西北农业学报 1999, 8(3): 1~4
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

文章编号: 1004-1389(1999)03-0001-04

# 分泌抗 BVDV McAb 杂交瘤细胞株的建立

王新华, 沈 敏, 周鹏飞, 钟发刚, 温建新
(新疆农垦科学院畜牧兽医所, 石河子 832000)

摘 要: 用牛病毒性腹泻病毒(BVDV)感染 MDBK 细胞, 将感染细胞培养物冻融后离心取上清经 PEG 沉淀浓缩抗原免疫 BALB/C 小鼠, 取血清抗体效价高的免疫鼠的脾细胞与 $SP_2/O$ 细胞在 PEG 作用下融合, 产生杂交瘤细胞, 用间接 ELISA 法检测杂交瘤细胞生长孔上清, 筛选阳性杂交瘤细胞株。以有限稀释法克隆 2~3 次, 得到 8 株分泌抗 BVDV 的单克隆抗体(McAb)杂交瘤细胞株。8 株 McAb 对 BVDV、猪瘟(CSFV)均呈阳性反应。杂交瘤细胞核内染色体数为 98~105 条。McAb 属性为: 6 株属 $IgG_1$, 2 株属 $IgG_{2a}$。经抗原结合位点分析, 8 株 McAb 可识别 3 个不同的抗原决定位点。将杂交瘤细胞注射 BALB/C 小鼠腹腔诱生腹水, 其抗体效价提高 3 200 倍以上, 有 3 株腹水单抗的 ELISA 效价在 1∶10 万以上, 最高 McAb 株达 1∶20 万。杂交瘤在液氮中保存 1~2 a 后复苏仍能稳定地分泌抗 BVD 病毒的 McAb。所有腹水 McAb 对 BVDV 的中和指数均大于 50($log10^{1.7}$), 最高达 50118($log10^{4.7}$)。McAb 作免疫扩散试验均无沉淀线。

关键词: 单克隆抗体(McAb); 牛病毒性腹泻病毒(BVDV)
中图分类号: S852.65 文献标识码: A

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和羊边界病毒(BDV)及猪瘟病毒(CSFV)同属于黄病毒科瘟疫病毒属(Pestivirus)[1]。黄骏明等(1986)用免疫荧光法检测 BVDV 与 CSFV 间抗原关系, 证明猪瘟石门系毒株与 BVD-Oregon $C_{24}V$ 株和 NADL 株具有密切的亲缘关系。BVDV 在自然情况下可使牛、羊、驼、鹿等反刍动物感染。自 80 年代初在国内发现本病并分离出病毒以来, 已有 15 个省、市、自治区陆续查出该病的抗体或分离到病毒。王治才等对新疆 7 个地区的腹泻羊作 BVDV 感染检查, 平均阳性率为 73.6%[2]。近年来有学者认为, 在许多猪场发生的非典型猪瘟的病原很可能是 BVD 病毒。国内丘惠深等(1988, 1990)先后研制了抗猪瘟兔化弱毒 McAb 和抗猪瘟强毒 McAb。国外将 BVD 病毒单抗应用于病毒的鉴定、纯化、诊断等方面的研究, 并在分析与中和作用相关的病毒粒子上的抗原决定基的数量和位置、BVDV 与 BDV、CSFV 的结构异同性鉴别等方面取得了一定的进展。国内迄今尚未见有 BVDV 的 McAb 的研究报道。为给 BVDV 抗原分析、分子生物学研究及瘟疫病毒诊断和免疫提供手段和试剂, 笔者们进行了 BVDV-McAb 的研究。

## 1 材料和方法

毒株为 BVD-Oregon $C_{24}$ V 株, 由中国兽药监察所引进。

骨髓瘤细胞 $SP_2/O$ 为中国科学院上海细胞所惠赠。

抗原制备 将 BVD-Oregon $C_{24}V$ 接种于 MDBK 传代细胞上大量培养增殖, 将细胞培养物反复冻融 3 次, 离心去除细胞碎片, 上清用聚乙二醇(PEG20000)沉淀, 离心[3]。TEN 悬浮后用蔗糖密度梯度离心(10%~60%蔗糖), 纯化抗原, 通过免疫电镜 IEM 法和培养细胞超薄切片上电镜检测病毒。

