

抗登革热Ⅱ型病毒蛋白单克隆抗体的若干特性

吴美雄 严泳措

(微生物与免疫学教研室)

摘要 1983年, 我室建立了两株能分泌抗登革热Ⅱ型(DEN-2)病毒单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞株。本文进一步分析了这两株McAb的若干特性。包括①两株McAb与DEN-2病毒感染的C6/36细胞裂解物进行双向免疫抗散, 形成融合的沉淀线; ②两株McAb都能沉淀DEN-2病毒感染的C6/36细胞裂解物中的分子量约为60K的抗原; ③这两株McAb能抑制由蔗糖密度梯度离心纯化的DEN-2病毒的红细胞凝集性; ④对DEN-2病毒感染的C6/36细胞作间接免疫荧光染色, 呈膜抗原染色阳性。这些结果表明, 与这两株McAb结合的抗原决定簇存在于DEN-2病毒的同一种蛋白上, 可能是DEN-2病毒的囊膜糖蛋白V₃。同时证明这两株McAb能保护小白鼠免受DEN-2病毒的致死性感染; 能有效地抑制DEN-2病毒在C6/36单层细胞中产生的融合细胞病变。此外, 用火箭电泳, 分析了在感染的C6/36细胞中, McAb针对的DEN-2病毒抗原的合成动态。

单克隆抗体(McAb)以其均一性和针对单一的抗原决定簇, 成为研究病毒特定抗原决定簇及其与生物学功能关系的良好工具, 已经成功地应用于许多病毒的抗原定位分析。

1983年, 我室建立了两株小鼠B淋巴细胞杂交瘤(17-3-D/5, 17-1-C/7)⁽¹⁾, 所分泌的McAb具有严格抗DEN-2病毒的特异性, 免疫球蛋白亚类分别为IgG₁和IgG₂。本文进一步对这两株杂交瘤细胞所分泌的McAb的某些特性进行了分析鉴定。包括其多肽的特异性, 被动保护作用, 抑制DEN-2病毒在C6/36单层细胞中产生的细胞融合病变, 以及观察该McAb所针对的病毒蛋白在宿主细胞中的合成动态。

材料与方 法

病毒与细胞培养: DEN-2病毒(New Guinea C株), 由北京卫生部生物药品检定所提供。白纹伊蚊C6/36细胞系, 由广东省卫生防疫站分赠, 用含10%灭活小牛血清的RPMI 1640培养液(pH 7.0), 置32℃恒温箱中培养。

腹水制备⁽¹⁾: 17-3-D/5(D/5), 17-1-C/7

(C/7)杂交瘤细胞分别用无血清RPMI 1640稀释, 腹腔注射BALB/C小鼠。注射后第13天, 抽取腹腔液, 低速离心。上清经56℃, 30分钟处理。并滴定血凝抑制效价, 分装小管于-70℃冻存备用。

细胞裂解物的制备: 按7~10个TCID₅₀ DEN-2病毒/细胞的感染量, 感染C6/36单层细胞, 用含1%小牛血清的RPMI 1640作为维持液, 置32℃恒温箱中培养。待细胞病变(CPE)达+++~++++时, 轻轻倒出维持液, 用NET缓冲液(150mM NaCl, 5mMEDTA, 50mM Tris, 0.02%叠氮钠, pH9.0)冲洗细胞单层一次。收集瓶壁上的细胞, 按每10⁷个细胞加入0.2ml的比例, 加入细胞裂解液(含20mM Tris-HCl, pH9.0, 137mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂, 1%NP-40和1%甘油)⁽²⁾混悬, 置37℃水浴中作用10分钟或于4℃作用3~4小时, 使细胞裂解。在4℃条件下, 经10,000 rpm离心30分钟, 取上清分装小管, 置-20℃冻存。依同法对未感染病毒的C6/36细胞制备细胞裂解物, 作为正常细胞对照。

