

310-355

第6期第4卷
1991年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 6 No. 4
Dec. 1991

马铃薯卷叶病毒单克隆抗体的制备*

郭素华 周岚 孟清 张鹤龄

(内蒙古大学生物系, 呼和浩特 010021)

5435.32
5432.41

提 要

采用杂交瘤技术, 以马铃薯卷叶病毒 (Potato Leafroll Virus, PLRV) 为抗原, 用直接将病毒注入脾脏和随后尾静脉注射的方法, 免疫BALB/C小鼠。将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合。用Dot-ELISA和间接血凝试验筛选分泌抗马铃薯卷叶病毒抗体的阳性克隆, 建立了分泌抗PLRV单克隆抗体的杂交瘤细胞株。用微量玻片双扩散法测定单克隆抗体亚类为IgG₁和IgG_{2a}, 轻链为λ。注射杂交瘤细胞株A₁、A₃、C₃和D₃于小鼠腹腔, 制备出含高效价单克隆抗体的腹水。用获得的四种单克隆抗体对马铃薯卷叶病毒15个分离物进行了鉴定。

关键词: 马铃薯卷叶病毒 单克隆抗体 杂交瘤 鉴定

用Köhler和Milstein于1975年创立的单克隆抗体(Monoclonal antibodies, McAb)技术^[1]获得的单克隆抗体具有特异性高、重复性好、建株细胞可长期保存并分泌化学上单一抗体等优点。该技术已在生物学、医学等许多领域得到了日益广泛的应用。在植物病毒方面, 已制备出30多种病毒的单克隆抗体^[2]。马铃薯卷叶病毒 (Potato Leafroll Virus, PLRV) 引起马铃薯黄矮、卷叶、植株僵化, 严重影响马铃薯的产量和品质, 是马铃薯重要的病毒病害。我国南北方的许多栽培品种均感染有这种病毒病^[3]。由于PLRV严格虫传和在植物体内含量低, 且难于提纯, 为PLRV抗血清的制备造成困难, 从而影响了该病毒的血清学诊断的进展。因此建立稳定、持久地分泌抗PLRV的单克隆抗体, 具有特殊重要意义。其次, 虽然PLRV有不同的株系, 但PLRV株系划分的依据报道很少, 且各株系均产生同一类型症状, 因而也有待提供具有专一性的抗体。本文报道应用杂交瘤技术制备分泌抗PLRV的单克隆抗体及其用于鉴定PLRV分离物的结果。

材 料 与 方 法

一、抗原及提纯 本实验所用的PLRV系由内蒙古大学分离自“小叶子”×“多子白”的毒源。用桃蚜 (*Mygus Persicae*) 传到紫花球果曼陀罗 (*Datura tatula L.*) 和无病马铃薯“紫花

本文于1990年12月25日收到, 1991年4月4日修回。

*本课题由国家自然科学基金和国际马铃薯中心 (CIP) 资助。

白^o上增殖。PLRV提纯按本室以前报道的方法进行^[1]。

二、小鼠免疫 选6—8周龄BALB/C健康雄性小鼠为免疫动物,采用将病毒直接注入脾脏的免疫方法^[5,6]用0.1ml PLRV提纯制剂(约400 μ g)进行直接脾脏注射,每间隔3天,用0.1ml病毒制剂注射尾静脉两次。第二次尾静脉注射后,第3天融合。

三、细胞融合和选择培养^[1,7] 用无血清RPMI-1640液(GIBCO)制备小鼠脾细胞悬液,同时收集处于对数生长期的SP2/0骨髓瘤细胞,将上述两种细胞以10:1比例混合,离心沉淀,在30秒内加50%PEG(MW4000, Merck)进行细胞融合。离心收集融合细胞,加HAT培养液悬浮后,将悬浮的细胞逐孔加入予先加有巨噬细胞饲养层的96孔细胞培养板进行选择培养。两周左右改换HT培养液,之后改换完全RPMI-1640培养液。

