

# 莴苣花叶病毒胶体金免疫层析试纸条的研制

魏梅生<sup>1</sup>, 尤佳<sup>2</sup>, 马洁<sup>1</sup>, 李桂芬<sup>1</sup>

(1. 中国检验检疫科学研究院 植物检疫研究所, 北京 100029; 2. 甘肃出入境检验检疫局, 甘肃兰州 730020)

**摘要:**为建立莴苣花叶病毒的现场快速检测方法, 采用胶体金标记莴苣花叶病毒的兔多克隆抗体, 在硝酸纤维素膜上喷涂检测 T 线和质控 C 线, 制作胶体金免疫层析试纸条。该试纸条检测莴苣花叶病毒提纯病毒的灵敏度为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 检测昆诺阿藜病汁液可稀释 1 000 倍(重量/体积)。试纸条可特异性检测到莴苣花叶病毒的 3 个分离物, 与马铃薯 X 等 8 种病毒无交叉反应。田间采集的莴苣样品试纸条和酶联检测的结果一致。该试纸条适用于疑似莴苣花叶病毒感染的莴苣叶片的快速诊断, 并在 10 min 内获得检测结果。

**关键词:**莴苣花叶病毒; 胶体金免疫层析法; 免疫试纸条

**中图分类号:** S432.4<sup>+</sup>1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-2767(2014)11-0074-04

莴苣(*Lactuca sativa*), 为菊科莴苣属植物, 是一种常见的食用蔬菜, 可分为叶用和茎用两类, 中国南北各地以茎用莴苣(莴笋)栽培为主, 近年来叶用莴苣在北京及沿海一些城市发展迅速。莴苣花叶病毒(*Lettuce mosaic virus*, LMV)在世界莴苣产区广泛分布, 是危害莴苣的主要病毒, 曾给一些国家的莴苣生产造成严重损失。该病毒为马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)成员, 病毒粒体呈弯曲线状, 大小为  $750 \text{ nm} \times 13 \text{ nm}$ , 核酸为单分子正义 RNA。其自然寄主有莴苣、苣荬菜(*Sonchus brachyotus*)、豌豆(*Pisum sativum* L.)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、野芥(*Sinapis arvensis* L.)、菠菜(*Spinacia oleracea* L.)、红花(*Carthamus tinctorius* L.)、蓝眼菊属(*Osteospermum* spp.)、勋章菊属(*Gazania* spp.)、柴胡(*Bupleurum falcatum*)和耳叶金鸡菊(*Coreopsis auriculata*)等<sup>[1-3]</sup>。LMV 可通过汁液接种、蚜虫和种子等途径传播。国内外对其生物学特性<sup>[4-6]</sup>、血清学关系、抗病性和分子生物学等方面进行了研究<sup>[7-10]</sup>。

病毒的检测是病毒病防控的关键点, 虽然 ELISA<sup>[11]</sup> 及 RT-PCR<sup>[12]</sup> 等方法均可用于对 LMV 的检测, 但在大田生产上胶体金免疫层析试纸条因具有检测快速、准确和便捷等优点, 受到广泛关注, 美国 Agdia 公司、瑞士 Bioreba 公司已出售多

种检测植物病毒的试纸条。该文通过病毒的提纯、抗血清的制备和胶体金试纸条的制作及测试, 以期建立 LMV 病毒的快速检测方法, 用于田间病害的诊断。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试的病毒毒原为 LMV-PV-63 分离物, 引自美国 ATCC, LMV-PV-0799、LMV-PV-0901 分离物引自德国 DSMZ, 保存在昆诺阿藜(*Chenopodium quinoa*)上。供试马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)、马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)、马铃薯 A 病毒(*Potato virus A*, PVA)、葡萄 A 病毒(*Grapevine virus A*, GVA)、齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)、黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)、葡萄扇叶病毒(*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)和烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)为中国检验检疫科学研究院植物检疫研究所收集的毒原。主要试剂和设备为羊抗兔抗体(军事医学科学院微生物流行病研究所)、碱性磷酸酯酶标记的山羊抗兔抗体(中杉金桥公司)、LMV 双抗体夹心酶联诊断试剂盒(美国 Agdia 公司)、层析膜(Whatman 公司的 Immunopore RP 膜)、Beckman Coulter Avanti J-26XPI 高速离心机、Beckman Coulter Optima L-100XP 超速离心机、JEM-1400 透射电子显微镜, BioDot XYZ 3050 三维喷点平台和 BioDot CM4000 切条机。

