维普资讯 http://www.cqvip.com

95-101

第8卷第1期
1993年3月

中国病学毒
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.4
Mar. 1993

单克隆抗体对小苍兰褪绿条纹花叶病毒及其决定簇的作用特性

(16)

陈伟丽 涂正金 于善谦

S432.41

（复旦大学生命科学学院病毒研究室，上海200433）

提 要

采用杂交瘤技术，得到抗小苍兰褪绿条纹花叶病毒（FCSMV）六个单克隆抗体P3、4A4，6B1，7A6，7D1和7D8。ELISA效价分别为1：10^2—1：10^6。7A6和7D1属于IgG1亚类，7D8和4A4分属IgG2a和IgG2b亚类，P3和6B1属于IgG3亚类。电镜观察单克隆抗体与病毒形成的复合物发现7D1能使病毒粒子发生严重断裂。6株单克隆抗体中的P3，4A4 6B1对应于病毒外壳蛋白上的顺序决定簇。纯化的病毒外壳蛋白经酶裂解和改进的盘状电泳分离，得到八段与多克隆抗体反应的收集液。用顺序决定簇的单克隆抗体检出P3对应的肽段22和4A4对应的肽段78。本文还讨论了7D1使病毒粒子发生断裂的原因和与病毒粒子表面结构的关系以及分离抗原决定簇所在片段的意义。

关键词：小苍兰褪绿条纹花叶病毒　抗原决定簇　单克隆抗体

自从1975年单克隆抗体技术创立以来[1]，在生命科学的许多领域中得到广泛应用。1982年以后，单克隆抗体开始应用于植物病毒学领域，目前已制备了数十种植物病毒的单克隆抗体，它们在病毒的检测与诊断以及分析病毒抗原结构等方面发挥了巨大的作用，因为单克隆抗体能识别抗原蛋白之间一个氨基酸的差异而成为研究病毒外壳蛋白抗原决定簇的理想工具[2,3]。用单克隆抗体分析纯化抗原裂解产物的免疫学性质，可对抗原决定簇进行定位。

本文以小苍兰褪绿条纹花叶病毒（Freesia chlorotic stripe mosaic virus）为材料，制备了该病毒的单克隆抗体，并用以研究对完整病毒和病毒外壳蛋白上的抗原决定簇的作用特性。

材料与方法

一、病毒的来源及纯化 FCSMV是本室从小苍兰上分离得到并纯化保存的，纯化方法与Freitag[4]方法基本相同。

二、单克隆抗体的制备 按文献[5]进行。BALB/C小鼠的免疫用纯化病毒与不完全佐剂进行

1991年11月26日收到，3月25日修回。
*国家教委博士点基金资助，编号8924615。1N＝1mol/L×离子价数。

维普资讯 http://www.cqvip.com

二次腹腔注射，每次病毒量约500μg，间隔二周。第三次注射于融合前3—4天进行，由尾静脉注射50μl2.5mg/ml的病毒液。

三、单克隆抗体的亚类测定 方法同文献[6]。

四、多克隆抗体制备 BALB/C小鼠免疫同前，于第三次注射时，同时腹腔注射10^6个SP2/0细胞，14天后收集腹水，并测其效价。

五、单克隆抗体或多克隆抗体与病毒复合物的电镜观察 分别取单克隆和多克隆抗体各50μl，各加25μl 0.67mg/ml的病毒悬液，37℃反应2小时后，铜网蘸取少量反应液，以2%磷钨酸负染，电镜观察病毒粒子形态的变化。

六、病毒外壳蛋白抗原决定的分类 纯化的FCSMV制剂在0.0625mol/L pH6.8的Tris-HCL缓冲液（含2%SDS，5%巯基乙醇）中煮沸3分钟，对0.02mol/L pH7.6的磷酸缓冲液充分透析除去SDS，用间接ELISA法[6]测定变性外壳蛋白以及完整的病毒粒子分别与单克隆抗体和多克隆抗体的反应。

七、外壳蛋白的酶解[6,7] 2mg纯化的病毒在室温下用1NHCl处理24小时后，8,000r/m离心10分钟，沉淀用1N HCl反复洗涤后对蒸馏水透析，经冷冻干燥得到纯化的病毒外壳蛋白。将此蛋白溶解在0.1ml 5%的甲酸溶液中，加1μl胃蛋白酶液（Sigma公司），37℃保温1小时后取出。

