



分泌抗甘薯羽状斑驳病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株构建及抗体初步应用

李汝刚 薛爱红 朱笑梅 蔡少华

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京)

甘薯羽状斑驳病毒(Sweet Potato Feathery Mottle Virus, SPFMV), 粒体条状, 长800—850nm, 不仅通过甘薯块根传播, 而且被多种蚜虫非持久性传播, 在世界甘薯产区均有发生, 引起甘薯叶片明脉, 脉带, 褪绿斑及紫色羽状纹等症状, 是我国甘薯产区的主要病毒之一[1-2]。

由于 SPFMV 在植物体内含量低, 提纯困难, 给抗SPFMV的血清制备造成了困难, 严重影响了对这一病毒的诊断, 限制了抗病毒品种的筛选及茎尖脱毒工作的开展。发展快速、灵敏的检测技术已成为我国研究和防治SPFMV的关键因素。因此建立稳定、持久地分泌抗SPFMV的单克隆抗体杂交瘤细胞株具有极其重要的意义。作者在分离、鉴定 SPFMV 的基础上[3], 制备了抗 SPFMV的单克隆抗体, 本文报道细胞株的构建及抗体的初步应用结果。

材料和方法

(一) 抗原来源

用于免疫和筛选的抗原——SPFMV-RC 株由美国北卡大学 J. W. Moyer 博士惠赠, SPFMV-LF 由作者从病薯叶片上分离获得。SPFMV-LF株在指示植物牵牛 (*Ipomoea nil*) 叶片上呈褪绿黄脉, (图版 I-B) 不侵染苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 及昆诺藜 (*C. quinoa*), 与 SPFMV-RC 株显著不同[4]。这两株病毒经作者繁殖后, 参考 Cali 和 Cohen[5-6] 的方法进行了提纯。

(二) 免疫

取6—8周龄, 体重20g左右的 BALB/c 小鼠3只, 每次以100 μ g 病毒的剂量腹腔注射, 第

一次加等体积福氏完全佐剂, 第二次加等体积福氏不完全佐剂, 两次注射间隔一周, 第二次免疫1周后, 用100 μ g 病毒腹腔加强免疫, 3天后取脾细胞融合。

(三) 细胞融合及克隆化培养

用无血清RPMI1640(GIBCO)培养基制备小鼠脾细胞悬液, 同时收集处于对数生长期的 Sp2/9骨髓瘤细胞, 将上述两种细胞以10:1比例混合做细胞融合, 收集融合细胞, 加入 HAT 选择性培养液(含12%条件培养液), 悬浮后分配到96孔细胞培养板。经 ELISA 检测, 阳性较强的杂交瘤细胞立即用有限稀释法克隆化。阳性克隆进行扩大培养, 收集对数生长期的杂交瘤细胞悬浮于冻存液(无血清 RPMI1640:小牛血清:二甲亚砜=7:2:1), 置液氮中长期保存。

(四) 阳性孔的检测及抗体特异性鉴定

人工接种SPFMV-RC及SRFMV-LF的牵牛 (*I. nil*)病叶汁液用 pH9.5 的碳酸盐缓冲液或 pH7.5, 0.05mol/L的TBS稀释50倍作筛选抗原, 未接种的 *I. nil*叶片汁液作阴性对照, 用间接ELISA法检测阳性孔。阳性孔经克隆化后, 用 Dot blot-ELISA鉴定抗体特异性。

(五) 抗体免疫球蛋白的类型及亚类测定

试验用兔抗BALB/c鼠 IgM、IgG、IgG2a、IgG2b、IgG3均为美国 Litton Bionetics Inc. 产品, 用琼脂双扩散测经浓缩20倍的杂交瘤培养上清液中的抗体亚类, 琼脂糖浓度为0.8%。

(六) 染色体的观察

参考文献[7]

本文于1991年11月10日收到。

本研究为国际马铃薯中心(CIP)资助项目。

本室赵海月同志协助工作, 在此致谢。

(七) 抗体的生产及初步应用

取 3 只生过小鼠的BALB/c 母鼠, 分别注射 0.5ml 降植烷, 一周后注射 10^6 个细胞/只, 待其腹部膨大后, 抽取腹水, 离心(10000r/min, Beckman, 17 号转头) 10min, 弃沉淀, 上清经 3 次硫酸铵沉淀、透析, 用于 Dot blot-ELISA 检测甘薯样品, 每个样品重复 2 次, 制样方法参考文献[2]。

