

大豆花叶病毒间接 ELISA 检测方法的建立及应用

李小宇, 张春雨, 张伟, 苏前富, 苏颖, 张金花, 李建平, 王永志*

(吉林省农业科学院/东北作物有害生物综合治理重点实验室/吉林省农业微生物重点实验室, 吉林 公主岭 136100)

摘要:为快速有效地检测大豆花叶病毒(Soybean Mosaic Virus, SMV),本研究利用已制备的大豆花叶病毒衣壳蛋白(Coat Protein, CP)及其单克隆抗体,通过优化 ELISA 各个影响因子,建立大豆花叶病毒间接 ELISA 检测方法。结果显示最佳检测条件为:检测材料抗原包被酶标板 37℃ 1 h,检测抗体工作浓度 125 ng/mL,孵育 60 min,酶标抗体工作浓度 100 ng/mL,孵育 30 min;SMV CP 蛋白最低检测限为 3.23 ng/mL;该方法重复性变异系数小于 3%,重复性良好;运用上述检测条件与 RT-PCR 检测方法对田间样品进行随机检测,结果显示一致率高达 94%。SMV 间接 ELISA 检测方法的成功建立,为 SMV 快速检测试剂盒及试纸条的研发奠定了基础。

关键词:大豆花叶病毒;间接 ELISA;检测

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)01-0022-06

Establishment and Application of Indirect ELISA of Mosaic Virus of Soybean

LI Xiaoyu, ZHANG Chunyu, ZHANG Wei, SU Qianfu, SU Ying, ZHANG Jinhua, LI Jianping, WANG Yongzhi*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences /Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast, Ministry of Agriculture /Jilin Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: In order to detect mosaic virus of soybean rapidly and effectively, we established indirect ELISA detection method by using prepared monoclonal antibody of soybean mosaic virus and optimizing the influence factors. The antigen was coated onto the microtiter plates at 37℃ for 1 h. The detection antibody at 125 ng/mL was incubated for 1 h. The enzyme labeled antibody at 100 ng/mL was incubated for 30 min. The detection sensitivity was 3.23 ng/mL for smv cp protein. The coefficient of variation of reproducibility was less than 3%. when the developed indirect ELISA method was compared with RT-PCR, the concordance rate was 94%. Establishment of indirect ELISA for soybean mosaic virus coat protein laid the foundation for development of detection kit and test strip.

Key words: Mosaic virus of soybean; Indirect ELISA; Detection

大豆花叶病毒(Soybean Mosaic Virus, SMV)是大豆的主要病害之一,在世界范围内均有发生^[1]。当 SMV 侵染大豆植株后,导致叶片退绿、花叶、皱缩,叶面积减小,严重影响光合作用。植株矮小,生物量下降,结荚数大量减少,是大豆减产的主要原因之一。SMV 会造成大豆籽粒带有褐斑,严重降低了大豆的商品质量。

SMV 基因组由单链正义 RNA 组成,编码的多聚蛋白自身分解为 10 个功能蛋白^[2-3],即 P1、HC-

Pro、P3、6K₁、CI、6K₂、NIa-Vpg、NIa-Pro、NIb 和 CP 蛋白。其中 CP 蛋白为衣壳蛋白,是基因组中的唯一结构蛋白,其功能为病毒的形成、症状表现和决定寄主范围等,也是 SMV 中研究最多的功能蛋白^[4-7]。

对 SMV 的检测主要采用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)方法,由于 SMV CP 段基因的保守性,检测引物一般设计在该区域。赵玖华等^[8]通过以 SMV CP 两端基因为引物,建立了 SMV 的 RT-PCR 检测方法。王杰等^[9]设计三对 SMV CP 基因引物,对大豆种子中的 SMV 进行了 RT-PCR 检测。沈建国等^[10]设计菜豆荚斑驳病毒衣壳蛋白基因和 SMV CP 基因引物,对进口菜豆、大豆建立了多重 RT-PCR 检测。

用 PCR 方法检测 SMV,成本高、操作条件苛刻,难以在基层推广。基于免疫学的酶联免疫吸

收稿日期: 2018-09-22

基金项目: 吉林省农业科技创新工程自由创新项目(CXGC2017ZY035);农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室开放基金课题(DB201505KF08)

