

# 分泌抗水稻细菌性条斑菌单克隆抗体杂交瘤株的建立及其在种子检验上的应用\*

许莉萍\*\* 赖文姜 罗瑞仙\*\*\* 许东 曾宪铭

(植保系)

## 提 要

本文首次报导了通过硫酸铵沉淀法提取水稻细菌性条斑菌(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) (以下简称细条菌)的蛋白质,并以它作抗原建立了4个杂交瘤细胞株E<sub>5</sub>、E<sub>6</sub>、A<sub>5</sub>和F<sub>11</sub>,其培养物上清的ELISA效价为1:20~1:160,腹水效价为1:10<sup>6</sup>~1:10<sup>7</sup>。该4个细胞株所分泌的单克隆抗体(McAb)与58个不同来源的细条菌都呈阳性反应,而对参试的具有一定代表性的其它13个细菌种,均呈阴性反应。试验还表明,4种McAb是针对同一抗原决定簇的,其亲和力大小为:E<sub>5</sub>>A<sub>5</sub>>E<sub>6</sub>>F<sub>11</sub>。应用McAb进行种子带菌检验也获得成功。

**关键词** 水稻细菌性条斑菌; *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*; 单克隆抗体; 水稻种子带菌检验

## 引 言

近年来,水稻细菌性条斑病为害严重<sup>[1]</sup>。由于此病是由种子带菌传播,且是内检对象,进行种子带菌检验是非常必要的<sup>[2]</sup>。赖文姜等<sup>[3]</sup>以致病性接种法证明了种子可带菌,但此法灵敏度不够高,且需较长的时间。虽有人尝试过培养皿法,然到目前仍未找到选择性强的培养基。噬菌体法虽是一种简单、快速的方法,但需做大量的试验来确定其专化性及可行性<sup>[4]</sup>,不是短时间内能解决的。血清学法是快速而灵敏的,但其可靠性取决于血清的专化性<sup>[5]</sup>,常规血清难于无限量生产并易发生交叉反应<sup>[6]</sup>;而McAb具有高度的特异性、均一性及无限生产的特点<sup>[7]</sup>,是目前被认为最理想的一种检验用的抗体。

关于细条菌McAb的研究,种藏文等<sup>[8]</sup>曾以细条菌的整个菌体作抗原来建株,但抗体特异性尚不够强,进行种子带菌检验时,出现非特异性反应,因而有必要进一步建立

\*本文承蒙林孔勤教授、梁子超教授审阅,广州医药卫生研究所何美卿同志热情帮助,特此致谢; \*\*1986届硕士研究生,现在福建农学院工作; \*\*\*广州医药卫生研究所。

1989年10月16日收稿

特异性强的杂交瘤株。本文主要介绍建株及应用McAb进行种子带菌检验。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 菌株：供试的细条菌菌株共58个，其中44个由作者采集，其余由福建农科院等兄弟单位提供。其它细菌13个：杂菌4个；甘蓝黄单胞杆菌致病变种5个，即柑桔溃疡菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*)、水稻白叶枯菌 (*X. C.* pv. *oryzae*)、豆角疮痂菌 (*X. C.* pv. *vesicatoria*)、甘蓝黑腐菌 (*X. C.* pv. *campestris*)及菜豆疫病菌 (*X. C.* pv. *phaseoli*)；其它另4个属的代表菌，即青枯菌 (*Pseudomonas solanacearum*)、白菜软腐菌 (*Erwinia carotovora* var. *carotovora*)、根癌菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、及马铃薯环腐菌 (*Corynebacterium sepedonicum*)。

2. 稻种：是人工接种病株上的带菌种子，有特特普、黑糯；田间采的带病种子有汕优30(清远，自采)、汕优3550(高州)、汕优63(潮州)。健种为X桂早(广州，自采)；没有注明的均由当地农业部门提供。

