

单抗免疫斑点法和组织印迹法 检测侵染蝴蝶兰的建兰花叶病毒

董晓辉¹ 孟春梅¹ 黎军英¹ 吴建祥¹ 荣松² 张超² 洪健^{1*}

(1. 浙江大学生物技术研究所 浙江 杭州 310029)

(2. 浙江传化生物技术有限公司 浙江 杭州 311231)

摘要: 应用抗建兰花叶病毒(CymMV)的单克隆抗体,建立了快速检测蝴蝶兰病样的免疫斑点法(Dot-ELISA)和组织印迹法(Tissue blot-ELISA)。CymMV 单抗稀释 8000 倍时, Dot-ELISA 可检出病毒粗汁液的最大稀释度为 1:10240; Tissue blot-ELISA 中样品 1 次平切后 1~5 次印迹与 Dot-ELISA 样品 1:80 稀释结果相当, 6~8 次印迹与 Dot-ELISA 1:320 稀释结果相当, 前 8 次印迹均可以得到满意的检测效果。Tissue blot-ELISA 的灵敏度略低于 Dot-ELISA, 使用单抗的结果比多抗特异性强, 操作更为简便, 适合大量兰花样品的快速检测。

关键词: 建兰花叶病毒, 免疫斑点法, 组织印迹法, 单克隆抗体

Detection of CymMV in Orchids Tissue by Dot-ELISA and Tissue Blot-ELISA with Monoclonal Antibody

DONG Xiao-Hui¹ MENG Chun-Mei¹ LI Jun-Ying¹ WU Jian-Xiang¹
RONG Song² ZHANG Chao² HONG Jian^{1*}

(1. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

(2. Zhejiang Chuanhua Biological Technology Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 311231, China)

Abstract: Dot-ELISA and tissue blot-ELISA with monoclonal antibody to detect *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) were established. 8000-dilution CymMV monoclonal antibody could be adopted to detect CymMV infecting leaf extract within a dilution limitation of 1:10240. CymMV could still be detected in the eighth print by tissue blot-ELISA. Similar results were shown between the fifth print by tissue blot-ELISA and 80-dilution of infected leaf extract by dot-ELISA. Comparison tests showed that the commonly used tissue blot-ELISA was less sensitive than dot-ELISA. It could illustrate that CymMV monoclonal antibody was more specific and sensitive than the polyclonal antibodies. The improved tissue blot-ELISA is more simple than dot-ELISA, and is suitable for fast detection with a large number of samples in the field.

Keywords: *Cymbidium mosaic virus*, Monoclonal antibody, Dot-ELISA, Tissue blot-ELISA

建兰花叶病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, 毒属(*Potexvirus*), 线形病毒粒子长 475 nm~490 nm、直径 13 nm, 是侵染兰科植物的重要病毒病原^[1-3], 主 CymMV) 隶属线形病毒科(*Flexiviridae*)、马铃薯 X 病

基金项目: 杭州市重大科技创新专项(No. 20080212A10); 浙江省科技厅分析测试科技计划项目(No. 2007F70014)

* 通讯作者: ✉: jhong@zju.edu.cn

收稿日期: 2009-03-13; 接受日期: 2009-05-12

要受侵染兰科植物有墨兰、文心兰、大花惠兰、石斛兰、蝴蝶兰、硬叶吊兰、卡特兰、秋兰和万代兰等。CymMV 单独侵染可在兰花上产生花叶或褐色斑, 与齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)复合感染导致植株矮化, 花出现褐色坏死线条等更为严重的症状, 大大降低兰花的商品价值^[4]。

目前, 国内外检测 CymMV 病株以及脱毒组培苗带毒检查主要采用酶联免疫吸附(ELISA)、电镜观察和 RT-PCR 分子检测^[5-8]。电镜观察需要大型精密仪器; RT-PCR 技术除了需要特殊仪器外, 还要提取 RNA, 不适用于大规模样品检测。ELISA 技术关键在高质量的抗体, 由于技术条件所限, 大多数兰花种植企业使用进口的多抗 DAS-ELISA 商品检测试剂盒, 成本昂贵, 影响了实际应用。为了满足日益增长的兰花病毒检测需求, 我们首次成功制备了 CymMV 的单克隆抗体, 并建立了间接抗原包被 ELISA 技术(ACP-ELISA)检测大量兰花样品^[9]。本文报道将单抗与免疫斑点法(Dot-ELISA)和组织印迹法(Tissue blot-ELISA)相结合快速检测 CymMV 的方法。

