

对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的研制

于佳 黄倭 宋晓玲 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

【摘要】 用经密度梯度离心纯化的对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV-937)注射 Balb/c 小鼠, 取其免疫后的脾细胞与 sp2/0 骨髓瘤细胞进行融合。经筛选与克隆, 获得 7 株抗 HHNBV 的单克隆杂交瘤细胞株。其中 F9 株的染色体数为 87, ELISA 测定培养上清中单抗滴度为 1:8, 腹水为 1:1000。患有杆状病毒的皮下及造血组织坏死症的对虾组织切片的单抗酶联免疫染色, 表明 F9 株单抗只与 HHNBV 病灶发生特异性结合, 与对虾组织结构不发生特异性反应。将其用于现场样品的检测研究表明, 该抗体适于用来进行对虾暴发性流行病的病原检测。

关键词: 对虾 皮下及造血组织坏死杆状病毒 单克隆抗体

单克隆抗体杂交瘤技术已在医学及生物学领域得到了广泛的应用, 在水产方面的应用起步较晚。国外有病原菌的单抗研究报道^[1], 用于鲑鳟鱼细菌性疾病诊断的单抗试剂盒已商品化生产。而对虾病毒的单抗只见到 IHNV(传染性皮下及造血组织坏死病毒)的研究工作, 由于存在 IgM 与正常对虾血淋巴非特异性结合问题还未能推向市场^[2]。国内也研制了草鱼出血病病毒的单克隆抗体^[3]。海洋研究领域, 单抗研究尚属空白。1993 年的对虾暴发性流行病给我国对虾养殖业造成了严重的危害, 经研究, 我们确认其病原是一种新的病毒, 暂定名为皮下及造血组织坏死杆状病毒 (Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, HHNBV)^[4]。为了能对该病进行早期快速诊断, 并查明其传播途径, 我们研制了该病毒的单克隆抗体, 现将方法与结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞株及小鼠

1.1.1 病毒种来源 HHNBV-937 系 1993 年 7 月自山东寿光道口镇发病虾池中采

* 本文的组织切片工作由本所养殖病害研究室张立敬同志完成, 特此致谢!

收到日期: 1995-07-10, 07-24 修回

集,冰冻后带回实验室,存放于 -35°C 。

1.1.2 骨髓瘤细胞株 小鼠骨髓瘤细胞株 sp2/0 购自中国科学院上海细胞研究所细胞库,本实验室传代约 20 代。

1.1.3 小鼠 Balb/c 小鼠购自中国预防医学科学院实验动物房。

1.2 HHNBV 的纯化

取 50g 虾头,去肝胰腺,加 PPB* 至 200ml,于 20000rpm 匀浆 10min,7000g 离心 20min,上清液 14000g 离心 3h,沉淀经蔗糖密度梯度(30%~60%, W/V)和 NaBr 密度梯度($\rho=1.100\sim 1.335\text{g}/\text{cm}^3$)两次离心纯化,取纯化的病毒区带^[5]。

1.3 Balb/c 小鼠的免疫

纯化 HHNBV-937 悬液($\text{OD}_{260}=0.02$)与等体积完全福氏佐剂充分乳化,颈部皮下注射 10~12 周龄的 Balb/c 小鼠(0.2ml/只),3 周后,用未含佐剂的病毒悬液腹腔注射加强免疫。3d 后,摘小鼠眼球放血,取脾脏用于细胞融合。小鼠血清按文献^[6]方法用正常虾组织吸收交叉反应抗体,ELISA 法^[7]测其中的抗体滴度,包被抗原为纯化 HHNBV-937($\text{OD}_{260}=0.005$)。

1.4 细胞融合

1.4.1 饲养细胞的制备^[7] 取 4 只未经免疫的 Balb/c 小鼠拉颈处死。消毒并剪开腹部表皮,每只小鼠腹腔注入 10ml 无血清 RPMI-1640 培养基,轻揉 1~2min,抽出腹水。经 1000g 离心 5min,用 37°C 预热的 HAT 培养基悬浮沉淀,加于 3 块 24 孔单克隆培养板(NUNCLON, 丹麦),7% CO_2 中 37°C 孵育过夜待用。

1.4.2 细胞融合^[7] 取免疫的 Balb/c 小鼠脾脏,制成细胞悬液,计数,按 10:1 与骨髓瘤细胞 sp2/0 混合进行细胞融合,融合剂为 50% PEG (MW=4,000),融合后,加于上述 3 块 24 孔单克隆板中,用含 10% 小牛血清和 2.2g/l NaHCO_3 的 HAT 培养基(RPMI-1640),7% CO_2 中 37°C 培养。

