

百合无症病毒单克隆抗体的制备及检测应用

吴建祥¹ 刘成科¹ 洪 健^{1*} 刘文洪² 叶美琴³

(¹浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

(²浙江中医学院 杭州 310053)

(³浙江丽水市农业局 丽水 323000)

摘 要 :用百合无症病毒(*Lily symptomless virus*, LSV)免疫的 BALB/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 LSV 单克隆抗体(MAb)的杂交瘤细胞(2A2、5H9、5H2 和 5E12),并分别制备它们的单抗腹水。4 株单克隆抗体腹水间接 ELISA 效价达 10^{-6} ,5H9 和 5E12 的抗体类型及亚类均为 IgG1,而 2A2 和 5H2 均为 IgG3,4 株单克隆抗体的轻链均为 κ 链。利用单克隆抗体建立了抗原包被间接 ELISA(ACP-ELISA)检测 LSV 的方法。病叶作 1:300 倍稀释,提纯 LSV 病毒浓度为 18ng/ml(每孔的病毒绝对量为 1.8ng)时,该方法仍能检测到病毒。利用 ACP-ELISA 检测了田间样品,发现 LSV 在百合上发病很普遍。

关键词 :百合无症病毒,单克隆抗体,ACP-ELISA

中图分类号:S432.41;S644.1 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)04-0580-04

百合无症病毒(*Lily symptomless virus*, LSV)是香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*)成员,病毒粒子为略弯曲的线状,无包膜,长 610~700nm,直径 12~15nm,螺旋对称结构。病毒基因组为单分子线形正义 ssRNA,长 8394nt,含有 6 个 ORF,其中 ORF5 编码 32kD 外壳蛋白,基因组 RNA 3' 端有一个 Poly(A)^{1-3]}。LSV 的寄主范围很窄,主要侵染百合科植物,单独侵染百合寄主时表现为隐症,与其它病毒复合侵染时则可引起严重的田间症状,直接影响了百合的花和球茎质量,给花卉生产带来重大经济损失^[4-6]。目前,检测 LSV 的方法主要采用进口抗血清检测试剂盒进行酶联免疫吸附测定(ELISA)以及用电镜直接观察组织中的病毒粒子。但抗血清存在非特异性高、准确性和均质性差、产量有限等不足;电镜检测需要昂贵的设备而不能普及应用。因而迫切需要建立快速、准确、简便的检测方法,为该病毒病的诊断、抗病育种和脱毒种球种苗生产提供技术支持。我们在对浙江丽水的栽培百合病毒病进行研究鉴定的基础上,首次制备了 LSV 的单克隆抗体,建立了抗原包被 ELISA(ACP-ELISA)检测方法,对田间百合样品进行了检测应用。

1 材料和方法

1.1 病毒、培养基和抗体

LSV 采集于浙江丽水百合栽培基地自然感病的东方百合。蚕豆萎蔫病毒 1(BBWW-1)、蚕豆萎蔫病毒 2(BBWW-2)、香石竹斑驳病毒(CarMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、甘蔗花叶病毒(SCMV)、烟草花叶病毒(TMV)、番茄花叶病毒(ToMV)和芜菁花叶病毒(TuMV)均由本实验室鉴定保存。RPMI-1640 培养基、HT、HAT、抗体类型及亚类鉴定试剂盒、碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 均为 Sigma 公司产品。LSV 的 DAS-ELISA 多抗血清检测试剂盒为 Agdia 公司产品。

1.2 百合无症病毒的提纯

采集于浙江丽水自然感病的东方百合病叶,经 ELISA 检测试剂盒验证为 LSV 感染,参照 Hsu 等^[7]的 LSV 提纯方法略作修改,以 0.1mol/L 的 Tris-HCl (pH9.0)为缓冲液提取 LSV。病毒提纯液经 2% 磷酸钨酸(pH6.7)负染色后置日本 JEOL 公司的 JEM-1200EX 透射电镜下观察粒子形态。

1.3 小鼠免疫、细胞融合、筛选与克隆

参照青玲等^[8]报道的免疫程序用纯化的 LSV 病毒粒子免疫 8 周龄的 BALB/C 小鼠。参照吴建祥

基金项目:浙江省科技厅资助项目(2002C32128),国家科技部农业科技成果转化专项资助项目(02EFN213300269)

* 通讯作者。Tel 86-571-86971179, E-mail: jhong@zju.edu.cn

作者简介:吴建祥(1968-),男,浙江诸暨人,讲师,在职博士研究生,主要从事免疫学和分子生物学研究。Tel 86-571-86971677, E-mail: wujx@zju.edu.cn