作者简介: 李小宇(1981-),男,助理研究员,硕士,研究方向:分子病毒学与生物反应器研究。

通讯作者: 王永志,男,博士,副研究员, E-mail: yzwang@126.com

附实验(Enzymelinked Immunosorbent Assay, ELISA),建立的植物病毒检测方法,具有耗时短、操作简单、重复性好、灵敏度高等特点,适合于基层工作人员操作。本研究通过SMV CP蛋白及其单克隆抗体,建立SMV间接ELISA检测方法,为SMV提供了快速有效的检测方法,为SMV快速检测试剂盒及试纸条的开发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验材料

SMV CP蛋白及单克隆抗体由实验室制备保存^[11],兔源酶标抗体购自美国Sigma公司,1st strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒购自Takara公司。

1.1.2 仪器

PCR仪TC-5000(英国TECHNE)、酶标仪(美国BioTek)、高速冷冻离心机CR12RE(日本HITACHI)、洗板机EL×800(美国BioTek)。

1.2 试验方法

1.2.1 间接ELISA方法的建立

间接ELISA基本程序(每个酶标孔工作体积均为100 μ L):0.1 mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释SMV CP蛋白,包被96孔酶标板,每孔0.2 μ g,包被时间选择4 $^{\circ}$ C过夜,设空白对照、阳性对照和阴性对照,3次重复,磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution with Tween-20, PBST, pH 7.4)洗涤3遍;5%脱脂奶(ddH₂O溶解)37 $^{\circ}$ C封闭30 min, PBST缓冲液洗涤3遍;检测抗体工作浓度选择200 ng/mL, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBST缓冲液洗涤3遍;酶标抗体选择200 ng/mL, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBST缓冲液洗涤6遍,甩干孔内残留液体;邻苯二胺(O-phenylenediamine, OPD)避光显色,2 mol/L H₂SO₄溶液终止反应,酶标仪测定OD_{490nm}值。根据检测样品OD_{490nm}值/阴性OD_{490nm}值>2.0为阳性判定结果。

1.2.2 间接ELISA方法的优化

对实验室制备保存的9株SMV CP蛋白单克隆抗体:3B8、2A8、6E7、6B10、4G12、2D3、2C1、5D2和1C2进行间接ELISA基本程序检测,选择P/N最高值为检测抗体。优化检测抗体工作浓度,设置8个梯度:1 000 ng/mL、500 ng/mL、250 ng/mL、125 ng/mL、62.5 ng/mL、31.25 ng/mL、15.625 ng/mL和7.813 ng/mL,每个梯度3次重复,根据OD_{490nm}值出现明显下降趋势的拐点为检测抗体最佳工作浓度。优化酶标抗体工作浓度,设置7个梯度:200

ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、25 ng/mL、12.5 ng/mL、6.25 ng/mL和3.125 ng/mL,每个梯度3次重复,根据OD_{490nm}值出现明显下降趋势的拐点为酶标抗体最佳工作浓度。优化检测材料抗原包被时间,设置5个梯度:37 $^{\circ}$ C2 h后4 $^{\circ}$ C过夜、37 $^{\circ}$ C1 h后4 $^{\circ}$ C过夜、4 $^{\circ}$ C过夜、37 $^{\circ}$ C1 h和37 $^{\circ}$ C2 h,每个梯度3次重复,选择P/N最高值为抗原包被最佳时间。优化检测抗体和酶标抗体孵育时间,设置6个梯度:15 min、30 min、45 min、60 min、75 min和90 min,每个梯度3次重复,选择P/N最高值为检测抗体和酶标抗体最佳孵育时间。通过以上参数的优化,最终确定SMV间接ELISA最佳检测方法。

1.2.3 间接ELISA方法灵敏度

按间接ELISA最佳工作条件,包被连续稀释的SMV CP蛋白溶液,蛋白浓度分别为:1 000 ng/mL、100 ng/mL、10 ng/mL、1 ng/mL和0.1 ng/mL,每个浓度3次重复。对SMV CP浓度和P/N值进行回归分析,得出线性方程和标准曲线。根据方程计算出间接ELISA检测SMV CP蛋白的最低检测限。

1.2.4 重复性实验

板内重复实验:按间接ELISA最佳工作条件,检测8份SMV阳性材料,每份材料设置3个平行;取0.1 g阳性材料,液氮研磨,1 mL包被液溶解,12 000 r/min离心5 min,上清即为检测样品,每孔包被100 μ L,检测抗体和酶标抗体均加入100 μ L,根据检测的P/N值计算出板内标准差和变异系数。板间重复实验:根据检测的P/N值计算出检测样品的板间标准差和变异系数。

