

[文章编号] 1000-2782(1999)04-0007-05

渭北烟区黄瓜花叶病毒酶联免疫检测方法

王海河, 高文臣, 魏宁生

(西北农业大学植物保护系, 陕西杨陵 712100)

[摘 要] 将采自渭北烟田的黄瓜花叶病毒 (CMV) 分离纯化后, 制备抗血清并建立了双抗体夹心式酶联免疫检测方法 (DAS-ELISA), 同时对其各项指标作了合理选择, 结果发现最适包被和酶标抗体的质量浓度均为 $0.625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 用此方法测定表明, 在渭北烟区越冬油菜是 CMV 的主要越冬寄主; CMV 侵染烟草所引起的花叶病约占 64.3%.

[关键词] 黄瓜花叶病毒; 烟草; 酶联免疫检测方法

[中图分类号] S435.72 **[文献标识码]** A

为了快速诊断和检测陕西渭北烟区黄瓜花叶病毒 (CMV) 的发生和流行状况, 建立了一套比较完善的 ELISA-CMV 检测系统, 并对 CMV 的越冬寄主和烟草的侵染率作了测定, 现报道如下.

1 材料与方 法

1.1 毒原的分离纯化

参见王海河等的方法^[1].

1.2 提纯病毒 CMV 的纯度鉴定

参照王海河、魏宁生等的方法^[1].

1.3 抗血清的制备

对兔子总共免疫注射 5 次, 每次 1.5 mg 病毒. 最后 1 次注射 28 d 后用微量沉淀法测定抗血清效价, 并进行心脏采血.

1.4 ELISA 的建立

1.4.1 免疫球蛋白 IgG 的提纯 参考张成良方法^[2].

1.4.2 酶标抗体制备 依照魏宁生等的方法, 用碱性磷酸盐酶 (Boehringer Mannheim, order-No. 567752) 标记纯化的 IgG.

1.4.3 DAS-ELISA 确定最适包被抗体和酶标抗体的质量浓度 双抗体夹心法参考 Gera 等^[3]的报道. 将未标记的 IgG (原质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 用包被缓冲液 ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ pH9.6) 分别稀释成 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 酶标抗体用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (含体积分数为 0.05% Tween-20, 体积分数为 2% PV P 和体积分数

[收稿日期] 1999-01-19

[基金项目] 陕西省科委资助项目

[作者简介] 王海河 (1970-), 男, 在读博士

为 0.5% BSA, pH7.4) 如上述方法稀释, 并以不同组合重复 3 次, 确定最适质量浓度。底物用磷酸对硝基苯反应测定其 $OD_{410\text{ nm}}$ 值。

1.4.4 DAS-ELISA 检测标准曲线的制作 将提纯的病毒稀释为 75, 17.9, 8.95, 4.5 及 2.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 包被抗体和酶标抗体质量浓度均为 0.625 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 $OD_{410\text{ nm}}$ 作曲线。

1.5 烟田烟草花叶病中黄瓜叶病所占比例的测定

用 ELISA 和鉴别寄主对永寿县马坊、蒿店二乡采集的 280 个烟草病叶样进行测定, 以明确 CMV 在烟田的危害程度。

1.6 越冬寄主 CMV 带毒率测定

将在渭北烟区马坊和蒿店两地冬前 (11 月 7 日), 春季 (4 月 23 日) 分别采集的常见越冬植物标样作双抗体夹心法测定, 确定 CMV 在这些地区的越冬寄主及其带毒数量。

2 试验结果

2.1 提纯病毒 CMV 的纯度鉴定

把提纯 CMV 稀释 50 倍, 经负染后在 JEM-100II 电镜下观察表明, 病毒粒子大小无明显差异。

直径约为 28 nm, 经 200~300 nm 紫外扫描证明为典型的核蛋白曲线, 吸收最高峰为 265.7 nm, 最低峰为 240.1 nm, A_{260}/A_{280} 为 1.58 (图 1)。

