马铃薯 X、Y 病毒的单克隆抗体及其在马铃薯病毒检测上的应用

李汝刚 郭 军 鞠振林 朱笑梅 梁 华 王远程

(中国农业科学院生物技术研究中心 北京 100081)

1 前 言

晚疫病、环腐病、黑茎病、青枯病及病毒病是危害我国马铃薯生产的 5 种主要病害。其中病毒病发生最普遍,自 70 年代以来一直是困扰我国马铃薯生产的主要因素,引起马铃薯的退化,大幅度降低产量,马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 Y 病毒 (PVY)、马铃薯卷叶病毒 (PLRV)、马铃薯 S 病毒 (PVS) 及马铃薯块茎类病毒 (PSTV) 是中国马铃薯的 5 种主要病毒及类病毒,而且某些病毒株系分化明显。培育抗病品种及脱毒种薯是减轻病毒病危害,提高马铃薯产量的重要措施。快速、准确、灵敏、特异的病毒检测方法是提高育种速度、保证脱毒效果的关键。传统的多克隆抗体效价低,特异性差,不能区分株系,使病毒检出水平受到影响。采用细胞工程杂交瘤技术研制生产的单克隆抗体效价高,特异性强,可显著提高检测灵敏度,在马铃薯病毒检测方面具有重要的应用价值,本文是我们所作关于 PVX、PVY 单克隆抗体及应用研究的总结。

2 马铃薯 X 病毒的单克隆抗体

自 1986 年至 1989 年,用 PVX 的 5 个株系 (PVX 普通株系 PV54、PVX 轻斑驳株系

PV197、PVX-HB 株系、PVX-C 株系及 PVX-GUA 株系) 做免疫和筛选抗原,采用 2 种免疫学方法 (普通免疫及诱导耐受性免疫),经数次融合,建立了 13 株稳定分泌抗 PVX 株系特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞系。其中,1 个对 PVX 普通株系、2 个对 PVX 轻斑驳株系、3 个对 PVX-HB 及 PVX-C 株系有特异反应,其它 6 个与供试 5 个 PVX 株系均有较好的反应。

13 个杂交瘤细胞系在克隆化 3 次之后,再传代培养 20 代以上,并经液氮多次冻存、复苏以及液氮冻存 2~3 年后仍表现稳定,日前,经复苏观察,测定发现细胞仍长势良好,抗体滴度及特异性不变。测定表明:

a. 腹水抗体 ELISA 滴度达 $1:1 \times 10^5$ 以上,细胞培养上清液中的抗体滴度达 $1:256 \sim 1024$,琼脂糖双扩散证明其免疫球蛋白属 IgG 亚类。

b. 中和试验表明,随着抗体浓度的增加,PVX 的枯斑寄主千日红上的枯斑数目逐渐减少,抗体的中和滴度为 $1:10^2$ 。

c. 抗体和 PVY、TMV、TEV、AMV、TuMV、CMV 等病毒无交叉反应。

d. 抗体较稳定,耐冻融,硫酸铵沉淀、冻干。

3 马铃薯 Y 病毒的单克隆抗体

PVY 单克隆抗体的研究始于 1984 年,供试抗原为 PVY 的 3 个株系——PVY⁰、

PVY^N、PVY^C。1984 至 1985 年, 获得了 16 个稳定分泌 PVY 株系特异性单抗的小鼠杂交瘤细胞株, 1987 至 1989 年又成功地建立了 6 个分出 PVY 单抗的大鼠杂交瘤细胞株, 其中 6 个小鼠单抗、1 个大鼠单抗对 PVY^O, 4 个小鼠单抗、3 个大鼠单抗对 PVY^N, 5 个单抗对 PVY^C 有特异反应; 其它 1 个小鼠单抗, 2 个大鼠单抗对供试的 3 个 PVY 株系均有反应。测定表明:

- a. 小鼠单抗的腹水 ELISA 滴度达 1: 1×10⁵ 以上, 细胞培养上清液滴度达 1: 1024, 大鼠单抗的腹水 ELISA 滴度可达 1: 10⁴~1: 10⁵。抗体免疫球蛋白除 1 株大鼠单抗为 IgM 外, 其余所有单抗均为 IgG 亚类。
- b. 无论大鼠单抗还是小鼠单抗与 TMV、CMV、TEV、AMV、TuMV 和 PLRV 等植物病毒均无交叉反应。
- c. 通过交叉封闭试验发现 PVY^C 株系至少存在 3 个不同的抗原决定簇, PVY^O 和 PVY^N 至少各有 4 个不同的抗原决定簇。
- d. 大鼠单抗对环境、温度、离子浓度、冻干、冻融具有一定的耐性, 理化性质较稳定。

