

乙型脑炎病毒单克隆杂交瘤抗体细胞系的 建立及其应用于抗原性比较

俞永新 李德富 李秀华 汪金凤 张国铭 郭 玮

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

提 要

本文建立了 13 株乙脑单克隆抗体杂交瘤细胞系, 对其中 6 株进行了特性研究, 结果表明该 6 株中 3 株为乙脑病毒种特异性抗体, 3 株为乙脑病毒亚组特异性抗体。以免疫荧光技术对 12 株国内外分离的乙脑病毒进行了抗原性比较, 结果表明我国分离的大多数病毒株间无明显的抗原性差异, 但个别近年来分离的病毒株如云南的 Y-M60, 福建的 NY, 湖南的 X8103 株与 1949 年北京分离的 P₃ 株即目前用于灭活疫苗生产的病毒株间有一定的差异。我国的大多数病毒株与日本的中山 (NaK) 株则有明显的差别。此外, 并发现 2 株单克隆抗体对我国的全部野病毒株有高滴度的强荧光反应而对 14-2 减毒株仅有十分微弱反应, 甚至无反应。以上结果提示乙脑不同病毒株间存在抗原性差异, 但是否有免疫保护上的抗原性差异尚待进一步研究。

流行性乙型脑炎 (以下简称乙脑) 病毒不同株间的生物学特性有较明显的差异^[1], 但其抗原性的差异在以往用多克隆抗体进行试验比较时, 未能获得一致的肯定结果^[2]。自应用单克隆抗体进行抗原性分析后乙型脑炎病毒株的抗原性差异似较明确, 特别是日本进行了 27 株的比较, 证明株间的抗原性有明显差异^[3]。我国虽亦有这方面的报告但所用单克隆株较少, 比较的病毒株也少^{[4][5]} 因此尚不够全面, 本文建立了 13 株乙脑单克隆细胞株选其中 6 株对 12 株乙脑病毒其中包括日本的毒株和我国的乙脑弱毒株进行抗原性比较现将结果报告如下:

材 料 与 方 法

1. 小白鼠免疫 用 P₃ 株乙脑毒种生产的灭活疫苗加等量福氏完全佐剂充分乳化后腹腔接种 8—10 周龄的 BACA/C 小鼠每只 1.0ml (含抗原 0.5ml) 一周后再加强一针 (等量抗原不完全佐剂) 再间隔一周以 P₃ 株活病毒腹腔攻击每只小鼠 0.5ml。另以云

本稿 1985 年 11 月 9 日收到

南大理分离的乙脑 Y-M60 株灭活病毒按同法免疫二次后, 以活毒静脉加强免疫一次。

2. 细胞融合 末次免疫后第三天取小鼠脾细胞悬液与小鼠骨髓瘤细胞 (SP210-Ag14) 按常规法^[6]进行融合培养, 有杂交瘤形成的培养孔当细胞长到孔底 1/3—1/2 时, 开始按免疫荧光法测定特异性抗体。

3. 细胞克隆培养及抗体测定 克隆化培养用有限稀释法进行, 每株细胞克隆化 4—5 次。抗体测定用免疫荧光技术进行, 即将 P₂ 株或 M60 株乙脑病毒接种蚊细胞置 28℃ 培养病变达 “+” 时弃去培养液, 加适量 PBS, 吹散细胞, 计数并稀释成 5×10^5 /ml 滴入筛孔玻片, 凉干, 冷丙酮固定后用 PBS 洗三次, 风干后存放 -40℃ 冰箱。检测免疫荧光抗体时按常规法染色。

4. 病毒株 用 12 株乙脑病毒株 (表 1) 进行抗原性比较, 用西尼罗 (WN), 登革热 1 型 (D-1), 基孔 (Chik) 等披膜病毒进行单克隆抗体特异性鉴定。这些病毒均能在 C₆/36 细胞内繁殖并出现病变^[8], 试验时按上述方法制备病毒抗原片。

结 果

1. 乙脑病毒杂交瘤细胞系的建立

先后进行三次细胞融合每次接种二块培养盘 (即 48 孔) 结果三次融合杂交瘤细胞生成率为 100% 但对乙脑特异性抗体的阳性率则不是很高。

从获得的 24 个阳性孔中经过 4—5 次克隆化培养建立 13 株能稳定产生抗乙型脑炎病毒的单克隆抗体的细胞株。现选其中 6 株进行试验, 其中 D₃B₉ 和 C₆B₃ 二株来源于 Y-M60 病毒, 另 4 株 D₁₁C₁, A₂G₁, D₁E₃, D₄G₁₂ 来源于 P₃ 病毒, 该 6 株抗体其球蛋白亚类均为 IgG1。

2. 六株单克隆抗体对乙脑不同抗体的滴度

6 株单克隆抗体的中和抗体效价除 D₁E₃ 为 1000, D₄G₁₂ 为 100 以上外, 其余均未测出效价; 血抑效价除 D₁E₃ 为 20—40 外, 其余均未测出效价。但 6 株的免疫荧光抗体滴度对其免疫株病毒均很高, 达 1280—10240, 因此以下我们仅用免疫荧光检测法进行乙脑不同株的抗原性比较。

