

建兰花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用

孟春梅^{1**} 吴建祥^{1**} 谢礼¹ 郑锦凯² 洪健^{1*}

(¹ 浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

(² 浙江森禾种业股份有限公司 杭州 310020)

摘要 :用建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)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 3 株能稳定传代并分泌抗 CymMV 单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞(2C6、5B7 和 12G9),分别制备它们的单抗腹水。其中 5B7 和 12G9 2 株单克隆抗体腹水间接 ELISA 效价达 10^{-6} , 3 株单抗的抗体类型及亚类均为 IgG1, 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 CymMV 的方法。蝴蝶兰病叶作 1:10240 倍稀释、提纯 CymMV 病毒浓度为 4.87ng/ml(每孔的病毒绝对量为 0.487ng)时,该方法仍能检测到病毒。利用 ACP-ELISA 方法检测了田间样品,发现 CymMV 在兰花上发病很普遍。

关键词 :建兰花叶病毒;单克隆抗体;ACP-ELISA

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)05-0928-04

建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)属线形病毒科(*Flexiviridae*) 马铃薯 X 病毒属(*Potexvirus*) 病毒粒子呈线状,长 475nm ~ 490nm,直径 13nm,螺旋对称结构,是兰科植物中发生最广泛为害最严重的病毒之一^[1,2]。CymMV 在各兰花品种上引起花叶、坏死、叶脉褪绿、条斑等症状,当与齿兰环斑病毒(ORSV)复合侵染时可导致植株矮化,叶片畸形等重症,严重影响其经济价值和观赏价值。目前,国内外检测 CymMV 主要采用酶联免疫吸附测定(ELISA)^[2-7]和 RT-PCR 技术^[8,9],Tanaka 等还使用快速免疫滤纸测定法从有症状或症状不明显的兰花样品中检测到该病毒^[10]。国内近年来随着兰花产业的扩大,兰花新品种不断引进,病毒病日益严重。各地采用加强出入境检疫、组织培养脱毒和抗病毒基因工程等手段来控制兰花病毒,同时建立了以 ELISA 和 RT-PCR 为主的病毒检测技术^[11-13]。由于 ELISA 检测中常使用的多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,RT-PCR 技术又不适用于大规模检测,因而需要建立一种快速、准确、简便的检测方法,为该病毒病的诊断、抗病育种和脱毒种苗生产提供技术支持。为此,我们制备了 CymMV 的单克隆抗体,并建立了抗原包被间接 ELISA(ACP-ELISA)检测方法,对田间兰花样品进行了检测应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 :CymMV 采集于浙江森禾种业股份有限公司海

宁花卉基地的蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)、蚕豆萎蔫病毒 1(BBWV 1)、蚕豆萎蔫病毒 2(BBWV 2)、香石竹斑驳病毒(CarMV)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、烟草花叶病毒(TMV)、中国番茄花叶病毒(TYLCCNV)、百合无症病毒(LSV)、茼蒿花叶病毒(TuMV)、中国番茄黄化曲叶病毒(TYLCCNV)和黄瓜花叶病毒(CMV)均由本实验室鉴定保存。

1.1.2 培养基和抗体 :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 产品。CymMV 兔多抗血清由福建农林大学吴祖建教授惠赠。

1.1.3 主要仪器 :880 酶联免疫检测仪(BIO-RAD)

1.2 建兰花叶病毒的提纯

采集到的蝴蝶兰病叶先用负染色法进行电镜观察,筛选出含有线状病毒粒子的病叶,再用 CymMV 抗血清进行间接 ELISA(I-ELISA)检测。阳性样品以曼陀罗(*Datura stramonium* L.)为枯斑寄主,3 次单斑分离后,在曼陀罗上进行繁殖。病毒提纯参照 Hu 等的方法^[3]稍加改进,在离心管底部加 20% 的蔗糖溶液垫。病毒提纯液经 2% 磷钨酸(pH 6.7)负染色后置日本 JEOL 公司的 JEM-1230 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^[14]报道的免疫程序用纯化的 CymMV 免疫 8 周龄的 BALB/C 小鼠。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 培养基换液一次,第 10 天用 HT 培养基换液,等到融合细胞覆盖孔底 5% ~ 30% 时,

基金项目 浙江省科技厅资助项目(G20030724)

