

流式微球一步法快速免疫检测马铃薯 A 病毒

高海霞^{1,2}, 邹明强^{2*}, 王岭^{1,2}, 蒋继志¹, 田世民²

(¹河北大学生命科学学院, 保定 071002)

(²中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要:【目的】建立流式微球一步法快速免疫检测马铃薯 A 病毒(PVA)的新方法。【方法】以荧光微球为反应载体, 通过在微球表面进行双抗夹心免疫反应形成微球-捕获抗体-PVA-标记 FITC 检测抗体的复合物, 利用流式细胞仪荧光检测系统收集荧光信号。【结果】通过实验优化检测条件, 最佳捕获抗体工作浓度为 4 μ g/mL、最佳检测抗体工作浓度为 1:25 倍稀释、最佳反应时间为 2h; 与马铃薯 Y 病毒、莴苣花叶病毒、番茄环斑病毒等均未出现交叉反应; 阳性样品经 64 倍稀释后依然可检出, 检测灵敏度是传统微孔板 ELISA 的 4 倍。【结论】流式微球一步法能灵敏、快速、简便的检测马铃薯 A 病毒。

关键词: 流式微球技术; 一步法; 马铃薯 A 病毒; 检测

中图分类号: S852.65, Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0380-05

马铃薯 A 病毒 (*Potato virus A*, PVA) 是马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 成员。PVA 侵染马铃薯后可造成减产 40% 以上, 是马铃薯生产上危害较严重的病毒病之一。在我国仅在黑龙江、福建省有发生的报道。该病毒可随种薯传播, 并随种薯的种植而定植。由于至少有 7 种蚜虫以非持久性的方式传播该病毒, 而这些蚜虫在我国又很普遍, 因此该病毒在我国流行的可能性很大, 是重要的国内监测对象和出入境口岸的对外检测目标^[1]。迄今 PVA 在国内报道极少, 目前的检测方法主要有基于抗血清的免疫学方法, 如酶联免疫吸附试验 (ELISA)^[2]、Dot-ELISA^[3], 和基于核酸分子组成差异的核酸分子标记方法, 如核酸分子杂交技术^[4, 5]、指示分子-核酸序列扩增 (NASBA) 技术^[4]、反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)^[4-6]。其中 ELISA 方法以其快速、灵敏、操作简单的优势得到广泛的应用。

流式微球技术 (cytometric bead array, CBA) 是流

式细胞术与荧光微球相结合的一项新技术^[7, 8], 其实实验或检测中的数据收集和分析是通过聚苯乙烯荧光微球上所携带的信号来完成的。该技术在液相环境中进行, 可保持蛋白质构象不变, 有利于抗原抗体结合^[9-10], 且具有高通量、快速分析多重生物反应的特点及高度的灵敏度和特异性, 已广泛应用于医学领域^[11, 12]。流式微球技术在各种应用中的检测结果与传统的 ELISA 基本一致, 但有着 ELISA 无法比拟的优越性。而流式微球一步法是将所有免疫试剂同时加入后温育一次即可获得检测结果, 比传统的流式微球技术的操作更简便、快速。Borges 等^[13]应用该技术进行鸡全血中白细胞亚型的研究, 试验结果表明流式微球一步法快速、准确、重复性好, 适用于大量样品的快速检测。目前该技术的相关报道较少, 国内还未见该技术在植物病毒检测方面的应用文献。

本研究拟利用流式微球技术建立一种新型的马铃薯 A 病毒免疫检测方法, 在此基础上将免疫反应一

基金项目: 国家自然科学基金 (20775076/B0509); “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BAK10B09); 科技部科研院所社会公益研究专项 (2005DIA2J128); 国家质检总局科技攻关项目 (2005IK0073)

*通讯作者: Tel: +86-10-85747380; Fax: +86-10-85745897; E-mail: mingqiangz@sina.com

作者简介: 高海霞 (1982-), 女, 新疆乌鲁木齐, 硕士研究生, 生物化学与分子生物学。E-mail: gaohaixia2005@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-23; 修回日期: 2007-11-12

