

抗HSV-1淋巴细胞杂交瘤的建立及应用 单克隆抗体对HSV分型

高谦 姜绍谔 马文煜 钟访英* 蔡晓宁**

指导者: 汪美先

(第四军医大学微生物教研室, 西安)

提 要

应用HSV-1 SM44株感染的BLK-21细胞及提取的感染细胞膜蛋白抗原免疫Balb/c小鼠。以免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 融合, 经ELISA 筛选仅与 HSV-1 反应的阳性克隆及克隆化, 建立了一株产生抗HSV-1型特异性McAb的杂交瘤细胞系(Mad-2)。经ELISA, IF及抗原吸收试验证明, 该细胞系的培养上清及制备的小鼠腹水均与HSV-1呈特异性反应, 但不与HSV-2反应。ELISA测定McAb Mad-2的腹水效价为 10^{-7} Ig亚类鉴定为IgG-1。应用Mad-2和抗HSV型共同性McAb 1A12及抗HSV-2型特异性McAb CH-A9, 对43株临床HSV分离株做了ELISA及IF分型。结果表明, 28株口唇、眼部感染分离株和1株宫颈炎分离株均与1A12和Mad-2反应, 不与CH-A9反应, 为HSV-1。余14株宫颈炎分离株均与1A12和CH-A9反应, 而不与Mad-2反应, 为HSV-2。ELISA和IF分型的结果完全一致。本研究提出作者应用的一套抗HSV McAb有可能作为HSV型别鉴定的标准试剂。

单纯疱疹病毒(HSV)二个血型(HSV-1和HSV-2)间的鉴定, 有助于HSV感染的治疗、预后及流行病学研究^{[1][2][3]}。作者曾报道建立了抗HSV型共同性和抗HSV-2型特异性的淋巴细胞杂交瘤^{[4][6]}, 并对其特异性做了研究。为使单克隆抗体(McAb)能更可靠地用于HSV分型, 组成一套较完整的McAb分型试剂, 本文在以往工作的基础上进一步建立了产生抗HSV-1型特异性McAb的淋巴细胞杂交瘤细胞系。同时应用一组抗HSV型特异性和型共同性McAb, 对43株HSV临床分离株做了型别鉴定。

* 广州第一军医大学南方医院免疫室

** 西安医学院附属二院妇产科

本稿1985年12月5日收到

材料与方 法

1. 病毒

(1) HSV参考株 HSV-1 SM44及HSV-2 Sav株引自北京生物制品研究所和成都生物制品研究所。二株病毒均于BHK-21细胞上传代增毒, -40°C 保存。

(2) HSV分离株 用原代乳兔肾细胞分离出HSV43株, 其中宫颈炎分离出15株、口腔疱疹、唇疱疹及疱疹性角膜炎分离出28株。各毒株均经ELISA及中和试验鉴定证实为HSV, 冻干保存于 -40°C 。

2. 细胞与小鼠

BHK-21细胞和Balb/c小鼠骨髓瘤细胞系Sp2/O均引自军事医学科学院。Balb/c小鼠、雌性、二月龄, 由本室动物室提供。

3. 抗 HSV-1淋巴细胞杂交瘤的制备

以HSV-1 SM44株感染的BHK细胞 5×10^5 腹腔免疫 Balb/c小鼠3次, 每次间隔10天。按文献报道方法^{[3][4]}制备 HSV-1 感染细胞的膜蛋白抗原, 细胞融合前三天眼静脉注射膜蛋白抗原200 μg 加强免疫。细胞融合按本室常规方法进行。用改良ELISA^[8]同时筛选上清中抗HSV-1和抗HSV-2抗体。将仅与HSV-1反应的阳性孔 Mad-2用有限稀释法做2次克隆化, 扩大培养冻存, 并按常规制备免疫腹水。

4. 抗HSV-1 McAb的鉴定

(1) 特异性测定 分别用ELISA和间接免疫荧光(IF)试验测定抗HSV-1杂交瘤细胞系Mad-2培养上清及腹水与HSV-1和HSV-2参考株的反应性及抗体效价。

