

减蛋综合征病毒单克隆抗体的生物学特性鉴定*

杨克军 孔德迎 辛朝安

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 该研究在建立分泌减蛋综合征病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的基础上, 鉴定了 10 株杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体 (4B1, 1D4, 2D6, 3D6, 2A1, 3A5, 3C6, 3C1, 1B3 和 2C5) 和生物学活性。这 10 株杂交瘤细胞分泌的抗体有高度的特异性, 只特异地作用于减蛋综合征病毒。微量血凝抑制试验 (HI) 发现 4B1, 3C1, 2C5 和 3C6 有血凝抑制活性, 腹水效价分别为 $24(\log_2)$, $4(\log_2)$, $7(\log_2)$ 和 $6(\log_2)$, 而阳性血清 HI 价仅达 $12(\log_2)$ 。这 10 株单抗都没有沉淀活性, 也不与 CELO 抗原发生沉淀反应。它们的亲和力除 3D6 外都很大, 相对亲和力依次为: $2D6 > 2C5 > 3C6 > 1B3 > 1D4 > 4B1 > 2A1 > 3A5 > 3C1 > 3D6$ 。

关键词 减蛋综合征 (EDS-76); 单克隆抗体; 生物学特性

中图分类号 S858.310.43

减蛋综合征-1976 作为一种影响蛋鸡和种鸡产蛋量的疾病, 在我国已有流行 (孔德迎等, 1991), 目前本病已发展成为引起产蛋损失的一种主要因素, 并呈全球发展的趋势, 正引起人们的广泛关注, 单克隆抗体、基因工程等先进实验技术正陆续应用于本病的研究。从 1975 年“分泌预定特异性抗体融合细胞的持续培养”这一论文发表以来单克隆抗体技术已取得长足的发展和进步, 单克隆抗体及其技术在病毒的快速鉴定、疾病的快速诊断和治疗以及在其它生物学领域的应用也日益增多。减蛋综合征病毒作为禽腺病毒中的一种, 它与禽腺病毒第 I 群有着部分共同的抗原 (Bouquet et al, 1982) 与其他禽类病毒无共同抗原的报道。因而, 有必要制备单克隆抗体和加深对单克隆抗体生物学及免疫学活性的了解。本文对减蛋综合征病毒单克隆抗体的有关生物学特性进行了研究。

1 材料与方法

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

1995-05-24 收稿

* 广东省自然科学基金 (1991-1994) 资助项目

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 PBS (0.01 mol/L, pH7.2) 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×800 mm),层析柱预先用 PBS(0.01 mol/L, pH7.2) 缓冲液平衡。收集第一峰,在电子显微镜下证实是纯的病毒,此份病毒经浓缩后备用。

1.3 其它抗原与阳性血清

新城疫病毒、流感甲 1、甲 3 型病毒、CELO 病毒及正常鸭胚尿囊液,EDS-76 病毒琼扩抗原由教研室提供。鼠抗 EDS-76 病毒阳性血清:参照孔德迎(1995)的方法,经 3 次免疫 BALB/c 小鼠获得。

1.4 EDS-76 病毒单克隆抗体的制备

单抗 2A1, 3A5, 1B3, 2C5, 4B1, 1D4, 2D6, 3D6, 3C6, 3C1 为参照孔德迎(1995)的方法建立的分泌抗 EDS-76 病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株,并获得用其生产的腹水与培养上清液。

1.5 EDS-76 病毒单克隆抗体的特异性鉴定

用方阵法进行间接 ELISA 试验(徐志凯, 1992),确定抗原、抗体的最佳工作浓度。封闭液为含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的碳酸盐缓冲液(0.85 mol/L, pH9.6)。特异性鉴定时分别用多种抗原(减蛋综合征病毒、CELO 病毒、流感病毒甲 1、甲 3 型、新城疫病毒及正常鸭胚尿囊液)包被聚苯乙烯板,然后同上法进行试验。在 490 nm 波长处测其 OD 值,以待测与标准阴性材料 OD 值之比大于 2.1 为阳性作出判断。

1.6 EDS-76 病毒单克隆抗体的血凝抑制活性的鉴定

按 Baxendale 等(1980)介绍的微量血凝试验方法来确定并制备 4 单位血凝价的 EDS-76 病毒。试验中抗原用生理盐水稀释,鸡红细胞使用浓度为 0.8%。然后参考唐桂运等译《禽病原分离鉴定实验室手册(第 3 版)》(Purchase, 1993)上的微量血凝抑制试验方法进行。

1.7 EDS-76 病毒单克隆抗体的沉淀活性的测定

参考 Darbyshire(1980)介绍的琼脂双扩散方法。用含 1.5 mol/L NaCl 的 PBS(0.01 mol/L, pH7.2) 配成 1% 的琼脂糖凝胶,然后按常规方法检测各单抗和它们两两混合物的沉淀活性。在上述琼脂糖凝胶中加入终浓度为 2% 的 PEG-6000(邹发明等, 1983),制成另一种凝胶,再次用琼脂双扩散法观测单抗的沉淀活性。

