DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 276 105 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 P 21/00
C 12 N 5/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 320 568 1 (22) 10.10.88 (44) 14.02.90

(71) Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Institut für Phytopathologie, Theodor-Roemer-Weg, Aschersleben, 4320, DD

(72) Rabenstein, Frank, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Proll, Eckhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Reichenbächer, Dieter, Dr. agr. Dipl.-Landw.; Richter, Johannes, Prof. Dr. sc. Dipl.-Biol.; Haase, Anita, Dipl.-Gartenbauing., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen das Kartoffelblattroll-Virus (potato leaf roll virus)

(55) monoklonale Antikörper, Kartoffelblattroll-Virus (potato leaf roll virus), Zellkultur, Hybridzellklone, Spezifität, Bindungsfähigkeit, Antigendeterminanten, Testsystem, Antikörperproduktion, Aszitesflüssigkeiten, Diagnose, Pflanzenmaterial, pflanzliche Virusdiagnostik

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen das Kartoffelblattroll-Virus (potato leaf roll virus, PLRV). Ziel der Erfindung ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern definierter Spezifität und hoher Bindungsfähigkeit in guten Ausbeuten. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man in an sich bekannter Weise Milzzellen von Mäusen, die mit PLRV immunisiert wurden, mit P3X63-Ag8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die Antikörper-produzierenden Hybridzellen auswählt, die Spezifität der Antikörper bestimmt, die reaktivsten und gegen verschiedene Antigendeterminanten gerichteten Antikörper ermittelt, die spezifischen und zum Aufbau eines Testsystems zum Nachweis des PLRV in Pflanzenmaterial am besten geeigneten Hybridzellklone auswählt und erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper durch Kultivierung und nach Transplantation auf histokompatible Mäuse in der Aszitesform einsetzt. Die geeignetsten Hybridzellklone IfP-R10-B/G3, IfP-R10-A/A2 und IfP-R10-A/B10 wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR (Liste 1988) unter den Nummern ZIM-0123, ZIM-0119 und ZIM-0115 hinterlegt. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die pflanzliche Virusdiagnostik.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen das Kartoffelblattroll-Virus (potato leaf roll virus, PLRV) durch Immunisation von Mäusen mit PLRV, Fusion ihrer Milzzellen mit Myelomzellen, Selektion PLRV-reaktiver Hybridzellklone, Auswahl der spezifischen, bindungsstärksten und gegen unterschiedliche PLRV-Determinanten gerichteten, zum Aufbau eines Testsystems zum Nachweis des PLRV in Pflanzenmaterialien am besten geeigneten Antikörper-produzierenden Hybridzellklone und ihre Kultivierung bzw. Transplantation auf Mäusen in der Aszitesform, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation die Hybridzellklone IfP-R 10-B/G 3 (ZIM-Liste 1988 = ZIM-0123), IfP-R 10-A/A 2 (ZIM-Liste 1988 = ZIM-0119) und IfP-R 10-A/B 10 (ZIM-Liste 1988 = ZIM-0115) eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Antigendeterminanten des Kartoffelblattroll-Virus (potato leaf roll virus, im folgenden mit PLRV abgekürzt). Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Diagnose von Pflanzenviren.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Das PLRV ist ein aphidenübertragbares Pflanzenvirus, das zur Gruppe der Luteoviren gehört. Es verursacht eine Erkrankung an Kartoffelpflanzen, die mit Ertragseinbußen von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung verbunden sein können. Für die Virusdiagnose werden Enzymimmunoassays angewandt. Infolge der geringen Konzentration, die Luteoviren in ihren Wirten erreichen, erfordert die Virusreinigung und Herstellung von diagnostischen Antiseren einen hohen Aufwand an Gerätetechnik, Material und Zeit (PROLL, E., et. al., Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz 20 [1984], 1–13).
Monoklonale Antikörper besitzen dagegen neben ihrer ausgezeichneten Spezifität die Eigenschaft, daß sie in großer Menge produziert werden können, ohne jedesmal gereinigtes Antigen zur Verfügung haben zu müssen.
Die Herstellung von zwei mAk gegen PLRV gelang bereits Martin und Stace-Smith (1984) (MARTIN, R.R., und STACE-SMITH, R., Can. J. Plant Pathol. 6 [1984], 206–210). Diese mAk reagierten unter Verwendung von polyklonalen Kaninchen IgG als coating-Antikörper in einem indirekten DAS-ELISA antigenspezifisch, zeigten aber z.T. auch eine unspezifische Bindung an die Plastoberfläche von ELISA-Testplatten. Nach Enzymmarkierung verloren sie vollständig ihre Aktivität und waren somit nicht in einem direkten DAS-ELISA einsetzbar.
Weitere zehn monokonale Antikörper wurden in Großbritannien gegen ein Isolat des PLRV hergestellt (MASSALSKI, P.R., und HARRISON, B.D., J. gen. Virol. 68 [1987], 1813–1821). Diese monoklonalen Antikörper konnten zur Unterscheidung von Isolaten des PLRV eingesetzt werden, die z.T. durch ausschließlich vegetative Vermehrung des Wirtes die Fähigkeit zur Übertragung durch Blattläuse verloren hatten. Die Herstellung neuer spezifischer Antikörper mit besseren, den schon vorhandenen monoklonalen Antikörpern fehlenden Eigenschaften, ist zum Aufbau routinemäßig einsetzbarer Testsysteme wünschenswert.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, monoklonale Antikörper gegen PLRV mit hoher Spezifität und starker Bindungsfähigkeit in guten Ausbeuten herzustellen. Diese Antikörper sollen zum Aufbau eines Testsystems geeignet sein, das zum Nachweis des PLRV verwendet werden kann. Der Virusnachweis soll sowohl im Blattmaterial als auch in Kartoffelkeimen möglich sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen antigene Determinanten des PLRV ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannter Weise Milzzellen von Mäusen (z.B. von A/J- oder Balb/c-Mäusen), die mit PLRV nach einem bestimmten Schema immunisiert wurden, mit X63-Ag8.653-Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die fusionierten Zellen in Gewebekulturplatten aussät, mit Hilfe eines Selektionsmediums die Hybridzellen selektiert, mit Hilfe eines indirekten Enzymimmunoassays, der in zwei Varianten durchgeführt wird, diejenigen Hybridomzellen nachweist, die Antikörper gegen natives oder gereinigtes PLRV produzieren, die Spezifität bestimmt, danach die spezifischen klonierten Hybridomzellinien, welche monoklonale Antikörper mit der größten Bindungsfähigkeit gegen Antigendeterminanten des PLRV produzieren auswählt, weitervermehrt und ggf. nach Lagerung in flüssigem Stickstoff, erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper durch Kultivierung oder nach Transplantation auf histokompatible Mäuse in der Aszitesform einsetzt.
Die monoklonalen Antikörper, die im Aszites oder in gesammelten Kulturüberständen enthalten sind, werden in an sich bekannter Weise durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatografie an DEAE-Cellulose gereinigt und können dann mit einem Enzym oder anderen Marker konjugiert werden.
Wesentliche Bestandteile der Erfindung sind:
1. das eingesetzte Immunisationsschema, das die B-Lymphozyten der Milz in einen für die Zellfusion günstigen Zustand bringt und somit zur Herstellung von Hybridzellen führt, die monoklonale Antikörper mit hoher Bindungsfähigkeit produzieren

