

番茄花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用^{*}

于 翠 吴建祥 周雪平^{**}

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘 要 用番茄花叶病毒(ToMV)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 4 株能稳定传代并分泌抗 ToMV 单克隆抗体(MAb)的杂交瘤细胞,其中 2 株能同时检测 ToMV 和烟草花叶病毒(TMV),各单克隆抗体腹水 ELISA 效价在 1:32 000~1:1 024 000 之间。经 TAS-ELISA 测定 4 株单克隆抗体检测病汁液的稀释度均能达到 1:2 000 倍以上。4 株单克隆抗体与其他病毒无交叉反应。Western-blot 分析表明,其中两株与 ToMV17.6kD 的外壳蛋白亚基有特异反应,而另两株无反应,推测它们是针对构象决定簇的抗体。

关键词 番茄花叶病毒,烟草花叶病毒,单克隆抗体,TAS-ELISA

中图分类号 S641.2 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2002)04-0453-05

番茄花叶病毒(Tomato mosaic virus,ToMV)是烟草花叶病毒属 Tobamovirus 的种,其寄主范围很广,能侵染茄科、十字花科、禾本科、藜科、豆科等许多植物,番茄是其主要寄主^[1]。ToMV 与烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus,TMV)粒子均为短杆状,基因组为单链正义 RNA,并在许多寄主上产生相同的症状,而且具有很近的血清学关系,因而过去一直被认为是 TMV 的一个株系。70 年代后 ToMV 从 TMV 中划出,成为独立的病毒种^[2]。ToMV 是 Tobamovirus 属中与 TMV 关系最近的一种病毒。我们对 ToMV 的研究报道始于 90 年代初,周雪平等^[3,4]和薛朝阳等^[5,6]对我国发生的 ToMV 生物学、血清学和分子生物学特性作了系统报道,并认为我国番茄上发生的大多应为 ToMV,洪健等^[7]研究了受 ToMV 和 TMV 侵染后寄主的超微病变结构,认为根据 X 体的有无可以将 TMV 和 ToMV 区分开来。

ToMV 和 TMV 之间有着较密切的血清学关系,单纯使用多抗血清较难区分 ToMV 和 TMV。制备能够区分 ToMV 和 TMV 的单克隆抗体对于鉴定病原、了解 ToMV 与 TMV 的发生分布有重要的意义。因此制备 ToMV 的单克隆抗体并进行了检测应用。

1 材料和方法

1.1 毒源

番茄花叶病毒 S1 分离物(ToMV-S1)和茶花分离物(ToMV-TL)、烟草花叶病毒蚕豆分离物(TMV-B)、黄瓜花叶病毒(CMV)、蚕豆萎蔫病毒 1(BBWV1)、蚕豆萎蔫病毒 2(BBWV2)、芜菁花叶病毒(TuMV)和甘蔗花叶病毒(SCMV)均由本实验室鉴定保存。

^{*} 国家重点基础研究发展规划项目(G2000016204)、教育部“高等学校优秀青年教学科研奖励基金”和国家杰出青年基金(30125032)资助

^{**} 联系作者

作者简介:于 翠(1976-),女,浙江大学生物技术所博士研究生,从事植物病理与生物技术研究。

收稿日期 2001-11-05,修回日期 2002-01-08

1.2 病毒提纯

将番茄花叶病毒 S1 分离物接种三生烟 (*Nicotiana tabcaum* Samsum nn) ,约两周后待烟草呈现典型花叶症状时采收病叶 ,并按周雪平等的方法^[8]提取病毒。病毒提纯液经 2% 磷钨酸 (pH6.7 染色后置 JEOL JEM-1200EX 电镜下观察粒子形态。

1.3 小鼠免疫

参照青 玲等^[9]免疫程序用纯化的 ToMV 病毒粒子免疫 8 周龄的 BAL B/c 小鼠。

1.4 细胞融合

参照刘秀梵^[10]方法将免疫小鼠的脾细胞和预先培养的 SP2/0 细胞融合。

1.5 筛选与克隆

参照青 玲等人^[9]方法进行 ,对阳性孔进行三次有限稀释克隆。

1.6 腹水制备及其效价测定

1200g 离心收集对数生长期的杂交瘤细胞 ,悬浮于生理盐水中(浓度为 10⁶ 个/mL) ,并加青霉素和链霉素至终浓度为 100 单位/mL。取 8 周龄健康 BAL B/c 小鼠 ,腹腔注入 0.3 ~ 0.5mL 降植烷 (Sigma 产品) ,7 ~ 10d 后注入 5 × 10⁵ ~ 10 × 10⁵ 个杂交瘤细胞 ,10d 后用大号针头刺入小鼠腹部收集腹水 ,4000g 离心 3min ,上清液即为腹水单克隆抗体。ELISA 测定腹水效价。

