

异源单克隆和多克隆抗体在检测无病毒唐菖蒲试管苗中的应用

蔡文启 徐绍华 赵淑珍 莽克强

(中国科学院微生物研究所,北京)

黄鸿枢 陈维云 杨燕仪 朱爱芳

(中国科学院华南植物研究所,广州)

利用异源的单克隆抗体和多克隆抗体通过间接酶联免疫吸附试验,检测了深圳唐菖蒲的叶组织、块茎和试管苗中的病毒。单克隆抗体检测效果优于多克隆抗体,并与电镜观察结果相符。在间接酶联免疫吸附试验中,同源多克隆抗体对烟草花叶病毒(TMV)检测的灵敏度比侵染性试验高30倍。同时对该方法在大规模检测其它无病毒试管苗中的重要性和可行性进行了讨论。

关键词 单克隆和多克隆抗体;间接酶联免疫吸附试验;唐菖蒲试管苗

感染病毒后的唐菖蒲植株矮缩,在叶片和花朵上都表现出褪色的条点,严重的甚至不能开花,丧失观赏价值,大大减少经济收益。在控制无性繁殖植物的病毒病方法中,茎尖脱毒是十分有效的,但还需检测试管苗是否携带病毒。如果忽视对试管苗病毒的检测,随着植物组织的快速繁殖,植物病毒也随之迅速扩散和传播。近年来我们曾对花卉、蔬菜、果树等组培试管苗进行病毒的检测,带病毒率一般达50—90%,所以病毒检测是无病毒种苗生产的重要环节。

试管苗不易直接观察到病毒病的症状。电子显微镜检测病毒颗粒虽然灵敏直观,但费事,工作量大,难以应付大量的被检样品。用鉴定寄主检测灵敏度低,而且受寄主年龄、温度和光照等条件限制,有时不易表现症状。自1976年Voller等人^[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有效工具。

1985年我们曾报道用同源兔抗血清通过间接酶联免疫吸附试验检测北京的无病毒唐菖蒲试管苗^[2]。

本文利用间接酶联免疫吸附试验用一种病毒一个株系的抗血清能鉴定同一病毒的相关株系^[3,4]的特点,用TMV小鼠单克隆抗体和兔多克隆抗体及马铃薯Y病毒(PVY)兔多克隆抗体,分别检测了深圳唐菖蒲上两种病毒:一种与TMV有密切的血清学相关性的棒状病毒,另一种与PVY有密切的血清学相关性的线状病毒。同时比较了单克隆和多克隆抗体在检测无病毒的深圳唐菖蒲试管苗中的重复性和可靠性,以及在大规模田间病毒诊断、无病毒苗木生产等方面应用的潜在能力。

材料和方法

(一) 病毒

TMV在普通烟(*Nicotiana tobacum*)上繁

本文于1987年10月24日收到。

本课题为国家“七·五”攻关项目资助课题。

莫仲兴同志提供部分病毒制品,特此致谢。

殖,参考 Gooding 等人^[5]的方法,经两次聚乙二醇(PEG)沉淀和差速离心获得纯病毒。

(二) 抗血清的制备

按文献[2]方法用纯化的 TMV 通过耳静脉注射法免疫兔子,21天后获得抗血清,在-70℃冷藏。

PVY 兔抗血清由外国朋友赠给,工作稀释度为 1:100。

(三) TMV 单克隆抗体制备

由本实验室制备^[6]。

(四) 间接酶联免疫吸附试验

基本上参照文献[2]进行。用多克隆抗体检测时选用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 结合物,工作稀释度为 1:100。当用单克隆抗体检测时选用辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 结合物,工作稀释度为 1:40。以上两种酶结合物均由卫生部北京生物制品研究所出品。检测样品时,以 2.5 μg/ml 的 TMV 和深圳唐菖蒲棒状病毒分离物纯品分别为阳性对照,单克隆抗体工作稀释度为 1:2000,在 492nm 的吸光度 A 约为 1。多克隆抗体工作稀释度为 1:1000,492nm 的吸光度约为 2。不相关病毒如大麦条纹花叶病毒(BSMV)或缓冲液作阴性对照,492 nm 平均吸光度约 0.1。用美国产的 Minireader 测定吸光度。

(五) 唐菖蒲叶组织、块茎和试管苗粗提液的制备

以 1g 组织加 1 ml 蒸馏水的比例,在研钵中研磨,汁液经 14000 r/min 离心 9 min,其上清液即为粗提液。

(六) 电镜观察

超薄切片按文献[7]方法,取典型病叶经3%戊二醛、2%锇酸双固定,乙醇系列脱水,国产 618 环氧树脂包埋, LKB 8800 III 型超薄切片机切片,经2%醋酸双氧铀、柠檬酸铅双染色,日立 H-500 型电镜观察。

