

稻瘟病菌单克隆抗体的研制及其对稻瘟病菌 附着胞形成的影响 *

吴建祥 林福呈 李德葆 陈正贤 娄沂春

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘 要 稻瘟病菌的分生孢子、芽管、附着胞的混合物作为抗原免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50% PEG 下融合成杂交瘤细胞,用间接 ELISA 筛选阳性孔,获 11 株单克隆抗体。间接免疫荧光试验表明其中 4 株单克隆抗体 2B₄、4A₁、1D₁ 和 2H₄ 分别与孢子、芽管或附着胞有特异性结合;Western blotting 分析发现 2B₄、4A₁、1D₁ 单克隆抗体分别与孢子、芽管表面的提取物有不同的结合带,此四株单克隆抗体均干扰稻瘟病菌附着胞形成,并抑制稻瘟病菌在叶表的致病性。

关键词: 稻瘟病菌附着胞,单克隆抗体,间接免疫荧光试验

中图分类号: S435.11 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2000)06-0638-45

稻瘟病是水稻的毁灭性病害,世界上几乎栽培水稻的地区都有此病发生。据英联邦真菌学协会(CMI Distribution Maps of Plant Diseases, 51, 6ed, 1981)统计,世界上 85 个国家都有此病的危害。日本尽管广泛地使用了化学杀菌剂,但 1953 年至 1960 年间,平均年损失仍占总产 2.98%^[1]。在印度,1960 年至 1962 年间,由于稻瘟病流行,造成 266,000 吨产量损失,占总产 0.8%^[2]。在菲律宾,稻瘟病流行地区上万公顷水稻遭受其害,产量损失超过 50%^[3]。进入 80 年代,由于抗病品种选育,合理栽培措施以及采用有效的杀菌剂,我国稻瘟病发生的面积及产量的损失有明显的降低,但是在 1984 年至 1985 年间我国稻瘟病仍然流行,造成的产量损失为 0.7%~0.8%^[4]。

稻瘟病菌以菌丝体和分生孢子在病稻草和病谷上越冬,病稻草和病谷是翌年病害初次侵染的主要来源。至第二年当气温回升到 20℃ 左右时,若遇降雨,就能不断地产生分生孢子。孢子的产生和传播以夜间 12 时至次晨 6 时为最多^[3]。当稻瘟病菌接触稻株后,在适宜湿度条件下发生如下的侵染过程 (1) 病菌的分生孢子接触寄主表皮上的机动细胞后,其尖端泄放的粘胶^[5]以及发芽使得孢子紧密地粘着在寄主表面 (2) 芽管继而分化成特别的侵染机构,叫附着胞^[6] (3) 附着胞产生侵染栓穿透角质层和表皮细胞壁 (4) 病菌分化成次生菌丝在寄主细胞中生长,侵染邻近表皮细胞并能深入叶肉细胞 (5) 5-7d 后出现症状,分生孢子梗上分化出大量的新的分生孢子并从病斑中释放出来 (6) 这些新形成的分生孢子可重新侵染寄主。在生长期即以菌丝体和分生孢子在病稻草、病谷上越冬,完成侵染循环。其中附着胞形成是病菌成功侵入寄主完成整个侵染循环的关键步骤之一。因此,我们开展了稻瘟病菌附着胞形成机理的研究。为了分析稻瘟病菌的结构成份,并探

* 国家自然科学基金资助项目(39670011)

作者简介: 吴建祥(1968-)男,浙江诸暨人,浙江大学生物技术研究所讲师,硕士,主要从事免疫学和分子生物学研究

收稿日期: 1999-08-16, 修回日期: 2000-01-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