步化,且考察了该方法的灵敏度、特异性和稳定性,并与 ELISA 方法的实验结果进行比较分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 马铃薯 A 病毒的捕获抗体、检测抗体及阳性、阴性质控样品均来自美国 Agdia 公司 ELISA 试剂盒; 马铃薯 Y 病毒、莴苣花叶病毒、番茄环斑病毒阳性质控样品购自美国 Agdia 公司; 荧光微球(0.4 μ m, 1×10^8 个/mL)购自 Spherotech 公司; FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(0.5mg/mL)和 FITC 标记的羊抗兔 IgG(0.5mg/mL)购自 Invitrogen 公司; 硫化 N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐(EDC)购自 Fluka 公司; 活化缓冲液, 封闭液, 洗涤液等均为分析纯。

1.1.2 主要仪器: FACSsort 流式细胞仪(美国 BECKMAN 公司); 高速离心机(Sigma 公司)。

1.2 流式微球一步法的建立

1.2.1 检测微球的制备: 将偶联缓冲液(NaH_2PO_4 0.1mol/L, pH6.2)、洗涤缓冲液(PBS 0.01mol/L, pH7.4)、封闭/储存缓冲液(PBS+1%BSA+0.02% NaN_3)放置到室温备用。取 1 μ L 微球悬液(约 1×10^5 个/ μ L)

用洗涤液洗一遍; 加入 80 μ L 活化缓冲液和 10 μ L EDC 和 NHS(5mg/mL)活化剂, 混匀; 室温下避光摇振 20min; 向活化微球中加入 100 μ L(4 μ g/mL)捕获抗体, 混匀; 室温下避光摇振 2h; 用洗涤液洗 3 次; 加入 200 μ L 封闭液; 室温下避光摇振 1h; 将包被好的微球放在 100 μ L 封闭/储存缓冲液中 4 $^\circ\text{C}$ 避光保存。

1.2.2 一步法反应步骤: 取 100 μ L 待测样品与 10 μ L(约 1×10^4 个)检测微球轻轻混匀, 加入 100 μ L(1:25 倍稀释)检测抗体和 100 μ L FITC 标记的羊抗小鼠 IgG, 混匀, 用 PBS 调至反应体积为 500 μ L; 室温避光摇振 2h 以形成微球双抗夹心复合物(图 1);

用洗涤液洗两次, 重悬浮后待测, 同时作阴性样本对照。

1.2.3 样品检测: 如图 1 所示, 在鞘液约束下逐个地通过检测区的微球双抗夹心复合物, 因荧光微球自身颜色(红)和荧光标记的羊抗小鼠 IgG 颜色(绿)而具有两种荧光信号, 当两种信号同时被检测出即达到了“双阳”时, 就表明微球与相关试剂已连接, 而连接了试剂的微球占微球总数的比率用连接率表示。利用 FS/PMT1 散点图和 PMT5、PMT2 直方图的技术进行流式细胞仪检测, 以减少杂荧光信号的影响。

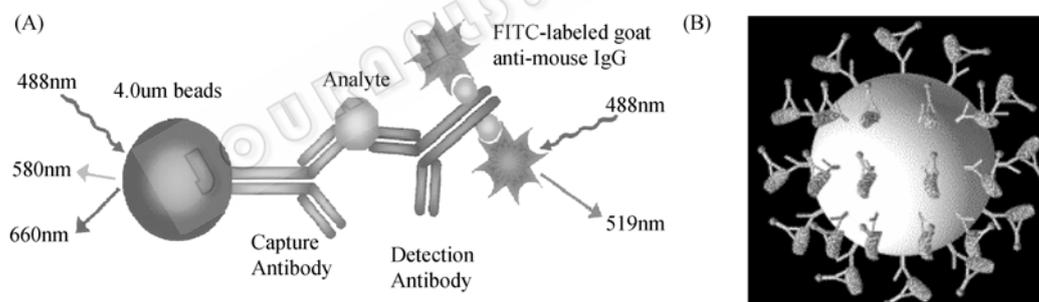


图 1 高分子微球与各种生物试剂连接示意图^[6, 11]

Fig. 1 Sketch map of the connection of fluorescent microsphere and biological reagents (DAS-ELISA). (A) A pictorial representation of the reagents used in this assay. Wavy lines represent the excitation light beam, straight lines represent the emission beams. (B) The microsphere which is already covalently coupled with biological reagents.

