

抗黄瓜花叶病毒单克隆抗体细胞株的建立 及其抗体鉴定

谷登峰 陈文彬 伊来提 龚成润

(新疆畜牧科学院兽医研究所, 乌鲁木齐)

康良仪 邱并生 张秀华 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

陈 京 张成良

(农牧渔业部植物检疫所, 北京)

用黄瓜花叶病毒(CMV)免疫的 BALB/C 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag-14, 经 5 次细胞融合, 6 次有限稀释, 获得 1 株 6 个稳定分泌 CMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞培养物, 所分泌的单克隆抗体均属 IgM 亚类。试验结果证明, 6 个单克隆抗体对 CMV 是特异的, 对 CMV-Q、CMV-P 和 CMV-B 呈阳性反应, 对 CMV-6 和番茄不孕病毒(TAV)呈阴性反应, 对所用的其他 8 种植物病毒: 南瓜花叶病毒(SqMV)、绒毛烟斑驳病毒(VTMoV)、大毒条纹花叶病毒(BSMV)、马铃薯病毒 X(PVX)、马铃薯病毒 Y(PVY)、玉米矮缩花叶病毒(MDMV)、大豆花叶病毒(SMV)和烟草花叶病毒(TMV)均无交叉反应。

关键词 黄瓜花叶病毒; 单克隆抗体

1975 年 Köhler 和 Milstein^[1] 首先证明, 可利用杂交瘤细胞建立能产生特异抗体, 并在体外连续培养的细胞株。这种杂交瘤细胞株, 每株只合成同种类型或单克隆免疫球蛋白, 即单克隆抗体。它具有纯度高、特异性强等优点。由于利用这种杂交瘤细胞生产抗体, 比从免疫动物获得抗体具有独特的优越性, 因此引起医学和生物学的重视, 这项技术也得到迅速普及。目前, 已在医学、生物学、分子生物学、兽医和农业上广泛应用^[2-4]。

近年来, 我国在医学界已获得了几种病毒的单克隆抗体, 农业上也获得了 TMV^[6,7]、PVY 的单克隆抗体。它们在病毒病的诊断和鉴定上有重要的应用价值。

CMV 的寄主范围很广, 它能侵染和危害的植物有 85 科 775 种^[5], 包括粮食作

物、蔬菜、果树、牧草和观赏植物等。在我国, CMV 的毒株有多少尚不清楚, 在病毒鉴定和植物检疫工作中, 急需专一的病毒抗体。目前, 国内外尚未见有这方面的报道。我们利用 CMV 为抗原, 建立了抗 CMV 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

材 料 和 方 法

(一) 抗原

用 CMV 番茄分离物作抗原。病毒接种在三生烟 (*Nicotiana tabacum* var. *samsun* NN) 上繁殖。接种后置防虫温室, 20—25℃, 自然光照。

接种后第 9 天收获感病叶, 在 0.5M 柠檬酸钠缓冲液 (pH6.7) 中, 用高速组织捣碎机匀浆,

本文于 1985 年 7 月 22 日收到。

承新疆军区总医院石磊主任的指导 and 帮助, 特此致谢。

8,000r/min 离心 20 分钟, 上清液经两次高低速交叉离心 ($105,000 \times g$ 2 小时, $10,000r/min$ 15 分钟), 提纯病毒用于免疫动物。

用于交叉反应的病毒有 4 个 CMV 株系和一个 CMV 组中的病毒: CMV-Q、CMV-P、CMV-B、CMV-6 和 TAV。其他 8 种植物病毒: SqMV、VTMoV、BSMV、PVX、PVY、MDMV、SMV、TMV。

(二) 骨髓瘤细胞

SP2/0-Ag-14 细胞株系新疆军区总医院免疫室赠送。用 RPMI-1640 培养液 (20% 新生牛血清、100mM 丙酮酸钠、200mM 谷氨酰胺、100mM HEPES、100 单位/ml 青链霉素, pH6.8—7.0) 培养, 取对数生长期细胞进行细胞融合。

