

鸭肝炎病毒单克隆抗体的制备

潘朋朋¹, 文力正², 单振振¹, 丁毅¹, 袁宝², 任文陟², 李维娜¹, 李晓叶¹

(¹吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; ²吉林大学实验动物中心, 长春 130062)

摘要:首先利用弗式完全佐剂和弗式不完全佐剂, 乳化病毒, 制备免疫抗原, 对BALB/c小鼠进行三次免疫。将免疫效价达到1:10000以上的免疫小鼠脾细胞与SP2/0细胞进行融合, 通过间接ELISA方法对阳性杂交瘤细胞株进行筛选, 并通过有限稀释法将呈强阳性的杂交瘤细胞亚克隆3~4次, 直到杂交瘤细胞阳性率达到100%。得到阳性株命名为2E3, 对阳性株细胞进行扩大培养, 并将细胞注入腹腔, 提取腹水, 测定细胞上清及腹水的效价, 分别为 10×2^5 , 10×2^6 。利用亚类鉴定试剂盒测定单抗的亚类。鉴定结果为IgG1型。

关键词:鸭肝炎病毒; 单克隆抗体; ELISA

中图分类号: S823.9+2

文献标志码: A

论文编号: 2010-1961

Preparation of Monoclonal Antibody against Duck Hepatitis Virus

Pan Pengpeng¹, Wen Lizheng², Shan Zhenzhen¹, Ding Yi¹, Yuan Bao², Ren Wenzhi², Li Weina¹, Li Xiaoye¹

(¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062;

²Laboratory Animal Center, Jilin University, Changchun 130062)

Abstract: In order to make DHV antigens, the experiment utilize IFA and CFA. The BALB/c mice were immunized with DHV for three times. The spleen's B lymphocyte of the mice should be fused with SP2/0 plasmacytoma cells until the immunopotency was up to 1:10000. The mascline hybridoma cells were screened by indirect enzyme-link immunosorbent assay. Hybridomas whose supernatants show stronger positive were subcloned by limited dilution methods for 3~4 times, until the positive rate come up to 100%. It was named 2E3. The immunopotency of ascites and supernatant was 10×2^5 , 100×2^6 . And the subtype of 2E3 was IgG₁.

Key words: DHV; Monoclonal antibody; ELISA

0 引言

鸭肝炎病毒(Duck Hepatitis Virus DHV)是引起雏鸭高致死性鸭病毒性肝炎(Duck Virus Hepatitis, DVH)的病原。DHV分为无血清学关系的I型、II型和III型等3种血清型, 近年也有关于新型DHV的报道。I型鸭肝炎病毒属于小RNA病毒科(picomaviridae)肠道病毒属(Enterovirus)^[1], DHV-I型病毒引起的鸭病毒性肝炎呈世界性分布^[2-3], 中国主要流行的也主要是I型鸭病毒性肝炎。

酶联免疫吸附实验(ELISA)是一种微量、简便、特异性强的检测方法, 中国国内已有用此方法检测DHV

的报道^[4-5]。制备了抗DHV单克隆抗体, 为今后建立更加灵敏、准确、特异性强的快速检测DHV方法打下了基础^[6-7]。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、病毒

SPF级BALB/C雌性小鼠(6~8周龄和10周龄以上), 购自卫生部长春生物制品研究所; 骨髓瘤细胞(SP2/0), 吉林大学实验动物中心保存; 鸭肝炎病毒, 购自于中国兽医药品监察所。

1.2 BALB/c小鼠的免疫

将佐剂与抗原充分的乳化, 在BALB/c小鼠适应

基金项目:吉林省科技平台建设项目“吉林省实验动物质量检测中心平台建设”(20071138)。

第一作者简介:潘朋朋, 男, 1986年出生, 江苏徐州人。吉林大学畜牧兽医学院硕士研究生。E-mail: panpengpeng304@126.com。

通讯作者:文力正, 男, 1976年出生, 甘肃省庆城县人, 讲师, 硕士, 主要从事动物遗传育种和实验动物质量检测工作。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学实验动物中心, Tel: 0431-87836570, E-mail: wlzsydw@hotmail.com。

