

马铃薯普通花叶病毒 (PVX) 抗血清的制备和不同酶联免疫吸附检测法的对比试验

吴凌娟, 张雅奎, 董传民, 李功轶, 梁杰, 温福军

(黑龙江省大兴安岭地区农业科学研究所, 加格达齐 165000)

摘要: 从一东农 303 马铃薯的重花叶症状病株, 经用千日红 (*Gomphrena globosa*) 两次单斑分离获得一马铃薯普通花叶病毒 (PVX) 毒源株, 用普通烟 (*Nicotiana tabacum*) 繁殖病毒, 参照 S. M. Paul Khurana 等人的方法提纯病毒, 免疫家兔, 获得了效价达 1:512, 非专化反应为 1:4 的马铃薯 X 病毒抗血清。把 PVX 抗血清用过碘酸钠氧化法制备成辣根过氧化物酶的结合物, 其工作浓度可达到 1:1000 以上。在这一基础上进行了直接酶联检测法 (Direct Immunosorbent Assay), 间接酶联检测法 (Indirect Immunosorbent Assay) 的对比试验。

关键词: 马铃薯普通花叶病毒; 直接酶联检测法; 间接酶联检测法

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2001) 04-0219-03

1 前言

马铃薯普通花叶病毒 (PVX) 是严重危害马铃薯生产的主要马铃薯病毒病害, 尤其是和轻型花叶病毒 (PVA)、重型花叶病毒 (PVY) 复合侵染时, 使马铃薯植株产生皱缩花叶和矮化症状, 其产量明显降低。建立健全的脱毒马铃薯繁育体系是防治马铃薯病毒病害的主要方法。马铃薯品种脱毒前后都需要检测其带病毒状况, 脱毒的试管苗也要不断的检测筛选, 使其达到不带病毒, 或是达到带病毒的种类很少, 病毒的浓度极低, 才可以作为繁殖用的基础试管苗。即使是检测筛选出的无病毒试管苗, 经继代繁殖后, 常常还产生一定比率的带有某种或某几种病毒的试管苗。因此, 在每年大量繁殖前仍需检测筛选, 用筛选出的无病毒的试管苗作为繁殖的基础试管苗, 是获得高质量脱毒马铃薯原种的必要方法。

直接酶联免疫吸附法 (夹心法) 是一种简单、

快速、准确的检测马铃薯病毒的方法, 由于这一检测法的灵敏度高, 非常适合于检测脱毒试管苗, 只要从小苗上取下 1 cm 长的茎段样品用夹心法检测, 便能获得准确结果。它的不足之处是每检测一种病毒就需要制备一种酶标抗体, 这在一般科研单位和原种繁殖场是难以做到的。目前市场上有羊抗兔免疫球蛋白酶标抗体出售, 由于它是用兔的免疫球蛋白作为抗原免疫山羊制备抗血清的酶标抗体, 可以和兔的血清免疫交联, 所以, 只要有用兔免疫制备的马铃薯病毒抗血清, 就可以用间接酶联免疫吸附法检测病毒, 这就为间接酶联检测法检测马铃薯病毒提供了条件。本试验的目的是制备马铃薯 X 病毒抗血清和酶标记抗体, 进行直接酶联免疫吸附检测法, 间接酶联免疫吸附检测法的对比试验, 为以后应用这些方法提供具体操作程序和依据。

2 材料与方法

2.1 马铃薯 X 病毒的毒源分离、繁殖和提纯

用一皱缩花叶症状的东农 303 马铃薯植株作为接种体, 摩擦接种于白花刺果蔓陀萝 (*Datura stramonium*), 以排除 Y 病毒, 然后接种于千日红 (*Gomphrena globosa*) 上进行两次单斑分离, 再接种于普通烟 (*Nicotiana tabacum* cv. *Humg Miao Yu*) 上繁殖病毒, 病毒提纯主要参照 S. M. Paul, Khurana 等

收稿日期: 2001-03-14

* 本项目为黑龙江省九五攻关项目《高纬度马铃薯脱毒技术开发》研究内容之一。

作者简介: 吴凌娟 (1965—), 女, 高级农艺师, 从事马铃薯脱毒技术研究。

中国知网 <https://www.cnki.net>

的方法, 称取冷冻毒源叶片300 g, 以 Beckan Optima LE-80K 型超速离心机提纯病毒, 用 0.2 M 磷酸氢二钠, 0.05 M 柠檬酸三钠缓冲液(内含 0.1% 二乙基二硫代氨基甲酸钠和 0.5% 硫基乙醇)匀浆毒源叶片, 用 7% 正丁醇澄清提取液, 先用聚乙二醇 6000 沉淀一次病毒, 然后以 10000 r/min 离心 90 min 沉淀病毒, 再以 10%~40% 蔗糖密度梯度, 28000 r/min 离心 90 min, 用 260 nm 监测, 分部收集病毒带, 然后合并病毒带加进一倍缓冲液, 用 45000 r/min 离心 90 min 回收病毒。

