

356-364

第6卷第4期
1991年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.6 No.4
Dec. 1991应用 $F(ab')_2$ -酶联吸附分析法检测
大麦黄花叶病毒

陈剑平 阮义理

(浙江省农业科学院病毒学实验室, 杭州 310021)

5435.12.4
5433.4

提 要

$F(ab')_2$ 酶联免疫吸附分析法($F(ab')_2$ -ELISA)成功地用于大麦黄花叶病毒(BaYMV)的常规检测和诊断,其步骤是先用稀释1000—4000倍的抗血清 $F(ab')_2$ 包被反应板,加待测样品和稀释1000倍的同种抗血清或IgG,然后再加A蛋白碱性磷酸酯酶和底物,测定OD值。比较试验表明,ELISA稀释缓冲液加入1%小牛血清或1%全脂奶粉,BaYMV的检测灵敏度可提高达2.5—5.0ng/ml,病叶汁液检测终浓度为稀释1600—3200倍。我国BaYMV分离物与英国分离物的血清学性质完全一致。BaYMV在大麦病株中以叶部含量较高,茎中含量次之,根部测不出病毒。检测和诊断田间样品,即使有的样品已不新鲜,也均能得到满意的结果。此方法也成功地用于大麦温和花叶病毒(BaMMV)、小麦黄花叶病毒(WYMV)、燕麦花叶病毒(OMV)和燕麦金色条纹病毒(OGSV)等禾谷多粘菌传麦毒的检测,这5种病毒的血清学关系研究表明,除BaYMV和WYMV之间具有血清学关系以外,其余彼此均不反应。

关键词: $F(ab')_2$ 酶联免疫吸附分析法 大麦黄花叶病毒 菌传麦类病毒
血清学关系

由禾谷多粘菌 *Polymyza graminis* 传播的大麦黄花叶病毒 (Barley yellow Mosaic Virus, BaYMV) 于1940年在日本首次报道^[1], 现已广泛分布于德国^[2]、英国^[3-4]、法国、比利时和荷兰等国。我国自七十年代中期在浙江省发生以来, 现已普遍发生于上海、江苏、安徽和湖北等长江中下游及东部沿海地区, 并造成严重危害^[5]。BaYMV只感染大麦及其紧密相关的一些野生种^[6]。

长期以来, BaYMV的诊断主要借助大麦叶部所表现的症状和表皮细胞中的内含体。对于有些不表现症状的材料, 则不能确定其是否带毒。A蛋白免疫电镜技术^[7]虽能很好地解决这个问题, 但因需要电镜, 从而普及有困难, 再则大量样品的快速检测也不方便。因此, 科研和生产上急需其他快速、灵敏而又实用的检测和诊断技术。酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 因具备上述优点, 近十年来发展很快, 国外已将此技术应用于

本文于1990年12月25日收到, 1991年3月25号修回。

* 农业部和浙江省自然科学基金会资助项目, 部分工作在英国洛桑试验站完成。

BaYMV^[3], 但国内尚未见有关报道。本文报道 F(ab')₂-ELISA 在 BaYMV 以及其他一些禾谷多粘菌传麦类病毒检测和血清学关系研究中的应用。

材料与方 法

一、病毒 BaYMV 浙江萧山分离物, BaYMV 英国分离物, 大麦温和花叶病毒 (Barley Mild Mosaic Virus, BaMMV), 小麦黄花叶病毒 (Wheat Yellow Mosaic Virus, WYMV), 燕麦花叶病毒 (Oat Mosaic Virus, OMV) 和燕麦金色条纹病毒 (Oat Golden Stripe Virus, OGSV) BaYMV 2 个分离物按 Adams 等^[4]的方法, 通过带毒禾谷多粘菌休眠孢子堆或游动孢子悬浮液接种大麦 (品种 Igri) 保存毒源, 而其他 4 种病毒均按常规摩擦接种技术分别接种大麦 (品种 Maris Otter), 小麦 (品种 Galahad) 和燕麦 (品种 Peniarth)。BaYMV 和健大麦提纯制剂按陈剑平等方法^[5]提纯获得。

