

抗甲型肝炎病毒单克隆抗体 (抗-HAV McAb) 的研究

李成明 殷大常 王宏禧 刘丽华
陈丹林 曾义学 毕晓 陈立礼

(四川省卫生防疫站病毒性疾病控制科, 成都)

摘 要

应用细胞融合技术成功地建立了3株持续高效分泌抗-HAV McAb的杂交瘤细胞株(AG₃, AD₂和AE₈株), 所得腹水中的抗-HAV滴度达1:128000~1:1024000。这3株McAb都能与粪便提取HAV和细胞培养HAV反应, 且这种反应均能被甲肝病人恢复期血清阻断。这些McAb作用于HAV的不同抗原位点, 其中AE₈ McAb具有中和HAV感染性的能性。

这些McAb作包被抗体检测HAV时, 所测的HAV滴度较人抗体作包被时测得的滴度高2~8倍。将AE₈ McAb标记酶后, 用以检测Abbott药盒标化的50份甲肝IgM血清, 49份结果一致, 符合率98%。

甲型肝炎是严重危害我国人民健康的疾病。多年来, 由于诊断试剂来源困难, 严重影响了该病的早期诊断和防治。近来, 国内采用Köhler⁽¹⁾建立的杂交瘤细胞技术来生产抗-HAV McAb, 获得了一些进展, 已有二篇研制成功的报告⁽²⁾⁽³⁾。但由于所获得的四株McAb滴度较低或缺乏对细胞培养HAV的反应性, 故尚无实际应用报告。

为了更好地进行甲肝病原学研究, 建立高水平的甲肝诊断试剂, 有必要研制反应谱广, 效价高的抗-HAV McAb。为此, 我们开展了该项目研究, 并成功地获得3株较理想的抗-HAV McAb。

材料与方 法

免疫抗原——称取10克甲肝病毒(HAV)阳性粪便, 按文献⁽⁴⁾方法粗提后, 再经Sephadex 4B柱层析纯化。纯化后HAV滴度为1:64(ELISA)。

动物免疫——取纯化HAV材料0.5 ml与等量福氏完全佐剂混合乳化后, 按0.25 ml/只注射到6周龄Balb/C鼠腹腔内, 30天后用无佐剂的纯化HAV同途径加强免疫一针, 65天时用0.15 ml纯化HAV尾静脉攻击, 3天后取脾细胞进行融合杂交。

鼠骨髓瘤细胞——SP2/0细胞。

细胞融合杂交与培养——按文献^[5]进行。

抗体阳性细胞的筛选——采用 μ 链捕获ELISA法。即 μ 链抗体包被后加入甲肝IgM抗体阳性或阴性血清，作用后加入HAV，随后加细胞培养上清和抗鼠Ig酶结合物，每个杂交瘤细胞孔的培养上清同时加到甲肝IgM阳性血清孔和阴性血清孔中。凡该上清在阳性血清孔呈阳性反应，在阴性孔为阴性反应时，判为抗-HAV McAb 阳性，反之或二孔均阳性则判为非特异性。随后按常规法将这些 McAb阳性孔的杂交瘤细胞克隆扩大和生产腹水。

McAb滴度测定——采用抗体夹心ELISA法。

McAb 的特异性测定——采用间接免疫荧光法(IF)和常规阻断ELISA法。

McAb 的免疫球蛋白类别鉴定——免疫扩散法。抗鼠免疫球蛋白亚类标准血清为上海生物制品研究所产品。

McAb 的提取与酶标记——采用聚乙二醇沉淀和DEAE柱洗脱法提取 McAb。提取后的 McAb放-20℃，供包被和标酶用。酶结合物制备按文献^[6]法进行。

结 果

一、杂交瘤细胞的生产与筛选：二次融合杂交试验共初筛出10株分泌抗-HAV McAb的杂交瘤细胞，将其连续传代和克隆后，仍有3株细胞保持了稳定分泌 McAb 的功能(表1)

表1 细胞融合与杂交瘤细胞筛选结果
Table 1 Results of cell fusion and screening hybridomas

试验批号	试验孔数	杂交瘤细胞生长孔数 (融合率)	初筛抗-HAV McAb 阳性孔数	稳定分泌 抗-HAV McAb 的株数与序号
1	485	246(50.7%)	4	1 (AG ₃)
2	545	184(33.7%)	6	2 (AD ₂ , AE ₃)
合计	1030	430(41.7%)	10	3

表2 3株抗-HAV McAb 的滴度(ELISA法)
Table 2 Anti-HAV titer of three McAbs by ELISA.

