

分泌抗马铃薯 X 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

肖小文 郭 军 蔡少华

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京)

刘 佳 冯兰香

(中国农业科学院蔬菜研究所, 北京)

徐惠迪

(美国农业部贝尔茨维尔农业研究中心, 马里兰)

用马铃薯 X 病毒 (PVX) 免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞 (SP2/0) 融合, 经 3 次克隆化后, 筛选出 3 类分泌抗 PVX 株系特异性的单克隆抗体 (McAb) 杂交瘤细胞株, 该细胞株经传代 20 代以上, 并经液氮冻存一年以后仍表现稳定。3 个杂交瘤细胞株染色体数目集中在 92—102 条之间, 其免疫球蛋白亚类均为 IgG3, 用 ELISA 间接法测定细胞培养上清滴度为 1:320—1:640, 小鼠腹水抗体滴度为 1:102400—1:204800, 后者比兔抗血清滴度 (1:320) 高 300 倍以上。McAb 对抗原具有中和作用, 中和滴度为 $1:10^2$ 。经反复冻融、硫酸沉淀和冻干后, 抗体活性无明显变化。

关键词 马铃薯 X 病毒; 杂交瘤; 单克隆抗体

马铃薯 X 病毒是马铃薯上的一种重要病害, 广泛分布于全世界马铃薯种植地区, 是引起马铃薯退化的重要病毒之一。马铃薯感染该病毒后产量损失可达 15% 以上。研究和生产无病毒种薯, 选育抗病品种是防治马铃薯病毒病的重要措施, 但由于缺少快速、准确的诊断手段, 在不同程度上影响了上述工作的开展。本项研究建立的杂交瘤细胞株将使大规模生产 McAb 成为可能, 并将为有关研究和生产单位提供 PVX 及部分株系的 McAb 诊断试剂, 必将推动马铃薯病毒病研究及防治工作的开展。

材 料 和 方 法

(一) 抗原来源

供试抗原为从美国菌种收藏中心引进

的 2 个株系: 普通株系 (PV54) 和 轻斑驳株系 (PV197), 和从国际马铃薯中心引进的 3 个株系: HB 株系、GUA 株系、C 株系。

(二) 方法

1. 免疫: 参照文献 [1]。
2. 细胞融合: 参照文献 [2, 3]。
3. 细胞克隆化: 克隆化前一天在 96 孔培养板中制备饲养细胞, 在第一排 (A_1 — H_1) 的各孔中不加饲养细胞, 分别加一滴培养液。吸取 1 滴含有阳性杂交瘤细胞的培养液加入 A_1 孔中, 混匀后吸出一滴加入 B_1 孔中, 以此类推, 倍比稀释至 H_1 孔。静置后在显微镜下观察, 挑选含有 30—50 个细胞的培养孔, 吸出细胞

本文于 1988 年 6 月 30 日收到。

本研究为国家科委生物工程开发中心资助。

混悬于 10ml 培养液中, 分配于含有饲养细胞的培养孔中, 每孔 0.1ml, 克隆化 3 次以上。

4. 抗体检测: 采用 ELISA 间接法。

5. 腹水抗体制备: 参照文献〔4〕。

6. 细胞染色体计数: 取传代培养 24h 的杂交瘤细胞, 在培养瓶中加入秋水仙素, 使最终浓度为 0.1mg/ml, 37℃ 培养 5h 后, 收集细胞, 按人类染色体组型标本的制作方法制备染色体标本〔5〕。

7. Ig 类型和亚类的测定: 以琼脂双扩散法, 用 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。(美国 Litton Bionetics, Inc.) 检测经浓缩 20 倍的杂交瘤细胞培养上清中 McAb 的 Ig 类型和亚类〔1〕。

8. 中和试验: 取纯化的 PV54 用 PBS 稀释为 100μg/ml, 分别与 1:10⁰、1:10¹、1:10²、1:10³、1:10⁴、1:10⁵、1:10⁶、1:10⁷、1:10⁸ PBS 稀释的腹水 McAb 等量混合, 37℃ 温育 30min 后, 分别接种于 PVX 的局部病痕寄主千日红 (*Gomphrena globosa*) 上, 每处理 4 片叶。以同样条件下处理的稀释 10 倍的腹水 McAb 加等量的 PBS 为阴性对照, 以 100μg/ml 的 PV54 加等量的 PBS 为阳性对照, 置 20℃ 恒温室中培养, 10 天后观察记载发病情况。

9. 与其他病毒的交叉反应: 用 ELISA 间接法分别测定杂交瘤细胞株 1-4C6、1-1H5、2-2A7 与 PVY、AMV、TMV、TEV、TuMV、CMV 6 种植物病毒的交叉反应〔4〕。

10. 冻融对 McAb 的影响: 将腹水 McAb 在 -60℃ 下反复冻融, 分 1、2、4、8、16 次不同处理, 以未冻融的腹水 McAb 为对照, 用 ELISA 间接法测定各处

