

TMVc的单克隆抗体及其对烟草花叶病毒组成员病毒间的鉴别

蔡文启 赵淑珍 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用烟草花叶病毒普通株(TMVc)纯病毒免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合, 通过2—3次有限稀释法克隆化获得10个能持续地分泌抗体的杂交瘤细胞株。所获抗体均属IgM。其中5个用来诱发高滴度腹水。用间接ELISA、免疫电泳、中和侵染性试验证明所获单克隆抗体对TMVc有特异性。7A、9G和12C单克隆抗体对来自十字花科的烟草花叶病毒组病毒YMV₁和TMV-B₂无交叉反应, 而对其它成员病毒如ToMV, ToMV-N₁₄, TMV-L₂有不同程度的交叉反应。7A和9G表现较强的异源特异性而12C却有明显的同源性特异性。

关键词 烟草花叶病毒普通株; 单克隆抗体; 血清学鉴别

自Köhler和Milstein^[1] 1975年建立了体细胞杂交并产生单克隆抗体技术以来, 近年来已有20多种植物病毒的单克隆抗体问世。由于单克隆抗体具备特异性强、均一性高、可以大量制备等特点, 在植物病毒血清学诊断、株系分析鉴定、抗原分析和病毒纯化中都是非常有用的工具。

Gugerli和Fries^[2] 在1983年得到了马铃薯Y病毒(PYV)的单克隆抗体, 能识别属于三个株系的24个分离物的共同抗原决定簇, 为大规模田间诊断提供了可能性。至今尚未得到能识别烟草花叶病毒组(Tobamoviruse)共同抗原决定簇的单克隆抗体, 但已被用于研究该组成员之间的血清学鉴别^[3,4]。

本文报道了分泌抗烟草花叶病毒普通株(TMVc)单克隆抗体的杂交瘤细胞株的建立, 并利用其中5个单克隆抗体对6

株有血清学相关的烟草花叶病毒组成员的鉴别进行了讨论。

材料和方法

(一) 病毒和免疫

用烟草花叶病毒普通株TMVc免疫BALB/c小鼠。所用TMVc在普通烟(N. tabaccum)上繁殖, 参考Gooding等人^[5]的方法, 经两次PEG沉淀和差速离心获得纯品。

选用九周龄的BALB/c雌性小鼠, 腹腔注射100μg TMVc (以1:1体积与GIBCO

本文于1985年3月26日收到。

本实验SP2/0由中国药监所赠; CMV, PXV, TMV-L₂, TMV-B₂由农业部植检所赠; ToMV, ToMV-N₁₄由本室赠; 徐浩同志赠Giemsa染液; 本所技术室协助电泳观察和照相; 友谊医院杨键同志参加部分工作, 特此致谢。

的完全弗氏佐剂混合),两周后腹腔注射 100 μ g TMVc (以 1:1 体积与 GIBCO 的不完全佐剂混合),两周后分别从背部皮下和腹腔各注射 50 μ g TMVc (用 0.85% NaCl 稀释)。两周后用间接 ELISA 法测试抗血清的滴度。融合前三天尾静脉注射 100 μ g TMVc。

(二) 骨髓瘤细胞系和饲养细胞

SP2/0 细胞株在 RPMI₁₆₄₀ (日本) 培养液中生长。培养液含 15% 新生小牛血清 (天津生化制品厂出品)、2mM L-谷氨酰胺、1% Antibiotic-Antimycotic (GIBCO)。骨髓瘤和杂交瘤细胞均在 37℃、保湿、CO₂-保温箱中培养。

小鼠腹腔巨噬细胞和脾细胞均可作为饲养细胞。参考 EMBO SKMB 训练班杂交瘤技术^[6]的方法用无血清的 RPMI₁₆₄₀ 制备 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞,最后用 HAT 选择性培养液悬浮到 1 × 10⁵ Cells/ml, 然后加入 24 孔培养板 (LINBRO) 每孔 0.4ml 或 96 孔培养板 (LINBRO) 每孔 0.1ml, 置 37℃、保湿、CO₂-保温箱中培养备用。

脾细胞制备,取未免疫的正常 BALB/c 小鼠的脾,用无血清 RPMI₁₆₄₀ 做成悬浮液,经尼龙布过滤、低速离心,脾细胞用 HAT 选择性培养液悬浮到 1 × 10⁵ Cells/ml, 如同巨噬细胞分配到 24 孔或 96 孔培养板中。