免疫 用 6~8 周龄 BALB/C 小鼠 5 只, 将提取的 BVDV 抗原与等量福氏完全佐剂充分混匀成乳状,

* 收稿日期: 1998-10-30 修回日期: 1999-01-11

多点皮内注射进行首免，间隔 2 周后用此抗原与等量福氏不完全佐剂充分混匀，同法再注射 2 次，细胞融合前 3 d 腹腔注射不含佐剂抗原，加强免疫。

细胞融合与选择性培养　将免疫小鼠脾细胞与 $SP_2/O$ 细胞按 2∶1 比例混合，在 50%PEG（MW4000）作用下融合，融合后置 HAT 选择培养基培养 10 d，之后换 HT 培养基培养，取镜检有杂交瘤细胞生长孔上清，用间接 ELISA 法进行检测[4]。

检测与筛选　用间接 ELISA 法筛选杂交瘤细胞生长孔上清液中的特异性抗体。

杂交瘤细胞克隆化　以间接 ELISA 法连续检测 2 次，从检出的阳性孔中选择 OD 值高、细胞生长旺盛、形态好的杂交瘤，用有限稀释法克隆 2～3 次。每次克隆时，都按前述继续做抗体阳性检查至 100% 阳性。当杂交瘤细胞增殖超过 1/2 孔底面积时，即转至 24 孔培养板扩大培养，尔后再转到小培养瓶内扩大培养，同时作细胞冻存。冻存的细胞 1～2 a 后复苏连续体外培养，观察其抗体分泌情况。

小鼠腹水制备　取健康 BALB/C 经产母鼠腹腔注射约含 $6.5～7\times10^5$ 杂交瘤细胞，逐日观察小鼠腹水产生情况，7～10 d 后采集腹水。所得腹水经离心处理后置－20 ℃冻存，并取少量检测抗体效价。

McAb Ig 类型与亚类鉴定　选择 ELISA 效价高的 5A9、5F11、5C9、4E6、2G3、5D7、5A5、5C2 等8 株杂交瘤细胞株培养上清，用上海生物制品研究所羊抗鼠 Ig 类型及 IgG 亚类鉴定血清，作 ELISA 检测 McAb Ig 类型与亚类鉴定。

杂交瘤细胞染色体计数　用生长 48 h 的 8 株杂交瘤细胞，按文献[5] 介绍的方法稍加改进制片染色后做染色体计数。

McAb 相加试验　经棋盘法筛选 BVDV 抗原包被浓度后，采用饱和硫酸铵盐析法提取 8 株 McAb 腹水抗体，作 McAb 饱和曲线测定[6]。尔后进行 8 株 McAb 的相加试验。加样顺序为先横行后竖列。

McAb 对 BVDV 中和活性测定　用 96 孔组织培养板在 MDBK 单层细胞上用稀释病毒法进行病毒中和（VN）试验。每个梯度设 4 孔重复，144 h 终判结果，并计算中和指数，中和指数＝中和组 $TCID_{50}$/对照组 $TCID_{50}$。

## 2　结果与分析

### 2.1　病毒抗原制备

提纯的病毒经电镜检查，病毒颗粒直径为 50 nm，内含直径约 30 nm 的核心。并观察到完整病毒的囊膜仍与感染细胞内质网膜相连并通过内质网膜向内质网池中的出芽成熟。呈现典型的 BVDV 形态。细胞上清毒价为 $10^{6.33}TCID_{50/0.1\ ml}$，聚乙二醇（PEG 20000）沉淀浓缩后毒价提高为 $10^{17}TCID_{50/0.1\ ml}$；蔗糖密度梯度离心 B 带（32%密度区）毒价为 $10^{8.67}TCID_{50/0.1\ ml}$；C 带（40%密度区）毒价为 $10^{12.75}TCID_{50/0.1\ ml}$；D 带（45%密度区）毒价为 $10^{7.77}TCID_{50/0.1\ ml}$。PEG 浓缩病毒 $OD_{260}/OD_{280}$ 比值 1.2，蔗糖 C 带病毒 $OD_{260}/OD_{280}$ 比值 1.5，病毒的纯度有明显提高。