二、IgG 和 F(ab')₂ 的制备 BaYMV 浙江萧山分离物的免抗血清由本实验室制备^[6]; BaYMV 英国分离物、BaMMV、OMV 和 OGSV 的免抗血清由英国洛桑试验站 M. J. Adams 博士提供; WYMV 免抗血清由日本九州农业试验场 T. usugi 博士赠送。

1. IgG: 取 1ml 血清, 按常规饱和硫酸铵沉淀法^[11]处理, 得到 2ml 浓度为 10mg/ml 的 IgG 制剂。

2. F(ab')₂ 制备: 制备方法按文献^[11,12,13]进行。将上述得到的 IgG 沉淀溶解于 2ml 0.07 mol/L pH4.0 醋酸钠缓冲液 (含 0.05mol/L 氯化钠), 并在同种缓冲液中透析过夜, 测 OD280 值, 计算出 IgG 含量为约 10mg/ml, 然后加 3mg 胃蛋白酶 (Sigma 公司产品, ~150 μ g 酶/mg IgG), 35 $^{\circ}$ C 酶切数小时, 最后室温下置 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) pH7.2 中透析过夜, 得到约 2ml F(ab')₂ 制剂, 测得浓度约为 5.4mg/ml, 经测定 F(ab')₂ 纯度后, 贮于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

三、F(ab')₂-ELISA 步骤: 基本根据 Adams 等^[8]的方法。用 0.05mol/L 碳酸钠缓冲液 pH9.5 稀释 F(ab')₂ 1000 倍, 包被聚乙烯反应板, 30 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时或 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用 0.1mol/L pH7.2 PBS (含 0.05% Tween 20) 洗板 3 次, 每次 3—5 分钟, 加待测样品, 病叶汁液通常用 ELISA 缓冲液 (0.1mol/L pH7.2 PBS 含 0.05% Tween 20, 2% PVP (分子量 44,000), 1% 全脂奶粉 (N100 公司产品)) 稀释 100 倍, 30 $^{\circ}$ C 孵育 2.5—3.0 小时或 4 $^{\circ}$ C 过夜, 经同样方法洗板后, 加用 ELISA 缓冲液稀释 1000 倍的 IgG 或抗血清, 30 $^{\circ}$ C 孵育 2.5—3.0 小时, 经同样方法洗板, 再加入用 ELISA 缓冲液稀释 1000—2000 倍的 A 蛋白碱性磷酸酯酶结合物 (Sigma 公司产品), 30 $^{\circ}$ C 孵育 2.5—3.0 小时, 洗板后, 最后加底物溶液 (1000ml 底物溶液中含 0.6g P-磷酸硝基苯, 97ml pH9.7 乙二醇胺和 0.2g 叠氮钠), 室温下反应 1 小时或过夜, 然后用酶标读数仪测定 OD410 值, 并以大于或等于阴性对照的 2 倍为阳性反应^[10]。

结果与讨论

一、F(ab')₂ 制备及其纯度检测

在制备 F(ab')₂ 中, 分别以 150、200 μ g/mg IgG 的胃蛋白酶量酶切 IgG, 经 PBS 透析后, 测得 F(ab')₂ 的浓度相似, 均为 5.0~5.9mg/ml 之间, 平均为 5.4mg/ml。将各 F(ab')₂ 制剂分别用 0.05mol/L pH9.6 碳酸钠缓冲液稀释成 200、1000 和 5000 倍, 包被于聚乙烯反应板, 洗板后, 各自直接加 A 蛋白碱性磷酸酯酶和底物, 结果均没有反应, OD410

值均为0.005以下(酶空白对照为0.005)。表明用150 $\mu\text{g}/\text{mg}$ IgG的酶量酶切是完全的。F(ab')₂制剂经透析后,不含有IgG和FC残基。

