

蚕豆萎蔫病毒单克隆抗体制备及检测应用*

青 玲** 吴建祥 戚益军 周雪平 李德葆

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘 要:用蚕豆萎蔫病毒(BBWV)免疫的 BAL B/C 鼠脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合,经筛选克隆,获得 6 株能稳定传代并分泌抗 BBWV 单克隆抗体(MAb)的杂交瘤细胞株,单抗腹水 ELISA 滴度为 1:320 000~1:640 000,各单抗抗体类型均为 IgG1。6 株单抗与 BBWV 不同分离物均有反应,而与其它植物病毒无交叉反应。经 Western-blot 印迹分析表明,此 6 株单克隆抗体均是针对 BBWV 44.7kD 的外壳蛋白大亚基的特异性抗体。这是国内外首次报道获得 BBWV 单克隆抗体。

关键词:蚕豆萎蔫病毒,单克隆抗体,检测

中图分类号:S432.4 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2000)02-0166-73

蚕豆萎蔫病毒(BBWV)为世界性流行病毒^[1],其寄主范围极广,据 Edwardson 等(1986)统计,它可侵染分属于 44 科 186 属的 328 种植物^[2]。BBWV 可通过蚜虫非持久性方式及汁液摩擦接种传播,它是豇豆花叶病毒科(Comoviridae)蚕豆病毒属(Fabavirus)的典型种^[3]。BBWV 病毒粒子球形,其外壳蛋白由两种亚基组成,分子量分别为 44.7kD 和 21.9kD,病毒基因组由两条单链 RNA 分子组成^[4]。

我国自奚仲兴等^[5]首次报道豇豆上受 BBWV 侵染以来,已经在辣椒、青菜、芹菜、菠菜、苍耳、太子参以及蚕豆、豌豆、大豆等多种豆科植物上发现有该病毒侵染,且 BBWV 在这些植物上发病率较高,严重时发病率可高达 80%^[6]。BBWV 侵染后往往引起花叶、矮化、萎蔫直至枯死等严重症状,影响作物生长,从而导致产量和品质的下降,造成较大的经济损失。由于 BBWV 在我国各地均有分布,且发病较严重,因而迫切需要建立有效检测方法,帮助我们了解 BBWV 的发生动态,为病毒的诊断、鉴定、育种和防治提供依据。至今国内外尚无 BBWV 单克隆抗体制备的报道,为此我们研制了 BBWV 的单克隆抗体,建立了三抗体夹心 ELISA(TAS-ELISA)检测 BBWV 的方法。

1 材料和方法

1.1 抗原

BBWV 蚕豆分离物和大豆分离物由本所分离鉴定^[7],BBWV 芹菜分离物和辣椒分离物由南京农业大学植保系濮祖芹教授惠赠,烟草花叶病毒(TMV)、黄瓜花叶病毒

* 国家自然科学基金(39770035)及浙江省人才基金资助项目

**西南农业大学植保系 重庆 630716

作者简介:青玲(1972-),女,四川人,西南农业大学讲师,硕士,1996~1998 年为浙江大学生物技术研究所进修生,主要从事植物病毒病害研究

收稿日期:1998-06-16,修回日期:1999-10-05

(CMV)、番茄花叶病毒(ToMV)、柑桔碎叶病毒(CTLV)和长叶车前草花叶病毒(RiMV)等也由本所分离鉴定。

1.2 抗血清

BBWV 多抗血清由本所制备,其琼脂双扩散效价为 1:64^[7]。羊抗鼠酶标记抗体为上海华美生物工程公司产品。

1.3 病毒纯化

将 BBWV 蚕豆分离物接种昆诺藜,待系统感病显症后采收病叶,按周雪平等建立的方法进行病毒提纯^[4]。

1.4 脾细胞免疫

将纯化的 BBWV(30~40 μ g)病毒粒子乳化在与抗原同体积的福氏完全佐剂中,对 8 周龄的 BAL B/C 雌鼠作腹腔注射,3~4 周后,将同样剂量抗原乳化在福氏不完全佐剂中,作第二次腹腔注射,2~3 周后用 60~80 μ g 提纯病毒作最后一次腹腔免疫,三天后取小鼠脾脏用于细胞融合。