讨其对附着胞形成的作用,我们首次制备了稻瘟病菌的一系列单克隆抗体。发现单克隆抗体在适当浓度下能有效地封闭病菌表面抗原因子,干扰病菌的附着胞形成,抑制病菌侵染寄主形成病斑。单克隆抗体这一特性为稻瘟病的防治提供了一条新的思路。而且,我们利用单克隆抗体为探针,筛选稻瘟病菌分生孢子的 cDNA 表达文库,已获得一个与附着胞形成相关的基因,为稻瘟病菌附着胞形成的分子生物学研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 发芽孢子和附着胞抗原制备

稻瘟病菌 91-11B1 由浙江省农业科学院稻瘟病研究室柴荣耀提供,该菌株对籼稻 (*indica*) 品种致病性强。菌种在实验过程中一般在 OMTA 上培养。通过混合培养产生大量孢子后,用 0.25% 明胶轻轻地在培养基表面洗擦,收集悬浮液,经羊毛纸过滤后得纯分生孢子。分生孢子悬液经 5,000g 离心 5min,收集沉淀孢子,用灭菌的去离子水 (Millipore) 悬浮稀释至 10^4 个分生孢子/mL 浓度。取该浓度的分子孢子悬液 50 μ L,然后用移液枪小心逐滴加到洗净灭菌的玻璃培养皿(直径 9cm)上,每皿 64 滴,保持一定距离,注意防止水滴之间相遇连合,23 $^{\circ}$ C 培养 10h 后,此时不发芽孢子所占比例为 5.4%,发芽孢子未形成附着胞比例为 61.3%,发芽孢子已形成附着胞的比例为 33.3%。用洗净灭菌的小橡皮轻轻擦刮,收集上述培养皿上的稻瘟病菌培养物,然后离心收集含有孢子、芽管和附着胞的混合物,4 $^{\circ}$ C 保存,作为抗原备用。

1.2 单克隆抗体的制备

1.2.1 单克隆抗体的制备主要参考吴建祥等方法^[7]。其中阳性孔筛选,单克隆抗体的纯化方法略作变动,即包被不一样,具体见 1.2.2,另外,提纯单克隆抗体方法不一样,采用辛酸—硫酸铵方法^[8]。

1.2.2 采用间接 ELISA 方法筛选对稻瘟病菌的单克隆抗体细胞株,方法如下:

①包被稻瘟病菌分生孢子悬液(3×10^5 个分生孢子 1mL)100 μ L/孔于 96 孔的 ELISA 板中,20 $^{\circ}$ C 培养 24h,使孢子发芽形成附着胞,并紧密粘附在小孔底壁,作为包被的抗原。如再用 1% 的乙醛固定 0.5h,效果更好。②用 5% 小牛血清(用 PBST 稀释)封闭液 100 μ L/孔 37 $^{\circ}$ C 封闭 30min。③加样:待检细胞培养上清(TCS)每孔加 100 μ L,重复 2 孔。每块反应板上设多克隆血清阳性对照和稀释液阴性对照各 2 孔,37 $^{\circ}$ C 温育 1h。④用 PBST 洗液洗三次,每次 3min。⑤加 1:2000 稀释的辣根过氧化合酶标记的羊抗鼠 IgG 结合物 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温育 30min。⑥用 PBST 洗液洗三次,每次 3min。⑦加新鲜配制的底物溶液(邻苯二胺溶液)每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 10min。⑧加终止液(2mol/L H₂SO₄)每孔 50 μ L,终止反应。用酶标读数仪判定,用酶标读数仪测读各反应孔在 490nm 处的光度值(OD)。按下式计算:P/N=待检孔 OD 值/阴性对照孔 OD 值,被检上清孔的 P/N 值 ≥ 2.1 者判为阳性。

1.3 用间接免疫荧光技术确定抗体在抗原表面的分布

采用间接法并略作改动,主要是利用孢子发芽后能紧密粘附于载玻片上的特性省去固定这一步。具体步骤如下:

