

研究简报

分泌 IHNV-B 病毒单克隆抗体 杂交瘤细胞株的建立

ESTABLISHMENT OF HYBRIDOMA PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS BENXI STRAIN (IHNV-B)

赵志壮 牛鲁祺

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150076)

Zhao Zhizhuang and Niu Luqi

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Harbin 150076)

刘长明

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 150001)

Liu Changming

(Harbin Veterinary Research Institute, 150001)

关键词 传染性造血器官坏死症病毒中国本溪株, 单克隆抗体, 杂交瘤

KEYWORDS IHNV-B, monoclonal antibody(McAb), hybridoma

虹鳟传染性造血器官坏死症是一种危害严重的鱼类病毒病,在北美、日本、欧洲及我国台湾等国家和地区均有报导。1990年作者曾分离出传染性造血器官坏死症病毒中国本溪株(IHNV-B),并报道如何应用 ELISA 法快速检测该病毒[赵志壮等,1993]。为了找出各地病毒株之间及强弱毒株之间的抗原差异,以及进一步采用 McAb-ELISA 法快速检测该病毒打下基础,减轻其危害,本实验应用杂交瘤技术,制备出能够持续分泌 IHNV-B 病毒单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞株,现简报如下。

一、材料与方 法

1. 抗原制备 将 IHNV-B 病毒接种于 CHSE 细胞使其增殖,取滴度为 10^5 TCID₅₀/0.1ml 的病毒悬液冻融,低速离心后取上清液,再超速离心(130,000g,4℃,90分钟)后悬于 PBS 中,经紫外分光光度法测定蛋白含量后,作为免疫用抗原。纯化后的病毒经超声波处理后,作为检测用抗原。

2. 小鼠免疫接种 按 Schultz 等[1985]所述的方法,对6周龄的 BALB/C 鼠进行免疫注射。

收稿日期:1993-05-03。

3. 酶联免疫吸附试验 采取间接 ELISA 方法, 以浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗原包被 96 孔酶联反应板, 每孔 0.1ml, 然后将第一抗体(被检杂交瘤培养上清液)和第二抗体(辣根过氧化物酶标记的兔抗 BALB/C 鼠 IgG)各加 0.1ml/孔, 底物为 $\text{OPD}-\text{H}_2\text{O}_2$, 终止液为 $2\text{MH}_2\text{SO}_4$, 另设阴性、阳性和空白对照, 于 MR580 型微量 ELISA 自动读数仪测定结果(即 $\text{P}/\text{N} > 2.1$ 为阳性)。

4. 杂交瘤细胞株的建立

(1) 细胞融合 取加强免疫后的 BALB/C 鼠脾细胞悬液和 SP2/0 骨髓瘤细胞悬液, 按 7:1 混于离心管中, 1000rpm 离心 10 分钟, 弃上清液后振散细胞, 在 37°C 中于 60 秒内加入 50% 聚乙二醇溶液 ($\text{pH} 7.6$) 0.7ml, 轻轻转动 90 秒, 在 5 分钟内由慢到快加入 10ml DMEM 营养液终止促融。1000rpm 离心 5 分钟, 取沉淀细胞加入 HAT-DMEM 选择培养液(内含 20% 胎牛血清、1% 的 $1.0 \times 10^{-2}\text{M}$ 次黄嘌呤、1% 的 $1.6 \times 10^{-3}\text{M}$ 胸腺嘧啶和 0.2% 的 $4.0 \times 10^{-3}\text{M}$ 氨基嘌呤), 接种于 1 天前准备好加有培养细胞的 96 孔培养板中, 置于 37°C 含 5% CO_2 培养箱中, 按常规补液和换液, 1 周后改用 HT-DMEM 培养液。

(2) 阳性孔的筛选、克隆、扩增及冻存 当融合细胞株长至 $1/3$ 孔时, 取上清液用 ELISA 法进行检测, 将阳性孔细胞以有限稀释法进行克隆, 3 次克隆后, 等细胞孔阳性率达 100% 时, 转入 24 孔板进行扩大培养, 于液氮中冻存。

(3) 杂交瘤腹水的制备 预先给 10 周龄左右的 BALB/C 鼠腹腔注射 0.5ml/只液体石蜡, 7~10 天后腹腔注射杂交瘤细胞 0.5ml/只(细胞浓度为 $10^5 \sim 10^7$ 个/ml), 约经 10 天后, 小鼠腹部明显膨大, 抽取腹水, 2000rpm 离心 10 分钟后, 取上清液冻存。

(4) 抗体的初步测定 收集杂交瘤细胞上清培养液和小鼠腹水作 ELISA 测定, 确定其最高稀释效价。

二、结果与讨论

1. 细胞融合率及阳性孔率测定。融合后细胞共接种 2 块 96 孔培养板, 经 HAT-DMEM 选择培养 7 天后, 改用 HT-DMEM 培养。第一板有 60 孔、第二板有 62 孔长出细胞克隆, 平均融合率为 63.5%, 经 ELISA 检测, 共有 8 孔产生了 IHNV-B 病毒抗体, 阳性孔率为 6.5%。

2. 阳性孔的克隆及 ELISA 效价测定。将阳性的 ELISA 检测结果相互比较, 筛选出 3 株强阳性的杂交瘤细胞株: 1H_9 、 1G_{10} 和 2H_5 , 经过 3 次克隆, 阳性率均达 100%, 取其上清液和 2H_5 株制备的腹水, 测得的 ELISA 效价分别为: 1H_9 为 1:320, 1G_{10} 为 1:320, 2H_5 为 1:640, 2H_5 腹水为 1:8000。

3. 自从 1975 年首次制备单克隆抗体报道以来 [Köhler 等, 1975], 杂交瘤技术有了不少改进, 尽管操作方法有所不同, 但都在设法提高细胞融合率。有关资料介绍 [徐宜为, 1991; 黄祯祥等, 1990], 将 HAT 转换成 HT 的时间为 2~3 周, 本实验中考虑到氨基嘌呤 (A) 对细胞的毒性, 将其缩短至 1 周, 获得了较高的融合率和阳性率。此外, 避免胎牛血清污染、DMEM 培养液 pH 值偏高及过期使用等因素, 均可使融合及克隆过程顺利进行。

本实验得到国家兽医生物技术重点实验室卢景良研究员的指导与支持, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 赵志壮等, 1993. 应用 ELISA 方法快速检测 IHNV-B 病毒. 水产学报, 17(1):60-63.
- [2] 徐宜为, 1991. 免疫检测技术, 231-269. 科学出版社(京).
- [3] 黄祯祥等, 1990. 医学病毒学基础及实验技术, 271-280. 科学出版社.
- [4] Köhler, G. *et al.*, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497.
- [5] Schultz, C. L. *et al.*, 1985. Production and characterization of monoclonal antibody against infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish Pathology*, 20(2/3):339-341.