

APPLICATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN AGRICULTURE



单克隆

抗体

刘秀亮 主编

在农业上

的应用

当代科技重要著作·农业领域
国家“八五”重点图书

刘秀梵 主编

单克隆抗体 在农业上的应用

APPLICATION OF
MONOCLONAL
ANTIBODIES
IN AGRICULTURE

安徽科学技术出版社

449898

(皖)新登字 02 号

责任编辑:汪卫生

装帧设计:蒋万景

单克隆抗体在农业上的应用

刘秀梵 主编

*

安徽科学技术出版社出版

(合肥市九州大厦八楼)

邮政编码:230063

安徽省新华书店经销 安徽新华印刷厂印刷

*

开本:850×1168 1/32 印张:13.125 字数:329 000

1994年11月第一版 1994年11月第一次印刷

印数:3 000

ISBN 7-5337-1114-9/S·168 定价:25.00元

449898

1
4
1
-
6
E
E

前 言

单克隆抗体技术自 1975 年问世以来,已在生物医学科学的各个领域里取得了极其广泛的应用,其中包括在农业研究和农业生产中的应用。自 1982 年以来,我国农业用单克隆抗体研究一直是农业生物技术研究的一个很活跃的领域,已取得多项研究成果,其中有的达到了世界先进水平。经过 10 多年努力,我国已研制出农业用单克隆抗体近百种,不仅为农业研究提供了先进的工具,而且有的已成为正式产品,在农业生产中推广应用,取得了显著的经济效益和社会效益。

为了总结我国在农业用单克隆抗体研究方面所取得的成果,推动这一先进技术 in 农业研究和农业生产中的应用,我们组织编写了这本《单克隆抗体在农业上的应用》。编著者大多是承担有关单克隆抗体研究的课题主持人或主要研究人员,长期活跃在科研、教学和生产的第一线。全书共分两部分。1—4 章介绍单克隆抗体技术的原理和方法,旨在帮助那些没有经过系统免疫学知识训练的农业科技工作者和有关实验室工作人员更好地理解、掌握和应用这一先进技术,为农业科学研究和农业生产服务。5—9 章是这本书的重点,系统介绍了 38 种重要的农业用单克隆抗体,其中与动物有关的单克隆抗体 26 种,与植物有关的单克隆抗体 12 种。对每种单克隆抗体除介绍有关背景,简述其制备过程和特性鉴定外,还重点讨论了应用的各个方面,并对今后的发展方向进行了评述。编著者们作了很大的努力,力求使这本书反映我国 10 多年来农业用单克隆抗体研究的主要成果,以及国外同类研究的进展。本书可作为高等农业院校各有关专业的教学参考用书,对广大农业科技

工作者也有重要的参考价值。

在本书编写过程中,我们得到了国内很多农业专家的鼓励和支持,编著者们通力协作,在繁忙的日常工作之余抽出时间收集和整理资料,及时完成书稿,特此表示衷心的感谢。

由于我们水平有限,书中难免存在缺点、错误和疏漏之处,希望广大读者批评指正。

刘秀梵

1994年1月

主 编 刘秀梵

编著者 (按姓氏拼音顺序排列)

陈溥言 陈永萱 陈毓川

程由铨 崔治中 董国雄

杜重波 方 元 高 远

黄寿森 焦新安 孔宪刚

李俊宝 李彦敏 李忠润

刘滨东 刘长明 刘晓明

刘秀梵 刘 玗 吕兆启

迈迪娜 丘惠深 苏 雄

谭 国 田增义 王景琳

王克领 王远程 徐崇波

许威光 袁文甫 张成良

张志东 张作芳 周长文

周鼎年 朱 华

内 容 提 要

本书系统总结了我国近 10 年来农业用单克隆抗体研究的主要成果,同时扼要介绍了国外同类研究的新进展。全书分两篇。第一篇(1-4 章)介绍单克隆抗体技术的原理和方法,旨在帮助那些没有经过系统免疫学知识训练的农业科技工作者和有关实验室工作人员更好地理解、掌握和应用这一先进技术,为农业科学研究和农业生产服务。第二篇(5-9 章)分别介绍了 38 种农业用单克隆抗体,其中与动物有关的 26 种,与植物有关的 12 种。本书除简述这些单克隆抗体的制备过程和特性鉴定外,还重点讨论了应用的各个方面,并对今后的研究方向进行了评述和展望。本书可供高等农业院校师生和广大农业科技工作者参考。

