

9-314, 1-03

第6卷第4期
1991年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 6 No. 4
Dec. 1991抗 EHFV 的独特型抗体在小鼠
体内诱导免疫应答的研究

李川江 林 乔 王懋梁

R373.32

(湖北省医学科学院病毒研究所, 武汉430070)

提 要

本文介绍用流行性出血热 (EHF) 病毒 J10 株制备单克隆抗体 (McAb), 以及用 7 个 McAb 免疫家兔, 使其产生抗 EHF 病毒 McAb 的抗体即抗独特型抗体 (Ab_2)。 Ab_2 能在体外同出血热病人恢复期血清和 EHF 病毒免疫的兔血清发生特异性结合。再经 EHF-McAb 亲和层析法分离提纯 Ab_2 , 免疫 BALB/c 小鼠, 将所获得的免疫血清 (Ab_3) 用荧光和 ELISA 分别加以测定。结果表明, 抗-抗独特型抗体可在体外识别 EHF 病毒, 而不能同病人恢复期血清发生结合, 从而支持免疫网络学说, 可能为我们提供一种新型的抗原来源途径。

关键词: 流行性出血热病毒 单克隆抗体 独特型抗体 抗独特型抗体

免疫应答

Jerne^[1] 提出的独特型免疫网络学说认为: 机体对抗原的免疫应答具有一系列独特型 (Idiotype, Id) — 独特型抗体 (idiotypic antibody, Ab_1) — 抗独特型抗体 (anti-idiotypic antibody, Ab_2) 的相互作用, 而使机体的免疫调节处在动态平衡之中。Sacke^[2] 认为 Ab_1 上存在有对抗原的互补位, 也存在具有免疫原性的独特位, 可诱导产生 Ab_2 并能被 Ab_2 的互补位所识别, 因此可以认为抗原和 Ab_2 与 Ab_1 结合的位点是相似的, 此关系是制备抗独特型疫苗的理论基础。近年来许多科研工作者^[3-6] 用不同病毒的 McAb 免疫动物, 制备出抗独特型抗体, 将这些抗独特型抗体注射动物, 可诱导出具有与原病毒特异的抗体应答。由此可见, 这种抗独特型抗体在功能上可以作为疫苗用于预防病毒的感染。因为 Ab_2 具有病毒的内在影象, 能被病人血清所识别。又因为独特型抗体 (Ab_1) 具有病毒的互补位同时具有独特位, 能刺激机体产生抗-抗独特型抗体 (Ab_2), 此抗体能识别病毒, 因此本实验将对 Ab_2 作为抗原用于 EHF 病人诊断的可行性和 Ab_3 作为 EHF 的抗独特型抗体疫苗的可行性进行研究。现报告如下。

本文于1990年10月18日收到, 1991年6月21日修回。

材 料 与 方 法

一、抗EHF病毒杂交瘤细胞的建立^[1]：用EHF病毒J10株小鼠胚抗原免疫BALB/c鼠，将免疫脾细胞与Sp2/0细胞以5:1的比例进行融合，融合剂用50% PEG（分子量为1000）。用EHF病毒J10株、A₃株Vero-E₆细胞抗原片进行免疫荧光鉴定，兔抗鼠EHF病毒血清、兔抗鼠荧光结合物均为本室制备，并请安徽医学科学研究所倪大石教授用76/118、H₄、XC、A₉、A₉₉、A₄₃₇、A₁₀₁₃、A₁、陈株、RG₁、R₂₂、R₁₆和湖北省卫生防疫站赠送的湖北利用、荊州等毒株的抗原片对McAb的特异性进行鉴定。

二、抗独特型抗体的制备：为了使免疫系统能产生较强的反应，我们取7种McAb（4G₆、6B₄、2A₆、3E₁、5G₁₂、4E₇、3D₅）等量混合，用40%硫酸铵沉淀提取IgG，取1ml（含IgG 17mg）以等量福氏完全佐剂乳化，免疫家兔，肩胛部皮下多点注射，第20、40天各重复一次，免疫后一周放血，分离的血清内含有抗独特型的抗体。

三、亲和层析法：取溴化氰活化的琼脂糖凝胶（上海药物研究所生产，批号70601）干粉1克，加入经pH8.5 NaHCO₃平衡的提纯McAb IgG 1ml（含蛋白量17mg），持续搅拌20小时，装柱，经PBS洗柱后按载体偶联法进行洗脱^[8]。测抗体的偶联率为54%。用1ml抗独特型抗体血清上柱，收集洗脱液即为纯化的抗独特型抗体（Ab₂）。

