

单克隆抗体技术在昆虫病毒研究中的应用

胡广淦 陆自强 杭三保 张 凌

乐云仙

(江苏农学院植保系, 扬州 225001)

(复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

APPLICATIONS OF MONOCLONAL ANTIBODY TECHNIQUE IN THE STUDIES OF INSECT BACULOVIRUSES

HU Guang-Gan LU Zi-Qiang HANG San-Bao ZHANG Ling

(Dept. of Plant Protection, Jiangsu Agricultural College, Yangzhou 225001)

LE Yun-Xian

(College of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

[提要] 本文论述了国内外昆虫病毒单克隆抗体方面的研究进展。着重介绍了单克隆抗体技术在昆虫病毒抗原结构分析、昆虫病毒的鉴定和分类、检测, 病毒感染昆虫细胞机理, 及昆虫病毒分子生物学研究方面的应用情况。

1975年, Köhler和Milstein创立的淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体技术, 是当今生物学领域中可以和DNA重组技术相提并论的一次重大技术革命。用杂交瘤技术制备的单克隆抗体, 与常规免疫血清(多克隆抗体)相比, 具有特异性强, 灵敏度高、质地均一, 可以大量生产等优点, 因而使其在近20年内得以迅速发展, 并渗透到生物科学的许多领域。在植物保护科学中, 国内外现已先后研制出多种植物病毒、细菌、类菌原体、螺原体、真菌、线虫和昆虫病毒的单克隆抗体, 并初步进行有关的应用研究, 显示出其优越性和广阔的应用前景。

1982年, 西德的Robert, P. L.等首次研制出5株分泌抗苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* NPV)单克隆抗体杂交瘤细胞株。1983年, 加拿大的Hohman, A. W.等也研制出34株抗AcNPV单克隆抗体。此后10年来, 一些昆虫病毒单克隆抗体相继问世。包括花旗松毒蛾核型多角体病毒(*Orgyia pseudotsugata* NPV) (Rebacca, L. Q., 1984)、美洲棉铃虫核型多角体病毒(*Heliothis zea* NPV) (Huang, H. S. et al., 1985)、粉纹夜蛾核型多角体病毒(*Trichoplusia ni* NPV) (Volkman, L. E., 1984)、家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori* CPY) (Akltomoke, 1984)、大菜粉蝶颗粒体病毒(*Pieris brassicae granuiosis virus*, PbGV) 和菜粉蝶颗粒体病毒(*Pieris rapae* GV, PrGV) (陈建国等, 1988)、云杉卷叶蛾核型多角体病毒(*Choristoneura fumiferane* NPV) (Faulkner, P., 1988)、家蚕浓核症病毒(*Bombyx mori densonucleosis virus*, BmDNV) (陈建国等, 1989)、棉铃虫核型多角体病毒(*Heliothis armigera* NPV) (姜成等, 1992)等10余种昆虫病毒单克隆抗体。

与其它动物病毒相比, 昆虫病毒单克隆抗体研究起步较晚, 但已初步显示出其广泛的应用前途。

1. 病毒抗原结构分析及抗原决定簇定位

单克隆抗体的高度特异性, 可用以鉴别不同昆虫病毒分离株间抗原结构上的微细差别。

注: 国家自然科学基金资助项目。

在大菜粉蝶颗粒体病毒 (PbGV) 和近缘的菜粉蝶颗粒体病毒 (PrGV) 的研究中, 陈建国等 (1988) 根据不同的单克隆抗体与昆虫病毒分离株的特异性反应, 可区别两者不同的病毒分离株。而 PbGV 的兔抗血清 (多克隆抗体) 与 PbGV 和 PrGV 的不同分离株都存在交叉反应, 多克隆抗体不能区别不同病毒分离株。他们根据单克隆抗体与各毒株反应结果, 结合 DNA 相似度分析, 提出 PrGV 与 PbGV 是抗原性有差异的同一种颗粒体病毒。