目 录

第一篇 单克隆抗体技术的原理和方法

第一章 单克隆抗体和多克隆抗体.....	(1)
第一节 抗体:一种特异的生物探针	(1)
第二节 单克隆抗体.....	(2)
第三节 单克隆抗体和多克隆抗体的比较.....	(4)
第四节 单克隆抗体标准试剂.....	(9)
参考文献	(10)
第二章 杂交瘤技术	(11)
第一节 基本原理	(11)
第二节 基本方法和程序	(22)
参考文献	(47)
第三章 单克隆抗体试剂的生产	(50)
第一节 单克隆抗体的大规模制备	(50)
第二节 单克隆抗体的纯化	(52)
第三节 单克隆抗体 Ig 活性片段制备.....	(58)
第四节 单克隆抗体的标记	(60)
第五节 单克隆抗体药盒	(65)
参考文献	(67)
第四章 单克隆抗体技术的发展	(69)
第一节 杂交瘤技术的发展	(69)
第二节 基因工程抗体	(73)
参考文献	(76)

第二篇 农业用单克隆抗体

第五章 动物病毒单克隆抗体	(79)
第一节 新城疫病毒单克隆抗体	(79)
第二节 鸡马立克氏病单克隆抗体	(97)
第三节 猪瘟病毒和牛病毒性腹泻-粘膜病病毒 单克隆抗体	(109)
第四节 口蹄疫病毒单克隆抗体	(118)
第五节 马传染性贫血病病毒单克隆抗体	(128)
第六节 猪水泡病病毒单克隆抗体	(139)
第七节 伪狂犬病病毒单克隆抗体	(146)
第八节 雏鸭肝炎病毒单克隆抗体	(153)
第九节 鸡传染性法氏囊病病毒单克隆抗体	(156)
第十节 禽白血病病毒单克隆抗体	(162)
第十一节 网状内皮增生病病毒单克隆抗体	(172)
第十二节 小鹅瘟病毒单克隆抗体	(181)
参考文献	(188)
第六章 畜禽病原细菌单克隆抗体	(200)
第一节 产肠毒素性大肠埃希氏菌粘附素单克隆抗体	(200)
第二节 沙门氏菌单克隆抗体	(220)
第三节 猪痢疾密螺旋体单克隆抗体	(240)
第四节 羊布鲁氏菌单克隆抗体	(245)
第五节 钩端螺旋体单克隆抗体	(249)
第六节 鼻疽菌和类鼻疽菌单克隆抗体	(254)
第七节 结核杆菌和副结核杆菌单克隆抗体	(263)
第八节 真菌毒素单克隆抗体	(271)
参考文献	(282)

