



应用 ELISA 法分析 PVA 单克隆抗体的反应

王新伟 滕伟丽

(黑龙江省农业科学院马铃薯研究所 克山 161606)

1 前言

PVA 是世界性分布的植物病毒, 它在大多数马铃薯生产国家中产生极大的经济损失。目前, 在捷克共和国有大量的马铃薯样品通过常规的 ELISA 对包括 PVA 在内的各类病毒进行检测。其中, 利用单克隆抗体 (MAbs) 作为新的免疫试剂避免了许多非特异性反应, 并大大地提高了灵敏度, 这为生产高度专化、不受约束并有实用价值的抗体提供了可能性。

本文报道的是捷克共和国 Na Karlovce 等利用单克隆抗体对 PVA 的反应结果。

2 材料与方法

试验者通过杂交瘤技术从腹水抗体中共获得 6 株稳定分泌 PVA 特异性抗血清的杂交瘤株系, 从而得到相应的抗血清 IgG1 (MAb.PVA-151, 187, 328 和 634), IgG2a(MAb PVA-534)以及 IgG2b (MAb PVA-290)。并在试验中应用了三种 ELISA 法。

间接 ELISA 双抗体夹心法 (IDAS-ELISA): 在兔子对 PVA 产生的多克隆抗体 (浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$) 中加入 50 ml 碳酸盐缓

冲液, 调至 pH 为 9.6, 37°C 下孵育 3 小时, 用该液包被微量滴定板小孔 ($200\mu\text{l}/\text{小孔}$), 再用 PBS 0.05% Tween 20 稀释液洗 4 次。加样并放于 4°C 下过夜, 和上述一样冲洗 4 遍后, 将分离的 MAbs ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 加到板孔上, 并于 37°C 下孵育 2 小时, 洗涤后, 加入 1:1000 稀释的猪抗鼠碱性磷酸脂酶的结合物 (SWAM-AP), 37°C 下孵育 4 小时, 底物用对硝基苯酚磷酸盐来检测。

ELISA 双抗体夹心(DAS-ELISA): 该法根据 Clark (1977) 的方法得到的。滴定板孔用 PABs ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 或 MAbs ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 包被, 用植物汁液孵育过夜后洗涤, 由 PABs 束缚的抗原通过兔子的多克隆碱性磷酸脂酶的结合物 (PABs-AP) 检验, 由 MAbs 束缚的抗原通过单克隆碱性磷酸脂酶 (MAb-AP) 检验, 每种结合物的稀释液浓度为 1:1000。

DAS₁-ELISA 用 PABs($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 包被滴板, 37°C 下孵育 3 小时, 样品中加入稀释液 PBS-TPOU, 4°C 下孵育过夜, 加入 MAPbs-AP (稀释度为 1:200 和 1:1000), 并在 37°C 下保持 4 小时。

DAS₂-ELISA 小孔首先由浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 MAbs 包被, 样品加到板孔后在 4°C 下孵育过夜, 之后加稀释

度为 1 : 1000 的多克隆抗体酶标, 在 37℃ 下孵育 4 小时。

间接 ELISA: 首先由纯化的病毒 (100 和 200 μg/ml) 包被滴板, 然后用 5 μg/ml 的 MAbs 作为一抗, 最后用稀释度为 1 : 1000 的 SWAm-AP 作二抗。

在各种 ELISA 法中都应用了浓度为 1 mg/ml 的对硝基苯酚磷酸盐作底物, 并在 30 分钟后于 405 毫微米下测定光密度值。

3 结 果

由表 1 可以看出, 辛酸纯化得到免疫球

表 1 利用 DAS-ELISA 比较由辛酸和硫酸铵分离得到纯化 PVA-151 单抗的反应值

单抗(作为 AP 结合物)来源	单抗(作为包被)的来源	
	辛 酸	硫酸铵
辛 酸	>2.45	1.76 ± 0.04
硫酸铵	0.80 ± 0.05	0.68 ± 0.07

表 2 各种单抗在 IDAS-ELISA 中的反应

单 抗	单抗浓度		对照液
	(1 μg/ml)	(5 μg/ml)	
151	+++	+++	0
187	+	+	0
290	+	+++	0
328	+	+++	0
534	+	+++	0
634	+++	+++	0

注: +++, A405 = 1.2~2.45; ++, A405 = 0.7~1.2; +, A405 = 0.1~0.7; 0, A405 = <0.1; 对照液: 无病毒

