

# 禽脑脊髓炎病毒单克隆抗体的制备与初步应用

徐建生,唐波,成大荣,董国雄,吕玲,曹军

(扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009)

**摘要:** 利用提纯的禽脑脊髓炎病毒(AEV) Van Roekel 株作为免疫原,免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠,采取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,用间接 ELISA 法筛选,间接免疫荧光法(IFA)和免疫组织化学法鉴定,经 3 次亚克隆得到了稳定分泌抗 AEV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 F<sub>11</sub> 和 G<sub>2</sub>,制备了腹水,并利用该单克隆抗体初步建立了 Dot-ELISA、间接 ELISA 和 IFA 等特异性检测 AEV 抗原的方法。

**关键词:** 禽脑脊髓炎病毒;单克隆抗体;斑点-酶联免疫吸附法

## Preparation and preliminary application of monoclonal antibody to avian encephalomyelitis virus

XU Jian-sheng, TANG Bo, CHENG Da-rong, DONG Guo-xiong, LÜ Ling, CAO Jun

(College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** 6-week old BALB/c mice were immunized with purified avian encephalomyelitis viruses at two weeks interval. Mice were killed and their spleen cells fused into SP2/0 myeloma cells on day 3 after third immunization. Indirect-ELISA, indirect immunofluorescent assay and immunohistochemistry were employed to select and characterize the fused cells secreting antibody to AEV. As a result, two hybridoma cell lines steadily secreting antibody to AEV, named F<sub>11</sub> and G<sub>2</sub>, were obtained after subcloning for three times. Ascites were prepared with the hybridoma and indirect fluorescent assay, indirect ELISA and Dot-ELISA were developed with the monoclonal antibody for the detection of AEV.

**Key words:** avian encephalomyelitis virus; monoclonal antibody; Dot-ELISA

禽脑脊髓炎(avian encephalomyelitis, AE)是由禽脑脊髓炎病毒(AEV)引起的以侵害雏禽中枢神经系统为主要特征的传染病,鸡、火鸡、野鸡、鹌鹑均可感染本病,其临床特征为病禽共济失调、震颤和非化脓性脑脊髓炎<sup>[1,2]</sup>。该病于 1930 年首先发现于美国罗德岛(Rhode island),后传至美国新英格兰地区,故又被称为新英格兰病;1932 年又根据发病雏鸡特征性头颈震颤,称为禽流行性震颤。1938 年 Van Rockel 等将其定名为禽脑脊髓炎。

AE 现已遍及世界大多数国家,我国 1980 年以来先后在广东、江苏、辽宁、黑龙江、河北、内蒙古、福建、上海等省市区发生<sup>[3,4]</sup>。在 AE 的诊断中病原分离是较可靠的诊断方法之一,但比较费时、费力。目前多采用免疫学方法,如免疫荧光(FA)和酶联免疫

吸附法(ELISA)直接检测抗原<sup>[5]</sup>。在应用这些方法时,为了避免非特异性反应,需使用提纯或吸附的抗血清。单克隆抗体技术特异性强,被认为是鉴定病毒因子的可靠方法,已用于多种病毒感染的诊断<sup>[6,7]</sup>。笔者利用纯化的 AEV 作为免疫原制备了单克隆抗体,并初步建立了单克隆抗体介导的检测 AEV 的方法,为进一步建立快速、灵敏地检测和诊断 AE 的方法打下了基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 毒株、细胞、种蛋和试验动物

AEV Van Roekel 株、鸡 AEV 阳性血清由农业部动物检疫所杜元钊研究员提供;其他 AEV 毒株: A TCC-29E-E<sub>4</sub>、青苗 AE-E<sub>3</sub>、A E<sub>28</sub>-E<sub>3</sub>(青岛)由笔者

