

# 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

## II 单克隆抗体免疫反应方法及在株系鉴别上的应用

涂正金 于善谦

(复旦大学生物系, 上海)

### 提 要

采用两种不同的 ELISA 方法比较了长叶车前花叶病毒上海分离株(RMVsh)7种单克隆抗体对完整病毒及其外壳蛋白的反应。结果表明不同的单克隆抗体在两种 ELISA 方法中的反应特性各异。这可能由于 ELISA 方法对抗原结构的影响而导致抗原抗体结合的不同。比较烟草花叶病毒群的7个分离株对 RMVsh 单克隆抗体和兔多克隆抗体的反应。结果表明单克隆抗体能与属于 RMV 的3个分离株起反应,并能将它们区分开来,与属于 TMV 的4个分离株均无反应。而兔多克隆抗体与这7个分离株均有较强的反应,但难以区分各株系。表明单克隆抗体在株系鉴别上具有高度的特异性。

血清学关系很早就被用来研究表达病毒及其株系间的相互关系。如用血清学差异指数(Serological Differentiation Index 简称 SDI)表示差异的数量关系<sup>[1]</sup>。近十多年来广泛使用的 ELISA 方法,由于不同的使用目的和要求,已发展了多种实验分析方法<sup>[2]</sup>,并广泛地用于单克隆抗体试验。该方法大大提高了血清学方法的特异性和灵敏度。已经用于烟草花叶病毒<sup>[3]</sup>、大麦黄矮病毒<sup>[4]</sup>等的株系鉴别上。本文报道用不同的 ELISA 方法对单克隆抗体与长叶车前花叶病毒及其外壳蛋白结合的影响及在株系鉴别上的应用。

### 材 料 与 方 法

**一、病毒株系及其单克隆抗体:** 长叶车前花叶病毒上海分离株同前<sup>[5]</sup>,外壳蛋白制备采用醋酸法<sup>[6]</sup>。其它病毒株系有长叶车前花叶病毒 Holmes' 株来自美国,油青菜分离株(RMVha)<sup>[7]</sup>由浙江农业大学提供。烟草花叶病毒青菜分离株(TMVnk)和辣椒分离株(TMVp)由江苏农业科学院提供。番茄乌心果(ToMV)<sup>[8]</sup>由本室分离。烟草花叶病毒普通株(TMVc)来自中国科学院微生物研究所。RMVsh的7种单克隆抗体的制备及特性见前文<sup>[9]</sup>。

**二、不同 ELISA 方法对病毒及外壳蛋白的反应:** 实验所采用的 ELISA 方法均列

本文于1987年11月3日收到

于表 1 中。ELISA 方法 1 用于单克隆抗体的筛选。兔 RMVsh 抗血清按常规方法制备，四次硫酸铵沉淀和 DEAE-纤维素柱层析纯化，使用浓度为 10 $\mu$ g/ml。RMVsh 和外壳蛋白 (RMVsh-P) 抗原浓度为 20 $\mu$ g/ml。测定采用表 1 中的 ELISA 方法 2 和 3。单克隆抗体和多克隆抗体依效价作适当稀释，其它步骤同前文<sup>[9]</sup>。同样测定抗体在不同稀释度下与抗原的作用曲线。

表 1 不同 ELISA 测定方法  
Tab 1 Different ELISA methods

步骤	方法 1	方法 2	方法 3
1	包被液	抗原/包被液	兔抗体/包被液
2	抗原/磷酸缓冲液	牛血清白蛋白饱和	牛血清白蛋白饱和
3	牛血清白蛋白饱和	第一抗体 (鼠)	抗原/磷酸缓冲液
4	待测抗体	酶联第二抗体	第一抗体 (鼠)
5	酶联第二抗体	底物水解	酶联第二抗体
6	底物水解		底物水解

三、不同病毒分离株对单克隆和多克隆抗体的反应：选用烟草花叶病毒群的 7 个分离株 RMVsh、RMV<sub>Holmes'</sub>、RMVha、TMVnk、TMVp、ToMV、TMVc，用间接 ELISA 方法和琼脂双扩散法测定各病毒株系与单克隆和兔多克隆抗体的反应。