第七章 与畜禽有关的其它单克隆抗体	(292)
第一节 弓形虫单克隆抗体.....	(292)
第二节 旋毛虫单克隆抗体.....	(299)
第三节 唾传锥虫单克隆抗体.....	(309)
第四节 雄烯二酮单克隆抗体.....	(317)
第五节 控制和鉴定动物性别的单克隆抗体.....	(326)
第六节 畜禽免疫球蛋白单克隆抗体.....	(342)
参考文献.....	(346)
第八章 植物病毒单克隆抗体	(355)
第一节 马铃薯 Y 病毒单克隆抗体	(355)
第二节 马铃薯 X 病毒单克隆抗体	(360)
第三节 烟草花叶病毒单克隆抗体.....	(364)
第四节 黄瓜花叶病毒单克隆抗体.....	(367)
第五节 大豆花叶病毒单克隆抗体.....	(370)
第六节 芜菁花叶病毒单克隆抗体.....	(374)
第七节 葡萄扇叶病毒单克隆抗体.....	(376)
参考文献.....	(378)
第九章 植物病原细菌单克隆抗体	(383)
第一节 水稻白叶枯病菌单克隆抗体.....	(383)
第二节 植物青枯病菌单克隆抗体.....	(391)
第三节 桑萎缩病类支原体单克隆抗体.....	(400)
第四节 枣疯病类支原体单克隆抗体.....	(402)
第五节 蜜蜂螺原体单克隆抗体.....	(406)
参考文献.....	(409)

单克隆抗体技术的原理和方法

第一章 单克隆抗体和多克隆抗体

第一节 抗体：一种特异的生物探针

抗体(antibody)是人或动物体在抗原刺激下产生的能与该抗原特异结合的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。免疫球蛋白依其化学结构和抗原性的不同可分为 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD。体液性抗体由 B 淋巴细胞系的浆细胞产生和分泌,存在于组织液、淋巴液、血液和脑脊髓液等体液中。抗体作为一种特异的生物探针主要依赖于它的特异性。在通常情况下,抗体只与相应的抗原发生反应,而不与其它抗原反应。这种特异性是由抗体分子上 Fab 片段的抗原结合部与相应抗原决定簇互相适合所决定的。在生物医学科学领域,抗体广泛用于抗原物质的鉴别、定位、分析和提纯,它不仅是多种病原体的诊断和检疫试剂,而且还是人和动物某些疾病的有效治疗药物。

要产生高度特异的抗体,首先需要高纯度的抗原,这在很多情况下是很困难的。除抗原纯度外,抗体制剂的特异性和效价还受

到免疫程序、动物个体差异、采血时间、血清抗体提纯的方法等多种因素的影响,所以不同批次的制剂质量差异很大。常规的抗体制备是通过动物免疫和采集抗血清的方法产生的,因此通常含有针对其它无关抗原的抗体和血清中其它蛋白质成分。一般的抗原分子大多含有多个不同的抗原决定簇,所以即使抗原很纯,常规抗体制备也是针对多个不同抗原决定簇抗体的混合物。进一步说,针对同一抗原决定簇的抗体仍是由不同 B 细胞克隆产生的不同质的抗体组成的。因此,常规血清抗体又称多克隆抗体(polyclonal antibody),简称多抗。

由于常规抗体的多克隆性质,使它作为一种特异的生物探针还存在不可避免的缺点。生产针对预定抗原的高度特异而又高度均匀一和同质的抗体,多年来一直是免疫学家努力的目标。随着杂交瘤技术的诞生,制备针对单个抗原决定簇的高度同质而又能保证无限量供应的单克隆抗体已成为普通实验室的日常操作,这是免疫学领域里的一次真正的革命,也使抗体作为一种特异的生物探针有了新的生命力,获得了更广泛的应用。

第二节 单克隆抗体

1975年,Köhler 和 Milstein^[7]建立了淋巴细胞杂交瘤技术,他们把用预定抗原免疫的小鼠脾淋巴细胞与能在体外培养中无限制生长的骨髓瘤细胞融合,形成具有双亲特征的杂交瘤细胞。这种杂交瘤细胞既像脾淋巴细胞那样能合成和分泌针对预定抗原的抗体,又像骨髓瘤细胞那样在体外培养中永生不死。通过克隆化可得到来自单个细胞的杂交瘤细胞系,它所分泌的抗体是针对同一抗原决定簇的,在分子上是同质的抗体,即所谓单克隆抗体(monoclonal antibody),简称单抗。图 1-1 示意多克隆抗体与单克隆抗体的形成过程。

