

# 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

郭 军<sup>1</sup> 肖小文<sup>1</sup> 蔡少华<sup>1</sup>

路文长<sup>2</sup> 刘诤平<sup>2</sup>

徐惠迪<sup>3</sup>

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京)<sup>1</sup>

(黑龙江省农业科学院园艺所, 哈尔滨)<sup>2</sup>

(美国农业部贝尔茨维尔农业研究中心花卉苗木研究室, 马里兰州)<sup>3</sup>

用大鼠的骨髓瘤细胞系(IR 983)与经马铃薯Y病毒(PVY)免疫的大鼠(LOU/c)脾细胞融合, 建立了3类分泌抗该病毒株系特异性单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞系。其一对PVY<sup>a</sup>具有特异性反应; 其二对PVY<sup>b</sup>具有特异性反应; 其三对PVY<sup>a</sup>和PVY<sup>b</sup>均产生反应。经用ELIAA双抗体夹心法和ELISA间接法检测, 上述(McAb)同TMV、CMV、TEV、AMV、TuMV、PLRV、PVX七种植物病毒均不产生交叉反应。对上述杂交瘤细胞系和McAb的生物学特性及理化特性进行了鉴定。

**关键词** 马铃薯Y病毒, 大鼠杂交瘤, 单克隆抗体

马铃薯Y病毒在全世界马铃薯种植区均广泛传播并在温暖地区造成严重的危害, 它主要引致马铃薯的退化, 大幅度降低马铃薯的产量。多年来很多国家开展了马铃薯的抗病毒品种选育和无病毒种薯生产的研究应用, 这些研究的进度和工作效率在很大程度上取决于是否具备快速、准确的检测手段。该抗体除具有McAb的共同特点外, 还特别具有单只大鼠腹水产量高, 成本低和省工等优点, 无疑将进一步促进上述研究和应用的发展。本文报道杂交瘤细胞系的建立及McAb的生物学特性和理化特性的鉴定。

## 材 料 和 方 法

### (一) 病毒来源及提纯

供试病毒由国际马铃薯中心L. Salazar博士惠赠。

采集在烟草(品种: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)上繁殖的PVY<sup>a</sup>和PVY<sup>b</sup>病叶, 按Damiragh and Shepherd<sup>[1]</sup>和Oosten<sup>[2]</sup>的方法分别提纯。提纯的病毒均经电镜观察和紫外分光光度计(Beckman DU-70)测其247nm, 260nm和280nm处的光吸收值, 以鉴别纯度。

### (二) 免疫

取6周龄的LOU/c大鼠(购自中国医学科学院实验动物中心), 用PVY<sup>a</sup>, PVY<sup>b</sup>脾内直接免疫, 每只免疫剂量为100—200 $\mu$ g, 4天后进行细胞融合。

### (三) 细胞融合及抗体检测

本文于1989年7月5日收到。

本研究为国家科委生物工程开发中心资助。

免疫的(LOU/c)大鼠脾细胞与IR983(从北京市肿瘤研究所引进)按5:1混合。融合剂为45%PEG(M.W.1450, Sigma)。筛选方法用间接ELISA<sup>[3]</sup>小鼠抗大鼠酶标IgG购自北京市肿瘤研究所,工作浓度为1:400。

#### (四)染色体计数

杂交瘤细胞及骨髓瘤细胞的染色体计数参照文献<sup>[4]</sup>。

#### (五)抗体类型及亚类鉴定

亚类鉴定用琼脂双扩散法,试验由北京市肿瘤研究所协助完成。

#### (六)McAb与其他植物病毒的交叉反应

用TMV、CMV、TEV、AMV、TuMV病叶,及提纯的PVX、PLRV,分别以ELISA双抗体夹心法及ELISA间接法同上述3类McAb进行交叉反应。

#### (七)互补实验

互补试验参照文献<sup>[5]</sup>。

#### (八)腹水抗体生产

LOU/c大鼠在注射杂交瘤细胞前一周,每只大鼠注射5.0ml降植烷(Pristane)。一周后,每只大鼠注射杂交瘤细胞约 $1 \times 10^8$ 个。

#### (九)抗体的稳定性测定

1. 冻融对McAb的影响:杂交瘤细胞系PO89-4和F6-3生产的腹水分别做2、4、6、8次冻融处理。

2. 环境温度对McAb的影响:将杂交瘤细胞系PO89-4和F6-3生产的腹水抗体分别置40℃、45℃和50℃超级恒温水浴器中保温处理0.5 h。

3. 冷冻干燥对McAb的影响:将杂交瘤细胞系PO89-4和F6-3生产的腹水以及该腹水经50%饱和度的硫酸铵(pH7.0)沉淀3次后透析的McAb液分别冻干,再用生理盐水溶解。

