

抗猪瘟病毒单克隆抗体的制备及其生物学特性鉴定

许保疆^{1,2}, 陈 陆¹, 游 一^{1,2}, 刘春生¹, 郑鹿平¹, 王川庆¹

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002)

摘要:为对猪瘟病毒(CSFV)建立更加有效的临床检测方法。用纯化的猪瘟兔化弱毒免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合。经 ELISA 方法筛选和 3 次亚克隆, 最终获得了 5 株能稳定传代并分泌抗猪瘟病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为: C7, C9, G9, G10 和 4E8, 其分泌的单克隆抗体(McAb)为 IgG1 (G9, 4E8) 和 IgG2a (C7, C9, G10) 亚类。经鉴定, 5 株单抗细胞培养上清效价为 1 1 600 ~ 1 3 200, 腹水效价为 1 51 200 ~ 1 102 400。交叉试验及特异性抗原阻断试验表明, 所制备的 McAb 与其他抗原无交叉反应性, 均完全针对猪瘟病毒(CSFV)抗原决定簇, 具有高度特异性。稳定性试验表明, 制备的杂交瘤细胞株经连续传代 25 代和经 3 次冻存复苏后, 仍能稳定分泌特异性抗体。抗 CSFV McAb 的成功制备, 为进一步研究 CSFV 的生物学特性及其快速诊断方法的建立奠定了基础。

关键词:猪瘟病毒; 杂交瘤; 单克隆抗体; ELISA; 鉴定

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091(2009)03 - 0064 - 05

Preparation of Monoclonal Antibodies against Classical Swine Fever Virus and Their Identification of Biological Characters

XU Bao-jiang^{1,2}, CHEN Lu¹, YOU Yi^{1,2},
LIU Chun-sheng¹, ZHENG Lu-ping¹, WANG Chuan-qing¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Farming and Veterinary, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The classical swine fever virus (CSFV) isolate was purified and used to vaccinate the BALB/c mice. After immunized for 5 times, the mouse spleen cells were used to fuse with the myeloma cell line Sp2/0. After screened by ELISA and subcloned for 3 times, five strains of hybridomas C7, C9, G9, G10 and 4E8 were obtained, of which G9 and 4E8 belonged to IgG1, while C7, C9 and G10 belonged to IgG2a. Among the five McAbs, the titers of cell cultures ranged from 1 1 600 to 1 3 200 and the titers of ascites fluids ranged from 1 51 200 to 1 102 400. The preparation of these McAbs provided a basis for further studying the biological characteristics of CSFV and establishing rapid diagnostic method.

Key words: CSFV; Hybridoma; Monoclonal antibody; ELISA; Identification

猪瘟(Classical swine fever; CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的猪的一种急性或慢性、热性和高度接触性传染病, 呈世界性分布。CSFV 感染后不但造成较高的死亡率, 而且具有不断向外排毒的危险性^[1,2]。鉴于其危害程度高, 对养猪业造成经济损失巨大, 世界动物卫生组织(OIE)将本病列入法定的 A 类传染病^[3], 并规定为国际重点检疫对象^[4]。由于国内普遍进行疫苗接种等预防措施, 大多集约化猪群已具有一定的免疫力, 使近年来猪瘟流行形式

发生了变化, 出现非典型猪瘟、温和型猪瘟, 临床症状轻或不明显, 死亡率低, 病理变化不特征, 给猪瘟的诊断带来困难^[5], 须依赖实验室诊断才能确诊^[6,7]。

目前, 对猪瘟病毒的检测主要为病毒分离、RT-PCR、中和试验和免疫荧光等, 这些检测方法大都存在试验操作繁琐、费时、技术要求较高且不利于进行大批量样品检测等不足。因此, 研制出抗猪瘟病毒单抗, 建立一种敏感、特异、快速、简便的猪瘟临床检

收稿日期: 2008 - 12 - 25

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAK02A21/3)

作者简介: 许保疆(1979 -), 男, 河南信阳人, 在读硕士, 主要从事动物传染病发病机理与免疫防治研究。

通讯作者: 王川庆(1951 -), 男, 河南濮阳人, 教授, 博士, 主要从事动物传染病发病机理与免疫防治研究。

测方法就显得尤为重要。本试验目的在于利用杂交瘤技术制备抗 CSFV 特异性单克隆抗体并对其生物学特性进行鉴定,为对 CSFV 的进一步研究和建立更加有效的猪瘟临床检测方法奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

