

水稻白叶枯病菌单抗杂交瘤细胞株 的建立及应用研究

朱 华 黄奔立 胡广淦 李清锐
高锦樑 刘斯文*

(江苏农学院, 扬州)

经水稻白叶枯病原细菌(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)菌株Ks-6-6、Os-213、Yz-32、Yz-34、Yz-24'免疫的BALB/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0融合、筛选和克隆化,共获得12株稳定分泌该病原细菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。其抗体分属IgG3和IgG2b亚类。抗体与其它主要病原细菌的种或致病变种无交叉反应,能区分水稻白叶枯病原细菌3个不同血清型的菌株。腹水抗体效价在 $1:10^3$ — $1:10^6$ 左右。初步用于抗原决定簇的识别,能区分出6个抗原决定簇,并能将获得的63个菌株分为9个菌株组。

关键词 水稻白叶枯病; 单克隆抗体; 菌株分类; 抗原决定簇

水稻白叶枯病是水稻的重要病害之一。利用单克隆抗体检测病原,不仅快速有效,而且能获得具有专一性的大量均质抗体。为了进一步扩大检测该病原细菌的覆盖面,我们在已研制出3株稳定分泌该病原细菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株的基础上^[1],于1988—1990年间又研制出了12株分泌其抗体的杂交瘤细胞株,并初步用于菌系分化的研究。

材 料 和 方 法

(一)免疫

抗原为江苏省农科院等单位提供及本校分离的Ks-6-6、Os-213、Yz-24'、Yz-32、Yz-34等。基本按Goding^[2]的方法免疫BALB/c小鼠3次。

(二)融合

按Galfre的方法^[3],所用骨髓瘤细胞系为SP2/0-Ag14。

(三)杂交瘤细胞株的筛选和克隆化

ELISA间接法。经超声波破碎的菌液,以125 μg/ml浓度包被,4℃过夜,1%牛血清白蛋白(BSA)封闭,4℃过夜,其余步骤按常规程序。羊抗鼠辣根过氧化物酶标抗体为北京卫生部生物制品所市售产品。酶标检测仪为DG-1型(南京华东电子管厂制造)。阳性杂交瘤细胞的克隆化采用有限稀释法。

(四)腹水的制备及效价测定

腹水制备按Heogeroed氏法^[4],效价测定采用全菌包被ELISA间接法。

(五)亚类鉴定

用琼脂双扩散法测定稀释20倍的腹水,所用免疫球蛋白亚类有IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgM。

(六)染色体数的测定

本文于1991年1月30日收到。

* 研究生期间参加了部分研究工作,现在武汉市洪山农牧局工作。

待测杂交瘤细胞加 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 秋水仙素处理 4—5h, 卡诺氏液固定, Gimsa染色后镜检计数。

(七)交叉反应

应用全菌包被 ELISA 间接法。

(八)供检测用抗原

供检测用的水稻白叶枯病原细菌菌株由江苏省农科院、南京农业大学、北京农业大学、杭州中国水稻所、福建省农科院、湖南省农科院、云南农业大学和四川农业大学提供及本校分离。其中包括 7 个不同致病类型^[5]、国际水稻所的 5 个生理小种以及 3 个不同血清型的代表菌株共 63 个。检测方法采用全菌包被 ELISA 间接法, 即 ELISA 反应板用 1.25%戊二醛溶液(含 0.1mol/L 碳酸氢钠)预处理, 37°C, 1h, 蒸馏水洗涤 3 次后, 每孔加入同样浓度的菌株悬浮液 50 μl , 37°C 过夜干燥, 次日用 1%牛血清白蛋白封闭, 4°C 过夜, 其余步骤按 ELISA 常规程序。

结果与分析

(一)单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及传代稳定性

表 1 杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性测定

Table 1 Measurement of stability of secreting McAb by the hybridoma cells (ELISA)