收稿日期: 2014-06-10

基金项目: 质检公益性行业科研专项资助项目(201310071)

第一作者简介: 魏梅生(1965-), 男, 安徽省巢湖市人, 硕士, 研究员, 从事植物病毒病害的检验检疫检测研究。E-mail: xsms2013@163.com。

1.2 方法

1.2.1 病毒的提纯 LMV-ATCC-PV63 在昆诺阿藜上繁殖,作病毒提纯用,提纯方法参照文献[13]。

1.2.2 多克隆抗体的制备和效价测定 免疫用的实验动物为新西兰白兔。提纯病毒和弗氏完全佐剂乳化后,后腿肌肉注射 1 次,其后病毒和弗氏不完全佐剂乳化后,后腿肌肉注射 4 次,每次注射间隔期为 10 d,末次注射 10 d 后采血。用间接 ELISA 方法测定抗血清的效价,抗血清用 1 mL HiTrap Protein G(GE 公司)柱纯化获得 IgG。

1.2.3 试纸条的检测和结果判定 试纸条的制作参照文献[14]。取出试纸条将具有胶体金复合物端插入 300~400  $\mu\text{L}$  离心后的检测样品中,10 min 左右判断结果。若试纸条仅质控 C 线出现紫红色线而检测 T 线未显色,结果为阴性;若试纸条上 C 线和 T 线均出现紫红色,结果为阳性;若试纸条 C 线和 T 线都没有显色,则说明此试纸条已经失效,结果无效。

2 结果与分析

2.1 病毒提纯结果

提纯的 LMV 经紫外测定,呈典型的核蛋白吸收曲线(见图 1), $\text{OD}_{260} = 3.851$ , $\text{OD}_{280} = 2.206$ , $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.75$ 。100 g 病叶提纯后可获得 1.5 mg 病毒,提纯的病毒用 2%醋酸双氧铀负染后在透射电子显微镜观察到长度约 750 nm 的弯曲线状病毒粒体(见图 2)。

2.2 抗血清的效价

LMV 抗血清用间接 ELISA 测定,检测提纯病毒(浓度  $3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )的效价高达 1/512 000,检测昆

