

## 应用 Dot-ELISA 检测 PVX、PVY 和 PVS\*

孟清 张鹤龄 宋伯符\*\*

(内蒙古大学生物系, 呼和浩特 010021)

5432.41

A

**提要** 以 NCM 为固相载体、应用间接 ELISA 法测定了纯化的 PVX、PVY 和 PVS; 对接种的烟草, 马铃薯块茎的芽、休眠块茎顶端的 PVX、PVY 和 PVS 也分别进行了测定。结果表明检测纯病毒 PVX、PVY 和 PVS 的灵敏度分别为 2.76pg、2.835pg 和 5.831pg。检测感病烟草汁液马铃薯块茎芽、休眠块茎顶端的稀释度 PVX 分别为: 1/20480~1/81920、1/20480 和 1/5120; PVY 分别为 1/81920、1/20480 和 1/5120; PVS 分别为 1/81920~1/327680、1/20480~1/81920 和 1/5120~1/20480。和 Cocktail-ELISA 相比, 检测 PVX 和 PVY 的灵敏度提高至少 16 倍。实验结果表明, Dot-ELISA 是检测 PVX、PVY 和 PVS 灵敏而有效的方法。

**关键词** 硝酸纤维素膜, 斑点酶联免疫吸附测定, 马铃薯 X 病毒, 马铃薯 Y 病毒, 马铃薯 S 病毒

马铃薯病毒, X 病毒; Y 病毒; S 病毒;

尽管十分普遍地以聚苯乙烯塑料板作固相载体用于酶联免疫吸附测定 (ELISA), 但是由于抗体或抗原抗体复合物从聚苯乙烯固相载体上“泄漏”(Leakage) 或者解吸附 (Desorption), 因而大大降低了常规 ELISA 的灵敏度。Salonen 和 Vaeheri<sup>[1]</sup> 发现如果加入聚苯乙烯塑料板中的抗体浓度为 50~500ng/ml 时, 吸附在固相载体表面上的 IgG 量只有加入量的 20.9%, 到免疫鉴定反应结束时, 最初吸附在载体表面的 20.9% 的 IgG 只有 50~70% 被最终吸附保存下来。就是说在整个 ELISA 检测中, 有效蛋白结合率大约只有最初加入量的 10%。

硝酸纤维素膜 (NCM) 对蛋白质有高度的亲和力, 提供蛋白比较大的结合表面, 抗体或病毒抗原和 NCM 的结合较聚苯乙烯载体更加有效, 使检测的灵敏度明显提高, 而且所需检测样品量少, 小到几微升<sup>[6]</sup>。Rybiki 和 Vonwechmar<sup>[2]</sup>、Berger<sup>[3]</sup> 以及 Powell 等<sup>[4]</sup> 先后分别以 NCM 为固相载体检测了植物病毒, 并达到了很高的灵敏度。Berger 等<sup>[3]</sup> 在 NCM 上用间接 ELISA 法, 以 GAR-AP 作为第二抗体时检测纯化 PVY, 其灵敏度达到 500fg (0.5pg), 应用生物素标记 GAR, 随后用生物素亲和素酶复合物 (ABC) 方法检测, 其灵敏度可达到 1pg; 当用活化长臂生物素 (Biotinyl- $\epsilon$ -amino-caproic acid N-hydroxysuccinimide, BANHS) 生物素化第二抗体和生物素化碱性磷酸酯酶单体 (monomeric alkaline phosphatase, mAp) 或生物素化碱性磷酸酯酶聚合物 (polymerized alkaline phosphatase, pAp) 时, 检测灵敏度也可达到 1pg。实验表明: DBLA (Dot blot immunobinding assay) 测定所需要最低病毒量为低于常规 ELISA 的 1000 倍。Bantari 和 Goodwin<sup>[5]</sup> 首次以 NCM 为固相载体, 应用双抗体夹心法检测 PVS、PVX 和 PVY, 并将此法命名 Dot-ELISA。他们的实验都证明和 DAS-ELISA 相比, Dot-ELISA 提高了检测的灵敏度。