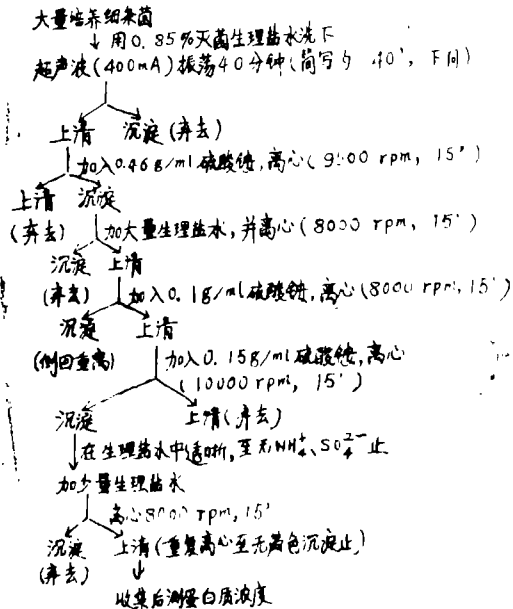


图1 蛋白质的提取流程

\* 每次加入硫酸铵后即调pH 7.0, 25°C作用1小时后离心。

4. 细胞融合、筛选、克隆化、腹水生产、细胞的冻存及复苏：均按常规方法<sup>2</sup>，只筛选法稍作改进，即包被4个杂菌（与细条菌亲缘关系相近）对初筛出的阳性孔再作筛选。

3. 抗原：用于免疫和包被的蛋白质都是由同一广东菌株提供的

4. 用于融合的细胞系：

SP2/o—Ag14来自广州医药卫生研究所病毒室。

5. 动物：BALB/c小鼠，来源与SP2/o同。

### (二) 方法

1. 菌株的分离：按常规法。

2. 蛋白质的提取：以硫酸铵逐级沉淀和差速离心相结合的方法来提取细条菌的特异蛋白质，用分光光度计测其浓度。具体步骤\*见图1。

3. 免疫：以上述细菌的蛋白质提取液对BALB/c鼠作基础免疫和追加免疫（在融合前3天连续进行），免疫方案见表1。

表1 小鼠免疫方案<sup>\*</sup>

种 类	次数	天数	抗原数 ( $\mu\text{g}$ )	补量 (ml)	佐剂	注射部位
基础免疫	1	1	95	0.1	等量完全佐剂	腹腔
	2	22	95	0.1	同上	同上
	3	29	190	0.2	—	同上
追加免疫	1	融合前3天	475	0.5	—	同上
	2	融合前2天	580	0.6	—	腹腔与静脉各半
	3	融合前1天	580	0.6	—	同上

\* “—”表示未加佐剂

### 5. McAb 及杂交瘤细胞的鉴定

(1) McAb 滴度的测定：按常规方法<sup>[2]</sup>。结果以酶标仪 (DG3022A型) 判定，凡样品O.D值与阴性对照之比 $\geq 2.1$ 者为阳性，反之为阴性。

(2) McAb 特异性测定：用4种MaAb对所有的菌株进行ELISA测定，以酶标仪判定。

(3) 染色体分析：基本按常规法<sup>[2]</sup>，不同的是，不加预处理剂及从30~40cm处滴液制片。

(4) 杂交瘤细胞的稳定性：在液氮中冻存4个月后复苏及在体外传代培养4个月后的杂交瘤细胞，对其产生抗体的特异性及“能力”进行测定。

(5) McAb对细条菌的抗原决定簇特异性

①酶标抗体的饱和曲线：按常规法<sup>[1]</sup>测定。

②McAb饱和曲线的测定：用8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白液包被，4种腹水作同样的倍比稀释，测O.D<sub>490nm</sub>值。

③McAb相加试验：同上法包被，分别加入4种McAb (E<sub>5</sub>、F<sub>11</sub>用1:10<sup>2</sup>，E<sub>8</sub>、A<sub>5</sub>用1:10<sup>3</sup>)，于37℃作用2小时，洗后加第二抗体。在相同条件下，同法测定不加第二抗体情况的O.D值。

(6) McAb相对亲和力的测定<sup>[1]</sup>：在相同的条件下，将腹水作倍比稀释，以ELISA测定。

### 6. McAb在种子带菌检验上的应用

(1) 种子上细菌的富集：种子壳米分离后，用灭菌的1%蛋白胨水浸6小时，进行离心集菌（浸出液以2000rpm离心5'，上清再以8000rpm离心30'，留沉淀）和盐析集菌，后者照前人方法<sup>[3]</sup>，不同点是，滤液与硫酸铵饱和液的体积比为1:0.25，以8000rpm离心20分钟，留沉淀。