1.5 融合方法

将脾细胞与鼠骨髓瘤细胞按 5~10:1 的比例混合于锥型塑料离心管中,加入 30mL 无血清基础培养液,1500r/min 离心 5min 后弃上清,将试管放入 37℃ 水浴。用吸管吸取 0.5mL 50% PEG 插入试管底部,在 1min 内滴完,同时轻轻搅动底部沉淀,然后静置 1min,再沿管壁四周轻轻加入无血清培养液,前 30s 内加 1mL,后 30s 内加 3mL,然后再加入 26mL 无血清培养液,1500r/min 离心 5min。弃去上清,用适量 HAT 培养基悬浮沉淀,将悬液移入细胞培养瓶内,最后再分装入预先培养有滋养细胞的 96 孔培养板,然后在 5% CO₂ 37℃ 细胞培养箱中培养。

1.6 杂交瘤细胞筛选、克隆

1.6.1 杂交瘤筛选:融合细胞先用 HAT 培养液筛选培养,然后换成 HT 培养液继续培养,待杂交瘤细胞长到每孔 300 个细胞以上时,取培养上清用间接 ELISA 方法筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原为纯化的 BBWV 病毒(10 μ g/mL)。每次筛选均设二次重复。

1.6.2 杂交瘤细胞的克隆:选择强阳性反应的杂交瘤细胞,用有限稀释法进行克隆培养,经过 3 次以上的有限稀释法克隆,最后一次克隆后检测为阳性的孔所得细胞株即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。经扩大培养后,用含 7% 二甲亚砜的完全培养液悬浮,分装安瓶瓶,液氮保存。

1.7 腹水抗体制备及纯化

1.7.1 腹水抗体制备:1500r/min 离心收集对数生长期的杂交瘤细胞,悬浮于生理盐水中,加适量青霉素和链霉素,悬浮细胞浓度为 10⁶/mL。取 8 周龄健康 BAL B/C 雌性小鼠,腹腔注射 0.2~0.5 mL 降植烷,7d 后在腹腔内注射 0.5mL 杂交瘤细胞悬液。注射后 7~10d 可见小鼠腹部明显膨大,用大号针头刺入鼠腹部,收集腹水,1500r/min 离心 10min,收集上清液即为腹水单克隆抗体,加入 0.01% 叠氮钠(NaN₃),分装小瓶,-20℃ 冻存待用,用间接 ELISA 法测定腹水效价。

1.7.2 腹水抗体的纯化:采用饱和硫酸铵盐析法粗提^[8]。2mL BBWV 腹水抗体用饱和硫酸铵沉淀后,将所得沉淀用 PBS 溶解,然后将溶液加到 SephadexG-200 层析柱,再用

0.01mol/L PBS 缓冲液洗脱单抗 IgG, 即得纯化的腹水抗体。将纯化的腹水抗体稀释后用 Shimadzu UV-2201 紫外分光光度计测定 200nm~300nm 的紫外吸收值, 并用 lowry-kalokar 计算 IgG 含量。

1.8 抗体类型及亚类鉴定

采用美国 Sigma 公司的羊抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM 标准抗血清, 用免疫双扩散法检测单抗类型。

1.9 TAS-ELISA 检测系统的建立

1.9.1 TAS-ELISA 方法操作步骤: 用适量 BBWV 的兔抗 IgG 包被微量反应板, 然后用小牛血清进行封闭, 再加待测抗原, 反应后加适当浓度的单抗, 最后加适当浓度的酶标抗体, 经邻苯二胺— H_2O_2 底物反应显色后加 2mol/L H_2SO_4 终止反应, 然后在 550 型酶联免疫检测仪上测各孔在 492nm 的 OD 值。以 $P/N > 2.1$ 作为阳性判断标准。每个样品设三个重复。

1.9.2 TAS-ELISA 最适条件的确定: 用 pH7.5 的磷酸缓冲液将单抗 IgG 从 1:5 000 至 1:640 000 倍比稀释, 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液, 将兔抗 IgG 从 23.7 μ g/mL 至 0.023 μ g/mL 进行倍比稀释, 使用 1:30(W/V) 的昆诺藜病叶粗汁液作为抗原, 酶标记抗体稀释倍数为 3 000, 以此条件进行 TAS-ELISA 方阵试验, 同时以健康昆诺藜叶片粗汁液 1:30(W/V) 作为阴性对照。

