

基于单克隆抗体的南方菜豆花叶病毒血清学检测技术

王亚琴¹ 田沂民² 于 翠² 周雪平¹ 吴建祥^{1*}

(1. 浙江大学生物技术研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310058;

2. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

摘要: 为建立南方菜豆花叶病毒(southern bean mosaic virus, SBMV)的快速、简便、高通量检测技术,加强该病毒的口岸检验检疫,以提纯的SBMV粒子为免疫原免疫BALB/C小鼠,利用杂交瘤技术获得3株杂交瘤细胞株19C3、19H9和20G4,其分泌的SBMV腹水单抗效价均达到 10^{-7} ,且3个单抗与感染SBMV大豆叶片组织粗提液有强烈的特异性免疫反应,而不与感染南方豇豆花叶病毒(southern cowpea mosaic virus, SCPMV)的豇豆、健康的大豆、毛豆、豌豆、蚕豆和菜豆叶片组织粗提液发生免疫反应。以制备的单抗为核心,建立了检测植物中SBMV的ACP-ELISA和dot-ELISA两种血清学方法。3个单抗中19H9单抗的检测灵敏度最高,以其建立的ACP-ELISA和dot-ELISA方法检测大豆病叶粗提液的灵敏度分别达到1:163 840和1:10 240稀释浓度。利用建立的dot-ELISA方法可从上海口岸截获的大豆种子中检测出SBMV,且该检测结果得到RT-PCR方法验证。表明制备的SBMV单抗及建立的SBMV血清学检测技术可有效用于我国SBMV的口岸检验检疫。

关键词: 南方菜豆花叶病毒(SBMV); 单克隆抗体; ACP-ELISA; dot-ELISA

Monoclonal antibody-based serological technology for southern bean mosaic virus detection

WANG Yaqin¹ TIAN Yimin² YU Cui² ZHOU Xueping¹ WU Jianxiang^{1*}

(1. State Key Laboratory of Rice Biology, Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058,

Zhejiang Province, China; 2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau,

Shanghai 200135, China)

Abstract: To establish rapid, simple and high-throughput detection techniques for southern bean mosaic virus (SBMV) and to strengthen the port inspection and quarantine of this virus, three hybridoma lines (19C3, 19H9 and 20G4) secreting monoclonal antibodies (MAbs) against SBMV were obtained. The titers of ascitic fluids containing MAbs secreted by the three hybridomas were up to 10^{-7} . All the three MAbs reacted strongly and specifically with SBMV in crude extracts from SBMV-infected soybean tissues. A negative reaction was observed when crude extracts were from cowpea plant tissues infected with SBMV, or from a healthy soybean, edamame, pea, vicia faba, or kidney bean plant tissues. Based on the prepared MAbs, two serological detection assays, ACP-ELISA and dot-ELISA were developed for detecting SBMV in plants. Of the three MAbs, 19H9 was the most sensitive for detecting

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201604, 2016YFD0300706), 浙江大学实验技术研究项目(SJS201809)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: wujx@zju.edu.cn

收稿日期: 2019-05-31

SBMV. The detection endpoints of ACP-ELISA and dot-ELISA assays based on MAb 19H9 were up to 1:163 840 and 1:10 240 dilution for SBMV-infected leaf tissue crude extracts, respectively. Using the developed dot-ELISA assay, SBMV infection was detected in soybean seeds intercepted at Shanghai port. The detection result of the dot-ELISA was verified by RT-PCR. This indicated that the prepared MAbs against SBMV and the developed serological detection techniques for SBMV can be effectively used in port inspection and quarantine of SBMV in China.

Key words: southern bean mosaic virus; monoclonal antibody; ACP-ELISA; dot-ELISA

豆科植物如大豆、菜豆、豇豆等,是我国农业生产中的重要作物,在我国种植面积逐年增加。南方菜豆花叶病毒(southern bean mosaic virus, SBMV)可侵染多种豆科植物,是一种危害豆科作物生产的重要检疫性有害病毒(王利民等,2001)。SBMV是南方菜豆花叶病毒属 *Sobemovirus* 的典型成员(陈青等,2009),主要分布于热带、亚热带地区,既能通过种子进行远距离传播,又可由叶甲 *Ceratomyza trifurcata* 携毒传播,还可通过人工机械接种侵染大豆、绿豆、赤小豆、红花菜豆、棉豆、豌豆、蚕豆和草木樨等12个属23种植物,介体传毒和种子输运加重了远距离传播的危害和风险(宋淑敏等,1991)。

SBMV粒子为等轴对称的二十面体,无包膜,直径约为30 nm,包含1条长4 100~4 500 nt的单链正义RNA基因组。该病毒的基因组RNA含有4个开放阅读框(open reading frame, ORF),其中ORF1编码1个21 kD的P1蛋白,该蛋白与病毒细胞间运动有关,也是1个RNA沉默抑制子;ORF2a编码1个多聚蛋白,可被切割为1个丝氨酸蛋白酶、1个病毒末端结合蛋白VPg、1个ATP酶P10和1个具有RNA结合功能的P8蛋白;ORF2b编码病毒的RNA聚合酶;ORF3位于病毒亚基因组,编码1个30 kD病毒外壳蛋白,参与病毒的细胞间运动与长距离运输(吴世宣等,1985)。