二、F(ab')₂-ELISA的建立

1. F(ab')₂适宜工作浓度的测定,用碳酸钠缓冲液将BaYMV抗血清的F(ab')₂制剂稀释成125、250、500、1000、...、16000倍等8种浓度,即各含F(ab')₂ 44.80, 22.40, 11.20, 5.60, ..., 0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$,分别包被反应板,加同源病毒或健康大麦汁液(均稀释100倍)、同种病毒IgG(稀释1000倍,含IgG100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、酶和底物,测定OD₄₁₀值。结果表明,随着F(ab')₂的浓度降低,OD值也相应减少(图1),当F(ab')₂的浓度较高(小于稀释1000倍,即>5.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)时,阴性对照的底色较高(OD₄₁₀>0.22),影响检测灵敏度和易发生假阳性反应;当F(ab')₂的浓度较低(大于稀释1000倍,即<1.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)时,虽然阴性对照的底色很低,与稀释1000—4000倍(F(ab')₂=5.06—1.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的OD₄₁₀值差不多,均为0.10—0.15之间,但病毒样品的OD₄₁₀值也迅速下降至0.39,影响检测效果。当F(ab')₂浓度在稀释1000—4000倍的范围内,病毒样品的OD₄₁₀值较高,而阴性对照底色也较低,具有较理想的检测效果,从而选择F(ab')₂的适宜工作浓度为稀释1000—4000倍。

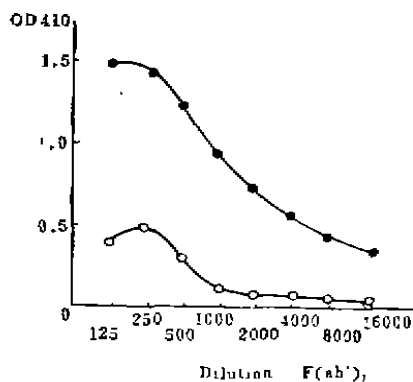


图1. F(ab')₂适宜工作浓度测定

Fig.1. Determination of F(ab')₂ optimal working concentration

·病大麦 ○健大麦
·Infected barley ○Healthy barley

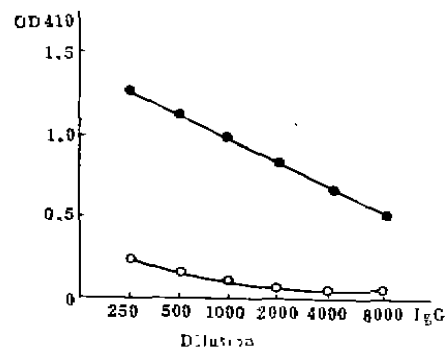


图2. IgG适宜工作浓度测定

Fig.2. Determination of IgG optimal working concentration

2. IgG适宜工作浓度的测定 用碳酸钠缓冲液稀释1000倍的F(ab')₂包被反应板,加同源病毒汁液或健康大麦汁液(均稀释100倍),然后分别加IgG(250, 500, 1000, ..., 8000倍等6种浓度,即IgG含量分别为40, 20, 10, ..., 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$),再加酶和底物,测OD₄₁₀值。结果表明,随着IgG浓度降低,OD₄₁₀值呈线性下降,而阴性对照的底色,当IgG稀释倍数小于1000倍时,随着IgG浓度降低而减小;当IgG稀释倍数大于1000倍时,底色几乎不随IgG浓度改变而变化(图2)。当IgG稀释倍数为1000倍时,具有理想的检测效果,从而选择稀释1000倍为IgG的适宜工作浓度。

