

分泌抗芜菁花叶病毒株系特异性单克隆 抗体杂交瘤细胞株的建立及抗体理化性质测定

杨 峰 蔡少华

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京)

徐 玲 冯兰香

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京)

用经芜菁花叶病毒(TuMV)免疫的BALB/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞(Sp2/0-Ag14)融合,经3次克隆化培养和ELISA筛选,建立了5类分泌抗TuMV的单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞株。其中4类分别对TuMV-C1株系、TuMV-C3株系、TuMV-C4株系和TuMV-C5株系具有特异性反应,第5类对TuMV 5个株系均有反应。以双抗体夹心ELISA和间接ELISA检测,上述McAb同CaMV、CMV、TMV、PVX和PVY等均不产生交叉反应,小鼠腹水McAb的滴度在1:256000—2048000之间,多为1:1024000,比常规多抗血清高400倍左右。对上述杂交瘤细胞系和McAb的生物学特性及理化性质进行了鉴定。用SDS-PAGE、Western-blotting对TuMV外壳蛋白亚基、McAb识别位点进行了分析,并就McAb区分TuMV株系进行了讨论。

关键词 芜菁花叶病毒;杂交瘤;单克隆抗体

芜菁花叶病毒(Turnip mosaic virus, TuMV)是十字花科作物病毒病最重要的病原病毒,分布相当广泛,除南美洲外其它各大洲均有报道。以TuMV为主要病原的病毒病在大白菜上常年发病率为10—30%、严重的达80—90%;油菜上发病率一般在20—30%、严重的达70%以上,可引起不同程度的减产、甚至个别地块失收,造成严重的经济损失。

早在五十年代我国就开展了芜菁花叶病毒的鉴定及十字花科蔬菜和油菜的抗病品种选育工作。为了进一步了解TuMV的株系分化,向开展抗病育种的单位提供快速、准确的单抗诊断试剂和为植物抗TuMV基因工程打下基础,开展了TuMV的株系特异性单克隆抗体的研究。这在国内外尚未见报道。

材 料 和 方 法

(一) 病毒来源及提纯

用于免疫及杂交瘤细胞筛选的抗原自北京地区分离,并以Provvidenti^[1]和Green^[2]的方法鉴定。供试的TuMV-C2株系为Provvidenti, R.博士惠赠。

采集在大白菜(品种:“胶白二叶”)上繁殖的TuMV C1、C3、C4和C5株系的病叶,按崔璋京^[3]的方法分别提纯。提纯的病毒经电镜观察和紫外分光光度计(Beckman DU-70)测其247nm、260nm和280nm处的光吸收值,以鉴别其纯度和计算含量。

(二) 免疫

本文于1991年11月6日收到。

参照文献〔4〕。取6周龄的BALB/c小鼠, 分别用提纯的TuMV C₁、C₃、C₄和C₅免疫, 免疫剂量为100 μ g/只。

(三) 细胞融合及抗体检测

参照文献〔5〕。免疫的BALB/c小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0按5:1混合, 融合剂为45% PEG (M W 1450, Sigma)。抗体检测和阳性杂交瘤细胞克隆化的筛选用间接ELISA方法(下同)。辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠IgG结合物为本实验室研制, 使用浓度为1:100。

(四) 细胞克隆化培养

参照文献〔6〕。采用有限稀释法克隆化三次以上。

(五) 小鼠腹水抗体制备

参照文献〔7〕。BALB/c小鼠在注射杂交瘤前一周, 每只注射0.5ml Pristane, 杂交瘤细胞注射量为3—5 \times 10⁵细胞/只。

(六) 细胞染色体计数

杂交瘤及骨髓瘤细胞的染色体计数参照文献〔8〕。

(七) Ig类型和亚类的测定

以琼脂双扩散法, 用IgM、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃(美国Litten Bionetics, Inc.) 测定经20倍浓缩的杂交瘤细胞培养上清液中McAb的Ig类型和亚类。

(八) McAb 与其它植物病毒的交叉反应

用花椰菜花叶病毒(CaMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、烟草花叶病毒(TMV)、马铃薯X病毒(PVX)和马铃薯Y病毒(PVY)分别以间接ELISA和双抗体夹心ELISA同McAb进行交叉反应。