免疫沉淀: 于1ml经DEN-2病毒的或未经病毒感染的C6/36细胞的裂解物中, 加入

8ml 冷 NET 缓冲液。先用10% SPA 菌体悬液 (上海生物制品研究所, 批号: 83-1, 用含 0.1MPBS, pH 7.2, 0.5% NP-40, 2mM 甲硫氨酸, 0.22% 叠氮钠的 SPA 菌体稀释液稀释), 100 μ l 吸收二次, 每次作用30分钟, 以去除非特异性吸附的蛋白质。然后加入15 μ l 的 McAb 腹水, 于4 $^{\circ}$ C 作用24小时, 约4小时振荡一次, 使抗原抗体充分结合。再加入10%的 SPA 菌体悬液 100 μ l, 继续作用24小时。经低速离心后, 沉淀物用冷 NET 缓冲液洗四次, 去除未结合的蛋白质。最后用电泳样品缓冲液 (0.01M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-ME, 10% 甘油和 0.001% 溴酚蓝) 100 μ l 重新混悬沉淀物, 置56 $^{\circ}$ C 水浴箱中20分钟, 使抗原抗体 SPA 复合物解离。经 2000rpm 离心10分钟, 用微量注射器小心吸取上清20~40 μ l 进行 SDS-PAGE 垂直板电泳。电泳毕, 用铬银染色法染色^[3]。每次电泳设标准蛋白对照, 以便测定分子量。

DEN-2 病毒的浓缩与提纯: 本文按黄志尚等浓缩 Sindbis 病毒的方法^[4], 从 DEN-2 病毒感染 C6/36 细胞的上清液中浓缩 DEN-2 病毒。所得病毒的浓缩液按 Stollar (1969)^[5] 报告的方法, 用蔗糖密度梯度离心法进行纯化。方法简述如下: 先在离心管中制备 20ml 5~25% 蔗糖连续密度梯度介质, 小心加 1.5ml 的病毒浓缩液叠加其上。在 MSE-75 型冷冻离心机中, 于4 $^{\circ}$ C 条件, 以 29,600 rpm 水平式离心3小时, 用分部收集器进行分部收集, 每管20滴, 共收集31管, 测定每管的 DEN-2 病毒血凝效价及蛋白含量。

DEN-2 病毒感染细胞膜的间接免疫荧光检测: 选一批生长良好的 C6/36 单层细胞小瓶, 按 3 TCID₅₀/细胞的感染量接种 DEN-2 病毒, 置32 $^{\circ}$ C 培养。于0、3、6、9、12、15、18、21、24小时, 取出一瓶感染病毒的细胞, 进行 McAb 的间接免疫荧光膜抗原染色^[6]。未感染的 C6/36 细胞作同样处理作为正常细胞对照。以50%以上的细胞着色作为阳性。

McAb 对 DEN-2 病毒在 C6/36 单层细胞中产生细胞融合病变的抑制作用, 在16孔聚乙烯

细胞培养板上进行^[2]。先在培养板接种 C6/36 细胞, 每孔1ml (约含10⁵个细胞), 置32 $^{\circ}$ C, CO₂ 恒温箱中培养16~20小时。然后小心吸出培养液, 每孔接种 DEN-2 病毒悬液 0.1ml (100 TCID₅₀), 于32 $^{\circ}$ C 吸附1小时后, 吸出接种物, 用含双抗的 Hanks 液冲洗细胞2次。再加入含有一系列不同稀释度 McAb 的维持液, 置32 $^{\circ}$ C, CO₂ 恒温箱中培养, 观察5天。并设正常腹水对照, 正常细胞对照, McAb 对照及病毒对照。以能抑制50%的细胞融合病变形成的最高稀释度作为 McAb 的抑制效价。

McAb 的被动保护作用: 预先将 DEN-2 病毒在3周小白鼠脑内接种, 经反复传代适应, 剖取发病濒死的小鼠脑, 置-70 $^{\circ}$ C 贮存。选一批3周龄健康小白鼠, 随机分组。分别于腹腔注射1:50、1:100的 McAb 腹水, 或小鼠骨髓瘤腹水, 或单纯稀释液。经12小时后, 脑内接种20%的 DEN-2 病毒鼠脑悬液 0.03ml, 接种后观察20天。记录各组小鼠的存活率。