1.9.3 TAS-ELISA 方法检测灵敏度测定: 昆诺藜病叶汁液从 1:5 至 1:5120 作倍比稀释, 分别以相应稀释度的健叶汁液作阴性对照。提纯的 BBWV 病毒(10mg/mL) 从 1:1 000 至 1:1024 000 作倍比稀释, 并以相应稀释度的健叶提纯液作阴性对照。兔抗 IgG 和鼠单抗 IgG 分别用 1.92 步骤中测得的最适工作浓度, 酶标记抗体稀释倍数为 3 000。

1.10 单抗对 BBWV 不同分离物及不同植物病毒的特异性检测反应

取 BBWV 的蚕豆、辣椒、芹菜及大豆分离物, 以及 TMV、ToMV、CMV、CTLV 及 RiMV, 用 TAS-ELISA 间接法, 分别测定与六株单抗的反应。

1.11 Western-blot 分析

参照周雪平等方法^[4]用提纯病毒(10mg/mL) 进行外壳蛋白亚基的 SDS 凝胶电泳, 电泳后将各孔道电泳胶切割, 一条孔胶用考马氏亮兰染色观察, 另外几条孔胶先进行电转移, 然后将电转移所得硝酸纤维素滤膜分别与不同的单抗细胞株进行 Western-blot 印迹分析。Western-blot 分析方法详见《分子克隆实验指南》^[9]。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞的筛选、克隆

免疫的 BAL B/C 小鼠脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合后, 经 HAT 培养液选择性培养, 第三天开始出现融合细胞, 376 个培养孔中有 371 个孔内有杂交瘤细胞生长, 融合率为 98.6%。融合 10d 后, 当每孔杂交瘤细胞长到 300 个以上时, 采用间接 ELISA 方法检测 371 个杂交瘤细胞生长孔培养上清, 有 325 个孔表现阳性反应, 阳性率为 87.6%, 选择 10 个具较强阳性反应的杂交瘤细胞系, 经过三次有限稀释法克隆, 共获得 4D11、3G12、2D2 等 6 株单克隆抗体杂交瘤细胞株。在三个月内经 40 次继代培养, 细胞生长良

好,并继续稳定分泌抗体。

2.2 腹水抗体制备、效价测定及抗体亚类鉴定

经腹腔注射降植烷,再注射单克隆杂交瘤细胞,10d 后采集 BAL B/C 鼠腹水,各杂交瘤细胞株各获得 3~4mL 腹水。腹水由饱和硫酸铵沉淀并经过 Sephadex G-200 柱层析后测得 IgG 含量为 1.38~22.685mg/mL(表 1)。采用纯化的 BBWV 抗原用间接 ELISA 法测得各细胞株腹水效价均在 1:256 000 以上(表 1)。将单抗腹水作适当稀释后,与美国 Sigma 公司生产的羊抗鼠 IgG 各亚类、IgA 和 IgM 抗体进行琼脂双扩散反应,结果表明,各单克隆抗体细胞株的抗体类型均为 IgG1(表 1,图 1)。

表 1 蚕豆萎蔫病毒单克隆抗体的特性

Table 1 Properties of monoclonal antibodies to BBWV

Monoclonal antibodies	Isotype	Titre of ascitic fluids	Yield of IgG from ascitic fluid /(mg/mL)
4D11	IgG1	1:640 000	9.56
3G12	IgG1	1:64 0000	2.69
2D2	IgG1	1:64 0000	22.685
2C7	IgG1	1:256 000	2.26
1G1	IgG1	1:320 000	2.98
4E1	IgG1	1:640 000	1.38