(三) 细胞融合和杂交瘤培养

参考 Galfré 和 Milstein 的方法^[7],混合 1 × 10⁷ SP2/0 (处于对数生长期) 和 1 × 10⁸ 脾细胞 (均用无血清培养液洗过一次), 1300rpm 离心 8 min, 弃上清液, 松散细胞沉淀。在 1min 内加入 0.8ml 50% PEG₁₀₀₀ (Baker), 边滴加边轻轻地搅动细胞悬浮液。置 37℃ 水浴轻轻振荡离心管 1 min。接着在 7 min 内加完 7ml 无血清培

养液。1000rpm 离心 7 min。加 25ml 或 30ml HAT 选择性培养液 [培养液中含 10⁻⁴M 次黄嘌呤(H), 4 × 10⁻⁷M 氨基嘌呤(A), 1.6 × 10⁻⁵M 胸腺嘧啶核苷(T)] 轻轻地悬浮融合后的细胞, 加 0.5ml 细胞悬浮液到含有饲养细胞的 24 孔培养板的各孔中。此外, 设一对照孔仅加 SP2/0 和 HAT 选择性培养液, 以证明所用的 SP2/0 全部具有 HGPRT⁻ 的特性。每 7 天更换一次 HT 培养液。

(四) 分泌特异抗体杂交瘤的筛选

融合后 2 周或 3 周采用间接 ELISA 检测产生杂交瘤克隆各孔的上清液。将 2.5 μ g/ml TMVc 包被在 40 孔聚乙烯板 (上海塑料三厂出品) 上, 待检上清液用 PBST 作 1:2 或 1:3 稀释。按 Dynatech Laboratories^[8] 的一步戊二醛法用硷性磷酸酶 (Sigma) 标记兔抗鼠 IgG + IgM, 该酶结合物的工作稀释度为 1:2000, 底物用 p-硝基酚磷酸盐 (Sigma)。设小鼠抗 TMVc 血清为阳性对照, HT 培养液为阴性对照。显色后 1h (初筛时可显色 5h) 用 Dynatech micro ELISA minireader 在 405nm 直接读其吸收值。

(五) 克隆化

采用有限稀释法将阳性孔杂交瘤细胞直接克隆化或经传代后继续分泌特异抗体的杂交瘤克隆化。(均用饲养细胞)。

(六) 小鼠腹水的单克隆抗体制备

按 Galfré 和 Milstein 的方法^[7] 将 10⁶—10⁷ 个杂交瘤细胞腹腔注射至预先注射过 0.5ml pristane (Sigma) 的 12 周龄雌性 BALB/c 小鼠。过 10 天左右用 8 号针头取腹水, 2000rpm 离心 15min。中部清亮的腹水 (或加等体积甘油) 分装在小塑料管内, 保存在 -70℃。底部杂交瘤细胞可在液氮中冷冻保存, 或经无血清培养液洗涤后再注射到小鼠腹腔内, 继续产生腹水。

(七) 小鼠杂交瘤单克隆抗体 Ig 类型的鉴定

按 EMBO SKMB 训练班杂交瘤技术^[1]的免疫双扩散法和间接 ELISA 法测定单克隆抗体的 Ig 类型。在间接 ELISA 中用 1:2 的上清液和卫生部北京生物制品研究所生产的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。两个方法均用 Miles 公司的兔抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃ 和 IgM 血清作标准品。

(八) 杂交瘤细胞的染色体数测定

杂交瘤细胞经 0.075M KCl 处理后, 用冰醋酸-甲醇溶液固定, 在 0.075M pH 7.4 PBS 条件下用 Giemsa 染液染色, 显微镜下计数染色体数目。

(九) 单克隆抗体的免疫电泳

用 400μg/ml 的 TMVc 加等体积 1:8 稀释的血清 (或腹水) 单克隆抗体, 充分混匀后於 37℃ 水浴保温 30min, 参考 Kelen 等人^[10]的方法, 采用填有三层粗滤纸的 2mm 厚的 1% 琼脂糖胶板, 将样品浓集到喷炭的火棉胶铜网上 (400 目)。2% 磷钨酸染色后, 在日立 H-500 电子显微镜上观察病毒颗粒。

(十) 单克隆抗体中和侵染性试验

用 PBS 将纯化的 TMVc 稀释到 1mg/ml, 分别与等体积的 1:10、1:10²、1:10³、1:10⁴、1:10⁵ 腹水单克隆抗体混和, 37℃ 保温 1.5h, 4℃ 过夜, 次日 15000rpm 离心 30min, 取上清液 40μl 接种在心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 的半面叶上, 每个处理接种 5—6 个半叶。1mg/ml TMVc 加等体积 PBS 经同样处理作对照, 接种到心叶烟的另一半叶上。