(九) 互补试验

参照文献〔9〕。

(十) 抗体稳定性测定

1. 冻融对McAb的影响: 取腹水

McAb在-60 $^{\circ}$ C下反复冻融, 分别进行2、4、8次处理, 以未冻融的腹水McAb作对照。

2. 硫酸铵沉淀对McAb的影响: 取腹水McAb分别作1、2、3次硫酸铵沉淀, 以未经硫酸铵沉淀的腹水McAb作对照。

3. 温度对McAb的影响: 取腹水McAb分别在超级恒温水浴上于40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C处理半小时, 以未经处理的腹水McAb作对照。

4. 冻干对McAb的影响: 将3次硫酸铵沉淀后的McAb冻干, 加入PBS稀释至原体积, 以3次硫酸铵沉淀后未经冻干的McAb作对照。

用间接ELISA测定各种处理与对照McAb的滴度, 并加以比较。

(十一) 抗体的纯化及标记

腹水McAb经硫酸铵沉淀后, 用Sephadex G-200柱层析纯化。辣根过氧化物酶标记纯化的McAb采用过碘酸盐改良法, 参照文献〔10〕。

(十二) TuMV[外壳蛋白的SDS-PAGE及Western-Blotting

参照文献〔11〕。标准分子量蛋白为(上海生物化学研究所产)低分子量标准蛋白质。检测用的辣根过氧化物酶标记McAb为本实验研制的。

结 果

(一) 病毒提纯

TuMV各株系提纯后, 吸收值为: $A_{280}/A_{260}=1.24$, $A_{280}/A_{247}=1.14$, 与文献报道的数据相似。电镜观察表明病毒颗粒形态和长度与标准相符。

(二) 杂交瘤细胞的产生、筛选及鉴定

定

经5次细胞融合, 融合率均在90%以

上,阳性率为7.4%—11.6%。经间接ELISA筛选、抗体株系特异性鉴定及3次细胞克隆化培养,建立了5类杂交瘤细胞系。其中对C1株系具有特异性反应的细胞系为TuH1-4C6;对C3株系具有特异性反应的为TuH2-1G9、TuH2-2D5和TuH

2-3B11;对C4株系具有特异性反应的为TuH3-5C6和TuH5-3C10;对C5株系具有特异性反应的为TuH4-5G11;对C1-C5株系均有反应的为:TuH4-8B2、TuH4-1C10和TuH5-5G10。详见表1。

(三) 杂交瘤细胞系的传代培养及冻

表1 McAbs对TuMV不同株系的反应

Table 1 Reactivities of the McAbs to strains of TuMV.

Number of McAbs		TuM 1-4C6	TuM 2-1G9	TuM 2-2D5	TuM 2-3B11	TuM 3-5C6	TuM 5-3C10	TuM 4-5G11	TuM 4-8B2	TuM 4-1C10	TuM 5-5G10
Strains of TuMV	C1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	C2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	C3	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	C4	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
	C5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

存稳定性

上述杂交瘤细胞系在3次克隆化后,经细胞传代培养20代以上,液氮冻存一年后仍能稳定分泌McAbs,抗体滴度没有下降。

(四) 杂交瘤细胞系的染色体分析

五类杂交瘤细胞系的染色体数目大多在89—109条之间,接近正态分布。骨髓瘤细胞Sp2/0-Ag14染色体数为72条左右,BALB/c小鼠脾细胞染色体数为40条左右。详见图1。

(五) 抗体类型及亚类鉴定

结果见表2。

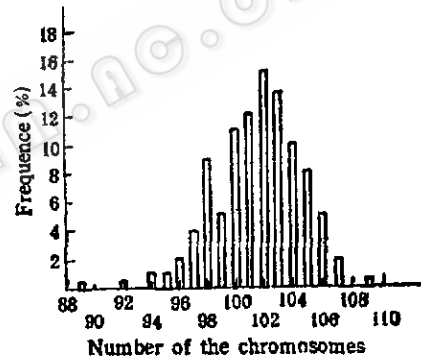


图1 TuH 5-3C10 杂交瘤细胞系染色体数目统计
Fig. 1 Distribution of the chromosomes of hybridoma cell line TuH 5-3C10.

(六) 腹水和细胞培养上清中McAbs

表2 杂交瘤细胞分泌的抗体类型及亚类

Table 2 The class and subclass of McAbs secreted by hybridomas.

