

研究简报

分泌 IHN—B 病毒单克隆抗体 杂交瘤细胞的建立*

ESTABLISHMENT OF THE HYBRIDOMA PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS BENXI STRAIN (IHN—B)

赵志壮

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

Zhao Zhizhuang

(Heilongjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070)

刘长明

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 150001)

Liu Changming

(Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, 150001)

关键词 虹鳟, IHN—B, 单克隆抗体, 杂交瘤细胞

KEYWORDS *Salmo gairdneri* Richardson, IHN—B, Monoclonal antibody, Hybridoma

虹鳟传染性造血器官坏死症是一种危害严重的鱼类弹状病毒病, 北美、日本、欧洲及我国台湾等国家和地区有所报道, 1990 年在我国本溪虹鳟稚鱼中分离出一株弹状病毒, 暂记为传染性造血器官坏死症病毒中国本溪株 (IHN—B), 为快速诊断及减轻危害, 找出各地毒株之间及强弱毒株之间的抗原差异, 本实验应用杂交瘤技术, 制备出能够持续分泌 IHN—B 病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 现简报如下。

材料与方 法

1. 抗原制备 以 IHN—B 病毒接种于 CHSE 细胞, 取滴度 10^5 TCID_{50/0.1ml} 的病毒悬液冻融, 低速离心取上清, 超速离心 (130,000g) 后悬于 PBS 中, 经紫外分光光度法测定蛋白含量后, 作为免疫用抗原。纯化后的病毒经超声波处理后, 作为检测用抗原。

2. 小鼠免疫接种 按 Schultz 氏等所述方法⁽⁴⁾, 对 6 周龄的 BALB/C 鼠进行免疫。

收稿日期: 1993-01-04.

* 本实验得到国家兽医实验室主任卢景良教授及石宗飏研究员的热忱指导和大力支持, 谨此致谢。

3. **酶联免疫吸附试验** 采取间接 ELISA 方法, 96 孔酶联反应板, 包被抗原浓度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$, 每孔 0.1ml ; 第一抗体 (被检杂交瘤培养上清) 和第二抗体 (酶标兔抗 BALB/C 鼠 IgG) 均加 $0.1\text{ml}/\text{孔}$; 底物为 $\text{OPD}-\text{H}_2\text{O}_2$, 设阴性、阳性及空白对照, 以 MR580 微量 ELISA 自动读数仪判定结果。

4. 杂交瘤细胞株的建立

(1) **细胞融合** 取加强免疫后的 BALB/C 鼠脾细胞悬液和 SP2/0 骨髓瘤细胞悬液, 按 $7:1$ 混于离心管中, 1000rpm 离心 10 分钟, 弃上清后振荡细胞, 在 37°C 中于 60 秒内加入 50% 聚乙二醇溶液 ($\text{pH}7.6$) 0.7ml , 轻轻转动 90 秒, 在 5 分钟内由慢到快加入 10ml DMEM 营养液终止促融, 1000rpm 离心 5 分钟, 取沉淀细胞加入 HAT—DMEM 选择培养液 (内含 20% 胎牛血清、1% 的 $1.0\times 10^{-2}\text{M}$ 次黄嘌呤、1% 的 $1.6\times 10^{-3}\text{M}$ 胸腺嘧啶和 0.2% 的 $4.0\times 10^{-3}\text{M}$ 氨基嘌呤), 接种于 1 天前准备好的加有饲养细胞的 96 孔培养板中, 置 37°C 含 5% CO_2 培养箱中, 按常规补液和换液, 1 周后改用 HT—DMEM 培养液。

(2) **阳性孔的筛选、克隆、扩增及冻存** 当融合细胞株长至 $1/3$ 孔时, 取上清以 ELISA 进行检测, 将阳性孔细胞以有限稀释法进行克隆 (至少 3 次), 待克隆孔阳性率达 100% 时, 转入 24 孔板进行扩大培养, 于液氮中冻存。

(3) **杂交瘤腹水的制备** 预先给约 10 周龄的 BALB/C 鼠腹腔注射 $0.5\text{ml}/\text{只}$ 液体石蜡, 7—10 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $0.5\text{ml}/\text{只}$ (细胞量 10^5-10^7 个/ ml), 经约 10 天后, 小鼠腹部明显膨大, 抽取腹水, 2000rpm 离心 10 分钟后取上清冻存。

(4) **抗体的初步测定** 收集杂交瘤细胞上清及腹水作 ELISA 测定, 确定其最高稀释效价。

结果与讨论

1. **细胞融合率及阳性孔率测定** 融合细胞共接种 2 块 96 孔培养板, 经 HAT—DMEM 选择培养 7 天后, 改用 HT—DMEM 培养, 第一板有 60 孔、第二板有 62 孔长出细胞克隆, 平均融合率为 63.5%, 经 ELISA 检测, 共有 8 孔产生 IHNV—B 病毒抗体, 阳性孔率为 6.5%。

2. **阳性孔的克隆及 ELISA 效价测定** 将阳性的 ELISA 检测结果相互比较, 筛选出 3 株强阳性的杂交瘤细胞株 1H_9 、 1G_{10} 和 2H_5 , 经过 3 次克隆, 阳性率均达 100%, 取其上清和 2H_5 制备的腹水, 测得 ELISA 效价各为: 1H_9 为 $1:320$, 1G_{10} 为 $1:320$, 2H_5 为 $1:640$, 2H_5 腹水为 $1:8000$ 。

3. 自从 1975 年 Köhler 等^[3]报道以来, 杂交瘤技术有了不少改进, 尽管操作方法有所不同, 但都在设法提高细胞融合率, 有的资料介绍^[1,2], 将 HAT 改换成 HT 的时间为 2—3 周, 本实验中考虑到氨基嘌呤 (A) 对细胞的毒性, 将其缩短至 1 周, 获得了较高的融合率及阳性率。另外, 避免胎牛血清污染、DMEM 培养液 pH 值偏高及过期使用等因素, 可使融合及克隆过程顺利进行。

参 考 文 献

[1] 徐宜为, 1991, 免疫检测技术, 231—240, 科学出版社

- [2] 黄桢祥等, 1990. 医学病毒学基础及实验技术, 271—280. 科学出版社。
- [3] Kohler, G *et al.*, 1981. Derivation of hybridomas producing monoclonal antibodies, AMBO International Training Course.
- [4] Schultz, C. L. *et al.*, 1985. Production and characterization of monoclonal antibody against infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish Pathology*, 20 (2/3): 339—341.

欢迎征订《中国水产科学》

《中国水产科学》是由中国水产科学研究院主办的水产科学技术领域的学术性刊物, 国内外公开发行。主要刊登水产系统和有关单位科技工作者在水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产品保鲜与加工、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器以及渔业基础研究的论文报告、研究简报、综述和学术动态等文稿。《中国水产科学》主要服务对象为水产科学研究、教学、科技管理人员以及大专院校师生。它面向水产业, 为水产经济建设服务。

《中国水产科学》为季刊, 16 开本 84 页, 每期定价 8.00 元 (包括邮费), 全年四期, 共收费 32.00 元。欢迎广泛订阅。

欲订购者, 可随时与《中国水产科学》编辑部联系办理手续。订费请通过银行信汇, 开户银行为: 北京市海淀区永定路分理处 (工商行) 帐号: 891195—90; 或者通过邮局将订费汇寄 100039 北京市永定路南青塔村 150 号《中国水产科学》编辑部。