1.3 双抗夹心 ELISA 检测

参照 Agdia 公司 ELISA 试剂盒说明书进行实验。

2 结果

2.1 实验条件优选

2.1.1 捕获抗体和检测抗体工作浓度的选择: 本实验用不同浓度(8 μ g/mL、4 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL、0.125 μ g/mL)的捕获抗体与活化后的微球连接, 洗涤后用 FITC 标记的羊抗兔 IgG

抗体与之反应, 经流式细胞仪检测荧光信号。结果表明, 当与微球连接的捕获抗体浓度为 4 μ g/mL 时, 平均连接率最高(98.3%), 达到饱和(图 2)。此浓度为最佳捕获抗体的工作浓度。

采用 4 μ g/mL 捕获抗体包被微球, 加入过量的马铃薯 A 病毒, 经振荡、离心、加入 100 μ L 不同浓度的捕获抗体和过量的 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG。再经离心洗涤微球及流式细胞仪分析。不同的检测抗体浓度其荧光信号的变化如表 1, 从表 1 可知 1:12.5 和

1:25 的稀释度所测得的荧光信号比较接近, 而 1:50 稀释时荧光信号急剧下降, 为保证一定的荧光信号, 又节省试剂, 在标准曲线的制作中, 选用检测抗体 1:25 的稀释度。

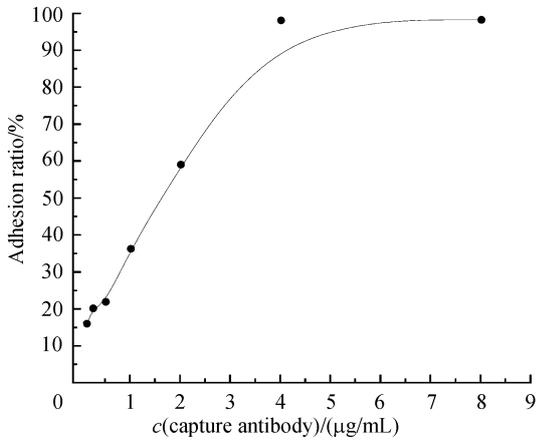


图 2 微球表面捕获抗体量的优化

Fig. 2 Influence of capture antibody concentration on coupling ratio.

表 1 不同稀释度检测抗体的荧光信号

Table 1 Fluorescence for detection antibody of different dilution

Antibody dilution	Fluorescent signal/%
1:12.5	60.2
1:25.0	55.0
1:50.0	30.0
1:100.0	10.7

2.1.2 免疫反应时间的优化: 采用流式微球一步法, 分别进行免疫反应 30min, 1h, 2h, 3h 后洗涤微球, 结果表明反应时间为 2h 时免疫反应充分, 为最佳反应时间。

2.1.3 洗涤的影响: 一步法双抗夹心免疫反应后, 分别进行不洗涤、洗涤一次、洗涤两次的试验, 发现不洗涤情况下微球对试剂的非特异性吸附很强, 而用 PBS (pH 7.4) 洗涤两次可以去除这种非特异的吸附。

2.2 流式微球一步法检测马铃薯 A 病毒

采用一步法分析不同稀释度的 PVA 病毒阳性样品液(1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128), 用阴性样品液作对照组。通过流式细胞仪分析结果, 绘制标准曲线(图 3, one step test), 相关系数(r) 0.996(n=8), 标准偏差(s)1.2。以 P/N 大于 3 作为阳性样品, 结果显示可检出的最高阳性样品稀释液为 1:64。分析同一批次和批次之间的平行样本稀释液, 其所在的反应曲线的位置漂移小, 如批次间阳性样品 1:4 稀释的 CV 为 6.1%, 说明该方法的稳定性较好。

