

# 传染性牛鼻气管炎病毒单克隆抗体的制备及其应用

李健强

(西北农业大学兽医系)

David T. Shen D. Burger J. R. Gorham W. C. Davis

(美国华盛顿州立大学, 美国农业部动物疾病研究单位)

(美国华盛顿州立大学)

**摘要** 采用改进的融合技术得到318个杂交瘤细胞系。经ELISA筛选, 这些细胞系所分泌的抗体均和病毒抗原发生反应。亚克隆出26个杂交瘤细胞系, 制出特异的单克隆抗体, 并采用ELISA、放射免疫沉淀试验(RIPA)、SDS-PAGE、免疫印迹及病毒中和试验等对单克隆抗体的特性作了鉴定。应用单克隆抗体对牛疱疹病毒I型(Bovine Herpes Virus I (BHV-1))主要结构蛋白作了分析。

**关键词** 传染性牛鼻气管炎病毒, 单克隆抗体, SDS-PAGE, 免疫印迹, 病毒中和试验

牛疱疹病毒I型是传染性牛鼻气管炎[Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)]的致病因子, 它可引起牛的呼吸道感染, 结膜炎, 外阴阴道炎、流产、脑炎和全身性感染, 造成巨大的经济损失。现行的灭活疫苗仅具有一定的效力, 而活的致弱疫苗与流产、隐性感染有关, 也可由疫苗毒诱发流行。另外, 疫苗并不能防止野毒的感染或建立隐性感染, 故发展安全有效, 亚单位疫苗来预防本病引起了科学家极大兴趣。已发展出一种亚单位疫苗完全可以保护犊牛感染, 但这种疫苗, 免疫反应的成分是不明确的, 为此, 许多实验室正在努力研究这个病毒的亚单位构成, 已报道<sup>[1]</sup>BHV-1有22种结构的非糖多肽和11种糖蛋白多肽, 这些糖蛋白在宿主-病毒相互作用中以及在病毒中和作用中起重要的作用。本研究试图进一步阐明BHV-1病毒的结构多肽和含糖蛋白成分, 利用单克隆抗体找出与病毒感染性有关的主要多肽, 为今后制出有效的亚单位苗或建立特异诊断方法, 为本病的研究提供可靠的理论根据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

使用的毒株为BHV-1 Los Angeles (LA)强毒株;从美国标准培养物收藏处(ATCC)获得并在Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)细胞传代不到10次。Norden Resbo (NR)为BHV-1弱毒株(从一弱疫苗分得)。用MDBK单层细胞增殖病毒, 增殖前病毒经蚀斑纯化两次, 再接种于单层细胞, 在37°C孵育箱中培养36~48 h, 80%~90%

文稿收到日期: 1989-60-03

的细胞出现病变 (CPE), 再将培养瓶置  $-70^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中冻融两次, 以  $8000\text{ r}/\text{min}$  离心  $30\text{ min}$  弃去细胞碎片, 取上清液测其  $\text{TCID}_{50}$  或  $\text{Pfu}$  作为种毒, 分装小瓶置  $-70^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

### 1.2 病毒抗原的制备

MDBK 单层细胞形成后, 用低剂量 ( $< 5\text{ Pfu}/\text{Cell}$ ) LA 株或 NR 株 BHV-1 病毒感染,  $37^{\circ}\text{C}$   $1\text{ h}$  吸附后加入 2% 犊牛血清的 MEM (Minimum Essential Medium) 培养液  $37^{\circ}\text{C}$  培养, 直到 80%~90% 单层细胞出现病变, 将其培养物冻融 3 次, 再离心  $8000\text{ r}/\text{min}$   $30\text{ min}$  去细胞碎片, 所得含毒上清液, 再通过 40% 蔗糖离心  $25000\text{ r}/\text{min}$   $60\text{ min}$  (Beckman SW28 转头), 沉淀物再按原体积 1/20 悬浮于 TNE (Tris, NaCl, EDTA) 缓冲盐水中, 将此悬浮液通过 20%~60% 不连续蔗糖梯度离心 ( $25000\text{ r}/\text{min}$ )  $14\text{ h}$ , 收集含毒部分, 再经  $35000\text{ r}/\text{min}$  (Beckman SW41 转头) 离心  $90\text{ min}$ , 将沉淀物悬浮于 TNE 缓冲盐水中, 进行感染试验并分装冻存  $-70^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.3 病毒多肽的放射标记

