

禽成髓细胞性白血病病毒的繁殖 及其杂交瘤细胞株的建立

王彭军 刘福安

(华南农业大学动物医学系,广州,510642)

摘要 用实验室-20℃条件下保存6年的禽成髓细胞性白血病病毒(AMV)BAI-A株鸡传代血浆毒感染1~3日龄的雏鸡,接毒后15~45 d陆续发病。取其血浆毒,经差速离心和蔗糖密度梯度离心,获得较纯的AMV抗原。用此抗原免疫8~10周龄BALB/C小鼠,将其脾细胞与SP2/O瘤细胞进行融合,经ELISA筛选、克隆,共获得6株阳性杂交瘤细胞株。分别采用传染性支气管炎病毒(IBV)、新城疫病毒(NDV)、传染性法氏囊病毒(IBDV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、减蛋综合征病毒(EDS-76)及火鸡疱疹病毒(HVT)等抗原用间接ELISA法对阳性杂交瘤细胞进行特异性鉴定,其中2株证明为稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞系,而对其它病毒则呈阴性反应。用该2株单抗分别进行临床检测,其结果显示,AMV单克隆抗体对临床拟订有效的鸡群净化措施有着良好的应用前景。

关键词 禽成髓细胞性白血病病毒;群特异性抗原;单克隆抗体;杂交瘤细胞

中图分类号 S 858.31

禽成髓细胞性白血病(AMV)是禽白血病(AL)家族中的一种急性白血病(Baluda et al, 1961)。其病原所属的禽白血病肉瘤病毒群(AL/SV)常引起多种类型的肿瘤性疾病,如淋巴细胞性白血病,成红细胞性白血病,成髓细胞性白血病,骨髓细胞瘤等(刘秀梵, 1994)。由于常见的淋巴细胞性白血病一般不导致家禽集中的急性的大批死亡,故目前不引起养禽专业户的足够重视,但因其广泛发生,累计的死亡率、所引起的生长阻滞及产蛋率下降给养禽业造成了极大的经济损失。

本文报道了用实验室-20℃条件下保存6年的AMV BAI-A株鸡传代血浆毒,接种雏鸡,引起发病,从其血浆中提纯病毒,以免疫小鼠来制备单克隆抗体,试图通过建立单抗诊断试剂盒,为建立禽白血病的净化措施提供捷径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验鸡 1~3日龄AA雏鸡,由广东省南海牧工商联合公司狮山养鸡场提供;Avian雏鸡由广东正大康地养鸡场购进。

1.1.2 病毒株 AMV BAI-A株鸡传代血浆毒,由华南农业大学禽病研究室-20℃保存6年的毒株;IBV、IBDV、NDV、ILTV及EDSV等均由禽病研究室保存。HVT由华南农业大学动物医学系开发部惠赠。

1.2 方法

1.2.1 病毒繁殖及提纯 按文献(戚丹英等, 1988; 谈建明, 1990)方法改进。

- 1.2.2 免疫小鼠和细胞融合 用经纯化的 AMV 血浆毒作免疫抗原,免疫程序见参考文献(朱平等, 1994),加强免疫后 3 d,取脾细胞与 SP2/O 骨髓瘤细胞融合,融合步骤见参考文献(兰乃洪, 1994)
- 1.2.3 阳性杂交瘤筛选和克隆 采用国产平底聚苯乙烯酶标板,以纯化的 AMV 抗原作包被抗原进行间接 ELISA 筛选阳性孔,对 OD 值较高的阳性孔以有限稀释法进行克隆,3 次克隆后建株
- 1.2.4 单克隆抗体特异性分析及临床初步应用 采用间接 ELISA 法进行,用 IBV、IBDV、NDV、EDSV、ILTV 及 HVT 等抗原与单克隆抗体进行结合反应,排出反应谱 临床应用时,分别从广州近郊 3 个鸡场抽检 20 只鸡血清,待处理后,用 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液 1:5 稀释,包被各孔,以两株特异性反应较强的单抗进行 ELISA 检测。

2 结果

2.1 禽成髓细胞性白血病病毒的繁殖特性

雏鸡一般在接毒后饲养 20 d 左右开始发病,症状表现同文献(戚丹英等, 1988)所述,主要是嗜眠,贫血,实质器官出现肿瘤性种大,血液、肝脏等组织器官出现大量的成骨髓细胞。将所收集的血浆毒经差速离心和蔗糖密度梯度离心后,病毒条带基本分布在 30%~45% 梯度内,其结果同文献(刘祥等, 1993)报道一致;磷钨酸负染,进行透射电镜观察病毒大小、形态等特征,符合文献(卡尔尼克, 1991)报道