1.2.5 间接ELISA方法准确性(田间样品检测)

大豆田中随机采集大豆样品50份,分别使用本研究建立的间接ELISA方法和RT-PCR方法进行检测。

RT-PCR检测方法如下:根据GenBank登记的SMV序列,设计保守区引物,上游引物:AAATCACTAAGTTACCGTAC,下游引物:GCTGCAATTCACCACATTG。TRIzol法提取大豆组织总RNA,1st strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒合成体外第一条链,以此为模板,进行PCR扩增。反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性2 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,50 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,进行30个循环,再72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳,观察目的条带情况,PCR产物送吉林省库美生物科技有限公司进行测序验证。

2 结果与分析

2.1 间接ELISA检测方法的建立

根据OD_{490nm}值,以P值或P/N值确定各个工作参数。检测抗体的确定:如表1所示,当检测抗体为单克隆抗体4G12时,检测的P/N值最高,定为检测抗体。抗体工作浓度的确定:如图1、图2所示,当检测抗体125 ng/mL、酶标抗体100 ng/mL时,P值出现明显下降趋势的拐点,确定为抗体最

佳工作浓度。检测抗原包被时间的确定:如图3所示,当抗原包被时间为37℃1 h时,P/N值最高,确定为最佳抗原包被时间。抗体孵育时间的确定:如图4所示,当检测抗体孵育时间为60 min,酶标抗体孵育时间为30 min时,检测的P/N值最高,确定为最佳抗体孵育时间。根据以上结果,最终确定间接ELISA最佳工作条件。

表1 检测抗体的确定

	3B8	2A8	6E7	6B10	4G12	2D3	2C1	5D2	1C2
P	3.424±0.086	2.965±0.101	3.051±0.045	2.846±0.115	3.678±0.046	3.335±0.061	2.156±0.159	2.313±0.098	2.566±0.128
N	0.091±0.006	0.079±0.010	0.07±0.008	0.073±0.016	0.082±0.009	0.087±0.012	0.067±0.019	0.074±0.015	0.077±0.016
P/N	37.626	37.532	38.138	40.085	41.795	37.472	32.667	31.257	33.325