(三) BALB/C 小鼠

BALB/C 小鼠购自中国科学院上海细胞生物学研究所。选用 8—12 周龄, 经血清学测定合格的雌性鼠免疫。

(四) 杂交瘤细胞的获得及其克隆化

1. BALB/C 小鼠免疫: 用提纯的 CMV (8.2 mg/ml), 第一次加福氏完全佐剂乳化, 腹腔注射, 每只鼠 0.2ml (含病毒 1mg)。间隔一周后, 第二、三次加半佐剂乳化, 腹腔注射, 每只鼠 0.2ml (含病毒 1mg)。间隔一周后, 第四次不加佐剂尾静脉注射, 每只鼠 0.5mg 病毒, 注射后 3 天取小鼠脾脏, 制成脾细胞悬液。

2. 细胞融合: 将 10^6 脾细胞与 2×10^7 骨髓瘤细胞悬液 (各 5ml) 充分混合, $1,000r/min$ 离心 10 分钟, 弃上清液, 将沉淀的细胞松散, 徐徐加入 50% PEG (聚乙二醇, 分子量 4,000), 1 分钟内完成操作。静置 1 分半钟后, 加入无血清的 RPMI-1640 培养液, $1,000r/min$ 离心 10 分钟, 迅速移去上清液, 加入含 1% HT 和 20% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液 (约 10ml)。将细胞悬匀, 植入 24 孔细胞培养板中, 每穴 0.5ml, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 24 小时后, 补加氨基嘌呤。

3. 杂交瘤细胞筛选和克隆化: 通常在细胞融合后培养两周, 用 ELISA 双抗体夹心法检测。在酶标仪上, 用 492nm 波长测吸收值, A 值比对照大二倍以上者判为阳性反应。

在第五次细胞融合中, 获得 3 个阳性反应

孔, 取其中反应较强者 3B-2 进行扩大培养和有限稀释, 植入培养板后镜检。将有单个细胞的孔穴作记号, 培养 2—3 周后, 按上述方法用 ELISA 检测。选出的阳性穴再进行有限稀释培养。经过 6 次有限稀释, 获得 6 个分泌 CMV 抗体的单克隆杂交瘤细胞培养物。分别定名为 2A₈、B₁₁、C₄、2C₉、2C₁₁ 和 D₁₁。

经过连续传代培养或在液氮冷藏后复苏再连续培养, 6 个月后仍能稳定分泌 CMV 特异的抗体。

将 C₄ 杂交瘤细胞培养物腹腔注射 BALB/C 小鼠, 约一周后取腹水, 用 ELISA 法测得其抗 CMV 滴度为 1:20,480。

结 果

(一) 杂交瘤细胞的染色体计数

选用 C₄ 杂交瘤细胞株进行核型分析, 计染色体数^[8]。将 C₄ 杂交瘤细胞和骨髓瘤细胞分别培养 24 小时, 按 $1\mu\text{g/ml}$ 加入秋水仙素, 37°C 6 小时。离心, 弃上清液, 加 8ml 75mM KCl (在 37°C 预先保温), 将细胞摇匀, 室温下放置 33 分钟。离心, 弃上清液, 加入 8ml 固定液 (甲醇:冰醋酸 = 3:1)。30 分钟后离心, 弃上清液, 再加固定液固定 30 分钟, 离心, 弃上清液。将沉淀的细胞制片, 用姬姆萨染色液染色, 镜检计数。结果表明, 骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag-14 的染色体平均为 65 条, 杂交瘤细胞染色体为 84—110 条, 表明为融合细胞。

(二) 抗 CMV 单克隆抗体特性

将所获得的 6 个分泌 CMV 单克隆抗体杂交瘤细胞培养物: 2A₈、B₁₁、C₄、2C₉、2C₁₁ 和 D₁₁ 分别扩大培养。收集无细胞上清液, 用 50% 饱和度硫酸铵沉淀浓缩, $1,000r/min$ 离心 15 分钟, 沉淀悬浮在 0.1M PBS 中, 并在该缓冲液中充分透析后, 分别在 280nm 和 260nm 波长测 A 值。按下式计算蛋白质含量: $1.45 \times A_{280\text{nm}} - 0.74 \times A_{260\text{nm}} = \text{mg 蛋白/ml}$ 。将所得到的样品用

