

# 芜菁花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用

施曼玲<sup>1,2</sup> 吴建祥<sup>1</sup> 郭 维<sup>1</sup> 周雪平<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

(<sup>2</sup> 杭州师范学院生命科学学院 杭州 310012)

**摘 要** 先以芜菁花叶病毒(TuMV)免疫 BAL B/C 小鼠,然后取其脾细胞使之与 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 TuMV 单克隆抗体(MAb)的杂交瘤细胞,并以之制备腹水单抗。4 株单克隆抗体腹水 ELISA 效价在  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  之间,仅对 TuMV 起特异性反应。Western blot 分析表明,4 株单抗都能与 TuMV 34kD 的外壳蛋白亚基起特异反应。利用 TuMV 的多抗血清和单抗腹水建立了三抗体夹心 ELISA 检测 TuMV 的方法,检测病叶的灵敏度为 1:5120 倍,检测提纯 TuMV 病毒绝对量为 21.9 ng。利用三抗体夹心 ELISA 测定出 7 种作物上有 TuMV 侵染。

**关键词** 芜菁花叶病毒,单克隆抗体,三抗体夹心 ELISA

中图分类号 S641.2 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2004)02-0185-04

芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)是重要的作物病毒病原之一,其寄主范围很广,可侵染 20 余科 202 种植物,其危害在十字花科作物上尤为严重<sup>[1]</sup>。TuMV 是马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)成员,病毒粒子是弯曲线形,长约 720nm,宽为 12nm。病毒基因组为单链正义 RNA。TuMV 一般不经种子传播,但可通过汁液和 40 多种蚜虫传播<sup>[2,3]</sup>。

TuMV 在我国各地均有分布<sup>[4]</sup>,发病严重,因而迫切需要建立快速准确的检测方法,帮助我们了解 TuMV 的发生动态,为病毒病的诊断和防治提供依据。为此,我们制备了 TuMV 的单克隆抗体,并建立了三抗体夹心 ELISA(TAS-ELISA)检测 TuMV 的方法,该方法有效地应用于田间作物上的 TuMV 检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 抗原和抗血清

TuMV、番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、蚕豆萎蔫病毒 1(*Broad bean wilt virus*, BBWV 1)、蚕豆萎蔫病毒 2(*BBWV 2*)、马铃薯 X 病毒(*Potato virus*, PVX)和马铃薯 Y 病毒(PVY)均由本实验室鉴定保存。TuMV 多抗血清由本实验室制备,碱性磷酸酶标记

的羊抗鼠 IgG 为 Sigma 产品。

### 1.2 病毒提纯

将 TuMV 分离物接种于青菜,15d 后采收病叶,按周雪平等<sup>[5]</sup>的方法提纯 TuMV。

### 1.3 免疫

按青玲等<sup>[6]</sup>的方法,用 TuMV 病毒抗原免疫 8 周龄的 BAL B/C 小鼠。

### 1.4 细胞融合

按刘秀梵<sup>[7]</sup>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 杂交瘤细胞筛选和克隆

将融合细胞培养 5d 后,用 HAT 培养基换液一次,第 10 天用 HT 培养基换液,等到融合细胞覆盖孔底 10%~50%时,取上清用间接 ELISA 方法筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原分别为 TuMV 感染的雪菜病汁液(以 1:10~1:15 稀释),并以健康汁液作阴性对照。选择强阳性反应的杂交瘤细胞,用有限稀释法克隆 3 次,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,一部分细胞株用含 10% 二甲基亚砜的冻存液悬浮,分装安培瓶,液氮保存,另一部分用于腹水制备。

基金项目 浙江省自然科学基金(301007)浙江省分析测试基金(03138)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-571-86971680; E-mail: zzhou@zju.edu.cn

作者简介 施曼玲(1969-),女,福建省人,杭州师范学院生科院副教授,从事植物病毒和分子生物学研究。

收稿日期 2003-06-18,修回日期 2003-10-20

## 1.6 腹水单抗的制备及其效价测定

按于翠等方法<sup>[8]</sup>制备腹水单克隆抗体。用间接 ELISA 测定腹水效价。

## 1.7 Western blot 检测

参照周雪平等方法<sup>[9]</sup>进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,以明确单克隆抗体与 TuMV 蛋白的特异性结合反应情况。

