

应用 DAS-ELISA 法同时检测多种马铃薯病毒

白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 何云霞, 张儒喜, 朱 财

(黑龙江省农科院生物中心 哈尔滨 150086)

摘 要: 报道了使用多价血清同时检测多种马铃薯病毒的快速 DAS-ELISA 法。实验分别用快速 DAS-ELISA 法和常规 DAS-ELISA 法检测 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV⁵ 种主要马铃薯病毒进行比较, 二者阳性率和灵敏度基本相同, 但快速法比常规法操作简便、节省时间、节省材料, 且快速法重复性好, 结果可靠, 表明快速 DAS-ELISA 法是一种直观、实用、快速、准确可靠的检测方法, 适合种薯生产中大量样品的多种主要马铃薯病毒的快速检测。

关键词: DAS-ELISA; 马铃薯病毒

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2000) 03-0143-02

1 前 言

在马铃薯生产中, 病毒检测是保证各级种薯质量的关键, 一般而言, 用种单位不只是针对某一病毒进行检测, 而更多是针对几种主要病毒同时进行检测, 从大量的样品中选出生产上可利用的种苗或种薯。双抗体夹心板酶联免疫吸附试验 (DAS-ELISA) 法^[1]是鉴定马铃薯病毒的常规方法^[2]。本试验对常规 DAS-ELISA 法作了两方面的改进: 第一, 在包被抗体和酶标记两步, 由原来的在一块板上一种酶标记一种抗体改为同块板上几种酶对应标记几种抗体 (文中以 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV⁵ 种病毒为例), 从而成倍地节省工作量、材料和时间; 第二, 使 DAS-ELISA 各种反应均在恒温摇床中进行^[3], 加快反应速度, 更大幅度地节省时间, 使之适合大量样品快速检测, 快速 DAS-ELISA 法的建立, 可以为马铃薯生产提供更多健康材料, 对提高种薯质量有重要意义。

2 材料与方 法

2.1 试验材料

2.2.1 马铃薯试管苗和块茎的选择

马铃薯试管苗由本研究室提供, 选用没脱毒的 11 个品种 8 管试管苗, 块茎采自田间收获的早大白、东农 303 和市场购买的马铃薯块茎, 共 88 粒。

2.2.2 包被抗体和酶标抗体最适稀释度的选择

供试抗体和酶标为国际马铃薯中心 (CIP) 产品, 酶结合物为碱性磷酸酶 (AP) 标记的 PVX、PVY、PVS、PVM 和 PLRV⁵ 种病毒抗体。

用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液倍比系列稀释各病毒抗体, 稀释倍数为 1:100~1:800, 用 PBS-Tween²⁰-2%PVP 缓冲液倍比系列稀释各病毒酶标抗体, 稀释倍数为 1:100~1:800, 感病植株和健康植株在提取缓冲液中稀释 10 倍, 按常规 DAS-ELISA 法操作程序进行方阵滴定, 选择最适稀释度, 结果得出包被抗体的最适稀度为 1:300, 酶标抗体最适稀度为 1:400, 这种组合下检测效果最好。

2.2 试验方法

2.2.1 快速 DAS-ELISA 法操作步骤

向 pH 9.6 碳酸盐缓冲液中加入 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV⁵ 种马铃薯病毒抗体各 0.05 ml, 轻轻混匀后包被一块聚乙烯微量滴定板, 每孔 200 μ l, 用粘性胶带密封滴定板恒温振摇状态下 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 用 PBS-Tween 20 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次 3 min。

用 PBS-Tween²⁰-2%PVP 提取缓冲液中溶解 2%白蛋白, 稀释抗原, 取样品液每孔 180 μ l 加入微量滴定板, 密封后 37 $^{\circ}$ C 恒温振摇孵育 30 min, 如前所述洗板, 直至完全洗去样品孔中植物汁液。

向 PBS-Tween²⁰-2%PVP 酶标缓冲液中溶解

2%白蛋白, 稀释 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV 5 种病毒酶标抗体各 0.05 ml, 轻轻混匀, 每孔 160 μ l 加入滴定板, 密封后恒温振摇, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 如前述洗板。