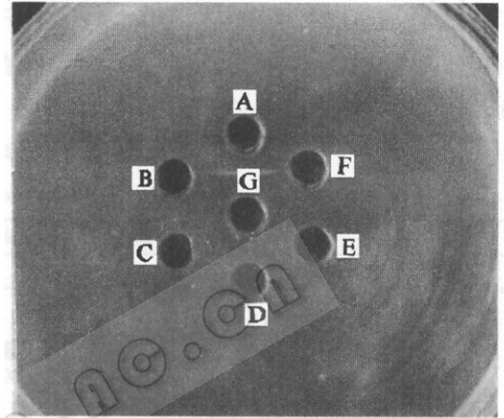


图 1 BBWV 单克隆抗体亚类鉴定

Fig.1 Identification of MAbs isotype

A. IgG1; B. IgG2a; C. IgG2b; D. IgG3; E. IgA; F. IgM; G. MAb 4D11.

2.3 TAS-ELISA 检测系统的建立

2.3.1 TAS-ELISA 最适条件确定:

作包被的 BBWV 兔抗 IgG 及检测用的鼠单抗 IgG 作倍比稀释后进行 TAS-ELISA 的测定,结果见图 2、图 3。兔抗 IgG 在 1:1 000~1:64 000 稀释范围内均可用于检测,以 1:1 000~16 000 稀释度效果为好;单抗 IgG 在 1.5 000~1:160 000 范围内均可用于检测,而健株对照在此范围内的 OD 值明显低于病株,P/N 值均大于 9。但考虑到实际应用时要求有较高检测灵敏度和尽可能减少非特异性反应,我们选择兔抗 IgG 稀释度为 1:5 000 和单抗 IgG 稀释倍数为 1:5 000 作为 TAS-ELISA 的最适工作条件。

2.3.2 TAS-ELISA 检测灵敏度测

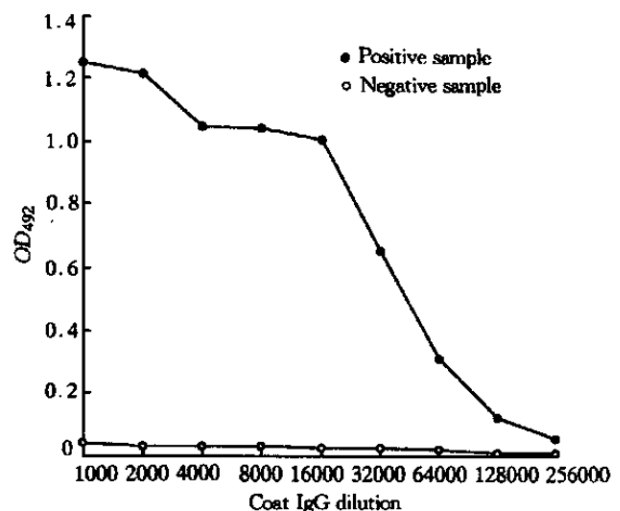


图 2 包被 IgG 浓度对病毒检测的影响

Fig.2 The effect of coating IgG concentration on virus detection

定:昆诺藜病汁液作 1:5(W/V)开始的倍比稀释后进行 TAS-ELISA 测定,结果见图 4。从图中可见从 1:5~1:640 都是较理想的稀释度。

将 BBWV 提纯病毒从 1:1 000 开始作倍比稀释进行 TAS-ELISA 检测,被检出的最大稀释度约为 $1:3 \times 10^4$ (图 5),此时病毒浓度约为 $0.312 \mu\text{g/mL}$,由于使用了 $100 \mu\text{L}$ 病毒稀释液,因此能被检出的病毒绝对量约为 31.2ng。说明建立的 TAS-ELISA 系统是灵敏、可靠的。

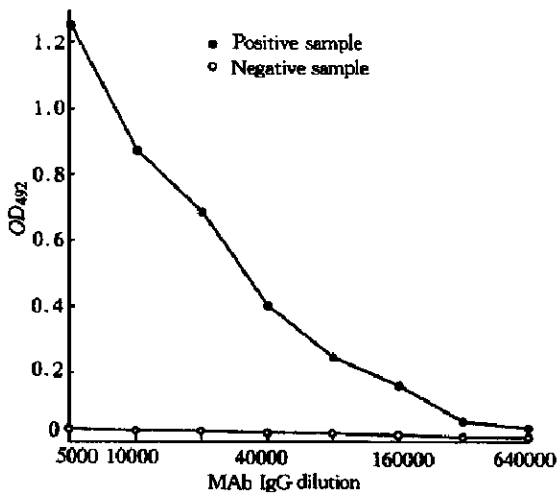


图 3 单抗 IgG 浓度对病毒检测的影响
Fig.3 The effect of MAb IgG concentratoin on virus detection

