

抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株的建立 及其产物生物学特性测定

朱瑞良^{1,2*} 崔治中² 赵 静²

¹(扬州大学畜牧兽医学院,扬州 225009)

²(山东农业大学动物科技学院,泰安 271018)

摘 要 用纯化的抗 IBDV IgG 免疫 Balb/c 小鼠,取其脾细胞与 SP2/0 细胞在聚乙二醇(PEG)作用下融合,ELISA 法检测筛选,经有限稀释法克隆 3 次,获得 2 株(5F₄ 株、2B₆ 株)分泌抗 IBDV 独特型抗体的杂交瘤细胞株,其能诱生 Balb/c 小鼠产生 ELISA 抗体效价分别为 1:12 800 和 1:25 600 的含抗 IBDV 独特型抗体的腹水。用此独特型抗体与福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂乳化制备成抗 IBDV 独特型抗体疫苗,免疫接种 SPF 鸡和普通京白公鸡,然后用 IBDV 强毒株(SD 株)2000 ELD₅₀ 攻毒,SPF 鸡免疫组 50 只,有 5 只发病、2 只死亡;对照组 10 只全部发病,8 只死亡。普通京白鸡免疫组 30 只,有 7 只发病,1 只死亡;对照组 10 只全部发病,6 只死亡。经 χ^2 检验,SPF 鸡 $\chi^2 = 34.15$,普通鸡 $\chi^2 = 16.68$,查 χ^2 值得 $\chi^2_{(1),0.01} = 6.63$,SPF 鸡 χ^2 和普通鸡 χ^2 均大于 $\chi^2_{(1),0.01}$ ($P < 0.01$),由此表明抗 IBDV 独特型抗体疫苗具有很好的免疫原性,对易感日龄的 SPF 鸡和普通鸡均具有极其明显的保护作用。从而证实了抗 IBDV 独特型抗体疫苗有潜在的研究和应用价值。

关键词 IBDV, 杂交瘤细胞, ELISA, 抗独特型抗体, 生物学特性

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0462-05

鸡传染性法氏囊病(IBD)是由鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)引起幼龄鸡的一种急性高度接触性传染病,该病已给养鸡业造成了巨大经济损失。近年来 IBDV 又呈现新的特点,特别是 IBDV 超强毒株(vvIBDV)^[1]和 IBDV 变异株^[2]的出现,使本病的防治又面临新的困境,因此探索新的预防方法和途径是当务之急。

自 1974 年 Jerne 提出免疫网络学说^[3]以来,对抗独特型抗体(Anti-idiotypic antibody)的研究日益增多,尤其在感染性疾病方面,如寄生虫^[4,5]、某些病毒^[6,7]、细菌^[8]等。抗独特型抗体不仅可以调节和维持机体免疫系统的稳定性,而且还可以替代抗原作为疫苗免疫动物,产生免疫应答,抵抗相应病原体的侵袭。根据这一原理,我们应用纯化的抗 IBDV IgG 免疫 Balb/c 小鼠,通过单克隆抗体(McAb)生产技术,建立稳定分泌抗 IBDV IgG 的 McAb 杂交瘤细胞系,以其生产抗 IBDV 独特型抗体疫苗,为 IBDV

的免疫防治探索一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞 42 日龄京白 SPF 鸡,购自山东家禽研究所 SPF 鸡场;35 日龄普通京白公鸡(IBDV 抗体阴性),购自山东农业大学实习畜牧场; Balb/c 小鼠,购自解放军军事医学科学院实验动物中心;SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞,南京农业大学动物传染病实验室提供。

1.1.2 病毒与血清 IBDV 山东株(IBDV-SD 株),本课题组分离,-70℃ 冰箱保存,对 30~42 日龄 SPF 鸡的发病率 100%,致死率为 60%~85%,对 9 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊接种的 ELD₅₀ 为 $10^{-3.76}/0.1$ mL。抗鸡新城疫病毒(NDV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)、鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽脑脊髓炎病毒(AEV)、禽呼肠孤病毒(ARV)、鸡马立克氏病

收稿日期 2003-01-28, 修回日期 2003-04-15。

基金项目: 国家自然科学基金重大项目基金资助(No. 39893290-3);山东省教育厅科研项目基金资助(No. J02H05);江苏高校省级重点实验室开放课题基金资助(No. kjs02030)。