收稿日期: 2005-08-29; 修回日期: 2005-12-05

作者简介: 徐建生(1963-),男,江苏泰兴人,副教授,博士, E-mail: jsyzxjs@yahoo.com.cn

所在教研室传代保存;对照病毒 NDV (LaSota)、IBDV、EDSV 和 IBV 以及 SP2/0 骨髓瘤细胞由扬州大学兽医学院预防兽医学教研室保存;SPF 种蛋购自山东家禽研究所;清洁级 BALB/c 小鼠由扬州大学比较医学中心提供。

## 1.2 主要试剂

DMEM 基础培养基购自 Sigma 公司;次黄嘌呤(H)、胸腺嘧啶(T)、氨基喋呤(A)为 Gibco 公司产品;犊牛血清购自郑州伯安生物公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体、荧光标记的羊抗鼠 IgG 抗体、荧光标记的羊抗鸡 IgG 抗体、PEG-2000 购自 Sigma 公司;二氨基联苯二胺(DAB)、低分子量蛋白质标准购自华美生物工程公司。

## 1.3 单克隆抗体的制备

### 1.3.1 小鼠免疫

免疫原为纯化的 AEV,由笔者所在教研室利用氯化铯密度梯度离心进行纯化。将纯化的 AEV 测定蛋白浓度(0.9 mg/mL)后,按  $V(\text{AEV}) : V(\text{佐剂}) = 1 : 1$  加入弗氏完全佐剂混合,乳化后皮下免疫 BALB/c 小鼠,0.3 mL/只;2 周后,改用弗氏不完全佐剂乳化病毒,以同样方法进行二次免疫;二次免疫后 2 周,腹腔注射纯化病毒 0.3 mL 加强免疫。

### 1.3.2 杂交瘤细胞的融合

按文献[8]所述方法进行。将加强免疫后 3 d 的小鼠脱颈处死,无菌取其脾细胞,与对数生长期的 SP2/0 骨髓瘤细胞用 PEG-2000 融合。融合后的细胞悬浮于 HAT 培养基,分装于 96 孔板,置 37℃,60 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,3~5 d 更换新鲜的 HAT 培养基;8~10 d 后改用 HT 培养基,定时观察,适时换液和检测。

### 1.3.3 杂交瘤细胞的检测与腹水制备

用纯化的 AEV 包被 ELISA 板,以常规间接 ELISA 检测杂交瘤细胞培养上清液,同时设正常 18 日龄 SPF 鸡胚脑悬液为阴性抗原对照。将初步筛选确定为阳性的杂交瘤细胞按有限稀释法进行亚克隆,对稳定分泌抗体的细胞经 3 次亚克隆后取形态良好、生长旺盛的单克隆细胞命名后扩大培养,一部分放于液氮中冻存,一部分用于制备单克隆抗体腹水。其方法为:每只 BALB/c 小鼠注射 0.5 mL 降植烷与弗氏不完全佐剂的等体积混合物,7 d 后腹腔注射杂交瘤细胞,接种细胞量为  $5 \times 10^5$ ,约经过 1 周,待小鼠腹部膨大后抽取腹水,以 5 000 r/min 离心 2 min,取上清液,-20℃ 保存备用。

## 1.4 单克隆抗体的鉴定

### 1.4.1 间接免疫荧光法(IFA)

按文献[9,10]制备 CEB 细胞。取 9~14 日龄 SPF 鸡胚,无菌取出

脑组织,用无菌 PBS(0.01 mol/L, pH 7.3)洗 3 次,加预冷的 1.25 g/L 胰酶悬浮,用量为每胚 10 mL,吸管吹打分散,4℃ 作用 4 h,然后剧烈摇振 15 s,用 8 层无菌纱布过滤后,以 1 000 r/min 离心 10 min,测定离心沉淀细胞的体积。用含 200 mL/L 犊牛血清的 DMEM 培养基按 1 : 100 稀释 CEB 细胞。加于细胞培养瓶和 12 孔细胞培养板中,8 mL/瓶(2 mL/孔),37℃,60 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养 5~7 d,待细胞长至单层后,接种 AEV,换用含 100 mL/L 犊牛血清的 DMEM 维持生长 4 d 后,将细胞培养板中的培养物用预冷的  $V(\text{丙酮}) : V(\text{乙醇}) = 3 : 2$  的固定液固定 15 min,用含 100 g/L 牛血清蛋白的 PBST 室温封闭 60 min,1 : 80 稀释单克隆抗体腹水,37℃ 湿盒作用 45 min,PBS 洗 3 次,5 min/次,加 1 : 200 稀释的绿色荧光标记的羊抗鼠抗体,37℃ 湿盒作用 45 min,PBS 洗 3 次,5 min/次,置荧光显微镜观察。同时设未接种病毒的 CEB 细胞为阴性对照。