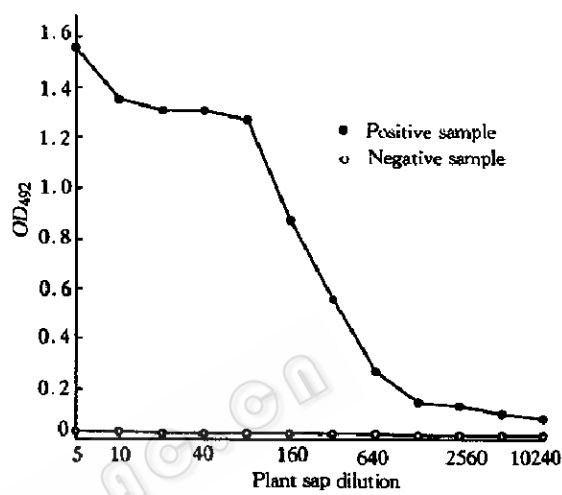


图 4 TAS-ELISA 对 BBWV 病汁液的检测
Fig.4 The detection of BBWV in plant sap by TAS-ELISA

2.4 单克隆抗体对 BBWV 不同分离物的特异性检测

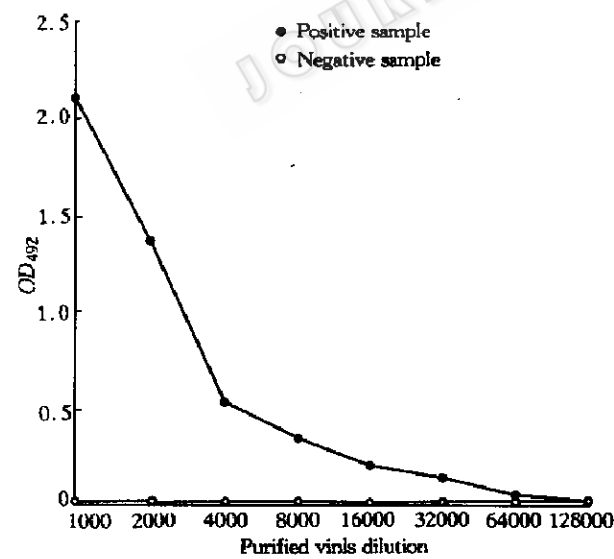


图 5 TAS-ELISA 对 BBWV 提纯病毒的检测
Fig.5 The detection of purified BBWV by TAS-ELISA

将 BBWV 蚕豆、辣椒、芹菜和大豆分离物分别与 6 株单抗进行 TAS-ELISA 测定。结果表明 6 株单抗均可用于检测四种 BBWV 分离物,但不同单抗对同一分离物的反应强度有明显差异,而同一株单抗对不同分离物的反应差异不明显(表 2)。在对 BBWV 四种分离物的反应中,4D11 和 3G12 对蚕豆分离物表现较强的阳性,2C7 对辣椒分离物表现较强的阳性,而 2D2、1G1 及 4E1 则对大豆分离物的反应表现出相对较强的阳性。除 2C7 对芹菜分离物的阳性反应表现最弱小,其余 5 株单抗均对辣椒分离物表现相对较弱的阳性。在比较 6 株单抗对同一种分离物的反应时可以发现,4D11 对任何一种分离物的反应均表现最强,3G12

次之,而 2C7 则对 4 种分离物均表现最弱的阳性。

表 2 单抗对 BBWV 不同分离物的特异性测定

Table 2 Reaction of MAbs with different isolates of BBWV tested by TAS-ELISA	
Different isolates of BBWV	Monoclonal antibodies
	4D11 3G12 2D2 1G1 4E1 2C7 Control
<i>Vicia faba</i>	1.229* 1.087 0.282 0.310 0.403 0.199 0.029
<i>Capsicum frutescens</i>	1.097 0.884 0.240 0.239 0.310 0.228 0.027
<i>Apium graveolens</i>	1.107 0.923 0.397 0.339 0.404 0.147 0.029
<i>Glycine max</i>	1.106 0.945 0.418 0.355 0.459 0.168 0.025

* 492nm value

2.5 单克隆抗体对不同植物病毒的特异性测定

用 5 种不同的植物病毒分别与 6 株单抗进行 TAS-ELISA 检测,以纯化 BBWV 作阳性对照。结果表明 6 株单抗只与 BBWV 有很强的阳性反应,而与其它 5 种植物病毒均无反应(表 3)。