2.2 免疫家兔

选取健康雄兔, 免疫 3 次, 每次间隔一周, 每次用 1 ml (6 mg/ml) 病毒加等量福氏佐剂进行肌肉注射, 第一次免疫加福氏完全佐剂, 其后两次加不完全佐剂。最后一次免疫一周后放血收集抗血清, 用试管沉淀法测定效价。

2.3 测定马铃薯 X 病毒抗血清的效价和非专化反应效价

用试管沉淀法进行测定: 用 0.85% 生理盐水以倍比稀释法稀释抗血清; 用 pH 7.4 的 0.01 M 磷酸缓冲液提取抗原。

2.4 酶联免疫吸附检测法试验 (Emzyme-Linked Immunosorbent Assay)

2.4.1 免疫球蛋白 (Immunoglobulin, IgG) 的提纯

1 ml 抗血清加 9 ml 水, 再加同体积的饱和硫酸铵溶液, 室温静止 1 h, 离心后把沉淀溶于 1 ml 磷酸缓冲液中, 充分透析后用 DE52 层析提纯 IgG, 分部收集, 用 280 nm 测定 IgG 量, E_{280 nm} 1.4=1 mg/ml。

2.4.2 从兔血清中提取的球蛋白 (IgG) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 交联, 制备酶标记抗体, 用过碘酸钠法制备酶标记抗体

① 将 5 mg 酶溶于 0.1 ml pH 8.1 的 0.3M 碳酸氢钠溶液中。

② 加入 0.1 ml 的 1% 氟二硝基苯无水乙醇溶液室温避光搅拌 1 h。

③ 加入 1 ml 0.06M 过碘酸钠溶液室温避光搅拌 30 min。

④ 加入 1 ml 0.16M 乙二醇溶液, 室温避光搅拌 1 h。

⑤ 对 pH 9.5, 0.01M 碳酸盐缓冲液于 4℃ 条件下透析, 换液 3 次。

⑥ 向透析完的醛化酶中加入 5 ml 抗体球蛋白, 测定 pH, 如达不到 pH 9, 要加入数滴 pH 9.5 的 1M 碳酸盐缓冲液使其 pH 值达至 9, 室温避光搅拌 2~3 h, 然后加入 5 mg 硼氢化钠, 4℃ 放置 3 h。

⑦ 向接合物中加入等量的饱和硫酸铵溶液 4℃ 条件下静止 1 h 离心, 留沉淀。再用 50% 饱和度的硫酸铵溶液离心洗涤 2 次, 把沉淀溶于 1 ml pH 7.4, 0.02M 的磷酸缓冲盐水中。用同一缓冲液透析, 换液 2 次, 把制备好的酶标抗体贮于 4℃ 条件下备用。

2.4.3 不同酶联免疫吸附检测法的对比试验

① 直接酶联免疫吸附检测法 (Direct Immunosorbent Assay·DIA), 从兔的抗血清中提取的 IgG, 制备酶标抗体, 然后用双抗体夹心法进行检测。

按常规酶联夹心法的包被, 加被检测样品, 加酶标记抗体, 加底物和加终止液等 5 个步骤进行。用 96 孔酶联滴定板; 用 pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释 IgG 包被酶联板 (包被浓度为 1 μg/ml); 用 0.01M 的磷酸缓冲液 (含 0.05% 吐温 20 和 0.15M 氯化钠) 作为各检测步骤间洗涤酶联板的洗液, 上述洗液加 2% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP K30) 作为酶标抗体稀释液 (工作浓度为 1:1000) 和研磨样品液; 底物缓冲液为 pH 5.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, 邻苯二胺为 0.4 mg, 30% 过氧化氢为 15 μg/ml。在室温条件下约反应 10 min, 当阴、阳对照能够明确区分时, 每孔加 50 μl 2M 硫酸为终止液。用 Mode 1550 型酶标仪检测, 490 nm 的吸收值, 每一处理重复 5 次。每一步骤间都在 37℃ 条件下孵育 2 h, 然后洗涤酶联板。