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

** 作者简介 :对本文有同等贡献。孟春梅(1983 -),女,山东泰安人,硕士研究生,从事分子植物病毒学研究,E-mail :mcm1983@126.com ; 吴建祥(1968 -),男,浙江诸暨人,副教授,主要从事免疫学和分子生物学研究,E-mail :wujx@zju.edu.cn

其他作者 :周雪平¹

收稿日期 2007-05-16 接受日期 2007-07-23 修回日期 2007-08-08

取上清用 I-ELISA 方法筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原分别为提纯的 CymMV、蝴蝶兰病叶和曼陀罗病叶汁液(1:30 稀释),并以蝴蝶兰、曼陀罗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吴建祥等的方法^[15]进行,采用辛酸-硫酸铵方法^[16]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

Sigma 公司的羊抗鼠捕获抗体包被 96 孔酶标板,3 株杂交瘤细胞上清液为一抗,3000 倍稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA 和 IgM 标准抗血清为二抗,按照试剂盒的说明进行三抗体夹心酶联免疫吸附检测(TAS-ELISA),判断 3 株单克隆抗体的抗体类型及亚类。以提纯病毒(1 μ g/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 I-ELISA 测定单克隆抗体的腹水效价。

1.6 Western blot 检测

参照吴建祥等^[15]的方法,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滤膜与不同的腹水单抗进行 Western blot 分析。

1.7 ACP-ELISA 检测 CymMV 的方法

参照 Jiang 等^[17]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 100 μ L/孔加入 ELISA 板,CymMV 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,硝基磷酸盐(PNPP)为底物,用 680 酶联免疫检测仪测 OD₄₀₅ 值,以 P/N > 3 作为阳性判断标准。

1.8 ACP-ELISA 法对 CymMV 和不同病毒的特异性测定

用提纯的 LSV、CarMV、BBWV 1、BBWV 2、PVY、TMV、TYLCCNV、ToMV、TuMV 和 CMV(1 μ g/mL)包被 ELISA 板,提纯的 CymMV 为阳性对照,缓冲液为阴性对照,用上述 ACP-ELISA 法分别测定 3 株单克隆抗体的特异性反应。

1.9 ACP-ELISA 法检测灵敏度检测

将 CymMV 蝴蝶兰病叶汁液作 1:10~1:20480 倍比稀释,提纯的 CymMV(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作阴性对照。将 5B7 单克隆抗体腹水作 5000 倍稀释后应用 ACP-ELISA 方法测定检测灵敏度。

1.10 应用 ACP-ELISA 法检测田间样品

应用 CymMV 单克隆抗体建立的 ACP-ELISA 方法对田间兰花样品进行了检测。在浙江海宁、浙江大学农场、北京、四川成都采集的蝴蝶兰、石斛兰(*Dendrobium*)、卡特兰

(*Cattleya*)、文心兰(*Oncidium*)、大花蕙兰(*Cymbidium hybridus*)、春兰(*Goering cymbidium*)样品,研磨组织汁液作 1:20 倍稀释,然后进行 ACP-ELISA 检测,用 CymMV 提纯样品作阳性对照,包被液作阴性对照。

2 结果和分析

2.1 建兰花叶病毒的提纯

从接种 CymMV 曼陀罗病叶中提纯的病毒在 JEM-1230 电镜下可观察到高浓度的线状病毒粒子(图略)。紫外吸收曲线具有明显核蛋白特征,最高吸收峰在 265nm,最低峰在 246nm 处, $A_{260}/A_{280} = 1.12$,与文献报道相近^[18]。

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/O 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。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 I-ELISA 方法检测细胞培养上清中抗体的分泌情况。选择 5 个呈强阳性反应的细胞孔,进行有限稀释法克隆,最后获得 2C6、5B7 和 12G9 共 3 株能分泌抗 CymMV 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,3 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,约 7~10d 后腹部膨大,采集腹水,之后每天取一次,每只小鼠可取 5~20mL 腹水。抗体类型及亚类鉴定结果表明(表 1),3 株单克隆抗体的抗体类型及亚类均为 IgG1,轻链均为 κ 链;其中 5B7 和 12G9 2 株单克隆抗体腹水间接 ELISA 效价达 10^{-6} 。

表 1 CymMV 单克隆抗体的特性

McAbs	Isotype	Ascites titre	IgG yield/(mg/mL)
2C6	IgG1 κ 链	10^{-5}	2.41
5B7	IgG1 κ 链	10^{-6}	8.16
12G9	IgG1 κ 链	10^{-6}	7.23

