

# 抗犬瘟热病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

胡勇 吴胜昔 蔡家利 胡仁建 (重庆工学院生物工程学院, 重庆400050)

**摘要** [目的] 筛选出稳定分泌抗犬瘟热病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株。[方法] 用纯化的犬瘟热病毒(CDV)抗原免疫BALB/c小鼠, 取脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合, 经间接ELISA和有限稀释法克隆杂交瘤细胞。研究了杂交瘤细胞的稳定性和染色体数, 测定了单克隆抗体的效价并鉴定其特异性和亚型。[结果] 经反复筛选和亚克隆后, 共获得3株能稳定分泌抗CDV单克隆抗体的杂交瘤细胞株。3株单抗对CDV均有较高的特异性, 与犬传染性肝炎病毒、犬细小病毒均不反应。3株杂交瘤细胞的腹水效价为1(8000~128000), 细胞培养上清效价为1(256~512), 染色体数为80~100。3株单克隆抗体重链均属于IgG1, 轻链均属于 $\kappa$ 链。[结论] 该研究为研制CDV快速检测试剂盒奠定了基础。

**关键词** 犬瘟热病毒; 单克隆抗体; 杂交瘤细胞株

中图分类号 S858.292 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)12-04992-02

## Establishment of Hybridoma Cell Lines Secreting Monoclonal Antibodies against Canine Distemper Virus

HU Yong et al (College of Bioengineering College, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050)

**Abstract** [Objective] The research aimed to screen out hybridoma cell lines that secreted monoclonal antibodies against canine distemper virus(CDV) stably. [Method] BALB/c mice were immunized with the purified CDV antigen. Spleen cells were taken to fuse with SP2/0 myeloma cells and hybridoma cells were cloned by using indirect ELISA and limited dilution method. The stability and chromosome number of hybridoma cells were studied, the titer of monoclonal antibodies were determined and their specificity and subtype were identified. [Result] After repeated screening and subcloning, 3 hybridoma cell lines that could stably secrete monoclonal antibody against CDV were obtained. Monoclonal antibodies in 3 lines all had higher specificity to CDV, which didn't react with infectious canine hepatitis virus and canine parvovirus. The ascites titers of 3 hybridoma cell lines were 1(8000~128000), the titer of cell culture supernatant was 1(256~512) and the chromosome number was 80~100. The heavy chains in monoclonal antibodies of 3 myeloma cell lines belonged to IgG1 and light chains belonged to  $\kappa$  chains. [Conclusion] This research laid the foundation for developing the reagent kit for rapid determination of CDV.

**Key words** Canine distemper virus; Monoclonal antibody; Hybridoma cell line

犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus, CDV)是负链单股不分节的RNA病毒,属于副黏病毒科、麻疹病毒属成员,只有1个血清型,通过感染犬等多种动物引起犬瘟热<sup>[1]</sup>。近年来,犬瘟热在我国犬群中的发病率和致死率均有升高的趋势,临床表现也与以往有所不同<sup>[2]</sup>。报道的CDV宿主范围也在不断扩大<sup>[3]</sup>,已有狮子、豹等大型猫科动物<sup>[4]</sup>甚至大熊猫感染CDV的报道;Kennedy等还证实2000年在里海有上万只海豹死于CDV感染<sup>[5]</sup>。如能及早发现并防治,无疑会最大限度地减少犬瘟热带来的损失。单克隆抗体具有高度特异性、灵敏性和重复性,制备抗CDV单克隆抗体对犬瘟热的临床诊断、流行病学调查、病原学研究及治疗都有重要意义。笔者筛选出能稳定分泌抗CDV病毒的杂交瘤细胞株,并对其特性进行测定,旨在为CDV的研究及临床应用提供基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** BALB/c小鼠,购自重庆医科大学;昆明系小鼠,购自第三军医大学;SP2/0骨髓瘤细胞由江苏省农科院畜牧兽医研究所惠赠,实验室传代冻存;Vero细胞由第三军医大学微生物教研室提供;CDV株、犬细小病毒(CPV)、犬传染性肝炎病毒(ICHV),均为实验室保存;DMEM培养基、HAT选择性培养基、胰酶为Invotrogen公司产品;PEG 1500、Muse Monoclonal Antibody Isotyping Kit为Roche公司产品;酶标二抗(HRP-羊抗小鼠IgG)为北京鼎国公司产品;胎牛血清为Gibco公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 抗犬瘟热病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

