

检测香蕉花叶心腐病原 CMV 的 PAS-ELISA 方法的改进

黄孟群 廖志松

(广东东莞石龙大洲工业区德星公司 东莞 511721)

作为一种快速、敏感的免疫学方法,ELISA 已被广泛地用于植物病毒的研究与应用性检测方面^[1]。在实验室中用 PAS-ELISA 检测香蕉花叶心腐病原 CMV 已被证明是一种获得无 CMV 组培苗的有效手段。在香蕉无病毒组培苗工厂化大批量生产中,我们应用此法作为质量控制的手段之一,剔除病苗,保证产品不带 CMV,获得一定成效。但同时我们也发现,香蕉组织中含有引起非特异性吸附反应的物质对检测结果有较严重的干扰作用,致使测值不均匀地偏高,形成部分假阳性结果。这使淘汰率过高,严重妨碍了这一方法在大生产中的应用。而改良抗原提取能基本克服这种测值异常,不均匀偏高的现象。本文报道经改进的 PSA-ELISA 方法及其研究结果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

兔抗 CMV 血清及 CMV、TMV 纯病毒由中国科学院微生物研究所提供;冻干葡萄球菌 A 蛋白(PA)购于上海生物制品所;辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白(A-HRP)购于上海科欣生物技术研究所;40 孔酶标板上海产品;DG3022A 型酶联免疫检测仪由江苏国营华东电子管厂制造。

香蕉田间成株健叶和病叶、田间健吸芽和病吸芽;分别采于东莞市麻涌镇、沙田镇、石碣镇和增城市三江镇;香蕉第一代组培苗:来自本公司培植室,是从外观无 CMV 症状母株上采吸芽制成。吸芽取未展开心叶作样本,组培苗取芽体上部作样本。

1.2 方 法

1.2.1 PAS-ELISA 常规检测程序^[2],以 C 法表示。加样顺序为:PA-抗原-抗体-抗原-抗体-A-HRP-邻苯二胺-2mol/L H₂SO₄ 中止反应。实验具体步骤如下:每加一次样孵育后,均需用 0.02mol/L PB 洗板 3 次,每次浸泡 3min,浸泡后将缓冲液倒出甩净,将板中孔内液体拍干。蛋白 A (Protein A) 包埋:用 coating buffer (c. b.) 稀释 1mg/ml 的母液成为 1 μ g/ml 蛋白 A 包埋液。每孔加入 100 μ l 包埋液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 或冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜;抗体吸附:按抗血清上标明的的工作稀释度用 0.02mol/L PB 稀释抗血清,配成抗体吸附液。每孔加入 100 μ l 抗血清稀释液 37 $^{\circ}$ C/2h 或冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜;病毒吸附:每一检测号样本称取 300mg 心叶,置小研钵中加入 300 μ l 抗原提取液(磷酸盐缓冲液),充分磨碎后再加入 300 μ l 抗原提取液,混合均匀,倒入 1ml 的小离心管内,以转速 4 000r/min 离心 10~20min。缓冲液对照孔加 0.02mol/L PB,阴性对照孔加阴性样品上清液,然后加入不同样本的上清液,最后加阳性对照样品上清液,每孔 100 μ l 14 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C, 2h;重做第二次抗体吸附:辣根过氧化物酶标记的蛋白 A (A. HRP) 吸附:用 0.02mol/L PB 按标明的的工作稀释度稀释 A. HRP 母液(一般工作稀释度为 1:40),配成 A. HRP 吸附液。每孔加入 100 μ l A. HRP 吸附液,37 $^{\circ}$ C, 2~3h 或冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜;底物反应:称取 10mg 邻苯二胺,溶于 25ml 磷酸-柠檬酸缓冲液(for O. P. D.) 中,完全溶解后加入 37.5 μ l 30% H₂O₂,摇匀后每孔加 100 μ l;终止反应:加底物 13min 后加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,25 μ l/孔,在 490nm 处测定吸收值(OD)。

1.2.2 中断免疫反应链,以 C1 法表示。加样顺序为:PA-抗体-抗原-不含抗体的缓冲液-不含 A-HRP 的缓冲液-邻苯二胺-2mol/L H_2SO_4 中止反应。

