维普资讯 http://www.cqvip.com

安徽省流行性出血热病毒杂交瘤单克隆抗体的研制与应用

余荣汉　谭福莱　沈宏开　苏　溪　姚益新
倪大石　廖德福

（安徽省医学科学研究所病毒室，合肥）

提　要

用流行性出血热病毒（EHFV）李株和陈株血凝素（HAN）分别免疫Balb/C小鼠，取其脾细胞和骨髓瘤细胞SP2/O融合，杂交瘤生长孔率为97.5%和60%，阳性率各为2.5%和22%，克隆化培养阳性率达到100%。通过筛选得2株杂交瘤细胞，一株为$2B_7$，另一株为$1H_8$。其腹水单克隆抗体（McAb）滴度均达1：16×10^4—32×10^4。$1H_8$的血凝抑制滴度达1：5120。经染色体核型分析，杂交细胞染色体$2B_7$为80—97条，$1H_8$为85—105条，每个细胞均含一条中着丝点标记染色体。McAb的Ig类别和IgG亚类检测结果$2B_7$为IgM，$1H_8$为IgG_{2b}。两者对19株不同来源的EHFV具有不同的反应，$1H_8$McAb与19株都具有不同程度的免疫荧光反应，滴度都较高，且对5株不同来源的EHFV-HAN具有血凝抑制活性，滴度在1：1280—5120，故$1H_8$为血凝抑制抗体；$2B_7$只对12株EHFV起反应，对7株不起反应，且没有血凝抑制活性。这说明$1H_8$与$2B_7$具有不同的特性。

关键词：流行性出血热病毒，单克隆抗体；血凝素，血凝抑制试验

近几年来，国内外学者已先后建立了多株EHFV-McAb杂交瘤细胞[1-4]，并开始用于实验研究、临床诊断和流行病调查。为了探索EHFV-McAb和HAN-McAb的性质，我们用淋巴细胞杂交瘤技术[5]开展了此项研究，得到了两株McAb，并做了鉴定与应用研究。现将结果报告如下。

材料与方法

一、细胞　1．骨髓瘤细胞：SP2/O-Ag14，用含20%胎牛血清（FCS）的RPMI-1640培养液培养。曾经8-氮杂鸟嘌呤（8-Azaguanine）处理过。

2.饲养细胞：融合试验采用正常Balb/C小鼠腹腔巨噬细胞，克隆化时用脾细胞。

二、病毒和HAN：EHFV李株[6]和陈株[7]用于感染Vero-E_6细胞，做抗原片。并用陈株感染乳鼠，待其发病后于濒死状态下解剖取脑，冷冻切片，经间接荧光抗体技术（IFAT）检查为阳性（＋＋＋）者，按蔗糖-丙酮法制备HAN[8]。

本文于1987年8月3日收到。

第四军医大学高谦和汪力亚同志做了McAb的Ig类别和IgG亚类鉴定，汪美先教授对原文作了修改；本室姚征兵同志参加了部分技术工作，余元勋同志参加了本课题筹备工作，在此一并致谢。

维普资讯 http://www.cqvip.com

三、动物和免疫：选用8周龄 Balb/C 雌性小鼠。李株和陈株 HAN 都由皮下、腹腔免疫两次，每次0.2ml。间隔4周后，再以 IFAT 检测抗体滴度，于融合前3天由静脉加强免疫，每鼠0.1ml。融合时取2只 Balb/C 小鼠的免疫脾细胞混合应用。

四、细胞融合和筛选：用悬浮融合法[9]，取对数生长期的 SP2/O 细胞与免疫脾细胞按1：10混合均匀，在内含5%DMSO[10]的50%PEG（MW＝4000）作用下进行融合，再将细胞悬液分配在96孔培养板中，以含HAT和20%FCS的RPMI-1640培养液进行选择培养。