结 果

一、两株 McAb 与感染细胞裂解物的双向免疫扩散 本实验所用的两株 McAb 已证明在免疫荧光测定, 血凝抑制及补体结合试验中都具有严格的抗 DEN-2 病毒的型特异性^[1]。为了了解这两株 McAb 之间的关系, 实验用生理盐水将两株 McAb 腹水稀释成1:4、1:10, 分别与 DEN-2 病毒感染细胞的裂解物, 加至琼脂玻片的各小孔中 (图1), 每孔30 μ l, 置37 $^{\circ}$ C 湿盒中扩散24小时。结果发现, 两株 McAb 均与 DEN-2 病毒感染细胞的裂解物形成沉淀线, 并且可见二条沉淀线互相融合。但两株 McAb 与正常 C6/36 细胞的裂解物则无沉淀线产生。表明此两株 McAb 所针对的抗原决定簇是在 DEN-2 病毒的同一种蛋白上。

二、与两株 McAb 结合的相应抗原及其分子量的测定 本实验用含 SPA 的葡萄球菌菌体悬液作为免疫沉淀剂、沉淀 DEN-2 病毒感染 C6/36 细胞的裂解物与 McAb 所形成的免疫

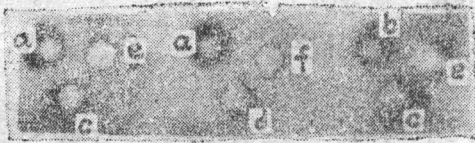


图1 两株 McAb 腹水与 DEN-2 病毒感染细胞裂解物进行双向免疫扩散。a. DEN-2 病毒感染 C6/36 细胞裂解物；b. 正常 C6/36 细胞裂解物；c. D/5 McAb 腹水(1:10)；d. D/5 McAb 腹水(1:4)；e. C/7 McAb 腹水(1:10)；f. C/7 McAb 腹水(1:4)。在 a-c, a-e 孔之间及 a-d, a-f 孔之间形成融合的沉淀线

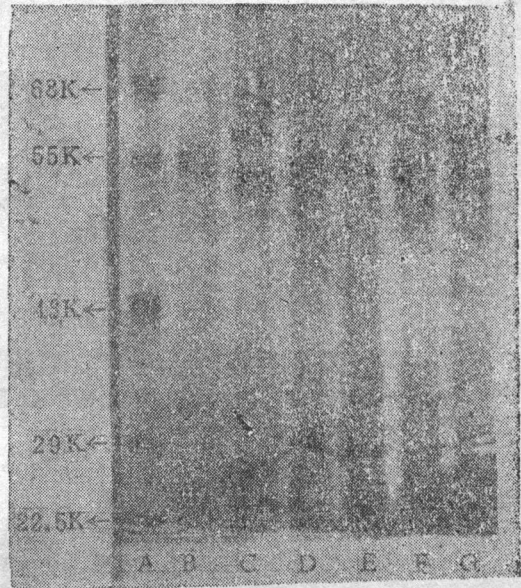


图2 SDS-PAGE 电泳图。电压100伏，电泳12小时，用铬银染色。A. 标准蛋白，从上至下，牛血清白蛋白(68k)、兔 IgG 重链(55k)、卵白蛋白(43k)、碳酸酐酶(29k)、兔 IgG 轻链(22.5k)；B. D/5 McAb 腹水的空白对照；D、F、分别为 D/5、C/7 McAb 腹水与正常 C6/36 细胞裂解物的免疫沉淀对照；E. 小鼠骨髓瘤腹水对照；C、G、分别为 D/5、C/7 McAb 腹水与 DEN-2 病毒感染的 C6/36 细胞裂解物免疫沉淀试验组。在分子量为 68k~55k 区间有一蛋白带，分子量为 60k

