

可阻断 IBDV 感染的抗 CEF 膜蛋白单克隆抗体的筛选

杨艳艳¹, 朱礼倩^{1,2}, 杨继飞¹, 滕蔓¹, 柴书军¹, 王丽¹, 罗俊¹, 邓瑞广¹, 张改平¹

(¹河南省农业科学院/河南省动物免疫学重点实验室, 郑州 450002; ²扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009)

摘要:【目的】利用细胞融合技术及细胞免疫组化方法, 筛选可特异性阻断鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 感染的抗鸡胚成纤维细胞 (CEF) 膜蛋白单克隆抗体, 为进一步研究 IBDV 的 CEF 受体奠定基础。【方法】用 CEF 细胞免疫 Balb/c 小鼠, 经细胞融合获得杂交瘤细胞上清。单层 CEF 用杂交瘤细胞上清孵育 2 h 后接种 IBDV, 病毒感染后固定细胞, 先后与 F22-EA6-Biotin 及 Streptavidin-HRP 进行反应, 最后用 AEC 染色, 显微镜下计数, 统计感染细胞减少的百分率以判定单抗上清阻断 IBDV 感染的效果。【结果】利用细胞组化的方法, 共计检测了 768 株杂交瘤细胞上清, 6 株 (1A5、1H11、2B12、3G1、4D10 和 4B8) 显示有阻断 IBDV 感染的效果, 其中 4B8 可完全阻断 IBDV 对 CEF 的感染, 该单抗针对的 CEF 膜蛋白很有可能是 IBDV 的细胞受体。【结论】筛选到的抗 CEF 膜蛋白的单抗可以阻断 IBDV 感染 CEF, 表明所建立的方法具有较高的敏感性和特异性。这些单抗可以用于进一步研究 IBDV 的 CEF 细胞受体。

关键词: 鸡胚成纤维细胞; IBDV 受体; Biotin Streptavidin

Screening of the Monoclonal Antibodies Against the Membrane Proteins of Chicken Embryo Fibroblast Which Can Block the Infection of IBDV

YANG Yan-yan¹, ZHU Li-qian^{1,2}, YANG Ji-fei¹, TENG Man¹, CHAI Shu-jun¹, WANG Li¹, LUO Jun¹, DENG Rui-guang¹, ZHANG Gai-ping¹

(¹Henan Provincial Key Laboratory for Animal Immunology, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002;

²College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu)

Abstract: 【Objective】To establish an efficient assay for screening monoclonal antibodies (McAbs) against the membrane proteins of chicken embryo fibroblast (CEF) for further studies of the cellular receptors of infectious bursal disease virus (IBDV). 【Method】McAbs against the membrane proteins of CEF were prepared by cell fusion. The monolayer CEF pre-incubated with the CEF-specific McAbs for 2 h were infected with IBDV and incubated with F22-EA6-Biotin postinfection. Then, the cells were reacted with Streptavidin-HRP and finally stained by AEC. The inhibitory percentage of IBDV infection was calculated by counting the IBDV-infected cells to determine the inhibition efficiency of the CEF-specific McAbs. 【Result】Compared with the control cells, the IBDV-infected cells pretreated with CEF-specific antibody significantly decreased; Supernatant fluids of total of 768 hybridomas were analyzed. The results of immunohistochemistry assays showed that six ones (1A5, 1H11, 2B12, 3G1, 4D10 and 4B8) have the abilities to block the infection of IBDV to CEF, and among which 4B8 can perfectly block the infection. 【Conclusion】This novel method is a sensitive and specific assay for the screening of CEF membrane protein-specific McAbs which can block the infection of IBDV to CEF, and these McAbs can be used for the further investigations of the cellular receptors of IBDV.