4. 硫酸铵沉淀对McAb的影响:将杂交瘤细胞系PO89-4和F6-3生产的腹水经50%饱和度硫酸铵分别沉淀1—3次,对PBS(pH7.4)透析。

用ELISA间接法测定上述试验抗体的滴度变化。

#### (十)抗体纯化及酶标记

腹水抗体提纯参照文献<sup>[6,7]</sup>,抗体酶标记参照文献<sup>[3]</sup>。

## 结 果

#### (一)病毒提纯

PVY病毒提纯后,测其光吸收值为:

$A_{280/260nm} = 0.8422$ ,  $A_{280/247nm} = 1.2949$ ,与PVY病毒紫外吸收测定标准数据相近。电镜观察:病毒颗粒形状与标准相符<sup>[8]</sup>,无杂蛋白污染,见图1。

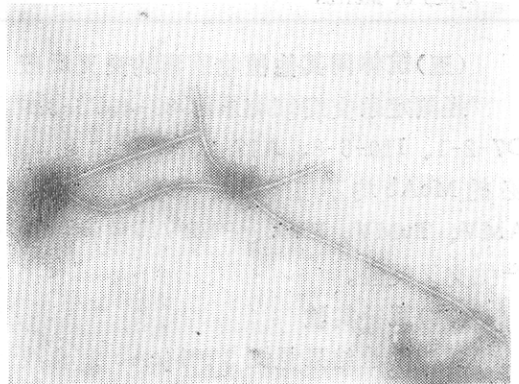


图1 PVY病毒电镜照片  
Fig.1 Electron micrography of the PVY(30000×)

#### (二)杂交瘤细胞的筛选

先后经3次细胞融合,其最高融合率为45.3%,阳性率为18.3%。经间接ELISA检测,及3次细胞克隆化培养,建立了3类杂交瘤细胞系。其中对PVY<sup>o</sup>具有株系特异性反应的杂交瘤细胞系为PO89-4,对PVY<sup>n</sup>有特异性反应的为A17-2、C1-2-3、

D7-2-1, 对PVY<sup>a</sup>和PVY<sup>b</sup>均有反应的为I10-6-8、F6-3。

(三) 杂交瘤细胞染色体计数

对骨髓瘤细胞系IR983和杂交瘤PO89-4、D7-2-1分别计数100个细胞的染色体, 结果见表1。D7-2-1染色体分布如图2。

表1 杂交瘤细胞染色体数目

Table 1 The numbers of chromosomes of hybridoma cells

| 细胞系<br>Name of cells           | IR983 | PO89-4 | D7-2-1 |
|--------------------------------|-------|--------|--------|
| 染色体数目<br>Numbers of chromosome | 25-35 | 55-65  | 55-65  |

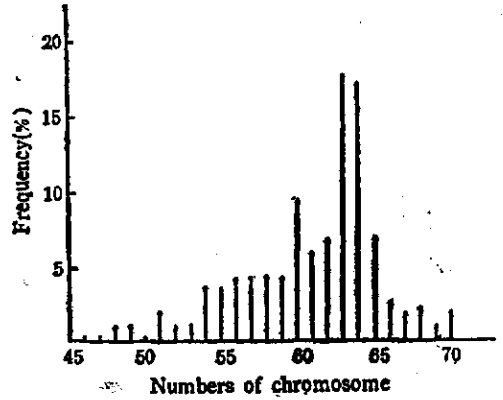


图2 杂交瘤细胞D7-2-1染色体分布  
Fig.2 Distribution of the chromosomes of hybridoma cell D7-2-1

(四) 抗体类型及亚型鉴定

抗体类型及亚类鉴定结果见表2。

表2 杂交瘤细胞的抗体类型

Table 2 The subclass of McAbs

| McAb                   | PO89-4 | F6-3  | I10-6-8 | C1-2-3 | A17-2 | D7-2-1 |
|------------------------|--------|-------|---------|--------|-------|--------|
| 抗体类型<br>Types of McAbs | IgM    | IgG2b | IgG1    | IgG2b  | IgG2b | IgG2c  |

(五) 抗体同其他植物病毒的交叉反应

经测定杂交瘤细胞系PO89-4、F6-3、D7-2-1、I10-6-8、A17-2、C1-2-3所分泌的McAb均不与TMV、CMV、TEV、AMV、TuMV、PVX、PLRV等植物病毒产生交叉反应。

(六) 互补实验

互补实验结果见图3。McAb混合液的稀释度与单独McAb液的稀释度相差无几, 说明A<sub>1</sub>与A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>与A<sub>4</sub>互补效果不显著, 它们的抗原识别位点差别不大。

注: A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>和A<sub>4</sub>分别代表F6-3、I10-6-8、D7-2-1和A17-2的腹水抗体。