生长好的 MDBK 单层细胞, 先用不含蛋氨酸的 MEM 洗 3 次, 然后在相同的培养基中让细胞维持  $3\text{ h}$ , 此时用  $2\text{ mL}$  含有  $10^{6.75}\text{ TCID}_{50}$  的 BHV-1 (LA 或 NR) 病毒感染单层,  $3\text{ h}$  过后用  $10\text{ mL}$  含有  $50\text{ }\mu\text{Ci}/\text{mL}$  的  $[^3\text{S}]\text{-}$ 蛋氨酸 或  $50\text{ }\mu\text{Ci}/\text{mL}$   $[^3\text{H}]\text{-}$ 葡萄糖胺的 MEM 代替接种物<sup>[2]</sup>, 感染后  $24\sim 36\text{ h}$  将含 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 mM 氟化苯磺酰 [Phenylsulfonfluoride (PHSF)] 混合液加入培养瓶并在冰浴中放置  $15\sim 30\text{ min}$ , 此后经超声裂解, 再在  $39000\text{ r}/\text{min}$  (SW41 转头) 离心  $60\text{ min}$ , 收获上清液即为溶解物, 储存于  $-80^{\circ}\text{C}$ , 经用 12% 三氯醋酸沉淀来测定溶解物标记蛋白的放射活性 (cpm)。结合率为 89.2%, 平均标记获得率为 32%, 在免疫沉淀试验中要达到  $1 \times 10^6\text{ cpm}/\text{每个样品}$ , 则需取溶解物  $0.5\sim 0.8\text{ mL}$ 。

### 1.4 单克隆抗体的制备

取病毒抗原 (LA) 免疫 BALB/c 小鼠三次, 首次抗原为  $0.02\text{ mg}$  加等量弗氏完全佐剂皮下注射, 第二次为两周后抗原  $0.05\text{ mg}$  加弗氏不完全佐剂腹内注射, 第三次为细胞融合前  $3\text{ d}$  静脉注射  $0.015\text{ mg}$  病毒抗原。3 天后无菌取出免疫 BALB/c 小鼠脾脏, 得到的脾细胞和  $\text{P}_3\text{-X}_{63}\text{-Ag}_{0.653}$  骨髓瘤细胞按 2.5: 1 的比例进行细胞融合试验<sup>[3]</sup>。

杂交瘤细胞的筛选采用间接 ELISA 法。

分泌特异抗体的阳性杂交瘤细胞, 经有限稀释法克隆, 然后一方面冻存阳性杂交瘤细胞系, 另一方面扩大培养生产单克隆抗体: 一是将阳性瘤细胞培养于大的培养瓶中, 直到几乎 90% 以上细胞死亡, 收获培养液经离心去细胞碎片, 上清液含有特异的单克隆抗体, 一是将培养好的阳性瘤细胞按  $2 \times 10^6$  细胞/每毫升腹腔注射给一周前注射过降植烷的 BALB/c 小鼠,  $5\text{ d}$  过后注意收集腹水, 内含高浓度单克隆抗体。

### 1.5 单克隆抗体的纯化

腹水或细胞培养液用饱和硫酸铵沉淀法<sup>[4]</sup> 或蛋白 A-琼脂糖凝胶 4B 亲和层析法提取免疫球蛋白。

### 1.6 ELISA

按下列程序进行:  $50\ \mu\text{L}$   $1:30-1:40$  稀释的病毒抗原加至96孔板让其  $4^\circ\text{C}$  过夜, 第二天取出洗3次, 每次  $3\ \text{min}$  ( $3\times 3'$ ), 然后加入  $50\ \mu\text{L}$  杂交瘤细胞培养液或腹液,  $37^\circ\text{C}$  孵育1 h 后洗  $3\times 3'$ , 再加  $50\ \mu\text{L}$   $1:200\sim 1:400$  稀释的兔抗鼠 IgG 碱性磷酸酶结合物, 置  $37^\circ\text{C}$  孵育1 h 再洗  $3\times 3'$ , 最后加底物溶液  $50\ \mu\text{L}$ , 室温下待出现颜色, 约  $10\sim 30\ \text{min}$ , 用 ELISA 读数器在  $405\ \text{nm}$  下测 OD 值, 同时设阳性和阴性血清对照。