## 1.8 TAS-ELISA 方法的建立

**1.8.1 TAS-ELISA 操作步骤:**参照青玲等方法<sup>[6]</sup>进行。

**1.8.2 TAS-ELISA 最适条件测定:**采用方阵试验,ELISA 板纵向从上而下,用 pH9.6 的碳酸缓冲液从 1:1000 至 1:128000 倍比稀释 TuMV 多抗血清包被;包被单抗时,横向从左到右为用 pH7.5 的磷酸缓冲液(含 5% 的脱脂奶粉)从 1:3000 至 1:614000 倍比稀释的 TuMV 单抗腹水;酶标记抗体稀释倍数为 10000, TuMV 感染的雪菜病叶粗汁液 1:10(W/V)稀释作为抗原,并以健康雪菜叶片粗汁液 1:10(W/V)作为阴性对照,每个处理设二次重复,本实验中以  $P/N > 2.1$  作为阳性判断标准。以此条件进行 TAS-ELISA 方阵实验。

## 1.9 TAS-ELISA 灵敏度测定

将 TuMV 病叶汁液 1:10 ~ 1:10240 倍比稀释、提纯的 TuMV 病毒(14 mg/mL)1:1000 ~ 1:128000 倍比稀释后,分别作为抗原,并以对应稀释度的健叶汁液和健叶提纯液为阴性对照。在上述确定的多抗和单抗工作浓度下,用 TAS-ELISA 测定检测灵敏度。

## 1.10 TAS-ELISA 的特异性检测

在上述确定的多抗和单抗工作浓度下,用 TAS-ELISA 方法测定单抗对 TuMV、ToMV、TMV、CMV、BB-WW-1、BBWW-2、PVX 和 PVY 的反应特异性,所用 TuMV 为雪菜分离物(TuMV-XC)、榨菜分离物(TuMV-ZC)、萝卜分离物(TuMV-LB)和青菜分离物(TuMV-QC)。

## 1.11 TAS-ELISA 检测田间病样

在杭州、宁波、桐乡、温州、南昌等地随机从雪菜(*Brassica multiceps*)、榨菜(*Brassica juncea*)、盘菜(*Brassica rapa L.*)、青菜(*Brassica chinensis*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、南瓜(*Cucurbita maxima*)等作物上采收呈病毒症状的病叶,按 1:10(W/V)稀释,利用制备的 TuMV 单抗对这些样本进行 TAS-ELISA 检测。检测为阳性的样品再接种苋色藜和青菜,观察其症状。

## 2 结果

### 2.1 杂交瘤细胞的融合、筛选、克隆

免疫的 BAL B/C 小鼠脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞按 5 ~ 10:1 的比例在 50% PEG 下融合,用 HAT 培养基筛选,4 块 96 孔细胞板的融合率为 100%。融合 10d 后换用 HT 培养基,当每孔杂交瘤细胞覆盖孔底 10% ~ 50% 时,采用间接 ELISA 方法检测细胞培养上清中抗体的分泌情况,有 195 孔表现阳性反应,阳性率为 50%。选择 7 个呈强阳性反应的细胞孔,进行有限稀释法克隆,最后获得 5H10、4A12、1D5 和 4F9 4 株能分泌 TuMV 特异性抗体的杂交瘤细胞株。经 6 个月以上体外传代和多次冻存复苏后,4 株细胞株均能良好生长,并稳定分泌抗体。

### 2.2 腹水抗体制备及效价测定

小鼠注射 0.3 ~ 0.5 μL 降植烷 7 ~ 10d 后,腹腔注入用生理盐水悬浮的  $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$  个杂交瘤细胞,7 ~ 10d 后采集单抗腹水,5000r/min 离心 1 ~ 3min,取上清, -70℃ 冻存备用。用常规的间接 ELISA 分别测定 4 株单抗腹水的效价,结果表明效价均在  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  之间。

### 2.3 Western blot 分析

Western blot 分析表明,4 株单抗都能与 TuMV 的 34 kD 的外壳蛋白亚基特异性结合(图 1),这说明所制备的单抗是针对 TuMV 的 34 kD 的外壳蛋白亚基的特异性抗体。

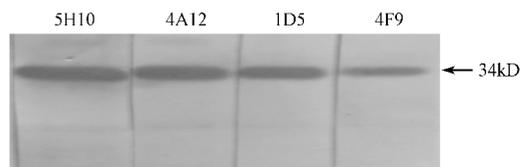


图 1 病毒外壳蛋白的 Western blot 检测

Fig. 1 Western blot of the virus coat protein subunit with MAbs

### 2.4 TAS-ELISA 最适条件确定

作包被的 TuMV 多抗血清倍比稀释后进行 TAS-ELISA 测定,多抗在 1:1000 ~ 1:32000 稀释范围内均可用于检测,以 1:1000 ~ 8000 稀释度效果为好。检测用的 TuMV 单抗血清倍比稀释后进行 TAS-ELISA 的测定,单抗在 1:3000 ~ 1:768000 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,我们选择多抗血清稀释度为 1:2000 和单抗血清稀释倍数为 1:12000 作为 TAS-ELISA 的最适工作浓度。

