

番木瓜环斑病毒单克隆抗体的制备及在病毒分型上的初步应用*

林壁润 李英杰^① 欧阳明辉^① 范怀忠

(华南农业大学植保系, 广州)

提 要

本试验是用番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRV)提纯制剂免疫的 BALB/c 小白鼠脾细胞与 Sp²/o-Ag14 骨髓瘤细胞融合, 获得三个能稳定传代并分泌抗番木瓜环斑病毒的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。其中 23H1 McAb 的效价较高, 用 ELISA 检测, 腹水抗体效价高达 1:76800, 能被 PRV 兔抗血清所阻断。这 3 个杂交瘤细胞系产生的单抗与 TMV 和 CMV 无血清交叉反应。它们可把 PRV 四个毒株初步区分为三个血清型。

关键词: 番木瓜环斑病毒, 单克隆抗体, 血清型

自从 1975 年英国 Kohler and Milstein 建立杂交瘤技术生产单克隆抗体 (McAb)^[1] 以来, 国外已研制出 TMV 等三十种植物病毒的单克隆抗体^[2], 并应用于植物病毒病的诊断、检测、鉴定和抗原决定簇分析等方面^[2]。我国也已先后研制了 TMV^[3], CMV^[4], PVY^[5], 和 RMV(Ribgrass mosaic virus)^[6] 四种植物病毒的单克隆抗体。关于 PRV 单克隆抗体的研究国内外尚未见报道。

番木瓜环斑病毒是番木瓜最重要的病害之一, 国内外产区大多数遭严重为害^[7,8]。PRV 寄主范围比较窄^[8], 目前尚没有发现较理想的枯斑寄主^[8]。因此, 用常规生物学方法较难把 PRV 株系鉴别出来^[8]。为了探索应用单克隆抗体区分 PRV 株系, 进行了本项试验。

材 料 与 方 法

(一) 抗原病毒 PRV 四个分离物 PRV-1, PRV-2, PRV-8, PRV-15, 采自广州地区, 经过纯化和初步鉴定, 认为他们的生物学特性和理化特性有一些差异。^[9]

病毒提纯采用 Mercedes^[10] 和 Gonsalves^[11] 报道的方法并略加修改^[9], 即取接种后 20 天的西葫芦(*Cucurbita pepo*)病叶用 0.5mol/L 的 PB 进行捣碎、离心, 用 6% 的 PEG (MW 6000) 进行二次沉淀得到的, 病毒提纯制剂经电镜观察, 为典型的 PRV 长线状病毒颗粒(600—800nm), 经紫外线分光光度计测定, 呈现典型的核蛋白吸收峰。

本文于 1988 年 1 月 12 日起收到。

* 国家自然科学基金会项目, 本实验在第一军医大学疟疾免疫研究室进行。

^① 第一军医大学疟疾免疫研究室, 广州

(二) 小白鼠与免疫方法 BALB/c 小白鼠由北京生物制品研究所引进, 在第一军区大学疟疾免疫研究室饲养繁殖。免疫用小鼠为 6~8 周龄, 雌雄不分。

免疫方法是 PRV-1 病毒提纯制剂与等量福氏完全佐剂 (FCA, Difco) 混合成乳剂, 每鼠每次腹腔注射病毒制剂 160 μ g, 每次间隔 10—15 天, 共免疫 5 次, 在进行融合前三天, 用不含佐剂的病毒制剂作静脉加强免疫一次。

(三) 小鼠瘤细胞系 实验采用非分泌型的 Sp²/0-Ag14 瘤细胞系, 北京生物制品研究所提供, 由第一军医大学疟疾免疫研究室培养和保种。

(四) 细胞融合 按文献方法^[12]进行, 以 10:1 比例选取免疫脾细胞和骨髓瘤细胞, 用 50% PEG(MW 4000) 为融合剂, 进行细胞融合, 随后将融合细胞分种于三块 96 孔培养板 (Falcon, 3072) 中, 培养 24 小时后加 HAT 选择培养基, 4~6 天后改为 HT 培养基, 当有大量的杂交瘤细胞团出现时, 取培养上清液进行检测。