于以下各项试验。

1. 单克隆抗体亚型分析: 标准兔抗鼠 IgG 1、IgG 2 b、IgG 3 和 IgM 系从 Miles 公司购买。用琼脂免疫双扩散法将 6 个抗 CMV 的单克隆抗体分亚型。结果表明, 6 个细胞培养物分泌的单克隆抗体只与 IgM 产生清晰的沉淀线, 而与 IgG 1、IgG 2b 和 IgG 3 均不反应。因此所获得的 6 个单克隆抗体属于 IgM 亚型。用琼脂免疫双扩散法测定的 6 个单克隆抗体与 IgM 免疫沉淀结果见图 1。

2. 阻断试验: 将提纯的 CMV 抗原, 用 0.1M 碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 稀释成不同浓度包被, 进行 ELISA 测定。加 1:8 稀释的兔抗 CMV 多克隆抗体封闭, 37℃ 反应 120 分钟后, 用 PBS 洗三次, 再按 500 μg/ml 分别加入 6 个杂交瘤细胞培养物分泌的单克隆抗体, 37℃ 反应 120 分钟后, 用 PBS 洗三次, 加酶标记的兔抗鼠抗体, 加底物反应后, 在 492nm 波长下测 A 值。表 1

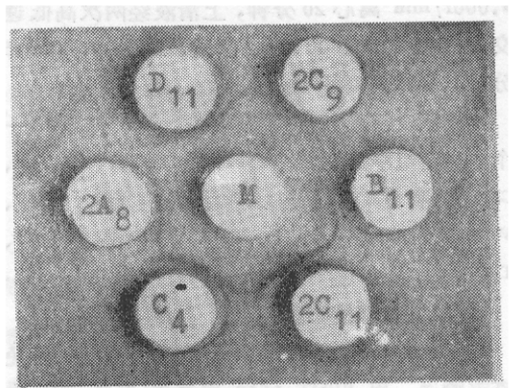


图 1 6 个单克隆抗体与 IgM 免疫沉淀反应
Fig. 1 Immunoprecipitation reaction of 6 monoclonal antibodies with IgM

结果表明, 在供试条件下, 未封闭的对照 (不加兔抗 CMV 多克隆抗体), 即使 CMV 抗原浓度稀释至 0.5ng/ml, 6 种单克隆抗体均能与 CMV 抗原反应, 而在试验的各抗原浓度下均能被 1:8 稀释的兔抗 CMV 血清阻断。

3. 中和试验: 抗原 (浓度 50 μg/ml) 与

表 1 阻断试验
Table 1 Blocking test

McAb	处 理 Treatment	抗原浓度 (ng/ml) Antigen concentration					
		50000	5000	500	50	5	0.5
2A ₃	对照	1.40	1.40	1.40	1.20	0.88	0.88
	试验	0.27	0.25	0.24	0.20	0.20	0.22
B ₁₁	对照	1.30	1.30	1.30	1.30	1.00	0.55
	试验	0.15	0.19	0.12	0.10	0.20	0.15
C ₄	对照	1.20	1.30	1.30	0.80	0.98	0.30
	试验	0.17	0.17	0.14	0.15	0.20	0.13
2C ₉	对照	1.50	1.50	1.50	1.40	1.20	0.65
	试验	0.19	0.19	0.17	0.17	0.14	0.17
2C ₁₁	对照	1.10	1.20	1.20	1.20	0.70	0.75
	试验	0.20	0.18	0.16	0.16	0.15	0.16
D ₁₁	对照	1.20	1.20	1.20	1.20	0.74	0.35
	试验	0.17	0.17	0.17	0.18	0.22	0.22

注: McAb 浓度: 500 μg/ml, 对照为未阻断, 试验为阻断, 用 ELISA 法测定。
McAb concentration: 500 μg/ml. Rabbit-antisera (dilution) 1:8 to CMV was used in the exp.
Control: no blocking. Exp.: blocking. Detected by ELISA.

