者简介: 王 琴(1983—), 女, 硕士; 罗晶璐(1984—), 女, 硕士研究生; *: 对本文贡献相同; 通讯作者: 任 涛
(1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: rentao@scau.edu.cn

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0723); 国家高技术研究发展计划(2006AA10A205);
广东省自然科学基金(5500-E07106); 广东省科技计划项目(2005A20401003)

炎病毒属成员,是一种具有囊膜的 RNA 病毒^[3]. 自 1926 年从印度瓜哇分离到 NDV 以来^[4],在世界上已发生了 4 次新城疫大流行,给许多国家造成了巨大的经济损失. 建立快速准确的新城疫病毒诊断方法,是预防和控制新城疫病毒扩散和侵入的首要环节. 单克隆抗体用于 NDV 诊断,具有快速、灵敏和特异性强等优点,所以单克隆抗体技术在 NDV 检测诊断方面的应用研究得到了越来越多的关注. 本研究利用杂交瘤技术,制备新城疫病毒特异性单克隆抗体,为快速检测 NDV 病原的双抗夹心 ELISA 方法、胶体金层析试纸条提供物质材料.

1 材料与方法

1.1 毒株

试验所用新城疫病毒 ND35、其他新城疫病毒 32 株分离株、禽流感病毒 AIV(H5 亚型)、产蛋下降综合症病毒(EDS-76V)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性法氏囊病毒(IBDV)、马立克氏病毒(MDV)和禽肺病毒(APV)均由华南农业大学兽医学院农业部养禽与禽病防治重点开放实验室分离鉴定及保存.

1.2 试验动物和细胞系

SPF Balb/C 小鼠购于第一军医大学实验动物中心,SP2/0 骨髓瘤细胞由哈尔滨兽医研究所惠赠.

1.3 主要试剂

DMEM 培养基和胎牛血清为 GIBCO BRL 公司产品,单克隆抗体亚类鉴定试剂盒为 HBT 公司产品,HRP-羊抗鼠 IgG 酶标二抗为晶美公司产品.

1.4 间接 ELISA 方法的建立

用纯化的 ND35 病毒尿囊液作包被抗原,采用方阵试验进行测定,最后以 P/N 最大时的抗原,血清最大稀释度作抗原及对照血清的最适工作浓度^[5].

1.5 杂交瘤细胞的制备及筛选

细胞融合参照文献[6]方法进行.

1.6 腹水和上清效价的测定

用已建立的 ELISA 最佳工作条件检测腹水稀释液(或细胞培养上清)和标准阴、阳性血清效价,并设 SP2/0 细胞腹水阴性对照. 具体判定标准为:阴性血清 $D_A < 0.2$,阳性血清 $D_A > 1.0$,检测样品 $D_A > 0.2$, $P/N > 2.1$ 时腹水的最大稀释倍数为腹水(或细胞培养上清)的 ELISA 效价^[5].

1.7 单克隆抗体 IgG 亚类鉴定

按照单克隆抗体亚类鉴定试剂盒(见主要试剂)介绍方法进行.

1.8 7G5 特异性试验

分别用 AIV(H5 亚型)、EDS-76V、IBV、IBDV、MDV 和 APV 等抗原包被酶标板,包被浓度与亲本毒 ND35 相同,同时设立 ND35 阳性对照、阴性对照和空白对照,运用间接 ELISA 鉴定单克隆抗体反应的特异性.

1.9 7G5 的 Western-blot 检测

用经超离浓缩的 ND35 抗原及正常尿囊液跑 SDS-PAGE 电泳,转印 NC 膜,用纯化的 7G5 作一抗,HRP-羊抗鼠 IgG 酶标二抗作二抗进行 Western-blot,DAB 显色.

2 结果

2.1 间接 ELISA 方法的建立

采用方阵法确定病毒的最佳包被浓度及阳性血清的最佳稀释倍数. 满足阳性血清孔的 $D_A > 1.0$,阴性血清孔的 $D_A < 0.2$, $P/N > 2.1$,并且 P/N 最大时病毒的稀释倍数和阳性血清的稀释倍数即为全病毒包被 ELISA 检测方法的最佳工作条件,结果显示最佳工作条件为:全病毒稀释度 1:100(0.2 μ g),抗体稀释度 1:1 600.

2.2 杂交瘤细胞的制备和筛选

细胞融合后 3~5 d 显微镜观察,计数 96 孔细胞培养板中出现明显细胞克隆的培养孔,实验结果显示融合率为 41.4%,阳性率为 10.7%. 经过有限稀释法亚克隆 2~3 次,待所有克隆细胞集落克隆孔检测为阳性时,表明此克隆为单克隆,此细胞系分泌的抗体为单克隆抗体. 最后获得 5 株能稳定分泌抗体的单克隆细胞株,将其产生的对应单抗分别命名为:7G5、1C1、5F9、4A8、8G10.

