维普资讯 http://www.cqvip.com

449—455

11229(13)

第7卷第4期 1992年12月
中国病毒学 VIROLOGICA SIINCA
Vol.7 No.4 Dec. 1992

用单克隆抗体研究鸡新城疫病毒抗原变异与流行病学的相关性

周维松* 刘秀梵

（江苏农学院牧医系，扬州 225001）

S852.65

提 要

用19株抗鸡新城疫病毒（NDV）单克隆抗体（简称单抗）测定与14个NDV国际参考株和16个NDV国内分离株的反应性，将毒株分为a～h 8个群。该组单抗能较精细地测出流行病学上不同的毒株间的抗原变异，毒株分群显示了抗原变异与流行病学特征的相关性。

关键词：鸡新城疫病毒 单克隆抗体 抗原变异 流行病学特征

鸡新城疫（ND）是造成养禽业巨大经济损失的烈性传染病，长期以来，许多鸡新城疫病毒（NDV）毒株得到了分离，利用经典方法亦可对与经济重要性密切相关的病毒毒力进行测定[1]，但对于病毒的抗原变异却了解不多。随着杂交瘤技术的问世，单克隆抗体（简称单抗）已被用于NDV毒株抗原差异性分析[2,3,4,5]。Russell曾根据40个NDV毒株与9株抗NDV单抗的反应性，将毒株分为8个群[1]。本试验选用19株单抗测定与14个国际参考株和16个国内分离株的反应性，结果表明，NDV的抗原变异与流行病学存在相关性，本试验所用单抗不仅能比Russell的9株单抗更精细地测出流行病学上不同的毒株抗原差异，而且将有助于毒株的鉴定和ND的流行病学研究。

材料和方法

一、病毒来源：NDV各毒株接种无特定病原（SPF）鸡胚复壮，收获致死鸡胚尿囊液，小量分装，－70℃保存备用。试验中所用的NDV国际参考株和国内分离株的来源及特性见表1。仙台病毒由中国预防医学科学院病毒所引进，鸡马立克氏病毒Z_4株（MDV-Z_4）、火鸡疱疹病毒（HVT）和鸡传染性法氏囊病病毒（IBDV）为本室保存的毒种。

二、细胞培养：鸡胚原代成纤维细胞（CEF）用常规方法制备，用含5%小牛血清的199+F10培养基（Sigma产品）培养。Vero细胞和PK-15细胞含10%小牛血清的MEM培养基（Nissui产品）传代。

本文于1991年12月28日收到，1992年4月23日修回。

* 现在地址：中国农科院生物中心，北京100081。

本研究为国家"七五"重点攻关项目，已通过鉴定。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1. 鸡新城疫病毒参考毒株和野外分离物的来源及生物学特性

Table 1. Origins and biological properties of NDV references strains and field isolates used in this study