Key words: CEF; IBDV receptor; Biotin-streptavidin

收稿日期: 2008-01-25; 接受日期: 2008-07-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671561), 国家“973”计划 (2005CB523203) 和国家科技支撑计划 (2006BAD06A04-6)

作者简介: 杨艳艳 (1962—), 女, 河南沁阳人, 研究员, 研究方向动物免疫学及细胞工程。E-mail: yyy88yan@yahoo.com.cn。通信作者张改平 (1960—), 研究员, 研究方向免疫学及动物病毒分子致病机制。Tel: 0371-65711364; Fax: 0371-65729031; E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

0 引言

【研究意义】单克隆抗体在基础医学研究中常用于分析细胞或组织中特定蛋白质(抗原)的质和量的变化或特定基因的表达情况^[1-2]。本试验建立的筛选方法是为了有效获得抗鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)细胞受体候选分子的单克隆抗体,该抗体对进一步深入研究IBDV的细胞受体、了解病毒感染的分子机制及预防法氏囊病具有重要意义^[3-4]。【前人研究进展】研究病毒受体的方法很多,如酵母双杂交技术^[5]、噬菌体展示技术^[6-7]以及病毒蛋白铺覆技术等^[8-9]。Nieper等^[10]通过饱和结合试验及竞争试验发现鸡胚成纤维细胞(CEF)和B淋巴细胞表面可能存在不同的IBDV受体分子;Agus SETIYONO等^[11]发现经B淋巴细胞系LSCC-BK3增殖的IBDV强毒株能够与LSCC-BK3细胞的70,80和110 kD的膜蛋白结合;Lin等^[12]最新报道DF-1细胞的cHsp90可能作为受体的重要成分介导IBDV的感染。【本研究切入点】目前,国内外在分子水平上研究IBDV受体与感染机制关系的报道较少。笔者根据病毒受体特异性的抗体与受体结合可部分或完全阻断病毒感染的原理^[13-14],建立筛选抗CEF表面IBDV受体候选分子的单克隆抗体的方法,为进一步深入研究IBDV的细胞受体奠定基础。【拟解决的关键问题】以CEF为固相反应支持物,Biotin标记的IBDV特异性单抗F22-EA6为一抗优化试验,提高检测的特异性和敏感性,建立筛选抗IBDV受体候选分子的单克隆抗体的免疫组化方法。

1 材料与方 法

1.1 试剂及材料

8~10日龄普通鸡胚购自大河遗址孵化场;IBDV细胞适应株HN₃由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室保存;抗IBDV单抗腹水原液亦由该重点实验室生产;DMEM培养基购自GIBCOTMInvitrogen公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;AEC酶底物显色试剂盒购于中杉金桥公司;Biotin和Streptavidin-HRP均购自PIERCE公司。

1.2 IBDV 的培养及效价测定

接种IBDV HN₃于单层的CEF,在37℃、5%CO₂培养箱中培养48~72 h后,于-20℃反复冻融3次,4℃条件下4 000×g离心10 min,取上清,根据Reed等建立的方法^[15]用CEF细胞测定TCID₅₀,分装后于-20℃保存备用。

1.3 CEF 的制备及小鼠免疫^[16]

取8~10日龄鸡胚无菌操作去除头、腿、翅和内脏,PBS洗后剪碎,加0.25%的胰酶37℃条件下消化20 min后,弃掉上清加入含10%胎牛血清的DMEM终止消化,吸管轻轻吹打分散细胞,制成2×10⁵/ml个细胞,将细胞悬液以100 μl/孔接种到96孔细胞板或以10 ml/瓶接种到85 cm²细胞培养瓶,在37℃、5%CO₂培养箱中培养18~36 h至长成单层的CEF,用于免疫组化实验或收集细胞免疫Balb/c小鼠。用浓度为5×10⁷个/ml的CEF以每只小鼠200 μl腹腔注射免疫Balb/c小鼠3次,每次间隔3周,多次免疫后采血分离抗CEF的多抗血清进行效价测定。

1.4 抗 CEF 膜蛋白多抗的效价测定

小鼠最后一次免疫15 d后采血测定多抗血清的CEF结合效价,以1:100,1:500,1:1 000,1:5 000,1:10 000,1:20 000稀释免疫鼠多抗血清和未免疫鼠阴性血清,50 μl/孔加入单层的CEF培养板中,孵育2 h,PBST洗2次,加1:80稀释的羊抗鼠IgG-HRP,孵育1 h,PBST洗2次,AEC染色。