随着豆制品进出口贸易和种资交换等日益增多,SBMV对我国豆科作物生产危害的风险也大大增加,我国在1992年将该病毒列入二类检疫性有害生物(王利民等,2001),于2007年被列入检疫性有害生物名录中。由于该病毒目前尚无有效的防治方法,因此建立该病毒快速准确的筛查技术是防止其口岸传入和境内传播的最有效途径之一。目前,口岸检疫对SBMV的检测方法主要有反转录PCR扩增(reverse transcription-PCR, RT-PCR)(陈青等,2009;董菁等,2010)、实时荧光定量PCR扩增(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)(白静等,2007)和血清学检测(宋淑敏等,1991;陈青等,2009)。RT-PCR和qRT-PCR检测方法虽然灵敏度高、特异性强,但该方法需经过RNA提取, RNA反转录, PCR扩增以及电泳检测,需要仪器和PCR试剂,测试成本相对较高,操作过程较为繁琐,对软、硬件均有较高要求。而自主生产的SBMV血清学检测方法缺失,导致我国每年需从美国和欧盟进口SBMV血清学检测试剂进行口岸检验检疫。血清学检测方法作为检测植物病毒便捷、灵敏、高效以及性价比最高的检测技术,其有效性、灵敏度以及特异性主要依赖于高质量的病毒抗体(Liu et al., 2016),因此制备SBMV的高质量抗体,并建立高效、快速的SBMV血清学检验检疫技术十分迫切(宋淑敏等,1991)。

本研究以纯化的SBMV粒子为抗原免疫BALB/c小鼠 *Mus musculus*, 利用杂交瘤技术获得分泌SBMV单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并以杂交瘤细胞株分泌的单抗为核心,探索建立检测SBMV的抗原包被酶联免疫吸附测定(antigen-coated plate enzyme-linked immunosorbent assay, ACP-ELISA)和斑点酶联免疫吸附测定(dot enzyme-linked immunosorbent assay, dot-ELISA)方法,以期实现该病毒的快速、准确、灵敏、实用的检验检疫,并为SBMV口岸检测和检验检疫提供技术和产品支持。

本研究以纯化的SBMV粒子为抗原免疫BALB/c小鼠 *Mus musculus*, 利用杂交瘤技术获得分泌SBMV单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并以杂交瘤细胞株分泌的单抗为核心,探索建立检测SBMV的抗原包被酶联免疫吸附测定(antigen-coated plate enzyme-linked immunosorbent assay, ACP-ELISA)和斑点酶联免疫吸附测定(dot enzyme-linked immunosorbent assay, dot-ELISA)方法,以期实现该病毒的快速、准确、灵敏、实用的检验检疫,并为SBMV口岸检测和检验检疫提供技术和产品支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病毒、小鼠及作物:SBMV、南方豇豆花叶病毒(southern cowpea mosaic virus, SCPMV)均购自德国微生物菌种保藏中心DSMZ;BALB/c小鼠购自西普尔-毕凯实验动物有限公司(上海),25℃恒温饲养7周后备用;健康的菜豆、毛豆、豌豆、蚕豆、大豆叶片均采自浙江大学实验大棚;口岸检测大豆由

上海海关提供。

试剂及仪器: 洛斯维公园纪念研究所-1640培养基、次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine and thymidine media supplement, HT)培养基、次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine, aminoperin and thymidine media supplement, HAT)培养基、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、抗体类型及亚类鉴定试剂盒、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)标记的羊抗鼠IgG二抗、DAS-ELISA试剂盒, 美国Sigma-Aldrich公司; 硝酸纤维素膜(NC), 美国Amersham Pharmacia公司; NBT/BCIP显色底物, 美国Promega公司; AMV反转录酶, 日本东洋纺公司; PCR反应缓冲液、dNTP混合物、Taq plus DNA聚合酶, 日本TAKARA公司。96孔细胞培养板、ELISA酶标板, 美国Corning公司; JEOL JEM-1200EX透射电镜, 日本JEOL公司; IX71倒置显微镜, 日本Olympus公司; Galaxy S二氧化碳培养箱, 英国RS Biotech公司; 680型酶标仪, 美国Bio-Rad公司; LE-80K超速冷冻离心机, 美国Beckman公司; ND-1000紫外分光光度计, 美国Nanodrop公司。

1.2 方法

1.2.1 SBMV的提纯和鉴定

将感染SBMV大豆病叶的液汁摩擦接种至2叶期的健康大豆苗上, 病毒繁殖3周后采集发病植物的病叶, 参照周雪平等(1994)方法提纯病毒粒子, 称取100 g病叶, 加入200 mL磷酸缓冲液, 匀浆2 min后用双层尼龙纱布过滤, 滤液离心20 min后去除植物组织残渣, 所得上清液边搅拌边滴加Triton X-100、PEG和NaCl, 搅拌4 h以上后离心15 min得沉淀, 沉淀经磷酸缓冲液充分洗涤后离心15 min, 吸出上清液并置于离心管中, 沉淀再洗涤、离心, 重复3次; 合并上清液, 35 000 r/min超速离心120 min, 所得沉淀经磷酸缓冲液悬浮后, 5 000 r/min离心15 min, 沉淀再悬浮、离心, 重复3次; 合并上清液, 置于加有30%蔗糖垫的离心管中, 30 000 r/min超速离心100 min, 所得沉淀经磷酸缓冲液悬浮, 悬浮液即为病毒提纯液; 病毒提纯液经2%磷酸钨负染后置于电镜下观察病毒粒子形态。