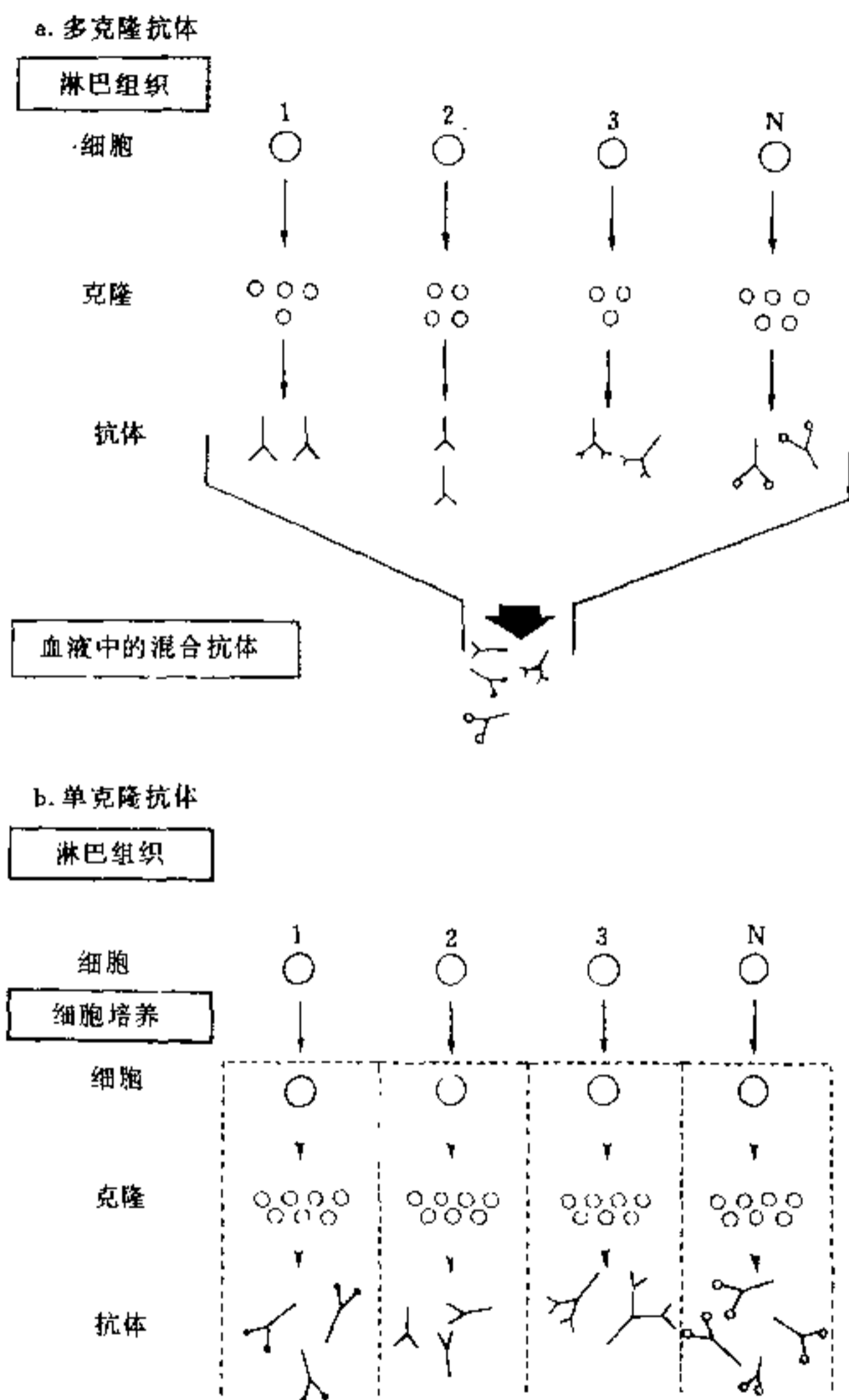


图 1-1 多克隆抗体和单克隆抗体形成过程的比较

因为单抗是针对单个抗原决定簇的在分子上完全同质的抗体,所以单抗的特异性是多抗不能比拟的。用单抗可以对抗原物质作多抗无法进行的精细分析和测试。单抗能用体内或体外方法无限量生产,且比多抗易于提纯,因此作为试剂更容易标准化。由于单抗的优越性,所以在它问世不久即在生物医学科学的许多领域获得越来越广泛的应用,促进了植物学、细胞生物学、分子生物学、生物化学、胚胎学、内分泌学、酶学、法医学、遗传学、血液学、微生物学、神经生理学、寄生虫学、基础与临床医学和兽医学等众多学科的发展^[1,2,4,5,6,8,9,11,12]。Köhler 和 Milstein 两人由于建立杂交瘤技术生产单克隆抗体的伟大贡献而荣获 1984 年度诺贝尔生理学 and 医学奖。

第三节 单克隆抗体和多克隆抗体的比较

与多抗相比单抗有很多优点,但是制备单抗比制备多抗的投入要大得多,此外也不是在所有的情况下单抗一定都比多抗优越,因此在今后相当长的时间内,尽管单抗试剂会越来越多,但仍然需要多抗试剂。为了更好地使用单抗,我们需要对单抗的特性及单抗与多抗之间的区别有全面的了解。

(一) 单抗的主要优点

1. 高度同质性 单抗是由源于一个 B 淋巴细胞的单克隆杂交瘤细胞系所分泌的,因此抗体分子是同质的,即抗体分子是完全一样的;而多抗是由多种异质抗体分子组成的。

2. 高度特异性 单抗以全或无的方式与特定抗原决定簇反应,一般不发生交叉反应。因为单抗是针对单个抗原决定簇的,因此它可以测定抗原分子上用多抗无法测定的微细差异。用不纯净的抗原可以得到针对特定靶抗原的单抗,甚至仅微量存在的靶抗