### 2.2　细胞融合及筛选

融合细胞共接种 5 块 96 孔培养板，经 HAT 选择培养，有细胞克隆生长占 99.37%（477/480）。其中 ELISA 阳性孔占 46.25%（222/480）。对 19 孔强阳性株采用有限稀释法进行 2～3 次克隆化培养后，ELISA 检测选出 8 株亚克隆 100%阳性化。

### 2.3　染色体计数与 **McAb** 的 **Ig** 类型、亚类鉴定

克隆 2～3 次后的杂交瘤细胞株的平均染色体数为 98～105 条，表明是由小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合而成。

用标准血清测定结果，5A9、5F11、5C9、4E6、2G3、5D7 等 6 株 McAb 为 $IgG_1$，5C2、5A5 为 $IgG_{2a}$（表 1）。

### 2.4　**McAb** 效价测定

8 株腹水 McAb 对 BVDV 的 ELISA 效价分别为 1∶3 500～1∶200 000，鼠源多抗为 1∶53 760。8 株腹水单抗与 BVDV、CSFV、MDBK 上清浓缩抗原和 5% NCS－1640 对照抗原均无沉淀线形成。猪源和鼠源多抗与 BVDV、CSFV 抗原形成 2 条沉淀线，与 MDBK 细胞上清浓缩抗原形成 1 条沉淀线，与 5% NCS－1640

对照无沉淀线形成。

表 1　McAb IgG 亚类与杂交瘤细胞的染色体数

**Table 1　The number of chromosome in hybridoma cell and IgG subclass of McAb**

| 杂交瘤细胞株 Hybridoma cell strain | 单抗 IGG 亚类 IgG subclass | 细胞染色体数 Number of chromosome | 杂交瘤细胞株 Hybridoma cell strain | 单抗 IGG 亚类 IgG subclass | 细胞染色体数 Number of chromosome |
|---|---|---|---|---|---|
| 2G3 | $IgG_1$ | 102.9±3.3 | 4E6 | $IgG_1$ | 103.4±3.2 |
| 5C2 | $IgG_2$ | 102.0±2.9 | 5C9 | $IgG_1$ | 100.9±9.7 |
| 5A5 | $IgG_{2a}$ | 100.4±5.7 | 5F11 | $IgG_1$ | 99.3±2.8 |
| 5D7 | $IgG_1$ | 98.6±4.7 | 5A9 | $IgG_1$ | 105.8±2.8 |

表 2　McAb 和 PAB 与 BVDV 的 ELISA 琼脂免疫扩散及中和活性实验结果

**Table 2　ELISA titer and double immunodiffusion and Neutalizing activity test with ascitic McAb and PAB for BVDV**

| 检测项目 Test item | 腹水 McAb　Ascitic McAb | | | | | | | | 猪源多抗 Swine PAB | 鼠源多抗 Mouse PAB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5A5 | 5C9 | 5F11 | 5C2 | 2G3 | 4E6 | 5A9 | 5D7 | | |
| ELISA 效价 ELISA titer | 1∶3500 | 1∶4000 | 1∶150000 | 1∶120000 | 1∶30000 | 1∶4500 | 1∶200000 | 1∶25000 | 未做 Not done | 1∶53760 |
| 琼脂免疫扩散 Double immunodiffusion | — | — | — | — | — | — | — | — | 1∶64 | 1∶32 |
| BVDV 中和指数 Neutralizing index | 5011 | 1698 | 758 | 29512 | 50118 | 5011 | 50 | 5011 | 208929 | 未做 Not done |

