

用 A 蛋白夹层酶联免疫吸附法对黄瓜花叶病毒的血清学鉴定

毋谷穗 康良仪 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用 A 蛋白夹层酶联免疫吸附法 (PAS-ELISA) 对两个来自日本蕃茄和一个来自中国青椒植物上的黄瓜花叶病毒分离物进行了血清学鉴定和比较。该方法利用 A 蛋白和酶联 A 蛋白分别作预包被和检测结合于抗体-抗原-抗体夹层中的抗体, 并通过底物反应, 间接反应出病毒抗原的量。对经过两次差速离心纯化的病毒进行检测的结果表明, 这三种黄瓜花叶病毒 (CMV) 分离物与黄瓜花叶病毒 P、Q 两株系同属一个血清型, 即可能均属于黄瓜花叶病毒中的 ToRS 组。

讨论了这种间接酶联免疫吸附法检测植物病毒的优越性和几个 CMV 分离物的提纯、保存方法。

关键词 A 蛋白酶联免疫吸附法; A 蛋白; 黄瓜花叶病毒

酶联免疫吸附法 (ELISA) 在病毒检测中的应用有直接法和间接法两种。直接法一般采用双抗体夹心法, 间接法则是在双抗体夹心之外加酶联抗抗体进行检测。最近英国 Cooper 等人^[1]建立了一种新的间接法, 应用于几种植物病毒的鉴定。该方法由于使用 A 蛋白和酶联 A 蛋白作预包被和检测, 因而在应用范围上优于其它方法。我们最近在对来自日本蕃茄和中国青椒的几个黄瓜花叶病毒分离物的研究中, 应用这一方法对这几个 CMV 分离物进行了血清学鉴定和比较。本文报道这一血清学鉴定结果。

材 料 和 方 法

(一) 病毒

CMV-J83 是 1983 年来自日本田间蕃茄上的一个分离物。CMV-JV 和 CMV-CV 分别是日本蕃茄田间的分离物和我国青椒田间的分离物。CMV-JV 和 CMV-CV 在烟草和蕃茄上均表现较强的毒力, 而 CMV-J83 则在烟草植物上仅表现

轻花叶症状。CMV-P 和 CMV-Q 是两株来自澳大利亚的黄瓜花叶病毒。大麦条纹花叶病毒 (BS MV) 在大麦上 (*Hordeum vulgare* L.) 繁殖, 提纯方法按文献[2]进行。

(二) 病毒提纯

上述几种 CMV 分离物均在三生烟 (*Nicotiana glauca* Sanjam NN) 上繁殖。感病 6—10 天的烟叶按照 H. Lot 等^[3]的方法, 在 0.5 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (含 0.1% 巯基乙醇, pH 6.5) 和氯仿中 (按: 感病叶: 缓冲液: 氯仿 = (2:2ml: 2 ml) 匀浆。聚乙二醇 (MW = 6000) 沉淀后在 4℃ 静置 30—40 分钟。两次差速离心后病毒的悬浮和保存分别在无菌蒸馏水和 10 mmol/L EDTA (pH 7.0) 中。病毒保存于 4℃。

经两次差速离心后的病毒于 Beckman UD-7 型分光光度计上扫描, 测定三种分离物的紫外吸收性质。病毒浓度计算取 $E_{280, 1\%} = 50$ ^[4]。

(三) A 蛋白夹层酶联免疫吸附法检测病毒

中国农牧渔业部植物检疫所协助用 CMV-CV、CMV-J83 和 CMV-JV 免疫家兔, 并制备血

本文于 1986 年 9 月 15 日收到。

本研究项目由中国科学院科学基金资助。

清。将上述三种病毒分离物的抗血清分别经两次 50% 硫酸铵沉淀, 制得兔免疫球蛋白。A 蛋白与辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白系市售的上海生物制品所产品。

