

马铃薯病毒检测中 DAS-ELISA 的改进及注意问题

李广存¹, 王秀丽¹, 杨元军², 李成彤³, 毕玉平¹, Luis F. Salazar⁴, 王毅⁴

(1. 山东省农科院高新技术研究中心, 济南 250100; 2. 山东省农科院, 济南 250100;

3. 天津农科院蔬菜所, 天津 300384; 4. 国际马铃薯中心, CIP)

摘要: 分别采用改进的 DAS-ELISA 和常规 DAS-ELISA 法同时对主要马铃薯病毒 (PVX、PVY、PVS、PVM 和 PLRV) 进行检测, 其检测结果完全一致, 且其灵敏度也基本相同。局部改进的 DAS-ELISA 方法简便、快速, 成本更低, 适合于种薯生产中大量样品的马铃薯病毒的快速检测。

关键词: 马铃薯; 病毒; DAS-ELISA

中图分类号: S532

文献标识码: B

文章编号: 1001-0092 (2001) 05-0305-02

1 前言

进行病毒诊断的方式有多种^[1]: 根据被侵染植株的表现症状进行诊断; 指示植物法; 电子显微镜观察; 核酸斑点杂交; PCR 或 RT-PCR 法以及血清学检测法等。其中血清学检测是目前最常用的快速有效的病毒检测方法^[2,3], 双抗体夹心酶联免疫吸附测定法 (DAS-ELISA) 在马铃薯病毒检测中有其独到的应用^[4~6]。本实验将常规 DAS-ELISA 法的包被和加样两步合为一步, 从而减少工作量、节省时间、降低成本, 同时对各步操作进行优化, 以避免假阳性反应, 获得准确可靠的结果。

2 材料与方法

2.1 材料

马铃薯试管苗, 接有病毒的普通烟草由本室保存。标准毒源 (阳性对照), 健康对照, 马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 Y 病毒 (PVY)、马铃薯 S 病毒 (PVS)、马铃薯 M 病毒 (PVM) 和马铃薯卷叶病毒 (PLRV)。抗血清及其相应的酶标抗体均由国际马铃薯中心 (International Potato Center, CIP) 提供, 生化试剂均为 Sigmata 公司产品。

2.2 方法

2.2.1 DAS-ELISA 法

第一步: 制样和包被

①制样: 用无毒塑料袋分别从试管苗和普通烟草上 (接有病毒) 取直径约 1 cm 的叶圆片 2 片, 加入 1 ml 包被液 (其中加有特异抗血清) 研磨, 样品与包被液的比例为 1/8 (w/v), 同时取健康样品和标准毒源, 按同样比例加入包被液研磨作为阴性对照和阳性对照。

②点样: 用微量进样器吸取样品, 每孔加 150 μ l (包括阴性和阳性对照), 加样完毕后用粘性胶带密封微量滴定板, 置于 37 $^{\circ}$ C 温箱内孵育 3 h。

第二步: 加酶标抗体液

用已备好的 PBS-Tween 20 洗涤缓冲液洗涤酶标板, 直至将植物汁液完全洗去, 用 PBS-Tween 20+2% PVP-40 酶标缓冲液分别稀释相应的 5 种酶标抗体, 对应向每孔加 130 μ l 酶标抗体液, 再次用粘性胶带密封微量滴定板, 置于 37 $^{\circ}$ C 温箱内孵育 3 h。

第三步: 显色 (加底物溶液)

如上所述用 PBS-Tween²⁰ 洗涤液洗涤酶标板 3 次, 每次 3 min。配制底物溶液并向每孔加 100 μ l 底物液, 室温放置, 观察反应, 并用酶标仪读数进行结果判定。

2.2.2 常规 DAS-ELISA 法

参照 Mclaughlin 的方法^[7]进行。

收稿日期: 2001-08-06

中国知网 <http://www.cnki.net> 李广存 (1972-), 男, 助理研究员, 从事分子生物学和免疫学研究。

3 结果与分析

3.1 检测结果

采用常规的 DAS-ELISA 和局部改进的 DAS-ELISA 法对试管苗和接有病毒的普通烟草进行病毒检测, 其检测结果一致, 即阳性率一致。利用酶标仪对检测结果进行读数判定, 其结果与目测结果一致, 两种方法灵敏度一致。供试试管苗中 5 种病毒检测结果均呈阴性, 而接有病毒的烟草, 其颜色的深浅程度有所不同, 若要对其量化分析, 尚需进一步研究。其中 PLRV 为带毒的马铃薯植株, 来源于 CIP。说明试管苗的脱毒效果非常好, 完全达到脱毒要求 (参照山东省脱毒马铃薯种薯生产标准)。