### 1.7 病毒中和试验

采用微量中和试验法, 腹液或抗血清用不含血清的 MEM 在细胞培养96孔板连续二倍稀释后, 每个稀释度2孔, 每孔  $50\ \mu\text{L}$ , 然后向每孔加入  $100\ \text{TCID}_{50}/0.05\ \text{mL}$  BHV-1 (LA) 毒  $37^\circ\text{C}$  1 h 或  $4^\circ\text{C}$  过夜, 再加  $1\times 10^7$  细胞/mL  $0.1\ \text{mL}$  MDBK 细胞悬液, 置  $5\% \text{CO}_2$  的  $37^\circ\text{C}$  孵箱培养48 h 或72 h, 根据能否抑制细胞出现病变来判定其中和滴度。在评价补体促进中和作用时, 以  $5\%$  的浓度加入豚鼠补体或兔补体。

### 1.8 放射免疫沉淀试验 (RIPA)

取 [ $^{35}\text{S}$ ]-标记的或 [ $^3\text{H}$ ]-标记的病毒溶解物  $0.5\sim 0.8\ \text{mL}$  或对照细胞溶解物  $1\ \text{mL}$  与  $10\sim 50\ \mu\text{L}$  单克隆抗体或抗血清混合置冰浴  $90\ \text{min}$ , 然后加  $50\sim 100\ \mu\text{L}$  活化的金黄色葡萄球菌悬液, 混合后再置冰浴  $90\ \text{min}$ , 再离心  $12000\ \text{r}/\text{min}$   $2\ \text{min}$ , 去上清加  $1\ \text{mL}$  溶解缓冲液悬浮洗涤4次。最后1次剩余  $15\ \mu\text{L}$  溶解液, 加热  $95^\circ\text{C}$   $3\ \text{min}$ , 离心取上清加等量2倍的样品缓冲液 (内含2-巯基乙醇或不含) 又加热  $95^\circ\text{C}$   $5\ \text{min}$ , 快速冷却, 将样品加入聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。

### 1.9 SDS-PAGE

按 Laemmli 所述方法<sup>[5]</sup>进行。凝胶由  $5\%$  的堆积胶和  $7.5\%\sim 15\%$  的不连续梯度胶 (或称分离胶) 组成, 缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 ( $\text{pH}_{8.4}$ ), 电压  $180\sim 220\ \text{V}$ ,  $16\sim 18\ \text{h}$  电泳后将凝胶处理、干燥, 最后放上 Kodak XR 胶片自显影。

### 1.10 免疫印迹 (Immunoblot)

采用 Bio-Rad 电泳装置, 将凝胶上分离的多肽转移到硝酸纤维素纸上, 缓冲液为 Tris-甘氨酸 ( $\text{pH}_{8.4}$ ) 或碳酸盐缓冲液 ( $\text{pH}_{9.5}$ ), 电压  $50\sim 60\ \text{V}$   $6\ \text{h}$  或  $30\ \text{V}$   $16\ \text{h}$ , 然后取下硝酸纤维素纸放于玻板上待干后切成条与单克隆抗体作用, 采用生物素-亲和素-碱性磷酸酶检测盒 (ABC-AP VECTASTAIN Kit) (按说明书操作), 可见黑色不溶性沉淀带出现。