五、克隆化和腹水制备：用有限稀释法[9]进行克隆化，直到抗体阳性率达100%为止。并按常规制备腹水。

六、血凝抑制试验（HIT）[11]：在微量血凝板上加入经丙酮处理过1：10稀释的腹水 McAb 25μl，用含2%卵清蛋白的硼酸盐水（pH9.0）行2倍递增稀释，加 HAN25μl（8个单位），振匀后置37℃孵育0.5小时，再加最适 pH（5.75）的0.4%鸡血球悬液50μl，于37℃孵育2小时，观察结果。

七、染色体分析和抗体类别检测：将杂交瘤细胞培养48小时，加秋水仙素到最终浓度为0.02μg/ml，再培养4小时，然后进行低渗处理、固定、涂片，用 Giemsa 染液染色镜检。

收集杂交瘤细胞的无血清培养液，用 PEG6000 浓缩20倍，用羊抗 Balb/C 鼠 IgM和 IgG亚类抗血清进行琼脂双扩散试验。

结　果

一、病毒及 HAN 免疫小鼠的结果：用 IFAT 法测定 EHFV 李株全程免疫小鼠后的血清抗体滴度为1：512—1024，陈株 HAN 前两次免疫小鼠后血清抗体滴度为1：160—320，取两只抗体滴度高的小鼠静脉加强免疫后，融合前血清的抗体滴度达1：1280。可见 EHFV-HAN 与 EHFV 一样具有较强的免疫原性。

二、细胞融合和筛选：细胞融合后置37℃、7%CO_2孵箱中培养，第4天可见生长的杂交瘤细胞，第10天可数杂交瘤细胞生长孔，结果李株病毒免疫的杂交瘤生长孔率为97.5%，而陈株 HAN 免疫的为60%，经筛选后得抗体阳性率为2.5%和22%。经扩大培养和克隆化后得2株阳性杂交瘤细胞株，前者称为$2B_7$，后者为$1H_8$。

三、克隆化培养及特异抗体滴度测定：2株杂交瘤细胞都进行了克隆化培养，并制备了小鼠腹水。最后克隆化阳性率达100%，其腹水 McAb 用本株抗原片检测免疫荧光滴度均在1：16×10^4—32×10^4，结果见表1。

表1　两株杂交瘤细胞克隆化培养及抗体滴度测定结果

Table 1. The results of cloning of two hybridoma cells and detection of antibodies titers

克隆化次数	阳性孔率（%）		特异抗体滴度（倒数）			
			细胞培养上清液		小鼠腹水	
	$2B_7$	$1H_8$	$2B_7$	$1H_8$	$2B_7$	$1H_8$
1	100(16/16)	27(18/66)	40—320	—	12×10^4—24×10^4	—
2	100(53/53)	100(68/68)	80—320	320—640	16×10^4—32×10^4	8×10^4—16×10^4
3	—	100(63/63)	—	640	—	16×10^4—32×10^4

维普资讯 http://www.cqvip.com

克隆化后的杂交瘤细胞在培养瓶中连续传代3个月和冻存6个月复苏后仍能稳定分泌特异性McAb。

四、两株McAb的HIT结果：$1H_8$对其HAN具有较高的血凝抑制滴度。而$2B_7$却没有血凝抑制活性，结果见表2。

表2 两株EHFV—McAb的HIT滴度

Table 2 The titers of two anti-EHFV McAbs by HIT

克隆化次数	血凝抑制滴度（倒数）			
	细胞培养上清液		小鼠腹水	
	$2B_7$	$1H_8$	$2B_7$	$1H_8$
1	<2	—	<2	—
2	<2	8—16	<2	640—1280
3	—	16—20	—	1024—5120

此外，$2B_7$对EHFV 76—118株、陈株和H_{8205}株的HAN都无血凝抑制作用；而$1H_8$对其他5株不同来源的EHFV-HAN却有血凝抑制活性，其滴度为1：1280-5120，见表3。