PK-15 细胞、Sp2/0 骨髓瘤细胞均购自中国兽药监察所,本实验室传代、保存;猪瘟兔化弱毒由本实验室鉴定保存;6~8 周龄 BALB/c 小鼠购自郑州大学医学院实验动物中心;弗氏佐剂、TMB、L-谷氨酰胺、8-氮鸟嘌呤、HAT/HT 选择培养基、二甲基亚砜、免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒均购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;DMEM 细胞培养基(高糖)购自 GIBCO 公司;特级胎牛血清购自 HyClone 公司;PEG4000、PEG6000 购自 BBI 公司。

1.2 方法

1.2.1 抗原制备 将 CSFV 无菌处理后接种 PK-15 细胞,增殖病毒 72 h 后收毒,将收集的病毒液加入 BEI 37 作用 18 h 灭活。然后将病毒悬液 -20 反复冻融 3 次,6 000 r/min 离心 30 min,取上清以 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液用半饱和硫酸铵沉淀法浓缩病毒,然后进行蔗糖密度梯度离心 45 000 r/min 2 h 提纯完整的病毒颗粒,紫外分光光度计测病毒蛋白含量。未接毒的正常 PK-15 细胞按同样方法处理作对照抗原。

1.2.2 动物免疫^[8-10] 以纯化的 CSFV 为免疫原,选择 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 4 只进行免疫,并设空白对照。首免用纯化抗原加等量弗氏完全佐剂,100 μ g/只,背部皮下多点注射,以后每隔 14 d,以不完全弗氏佐剂制备的抗原,加强免疫一次。免疫 5 次以后,间隔 7 d,尾静脉采血,用建立的间接 ELISA 法检测血清效价,当抗体水平达到 1 6400 以上时,可用于细胞融合。融合前 3~5 d,选取抗体水平最高的小鼠,腹腔注射 200 μ g PBS 稀释的不加佐剂的纯化抗原,进行加强免疫。

1.2.3 检测抗 CSFV 抗体间接 ELISA 方法的建立^[11,12] 采用方阵滴定法。用包被液将纯化病毒从 1 100 倍比稀释至 1 12 800,包被酶标板。阴、阳性血清从 1 800 倍比稀释至 1 25 600,加入酶标板中,并设空白对照。以阳性血清孔的 OD 值接近 1.0, P/N \geq 2.0 的抗原及阳性对照血清最大稀释度作为抗原及阳性对照血清的最适工作浓度。检测结果判定: $P/N = (\text{待检样品孔 OD 值} - \text{空白孔 OD$

值) / (阴性对照孔 OD 值 - 空白孔 OD 值)。当 P \geq 0.2, 且 N \geq 0.2 时,若 P/N \geq 2.0, 判为阳性;若 P/N $<$ 2.0, 判为阴性。

1.2.4 细胞融合及杂交瘤细胞筛选^[13,14] 分别制备免疫鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞,经细胞计数后,将脾细胞和骨髓瘤细胞按 5:1 混合于离心管中,用 50% PEG4000 (pH 8.0) 作为融合剂进行细胞融合。然后置于 37 \pm 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。在融合后的第 4 天和第 7 天分别用 1% HAT 选择培养基半量换液;融合后的第 10 天和第 14 天改用 1% HT 选择培养基半量换液,以后逐步改用 DMEM 完全培养基。当细胞克隆长到孔底的 1/4 时,用纯化的特定浓度的 CSFV 包被酶标板,用建立的间接 ELISA 方法筛选分泌抗 CSFV 抗体的阳性细胞孔,并用阻断 ELISA 验证抗体的特异性。筛选出的特异性阳性孔采用有限稀释法进行 3 次亚克隆,获得分泌抗 CSFV McAb 的杂交瘤细胞株。

1.2.5 腹水单抗的制备 挑选 10 只 8~10 周龄经产 BALB/c 母鼠,每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 灭菌液体石蜡油。7~10 d 后,每只小鼠腹腔注射 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个所筛选的杂交瘤细胞。持续观察小鼠腹部,待其腹部明显膨大时,收集腹水,3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,即为 McAb 腹水, -20 冻存备用。

