

苹果褪绿叶斑病毒的 ELISA 检测技术研究

马书尚, 阮小凤, 杨 勇

S436.611.1

(西北农林科技大学果树研究所, 西安 710065)

[摘 要] 比较了直接双抗体夹心法(DAS-ELISA)和间接双抗体夹心法(F(ab)₂-ELISA)检测 CLSV 的范围(不同株系), 并分析了在病毒提取介质中加入某些特殊成分后, 对直接双抗体夹心法检测 CLSV 效果的影响。结果表明, 间接法可以检测较宽范围的病毒株系; 当常规病毒提取介质中加入尼古丁、氯化镁和聚酰胺时, 标准双抗体夹心法的检测范围也可以扩大。**苹果褪绿叶斑病毒, ELISA检测**

[关键词] CLSV; ELISA; 病毒提取介质

[中图分类号] S436.611.1 **[文献标识码]** A

苹果褪绿叶斑病毒(CLSV)是落叶果树是一种非常普遍的病毒, 感染苹果、梨、樱桃、桃、杏和李等多种果树^[1]。通常在仁果类果树上不表现明显症状, 呈潜隐性, 造成慢性危害, 而在核果类果树上则引起严重的病毒病害, 如桃深绿叶斑病、樱桃裂皮病、杏矮缩病、李果实坏死痘斑病等^[2~4]。国内外对这一病毒的苹果株系已经制备出相应的抗血清, 建立了 ELISA 检测方法^[2,3,5,6]。但由于该病毒寄主范围广, 株系及血清类型多, 且体外稳定性差^[1], 当用某种 ELISA 方法检测 CLSV 时, 有时对已知感染者, 却检测不出来, 或者是有些器官能检出, 有些器官检不出。在用标准双抗体夹心法(DSA-ELISA)对苹果、桃、樱桃和杏的 CLSV 感染情况进行调查时就出现了这种问题。当改变 ELISA 检测方法或在病毒提取缓冲液中增加某些成分时, 则可以扩大检测范围, 识别出更多的株系。为此, 从 1996~1997 年, 对 CLSV 的 ELISA 检测技术进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材 料

抗血清 DSA-ELISA 所用抗体和碱性磷酸盐酶标抗体为瑞士 BIOREBA AG 公司生产(是针对 CLSV 的 1 个苹果株系); F(ab)₂-ELISA 所用抗血清为英国东茂林国际园艺研究所 Adams 博士提供。

阳性对照 英国东茂林国际园艺研究所 Adams 博士提供的 CLSV 标准毒原, 保存于草本植物昆诺藜上。

阴性对照 CLSV 鉴定指示植物(R12740-7A)

被检 CLSV 寄主植物(株系) 苹果、桃、樱桃和杏, 为以前在病毒病的调查、检测中,

[收稿日期] 1999-06-28

[基金项目] UNDP 91/113 项目; 陕西省科技攻关项目(97K01-G8)

[作者简介] 马书尚(1957—), 男, 副研究员, 硕士

用指示植物鉴定法和 ELISA 检测法确认的 CLSV 田间感染植株。

1.2 方 法

采样 1996~1997 年,春季在花期同时采集花瓣和幼叶,从植株的各个方位采集 30 朵花的花瓣和 20 片幼叶,样品从田间采回后,每样品立即称取 5 份各 1 g,分别装入塑料研样袋,编号后保存于 -40℃ 低温冰箱,直至各树种采样结束后一同检测。

检测 DSA-ELISA 程序主要参照文献[2]进行,IgG 和碱性磷酸酯酶标记 IgG 的使用浓度均为 1:1 000;F(ab)₂-ELISA 中 F(ab)₂ 片断的制备及检测法均按 Barbara 和 Clark 所描述的方法^[7]进行,第 1 抗体 F(ab)₂ 的浓度为 1:1 000,第 2 抗体 IgG 的使用浓度为 1:2 000。样品处理和检测结果分析按文献[2]所描述的方法进行。