收稿日期:2005-03-04,修回日期:2005-04-30

等^[9]的方法将免疫小鼠的脾细胞和鼠 SP2/0 细胞融合。融合细胞培养 5d 后,用 HAT 培养基再换液一次,第 10d 用 HT 培养基换液,等到融合细胞覆盖孔底 5%~30% 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提纯的 LSV、LSV 感染的百合病叶汁液(1:30 稀释),并以健康叶汁液作阴性对照。选择强阳性反应的杂交瘤细胞,用有限稀释法连续克隆 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。杂交瘤细胞经扩大培养后,用于腹水制备和液氮保存。

1.4 腹水制备和抗体纯化

单克隆抗体腹水制备按照施曼玲等^[10]的方法进行,采用辛酸-硫酸铵方法^[11]纯化单抗腹水,获得的纯化单抗于 -70℃ 保存。

1.5 抗体类型及亚类鉴定和腹水效价测定

采用 Sigma 公司的羊抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM 标准抗血清,将纯化的腹水抗体作适当稀释后用琼脂双扩散法测定,24h 后观察沉淀线,判断 4 株单克隆抗体的抗体类型及亚类。以提纯病毒(1μg/mL)包被 ELISA 板,倍比稀释的腹水作一抗,碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行间接 ELISA 测定单克隆抗体的腹水效价。

1.6 Western blot 检测

参照于翠等^[12]的方法进行,用提纯病毒进行外壳蛋白亚基的 SDS 凝胶电泳,将电泳胶切割后一部分用于考马斯亮蓝染色观察,另一部分进行电转移,然后将电转移所得的硝酸纤维素膜与不同的腹水单抗进行 Western blot 分析。

1.7 LSV 的 ACP-ELISA 检测方法

参照 Jiang 等^[13]操作步骤进行 ACP-ELISA,用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)30 倍稀释的病叶汁液 100μL/孔加入 ELISA 板,LSV 提纯病毒为阳性对照,健康叶汁液为阴性对照,5000~10000 倍稀释单抗腹水为一抗,8000 倍稀释 AP 标记的羊抗鼠 IgG 结合物为二抗,对硝基苯磷酸盐(PNPP)为底物,用 680 酶联免疫检测仪(BIO-RAD)测 OD₄₀₅ 值,以 P/N > 2.1 作为阳性判断标准。

1.8 ACP-ELISA 方法对 LSV 和不同病毒的特异性测定

用提纯的 BBWV1、BBWV2、CarMV、CMV、PVX、PVY、SCMV、TMV、ToMV 和 TuMV (1μg/mL)包被 ELISA 反应板,以免疫抗原 LSV 为阳性对照,以包被缓冲液作阴性对照,用上述 ACP-ELISA 法,分别测定

4 株单克隆抗体的特异性反应。

1.9 ACP-ELISA 方法测定检测灵敏度

将 LSV 病叶汁液作 1:10~1:10240 倍比稀释,提纯的 LSV 病毒(5mg/mL)作 1:1000~1:128000 倍比稀释后,分别作为抗原包被 ELISA 板,并以对应稀释度的健叶汁液和健叶提纯液为阴性对照。将 5E12 单克隆抗体腹水作 1:10000 倍稀释后利用 ACP-ELISA 方法测定检测灵敏度。

1.10 ACP-ELISA 方法田间检测 LSV 的应用

利用制备的 LSV 单克隆抗体建立的 ACP-ELISA 方法对田间百合进行检测。在浙江丽水地区采集百合样品,研磨组织汁液作 1:30 倍稀释,然后进行 ACP-ELISA 检测,用百合健叶汁液作阴性对照,LSV 提纯样品作阳性对照。

2 结果和分析

2.1 百合无症病毒的提纯

用改进的方法提纯田间百合病叶样品,在电镜下观察提纯液中有高浓度的病毒粒子,形态呈略弯曲的线状,粒子完整(图 1)。用紫外分光光度法测得提纯病毒的浓度为 5mg/mL。

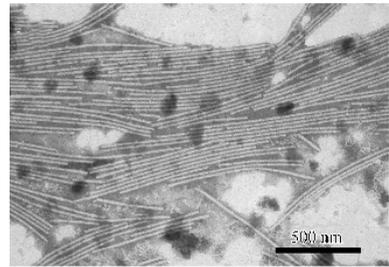


图 1 纯化的 LSV 病毒粒子(30000×)

Fig.1 Virus particle of purified LSV(30000×)

2.2 杂交瘤细胞的融合、筛选、克隆

免疫的 BALB/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,6 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 5%~30% 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 198 孔表现阳性反应,阳性率为 35%。选择 8 个呈强阳性反应的细胞孔,进行有限稀释法克隆,获得 2A2、5H9、5H2 和 5E12 共 4 株能分泌抗 LSV 的特异性抗体杂交瘤细胞株。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。

2.3 腹水抗体制备、抗体类型及亚类鉴定、效价测定

注射单克隆杂交瘤细胞的 BALB/C 小鼠后,约

7~10d后腹部膨大,采腹水,以后每天取一次,每只小鼠可取5~20mL腹水。抗体类型及亚类鉴定结果表明,5H9和5E12的抗体类型及亚类均为IgG1,而2A2和5H2均为IgG3。4株单克隆抗体的轻链均为 κ 链;4株单抗腹水间接ELISA效价均达 10^{-6} (表1)。

表1 LSV单克隆抗体的特性

Table 1 Properties of monoclonal antibodies to LSV

MAbs	Isotype	Ascites titre	IgG yield(mg/mL)
2A2	IgG3 κ	10^{-6}	5.42
5E12	IgG1 κ	10^{-6}	6.45
5H2	IgG3 κ	10^{-6}	13.2
5H9	IgG1 κ	10^{-6}	9.85

2.4 Western blot 分析

对提纯的LSV进行Western blot分析表明,4株单抗均能与提纯病毒的32kD外壳蛋白亚基特异性结合(图2),说明所制备的单抗是针对LSV的32kD

外壳蛋白亚基的特异性抗体。

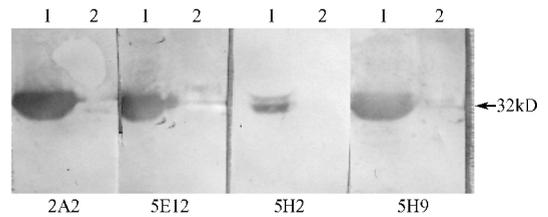


图2 LSV外壳蛋白Western blot检测

Fig.2 Western blot analysis of LSV coat protein

1. Virus particle of purified LSV; 2: Healthy plant sap.

2.5 ACP-ELISA 的特异性检测

ACP-ELISA检测表明,4株单抗均仅对LSV有特异性反应,而与BBWV1、BBWV2、CarMV、CMV、PVX、PVY、SCMV、TMV、ToMV和TuMV等病毒均无反应(表2),说明用这4株单抗建立的ACP-ELISA方法对LSV有很好的特异性。

表2 LSV单克隆抗体的特异性

Table 2 Specificities of MAbs tested by ACP-ELISA

MAbs	Virus											
	LSV	BBWV1	BBWV2	CarMV	CMV	PVX	PVY	SCMV	TMV	ToMV	TuMV	Healthy
2A2	0.762*	0.020	0.020	0.021	0.022	0.019	0.022	0.020	0.017	0.024	0.022	0.021
5E12	1.320	0.020	0.020	0.025	0.021	0.023	0.020	0.019	0.025	0.020	0.026	0.020
5H2	1.021	0.025	0.023	0.021	0.020	0.021	0.019	0.021	0.023	0.021	0.019	0.024
5H9	1.211	0.019	0.021	0.023	0.022	0.023	0.024	0.023	0.022	0.020	0.021	0.018

* OD_{405} value 30min after adding substrate at room temperature.

2.6 检测灵敏度的确定

灵敏度检测表明,用5E12单克隆抗体建立的ACP-ELISA方法对1:5~300倍稀释的病叶汁液均呈阳性反应,即对检测病叶的灵敏度可达到1:300,对纯病毒的检测灵敏度可达18ng/mL,每孔的病毒绝对检出量为1.8ng。

2.7 ACP-ELISA 的田间检测应用

利用制备的单抗和建立的ACP-ELISA方法对采自浙江丽水地区的53个百合样品进行了检测。检测结果发现25个样品呈阳性反应,阳性率为47.2%,说明百合上LSV的感染率很高。

3 讨论

本研究通过LSV病毒的动物免疫、细胞融合、筛选、克隆和腹水制备,获得了4株LSV特异性单抗,并用这些单抗建立了对LSV有特异性反应,而与BBWV1、BBWV2、CarMV、CMV、PVX、PVY、SCMV、TMV、ToMV和TuMV等病毒均无反应的ACP-ELISA检测方法。从已有报道看,目前国内外对LSV的血

清学检测方法均基于LSV多抗血清而建立的^[4-6],商品ELISA检测试剂盒也是多抗血清,然而多抗存在非特异性高、准确性和均质性差、产量有限等不足,难以满足日益增长的花卉生产中对病毒的检测需求。本研究首次研制了LSV特异性单克隆抗体,其具有特异性强、均质性好、可无限量生产等优点,从而使以单克隆抗体建立的ACP-ELISA血清学方法具有准确性强、易标准化和大规模生产等特点。我们应用LSV单抗的ACP-ELISA方法对采自浙江丽水地区的53个百合样品进行了检测,有25个样品检测到该病毒,侵染率达47.2%,表明LSV是田间百合上存在的最主要病毒种类之一。尽管少有文献报道LSV在我国的发生^[3],但随着各地百合种球的大量引进,LSV在我国百合上普遍发生是一个不争的事实。LSV对百合的侵染一直没有引起重视的原因可能是当LSV单独侵染时表现为隐症,不被人们所注意,当LSV与其他病毒复合侵染出现明显的生物学症状,造成重大经济损失时,人们又认为是与LSV复合侵染的病毒单独作用的结果。LSV单克隆