## 结 果

一、不同 ELISA 方法对单克隆抗体与病毒及外壳蛋白结合的影响：用 ELISA 方法 2 和 3 测定 7 种单克隆抗体与完整病毒及外壳蛋白的反应结果见表 2。7 种单克隆抗体分为两组：1H2、12H3 用抗原直接包被的 ELISA 方法 2 时基本无反应，而用方法 3 时，抗原先吸附于兔抗体则对完整病毒和病毒外壳蛋白都有明显的反应，且前者强于后者。7H1 等其它 5 个单克隆抗体在 ELISA 方法 2 中对两种抗原反应都较强，在方法 3 中对完整病毒反应较弱，但对外壳蛋白反应强烈。小鼠和兔多克隆抗体在各种测定方法中反应都很强。

表 2 不同 ELISA 方法对单克隆抗体与病毒及外壳蛋白反应的影响  
Tab 2 Effect of different ELISA methods on determination of virus and its coat protein by monoclonal antibodies.

ELISA 方法	抗 原	抗 体 及 稀 释								
		1H2 1:10 <sup>4</sup>	7H1 1:10 <sup>4</sup>	10H1 1:10 <sup>4</sup>	11H2 1:10 <sup>4</sup>	12H3 1:10 <sup>4</sup>	17H6 1:10 <sup>4</sup>	29H1 1:10 <sup>4</sup>	MPc* 1:10 <sup>8</sup>	RPc** 1:10 <sup>8</sup>
2	RMVsh	0.002	1.501	1.527	1.419	0.069	1.443	1.431	1.509	2.548
	RMVsh-P	0.000	1.477	1.412	1.332	0.000	1.216	1.179	1.531	1.659
3	RMVsh	0.983	0.372	0.251	0.180	1.674	0.233	0.345	2.896	—
	RMVsh-P	0.213	2.574	2.102	1.929	0.247	1.939	1.804	1.603	—

\*MPc: 鼠多克隆抗体, \*\*RPc: 兔多克隆抗体。底物水解 0.5 小时。

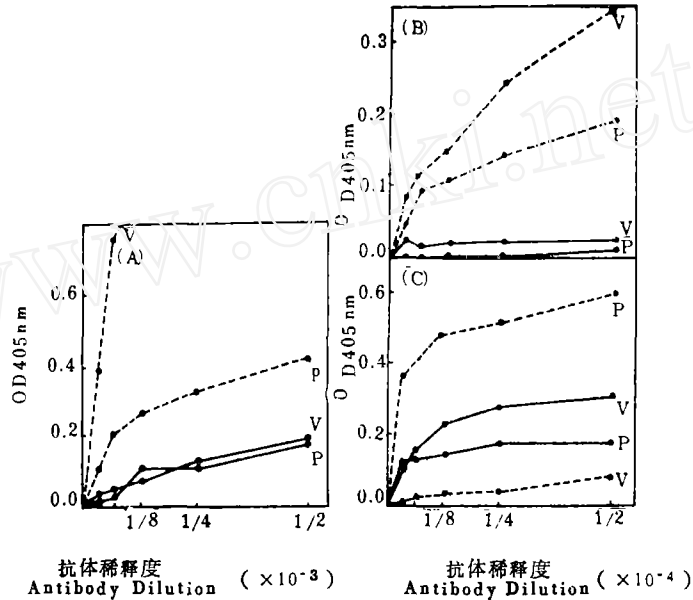


图1 多克隆抗体和单克隆抗体与病毒及外壳蛋白的ELISA反应曲线  
(A): BALB/c小鼠多克隆抗体, (B): 单克隆抗体1H2, (C): 单克隆抗体10H1,  
(V): RMVsh, (P): RMVsh, (—): ELISA方法2, (---): ELISA方法3

Fig 1 Schematic illustration of the ELISA reactions of polyclonal and monoclonal antibodies with virus and its coat protein.