1.2.2 杂交瘤细胞和单克隆抗体制备

参照饶黎霞等(2018)的免疫程序, 以1.2.1提取的SBMV粒子为免疫原免疫7周龄的BALB/c雌、雄小鼠。参照Wu et al. (2011)方法将发生免疫的BALB/c小鼠脾细胞和SP2/0鼠骨髓瘤细胞按体积

比7:1混合, 经PEG融合, HAT培养基筛选培养10 d后换HT培养基培养, 然后置于25块96孔细胞板进行细胞融合、筛选与克隆。以感染SBMV的菜豆叶片和提纯病毒为抗原, 采用间接ELISA方法检测杂交瘤细胞培养液上清液中的抗体(Wu et al., 2011)。参照饶黎霞等(2018)的方法, 经过3~4次有限稀释法克隆得到分泌抗SBMV单克隆抗体的杂交瘤细胞, 筛选高效分泌抗SBMV特异性单抗的杂交瘤细胞株, 参照Song et al. (2017)方法制备腹水单抗, 即选取20周龄BALB/c雄性小鼠, 腹腔注射0.4 mL降植烷, 7 d后腹腔注射约 10^5 个杂交瘤细胞, 7~10 d后小鼠腹部膨大, 用采血针头采集小鼠腹水。参照Wu et al. (2011)的间接ELISA方法, 以1 μ g/mL病毒提纯液作为包被抗原包被酶标板, 将腹水单抗按体积比从1:312 500至1:40 000 000比例稀释后作为一抗, 以AP标记的羊抗鼠IgG为二抗测定单抗效价, 并参照DAS-ELISA试剂盒操作说明测定IgG含量, 鉴定单抗的抗体亚类(宋革等, 2016)。

1.2.3 ACP-ELISA方法建立及其灵敏度和特异性分析

通过方阵试验确定ACP-ELISA中单抗和AP标记的羊抗鼠IgG二抗的最适工作浓度(Liu et al., 2014), 在感染SBMV的大豆病叶的研钵中按质量体积比1:30加入包被缓冲液(0.05 mol/L碳酸盐缓冲液, pH 9.6)后研磨匀浆, 匀浆液5 000 g离心5 min后得到上清液为叶片组织粗提液。参照宋革等(2016)方法, 以叶片组织粗提液为抗原(100 μ L/孔)包被ELISA酶标板, 接着分别加入最适工作浓度的检测单抗和AP标记的羊抗鼠IgG二抗并各孵育1 h, 最后底物显色, 建立以抗SBMV单抗为核心检测植物样品中SBMV的ACP-ELISA方法。

将上述感染SBMV的叶片组织粗提液用包被缓冲液按质量体积比1:20~1:655 360稀释, 各个梯度分别包被ELISA酶标板, 用建立的ACP-ELISA方法分别测定3个SBMV单抗的灵敏度。以健康的菜豆、毛豆、豇豆、豌豆和蚕豆样品为检测抗原, 以感染SBMV的大豆样品为阳性对照, 健康大豆样品为阴性对照, 用包被缓冲液按质量体积比1:20稀释, 上述叶片组织粗提液分别包被ELISA酶标板, 用建立的ACP-ELISA方法分别测定3个SBMV单抗的特异性, 重复2次。

1.2.4 dot-ELISA方法建立及其灵敏度和特异性分析

根据宋西娇等(2017)方阵试验确定dot-ELISA方法中抗SBMV单抗和AP标记的羊抗鼠IgG二抗

的最适工作浓度,参照宋革等(2016)方法以抗体最适工作浓度建立检测植物叶片样品中SBMV的dot-ELISA方法。将感染SBMV的大豆病叶用0.01 mol/L、pH 7.4磷酸缓冲液研磨匀浆,匀浆液以5 000 g离心5 min得到的上清液即叶片组织粗提液,用磷酸缓冲液按质量体积比1:20~1:10 240共10个梯度进行稀释,每个稀释度取2.5 μ L点于硝酸纤维素膜上,斑点印迹室温晾干,健康菜豆和大豆叶片也作同样处理。将晾干后的斑点印迹膜用5%脱脂奶粉封闭20 min,使用PBST缓冲液洗膜15 min,然后用抗体最适工作浓度进行一抗孵育1.5 h,再使用PBST缓冲液洗膜3次,每次15 min,加入二抗孵育1.5 h后使用PBST缓冲液洗膜3次,每次15 min,并用于显色。用建立的dot-ELISA方法进行检测,分析dot-ELISA的灵敏度,重复2次。

利用感染SCPMV的豇豆、健康的菜豆、毛豆、豌豆和蚕豆样品为检测抗原,以感染SBMV的大豆样品为阳性对照,健康大豆样品为阴性对照,取2.5 μ L叶片组织粗提液上清液点到硝酸纤维素膜上,然后用建立的dot-ELISA方法进行检测,分析建立的dot-ELISA的特异性,重复2次。

