

抗伪狂犬病毒闽 A 株单克隆抗体的制备及鉴定

吕 蔚, 李潭清, 韩新影, 康亚男, 杨润德

(河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071000)

摘要: 用纯化的猪伪狂犬病毒闽 A 株 (PRV-FA) 免疫 Balb/c 鼠, 取脾细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合, 经间接 ELISA 筛选, 获得 2 株能稳定分泌伪狂犬病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 4G9E9 和 4H9C9。这 2 株杂交瘤细胞株细胞培养上清和小鼠腹水效价 (ELISA) 分别为 $1:6\ 400$ 、 $1:12\ 800$ 及 $1:12\ 800$ 、 $1:25\ 600$ 。特异性鉴定结果表明, 各株单抗均不与猪瘟病毒、乙脑病毒、猪呼吸繁殖障碍综合症病毒、猪细小病毒等发生交叉反应, 这 2 株抗 PRV 杂交瘤细胞株的获得为进一步建立准确快速的抗原检测方法奠定了基础。

关键词: 伪狂犬病病毒; 单克隆抗体; 制备

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0027-03

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody to PRV-FA Strain

LU Wei, LI Tan-qing, HAN Xin-ying, KANG Ya-nan, YANG Run-de

(The College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: The purified psudorabies virus strain FA (PRV-A) was inoculated to Balb/c mice. Two monoclonal hybridoma cell named 4G9E9 and 4H9C9 lines which were able to stably excrete monoclonal antibodies against PRV were produced by means of hybridoma technique and indirect ELISA detection. The indirect ELISA titer of culture supernatant and ascites were $1:6\ 400$, $1:12\ 800$ and $1:12\ 800$, $1:25\ 600$. All these monoclonal antibodies didn't react with HCV, JEV, PRRSV and PPV. These results could be used to develop diagnostic methods for detection of PRV antigen as well as to investigate protein function of PRV.

Key words: Psudorabies virus; Monoclonal antibodies; Preparation

伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是猪疱疹病毒 I 型引起的一种多种家畜感染的急性传染病。其特征为发热、奇痒及脑脊髓炎, 可引起妊娠母猪繁殖障碍、流产、死胎、呼吸症状。新生仔猪除出现神经症状外, 还可侵害消化系统^[1]。临床症状主要表现为腹泻、呕吐、生长不良等。在自然条件下猪、牛、绵羊、犬、猫、兔、鼠及多种野生动物都能发生感染。为了检测该病, 人们建立了 ELISA、乳胶凝集 PCR、免疫荧光等方法^[2]。而国内有关 PRV 单抗应用方面的报道还较少, 基于此目的, 笔者开展了抗 PRV MAb 的研究, 并利用杂交瘤技术获得了 2 株分泌抗 PRV 单抗的杂交瘤细胞; 这为建立快速、准确诊断 PRV 的方法奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 细胞系和毒株

PRV (FA 株)、猪细小病毒 (PPV)、猪繁殖与呼吸

综合征病毒 (PRRSV)、猪瘟病毒 (HCV)、乙脑病毒 (JEV) 等病毒及猪肾细胞 (PK15) 均由河北农业大学动物科技学院微生物实验室保存; SP2/0 多发性骨髓瘤细胞为河北省科学院生物研究所细胞生化室保存; 检测时同时设立空白对照。

1.2 试验动物

5~8 周龄 Balb/c 雌性小鼠购自河北医科大学实验动物中心。

1.3 主要试剂配制方法

DMEM 基本培养基: 称取 DMEM 13.37 g 溶于超纯水或三蒸水 980 mL, 待完全溶解后加水定容至 1 000 mL, 过滤除菌, 分装 4°C 保存备用。