(2) 种子带菌检验：以种子浓缩液接种法作对照，以ELISA及间接免疫荧光法

(IIF) 进行检验。新鲜种子的ELISA结果以肉眼判定,其它用酶标仪。IIF照常制片,判定标准按前人方法<sup>[3]</sup>。

## 结 果

### (一) 细胞融合、筛选及克隆化

共进行15次融合,第11、13及15批都有阳性孔,但只第11批的4个孔成株,即E<sub>5</sub>、E<sub>8</sub>、A<sub>5</sub>及F<sub>11</sub>。第14批在融合后第6及第9天检测,阳性率都达80%以上,但克隆化却未能检测到阳性。

### (二) 杂交瘤细胞及McAb的鉴定结果

1. McAb的滴度: 培养上清的ELISA滴度为E<sub>5</sub>-1:80, E<sub>8</sub>、A<sub>5</sub>-1:160, F<sub>11</sub>-1:20; 腹水ELISA滴度除F<sub>11</sub>为1:10<sup>4</sup>,其余为1:10<sup>7</sup>。

2. McAb的特异性: 4种McAb结果一致。供试的58个细条菌菌株全呈阳性,其它的13个细菌全呈阴性。

3. 染色体分析结果: 5个细胞系SP 2/0、E<sub>5</sub>、E<sub>8</sub>、A<sub>5</sub>及F<sub>11</sub>的平均染色体数分别为61条、91条、96条及82条。

4. 杂交瘤细胞的稳定性: McAb仍具高度的专一性,只识别细条菌,滴度也与前一样。A<sub>5</sub>及E<sub>8</sub>的腹水ELISA滴度仍达1:10<sup>7</sup>。

### 5. McAb对抗原决定簇的特异性

(1) 酶标抗体的饱和曲线。结果见图2(O<sub>490</sub>值为三次平均,下同)。图2表明,酶浓度达1:100后,反应曲线开始出现平峰,说明酶已饱和了所有结合的抗体。

(2) McAb的饱和曲线。结果见图3。由图3可知,McAb稀释到一定程度时,反应曲线出现平峰,说明抗体在此浓度已开始饱和抗原上相应的位点。E<sub>5</sub>、E<sub>8</sub>(A<sub>5</sub>)、F<sub>11</sub>所致腹水的起始饱和稀释度分别为1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>及1:10<sup>2</sup>。

(3) 单抗相加试验的结果。不加第二种抗体时, E<sub>5</sub>、E<sub>8</sub>、A<sub>5</sub>及F<sub>11</sub>的O<sub>490</sub>值分别为1.67、1.61、1.14和1.72; 加第二抗体后,即E<sub>5</sub>+E<sub>8</sub>、E<sub>5</sub>+A<sub>5</sub>、E<sub>5</sub>+F<sub>11</sub>、A<sub>5</sub>+F<sub>11</sub>、E<sub>8</sub>+F<sub>11</sub>、A<sub>5</sub>+E<sub>8</sub>的O<sub>490</sub>值分别为1.77、1.82、1.84、1.75、1.75和1.78。可见4种McAb分别相加后的O<sub>490</sub>值与

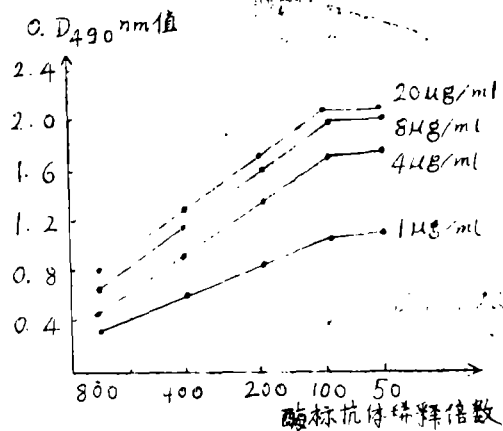


图2 酶标抗体反应的饱和曲线

单个McAb的差异不大。在理论上，当抗原决定簇被相应的抗体完全饱和后，增加抗体的浓度不会增加反应，即O.D值不会增大，否则O.D值应为两者之和。因此认为，4种McAb是针对同一抗原决定簇的。

(4) 相加指数 (A.I)：左冬梅等<sup>[1]</sup>为定量起见，引进A.I,表2是A.I的计算结果。理论上，若两种抗体是针对同一抗原决定簇，则A.I=100%，反之则A.I为0。但是两个不同的抗原决定簇可由于位点相近而形成空间位阻，使A.I难达100%；此外，抗原抗体结合时表位是否最适也影响O.D值，使A.I难为0。按规定若A.I<50%，判为识别同一抗原决定簇。表2中所有的A.I都小于50%故认为4种McAb均针对同一抗原决定簇。