①用 pH7.2 0.02mol/L PBS 配制稻瘟病菌分生孢子悬液(10^4 个分生孢子/mL),取 100 μ L 于无菌干净的载玻片上,20 $^{\circ}$ C 培养 24h,使孢子发芽形成附着胞,并紧密粘附在载

玻片上。②用上述 PBS 洗一次 5min。③以正常的 10%(V/V)小鼠血清(Sigma)作为阴性对照 ;以 10%(V/V)稻瘟病菌多克隆小鼠抗体为阳性对照 ;以杂交瘤细胞的培养上清(TCS ,待测单抗)作为待测样品 ;上述各样品在载玻片上加 300μL 重复 3 片 室温下处理 2h。④PBS 洗三次 ,每次 5min。⑤加入释度为 1:40 的 FITC 接合的经亲和层析提纯的羊抗鼠 IgG 全分子 ,Saint Louis ,USA)300μL 室温下处理 2h。⑥PBS 洗三次 ,每次 5min。⑦滴加缓冲甘油(9 份甘油加 1 份 PBS) ,用盖玻片封液 ,并在激发波长为 450~490 的荧光显微镜下观察记录实验结果。

1.4 单克隆抗体对附着胞形成的干扰作用测定

①将各单抗小鼠腹水 IgG 稀释成 5 ,10 和 20μg/mL 三个浓度梯度。IgG 蛋白含量采用分光光度计进行比色测定 ,然后获得 280nm 和 260nm 的波长下的吸光值 A ,按 Lowry-Kalokar 公式计算蛋白浓度 :

蛋白浓度(mg/mL)= 1.45 × A280 - 0.74 × A260。

②取各单抗小鼠腹水 IgG 的各释度 20μL 加到洋葱表皮上和 24 孔培养板的小孔中 ,然后加 20μL 的 2 × 10⁴ 个分生孢子/mL 的孢子悬液 ,混合后使孢子浓度和 IgG 浓度都稀释一倍。以正常小鼠血清 IgG(Sigma)作为阳性对照 ,重复三次。28℃ 下 18h 后测定附着胞的形成率。试验重复二次。

1.5 单克隆体对稻瘟病菌的致病性抑制作用测定

1.5.1 取五叶期原丰早水稻稻叶 ,剪成 5.00cm 长片段 ,然后置于含湿的灭菌棉花球的培养皿(直径为 9cm)中 ,叶背朝上 ,备用。

1.5.2 同时 ,采用对稻瘟病菌附着胞具有抑制作用的单抗 IgG 与分生孢子悬液混合 ,使分生孢子浓度为 10⁴ 个分生孢子/mL ,单抗 IgG 浓度相应稀释到原先相对应对附着胞具有抑制作用的浓度。然后共取 10μL 加到水稻片段的叶背面一侧(以中脉为界) ,每叶 3 滴 ,在叶背面相对应另一侧加 10μL 同样浓度但不含单抗的分生孢子悬液(10⁴ 个分生孢子/mL) ,同样 3 滴 ,每皿 3 片叶片 ,重复 3 皿。将上述培养皿置于 28℃ 下光暗(13h/11h)培养 5d ,每天记录实验结果。实验重复 2 次。

1.6 Western blotting 分析

1.6.1 样品处理 :收集分生孢子和带发芽的分生孢子各 0.5g ,分别加 1% SDS 含 1mmol/LPMSF 和 40mmol/L β-巯基乙醇 0.5mL ,置于 Eppendorf 离心管中 ,在沸水中煮 30min ,然后 8,000r/min 离心 5min ,取上清 ,加含 SDS 蛋白电泳上样缓冲液。电泳备用。另收集分生孢子和带发芽的分生孢子各 0.5g ,分别加 0.5mL 的冷 100% 三氟乙酸(TFA) ,充分混匀 10min ,8,000r/min 离心 10min ,低温抽真空 ,干燥后 ,加含 SDS 蛋白电泳缓冲液 ,混匀备用。

