

# 犬细小病毒单克隆抗体的制备及其与免疫血清 在血凝抑制中的比较

符兆英\* 渠川玫 田克恭

(军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

朱关福

(军事医学科学院微生物研究所, 北京 100850)

**摘要** 将用犬细小病毒免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞在聚乙二醇作用下融合,

---

\* 现在地址: 延安医学院 33 信箱 (邮编 716000)

1993-01-15 收稿

经筛选、克隆,得到6株稳定分泌犬细小病毒单克隆抗体的杂交瘤。用杂交瘤腹水作血凝抑制试验,检测分别含有犬细小病毒、猫泛白细胞减少症病毒和水貂肠炎病毒的标本,及CPV感染犬粪便标本,并与免疫血清作对比。结果表明,用单克隆抗体作血凝抑制试验,比用免疫血清作具有特异性高、操作简便省时等优点,而二者敏感性一致。

**关键词** 犬细小病毒,单克隆抗体,血凝抑制试验

犬细小病毒(*Canine parvovirus* CPV)是细小病毒科细小病毒属猫细小病毒种的一个宿主变异种<sup>[1]</sup>,可引起犬出血性肠炎和心肌炎<sup>[2,3]</sup>。其传染性强、发病率高、病死率高,对实验犬、军犬、警犬等集中饲养的犬群具很大危险性。故对感染犬作出及时诊断,以便采取措施防止蔓延甚为重要。

目前对CPV的检测主要用血凝-血凝抑制(HA-HI)法,但用免疫血清作HI,存在着用前需经红细胞吸收,和可与猫泛白细胞减少症病毒(FPLV)、水貂肠炎病毒(MEV)交叉反应等缺点<sup>[4,5]</sup>。

本实验制备了抗CPV的单克隆抗体(McAb),比较了用McAb和免疫血清作HI的特异性和敏感性,旨在建立一种以McAb代替免疫血清的特异、敏感、简便、经济的CPV检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

CPV和CPV免疫犬血清:军事医学科学院实验动物中心,FPLV和MEV:军事兽医研究所,骨髓瘤细胞Sp2/0:中国兽药监察所,BALB/c小鼠:中国医学科学院实验动物所。

### 1.2 CPV单克隆抗体的制备

用HA效价为1:1280的CPV悬液免疫BALB/c小鼠,将免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0在聚乙二醇作用下融合,HI法筛选,以有限稀释法克隆3次,得到6株分泌CPV-McAb的杂交瘤。将所得杂交瘤接种BALB/c小鼠生产杂交瘤腹水,用Sephadex G200柱层析提纯腹水,HI法测定提纯前后腹水效价,标准抗Ig血清作琼脂双扩散鉴定

McAb血清型。用HI法测定杂交瘤细胞在连续传代(共45代)期间和经液氮冻存、复苏后分泌McAb的稳定性,及McAb对热和长期保存的稳定性。

### 1.3 CPV免疫血清的处理

免疫血清的提纯用硫酸铵盐析法。作HI之前,免疫血清按以下方法吸收:将免疫血清以1:10稀释后与50%猪红细胞按9:1混合,4℃静置过夜或37℃静置30分钟后离心去除红细胞。

### 1.4 McAb与免疫血清对三种病毒的HI试验

将含CPV、FPLV、MEV的三种病毒悬液分别在96孔血凝板上以PBSS(0.015mol/L PBS, 0.9%NaCl, pH7.0)从1:10开始对倍稀释(每孔25μl),每种病毒悬液稀释相同的5排,每排最后一孔不稀释病毒,只加25μl PBSS作对照(第一排为红细胞对照,第2—5排为各相应抗体材料对照)。每种病毒的第一排各孔加PBSS 25μl作HA用;第2—5排分别加用PBSS按8个HI单位稀释的提纯前和后的1F<sub>3</sub>杂交瘤腹水,提纯前和后的免疫血清,每孔25μl,作HI用。振荡混匀后置37℃,30分钟后所有孔均加4℃预冷的1%猪红细胞悬液50μl(以含0.1%牛血清白蛋白的PBSS稀释),振荡混匀后置4℃,1小时后或待红细胞对照完全沉降后,观察判定抑制前后病毒凝集效价。以50%凝集的病毒最高稀释度为病毒凝集效价,抑制后(HI排)的病毒凝集效价比抑制前(HA排)者低2个以上稀释度为HI阳性,否则为阴性。