## 2 结果

### 2.1 杂交瘤的特性

采用改进的融合试验法, 将骨髓瘤细胞系 P3 $\times$ 63-Ag8.653 和 BHV-1 病毒抗原免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞在 PEG 作用下, 得到 318 个杂交瘤细胞系, 经 ELISA、病毒中和试验和免疫沉淀试验证明含有 BHV-1 病毒抗原的特异抗体。经有限稀释法克隆出 35 个杂交瘤细胞系, 其中 26 个为 IgG 类, 9 个为 IgM。这些克隆的杂交瘤细胞系分别注射给小鼠腹腔或让其在培养瓶中增殖, 得到的腹水和培养液中含有高浓度单克隆抗体。经饱和硫酸铵沉淀提纯后使用或直接应用于 ELISA、病毒中和试验, 放射免疫

沉淀试验以及免疫印迹等, 对其特性作了较为详细的鉴定, 其结果见表1。

表1 抗BHV-1病毒单克隆抗体的特性

克隆的瘤 细胞系	原始瘤 细胞系	单克隆 抗体	ELISA 滴度	病毒中和试验		免疫印迹	免疫印迹 识别的多肽	RIPA	RIPA识别 的多肽
				未加补体	加补体				
33	13D <sub>9</sub>	G <sub>1</sub>	1:102400	1:320	1:320	+++	130/71/56	+++	130/71/56
76	3G <sub>6</sub>	G <sub>2b</sub>	1:163840	<1:8	<1:8	+	130	+++	130/71/56
74	3C <sub>4</sub>	G <sub>2a</sub>	NG	<1:80	<1:80	ND	—	+++	130/71/56
196	2B <sub>8</sub>	G <sub>1</sub>	1:163840	1:32	1:32	++	130/91/44	+++	149/97
132	9B <sub>9</sub>	G <sub>1</sub>	<1:320	1:1024	1:1024	—	—	++*	71
186	12D <sub>9</sub>	G <sub>1</sub>	<1:320	1:5120	1:10240	+	71	++*	71
191	1G <sub>1</sub>	G <sub>2a</sub>	1:40960	1:2560	2:5120	++	71	++*	71
181	12H <sub>5</sub>	G <sub>2b</sub>	1:20480	1:16	1:32	+++	97	++	97
128	8E <sub>7</sub>	G <sub>2a</sub>	1:81920	1:32	1:128	—	—	++	97
177	12E <sub>10</sub>	G <sub>2b</sub>	1:40960	1:64	1:256	—	—	+++	97
213	7D <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	1:163840	1:64	1:128	—	—	+++	97
92	5E <sub>11</sub>	G <sub>1</sub>	1:10240	1:8	1:32	—	—	+++	97
101	6C <sub>3</sub>	G <sub>1</sub>	1:81920	1:32	1:32	+++	97	++	97
102	6C <sub>4</sub>	G <sub>1</sub>	1:81920	1:15	1:32	+++	97	++	97
185	13C <sub>12</sub>	G <sub>2b</sub>	1:2560	1:64	1:64	—	—	++	97
190	1C <sub>7</sub>	G <sub>1</sub>	1:5120	<1:8	<1:8	++	97	++	97
124	8C <sub>7</sub>	G <sub>1</sub>	1:81920	1:8	1:8	+++	97	++	97
208	6F <sub>5</sub>	G <sub>1</sub>	1:40960	<1:8	<1:8	—	—	++	97
130	8G <sub>3</sub>	G <sub>2a</sub>	1:16384	1:16	1:16	—	—	++	97
85	5B <sub>9</sub>	G <sub>1</sub>	1:5120	1:80	1:80	++	37/32	++	37/32

注: ND. 未做试验; \*需要加第二抗体

从表1看出, 克隆出的瘤细胞系均分泌抗BHV-1病毒特异的单克隆抗体。这些单克隆抗体具有强的或较强的免疫沉淀反应及病毒中和能力, 它们都有识别病毒结构多肽的能力。

## 2.2 BHV-1病毒的结构多肽以及被免疫血清和单克隆抗体所识别的病毒结构多肽

### (1) 病毒的结构多肽

将<sup>[35S]</sup>-标记的病毒感染细胞24~36h的细胞溶解物经SDS-PAGE后, 通过对放射自显影图的对比分析表明, BHV-1病毒至少含有25种结构多肽(图1A、B、C), 多肽分子量介于18kd到200kd, 其中15个是主要的, 它们是180, 150, 144, 130, 112, 97, 89, 71, 56, 45, 37, 32, 28, 25和18kd。

