

任春梅, 杨 柳, 缪 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.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.005

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

任春梅, 杨 柳, 缪 倩, 程兆榜

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为建立简便、有效、低成本小麦黄花叶病毒(WYMV)的检测方法,用提纯的 WYMV 免疫 BALB/c 小鼠后,利用杂交瘤细胞技术经细胞融合、筛选和克隆,共获得 2D4、2D3 和 6F4 3 株能稳定传代并分泌抗 WYMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞,并分别注射小鼠腹腔制备其单抗腹水。3 株单抗腹水的间接 ELISA 效价为 $10^{-6} \sim 10^{-7}$, 抗体类型及亚类均为 IgG1、 κ 链。特异性检测结果表明 6F4 和 2D4 这 2 株单抗仅与 WYMV 的 32 kD 外壳蛋白有特异性免疫反应。利用效价最高的 2D4 单抗建立了检测 WYMV 的抗原包被 ELISA 方法(ACP-ELISA),其灵敏度分析结果表明,当病叶以 1:25 600 (g/ml) 倍稀释时仍能检测到病毒,特异性分析结果表明可有效区分小麦易感染的中国小麦黄花叶病毒(CWMV)。田间样品检测结果表明该方法可准确、可靠地用于小麦 WYMV 的大规模检测。

关键词: 小麦黄花叶病毒; 单克隆抗体; ACP-ELISA

中图分类号: S435.121

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)01-0034-07

Production of monoclonal antibodies to wheat yellow mosaic virus and ACP-ELISA application in virus detection

REN Chun-mei, YANG Liu, MIAO Qian, CHENG Zhao-bang

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To develop a simple, effective and low-cost method for detecting wheat yellow mosaic virus (WYMV), the purified WYMV virus particles were used as an immunogen, after fused, selected and cloned, three hybridoma cell lines (2D4, 2D3 and 6F4) secreting monoclonal antibodies (MAbs) against WYMV were produced by fusing mouse myeloma cells with spleen cells from BALB/c, and injected intraperitoneally into BALB/c mice to produce ascetic fluids. The titers of three MAbs in ascites determined by an indirect-ELISA ranged from 10^{-6} to 10^{-7} . Isotypes and subclasses of three MAbs belonged to IgG1, κ light chain. 6F4 and 2D4 MAbs could specifically react with coat protein (32 kD) of WYMV. Based on the most sensitive 2D4 MAb, an antigen-coated plate enzyme-linked immunosorbent assay (ACP-ELISA) for detecting WYMV was established. Sensitivity analysis results showed that the virus could be detected when the diseased leaves were diluted with 1:25 600 (g/ml) times, specificity analysis results showed that the method could be used to distinguish WYMV and Chinese wheat mosaic virus (CWMV). The field sample detection results suggested that the ACP-ELISA could accurately and reliably detect WYMV in large-scale wheat samples.

Key words: wheat yellow mosaic virus;

monoclonal antibodies; ACP-ELISA

收稿日期: 2017-07-25

基金项目: 国家转基因重大专项(2016ZX08002)

作者简介: 任春梅(1981-), 女, 江苏大丰人, 副研究员, 硕士, 主要从事植物病毒研究。

通讯作者: 程兆榜, (E-mail) onlyone8501@126.com

小麦黄花叶病是由禾谷多黏菌(*Polymyxa graminis* L.)传播的一种麦类土传病毒——小麦黄花叶

病毒 (Wheat yellow mosaic virus, WYMV) 引起的^[1-2], 该病早在 1927 年就由日本的 Sawada 发现和报道^[3], 至今仍对小麦的生产造成一定危害。在自然条件下, 中国小麦花叶病毒 (Chinese wheat mosaic virus, CWMV) 与 WYMV 一样易感染小麦, 导致严重的田间病害^[4], 且两者常发生复合侵染, 因病害症状极其相似, 给鉴定工作带来了一定难度。在中国, 目前该病主要分布于淮河流域的河南、湖北、安徽、山东以及长江、黄河中下游的四川、陕西、江苏、浙江等省, 据 2013 年的统计, 在中国的发生总面积达 $2.00 \times 10^6 \text{ hm}^2$ ^[5-7], 已经对中国的小麦产量和品质都造成了严重影响, 因此急需建立一种能够准确、规模化检测该病毒的方法, 为小麦黄花叶病的防控提供技术保障。