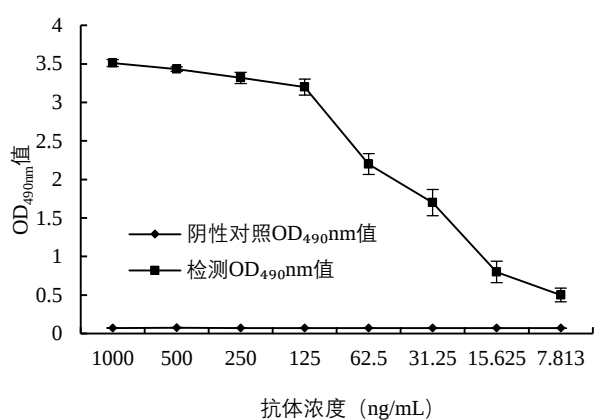


图1 检测抗体的最佳工作浓度

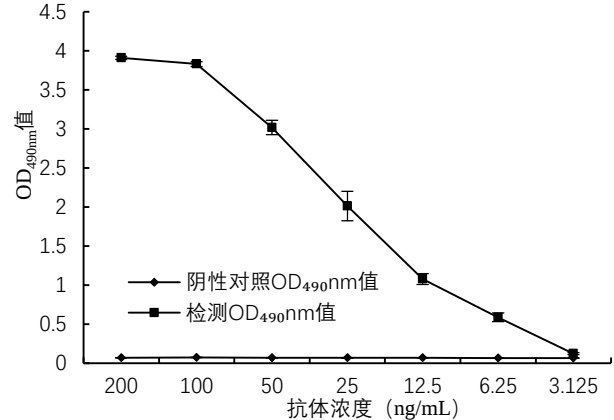


图2 酶标抗体的最佳工作浓度

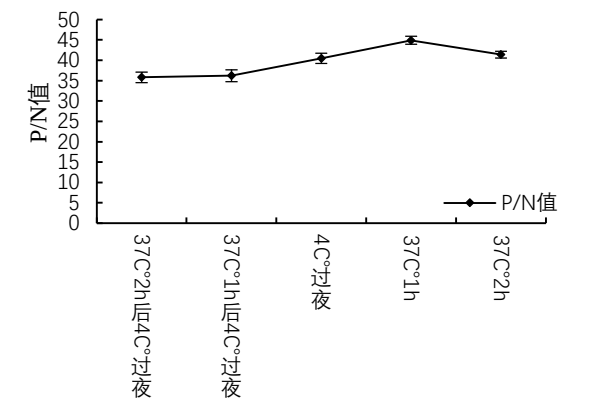


图3 抗原包被时间对检测结果的影响

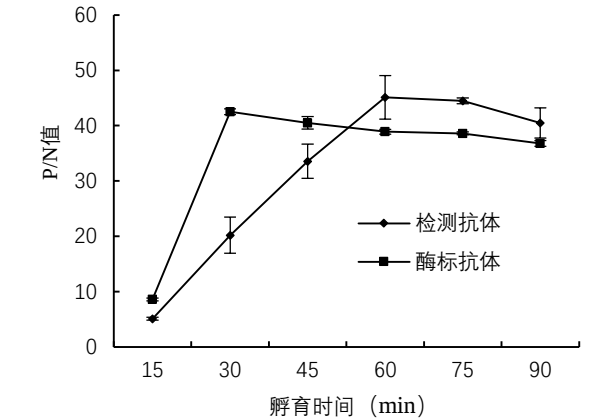


图4 检测抗体和酶标抗体孵育时间对检测结果的影响

2.2 间接ELISA方法灵敏度

如图5所示,测定连续稀释的SMV CP蛋白溶液,根据SMV CP蛋白浓度和P/N值建立标准曲线,其中横坐标为连续稀释的SMV CP蛋白浓度,纵坐标为P/N值,得出线性方程 $y=-8.57x+44.81$, $R^2=0.9964$,说明当SMV CP蛋白在0.1 ~ 1 000 ng/mL之间有很好的线性关系。当P/N=2.0时,SMV CP蛋

白最低检出限为3.23 ng/mL。

2.3 重复实验结果

根据8份阳性样品的检测结果,测定板内和板间的重复性。如表2所示,板内变异系数为0.6%~2.3%,板间变异系数为0.3%~2.1%,变异系数均小于3%,表明建立的间接ESLIA检测方法重复性良好。

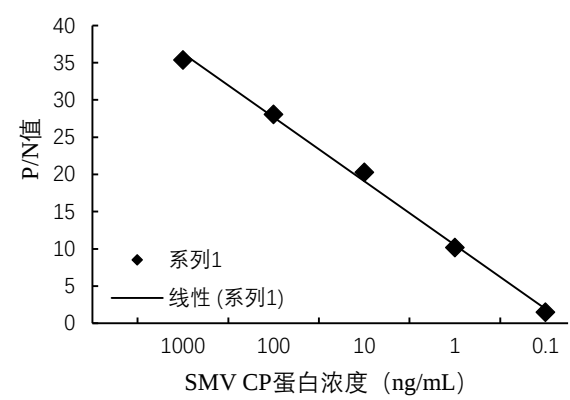


图5 灵敏度检测

2.4 间接 ELISA 方法的应用

大豆田中随机采集 50 份大豆样品进行检测, 根据表 3 可以看出, 间接 ELISA 方法检测出 33 份阳性材料, 17 份阴性材料。根据图 6 可以看出, RT-PCR 方法检测出 36 份阳性材料, 14 份阴性材料, 即在近 200bp 处出现目的条带, 与引物预计扩增条带大小相同, 经测序后, 登陆 GenBank 进行序列(序列号: KP710869.1)比对, 均为 SMV。其中两种检测方法结果均呈阳性的有 33 份, 均呈阴性的 14 份。根据表 4 可以得出, 一致率=(共同阳性结果份数+共同阴性结果份数)/样品总数, 两种方法的一致率高达 94%。

表2 板内和板间重复实验结果

样品	n	板内			板间		
		P/N 平均值	P/N 标准差	变异系数(%)	P/N 平均值	P/N 标准差	变异系数(%)
阳性 叶片	4	32.004	1.121	0.8	32.054	1.078	0.6
		31.896	1.067	0.6	31.598	1.089	0.6
		32.022	1.122	0.9	32.700	1.056	0.3
		32.016	1.132	0.9	32.680	1.077	0.4
阳性 种子	4	19.463	0.655	1.5	19.275	0.756	1.7
		19.354	0.892	2.3	19.844	0.821	2.1
		18.963	0.785	1.8	18.709	0.739	1.5
		19.883	0.676	0.7	19.218	0.687	0.8

