

马铃薯病毒和类病毒检测技术

刘卫平

(黑龙江省农业科学院马铃薯研究所, 克山 161606)

摘要: 马铃薯病毒和类病毒严重影响马铃薯的产量和质量, 防治的主要措施是应用无病毒种薯。确认种薯是否带毒, 世界和国内主要采用 ELISA 法和双向复聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行检测。为提高检测速度和准确性, 我们在加拿大传统的检测技术基础上进行改进, 建立了快速、灵敏、高特异性的检测方法。

关键词: 病毒; 类病毒; 快速检测

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2000) 04-0208-02

1 前言

早在 20 年代, 马铃薯病毒就作为马铃薯生产的重要问题开始研究。1975 年, 现代马铃薯病毒的分离和鉴定技术有了新开端。几十年来, 马铃薯病毒鉴定从幼芽鉴定法、生物学鉴定法、病毒生物特性测定鉴定法、化学药剂鉴定法、血清学鉴定法, 发展到 ELISA 法和 R-PAGE。为降低实验成本, 节约时间, 提高工效, 1991 年以来, 我们对马铃薯 P-PAGE 法和 ELISA 法进行了改进, 并应用于研究和生产。实践证明: 改进的检测法优于常规法。

2 材料与方

2.1 材料

马铃薯块茎、马铃薯试管苗。

2.2 方法

2.2.1 常规 R-PAGE 法与改进 R-PAGE 法对比实验

2.2.1.1 类病毒核酸提取方法对比实验

常规 P-PAGE 法中植物组织用量核酸提取液用量均大。改进 R-PAGE 法中, 将两者用量减半, 列于表 1。

从表 1 中可以看出, 随着组织用量减少, 提取液和酚液用量减少 (提取液中含有 5 种贵重试剂)。

表 1 类病毒核酸提取方法对比

方 法	组织用量 (g)	提取缓冲液用量 (ml)	饱和酚用量 (ml)
常规法	1	3	4
改进法	0.5	1.5	2

2.2.1.2 电泳缓冲液浓度大小对比

为了节约实验费用, 我们将电泳液的浓度减半, 见表 2。

表 2 两种方法电泳缓冲液浓度对比

方 法	电泳缓冲液 浓 度	三羟甲基氨基 甲烷 (g)	硼酸 (g)	乙二醇四 乙酸 (g)
常规方法	1XTBE	10.78	5.5	0.93
改进方法	1/2XTBE	5.39	2.75	0.465

从表 2 可知: 随着电泳缓冲液浓度减少, 三羟甲基氨基甲烷、硼酸、乙二醇四乙酸用量也减少 (电泳缓冲液中含三种贵重试剂)。

2.2.1.3 电泳板规格大小对比

为了提高检测马铃薯纺锤块茎类病毒的速度, 我们改变了电泳板的规格, 如表 3。

收稿日期: 1999-12-23

表3 两种方法电泳板大小对比

方法	电泳板规格 (mm)	电泳液 (ml)	电泳时间 (h)
常规方法	160×80	4000	4
改进方法	110×80	3000	3

从表3中可以看出：电泳板缩短，电泳液用量减少，电泳时间缩短。

2.2.1.4 电泳变性温度对比

用R-PAGE法检测类病毒，须使类病毒核酸变性才能测PSTV的有无。在电泳液中加入有机氮化物能使PSTV的变性温度降低，如表4。

表4 两种方法变性温度对比

方法	变性物质	变性温度(℃)
常规法		71
改进法	有机氮化肥	60

从表4中可以看出：由于变性物质的加入，类病毒核酸可在低温变性。

2.2.2 常规ELISA法与改进ELISA法对比实验

常规ELISA法各种反应是在静止状态下进行。改进法中各种反应是在振摇状态下进行。我们将聚苯乙烯反应板置于摇床上，然后放在37℃恒温箱中，见表5。

表5 两种方法不同点比较

方法	聚苯乙烯反应放置状态	抗体抗原酶标孵育时间 (h)
常规法	静止	4
改进法	振摇	0.5

从表5中看出，由于反应状态的变化，反应时间随之变化。

3 结果与分析

3.1 常规R-PAGE法和改进R-PAGE法结果分析

我们用常规法、改进法各检测了3688个马铃薯块茎后认为：改进法结果准确，灵敏度高于常规法。从表1、表2、表3、表4中可以看出，方法

改进后，药品用量减少，反应时间缩短，操作简便，共可节约10种贵重药剂，两种方法药剂用量列于表6。

表6 两种方法药品用量比较

药品名称	常规方法 药品量(g)	改进方法 药品量(g)	节约药品量
氢氧化铵	0.0056	0.0028	0.0028
乙二醇四乙酸	0.0116	0.0058	0.0058
氯化锂	0.0725	0.0360	0.0036
三羟甲基氨基甲烷	10.7286	5.3724	5.3416
硼酸	5.5248	2.7665	2.7583
乙二醇四乙酸二钠	0.9342	0.4728	0.4614
丙烯酰胺	2.25	1.5	0.75
双丙烯酰胺	0.0562	0.0375	0.0188
过硫酸铵	0.03	0.01	0.01
TEMED	30 μ l	20 μ l	10 μ l

改进后，药品利用率提高，反应时间缩短，节约药品费、水费、电费，减少了劳动强度，加快了检测速度。

3.2 常规ELISA法和改进ELISA法结果分析

我们用常规法和改进法各检测217管试管苗，结果表明：两种方法阳性率和灵敏度一致。但后者反应时间缩短10.5h。

改进法中实验是在振摇状态下进行的，抗原、抗体、酶标和固相受体分子之间碰撞机率增大，各反应过程在短时间内迅速达最佳饱和状态。常规法中实验是在静止状态下进行的，包被时间长，易使包被物失活，且产生边缘效应。

4 小结

改进的R-PAGE和ELISA法，即可节约药品费、水费、电费、人工费，又能提高工效，便于操作，检测速度随之加快。该法可在各研究所、生产单位推广应用。

参 考 文 献

- [1] 崔荣昌等. 应用酶联免疫吸附试验法鉴定几种主要马铃薯病毒. 植物学报, 1989, 2