

长叶车前花叶病毒上海分离株 单克隆抗体的制备及其免疫学特性

I 单克隆抗体制备、亚类测定及免疫沉淀反应

涂正金 于善谦 张若平 王鸣歧

(复旦大学生物系, 上海)

提 要

采用杂交瘤技术, 以长叶车前花叶病毒上海分离株 (RMVsh) 为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 取脾脏细胞与骨髓瘤 SP2/O 细胞融合, 经筛选克隆, 共获得 1H2、7H1、10H1、11H2、12H3、17H6、29H1 7 株分泌 RMVsh 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。以双抗夹心 ELISA 方法测定亚类; 1H2 属 IgG₃, 7H1 属 IgG_{2b}, 其余均为 IgG₁。7 个杂交瘤植入鼠体内均产生腹水。在免疫双扩散反应中 1H2、12H3 能与 RMVsh 产生免疫沉淀线, 而其余 5 个单克隆抗体均不能与 RMVsh 产生沉淀线。制备的单克隆抗体可用于病毒病害的诊断鉴定, 也可用于进一步分析病毒的抗原特性。

Kohler & Milstein^[1] 建立的杂交瘤技术使免疫学获得了突破性进展。由于用该技术获得的单克隆抗体具有特异性高、标准性强及杂交瘤细胞可以长期保存等优点, 从而在生物学和医学研究等许多领域中得到日益广泛的应用。在植物病毒研究方面, 近几年已有 30 余种病毒制备了单克隆抗体^[2], 并广泛地应用于病毒分子生物学研究^[3-4], 病毒株系的分析^[5]及病毒病害的诊断鉴定上。长叶车前花叶病毒 (Ribgrass Mosaic Virus 简称 RMV 或 HRV) 是烟草花叶病毒群的一个成员, 有许多株系, 流行范围广泛, 特别是在十字花科等蔬菜上造成严重的危害。因此建立灵敏、高特异性的病毒检测、分析方法对 RMV 及其有关株系进行比较研究有重要的理论与实际意义。本文将分几部分报道长叶车前花叶病毒上海分离株单克隆抗体的研制及其在株系鉴别、病毒抗原结构特性分析等方面的研究结果。

材 料 与 方 法

一、病毒来源及纯化 长叶车前花叶病毒上海分离株是本室自青菜 (*Brassica chinensis*) 上分离得到的^[7]。病毒以三生烟 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) 进行繁殖。纯化方法同文献^[8]。

本文于1987年9月2日收到。

二、小鼠免疫 选用重约 18g 的健康雄性 BALB/c 小鼠, 每次腹腔与皮下注射病毒抗原约 500 μ g。第一次用完全佐剂, 第二次用不完全佐剂, 间隔二周。第三次注射于融合前 3—4 天进行, 由尾静脉注入 100 μ g/50 μ l 的抗原溶液。

三、细胞培养与细胞融合 小鼠骨髓瘤细胞选用 SP₂/O, 细胞培养液为含 15% 小牛血清 (天津生化制品厂) 的 RPMI 1640 (GIBCO)。免疫小鼠的脾脏细胞与 SP₂/O 细胞的融合及选择按已报道的方法^[5]进行。融合剂为 50% 聚乙二醇 (M.W. 1000, Merck)。

四、杂交瘤的筛选、克隆和小鼠腹水的制备 采用间接酶联免疫吸附法 (ELISA) 筛选杂交瘤^[4]: ① 于 40 孔聚苯乙烯板 (天津有机玻璃制品厂) 中加入 0.05mol/L Na₂CO₃ 缓冲液 pH9.6, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 处理 2 小时; ② 用洗涤液 (0.01mol/L 磷酸缓冲液 pH7.4 含 0.05% Tween 20) 吸洗 4 次后, 各孔加入以 0.01mol/L 磷酸缓冲液 pH8.0 稀释成 20 μ g/ml 的 RMVsh 抗原溶液 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时; ③ 洗涤 4 次, 用 0.25% 牛血清白蛋白溶液加满各孔, 封闭反应 2 小时; ④ 洗涤 4 次后, 加入 100 μ l 杂交瘤细胞培养上清液为待测样品, 反应同样时间; ⑤ 洗涤 4 次, 加入 1:1000 稀释的碱性磷酸酯酶联羊抗鼠 IgG (Sigma), 反应 2 小时; ⑥ 洗涤后, 加入 1mg/ml 的对硝基酚磷酸钠 (Sigma) 底物溶液 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 小时, 3mol/L NaOH 100 μ l 终止酶反应, 酶标比色仪测定在 405nm 波长下的读数。反应较强的孔中杂交瘤细胞用有限稀释法^[9]进行克隆, 培养与筛选方法同前。选出的单个克隆细胞进行扩大培养或第二次克隆。获得的阳性杂交瘤细胞株悬浮于含 10% 的二甲亚砜 (DMSO) 完全培养液中, 液氮中长期保存, 并按常规方法制备小鼠腹水。