测定时期 Phase for measurement	融合细胞 Fusing cells	克隆化细胞 Cloned cells	液氮冻存 Preserved under fluid nitrogen		
			7 周 7 Week	半年 Half year	一年 One year
OD _{490nm}					
McAb					
K26	0.81	0.49	/	0.66	/
K1.08	1.17	1.07	0.70	/	0.73
K123	1.11	1.08	/	1.24	/
Os3	0.48	0.51	/	/	0.48
CK(-)	0.10	0.04	0.04	0.08	0.01

BALB/c 小鼠脾细胞染色体数为 40 条。经鉴定单抗 K10、K13、K19、K108、K123 的免疫球蛋白亚类为 IgG3, 单抗 Os3

通过免疫融合新建立了分泌抗水稻白叶枯病菌的单克隆抗体杂交瘤细胞株共 12 株。其中, 免疫原为 Ks-6-6 所获得的杂交瘤细胞株共 6 株, 即 K19、K26、K71、K74、K76 和 K79。取其培养上清进行检测, 表明均含有抗 Ks-6-6 的特异性抗体, 其中 K26 和 K19 的腹水 ELISA 效价分别为 1:10⁶ 和 1:10⁴。免疫原为 Os-213 所获得的杂交瘤细胞株 Os3, 其培养上清经检测表明含抗 Os-213 的特异性抗体, 腹水效价为 1:10³。免疫原为 Yz-34 所获得的杂交瘤细胞株有 K123、K161, 检测其培养上清表明含抗 Yz-34 的特异性抗体, 其中 K123 腹水效价为 1:10⁵。免疫原为 Yz-24' 所获得的杂交瘤细胞株 K10、K13、K108, 检测表明能分泌抗 Yz-24' 的特异性抗体, 其中 K108 的腹水效价为 1:10⁶。

所获得的分泌单抗的杂交瘤细胞经传代 14—20 代及液氮冻存 7 周、半年或 1 年, 复苏后的细胞培养上清经检测表明均能稳定地分泌其抗体(见表 1)。镜检免疫原不同的杂交瘤细胞株 K19、Os3、K13、K10、K108、K123 等的 313 个处于分裂相的杂交瘤细胞, 其染色体条数多为 84—101 条(图 1)。SP2/0 细胞染色体数为 72 条,

的免疫球蛋白亚类为 IgG2b。

(二)交叉反应实验结果

用所得单抗对不同属种的主要植物病

原细菌进行交叉反应试验的结果表明, 与胡萝卜软腐病欧氏杆菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), 茄青枯病假单胞杆菌 (*Pseudomonas solanacearum*), 马铃薯环腐病棒杆菌 (*Corynebacterium sepedonicum*) 和根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 均表现为阴性反应; 与水稻白叶枯病菌同种不同致病变种的甘蓝黑腐病黄单胞菌 (*X. campestris* pv. *campestris*)、棉花角斑病黄单胞菌 (*X.*

campestris pv. *malvacearum*) 和水稻细菌性条斑病黄单胞菌 (*X. campestris* pv. *oryzicola*) 等也均表现为阴性反应。

用上述抗体和已报道的杂交瘤细胞株 K1、K31 的抗体检测具有一定代表性的、来源较广的水稻白叶枯病菌 63 个菌株, 结果表明 K1、K31、K19、K74、K71、K26 和 K79 的反应类似; K161 和 K123 的反应类似, 其余单抗与各菌株的反应各不相同 (表 2)。



图 1 杂交瘤细胞染色体数(左: K19; 右: K13)

Fig. 1 The number of chromosome of hybridoma cells (left:K19, right:K13)

