

A 蛋白间接酶联免疫吸附法检测二种西瓜花叶 病毒病 (WMV-2和 CMV) 的研究

陈永萱 薛宝娣 刘凤权

(南京农业大学植保组, 南京)

提 要

本文用一种改进了的间接酶联免疫吸附法 (PAS-ELISA) 对二种西瓜上的病毒 (WMV-2 和 CMV) 进行检测。结果证明, 利用 A 蛋白预包被和酶联 A 蛋白的间接 ELISA 方法具有高度的灵敏度和特异性。

双抗体夹心的直接酶联免疫吸附方法 (DAS-ELISA) 是 Clark 和 Adams 于 1977 年提出^[3], 并且已广泛的应用于植物病毒的检测工作。作为一般诊断, 应用这种方法的不足之处是每一种检测病毒都必须制备各自的酶标记免疫球蛋白, 而且有时还有非特异性颜色反应的干扰。近年来已有多种途径改进了 ELISA 的直接测定方法^[4]。本文用 Edwards 和 Cooper (1985) 提出的一种“A 蛋白双抗体夹心 (PAS-ELISA)”新方法, 进行了西瓜上的两种病毒即西瓜花叶病毒 2 号 (WMV-2) 和黄瓜花叶病毒 (CMV) 的检测试验。在包被抗血清前先用 A 蛋白包被微量测定板, 利用 A 蛋白与抗血清中免疫球蛋白的 FC 部位结合, 以 F(ab')₂ 部位吸附抗原病毒。在被吸附的病毒上再加一层相同的抗血清和酶标记的 A 蛋白, 最后显色测定。从而增强了反应的灵敏度, 并降低了非特异性反应。

材 料 和 方 法

病毒: 西瓜花叶病毒 2 号是 1986 年从江苏句容的西瓜上分离得到的, 并经过鉴定, 提纯和免疫家兔获得其抗血清^[1,2]。测定用的黄瓜花叶病毒也是从西瓜上分离得到, 其抗血清则由农牧渔业部植检实验室惠赠。以玻管环状沉淀法测定, 二种病毒的抗血清效价均为 1:640。

A 蛋白双抗体夹心 ELISA (PAS-ELISA): 是参考 Edwards 和 Cooper (1985) 的方法^[4]。试验在微量测定板的小孔内进行。测定的具体步骤是:

(1) 用 0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液配制的 A 蛋白溶液预包被。每孔 200 μ l, 处理 2 小时或 4 $^{\circ}$ C 下过液。

(2) 以 0.05% 的 Tween 20 磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L pH7.0 PBST) 稀释的抗

本文 1987 年 7 月 3 日收到。

血清包被小孔, 每孔加 $100\mu\text{l}$, 处理 1 小时。

(3) 加测定样本即病株叶片榨取液, 以 PBST 稀释, 每孔加 $100\mu\text{l}$ 处理 2 小时。

(4) 加测定抗血清, 以 PBST 稀释, 每孔加 $100\mu\text{l}$, 处理 2 小时。

(5) 加辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌 A 蛋白 (HRP-Protein A 是卫生部上海生物制品研究所产品)。HRP-Protein A 同样以 PBST 稀释, 每孔加 $100\mu\text{l}$, 处理 1 小时。

(6) 加底物 TMB 显色 30 分钟。底物以 22.2ml 的 0.1mol/L 柠檬酸加 27.8ml 的 0.2mol/L 磷酸氢二钠加蒸馏水至 100ml 的缓冲液稀释, 每孔 $100\mu\text{l}$ 。

(7) 以 2M 的 H_2SO_4 终止反应, 每孔加 $50\mu\text{l}$ 。然后在 DG3022 酶标免疫检测仪上 ($A_{450\text{nm}}$) 记录读数。

整个测定过程在 30°C 下进行, 从 (1) — (6) 的每一步骤间都用 PBST 液洗涤 3 次。

结 果

一、A 蛋白预包被对测定结果的影响:

试验是以有或没有 A 蛋白预包被的处理来确定 A 蛋白在测定 WMV-2 病毒中的作用及其对测定的影响。图 1 结果说明 A 蛋白预包被能影响 ELISA 测定的结果。它不仅能提高测定的效价特别是在测定抗血清稀释度较高的情况下更为显著, 而且也能明显的降低对照健株汁液本底值。凡不加 A 蛋白预包时的本底值在 $0.3—0.4$ 之间, 而加 A 蛋白预包被的本底值却都降低到 0.1 左右, 与缓冲液作对照的数值相似。

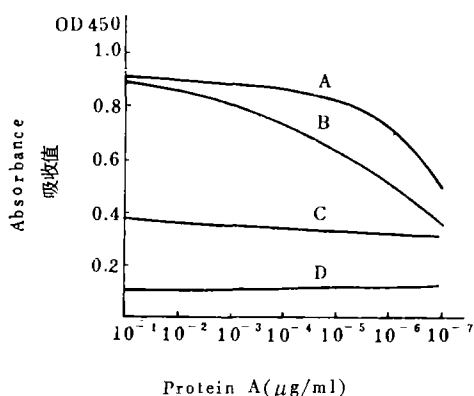


图 1 A 蛋白预包被对测定的影响

Fig.1. The effect of pre-coating protein A concentration on virus detection

注: A—病株加 A 蛋白预包被
A—Protein A pre-coating (Disease plant)
B—病株不加 A 蛋白预包被
B—No protein A pre-coating (Disease plant)
C—健株不加 A 蛋白预包被
C—No protein A pre-coating (Health plant)
D—健株加 A 蛋白预包被
D—Protein A pre-coating (Health plant)

表 1 的结果还进一步说明了 A 蛋白预包被并配合第二步的抗血清包被与否也影响了测定的特异性。加 A 蛋白预包被不加抗血清包被处理时, 同样也对测定的特异性有一定影响。如果两个步骤都取消, 病健株的测定因效价降低, 本底值增高而明显的干扰了结果的比较。尤其是在抗原浓度 (测定样本榨取液) 和测定抗血清浓度较低的情况下, 更不可能得到令人满意的结果。但在 A 蛋白预包被, 同时又有抗血清包被的处理下, 却能大大的提高测定的灵敏度。

表 1 A 蛋白预包被对测定的影响 (OD₄₅₀ 的吸收值)
Tab.1 The effect of precoating protein A on virus detection (OD₄₅₀ Absorbance)

	A 蛋白预包被加 抗血清包被 Protein A precoating and antiserum coating	无 A 蛋白预包被 仅有抗血清包被 No Protein A precoating, only antiserum coating	无 A 蛋白预包被 无抗血清包被 No Protein A precoating and no antiserum coating
CMV 病株榨取液(1:10) Disease plant sap (1:10) (CMV)	1.52	1.11	/
健株汁液(1:10) Health plant sap (1:10)	0.07	0.35	/
WMV-2 病株榨取液(1:10) Disease plant sap (1:10) (WMV-2)	0.75	0.68	0.84
健株汁液(1:10) Health plant sap (1:10)	0.94	/	/
健株汁液(1:10) Health plant sap (1:10)	0.09	0.38	0.63
缓冲液对照 Buffer control	0.07	0.12	0.11
WMV-2 病株榨取液(1:100) Disease plant sap (1:100) (WMV-2)	0.88	0.44	0.88
健株汁液(1:100) Health plant sap (1:100)	/	0.46	0.80
健株汁液(1:100) Health plant sap (1:100)	0.14	0.32	0.56
缓冲液对照 Buffer control	0.13	0.11	0.10

注: 测定抗血清浓度为 10^{-3} , A 蛋白浓度为 1 微克/毫升, 酶标记 A 蛋白浓度为 1/50.