影响流式微球一步法检测 PVA 的因素除了要筛选特异性较好的免疫试剂外, 非特异性连接和交叉反

应是影响其结果准确性的重要因素。用未活化的微球与一定量的 FITC-IgG 进行温育、洗涤后检测, 结果未发现“双阳”现象, 说明微球不与 IgG 抗体发生非特异性吸附。此外, 交叉实验结果显示(表 2), 马铃薯 A 病毒检测体系与马铃薯 Y 病毒(PVY)、莴苣花叶病毒(LMV)、番茄环斑病毒(ToRSV)等发生交叉反应率均小于 0.1%。

表 2 马铃薯 A 病毒检测体系与其它病毒的交叉反应率
Table 2 The percent cross-reactivity of PVA detection system with other virus

Virus	Cross-reactivity/%
Potato virus Y (PVY)	0.1
Lettuce mosaic virus (LMV)	0.1
Tomato ringspot virus (ToRSV)	0.1
Potato virus A (PVA)	100

2.3 与流式微球“分步法”及双抗夹心 ELISA 方法的比较试验结果

传统的流式微球分析法即“分步法”, 是依次加入马铃薯 A 病毒、检测抗体、荧光标记物的分步温育、分步反应, 而后进行流式分析。比较“一步法”和“分步法”所得检测结果表明(图 3), 两种方法绘制的标准曲线的变化趋势基本相同, 其中一步法曲线更圆滑, 灵敏度略高; 分步法则离心洗涤的次数较多, 操作繁琐, 在低于一定浓度(阳性样品稀释 1:4)后曲线斜率较低, 即检测灵敏度较低。更重要的是, 一步法将分步法所需的 4.5h 减少到 2h。

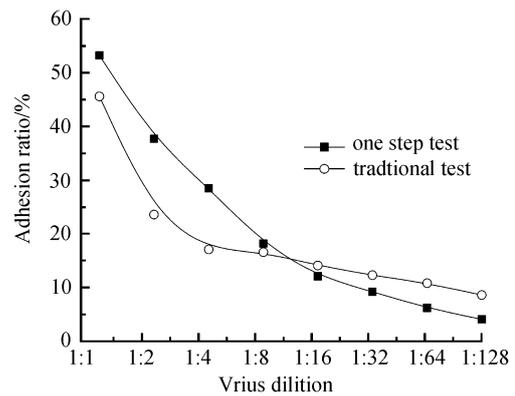


图 3 流式微球技术检测 PVA 病毒结果

Fig. 3 Screening test for PVA using cytometric bead array.

ELISA 方法按照 Agdia 公司 ELISA 试剂盒推荐的工作浓度进行 PVA 检测, 以 P/N 大于 2.1 作为阳性, 可检出的最高阳性样品稀释液为 1:16。两种方法的检测结果(表 3)表明流式微球一步法具有灵敏度高, 特异性好, 操作方便且检测周期短的优势。

表 3 DAS-ELISA 方法和流式微球一步法检测 PVA 结果
Table 3 Detection of PVA by ELISA and One-step cytometric bead array

Sample	ELISA		One-step cytometric bead array	
	OD ₄₀₅	Result	Adhesion ratio/%	Result
P+ (1: 1)	2.4885	+	53.20	+
P+ (1: 2)	1.8175	+	32.70	+
P+ (1: 4)	1.3725	+	28.50	+
P+ (1: 8)	1.006	+	18.20	+
P+ (1: 16)	0.857	+	12.10	+
P+ (1: 32)	0.736	-	9.25	+
P+ (1: 64)	—	—	6.20	+
P+ (1: 128)	—	—	4.10	-
P- (1:1)	0.3585	-	1.80	-

P+: Positive sample; P-: Negative sample.