2 结果与分析

2.1 2 种 ELISA 检测法的检测结果

分别用标准双抗体夹心法和 F(ab)₂ 间接法对苹果、桃、樱桃及杏不同器官感染的 CLSV 进行了检测,结果见表 1。

表 1 2 种 ELISA 检测法的检测结果比较

寄主	器官	OD 值	
		双抗体夹心法(405 nm)	F(ab) ₂ 间接法(490 nm)
苹果	花瓣	2.81	1.75
	幼叶	0.11	0.15
桃	花瓣	2.02	1.94
	幼叶	1.05	1.27
樱桃	花瓣	—	—
	幼叶	1.14	1.14
杏	花瓣	0.04	—
	幼叶	0.03	1.07
阳性对照		2.56	2.09
阴性对照		0.03	0.02

注:每 1 树种的花瓣和叶片来自同一 CLSV 感染株;每 1 树种不同器官 2 年共检测 20 个样本,每样本重复 2 次。

从表 1 可以看出,用直接双抗体夹心法检测,在桃树上,被检组织为花瓣和幼叶时都表现出较强的阳性反应,OD 值分别为 2.02 和 1.05,检测效果良好;苹果上用花瓣检测时,阳性反应最为强烈,OD 值高达 2.81,而用幼叶检测效果不好,OD 值仅为 0.11;在樱桃上,用幼叶检测时阳性反应良好,OD 值为 1.14;杏上用花瓣和幼叶检测均没有明显的阳性反应,OD 值仅为 0.04 和 0.03,基本与阴性对照相同。说明用苹果的 1 个 CLSV 株系制备的抗血清,标准双抗体夹心法可以检出苹果、桃和樱桃上的 CLSV 株系,检不出杏上的株系。苹果上用花瓣检测效果最好,幼叶则不够理想,检测桃和樱桃时,用幼叶和花瓣都可得到满意的检测效果。F(ab)₂ 间接法,在苹果上,虽然以幼叶为被检样品时,检测效果仍不理想,OD 值仅为 0.15,但能够检出杏上的 CLSV 株系,OD 值达到 1.07,阳性反应明显。同时也检出了桃和樱桃上的株系,OD 值也较高。

2.2 病毒提取缓冲液中加入不同成分后的检测效果

用直接双抗体夹心法,在标准病毒提取缓冲液中加入某些成分,可使检测敏感性增

强,即检测范围扩大,结果见表2。

表2 不同成分病毒提取介质对 CLSV 检测效果的影响

寄主	器官	病毒提取介质			
		PBS-TPO	PBS-TPO,N	PBS-TPO, Mg,DD	PBS-TPO, Mg,DD,N
苹果	花瓣	1.81	1.65	1.68	1.72
	幼叶	0.11	1.54	0.15	1.83
桃	花瓣	2.02	2.01	2.05	2.65
	幼叶	1.05	2.04	1.98	2.22
樱桃	花瓣	—	—	—	—
	幼叶	1.14	1.65	1.71	1.83
杏	花瓣	0.04	—	—	—
	幼叶	0.03	1.07	1.21	1.59
阳性对照		2.56	2.47	2.64	2.46
阴性对照		0.03	0.02	0.03	0.03

注:结果为405 nm的OD平均值。N = Nicotine、尼古丁,0.25 g/L; Mg = MgCl₂, 1 g/L; DD = 3,3'-diaminodipropylamine, 聚酰胺,0.02 g/L。

从表2可以看出,在常规病毒提取介质(PBS-TPO)中只加入尼古丁,对苹果花瓣的检测效果没有明显影响,而苹果幼叶的OD值由0.11提高到1.54,杏幼叶的OD值由0.03提高到1.07,对桃和樱桃的检测虽有促进,但不显著。说明在PBS-TPO中加入尼古丁提高了苹果叶片的检测效果,同时对检测杏品种上的CLSV株系也特别有效;在加入Mg²⁺和聚酰胺(3,3'DD)2种附加成分时,苹果叶片检测的OD值仅从0.11提高到0.15,说明对检测苹果叶片的效果不明显,检测杏叶片的OD值由0.03提高到1.21,效果显著,同时加入尼古丁、MgCl₂及聚酰胺(3,3'DD)3种成分时,供试样品都得到满意的检测结果。由此可得出,对CLSV检测最适宜的病毒提取介质是PBS-TPO中加入尼古丁、Mg²⁺和3,3'DD。但在对桃的花瓣和幼叶、樱桃幼叶、苹果花瓣及草本寄主检测时,则不必加入上述物质,因为仅用基本病毒提取缓冲液即可得到满意的检测效果。