A 蛋白预包被适宜浓度的测定是将 A 蛋白从 5 微克/毫升稀释至 0.001 微克/毫升分别预包被微量测定板, 对 WMV-2 和 CMV 病株进行测定。测定的 OD 值随 A 蛋白的稀释而有下降的趋势。但是在测定的 A 蛋白预包被的浓度范围内没有很显著的影响。说明 A 蛋白预包被可以在很微量的浓度下进行测定, 即使稀释到 0.001 微克/毫升仍有较好的测定结果。

二、抗原(粗提纯制品和病株汁液)浓度对测定结果的影响:

粗提纯的 WMV-2 病毒经测定其病毒含量为 2.0843 毫克/毫升。将粗提纯病毒经 10 倍系列稀释至 10^{-8} 后进行灵敏度和特异性的测定。结果见图 2。提纯病毒含量在 0.2 微克/毫升以上时, 都能得到明显的测定结果。而当病毒含量在 0.02 微克/毫升以下时, 测定结果与对照相近, 即不适宜进行测定工作。

将二种病毒的病株榨取液稀释不同倍数在相同条件下进行测定。WMV-2 和 CMV 二种病毒的测定结果见图 3。结果表明, 这二种病毒测定的趋势是一致的, OD 值随抗原稀释倍数的增加而下降, 然而下降的幅度还受测定抗血清浓度的影响。当测定抗血清

浓度为 10^{-2} 或 10^{-3} 时, 病株汁液稀释至到 100 倍时就不能进行测定比较而测定抗血清浓度为 10^{-1} 时, 病株汁液稀释至 500 倍以上时才不能进行测定。当然抗原浓度还随病株体内病毒浓度的不同而变化。将提纯制品和病株榨取液的反应曲线相比较, 说明在一般情况下, A 蛋白间接酶联法在实际检测工作中, 可以测到病毒含量在 0.02 微克/毫升以上浓度的病株榨取液中的病毒含量, 并可进行定性和定量的比较。

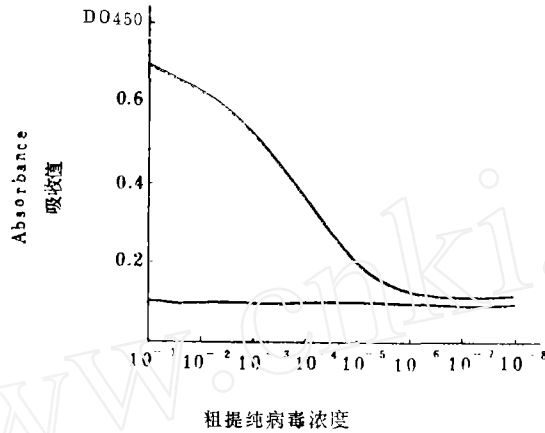


图2 粗提纯WMV-2病毒浓度对测定的影响
Fig.2 The effect of antigen concentration of purified WMV-2 on virus detection.

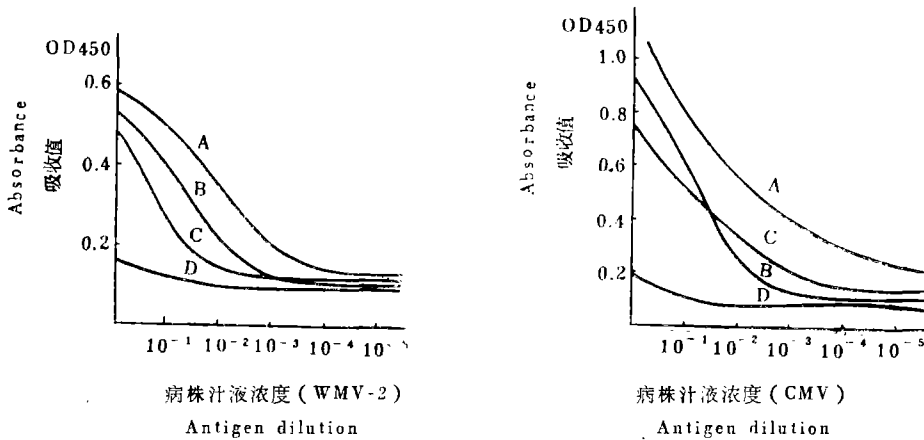


图3 抗原浓度对测定的影响
Fig.3 The effect of antigen concentration of test plant sap on virus detection

- 注: A: 测定抗血清浓度为 1 : 10
A: Concentration of detecting antiserum is 1 : 10
B: 测定抗血清浓度为 1 : 100
B: Concentration of detecting antiserum is 1 : 100
C: 测定抗血清浓度为 1 : 1000
C: Concentration of detecting antiserum is 1 : 1000
D: 对照健株汁液, 测定抗血清为 1 : 100
D: Concentration of detecting antiserum is 1 : 100, (Health plant sap)