1.6.2 SDS-PAGE、Western blotting 分析 :参考李德葆等^[9]方法。

2 结果和分析

2.1 单克隆抗体筛选

共测定了 850 个杂交瘤细胞的培养上清(TCS) ,发现 230 个细胞株的 TCS 能够在间接 ELISA 显色中呈阳性 ,其中 23 个细胞株的 TCS 呈强阳性。进一步克隆得 11 株细胞

株(见表 1)。

表 1 稻瘟病菌单克隆抗体的性质
Table 1 Characteristics of monoclonal antibodies of *Magnaporthe grisea*

| Monoclonal antibodies | Isotypes and subclasses of monoclonal antibodies | Titre of ascitic fluids | Binding sites of monoclonal antibodies (IFA) |
|-----------------------|--|-------------------------|--|
| 4A1 | IgA | 1:64000 | Conidia |
| 2B4 | IgA | 1:6400 | Conidia germ tube appressoria |
| 2H4 | IgA | 1:36000 | Appressoria |
| 1D1 | IgA | 1:32000 | Germ tube |
| 2B11 | IgA | 1:16000 | Conidia |
| 5E2 | IgA | 1:64000 | Conidia germ tube appressoria |
| 2A3 | IgM | 1:16000 | Germ tube |
| 4G9 | IgA | 1:16000 | Conidia germ tube |
| 3G4 | IgA | 1:8000 | Germ tube |
| 5H10 | IgA | 1:8000 | Conidia |
| 1F8 | IgA | 1:8000 | Conidia germ tube |

2.2 间接免疫荧光方法获得的结果

从表 1 可以观察到 11 株单抗原结合位点在稻瘟病菌的分生孢子、芽管和附着胞表面分别具有不同的分布状况。其中 4 株单抗,即 4A1、2B4、2H4 和 1D1 能在免疫荧光反应中表现出很强的阳性反应。4A1 能够对孢子具有很强的结合作用,但对芽管和附着胞反应很弱;2B4 能够与分生孢子、芽管和附着胞都具有结合作用;2H4 只能与附着胞起着很强的结合作用,但对分生孢子和芽管不作用;1D1 仅对芽管具有结合作用,对分生孢子和附着胞不结合(见图 1)。

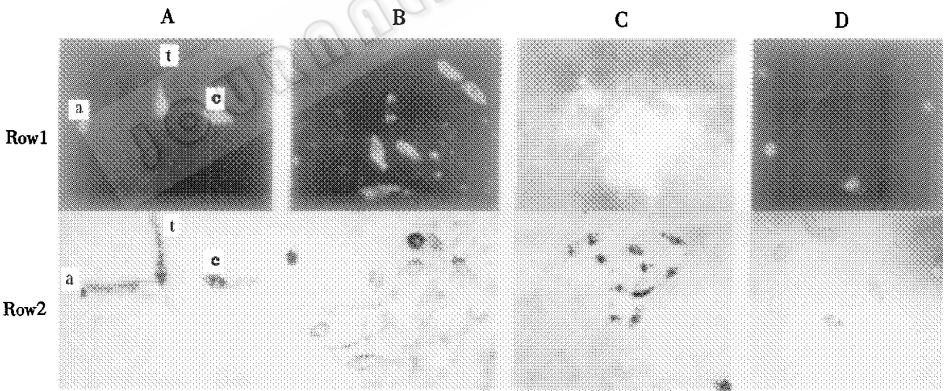


图 1 采用间接免疫荧光技术显示各种稻瘟病菌单克隆抗体在病菌表面的结合状况

Fig.1 Indirect immunofluorescence indicating the antigen localization in the infection strctures of *Magnaporthe grisea* by monoclonal antibodies

FITC fluorescence was viewed with exitation filter BP 450 – 459. Row 1 presents the pictures under UV-epifluorescence and Row 2 as a check under light.

