

单抗免疫斑点法和组织印迹法检测百合无症状病毒*

李燕宏¹ 吴建祥¹ 洪 健^{1**} 周雪平¹ 叶美琴²

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)¹ (浙江丽水市农业局 丽水 323000)²

摘要:应用抗百合无症状病毒 (*Lily symptomless virus*, LSV) 的单克隆抗体, 建立了快速检测田间样品的免疫斑点法 (Dot-ELISA) 和组织印迹法 (Tissue blot-ELISA) 体系。LSV 单抗稀释 2,000 倍时, Dot-ELISA 中病叶粗汁液可被检出的最大稀释度为 1:640。Tissue blot-ELISA 中样品一次平切后第 1 次印迹与 Dot-ELISA 样品 1:40 稀释的结果相当, 前 4 次印迹均可获得满意的显色效果。常规 Tissue blot-ELISA 的灵敏度低于 Dot-ELISA, 但用丙酮处理点过样的硝酸纤维素膜后, 二者的灵敏度相当, 且 Tissue blot-ELISA 操作更简便, 适合田间大量样品的快速检测。

关键词:百合无症状病毒, 单克隆抗体, 免疫斑点法, 组织印迹法

中图分类号: S432.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0025-05

Detection of LSV in Lily Tissue by Dot-ELISA and Tissue Blot-ELISA with Monoclonal Antibody*

LI Yan-Hong¹ WU Jian-Xiang¹ HONG Jian^{1**} ZHOU Xue-Ping¹ YE Mei-Qing²

(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)¹

(Agriculture Bureau of Lishui, Lishui 323000)²

Abstract: Dot-ELISA and tissue blot-ELISA with monoclonal antibody to detect *Lily symptomless virus* (LSV) were established. 2000-dilution LSV monoclonal antibody could be adopted to detect LSV infecting leaf extract within a dilution limitation of 1:640. LSV could still be detected in the forth print by tissue blot-ELISA. Similar results were shown between the first print by tissue blot-ELISA and 40-dilution of infected leaf extract by dot-ELISA. Comparison tests showed that the commonly used tissue blot-ELISA was less sensitive than dot-ELISA, but soaked cellulose nitrate membrane (NCM) with acetone in tissue blot-ELISA produced the same sensitivity as dot-ELISA. The improved tissue blot-ELISA is more simple than dot-ELISA, and is suitable for fast detection with a large number of samples in the field.

Key words: *Lily symptomless virus*, Monoclonal antibody, Dot-ELISA, Tissue blot-ELISA

百合 (*Lilium*) 是集观赏、食用、药用于一身的重要经济作物, 近年来种植规模不断扩大, 每年从国外引进的切花种球和高档蔬菜品种越来越多, 病毒病发生日趋严重。国内外已报道侵染百合的病毒有 10 种以上^[1-3], 主要有百合无症状病毒 (*Lily symptomless virus*, LSV)、百合斑驳病毒 (*Lily motile virus*, LMoV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 等, 其中 LSV 发生最为普遍。尽管 LSV 侵染百合通常不引起明显症状, 但与 LMoV 或 CMV 复合侵染可引起花叶、畸形、坏死等症状^[3], 严重影响其经济价值。

* 国家高技术研究发展计划资助项目 (No. 2003AA2Z2091)

浙江省科技厅资助项目 (No. 2002C32128, G20030724)

** 通讯作者 E-mail: jhong@zju.edu.cn

收稿日期: 2005-05-17, 修回日期: 2005-06-27

目前,我国对进口百合种球检疫以及脱毒组培快繁中病毒检测主要采用电镜观察法、酶联免疫吸附法(ELISA)和 RT-PCR 分子检测法^[4-6]。电镜观察法需要大型精密仪器;RT-PCR 分子技术除了需要特殊仪器外,还要提取 RNA,不适用于田间大规模样品检测;ELISA 技术关键在于制备高质量的抗体,但百合病毒复合侵染普遍,分离提纯较困难,商品检测试剂仅有 LSV 多抗 DAS-ELISA 检测试剂盒,且价格昂贵。为了满足日益增长的百合病毒检测需求,我们首次成功制备了 LSV 单克隆抗体,并建立了间接抗原包被 ELISA 技术(ACP-ELISA)检测田间大量百合样品。本文报道将单抗与免疫斑点法(Dot-ELISA)和组织印迹法(Tissue blot-ELISA)相结合快速检测 LSV 的方法。