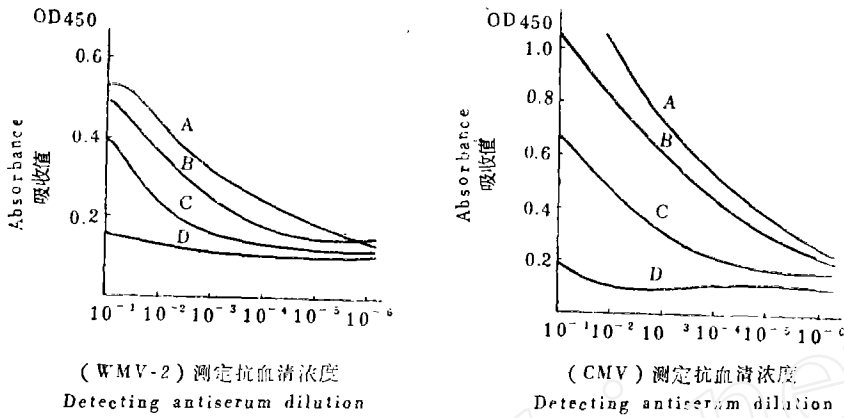


图4 测定抗血清浓度对测定的影响
Fig.4 The effect of detecting antiserum concentration on virus detection

- 注: A: 病株汁液稀释1:5
A: Dilution of disease sap is 1:5
B: 病株汁液稀释1:10
B: Dilution of disease sap is 1:10
C: 病株汁液稀释1:100
C: Dilution of disease sap is 1:100
D: 对照健株汁液1:5
D: Dilution of health sap is 1:5

三、检测抗血清浓度对测定结果的影响

测定抗血清浓度经10的倍比稀释至 10^{-6} ，在相同条件下进行测定比较。结果见图4。这二种病毒的测定结果趋势一致。OD值随着测定抗血清浓度的降低而下降，同时抗原浓度对测定结果也有较大的影响。当病株汗液稀释1:100倍以上时， 10^{-3} 的测定抗血清浓度所得的OD值与健株差别不明显。然而当病株榨取液稀释1:5—1:10时，测定抗血清浓度在 10^{-3} (WMV-2)和 10^{-4} — 10^{-5} (CMV)时也可测出明显的差别。

四、辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌A蛋白(HRP-Protein A)浓度对测定结果

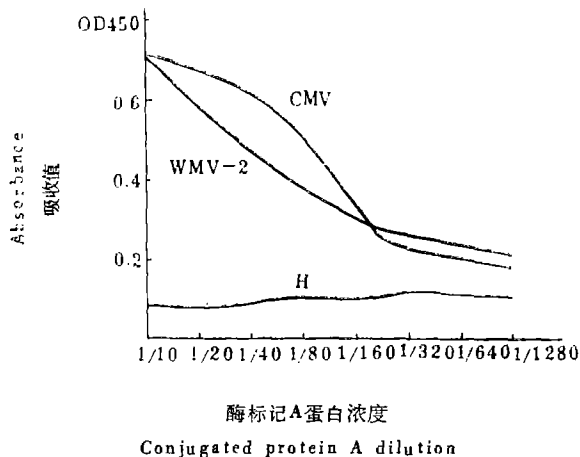


图5 HRP-Protein A浓度对测定的影响
Fig.5 The effect of HRP-Protein A concentration on virus detection

的影响:

所购的卫生部生物制品研究所产品 HRP—Protein A 从 1:10 稀释至 1/1280 (见图 5)。结果表明这二种病毒在抗原浓度为 1:5, 测定抗血清浓度为 10^{-3} 下, 酶标 A 蛋白的工作浓度在 1:10—1:100 的范围内都能得到较好的测定结果。

结 论

A 蛋白间接酶联免疫吸附 (PAS-ELISA) 方法对二种西瓜上的病毒 (WMV-2 和 CMV) 的检测表明, 这种方法不仅对病株汁液或混合感染病株的汁液进行测定, 而且具有高度的特异性和灵敏度。