·C 法的修饰法以 B 法表示。加样顺序同常规检测程序 C 法。修饰之处在于抗原提取液中加入亚硫酸盐。

·C1 法的修饰法以 B1 法表示。加样顺序同 C1 法。修饰之处在于抗原提取液中加入亚硫酸盐。

上述 4 种吸附反应处理控制在相同条件下进行。抗体-抗原吸附在 4℃ 条件下保温一夜完成,其余吸附过程均在 37℃ 条件下保温 2h 完成。各吸附步骤加样量均为 0.1ml/孔,底物反应在室温 (20~30℃) 下 10~13min 完成。可见 C1 和 B1 法中除病毒与其特异性抗体的反应和 A-HRP⁻ 被省略外,其它各步骤均与 B 法和 C 法相同,所以 C1 和 B1 可以认为是 C 和 B 的对照。

C、C1、B、B1 法所用的抗原均取自同一植株的同一叶片。提取抗原时,先将叶片沿中脉一分为二,分别用常规检测的抗原提取缓冲液和修饰法的抗原提取缓冲液磨样提取抗原。采用常规检测的抗原提取缓冲液制得的抗原供 C、C1 法使用,用修饰法的抗原提取缓冲液制得的抗原供 B、B1 法使用。

1.2.3 CMV 病毒曲线的制备:分别以 C 法抗原提取液和 B 法抗原提取液为稀释液,稀释 CMV 病毒,制得 C 法和 B 法病毒曲线各一条。为减少板孔差异对实验结果的影响每个稀释度作 5 个重复取平均值。

1.2.4 TMV 病毒曲线的制备:分别以 C 法抗原提取液和 B 法抗原提取液为稀释液,稀释 TMV 病毒,制得 C 法和 B 法病毒曲线各一条。为减少板孔差异对实验结果的影响每个稀释度作 5 个重复取平均值。

* 已有初步试验证明 C1 法和或不加 A-HRP 不影响反应

2 结果与分析

试验所用材料为大田成株叶片和吸芽及第一代组培苗这三类样本。采用 C 法和 B 法进行平行测定,并分别用 C1 法和 B1 法作无病毒因素空白对照。实验结果及分析分述如下:

2.1 C 法检测香蕉不同生长期样本的非特异性吸附反应

按 PAS-ELISA 的原理推论,C1 法应没有颜色反应。C1 法若有颜色反应则 OD 值的大小应表示检测过程中非特异性反应的强弱。

2.1.1 成株健、病叶:表 1 显示健叶 C 法平均 OD 值 ($\overline{C\ O\ D}$) 和 C1 法平均 OD 值 ($\overline{C1\ O\ D}$) 都很低, $\overline{C1\ O\ D}$ 值无一超过病叶 C 法检测阳性样本最低 OD 值 (即 0.29);病叶 $\overline{C\ O\ D}$ 很高、 $\overline{C1\ O\ D}$ 则相当低。上述数据表明 C 法检测叶片非特异性吸附反应很弱,均未达到实际检测中的阳性最低值,故对检测病毒基本不形成干扰,检测结果不会出现假阳性现象。C 法检测健叶和病叶 OD 值平均数显著性分析结果为差异显著。可见常规的 C 法可正确区分成株健、病叶。病叶 $\overline{C\ O\ D}$ / 健叶 $\overline{C\ O\ D}$ 为 16,这一比值在酶联免疫吸附测定中属比较合适的范围,因此上述结果是可靠的。

表 1 C 和 C1 法检测数据分析

样本名称	样本数	C 法平均 OD 值	C1 法平均 OD 值	C1 法 OD 值 $\geq 0.29^{**}$		C1 法 OD 值 $\geq 1.20^{***}$	
				样本数	%	样本数	%
田间健叶	15	0.075 ± 0.031	0.088 ± 0.040	0	0.0	0	0.0
田间病叶	34	1.200 ± 0.783	0.158 ± 0.118	6	17.6	0	0.0
田间健吸芽	14	0.895 ± 0.567	1.004 ± 0.613	12	85.7	6	42.9
田间病吸芽	40	0.966 ± 0.734	0.694 ± 0.710	24	60.0	7	17.5
第一代组培苗*	235	0.344 ± 0.380	0.336 ± 0.395	17	37.0	11	4.7