目前, 针对 WYMV 的检测主要有电镜观察、血清学、分子生物学等方法。早在 2000 年叶荣等就采用电镜观察法对 WYMV 的典型病毒粒子进行了诊断^[8], 但此方法的仪器精密, 价格昂贵; 血清学检测, Xing 等以 P2 蛋白^[9]、向荣等以 P1 蛋白^[10]、韩成贵等以 CP 蛋白^[11]的原核表达产物制备了相应抗血清, 尚巧霞等^[12]根据 CP 的原核表达建立了 WYMV 的 ELISA 检测系统, 耿波等^[13]利用异种动物抗血清建立了双抗夹心 ELISA 检测技术, 但这些血清学方法应用于田间大规模样品的检测还未见报道; 分子生物学检测, 丛倩倩等^[14]利用 RT-PCR 检测了山东地区小麦黄花叶病的发生情况, 缪倩等建立了一步法快速检测 WYMV 和 CWMV 的 RT-PCR 方法, Tao 等^[15]建立了包括 WYMV 在内的小麦多种病毒的多重 PCR 检测体系, Zhang 等^[16]建立了检测 WYMV 的环介导等温扩增技术体系, Fukuta 等^[17]建立了包括 WYMV 在内的土传小麦花叶病毒多重 RT-LAMP 检测体系, 但该技术的应用受仪器设备和操作人员技术的限制, 成本高, 耗时长, 不适于田间大量样品的检测。因此本实验室利用蔗糖硫酸铯密度梯度离心法提纯了 WYMV 病毒粒子, 以此为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 利用杂交瘤技术获得了 3 个分泌抗 WYMV 的杂交瘤细胞株, 以此制备了 WYMV 的单抗腹水, 并利用其中最灵敏的一株单抗建立了检测 WYMV 的 ACP-ELISA 方法, 成功地应用于田间小麦黄花叶病毒的检测, 为 WYMV 田间大规模快速检测的实现提供了物质和技术支撑, 从而推动小麦黄花叶病的预报预警和科学防控体系的建立。

1 材料和方法

1.1 毒源

WYMV 毒源繁殖于江苏省农业科学院植物保护研究所小麦黄花叶病旱池病圃, 经 RT-PCR 鉴定后用于 WYMV 的提纯, -70°C 冰箱保存提纯病毒。中国小麦花叶病毒 (Chinese wheat mosaic virus, CWMV) 和大麦黄花叶病毒 (Barley yellow mosaic virus, BaYMV) 经本实验室鉴定后保存。

1.2 WYMV 的提纯

WYMV 的提纯参照任春梅等^[18]的方法加以改进, 先将约 400 g 小麦病叶和 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液置于搅拌机, 搅碎后用两层纱布过滤, 滤液中加入 300 ml 1/4 四氯化碳搅拌 5 min、静置 10 min, 8 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 加入 6% PEG-6000、3% NaCl 和 1% Triton.X-100, 冰浴搅拌至全部溶解, 4°C 下放置 6 h 或过夜, 8 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用悬浮缓冲液悬浮, 10 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 上清液加 5 ml 30% 蔗糖垫 (含 0.3% Triton.X-100), 25 000 r/min 离心 2 h, 沉淀用悬浮缓冲液悬浮, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液。进一步纯化采用蔗糖硫酸铯不连续密度梯度离心法, 以 22 000 r/min 离心 3 h, 取离心管上端 1/3 处为病毒层, 用样品缓冲液稀释, 40 000 r/min 离心 1 h, 沉淀用 0.5 ml 样品缓冲液悬浮, 即为所提纯病毒溶液。提纯病毒液经 2% 磷钨 (PTA) 染色后置 JEM-1200EX 电镜下观察病毒粒子形态。以纯化的 WYMV 病毒粒子作为抗原, 制备抗 WYMV 的单克隆抗体。

1.3 小鼠免疫

参照 Shang 等^[19]的免疫程序, 选用 7 周龄左右雌性 BALB/c 小鼠 6 只, 将提纯的 WYMV 与等体积弗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FC) 混合, 首次免疫采用皮下注射, 2~3 周后加强免疫 1 次, 将抗原与弗氏不完全佐剂 (Freund's incomplete adjuvant, FC) 等体积混合, 采用皮下及腹腔注射。4 次免疫后采血检测, 通过间接 ELISA 方法确定抗血清的效价, 待效价大于 1:10 000, 选择 1~2 只小鼠进行细胞融合。