NDV毒株和分离物 NDV strains and isolates	分离地点 The place of isolation	分离时间 The time of isolation	宿主 Host	毒力型 Virulence type
F48E8	北 京 Beijing	1944	鸡 Fowl	VV[a]
台 山 TS	台 山 Taishan	1970s	鸡 Fowl	VV
新 疆 XJ	新 疆 Xinjiang	1970s	鸡 Fowl	VV
GB Texas	美 国 U.S.A.	1948	鸡 Fowl	NV[b]
Kuwait	科威特 Kuwait	1968	鸡 Fowl	VV
Calif-1085	美 国 U.S.A.	1971	鸡 Fowl	VV
New York Parrot	美 国 U.S.A.	1970	鹦 鹉 Parrot	VV
南 京 NJ	南 京 Nanjing	1970s[f]	鸡 Fowl	VV
扬 州 YZ	扬 州 Yanzhou	1983	鸡 Fowl	VV
山 西 SX	山 西 Shanxi	1980s	鸡 Fowl	L[c]
广 州 GZ	广 东 Guangdong	1970s	鸡 Fowl	VV
D 43	无 锡 Wuxi	1982	鸭 Duck	L
河 北 HB	河 北 Hebei	1970s	鸡 Fowl	VV
浙 江 ZJ	浙 江 Zhejiang	1970s	鸡 Fowl	FL[d]
F 26	镇 江 Zhenjiang	1983	鸭 Duck	L
D 99	无 锡 Wuxi	1982	鸭 Duck	L
Hert'33	英 国 England	1983	鸡 Fowl	VV
Northants'72	英 国 England	1972	鸡 Fowl	VV
上 海 SH	上 海 Shanghai	1970s	鸡 Fowl	VV
Lasota	美 国 U.S.A.	1948	鸡 Fowl	L
N 79	英 国 England	1979	鸡 Fowl	L
B I	美 国 U.S.A.	1948	鸡 Fowl	L
N.J.Rokin	美 国 U.S.A.	1949	鸡 Fowl	M[e]
内 蒙 NM	内 蒙 Neimeng	1970s	鸡 Fowl	VV
云 南 YN	云 南 Yunnan	1970s	鸡 Fowl	VV
Komorov	巴勒斯坦 Palestine	1949	鸡 Fowl	M
F 系	英 国 England	1949	鸡 Fowl	L
AG 68	英 国 England	1949	鸡 Fowl	VV
吉林JL	吉 林 Jilin	1970s	鸡 Fowl	VV
Queensland	澳大利亚 Australia	1966	鸡 Fowl	L

a: VV=Viscerogenic velogenic 嗜内脏速发型　　d: FI=Field isolate 野外分离物

b: NV=Neurotropic velogenic 嗜神经型　　e: M=Mesogenic 中毒型

c: L=Lentogenic 弱毒型　　f: 1970s=70年代

三、杂交瘤和单抗：将密度梯度离心提纯的$F_{41}E_3$用 Triton X-100 处理，即将病毒液（15.42 mg/ml）与等量4% Triton X-100，0.4mol/L KCl，pH6.8 125mmol/L Tris-HCl 缓冲液混合，37℃作用30分钟后，免疫BALB/C小鼠，免疫程序采用 Goding 的方法[7]。骨髓瘤细胞为 SP_2/O-

维普资讯 http://www.cqvip.com

Ag14，融合剂为50%聚乙二醇（PEG1000，Baker产品），按Lane氏的方法进行细胞融合[8]，用间接ELISA检测和筛选杂交瘤细胞[9]。用有限稀释法进行NDV特异性阳性杂交瘤细胞的克隆化。将5×10⁶个杂交瘤细胞注射于经降植烷（Pristane）激化的BALB/C小鼠制备单抗腹水。

四、单抗特性测定：单抗亚类、单抗腹水的ELISA、IIF效价、血凝抑制（HI）能力和溶血抑制（HLI）能力的测定分别按刘秀梵和Beard等的方法进行[9,10,11]。

五、间接免疫荧光试验(IIF)测不同单抗对不同毒株的反应性：在40孔小孔板板孔中制备Vero细胞单层，不同NDV毒株尿囊液用含10%小牛血清的MEM培养基作1∶500倍稀释后加到细胞孔中，0.2ml/孔，继续培养，在细胞刚开始出现病变时，弃去板中培养基，PBS洗一遍，用10%福尔马林生理盐水固定10分钟，PBS洗三遍，向板孔加入100倍稀释的单抗腹水，37℃温育1小时，PBS洗3遍，向板孔中加入适当浓度的兔抗鼠荧光抗体（FITC-IgG结合物），37℃温育1小时，PBS洗3遍，将板翻转，置荧光显微镜低倍镜下观察，同时做不接种NDV的Vero细胞的IIF对照，以及用抗大肠杆菌K_{88}粘着素抗原单抗（本室研制）作为第一抗体的阴性对照。出现胞浆或细胞膜荧光且对照无荧光的样品孔判为阳性反应，见图1。将仙台病毒接种猪瘟病毒感染的PK-15细胞、$MDVZ_4$株、HVT、IBDV接种CEF细胞，制备病毒感染的细胞盖玻片，进行IIF试验测定与抗NDV单抗的交叉反应[9]。