诺阿藜病汁液(稀释 10 倍)效价为 1/128 000,健康昆诺阿藜(稀释 10 倍)的本底反应低(见表 1)。

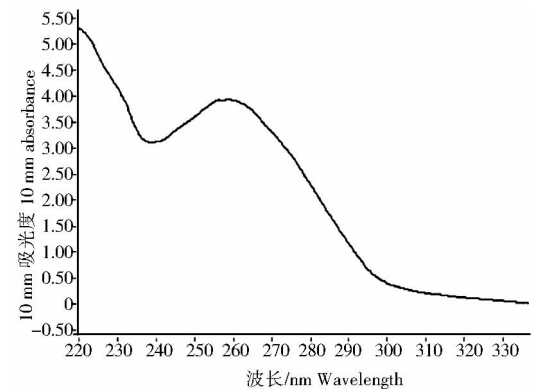


图 1 提纯 LMV 的紫外吸收

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of purified LMV

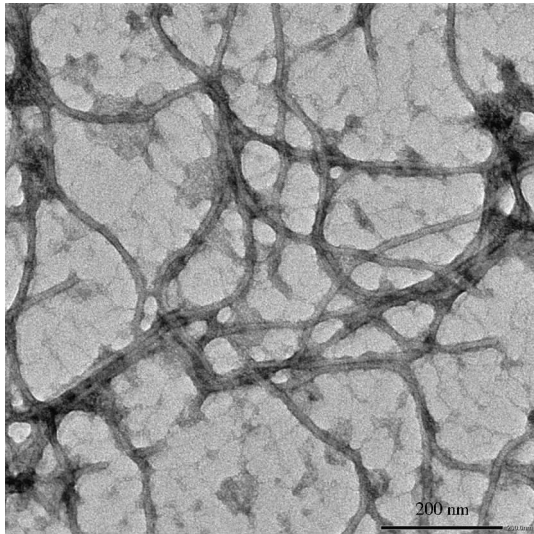


图 2 提纯 LMV 的弯曲线状病毒粒体

Fig. 2 Purified virus particles of LMV

表 1 LMV 抗血清效价测定酶联  $\text{OD}_{405}$

Table 1 ELISA absorbance value for LMV antiserum titer test

抗血清稀释度 Dilution of antiserum	提纯 LMV Purified LMV	昆诺阿藜病汁液 Infected <i>C. quinoa</i>	昆诺阿藜健康汁液 Healthy <i>C. quinoa</i>
1/32000	4.061	0.583	0.188
1/64000	2.520	0.299	0.133
1/128000	1.484	0.210	0.103
1/256000	0.801	0.149	0.096
1/512000	0.445	0.112	0.080

2.3 试纸条检测灵敏度

试纸条检测提纯 LMV 灵敏度可达  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (见图 3),缓冲液对照 T 线未显色;检

测昆诺阿藜病汁液可稀释 1 000 倍(W/V),健康对照 T 线未显紫红色,有叶绿素吸附(见图 4)。

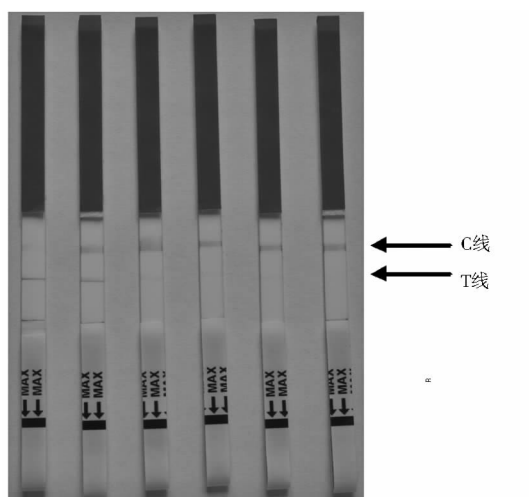


图3 试纸条检测提纯的LMV

从左至右分别为:提纯的病毒( $10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),缓冲液对照。

Fig. 3 Detection of purified LMV by immnostrip

From left to right show purified LMV( $10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and Buffer(CK).

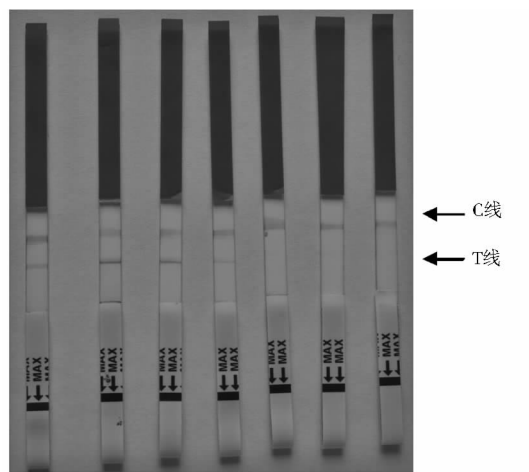


图4 试纸条检测昆诺阿藜病汁液

从左至右分别为:昆诺阿藜健康汁液( $10^{-1}$ ),昆诺阿藜病汁液( $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$ )。

Fig. 4 Detection of LMV infected

*C. quinoa* leaf by immnostrip

From left to right show Healthy *C. quinoa* ( $10^{-1}$ ), LMV infected *C. quinoa* ( $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$ ).

