

间接酶联免疫吸附试验快速检测无毒唐菖蒲试管苗

蔡文启 赵淑珍 奚仲兴 徐绍华 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

郑万珍 何传启

(中国科学院遗传研究所, 北京)

本文利用间接酶联免疫吸附试验检测了从北京地区栽种的唐菖蒲上分离到的一株病毒的提纯制品和唐菖蒲试管苗的病叶粗提液。用提纯的病毒免疫家兔, 抗血清的滴度为 1:62500。提纯病毒的最适包被浓度为 $2.5\mu\text{g/ml}$ 。能检测提纯病毒的最低浓度为 1ng/ml 。侵染性试验检测提纯病毒的最低浓度为 30ng/ml 。在间接酶联免疫吸附试验中, 该病毒与烟草花叶病毒普通株有血清学相关性。

关键词 间接酶联免疫吸附试验; 无毒唐菖蒲试管苗

自 1976 年 Voller, Clark 和 Adams 等^[1]把酶联免疫吸附试验应用于检测植物病毒以来, 各种酶联免疫吸附试验技术已成为定性和定量检测植物病毒的非常有效的工具。用双抗体夹心法检测植物病毒抗原, 每种被检抗原的抗血清必需纯化并与酶偶联。此法特异性极强, 甚至同一病毒的密切相关的株系之间也无交叉反应^[2,3]。间接酶联免疫的吸附试验(Indirect ELISA)中病毒抗原直接被联到聚苯乙烯等材料的固相表面, 首先与该抗原的兔抗血清反应, 用商品化的酶标记的羊抗兔 IgG 作为第二抗体去检测抗原与抗体的复合物。因此每种欲检抗原的抗血清既不需要纯化也无需与酶偶联。与双抗体夹心法相比, 更为简便、灵敏、快速。此外, 还能用一种病毒的一个株系的抗血清去鉴定同一病毒的相关株系^[3]。1982 年 Lommel 等人^[4]用间接酶联免疫吸附试验检测了石竹斑驳病毒和石竹环斑病毒的提纯病毒及病叶的粗提液。

本文用间接酶联免疫吸附试验快速检

测无病毒的唐菖蒲试管苗, 并初步得知, 从感病的唐菖蒲所得的一个病毒分离物与烟草花叶病毒普通株具有血清学相关性。

材料和方法

(一) 病毒的分离和纯化

该病毒是从北京地区栽培的唐菖蒲上得到的。经寄主鉴定和分离后, 在普通烟草上繁殖。经一系列的纯化步骤后, 还通过蔗糖密度梯度离心, 最后得到比 TMV 长而略细的均一病毒颗粒。

(二) 抗血清的制备

用纯化的病毒免疫荷兰大白兔。用耳静脉注射法免疫兔子, 每次注射 $1\text{mg}(0.1\text{ml})$ 提纯病毒, 每次间隔 3—4 天, 共注射 3 次。最后一次注射后的第十天, 采少量耳血, 小试管沉淀法测得滴度为 1:512。放耳血, 制备第一批抗血清。一个月后再放耳血, 制备第二批抗血清。两个月后颈动脉放血, 采集最大量的抗血清。抗血清加硫柳汞后分装在灭过菌的青霉素小瓶内, 分别在 -18°C 和 -70°C 冷藏。

本文于 1985 年 2 月 28 号收到。

(三) 间接酶联免疫吸附试验^[3]

选用上海塑料三厂出品的 40 孔微量聚苯乙烯板,先在 95% 乙醇中浸泡 2 小时,经自来水清洗后,过一遍蒸馏水,拍干后室温凉干备用。

1. 抗原的包被: 用 0.05M 碳酸盐缓冲液(pH 9.6) 将提纯的病毒稀释到 1—10 μ g/ml, 每孔加 0.2ml, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

2. 次日用磷酸盐缓冲液-吐温 20(pH7.4)(简称 PBST) 洗板 3 次。用 PBST 将抗血清稀释到最适工作稀释度,每孔加 0.2ml, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

3. 次日用 PBST 洗板 3 次,加 0.2ml PBST 稀释过的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔结合物(简称酶结合物,由卫生部北京生物制品研究所出品) 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。

4. PBST 洗板 3 次后,加邻苯二胺底物溶液(用磷酸-柠檬酸缓冲液 pH 5.0 配制)4mg/10ml,临用前加 15 μ l 30% H₂O₂,室温避光放置 15—30 分钟。每孔加 50 μ l 2M H₂SO₄ 以终止反应,用四川分析仪器厂制造的 GXM-201 酶标光度计,在 492nm 测定吸光度 (A_{492nm})。

每块 40 孔板均需设阴性孔、阳性孔。以仅加底物溶液的孔作为读数时仪器的调零孔。阴性孔用不相关病毒如大麦条纹花叶病毒 (BSMV) 或健的唐菖蒲叶子的粗提液。阳性孔实为标准孔。当包被 2.5 μ g 病毒/ml, 用 1:5000 稀释的抗血清, 1:200 稀释的酶结合物时 A_{492nm} 约为 1。