原的特异单抗。

3. 无限量供应性 分泌特异单抗的杂交瘤细胞系一旦建立即可在液氮中长期冻存,并可根据需要随时生产理化特性和免疫生物学特性明确的单抗试剂。同一种单抗试剂不同批次的差异很小,便于试验的标准化。对于需求量大的单抗试剂,相对的投入比制备多抗试剂要少。

(二) 单抗的交叉反应

特异性强是单抗的特性,但有时单抗可与相关或不相关的抗原发生交叉反应。因为单抗所识别的是抗原分子上的单个抗原决定簇,其它相关或不相关的抗原分子上有相同或相似的抗原决定簇就可发生交叉反应。例如有些鸡马立克氏病病毒单抗可以与伪狂犬病病毒发生交叉反应。认识单抗的交叉反应性对我们根据需要筛选合适的单抗很重要。有时我们需要筛选没有交叉反应的单抗,例如在制备新城疫病毒单抗时,首先要去掉与其它副粘病毒发生交叉反应的单抗。因为新城疫病毒有些抗原决定簇是与其它副粘病毒相同的。有时我们需要利用这种交叉反应性,例如筛选沙门氏菌的属特异单抗。我们无法制备沙门氏菌的属特异多抗,因为虽然存在为绝大多数沙门氏菌所共有的决定簇,但它们都不是免疫优势决定簇,所以在多抗制备中针对这种属共同决定簇的抗体含量极微,我们可以制备针对这种属特异决定簇的单抗,作为检测沙门氏菌的试剂。

从实用意义上说,我们用单抗试剂取代多抗试剂之前,首先要对所选用的单抗用尽可能多的相关或不相关抗原作特异性和交叉反应性的详细鉴定。

(三) 单抗有时可能太特异

前面已经提到多抗的特异性取决于成万个克隆所产生抗体的



总效应,这些抗体与抗原表面相应的抗原决定簇结合。因此,由遗传多态性、糖基化异质性或轻度变性造成的抗原结构的微小变化,通常不影响这些抗原与多抗的结合。多抗制备中的某些抗体亚群通常可结合已改变或变性的抗原。