本文于 1992 年 8 月 31 日收到, 1993 年 4 月 24 日修回

- \* 本课题由国际马铃薯中心资助。
- \*\* 国际马铃薯中心驻京办事处。

另外,使用 NCM 除了提高检测的灵敏度外,还具有如下优点:一是和无色的 NCM 相比,产生鲜明的色斑,形成强烈的对比;二是 Dot-ELISA 或者 NCM-ELISA 的操作要比 DAS-ELISA 更容易,每张 NCM 的包被、洗涤、酶标记 IgG 的反应都被作为一个整体在一个平皿中或者一个塑料袋(12cm 长×8cm 宽)中进行;三是不需要同位素和昂贵的仪器设备。

本文以 NCM 作为固相载体,在 Banittari 和 Goodwin<sup>[6]</sup>方法的基础上略作改进,对提纯病毒、温室接种感病毒烟草、感病马铃薯芽、休眠块茎的顶端中的 PVX、PVY 和 PVS 进行测定。

## 材料和方法

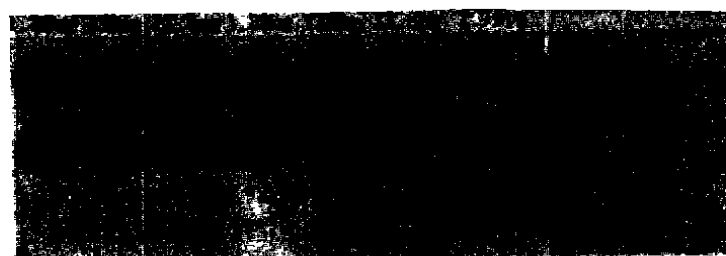
- 1 试剂 Ap、NBT、BCIP(Sigma Chemical CO),GAR-IgG(北京生物制品所),NCM(孔径为 0.45 $\mu$ m,)PVP(MW:40000,日本进口)。
- 2 待测植物和病毒 用 PVX、PVY 和 PVS(毒源来自内蒙古大学生物系温室)分别接种普通烟和地烟,接种植物在温室中培养了 3—4 个星期,用于提纯病毒和 Dot-ELISA 以及 Cocktail-ELISA 的测定样品,感病马铃薯块茎取于大田材料。
- 3 病毒提纯及多克隆抗血清 将上述经接种 PVX、PVY 和 PVS 培养的烟草用于病毒的提纯。提纯 PVX 的主要步骤如下:感病烟叶加入 0.1mol/L pH 7.2 pB<sup>+</sup>(内含 0.2%巯基乙醇、0.01mol/L EDTANa<sub>2</sub>)匀浆,两层纱布过滤之后,于汁液中加入 1/4 体积的氯仿和正丁醇(1:1)混合物乳化 20 分钟,低速离心收取上清,加入 6% PEG(MW:6000)沉淀病毒 4—6 小时,8000 r/m 离心收集沉淀,用 0.01mol/L pH7.2 pB<sup>+</sup>悬浮,4000 r/m 离心 10 分钟,上清液做 20%蔗糖垫层超离心(35000 r/m,90 分钟),沉淀悬浮后进行蔗糖密度梯度离心。梯度为 20%、30%、40%和 50%,20000 r/m 离心 3 小时,收取梯度液中的病毒带,对 0.01mol/L pH7.2 pB<sup>+</sup>透析。病毒含量按照  $A_{260nm}^{0.1\%} = 2.9^{[7]}$  来测定。取纯化的 PVX 病毒免疫家兔。最初三次均为病毒液加不完全佐剂,病毒含量均为 2mg,最后一次用 3mg 的纯病毒免疫,一星期后耳静脉采血制备抗血清。用微量沉淀实验测定抗血清的效价。提纯 PVY 和 PVS 所用的缓冲液分别为 0.2mol/L PB<sup>+</sup> pH7.0 和 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液、pH 8.2 含 0.01 mol/L EDTANa<sub>2</sub>,0.2%巯基乙醇,PVY 和 PVS 病毒含量分别按照  $E_{1cm}^{0.1\%} = 2.8^{[10]}$  和  $E_{1cm}^{0.1\%} = 3.0^{[11]}$  来测定。其余病毒的提纯程序、制备抗血清及抗血清效价的测定同上。三种病毒抗血清效价均为 1:4096。
- 4 IgG(PVX、PVY、PVS)制备 免疫球蛋白(IgG)的制备按照 Clark 和 Adams 的方法进行<sup>[12]</sup>,IgG 没有被进一步用 DE 纤维素柱纯化,但经过正常植物蛋白的吸收。
- 5 IgG(GAR)及其 AP-IgG 羊抗兔 IgG(GAR)购于北京生物制品研究所,其酶结合物(AP-IgG)也是按照 Clark 和 Adams 的方法<sup>[12]</sup>制备。
- 6 Dot-ELISA 的步骤
  - 6.1 提取样品 称取 1g 待检样品放入 8×12cm 的塑料袋中,加入 5ml 样品提取液 TBS(0.01mol/L Tris, HCl, pH7.5, 0.9% NaCl, 0.05% Tween-80)内含 0.01mol/L EDTANa<sub>2</sub>,和 0.01mol/L DIECA,用大试管彻底研碎,静置 5 分钟,吸取 1ml 上清置于另一塑料袋中,加入 3ml 提取液混用于点样。
  - 6.2 NCM 的处理 将 NCM 浸入去离子水中 5 分钟,加入 TBS(0.01mol/L Tris, HCl, pH7.5, 0.9% NaCl)10 分钟,取出即可用于点样。
  - 6.3 点样 取处理好的 NCM,放置在装有抽滤设备的点样器上,抽滤点样,4 倍系列稀释样品液,每样品点 25 $\mu$ l,点样后置 37℃干燥 1 小时,或室温干燥 2 小时即可。
  - 6.4 封膜 第一抗体,第二抗体反应:点样后的 NCM 用 5% NFM 溶液(于 TBS 中)34℃封闭 2 小时,不经洗涤,转入第一抗体溶液(兔抗 PVX、PVS 和 PVY-IgG, 5 $\mu$ g/ml),稀释液为 TBS+2% PVP+0.2% NFM,34℃温育 3 小时,取出于 TBS-T<sub>0</sub>中洗涤三次,每次 5 分钟,加入 GAR-AP(1:1000),34℃反应 3 小时。如上洗涤,而后放入显色液中显色 15~30 分钟。阳性反应为蓝紫色斑点,阴性对照为绿色或无色。上述的封闭、第一抗体反应、