### (2) 抗BHV-1病毒免疫血清所识别的病毒多肽

为了鉴定BHV-1病毒主要抗原决定簇, 将BHV-1病毒免疫犊牛血清(血清中和滴度1:640)适当稀释后与标记的感染细胞溶解物作用, 再经SDS-PAGE和放射自显影分析可看到有5条沉淀带, 其分子量为180, 130, 71, 56和25kd, 而以分子量130、71和56kd出现的沉淀带最强(图1D)。

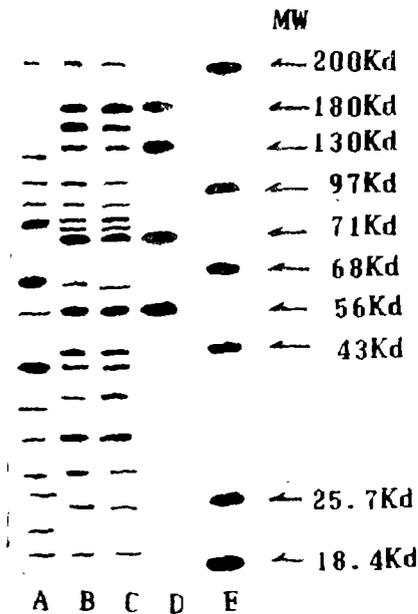


图 1 ( $^{35}\text{S}$ )—标记病毒感染细胞溶解物及其与免疫血清作用经 SDS—PAGE 和放射自显影后显示出病毒多肽成份。

A. 未感染细胞溶解物对照 B. BHV—1 感染细胞溶解物 (LA 株) C. BHV—1 感染细胞溶解物 (NR 株) D. 免疫血清与 B 作用后所识别的多肽 E. 标准分子量蛋白

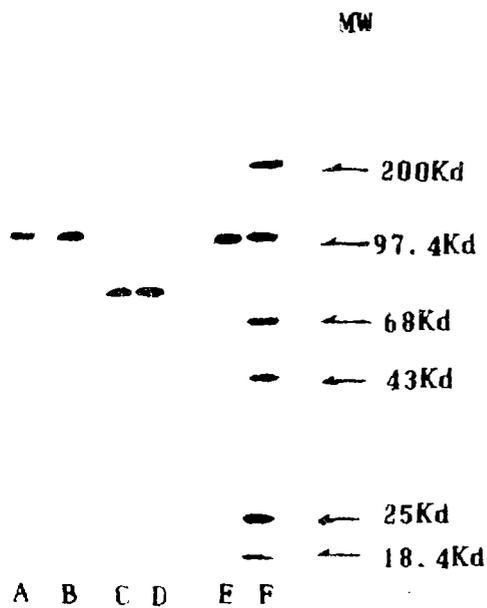


图 2 单一型单克隆抗体反应类型

A. 单克隆抗体\*92 所识别的 97kd 多肽 B. 单克隆抗体\*181 所识别的 97kd 多肽 C. 单克隆抗体\*186 所识别的 71kd 多肽 D. 单克隆抗体\*131 所识别的 71kd 多肽 E. 单克隆抗体\*101 所识别的 97kd 多肽 F. 标准分子量蛋白质

### ( 3 ) 单克隆抗体所识别的病毒多肽成分

根据 SDS—PAGE 和免疫印迹试验结果，可将克隆的单克隆抗体 ( 不包括 IgM ) 分为两大反应类型，第一类为单一型即单克隆抗体和病毒抗原作用后只形成一条沉淀带如图 2 和图 4 所示，在图 2 中单克隆抗体\*92，\*181 和 \*101 只和病毒 97 kd 多肽发生作用，而单克隆抗体 \*186，\*191 和 \*132 只和病毒的 71 kd 多肽发生作用，这是 BHV—1 病毒两种主要结构成分，它与病毒的感染性有关，相应的单克隆抗体有强的病毒中和能力；第二类为复合型，即单克隆抗体与病毒抗原作用后可形成一条或多条沉淀带如图 3 B、C 和图 4 B、D 所示，在图 3 B、C 中，单克隆抗体 \*33 和 \*76 可与病毒多肽 130，71 和 56kd 发生强的免疫沉淀作用，但在非还原条件下只看到一条沉淀带 ( 图 7 B、C ) 。

