环境中棉铃虫NPV定性定量的ELISA测定

王晓容 周春莲 张友清

（中国科学院武汉病毒研究所，武汉）

提 要

酶联免疫吸附检测法，具有较高的敏感性，特异性强、简便、客观观察结果，便于大规模检测等特点。本试验采用这个方法，对棉铃虫核型多角体病毒（Heliothis armigera NPV）杀虫剂的生产和使用环境中的水、土进行了ELISA测定，在大量用过此杀虫剂的田里，发现NPV含量约为4—9PIB/克土，扩散区约为6—53PIB/克土，污染严重的水塘中，病毒含量约为630PIB/ml水，产品车间约为830PIB/克土以上。

近十年来，蒋湖生防站一直是棉铃虫病毒杀虫剂的研制生产和使用基地。为了解棉铃虫NPV在这一区域的残留和传播情况，我们做了这个试验，其方法和结果如下：。

材料与方法

病毒分离提纯 采用本所分离的S01-43株棉铃虫核型多角体病毒。参照黄文林等人的方法[1]，用时将病毒分离提纯，然后降解（降解液为0.05mol/L Na_2CO_3 + 0.05mol/L NaCl，1:1，pH11），37℃下搅拌降解1小时，离心，3000r/m30分钟，取上清，用0.5*N*HCl调pH至中性。以病毒粒子和多角体蛋白为混合抗原。

抗血清的制备 按常规制备抗血清方法，选四斤左右的健康白兔，行耳静脉、皮下、肌肉各点注射。首次注射每只兔用0.5ml抗原，并加1:1的福氏完全佐剂乳化，以后加强每只用1ml，不加佐剂。每10天后加强一次，第二次加强后一周试血，琼脂糖扩散效价为1：128，ELISA间接法试验[2]见表一，然后放血分离血清，置－20℃贮存备用，并根据表一确定抗血清工作浓度为1：500。

OD值与NPV浓度对数标准曲线的制备：参照Kelly，D.C.[3]和Evans，H.F.[4]的方法，他们用病毒粒子做抗原，检测幼虫在不同龄期发病后多角体的含量，本试验是用病毒粒子与多角体蛋白为混合抗原，并参考文中[3]的病毒粒子浓度与消光值曲线，做一消光值（OD）与NPV浓度（试验时为混合抗原）对数的标准曲线。将提纯的多角体悬液，光镜下多次计数，同前面的方法降解和ELISA试验，在492nm下测其OD值，其函数图象如图1所示：

本稿1986年元月15日收到

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1 抗体效价的ELISA测定
Table 1: The valence of the antibody to be tested with ELISA

抗原 / 结果 / 抗体	1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	CK	自水来
1:100	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	−	−
1:1000	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	−	−
1:5000	卅	卅	卅	+	+	±	−	−	−
1:10000	卅	卅	卅	+	+	−	−	−	−

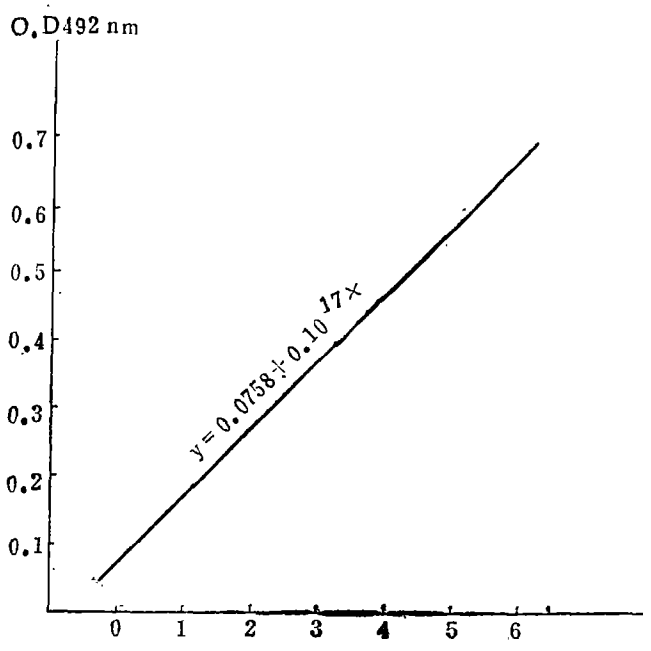

图1 OD值与NPV浓度对数曲线
Fig. 1 The relationship between log10 number of NPV ELISA and OD492nm