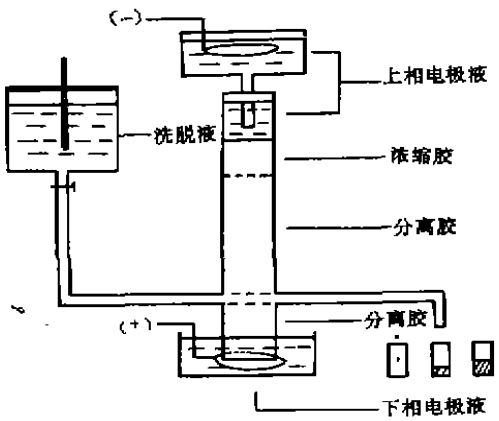

图1 改进的盘状电泳装置

Figure 1. Modified disc electrophoresis

八、改进的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离外壳的蛋白酶解片段及顺序决定簇所在片段的检出 采用图1所示的改进的盘状电泳装置分离酶解片段。选用10%的分离胶和3.75%的浓缩胶，上样量100μl，电泳恒压80V，电泳管内径9mm，其它条件同文献[3]。用分部收集仪分段收集流出液，流速0.125ml/min，每管收集1.5ml。收集液用ELISA法（同前）测出能与多克隆抗体反应的阳性段后，再用ELISA法检出与对应的单克隆抗体反应的顺序决定簇所在的酶解片段。

九、荧光标记及SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测顺序决定簇所在片段纯度以及外壳蛋白及其酶解片段 顺序决定簇所在片段，外壳蛋白及其酶解片段溶液各取100μl，在pH9的条件下加100μl 0.2mol/L $NaHCO_3$和5μl 2.5mg/ml的DNS-Cl丙酮溶解液于37℃保温1小时，进行荧光标记[8]。标记后的样品按文献[5]进行SDS-PAGE电泳，采用15%的分离胶和3.75%的浓缩胶，电压150伏。电泳的同时，在紫外灯下（=2537A°）观察荧光带的运动情况，并描下其对应位置。

结 果

一、分泌单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

小苍兰褪绿条纹花叶病毒免疫的BALB/C小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞融合后，经HAT培养液的选择培养，ELISA法进行产抗体细胞筛选，细胞克隆，最后得到6个分泌单克抗体的细胞株系，分别命名为：P3，4A4，6B1，7A6，7D1和7D8。经体外多次传代培养，反复冻融，仍能稳定地分泌单克隆抗体。由小鼠体内生产法得到的单克隆抗体

维普资讯 http://www.cqvip.com

经ELISA法测定，7A6和6B1效价为1：10^4，4A4和7D8效价为1：10^3，P3效价为1：10^2。

用双抗夹心ELISA法测定的单克隆抗体的亚类见表1。

表1. 双抗夹心ELISA法测定单克隆抗体亚类

Table 1. Detection of the subclass of monoclonal antibodies by double sandwich ELISA

亚类 subclass	抗体 Antibodies						
	P3	4A4	6B1	7A6	7D1	7D8	PBS
IgG1	0.000	0.000	0.028	0.525	0.935	0.000	0.000
IgB2a	0.027	0.001	0.000	0.000	0.009	1.128	0.000
IgG2b	0.003	0.600	0.013	0.014	0.000	0.003	0.000
IgG3	1.144	0.000	1.034	0.002	0.004	0.005	0.000
IgG	1.146	1.146	0.922	0.540	1.149	1.103	0.000

*PBS：磷酸缓冲液 phoshate buffer solution.

由表1可知，7A6和7D1属于IgG1亚类，7D8属于IgG2a亚类，4A4属于IgG2b亚类，P3和6B1属于IgG3亚类。

二、单克隆，多克隆抗体与病毒形成复合物后对病毒形态的影响

电镜观察表明，病毒粒子与单克隆抗体7DB，P3，4A4，6B1及7A6形成抗原—抗体复合物后，病毒粒子形态无明显变化（图2b）；而与7D1形成复合物后，粒子大多发生了断裂，并且病毒粒子浓度大大下降（图2C）；病毒与多克隆抗体形成复合物后，则可见病毒粒子外形加粗，边缘粗糙。