### ( 4 ) 病毒结构糖蛋白的分析

为了能鉴别出 BHV—1 病毒结构多肽中的含糖多肽及其它们在病毒感染中的作用，采用 [ $^{3}\text{H}$ ] 葡萄糖胺标记病毒感染细胞溶解物经 SDS—PAGE 和放射自显影分析和刀豆素 A—生物素—亲和素反应系统检查，证实 130 kd，71 kd 和 56 kd 是含糖的病毒多肽，我们还采用 Tunicamycin 阻断糖化蛋白合成敏感性试验来证明上述结果，还未取得满意效果。

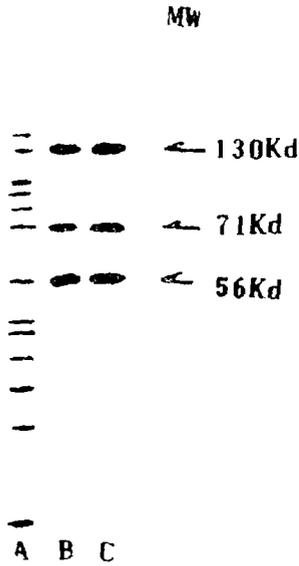


图3 复合型单克隆抗体反应类型  
 A. [35S]-标记BHV-1 (LA株) 感染细胞溶解物 B. 单克隆抗体\*33所识别的病毒多肽130kd/71kd/56kd C. 单克隆抗体\*97所识别的病毒多肽130kd/71kd/56kd

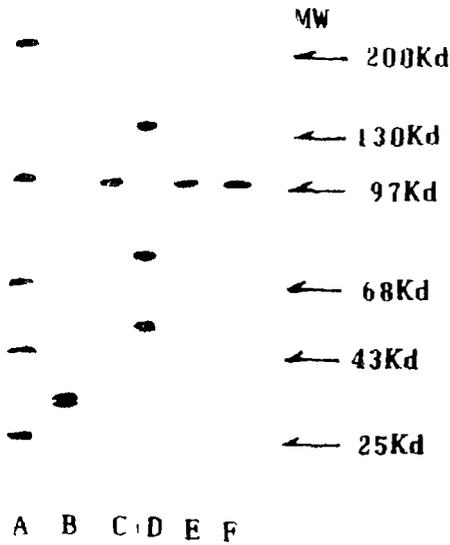


图4 纯化病毒粒子经 Immunoblot 后与单克隆抗体作用显示的病毒多肽分子量  
 A. 标准分子量蛋白质 B. 单克隆抗体\*85识别病毒37/32kd两条多肽 C. 单克隆抗体\*181识别病毒97kd D. 单克隆抗体\*33识别病毒130kd/71kd/56kd E. 单克隆抗体\*92识别病毒97kd F. 单克隆抗体\*101识别病毒97kd

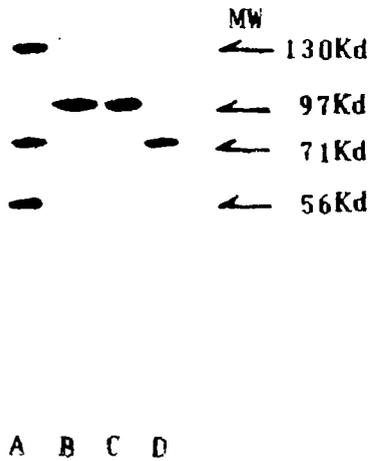


图5 [3H]-葡萄糖胺标记 BHV-1 病毒感染细胞溶解物与单克隆抗体作用显示出含糖的病毒多肽  
 A. 单克隆抗体\*33识别的多肽130kd/71kd/56kd, B. 单克隆抗体181识别的多肽97kd, C. 单克隆抗体\*92识别的多肽97kd, D. 单克隆抗体\*191识别的多肽71kd