(四) 唐菖蒲病、健试管苗叶片粗提液的制备

以 1g 叶子加 1ml 蒸馏水的比例,在研钵中研磨,将汁液转移到 1.5ml 塑料小离心管,16000 rpm 离心 10 分钟,其上清液即为粗提液。粗提液用 0.05M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释 4 倍,包被时每孔加 0.2ml。

结 果

(一) 抗血清滴度的测定

小试管沉淀法测得 21 天的抗血清滴度为 1:512。用间接酶联免疫吸附试验测定时,当包被的病毒浓度为 2.5 μ g/ml 时,抗血清滴度为 1:62500。用间接酶联免疫吸附试验测定抗血清滴度时比小试管沉淀

法灵敏度提高几百倍,既省病毒又省抗血清。

(二) 提纯病毒的最适包被浓度

从抗血清滴度测定试验时得知 1:5000 是抗血清的最适工作稀释度。将提纯病毒作系列稀释,从图 1 中可以看到提纯病毒的最适包被浓度为 2.5 μ g/ml。

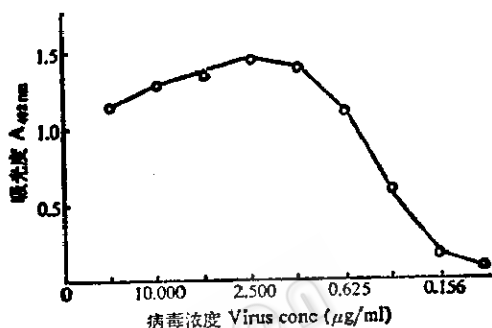


图 1 提纯病毒的最适包被浓度

Fig. 1 Optimum concentration of coating virus

(三) 间接酶联免疫吸附试验检测提纯病毒的灵敏度

将提纯病毒作系列稀释,BSMV 作阴性对照 (A_{492nm} 平均值为 0.05),抗血清稀释度为 1:5000,酶结合物工作稀释度为 1:200。四次重复实验求得提纯病毒各稀释度的平均值(扣除阴性对照值)。从图 2 中可以看到当提纯病毒浓度为 0.004 μ g/ml

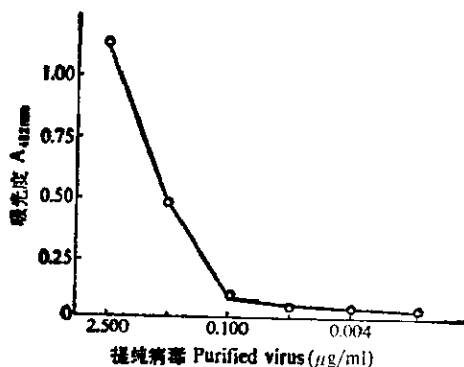


图 2 间接酶联免疫吸附试验测定提纯病毒的灵敏度

Fig. 2 Sensitivity of indirect ELISA for detection of purified virus

(4ng/ml) 时, A_{492nm} 等于 0.043。所以间接酶联免疫吸附试验能检测 4ng/ml 提纯病毒(即它的灵敏度)。

(四) 侵染性试验的灵敏度

选择心叶烟作枯斑寄主来测定提纯病毒的侵染性。经多次重复, 当提纯病毒稀释到 30ng/ml 时, 每半叶只出现一个枯斑, 侵染性实验检测提纯病毒的最低浓度为 30ng/ml。由此可见在检测提纯病毒时, 间接酶联免疫吸附试验灵敏度比侵染性试验

高 8 倍。

(五) 唐菖蒲试管苗无病毒株的检测

用间接酶联免疫吸附试验检测了不同来源的试管苗一百多株。健叶或 BSMV 作阴性对照 A_{492nm} 平均值为 0.05。被检样品 A_{492nm} 值超过 0.1 者均视为阳性(带病毒株)。其结果如表 1 所示。无毒株可移栽到防虫的或病毒病传播可能性较小的花房, 以保证唐菖蒲花朵的观赏质量。

(六) 间接酶联免疫试验鉴定 TMV

表 1 间接酶联免疫吸附试验检测唐菖蒲试管苗无病毒株

Table 1 Virus-free detection of *Gladiolus* plantlets by indirect ELISA

试管苗来源 Plantlets source	株 数 No. of plantlets	阳性株数 No. of positive plantlets	阴性株数 No. of negative plantlets	阴性试管苗株数占检 测株数的百分率 Negative plantlets percent (%)
块 茎 Corm	24	19	5	21
子球块茎 Sub-corm	11	7	4	36
茎 尖 Stem-tip	35	21	14	40
花 瓣 Petal	16	14	2	13
花 药 Anther	2	2	0	0
花 梗 Pedicel	6	4	2	33
子 房 Ovary	10	6	4	40

表 2 间接酶联免疫吸附试验研究 TMV, YMV₁, 和唐菖蒲病毒分离株的血清学关系

Table 2 Serological relation between TMV, YMV₁, and a virus from *Gladiolus* by indirect ELISA