3. 六株单克隆抗体的特异性鉴定

为了进一步确定其免疫学反应的特异性, 选用乙脑病毒同一亚组的西尼罗 (WN), 非同一亚组的登革热 I 型 (D-1) 及不同组的基孔 (Chik) 病毒, 按同法制成细胞抗原片进行单克隆抗体免疫荧光反应检测。结果见表 3。从表 3 可见 D₁₁C₁, A₂G₁, D₄G₁₂ 三株抗体只对乙脑病毒起反应对 WN, D-1, Chik 均无交叉反应表现为乙脑病毒种特异性, D₁E₃, D₃B₉, C₆B₃ 除对乙脑病毒反应外, 还与同一亚组的 WN 交叉反应, 但对 D-1 和 Chik 则无反应表现为亚组特异性。

4. 六株单克隆抗体对 12 株乙脑病毒的免疫荧光反应

六株单克隆抗体与同法制备的 12 株乙脑病毒的细胞抗原片进行了荧光抗体反应试验。荧光结果列于表 4。表 4 结果可见六株单克隆抗体对大多数不同乙脑病毒株均有较

高的反应滴度但对日本的 NaK 株则反应均较差, 其中 C_6B_3 , D_3B_9 株单克隆抗体对乙脑弱毒株的反应很差几乎测不出滴度。 $D_{11}C_1$ 株抗体对 NY 株病毒, A_2G_1 株抗体对 NY, M60, X_{8103} , 14-2 病毒的反应也较差。以上结果经反复试验, 结果基本上相同。说明乙脑病毒存在株间的抗原性差异。

因此如按与免疫株病毒的反应滴度相差 8 倍以上作为有差别分析则 6 个单克隆抗体似可分为四种类型。第一类型为 D_1E_3 , D_4G_{12} 仅对 NaK 株有差别; 第二类型为 $D_{11}C_1$ 仅对 NY 株有差别; 第三类型为 C_6B_3 , D_3B_9 对 NaK、14-2 有差别; 第四类型为 A_2G_1 对较多乙脑病毒有差别 (NaK、M60、X、NY)。

讨 论

本文对 6 个乙脑杂交瘤细胞系所分泌的抗体进行了试验研究, 根据抗体性质, 可初步分为二类, 第一类仅和乙脑病毒反应, 与同一亚组, 其他亚组, 不同组病毒均无交叉反应为乙脑病毒种特异性; 第二类对乙脑病毒和同一亚组病毒反应但对其他亚组和不同组病毒无交叉反应为亚组特异性。披膜病毒科黄病毒属内特别是同一亚组内的病毒存在明显的抗原共同关系, 血清学鉴定时容易发生交叉反应而难于确定。本文第一类杂交瘤细胞系中的三株单克隆抗体在应用免疫荧光技术检测时对乙脑的种特异性强, 容易排除其他抗原性关系密切的虫媒病毒如西尼罗、登革热等。这在乙脑病毒分离或其他虫媒病毒调查中具有实际应用价值。

近年来应用单克隆抗体技术对乙脑不同病毒株间抗原性进行分析结果表明毒株间存在血抑^{[3][5][9]}或中和抗体^[4]的差异。亦有应用单克隆抗体免疫荧光技术检测登革热不同型的差别^[10]和流行性出血热毒株间的抗原性差异^{[11][12]}本文应用免疫荧光技术用我们建立的 6 株单克隆抗体对 12 株乙脑病毒, 主要是近年来从国内不同地区不同动物分离的病毒并包括日本的毒株和我国的减毒株进行抗原性比较, 结果虽然表明我国分离的大多数毒株间无明显的抗原性差异但仍可看出个别近年来分离的毒株如 Y-M60, NY, X_{8103} 株与 1949 年分离的 P_3 株有一定的差异。而我国的地方毒株与日本的 NaK 株比较结果则有更明显的差别。此外并发现二株单克隆抗体对我国的全部野毒株有很强的荧光反应而对减毒株的反应却十分微弱, 几乎检测不出, 说明弱毒株在减毒过程中某些抗原发生了变化, 但究竟是病毒的那一抗原成分发生变化有待进一步研究, 强弱株间的抗原性差异在应用单克隆抗体研究黄热病病毒时也曾发现^[13], 这一现象并有助于强弱株间的鉴别, 在弱毒活疫苗应用中检查减毒株是否有返祖现象, 具有重要的实用意义。