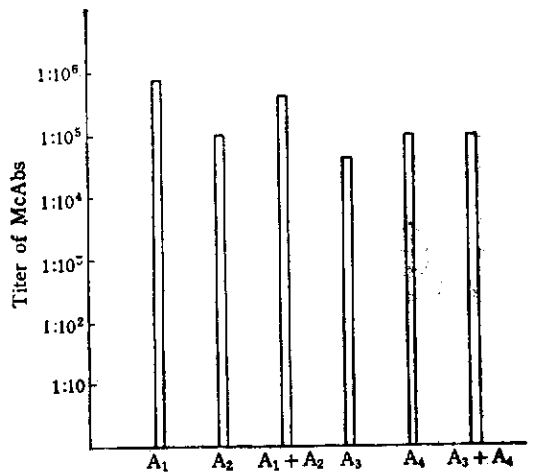


图3 4种McAb的互补试验  
Fig.3 The test of complement about four kinds of McAbs

(七) 腹水产量及McAb滴度

大鼠(LOU/C)在注射杂交瘤细胞后1-2周, 即可收取腹水, 每只可收集30-50ml, 有的大鼠腹水产量可高达100ml。经间接ELISA测定抗体滴度, 结果见表3。

(八) 抗体理化稳定性

试验结果见表4。冻融、耐温、冻干及硫酸铵沉淀对PO89-4(Ab), F6-3(Ab)的活性均无明显影响, 表明上述McAb的

表 3 腹水抗体滴度  
Table 3 McAb titers of ascitic fluids

| 抗原<br>Antigen    | McAbs                     |                           |                           |                           |                           |
|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                  | PO89-4                    | A17-2                     | D7-2-1                    | F6-3                      | I10-6-8                   |
| PVY <sup>a</sup> | —                         | 1:8.0<br>×10 <sup>4</sup> | 1:4.0×<br>10 <sup>4</sup> | 1:1.6×<br>10 <sup>4</sup> | 1:8.0×<br>10 <sup>4</sup> |
| PVY <sup>b</sup> | 1:1.8×<br>10 <sup>5</sup> | —                         | 1:1.0×<br>10 <sup>2</sup> | 1:1.6×<br>10 <sup>5</sup> | 1:8.0×<br>10 <sup>4</sup> |

理化性质比较稳定。

(九) 抗体纯化与酶标记

分别对F6-3(Ab), I10-6-8(Ab)纯化和用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。结果见表 5。

表 4 McAb的稳定性测定  
Table 4 The test of stability about McAbs

| 处理方式<br>Methods of treating   | McAbs  | McAb的稀释度 Titers of McAbs |                   |                   |                   |                   |                   |   |
|---|--|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---|
|   |  | 1:10 <sup>1</sup>        | 1:10 <sup>2</sup> | 1:10 <sup>3</sup> | 1:10 <sup>4</sup> | 1:10 <sup>5</sup> | 1:10 <sup>6</sup> |   |
| 硫酸铵沉淀<br>Precipitated by<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1 time   | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
|   | 2 times  | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   | 3 times  | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
| 冻融试验<br>Freezing and<br>thawing   | 2 times  | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | ++                | -                 | - |
|   | 4 times  | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | ++                | +                 | - |
|   | 8 times  | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | ++                | -                 | - |
| 耐温试验<br>Heat-resisting  | 40℃  | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
|   | 45℃  | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
|   | 50℃  | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
| 冻干试验<br>Freezing-drying   | ascitic fluids   | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
|   | precipitated<br>by(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub><br>SO <sub>4</sub> ,3times | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | +++               | +                 | - |
| 对 照<br>CK   | ascitic fluids   | PO89-4                   | +++               | +++               | +++               | +++               | ++                | - |
|   |  | F6-3                     | +++               | +++               | +++               | ++                | +                 | - |

依ELISA反应显色强度分为(+++), (++)、(+)级和不产生反应(-)

According to the ELISA results, the level of reaction are divided into positive reaction (+++, ++, +)and negative(-)

表 5 辣根过氧化物酶标记结果

Table 5 The titers of McAb marked by HRP

| 抗原<br>Antigen    | I10-6-8(Ab)              |                       | F6-3(Ab)                 |                           |
|------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
|                  | 原腹水<br>Ascitic<br>fluids | McAb-<br>HRP          | 原腹水<br>Ascitic<br>fluids | McAb-<br>HRP              |
| PVY <sup>o</sup> | 1:1.0×10 <sup>4</sup>    | 1:1.2×10 <sup>4</sup> | 1:1.6×10 <sup>5</sup>    | 1:1.0×<br>10 <sup>5</sup> |
| PVY <sup>o</sup> | 1:1.0×10 <sup>4</sup>    | 1:1.2×10 <sup>4</sup> | 1:1.6×10 <sup>5</sup>    | 1:1.0×<br>10 <sup>5</sup> |