GAR-AP 反应、显色反应均在  $12 \times 8 \text{cm}$  塑料袋中进行。

7 Cocktail-ELISA 本实验与 Dot-ELISA 相比较, NCM 的处理、样品液的制备、点样膜的封闭、所用的洗涤液完全相同, 不同点只是第一抗体和酶标记第二抗体(GAR-AP), 同时加入, 保温反应 3 小时即可显色。

## 结 果

1 Dot-ELISA 用 Dot-ELISA 对纯化的 PVX、PVY 和 PVS 及感染上述三种病毒的烟草、马铃薯休眠块茎的顶端以及马铃薯块茎的芽分别进行测定。结果见表 1 及图 1 和 2。从图及表中可知以 NCM 为固相载体, 应用间接 ELISA 法测定提纯病毒、感病毒烟草、休眠块茎顶端和块茎芽时, 其灵敏度或汁液稀释度 PVY 分别达到  $2.76 \mu\text{g}$ 、 $1/81920$ 、 $1/5120$  和  $1/20480$ ; PVX 分别达到  $2.835 \mu\text{g}$ 、 $1/20480 \sim 1/81920$ 、 $1/5120$  和  $1/5120 \sim 1/20480$ ; PVS 分别达到  $5.831 \mu\text{g}$ 、 $1/81920 \sim 1/327680$ 、 $1/5120 \sim 1/20480$  和  $1/20480 \sim 1/81920$ 。



a、b 为纯化的  
PVY  
b Purified PVY  
(a, b)  
c 为健康粗汁  
液  
Healthy (c)

图 1 应用 Dot-ELISA  
检测纯化的 PVY  
(A)、PVX (B) 和  
PVS (C)

Fig. 1 Detection of pur-  
ified PVY (A)  
PVX (B) and  
PVS (C) by En-  
zyme Linked Im-  
munosorbent As-  
say on Nitrocellu-  
lose Membranes  
(Dot-ELISA)



a、b 为纯化的  
PVX  
b Purified PVX  
(a, b)  
c 为健康粗汁  
液  
Healthy (C)



a、b 为纯化的  
PVS Purified  
PVS (a, b)  
C 为健康粗汁  
液  
Healthy (C)