* 通讯作者。 Tel 86-538-8242341 Fax 86-538-8241419 E-mail zhurl@sdau.edu.cn
©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

病毒 (MDV) 等血清, 本课题组通过免疫 SPF 鸡制备, -70°C 冰箱保存。

1.1.3 主要试剂和材料: PEG (6000、1540), 瑞典 Fluka 产品; HRP-羊抗鼠 IgG, 军事医学科学院生物制品中心产品; 羊抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM 等各亚类抗体及羊抗鼠 Kappa、Lambda 链抗体, Sigma 产品; RPMI-1640 干粉培养基, HAT、HT 培养基, Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 免疫原的制备与检验: 取 IBDV-SD 株通过滴鼻和点眼接种 42 日龄 SPF 鸡, 取死亡鸡的法氏囊经匀浆、反复冻融、离心、取上清液, 加 7% PEG (6000) 3% NaCl, 不断搅拌至充分溶解, 放 4°C 过夜, 10 000 r/min 离心 20 min, 将沉淀用少量 PBS 溶解, 加入含 30%、40%、50%、60% 蔗糖的梯密度离心管中, 以 40 000 r/min 离心 2.5 h, 取含病毒带透析去除蔗糖, 电镜观察病毒颗粒, 并用 721 紫外分光光度计测定病毒蛋白浓度。用纯化的 IBDV 免疫 SPF 鸡, 琼脂扩散反应 (AGP) 检测血清中抗 IBDV 抗体效价, 合格后心脏采血, 分离制备抗 IBDV 的高免血清, 通过饱和硫酸铵盐析获得抗 IBDV IgG 粗提物, 经透析除去部分 NH_4^+ 和 SO_4^{2-} , 再经 Sephadex G-25 层析柱除盐, 蔗糖浓缩获得抗 IBDV IgG 纯化品, 用紫外分光光度计测定其蛋白含量, SDS-PAGE 检测其纯度。

1.2.2 分泌抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株的建立: 取 6~8 周龄 Balb/c 小鼠, 用提纯的抗 IBDV IgG 经 3 次免疫, ELISA 检测抗 IBDV IgG 的抗体效价达 $1:10^4$ 时, 可作细胞融合用免疫鼠。按常规方法^[9] 准备免疫鼠脾细胞、饲养细胞及 SP2/0 细胞, 将免疫鼠脾细胞与 SP2/0 细胞按 10:1 混合, 用 50% PEG (1540) 作融合剂进行融合。细胞融合后经加 HAT 选择性培养基培养, 10d 左右在倒置显微镜下观察记录, 当 SP2/0 细胞全部死亡后改换 HT 培养基培养, 在融合细胞生长的细胞集落占细胞培养板孔底面积的 $1/3 \sim 1/2$ 时, 用 ELISA 检测上清液, 强阳性孔经有限稀释, 进行克隆化培养, 对克隆阳性细胞培养后按此法再克隆 2 次, 可获得稳定分泌抗 IBDV 独特型抗体的杂交瘤细胞株。

1.2.3 分泌抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株产物的制备及生物学特性检测:

1) 小鼠腹水制备: 取 3 月龄以上的 Balb/c 小鼠腹腔注射灭菌液体石蜡, 0.5 mL/只, 2~3 周后腹腔注射抗 IBDV 独特型抗体的杂交瘤细胞株 (每鼠约 10^7 个细胞), 至 12d 小鼠腹部明显膨大隆起, 开始收

集腹水, 所得腹水经 1000 r/min 离心 10 min, 去沉淀, 用间接 ELISA 通过酶标仪测定 490 nm 的 OD 值, 再加抗生素 -70°C 保存。

2) 分泌抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株染色体计数: 参照鄂征^[10] 介绍的方法。

3) 抗 IBDV 独特型抗体亚类及轻链型 (Kappa 或 Lambda 型) 鉴定: 用羊抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM 等亚类抗体及羊抗鼠 Kappa、Lambda 链抗体与抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞培养上清液进行 AGP, 根据出现的沉淀线确定抗 IBDV 独特型抗体亚类及轻链型。

4) 抗 IBDV 独特型抗体小鼠腹水特异性鉴定: 应用 ELISA 测定小鼠腹水与抗 IBDV IgG, 抗 IBV、ILTV、AEV、MDV、ARV 等抗血清的交叉反应性, 同时用健康 SPF 鸡血清作为阴性对照。

