

用放射免疫吸附测定法检测大麦

黄矮病毒及雀麦花叶病毒

DETECTION OF BYDV AND BMV BY RADIOIMMUNOSORBENT ASSAY

魏宁生

李毅

张慧

(植保系)

(中心实验室)

Wei Ningsheng

Li Yi

Zhang Hui

(Dept. of Plant Protection)

(Centre laboratory)

关键词: 大麦黄矮病毒; 雀麦花叶病毒; 放射免疫吸附测定法**Key words:** barley yellow dwarf virus; brome mosaic virus; radioimmunosorbent assay

放射免疫吸附测定法 (Radioimmunosorbent assay RISA) 是一种灵敏、快速检测植物病毒的方法, 它的灵敏度高于酶联免疫吸附法 (Enzyme-Linked immunosorbent assay ELISA)。作者应用 ^{125}I 分别标记雀麦花叶病毒 (Brome Mosaic Virus BMV) 和大麦黄矮病毒 (Barley Yellow Dwarf Virus BYDV) 免疫 γ -球蛋白, 进行了病毒检测, 取得了较为满意的结果, 这为进行蚜虫带毒率的测定和病害流行测报打下基础。

1 材料和方法

1.1 病毒提纯

将大麦黄矮病毒混合株系接种于三叶期的岸黑燕麦 (*Avena byzantina*) 上, 在 $20\sim 25^\circ\text{C}$ 的防虫温室内培养 $3\sim 4$ 个星期。提纯方法基本采用 Cleora J. 等人^[3]的程序。雀麦花叶病毒 E 株系接种于三叶期大麦 (*Hordeum vulgare*) 上, 于 $20\sim 25^\circ\text{C}$ 下培养 2 个星期, 提纯方法基本采用魏宁生等^[1]聚乙二醇沉淀法。

1.2 ELISA 程序

(1) 抗血清的制备及 γ -球蛋白的提取: BYDV 和 BMV 抗血清的制备是分别通过三次肌肉注射和一次静脉注射兔子后获得的。琼脂双扩散试验表明, 其效价分别为 BMV 1:256, BYDV 1:32。BYDV 和 BMV 免疫 γ -球蛋白的提取是通过饱和硫酸铵沉淀后加以透析, 再通过 DEAE (或 Whatman DE₃₂) 纤维素柱纯化后获得的。

(2) γ -球蛋白的标记: 供标记用 γ -球蛋白的浓度分别为 BYDV 0.5mg/ml 及 BMV 3.3mg/ml 。 γ -蛋白经成二醛氧化后用碱性磷酸盐酶 (西德 Boehringer Mannheim, order—No. 567752) 标记、后在 PBS 缓冲液中透析 24h 除掉残余的成二醛, 加入少许牛血清白蛋白及微量 25% 叠氮化钠于 4°C 下保存备用。

本文于 1988 年 12 月 14 日收到

(3) ELISA测定程序：采用clark等双抗体夹心法^[1]。整个测定是在聚苯乙烯微量试验板上(10×10)进行，具体程序从略。

1.3 RISA 程序

(1) r-球蛋白的标记：标记抗体的制备基本采用Hunter和Greenwood^[5]所述氯胺T法。即各取50μl BYDV和BMV的r-球蛋白置于小安培瓶内，用1mCi Na¹²⁵I标记，同时加入新鲜配制的10%氯胺T溶液氧化。反应后随即应用偏重亚硫酸钠终止反应。再通过Sephadex G-50分析柱除去游离碘。分离标记的r-球蛋白用PBS-PVP-BSA缓冲液稀释后备用。

(2) 测定程序：采用双抗体夹心法，与ELISA不同之处是RISA用Na¹²⁵I标记r-球蛋白代替前者的酶标r-球蛋白。经Na¹²⁵I标记后于4℃下培养24h，用洗涤缓冲液冲洗3次，再用转移缓冲液转至聚苯乙烯塑料管中。最后在r-放射免疫计数器上测定。

1.4 缓冲液

(1) 包被缓冲液：0.05M碳酸钠缓冲液(pH9.6)含0.02%叠氮化钠。

(2) 样品缓冲液：0.02M磷酸盐生理盐水缓冲液(PBS)含0.05%Tween20和0.02%叠氮化钠。

(3) 基物缓冲液：10%二乙醇胺用盐酸调pH至9.8。

(4) 冲洗缓冲液：0.02M PBS并含0.02%Tween20。

(5) 磷酸盐生理盐水缓冲液(PBS)：0.02M磷酸盐加0.15M NaCl(pH7.4)。

(6) 转移缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液(pH2.3)。

(7) PBS-PVP-BSA 缓冲液：0.02MPBS含0.02%叠氮化钠，0.05%Tween20，20%PVP，0.2%BSA。

2 试验结果

2.1 Na¹²⁵I 标记r-球蛋白的测定

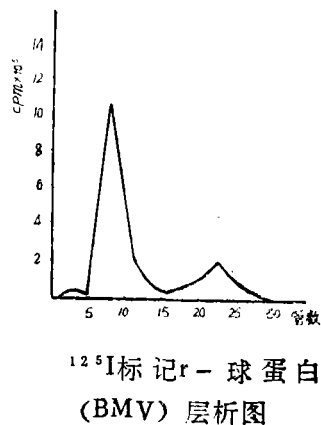
Na¹²⁵I标记的BYDV和BMV r-球蛋白经Sephadex G-50柱后，分管收集，每管约1ml，共收集26管。经r-放射免疫计数器测定后，以管数为横坐标，以计数率为纵坐标，绘出峰位(见下图)，由此可得两个放射峰，第一峰在6~12管之间为碘化蛋白，第二峰在21~24管之间为游离碘峰。将第一峰各管合并于0℃下保存备用，并计算¹²⁵I利用率^[2]。