四、杂交瘤的筛选、克隆和小鼠腹水的制备: 采用Dot-ELISA^[11]和间接血凝法^[9]筛选杂交瘤。Dot-ELISA操作程序为将硝酸纤维素膜(0.45 μ m, 西德Schleicher & Schuell)浸泡于PBS缓冲液中,约10分钟;将稀释后的提纯PLRV点于膜上(每个斑点含PLRV约100ng),80 $^{\circ}$ C烘干1小时;打孔取下抗原斑点。将打下的圆片放入含3%脱脂奶粉的PBS中封闭1小时。抗原圆片与待检测的细胞培养上清于37 $^{\circ}$ C保温2小时,用含0.05%Tween 20的PBS洗涤。转入用含2%脱脂奶粉的PBS稀释20倍的兔抗鼠IgG(军事医学科学院微生物流行病学研究所产品)溶液中,在37 $^{\circ}$ C保温1小时依同方法洗涤后再转入1:100稀释的碱性磷酸酯酶(Alkaline Phosphatase, AP, 西德Boehringer产品)标记的羊抗兔IgG(军事医学科学院微生物流行病学研究所产品)溶液中,在37 $^{\circ}$ C保温1小时,用同法洗涤。最后用AP缓冲液洗涤一次。加入底物BCIP-NBT溶液中,在37 $^{\circ}$ C显色40分钟;终止反应。间接血凝法操作是用PLRV致敏醛化的羊红细胞,在待检测细胞培养上清中加入1:100稀释的PLRV致敏红细胞,室温振荡30—50分钟,静置2小时后观察结果。选择阳性反应比较强的杂交瘤细胞株用有限稀释法进行三次克隆化,培养与筛选方法同前。筛选出阳性的克隆化细胞进行扩大培养。将获得的阳性杂交瘤细胞株悬浮于冷冻液(血清:二甲亚砷=9:1)中,置液氮中,长期保存。

小鼠腹水制备^[10]:取四只经产的雌性Balb/c小鼠,每只腹腔注射灭菌液体石蜡油0.7ml。7天后,腹腔内分别注入A₁, A₂, C₃, 和D₃杂交瘤细胞10⁶/0.5ml。注射杂交瘤细胞10天后,用9号针头,抽取活体腹水。

五、杂交瘤细胞的染色体检查^[11]:于生长旺盛的杂交瘤培养液中加入秋水仙素,使秋水仙素终浓度达1 μ g/ml,37 $^{\circ}$ C培养2.5—5小时。用0.075mol/L KCl低渗处理,用甲醇和冰醋酸液(3:1)固定三次。成细胞悬液滴于洁净冷冻玻片上。用10% Giemsa染色约10分钟,干燥,镜检。

六、单克隆抗体亚类的测定:采用微量玻片双扩散法^[12],用PBS制备0.8%琼脂糖凝胶,用兔抗鼠亚类IgG、IgG2a、IgG2b、IgG3、 λ 、 κ 轻链血清(美国Miles公司,由中国科学院微生物所蔡文启研究员惠赠),分别与浓缩10倍的杂交瘤细胞培养上清进行免疫双扩散反应。37 $^{\circ}$ C保温48小时后观察结果,并以氨基黑10B染色。

结 果

一、杂交瘤细胞株的建立

经PLRV免疫的BALB/C小鼠脾脏细胞和骨髓瘤SP2/0细胞在PEG作用下融合。融合后约一周杂交瘤可分裂、繁殖成较大的细胞群落,约两周后用Dot-ELISA和间接血凝

法筛选阳性孔。抗体活性较高的阳性杂交瘤用有限稀释法进行三次克隆, 并依同法筛选。现将两次融合的融合率和所得杂交瘤细胞分泌抗PLRV抗体的阳性率列表 1。

表 1 融合率及分泌抗体杂交瘤细胞阳性率

Tabl 1 Rate of cell fusion and positive hybridomas formed

融合次数 Fusion test	培养总孔数 Total wells cultured	杂交瘤孔数 Wells with hybridoma	阳性杂交瘤孔数* No. of hybridoma cell lines secreting McAb to PLRV	融合率 Rate of fusion (%)	阳性率 Rate of positive hybridoma cell lines(%)
1	96×2	188	188	97.9	100
2	96×2	192	192	100	100