2.3 腹水和上清效价的测定

从全病毒检测的未知蛋白单克隆抗体的腹水及细胞培养上清的 ELISA 效价可以得出,5 株单抗中 7G5 这株单抗的 ELISA 效价最高. 具体结果见表 1.

表 1 全病毒特异性单克隆抗体效价结果
Tab. 1 The antibody titers of the monoclonal antibodies against ND35

检测项目	7G5	5F9	8G10	4A8	1C1
腹水	1:16 000	1:8 000	1:2 000	1:4 000	1:1 000
培养液上清液	1:3 200	1:400	1:200	1:100	1:100

2.4 单克隆抗体 IgG 亚类鉴定

采用 HBT 抗体亚类试剂盒方法鉴定各株单克隆抗体的抗体亚类. 结果表明,5 株单抗中有 4 株为

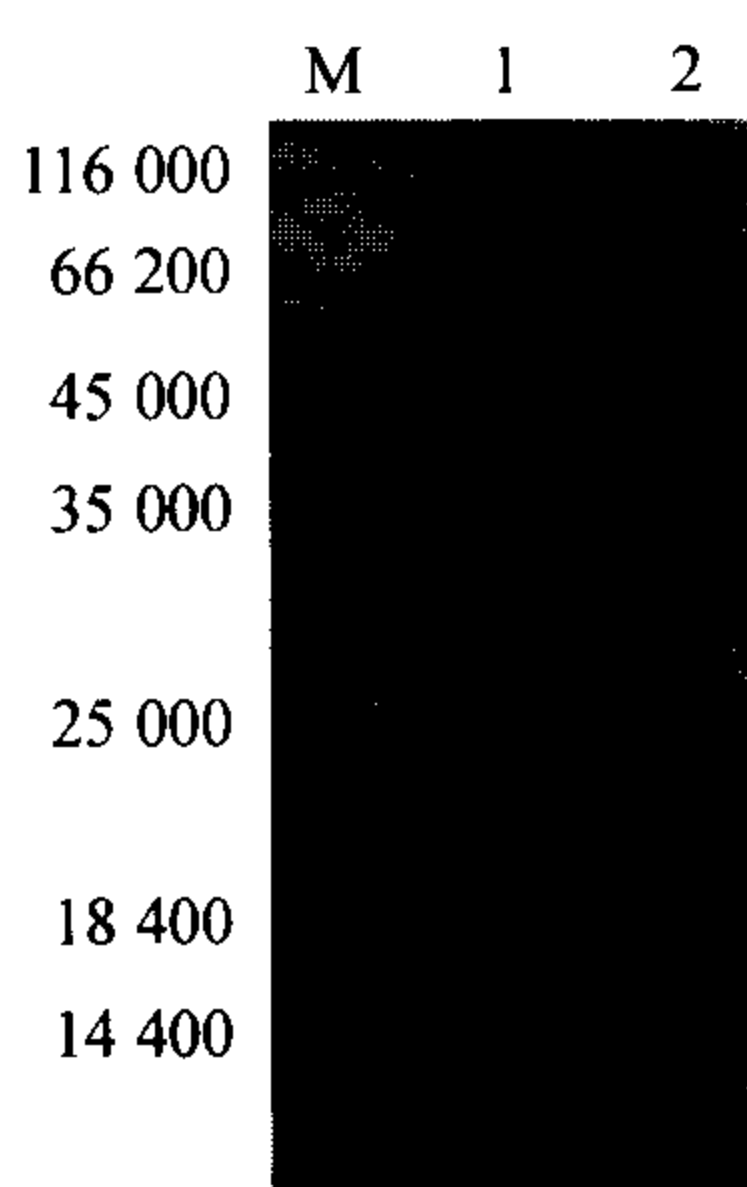
IgG1(7G5,5F9,8G10,1C1),1株为IgG2b(4A8),所有单克隆抗体轻链均为 κ 链.

2.5 7G5 特异性试验

间接 ELISA 鉴定单抗反应的特异性结果表明,单抗 7G5 与亲本毒有较强的反应,而与 AIV(H5 亚型)、EDS-76V、IBV、IBDV、MDV 和 APV 禽类病毒不反应,特异性较好.