A 蛋白夹层酶联免疫吸附法^[1] (PAS-ELISA, Protein A Sandwich ELISA) 在微孔板中加入五种试剂, 依次为: (1) A 蛋白(预包装); (2) 抗血清(包被); (3) 待测病毒样品; (4) 抗血清(检测); (5) 酶联 A 蛋白。在用 PAS-ELISA 法测病毒前, 将检测用兔免疫球蛋白的浓度对测定的影响进行试验, 以选择出最适浓度。即将待测病毒样品浓度固定为 500 ng/ml, 将检测用兔免疫球蛋白作六个浓度梯度, 即 0.1、1.0、2.5、5.0、10 和 20 $\mu\text{g/ml}$, 其它各层及保温条件均与下述测定时相同。最终选择出能最大程度避免非特异性结合的最适浓度。

PAS-ELISA 法检测病毒的具体作法: 用 0.05 mol/L Na_2CO_3 (pH 9.6) 将 A 蛋白稀释为 5 $\mu\text{g/ml}$, 加入微孔板中 (0.2 ml/孔), 28 $^{\circ}\text{C}$ 预包装 2 小时。弃去预包装溶液, 用 PBST 缓冲液 (0.02 mol/L KH_2PO_4 , 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4, 含 0.5 ml/L Tween 20) 洗涤 4 次。每孔加入用 PBST 稀释成 5 $\mu\text{g/ml}$ 的抗病毒免疫球蛋白, 28 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 小时。PBST 洗涤 4 次, 加入用 PBST 稀释为六个浓度梯度的病毒悬液, 六个稀释梯度分别为 50、100、250、500、1000 和 2000 ng/ml。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温过夜。PBST 洗涤 4 次后, 加入检测用兔免疫球蛋白 (5 $\mu\text{g/ml}$, PBST 中), 28 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 小时。洗涤, 每孔各加入 PBST 稀释的辣根过氧化物酶标记 A 蛋白 (HRP-Protein A) (5 $\mu\text{g/ml}$), 28 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 小时。PBST 洗涤, 每孔加入底物溶液 0.25 ml (底物溶液为每 100 ml 0.01 mol/L、pH 6.0 磷酸缓冲液中含有 10 μl H_2O_2 和 1.7 ml 1% 联大茴香胺的甲醇溶液)。于室温下反应 30 分钟后, 加入 0.05 ml 5 mol/L HCl 终止反应。在 GXM-201 型酶标光度计上于波长 405 nm 处测吸光度。

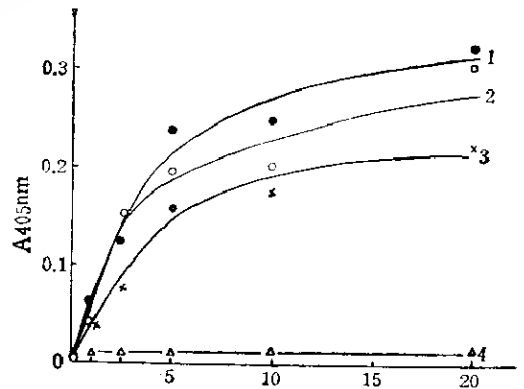
结 果

(一) 三种 CMV 分离物的提纯、产量和紫外吸收性质

用 H. Lot 等的方法^[3] 分别对感染病毒的三生烟 (*Nicotiana tabacum* Sansam NN) 叶中的 CMV-CV、CMV-J 83 和 CMV-JV 进行提纯, 并测定其紫外吸收性质。这三种 CMV 分离物具有近似的紫外吸收曲线, 各自在 200 nm—300 nm 间的最大和最小吸收波长也都相差无几。三者 260 nm 吸收值与 280 nm 吸收值之比在 1.62—1.71 之间, 为一般 CMV 病毒颗粒的吸收比值^[5]。它们的产量分别为每千克感病叶 CMV-CV 350 mg, CMV-J 83 300 mg, CMV-JV 470 mg。其中 CMV-J 83 产量略低, 是其复制受到卫星 RNA 干扰所致。含有卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒的提纯产量降低的现象在其它 CMV 株系中也有发现^[6,7]。

