

# 鸡传染性支气管炎病毒单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立<sup>\*</sup>

林永青

(兽医系)

提 要

以提纯的IBV—M病毒抗原免疫BALB/C小鼠,末次免疫后三天取脾细胞与SP2/O细胞在50%PEG2000作用下融合,三次融合两次获得成功。经抗体检测、筛选和克隆化培养,最后获得三株分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞系。三株杂交瘤细胞经体外连续传代培养2个多月,以及液氮冻存4个月后复苏培养,仍能稳定地分泌抗体。

**关键词** 鸡传染性支气管炎病毒;淋巴细胞杂交瘤;单克隆抗体

## 引 言

鸡传染性支气管炎(IB)是由冠状病毒属鸡传染性支气管炎病毒(IBV)引起的一种高度接触性呼吸道疾病。该病目前呈世界性分布,是威胁各国养鸡业发展的重要疾病之一<sup>(7)</sup>。在国外,已有人应用淋巴细胞杂交瘤技术,生产出抗IBV的单克隆抗体(McAb)并成功地应用于抗原提纯<sup>[18]</sup>和临床诊断<sup>[10]</sup>。在国内,有关IBV—McAb的研究仍未见报道,而对IB的快速诊断和防治问题尚未完全解决,对IBV抗原结构与功能之间的关系也未完全清楚。鉴此,作者开展了这方面的研究,目的在于应用杂交瘤技术,建立分泌抗IBV—M株病毒McAb的杂交瘤细胞系,生产McAb以图取代常规血清试剂,为IBV的快速诊断、流行病学调查、抗原成分的分析 and 提纯等方面提供高质量的试剂。

## 材料和方法

### (一) 抗原制备

IBV—MF<sub>3</sub>E<sub>3</sub>毒株(中国兽药监察所)接种于10天龄鸡胚尿囊腔中,37℃孵化48小

• 本研究是在导师欧守杼教授的指导下完成的。还得到暨南大学免疫遗传室林剑教授,向军俭老师、卢维新老师以及华南农业大学兽医微生物教研室各位老师的指导和帮助,在此深表谢意。

• • 本校1985~1988年研究生。本文是硕士学位毕业论文。

1988年11月5日收稿。

时,收获尿囊液。含毒尿囊液经 $6500\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心30分钟,取上清再经 $100000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心1.5小时。弃上清,用少量Hanks液悬浮沉淀,然后再经蔗糖梯度离心处理( $105000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3小时);收集样品带,经透析后得到抗原样品。对所得抗原作电镜观察、病毒蛋白含量测定和鸡胚致病性试验。

## (二)小鼠免疫

10周龄雌性BALB/C小鼠(中山医科大学动物所),每只免疫4次。初次免疫每只腹腔注射 $50\mu\text{g}$ 抗原,间隔3周,腹腔追加 $100\mu\text{g}$ 抗原,共二次;融合前3天,腹腔再注射 $100\mu\text{g}$ 抗原。

## (三)细胞融合

方法一:按常规方法培养SP2/0小鼠骨髓瘤细胞。融合时,免疫小鼠脾细胞与SP2/0细胞按8:1比例混合,用50%PEG2000进行融合。融合后的细胞悬浮于含15%小牛血清并加有HAT的RPMI1640选择培养基中,分种于已含有小鼠腹腔细胞的细胞板中。置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,含5% $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养。隔3~5天换HAT一次,14天后用HT,再过7天改用正常培养液。

方法二:直接取活体内生长的骨髓瘤细胞进行融合<sup>[1]</sup>。即先给BALB/C小鼠背部皮下注射SP2/0细胞,让其长成实体瘤肿块后,取出肿瘤细胞,经洗涤后马上用于融合。

## (四)特异性抗体分泌克隆的筛选及克隆化

抗体检测共用两种方法。

酶联免疫吸附试验(ELISA)间接法<sup>[1][2]</sup>:以IBV抗原 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 包被55孔聚苯乙烯板,用辣根过氧化物酶标记兔抗鼠IgG结合物作第二抗体,底物为邻苯二胺。经温育、洗涤后,用酶标检测仪测定。设以下对照:SP2/0细胞培养上清,正常小鼠血清,小鼠阳性血清和正常鸡胚液包被对照,以P/N值 $\geq 2.1$ 为阳性<sup>[2]</sup>。