结 果

(一) 分泌抗 TMVc 单克隆抗体的杂

交瘤细胞株的建立

按材料和方法中的免疫方法免疫 BALB/c 小鼠, 选抗 TMVc 小鼠血清滴度在 1:1×10⁴—1:1×10⁶ 之间的小鼠作融合实验, 共做两块 24 孔板。融合后第三天对照孔中的 SP2/0 全部死亡, 其他培养孔开始出现杂交瘤小克隆。融合后第十天 47 孔内均有肉眼可见的杂交瘤克隆。两周后用间接 ELISA 法检测各培养孔的上清液, 阳性孔共 16 个, 阳性率为 34%。阳性孔或传代后的阳性孔经 2—3 次有限稀释克隆化, 得到 10 个杂交瘤细胞系。经培养传代 5 月余分泌抗 TMVc 抗体的性能稳定, 其中 7A 杂交瘤在无血清培养液中分泌抗体略低于含血清的培养液。含单克隆抗体的培养液上清在 4℃ 放置两个月, 其抗体滴度不减低。

(二) 腹水制备

杂交瘤 7A、9G、11A、11H 和 12C 用来制备腹水。12C 在大多数情况下产生实体瘤, 形成腹水较少, 极个别的能得到 5ml 腹水。10B (11H 的亚克隆) 有时也诱发实体瘤。其他杂交瘤一般 1 个 BALB/c 小鼠能得到 3—10ml 腹水。用间接 ELISA 测定腹水抗体的滴度 (小鼠健血清作对照) 最高能达 1:1×10⁶—1:1×10⁷, 多数可达 1×10⁵—1×10⁶。腹水和实体瘤内的杂交瘤细胞可继续在 BALB/c 体内诱发具有高滴度抗体的腹水或实体瘤。

(三) 杂交瘤抗体 Ig 类型的鉴定

用免疫双扩散和间接 ELISA 两个方法得到相同的结果。图 1 是杂交瘤 9G 培养物浓缩上清液与标准的兔抗鼠 IgM 血清产生的一条细而明显的沉淀线 (A、B、C、D、E 分别为兔抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃ 和 IgM 血清; 中心孔为 9G 培养物浓缩上清液) 其他杂交瘤抗体结果与 9G 完全相同。所以我们得到的杂交瘤抗体均为

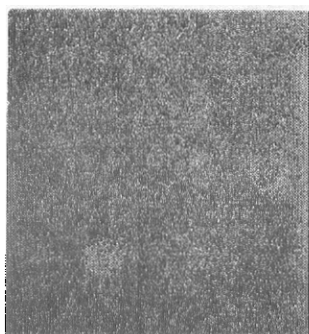


图 1 杂交瘤 9G 抗体和标准的兔抗鼠 IgM 血清的沉淀反应

Fig. 1 Precipitation reaction of hybridoma 9G and standard rabbit antiserum against mouse IgM

IgM。

(四) 杂交瘤细胞的染色体

图 2 是杂交瘤 12C 细胞的染色体, 平均含 107 个染色体。小鼠脾细胞一般含 40 个染色体, SP2/0 一般含 70 个左右的染色体。图 2 箭头所示指染色体是一个大型的



图 2 杂交瘤 12C 的染色体

Fig. 2 Chromosomes of hybridoma 12C

中间着丝点染色体。这与李德富等人^[10]报道的结果相同, 他们认为在 SP2/0 中未曾见到此种染色体。从染色体数及具有大型的中间着丝点染色体来看, 12C 细胞是脾细胞和 SP2/0 的杂交瘤细胞。

(五) 单克隆抗体的免疫电镜

图 3 是杂交瘤 7A 血清抗体与 TMVc 的免疫电镜照片。右下角是未经单克隆抗体

处理的 TMVc 颗粒, 颗粒周围仅复盖薄薄一层磷钨酸染料。而经单克隆抗体处理的 TMVc 颗粒周围却复盖着较宽的磷钨酸染料。这是由于 TMVc 与抗体特异性结合形成复合物, 所以用磷钨酸染色时, 相应着