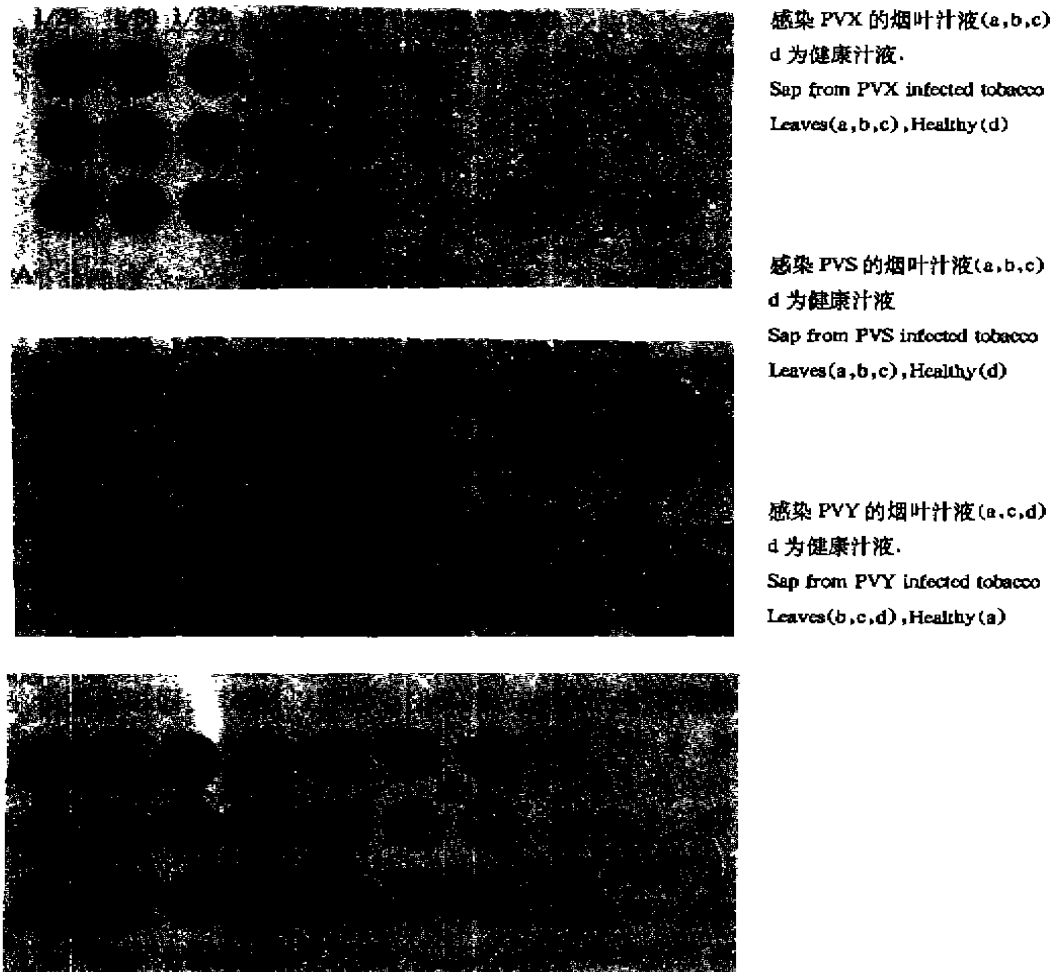


图 2 应用 Dot-ELISA 检测感病烟叶中的 PVX、PVS 和 PVY

Fig. 2 Detection of PVX PVS and PVY in infected tobacco by Enzyme Linked Immunosorbent Assay on Nitrocellulose Membranes(Dot-ELISA)

表 1 用 Dot-ELISA 检测 PVX、PVY 和 PVS

Table 1 Detection of PVX PVY and PVS by Dot-ELISA

测定样品 Samples	测定灵敏度(或汁液稀释度) Sensitivities (or dilution of sap)		
	PVY	PVX	PVS
提纯病毒 Purified viruses	2.76pg	2.835pg	5.831pg
感病烟草 Infected tobacco	1/81920	1/20480~1/81920	1/81920~1/327680
休眠块茎顶端 Rose-end of dormant tubers	1/5120	1/5120	1/5120~1/20480
块茎芽 Sprouts of tubers	1/20480	1/5120~1/20480	1/20480~/81920

2 Cocktail-ELISA 用 Cocktail-ELISA 对感染三种病毒的烟草进行测定,结果表明以 NCM 为固相支持物,应用 Cocktail-ELISA 测定感染病毒烟草的 PVY、PVX 和 PVS 时,其汁液稀释度分别也可达到 1/1280~1/5120、1/1280~1/5120 和 1/20480。

## 讨 论

我们的实验结果表明,以 NCM 为固相载体应用间接 ELISA 法可以有效地检测感病烟草和马铃薯以及纯化制剂中的 PVX、PVY 和 PVS。检测纯病毒、感病烟草或者感病马铃薯块茎都可以达到很高的灵敏度或汁液稀释度。Bode L<sup>[7]</sup>等报道以 NCM 为固相载体的 ELISA 可使检测的灵敏度提高 8—10 倍,Lockhart<sup>[13]</sup>报道可使检测 BYSMV 的灵敏度提高 30 倍。究其原因主要是 NCM 对蛋白质有高度的亲和力,而常规 ELISA 中的固相载体在整个检测反应过程中存在有“泄漏”和“解吸附”现象。

以 NCM 为固相载体,应用间接 ELISA 或者直接 ELISA 检测病毒抗原或抗体,其灵敏度也不一样。Bantari et al<sup>[5]</sup>以 NCM 为固相支持物,应用双抗体夹心 ELISA 检测温室繁殖的马铃薯茎和叶中的 PVX 和 PVS,结果表明测定汁液的稀释度达到 1/16000,我们以 NCM 为固相载体,应用间接 ELISA 法检测感病烟草中的 PVY 和 PVS,汁液稀释度可达到 1/81920,即使测定打破休眠后的马铃薯块茎芽中的 PVY 和 PVS,也可达到 1/20480。这表明以 NCM 为固相载体,间接 ELISA 比直接 ELISA 检测灵敏度高。采用这种测定方法,首先吸附在 NCM 上的是病毒“大分子”抗原,而每一个病毒抗原表面都有许多个抗原决定簇,它又可以和相应数量的抗体分子(IgG)相结合,随后结合同等数量的第二抗体分子。而以 NCM 为固相载体的直接 ELISA 却不然,首先吸附在固相载体表面的不是“大颗粒”抗原,而是“小分子”的抗体 IgG,在有限的吸附表面上即使吸附更多的 IgG,但随后和大颗粒抗原结合时,由于空间的“位阻”效应,实际上结合上去的抗原数量却是有限的,这可能是造成两种检测方法检测灵敏度有差异的一个原因。

此外,在间接 ELISA 检测中抗原分子吸附于 NCM 上,如同直接 ELISA 中抗体 IgG 的吸附一样,首先是依靠 NCM 对蛋白质的高度亲和力;其次与直接 ELISA 不同点还在于抗原分子还借助于外力的作用(点样器的抽滤)驱使其全部加速吸附于 NCM 上,因而“有效”抗原数量大大增加,检测的灵敏度相应提高。

当然所用材料如马铃薯是续发感染,还是当年接种,其病毒含量也有很大差异。Bantari et al<sup>[5]</sup>以同样的方法测定马铃薯茎叶中的 PVY,其汁液的稀释度高达 1:128000。

1989 年 Heuvel 和 D. Peters<sup>[8]</sup>以聚苯乙烯作为固相载体,应用 Cocktail-ELISA,结合酶放大系统检测了马铃薯卷叶病毒。和常规 ELISA 相比,使检测的灵敏度提高 15 倍。我们以 NCM 为固相支持物检测 PVX、PVY 和 PVS,检测结果相比较表明,Dot-ELISA 检测的灵敏度至少是 Cocktail-ELISA 的 16 倍。

上述情况表明,以 NCM 为固相载体,应用 ELISA 检测马铃薯病毒是一种简易、可行、灵敏度高的理想检测方法。

## 参 考 文 献

- 1 Salonen E, Vaheri A. Immobilization of viral and mycoplasma antigens and of immunoglobulins on polystyrene surface for immunoassays. *J. Immunol Methods*, 1979, 30 : 209-218
- 2 Rybicki E P, Von Wechmar M B. Enzyme-assisted immune detection of plant virus proteins electroblotted onto nitrocellulose paper. *J. Virol Methods*, 1982, 5 : 267~278
- 3 Berger P H, Thornbury D W, Pirone T P. Detection of picogram quantities of potyviruses using a Dot blot immunobinding assay. *J Virol Methods*, 1985, 12 : 31~39
- 4 Powell C A. Detection of three plant viruses by an immunoblot assay. *Phytopathology*, 1984, 74 : 847
- 5 Bantari E E, Goodwin P H. Detection of potato viruses S, X, and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-ELISA). *Plant Dis*. 1985, 69 : 202~205
- 6 Lizarraga C, Fernandez-Northcote E N. Detection of potato viruses X and Y in sap extracts by a modified indirect enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA). *Plant Dis*. 1989, 73 : 11~14
- 7 Bole L, Beutin L, Köhler H. Nitrocellulose enzyme-linked immunosorbent assay (NC-ELISA)—a sensitive technique for the rapid visual detection of both viral antigens and antibodies. *J Virol Methods*, 1984, 8 : 111~121
- 8 Van Den Heuvel J. F. J. M., Peters D. Improved detection of potato leafroll virus in plant material and in aphids. *Phytopathology*, 1989, 79 : 963~967
- 9 Riivo Sinijärvi, Lilian Järvekülg, Elena andreeva et al. Detection of potato virus X by one incubation europium time-resolved fluorimunoassay and ELISA. *J. Gen. Virol*. 1988, 69 : 991~998
- 10 Stace-Smith R, Tremaine J. H. Purification and composition of potato virus. *Phytopathology*, 1970, 60 : 1785~1789
- 11 Donald J. Mackenzie, Tremaine J. H., Stace-Smith R. organization and intervirial homologies of the 3-terminal portion of potato virus S RNA. *J. Gen. Virol*, 1989, 70 : 1053~1063
- 12 Clark M. F. Adams A. N. Characteristics of the microplate method enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol*. 1977, 34 : 475~483
- 13 Lockhart B. E L, El Maataoui M, Carroll T. W., et al. Identification of barley yellow striate mosaic virus in Morocco and its field detection by enzyme immune assay. *Plant Dis*. 1986, 70 : 1113~1117

### Detection of Potato Virus X Y and S by Enzyme Linked Immunosorbent Assay on Nitrocellulose Membranes (Dot-ELISA)\*

Meng Qing Zhang Heling Song Bofu<sup>①</sup>

(Biology Department of Inner Mongolia University, Huhhot 010021)

Purified potato virus Y, X, and S were detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on nitrocellulose membranes. Potato virus Y, X, and S in infected tobacco, sprouts of potato tubers, rose end of dormant tubers were detected respectively. The results indicated that the small amount of sample required permit the detection of as little as 2.76pg, PVY, 2.835pg PVX and 5.83pg PVS in purified preparations. PVX was detected in infected tobacco, rose end of dormant tubers and

\* This research was supported by International Potato Center (CIP)

① CIP Region Office, Beijing, China 100081

sprouts of potato tuber by Dot-ELISA at dilutions of 1/20480—1/81920, 1/5120, 1/5120—1/20480; and PVY was detected in infected tobacco, rose end of dormant tuber and sprouts of tubers by Dot-ELISA at dilutions of 1/81920, 1/5120, 1/20480, and PVS was 1/81920—1/327680, 1/5120—1/20480 and 1/20480—1/81920 respectively.

The assay for potato virus X and Y was at least sixteen times more sensitive than Cocktail-ELISA. The results indicated that Dot-ELISA was considered to be the simplest, sensitive and reliable method for the detection of PVX, PVY and PVS in purified preparation and in extracts of infected tissues.

**Key words** Nitrocellulose Membranes(NCM), Dot-ELISA, PVX, PVY, PVS