三、外壳蛋白抗原决定簇分类

变性的病毒外壳蛋白和完整的病毒粒子与单克隆，多克隆抗体的反应结果（见表2）。P3，4A4和6B1能与变性后的外壳蛋白反应，其对应的抗原决定簇应为顺序决定簇，而7A6，7D1和7D8不能与变性的外壳蛋白反应，仅能与完整的病毒粒子反应，其对应的抗原决定簇可能与外壳蛋白的高级结构有关。

表2. ELISA法检测病毒外壳蛋白顺序决定簇对应的单克隆抗体

Table 2. Detection of monoclonal antibodies to sequential epitopes on the coat protein of the virus by ELISA

抗原 antigens	抗体 Antibodies						
	P3	4A4	6B1	7A6	7D1	7D8	多抗(PAb)
变性的外壳蛋白 coat protein	0.484	0.942	0.613	0.000	0.010	0.009	1.118
完整的病毒粒子 virion	1.106	1.147	1.067	0.077	0.695	0.217	1.175

注：抗体稀释倍数：P3，4A4和7D8，$1:10$，7A6，7D1 $1:10^4$

四、顺序决定簇所在片段的检出

外壳蛋白的胃蛋白酶解片段经改进的盘状电泳分离后，收集在86只管中，用多克隆

维普资讯 http://www.cqvip.com

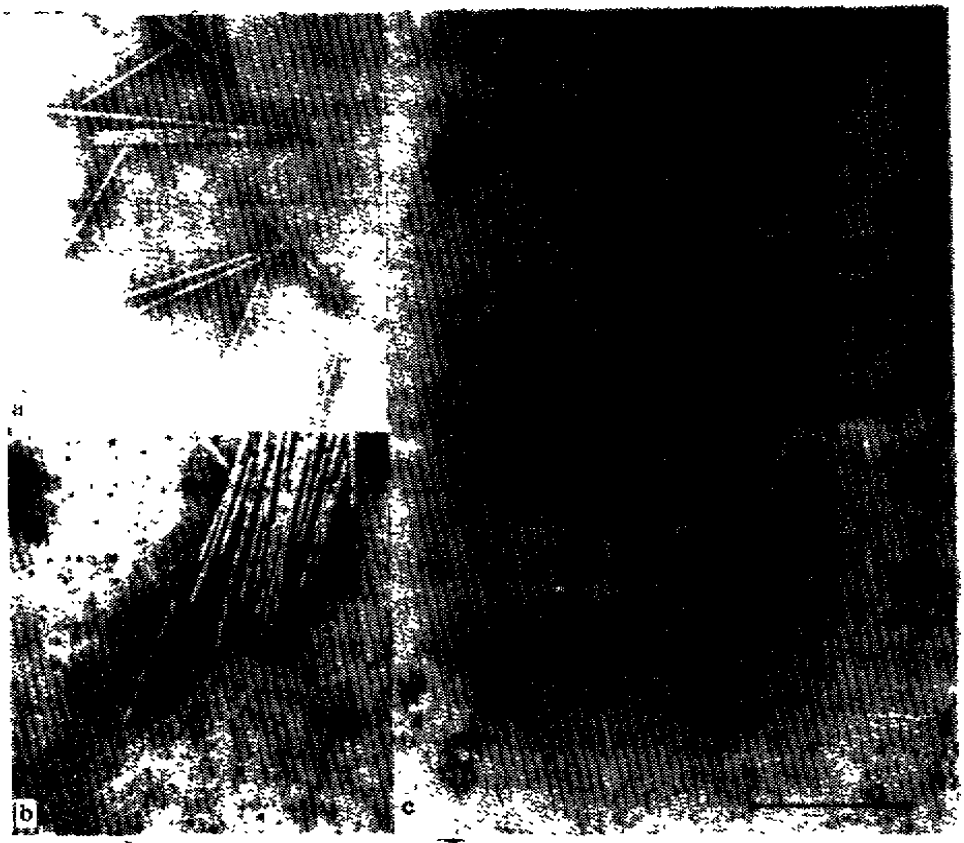

图2 电镜下FCSMV和FCSMV-抗体复合物形态（标尺长：500nm）

Figure 2. FCSMV and Virus-antibody complexes electron micrography (The bar represents 500nm)

a. FCSMV b. Virus-6B1 complexes(病毒与6B1复合物)

c. Virus-7D1 complexes(病毒与7D1复合物)