1.2.5 血清学方法在口岸检测中的应用

由于dot-ELISA方法不需要大型仪器,操作更简便、高效、快速,检测结果直观,更能满足口岸检疫对检测方法便捷性的要求,所以选取该方法进行应用评价。采用本研究所建立的dot-ELISA方法对2018年3月上海口岸进口的一批大豆进行检测。将随机取样的20颗大豆叶片在研钵中用液氮研磨成粉末,用按质量体积比1:10加入0.01 mol/L磷酸缓冲液,继续研磨匀浆2 min,匀浆液以5 000 g离心5 min得到的上清液即叶片组织粗提液,用上述建立的dot-ELISA方法对粗提液进行SBMV检测;并进一步随机取样12颗大豆在温室中进行发芽生长,待长成植株后用dot-ELISA再次进行SBMV检测。并参照董菁等(2010)报道的方法和中华人民共和国出入境检验检疫行业标准(SN/T1611—2013)中的RT-PCR方法进行验证,选用Sobe RdRp-R(5'-CCNTCNAARCCNGGNATGGGNYT-3'/5'-TCRTCDCCCATDKCDATRCACCA-3')和SBMV-F1/SBMV-R1(5'-ACTTGTCTGAGGGCAA-GTG-3'/GTGTCAGCCATATCATATTGG-3')2对引物对健康大豆和感病大豆进行RT-PCR扩增,目的片段大小分别为400 bp和580 bp,用AMV反转录酶合成cDNA。引物合成由浙江有康生物科技有限公司

完成。PCR反应体系为:反应缓冲液2.5 μ L、dNTP混合物0.5 μ L、上下游引物各1.0 μ L、模板cDNA 0.5 μ L、*Taq plus* DNA聚合酶0.25 μ L,加双蒸馏水至终体积为25 μ L。PCR反应程序为:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,54℃退火45 s,72℃延伸45 s,35个循环;72℃延伸10 min。

2 结果与分析

2.1 SBMV抗原的制备

大豆苗摩擦接种SBMV 2~3周后呈现由褪绿斑引起的典型花叶症状(图1-A)。收集发病叶片提纯SBMV粒子。提纯的SBMV用紫外分光光度计测得浓度为6.95 mg/mL,经2%磷酸钨负染后电镜下观察,发现提纯液中有较高浓度的病毒粒子,粒子形态为球状,直径约为28 nm(图1-B),具有SBMV粒子的典型粒子形态。

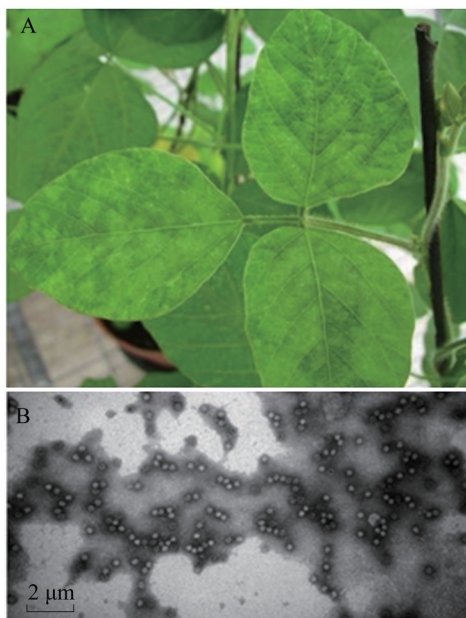


图1 南方菜豆花叶病毒的症状(A)及提纯病毒粒子的电镜照片(B)

Fig. 1 Symptoms of SBMV-infected bean plants (A) and electron micrograph of the purified SBMV particles (B)

2.2 杂交瘤细胞的融合、筛选和克隆

以提纯SBMV粒子为包被抗原,采用间接ELISA方法检测培养细胞上清液中的特异性抗体,检测结果发现,有150个孔抗体呈阳性反应。挑选18个特异性好、阳性反应强的杂交瘤细胞系进行有限稀释法克隆,最后获得3株能高效分泌抗SBMV特异性单抗的杂交瘤细胞株19C3、19H9和20G4,3株细胞株经3个月40次继代培养和多次冻存复苏仍生长良好并能稳定分泌抗体。

2.3 单抗腹水的制备与特性鉴定

从注射杂交瘤细胞的BALB/c小鼠腹腔采集到19C3、19H9、20G4单抗腹水,并对3个单抗腹水经饱和硫酸铵纯化后检测IgG含量分别为11.1、14.3、10.8 mg/mL,其中19H9含量最高。抗体类型及亚类鉴定结果表明,3个单抗类型均为IgG₁、 κ 轻链,间接ELISA方法测得3个单抗腹水的效价均达到 10^{-7} 。

2.4 ACP-ELISA方法建立及其灵敏度和特异性分析

3次方阵试验结果显示,在ACP-ELISA检测中19C3、19H9和20G4单抗及酶标二抗的最适工作浓度分别均为1:6 000和1:8 000稀释浓度,利用抗体的最适工作浓度建立检测植物中SBMV的ACP-ELISA方法。特异性结果表明,3个单抗与SBMV感病大豆叶片组织有强烈的特异性免疫反应,而不与健康的菜豆、大豆、毛豆、豌豆、蚕豆及感染SCPMV的豇豆叶片组织粗提液发生免疫反应(图2-A)。