McAb 来源	McAb		
	AG ₃	AD ₂	AE ₃
上 克隆前	1:256	1:128	1:512
清 克隆后	1:1624	1:512	1:4096
腹 克隆前	ND	1:16000	1:256000
水 克隆后	1:128000	1:128000	1:1624000

ND—未测定。

二、McAb的滴度：抗体夹心 ELISA 法测定结果表明，无论培养上清或腹水，3株杂交瘤细胞克隆后的抗-HAV 滴度都较克隆前数倍增高。克隆后3株细胞生产的腹水抗-HAV滴度达1:100000以上，其中AE₈达1:1024000（表2）。

三、McAb 的免疫球蛋白属类：AG₃和AD₂ McAb 属小鼠 IgG₁，AE₈ McAb 为小鼠 IgM。

四、McAb 对不同 HAV 材料的反应性：应用抗体夹心 ELISA 法检测3株 McAb对来自不同地区的粪便提取 HAV 的反应性，结果显示它们均能与各地的 HAV 毒株发生反应。用 ELSA 和 IF 法检测细胞培养 HAV，证实这样 McAb 与细胞 HAV 也有良好的特异性反应（表3）。McAb 检测细胞内 HAV 时，其荧光表现与人恢复期血清的检查结果完全一致，颗粒荧光聚集在核周围的胞浆内（图1，2）。

表3 应用 ELISA 和 IF 法检测 3 株 McAb 对粪便和细胞培养来源 HAV 的反应性
Table 3 Detection of reactivity of three anti-HAV McAbs with HAV from stools and cell culture by ELISA and IF.

HAV 来源	抗-HAV McAb			抗-HBs McAb	
	AG ₃	AD ₂	AE ₈	2D ₆	
粪 便 来 源	川—HAV ₁	+	+	+	—
	川—HAV ₂	+	+	+	—
	辽宁—HAV	+	+	+	—
	江苏—HAV	+	+	+	—
	河北—HAV	+	+	+	—
	正常人粪便 ₁	—	—	—	—
正常人粪便 ₂	—	—	—	—	
细 胞 悬 液	S ₈₄ —HAV	+	+	+	—
	S ₈₅ —HAV	+	+	+	—
	S ₈₆ —HAV	+	+	+	—
	正常细胞	—	—	—	—
细 胞 盖 片	S ₈₄ —HAV	+	+	+	—
	S ₈₅ —HAV	+	+	+	—
	正常细胞	—	—	—	—
	HBsAg 阳性血	—	—	—	+

• —IF法检测，其余为ELISA法检测。

五、阻断 McAb 活性试验：用甲肝病人恢复期血清进行 ELISA 阻断试验，结果所有3株 McAb 的活性均能被特异性阻断。3株 McAb 交叉阻断试验中，这些 McAb 的活性均能被自身所阻断，AG₃和AD₂ McAb 能互相阻断，但不能阻断AE₈ McAb 的活性。反之，AE₈ McAb 却能阻断它们的活性（表4）。这种单向交叉阻断作用表明这些 McAb 是作用于 HAV 的不同抗原决定簇上。

六、McAb 的中和活性试验：将3株 McAb 腹水稀释除菌后，与等量不同稀释度的 S₈₄-HAV 混合，室温作用2小时后接种到成片2BS细胞上，按常规法培养和检查。结

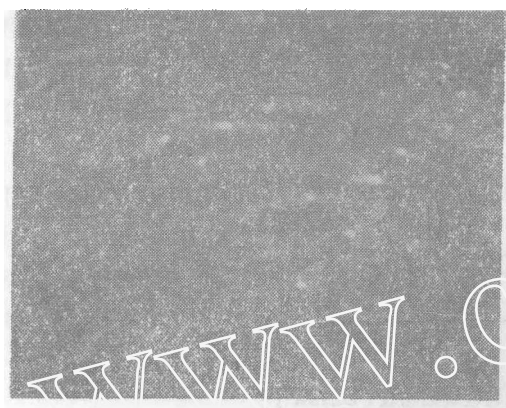


图1 用AG₃ McAb 检测感染2BS细胞内的 HAV (免疫荧光法)

