

产生抗登革热 I 型病毒单克隆抗体 杂交瘤细胞株的建立

刘乐和 李少冰 麦小萍 郭辉玉 蔡尚达

(中山医科大学, 广州)

提 要

用登革热 I 型病毒(夏威夷株)免疫的小白鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合, 获得7个产生抗登革热 I 型病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 这些杂交瘤细胞上清液及小鼠腹水抗体均用间接免疫荧光法检测, 其中3个杂交瘤细胞系产生的抗体对登革热 I 型病毒具有型特异性。

登革热是东南亚地区的重要传染病之一。我国在1978—1980年间曾连续发生登革热的暴发流行^[4]。为了提供登革热病毒型特异的诊断制剂, 解决登革热病原诊断中的抗原性交叉问题, 我们于1983年开展了登革热 II 型病毒单克隆抗体的研究^[3], 此后我们又开展了登革热 I 型病毒单克隆抗体的研究, 并建立了对登革热 I 型病毒具有型特异的单克隆抗体细胞株。

材 料 和 方 法

用于融合的骨髓瘤细胞为X₆₃-Ag8-653, 免疫脾细胞是用Balb/C小鼠, 以登革热 I 型病毒乳鼠脑悬液与福氏佐剂按 Dittmar 等采用的免疫程序^[1], 于末次免疫后3天, 取出鼠脾细胞供细胞融合用。杂交瘤细胞的产生, 取小鼠免疫细胞(10^8)与小鼠骨髓瘤细胞(10^7)在PEG作用下进行融合, 然后将细胞悬于含有HAT培养基中, 分别种于有“饲养”细胞的96孔培养板中, 置37℃含5%CO₂恒温箱培养, 于融合后第5、8、11天置换新鲜培养液, 当培养孔内的杂交瘤细胞集落生长到约占1/3底面积时, 吸取培养液, 用间接免疫荧光法^[1,2]检测抗体, 镜检阳性者, 用有限稀释法进行克隆。

结 果 与 讨 论

融合后, 在364孔中有254孔出现了融合细胞, 其中7孔抗体阳性, 融合率为70%,

本稿1986年2月21日收到

阳性率为 3%，经反复克隆化后，获得了分泌抗登革热 I 型病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系，命名为 C₄、F₅、F₁、B₄、A₂、H₇、D₆。它们具有双亲代的生物学性质，已稳定地传代 5 个月。将杂交瘤细胞产生的小鼠腹水抗体用间接免疫荧光法进行了登革热病毒的类型间的交叉滴定。结果见表 1。

表 1 抗登革热 I 型病毒杂交瘤腹水的免疫荧光滴定
Table 1 Immunofluorescence assay of hybridoma cells induced ascitic fluids against type 1 dengue virus

杂交瘤细胞系	Den-1	Den-2	Den-3	Den-4
C ₄	1:2560	<10	<10	<10
F ₅	1:320	<10	<10	<10
F ₁	1:20	<10	<10	<10
A ₂	1:640	<10	1:20	<10
B ₄	1:640	<10	1:320	<10
H ₇	1:10240	<10	1:320	<10
D ₆	1:10240	1:320	1:320	<10

7 株杂交瘤细胞产生的单克隆抗体与四型登革热病毒交叉血凝抑制试验及与登革热 I 型病毒抗原作补体结合试验均为阴性。表明 7 株细胞产生的单克隆抗体均无血凝抑制特性及补体结合特性。

染色体分析结果表明 7 株细胞系染色体数介于 68~76 之间 (X63-Ag8-653 细胞染色体平均数为 58, 正常小鼠脾细胞的染色体平均数为 40)。

7 株杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体经聚乙二醇 (分子量 6000) 浓缩 10 倍后分别与上海生物制品研究所生产的冻干羊抗鼠 IgG 亚类血清作琼脂免疫双扩散试验, C₄、F₅、A₂ 株为 IgG₁, H₇、B₄、D₆ 为 IgG_{2a}, F₁ 为 IgG_{2b}。

我们获得 7 株细胞中, 其中 3 株 (C₄、F₅、F₁) 用交叉免疫荧光试验结果表明具有型特异性。能用于准确地定型。解决了在登革热病毒的鉴定分型工作中出现的交叉反应这一问题, 同时对登革热实验室的快速诊断提供了新的手段, 此外对流行病学调查、病毒抗原结构分析, 抗原的纯化等都有实用意义。

近年来广州地区仍有登革热流行发生, 1985 年从病人分出的毒株经广东省防疫站及广州市医药卫生研究所鉴定均属 I 型登革热病毒^[5]。我们用上述杂交瘤细胞株 (C₄) 所制备的单克隆抗体作间接免疫荧光法检查亦证实为 I 型^[6]。表明该株具有严格的 I 型病毒特异性的单克隆抗体 (C₄), 可适用于今后制备试剂盒供登革热病毒快速定型, 对登革热病毒的诊断有实用意义。

参 考 文 献

- [1] Dittmar D, Haines H, G, and Castro A., 1980, *J. Clin. Microbiol.* 12:70-78.
[2] Hemchal E, A, et al., 1982, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31(4):330~336.
[3] 刘乐和、罗瑞仙等, 1983, *免疫学快报* 3(6):35.
[4] 周国珍等, 1983, *解放军医学杂志* 3(2):81.
[5] 黄满涛、罗瑞仙等, 1985, 个人通讯。
[6] 罗瑞仙、黄满涛、刘乐和等, 1985, 未发表资料。

PRODUCTION OF HYBRIDOMA CELL LINES SECRETING MONOCLONAL ANTIBODIES TO DENGUE VIRUS TYPE I

Liu Lo-he Li Shao-bing Mai Xiao-ping
Guo Hui-yu Cai Shang-da

(*Zhongshan Medical University, Guangzhou*)

Mouse lymphocyte hybridomas were prepared by polyethylene glycol-mediated fusion of cells from a mouse plasmacytoma line (X63-Ag8-653) with lymphocytes from Balb/c mice hyperimmunized with dengue virus type I (Hawaii). Seven mouse lymphocyte hybridoma clones (C4, F5, F1, A2, B4, H7, D6) which can steadily produce antibodies against dengue-1 antigen were established after selecting and cloning for at least 3 times and have been kept in the laboratory for more than 5 months. Cross-immunofluorescent staining tests using C6/36 cells infected with four dengue virus serotypes as antigens reacting with mouse ascitic fluids obtained by these hybridomas were performed. Among the seven clones three (C4, F5, F1) were found to be secreting McAbs specific for dengue-1 virus, three (A2, B4, H7) gave McAbs cross-reacting with type 3 virus, while one (D6) secreted McAbs cross-reacting with type-2 and type-3 viruses. None of these 7 McAbs reacts with dengue type-4 virus. No hemagglutination inhibiting and complement-fixing activities were revealed for these 7 McAbs, even by repeated control tests with standard hemagglutination antigens prepared from the 4 types of dengue virus. Double immunodiffusion test using standard rabbit anti-mouse

IgG subclass antibodies were performed to identify immunoglobulin G subclass of the McAbs. The results showed that the three clones (C4, F5, A2) belonged to IgG-secreting lines, three clones (H7, B4, D6) identified as IgG2a, one clone (F1) as IgG2b. The karyotype analysis of the 7 clones were shown to vary from 68 to 76.

www.cnki.net