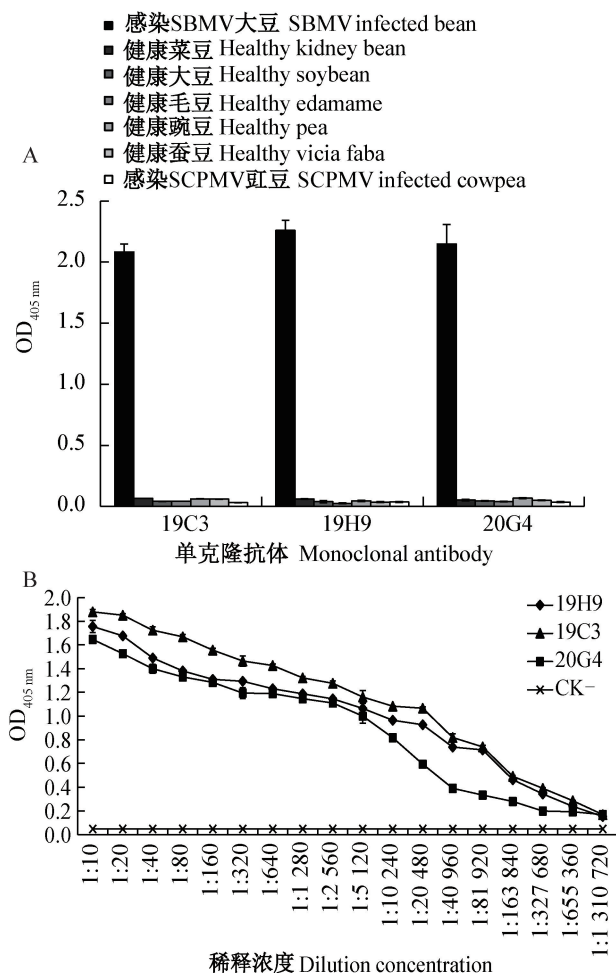


图2 ACP-ELISA方法分析单抗特异性(A)和灵敏度(B)

Fig. 2 Specificity (A) and sensitivity (B) analyses of the anti-SBMV MAbs by ACP-ELISA

灵敏度分析结果表明,19C3单抗和19H9单抗的灵敏度最好,对感染SBMV病叶的灵敏度均高达1:163 840稀释浓度,而20G4单抗的灵敏度略低,但也达到1:81 920稀释浓度(图2-B)。说明本研究所制备的SBMV三个单抗以及建立的ACP-ELISA方法对SBMV具有非常好的检测灵敏度和特异性。

2.5 SBMV的dot-ELISA方法的建立

3次方阵试验结果表明,dot-ELISA检测中单抗19C3、19H9和20G4的最适工作浓度分别为1:5 000、1:5 000和1:4 000稀释浓度,而AP标记的羊抗鼠IgG二抗均以1:8 000稀释浓度为最适工作浓度。利用抗体的最适工作浓度建立检测SBMV的dot-ELISA方法。灵敏度分析表明,以单抗19H9为核心建立的dot-ELISA方法的灵敏度最好,即检测病叶的灵敏度高达1:10 240稀释浓度(图3-A);以单抗19C3或单抗20G4建立的dot-ELISA方法检测病叶的灵敏度略低,但灵敏度也分别达1:2 560、1:1 280稀释浓度(图3-A)。

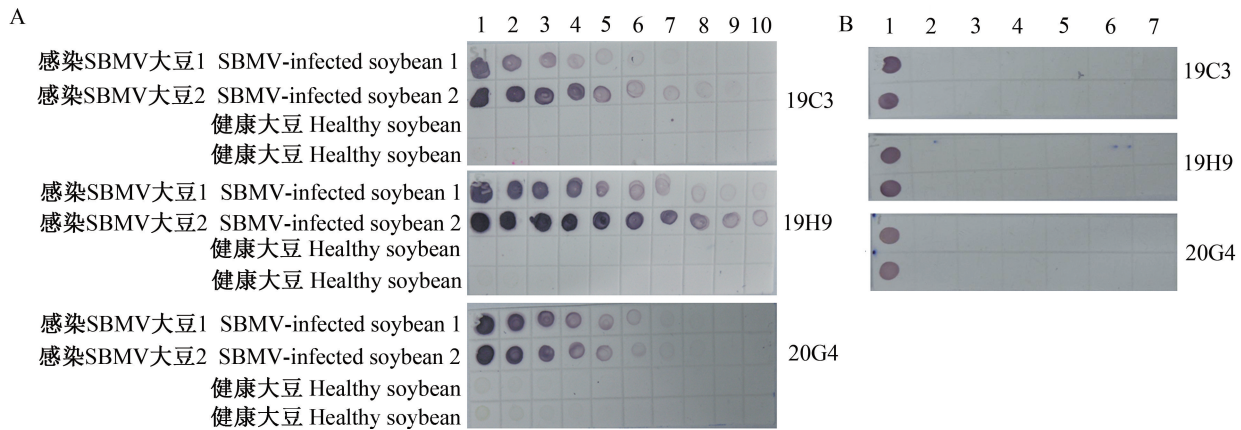
特异性分析表明,以3个单克隆抗体为核心建立的dot-ELISA方法检测感染SBMV植物组织呈特异性阳性反应,而检测同属的感染SCPMV的大豆和健康的大豆、毛豆、豌豆、蚕豆和菜豆植物组织呈阴性反应(图3-B)。