表3 间接 ELSIA 检测结果

样品序号	阳性结果	阴性结果	样品序号	阳性结果	阴性结果
1	+		21	+	
2		-	22	+	
3	+		23		
4	+		24	+	
5		-	25	+	
6	+		26	+	
7	+		27	+	
8	+		28	+	
9		-	29		-
10		-	30	+	
11		-	31		-
12	+		32	+	
13	+		33		-
14	+		34	+	
15	+		35	+	
16		-	36	+	
17	+		37		-
18	+		38		-
19	+		39	+	
20			40	+	

续表 3

样品序号	阳性结果	阴性结果	样品序号	阳性结果	阴性结果
41	+		46	+	
42	+		47	+	
43		—	48		—
44		—	49	+	
45		—	50	+	

注：“+”号代表检测结果为阳性，“—”号代表检测结果为阴性

表 4 间接 ELISA 和 RT-PCR 检测结果比较

检测方法		建立的间接 ELISA 方法		一致率 (%)
		阳性样品数	阴性样品数	
RT-PCR	阳性样本数	33	3	94
	阴性样本数	0	14	

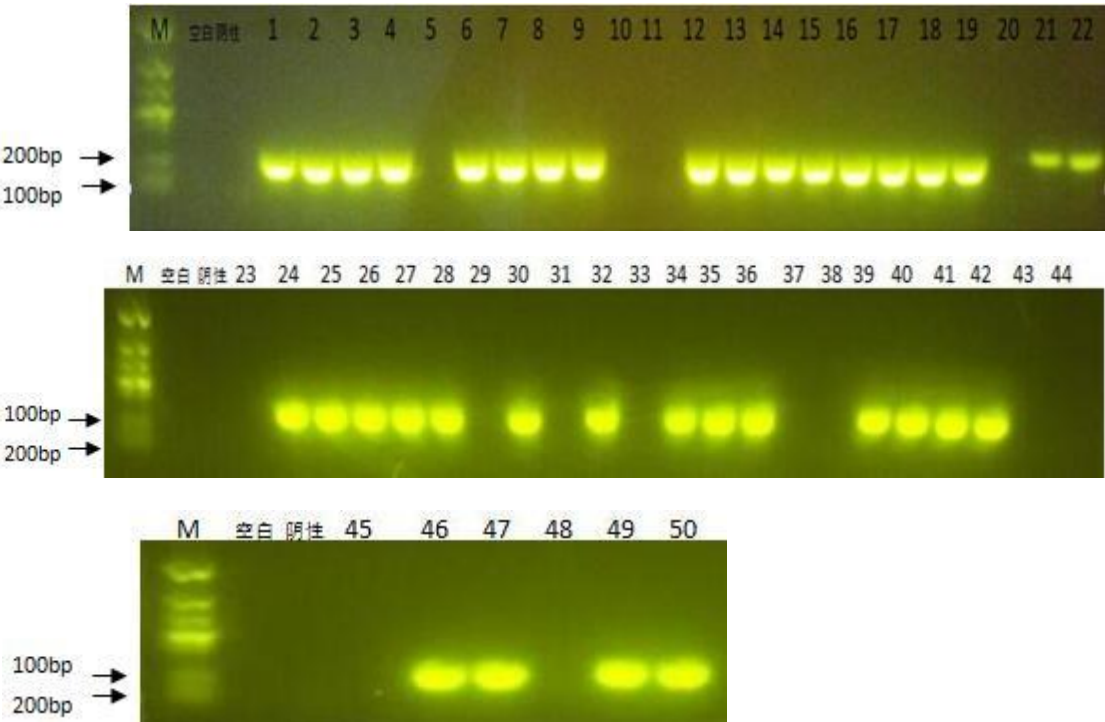


图 6 RT-PCR 检测结果

3 讨 论

本研究建立的 ELISA 检测方法选择单克隆抗体为检测抗体,单克隆抗体较多克隆抗体特异性高、亲和力强,并且能够长期制备,克服了不同批次多克隆抗体不稳定的问题;虽然多克隆抗体能够识别多个抗原表位,但亲和力不同,造成在操作过程中结合物容易被洗涤掉,影响检测结果。SMV 隶属于马铃薯 Y 病毒属,本研究选择的 SMV CP 蛋白单克隆抗体 4G12,识别的马铃薯 Y 病毒抗原表位高度保守,可以检测多种马铃薯 Y