微量被动血凝法(PHA):按常规方法进行,以出现“++”以上凝集强度时定为阳性。

对阳性克隆用有限稀释法进行克隆化2~3次,并扩大培养、液氮冻存。

## (五)腹水单克隆抗体的制备

BALB/C小鼠腹腔注射液体石蜡 $0.5\text{ml}$ 后7~14天,腹腔注入杂交瘤细胞 $2\times 10^6$ 个/生成明显腹水后,重复采集。腹水置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

## (六)鉴定

1. 杂交瘤细胞的染色体分析<sup>[3]</sup>:将秋水仙素按最终浓度 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 加入对数生长期的杂交瘤细胞, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用2小时,用 $0.075\text{MKCl}$ 低渗处理,再经甲醇-冰醋酸液固定后制片,作Giemsa染色,镜检。

2. 单克隆抗体Ig亚类鉴定:杂交瘤细胞培养上清作10倍浓缩,与标准羊抗鼠Ig类及亚类血清(上海生物制品研究所)作免疫双扩散试验。

3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析:取杂交瘤无血清培养上清液浓缩样品作PAGE电泳<sup>[4]</sup>。电泳条件:先低压 $100\text{V}$ 电泳,让样品通过成层胶,然后高压 $250\text{V}$ 继续电泳。当标记染料迁移至样品胶以外时停止电泳。

4. 单克隆抗体效价的测定:用与检测时相同的条件,以ELISA和PHA测定杂交瘤

培养上清及致瘤腹水中的McAb效价。

5. ELISA特异性阻断试验: 含McAb的小鼠腹水先作1:100倍稀释, 然后分别与已知阳性的IBV尿囊液、NDV尿囊液和ILT<sub>V</sub>绒毛尿囊液按1:4比例混合, 37℃作用2小时后, 放4℃过夜。用ELISA测定这些腹水的OD值。同时设阴性腹水、阳性腹水和正常鸡胚液对照。

6. 杂交瘤细胞抗体分泌稳定性的测定: 杂交瘤细胞在体外连续传代培养2个多月后, 以及经液氮冻存4个月后复苏培养, 用PHA测定培养上清的McAb效价。

## 试验结果

### (一) 抗原鉴定

抗原样品经电镜(EM400)观察, 可看到许多近似球形, 直径为80~120nm的病毒颗粒。经测定, 病毒蛋白含量为5.25mg/ml。鸡胚致病性测定结果, 抗原样品连续通过鸡胚两代后可接近IBV原液的致病力水平。

### (二) 细胞融合及抗体检测结果

共进行三次细胞融合, 除第一次失败外, 第二、三次均融合成功。第二次的融合率为42.2%, 检测筛选出抗体分泌阳性孔(命名为C8、E11和2D6)、阳性克隆率为4.6%。第三次的融合率为5.8%, 检测出阳性孔一个(命名为4B10), 阳性克隆率为14.2%。融合及检测情况见表1。

表1 细胞融合及抗体检测情况

融合次数	接种孔数	融合孔数	融合率	抗体阳性孔数	阳性克隆率
1	154	—	—	—	—
2	154	65	42.2%	3	4.6%
3	120	7	5.8%	1	14.2%

### (三) 杂交瘤细胞的克隆化

经抗体检测, 筛选出的4个阳性杂交瘤细胞原始克隆, 均经扩大培养和再次检测后再作克隆化。因为其中的C8在克隆化前的抗体检测即为阴性, 所以只对其余三个作克隆化培养。E11和2D6经两次克隆化后阳性率达100%, 4B10经三次克隆化后亦达100%。

### (四) 杂交瘤细胞的染色体分析

显微镜下观察, 杂交瘤细胞的核型均由大部分端着丝点染色体和少量中央或近中着丝点染色体所组成。每个标本计算30个完整的中期分裂相的染色体数, 结果E11、2D6和4B10的染色体平均数分别为98、97和94条。SP2/0细胞平均为69条。因此, 从染色体形态特征和数目两方面, 都说明杂交瘤细胞是由SP2/0细胞与小鼠脾细胞融合而成的。

### (五) 单克隆抗体的Ig亚类及纯度的鉴定

在免疫双扩散试验中, 三种单克隆抗体均与羊抗鼠IgG1亚类血清反应, 呈单一沉淀

线,说明三种单克隆抗体均为IgG 1亚类,PAGE凝胶电泳结果,三种样品均只在 $\gamma$ 球蛋白区出现一条带。以上结果显示,三种单克隆抗体均有很高的纯度均一性。

