

文章编号:1008-9209(2005)01-0037-04

## 以直接斑点免疫结合测定法检测灰飞虱体内的水稻条纹病毒

王贵珍<sup>1</sup>, 周益军<sup>2</sup>, 周雪平<sup>1</sup>

(1. 浙江大学 生物技术研究, 浙江 杭州 310029; 2. 江苏省农科院 植保所, 江苏 南京 210014)

**摘 要:** 利用过碘酸钠法用辣根过氧化物酶标记了水稻条纹病毒(RSV)的3株单克隆抗体,3株酶标抗体(HRP-3B9、HRP-2H2、HRP-2E5)的效价分别达到1:25600、1:1600、1:3200,直接ELISA方阵试验确定HRP-3B9的最佳工作浓度分别为1:5000. 用HRP-3B9在硝酸纤维素膜上采用直接和间接斑点免疫结合试验(DIBA)对灰飞虱体内RSV进行了检测. 结果表明,DIBA法可有效地用于检测灰飞虱的带毒率,直接DIBA法比间接DIBA法灵敏度更高. 故采用直接DIBA法对采自江苏10个县、市的灰飞虱带毒率进行了检测.

**关 键 词:** 水稻条纹病毒; DIBA; 酶标抗体; 灰飞虱

中图分类号: S432.4 文献标识码: A

---

WANG Gui-zhen<sup>1</sup>, ZHOU Yi-jun<sup>2</sup>, ZHOU Xue-ping<sup>1</sup> (1. *Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*; 2. *Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China*)

**Detection of Rice stripe virus in *Laodelphax striatellus* by direct dot immunobinding assay.** Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2005,31(1):37-40

**Abstract:** Three horseradish peroxidase-linked monoclonal antibodies of *Rice stripe virus* (RSV), HRP-3B9, HRP-2H2 and HRP-2E5, were produced by NaIO<sub>4</sub> method. The diluted times of the three enzyme-linked antibodies were 1:25600, 1:1600 and 1:3200, respectively. In direct ELISA, the suitable diluted times of HRP-3B9 was 1:5000. Enzyme-linked antibody HRP-3B9 was selected to detect RSV in *Laodelphax striatellus* Fallen with direct dot immunobinding assay (DIBA) and indirect DIBA, and the detection results showed that the direct DIBA was more sensitive than indirect DIBA. The direct DIBA was then used to detect the virus in *Laodelphax striatellus* Fallen collected from 10 counties in Jiangsu province, China.

**Key words:** *Rice stripe virus*; DIBA; Enzyme-linked antibodies; *Laodelphax striatellus*

---

收稿日期: 2004-01-07

基金项目: 浙江省农业成果转化资金(G20030724); 江苏省重点攻关项目(BE2001339); 江苏省重大基础研究计划(BK2003002); 江苏省政府专项资助.

作者简介: 王贵珍(1978—),女,湖北黄冈人,硕士,从事病毒分子生物学研究. Tel:0571-86882197; E-mail: mumu7873@sina.com.

通讯作者: 周雪平,男,教授,博士生导师,从事植物病毒学研究. Tel:0571-86971680; E-mail: zzhou@zju.edu.cn.

水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)引起的水稻条纹病是我国水稻上发生范围最广的一种病毒病<sup>[1]</sup>。在我国,该病从南至北都有发生,特别是近年来在局部地区爆发病害流行。灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallen)是RSV的主要传播介体。灰飞虱的带毒虫量是水稻条纹病发生流行的主要影响因子<sup>[2,3]</sup>,适期治虫不仅要了解灰飞虱的数量,同时还要准确测定其带毒率。因此建立一种快速、灵敏检测灰飞虱带毒率的方法是十分必要的。目前检测植物病毒的方法较多,如ELISA已用于检测灰飞虱体内的RSV,但此方法较费时,不适于基层技术人员操作。1982年,Hawkes等人仿照分子生物学中点杂交(Dot hybridization)方法发展了斑点免疫结合测试技术(Dot immunobinding assay, DIBA),利用硝酸纤维素膜代替酶联板进行酶联免疫吸附测定,使检测更简便、快速、经济、有效、灵敏<sup>[4]</sup>。为此,我们进行了DIBA检测RSV的研究,并建立了快速、灵敏检测灰飞虱体内RSV的DIBA方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

带毒灰飞虱于2003年采自江苏姜堰发病稻田,经人工饲毒后,筛选到经卵带毒虫。RSV江苏分离物由本实验室分离保存。

### 1.2 IgG的制备

RSV江苏分离物的单克隆抗体2H2、3B9和2E5由本实验室制备<sup>[5]</sup>。IgG的纯化按常规饱和硫酸铵沉淀法进行<sup>[6]</sup>。