1 材料与方法

1.1 检测对象

在浙江丽水市格丽雅花卉栽培基地采集呈花叶、畸形等症状以及无明显症状的东方百合 [*Lilium* cvs. (Oriental Hybrids)]、亚洲百合 [*Lilium* cvs. (Asiatic Hybrids)]、百合铁亚杂种 [*Lilium* cvs. (L/A)] 田间植株;经电镜负染色观察和 ACP-ELISA 检测确定为 LSV 感染的叶片作阳性对照,确定不带任何病毒的叶片为阴性对照。

1.2 单克隆抗体

LSV 单克隆抗体由本实验室研制,工作浓度为 1:2,000。

1.3 免疫斑点法 (Dot-ELISA)

参考肖启明等^[7]的方法并加以改进。将硝酸纤维素膜(NCM)剪成适当大小,用打孔器印出点样位置。TBS 40 倍稀释样品粗汁液,将 4 μ L 各稀释度的样品粗提液点在打孔器圆形印斑中央,空气中自然干燥。清洗液 TBST (TBS + 0.05% Tween20)清洗 3min,移入封闭液 (TBS + 0.05% Tween20, 3% 牛血清白蛋白),水平摇床轻微振荡 60min, TBST 清洗 3 次, 3 ~ 5min/次。倾去清洗液,加入 2,000 倍封闭液稀释的 LSV 单抗,水平摇床轻微振荡 60min。洗涤同上。倾去洗液,加入 8,000 倍封闭液稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG (购自 Sigma 公司),振荡 60min。洗涤同上。加入底物 (5mL 磷酸盐-柠檬酸缓冲液中加入 BCIP16.5 μ L, NBT33 μ L),暗处反应 2 ~ 5min 后蒸馏水漂洗 3 次,晾干并判断结果。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅,阴性反应记录为“-”。

1.4 组织印迹法 (Tissue blot-ELISA)

NCM 剪成适当大小,用打孔器印出印迹位置,铺垫在 3 层干净的吸水纸上。将叶片紧卷成筒,刀片迅速横切,将横切面在 NCM 上压印一下。其余步骤同免疫斑点法。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅,阴性反应记录为“-”。

1.5 电镜负染色观察

待检百合叶片充分研磨至匀浆,将覆有 Formvar 膜的铜网膜面朝下蘸取粗汁液,用滤纸吸掉余液。再用 2% 的磷钨酸 (PTA) 负染色。在透射电子显微镜下观察 LSV 粒子的有无及形态,以“++++、+++、++、+”4 个等级表示视野中 LSV 粒子的多少。放大 25,000 倍时视野中 LSV 粒子数 $n \geq 15$ 记为“++++”, $10 \leq n < 15$ 记为“+++”, $5 \leq n < 10$ 记为“++”, $1 \leq n < 5$ 记为“+”;未观察到 LSV 粒子的以“-”表示。

1.6 病叶粗汁液不同稀释度检测

经电镜负染色观察和 ACP-ELISA 检测确定为 LSV 单独侵染和 LSV 与 LMoV 复合侵

染的叶片，分别用 TBS 将其粗汁液稀释为 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640，进行免疫斑点法检测。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅，阴性反应记录为“-”。

1.7 病叶组织不同印迹次数检测

LSV 病叶一次平切后在 NCM 上多次印迹（分别为第 1~7 次印迹），用丙酮浸泡印迹过的 NCM 3min，进行组织印迹法检测。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅，阴性反应记录为“-”。