理的 McAb 滴度。

11. 硫酸沉淀对 McAb 的影响: 取腹水 McAb 分别作 1、2、3 次硫酸沉淀, 以未经硫酸沉淀的腹水 McAb 为对照, 用 ELISA 间接法测定各处理的 McAb 滴度〔6〕。

12. 冻干对 McAb 的影响: 将 1 次硫酸沉淀后的 McAb 冻干后, 加入 PBS 稀释至原体积, 以 1 次硫酸沉淀后未经冻干处理的 McAb 为对照, 用 ELISA 间接法测定其 McAb 滴度。

结 果

(一) 杂交瘤细胞株的产生、筛选及特异性鉴定

经两次细胞融合, 得到 40 多个阳性杂交瘤细胞孔, 其融合率为 90%, 阳性率为 7%。经株系特异性鉴定后, 初步筛选出 3 类分泌不同 McAb 的 7 个培养孔中的细胞分别进行克隆化, 即对供试株系均有反应的 1-4C6、1-5C1、1-4A9、1-2D8; 对 PV54 特异的 1-1H5; 对 PV197 特异的 2-2A7、1-4E6。经 3 次克隆化后, 筛选出 3 个阳性较强, 分泌抗体稳定的细胞系, 即 1-4C6、1-1H5、2-2A7, 见表 1。

表 1 McAbs 对 PVX 不同株系的反应
Table 1 Reactivities of McAbs against strains of PVX

McAb 代号 No. of McAb	PVX 株系 Strains of PVX				
	PV54	PV197	HB	C	GUA
1-4C6	+	+	+	+	+
1-5C1	+	+	+	+	+
1-4A9	+	+	+	+	+
1-2D8	+	+	+	+	+
1-1H5	+	-	-	-	-
1-4E6	-	+	-	-	-
2-2A7	-	+	-	-	-

(二) 杂交瘤细胞系的连续传代及冻存的稳定性

3个杂交瘤细胞系在克隆化3次以后,再传代培养20代以上,并经液氮多次冻存、复苏以及液氮冻存一年后仍表现稳定,细胞生长良好,抗体滴度没有下降。

(三) 杂交瘤细胞系的染色体分析

3个杂交瘤细胞系的染色体数目大多集中在92—102条之间,幅度范围为89—109,接近正态分布,见图1。而骨髓瘤细胞(SP2/0)染色体数目平均为72条,BABL/c小鼠脾细胞染色体数目平均为40条。



图 1 杂交瘤细胞染色体照片
Fig.1 Hybridoma chromosome

(四) 腹水和细胞培养上清 McAb 滴度

结果见表2,其滴度比多克隆兔抗血清(1:320)高300倍以上。

表 2 3类杂交瘤细胞系所分泌的McAb滴度
Table 2 Titres of McAbs secreted by three hybridoma cell lines

Hybridoma cell lines	抗体滴度 Titres of McAbs	
	腹水 Ascites fluid	杂交瘤细胞培养上清 Supernatant of hybridoma cultured
1-4C6	1:204800	1:640
1-1H5	1:102400	1:320
2-2A7	1:102400	1:320

(五) 中和试验

结果见表3,随着McAb浓度增加,干日红发病逐渐减轻,其中和滴度为1:10²。

(六) 交叉反应

杂交瘤细胞系1-4C6、1-1H5、2-2A7所产生的抗体与PVY、TMV、TEV、AMV、TuMV、CMV 6种病毒均不产生交叉反应。

(七) 反复冻融对McAb的影响

表 3 单克隆抗体对PVX的中和作用
Table 3 Neutralization test of McAb against PVX

McAb代号 No. of McAb	McAb 稀 释 度 Dilutiution of McAb										
	1:10 ⁰	1:10 ¹	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶	1:10 ⁷	1:10 ⁸	+CK*	-CK*
1-1H5	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	-

* +CK, Positive control; -CK: Negative control

腹水 McAb 经-60℃反复冻融后,其滴度几乎没有降低,证明冻融对腹水McAb活性几乎没有影响,见表4。

(八) 硫酸沉淀对McAb的影响

表5的结果表明,腹水McAb经硫酸沉淀后,其滴度几乎没有降低,3次硫酸沉淀之间也几乎没有差异,证明硫酸沉淀对McAb几乎没有影响。

表 4 冻融对McAb的影响 (1-1H5)
Table 4 Effect of freezing and thawing on McAb

冻融次数 Times of freezing and thawing	McAb 稀释度 Dilution of McAb											
	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400
1	1.547	0.872	1.298	1.203	1.105	0.729	0.562	0.652	0.448	0.325	0.249	0.153
2	1.534	1.233	1.545	1.451	1.261	1.031	0.713	0.641	0.522	0.274	0.283	0.207
4	1.519	1.415	1.499	1.309	1.264	0.987	0.784	0.441	0.465	0.415	0.429	0.214
8	1.631	1.379	1.332	1.382	1.028	0.777	0.497	0.392	0.401	0.344	0.401	0.214
16	1.514	1.527	1.528	1.158	0.997	0.620	0.429	0.314	0.256	0.308	0.259	0.207
CK	1.590	1.530	1.484	1.316	1.187	0.979	0.781	0.650	0.547	0.381	0.249	0.210