2. der zur Selektion der antikörperproduzierenden Hybridome eingesetzte Enzymimmunoassay, der in folgenden Varianten durchgeführt wird:
   a) gereinigtes PLRV, suspendiert in PBS-Puffer (*p*H 7,2), wird an Mikrotestplatten gebunden, danach werden die freien Bindungsstellen an der Plastoberfläche mit Rinderserumalbumin abgeblockt, im nächsten Schritt mit dem Kulturüberstand der Hybridome und anschließend mit enzymmarkiertem Anti-Maus-Immunglobulin inkubiert
   b) Anti-PLRV-IgG (gereinigt aus Kaninchenantiserum) wird an Mikrotestplatten gebunden, danach erfolgt eine Inkubation mit lyophilisierten PLRV-infizierten Kartoffelpreßsäften (als Negativkontrolle wird Saft aus gesunden Pflanzen verwendet), anschließend wird mit Kulturüberstand der Hybridome und danach mit enzymmarkiertem Anti-Maus-Immunglobulin inkubiert
3. daß die erfindungsgemäß eingesetzten Hybridzellinien monoklonale Antikörper gegen verschiedene Determinanten (Epitope) des PLRV sezernieren
4. daß diejenigen monoklonalen Antikörper ausgewählt werden, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind und gleichzeitig die größte relative Bindungsfähigkeit besitzen.