### 1.4.2 免疫组织化学法

用纯化的 AEV 经脑内接种 1 日龄雏鸡。待感染鸡发病后取其脑组织、胰和小肠,经 100 mL/L 甲醛固定后,制备石蜡切片(厚度为 3 μm)备用。免疫组化具体步骤参考文献[11]。切片经水化、胰酶消化、正常非免疫血清封闭后,以单克隆抗体腹水 1 : 80 稀释液作为一抗加于切片上,37℃ 湿盒中作用 45 min;洗涤后加 1 : 200 稀释的过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,37℃ 湿盒中作用 45 min;洗涤后以 DAB 显色,苏木素染色作为对比染色,封片后镜检。以正常的 10 日龄 SPF 雏鸡脑、胰、小肠组织切片为阴性对照。

### 1.4.3 单克隆抗体的特异性试验

分别用接种 NDV(LaSota)、IBDV、EDSV、IBV 的鸡胚尿囊液包被 ELISA 板,将本研究制备的单克隆抗体腹水用 PBS 以 1 : 1 000 稀释,通过间接 ELISA 反应鉴定单克隆抗体的特异性,并以正常 SPF 鸡胚尿囊液和鸡胚脑悬液分别包被 ELISA 板作为阴性抗原对照,以纯化的 AEV 和接种 AEV 的鸡胚脑悬液(1 : 5 稀释)上清液分别为阳性抗原对照,以抗其他病原的单克隆抗体腹水为阴性抗体对照。

### 1.4.4 腹水的 ELISA 效价测定

用纯化的 AEV 包被 ELISA 板,将单克隆抗体腹水以 PBS 倍比稀释,进行间接 ELISA 反应。

## 1.5 单克隆抗体的初步应用

### 1.5.1 单克隆抗体介导的 Dot-ELISA

取适当大小的硝酸纤维素膜,压痕标记后用蒸馏水浸泡,之后从蒸馏水中取出,晾干后将经传代复壮的 AEV 毒株(VR 株、ATCC-29E、青苗 AE、AE<sub>28</sub>)以及 1 日龄

雏鸡脑内接种 AEV 发病后采取的脑组织悬液 (1:5) 上清液氯仿抽提处理后,滴加于硝酸纤维素膜上,每点 5  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 温箱烘干;用含 10 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 溶液 37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h,PBS 洗 3 次,5 min/次;然后将其浸入 1:1000 稀释的单克隆抗体腹水,37  $^{\circ}$ C 作用 60 min,漂洗后浸入 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,37  $^{\circ}$ C 作用 60 min,PBS 洗 3 次,5 min/次;以 DAB 显色,蒸馏水终止反应。以正常 18 日龄 SPF 鸡胚脑组织为阴性对照,以纯化的 AEV 为阳性对照。

1.5.2 单克隆抗体介导的间接 ELISA 将经传代复壮的 AEV 毒株 (VR 株、ATCC-29E、青苗 AE、AE<sub>28</sub>) 的鸡脑以及 1 日龄雏鸡脑内接种 AEV 发病后采取的脑组织分别研磨后,用 PBS 按 1 g/5 mL 稀释,离心取上清液,氯仿抽提后包被 ELISA 板,以