4 抗体生产

抗体生产主要在小鼠和大鼠腹腔内进行。每只小鼠平均产 5~10ml 腹水抗体, 每只大鼠平均产 30~50ml。

5 抗体的提纯及酶标记

腹水抗体经过 3 次硫酸铵沉淀, 透析 3 次 (有一次过夜), Sephadex G200 柱层析即可得到比较纯化的抗体免疫球蛋白。试验测定表明: 每毫升小鼠腹水经上

述纯化后可集到 5~7mg 抗体免疫球蛋白, 每毫升收大鼠腹水可收集到 5~10mg。

将纯化的抗体免疫球蛋白分别用辣根过氧化物酶 (HRP) 及碱性磷酸脂酶 (Ap 标记, 将标记好的抗体分装冻干, 每只冻干抗体可检测 100 份样品。

6 检测方法

近几年来, 我室发展了 4 种灵敏、快速的病毒检测方法:

- a. 间接 ELISA: 待检样品 (抗原)+第一抗体 (抗病毒单抗)+第二次抗体 (酶标抗体)+底物。
- b. 双抗体夹心 ELISA: 包被抗体+待检样品+抗病毒单抗-酶结合物+底物。
- c. 硝酸纤维素膜 (NCM)-ELISA: 待检样品点样+抗病毒单抗+酶标第二抗体+底物。
- d. 组织印迹 ELISA: 待检样品印迹+组织抗病毒单抗-酶结合物+底物。

其中, 第 1 种方法主要用于检测纯化的抗原, 筛选抗体阳性细胞孔; 第 2, 3 种方法主要用于实验室内检测样品, 要求实验室具备有一定的条件, 而第 4 种方法用于田间直接测定, 在 2.5 小时内即可获得实验结果, 而且灵敏度较高。

7 抗体应用

7.1 病毒调查

用单克隆抗体较大规模地调查我国马铃薯主产区的 PVY 或 PVX, 已进行了 2 次。

1985 年对采自我国 8 个省市马铃薯产区的 713 份样品进行了检测发现 PVY 带毒率达 59.1%。被检测的 8 个地区, 马铃薯感病程度变异很大, 其中陕西、宁夏、

四川、广东、北京、上海在 72%~86% 之间, 而内蒙古、黑龙江两地则只有 22% 和 39%。由北向南 PVY 带毒率依次增高。3 个株系中, PVY^O 占检出 PVY 样品数的 55.5%~100%, 平均 93.1%, 是我国的主导株系, 而 PVY^C 株系检出率较低(0~17.9%), 平均为 7.3%, 且内蒙、陕西、宁夏、上海、北京等五处均未检出 PVY 株系。PVY^N 株系居中。不同株系的复合感染率各地差异很大, 在 0~74% 之间, 平均为 35.5%, 其中以 PVY^O 与 PVY^N 复合感染为主。

1990 年用新研制成功的大鼠 PVY 单抗对采自黑龙江、内蒙古、甘肃、北京、河北、山东、四川的 1804 份马铃薯样品再次进行检测。结果表明 PVY 带毒率占 46.8%, 从中选出 368 份阳性样品进行株系检测, 其 PVY^O 株系占 54.3%, 而 PVY^N 株系占 54.6%, 90% 以上为 2 株系复合感染, 这 2 次调查结果表明, 近年来, 由于在我国大面积推广脱毒种薯, 马铃薯 Y 病毒感染程度有逐渐减轻的趋势; 在株系群中 PVY^N 株系呈上升趋势。而 PVY^O 株系则呈下降趋势。

1990 年同时检测了 PVX 的感病程度及株系分布。结果表明, PVX 带毒率占 51.7%, PVX-HB 和 PVX-C 株系带毒率占 33%。其中 PVX 普通株系占检出样品的 49.4%, PVX 轻斑驳株系占检出样品的 50.8%。

1990 年的检测结果揭示出 PVX、PVY 仍是我国马铃薯产区的 2 种主要病毒, 并且大多数样品为二者复合感染。

7.2 脱毒马铃薯生产与推广

自 1985 年, 我们就发现国内许多“脱毒”马铃薯试管苗, 实际上并没有完全脱毒, 经过“脱毒”处理的试管苗带毒率仍达 15% 左右, 即使某些从美国进口的马铃薯品种脱毒试管苗, 例: “布尔班克”、“林