2.4 Western blot 分析

对提纯的 CymMV 进行 Western blot 分析表明,3 株单抗都能与 CymMV 的 27kDa 外壳蛋白亚基特异性结合(图 1),说明所制备的单抗是针对 CymMV 的 27kDa 外壳蛋白亚基的特异性抗体。

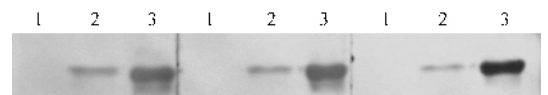


图 1 CymMV 外壳蛋白 Western blot 检测

Fig.1 Western-blot analysis of CymMV coat protein. 1: Healthy plant sap; 2: Plant sap infected with CymMV; 3: Purified CymMV.

2.5 ACP-ELISA 的特异性检测

ACP-ELISA 检测表明,3 株单抗均仅对 CymMV 有特异性反应,而与 BBWV 1、BBWV 2、CarMV、PVY、TMV、ToMV、TuMV、LSV、TYLCCNV 和 CMV 等病毒均无反应(表 2),说明这 3 株单抗建立的 ACP-ELISA 方法对 CymMV 有很好的特异性。

表 2 CymMV 单克隆抗体的特异性

Table 2 Specificities of McAbs tested by ACP-ELISA

McAbs	Virus											
	CymMV	BBWV 1	BBWV 2	CarMV	PVY	TMV	ToMV	TuMV	LSV	TYLCCNN	CMV	Healthy
2C6	3.520	0.100	0.100	0.100	0.087	0.094	0.087	0.099	0.100	0.100	0.086	0.099
5B7	3.931	0.093	0.086	0.099	0.086	0.098	0.109	0.094	0.089	0.092	0.085	0.114
12G9	3.822	0.100	0.097	0.104	0.093	0.100	0.100	0.094	0.094	0.091	0.091	0.105

2.6 检测灵敏度的确定

灵敏度检测表明,用 5B7 单克隆抗体建立的 ACP-ELISA 方法对 1:10 ~ 1:10240 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 1:10240,对纯病毒的检测灵敏度可达 4.87ng/mL,每孔的病毒绝对检出量为 0.487ng。

2.7 ACP-ELISA 的田间检测应用

应用制备的单抗和建立的 ACP-ELISA 方法对采自浙江、北京、四川等地 87 个蝴蝶兰、石斛兰、文心兰等不同兰花样品进行检测。结果发现,有 46 个样品呈阳性反应,阳性率高达 52.9%,表明兰花上 CymMV 的感染率很高。

3 讨论

本研究通过 CymMV 的动物免疫、细胞融合、筛选、克隆和腹水制备,获得了 3 株 CymMV 特异性单克隆抗体,并用这些单抗建立了对 CymMV 有特异性反应、而与其它 10 种病毒均无反应的 ACP-ELISA 检测方法。本研究研制的 CymMV 单克隆抗体具有特异性强、均质性好、可无限量生产等优点,使用该单抗建立的 ACP-ELISA 方法简便、准确性强、易标准化和大规模生产。此方法已有效地用于 CymMV 的田间检测。我们应用 CymMV 单抗 ACP-ELISA 方法对采自浙江、北京、四川等地 87 个兰花样品进行了检测,在 46 个样品中检测到该病毒,感染率高达 52.9%,表明 CymMV 是各地兰花上存在的最主要病毒之一。我国兰花产业正处于蒸蒸日上的大好发展时期,兰花的观赏价值和巨大经济效益也逐渐体现出来,但由于病毒病的影响,兰花叶片及花出现明显病症,将严重影响其经济价值。我们制备的 CymMV 单克隆抗体及建立的 ACP-ELISA 检测方法,将为该病毒病的快速诊断、抗病育种和脱毒种苗生产提供技术支持。