### 1.3 酶标抗体的制备及定量测定

以改良的过碘酸钠法用辣根过氧化物酶制备酶标单克隆抗体<sup>[7]</sup>。将制备的酶标单克隆抗体作适当稀释后,用Shimadzu UV-2201紫外分光光度仪测定250~450 nm的光吸收值,并按以下公式计算酶标单克隆抗体中酶量及克分子比,以鉴定其酶标效果<sup>[8]</sup>。

$$\begin{aligned} \text{结合物中酶浓度}/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) &= \text{OD}_{403} \times 0.4 \times \text{稀释倍数} \\ \text{结合物中IgG浓度}/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) &= (\text{OD}_{280} - \text{OD}_{403} \times 0.4) \times 0.62 \times \text{稀释倍数} \\ \text{克分子比} &= (\text{酶浓度}/\text{IgG浓度}) \times 4. \end{aligned}$$

$$\text{酶结合率} = \frac{\text{结合物中酶量}}{\text{标记加入酶量}} \times 100\%.$$

### 1.4 酶标抗体效价的测定

以1 μg/mL的提纯病毒包被ELISA板,每孔加样100 μL,用ELISA包被液分别以1:100开始倍比稀释酶标抗体HRP-3B9、HRP-2H2和HRP-2E5,用未免疫的小鼠血清作同样的稀释度作为阴性对照。用间接ELISA测定3株酶标抗体的效价<sup>[5]</sup>。

### 1.5 酶标抗体最佳工作浓度的测定

将2 mg/mL的提纯病毒用ELISA包被液以1:500开始倍比稀释,HRP-3B9用包被液以1:200开始倍比稀释,以水稻健康汁液作为阴性对照进行方阵试验,确定HRP-3B9的最佳工作浓度。

### 1.6 直接DIBA和间接DIBA

**1.6.1 直接DIBA** 单头灰飞虱成虫加100 μL碳酸盐缓冲液,用牙签捣碎,5000 r/min离心3 min,取上清3 μL加样,室温凉干,浸入5%脱脂奶粉封闭缓冲液37℃封闭30 min,加入5000×酶标抗体(HRP-3B9),37℃孵育1.5 h,用PBST洗涤3次,每次3 min。加入底物溶液,37℃下反应30 min,自来水冲洗膜,凉干保存。底物溶液为:4-氯-1-萘酚6 mg溶于2 mL无水乙醇,加入10 mL 0.02 mol/L pH 7.4的PBS,加入7 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>混匀。有显色反应的判断为阳性,无显色反应的则为阴性。

**1.6.2 间接DIBA** 样品处理同1.6.1,5%的脱脂奶粉封闭后加入10000×的单抗(3B9),37℃孵育1.5 h,用PBST洗涤3次,每次3 min。将膜浸入5000×的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG,37℃孵育1.5 h,用PBST洗涤3次,每次3 min,将膜浸入底物溶液,37℃下反应30 min,自来水冲洗膜,凉干保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶标抗体的制备

按常规饱和硫酸铵沉淀法纯化了3株单抗(3B9、2H2、2E5),测定其IgG含量分别为:6.52、10.25、9.64 mg/mL。

以改良的过碘酸钠法制备了3株单克隆抗

体的酶标抗体 HRP-3B9、HRP-2H2 和 HRP-2E5,其定量测定如表 1,徐宜为认为结合物中酶浓度为 0.5 mg/mL,克分子比值 1.5~2.0 之间,酶结合率大于 30%时,标记效果最好<sup>[8]</sup>. 从表 1 数据可以看出,HRP-3B9 标记效果最好.

以直接 ELISA 测定酶标抗体 HRP-3B9、HRP-2H2 和 HRP-2E5 的效价分别为 1:25600,1:1600,1:3200. 因此选择 HRP-3B9 进行 DIBA.

表 1 酶标抗体的定量测定

Table 1 Quantitative analysis of enzyme-linked antibodies

|                               | HRP-3B9 | HRP-2H2 | HRP-2E5 |
|-------------------------------|---------|---------|---------|
| 酶浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )    | 0.68    | 0.52    | 0.44    |
| IgG 浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 0.89    | 0.27    | 0.87    |
| 克分子比                          | 3.07    | 7.79    | 2.0     |
| 酶结合率/%                        | 27.2    | 20.8    | 17.6    |