2 结果

2.1 免疫斑点法和组织印迹法检测结果

为检验 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 的检测结果，同时用电镜观察法对 1~6 号样品进行检测，其中 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 两种方法各设两个重复。检测结果显示（表 1），Dot-ELISA 和电镜观察法灵敏度高于 Tissue blot-ELISA。Dot-ELISA 阳性反应呈褐色，阴性反应无色。Tissue blot-ELISA 存在叶绿素干扰，阳性反应呈黑褐色，阴性反应呈绿色。样品组织的粗汁液经电镜负染色观察，有的只存在 600nm~700nm 的线状粒子（图 1），形态符合麝香石竹潜隐病毒属（*Carlavirus*）特征。有的还同时存在 700nm~900nm 的线状粒子和风轮状内含体（PW）碎片，形态符合马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*）特征。

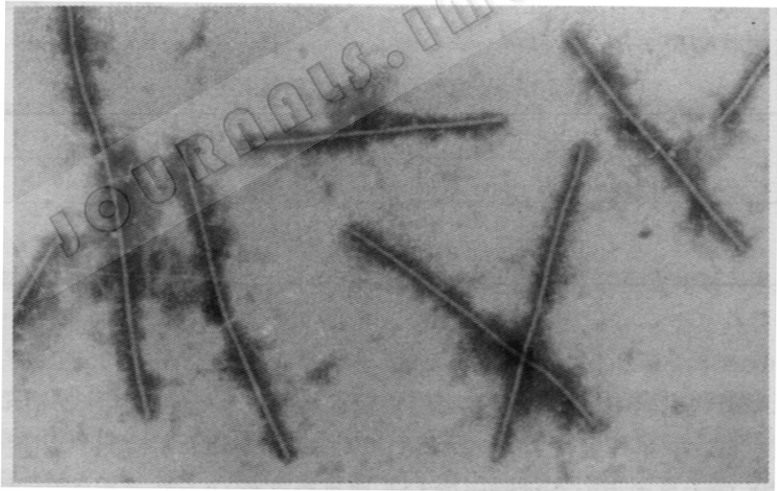


图 1 经 2% PTA 负染色的百合病叶粗汁液中 LSV 粒子 (80,000×)

表 1 免疫斑点法、组织印迹法和电镜观察法检测结果

检测方法	样品编号					
	1	2	3	4	5	6
Dot-ELISA	+++	++	-	++++	+	+
	+++	++	-	++++	+	+
Tissue blot-ELISA	+++	+	-	+++	-	+++
	+++	+	-	+++	-	+++
电镜观察法	++++	+++	-	++++	+	+++

2.2 LSV 病叶粗汁液不同稀释度检测结果

为检验复合侵染是否影响利用单抗检测 LSV (包括反应有无及反应强度), 分别对受 LSV 单独侵染的叶片和受 LSV 与 LMoV 复合侵染的叶片进行检测 (表 2)。从表 2 可以看出, 两种病叶检测结果一致, 粗汁液稀释到 1:640 均能被检出; 阳性对照呈褐色, 阴性对照无色。

表 2 LSV 病叶粗汁液不同稀释度检测结果

样 品	粗汁液稀释倍数				
	40	80	160	320	640
LSV 单独侵染病叶	+++	++	++	+	+
阳性对照	++++				
阴性对照	-				
LSV 与 LMoV 复合侵染病叶	+++	++	++	+	+
阳性对照	++++				
阴性对照	-				

2.3 组织一次平切后不同印迹次数检测结果

由于是直接印记, 未能作灵敏度试验, 但根据显色程度看, 样品一次平切后的第 1 次印迹与 Dot-ELISA 1:40 稀释的结果相当, 第 2、3、4 次印迹与 Dot-ELISA 1:80 稀释的结果相当, 第 5、6、7 次印迹与 Dot-ELISA 1:160 稀释的结果相当 (表 3)。对照印记后呈现水渍状印斑。