3 讨论

本研究应用流式微球一步法免疫检测马铃薯 A 病毒, 其灵敏度比传统微孔板 ELISA 高 4 倍, 且检测时间仅需 2h, 实验结果显示流式微球一步法具有特异性强、灵敏度高、重复性好、操作简便的优点, 可广泛用于 PVA 的快速检测, 也为其他病毒检测研究奠定了基础。

马铃薯病毒检测技术经历了传统生物学检测技术、免疫学检测技术和分子生物学检测技术 3 个阶段。传统的生物学检测技术以观察鉴别寄主在接种后的症状反应为主要标准之一, 此外还有病毒细胞质内含体形态等生物学指标和病毒生物学特性测定等鉴定标准。此方法准确、直观、易于操作, 但耗时长^[14]。免疫学检测技术是目前检测马铃薯病毒通常采用的方法, 其中 ELISA 方法快速、灵敏, 适用于大量样品的检测, 现已有商品化的试剂盒, 能够满足快速诊断及现场诊断的要求, 是目前我国 PVA 检测鉴定的主要方法^[3]。RT-PCR 和核酸分子杂交等分子生物学检测技术在马铃薯病毒检测中已有广泛的应用^[4], 但利用该技术检测 PVA 的报道较晚, 2004 年吴兴泉等^[5]首次建立了 PVA 分子鉴定与检测技术。RT-PCR 技术具有高度的专一性和灵敏度, 但是检测所需的 RNA 提取方法步骤繁琐; 核酸分子杂交技术对实验仪器没有特殊要求, 但是操作步骤繁琐, 与 RT-PCR 相比, 其灵敏度和特异性要差一些^[4]。由此可见分子生物学检测技术用于 PVA 快速检测还有待于不断的改进, 简化病毒 RNA 的提取方法及其它操作步骤。

本实验首次提出流式微球一步法免疫检测 PVA, 与 ELISA 相比, 免去了实验中的多次温育、洗涤步骤, 操作简便且大大节约了实验时间, 并且微球表面捕获抗体后可以在 4 避光保存数周不脱落, 供多次实验使用。该技术优势突显, 为 PVA 快速检测提供了一种新的免疫学检测手段, 相信通过微球选择、微球与抗体结合等条件优选, 可以进一步降低免疫试剂用量, 节约试验成本, 提高检测灵敏度。但流式细胞仪价格昂贵, 限制了该方法的应用, 本研究小组已着手于小型仪器的研发, 利用流式细胞仪的原理开发编码微球微流控芯片分析仪。目前样机已进入调试阶段, 配套的检测软件也正在完善之中。

参 考 文 献

- [1] 胡琼. 马铃薯 A 病毒病及其防治. 现代农业科技(*Anhui Agriculture*), 2005, 5: 21.
- [2] 崔荣昌, 李芝芳, 李小龙, 等. 应用酶联免疫吸附试验法鉴定几种主要马铃薯病毒. 植物保护学报(*Journal of Plant Protection*), 1989, 16(3): 193-197.
- [3] 田世民, 施丽飞, 周朋, 等. 两种 NC 膜条上马铃薯 A 病毒 DAS-ELISA 检测研究. 微生物学通报(*Microbiology*), 2007, 34(4): 712-714.
- [4] 吴兴泉, 陈士华, 吴祖建, 等. 分子生物学技术在马铃薯病毒检测中的应用. 中国马铃薯(*Chinese Potato*), 2003, 17(3): 175-180.
- [5] 吴兴泉, 陈士华, 魏广彪, 等. 福建马铃薯 A 病毒的分子鉴定及检测技术. 农业生物技术学报(*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2004, 12(1): 90-95.
- [6] 袁青, 殷幼平, 王中康, 等. 二重 RT-PCR 快速检测马铃薯病毒的方法. 植物检疫(*Plant Quarantine*), 2005, 19(3): 135-139.
- [7] Szurdoki F, Michael K, Walt D. A duplexed microsphere-based fluorescent immunoassay. *Analytical biochemistry*, 2001, 291: 219-228.
- [8] 于淼, 邹明强, 何昭阳. 高分子荧光微球在生物医学领域中的某些应用. 分析测试学报(*Journal of Instrumental Analysis*), 2006, 25 (3): 115-119.
- [9] Dario AA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243: 243-255.
- [10] Yan X, Schielke EG, Grace KM, et al. Microsphere-based duplexed immunoassay for influenza virus typing by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 2004, 284: 27-38.
- [11] Bio-Plex Manager™ 3.0 User Guide.
- [12] Jonathan S, David P. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100™ microsphere system. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 267: 165-171.
- [13] Burgess SC, Davison TF. Counting absolute numbers of specific

leukocyte subpopulations in avian whole blood using a single-step flow cytometric technique: comparison of two inbred lines of chickens. *Journal of Immunological Methods*, 1999, 227:

169–176.