1 材料与方 法

1.1 检测对象

在浙江传化生物技术有限公司花卉栽培基地采集呈花叶、畸形等症状的蝴蝶兰病株以及无明显症状的植株, 经电镜负染色观察和 ACP-ELISA 检测确定为 CymMV 感染的叶片作阳性对照, 确定不带任何病毒的叶片为阴性对照。

1.2 抗体

CymMV 单克隆抗体由本实验室研制^[9], 工作浓度为 1:8000。CymMV 多抗由福建农林大学吴祖建教授惠赠, 工作浓度为 1:2000。

1.3 免疫斑点法(Dot-ELISA)

参照李燕宏等^[10]的方法。将硝酸纤维素膜(NCM)剪成适当大小, 用打孔器印出点样位置。样品粗提液用 PBST(PBS+0.05% Tween20)稀释 40 倍起, 取倍比稀释后各稀释度的粗提液 4 μ L 点在打孔器圆形印斑中央, 提纯病毒 1000 倍起倍比稀释依次点样, 室温自然干燥。PBST 清洗 3 min, 移入封闭液 (PBS+0.05% Tween 20, 5%脱脂奶粉), 水平摇床

轻微振荡 60 min, PBST 清洗 3 次, 每次 3 min~5 min。倾去清洗液, 加 8000 倍封闭液稀释的单抗或 2000 倍封闭液稀释的多抗, 水平摇床轻微振荡 60 min。洗涤同上。倾去洗液, 加 8000 倍封闭液稀释的碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG 或羊抗兔 IgG(Sigma 公司), 振荡 60 min。洗涤后加底物(10 mL 磷酸盐-柠檬酸缓冲液中加入 BCIP 33 μ L, NBT 66 μ L), 暗处反应 2 min~5 min 后双蒸水漂洗 3 次, 晾干后读取判断结果。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅, 阴性反应为“-”。

1.4 组织印迹法(Tissue blot-ELISA)

NCM 剪成适当大小, 用打孔器印出印迹位置, 铺垫在 3 层干净的吸水纸上。将叶片切成长条, 刀片迅速横切条状叶, 将横切面在 NCM 上压印一下。其余步骤同免疫斑点法。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅, 阴性反应为“-”。

1.5 电镜负染色观察

兰花病叶充分研磨至匀浆, 将有膜铜网膜面朝下蘸取粗汁液, 用滤纸吸掉余液。再用 2%的磷钨酸(pH 6.7)负染色。在日立 H-7650 透射电镜下观察 CymMV 线形粒子, 以“++++、+++、++、+”4 个等级表示视野中病毒粒子的多少。放大 25000 倍时视野中病毒粒子数 $n \geq 15$ 记为“++++”, $10 \leq n < 15$ 记为“+++”, $5 \leq n < 10$ 记为“++”, $1 \leq n < 5$ 记为“+”; 未观察到病毒粒子以“-”表示。

1.6 提纯病毒不同稀释度检测

将提纯的 CymMV 病毒(5 mg/mL)用 PBST 稀释, 1:1000~1:64000 倍比稀释后分别使用单抗和多抗作为一抗进行免疫斑点法检测。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅, 阴性反应为“-”。

1.7 病叶粗汁液不同稀释度检测

经电镜负染色观察和 ACP-ELISA 检测确定为 CymMV 单独侵染叶片用 PBST 将粗汁液稀释, 1:40~1:20840 倍比稀释后分别使用单抗和多抗作为一抗进行免疫斑点法检测。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅, 阴性反应为“-”。

1.8 病叶组织不同印迹次数检测

病叶一次平切后在 NCM 上多次印迹(第 1~12 次印迹), 使用单抗和多抗进行组织印迹法检测。以“++++、+++、++、+”4 个反应强度表示颜色深浅, 阴性反应为“-”。