Fig 1 Detecting HAV in infected 2BS cell by AG₃ McAb (IF)

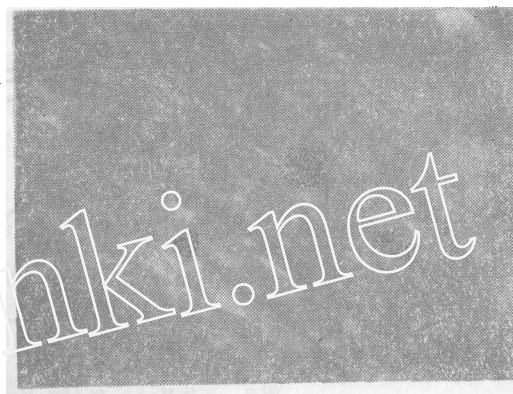


图2 用人抗-HAV血清检测感染2BS细胞内的 HAV (免疫荧光法)

Fig 2 Detecting HAV in infected 2BS cell by human anti-HAV serum (IF)

表4 McAb 活性阻断试验 (ELISA)

Table 4 Blocking test of the activity of McAbs to HAV by ELISA

阻断试剂	受阻断的 McAb *			
	AG ₃	AD ₂	AE ₈	
甲肝恢复期 血清	1 : 10	+	+	+
	1 : 250	+	+	+
AD ₂ McAb		+	+	-
AG ₃ McAb		+	+	-
AE ₈ McAb		+	+	+
正常人 血清	1 : 10	-	-	-
	1 : 250	-	-	-
抗-HBs McAb		-	-	-

*该栏内McAb均标记了过氧化物酶。

果 AG₃ 和 AD₂ McAb 培养管内仍有 HAV 生长, 而 AE₈ McAb 管则无 HAV, 表明仅 AE₈ McAb 具有中和 HAV 感染性的能力。

七、McAb 的实用性: 将 3 株 McAb 腹水与高滴度甲肝恢复期血清 (1 : 2560, IAHA 法) 平行提纯后, 引入到检测 HAV 的抗体夹心 ELISA 法^[3]中, 比较它们用作包被抗体的效果。结果表明 3 株 McAb 的包被效果均优于人甲肝抗体, 以 AG₃ McAb 的效果最好。这 3 株 McAb 不仅使用稀释度高, 而且所测定的 HAV 滴度也比人抗体测定的滴度高 2 ~ 8 倍 (图 3)。

将滴度最高的 AE₈ McAb 提纯标酶后, 用做本室常规甲肝诊断试剂, 与人抗体酶结合物平行测定数百份甲肝血清, 结果基本一致 (符合率 96%)。虽然 McAb 酶结合物检测孔的颜色稍浅于人抗体酶结合物孔, 但前者的本底更低, 不受类风湿因子影响, 故特异性好。用 McAb 酶结合物生产的甲肝 IgM 抗体诊断药盒检测 50 份 Abbott-ELISA 药盒标

化的甲肝 IgM 抗体阴、阳性血清, 49 份结果一致, 符合率达 98% (表 5)。

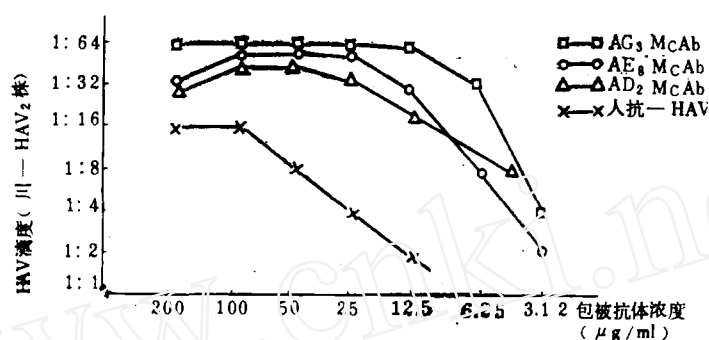


图3 三株McAb 与人抗-HAV 的包被效果比较 (ELISA)。

Fig 3 Comparison of coating effect of 3 anti-HAV McAbs and human anti-HAV serum by ELISA

表5 McAb药盒与Abbot 药盒检测50份血清抗-HAV IgM的结果比较

Table 5 Comparisons of McAb kit and Abbott kit for detecting anti-HAV IgM in 50 sera by ELISA