四、抗-抗独特型抗体的制备：用亲和层析法提纯的Ab₂ IgG，免疫BALB/c小鼠5只，腹腔注射，第一次每只500μg/0.5ml，初免后第20天用100μg/0.2ml重复注射一次，一周后采血，分离血清内含有抗-抗独特型的抗体。

五、病毒提纯：将EHF病毒J10株Vero-E₆细胞抗原悬液，冻融三次，离心4000转/分，60分钟，取上清液进行50%和20%蔗糖不连续密度梯度离心，取病毒带，滴于铜网上，负染后于电镜下观察。

六、ELISA试验：

1. 抗独特型抗体测定：（1）以出血热病人恢复期血清、正常人血清、提纯EHF病毒、Vero-E₆细胞、EHF McAb包被固相载体，分别与Ab₂、Ab₁在37℃保温2小时，再与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、兔抗鼠IgG（本室制备）在37℃保温2小时，加底物，测OD值，以 $\bar{x}+3SD$ 为阴/阳性临界值。（2）Ab₂和EHF病毒分两组包被固相载体，分别加入8份EHF病人恢复期血清（1:40）、兔抗EHF病毒血清和正常鼠IgG，37℃保温2小时后，再与辣根过氧化物酶标记的羊抗人、羊抗兔、兔抗鼠IgG，在37℃保温2小时，加底物，用自动酶联免疫检测仪测定OD值， $\bar{x}+3SD$ 为阴/阳性临界值。

2. 抗-抗独特型抗体测定：用提纯后的EHF病毒包被固相载体，4℃过夜。封闭后分别加入Ab₂、Ab₁、EHF McAb、兔免疫Ab₂血清（均1:40），37℃保温2小时，再加入兔抗鼠、羊抗兔酶结合物，37℃保温2小时，加底物测OD值。

七、免疫荧光试验：EHF病毒E₆细胞抗原片，分别加上1:40稀释的EHF McAb、Ab₂、Ab₁、兔免疫血清，10μl/孔，37℃保温1小时，再加含有1/10000伊文思兰的兔抗鼠和羊抗兔荧光结合物，37℃，保温1小时，PBS搅拌洗涤后在荧光镜下观察结果。

结 果

1. 杂交瘤分泌抗体的特异性鉴定: 7 株 McAb 与 14 株 EHFV 的全部或部分发生特异性结合结果见表 1。

表 1 7 株腹水抗体与 14 株 EHFV 的免疫荧光鉴定结果

Table 1. The reaction of monoclonal antibodies with 14 strains of EHFV using immunofluorescence method

单 抗 Monoclonal antibodies	抗 原 Antigen													
	76/418	H5	XC	A ₁	A86	A527	A1018	A ₃	RG4	R56	R22	陈	利川	荆州
4G ₁	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
6B ₄	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
2A ₆	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3E ₉	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
5G ₁₂	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4E ₇	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
3D ₅	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

7 monoclonal antibodies could combine specifically with 14 strains of EHFV

7 株 McAb 能与 14 株 EHFV 中的全部或部分发生特异性结合

2. 提纯 EHF 病毒的电镜照片见图版 III 1。

病毒颗粒呈圆形或卵圆形, 直径在 100—200nm 之间。

3. ELISA 测定结果:

(1) Ab₂、Ab₃ 与 EHF 病人血清、EHFV、McAb、Ab₂、ELISA 测定结果见表 2。

Ab₂ 与病人血清、McAb, Ab₃ 与 EHFV、Ab₂ 的 OD 值均大于 0.44。

(2) 8 份恢复期病人血清与 Ab₂、EHFV, Ab₂ 与 EHFV 免疫兔血清、正常鼠血清、正常人血清的 ELISA 测定结果, 临界值为 $\bar{x} + 3SD$, 见表 3。

表 2 Ab₂、Ab₃ 与 EHF 病人血清、EHFV、McAb 的 ELISA 测定结果Table 2. The result of reaction of Ab₂ and Ab₃ with sera of EHF-patient, EHF-McAb, EHFV and Ab₂ by the method of ELISA

独特型抗体 Idiotypic antibodies	抗体或抗原 Antibody or Antigen					
	Serum of EHF-patient	Serum of normal persons	EHFV	EHFV McAb	E ₀ -cell	Ab ₂
Ab ₂	1.2*	0.32	0.18	1.33*	0.16	0.12
Ab ₃	0.12	0.14	0.9*	0.11	0.10	1.3*

*N=5 $\bar{x}=0.74$ $SD=0.04$ $\bar{x}+3SD=0.44$

1. Ab₃ 可与 EHFV 发生特异性结合而不能与 EHF 病人血清、EHF-McAb 结合。

2. Ab₂ 能与 EHF 病人血清、EHF-McAb 发生特异性结合, 而不能与 EHFV 结合。

3. Ab₃ could combine specifically with EHFV, but could not combine with serum of EHF-patient and McAb of EHFV

b, Ab₂ could combine specifically with serum of EHF-patient and McAb of EHFV, but could not combine with EHFV.