1.2.6 腹水单抗的提纯 采用辛酸-硫酸铵法^[15] 提纯腹水单克隆抗体。

1.2.7 杂交瘤细胞培养上清及腹水单抗效价的测定 采用已建立的间接 ELISA 方法测定。测定中分别以 Sp2/0 细胞培养上清液及 Sp2/0 细胞诱生的腹水作为阴性对照。以 P/N \geq 2.0 的抗体最大稀释度作为效价终值。

1.2.8 McAb 的亚类鉴定 单克隆抗体亚类鉴定采用 Sigma 公司的免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒进行鉴定,具体操作步骤按说明书进行。

1.2.9 McAb 的特异性鉴定

1.2.9.1 交叉反应性试验 采用间接 ELISA 法测定。分别将 O 型口蹄疫病毒 (FMDV)、伪狂犬病毒 (PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪 2 型圆环病毒 (PCV2)、猪细小病毒 (PPV)、Sp2/0 细胞培养上清抗原(阴性对照)、CSFV (阳性对照) 作为包被抗原,制备的 McAb 作为一抗进行检测,读取反应的 OD 值,根据 P/N 值判定制备的抗 CSFV McAb 与其他抗原的交叉反应性,从而判断其特异性。

1.2.9.2 特异性抗原阻断试验 用 1 6400 稀释的 CSFV 包被酶标板。随机选一株抗 CSFV 杂交瘤细

胞株(C9),将其细胞培养上清从1 10 倍比稀释到1 1 280;将CSFV从1 160 倍比稀释到1 1 280,对照阻断抗原为FMDV(1 800 倍稀释)和阴性血清。将稀释的细胞培养上清与稀释的等量抗原混合,37 作用1 h 后加入酶标板中,用间接阻断 ELISA 检测抗CSFV 细胞上清所分泌的单抗的特异性以及抗原的最佳阻断浓度。

1.2.10 杂交瘤细胞稳定性的测定 将杂交瘤细胞连续培养传代25 代,每5 代检测一次细胞培养上清液的ELISA 抗体效价,以正常培养液为阴性对照;将杂交瘤细胞进行冻存,分别在15,30,180 d 后各进行一次复苏,测定其复苏后细胞上清效价,以检测杂交瘤细胞的活性和分泌抗体的稳定性。

1.2.11 McAb 的 SDS-PAGE 电泳 随机挑选5 株McAb 中的C7 腹水进行初提纯,将纯化后的单抗腹水与Sp2/0 细胞诱生腹水(阴性对照)一同进行SDS-PAEG 电泳,染色并记录结果。

1.2.12 杂交瘤细胞染色体数目分析^[16] 取处于对数生长期的杂交瘤细胞加入终浓度为0.1~0.4 μg/mL 的秋水仙素,置培养箱中继续培养6~10 h,离心,弃上清液,进行低渗处理后,经过3 次固定,制片,姬姆萨染色。于镜下选择染色体分散良好、无重叠、无散失的细胞进行观察分析,记录染色体数目。

2 结果与分析

2.1 检测抗CSFV 抗体间接ELISA 方法的建立

根据矩阵法,确定纯化猪瘟病毒抗原最佳工作

表1 各株McAb 细胞培养上清和腹水效价及亚类鉴定

Tab.1 The titres of supernatant and ascites fluids and species identified of five McAbs

项 目 Items	单抗 McAbs				
	C7	C9	Θ	GI0	4E8
上清效价 Supernatant titer	1 3 200	1 1 600	1 1 600	1 3 200	1 3 200
腹水效价 Ascites titer	1 102 400	1 51 200	1 102 400	1 102 400	1 102 400
IgG 亚类 Subtype of IgG	IgG2a	IgG2a	IgG1	IgG2a	IgG1

2.4 单克隆抗体特异性鉴定

2.4.1 交叉反应性试验结果 经ELISA 检测,制备的抗CSFV 单克隆抗体C7,C9,Θ,GI0 及4E8 与CSFV 均

浓度为1 6 400,阴阳性血清最佳工作浓度为1 1 600。换算出最佳包被条件时病毒的蛋白含量为4.639 μg/mL。

2.2 细胞融合及阳性杂交瘤细胞的筛选

免疫的脾细胞和Sp2/0 细胞融合后,经HAT 选择培养基培养,在第3 天可见小克隆,576 个培养孔中有432 个孔内有杂交瘤细胞生长,融合率为75%,经ELISA 方法检测432 个杂交瘤细胞生长孔培养上清液,有146 个孔表现阳性反应,阳性率为34%,选择经特异性检测并且OD_{450nm} 值最大的若干个融合细胞孔,通过有限稀释法进行3 次亚克隆(图1),最终获得5 株能稳定分泌抗CSFV McAb 的杂交瘤细胞株,分别命名为C7,C9,Θ,GI0 和4E8。