复合物，经 SDS 与 2-ME 解离后，进行 SDS-PAGE，以测定被沉淀抗原的分子量。实验同时包括：① McAb 腹水与正常 C6/36 细胞的裂解物作用后，用 SPA 菌体进行免疫沉淀作对照；② 单用 McAb 腹水，不加 DEN-2 病毒抗原或正常细胞抗原作对照；③ 小鼠骨髓瘤细胞腹水，加 DEN-2 病毒抗原作对照。从图 2 结果可见，无论是 McAb 腹水空白对照(B 径)，正常 C6/36 细胞对照(D、F 径)，还是正常腹水对照(E 径)，在分子量为 68k~55k 区间均未发现蛋白带，而用 McAb 腹水与含 DEN-2 病毒抗原的裂解物作免疫沉淀的试验组的电泳径道中(C 与 G 径)，则在分子量为 68k~55k 之间，均显示出一条特异的蛋白带。以同一凝胶板上的几种标准蛋白的迁移率为横坐标，相应分子量的对数为纵坐标，用统计学进行直线回归，计算得这一条特异蛋白带的分子量为 60k。这一结果表明，与 C/7、D/5 两株 McAb 结合的抗原，其分子量均为 60k。且这一抗原是 DEN-2 病毒感染 C6/36 细胞所特有的。

三、两株 McAb 对纯化 DEN-2 病毒的血凝抑制作用 以 DEN-2 病毒，感染 4 批 C6/36 细胞，共收集受感细胞培养液约 2550ml。经 PEG6000 沉淀，PEG2000 进一步浓缩，使病毒感染的细胞培养液浓缩 100 倍。取此浓缩液 1.5ml，经连续蔗糖密度梯度(5~25%)，29,600rpm 高速离心 3 小时，然后分部收集 31

管，并测每管的蛋白含量及血凝素效价，结果见图 3。取血凝效价最高(1:280)，蛋白含量较低(3.6mg)的第 25 管，作为较纯的 DEN-2 病毒。取 8 单位提纯的 DEN-2 病毒血凝素分别与 C/7、D/5 两株 McAb 腹水做血凝抑制实验。结果两株 McAb 的血凝抑制效价均大于 1:100。表明两株 McAb，均能有效地抑制由蔗糖密度梯度离心纯化的 DEN-2 病毒的红细胞凝集性。说明其所针对的抗原决定簇与病毒的结构蛋白密切相关。

四、两株 McAb 对 DEN-2 病毒感染的 C6/36 细胞膜抗原的间接免疫荧光染色 DEN-2 病毒感染过程中，其囊膜糖蛋白 V₁ 嵌合在宿主细胞膜上，因而有必要了解这两株抗

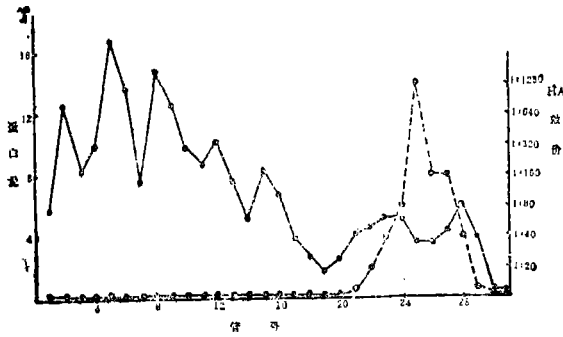


图3 DEN-2病毒的浓缩与提纯。蔗糖密度梯度(5~25%) 29600rpm × 3hr 离心后, 收集31管。分别测定每管的血凝效价(○)及蛋白量(●), 其中第25管含有高的血凝效价和低的蛋白含量

DEN-2 病毒的 McAb 是否与受染细胞膜上产生的病毒特异性抗原相结合。实验用 3TCID₅₀/细胞的 DEN-2 病毒感染 C₆/36 细胞, 置 32℃ 孵育不同时间。然后用两株 McAb 分别与各个时间收集的 C₆/36 细胞进行间接免疫荧光染色。结果见表 1。实验结果表明, C₆/36 细胞在感染 DEN-2 病毒后, 最早于 18 小时, 即有 50% 以上的细胞荧光着色。在荧光显微镜下, 可见细胞表面有翠绿色的荧光颗粒, 有些在细胞周边密集成环, 有些呈半环状。而 McAb 与未感染 DEN-2 病毒的 C₆/36 细胞对照, 细胞表面均未发现有类似的荧光颗粒。证明这两株 McAb 能与 DEN-2 病毒感染的 C₆/36 细胞膜上