*阳性对照 1: BALB/C小鼠抗PLRV血清, 1:50, 1:100, 1:200

Positive control 1: BALB/C mice-anti-PLRV antiserum diluted to
1:50, 1:100, 1:200

阳性对照 2: 兔抗PLRV IgG, 1:100稀释

Positive control 2: Rabbit-anti-PLRV IgG diluted to 1:100

阴性对照 1: RPMI-1640 (Dot ELISA) 生理盐水 (间接血凝)

Negative control 1: RPMI-1640 for Dot-ELISA, 0.85% NaCl for Indi-
rect Haemagglutination test

二、杂交瘤培养上清中单克隆抗体效价测定

取经过克隆化的杂交瘤A₁、A₂、C₁和D₃培养上清, 用间接血凝试验, 测得抗PLRV的单克隆抗体效价均为1:320, 结果见图1。

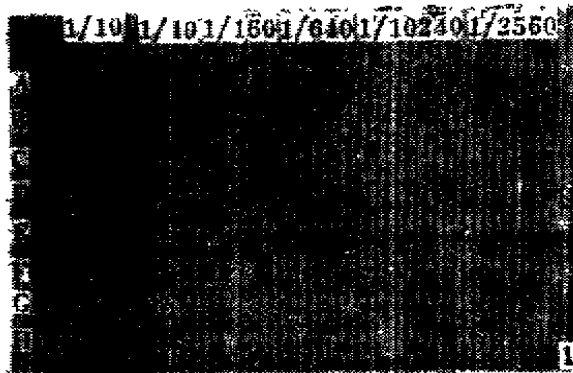


图 1 用间接血凝试验测定杂交瘤培养上清的效价

Fig.1 Detection of the titer of monoclonal antibodies
to PLRV in the cloned hybridoma cell culture
supernatant by indirect haemagglutination test

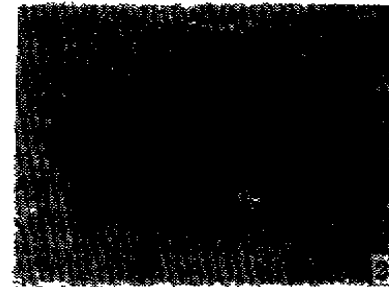


图 2 杂交瘤细胞的染色体

fig 2. Chromosomes in the
hybridoma cells

三、杂交瘤细胞染色体的数目

用秋水仙素处理杂交瘤细胞, 再给 KCl 溶液低渗处理, 用甲醇-冰醋酸固定, 以 Giemsa 染色镜检结果。杂交瘤细胞中染色体数目为 80 余条, 如图 2 所示。

四、单克隆抗体亚类的测定

用美国 Miles 公司兔抗鼠亚类 IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ 及 λ、κ 轻链抗血清、用

微量玻片双扩散试验鉴定结果表明杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体属于小鼠IgG2a亚类, 轻链为 λ_2 。

五、制备小鼠腹水

将杂交瘤细胞系A₁、A₃、C₃和D₃分别进行扩增并移入同系小鼠腹腔内, 制备高效

表2 用间接血凝试验检测小鼠腹水抗PLRV单克隆抗体效价
Table 2. Detection of the titer of MoAb in ascitic fluids to PLRV by Indirect Haemagglutination test

杂交瘤细胞系 Hybridoma cell line	腹水中抗PLRV抗体效价 Titer of MoAb to PLRV in ascitic fluid
A ₁	8 × 10 ⁵
A ₂	4 × 10 ⁶
C ₃	4 × 10 ⁶
D ₃	4 × 10 ⁵

价抗马铃薯卷叶病毒的单克隆抗体。用间接血凝试验测得小鼠腹水抗体效价为4 × 10⁵—8 × 10⁶ (见表2)。

六、单克隆抗体特异性鉴别

用间接血凝试验和Dot ELISA鉴定结果, 所得各杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体和马铃薯Y病毒、马铃薯X病毒、马铃薯S病毒、