表 5 硫酸沉淀对McAb的影响 (1-1H5)
Table 5 Effect of precipitation by ammonium sulphate on McAb

沉淀次数 Times of precipitation	McAb 稀释度 Dilution of McAb											
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480
1	2.000	1.817	1.714	1.701	1.561	1.321	0.832	0.710	0.630	0.533	0.456	0.390
2	2.000	1.969	1.725	1.711	1.499	1.210	0.801	0.720	0.642	0.540	0.443	0.411
3	2.000	1.861	1.846	1.780	1.509	0.802	0.801	0.772	0.654	0.530	0.511	0.453
CK	1.999	1.817	1.706	1.697	1.516	1.101	0.842	0.720	0.582	0.652	0.446	0.374

表 6 冻干对McAb的影响 (1-1H5)
Table 6 Effect of freeze drying on McAb

冻干 Freeze drying	McAb 稀释度 Dilution of McAb											
	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400
Freeze drying	1.909	1.092	0.827	0.567	0.493	0.438	0.382	0.348	0.292	0.438	0.413	0.302
CK	1.691	0.965	0.693	0.536	0.435	0.488	0.425	0.494	0.395	0.355	0.479	0.395

(九) 冻干对McAb的影响

结果表明冻干对 McAb几乎没有影响
见表 6。

讨 论

Torrales 等 (1986)^[7]建立了分泌抗 PVX 的 McAb 大鼠杂交瘤细胞系, 其一 (MA58) 所分泌的 McAb 同供试的 PVX 的 33 个分离物均产生反应。其二 (MAC

67) 只同上述的 2 个分离物产生反应。但如同另一个杂交瘤细胞系 (MAC95) 一起可用于鉴别诊断 PVX-HB 株系。Koenig 等^[8]应用上述 McAb 对 PVX 的 HB 株系进行了抗原决定基分析。

我们所建立的 3 类杂交瘤细胞系, 其中分别对 PVX 的普通株系和轻斑驳株系具有特异性反应的 2 类杂交瘤细胞系可用于株系调查及抗病品种选育, 而对供试的 PVX 株系均有反应的杂交瘤细胞系在马

铃薯茎尖培养脱毒, 无病毒种薯生产及抗病品种选育中都有着十分重要而广阔的应用前景。此项研究尚在继续进行。

我们所用的细胞克隆方法简便易行、准确可靠。

随着我国农业生产的发展, 南方及北方低海拔地区对无病毒马铃薯种薯的需求量越来越大。因而种薯生产单位对马铃薯

病毒 McAb 的需求也越来越迫切。河北、内蒙等省、区的有关单位曾多次要求我们提供 McAb 诊断试剂, 内蒙呼盟种子分公司曾以每套诊断盒 500 美元的价格从丹麦进口 McAb 诊断盒 (可检测 5000 份样品), 看来小批量生产 McAb 已成为我们面临的一项重要任务。

参 考 文 献

- [1] Schreier, M. et al., *Hybridoma Techniques*, EMEQ SKMB Course, Basel, pp.7-36, 1980.
 [2] Galfré, G. et al., *Nature*, 266:550-552, 1977.
 [3] Nowinski, R.C., *Virology*, 93: 111-126, 1979.
 [4] 姚康生等; 中国农业科学, 4: 67-72, 1985
 [5] 河北师大等; 遗传学实验, 人民出版社, pp.9-10, 1982.
 [6] 王世中等; 中华微生物学和免疫学杂志, 5: 125-126, 1985
 [7] Torrala, L. et al., *Journal of General Virology*, 67: 57-67, 1986.
 [8] Koenning, R. et al., *Journal of General Virology*, 67 (10): 2145-2151, 1986.

SOME PROPERTIES OF POTATO VIRUS X SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES AND THE HYBRIDOMA CELL LINES

Xiao Xiaowen Gou Jun Cai Shaohua¹ Lui Jia Feng Lanxiang² Hsu Hei-ti³
 (Biotechnology Research Center¹, Vegetable Institute², Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing; USDA-ARS, Plant Sciences Institute, Florist and Nursery Crops Laboratory, Beltsville, Maryland 20705, USA³.)

Seven hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (McAbs) against potato virus X (PVX) were established by fusing mouse myeloma cells (SP2/0) with splenocytes of BALB/c mice immunized with purified PVX.

One of the seven hybridoma cell lines secreting McAbs reacted specifically to a common strain of PVX, two reacted to a mild strain and the remaining four reacted to all of the five strains tested. Three hybridoma cell lines, namely 1-1H5, 2-2A7, and 1-4C6 secrete IgG3 immunoglobulins. The McAb titers of ascitic fluids were about 300 times of that of rabbit antisera measured by indirect ELISA. The McAbs had a $1:10^2$ neutralization titer. The reactivities of McAbs were not affected significantly by freeze drying, repeatedly freezing-thawing, or precipitating with ammonium sulphate.

Key words

Potato virus X; hybridoma; monoclonal antibodies