No. of McAbs	TuM 1-4C6	TuM 2-1G9	TuM 5-3C10	TuM 4-5G11	TuM 4-1C10
Type of McAbs	IgM	IgG _{2a}	IgG _{2a}	IgG ₁	IgG ₃

滴度

结果见表3。

(七) 交叉反应

五类杂交瘤细胞系所分泌的McAbs经间接ELISA和双抗体夹心ELISA检测,均不与十字花科蔬菜上常见的CaMV、

CMV、TMV及PVX、PVY等起交叉反应。

(八) 互补试验

结果见图2。McAb混合液的稀释度与单独的McAb液稀释度相近,说明互补效果不显著,抗原识别位点差别不大。

表3 杂交瘤细胞所分泌McAbs的滴度

Table 3 Titers of McAbs secreted by hybridomas.

Hybridoma cell lines	Titers of McAbs	
	Ascitic fluids	Supernatant of hybridoma cultured
TuH 1-4C6	1:512000	1:1280
TuH 2-1G9	1:1024000	1:2560
TuH 3-5C6	1:1024000	1:2560
TuH 5-3C10	1:2048000	1:5120
TuH 4-5G11	1:256000	1:640
TuH 4-1C10	1:1024000	1:2560

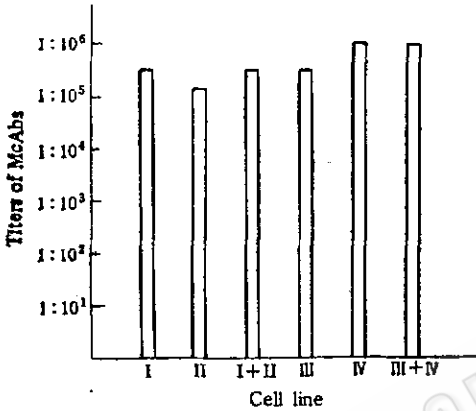


图2 四种McAbs的互补试验(I、II、III、IV代表TuM 2-1G9, TuM 2-2D5, TuM 3-5C6, TuM 5-3C10)

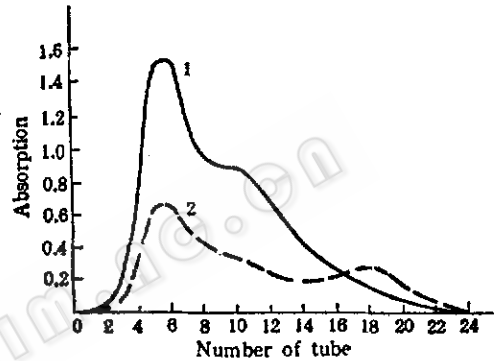
Fig. 2 The complement test of four kinds of McAbs.

(九) McAbs的理化稳定性

实验证明,冻融、硫酸铵沉淀、耐温、冻干等处理对五类McAbs的滴度无明显影响,说明各McAbs具有稳定的理化性质,适合实际应用的需要。

(十) McAb的纯化和酶标记

纯化后的McAb在SDS-PAGE中呈现两条带,经分子量测定证明分别是抗体

图3 Sephadex G-200柱(5cm²×25cm)纯化酶标

TuM 5-3C10所收集各部分蛋白和酶的吸收峰

Fig. 3 The absorptivity of different parts of TuM 5-3C10 and enzyme when the conjugate was purified and collected by using Sephadex G-200 column.

1. A_{280nm} 2. A_{403nm}

分子解离后的重链和轻链。

纯化的TuM 5-3C10标记产物经Sephadex G-200柱层析纯化,其洗脱曲线见图3。标记前后,抗体滴度无明显改变,结果见表4。

(十一) TuMV外壳蛋白的SDS-PAGE及Western-Blotting

TuMV各株系的外壳蛋白在SDS-

表4 TuM 5-3C10酶标记结果

Table 4 Result of conjugation of enzyme-McAb (TuM 5-3C10).

Volume of ascites	Titer of ascites McAb	IgG	HRP Enzyme	Enzyme-McAb conjugation					
				Yield	Titer	Conc of HRP	Conc of McAb	Enzyme/McAb in molarity	Conjugation rate
5.0ml	1:2 048 000	33.2mg	18.0mg	30.0ml	1:51200	0.134mg/ml	0.459 mg/ml	1.16	40.1%

PAGE中均显示一条位置相同的带,分子量为34kD。

在 Western-Blotting 中, TuM 4-1C10能与C1-C5株系的蛋白带发生反应; TuM 5-3C10仅与C4株系的蛋白带发生反应; TuM 1-4C6、TuM 2-1G9和 TuM 4-5G11与各株系蛋白带均不发生反应。