表3 $1H_8$对EHFV不同毒株HAN的HIT滴度

Table 3 The titers of $1H_8$ McAb to different strain HAN of EHFV by HIT

HAN	毒株来源		血凝抑制滴度（倒数）
A_{537}	福建	黑线姬鼠	2560
A_{16}	陕西	黑线姬鼠	1280
R_{178}	福建	褐家鼠	5120
R_{03}	广东	褐家鼠	1280
CSF_1	陕西	患者脑脊液	2560

从以上结果可见：$1H_8$ McAb具有较广泛的血凝抑制活性。

五、杂交瘤细胞染色体核型分析：我们将杂交瘤细胞$2B_7$与$1H_8$进行了核型分析，各自都检查了50个细胞。$2B_7$的染色体平均为88条，$1H_8$平均为91条。细胞内绝大多数为端着丝点染色体，每个细胞至少有一条中着丝点标记染色体。

由此证明：$2B_7$与$1H_8$确为Balb/C小鼠脾细胞与SP2/O骨髓瘤细胞的杂交细胞。

六、两株McAb的Ig类别及IgG亚类鉴定：用羊抗小鼠IgM和IgG亚类的抗血清进行琼脂双扩散证明$2B_7$ McAb属于IgM，而$1H_8$属于IgG_{2b}。

七、两株McAb对EHFV不同毒株的应用研究：两株McAb对本株抗原都具有最高的免疫荧光反应滴度，而它们对其他18株不同来源的EHFV抗原都具有不同的反应滴度，其结果见表4。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 4 两种 McAb 对 EHFV 不同毒株的滴度

Table 4 The titers of two McAbs to different strains of EHFV by IFAT

毒株	来源		McAb 的 IFAT 滴度（倒数）	
			$2B_7$	$1H_8$
许株	安徽	患者血液	12×10^4	16×10^4
李株	安徽	患者血液	16×10^4	16×10^4
H_3	湖北	患者血液	4×10	2×10^4
H_{14}	陕西	患者血液	4×10	1×10^3
H_{8205}	黑龙江	患者血液	<10	1×10^3
H_{8278}	吉林	患者血液	<10	1×10^3
B_5	浙江	患者血液	4×10	5×10^2
B_9	安徽	患者血液	4×10	5×10^2
A_6	江苏	黑线姬鼠	4×10	8×10^4
A_{96}	安徽	黑线姬鼠	32×10	2×10^4
76—118	南朝鲜	黑线姬鼠	4×10^4	2×10^4
A_{1018}	湖北	黑线姬鼠	<10	1×10^3
A_5	江苏	黑线姬鼠	4×10	5×10^2
R_{35}	云南	褐家鼠	<10	8×10^4
R_2	安徽	褐家鼠	<10	1×10^4
R_{22}	河南	褐家鼠	<10	1×10^4
R_{25}	山东	褐家鼠	<10	5×10^2
R_{27}	河南	褐家鼠	8×10	5×10^2
C_{10}	安徽	猫	4×10	4×10

讨 论

从两个 EHFV-McAb 的IFAT滴度看，小鼠腹水滴度为细胞培养上清液滴度的250—500 倍；而它们的 HIT 滴度则不同，$1H_8$的小鼠腹水McAb为细胞培养上清液的 256 倍，所以为 EHFV-HAN 抗体，即血凝抑制抗体。但 $2B_7$ 却不抑制血凝试验，为非血凝抑制抗体。

$1H_8$ 对 19 株不同来源的 EHFV 抗原都有不同程度的免疫荧光反应，滴度都较高，而$2B_7$却只有12株能起反应，并且滴度低得多，另有 7 株和它不起反应。前者提示在 19 株病毒中都具有血凝抑制抗体 $1H_8$ 相对应的共同抗原决定簇，而后者却不然，在 19 株中只有 12 株具 $2B_7$ 相对应的抗原决定簇，其余 7 株病毒不具备或不外露该抗原决定簇。

