

两种 NC 膜条上马铃薯 A 病毒 DAS-ELISA 检测研究*

田世民^{1 2 * *} 施丽飞^{1 3} 周 朋^{1 2} 邹明强^{1 2 * *} 薛 强^{1 2}

(中国检验检疫科学研究院检测与装备技术研究所 北京 100025)

(北京中美检科微技术研究所 北京 100025) (大连医科大学检验医学院 大连 116027)

摘要 基于双抗体夹心 ELISA 反应原理,在两种不同加工成形的硝酸纤维素膜条(NC strip)上进行了马铃薯 A 病毒(PVA)的检测研究,并以酶标板 ELISA 做参比。结果表明,在 NC 条-2(NC strip-2)上的检测灵敏度与酶标板 ELISA 相当,而反应试剂的用量仅为酶标板 ELISA 的百分之一;NC 条-1(NC strip-1)由于加样点间易发生交叉污染而不适合进行 ELISA 检测。应用 NC 条-2 可稳定进行 PVA 的 ELISA 检测,为进一步开展微流体斑点免疫检测研究奠定了基础。

关键词 马铃薯 A 病毒, DAS-ELISA, NC 条

中图分类号 S432.41 文献标识码 A 文章编号 0253-2654(2007)04-0712-03

Study on Detection of Potato Virus A on NC Strips by DAS-ELISA*

TIAN Shi-Min^{1 2 * *} SHI Li-Fei^{1 3} ZHOU Peng^{1 2} ZOU Ming-Qiang^{1 2 * *} XUE Qiang^{1 2}

(Institute of Inspection Technology and Equipment, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025)

(Beijing Sino-America Microtechnology Institute, Beijing 100025)

(College of Laboratory Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116027)

Abstract Based on DAS-ELISA procedures, Dot-ELISA for detecting potato virus A (PVA) was conducted on two kinds of differently processed NC (nitrocellulose) strips (NC strip-1, NC strip-2), respectively. The PVA in infected potato leaves can be clearly detected by performing the ELISA on NC strip-2, whereas not on NC strip-1 due to cross-reaction between two adjacent NC dots. This result has given a deep foundation for developing micro fluidic immunoassay chip for potato virus A.

Key words Potato virus A, DAS-ELISA, NC strip

可侵染马铃薯的植物病毒有 20 余种,其中马铃薯 A 病毒(potato virus A, PVA)引起系统侵染的马铃薯 A 病毒病^[1,2]。该病毒的已知寄主为茄属植物(如马铃薯、烟草等),在欧洲和北美广泛发生^[2]。在一些地区,该病可造成高达 40% 的产量损失,是马铃薯生产上危害较严重的病毒病之一^[2,3]。在我国仅在黑龙江省有发生的报道^[4]。由于至少有 7 种我国较常见的蚜虫能以非持久性方式传播该病毒,因此 PVA 在我国流行的可能性很大^[3],是重要的国内监测对象和出入境口岸对外检测目标^[1]。

PVA 在马铃薯上引起花叶症状的严重程度受病毒株系、栽培品种和环境条件的影响。PVA 隶属

于马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus),病毒粒子为正单链 RNA,线状,长约 730nm,直径 15nm。该病毒可随种薯传播并随着种薯的种植而定殖。在 PVA 病毒常发区,种植抗病品种和脱毒种薯、防治蚜虫是防治 PVA 的有效措施;在偶发区和未发区,实施严格的检验检疫是关键的预防措施。

酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是植物病毒检验检疫常用和有效的方法^[2,4,5,9,10]。目前国际上有关于 PVA 病毒 ELISA、RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR 检测和应用研究的报道^[2,6]。国内仅有应用国外进口试剂盒进行 PVA 检测的报道^[4]。斑点酶联免疫吸附实验(Dot-ELISA)

* 科研院所社会公益研究专项(No.2005DIA2T128) 国家质检总局科研计划项目(No.2005IK0073)

* * 通讯作者 Tel 010-85747380, E-mail: mingqiangz@sina.com, shimintian@yahoo.com.cn

其他作者 李锦丰 齐小花¹ 王楠¹

收稿日期:2006-11-28,修回日期:2007-02-22

是以硝酸纤维素膜(NC)为载体而发展的一种酶联免疫吸附方法,具有样品吸附量大和试剂用量少等特点,已经在多种病原微生物的检验检疫中得到研究和应用^[7-10]。通常的 dot-ELISA 是在一块剪切大小适宜的硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NCM)上进行。

本研究采用复合式双抗体夹心 ELISA 检测体系(compound double antibodies sandwich ELISA, DAS-ELISA),在 2 种不同加工成形的 NC 膜条或片上进行马铃薯 A 病毒的检测研究。

1 材料与方法

1.1 NC 条的制作

供试的 NC 膜由北京中美检科微技术研究所提供。NC 条-2(NC strip-2)是先将硝酸纤维素膜(孔径 $0.45\mu\text{m}$, Gelman Science, 美国)经激光切割成直径 2mm 的圆片,然后以边缘粘贴在事先打孔(孔径 $2\text{mm} \times 1.5\text{mm}$, 间距:10mm)的塑料胶条上(大小 $40\text{mm} \times 2\text{mm}$) (如图 2 右所示)。NC 条-1(NC strip-1)是将 NC 膜切割成长 30mm 和宽 2mm 的窄条,直接粘在塑料胶条上(如图 2 左所示)。