讨 论

自1921年Gardner和Schultz首次描述TuMV以来,国内外学者对TuMV进行了深入的研究,先后在不同寄主上发现了不同的TuMV分离物。但由于TuMV株系分化较复杂,目前不同作者对TuMV的分类方法有所不同。除Provvidenti和Green等按寄主抗病基因型分类方法外,国内还有另一种根据TuMV不同分离物对不同鉴别寄主即十字花科蔬菜不同种或变种的致病力强弱差异的分类方法。我们根据Provvidenti和Green的分类方法,建立了分泌抗TuMV C1、C3、C4、C5株系特异性的McAbs杂交瘤细胞系,分别用间接ELISA和双抗体夹心测定McAbs与TuMV各株系的反应情况,证明上述McAbs能区分供试TuMV的各株系,

这反映了Provvidenti和Green等按寄主抗病基因型划分的TuMV株系之间确实存在抗原性差异,表明其分类方法具有可靠性和实用性。同时表明,用上述杂交瘤细胞生产的McAbs有可能成为TuMV株系鉴定、病害流行病学规律研究和抗病品种选育的检测试剂。作者尚未建立分泌抗TuMV C2株系McAb的杂交瘤细胞系是因为C2株系未能及时扩大繁殖,这部分工作还在继续。

众所周知,McAb在稳定性方面不及PcAb,不同的McAb稳定性差异很大,因此,有必要分析McAb的稳定性,择优而用。影响McAb稳定性的理化因素甚多,从实用观点出发,一般需测定McAb在不同酸碱度、离子强度和温度条件下,以及McAb生产和使用过程中所需的硫酸铵沉淀、冻融、冻干处理后滴度的变化。本实验的抗体筛选和理化特性鉴定过程已经证明,上述McAbs能适应ELISA检测的酸碱度和离子强度,因此实验中重点测试了不同温度、硫酸铵沉淀、反复冻融、冻干处理对McAb滴度的影响。结果表明:其滴度均无明显下降,证明上述McAbs的稳定性完全适应今后生产和应用的要求。

参 考 文 献

- [1] Provvidenti, R., *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 105(4):571-573, 1980.
- [2] Green, S. K., *Plant Disease*, 69(1):28-31, 1985.
- [3] Choi, J. K. et al., *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 43:440-448, 1977.
- [4] Engvall, E. et al., In, "Immunoassays in the clinical laboratory", Ed. by R. M. NaRa mura, pp. 89-97. Liss, New York, 1979.
- [5] Galfre, G. et al., *Nature*, 266:550-552, 1977.
- [6] 刘尔翔, 杂交瘤技术在寄生虫病方面的应用, 人民卫生出版社, 北京, 1981.
- [7] 姚康生等, 中国农业科学, 18(4):67-72, 1985.
- [8] 河北师范大学等, 遗传学实验, 人民出版社, pp. 9-10, 1982.
- [9] 刘庆良等, 上海免疫学杂志, 8(3):231-234, 1988.
- [10] 蒋成淦, 酶联免疫测定法, 人民出版社, pp. 45, 1984.
- [11] Towbin, H. et al., *J. Immunol. Methods*, 72:313, 1984.

The Establishment of Hybridoma Cell Line Secreting Specific Monoclonal Antibodies Against Turnip Mosaic Virus and Analysis of Properties of the McAbs

Yang Feng Cai Shaohua

(*Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing*)

Xu Ling Feng Lanxiang

(*Institute of Vegetable and Floriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing*)

Monoclonal antibodies of hybridomas derived from fusing the mouse spleenocytes immunized by TuMV with BALB/c mouse myeloma cells (Sp 2/0-Ag14). Five kinds of hybridoma cell line were produced by indirect-ELISA screening and cloning three times with Limiting dilution. Four kinds of hybridoma respectively produced antibodies reactive to TuMV C1, C3, C4, C5. One kind reactive to all five strains of TuMV. In indirect-ELISA and sandwich-ELISA tests, TuMV specific monoclonal antibodies didn't react with CaMV, CMV, TMV, PVX and PVY. Antibody titers of ascitic fluids were about 1:256000 to 2048000 in indirect-ELISA. Biological property and physical and chemical property of the hybridoma cell lines and McAbs was identified. The identification of TuMV strains, the specificity and stability of McAbs, the coat proteins and antigenic site of TuMV were discussed in this paper with SDS-PAGE and western-blotting.

Key words

Turnip mosaic virus; hybridoma; monoclonal antibodies