

# H11亚型禽流感病毒血凝素特异性单克隆抗体的制备

陈 清, 刘文博, 提金凤, 姚月琴, 刘秀梵\* (扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 江苏 扬州 225009)

[关键词] H11亚型禽流感病毒; 单克隆抗体; 血凝抑制试验  
[中图分类号] R392.11 [文献标识码] B

禽流感 (avian influenza, AI)是由 A型流感病毒 (AV)引起的一种禽类的感染和 (或)疾病综合征<sup>[1]</sup>。本病在世界各国均有存在, 我国自 1992年报道 AI以来, 已分离到了多株病毒<sup>[2]</sup>, 绝大多数都是低致病力毒株, 却也给养禽业造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。血凝抑制试验 (HI)试验快速、简便, 且价格低廉, 因此是最常用的一种检测 AV的方法。但多抗血清的制备比较繁琐, 不同批次的抗体质量差异大。如能制备出针对 AV HA蛋白的 mAb, 将会弥补以上多抗血清的缺点, 还可无限制的制备同质的抗体<sup>[4]</sup>。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 6株 H11亚型 AV分离株, H1、H6、H10亚型 AV分离株各 2株, H4、H5、H9亚型 AV分离株各 1株, 1株新城疫病毒分离株, 均由本室保存; 免疫原所用毒株: H11亚型 AV A/Duck/YangZhou/343/2003; 8周龄 BALB/c小鼠及 ICR小鼠购自扬州大学实验动物中心; SPF鸡胚购自山东省家禽科学研究所; 高糖型 DMEM干粉购自 Sigma公司; 小牛血清购自中美合资兰州民海生物工程有限公司; ISO-2 mAb亚类鉴定试剂盒购自 Sigma公司; PEG Solution (P7181)购自 Sigma公司。

**1.2 方法** SPF鸡胚扩增病毒, 收集尿囊液, 腹腔注射免疫 8周龄 BALB/c小鼠 (0.2 mL/只)。隔 2周再免疫 1次, 3周后加强免疫, 剂量、途径同前述。加强免疫 3 d后, 进行细胞融合。筛选用 HI试验 (微量法), 常规法进行克隆化及 mAb腹水的制备。杂交瘤细胞培养上清及腹水中的 mAb的效价, 均采用 HI法测定。Ig亚类鉴定按照说明书进行, 主要操作如下: 取蔗糖垫底提纯的抗原包被酶标板, 加入稀释好的 mAb, 37 作用 1.5 h, PBST洗涤 3次, 加入试剂盒中提供的抗鼠 IgG1、IgG3、IgG2a、IgG2b、IgA、IgM亚类血清, 37 作用 1 h, PBST洗涤 3次, 加入工作浓度的免抗羊辣根过氧化物酶结合物, 37 作用 1 h, PBST洗涤 3次, 加 OPD显色, 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止。mAb的特异性鉴定: 腹水分别与 H1、H4、H5、H9、H10亚型 AV及 NDV用 HI法测定。mAb的排谱试验: 用 mAb腹水与本室现存的 6株 H11亚型 AV作 HI测定。

## 2 结果

**2.1 杂交瘤细胞株的建立** 经融合, 2次克隆化, 最后获得 1株稳定分泌抗 H11亚型 AV HA mAb的细胞株, 命名为 3F10。

**2.2 mAb的特性鉴定** 杂交瘤细胞上清 mAb的 HI效价为 2<sup>5</sup>, 腹水 mAb HI效价为 2<sup>10</sup>。mAb的 Ig亚类为 IgG2a。以 HI试验作 mAb的特异性鉴定显示, mAb与其他亚型 AV及 NDV不反应。

**2.3 mAb的排谱试验** mAb腹水与 6株分离自不同时间不同地点 H11亚型 AV毒株做 HI排谱试验, 均起反应, 对受试 6株 H11亚型 AV的 HI效价为 2<sup>10</sup>~2<sup>11</sup>。

## 3 讨论

AV亚型较多, 国际动物卫生组织 (OIE)最新报告有 16个血凝素 (HA)亚型, 禽流感的多亚型性为该病的诊断和防制带来了很大的困难。本实验室从水禽分离到多种亚型的禽流感病毒, 并对各种亚型的 mAb进行研制, 为病原分类, 病原进化, 该疫病的监测和防制提供有用工具。

本实验得到 1株针对 H11亚型 AV HA的 mAb, 具有较高的血凝抑制效价, 与 6株分离株均反应, 且不同毒株间差异不大, 表明该 mAb具有亚型内毒株反应的广谱性。而该 mAb不能抑制其他亚型禽流感病毒及新城疫病毒的血凝作用, 说明该 mAb具有 H11亚型特异性。在抗原抗体反应中, 抗体与配体表位作用强弱主要在于其亲和力, 而本实验中筛选出的 mAb 3F10与免疫原的亲和力并不比其他毒株的亲和力强, 因此造成该 mAb对免疫原的 HI作用低于与其他毒株的 HI作用。

水禽是禽流感病毒的储存库。各种亚型的 AV均能从野生水禽中分离到, H11亚型在水禽中的存在也已被证实。由于水禽这种宿主的特性会导致基因重排与互换, 病毒基因重排后的毒株传播给人类, 对人类新毒株的演化产生一定的作用<sup>[5]</sup>, 严重威胁人类的健康和安全。因此, 这些 mAb的制备将为流感疫情预警提供必须的生物材料。

## 参考文献:

- [1] 卡尔尼克 BW. 禽病学 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 455 - 471.
- [2] 陈伯伦, 张泽纪. 禽流感 [J]. 中国家禽, 1994, (2): 32 - 33.
- [3] 唐秀英, 田国滨, 赵传删, 等. 中国禽流感流行株的分离鉴定 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(1): 1 - 5.
- [4] Espy MJ, Smith TF, Hamon MW, et al. Rapid detection of influenza virus by shell vial assay with monoclonal antibodies [J]. *J Clin Microbiol*, 24: 677 - 679.
- [5] 蔡家利, 官爱艳, 王 健, 等. 抗禽流感病毒轻链抗体库的构建 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(2): 188 - 190.

收稿日期: 2005 - 12 - 29; 接受日期: 2006 - 03 - 22

作者简介: 陈 清 (1982 - ), 女, 内蒙古包头人, 硕士生

\* Corresponding author, E-mail: xiufanliu@mail yzu. u. edu. cn  
Tel: 0514-7991417