2.6 SBMV的dot-ELISA方法的应用

用本试验建立的dot-ELISA方法对上海口岸进口的20颗大豆样品进行SBMV检验检疫,结果显示有2颗大豆样品呈SBMV阳性(图4-A)。大豆苗样品用dot-ELISA方法再次进行SBMV检测,发现检测的12株大豆苗中有1株感染SBMV(图4-B)。并且通过RT-PCR验证,即从血清学检测为阳性的1株大豆样品中,分别扩增到400 bp和580 bp的特异性基因产物(图4-C),证明了dot-ELISA方法检测结果的可靠性。

3 讨论

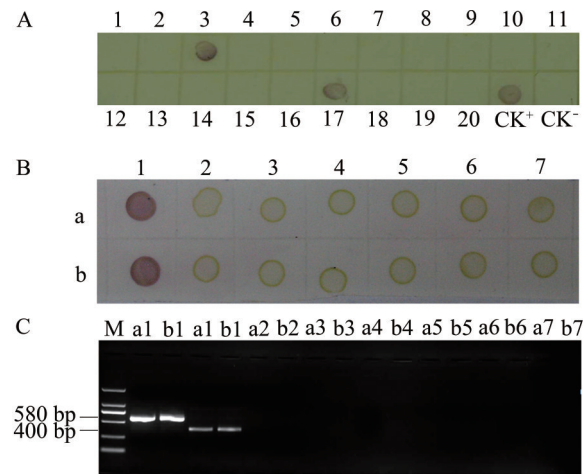
我国每年从美国、巴西等国进口大量的豆类农产品,SBMV作为一种重要的进境检疫性有害生物,入侵的风险较高。而且该病毒可随种子带毒进行远距离传播,菜豆种传率为1%~5%,豇豆种传率更高,为5%~40%,因此在检验检疫口岸及时检测并阻断SBMV的入侵可避免SBMV在国内的传播和危害(沈建国等,2016)。



图A中1~10分别代表1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120、1:10240的稀释浓度。图B中1和2分别为感染SBMV大豆和健康大豆的叶片组织粗提液；3：感染SCPMV豇豆的叶片组织粗提液；4~7分别为健康菜豆、毛豆、豌豆和蚕豆的叶片组织粗提液；上下2个点为同一样品的重复。1-10 in figure A represent the dilution concentrations of 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240. 1 and 2 in figure B are crude extracts from the SBMV-infected and healthy soybean plants respectively; 3 is SCPMV-infected cowpea plant crude extract; 4-7 are healthy kidney bean, edamame, pea and *vicia faba* plant crude extracts, respectively; up and down dots of the same membrane indicate repeats of the same sample。

图3 建立的 dot-ELISA 方法的灵敏度(A)和特异性(B)分析

Fig. 3 Sensitivity (A) and specificity (B) analyses of the developed dot-ELISA



A图：1~20为上海口岸20个大豆样品的检测结果；CK⁺和CK⁻分别是感染SBMV大豆和健康大豆，为阳性和阴性对照。B~C图：a1~a7和b3~b7分别是上海口岸12颗豆苗样品，b1和b2为感染SBMV豆苗和健康豆苗，为阳性和阴性对照，M：Marker。紫色斑点为阳性结果，无色或绿色斑点为阴性结果。A：1-20 are the detection results of 20 soybean samples from Shanghai port. CK⁺ and CK⁻ are positive (SBMV-infected soybean) and a negative (healthy soybean) controls. B and C：a1-a7 and b3-b7 are the detection results of 12 soybean seedling samples from Shanghai port. b1 and b2 are positive (SBMV-infected soybean seedling) and negative (healthy soybean seedling) controls. M：Marker. Purple color dots are positive samples; colorless or green color dots are negative samples.

图4 Dot-ELISA(A、B)和RT-PCR(C)方法对进口大豆的检测结果

Fig. 4 Detection results of imported soybeans by the dot-ELISA (A, B) and RT-PCR (C)

目前针对SBMV的口岸检测一般采用血清学(宋淑敏等, 1991; 陈青等, 2009; Ali, 2017)和基于PCR的RT-PCR(陈青等, 2009; 董菁等, 2010)、RT-LAMP(郭立新等, 2014)和qRT-PCR(白静等, 2007)分子生物学技术。RT-PCR检测SBMV虽具有很好

的灵敏度和特异性,但RT-PCR操作繁琐、费时费力,不适合大规模样品的检测。郭立新等(2014)根据SBMV外壳蛋白基因序列设计合成RT-LAMP引物,建立了SBMV的RT-LAMP检测方法,该方法比普通RT-PCR法灵敏度高,检测时间缩短,但其检疫

应用中依然存在假阳性的缺点,而且检测成本也较血清学方法高。白静等(2007)建立了检测 SBMV 的 qRT-PCR 方法,该方法是目前检测 SBMV 最灵敏的方法,但其需要昂贵的实时荧光 PCR 仪,操作技术水平要求高,仅适合于实验室小样本的检测。本研究所建立的血清学方法因快速、特异、灵敏、可规模化检测等优点,在病毒的口岸检验检疫和田间检测病毒样品中应用广泛。但血清学方法也存在不足,即有时检测的灵敏度和准确性达不到分子检测方法的水平,高质量的 SBMV 抗体决定了血清学方法的灵敏度和准确性。