6. McAb相对亲和力的测定结果，以图4示。按达到最大结合50%所需的McAb浓度来判断，亲和力越大，所需的浓度越小。从图4可知，相对亲和力的大小为：F<sub>8</sub>>A<sub>5</sub>>E<sub>5</sub>>F<sub>11</sub>。

(三) McAb在种子检验上的应用

结果见表3。由表3可知，IIF法灵敏度最高，可检测出存放4个月的全部病种（用盐析法集菌）；其次是间接ELISA法，可检验出全部的新鲜病种和部分存放4个月的病种；种子

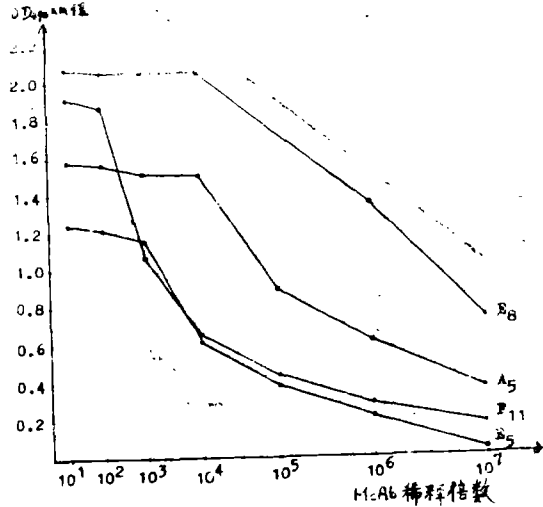


图3 McAb饱和曲线

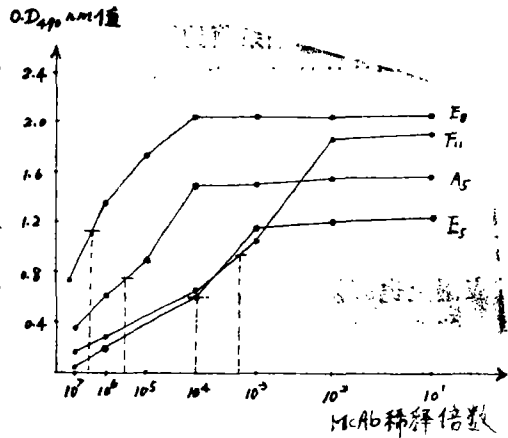


图4 McAb相对亲和力的测定曲线

表2 McAb相加实验的O.D值和A.I值

细胞系	细胞系产生的McAb							
	E <sub>5</sub>		E <sub>8</sub>		A <sub>5</sub>		F <sub>11</sub>	
	O.D值	A.I值	O.D值	A.I值	O.D值	A.I值	O.D值	A.I值
E <sub>5</sub>	1.67	—	1.77	7.9%	1.82	29.5%	1.84	8.6%
E <sub>8</sub>	1.77	7.9%	1.61	—	1.78	—	1.75	5.1%
A <sub>5</sub>	1.82	29.5%	1.78	29.5%	1.14	29.5%	1.75	22.4%
F <sub>11</sub>	1.84	8.5%	1.75	5.1%	1.75	22.4%	1.72	—

浓缩液接种法灵敏度较低。除外,用盐析法集菌的效果较离心法好。

表3 种子带菌检验的测定结果\*

品 种	来 源	致病性		间接ELISA		IIF	
		新鲜样品	新鲜样品	20°C存4个月		20°C存4个月	
		离心	离心	离心	盐析	离心	盐析
黑糯	人工接种	+	+	0	0	0	0
特特普	人工接种	+	+	+	+	+	+
汕优30	清远	+	+	-	+	-	+
汕优63	潮州	0	0	-	-	-	+
汕优3550	高州	-	+	-	-	-	+

\*“+”表阳性,“-”表阴性,“0”表未测;新鲜种子量为30克,其余为30、20及10克,结果一致;新鲜种子重复二次,其余三次;x桂早全为阴性。

## 讨论和结论

本文报导了以细条菌的蛋白质粗提物作抗原来建株,解决了血清不专化的问题,提供了一种有效的检验带菌种子的方法,也为今后抗原性复杂的细菌制备特异的抗体提供了一条可取的途径。