病毒属的病毒^[12-13],该抗体可以为基因工程植株提供靶标基因,也可以为马铃薯 Y 病毒属病毒检测提供广谱抗体。本研究通过间接 ELISA 方法和 RT-PCR 方法的比较发现,对田间 50 份随机样品进行两种方法的检测,其中间接 ELISA 检测呈阴性而 RT-PCR 检测为阳性的有 3 份,推测由于检测材料病毒积累较低,低于本检测方法的最低检出限。SMV 可以通过大豆籽粒传毒,本研究建立的检测方法可以高通量、快速地检测大豆籽粒,为提高大豆种子质量提供了可靠的检测方法,为大

豆抗病育种的检测奠定了基础。另外ELISA检测方法在植物病毒研究中应用越来越广泛^[14-17],本检测方法的建立为植物病毒快速检测试剂盒的研制及检测试纸条的开发提供了理论基础。

参考文献:

- [1] De Jaeger G, De Wilde C, Eeckhout D, et al. The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance[J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(4): 419-428.
- [2] Urcuqui-Inchima S, Haenni A L, Bernaidi F. Potyvirus proteins: a wealth of functions[J]. *Virus Research*, 2001, 74: 157-175.
- [3] Floss D, Falkenburg D, Conrad Y. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview[J]. *Transgenic Res*, 2007, 16 (3): 315-332.
- [4] Lrrick J W, Yu L, Chen J, et al. Production of antibodies in transgenic plants[J]. *Res Immunol*, 1998, 149 (6): 603-608.
- [5] 黄赛花,袁 媛,王成坤,等.大豆花叶病毒CP基因密码子使用偏性分析[J]. *中国油料作物学报*, 2015, 37(2): 148-153.
- [6] 王大刚,智海剑,田 震,等.大豆花叶病毒致病基因的克隆与序列分析[J]. *大豆科学*, 2015, 34(5): 760-768.
- [7] 蔡春梅,姜 骁,赵春梅,等.中国大豆花叶病毒SC外壳蛋白基因的序列测定及其与美国株系的比较[J]. *病毒学报*, 2014(5): 489-494.
- [8] 赵玖华,尚佑芬,杨崇良,等.RT-PCR技术检测大豆花叶病毒的研究[J]. *山东农业科学*, 2000(4): 34-35.
- [9] 王 杰,王晓鸣,黄丽丽.大豆干种子大豆花叶病毒的RT-PCR检测[J]. *植物病理学报*, 2005, 35(3): 214-220.
- [10] 沈建国,高芳鑫,蔡 伟,等.进口大豆种子上菜豆荚斑驳病毒和大豆花叶病毒的多重RT-PCR检测[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(4): 667-676.
- [11] 王永志,苏 颖,米丽娟,等.东北地区大豆花叶病毒3号株系衣壳蛋白的表达、纯化及单克隆抗体制备[J]. *吉林农业科学*, 2011, 36(6): 37-39.
- [12] 尤 晴,李小宇,张春雨,等.马铃薯Y病毒属三种病毒通用型单克隆抗体的鉴定[J]. *植物保护*, 2016, 42(6): 76-79.
- [13] 王永志,万 千,李小宇,等.OYDV衣壳蛋白表达及其单克隆抗体分析[J]. *东北农业科学*, 2018, 43(2): 26-29.
- [14] 任春梅,杨 柳,繆 倩,等.小麦黄花叶病毒单克隆抗体的制备及ACP-ELISA检测方法的建立[J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(1): 34-40.
- [15] 宋志成,费新敏,杨 煜,等.马铃薯A病毒重组CP多克隆抗体的制备及其在DAS-ELISA检测中的应用[J]. *华北农学报*, 2017, 32(1): 41-46.
- [16] 孙艳秋,赵奎华,刘长远,等.黄瓜细菌性白枯病菌特异性抗体制备及其ELISA检测方法的建立[J]. *生物技术*, 2011, 21(2): 57-60.
- [17] 张春雨,李小宇,万 千,等.马铃薯M病毒衣壳蛋白原核表达和多克隆抗体制备[J]. *东北农业科学*, 2017, 42(3): 27-30.