20 世纪 90 年代初,我国就已制备出了抗 SBMV 的单抗和多克隆抗体(简称多抗),用制备的单抗和兔多抗组合的 DAS-ELISA 方法对提纯病毒的检测灵敏度最高,达到 78 ng/mL,但其制备的兔多抗具有非特异性强,检测效果不理想的缺点,且未分析制备单抗与同属 SCPMV 的交叉性、单抗检测病叶的灵敏度及检测结果的准确性(宋淑敏等,1991)。陈青等(2009)利用基于多抗的 DAS-ELISA 试剂盒和 RT-PCR 方法对进境豇豆种子发芽的幼苗进行 SBMV 的检测与鉴定,并成功检测到 SBMV,但该血清学检测试剂盒的多抗与 SCPMV 有交叉反应,因而对其检测结果无法进行最终判断。Ali(2017)利用基于多抗的 dot-ELISA 方法对美国俄克拉荷马州的田间大豆植株样品进行了 SBMV 检测,但没有具体报道该检测方法的灵敏度、特异性及准确性。本研究利用提纯的 SBMV 粒子作为免疫原,经细胞融合、筛选、克隆和腹水制备,共获得了 3 个抗 SBMV 高质量单抗 19C3、19H9 和 20G4,制备的 3 个单抗与感染 SBMV 大豆叶片有强烈的特异性免疫反应,3 个单抗对感染 SBMV 大豆叶片组织粗提液的灵敏度均达到 1:81 920 稀释浓度以上,且不与感染 SCPMV 的豇豆、健康的大豆、毛豆、豌豆、蚕豆和菜豆叶片组织粗提液发生免疫反应,说明这 3 个制备的 SBMV 单抗具有非常好的灵敏度和特异性,为建立 SBMV 血清学检测技术提供了关键的单克隆抗体。

以制备单抗为核心建立检测 SBMV 的 ACP-ELISA 和 dot-ELISA 两种血清学方法,这 2 种方法均能特异性检测 SBMV,而检测健康的菜豆、大豆、毛豆、豌豆和蚕豆植物组织呈阴性反应。其中,以 19H9 单抗建立的 ACP-ELISA 和 dot-ELISA 方法检测大豆叶片组织粗提液的灵敏度分别达到 1:163 840 和 1:10 240 稀释浓度。说明建立的 2 种血清学方法对 SBMV 具有很好的检测特异性和灵敏度。口岸大豆

样品的 dot-ELISA 检测结果与 RT-PCR 检测结果完全一致,说明建立的 dot-ELISA 方法可以准确地用于大豆种子中 SBMV 的口岸检验检疫。据现有文献信息显示,这是国内外首次关于 dot-ELISA 血清学方法应用于大豆种子中 SBMV 检测的报道。因此,本研究制备的 SBMV 高质量单抗及建立的血清学方法对于我国口岸快速检验检疫携带 SBMV 的大豆样品及田间检测诊断 SBMV 侵染的作物具有重要的应用价值。

参 考 文 献 (References)

- ALI A. 2017. Rapid detection of fifteen known soybean viruses by dot-immunobinding assay. *Journal of Virological Methods*, 249: 126–129
- BAI J, CHEN HY, FU JF, LI GF, ZHU SF. 2007. Detection of *Southern bean mosaic virus* by one step assay of real-time fluorescent RT-PCR. *Journal of Plant Protection*, 34(1): 78–82 (in Chinese) [白静, 陈红运, 傅俊范, 李桂芬, 朱水芳. 2007. 实时荧光 RT-PCR 一步法检测南方菜豆花叶病毒. *植物保护学报*, 34(1): 78–82]
- CHEN Q, LIN SM, CHEN HY, LIAO FR, YU FP, CHEN HJ, ZHU SF. 2009. Detection and identification of seed transmitted virus from imported cowpea germplasm. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39(1): 91–94 (in Chinese) [陈青, 林石明, 陈红运, 廖富荣, 余芳平, 陈洪俊, 朱水芳. 2009. 进境豇豆种子携带种传病毒的检测与鉴定. *植物病理学学报*, 39(1): 91–94]
- DONG J, CHEN Q, CHEN HY, ZHAO WJ, LIN Y, CHEN HJ. 2010. Utilization of degenerate primers for detecting sobemoviruses. *Journal of Plant Protection*, 37(4): 36–37 (in Chinese) [董菁, 陈青, 陈红云, 赵文军, 林毅, 陈洪俊. 2010. 应用简并引物检测南方菜豆花叶病毒属病毒. *植物保护学报*, 37(4): 36–37]
- GUO LX, DUAN WJ, XU YF, ZHANG YJ, ZHANG JH. 2014. Detection of *Southern bean mosaic virus* by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Plant Protection*, 44(4): 349–356 (in Chinese) [郭立新, 段维军, 徐亚飞, 张永江, 张吉红. 2014. 逆转录环介导等温扩增技术检测南方菜豆花叶病毒. *植物保护学报*, 44(4): 349–356]
- LIU H, SONG XJ, NI YQ, LU LN, ZHOU XP, WU JX. 2014. Highly sensitive and specific monoclonal antibody-based serological methods for *Rice ragged stunt virus* detection in rice plants and rice brown planthopper vectors. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(9): 1943–1951
- LIU Z, CHEN Z, HONG J, WANG XF, ZHOU CY, ZHOU XP, WU JX. 2016. Monoclonal antibody-based serological methods for detecting *Citrus tristeza virus* in citrus groves. *Virologica Sinica*, 31(4): 324–330
- RAO LX, HANG DQ, ZHOU XP, QIAN YJ, WU JX. 2018. Production and serological detection application of monoclonal antibodies against *Sugarcane mosaic virus*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 26(11): 1989–1995 (in Chinese) [饶黎霞, 黄德青, 周雪平, 钱亚娟, 吴建祥. 2018. 甘蔗花叶病毒单克隆抗体的制备及