负染法:取病叶研磨,汁液用适当量2%PTA 稀释,用复有福尔马膜的电镜铜网沾取样品液,数秒钟后用滤纸吸去多余液滴,晒干后电镜观察。

结 果

(一) 深圳唐菖蒲病毒的电镜鉴定

从感病的深圳唐菖蒲叶片的浸渍电镜

实验中观察到两种形态结构的病毒颗粒。一种是 13 × 900 nm 和 18 × 300nm 的棒状病毒,另一种是 10 × 700 nm 的线状病毒。感病叶组织的电镜超薄切片证明,感病细胞出现典型的马铃薯 Y 病毒组所具有的风轮状内含体。用盐析沉淀法及差速离心法直接从感病的唐菖蒲叶组织中获得含棒状病毒颗粒的制品,浓度为 2 mg/ml。

(二) 间接酶联免疫吸附试验检测 TMV 纯品的灵敏度

当用间接酶联免疫吸附试验测定多克隆抗体滴度时, TMV 的包被浓度为 2.5 μg/ml, TMV 多克隆抗体滴度为 1:31250。将 TMV 纯品作系列稀释,多克隆抗体工作稀释度为 1:1000,从图 1 中可以看到阴性的吸光度为 0.14。如规定两倍于阴性的吸光度为阳性,那末间接酶联免疫吸附试验检测 TMV 的灵敏度可达 1 ng/ml。而用枯斑三生 (*Nicotiana tobacum* var. Xanthinc) 作为枯斑寄主检测 TMV 侵染性时, TMV 纯品的最低浓度为 35 ng/ml。可见

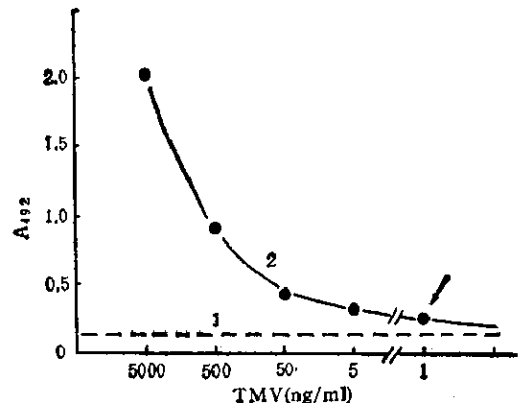


图 1 间接酶联免疫吸附试验测定 TMV 纯品的灵敏度

1. 阴性对照; 2. TMV 纯品

(箭头所指为两倍于阴性对照的吸光度)

Fig. 1 Sensitivity of indirect ELISA for detection of the purified TMV

1. Negative control; 2. Purified TMV
(The arrow indicates the absorbance value considered positive for detection of TMV)

表 1 TMV 和深圳唐菖蒲病毒分离物的血清学相关性

Table 1 Serological relationship between TMV and the rod shaped virus of *Gladiolus* (Shen Zhen) by indirect ELISA

病毒 Virus (2.5µg/ml)	A ₄₉₂		
	TMV 抗血清 1:1000 Rabbit antiserum to TMV 1:1000 dilution	9G 腹水 1:2000 9G Ascitic fluid 1:2000 dilution	PVY 抗血清 1:100 Rabbit antiserum to PVY 1:100 dilution
烟草花叶病毒 TMV	1.50	0.66	0.06
深圳唐菖蒲棒状病毒 Rod shaped virus of <i>Gladiolus</i> from Shen Zhen	1.65	0.62	0.08

表 2 间接酶联免疫吸附试验检测唐菖蒲

Table 2 Detection of *Gladiolus* by indirect ELISA

样品 Sample		A ₄₉₂				电镜观察 Electronmi- croscopy
		TMV 抗血清 1:1000 Rabbit antiserum to TMV 1:1000 dilution	9G 腹水 1:2000 9G Ascitic fluid 1:2000 dilution	PVY 抗血清 1:100 Rabbit antiserum to PVY 1:100 dilution		
叶组织 Leaves	1	1.60 (++)	1.15 (++)	1.45 (++)		
	2	1.30 (++)	0.78 (+)	0.90 (+)		
块茎 Corm*	T ₂	0.09 (-)	0.13 (-)	0.18 (-)		棒, 线 R. T
	T ₃	0.20 (-)	0.70 (+)	>2.00 (++)		
	M ₁₁	0.11 (-)	0.15 (-)	1.40 (++)		
试管苗 Plantlets	4	1.80 (++)	1.90 (++)	1.47 (++)		棒, 线 R. T 线 T 无 N
	9	0.30 (+)	0.30 (+)	0.76 (+)		
	6	0.11 (-)	1.19 (++)	1.70 (++)		
	9'	0.05 (-)	0.05 (-)	0.17 (-)		
	10	0.07 (-)	0.07 (-)	1.25 (++)		
	D ₂	0.50 (+)	0.78 (+)	1.30 (++)		
	C ₇	0.22 (+)	0.46 (+)	1.20 (++)		
	B ₁	0.15 (-)	未测	0.26 (+)		