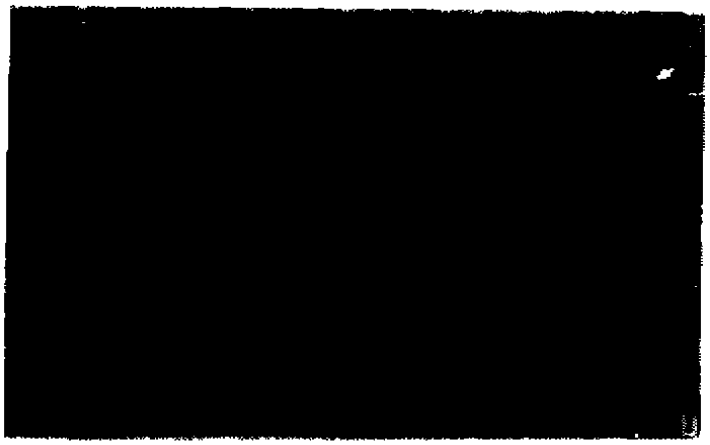

图1　NDV毒株与单抗的反应性

Fig. 1　Reactivity of McAbs to NDV strains

单抗与感染Vero细胞的NDV出现阳性反应

Vero细胞胞浆出现绿色免疫荧光

The positive reaction of McAb to NDV infected Vero cells

Green immunofluorescence appearing in Vero cells cytoplasm

结果与讨论

本试验得到稳定分泌抗NDV特异单抗杂交瘤16株，从本室未经筛选的杂交瘤细胞冻存株中筛选得到抗NDV阳性杂交瘤细胞3株，徐秀龙建株的杂交瘤细胞3株，共计22株。从中选取19株单抗用于单抗与毒株的反应性测定，单抗的生物特性见表2。19株抗NDV单抗与仙台病毒MDV-Z_4、HVT、IBDV无交叉反应。根据19株单抗对NDV

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 抗 NDV 特异单抗的免疫生物学特性

Table 2. Immunobioligical properties of monoclonal antibodies specific for NDV

单 抗 McAbs	免疫毒株 Immune strains	单抗亚类 Isotype of McAb	HI 效价 HI titers	HLI 效价 HLI titers	ELISA 效价 ELISA titers	IIF 效价 IIF titers
10-1	$F_{48}E_8$	IgG_{2a}	$1:2\times10^5$	>1:550	$1:10^4$	$>1:10^4$
15-1	"	IgG_{2a}	$1:1\times10^7$	>1:550	$1:10^4$	$1:10^4$
27-s-2	"	IgM	<1:6	<1:16	$>1:10^4$	$>1:10^5$
27-3	"	IgG_1	<1:6	<1:16	$1:10^4$	$1:10^4$
39-1	"	IgG_1	1:12	<1:16	$1:10^3$	$1:10^3$
44-s-1	"	IgG_2	<1:6	<1:16	$1:10^4$	$1:10^3$
44-s-2	"	IgG_1	$1:6.4\times10^3$	>1:550	$1:10^4$	$1:10^4$
94-s	"	IgG_1	$1:1.6\times10^3$	1:16	$>1:10^4$	$1:10^4$
107-2	"	IgG_1	$1:2.6\times10^4$	>1:550	$1:10^4$	$>1:10^4$
107-3	"	IgG_1	$1:1.3\times10^4$	>1:550	$1:10^4$	$>1:10^4$
B1-s-1	"	IgG_1	<1:16	<1:16	$1:10^4$	$1:10^3$
B4	"	IgG_1	<1:16	<1:16	$>1:10^4$	$1:10^3$
G12-s-1	"	IgG_1	<1:16	<1:16	$>1:10^4$	$>1:10^4$
G12-s-2	"	IgG_1	<1:16	<1:16	$1:10^4$	$1:10^4$
LA8	Lasota	IgG_1	1:64	<1:10	$1:10^4$	$1:5\times10^4$
LA20	"	IgG_1	1:1024	<1:10	$1:10^4$	$1:5\times10^3$
LA21	"	IgG_1	1:128	<1:10	$1:10^4$	$1:5\times10^4$
LA15-7*	"	IgG_1	1:320	>1:750	$>1:10^4$	$1:5\times10^5$
LE22-3*	"	IgG_1	1:128	<1:10	$1:10^4$	$1:5\times10^4$