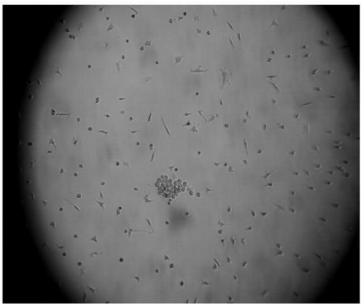


图1 亚克隆3 d 后的单个克隆

Fig.1 The single clone three days after subclone

2.3 McAb 细胞培养上清和腹水效价及亚类鉴定

经ELISA 检测,5 株单抗的细胞上清液效价为1 1 600~1 3 200,其腹水效价为1 51 200~1 102 400;5 株McAb 中,除Θ,4E8 为IgG1 亚类外,其余3 株McAb 均为IgG2a 亚类(表1)。

呈阳性反应,而与FMDV,PRV,PRRSV,PCV2,PPV 及Sp2/0 抗原均不反应,表明所制备的单抗与其他抗原无交叉反应性,具有较高的特异性,结果见表2。

表2 间接ELISA 交叉反应实验(OD 值)

Tab.2 The cross-reactions of indirect ELISA(OD value)

单抗 McAbs	不同的包被蛋白 Different coating protein						
	FMDV	PRV	PRRSV	PCV2	PPV	SP2/0	CSFV
C7	0.093/-	0.098/-	0.086/-	0.093/-	0.077/-	0.078/-	1.412/+
C9	0.113/-	0.069/-	0.109/-	0.079/-	0.089/-	0.080/-	1.115/+
Θ	0.096/-	0.101/-	0.111/-	0.065/-	0.114/-	0.104/-	1.381/+
GI0	0.105/-	0.073/-	0.084/-	0.064/-	0.106/-	0.085/-	1.530/+
4E8	0.086/-	0.099/-	0.085/-	0.092/-	0.085/-	0.095/-	1.461/+

注:+.有反应;- .无反应。

Note: +. Means reaction; - . Means no reaction.

2.4.2 特异性抗原阻断试验结果 经特异性抗原

阻断ELISA 试验检测,抗CSFV 杂交瘤细胞株(C9)

细胞培养上清在 1 80 ~ 1 640 ,阻断抗原 CSFV 浓度在 1 320 ~ 1 640 时阻断效果比较明显 ,OD 值均下降 80 % 以上 ;而用 FMDV 抗原和阴性血清阻断则效果不明显 ,说明分泌抗 CSFV 杂交瘤细胞株细胞培养上清具有较高的特异性 ,结果见表 3。

表 3 不同浓度的 CSFV 抗原阻断后单抗上清的 OD 值

不同浓度的阻断抗原 Different concentration of blocking antigens		抗 CSFV 杂交瘤细胞株 (C9) 细胞培养上清稀释度 Concentration of C9 cell supernatant							
		1 10	1 20	1 40	1 80	1 160	1 320	1 640	1 1 280
不阻断	No blocking	1. 248	1. 229	1. 212	1. 205	1. 201	1. 076	0. 811	0. 514
CSFV	1 160	1. 238	0. 118	0. 069	0. 071	0. 062	0. 065	0. 100	0. 086
不阻断	No blocking	1. 304	1. 221	1. 235	1. 223	1. 197	1. 065	0. 854	0. 533
CSFV	1 320	1. 263	1. 008	0. 101	0. 069	0. 059	0. 068	0. 105	0. 118
不阻断	No blocking	1. 260	1. 253	1. 227	1. 233	1. 204	1. 086	0. 873	0. 518
CSFV	1 640	1. 255	1. 235	0. 988	0. 095	0. 089	0. 076	0. 122	0. 108
不阻断	No blocking	1. 247	1. 239	1. 236	1. 229	1. 200	1. 058	0. 835	0. 531
CSFV	1 1280	1. 246	1. 238	1. 217	0. 921	0. 226	0. 084	0. 113	0. 113
不阻断	No blocking	1. 266	1. 246	1. 245	1. 235	1. 241	1. 077	0. 845	0. 524
FMDV	1 800	1. 255	1. 230	1. 219	1. 211	1. 141	1. 010	0. 886	0. 544
阴性血清	Negative serum	1. 241	1. 241	1. 239	1. 251	1. 245	1. 130	0. 886	0. 564