		McAb 药盒		合 计
		+	-	
Abbot	+	37	1	38
药盒	-	0	12	12
合 计		37	13	50

讨 论

用 HAV 免疫 Balb/c 鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 获得 3 株能持续高效分泌抗-HAV McAb 的杂交瘤细胞。它们所分泌的抗-HAV McAb 滴度高达 1:128000 ~ 1:1024000 (腹水)。该滴度不仅远远高于人血清抗-HAV 的滴度, 而且也较国内目前报告的 4 株抗-HAV McAb 滴度高 10~40 倍。实验表明这 3 株 McAb 能与细胞培养和粪便中提取的 HAV 发生反应, 而且这种反应均能被甲肝恢复期血清阻断, 证明它们具有抗 HAV 的特异性。

交叉阻断试验结果表明, 3 株抗-HAV McAb 在 HAV 上的作用部位不同。AE₈ McAb 能阻断其它 2 株 McAb 的抗体活性, 而自己的抗体活性却不被它们阻断, 表明 HAV 颗粒上至少有二种以上的抗原决定簇。细胞中和试验说明 AE₈ McAb 是针对 HAV 的主要抗原决定簇的。

这 3 株 McAb 在检测 HAV 和抗-HAV IgM 的试验中, 特异性和敏感性都较理想, 完全可以取代人甲肝抗体血清。众所周知, 甲肝免疫血清的制备极其困难, 目前国内甲肝诊断试剂中的甲肝抗体均来源于病人恢复期血清, 但高滴度的恢复期血清的获得也较

困难。因此,这3株既对粪便 HAV、也对细胞培养 HAV 发生反应的高滴度抗-HAV McAb 的获得是十分重要的,它们不仅可满足国内大规模生产甲肝诊断试剂的需要,而且也可提高诊断试剂的水平,促进甲肝病原学研究的进展。

据文献^[9]报道, HAV 毒株间存在抗原性差异,我们用所得3株抗-HAV McAb检查几株不同地区的 HAV 时,尚未发现这种现象。实验中首次引入 IgM 抗体捕获 ELISA 法来筛选抗-HAV McAb,获得满意结果,从而避免了用双抗体夹心ELISA法筛选时遇到的大量假阳性反应(资料未列出)。这一经验可供其它难以获得动物免疫血清的病毒 McAb 生产时借鉴。

参 考 文 献

- [1] Kohler G et al., 1975, *Nature* 258: 459
- [2] 孟强骅等, 1986, 中华传染病学杂志 4(1):5
- [3] 王凤来等, 1985, 病毒学报 1(1):80
- [4] 孙亚洲等, 1979, 中华医学杂志 59:193
- [5] 李成明等, 1986, 预防医学情报 2(4):214
- [6] Wilson MB et al., 1978, 《*Immunofluorescence and related staining techniques*》P 215
- [7] 尹卫东等, 1986, 病毒学报 2(3):209
- [8] 李成明等, 1982, 中华微生物学和免疫学杂志 2(6):390
- [9] Znkerman A J., 1980, *J.Virol. Meth* 2(7):1

Studies on Monoclonal Antibodies to Hepatitis A Virus

Li Cheng-ming Chen Li-li Ying Da-chang Wang Hong-xi Lu Li-hua
Chen Dan-lin Zheng Yi-xue Bi Xiao

(Department of Viral Disease Control, Health and Antiepidemic Centre of Sichuan Province, Chengdu)

Three strain hybridomas (AG3, AD2, AE8) were developed by cell fusion technique. They secreted stably McAbs against HAV with the titer of 1:128000—1:1024000 in ascites fluid by ELISA. All of these McAbs are of positive reaction on HAV derived from patient's stools and cell culture, and this reaction can be inhibited by human anti HAV positive sera. The results of cell neutralization test and cross-blocking ELISA show that AE8 McAb is able to neutralize HAV infectivity, and that these McAbs recognize different epitopes of HAV.

Compared with human anti-HAV, these anti-HAV McAbs, as coating antibody in ELISA, have higher detective ability. The titer of the HAV samples is 2—8 times higher than those of human anti-HAV. Using AE8 McAb-HRP and Abbott EIA kit to detect anti-HAV IgM in human sera, 49 out of 50 specimens are identical. The coincident rate is 98%.