

应用单克隆抗体对烟草花叶病毒抗原决定簇 及其抗原型的分析研究*

张成良¹ 张作芳¹ 阙晓枫¹ 陈京¹
胡伟贞¹ 宋淑敏¹ 陆家珏¹ 孙月英⁴
陈伯权³ 田波² 季良¹

要 要

收集国内9省、市、自治区14个烟草花叶病毒(TMV)分离物,在隔离条件下繁殖毒源,以同一方法、相同条件提纯并定量。以20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为起始浓度,作 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} …… 10^{-9} 9个稀释度(设健康寄主对照),分别与适宜浓度(通过逐一测定滴度而选定的)10个TMV单克隆抗体(McAb)[设多克隆抗体、正常细胞腹水(SP2/0)对照]进行ELISA试验,结果从14株分离TMV分离物中识别到8种抗原决定簇,并将这些TMV分离物划分为六个抗原型。这揭示了应用McAb区分TMV株系是一个很有希望的方法

在国际上对植物病毒株系的划分,尚无统一标准,各研究者均根据自己的需要和收集到的分离物,用不同的方法划分株系。例如,同是烟草花叶病毒(TMV),都丸氏根据在烟草上症状分为普通系、黄斑系、潜伏系、坏死系等4个株系;而Felolman氏则根据TMV寄主范围的差异分成烟草、辣椒、马铃薯、心叶烟、番茄、十字花科、葫芦科、豆科、蓝科、车前等10个系群;我国番茄毒源鉴定协作组,从抗病育种出发,按其基因型将TMV分为0, 1, 1.2, 2四个株系等等。此外还有很多从不同方面划分TMV株系的报道。总之, TMV的株系问题极其复杂,这就给TMV株系的研究和应用带来很多的困难。怎样才能快速、准确地鉴别不同株系就成为很多学者所共同关心的问题。Knight¹氏曾对TMV有代表性的6个株系进行了氨基酸配列的比较,结果发现在不同株系之间,氨基酸配列有2—56%的相差,而且越是远缘,相差率越高。由于氨基酸配列的不同,可以导致病毒的抗原性变化,所以利用这种抗原性的变化鉴别不同株系是一个比较好的方法。但是过去所用的血清抗体是多克隆抗体,其中含有对多种抗原决定簇的抗体,用这样的抗体去检测不同株系,往往不同株系间会产生相同的血清反应,难以达到目的,自单克隆抗体(McAb)技术开展以来,因每种McAb只能和抗原决定簇进行应答,所以应用McAb对TMV的抗原决定簇进行分析,并用来鉴别具有不同抗原决定簇的不同株系就有了可能,因此我们着手此项研究工作。

*: 1、农牧渔业部植物检疫实验所

2、中国科学院微生物研究所

3、中国预防医学中心病毒研究所

4、中国医学科学院基础医学研究所

本文1985年9月16日收到

材料和方 法

一、抗 体

1、单克隆抗体：用TMV番茄株纯化抗原，免疫的BALB/C小鼠脾细胞与SP2/0鼠骨髓瘤细胞融合，获得T1、T2、T3、T4、T5、T6、T8、T9、T10、T15等10个McAb⁽³⁾。

2、多克隆抗体：用同上抗原免疫BALB/C小鼠，再注射鼠腹水瘤细胞S180，获得鼠抗TMV腹水抗体。同样抗原免疫兔，制备兔抗TMV抗体⁽⁴⁾。

3、标记抗体：兔抗BALB/C小鼠IgG酶标记物为市售商品。

二、TMV分离物

1、上海0株；2、广州番茄株；3、广州烟草株；4、贵州烟草株；5、新疆地黄株；6、新疆番茄；7、西南0株；8、甘肃番茄株；11、北京1株；12、北京1.2株；13、四川紫云英株；14、北京豌豆株；16南京L₂株”17、南京B₂株等14株TMV分离物，分别由本所病毒室和各省农科院、农业院校赠送。经隔离温室，同一时期，相同条件，同一方法接种普通烟，待显症后采收；同时用相同的方法提纯，并进行紫外吸收光谱的测定，其最低吸收值在240nm，最高吸收值在260nm，具有典型蛋白吸收峰。计算浓度，分装、冷贮备作测定抗原用。