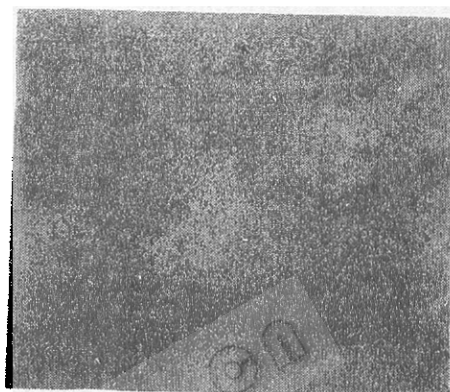


图 3 TMVc 病毒颗粒用杂交瘤 7A 抗体处理后的免疫电镜照片

Fig. 3 Immunoelectronmicroscopy of TMVc particles treated with hybridoma 7A antibody ($2 \times 48,000$)

色区加宽, 电镜下颗粒周围的阴影部分就显得较宽。7A 腹水抗体与 TMVc 的复合物在电镜下也能观察到同样结果。当用健血清作对照时, 电镜观察结果与用 PBS 处理相同。免疫电镜结果证明了这些杂交瘤单克隆抗体对 TMVc 具特异性。

(六) 单克隆抗体中和 TMVc 侵染性试验

为了消除由于植株的年龄、生理状况所引起的 TMVc 侵染心叶烟的枯斑反应差异, 每片叶子的右半叶作单克隆抗体中和 TMVc 侵染试验, 左半叶作 PBS 对照处理。三次实验结果基本一致。表 1 列出其中一次实验的结果。从表 1 可见腹水抗体稀释到 10^{-5} 时基本上不能中和 TMVc 侵染性。从而也证明了单克隆抗体对 TMVc 的特异性。

(七) 杂交瘤 9G、7A 和 12C 的单克隆抗体与烟草花叶病毒组一些成员的反应

表 1 9G腹水单克隆抗体中和TMVc侵染性试验
Table 1 Neutralization of TMVc infectivity by 9G ascitic fluid

腹水抗体稀释度 Dilution of ascitic fluid	2×10^{-1}	2×10^{-2}	2×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-5}
枯斑数(中和) No. of lesions(neutralization)	2	3	17	11	38
枯斑数(对照) No. of lesions (control)	32	31	36	25	50
中和百分数 Neutralization (%)	94	90	53	56	24

1. 当用间接ELISA法检测时, 杂交瘤9G、7A、12C、11A和11H单克隆抗体与黄瓜花叶病毒(CMV)、马铃薯X病毒(PXV)、大麦条纹花叶病毒(BSMV)的提纯制品均无交叉反应。

2. 实验用的TMV番茄株(ToMV)、TMV番茄株的亚硝酸突变株^[11](ToMV-N₁₄)、油菜花叶病毒15号(YMV₁₅)、TMV-L₂(从番茄上分离到的)和TMV-B₂(从大白菜上分离到的)^[12]这五个病毒用多克隆抗血清测试时与TMVc都有相关性。图4通过间接ELISA法比较单克隆抗体9G、7A、12C与这些病毒的结合反

应。三次重复实验表明这三个单克隆抗体与YMV₁₅、TMV-B₂均无结合反应(交叉反应), 甚至把YMV₁₅和TMV-B₂的浓度加大到20 μ g/ml、40 μ g/ml、80 μ g/ml时亦无反应, 与TMV-L₂的结合反应也不强。当与TMVc同源抗原的结合反应强度作比较时, 发现9G、7A与ToMV-N₁₄的反应最强, 超过与TMVc同源抗原反应; 而12C与ToMV、ToMV-N₁₄反应都很弱, 低于与TMVc同源抗原反应。7A与ToMV的反应比9G与其反应弱些, 9G与ToMV和TMVc结合反应基本接近。为更清楚表明以上结果列于表2。

表 2 用间接ELISA法比较三个单克隆抗体与TMVc和烟草花叶病毒组一些成员的结合反应

Table 2 Comparison of the binding ability of monoclonal antibodies to TMVc and related tobamoviruses by indirect ELISA

病毒 Viruses	ToMV-N ₁₄	ToMV	YMV ₁₅	TMV-B ₂	TMV-L ₂
单克隆抗体 McAb					
7A 1:1,000	+	-	0	0	-
9G 1:1,000	+	=	0	0	-
12C 1:3,000	-	-	0	0	-

- = 表示与TMVc反应基本相等 Equal binding to that observed with TMVc
 - 表示比与TMVc反应弱 Lower binding than that observed with TMVc
 + 表示比与TMVc反应强 Higher binding than that observed with TMVc
 0 表示无反应 No binding