病 毒 Virus	吸光度 A	
	TMV 抗血清(1:500) Rabbit antiserum to TMV (1:500 dilution)	唐菖蒲的病毒分离株抗血清(1:5000) Rabbit antiserum to a Virus from <i>Gladiolus</i> (1:5000 dilution)
烟草花叶病毒普通株 TMV	0.866	0.679
油菜花叶病毒 15 号 YMV ₁₅	1.554	0.089
唐菖蒲的病毒分离株 A Virus from <i>Gladiolus</i>	1.158	0.96
大麦条纹花叶病毒 BSMV	0.050	0.050

(烟草花叶病毒)普通株的相关病毒

表 2 所示,当用 TMV 的兔抗血清时,显示 YMV₁₅ (油菜花叶病毒 15 号)与从唐菖蒲上得到的一个病毒分离物与 TMV 之间有血清学相关性。当用唐菖蒲的病毒分离物的兔抗血清时,仅显示 TMV 与唐菖蒲的病毒分离物之间有血清学相关性。

讨 论

Koening^[2] 曾报道过,当采用双抗体夹心法时,免疫一个月的抗血清,其酶联免疫吸附试验结果为阴性。两个月的抗血清或更长一点时间的抗血清是酶联免疫吸附试验测定的最佳时间。在间接酶联免疫吸附试验中,我们用耳静脉注射法,21 天的抗血清就能获得理想的效果。21 天的抗血清滴度最高,一个月和两个月的抗血清滴度较低。间接酶联免疫吸附试验与耳静脉注射相结合,不仅节省抗原和抗体用量,还能加速整个实验进程。

Lommel 等人^[4]比较了蒸馏水和几种缓冲液制备的组织粗提液检测病毒的效果,以蒸馏水效果最好。我们比较了蒸馏水、包被用的缓冲液和 PBST 制备的组织粗提液检测病毒的效果。当带病毒组织粗提液作系列 5 倍稀释时,蒸馏水的组织粗提液随稀释度增加而 A_{492nm} 值明显减少,在高稀释度时 A_{492nm} 值接近阴性值。而包被用的缓冲液和 PBST 的组织粗提液在高稀释度条件下其 A_{492nm} 值比蒸馏水的组织粗提液高一些,易出现假阳性,干扰检测正确性。所以用蒸馏水作为组织提取液较

为妥当。

表 1 中可以看到用子房培植的试管苗,阴性率不算低,这在处理难以得到的几株名贵品种时,用子房培植试管苗以保留原名贵品种也是可以尝试的。

间接酶联免疫吸附试验除了能检测植物病毒外,还能确定株系相关性^[3]。我们用间接酶联免疫吸附试验研究了 TMV、YMV₁₅ 与唐菖蒲上的一个病毒分离物之间的血清学相关性。从表 2 可以设想 TMV 与 YMV₁₅ 有一些共同抗原决定簇, TMV 与唐菖蒲的病毒分离物也有一些共同抗原决定簇。YMV₁₅ 与唐菖蒲的病毒分离物之间的共同抗原决定簇也许就很少了。这种设想在最近用抗 TMV 单克隆抗体中初步得到验证。利用间接酶联免疫吸附试验,这些单克隆抗体与 TMV、唐菖蒲上的病毒分离物有连结反应,但与 YMV₁₅ 无连结反应。一旦获得既能与 TMV 又能与 YMV₁₅ 有连结反应,而与唐菖蒲的病毒分离物无连结反应的抗 TMV 单克隆抗体时,它们之间的血清学相关性将会变得更为清楚。

参 考 文 献

- [1] Voller, A. et al.: *J. Gen. Virol.*, 33: 165—167, 1976.
- [2] Koening, R. et al.: *J. Gen. Virol.*, 40: 309—318, 1978.
- [3] Van Regenmortel, M. H. V. and J. Burckard.: *Virology*, 160: 327—334, 1980.
- [4] Lommel, S. A. et al.: *Phytopathology*, 72: 1018—1022, 1982.
- [5] Dynatech Laboratories: *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. p. 29.

RAPID DETECTION OF VIRUS-FREE *GLADIOLUS* PLANTLETS BY INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Cai Wenqi Zhao Shuzhen Xi Zhongxing

Xu Shaohua Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Zheng Wanzhen He Chuanqi

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

We have detected a purified virus from *Gladiolus* in Beijing area and crude extraction of infected leaves of *Gladiolus* plantlets by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Rabbits were immunized by a purified virus, while the titer of antiserum is 1:62500. The optimum concentration of purified virus for coating is 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The sensitivity of indirect ELISA to detect purified virus is 4 ng/ml, while in the infectivity test the

minimum concentration of the purified virus used is only about 30 ng/ml. We have also studied serological relation between TMV and a virus isolated from *Gladiolus* by indirect ELISA.

Key words

Indirect ELISA; Virus-free *Gladiolus* plantlets