

## 鸭肝炎病毒现场分离株单克隆抗体的研制

周珍辉<sup>1</sup>, 陈万荣<sup>2</sup>, 周育森<sup>2</sup>, 向双云<sup>1</sup>, 曹金元<sup>1</sup>, 李玉冰<sup>1</sup>, 杨久仙<sup>1</sup>, 曹授俊<sup>1</sup>, 田璐<sup>1</sup>, 张浩<sup>1</sup>

(1.北京农业职业学院 畜牧兽医系, 北京 102442; 2.中国军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**摘要:** 为有效防治鸭肝炎, 建立特异性强、敏感性高、简便快速的 DHV 检测方法, 对分离的 DHV 进行纯化, 并制备单克隆抗体。鸭胚尿囊液中的 DHV 经冻融、氯仿反复处理、PEG 浓缩和超速离心纯化后, 免疫 BALB/c 小鼠, 用杂交瘤技术, 通过间接 ELISA 法筛选及多次亚克隆, 成功获得 8 株阳性杂交瘤细胞, 分别命名为 DHV-1、DHV-6、DHV-7、DHV-8、DHV-9、DHV-10、DHV-11 和 DHV-12, 并制备出腹水。8 株单抗腹水经 ELISA 法检测, DHV-7、DHV-8 的效价为 1:2 000; DHV-6、DHV-10 的效价为 1:8 000; DHV-1、DHV-9、DHV-11 和 DHV-12 的效价为(1:32 000)~(1:512 000)。抗体亚类鉴定, DHV-6、DHV-7、DHV-8、DHV-10 为 IgG1; DHV-1、DHV-12 为 IgG2a; DHV-2、DHV-9、DHV-11 为 IgG2b。上述抗体均为  $\kappa$  链。特异性鉴定表明, 上述单克隆抗体只能与从尿囊液中纯化的 DHV 病毒包板反应, 与非 DHV 抗原无反应。鸭胚中和试验及雏鸭保护试验结果表明, DHV-6、DHV-7、DHV-9、DHV-10 具有较好的中和活性, 并对雏鸭有不同程度的保护作用。

**关键词:** 鸭肝炎病毒; 单克隆抗体; 间接 ELISA 法; 中和试验

中图分类号: S858.32; S855.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0078-04

## Preparation and identification of monoclonal antibodies against locale isolated strain of duck hepatitis virus

ZHOU Zhen-hui<sup>1</sup>, CHEN Wan-rong<sup>2</sup>, ZHOU Yu-sen<sup>2</sup>, XIANG Shuang-yun<sup>1</sup>, CAO Jin-yuan<sup>1</sup>,  
LI Yu-bing<sup>1</sup>, YANG Jiu-xian<sup>1</sup>, CAO Shou-jun<sup>1</sup>, TIAN Lu<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>

(1.Department of Animal Husbandry & Veterinary, Beijing Agricultural Vocational College, Beijing 102442, China;

2. Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing Military Physic Academy, Beijing 100071, China)

**Abstract:** The BALB/c mice were immunized with DHV of allantoid liquid in duck embryo which were purified by freezing and melting repeatedly, dealt with by chloroform, concentrated by PEG and overspeed membrane filtrating. Eight hybridoma cell lines were obtained after detecting and 3 sub-cloning by I-ELISA. They were named DHV-1, DHV-6, DHV-7, DHV-8, DHV-9, DHV-10, DHV-11 and DHV-12 respectively. The ascites titres of these MAbs were between 1:2 000 and 1:512 000. The ascites had no cross reaction with other antigen and the normal allantoid liquid in duck embryo. MAbs belonged to IgG with  $\kappa$ -chain. neutralization test and young duck protection test indicated that neutralization characters of DHV-6, DHV-7, DHV-9, DHV-10 are stronger.