表 1 用 McAb 对 DEN-2 病毒感染 C₆/36 细胞的免疫荧光染色
检测细胞表面特异性病毒抗原形成的动态

腹 水 1:10	正常 C ₆ /36 细 胞	DEN-2 病毒感染 C ₆ /36 细胞后免疫荧光染色的时间 (hr)									
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	
17-3-D/5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
17-1-C/7	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
sp 2/0	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

-、阴性; +、阳性; 以大于 50% 的细胞着色为阳性。ND, 未进行试验。

的抗原结合, 这种结合反应是病毒特异的。

五、两株 McAb 抑制 DEN-2 病毒在 C₆/36 单层细胞中所产生的细胞融合病变 实验用 100TCID₅₀ 的 DEN-2 病毒感染 C₆/36 单层细胞后, 加入含有不同稀释度 McAb 的维持液培养。观察这两株 McAb 对 DEN-2 病毒在 C₆/36 细胞单层中产生的细胞融合病变有无抑制作用。实验结果表明, 两株 McAb 均能有效地抑制 DEN-2 病毒在 C₆/36 单层细胞中所产生的特征性细胞融合病变。C/7 与 D/5 两株 McAb 的抑制效价分别为 1:40 与 1:320。这一结果提示此两株 McAb 所针对的抗原决定簇与 DEN-2 病毒的细胞融合活性密切相关。

六、McAb 的被动保护作用 结果见表 2, 3 周龄小白鼠, 于感染 DEN-2 病毒前 12 小时, 用 1:50 或 1:100 的 McAb 腹水作腹腔注射后,

均能保护部份小鼠免受 DEN-2 病毒的脑内致死攻击。McAb 注射组小白鼠, 经观察 20 天后, 存活率为 42~86%。而用小白鼠骨髓瘤腹水或稀释液注射的全部小白鼠, 则在接种后第 5 天, 出现毛松, 弓背, 于第 7、8 天, 后肢出现麻痹而死亡。从而证明这两株 McAb 均能保护小白鼠免受较大剂量的 DEN-2 病毒的感染。

七、应用 McAb 检测与其相应的抗原在宿主细胞中的合成动态 用 DEN-2 病毒感染一批 C₆/36 单层细胞培养瓶, 从感染病毒后 0、3、6、9、12、15、18、21 小时分别收集感染病毒的细胞, 制备细胞裂解物, 与 D/5 McAb 进行火箭电泳, 结果见图 4。从病毒感染后 0、15、18、21 小时, 均有可见的沉淀峰出现。并在 15 小时后, 沉淀峰可随时间的延长而升

表 2 二株 McAb 对 DEN-2 病毒感染小鼠的被动保护作用

试验组别	预 处 理* (i.p)	20% 的感染鼠脑§ 或正常鼠脑悬液 (i.C)	小鼠存活率♂		存活率(%) 均 数
			实验 1	实验 2	
1	D/5McAb 腹水 (1:50)	DEN-2	9/10	9/11	86.
2	D/5McAb 腹水 (1:100)	DEN-2	5/9	6/11	55.
3	C/7McAb 腹水 (1:50)	DEN-2	3/9	5/10	42.
4	sp2/0 腹水 (1:50)	DEN-2	0/10	0/11	0.
5	稀释液	DEN-2	0/10	0/10	0.
6	稀释液	NMB Δ	10/10	10/11	96.

* 每只小鼠腹腔接种 McAb 腹水或稀释液 0.5ml。稀释液为含 5% 灭活小牛血清, 100 μ g 链霉素及 100u.