5) 抗 IBDV 独特型抗体小鼠腹水免疫原性的检测: 将抗 IBDV 独特型抗体小鼠腹水离心后的上清液分别与福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂按一定比例乳化制备成抗 IBDV 独特型抗体疫苗, 用此疫苗分别免疫 SPF 鸡和普通京白鸡。首先接种福氏完全佐剂苗, 每只鸡肌肉注射 0.2 mL, 间隔 1 周, 二免接种不完全福氏佐剂苗, 每只鸡肌肉注射 0.3 mL。SPF 鸡接种 50 只, 对照 10 只; 普通京白鸡接种 30 只, 对照 10 只。二免后 10d 用 IBDV-SD 株 2000 ELD₅₀ 滴鼻、点眼攻毒, 观察发病、死亡情况。

2 结果

2.1 免疫原的制备

经蔗糖梯密度离心后的病毒带, 电镜下可见有典型的 IBDV 颗粒, 没有发现其它病毒颗粒。提纯后的病毒蛋白浓度为 10.8 mg/mL。用纯化的 IBDV 免疫 SPF 鸡, AGP 检测高免血清中抗 IBDV 抗体效价为 $1:128 \sim 1:256$ 。蔗糖浓缩获得的抗 IBDV IgG 纯化品, 紫外分光光度计测定蛋白含量为 16.5 mg/mL。抗 IBDV IgG 经 SDS-PAGE 后, 分别出现两条 IgG 的特异条带, 最前面一条带分子量在 20~30kD 之间, 约为 23kD, 为抗 IBDV IgG 的轻链; 第二条带分子量在 45~66kD 之间, 约为 53kD, 为抗 IBDV IgG 的重链 (见图 1), 由此说明提取的抗 IBDV IgG 纯度较高。

2.2 分泌抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株的建立及其产物生物学特性测定

2.2.1 抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株的建立: 细胞融合后, 强阳性孔经有限稀释法克隆 3 次后, 获

得 2 株分泌抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株 (2B₆、5F₄) 其 ELISA 检测结果见表 1。

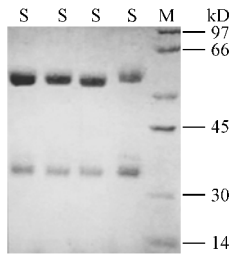


图 1 抗 IBDV IgG SDS-PAGE 电泳结果

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis of anti-IBDV IgG
S. Anti-IBDV IgG ;M. Marker

表 1 2 株杂交瘤细胞培养上清液 ELISA 测定结果 (OD_{490nm})

Table 1 ELISA of the conditioned medium by the 2 hybridoma cell lines (OD_{490nm})

Items	2B ₆	5F ₄	Positive control	Negative control
OD value	0.885	0.784	0.915	0.272
S/P value	0.95	0.80		

Note S/P = (S-N) / (P-N) S : OD value of treatment ; P : OD value of positive control ; N : OD value of negative control

The mouse anti-chicken IBDV IgG was used for positive control and the conditioned medium by normal cells was used for negative control

2.2.2 抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株染色体计数 :杂交瘤细胞 2B₆、5F₄ 染色体数均在 88~106 范围内变化,平均 95 条。

2.2.3 抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株诱生 Balb/c 小鼠腹水 ELISA 抗体效价测定 :2 株分泌抗 IBDV 独特型抗体杂交瘤细胞株诱生 Balb/c 小鼠产

生腹水的 ELISA 抗体效价 2B₆ 为 1:25600、5F₄ 为 1:12800。

2.2.4 抗 IBDV 独特型抗体小鼠腹水特异性鉴定 :用 ELISA 测定 2B₆、5F₄ 小鼠腹水与抗 IBDV IgG、抗 IBV、ILTV、AEV、MDV、ARV 抗血清的交叉反应,结果见表 2。

2.2.5 抗 IBDV 独特型抗体亚类及轻链型鉴定 :用羊抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM 各亚类抗体及羊抗鼠 Kappa、Lambda 链抗体分别与 2B₆、5F₄ 杂交瘤细胞培养上清液进行 AGP,结果表明这两株抗独特型抗体均为 IgG₁、Kappa 型,而与 IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM 不反应,说明所获得的杂交瘤细胞具有分泌单一抗体的能力。