结 果

(一) 杂交瘤细胞株的建立及染色体分析

经两次细胞融合, 获得 800 个杂交瘤细胞孔, 融合率达 100% (见表 1), 经用感染 SPFMV 的病叶汁液筛选从中获得 8 个阳性细胞孔, 阳性率 1%, 其中 4 个阳性杂交瘤克隆在扩大培养过程中失去分泌抗体的能力, 经对另 4 个阳性杂交瘤中的 2 个克隆化, 得到了 2 株单抗, 4H9 和 6F9。冻存一年后, 细胞长势良好, 分泌抗体能力稳定。为进一步证明细胞的稳定性, 进行了染色体分析。2 株细胞的核染色体数集中在 92—100 条之间, 证明是 BALB/c 脾细胞和 Sp2/0 骨髓瘤细胞的杂交细胞。

(二) 抗体特异性鉴定

Dot blot-ELISA 证明, 2 株细胞分泌的抗体和试验的 2 个株系——SPFMV-RC, SPFMV-LF 均有较好的反应, 而和健康对照无反应 (图板 I-A, D)。

表 1 融合率及分泌抗体杂交瘤细胞阳性率

融合次数	接种孔数	杂交瘤孔数	阳性杂交瘤数	融合率	阳性率
1	96 × 3	288	3	100%	1%
2	96 × 5	480	5	100%	1%

(三) 抗体免疫球蛋白亚类及抗体效价

结果详见表 2

表 2 抗体免疫球蛋白类型及抗体效价

杂交瘤	Ig 类型	杂交瘤细胞培养上清效价	腹水抗体效价
4H9	IgG2a	1:256	$1:1 \times 10^4$
6F9	IgG3	1:256	$1:1 \times 10^4$

(四) 抗体的初步应用

用抗体检测了 8 株温室保存的甘薯植株, 3 株人工接种 SPFMV-LF 的牵牛 (*I. setosa*) 及 40 株田间甘薯病株。结果表明, 3 株温室甘薯, 2 株接种的牵牛及 23 株田间病薯和抗体反应, 而健康对照无反应 (表 3, 图版 I-C, D)。

表 3 Dot blot-ELISA 检测 SPFMV 侵染的样品

样 品	总数	阳性样品数	阳性率
温室保存的样品	8	3	37.5%
人工接种 SPFMV-LF 的牵牛	3	2	66.7%
来自大田的甘薯样品	40	23	57.5%

讨 论

在筛选阳性杂交瘤孔时, 一般都用纯化的抗原作筛选抗原, 而本实验用病叶汁液代替纯化病毒筛选阳性孔获得成功, 这不仅省去了大量时间、人力去繁殖提纯病毒, 而且避免了由于提纯过程中某些抗原决定簇的变化, 导致所得单抗不适于田间样品测定的现象^[8]。

本实验仅用了 2 个株系, 关于抗体的特异性尚有待于用国内外其它的 SPFMV 分离物进行鉴定。就检测的样品而言, 凡多抗检测呈阳性反应的样品, 单抗检测也呈阳性反应, 证明该单抗具有较广的检测谱, 可用于田间大量样品的检测, 具有应用前景。本项研究在国内外属首次报道。

参 考 文 献

- [1] Moyer, J. W. and Salazar L. F.: *Plant Disease*, 73(6):451—455, 1989.
- [2] 李汝刚等: 植物病理学报, 20(3):189—194, 1990.
- [3] 李汝刚等: 植物病理学报(印刷中).
- [4] Moyer, J. W. and Kennedy, G. G.: *Phytopathology*, 68:998—1004, 1978.
- [5] Cali, B. B. and Moyer, J. W.: *Phytopathology*, 71:302—305, 1981.
- [6] Cohen, J. et al.: *Phytopathology*, 78:809—811, 1988.
- [7] 河北师大等: 遗传学实验, 人民出版社 pp.9—10, 1982.
- [8] Jaegle, M. et al.: *Journal of Virological Methods*, 11:189—198, 1985.