**Key words:** duck hepatitis virus; monoclonal antibody; indirect-ELISA; neutralization test

I 型鸭病毒性肝炎 (serotype I duck viral hepatitis, DHV I) 由 I 型鸭肝炎病毒引起, 以发病急、传播快、病程短、死亡率高为主要特征, 临床表现为痉挛、抽搐和角弓反张等神经症状, 主要病

变为肝脏出血、坏死和肿胀, 是危害养鸭业最严重的疾病之一<sup>[1-4]</sup>。笔者对分离的 DHV 进行纯化, 并制备单克隆抗体, 旨在建立特异性强、敏感性高、简便快速的 DHV 检测方法。

收稿日期: 2010-06-02

基金项目: 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM200700005002)

作者简介: 周珍辉(1969—), 女, 湖南汨罗人, 硕士, 副教授, 主要从事兽医病理研究

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

毒株由北京某鸭场分离,经动物试验、鸭胚尿囊腔接种、PCR诊断,确诊为I型鸭肝炎病毒<sup>[5-6]</sup>。试验动物BALB/c小鼠由中国军事医学科学院试验动物中心提供,SP2/0骨髓瘤细胞由中国军事医学科学院分子病原研究室提供;抗体亚类试剂盒购自Gibco公司;10日龄鸭胚及1日龄雏鸭购自北京三江宏利牧业有限公司。

### 1.2 抗原制备及鉴定

#### 1.2.1 DHV 抗原的纯化

将临床发病鸭的肝脏制成悬液,通过尿囊腔接种10日龄鸭胚,收集接种后4~5 d死亡的鸭胚尿囊液,反复冻融后,4℃ 6 000 r/min离心,去沉淀,取上清,加等量氯仿,振摇20 min,4℃ 6 000 r/min离心,去沉淀,取上清,重复上述过程6次,收集上清液。在收集的上清液中加入10% PEG6000及终浓度为0.4 mol/mL的NaCl,4℃磁力搅拌过夜后,4℃ 12 000 r/min离心,去上清,沉淀加少量pH7.4、0.01 mol/mL PBS重悬,再经蔗糖密度梯度超速离心纯化<sup>[7]</sup>。设30%和60% 2个蔗糖梯度,于10 mL离心管中,每一梯度溶液加4 mL,最后在溶液面上加粗提抗原2 mL,经35 000 r/min离心4 h,分别收集各明显的梯度带。纯化抗原作适当稀释,磷钨酸负染,透射电镜观察病毒粒子的形态及纯度。纯化病毒作免疫原免疫动物用和包被抗原检测抗体用。纯化抗原的蛋白质量浓度为0.77 mg/mL, - 80℃冰柜冻存备用。

#### 1.2.2 正常尿囊液抗原的制备

在制备DHV尿囊液的同时,取正常14至15日龄鸭胚尿囊液,同步纯化蛋白。除不进行超速离心外,其余按1.2.1的方法进行,检测蛋白质量浓度为1.94 mg/mL,作包被抗原间接ELISA法筛选抗体时排除非特异用, - 80℃冰柜冻存,作为阴性抗原对照。

#### 1.2.3 纯化抗原的病原性鉴定

将提纯抗原经0.22 μm滤膜处理,接种10日龄鸭胚5枚,对照组鸭胚注射生理盐水,每天照蛋2次,逐日统计鸭胚死亡情况;采取颈背部皮下注射的方

式,注射1日龄雏鸭5只,对照组雏鸭注射生理盐水,观察雏鸭发病死亡情况。

### 1.3 免疫 BALB/c 小鼠

第1次免疫时取纯化抗原与福氏完全佐剂等量混合,充分乳化后,按每只100 μg(每只0.5 mL)的抗原量,采取腹部皮下两点注射的方式,注射8周龄BALB/c 雌性小鼠3只,另取1只小鼠注射生理盐水为对照;2周后取纯化抗原与福氏不完全佐剂乳化后进行第2次免疫,方法与第1次免疫相同;4周后进行第3次免疫,方法与第1次免疫相同;6周后从免疫小鼠和对照小鼠的尾尖采血,分离血清,将纯化的DHV抗原分别以2、5、10 μg/mL包被96孔板,同时用纯化的正常尿囊液蛋白按上述浓度分别包板,用间接ELISA法检测血清中的抗体含量。当免疫小鼠抗体含量较高时,融合前加强一次免疫,直接用纯化抗原经腹部皮下分两点注射免疫小鼠,第4天后取抗体含量最高的小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合,筛选抗体。