2.2.6 抗 IBDV 独特型抗体的免疫原性 :实验鸡用抗 IBDV 独特型抗体疫苗免疫 2 次后,IBDV-SD 株攻毒,SPF 鸡对照组 10 只 85 h 内全部发病,120 h 内死亡 8 只,另 2 只逐渐恢复,但生长受阻;SPF 鸡免疫组 50 只攻毒后逐日观察 7d,有 5 只精神出现异常,采食量下降,死亡 2 只,另 3 只逐渐恢复。普通京白鸡对照组 10 只攻毒后 90 h 内全部出现精神萎靡,扎毛,食欲降低,粪便呈黄绿色,死亡 6 只;免疫组 30 只攻毒后连续观察 7d,有 7 只出现精神欠佳,死亡 1 只,其余 6 只逐渐恢复正常。经 χ^2 检验,SPF 鸡 $\chi^2 = 34.15$,普通鸡 $\chi^2 = 16.68$,查 χ^2 值表得 $\chi^2_{(1),0.01} = 6.63$,SPF 鸡 χ^2 和普通鸡 χ^2 均大于 $\chi^2_{(1),0.01}$ ($P < 0.01$),由此说明抗 IBDV 独特型抗体疫苗具有很好的免疫原性,对易感日龄的 SPF 鸡和普通鸡均具有极其明显的保护作用。

表 2 抗 IBDV 独特型抗体特异性鉴定 (OD_{490nm})

Table 2 Evaluation of specificity of anti-idiotypic antibody (Id-Ab) against IBDV (OD_{490nm})

Antiserum	IBDV	IBV		ILTV		AEV		MDV		ARV			
		OD	P/N	OD	P/N	OD	P/N	OD	P/N	OD	P/N		
Anti- Id-Ab	2B ₆	2.204	11.38	0.212	0.68	0.216	0.70	0.173	0.47	0.227	0.76	0.172	0.46
Against IBDV	5F ₄	2.021	10.40	0.185	0.53	0.165	0.42	0.182	0.52	0.195	0.59	0.124	0.20

Note P/N = (OD value of treatment - OD value of blank control) / (OD value of negative control - OD value of blank control), P/N ≥ 2.1 for positive.

3 讨 论

1) 构建分泌抗独特性抗体 (Ab₂) 的杂交瘤细胞克隆,通常是先构建分泌抗某一抗原的 McAb (Ab₁) 的细胞克隆,然后用 Ab₁ 免疫 Balb/c 小鼠,再制备分泌 Ab₂ 的杂交瘤细胞克隆^[5]。我们采取先制备抗 IBDV 高免血清、提取纯化 IgG,再建立分泌抗该 IgG

的 McAb 杂交瘤细胞株而生产抗独特型抗体,从实验结果看这种方法生产抗 IBDV 独特型抗体是可行的,仅通过一次 McAb 制备过程,使研制方法简单化。

2) 在抗独特型抗体制备过程中,免疫原的纯度对杂交瘤细胞的筛选有一定影响,低纯度的免疫原制备抗独特型抗体筛选麻烦,工作量大,也会影响抗

独特型抗体的产生,高纯度的免疫原,筛选简单,工作量小^[7]。本研究用纯度较高的 IBDV 免疫 SPF 鸡,制备抗 IBDV 的高免血清,经盐析法处理,获得纯化的 IgG 免疫 Balb/c 小鼠,取其脾细胞与 SP2/0 细胞融合后,经 3 次克隆化,即获得了稳定分泌抗 IBDV 独特型抗体的细胞株。

3) 用抗 IBDV 独特型抗体疫苗免疫 SPF 鸡和普通京白鸡后,IBDV-SD 株攻毒,SPF 鸡对照组 100% 发病,80% 死亡,而免疫组存活率为 96%;普通京白鸡对照组 100% 发病,60% 死亡,而免疫组存活率 97%。经 χ^2 检验,SPF 鸡 χ^2 和普通鸡 χ^2 均大于 $\chi^2_{(1)0.01}$ ($P < 0.01$),由此可见抗 IBDV 独特型抗体疫苗免疫易感鸡后,可有效地抵抗 IBDV 强毒株的感染,说明用抗 IBDV 独特型抗体疫苗代替常规 IBDV 疫苗是可行的。使用此种疫苗可以避免 IBDV 活疫苗对鸡群造成的不良反应,为从根本上消灭 IBDV 对环境的污染、自然清除 IBDV 提供了保证。而且这种疫苗可以不断地、均一地制备,有利于疫苗的标准化的,这为 IBDV 的免疫防制开辟了一条新的途径。