A 蛋白预包被对测定结果的本底值下降和非特异性反应的消除有明显的作用, 从而大大提高了测定的效价。根据本试验对病毒粗提纯制品测定的估计, 在最适测定范围内可以测得 0.02 微克/毫升以上病毒含量的样品。一般对植物病毒病株汁液中的病毒含量是完全可以进行测定的。

测定步骤中, 预包被的 A 蛋白只需要很微的量, 测定抗血清的浓度比包被抗血清的浓度对测定结果的影响更重要, 提高抗血清的效价, 肯定可以提高测定的灵敏度; 而酶联 A 蛋白的测定浓度亦影响到测定的结果。按我们测定所获得的各步骤一般所使用的适宜浓度范围是: (1) A 蛋白预包被浓度为 1 微克/毫升; (2) 包被抗体的浓度对测定的影响不明显, 一般使用 1:1000 倍; (3) 抗原 (病株汁液) 的浓度, 虽然受不同病毒在植株内的浓度和测定抗血清效价的影响, 通常在病毒浓度低或测定血清效价低时, 可以降低病株汁液的稀释度进行测定。一般稀释病株汁液 1:5—10 的浓度范围是比较适合的; (4) 测定抗血清浓度范围为 1:100—1:1000; (5) 辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白测定浓度为 1:50 左右。

参 考 文 献

- [1] 薛宝娣、陈永萱、刘凤权 (摘要), 1986, 南京农业大学科学报告会论文摘要汇编第 58 页。
- [2] 薛宝娣、陈永萱、吴汉章、张超然等, 1987, 南京农业大学学报(4): 53—58。
- [3] Clark, M.F. and Adams, A.N., 1977 *J.Gen.Virology*, 34:475.
- [4] Edwards, M.L. and Cooper, J.I., 1985 *Journal of Virological Methods*, II, 309—319.

Studies on WMV-2 and CMV Detection Using Protein A Sandwich ELISA Method

Chen yong-xuan Xiu Bao-di Liu Feng-quan

(Nanjing Agricultural University, Dept. of Plant Protection, Nanjing)

A new form of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

has been used for detection of WMV-2 and CMV in watermelon plants. The method uses protein A in two applications to direct ELISA method. The first layer of protein A is a precoating layer for the coating antibody. The second layer of protein A is conjugated enzyme for detecting the second antibody layer.

In practical application, Protein A sandwich ELISA (PAS-ELISA) was more sensitive and specific than the direct double antibody sandwich form of ELISA (DAS-ELISA).

第三届全国杀虫微生物学术讨论 会在南昌召开

3th National Symposium on the Microbial Control of Insect, Nanchang

中国微生物学会农业微生物专业委员会于1988年10月21—23日在南昌召开了第三届全国杀虫微生物学术讨论会。来自21个省市、自治区的高等院校、科研、生产、管理、出版等60个单位的85名代表出席了会议。

这次学术讨论会是杀虫微生物战线二年一度的盛会。大会收到126篇论文报告。其中病原细菌57篇，昆虫病毒40篇，虫生真菌18篇，杀虫抗菌素3篇，微孢子虫3篇，线虫3篇，其他2篇。大会报告了苏云金杆菌各变种间内毒素基因的转移，杀虫素进展等十个专题，这些反应了国内杀虫微生物基础研究在深度、广度有了较大突破，生物技术步入基因工程、细胞工程的新阶段。昆虫病毒是微生物生防中一个比较活跃的新领域，初步统计已有21种昆虫病毒杀虫剂通过了省级鉴定。已建成了我国第一座棉铃虫病毒杀虫剂实验工厂，开始步入商品化生产。油桐尺蠖、茶青虫、斜纹夜蛾及松毛虫为病毒杀虫剂，均已列为国家“七五”攻关项目。讨论中，与会代表们认识到杀虫微生物不只是防病杀虫的问题，而且具有保护环境，有利生态平衡，节约能源的优点，具有强大的生命力，相信这次学术讨论会的召开对我国杀虫微生物近期的发展将起到良好的引导和积极的推动作用。会议决定第四届杀虫微生物学术讨论会于1990年在武汉华中师大召开。

(汤显春, 张光裕)