1.7 TAS-ELISA

TAS-ELISA 操作参照文献 11 方法进行 ,其中多抗血清由本实验室制备 ,工作浓度为 1:3000。

1.8 检测灵敏度测定

将温室接种 ToMV 和 TMV 的病叶分别从 1:10 开始作倍比稀释 ,将提纯的 ToMV 和 TMV 病毒从 1:1 000 开始作倍比稀释。各稀释液分别加入反应孔内 ,用同 1.7 方法进行 TAS-ELISA 测定。测定时 ,分别以对应稀释度的健叶汁液或健叶提纯液作为阴性对照。

1.9 Western-blot 检测

参照周雪平等方法^[12]进行 ,用提纯病毒(65.1mg/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 ,一部分用于考马斯亮蓝染色 ,另一部分进行电转移 ,然后将电转移所得的硝酸纤维素滤膜与不同的腹水单抗进行 Western-blot 印迹分析。

1.10 ToMV 的田间检测

利用制备的 ToMV 单抗对田间作物进行 TAS-ELISA 检测。在杭州市郊、云南随机从番茄、辣椒、烟草、蚕豆、豇豆、茄子、马铃薯、莴苣等作物中采收呈病毒症状的病样 ,作 1:10 ~ 1:20 倍稀释 ,然后进行 TAS-ELISA 检测 ,用温室播种的各作物的健株汁液作阴性对照 ,接种 ToMV 和 TMV 的汁液作阳性对照 ,检测为阳性的样品再在温室中接种普通烟 (*N. tabacum*) 进一步验证。

2 结果和讨论

2.1 杂交瘤细胞的融合、筛选及克隆化

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 359 个孔内有杂交瘤细胞生长 ,融合率

为 95.5%。融合 10 天后换用 HT 培养基,当每孔杂交瘤细胞覆盖孔底 10% ~ 50% 时,采用 ELISA 方法检测 359 个杂交瘤细胞生长孔培养上清液,有 51 孔表现阳性反应,阳性率为 14.3%。选择 6 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 1E7、1E12、2A9、4D8 4 株单克隆抗体杂交瘤细胞株。其中 4D8、2A9 对 ToMV 和 TMV 都有反应,而 1E12、1E7 只对 ToMV 特异反应。在 3 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

将小鼠腹腔注射降植烷,再注射单克隆杂交瘤细胞,约 10d 后采集 BAL B/C 腹水,每只小鼠约可取 7 ~ 8mL 腹水。用 TAS-ELISA 测得各细胞株腹水效价分别为:1:32 000 (1E7);1:1 024 000 (1E12);1:32 000 (2A9);1:512 000 (4D8)。

2.3 检测灵敏度确定

ToMV 和 TMV 汁液及提纯病毒倍比稀释后进行 TAS-ELISA 测定。对接种 ToMV 和 TMV 病叶的检测表明,所制备的单克隆抗体均有较高的检测灵敏度。1E7 对 ToMV 病叶的检测灵敏度达到 1:10 240 (图 1),2A9 检测 ToMV 病叶的灵敏度达到 1:2 560,检测 TMV 病叶的灵敏度为 1:2 560 (图 2)。不论是对 ToMV 特异的 1E7 还是与 ToMV 和 TMV 都有反应的 2A9,他们对健康汁液的反应都是微弱的。1E7 和 2A9 对 ToMV 提纯病毒的检测灵敏度均为 1:256 000,而 2A9 对 TMV 提纯病毒的检测灵敏度为 1:256 000 (图 3、图 4)。由此可见用于检测的单克隆抗体和所用的 TAS-ELISA 检测系统是灵敏可靠的。

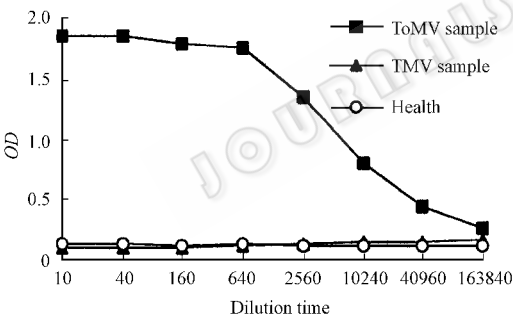


图 1 1E7 对 ToMY、TMV 病叶的检测
Fig.1 Detection of ToMV and TMV in infected plants with 1E7