(2) 抗原吸收试验 取不同数量的HSV-1和HSV-2感染细胞分别与2倍稀释的杂交瘤细胞系Mad-2培养上清0.3ml混合, 37°C 水浴45分钟后离心, 吸取上清, ELISA测定与HSV-1参考株的反应性。

5. 抗HSV McAb对HSV临床分离株的型别鉴定:

以43株HSV临床分离株感染的BHK-21细胞制备抗原片及改良ELISA抗原板^[8]。分别用IF和改良ELISA测定各分离HSV毒株与抗HSV-1 McAb Mad-2、抗HSV-2 McAb CH-A9^[5]和抗HSV型共同性 McAb 1A12^[4]的反应性。

结 果

1. 抗HSV-1 杂交瘤细胞系Mad-2 的建立及鉴定

由16块96孔融合板筛选出阳性孔223个, 其中仅1孔(Mad-2)与HSV-1反应, 与HSV-2不反应, 余均与两型HSV反应。用有限稀释法将Mad-2做2次克隆化, 阳性克隆率达100%。

经ELISA及IF测定, 杂交瘤细胞系Mad-2培养上清及腹水均与HSV-1参考株反应, 但不与HSV-2参考株反应。ELISA测腹水效价为 10^{-7} 、IF为 10^{-4} 。取Mad-2浓缩培养上清与兔抗小鼠Ig亚类抗血清做免疫双扩散, 结果表明该McAb亚类为IgG₁。

抗原吸收试验表明, 逐渐增加吸收抗原用量, HSV-2感染的BHK细胞对McAb Mad-2无吸收作用, 而HSV-1感染细胞则逐渐将Mad-2完全吸收(图1)。

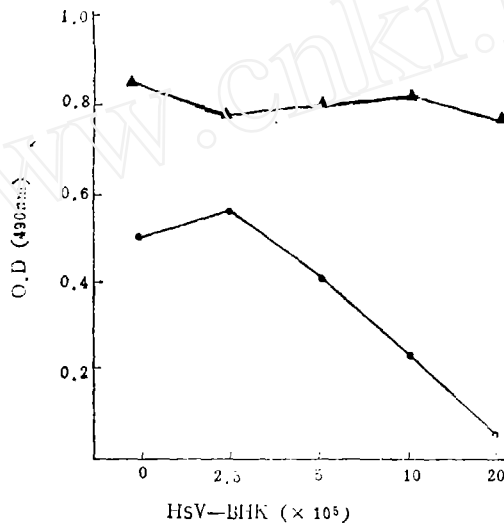


图1. McAb Mad-2 的抗原吸收试验
Fig 1. Antigen absorption of McAb Mad-2
▲—▲ HSV-2 吸收 absorbed by HSV-2
●—● HSV-1 吸收 absorbed by HSV-1

2. 抗HSV McAb对HSV临床分离株的分型

用改良ELISA和IF对HSV临床分离株的McAb分型结果表明, 43株HSV分离株均与1A12呈阳性反应。15株宫颈炎分离株中14株与CH-A9反应, 而不与Mad-2反应, 为HSV-2; 1株与Mad-2反应但不与CH-9A反应, 为HSV-1。28株头面部感染分离株均与Mad-2反应, 而不与CH-A9反应, 为HSV-1。改良ELISA和IF分型的结果完全一致(图2及表1)。