表 3 单克隆抗体的特异性鉴定

Table 3 Specificities of MAbs tested by TAS-ELISA	
Virus	Monoclonal Antibodies
	4D11 3G12 2D2 2C7 1G1 4E1 Control
BBWV	1.284* 1.135 0.638 0.384 0.880 0.924 0.021
TMV	0.028 0.028 0.029 0.032 0.031 0.031 0.026
ToMV	0.031 0.031 0.024 0.030 0.029 0.028 0.026
CTLV	0.030 0.034 0.031 0.033 0.030 0.032 0.029
RiMV	0.037 0.037 0.030 0.031 0.035 0.036 0.030
CMV	0.039 0.031 0.033 0.039 0.037 0.038 0.031

* 492nm value

2.6 Western-blot 分析

将 BBWV 提纯病毒进行 SDS 凝胶电泳,考马氏亮兰染色后可见大小蛋白亚基两个条带,分子量分别为 44.7kD 和 21.9kD,经 West-ern-blot 分析,结果表明 6 种单克隆抗体均是针对 BBWV 44.7kD 的外壳蛋白大亚基的特异性抗体(图 6)。

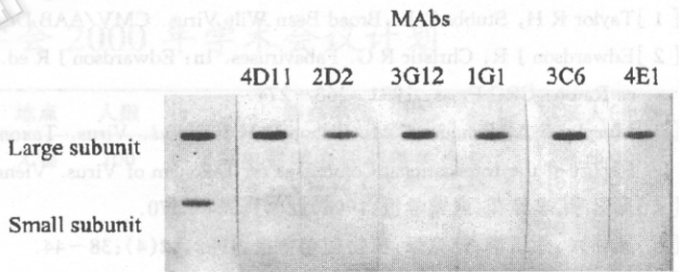


图 6 病毒亚基的 Western-blot 检测

Fig. 6 Western-blot of the virus coat protein subunit with MAbs

3 讨论

利用分离鉴定的 BBWV 蚕豆株系提纯病毒粒子,作为抗原免疫 BAL B/C 小鼠,获得 6 株分泌 BBWV 特异性抗体的 MAb 杂交瘤细胞株。经过体外 40 次传代培养,以及多次经液氮冻存与复苏培养,结果表明,这些细胞株分泌抗体的性能非常稳定。以浓度为 1μg/mL 的提纯病毒包板,经间接 ELISA 方法测定,6 株杂交瘤细胞培养物诱导 BAL B/C 小鼠所得腹水的效价均在 1:256 000 以上,最高达 1:640 000。六种单克隆抗体类型均属于 IgG1,且均为针对 BBWV 44.7kD 外壳蛋白大亚基的特异抗体。六种单克隆抗体检测特异性强,不能与 TMV、ToMV、CMV、CTLV 及 RiMV 等 5 种其它植物病毒进行反应,

但均可用于 BBMV 四种分离物的检测。

TAS-ELISA 检测表明,同一种单抗对不同 BBWV 分离物的反应差异不明显,不同的单抗对不同的分离物的反应则有差异。各株单抗对不同分离物的这种反应差异表明不同 BBWV 分离物病毒粒子表面的抗原决定簇可能有差异,因此这些单抗可望用于 BBWV 种下的鉴定,在这方面有待今后作进一步的研究。

周雪平等^[6]曾用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶标记 BBWV 的多抗 IgG,并建立了快速灵敏的 DAS-ELISA 检测方法。本研究在已建立的 DAS-ELISA 检测方法的基础上,运用我们研制的单克隆抗体,建立了 TAS-ELISA 检测方法。TAS-ELISA 血清用量少,检测特异性高,而且检测的灵敏度也大大提高。此方法对研究 BBWV 在田间作物上的发生分布将会起推动作用。

Uyemota 等根据琼脂双扩散试验中产生的沉淀线类型,曾将 7 个来源不同的 BBWV 分离物归为两个血清型,即血清型 I 和血清型 II^[11]。从已有的报道来看,我国广为发生的 BBWV 均属血清型 II,而血清型 I 则尚未见报道^[10,12],而大多欧洲国家报道的 BBWV 多属血清型 I。分析 BBWV 血清型 I 和 II 在寄主植物上的症状,发现很难用某些寄主植物上的症状来划分血清型 I 和 II,而其它生物学性状也无法用于区分血清型^[10]。特异性单抗对于研究病毒血清学关系具有十分重要的作用。如果 BBWV 不同株系或血清型共有的或不同的抗原决定簇能够被我们研制的单抗所识别的话,可望为 BBWV 的株系及血清型划分提供新的依据,这些工作我们近期将陆续开展。