3.2 简化程序, 降低成本, 更易于操作

改进的 DAS-ELISA 将常规 DAS-ELISA 中包被和制样两步合成一步, 大大缩短了时间, 由原来所需的 3~5 h 包被和加上样品后过夜孵育约 14 h 缩短为 3 h, 使本来进行一次 DAS-ELISA 一天半的工作在一天内便可轻松完成。因病毒粒子与抗体能特异结合, 当包被和制样两步合成一步混合加样时, 抗体可吸附微量滴定板上, 同时暴露在外面的与抗体特异结合的病毒粒子则可再与酶标抗体特异结合, 达到与常规 DAS-ELISA 同样的目的。在进行 DAS-ELISA 过程中, 将原来各步加样量一样改为逐级递减, 特别是在第二步加酶标抗体时, 低于第一步的上样量, 避免了酶标抗体与未包被区域的接触, 减少了非特异性吸附, 避免了假阳性的产生。改进的 DAS-ELISA 中, 无需配制提取缓冲液, 而以包被缓冲液代之, 对样品提取病毒, 这样可使检测成本降低 5%~10%。

4 DAS-ELISA 检测中应注意的问题

DAS-ELISA 是看似简单而实际操作起来并不十分简单的实验技术, 在进行 DAS-ELISA 的具体实验过程中, 往往会出现失误, 根据 CIP 的经验和近两年来试剂盒使用单位的反馈意见, 现将进行 DAS-ELISA 应注意的问题总结如下:

4.1 pH 值

pH 值是影响检测结果的重要因素。由于各地的条件不同, 所使用的蒸馏水或去离子水的酸碱度也会有所差异, 因此配制出溶液的酸碱度也不尽相同, 有时会相差很大, 特别是在配制包被缓冲液和

底物缓冲液时, 最好用高纯度蒸馏水, 并用酸度计调 pH 值, 包被缓冲液的 pH 值以 9.6 为宜, 底物缓冲液的 pH 值以 9.8 为宜, 这两种缓冲液的偏酸或偏碱将直接影响包被和显色。

4.2 加样量逐级递减

加样量逐级递减可以有效避免一些人为操作造成的假阳性。包被时加样量最多, 以使每个孔充分的较大范围的包被, 加酶标抗体应低下包被时加样量至少 20 μ l, 这样酶标抗体的液面就可低于包被液液面约 0.1 mm, 只要酶标板倾斜度不超过 20 度时, 酶标抗体的液面就不会高于包被液液面, 若加量与包被时加样量一样多, 因酶标抗体与抗体一样可以与酶标板吸附, 将极有可能因人为操作而使酶标抗体吸附到未被包被区域, 造成假阳性。滴加底物液同样遵循上述递减原则, 使底物仅与酶标抗体-病毒粒子复合体上标记酶发生酶促反应。逐级递减可以最大限度降低人为操作带来的假阳性。

4.3 洗板

洗板是否彻底与检测结果中背景颜色的有无和深浅密切相关。在进行 DAS-ELISA 过程中, 涉及到多次洗涤酶标板, 以洗去未结合的抗体、病毒、酶标抗体, 以便得到准确可靠的 ELISA 结果。首先, 在洗板时要避免串样, 串样可导致假阳性产生。其次, 在洗涤时, 每一步第一次洗板应迅速倾去洗液, 特别是在洗涤样品时, 第一次洗板迅速倾去洗液, 有利于将样品颜色洗去, 若样品颜色不能有效洗去, 将会对结果观察带来影响, 特别是用酶标仪读数判定结果影响更大。第三, 洗板所加洗液应大于最大加样量, 一般用 180 μ l, 以使洗涤充分。