### 1.4 杂交瘤细胞株的融合和筛选

参考文献[8-9],取抗体含量最高免疫小鼠的脾细胞和处于对数生长期的SP2/0细胞,按(1:5)~(1:10)的比例进行融合,融合后分装5块96孔板,置37℃ 5%CO<sub>2</sub>培养箱中,用筛选培养基进行培养,1周后改用HT培养基进行培养,每日观察细胞生长状况,7~9 d用间接ELISA法进行检测筛选。用纯化抗原与纯化正常尿囊液蛋白分别包被96孔板,蛋白浓度为10 μg/mL,每孔100 μL,4℃过夜,次日用PBS-Tween-20洗涤3次,每孔加入100 μL初筛抗体,37℃作用1 h,用同样的方法洗板3次,加入酶标记的羊抗鼠IgG,37℃作用30 min,洗涤3次,加入显色剂显色后,再加终止液终止,用酶标仪测定OD值。选择经纯化抗原检测后OD值较高且与正常纯化尿囊液蛋白无反应的阳性孔进行亚克隆。用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞连续进行3次亚克隆后,上清检测阳性率达100%的单克隆孔进行扩大培养,冻存细胞株,制备腹水。

### 1.5 腹水的制备、效价检测及特异性鉴定

1) 腹水的制备。参考文献[8],给每只BALB/c小鼠腹腔注射灭菌液体石蜡油0.5 mL,2周后再注

射杂交瘤细胞,每株单抗注射4只小鼠,每只0.5 mL,每1 mL含 $1 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞。2周左右有腹水产生,抽取腹水,56℃灭活冻存,备用。

2) 腹水效价的测定。将纯化抗原与纯化正常尿囊液蛋白包板后,用间接ELISA法检测腹水中的抗体效价。包被用抗原量为10  $\mu\text{g/mL}$ ,每孔100  $\mu\text{L}$ 。

3) 腹水的特异性鉴定。将腹水1:100稀释,分别用纯化DHV抗原、正常纯化尿囊液蛋白和乙型肝炎表面抗原(HBS)包板,用间接ELISA法检测。

### 1.6 单克隆抗体亚类鉴定

用单克隆抗体亚类鉴定试剂盒测定8株单抗的类型。按说明书,用ELISA法进行检测。

### 1.7 鸭胚中和试验

采用固定病毒-稀释抗体法<sup>[10]</sup>进行 $EID_{50}$ 的测定:取经尿囊腔繁殖的病毒液用PBS进行 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 稀释,每个稀释度尿囊腔接种5枚10日龄鸭胚,7 d内逐日观察鸭胚的死亡情况,计算出200个 $TCID_{50}$ 的含量。将7株单抗原产生的腹水用滤膜过滤后,用PBS作1:2、1:4、1:8、1:16、1:32稀释,用含200个 $TCID_{50}$ 的DHV病毒液分别与7株单抗原液不同稀释度的腹水等量混合,37℃作用2 h后,各稀释度尿囊腔接种10日龄鸭胚5枚,0.2 mL/枚,另设5枚接种病毒,作为对照。逐日观察9 d,记录鸭胚死亡情况。

### 1.8 雏鸭保护试验

1日龄雏鸭分为8组,每组8只,前7组分别颈背部皮下接种DHV-1、DHV-6、DHV-7、DHV-8、DHV-9、DHV-10、DHV-11、DHV-12腹水0.5 mL,24 h后接种含毒尿囊液0.2 mL,第8组只接种含毒尿囊液0.2 mL,作为对照。各组鸭分开饲养,连续观察7 d,记录各组鸭的死亡情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗原的纯化及鉴定结果

病毒经冻融氯仿反复处理及离心后,去除了大量的杂蛋白,经PEG-6000浓缩后,病毒蛋白含量大大提高。浓缩抗原经蔗糖密度梯度离心,共出现了2个明显条带。约位于30%蔗糖梯度间的条带为病毒带。在电镜下可见直径20~40 nm的病毒粒子,呈