青霉素的 Hank 氏液。

§ 小鼠腹腔注射 McAb 腹水或稀释液后 12 小时, 脑内接种 Den-2 病毒 0.03ml。

♂ 接种 DEN-2 病毒后, 观察 20 天的小鼠存活率。

Δ NMB, Normal mouse brain



图 4 McAb 的火箭电泳检测其所针对的抗原在感染 C6/36 细胞中的合成动态。在琼脂糖玻板中混合有 1ul/cm² 的 D/5 McAb 腹水, 于抗原孔中加入感染 DEN-2 病毒后不同时间的 C6/36 细胞裂解物, 每孔 30ul, N 孔加入未感染的 C6/36 细胞裂解物做正常对照。电流 4mA/cm, 电泳 4 小时。可见在 0、15、18、21 小时出现沉淀峰, 感染后 3、6、9、12 小时无沉淀峰出现

高。但感染后的 3、6、9、12 小时则未见沉淀峰出现。

讨 论

本文实验对两株抗 DEN-2 病毒的 McAb (C17 和 D/5) 的特性, 以及它们所针对的病毒抗原分子量大小, 病毒蛋白的某些生物学性质进行了探讨。首先, 用含蛋白 A 的葡萄球菌

菌作免疫沉淀剂, 将两株新近建立的 McAb (D/5 和 C/7) 与 DEN-2 病毒感染细胞的裂解物相互作用所产生的复合物沉淀下来, 经 SDS 解离后, 进行 SDS-PAGE 分析, 发现在分子量约 60k 处, 有一特异的蛋白带, 而各对照组, 在分子量 68k~55k 区间, 无类似蛋白带。提示这一蛋白带是病毒特异的, 其分子量略大于 stollar^[6] 和 Trent 报道的 DEN-2 病毒结构蛋白 V₃ (Mw: 59、58k) 的分子量。而与 Westaway (1977)^[7] 测定的 DEN-2 病毒 V₃ 的分子量 60k 相仿。因此, 我们认为这两株 McAb 所针对的 DEN-2 病毒蛋白, 可能相当于文献报导的 DEN-2 病毒结构蛋白 V₃。

在 DEN 病毒的四个血清型中, DEN2 病毒病毒感染细胞后, 能诱导出最典型的细胞融合病变。这种细胞融合作用, 一般发生在病毒感染后期, 不是病毒感染的前期。DEN-2 病毒能通过感染细胞与邻近未感染的细胞的互相融合而扩散感染。Paul (1969) 认为 DEN-2 病毒的这种细胞融合作用, 可能与病毒在细胞内复制过程中, 病毒糖蛋白嵌入受染细胞膜, 使之发生改变有关。本研究发现 C/7、D/5 两株 McAb 均能抑制 DEN-2 病毒在 C6/36 单层细胞中诱导的细胞融合形成, 并抑制病毒感

染的扩散,表明两株 McAb 所针对的 DEN-2 病毒蛋白与病毒诱导的细胞融合病变这一特性有关。

Stohlman (1976)^[8]报告,用 ConA 亲和层析法从 DEN-2 病毒感染的 BHK 细胞膜上分离了 DEN-2 病毒的囊膜糖蛋白 V₃,并证明 V₃ 具有凝集鸽子红细胞的特性。但作者进一步将抗 DEN-2 病毒的特异免疫血清,加入经提纯的 V₃ 蛋白做中和阻断实验,结果发现纯化的 DEN-2 病毒 V₃ 蛋白,对特异免疫血清的中和能力并无明显的阻断作用。提示作者提纯的 DEN-2 病毒的囊膜糖蛋白 V₃,缺乏与特异性中和抗体结和的抗原决定簇。Stohlman 推测是在用 ConA 亲和层析柱分离纯化 DEN-2 病毒糖蛋白 V₃ 的过程中, V₃ 蛋白的构象发生了变化,从而影响其与中和抗体结和的能力。本文试验结果虽已表明这两株 McAb 能保护小鼠抵抗 DEN-2 病毒的脑内攻击,但其保护作用能否被 DEN-2 病毒囊膜糖蛋白 V₃ 所阻断?有待进一步探讨。