五、单克隆抗体亚类的测定 约 10⁶ 个杂交瘤细胞以 4ml 无血清 RPMI 1640 培养液培养 3 天, 收集上清液作为不含其它杂蛋白的单克隆抗体液用于抗体亚类的测定。亚类测定方法采用双抗夹心 ELISA 法: 聚苯乙烯板先分别以 1:100 稀释的羊抗鼠 IgG 的抗血清 (上海市放射免疫研究所, 多抗, 正对照) 及其亚类抗血清 (上海生物制品研究所) 包被; 杂交瘤细胞无血清培养液作为抗原加入; 酶联羊抗鼠 IgG 作为第二抗体; 其它反应条件同前。以 0.01mol/L 磷酸缓冲液 pH7.0 含 0.15mol/L NaCl (PBS) 及鼠多克隆抗体作对照。

六、免疫双扩散反应 1% 琼脂糖以 PBS 配制。用浓度为 1.20mg/ml 的病毒抗原与小鼠腹水进行免疫双扩散反应, 24 小时后观察结果, 并以氨基黑 10B 染色。

七、感染性的中和试验 纯化的 RMVsh 50 μ g/ml 与等体积的不同稀释度的单克隆抗体腹水混和, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。以半叶法磨擦接种于心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 上, 4 天后作枯斑计数。以 PBS 作对照。

八、用单克隆抗体诊断感染植物 RMVsh 感染的三生烟, 于 0.2mol/L PB pH7.0 中研磨, 低速离心, 上清液经 60 $^{\circ}$ C 处理 0.5 小时。用单克隆抗体 10H1 以间接 ELISA 方法测定汁液反应。以单克隆抗体 1H2、12H3 测定对汁液的免疫双扩散反应。同时均以健三生烟汁液作对照。

结 果

一、杂交瘤细胞株的建立:

RMVsh 免疫 BALB/c 小鼠脾脏细胞与骨髓瘤 SP2/o 细胞在聚乙二醇作用下融合。经 HAT 培养液选择性培养, 3~5 天可见杂交瘤细胞开始生长繁殖, 而对照的 SP2/o 细胞大量萎缩死亡。7 天后杂交瘤细胞可长成较大的细胞群落, 更换 HT 培养液。14 天后长成肉眼可见的细胞群落。间接 ELISA 方法筛选抗体阳性孔。四次融合及抗体阳性孔率如表 1 所示。抗体活性较高的阳性杂交瘤用有限稀释法克隆, 间接 ELISA 复筛。最后分别从 7 个孔中分离得到 7 株分泌 RMVsh 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为: 1H2、7H1、10H1、11H2、12H3、17H6、29H1。经体外长期传代, 反复冻融均稳定地保持分泌单克隆抗体的能力。

表 1 杂交瘤及抗体阳性孔率
Tab 1. Percentage of the well containing hybridomas
and antibody-secreting hybridomas.

融合次数	瘤细胞数	脾细胞数	杂交瘤孔数及阳性孔率		
			总数	杂交瘤	阳性杂交瘤
1	3.45×10^7	1.67×10^8	318	198 (62.3%)	45 (22.7%)
2	1.95×10^7	2.10×10^8	318	62 (19.5%)	36 (58.1%)
3	1.80×10^7	8.30×10^7	318	268 (84.3%)	46 (17.2%)
4	1.25×10^7	6.05×10^7	238	201 (84.5%)	54 (26.9%)

二、单克隆抗体亚类的测定:

双抗夹心 ELISA 方法测定单克隆抗体亚类反应的结果见表 2。对于每一种单克隆抗

表 2 双抗夹心 ELISA 方法测定单克隆抗体亚类
Tab 2 Detection of the subclass of monoclonal antibody
by double antibody sandwich ELISA.