* 外观无 CMV 症状之母株吸芽所制组培苗。

** 0.29 为田间病叶组用 C 法测定时超过阳性判别标准的最低测值。阳性判别标准为以田间健叶组 C 法检测 O. D 值平均值的 2.1 倍即 $0.075 \times 2.1 = 0.16$ 。

*** 1.20 为田间病叶 C 法检测 O. D 值平均值。

2.1.2 健、病吸芽: 表 1 可见, 健吸芽 $\overline{C1OD}$ 与 $\overline{C1OD}$ 都很高。而且有 42.9% 样本的 $\overline{C1OD}$ 达到或超过病叶 $\overline{C1OD}$ (1.20), 有 85.7% 样本的 $\overline{C1OD}$ 值达到或超过 C 法检测病叶阳性样本最低 OD 值 (0.29)。病吸芽 $\overline{C1OD}$ 也较高, 而且有 17.5% 样本的 $\overline{C1OD}$ 值达到或超过病叶 $\overline{C1OD}$ (1.20), 60% 样本的 $\overline{C1OD}$ 值达到或超过 C 法检测病叶阳性样本最低 OD 值 (0.29), 这表明在健、病吸芽的检测中, 有很大一部分样本的非病毒因素所引起的测值 ($\overline{C1OD}$ 的 OD 值) 已达到阳性测值区足以干扰对本样本阳性的判别; C 法检测健吸芽与病吸芽 OD 值平均数显著性分析结果为差异不显著, 即 C 法检测不能准确区分出病吸芽和健吸芽, 上述结果表明常规的 C 法检测吸芽极可能存在很强的非特异性吸附反应, 这对检测病毒已形成严重干扰, 检测结果会出现严重的假阳性现象。

2.2 B 法检测不同生长期香蕉样品的非特异性吸附反应

按 PAS-ELISA 法原理推论, B1 法理应没有颜色反应。从表 2 可见, B1 法测定田间叶、田间吸芽和第一代组培苗等三类样品, 不论样品是健还是病, 与 C 法比较其 \overline{OD} 都很低, 没有一个样品的 OD 值能达到 B 法检测病叶 \overline{OD} 值 (1.19); 同时也没有一个健叶、健吸芽或组培苗的 OD 值能达到 B 法检测田间病叶样品的最低 OD 值 (0.17), 只有个别的病叶和病吸芽样品达到了这个最低值, 这一结果与上述从 ELISA 法原理推导 B1 法理应没有颜色的结论是一致的。从 B 法检测这三类检品的结果看也是符合客观实际的, 因为健叶、健吸芽的 \overline{OD} 值都很低, 而病叶和病吸芽 \overline{OD} 却很高, 两者可形成鲜明的对比。

表 2 B 和 B1 法检测数据分析

样本名称	样本数	B 法平均 OD 值	B1 法平均 OD 值	B1 法 OD 值 $\geq 0.17^{**}$		B1 法 OD 值 $\geq 1.19^{***}$	
				样本数	%	样本数	%
田间健叶	15	0.074 \pm 0.024	0.029 \pm 0.013	0	0.0	0	0.0
田间病叶	34	1.187 \pm 0.758	0.084 \pm 0.038	1	2.9	0	0.0
田间健吸芽	14	0.071 \pm 0.053	1.045 \pm 0.031	0	0.0	0	0.0
田间病吸芽	40	0.587 \pm 0.542	0.077 \pm 0.044	2	5.0	0	0.0
第一代组培苗*	235	0.088 \pm 0.040	0.056 \pm 0.032	0	0.0	0	0.0

* 外观无 CMV 症状之母株吸芽所制组培苗。

** 0.17 为田间病叶组用 B 法检测 OD 值的 2.1 倍 ($0.074 \times 2.1 = 0.16$) 为阳性判别标准, 在田间病叶组中, 超过此标准值的最低测值。

*** 1.19 为田间病叶 B 法检测 OD 值平均值。

健叶与病叶, 健吸芽与病吸芽之间的 B 法 OD 值平均值显著性检验结果均呈显著性的差异。病叶 \overline{BOD} /健叶 \overline{BOD} 为 16, 病吸芽 \overline{BOD} /健吸芽 \overline{BOD} 为 8, 这两个比值正位于 ELISA 法检测病健 OD 比的较合适范围内。综合表 2 和表 3, B 法检测结果可以认为在抗原提取液中加入亚硫酸盐可以大大消除原有 C 法的严重的非特异性吸附反应, 因此也就大大减少了检测病毒过程中假阳性的干扰作用。