抗体对其检测的结果（图3）表明，在86只收集管中，和有8个阳性峰，分别位于管22，管32—33，管35，管45，管62，管64，管71—73和管78中，取各阳性管的组分与对应于顺序决定簇的单克隆抗体P3，4A4和6B1反应，结果见表3。数据表明，P3对应的顺序决定簇所在片段在管78中，定为肽段78。

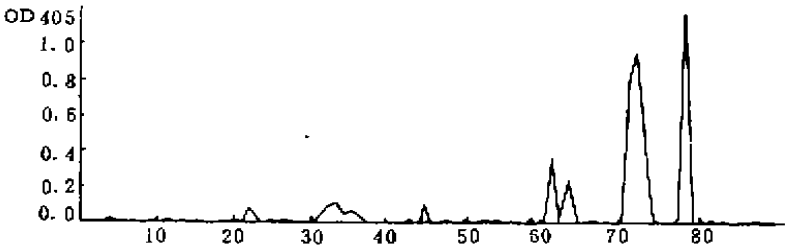

图3 ELISA检测改进盘状电泳收集液与多克隆抗体的反应

Figure 3. Detection of fractions from modified disc eletrophoresis by ELISA with P-Ab

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3、ELISA法检测外壳蛋白酶解片段与单克隆抗体的反应

Table 3. Detection of cleavages of coat protein by ELISA with mAb

mAb	管号 Fractions No.							
	22	32	35	45	62	64	71	78
P3	0.615	0.018	0.002	0.019	0.005	-0.002	0.014	0.018
4A4	0.014	0.017	0.015	0.011	0.041	-0.003	0.046	0.671
6B1	0.013	0.049	0.032	0.042	0.002	0.034	0.007	0.050
pAb	1.152	1.184	1.010	0.947	0.701	0.912	1.094	1.143

五、顺序决定簇所在片段纯度和外壳蛋白及其酶解片段的电泳

用荧光试剂DNS-Cl对顺序决定簇所在肽段22和肽段78以及外壳蛋白，外壳蛋白酶解片段标记后，在紫外灯下观察电泳分离情况表明，肽段22和肽段78是纯的，它们除前沿外只产生一条荧光带，外壳蛋白也仅产生一条带；外壳蛋白的胃蛋白酶裂解液产生一条主带以及主带下方的一片荧光区域（图4为电泳过程在紫外灯下的观察结果，荧光较弱不易照相。仅以线条图表示）。

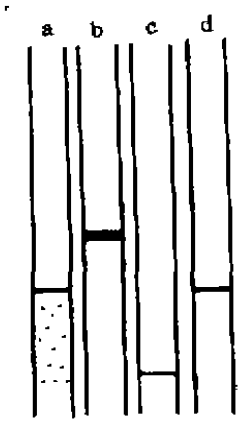

图4、DNS-Cl标记外壳肽段蛋白及其酶解片段的SDS-PAGE电泳条带的位置图（荧光较弱不易照相）

a.外壳蛋白酶解，b.外壳蛋白(MW＝17，500)

c.肽段22，d，肽段78。———条带位置，荧光区

Figure 4. The bands location of peptides, coat protein and cleavages of coat protein labled by DNS-Cl after electrophoresis.

a. Cleavages of coat protein treated with pepsin; b. Coat protin; c. peptide 22; d. Peptide 78.

—: The band location;

The area which is fruorescent.

讨　论

用杂交瘤技术得到了抗小苍兰褪绿条纹花叶病毒的6种单克隆抗体，它们分属于四个IgG亚类。用单克隆抗体与完整病毒和病毒外壳蛋白进行免疫测定的结果表明6种单克隆抗体中7A6，7D1和7D8专一于结构决定簇，因为在外壳蛋白变性之后结构改变，使失去与这几种单抗结合的能力。单抗4A4，P3和6B1专一于顺序决定簇，顺序决定簇在变性后的外壳蛋白上仍能与抗体结合[10]。

变性的病毒外壳蛋白经过胃蛋白酶降解后，以改进的流动盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳，能将酶解蛋白片段分离。分段收集液经过多克隆抗体检测表明，所收集的各段从第