本文研究还利用 McAb 具有针对单一抗原决定簇的特点,设计了 McAb 的火箭电泳实验,检测 DEN-2 病毒抗原在感染的 C6/36 细胞内的合成动态。结果发现, McAb 与感染 DEN-2 病毒的细胞裂解物能形成明显的沉淀峰,从感染病毒后的15小时开始,沉淀峰逐渐升高。并发现这种沉淀峰的出现,要比同时测定的 DEN-2 病毒(培养液中)的增殖曲线的高峰出现早。表明应用 McAb 可以在未提纯的混有大量宿主细胞蛋白的样品中,快速而简便地检测病毒特异蛋白在细胞中的合成情况。关于本文实验中观察到的 C6/36 细胞感染后立即(0时)制备的细胞裂解物与 McAb 作用时,亦可测出沉淀峰,其原因可能与病毒感染剂量大(7~10TCID₅₀/细胞),许多病毒颗粒吸

附到细胞表面,一部份病毒虽然迅速被内陷胞膜包裹,进入胞浆空泡中,但此时病毒还未脱壳,仍保留病毒颗粒的完整性和抗原性,故仍会出现沉淀峰。上述机理已于甲组虫媒病毒中的 Semliki 森林病毒感染感的 BHK-21 细胞中有过报导^[9]。

参 考 文 献

- [1] 刘乐和等. 产生 DEN-2 病毒 McAb 杂交瘤细胞株的建立. 免疫学快报 1983; 3(6): 35.
- [2] Arlene R. C. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* 1982; 119:385.
- [3] 张向明. 铬银染色法在 ng 量蛋白 PAGE 检测中的应用. 生物化学与生物物理学进展 1983; 3:63.
- [4] 黄志尚. Sindbis 病毒的浓缩提纯. 中华微生物与免疫学杂志 1981; 1(2):101.
- [5] Stollar V. Studies on the nature of dengue viruses IV, the structural proteins of type 2 dengue virus. *Virology* 1969; 39:426.
- [6] 上海市第二医学院, 上海市免疫学研究所. 单克隆抗体间接免疫荧光染色膜抗原技术. 免疫荧光技术 1982; 73.
- [7] Westaway G E. Heterogeneity among flavivirus proteins separated in slab gels. *Archives of Virol* 1977; 53:305.
- [8] Stohlman S. A. Isolation of the dengue virus envelope glycoprotein from membranes of infected cells by concanavalin A affinity chromatography. *J Virol* 1976; 18:142.
- [9] Helenius A. On the entry of semliki forest Virus into BHK-21 cells. *Cell Bio* 1980; 84(2):404.

Properties of Monoclonal Antibodies Directed against Dengue-2 Viral Protein

Wu Meixion Yan Yongkai

(Department of Microbiology and Immunology)

Abstract

Two hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies (McAb) against dengue-2 virus were established in our laboratory in 1983. In this report we have further examined the properties of the two McAb including 1) the two McAb could produce confluent precipitation line with the cytoplasmic extract of C₆/36 cells infected by dengue-2 virus in double immunodiffusion test; 2) the two McAb could precipitate an antigen with molecular weight about 60k. d. from the cytoplasmic extract of dengue-2 virus infected C₆/36 cells; 3) the two McAb could inhibit hemagglutination with dengue-2 virus partially purified by continuous sucrose density gradient ultracentrifugation; 4) they showed positive staining of the surface of dengue-2 virus infected C₆/36 cells by indirect immunofluorescence staining. These results provide indirect evidence that the epitope combined with the two McAb is present on the same protein of dengue-2 virus, probably identical with the envelope glycoprotein V₃ of dengue virus.

Furthermore, the two McAb could passively prevent mice infected with dengue-2 virus from fatal infected. They could effectively inhibit the CPE in dengue-2 virus infected C₆/36 cells, characterized by syncytia cell formation. The kinetics of synthesis of dengue-2 viral protein specified by McAb (D/5) in infected C₆/36 cells was also analysed by rocket electrophoresis.