3. F(ab')₂-ELISA 稀释缓冲液的选择 用碳酸钠缓冲液稀释1000倍的F(ab')₂包被反应板。加病或健汁液(100倍)、IgG(1000倍)以及酶和底物,测OD₄₁₀值。用PBS

-Tween 20, 含 2% PVP, 1% 全脂奶粉; PBS-Tween 20, 含 2% PVP, 1% 小牛血清; PBS-Tween 20, 含 2% PVP, 1% 全脂奶粉, 1% 小牛血清; PBS-Tween 20, 含 2% PVP, 2% 全脂奶粉; PBS-Tween 20, 含 2% PVP, 2% 小牛血清; PBS-Tween 20, 含 2% PVP, 2% 全脂奶粉, 2% 小牛血清; 以及 PBS-Tween 20, 含 2% PVP, 1% 卵清白蛋白等 7 种 ELISA 缓冲液, 分别稀释病汁或健汁液, IgG 和酶结合物, 并以 PBS-Tween 20 为对照。结果见表 1, 用 PBS-Tween 20 含 2% PVP, 1% 全脂奶粉和 PBS-Tween 20 含 2% PVP, 1% 小牛血清稀释所得的病汁液 OD₄₁₀ 值 (>1.000), 显著大于对照 (0.224), 而健汁液 OD₄₁₀ 值 (0.143~0.146) 较小, 与对照 (0.128) 无显著差异。用 PBS-Tween 20 含 2% PVP, 1% 全脂奶粉, 1% 小牛血清稀释, 虽然病汁液的 OD₄₁₀ 值较大, 但健汁液的 OD₄₁₀ 值 (0.17) 要比前二者大。其他 4 种 ELISA 缓冲液的稀释效果相对要差些。所以, 在以后的实验中选择 PBS-Tween 20 含 2% PVP, 1% 小牛血清或 PBS-Tween 20 含 2% PVP, 1% 全脂奶粉缓冲液作为稀释缓冲液。

表 1 不同 ELISA 缓冲液的作用

Table 1 Effect of different ELISA buffers

PBS-Tween 20+2% PVP	OD ₄₁₀	
	病麦汁液 Infected	健麦汁液 Healthy
+1% 小牛血清 +1% Bovine Serum	1.132	0.143
+1% 全脂奶粉 +1% Full Cream Milk	1.072	0.146
+1% 小牛血清, 1% 全脂奶粉 +1% Bovine Serum, 1% Full Cream Milk	1.023	0.170
+2% 小牛血清 +2% Bovine Serum	0.344	0.140
+2% 全脂奶粉 +2% Full Cream Milk	0.747	0.143
+2% 小牛血清, 2% 全脂奶粉 +2% Bovine Serum, 2% Full Cream Milk	0.856	0.161
+1% 卵清白蛋白 +1% Oval Albumin	0.467	0.114
不加 (对照) Nothing added (Control)	0.224	0.128

4. 灵敏度 用经碳酸钠缓冲液稀释 1000 倍的 $F(ab')_2$ 包被反应板, 分别加入 8 种浓度 (80, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的病毒制剂, 并以同样方法提纯, 稀释的健大麦制剂作为阴性对照, 以 OD 灵敏度/OD 阴性 = 2 为临界值, 二次测定结果表明 (图 3), 此方法检测 BaYMV 的灵敏度达约 2.5—5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

三、应用

1. 我国 BaYMV 分离物与英国分离物的血清学关系 用我国 BaYMV 分离物和英国分离物抗血清的 $F(ab')_2$ 和 IgG, 与我国 BaYMV 分离物及英国分离物的病麦汁液, 分别进行组合, 进行 $F(ab')_2$ -ELISA 反应, 并以健大麦汁液为阴性对照, 二次重复。结果如表 2 所示, BaYMV 二个分离物的血清学性质完全一致。

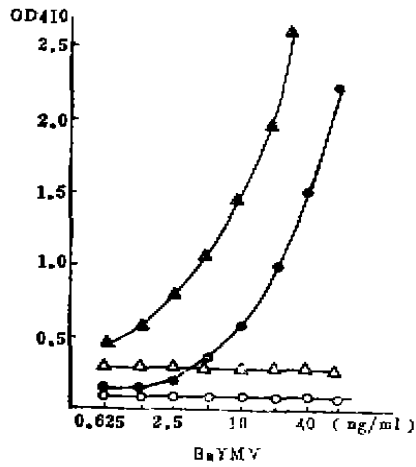


图 3 F(ab')₂-ELISA 检测 BaYMV 灵敏度
Fig 3. Detective sensitivity of BaYMV using F(ab')₂-ELISA

测定 1 Reading 1 ● 病毒制剂, purified Virus preparation
○ 健大麦提纯制剂, purified healthy barley preparation
测定 2 Reading 2 ▲ 病毒制剂, purified virus preparation
△ 健大麦提纯制剂, purified healthy barley preparation

表 2 BaYMV 中英两国分离物的血清学关系
Table 2. Serological relationship between BaYMV Chinese and English isolates

F(ab') ₂ (1000x)	叶 汁		OD410	
	Leaf sap (100x)	IgG (1000x)	病汁 Infected	健汁 Healthy
中国 Chinese	中国 Chinese	中国 Chinese	1.574	0.11
	中国 Chinese	英国 English	1.427	0.020
	英国 English	中国 Chinese	1.558	0.031
	英国 English	英国 English	1.803	0.013
英国 English	中国 Chinese	中国 Chinese	1.681	0.008
	中国 Chinese	英国 English	1.956	0.017
	英国 English	中国 Chinese	2.000	0.017
	英国 English	英国 English	2.000	0.030

2. 大麦病株各部位中 BaYMV 分布 取具有典型病毒症状的大麦一株, 连根拔起, 用自来水洗去根部的泥砂, 镜检根部具有禾谷多粘菌的游动孢子囊, 然后分成根、茎、叶三部分, 称重, 加 ELISA 缓冲液研磨, 将根、茎液分别稀释成 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 以及 1600 等 8 种浓度, 将叶汁液稀释成 100, 200, 400...12800 倍 8 种浓度, 然后用 F(ab')₂-ELISA 检测, 并以健大麦同样组织同样稀释倍数为阴性对照。结果表明, 叶片中病毒浓度最高, 稀释 1600—3200 倍时还能检测到病毒。茎中病毒浓度较低, 只能检测到稀释 100 倍, 而根中不管稀释多少倍, 均测不到病毒 (表 3)。

表3 F(ab')₂-ELISA检测大麦病株中各个部位中的BaYMV
Table 3. Detection of BaYMV in different parts of barley plant by F(ab')₂-ELISA

稀释倍数 Dilution	根 Root		茎 Stem		叶 Leave	
	病汁 Infected	健汁 Healthy	病汁 Infected	健汁 Healthy	病汁 Infected	健汁 Healthy
10	0.182*	0.150	0.596	0.092		
20	0.185	0.178	0.411	0.140		
50	0.192	0.188	0.342	0.114		
100	0.195	0.192	0.254**	0.115	1.561	0.071
200	0.206	0.193	0.219	0.117	0.987	0.077
400	0.198	0.188	0.166	0.114	0.741	0.080
800	0.195	0.198	0.129	0.116	0.481	0.083
1600	0.205	0.196	0.131	0.122	0.290	0.088
3200					0.194**	0.085
6400					0.140	0.097
12800					0.145	0.100

* OD₄₁₀值* OD₄₁₀ value

** 检测终点稀释倍数

** End dilution of detection

表4 五种真菌传变类病毒的血清学关系
Table 4. Serological relationship between five fungally transmitted cereal viruses

叶汁液 Leave sap(1000×)	F(ab') ₂ (1000×), IgG(1000×)				
	BaYMV	BaMMV	OGSV	OMV	WYMV
BaYMV	1.423*	0.046	0.065	0.169	0.568
BaMMV	0.188	2.473	0.063	0.365	0.108
健大麦Healthy barley	0.193	0.037	0.066	0.392	0.106
OMV	0.215	0.048	0.087	1.551	0.128
OGSV	0.188	0.030	1.157	0.205	0.095
健燕麦Healthy oat	0.205	0.043	0.074	0.252	0.100
WYMV	0.425	0.051	0.076	0.227	0.152
健小麦Healthy wheat	0.205	0.040	0.076	0.282	0.125

* OD₄₁₀值* OD₄₁₀ value

3. 田间大麦样品的诊断 1989年12月至1990年3月,从英国各地采集病大麦样品,并邮寄到洛桑试验站,用此方法进行BaYMV诊断。结果表明,71个样品中51个含有BaYMV,其中有的样品因在途中耽搁约7天到达实验室时已看不出症状,并已干枯,开始腐烂,但诊断结果还是表现为阳性。部分样品同时经英国农业部中心实验室电镜诊断,二种方法结果一致。

4. BaYMV、BaMMV、WYMV、OMV和OGSV的血清学关系 用BaYMV、BaM-

MV、WYMV、OMV和OCSV的 $F(ab')_2$ 和IgG 分别与同种和异种病毒汁液组合,并以大麦、小麦和燕麦的健株汁液为阴性对照,通过此 ELISA 方法研究它们之间的血清学关系。结果如(表4)所示, BaYMV 和 WYMV 的抗血清除与其同种病毒反应外,两者也能发生交叉反应,而其余各种病毒血清均只能与其同种病毒反应,与异种病毒不反应。

讨 论

自 1977 年 ELISA 技术首次应用到植物病毒学以来^[12],因其具有灵敏、快速和方便等优点,从而发展很快,方法也不断完善和改正。 $F(ab')_2$ -ELISA 和标准夹心直接法 ELISA(DAS-ELISA) 相比,除保持其各种优点外,还克服了制备病毒特异性酶标抗体的麻烦,检测灵敏度也有所提高^[13]。和异种动物双抗体夹心法^[14]相比,此方法仅需一种病毒兔抗血清,其原理是用 IgG 的 $F(ab')_2$ 片段特异地捕获病毒,接着用同种完整 IgG 与病毒结合,再用 A 蛋白-酶结合物连接 IgG 的 Fc 段,通过显色反应来达到检测病毒的目的。当然,用异种病毒 IgG 代替同种病毒 IgG 作为检测抗体,可用作病毒间血清学关系的研究。

在我们的 $F(ab')_2$ -ELISA 体系中,选用 A 蛋白碱性磷酸酯酶结合物作为兔 IgG 特异性酶结合物,反应不需要终止,在 1~16 小时内都能获得满意的结果。不过,鉴于实验体系标准化,我们一般在显色反应约 1 小时后进行 OD₄₁₀ 读数。

在 ELISA 稀释缓冲液中,不加小牛血清或全脂奶粉等蛋白质,稀释 100 倍的病麦汁 OD₄₁₀ 值为 0.224,与同样稀释倍数的健麦汁 OD₄₁₀ 值(0.128)无明显差异,这可能是此条件下 $F(ab')_2$ -ELISA 的灵敏度较低的缘故。当加入小牛血清或其他种类蛋白质时,检测灵敏度显著提高。按照通常的概念,ELISA 缓冲液中加入一些蛋白质,起到封板作用,降低检测抗体直接吸附于反应板的程度,减少底色 OD₄₁₀ 值以提高检测灵敏度。然而,在我们的结果中,小牛血清等蛋白质似乎改善了病毒与 $F(ab')_2$, IgG 与病毒,以及酶与 IgG 中各步或至少其中一步的反应条件,使病麦汁的 OD₄₁₀ 值从 0.224 提高到 1.132,大幅度提高了检测灵敏度。Adams(私人通讯)也获得了相似的结果。这里,小牛血清等蛋白质的真正作用机理不清楚。稀释缓冲液中加入全脂奶粉,是由英国洛桑试验站的 P. Jones 建议的,他在试验中由于常用的小牛血清一时短缺,便随意用全脂奶粉代替,发现效果很好。Adams 等^[9]也曾进行了尝试,结果同样有效。我们应用全脂奶粉也获得满意的结果,但其作用机理不清楚。

在测定 $F(ab')_2$ 适宜工作浓度时,当 $F(ab')_2$ 浓度较高(稀释 125—500 倍)时,健大麦的 OD₄₁₀ 值较大(0.3~0.5),随着 $F(ab')_2$ 稀释倍数提高,其 OD₄₁₀ 值迅速下降,从而推测我们制备的 BaYMV 兔抗血清中可能存在大麦的抗体。

$F(ab')_2$ -ELISA 具有较高的灵敏度,能成功地检测大麦病叶中的 BaYMV,但尚不能检测病根中的 BaYMV。从上面的结果看,应用此方法检测 BaYMV 时,阴性对照的底色在 0.1—0.2 之间,较 BaMMV 阴性对照 0.037 高,我们试图降低底色以进一步提高检测灵敏度,具体方法是分别如上述 7 种 ELISA 缓冲液按 $F(ab')_2$ 包被后,于 30℃ 封板 3 小时,

然后再加病毒和IgG, 结果表明所有处理效果都不明显。

F(ab')₂-ELISA体系还可成功地用来其他几种病毒, 即BaMMV、WYMV、OMV和OGSV的检测, 其中以检测BaMMV的效果最佳(阴性对照的底色在0.005以下), 并能检测到病根中的病毒。BaMMV至今仅报道于西欧, 开始时作为BaYMV的一个株系^[16], 目前日本也有零星分布(Kashiwazaki, 私人通讯), 我国尚未发现。2种病毒可在同一块田中同时发生, 或者说可同时感染同一株大麦。我国BaYMV除与西欧BaYMV血清学性质一致或相似外, 还与日本BaYMV的II-1和III株系相关(Kashiwazaki, 私人通讯)。

参 考 文 献

- [1] Inoue, T. et al., 1975, CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses NO.143.
- [2] Huth W. et al., 1984, *Phytopath. Z.* 111: 37—54.
- [3] Hill S. et al., 1980, *Plant Patholog* 29: 197—199.
- [4] Adams M. J. et al., 1988, *Ann. Appl. Biol.* 109: 561—572.
- [5] 阮义理等, 1987, 大麦通讯, (4): 1—4。
- [6] 阮义理等, 1988, 植物病理学报, 13(3): 48—55。
- [7] 陈剑平等, 1991, 植物病理学报, (待发表)。
- [8] Adams M. J. et al., 1987, *Ann. Appl. Biol.* 110: 321—327.
- [9] 陈剑平等, 1988, 植物病理学报, 19(1): 35—39。
- [10] 陈剑平等, 1988, 浙江农业科学, (5): 239—241。
- [11] 梁训生等, 1985, 植物病毒血清学技术, 农业出版社, 第154—166页。
- [12] Clark M. F. et al., 1977, *J. Gen. Virol.* 34: 475—483.
- [13] Barbara D. J. et al., 1982, *J. Gen. Virol.* 58: 315—322.
- [14] 陈剑平等, 1989, 浙江农业科学, (2): 81—83。
- [15] Huth W. et al., 1989, *Intervirology* 31: 38—42.

Detection of Barley Yellow Mosaic Virus Using $F(ab')_2$ -ELISA

Chen Jian-ping Ruan Yi-li

(Virology Laboratory, Zhejiang Academy of Agricultural
Sciences, Hangzhou 310021)

Barley yellow mosaic virus (BaYMV) was routinely detected and diagnosed by the $F(ab')_2$ indirect enzyme-linked immunosorbent assay $F(ab')_2$ -ELISA in which (1) virus in ELISA buffer was trapped by $F(ab')_2$ fragments of specific IgG diluted in 1000 to 4000 with 0.05mol/L sodium carbonate coating buffer pH9.6 on microtiter plate, (2) trapped virus was detected by intact IgG diluted 1 in 1000 with ELISA buffer, (3) positive reaction was identified using protein diluted A alkaline phosphatase diluted 1 in 1000 to 2000 with ELISA buffer and substrate solution. Application of 1% BSA or 1% full cream milk in ELISA buffer was helpful for detection and diagnosis of the virus. The detective sensitivity of the method was 2.5—5 ng/ml in purified preparation and 1 in 1600 to 3200 dilution of leaf extract. BaYMV Chinese isolate was serologically related or identical with English isolate. The virus concentration was the highest in leaf, followed by in stem tissue but none could be detected in root tissue from the same diseased barley plant. The positive results were obtained when the method was applied to diagnosis the leaf samples from different fields although some of these were not fresh. This method had also been successfully applied for detections of other fungally transmitted cereal viruses including barley mild mosaic virus (BaMMV), wheat yellow mosaic virus (WYMV), oat mosaic virus (OMV) and oat golden stripe virus (OGSV). Among these 5 viruses, BaYMV and WYMV have some cross serological reactions and the others could only react with their own homologous antisera.

Key words: $F(ab')_2$ indirect enzyme-linked immunosorbent assay
Barley yellow mosaic virus Fungally transmitted cereal viruses Serological relationship