维普资讯 http://www.cqvip.com

22管到78管分段中共有8段含有与抗体结合的肽段。再以顺序决定簇的三种单抗检测8个有抗原性的肽段，发现分子量较小的第22肽段与单抗P3有抗体结合反应，分子量较大的第78肽段与单抗4A4有抗体结合反应。用荧光试剂DNS-Cl顺序决定簇所在肽段进行标记以后的电泳观察证实这两个肽段皆是单一肽段。实验表明用单克隆抗体作为探针能有效地分离和鉴定抗原大分子上的个别顺序决定簇，它对于研究个别抗原决定簇的化学组成与免疫活性，监测抗原的微小变异具有重要的作用。

此外从所得到单抗7D1与完整病毒结合以后看到的病毒颗粒降解现象表明单抗7D1与完整病毒上的结构决定簇结合以后，可能因为改变了病毒的构象以使病毒的结构失去平衡受到破坏。这与我们以前曾观察到个别单克隆抗体，能使长叶车前花叶病毒[6]及香石竹潜病毒（末发表）失去侵染性是一致的。有的单抗甚至会造成病毒粒空壳增加[11]，可能与我们的实验有某些联系。这种现象在多克隆抗体反应中未见报道。

至于这类单克隆抗体是否起到抗体酶的作用[13,14]是一个极为有趣的问题有待研究证实。

参 考 文 献

〔1〕 Kohler, G.and Milstein, C., 1975, *Nature*, 256：495—497.

〔2〕 Williams, G., 1988, *TIBTECH*, 6：36—42.

〔3〕 郑光宇，赵荣乐，1988，生物科学动态，3：17。

〔4〕 Freitag, J.H.and Miloe, R.S., 1970, *Phytopathology*, 60—66.

〔5〕 于善谦等，1986，中国科学，B.12：1266—1270。

〔6〕 涂正金等，1988，病毒学杂志，(4)：364—369。

〔7〕 Short, M.N.1987, Ann.Appl.Biol., 110：213—219.

〔8〕 Croft, L.R., 1980, Handbook of protein Sequance Analysis, 14—15.

〔9〕 Leammli, U.K., 1970, *Nature*, 227：680—685.

〔10〕 Walker, I.H., 1984, Methods in Molecular Biology(I) Protein 205—206, Humana Press, Clifton, NJ.

〔11〕 Van Regenmortel, M.H.V., 1986, *The Plant Disease*, 2; 79—104.

〔12〕 Shokat, K.M., et al, 1989, *Nature*, 338: 269—271.

〔13〕 Richard, A., et al, 科学，7：17—26。

〔14〕 Weiss, D.B., 1992, *Virology*, 162：279—289.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Monoclonal Antibodies to Freesia Chlorotic Stripe Mosaic Virus and Their Characteristics of Binding to Antigenic Determinants on the Coat Protein

Chen Weili Tu Zhengjin Yu Shanqian

(*Virology Section, School of Life Science, Fadan University, Shanghai* 200433)

Using hybridoma techniques, six monoclonal antibodies (mAb), P3, 4A4 6B1, 7A6, 7D1 and 7D8 to Freesia chlorotic stripe mosaic virus (FCSMV), were prepared. The titers of mAb were $1:10^5$—$1:10^6$. MAb 7A6 and 7D1 were IgG1 subclass, 7D8 and 4A4 were IgG2a and IgG2b subclass, respectively, mAb P3 and 6B1 were of IgG3 subclass. The reactions of mAb to virus particles and denatural coat protein indicated that mAb P3, 4A4 and 6B1 were associated with different sequential epitopes of coat protein, and others were associated with different structural epitopes on virus particles. MAb P3 reacted with epitope on No.22 peptide fraction and mAb 4A4 reacted with epitope on No.78 peptide fraction when each fraction which was separated by modified disc electrophoresis after degestion of coat protein by pepsin was detected by mAbs p3, 4A4 and 6B1.

Only one band of No.22 or No.78 peptide fraction was shown by DNS-Cl labling, SDS-PAGE.

It was found that the virus particles were broken severely when virus preparation was mixed only with mAb 7D1 but not with other mAbs and even polyclonal antibody. It is posssible that the virus structure was changed when the structural epitope binded with relative mAb 7D1 or the mAb 7D1 may have function of Abzyme. More evidences are required.

Key words: Freesia chlorotic stripe mosaic virus Antigenic determinant Monoclonal antibody