1:1000 稀释的单克隆抗体腹水作一抗,过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体为二抗,OPD 显色。设纯化的 AEV 为阳性抗原对照,以抗其他病原的单克隆抗体腹水为阴性抗体对照。

## 2 结果

### 2.1 杂交瘤细胞的检测与细胞株的建立

经常规 ELISA 检测,得到 2 株阳性反应的细胞株,命名为 F<sub>11</sub> 和 G<sub>6</sub>。经 3 次亚克隆后全部杂交瘤细胞保持分泌抗 AEV 抗体的能力。

### 2.2 单克隆抗体的鉴定

2.2.1 IFA 接种 AEV 的 CEB 以 AEV 单克隆抗体腹水为一抗,经免疫荧光染色后可见光亮的绿色荧光 (见图 1-1),而未接种 AEV 的 CEB 经免疫荧光染色后未见特异性的绿色荧光 (见图 1-2)。

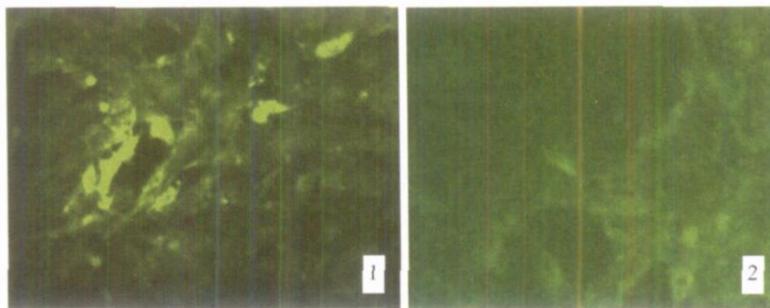


图 1 单克隆抗体的 IFA 检测结果

Fig.1 Detecting results of the monoclonal antibody by IFA

2.2.2 单克隆抗体的特异性试验 单克隆抗体腹水与 NDV、IBV、IBDV、EDSV、正常脑组织以及正常 SPF 尿囊液反应,均为阴性;单克隆抗体腹水与纯化的 AEV 以及接种 AEV 的鸡胚脑组织悬液上清反应,均为阳性。

2.2.3 免疫组织化学法 发病雏鸡的脑、胰、小肠组织石蜡切片经免疫组化染色后呈现特异性的黄褐色;正常的 10 日龄 SPF 雏鸡脑、胰、小肠组织切片经免疫组织化学染色后未见特异性染色。

2.2.4 腹水的 ELISA 效价测定 用间接 ELISA 检测本研究制备的单克隆抗体腹水效价为 171b。

### 2.3 单克隆抗体的初步应用

2.3.1 单克隆抗体介导的 Dot-ELISA 在硝酸纤维素膜上,包被接种 AEV VR 株、ATCC-29E、青苗 AE 株的鸡胚脑悬液抽提物的点出现特异性黄褐色染色,包被接种 AE<sub>28</sub> 株的鸡胚脑悬液抽提物的点未出现特异性黄褐色染色,正常 18 日龄 SPF 鸡胚脑组织的点未出现特异性染色,作为阳性对照的纯化

AEV 的点出现特异性染色。

2.3.2 单克隆抗体介导的间接 ELISA 包被接种 AEV VR 株、ATCC-29E、青苗 AE 株的鸡胚脑悬液抽提物的孔反应为阳性,包被接种 AE<sub>28</sub> 株的鸡胚脑悬液抽提物的孔反应为阴性,包被正常 18 日龄 SPF 鸡胚脑组织的孔反应为阴性,作为阳性对照的纯化 AEV 的孔反应为阳性。

## 3 讨论

单克隆抗体特异性强,被认为是鉴定病毒的可靠方法,已用于多种病毒感染的诊断。国外已有报道利用 AEV 单克隆抗体 VR9-1 株建立检测 AEV 抗原的方法<sup>[6]</sup>。本研究利用 AEV VR 株作为免疫原制备单克隆抗体,经过筛选获得了 2 株稳定分泌抗 AEV 抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 F<sub>11</sub> 和 G<sub>6</sub>,按有限稀释法亚克隆 3 次后,100% 细胞稳定分泌 AEV 抗体,证明获得了纯化的单克隆细胞株。