亚类	1H2	7H1	10H1	11H2	12H3	17H6	29H1	PBS*	MPC**
IgG ₁	0.036	0.000	0.288	0.274	0.109	0.201	0.125	0.000	0.870
IgG _{2a}	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.280
IgG _{2b}	0.000	0.093	0.016	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.821
IgG ₃	0.205	0.000	0.035	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.645
IgG	0.085	0.093	0.204	0.220	0.132	0.166	0.124	0.000	1.650

*PBS: 磷酸缓冲液, **MPC: 鼠多克隆抗体。

体在四种亚类抗血清包被的孔中只有一个阳性反应孔。以包含各个亚类的羊抗鼠 IgG 测定同样也是阳性反应。因此确定单克隆抗体 1H2 属 IgG₃, 7H1 属 IgG_{2b}, 其余 5 个单克

隆抗体均属 IgG₁ 亚类。对照中, 磷酸缓冲液无反应, 鼠多克隆抗体都有较强的反应。

三、单克隆抗体免疫沉淀反应特性

7 种单克隆抗体对抗原 RMVsh 免疫双扩散反应结果如图 1 所示。其中 1H2、12H3 能与 RMVsh 反应形成免疫沉淀线, 而单隆抗体 7H1、10H1、11H2、17H6、29H1 均不能与 RMVsh 反应形成免疫沉淀线。

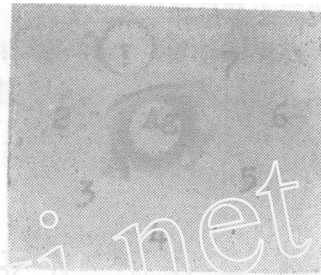


图 1 单克隆抗体对抗原的免疫扩散反应

Ag: RMVsh, (1): 1H2, (2): 7H1, (3): 10H1, (4): 11H2, (5): 12H3, (6): 17H6, (7): 29H1.

Fig 1 Immunodiffusion reaction of monoclonal antibody with antigen.

四、单克隆抗体对病毒感染的中和作用

单克隆抗体 1H2、10H1、29H1 对病毒感染的中和试验结果见表 3。1H2 在 10⁻¹ 浓度时能完全中和病毒的感染, 但中和能力随稀释度的增大而减弱。10H1、29H1 在 10⁻¹ 浓度时仅能部分中和病毒感染, 在 10⁻² 稀释度以上基本无中和作用。

表 3 单克隆抗体对病毒感染的中和作用

Tab 3 Neutralization of the infectivity of RMVsh by monoclonal antibody.

单克隆抗体	稀 释 度					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	PBS
1H2	0.0	0.5	15.2	20.2	19.2	15.2
10H1	1.5	15.0	15.8	25.3	30.5	26.7
29H1	6.3	18.3	14.8	15.5	35.3	15.5

五、单克隆抗体检测 RMVsh 感染植物

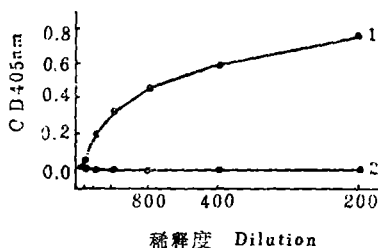


图 2 单克隆抗体 10H1 间接 ELISA 法检测植物中病毒
1. RMVsh 感染植物, 2. 健康植物
Fig 2 Detection of virus in the plant by monoclonal antibody in indirect ELISA.
1: RMVsh infected plant,
2: Health plant.

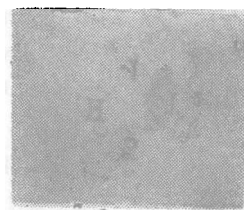


图 3 单克隆抗体对植物汁液的免疫扩散反应
(1): 1H2, (2): 12H3, (H): 健植株, (I): RMVsh 感染植株
Fig 3 Immunodiffusion reaction of monoclonal antibody with plant sap.
(H): Health plant,
(I): RMVsh infected plant.