DMEM 完全培养基: 在 DMEM 基本培养基加入新生牛血清及双抗、hepes、 NaCO_3 。

HAT 培养基: 在 DMEM 完全培养基加入 1% 100 \times HAT 盐。

HT 培养基: 在 DMEM 完全培养基加入 1% 100

收稿日期: 2009-03-01

作者简介: 吕 蔚 (1982-), 男, 河北石家庄人, 在读硕士, 主要从事预防兽医学研究。

通讯作者: 杨润德 (1950-), 女, 河北保定人, 教授, 主要从事畜禽病毒病防控的教学与研究。

×HT 盐。

1.4 抗原的制备

PRV 病毒繁殖及纯化: 把 PRV FA 株接种于已长满单层的 PK15 细胞, 37℃吸附 1 h, 加入维持液, 待 80% 以上细胞出现 CPE 时收获病毒, 反复冻融 3 次后先差速离心, 再用不连续蔗糖浓度梯度超速离心, 收集含病毒的特定条带的蔗糖, 用吸光光度计粗测其中病毒蛋白含量^[5]。

1.5 动物免疫

用纯化的病毒免疫 5 周龄的 Balb/c 雌性小鼠, 免疫过程中均未使用免疫佐剂, 具体免疫时间、剂量、部位情况见表 1。

表 1 Balb/c 小鼠的免疫程序

Tab. 1 The program of immunity of Balb/c mouse

免疫次数 Times of immunity	时间/d Time	剂量/ μ g Dose	部位 Part
1	1	100	腹腔
2	8	75	腹腔
3	15	75	腹腔
4	22	75	腹腔
5	25	100	腹腔

1.6 细胞融合

无菌取免疫小鼠脾细胞, 按 1:5 比例与 SP2/0 多发性骨髓瘤细胞混合均匀, 在 50% PEG 融合剂的作用下融合, 用 37℃预温的 HAT 选择培养基悬浮融合后的细胞, 分种到 96 孔板中, 静置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养^[3]。

1.7 杂交瘤细胞的筛选和克隆

融合 5 d 左右用 HAT 培养基换去一半培养基, 7~10 d 后用 HT 培养基换出 HAT 培养基, 经常观察杂交瘤细胞生长情况, 待其长至孔底面积 1/10 以上时, 开始用间接 ELISA 检测细胞培养上清, 筛选杂交瘤细胞。用纯化的 PRV 包被 ELISA 板, 同时设健康未免疫小鼠血清作为阴性对照, 选取 PRV 反应阳性而健康未免疫小鼠血清反应阴性且细胞生长旺盛、形态好的细胞生长孔, 用有限稀释法进行克隆^[3]。

1.8 单克隆抗体的生产和效价测定

对已经建株后的杂交瘤细胞扩大培养, 收集上清液, 用间接 ELISA 测定其效价, 冻存。同时选取健康 8 周龄 Balb/c 鼠, 每只腹腔注射无菌液体石蜡 0.5 mL, 7~10 d 后腹腔注射杂交瘤细胞, 待其腹腔明显增大时, 抽取小鼠腹水, 离心, 测定上清效价, 冻存腹水和细胞^[3]。

1.9 单克隆抗体的结合活性测定

用间接免疫荧光试验检测 McAb 与伪狂犬病毒 (PRV) 的反应: 将 PK 细胞培养于 24 孔培养板, 待细胞快长成单层时, 用 PRV 感染; 当细胞有轻微病变时, 弃上清, 用 PBS 轻洗 3 次后用甲醇固定细胞, 待单层细胞颜色发白时, 小心弃去甲醇, 用 PBS 洗 3 次; 再用含 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 的封闭液 37℃封闭 30 min; 用 PBS 洗 3 次, 加入小鼠腹水 (500 倍稀释), 同时设阳性血清 (40 倍稀释) 和阴性血清 (40 倍稀释), 37℃温育 40 min, PBS 洗 3 次, 加入异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isocyanate, FITC) 标记的羊抗鼠荧光二抗, 37℃温育 40 min, PBS 洗 3 次后置荧光显微镜下观察, 有绿色荧光者判为阳性, 无荧光者判为阴性。