在杂交瘤细胞株的筛选过程中,始终应用正常

的 SPF 鸡胚胎悬液作为对照抗原,以排除在病毒纯化过程中可能污染的非病毒成分的干扰;在筛选方法上,应用了不同的选择系统,以间接 ELISA 为主,用 Dot-ELISA 和免疫组织化学染色法确认,从而确保了单克隆抗体的反应特异性。

利用获得的杂交瘤细胞制备了单克隆抗体腹水,并初步建立了 Dot-ELISA、间接 ELISA 和 IFA 等特异性检测 AEV 抗原的方法。从检测方法的初步应用结果看, Dot-ELISA 和间接 ELISA 操作简单,结果容易判断,且比较准确;IFA 灵敏度较高,但对仪器要求较高,需要荧光显微镜。因此, Dot-ELISA 和间接 ELISA 的应用前景较好。在本试验中应用 Dot-ELISA 和间接 ELISA 检测笔者所在教研室保存的 AEV 不同毒株的试验中, AE<sub>28</sub> 株用两种检测方法检测的结果均为阴性,这可能与病毒的含量较少有关。此外,还须探索 Dot-ELISA 和间接 ELISA 这两种方法的最佳检测条件,以便最终建立简便易行的检测 AEV 的方法。

在用超免疫血清进行免疫学研究时,通常需要用正常的鸡组织吸附鸡血清以排除非特异性反应。本研究所制备的单克隆抗体腹水无需进行这一过程,即对 AEV 产生特异性反应,且不与 NDV、IBDV、IBV 和 EDSV 等鸡的常见病毒发生交叉反应。

## 参考文献(References)

- [1] Calnek B W, Luginbuhl R E, Helmboldt C F. *Diseases of Poultry* [M]. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. 571-581.
- [2] Tannock G A, Shafren D R. Avian encephalomyelitis: A review[J]. *Avian Pathol*, 1994, 23: 603-620.
- [3] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 93-94. Gan M H. *Avian Diseases of China* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1998. 93-94. (in Chinese)
- [4] 黄俊明. 禽脑脊髓炎[J]. 中国畜禽传染病, 1994, (4): 57-60. Huang J M. Avian encephalomyelitis[J]. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*, 1994, (4): 56-60. (in Chinese)
- [5] Shafren D R, Tannock G A. An enzyme linked immunosorbent assay for the detection of avian encephalomyelitis virus antigens[J]. *Avian Dis*, 1988, 32: 209-214.
- [6] Ohishi K. Detection of avian encephalomyelitis viral antigen with a monoclonal antibody[J]. *Avian Pathology*, 1994, 23 (1): 49-59.
- [7] 胡顺林, 吴艳涛, 刘文博, 等. 鹅源新城疫病毒单克隆抗体的研制及其与不同 NDV 毒株的反应性[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(5): 341-345. Hu S L, Wu Y T, Liu W B, et al. Development of monoclonal antibodies against NDV isolated from goose and their reactions with NDV isolates[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2005, 35(5): 341-345. (in Chinese)
- [8] 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. Liu X F. *Application of Monoclonal Antibodies to Agriculture* [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 1994. (in Chinese)
- [9] Shafren D R, Tannock G A. Pathogenesis of avian encephalomyelitis viruses[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2713-2719.
- [10] 曹澍泽, 郭玉璞, 董国雄, 等. 兽医微生物及免疫学技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991. Cao S Z, Guo Y P, Dong G X, et al. *Technology of Veterinary Microbiology and Immunology* [M]. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1991. (in Chinese)
- [11] 许益民. 免疫过氧化物酶染色方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 47-49. Xu Y M. *Immunoperoxidase Staining Methods* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001. 47-49. (in Chinese)