球形或类球形,颗粒结构清晰,大小、结构均符合I型DHV特征(图1)。将纯化抗原接种鸭胚后可导致鸭胚全部死亡,胚体出血明显。攻毒1日龄雏鸭2~3 d后死亡,肝脏上有针尖到米粒大小的出血斑点。

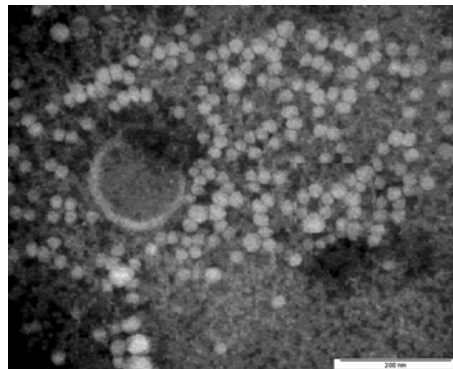


图1 鸭肝炎电镜照片

Fig.1 Electricity lens picture of DHV

DHV病毒的纯化方法较多,在前期工作中用硫酸铵沉淀病毒后,发现杂蛋白多,病毒的形态被破坏,结构模糊<sup>[11-12]</sup>。通过反复冻融,氯仿去脂,PEG沉淀,蔗糖密度梯度离心后,得到了较纯的DHV,电镜下可见大量DHV颗粒,通过鸭胚尿囊腔接种,感染鸭胚全部死亡,说明经过上述纯化后,抗原保持了良好的活性。

### 2.2 小鼠免疫结果

小鼠三免后采血,纯化抗原包板后,检测出3只免疫小鼠血清抗体的效价为(1:400)~(1:16 000),正常小鼠的效价 $< (1:100)$ 。正常纯化尿囊液蛋白包板后,用间接ELISA法检测出3只免疫小鼠及正常小鼠血清抗体的效价均 $< 1:100$ 。由此,可以排除分泌针对正常尿囊液抗体的杂交瘤细胞株。10  $\mu\text{g/mL}$ 抗原用量包板后所测得的OD值优于2.5  $\mu\text{g/mL}$ 的抗原用量,故在进行单克隆抗体的筛选中,将包板的最佳抗原用量定为10  $\mu\text{g/mL}$ 。

免疫小鼠血清抗体含量检测结果显示,用纯化抗原包板检测的OD值显著高于用正常纯化尿囊液蛋白包板所测得的OD值。由此可知,免疫小鼠血清中的抗体主要由注射DHV抗原所致,小鼠免疫效果好,免疫用的DHV抗原纯度较高。

### 2.3 杂交瘤细胞株的融合和筛选结果

细胞融合经过初次检测,3次亚克隆后,共筛选出阳性杂交瘤细胞8株,分别命名为DHV-1、

DHV-6、DHV-7、DHV-8、DHV-9、DHV-10、DHV-11、DHV-12。在亚克隆过程中,有DHV-2、DHV-3、DHV-4、DHV-5共4株杂交瘤细胞分泌抗体特性丢失。DHV-1、DHV-6、DHV-7、DHV-8、DHV-9、DHV-10、DHV-11、DHV-12经过多次传代、冻存复苏后,保持了稳定分泌抗体的功能。在初次筛选时,选用 $OD$ 值0.5以上的阳性孔进行亚克隆,这样可以更多地筛选出阳性的杂交瘤细胞株而不致于丢失。正常纯化的尿囊液以 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 包板筛选单克隆抗体时, $OD$ 值均为 $0.01\sim 0.10$ ,因此,筛选阳性孔时基本排除了非特异性反应。

#### 2.4 腹水的效价及特异性鉴定结果

正常纯化尿囊液蛋白包板后,用间接ELISA法检测8株单抗腹水中的抗体效价均 $<(1\text{ }100)$ 。将纯化抗原包板后,用间接ELISA法检测8株单抗腹水中的抗体效价,DHV-7、DHV-8为 $1\text{ }1000$ ,DHV-6、DHV-10为 $1\text{ }8000$ ,DHV-1、DHV-9、DHV-11和DHV-12为 $(1\text{ }32000)\sim(1\text{ }512000)$ 。由此可知,腹水中的抗体主要是针对DHV抗原产生的。经间接ELISA法鉴定,所制备的单克隆抗体与乙型肝炎表面抗原、正常纯化尿囊液蛋白无交叉反应,表明所制备的杂交瘤细胞具有良好的特异性。