* 块茎用 9G 血清单克隆抗体 (1:2000)

Corm was detected by 9G serum monoclonal antibody 1:2000 dilution R: Rod shaped virus; T: Thread shaped virus; N: Virus-free

间接酶联免疫吸附试验灵敏度至少能比枯斑寄主侵染性试验高 30 倍。

(三) 深圳唐菖蒲病毒分离物的血清学鉴定

用间接酶联免疫吸附试验分别包被 TMV 和深圳唐菖蒲棒状病毒分离物。从表 1 可见, 深圳唐菖蒲棒状病毒分离物与 TMV 有密切的血清学相关性, 而与 PVY 没有血清学相关性。

(四) 深圳唐菖蒲试管苗的检测

用 -70℃ 冷藏 11 个月的含 50% 甘油的 9G 腹水单克隆抗体和 TMV 及 PVY 多克隆抗体, 通过间接酶联免疫吸附试验检测了深圳唐菖蒲的叶组织、块茎和试管苗。前后三次共检测样品一百份。表 2 仅列出部分数据, 吸光度大于阴性孔两倍的被判为阳性, 即带病毒, 以 (+) 标出, (++) 为强阳性者。吸光度等于或小于阴性孔两

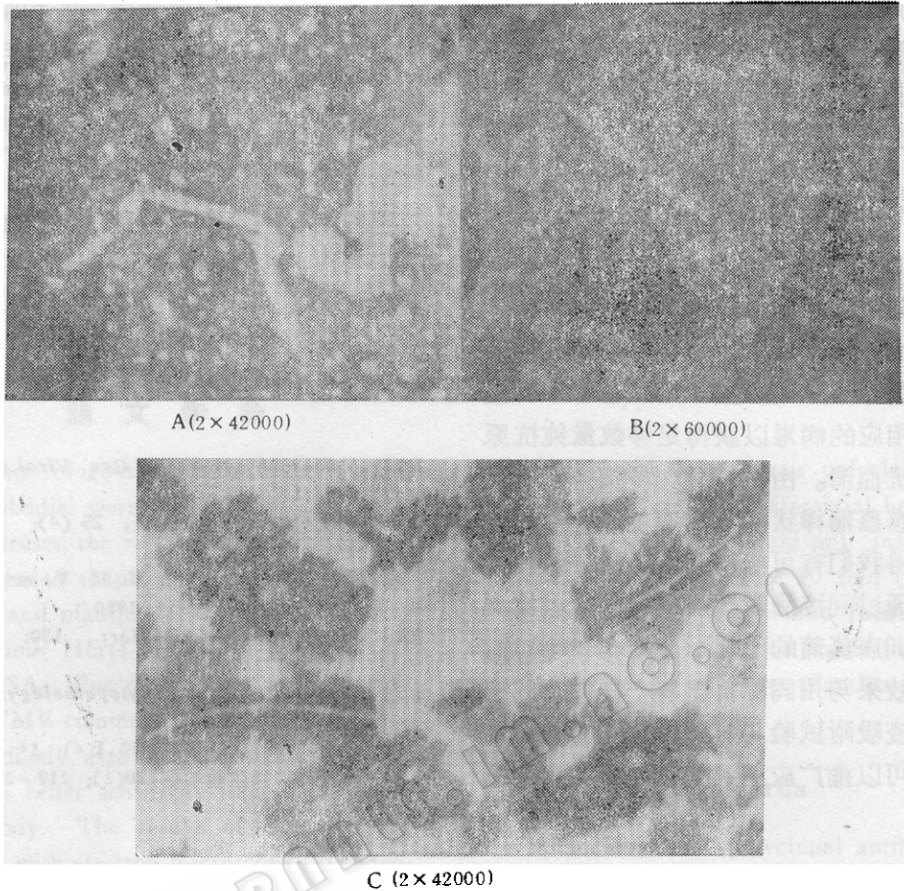


图 2 深圳唐菖蒲试管苗和叶组织粗提取液的电镜照片

A, B. 为 D_2 样品; C. 为 C_1 样品

Fig. 2 Electronmicroscopy of leaf crude extract of *Gladiolus plantlets*

A, B. D_2 Sample; C. C_1 Sample

倍的被判为阴性者，即无病毒，以(一)标出。TMV 单克隆抗体与多克隆抗体检测结果基本一致。仅块茎样品 T_1 和试管苗样品 6 例外，单克隆抗体检出率较高，这也在电镜结果中得到进一步证明。从表 2 中能看到深圳唐菖蒲带病毒的大概情况：棒状和线状病毒混合感染；无病毒；仅线状病毒感染（仅棒状病毒感染实例没有在表 2 中列出）。