三、检测抗原方法

酶联免疫吸附试验(ELISA)间接法^(4,5)。

实 验 与 结 果

一、10个McAb对14个TMV分离物的ELISA反应

以20微克/毫升TMV包被板与10、40、160……653560一系列4倍倍比稀释的各个McAb反应，选择出适宜的工作浓度。再以此适宜浓度的McAb与各个不同浓度的TMV(将20微克/毫升的TMV提纯液作10⁻¹、10⁻²……10⁻⁹稀释)进行ELISA试验(设正常腹水、多克隆特异抗体、健康寄主抗原等阴性对照)结果以P/N≥2.1判断为阳性(P为待测样品O·D值，N为阴性对照O·D值)结果见附表。

从十个McAb与14株TMV分离物的反应模式中初步识别出8个不同抗原决定簇。

1、H抗原决定簇：在14个分离物中均存有此抗原决定簇，这可能是TMV的共同决定簇。与此相应答的单克隆抗体对14株分离物均呈现阳性反应。

2、G抗原决定簇：除去新疆地黄和南京B₂株以外，其他各分离物都含有此抗原决定簇。

3、F抗原决定簇：和G抗原决定簇相似；但广州烟草株不含有该抗原决定簇。

4、E抗原决定簇：除贵州烟草株，南京L₂株，南京B₂株及新疆地黄株四个分离物外，

其他各分离物均含有该抗原决定簇。

5、D抗原决定簇：北京1.2株，北京豌豆株，北京1株，广州番茄株，新疆番茄株，甘肃番茄株，广州烟草株和四川紫云英株等8个分离物均含有此抗原决定簇。

6、C抗原决定簇：除西南0株及四川紫云英株两分离物略有不同之外，其余均与D抗原决定簇相同。

7、B抗原决定簇：只有北京1.2株，北京1株，北京豌豆株三个分离物中含有这个抗原决定簇。

8、A抗原决定簇：仅北京1.2株中含有此特异性抗原决定簇。

二、14个分离物抗原型的分析

根据上述对抗原决定簇的分析，可将14株分离物初步分成六组抗原型。

I组：北京1.2株分离物，含有前述全部（8个）抗原决定簇。

II组：包括北京1株和北京豌豆株两个分离物，含有除A以外的其他7个抗原决定簇。

III组：包括新疆、甘肃、广州的三个番茄分离物，均具有H、G、F、E、D、C六个抗原决定簇，此外广州烟草株分离物除缺少F抗原决定簇外，其余和上述三个分离物均相同，故将此四个分离物列入同一组内。

IV组：包括上海0株，西南0株，四川紫云英株三个分离物，共同含有H、G、F、E四个抗原决定簇。但四川紫云英株和西南0株两个分离物稍有差异，除共同含有上述四个抗原决定簇外，前者还含有D决定簇，后者含有C决定簇，这三株分离物具有相似的反应模式，所以将其归为一组。

V组：包括贵州烟草株，南京L₂株含有H、G、F三个抗原决定簇。

VI组：新疆地黄和南京B₂分离物除含有H抗原决定簇以外，和其他分离物没有共同的抗原决定簇，说明和其他分离物的亲缘关系较远。

讨 论

如以上所述，应用McAb从十四株TMV分离物中识别了八个抗原决定簇，并将这些分离物分成六个抗原型，但这仅是初步研究结果，还有很多不足之处，由于实验所用的McAb只有十株，TMV分离物也只有十四株。实际上TMV的抗原决定簇决不止这八个，而这六个抗原型也是就这八个抗原决定簇通过十四株分离物相比较而划出的，每个抗原型的抗原决定簇组成也绝不止于此。如果将来发现更多的抗原决定簇和更多的分离物，还会分出新的抗原型，而现在定的六个抗原型的抗原决定簇组成也会有增加，可能更接近实际情况。

此外，决定病毒的侵染的密码子与决定外壳蛋白氨基酸配列的密码子，各处于核酸的不同部位，外壳蛋白抗原性的变化和病毒侵染性的变化，不一定都是一致的。这六个抗原型及其侵染性的关系如何？也尚有待进一步研究。再者，本试验所用的分离物都是从国内分离到的，与国外已被确认的一些株系的关系又是如何？这些都不清楚。但是从本实验中可以看到，对侵染性已经做过分析的0株、1株、1.2株三个不同的基因型分别表现为三个不同的抗原型，而分别来源于上海和西南的两个0株系，虽然采集地相隔千里以上，但都具有相同的抗原决定簇，表现为同一抗原型。特别值得注意的是甘肃、新疆、广州三地的番茄分离