1.4 细胞融合、筛选与亚克隆

1.4.1 细胞融合 首先依据 Wu 等^[20]的方法, 制备数量比为 20:1 免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞, 再用 DMEM 基础培养基稀释细胞并用冷冻离心机离心弃上清, 摇动离心管使细胞均匀, 缓慢加

入 0.8 ml 50% PEG, 反应 90 s, 加入 20~30 ml DMEM 培养基终止 PEG, 把融合的细胞放到 37 °C 水浴锅中反应 10 min, 再离心弃上清液加入 HAT DMEM 培养基, 最后置于 CO₂ 培养箱中培养, 融合 10 d 后开始筛选检测。

1.4.2 融合筛选 检测前 1 d, 用 PBS 包被 5 µg/ml 抗原于 ELISA 板, 过夜。次日吸取细胞上清液 1 孔 100 µl 进行间接 ELISA 检测, 以提纯的 WYMV 和感染 WYMV 的病叶为阳性, 健康小麦叶片为阴性, 根据 ELISA 结果, 判断是否阳性(样品孔 OD 值/阴性孔 OD 值 ≥ 2.1 则判定为阳性)。用单道移液器挑检整板检测出的阳性孔, 进行第二次 ELISA 确认检测, 确定后的阳性孔细胞进行亚克隆。

1.4.3 亚克隆 参考 Wu 等^[20]的方法, 将强阳性反应杂交瘤细胞进行 3 次连续细胞克隆, 挑出稳定传代细胞的单克隆扩大培养。

1.5 腹水制备和抗体纯化

1.5.1 腹水制备 参考 Wu 等^[20]的方法, 将杂交瘤细胞悬液注射入小鼠腹腔, 再收集腹部明显膨大的小鼠腹水, 离心取上清液即为腹水单克隆抗体, -20 °C 保存备用, 待测定效价。

1.5.2 抗体纯化 参照汪谦^[21]采用的辛酸硫酸铵方法纯化抗体, 最后取少量进行效价测定。

1.6 抗体类型鉴定、效价测定和特异性分析

1.6.1 抗体类型及亚类鉴定 鉴定依据美国 Sigma 公司的抗体类型鉴定试剂盒操作说明进行。

1.6.2 抗体效价测定 将提纯的 WYMV 用碳酸盐包被液稀释为 1 g/ml 作为抗原, 一抗采用倍比稀释的单抗, 二抗应用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 参照 Wu 等^[20]采用的间接 ELISA 方法测定腹水的效价。

1.6.3 Western blot 分析单抗的特异性 选用 WYMV 和 CWMV 感染的小麦叶片、BaYMV 感染的大麦叶片、健康小麦叶片为分析对象, 参考刘欢等^[22]的方法进行 Western blot 分析, SDS-PAGE 电泳胶一部分用于考马斯亮蓝染色观察, 另一部分电转移硝酸纤维素膜(NC)后与不同株单抗进行 Western blot 分析, 测定单抗的特异性反应情况。

1.7 ACP-ELISA 方法的建立

1.7.1 ACP-ELISA 抗体最适工作浓度 根据刘欢等^[22]的方法, 利用 WYMV 的单克隆抗体建立其 ACP-ELISA 检测方法。用方阵实验确定单抗和酶标抗体的最适工作浓度。设置 WYMV 单抗浓度:

4.000 µg/ml、2.000 µg/ml、1.000 µg/ml、0.500 µg/ml、0.250 µg/ml、0.125 µg/ml、0.062 µg/ml、0.032 µg/ml、0.016 µg/ml 和 0.008 µg/ml; HRP 酶标记的羊抗鼠 IgG 二抗浓度: 0.248 µg/ml、0.124 µg/ml、0.062 µg/ml、0.032 µg/ml、0.016 µg/ml、0.008 µg/ml、0.004 µg/ml 和 0.002 µg/ml, 测定酶标仪上的 OD₄₅₀ 值。同时设健康小麦为阴性, 每个处理 3 次重复。选取方阵中间 OD₄₅₀ ≈ 1.5, 阴性, OD₄₅₀ < 0.2 对应的 WYMV 单抗和酶标二抗的稀释倍数作为最佳工作浓度。