(A): BALB/c mouse polyclonal antibody, (B): Monoclonal antibody 1H2, (C): Monoclonal antibody 10H1, (V): RMVsh, (P): RMVsh coat protein, (—): ELISA method 2, (---): ELISA method 3.

1H2、10H1及鼠多克隆抗体(MPc)在不同稀释度下对病毒及外壳蛋白抗原(20 $\mu$ g/ml)的反应曲线如图1所示。从图1A可见多克隆抗体对抗原反应应用ELISA方法3较方法2灵敏度高。图1B示单克隆抗体1H2在ELISA方法3中对完整病毒反应较强,与外壳蛋白反应较弱,ELISA方法2与两者基本无反应。图1C则表明单克隆抗体10H1用ELISA方法3时对外壳蛋白反应强度较病毒粒子高5.1倍,完整病毒反应很弱。而ELISA方法2中对病毒的反应强度高于外壳蛋白。

二、病毒株系的鉴别: 7种单克隆抗体在一定稀释度下与烟草花叶病毒群的7个分离株及健三生烟抽提物,用ELISA方法测定反应,结果列于表3中。7种单克隆抗体对RMVsh、RMV<sub>Holmes'</sub>、RMVha都有反应,而对TMVnk、TMVp、ToMV、TMVc均无反应。但RMVsh兔多克隆抗体与上述7个分离株均有强烈反应。健株对照均无反应。

单克隆抗体11H2、12H3及兔多克隆抗体与不同浓度的抗原反应曲线如图2所示。单克隆抗体11H2(图2A)对RMVsh反应最强, RMV<sub>Holmes'</sub>中等但较RMVha强。而单克隆抗体12H3(图2B)对RMVsh反应仍最强, RMVha反应比RMV<sub>Holmes'</sub>反应强。两者与TMVnk、TMVp、ToMV、TMVc均无反应。兔多克隆抗体与上述7个分离株均有较强反应,但很难区分各株系(图2c)。

表 3 单克隆抗体与烟草花叶病毒群的几个分离株的反应

Tab 3 Reaction of monoclonal antibodies with some strains of Tobamoviruses.

单克隆抗体	ELISA 方法	稀释度	病毒分离株 (20 $\mu$ g/ml)							
			RMVsh	RMVH	RMVha	TMVnk	TMVp	ToMV	TMVc	Health
1H2	3	2 $\times 10^{-5}$	0.254	0.081	0.194	0.009	0.008	0.009	0.014	0.000
12H3		2 $\times 10^{-5}$	0.077	0.232	0.382	0.000	0.000	0.014	0.012	0.010
7H1		1 $\times 10^{-5}$	0.703	0.541	0.246	0.001	0.000	0.042	0.000	0.000
10H1		1 $\times 10^{-5}$	0.414	0.437	0.391	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
11H2	2	1 $\times 10^{-5}$	0.348	0.389	0.290	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000
17H6		1 $\times 10^{-4}$	0.740	0.739	0.553	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060
29H1		1 $\times 10^{-5}$	0.718	0.782	0.595	0.000	0.009	0.004	0.001	0.009
RPc	2	1 $\times 10^{-3}$	0.884	0.876	0.842	0.866	0.888	0.916	0.855	0.045