(二) 检测用免疫球蛋白浓度的选择

分别用抗 CMV-CV、抗 CMV-J 83 和



免疫球蛋白 Immunoglobulins ($\mu\text{g/ml}$)

图 1 检测用抗 CMV 免疫球蛋白浓度对间接酶联法测定病毒的影响

1. 抗 CMV-J83 免疫球蛋白对 CMV-J83;
2. 抗 CMV-CV 免疫球蛋白对 CMV-CV;
3. 抗 CMV-JV 免疫球蛋白对 CMV-JV;
4. BSMV 对照

Fig. 1 The effect of detecting anti-CMV immunoglobulin concentration on virus detection

1. anti-CMV-J83 immunoglobulin against CMV-J83
2. anti-CMV-CV immunoglobulin against CMV-CV;
3. anti-CMV-JV immunoglobulin against CMV-JV
4. BSMV check

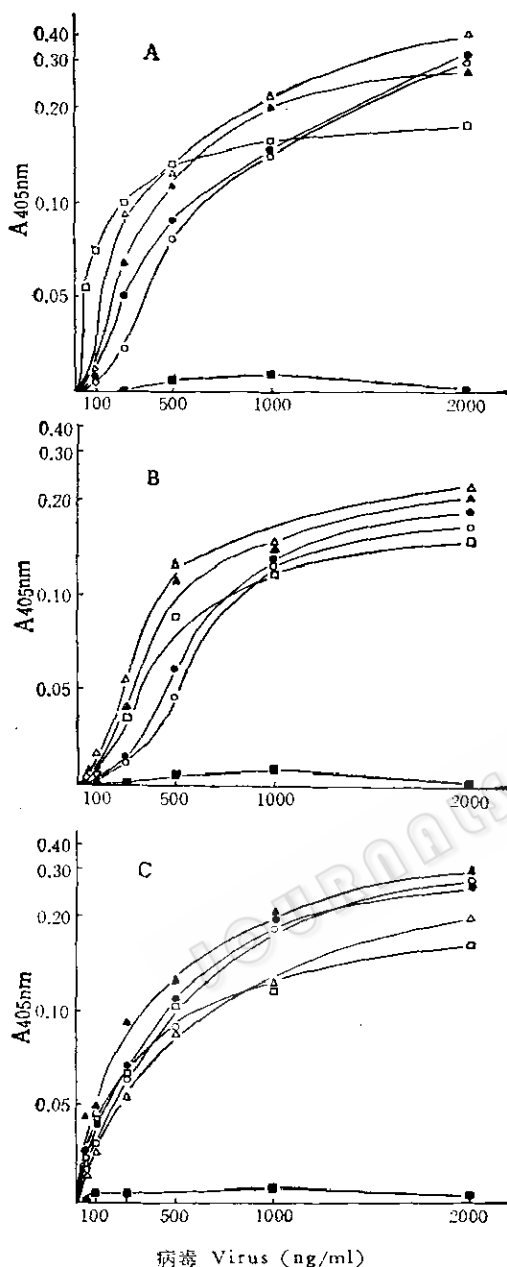


图2 用酶标 A 蛋白间接酶联法测定五株 CMV 抗原性

检测用: A. 抗 CMV-JV 免疫球蛋白; B. 抗 CMV-CV 免疫球蛋白; C. 抗 CMV-J83 免疫球蛋白

Fig. 2 The detection of five CMV strains using PAS-ELISA

Detecting with A. Anti-CMV-JV immunoglobulins B. Anti-CMV-CV immunoglobulins C. Anti-CMV-J 83 immunoglobulins