1.7.2 ACP-ELISA 特异性分析 利用以上建立的 ACP-ELISA 检测方法, 测定 WYMV 感染小麦、CWMV 感染小麦、BaYMV 感染大麦病叶和健康小麦叶片在酶标仪上的 OD₄₅₀ 值, 分析 ACP-ELISA 方法的特异性。

1.7.3 ACP-ELISA 灵敏度分析 同上, 以 WYMV 感染小麦病叶为阳性, 健康小麦叶片为阴性, 用 0.01 mol/L 的 PBS (PH7.4) 将小麦病叶从 1:100 到 1:102 400 (g/ml) 倍比稀释, 健康小麦叶片作同样倍比稀释, 进行 ACP-ELISA 方法的灵敏度分析。

1.8 ACP-ELISA 方法的检测应用

应用建立的 ACP-ELISA 检测方法, 对采自于江苏的高邮、宝应、仪征、常州、姜堰、兴化、盐都、淮安和大丰, 安徽的寿县和来安, 河南的遂平, 山东的临沂、泰安和济宁等的小麦中小麦黄化叶病疑似样品进行检测, 用温室生长的小麦健康叶片为阴性对照, 病圃中经检测为小麦黄化叶病病叶为阳性对照, 每个处理设 3 个重复, 以 $P/N > 2.1$ 作为阳性判断标准。再对每个样品用 RT-PCR 方法进行验证, 观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 小麦黄花叶病毒的提纯

用改进的方法提纯小麦黄花叶病毒样品, 经 2% 磷钨酸负染后在透射电镜下观察到较纯且浓密的病毒粒子(图 1), 粒子形状呈直线状, 长度约 200 nm, 直径约 13 nm。用紫外分光光度法测得的浓度为 5.44 mg/ml。

2.2 杂交瘤细胞的融合率、阳性率和克隆

提纯的 WYMV 免疫小鼠, 经融合、筛选和培养后, 18 块 96 孔板细胞的融合率达到 100%。当杂交瘤细胞生长至覆盖孔底 20~30% 时, 以提纯病毒为包被抗原采用间接 ELISA 方法对融合细胞进行阳

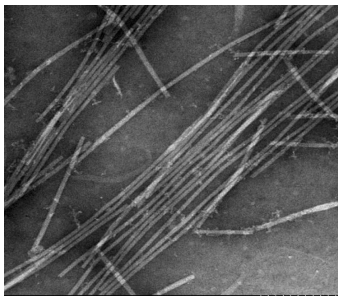


图1 WYMV 病毒粒子的电镜观察
Fig.1 Electron microscopic observation of wheat yellow mosaic virus (WYMV) particles

性筛选,结果显示阳性率为 9.5%。利用有限稀释法对 5 个阳性反应强、特异性好的杂交瘤细胞进行 3 次细胞克隆,最终获得 6F4、2D3 和 2D4 共 3 株生长良好且能稳定分泌抗 WYMV 的单抗杂交瘤细胞株。

2.3 抗体的制备和特性鉴定

用克隆好的杂交瘤细胞注射 BALB/c 小鼠腹腔,采集腹水,最终 3 个细胞株各获得约 25 ml 腹水。3 株腹水纯化后的 IgG 含量在 1.45~ 3.10 mg/ml(表 1),经试剂盒鉴定,3 个抗体均为 IgG1、κ 链,间接 ELISA 方法测得 3 株腹水单抗的效价达 10⁻⁷~10⁻⁶(表 1)。

表 1 WYMV 单克隆抗体 (MAbs) 的特性
Table 1 Properties of monoclonal antibodies (MAbs) against WYMV

单克隆抗体	单克隆抗体类型	单克隆抗体腹水效价	IgG 含量 (mg/ml)
6F4	IgG1, κ 链	10 ⁻⁶	1.45
2D3	IgG1, κ 链	10 ⁻⁶	2.30
2D4	IgG1, κ 链	10 ⁻⁷	3.10