Die für die erfindungsgemäße Antikörperproduktion eingesetzten Hybridzellklone wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR unter folgenden Nummern hinterlegt:

ZIM-0123:IfP-R10-B/G3
ZIM-0119:IfP-R10-A/A2
ZIM-0115:IfP-R10-A/B10.

Die durch die Erfindung hergestellten neuen monoklonalen Antikörper zeichnen sich durch die spezifische Erkennung von nativem PLRV in Pflanzensäften aus und sind gegen die Antigendeterminanten A, B und C gerichtet. Die Antikörper eignen sich somit zum Aufbau von Testsystemen, in denen sie einzeln oder in Kombination eingesetzt werden können.
Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

1. Immunisation von A/J-Mäusen
   Etwa vier Wochen alte A/J-Mäuse wurden nach folgendem Schema mit einem gereinigten PLRV-Präparat immunisiert:

Immunisation	Tage	verabreichte Mengen und Form
1.	0	60 µg in FA komplett i. p.
2.	28	60 µg in FA inkomplett i. p. und s. c.
3.	100	10 µg i. v. und 20 µg i. p. ohne Fa
4.	123	15 µg i. v. ohne FA
5.	124	15 µg i. v. und 15 µg i. p. ohne FA
6.	125	20 µg i. v. und 20 µg i. p. ohne FA
7.	126	20 µg i. p. ohne FA.

   Hervorzuheben ist, daß die Boosterinjektionen ab 123. Tag (Start 4 Tage vor Fusionsbeginn) sämtlich ohne Freundsches Adjuvans (FA) verabreicht wurden.
2. Herstellung der Hybridzellen aus Milzzellen von A/J-Mäusen und X63-Ag 8.653 Myelomzellen.
   Die Fusion von Milz- und Myelomzellen, Kultivierung von Hybridzellen, Klonierung etc. erfolgte nach Standardmethoden entspr. KÖHLER, G., und MILSTEIN, C., Nature **256**, 495–497 sowie GODING, J.W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, London (1983).
3. Selektion der Antikörper-produzierenden Hybridzellen
   Variante a)
   Gereinigtes PLRV in einer Konzentration von 1 µg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), *p*H 7,2 bzw. gereinigtes Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus, CMV) als Negativkontrolle werden durch Inkubation von je 100 µl/well über Nacht im Kühlschrank an Mikrotestplatten gebunden. Der Inhalt der Testhöhlungen wird ausgeschüttet und diese dann für etwa 30 Min. mit einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung (RSA) erneut gefüllt. Die Verwendung von PLRV in PBS führt dazu, daß das Virus in seiner Struktur weitgehend erhalten bleibt. Eine Inkubation mit RSA bewirkt, daß eine unspezifische Bindung an Plaste verhindert wird, indem freie Bindungsstellen abgeblockt werden.
   Nach der Blockierung erfolgt eine Inkubation mit 100 µl Zellkulturüberstand von Hybridomen für 2 Std. Der Nachweis der gebundenen monoklonalen Antikörper wird entsprechend etablierter Methoden durchgeführt (RABENSTEIN, F., et al., Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz **20**, 517–519).
   Variante b)
   Aus Kaninchenantiserum gereinigte Anti-PLRV-Immunglobuline werden in einer Konzentration von 1 µg/ml in Coatingpuffer (0,05 M Natriumcarbonat mit 0,01% Natriumazid, *p*H 9,6) gelöst und durch 4 Std. Inkubation im Kühlschrank an Mikrotestplatten gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween erfolgt eine Inkubation im Kühlschrank über Nacht mit PLRV-infizierten bzw. gesunden Kartoffelblattsäften. Der Saft wird mittels einer Walzenpresse hergestellt und im Verhältnis 1:4 mit Extraktionspuffer (PBS mit 2% Polyvinylpyrolidon und 0,2% RSA) gemischt. Dieses Gemisch wird in Ampullen abgefüllt und anschließend gefriergetrocknet. Die Verwendung von lyophilisiertem Pflanzenmaterial bietet den Vorteil, daß während der ganzen Jahreszeit virushaltiges Testmaterial zur Verfügung steht.
   Nach der Inkubation mit Pflanzensäften wird mit PBS-Tween gewaschen und mit 100 µl Hybridomzellkulturüberstand für 2,5 Std. inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt wie in Variante a).