2.6 7G5 的 Western-blot 检测

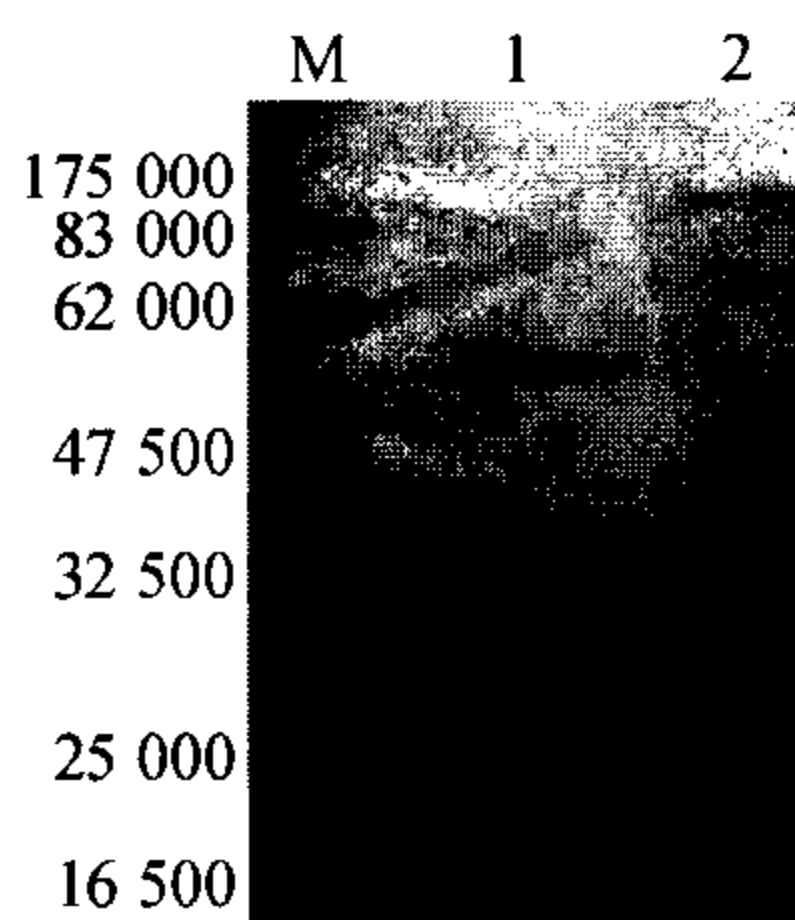
以浓缩 200 倍的 ND35 病毒尿囊液超声裂解后进行 SDS-PAGE 电泳,并以纯化的 7G5 作一抗,HRP-羊抗鼠 IgG 酶标二抗作二抗进行 Western-blot 检测. SDS-PAGE 电泳结果显示经超速离心纯化的 ND35 大约有 6 条肉眼可见的蛋白条带,其中 L 蛋白含量较少而条带不清晰,见图 1. Western-blot 结果显示,在相对分子质量为 47 500 ~ 62 000 之间出现一个明显的条带,表明其与 NDV 抗原具有特异性结合,见图 2.



M:蛋白质相对分子质量标准;1:浓缩的 ND35 病毒尿囊液;2:正常尿囊液对照

图 1 病毒尿囊液 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of ND35 virus particles



M:预染蛋白质相对分子质量标准;1:浓缩的 ND35 病毒;2:正常尿囊液对照

图 2 Western-blot 转印结果

Fig. 2 The result of Western-blot

3 讨论

很多报道都用相对分子质量为 4 000 的 PEG 作为融合剂^[7-10],高相对分子质量的 PEG 细胞融合能力和效果相对较好,但对细胞伤害较大. 相对分子质量较低的 PEG,则对细胞损害较小,但细胞融合能力和效果可能就相对较差,本研究中的细胞融合剂采用的是相对分子质量为 1 500 的 PEG,也获得了较好的细胞融合效果. 本研究结果显示,经超速离心纯化的 ND35 大约有 6 条肉眼可见的蛋白条带. 其中 L 蛋白因含量较少而条带不清晰. 7G5 单抗的免疫印迹试验结果相对分子质量在 47 500 ~ 62 000 之间出现一个明显的条带,表明其与 NDV 抗原具有特异性结合. 本研究利用杂交瘤技术,制备新城疫病毒特异性单克隆抗体,为快速检测 NDV 病原的双抗夹心 ELISA 方法、胶体金层析试纸条提供物质材料. 该成果将在新城疫的检测监控上具有良好的推广和应用前景.

参考文献:

- [1] WESTBURY H. Newcastle disease virus: An evolving pathogen [J]. Avian Pathology, 2001, 30: 117-128.
- [2] KING D J. Newcastle disease: Still a world wide threat to poultry [J]. Zootechnica, 1996:76-77.
- [3] SAIF Y M. Diseases of Poultry [M]. 11th ed. Iowa: Iowa State Press, 2003:64-81.
- [4] 卡尔尼克 B W. 禽病学 [M]. 高福,等译. 10 版. 北京:中国农业出版社, 1999:692.
- [5] 吴保成,荆汝顶. 确定 ELISA 试验阳性临界值的探讨 [J]. 中国动物检疫, 1994, 11(5):15-16.
- [6] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用 [M]. 合肥:安徽科学出版社, 1994:1-68.
- [7] 薛庆善. 体外培养原理与技术 [M]. 北京:科学出版社, 2001:16-19.
- [8] 周沧江,张德明,刘玉涛,等. 抗新城疫病毒中和性单克隆抗体研制和特性分析 [J]. 福建农业学报, 2006, 21(1):39-41.
- [9] 张小燕,潘志明,胡青海,等. 鸡白细胞介素 2 分子单克隆抗体的研制 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(1):39-41.
- [10] 曾翠平,王晓杜,戴汉川,等. 猪 α 干扰素基因的表达及其单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(3):350-353.

【责任编辑 柴 焰】