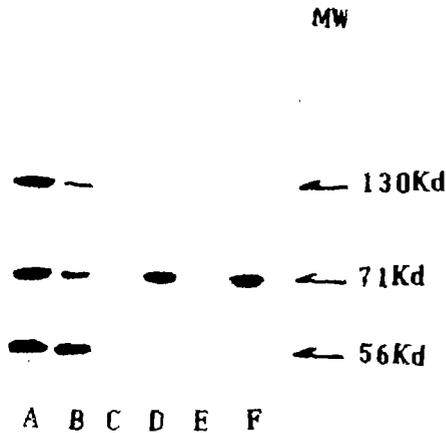


图7 不同单克隆抗体与蛋白A的结合力  
 A,B.为单克隆抗体\*33, C,D.为单克隆抗体\*186, E,F.为单克隆抗体\*136, A,C,E.为未加第二体的试验结果, B,D,F.为加入第二抗体的试验结果

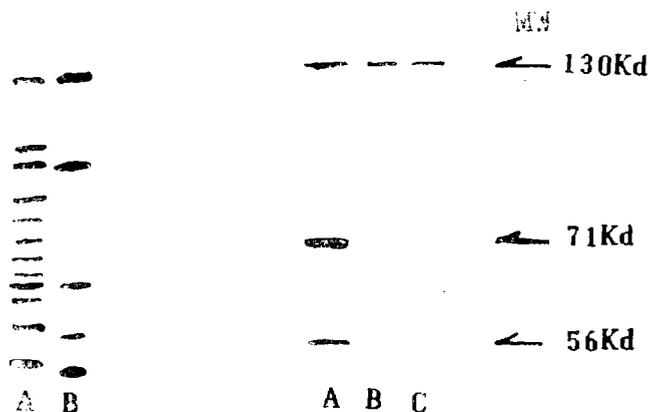


图6 (左) [ $^{35}\text{S}$ ] 标记病毒感染细胞溶解物 (右) 单克隆抗体\*33和\*76在还原条件  
A.还原条件下 B.非还原条件下 (A) 和非还原条件 (B,C) 所识别的多肽

### 3 讨论

传染性牛鼻气管炎病毒的生物学特性已作过大量的研究, 但对其结构成分与致病性有关的主要结构成分研究不够, 自80年代以来, 采用多种分子生物学技术和方法, 对病毒结构成分做了研究, Misra *et al.* 报道病毒有25~33种结构多肽<sup>[1]</sup>, Bolton *et al.* 报道 BHV-1 病毒有33种病毒蛋白成分<sup>[6]</sup>, 我们采用放射标记和 SDS-PAGE 以及银染色法<sup>[7]</sup>对 BHV-1 病毒粒子的结构成分的分析表明, 病毒至少有25种结构多肽, 这与上述研究者的结果基本一致, 也和其它疱疹病毒的结构成分相近。单纯疱疹病毒有33种多肽<sup>[8]</sup>, 伪狂犬病毒有20种多肽<sup>[9]</sup>, 鼠巨细胞病毒有26种多肽<sup>[10]</sup>, 以及 Epstein-Barr 病毒有33种多肽<sup>[11]</sup>。在 BHV-1 病毒结构多肽中, Misra *et al.* 证明有11种糖蛋白<sup>[1]</sup>, Marshall *et al.* 表明有10种含糖蛋白<sup>[2]</sup>, 我们分析表明有4种主要的含糖蛋白(130 kd, 97 kd, 71 kd 和 56 kd), 其中130 kd、71 kd 和 56 kd 可被免疫血清和单抗\*33、\*76 和 \*191所识别, 据其他研究者证实, 这3种多肽在还原条件下(即样品处理液中含有2-巯基乙醇)可呈3条沉淀带即在130 kd、71 kd 和 56 kd 处分别可见, 而在非还原条件下仅在130 kd 处显出沉淀带, 因此说明130 kd 是71 kd 和 56 kd 的肽聚合体, 它们借助二硫键相连, 我们也证实了上述结果如图6所示。