2.2 AMV 杂交瘤细胞株的建立

经细胞融合,间接 ELISA 筛选,从 6 个阳性杂交瘤孔中挑选 3 个孔进行扩大培养和克隆化,并进行单克隆抗体的生产和分析。

2.3 杂交瘤分泌单克隆抗体的特性及对其它病毒的反应特性

株阳性杂交瘤经 BALB/C 小鼠产生的腹水单抗用间接 ELISA 检测其效价,其中 2C₄ 和 1G₂ 两株效价较高: 2C₄ 为 2⁸; 1G₂ 为 2¹¹。用该两株单抗对其它病毒进行特异性鉴定,间接 ELISA 结果表明,IBV、IBDV、NDV、ILTV、EDSV 及 HVT 对 2C₄ 和 1G₂ 两株均不发生强烈交叉反应,只特异性地作用于 AMV,详见表 1

表 1 各病毒株对 AMV 单抗的特异性鉴定结果 (光密度值)

单 抗 株	包 被 抗 原						
	AMV ¹⁾	IBV	IBDV	NDV	EDSV	ILTV	HVT
2C ₄	1.15	0.40	0.41	0.25	0.26	0.30	0.42
1G ₂	1.32	0.35	0.39	0.41	0.28	0.35	0.39

1) 阳性血清 (免疫鼠血清 1:10 稀释) 对照值: 0.86; 阴性血清 (正常骨髓瘤细胞上清) 为 0.30

2.4 单克隆抗体的临床初步应用 (结果见表 2)

表 2 临床试验样品检测结果

鸡 场	品 种	年 龄	阳 性 率
A	粤黄鸡	60 周	5/20 ^{1),2)}
B	AA 鸡	12 周	4/10 ²⁾
C	“882”鸡	20 周	3/20

1) 分母为检测例数,分子为阳性例数; 2) A 鸡场 1 例样品可疑, B 鸡场 2 例样品为可疑

如表 2,应用 ELISA 试验检查部分鸡场的不同年龄、不同品种的鸡血清,发现禽白血病虽然在鸡中不引起发病症状,但其病原普遍存在,尤其 AA 鸡等白鸡对该病相对较敏感

3 讨论

AL 是家禽最重要的蛋传递性疾病之一,净化 AL 的措施目前国内唯一的方法是检出并淘汰带毒鸡,但由于内、外源性 ALV 感染,混淆了常规法如 ELISA 法对该病的诊断 (Clark et al, 1980; Fadly et al, 1981) 建立抗 ALV 各亚群的单克隆抗体,有希望在进行内、外源性 ALV 感染鉴别中带来科学依据。

AMV 属于反转录病毒,有囊膜,耐热性差,高温下快速灭活 (卡尔尼克, 1991) -15°C 时半衰期不超过一周 (Eckert et al, 1955), 在 -60°C 时尚能保存数年 (Bryan et al, 1954), 但是本试验过程中使用的种毒为 -20°C 已保存 6 年,理论上应已死亡,不会产生感染性的。所以根据发病情况证明此接种物尚残存少量带完整或部分囊膜的 AMV,接种的雏鸡本身已携带 AMV 的一些辅助病毒或者在接种物诱导下,使内源性 ALV 产生感染力的结果

目前,单克隆抗体制备已成为常规性技术,用于诊断的单抗试剂大多以诊断药盒形式提供。至今国外单抗试剂生产已发展为强大的产业,但国内大多数兽用单抗试剂尚停留在实验室试验阶段,因此研制出诊断试剂药盒并在生产实践中试用,将会给国内畜牧业带来巨大的经济效益

致谢 单克隆抗体的部分工作在广东省生物技术重点实验室完成,并得到杜伟贤副研究员的指导和帮助,特此致谢!