Im Gegensatz zu früheren Fusionsexperimenten (z.B. R3) konnte unter Verwendung des oben beschriebenen Immunisationsschemas die Fusionsrate und die Anzahl positiver Hybridzellinien wesentlich erhöht werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1:
Selektion PLRV-reaktiver Hybridomzellinien

Fusion	Wachstum	positive Hybridome	stabile Primärklone	unabhängige Zellinien
R3	36/192	18	1	0
R10	455/480	50	36	bisher 10

Während R3 keine verwertbaren Hybridomzellinien ergab, wurden aus R10 insgesamt 36 stabile Primärklone erhalten und in flüssigem Stickstoff gelagert. Von diesen 36 Hybridzellklonen wurden im Screening 28 ausgewählt, die positive Werte in den Testvarianten a) und b) ergaben (A_{405}-Werte größer als 0,25). Bisher konnten 10 unabhängige Hybridomzellinien nach Zellklonierung etabliert werden.

4. Herstellung der Antikörper
Die ausgewählten Hybridzellklone wurden zur Herstellung der Antikörper gemäß üblicher Techniken (KENNETT, R.H., McKEARN, T.J., und BECHTOL, K.B., Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A new dimension in biological analysis, New York u. London 1981) eingesetzt. Beispielsweise wurden folgende in Tabelle 2 zusammengestellte monoklonale Antikörper erhalten. Von sieben Zellinien stellten wir nach allgemein bekannten Methoden Aszitesflüssigkeiten her.

Tabelle 2:
Reaktionsfähigkeit ausgewählter monoklonaler Antikörper im Testsystem Variante b)

mAk	Bezeichnung des Zellklons	ZIM-Liste	Titer nach Variante b) Kultur-überstand	Aszites-flüssigkeit
PLRV-1	IfP-R10-A/A2	0119	2^{13}	10^9
PLRV-2	IfP-R10-A/B10	0115	2^{12}	10^4
PLRV-3	IfP-R10-A/B12	–	2^3	–
PLRV-4	IfP-R10-B/C5	–	2^4	–
PLRV-5	IfP-R10-B/C11	0120	2^{11}	10^8
PLRV-6	IfP-R10-B/E2	–	2^5	–
PLRV-7	IfP-R10-B/E3	–	2^{11}	10^7
PLRV-8	IfP-R10-B/E11	0122	2^4	10^3
PLRV-9	IfP-R10-B/G3	0123	2^{13}	10^8
PLRV-10	IfP-R10-C/G2	0121	2^6	10^3

5. Kreuzreaktivität und Bindungscharakteristik
Die monoklonalen Antikörper (mAk) PLRV-1 bis PLRV-10 reagierten im indirekten ELISA der Varianten a) und b) positiv mit PLRV, nicht jedoch mit barley yellow dwarf virus, einem anderen Luteovirus.
Polyklonale Mausantiseren ergaben Kreuzreaktionen zwischen PLRV und dem zur Luteovirusgruppe gehörenden beet mild yellowing virus (BMYV). Dieses Ergebnis weist auf gemeinsame Antigendeterminanten hin (siehe auch RICHTER, J., et al., Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz 19 [1983], 419–422).
Eine solche Kreuzreaktivität zeigten unter den genannten Testbedingungen nur die mAk PLRV-1, PLRV-8 und PLRV-10, während alle anderen Antikörper (siehe Tabelle 2) sich durch eine spezifische Reaktion mit PLRV auszeichneten.
Die Bindungscharakteristika der mAk PLRV-1 bis PLRV-10 wurde nach der bekannten Methode von JORDAN, R., und AEBIG, J., Acta Horticulturae **164** (1985), 385–393 bestimmt. Danach zeigten die Antikörper PLRV-1, PLRV-2, PLRV-5, PLRV-7, PLRV-9 und PLRV-10 eine hohe relative Bindungsstärke zum PLRV.

6. Konjugation mit alkalischer Phosphatase
Gemäß gebräuchlicher Methoden, beispielsweise nach CLARK, M.F., und ADAMS, A.J., J. gen. Virol. 34 (1977), erfolgte eine Konjugation der gereinigten mAk mit alkalischer Phosphatase.