表 2 代表菌株与各单抗的反应结果

Table 2 Reaction among the McAbs and representative strains

McAbs	K1	K31	K19	K74	K71	K79	K26	Os3	K123	K161	K108	K13	K10
Strains	OD _{490nm} of strains/OD _{490nm} of ck												
Ks-6-6	3.7	8.5	6.4	4.1	2.8	2.8	2.9	0.7	0.7	0.8	1.2	1.0	1.1
Os-B-1	2.9	5.4	5.3	4.4	6.2	5.8	5.5	3.2	0.5	0.6	0.9	1.5	1.0
Yz-21	4.1	6.1	5.3	7.9	5.2	6.6	5.8	0.6	0.3	0.3	1.1	1.4	2.4
Yz-31	1.7	1.6	1.4	1.8	0.5	1.0	1.8	4.0	0.8	1.3	13.3	1.6	4.4
Yz-32	1.7	1.4	1.7	1.8	1.3	1.0	1.2	4.2	1.1	1.1	1.0	0.8	1.1
Os-209	1.7	0.9	1.4	1.4	1.0	0.9	1.5	2.4	0.8	0.8	12.9	6.1	1.8
Yz-34	0.8	0.8	1.1	1.3	0.8	0.6	1.3	1.3	6.0	5.6	1.4	0.9	1.0
Yz-22	1.3	0.6	0.4	1.3	0.4	1.0	1.4	1.0	0.5	0.7	5.0	2.7	1.7
Yz-24	1.5	0.5	0.3	1.3	0.7	0.4	1.7	1.3	0.8	0.6	3.8	4.5	2.3

* : positive(+): number > 2

从中筛选出 K1、K108、K123、Os 3 4 个杂交瘤细胞株, 用其腹水抗体检测不同血清型的菌株, 发现 K1 主要与 Ks-6-6、Ks-1-20 等血清 I 型菌起反应; K108 与 Os-209、Os-213 等血清 II 型菌株呈阳性反

应; Os3 与 III 型及部分 I 型和 II 型菌株呈阳性反应; 而 K123 则与已知的 3 个血清型均不产生反应, 只与特定的菌株产生反应, 结果见表 3。这些结果说明, 利用建立的 4 株杂交瘤细胞株的单抗可以区分水

表 3 四株单抗对不同血清型代表菌株的反应结果
Table 3 Reaction among the strains from different serovars and 4 McAbs

单 抗 McAb		菌 株 Strain	Ks-6-6 (血清 I 型) Serovar. I	Os-213 (血清 I 型) Serovar. I	YZ-32 (血清 II 型) Serovar. II	YZ-34	阴性对照 CK
K1	OD* _{490nm}		1.16	0.24	0.18	0.17	0.15
	阴阳(-、+)		+	-	-	-	
K108	OD* _{490nm}		0.12	1.29	0.11	0.14	0.09
	阴阳(-、+)		-	+	-	-	
K123	OD* _{490nm}		0.08	0.08	0.17	0.64	0.12
	阴阳(-、+)		-	-	-	+	
Os3	OD* _{490nm}		0.39	0.91	1.30	0.38	0.23
	阴阳(-、+)		-	+	+	-	

* 为两次重复的平均值, 大于阴性对照 2 倍为阳性。
* positive; number > 2 times of CK.

稻白叶枯病菌不同血清型的菌株。

用已获得的单克隆抗体测定供试菌株, 可以识别出 6 个不同的抗原决定簇; 将供试菌株分为 9 种反应类型, 暂称为 9 个菌株组。第 I 菌株组的菌株具有抗原决定簇 Xc-oA, 占检测菌株的 74.6%, 包括了血清 I 型菌。第 II 菌株组的菌株具有抗原决定簇 Xc-oA 和 Xc-oB, 占检测菌株的 9.5%, 包括了 Js-137 及来自北京的两个菌株。第 III 菌株组的菌株有 1 个, 具有抗原决定簇 Xc-oA 和 Xc-oD, 占供试菌株的 1.6%。属于第 IV 菌株组的菌株具有