表 3 LSV 病叶不同印迹次数检测结果

样 品	印迹次数						
	1	2	3	4	5	6	7
LSV 病叶	++++	+++	+++	+++	++	++	++
健康叶片	-	-	-	-	-	+	+

3 讨论

免疫斑点法和组织印迹法已广泛应用于植物病毒的快速检测^[8,9], Kim 等 (1996) 用多抗血清对百合栽培种进行了 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 检测^[10], 但单克隆抗体用于检测 LSV 尚未见报道。本试验应用 LSV 单抗首次建立了快速检测田间样品的单抗 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 体系, 在病叶粗汁液不同稀释度的检测中, 受 LSV 单独侵染和 LSV 与 LMoV 复合侵染的叶片检测结果一致, 表明其它病毒的存在不会影响 LSV 单抗对该病毒的检测, 可靠性进一步提高。而采用多抗血清检测时, 虽然可以用健康寄主汁液吸附抗血清以除去植物本身含有的非特异性蛋白质, 但百合病毒复合侵染普遍, 分离提纯较困难, 难以确定检出病毒即是 LSV。采用电镜负染色观察, 由于多种线状病毒复合侵染百合, 视野中的少量病毒粒子也难以确定即是 LSV。因此单抗 ELISA 检测有着其他方法不能替代的优点。

Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 以 NCM 代替酶联板, NCM 对蛋白质的亲和力比聚苯乙烯载体高, 反应过程中较少存在泄漏和解吸现象, 灵敏度进一步提高; 同时操作

简单、快速, 整个检测流程可在 4h 内完成。采用 Tissue blot-ELISA 省去样品粗汁液提取和稀释, 操作更简便。新鲜样品平切后直接印迹会留下叶绿素斑痕, 用丙酮浸泡点过样的 NCM 可消除叶绿素背景, 该方法处理的样品一次平切第 1、2、3、4 次印迹均可获得理想的显色效果, 第 6、7 次印迹反映颜色较浅, 易与健康样品的水渍状痕迹混淆。和 Dot-ELISA 相比, 改进后的 Tissue blot-ELISA 更适合田间大量样品的快速检测。

Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 中选用的二抗标记酶以碱性磷酸酶较好。由于植物中不同程度地存在过氧化物酶, 并且是利用植物粗汁液检测或直接印迹, 使用辣根过氧化物酶可能出现假阳性。

参 考 文 献

- [1] Derks A F L M, Lemmers M E C, Konicheva V, *et al.* *Acta Horticulturae*, 2002, **568**: 247 ~ 252.
- [2] Yasuyuki Y, Xiaoyun Lu, Satochi K, *et al.* *European Journal of Plant Pathology*, 2001, **107**: 833 ~ 837.
- [3] 徐秉良, 梁巧兰, 徐 琼. 植物保护, 2004, **30** (5): 62 ~ 65.
- [4] Niimi Y, Han D S, Mori S, *et al.* *Scientia Horticulturae*, 2003, **97** (1): 57 ~ 63.
- [5] 王继华, 翟素萍, 孔宝华, 等. 云南农业大学学报, 2004, **19** (2): 148 ~ 150, 173.
- [6] 贾 慧, 王进忠, 陈忠斌, 等. 北京农学院学报, 2004, **19** (4): 73 ~ 76.
- [7] 肖启明, 刘学瑞, 黄声仪. 中国病毒学, 1993, **8** (1): 102 ~ 103.
- [8] 刘 勇, 杨树军, 李飞天. 烟草科技, 2000, **12**: 42 ~ 44.
- [9] 张爱平. 上海农业学报, 1999, **15** (2): 84 ~ 86.
- [10] Kim J, Lee S, Kim H, *et al.* *Acta Horticulturae*, 1996, **414**: 189 ~ 194.