参 考 文 献

- 刘 祥,张 晶,张永久,等. 1993. 抗禽白血病病毒结构蛋白 p27 群特异性抗体的制备. 中国畜禽传染病, 1: 45~ 47
- 刘秀梵主编. 1994. 单克隆抗体在农业上的应用. 安徽: 安徽科学技术出版社, 162~ 172
- 兰乃洪. 1994. 减蛋综合征 197 病毒单克隆抗体的研究: [学位论文]. 广州: 华南农业大学动医系
- 朱 平,冯书章主编. 1994. 抗体实验技术. 长春: 长春出版社, 127~ 168
- 谈建明,刘福安. 1990. 禽白血病检测方法的建立和比较. 上海农学院学报, 8(2): 101~ 107
- 戚丹英,刘福安. 1988. 人工诱发禽成髓细胞性白血病. 华南农业大学学报, 9(2): 64~ 67
- 卡尔尼克 B. W 主编. 1991. 禽病学. 第九版. 高福等主译. 北京: 北京农业大学出版社, 334~ 381
- Baluda M A, Jameson P P. 1961. In vivo infectivity studies with Avian Myeloblastosis virus. Virology, 14: 33~ 45
- Bryan W R, Moloney J B, Calnan D. 1954. Stable standard preparations of the Rous Sarcoma virus preserved by freezing and storage at low temperatures. J Nat Cancer Inst, 15: 315~ 329
- Clark D P, Dougherty R M. 1980. Detection of avian oncovirus group-specific antigens by the enzyme-linked immunosorbent assay. J Gen Virol, 47: 283~ 291
- Eckert E A, Green I, Sharp D G, et al. 1955. Virus of avian erythromyeloblastic leukemia V II. Thermal stability of virus infectivity, of the virus particle, and of the enzyme dephosphorylating adenosine triphosphate. J Nat Cancer Inst, 16: 153~ 161
- Fadly A M, Okazaki W, Smith E J, et al. 1981. Relative efficiency of test procedures to detect lymphoid leukemia virus infection. Poultry Sci, 60: 2031~ 2044 (下转 93 页)
- ©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

STUDIES ON DEVELOPMENT OF DRUG- TOLERANT AND ATTENUATED O₂(Nor^r, Ch^f) AND O₇₈(Ch^f, Nor^s) STRAINS OF *Escherichia coli* FROM POULTRY

Huang Qingyun Chen Jinding Ren Tao Luo Xianzhong Ou Shoushu
(Dept. of Vet. Med., South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

This paper reports the development process of drug- tolerant and attenuated *Escherichia coli* O₂(Nor^r, Ch^f) and O₇₈(Ch^f, Nor^s) strains. With *Escherichia coli* O₂ and O₇₈ which are the most important serotypes of *E. coli* in poultry colibacillosis as parent strains, drug resistant and attenuated O₂(Nor^r, Ch^f) and O₇₈(Ch^f, Nor^s) strains of *E. coli* were induced by Norfloxacin and Chloramphenicol which are two antibacterial drugs most frequently used in veterinary practice. The essential characteristics of *E. coli* O₂(Nor^r, Ch^f) and O₇₈(Ch^f, Nor^s) strains were examined. The results indicated that the drug- tolerance and the heredity of *E. coli* O₂(Nor^r, Ch^f) and O₇₈(Ch^f, Nor^s) strains were stable. This achievement might be a good beginning for further developing efficient and multivalent vaccines by using spheroplast fusion technique.

Key words *E. coli*; drug- tolerant strain; attenuated strain

(上接 84 页)

PROPAGATION OF AVIAN MYELOBLASTOSIS VIRUS AND ESTABLISHMENT OF HYBRIDOMA CELL LINES

Wang Pengjun Liu Fu'an
(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

One to three- day old susceptible chicks were experimentally infected with the BAI- A strain of Avian Myeloblastosis Virus (AMV) in passaged chicken plasma stored at - 20°C for six years, and the onset of disease was seen 15 to 45 days postinoculation. BALB/C mice 8- 10 weeks of age were immunized with AMV antigens purified from AMV- infected chicken plasma by differential and isopycnic centrifugation in a discontinuous sucrose gradient. B lymphocytes from mouse spleen were hybridized with SP2/O myeloma cells, and six hybridoma cell lines finally established after specific antibody detection and cell cloning. Indirect ELISA demonstrated that only two ascitic monoclonal antibodies (McAb) reacted positively with specific AMV antigen and showed no cross reaction with IBV, IBDV, EDSV- 76, ILTV and HVT viruses, retaining its specific antibody- secreting property. Furthermore, the application of AMV- McAb in diagnosis and eradication of avian leukosis from chicken flocks was discussed.

Key words avian myeloblastosis virus; group- specific antigen; monoclonal antibody; hybridoma