不同免疫原对建株的影响。种藏文等<sup>[5]</sup>以细条菌的整个菌体作抗原来建株,可能分泌的McAb特异性尚不够强,未能区别病种与健种。本文以其蛋白质粗提物作抗原,所建的4株分泌的McAb特异性均较好,只识别细条菌,无交叉反应,在种子带菌检验的应用上也获得成功,4种单抗均能区分病、健稻种。

筛选和克隆化是成功建株的关键。本试验结果表明,用亲缘关系与细条菌相近的杂菌对初筛出的阳性孔进行再筛选,也是成功建株的一个关键。然而,可能由于:(1)筛选中的假阳性。如第14批,可能是检测前换液次数不够多,致使未融合的脾细胞所分泌的免疫球蛋白污染了上清液。(2)克隆化过程中的失误。第11、13及15批的阳性孔即由于克隆化中的污染及生长不良而丧失。

4种McAb均具有高度的特异性。由于供试的58个细条菌的菌株来源较广,覆盖率又达100%;其次,供试的13个其它细菌又具有一定的代表性,其中5个是与细条菌同属同种的不同变种,4个是不同属的病原细菌,另4个是从病种上分离的杂菌,但它们都不与McAb反应。这就说明该McAb具高度的特异性。

高亲和力的抗体有利于提高阳性检出率,金建平<sup>[4]</sup>认为,ELISA筛选上清时,O.D值的高低主要由亲和力大小决定,抗体的浓度则是次要的,作者的结果支持了此观点。

用不同的方法检验人工病种和自然病种的试验均已成功。作者认为,有必要把McAb迅速制成试剂盒,供使用单位应用,以便控制该检疫性病害的扩展,并进而逐步缩小疫区。

### 引用文献

- [1] 左冬梅, 杨守纯. 单克隆抗体通讯, 1987; (4): 14—19
- [2] 刘尔翔. 广东省微生物学会杂交瘤技术方法简介, 1981; 34
- [3] 李学书, 邹雪容, 商玉霞. 植物检疫, 1983; (3): 3—10
- [4] 金建平. 单克隆抗体通讯, 1986; (1—2): 107—110
- [5] 种藏文, 朱哲大, 程由铨. 福建农科院学报, 1987; 2(1): 96—97
- [6] 梁训生, 张成良, 张作芳. 在植物病毒血清学技术. 北京: 农业出版社, 1985; 176—200, 288
- [7] 赖文姜, 曾宪铭. 广东农业科学, 1987; (5): 42—44
- [8] De Boer, S. H, 1987, *Canada Journal of Plant Pathology* 9: 182—187
- [9] Schaad, N. W, 1982, *Plant Disease* 66 (10): 885—890

## ESTABLISHMENT OF HYBRIDOMA LINES SECRETING MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THE PATHOGEN OF RICE BACTERIAL STREAK (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) AND ITS APPLICATION TO THE DETECTION OF THE BACTERIA IN RICE SEEDS

Xu Liping                      Lai Wenjiang                      Luo Ruixian

Xu Dong                      Zeng Xianming

(Department of Plant Protection)

### ABSTRACT

In this paper is reported for the first time the establishment of four hybridoma cell lines, E<sub>8</sub>, E<sub>5</sub>, A<sub>5</sub>, and F<sub>11</sub>, secreting monoclonal antibodies against the pathogen of Rice Bacterial Leaf Streak (RBLs). For this BALB/c mice were immunized with the antigenic protein extracted from the bacteria by means of ammonium sulfate sedimentation. The culture fluid supernatant of the 4 cell lines had titers of 1:20 to 1:160 and that of the ascitic fluid was 1:10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> by ELISA. ELISA run on 58 isolates of RBLs and 13 representatives of species from different sources, showed that the 4 McAbs recognized only bacteria of RBLs. The results also showed that the 4 McAbs acted against the same antigenic determinant. The degrees of relative affinity of the 4 McAbs for the pathogen were shown to be E<sub>8</sub> > A<sub>5</sub> > E<sub>5</sub> > F<sub>11</sub>. Using the McAbs to detect the bacteria in rice seeds was also demonstrated to be successful.

Key words: *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*; Monoclonal antibody; Detection of bacteria in rice seeds