**1.2.1 病毒增殖。**同步接种0.5 ml种毒(病毒量为 $5 \times 10^{6.5}$

TCID<sub>50</sub>)于Vero细胞,37℃吸附2h后,加入含5%胎牛血清的DMEM培养液,33℃下培养至细胞病变(CPE)达80%时收获病毒。

**1.2.2 抗原纯化。**参照文献[6]的方法。将收获的细胞病毒液反复冻融3次,6000 r/min离心30 min,取上清,加等量饱和硫酸铵,混匀,于4℃盐析60 min,5000 r/min离心30 min,弃上清。取沉淀,用PBS液悬浮,6000 r/min离心30 min,取上清,经透析去硫酸铵后,再加于60%、45%和30%的蔗糖梯度管上,30000 r/min离心180 min,取病毒带,透析去除硫酸铵,紫外分光光度法测病毒蛋白含量,-20℃冻存储存。未接毒的正常Vero细胞按同样方法处理作为对照抗原。

**1.2.3 动物免疫。**取0.2 ml纯化的CDV与等量福氏完全佐剂混合,乳化后背部皮下多点免疫7周龄的雌性BALB/c小鼠。第1次免疫3周后,再取0.2 ml纯化的CDV与等量福氏不完全佐剂充分乳化,加强免疫。2周后,再加强免疫1次。融合前3 d,用加倍量的不加佐剂的抗原,腹腔加强免疫。

**1.2.4 间接ELISA方法的建立。**用纯化的CDV作为抗原,按常规方法建立间接ELISA法,通过方阵滴定确定抗原包被浓度和阴性、阳性血清(S<sup>-</sup>、S<sup>+</sup>)最佳工作稀释度。

**1.2.5 细胞融合。**按刘秀梵的方法<sup>[7]</sup>进行。

**1.2.6 阳性杂交瘤细胞的克隆。**采用有限稀释法克隆杂交瘤细胞。将细胞用完全培养基稀释成10.0、5.0、2.5个/ml 3个密度,分装96孔细胞培养板,每孔0.2 ml,1周后观察并标记单克隆孔,当单克隆孔长至孔面积的1/3~1/2时,检测单克隆孔的细胞上清液。阳性单克隆孔再进行2~3次亚克隆,直至整个细胞培养板的单克隆孔均为阳性为止。

## 1.3 单克隆抗体的生物特性鉴定

**1.3.1 阳性杂交瘤细胞的稳定性试验<sup>[8]</sup>。**杂交瘤细胞继代培养3个月以上,定时用间接ELISA法测定培养上清抗体效

基金项目 重庆市科委自然科学基金项目(CSTC,2006BB5400)。

作者简介 胡勇(1970-),男,四川宣汉人,博士,讲师,从事致病微生物方面的研究。

收稿日期 2008-02-25

价。分别复苏冻存1、2、4、8和12个月的阳性杂交瘤细胞,用间接ELISA法测定细胞培养上清及细胞诱生小鼠腹水的抗体效价。

**1.3.2 杂交瘤细胞染色体分析。**取对数生长期的杂交瘤细胞,经秋水仙碱0.075 ml/L KCl 溶液处理,固定制片后染色,油镜下观察染色体并记数。

**1.3.3 单克隆抗体的生产及效价的测定。**对获得的杂交瘤细胞扩大培养,收集上清液,间接ELISA测定效价,冻存。同时,用灭菌的液体石蜡油腹腔注射12周龄健康BALB/c小鼠,0.5 ml/只,7~10 d后每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞( $3 \sim 6$ )  $\times 10^6$ 个,待其腹部隆起时,用针头抽取腹水,4 000 r/min离心10 min,取上清,间接ELISA检测抗体的效价,冻存。

**1.3.4 单抗特异性鉴定。**分别以犬传染性肝炎病毒(ICHV)和犬细小病毒(CPV)为抗原包被聚苯乙烯微量滴定板,同时设CDV为阳性对照,间接ELISA检测各株单抗反应的特异性。

**1.3.5 单抗的亚型鉴定。**按试剂盒操作手册进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗犬瘟热病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

**2.1.1 CDV的分离纯化。**经硫酸铵盐析、蔗糖密度梯度离心并透析,紫外分光光度法测得病毒蛋白浓度为0.6 ng/ml。

**2.1.2 最佳抗原包被浓度。**根据方阵试验结果,最佳抗原包被浓度为3.75  $\mu$ g/ml;最佳阳性、阴性血清稀释度为1 4 000。

**2.1.3 细胞融合及筛选结果。**共用5块96孔细胞板融合筛选,有311孔有融合细胞生长,融合率为65%(311/480),其中43孔抗体阳性,阳性率为14%(43/311)。选择其中OD值较高的阳性克隆进行亚克隆,采用有限稀释法,经过反复筛选及亚克隆共获得3株能稳定分泌抗CDV的杂交瘤细胞株,分别命名为3A5、3F6、5G6。