2 结果

2.1 免疫斑点法和组织印迹法检测结果

使用 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 方法, 结合电镜观察对 6 个蝴蝶兰样品进行了检测, 其中 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 两种方法各设两个重复, 检测结果见表 1。Dot-ELISA 灵敏度高于 Tissue blot-ELISA 和电镜观察。Dot-ELISA 阳性反应呈紫色, 阴性反应无色。Tissue blot-ELISA 存在叶绿素干扰, 阳性反应呈紫色, 阴性反应呈绿色。蝴蝶兰病叶组织的粗汁液经电镜负染色观察, 存在着长 400 nm~500 nm 的线状病毒粒子, 形态符合 *Potexvirus* 病毒的特征。

2.2 CymMV 提纯病毒和病叶粗汁液不同稀释度检测结果

分别使用 CymMV 单抗和多抗作为一抗, 对提纯病毒和 CymMV 单独侵染的叶片进行免疫斑点法

检测, 比较两者的灵敏度。结果显示(表 2 和表 3), 多抗血清可检测出病毒最低稀释度为 1:16000, 单抗血清可检测病毒最低稀释度为 1:32000, 灵敏度比多抗血清高出一倍。对于病叶粗汁液, 单抗的反应结果总体颜色较多抗血清的深, 粗汁液稀释 1:10240 时仍可检出, 而多抗在 1:5120 可检出, 其后检测不出。阳性对照均呈紫色, 阴性对照无色。

2.3 组织一次平切后不同印迹次数检测结果

样品 1 次平切后直接进行多次印迹, 使用单抗结果 1~5 次印迹与 Dot-ELISA 倍比稀释至 1:80 的结果相当, 第 6~8 次印迹与 Dot-ELISA 1:320 稀释的结果相当, 第 9~12 次印迹与 Dot-ELISA 倍比稀释至 1:1280 的结果相当(表 4), 前 8 次印迹均可以得到满意的检测效果。阴性对照印迹后呈现水渍状绿色印斑。使用多抗印迹颜色较单抗要浅些, 且阴性对照印记 10 次都有非特异性反应, 效果较差。

表 1 免疫斑点法、组织印迹法和电镜观察法检测结果

Table 1 The result of Dot-ELISA, tissue blot-ELISA and electron microscopic observation

检测方法 Test methods	样品 1 Sample 1	样品 2 Sample 2	样品 3 Sample 3	样品 4 Sample 4	样品 5 Sample 5	样品 6 Sample 6
Dot-ELISA	+++	++	-	+	++++	+
Tissue blot-ELISA	+++	++	-	+	++++	+
	++	+	-	+	+++	-
EM	++	++	-	+	+++	+

表 2 提纯病毒不同稀释度免疫斑点法检测结果

Table 2 The result of Dot-ELISA under the different concentrations of the purified virus

一抗 First antibody	阴性对照 Negative control	阳性对照 Positive control	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000
Monoclonal antibody	-	++++	++++	+++	++	++	++	+	-
Polyclonal antibody	-	++++	++++	+++	++	++	+	-	-

表 3 病叶粗汁液不同稀释度免疫斑点法检测结果

Table 3 The result of Dot-ELISA under the different concentrations of the infected leaves

一抗 First antibody	阴性对照 Negative control	阳性对照 Positive control	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20840
Monoclonal antibody	-	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
Polyclonal antibody	-	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-

表 4 病叶不同印迹次数检测结果

Table 4 The result of Tissue blot-ELISA under different blots of infected leaves

一抗 First antibody	第 1 次 1st	第 2 次 2nd	第 3 次 3rd	第 4 次 4th	第 5 次 5th	第 6 次 6th	第 7 次 7th	第 8 次 8th	第 9 次 9th	第 10 次 10th	第 11 次 11th	第 12 次 12th
Monoclonal antibody	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	++	+
Polyclonal antibody	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+