4) 本项研究在抗 IBDV 独特型抗体方面进行了初步探讨,获得了不含有传播病原的 IBDV 疫苗替代物—抗 IBDV 独特型抗体。在免疫易感日龄鸡的试验中,表明抗 IBDV 独特型抗体与 IBDV 具有“内映像”关系,可模拟 IBDV 抗原,作为 IBDV 的替代物进行无病原免疫学研究,这与 Jerne 提出的免疫网络调节学说^[3]相一致,本研究初步显示出了抗 IBDV

独特型抗体的应用价值和潜在的研究价值。

REFERENCES (参考文献)

- [1] CUI Z Z (崔治中), SUN S H (孙淑红), SHAN Z F (单忠芳) *et al.*. Pathogenicity of a very virulent strain GX8/99 of infectious bursal disease virus. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报) 2002, **18**(2): 162 - 166
- [2] Rosenberger J K, Cloud S S. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J A Vet Med Assoc*, 1989, **33**(4): 357
- [3] Jenre N K. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol* (Paris), 1974, **125**C: 373 - 389
- [4] FENG Z Q (冯振卿), LI Y H (李玉华), QIU Z N (仇镇宁). Protective immunity role of monoclonal anti-idiotypic antibody NP30 of Japanese blood flukes to goat. *Chinese Journal of Medical Science* (中华医学杂志) 2000, **80**(6): 411 - 413
- [5] GUO Z Q (郭志刚), DU C B (杜重波), ZHANG D L (张德林) *et al.*. Study on anti-Idiotypic antibody of bowshaped worm. *Chinese Technology of Veterinary* (中国兽医科技), 1993, **23**(8): 9 - 10
- [6] LI G C (李官成), ZHU J C (朱建高), ZHOU G H (周国华) *et al.*. Humoral immunity and cellular immunity of anti-idiotypic antibody to nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Cell and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志) 2000, **16**(2): 134 - 137
- [7] LI Y M (李彦敏), LI Z R (李忠润), LIU X T (刘湘涛) *et al.*. Study on anti-idiotypic antibody of swine blister disease virus. *Chinese Technology of Veterinary* (中国兽医科技), 1995, **25**(5): 3 - 5
- [8] Magliani W, Polonelli L, Conti S. Neonatal mouse immunity against group B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes. *Nat-Med*, 1998, **4**(6): 705 - 709
- [9] Harlow E, Lane D. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- [10] E X (鄂征). *Technique of Tissue Culture*. Beijing: Publishing Company of the People Hygiene, 1988, pp. 246

Establishment and Biological Properties of Hybridoma Cell lines Secreting Anti-IBDV Idiotypic Antibodies

ZHU Rui-Liang^{1, 2*} CUI Zhi-Zhong² ZHAO Jing²

¹(Animal Science and Veterinary College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

²(Animal Science and Technique College, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract In recent years, the prevention and cure of infectious bursal disease (IBD) have become more and more difficult due to the emergence of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) and the variant strains of IBDV. In this research, the hybridoma cell lines which secretes anti-idiotypic antibodies against anti-IBDV IgG were established. According to the Jerne's theory of immune network, the use of the anti-idiotypic antibodies as a vaccine will be a new method for the prevention of IBD.

In this study, the SPF chickens were inoculated with the IBDV-SD strain, and the bursal was obtained from the died chickens. The bursal was then homogenized and frozen-thawed 3 cycles, and the virus samples were prepared by cane sugar density gradient centrifugation and dialysis. Typical IBDV particles were observed under an electron microscope, and the concentration of the virus protein measured by ultraviolet absorbance spectrophotometry was 10.8 mg/mL. SPF chickens were immunized

Received: 01-28-2003

This work was supported by a Grant from National Science Foundation of China (No. 39893290-3).

* Corresponding author. Tel 86-538-8242341; Fax 86-538-8241419; E-mail zhrl@sdau.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