以间接 ELISA 方法测定单克隆抗体 10H1 对植物汁液的反应结果如图 2 所示。感染的三生烟呈现很强的反应, 稀释到 1 : 3200 时仍有较明显的阳性反应。而健烟无反应。同样以 1H2、12H3 对两种汁液作双扩散反应, 结果病毒感染的汁液有免疫沉淀线出现。而健汁液无反应(见图 3)。

讨 论

采用杂交瘤技术建立了 7 株分泌长叶车前花叶病毒上海分离株单克隆抗体的杂交瘤细胞株。这 7 个细胞株分泌的单克隆抗体经测定分属于 IgG₃、IgG_{2b} 和 IgG₁ 亚类。测定亚类所用的双抗夹心 ELISA 方法较常规所用的免疫双扩散法^[10] 敏感, 比文献报道的间接 ELISA 方法^[10] 简单。羊抗鼠 IgG 及其亚类抗血清国内有商品供应, 并能稀释至少 100 倍使用。杂交瘤细胞株的无血清培养液不需要浓缩, 而且用量也少。因此该方法适用于抗体亚类的快速分析, 结果可靠。

在制备的 7 种单克隆抗体中, 仅 1H2、12H3 能与抗原在琼脂双扩散中反应形成免疫沉淀线, 同样 1H2 也能中和病毒, 使其失去感染性。其余 5 种单克隆抗体均不能与抗原反应形成免疫沉淀线, 同样 10H1、29H1 也不表现完全的中和病毒感染作用。这可能是由于抗原决定簇不在病毒外壳蛋白表面所致。制备的单克隆抗体能特异地检测病株汁液的带毒情况, 为单克隆抗体在病毒病的快速鉴定中的应用提供了条件。关于在病毒抗原结构分析方面的研究结果将另文报道。

参 考 文 献

- [1] Kohler, G. and Milstein, C., 1975, *Nature*, 256: 495-497.
- [2] Edward, J.H., 1985, *Ann. Rev. Phytopathology*, 23: 321-350.
- [3] Al Moudallal, Z. et al., 1985, *The EMBO Journal*, 4: 1231-1235.
- [4] Dietzgen, R.G., 1986, *Archives of Virology*, 87: 73-86.
- [5] 于善谦等, 1986, *中国科学(B辑)*, 12: 1266-1270.
- [6] Oshima, N. and Harrison, B.D., 1975, *CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses*, 152.
- [7] 徐来升等, 1980, *上海农业科技*, 3: 28-31.
- [8] 郁操国等, 1982, *病毒学集刊*, 1: 129-135.
- [9] Oi, V.T. and Herzenberg, L.A., 1980, *Selected Methods in Cellular Immunology*, 351-372, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- [10] Campbell, A.M., 1984, *Monoclonal Antibody Technology*, 187-189, Elsevier, Amsterdam.

Preparation and Immunological Properties of Monoclonal Antibodies to Ribgrass Mosaic Virus (RMVsh)

I Preparation of Monoclonal Antibodies, Subclasses

Determination and Immunoprecipitin Reaction

Tu Zheng-jin Yu Shan-qian Zhang Ruo-ping Wang Ming-qi

(Department of Biology, Fudan University, Shanghai)

Using hybridoma techniques, seven hybridoma cell lines, 1H2, 7H1, 10H1, 11H2, 12H3, 17H6, 29H1, secreting monoclonal antibodies to Shanghai Isolate of Ribgrass Mosaic Virus (RMVsh) were prepared by fusion on myeloma cells SP2/O with spleen cells of BALB/c mouse immunized with RMVsh. The subclasses of these monoclonal antibodies were determined by double antibody sandwich ELISA. 1H2, 7H1 and other monoclonal antibodies belong to IgG₃, IgG_{2b} and IgG₁ subclass, respectively. The ascitic fluids were obtained when these hybridoma cells were injected to BALB/c mice. A precipitin line was formed when monoclonal antibodies 1H2, 12H3 reacted with the antigen of RMVsh in agarose medium by double immunoprecipitin, but no precipitin line was formed with other five monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies prepared here could be used in the diagnosis of infected plants and the analysis of the antigenic properties of the virus.