单克隆抗体可与病毒的一个或数个抗原决定簇结合, 因此根据单克隆抗体与病毒粒子的特异性反应, 可进行病毒抗原决定簇定位, 并区别出病毒特有或共有的抗原决定簇。用酶联免疫吸附测定表明, 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 单克隆抗体 3F₃ 和 5E₉ 杂交瘤细胞株针对的抗原决定簇为 32Kda 的多角体病毒蛋白, 而 3D₁₀ 细胞株针对的抗原决定簇则为 42Kda 的病毒衣壳蛋白 (Robert, P. L. 1982)。进一步研究发现, 3F₃ 和 5E₉ 细胞株分泌的单克隆抗体在不同杆状病毒之间存在交叉反应, 说明其抗原决定簇为杆状病毒共有, 而 3D₁₀ 只与 AcNPV 表现特异性反应, 说明其抗原决定簇为 AcNPV 所特有。Hohman, A. W. 等 (1983) 对 AcNPV 单克隆抗体研究也有类似结果。

2. 昆虫病毒的鉴定和分类

在自然界, 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 存在两种表型: OV 型 (PDV 型), 其囊膜是在结合进多角体蛋白基质前, 在细胞核内形成; OV 病毒主要起从罹病幼虫传染到其它幼虫的作用; BV 型病毒, 其囊膜主要在感染虫体细胞膜以出芽方式产生, BV 病毒在感染虫体内主要起在组织内相互传播的作用。OV 和 BV 两种表型病毒其限制性内切酶谱相同, 但其形态和生物学等方面存在差异。用常规多克隆抗体血清很难区分这两种表型, 而在制备 AcNPV 单克隆抗体以后, 单克隆抗体不仅可把 AcNPV 与亲缘极近的云杉卷叶蛾核型多角体病毒 (CfNPV) 分开, 而且可区别 AcNPV 的 BV 和 OV 两种表型病毒 (Hohman, A. W. et al., 1983)。Volkman, L. E. 等 (1984) 并由此建立了鉴定两种表型病毒高度专化性的检测方法。

运用单克隆抗体, 可以指导人们鉴定和选择有效的生物杀虫剂。花旗松毒蛾核型多角体病毒存在两种包涵体: 多粒包埋型 OpMNPV 和单粒包埋型 OpSNPV。OpMNPV 是花旗松毒蛾的有效杀虫剂, 已取得登记, OpSNPV 尽管对花旗松毒蛾也可致病, 但毒性不如 OpMNPV。OpMNPV 和 OpSNPV 抗原结构与理化特性相同, 都包埋于多角体蛋白晶体中, 常规免疫技术不能区别 OpMNPV 和 OpSNPV。Rebecca, L. Q. 等 (1984) 制备了分别针对 OpMNPV 和 OpSNPV 多角体的单克隆抗体。用单克隆抗体可区别这两种包埋类型的病毒, 并能用于鉴定罹病虫体提取物中的多角体类型。因此, 单克隆抗体为鉴定、监测有效杀虫剂 OpMNPV 提供了手段。

3. 昆虫病毒的检测

在昆虫病毒流行病学方面, 利用单克隆抗体进行检测, 可有效地排除自然界存在的其它病毒毒株对检测的影响, 灵敏、准确、迅速地检测田间虫体内病毒消长情况。用粉纹夜蛾核型多角体病毒 (TnNPV) 单克隆抗体检测田间幼虫虫体内 TnNPV 发现, 病毒感染虫体后 4 小时, 单克隆抗体即可测出虫体内的多角体蛋白, 而典型症状要在感染后 4 天才开始出现 (Volkman, L. E. et al., 1982)。张光裕等 (1988) 应用单克隆抗体检测感染云杉卷叶蛾核型多角体病毒 (CfNPV) 的云杉卷叶蛾幼虫体内多角体病毒和病毒粒子。3 龄幼虫饲喂表层涂有 CfNPV 人工饲料后 6 小时, 即可在幼虫抽提液中检出多角体蛋白抗原和病毒粒子抗原, 随

