

# H5 亚型禽流感病毒血凝素蛋白 单克隆抗体的制备及鉴定

谢青梅<sup>1</sup>, 徐维加<sup>2</sup>, 陈俊伟<sup>1</sup>, 王玲玲<sup>1</sup>, 马静云<sup>1</sup>, 毕英佐<sup>1</sup>, 曹永长<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 云南出入境检验检疫局, 云南 昆明 650228)

**摘要:**用纯化的 H5 亚型禽流感病毒(AIV)抗原免疫 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 9 株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其中 4 株能高效分泌血凝素(HA)蛋白特异性的单克隆抗体. 特异性试验表明,IE6 单克隆抗体仅与试验的 H5 病毒株反应,而不与新城疫病毒(NDV)、H9 亚型 AIV 和产蛋下降综合症病毒(EDSV)反应. 这 9 株单克隆抗体分别为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgM 亚类, $\kappa$  轻链.

**关键词:**H5 亚型; 禽流感病毒; 血凝素蛋白; 单克隆抗体

中图分类号:S852.659.5

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)04-0117-02

## Preparation and Identification of Monoclonal Antibodies Against Haemagglutinin of Subtype H5 Avian Influenza Virus

XIE Qing-mei<sup>1</sup>, XU Wei-jia<sup>2</sup>, CHEN Jun-wei<sup>1</sup>, WANG Ling-ling<sup>1</sup>, MA Jing-yun<sup>1</sup>,  
BI Ying-zuo<sup>1</sup>, CAO Yong-chang<sup>1</sup>

(1 College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China;

2 Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Kunming 650228, China)

**Abstract:**Balb/C mice were immunized with the purified H5N1 and H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) antigens. And monoclonal antibodies against above antigens were produced. Splenocytes from the immunized mice were fused with SP2/0 myeloma cells. Positive hybridoma clones were screened by ELISA, and nine monoclonal antibodies were generated following conventional protocols for making monoclonal antibodies. The nine monoclonal antibodies reacted with newcastle disease virus (NDV), H5 subtype and H9 subtype AIV antigen, and only IE6 was specific to H5 subtype AIV. And IIB6C3, IIA8H11, IE6, IIC2D1 were specific to the hemagglutinin(HA) fusion proteins. The nine monoclonal antibodies belonged to the IgG1、IgG2a、IgG2b、IgM subclass, with  $\kappa$  type light chain.

**Key words:**H5 subtype; aivan influenza virus; hemagglutinin; monoclonal antibody

禽流感(avian influenza, AI)是由正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒所引起的禽类传染病,被国际兽疫局确定为 I 类烈性传染病<sup>[1]</sup>. 建立快速准确的诊断 H5 亚型禽流感病毒(AIV)技术,是预防和控制高致病性禽流感(HPAI)扩散和侵入的首要环节. 单克隆抗体能克服常规血清学诊断方法的诸多缺点,具有对各个抗原决定簇的特异性以及产生特定

性质抗体的特性,以其特异性高、敏感性强被广泛用于各类疾病病原的血清学检测和诊断中<sup>[2]</sup>. 血凝素(HA)是 AIV 的主要毒力因子和保护性抗原,因此,在 AIV 的检测中常以其作为检测对象. 国内外已有报道研制出 H5 亚型 AIV HA 的单克隆抗体<sup>[3-4]</sup>,秦爱建等<sup>[5]</sup>研制的抗 AI H5 和 H9 亚型病毒的单克隆抗体,建立免疫荧光技术检测 AIV 的方法. 本研究

收稿日期:2006-12-21

作者简介:谢青梅(1972—),女,副教授,博士; 通讯作者:曹永长(1965—),男,教授,博士,E-mail:yccao@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2005A20901004)

利用杂交瘤技术,制备 H5 亚型 AIV HA 特异性单克隆抗体,为快速检测 A1 病原的胶体金层析试纸条、蛋白质芯片和压电免疫传感器技术提供物质材料。

## 1 材料与方 法

用纯化的 H5 亚型 AIV 抗原(超速离心法纯化)按常规方法免疫 Balb/C 小鼠(购自中山大学实验动物中心),取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,用间接 ELISA 法筛选分泌阳性抗体的杂交瘤细胞株,再将筛选的杂交瘤细胞注射于小鼠腹腔制备腹水,收集腹水上清液于 56 ℃ 灭活 30 min 后保存备用。同时用 SPA-Sepharose CL-4B 亲和层析法纯化小鼠腹水中的 IgG,用小鼠 mAb Ig 亚类鉴定试剂盒(HyCult Biotechnology B. V.)测定各单克隆抗体的亚类,并测定各单克隆抗体的反应性和杂交瘤细胞株抗体分泌稳定性。