海”、“夏波蒂”仍具有相当高的带毒率, 1990 年调查发现以上 3 个品种脱毒试管苗繁殖的后代, 其块茎 PVX 带毒率分别是 14.6%, 18.8%, 9.4%; 叶片 PVX 带毒率分别 77.9%, 71.9% 38.5%; 块茎 PVY 带毒率分别是 19.8%, 23.9%, 5.2%; 叶片 PVY 带毒率分别是 89.6%, 78.4%, 42.7%。用免疫电镜技术也证实了上述实验结果。

针对上述情况, 自 1989 年我们与河北省围场县(全国马铃薯种薯生产基地)合作, 将单克隆抗体用于围场县马铃薯原种场脱毒种薯的病毒检测。经过近几年的努力, 该原种场的马铃薯原种带毒率已降至 3% 以下, 1991 年全县播种脱毒马铃薯 17.66 万亩, 占马铃薯播种面积 70.64%, 亩增 266.7kg, 如按每千克鲜薯销售 0.30 元, 亩增 80.0 元, 总增效益 1408 万元。这些工作在围场产生了巨大的经济效益。

8 讨 论

8.1 PVX 单克隆抗体

本实验所用的 5 个 PVX 株系是国际上几个典型的株系。其中 HB 株系具有打破抗性基因的特性, 除在南美发现外, 尚未在其它地区发现, HB 株系的存在及传播对马铃薯育种是一潜在的威胁。由于该株系和 PVX 的其它株系在马铃薯上引起相似的症状, 而用多克隆抗体又不能区分它们, 因此在研究 PVX 株系特异性单抗的过程中重点放在筛选 HB 株系特异性的单抗。实验证明, 靠传统的免疫方法很难成功, 而采用诱导免疫技术, 通过对新生 BALB/C 小鼠免疫诱导其对 HB 株系以外的其它 PVX 株系的耐受性, 从而较易地获得了抗 HB 株系单克隆抗体, 这些抗体虽然和 C 株系尚有交叉反应(原因是 HB 株系和 C 株系抗原决定簇可能相同, 或由

于 C 株系较不稳定, 免疫小鼠前降解程度较大, 没起到免疫诱导作用), 相比较而言大大提高了其特异性, 由于 C 株系是最能代表 PVX 的一典型株系, 因此这类抗体具有相当重要的应用价值。

8.2 PVY 单克隆抗体

PVY 是众多的马铃薯病毒中株系分化最明显的病毒, 本研究获得了对 3 个株系都具有特异反应的单抗, 获得了抗 PVY 的大鼠单抗, 后者在植物病毒单抗研究方面还是第一次, 单只大鼠的腹水产量是小鼠的 10~20 倍或更高; 腹水的效价与小鼠单抗的腹水几乎相当, 单只大鼠抗 PVY 单抗的研制成功为 PVY 的检测提供较为廉价的试剂。但是大鼠杂交瘤的退化问题较为严重, 某些杂交瘤在大鼠腹中不能诱发腹水, 其原因及控制措施正在研究之中。

本研究采用脾脏免疫方法, 免疫周期短, 可节约大量抗原, 对某些产量较低的病毒是一好方法。

实验证明已得 PVX、PVY 抗体理化性质较稳定, 对环境、温度、离子浓度、冻干、冻融具有一定的耐受性, 这对于抗体的贮藏、运输及推广应用有着重要的指导意义。

8.3 抗体的应用

本研究获得的抗体对于 PVX、PVY 病毒调查、株系鉴定、抗病育种、国内外检疫具有重要的应用意义。截止目前, 国内多家科研生产单位使用我们的单抗检测样品达万份。特别自 1989 年来我单位和河北省围场县农业局合作将单抗用于其原种场的脱毒薯的病毒检测上产生了巨大的社会效益, 这一项工作正在向全国展开。

参 考 文 献

- 1 姚康生、蔡少华、贾士荣等. 分泌抗马铃薯 Y 病毒 (PVY) 株系特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立. 中国农业科学, 1985, 4: 67~72
- 2 肖小文、郭军、蔡少华等. 分泌抗马铃薯 X 病毒株系特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及抗体理化性质测定. 生物工程学报, 1989, 5 (2): 108~112
- 3 郭军、肖小文、蔡少华等. 分泌抗马铃薯 Y 病毒单克隆抗体的大鼠杂交瘤细胞系的建立及抗体稳定性测定. 生物工程学报, 1990, 6 (3): 130~235
- 4 Li Rugang, Cai Shaohua et al. The establishment of hybridomas secreting antibodies against potato virus-HB strain by using mice with induced immunological tolerance to other strains of PVX. In Potato and Sweet Potato Reseaech in China. CAAS and CIP Region VIII, 1990
- 5 姚康生、蔡少华、贾士荣. PVY 单克隆抗体在马铃薯 Y 病毒株系调查中的应用. 中国农业科学, 1985, 5: 92