将底物溶液每孔 160 μ l 加入滴定板, 室温放置, 观察反应。

2.2.2 常规 DAS-ELISA 法操作步骤

用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液分另稀释 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV 5 种病毒抗体, 然后每种病毒抗体每孔 200 μ l 包被一块微量滴定板, 将 5 块滴定板 4 $^{\circ}$ C 过液或 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 用 PBS-Tween 20 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次 3 min。

用 PBS-Tween 20-2%PVP 溶液稀释抗原 (植物汁液), 将每份抗原分别滴加 5 块滴定板, 每孔 200 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过液或 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 如前所述洗板。

用 PBS-Tween 20-2%PVP 酶标缓冲液分别稀释 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV 5 种病毒酶标抗体, 每孔 200 μ l 对应加入 5 块滴定板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 如前所述洗板。

5 块滴定板分别滴加底物溶液, 每孔 200 μ l, 室温放置, 观察反应。

以上各反应均在静置状态下进行。

2.3 结果判定

在加入底物溶液 30~60 min 之间, 根据聚乙烯微量滴定板中样品孔颜色变化判定带毒情况, 显黄色判为阳性, 微黄色或不显色判为阴性, 限该样品未感染待检病毒, 为合格样品。

3 结果与分析

3.1 快速 DAS-ELISA 法与常规 DAS-ELISA 法结果比较

用两种方法对马铃薯试管苗和块茎进行病毒鉴定, 其中常规 DAS-ELISA 法各病毒检测结果汇总, 所有检测项目都为阴性的样品为合格样品, 一个以上检测项目为阳性样品则属淘汰样品, 汇总结果与快速 DAS-ELISA 法检测结果一致, 即阳性率一致。

在检测同一样品时, 快速法一块板可以检测多个项目, 而常规法一块板只能检测一个项目, 常规法在包被、加样、加酶标、加底物以及洗涤等步骤均是快速法工作量的 5 倍, 因此在操作时间和耗材等方面, 快速法比常规法优越得多。

在快速法中, 向提取缓冲液和酶标缓冲液中加入 2% 白蛋白, 可以封闭这两步反应中未结合位点, 减少非特异性吸附, 同时, 快速法在包被、加样和加酶标时, 样品孔内各物质量由 200 μ l 至 180 μ l 至 160 μ l 递减, 也是减少非特异性吸附的干扰, 避免假阳性的产生。而常规法因没有封闭步骤和各步进样量都是 200 μ l, 则易产生非特异性反应, 灵敏度相应略低于快速法。

快速 DAS-ELISA 法整个反应都是在恒温振摇状态下进行, 这可以提高抗体与固相载体, 抗原与抗体和抗原与酶标等分子之间的碰撞机率, 加快反应速度, 比静止状态下进行各反应的常规法大大缩短检测时间。

3.2 快速 DAS-ELISA 法重复试验

从上述对比试验中随机抽取 44 份试管苗样品和 44 份块茎样品, 按快速 DAS-ELISA 法操作步骤进行检测, 重复 3 次。结果完全一致, 从而得出本法稳定可靠的结论。

4 讨论

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测病毒是根据病毒颗粒能够与它们的特异性抗体在离体情况下相互反应, 并用酶检测并放大这个反应^[4,5], 因此试验中抗体浓度、进样量、反应条件以及操作中人为误差等因素都会最终影响检测结果。本试验对常规 DAS-ELISA 法进行一系列改进, 不仅在节省工作量、时间和材料方面有很大作用, 而且使特异性得到提高, 结果更可靠。

采用快速 DAS-ELISA 法进行马铃薯病毒检测可以在一天内完成, 它适合种薯生产中快速针对大量马铃薯样品中多种病毒进行定性鉴定, 对促进脱毒马铃薯生产有积极作用。

参 考 文 献

- [1] 蒋成淦. 酶免疫测定法. 北京: 人民出版社, 1984
- [2] 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. 植物保护学报, 1989, 2
- [3] 刘卫平. 快速 ELISA 法鉴定马铃薯病毒. 马铃薯杂志, 1997, 11 (1): 11~12
- [4] Voller A et al. A microplate method of enzyme linked immunosorbent assay and its application to malaria. Bull WHO. 1974, 51: 209~211
- [5] Voller A et al. Enzyme immunoassay with special reference to ELISA technique. J. Clin. Pathol, 1978, 31: 507~520