2.2 抗血清效价测定

微量沉淀试验表明, 抗血清效价为 1:1024。

2.3 ELISA 的建立

2.3.1 纯化 IgG 的质量浓度测定 经核酸蛋白紫外检测仪检测, 柱层析提纯的 IgG 在 280 nm 处的紫外吸收值为 2.532, 而 260 nm 处为 1.292。根据张成良的方法^[2]得出提纯 IgG 的质量浓度为 2.715 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.2 最适包被和酶标抗体质量浓度选择曲线

分别固定抗原 CMV 质量浓度为 3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶标抗体质量浓度为 3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 把 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的包被和酶标抗体 IgG 均分别稀释为 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 和 0.078 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 由 $OD_{410\text{ nm}}$ 的吸光值分别对 2 种抗体的不同质量浓度作图, 如图 2 所示; 由此曲线可以看出, 包被抗体和酶标抗体的最小质量浓度为 0.156 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而最适包被抗体均为 0.625 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 ELISA 检查标准曲线的制作 根据提纯的不同 CMV 质量浓度的 $OD_{410\text{ nm}}$ 值做出标准曲线, 如图 3 所示。这样就可以根据以后得到的 $OD_{410\text{ nm}}$ 值, 查知待测抗原中 CMV 的质量浓度。根据实测结果, 可以证明此方法的检测灵敏度达 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