参 考 文 献

- [1] Zettler FW, Ko NJ, Wisler GC. Viruses of orchids and their control. *Plant Disease*, 1990, **74**(9): 621 - 626.
- [2] 明艳林,李梅,郑国华. 建兰花叶病毒研究进展. *福建农业学报*, 2005, **20**(1): 30 - 33.
- [3] Hu JS, Ferreira S, Wang M, et al. Detection of Cymbidium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Tomato spotted wilt virus, and Potyvirus infecting orchids in Hawaii. *Plant Disease*, 1993, **77**(5): 464 - 468.
- [4] Grisoni M, Davidson F, Hyrondelle C, et al. Nature, incidence, and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. *Plant Disease*, 2004, **88**: 119 - 124.
- [5] Abdulseamad N, Ari Z. The use of antibody-sensitized latex to detect cymbidium mosaic virus in orchids. *Pertanika Journal of Tropical Agriculture Science*, 1993, **16**(2): 157 - 160.
- [6] Ryu KH, Park WM. Occurrence of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in Korea. *Plant Disease*, 1995, **79**: 321 - 326.
- [7] Khentry Y, Paradomuwat A, Tantiwiwat S, et al. Incidence of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus in *Dendrobium* spp. in Thailand. *Crop Protection*, 2006, **25**: 926 - 932.
- [8] Sherpa AR, Hallan V, Pathak P, et al. Characterization of the coat protein gene of Cymbidium mosaic virus isolates from India. *J Phytopathology*, 2006, **154**: 275 - 280.
- [9] Chung SY, Yoon KE, Ryu KH, et al. Detection of Cymbidium mosaic virus from orchids by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of viral coat protein and 3'-noncoding region sequence. *J Kor Soc Hort Sci*, 1996, **37**(1): 158 - 165.
- [10] Tanaka S, Nishii H, Ito S, et al. Selection of cymbidium mosaic potexvirus and odontoglossum ringspot tobamovirus from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. *Plant Disease*, 1997, **81**: 167 - 170.
- [11] 潘俊松,刘志昕,郑学勤. 建兰花叶病毒的分离、鉴定及检测研究. *热带作物学报*, 1997, **18**(1): 63 - 69.
- [12] 明艳林,郑国华,李梅. 建兰花叶病毒厦门分离物的鉴定及其抗血清的制备与应用. *植物病理学报*, 2005, **35**(4): 366 - 369.
- [13] 周国辉,陈晓琴,李梅辉,等. 广东地区两种兰花病毒病害的分子鉴定及检测. *中国病毒学*, 2004, **19**(2): 149 - 152.
- [14] 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.
- [15] 吴建祥,王贵珍,洪健,等. 香石竹斑驳病毒单克隆抗体的制备及检测应用. *微生物学报*, 2005, **35**(4): 322 - 326.
- [16] 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, **6**(2): 122 - 126.
- [17] Jiang JX, Chen ZX, Zhou XP. Production of a monoclonal antibody to sugarcane mosaic virus and its application for virus detection in China. *J Phytopathology* 2003, **151**: 361 - 364.
- [18] Frowd JA, Tremaine JH. Physical, chemical, serological properties of Cymbidium mosaic virus. *Phytopathology*, 1977, **67**: 43 - 49.

Production of monoclonal antibodies to *Cymbidium mosaic virus* and application in Orchids virus detection

MENG Chun-mei^{1**}, WU Jian-xiang^{1**}, XIE Li¹, ZHENG Jin-kai², HONG Jian^{1*}

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

(² Zhejiang Senhe Seed Co. Ltd., Hangzhou 310020, China)

Abstract: Three hybridoma cell lines, 2C6, 5B7 and 12G9, secreting monoclonal antibodies (McAbs) against *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) were produced by fusing mouse myeloma cells (SP2/0) with spleen cells from BALB/C immunized by the CymMV particles. The three McAbs could specifically react with CymMV. The titres of ascitic fluids of two McAbs are up to 10^{-6} in I-ELISA. Isotypes and subclasses of the three McAbs belong to IgG1. Isotypes of light chains of the three McAbs all belong to κ . They were used in antigen-coated plate (ACP)-ELISA for CymMV detection, and ACP-ELISA could successfully detect 0.487 ng of purified CymMV or virus in plant sap diluted 1:10240. The presence of CymMV in field Orchids tissues was investigated with ACP-ELISA.

Keywords: *Cymbidium mosaic virus*; monoclonal antibodies; ACP-ELISA

Foundation item: Project for the Science and Technology of Zhejiang Province (G20030724)

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

** These authors contributed equally to this work.

Other author: ZHOU Xue-ping¹

Received: 16 March 2007/Accepted: 23 July 2007/Revised: 8 August 2007