参 考 文 献

- [1] Potato viruses and their control. Luis. F. Salazar. 1996.
- [2] Gugerli, P. The detection of two Potato Viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathol. Z.* 1978, 92: 51-56.
- [3] S. Priou, L. Gutaarra and P. Aley. Highly Sensitive detection of *Ralstonia Solanacearum* in latently infected potato tubers by post-enrichment enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membrane. *Bulletin OEPP/EPPo Bulletin*, 1999, 29: 117-125.
- [4] Singh, U., Trevors, C. M., De Boer, S. H. and Janse, J. D. Fimbral-specific monoclonal antibody-based ELISA for European Potato Strains of *Erwinia Chrysanthemi* and comparison to PCR. *Plant Dia.* 2000, 84: 443-448.

基质配方对试管苗生长影响的试验

吴德寿¹，孙福临²，孟庆文²，归 原²

(1. 青岛恒生源生态农业有限公司 266200; 2. 青岛即墨市科委)

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1001-0092 (2001) 05-0307-01

青岛恒生源生态农业有限公司生物工程中心，1999 年新上脱毒马铃薯原原种生产。为了探索基质配方对脱毒试管苗生长的影响，生物工程中心对基质中大量元素和白糖的不同含量与常规培养基配方进行了比较试验。

1 材料与方法

鲁引 1 号脱毒马铃薯试管苗。

配方试验对大量元素含量和白糖含量分别做了 6 组处理。常规配方做对照 (CK)。重复 10 次。pH 值用 pH 试纸于灭菌前测试。表中基质成分含量以每升溶液中的含量计算。

表 1 基质配方

编 号	大量元素 (ml)	微量元素 (ml)	铁盐 (ml)	白糖 (g)	琼脂 (g)	pH
1	150	10	10	10.0	7	5.8~6.0
2	150	10	10	7.0	7	5.8~6.0
3	150	10	10	5.0	7	5.8~6.0
4	100	10	10	10.0	7	5.8~6.0
5	100	10	10	7.5	7	5.8~6.0
6	100	10	10	5.0	7	5.8~6.0
CK	100	10	10	20.0	7	6.0

培养温度: 24~25 ℃; 光照: 16 h/d; 培养时间: 30 d; 光照强度: 2000~3000 lx。

2 结果与分析

调查内容: ①根系状况、扎根率; ②叶片颜色; ③平均茎节数。

表 2 试验苗生长情况

编 号	根系	扎根率 (%)	平均茎节数	叶片颜色
1	细长	91	5.2	深绿
2	细长	91	5.2	深绿
3	特细、稀	75	3.5	黄绿
4	细长	98	5.9	深绿
5	细长	85	4.3	浅绿
6	细而稀	84	3.9	黄绿
CK	粗、短	95	4.9	深绿

通过试验发现，在常规生产扩繁配方中，基质其它成分含量不变，将白糖的含量减少 50%，即由原来每升溶液中加 20 g 减少至 10 g，会使扎根率比对照增加 3%，平均茎节数比对照增加 1 个。基质 4 配方是脱毒马铃薯试管苗扩繁的最佳配方。

3 结 论

基质 4 配方组合，能降低生产成本，提高脱毒马铃薯扩繁苗的质量和产量。

收稿日期: 2001-06-30
作者简介: 吴德寿 (1956-), 男, 高级工程师, 青岛恒生源集团董事长兼总经理。

[5] Fribourg, C. E. and J. Nakashima. An improved latex agglutination test for routine detection of potato virus. Potato Res. 1984, 27; 237-249.

[6] J. A. C. de Souza-Dias, P. Russo. et al. Simplified Extrac-

中国知网 <https://www.cnki.net> tion assay for ELISA and PCR detection of potato leafroll lu-

teovirus Primary infected in Dormant Potato Tubers. Amer J of

Potato Rea. 1999, 76; 209-213.

[7] Mclaughlin, R. J., and Chen, T. A. ELISA methods for

plant pathogenic prokaryotes. Pages 1990, 197-204 in: Sero-

logical Methods for Detecton and Identification of Viral and Bacte-

rial Plant Pathogens-A Laboratory Manual. R. Hampton, E.

Ball. and S. De Beer, eds. APS Press, St. Paul. M. N.