收稿日期:2010-06-29, **修回日期:**2010-08-02。

表1 BALB/c小鼠免疫程序

次数	抗原量/ μg	剂量/ μL	佐剂	间隔时间/W	免疫途径
1	100	400	弗式完全	2	腹腔
2	100	400	弗式不完全	2	腹腔
3	100	400	弗式不完全	2	腹腔
4	60	100	无	1~2	尾静脉

环境后进行免疫。6只BALB/c小鼠,分两组进行免疫。免疫程序见表1。

1.3 免疫效价的测定

BALB/c小鼠在最后一次乳剂腹腔免疫1~2周内,小鼠断尾采血分离血清,作为阳性血清,以未免疫小鼠的血清为阴性血清,并设空白对照,利用ELISA方法检测免疫效价^[8]。

1.4 最佳工作浓度及临界值的确定

对抗原进行纵向倍比稀释,阳性血清进行横向倍比稀释,用方阵试验进行测定。将结果中阳性血清与阴性血清P/N值较大,并且OD₄₉₀值最接近于1.00的抗原与血清稀释倍数,作为最佳工作浓度。

在最佳工作条件下检测融合后杂交瘤细胞的上清,取大多数阴性融合孔平均OD₄₉₀值,采用P/N值和OD₄₉₀均值两个方面进行综合判定临界值。具体标准为:①P/N \geq 2.1;②P \geq N+3sd。同时满足上面两个的融合孔的杂交瘤细胞为阳性孔,只符合其中一条或都不符合的则判断为阴性^[9-10]。

1.5 单抗的制备

将脾细胞和SP2/0细胞按照(5~10):1的比例在融合剂50%PEG的作用下进行细胞融合,融合后利用HAT/HT选择培养基进行选择培养。进行ELISA检测,对呈现阳性的细胞孔,利用液相有限稀释法进行细胞的克隆,经3~4次亚克隆,上清检测的阳性率达100%时,即可确定所得阳性株为分泌单克隆抗体的细胞株。对阳性孔进行扩大培养,冻存保种。小鼠腹腔注射液体石蜡,3~10天后注入阳性杂交瘤细胞,制备腹水^[11-13]。

1.6 抗体特性鉴定

利用间接ELISA方法测定细胞上清及腹水的抗体效价,并利用抗体亚类鉴定试剂盒鉴定抗体的亚类。

2 结果与分析

2.1 最佳工作浓度及临界值的确定

利用方阵滴定方法,结果如表2。

最佳工作条件为抗原1:8000稀释包被,血清1:1600稀释。

根据判断标准可得出,当OD₄₉₀值大于等于0.29时

表2 方阵滴定结果

病毒	血清								
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	空白值	阴性
1:1000	1.447	1.125	0.875	0.637	0.454	0.314	0.210	0.046	0.195
1:2000	1.272	1.081	0.806	0.543	0.397	0.289	0.200	0.066	0.192
1:4000	1.216	1.046	0.799	0.422	0.408	0.290	0.219	0.089	0.212
1:8000	1.216	0.987	0.669	0.549	0.353	0.263	0.211	0.062	0.202
1:16000	1.096	0.855	0.677	0.503	0.345	0.221	0.179	0.051	0.166
1:32000	0.827	0.740	0.525	0.412	0.270	0.182	0.149	0.047	0.198
1:64000	0.723	0.606	0.403	0.329	0.207	0.149	0.127	0.047	0.210