比较田间病叶的 $\overline{C1OD}$ 和 $\overline{B1OD}$ 两者很接近, 而且 C 法的病叶与健叶的 \overline{OD} 比值与 B 法的比值几乎相等均为 16, 这充分说明 C 法检测田间病叶时非特异性吸附极微弱, 不足以形成干扰而引起病毒假阳性。与之形成鲜明对比的是田间病吸芽的 $\overline{C1OD}$ (0.996) 是 $\overline{B1OD}$ (0.567) 的 1.7 倍, C 法的病健比值为 1.07 而 B 法为 7.98, 这说明用 C 法检测田间吸芽时, 会产生明显的非特异性吸附, 引起干扰, 而 B 法则无此现象。

2.3 C 法、B 法检测第一代组培苗的非特异性吸附反应

通过 B、C 两法对大量病健叶或吸芽对比检测可以认为 B 法是可靠的。利用 B、C 法对 200 多个组培培养苗也进行了对比检测, 这些第一代组培苗是来自田间无心腐病和束顶病症的吸芽, 但带毒情况是未知的。从表 1、表 2 可见, 第一代组培苗 $\overline{C1OD}$ 和 $\overline{C1OD}$ 都比较高, 而 $\overline{B1OD}$ 和 $\overline{B1OD}$ 均较低, $\overline{C1OD}$

法中有 4.7% 的样品 OD 值达到或超过田间病叶 C 法 \overline{OD} (1.20); 有 37% 的样品达到或超过病叶样品 C 法的最低 OD 值 (0.29), 而 B 法中测值达到或超过田间病叶的 \overline{BOD} (1.19) 的百分数为 0; 达到或超过病叶样品 B 最低 OD 值 (0.17) 的百分数也为 0, 这充分说明了, C 法检测第一代组培苗非特异性吸附较强, 对检测病毒已造成较严重的干扰, 检测结果会出现一定机率的假阳性, 而 B 法则可以克服非特异性吸附较强, 对检测病毒已造成较严重的干扰, 检测结果会出现一定机率的假阳性, 而 B 法则可以克服非特异吸附所引起的干扰, 大大的减少了假阳性的存在。

2.4 C 法、B 法病毒曲线的制备

以 CMV 和 TMV 纯病毒用 C 法和 B 法抗原提取液为稀释液分别制备病毒曲线, 见图 1 和图 2。由这两对曲线可见, C 法和 B 法无论是个体测值, 还是灵敏度均无显著性差异。