抗原决定簇 Xc-oB、Xc-oC、Xc-oE, 均为血清型 II 型菌株, 占供试菌株的 3.2%。属于第 V 菌株组的菌株有 1 个, 具有抗原决定簇 Xc-oB、Xc-oD、Xc-oE, 占供试菌株的 1.6%。第 VI 菌株组的菌株具有抗原决定簇 Xc-oB, 也为 1 株, 占 1.6%。第 VII 菌株组的菌株 1 株, 具抗原决定簇, Xc-oF, 占 1.6%。第 VIII 菌株组的菌株具有抗原决定簇 Xc-oC、Xc-oE, 占供试菌株的 4.8%。第 IX 菌株组的菌株也仅 1 株, 具抗原决定簇 Xc-oC、Xc-oD、Xc-oE。占供试菌株的 1.6% (见表 3)。

表 4 代表菌株与代表单抗的反应情况
Table 4 Reaction among the represent strains and the represent McAbs

供试代表菌株 Strains tested	菌株组 Groups of strains	ELISA 试验的反应性 Reaction of ELISA						菌株数 Number of strains	占供试菌株百分率 proportion(%)
		K19	Os3	K13	K10	K108	K161		
Ks-6-6	I	+	-	-	-	-	-	47	74.6%
Os-B-1	I	+	+	-	-	-	-	6	9.5%
YZ-21	II	+	-	-	+	-	-	1	1.6%
Os-209	IV	-	+	+	-	+	-	2	3.2%
YZ-31	V	-	+	-	+	+	-	1	1.6%
YZ-32	VI	-	+	-	-	-	-	1	1.6%
YZ-34	VII	-	-	-	-	-	+	1	1.6%
YZ-22	VIII	-	-	+	-	+	-	3	4.8%
YZ-24	IX	-	-	+	+	+	-	1	1.6%
抗原决定簇 epitope		Xc-oA	Xc-oB	Xc-oC	Xc-oD	Xc-oE	Xc-oF		

讨 论

血清学方法作为细菌鉴定的辅助手段已被广泛使用，但常规多克隆血清学方法存在的问题较多。由于单克隆抗体专化性强，必须用不同类型菌株作为抗原免疫以建立能稳定分泌抗水稻白叶枯病菌不同类

型菌株单克隆抗体杂交瘤细胞株，才能提高检出的覆盖面。单抗与各菌株的 ELISA 试验反应结果表明，许多单抗与不同血清型菌株之间的反应往往不同，即使是在同一血清型的不同菌株上所识别出的抗原决定簇有的也有差异。通过进一步完善，可利用不同的单抗或其组合来区分常规血清学方法不能区分的血清型。

参 考 文 献

- [1] 高锦操等：植物病理学报，4:245—249,1989.
- [2] Goding, T.W.et al.,Monoclonal antibodies,P.58,1983.
- [3] Galfre,G.et al.,Nature,266:550—552,1977.
- [4] Heegerod,N.et al.,J.Immunol.Method,61:310—317,1983.
- [5] 方中达等：植物病理学报，2:81—88,1990.

The Continuous Production of Hybridoma Cell Line Secreting Monoclonal Antibodies Against *Xanthomonas* *campestris* pv. *oryzae* and its Preliminary Appli- cation in Classification of Strains

Zhu Hua Huang Benli Hu Guanggan Li Qingxian
Gao Jingliang Liu Siwen
(Dept. of Plant Protection, Jiangsu Agric.College, Yangzhou)

By fusion of mouse myeloma cells (SP2/0-Ag14) and spleen cells derived from BALB/c mice immunized with the preparation of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* Ks-6-6, Os-213, Yz-32, Yz-34 and Yz-24, 12 hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies were produced. All McAbs did not cross react with the other varieties of plant pathogenetic and non-pathogenetic bacteria. The McAbs could distinguish the variant serotypes of strains. Antibody titers of ascitis were about $1:10^3$ — $1:10^6$ when measured by ELISA method. The McAbs could differentiate 6 epitopes. Based on the epitopes, the 63 strains of *X. campestris* pv. *oryzae* were grouped into nine groups.

Key words

Bacterial blight of rice; McAbs; classification of strains; epitopes