2.5 杂交瘤细胞稳定性的测定

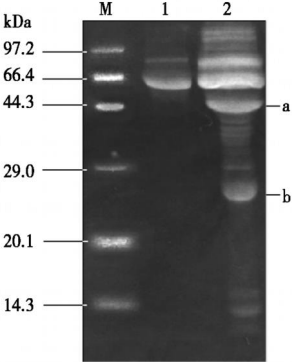
稳定性测定表明 ,杂交瘤细胞经连续培养传代培养 ,其抗体分泌能力基本保持不变 ,始终能稳定分泌特异性抗体 ;杂交瘤细胞冻存后经不同时间复苏仍能分泌特异性抗体 ,且细胞上清液效价基本保持不变 (表 4)。

表 4 5 株杂交瘤细胞分泌抗体稳定性测定结果

项 目 Items		细 胞 株 Hybridoma cell line				
		C7	C9	C9	GL0	4F8
5 代细胞培养上清	5th passaged supernatant	1 3 200	1 1 600	1 3 200	1 3 200	1 3 200
15 代细胞培养上清	15th passaged supernatant	1 3 200	1 1 600	1 3 200	1 3 200	1 3 200
25 代细胞培养上清	25th passaged supernatant	1 3 200	1 1 600	1 3 200	1 3 200	1 3 200
冻存 30 d 复苏后细胞培养上清	30 d recovered supernatant	1 3 200	1 1 600	1 1 600	1 1 600	1 3 200
冻存 180 d 复苏后细胞培养上清	180 d recovered supernatant	1 3 200	1 1 600	1 3 200	1 1 600	1 3 200

2.6 McAb SDS-PAGE 电泳分析

随机将 5 株 McAb 中 C7 腹水上清液进行 SDS-PAGE 电泳 ,电泳结果显示 ,收集的蛋白中以 Ig 抗体重链和轻链为主 ,分别以 a 和 b 标出 ,其相对分子量分别在 45 000 和 25 000 Da 左右 ,符合预期的大小 (图 2)。



M. Protein Marker ;1. Sp2/0 ascitecs fluids ;2. McAb ascitecs fluids.

图 2 C7 腹水的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 C7 McAb abdomen liquor by SDS-PAGE

2.7 杂交瘤细胞染色体数目分析

染色体计数结果发现 ,所得的各株杂交瘤细胞

的平均染色体数目为 96 ~ 99 条 ,而 Sp2/0 细胞染色体数目为 62 ~ 68 条 ,正常小鼠脾细胞染色体数目为 40 条 ,杂交瘤细胞的染色体数目处于 96 ~ 108 条之间 ,符合预期数量 (图 3)。

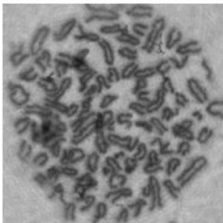


图 3 杂交瘤细胞株的染色体 (1 600 ×)

Fig. 3 The chromosome of the hybridoma cell strains (1 600 ×)

3 讨论

在单抗的制备中 ,用作动物免疫的抗原不苛求高度纯化 ,这是杂交瘤技术的优点之一。但是高纯度纯化的免疫抗原可提高杂交瘤细胞的阳性率 ,从而大大减轻筛选的工作量 [17]。同时 ,在制备全病毒抗原时 ,应尽可能在不影响病毒蛋白自然结构前提

下纯化病毒,以刺激免疫鼠产生分泌针对病毒表面抗原自然决定簇抗体的 B 细胞。本试验采用差速离心、半饱和硫酸铵沉淀和蔗糖密度梯度离心法浓缩纯化病毒,既有效地去除了杂蛋白又很好地保护了病毒蛋白的自然结构,从而大大提高了杂交瘤细胞的阳性率。