## 2.5 TAS-ELISA 灵敏度测定

青菜病汁液从 1:10 (W/V) 开始倍比稀释后进行 TAS-ELISA 测定, 从 1:10 ~ 1:5120 都是较理想的稀释度。而稀释度为 1:10240 时, P/N 已小于 2.1, 所以可确定 1:5120 为检测极限。提纯的 TuMV 病毒被检测出的最大稀释度约为 64000, 病毒浓度约为 0.219 μg/mL, 由于检测时每孔加 100 μL 病毒稀释液, 因此被检测出的病毒绝对量约为 21.9 ng。这说明建立的 TAS-ELISA 系统是灵敏可靠的。

## 2.6 TAS-ELISA 的特异性检测

4 株 TuMV 单抗用 TAS-ELISA 方法对 7 种植物病毒进行检测, 每株单抗均与 TuMV 病毒的 4 个分离物呈阳性反应, 而与其它 6 种植物病毒反应呈阴性(表 1), 说明制备的单抗对 TuMV 具有特异性, 可用于对 TuMV 的特异性检测。对 TuMV 的 4 个分离物检测表明, 同一株单抗对不同的 TuMV 分离物反应差别不大, 但不同株单抗对同一分离物的反应差异明显, 其中 5H10 和 4A12 两株单抗对 TuMV 反应更灵敏。

表 1 单克隆抗体的特异性鉴定

Table 1 Specificities of MAbs tested by TAS-ELISA

Virus	MAbs			
	5H10	4A12	1D5	4F9
TuMV-XC	1.185	1.052	0.379	0.263
TuMV-ZC	1.055	0.914	0.335	0.274
TuMV-LB	1.153	1.045	0.359	0.256
TuMV-QC	1.208	1.068	0.376	0.249
ToMV	0.079	0.032	0.022	0.032
TMV	0.082	0.041	0.023	0.025
CMV	0.084	0.036	0.017	0.034
BBWV 1	0.062	0.067	0.018	0.028
BBWV 2	0.078	0.046	0.014	0.033
PVX	0.091	0.038	0.026	0.041
PVY	0.101	0.067	0.025	0.023
CK	0.087	0.056	0.033	0.046

## 2.7 TAS-ELISA 的田间检测

对雪菜、榨菜、青菜、萝卜、盘菜、番茄和南瓜等作物的病样检测表明, 所制备的单抗和建立的 TAS-ELISA 系统可以有效快速用于田间检测 TuMV(表 2)。TuMV 在雪菜、榨菜、青菜、萝卜和盘菜等作物上发生很普遍, 而在番茄和南瓜上没有检测到。TAS-ELISA 检测为阳性的病样, 温室接种青菜和苋色藜, 均产生典型的 TuMV 引起的症状。

表 2 TAS-ELISA 检测田间作物上 TuMV 侵染

Table 2 Detection of TuMV in field samples with TAS-ELISA

Crop	Number of sample	Number of positive sample	Positive rate/%
<i>Brassica multiceps</i>	53	47	88.68
<i>Brassica juncea</i>	32	30	93.75
<i>Brassica chinensis</i>	26	16	61.54
<i>Raphanus sativus</i>	15	15	100
<i>Brassica rapa L</i>	23	23	100
<i>Lycopersicon esculentum</i>	30	0	0
<i>Cucurbita maxima</i>	30	0	0

## 3 讨论

自 1921 年 Cardner 和 Schultz 首次描述 TuMV 以来, 国内外学者对 TuMV 进行了深入的研究, 先后在芜菁花叶病毒病的病原鉴定、快速诊断、细胞超微结构以及分子生物学等方面作了大量的研究<sup>[10-12]</sup>。国内虽已有 TuMV 单克隆抗体制备的报道, 但所制备的单克隆抗体主要用于研究其理化特性, 以及不同 TuMV 分离物外壳蛋白的抗原结构, 这些单抗并未用于 TuMV 的广泛检测<sup>[13,14]</sup>。本实验室已研制了多种病毒的单克隆抗体, 在此基础上获得了 4 株 TuMV 特异性单克隆抗体, 4 株单克隆抗体均能用于检测 TuMV, 这些单抗的获得为 TuMV 的检测提供了基础。