(五) ELISA 间接法筛选产抗体的杂交瘤 按文献报道方法^[13]进行, 辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 由北京生物制品研究所提供, 最适工作浓度为 1:500, 病毒制剂最适包被浓度为 8 μ g/ml。每次试验均设有 Sp²/0 的细胞培养上清液, RPMI-1640 完全培养基和正常小白鼠血清为阴性对照, 小白鼠抗 PRV-1 多克隆抗体为阳性对照。试验以 P/N \geq 2.1 者为阳性, 每个试验重复三次。

(六) McAb IgG 亚类和杂交瘤细胞染色体数测定 按文献报道^[12]进行。

结 果

1. 杂交瘤细胞株的建立

免疫脾细胞和 Sp²/0-Ag14 瘤细胞融合后, 接种 288 个培养孔, 4 天后全部出现杂交瘤细胞集落。经 ELISA 三次重复检测, 三次检测均为阳性的有 19 个孔, 阳性克隆率为 7%。选择其中三个强阳性孔的细胞, 进行 3—4 次有限稀释克隆化, 经过三个月的体外培养, 冻存, 复苏, 三个杂交瘤细胞 (23H1, 22A12-B2, 22A12-E12) 能稳定繁殖和分泌抗 PRV-1 的 McAb。其中 22A12-B2 和 22A12-E12 来源于同一融合细胞培养孔 22A12 的融合细胞, 从第一次有限稀释克隆化开始, B2 贴壁生长, E12 悬浮生长。按常规方法分别制备了该三种细胞系的小鼠腹水抗体, 其效价以 23H1 为较高, ELISA 法检测达 1:76800。

2. 杂交瘤细胞系和单克隆抗体的特性

表1 三个细胞系的染色体数及其单抗 IgG 亚类
Table 1 McAb IgG subclass and chromosome of cell lines

细胞系 Cell lines	IgG 亚类 IgG subclass	每个细胞染色体数* Average number of chromosomes per cell*
23H1	IgG1	93(82-114)
22A12-B2	IgG3	90(80-103)
22A12-E12	IgG3	94(82-114)

* 50个细胞平均。 Average from 50 cells.

按常规方法分别对三个杂交瘤细胞系的染色体, 单克隆抗体 IgG 亚类进行了测定分析。结果(见表 1)表明, 三个杂交瘤系所分泌的单抗分属 IgG1 和 IgG3 两个亚类, 染色体数平均在 90 以上。

3. 单克隆抗体的特异性

用 PRV-1 病毒制剂包被反应板, 用兔抗 PRV 特异性多克隆抗体对 23H1 细胞培养上清液进行封闭试验。结果封闭组的 23H1 细胞培养上清液的效价小于 1:10, 对照组效价则大于 1:160, 表明 23H1 细胞系所分泌的 McAb 可被兔抗 PRV 特异血清所封闭。

用三个杂交瘤细胞系的腹水抗体与 CMV 和 TMV 病毒提纯制剂进行血清试验, 结果均无反应。

4. PRV 四个分离物血清型分析

应用间接 ELISA 法检测三个杂交瘤细胞系腹水抗体与 4 个 PRV 分离物的反应, 结果列于表 2, 根据反应性的差异, 可将四个 PRV 分离物初步划分为三个血清型:

表 2 单克隆抗体与 PRV 分离物反应结果
Table 2 Reactions of monoclonal antibodies with PRV isolates*

病毒分离物及血清型 virus isolates and serotypes		单抗 McAb			对照 Control	
血清型 Serotypes	分离物 isolates	23H1	22HA12-B2	22A12-E12	兔抗血清 Rabbit antiserum	Sp2/0 细胞培养上清 Sp2/0 supernatant medium
I	PRV-1	+	+	+	+	-
	PRV-2	+	+	+	+	-
II	PRV-15	+	+	-	+	-
III	PRV-8	-	-	-	+	-