参 考 文 献

- [1] Taylor R H, Stubbs L L. Broad Bean Wilt Virus. CMV/AAB Description of Plant Viruses No. 81.
- [2] Edwardson J R, Christie R G. Fabaviruses. In: Edwardson J R ed. CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes. Boca Raton: CRC Press, 1991. 263~274.
- [3] Murphy F A, Fanquet C M, Bishop D H L, *et al.* Virus. Taxonomy-classification and Nomenclature of Viruses Six Report of the International Committee on Taxonem of Virus. Vienna: Springer-Verlag Press, 1995. 341~347.
- [4] 周雪平,李德葆.病毒学报,1996,12(4):364~370.
- [5] 莫仲兴,徐绍华,莽克强.植物病理学报,1982,12(4):38~44.
- [6] 周雪平,余永杰,戚益军,等.植物病理学报,1996,26(4):347~352.
- [7] 周雪平,钱秀红,张龙存,等.浙江大学学报(自然科学版),1994,28(增):271~277.
- [8] 于 涟.免疫学实验技术.杭州:浙江大学出版社,1991.11~15.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著(金冬雁,黎孟枫等译).分子克隆实验指南.北京:科学出版社出版,1992. 880~898.
- [10] 周雪平,余永杰,刘 勇,等.浙江农业大学学报,1995,21(3):221~226.
- [11] Uyemoto J K, Provvidenti R. *Phytopathology*, 1974, 64(12):1547.
- [12] Xu Z G, Cockbain A J, Woods R D, *et al.* *Ann Appl Biol*, 1988. 113(2):287~296.

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TOBROAD BEAN
WILT VIRUS AND APPLICATION IN VIRUS DETECTION *

Qing Ling Wu Jianxiang Qi Yijun Zhou Xueping Li Debao
(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: Six hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies(MAbs) against broad bean wilt virus(BBWV) were produced by fusing mouse myeloma cells(SP 2/0) with spleen cells from BAL B/c immunized by the BBWV particles. The hybridoma cell lines secreted MAbs stably after cultured *in vitro* for 3 months or stored in liquid nitrogen and then revived for several times. The titres of ascitic fluids of six MAbs ranged from 1:256000 to 1:640000 when measured by indirect ELISA. In agarose gel immunodiffusion test, it showed that the six MAbs represented the same isotype of murine antibodies, IgG1. Six MAbs could detect 4 tested BBWV isolates, but didn't crossreact with other 5 plant viruses. The result of Western blot showed that all the six MAbs can react with the 44.7kD large coat protein subunit of BBWV. This is the first report of production of MAbs against BBWV.

Key words: Borad bean wilt virus, Monoclonal antibodies, Detection

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39770035)

中国微生物学会 2000 年学术会议计划

会议名称	时间	地点	人数	筹办单位	联系人(电话)
第三届全国青年微生物学工作者学术会议	5 月	无锡	100	中国微生物学会基础微生物专业委员会、无锡轻工大学、江苏省微生物研究所	李华中 0510-5876906 陈 坚 0510-5888301
中国微生物学会“迎接 21 世纪微生物学研讨会”	7.24~28	烟台	300	中国微生物学会*	薛春华 010-62554677
第三届全国酶工程学术讨论会	7 月~8 月	成都	120	中国微生物学会酶工程专业委员会	黎高翔 010-62550183
第七届中日微生物学学术讨论会	8 月	上海	100	中国微生物学会	薛春华 010-62554677 戚中田 010-25070265
全国第三届分析生物学暨第八届分析微生物学学术讨论会	8 月下旬	兰州	150	分析微生物学专业委员会	周 方 010-66948605 杨瑞馥 010-66968562
中美国际微生物学学术研讨会	10 上旬	北京	50	中国微生物学会	薛春华 010-62554677
第六届中日双边酶工程学术讨论会	10.15~18 日	日本京都	100	日本酶工程学会和中国微生物学会酶工程专业委员会共同主办	黎高翔 010-62550183 010-62554677