1.8 EDS-76 病毒单克隆抗体的亲和力鉴定

参考 Friguet 等(1985)和徐志凯(1992)的方法。用最佳抗原浓度包被聚苯乙烯板 18 h 以上(4 ℃ 冰箱中),用 PBS-吐温洗涤,用含 1% BSA 的包被缓冲液封闭 1 h,同样洗涤 3 次。将一定量单抗与等量倍比稀释后的 EDS-76 病毒于 4 ℃ 作用 24 h 后加入上述洗涤过的板中,37 ℃ 作用 1 h,然后同样洗涤 3 次。加入羊抗鼠 IgG-HRP, 37 ℃ 作用 1 h,然后洗涤 3 次。加入现配的底物 100 μ L 于暗处显色 15 min 左右,然后用 2 mol/L 硫酸终止反应,于酶标检测仪上测定每孔的 A 值。按公式 $A_0/(A_0 - A) = 1 + K_D/a$ 。计算各单抗的亲合常数,同时比较它们的相对亲和力大小。(A_0 为无抗原时的光密度值, A 为不同抗原浓度时的光密度值, K_D 为亲合常数, a 为与单抗反应的抗原初始浓度)。

2 实验结果

2.1 减蛋综合征病毒单克隆抗体的特异性

间接 ELISA 的结果表明:这 10 株单抗只特异地作用于减蛋综合征病毒,而与 CELO 病毒、新城疫病毒、禽流感甲 1、甲 3 型病毒、及正常鸭胚尿囊液都不发生反应。

2.2 减蛋综合征病毒单克隆抗体的血凝抑制活性

微量血凝抑制试验的结果表明这 10 株单抗中 4B1, 3C1, 2C5, 3C6 具有阻断减蛋综合征病毒凝集鸡红细胞的能力,它们的效价分别为 $24(\log_2)$, $4(\log_2)$, $7(\log_2)$, $6(\log_2)$ 。其中 4B1 的细胞培养上清液的血凝抑制效价为 $11(\log_2)$, 其效价与阳性血清相近,效价为 $12(\log_2)$ 。

2.3 减蛋综合征病毒单克隆抗体的沉淀活性

这 10 株单抗在琼扩试验中都未能与减蛋综合征病毒形成可见的沉淀线,但单抗两两的混合物能与抗原形成沉淀线。参照邹发明等(1983)的方法,在琼脂糖凝胶中加入 2% 的 PEG-6000 也未发现有沉淀线出现。这些单抗也不与 CELO 病毒沉淀抗原发生沉淀反应。

2.4 减蛋综合征病毒单克隆抗体的真实亲和力

根据间接 ELISA 试验所得 OD 值计算得各单抗的真实亲和常数见表 1。这 10 株单抗的亲和力大小依次为 $2D6 > 2C5 > 3C6 > 1B3 > 1D4 > 4B1 > 2A1 > 3A5 > 3C1 > 3D6$ 。

表 1 各单抗的真实亲和常数 (K_D)

单抗	2D6	2C5	3C6	1B3	1D4	4B1	2A1	3A5	3C1	3D6
$K_D/g \cdot L^{-1}$	0.05	0.5	0.6	0.64	0.8	1.08	2.43	2.47	3.06	58

3 讨论

间接 ELISA 试验表明这 10 株单抗都只作用于减蛋综合征病毒,与所试的其它病毒无交叉反应,说明它们具有高度的特异性。同时,这些单抗也不与正常鸭胚尿囊液发生反应,这表明我们所用抗原其提纯效果是确实的。减蛋综合征病毒作为禽腺病毒中的一种,它与禽腺病毒第 I 群有着部分共同的抗原(Bouquet et al, 1982),但 McFerran 等(1978)发现用免疫荧光试验和琼脂扩散试验却不能检测到减蛋综合征病毒与禽腺病毒的共同抗原。在本试验中无论是用间接 ELISA 方法还是用琼脂扩散的方法都没有检测到这些单克隆抗体与 CELO 病毒抗原发生反应,因而这 10 株单抗不是针对二者间的共同抗原,所以可用这些单抗区别减蛋综合征病毒与禽 I 群腺病毒。

在这 10 株单抗中,4B1, 3C1, 2C5, 3C6 具有血凝抑制能力,其中以 4B1 的血凝抑制效价最高,2C5, 3C6 次之,3C1 效价最低。这初步表明在涉及减蛋综合征病毒血凝活性的结构蛋白多肽上有多个与血凝活性有关的抗原决定簇,它们的作用有主次之分。其中 4B1 的作用位点就是一个关键点,该位点的封闭与否直接关系到减蛋综合征病毒凝集鸡红细胞的能力。根据减蛋综合征病毒纤突的结构特点可推测,这一位点处于纤突的顶端,2C5, 3C6 的作用位点则偏离顶端,位于纤突的柄上。3C1 针对的抗原位点受到的空间位阻作用最大,因而效价最低。