## 2 试验结果

### 2.1 杂交瘤细胞的制备及筛选

经 3 次融合,3 次亚克隆后,用 ELISA 方法进行筛选,得到 9 株与 H5 亚型 AIV 抗原反应能高效分泌单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别命名为 IIB6C3、IE6、IIA8H11、IIIF6G8、IIIC2D1、IIE9G8、IIA8F12、D2H11、IIG6A11。挑取单克隆进行扩大培养,每传 2 代检测 1 次,至 10 代以上仍呈阳性反应。扩大培养后液氮冻存,复苏后测定细胞仍保持分泌抗体的能力。

### 2.2 HA 蛋白单克隆抗体细胞株的建立

阳性细胞株经无限稀释法克隆,在 9 株与 H5 亚型 AIV 抗原反应的杂交瘤细胞株中有 4 株能高效分泌 HA 蛋白特异性的单克隆抗体,分别为 IIB6C3、IIA8H11、IE6 和 IIIC2D1。

### 2.3 杂交瘤细胞及单克隆抗体特性的鉴定

2.3.1 腹水和上清效价的测定 对培养上清液及腹水的效价测定采用间接 ELISA 法,抗原为纯化的病毒抗原或重组蛋白,包被质量浓度为 2 μg/mL。9 株单克隆抗体细胞培养上清液和腹水的效价分别在 1:50 ~ 1:400、1:3 200 ~ 1:12 800 之间。

2.3.2 mAb Ig 亚类鉴定 根据鼠 mAb Ig 亚类鉴定试剂盒进行检测。9 株单抗均为 κ 轻链,IIB6C3、IE6、IIIC2D1 为 IgG1 亚类,IIA8H11、IIA8F12、IIG6A11 为 IgG2a 亚类,IIIF6G8、IIE9G8 为 IgG2b 亚类,D2H11 为 IgM 亚类。

2.3.3 特异性试验结果 用 ELISA 方法检测,IIB6C3、IIA8H11、IIIF6G8、IIIC2D1、IIE9G8、IIA8F12、D2H11、IIG6A11 与新城疫病毒(NDV)、H9 和 H5 亚型 AIV 都有交叉反应,与产蛋下降综合症病毒(EDSV)都

不反应;仅 IE6 单抗与 NDV、H9 亚型 AIV 和 EDSV 不反应。证明 IE6 单抗与 H5 型 AIV 有较好的反应特异性。

2.3.4 杂交瘤细胞株抗体分泌稳定性的测定 稳定性试验结果表明,单克隆抗体细胞株经 3 次冻存复苏后,抗体分泌能力有所下降( $D_{450\text{nm}}$ 下降了 0.1 ~ 0.2),但分泌能力并没有消失,仍具有较高的抗体水平。

## 3 小结

本试验选用 PEG4000 诱导物和 HAT 培养系统,通过 4 次免疫动物和 3 次细胞融合,6 块 96 孔培养板的 576 孔中有 440 孔长出杂交克隆,融合率为 76.4%,细胞融合还是比较成功的。本试验通过 4 次亚克隆筛选,筛选到 9 株与病毒抗原反应能高效分泌单克隆抗体杂交瘤细胞株,4 株与 HA 蛋白抗原反应能高效分泌单克隆抗体杂交瘤细胞株,所获的 IE6 单克隆抗体为 H5 亚型禽流感病毒和血凝素蛋白特异性的单克隆抗体,为 H5 亚型禽流感的确诊提供了高质量的抗体。本研究单抗特异性试验可看出,研究中用的纯化的 AIV 抗原可能污染了 NDV,致使所获得单抗中有 8 株能与 NDV 发生交叉反应,但幸运的是筛选到 1 株 H5N1 AIV 特异的单抗。目前华南农业大学家禽研究室应用该单克隆抗体建立快速检测病原的胶体金层析试纸条、蛋白质芯片和压电免疫传感器技术已取得阶段性成果,初步试验显示出很好的效果。随着我国加入 WTO,对外贸易日益频繁,该成果将在进出口检疫、禽流感的检测监控上具有良好的推广和应用前景。

### 参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京:中国农业出版社,2002:1.
- [2] ZHOU E M, CHAN M, HECKERT R G. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein [J]. Avian Disease, 1998,42:517-522.
- [3] 邵红霞,秦爱建,钱琨,等. 抗禽流感病毒 H5 亚型血凝素特异性的单克隆抗体的研制[J]. 中国动物检疫, 2002,19(8):21-23.
- [4] VARECKOVA E, WHARTON S A, MUCHA V, et al. A monoclonal antibody specific to the HA2 glycoprotein of influenza A virus hemagglutinin that inhibits its fusion activity reduces replication of the virus[J]. Acta Virol,2006, 47(4):229-236.
- [5] 秦爱建,邵红霞,钱琨,等. 抗禽流感病毒 H5 和 H9 亚型血凝素特异性单克隆抗体的研制及应用[J]. 中国预防兽医学报,2003,25(3):161-163.

【责任编辑 柴 焰】