物，都表现为同一抗原型，Wang和Knight氏²曾从世界各地收集了在番茄上发生的13株TMV分离物，并对其氨基酸配列进行了分析比较，结果发现这十三株番茄分离物非常相似，TMV普通株系的C末端氨基酸都是苏氨酸，而这些来自番茄的分离物都换成丝氨酸，另外在147位的丝氨酸也换成蛋氨酸，而在TMV普通株系里是不含有蛋氨酸的。鉴于C末端及其临近的氨基酸位于外壳蛋白的表面，与抗原性的变化有着密切关系，这点和我们的结果有些不谋而合，所有这些都暗示我们应用McAb，再配合若干鉴别寄主区别TMV株系可能是很有希望的。

附表 TMV不同分离物抗原型区分表

血清反应组 TMV分离物 抗原抗体反应 单克隆抗体		1组	2组	3组			4组			5组	6组	抗原决定簇			
		北京1.2号株	北京1号株	北京豌豆株	广州番茄株	新疆番茄株	甘肃番茄株	广州烟草株	四川紫云英株	西德0株	上海0株		贵州烟草株	南京L ₂ 株	南京B ₂ 株
	T ₁₀	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	H
	T ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	T ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	G
	T ₃	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	F
	T ₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	E
	T ₈	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	D
	T ₉	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	C
	T ₁₅	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B
	T ₅	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	T ₈	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
对照	多克隆特异抗体	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SP ₂ /O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

TABLE Distinction of antigen type of TMV different isolates

Serology group	TMV isolates	Monoclonal antibodies										Contrast	
		T ₁₀	T ₂	T ₁	T ₃	T ₄	T ₈	T ₉	T ₁₅	T ₅	T ₆	PcAb*	sp ₂ /o
1	Beijing 1.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Beijing 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
	Beijing pea	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
3	Guangzhou tomato	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
	Xinjiang tomato	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
	Gansu tomato	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
	Guangzhou tobacco	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	
4	Sichuan milkvetch	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
	Xinan O	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	
	Shanghai O	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	
5	Guangzhou tobacco	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	Nanjing L ₂	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
6	Nanjing B ₂	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
	Xinjiang AR**	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Antigen determinants		H		G	F	E	D	C	B		A		

* Specific polyclonal antibody

**Adhesive Rehmanna

参 考 文 献

- [1] Knight, C.A. 1975, Chemistry of Viruses. 2nd ed, Springer-Verlag, New York.
- [2] Wang, A. L and Knight, C. A. 1967 Analysis of protein components of tomato strains of tobacco mosaic virus. Virology 31: 101-106.
- [3] 张成良等, 1985, 烟草花叶病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立, 病毒学报, 1(2): 153-156.
- [4] 张成良等, 1982, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测豆类种传病毒的研究, 植物保护学报, 9(1): 9-14.
- [5] [日] 久原重松, 1980, 植物防疫, 34: 129.

ANALYSIS BY MONOCLONAL ANTIBODY OF TOBACCO MOSIAC VIRUS DETERMINANT AND ITS ANTIGEN TYPE*

Zhang Cheng-Liang¹ Zhang Zuo-faog¹ Que Xiao-feng¹ Chen Jing¹

Hu wei-hen¹ Song Shu-min¹ Lu Jia-jue¹ Sun Yun-ying⁴

Chen Bo-Quan³ Tian Po² Ji Liang¹

Fourteen isolates of Tobacco Mosaic Virus (TMV) were collected from 9 different regions of China. They were multiplied under isolating conditions and purified and measured by the same method. The concentration series were started from 20 μ g/ml and then were diluted into nine dilutions from 10⁻¹. 10⁻²...to 10⁻⁹ (contrasted with healthy host). Each was reacted individually with 10 TMV monoclonal antibodies of optimal dilution(selected through detecting titers) in ELISA(contrasted with polyclonal antibody and ascites of normal cells). Eight antigen determinants were distinguished from 14 TMV isolates and these were divided into six antigen types(table). The result reveals a promises method of differentiating TMV strain by monoclonal antibody.

* 1. Institute of plant Quarantine, Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fishery.

2. Institute of Microbiology Academia Sinica.

3. Institute of Virology, China National Center for preventive Medicine.

4. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences.