维普资讯 http://www.cqvip.com

102-106

第8卷第1期
1993年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.1
Mar. 1993

四种血清学方法检测烟草TMV、CMV的比较*

肖启明 刘学端 黄声仪

（湖南农学院植保系，长沙410128）

S435.72
S432.41

提 要

本文应用ELISA-异种动物抗体双夹心法（DSM-ELISA）、ELISA-A蛋白酶联法（SPA-ELISA）、ELISA-斑点免疫法（Dot-ELISA）和葡萄球菌凝集法（SA-test）等四种血清学方法检测TMV、CMV感染的烟草病叶，结果以Dot-ELISA法灵敏度最高，其检测病叶粗汁液的最大稀释度为1：1280—2560，其次是DSM-ELISA和SPA-ELISA，均为1：640，SA-test灵敏度较低，为1：80。SPA-ELISA的非特异性反应比DSM-ELISA低，用健康汁液吸附抗血清，可以明显降低Dot-ELISA和SA-test的非特异性反应。

关键词： 酶联免疫吸附法 葡萄球菌凝集法 烟草 病毒检测 TMV CMV

血清学方法

TMV和CMV侵染烟草均引起烟草花叶病，但田间症状往往很难区分[1,2]，因而准确、快速地检测烟田TMV和CMV感染的烟草病株，对制订防治措施具有重要意义。为摸索一种简便、实用的检测方法，我们于1990—1991年选用以聚苯乙烯微量反应板为载体的ELISA-异种动物抗体双夹心法（DSM-ELISA）、ELISA-A蛋白酶联法、以硝酸纤维素膜为载体的斑点免疫法（Dot-ELISA）和葡萄球菌凝集法（SA-test）等四种血清学方法检测烟草病叶中的TMV和CMV，比较它们的检测效果、灵敏度和非特异性反应。

材 料 和 方 法

一、SPA-ELISA法

参考Edwards和Cooper（1985）提出的SPA-ELISA方法[3]，试验在聚苯乙烯微量反应板上进行。

供试病毒CMV、TMV经分离纯化，保存在防虫温室的普通烟上。试验时取病叶用5倍（W/V）0.02mol/L pH7.2的磷酸盐缓冲液提取汁液。供试TMV、CMV免抗血清，由农业部植物检疫实验所血清室提供。冻干葡萄球菌A蛋白纯品（SPA）和冻干酶联球菌A蛋白纯品（HRP-SPA），为卫生部上海生物制品研究所产品。

本文于1992年4月23日收到，8月19日修回。

*本研究得到湖南省烟草公司的大力支持，承蒙农业部植物检疫实验所张成良研究员、本系陈杰教授、罗宽教授的热心指导，谨致谢意。

维普资讯 http://www.cqvip.com

二、DSM-ELISA法

按常规的DSM-ELISA方法[4]进行。供试病毒同SPA-ELISA。TMV、CMV兔抗血清和鼠腹水抗体由农业部植物检疫实验所血清室提供。冻干辣根过氧化酶标记羊抗兔IgG（GARaIgG-HRP）为卫生部北京生物制品研究所产品。

三、Dot-ELISA法

参考改进的斑点免疫法[5,6]进行。供试病毒TMV、CMV和CMV、TMV兔抗血清同SPA-ELISA。冻干辣根过氧化酶标记羊抗兔IgG（GARaIgG-HRP）同DSM-ELISA法。硝酸纤维素膜（NC膜），为浙江黄岩人民化工厂产品。

试剂：a.样本提取缓冲液：pH7.4，0.01mol/LTris-HCL缓冲液（内含0.14mol/L NaCl，简称TBS）。

b、清洗液和封闭液：含0.5%Tween20的TBS（简称TBST）。

C、底物溶液：邻苯二胺溶液，室温暗处振荡3小时以上，过滤作为贮备液，用前加H_2O_2 30μl/ml。

试验程序：操作在室温下进行。将NC膜剪成适当大小，用软铅笔在膜上划成小方格。取待测样品1g加9mlTBS研磨过滤，取上清液5μl滴于NC膜小格中央，自然干燥后，用清洗液清洗3分钟；移入封闭液中，轻微振荡1小时，取出清洗；加入用健康汁液吸附过的抗血清，轻微振荡3小时，取出洗涤3次，每次10分钟；加GARaIgG-HRP（1：80），轻微振荡2—3小时，洗涤3次，每次10分钟；再加底物溶液，暗反应3—5分钟，取出漂洗10分钟，凉干。底物显色后，在NC膜上形成特异性的褐色斑为阳性反应，不显色的为阴性反应。

四、SA-test法

参考Chirkov，S.N.（1984）等的方法[7]。供试病毒和抗血清同SPA-ELISA法，金色葡萄球菌（SP）为中国科学院北京微生物所提供。

菌体试剂制备：将新鲜菌体用0.01mol/L pH7.2 PBS液洗1次，加适量PBS缓冲液，4000r/m离心30分钟，弃上清，沉淀按1：10（W/V）稀释，得SP菌液。

致敏：取SP菌液1ml，加0.1ml抗血清混匀，37℃水浴1小时，用适量0.1mol/L、pH7.2PBS缓冲液洗涤离心3次，再用该缓冲液悬浮成1%致敏SP菌体试剂。

检测：待测样品用0.02mol/L、pH7.2 PBS缓冲液研磨过滤，取上清液滴入凹玻片上，加等量致敏SP菌体试剂，用玻棒混匀，1～2分钟后，肉眼观察。液体清亮，有凝聚颗粒为阳性反应，记录为"＋"；液体混浊，无凝聚颗粒，为阴性反应，记录为"－"。

结　果

一、不同血清学方法检测的灵敏度比较

采集温室中保存繁育的烟草TMV、CMV样品，按各种方法的要求，用不同的样品稀释液研磨病叶，提取粗汁液，以1：10为初始浓度，进行倍比稀释。同时用DSM-ELISA、SPA-ELISA、Dot-ELISA和SA-test 4种血清学方法进行检测，每处理每样品设三次重复，1990年～1991年共进行4次试验，结果整理见表1。

由表1看出，4种检测方法中以Dot-ELISA灵敏度最高，其检测粗汁液的最大稀释度为1：1280～2560，是其他2种ELISA法的2—4倍，为SA-test的16—32倍；DSM-ELISA和SPA-ELISA的灵敏度相当，均为1：640；SA-test的灵敏度较低，为1

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1. 几种血清学方法检测灵敏度的比较

Table 1. The comparison of the sensitivity of four serological methods for detecting TMV and CMV

方法 Method	病毒 Virus	粗汁液稀释度Dilution of crude extract 1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
SPA-ELISA	TMV	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	CMV	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
DSM-ELISA	TMV	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	CMV	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Dot-ELISA	TMV	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
	CMV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
SA-test	TMV	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
	CMV	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−

：80。

对采自湖南主要烟区的314个田间烟草花叶病的样品，用TMV和CMV抗血清同时采用上述四种血清学方法检测，重复三次。结果表明，Dot-ELISA对样品中病毒的检出率最高，为97.5%（含TMV和CMV，下同）；DSM-ELISA和SPA-ELISA相当，分别为90.3%和91.5%，SA-test的检出率较低，为74.3%。

二、不同血清学方法非特异性反应的比较

1. DSM-ELISA和SPA-ELISA比较：以10倍健康烟叶汁液为初始浓度，用0.02 mol/L、pH7.2PBS缓冲液进行倍比稀释，同时进行DSM-ELISA和SPA-ELISA试验。加入底物溶液后，反应相同时间，然后用2mol/L H_2SO_4终止反应，立即测定OD值。每处理3次重复。结果表明，SPA-ELISA的OD值明显低于DSM-ELISA，数据经t检验，差异显著。由此可知，SPA-ELISA的非特异性反应低于DSM-ELISA。

2. 用健康汁液吸附抗血清对消除Dot-ELISA和SA-test非特异性反应的效果

取温室中纯化繁育的烟草TMV和CMV样品，用经过健康汁液（1：20倍）吸附和未经吸附的抗血清同时进行Dot-ELISA和SA-test检测，每处理重复3次。结果发现，在Dot-ELISA检测中，使用未经吸附的抗血清，健株对照也显出较深的褐色斑，而使用吸附过的抗血清，健株对照基本上没有褐色反应斑，获得了满意的效果。在SA-test检测中，使用未经吸附的抗血清，健株对照产生了少量颗粒状沉淀，而使用吸附过的抗血清，健株对照不产生颗粒状沉淀，这表明，健康汁液吸附抗血清可有效地消除SA-test检测中的非特异性反应。

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

大批量检测植物病毒样本目前最常用的是ELISA法，尤其是DSM-ELISA法，其检测灵敏度高，特异性强，至今仍是广泛使用的一种检测技术。但这种方法需要制备2种不同动物的抗血清，操作欠简便。SPA-ELISA法则克服了上述缺点，且保持了灵敏度高，特异性强的优点，但仍须专门的仪器检测反应结果。近年来报道的以硝酸纤维膜为载体的Dot-ELISA法具备了ELISA法的主要优点，并不需特殊仪器，结果可长期保存。但目前在植物病毒检测中应用尚不广泛。从本文的试验结果来看，该法较以聚苯乙烯板为载体的ELISA法灵敏度高，特异性强，操作简便，是一种值得推广的好方法。

SA-test法目前很少用于植物病毒的检测，从我们的试验来看，此法灵敏度虽较低，但操作简便，而且反应在1—2分钟内就能观察到结果。若进一步改进，提高灵敏度，该法不失为产地检疫、检测的好方法。

血清学方法检测病叶粗汁液的一个突出的问题是非特异性反应的干扰，尤其是对Dot-ELISA法和SA-test法这类凭肉眼直接观察结果的试验，干扰更大，影响了试验结果的正确判断。我们试验用健康汁液吸附供试抗血清的方法，对降低非特异性反应有明显的效果。

参 考 文 献

〔1〕 陈瑞泰等，1986，中国烟草，(1)：1—4。
〔2〕 钱　浚等，1988，烟草科技，(2)：36—40。
〔3〕 Edwards, M.L. and Cooper I.L., 1985, Journal of Virlogical Methods, 11：309—319.
〔4〕 陆家旺等，1987，植物病理学报，17(4)：241—246。
〔5〕 周雪平等，1990，病毒学杂志，(3)：317—321。
〔6〕 郑光宇等，1988，病毒学报，4(2)：150—155。
〔7〕 Chirkov S.N. et al., 1984, Ann.Appl.Biol., 104：477.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Comparison of Four Serological Methods for Detecting CMV and TMV in the Crude Extracts of Diseased Tobacco Leaves

Xiao Qiming Liu Xueduan Huang Shengyi

(*Department of Plant protection, HNAC, Changsha* 410128)

Three ELISA and an SA-test methods were used to detect CMV and TMV in the crude extracts of diseased plant. For the sensitivity, Dot-ELISA method is the best with maximum dilution point of $1.28—2.56\times10^{-3}$, followed by DSM-ELISA and SPA-ELISA (6.4×10^{-2}), SA-test is lower(0.8×10^{-2}). For the nonspecific reaction, SPA-ELISA is lower than DSM-ELISA. When the antisera are absorbed by the extracts from the health plants, it was avoided to a great extent in Dot-ELISA and SA-test.

Key words: ELISA SA-test Detection of tobacco viruses