② 间接酶联免疫吸附检测法 (Indirect Immunosorbent Assay·II A)。

整个操作条件与夹心法相同, 只是前三个步骤略有不同; 第一步骤是加进用碳酸盐缓冲液研磨被检测样品; 第二步加进碳酸盐缓冲液稀释为 1:500 的抗血清或 IgG (加有 0.05% 牛血清白蛋白); 第三步是加进用上述稀释液稀释为 1:500 的羊抗兔辣根过氧化物酶标记的抗体。

3 结果与分析

3.1 马铃薯 X 病毒的提纯

经提纯的病毒制剂, 在蛋白核酸检测仪 DU640 测定 220~320 nm 的 OD 值, 其中最高吸收峰在 260 nm, PVX 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.18,

PVX 的消光系数 E_{26011 nm} 0.1% 为 2.97, 病毒提纯量为 7.5 ml。稀释 5 倍后测定 OD 值为 3.6234, 所获得病毒量为 45.75 mg/300 g 病叶。

3.2 提纯病毒的生物及化学鉴定

经提纯的马铃薯 X 病毒制剂, 稀释 10 倍, 摩擦接种在千日红上, 5~7 d 接种叶片出现紫环枯斑。利用血清学检测, 只含有 PVX 病毒, 说明提纯马铃薯 X 病毒已分纯并具有生物活性。

3.3 马铃薯 X 病毒抗血清效价的测定

利用试管沉淀法测定马铃薯 X 病毒抗血清的

效价及非专化性反应效价, 测定结果见表 1。

结果表明: 马铃薯 PVX 病毒抗血清的效价为 1:512, 非专化性效价 1:4。

3.4 r 球蛋白提取及酶标抗体工作浓度

1 m 马铃薯 X 病毒抗血清, 用硫酸铵沉淀, 用 DE52 纤维素层析, 提纯 r-IgG 量为 3.58 mg, 球蛋白 IgG 和酶标抗体工作浓度的测定, 利用双抗体夹心法在 96 孔聚乙烯板上进行测定。测定结果见表 2。可见 IgG 的工作浓度为 1 μg/ml, 酶标抗体工作浓度为 1:1600。

表 1 PVX 抗血清效价及其非专化性反应效价测定

抗原		抗血清稀释度抗血清									
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
PVX 抗血清	PVX 毒源汁液	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+-
正常血清	PVX 毒源汁液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVX 抗血清	未接种烟草提取液	+	+-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: +++ 表示非常明显絮状沉淀; ++ 表示有明显絮状沉淀; + 表示 4°C 过夜后有絮状沉淀; +- 表示 4°C 过夜后有轻微絮状沉淀; - 表示 4°C 过夜后没有絮状沉淀。

表 2 球蛋白和酶标抗体工作浓度的测定 (包括 γ 球蛋白的浓度 μg/ml)

t	10				1.0				0.1							
	(2—4)	(5—7)	(8—10)	(11—12)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A																PBS-T 缓冲液
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:10 供试样品
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:10 供试样品
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:100 供试样品
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:100 供试样品
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:10 阴性对照
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	空白对照
H																PBS-T 缓冲液
	1:400	1:800	1:1600	1:400	1:800	1:1600	1:400	1:800	1:1600	1:400	1:800	1:1600				
																酶 标 稀 释 度

注: + 表示显阳性反应; - 表示显阴性反应或反应非常不明显; t 为 PBS-Tween²⁰ 为缓冲液。

3.5 比较酶联夹心法和间接酶联法的灵敏度

比较酶联夹心法、间接酶联法检测 PVX 提纯病毒的相对灵敏度见图 1。间接酶联法所检测的病毒是用碳酸盐缓冲液稀释, 浓度范围为 10 到 1000 μg/ml, 加到未包被酶联板上, 夹心法则是先用 1 μg/ml 的球蛋白包被酶联板, 然后用夹心法酶联缓冲液把病毒稀释成和间接法同样的病毒含量范围, 加到已包被的酶联板上。二者的试验条件一样, 两种检测方法都随着病毒含量的提高其吸光值也相应增高。间接法检测病毒的灵敏度比夹心法相对高,

这为应用间接法检测病毒提供依据。

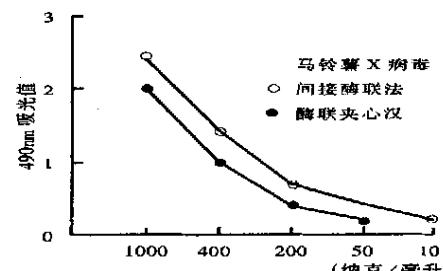


图 1 间接酶联与夹心法检测灵敏度比较

每一点为 5 次重复, 标准差为 0.01