表 2 HRP-3B9 最佳工作浓度测定

Table 2 Detection of the suitable dilution time of HRP-3B9

| HRP-3B9<br>稀释倍数 | RSV 抗原稀释倍数(×100) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 阴性对照  |
|-----------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                 | 5                | 10    | 20    | 40    | 80    | 160   | 320   | 640   | 1280  | 2560  | 5120  |       |
| 200             | *                | *     | 2.733 | 1.925 | 1.338 | 0.826 | 0.589 | 0.398 | 0.285 | 0.228 | 0.218 | 0.100 |
| 400             | *                | *     | 2.726 | 1.843 | 1.176 | 0.770 | 0.487 | 0.334 | 0.252 | 0.184 | 0.169 | 0.091 |
| 800             | *                | *     | 2.723 | 1.779 | 1.071 | 0.700 | 0.457 | 0.306 | 0.234 | 0.178 | 0.164 | 0.085 |
| 1600            | *                | *     | 2.683 | 1.739 | 1.031 | 0.654 | 0.447 | 0.303 | 0.230 | 0.168 | 0.134 | 0.091 |
| 3200            | *                | *     | 2.479 | 1.618 | 1.012 | 0.642 | 0.423 | 0.276 | 0.213 | 0.164 | 0.132 | 0.091 |
| 6400            | *                | 2.994 | 2.152 | 1.377 | 0.942 | 0.538 | 0.387 | 0.264 | 0.212 | 0.161 | 0.131 | 0.096 |
| 12800           | 2.793            | 2.496 | 1.880 | 1.197 | 0.778 | 0.529 | 0.339 | 0.245 | 0.181 | 0.154 | 0.128 | 0.093 |
| 25600           | 2.111            | 1.801 | 1.430 | 0.974 | 0.646 | 0.472 | 0.313 | 0.208 | 0.169 | 0.152 | 0.127 | 0.095 |

注:OD<sub>490</sub>>3.5.

### 2.3 DIBA 法检测灰飞虱体内 RSV 的最适实验条件

单抗 3B9 分别稀释 10000、5000、2500 倍,37 °C 下孵育的时间均为 90 min,羊抗鼠 HRP-IgG 稀释 5000 倍,37 °C 下孵育 90 min,间接 DIBA 结果表明改变单抗的浓度对实验结果基本没有影响,阳性斑点的颜色基本没有深浅变化. 3B9 稀释 10000 倍,37 °C 下分别孵育 30、60、90 min,以确定改变单抗孵育的时间对检测结果的影响. 结果表明 37 °C 孵育 30 min 时,检测不出阳性样品,孵育 90 min 比 60 min 时的斑点颜色深. 故确定单抗稀释 10000 倍、37 °C 孵育 90 min,羊抗鼠 HRP-IgG 稀释 5000 倍、37 °C 孵育 90 min,为间接 DIBA 的最佳工作条件.

### 2.2 酶标抗体最佳工作浓度的测定

用直接 ELISA 方阵试验测定酶标抗体 HRP-3B9 的最佳工作浓度,提纯病毒(2 mg/mL)以 1:500 倍开始倍比稀释,酶标抗体以 1:200 开始倍比稀释. 表 2 为 HRP-3B9 的测定数据. 从表 2 可以看出,在同一抗原浓度下,检测 OD 值随着 HRP-IgG 稀释倍数的增加而减小,在 HRP-3B9 稀释 800~25600 倍之间时,OD 值下降幅度最大. 在同一 HRP-IgG 稀释倍数下,检测 OD 值随着抗原稀释倍数的增加而减小. 在同一 HRP-3B9 稀释倍数下,抗原稀释至 2000~32000 倍之间时,下降幅度最大,在 HRP-3B9 稀释至 200 倍时,阴性对照的 OD 值较高,综合考虑到田间样品检测的灵敏度,将酶标抗体 HRP-3B9 稀释 5000 倍作为检测的最适合工作浓度.

HRP-3B9 稀释 5000、2500、1000 倍,37 °C 孵育 90 min,直接 DIBA 结果表明改变 HRP-3B9 的浓度不影响检测灵敏度,阳性斑点的颜色变化不大. HRP-3B9 稀释 5000 倍,37 °C 孵育 30、60 和 90 min,直接 DIBA 结果表明 37 °C 孵育 30 min 时,阳性样品的颜色很浅,灵敏度不高,孵育 90 min 比 60 min 时阳性斑点深,但不影响检测灵敏度. 故确定 HRP-3B9 稀释 5000 倍、37 °C 孵育 90 min 为直接 DIBA 的最佳工作浓度.

### 2.4 直接与间接 DIBA 法检测灰飞虱体内的 RSV 比较

应用建立的直接 DIBA 法和间接 DIBA 法检测经卵带毒的 15 头灰飞虱,比较两种方法的

检测灵敏度. 直接 DIBA 法能检测到阳性样品 9 个, 阳性率为 60%, 间接 DIBA 法能检测到阳性样品 6 个, 阳性率为 40%, 且直接法的斑点颜色比间接法深很多, 因此直接 DIBA 法比间接 DIBA 法的灵敏度高, 而且直接法整个流程只需要 3 h, 比间接法省时.