7. Epitopanalyse
Die Analyse wurde mit einem gereinigten PLRV-Präparat durchgeführt. Erfolgte eine Hemmung der Bindungsfähigkeit von mAk-Enzymkonjugation durch einen im Überschuß zugegebenen nichtmarkierten zweiten mAk, so wurde geschlußfolgert, daß beide Antikörper um die gleiche Antigendeterminante konkurrieren und dasselbe Epitop auf dem Hüllprotein des PLRV erkennen. Unter den sechs ermittelten mAk mit einer hohen relativen Bindungsstärke (siehe 5.) erkennen PLRV-5, PLRV-7 und PLRV-9 die gleiche Antigendeterminante (A), wobei PLRV-9 die höchste relative Bindungsstärke besitzt. Eine weitere Determinante (B) wird von den Antikörpern PLRV-1 und PLRV-10 erfaßt, während PLRV-2 mit der Determinante C reagiert. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Antigendeterminanten A, B und C auf dem PLRV nachgewiesen werden können, die von den mAk PLRV-9, PLRV-1 und PLRV-2 mit der jeweils höchsten relativen Bindungsstärke erfaßt werden. Diese Antikörper, die von den Zellinien IfP-R10-B/G3, IfP-R10-A/A2 und IfP-R10-A/B10 produziert werden, eignen sich somit zum Aufbau von Testsystemen, in denen sie einzeln oder in Kombination eingesetzt werden können.

8. Virusnachweis in Pflanzenproben
Die mAk PLRV-1, PLRV-2 und PLRV-3 wurden beispielsweise zum Virusnachweis in Kartoffelpflanzen eingesetzt, die im Rahmen eines Resistenzprüfprogrammes künstlich im Gewächshaus mit PLRV infiziert wurden. Die Testdurchführung

erfolgte nach Variante b). Jedoch kamen anstelle von Kulturüberständen gereinigte mAk in einer Konzentration von 5µg/ml zum Einsatz. Zu Vergleichszwecken wurde ein Standardtest (direkter DAS-ELISA) unter Verwendung eines polyklonalen Enzymkonjugates durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3:
Nachweis des PLRV in einer infizierten Kartoffelprobe

Verdünnung des Blatt-extraktes	monoklonaler Antikörper PLRV-1	PLRV-2	PLRV-9	polyklonaler DAS-ELISA
1:20	0,69*	1,85	2,15	1,56
1:80	0,52	1,40	1,88	0,97
1:320	0,31	0,65	0,99	0,18
1:1 280	0,09	0,26	0,45	0,08
Gesundkon-trolle 1:20	0,03	0,01	0,01	0,02

* Extinktion bei 405nm nach einer Std. Substratinkubation

Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 getrennten Experimenten mit jeweils 2 Wiederholungen und stellen die Eignung der mAk zum Nachweis des PLRV in Pflanzenmaterial unter Beweis. Die Verwendung von PLRV-9 in der beschriebenen Testvariante ergibt sogar bessere Resultate als ein polyklonales Enzymkonjugat.
In weiteren Experimenten wurde die Eignung des mAk PLRV-9 (Konzentration 5µg/ml) zum Nachweis des PLRV in Kartoffelkeimen untersucht. Die Testdurchführung erfolgte ebenfalls nach Variante b). Anstelle von Blattextrakten wurden jedoch Extrakte von Dunkelkeimen eingesetzt. Die Inkubationsdauer von PLRV-9 betrug 3 Std. und die des Anti-Mausenzymkonjugates 2 Std. Die Ergebnisse der Prüfung von 20 Keimproben sind in Tabelle 4 dargestellt. Zum Vergleich wurde die Prüfung mit einem polyklonalen DAS-ELISA durchgeführt.

Tabelle 4:
Nachweis des PLRV in Kartoffelkeimen

Proben Nr.	mAk PLRV-9 (5 µg/ml)	polyklonaler DAS-ELISA
1	0,02*	0,02
2	0,01	0,02
3	0,03	0,05
4	0,08	0,08
5	0,05	0,04
6	0,03	0.01
7	0,00	0,05
8	0,00	0,01
9	0,63	1,12
10	0,58	0,31
11	0,19	0,14
12	2,14	2,12
13	2,29	2,24
14	2,02	1,94
15	1,33	1,79
16	0,18	0,24
17	0,63	0,96
18	0,18	0,25
19	0,82	1,27
20	0,08	0,03

* Extinktion bei 405 nm nach einer Std. Substratinkubation