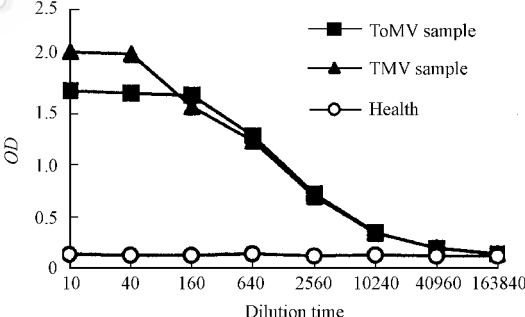


图 2 2A9 对 TMV 和 ToMV 病叶的检测
Fig.2 Dection of TMV and ToMV in infected plants with 2A9

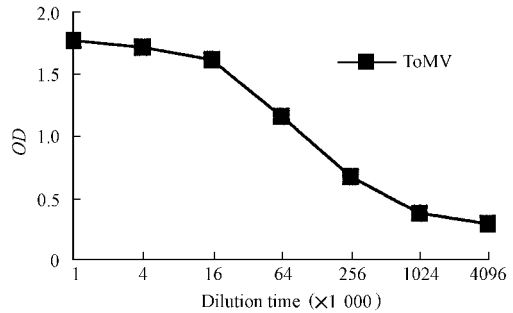


图 3 1E7 对提纯病毒的检测灵敏度
Fig.3 Detection of the purified ToMV with 1E7

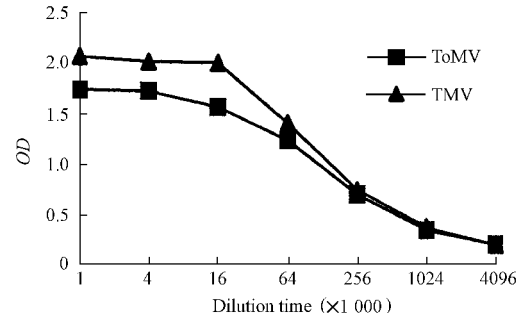


图 4 2A9 对纯病毒的检测
Fig.4 Detection of the purified ToMV and TMV with 2A9

表 1 单克隆抗体的特异性鉴定
Table 1 Specificities of MAbs tested by TAS-ELISA

Virus	MAbs			
	4D8	2A9	1E7	1E12
ToMV-TL	1.610	0.923	1.554	1.574
ToMV-S1	1.635	1.033	1.578	1.620
TMV	1.562	1.537	0.145	0.187
CMV	0.152	0.169	0.130	0.138
TuMV	0.127	0.113	0.131	0.131
BDMV	0.148	0.124	0.141	0.130
NRSV2	0.196	0.118	0.142	0.114
B935	0.170	0.118	0.120	0.117
Health CK	0.148	0.116	0.105	0.111



图 5 病毒外壳蛋白的 Western-blot 检测
Fig.5 Western-blot of the virus coat protein subunit with MAbs

2.6 TAS-ELISA 的田间检测

利用制备的单抗和建立的 TAS-ELISA 系统对杭州市郊和云南地区的烟草、番茄、辣椒、蚕豆、豇豆、茄子、马铃薯、莴苣等田间作物进行了检测。番茄样品 7 例,检测为 TMV 侵染的有 1 例,被 ToMV 侵染的 1 例,辣椒样品 7 例,被 TMV 侵染的有 3 例,未发现 ToMV 侵染,烟草样品 26 例(采自云南),检测为 TMV 侵染的有 13 例,亦未发现 ToMV 侵染,茄子样品 4 例,只有 1 例是由 TMV 侵染的,而在莴苣、蚕豆、豇豆上未检测到 TMV 和 ToMV。检测呈阳性的样品再在温室接种普通烟,其验证的结果与 TAS-ELISA 测定结果一致。这表明所制备的单克隆抗体能很好的用于检测田间 ToMV 和 TMV。

过去我们对 ToMV 和 TMV 的鉴定主要是通过二者在某些指示植物上的症状反应^[4],病毒侵染后寄主的超微病变差异和胶内交叉吸附试验等方法,虽能区分 ToMV 和 TMV,但是这些方法或者实验周期过长,或需要精密的仪器。而使用能够区分 TMV、ToMV 的单克隆抗体,使鉴定比较容易进行,且重复性好。

ToMV 单克隆抗体的获得及检测系统的建立为了解田间作物上的病毒的发生分布创造了条件。薛朝阳等^[13]利用 ToMV 的多抗血清对浙江和山西等地的田间病样进行了测定,结果发现茄子、番茄等茄科作物中均有 ToMV 的侵染,其中番茄中 ToMV 发生率南北差异大,在浙江发生率仅为 10%左右,而在山西有 60.7%的发生率。目前我们正在利用各单抗对茄科作物进行大量的检测,以便进一步明确这些作物上 Tobamovirus 的分布。