单克隆抗体 (用 pH7.2 0.1M PB 稀释成 500 μ g/ml) 等体积混合, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 小时。对照用 pH7.2 0.1MPB 代替单克隆抗体稀释液, 在同样条件下处理。在 CMV 局部病斑寄主绿豆 (*Phaseolus aureus*) 上, 半叶法接种 5 片叶, 4 天后计算病斑数。表 2 结果说明, 在供试条件下, CMV 抗原经 6 个单克隆抗体中和后, 完全丧失了侵染能力。

4. 病毒株系的特异性: 用 CMV-Q、CMV-P、CMV-B、CMV-6 和 TAV (属黄

瓜花叶病毒组), 比较了 6 个杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体的病毒株系特异性。表 3 结果说明, 6 个单克隆抗体与 CMV-Q、CMV-P 和 CMV-B3 个毒株均有明显反应, 而与 CMV-6 和 TAV 均无反应。

将 C₄ 杂交瘤细胞的单克隆抗体 (C₄McAb) 进行不同浓度稀释, 分别与 CMV-Q、CMV-P、CMV-B、CMV-6 和 TAV 反应, 用 ELISA 法测定。结果(图 2)表明, 在供试的病毒浓度下, 当抗体浓度为 0.5 μ g/ml 时, CMV-Q、CMV-P 和 CMV-B

表 2 中和试验
Table 2 Neutralization test

McAb	枯斑总数/5片半叶 Local lesion No. /5 half leaves	
	对 照 Control	试 验 Exp.
2A ₁	90	0
B ₁₁	70	0
C ₄	70	0
2C ₁	45	0
2C ₁₁	45	0
D ₁₁	40	0

注: 抗原浓度 50 μ g/ml, 抗体浓度 500 μ g/ml, 抗原与抗体在 37 $^{\circ}$ C 反应 3 小时。测试寄主: 绿豆。
Antigen concentration: 50 μ g/ml; McAb concentration: 500 μ g/ml. Antigen reacted with antibodies for 3 h at 37 $^{\circ}$ C. Test host: *Phaseolus aureus*.

表 3 6 个杂交瘤细胞培养物的单克隆抗体与 CMV 不同株系反应
Table 3 Reaction of six monoclonal antibodies with different strains of CMV

McAb 病 毒 Virus	2A ₂	B ₁₁	C ₄	2C ₁	2C ₁₁	D ₁₁	对 照 Control
CMV-Q	++	++	++	+++	+++	++	-
CMV-P	++	++	++	+++	+++	++	-
CMV-B	++	++	++	++	++	++	-
CMV-6	-	-	-	-	-	-	-
TAV	-	-	-	-	-	-	-

注: 病毒起始浓度为 50 μ g/ml, 10 倍稀释到第 6 孔; McAb 浓度为 500 μ g/ml。阴性反应对照 A 值的 1.5 倍判断为阳性反应。+++ 表示反应达第三个稀释孔; ++ 表示反应达第二个稀释孔。
Original concentration of virus: 50 μ g/ml, dilution (each 10 \times) to sixth well; McAb concentration: 500 μ g/ml. 1.5 \times A of control was decided +; +++ Reaction to third well; ++ Reaction to second well. Detected by ELISA.

表 4 6 个杂交瘤细胞培养物的单克隆抗体与 8 种其他病毒的交叉反应

Table 4 Cross-reaction of six monoclonal antibodies with other 8 species of plant viruses

病毒 Virus	McAb	2A ₁	B ₁₁	C ₄	2C ₁	2C ₁₁	D ₁₁	对 照 Control
SqMV		±	—	—	—	—	—	—
VTMoV		—	—	—	—	—	—	—
BSMV		±	—	—	—	—	—	—
PVX		—	—	—	—	—	—	—
PVY		—	—	—	—	—	—	—
MDMV		—	—	—	—	—	—	—
SMV		—	—	—	—	—	—	—
TMV		—	—	—	—	—	—	—
CMV		+	+	+	+	+	+	+

注：病毒起始浓度为 50 μg/ml，10 倍稀释到第 6 孔，McAb 浓度为 20 μg/ml，用 ELISA 法测定。

Original concentration of virus: 50 μg/ml, dilution (each 10×) to sixth well, McAb concentration: 20 μg/ml. Detected by ELISA.