Construction of Hybridomas Secreting Monoclonal Antibodies Against Sweet Potato Feathery Mottle Virus and Use of Antibody for Detection of SPFMV

Li Rugang Xue Aihong Zhu Xiaomei Cai Shaohua

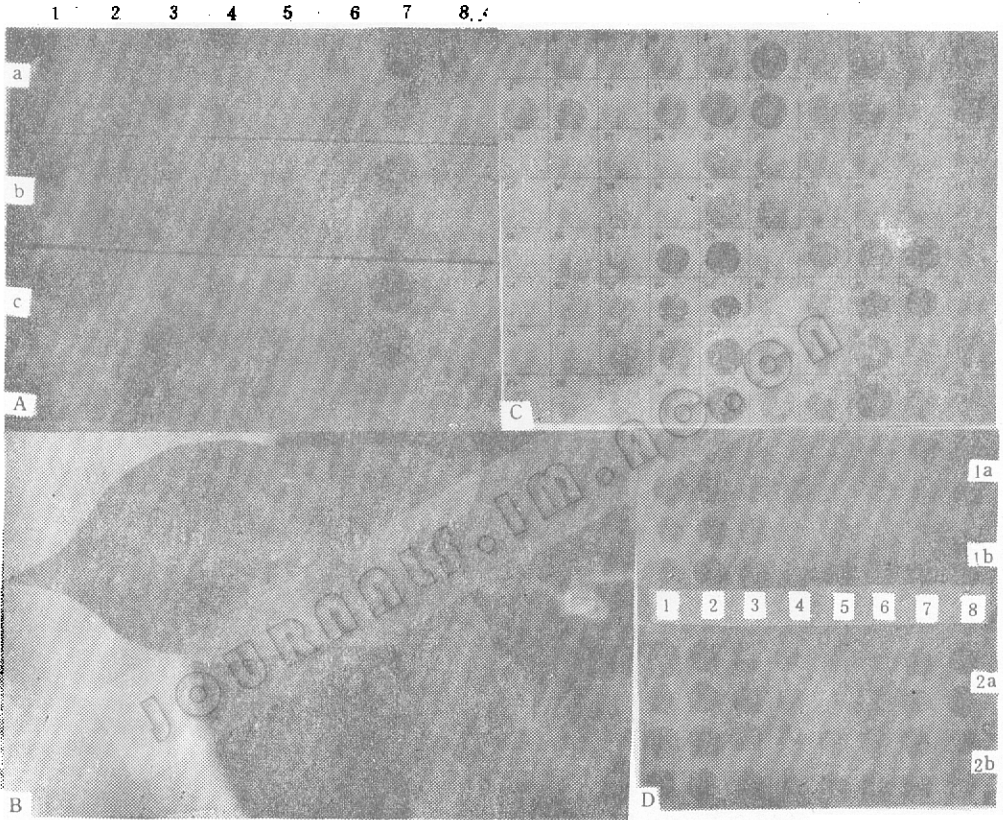
(*Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing*)

Two hybridomas stably secreting monoclonal antibodies (MCAs) against sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) were constructed by fusing mouse myeloma (Sp2/0-Ag14) with mouse splenocytes immunized with SPFMV-LF. MCAs secreted by the two hybridomas specifically reacted with both SPFMV—LF (China strain) and SPFMV—RC (American strain) in Dot blot-ELISA. A large amount of MCA was produced with BALB/c mice. The titre of hybridoma cultured supernatant was 1:256, and that of ascitic fluids was $1:1 \times 10^4$. Immunoglobulins of MCAs were IgG2a and IgG3 respectively. The detection of SPFMV-infected sweet potato plants with MCAs confirmed that the MCAs obtained in this test were desirable for large scale routine surveys of SPFMV. The study on construction of hybridomas and detection of SPFMV using MCAs were the first report in the world.

Key words

Sweet potato feathery mottle virus; hybridomas; monoclonal antibody

LI Rugang, et al; Construction of hybridomas secreting monoclonal
antibodies against Sweet Potato Feathery Mottle
virus and use of antibody for detetion of SPFMV



- A. a. 抗SPFMV-LF的多克隆抗体; b. 单抗4H9; c. 单抗6F9;
1. SPFML-RC; 2. SPFML-LF; 3,4,5. 健康的 *I. nil*; 6. 健康的 *Nicotiana glutinosa*;
7,8. 甘薯样品
- B. SPFMV-LF在 *I. nil*上引起的近绿脉带
- C. 单抗检测采自大田的样品(碱性磷酸酶系统)
- D. 上部为抗SPFMV-RC的多抗检测样品; 下部为单抗检测样品
a. 1. SPFMV-RC; 2. SPFMV-LF; 3,4. 健康的 *I. nil*; 5. 健康的 *Nicotiana glutinosa*;
6,7,8. 3个嫁接的牵牛 *I. setosa*样品
b. 8个保存于温室的样品