* "+" Indicates P/N > 2.1, "-" Indicates P/N < 2.1

血清型 I: PRV-1 和 PRV-2, 能与单抗 22A12-B2 和 22A12-E12 反应。

血清型 II: PRV-15, 能与单抗 23H1 和 22A12-B2 反应。

血清型 III: PRV-8, 不能与这三个单抗反应。

讨 论

本试验所建立的三个杂交瘤细胞系, 经过体外长期传代培养, 定期抗体活性检测, 液氮冻冷后复苏培养, 染色体分析等试验结果证明, 这些细胞系分泌的抗体稳定, 细胞染色体符合杂交瘤细胞的特点。它们之间又有不同, 可以初步认为它们是三个不同的细胞系。

这三个细胞系的单抗均为 IgG, 而且特异性较强, 这对于 PRV 病毒血清型的划分和病害的诊断将有一定意义。

细胞系 22A12-E12 和 22A12-B2 虽来源于同一融合细胞培养孔, 但它们的染色体数不同(见表 1), 它们的单抗对 PRV 四个分离物的反应性不同, 因此他们可能是来自二个不同亲代的杂交细胞, 可认为是二个不同的细胞系。

本试验所用 PRV 四个分离物在寄主范围和理化特性上虽略有差异^[9], 但还是比较难以鉴别开来^[9]。然而, 根据这四个 PRV 分离物与所建立的三个杂交瘤系 McAb 的反应性, 则可初步把它们分为三个血清型。

上述为初步试验结果, PRV 只用了四个分离物, 而且都只来自广州地区, 试验只研制出 McAb 三个细胞系, 因此只能初步地把 PRV 四个分离物划分为三个血清型。而实际上 PRV 可能不只这三个血清型。因此, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kohler G et al., 1975, *Nature*, 256: 495.
- [2] Halk E L et al., 1985, *Ann Rev Phytopath*, 23: 321.
- [3] 张成良等, 1985, *病毒学报* 1: 153.
- [4] 于善霖等, 1986, *中国科学*, 12: 1266.
- [5] 姚康生等, 1985, *中国农业科学*, 4: 67.
- [6] 张永平等, 1987, *病毒学报*, 3: 145.
- [7] Purcifull D E et al., 1984, *Description of Plant Virus No*, 292.
- [8] 吴方城等, 1983, *植物病理学报*, 13: 21.
- [9] 林壁润等, 待发表.
- [10] Mercedes De L R et al., 1983, *Phytopath Z* 106: 329.
- [11] Gensalves D et al., 1980, *Phytopath*, 70: 1023.
- [12] 李英杰等, 1985, *寄生虫学与寄生虫病杂志*, 3: 359.

Preparation of Monoclonal Antibodies to Papaya Ringspot Virus and Application in Serotyping¹

Lin Bi-run² Li Ying-jie³ Ouyang Min-hui³ Faan Hwei-chung²

Three stable hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against papaya ringspot virus were produced by fusing spleen cells of mice immunized with papaya ringspot virus (PRV-1) to mouse myeloma cell lines Sp2/0-Ag14. Of three hybridoma cell lines, the titer of 23H1 secreting monoclonal antibody was found to be the highest, when testing by ELISA method, the titer of 23H1 in ascitic fluid was 1:76800. Three cell lines secreting monoclonal antibodies were specific for papaya ringspot virus, not reactive to CMV and TMV. McAbs 23H1 and 22A12-B2 were reactive to isolates PRV-1, PRV-2 and PRV-15, and 22A12-E12 was reactive to isolates PRV-1 and PRV-2. Three serotypes of PRV were proposed by the authors after testing these monoclonal antibodies with four isolates of PRV.

Key words: Papaya ringspot virus, Monoclonal antibody, Serotype

1. The Project Supported by National Natural Science Foundation of China.
2. South China Agricultural University, Guangzhou.
3. The Frist Medicine University of PLA, Guangzhou.