(○)CMV-P; (●)CMV-Q; (△)CMV-CV; (▲)CMV-J83; (□)CMV-JV; (■)BSMV

抗 CMV-JV 的免疫球蛋白对其各自特异的黄瓜花叶病毒分离物进行不同 PAS-ELISA 测定将病毒抗原浓度固定, 用不同浓度的免疫球蛋白进行检测。图 1 表示出上述三种免疫球蛋白对其各自特异病毒分离物测定的吸光度曲线。当免疫球蛋白在 $5 \mu\text{g/ml}$ 以下时, 随着免疫球蛋白浓度的升高, 吸光度逐渐增大。当免疫球蛋白浓度在 $5 \mu\text{g/ml}$ 以上, 则吸光度渐渐趋于平缓。而当免疫球蛋白浓度达到 $20 \mu\text{g/ml}$ 时, 吸光度再度有所增高, 这可能是由于过高的免疫球蛋白浓度引起的非特异性的结合^[1]。图 1 中曲线 3 抗 CMV-JV 免疫球蛋白对 CMV-JV 的测定, 其吸光度比曲线 1 和曲线 2 略低, 可能是由于该免疫球蛋白的效价稍低于前两种造成的。根据测定结果, 检测用免疫球蛋白的最适浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 。

(三) PAS-ELISA 对三个 CMV 分离物的检测

为了对 CMV-CV、CMV-J 83 和 CMV-JV 三种分离物进行血清学鉴定, 用抗上述三种病毒分离物的免疫球蛋白分别对 CMV-P、CMV-Q、CMV-CV、CMV-J 83 和 CMV-JV 五株黄瓜花叶病毒和一个不相关病毒——大麦条纹花叶病毒 (BSMV) 作 A 蛋白酶联免疫吸附测定。测定结果见图 2。随着病毒抗原浓度的增加 (除 BSMV 无反应外) 这 5 株 CMV 均有明显的反应性, 其曲线也很一致。从图 2 的三组曲线看出, 尽管每种抗病毒免疫球蛋白都是对自己特异的病毒分离物反应性最强, 但是其它 CMV 分离物或株系对每一种免疫球蛋白的反应性也很相似。说明无论是中国青椒上的分离物 CMV-CV, 还是日本蕃茄上的分离物 CMV-JV 和 CMV-J 83, 与 CMV-P 和 CMV-Q 在血清学关系上都应归属同一个血清型。CMV

Q 即属于黄瓜花叶病毒中的 ToRS 组^[8,9]。

讨 论

黄瓜花叶病毒的提纯和保存是人们一直进行研究的一个问题。这个三分基因组的球状病毒颗粒的稳定性较差^[10], 尤其是含有卫星 RNA 的一些株系在病毒提纯时产量较低, 而且不易稳定保存^[11]。目前普遍使用的 CMV 提纯方法有两种, 均从 Scott 1963 年建立的方法^[12]改进而来。一是本文引用并稍作改进的 H. Lot 等 1972 年的方法^[3], 另一是 Mossop 等 1976 年的方法^[13], 后者适用于用前一个方法提取困难的某些特殊 CMV 株系。H. Lot 等的方法主要是根据 CMV 病毒颗粒在植物匀浆液中极不稳定的性质, 在匀浆时加入氯仿, 以减少病毒在植物组织汁液中的停留时间, 并使其更易于从细胞中释放出来。另外聚乙二醇(6000)沉淀以后, 病毒的悬浮用含有 2% Triton X-100 的缓冲液处理很必要, 因为 CMV 病毒颗粒沉淀后极易聚集而难以悬浮。Triton X-100 的加入可以使聚集态的病毒颗粒倾向于解离。当然 Triton X-100 作为一种膜研究中使用的非离子型表面活性剂, 大量或长时间作用也会使病毒颗粒裂解。我们多次使用这一提纯方法都得到了较高的病毒产量。另外, Habili 等^[14]报道 CMV 在阳离子存在下很容易沉淀, 因此 CMV 保存于低盐的缓冲液中, 用 5 mmol/L 硼酸盐-0.5 mmol/L EDTA (pH9.0) 或用 10 mmol/L EDTA (pH 7.0) 可以稳定保存 CMV 半年以上。

