

中图分类号: S532; S432.4*1 文献标识码: A 文章编号: 1672-3636 2006)06-0339-04

NCM-ELISA 检测马铃薯 Y 病毒 (PVY) 技术的研究及应用

吕典秋^{1,2}, 李学湛¹, 吕文河^{2*}, 于德才¹, 李辉³

(1. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086;
2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 黑龙江省
农业科学院谷物品质研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 血清学方法是病毒检测的主要手段。本试验通过对马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的提纯, 免疫家兔制备 PVY 抗血清, 并提取 PVY 免疫球蛋白 IgG 作为 NCM-ELISA 反应为一抗, 以市售羊抗兔抗血清为二抗, 在硝酸纤维素膜 (NCM) 上进行 NCM-ELISA 反应检测 PVY, 建立 PVY NCM-ELISA 检测反应体系。试验结果显示, NCM-ELISA 具有反应特异性强, 灵敏度高的优点, 检测植物叶片样品的最高稀释度可达到 1:250。通过对田间 40 份样品的 NCM-ELISA 和 DAS-ELISA 检测比较, 其检测结果吻合率达到 100%。由于 NCM-ELISA 方法可以将样品点在硝酸纤维素膜上, 并且可贮存几个星期或将膜送到其他实验室进行检测, 因此具有操作简单, 使用方便, 检测成本低等优点。

关键词: 硝酸纤维素膜-酶联免疫分析; 马铃薯 Y 病毒; 检测

马铃薯 Y 病毒主要由蚜虫以非持久性方式进行传播^[1], 其减产幅度可达 50%~80%^[2]。当和 PVX、PVA 病毒复合侵染时, 常能造成较大的减产^[3]。依病毒株系不同, 其症状差异较大。根据其在马铃薯、烟草和其它寄主上症状严重程度, 可分为三个株系 PVY^O, PVY^C 和 PVY^N^[4]。利用 CF RT-PCR (Competitive fluorescent RT-PCR assay) 技术可以快速、准确地进行不同株系的鉴定^[5]。植物病毒的诊断主要通过症状观察、指示植物接种鉴定、血清鉴定、电镜观察等方法进行诊断^[6-7]。早在 1983 年 Vetten 等^[8]就利用 ELISA 技术成功地检测到自然状态下和打破休眠薯块中的 PVY 和 PVA 病毒。目前, 在生产上检测马铃薯病毒的方法主要有 Indirect-ELISA、DAS-ELISA 和 NCM-ELISA 等。其中, NCM-ELISA 是一种利用硝酸纤维素膜取代微量滴定板的间接酶联免疫分析方法。

收稿日期: 2006-03-08

作者简介: 吕典秋 (1973-), 男, 助理研究员, 现为东北农业大学在读博士研究生, 主要从事植物病毒分子生物学研究。

* 通讯作者: whlu@mail.neau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 植物材料

2005 年 7 月, 采自哈尔滨市南岗区马铃薯生产基地的马铃薯植株叶片样品, 品种为早大白。

1.2 抗原及抗血清

将密度梯度离心纯化的 PVY 病毒, 进行免疫家兔制备抗血清。阳性对照和 DAS-ELISA 试剂盒来自国际马铃薯中心 (CIP)。

1.3 试剂

NBT、BCIP、羊抗兔酶标抗体、硝酸纤维素膜均购自 Sigma 公司, 其它试剂为国产分析纯试剂。

1.4 免疫球蛋白 IgG 的制备和纯化

利用硫酸铵沉淀方法进行^[9]。向 30 mL 离心管中加入 1 mL 粗抗血清, 再加入 9 mL 蒸馏水, 小心搅拌, 加入 10 mL 饱和硫酸铵, 室温放置 45 min。4, 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃去上清, 将沉淀重新悬浮于 1 mL 透析缓冲液 (5 mM PBS, pH=7.4) 中。4 透析, 更换 3 次透析液, 每次 500 mL。用分光光度计测量 280 nm 的紫外吸收值以便计算

球蛋白的确切浓度 $A_{280}=1.4$, 相当于球蛋白的浓度 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4 贮存。

1.5 利用 NCM-ELISA 检测 PVY

1.5.1 样品采集

在田间采集样品, 分别从待测植株的顶部、中部和底部各取一个叶片组成混合样品, 放入塑料样品袋中-20 冰箱保存。

1.5.2 样品的制备

向样品中加入 10 倍样品重量的提取缓冲液 (含 0.2% 亚硫酸钠的 TBS, 0.02 M Tris, 0.5 M NaCl, pH=7.5), 室温下充分研磨叶片。

1.5.3 点样

将膜裁成需要的大小, 使用前在 TBS 中浸湿至少 5 min, 将一张事先浸泡过的 1# Whatman 滤纸置于斑点杂交多孔过滤加样器的抽真空板上, 将浸润的膜置于其上, 用一块封口膜封闭抽真空板上未被覆盖的区域。连接真空泵, 小心打开开关, 每孔上样 $30 \mu\text{L}$ (植物汁液), 将膜从抽真空板上取下, 在室温下风干 (15~30 min)。

1.5.4 血清学检测

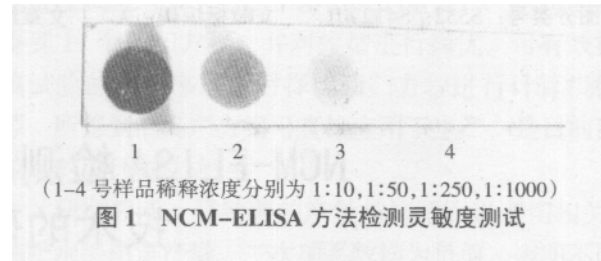
将干燥后的膜浸泡在封闭液中 (TBS+2% 牛奶+2% Triton X-100), 室温下摇床振荡 ($50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 封闭 1 h。用 TBS-2% 牛奶稀释第一抗体 (工作浓度为 $1:1000$)。室温下振荡 ($50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 孵育过夜, 用 TBS+2% 牛奶稀释酶标抗体。室温下振荡 ($50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 孵育 1 h, 用 TBS (含 0.05% Tween-20) 洗膜 4 次, 每次快速振荡 ($100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 洗涤 3 min。

向 25 mL 底物缓冲液 (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.005 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pH 9.5) 中加入 NBT 储备液 (40 mg NBT, 1.2 mL 70% 二甲基甲酰胺), 然后滴加 BCIP 储备液 (20 mg BCIP 中加入 70% 二甲基甲酰胺 1.2 mL)。将膜置于 NBT/BCIP 底物溶液中, 室温下振荡 ($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 孵育 30 min。弃去 NBT/BCIP 底物溶液并用蒸馏水浸泡膜终止显色反应。用蒸馏水洗膜 3 次, 每次 3 min。

2 试验结果

2.1 NCM-ELISA 方法检测 PVY 检出量

将已知的阳性样品提取汁液按 $1:10$, $1:50$, $1:250$, $1:500$ 进行稀释, 按 1.5 中 NCM-ELISA 检测操作程序进行。结果显示, 可检出的最高汁液稀释度为 $1:250$ (见图 1)。

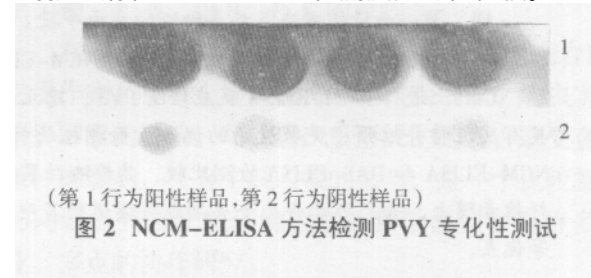


(1-4 号样品稀释浓度分别为 1:10, 1:50, 1:250, 1:1000)

图 1 NCM-ELISA 方法检测灵敏度测试

2.2 NCM-ELISA 方法检测 PVY 专化性测试

将已知的 PVY 阳性样品和阴性样品分别按 $1:20$ 稀释, 点在 NCM 膜上进行专化性测试, 测试结果如图 2。结果看出, 阳性样品有斑点颜色反应 (第 1 行), 阴性样品没有颜色反应 (第 2 行), 证明所制备的抗血清和 NCM-ELISA 检测反应专化性强。



(第 1 行为阳性样品, 第 2 行为阴性样品)

图 2 NCM-ELISA 方法检测 PVY 专化性测试

2.3 同 DAS-ELISA 检测结果比较

将田间采集的 40 份植株叶片样品分别利用 NCM-ELISA 和 DAS-ELISA 方法进行检测, 比较两种方法的检测结果。其中利用 NCM-ELISA 对 40 个样品的检测结果见图 3, 带有紫色斑点的为阳性样品, 无紫色斑点的为阴性样品。阳性样品数为 26, 检出率为 65%。利用 DAS-ELISA 对同样样品的检测结果见表 1, 其中, 两个对照阴性样品 OD_{405} 值分别为 0.193 和 0.183, 以大于阴性样品平均值+0.05 的样品作为阳性样品, 即以 OD_{405} 大于 0.238 的样品视为阳性样品。和 NCM-ELISA 结果相比较, 两者检测结果吻合率 100%。

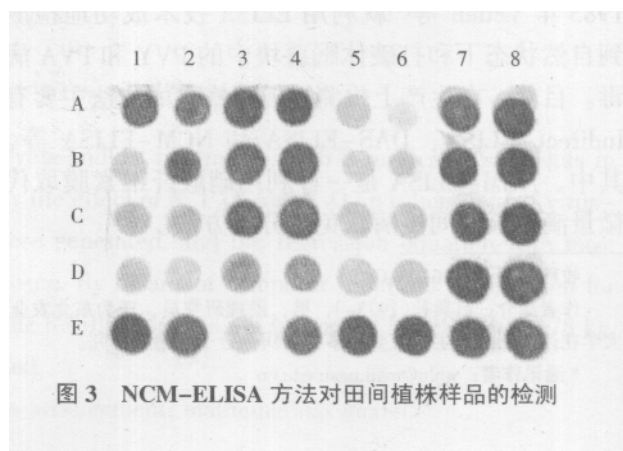


图 3 NCM-ELISA 方法对田间植株样品的检测

表 1 DAS-ELISA 对田间植株样品的检测

样品号	OD 值	结果	样品号	OD 值	结果
A1	1.023	+	C5	0.159	-
A2	0.992	+	C6	0.172	-
A3	1.873	+	C7	1.835	+
A4	1.795	+	C8	1.902	+
A5	0.163	-	D1	0.106	-
A6	0.086	-	D2	0.160	-
A7	0.998	+	D3	0.301	+
A8	1.001	+	D4	0.415	+
B1	0.134	-	D5	0.100	-
B2	1.102	+	D6	0.136	-
B3	1.798	+	D7	2.010	+
B4	1.821	+	D8	2.021	+
B5	0.078	-	E1	1.764	+
B6	0.096	-	E2	1.657	+
B7	1.964	+	E3	0.101	-
B8	2.001	+	E4	1.030	+
C1	0.164	-	E5	1.531	+
C2	0.173	-	E6	1.623	+
C3	1.636	+	E7	1.778	+
C4	1.705	+	E8	1.696	+
阴性样	0.193	-	阴性样	0.183	-

注: 样品号与 NCM-ELISA 膜上样品相对应。

3 讨论

试验结果表明, NCM-ELISA 检测 PVY 具有较高的灵敏度和专化性, 同 DAS-ELISA 检测结果吻合率 100%。目前, 脱毒种薯在生产上得到广泛应用, 田间种薯质量控制和病害监测对种薯生产起到重要作用, 而以往多数采用 DAS-ELISA 技术进行

病毒病检测。DAS-ELISA 技术操作比较方便, 但目前很多单位和种薯生产者不具备相应的检测条件。而 NCM-ELISA 技术可将田间采集的样品进行简单处理后, 点在硝酸纤维素膜上, 然后将膜送到有检测能力的质检部门进行检测, 膜还可进行长期保存。因此, 在生产中可进行广泛应用。

[参 考 文 献]

- [1] Sigvald R. The relative efficiency of some aphid species as vectors of potato virus Y [J]. *Potato Research*, 1984, 27: 285-290.
- [2] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所. 中国马铃薯栽培学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [3] Hull R. Rapid diagnosis of plant virus infections by spot hybridisations [M]. *Trends in Biotechnology*, 1984.
- [4] Jones R A C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars [J]. *Annals of Applied Biology*, 1990, 117: 93-105.
- [5] Walsh K, North J, Barker I, et al. Detection of different strains of potato virus Y and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, 2: 167-173.
- [6] 张鹤龄, 孟清, 陈利民. 马铃薯卷叶病毒的免疫电镜 (IBEM) 快速诊断 [J]. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 1990, 21: 284-289.
- [7] Lommel S A, McCain A H, Morris T J. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses [J]. *Phytopathology*, 1982, 72:1018-1022.
- [8] Vetten H J, Ehlers U, Paul H L. Detection of potato viruses Y and A in tubers by enzyme linked immunosorbent assay after natural and artificial break of dormancy [J]. *Phytopathology*. 1983, 108: 41-53.
- [9] 吕典秋, 李学湛, 白艳菊, 等. 马铃薯 X 病毒 (PVX) 和烟草花叶病毒 (TMV) 的提纯及抗血清制备 [J]. *中国马铃薯*, 2000, 14 (4): 212-214.

Detection of Potato Virus Y by NCM-ELISA Method

Lu Dianqiu^{1,2}, Li Xuezhao¹, Lu Wenhao², Yu Decai¹, Li Hui³

(1. Viruses-free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

2. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

3. Crop Quality Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Serological technique as important method for virus diagnose has been applied extensively in the field of disease detection. In this research, potato virus Y (PVY) was purified and the rabbit was immunized with

稀土旱地宝在马铃薯上的应用效果

王效瑜¹, 康有福², 张秋燕¹

(1.宁夏固原市农业科学研究所, 宁夏 固原 756000; 2.固原市原州区
黑城农业技术服务部 宁夏 固原 75600)

摘要: 马铃薯专用型稀土旱地宝在宁夏南部干旱区对马铃薯刀切种薯浸种试验结果表明, 试验设计的 3 种不同浓度稀释液浸种 20~30 min 可使马铃薯比对照提早出苗 3~5 d, 提前成熟 3~10 d, 株高增加 3.5~12.0 cm, 产量增加 3.4%~19.9%, 并能有效预防早疫病、晚疫病、环腐病等细菌性病害。在 3 种不同浓度稀释液中, 以 25 倍和 50 倍稀释液浸种防病抗旱增产效果显著。

关键词: 稀土旱地宝; 马铃薯; 浸种; 效果

宁南山区是宁夏马铃薯的主要产区, 2006 年种植面积达 14 万 hm²。但干旱和病害依然是影响马铃薯生产健康发展的主要制约因素。马铃薯专用型稀土旱地宝是一种新型复合微肥^[1], 含有稀土植物生长调节剂、ABT 生根粉、增产灵等微量元素, 对马铃薯发芽生根具有催生作用, 促进植株健壮生长, 增强抗旱能力, 同时还含有效能极高的内吸式农药, 对晚疫病、早疫病、环腐病等通过刀切种薯传播的病害具有很好的灭杀作用。为了检验稀土旱地宝在马铃薯上应用的实际效果, 我们进行了本试验。

收稿日期: 2006-05-16

作者简介: 王效瑜(1965-), 男, 高级农艺师, 主要从事马铃薯育种工作。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验设在宁夏固原市农业科学研究所头营科研基地, 土壤为浅黑垆土, pH=7.6~8.6, 有机质含量 2.69%, 水解氮 96.6 mg·L⁻¹, 有效磷含量 34.9 mg·L⁻¹, 有效钾含量 187 mg·L⁻¹。

1.2 供试材料

马铃薯专用稀土旱地宝是由宁夏中天技术创新工程有限公司提供; 马铃薯品种为青薯 3 号。

1.3 试验设计及方法

稀土旱地宝用量设 25 倍、50 倍、75 倍稀释液 3 个处理, 浸泡刀切种薯 20~30 min 后播种, 以不浸种为对照。小区面积 20 m², 随机排列, 重复 3

the purified virus of PVY for antiserum preparation. IgG of PVY was prepared as the first antibody of NCM-ELISA and the commercial antiserum of goat-anti-rabbit was used as the second antibody. The reactions of ELISA were performed on NCM and the formal reaction system was established. The results showed that NCM-ELISA had the same merits of high specificity and sensitivity as DAS-ELISA. The highest detectable dilutions of extract of infected potato leaves was 1:250. NCM-ELISA had 100% consistency with DAS-ELISA based on comparison of test results from 40 potato samples collected from field. The samples can be added onto the NCM and the membrane can be stored for a few weeks or sent to other labs where the test can be done, so NCM-ELISA has the advantages of easy operation, convenience and low detection cost.

Key Words: NCM-ELISA; potato virus Y; detection