蛋白的光密度值大于硫酸铵分离得到相同浓度的免疫球蛋白光密度值的二倍。而且同时

以辛酸纯化得到的 PVA-151 作为包衣和酶标抗体时其光密度值最高, 大于 2.45。由此看出, 腹水抗体的纯化方法影响着 ELISA 反应的灵敏度。在表 2 中, PVA 的多抗血清与 6 种单克隆抗体都反应, 有完全封闭作用, 这说明, PVA 多抗的抗原组分中包括 6 种单抗的特异抗原组分, 而且反应中 PVA-151 和 PVA-634 最灵敏。

表 3 单抗在 DAS₁-ELISA、DAS₂-ELISA 中的反应

MAbs	DAS ₁ -ELISA		DAS ₂ -ELISA	
	1 : 1000	1 : 200	(1 μg/ml)	(5 μg/ml)
151	+++	+++	+	+
187	+	+	+	+
290	+	+	0	+
328	+	+	+	++
534	+	+	++	++
634	+++	+++	+	+

表 4 单抗在 DAS-ELISA 中的反应

MAbs(包被)	MAbs-AP					
	151	187	290	328	534	634
151	+++	+	0	+	+	0
187	+++	+	0	+	++	0
290	++	+	0	+	+	0
328	+++	+	0	+	+	+
534	++	+	0	0	+	++
634	0	0	0	0	0	0

从表 3 看出, 在 DAS₂-ELISA 中, 以多克隆抗体作酶标抗体时, 各种单抗束缚病毒能力不同。从 DAS₁-ELISA 中看出, 相同免疫球蛋白亚类的单克隆抗体 (PVA-151, 187, 328 和 634) 表现不同的反应值, 这些结果区分了单克隆抗体和多克隆抗体。在 DAS₂-ELISA 中又可看出, 当

单克隆抗体 PVA-534 和 PVA-328 用于包被抗体, 多克隆抗体作为酶标抗体时, 获得较高灵敏度, 而它们的位置颠倒时效果下降, 该结果与 Hill 等 1984 年做过的大豆花叶病毒时得到的结果相似, 即病毒性多抗血清的专化病毒束缚剂干扰相同病毒的单克隆抗体束缚剂。

表 4 中, 当 PVA-151 单抗作包衣, 同时用它作为酶标抗体时反应值最高, 另外, 当 PVA-151 作酶标抗体时, 用 PVA-328 和 PVA-187 作包衣也可得到较理想的结果。

另外, 用 6 种单抗分别与 PVA 侵染的马铃薯不同品种反应, ELISA 检测结果表明, PVA-151 与所有 PVA 侵染的样品都反应, 于是它被选择为检测 PVA 的特征工具。

4 结 论

各个单克隆抗体(MAbs)随着 ELISA 类型的不同反应结果不同, PVA-634 在 DAS₁-ELISA 中作为酶标抗体时有较高的亲和力, 而在 DAS₂-ELISA 中作为包衣抗体时反应微弱, 在 DAS-ELISA 中作包衣与所有单克隆酶标都不发生反应。所以, 应

用 ELISA 反应时, 准确选择单抗作为包衣和结合物是与多抗或单抗结合的一条重要原则。

DAS-ELISA 中获得最高反应值的是同时以 PVA-151 作为包衣抗体和酶标抗体时获得的, 而且, 单抗中的 PVA-151 或 PVA-328, PVA-187 用于包衣, PVA-151 用作酶标抗体比其它单抗用于包衣和酶标抗体有较高的灵敏度。这说明, PVA-151 不仅是最好粘附 PVA 毒源的包衣抗体, 而且也是 PVA 最好的酶标抗体。所以, PVA-151 对 PVA 具有严种特异性, 用它测受 PVA 侵染的汁液相当有效, 如果用它与另一类单抗配合使用可能鉴别诊断 PVA 的新型株系, 于是利用 PVA-151 单抗对马铃薯 PVA 抗病品种的选育, 无病毒种薯的生产及进口种苗的检测都是相当有用的试剂。

ELISA 技术的发展趋势主要表现在完善和改进已有的测定方法, 发展新的测定方法, 使测定结果更灵敏、准确, 使用范围更广泛。所以我们在今后的检测工作中, 要多渠道探索国内外最新 ELISA 检测方法, 开展对新型免疫试剂如高选择性单克隆抗体的研究, 尤其利用基因工程, 蛋白质工程开发出超高效免疫试剂。