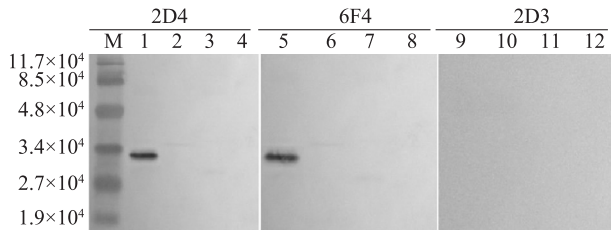
2.4 单抗的特异性分析

Western blot 结果表明,6F4 和 2D4 两株抗体均能与 WYMV 病叶中 1 条约 32 kD 的蛋白亚基结合,而在 CWMV 和 BaYMV 病叶、健康小麦叶片中均没有出现任何条带(图 2),说明这两株单抗均能与 WYMV 外壳蛋白亚基特异性结合。2D3 抗体在 WYMV、CWMV、BaYMV 病叶、健康小麦叶片中均未检测到任何条带,但 ACP-ELISA 检测时 2D3 抗体与 WMYV 病毒呈阳性反应,故推测 2D3 单抗是针对 WYMV 构象型的抗原决定簇,具有一定的空间构

象,其空间结构由于电泳过程中的变性而被破坏,使得单抗不能与抗原结合。

2.5 ACP-ELISA 法的条件优化

经方阵实验,ACP-ELISA 法中 6F4、2D4 和 2D3 的 3 个单抗的最适工作浓度分别为 0.50 μg/ml、0.25 μg/ml 和 2.00 μg/ml,酶标二抗的最适工作浓度为 0.062 μg/ml。

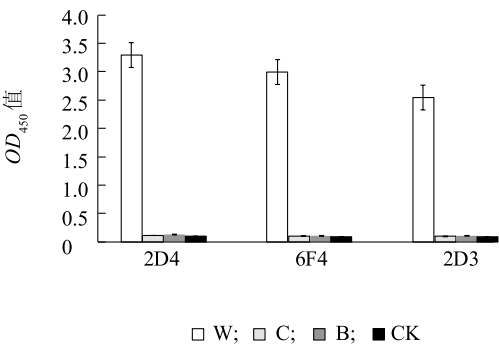


M:蛋白 marker;1、5 和 9: WYMV 感染小麦病叶提取液;2、6 和 10: CWMV 感染小麦病叶提取液;3、7 和 11: BaYMV 感染大麦病叶提取液;4、8 和 12: 健康小麦叶片提取液。

图 2 WYMV 单克隆抗体 (MAbs) 与病毒衣壳蛋白的 Western blot 分析
Fig.2 Western blot analysis of WYMV coat protein with monoclonal antibodies (MAbs)

2.6 ACP-ELISA 法的特异性分析

3 个抗体建立的 ACP-ELISA 法的特异性分析见图 3,结果显示 3 个单抗的 ACP-ELISA 检测中,只有 WYMV 感染病叶出现了强阳性反应,而 CWMV 和 BaYMV 感染病叶与健康小麦叶片为阴性反应,说明这 3 种单抗建立的 ACP-ELISA 方法均具有很好的特异性。



W: WYMV 感染的小麦叶片; C: CWMV 感染的小麦叶片; B: BaYMV 感染的大麦叶片; CK: 健康小麦叶片。

图 3 ACP-ELISA 的特异性
Fig.3 Specificity of the ACP-ELISA

2.7 ACP-ELISA 法的灵敏度

灵敏度分析结果表明,以 2D4 单抗建立的

ACP-ELISA 检测病叶的灵敏度最高,当小麦病叶以 1 : 25 600 倍稀释时,仍呈阳性反应;而以 6F4 和 2D3 单抗建立的 ACP-ELISA 检测病叶的灵敏度稍差(图 4)。