[14] 刘卫平. 马铃薯病毒和类病毒检测技术. 中国马铃薯(*Chinese Potato*), 2000, 14(4): 208–209.

One-step cytometric bead array for rapid detection of Potato Virus A

Haixia Gao^{1,2}, Mingqiang Zou^{2*}, Ling Wang^{1,2}, Jizhi Jiang¹, Shimin Tian²

(¹ College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

(² Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: [Objective] Based on immunoassay, we developed a method to detect *Potato Virus A* (PVA) using one-step cytometric bead array (CBA). [Methods] Using fluorescent beads as carriers, we formed the complexes of bead-capture antibody-PVA-fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled detection antibody by immunoreaction of double antibody sandwich on bead surface. We measured the fluorescent signals produced from beads and from FITC with a multiparameter flow cytometer. [Results] By optimization test, capture antibody and detection antibody (from PVA detection kit, Agdia, USA) were finally diluted at 1:50 (4 μ g/mL) and 1:25 to be used in one step CBA, respectively. A total CBA reaction time of 2 h was needed. No cross reactivity with other plant virus similar to potato virus Y, lettuce mosaic virus and tomato ring spot virus were found. Detection sensitivity for positive control sample in one-step CBA was 4 folds higher than that in normal plate double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). [Conclusion] A one-step CBA method for rapid and sensitive detection of PVA is developed.

Keywords: cytometric bead array; one-step; potato virus A; detection

Supported by the National Science Foundation of China (20775076/B0509), the Key Project of Chinese National Program for Fundamental Research and Development(2006BAK10B09), the China Science and Technology Ministry, Program for Social Profit (2005DIA2J128) and the China General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Program for Science and Technology Development (2005IK0073)

*Corresponding author. Tel: +86-10-85747380; Fax: +86-10-85745897; E-mail: mingqiangz@sina.com

Received: 23 July 2007/ Revised: 12 November 2007

科学出版社生命科学新书推介(2008-01)

表观遗传学(影印版)

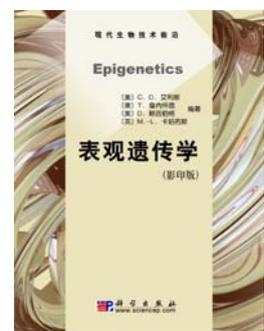
[美] C. D. 艾利斯 [奥] T. 詹内怀恩 [美] D. 赖因伯格 [英] M.L. 卡珀若斯 编著

978-7-03-020774-6 ¥ 96.00(含光盘) 2008年1月11日出版

表观遗传学是研究非 DNA 序列变化的、可遗传的表达改变的的科学, 表观遗传学机制参与个体发育、成体的许多生物学进程中基因表达的调节, 这一过程的异常可导致人类癌症和其他疾病的发生。本书是基础研究专著, 24 章均由知名专家撰写, 分别从不同角度探讨表观遗传学问题。首先介绍表观遗传学简史、基本概念; 然后详细阐释表观遗传调节的分子机制及与之相关的细胞生物学过程; 介绍了组氨酸和 DNA 甲基化, siRNA 和基因沉默, X 染色体失活, 剂量补偿和印记, 以及微生物、植物、昆虫和哺乳动物中的表观遗传机制; 还讨论了细胞分裂和分化中的表观遗传作用, 以及这些途径中发生的错误对癌症和人类肿瘤的影响; 此外, 也阐述了表观遗传在动物克隆中可能发生的影响。

本书可供发育生物学、细胞生物学、遗传学、基因组学、神经生物学和分子生物学等生命科学相关领域的教学研究人员, 以及本科生、研究生参考。

原著正文内彩图集中列于书中所附光盘。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目