表 3. Ab₂ 与病人血清ELISA测定结果

Table 3. The results of ELISA of Ab₂ and EHFV with sera of EHF-patient, immunized EHFV rabbits, normal mice and normal persons

血清 Serum	抗原 Antigen		
	Ab ₂	EHFV	
	1	1.14	2.0
EHF病人血清 Serum of EHF-patient	2	1.0	1.3
	3	1.02	1.6
	4	1.06	1.4
	5	1.0	1.9
	6	1.1	2.4
	7	1.9	2.5
	8	1.6	2.1
免疫兔血清 Serum of immunized EHFV rabbit		1.9	2.2
正常鼠血清 Serum of normal mice		0.62	0.54
正常人血清 Serum of normal persons		0.58	0.60

Ab₂、EHFV可与病人血清、免疫兔血清发生特异性结合
Ab₂ and EHFV could combine specifically with
sera of recovery EHF-patients and sera of
immunized EHFV rabbits, but the OD value
of Ab₂ is lower than that of EHFV.
N=5 \bar{X} =0.68 SD=0.44 $\bar{X}+3SD=0.72$

表 4. Ab₃、Ab₂与 EHFV 的 ELISA测定结果

Table 4. The result of determination of Ab₃ and Ab₂ by EHFV using ELISA

抗体 Antibodies	EHFV	
	1	2
Ab ₃	3	0.78
	4	0.80
	5	0.92
		0.86
		0.87
Ab ₁		1.12
Ab ₂		0.18
免疫兔血清 Serum of immu- nized EHFV rabbit		1.23

免疫兔血清, Ab₁、Ab₃可与 EHFV 结合,
而 Ab₂ 不能。

Serum of immunized EHFV rabbit,
Ab₁ and Ab₃ could combine speci-
fically with EHFV but Ab₂ could
not.

N=5 \bar{X} =0.172 SD=0.014

$\bar{X}+3SD=0.21$

Ab₂、EHFV均能同病人血清发生特异性结合, 但 Ab₂ 的 OD 值明显低于 EHFV。

(3) 提纯的 EHF 与 5 只免疫 Ab₂ 的 BALB/c 鼠血清、Ab₂、McAb、兔免疫血清的 ELISA 测定结果, 临界值为 $\bar{X}+3SD$ 。结果见表 4。

5 只被 Ab₂ 免疫的 BALB/c 鼠血清均能同 EHFV 发生特异性结合, 而 Ab₂ 则不能与 EHFV 结合。

4. 荧光测定结果: 见图版 III 2。

Ab₃、McAb、免疫兔血清与抗原片形成荧光, 而 Ab₂ 与抗原片无荧光现象。

从上述图表所示结果表明, Ab₂ 能同免疫血清、McAb 而不能同病毒结合, Ab₃ 能同病毒、Ab₂ 而不能同免疫血清结合。McAb 和兔免疫血清与病毒结合的能力都较抗-抗独特型抗体强, 抗-抗独特型抗体和兔免疫血清所形成的荧光形态又与 McAb 不同, McAb 表现出明显的荧光颗粒。5 只 BALB/c 小鼠对抗独特型抗体所产生免疫应答的强弱也有所不同。

讨 论

从上述试验的结果, 我们可以清楚地看到: Ab_2 IgG 上的互补位可被抗 EHFV 抗体 IgG 上的独特位所识别并能发生特异性结合。 Ab_2 刺激产生的 Ab_3 又与 Ab_1 IgG 上某些表位结构相似而能识别 EHF 病毒, 从而证明 Ab_2 上的互补位同 Ab_1 上的独特位结构是相似的, 同时提示我们 Ab_2 上的互补位与 EHF 病毒上的独特位也是相似的, 这就进一步证实免疫网络学说。从而将有可能提供一种新的抗原来源途径, 为今后的疾病诊断和疫苗生产提供新的材料和方法, 特别是对普通方法难以获得足够抗原的病毒尤为重要。