杂交瘤11A和11H与TMVc和烟草花叶病毒组的这些成员反应强度基本类似7A。

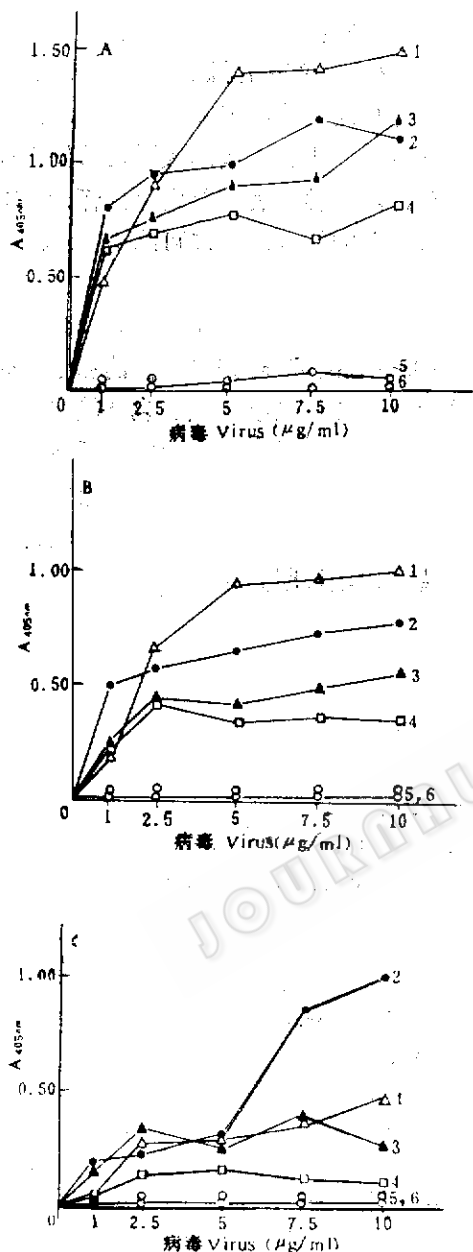


图4 通过间接ELISA法比较三个单克隆抗体与烟草花叶病毒组一些成员的结合反应

Fig. 4 Comparison of the binding ability of monoclonal antibodies to related tobamoviruses by indirect ELISA

- A. 9G 腹水抗体 9G ascitic fluid (1:1,000)
 B. 7A 腹水抗体 7A ascitic fluid (1:1,000)
 C. 12C 腹水抗体 12C ascitic fluid (1:3,000)
 1. ToMV-N₁₄ 2. TMVc 3. ToMV
 4. TMV-L₂ 5. TMV-B₂ 6. YMV₁₅

讨论

本试验所得五种对 TMVc 特异的单克隆抗体与来自十字花科作物的两个烟草花叶病毒组 (Tobamovirus) 成员 YMV₁₅ 和 TMV-B₂ 无交叉反应, 而与来自番茄的 ToMV、ToMV-N₁₄、TMV-L₂ 和来自普通烟的 TMVc 均有强弱不同的反应, 甚至与来自兰花或唐菖蒲的烟草花叶病毒组的一些成员也有与 TMVc 相等的反应 (本实验室未发表结果)。显然这几种单抗所识别的抗原决定簇很可能正是 TMV 某一亚组的外壳蛋白亚基最易与抗体反应的决定簇。与 YMV₁₅ 无交叉反应似非偶然, 因为用 TMVc 的多克隆抗血清做间接 ELISA 测定 YMV₁₅ 有明显的交叉反应 (待发表结果), 因此不可能是由于抗原包被在聚乙烯板失败而造成的; 再者用 cDNA 杂交方法测定已知 TMVc、ToMV 和 ToMV-N₁₄ 的 RNA 序列有较高的同源性, 似属于以 TMV-U₁ 为代表的亚组, 而 YMV₁₅-RNA 与它们的同源性很低, 与该亚组无关^[11]。本文利用单抗所测得的结果与 RNA 序列同源性的结果是一致的, 而利用多克隆抗血清则无法鉴别 TMVc 和 YMV₁₅。从 YMV₁₅ 外壳蛋白的氨基酸组成分析, 似乎也不难理解这种免疫学上的差别, 因其外壳蛋白中含有其他几株所没有的蛋氨酸和组氨酸, 从而很可能形成了完全不同的抗原决定簇。若欲得到能识别 YMV₁₅ 的单克隆抗体, 可能需要直接用该病毒免疫小鼠和筛选杂交瘤细胞。

