

金黄色葡萄球菌协同凝集试验快速检测葡萄扇叶病毒

蔡文启 刘宏迪 黄德来 王荣 莽克强

(中国科学院微生物研究所,北京)

葡萄扇叶病毒(GFV)是葡萄病毒中广泛传播和危害最大的病毒之一。近年来盲目引种使葡萄园内 GFV 危害只增不减。利用茎尖组织培养或结合热处理是选育脱 GFV 葡萄组培苗的有效方法,但要确认到底有没有真正脱除 GFV 还需经过检测,目前应用酶联免疫吸附试验(ELISA)技术能可靠检测葡萄叶组织中的 GFV,国外和我们的工作均表明检出 GFV 的最低浓度为 10ng/ml。

本文报道一个新的试验方法即协同凝集试验。利用富含 A 蛋白的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 菌体上的 A 蛋白与特异抗体 IgG 分子的 Fc 段结合,使之菌体成为吸附抗体的载体,当与相应抗原接触时,抗原和抗体之间的特异性免疫反应互相连结而呈现凝集现象。

用高滴度的兔抗 GFV 血清标记金黄色葡萄球菌菌体。以 LN-33 (从美国引进脱 GFV 葡萄植株)葡萄叶组织的 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 粗提液为阴性对照, LN-33 健叶粗提液对提纯的 GFV 作系列稀释。标记菌体试剂与健叶粗提液在载玻片上等量(各 20 μ l)混匀后,只见到菌体本身的混浊状态,无细小凝集颗

粒可见。经重复验证, GFV 浓度仅为 4ng/ml 时,当与标记菌体试剂混匀后数分钟内,用肉眼仍可见到混浊菌液中有凝集的小颗粒出现,随着 GFV 浓度的增加,菌液呈透明状,肉眼易见到大颗粒。协同凝集试验检测植物病毒灵敏度很大程度上取决于抗血清的滴度。

用金黄色葡萄球菌 A 蛋白夹心酶联免疫法 (PAS-ELISA) 和协同凝集试验法,对感染 GFV 葡萄的叶组织及组培苗进行平行测试(同一叶片均一分为二), PAS-ELISA 测定中 A_{490nm} 高者,其凝集试验中凝集颗粒也大。我们认为金黄色葡萄球菌协同凝集试验法能与 ELISA 相媲美,它不需要特殊试剂和仪器,更为快速、简便,更适合于基层大规模样品检测。

该方法自 Kronvall 在 1973 年用于肺炎球菌分型以来,已广泛应用于细菌、动物病毒和寄生虫的诊断。用于植物病毒检测仅见到 Chirkov 在 1981 年和 1984 年的报道,但他们检测提纯病毒的最低浓度只是 100—400ng/ml。协同凝集试验在葡萄上对 GFV 的检测也未见国外和国内的报道。该方法在转基因植株初筛及子代选择上相信也会有其广泛应用的可能。