3 讨论

1)Barba等^[8]的研究表明,不同树种中分离的CLSV可能属于不同的血清型,即不同株系。本研究中F(ab)₂间接法比标准双抗体夹心法可以检测出更多的病毒株系,这与Barbara报道的结果一致^[6]。

2)ELISA检测效果与被检植物组织中的病毒含量密切相关,本研究在比较2种不同方法的检测效果时,所用抗原为同一样品,这就基本消除了病毒含量本身对检测效果的影响。

3)ELISA检测的成功与否也取决于病毒提取介质的性质和其对寄主植物及病毒本身的适应性。尼古丁为一抗氧化剂,可以中和干扰ELISA检测的单宁等氧化物质,因此,在检测含单宁较高的苹果和杏的叶片时,加入尼古丁,则得到比较满意的检测效果。

4)CLSV病毒粒子的体外稳定性较差^[1],在病毒提取过程中加入稳定剂Mg²⁺,增加了病毒的稳定性,也加强了病毒蛋白质与抗体蛋白质之间的相互反应;聚酰胺可以保护病毒的RNA,避免核酸降解酶的作用,因此,病毒提取介质中加入上述物质后检测效果明显。

加强。

〔参考文献〕

- [1] Maria Nemeth. Virus, mycoplasma and rickettsia disease of fruit tree[M]. Dordrecht, Boston, Lancaster, Budapest, Akademiai kiado, budapest and martinus nihiff publishers, 1956.
- [2] 阮小凤, 周媛月, 马书尚, 等. 桃病毒病调查与检测研究[J]. 西北农业学报, 1998, 7(3): 59~62.
- [3] 阮小凤, 杨 勇, 马书尚, 等. 甜樱桃病毒病的 ELISA 检测研究[J]. 山东农业大学学报, 1998, 29(3): 277~282.
- [4] Desvignes J C, Boye R. Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruit tree[J]. Acta Horticulturae, 1988, 235: 31~38.
- [5] 王小凤, 洪 宽, 刘福昌. 苹果褪绿叶斑病毒的分离提纯和酶联免疫吸附法检测[J]. 中国果树, 1990, (1): 52, 32.
- [6] 洪 宽, 王国平. 苹果褪绿叶斑病毒提纯及抗血清制备技术研究[J]. 中国果树, 1999, (1): 15~18.
- [7] Barbara D J, Clark M F. A simple indirect ELISA using F(ab')₂ fragments of immunoglobulin[J]. J Gen Virol, 1982, 58: 315~322.
- [8] Barba M, Clark M F. Detection of strains of chlorotic leafspot virus by F(ab)₂-based indirect ELISA[J]. Acta Horticulturae, 1986, 193: 297~340.

Study on the techniques of ELISA in the detection of different strains of apple chlorotic leaf spot virus

MA Shu-shang, RUAN Xiao-feng, YANG Yong

(Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry
Shaanxi Pomology Research Institute, Xi'an 710065, China)

Abstract: Two procedures, DSA-ELISA and F(ab)₂-ELISA were used to test CLSV in apple, peach, cherry and apricot and the testing effects were compared. The effect of different additives in virus extract medium on the testing effect of DSA-ELISA was also analyzed. The results showed that F(ab)₂-ELISA could detect more virus strains than DSA-ELISA, and that the testing effect of DSA-ELISA was improved when nicotine, MgCl₂ and 3, 3'-D were supplemented into virus extract medium of petals and leaves.

Key words: CLSV; ELISA; virus extract medium