## 2.5 应用直接 DIBA 法检测田间灰飞虱的带毒率

利用建立的直接 DIBA 法对 2003 年采自建湖、盐都、武进、海安、常熟、姜堰、靖江、丹阳、高邮、灌云等地的灰飞虱成虫进行检测, 检测的样品数分别为 34、14、15、5、20、50、51、35、74、18、22 头, 阳性样品数对应为 8、5、3、1、4、21、16、7、25、8、7 头, 带毒率对应为 23.5%、35.6%、20%、20%、20%、42%、31.1%、20%、33.7%、44.4% 和 31.7%. 从上述数据可以看出, 各地灰飞虱的带毒率还是很高, 这也是近年来江苏省部分地区水稻条纹病毒广泛流行的主要因素.

## 3 讨论

制备了 RSV 单克隆抗体的酶标抗体 HRP-3B9、HRP-2H2 和 HRP-2E5, 在此基础上建立了直接 DIBA 和间接 DIBA 检测 RSV 的方法. 比较两种方法对灰飞虱体内 RSV 的检测灵敏度, 发现直接 DIBA 较间接 DIBA 灵敏, 因此我们认为直接 DIBA 更适合对田间灰飞虱带毒率的检测.

硝酸纤维素膜不仅比酶联板便宜, 而且可以根据试验需要裁减成不同大小. 在进行病害田间诊断和调查时, 硝酸纤维素膜体积小而便于携带, 在很小的体积上可以进行大量样品检测, 使用十分方便. DIBA 法检测时使用的抗原少, 只需要点样 3  $\mu$ L. 这对于检测昆虫体内含量较低的病毒十分有利. 反应的底物以非容性的固体形式沉淀在硝酸纤维素膜上, 结果可以长期保存, 而且直接 DIBA 法的整个流程只需要 3 h, 对于大批量的检测十分适用.

近年来 RSV 引起的水稻条纹病在我国的

发生呈上升趋势, 在江苏的一些地区发生面积较广, 特别是 2001 年, 发病率达到 50% 以上, 已成为江苏省水稻生产前期的一个重要病害. 而灰飞虱的带毒率是水稻条纹病流行的主要影响因子. 直接 DIBA 方法的建立, 可望为准确检测各发病地区灰飞虱的带毒率及适期治虫提供了依据, 也为水稻条纹病毒的防治打下了基础, 进而达到遏制水稻条纹病广泛流行的目的.

## References:

- [1] LIN Qi-ying, XIE Lian-hui, ZHOU Zhong-ju, *et al* (林奇英, 谢联辉, 周仲驹, 等). Studies on rice stripe: 1. Distribution of and losses caused by the disease [J]. *Journal of Fujian Agricultural University* (福建农学院学报), 1990, 19(4): 421-425. (in Chinese)
- [2] LIU De-jun, HUANG Ba-shan, ZHU Yun-e, *et al* (刘德钧, 黄拔山, 朱云娥, 等). A study on a forecasting model of the occurrence of rice stripe virus disease [J]. *Acta Agricultural Shanghai* (上海农业学报), 1993, 9(1): 70-74. (in Chinese)
- [3] LIN Qi-ying, XIE Lian-hui, XIE li-yan, *et al* (林奇英, 谢联辉, 谢莉妍, 等). Studies on rice stripe: 1. Symptoms and transmission of the disease [J]. *Journal of Fujian Agricultural University* (福建农学院学报), 1991, 20(1): 24-28. (in Chinese)
- [4] Hawkes, R. A Dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies [J]. *Analytical Biochemistry*, 1982, 119: 142-147.
- [5] WANG Gui-zhen, ZHOU Yi-jun, CHEN Zheng-xian, *et al* (王贵珍, 周益军, 陈正贤, 等). Production of monoclonal antibodies to Rice stripe virus and application in virus detection [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2004, 34(4): 302-306. (in Chinese)
- [6] LIANG Xun-sheng, ZHANG Cheng-liang, ZHANG Zuo-fang (梁训生, 张成良, 张作芳). *Plant virus serological technology* (植物病毒血清学技术) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1985. (in Chinese)
- [7] GUO Chun-xiang, GUO Xi-qiong (郭春祥, 郭锡琼). Introduction of a rapid and effective method which could bind antibodies with horseradish peroxidase by  $\text{NaIO}_4$  [J]. *Shanghai Journal of Immunology* (上海免疫学杂志), 1983, 3(2): 97-99. (in Chinese)
- [8] XU Yi-wei (徐宜为). *Technology of immuno-assay* (免疫检测技术·第二版) [M]. Beijing: Science Press, 1991. (in Chinese)