## 2.5　McAb 中和活性测定

加样后 144 h 终判, 对照组为 $10^8$TCID$_{50/0.1\ ml}$, 依公式得出 8 株腹水 McAb 中和指数在 50 ~50118(log $10^{1.7\sim4.7}$)之间, 猪高免血清的中和指数为 208929(log $10^{5.32}$)。由相加试验所得相加指数( $AI$ )分析可知, 5D7、5C9、2G3 和 4E6 等 4 株 McAb 的抗原结合位点非常接近, 为 1 组, 组内 $\overline{AI}$=4.92。5A5 和 5C2 为 2 组, 组内 $AI$ =10.05; 5A9 和 5F11 为 3 组( $AI$ =10.72)。3 组 McAb 的组内平均相加指数都较少, 说明其组内单抗的抗原结合位点相同或非常接近。3 组间 $\overline{AI}$ 则较大, 约为 60(1 组和 2 组间 McAb $\overline{AI}$=59.1; 1 组和 3 组间 McAb $\overline{AI}$=59.8; 2 组和 3 组间 McAb $\overline{AI}$=60), 表明 8 株单抗分别可识别 3 个相对独立的抗原位点(表 3)。

表 3　McAb 相加实验相加指数分布

**Table 3　Additivity index distribution in the additive effect test for McAb**

| | 5A5 | 5C2 | 5A9 | 5F11 | 5D9 | 5C9 | 2G3 | 4E6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5A5(0.46) | | 0.00 | 69.23 | 44.58 | 33.82 | 33.88 | 41.35 | 42.22 |
| 5C2(0.33) | 20.11 | | 57.69 | 74.29 | 54.47 | 56.60 | 55.00 | 57.38 |
| 5A9(0.19) | 50.70 | 38.40 | | 17.86 | 54.13 | 53.19 | 51.89 | 66.67 |
| 5F11(0.37) | 42.12 | 62.82 | 3.57 | | 48.03 | 39.29 | 20.83 | 55.56 |
| 5D7(0.90) | 61.76 | 59.32 | 52.29 | 44.88 | | 4.24 | 0.00 | 0.00 |
| 5C9(0.75) | 71.90 | 79.63 | 92.61 | 67.86 | 17.58 | | 1.24 | 6.09 |
| 2G3(0.87) | 71.43 | 70.00 | 100.00 | 54.84 | 1.69 | 19.74 | | 3.41 |
| 4E6(0.89) | 74.30 | 81.94 | 94.4 | 60.32 | 3.91 | 0.00 | 1.14 | |

# 3　结论和讨论

3.1　本实验初步建立了 8 株分泌抗 BVDV-McAb 杂交瘤细胞株。为今后开展 BVDV 及瘟疫病毒的研究提供了新的试剂和手段。

3.2　在制备病毒抗原过程中, 本实验将病毒感染细胞离心去除细胞碎片后, 上清液以 PEG20000 沉淀浓缩病毒, 其毒价达 $10^{17}$TCID$_{50/0.1\ ml}$, OD$_{260}$/OD$_{280}$为 1.2。作为免疫抗原虽毒价较高但含一些杂蛋白。通过蔗糖密度梯度离心, 获得 C 区带病毒毒价为 $10^{12.75}$TCID$_{50/0.1\ ml}$, OD$_{260}$/OD$_{280}$为 1.5。表明该病毒中杂蛋白减少。经电镜观察和细胞感染试验证明, 所获提取物含有完整的具感染性 BVDV。

3.3　本实验先后融合 6 次。前 5 次融合后的杂交瘤细胞都在 HAT 培养 7 ~ 14 d 后逐渐死亡。分析融合各环节考虑 $SP_{2/0}$骨髓瘤细胞可能被支原体污染。将其在 BALB/C 小鼠腹腔接种, 通过小鼠体内免疫作用使骨髓瘤细胞得以净化。之后的第 6 次融合即获成功。