1.2 植物材料和 ELISA 试剂

PVA 侵染的马铃薯叶片和阴性质控样品(健康马铃薯叶片)以及其多抗 IgG(包被抗体)、单抗 IgG(检测抗体)和碱性磷酸酶标记的兔抗鼠 IgG 均来自美国 Agdia 公司。样品提取液是 1 倍磷酸缓冲液(8.0gNaCl , $0.2\text{gKH}_2\text{PO}_4$, $2.9\text{gNa}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2gKCl , $1000\text{mL ddH}_2\text{O}$, pH7.4, PBS);洗涤液是含 0.05%吐温 20 的磷酸缓冲液(PBST)^[10]。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自 Sigma 公司,可拆卸式 96 孔酶标板购自 Nunc 公司。

1.3 样品提取液的准备

称取 0.05g 经冷冻干燥(-50°C , 12h)和粉碎后的马铃薯叶片(包括发病的和健康的),加入 2mL 样品提取液(含 2% polyvinylpyrrolidone(PVP)的 PBS 溶液, pH7.4),在 4°C 条件下振荡 5min,离心后取上清液备用(4°C , 8000r/min, 10min)。

1.4 酶标板上 DAS-ELISA

常规的 DAS-ELISA 参照蒋成淦^[10]的记载。包被抗体、检测抗体和酶标抗体在工作稀释倍数比为 2:1:1;反应试剂的用量为 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 。在酶标板上加

入适宜浓度的包被抗体, 4°C 过夜,倒去上清液, PBST 冲洗 3 次(3min/次);用 2% BSA 在 37°C 封闭 1h, 冲洗同上;加入待检样品和阴性质控样品提取液及空白对照, 37°C 温育 1h, 冲洗同上;加入适宜稀释的检测抗体和酶标抗体混合液, 37°C 温育 1h, 冲洗同上;加入显色底物 P-硝基苯磷酸酯(PNPP, $1\text{mg}/\text{mL}$), 室温避光反应 20min ~ 30min。最后用酶标仪(Sunrise, Tecan, 奥地利)在 405nm 波长下读取吸光度值(OD)。

1.5 NC 膜免疫斑点 ELISA(Dot-ELISA)

供试的 NC 条首先在 PBST 中漂洗 30min, 晾干后备用。在 NC 条上的 DAS-ELISA 操作步骤基本同 1.4, 所不同的是反应试剂用量为 $1\mu\text{L}/\text{NC}$ 片, 显色底物为 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸/氮蓝四唑(BCIP/NBT, 1:2 V/V), 结果的判断是直接观察 NC 膜上的颜色, 与阴性质控样品和空白对照(不显色)对比明显着色者为阳性。

2 结果与分析

2.1 酶标板上 PVA 的检测

由图 1 可见, 在两种不同抗体稀释组合下, PVA 侵染叶片的 OD 值均显著高于健康组织(阴性对照)的 OD 值约 3 倍, 一般 2 倍即可判定为阳性, 且两种抗体浓度间的 OD 值没有明显差异。

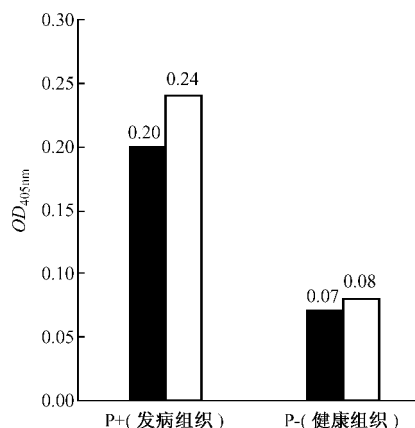


图 1 酶标板上马铃薯侵染叶片中 PVA 的 DAS-ELISA 检测

注: 黑柱 包被抗体 200 倍稀释/检测抗体 100 倍稀释, 白柱 包被抗体 100 倍稀释/检测抗体 50 倍稀释

2.2 在两种 NC 条上及不同抗体浓度下 PVA 的检测

图 2 左侧 2 条为 NC 条-1, 右侧 2 条为 NC 条-2。无论是侵染样品还是未侵染样品(从上至下: P-, P+, P-, P+), 在 NC 条-1 上均能检测到明显的阳性反应, 而在 NC 条-2 上则无明显的阳性反应。从图 2 可以看出, 在 NC 条-1 上, 无论是侵染样品还是未侵染样品, 在两种不同抗体浓度下, 均能检测到明显的阳性反应, 而在 NC 条-2 上则无明显的阳性反应。

