

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 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