就可以判定为阳性。即0.29为判断的临界值。同时在检测的过程中,可以根据背景值的大小,适当的调整判断的标准。

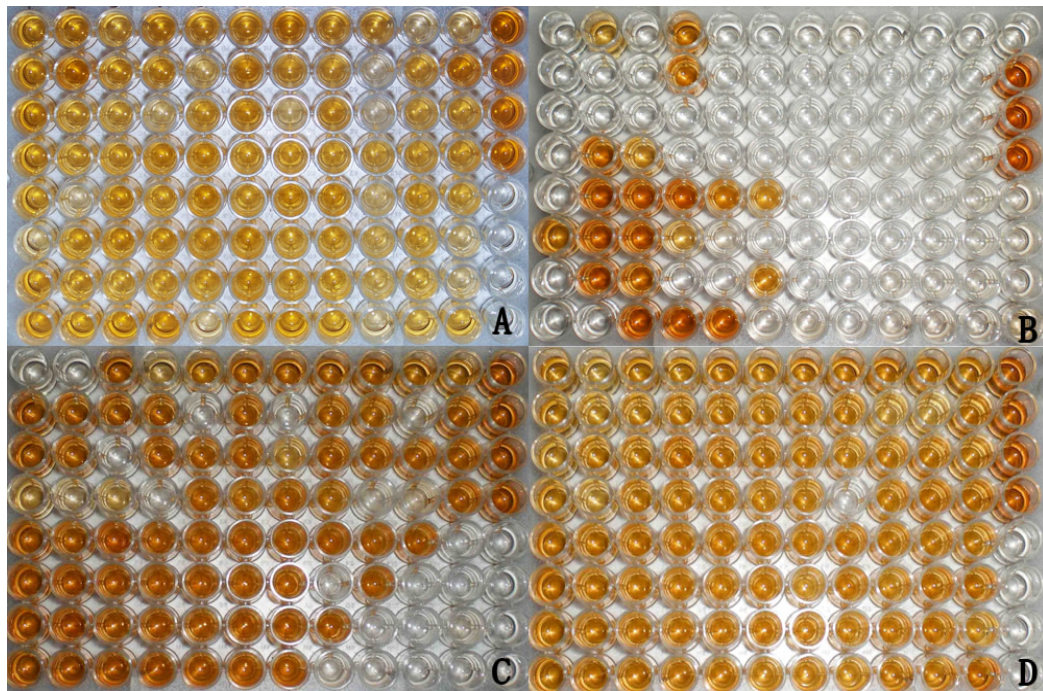
2.2 单抗筛选的结果

用I-1, I-2号免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行两次融合,利用有限稀释法进行3次的亚克隆,阳性率达100%的杂交瘤细胞株,进行细胞株扩大培养、冻存。经检测和筛选最终获得能够稳定分泌抗鸭肝炎

病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞一株,命名为2E3,在克隆的过程中丢失一株阳性。结果见图1及表3。

表3 杂交瘤细胞克隆结果

克隆次数	3次克隆结果	
	单克隆率/%	阳性率/%
第一次	88/192=45.8	19/88=21.6
第二次	82/154=53.2	70/82=85.4
第三次	88/96=91.7	87/88=99



A为2E3融合结果;B为2E3 一克结果;C为2E3 二克结果;D为2E3 三克结果

图1 2E3 融合情况及三次克隆的结果

2.3 抗体的效价及亚类的鉴定

通过ELISA检测方法对2E3株杂交瘤细胞的培养上清和腹水进行效价测定。结果见表4。

单抗亚类鉴定试剂盒对2E3单抗进行亚类鉴定,

表4 单抗的免疫学特性

McAbs	培养上清抗体效价	腹水抗体效价
2E3	10×2^5	10×2^6

表5 单抗亚类鉴定

McAbs	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgM	IgA	阴性对照
2E3	1.589	0.559	0.559	0.567	0.598	0.568	0.098

结果见表5,2E3株为IgG1亚类抗体。

3 讨论

鸭病毒性肝炎的实验室诊断方法很多,包括电镜检测、中和试验、琼脂扩散、对流免疫电泳、血凝试验、荧光抗体、酶连免疫吸附试验(ELISA)、cDNA探针技术等,方法各有优点。随着单克隆抗体技术的成熟应用,ELISA也成为重要的检测方法之一。韩永俊以DHV纯化病毒作为包被抗原,建立检测鸭肝炎病毒的ELISA检测方法,特异性强,敏感性高,重复性好,灵敏度较琼脂扩散试验高32倍^[4]。所以制备抗鸭肝炎病毒的单克隆抗体,为快速准确的检测提供条件。

免疫动物选择的原则为取与骨髓瘤细胞供体属于同一品系的动物进行免疫,品系越相近,杂交瘤细胞就越稳定。目前骨髓瘤细胞系大多来自于BALB/c小鼠^[5]。免疫方法采用常规的体内免疫(包括皮下、腹腔、静脉注射),方法简单且易于操作,免疫效果较好。