A. 2B4 labeled conidia , germ tubes and appressoria uniformly ; B. 4A1 labeled conidia strongly and uniformly ; C. 1D1 labeled germ tubes ; D. 2E4 labbeled appressoria most strongly.
c : conidia ; t : germ tube ; a : appressoria.

2.3 单克隆抗体对稻瘟病菌附着胞形成干扰作用

由于 2B4、4A1、1D1、2H4 在免疫荧光反应中反映强,且抗原表面的结合位点具有代表性,故选用此四株单克隆抗体测定它们对稻瘟病菌附着胞形成的干扰作用。结果表明

2B4、4A1、1D1 和 2H4 能够在洋葱表皮和 24 孔聚乙烯培养板上有效地抑制稻瘟病菌附着胞的形成(见表 2)。2B4 作用效果最佳,即使其 IgG 的浓度为 5ug/mL 还能起抑制作用;在洋葱表皮表面尤为明显(见图 2,3),而最弱者为 2H4,其 IgG 浓度需达到 20μg/mL 时才具作用。10h 后观察已发现有抑制作用,但对照此时形成的附着胞率还不高,因此,对比不明显,而 18h 后对照附着胞形成率达 100%,而实验组附着胞形成率与 10h 后几乎一样,抑制效果明显。

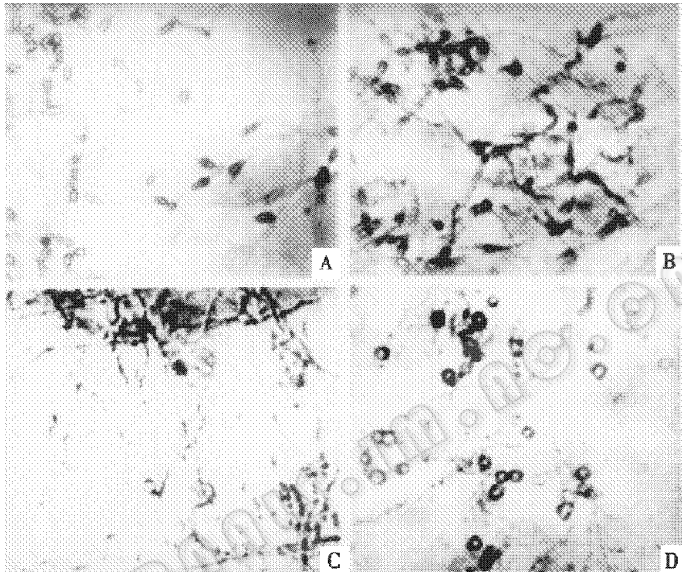


图 2 单克隆抗体 2B4 在聚乙烯表面对稻瘟病菌附着胞形成的抑制作用

Fig. 2 Interfering with appressorium formation by monoclonal antibody 2B4 on the surfaces of polyethylene substrates B and D as checks, after incubation of 10h and 18h, respectively; A and C indicate 2B4 interferd with appressorium formation.

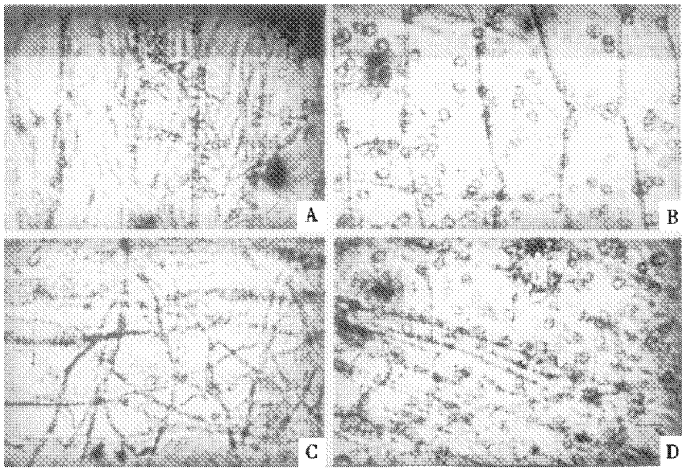


图 3 单克隆抗体 2B4 在洋葱表皮上对稻瘟病菌附着胞形成的抑制作用

Fig. 3 Interfering with appressorium formation by monoclonal antibody 2B4 on the surfaces of onion epidermis B and D as checks after incubation of 10h and 18h, respectively; A and C indicate 2B4 interferd with appressorium formation.