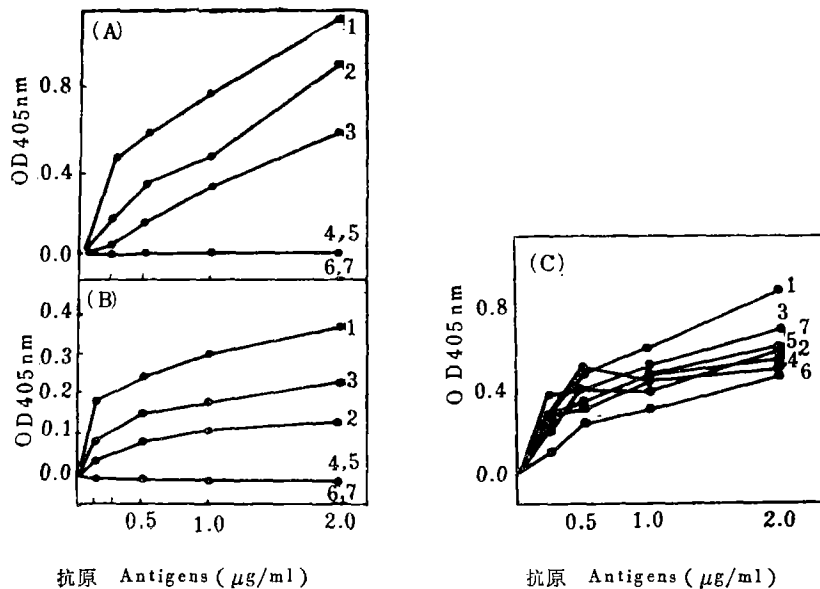


图 2 多克隆抗体和单克隆抗体与烟草花叶病毒群的几个分离株的反应曲线  
(A) : 单克隆抗体, 11H2 (B) : 单克隆抗体 12H3, (C) : 兔多克隆抗体,  
(1) : RMVsh, (2) : RMV Holmes', (3) : RMVha,  
(4) : TMVnk, (5) : TMVp, (6) : ToMV, (7) : TMVc.

Fig 2 Schematic illustration of the reaction of polyclonal and monoclonal antibodies with some strains of Tobamoviruses.  
(A) : Monoclonal antibody 11H2, (B) : Monoclonal antibody 12H3,  
(C) : Rabbit polyclonal antibody,

用琼脂双扩散法比较单克隆抗体和多克隆抗体对病毒分离株的免疫沉淀反应特性如图 3 所示。1H2、12H3 与 RMVsh、RMV Holmes'、RMVha 3 个分离株都产生一条沉淀线, 而对其它 4 个分离株均无反应(图 3A, 3B)。兔多克隆抗体与 7 个分离株均产生免疫沉淀线(图 3c)。

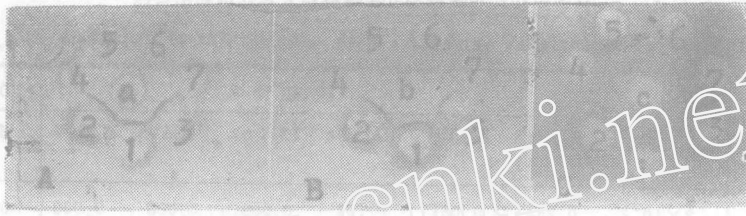


图3 单克隆抗体和兔多克隆抗体对几个病毒株系的免疫双扩散反应  
(a) : 1H2, (b) 12H3, (c) : RPe, (1) : RMVsh, (2) RMVH  
(3) : RMVha, (4) : TMVnk, (5) : TMVp, (6) ToMV,  
(7) : TMVc.

Fig 3 Immunodiffusion reaction of monoclonal antibody and rabbit polyclonal antibody with some strains of viruses.

## 讨 论

以 ELISA 方法 1 筛选的单克隆抗体用 ELISA 方法 2 和 ELISA 方法 3 测定与病毒及其外壳蛋白的结合作用, 结果表明不同 ELISA 方法明显地影响到单克隆抗体的筛选及抗原抗体反应测定的结果。ELISA 方法 2 中, 抗原在高碱性 (pH9.6) 的包被液中直接吸附于聚苯乙烯板表面, 可能对抗原结构改变较大<sup>[10]</sup>。ELISA 方法 3 中抗原在中性溶液中吸附有利于保持结构的完整。单克隆抗体 1H2、12H3 在 ELISA 方法 2 中与抗原基本不反应, 而在方法 3 中与完整病毒反应较强, 与外壳蛋白反应较弱。7H1 等 5 个单克隆抗体在 ELISA 方法 2 中与完整病毒及外壳蛋白反应都较强, 但在 ELISA 方法 3 中对完整病毒结合大大低于外壳蛋白。从而推断: 1H2、12H3 结合的抗原决定簇可能属于与结构有关的不连续决定簇 (Discontinue determinant)。后 5 种单克隆抗体结合的抗原决定簇可能属于顺序有关的连续决定簇 (Continue determinant), 在病毒结构较完整时可能处于隐蔽部分, 也有人称隐蔽决定簇 (Cryptope)<sup>[11]</sup>。Al Moudallal<sup>[12]</sup> 在比较 TMV 单克隆抗体时也发现了类似的现象。因此在筛选单克隆抗体及进行株系鉴别时要注意不同测定方法可能带来的差异。