每次免疫,都要制定详细的免疫计划,包括抗原的性质和纯度、抗原量、免疫途径、次数及间隔时间、佐剂的应用及免疫动物对于该抗原的免疫应答等。所用的病毒抗原抗原性较强,所以所免疫的抗原量较少,为一般免疫剂量的1/2~1/3。

阳性克隆细胞的筛选主要的方法为间接的ELISA方法。ELISA试验以灵敏度较高、特异性好的特点得到了广泛的应用^[6],但操作中的各个环节对检测细胞的影响较大,对于阳性孔的筛选就会造成误选,影响实验结果。首先,孵育时间严格按照操作说明进行,洗板时要保证洗涤液注满每孔,洗涤时间也应严格的控制在3分钟内。显色时间参照文献10~15分钟,此显色时间效果最好^[7]。

根据临界值,判定阳性株,应及早的进行克隆化。阳性细胞生长过多,克隆所用细胞数量较少,这样阳性细胞被扩大培养的几率也会减少,就会增加阳性株丢

失的可能。假如阳性细胞很少,就可能将尽量多的阳性细胞克隆化。所以最佳的克隆时期是当杂交瘤细胞株面积为孔的1/10。并且尽量选择单细胞集落进行下一步的亚克隆,这样可以通过尽少的克隆次数筛选出单抗。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] Levine, P P. Fabricant J. A hitherto-underscribed virus disease of duck in North America[J].Cornell Vet.,1950,40(1):71-86.
- [2] Asplin F D, Mclauchlan J D. Examination of sera from wild fowl for antibodies against duck hepatitis virus[J].Vet.Rec.1954.66: 456-458.
- [3] 唐桂运,武华主,冀锡霖.禽病原分离鉴定实验室手册(三版)[M],北京:北京农业大学出版社,1993:190-194.
- [4] 古飞霞,蒋德敏,刘容珍,等.一例疑似新型鸭病毒病的疫情[J].养禽与禽病防治,2007,09(3):26-28
- [5] 王平,潘文石,胡寿文,等.北京小鸭病毒性肝炎的研究(一)诊断和防治[J].北京大学学报,1980,1:55-74.
- [6] Davis D, Wool P R. Passage of duck hepatitis virus in cell cultures derived from avian embryos of different species[J].Res Vet Sci 1986,41:133-134.
- [7] 汪铭书,程安春,陈孝跃,等.鸭病毒性肝炎的研究-弱毒在雏鸭和成年鸭体内的分布和排泄[J].中国畜禽传染病,1997(4):11-15.
- [8] 刘美玲.鸭病毒性肝炎的流行病学特征及防制[J].中国畜牧兽医.2008,35(7):56-58.
- [9] 赵新柳,李观娣,钟变清,等.ELISA检测鸭病毒性肝炎抗体的研究[J].中国兽医科技,1990,20(11):5-7.
- [10] 吴题,郭玉璞.ELISA法检测鸭病毒性肝炎抗体[J].中国兽医杂志,1994,20(5):5-7.
- [11] 陈光.单克隆抗体技术历史与发展简述[J].生物学通报,2003,38(9):36-39.
- [12] 孙泉云,刘红,刘劲松,等.单克隆抗体捕捉法检测抗体的研究[J].中国畜禽传染病,1997(2):7-10.
- [13] 赵新柳,李观娣,钟安清,等.检测鸭病毒性肝炎抗体的研究[J].中国兽医科技,1990,11:5-6.
- [14] 韩永俊.鸭肝炎病毒的分离鉴定及ELISA检测抗原抗体方法的建立[D].湖北:华中农业大学,2007:13-15.
- [15] 蒋学军,夏邦才,林松女,等.雏鸭病毒性肝炎综合防治[J].中国畜牧兽医,2007,34(5):116.
- [16] 陈溥言.应用酶联免疫吸附试验检测雏鸭肝炎病毒抗原[J].畜牧与兽医,1989,21(5):200-201.
- [17] 范伟兴,陈溥言,蔡宝祥,等.检测雏鸭肝炎病毒的单克隆抗体-抗原斑点试验的建立[J].南京农业大学学报,1991,14(3):97-101.