TuMV 是种世界性流行的植物病毒, 它给作物生产带来严重危害, 因此建立 TuMV 快速准确的检测方法, 将有现实的意义。已报道的 TuMV 血清学检测方法都是采用间接酶联免疫反应( ID-ELISA )和双抗体夹心酶联免疫反应( DAS-ELISA )<sup>[15,16]</sup>。本研究运用研制的 TuMV 特异性单克隆抗体, 建立了 TAS-ELISA 检测体系, 该方法不但正确性好, 而且病毒检测的灵敏度也高, 可有效地用于研究 TuMV 在田间作物上的发生和分布。本实验对田间作物的测定结果表明, TuMV 在田间多种十字花科作物上发生普遍。

## 参 考 文 献

- [1] 施曼玲, 李桂新, 陶小荣. 芜菁花叶病毒温州分离物 HC-Pro 基因序列分析. 微生物学通报, 2002, 29(1): 26-30.
- [2] Shukla D D, Ward C W. Structure of potyvirus coat proteins and its application in taxonomy of potyvirus group. *Adv Virus Res*, 1989, 36: 273-314.

- [ 3 ] Shattuck V L. The effect of turnip mosaic virus infection of the mineral content and storability of field-grown rutabaga. *Commun Soil Sci Plan* ,1989 ,**29** 581 - 595.
- [ 4 ] 刘翔平,路文长.我国十省(市)十字花科蔬菜芜菁花叶病毒(TuMV)株系分化研究.科学通报,1989,**34**(21):1660-1664.
- [ 5 ] 周雪平,陈集双,李德葆,等.马铃薯Y病毒组病毒的高产量提取方法建立.微生物学通报,1994,**21**(3):184-186.
- [ 6 ] 青玲,吴建祥,戚益军,等.蚕豆萎蔫病毒单克隆抗体的制备及检测应用.微生物学报,2000,**40**(2):167-172.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] 于翠,吴建祥,周雪平.番茄花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用.微生物学报,2002,**42**(4):453-457.
- [ 9 ] 周雪平,李德葆.蚕豆萎蔫病毒纯化和病毒蛋白质及RNA组份分析.病毒学报,1996,**12**(4):367-373.
- [ 10 ] 徐均焕,李德葆,盛方镜,等.不同抗性的榨菜在芜菁花叶病毒感染后细胞超微结构的研究.中国病毒学,1996,**11**(1):61-68.
- [ 11 ] Kasschau K D, Carrington J C. Requirement for HC-pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* , 1995 **209** 268 - 273.
- [ 12 ] Blanc S, Ammar E D, Sandra G L, et al. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J Gen Virol* , 1998 **79** :3119 - 3122.
- [ 13 ] 杨峰,蔡少华,徐玲,等.分泌抗芜菁花叶病毒株特异性单克隆抗体杂交瘤细胞的建立及抗体理化性质测定.生物工程学报,1992,**8**(4):342-347.
- [ 14 ] 叶荣,于善谦,韦石泉.用单克隆抗体作芜菁花叶病毒不同分离物外壳蛋白抗原结构的比较研究.病毒学报,1996,**12**(1):62-68.
- [ 15 ] 李新予,蔡岳松,王彬,等.酶联免疫吸附法检测四川榨菜病毒种类.中国病毒学,1992,**7**(3):311-315.
- [ 16 ] 费小雯,邓晓东,刘志昕,等.芜菁花叶病毒的分离鉴定.热带作物学报,1999,**20**(4):53-55.

## Preparation of Monoclonal Antibodies to *Turnip Mosaic Virus* and Its Application for The Virus Detection

SHI Man-Ling<sup>1,2</sup> WU Jian-Xiang<sup>1</sup> GUO Wei<sup>1</sup> ZHOU Xue-Ping<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(<sup>2</sup> College of Life Science, Hangzhou Teachers' college, Hangzhou 310012, China)

**Abstract:** Four hybridoma cell lines capable of secreting monoclonal antibodies (MABs) against *Turnip mosaic virus* (TuMV) were obtained by fusing mouse myeloma cells (SP2/0) with spleen cells taken from the BAL B/C having been immunized by the TuMV particles. The four MABs could specifically react with TuMV. The ELISA titres of ascitic fluids of four MABs ranged from  $10^{-5}$  ~  $10^{-6}$ . The result of Western blot showed that 4 MABs can react specifically with the 34 kD coat protein submit of TuMV. TAS-ELISA was set up with polyclonal and MABs for TuMV detection, and the MABs could successfully detect 21.9ng purified TuMV or virus in plant sap at 1:5120 dilution. TAS-ELISA were then used for detection of TuMV in seven crops.

**Key words:** *Turnip mosaic virus*, Monoclonal antibodies, TAS-ELISA