$$^{125}\text{I利用率} = \frac{\text{蛋白质峰放射性}}{\text{Na}^{125}\text{I总投入放射性}}$$

结果表明，碘利用率可达69.2%。

2.2 RISA和ELISA测定BYDV和BMV的结果

分别用BYDV和BMV提纯病毒以及BYDV病株和带毒二岔蚜虫提取液，经系列稀释后进行测定。结果表明，ELISA检测BYDV和BMV提纯病毒可检测到的最低浓度分别为1μg/ml和100ng/ml，而RISA则分别达到100



ng/ml和10ng/ml。BYDV病株提取液(1g病叶加5ml PBS-PVP-BSA缓冲液匀浆)可分别稀释到 10^{-3} (RISA) 及 10^{-2} (ELISA); 而带毒蚜虫(50头二岔蚜加 1ml PBS-PVP-BSA缓冲液匀浆) 则分别可稀释至 10^{-3} (RISA) 及 10^{-2} (ELISA)。结果详见下表。

RISA和ELISA的测定结果

病毒名称	样 品	稀 释 倍 数	RISA ¹²⁵ I (cpm/μl)	ELISA	
				观察 (1)	A ₄₀₅ (2)
BYDV	提纯病毒 (1mg/ml)	10^{-2}	9677	+	0.78
		10^{-3}	6153	+	0.71
		10^{-4}	4959	+	0.65
		10^{-5}	4837	+	0.59
		10^{-6}	2802	+	0.52
		10^{-7}	1747	-	0.08
	病叶提取液 (3)	10^{-8}	292	-	0.09
		原液	3709	+	0.76
		10^{-1}	3340	+	0.67
		10^{-2}	2897	+	0.38
		10^{-3}	1317	-	0.05
		10^{-4}	302	-	0.03
	饲毒蚜虫提取液 (4)	原液	4201	+	0.76
		10^{-1}	2880	+	0.68
		10^{-2}	1742	+	0.63
		10^{-3}	1278	-	0.12
		10^{-4}	315	-	0.09
		无毒蚜	302	-	0.06
BMV	提纯病毒 (1mg/ml)	10^{-2}	25606	+	0.81
		10^{-3}	20960	+	0.74
		10^{-4}	14860	+	0.62
		10^{-5}	5639	+	0.57
		10^{-6}	4008	+	0.50
		10^{-7}	2186	+	0.42
		10^{-8}	1226	-	0.11
		10^{-9}	283	-	0.07
		对照	276	-	0.09

(1) + 示清晰可见的黄色反应, - 示无黄色出现;

(2) 在ELISA酶标仪(波长405nm)上测得的吸收值;

(3) 1g病叶加5ml PBS-PVP-BSA缓冲液匀浆为原液

(4) 50头蚜虫加1ml PBS-PVP-BSA缓冲液匀浆为原液。

3 讨 论

Ghabrial S A等^[6]报道,应用¹²⁵I标记花椰菜花叶病毒(CaMV)和莴苣花叶病毒(LMV)免疫γ-球蛋白,可检测到的最低浓度分别为5ng/ml和2ng/ml。对某些

病毒可检测到的浓度则更低，低于 $1\text{ng}/\text{ml}$ 。作者应用 ^{125}I 分别标记BYDV和BMVr-球蛋白，经测定后可检测到的最低浓度分别为 $100\text{ng}/\text{ml}$ 和 $10\text{ng}/\text{ml}$ ，高于ELISA的测定结果 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $100\text{ng}/\text{ml}$ 。RISA测定中的灵敏度主要取决于三个因素：首先是病毒抗原性的强弱；其次是抗血清的效价、纯度和r-球蛋白的纯度和浓度；第三是标记的r-球蛋白的放射性比活度。由于BYDV在寄主组织中的含量低，提纯后病毒的浓度也低，所以难于获得高效价的抗血清，以致影响检测的灵敏度。

对单头蚜虫带毒情况的检测有待于在进一步提高RISA的检测灵敏度和摸索出完全释放并不损失蚜虫体液的程序后，方可尝试单头蚜虫带毒与否的测定。

RISA中用作标记的 ^{125}I ，其半衰期为60d，所以标记的r-球蛋白可保持6个星期左右而不明显地丧失其在测定中的灵敏度。再者，采用氯胺T法标记，不仅可获得高比度的碘化抗体而且 ^{125}I 利用率可达67.2%。

参 考 文 献

- 1 魏宁生等. 植病学报, 1984, 14 (2): 71—78
- 2 金子渔等. 病毒学集刊, 1987 (5): 89—95
- 3 Cleora J et al. Phytopathology 1983 (73): 755—759
- 4 Clark M F et al. J Gen Virology 1977 (34): 475—483
- 5 Greenwood F G et al. J Biochemical 1963 (89): 114—128
- 6 Ghabrial S A et al. J Gen Virol 1980 (48): 311—317