#### (六) 单克隆抗体效价的测定

三种McAb的PHA效价都较低,培养上清为原液~1:4,腹水为1:16~1:64;但ELISA效价较高,培养上清为1:100~1:800,腹水可高达1:5×10<sup>4</sup>~1:5×10<sup>5</sup>以上。三种McAb的混合物可使PHA效价提高2~3个滴度。腹水的McAb与培养上清的McAb相比,PHA效价高8~15倍,ELISA效价高500~1000倍。腹水McAb的ELISA效价性比阳血清还要高。(见表2)

表2 McAb的效价测定结果

细胞系及样品	PHA		ELISA	
	培养上清	腹水	培养上清	清 水
E 11	1: 4	1: 32	1: 200	1: 2×10 <sup>5</sup>
2 D 6	1: 4	1: 64	1: 800	>1: 5×10 <sup>5</sup> △
4 B 10	原液	1: 16	1: 100	1: 5×10 <sup>4</sup>
E11+2D6+4 B10	1: 16	1: 128	未 做	未 做
小鼠阴性血清		0.00		0.00
小鼠阳性血清		1: 1024		1: 6400
SP 2/0 腹水		0.00		0.00
SP 2/0 上清		0.00		0.00

△终点稀释度OD值=0.25

#### (七) ELISA特异性阻断试验

三种McAb经IBV抗原中和后,ELISA反应的OD值均显著降低(OD值<0.10),说明IBV抗原与McAb特异结合从而阻断了ELISA反应。NDV、ILTV和正常鸡胚液均不能阻断这些McAb的ELISA反应(OD值>0.60)。按照抗体被抗原中和后,OD值降低50%即为阻断试验阳性的标准衡量<sup>[2]</sup>,三种McAb均是IBV特异性的。结果还显示,两个IBV地方分离株可能同属Massachusetts血清型。(见表3)

#### (八) 杂交瘤细胞分泌抗体稳定性的测定

三株杂交瘤细胞在体外连续传代培养约30代,历时2个多月。其中一段时间因培养环境不良,细胞的生长状态较差。后来重新配制了培养基和更换CO<sub>2</sub>之后,细胞的生长状态才慢慢恢复正常。经PHA测定,4 B10的效价无变化,但E11和2 D 6均降低了1个滴度。估计主要是受前段时期生长不良的影响。三株杂交瘤细胞经液氮冻存4个月后复苏,细胞的生长和形态特征均正常。经PHA测定,抗体效价无变化。上述结果表

表3 ELISA特异性阻断试验结果

阻断剂及对照样品	ELISA(OD值)		
	E11	2D6	4B10
IBV—MF <sub>3</sub> E <sub>3</sub>	0.06	0.09	0.05
IBV—农科院	0.08	0.06	0.10
IBV—本室	0.10	0.10	0.08
NDV	0.62	0.60	0.65
ILTV	0.60	0.64	0.60
正常鸡胚液	0.65	0.67	0.62
PBS	0.68	0.70	0.69
阳性腹水对照	0.72	0.80	0.75

三株杂交瘤细胞的抗体分泌特性是基本稳定的。

## 讨 论

本研究应用淋巴细胞杂交瘤技术, 获得了三株分泌抗IBV—McAb的杂交瘤细胞系。三种McAb均属IgG 1亚类, 它们既有ELISA特性, 亦有PHA特性; 虽然PHA效价较低, 但有较高的ELISA效价。这些McAb均是IBV—M特异性, 对NDV和ILTV不发生交叉反应。抗IBV—McAb的研制成功, 对IB的诊断, 预防以及IBV抗原成分的分析 and 提纯等研究将会有重要意义。

细胞融合是McAb技术中最重要的一个环节。通常认为, 骨髓瘤细胞生长状态的好坏以及是否被支原体污染, 小牛血清、PEG、HAT等多种试剂的质量都直接影响到融合的成败<sup>[8][9]</sup>。本研究第一次融合失败后, 马上采取了如下措施: (1)重新配制PEG、HAT等试液。因为这些试液配制好后放置时间稍长就有可能失效。(2)用0.22 $\mu$ 微孔滤膜过滤小牛血清。有报道这种滤膜可有效地除去可能存在于血清中的支原体污染<sup>[6]</sup>。结果, 后两次融合均获成功。虽然未能最终肯定是那种因素导致第一次融合失败, 但结果提示这些试液的质量可能有很大关系, 值得特别注意。另外, 在融合后一段时期内的细胞管理工作对融合的成败及融合率的高低也有着重要影响。首先, 过多地搬动培养板以及换液时过度冲击细胞孔对杂交瘤细胞的形成和生长都极为不利; 其次, 要积极做好防污染工作并及时发现和处理培养板中可能出现的污染孔, 否则污染会很快蔓延。