以上结果提示有必要进一步研究 P_3 灭活疫苗株和 14-2 减毒活疫苗株对不同地区分离的不同乙脑野毒株是否存在免疫保护上的抗原性差异。

表 1. 试验用乙型脑炎病毒毒株来源

Table 1. Isolation sources of JEV strains used for testing

病毒株 strains	分离年代 year	分离地区 place	宿主 source
P ₃	1949	北 京	人
Y-M ₆₆	1977	云 南 大 理	蚊
SA ₁₄	1953	西 安	蚊
NY	1981	福 建 龙 岩	蚊
X ₈₁₀₃	1981	湖 南 桃 源	蚊
BJ	1981	北 京	人
YC ₄	1981	银 川	蚊
JI	1981	黑 龙 江 集 贤 县	猪
ZH ₈₁₅₂	1981	内 蒙 哲 盟	蚊
Z-M ₂	1982	浙 江	蚊
NaK	1935	日 本 东 京	人
14-2[?]	来源于 SA ₁₄ 株的减毒株		

表 2. 单克隆抗体对不同虫媒病毒的免疫荧光反应

Table 2. Characterization of JEV monoclonal antibodies by IFA

杂交瘤号 No. of Hybrid Cell	病毒株 Virus				
	P ₃	Y-M ₆₆	WN	D-1	Chik
D ₁₁ C ₁	5120	2560	<10	<10	<10
A ₂ G ₁	1280	160	<10	<10	<10
D ₁ E ₃	1280	5120	10	<10	<10
D ₄ G ₁₂	5120	5120	<10	<10	<10
D ₃ B ₉	2560	10240	80	<10	<10
C ₆ B ₃	2560	10240	80	<10	<10
SA ₁₄ 多克隆	1280	640	80	<10	<10

表 3. 单克隆抗体对12株乙脑病毒的免疫荧光反应

Table 3. IFA reaction of six MeAb to 12 strains of JE Virus

杂交瘤号 No. of hybrid cell	乙脑病毒株 (滴度) JEV strain (titer)											
	P ₃	Y-M60	SA ₁₄	14-2	NY	X ₈₁₀₃	BJ	YC ₄	JI	ZH ₈₁₅₂	Z-M ₂	NaK
D ₁₁ C ₁	5120	2560	10240	2560	320	2560	10240	10240	10240	5120	2560	640
A ₂ G ₁	1280	160	1280	320	<160	160	1280	640	1280	1280	640	160
D ₁ H ₃	1280	5120	2560	2560	≥320	2560	2560	2560	1280	1280	640	80
D ₄ G ₁₂	5120	5120	2560	2560	1280	2560	10240	5120	5120	5120	5120	80
D ₃ B ₉	2560	10240	2560	20	1280	5120	10240	10240	10240	10240	10240	160
C ₆ B ₃	2560	10240	2560	10	1280	2560	10240	10240	10240	10240	10240	160
SA ₁₄ 多克隆	1280	640	320	320	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	320

参 考 文 献

- [1] Huang, C.H., 1982. In "Advances in Virus Research" Vol.27. by Academ press, Inc.
- [2] 李河民等, 1959, 全国性急传染病学术会议资料选编 下册 P.137.
- [3] Kobayashi, Y. et al., 1984. *Infect. and Immun.* 44(1):115.
- [4] 陈伯权等, 1983, 中国医学科学院学报 5(4):210.
- [5] 徐震州等, 1985, 单克隆抗体通讯 全军单克隆抗体协作组编印 1:28.
- [6] 李德富等, 1982, 中华微生物学和免疫学杂志 2(6):341.
- [7] 俞永新等, 1981, 中华微生物学和免疫学杂志 1(2):77.
- [8] 张国铭等, 1985, 中国公共卫生 4(1):50.
- [9] Kimura-Kuroda, et al., 1983. *J.Virol.* 45:124.
- [10] Henschel, E.A. et al., 1982. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31(4):830.
- [11] Svedmyr, A. et al., 1982. *Scand. J. Infect Dis. Suppl.* 36:186.
- [12] 陈伯权等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志 5(3):136.
- [13] Schlesinger, J.J. et al., 1983. *Virology* 125:8.

ESTABLISHMENT OF HYBRIDOMA CELL LINES SECRETING MCAB TO JEV AND THEIR USES FOR ANTIGENIC ANALYSIS

Yu Yong-xin Li De-fu Li Xiu-hua
Wang Jin-feng Zhang Guo-ming Guo Wei

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

Thirteen hybridoma cell lines secreting McAbs against JEV have been established. Six of them were selected for study. The characterization of the six cell lines of McAb indicated that three of them were JEV—species specific and the other three were JEV—subgroup specific. In this paper, 12 JE virus strains, including 10 Chinese strains, one Japanese strain and one attenuated virus, were selected for antigenic analysis with the six cell lines of McAb. The result showed that most of those Chinese strains were antigenically identical, however, the antigenicity of three strains recently isolated from Yunnan, Fujian and Hunan provinces showed considerable difference from P₃ strain, isolated in 1949 and now used for production of JE killed vaccine. The result also revealed that most JE virus strains isolated in China showed marked difference with Japanese NaK strain. Besides, two cell lines of McAb were found to react with all the 10 Chinese wild JEV strains to a high titre (≥ 1280) but very low (10—20) with 14—2 attenuated virus. The significance of this discrepancy deserve further investigation.