3.4　McAb 效价测定结果表明, 腹水单抗 ELISA 效价显著高于细胞培养上清。其中有 3 株腹水 McAb 效

价超过1∶10万。这可能与本实验选5只免疫鼠抗体效价最高的BALB/C鼠脾细胞供融合有关。

3.5 当抗体对病毒中和指数≥log $10^{1.7}$(50.1)时,则被认为具有中和活性。本实验8株McAb均具中和活性,有2株McAb中和指数很高,2G3中和指数为log $10^{4.7}$(50118),5C2中和指数为log $10^{4.47}$(29512)。可能是本实验采用长间隔经4次免疫BALB/C小鼠后产生较高中和抗体的免疫应答所致。

3.6 本实验8株MAB对猪瘟病毒也有交叉阳性反应。据报道,猪瘟病毒和BVDV的核苷酸序列约66%同源,氨基酸序列约85%同源。说明两者间抗原相关密切。8株McAb对BVDV和CSFV的抗原特性分析正在进一步试验中。

3.7 MAB相加试验表明,8株单抗分别可识别3个不同的抗原位点。其中1组(2G3、5D7、4E6、5C9)和2组(5C2、5A5)抗原结合位点可能在中和抗体识别的囊膜糖蛋白重要结构上,3组(5A9、5F11)则可能与中和抗体所识别的囊膜糖蛋白的次要结构相关连。要弄清其相应抗原结合位点,尚需深入研究。

致谢:上海细胞所张荣兴研究员、林斯骏研究员、葛锡锐研究员、王珏研究员等专家给予本实验技术指导,谨致谢忱。

[参 考 文 献]

[1] 沈正达. 与兽医学和公共卫生学有关的病毒新近分类地位. 甘肃畜牧兽医,1993,(6):25.
[2] 王治才,刘崇向,赵泽森,等. 牛病毒性腹泻病毒感染羔羊的调查. 中国畜禽传染病,1992,(3):41~42.
[3] 沈 敏,王新华,周鹏飞,等. BVD-MDV 细胞毒的快速粗提. 中国畜禽传染病,1997,(4):58~59.
[4] 王新华,刘守仁,张荣兴. ELISA 检测 BVD-MDV 抗体. 新疆农业科学,1996,(1):44~45.
[5] 刘 耳. 鼠—鼠杂交瘤细胞染色体制备方法探讨. 中国畜禽传染病,1990,(3):58.
[6] 钟发刚,沈 敏,王新华,等. 抗牛病毒性腹泻/粘膜病病毒单克隆抗体的抗原结合位点分析. 中国畜禽传染病,1997,(6):48~49.

# The Establishiment of Hybridoma Cell Lines Secreting Monoclonal Antibodies against Bovine Viral Diarrhea Virus(BVDV)

**WANG Xin-hua, SHEN Min, ZHOU Peng-fei, ZHONG Fa-gang, WEN Jian-xin**
(Xinjiang Research Academy of Farms and Land Reclamation, Shihezi 832000)

**Abstract**: Eight hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (MAB) against Bovine Viral Diarrhea Virus(BVDV) were established by hybridoma techniques. These McAb all showed masculine reactors to BVDV and CSFV. The number of chromosome in the hybridoma cells are 98~105 pieces. The McAb's type and subtypes six cell lines were $IgG_1$, two were $IgG_{2a}$. By analyzing of using epitopes combined with antigen experiment, the results indicated that eight cell lines of McAb can recognized three different antigen determinative epitopes. BALB/c mice were injected hybridoma cells to induce ascites. The antibody titer was detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)method. The ascites' antibody Iter was three thousand two hundred times higher than before. Three of them were 1∶100 000 or more, the best McAb reached 1∶200 000. Hybridoma cells could steadily secret McAb against BVDV after having been preserved for one or two years and being resuscitated. All ascites' McAb neutralization index to BVDV was higher than 50(log$10^{1.7}$), the highest one reached 50118(Log$10^{4.7}$). No deposition lines were appeared by immunity diffuse teat

**Key words**: Monoclonal antibodies; Bovine Viral Diarrhea Virus(BVDV)

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net