直接应用活体内生长的骨髓瘤细胞进行融合(活体法)的报道很少。国内史良如(1986)利用小鼠体内生长的NS 1细胞直接进行融合, 16次融合成功率达100%<sup>[1]</sup>。本研究的第三次融合也尝试了利用SP 2/0细胞系的活体法, 结果也获得成功。至于融合率较低, 可能是由于分离肿瘤细胞时一些组织杂质未除干净而影响到整个融合环境所致。应用活体法的好处是: 骨髓瘤细胞在体内生长时能清除掉可能潜在的支原体污染和增强细胞活力。另一方面, 也可免除在体外反复传代和大量培养细胞。

McAb的高度专一性是其突出的优点, 但在某些方面也可能成为其弱点。有研究表明, 在以凝集为主的血清学反应中, McAb的作用往往比常规抗血清弱<sup>[3]</sup>。本研究结果也说明了这一点。虽然三种McAb腹水的ELISA效价都高于常规阳性血清的效价, 但它们的PHA效价却远低于常规阳性血清的效价。其原因可能是由于一种McAb只针对抗原的一个决定簇, 在抗原抗体反应时不易形成较大的网络, 因而不易发生明显凝集。与此相反, 常规抗血清则是一种抗体的混合物, 不同的抗体可针对不同的决定簇, 当与抗原结合时更易形成较大的网络而发生明显的凝集。据此, 当把抗同一抗原的几种McAb混合使用时, 常可大大提高对抗原的凝集作用, 此即McAb的协同作用<sup>[8]</sup>。为了增强McAb在检测诊断中的效能, 在临床应用中, 已有不少把多种McAb混合后使用的实例。

## 引用文献

- [1] 史良如等. 单克隆抗体通讯, 1986; 17(4):107—113
- [2] 杜平. 医用病毒学. 人民军医出版社, 1985:113—180

- [3] 顾方舟. 淋巴细胞杂交瘤技术的应用. 人民卫生出版社, 1985: 1—243
- [4] 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 高等教育出版社, 1981: 94—119
- [5] 高锦声. 人类染色体方法学手册. 江苏省医学情报研究, 1981: 10—130
- [6] 曾向实等. 单克隆抗体通讯. 1986, 14(1): 85
- [7] Hofstard, M.S., 1978. Disease of Poultry, Seventh Edition, Academic Press., P. 487—503
- [8] James, W.G., 1983. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press. P. 5—89
- [9] John, G.R., Hurrell, 1981. Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application. P. 5—54
- [10] Koch, G., Hartog, L., 1986. Vet. Bull. 56: 992
- [11] Mockett, A.P.A., 1981. Avian Pathology, 10: 1—10
- [12] Mockett, A.P.A., Brown, J.D.K., 1984. Avian Pathology, 13: 333—337
- [13] Mockett, A.P.A., 1986. Vet. Bull., 56(2): 467

**ESTABLISHMENT OF HYBRIDOMA CELL LINES SECRETING  
MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST AVIAN INFECTIOUS  
BRONCHITIS VIRUS**

Lin Yongqing

Supervising Professor, Ou Shou-Zhu

(Department of Veterinary Medicine)

**ABSTRACT**

This paper deals with the establishment of hybridoma cell lines which secrete monoclonal antibodies (McAbs) against avian infectious bronchitis virus (IBV) Massachusetts strain. BALB/c mice were immunized with the antigens of IBV which was grown in embryonated eggs and purified using differential and sucrose gradient centrifugation. Spleen cells from the immunized mouse were fused with SP2/0 mouse myeloma cells. Screened by both indirect ELISA and PHA, and subcloned two or three times, three hybridoma cell lines namely E11, 2D6, 4B10 secreting specific McAbs to IBV were established.

Results showed that the chromosome numbers of hybridoma E11, 2D6 and 4B10 were 98, 97, and 94 respectively. Those McAbs were found to belong to subclass 1 of murine IgG and showed the single band in the gamma globulin region of PAGE electrophoregram. The supernatant of hybridoma cell cultures had a titer of 1 to 1/4 measured by PHA and 1/100 to 1/800 by ELISA, and the ascites fluid had a titer of 1/16 to 1/64 measured by PHA and 1/50000 to 1/500000 by ELISA. The specificity of McAbs to IBV was proved by the results of competitive ELISA. The hybridomas were still stable in their ability to secrete McAb after they were preserved in liquid nitrogen for four months.

A further study on other characteristics of those McAbs and attempt to apply them to use are being undertaken.

**Key Words:** Avian infectious bronchitis virus (IBV); Hybridoma; Monoclonal antibody