后此两种抗原量逐渐增加,直至等5天,而用染色涂片镜检法,则在添食病毒后3天才可观察到有少量多角体,病虫的病症需5~6天才出现。

单克隆抗体特异性强,如AcNPV单克隆抗体3D₁₀,针对AcNPV的42Kda病毒衣壳蛋白,仅与AcNPV反应,而不与其它11种昆虫核型多角体病毒株的衣壳蛋白反应。运用蛋白质印迹(Western-blot)-ELISA方法,灵敏度很高,可测出10ng蛋白量或 3×10^5 个多角体的AcNPV,因此,这种方法可用于检测各种粗提液如感染血淋巴,幼虫匀浆中的AcNPV(Naser, W. C. et al., 1982)。

4. 病毒感染昆虫细胞机理

Hohman, A. W.等(1983)制备的AcNPV单克隆抗体中,AcV1单克隆抗体能识别BV型病毒,并可与BV病毒粒子发生中和反应,而不与OV型病毒反应。他们用这种具有中和BV病毒的单克隆抗体研究BV病毒的出芽过程。发现在多角体形成之前,病毒出芽时期,单克隆抗体可与感染细胞表面反应。免疫电镜观察表明,抗原与中和性抗体反应在整个病毒囊膜上都可发生,但在其peplomers端浓度较高,用单克隆抗体可从BV病毒提取液中免疫沉降下4种蛋白,最主要的蛋白分子量约为64Kda,另3个蛋白质分别为127 Kda, 59 Kda, 和49 Kda。

BV型病毒在罹病虫体内组织间传染。用单克隆抗体研究BV型病毒侵入细胞的途径,可能有两不同的通道。单克隆抗体AcV1可阻断BV病毒较适宜的进入方式——吸附胞饮作用(adsorptive endocytosis)。进一步研究发现,未被AcV1中和的BV病毒粒子可通过另一种途径进入细胞。比较AcNPV的两种表型(BV和OV型)感染力的差异,在细胞间感染,BV型感染力大于OV型。这可能与两种表型病毒进入细胞机制有关。BV病毒通过吸附胞饮作用(adsorptive endocytosis)进入细胞的方式更为有效(Volkman, L. E. et al., 1985)。

5. 昆虫病毒分子生物学研究

在昆虫病毒分子生物学研究方面,单克隆抗体可用来作为探针,结合DNA基因文库(分子库),研究蛋白基因及进行DNA顺序测定。

在昆虫病毒感染后期,杆状病毒可产生至少两种过量蛋白质,一种是29Kda的多角体蛋白,包埋病毒,可抵抗不良环境,另一种蛋白P₁₀,其功能尚不清楚。Quant-Russell, R. L.等(1987)研制了OpMNPV病毒粒子蛋白单克隆抗体,根据蛋白质印迹试验,其中4株单克隆抗体可与OpMNPV病毒粒子14Kda蛋白反应,用这些单克隆抗体作为分子探针,可检出OpMNPV DNA λ gt11表达文库中免疫反应克隆,通过来自 λ gt11克隆的插入DNA与OpMNPV基因DNA酶切片段杂交及对 λ gt11插入末端定序,表明这些克隆含有P₁₀基因片段。他们利用单克隆抗体,通过蛋白印迹和免疫荧光法对P₁₀合成特性进行研究。在病毒感染后14小时,可用免疫荧光显微镜测出P₁₀蛋白质。感染后20小时,可形成染色致密的细胞质结构。用蛋白印迹试验,可观察到2种P₁₀(14Kda和15Kda)蛋白质。