- 其血清学检测应用. 农业生物技术学报, 26(11): 1989–1995]
- SONG SM, ZHANG CL, QUEXF, CHENG J, HU WZ, ZHANG ZF, YOU XJ. 1991. Preliminary study of the monoclonal antibodies against *Southern bean mosaic virus*. *Journal of Virology*, 7(2): 176–179 (in Chinese) [宋淑敏, 张成良, 阙晓枫, 陈京, 胡伟贞, 张作芳, 由雪娟. 1991. 南方菜豆花叶病毒单克隆抗体的初步研究. 病毒学报, 7(2): 176–179]
- SHEN JG, GAO FL, CAI W, JIN J, LIAO FR, WU JZ. 2016. Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of *Bean pod mottle virus* and *Soybean mosaic virus* in imported soybean seeds. *Scientia Agricultura Sinica*, 49(4): 667–676 (in Chinese) [沈建国, 高芳鑫, 蔡伟, 金晶, 廖富荣, 吴祖建. 2016. 进境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. 中国农业科学, 49(4): 667–676]
- SONG G, WU JY, XIE Y, LIU Y, QIAN YJ, ZHOU XP, WU JX. 2017. Monoclonal antibody-based serological assays for detection of potato virus S in potato plants. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 18(12): 1075–1082
- SONG G, GUO YS, RAO LX, ZHOU XP, WU JX. 2016. Preparation and detection application of monoclonal antibodies against *Potato virus Y*. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 42(5): 317–526 (in Chinese) [宋革, 郭玉双, 饶黎霞, 周雪平, 吴建祥. 2016. 马铃薯 Y 病毒单克隆抗体的制备及其检测应用. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 42(5): 517–526]
- SONG SM, ZHANG CL, QUE XF, CHEN J, HU WZ, ZHANG ZF, YOU XJ. 1991. Preliminary study of the monoclonal antibodies against *Southern bean mosaic virus*. *Journal of Virology*, 7(2): 176–179 (in Chinese) [宋淑敏, 张成良, 阙晓枫, 陈京, 胡伟贞, 张作芳, 由雪娟. 1991. 南方菜豆花叶病毒单克隆抗体的初步研究. 病毒学报, 7(2): 176–179]
- SONG XJ, DUAN S, HONG J, ZHOU CY, ZHOU XP, WU JX. 2017. Preparation and application of monoclonal antibodies against *Citrus tatter leaf virus* (CTLV). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 25(1): 165–172 (in Chinese) [宋西娇, 段硕, 洪健, 周常勇, 周雪平, 吴建祥. 2017. 柑橘碎叶病毒(CTLV)单克隆抗体的制备及其检测应用. 农业生物技术学报, 25(1): 165–172]
- WANG LM, YANG LC, HE LJ, ZHANG XQ, KE B, YOU P. 2001. ELISA for *Southern bean mosaic virus* in Guizhou Province. *Journal of Guizhou Normal University (Natural Science)*, 19(1): 33–35 (in Chinese) [王利民, 杨立昌, 何丽鹏, 张显强, 柯波, 游萍. 2001. 贵州南方菜豆花叶病毒的 ELISA 检疫. 贵州师范大学学报(自然科学版), 19(1): 33–35]
- WU JX, MENG CM, SHANG HL, RONG S, ZHANG C, HONG J, ZHOU XP. 2011. Monoclonal antibody-based triple antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay and immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction for *Odontoglossum ringspot virus* detection. *Journal of Virological Methods*, 171(1): 40–45
- WU SX, MANG KQ, KAESBERG P. 1985. Nucleotide sequence of coat protein cistron at 3'-end of *Southern bean mosaic virus*. *Chinese Journal of Virology*, 1(1): 47–54 (in Chinese) [吴世宣, 莽克强, 庇·卡斯伯格. 1985. 南方菜豆花叶病毒外壳蛋白基因序列的分析. 病毒学报, 1(1): 47–54]
- ZHOU XP, CHEN JS, LI DB, LI WM. 1994. A method for high yield purification of *Potyvirus*s. *Microbiology China*, 21(3): 184–186 (in Chinese) [周雪平, 陈集双, 李德葆, 李尉民. 1994. 马铃薯 Y 病毒组病毒高产量提取方法的建立. 微生物学通报, 21(3): 184–186]

(责任编辑:王璇)