## 2.4 试纸条特异性测试

用莠苣花叶病毒试纸条检测 LMV 的 3 个分离物(PV-63、PV-0907、PV-0799),C 线和 T 线均出现紫红色,结果呈阳性反应(见图 5)。

用莠苣花叶病毒试纸条检测其它 8 种病毒,C 线均出现紫红色的线,检测 T 线未出现紫红

色,检测结果为阴性,但其中 6 种病毒(PVY、PVA、GVA、CGMMV、GFLV、TRSV)的 T 线上出现不同程度的叶绿素非特异性吸附(见图 6)。

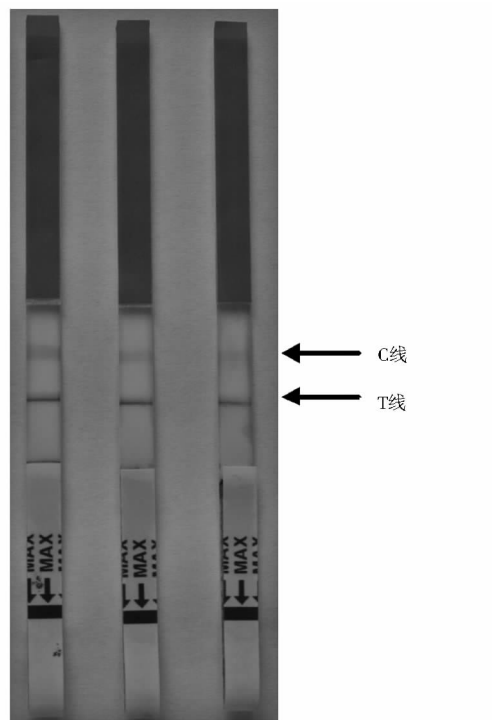


图5 试纸条检测 LMV 不同的分离物

从左至右分别为:LMV-PV-63、LMV-PV-0907、LMV-PV-0799。

Fig. 5 Detection of different LMV isolates by immnostrip

From left to right show LMV-PV-63, LMV-PV-0907, LMV-PV-0799.

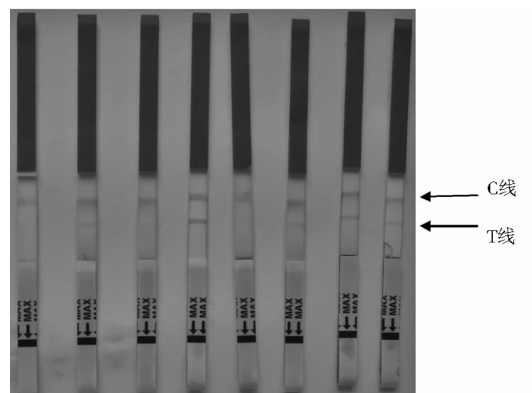


图6 试纸条检测其它的植物病毒

从左至右分别为:PVX、PVY、PVA、GVA、ORSV、CGMMV、GFLV、TRSV。

Fig. 6 Detection of other viruses by immnostrip

From left to right show PVX, PVY, PVA, GVA, ORSV, CGMMV, GFLV, TRSV.

## 2.5 田间采集样品的测试

从田间采集来的莴苣叶片 30 份,按 1:10(W/V)稀释,用试纸条进行测试,结果 2 份为阳性,28 份为阴性,经 ELISA 方法确认,两者结果相符。

## 3 结论与讨论

研究所制作的 LMV 胶体金免疫层析试纸条检测提纯病毒的灵敏度可达  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,检测病汁液可稀释 1 000 倍,试纸条可特异性检测到 LMV 的 3 个分离物,与 PVX 等 8 种其它病毒无交叉反应。

病毒的提纯和高质量抗血清制备是成功制作胶体金试纸条的前提,课题组制作的试纸条有时 T 线上会出现叶绿素吸附的绿色线,在结果判断时要引起注意,为避免误判,必要时可用其它方法对结果加以验证。出现的植物体内色素的非特异性吸附问题,今后可通过对试纸条制作的工艺或样品的前处理加以改进,以消除叶绿素等对检测结果的影响。