## 讨 论

Gugerli, P. 等<sup>[9]</sup>及姚康生等<sup>[10]</sup>先后建立了抗马铃薯Y病毒的小鼠杂交瘤细胞株。而本项研究建立的大鼠杂交瘤细胞株具有其独特的优点。单只大鼠的腹水产量是小鼠的10—20倍或更高,腹水的效价与小鼠杂交瘤<sup>[10]</sup>的腹水几乎相当,单只大鼠的价格仅比小鼠高3倍,还可节约大量人力,降低成本。所以大鼠抗PVY病毒杂交瘤细胞株的建立将为科研及生产中推广PVY的检测提供较为廉价的试剂。

自大鼠杂交瘤技术建立以来<sup>[11]</sup>,由

于种种原因,关于建成大鼠杂交瘤细胞株的报道并不多见。这可能同大鼠杂交瘤技术本身还存在一些技术难题有关。其中最重要的是杂交瘤细胞系的退化问题,在杂交瘤细胞克隆化培养过程中,阳性克隆在经过几次克隆化培养后,即易丧失其分泌抗体的能力,因而难于筛选到稳定分泌型的杂交瘤细胞系。另一个问题是某些杂交瘤细胞株在大鼠腹腔中不能诱生腹水,在注射杂交瘤细胞1—2周后大鼠死亡。解剖后发现在大鼠腹腔内壁上有许多微小的肿瘤块。产生上述问题的原因及控制措施正在进一步研究之中。

本实验采用脾内免疫方法,免疫周期短,可节约大量抗原,经一次免疫后其血清效价可达1:625倍(间接ELISA)。

抗体的理化稳定性测定结果表明该类McAb理化性质稳定,对环境、温度、离子浓度、冻干、冻融具有一定的耐受性,对于该McAb的贮藏、运输及推广应用有着重要的指导意义。

## 参 考 文 献

- [1] Damiragh, I.R. and Shepherd, R.J., *Phytopathology*, 60:132—142, 1970.
- [2] Oosten, H.J., *Neth. J. Plant Pathology*, 78:33—44, 1972.
- [3] 蒋成澄:酶免疫测定法,人民出版社, pp.45—46, 102—133, 1984.
- [4] 河北师范大学等:遗传学实验,人民出版社, p.9, 10, 1982.
- [5] 刘庆良等:抗可溶性抗原单克隆抗体的特性分析和鉴定,上海免疫学杂志, 8(3):231—234, 1988.
- [6] 高庆祥等:临床免疫学与实验技术,山东科学技术出版社, pp.400—406, 1984.
- [7] 苏拔贤等:生物化学制备技术,科学出版社, pp.119—135, 1986.
- [8] 复旦大学生物系植物病毒研究室译:植物病毒志,上海科学技术出版社,第一集, pp.98—100.
- [9] Gugerli, P. and Fries, P., *J. Gen. virol.*, 64:2471—2477, 1983.
- [10] 姚康生等:中国农业科学, (4):67—72, 1985.
- [11] Baziw, H. et al., *Rat-rat monoclonal antibodies*, 1986.

# THE ESTABLISHMENT OF RAT HYBRIDOMA CELL LINES SECRETING McAb<sup>1</sup> AGAINST STRAINS OF POTATO VIRUS Y AND ANALYSIS OF PROPERTIES AND STABILITY OF THE McAbs

Guo Jun<sup>1</sup> Xiao Xiao en<sup>1</sup> Cai Shaohua<sup>1</sup> Lu Wenchang<sup>1</sup> Liu Xuping<sup>2</sup> Hsu Hei-ti<sup>3</sup>  
(*Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing*)<sup>1</sup>  
(*Horticultural Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin*)<sup>2</sup>  
(*Florist and Nursery Crops Laboratory, USDA-ARS, Beltsville, USA*)<sup>3</sup>

The rat spleencytes immunized with potato virus Y (PVY) and rat myeloma (IR983) were fused by PEG(M.W.1450). Three kinds of stable hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (McAb) were derived. One kind of the cell lines producing McAbs reacts to PVY<sup>n</sup> specifically. Another reacts to PVY<sup>o</sup> specifically. The third one reacts to both of the two strains. Tested by the methods of sandwich-ELISA and indirect-ELISA, all kinds of McAbs did not react to seven plant viruses: tobacco mosaic (TMV), cucumber mosaic (CMV), tobacco etch (TEV), alfalfa mosaic (AMV), turnip mosaic (TuMV), potato leaf roll (PLRV), and potato virus X (PVX). The properties of the hybridoma cell lines and the McAbs were tested.

## Key words

Rat hybridoma; potato virus Y; monoclonal antibodies