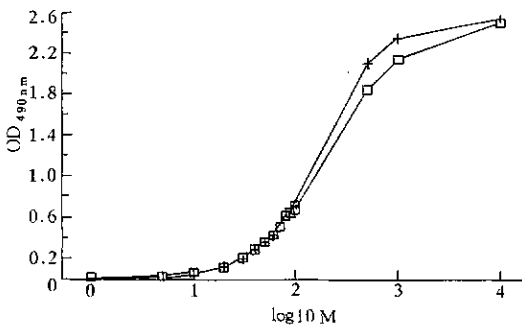


图 1 C 法和 B 法 CMV 病毒曲线

□: C 法, +: B 法曲线; M 病毒浓度/ng · ml⁻¹

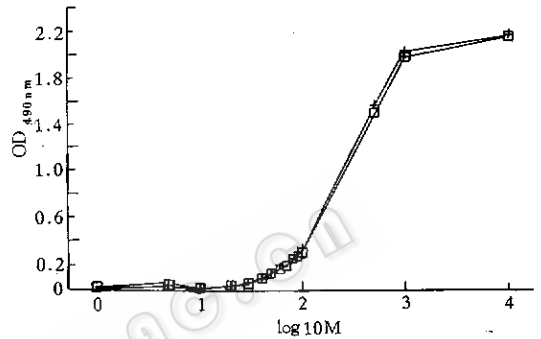


图 2 C 法和 B 法 TMV 病毒曲线

图例同图 1

3 结论与讨论

根据本文结果, 常规的 C 法检测香蕉花叶心腐病病原 CMV 只适用于成株叶片, 在检测吸芽样品时会出现严重的假阳性, 检测第一代组培苗样品时也出现一定比例的假阳性。这种假阳性现象显然是由植物体内含物中的某种非病毒性成分所造成的。该成份有可能是某种多酚氧化酶, 或某种过氧化物酶, 或单宁, 或是一些能与邻苯二胺发生氧化还原反应的小分子物质, 它们可使邻苯二胺发生显色反应。该物质在植物体内的含量或活性与香蕉的生长发育阶段有密切关系。吸芽苗和第一代组培苗均处于营养发育的初期阶段很可能这类物质含量大, 活性高而导致相当比例的假阳性。大田成株已处营养繁殖阶段后期花蕾期前夕, 这类物质含量、活性可能已显著降低。

C 法检测吸芽苗时会出现严重的假阳性, 这说明 C 法在检测病吸芽时其测值在一定程度上可表现出病毒的存在, 但由于病健吸芽的 \overline{COD} 接近, 在检测中仍难以分辨出准确的阳性样品。健吸芽的 $\overline{C1OD}$ 较病吸芽 $\overline{C1OD}$ 高 (1.004/0.694) 这种情况表面看来是不合理的, 这可能反应了病毒侵入吸芽后, 对吸芽体内的代谢过程的影响, 也可能是采样时病、健吸芽来自两地区, 从而存在品种、生长发育期、及生长势等的差异, 造成两个 $\overline{C1OD}$ 的差异。

C 法、B 法检测 CMV、TMV 的病毒曲线表明: C 法和 B 法抗原提取液对病毒检测过程本身并无显著影响, B 法修饰的作用主要表现在消除非特异性吸附上。

B 法检测香蕉花叶心腐病病原 CMV 适用于田间成株叶片, 田间吸芽等各不同生长时期的香蕉植株组织, 及组培苗, 抗原提取液的改良基本消除非特异性吸附反应, 克服了假阳性现象。至于亚硫酸盐何以能消除测定香蕉样品的假阳性颜色反应, 需要进一步阐明, 不过从亚硫酸盐具有较强的还原性, 和假阳性是由于香蕉提取液中含有某种可与邻苯二胺作用形成颜色反应这两个事实分析, 亚硫酸盐的作用机理很可能涉及阻断香蕉组织被破碎后形成的一系列氧化反应中的某一步。再者香蕉组织富含 3, 4-二羟基苯二胺这类多酚化合物, 亚硫酸盐还原作用是否与阻断这类多酚化合物的氧化有关, 有待进一步试验阐明。

致谢 本文所采用的 PAS-ELISA 常规方法是在中国科学院微生物研究所的蔡文启副教授指导下建立的。在整个实验过程中也时常得到蔡文启老师, 莽克强教授的指导。在文章修改过程中更得到莽克强教授的极大帮助, 在此特对这两位老师表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] Lomel S A, Mccain A H, Morris T J. *Phytopathology*, 1982, 72: 1018~1022.
[2] Zgula K R, Barbara D J, Fulbright D W *et al.* *Plant Disease*, 1990, 70: 974~978.

The Improvement of PAS-ELISA for Detection of CMV-free Germplasm in Larger Scale Micropropagation of Banana Plants

Huang Mengqun Liao Zhisong

(*Shilong Dexing (Agristar) Aseptic Cultured plant Co. Ltd, Donguan 511721*)

Abstract Owing to the application of a routine ELISA test for detection of CMV-free germplasm in larger scale production of the micropropagated banana plants, we found severe false positive interference which caused high rate of germplasm loss. A modified test was developed by addition of sulphite in the solution for preparation of antigen. Statistical data showed that serious interference occurred in the samples of the banana sucker and the first 1~2 generation of the micropropagated plantlet by using routine technique, and the false positive reaction were almost completely eliminated with the modified method. The dilution curve of purified CMV and TMV verified that there is no difference between the routine and modified methods in term of the sensitivity.

Key words Modified PAS-ELISA, banana, CMV-free germplasm