1.5 杂交瘤细胞的筛选、单克隆与扩大培养

1.5.1 杂交瘤细胞的筛选^[7] 杂交瘤细胞经 HAT 培养基培养 2 周后,换 HT 培养基再经 2 周培养,待孔中细胞集落铺满孔底时,取其上清液用于检测 HHNBV 抗体滴度。

用纯化 HHNBV-937 悬液($\text{OD}_{260}=0.005$)包被 96 孔酶标板(天津有机玻璃制品厂) A~D 行孔,1991 年自崂山采集的冰冻无病虾组织匀浆液包被酶标板 E~H 行孔,间接 ELISA 法^[7]初步检测融合细胞上清液的抗体。酶标显色系统为辣根过氧化物酶(HRP)标羊抗鼠 IgG (军事医学科学院微生物流行病学研究所,批号:9206)和联苯二胺(OPD)。显色后在 511 型酶标仪上读数,求 P/N 值,该值大于或等于 2.1 为阳性孔^[7]。

1.5.2 杂交瘤细胞的单克隆 在 96 孔单克隆板(NUNCLON, 丹麦)中两次用有限稀释法将阳性孔的杂交瘤细胞进行单细胞克隆,稀释度为 1 个细胞/孔^[7],并继续用上述方法筛选阳性孔。

* 黄健,于佳,宋晓玲. 中国对虾生理无机盐缓冲液的组成研究. 1993.(待刊)

1.5.3 单克隆杂交瘤细胞株的扩大培养及小鼠腹水的制备 经筛选后,用含10%小牛血清的RPMI-1640扩大培养抗HHNBV单抗杂交瘤细胞株。在Balb/c小鼠腹腔中注射液体石蜡油(0.5ml/只),一周后腹腔注射 $10^5 \sim 10^6$ 的单克隆杂交瘤细胞,2~3周后收取小鼠腹水。

1.6 单克隆抗体杂交瘤细胞株特性的测试

1.6.1 染色体数 取对数期生长的克隆化杂交瘤细胞,加入秋水仙碱至 $1\mu\text{g/ml}$,培养1~2h,1000rpm离心沉淀细胞,按文献方法^[7]将细胞低渗、固定、滴片及吉姆萨染色,镜检计染色体数。

1.6.2 单抗滴度 用ELISA间接法^[7]测定杂交瘤细胞培养液中的HHNBV抗体的滴度,包被抗原为纯化HHNBV-937 ($\text{OD}_{260}=0.005$)。

1.7 单克隆抗体的特异性

1.7.1 用HHNBV单抗对新鲜对虾样品的ELISA检测 对虾育苗期和养成期在现场取样,置于加有100 μl 0.2% NaN_3 的1.5ml离心管中,用灼烧消毒过的剪刀剪碎,加入1ml包被液(0.05M碳酸盐缓冲液, pH9.6),混匀,经7000g离心5min,上清液包被酶标板,进行间接ELISA^[7],第二抗体为HRP-羊抗鼠IgG。

1.7.2 HHNBV病变组织的酶联免疫染色 1994年8月于崂山红岛镇发病虾池现场取样,用70%乙醇固定病虾,经病理组织切片,按文献^[8]方法进行酶联免疫染色,底物为3,3'-二氨基联苯胺(DAB),再经苏木精轻度衬染,中性树胶封片,镜下观察照相。

2 结果

2.1 病毒的纯化和电镜观察

蔗糖密度梯度离心后,HHNBV乳白色区带呈现在棕色杂蛋白背景上。可见只经过一次密度梯度离心,HHNBV难以与杂蛋白有效地分离。该区带经再次NaBr密度梯度离心,病毒区带与杂蛋白区域分离良好,密度约 $1.21 \pm 0.02\text{g/cm}^3$ (图版I, A)。经负染,电镜下可观察到集中的杆状病毒粒子,大小约为 $150\text{nm} \times 450\text{nm}$ ^[5](图版I, B)。