1.5 IBDV 单抗 F22-EA6 的纯化^[17]及生物素标记

以硫酸钠盐析法纯化F22-EA6。用0.1 mol·L⁻¹的PBS透析纯化的F22-EA6 24 h,按照说明书配制新鲜的10 mmol·L⁻¹ Biotin,以20倍IgG摩尔数的用量加入Biotin,冰上作用2 h,0.1 mol·L⁻¹ PBS透析24 h,测定工作浓度后加入30%的甘油,-20℃保存备用。

1.6 IBDV 和 F22-EA6-Biotin 的工作浓度测定

完全弃去单层CEF细胞培养上清,以50 μl/孔加入1:5,1:10,1:20,1:40,1:80的IBDV悬液,设2%胎牛血清的DMEM稀释液为阴性对照,37℃孵育3 h;换新鲜的2%胎牛血清DMEM继续培养21 h;弃除培养基,用含0.3% H₂O₂的甲醇固定10 min,PBST洗2次;50 μl/孔加入1:100,1:500,1:1 000稀释的F22-EA6-Biotin(稀释液为含5%胎牛血清的DMEM,每个浓度对应不同浓度IBDV感染的细胞和无毒的阴性对照),37℃孵育1 h,PBST洗3次;加5%猪血清稀释的Streptavidin-HRP,常温作用25 min,PBST洗3次,AEC显色。镜检观察细胞染色结果,确定IBDV和F22-EA6-Biotin的最佳工作浓度。

1.7 细胞融合及可阻断 IBDV 感染的抗 CEF 膜蛋白单抗的筛选

抗CEF膜蛋白单克隆抗体的制备:用浓度为10⁷个/ml的CEF 200 μl经腹腔注射超免已3次免疫后的Balb/c小鼠,超免后第4 d取免疫鼠的脾细胞约1×10⁸

个与 2×10^7 个 NS0 骨髓瘤细胞按常规方法进行细胞融合。待杂交瘤细胞生长 12 d 后开始取细胞上清, 用细胞组化的方法检测其能否阻断 IBDV 对 CEF 的感染, 以筛选可阻断 IBDV 感染的抗 CEF 膜蛋白单抗。

细胞组化法筛选抗 CEF 膜蛋白单克隆抗体: (1) 无菌弃去 96 孔板内的单层 CEF 细胞培养基, 用 37°C 预温热的 PBS 洗涤 1 次; (2) $50 \mu\text{l}$ /孔加杂交瘤细胞上清 (以 1:1 000 稀释的 CEF 免疫鼠多抗血清为阳性对照, 未免疫鼠血清为阴性对照), 每一样品 3 个重复, 37°C 孵育 2 h 后用 DMEM 培养基洗 3 次; (3) $50 \mu\text{l}$ /孔加入 10^5TCID_{50} 的 IBDV 病毒悬液, 37°C 孵育 3 h, 弃上清后用 DMEM 培养基洗 3 次, 加新鲜的含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 20~22 h; (4) 弃上清, 用含 0.3% H_2O_2 的甲醇溶液 $100 \mu\text{l}$ /孔固定 10 min, PBST 洗 3 次; (5) $150 \mu\text{l}$ /孔加入 5% 猪血清封闭液, 37°C 孵育 1 h, PBST 洗 3 次; (6) $50 \mu\text{l}$ /孔加入 1:500 稀释的 F22-EA6-Biotin, 37°C 孵育 1 h, PBST 洗 3 次; (7) $50 \mu\text{l}$ /孔加入 5% 猪血清稀释的 Streptavidin-HRP, 作用 25 min, PBST 洗 3 次; (8) AEC 底物显色; (9) 倒置显微镜下计数显色细胞。