研发的试纸条可用于对田间莴苣叶片的检测,可以及时发现和铲除病株,以收获健康的莴苣种子。该试纸条未对莴苣病种子进行测试,病种子的检测受病害种传率大小和抽样方法的影响较大,建议对种子的检测采用 ELISA 方法比较合适。

### 参考文献:

- [1] Le Gall O. Lettuce mosaic virus. Descriptions of plant viruses [EB/OL]. [2014-06-01] <http://www.dpvweb.net/dpv/>, 2003; No. 399.
- [2] 夏俊强. 国外莴苣花叶病毒的研究[J]. 莱阳农学院学报, 1985(1): 133-138.
- [3] Naidu, R A, Karthikeyan G, Jarugula S, et al. First report of the natural infection of *Coreopsis auriculata* 'Nana' with *Lettuce mosaic virus* in the United States[J]. Plant Disease, 2008, 92(3): 486.
- [4] 夏俊强, 严敦余, 王清和, 等. 莴苣花叶病毒的研究 I. 病原鉴定[J]. 植物病理学报, 1984, 14(4): 241-246.
- [5] 魏宁生, 贾长盛. 莴苣病毒病病毒的分离及鉴定[J]. 病毒学报, 1987, 3(1): 102-103.
- [6] 钱荣田, 骆江洪, 龚志强. 侵染莴苣的莴苣花叶病毒(LMV)研究[J]. 浙江农业大学学报, 1996, 22(3): 304-307.
- [7] 夏俊强, 严敦余, 王清和, 等. 莴苣花叶病毒病的研究 II 病害的分布、损失、寄主和传播[J]. 植物病理学报, 1986, 16(1): 37-40.
- [8] Revers F, Lot H, Souche S, et al. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates[J]. Phytopathology, 1997, 87: 397-403.
- [9] 郑滔, 陈炯, 陈剑平. 莴苣花叶病毒浙江余杭分离物基因组全序列及其结构分析[J]. 病毒学报, 2002, 18(1): 66-70.
- [10] 尚巧霞, 向海英, 韩成贵, 等. 莴苣花叶病毒北京分离物基因组 3' 末端序列分析[J]. 农业生物技术科学, 2007, 23(7): 88-90.
- [11] Falk, B W, Purcifull, D E. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) test to index lettuce seeds for lettuce mosaic virus in Florida[J]. Plant Disease, 1983, 67: 413-416.
- [12] Peypelut M, Krause-Sakate R, Guiraud T, et al. Specific detection of lettuce mosaic virus isolates belonging to the "Most" type[J]. Journal of Virological Methods, 2004, 121(1): 119-24.
- [13] 周雪平, 濮祖芹. 侵染豌豆的莴苣花叶病毒(LMV)研究[J]. 江苏农业学报, 1991, 7(2): 44-47.
- [14] 魏梅生, 刘洪义, 李桂芬, 等. 马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 139-141.

# Colloidal Gold Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of *Lettuce mosaic virus*

WEI Mei-sheng<sup>1</sup>, YOU Jia<sup>2</sup>, MA Jie<sup>1</sup>, LI Gui-fen<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029; 2. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou, Gansu 730020)

**Abstract:** In order to establish a rapidly diagnostic method for *Lettuce mosaic virus* (LMV) in the field, colloidal gold immunochromatographic strip (ICS) was developed by coupling colloidal golds with polyclonal rabbit antibody against LMV. Test line and control line on nitrocellulose membrane were spread by Biojet Quanti 3 000 dispenser on XYZ dispensing platform. The sensitivity of immunostrip was  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  for purified LMV. Extract from LMV infected *Chenopodium quinoa* leaf diluted 1 000 times could be used to detect (W/V). The immunostrip was specific to LMV and detected three isolated viruses. There was no cross reaction with other eight viruses. Immunostrip test result was confirmed by ELISA for lettuce leaves collecting from field. The immunostrip was suitable for rapid diagnosis of LMV in suspicious lettuce leaf samples within 10 minutes.

**Key words:** *Lettuce mosaic virus*; immunochromatography assay; immunostrip