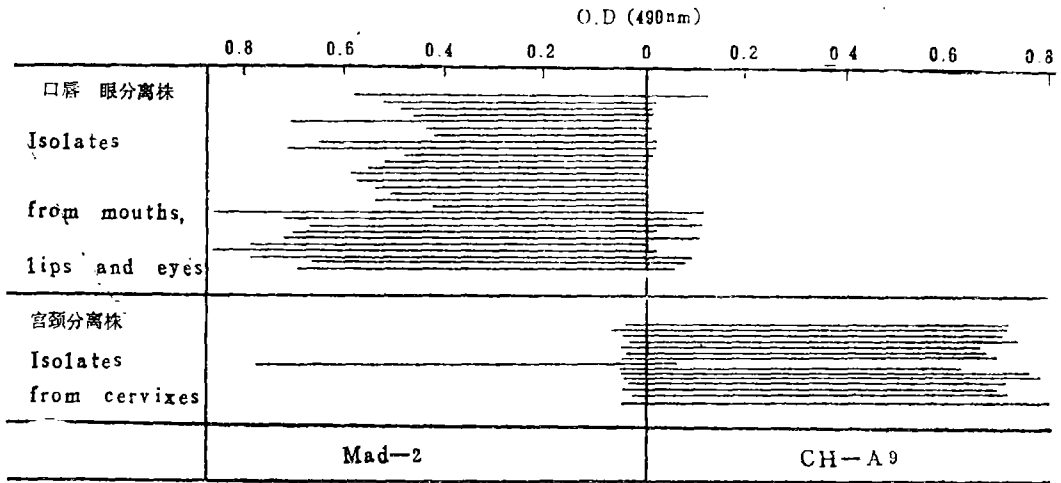


图 2. ELISA测定Mad-2和CH-A9与HSV分离株的反应性
Fig 2. Reactivity of Mad-2 and CH-A9 With HSV
isolates by ELISA

表 1 HSV分离株的McAb-IF分型
Table 1 McAb-IF typing of HSV isolates

	株数 No. of isolates	McAb-IF阳性数 Positive No. of McAb-IF			型 别 Type of HSV	
		1A12	Mad-2	CH-A9	HSV-1	HSV-2
口唇、眼部分离株 Isolates from mouths, lips and eyes	28	28	28	0	28	0
宫颈分离株 Isolates from cervixes	15	15	1	14	1	14

讨 论

HSV有HSV-1和HSV-2二个血清型。HSV-1多引起头面部器官感染和角膜炎，HSV-2多引起生殖器官感染。近来发现，这种二型HSV感染不同部位的特点并非特定^{[1][9]}。由于二型病毒间广泛的交叉反应，应用多价抗血清难以区别。其它分型方法因操作复杂也不易进行^{[10][11]}。运用McAb对HSV进行分型，是目前公认的一种准确而简便的分型方法。国内尚未见到应用McAb对HSV分型的报道。本文应用细胞融合技术，建立了一株产生抗HSV-1型特异性McAb的杂交瘤细胞系。该McAb(Mad-2)与作者曾报道的

抗HSV型共性 McAb 1A12和抗HSV-2型特异性McAb CH-A9共同组成了一套敏感、准确的HSV型别鉴定试剂。应用该组McAb对43株 HSV 临床分离株进行ELISA及IF分型,二种方法所得结果完全一致。43株分离株均可被分为HSV-1或HSV-2。从而认为,作者制备的这组抗HSV McAb,有可能做为 HSV 型别鉴定及其它生物学研究的标准试剂。

参 考 文 献

- (1) Reeves W. C. et al., 1981, *N. Engl. J. Med.* 305: 315.
- (2) Declercq E. et al., 1980, *J. Infect. Dis.* 141: 563.
- (3) Nahmias A. J. et al., 1976, *Viral Infections of Humans-Epidemiology and Control*, Ed. A. Evans, p. 253 *Palenum New York*.
- (4) 高谦等, 1985, 解放军医学杂志 10: 91.
- (5) 高谦等, 1985, 中华微生物和免疫学杂志(待发表)。
- (6) Svennerholm B., 1984, *J. Microbiol.* 13: 255.
- (7) Susuma H. et al., 1979, *Anal. Biochem.* 97: 116.
- (8) 高谦等, 1985, 上海免疫学杂志5: 333.
- (9) Fife K. H. et al., 1983, *J. Infect. Dis.* 148: 338.
- (10) Nahmias A. J. et al., 1968: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 1022.
- (11) Cheng Y-C et al. 1982. *J. Virol Methods*, 5: 209.

THE PRODUCTION OF AN ANTI-HSV-1 LYMPHOCYTE HYBRIDOMA CELL LINE AND TYPING OF HSV ISOLATES WITH MONOCLONAL ANTIBODIES

Gao Qian et al

(Dept. Microbiology, The Fourth Military Medical College, Xian)

A hybridoma cell line (Mad-2) was produced by fusing mouse myeloma cell line Sp2/O with the spleen cells immunized by HSV-1 SM44 strain infected BHK-21 cells and membrane protein antigen extracted from the HSV-1 infected cells. the positive clone Mad-2 secreating monoclonal antibody (McAb) against HSV-1 was selected by ELISA. the supernatant and ascites produced by Mad-2 all reacted with HSV-1, but not with HSV-2. the titer of McAb in ascites measured by ELISA was 10^{-7} and the subclass of the Mad-2 was IgG1.