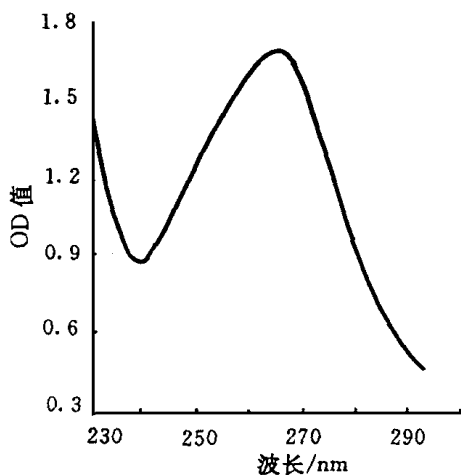


图 1 提纯 CMV 的紫外扫描曲线

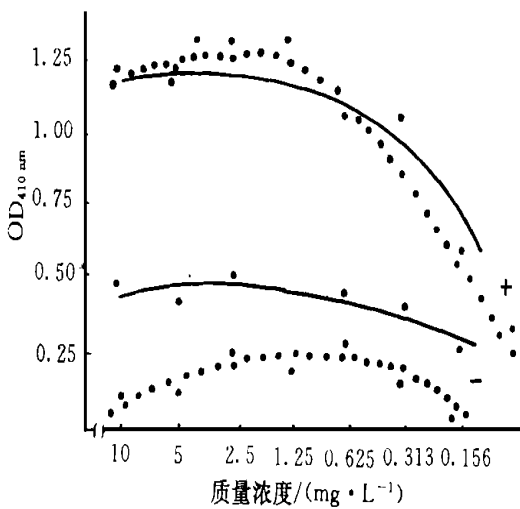


图 2 CMV-ELISA 最适包被和酶标抗体选择曲线
+ 提纯病毒样品; - 健康汁液
—— 包被抗体曲线; ····· 酶标抗体曲线

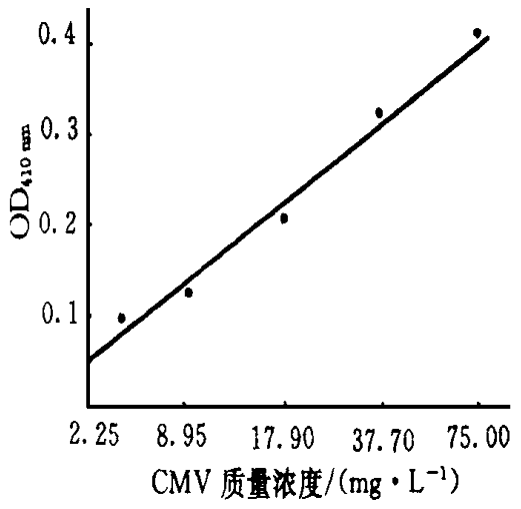


图 3 CMV-ELISA 的标准曲线

2.4 CMV 所引起的花叶病所占比例的测定

1996 年 8 月,对采自永寿县马坊、蒿店二乡烟田的 300 份花叶病标样进行 ELISA 和鉴别寄主测定。结果表明,所采 300 份病样中经过 ELISA 检测呈阳性反应的为 193 个,占总样数目的 64.3%。通过鉴别寄主测定 130 个病样结果表明,表现典型 CMV 症状的病样数目为 53 个,占所测总样的 40.7%,而表现 TMV 症状的病样数目为 31 个,占所测总病样的 23.8%,而剩余的 46 份病样均表现 CMV 和 TMV 的混杂症状,占总病样的 35.5%。

2.5 渭北烟区越冬寄主带毒率的 ELISA 检测结果

用 DAS-ELISA 对 1996 年 11 月 7 日和 1997 年 4 月 23 日采自蒿店和马坊两地的常见绿色越冬植物分别进行检测,结果参见文献 [1]。此外,越冬后油菜上的带毒桃蚜 (*Myzus persicae*) 经人工接种可将 CMV 传到烟草,也可再回接到油菜上,两者均表现出典型症状。同时,早春对大田烟田周围油菜上的桃蚜连续 2 年进行迁飞标记试验结果也证实,有近 1% 的标记蚜虫能迁飞至烟草植株上,而且其数量与两者间的距离成反比。

由 CMV 越冬寄主带毒检测结果和人工接种以及迁飞标记试验可以看出,在陕西渭北,CMV 主要在十字花科植物油菜和萝卜上越冬,而油菜为此地区冬季种植面积仅次于小麦的作物,而且 CMV 在油菜上的带毒率最高。由此说明 CMV 的带毒数量也很高,但萝卜留种苗的数量有限,不足以占主导地位。

3 分析与讨论

3.1 病毒的提纯

CMV 为球形病毒,直径为 28 nm 左右,因而在 PEG₆₀₀₀ 沉淀时质量浓度应适当增大,如 Walkey^[4] 和 Wilson 等^[5] 用 100 mg · L⁻¹ 的 PEG₆₀₀₀ 沉淀病毒粒子。因此在提纯过程中

首先采用 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG₆₀₀₀ 沉淀;却发现当 CMV 粒子沉淀时发生严重聚集,很难彻底悬浮,导致以后工作过程中 CMV 粒子的严重丢失。于是改变 PEG₆₀₀₀ 用量为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而得到的沉淀就较易悬浮起来了。在第 2 次 PEG₆₀₀₀ 沉淀过程中,又把 PEG₆₀₀₀ 用量降到 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,既达到浓缩 CMV 粒子浓度又除去小分子及有色物的良好效果。因此认为,在 CMV 提纯过程中,PEG₆₀₀₀ 的用量是关系到提纯成功与否的一个主要因素。

3.2 ELISA 检测

众所周知,在作 ELISA 检测时,微量板 4 周最外边的孔都不被应用,其原因是由于有边界效应。但是,什么原因造成这种边界效应,却未曾有过报道。作者曾猜测认为,这种边界效应可能是微孔板在 37°C 温育时受热不均匀所导致。于是作者又在未用的四边微孔中用清水每次填满,结果发现与四边孔未用水填满的微量板相比较,次外周孔的 $\text{OD}_{410 \text{ nm}}$ 值明显降低。因此笔者以为在做 ELISA 检测时,应在微孔板上 4 周不用孔中注入水等液体,使次外周微孔与内部微孔受热均匀,以尽可能消除边界效应。