3 讨论

免疫斑点法和组织印迹法快速检测植物病毒已有不少报道^[10-12], 但单克隆抗体结合免疫斑点法和组织印迹法仅见李燕宏等^[10]在百合无症病毒检测上的应用, 对 CymMV 检测尚未见报道。本试验在已建立的单抗 ACP-ELISA 基础上^[9], 应用研制的 CymMV 单抗建立了快速检测兰花样品的单抗 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 体系。与经典 ELISA 相比, Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 更为简便、快速, 对操作者的技术要求不高, 灵敏度能满足一般检测需要, 非常适合于兰花企业检测应用。由于单抗有较高的效价, 无论是对提纯病毒还是病叶检测结果都优于多抗。在这两种方法中以 NCM 代替酶联板, NCM 对蛋白有高亲和性, 清洗方便快捷, 使得检测灵敏度更高。两种方法操作简单, 整个过程可在 4 h 内完成, 大大提高了实用性。Tissue blot-ELISA 还省去了样品粗汁液研磨和稀释, 蝴蝶兰叶厚汁多, 印迹操作比较方便。与 Dot-ELISA 相比, Tissue blot-ELISA 更适合田间大量样品的快速检测。由于检测的是植物材料, Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 中选用的二抗标记酶以碱性磷酸酶较好, 若选用辣根过氧化物酶可能出现假阳性。

单抗 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 已有效地用于大批兰花的 CymMV 检测。在实际兰花栽培中 CymMV 与 ORSV 两种病毒复合侵染的现象非常普遍, 有时还会有其他病毒存在, 单抗的特异性保证了在多种病毒复合侵染时对病叶粗汁液中的 CymMV 检测灵敏、可靠, 不受其他病毒复合侵染的影响。我国兰花产业正处于蒸蒸日上的大好发展时期, 兰花的巨大经济效益正逐渐得以体现, 我们建立 CymMV 单抗 Dot-ELISA 和 Tissue blot-ELISA 快速检测法将为该病毒的快速诊断和脱毒种苗生产提

供技术支持。

参 考 文 献

- [1] Zettler FW, Ko NJ, Wisler GC. Viruses of orchids and their control. *Plant Disease*, 1990, **74**(9): 621-626.
- [2] 明艳林, 李梅, 郑国华. 建兰花叶病毒研究进展. *福建农业学报*, 2005, **20**(1): 30-33.
- [3] 李梅, 明艳林, 陈青, 等. 蝴蝶兰病毒病的病原鉴定. *福建农业科技*, 2001, **6**: 11-12.
- [4] 潘俊松, 刘志昕, 郑学勤. 建兰花叶病毒的分离、鉴定及检测研究. *热带作物学报*, 1997, **18**(1): 63-70.
- [5] 周国辉, 陈晓琴, 周洁浪, 等. 广东省兰花建兰花叶病毒分子鉴定及其外壳蛋白基因序列分析. *华中农业大学学报*, 2004, **23**(4): 381-384.
- [6] 刘志昕, 吴豪, 潘俊松, 等. 建兰花叶病毒运动蛋白基因克隆及序列分析. *中国病毒学*, 2001, **16**(1): 51-54.
- [7] Khentrya Y, Paradornuwata A, Tantiwivatb S, et al. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Dendrobium* spp. in Thailand. *Crop Protection*, 2006, **52**: 926-932.
- [8] Hsu HT, Vongsasitorn D, Lawson RH. An improved method for serological detection of *Cymbidium Mosaic Potexvirus* infection in orchids. *Phytopathology*, 1992, **82**: 491-495.
- [9] 孟春梅, 吴建祥, 谢礼, 等. 建兰花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用. *微生物学报*, 2007, **47**(5): 928-931.
- [10] 李燕宏, 吴建祥, 洪健, 等. 单抗斑点免疫法和组织印迹法检测百合无症病毒. *微生物学通报*, 2006, **33**(2): 25-29.
- [11] 张爱平. 组织直接印迹 ELISA 检测香石竹病毒. *上海农业学报*, 1999, **15**(2): 84-86.
- [12] 刘勇, 杨树军, 李飞天. 应用点免疫结合法和组织印迹法检测烟草组织中的 TMV 和 CMV. *烟草科技*, 2000, **12**: 42-44.