+ ,P- ,P+ ,P- ,P+ ,P- ,P+) ,NC 条-2 的颜色均比在 NC 条-1 上的均匀和清晰且反应点之间没有交叉扩散现象。从 NC 条-2 上侵染样品 P+ 的检测结果来看 ,高浓度抗体下(20X ,50X)的反应颜色比低浓度(100X ,200X)的深 ,显示出一定的定量检测的趋势。健康组织 P-的结果发现高浓度抗体下的底色亦较深。所以 ,100 和 200 倍抗体稀释是适宜马铃薯 A 病毒的 dot-ELISA 的工作浓度 ,与酶标板 ELISA 检测趋势一致。

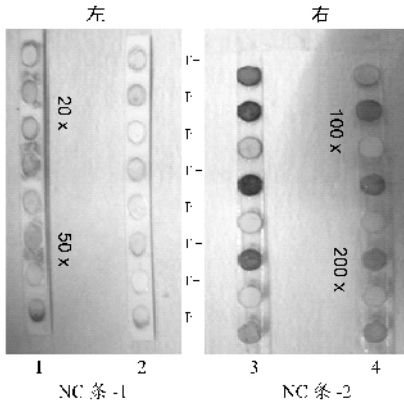


图2 两种 NC 条和四种不同抗体使用浓度下 PVA 的检测

注 :P+ :侵染样品 ,P- :健康组织 样品的排列顺序从上至下 P- 和 P+ 交互排列 条 1 和条 3 为 20 倍和 50 倍的包被抗体稀释 ,条 2 和条 4 为 100 倍和 200 倍的包被抗体稀释 ,每一浓度设 4 个 NC 片、重复 2 次

2.3 在 NC 条-2 上 PVA 的检测实验

在捕获抗体 200X/检测抗体 100X 的稀释浓度下 PVA 病毒的重复性 dot-ELISA 检测实验(图 3)结果表明 NC 条-2 可稳定用于 PVA 的 ELISA 定性检测。

3 讨论

斑点酶联吸附实验(dot-ELISA)由于试剂用量少、操作简便、费用低、结果直观等优点 ,已在许多病原菌的检测中得到应用^[3-5]。本研究采用不同加工成形的 NC 膜进行 dot-ELISA 检测 PVA 研究 ,实验结果更显示出 dot-ELISA 检测的优越性 ,可广泛用于 PVA 的定性检测 ,为进一步开展微流控-斑点免疫芯片检测研究奠定基础。

目前利用 dot-ELISA 进行样品的准确定量还很困难 ,而半定量是有可能实现的 ,本研究结果(图 2)显示出 dot-ELISA 半定量检测的可能性。观察还发现抗体浓度过高(如 20 倍稀释) ,对照的底色明显加

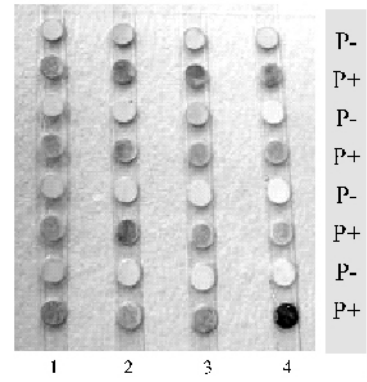


图3 在 NC 条-2 上马铃薯 A 病毒 DAS-ELISA 检测结果

注 :P+ :侵染样品 ,P- :健康组织 ;NC 条上样品的排列顺序同图 2 ;包被抗体 200 倍/检测抗体 100 倍稀释

重 ,所以半定量检测也应有一定的浓度范围内。

通常情况下 dot-ELISA 是在人为剪成的 NC 膜上用画线标记出点样点^[7-10]。这易造成如‘标记线’在冲洗中变模糊、滴液不准确、反应点扩散等现象 ,给实验操作和观察带来不便。本研究中采用激光切割和微加工技术 ,比手工操作规范且省材料。虽然加工和制作难度较大 ,但是显色均匀、清晰 ,而且不发生交叉反应现象。所以 ,不同加工成形的 NC 条可显著影响 dot-ELISA 检测实验。

在不同检测点上同一样品的 NC 片显色程度有时表现出较大差异(图 3) ,原因可能是操作中的人为误差或者 NC 条在加工过程中可能受到损坏 ,所以在实际检测中每个样品重复 2~3 个 dot 是必要的 ,且要进一步规范和标准 NC 条的加工制作。

参考文献

- [1] 李明福. 植物检疫, 1997, 11(5): 261~264.
- [2] Rajamäki M, Merits A, Rabenstein F *et al.* Phytopathology, 1998, 88(4): 311~321.
- [3] 胡琼. 马铃薯 A 病毒病及其防治. 现代农业科技, 2005, 40(21): 21.
- [4] 刘洪义, 张洪祥, 李明福, 等. 东北农业大学学报, 2006, 37(3): 307~310.
- [5] 崔荣昌. 植物保护学报, 1989, 16(3): 193~196.
- [6] XU H, Nee J. Phytopathology 2006, 96: S126.
- [7] Rahman H. Indian Journal of Medical Research, 1999, 110(1): 47~49.
- [8] 赵荣乐, 郑光宇. 北京师范大学学报, 2004, 40(4): 513~516.
- [9] 李燕宏, 吴建祥, 洪健, 等. 微生物学通报, 2006, 33(2): 25~29.