这 10 株单抗没有一株能沉淀减蛋综合征病毒琼扩抗原,在加了 2%PEG-6000 的琼扩

试验中也未发现沉淀线出现。我们知道多克隆抗体在琼脂凝胶中与相应的抗原反应可形成沉淀线,但单抗则不然,有的能形成、有的则不能形成,这与单抗只作用于相应抗原上单一的抗原决定簇有关(顾方舟,1985)。另一方面,这10株单抗都属IgG(因都是用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG筛选出来的)。刘宝全(1982)认为IgG与抗原只有两个结合位点,它们不能与大多数的抗原形成复杂的网络结构,而网络形成又恰恰是沉淀反应的必要条件,所以有些单抗不能用于以沉淀反应为基础的检测方法,如免疫电泳或琼脂扩散试验等。进一步的试验表明,两个单抗混合使用能产生可见的沉淀线,从另一方面说明了单抗在沉淀反应上的局限性。

亲和常数是单抗与抗原在均一的液相体系中达到结合-解离平衡时的平衡常数,亦称解离常数(K_D) (张继全等,1993)。单抗真实亲和力的计算不仅能让我们知道各单抗与抗原反应的具体情况,还能对它们的相对亲和力作出比较。亲和常数愈大,表示单抗与抗原达到结合-解离平衡时液体中游离的单抗愈多,那么,单抗的亲和力就愈小;反之则愈大。单抗亲和力的大小为单抗的合理应用提供了有力的证据。从试验结果可以看出,各单抗的亲和常数除3D6外都很小,这说明单抗的亲和力都很大,它们与病毒的结合都是相当牢固的。根据它们的其它生物学活性可有选择地将它们用于不同的目的,如应用亲和力相对较小的3C1来制备亲和层析柱。

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
- 孔德迎,兰乃洪,辛朝安,等.1995.减蛋综合征病毒单克隆抗体的制备及其初步鉴定.华南农业大学学报,15(2):1~4
- 刘宝全编.1982.兽医免疫学.哈尔滨:东北农学院出版社,138~146
- 邹发明,林嘉友,刘尔翔,等.1983.分泌抗人IgG重链单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立.中华微生物学和免疫学杂志,3:278~282
- 张继全,罗应荣,陈动春,等.1993.抗牛FSH单克隆抗体真实亲和力常数的测定.上海免疫学杂志,13: 145~155
- 顾方舟主编.1985.淋巴细胞杂交瘤技术的应用.北京:人民卫生出版社,28~29
- 徐志凯主编.1992.实用单克隆抗体技术.西安:陕西科学技术出版社,42~45,75~89
- Purchase H Graham主编.1993.禽病原分离鉴定实验手册.第3版.唐桂运,武华主,译校.北京:北京农业大学出版社,102~103
- Baxendale W, Lutticken D, Hein R, et al.1980. The results of field trials conducted with an inactivated vaccine against the egg drop syndrome 76(EDS-76).Avian Pathol,9:77~91
- Bouquet J F, Moreau Y, McFerran J B, et al.1982. Isolation and characterisation of an adenovirus isolated from muscovy ducks.Avian Pathol,11:301~307
- Darbyshire J H, Peters R W.1980. Studies on EDS-76 virus infection in laying chickens. Avian Pathol, 9: 277~290
- Friguet B, Alain F Chaffotte, Lisa Djavadi-Ohianice, et al. 1985. Measurement of the true affinity to constant in solution of antigen-antibody by Enzyme-linked Immunosorbent assay. J Immunol Methods, 77: 305~319
- McFerran J B, Connor T J, Adair B M. 1978. Studies on the antigenic relationship between an isolate(127) from the egg drop syndrome 1976 and a fowl adenovirus. Avian Pathol. 7: 629~636

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST EGG DROP SYNDROME 1976 VIRUS

Yang Kejun Kong Deying Xin Chaoan

(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Biological properties of 10 monoclonal antibodies(named 4B1, 1D4, 2D6, 3D6, 2A1, 3A5, 3C6, 3C1, 1B3 and 2C5) against egg drop syndrome 1976 virus (WPDV205) were studied in this paper. All MAbs were highly specific to EDS-76 virus. Four of them(4B1, 3C1, 2C5 and 3C6) had the activity of hemagglutination inhibition. The HI titres of ascitic fluids were 24(log₂), 4(log₂), 7(log₂) and 6(log₂) respectively. None of these MAbs had immunoprecipitation capacity. Their true affinities, sorted as 2D6 > 2C5 > 3C6 > 1B3 > 1D4 > 4B1 > 2A1 > 3A5 > 3C1 > 3D6, were calculated with optical densities determined by indirect-ELISA.

Key words egg drop syndrome 1976 virus; monoclonal antibodies; biological characterization