2.4 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 4 株单抗进行 TAS-ELISA 检测,以 ToMV-TL、ToMV-S1、TMV 病汁液作阳性对照。健康汁液作阴性对照。结果表明 1E12、1E7 只与 ToMV-TL、ToMV-S1 反应,4D8、2A9 与 ToMV-TL、ToMV-S1、TMV 有反应,4 株单抗均不与其他病毒发生反应。在对 ToMV 和 TMV 的反应中,4D8 对两种病毒反应差异不明显,而 2A9 对 TMV 的反应较 ToMV 强。同一种单抗对 ToMV 的两种分离物差异不明显(表 1)。

2.5 Western-blot

对提纯的 ToMV 和 TMV Western-blot 分析表明,1E12 和 1E7 能与 ToMV 17.6kD 的外壳蛋白亚基特异性结合(图 5),而 4D8 和 2A9 没有特异性结合条带。可能是因为它们所结合的抗原决定簇具有一定的空间构象,在电泳过程中由于变性而空间结构被破坏,致使所制备的单抗不能与抗原结合。

参 考 文 献

- [1] Brunt A A. Tomato Mosaic Virus. In :Van Regenmortel M H V , *et al.* ed. The plant virus. Vol. 2. New York and London :Plenum press ,1986. 181 ~ 203.
- [2] Hollings M ,Huttinga H. Tomato mosaic virus. CMV/AAB Description of plant viruses ,1976. No. 156.
- [3] 周雪平 ,钱秀红 ,刘 勇 ,等. 中国病毒学 ,1996 ,**11** :268 ~ 276.
- [4] 周雪平 ,薛朝阳 ,刘 勇 ,等. 植物病理学报 ,1997 ,**27** :53 ~ 58.
- [5] 周雪平 ,薛朝阳 ,石银鹿 ,等. 植物病害及其防治. 北京 :中国农业科学出版社 ,1998. 184 ~ 185.
- [6] 薛朝阳 ,周雪平 ,刘 勇 ,等. 中国病毒学 ,1998 ,**13** :150 ~ 155.
- [7] 洪 健 ,薛朝阳 ,徐 颖 ,等. 植物学报 ,1999 ,**41** (12) :1259 ~ 1263.
- [8] 周雪平 ,徐志新 ,徐 静 ,等. 华南农业大学学报 ,1995 ,**16** (2) :74 ~ 79.
- [9] 青 玲 ,吴建祥 ,戚益军 ,等. 微生物学报 ,2000 ,**40** (2) :167 ~ 172.
- [10] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用. 合肥 :安徽科学出版社 ,1994. 26 ~ 30.
- [11] Zhou X P ,Liu Y L ,Calvert L ,*et al.* , *Journal of General Virology* ,1997 ,**78** :2102.
- [12] 周雪平 ,李德葆. 病毒学报 ,1996 ,**12** (4) :38 ~ 44.
- [13] 薛朝阳 ,周雪平 ,青 玲 ,等. 植物病理学报 ,1999 ,**29** (2) :157 ~ 162.

Production of Monoclonal Antibodies to Tomato Mosaic Virus and Application in Virus Detection *

Yu Cui Wu Jianxiang Zhou Xueping

(Institute of Biotechnology ,Zhejiang University ,Hangzhou 310029 ,China)

Abstract : Four hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (MAb) against Tomato mosaic virus (ToMV) were produced by fusing mouse myeloma cells (SP2/0) with spleen cells from BAL B/ c immunized by the ToMV particle. The four MAbs could specifically react with ToMV , and the MAbs from two cell lines can react with ToMV and TMV simultaneously. The titres of ascitic fluids of four MAbs ranged from 1:32 000 to 1:102 400 0 with ELISA , and the sensitivity for detection virus from the plant sap reached over 1:2000 dilution. The MAbs didn ' t crossreact with other plant viruses. The result of Western-blot showed that two MAbs can react with the 17.6 kD ToMV coat protein submit specifically , while the other two MAbs can not react with it , they are supposed to against conformational determinants of ToMV CP.

Key words : Tomato mosaic virus , Tobacco mosaic virus , Monoclonal antibodies , TAS-ELISA

* The work was supported by the Major Basic Research Development Program of China (G2000016204) , the Teaching and Research Award Program for Outstanding Young Teachers in Higher Education Institutions of MOE and the National Science Fund for Young Scholars (30125032)