TMV以及健康马铃薯提取液不发生反应。

七、杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性

C₃杂交瘤细胞在液氮中经过30次反复冷冻复苏, 培养后测定上清中单克隆抗体效价均可稳定在1:16—32 (间接血凝法)。

将分泌抗PLRV抗体的C₃杂交瘤细胞接种于6 × 13cm方瓶中培养, 每3天测定培养上清中的IgG的抗体效价。结果表明, 其效价逐渐上升, 第3天为1:16—32, 第10天即可达到1:320—640。

八、用单克隆抗体鉴定马铃薯卷叶病毒的分离物

用获得的四种杂交瘤细胞株分泌的抗PLRV的单克隆抗体, 用ELISA和被动血凝(PHA)鉴定了15个不同马铃薯品种上的PLRV分离物, 结果见表3。

表3 用单克隆抗体鉴定马铃薯卷叶病毒分离物
Table 3 Identification of PLRV isolates with MoAb

分离物 Isolates	单克隆抗体 MoAb			
	A ₁	A ₃	C ₃	D ₃
高凉7号 Highlard No.7	+	+	+	+
鸟盟601 Wumeog 601	+	+	+	+
Kufra	+	+	+	+
普6 Jin No.6	+	+	+	+
Favorita	+	+	+	+
京造1号 Jingzhao No.1	+	+	+	+
克新2号 Kexin No.2	+	+	+	+
Desiree	+	-	+	-
郑薯6号 Zhengshu NO.5	+	-	+	-
全抗白 Jinkengbai	+	-	+	-
东农303 Dongnong 303	+	-	+	-
8212	-	-	+	+
Atzinba	-	-	+	+
Schwalbe	-	-	-	-
Mira	-	-	-	-

试验结果表明,由杂交瘤细胞A₁, C₃分泌的单克隆抗体可以和广泛的PLRV分离物反应。而A₃和D₃分泌的单克隆抗体只能和部分PLRV分离物反应,如高原7号,乌盟601, Kufra, 晋6, Favorita, 京造1号和克新2号。同时也表明所有上述四种单克隆抗体A₁, A₃, C₃和D₃均不与抗马铃薯卷叶病毒品种提取物反应。

根据对不同单克隆抗体的反应,可将供鉴定的马铃薯卷叶病毒分离物分为三组。一组是可以和所有上述四种单抗发生反应,包括高原7号,乌盟601, Kufra, 晋6, Favorita, 京造1号和克新2号。第二组分离物只和较为广谱的单克隆抗体A₁和C₃反应,而和A₃, D₃单抗反应很弱或不反应,如郑薯6号, Desiree, 金抗白, 东农303等。第三组分离物只和C₃、D₃单抗反应,而和A₁, A₃反应很弱或不反应,其中包括8212和Atzinba。PLRV不同分离物对单克隆抗体的不同反应,为PLRV株系的鉴定提供了可参考的依据。

讨 论

1. 本实验采用了将提纯的马铃薯卷叶病毒直接注入脾脏的免疫程序。与常规免疫程序相比,具有免疫周期短,抗原直接进入脾脏,直接刺激B细胞,使B细胞迅速分化,增殖成浆细胞,导致很快产生抗体,免疫反应较强。一般认为直接注射脾脏后融合,易产生IgM。我们在脾脏注射后两次尾静脉加强免疫,获得了较高的融合率和产生高效价IgG的免疫活性较强的杂交瘤细胞株。

2. 用于杂交瘤培养上清中单克隆抗体检测的Dot-ELISA和间接血凝试验。均具有快速灵敏。重复性高和适于大量样品测定的优点。经过作者多次使用。证明这两种方法均是筛选分泌抗体的杂交瘤细胞株的较为理想的方法。二者几乎具有相同的灵敏度。在Dot-ELISA试验中。将硝酸纤维膜打成小园片,直接浸入抗原溶液中吸附抗原,用以代替负压下在硝酸纤维膜上点抗原样品,可得同样效果,但更为省时和简便。