在制定免疫方案时要充分考虑佐剂、免疫剂量、途径、次数、间隔时间等因素。免疫剂量低于一定限度时,不足以刺激产生高滴度特异性抗体;超过一定限度时,免疫系统的神经元由兴奋转为阻抑,抗体的产生受到抑制,出现“免疫麻痹”现象。研究表明^[18],阳性杂交瘤出现的高峰与小鼠血清抗体的滴度并无明显的平行关系,而多在血清抗体高峰之前。所以就融合能力来说,已完全分化的浆细胞远比分裂中的浆细胞为差。因此,为达到最高的杂交瘤形成率并不一定要求有最高的抗体滴度。故一般认为以最后一次加强免疫后第 3 天取脾脏进行融合为好。本试验经 5 次免疫后用建立的间接 ELISA 方法检测各免疫鼠的血清效价,均达到 1 6 400 以上,取得了较好的免疫效果。

细胞融合时,融合剂聚乙二醇(PEG)的选择也很重要。不同分子量的 PEG 融合效果不同,通常用分子量 1 000 或 4 000 的 PEG 作为融合剂,分子量低的往往融合能力较差,分子量高的往往毒性较强。笔者曾先后采用 37 ℃ 预热的 50 % PEG4000(pH8.0)溶液和 37 ℃ 预热的 50 % PEG6000(pH8.0)溶液进行细胞融合。结果表明,前者的融合率和阳性率均明显高于后者。由于 PEG4000 分子量适中,对细胞的毒性较小,融合能力和效果较好,本试验最终选择其作为融合剂,因而取得了较好的试验效果。

本试验经过 5 次动物免疫、3 次细胞融合和 3 次亚克隆筛选,最终筛选出 5 株高效分泌抗 CSFV 单克隆抗体杂交瘤细胞株。单克隆抗体特异性鉴定和杂交瘤细胞稳定性测定等试验表明,所制备的单抗与其他抗原无交叉反应性,具有较高的特异性和敏感性;所制备的杂交瘤细胞无论是连续传代培养还是冻存后经不同时间复苏均能稳定分泌特异性抗体。该单克隆抗体的成功制备,为下一步相关 ELISA 检测方法的建立、免疫层析快速诊断试纸的制备奠定了基础。

参考文献:

- [1] Kamijo Y, Ohkuma S I, Shimizu M, *et al.* Differences in pathogenicity and antigenicity among hog cholera virus strains[J]. *Natl Inst Anim Health Q*, 1977, 17:133 - 140.
- [2] Bjorklund H, Lowings P, Stadejek T, *et al.* Phylogenetic comparison and molecular epidemiology of classical swine virus [J]. *Virus Genes*, 1999, 19(3):189 - 195.
- [3] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 动物病毒学[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- [4] Barbara E, straw. 猪病学[M]. 第 9 版. 赵德明等,译. 北京:中国农业大学出版社,2008:325 - 331.
- [5] 陈溥言,王川庆,等. 兽医传染病学[M]. 第 5 版. 北京:中国农业出版社,2006:210 - 216.
- [6] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1997:652 - 664.
- [7] 杜念兴. 猪瘟的回顾与展望[J]. *中国畜禽传染病*, 1998, 20(5):317 - 319.
- [8] Gálfe G, Mounir S, Howe C, *et al.* Antibodies to major compatibility antigens produced by hybrid cell lines[J]. *Nature*, 1997, 66:550 - 552.
- [9] YU Xing-long, TU Chang-chun, LI Hong-wei, *et al.* DNA-mediated protection against classical swine fever virus[J]. *Vaccine*, 2001, 19(11):1520 - 1525.
- [10] 吴春风,马忠森,王秀丽,等. 抗人 DcR3 单克隆抗体的研制及其鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(2):139 - 141.
- [11] 王川庆. 囊素三肽免疫调节机理研究及其单克隆抗体细胞株的建立[D]. 南京:南京农业大学,1998.
- [12] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000:352 - 356.
- [13] Hedd Zola. 单克隆抗体技术手册[M]. 周宗安,译. 南京:南京大学出版社,1991:31 - 39.
- [14] Richard D L. A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas[J]. *Immunol Methods*, 1985, 81:223 - 228.
- [15] 白丽,钱金木付,王晶. 应用辛酸-硫酸铵法提纯小鼠腹水和血清中的 IgG 抗体[J]. *大理医学院学报*, 2000, 9(4):2 - 3.
- [16] 王捷. 动物细胞培养技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [17] Anderson J. Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to Bluetongue[J]. *Virus J Immunological Methods*, 1984, 74:139 - 149.
- [18] 周珍辉. 动物细胞培养技术[M]. 北京:中国环境科学出版社,2006:193 - 198.