2.4 单克隆抗体对稻瘟病菌致病的影响

由于 2B4、4A1、1D1、2H4 四株单克隆抗体在免疫荧光反应中反应强 ,且在抗原表面的结合位点具有代表性 ,故选用此四株单克隆抗体测定对稻瘟病菌致病的影响。试验表明 ,单克隆抗体 2B4、4A1、1D1 和 2H4 均对稻瘟病菌的病斑形成具有有效的抑制作用。单抗 2B4 表现最强的作用 ,其 IgG 浓度仅为 5μg/mL 时 ,就可以对病斑具有有效抑制作用。单抗对病菌致病性的影响主要是干扰病菌在稻叶表面形成附着胞从而完全抑制或延缓病斑的形成(见表 2 ,图 4)。

表 2 单克隆抗体对稻瘟病菌附着胞形成和病菌致病性的影响

| Table 2 Interfering with appressorium formation of magnaporthe grisea and its pathogenesis by monoclonal antibodies | | | | |
|---|--------------------------------|--|--|---------------------------------|
| Monoclonal antibodies | Concentration of IgG/(μg/mL) | Efficiency of appressorium formation on the onion 's | Efficiency of appressorium formation on the surface of | Lesion length on rice leaf/mm * |
| | | epidermis/% | polyethylene/% | |
| 2B4 | 20 | 1.2 ± 1.2 | 1.0 ± 0.9 | 0.0 |
| | 10 | 2.8 ± 1.3 | 2.1 ± 1.4 | 0.0 |
| | 5 | 7.3 ± 1.4 | 5.4 ± 1.5 | 0.3 |
| 4A1 | 20 | 3.9 ± 2.0 | 3.1 ± 1.3 | 0.0 |
| | 10 | 8.0 ± 3.0 | 6.5 ± 4.0 | 0.2 |
| 1D1 | 20 | 3.5 ± 1.4 | 2.9 ± 1.4 | 0.0 |
| | 10 | 6.9 ± 1.5 | 5.9 ± 1.3 | 0.3 |
| 2H4 | 20 | 7.4 ± 1.8 | 6.7 ± 1.5 | / |
| CK | | 91.4 ± 7.9 | 86.9 ± 7.5 | 10.3 |

* Length of leaf lesions were measured after 5 days ;CK : no IgG.

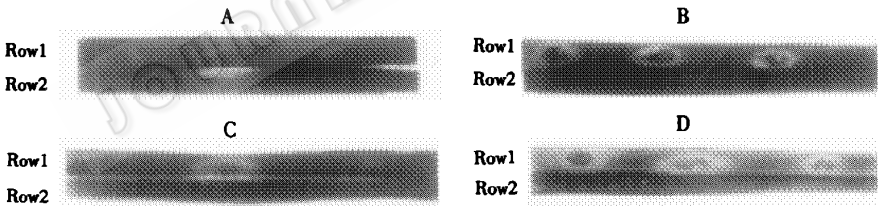


图 4 单克隆抗体对稻瘟病菌在水稻叶表致病性的影响

Fig.4 Effect of monoclonal antibodies on the fungal pathogenesis

Row 1. check ;Row 2. treatment. All of the four monoclonal antibodies could effectively inhibited the disease leaf development after 5 days.