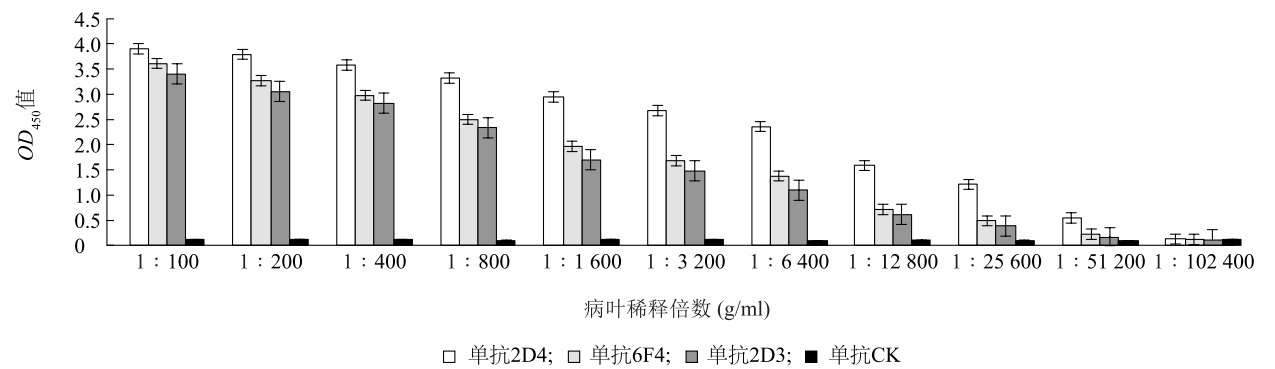


图 4 ACP-ELISA 的灵敏度
Fig.4 Sensitivity of the ACP-ELISA

2.8 ACP-ELISA 法的检测应用

应用最灵敏的 2D4 单抗建立的 ACP-ELISA 检测方法对采自中国 4 个省 15 个县、市的 60 个样品进行检测,结果见表 2。由表可知,WYMV 的分布广泛,除江苏的淮安、大丰和仪征三地的小麦样品中未检测到外,其余 12 个县、市均有分布,阳性检出率在 63.63%以上,说明 WYMV 目前仍是麦子上较为流行的主要病毒。同时,小麦样品进一步用 RT-PCR 检测验证,结果表明与 ACP-ELISA 检测的阳性结果高度一致(图 5),此外,阳性 RT-PCR 产物经核酸测序验证均为 WYMV。说明本研究建立的检测 WYMV 的 ACP-ELISA 方法能够可靠、准确地用于小麦中 WYMV 的检测。

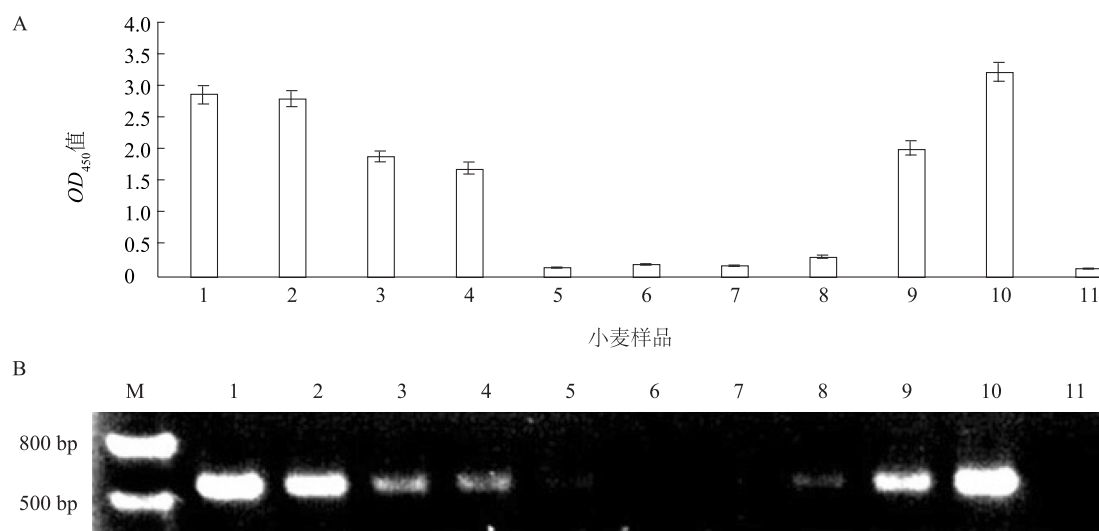
3 讨论

单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb)是由一个 B 淋巴细胞产生的针对一种抗原决定簇的抗体,因其特异性强、灵敏度高、可无限量生产等特点而被广泛应用,目前已被应用于生物学和医学的各个研究领域,促进了细胞学、遗传学、免疫学和病毒学等众多学科的发展^[23]。自 1982 年西德科学家成功研制了烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)的单克隆抗体,目前单抗在植物病毒学的检测方面得到了广泛应用。国内外学者已经制备了水稻、玉米、蔬菜等作物上几十种植物病毒的单抗,大部分都已应用于田间样品的检测,对控制病毒病害在田间的发生,减少经