图 4 结果清楚地表明对 TMVc 特异的单克隆抗体 7A 和 9G 与 ToMV-N₁₄ 的反应比与同源的 TMVc 还要强, 从 A 值判断, 最大区别几乎高出一倍。这种与非所用的免疫原有较高结合力的现象在植物病毒单

克隆抗体制备中已非罕见^[3,13], 本试验结果不过再次证明这种异源特异性(Heterospecificity)的存在。分子免疫学的研究已知抗体与抗原的最佳结合力并不一定发生在抗体与诱发该抗体的免疫原之间, 而恰是与其他抗原之间, 即所谓异源特异性。MHV VAN Regenmortel^[13]认为, 这种现象在单克隆抗体测定中更加清晰, 可能是由于在单抗测定中没有多克隆抗血清中其他抗体的遮蔽作用。从ToMV-N₁, 这个人工诱变株的外壳蛋白氨基酸组成看, 该诱变株比 ToMV 的酪氨酸、丝氨酸、谷氨酸和甘氨酸各少一个分子, 而丙氨酸、苯丙氨酸各多一个分子, 亮氨酸多两个分子, 很可能这些氨基酸组分的变化使ToMV-N₁, 的某一抗原决定簇与ToMV

比较在构象方面发生了较大的变化, 因此ToMV-N₁, 有异源特异性的表现而ToMV则没有。与7A、9G的异源特异性行为形成鲜明对比的是, 单抗12C无任何异源特异性, 与TMVc结合力远远大于与其他株系的结合力, 这种显著的差别令人怀疑12C单抗所识别的抗原决定簇可能与7A、9G所识别的是在不同位点上, 但这需要其他数据如免疫双扩散等, 才能最终判断。

7A、9G和12C对来自唐菖蒲和兰花的一些烟草花叶病毒组的成员也有较强的相当于与TMVc的反应, 因此单克隆抗体的标准化和可大量制备的特点很有希望去替代多克隆抗血清用于唐菖蒲等名贵花卉的茎尖脱毒快速诊断方面。

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. and C. Milstein, *Nature*, 265:495, 1975.
- [2] Gugerli, P. and P. Fries: *J. G. Virol.*, 64:2471-2477, 1983.
- [3] Briand, J. P. et al., *Journal of Virological Methods*, 5:293-300, 1982.
- [4] Dietzgen, R. G. and Evamarie Sander, *Archives of Virology*, 74:197-204, 1982.
- [5] Gooding, G. V., *Phytopathology*, 57:1258, 1967.
- [6] EMBO SKMB Course, Hybridoma Techniques, 1980.
- [7] Galfre, G. and C. Milstein, *Methods in Enzymology*, 73:3, 1981.
- [8] Dynatech Laboratories, The Enzyme Linked Immunosorbent Assay, p. 39.
- [9] Kelen, A. E. et al., *Can. J. Microbiol.*, 17:993, 1971.
- [10] 李德富等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(6):341-344, 1982.
- [11] Palukaitis, P. 等, 生物化学与生物物理学报, 14(3):217-223, 1982.
- [12] 濮祖序等: 植物病理学报, 13(1):57-64, 1983.
- [13] MHV VAN Regenmortel, *Microbiological Sciences*, 1:73-78, 1984.

MONOCLONAL ANTIBODIES OF TMVc AND ITS USE IN DIFFERENTIATION OF SOME MEMBERS OF TOBAMOVIRUS

Cai Wenqi Zhao Shuzhen Mang Keqiang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Ten hybridomas stably producing monoclonal antibodies against TMVc (common strain) have been derived from fusion the spleen cells of TMVc-immunized BALB/c mice with SP 2/0. Then were cloned by 2—3 times of limiting dilution. Hybridomas were of IgM class. Five of them were used to make ascitic fluid with high titer and their specificities for TMVc were determined by indirect ELISA, immunoelectronmicroscopy and neutralization assay. They were used for serological differentiation of six members of Tobamovirus group, not reacted at all with YMV₁₅ and TMV-B₂ two isolates from Crucifer, while ToMV, (Tomato mosaic virus), ToMV-N₁₄ (an artificial mutant, mild strain of ToMV) and TMV-L₂ (an isolate from tomato) give reaction with different intensities. The monoclonal antibodies from 7A or 9G show a quite strong heterospecificity while 12C a conspicuous homospecificity.

Key words

TMVc; monoclonal antibodies; serological differetiation