抗体的获得及检测方法的建立,将为该病毒病的快速诊断、抗病育种和脱毒种球种生产提供技术支持,同时为研究 LSV 侵染寄主的分子机理打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Choi S A , Ryu K H . The complete nucleotide sequence of the genome RNA of lily symptomless virus and its comparison with that of other carlaviruses . *Arch Virol* ,2003 ,**148**(10):1943 - 1955 .
- [2] Ahn H I , Ryu J H , Kim J K , *et al* . Nucleotide sequence analysis of the 3'-terminal region of two Korean isolates of lily symptomless Carlavirus and expression of the coat protein in *E. coli* . *Mol Cells* , 1999 ,**9**(3) 338 - 343 .
- [3] Zheng H Y , Chen J , Zhao M F , *et al* . Occurrence and sequences of lily mottle virus and lily symptomless virus in plants grown from imported bulbs in Zhejiang province , China . *Arch Virol* ,2003 ,**148**(12) 2419 - 2428 .
- [4] Beijersbergen J C M , van der Hulst C T C . Detection of Lily symptomless virus (LSV) in bulb tissue of lily by means of ELISA . *Acta Hort* ,1980 ,**109** :487 - 493 .
- [5] Kim J Y , Choi S T , Hsu H T . Comparison of detection efficiency of lily symptomless virus in lily bulbs by ELISA , DBIA and tissue blotting method . *J Korean Soc Hort Sci* ,1995 ,**36** :560 - 566 .
- [6] Benetti M P , Tomassoli L . Research on lily symptomless virus in Italy : purification and serology . *Informatore Fitopatologico* , 1988 , **38** :51 - 55 .
- [7] Hsu H T , Kim J Y , Lawson R H . Purification of lily symptomless carlavirus and detection of the virus in lilies . *Plant Disease* , 1995 , **79** :912 - 916 .
- [8] 青 玲 ,吴建祥 ,戚益军 ,等 . 蚕豆萎蔫病毒单克隆抗体的研制及检测应用 . *微生物学报* ,2000 **40**(2):166 - 173 .
- [9] 吴建祥 ,林福呈 ,李德葆 ,等 . 稻瘟病菌单克隆抗体的研制及其对附着胞形成的影响 . *微生物学报* ,2000 **40**(6):638 - 645 .
- [10] 施曼玲 ,吴建祥 ,郭 维 ,等 . 芜菁花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用 . *微生物学报* ,2004 **44**(2):185 - 188 .
- [11] 陈伯权 ,吴美英 ,叶群瑞 . 几种部分纯化单克隆抗体方法的比较 . *病毒学报* ,1990 **10**(2):122 - 126 .
- [12] 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):454 - 457 .
- [13] Jiang J X , Chen Z X , Zhou X P . Production of a monoclonal antibody to sugarcane mosaic virus and its application for virus detection in China . *J of Phytopathology* ,2003 ,**15**(6):361 - 364 .

Production of monoclonal antibodies to *Lily symptomless virus* and application in lily virus detection

WU Jian-xiang¹ LIU Cheng-ke¹ HONG Jian^{1*} LIU Wen-hong² YE Mei-qing³

(¹ Institute of Biotechnology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

(² Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine , Hangzhou 310053 , China)

(³ Agriculture Bureau of Lishui , Lishui 323000 , China)

Abstract : Four hybridoma cell lines , 2A2 , 5H9 , 5H2 and 5E12 , secreting monoclonal antibodies (MAbs) against *Lily symptomless virus* (LSV) were produced by fusing mouse myeloma cells (SP2/0) with spleen cells from BALB/C immunized by the LSV particles . The four MAbs could specifically react with LSV . The titres of ascitic fluids of the four MAbs are up to 10^{-6} in ELISA . Isotypes and subclasses of 5H9 and 5E12 belong to IgG1 while those of 2A2 and 5H2 belong to IgG3 . Isotypes of light strains of the four MAbs all belong to κ . The four MAbs were used in antigen-coated plate (ACP)-ELISA for LSV detection , and ACP-ELISA could successfully detect 1.8 ng of purified LSV or virus in plant sap diluted 1 300 . The presence of LSV in field lily tissues was investigated with ACP-ELISA .

Key words : *Lily symptomless virus* , Monoclonal antibodies , ACP-ELISA

Foundation item : Project for the Science and Technology of Zhejiang Province (2002C32128) ; The Ministry Science and Technology Fund (02EFN213300269)

* Corresponding author . Tel : 86-571-86971179 ; E-mail : jhong@zju.edu.cn

Received date 03-04-2005