*：徐秀龙等建抗的单株

McAb constructed by Xu et al

不同毒株的反应性，将30个毒株分为a、b、c、d、e、f、g、h八个群，a群分a_1、a_2、a_3三个亚群，b群和f群各2个亚群，见表3。国内的16个分离株与单抗出现a_1、b_2、c、d、e、g六种反应谱。说明国内存在这6种抗原类型的NDV，但主要集中于a_1、b_2、c三群，而这些毒株间的抗原差异用常规血清学方法不能区分[12]。归入a_1群的$F_{48}E_8$、新疆株和台山株抗原性很接近。归于b_1群的Calif·1085和New York Parrot均是70年代初美国ND大流行时分离的强毒株。归入d群的Northants'72是1972年夏在英国分离到的一株嗜内脏速发型毒株。Allan认为Northants'72与70年代初英国ND大流行时的其他分离株不同，它是从一个孤立爆发的ND疫点分离得到，性能类似对Hert'33等1970年以前英国的NDV分离物。这一点被Russell用单抗进行抗原差异性分析得到证实[6]，也与本试验研究结果一致。

归入e群的B_1株和N.J.Rokin株分别是1948—1949年间在美国分离的弱毒和中毒株。归入f群的有弱毒F株和中毒Komorov株，这两株与单抗的反应性不同于其他被试毒株。这两个毒株在流行病学上也与其他毒株不同（见表1）。GB Texas是1948年在美国分离的强毒株，Kuwait株是1968年在科威特分离的强毒株，这两株的单抗反应

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3　单抗与NDV参考毒株和分离株的IIF结合反应性

Table 3　Binding of McAb to cell infected with NDV strains and isolates detected by IIF

病毒 Virus	分组 Group	单抗 monoclonal antibodies																		
		107-2	107-3	94-s	LA-21	44-s-2	LA-20	10-1	15-1	LA-8	30-1	B4	B1-s-1	LA15-7	LE22-3	44-s-1	27-3	27-s-2	g12-s-1	g12-s-2
F48E8	a_1	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
台山 TS	a_1	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
新疆 XJ	a_1	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GB Texas	a_2	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
Kuwait	a_3	−	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+
Calif.1085	b_1	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N.Y. Parrot	b_1	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
南京 NJ	b_2	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
扬州 YZ	b_2	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山西 SX	b_2	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
广州 GZ	b_2	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D 43	b_2	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
河北 HB	c	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
浙江 ZJ	c	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F 26	c	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D 09	c	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hert33	d	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Northants'72	d	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
上海 SH	d	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lasota	d	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N 79	e	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 1	e	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N.J.Rokin	e	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
内蒙 NM	e	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
云南 YN	e	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Komorov	f_1	+	+	−	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F 系	f_2	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG 68	g	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吉林 JL	g	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−
Queensland	h	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+
仙台病毒	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
IBDV	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
HVT	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
MDV-z4	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

+：阳性反应　Positive reaction

−：阴性反应　Negative reaction

维普资讯 http://www.cqvip.com

性也与其他毒株不同，但与 a 群毒株相对比较一致（见表 3），故将其归于a 群的 a_2和 a_3 亚群。

在流行病学上完全不同，分别分离自亚洲、欧洲和大洋洲的三个毒株 Kuwait 株、F 株和 Queesland 株（见表 1）与单抗的反应性不同，分别归于a、f、和 h 群表明，这三株之间存在较大的抗原变异，该结果与 Russell 的报道一致[6]。GB Texas 和 N.J. Rokin 虽然于 1984和1949年间在美国被分离，但GB Texas 是强毒株，N.J.Rokin 是中毒株，Komorov 是1949 年在巴基斯坦分离的中毒株。本试验中，这三个毒株分别属于 a_2、e 和 f 群，表明这三个毒株在抗原性上存在较大差异，而 Russell 用单抗测定 NDV 毒株的抗原性时，这三个毒株的反应性相同，属同一群[1]。本试验所用的单抗不仅能测出流行病学上不同的毒株间的抗原变异，而且结果比 Russell 所用的单抗更精细。