计算方法 用常规数理统计方法计算出直线方程为，$y=0.0758+0.1017x$，显著性测验 $r=0.953$（$v=4$时，P为0.01的临界值为0.917），说明此方程相关性极显著。

样品 包括水和土。来源于棉铃虫病毒杀虫剂的生产和使用环境。其中田间土样分别来自一年用药和多年用药的，分为0 cm 5，cm，10cm，15cm。另加阴性对照样品。

样品处理 取水10ml，离心3000rpm30分钟，弃上清，加2 ml降解液（pH_{11}），37℃下降解1小时，用0.5NHCl调pH至中性，取土3克，加10ml降解液，37℃下搅拌降解1小时，离心3000rpm30分钟，取上清，用0.5NHCl调pH至中性。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ELISA 试验 根据祝庆荃等人的方法[5]，以聚苯乙烯微量板作载体，每样品包被四个小孔，每孔0.2ml，设有阳性、阴性和空白对照。包被后 4 ℃孵育过夜。

将孔内液倒掉，用 pH7.4PBS-Tween20（简称PBS-T）充满各孔，室温放置 3 分钟，如此重复 3 次（以下简称3′×3，甩干）。

加入0.2ml用 PBS-T 稀释的兔抗血清，37℃结合 1 小时。

洗3′×3，甩干。

加入0.2ml用 PBS-T 稀释的酶标羊抗兔 IgG1：100倍，37℃结合 1 小时。

洗3′×3，甩干。

加入0.2ml新鲜配制的酶作用底物-邻苯二胺，室温15—30分钟。

每孔加入 2 M $H_2SO_4$50μl终止反应，在492nm下测取OD值。

结 果

经ELISA测定，结果见表二：

表二 抗体与样品间的反应结果（ELISA）及病毒含量
Table 2: The result of reaction between the antibody and the samples (ELISA) and content of the NPV.

被测对象 \ 项目 结果		ELISA 反应（目 测）	OD 值 492nm	NPV 含量（PIB/克土或ml水）
阳性对照		卅		
生产环境	土	卅 卅	0.32—0.37	830—2640
	水	卅 卅	0.36	630
使用环境	多年用药	+ 土	0.08—0.12	4—9
	一年用药	—		
距生产区100—200米		+ 土	0.1—0.2	6—58
非使用区		—		
阴性对照		—		
空白对照		—		

为避免土中多种因素对降解液的影响，设有三个对照。表中 OD 值是以空白对照校正阴性样品，然后以阴性样品为零，来校正其它样品的。上表说明，生产环境受到严重污染，每克土中（包括车间地灰）含病毒在830PIB以上，每ml水中约含 630PIB。使用

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

环境里，一年用药地里未发现病毒残留，曾多年用药的地里，在0—15cm耕层中都发现有病毒残留。表中NPV含量是多点取样测定后的综合值。病毒存在量与土层深度无明显关系，约为4—9 PIB/克土。距生产区百余米的地方发现有阳性反应，存在量不等，约为6—58PIB/克土，说明病毒在场区内已扩散。取未用过病毒杀虫剂的土进行测定，反应为阴性。

讨 论

以上试验，本文仅作一初探。对于厂家能了解H. armigera NPV的扩散情况，为安全生产提供了重要依据。对于进一步研究H.armigera NPV在自然界的累积情况及生态效应，提供了参考资料。

参 考 文 献

[1] 戴文林等，1980.《棉铃虫病毒杀虫剂鉴定会资料》73—76。
[2] 邵采芳等，1979.《医学情报资料》4—5：93—95。
[3] Kelly, D.C.et al., 1978.J.gen.Virol 40.465—469.
[4] EVANS, H.F.et al., 1981.Archives of Virology 70, 207—214.
[5] 祝庆基等，1982.《油桐尺蠖核型多角体病毒的研究及其应用资料汇编》29—33。

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DEMONSTRATION OF NPV OF THE COTTON BOLLWORM (HELIOTHIS ARMIGERA) IN THE ENVIRONMENT BY THE ELISA

Wang Xiao-yong Zhou Chun-lian Zhang You-qing

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan*)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA) has a higher sensitivity, speciality and simplicity, in particular, it is convenient in large-scale observation. The water and soil in the environment which produced and used *Heliothis armigera* NPV inssecticide were detected by this assay. The contents of NaNPV were about 4-9PIB/g, 6-58PIB/g, 630PIB/ml water, above 830PIB/g, respectively in the farmland largely using the insecticide, the spread area, the heavily polluted pool and the product workshop.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net