EHF 病毒的抗独特型抗体能否代替病原体抗原刺激机体产生针对本病原体的免疫应答, 从而建立起对此病的免疫力, 目前尚无报道。从本实验的结果分析, 抗独特型抗体所诱导 BALB/c 鼠产生的免疫应答可在体外识别 EHF 病毒。如果独特型抗体是针对病原体保护性抗原的抗体, 那么抗独特型抗体就有可能得到病原体保护性抗原的模似物, 起到疫苗的功效, 成为代用疫苗。这对 EHF 的疫苗研究有着较大的实际意义。由于抗独特型抗体诱发保护性免疫应答似乎不具有主要组织相容性抗原复合物限制性, 这使由异种动物制备的抗独特型疫苗应用于人类疾病成为可能。尽管抗独特型抗体疫苗的研究已经做了许多工作, 但仍有待完善。诸如目前抗独特型抗体一般由家兔或小鼠产生, 因此对人体是异种蛋白等。但作为一种新型疫苗, 它已显示出广阔的发展前景。

参 考 文 献

- (1) Jerne, N. K., 1974, *Ann Immunol* 125: 373.
- (2) Sacke, D. C., 1984, *New Approaches to vaccines development*, eds by Bell, R. and C. Terrigliani, pp121, Schuabe & Co. AG, Basel.
- (3) Reagen KJ., 1983, *J Virol* 48: 660.
- (4) Kennedy Bc et al., 1984, *Science* 223: 930.
- (5) Vytdehaag FC CM et al., 1986, *J Immunol* 134: 1226.
- (6) Tanaka M et al., 1986, *Microrobiol Immunol* 30: 323.
- (7) Scherier M, et al., 1980, *Hybridoma Techniques EMBO, SKMB course basel, Basel Institute for Immunology.*
- (8) 王世中: 1980, 免疫化学技术, 科学出版社, 第34页。

The Production of Idiotypic Antibody against EHFV and Immunoreaction of Anti-EHFV Induced by the Idiotypic Antibody in Mouse

Li Chuan-jiang Lin Qiao Wang Mao-liang

(Hubei Academy of Medical Sci, Wuhan, 430070)

In this paper, the preparation of monoclonal antibodies using epidemic hemorrhagic fever virus J10 strain and anti-EHFV McAb antibody (idiotypic antibody, Ab2) produced by rabbit immunized with 7 clones of McAb are described. In vitro, Ab2 was able to combine specifically with serum of recovering patients with EHF and serum of rabbit immunized by EHFV. Ab2 separated and purified by means of affinity chromatography was used to immunize Balb/c mice. The immunized serum (Ab3) was determined by immunofluorescence and ELISA. The result indicated that, in vitro, anti-idiotypic antibody could identify EHFV but could not combine with serum of recovering patients with EHF, which supports the theory of immunonet-work and will probably provide a way to obtain new antigen.

Key words: McAb Idiotypic antibody Anti-idiotypic antibody
EHFV

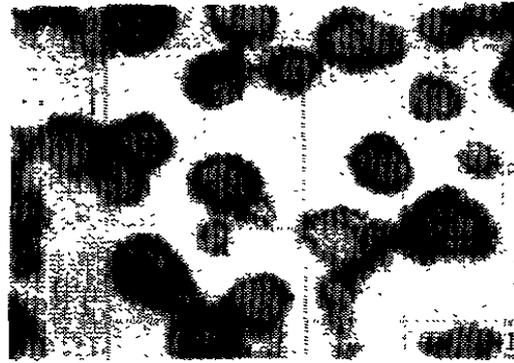


图 1 用 PTA 染色的 EHFV 颗粒的电镜观察 ($\times 70000$)

Fig 1 Electron micrograph of EHF virus particles stained with PTA ($\times 70000$)
The virus particles were round or elliptical, The diameters were among 100—200 nm



图 2 EHFV 感染细胞的免疫荧光染色照片

Fig 2 Immunofluorescent staining of EHFV infected cell

- A. 抗-抗独特型抗体在流行性出血热病毒原细胞膜上产生荧光
- B. 甲壳素抗体在流行性出血热病毒原细胞膜上产生强荧光
- C. 兔免疫血清在流行性出血热病毒原细胞膜上产生较强荧光
- D. 抗独特型抗体在流行性出血热病毒原细胞膜上产生弱荧光
- A. Using Ab₁ the fluorescence seen on the cell membrane and in the cell cytoplasm
- B. Using McAb the fluorescent particle seen on the cell membrane and in the cytoplasm
- C. Using serum of immunized rabbit the fluorescent seen on the cell membrane and in the cell cytoplasm
- D. Using Ab₂ no immunofluorescence found