相对定量判定筛选结果: 分别统计阴性血清对照孔、免疫鼠多抗血清及杂交瘤细胞上清孵育孔的 IBDV 感染阳性细胞数量, 求各自的平均数。对照孔的感染阳性细胞数用 M 表示, 抗体孵育的感染阳性细胞数用 N 表示, 感染细胞减少百分率用 I 表示, 计算公式为 $I = (M - N) / M \times 100\%$ 。当 $I > 50\%$ 时, 表明多抗血清或单抗上清中存在可特异阻断 IBDV 感染的抗体存在, 可对该单抗进一步筛选鉴定。

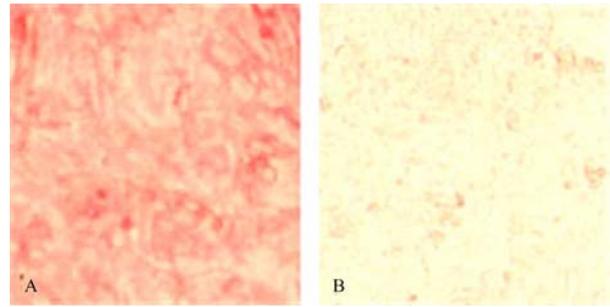
2 结果与分析

2.1 细胞免疫组化最佳工作条件

细胞组化结果表明, CEF 全细胞免疫 Balb/c 小鼠的多抗血清效价介于 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 之间, 当多抗血清稀释度为 2×10^{-3} 时做 CEF 细胞膜蛋白染色效果最好 (图 1)。IBDV 感染 CEF 48~72 h 后约 80%~90% 的细胞因病变而裂解脱落, 收集的病毒液以 $10^5 \text{TCID}_{50}/50 \mu\text{l}$ 孔用于 IBDV 感染阻断试验最佳。1:500 稀释的 F22-EA6-Biotin 可与 IBDV 感染细胞特异性结合呈现良好显色效果, 并且与对照细胞无非特异性反应 (图 2)。

2.2 细胞组化筛选抗 CEF 膜蛋白单抗

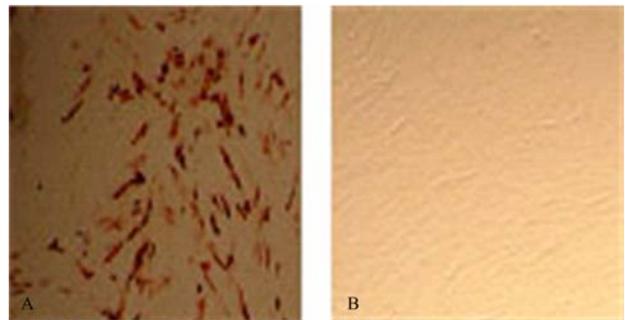
用细胞融合技术获得的杂交瘤细胞, 其培养上清与 CEF 预作用后, 接种 IBDV 进行感染以筛选可阻断 IBDV 感染的抗 CEF 膜蛋白单抗。本试验中共计检测



A: 1:2000 稀释的 CEF 免疫鼠血清; B: 1:2000 稀释的正常鼠血清
A: 1:2000 diluted serum of mice immunized with CEF; B: 1:2000 diluted normal mice serum