3.3 CMV 的初侵染源

本研究表明,在陕西渭北侵染烟草的 CMV 主要来自油菜田块。当烟草移栽到大田后 20 d 左右(5 月下旬),适逢油菜田蚜虫(桃蚜为主)迁飞到烟田,造成烟田蚜虫群体增长的第 1 个高峰期;在 6 月上旬,桃园中的有翅蚜迁入烟田,造成第 2 个高峰期,此时田间 CMV 病害便大量发生,这与张满良和魏宁生^[6]的研究结果相似。秋季时,烟叶收获,大多数杂草枯萎,而冬油菜已播种,因此蚜虫从 CMV 其他寄主植物(如蔬菜、瓜类等)又迁飞到油菜田以若虫越冬或迁飞到桃园,然后在桃树上产卵越冬。当蚜虫迁飞到油菜上时,同时也携带了 CMV,并在油菜上得以安全越冬,为第二年的初侵染准备了条件。因此,在渭北冬油菜为烟蚜和 CMV 的最主要越冬寄主,在 CMV 流行中起重要作用。当然,CMV 还有其他越冬寄主,但都数量有限,不居重要位置。

3.4 烟草 CMV 病害的防治

本研究充分证明,CMV 明显比 TMV 的危害严重,为当地烟草花叶病的主要病原,并且油菜是烟草 CMV 的主要越冬寄主,构成第 2 年的初侵染源。因此,在作物合理布局原则下,烟区尽可能不种油菜或使烟田远离油菜和桃园,清除田间杂草,减少初侵染毒原数量。油菜田越冬蚜虫是构成烟田第 1 次蚜虫高峰期的主要虫源^[1],因而早春对油菜田蚜虫的防治就显得十分重要,它既可以减少 CMV 在油菜上的再侵染频率,又可减少 CMV 毒源量及其介体数量,对减轻烟田 CMV 的发病程度具有十分重要的意义。

[参考文献]

- [1] 王海河,魏宁生,高文臣.陕西渭北烟区黄瓜花叶病毒流行学的初步研究[J].西北农业大学学报,1999,27(3): 50 ~ 55.
- [2] 张成良.植物病毒血清学技术[M].北京:农业出版社,1987.
- [3] Gera A, Loebenstein G, Raccach B. Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by ELISA[J]. Virology, 1978, 86: 521~ 527.
- [4] Walkey D G A. Applied plant virology[M]. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1991.
- [5] Wilson A D, Halliwell R S. Characterization and field studies of a cucumber mosaic virus isolate from spinach in the winter garden area of Texas[J]. Plant Dis, 1985, 69: 751~ 754.

[6] 张满良,魏宁生.渭北烟区烟草蚀纹病毒和黄瓜花叶病毒侵染循环的研究[J].中国烟草学报,1992,1(1): 53~ 60.

The Establishment of ELISA for the Detection of Cucumber Mosaic Virus in Weibei Tobacco-Planting Area of Shaanxi Province

WANG Hai-he, GAO Wen-chen, WEI Ning-sheng

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The cucumber mosaic virus (CMV) was isolated from tobacco leaves from Weibei tobacco-planting area, multiplied in special hosts and purified. The purified virus was used to immunize rabbits to produce antiserum and established the DAS-ELISA detection system. The concentrations of coating and enzyme-labeled antibody were all $0.625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the standard detection curve was drawn. Using this ELISA detection system for the detection of CMV from tobacco plants and overwintering hosts, it were concluded that the tobacco mosaic disease induced by CMV was 64.3% and that rape was the most important primary inoculum source of CMV in this area.

Key words cucumber mosaic virus; tobacco; ELISA detection

《西北农业大学学报》荣获教育部优秀科技期刊一等奖

据教育部教技[1999]1号文件,1999年度全国优秀高校自然科学学报及教育部优秀科技期刊评比结果,《西北农业大学学报》荣获教育部优秀科技期刊一等奖。此次共评出获奖期刊200种,其中一等奖50种,二等奖80种,三等奖70种。全国农业高校有南京农业大学学报、华中农业大学学报、西北农业大学学报、湖南农业大学学报、浙江农业大学学报、河南农业大学学报、吉林农业大学学报等7种学报获一等奖。陕西省高校有西北大学学报(自然科学版)、西北农业大学学报和陕西师范大学学报(自然科学版)3种学报获一等奖。另外,陕西省荣获一等奖的期刊还有《中国有线电视》。

(申云霞 供稿)