(五) 间接酶联免疫吸附试验与电镜结果的比较

为对比和验证试验的可靠性及灵敏度，经间接酶联免疫吸附试验测试后剩余

的样品，再在电镜下进行病毒颗粒的观察，每个电镜样品观察 6 个铜网，结果见图 2。样品 B_1 经间接酶联免疫吸附试验测定，棒状病毒为阴性，线状病毒为弱阳性，电镜下未见任何病毒颗粒。样品 C_1 ，棒状病毒检测为弱阳性，线状病毒检测为强阳性，电镜下只观察到线状病毒颗粒，说明血清学反应比电镜灵敏。样品 D_2 棒状病毒检测为阳性，线状病毒检测为强阳性，电镜下两种病毒颗粒均被观察到。样品 T_1 ，经电镜观察可见到棒状和线状病毒，但间接酶联免疫吸附试验用 TMV 多克隆抗体未被检出，而用 TMV 单克隆抗体却被检出，看来

单克隆抗体检测灵敏度更高一些。

综上所述,目前建立的用异源单克隆和多克隆抗体通过间接酶联免疫吸附试验对深圳唐菖蒲进行病毒检测既可靠,又简便。

讨 论

经电镜和血清学鉴定深圳唐菖蒲被棒状和线状病毒所感染。因目前尚未找到分离这些病毒的草本寄主,无法在草本寄主上繁殖相应的病毒以获得足够数量纯抗原来制备抗血清。由于 PVY 多抗与 TMV 和深圳唐菖蒲棒状病毒没有血清学相关性,使得我们有可能用两种异源(相关的)抗血清通过间接酶联免疫吸附试验去检测侵染深圳唐菖蒲的不同形态结构的病毒。其检测效果与用同源抗血清一样^[2]。间接酶联免疫吸附试验与异源(相关的)抗血清相结合可以推广应用到其它名贵花卉及重

要经济果木的大规模病毒诊断和组培无病毒苗木生产上。优良唐菖蒲种球目前进口量极大,往往也带有病毒,采用严格的茎尖培养技术配合灵敏的病毒检测方法,无病毒唐菖蒲种球获得是不难的。数年之后,随国内的无病毒唐菖蒲种球基地的建立,不但可以减少进口,还能打入国际市场,以取得更大的经济效益。

参 考 文 献

- [1] Voller, A. et al.: *J. Gen. Virol.*, **33**:165—167, 1976.
- [2] 蔡文启等: *微生物学报*, **25** (4): 329—333, 1985.
- [3] Van Regenmortel, M. H. V. et al.: *Virology*, **160**: 327—334, 1980.
- [4] Casper, R.: *Acta Hort.*, **130**: 143—144, 1982.
- [5] Gooding, G. V.: *Phytopathology*, **57**: 1258, 1967.
- [6] 蔡文启等: *生物工程学报*, **1**(4): 34—41, 1985.
- [7] 徐绍华: *微生物学报*, **20**(2): 219—220, 1980.

APPLICATION OF HETEROLOGOUS MONOCLONAL AND POLYCLONAL ANTIBODIES FOR DETECTION OF VIRUS-FREE *GLADIOLUS PLANTLETS*

Cai Wenqi Xu Shaohua Zhao Shuzhen Mang Keqiang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Huang Hongshu Chen Weiyun Yang Yanyi Zhu Aifang

(*Institute of Hua Nan Botany, Academia Sinica, Guang Zhen*)

The heterologous monoclonal and polyclonal antibodies were used to detect the existence of viruses, the rod shaped (TMV-related) and thread shaped (PVY-related) in leaves, corm and plantlets of *Gladiolus* (*Gladiolus hybridus* Hort) from Shen Zhen by indirect ELISA. For detection of the rod shaped, the TMV common strain specific monoclonal antibody used in the indirect ELISA gave much better sensitivity than its polyclonal antibody. The results of detection are coincident with electron microscopy. The sensitivity was also checked between the indi-

rect ELISA with homologous polyclonal antibody to TMV and the differential host (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi-nc) infectivity, the former was about more 30 fold than the latter one. The important and feasibility of the method presented in this report for detection other kinds of virus-free plantlets in large scale had been discussed.

Key words

Monoclonal and polyclonal antibodies;
Indirect ELISA; *Gladiolus plantlets*