### 2.2 单克隆抗体的生物特性鉴定

**2.2.1 腹水及细胞培养上清MAb的效价。**间接ELISA测得3株杂交瘤细胞腹水效价为1 8 000~1 128 000,细胞培养上清效价分别为1 256~1 512,见表1。

表1 杂交瘤细胞株上清及腹水ELISA效价

**Table 1 The ELISA titers of supernatant and ascites of hybridoma**

杂交瘤细胞株	细胞培养上清	腹水
Hybridoma strains	Supernatant	Ascites
3A5	1 256	1 8 000
3F6	1 512	1 64 000
5G6	1 512	1 128 000

**2.2.2 阳性杂交瘤细胞稳定性试验。**细胞株连续继代培养3个月以上,其培养上清效价仍保持在1 256~1 512。这些

细胞株冻存1、2、4、8和12个月后复苏,其诱生腹水的单抗效价仍保持在 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 。

**2.2.3 杂交瘤细胞染色体。**对3株杂交瘤细胞分裂相染色体形态进行观察,均可见到端着丝点和中间着丝点,染色体数目介于80~100条,具有杂交瘤细胞染色体特征。

**2.2.4 单抗特异性。**筛选的3株杂交瘤细胞株与犬传染性肝炎病毒(ICHV)和犬细小病毒(CPV)的反应均为阴性,与CDV阳性对照反应正常,说明不存在交叉反应,3株单克隆抗体都是针对CDV的特异性单克隆抗体。

**2.2.5 单抗亚型。**在试纸条的G1、区各出现1条清晰的条带,说明3株单克隆抗体均为IgG<sub>1</sub>型。

## 3 讨论

MAb的制备有赖于B细胞杂交瘤技术,其周期长,涉及的试验环节很多,受很多因素的影响。在诸多的影响因素中,抗原制备、动物免疫及免疫方法等是能否获得杂交瘤细胞和高效价特异性单克隆抗体的重要因素。通过对病毒培养液进行反复冻融、硫酸铵沉淀和蔗糖密度梯度离心进行纯化,并用纯化的抗原免疫BALB/c小鼠,提高了杂交瘤细胞的阳性率。但在进行间接ELISA阳性克隆筛选时,这样的抗原还是会产生假阳性结果,因此,在筛选时,设置未接种病毒的vero细胞抗原为对照,最大限度地去除了假阳性结果。

研究共获得3株能稳定分泌抗CDV单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞株。这3株单克隆抗体均为IgG类,将有利于标记二抗的选择及建立相应的免疫检测方法。ELISA检测结果还证实,3株单克隆抗体均有较高的特异性,与犬传染性肝炎、犬细小病毒均无交叉反应。因此,可以为实验室研制CDV快速检测试剂盒提供基础。但由于暂没有得到更多的CDV毒株,因此,该试验所制备的单抗与不同毒株的反应情况有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] ORVELL C, SHESHBERADARAN H, NORRBY E. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against four structural components of canine distemper virus[J]. J Gen Virol, 1985, 66: 443-456.
- [2] 遇秀玲, 田克恭, 吴娜. 犬瘟热病毒的分离鉴定、致病特点和单克隆抗体的研究[J]. 动物医学进展, 1999, 20(3): 178-179.
- [3] 何洪彬, 夏咸柱. 犬瘟热的诊断及其预防免疫的研究进展[J]. 动物医学进展, 2001, 22(1): 12-15.
- [4] SEKI F, ONO N, YAMAGUCHI R, et al. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in vero cells expressing canine SLAMF2 (CD150) and their adaptability to nonset B95a cells[J]. J Virol, 2003, 77(18): 9943-9950.
- [5] KENNEDY S, KUIKEN T, JEPSON P D, et al. Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus[J]. Emerg Infect Dis, 2000, 6(6): 637-639.
- [6] 袁书智, 夏咸柱. 犬瘟热荧光抗体技术的应用研究[J]. 中国兽医学报, 1994, 14(2): 146-150.
- [7] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994: 21-23, 32-36.
- [8] 吴胜昔, 尧蒙, 胡仁建. 抗禽流感病毒单克隆抗体的研制[J]. 重庆工学院学报, 2006, 20(11): 11-14.