图 1 多抗血清与 CEF 的细胞组化染色

Fig. 1 The immunohistochemistry assay of CEF stained with mice serum



A: IBDV 感染组; B: 未感染对照组
A: CEF infected with IBDV; B: CEF uninfected

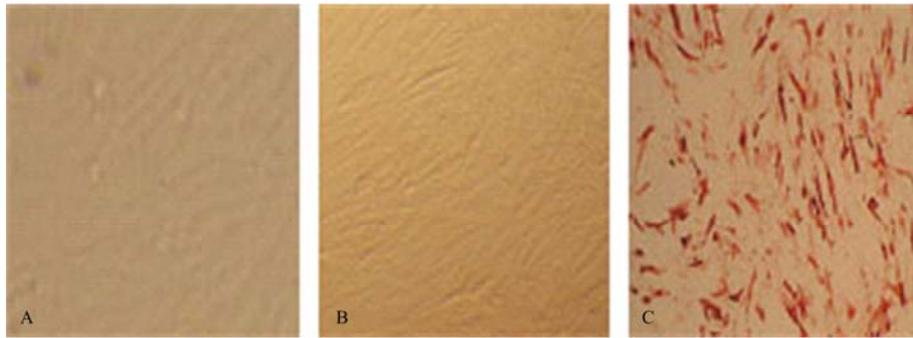
图 2 IBDV 感染 CEF 细胞组化

Fig. 2 The immunohistochemistry assay of CEF infected with IBDV

了 768 株杂交瘤细胞的培养上清, 其中 6 株 (1A5、1H11、2B12、3G1、4D10 和 4B8) 单抗阻断作用明显, 经它们预作用后 CEF 感染细胞数量与对照组相比显著减少, 而且 4B8 的杂交瘤细胞上清可完全阻断 IBDV 对 CEF 的感染, 与多抗血清的阻断效果基本一致, 正常鼠血清则不能阻断 IBDV 的感染 (图 3)。

3 讨论

IBDV 属双 RNA 病毒科禽双 RNA 病毒属, 对鸡 B 淋巴细胞、Vero 细胞、CEF 等多种细胞均具有易感性^[18-19]。作为 IBDV 易感细胞之一的 CEF, 其细胞表面很可能存在 IBDV 细胞受体^[20-22]。8~10 日龄鸡胚 CEF 培养 18~36 h 就能够长成细胞单层, 接毒 20 h



A: 1 : 1000 稀释的多抗血清阻断组; B: 4B8 单抗上清阻断组; C: 正常鼠血清阻断组

A: Infection of IBDV blocked by polyclonal antibodies diluted 1 : 1000; B: Infection of IBDV blocked by McAb-4B8; C: Infection of IBDV blocked by normal mice serum

图 3 多抗及单抗阻断 IBDV 感染 CEF 的细胞组化

Fig. 3 Blocking assays of the infection of IBDV to CEF using poly- or monoclonal antibodies

后胞浆中即有大量繁殖的病毒, 经固定后的细胞形态和通透性很好, 非常适合细胞表面蛋白的染色和胞浆内病毒增殖的检测试验。因此, 利用细胞免疫组化的方法筛选抗 CEF 膜蛋白的单抗, 并进一步获得抗 IBDV 受体候选分子的单抗是可行的。

本研究的结果表明, 细胞组化方法筛选抗 CEF 膜蛋白单抗具有较高的敏感性和特异性。通过对细胞的接种密度和培养时间、病毒吸附和孵育时间、固定剂及固定时间、封闭液等条件进行优化, 使有限的细胞膜蛋白获得鲜明的染色^[23]。利用 Biotin 与 Streptavidin 的极高亲和性, 用 Biotin 标记 F22-EA6 检测 IBDV, 有效提高了筛选方法的敏感性, 试验结果也表明经 CEF 免疫鼠多抗血清封闭的细胞不感染 IBDV, 而对照组有大量的感染细胞染色, 二者差异非常明显。分析的 768 株杂交瘤细胞培养上清中, 0.78% 的细胞株具有明显的阻断感染作用, 其中 4B8 单抗上清的 I 值达 100%, 显示该筛选方法有较高的特异性。

利用抗体阻断感染及细胞组化方法, 共获得了 6 株可明显阻断细胞适应株 IBDV 感染的抗 CEF 膜蛋白的单抗细胞株, 这些单抗很有可能识别的是 CEF 表面的 IBDV 细胞受体, 这些单抗可作为指示系统, 为进一步研究细胞适应株 IBDV 的细胞受体奠定了物质基础。