### 1.5 粪便材料的处理

粪便标本来自军事医学科学院动物中心  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的人工 CPV 感染幼犬试验。每克粪便加 9ml Eagles 液，搅拌均匀，稍停后吸上层液体，3000r/min 离心 30 分钟，吸上清液，加氯仿（按 1 : 10v/v），充分振荡后以 3000r/min 离心 30 分钟，吸上清液备用。

### 1.6 McAb 与免疫血清对 30 份粪便的 HI 试验

将 30 份粪便标本在血凝板上以每份 3 排对倍稀释，第 1 排作 HA，第 2、3 排分别加 1F<sub>3</sub> 杂交瘤腹水、免疫血清作 HI。详细方法与结果判定参见本文 1.4。

## 2 结果

### 2.1 杂交瘤与 McAb 的特性

6 株杂交瘤细胞所分泌 McAb 的血清型、杂交瘤腹水提纯前后之 HI 效价见表 1。杂交瘤细胞在连续 45 代传代期间和经液氮冻存 7 个月后复苏，分泌 McAb 的 HI 效价基本稳定（表 2）。McAb 经 56℃ 水浴 30 分钟；经 -20℃ 保存一年；和经 4℃ 保存半年，其 HI 效价不变（前后效价相同）。

表 1 McAb 血清型和杂交瘤腹水 HI 效价

杂交瘤株名	1E <sub>3</sub>	1F <sub>3</sub>	2D <sub>10</sub>	2E <sub>8</sub>	4E <sub>7</sub>	4F <sub>10</sub>
McAb 血清型	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub>	IgM	IgM	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub>
腹水效价 (X <sup>-1</sup> )	256	512	128	128	256	256
提纯前						
提纯后	—	512	128	—	—	—

“—”表示未作提纯

表 2 杂交瘤细胞传代期与复苏后 HI 效价 (X<sup>-1</sup>)

株名	基础效价	传代期效价 (天数/代次)				复苏后效价
		30/6	60/12	120/40	180/45	
1E <sub>3</sub>	32	32	32	32	32	32
1F <sub>3</sub>	32	32	32	32	32	32
2D <sub>10</sub>	16	16	16	8	16	16
2E <sub>8</sub>	16	16	16	8	16	16
4F <sub>7</sub>	32	32	32	32	32	32
4F <sub>10</sub>	32	32	32	32	32	32

### 2.2 McAb 与免疫血清的 HI 特异性

由 1F<sub>3</sub> 杂交瘤腹水与 CPV 免疫血清对 3 种病毒的 HI 结果（表 3）可见，腹水 McAb 不论提纯前后，以 8 单位稀释时，只对 CPV 为阳

性而对 FPLV、MEV 呈阴性；而免疫血清不论提纯前后，以 8 单位稀释时，对 CPV、FPLV、MEV 均呈阳性。

表 3 McAb 腹水和免疫血清对 3 种病毒的 HI

病毒	抑制前凝集效价 (X <sup>-1</sup> )	抑制后凝集效价 (X <sup>-1</sup> )			
		提纯前腹水	提纯后腹水	提纯前血清	提纯后血清
CPV	40	<10	<10	<10	<10
FPLV	80	40	80	<10	<10
MEV	80	40	80	<10	<10