济损失,抗病筛选和病害流行预测都起到了十分重要的作用。

表 2 ACP-ELISA 法检测田间疑似小麦黄化叶病样品结果
Table 2 Detection results of field wheat samples tested by ACP-ELISA

采集地点	样品数 (个)	阳性数(个)		吻合率 (%)
		ACP-ELISA	RT-PCR	
江苏高邮	3	2	2	100
江苏宝应	1	1	1	100
江苏仪征	5	0	0	100
江苏常州	4	4	4	100
江苏姜堰	7	4	4	100
江苏兴化	5	5	5	100
江苏盐都	1	1	1	100
江苏淮安	3	0	0	100
江苏大丰	7	0	0	100
安徽寿县	3	3	3	100
安徽来安	2	2	2	100
河南遂平	5	4	4	100
山东临沂	3	3	3	100
山东泰安	4	4	4	100
山东济宁	2	1	1	100



A: ACP-ELISA 检测方法; B: RT-PCR 检测方法; M: DNA 分子量 marker; 1-9: 田间小麦样品; 10: WYMV 感染小麦样品 (阳性对照); 11: 健康小麦样品 (阴性对照); 图中扩增带均为 520 bp WYMV 目的条带。

图 5 ACP-ELISA 法 (A) 和 RT-PCR 法 (B) 检测结果的吻合度

Fig.5 Detection results of field wheat samples tested by ACP-ELISA (A) and RT-PCR (B)

近几年,随着耕作制度和推广品种的交替变化,小麦黄花叶病在山东、河南、江苏、安徽等冬小麦上发生仍然严重^[24-25],因此亟待寻找到控制该病害的有效方法。其中病害的预测预报是前提,抗病品种的应用是首选,这些策略都会产生大量需要检测的样品。因为田间小麦黄花叶和小麦花叶病毒病的发病症状极其相似,而且常常发生复合侵染、隐症等现象,生物学方法不可有效鉴定。虽然分子生物学方法的灵敏度强且特异性好,但其需要更高的成本和更精密的仪器,且对操作者的要求比较高,所以一般只局限于实验室使用。综合而言,血清学方法的操作相对简便,且具有特异性好、灵敏度高、成本低等特点,所以更适用于大规模田间样品的检测,也易于在基层进行推广。基于此,本研究从自建的小麦黄花叶病病圃中采集了大量病叶,用蔗糖硫酸铯密度梯度离心提纯病毒,免疫小鼠,通过杂交瘤技术得到了3株能高效分泌 WYMV 的单克隆抗体细胞株并制备了单抗腹水,其效价达 $10^{-7} \sim 10^{-6}$,以其为核心建立了检测 WYMV 的 ACP-ELISA 方法,其检测病叶的灵敏度达 1:25 600 倍稀释,且特异性强。利用建立的 ACP-ELISA 方法测定中国小麦主产区小麦黄花叶病的发生情况,检测结果发现 WYMV 的感染率高达 63.64%,说明该病仍是当下小麦上极易发生的病毒病害,应引起相关部门足够的重视,也提示我们快捷、高效、低成本检测方法研制的必要性。该

方法虽不及 RT-PCR 法的检测灵敏度高,但检出率与其一致,说明其检测的可靠性。相比于多抗建立的检测方法,其具有特异性高、均质性好,且只要得到 1 株好的细胞株就可以无限量生产等优点。强特异性能有效解决田间 WYMV 和 CWMV 复合感染不易区分的难题,这在田间应用中的优点尤为明显。总之,以单抗为核心建立的 ACP-ELISA 方法具有操作简便、准确性强、易标准化和大规模生产等特点,可有效应用于田间小麦 WYMV 的检测,对该病毒病的诊断、预测、预报及防控具有重要意义。

参考文献:

- [1] 陈剑平,阮义理,董玛佳. 我国一些地区发生的小麦土传病毒病原研究[J]. 病毒学杂志, 1989(2): 176-181.
- [2] 雷利娟,陈炯,陈剑平,等. 我国真菌传线状小麦花叶病毒病原初步鉴定为小麦黄花叶病毒(WYMV)[J]. 中国病毒学, 1998, 13(1): 89-96.
- [3] SAWADA E. Wheat yellow mosaic prevention[J]. Journal of Plant Protection (Byochugai-Zasshi), 1927, 14: 444-449.
- [4] 缪倩,季英华,任春梅,等. 一种快速同步检测小麦花叶病毒和中国小麦花叶病毒的方法[J]. 麦类作物学报, 2013, 33(3): 595-599.
- [5] 孙炳剑,羊健,孙丽英,等. 禾谷多黏菌传小麦病毒病的分布及变化动态[J]. 麦类作物学报, 2011, 31(5): 969-973.
- [6] 燕飞,孙丽英,尚佑芬,等. 我国粮食作物病毒病发生与防控现状[J]. 植物保护, 2013, 39(5): 33-37.
- [7] 李鹏,崔正勇,高国强,等. 小麦黄花叶病研究进展[J]. 山东

- 农业科学, 2017, 49(8): 168-172.
- [8] 叶荣, 郑滔, 徐磊, 等. 山东烟台小麦土传病毒病由小麦黄花叶病毒和土传小麦花叶病毒相关病毒复合侵染所致[J]. 病毒学报, 2000, 16(1): 80-82.
- [9] XING Y, SU N, LI D. Over-expression of 72 kDa protein of wheat yellow mosaic virus in *E.coli* and preparation of its antiserum[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(6): 525-528.
- [10] 向荣, 孙丽英, 孙炳剑, 等. 小麦黄花叶病毒 P1 蛋白原核表达、抗血清制备及其检测[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(2): 324-328.
- [11] 韩成贵, 李大伟, 于嘉林, 等. 小麦黄色花叶病毒外壳蛋白基因 *E.coli* 表达产物特异性抗血清的制备及其应用[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 373-376.
- [12] 尚巧霞, 韩成贵, 杨莉莉. 小麦黄花叶病毒的血清学检测[J]. 北京农学院学报, 2002, 17(2): 15-17.
- [13] 耿波, 韩成贵, 翟亚峰, 等. 利用异种动物抗血清双抗夹心法检测小麦黄花叶病毒[J]. 中国病毒学, 2003, 18(1): 76-78.
- [14] 丛倩倩, 许斐斐, 李向东, 等. 山东小麦黄花叶病毒的分子检测与鉴定[J]. 山东农业科学, 2012, 44(11): 8-11.
- [15] TAO Y, MAN J, WU Y. Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China[J]. Archives of Virology, 2012, 157(7): 1261-1267.
- [16] ZHANG Z Y, LIU X J, LI D, et al. Rapid detection of wheat yellow mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Virology Journal, 2011, 8(1): 550.
- [17] FUKUTA S, TAMURA M, MAEJIMA H, et al. Differential detection of Wheat yellow mosaic virus, Japanese soil-borne wheat mosaic virus and Chinese wheat mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 189(2): 348-354.
- [18] 任春梅, 程兆榜, 朱慧, 等. 3 种麦类土传花叶病毒的多抗制备及检测应用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 143-146.
- [19] SHANG H, XIE Y, ZHOU X, et al. Monoclonal antibody-based serological methods for detection of Cucumber green mottle mosaic virus[J]. Virology Journal, 2011, 8(1): 228-236.
- [20] WU J X, NI Y Q, LIU H, et al. Development and use of three monoclonal antibodies for the detection of Rice black-streaked dwarf virus in field plants and planthopper vectors[J]. Virology Journal, 2013, 10(1): 114.
- [21] 汪谦. 现代医学实验方法[M], 北京: 人民卫生出版社, 1997: 730-738.
- [22] 刘欢, 倪跃群, 饶黎霞, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒和水稻黑条矮缩病毒的单抗制备及其检测应用[J]. 植物病理学报, 2013, 43(1): 27-34.
- [23] 孔君, 刘箬, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 170-173.
- [24] 陈剑平. 中国禾谷多黏菌传麦类病毒研究现状与展望[J]. 自然科学进展, 2015, 15(5): 524-533.
- [25] HAN C G, LI D W, XING Y M, et al. Wheat yellow mosaic virus widely occurring in wheat (*Triticum aestivum*) in China[J]. Plant Disease, 2000, 84(6): 627-630.

(责任编辑: 姜华珏)