根据倪大石[12]、夏东翔[11]的实验结果及 $1H_8$ McAb 与 5 株不同来源的 EHFV-HAN 的HIT来看，认为 HAN 是所有 EHFV 的主要结构蛋白之一，是该类病毒的共同抗原，具有较强的免疫原性。至于反应滴度高低的差别，可能与不同毒株的 HAN 含量不一有关。

$1H_8$McAb 的研制成功对 EHFV-HAN 的进一步纯化和结构与功能的研究提供了有利条件。当然 EHFV 不同毒株间 HAN 抗原性及其抗原决定簇的差异，有待进一步研

维普资讯 http://www.cqvip.com

究。

参 考 文 献

〔1〕 陈伯权等，1989，中华微生物学和免疫学杂志 3(6)：368。
〔2〕 安献禄等，1984，解放军医学杂志 9(4)：241。
〔3〕 Franko,WC.et al.,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.80：4140。
〔4〕 Yamanisbi,K.et al.,1984,J.Virol.52(1)：23[illegible]。
〔5〕 Köhler,G.and Milstein,C.,1975,*Nature* 256：495。
〔6〕 倪大石等，1983，全国流行性出血热防治工作座谈会资料汇编（合肥） P.68。
〔7〕 倪大石等，1983，中华医学杂志 63：65。
〔8〕 陈伯权等，1978，流行病防治研究 2：114。
〔9〕 Misbell,B.B.and Shiigi,S.M.,1979,In *Selected Methods in Cellular Immunology*,W.H.Freeman Pub.San Francisco P.1。
〔10〕 Fazekas,S.et al.,1980,*J.Immunol.Methods* 35：1。
〔11〕 夏亦翔等，1986，病毒学杂志 1(3)：37。
〔12〕 倪大石等，1986，中华医学会病毒学会第一届学术会议论文汇编（天津） P.33。

Preparation and Application of the Monoclonal Hybridoma Antibodies against the Epidemic Hemorrhagic Fever Virus (EHFV) in Anhui Province

Yu Rong-han Tan Fu-lai et al.

(*Division of Virology, Anhui Institute of Medical Sciences, Hefei*)

Two monoclonal antibodies (McAb) were obtained by fusion of SP2/0 myeloma cells with spleen cells from Balb/c mice. They were respectively immunized with the Li strain and the hemagglutinin (HAN) from the Chen strain of EHFV. Two fusions had been done. The growth rate of hybridoma was 97.5% and 60%. The positive rate was 2.5% and 22%. The positive rate of cloning all achieved 100%. Finally two hybridoma cell lines had been established. They were separately designated as $2B_7$ and $1H_8$. The titers of two ascites McAbs were up to $1:16\times10^4$—32×10^4 by indirect fluorescent anti-

维普资讯 http://www.cqvip.com

body technic (IFAT) . The titers of $1H_8$ ascites McAb were up to 1 : 5120 by hemagglutination inhibition test (HIT) . The karyotypes of hybridoma cells indicate that $2B_7$ has 80 to 97 chromosomes, $1H_8$ has 85 to 105 ones, among which one or two metacentric chromosomes from the SP2/O cells could be seen. Furthermore, according to double diffusion test of agar $2B_7$ McAb was identified as mouse IgM and $1H_8$ was IgG2b subclass. In addition, it was found that $1H_8$ McAb had indirect immunofluorescent reaction with 19 different source strains of EHFV, and had activity of HIT against 5 strains HAN. $1H_8$ is the inhibition antibody of hemagglutination test, but $2B_7$ is not. $2B_7$ McAb had reaction only with 12 strains and had no reaction with 7 strains and did not inhibit the hemagglutination reaction. The results imply that the 19 strains of virus all have the HAN antigenic determinants, but $1H_8$ McAb has different activity.

Key words: Epidemic Hemorrhagic Fever Virus(EHFV), Monoclonal Antibody (McAb), Hemagglutinin(HAN), Hemagglutination Inhibition Test(HIT)