### 2.3 McAb 与免疫血清的 HI 敏感性

由 1F<sub>3</sub> 杂交瘤腹水和 CPV 免疫血清对 30 份粪便标本的 HI 结果(表 4)可见,腹水 McAb

和免疫血清对所有标本的 HI 检测阳性符合率为 100%。

表 4 McAb 腹水和免疫血清对 30 份粪便的 HI

标本 序号	抑制前凝集 效价 ( $X^{-1}$ )	抑制后凝集效价 ( $X^{-1}$ )		标本 序号	抑制前凝集 效价 ( $X^{-1}$ )	抑制后凝集效价 ( $X^{-1}$ )	
		McAb	免疫血清			McAb	免疫血清
1	5120	<10	<10	16	160	<10	<10
2	2560	<10	<10	17	80	<10	<10
3	1280	<10	<10	18	160	<10	<10
4	1280	<10	<10	19	80	<10	<10
5	2560	<10	<10	20	40	<10	<10
6	10240	<10	<10	21	640	<10	<10
7	640	<10	<10	22	1280	<10	<10
8	320	<10	<10	23	1280	<10	<10
9	1280	<10	<10	24	640	<10	<10
10	2560	<10	<10	25	640	<10	<10
11	2560	<10	<10	26	160	<10	<10
12	80	<10	<10	27	320	<10	<10
13	80	<10	<10	28	640	<10	<10
14	40	<10	<10	29	320	<10	<10
15	40	<10	<10	30	640	<10	<10

## 3 讨 论

### 3.1 McAb 作 HI 检测 CPV 的优越性

在已建立的 CPV 检测方法中,以 HA-HI 应用最为普遍。迄今,国内外均用免疫血清作 HI。本实验对用 McAb 与免疫血清作 HI 作了比较,结果发现:①McAb 比免疫血清特异性高,只对 CPV 为阳性而对 FPLV、MEV 均呈阴性;②McAb 比免疫血清操作简便省时,用前不需红细胞吸收;③二者敏感性相同。

### 3.2 McAb 作 HI 检测 CPV 是否有局限性

到目前为止,国内尚未见有 CPV 不同血清型的报道,故尽管本实验只用了一个 McAb 株作 HI,其应用仍应有普遍性。此外,因血凝

蛋白普遍存在于 CPV<sup>[3]</sup>,本实验用 HI 法筛选,所得到的 McAb 是针对血凝蛋白的,故在应用中不应有局限性。进一步的工作需将所得 McAb 应用于检测不同来源的毒株和野毒株中去,以获得确切的证据。

## 参 考 文 献

- [1] Siegl G. Interviral, 1985, 23: 61.
- [2] Afshar A. Vet Bullit, 1980, 51: 605.
- [3] Siegl G. The Parvovirus, 1st ed. New York: Plenum Press, 1984, 363-388.
- [4] Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. Am J Vet Res, 1980, 41 (5): 784.
- [5] Appel MJG, Scott FW, Carmichael LE. Vet Res, 1979, 105 (8): 156.

# PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES (McAbs) AGAINST *CANINE PARVOVIRUS* AND COMPARISON BETWEEN MCABS AND SERA IN HEMAGGLUTINATION INHIBITION

Fu Zhaoying Qu Chuanmei Tian Kegong

(Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Zhu Guanfu

(Institute of Microbiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

**Abstract** Spleen cells from a BALB/c mouse immunized with canine parvovirus (CPV) were fused with Sp2/0 myeloma cells by polyethylene glycol. After screening and cloning, 6 hybrid cell lines steadily secreting monoclonal antibodies (McAb) were obtained. Hybridoma ascites were used in hemagglutination inhibition (HI) test to detect samples known containing CPV, feline panleukopenia virus (FPLV), and mink enteritis virus (MEV) respectively, and fecal samples from CPV infected dogs, compared with anti-CPV sera. The results suggested that HI test with CPV-McAbs was more specific and time-saving than that with anti-CPV sera, yet both were equally sensitive.

**Key words:** *Canine parvovirus*, Monoclonal antibody, Hemagglutination inhibition test