4 结论

建立了细胞组化方法, 成功筛选到能够有效阻断细胞适应株 IBDV 感染的抗 CEF 膜蛋白的特异性单克隆抗体, 这些单抗所针对的细胞表面蛋白很可能是介

导 IBDV 感染的细胞受体蛋白, 可以用于建立进一步筛选鉴定 IBDV 的 CEF 细胞受体的指示系统。

References

- [1] Stone D M, Norton L K, Davis W C. Modulation of bovine Leukemia virus-associated spontaneous lymphocyte proliferation by monoclonal antibodies to lymphocyte surface molecules. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1997, 83(2): 156-164.
- [2] 张昶, 任向阳, 刘秋燕, 吴青, 陈陆, 王川庆. 单克隆抗体在畜禽疫病诊断中的应用. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(5): 93-95.
Zhang C, Ren X Y, Liu Q Y, Wu Q, Chen G L, Wang C Q. Application of monoclonal antibody in diagnosis of animal disease. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, 34(5): 93-95. (in Chinese)
- [3] Mettenleiter T C. Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Research*, 2002, 82: 3-8.
- [4] 刘建文, 涂长春. 单克隆抗体在动物病毒性传染病研究中的应用. *畜牧兽医科技信息*, 2003, 19(5): 11-13.
Liu J W, Tu C C. Application of mAbs in the studies of animal viral infectious diseases. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2003, 19(5): 11-13. (in Chinese)
- [5] Field S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interaction. *Nature*, 1989, 340: 245-246.
- [6] Cui X, Nagesha H S, Holmes I H. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display. *Journal of Virology Methods*, 2003, 109(1): 75-83.
- [7] Sche P P, Mckenzie K M. Display cloning: functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display. *Chemistry &*

- Biology*, 1999, 6: 707-716.
- [8] Haywood A M. Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *Journal of Virology*, 1994, 68(1): 1-5.
- [9] Haywood A M. Characteristics of Sendai virus receptors in a model membrane. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 83: 427-436.
- [10] Nieper H, Müller H. Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence of specific binding sites. *Journal of General Virology*, 1996, 77: 1229-1237.
- [11] Augus S, Tomokazu H, Tsuyoshi Y, Hodeto F, Hatsuya H. Detection of cell membrane proteins that interact with virulent infectious bursal disease virus. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 2001, 63(2): 219-221.
- [12] Lin T W, Lo C W, Lai S Y. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 2007, 81(16): 30-41.
- [13] Pierson T C, Doms R W. HIV-1 entry inhibitors: new targets, novel therapies. *Immunology Letter*, 2003, 85: 113-118.
- [14] Smith A E, Helenius A. How viruses enter animal cells. *Science*, 2004, 304: 237-242.
- [15] Reed L J, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 1938, 27: 493-497.
- [16] Youngner J S. Monolayer tissue culture. I. Preparation and standardization of suspensions of rypsin-dispersed monkey-kidney cells. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 1954, 85: 202-207.
- [17] 杨艳艳, 张改平, 郭军庆. 高亲和力抗 IBDV 单克隆抗体的生产与免疫学鉴定. *中国免疫学杂志*, 2000, 16(7): 384-386.
- Yang Y Y, Zhang G P, Guo J Q. Generation and identification of monoclonal antibodies strongly binding to IBDV. *Chinese Journal of Immunology*, 2000, 16(7): 384-386. (in Chinese)
- [18] Yamaguchi T, Kondo T, Inoshima Y, Ogawa M, Miyoshi M, Yanai T, Masegi T, Fukushi H, Hirai K. *In vitro* attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: Some characteristics of attenuated strains. *Avian Disease*, 1996, 40: 501-509.
- [19] Kwon H M, Kim S J. Sequence analysis of the variable VP2 gene of infectious bursal disease viruses passaged in Vero cells. *Virus Genes*, 2004, 28: 285-291.
- [20] Chi Wai Yipa, Yin Shan Yeunga, Ching Man Maa. Demonstration of receptor binding properties of VP2 of very virulent strain infectious bursal disease virus on Vero cells. *Virus Research*, 2007, 123(1): 50-60.
- [21] Kibenge F S, McKenna P K. Isolation and propagation of infectious bursal disease virus using the ovine kidney continuous cell line. *Avian Disease*, 1992, 36: 256-261.
- [22] Himly M, Foster D N, Bottoli I, Iacovoni J S, Vogt P K. The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology*, 1998, 248: 295-304.
- [23] 沈关心, 龚非力. 抗体技术试验指南. 北京: 科学出版社, 2002: 67-91.
- Shen G X, Gong F L. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Beijing: Science Press, 2002: 67-91. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)