Fourty-three HSV isolates were typed by ELISA and IF with the type-common McAb 1A12, anti-HSV-1 McAb Mad-2 and anti-HSV-2 McAb CH-A9. Twenty-eight HSV isolates from mouths, lips and eyes and one isolates from cervix all

reacted with 1A12 and Mad-2 and were typed HSV-1. Fourteen isolates from cervixes reacted with 1A12 and CH-A9 which were typed HSV-2. It was suggested from this study that the set of McAb against HSV act as some standard reagent in HSV typing.

中国科学院武汉病毒所 庆祝建所三十周年

THE 30TH ANNIVERSARY WUHAN INSTITUTE OF VIROLOGY ACADEMIA SINICA

一九八六年十月十四至十六日,中科院武汉病毒所举行了建所三十周年庆祝活动和学术报告会。参加十四日上午庆祝大会的,有中科院侯自强副秘书长,湖北省政府伍愉凝副秘书长,生物学部主任曹天钦教授,学部委员高尚荫、陈华癸教授,微生物及生物化学家简浩然教授,病毒学家向近敏、邓瑞麟教授,武汉分院原任现任党政领导谢文生、郑耀华、陈宏奚等各方面领导、国内外专家、有关院校和兄弟单位的代表及科技工作者400多人。美国北卡大学黄英里教授还专程赶来参加所庆活动并作了学术报告。

庆祝大会前,中科院院长卢嘉锡和湖北省顾委副主任李尔重同志,为所庆三十周年亲笔题词,中科院党组书记、副院长严东生同志发来了贺信。发来贺信的还有学部委员朱既明、裘维蕃、刘健康、蒲蜚龙等国内外著名专家和20多个单位。他们热烈祝贺武汉病毒所过去所取得的成就,祝愿今后作出更大贡献。

在庆祝大会上,首先由武汉病毒所所长丁达明报告了建所三十年来的发展概况,并表示今后一定要继往开来,立足改革,立足竞争,立足创新,努力把武汉病毒所办成开放流动的全国普遍病毒中心和保藏中心,做出高水平的工作,培养高水平的人才,为四化大业作出新贡献。为创建和发展病毒所奠基立业的原所长高尚荫教授,以《回顾和展望》为题,首先概述了该所从建立起国内第一个进行病毒学基础研究的专业机构以来,开辟了国内一些新领域,取得了出成果出人才的显著成绩,创办了《病毒学集刊》和《病毒学杂志》,加强了同国际著名学者间的频繁交往,已成为有能力培养硕士和博士研究生并有条件承担国家和地方有关科技任务的研究所,为国内外所瞩目。在展望未来时,他着重就现代病毒学的四个显著特点和某些研究动向,具体阐述了目前病毒学是一门非常活跃、大有可为的学科,并提出了今后办好病毒所的奋斗目标和希望。

接着,总院侯自强和省府伍愉凝副秘书长,学部曹天钦主任和分院陈宏奚院长,分别代表总院、省政府、学部和分院发表了热情洋溢、希望殷切的讲话,热情赞扬病毒所过去所取得的成绩和为全国、全省所作的贡献,勉励全所同志要再接再厉,锐意改革,积极进取,再立新功。曹天钦主任还就所里方向任务和战略目标发表了远见卓识的讲话,希望病毒所要勇攀高峰,力争跻身于国际先进水平之列。

十四日下午至十五日下午,除组织专题座谈外,还举办了学术报告会和文艺晚会,有关专家学者作了病毒学方面的专题报告,参观了成果展览,有的还挥笔题词作画,兴趣盎然。

这次所庆,给病毒所的同志带来了深厚的回忆,难忘的激情,莫大的鼓舞,无形的鞭策,大家正以新的精神面貌去迎接美好的未来。(孙正珂)