与多抗不同,单抗通常只结合抗原分子上相应的抗原决定簇,不论何种原因使该部位发生改变,单抗可继续结合或不能再结合,均决定于一种抗体分子的单独效应。由遗传多态性、糖基化异质性或轻度变性造成的抗原结构微小变化,都可能使反应完全不同。在很多情况下这是单抗的优点,能测定抗原的微细差异或变化;但有时这也使单抗显得太特异,在用单抗取代多抗用作诊断试剂时尤其应注意这一点。有些单抗诊断试剂可以用几种单抗配制,使其特异性和在检测系统中的反应性适合于各种情况。

(四) 单抗的亲合力

大多数多克隆抗血清含有亲和力波动范围很大的抗体,其平衡常数从不到 10^6L/mol 到大于 10^9L/mol 。亲和力小于 10^6L/mol 的抗体用标准方法不易测出,在大多数情况下高亲和力抗体主导了多抗试剂的特异性。但很高亲和力的抗体只占抗体总量的一小部分,可以推测,高亲和力的单抗在单抗中也只占较小的比例。

多抗的高度异质性使它在部分抗体发生共价改变不能再结合抗原时,仍保留足够的反应性。即使 95% 以上的抗体被破坏,抗原-抗体结合仍能被查出。单抗的情形则不同,有时抗原或抗体发生广泛改变而不影响抗原-抗体结合,有时抗原或抗体发生很小的改变就能完全取消抗原-抗体结合。

单抗的同质性意味着每种单抗都有确定的亲和力。用单抗作亲和层析或免疫荧光试验时通常需充分洗涤以除去未结合的抗体,如单抗的亲合力低,过度洗涤会造成抗原-抗体复合物的解离。

多抗与抗原的结合在相当大的 pH(4—9) 和氯化钠浓度(0—

1mol/L)范围内是稳定的,而有些单抗则可能对微小的变化敏感。一些单抗的低亲和性和对环境变化的敏感性不一定是缺点,例如用低亲和性单抗做亲和层析可以在很温和的条件下洗脱。

为了得到在亲和性、与变性抗原的结合能力和对环境条件的敏感性等方面都符合要求的单抗,在设计杂交瘤筛选方法时就应考虑这一点。如果要得到高亲和力抗体,则筛选试验孵育的时间要短。如果要得到能识别变性抗原或在特定离子环境中抗原的抗体,在筛选试验中应使用这些条件。

由于单抗的上述特点,我们应根据将来使用单抗的目的来筛选合适的单抗,在采用的试验系统中控制试验条件。有些单抗是严格检测试验特异的,如仅在免疫荧光试验中反应,而在酶联免疫吸附试验(ELISA)和其它试验中不发生反应;有些单抗则可在多种血清学试验中表现活性,如同时有免疫荧光反应、ELISA反应和中和反应等。有些单抗在吸附于固相载体后完全丧失了捕捉抗原的能力;有些单抗则在标记后失去抗体活性。往往在众多的特异性相同的单抗中只能选出一二株是适合于选定的试验系统的。为了有选择的余地,我们在筛选杂交瘤细胞系时不要轻易丢弃特异性相同而理化特性和其它免疫生物学特性不同的单抗。

(五) 单抗的其它特性

1. 结合抗原的动力学特性 有些单抗与抗原结合达到平衡所需时间较长(90min以上),有的则较短(15min左右)。结合的快慢与反应的温度条件也有很大关系。由于单抗结合抗原的这种动力学特性,使反应时间保持恒定是很重要的,否则会影响试验的准确性和可重复性。

2. 与抗原交叉连结的能力 抗原分子上有两个或两个以上重复的抗原决定簇时,单抗才能与之发生交叉连结。在琼脂扩散试验中,当抗原是二聚体或多聚体时单抗才能与之形成沉淀物,产生