3. 曾根据在洋酸浆 (*Physalis floridana*) 上引起的症状强弱, Webb等(1951)把马铃薯卷叶病毒分为5个株系^[18], 而Rozenda l(1952)则依同法将其分为3个株系。但所有株系均产生同一类型的症状, 国际马铃薯中心(CIP)研究了一些PLRV分离物在洋酸浆、白花刺果曼陀罗等数种寄主上引起的症状。认为PLRV的侵染强弱, 不能作为鉴别株系的标准, CIP用单克隆抗体, 用ELISA鉴定了收集自世界各地的PLRV分离物, 根据读取的光密度值, 把PLRV分离物分为3个血清组(Serogroups)^[15]。到目前为止, 关于PLRV株系研究的报道尚不多见, 我们的试验表明不同PLRV分离物对单克隆抗体的反应有所不同, 经鉴定的15个PLRV分离物, 依其和不同单抗的反应为3个血清反应不同的类型, 和单克隆抗体血清学反应的差异, 能否作为PLRV株系划分的依据, 尚有待进一步研究。

4. 由于马铃薯卷叶病毒严格虫传, 植物体内含量低, 难于大量提纯和抗原性弱等原因, 为其抗血清制备和血清学诊断造成困难。分泌抗马铃薯卷叶病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立, 对于改进抗PLRV抗体制备和生产, 提高抗体特异性, 从而对改善其血清学诊断具有重要现实意义。同时也为进一步研究PLRV株系和Luteovirus组内成员

间血清学关系, 以及PLRV 抗原结构分析创造了条件。

参 考 文 献

- (1) Kohler, G. and Milsteim, C., 1975, *Nature*, 256: 495—497.
- (2) Edward, J.H., 1985, *Ann. Rev. Phytopathology*, 23: 321—350.
- (3) 张鹤龄, 1983, 马铃薯, 2: 34~39.
- (4) 孟清, 张鹤龄, 1987, 病毒学报, 3: 151~155.
- (5) 王大坤等, 1987, 中华微生物和免疫学杂志, 2: 144.
- (6) 李福琛等, 1986, 中华微生物和免疫学杂志, 5: 322.
- (7) Dietzgen, R.G. and Evamarie Sander., 1982, *Archives of Virology*, 7: 197—204.
- (8) 陈志英, 张鹤龄, 1989, 内蒙古大学学报, 20: 401—405.
- (9) 韩澄源, 1979, 间接血凝技术, 科学出版社.
- (10) 于立坚等, 1988, 中国免疫学杂志, 4: 306.
- (11) 章谷生, 容秉培, 1987, 单克隆抗体在医学上的应用, 上海科学技术出版社.
- (12) 侯燕军, 张鹤龄, 1989, 病毒学杂志 3: 292—296.
- (13) Webb, R.E., Lavson R.H. & Walker, J.C. 1951, *Am. Potato J.* 28: 667.
- (14) Rozendaal, A. 1952, *Meded. ned. alg. ReurDienst Landbzaken Aurdappelpoort* 8: 94.
- (15) International Potato Center, 1990, Control of Virus and Virus-like Diseases. In "CIP 1990 Annual Report." p. 51—58.

Preparation of Monoclonal Antibodies to Potato Leafroll Virus

Guo Shu-hua Zhou Lan Meng Qing Zhang He-ling

(Department of Biology, Inner Mongolia University, Huhahaote 010021)

The hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to Potato Leafroll Virus (PLRV) were established by fusion of myeloma cells SP2/0 with spleen cells of BALB/C mouse immunized with purified PLRV by direct spleen injection followed by two tail injections. The hybridoma were screened by Dot-ELISA and indirect haemagglutination test. The subclasses of monoclonal antibodies obtained belong to IgG 2a with light chain examined by microslide gel double diffusion test. The ascitic fluid with high titer of monoclonal antibodies 1.4×10^5 to PLRV was prepared and used for identification of PLRV isolates.

Key words: Potato leafroll virus Monoclonal antibodies
Hybridoma

* This work was funded by CIP and The Chinese Foundation Committee of Natural Sciences