A. 2B4 , 5μg/mL ; B. 4A1 , 10μg/mL ; C. 1D1 , 10μg/mL ; D. 2H4 , 20μg/mL.

2.5 Western blotting 分析结果

结果表明 ,单克隆抗体 2B4 能与 15KDa 的蛋白抗原起结合作用。由于该蛋白抗原存在于分生孢子和芽管表面的冷 100% TFA 提取物 ,而不存在于热 1% SDS 提取物中 ,故而推测该蛋白可能是某种疏水蛋白。Western blotting 分析表明 ,其它三株单克隆抗体 ,4A1、1D1 和 2H4 均不能与分生孢子或芽管表面的冷 100% TFA 提取物任何蛋白条带起结合作用。4A1 仅对溶于热 1% SDS 的分生孢子提取物 31kD 蛋白及来自分子量 marker (Promega ,USA)组分 31kD 的羧化酶蛋白起结合作用 ,对芽管提取物及冷的 100% TFA 提取物不起结合作用 ,1D1 仅识别溶于热 1% SDS 的芽管提取物中的 60kD 蛋白 ,2H4 对

上述各种物质(TFA 和 SDS 提取物)均没有发现特异的结合条带(见表 3 ,图 5)。

表 3 稻瘟病菌单克隆抗体 Western blotting 分析结果

Table 3 Analysis results of Western blotting by monoclonal antibodies of Magnaporthe grisea

| Monoclonal antibodies | Sources of samples | | Protein antigens |
|-----------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------|
| | cold 100% TFA | hot 1% SDS | |
| 2B4 | Conidia , germ tube | / | 15kD |
| 4A1 | / | Conidia , marker(Promega , USA) | 31kD |
| 1D1 | / | Germ tube | 60kD |
| 2H4 | / | Conidia , germ tube , | / |

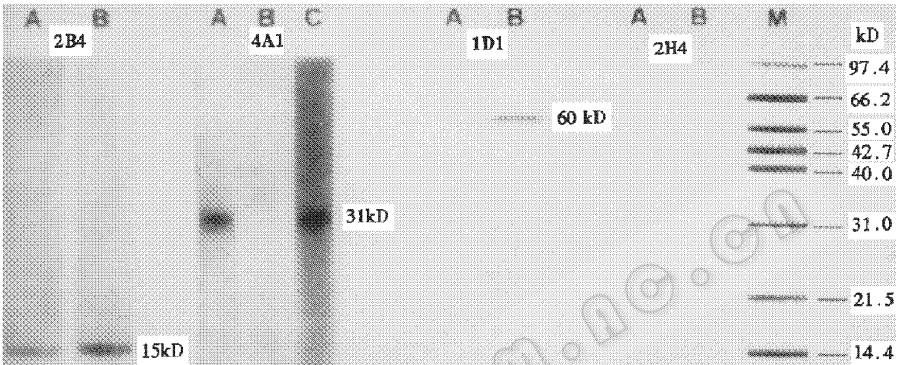


图 5 稻瘟病菌单抗 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blot analysis

A. Indicates the sample from conidia ; B. Germ tubes ; C. Carbonic anhydrase and M marker.
2B4 recognized 15kD protein antigen both for conidia and germ tubes ; 4A1 recognized 31kD protein antigen from conidia and the component of midrange molecular marker(Promega , USA) ; 1D1 recognize 60kD protein antigen from germ tubes ; 2H4 almost did not recognize any protein bands in NC membranes both from conidia and germ bues.