根据 Lasota 株与单抗的反应性将其归于 d 组。从表 3 可见：Lasota 株与从其中克隆出的N_{79}毒株的反应性不同。用单抗测定蒋建东从鹅胚化 Lasota 株中克隆出的三个毒株的反应性，三个克隆化毒株与母系 Lasota 的反应性也不同（结果未列出）。这些说明：在 Lasota 疫苗株中存在不同抗原性的多种病毒粒子，N_{79} 株与 B_1 株的单抗反应性一致，表明 Lasota 中存在与B_1抗原关系相近的病毒粒子，这与 Russell[1]、Meulemans[13]、Srinivasappa[14]、徐秀龙[3]等报道的结果一致。

本试验所用19株单抗对 NDV 毒株所作的抗原性分群与流行病学特征有很好的一致性，显示了毒株抗原变异与流行病学的相关性，该组单抗将有助于 NDV 毒株和野外分离株的比较、鉴定和 ND 的流行病学研究。

参 考 文 献

〔1〕 Beard C W et al., Newcastle Disease Virus, In *Disease of Poultry*, 8th edited, M S Hofstad, 452—470.

〔2〕 Alexander D J et al., 1987, Avian Pathology, 16：553—565.

〔3〕 徐秀龙，刘秀梵，1988，病毒学报，4(1)：39—44。

〔4〕 Nishikawa K et al., 1983, *Virology*, 130：318—330.

〔5〕 Ishida M et al., 1935, *Archives of Virology*, 85：109—121.

〔6〕 Russell P H and D J Alexander., 1983, *Archives of Virology*, 75：243—253.

〔7〕 Goding J W., 1983, Monoclonal Antibodies: Principles and practice, London-New York: Academic Press.

〔8〕 Lane R D., 1985, *Journal of Immunological Methods*, 81：223—228.

〔9〕 刘秀梵，1988，单克隆抗体：原理、方法及应用，生物工程讲习班资料。

〔10〕 刘秀梵，周维松等，1985，病毒学报，1(4)：404.

〔11〕 Beard C W., 1980, Serological Procedures in Isolation and Identification of Avian Pathogens, by Stephen B H et al, p. 129, Ame. Asso. of Avian Pathologist, Texas State University, USA.

〔12〕 李慧姣，1985，病毒学报，1(4)：354—359.

〔13〕 Meulemans G et al., 1987, *Archives of Virology*, 92：55—62.

〔14〕 Srinivasappa G E., 1986, *Avian Disease*, 30(3)：562—567.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Relativity Between Antigenic Variation and Epidemiologic Characters of Newcastle Disease Virus Strains Detected by Monoclonal Antibodies

Zhou Wei-song Liu Xiu-fan

(*Department of Animal Science and Veterinary Medicine, Jiangsu Agricultural College Yangzhou 225001*)

Nineteen monoclonal antibodies (McAb) specific for Newcastle Disease Virus (NDV) was produced and used for the reactivity detection to 14 international reference NDV strains and 16 domestic NDV isolates by indirect immunofluorescent assay (IIF). According to the results, the 30 NDV strains was divided into 8 groups from a to h. The antigenic variation of the strains which are different in epidemiology could be estimated by IIP test using the 19 McAbs. It was showed that there is relativity between antigenic variation and epidemiologic characters of NDV strains by the grouping of the 30 NDV strains. In addition, antigenic different virions were found to exist in Lasota strain.

Key words: Newcastle disease virus Monoclonal antibodies Antigenic variation Epidemiology