2.2 小鼠血清的抗体效价

小鼠经HHNBV的颈部皮下免疫和再次腹腔加强免疫注射,取脾脏时,其血清中的HHNBV抗体滴度经ELISA测试,为1:320。

2.3 细胞融合的融合率与抗体阳性率

将骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按1:10的比例融合后,共分装了72孔。有细胞生长的孔数为60,融合率为83.3%,其中培养上清为阳性的是9孔,阳性率为12.5%。经有限稀释法筛选单克隆后,得到7株抗HHNBV的单克隆杂交瘤细胞株,标号是F2、F3、F8、F9、G4、G6、G10。经8个月约80代的连续培养及抗体特异性筛选,保留F9株,仍有稳定的产生抗体的能力。

2.4 杂交瘤细胞株的特性

2.4.1 染色体数 将F9株单抗杂交瘤细胞进行染色体计数,在12个细胞中,平均

染色体数为 87 条, 大于 sp2/0 细胞的平均染色体数 71 条。

2.4.2 HHNBV 抗体的滴度 ELISA 间接法测定的 F9 株杂交瘤细胞的培养上清中抗体滴度为 1:8, 腹水的抗体滴度为 1:1000。

2.5 单克隆抗体的特异性

2.5.1 新鲜虾样的 ELISA 自山东和浙江采集了发病和未发病的对虾苗种样品 22 份, 养成期样品 65 份, 在现场或实验室用 F9 株杂交瘤细胞的腹水进行 HHNBV 的 ELISA 检测, 其中阳性 27 份, 可疑 17 份, 阴性 45 份。详细结果在文献[9]~[11]中分别予以报道。

2.5.2 酶联免疫染色 用 F9 株杂交瘤细胞的小鼠腹水对 1994 年红岛发病对虾切片进行酶联免疫染色, 轻度苏木精衬染, 可见到皮下组织、造血组织、结缔组织等的核内包涵体样物质被染上较深的棕色, 背景呈均匀较浅的非特异性着色(图版 I, D)。还对 HHNBV 和 MBV 共同感染的斑节对虾亲虾样品用 F9 株单抗进行酶联免疫染色^[12], 在同一张切片上, HHNBV 的病变细胞核着褐色, MBV 包涵体区着色与背景相同(图版 I, E)。

3 讨论

我们采用单抗技术制备了皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)的单克隆抗体。细胞融合的融合率为 83.3%, 阳性率为 12.5%。经有限稀释法单克隆化, 得到 7 株抗 HHNBV 的单克隆抗体杂交瘤细胞株。对 F9 株单抗杂交瘤细胞的研究, 表明该株细胞的染色体数大于 sp2/0 杂交瘤细胞株的染色体数, 说明它是融合的细胞株。培养上清的抗体滴度为 1:8, 腹水滴度为 1:1000。

发病对虾组织切片的酶联免疫染色, 证实了 F9 株杂交瘤细胞所产生的抗体能与 HHNBV 发生反应, 排除了与对虾组织结构发生特异性结合的可能性。用该抗体对 HHNBV 和 MBV 共同感染的对虾组织切片进行了酶联免疫染色^[12], 更进一步说明了它是 HHNBV 的特异性抗体^[12]。同时, 还用 F9 株单抗对寿光和崂山的纯化 HHNBV 分离株进行 ELISA, 两分离株得出基本相同结果^[3], 提示该抗体可用于不同地区的对虾暴发性流行病原检测, 用 F9 株单抗对纯化的病毒囊膜、完整粒子和病毒衣壳进行 ELISA^[3], 结果表明该抗体的抗原决定簇位于病毒囊膜, 它可能有较高的中和反应滴度。由于缺乏对虾细胞系, 中和反应滴度尚难以测量。

将单抗技术应用到对虾病毒研究, 在国内是首次报道。国外 IHHNV 的单抗研究尚在进行中, 几株 IHHNV 单抗对长期冰冻样品间接 ELISA 检测时, 可得出很好的结果, 但对新鲜样品检测, 则与正常虾组织发生假阳性反应, 该抗体研究者经研究认为这可能是 IgM 与对虾血淋巴内凝集素(Lectins)的非特异性吸附^[2], 选择 IgG 型的单抗或将第二抗体改用抗鼠 IgG 的抗体后, 检测结果的假阳性问题可得到解决。在本文的 F9 株单抗的研究中, 用该抗体对 87 份新鲜对虾样品进行了检测, 未观察到与上述类似的假阳性反应, 检测结果的阳性反应与对虾发病情况基本相符, 且能在发病前 20~40d 作出预报^[3], 可见 F9 株单抗适用于对虾暴发性流行病的病原检测。