3 讨论

为了试图制备稻瘟病菌表面抗原的单克隆抗体来探讨单克隆抗体对附着胞形成机理的作用和对抗原结构的分析 ,并进一步把单克隆抗体作为探针来筛选分生孢子 cDNA 表达文库 ,以获得与附着胞形成相关基因。因此 ,我们用完整的发芽孢子免疫 BalB/C 小白鼠 ,并用完整的发芽孢子抗原筛选阳性孔。这一点对我们获得稻瘟病菌表面抗原的单克隆抗体至关重要 ,但也大大地增加了间接 ELISA 筛选阳性孔时包被的难度。我们在本研究过程中摸索出本论文中的包被方法 ,效果良好。并且在 ELISA 过程中 ,可随时在倒置显微镜上检查孔中的抗原数量。这一方法也是由于稻瘟病菌孢子能形成紧密粘附于基膜的芽管和附着胞这一特性所决定。当然也可用液氮把真菌抗原磨碎或用超声波击碎后的抗原包被 ,然后用免疫荧光技术或免疫胶体金技术来定位 ,但工作量很大。应用本文中的包被方法在洗涤和加样过程中要做到尽量温和 ,切忌拍打 ELISA 反应板 ,用吸水纸吸干即可。真菌的抗原性一般不强 ,一般阳性率较低 ,如何提高其阳性率值得大家探讨。

利用单克隆抗体作为探针 ,来筛选稻瘟病菌产生孢子的 cDNA 表达文库 ,以获得与附着胞形成相关的基因 ,是一条行之有效的途径 ,目前我们利用 2B4 单克隆抗体已从分生

孢子 cDNA 表达文库中获得阳性克隆,该阳性克隆的基因 DNA 序列已完成,发现是一个新的基因,其功能还在研究之中。因此,稻瘟病菌的单克隆抗体研制为水稻稻瘟病发病机理以及其抗体基因转化水稻的研究打下基础。

参 考 文 献

- [1] Goto K. Estimating losses from rice blast in Japan. *The Rice Blast Disease*, Baltimore, Maryland, USA, Johns Hopkins Press, 1965. 195~202.
- [2] Padmanabhan S Y. Breeding for blast resistance in India. *The Rice Blast Disease*, Baltimore, Maryland, USA, Johns Hopkins Press, 1965. 203~221.
- [3] Ou S H. *Rice Disease*. 2nd ed. Commonwealth Mycology Institute, Surry, UK, 1985.
- [4] Shen M, Lin J. The economic impact of rice blast disease in China. *Rice Blast Disease*. In: Zeigler R S, Lenong S A, Teng P S, eds. CAB International, Wallingford, UK, 1995, 321~331.
- [5] Hamer J E, Howard R J, Chumley F G. *Science*, 1989, **239** 288~290.
- [6] Bourett T M, Howard R J. *Canadian Journal of Botany*, 1990, **68** 329~342.
- [7] 吴建祥,青玲,周雪平,等.浙江农业大学学报,1999, **25**(2):147~150.
- [8] 陈伯权,吴美英,叶群瑞.病毒学报,1991, **17**(2):122~126.
- [9] 李德葆,周雪平,许建平.基因工程操作技术.上海:上海科学技术出版社,1996. 146~150.

STUDIES ON MONOCLONAL ANTIBODIES OF MAGNAPORTHE GRISEA AND ITS INTERFERING EFFECT ON APPRESSORIUM FORMATION*

Wu Jianxiang Liu Fucheng Li Debao Chen Zhengxian Lou Yichun
(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: Selecting by indirect ELISA eleven hybridoma cell lines, secreting monoclonal antibodies (McAbs) against *Magnaporthe grisea* were produced by fusing mouse myeloma cells (SP2/0) with spleen cells from BALB/c mice immunized with the mixture of conidia, germ tubes and appressoria of *M. grisea* using 50% PEG. The result of IFTC test showed that four of McAbs, named as 2B₄, 4A₁, 1D₁, and 2H₄ specifically bound to the cell wall surface of the fungus; Western blotting revealed that 2B₄, 4A₁, 1D₁ were recognized different protein antigens from the surface of conidia and germ tubes; These four McAbs could effectively interfere with the appressorium formation both on cellophane membrane and the surface of onion epidermis and inhibit the disease leaf lesions development *in vitro* test.

Key words: Appressorium of *magnaporthe grisea*, Monoclonal antibody, IFA

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39670011)