#### 2.5 单克隆抗体亚类鉴定结果

经MAb亚类鉴定,所获得的杂交瘤细胞株DHV-6、DHV-7、DHV-8、DHV-10为IgG1亚类,DHV-1、DHV-12为IgG2a亚类,DHV-2、DHV-9、DHV-11为IgG2b亚类,轻链均为 $k$ 链。

#### 2.6 鸭胚中和试验结果

接种病毒的鸭胚在接种后 $3\sim 4\text{ d}$ 全部死亡。DHV-6、DHV-7、DHV-9、DHV-10能原倍中和病毒,2倍稀释后中和保护率为 $50\%$ ,各稀释度均能明显延缓鸭胚的死亡。DHV-1、DHV-8、DHV-11、DHV-12原倍中和的保护率为 $50\%$ ,各稀释度均能明显延缓鸭胚的死亡。

#### 2.7 雏鸭保护试验结果

保护试验结果显示,DHV-6、DHV-7、DHV-9、DHV-10单抗对雏鸭的保护率为 $50.0\%\sim 62.6\%$ 。DHV-1、DHV-8、DHV-11、DHV-12 4株单抗对雏鸭的保护率差,在 $25\%$ 以下。

### 3 结论与讨论

正常鸭胚尿囊液中的混杂物很多,需对尿囊液中的病毒进行纯化。本研究中,在抗原纯化、小鼠免疫、杂交瘤细胞株的融合筛选、腹水效价检测试验中,均以正常尿囊液作对照,免疫用的DHV抗原纯度较高,排除了非特异性反应。在试验过程中,为防止细胞的突变返祖,确保骨髓瘤细胞对HAT的敏感性,每 $3\sim 6$ 个月应用8-氮杂鸟嘌呤(8-AG)筛选1次。细胞融合后第1次克隆化的时间应尽可能早,越早越不容易丢失阳性克隆。要尽早检测,以确定细胞融合后的克隆是否分泌特异性抗体。一旦检测为阳性,则不论其细胞克隆的大小,应立即进行克隆化,这是保证克隆化成功、获得稳定分泌McAb杂交瘤细胞系的非常重要的一环。即使克隆化过的杂交瘤细胞也需要定期再克隆,以防止杂交瘤细胞的突变或染色体丢失,从而丧失产生抗体的能力。

#### 参考文献:

- [1] 孙刚,张加勇,王宇祥,等. 黑龙江省鸭肝炎病毒HD-I的分离与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2007, 34(7): 63-65.
- [2] 张展. I型鸭病毒性肝炎的诊断与防治[J]. 兽医导刊, 2008, 126(2): 19-20.
- [3] 苏环. 雏鸭病毒性肝炎的诊治[J]. 浙江畜牧兽医, 2009(4): 14.
- [4] 谢运锋. 中药在防治雏鸭病毒性肝炎中的应用[J]. 广西畜牧兽医, 2009, 25(5): 276-277.
- [5] 周珍辉,李玉冰,杨新建,等. 雏鸭病毒性肝炎的分离与初步鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3): 75-76.
- [6] 周珍辉,陈万荣. 用RT-PCR诊断I型鸭肝炎病毒[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(3): 338-340.
- [7] 孙泉云,刘虹,李劲松,等. 间接ELISA检测鸭肝炎病毒抗体的研究[J]. 中国兽医学报, 1997, 17(5): 347-349.
- [8] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 55-68.
- [9] 金伯泉. 细胞和分子生物免疫学实验技术[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2003: 21-45.
- [10] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 11.
- [11] 杨萍萍,宋敏训,艾武,等. 鸭肝炎病毒单克隆抗体的研制[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(8): 212-216.
- [12] 罗函禄,徐汉祥,范文明,等. 鸭病毒性肝炎病毒的纯化及电镜观察[J]. 中国畜禽传染病, 1990, 52(3): 1-2.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