A 蛋白夹层酶联免疫吸附法 (PAS-ELISA) 的主要原理是, 根据抗病毒 IgG 分子的 Fc 段与预包被在微孔板上的 A 蛋白结合, 而 F(ab') 段则用于结合病毒抗原。第二层 IgG, 即检测用 IgG, 以同样方式结合于病毒抗原上, 其 Fc 段则由酶联 A

蛋白结合, 并通过底物反应间接地反应出病毒抗原的结合量。在这一方法中, 检测用抗血清或免疫球蛋白的浓度对非特异性结合影响较大^[1], 在测定前须找出它的最适浓度。Cooper 等在建立 PAS-ELISA 方法时仅对少数几种病毒进行检测, 本文引用该法对黄瓜花叶病毒的几个分离物进行鉴定, 结果表明 PAS-ELISA 法尽管在测定灵敏度上与其它间接法相比基本相同, 但其优点是显而易见的。它由于引入 A 蛋白而使抗血清中提纯抗病毒抗体进行酶标等一系列操作可以省去, 更无需制备抗抗体。原则上, 只要制得待测病毒的抗血清, 就可以进行该病毒的 PAS-ELISA 测定, 具有使用范围的广泛性。总之, A 蛋白夹层酶联免疫吸附法是一种既保持了灵敏性又简便了操作的间接酶联法。

Devergne 等^[15,9]曾用直接法和间接法的 ELISA 将 CMV 的株系从血清学上分为两组, 即 DTL 组和 ToRS 组。本文中所使用的 CMV-Q 属 ToRS 组^[15]。分属不同两组的 CMV 株系间的血清学反应较低。图 2 中各株 CMV 对三种免疫球蛋白反应性很近似, 可以推测, 这几个 CMV 分离物可能亦属 ToRS 组。当然只有用 DTL 组 CMV 的抗血清验证后才能最后确定。

参 考 文 献

- [1] Cooper, J. I. et al.: *J. Virol. Methods*, 11: 309—319, 1985.
- [2] Qiu, B. S. et al.: *J. Gen. Virol.*, 58: 323—327, 1982.
- [3] Lot, H. et al.: *Ann. Phytopathol.*, 4: 25—38, 1972.
- [4] Kaper, J. M. et al.: *Virology* 27: 54—72, 1965.
- [5] Kaper, J. M. et al.: *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis* (ed. Kurstak, E.), p. 257—332, 1981.
- [6] Kaper, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 72: 1237—1243, 1976.

- [7] Francki, R. I. B.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **39**, 151—174, 1985.
- [8] Devergne, J. C. et al.: *Ann. Phytopathol.*, **5**, 409—430, 1973.
- [9] Devergne, J. C. et al.: *J. Virol. Methods*, **3**, 193—200, 1981.
- [10] Devergne, J. C. et al.: *Ann. Phytopathol.*, **4**, 5—23, 1972.
- [11] Kaper, J. M. et al.: *Virology*, **114**: 526—533, 1981.
- [12] Scott, H.: *Virology*, **20**, 103—106, 1963.
- [13] Mossop, D. W. et al.: *Virology*, **74**: 544—546, 1976.
- [14] Habili, N. et al.: *Virology*, **60**: 29—36, 1974.
- [15] Francki, R. I. B. et al.: CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 213, 1979.

SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF CUCUMBER MOSAIC VIRUSES BY PROTEIN A SANDWICH ELISA

Wu Gusui Kang Liangyi Tien Po

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Protein A sandwich ELISA (PAS-ELISA) was used to serologically identify two cucumber mosaic virus isolates from Japanese tomato plant. The virus preparations purified by two cycle different-speed-centrifugation were assayed and compared with several related cucumber mosaic viruses. The suitability of Protein A sandwich ELISA

procedure for detecting serologically related cucumber mosaic viruses was discussed.

Key words

Protein A sandwich ELISA; Protein A; Cucumber mosaic virus