1.10 单克隆抗体的亚类鉴定

亚类鉴定用间接 ELISA 法, 以分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞上清液作为一抗, 加到已用纯化 PRV 抗原包被的 ELISA 板上, 37℃作用 60 min, 洗涤后加 1:1 000 稀释的羊抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM 和 IgA, 37℃作用 30 min, 洗涤后再加兔抗羊 IgG—HRP (使用效价 1:3 000), 室温作用 20 min, 以邻苯二胺底物显色, 2 mol/L H₂SO₄ 中止反应, 在 490 nm 处测定吸光度。

1.11 特异性鉴定

应用间接 ELISA 检测腹水与猪瘟病毒、乙脑病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪细小病毒等的交叉反应性。

2 结果与分析

2.1 免疫小鼠后血清抗体效价

采用间接 ELISA 方法检测小鼠免疫前、二免、三免和四免后的血清效价 (血清都做 200 倍稀释) 其效价分别为 0, 1:400, 1:6 400 和 1:12 800。

2.2 杂交瘤细胞的筛选

采用间接 ELISA 检测细胞培养上清, 结果获得了 2 株抗 PRV 的单克隆抗体细胞株, 命名为 4G9E9 和 4H9C9, 此 2 株细胞经过 3 次亚克隆后, 100% 的检测孔保持了分泌抗 PRV 抗体的能力。

2.3 单克隆抗体的效价

利用间接 ELISA 对此株抗单克隆抗体进行检测, 4G9E9 和 4H9C9 株单克隆抗体腹水效价分别达到 1:12 800 和 1:25 600, 细胞培养上清效价分别为 1:6 400 和 1:12 800^[4]。

2.4 交叉试验

此株 MAbs 与 PPV、PRRSV、HCV、JEV 等病毒之间均无交叉反应。而阳性对照 PRV 反应正常。

2.5 单克隆抗体的亚类

筛选的单抗在亚类鉴定中, 均属于 IgG₃。

3 讨论

3.1 关于抗原的纯度问题

制备单克隆抗体时, 对抗原纯度的要求比较高, 特别是在筛选阳性克隆时, 抗原纯度的高低可能会影响检测的结果。本试验中, 采用差速离心和不连续蔗糖浓度梯度超速离心相结合的方式, 省去了常规的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 法沉淀步骤, 尽可能的纯化了抗原, 减少了因为抗原不纯而影响检测效果的可能。

3.2 关于动物的免疫问题

免疫动物时, 我们采用了腹腔免疫的方式, 最大限度地刺激脾脏中的 B 淋巴细胞, 增加了脾细胞的数量而又避免因操作导致小鼠以外死亡, 结果显示: 通过该方法的使用, 融合时小鼠的脾脏明显比用常规方法免疫的大, 增加了脾细胞融合的数量, 提高了成功融合的机会。

3.3 关于瘤细胞 SP2/0 的使用问题

瘤细胞 SP2/0 的活性也是影响融合成功率的关

键因素之一。本试验中, 我们把瘤细胞 SP2/0 注射到小鼠腹腔, 在其体内活化瘤细胞 SP2/0, 待其长到一定大小, 取出 SP2/0 在培养液中培养到适当数量和脾细胞融合, 实践显示, 在小鼠体内生长过的瘤细胞活力明显高于只在培养液中培养的细胞的活力, 提高了融合率。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 116—117.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 619—625.
- [3] 程由铨, 李怡英, 吴平, 等. 伪狂犬病毒单克隆抗体的特性与应用[J]. 病毒学报, 1992, 8(2): 162—167.
- [4] 周宗安. 单克隆抗体技术手册[M]. 南京: 南京大学出版社, 1991: 48—87.
- [5] 李富强, 刘尚高. 伪狂犬病病毒北京株的纯化及电镜观察[M]. 中国兽医科技, 1996, 29(10): 32—33.