71 kd 多肽是病毒的主要结构成分, 位于病毒粒子表面, 与病毒的致病性有关, 这种多肽相对应的单抗\*186, \*132 和 \*191 具有很强的病毒中和作用, 可比免疫血清病毒中和滴度(1:640)高2~3倍, 这种中和力不因补体的加入而增强, 这一点与文[12]报道的结果一致。它是 BHV-1 亚单位疫苗有希望的候选多肽成分。

97 kd 多肽也是病毒主要成分之一, 是病毒的显性抗原决定簇, 在克隆的26个杂交瘤中, 可识别这种多肽的有17个, 占其克隆杂交瘤细胞系的65.4%, 其相应的单抗具有较强的病毒中和作用。在中和试验中, 有些单抗如 \*128, \*177 在加入适量补体后可使其病毒中和力提高2~3倍(见表1)。

单克隆抗体对蛋白A的结合力有差别, 若在试验过程中加入第二抗体——兔抗鼠 IgG, 可助其结合力的提高如图7所示。单抗\*186, \*132 在不加第二抗体时(图7

C, E) 不出现沉淀带, 而在加入第二抗体后出现清晰的沉淀带(图7D, F)。

据 Marshall *et al.* 报道, 180 kd 和 150 kd 分别是 97 kd 和 77 kd 的二聚体<sup>[2]</sup>。而文〔12〕报道, 180 kd 是 91 kd 的二聚体。在我们的实验中多次出现 180 kd 和 150 kd 的沉淀带, 但未确定它们之间的二聚体关系。

致谢 本研究得到美国爱达荷大学农学院和美国华盛顿州立大学兽医学院美国农业部动物疾病研究单位的资助, Soonhee Kwon 女士的合作。

#### 参 考 文 献

- 1 Misra Vikram *et al.*, *J Virol.* 1981, 40: 367~378
- 2 Marshall R L *et al.*, *J Virol.* 1986, 57: 745~753
- 3 李健强等. 西北农业大学学报, 1988, 16 (2) : 18~22
- 4 Zola Hand, Brock D S. *Techniques for The production and characterization of Monoclonal hybridoma: Techniques and applications*, CRC Press INC, 1982, 1~57
- 5 Laemmli U K. *Nature*, 1970, 227: 680~685
- 6 Bolton David C *et al.*, *Vet Microbiol*, 1983, 8: 57~68
- 7 Moeremans M *et al.*, *J Immunol Meth*, 1984, 74, 353~360
- 8 Epear P G *et al.*, *J Virol*, 1972, 9: 143~159
- 9 stevely W S, *J Virol*, 1975, 16: 944~950
- 10 Chantler J K *et al* *Virology*, 1978, 86: 22~36
- 11 Dolyniuk M *et al.*, *J Virol*, 1976, 17: 935~949
- 12 Van Dramen, Lit el-Van den, Hurk S *et al.*, *J Virol*, 1986, 59: 401~410

# Preparation and Application of Monoclonal Antibodies of Infections Bovine Rhinotracheitis Virus(BHV-1)

Li Jianqiang

*(Department of Veterinary Science Northwestern Agricultural University)*

David T. Shen    Diet Burger    John R. Gorham

*(Animal Disease Research Unit, USDA, USA)*

W. C. Davis

*(Washington State University, USA)*

**Abstract** 318 hybridoma cell lines have been obtained by using improved fusion method. These cell lines screened by ELISA are the secreted specific antibodies reacting to BHV-1 virus antigen. 26 hybridoma cell lines were cloned to produce specific monoclonal antibodies to the virus antigen. The characteristics of monoclonal antibodies were identified with ELISA, RIPA, SDS-PAGE, Immunoblot and Virus Neutralization test. The major BHV-1 structural peptides were analysed by monoclonal antibodies.

**Subject words** infectious bovine rhinotracheitis virus, Monoclonal antibody, SDS-PAGE, Immunoblot, Virus neutralization test