间接 ELISA 法测定所制备的 7 个单克隆抗体与不同株系的反应。结果 7 个单克隆抗体都与属于 RMV 的 3 个分离株反应, 不能与 TMV 各分离株反应。不同的单克隆抗体可以区分 RMV 的不同株系。RMVsh 兔多克隆抗体能与所用的 7 个分离株起反应, 但很难将它们区分开来。免疫双扩散反应结果也相似。因此 RMVsh 兔多克隆抗体包含了能与 RMV 及 TMV 各株系起反应的抗体。而我们所制备的 BALB/c 小鼠的 7 种单克隆抗体都不能与 TMV 反应。至今仅 Dietzgen<sup>[11]</sup> 用 STU 品系小鼠制备的 TMV 单克隆抗体与 RMV 有反应外, 其它用 BALB/c 小鼠制备的 TMV 单克隆抗体均未发现与 RMV 有反应<sup>[13]</sup>。这可能由于 TMV 与 RMV 外壳蛋白氨基酸同源性仅为 44%<sup>[14]</sup>, 而同源部分可能对 BALB/c 小鼠的免疫原性很弱或无免疫原性所致。但这有待进一步研究证实。

### 参 考 文 献

- [1] Van Regenmortel, M.H.V., 1975, *Virology*, 64: 415-420.
- [2] Voller, A. et al., 1982, *New Developments in Practical Virology*, 59-81, Alan R. Liss, Inc., N.Y.
- [3] Briand, J. P. et al., 1982, *J. of Virological Methods*, 5: 293-300.
- [4] Hsu, H.T. et al., 1984, *Phytopathology*, 74: 600-605.
- [5] 徐来升等, 1980, *上海农业科技*, 3: 28-31.
- [6] Fraenkel-conrat, H., 1957, *Virology*, 4: 1-4.
- [7] 盛方镜等, 1983, *浙江农业大学学报*, 9: 39-46.
- [8] 黄素珍等, 1983, *复旦大学学报(自然科学)*, 22: 332-328.
- [9] 涂正金等, 1988, *病毒学杂志* (见本期)
- [10] Verhagen, W. et al., 1972, *Virology*, 50: 431-439.
- [11] Dietzgen, R.G., 1986, *Archives of Virology*, 87: 73-86.
- [12] Al Moudallal, Z. et al., 1984, *J. of Immunological Methods*, 69: 35-43.
- [13] Altshuh, D. et al., 1985, *Molecular Immunology*, 22: 329-337.
- [14] Van Regenmortel, M.H.V., 1981, *Handbook of Plant Virus Comparative Diagnosis*, 541-564, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

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

### II Methods of Immunological Reaction of Monoclonal Antibodies and its Applying in the Differentiation of Virus Strains

Tu Zheng-jin Yu Shan-qian

(Department of Biology, Fudan University, Shanghai)

The reactions of seven monoclonal antibodies specific for Shanghai Isolate of Ribgrass Mosaic Virus (RMVsh) with virion and its coat protein by two different ELISA methods were compared. The results showed that the properties of reaction of some monoclonal antibodies in two different ELISA methods were different. It may be that the antigen structure was effected by the different ELISA methods, so that the capability of the binding of antigen to antibody was changed. The results of determination of seven strains of Tobamoviruses using monoclonal antibodies and rabbit polyclonal antibodies indicated that all monoclonal antibodies reacted only with three strains of RMV, not with other strains of TMV. Three strains of RMV could be differentiated by these monoclonal antibodies. All strains which were tested could react with rabbit polyclonal antibodies strongly, but they were difficult to be differentiated. The monoclonal antibodies we prepared appeared a high specificity for differentiation of virus strains.