P39是杆状病毒OV和BV表型共有的一种最主要的结构蛋白。Pearson, M. N.等(1988)制备了2株OpMNPV 39Kda蛋白的单克隆抗体。用蛋白印迹试验表明,两种单克隆抗体可与BV和OV表型的OpMNPV病毒粒子39Kda蛋白反应。用其中一种单克隆抗体,通过蛋白印迹和免疫荧光染色技术,研究舞毒蛾细胞中P39合成特性。发现侵染后24小时,利用荧光显微镜可测出P39蛋白质。48小时后,可在胞核中测出P39蛋白,而在胞质中检出很少或根本

检测不到,说明P39蛋白从胞质已运输到胞核中,而降低了胞质中P39浓度。用两种单克隆抗体从一个 λ gt11 OpMNPV DNA表达文库中检出3株免疫反应克隆。通过用3株 λ gt11克隆的插入DNA与OpMNPV基因DNA酶切片段杂交,对OpMNPV基因组上39Kda基因位点进行了定位。利用 λ gt11插入DNA和单克隆抗体分析OpMNPV和AcMNPV P39基因和蛋白,表明在大小、DNA顺序和抗原性上,OpMNPV和AcMNPV有密切联系。

总之,单克隆抗体技术在昆虫病毒鉴定、分类,田间早期检测,流行病学研究,基因产物定位等方面有广泛的应用潜力。研制昆虫病毒单克隆抗体诊断试剂,逐步取代常规抗血清,已成为大势所趋。今后,单克隆抗体结合其它技术如DNA重组,cDNA文库等,可进一步深入研究昆虫病毒的结构、功能和复制等机制问题。为用昆虫病毒防治农林作物害虫,提供有效的监测手段。

主要参考文献

- [1] 陈建国,等. 1988. 应用菜粉蝶颗粒体病毒单克隆抗体对不同株病毒进行抗原分析. 病毒学报, 4(2): 137~141.
- [2] 陈建国,等. 1989. 抗家蚕浓核症病毒单克隆抗体的研制及其在诊断上的应用. 病毒学报, 5(1): 77~82.
- [3] 张光裕,等. 1988. 用单克隆抗体结合酶联免疫吸附试验检测云杉卷叶蛾幼虫体内的核多角体病毒. 病毒学报, 4(1): 61~64.
- [4] 姜成,等. 1993. 棉铃虫单粒包埋型核型多角体病毒粒子单克隆抗体制备及抗原特性分析. 江苏农学院学报, 14(1): 47~52.
- [5] Akltomike, et al. 1984. Preparation of monoclonal antibodies to the *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Seric. Sci. Japan., 53(1): 59-63.
- [6] Hohman, A. W. et al. 1983. Monoclonal antibodies to baculovirus structural proteins: determination of specificities by western blot analysis. Virology, 125, 432-444.
- [7] Huang, Y. S. et al. 1985. Monoclonal antibodies identify conserved epitopes on the polyhedrin of *Heliothis zea* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 143, 380-391.
- [8] Naser, W. L. et al. 1983. Rapid baculovirus detection, identification, and serological classification by western blotting-ELISA using a monoclonal antibody. J. Gen. Virol., 64, 639-647.
- [9] Pearson, M. N. et al. 1988. p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. Virology, 167, 407-418.
- [10] Quant-Russell, R. L. et al. 1987. Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. Virology, 160, 9-19.
- [11] Rebecca, L. Q. et al. 1984. Production of polyhedrin monoclonal antibodies for distinguishing two *Orygia pseudotsugata* baculovirus. Applied and Environmental Microbiology, 48(4): 732-736.
- [12] Robert, P. L. et al. 1982. Characterization of monoclonal antibodies to the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 122, 424-430.
- [13] Volkman, L. E. et al. 1982. Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect the presence of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera, Noctuidae) 's nuclear polyhedrosis virus polyhedrin in *T. ni* larvae. J. of Econo. Entomol., 75(5): 868-871.
- [14] Volkman, L. E. et al. 1984. Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen. Virology, 133, 354-362.
- [15] Volkman, L. E. et al. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. Virology, 143, 185-195.