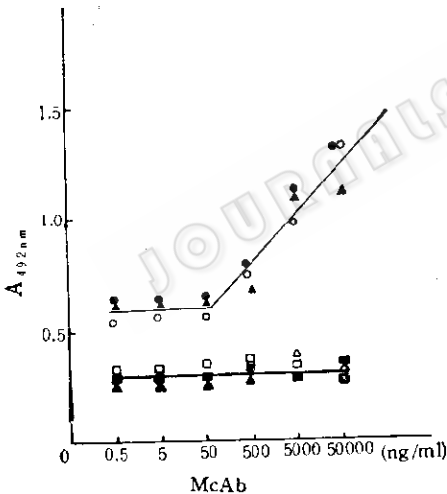


图 2 C₄ 单克隆抗体与 CMV 不同株系的反应

Fig. 2 Reaction of C₄ monoclonal antibody with different strains of CMV

●—● CMV-Q ○—○ CMV-P ▲—▲ CMV-B
△—△ CMV-6 ■—■ TAV □—□ 对照 Control
病毒浓度 Virus concentration: 50 μg/ml

有明显反应，抗体浓度在 0.5—50 μg/ml 时，A 值呈直线增长。CMV-6 和 TAV 与 C₄McAb 均无反应。此结果与表 3 结果一致。

5. 6 个杂交瘤细胞培养物分泌的单克隆抗体与其他 8 种植物病毒的交叉反应：测试了 6 个杂交瘤细胞株的单克隆抗体与 SqMV、VTMoV、BSMV、PVX、PVY、MDMV、SMV 和 TMV 的交叉反应，用 ELISA 法测定。表 4 结果说明，6 个单克隆抗体与 8 种植物病毒均不呈交叉反应，只与 CMV 呈阳性反应。

讨 论

试验所获得的 6 个杂交瘤细胞培养物分泌的单克隆抗体属于 IgM 亚类，经连续培养或液氮冷藏后复苏，再连续培养仍能稳定分泌抗 CMV 的单克隆抗体。用 ELISA 法测得 C₄ 细胞培养物注射的 BALB/C 鼠所得腹水的滴度达 1:20480。

阻断试验、中和试验和与不同病毒的交叉反应试验结果证明，6 个单克隆抗体对 CMV 是特异的，能与 CMV-Q、CMV-P 和 CMV-B 等株系呈阳性反应，但与 CMV-6 株系和同一组的 TAV 则呈阴性反应。而用 CMV 的多克隆抗体测得与

CMV 和 TAV 有某种血清学关系。6 个单克隆抗体与其他 8 种病毒也呈阴性反应。

综上所述, 6 个杂交瘤细胞培养物分泌的单克隆抗体, 能区分 CMV 组中的不同病毒, 也能区分某些株系。这在黄瓜花叶病的鉴定和植物检疫中具有一定应用价值。

参 考 文 献

[1] Köhlwe, G. and C. Milstein: *Nature*, **256**: 495,

1976.

- [2] Yelton, D. E. and M. D. Schanff: *Ann. Rev. Biochemistry*, **50**: 657, 1981.
- [3] Reading, C. L.: *J. Immunol. Methods*, **53**: 261, 1982.
- [4] Harris, H.: *Ann. Rev. Genet.*, **17**: 279, 1983.
- [5] Douine, L.: *Ann. Phytopathol.*, **11**: 439, 1979.
- [6] 张成良等: 病毒学报, **1**(1): 153, 1985.
- [7] 张成良等: 科学通报, **5**: 399, 1985.
- [8] 顾方舟等: 中华微生物学和免疫学杂志, **2**(3): 138, 1982.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CUCUMBER MOSAIC VIRUS

Gu Dengfeng Chen Wenbin Yi Laiti Gong Chengrun

(*Institute of Veterinary, Xingjing Academy of Husbandry, Ürümqi*)

Kang Liangyi Qiu Bingsheng Zhang Xiuhua Tian Bo

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Chen Jing Zhang Chengliang

(*Institute of Plant Quarantine, Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fishery, People's Republic of China, Beijing*)

Six monoclonal antibodies to CMV were obtained by fusion of SP 2/0 myeloma cells with spleen cells from BALB/C mice immunized with CMV. They belong to IgM subgroup.

The blocking test, neutralization test and cross-reaction with different viruses showed that six monoclonal antibodies were specific to CMV, cross-reacted with CMV-Q, CMV-P,

and CMV-B, but did not with CMV-6 and TAV. They did not cross-reacted with other 8 species of plant viruses used.

Key words

Cucumber mosaic virus; Monoclonal antibodies